

재조합 효모를 이용한 포도당 산화 효소의 생산

전 병 원 · *김 대 혁 · **정 봉 우 · **이 현 철 · †양 문 식
전북대학교 생물과학부 · *유전공학연구소 · **화학공학부

Production of Glucose Oxidase Using Recombinant Yeast

Byung-Won Chun, Dae-Hyuk Kim*, Bong-Woo Chung**, Hyun-Chul Lee**, and Moon-Sik Yang†

Department of Biological Science, *Institute for Molecular Biology and Genetics,
**Department of Chemical Engineering and Technology,
Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea

ABSTRACT

Heterologous expression of glucose oxidase gene using recombinant yeast has been carried out. Polymerase chain reaction was conducted to obtain the gene encoding glucose oxidase from *Aspergillus niger* and sequence comparison indicated the cloned 1.9kb DNA fragment appeared to be the glucose oxidase structural gene containing a signal sequence for extracellular location. Transforming shuttle vector was constructed with YEp352 to express the cloned glucose oxidase gene under the control of either GAL1 or GAL10 promoter. Plate assay of recombinant yeasts has shown that GAL1 promoter was more effective in yielding glucose oxidase than GAL10 promoter. Among the five different concentrations of galactose tried, 1% galactose showed the highest induction of glucose oxidase. Cellular localization experiment of recombinant enzyme using spheroplast revealed that most of enzymes(80%) were secreted into culture media in contrast to *A. niger*. There is no difference in heat-stability of recombinant enzyme up to 50°C compared to the glucose oxidase from *A. niger*. However, a dramatic reduction of enzyme activity was observed in both enzymes at 60°C.

서 론

포도당산화효소(β -D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4)는 산소 존재 하에서 포도당을 glucono- δ -lactone 으로 산화시키고, 과산화수소를 생성하는 효소이다: β -D-glucose + O₂ → glucono- δ -lactone + H₂O₂. 1928년 Muller (1)에 의해서 *Aspergillus niger* 추출물 중에 포도당 산화효소 활성이 보고된 이후 Swoboda and Massey 등(2)이

*Aspergillus niger*로부터 이 효소를 분리, 정제하였다. 본 효소는 분자량 150 kDa인 dimer이며 두개의 FAD cofactor를 함유하는 것으로 알려져 있으나(3) 본 효소의 작용 기작은 정확히 알려져 있지 않다(4). 또한 1990년 Frederick 등(5)에 의해 결정된 포도당 산화효소의 아미노산 서열을 바탕으로 포도당 산화효소 유전자를 *A. niger*의 cDNA library로부터 cloning하였다.

포도당산화효소는 포도당만을 특이적으로 산화시키기 때문에 광범위한 용도로 사용된다. 즉 혈액이

† Corresponding Author

나 뇨와 같은 체액이나 산업 용액으로부터 포도당을 정량하거나 포도당 바이오센서 제조, 식품 중의 포도당이나 산소의 제거, 과산화수소 발생에 의한 식품의 저장과, 글루콘산 및 그 유도체와 glucono- δ -lactone 생산에 이용되고 있다(6). 글루콘산 및 그 유도체는 의약품, 식품 및 사료용 외에도 습윤제, 식물 염색용, 도금용, 세정용 등의 용도로 사용되고 있어 그 용도가 다양화되고 있으며 glucono- δ -lactone은 육가공, 제과, 제빵, 낙농 제품, 두부 등 식품 가공에 널리 쓰이고 있다. 이와 같이 포도당산화효소는 상업적으로 다양한 용도를 가지고 있으나 *Aspergillus niger* 균체로부터 순도 높은 포도당산화효소를 대량 생산하는 데에는 본 효소 중에 존재하는 catalase, cellulase 및 amylase와 같은 불순물 때문에 많은 제약을 받고 있으며(7) 또한 분리 정제공정의 비용 때문에 큰 어려움을 안고 있다(8).

최근 De Baetselier 등(9)에 의해 cloning된 포도당산화효소 유전자에 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 alcohol dehydrogenase II glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase의 hybrid promoter를 조절자로 하고 재조합 단백질의 배지내로의 분비를 위해 포도당산화효소 분비신호와 효모 접합인자 1의(MT 1) 유전자 분비신호 등을 이용하여 효모에 형질전환시킨 후 배지로 포도당산화효소를 분비시킴으로써 비교적 높은 수준의 활성효소를 얻었으나(9) 사용된 hybrid promoter의 최적발현을 위해 재조합 효모의 액체배양 시작 후 포도당산화효소의 최대발현까지 약 150~200시간의 배양 시간차(hybrid promoter의 derepression을 위해 효모에 의한 배지내의 ethanol 생성에 필요한 시간)등이 나타났다.

따라서 본 연구는 hirudin의 heterologous expression(10)에 좋은 결과를 보인 *S. cerevisiae* strain 2805에서 galactose에 의해 그 유도 반응이 빠르며, 유전자 조절기작 등 이미 많은 연구가 이루어진 유전자 GAL1과 GAL10의 promoter와 *A. niger*의 포도당산화효소 유전자 분비신호를 이용한 유전자조작을 통해 재조합 효모에서 포도당산화효소의 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

포도당산화효소 유전자발현을 위한 숙주 세포로 *S. cerevisiae* 2805(Mat a, pep4:HIS3, prb1- δ ,

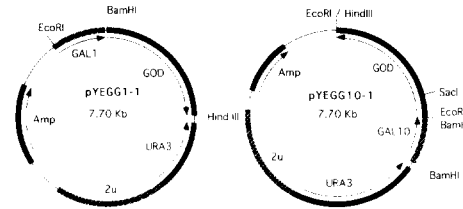


Fig. 1. Structure of YEp352-based transforming vectors for the production of glucose oxidase in yeast. Only key restriction enzyme sites are shown. Amp, GAL1, GAL10, GOD, URA3 and 2 μ represent ampicillin resistance gene, GAL1 promoter, GAL10 promoter, glucose oxidase, URA3 gene and 2 μ m circle sequence for yeast replicating origin, respectively.

can1, GAL2, his3 δ , ura3-52)를 사용하였다. 유전자 재조합을 위한 plasmid로는 pUC18 일부 부위와 선별표지를 위한 효모의 URA3 유전자 및 2 μ m 유전자를 갖는 shuttle vector인 YEp352(10)를 기본구조로 사용하였다. 형질전환을 위한 재조합운반체 제조는 *A. niger*로부터 polymerase chain reaction (PCR)에 의해 얻어진 포도당산화효소 유전자 단편의 5', 3' primer에 각각 존재하는 제한효소 BamHI과 XbaI자리를 이용 pUC19의 BamHI과 XbaI자리에 subcloning(pCBGOD) 한 후 pCBGOD로부터 포도당산화효소 유전자를 포함하는 BamHI과 HindIII 절편을 이용 YEp352의 GAL1과 GAL10 promoter뒤에 각각 cloning하여 pYEGG1-1과 pYEGG10-1이라 하였다(Fig. 1).

배지 및 배양방법

효모의 배양배지는 YEPD(1% yeast extract, 2% bactopectone, 1% glucose)와 최소배지에 0.5% casamino acid가 첨가된 yeast nitrogen base without amino acid(YNB; 6.67 g/L)를 기본으로 사용하였으며 포도당산화효소 유전자 발현을 위해 각각의 배지에 적정량의 galactose를 첨가하였다.

기초 실험을 위한 전배양과 플라스크 배양 조건은 Lee 등(10)의 방법을 따랐다.

*Aspergillus niger*로부터 포도당산화효소의 클로닝 및 특성화

이미 알려진 포도당산화효소(5)의 염기서열을 바탕으로 computer program을 이용하여 PCR에 사용될 primer를 설계하여 사용하였다. 본 실험에 사용된 primer쌍의 염기배열은 다음과 같다. 5' primer(5' -GGATCCGCAACCAGC -CTTTCCTCTC -3'), 3' primer(5' -TCTAGACAGCATCTAAGT -ACCATCCCC-3').

PCR에 의해 증폭된 포도당산화효소를 coding하는 유전자 단편은 plasmid vector, pUC19의 BamHI과 XbaI 제한효소 자리에 클로닝하고 클로닝된 유전자를 유전자 염기서열 결정을 통하여 특성화하였다. 유전자 염기서열 결정은 dideoxynucleotide chain termination방법(11)에 의하여 수행하였다. 염기서열 결정효율을 증진시키기 위하여 Henikoff의 방법(12)에 따라서 unidirectional deletion을 유도하였다.

효모에 재조합 유전자의 도입

효모의 형질전환은 Ito등(13)의 방법에 따라 수행하였다. 형질전환체는 uracil 결핍 선별배지(YNB, 0.5% casamino acid, adenine 0.03 g/L, tryptophan 0.03 g/L, 2% glucose, 2% agar)에서 선별하였다.

포도당산화효소의 역가 검정

포도당산화효소의 역가 검정은 Sigma사의 assay manual을 변형시킨 방법에 의하여 측정하였다(5). 즉, 0.1 M sodium acetate 완충액(pH 5.1)에 녹인 0.42mM o-dianisidine 1.2mL, 10% -D-glucose 0.5mL, peroxidase solution(60 purpurogallin units/mL) 0.1 mL, H₂O 1.2mL를 혼합하여 35°C에서 평형화시킨다. 여기에 배양 여과액 0.1mL를 가하여 즉시 혼합한 다음 35°C에서 10분동안 반응시키고 4N H₂SO₄ 0.3mL을 첨가하여 반응을 중단시킨후 500nm에서 흡광도를 측정하고 표준 곡선으로부터 역가를 검정하였다. 표준품으로는 *A. niger* 포도당산화효소(Sigma, type 5)를 사용하였다.

고체배지에서의 포도당산화효소의 발현양 검정은 Hodgkins등(14)의 방법을 변형하여 사용하였다. 본 실험에서는 bottom agar로 1% galactose와 2% agar가 첨가된 YEP(1% yeast extract, 2% bactopectone)를 사용하였고 top agar로는 0.5%

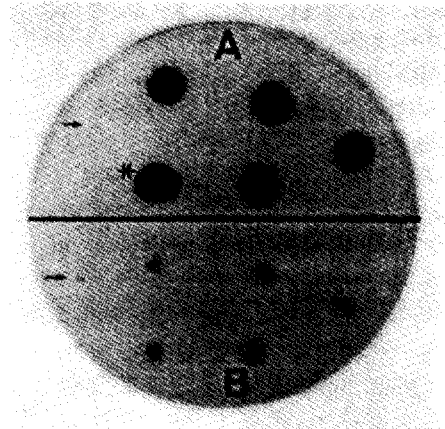


Fig. 2. Plate assay for glucose oxidase(GOD) production. Upper panel(A) represents GAL1-mediated GOD expressing recombinant yeast and lower panel(B) for GAL10-mediated GOD expressing recombinant yeast. Asterik indicates the recombinant yeast (yGOD1-1) showing the highest GOD activity based on the colored enzymatic zone and arrowheads indicate the non-transformed yeast as a control.

glucose, 1% agar, 2% glycerol, 1% o-dianisidine 과 6 IU/mL peroxidase가 첨가된 YEP(1% yeast extract, 2% bactopectone)를 사용하였다.

포도당산화효소의 세포내 localization과 분비효율

포도당산화효소의 재조합 효모에서의 세포내 존재 위치 및 분비효율을 측정키위해 효모의 배양여과액과 재조합효모의 spheroplast를 각각 분리하여 extracellular-, periplasmic-, intracellular-포도당산화효소의 양을 측정비교 하였다. 효모로부터 spheroplast 제조를 위한 방법으로는 Burgers와 Percival(15)의 방법을 따르며 세포질내의 포도당산화효소 측정을 위한 spheroplast의 파괴는 glass bead를 이용한 De Baetselier 등(7)의 방법을 따랐다.

결과 및 고찰

포도당산화효소 유전자의 클로닝

포도당산화효소 분비신호를 포함하는 구조유전자를 PCR을 이용 cloning하였다. Cloning한 유전자

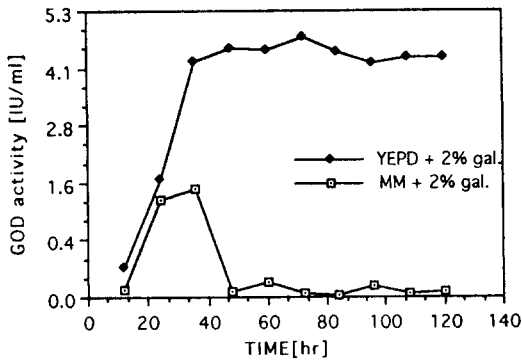


Fig. 3. Effects of different media on glucose oxidase(GOD) production. GOD activity is the average from duplicated experiments with three replications.

의 크기는 1911 bp이었으며 전체 염기서열을 결정하여 특성화한 유전자는 밝혀진 유전자의 염기서열(5)과 차이를 보이지 않아 본 유전자가 포도당산화효소 유전자임을 최종 확인 할 수 있었다.

포도당산화효소를 생산하는 재조합 효모의 선발

재조합 유전자운반체, pYEGG1-1 과 pYEGG10-1를 각각 사용하여 얻은 효모의 형질전환효율은 사용한 μg DNA당 10^3 - 10^4 개의 형질전환체를 획득하였다. 획득한 형질전환체들의 포도당산화효소 형성능을 고체배지를 이용하여 조사한 결과 형질전환체 모두 포도당산화효소 발현의 특징인 갈변을 나타냈으며(Fig. 2) 이중 효소역가가 탁월한 재조합 효모를 선발(yGOD1-1)하여 본 실험에 사용하였다.

포도당산화효소 발현에 대한 배지의 영향

2% galactose가 첨가된 YEP와 최소배지에서의 포도당산화효소 발현을 조사한결과 yeast extract가 포함된 YEP의 경우 배양시작 48시간 후 그 발현이 최고(5.0 IU/mL)에 이르며 배양 5일까지 그 발현이 계속 유지되었으나 최소배지의 경우 배양 36시간 후 최고(1.6 IU/mL)에 이르나 그 후 YEP와는 달리 활성 포도당산화효소가 급격히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이와같은 포도당산화효소 발현양상의 차이를 분석한 결과 배지의 pH변화와 포도당산화효소 발현과 밀접한 관계를 발견하였다. YEP의 경우 포도당산화효소 발현이 시작된 후 배지의 pH가 일시적으로 감소된 후 원래의 pH(~6.0)에 이르

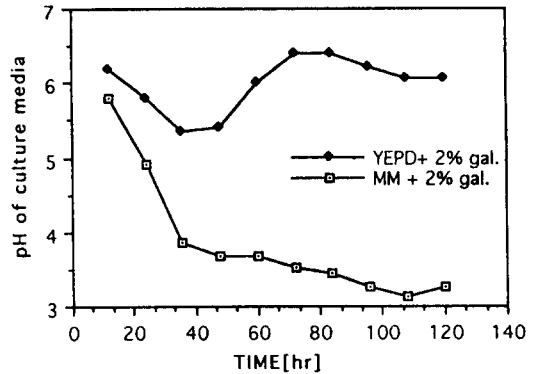


Fig. 4. pH fluctuations in culture media during the growth of recombinant yeasts. Data were obtained from duplicated experiments with three replications.

는 것이 관찰되나 최소배지의 경우 포도당산화효소 발현에 따라 pH가 급격히 감소되어 효소의 역가가 현저히 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 이와같은 pH의 변화는 포도당산화효소에 의해 glucose에서 생성된 glucono- δ -lactone으로부터 비 효소적으로 발생하는 gluconic acid (16)에 의한 것으로 유추되며 YEP의 경우 예상된 cell mass의 증가로 효소 생산량이 최소배지보다 현저히 증가됨을 알 수 있으며 나아가 YEP의 pH변화 억제능력에 의해 효소의 생산과 활성이 일정기간 유지되는 것으로 유추된다.

Galactose농도에 따른 포도당 산화 효소 발현 정도

GAL1 promoter는 glucose에 의해 억제되고 galactose에 의해 유도되는 promoter이다(17). Galactose 농도가 포도당산화효소의 발현에 미치는 영향을 조사하기위해 YEP배지에 다른 농도의 galactose를 각각 첨가하고 포도당산화효소 t생산정도를 측정하였다(Fig. 5). 조사한 모든 galactose농도에서 포도당산화효소의 생산은 배양 48시간 후 최고에 이르며 효소의 유도능력은 1% galactose가 가장 우수한 것으로 확인되었다. 최적 조건(1% galactose를 포함한 YEP)에서의 포도당산화효소 생산은 6 IU/mL로 *A. niger*를 이용한 경우(1.2 IU/mL)보다(8) 최소 6배 이상의 효과를 나타냈다.

포도당산화효소의 세포내 localization과 분비효율

재조합 효모의 배양 추출액과 spheroplast를 이용하여 포도당산화효소의 세포내 localization을 조사

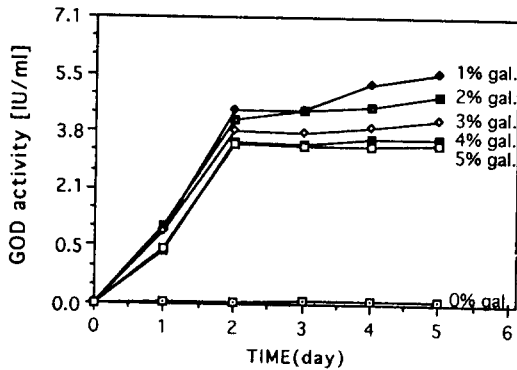


Fig. 5. Effects of galactose concentration on the glucose oxidase(GOD) induction. Duplicated experiments with three replications were conducted.

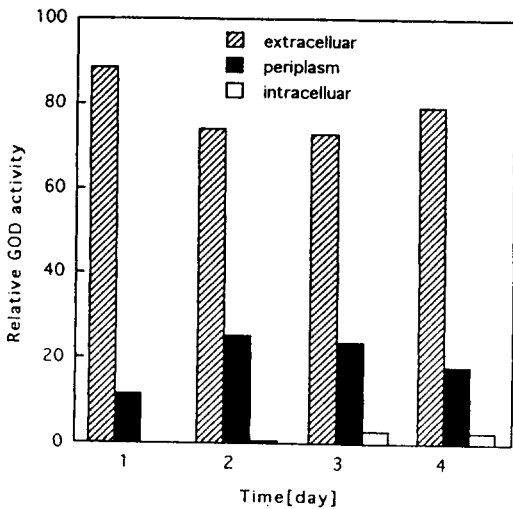


Fig. 6. Cellular localization of glucose oxidase (GOD) in recombinant yeast. Relative activity is the ratio(%) of GOD activity from different cellular compartments to the total GOD activity at each time point. GOD activity is the average from duplicated experiments with three replications.

하였다. 배양 24시간 후 80% 이상의 포도당산화효소가 배지내로 분비됨을 확인하였고 이와같은 발현된 포도당산화효소의 높은 효율의 분비양상은 배양 4일 후에도 73% 이상이 계속 분비됨을 확인하였다 (Fig. 6). 일반적으로 생산물의 발현속도가 분비속

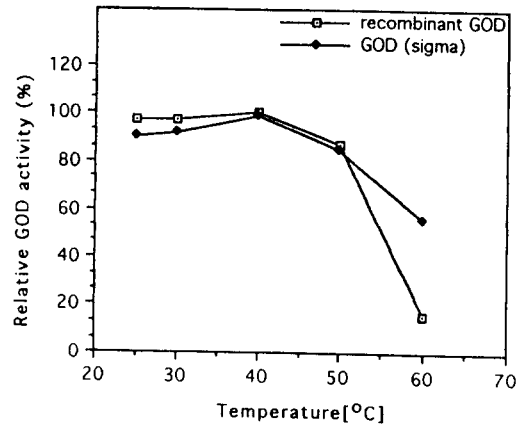


Fig. 7. Heat-stability of recombinant glucose oxidase(GOD) compared with standard enzyme from *A. niger*. Relative activity is the ratio(%) of GOD activity at different temperature to the highest GOD activity. GOD activity is the average from duplicated experiments with three replications.

도보다 높을 때 분비기관에 생산물이 축적되는 현상을 보이는데 재조합 포도당산화효소의 경우 세포내보다 periplasm에서 포도당산화효소의 활성이 현저히 높게 측정되는 것으로 미루어 포도당산화효소는 발현 즉시 분비되는 것으로 보인다. *A. niger*의 경우 포도당산화효소의 세포내 위치가 많은 논란이 되고 있으며(18) 많은 양의 효소가 세포내에 존재하는 것으로 밝혀져(16) 순수 분리정제하는데 많은 어려움이 있으나 재조합 효모에 의한 포도당산화효소의 분비 특성은 효소의 분리공정에 크게 기여하리라 기대된다.

재조합 포도당산화효소의 물리적 특성

재조합 포도당산화효소의 열 안정성을 측정하기 위해 25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C에서 1시간 배양 후 상대적 활성을 Sigma에서 구입한 표준품과 비교 측정하였다(Fig. 7). 재조합 포도당산화효소의 경우 50°C까지 85% 이상의 높은 활성을 보여 열에 대한 비교적 안정성을 나타내었지만 60°C에서는 16%의 활성을 보여 표준품과 차이를 나타냈다.

이상의 결과로 미루어 본 실험에서 제조한 재조합 효모를 이용한 포도당산화효소의 대량생산 가능성이 제시될 뿐 아니라 재조합 효모에서 효소의 분비특성

을 이용한 순수 포도당산화효소의 정제 공정 과정을 위하여도 크게 기여하리라 사료된다.

요 약

재조합 효모를 이용한 포도당산화효소의 대량생산에 관한 기초연구를 실시하였다. 분비신호를 포함한 포도당산화효소 유전자는 *Aspergillus niger*로부터 polymerase chain reaction을 이용하여 클로닝한후 GAL1과 GAL10 promoter를 이용하여 *S. cerevisiae* strain 2805에서 발현시킨 결과 GAL1 promoter를 사용한 형질전환체(yGOD1-1)에서 높은 효율의 효소생성을 나타냈다. 플라스크 배양 결과 1% galactose를 포함한 YEP 배지에서 최고 6 IU/mL의 포도당산화효소를 생산하였으며 재조합 포도당산화효소의 세포내 위치를 비교한 결과 *A. niger*와는 달리 발현된 효소가 80% 이상 배지로 분비됨을 확인하였다. 재조합 포도당산화효소의 열 안정성을 측정할 결과 표준품과 비교하여 50°C까지 큰 차이를 보이지 않고 높은 활성을 유지하는 것으로 확인되었다.

감 사

이 논문은 전북대학교 유전공학연구소와 교육부 생물화학공학 학술연구조성비의 지원으로 가능하였으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. Muller(1928), *Biochem. Z.*, **199**, 136.
2. Swoboda, BEP and V. Massey(1965), *J. Biol. Chem.*, **240**, 2209.
3. J. Pazur and K. Kleppe(1964), *Biochem.*, **3**, 578.
4. Q. Gibson, B. Swoboda, and V. Massey

- (1964), *J. Biol. Chem.*, **239**, 3927.
5. K. Frederick, J. Tung, R. Emerick, F. Masiarz, S. Chamberlain, A. Vasavada, and S. Rosenberg(1990), *J. Biol. Chem.*, **265**, 3793.
6. G. Richter(1983), *Glucose oxidase In Industrial Enzymology*, Godfrey, T., and Reichelt, J. eds. MacMillan, pp. 428, N. Y.
7. A. De Baetselier, P. Dohet, M. De Beukelaer, V. Ha-Thi, J. Hanotier, K. Frederick, S. Rosenbwerg, and A. Vasavada(1992), *J. Biotech.*, **24**, 141.
8. (주)알천산업, 기술자료 ACTM-9301(1992).
9. A. De Baetselier, A. Vasavada, P. Hohet, V. Ha-Yhi, M. De Beukelaer, T. Erpicum, L. De Clerck, J. Hanotier, and S. Rosenberg(1991), *Bio/Technology*, **9**, 559.
10. 이동훈, 서진호, 손정훈, 최의성, 이상기(1994), *한국생물공학회지*, **9**, 8.
11. F. Sanger and S. Nicklen(1977), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463.
12. S. Henikoff(1984), *Gene*, **28**, 351.
13. H. Ito, Y. Fukuoka, K. Murata, and A. Kimura(1983), *J. Bacteriol.*, **153**, 163.
14. M. Hodgkins, D. Mead, D. J. Ballance, A. Goodey, and P. Sudbery(1993), *Yeast*, **9**, 625.
15. P. M. J. Burgers and K. J. Percival(1987), *Anal. Biochem.*, **163**, 391.
16. M. Traeger, G. N. Qazi, U. Onken, and C. L. Chopra(1991), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **50**, 1.
17. L. Guarente, R. R. Yocum, and P. Gifford(1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **79**, 7410.
18. J. P. van Dijken and M. Veenhuis(1980), *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 275.