

전분을 이용한 탄수화물 분해효소의 고 생산과 효소 안정성 증가를 위한 글리세롤 첨가

¹이 선 옥 · ²이 진 하 · ¹박 준 성 · ¹서 은 성 · ¹김 창 용 · ³조 동 련 · ⁴김 도 원 · ^{†2,3}김 도 만
¹전남대학교 물질·생물화학공학과, ²공업기술연구소, ³응용화학부, ⁴강릉대학교 물리학과
(접수 : 2002. 11. 22., 게재승인 : 2002. 12. 26.)

Glycerol Addition for the Hyper-production and Stabilization of a Novel Carbohydrolase by *Lipomyces starkeyi*

Sun Ok Lee¹, Jin Ja Lee², Jun Seong Park¹, Jun Seong Park¹, Eun Seong Seo¹, Chang Yong Kim¹,
Dong Lyun Cho³, Do Won Kim⁴, and Doman Kim^{†2,3}

¹Department of Materials and Biochemical Engineering, ²The Engineering Research Institute

³Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea

⁴Department of Physics, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

(Received : 2002. 11. 22., Accepted : 2002. 12. 26.)

Lipomyces starkeyi KSM 22 produces dextranase and amylase (DXAMase). The addition of 0.02% (w/v) 2-deoxy-D-glucose or 0.5% (w/v) glycerol into a 1% (w/v) starch medium increased the final activity of DXAMase produced 2.5 fold or 2.4 fold, respectively, compared to that of a 1% (w/v) starch medium. This activity was similar to that produced with 1% (w/v) dextran. The stability of purified DXAMase at 40°C for 3 weeks was tested using the various enzyme stabilizers. With the addition of 25% (v/v) glycerol, 90.9% of initial activity was left after 3 weeks. For practical use, the addition of 1% (v/v) glycerol with 50 mM of CaCl₂ or KH₂PO₄ was adequate and maintained 73.4% of the initial activity under the test conditions used.

Key Words : *Lipomyces starkeyi*, dextranase, production, stabilization, glycerol

서 론

*Lipomyces starkeyi*는 자낭포자형성 효모균주로서 텍스트라나아제 (dextranase; EC. 3.2.1.11)를 생산한다(1). 텍스트라나아제는 α -(1→6)의 글루코시딕 결합을 선택적으로 자르는 가수분해 효소로 몇몇 균주를 제외하고 대부분의 텍스트라나아제는 텍스트란을 배지에 넣어 유도적으로 생산되지만 Kim과 Day는 구성적(constitutive)으로 텍스트라나아제를 생산해 내는 돌연변이 균주인 *L. starkeyi* ATCC 74054를 개발하여 포도당과 과당, 설탕, 전분 등으로 효소를 생산하였다(2-4). 하지만 텍스트란을 기질로 이용하는 경우보다 효소의 생산성이 낮았다. 이후 텍스트라나아제의 생산성이 증가된 균인 *L. starkeyi* KSM22가 개발되었고 이 균 효소의 생화학적 특성이 연구, 발표되었다(4). 흥미롭게도 KSM22로부터 얻은 효소들

중에는 텍스트라나아제 활성과 아밀라아제 활성을 동시에 갖고 SDS-PAGE 상에서는 약 100 kDa 크기의 단일 단백질 밴드를 보이는 효소가 확인되었다(4). 이 효소를 텍사메이즈(DXAMase)라 명명하였으며, 불용성 글루칸의 형성을 억제하고, 이미 생성된 플라그를 제거하는 기능을 가지고 있어 구강세정제의 활성 성분으로의 이용 가능성을 확인하였다(5,6). 효소의 상업적 이용을 위해서는 고생산성과 안정성 유지가 필요하며, 본 연구에서는 텍사메이즈의 생산성 증대를 위해 gratuitous repressor인 2-deoxy-D-glucose(4,7)와 pectin 가수분해 효소 유전자의 repressor인 글리세롤(8-9)을 이용하여 효소의 생산성 증가에 미치는 효과를 살펴보았으며, 현재 상용 중인 구강세정제에 포함되어 있는 다양한 종류의 염과 화학성분들, 그리고 일반적으로 효소의 안정제로 사용되는 물질들을 첨가하여 DXAMase의 안정성을 증가할 수 있는 조건을 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

Lipomyces starkeyi KSM22는 1% (w/v) 전분 (Yakuri pure

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, Gwang-Ju 500-757, Korea.

Tel : +82-62-530-1844, Fax : +82-62-530-1844

E-mail : dmkim@chonnam.ac.kr

Table 1. Effect of various carbon sources on DXAMase* production The concentration of carbon source was 1% (w/v) except indicated

Strain	Carbon source	Activity** (Unit/mL)	
<i>L. starkeyi</i> ATCC 74054	starch	0.14	
	starch	2.85	
	1% (w/v) starch+0.02% (w/v) 2-deoxy-D-glucose***	4.65	
	-D-glucose***	4.78	
	dextran	2.68	
	0.5% (w/v) starch+0.5% (w/v) dextran	1.47	
	<i>L. starkeyi</i> KSM 22	hydrol	0.84
		glucose	0.50
		maltose	0.98
		fructose	0.96
sucrose		4.49	
1% (w/v) starch+0.5% (v/v) glycerol			

*DXAMase activity was described as a dextranase equivalent activity. **Activity was analyzed at the stationary growth phase (OD₆₆₀=8.0).

***2-deoxy-D-glucose was used as a gratuitous repressor for DXAMase production.

chemical Co., Japan)을 탄소원으로 하고 0.02% (w/v) 2-deoxy-D-glucose (Sigma chemical Co., USA)가 첨가된 LW배지에 키워 보관하였다. LW 배지 조성은 0.3% (w/v) yeast extract, 0.3% (w/v) KH₂PO₄ 그리고 1% (v/v) mineral solution [2% (w/v) MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% (w/v) NaCl, 0.1% (w/v) FeSO₄ · 7H₂O, 0.1% (w/v) MnSO₄ · H₂O, 0.13% (w/v) CaCl₂ · 2H₂O]이다. 그 외 화학약품은 일반시약등급을 사용하였다.

효소 활성과 단백질 분석

텍사메이즈의 역가는 텍스트라나아제와 아밀라아제의 활성으로 확인하였으며, 20 mM citrate phosphate 완충용액 (pH 5.5)에 녹인 2% (w/v)의 텍스트란 혹은 전분을 기질로 사용하였다. 효소와 기질을 혼합하여 37°C에서 일정시간 반응시킨 후 반응액을 copper-bicinchoninate 환원당 측정 방법으로 유리된 환원당들의 양을 글루코스 양으로 환산하여 비교하였다(10). 효소 1 unit (IU)은 위 반응 조건에서 1분 동안 1 μmole의 글루코오스에 해당하는 환원당을 유리해내는데 필요한 효소의 양으로 정의한다. 단백질은 Bradford(11)법에 의해 정량해 주고 280 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다.

텍사메이즈 생산 및 정제

전배양은 LW 배지에 전분을 1% (w/v) 농도로 첨가하여 28°C에서 진탕 배양하였다. 이후 10 L 발효조 (Hanil R&D Co., Korea)를 이용하여 1% (w/v) 전분을 탄소원으로 8.3 L LW 배지에 배양하여 텍사메이즈를 얻었다. 배양 상등액은 100 K cut off hollow-fiber (Saehan Co., Korea)를 이용하여 회수하였으며, 이를 다시 30 K cut off hollow-fiber (Millipore, USA)로 830 mL까지 농축하였다. Ammonium sulphate (Sigma Chemical Co., USA)를 70%까지 넣어 주어 단백질을 침전시키고 원심 분리한 후 침전물을 60 mL의 20 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.4)으로 현탁하였다. 단백질 농도와 역가는 정제 단계별로 측정하였다. 단백질 농축액 (30 mg/1.5 mL)을 20 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 6.4)으로 평형화 시킨 DEAE-Sepharose 컬럼에 주입하고 NaCl로 0-1.0 M까지 농도 구배를 주어 단백질을 용출하였다. 활성을 보이는 분획을 모아 농축한 후 GPC 컬럼 (Bio-Rad

Co., A-0.5 m, 70 cm×2.6 cm)에 주입하여 분리하였으며, 사용한 컬럼은 50 mM citrate phosphate (pH 5.5) 완충용액으로 평형화 시켰고 투입한 단백질은 4 mg/mL이었다.

탄소원에 따른 효소 생산성

LW 배지에 1% 전분 대신 다른 종류의 탄소원을 넣고 텍사메이즈 생산에 주는 영향을 조사하였다. 사용한 탄소원은 전분 이외에 글루코오스, 플라кто오스, 말토오스, 텍스트란, 하이드롤, 그리고 수크로오스이었고, LW 배지에 10 g/L (w/v)의 농도로 각각의 탄소원을 첨가하였고, 28°C에서 48시간 배양하여 상등액을 조효소액으로 회수하였다.

염과 화학약품의 텍사메이즈 안정성에 미치는 영향

구강세정제에 포함된 성분들 중 몇 가지를 정제된 텍사메이즈 효소 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 이온들의 킬레이팅 효과를 줄이기 위해 50 mM citrate phosphate 완충용액 (pH 5.5)을 사용하였으며, 이 완충용액에 화학성분들을 녹이고, 이 용액과 효소액을 85:15 (v/v-텍스트라나아제 역가 기준; 24.6 U/mL)의 비율로 혼합하여 40°C에서 3주간 방치하면서 24시간마다 시료를 취하여 역가를 확인하였다. 역가 확인 방법은 위에서 제시한 방법과 동일하다.

결과 및 고찰

다양한 탄소원의 텍사메이즈 생산성에 미치는 영향

L. starkeyi 균을 이용한 텍스트라나아제 발효의 약점은 텍스트란을 효소 생산에 이용해야 한다는 점이었다(12). 따라서, 발효에 있어서 효소 생산 비용의 60-80%가 원료물질의 비용으로 효소 생산단가의 대부분이 탄소원의 가격에 영향을 받는다. 그러므로 효소 생산을 위하여 가장 좋은 *Lipomyces* 균의 특성은 구성적(constitutive)으로 효소를 생산하고 derepression 되어야 한다(12). 본 연구에서 사용한 *L. starkeyi* KSM22 균은 부분적으로 constitutive하게 텍사메이즈를 생산하는 derepresse된 균으로(5), 이 균의 효소를 상업적으로 이용하기 위하여 값이 싼 탄소원을 이용하여 효소를 생산하고자 배양 시 여러 가지 종류의 탄소원이 텍사메이즈 생산에 미치는 영향을 확인하였다 (Table 1). LW 기본 배지에 1% (w/v) 전분

만을 사용하고 OD₆₆₀이 8.0 가량 되었을 때 (접종 후 약 48-52시간) 텍스트라나아제에 해당하는 효소의 활성은 2.85 U/mL 이었으며, 탄소원으로 1% (w/v) 텍스트란을 사용한 경우는 4.78 U/mL 로 약 1.68배의 증가된 텍사메이즈의 생산을 확인하였다. 실험에 사용한 단당과 이당의 경우는 텍사메이즈 생산이 적어 0.5에서 1.47 U/mL의 활성 범위를 보였다. 하지만, 구체적으로 어떤 물질이 텍스트라나아제 유전자 발현을 위한 inducer 인지 알려져 있지 않다(12). *Penicillium*에서 생산되는 텍스트라나아제의 경우, 텍스트란 자체보다는 텍스트란의 가수분해 산물에 의해 효소가 induction 됨이 보고된 바있다(12). Koenig와 Day는 1-β-methyl-D-glucose를 사용하면 *L. starkeyi* ATCC 20825 균의 텍스트라나아제 생산이 텍스트란을 사용하여 배양한 경우보다 2.19배 더 촉진하는 것으로 보고하였으며 isomaltose에서 isomaltopentaose의 경우는 21%-73%의 낮은 induction을 보임을 보고하였다(13). *L. starkeyi* KSM22 균을 값싼 전분을 사용하여 효소를 생산하는 경우 생산 비용에 장점이 될 수 있지만 전분만을 탄소원으로 사용하는 경우 효소의 생산성이 텍스트란을 사용하는 경우보다 낮아 전분을 이용하면서 효소의 생산성을 증가시키기 위해서 gratuitous repressor를 이용하고자 하였다. 전분에 0.02% (w/v) 2-deoxy-D-glucose를 첨가하여 배지에서 배양했을 경우 전분만을 사용하였을 때 보다 약 2.5배 증가된 텍사메이즈 생산성을 보였다(Table 1). 2-deoxy-D-glucose는 탄수화물 분해 효소의 생산을 위한 gratuitous repressor로서 constitutive하고 derepressed 탄수화물 분해 효소의 생산을 하는 균을 개발하기 위하여

사용이 되어왔다(4,7,14-17). 이 물질은 glucose의 유사체로 대부분의 효모균은 이 화합물을 탄소원으로 사용하지 못한다. 이 물질을 전분과 같은 다른 탄소원과 섞어서 사용하면 효모균 중 전분 분해 효소의 생산이 글루코오스에 의해 repression 되는 경우는 효소를 생산하지 못하고 글루코오스의 효과를 극복 할 수 있는 효소 생산 시스템을 가지는 균만 효소를 생산한다. Table 1에서와 같이 효소의 양은 텍스트란을 사용한 경우와 비슷하였지만 2-deoxy-D-glucose 역시 값이 비싼 화학 성분으로 상업적 효소 생산을 위하여는 효과적이지 못하다. 따라서 pectin 가수분해 효소의 repressor로서 사용되는 글리세롤을 첨가하여 효소의 생산성 연구를 하였다(9). 글리세롤 역시 2-deoxy-D-glucose와 대사면에서 유사한 효과를 주어 본 연구에서는 1% (w/v) 전분이 첨가된 LW기본 배지에 0.5% (v/v) 글리세롤을 첨가하였을 때 전분만을 사용하였을 때보다 약 2.4배 증가된 효소 생산성을 보였다. 이는 값비싼 텍스트란이나 전분에 2-deoxy-D-glucose를 첨가하여 얻을 수 있는 효소의 생산성으로 글리세롤을 사용함으로써 저비용으로 효소를 생산할 수 있음을 의미한다. 배양 상등액으로부터 hollow-fiber와 황산 암모늄을 이용하여 농축하고, 음이온 교환수지 (DEAE-Sephrose)를 이용하여 텍사메이즈를 분리, 정제하였으며 최종적으로 얻어진 텍사메이즈는 텍스트라나아제와 아밀라아제에 해당하는 활성으로 각각 48.1 U/mL과 33.8 U/mL 이었고 정제된 효소는 SDS-PAGE와 효소 활성 염색을 수행한 결과 텍스트라나아제와 아밀라아제 역할을 동시에 갖는 순수한 단일 밴드를 갖는 100 kDa 크기의 효소임을 확인하

Table 2. The effect of chemical ingredients on the stability of DXAMase after 3 weeks at 40°C

Ingredients		Concentration	Activity left (%)
Control			11.5
Salts	Aluminium hydroxide	21.6%	18.5
	Sodium benzoate	0.5%	12.1
Sugar alcohol	Sorbitol	25%	31.5
	Mannitol	25%	46.5
Carbohydrates	Branched oligosaccharide	200 mM	54.5
		0.1%	6.0
	Trehalose	0.2%	9.0
		1%	20.1
	Carboxymethylcellulose	0.4%	24.2
		10%	42.5
	Glycerol	25%	90.9
Detergents		40%	78.8
	Propylene glycol	70%	88.9
	PEG 400	25%	36.3
	Triton X-100+SDS	0.025%+0.05%	7.5
	Betain	4%	21.2
	Betain+SDS	4%+1.2%	6.2
Glycerol (1%)	Betain+Glycerol	4%+20%	60.5
	CaCl ₂	50 mM	73.4
	KH ₂ PO ₄	50 mM	73.4
	KCl	50 mM	69.6
	CaCl ₂	50 mM	46.8
PEG 400 (1%)	KH ₂ PO ₄	50 mM	61.2
	KCl	50 mM	44.4

*Activity left (%) : Reported as percent activity left after incubation of the enzyme with chemical ingredient(s) at 40°C for three weeks.

였다. 이 정제된 효소를 다음의 텍사메이즈의 안정성을 위한 화학물질의 선발에 사용하였다.

텍사메이즈 안정성에 미치는 화학 성분 영향

텍사메이즈를 구강세정제의 활성 물질로 제품화하여 사용하기 위해서는 일반적으로 40°C에서 3주간 방치했을 때 초기 활성의 70% 이상 안정성이 유지되어야 한다. 첨가한 물질은 염, 당알콜, 탄수화물, detergents, 그리고 1% (v/v)의 글리세롤 혹은 PEG 400에 섞어준 50 mM의 염들이었다. 아무것도 첨가하지 않은 경우의 텍사메이즈는 실험 기간 후 초기 효소 활성의 11.5%만이 남았으며 25% (v/v) 이상의 글리세롤과 70% (v/v)의 Propylene Glycol을 첨가한 경우에는 78.8% 이상의 초기 효소 활성이 잔존함을 확인하였다. 하지만 이러한 화학성분의 농도는 텍사메이즈의 상품화를 위해서는 너무 높은 농도이므로 글리세롤의 농도를 1% (v/v)로 유지하고 여러 가지 종류의 염들을 추가함으로써 효소의 안정성을 증가할 수 있는 조건을 살펴보았다(Table 2). 1% (v/v) 글리세롤에 50 mM KH₂PO₄와 CaCl₂가 첨가된 군에서 초기 활성의 73.4% 효소 역가가 유지되어 효소 안정성에 효과가 좋은 것으로 나타났다. 따라서 글리세롤을 효소 생산 배지에 첨가함으로써 효소의 생산성 증가와 생산 효소의 안정성 유지에도 좋은 효과가 있겠다.

요 약

Lipomyces starkeyi KSM22는 텍스트라나아제와 아밀라아제 활성을 동시에 갖는 텍사메이즈를 생산한다. 1% (w/v)의 전분을 포함한 배지에 0.02% (w/v) 2-deoxy-D-glucose를 첨가한 경우, 넣지 않았을 때보다 약 2.5배의 증대된 효소 생산성을 보였으며, 0.5% (v/v) 글리세롤을 첨가한 경우 2.4배의 효소 생산성을 보여 1% (w/v)의 텍스트란을 사용한 경우에 생산되는 텍사메이즈 양만큼의 생산성을 얻을 수 있었다. 정제된 효소와 효소 안정제로 사용이 가능한 혼합액을 40°C에서 3주간 방치 후 초기 활성과 비교하여 잔존하는 효소의 활성을 확인한 결과 25% (v/v) 글리세롤을 첨가했을 때 3주 후 텍스트라나아제의 활성으로 확인된 텍사메이즈의 활성은 초기의 90.9%가 유지되었고, 1% (v/v) 글리세롤에 50 mM CaCl₂와 KH₂PO₄를 첨가한 경우는 초기 활성의 73.4%가 유지되어 텍사메이즈 안정성에 효과가 있었다.

감사의 글

본 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구(KRF-Y00-290)되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Webb, E. and I. S. Martins (1983), Extracellular endodextranase from the yeast *Lipomyces starkeyi*, *Can. J. Microbiol.* **29**, 1029-1095.
- Barrett, J. F., T. A. Barrett, and R. Curtiss (1987), Purification and partial characterization of the multicomponent dextranase complex of *Streptococcus sorbrinus* and the cloning of the dextranase gene, *Infect. Immun.* **55**, 729-802.
- Koenig, D. and D. F. Day (1988), The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*, *Eur. J. Biochem.* **183**, 161-167.
- Kim, D. and D. F. Day (1995), Isolation of a dextranase constitutive mutant of *Lipomyces starkeyi* and its use for the production of clinical size dextran, *Lett. Appl. Microbiol.* **20**, 268-270.
- Ryu, S. J., D. Kim, H. J. Ryu, S. Chiba, A. Kimura, and D. F. Day (2000), Purification and partial characterization of a novel glucanhydrolase from *Lipomyces starkeyi* KSM 22 and its use for inhibition of insoluble formation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 223-228.
- Saito, K. (1982), Application of dextranase to dentistry, *Furegurasu Janaru.* **10**, 101-107.
- Novak, S., D. A. Tony, and G. G. Stewart (1990), 2-Deoxy-D-glucose resistant yeast with altered sugar transport activity, *Federation of European Biotechnical Societies.* **1**, 202-204.
- Hadj-Taieb, M., A. Malika, T. Samah, B. Faten, and G. Ali (2002), Hyperproduction of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*, *Enzyme Microbial Technol.* **30**, 662-666.
- Jain S., H. Durand, and G. Tiraby (1990), Production of extracellular pectinase enzymes by a mutant (Pol1) of *Penicillium occitanis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 308-312.
- Fox. J. D. and J. F. Robyt (1991), Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader, *Anal. Biochem.* **195**, 93-96.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Koenig, D. W. (1988), The dextranase *Lipomyces starkeyi* and its in Sugar can Processing. Ph. D. Dissertation, Dept. of Microbiology, The Louisiana State University, USA.
- Koenig, D. W. and D. F. Day (1989), Induction of *Lipomyces starkeyi* dextranase, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2079-2081.
- Heredia, M. F. and C. F. Heredia (1988), *Saccharomyces cerevisiae* acquires resistance to 2-deoxyglucose at a very high frequency, *J. Bacteriol.* **170**, 2870-2872.
- Kawamori, M., Y. Morikawa, Y. Shinsha, K. Takayama, and S. Takasawa (1985), Preparation of mutants resistant to catabolite repression of *Trichoderma reeser*, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 2875-2879.
- Kawamori, M., Y. Ado and S. Takasawa (1986), Preparation and application of *Trichoderma reesei* mutants with enhanced β -glucosidase, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2477-2482.
- Van Uden, N. and M. B. da Costa (1980), Use of 2-deoxyglucose in the selective isolation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced β -glucosidase production, *Biotechnol. Bioeng.* **22**, 2429-2432.