

Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase의 결손변이효소에 의한 cyclofructan의 고효율 생산

박정하 · 권현주 · 김병우*

동의대학교 생명응용과학과

Received September 6, 2005 / Accepted December 1, 2005

High Yield Production of Cyclofructan by Deletion Mutant Enzyme of Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase. Jung-Ha Park, Hyun-Ju Kwon and Byung-Woo Kim*. *Department of Life Science and Biotechnology, College of Natural Science, Dongeui University, Busan 614-714, Korea* – This study investigated the optimal conditions of high yield production of cyclofructan (CF) using recombinant deletion mutant enzyme CFT108 which is constructed by N-terminal deletion from cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) gene of *Penibacillus polymyxa*. The production yield was dependent on reaction time, substrate concentration and enzyme concentration. The optimum reaction time for industrial purpose was achieved at 3 hr reaction. The optimum concentrations of substrate and enzyme were found to be 2% inulin and 40 unit/g inulin, respectively. At optimum condition, 9.5 g/l of maximum yield and 47.5% of conversion efficacy were achieved. For purification of CF produced, the reaction mixture was treated with 1 unit/ml exoinulinase and then added 3% CaO three times with blowing CO₂ gas, resulted in 95% purity.

Key words – *Penibacillus polymyxa*, cyclofructan, inulin, production condition, cycloinulooligosaccharide fructanotransferase.

Cycloinulooligosaccharide (cyclofructan, CF)는 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase)의 작용에 의해 inulin으로부터 생산되는 환상 올리고당이다. CF를 생산하는 CFTase는 분자내 당전이 반응에 의해 주로 fructose 분자 6~8개가 β-(2→1)결합으로 연결된 비환원성의 cycloinulohexaose (CF₆), cycloinulohexaose (CF₇), 그리고 cycloinulooctaose (CF₈)를 생산하며, 약 CF₆ 80%, CF₇ 20%, CF₈ 1%의 비율로 생산한다[3,4].

CF는 bowl-shape 구조로 되어있고, 외부는 hydroxyl group에 의해 친수성을 나타내며, 내부는 ether 결합으로 인하여 소수성을 띠고 있다. CF의 이와 같은 구조는 환상 올리고당으로 잘 알려진 cyclodextrin과 물리적, 화학적으로 유사한 성질을 가지며 주로 내부 공극에 휘발성 화합물이나 유기 화합물을 포집하여 포집화합물의 물성 개선 효과를 가진다[11]. 그 중 CF₆은 crystal 구조 분석에서 18-crown-6-skeleton 구조를 하고 있는 것으로 밝혀졌으며, 또한 CF₆은 metal ion과 복합체를 형성할 수 있는 성질을 가지고 있다[8,10,11]. 이 같은 CF의 물리적, 화학적 특성은 식품, 의약, 농업, 화학공업 등의 여러 분야에서 응용되어 이용될 수 있다[9]. 또한, CF는 여러 물질의 동결, 해동에 안정적 효과를 나타내기 때문에 빵 제조에서 밀가루 반죽이나, 화장품 또는 의약분야에서 liposome 부형제 등에 사용되는 등 앞으로 산업적으로 이

용이 크게 증가될 수 있을 것으로 기대된다[2]. 그 예로 식품 분야에서는 차 또는 커피의 쓴 맛 성분, caffeine, 수산 가공품의 악취, 그리고 콜레스테롤 등의 유해성분 제거 등에 사용될 수 있으며, 의약 분야에서는 약물 운반체, 용해제, 유도체 등의 보조제 등으로 사용 가능하다. 농약의 살충제 및 살균제 성분 등도 CF의 포집능을 이용하면 난용성 살충성분의 용해도 증가, 휘발성이 강한 살충, 살균 성분의 안정화, 산소, 열 등의 분해 요인으로부터 안정화 등의 물성개선제로 사용할 수 있다. 한편 CF는 물성 개선제로서의 이용 뿐 만 아니라 장내세균개선 효과, 치아 우식증 예방, 혈당 강화작용 등의 올리고당의 기능성까지도 포함하고 있다.

CFTase는 *Bacillus circulans* OKUMZ31B[3,4], *Bacillus circulans* MCI-2554[6], 그리고 *Bacillus macerans* CFC1[5] 등 주로 *Bacillus* 속 세균이 생산하는 것으로 알려져 있다. CFTase를 이용한 CF의 생산은 최근 급격히 늘어가고 있는 기능성 식품, 건강식품 및 대체의약품에 대한 관심과 수요의 측면에서 그 유용성이 기대되고 있지만 아직까지 CF를 산업적으로 생산하여 판매하고 있지 않다.

본 연구는 토양으로부터 분리한 *Penibacillus polymyxa* 균주가 생산하는 CFTase를 결손 변이시켜 재조합 결손 변이체를 제작하였으며 변이 효소를 이용하여 CF의 대량 생산 최적 조건을 검토하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1536, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : bwkim@deu.ac.kr

재료 및 방법

사용균주, plasmid 및 효소의 생산

본 연구에 사용한 효소는 본 연구실에서 분리한 *Penibacillus polymyxa* MGL21의 CFTase를 결손 변이시켜 CF의 생산 효율을 높인 mutant 효소 CFT108을 사용하였다. 효소의 대량 발현과 정제 효율을 위하여 CFT108 유전자를 발현 vector pET28a(+)에 subcloning 하고 이 plasmid를 pDI2 Δ N-His라 명명하였다. pDI2 Δ N-His plasmid를 이용하여 단백질 대량 발현용 숙주세포 *E. coli* HMS174(DE3)pLysS(*FrecA1 hsdR* (r_{K12} - m_{K12} +)Rif^R(DE3)pLysS)를 형질전환시켜 CFT108을 유도 발현시켰다.

재조합 CFT108 효소의 정제

CFT108의 정제는 pDI2 Δ N-His를 포함한 *E. coli* HMS174/pDI2 Δ N-His를 NZCYM(Difco Co.)배지 500 ml에 배양한 후 최종 농도가 1 mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 CFT108의 발현을 유도하였다. pDI2 Δ N-His에서 생산되는 단백질인 CFT108은 N말단에 His-Taq가 융합된 형태로 발현되어 정제가 용이하다. 발현된 재조합 단백질 CFT108은 불용성 봉입체의 형성이 확인되었으며, 효소를 획득하기 위하여 sonication buffer (50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)를 사용하여 균체를 파쇄 시킨 후 원심분리하여 균체 파쇄물로부터 봉입체를 회수하였다. 회수한 봉입체는 wash buffer (2 M Urea, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2% Triton X-100)를 사용하여 숙주세포 유래 단백질을 제거하고, 8 M Urea가 첨가된 20 mM phosphate buffer (pH 7.8)를 사용하여 Ni⁺ column (Histrap kit, Novagen Co.)을 통해 CFT108을 정제하였다. 정제된 재조합 단백질 CFT108은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 투석을 통해 refolding 시킨 후 이 후 실험의 효소액으로 사용하였다.

효소의 활성 측정

CFTase 반응에 의한 반응생성물의 정성적인 활성측정은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 효소반응은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 최종 농도 1%가 되도록 녹인 기질(inulin)과 효소액을 1:1로 혼합하여 40°C에서 시간별로 반응시켰다. 효소 반응액을 비등수에서 5분간 열처리 하여 효소 반응을 정지시키고 반응액 5 μ l TLC plate (MERCK)에 점적한 후 butanol : isopropanol : water (3 : 12 : 4, v/v)를 전개용매로 하여 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray (3% urea, 5% ethanol, 1 M H₃PO₄)로 도포한 후 120°C에서 10분간 가열하여 발색시켜 확인하였다.

생성된 CF의 순도 확인 및 효소 활성의 정량은 HPLC로 행하였다. Column은 TSK gel Amide-80 (Tosoh Co., Japan)을 사용하였고, 용출용매는 탈기한 acetonitrile : H₂O (65 : 35, v/v), 유속 1.0ml/min, column oven 온도는 65°C로 하였

다. HPLC 기종은 Waters (module 1, U.S.A.)를 사용하였고, RI detector (Model 410, Waters)로 검정하였다. CFT108의 효소 활성은 40°C에서 1분간 1 μ mole의 CF를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

CF의 정제

CF를 생산하기 위한 반응액에는 기질 inulin이 첨가되어 있다. 본 반응액은 기질이 100% 생산물로 바뀌는 반응이 아니기 때문에 미 반응한 inulin이 존재하게 되며 CF의 순수분리 정제를 위하여 이것을 제거할 필요가 있다. 미 반응 inulin의 제거를 위하여 *Penibacillus polymyxa* exoinulinase [7]를 사용하였다. 1 L의 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 기질은 최종 2%, 재조합 단백질 CFT108은 40 unit/ml이 되도록 혼합하고 40°C에서 3시간 반응시켰다. 생성된 CF 이외의 잔존 inulin 및 fructo- oligosaccharide를 제거하기 위하여 exoinulinase를 첨가하여 37°C에서 6시간 처리하였다. Exoinulinase 처리 후에 생성된 당당류를 제거하기 위하여 용액에 3% 농도로 calcium oxide를 첨가하고 CO₂ 가스를 주입하여 80°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이 두 과정을 수회 반복 후 12,000 rpm, 10분간 원심분리 하였다. 상등액에 100% 차가운 ethanol을 3:7 비율로 혼합하여 12,000rpm, 5분간 원심분리 하여 침전물을 회수하였다. 위의 ethanol 처리과정을 3회 반복하여 순수한 CF를 정제하였다.

결과 및 고찰

고효율 재조합 효소 CFT108의 정제

CFTase 유전자의 구조는 크게 3개의 영역으로 나뉘어져 있다. 먼저, inulin 분해 기능을 가진 inulinase 상동성 영역 core region (CR)과 endo-inulinase와 상동성 영역인 ERH 영역, 그리고 반복 영역인 repeat sequence (R)영역으로 구성되어 있다[1].

CF의 대량생산을 위한 고효율 효소를 개발하기 위하여 본 연구실에서 분리한 *Penibacillus polymyxa*의 CFTase 유전자를 이용하여 여러 가지 결손 변이체를 제작하여 그 활성을 비교해 본 결과 N-말단에 존재하는 2개의 repeat region을 제거한 CFT108이 야생형 CFTase보다 고효율의 CF를 생산하였다(data not shown). 따라서 이 효소를 이용하여 CF를 대량생산하기 위해서 재료 및 방법에 설명한 대로 발현 vector pET28a(+)에 subcloning 하여 숙주세포 *E. coli* HMS174(DE3)pLysS에서 대량 발현시킨 후 Ni⁺ column으로 재조합 단백질 CFT108을 정제하였다.

CF 생산 최적 반응시간

50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml에 1% inulin과 10

unit/ml의 CFT108을 첨가하여 40°C에서 반응시켜 반응 시간에 따른 CF 생산량을 TLC와 HPLC로 분석하였다. 그 결과 3시간까지는 반응 시간에 따라 생산량이 현저히 증가되었으나 반응 3시간 이후에는 생산량에 큰 변화가 없었다(Fig. 1). 따라서 경제성을 고려한 CF 생산 최적 반응 시간은 3시간으로 결정하였다.

CF 생산을 위한 최적 기질 농도

기질 농도에 따른 CF 생산량을 검토하기 위해서 고효율 효소 CFT108을 이용하여 기질인 inulin을 1-6%까지 농도별로 변화시키면서 효소액 10 unit/ml을 첨가하여 40°C에서 3시간 반응시켜 전술한 방법에 따라 CF를 생산하였다. 생산한 CF를 증류수에 녹인 후 0.45 µm filter로 여과한 다음 여액을 HPLC로 분석하였다. 그 결과 4% 기질에서 최대 9.71 g/l의 CF를 생산하나 2% 기질을 사용할 때 8.72 g/l와 비교하여 현저한 차이가 없어 경제성을 고려하여 2%가 가장 적절한 기질 농도라고 사료되었다. 따라서 CF 생산을 위한 최적 기질

농도를 2%로 결정하였다(Fig. 2).

CF 생산을 위한 최적 효소량

CFT108은 야생형의 CFTase보다 빠른 시간에 대량 생산하는 특징을 가지고 있으나, 일정량의 CF를 생산하면 그 이후에는 생성된 CF를 분해하는 특성을 가지고 있다. CF는 fructose 6-8개가 연결된 환상의 분자이지만 CF가 분해되기 시작하면 F₂, F₃, F₄ 등의 fructooligosaccharide를 생산하게 된다. 본 연구의 목적은 CF의 대량 생산 및 순수 정제에 있으므로 보다 많은 양의 CF를 생산할 수 있도록 최적의 효소량을 검토하였다.

효소 농도에 따른 CF 생산량을 검토하기 위해 2% inulin 농도에 기질 1 g inulin 당 CFTase를 10, 20, 40, 60, 80, 100 unit 농도별로 첨가하여 40°C에서 3시간 반응시켜 CF를 생산하였다. 그 결과 효소 농도를 증가시킬수록 CF의 생산량이 증가하여 40 unit/g inulin 사용 하였을 때, 최대 생산량 9.5 g/l를 생산하였으며 그 이상에서는 CF의 생산 증가가 없었

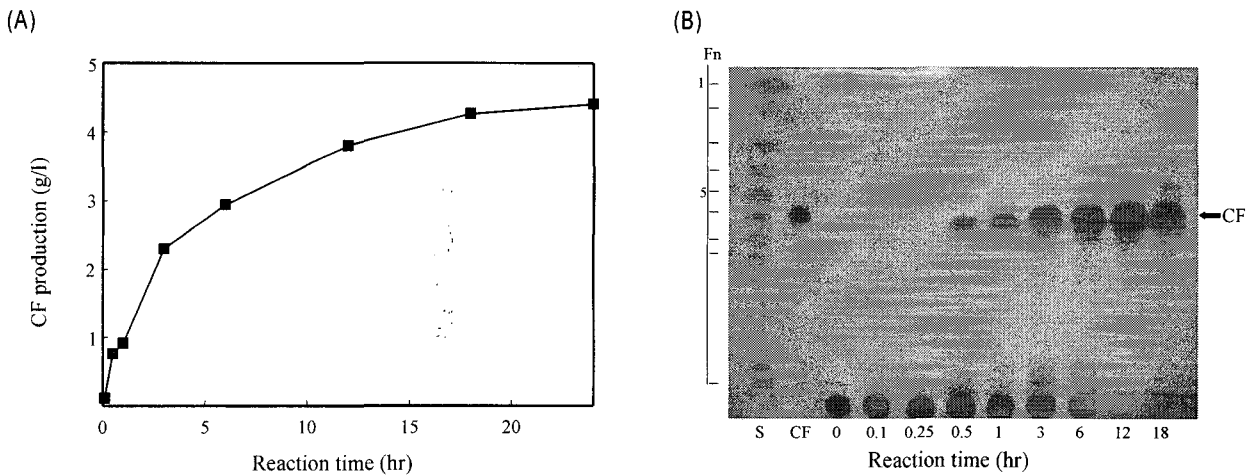


Fig. 1. Time course profile of CF production from inulin by CFT108 (A) and thin-layer chromatogram of the reaction products (B).

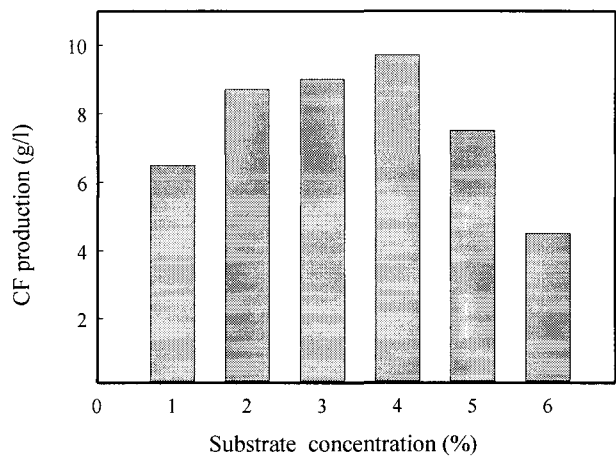


Fig. 2. The effect of substrate concentration on CF production.

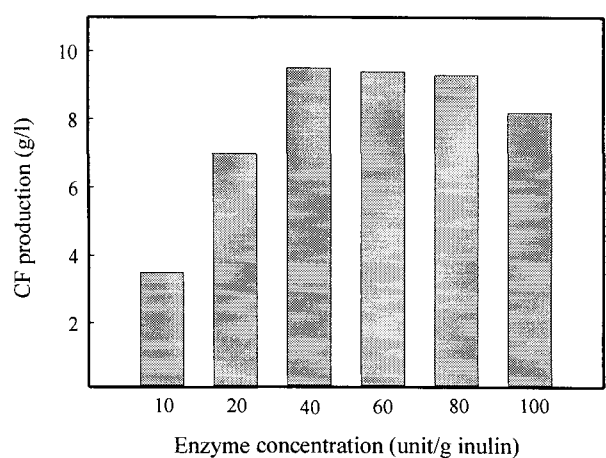


Fig. 3. The effect of enzyme concentration on CF production.

다(Fig. 3). 따라서 최적 CF 생산 효소 농도는 40 unit/g inulin으로 결정하였다. 이때의 CF 전환율은 47.5%였다. 이와 같은 CF 생산 효율은 야생형 CFTase의 전환율 25.3%에 비해 약 2배 이상 증가하였다.

CF 순수 분리 정제

CF를 생산 반응액에서 미 반응 inulin의 제거를 위하여 2% inulin과 CFTase 40 unit/g inulin의 조건으로 CF 생산 반응 후 exoinulinase 0.1, 0.5, 1 unit/ml을 CFTase 반응액에 첨가하고 시간별로 반응시켜 미 반응 한 inulin의 분해 정도를 Somogyi-Nelson법으로 확인하였다(Fig. 4). 본 exoinulinase의 1 unit는 1분간 1 μmole의 fructose를 생산하는 효소의 양이다. Fig. 4의 결과에서 보는 바와 같이 exoinulinase 1 unit/ml로 6시간 처리하였을 때 미 반응 inulin (이론상 10.5 g/l)이 가장 효율적으로 분해되는 것을 알 수 있었다.

다음은 반응액에서 exoinulinase 처리에 의해 생성된 부산

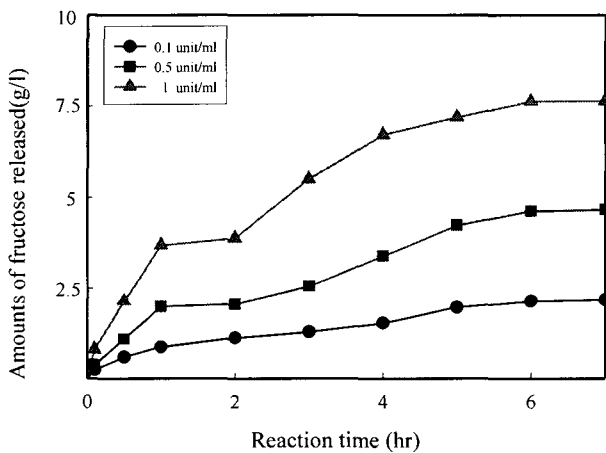


Fig. 4. The amounts of released fructose from unreacted inulin by exoinulinase treatment for 7 hr.

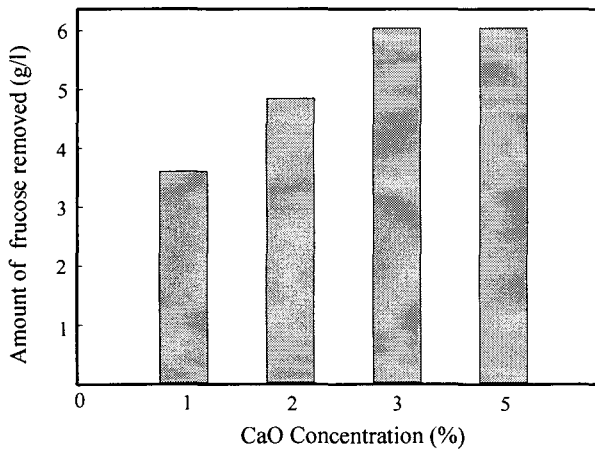


Fig. 5. The amounts of removed fructose by treatment of CaO in reaction mixture treated exoinulinase.

물인 fructose를 제거하여 CF를 순수 정제하기 위한 조건을 검토하였다. 올리고당 반응액에서의 당류의 제거는 반응액에 CaO 처리로 효율적으로 흡착제거 시킬 수 있다. CFTase 반응액(2% inulin, CFTase 40 unit/g inulin)에 exoinulinase 1 unit/ml 농도로 6시간 처리한 후, CaO를 1-5%까지 농도별로 처리한 후 80℃에서 CO₂ 가스를 주입하여 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤에 원심분리하여 CaO 잔사를 제거하고 상등액에 남아있는 당류의 농도를 Somogyi-Nelson법으로 정량하여 확인하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 CaO에 의한 fructose 흡착 제거 조건은 CaO 3%가 최적이었으며, CaO 처리와 ethanol 처리과정을 3회 반복한 후 evaporator로 건조하여 분말화시켜 순수한 CF를 얻을 수 있었다(Fig. 6). 정제된 CF (50 mg/ml)를 HPLC에 20 μl injection 하여 확인한 결과 CF₆, CF₇, CF₈ 비율이 72 : 27 : 1 이었으며 CF가 95% 이상으로 순수 정제되었음을 확인하였다(Fig. 7).

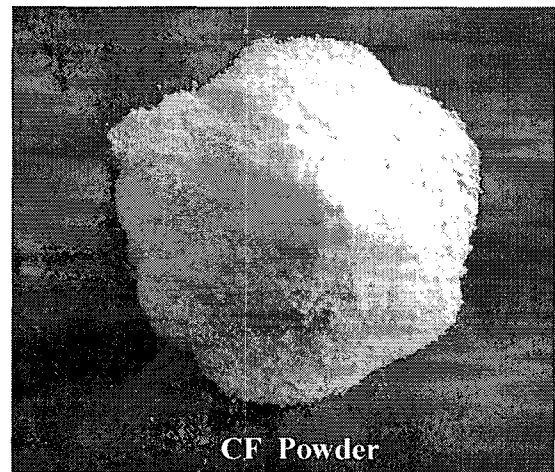


Fig. 6. Purified CF powder.

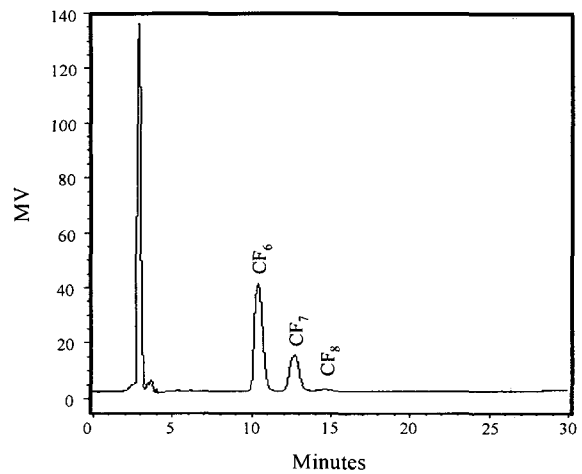


Fig. 7. HPLC analysis of highly purified CF.

요 약

본 연구는 *Penibacillus polymyxa* 균주의 CFTase 유전자를 결손 변이시킨 고효율 효소 CFT108을 이용하여 cyclofructan (CF)의 대량생산 조건을 검토하고 생산된 CF의 순수 분리 정제 공정을 개발하였다. CF의 대량생산 조건은 2%의 inulin 기질과 40 unit/g inulin의 기질에서 3시간 반응시켰을 때 최대 생산량 9.5 g/l의 수율을 달성할 수 있었으며, 이때의 inulin의 CF 전환율은 47.5%였다. 생산된 CF를 순수 분리 정제하기 위해서 CFTase 반응액을 exoinulinase 1 unit/ml로 6시간 처리하여 미 반응 inulin을 단당화시켰으며, 유리된 fructose는 3% CaO로 CO₂ 가스 하에서 80℃, 10분간 3회 흡착 제거 시킴으로써 순수 정제하였다. 정제된 CF를 HPLC로 확인한 결과 정제도는 95% 이상이였으며, CF₆, CF₇, CF₈ 비율이 72 : 27 : 1 이었다.

감사의 글

본 연구는 2004학년도 동의대학교 교내연구비(2004AA096)의 지원에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Jeon, S. J., D. J. You, H. J. Kwon, K. Shigenori, K. Namio, K. H. Kim, Y. H. Kim, and B. W. Kim. 2002. Cloning and characterization of Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase(CFTase) from *Bacillus polymyxa* MGL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12(6)**, 921-928.
2. Kanai, T., N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda, and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cycloinulooligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4956-4960.
3. Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura, and K. Mizutani. 1989. Formation of a cycloinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **192**, 83-90.
4. Kawamura, M., and T. Uchiyama. 1994. Purification and some properties of cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **260**, 297-304.
5. Kim, H. Y., and Y. J. Choi. 2001. Molecular characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 995-1000.
6. Kushibe, S., R. Sashida, and Y. Morimoto. 1994. Production of cyclofructan from inulin by *Bacillus circulans* MCI-2554. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1136-1138.
7. Kwon, H. J., S. J. Jeon, D. J. You, K. H. Kim, Y. G. Jeong, Y. H. Kim, Y. M. Kim, and B. W. Kim. 2002. Cloning and characterization of exoinulinase from *Bacillus polymyxa*. *Biotechnology Letters.* **25**, 155-159.
8. Sawada, M., T. Tanaka, Y. Takai, T. Hanafusa, T. Taniguchi, M. Kawamura, and T. Uchiyama. 1991. The crystal structure of cycloinulohexaose produced from inulin by cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **217**, 7-17.
9. Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **7**, 244-248.
10. Takai, Y., Y. Okumura, S. Takahashi, M. Sawada, M. Kawamura, and T. Uchiyama. 1993. A permethylated cyclic fructo-oligosaccharide host that can bind cations in solution. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1**, 53-54.
11. Uchiyama, T., M. Kawamura, T. Uragami, and H. Okuno. 1993. Complexing of cycloinulo-oligosaccharides with metal ions. *Carbohydr. Res.* **241**, 245-248.