

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Aspergillus oryzae* 유래의 exo- $\beta$ -1,3-glucanase (laminarinase)의 생산 최적화

김민정<sup>1</sup>, 남수완<sup>1,2</sup>, Koichi Tamano<sup>3</sup>, Masayuki Machida<sup>3</sup>, 김성구<sup>4</sup>, 김연희<sup>1,2,\*</sup>

### Optimization for Production of Exo- $\beta$ -1,3-glucanase (Laminarinase) from *Aspergillus oryzae* in *Saccharomyces cerevisiae*

Min-Jung Kim<sup>1</sup>, Soo-Wan Nam<sup>1,2</sup>, Koichi Tamano<sup>3</sup>, Masayuki Machida<sup>3</sup>, Sung-Koo Kim<sup>4</sup>, and Yeon-Hee Kim<sup>1,2,\*</sup>

접수: 2011년 7월 28일 / 게재승인: 2011년 10월 17일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, a *EXGA* gene code for exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Aspergillus oryzae* was overexpressed and secretory produced in *Saccharomyces cerevisiae*. To overexpress the  $\beta$ -1,3-glucanase, pGInu-exgA and pAInu-exgA plasmids having *GAL10* and *ADHI* promoter, respectively, and exoinulinase signal sequence (*Inu s.s.*) were constructed and introduced in *S. cerevisiae* SEY2102 and 2805. The recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase was successfully expressed and secreted into the medium and the  $\beta$ -1,3-glucanase activity in 2102/pGInu-exgA and 2102/pAInu-exgA strain were 5.01 unit/mL and 4.09 unit/mL, respectively. In the 2805/pGInu-exgA and 2805/pAInu-exgA strain, the  $\beta$ -1,3-glucanase activity showed 3.23 unit/mL and 3.22 unit/mL, respectively. Secretory efficiency in each strain reached 95% to 98%. Subsequently, the recombinant  $\beta$ -1,3-

glucanase was used for ethanol production. Ethanol productivity in 2102/pAInu-exgA strain was 0.83 g/L when pre-treated *Laminaria japonica* which has initial reducing sugar of 1.4 g/L was used as substrate. It is assumed that the polysaccharides of *Laminaria japonica* was effectively saccharified by recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase, resulting in increase of ethanol productivity. These results suggested that recombinant  $\beta$ -1,3-glucanase was efficiently overexpressed and secreted in *S. cerevisiae* SEY2102 as host strain by using *ADHI* promoter-*Inu s.s.* system.

**Keywords:**  $\beta$ -1,3-glucanase, *ADHI* promoter, *GAL10* promoter, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*

#### 1. 서론

최근 지구온난화에 따른 친환경 바이오연료의 공급이 시급해짐에 따라 세계적으로 바이오 연료의 생산량이 급증하고 있다 [1]. 바이오에탄올을 생산할 수 있는 대표적인 바이오매스로는 사탕수수와 옥수수 같은 곡물류와 임업 및 농업 부산물인 목질계 바이오매스 등이 있다. 그러나 이러한 바이오매스는 식량경쟁과 재배면적의 한정성 등으로 인해 생산의 한계가 있다. 이에 따라 상대적으로 풍부한 해조류를 바이오매스로 이용한 바이오 연료의 생산이 대안으로 부각되고 있다. 해조류 바이오매스 중 갈조류는 성장이 빠르고 단위 면적당 생산량이 많다는 장점을 가지고 있으며, 건조중량의 약 30~67%의 탄수화물을 함유하는 특징을 보인다 [1]. 이러한 탄수

<sup>1</sup>동의대학교 바이오물질제어학과

<sup>1</sup>Department of Biomaterial Control (BK21 program)

<sup>2</sup>동의대학교 생명공학과

<sup>2</sup>Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea  
Tel: +82-51-890-2281, Fax: +82-52-890-2632  
e-mail: yeonheekim@deu.ac.kr

<sup>3</sup>일본 산업기술종합연구소 (AIST)

<sup>3</sup>Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ibaraki 305-8566, Japan

<sup>4</sup>부경대학교 생물공학과

<sup>4</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

화물의 주요 구성 성분으로는 alginate와 laminaran 그리고 당 알코올인 mannitol이 있으며, 이들의 성분 비율은 채취 시기 및 중, 산지에 따라 차이를 보인다.

Laminaran은 특히 laminaria 속의 저장성 고분자 다당류로서 갈조류의 성장기에는 함량이 적으나 성숙기에는 건물 중 약 20~30%를 차지하기도 한다 [1]. 주로  $\beta$ -1,3 linked D-glucose로 되어있는 polymer (glucan)로 되어있으며, 약간의  $\beta$ -1,6 결합 분자가 있으며 D-glucose 이외에 미량 (2~5%)의 D-mannitol을 함유하고 있다. Laminaran의 효율적인 사용을 위해서는 laminaran을 glucose로 전환시켜주는 당화 과정이 필수적인데, laminaran을 분해하는 효소로는  $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase와  $\text{endo-}\beta$ -1,3-glucanase가 있다.  $\beta$ -1,3-glucanase는  $\beta$ -1,3-glucan 뿐만 아니라  $\beta$ -1,3-glucoside에서의  $\beta$ -1,3-glucosidic bond의 가수분해를 촉진시키는 효소로 맥주 생산, 과일 및 glucosidic 전구체로부터의 향기로운 화합물 합성 및 발효 등을 포함하여 바이오공정공학 프로세스에 널리 다양하게 사용된다 [2-4]. 또한 맥주 생산 등에 있어서 끓인 맥아의 점성을 줄이고 여과의 문제를 일으키는  $\beta$ -glucan의 고분자 질량을 감소시켜 정제효율과 정제속도의 증가를 도와주는데  $\beta$ -1,3-glucanase가 사용되었다고 보고되고 있다 [5]. 와인 생산에 있어서는 *Saccharomyces cerevisiae*에서  $\beta$ -1,3-glucanase를 과발현시켜 와인의 향미를 증가시키는데에도 사용되었다 [6]. 본 연구에서는 *Aspergillus oryzae* 유래의  $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase를 code하는 *EXGA* 유전자 (ORF 1.3 kb)를 사용하였다. *ExgA* orthologs는 *Magnaporthe grisea* 등의 식물 병원성 곰팡이, *S. cerevisiae* 등의 yeast, *A. oryzae*의 *Aspergilli* 등 다양한 종들에 존재하며, 그 중 *S. cerevisiae*의 *ExgA* ortholog는 많은  $\beta$ -1,3-glucanase를 가지고 있다 [7-11].

효모 균주 *S. cerevisiae*는 고등생물세포와 유사한 번역 후 수식체가 있어 folding, disulfide 결합 등 단백질의 구조와 기능이 천연상태로 생산된다. 또한 효모는 대장균에 비해 유전자 재조합 단백질을 더 효율적으로 세포 밖으로 분비 생산하여 단백질의 분리 정제에 도움을 줄 수 있다 [12]. 현재까지 에탄올 발효에 산업적으로 사용되었던 미생물은 *S. cerevisiae*와 *S. uvarum* 등의 효모 균주이며, 이들은 발효를 위한 기질로서 단당류나 이당류인 glucose, sucrose 등을 선택적으로 이용하기 때문에 다당류를 이용한 에탄올 생산을 위해서는 당화과정이 필수적이며 당화 산물인 포도당을 에탄올로 손쉽게 전환할 수 있을 것이다 [13]. 그러므로 laminaran을 기질로 사용하여 에탄올 생성을 하기 위해서 효모에서 효율적인 당화효소의 생산이 요구된다. 효모에서 glucanase를 과발현시킨 예로는 *S. cerevisiae*의  $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase 유전자, *Bacillus subtilis*  $\text{endo-}\beta$ -1,3-1,4-glucanase 유전자 그리고 *Butyrivibrio fibrisolvens*  $\text{endo-}\beta$ -1,4-glucanase 유전자를 함께 효모에서 과발현시킨 경우가 있었다 [14]. 또한 배지 중에 첨가된 laminaran을 단당화시키기 위해서는  $\beta$ -1,3-glucanase가 배지내로 분비되어야 하며, 생산된  $\beta$ -glucanase의 효율적 정제를 위해서도 배지내로의 분비생산이 필요한데 효모로부터 재조합 단백질의 분비생산을 위해서는 효모의 분비 서열을 이용하는 것이 효율적이다 [12]. 따라서 본 연구에서는 *Kluyveromyces marxianus* exoinulinase 유전자 (*INU1*) [15]

의 분비 신호 서열을 이용하여 *S. cerevisiae* 형질 전환체로부터 배지내로  $\text{exo-}\beta$ -1,3-glucanase의 효율적인 분비 생산을 시도하였다. 또한  $\beta$ -1,3-glucanase가 재조합 된 효모균주에서 *GAL10* promoter 또는 *ADH1* promoter를 사용하여  $\beta$ -1,3-glucanase의 성공적인 과발현계를 구축하여 최적 효모균주 및 promoter를 선별하고 최대 분비활성을 보이는 발현시스템을 구축하여 에탄올 생산에도 이용하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 사용균주 및 plasmids

Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *Escherichia coli* 숙주세포는 DH5 $\alpha$ 를 사용하였고, *A. oryzae* 유래의 *EXGA* 유전자 [11] 발현을 위한 효모 숙주세포는 invertase 결손 변이주 (*suc2- $\Delta$* ) 및 uracil 영양요구성 변이주 (*ura3-52*)이며 haploid인 *S. cerevisiae* SEY2102 [12,16]와 *S. cerevisiae* 2805 [17]를 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*에서 *EXGA* 유전자의 발현을 위해 유도성 promoter인 *GAL10* promoter와 구성적 promoter인 *ADH1* promoter를 이용하였으며 재조합 단백질의 분비 생산을 위한 발현계 구축을 위해 *K. marxianus* exoinulinase signal sequence (*INU1* 분비서열)를 포함하는 pYInu-CT1 vector [12]와 pVT-inuCT1 vector를 사용하였다. 이들 plasmid는 선택표지로 *URA3* 유전자를 함유하고 있어 uracil 영양요구성 변이주 효모세포 (*ura3-52*)를 숙주세포로 사용할 수 있다.

### 2.2. 재조합 plasmid 구축 및 형질전환

효모에서 *INU1* 분비 서열 (*Inu s.s*)과 *GAL10* promoter를 이용하여 *EXGA*를 발현시키기 위한 plasmid 구축은 pET21b vector (Novogen, USA)에 *EXGA* 유전자가 도입된 pET21b-*exgA* plasmid를 주형으로 primer-1 (5'-CTCAGATCTTTA CCCCTTTTGCTCT-3')과 primer-2 (5'-GCTCTCGAGAA GCTTTTAGCACTGCTTAGGGA-3')를 이용하여 *EXGA* 유전자를 증폭하였다. 얻어진 단편은 *Bgl* II/*Sal* I으로 처리하고 *Bgl* II/*Xho* I 제한효소에 의해 pYInu-CT1 [12]의 *CELA* 유전자를 *EXGA* 유전자로 치환시켜 pGInu-*exgA*를 구축하였다. *INU1* 분비 서열과 *ADH1* promoter를 이용한 *EXGA* 유전자의 발현을 위한 plasmid 구축은 pGInu-*exgA* plasmid를 주형으로 primer-2와 primer-3 (5'-GCTTCTAGAATGAAGTTA GCATACT-3')를 이용하여 *INU1* 분비 서열을 포함한 *EXGA* 유전자를 증폭하였다. 얻어진 단편은 *Hind* III/*Xba* I으로 처리하고 동일한 제한효소를 사용하여 pVT-inuCT1의 *Inu s.s-CELA* 유전자 대신에 *Inu s.s-EXGA* 유전자가 치환된 pAlnu-*exgA*를 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에서 증폭, 추출되었고, *S. cerevisiae*의 형질전환은 salmon testes 유래의 single-stranded carrier DNA를 사용하는 고효율 효모 형질전환법 [18]을 이용하였다.

### 2.3. 배지 조성 및 배양조건

*S. cerevisiae* 균주의 증식배지로는 YPD 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)를 사용하였으며 *GAL10* promoter

를 사용한 유전자 발현 유도 시에는 YPDG 배지 (1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose)를 사용하였고, *ADHI* promoter 하류의 유전자 발현 시에는 YPD 배지를 사용하였다. 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 YNBCAD 배지 (0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 0.5% casamino acid, 2% glucose)를 사용하였다. 재조합 효모 균주는 5 mL YPD 배지에서 16~24시간 동안 전배양 한 후 250 mL flask (working volume: 50 mL)에 접종 (initial OD<sub>600</sub> 0.1) 하여 30°C, 190 rpm에서 48시간 배양하였다. 다시마 전처리 용액을 이용한 에탄올 발효에는 다시마 분말 1 g에 1 N HCl 산 처리 후 분해효율을 높이기 위하여 121°C에서 30분 동안 고압 멸균하였다. 전처리 한 다시마 용액은 NaOH를 이용하여 pH 7.1로 중화하였으며, 최종 부피를 50 mL로 동일하게 조절하였다. 배지는 추가적인 기질의 첨가 없이 산 전처리 한 다시마만을 이용하였으며, YPD배지에서 전배양한 균주를 500 mL flask (working volume: 50 mL)에 접종하여 에탄올 발효를 유도하였다.

#### 2.4. 균체 농도 및 Plasmid 안정성

균체 농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계 (Shimadzu UV-1601, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 약 100개의 colony를 YNBCAD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비 (백분율)로 측정하였다.

#### 2.5. MUG plate assay

각각의 효모 형질전환체에 대하여 높은 β-1,3-glucanase 활성을 가진 형질전환체를 선별하기 위해 plate assay를 수행하였다. β-1,3-glucanase의 plate assay를 위해 MUG (4-Methylumbelliferyl-β-D-glucopyranoside) (Fluka Analytical, USA) [14,19]가 기질로 사용되었고, YPD 평판배지에서 자란 형질전환체에 0.04% MUG을 1 mL 스프레이 한 후 37°C에서 10분간 반응시켜 UV상에서의 발광으로 분비활성을 확인하였다.

#### 2.6. 균체분획 및 β-1,3-glucanase 활성 측정과 분비효율

세포내·외의 활성을 비교하기 위하여 일정시간마다 채취한 배양액을 13000 rpm으로 원심분리하여 배양 상등액과 균체 침전물로 나누었다. 세포내 분획을 얻기 위해 균체 침전물을 zymolyase 100T (Bioshop®, Canada Inc., USA)와 20 mM PMSF solution을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응 시킨 후 3분 동안 vortexing하고 원심분리하여 상등액을 분리 한 다음 현미경으로 관찰하여 세포 파쇄 여부를 확인하였다. β-1,3-glucanase 활성 측정은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법을 이용하여 정량분석하였다 [20,21]. 효소 활성 측정을 위해 1% laminaran (Sigma, UK)을 기질로 사용하였으며 효소용액을 첨가해서 40°C에서 10분간 반응 시킨 후 DNS용액을 첨가하였다. 3분간 boiling한 뒤 ice에 5분간 cooling 후에 멸균수 600 μL를 첨가하여 흡광도 550 nm에서 활성을 측정하였다. 이때 효소의 활성은 1% laminaran을 이용하여 40°C에서 1분당 1 μmole의 glucose를 생산하는 효소의 양을 1 unit로

정의하였으며 표준적정곡선으로 0.2% glucose를 사용하였다. 각 효소들의 분비효율 (secretion efficiency)은 전체 효소 활성 (세포외 활성 + 세포내 활성)에 대한 세포외 효소 활성 비를 백분율로 나타내었다.

#### 2.7. SDS-PAGE에 의한 단백질 확인

단백질 확인을 위해 Laemmli법 [22]에 따라 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)의 존재 하에서 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)를 수행하였다. 각각의 형질전환체에 대해 배양 상등액 100 μL를 동결건조법을 사용하여 약 20 μL 정도로 농축하여 15 μL를 loading하였으며, 전기영동이 끝난 SDS-gel은 Coomassie Brilliant Blue R로 염색하여 단백질을 확인하였다.

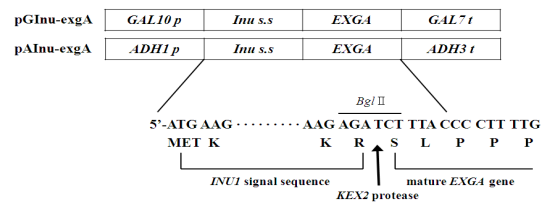
#### 2.8. 에탄올 생산성 측정

생성된 에탄올의 정량을 위해 배양된 시료를 원심분리 후 상등액을 gas chromatograph (GC)를 이용하여 분석하였다. GC는 HP 5890 series II를 사용하였고, 컬럼은 HP-FFAP capillary column (Agilent technologies, Canada, Cross-Linked PEG-TPA 30 m/0.25 mm/0.25 μL)을 사용하였다. 이동상은 N<sub>2</sub>를 0.6 mL/min 유속으로 사용하였으며, 주입구 온도는 150°C, 검출기 온도 200°C, 승온 조건은 50°C (1.4 min)/10°C/min/60°C (1 min)/(25°C/min)/100°C (1 min)/(50°C/min)/150°C (1 min)이었다. 분리비는 70 : 1로 했으며 내부 표준 물질로 1% (v/v)의 isopropanol을 이용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. β-1,3-glucanase 발현 재조합 plasmid의 구축

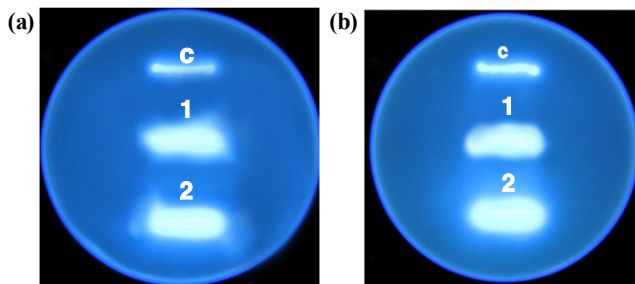
효모 유래 분비 서열을 이용하여 *EXGA* 유전자를 유도적, 구성적으로 발현·분비시키기 위하여 *GAL10* promoter와 *ADHI* promoter 하류에 각각 exoinulinase signal sequence (*Inu s.s.*; 23개 아미노산 잔기로 구성; MKLAYSLLLPLAG VSASVINYKR)와 *EXGA* 유전자를 cloning하여 pGInu-exgA (7.6 kb)와 pAInu-exgA (8.1 kb) plasmid를 구축하였다. *Inu s.s.*와 *EXGA* 유전자와의 연결 부위의 서열은 5'-AAGA GATCTTTACCCCTTTTG-3'로서 *Bgl* II로 절단하여 연결함으로써 KRSLLP의 아미노산 서열을 가지게 되어, 번역 후 분비 과정 중 *KEX2* protease에 의해 절단되어 mature form의 β-glucanase가 분비 될 수 있다 (Fig. 1) [12].



**Fig. 1.** Schemes of expression plasmid for β-1,3-glucanase, pGInu-exgA and pAInu-exgA. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence indicate the *INU1*s.s.-*exgA* junction region. The arrow indicate a cleavage site by the *KEX2* protease.

### 3.2. 효모 형질전환체 선별 및 MUG assay

구축된 pGInu-exgA 및 pAInu-exgA를 uracil 영양요구성 변이주인 *S. cerevisiae* SEY2102와 *S. cerevisiae* 2805 균주에 각각 형질전환하여 YNBCAD배지에서 1차 선별하였다. 각 10개의 형질전환체를 선별하여 *EXGA* 유전자의 유무를 확인해보기 위해 colony PCR을 수행한 결과, 모든 형질전환체에서 1.3 kb의 *EXGA* 유전자가 증폭되었음을 알 수 있었다 (data not shown). 다음으로 각 10개의 형질전환체들에 대해 MUG plate assay를 수행하였다. 그 결과 숙주세포인 SEY2102와 2805 균주에서도 MUG기질로부터 UV형광이 관찰되었는데, 이는 *S. cerevisiae*의  $\beta$ -1,3-glucanase를 코드하는 자체 *EXGI* 유전자에 의한 활성으로 생각된다. 그러나, 재조합 *EXGA* 유전자가 발현된 각각의 형질전환주에서는 숙주세포에 비해 상대적으로 크고 선명한 분해환이 나타나 선별된 각각의 형질전환주에서 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase가 성공적으로 발현·분비되었음을 확인할 수 있었다. 10개 중 대표적인 형질전환체에 대한 MUG assay 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 다음으로 각 10개의 형질전환주 중 5개씩 선별하여 5 mL test tube culture를 실시한 결과 최저 1.79 unit/mL에서 최고 3.16 unit/mL까지의  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 보였으며 (data not shown) 그 중 각 형질전환체에 대해 가장 높은 활성을 가지는 균주를 선별하여 다음 실험을 수행하였다.

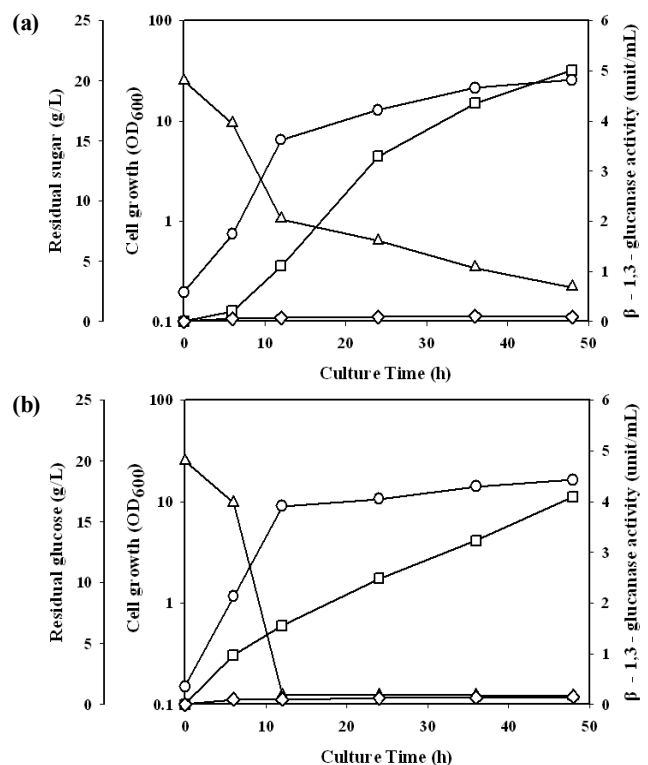


**Fig. 2.** Active staining of yeast transformants harboring *EXGA* gene grown in YPD (a) and YPDG (b) plate. (a) C: SEY2102, 1: SEY2102/pGInu-exgA, 2: SEY2102/pAInu-exgA. (b) C: 2805, 1: 2805/pGInu-exgA, 2: 2805/pAInu-exgA. The  $\beta$ -1,3-glucanase activity was detected by spraying the plates with 0.04% MUG in sodium acetate buffer and incubating for 10 min at 37°C before UV illumination.

### 3.3. $\beta$ -1,3-glucanase 과발현 및 분비생산

선별된 균주의 flask 배양을 통해 균체증식,  $\beta$ -1,3-glucanase의 발현율과 분비 국제성 및 plasmid 안정성 등을 분석하여 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase 대량 분비생산을 위한 최적의 숙주-벡터계를 선택하고자 하였다. Host별로  $\beta$ -1,3-glucanase의

활성을 측정해 본 결과, 배양 48시간째 *S. cerevisiae* SEY2102/pGInu-exgA에서는 세포밖 배양상등액에서 5.01 unit/mL, 세포내에서 0.09 unit/mL의 최대 효소활성을 보였고, SEY2102/pAInu-exgA에서는 세포밖 배양상등액에서 4.09 unit/mL, 세포내에서 0.15 unit/mL의 효소활성을 보였으며 각각의 균주에서 98%와 96%의 분비효율을 나타내었다 (Fig. 3). *S. cerevisiae* 2805/pGInu-exgA에서는 세포밖 배양상등액에서 3.23 unit/mL, 세포내에서 0.16 unit/mL의 최대 효소활성을 보였고, 2805/pAInu-exgA에서는 세포밖 배양상등액에서 3.22 unit/mL, 세포내에서 0.13 unit/mL의 효소활성을 보였으며 각각의 균주에서 95%와 96%의 분비효율을 나타내었다 (Fig. 4). 이는 *INUI* 분비 서열을 이용하여 분비발현시킨 lipocortin-I (80% 분비효율)와 levansucrase (50% 분비효율),  $\alpha$ -antitrypsin (70% 분비효율) 그리고 endoglucanase A (73% 분비효율)에 비해서도 높은 분비효율을 나타냄을 알 수



**Fig. 3.** Time profiles of cell growth,  $\beta$ -1,3-glucanase activity and residual sugar in 50 mL flask culture of SEY2102/pGInu-exgA (a) and SEY2102/pAInu-exgA (b). Symbols: (○), cell growth; (□), extracellular enzyme activity; (◇), intracellular enzyme activity; (△), Residual sugar.

**Table 1.** Comparison of cell growth,  $\beta$ -1,3-glucanase activity, specific growth rate ( $\mu$ ), specific activity, secretion efficiency and plasmid stability in yeast *S. cerevisiae* transformants

Transformants	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	$\beta$ -1,3-glucanase activity (unit/mL)		$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	specific activity (unit/mL/OD <sub>600</sub> )	Secretion efficiency (%)	Plasmid stability (%)
		Extracellular	Intracellular				
SEY2102/pGInu-exgA	26	5.01	0.09	0.34	0.20	98	76
SEY2102/pAInu-exgA	16	4.09	0.15	0.36	0.25	96	71
2805/pGInu-exgA	24	3.23	0.16	0.34	0.14	95	55
2805/pAInu-exgA	14	3.22	0.13	0.34	0.24	96	66

있었고 β-1,3-glucanase 유전자의 발현에 *INUI* 분비서열이 아주 효과적임을 알 수 있었다 [23-25]. 이들 형질전환체에서의 plasmid 안정성을 확인한 결과 SEY2102에서는 pGInu-exgA plasmid가 76%, pAInu-exgA plasmid가 71% 였으며 2805에서는 pGInu-exgA plasmid가 55%, pAInu-exgA plasmid가 66%의 안정성을 보였다 (Table 1). 결론적으로 SEY2102 균주가 2805 균주보다 β-1,3-glucanase의 생산에 적합함을 알 수 있었다. 또한, SEY2102 균주에서는 promoter별로 β-1,3-glucanase의 활성 차이가 나서 *GAL10* promoter가 β-1,3-glucanase의 생산에 적합한 것으로 보여지고, 2805 균주에서는 promoter별로 활성의 차이가 거의 나지 않았다. 그러나 세포농도로 효소활성을 나눈 specific activity를 비교해 보았을 때 두 균주 모두 *ADHI* promoter가 더 효율적임을 알 수 있었으며, *GAL10* promoter의 경우 공정상 galactose가 필요하기 때문에 대량생산등의 공정에는 *ADHI* promoter가 더 적합하다고 판단되어진다.

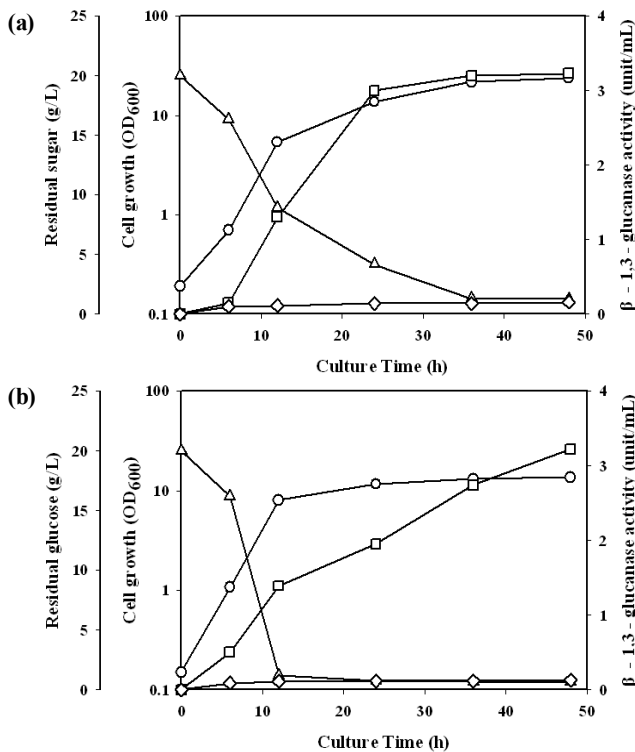


Fig. 4. Time profiles of cell growth, β-1,3-glucanase activity and residual sugar in 50 mL flask culture of 2805/pGInu-exgA (A) and 2805/pAInu-exgA (B). Symbols: (○), cell growth; (□), extracellular enzyme activity; (◇), intracellular enzyme activity; (△), Residual sugar.

### 3.4. β-1,3-glucanase 단백질 확인 및 에탄올 생산성

각 형질전환체에서 β-1,3-glucanase의 분비단백질을 확인하기 위해 각각의 배양상등액을 농축하여 SDS-PAGE를 수행하였다. Fig. 5의 결과에서 처럼 숙주 세포인 SEY2102와 2805 균주에 비해 각 형질전환체에서는 약 43 kDa의 β-1,3-glucanase의 단백질이 확인되었고, 배양상등액의 다른 분비 단백질에 비해 과발현 분비되었음을 확인할 수 있었다. 다음으로 각각의 형질전환체를 이용하여 에탄올 생산성을 조사해

보았다. 먼저 YPD (2% glucose)배지에 48시간 배양한 후 에탄올을 농도를 측정한 결과 SEY2102/pAInu-exgA에서는 9.6 g/L의 에탄올을 생산하였고, 2805/pAInu-exgA에서는 9.5 g/L의 에탄올을 생산함을 알 수 있었다. 또한, 에탄올 생산에 적합한 SEY2102/pAInu-exgA를 이용하여 갈조류와 같은 해양 바이오 매스를 사용한 바이오 에탄올 생산성의 유효성을 알아보았다. 먼저 전처리한 다시마를 사용하여, 다른 기질의 추가적인 첨가 없이 48시간 배양하였다. 배양 후 에탄올 생산성을 조사한 결과, 0.83 g/L의 에탄올이 생산됨을 알 수 있었고, 전처리한 다시마의 환원당이 1.4 g/L임을 감안하면, 분비된 β-1,3-glucanase에 의해 다시마의 다당이 분해되어 에탄올 생산성이 증가되었음을 알 수 있다. 실제로 *EXGA* 유전자를 효모염색체내에 multiple integration시켜 과발현시킨 균주에서는 1.21 g/L의 에탄올을 생산시킨 예도 있어, 전처리한 다시마의 부분적인 당화에 재조합 β-1,3-glucanase가 효과적임을 확인 할 수 있었다 (unpublished result).

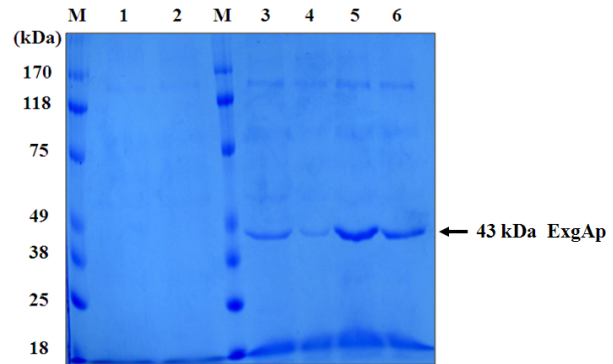


Fig. 5. SDS-PAGE analysis of β-1,3-glucanase expressed from each transformant. M: Color protein molecular markers, Lane 1: SEY2102, lane 2: 2805, lane 3: SEY2102/pAInu-exgA, lane 4: 2805/pAInu-exgA, lane 5: SEY2102/pGInu-exgA, lane 6: 2805/pGInu-exgA.

이상의 결과로 본 연구에서 최적화한 재조합 β-1,3-glucanase의 과발현 및 분비 시스템을 이용하여 산업적으로 유용한 β-1,3-glucanase의 대량 생산 뿐만 아니라 에탄올 발효에의 응용까지 그 이용범위가 확대될 것이라 기대된다.

## 4. 결론

본 연구는 *Aspergillus oryzae* 유래 exo-β-1,3-glucanase를 코딩하는 *EXGA* 유전자를 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에 재조합하여 과발현 분비 생산 시스템을 구축하고 에탄올 생산에의 응용에 이용하고자 하였다. *GAL10* promoter와 *ADHI* promoter를 이용한 pGInu-exgA와 pAInu-exgA plasmid를 구축하고, 이를 *S. cerevisiae* SEY2102와 2805에 각각 형질전환시켜 host별, promoter별로 β-1,3-glucanase활성을 비교하였다. MUG plate assay를 통해 활성형의 β-1,3-glucanase가 배지밖으로 분비됨을 확인하였고, 50 mL flask culture결과, SEY2102/pGInu-exgA에서는 5.01 unit/mL, SEY2102/pAInu-exgA에서는 4.09 unit/mL의 β-glucanase activity를 나타내

었고 2805/pGInu-exgA에서는 3.23 unit/mL, 2805/pAInu-exgA에서는 3.22 unit/mL의 activity를 나타내었으며, 각각의 형질전환체에서 95~98%의 높은 분비효율을 보임을 알 수 있었다. 갈조류인 다시마를 이용한 에탄올 발효에서 SEY2102/pAInu-exgA 균주는 0.83 g/L의 에탄올을 생성하였고, 전처리한 다시마의 환원당이 1.4 g/L임을 감안하면, 분비된  $\beta$ -1,3-glucanase에 의해 다시마의 다당이 분해되어 에탄올 생산성이 증가되었음을 알 수 있었다. 이상의 결과로 본 연구에서는 재조합  $\beta$ -1,3-glucanase의 과발현 및 분비생산에 *S. cerevisiae* SEY2102가 숙주세포로 적합하고 *ADHI* promoter-*Inu s.s* 시스템이 유용함을 확인하였다.

## 감사

본 연구는 국토해양부 소관 해양생명공학기술개발 사업의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 본 연구에 참여한 김민정은 교육부의 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

## References

- Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
- Pitson, S. M., R. J. Seviour, and B. M. McDougall (1993) Noncellulolytic fungal beta-glucanases: their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Technol.* 15: 178-192.
- Guegen, Y., P. Chemardin, G. Janbon, A. Arnaud, and P. Galzy (1996) A very efficient  $\beta$ -glucosidase catalyst for the hydrolysis of flavor precursors of wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2336-2340.
- Shoseyov, O., A. B. Bravdo, R. Ikan, and I. Chet (1990) Immobilized endo- $\beta$ -glucosidase enriches flavor of wine and passion fruit juice. *J. Agric. Food Chem.* 27: 1973-1976.
- Vasserot, Y., A. Arnaud, and P. Galzy (1995) Monoterpenyl glycosides in plants and their biotechnological transformation. *Acta. Biotechnol.* 15: 77-95.
- Gil, V. J., P. Manzanares, S. Salvador Genoves, S. Valles, and L. Gonzalez-Candelas (2005) Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 57-68.
- Kim, H., J. H. Ahn, J. M. Grolach, C. Caprari, J. S. Scott-Craig, and J. D. Walton (2001) Mutational analysis of beta-glucanase genes from the plant-pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14: 1436-1443.
- Vazquez de Aldana, C. R., J. Correa, P. San Segundo, A. Bueno, A. R. Nebreda, E. Mendez, and F. del Rey (1991) Nucleotide sequence of the exo-1,3-beta-glucanase encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 97: 173-182.
- van de Rhee, M. D., O. Mendes, M. W. Werten, H. J. Huizing, and H. Mooibroek (1996) Highly efficient homologous integration via tandem exo-beta-1,3-glucanase genes in the common mushroom. *Agaricus bisporus. Curr. Genet.* 30: 166-173.
- Jiang, B., A. F. Ram, J. Sheraton, F. M. Klis, and H. Bussey (1995) Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Mol. Gen. Genet.* 248: 260-269.
- Tamano, K., Y. Satoh, T. Ishii, Y. Terabayashi, S. Ohtaki, M. Sano, T. Takahashi, Y. Koyama, O. Mizutani, K. Abe, and M. Machida (2007) The  $\beta$ -1,3-exoglucanase gene *exgA* (*exg1*) of *Aspergillus oryzae* is required to catabolize extracellular glucan, and is induced in growth on a solid surface. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71: 926-934.
- Lim, M. Y., J. W. Lee, J. H. Lee, Y. H. Kim, J. H. Seo, and S. W. Nam (2007) Secretory overexpression of clostridium endoglucanase A in *Saccharomyces cerevisiae* using *GAL10* promoter and exoinulinase signal sequence. *J. Life Science* 17: 1248-1254.
- Choi, G. W., H. W. Kang, Y. R. Kim, and B. W. Chung (2008) Comparison of Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* CHY1077 and *Zymomonas mobilis* CHZ2501 from Starch Feedstocks. *Kor. Chem. Eng. Res.* 46: 977-982.
- van Rensburg, P., W. H. van Zyl, and I. S. Pretorius (1997) Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo- $\beta$ -1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo- $\beta$ -1,4-glucanase gene in yeast. *J. Biotechnol.* 55: 43-53.
- Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. V. Beeumen and J. Vandenhoute (1991) Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS J.* 289: 64-68.
- Emr, S. D., R. Schekman, M. C. Flessel, and J. Thorner (1983) An *MFa1-Suc2* ( $\alpha$ -factor invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7080-7084.
- Park, H. S., H. C. Kim, D. H. Shin, J. K. Kim, and S. W. Nam (2005) Expression of *Thermomonoepora fusca* exoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* and its application to cellulose hydrolysis. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33: 267-273.
- Gietz R. D. and R. H. Schiestl (1995) Transforming yeast with DNA. *Methods Mol. Cell. Biol.* 5: 225-269.
- Jijakli, M. H. and P., Lepoivre (1998) Characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology* 88: 335-343.
- Bara, M. T. F., A. L. Lima, and C. J. Ulhoa (2003) Purification and characterization of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 219: 81-85.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Chung, B. H., S. W. Nam, B. M. Kim, and Y. H. Park (1996) Highly-efficient secretion of heterologous protein from *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal peptide. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 473-479.
- Kang, H. A., S. W. Nam, K. S. Kwon, B. H. Chung, and M. H. Yu (1996) High-level secretion of human  $\alpha$ 1-antitrypsin form *Saccharomyces cerevisiae* using inulinase signal sequence. *J. Biotechnol.* 48: 15-24.
- Lim, C. K., Y. K. Kim, K. H. Kim, C. H. Kim, S. K. Rhee, and S. W. Nam (2004) Expression and secretion of *Zymomonas mobilis* levansucrase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Life Sci.* 14: 429-434.