

## 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*에서 Invertase의 발현에 대한 Sucrose의 영향

임형권 · 김기홍 · 서진호\*

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재 연구센터

### Effects of Sucrose on Invertase Expression in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Lim, Hyung-Guen, Kee-Hong Kim and Jin-Ho Seo\*

Department of Food Science and Technology, Research Center for  
New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

**Abstract** — The expression pattern of the cloned *SUC2* gene in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* was investigated in a two-stage culture. The recombinant yeast grown in a glucose medium where the *SUC2* gene was repressed was harvested and then resuspended in a sucrose medium to induce invertase expression. The maximum activity of 10 units was obtained in a medium containing 2 g/l sucrose as a carbon source at 30°C. The oscillatory behavior of invertase activity in response to glucose concentrations in the second stage was observed. This effect can be attributed to a series of events: invertase expression from the *SUC2* gene, sucrose hydrolysis to glucose and fructose by invertase, *SUC2* repression by high glucose concentration, invertase induction as a result of depletion of glucose used for the yeast growth. The invertase activity was increased by 72.5% when growth temperature changed from 30°C to 35°C.

유전자 재조합기술의 발전에 힘입어 각종 의약품 단백질을 비롯한 산업용 효소를 보다 경제적으로 생산할 수 있게 되었다. 유전자세포 발효공정의 특징은 외부 유전자의 발현속도와 숙주세포의 생육속도가 서로 반비례 관계에 있다는 것이다(1,2). 외부유전자를 대량 발현시킬 경우 숙주세포의 성장속도가 감소하며 외부유전자의 안정성이 떨어져 전체수율이 현저하게 저하된다. 이것은 외부유전자와 세포자체의 염색체가 세포내 한정된 생합성 기구를 경쟁적으로 공유하기 때문이다. 따라서 생산성을 향상시키기 위해서는 유전자 발현시기와 균체생육시기를 구분할 필요가 있다. 이러한 목적으로 유전자 조작단계에서 제어프로모터(regulated promoter)를 도입하여 외부 유전자 발현속도를 환경인자의 조절을 통하여 제어할 수 있다.

효모를 숙주세포로 하는 경우 주로 사용되는 제어

프로모터는 GAL, PHO5, SUC2 등의 프로모터이다(3). 이중 *SUC2* 유전자에 관한 연구가 많이 진행되어 본 연구에서도 *SUC2* 유전자를 이용하였다. 효모의 *SUC2* 유전자는 프로모터와 구조유전자로 이루어져 있으며, 두 가지 형태의 invertase를 생산하는 암호를 가지고 있다(4). 한 가지는 1.9 kb RNA의 판독(translation)에 의해 생성되는 효소로서 glycosylation 되어 있고 세포간막으로 분비되며 포도당에 의해 그 합성이 조절된다. 다른 한 가지는 1.8 kb RNA의 판독에 의해 생성되는데, *SUC2* 유전자의 신호서열(signal sequence)의 중간에서 전사가 시작되었기 때문에 분비가 되지 못하고, 따라서 glycosylation 되지 않으며 세포질내에 남게 되는 효소이다(4). *SUC2* 프로모터는 포도당에 의해 발현이 억제(repression)되는 반면 포도당이 없는 경우 해제(derepression)되어 invertase를 생산한다(5). 또한 단백질 분비에 관여하는 신호부위(signal sequence)도 갖고 있기 때문에 생성된 invertase를 효모의 단백질분비 과정을 거쳐

**Key words:** Recombinant yeast, invertase, *SUC2*

\*Corresponding author

세포간막(periplasm)으로 이동시킨다(5).

*SUC2* 유전자의 발현과 단백질 분비에 관한 연구는 포도당을 탄소원으로 하여 여러 배양형태에서 이루어졌다. 회분식 배양에서 *SUC2* 프로모터는 포도당 농도 2 g/l 이하에서 발현이 유도됨을 발견하였고, 포도당농도가 *SUC2* 유전자의 발현을 엄격하게 제어하고 있음이 밝혀졌다(6). 그리고 비통기적 회분배양이 통기적 회분배양보다 invertase 생산에 유리하였으며, 유기식 배양을 통하여 배지 중의 포도당 농도를 조절한 결과 균체생산을 억제하고 invertase 생산성을 향상시켰다는 보고가 있다(7). 또한 연속 배양기에서는 잔류 포도당 농도 50 mg/l에서 *SUC2* 유전자의 발현이 최대로 되었다(8). 특기할 것은 배양기 형태에 따라 *SUC2* 유전자의 발현 양상이 달라진다는 것이다. *SUC2* 유전자에서 유래된 신호부위에 의한 단백질의 분비에 관한 연구결과도 보고되었다(9, 10).

본 연구에서는 탄소원으로 사용되는 sucrose의 농도가 *SUC2* 유전자의 발현속도에 미치는 영향을 살펴보았다. 포도당이 아닌 다른 탄소원의 분해효소를 생성하는 유전자는 대부분 유도형 프로모터(inducible promoter)를 갖고 있으나 *SUC2* 유전자에 함유된 프로모터는 비유도형(noninducible)으로 알려져 있다. 따라서 sucrose와 *SUC2* 유전자의 발현속도와의 관계를 규명하는 것은 흥미있는 일이라 생각된다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에서 사용한 균주는 invertase의 구조유전자인 *SUC2* 부위 전체를 가지고 있는 plasmid pRB58로 형질전환시킨 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 (MAT  $\alpha$  ura3-5 leu2-3, -112, his4-519)이다(4). 숙주세포는 염색체상의 *SUC2* 유전자가 완전히 제거되었고, invertase 구조유전자와 연관된 다른 어떤 유전자(*SUC1*, *SUC3-SUC7*)도 포함하고 있지 않아서 그 자체로는 invertase를 생산할 수 없다.

2  $\mu$ m plasmid가 기초가 된 pRB58은 선별표식(selection marker)으로 사용되는 *URA3* 유전자를 가지고 있고, 생성단백질을 세포질 밖으로 분비시키는 역할을 하는 신호부위(signal sequence)가 포함된 *SUC2* 유전자를 가지고 있다.

### 배지 및 배양조건

모든 실험은 선별배지(selective SD medium)에서 실시하였는데(5), 0.76%(w/v)의 Yeast Nitrogen Base w/o amino acid(Difco), 0.5%(w/v)의 casamino acid(Difco)가 포함되어 있고, 탄소원으로는 2%(w/v) 포도당 또는 리터당 2g과 5g의 sucrose를 사용하였다.

발효조(한국발효기)는 working volume을 2 리터로 하여 사용하였다. pH는 전 발효기간 동안 0.5 M NaOH와 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 5.5로 유지시켰다. 온도는 실험에 따라 30°C와 35°C로 유지하였다.

### Transition 실험

세포를 우선 초기농도 2% 포도당을 함유하는 선택배지인 SD 배지에서 배양한 후 포도당의 농도가 절반 가량으로 떨어졌을 때 원심분리기를 이용하여 무균적으로 회수한 다음 배지 1리터당 2g 및 5g의 sucrose가 포함된 SD 배지(앞의 배지와 조성이 같으나 탄소원이 포도당에서 sucrose로 교체되었음)로 옮겼다(7). 첫번째 발효조에서 회수된 효모는 배지 중의 높은 포도당 농도로 인하여 invertase의 발현이 억제된 상태이다.

### 분석방법

포도당 농도는 효소적 비색정량법(Sigma, Glucose Procedure No. 510)을 이용하여 측정하였으며, sucrose 농도는 시료 중의 sucrose 0.1 ml과 0.5 M의 HCl 0.9 ml를 섞어 100°C에서 6분간 완전히 산 가수분해시킨 후의 포도당 농도를 구한 다음 아래와 같이 산 가수분해시키지 않은 시료의 포도당 농도를 감하여 sucrose와 포도당의 mole비를 곱해주어서 구하였다.

### Sucrose 농도

$$= \left[ \frac{\text{산 가수분해후 포도당의 농도} - \text{산 가수분해전 포도당의 농도}}{\text{포도당의 농도}} \right] \times 1.9$$

과당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약으로 시료의 전 환원당의 농도를 구한 후 이 값에 포도당의 농도를 감하여 구하였다.

Invertase의 역가는 효모세포 자체를 이용한 분석 방법으로 측정하였다(10). 배양액 1.5 ml를 원심분리하여 세포를 회수한 다음 증류수로 2번 세척한 후 증류수로 적당히 희석하였다. 37°C 항온수조에서 세포의 희석액 0.5 ml에 sucrose 용액(100g sucrose/l acetate-acetic acid buffer 0.010 M, pH 4.6) 2.5 ml를 첨가하여 효소반응을 시킨 후 형성된 환원당을 DNS 3 ml를 첨가하여 정량하였다. Invertase의 활성도는

sucrose로부터 pH 4.6, 37°C 에서 1분당 1  $\mu$ mole의 포도당을 생성하는 효소의 양을 1 unit라고 정의하였다. 세포의 농도는 배양액의 탁도를 600 nm에서 spectrophotometer(PYE UNICAM PU8600 UV/VIS)를 이용하여 측정된 흡광도로 표시하였다.

### 결과 및 고찰

대부분의 경우 기질은 그 효소의 inducer로서 작용을 한다고 알려져 있다(12). Invertase의 기질인 sucrose는 이당류로서 일반적으로 미생물에 의해 직접 섭취되지 않고 가수분해에 의하여 단당류로 분해된 다음 섭취되는 것으로 여겨지고 있다. 그러나 Eugenio (1982)에 의해 sucrose는 proton/sucrose symport에 의한 active transport로 효모에 의해 섭취됨이 밝혀졌고, 이 결과는 sucrose가 유전자 수준에서 invertase 발현에 직접 관여할 수 있음을 시사한다(12). Sucrose의 invertase 생성효과를 보기 위해 배지중 탄소원으로서 배양 초기 포도당과 sucrose 농도의 비율을 100% 포도당, 100% sucrose, 그리고 포도당과 sucrose의 비율을 1:1로 한 배지에서 invertase의 발현을 비교한 결과 최대비역가 값이 각각 6.2, 8.6, 7.6으로서 sucrose의 비율이 높을수록 높아졌다(Fig. 1).

탄소원으로서의 sucrose의 역할과 적정 농도를 알기 위해서 효모를 30°C 에서 2% 포도당 배지에서 키운 다음 발현이 억제된 세포들을 회수하여 다시 같은

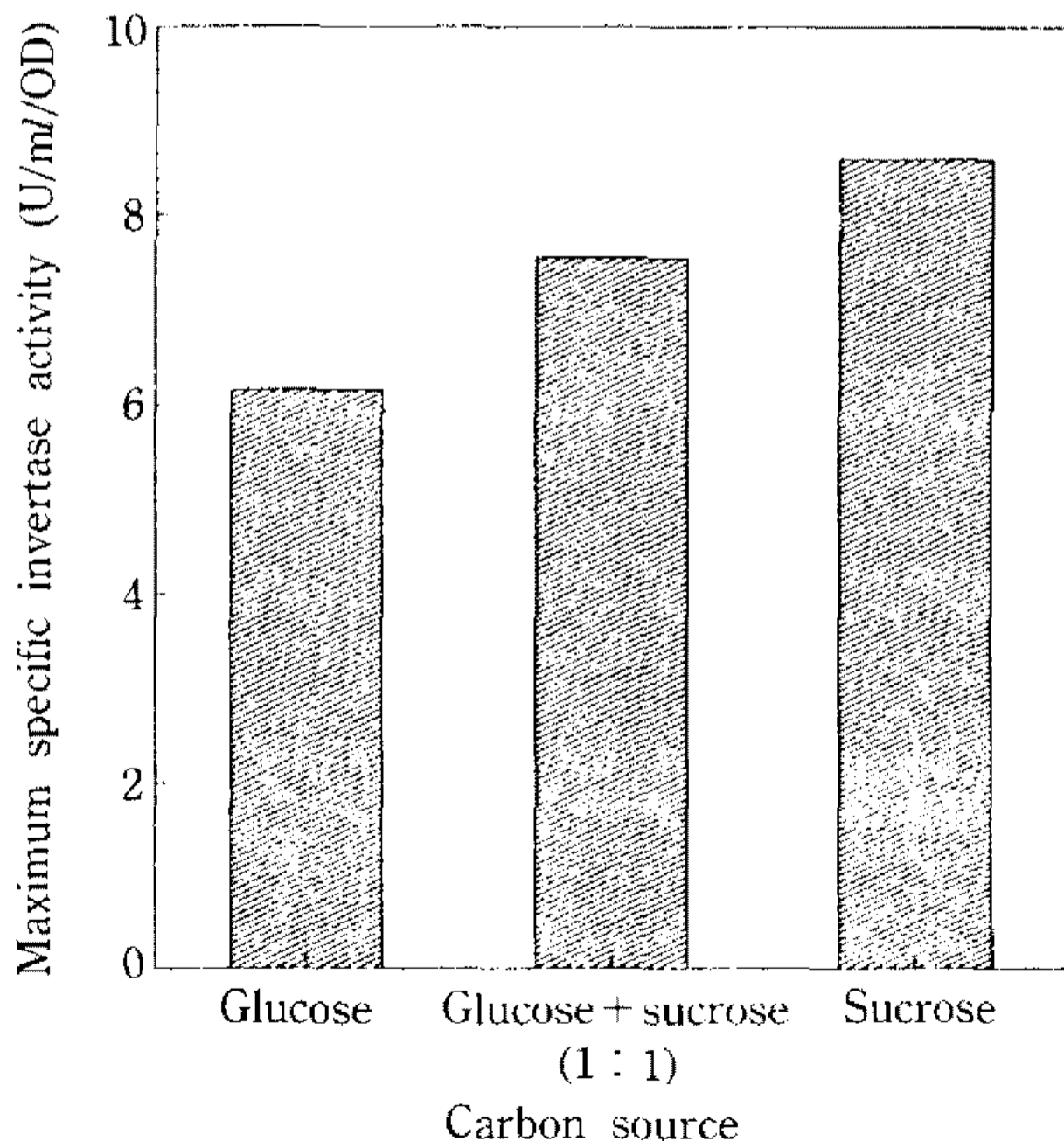


Fig. 1. Effect of carbon source on the maximum specific activity of invertase.

온도에서 sucrose가 포함된 발현 배지로 옮겨서 invertase의 발현 정도를 알아보는 transition 실험을 수행하였다. 이 방법을 통하여 재조합효모의 생육시기와 invertase 발현시기를 구분할 수 있었다. 실험결과는 Fig. 2와 3에 나타내었다.

그 결과 2g/l의 sucrose가 존재할 때 최대 비역가가 10 units로서 5g/l의 sucrose가 존재할 때보다 3 units 정도 더 높았다. 그리고 탄소원이 없는 배지로 효모를 옮겨 주었을 때는 transition 4시간 후에도 invertase의 발현이 전혀되지 않았다(실험결과는 나타내지 않았음).

따라서 높은 농도의 sucrose는 오히려 invertase 발현에 저해효과를 가져왔다. 이는 sucrose의 높은 분해속도로 인하여 높은 농도의 포도당이 배지 중에 생성되어서 SUC2 유전자의 발현이 억제된 결과로 보여진다. 각 농도에 따른 균체량의 증가를 600 nm에서의 흡광도 값으로 나타내면 2 g/l sucrose 농도일 때 0.3, 5 g/l sucrose 농도일 때 1.5 증가하였는데, 낮은 농도의 sucrose가 존재할 때 투입된 탄수화물의 양에 대한 생성된 균체량이 상대적으로 낮았다. 탄수화물이 에너지원으로서 일부는 유전자 산물(invertase)을 만들기 위해 사용되고, 나머지는 균체증식에

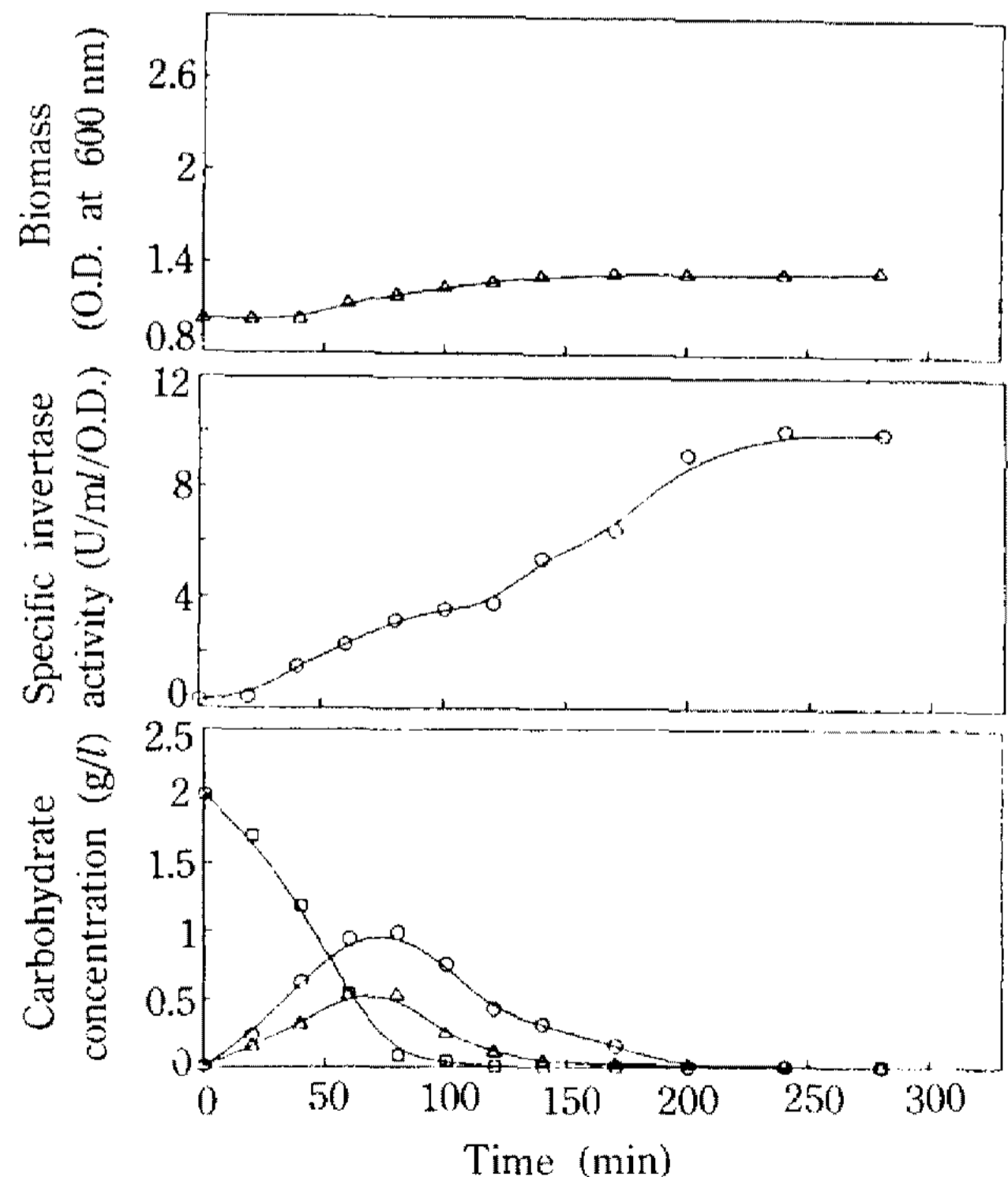


Fig. 2. Profiles of biomass ( $\Delta$ ), specific invertase activity ( $\circ$ ) and concentrations of sucrose ( $\square$ ), fructose ( $\circ$ ) and glucose ( $\Delta$ ) in the second stage containing 2 g/l sucrose as a carbon source at 30°C.

이용된다고 가정하였을 경우 유전자 산물을 만들기 위해서는 2 g/l의 sucrose 농도가 5 g/l sucrose 농도일 때보다 더 효율적임을 보여주는 결과이다.

위의 Fig. 2, 3에서 sucrose의 농도에 따른 탄수화물의 생성과 감소의 양상을 살펴보면 효모는 포도당을 우선적으로 섭취하였고 과당은 농도가 최대 이론치에 이를 때까지 섭취하지 않았다. 상기한 바와 같이 sucrose의 농도가 높을수록 sucrose의 분해속도가 빨라 포도당의 생성속도도 빨랐다.

Fig. 2와 3에서 일어나는 현상을 살펴보면, 초기에는 *SUC2* 유전자의 발현으로 invertase 생성이 진행되었다. 세포간막으로 이동된 invertase는 배지중의 sucrose를 그 구성성분인 포도당과 과당으로 분해한다. 분해로 생긴 포도당의 농도가 2 g/l 이상 존재하면 in-

vertase 생성(*SUC2* 유전자 발현)이 다시 억제된 반면 세포증식은 계속되었다. 그러나 포도당 농도가 2 g/l 미만일 때는 invertase의 생성은 계속 진행되었다. 포도당 농도가 미생물의 섭취에 의해 다시 2 g/l 이하로 떨어지면 *SUC2* 유전자의 발현을 유도하여 invertase 활성도는 다시 증가하게 된다. 포도당이 배지에서 고갈된 후 과당이 탄소원으로 이용되어 미생물의 성장을 지속시켰다. 이렇듯 배지중 포도당(sucrose 분해에 의해 생긴) 농도와 invertase의 발현정도는 직접적인 대응관계가 있음을 알 수 있었다. 재조합 미생물 배양에서 재조합단백질의 양이 배지조건에 따라 oscillatory 변화를 보여주는 사례는 재조합대장균에서도 보고된 바가 있다(14).

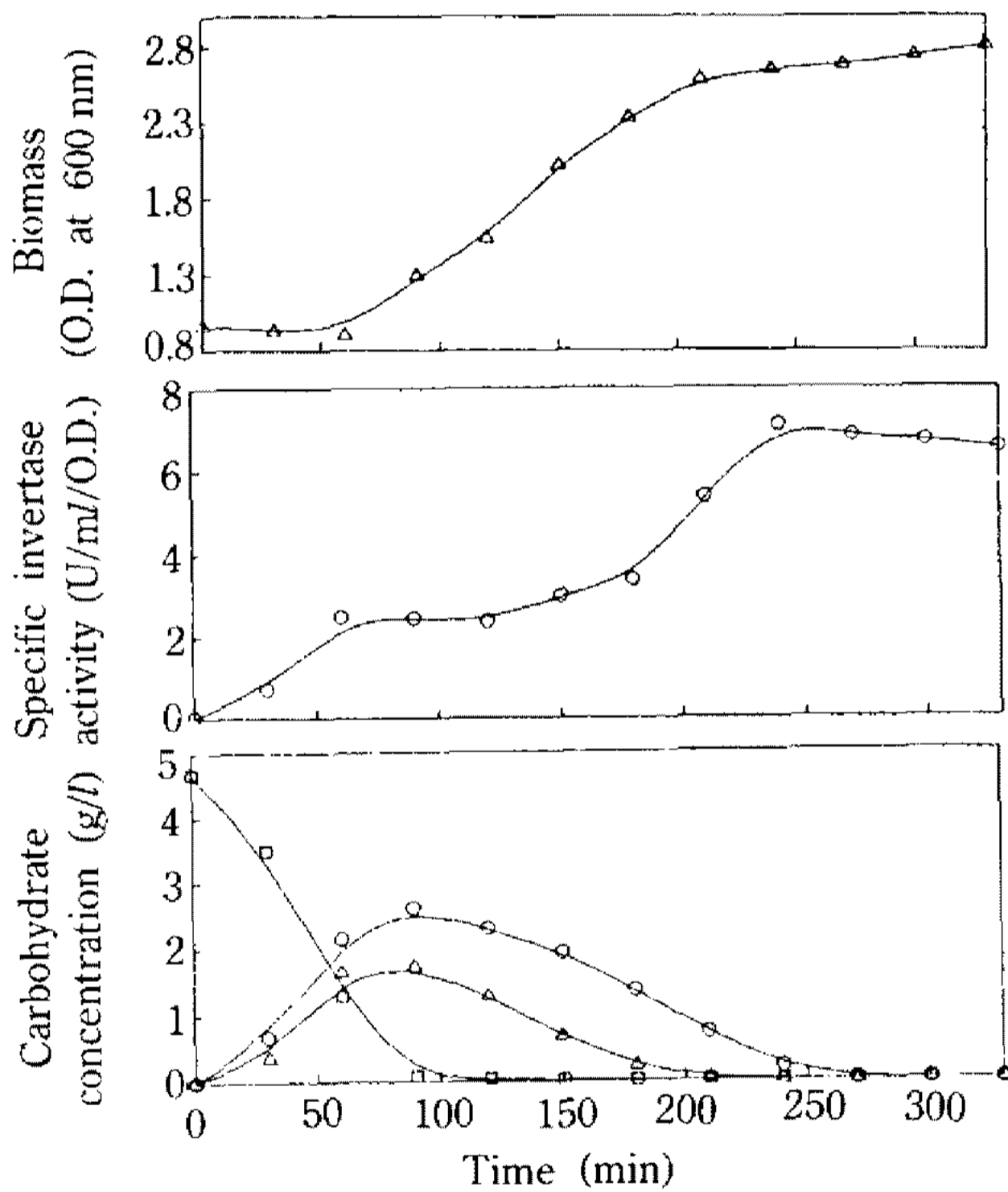


Fig. 3. Profiles of biomass ( $\Delta$ ), specific invertase activity ( $\circ$ ) and concentrations of sucrose ( $\square$ ), fructose ( $\circ$ ) and glucose ( $\Delta$ ) in the second stage containing 5 g/l sucrose as a carbon source at 30°C.

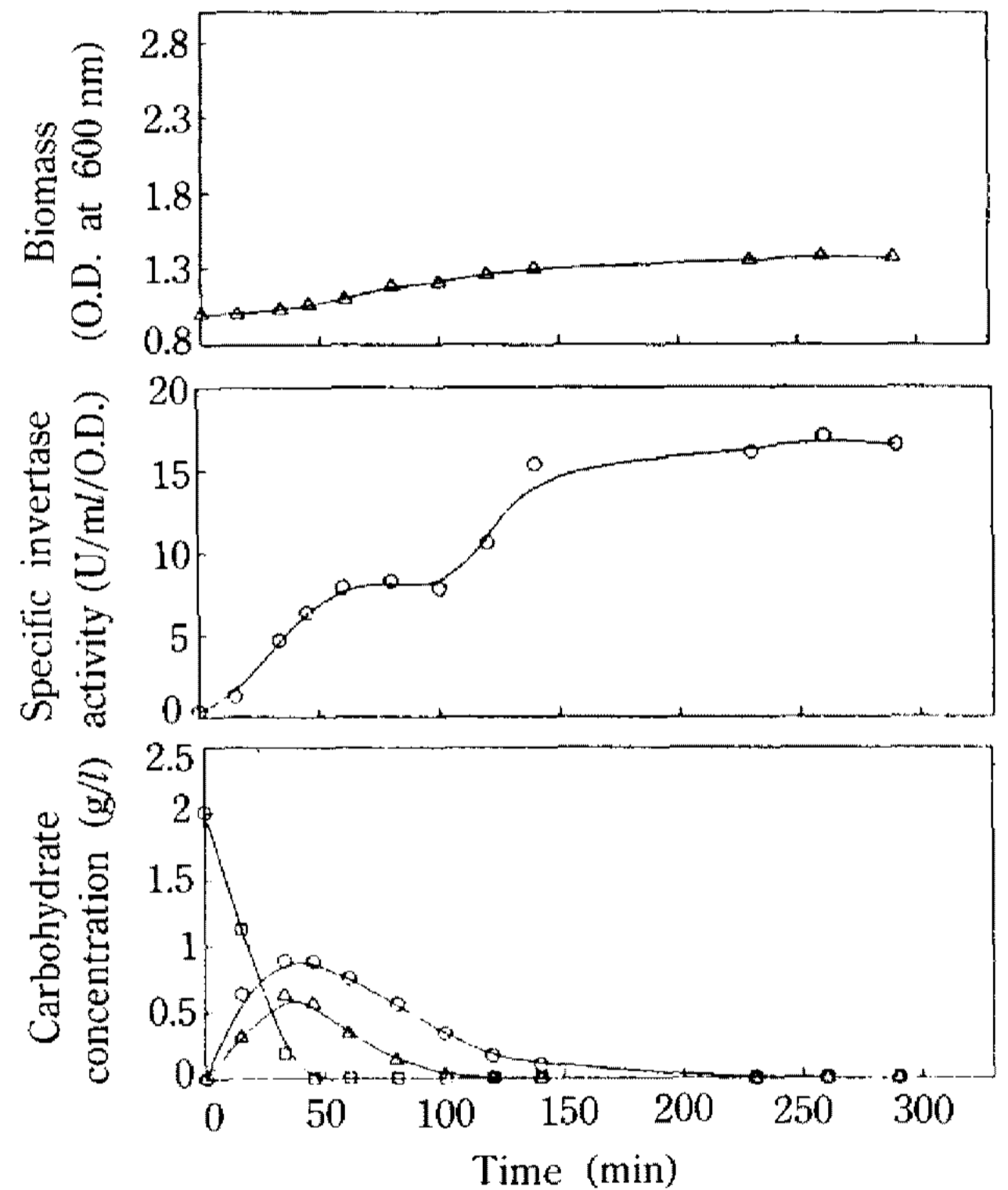


Fig. 4. Profiles of biomass ( $\Delta$ ), specific invertase activity ( $\circ$ ) and concentrations of sucrose ( $\square$ ), fructose ( $\circ$ ) and glucose ( $\Delta$ ) in the second stage containing 2 g/l sucrose as a carbon source at 35°C.

Table 1. Effect of sucrose concentrations in the expression medium on specific growth rate, maximum specific invertase activity, sucrose hydrolysis rate and glucose production rate at 30°C

Sucrose concentration in second stage (g/l)	Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	Maximum specific invertase activity (U/ml/O.D.)	Sucrose hydrolysis rate (g/l/hr)	Glucose production rate (g/l/hr)
2	0.140	10.02	1.80	0.520
5	0.426	6.91	3.22	1.420

발현배지의 온도를 35°C로 증가하였을 경우, invertase의 발현이 2 g/l의 sucrose가 존재할 때와 5 g/l의 sucrose가 존재할 때 각각 17.6 units와 11 units(실험결과는 나타내지 않았음)로서 모두 30°C일 때보다 더 높은 최대 비역가를 나타내었다(Fig. 4). 이 온도에서도 마찬가지로 발현배지 중 sucrose가 2 g/l의 농도로 존재할 때가 5 g/l로 존재할 때보다 invertase 생산에 더 유리하였다. 특히 발현배지에서 invertase의 발현양상을 보면 sucrose 분해로 생성된 glucose로 인한 발현억제(repression) 시기가 30°C일 때보다 더 빨랐다. 이는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 포도당의 생성속도가 30°C와 비교해서 무척 빨랐기 때문이라고 해석할 수 있다. 최대 비역가 증가는 유전자 전사속도 및 유전자 산물의 분비속도의 증가 등의 여러 인자가 작용하므로 이들에 대한 연구가 현재 진행중이다.

## 요 약

Sucrose에 의한 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 invertase 생성 양상을 이단계 배양을 통하여 관찰하였다. 포도당 배지에서 *SUC2* 유전자의 발현이 억제된 상태에서 발현배지의 sucrose 농도가 2 g/l일 경우 invertase 최대 비역가는 10 units로 5 g/l보다 40% 향상된 값을 보여주었다. 발현배지에서의 당의 농도변화와 invertase 발현은 서로 대응관계가 있음을 발견하였다. 초기에는 *SUC2* 유전자가 발현되어 invertase가 생성 분비되어서 배지중 sucrose를 포도당과 과당으로 분해하였다. 분해된 포도당의 농도가 2 g/l 이상이 되면 invertase 생성은 다시 억제되었다. 동시에 미생물의 생육에 의해 포도당 농도가 2 g/l 이하로 감소되면서 다시 invertase 생성이 유도되었다. 이러한 현상은 5 g/l의 sucrose 배지에서 더욱 현저하게 관찰할 수 있었다. 발현배지의 온도를 35°C로 증가시켰을 경우 invertase 생성은 30°C보다 약 1.7배만큼 증가하였다.

## 감사의 말

본 연구는 교육부 학술연구조성비(유전공학)의 지원을 받은 것이므로, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## 참고문헌

1. Seo, J.H. and J.E. Bailey. 1985. Effects of recombinant plasmid content on growth properties and

- cloned gene product formation in *E. coli*. *Biotech. Bioeng.* **27**: 1668-1674.
2. Siegel, R. and D.Y. Ryu. 1985. Kinetic study of instability of recombinant plasmid pPLc 23 trpAI in *E. coli* using two-stage continuous culture system. *Biotech. Bioeng.* **27**: 28-33.
3. Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1989. *The Yeast: Metabolism and Physiology of Yeasts*. Academic Press. CA. U.S.A.
4. Carlson, M. and D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**: 145-154.
5. Marten, M.R. and J.H. Seo. 1991. Engineering studies of protein secretion in recombinant *S. cerevisiae*. *American Chem. Soc. Symp. Ser.* **477**: 77-96.
6. Patkar, A. 1990. Ph. D. Thesis. Kinetics, modeling and optimization of recombinant yeast fermentations. Purdue University.
7. Jung, S-C., J.K. Jang., I.G. Kim and Y.R. Pyun. 1989. Expression of invertase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing *SUC2* gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 263-268.
8. Jang, J.K., Y.R. Pyun, P.K. Shin and J.-H. Seo. 1990. Analysis of cloned *SUC2* gene expression in continuous culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotech. Bioeng.* **36**: 960-964.
9. Zsebo, K., H.S. Lu, J. Fisco., L. Goldstein., J. Davis., K. Duker., S. Siggs., P.H. Lai and G.A. Bitter, 1986. Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro- $\alpha$ -factor leader region. *J. Biol. Chem.* **231**: 5858-5865.
10. Marten, M.R. and J.-H. Seo. 1989. Localization of cloned invertase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* directed by the *SUC2* and *MFa1* signal sequences. *Biotech. Bioeng.* **34**: 1133-1139.
11. Vitolo, M. and Walter Borzani. 1983. Measurement of invertase activity of cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Biochem.* **130**: 469-470.
12. Reese, E.T., J.E. Lola and F.W. Parrish. 1969. Modified substrates and modified products as inducers of carbohydrases. *J. Bacteriol* **100**: 1151-1154.
13. Santos, E., Luis Rodriguez, M. Victoria Elorza and Rafael Sentandreu. 1982. Uptake of sucrose by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 652-660.
14. Shin, P.K. and J.H. Seo. 1990. Analysis of *E. coli* *phoA-lacZ* fusion gene expression inserted into a multicopy plasmid and host cell's chromosome. *Biotech. Bioeng.* **36**: 1097-1104.

(Received March 27, 1992)