

## *Pseudomonas* sp. Inulinase 유전자의 클로닝 및 *Escherichia coli*에서의 발현

엄수정 · 권영만 · 최용진\*  
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

### Molecular Cloning of *Pseudomonas* sp. Inulinase Gene and its Expression in *E. coli*

Su-Jeong Eom, Young-Man Kwon and Yong-Jin Choi\*

Department of Genetic Engineering College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Abstract** — A strain of *Pseudomonas* sp. isolated from soil was shown to produce a high level of extracellular endo-inulinase. In this work, the endo-inulinase gene (*inu1*) of the bacterial strain was cloned into the plasmid pBR322 by using *EcoRI* restriction endonuclease and *E. coli* HB101 as a host strain. One out of 7,000 transformants obtained from the above cloning experiment formed a clear zone around its colony on the selective medium supplemented with 2.0% inulin after a prolonged incubation at 37°C and subsequent cold shock treatment. The functional clone was found to carry a recombinant plasmid (pKMG50) with a 3.7 kb genomic insert containing the genetic information for the inulinase activity. The inulinase from *E. coli* HB101/pKMG50 was proved to be an endo-acting enzyme and produced constitutively in the recombinant *E. coli* cells. Zymogram of the enzyme from the recombinant cells with inulin substrate indicated that the molecular mass of the active protein was 190 Kd, while that of the endo-inulinase from the *Pseudomonas* strain was 170 Kd. This size discrepancy suggested that the inulinase from the recombinant *E. coli* HB101 cells might be the initial product of translation, not the mature form produced in the strain of *Pseudomonas* sp..

Inulin은 우리 나라에서 재배가 극히 용이한 돼지 감자, 치코리 등과 같은 각종 국과 식물 괴근에 다량 포함되어 있는 저장 탄수화물로서 30~35 단위의 fructose가  $\beta$ -2,1결합에 의해 직쇄상으로 결합되어 있고 그 말단에 D-glucose 한 분자가  $\alpha$ -1,2결합을 하고 있는 일종의 polyfructan이다(1, 2). 따라서 inulin을 가수분해하면 사용 효소의 종류에 따라 D-fructose는 물론이고 기타 각종의 inulooligosaccharides, difructose dianhydrides 및 cyclofructan 등과 같은 다양한 종류의 감미료를 생산할 수 있는 것이다. 그러므로 inulin은 적극적 활용을 위한 연구 노력에 따라서는 매우 가치있는 잠재 감미 자원이 될 수 있다고 본다. 특히 감미 자원이 전무하고 농업 시장 개방에 적극 대처하지 않으면 안 되는 우리 나라로서는 inulin을 이용한 각종 고가치의 감미료 생산을 위한 연구는 매우 중요한 과제 중에 하나이며 이 과제의 성공적 수행을 위해서는 우선 무엇보다 우수 inulin 분해

효소의 경제적 대량 생산이 필수 요건인 것으로 판단된다. 본 연구실에서는 inulin 가수분해와 관련된 다년간의 연구로 매우 효과적인 특성을 지닌, endo-inulinase를 생산하는 *Pseudomonas* sp. 균주를 토양으로부터 분리하고 생산 효소의 정제와 특성을 조사하여 그 결과를 이미 보고한 바 있다(3-5). 본 연구에서는 상기 *Pseudomonas* sp. 균주의 inulinase 생산 유전자를, *E. coli*에 클로닝하여 그 결과를 보고한다.

#### 재료 및 방법

##### 사용 균주 및 균주 배양

Endo-inulinase 유전자 공여 균주는 *Pseudomonas* sp. 토양 분리균(3), 클로닝 실험의 vector는 pBR322(6)를 숙주균주는 *E. coli* HB101(F-, *hsdS20*, *recA13*, *ara14*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20*, *xy15*, *mt11*, *supE*(44)을 사용하였다. *Pseudomonas* sp. 배양은 효소 생산 최적 배지를 사용, 45°C에서 48시간 진탕 배양하였으며 *E. coli*는 LB배지에서 37°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 형질전환체는 50  $\mu$ g/ml의 ampicillin을

Key words: Cloning, inulinase, *Pseudomonas* sp.  
\*Corresponding author

첨가한 LB배지에서 배양하였다.

### 사용 시약 및 효소

Lysozyme, RNase, dahila tuber inulin 등은 Sigma Chemical Co.(U.S.A), T4 DNA ligase와 각종 제한 효소들은 한국 제철 화학(KOSCO) 또는 New England Biolab(U.S.A), Dig DNA Labelling & Detection Kit는 Boehringer Mannheim(Germany), 그리고 Nylon membrane은 Amersham(England) 제품인 Hybond-N<sup>+</sup>를 구입 사용하였으며 기타 일반 시약은 시판 일급 이상의 분석용을 사용하였다.

### Chromosomal DNA 및 plasmid의 분리와 형질 전환

Gel electrophoresis는 TAE buffer(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)를 사용하여 Maniatis 등의 방법(7)에 따랐으며, agarose gel상의 DNA 절편은 electro-elution 방법(7), 또는 Gene Clean kit를 사용하여 추출 회수하였다. 그리고, chromosomal DNA는 Roy H. Doi(8)의 방법에 따라 분리하였으며, plasmid는 CsCl-EtBr equilibrium centrifugation법, 또는 rapid alkaline lysis법 등을 이용하여 분리 정제하였다. 또한 형질전환 실험은 Simanis(9)의 과정에 따랐다.

### Inulinase 생산 Recombinant clone의 선별

형질전환체 현탁액을 ampicillin(50 µg/ml)과 inulin (2.0%)이 첨가된 LB 한천평판배지에 도말하고 37°C에서 18시간 동안 배양하여 직경이 약 1.0~1.5 mm 크기의 colony을 얻은 다음, periplasm 효소 분비 증대 내지는 용균을 위해 4°C에서 12시간동안 cold shock을 주었다가 다시 37°C에서 3시간 배양시키는 과정을 여러 차례 반복 실시하여 inulin 분해에 의한 투명한 형성을 유도하여 선별하였다.

### Southern blotting

Agarose gel상의 DNA단편은 capillary blot transfer법(10)에 따라 Hybond-N<sup>+</sup> membrane으로 옮긴 다음 DNA hybridization을 실시하였다. DNA labeling과 detection은 Nonradioactive Dig kit를 이용한 digoxigenin-anti-digoxigenin ELISA방법(11)에 따랐다.

### 조효소액 조제 및 효소 활성 측정

*Pseudomonas* sp.에서 생산된 효소는 균체를 제거한 배양 상층액을 Amicon YM 10 membrane(Molecular

Weight cut off : 10,000)을 이용, 20배 농축하여 사용하였다. *E. coli* 재조합 균주의 경우는 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 세척한 다음 0.1M acetate 완충용액(pH 5.5)에 현탁시키고 28 KHz에서 초음파 처리(SUH ILL Ultrasonic Co. type KLK150)하여 세포벽을 완전히 파쇄한 후 원심분리한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정은 2% inulin acetate 완충용액(0.1M, pH 5.5) 0.5 ml을 55°C에서 5분간 예열한 후, 동량의 조효소액을 가한 다음 30분간 반응시키고 가수분해에 의해 생산되는 환원당을 DNS법(12)으로 측정하였다. 1분간에 1 µmol의 환원당(과당으로 환산)을 생산하는 효소량을 1 unit로 하였다. 효소 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용한 Lowry 법(13)을 이용하였다.

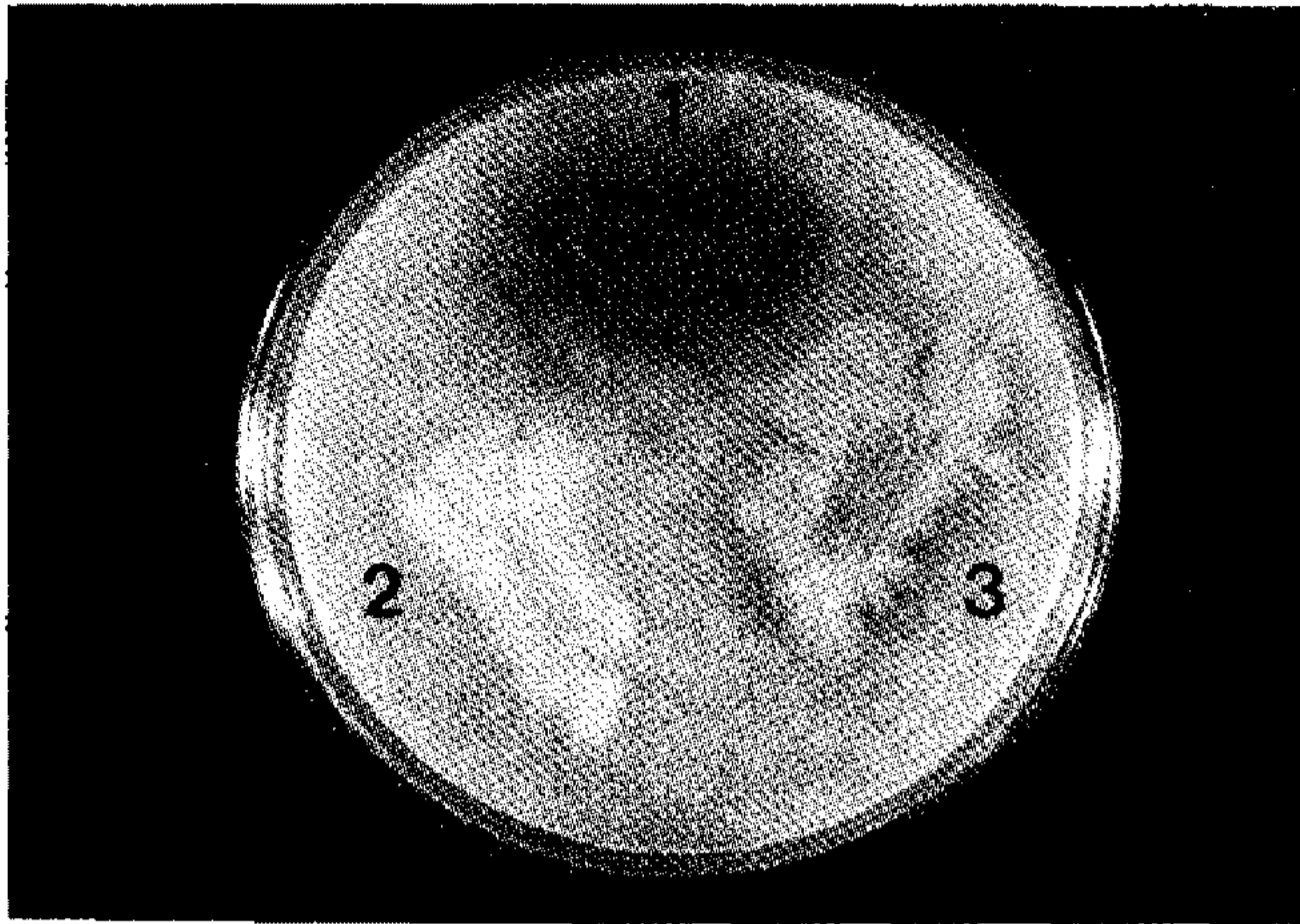
### Zymogram

조효소액(10 µl) 중의 단백질을 6% inulin을 첨가한 두 5% nondenaturing polyacrylamide gel을 이용한 전기 영동법(14)으로 분리하고 두 gel중 하나는 직접 coomassie blue R250으로 염색 단백질 분리대 관찰에 이용하였고 다른 한 gel은 전기 영동후 0.1M acetate 완충용액(pH 5.5)으로 2회 세척한 다음 55°C의 동일 완충 용액중에서 15분간 효소 반응시켰다. 반응이 끝난 다음 gel을 4°C, methanol-acetic acid-water(5 : 1 : 5) 용액에 12시간 보관, 분해되지 않은 inulin의 침전을 촉진시켜 보다 뚜렷하게 형성되는 효소 활성 투명대를 단백질 분리대와 비교 분석하였다(15).

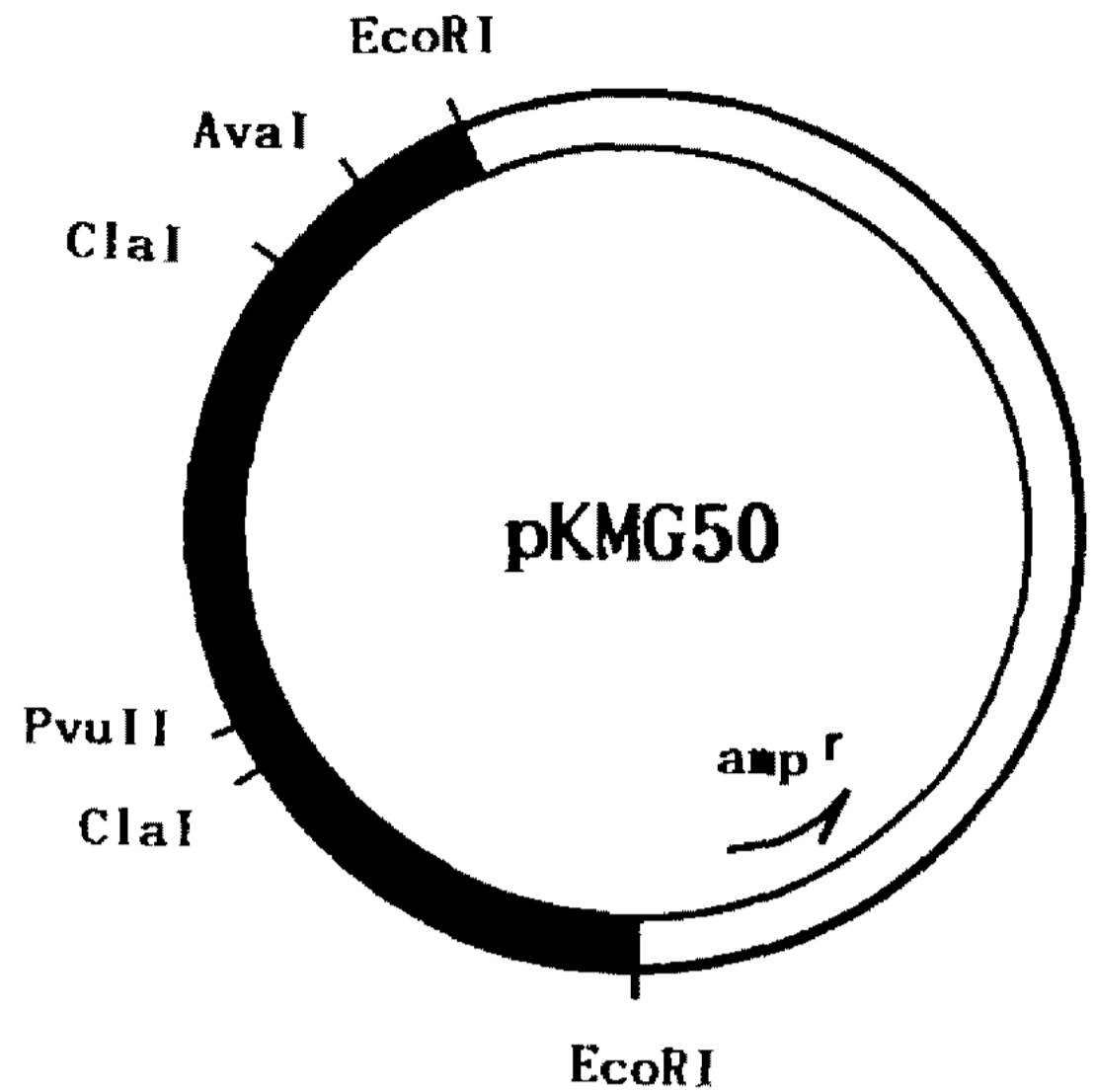
## 결과 및 고찰

### Inulinase 유전자(*inu1*) 크로닝과 제한 효소 지도

*Pseudomonas* sp.의 3~9 kb *EcoRI* chromosomal DNA 단편을 *EcoRI*으로 완전 절단한 후 CIP를 처리한 pBR322 DNA에 ligation시켜 *E. coli* HB101에 형질 전환시켰다. 형질전환체는 ampicillin이 첨가된 LB한천배지를 이용, 방법란에 상술한 과정에 따라 inulin 분해 활성을 나타내는 형질전환체를 검색한 결과, 약 7000개의 콜로니 중 한 개의 콜로니 주위에 투명한이 형성되었다(Fig. 1). 상기 형질전환체를 순수 분리한 다음, 플라스미드를 분리하여 분석해 본 결과 inulinase 활성과 관련된 약 3.7 kb의 삽입 DNA를 가지고 있는 재조합 플라스미드를 가지고 있음을 확인하였고, 이 재조합 플라스미드를 pKMG50으로 명명하였다(Fig. 2). pKMG50에 삽입된 3.7 kb 외래 DNA를 *EcoRI*, *AvaI*, *ClaI* 및 *PvuII*로 단독 내지는 중복 처리하여 각 효소의 절단 부위를 결정하였다. Fig. 3에

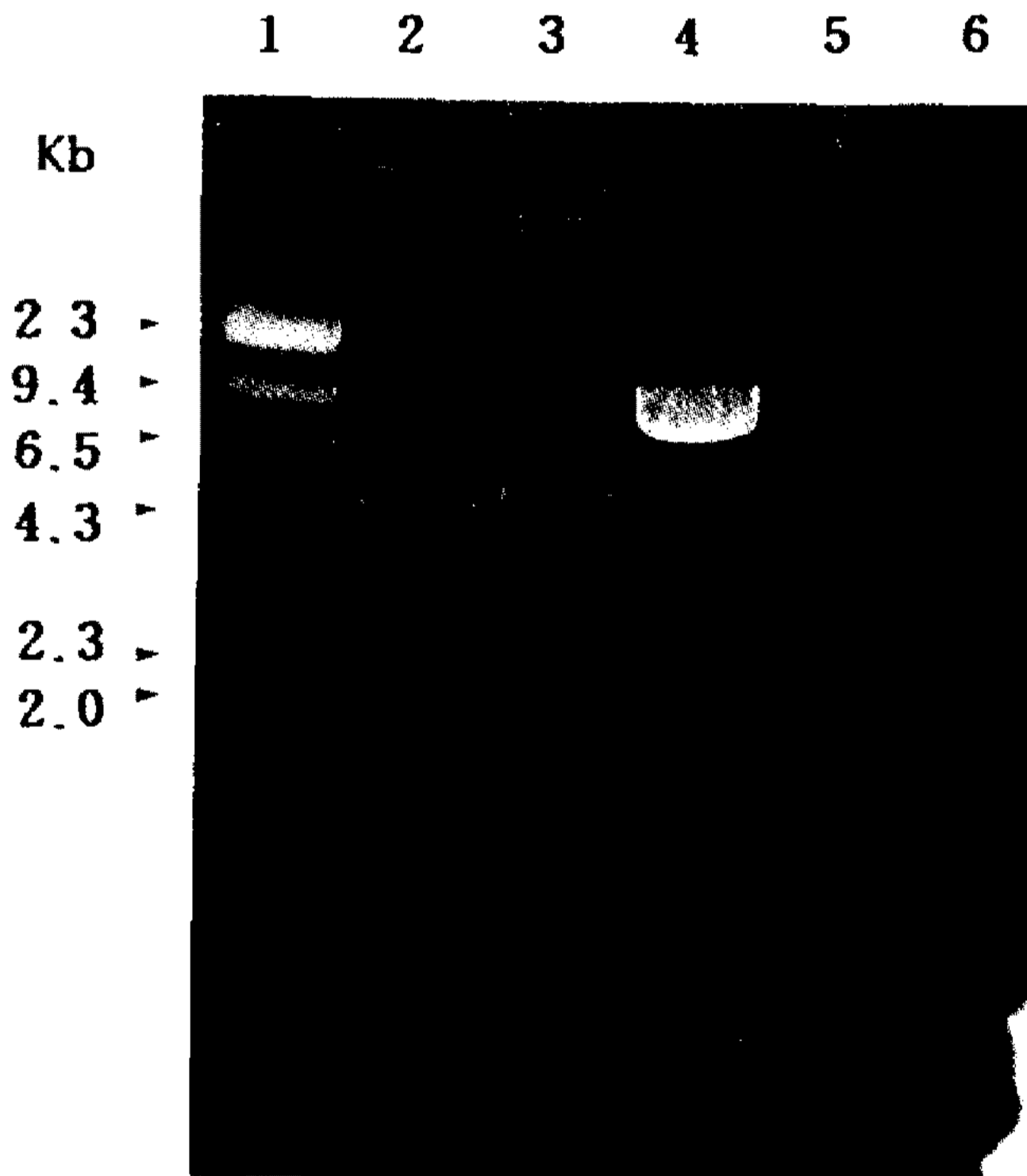


**Fig. 1. Clear zone formation by *Pseudomonas* sp. and the recombinant *E. coli* HB101 cells carrying pKMG50.** Incubation was carried out for 2 weeks at 37°C, with cold shock at 4°C intervally on the basal medium containing 1.5% inulin, 0.5% yeast extract, 1.06% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.61% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.26% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.12% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 0.003% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. No.1; *Pseudomonas* sp., No.2; *E. coli* HB101/pBR322, and No.3; *E. coli* HB101/pKMG50



**Fig. 3. Restriction map of pKMG50.** The thick line represents the 3.7 kb foreign DNA fragment containing the *inu1* gene, and the thin line indicates pBR322 plasmid.

site가 존재하는 것으로 분석되었다.



**Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of the recombinant plasmid, pKMG50.** Lanes 1. λ-DNA digested with *Hind*III, 2. pKMG50/*Ava*I, 3. pKMG50/*Cla*I, 4. pKMG50/*Pvu*II, 5. pKMG50/*Eco*RI, 6. pKMG50/*Eco*RI

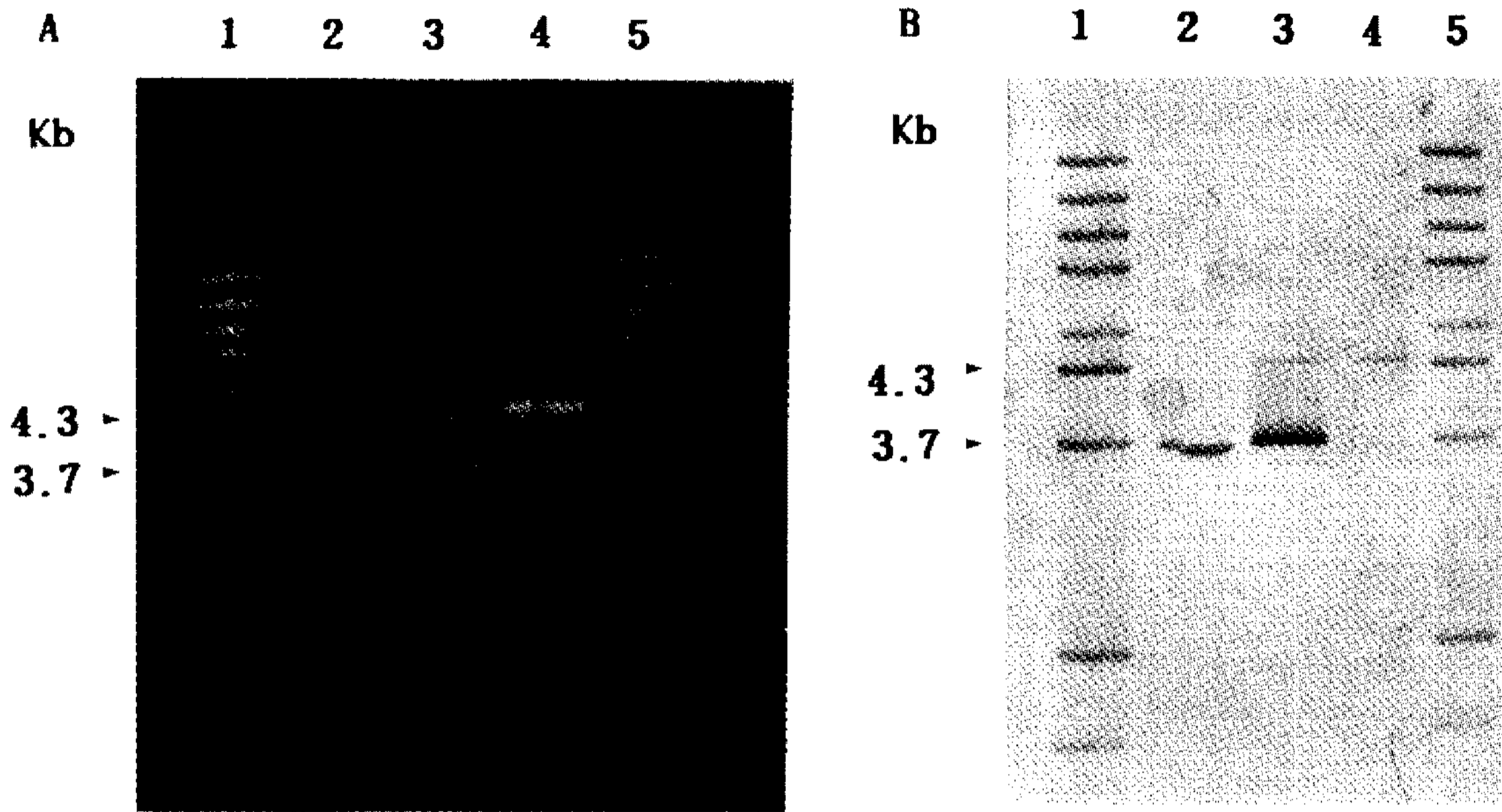
표시되어 있는 바와 같이 pKMG50 삽입 DNA 상에는 *Ava*I과 *Pvu*II site가 각각 하나씩 있었고 두개의 *Cla*I

**Inulinase 유전자(*inu1*) DNA의 확인**

pKMG50에 클로닝된 endo-inulinase 생산 유전자의 유래를 확인하기 위하여 pKMG50에 삽입된 3.7 kb DNA를 Dig-labeling하여 얻은 probe DNA와 *Eco*RI으로 절단한 *Pseudomonas* sp. chromosomal DNA 단편을 hybridization시켜 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 상기 probe DNA는 실험 대조로 사용한 pBR322 DNA와는 hybridization하지 않았으나 *Eco*RI으로 절단한 pKMG50 DNA와 chromosomal DNA 단편과는 probe DNA와 같은 크기의 위치에서 단일 hybridization band를 나타내었다. 따라서 pKMG50 내에 삽입된 endo-inulinase 활성과 관계된 3.7 kb 외래 DNA는 *Pseudomonas* sp. genomic DNA에서 유래된 *inu1*을 포함하고 있는 DNA단편임을 확인할 수 있었다.

**Zymogram**

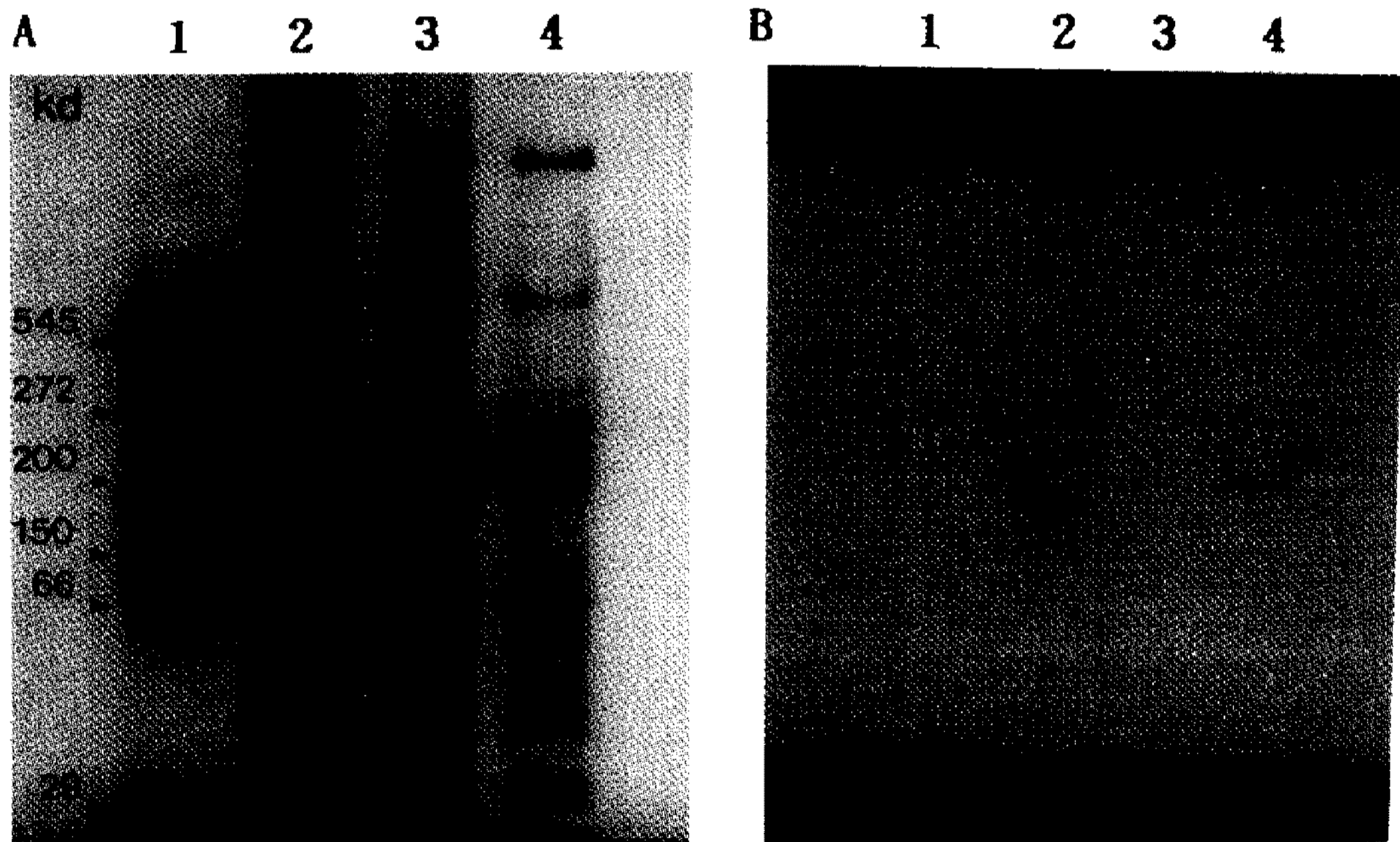
*Pseudomonas* sp.와 *E. coli* HB101/pKMG50 균주가 생산하는 단백질을 nondenaturing polyacrylamide gel을 이용하여 분리하고 이들 분리 단백질의 inulinase 활성을 조사해 본 결과, 대조 균주로 사용한 *E. coli* HB101/pBR322 단백질에서는 효소 활성대를 관찰할 수 없었으나 *Pseudomonas* sp.와 *E. coli* HB101/pKMG50 균주에서는 뚜렷한 단일 효소 활성대를 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 따라서 두 균주가 생산한 inulinase는 동일 유전자(*inu1*) 산물임을 확인할 수



**Fig. 4. Southern hybridization of *Pseudomonas* sp. genomic DNA with the random-primed DNA synthesized from the pKMG50 insert DNA.**

A: DNA electrophoretic patterns, B: Southern blot patterns

Lanes 1.  $\lambda$ -DNA digested with *Bst*EII, 2. Genomic DNA/*Eco*RI, 3. pKMG50/*Eco*RI, 4. pBR322/*Eco*RI, 5.  $\lambda$ -DNA/*Bst*EII



**Fig. 5. Zymogram of the inulinase produced by *Pseudomonas* sp. and *E. coli* HB101/pKMG50.**

A: Protein bands, B: Activity bands

Lanes 1. Non-denaturing protein size markers; carbonic anhydrase (29 kd), albumin (66 kd), alcohol dehydrogenase (150 kd),  $\alpha$ -amylase (200 kd) and Urease (tri: 272 kd, hex: 545 kd), 2. Extracellular proteins of *Pseudomonas* sp., 3. Intracellular proteins of *E. coli* HB101/pBR322, 4. Intracellular proteins of *E. coli* HB101/pKMG50

있었다. *Pseudomonas* sp. 효소활성대는 약 170 kd 크기, *E. coli* HB101/pKMG50 균주는 약 190 kd 크기의 효소 활성대로 각 효소 단백질의 크기에 약간의 차이를 나타내었다. 이와 같이 *Pseudomonas* sp.와 *E.*

*coli* HB101/pKMG50의 inulinase 활성 단백질의 크기의 불일치는 여러가지 원인으로 설명할 수 있겠으나 *Pseudomonas* sp. 생산 inulinase는 mature form인데 비해 *E. coli* 재조합균주 생산 효소는 processing 되지



**Table 1. Effect of carbon sources on the production of inulinase in *E. coli* HB101/pKMG50**

Carbon source (0.5%)	pH after culture	Cell growth (O.D.640)	Inulinase activity ( $\mu$ units/ml)
None	8.45	2.007	6.549
Glycerol	5.60	2.073	5.295
Glucose	4.87	1.926	3.119
Fructose	5.43	2.152	5.259
Starch	8.30	2.404	9.467
Sucrose	8.44	1.978	7.231
Inulin	8.20	2.408	9.911

Cultivation was carried out for 10 hrs at 37°C in LB medium (initial pH 7.0) containing 0.5% various carbon sources.

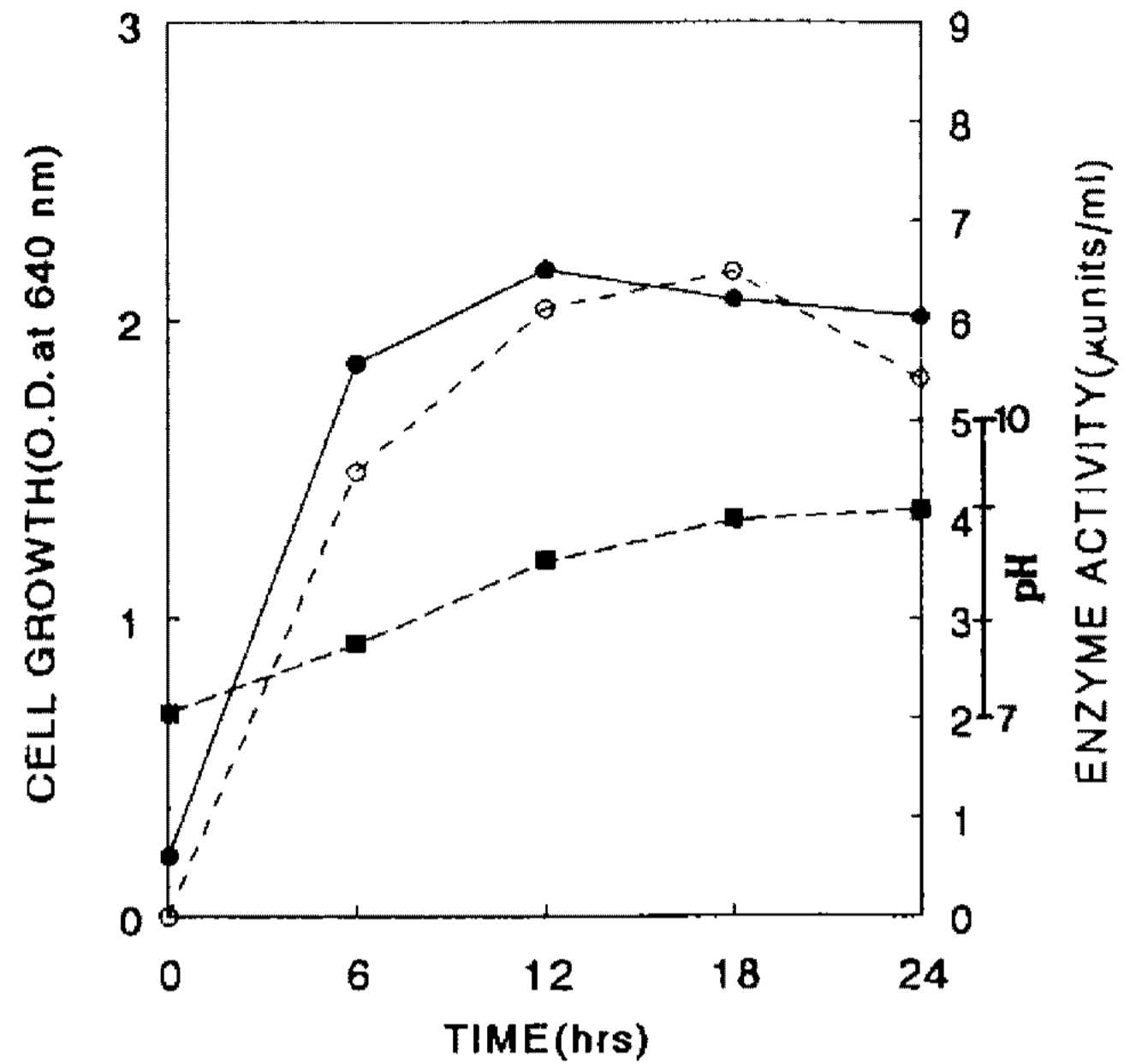
많은 precursor form이기 때문일 것이라고 추측된다.

***E. coli* HB101/pKMG50에서 Inulinase 생산에 미치는 탄소원의 영향**

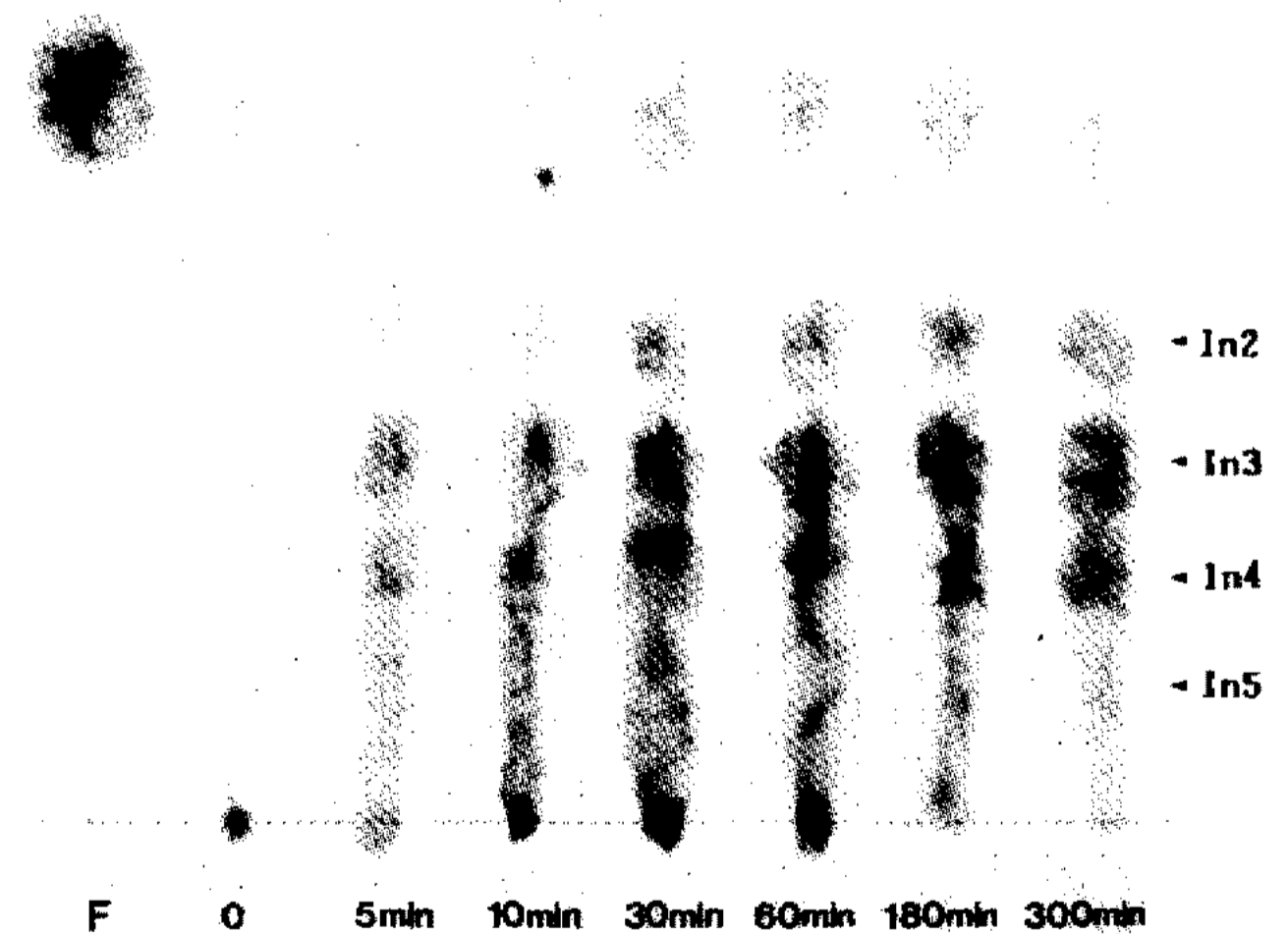
각종 탄소원 0.5%와 ampicillin을 첨가한 LB배지에 *E. coli* HB101/pKMG50 균주를 접종, 37°C에서 10시간 진탕 배양하여 *E. coli* HB101/pKMG50에 의한 inulinase 생산에 미치는 탄소원 종류의 영향을 조사, Table 1의 결과를 얻었다. 현저히 낮은 수준의 효소 생산량을 보인 포도당(3.119  $\mu$ units/ml)을 제외하고는 탄소원의 종류에 관계없이 거의 비슷한 양(5~7  $\mu$ units/ml)의 효소생산을 보였다. 그러나 포도당 또는 glycerol에 의한 상기 효과도 효소 생합성과 직접 관련된 효과라기 보다는 배양 경과에 따른 큰 폭의 pH 저하에 의한 간접적인 효과가 주 원인이라고 판단된다. 따라서 재조합 균주에 의한 inulinase 생합성은 원 inulinase 생산균인 *Pseudomonas* sp.와는 달리 탄소원에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 결론 내릴 수 있었다. 또한, 질소원의 경우 별도 자료 제공은 하지 않았으나 무기 질소원에 비해 유기 질소원이 월등히 높은 효소 생산량을 보였다. 특히 탄소원으로 0.5% inulin과 함께 0.5% yeast extract를 첨가하여 18시간 배양했을 때 세포 생육은 물론이고 효소 생산량 역시 가장 높은 결과를 얻었다(Fig. 6).

**재조합 *E. coli* HB101/pKMG50이 생산한 inulinase의 활성**

2% inulin 용액에 재조합 *E. coli* 균주가 생산한 inulinase 조효소액을 첨가 55°C에서 반응시키면서 반응 시간별로 반응 생성물을 paper chromatography로 분석하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 반응



**Fig. 6. Relationship between the inulinase production and the culture period of *E. coli* HB101/pKMG50.** Cultivation was carried out for 24 hrs at 37°C in LB medium containing 0.5% inulin. Symbols: (●), cell growth; (■), pH; (○), enzyme activity



**Fig. 7. Paper chromatogram of the hydrolysed products of inulin by the inulinase.**

Paper chromatography (16) was done by a multiple ascending technique (triple development) on Whatman No.1 filterpaper. The solvent system was 1-propanol:ethylacetate:water (2:2:1, V/V). The sugars were detected with urea-metaphosphoric acid (17). F: Fructose, In2: Inulobiose, In3: Inulotriose, In4: Inulotetraose, In5: Inulopentaose

10분째는 triose 이상의 oligomer만이 가수분해산물로 검출되었으나 반응 30분 이후부터는 oligomer의 분해와 더불어 주분해 산물로서 fructose, inulobiose 및 inulotriose가 다량 생산되고 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리 클로닝한 pKMG50 상의 inulinase 유전자 발현 산물은 전형적인 endo-type 효소로서 클로닝 실험에서 유전자 공여 균주로 사용한 *Pseudomonas* sp. inulinase와 같은 효소임을 재차 확인할 수 있었다.

## 요 약

토양에서 분리한 endo-inulinase 다량 생산균주인 *Pseudomonas* sp.의 *EcoRI* 절단 genomic DNA를 pBR 322 plasmid DNA의 *EcoRI* 절단 부위에 삽입하여 만든 genomic library로부터 endo-inulinase 생산 유전자(*inu1*)를 검색하였다. 약 7000개의 *E. coli* HB101 형질전환체 중에서 inulin 첨가 배지에서 colony 주위에 투명환을 형성하는 한 개의 형질전환체를 분리하였다. 상기 inulinase 양성 형질전환체는 endo-inulinase 생산 유전자(*inu1*)를 포함하고 있는 약 3.7 Kb의 *Pseudomonas* sp. 유래의 DNA 단편이 삽입된 재조합 플라스미드를 가지고 있음을 확인했고 이 플라스미드를 pKMG50으로 명명하였다. 또한 *E. coli*/pKMG50에서 탄소원의 종류에 관계없이 항시적으로 생산되는 inulinase는 *Pseudomonas* sp. 생산 inulinase와 같은 endo-type으로 확인되었으나 zymogram 실험결과 *Pseudomonas* sp. 생산 endo-inulinase의 크기가 약 170 KDa인데 반해 *E. coli* HB101/pKMG50 생산효소는 190 KDa으로 효소단백질 크기가 약간의 차이를 나타내었다. 이와같은 단백질 크기의 불일치는 재조합 *E. coli* 균주 생산 endo-inulinase는 아마도 processing 되지 않은 precursor form의 효소이기 때문으로 추측된다.

## 참고문헌

1. Hirst, E.L., D.J. Mcgilvray, and E.G.V. Percival. 1950. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.* **72**: 1279.
2. Guriraud, J.P. 1981. Enzymatic hydrolysis of plant extracts containing inulin. *Enzyme Microbiol. Technol.* **3**: 305.
3. Lee, T.K., H.C. Sung, Y.J. Choi, and H.C. Yang.

1987. Culture condition for inulase prodction by *Pseudomonas* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 176.
4. Lee, T.K., Y.J. Choi, and H.C. Yang. 1988. Purification and properties of extracellular inulase of *Pseudomonas* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 259.
5. Lee, T.K., H.C. Shin, Y.J. Choi, and H.C. Yang. 1988. Characteristics of extracellular endo-inulinase produced by *Pseudomonas* sp. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 484.
6. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *E. coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **43**: 77.
7. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.
8. Rodriguez, R.L. and R.C. Tait. 1983. Recombinant DNA Techniques. An introduction. Addison-Wesley Pub.
9. Hanahan, K. 1985. Techniques for Transformation of *E. coli*, Pp. 109-135. In D.M. Glover (ed.), DNA Cloning, Vol. 1, IRL Press, Oxford.
10. Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503.
11. Anthony, C.F. and L.M. James. 1985. Nonradioactive hybridization probe prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucl. Acids Res.* **13**: 745.
12. Miller, G.L. 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.
13. Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
14. Laemli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680.
15. R.H.F. Beck, and W. Praznik. 1986. Determination of inulase isoenzymes on polyacrylamide gels by activity staining. *Journal of Chromatography* **369**: 240.
16. Edelman, J. and Dikerson, A.G. 1966. The metabolism of fructose polymers in plant. *Biochem.* **27**: 33.
17. Wise, C.S., Dimler, R.J., Davis, H.A. and Rist, C.E. 1955. Determination of easily hydrolyzable fructose units in dextran preparations. *Anal. Chem.* **27**: 33.

(Received 29 March 1995)