

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 Endoinulinase를 이용한 Inulooligosaccharides의 생산

김현철<sup>1</sup> · 김현진 · 김병우<sup>2</sup> · 권현주<sup>2</sup> · 남수완\*  
동의대학교 생명공학과, <sup>1</sup>바이오물질제어학과, <sup>2</sup>생명응용과학과

**Production of Inulooligosaccharides by Endoinulinase Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*.** Kim, Hyun-Chul<sup>1</sup>, Hyun-Jin Kim, Byung-Woo Kim<sup>2</sup>, Hyun-Ju Kwon<sup>2</sup>, and Soo-Wan Nam\*. Department of Biotechnology & Bioengineering, <sup>1</sup>Department of Biomaterial Control, <sup>2</sup>Department of Life Science & Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – The endoinulinase gene (*imu*, 2.733 kb, EC 3.2.1.7) from *Paenibacillus polymyxa* was subcloned into an *Escherichia coli*-yeast shuttle vector with *GAL1* promoter for the expression in *Saccharomyces cerevisiae*. The constructed plasmid, pYGENIU27 (8.6 kb) was introduced into *S. cerevisiae* SEY2102 cell and then the yeast transformant was selected on the synthetic defined media lacking uracil and on the inulin-containing media. The recombinant endoinulinase was predominantly localized in the periplasmic space of the yeast cell. The total activity of the endoinulinase reached 1.81 unit/ml by cultivation of yeast transformant on YPDG medium. The optimized conditions determined for the inulooligosaccharides (IOSs) production from inulin were as follows; pH, 8.0; reaction temperature, 45°C; inulin source, Jerusalem artichoke. Enzyme activity was stably maintained up to the pH of 10.0. Under the optimized condition and with endoinulinase of 36 unit/g-inulin, IOSs started to be produced after 10 min of enzymatic reaction. By the reaction with inulin, IOSs consisting of inulobiose (F2), inulotriose (F3), and inulotetraose (F4) were produced and F3 was the major product. Consequently, these data would be used as a fundamental parameters for the production of functional sweetener IOSs from inulin by recombinant yeast endoinulinase.

**Key words:** Endoinulinase, *Paenibacillus polymyxa*, inulin, inulooligosaccharides, *Saccharomyces cerevisiae*

Inulin은 돼지감자(Jerusalem artichoke), 치커리(Chicory), 다알리아(Dahlia) 등의 국화과(Compositae) 식물의 구근에 함유된 polyfructan으로 30-35개의 fructose가  $\beta$ -1,2 결합에 의해 직쇄상으로 연결되어 있고 그 말단에 D-glucose가  $\alpha$ -1,2 결합을 하고 있다. 돼지감자는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력, 내병성 및 내충성이 강하고 단위 면적 당 수확량도 많아서 우리나라에서 재배하기가 용이한 식물 일뿐 아니라, inulin 가수분해에 의해 75% 이상의 fructose를 생산할 수 있다고 보고되어 있어 감미 자원이 부족한 우리나라에서는 매우 유망한 감미 자원으로 활용할 수 있다[1, 5]. Inulin 분해 효소는 작용기작의 차이에 따라 exo-inulinase (EC 3.2.1.26;  $\beta$ -D-fructofuranosidase) [4], endo-inulinase (EC 3.2.1.7; 2,1- $\beta$ -D-fructan fructanohydrolase) [16], inulin fructotransferase (depolymerizing) (EC 2.4.1.93) [22], 및 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) [8]로 분류되어진다. Inulin을 각 효소에 의해 가수분해 되면 D-fructose는 물론이고 기타 각종의 inulooligosaccharides,

difructose dianhydrides 및 cyclofructan 등과 같은 다양한 종류의 감미료를 생산할 수 있다. 그러므로 inulin은 적극적인 활용을 위한 연구 노력에 따라서는 매우 가치 있는 잠재 감미 자원이 될 수 있다고 본다. 특히 감미자원이 전무하고 농업 시장 개방에 적극 대처하지 않으면 안 되는 우리나라로서는 inulin을 이용한 각종 고가치의 감미료 생산을 위한 중요한 연구라고 할 수 있다.

Endoinulinase는 inulin을 이용하여 분자내 당전이 반응에 의해 주로 inulobiose (F2), inulotriose (F3), inulotetraose (F4), 그리고 inulopentaose (F5) 등 inulooligosaccharides (IOSs)를 생성하는 효소이다[9, 16, 25]. 설탕 대체 소재로서 올리고당은 지난 10여 년간 전 세계적으로 관심사가 되어 왔으며 말토올리고당, cyclodextrin, 당알코올 등이 상품화되어 음료수, 과자류, 카라멜, 초코렛, 아이스크림 등에 이용되고 있다. 이들 소재는 장내 균총의 선택적 증식을 도와 장내 건강을 유지시킬 수 있는 소위 올리고당 및 그 유도체로 개발된 것이 대부분이다. 활용가치가 거의 없던 농산부산물 inulin을 endoinulinase를 이용, IOSs로 분해하여 기능적 감미료 등 여러 분야에서 산업적 이용이 가능하다.

Inulin 분해효소를 생산하는 효모 관련 연구로, *Saccharomyces cerevisiae* 1200을 이용하여 65 g inulin으로

\*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-890-1619

E-mail: swnam@deu.ac.kr

부터 약 20%의 에탄올을 생산한 예가 있다[21]. 또한 Kim 등[14]은 *Kluyveromyces marxianus* inulinase 유전자를 *S. cerevisiae*에서 발현, Jerusalem artichoke inulin을 이용하여 초기 정지기(30 h)에서 9 g/l의 에탄올을 생산하였다. *Aspergillus niger* AF10 유래 inulinase 유전자를 *Pichia pastoris*에서 발현하여 5 l 발효조 배양하여 효소를 316 unit/ml 얻었고, 25 unit/g inulin 조건으로 92% 기질 분해율과 6 시간 효소 반응 후 90% fructose 생성물을 얻었다[26]. 또한 *K. marxianus* inulinase 유전자를 *S. cerevisiae*에서 발현시켜 높은 수율의 fructose를 생성한 예도 보고되었다[2]. Kanai 등[10]은 *Bacillus circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 *S. cerevisiae*에서  $\alpha$ -factor 분비신호를 이용하여 효과적으로 발현시켜 N형 당쇄부가에 의한 높은 내열성 증가를 보였고, 391 U/l의 활성을 얻었다. Lim 등 [17]은 *Paenibacillus polymyxa* 유래의 CFTase를 *S. cerevisiae*에서 발현하여 cyclofructans의 최적 생성조건을 확립하는 경우 등 많은 inulin 분해효소를 *S. cerevisiae*에서 발현한 경우가 있다.

본 논문에서는 *Paenibacillus polymyxa* 유래의 inu 효모 발현계를 구축한 뒤 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 endoinulinase 발현과 분비 양상을 조사하여, IOSs의 경제성 있는 생산공정 개발을 위한 기초자료를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 숙주세포로는 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*sup44*  $\Delta$ *lac* *U169* ( $\phi$ *lacZ* $\Delta$ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gvrA96* *Tri-1* *relA1*)와 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102를 사용하였다. *S. cerevisiae* SEY2102(*MAT $\alpha$*  *ura3-52* *leu2-3* *leu2-112* *his4-419* *suc2- $\Delta$ 9*)[3]는 invertase 결손 변이주(*suc2- $\Delta$ 9*) 및 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5 $\alpha$ 를 사용하였다. Endoinulinase 유전자 공여 plasmid는 pUC18에 *P. polymyxa*의 endoinulinase 유전자를 cloning한 pDI2 $\Delta$ N $\Delta$ C27을 사용하였다[8]. 효모 *S. cerevisiae*에서 endoinulinase 발현을 위한 vector로는 *E. coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES2.0(Invitrogen Co., USA)를 사용하였다.

### 재조합 Plasmid 제작 및 형질전환

효모에서의 유도적 발현을 위한 재조합 plasmid의 구축은 *P. polymyxa*의 inu 유전자를 함유한 pDI2 $\Delta$ N $\Delta$ C27을 *EcoRI*/*XhoI*으로 처리하여 얻어진 inu 유전자 단편을 Gel extraction kit (Bioprogen Co., Korea)로 정제하였다. 얻어진 inu 단편을 *GAL1* promoter를 함유한 pYES2.0 (*EcoRI*/*XhoI*으로 미리 절단)에 재조합하여 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환하여 재조합 plasmid pYGENIU27 (8.6 kb)을 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 로부터 증폭, 추

출하여 LiCl법[7]으로 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환하였다.

### 효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose)를 사용하였고, 재조합 endoinulinase의 생산을 위한 재조합 효모의 배양은 YPDG 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% dextrose, 1% galactose)를 사용하여 배양하였다. 균체 증식과 유전자 발현에 미치는 초기 pH 및 배양온도의 영향을 조사하기 위해 YPDG 배지를 50 ml 함유하는 baffled-flask로 실험하였다.

재조합 효모 균주의 전배양은 SD 배지로 하였으며 flask 배양 및 fermentor 배양시 접종량은 0.1 OD<sub>600</sub>/ml로 하였다. Flask 배양에서는 500 ml baffled-flask (working volume; 50 ml)로 30°C, 170 rpm에서 수행하였으며, 재조합 endoinulinase의 조효소액을 확보하기 위한 발효조 (KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 YPDG 배지로 working volume, 1 l; 온도, 30°C; 초기 pH, 6.0; 교반속도, 300~500 rpm; 통기속도, 1~1.5 vvm의 조건하에서 수행하였다.

### 균체 농도, 잔존환원당 및 Plasmid 안정성 분석방법

균체 농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid (DNS) 방법[18]을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 colony를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비 (백분율)로 측정하였다.

### 균체 분획 및 Endoinulinase 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T (Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads (0.4~0.5 mm)를 사용하여 periplasmic space 분획과 전세포분획을 얻었으며[19], 이들 분획과 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 endoinulinase 활성을 측정하였다. Endoinulinase의 활성 측정은 5% inulin-용액(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)과 45°C에서 반응시킨 후 반응액을 비등수에서 5분간 열처리 한 후 반응액을 0.45  $\mu$ m filter로 여과한 후 TLC로 분석하는 것 [8]과 효소반응액상의 환원당은 DNS 방법을 사용하여 측정하였다. 효소 1 unit는 inulin을 가수분해하여 분당 1  $\mu$ mol의 환원당 (과당으로 환산)을 생성하는 효소의 양으로 정의 하였다.

### 재조합 Endoinulinase의 pH 안정성 및 열 안정성

효소의 pH 안정성과 열안정성을 조사하기 위하여 완충액

으로 pH 4.0~6.0 범위에서는 50 mM acetate buffer, pH 6.0~8.0에서는 50 mM phosphate buffer, pH 8.0~10.0 범위는 50 mM tris-HCl buffer를 사용하였다. 열 안정성은 30~100°C 범위에서 측정하였다.

**Thin-Layer Chromatography에 의한 효소반응생성물의 확인**

효소반응 생성물은 thin-layer chromatography (TLC)로 분석하였다. 효소반응은 50 mM phosphate buffer에 녹인 5% inulin과 endoinulinase 조효소액을 1:1로 45°C에서 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리 한 후 각각의 반응액 5 µl씩을 TLC plate (MERCK)에 점적한 후 butanol : isopropanol:water (3:12:4, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray로 110°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다[8]. Urea spray는 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (water-saturated n-butanol 93.22 ml, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 6.78 ml)에 5 ml ethanol과 3 g의 urea를 첨가하여 제조하였다. Standard는 2% inulin 용액과 50 mM~100 mM의 FeCl<sub>2</sub>, AlCl<sub>3</sub> 용액을 1:1로 혼합하여 5~10분간 100°C 끓는 물에서 가수분해하여 사용하였다. TLC의 spot은 image analyzer (FluorChem 5500, Alpha InnoTech, USA)를 이용하여 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**재조합 Plasmid의 구축 및 효모 형질전환체 선별**

효모에서 endoinulinase 유전자(*inu*, 2.733 kb, 100.2 kDa)를 발현시키기 위해 유도적 발현계를 구축하였다(Fig.

1). *inu* 유전자를 포함하는 pDI2ΔNΔC27를 *EcoRI/XhoI*으로 처리하여 *inu* 유전자 단편을 얻고, 이를 pYES2.0의 *GAL1* promoter 하류에 subcloning하여 pYGENIU27 (8.6 kb)를 구축하였다. 구축된 *inu* 발현 plasmid (pYGENIU27)를 효모에 형질전환하여 SD배지에서 1차 선별하고, 1차 선별된 균주는 시험관에서 배양한 후 cell lysates와 5% inulin을 반응시켜 반응산물을 TLC로 분석한 결과, IOSs의 생성능과 균체중식이 높은 재조합균주(*S. cerevisiae* SEY2102/pYGENIU27)를 최종 선별하였다. 최종 선별된 재조합 균주의 배양에서 *GAL1* promoter의 유도제인 galactose 첨가하여 안정적으로 endoinulinase가 발현·생산됨을 확인할 수 있었다.

**재조합 CFTase 발현과 분비 국재성**

재조합 균주 *S. cerevisiae* SEY2102/pYGENIU27를 초기 pH 6.0, 30°C, YPDG 배지에서 48시간동안 flask 배양한 다음 배양 상등액, periplasmic space와 cytoplasm으로 분획 후 inulin과 반응 결과, periplasmic space, cytoplasm에서 만 효소반응 10분째부터 IOSs가 생성되었다. IOSs는 cytoplasm 보다 periplasmic space에서 많이 생성됨을 TLC 상에서 확인하였다(Fig. 2). Periplasmic space에서 생성된 IOSs는 inulotriose (F3)와 inulotetraose (F4)를 생성하고, cytoplasm에서 생성된 IOSs는 inulobiose (F2)와 inulotriose (F3)를 생성하였다. 생성된 IOSs의 주 생성물은 F3이었다. IOSs는 배양 상등액에서는 생성되지 않은 것으로 미루어보아 endoinulinase는 세포외로 분비되지 않는 것으로 생각되어졌다. *S. cerevisiae* SEY2102/pYGENIU27를 회분배양을 한 결과, dextrose 소모 후 galactose를 이용하는 12시간 이

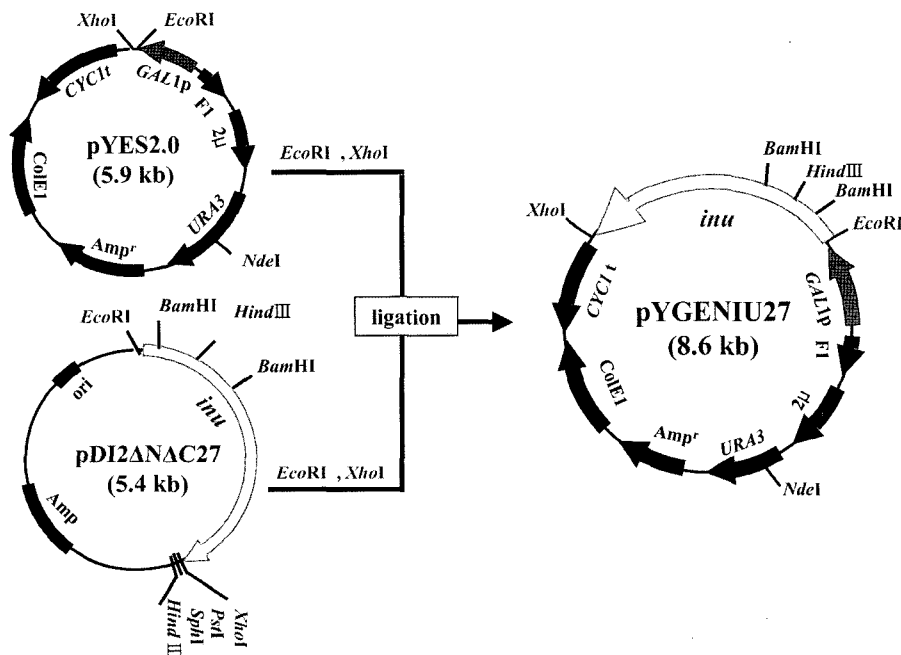
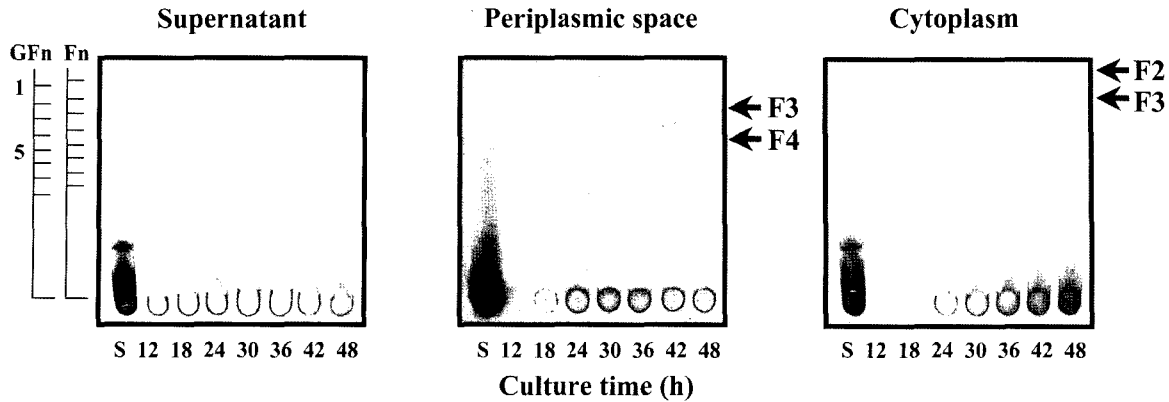


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant plasmid, pYGENIU27, used in this work.



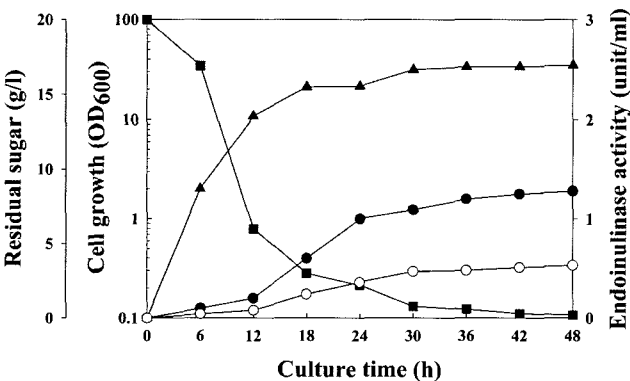
**Fig. 2.** Time profiles of thin-layer chromatogram of the reaction products from inulin by the recombinant endoinulinase from *S. cerevisiae*. S, inulin hydrolysate; GFn, glucofructooligosaccharides; Fn, inulooligosaccharides; F2, inulobiose; F3, inulotriose; F4, inulotetraose.

후부터 발현되어 48시간까지 계속 발현량이 증가하는 양상을 나타내었고(Fig. 3), 배양 48시간에서 OD<sub>600</sub> = 42.3의 균체농도에 도달하였다. 배양 48시간때 periplasmic space에서 활성 1.28 unit/ml을 얻었고, cytoplasm에서는 0.53 unit/ml으로 periplasmic space에서 2.4배 더 높은 활성을 얻었다. 총 활성은 1.81 unit/ml을 얻었다. Plasmid 안정성은 형질전환체의 배양초기부터 98% 이상의 높은 수준으로 유지되다가 최대 증식인 48시간에서도 90% 이상을 나타내었다.

이전 보고에서 *Bacillus*의 endoglucanase를 효모에서 발현시킨 경우[6]와 *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)를 효모에서 발현시켜 90% 이상의 분비 효율을 얻은 경우[20]는 자체 signal peptide을 사용하였다. 이러한 연구결과들은 효모의 분비경로에 *Bacillus* 자체 분비 신호가 적용 될 수 있음을 보여주었다. 또한,  $\alpha$ -factor 분비 신호(MFaI)를 이용하여 *S. cerevisiae*에서 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 발현시켜 재조합 CFTase를 생

산하였다[10]. 그 연구결과에 따르면 전체 CFTase 유전자를 N-말단의 3개 repeat region를 제거한 약 3 kb 단편과  $\alpha$ -factor 분비신호를 연결하고 그 사이에 Kex2 protease 인식 서열을 삽입함으로써 높은 효소활성을 가지는 CFTase를 효과적으로 분비시켰다. 현재까지 수많은 재조합 단백질이 효모에서 발현 분비되었고 그 단백질의 수는 계속 증가하고 있다. 그러나, 재조합 단백질이 효모 세포내에 생산될 경우 불 수용성, 불활성, 부정확한 아미노말단 등의 문제가 발생하여 이런 문제는 disulfide 결합, 당쇄부가 결핍에 기인한다[12]. 따라서 안정하고 활성형 재조합 단백질의 효모에서의 생산에 대한 연구는 세포내 축적 생산보다 분비생산에 집중되고 있다.

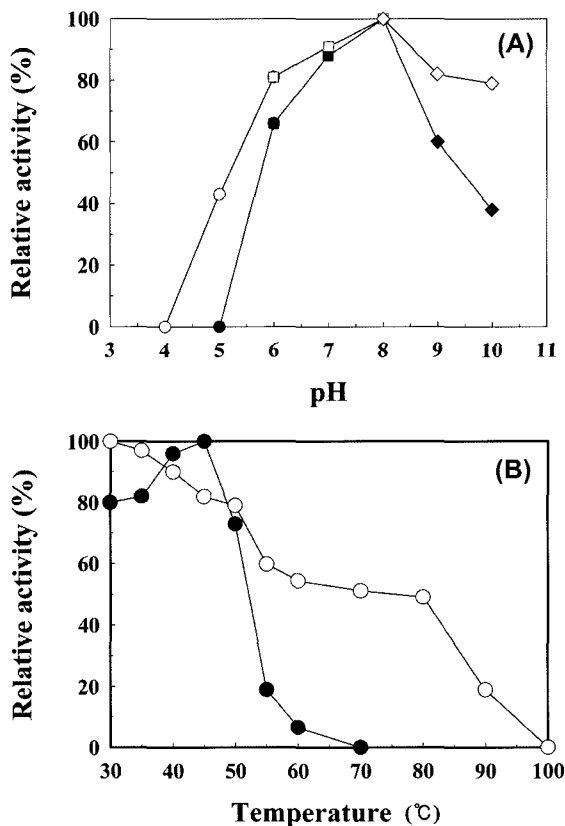
또한 진핵세포에서의 단백질 분비과정은 여러 종류의 번역 후 수식(post-translational modification) 과정을 포함하고 있어 외래 단백질을 효모에서 분비 생산하고자 할 때, 이에 따른 여러 문제점들이 발생 될 수 있다. 일반적으로 외래 숙주에서 발현 분비되는 재조합 단백질의 양과 질을 향상시키기 위해서 발현 카세트의 최적화, 발현카세트 효율 극대화, gene fusion technique, 숙주 균주의 분자적 육종, 그리고 배지 및 배양조건의 최적화 등 여러 다양한 전략을 시도 가능하다. Scotti 등[23]은 다양한 signal peptides ( $\alpha$ -factor, invertase, acid phosphatase, *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비효율을 조사한 연구결과에 따르면 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야 ER에서 Golgi체로, Golgi체에서 분비과립으로, 분비과립에서 세포밖으로의 일련의 분비능을 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에 사용된 *P. polymyxa* endoinulinase 유전자와 여러 signal sequence를 이용하여 효모에서 발현시킨다면 분비효율이 높은 재조합 endoinulinase를 생산 할 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 3.** Time profiles of cell growth, sugar consumption, and endoinulinase expression in the batch fermentation of *S. cerevisiae* SEY2102/pYGENU27 on YPDG medium (1% dextrose, 1% galactose). Symbols : (▲), cell growth; (■), residual sugar; (●), endoinulinase activity in periplasmic space; (○), endoinulinase activity in cytoplasm.

**반응 최적 pH와 최적온도**

재조합 endoinulinase의 효소반응의 최적활성 pH를 pH 4.0~10.0의 범위에서 측정한 결과, Fig. 4A에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서 최적 활성을 보였다. pH 5.0 이하에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았고, pH 6.0~10.0에서 반응시켜도 효소활성이 많이 남아있는 것으로 보아 효모에서 발현된 endoinulinase는 넓은 범위의 pH에서도 비교적 안정한 것으로 예상되었다. 재조합 endoinulinase의 효소반응의 최적 온도를 30~70°C의 범위에서 측정한 결과, Fig. 4B에서와 같이 45°C에서 최적 활성을 보였다. 또한, 50°C 이상에서 효소활성이 감소되었고, 60°C 이상에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다. 이는 *P. polymyxa* 유래 endoinulinase와

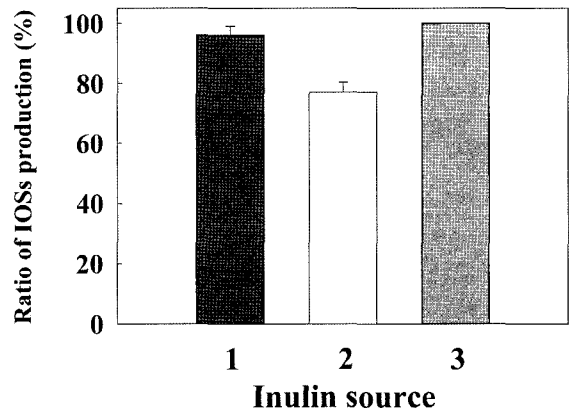


**Fig. 4. Effects of pH and temperature on the activity and stability of recombinant endoinulinase. Dahlia tubers inulin (5%) was used for the substrate. (A)** Enzyme activity in 50 mM acetate buffer (●), 50 mM phosphate buffer (■) and tris-HCl buffer (◆) were measured at 45°C at the indicated pHs. pH stability in 50 mM acetate buffer (○), 50 mM phosphate buffer (□) and tris-HCl buffer (◇) were measured by incubating enzyme at the indicated pHs for 1 h at 45°C, and then the residual activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) at 45°C. **(B)** Enzyme activity (●) in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) was measured at the indicated temperatures. Thermostability (○) was measured by incubating enzyme at the indicated temperatures for 1 h in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) and then the residual activity was measured at 45°C.

CFTase를 사용하여 Jeon 등[8]이 대장균에서 발현시켰을 때와 차이점을 보이지 않았다. 본 연구에서 사용한 *P. polymyxa* endoinulinase에서는 약 6개의 N-형 당쇄부가 가능 부위 [-Asn-Xaa-Thr (or Ser)-]가 존재하나[15] 당쇄부가에 의해 열안정성이 향상되지 않았음을 알 수 있었다. Lim 등[17]은 약 10개의 N-형 당쇄부가 가능 부위를 가지는 *P. polymyxa* 유래의 CFTase를 *S. cerevisiae*에서 발현시켰으나 55°C 이상의 고온에서 효소 활성이 감소하였다. 반면에 Kanai 등[10]은 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를  $\alpha$ -factor 분비신호(MFa1)를 이용하여 *S. cerevisiae*에서 발현시켰을 때, 열안정성이 증대된 재조합 CFTase를 얻었다. 이 CFTase에는 5 군데의 당쇄부가 부위가 존재하지만, 효모에서 생산된 재조합 CFTase (117 kDa)를 endo-H로 처리했을 때 분자량은 116 kDa로 약간 감소한 결과 봐서, 당쇄부가 정도가 크게 나타나지 않았다. 그러나 117 kDa의 CFTase는 70°C에서 30분후에도 약 62%의 잔존 활성을 보였으며, 반면에 당쇄부과 되지 않은 재조합 CFTase는 약 10%의 잔존 활성을 보였다. 이와 같은 결과에서 CFTase는 당쇄부가에 의해 열안정성이 증가되는 것으로 사료된다. 본문의 *S. cerevisiae* 발현 endoinulinase의 당쇄부가에 의한 열안정성이 향상되지 않은 이유로는 N-형 당쇄부가 가능 부위 [-Asn-Xaa-Thr (or Ser)-]에서 당쇄부가가 일어나기 힘든 Asp, Leu, Pro 등을 Xaa 아미노산으로 가지거나, 세 번째 아미노산으로 Ser 같은 아미노산을 가지기 때문으로 사료된다[11].

**Inulin에 대한 반응 생성물의 비교**

IOSs의 최적 생성을 위하여 inulin의 종류(dahlia, chicory, Jerusalem artichoke)에 따른 효소반응의 차이점을 비교하였다(Fig. 5). TLC상의 각 inulin에 대한 효소반응생성물의 spot을 image analyzer로 분석한 결과, Jerusalem artichoke으로부터 생성된 IOSs를 100%로 하였을 때, chicory는



**Fig. 5. Effect of inulin source on the inuloooligosaccharides (IOSs) production.** Lane 1, Dahlia; 2, Chicory; 3, Jerusalem artichoke. IOSs production in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0), 50°C was measured at the indicated inulin source.

77.2%, dahlia는 96.1%로 나타났다. Jerusalem artichoke와 dahlia가 효과적이었다. 이 결과로 Jerusalem artichoke와 dahlia은 산업적으로 활용가치가 거의 없던 농산부산물 inulin을 고부가가치 생물소재 생산원료인 IOSs 생성에 유용할 것으로 사료된다. Ohta 등[21]의 연구 결과에 따르면 fructose 평균중합도가 dahlia는 40.3, chicory는 33.6, Jerusalem artichoke는 40 이상으로 나타났다, Jerusalem artichoke의 높은 fructose 평균중합도는 cell growth를 증가시키고 IOSs와 에탄올 생성에 효과적으로 나타났다[13,24]. 또한 inulin, Jerusalem artichoke powder와 Jerusalem artichoke juice를 *A. ficuum* endoinulinase와 반응한 결과 Jerusalem artichoke juice를 기질로 하였을 때 반응 72시간 때 가장 높은 IOSs 수율(79.8%)을 얻었다[9].

## 요 약

*Paenibacillus polymyxa* 유래의 endoinulinase 유전자(imu, 2.733 kb, E.C. 3.2.1.7)를 *Saccharomyces cerevisiae*에 발현시키기 위해 대장균과 효모의 shuttle vector (*GAL1* promoter 함유)에 subcloning하여 구축된 pYGNIU27 (8.6 kb) plasmid를 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환하였다. Uracil이 결핍된 SD 배지와 inulin이 포함된 배지에서 효모 형질전환체를 선별하였다. 효모 형질전환체의 배양에서 endoinulinase는 periplasmic space에 다량 존재함이 확인되었다. YPDG 배지에서 재조합 endoinulinase는 총 활성 1.81 unit/ml로 생산되었다. Inulooligosaccharides (IOSs) 생산을 위한 효소의 최적 반응 조건으로 pH 8.0, 반응온도 45°C, 기질은 Jerusalem artichoke로 결정되었다. 효소활성은 pH 10.0에서도 안정적으로 유지되었으며, 최적 반응 조건 (g-inulin 당 36 unit 효소 이용)에서 반응 10분 후부터 IOSs가 생산되기 시작하였다. 생성된 IOSs의 구성분으로 inulobiose (F2), inulotriose (F3)와 inulotetraose (F4)가 생성되었고, 이 중에서 F3가 주성분이었다. 이상의 결과는 효모에서 생산된 재조합 endoinulinase를 이용하여 inulin으로부터 기능성 감미소재인 IOSs의 산업적 생산을 위한 기초결과로 활용될 것이다.

## 감사의 글

본 연구에 연구비를 지원해준 한국과학재단 (Korea Science and Engineering Foundation, 과제번호: R05-2003-000-12381-0)에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Bajpai, P. K. and P. Bajpai. 1991. Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and

high fructose syrup production. *Enz. Microbiol. Technol.* **13**: 359-362.

2. Brevnova, E. E., D. G. Kozlov, B. D. Efremov, and S. V. Benevolensky. 1998. Inulase-secreting strain of *Saccharomyces cerevisiae* produces fructose. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: 492-497.

3. 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.

4. Eom, S. J., Y. M. Kwon and Y. J. Choi. 1995. Molecular cloning of *Pseudomonas* sp. inulinase gene and its expression in *E. coli*. *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 550-555.

5. Hirst, E. L., D. J. Mcgilvary and E. G. V. Percival. 1950. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.* **72**: 1279-1284.

6. Han, Y. J., D. O. Kang, S. C. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen and J. S. Ahn. 1994. Secretion of a *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 24-29.

7. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.

8. Jeon, S. J., D. J. You, H. J. Kwon, S. Kanaya, N. Kunihiro, 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**: 921-928.

9. Jin, Z., J. Wang, B. Jiang, and X. Xu. 2005. Production of inulooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Res. Int.* **38**: 301-308.

10. 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.

11. Kasturi, L., H. Chen and S. H. Shakin-eshleman. 1997. Regulation of N-linked core glycosylation : use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochem. J.* **323**: 415-419.

12. Kingsman, S. M., A. T. Kingsman, M. J. Dobson, J. Mellar and N. A. Roberts. 1985. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **3**: 377-415.

13. Kim, D. H., Y. J. Choi, S. K. Song, and J. W. Yun. 1997. Production of inulo- oligosaccharides using endo-inulinase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **19**: 369-371.

14. Kim, Y. H., S. W. Nam, and B. H. Chung. 1998. Simultaneous saccharification of Inulin and ethanol fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* secreting Inulinase. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **3**: 55-60.

15. Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.

16. Kwon, Y. M., H. Y. Kim and Y. J. Choi. 2000. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *J.*

- Microbiol. Biotechnol.* **10**: 238-243.
17. Lim, C. K., H. C. Kim, K. H. Kim, B. W. Kim and S. W. Nam, 2004. Production of cyclofructan by cycloinulooligosaccharide fructanotransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 60-66.
  18. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
  19. Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 1049-1054.
  20. Nam, S. W., H. Y. Park, J. H. Kim, J. H. Seo, N. S. Han and B. W. Kim. 2001. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 727-730.
  21. Ohta, K., S. Hamada, and T. Nakamura. 1993. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 729-733.
  22. Park, J. B. and Y. J. Choi. 1996. Purification and characterization of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. A-6. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 402-406.
  23. Scotti, P. A., M. Praestegaard, R. Chambert and M. R. Petit-Glatron. 1996. The targeting of *Bacillus subtilis* levansucrase in yeast is correlated to both the hydrophobicity of the signal peptide and the net charge of the N-terminus mature part. *Yeast* **12**: 953-963.
  24. Vandamme, E. J. and D. G. Derycke. 1983. Microbial inulinase: fermentation process, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**: 139-176.
  25. Yun, J. W., Y. J. Choi, C. H. Song, and S. K. Song. 1999. Microbial production of inulooligosaccharides by an endoinulinase from *Pseudomonas* sp. expressed in *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 291-295.
  26. Zhang, L., C. Zhao, D. Zhu, Y. Ohta, and Y. Wang. 2004. Purification and characterization of inulinase from *Aspergillus niger* AF10 expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification* **35**: 272-275.

(Received Dec. 1, 2005/Accepted Dec. 16, 2005)