

## 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*에서 Inulinase와 Invertase의 발현과 분비에 미치는 배양조건의 영향

남수완\* · 신동하 · 김연희

동의대학교 미생물학과

**Effect of Culture Conditions on Expression and Secretion of Inulinase and Invertase in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.** Soo-Wan Nam\*, Dong-Ha Shin and Youn-Hee Kim. Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea - The effects of medium pH and culture temperature on the expression and secretion of inulinase and invertase were investigated with recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. These cells were obtained by transformation of 2  $\mu$ -based plasmids pYI10 and pYS10 which contain *Kluyveromyces marxianus* inulinase gene (*INU1A*) and *S. cerevisiae* invertase gene (*SUC2*), respectively, in the downstream of *GAL1* promoter. The expression level and localization of inulinase and invertase were not affected significantly by the initial medium pH: secretion efficiencies of inulinase and invertase into the medium were about 90% and 60%, respectively, in the pH ranges of 4.0 to 6.5. However, the expression and secretion of both enzymes were strongly dependent on the culture temperature. The highest expression (7.7 units/mL) and secretion (6.7 units/mL) of inulinase were observed at 28°C and 30°C. As a consequence of decreased localization of inulinase in the periplasmic space, the secretion efficiency increased from 68% at 20°C to 95% at 35°C. The total expression level and secretion efficiency of invertase increased from 19 units/mL and 55% at 20°C to 25 units/mL and 68% at 35°C, respectively. Irrespective of the culture temperature, the invertase activity in the cellular fraction (periplasmic space and cytoplasmic fractions) was kept constant at around 33~45%.

효모에서 분비성 단백질이 periplasmic space에 잔존하는 정확한 분자기작은 아직까지 불분명하며, 큰 단백질보다 작은 단백질이 더 효율적으로 분비되므로 세포벽은 일종의 분자체(molecular sieve)로 작용한다는 이론이 제기되고 있다(1). 그러나, 최근 Rossini 등(2)은 *E. coli*  $\beta$ -galactosidase의 분비에 관한 연구에서 효모 세포벽은 단순한 분자체로 작용하지 않고 목적단백질과 periplasmic space잔존에 기여한다고 주장하였다. 즉, 세포벽에는 여러 종류의 하전기(charged group)가 존재하며 이들의 수와 종류는 세포벽 구조와 조성에 영향을 미치는 배양조건의 함수로 변화한다고 보고하였다. 예로,  $\beta$ -galactosidase의 분비에서 세포벽의 crossing 단계가 온도 의존성이 보고되었고(2), 인간 interferon과 proinsulin의 경우 배양온도가 낮을 때 단백질분해(proteolysis)가 감소되어 최종 분비량이 증가됨이 보고되었다(3-5). 이러한 단백질분해 감소효과는 prourokinase의 분비 생산시, 첨가한 인산에 의해 배지의 pH가 높게 유지될 때 관찰되었다(6). 인간 lysozyme 생산에서는 초기 탄

소원 농도와 기타 배지성분의 최적화등을 통해 분비수율이 7-8배 증가되었으며(7), 혈액응고인자 XIIIa와 인간 lipocortin-1의 발현 분비 연구(8,9)에서는 탄소원(포도당 또는 galactose) 농도와 공급방법에 따라, 신경성장인자의 분비생산 연구(10)에서는 사용한 yeast extract와 casamino acid의 종류에 따라 산물의 발현과 분비효율이 크게 좌우되었다. 따라서, 효모에서의 재조합 단백질의 발현과 분비효율(또는 분비극대성)은 사용한 효모속주세포, 목적 단백질, 배양조건(배양온도, pH, 배지조성 및 농도) 및 세포의 생리적 상태에 의해 크게 영향을 받기 때문에 재조합 단백질 산물의 분비생산을 위한 최적의 배양조건은 그 선택에 신중을 기해야 한다.

1983년에 cloning된 invertase 유전자(*SUC2*)는(11) 효모에서의 당단백질 분비기작에 관한 연구에 가장 널리 사용되고 있으며(12-14), *K. marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424의 inulinase 유전자도 cloning되어 그 염기서열이 보고되었다(15, 16). Inulinase 유전자(*INU1* 또는 *INU1A*)의 ORF 크기는 1.67 kb이며 코딩하는 단백질은 555개(*INU1A*의 경우 556개) 아미노산으로 구성된 당단백질(15개소의 N형-당쇄부가 가능부위)이다. Invertase(13개소의 N형-당쇄부가 가능부위)와의 아미노산 서열 상동성은 67%에 달하여 이 두 효소의 진화적 상관성은 매우 높으며, 아미노 말단에는 소수성 peptide

\*Corresponding author

Tel. 82-51-890-1537, Fax. 82-51-891-7740

E-mail: swnam@hyomin.dongeu.ac.kr

Key words: Inulinase, Invertase, *Saccharomyces cerevisiae*, Secretion, Culture conditions

로 구성된 특징적인 분비신호서열을 가지고 있다. 그러나, 이렇게 높은 상동성에도 불구하고 이들 두 효소의 가장 큰 차이점은 기질 특이성(sucrose와 inulin의 분해 활성비; S/I ratio)과 분비 국재성(localization) 및 oligomer 형태에 있다. 즉, invertase의 S/I ratio는 5,800~14,000이며, inulinase의 S/I ratio는 3.5~26정도로 알려져 있다(17, 18). 또한, *S. cerevisiae* invertase는 세포벽 잔존 효소(periplasmic enzyme)이고 8개의 동일한 subunit로 구성된 octamer(배지로 분비되는 소량의 invertase는 dimer)인데 반하여(14), *K. marxianus* inulinase는 균체외 효소(extracellular enzyme)이고 dimer 형태이며 소량의 세포벽 inulinase는 tetramer이다(19).

본 연구에서는 *K. marxianus* 유래의 inulinase와 *S. cerevisiae* 유래의 invertase를 model 단백질로 설정하여 *S. cerevisiae*에서 발현시킬 때 그 발현량과 분비효율 또는 분비국재성에 미치는 배양조건(초기 pH, 배양온도)의 영향을 분석하여 효모로부터 재조합 당단백질의 분비생산을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 효모속주세포는 *S. cerevisiae* SEY 2102 (*MAT $\alpha$  ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-519 suc2- $\Delta$ 9*)(20)로써 uracil, leucine 및 histidine 요구성 변이주이며 동시에 염색체상의 *SUC2* 유전자가 제거되어 숙주 세포 자체로는 invertase를 생산할 수 없어 재조합 inulinase의 활성 측정에는 전혀 영향을 줄 수 없다. *E. coli-S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES2.0 (Invitrogen Co., USA)에 *SUC2*와 *INU1A*를 각각 subcloning한 pYS10 및 pYI10를 invertase와 inulinase 유도성 발현 plasmids로 사용하였다(21). 이 두 plasmids에서는 *GAL1* promoter와 *CYC1* terminator가 유전자 전사를 조절하며, 선택표지로 *URA3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를, 효모 복제원으로 2- $\mu$ m 복제원을 함유하고 있다.

### 형질전환, 배지 및 배양조건

pYI10과 pYS10 plasmids의 효모 *S. cerevisiae* SEY 2102로의 형질전환은 LiCl 법(22)을 사용하였다. 효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose, 0.5% casamino acid)를 사용하였고, 재조합 균주를 SEY2102/pYI10, SEY2102/pYS10으로 각각 명명하였다. 재조합 효모의 flask 배양을 위해서는 YPDG 배지(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% dextrose, 1% galactose)를 사용하였다. *SUC2* 또는

*INU1A*의 발현과 분비에 미치는 초기 pH(4.0-6.5) 및 배양온도(20-35°C)의 영향은 YPDG 배지를 50 mL 함유하는 500 mL baffled-flasks로 200 rpm의 진탕배양기(SI-900R, Jeio Tech Co., Korea)에서 수행하였다. 동일 조건에서 duplicate로 flask 배양을 하였으며, 일반적인 경향을 벗어난 결과(비증식속도나 분비속도등)의 경우는 (pH4.5, 6.0과 배양온도 25°C, 28°C, 30°C등) 재실험을 통하여 확인하였다.

### 분석방법

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 필요시 OD<sub>600</sub> 값은 표준곡선으로부터 건조균체농도(dry cell weight; DCW)로 환산하였다(1.0 OD<sub>600</sub>=0.32 g-DCW/L). 배양액을 3,000×g에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(23)을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD(1% Bacto-yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose) 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 colonies를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

### 균체분획 및 효소 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads (0.4-0.5 mm)를 사용하여 periplasmic space 분획과 전세포분획을 얻었으며(21), 이들 분획과 배양상등액을 사용하여 각 분획에서의 inulinase 및 invertase 활성을 측정하였다. Inulinase 활성은 1.5% inulin(Jerusalem artichoke, Sigma)를 기질로 사용하여 측정하였으며 pH5.0 (0.1 M Na·acetate buffer), 50°C에서 1분당 1  $\mu$ mole의 환원당(fructose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. Invertase 활성은 2% sucrose를 기질로 사용하여 측정하였으며 pH4.7 (0.1 M Na·acetate buffer), 37°C에서 1분당 1  $\mu$ mole의 환원당(dextrose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 비활성도(specific activity)는 각 효소 활성을 균체농도(OD<sub>600</sub> 또는 DCW)로 나누어서 계산하였다. 효소 활성 측정시 산물인 환원당의 정량은 DNS 방법(23)을 사용하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소활성(균체외 활성+균체내 활성)에 대한 균체외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다. 효소 활성 측정에는 항온수조(WBC-2330, Jeio Tech Co., Korea)를 사용하여 해당 온도( $\pm$ 0.01°C)에서 원하는 시간동안 정밀하게 반응시켰다.

결과 및 고찰

초기 pH의 영향

배양 초기 pH를 4.0에서 6.5까지 변화시키면서 SEY 2102/pYI10 균주를 flask 회분배양한 결과(Fig. 1.(a)-(c)), 배양 12시간내에 약간의 pH 감소가 관찰되고 이후 서서히 증가하여 48시간 이후에는 거의 일정하게 유지되었다(Fig. 1.(a)). 균체증식은 배양 초기 12시간(dextrose 소모구간)까지 빠른 속도를 보이다가 이후 36시간까지 일정한 속도( $\mu=0.10\sim0.11\text{ hr}^{-1}$ )를 보인 후 정지기에 들어가 29-33 OD<sub>600</sub> 값의 최종균체농도를 보였다(Fig. 1.(b)). 초기 pH 5.0에서 가장 빠른  $\mu$ 값 ( $0.11\text{ hr}^{-1}$ )을 보였으나 다른 pH 때의  $\mu$ 값( $\mu=0.10\text{ hr}^{-1}$ )과는 큰 차이를 보이지 않았다. 배양 초기의 빠른 증식속도는 공급된 dextrose의 탄소원과 yeast extract 및 peptone 유래의 아미노산, nucleotides, vitamins 등 세포가 쉽게 이용할 수 있는 질소원 때문으로 생각된다. 배지중에 dextrose가 고갈되는 12시간 이후 catabolite repression

은 해제되어 inulinase 발현이 시작되었다(Fig. 1.(c)). 배양 48시간 이후 세포내 inulinase(세포벽 잔존 inulinase 활성포함)는 일정한 수준으로 유지되지만 배지의 분비생산은 60시간까지 계속되었다. 초기 pH가 4.5 또는 5.0인 경우 가장 빠른 inulinase 분비속도( $0.22\text{ units/mL/hr}$ )를 보였으며, 초기 pH가 6.0 또는 6.5인 경우 48시간 이후 그 분비속도는 약간 둔화되었다(24시간부터 36시간까지의 분비속도는  $0.19\text{ units/mL/hr}$ 였다).

SEY2102/pYS10 균주인 경우 초기 pH에 따른 배양중 pH 변화, 균체증식등은 SEY2102/pYI10 균주와 대체로 비슷하였으며(Fig. 2.(a)-(b)), 초기 pH 5.0에서 가장 빠른  $\mu$ 값( $0.11\text{ hr}^{-1}$ )을 보였다. Inulinase 발현과 가장 큰 차이점은 invertase의 발현과 분비기간이었다(Fig. 2.(c)). 즉, inulinase의 경우 발현과 분비는 배양 60시간까지 계속되었으나, invertase는 48시간까지 발현(분비는 36시간까지)되고 이후 일정한 발현 및 분비 수준에 머물렀다. 배지중에 dextrose가 고갈되는 12시간에서도 invertase 발현이 일어난 것은 pYS10 plasmid 구축시 함께 subcloning된 SUC2 promoter에 기인하는 것으로 생

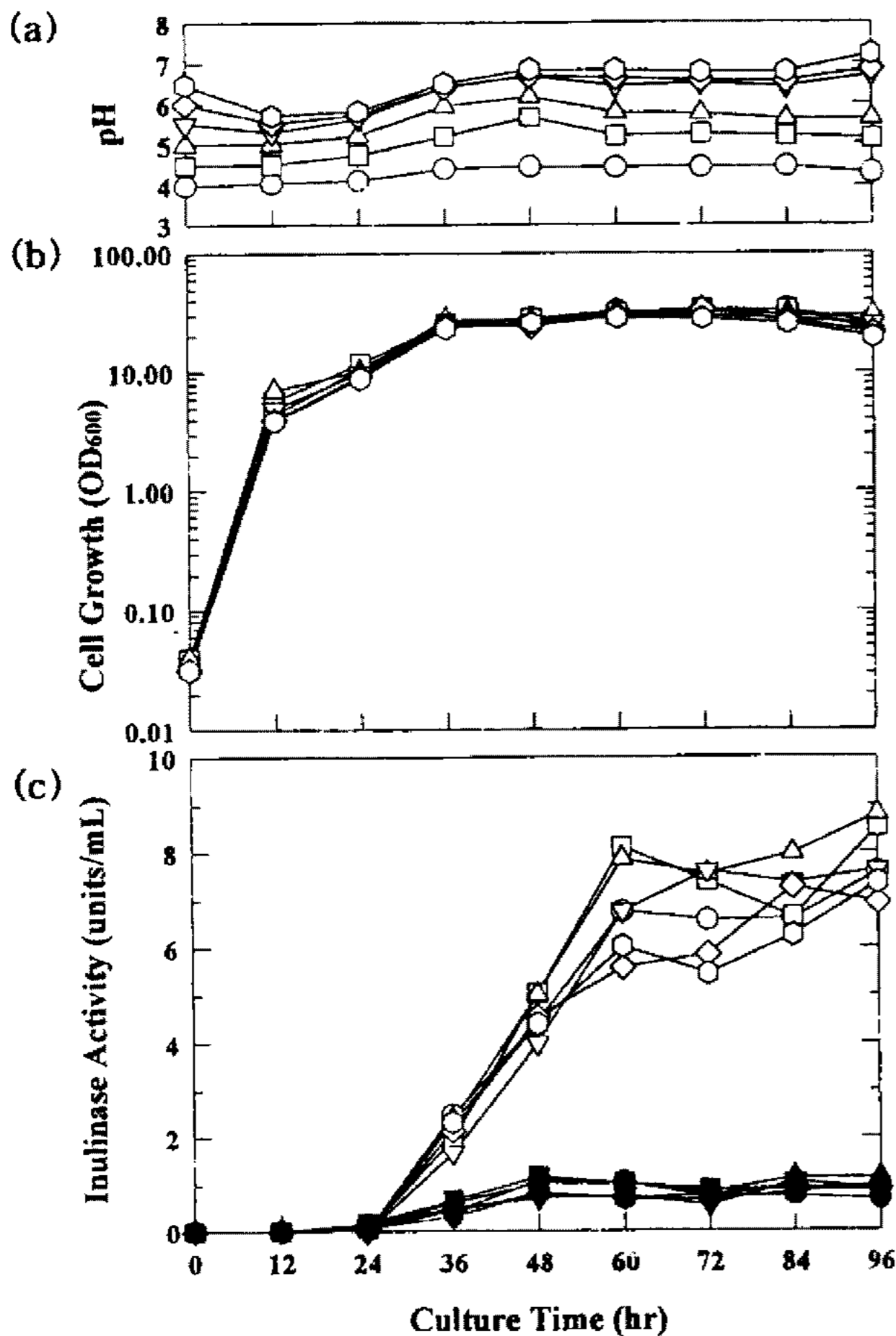


Fig. 1. Effect of initial pH on the cell growth and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYI10. (a) pH profiles, (b) cell growth, (c) inulinase expression. Initial pHs are 4.0 (○), 4.5 (□), 5.0 (△), 5.5 (▽), 6.0 (◇), and 6.5 (○). (open symbols), extracellular inulinase activity; (closed symbols), whole cell inulinase activity.

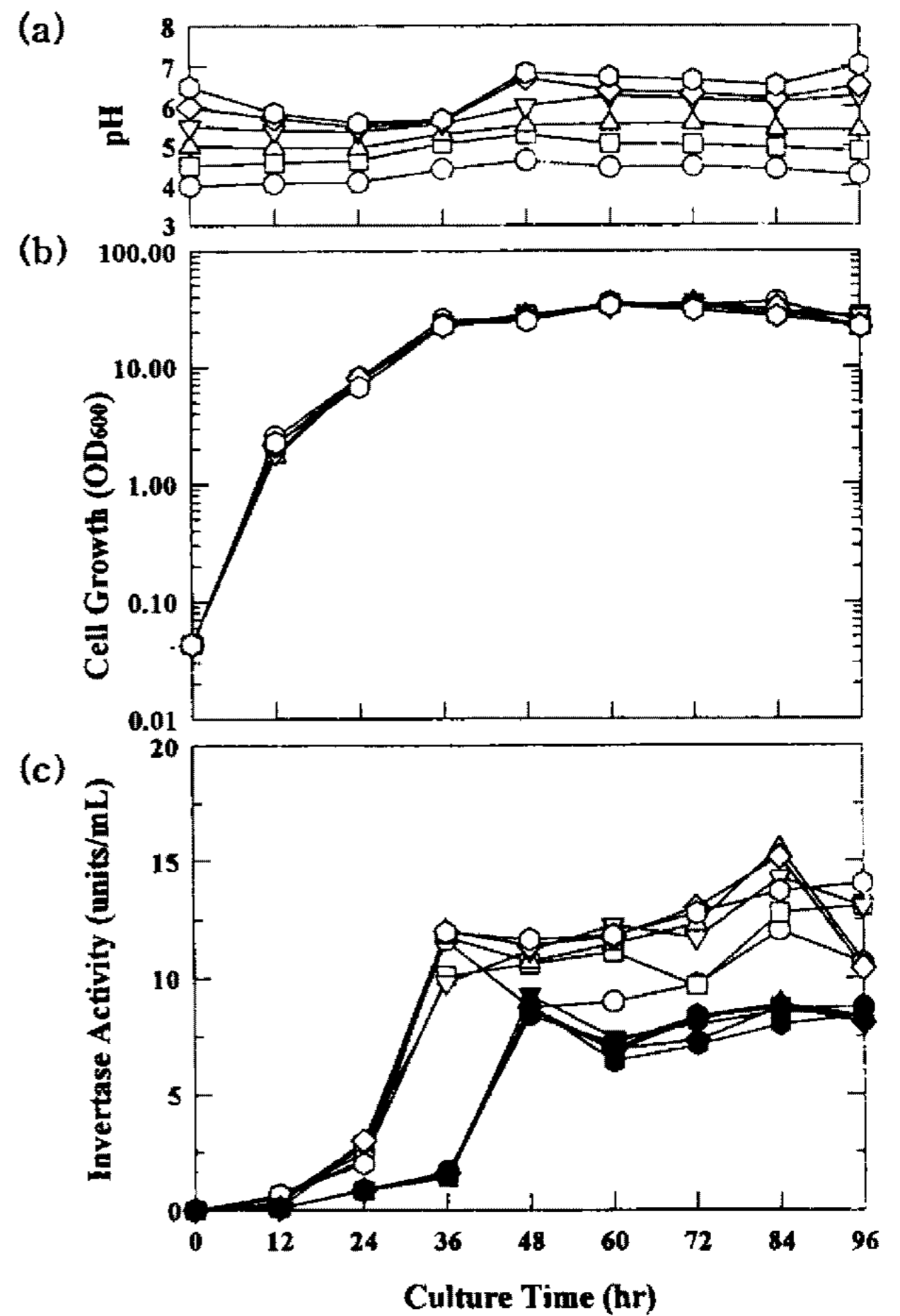


Fig. 2. Effect of initial pH on the cell growth and invertase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYS10. (a) pH profiles, (b) cell growth, (c) invertase expression. Symbols are the same as in Fig.1. (open symbols), extracellular invertase activity; (closed symbols), whole cell invertase activity.

**Table 1. Effect of initial pH on the cell growth, plasmid stability, and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYI10. The measurements were made at 60 hr cultivation on YPDG medium**

Initial pH	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Inulinase Activity (units/mL)			Secretion Efficiency (%)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	
4.0	32.7	85	6.76	1.03	<0.01	87
4.5	31.1	89	8.11	0.98	0.03	89
5.0	32.2	88	7.86	0.98	0.04	89
5.5	29.9	86	6.76	0.80	0.01	89
6.0	29.6	79	5.58	0.70	0.02	89
6.5	28.7	80	6.03	0.68	<0.01	90

**Table 2. Effect of initial pH on the cell growth, plasmid stability, and invertase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYS10. The measurements were made at 60 hr cultivation on YPDG medium**

Initial pH	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Invertase Activity (units/mL)			Secretion Efficiency (%)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	
4.0	35.5	78	8.96	3.91	3.29	55
4.5	34.8	82	11.09	4.02	2.86	62
5.0	33.6	75	11.45	3.80	3.20	62
5.5	33.4	85	12.24	3.93	3.51	62
6.0	35.1	81	11.76	3.37	3.23	64
6.5	33.7	87	11.81	3.75	2.66	65

각된다(21): *SUC2* promoter는 dextrose 농도가 낮을 때에도 전사 기능을 발휘한다(11, 24). Galactose가 본격적으로 소모되는 배양 12시간 이 후 invertase의 발현과 분비는 활발하게 일어나고 있으며 초기 pH가 높을수록 빠른 분비속도(pH6.5일 때 0.83 units/mL/hr의 가장 빠른 분비속도)를 보이고 있고, 초기 pH가 4.0인 경우 가장 낮은 invertase 발현을 보였다.

이상의 초기 pH 영향 결과(배양 60시간때)와 각 분획(periplasmic space와 cytoplasm)에서의 분비국재성을 Table 1 (SEY2102/pYI10)과 Table 2 (SEY2102/pYS10)에 정리하였다. 최종 균체농도는 SEY2102/pYS10 균주가 3~4 OD<sub>600</sub> 정도 더 높았으며, plasmid 안정성은 초기 pH에 크게 영향을 받지 않고 두 균주 모두 75~90% 범위에서 안정하게 유지되었다(접종시 plasmid 안정성은 94%였다). Inulinase의 발현은 pH가 6.0이상 일 때 6.3~6.7 units/mL 수준으로 낮았으며, 분비국재성은 초기 pH에 크게 영향을 받지 않았다. 즉, 배지로의 분비효율은 대체로 90% 수준이었으며, periplasmic space에는 10% 내외, cytoplasm에는 1% 이하로 잔존하고 있었다. Invertase의 발현과 분비에도 초기 pH는 큰 영향을 미치지 않았으며(초기 pH가 4.0 인 경우 가장 낮은 16.2 units/mL의 발현량과 55%의 분비효율을 보였다), 60% 정도의 분비효율을 보이며 periplasmic space에는 20%, cytoplasm에는 15~20% 정도 invertase 활성이 잔존하고 있었다. Cytoplasm내 invertase 활성은 *SUC2* promoter에 의해 구성적으로 발현되는 cytoplasmic core-glycosylated invertase로 판단된다(11). Inulinase의 경

우 가장 높은 총발현량(9.1 units/mL)과 비활성(0.91 units/mg-DCW)은 pH4.5에서 관찰되었으며, invertase의 경우 pH5.5에서 가장 높은 총발현량(19.7 units/mL)과 비활성(1.84 units/mg-DCW)을 보였다.

*SUC2* 자체 promoter를 이용한 invertase 발현 연구(25)에서는 가장 높은 발현량과 비활성(units/mL/OD)이 pH6.5에서 관찰되었다. Marten 등(25)은 pH를 배양 전구간에 걸쳐 조절하였으며 본 연구에서는 초기 pH만을 조절하였다. 또한, 발현 promoter(*GAL1* promoter와 *SUC2* promoter)와 배양 system의 차이(fermentor와 flask) 및 사용배지의 차이(SD 배지와 YPDG 배지)에도 기인하여 본 연구와 다른 결과를 보이는 것으로 판단된다.

#### 배양온도의 영향

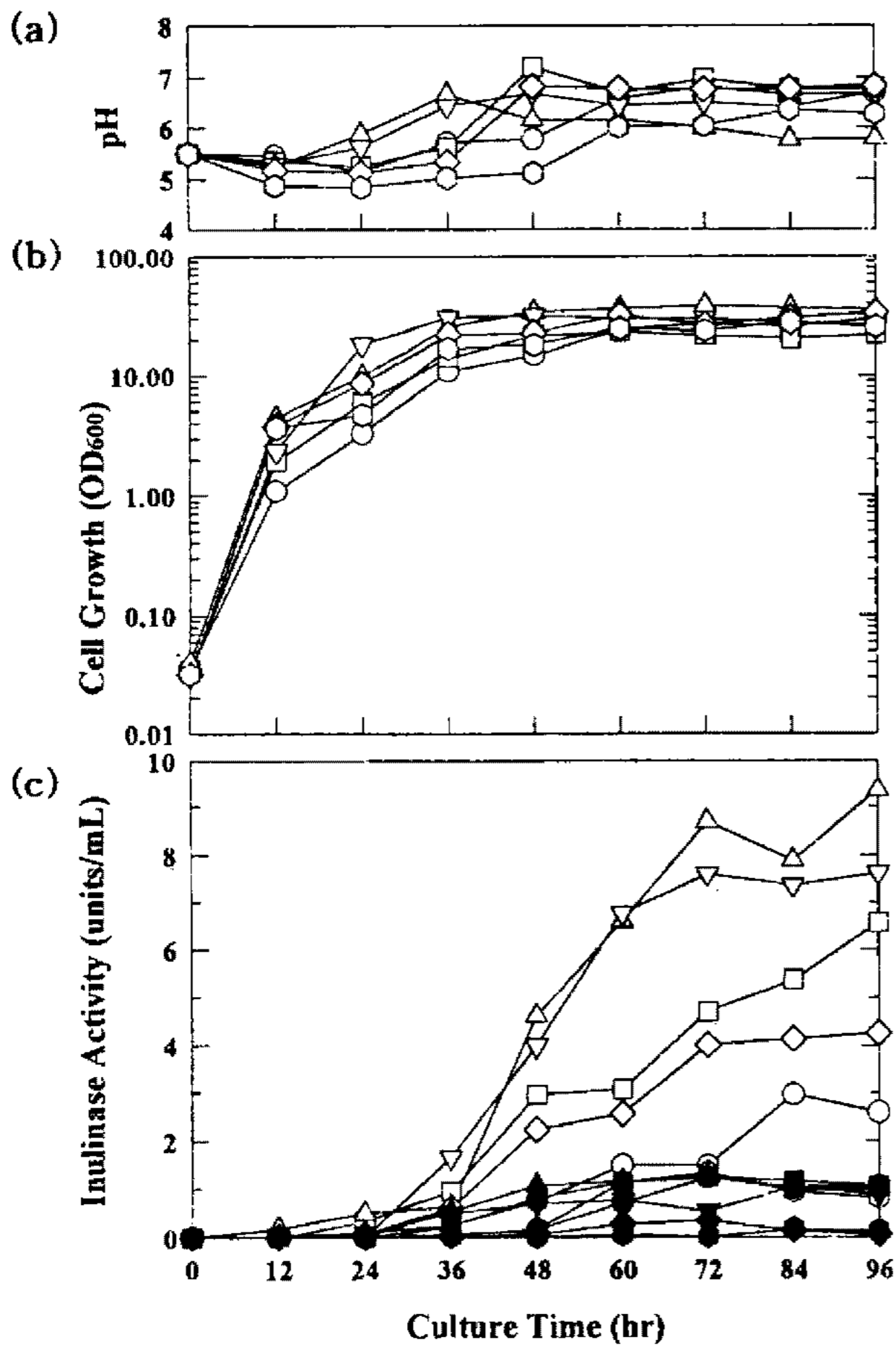
Inulinase와 invertase의 발현과 분비에 미치는 배양온도의 영향을 분석하기 위해 배양 온도를 20°C에서 35°C까지 변화시키면서 SEY2102/pYI10와 SEY2102/pYS10 두 균주를 배양(초기 pH4.5, YPDG 배지 사용)하였다. 배양초기 약간의 pH 저하가 관찰되고, 이 후 서서히 증가하여 일정하게 유지되는 양상을 보였다(Fig. 3.(a), Fig. 4.(a)). 두 균주 모두 온도가 낮을수록 균체증식속도는 감소하며 48시간 이 후 정지기에 들어간다(Fig. 3.(b), Fig. 4.(b)). 배양 12시간 이 후의 galactose 소모구간에서의 비증식속도( $\mu$ )는 28°C 이하에서 0.07-0.08 hr<sup>-1</sup>, 30°C 이상에서는 0.11 hr<sup>-1</sup> 값을 보였다.

Inulinase의 경우(Fig. 3.(c)) 발현속도는 28°C 또는 30°C에서 가장 빨랐으며, 분비는 72시간까지 계속되고

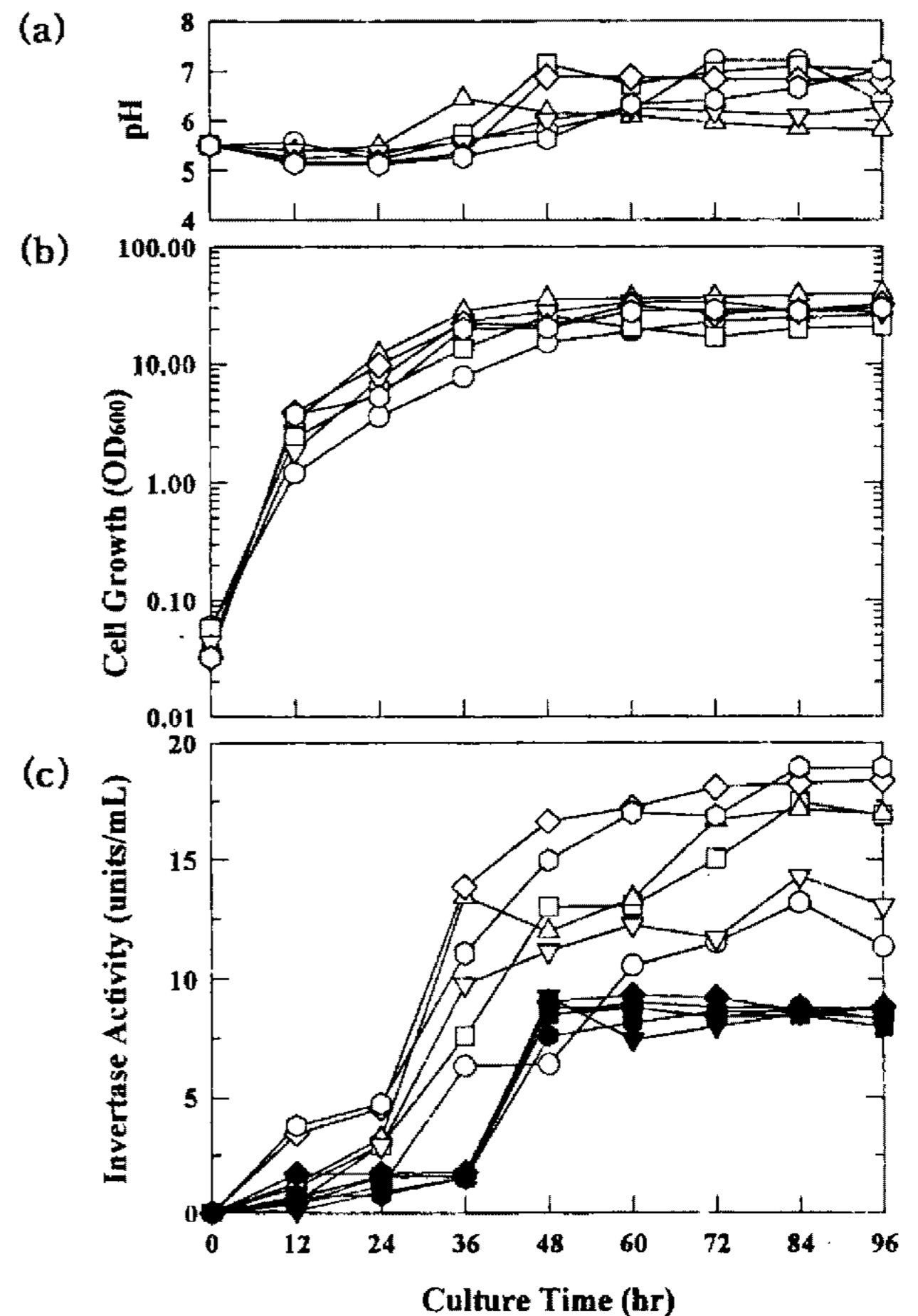
그 분비속도는 30°C에서 0.21 units/mL/hr, 28°C에서 0.33 units/mL/hr 값을 보였다. 최종 분비된 inulinase 양도 30°C 때보다 28°C 때가 높았다. Invertase의 경우 (Fig. 4.) 초기 pH 영향 실험에서와 같이(Fig. 2.(c)) 24시간과 48시간 사이에서 invertase 발현과 분비가 집중적으로 일어나며, 배양 48시간 이 후 균체내 invertase 활성은 8-9 units/mL의 일정한 수준에서 유지되는 반면, 균체의 배지로의 분비는 48시간 후부터 느린 속도

로 72시간까지 계속되었다. 특히, 33°C와 35°C의 높은 온도에서 invertase 분비와 발현량이 뛰어남을 알 수 있다.

이상의 배양 온도 영향 결과(배양 60시간때)와 각 분획(periplasmic space와 cytoplasm)에서의 분비국재성을 Table 3 (SEY2102/pYI10)과 Table 4 (SEY2102/pYS10)에 정리하였다. 균체농도는 28°C-33°C 범위에서 OD<sub>600</sub> 값이 30이상으로 높았으며 그 중에서 28°C에서 가장 높은 균체농도(34-36 OD<sub>600</sub>)를 보였다. Plasmid 안정



**Fig. 3. Effect of culture temperature on the cell growth and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYI10. (a) pH profiles, (b) cell growth, (c) inulinase expression.** Culture temperatures are 20°C (○), 25°C (□), 28°C (△), 30°C (▽), 33°C (◇), and 35°C (◇). (open symbols), extracellular inulinase activity; (closed symbols), whole cell inulinase activity.



**Fig. 4. Effect of culture temperature on the cell growth and invertase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYS10. (a) pH profiles, (b) cell growth, (c) invertase expression.** Symbols are the same as in Fig.3. (open symbols), extracellular invertase activity; (closed symbols), whole cell invertase activity.

**Table 3. Effect of culture temperature on the cell growth, plasmid stability, and inulinase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYI10. The measurements were made at 60 hr cultivation on YPDG medium**

Culture Temperature (°C)	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Inulinase Activity (units/mL)			Secretion Efficiency (%)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	
20	24.5	87	1.50	0.70	0.02	68
25	23.6	86	3.09	1.07	0.07	73
28	33.8	78	6.60	0.97	0.19	85
30	30.0	86	6.76	0.80	0.01	89
33	32.1	67	2.58	0.28	<0.01	90
35	25.0	65	1.15	0.06	<0.01	95

**Table 4. Effect of culture temperature on the cell growth, plasmid stability, and invertase expression in *S. cerevisiae* SEY2102/pYS10. The measurements were made at 60 hr cultivation on YPDG medium**

Culture Temperature (°C)	Cell Growth (OD <sub>600</sub> )	Plasmid Stability (%)	Invertase Activity (units/mL)			Secretion Efficiency (%)
			Medium	Periplasm	Cytoplasm	
20	19.1	86	10.56	4.35	4.28	55
25	20.4	91	13.05	4.35	4.43	60
28	36.4	79	13.36	4.52	4.51	60
30	33.4	85	12.24	3.93	3.51	62
33	31.3	75	17.22	4.29	4.23	67
35	27.7	64	17.02	4.18	3.99	68

성은 30°C 이하에서는 80% 이상으로 유지되나 33°C와 35°C에서 65-75% 수준으로 다른 온도 때보다 낮게 유지되었다(접종시 plasmid 안정성은 90% 수준이었다). Inulinase와 invertase의 발현량과 분비국재성은 배양온도에 크게 영향을 받으며, inulinase는 배양온도가 낮거나 (20°C, 25°C) 높을 때(33°C, 35°C) 그 총발현량은 크게 감소하였다. 28°C~30°C에서 가장 높은 inulinase 총발현량(7.7 units/mL)과 분비(6.7 units/mL)를 보였다. Cytoplasm 잔존 inulinase 활성은 온도에 무관하게 2% 이하로 관찰되었으나, periplasmic space에 잔존하는 inulinase 양은 온도가 증가할수록 감소하여 20°C의 32%에서 35°C의 5% 수준까지 감소하였다. 즉, 온도가 낮을수록 inulinase는 periplasmic space에 더 많이 잔존하여 배지르의 분비효율이 낮았다(35°C의 95%에서 20°C의 68%까지 분비효율이 감소하였다). Invertase는 온도가 높을수록 총발현량 및 분비효율이 증가하였다. 즉, 총발현량은 20°C의 19 units/mL에서 35°C의 25 units/mL 수준까지 증가하였으며, 분비효율은 20°C의 55%에서 35°C의 68%까지 증가하는 분비양상을 보였다. Periplasmic space와 cytoplasm에 잔존하는 invertase 활성은 30°C이하에서 약 40% 수준으로 일정하나, 33°C와 35°C에서는 33% 수준으로 감소하였다. 비활성을 비교해 보면, inulinase의 경우 20°C에서 30°C까지 온도가 높을수록 증가하여 30°C에서 가장 높은 0.79 units/mg-DCW 값을 나타낸 반면, invertase는 20°C와 25°C의 낮은 온도에서 높은 비활성을 나타내고 25°C에서 가장 높은 3.34 units/mg-DCW를 보였다. Invertase는 30°C이상에서 온도에 따라 증가하는 비활성을 보여 35°C에서는 2.84 units/mg-DCW의 비활성을 보였다.

Invertase(25)와  $\beta$ -galactosidase(2) 발현에서는 배양온도가 높을수록 이들 효소가 효율적으로 발현·분비되었다. Rossini 등(2)은 그 이유로 높은 온도에서 세포벽 구조가 느슨하게 변화됨에 기인한다고 주장하였다. 반면에 인간 interferon과 proinsulin의 발현에서는 낮은 배양온도에서 높은 분비량을 보여 단백질 분해(proteolysis) 저하 정도가 분비효율 증가에 주된 요인으로 작용한다고 주장하였다(3-5). Acid phosphatase 발현에서는 배

양온도가 낮을 때 단백질 접힘(folding)이 증가하여 소포체(ER) 이후의 분비단계가 개선되고, 결과적으로 그 분비능이 증가됨이 보고되었다(26). 이와 같이 목적 단백질에 따라 배양온도는 다양한 요인(세포벽 구조, 단백질 분해, 단백질 접힘등)에 의해 분비효율 또는 분비국재성에 크게 영향을 미치는 바, 본 연구의 inulinase 및 invertase의 분비에서는 배양온도가 증가할수록 분비효율이 증가하고, periplasmic space 분획에서의 잔존활성이 감소하므로(Table 3과 Table 4), 온도에 따른 세포벽 구조 변화가 분비국재성을 좌우하는 주된 요인이라 판단된다. 또한, inulinase는 *K. marxianus*에서와 마찬가지로(27) *S. cerevisiae*에서도 대부분 배지로 분비생산되고(약 85% 이상)(28, 29), invertase는 항상 55~65% 정도만 분비되므로, inulinase 및 invertase의 분비에는 세포벽 구조와 관련된 효모 균주 특이적(strain-specific)인 요인 외에도 단백질 특이적인(protein-specific) 요인, 즉, 이들 단백질 내부에 특유의 분비관련 신호가 존재함을 알 수 있다.

## 결론

*K. marxianus* 유래의 inulinase와 *S. cerevisiae* 유래의 invertase를 *S. cerevisiae*에서 발현시켜 재조합 inulinase와 invertase의 발현과 분비에 미치는 초기 pH와 배양온도의 영향을 조사하였다. 배양 초기 pH를 4.0에서 6.5까지 변화시키면서 inulinase와 invertase의 발현량 및 분비효율을 조사한 결과, inulinase의 분비국재성은 초기 pH에 크게 영향을 받지 않았고, 배지로의 분비효율은 대체로 90% 수준이었으며, periplasmic space에는 10%, cytoplasm에는 1% 이하로 잔존하고 있었다. Invertase의 발현과 분비에도 초기 pH는 큰 영향을 미치지 않았고, 조사한 범위의 pH에서 60% 정도의 분비효율을 보이며 periplasmic space에는 20%, cytoplasm에는 15~20% 정도 invertase 활성이 잔존하였다. Inulinase의 경우 가장 높은 총발현량(9.1 units/mL)과 비활성(0.91 units/mg-DCW)은 pH4.5에서 관찰되었으며, invertase의 경우 pH5.5에서 가장 높은 총발현량(19.7 units/

mL)과 비활성(1.84 units/mg-DCW)을 보였다. 배양 온도를 20°C에서 35°C까지 변화시키면서 배양한 결과, pH 영향과는 달리 inulinase와 invertase의 발현량과 분비국재성은 배양온도에 크게 영향을 받았다. 즉, inulinase는 배양온도가 낮거나(20°C, 25°C) 높을 때(33°C, 35°C) 그 총발현량은 크게 감소하였으며, 28°C와 30°C에서 가장 높은 7.7 units/mL의 발현량과 6.7 units/mL의 분비량을 각각 보였다. Cytoplasm 잔존 inulinase 활성은 온도에 무관하게 2% 이하로 관찰되었으나, periplasmic space에 잔존하는 inulinase 양은 온도가 증가할수록 감소하여 20°C의 32%에서 35°C의 5% 수준까지 감소하였다. 이에 따라 분비효율도 20°C의 68%에서 35°C의 95%까지 증가하였다. Invertase는 온도가 높을수록 총발현량 및 분비효율이 증가하였다. 즉, 총발현량은 20°C의 19 units/mL에서 35°C의 25 units/mL 수준까지 증가하였으며, 분비효율은 20°C의 55%에서 35°C의 68%까지 증가하는 분비양상을 보였다. Inulinase와는 달리 periplasmic space와 cytoplasm에 잔존하는 invertase 활성은 온도에 상관없이 대체로 33~45% 수준으로 일정하였다.

### 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 1995년도 국산연구기기 시험연구사업의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- De Nobel, J. G. and J. A. Barnett. 1991. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast*. **7**: 313-323.
- Rossini, D., D. Porro, L. Brambilla, M. Venturini, B. M. Ranzi, M. Vanoni and L. Alberghina. 1993. In *Saccharomyces cerevisiae*, protein secretion into the growth medium depends on environmental factors. *Yeast*. **9**: 77-84.
- Kramer, R. A., T. M. DeChiara, M. D. Schaber and S. Hilliker. 1984. Regulated expression of a human interferon gene in yeast: control by phosphate concentration or temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**: 367-370.
- Fieschko, J. C., K. M. Egan, T. Ritch, R. A. Koski, M. Jones and G. A. Bitter. 1987. Controlled expression and purification of human immune interferon from high-cell-density fermentations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **29**: 113-121.
- Tottrup, H. V. and S. Carlsen. 1990. A process for the production of human proinsulin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 339-348.
- Melnick, L. M., B. G. Turner, P. Puma, B. Price-Tillotson, K. A. Salvato, D. R. Dumais, D. T. Moir, R. J. Broeze and G. C. Avgerinos. 1990. Characterization of a nonglycosylated single chain urinary plasminogen activator secreted from yeast. *J. Biol. Chem.* **265**: 801-807.
- Ichikawa, K., K. Komiya, K. Suzuki, T. Nakahara and Y. Jigami. 1989. The effects of culture conditions on the secretion of human lysozyme by *Saccharomyces cerevisiae* A2-1-1A. *Agri. Biol. Chem.* **53**: 2687-2694.
- Broker, M., O. Bauml, A. Gottig, J. Ochs, M. Bodenbenner and E. Amann. 1991. Expression of human blood coagulation factor XIIIa in *Saccharomyces cerevisiae*: dependence of the expression levels from host-vector systems and medium compositions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 756-764.
- Nam, S. W., D. J. Seo, S.-K. Rhee, Y. H. Park and B. H. Chung. 1993. Effect of galactose and dextrose on human lipocortin-1 expression in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* carrying galactose-regulated expression system. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 168-173.
- Fumio, H. 1991. 酵母によるヒト神経成長因子の分泌生産. *バイオサイエンスとインダストリー*. **49**: 1255-1262.
- Carlson, H. and D. Botstein. 1983. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*. **28**: 145-154.
- Esmon, B., P. C. Esmon and R. Schekman. 1984. Early step in processing of yeast glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **259**: 10322-10327.
- Schekman, R. 1985. Protein localization and membrane traffic in yeast. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**: 115-143.
- Esmon, P. C., B. E. Esmon, I. E. Schauer, A. Taylor and R. Schekman. 1987. Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.* **262**: 4387-4394.
- Ko, J. H. 1987. Studies on the extracellular secretion of proteins in yeast. Ph.D. Thesis, The University of Tokyo.
- Laloux, O., J. P. Cassart, J. Delcour, J. van Beeumen and J. Vantenhaute. 1991. Cloning and sequencing of the inulinase gene of *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 12424. *FEBS Lett.* **289**: 64-68.
- Snyder, H. E. and H. J. Phaff. 1960. Studies on a  $\beta$ -fructosidase(inulinase) produced by *Saccharomyces fragilis*. *Antonie van Leeuwenhoek: J. Microbiol. Serol.* **26**: 433-452.
- Rouwenhorst, R. J., L. E. Visser, A. A. van der Baan, W. A. Scheffers, and J. P. van Dijken. 1988. Production, distribution, and kinetics properties of inulinase in continuous cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1131-1137.
- Rouwenhorst, R. J., M. Hensing, J. Verbakel, L. E. Visser, W. A. Scheffers and J. P. van Dijken. 1990. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3337-3345.
- 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.

21. 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.
22. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
23. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
24. Patkar, A. and J.-H. Seo. 1992. Fermentation kinetics of recombinant yeast in batch and fed-batch cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 103-109.
25. Marten, M. R., C. M. Choi, and J. H. Seo. 1995. Effects of environmental variables on expression and secretion of cloned invertase from recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Foods Biotechnol.* **4**: 70-74.
26. Riederer, M. A. and A. Hinnen. 1991. Removal of N-glycosylation sites of yeast acid phosphatase severely affects protein folding. *J. Bacteriol.* **173**: 3539-3546.
27. Rouwenhorst, R. J., W. S. Ritmeester, W. A. Scheffers and J. P. van Dijken. 1990. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3329-3336.
28. Nam, S. W., M. H. Woo, B. M. Kim, B. H. Chung and Y. H. Park. 1994. Expression and localization of inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 152-157.
29. Nam, S. W., H. J. Lim, B. H. Chung, and Y. K. Chang. 1996. Expression and secretion of recombinant inulinase under the control of *GAL* or *GAP* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**: 445-452.

(Received 16 January 1997)