

## Expression of *Bacillus macerans* Cyclodextrin Glucanotransferase on the Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae*.

김규용, 김명동, 한남수\*, 서진호

서울대학교 식품공학과, 충북대학교 식품공학과\*

전화 (031) 290-2591, FAX (031) 293-4789

A whole-cell biocatalyst was constructed by immobilizing an enzyme on the surface of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The gene encoding *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase(CGTase) was fused with the *AGA2* gene encoding a small peptide disulfide-linked to the *aga1*, a cell wall protein of  $\alpha$ -agglutinin. The plasmid was introduced *S. cerevisiae* and expressed in the medium consisting of 10g/L yeast extract, 20g/L peptone, and 20g/L galactose. The activity was detected with the formation of cyclodextrin(CD) from 10g/L soluble starch. Surface display of CGTase was also verified with the halo-test, flow cytometry, and immunofluorescence microscopy. The recombinant *S. cerevisiae* produced  $\alpha$ -cyclodextrin more efficiently than the free CGTase by simultaneous fermentation and cyclization as yeast consumes glucose and maltose which are inhibitors for CD synthesis.

### 서 론

표면 발현 기술은 bacteriophage, bacteria, yeast, mammalian cell 등을 microbial biocatalysts, whole-cell absorbant 혹은 live vaccine 등으로 개발할 수 있는 첨단 기술이다. 이 중, yeast는 산업적으로 유용한 단백질 및 화학물질의 생산에 사용되고 있으며 특히 *Saccharomyces cerevisiae*는 GRAS(Generally Regarded As Safe)등급으로 식품, 제약 산업에도 응용되고 있으며, 또한 알려진 유전정보를 활용한 여러 가지 형질전환 시스템이 개발되고 있다.<sup>1)</sup>

Cyclodextrin(CD)은 hydrophilic outside와 hydrophobic central cavity를 가지고 있는 cyclic oligosaccharide이며 glucose의 수에 따라 각각  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD로 불리어진다. CD는 향기 성분이나 hydrophobicity가 강한 물질과 inclusion complex를 형성하여 분리 효율 및 안정성, 용해도를 증가시켜 식품, 제약, 화장품 등 산업적으로 유용하게 이용되고 있다. CD는 cyclodextrin glucanotransferase([EC 2.4.1.19];CGTase)의 효소반응에 의해 생산된다. CGTase의 작용기작은 크게 cyclization, coupling reaction, disproportionation으로 나누어진다.<sup>2)</sup> 이 효소반응은 starch를 기질로 했을 경우 기질저해를 받을 뿐만 아니라 CD를 생산하면서 형성되는 glucose와 maltose에 저해를 받으며<sup>3)</sup> glucose와 maltose를 acceptor로 coupling reaction과 disproportionation으로 CD를 올리고당으로 분해한다.

본 실험에서는 *S. cerevisiae*의 세포 표면에 *Bacillus macerans* CGTase를 발현시켜 효소

의 고정화를 통해 효소의 생산과 분리를 쉽게 하고 *S. cerevisiae*를 이용하여 효소 작용을 저해하고 CD 분해에 사용되는 glucose, maltose를 제거해 cyclodextrin의 생산, 분리 공정을 개선하도록 하였다.

### 재료 및 방법

*S. cerevisiae* pMDISCGT의 발현은 yeast extract 10g/L, peptone 20g/L과 galactose 20g/L(YPG)로 유도하였으며, cyclodextrin의 형성을 확인하기 위해 starch 10g/L를 첨가하였다. 효소의 표면 발현을 확인하기 위해 halo-test, immunofluorescence microscopy, flow cytometry 등을 사용하였으며 재조합 효모 및 효소 반응 산물인 CD와 부산물로 형성되는 glucose, maltose와 oligosaccharides의 구분을 위해 Thin Layer Chromatography(TLC)를 수행하였다.

### 결과 및 고찰

*E. coli*를 이용한 재조합 기술을 이용하여 만들어진 벡터인 pMDISCGT를 사용하여 *S.cerevisiae* EBY 100을 형질전환시켰다. 형질전환된 효모는 YNB trp- 배지를 이용하여 선별하였으며 효소의 발현은 YPG배지에 starch 10g/L를 넣어 cyclodextrin이 형성됨을 HPIC, HPLC, TLC등을 통하여 확인하였다. 효소의 표면 발현은 halo-test를 통하여 효소가 cell의 외부에 존재함을 확인하였으며 immunofluorescence microscopy와 flow cytometry를 통하여 cell membrane에 발현되어 있음을 확인하였다.

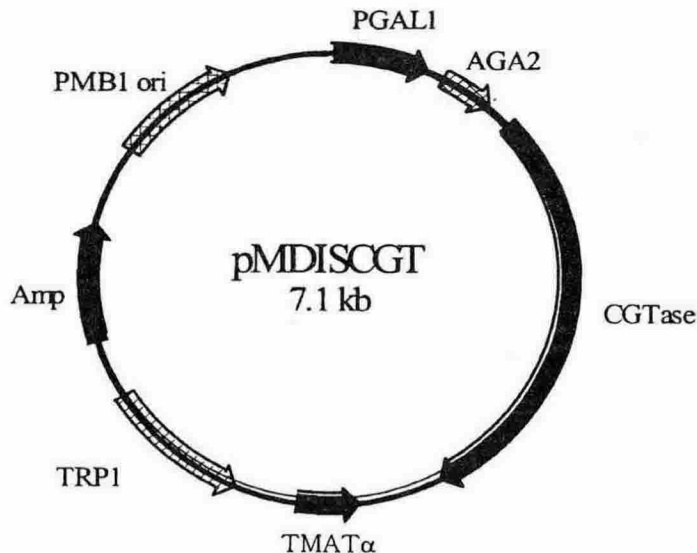


Figure 1. Genetic map of plasmid pMDISCGT

*B. macerans* 유래의 CGTase는 starch를 기질로 이용하여 주로  $\alpha$ -CD를 만드는 효소이

다. 효소반응 중 형성되는 glucose와 maltose는 효소반응을 저해할 뿐만 아니라  $\alpha$ -CD를 여러 올리고당으로 분해하는데 사용된다. 재조합 *S. cerevisiae*는 glucose와 maltose를 제거함으로써 이를 해결해 주며, 동시에 surface display된 CGTase는 cyclization을 통해 cyclodextrin을 생산한다.

## 요 약

*B. macerans* 유래의 CGTase를 yeast surface display기술을 이용하여 *S. cerevisiae*의 표면에 발현된 것을 halo-test와 immunofluorescence microscopy와 flow cytometry를 통하여 확인하였다. 재조합 효모는 효소의 cyclization작용을 저해하고 CD의 분해작용을 촉진하는 glucose와 maltose를 제거하는 발효공정과 표면 발현된 CGTase의 cyclization공정을 동시에 수행할 수 있어 CD의 생산, 분리공정을 효율적으로 개선하였다.

## 참고문헌

1. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. "Yeast surface display for screening combinational polypeptide libraries"(1997), *Nature biotechnology*, 15, 553-557.
2. Alexandra Tonkova. "Bacterial cyclodextrin glucanotransferase"(1998), *Enzyme and Microbial Technology*, 22, 678-686.
3. Lima, O.S.H., De Moris F.F. and Zanin, M.G. " $\beta$ -cyclodextrin production by simultaneous fermentation and cyclization"(1998), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72, 789-804.