

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 *Bacillus stearothermophilus* Cyclodextrin Glucanotransferase의 특성

박현이 · 전송종<sup>1</sup> · 권현주<sup>2</sup> · 남수완<sup>3</sup> · 김한우 · 김광현 · 김병우\*

동의대학교 미생물학과, <sup>1</sup>일본산업기술종합연구소, <sup>2</sup>미쯔비시화학생명과학연구소, <sup>3</sup>동의대학교 생명공학과

**Characterization of *Bacillus stearothermophilus* Cyclodextrin Glucanotransferase that Expressed by *Saccharomyces cerevisiae*.** Park, Hyun-Yi, Sung-Jong Jeon<sup>1</sup>, Hyun-Ju Kwon<sup>2</sup>, Soo-Wan Nam<sup>3</sup>, Han-Woo Kim, Kwang-Hyeon Kim, and Byung-Woo Kim\*. Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea, <sup>1</sup>The special division for Human Life Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Kansai), Osaka 563-8577, Japan, <sup>2</sup>Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo 194-8511, Japan, <sup>3</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea -The cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) gene from *Bacillus stearothermophilus* NO2 was expressed in *Saccharomyces cerevisiae* 2805 under the *adh1* promoter. The CGTase was purified from *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS. The purified enzyme exhibited an optima of activity around pH 7.0 and 65°C. Thermal stability of the enzyme was increased fairly as compared with the CGTase of *B. stearothermophilus* NO2. The conversion yield of cyclodextrin (CD) and the production ratio of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD from starch were showed similarly aspect to the CGTase of *B. stearothermophilus* NO2.

**Key words:** *Bacillus stearothermophilus*, cyclodextrin glucanotransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, thermal stability

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; CGTase)는 녹말이나 아밀로오즈, 아밀로펙틴, maltooligosaccharide 등의 기질에 작용하여 cyclodextrin(CD)을 합성하는 효소이다. CD는 왕관모양의 환상화합물로 그 내부의 소수성 공간에 다른 화합물질을 포접하는 성질이 있고 이러한 특성을 이용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유화 등 물성개선의 첨가제로 이용되고 있다[5,10].

CGTase는 *Bacillus macerans*, *B. circulans*, *B. obhensis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. firmus*, alkalophilic *Bacillus* sp. 등의 주로 *Bacillus* 속의 세균이 생산하는 것으로 알려져 있으며[2,3,6], 그 외에도 *Streptococcus pneumoniae*[1], *Thermoanaerobacter* sp.[8], *Brevibacterium* sp.[7] 등의 미생물도 CGTase를 생산하는 것으로 보고되어 있다.

한편, 최근에는 식품산업 소재로 이용 될 수 있는 효소들의 유전자를 재조합하여 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현 시킴으로써 목적 단백질을 대량생산하거나 효소의 활성을 개량하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 효모에서 재조합 단백질의 발현 시 번역 후 수식과정을 통하여 당쇄 등이 부가

되어 효소의 구조와 기능에 변형을 주어 새로운 활성을 가지는 효소의 획득이 가능해 질 수 있으며, 유전자의 발현 효율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 세포 내에서 생산된 유용 단백질을 세포 외로 자체 분비시킬 수 있어서 분리공정을 용이하게 할 수 있다는 장점이 있다[9,11]. 따라서, 본 연구에서는 *B. stearothermophilus* NO2 유래의 CGTase를 효모 *S. cerevisiae* 2805에서 세포외로 발현시켜서 생산, 분비된 재조합 CGTase를 정제하여 재조합 효소의 생화학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 균체 배양조건

재조합 효모 균주의 전배양은 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose)로 하였으며 flask 배양 및 fermentor 배양시 접종량은 5~6.5%(v/v)로 하였다. Flask 배양에서는 500 ml baffled-flask(working volume; 100 ml)로 30°C, 170 rpm에서 수행하였으며, 효모에서 발현된 CGTase의 효소액을 대량 확보하기 위한 발효조(Korea Fermentor Co., Korea) 회분배양은 YPD 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose)로 working volume, 1.6L; 온도, 30°C; 초기 pH 5.5; 교반속도, 300~500 rpm; 통기속도, 1~2 vvm의 조건 하에서 수행하였다.

\*Corresponding author

Tel. 82-51-890-1536, Fax 82-51-891-7740

E-mail: bwkim@dongeui.ac.kr

**재조합 CGTase의 정제**

배양 상등액을 70% ammonium sulfate로 염석하여 단백질을 10,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전시킨 후 침전물을 적당량의 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 녹이고 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 불용성 침전물을 제거한 다음 20 mM phosphate buffer(pH 6.0)로 4°C에서 24 시간 투석하였다. 투석한 조효소액을 20 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하여 0~0.5 M NaCl gradient로 1 ml/min의 유속으로 Resource Q column을 사용한 FPLC로 정제하였다. 활성 분획만을 모아서 PEG-6000으로 농축하고 농축액을 20 mM phosphate buffer(pH 6.0)으로 투석한 다음 gel filtration column인 Superose 12HR을 사용하여 0.15 M NaCl이 포함된 20 mM 인산염 완충액(pH 6.0)으로 0.3 ml/min의 유속으로 용출하여 정제하였다.

**pH 및 열 안정성**

완충액으로 pH 3.7~5.6 범위에서는 50 mM acetate buffer, pH 5.6~8.0 범위에서는 50 mM phosphate buffer, pH 8.0~10.6 범위는 50 mM glycine buffer를 사용하였다. 열 안정성은 40~80°C 범위에서 측정하였다.

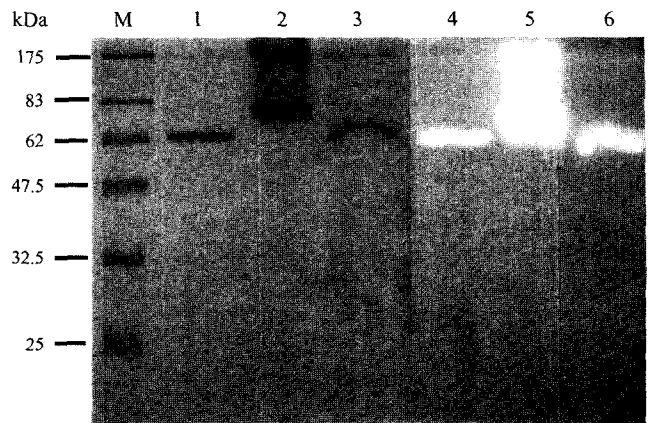
**CD의 분석 및 정량**

정제효소의 CD 생산효율을 분석하기 위하여 반응은 50 mM의 인산 완충액(pH 6.0)에 기질로 5%(w/v) soluble starch와 정제효소를 가하여 50°C에서 반응시킨 후 생성된 CD를 HPLC로 분석하였다. HPLC(Waters사의 LC Module I) column은 TSKgel Amide-80(Tosoh Co.)으로 acetonitrile : H<sub>2</sub>O = 60 : 40의 용매로 분당 1 ml의 유속으로 용출하여 RI detector(Model 410, Waters)로 검정하였다.

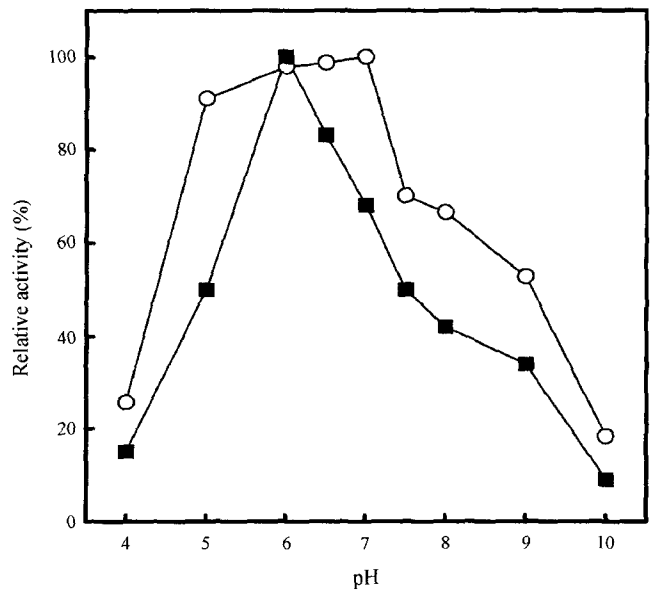
**결과 및 고찰**

**효모 *S. cerevisiae* CGTase의 분자량 및 당 함량**

*B. stearothersophilus* NO2가 발현된 CGTase와 재조합 효모 *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS에서 발현된 CGTase를 정제하여 SDS-PAGE로 확인하고 activity staining을 한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Bacillus* CGTase는 68 kDa인데 반해 효모 CGTase는 78~178 kDa으로 *Bacillus* CGTase에 비해 15~160% 정도의 과당쇄부가가 일어났으며, 당쇄 분해 효소인 Endo H 처리 후의 분자량도 74 kDa으로 약 7%의 당쇄가 남아 있는 것으로 나타났다. *B. stearothersophilus* NO2의 CGTase 유전자의 염기서열[4]을 분석해보면 당쇄 부가 가능 부위인 -Asn-Xaa-Thr(or Ser)- 잔기가 16군데 존재하며 이 유전자가 효모에서 발현될 때 여기에 약 15~140%의 N형 당쇄 부가가 일어나는 것으로 추정된다. 그리고 CGTase의 activity staining 결과에서 *Bacillus* CGTase 보다 효모 CGTase의 활성이 높게 나타났다.



**Fig. 1. SDS-PAGE and detection of CGTase activity of the purified enzyme from *B. stearothersophilus* NO2 and *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS.** M: protein molecular mass marker; lane 1, 4: purified *B. stearothersophilus* NO2 CGTase; lane 2, 5: purified *S. cerevisiae* /pVT-CGTS CGTase; lane 3, 6: lane 2 treated with Endo H; lanes 1-3 : coomassie brilliant blue R-250 staining; lanes 4-6: I<sub>2</sub>/KI staining.



**Fig. 2. Optimal pH of CGTase activity expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS (○) and *B. stearothersophilus* NO2 (■).** The enzymes were assayed at various pHs for the measurement of enzyme activity.

**최적 pH 및 pH 안정성**

효모 CGTase 효소반응의 최적 pH를 알아보기 위해 pH 4.0~10.0의 범위에서 활성을 측정된 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Bacillus* CGTase의 경우에는 pH 6.0에서 최적활성을 보이며 그 이외의 pH에서는 반응성이 크게 저하되는 반면, 효모 CGTase의 경우에는 pH 5.0~7.0의 광범위한 영역에서 약 80% 이상의 활성을 보였으며 pH 7.0에서 최적활성을 나타내었다. 효모 CGTase 효소의 pH 안정성을 조사하

기 위해 주어진 pH에서 72시간까지 방치하면서 시간에 따른 잔존 활성을 측정한 결과 pH 4.0~7.0 범위에서는 72시간 더리하여도 80% 이상의 잔존활성을 나타내었고, pH 7.5 이상에서는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). pH 안정성에 있어서는 *Bacillus* CGTase 효소도 거의 같은 양상을 보여(data not shown) 효모에서 발현되어도 효소의 pH 안정성의 개선 효과는 없었다.

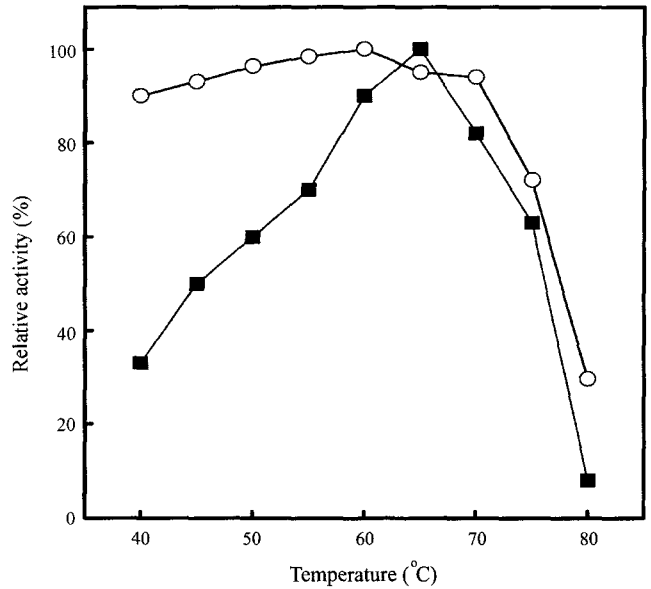
**최적온도 및 열안정성**

효모 CGTase의 반응 최적온도를 40~80°C의 범위에서 측정한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *Bacillus* CGTase의 경우 65°C에서 최적활성을 나타내었고, 그 이외의 온도에서는 활성이 급격히 감소하였다. 반면 효모 CGTase의 경우 40~70°C 범위에서 모두 85% 이상의 높은 활성을 나타냈으며 60~65°C가 최적 온도였다.

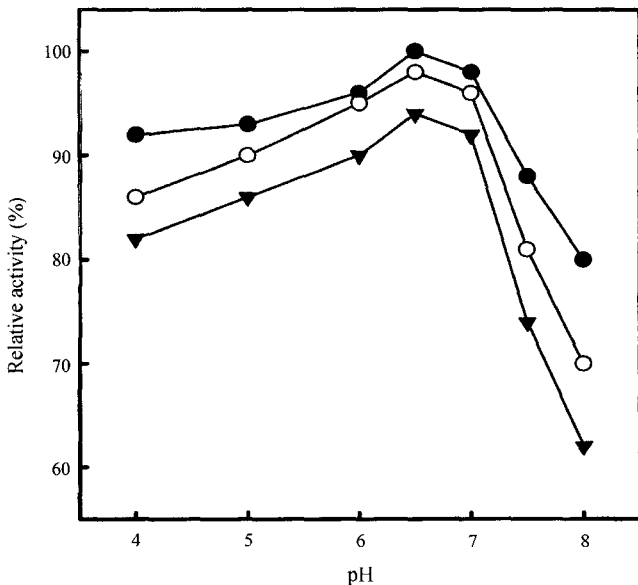
열안정성을 조사하기 위해 효소를 각각의 온도에서 20분간 열처리 후 0°C에서 30분간 방치한 다음 효소 잔존 활성을 측정한 결과 *Bacillus*와 효모 CGTase 효소 모두 60°C까지는 모두 100% 잔존활성을 나타내었고, *Bacillus* CGTase의 경우 65°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하는 반면 효모 CGTase의 경우에는 75°C에서도 약 90%이상의 잔존활성을 나타내어 *Bacillus* CGTase에 비해 열안정성이 크게 개선되었다(Fig. 5). 이것은 효모에서 발현되어질 때의 과당쇄화에 의한 효과인 것으로 사료되어진다. 효모 CGTase의 시간에 따른 열안정성에 있어서도 60~65°C에서는 24시간 처리 후에도 약 60% 이상의 잔존활성을 나타내었고 70°C에서 효소 반감기는 7~10시간 사이였다(Fig. 6).

**CD 생성 pattern**

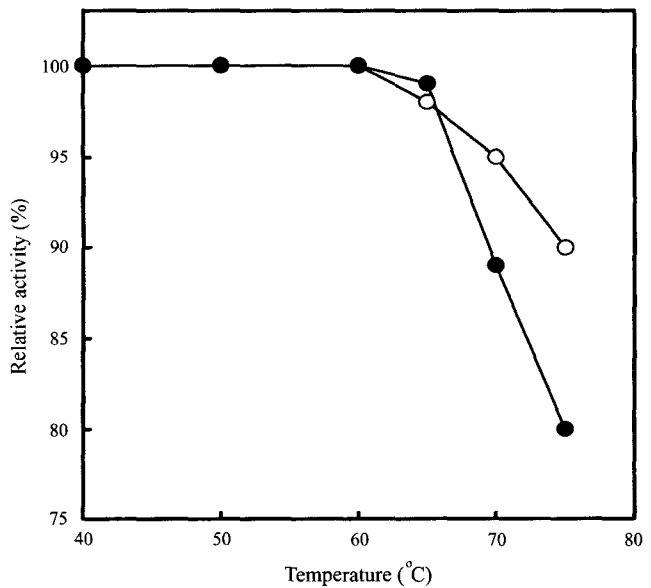
*Bacillus* CGTase와 효모 CGTase의 반응 생성물인  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD의 생산비율을 검토하기 위해 각각을 5% soluble starch를 기질로 효소반응 시킨 후 HPLC로 분석한 결과 *Bacillus* CGTase와 효모 CGTase 모두 약 3:6:1의  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD의



**Fig. 4. Optimal temperature of CGTase activity expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT -CGTS (○) and *B. stearothersophilus* NO2 (■).** The enzymes were assayed at various temperatures for the measurement of enzyme activity.



**Fig. 3. pH stability of CGTase activity expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS.** The enzyme was assayed after incubation at various pHs for 24 h (●), 48 h (○) and 72 h (▼) for the pH stability.



**Fig. 5. Thermostability of CGTase activity expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS (○) and *B. stearothersophilus* NO2 (■).** The enzymes were assayed after incubation at various temperature for 20min for the thermal stability.

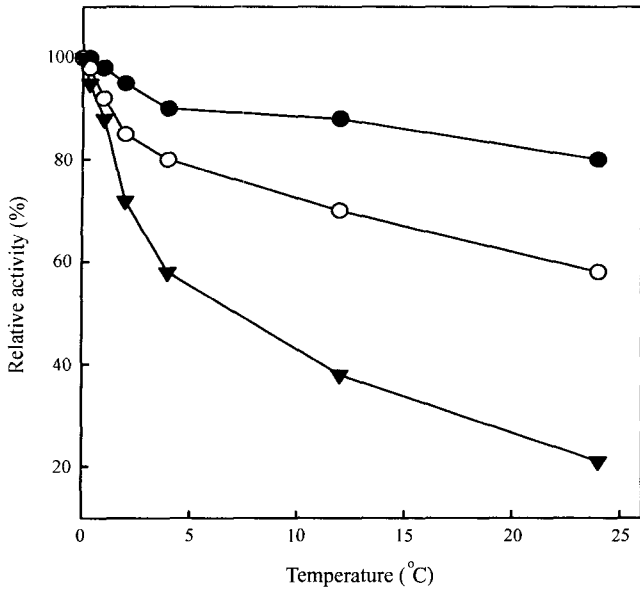


Fig. 6. Time course of thermal stability of CGTase activity expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS. The enzyme was assayed after incubation for 24 h at 60 °C (●), 65 °C (○) and 70 °C (▼).

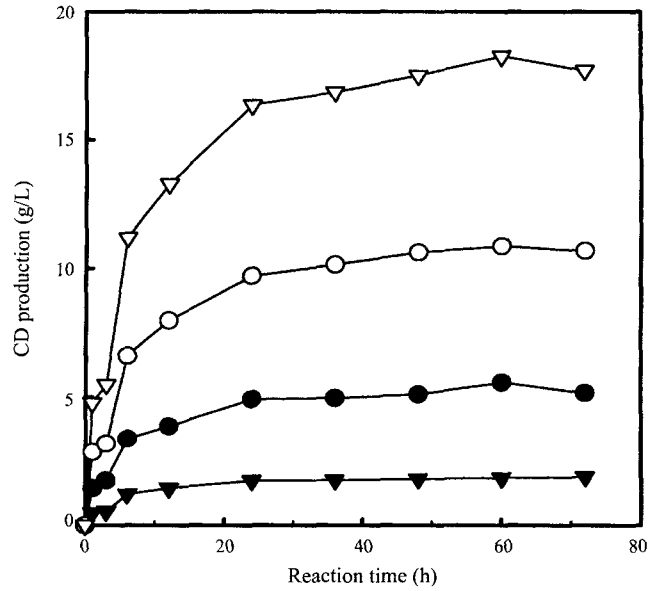
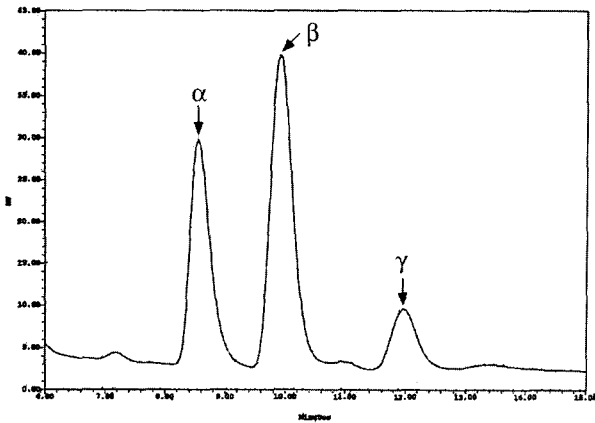
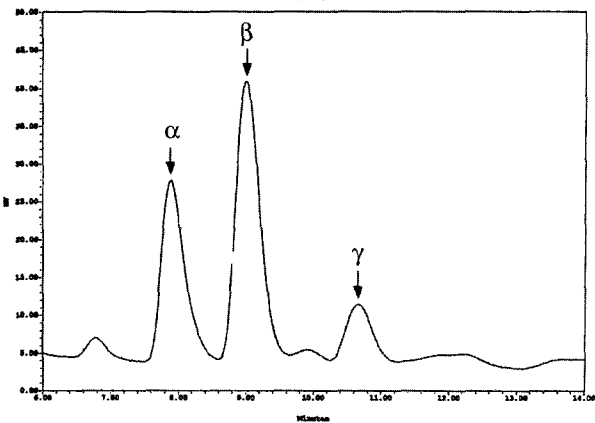


Fig. 8. Time course of CD formation of CGTase expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS. 5% soluble starch in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) was treated with CGTase at 60°C. CDs formed were measured by HPLC. Symbol: ●; α-CD, ○; β-CD, ▼; γ-CD, ▽; Total CD.



(A)



(B)

Fig. 7. CD product ratio of CGTase expressed in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS (A) and *B. stearothersophilus* NO2(B).

생산비율을 나타내어 별다른 변화가 없었고(Fig. 7) CD 전환율에 있어서도 효모 CGTase는 반응 60시간에 40.2%의 starch를 CD로 전환하였으며 *Bacillus* CGTase의 CD 전환율 역시 40%(data not shown)로 비슷한 양상을 보였다(Fig. 8).

요 약

효모 *S. cerevisiae*에서 *B. stearothersophilus* 유래의 CGTase를 발현 생산하였으며, 분비, 생산된 단백질을 정제하여 그 특성을 조사하였다. 재조합 효모 *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS가 생산하는 CGTase의 분자량은 효모에서 발현될 때 고당쇄가 추가되어 야생형의 68 kDa에 비해 15~160% 증가된 약 78~178 kDa으로 나타났다. 효모 *S. cerevisiae*에서 발현된 CGTase의 효소반응 최적활성조건은 pH 7.0, 65°C 였고, 열안정성에 있어서 75°C에서 약 90%의 잔존활성을 가질 정도로 내열성이 개선되었다. 효모 *S. cerevisiae*에서 발현된 CGTase는 5% soluble starch를 기질로 약 40.2%의 CD 전환율 및 3 : 6 : 1의 α-, β-, γ-CD의 생산 비율을 나타내어 야생형과 별다른 변화가 없었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구개발산업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다(HMT-00-PT-21100-0002).

## REFERENCE

1. Bender, H. 1982. Effect of various acceptors on the rate of the cyclization and chain-shortening of amylose catalyzed by the cyclodextrin glycosyltransferase from *Klebsiella pneumoniae* M5a1. Improvement of new photometric assay methods. *Carbohydr. Res.* **101**: 279-285.
2. Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
3. Fujita, Y., H. Tsubouchi, Y. Inagi, K. Tomita, A. Ozaki, and K. Nakanishi. 1990. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus* sp. AL-6. *J. Ferment. Bioeng.* **70**: 150-154.
4. Fujiwara, S., H. Kakihara, B. W. Kim, A. Leujeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi, and T. Imanaka. 1992. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH<sub>2</sub>-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4016-4025.
5. Hara, K. and H. Hashimoto. 1986. Application of cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **3**: 152-161.
6. Kitahata, S. and S. Okada. 1982. Comparison of action of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus megatrium*, *B. circulans*, *B. stearothersophilus* and *B. macerans*. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **29**: 13-18.
7. Mori, S., S. Hirose, T. Oya, and S. Kitahata. 1994. Purification and properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Brevibacterium* sp. No. 9605. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 1968-1972.
8. Norman, B. E. and S. T. Jogensen. 1992. *Thermoanaerobacter* sp. CGTase: its properties and application. *Denpun Kagaku* **39**: 101-108.
9. Smith, R. A., M. J. Duncan, and D. T. Moir. 1985. Heterologous protein secretion from yeast. *Science.* **230**: 1219-1224.
10. Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology*, pp. 1-59. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
11. van den Berg, J. A., K. J. van der Laken, A. J. J. van Ooyen, T. C. H. M. Renniens, K. Reitsveld, A. Schaap, A. J. Brake, R. J. Bishop, K. Schultz, D. Moyer, M. Richman, and J. R. Schuster. 1990. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: Expression and secretion of prochymosin. *Bio. Technology* **8**: 135-139.

(Received May 1, 2002/Accepted Aug. 21, 2002)