

Saccharomyces cerevisiae에서 Bacillus CGTase의 표층발현

김현철¹ · 임채권 · 김병우² · 전승종 · 남수완*

동의대학교 생명공학과, ¹바이오물질제어학과, ²미생물학과

Received January 14, 2005 / Accepted February 1, 2005

Surface Display of Bacillus CGTase on the Cell of Saccharomyces cerevisiae. Hyun-Chul Kim¹, Chaekwon Lim, Byung-Woo Kim², Sung-Jong Jeon and Soo-Wan Nam. Department of Biotechnology & Bioengineering, ¹Department of Biomaterial Control, ²Department of Microbiology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea - For the expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus stearothermophilus* cyclodextrin glucanotransferase gene (*cgt5*) in pCGTS (4.8 kb) was subcloned into the surface expression vector, pYD1 (*GAL1* promoter). The constructed plasmid, pYDCGT (7.2 kb) was introduced into *S. cerevisiae* EBY100 cells, and then yeast transformants were selected on the synthetic defined media lacking tryptophan. The formation of cyclodextrin (CD) was confirmed with active staining of culture broth of transformant grown on starch medium. Enzymatic reaction products with respect to the culture time and the reaction time were examined by TLC analysis. The results indicated that the enzyme activity was exhibited after 12 h cultivation and CD was produced after 10 min of enzymatic reaction. When the surface-engineered yeast cells were cultured on galactose medium, maximum activities of CGTase were about 21.3 unit/l and 16.5 unit/l at 25°C and 30°C, respectively. The plasmids stability showed about 80% even at 25°C and 30°C.

Key words – *Bacillus stearothermophilus*, CGTase, surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, cyclodextrin

최근 세포표면에 다양한 생리활성효소나 금속이온 결합단백질의 고정화를 통하여 고부가가치의 물질생산을 위한 전세포 생물촉매(whole cell biocatalyst)는 그 이용성이 매우 다양하다[6,10,12]. 표면발현에 대한 연구는 bacteriophage나 원핵세포인 대장균 및 그람양성 세균 등에서 다양한 표면단백질을 매개로 이용하는 기술이 개발되었으며 산업적으로 응용성을 넓혀 나가고 있는 추세이다. 그러나 bacteriophage의 경우 고밀도 표면 발현이 가능한 경우는 약 50~60 amino acids로서 display 할 수 있는 단백질의 크기에 한계가 있으며 대장균이나 그람양성세균의 경우에는 효소와 같은 분자량이 큰 단백질을 display할 수 있으나 표면발현의 밀도가 매우 낮은 문제점 등이 단점으로 지적되고 있다. 뿐만 아니라 식품이나 인체를 대상으로 하는 의약품 생산을 위한 효소 반응의 경우 인체에 대한 안전성 문제(GMO)도 심각하게 대두되고 있다. 따라서 최근에는 이러한 원핵세포를 이용한 표면발현의 단점을 보완할 수 있는 새로운 표면발현 시스템으로서 진핵세포인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다.

제빵 효모 *S. cerevisiae*는 GRAS (generally recognized as safe)이며 오랫동안 많은 전통 생물공학산업에 이용되어 왔기 때문에 분자 유전학 연구가 많이 되어 왔고 또 세포의 고농도 발효기술이 축적되어 있다. 뿐만 아니라 효모는 진핵세포로서 고등생물과 유사한 유전자 구조 및 당쇄부과(glycosy-

lation)을 포함하는 번역후 단백질 수식(post-translational modification) 과정을 가지기 때문에 고등세포 유래의 단백질을 활성상태로 발현할 수 있다[11]. 유용 효소유전자의 표면발현의 측면에서 효모는 다음과 같은 장점을 제공한다. 첫째, 효모는 다른 미생물에 비하여 외래단백질의 분비기구가 잘 발달하여 있으므로 표면발현의 전제조건인 목표단백질의 분비가 용이하다. 둘째, 효모는 다른 미생물에 비하여 세포벽이 매우 단단하며 표면에 부착되는 단백질들이 세포표면의 glucan 구조와 공유결합에 의하여 결합되므로 반응 중 추출되지 않는 장점을 있어 산업적 응용에 있어서 life-time이 길다. 셋째, 표면발현 시 단백질의 표면밀도 측면에서도 효모의 agglutinin 경우 효모 세포 1개당 10⁴ 분자수로써 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다.

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19 ; CGTase)는 전분이나 아밀로오즈, 아밀로펙틴, maltooligosaccharide 등의 기질에 작용하여 환상의 비환원성(non-reducing)인 cyclodextrin (CD)을 합성하는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과 분자 간 당전이 반응인 coupling 반응 및 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소이다. 하지만 CGTase의 주작용은 CD 합성 반응으로 전분으로부터 포도당 6~8개가 α-1,4- glucosidic 결합으로 환상 연결된 비환원성의 α-, β-, γ-CD를 생산한다. CD의 화학적 구조는 환상의 고리구조로 인해 안쪽에 동공(cavity)을 갖고 있으며 각 포도당의 외부로 노출되어 있는 C6 위치의 hydroxyl group이 친수성을 나타내는 반면, 내부는 수소결합과 ether 결합으로 인하여 소수성을 띄게 된다. 따라서 외부에서 소수성을 가진 물질이 침

*Corresponding author

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

E-mail : swnam@deu.ac.kr

가되면 CD의 동공 내로 이 물질을 포접하여 복합체를 형성하게 되며, 이러한 특성에 따라 포접된 물질을 보호하고 안정화시키는 역할을 함으로써 휘발성 물질의 불휘발화, 불안정한 화학물질의 안정화 등 포접된 물질의 물리적, 화학적 성질(용해도, 색, 맛, 향기 등)을 변화시킬 수 있다[13]. CD를 이용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유효 등 물성개선의 첨가제로 이용되고 있다[1,14].

본 연구에 사용된 목적단백질의 표면 발현을 위한 운반체 단백질로서 효모세포벽에 N말단이 공유결합된 형태로 존재하는 a-agglutinin을 사용하였다. 이 단백질은 Aga1과 Aga2의 소단위체(subunit)로 구성되어 있으며 Aga1 단백질이 β -glucan 결합으로 세포벽에 고정되고 Aga2 (69개 amino acid)는 목적 유전자(CGTase 유전자)와 융합 발현되어 Aga1과 disulfide 결합을 하고 있다[4].

따라서, 본 연구에서는 Aga2 단백질의 C 말단에 *B. stearrowthermophilus* NO. 2 CGTase를 유전적으로 융합시켜 효모 *S. cerevisiae*의 세포 표면에 CGTase 효소가 고정 부착된 새로운 생체촉매제(biocatalyst)를 개발하여 전분으로부터 CD를 생산함으로써, 유용 산업효소를 *S. cerevisiae* 세포 표면에서 발현하는 표면 발현 시스템을 구축하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 재조합 CGTase 발현용 *S. cerevisiae* 균주는 모두 uracil 영양요구성 변이주이며 haploid로 *S. cerevisiae* EBY100(MATa *ura3-52 trp1 leu2-Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1 Δ1.6R can1 GAL1*)를 사용하였다[2]. 또한 plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5a를 사용하였다. CGTase 유전자 공여 plasmid는 *B. stearrowthermophilus*의 CGTase 유전자를 cloning한 pCGTS [18]을 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*에서 CGTase 표면발현 vector는 유도성 발현 vector로써 *GAL1* promoter를 가진 pYD1 (Invitrogen Co., USA)를 사용하였다. 이 vector는 형질전환효소의 선택표지로 *TRP1* (phosphoribosyl-anthranilate synthesis) 유전자를 가지며, 2 μ m replication origin을 이용하여 복제한다.

이전에 구축된 episomal 발현체인 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-CGTS (*GAL1* promoter에 의한 유도성 발현체)와 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CGTS (*ADH1* promoter에 의한 구성적 발현체)[18]를 대조구로 하여 표면 발현체와 활성 비교 등에 사용하였다.

PCR primers의 제작

*B. stearrowthermophilus*의 CGTase 유전자(2.1 kb)의 경우 효율적인 발현을 위해서 *cgT* 유전자 ORF 부위만 PCR로 증폭

하였다. primers는 5'-AACTGAGAATTCATGAGAAGATGGCTTTCG-3' (sense primer)와 5'-GCCTCGAGGTTCGCGTTCTGCCAATCCACTAT-3' (anti-sense primer)로 제작하였다. Sense primer 부위에는 *EcoRI* 제한효소 인식부위를 가지며, anti-sense primer에는 *XhoI* 제한효소 인식부위를 가지고 있다. 주형 DNA로 *B. stearrowthermophilus*의 *cgT* 유전자를 함유한 pCGTS[18]을 사용하여 Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400(USA)에서 2.1 kb의 유전자 단편(*cgT*)만을 대량 증폭하였다. 증폭된 *cgT* 단편은 pYD1에 *EcoRI/XhoI*으로 연결하여 *E. coli* DH5a를 숙주세포로 CaCl₂법으로 형질전환하여 *cgT* 단편을 확보하였다.

재조합 plasmid 제작 및 형질전환

효모에서의 표면발현을 위한 재조합 plasmid의 구축은 PCR를 통해 확보된 *B. stearrowthermophilus*의 *cgT* 유전자와 pYD1를 각각 *EcoRI/XhoI*으로 처리하여 Gel extraction kit (Bioprogen Co.)로 정제하였다. 얻어진 *cgT* 단편을 *GAL1* promoter와 *AGA2* gene를 함유한 *E. coli-S. cerevisiae* shuttle vector인 pYD1 (각각 *EcoRI/XhoI*으로 미리 절단)에 재조합하여 재조합 plasmid pYDCGTS을 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5a로부터 증폭, 추출하여 LiCl 법[7]으로 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환하였다.

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2% dextrose)에 leucine를 30 mg/l로 첨가하여 사용하였고, CGTase활성 확인을 위해 1%의 soluble starch를 첨가한 YPGS (1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% galactose, 1% soluble starch) 고체배지 상에 도말, 배양 후 iodine 증기에 의한 전분 분해 환의 형성을 통해 CGTase 활성을 확인하였고, 이전에 episomal 발현과 비교하기 위해 이전에 재조합된 *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-CGTS (*GAL1* promoter)와 *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CGTS (*ADH1* promoter)[10]를 *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS와 함께 활성염색하였다. 또한, 형질전환체 세포와 2% soluble starch를 반응한 후 명확한 CD 결정을 보기 위해 요오드를 첨가하여 건조시키고 현미경으로 검경하여 CD 결정의 생성 여부를 확인하였다[1].

재조합 CGTase의 표면 발현을 위해 재조합 효모의 발효 배양은 유도적 promoter인 *GAL1* promoter를 가진 pYD1 vector와 재조합된 유전자의 발현을 위해 YPDG 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% dextrose, 1% galactose)를 사용하여 배양하였다.

재조합 효모 균주의 전배양은 SD 배지로 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, 재조합 CGTase의 조효소를 확보하기 위한 발효조(KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 YPDG 배지로 working volume, 2 l; 온도, 25~30°C; 초기 pH 6.0; 교반속도, 300~500 rpm; 통기속도, 1~1.5 vvm의 조건하에서 수행하였다.

균체 농도 및 plasmid 안정성

균체 농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서의 흡광도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 보정곡선에 의해 OD₆₀₀ 값은 건조균체농도(g-dry cell weight/l)로 환산하였다(1.0 OD₆₀₀=0.28 g-DCW/l).

Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100개의 colony를 SD 선별배지로 tooth-picking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

균체 분획 및 CGTase 활성 측정

균체 침전물과 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 CGTase 활성을 측정하였다. CGTase의 활성은 Fujiwara 등 [5]에 의해 제안된 methyl orange 법으로 측정하였다. 효소 반응은 1.5 ml의 50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 soluble starch와 methyl orange 최종농도가 각각 1%와 0.035 mM이 되도록 첨가하여 잘 섞고 이 혼합액에 효소 용액을 가하여 50°C에서 3시간 반응시켰다. 반응 후 6 N HCl을 가하여 반

응을 정지시키고 반응액을 16°C에서 15분간 방치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와 같은 조건에서 분당 1 μmole의 α-CD를 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 비활성도(specific activity)는 각 효소 활성을 건조균체농도(g-DCW/l) 값으로 나누어서 계산하였다.

Thin-layer chromatography에 의한 효소반응생성물의 확인

효소반응 생성물은 thin-layer chromatography로 분석하였다[8]. 효소반응은 50 mM 인산 완충액에 녹인 2% soluble starch와 형질전환체 세포를 1:1로 60°C에서 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리 한 후 각각의 반응액 5 μl씩을 TLC plate (MERCK)에 점적한 후 nitromethane : n-propanol : water (4 : 10 : 3, v/v)를 전개 용매로 3회 전개하였다. 생성물은 methanol/sulfuric acid (95:5)로 110°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다. 표준물질은 시판되고 있는 α-CD (Sigma Co.)를 10 mM의 농도로 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축 및 형질전환체 선별

Galactose로 유도되는 표면발현 vector인 pYD1 (GAL1 promoter)에 *cgtS* 유전자를 subcloning하여 pYDCGTS (7.2 kb)를 구축하였다(Fig. 1). 구축된 plasmid는 우선 *E. coli* DH5α

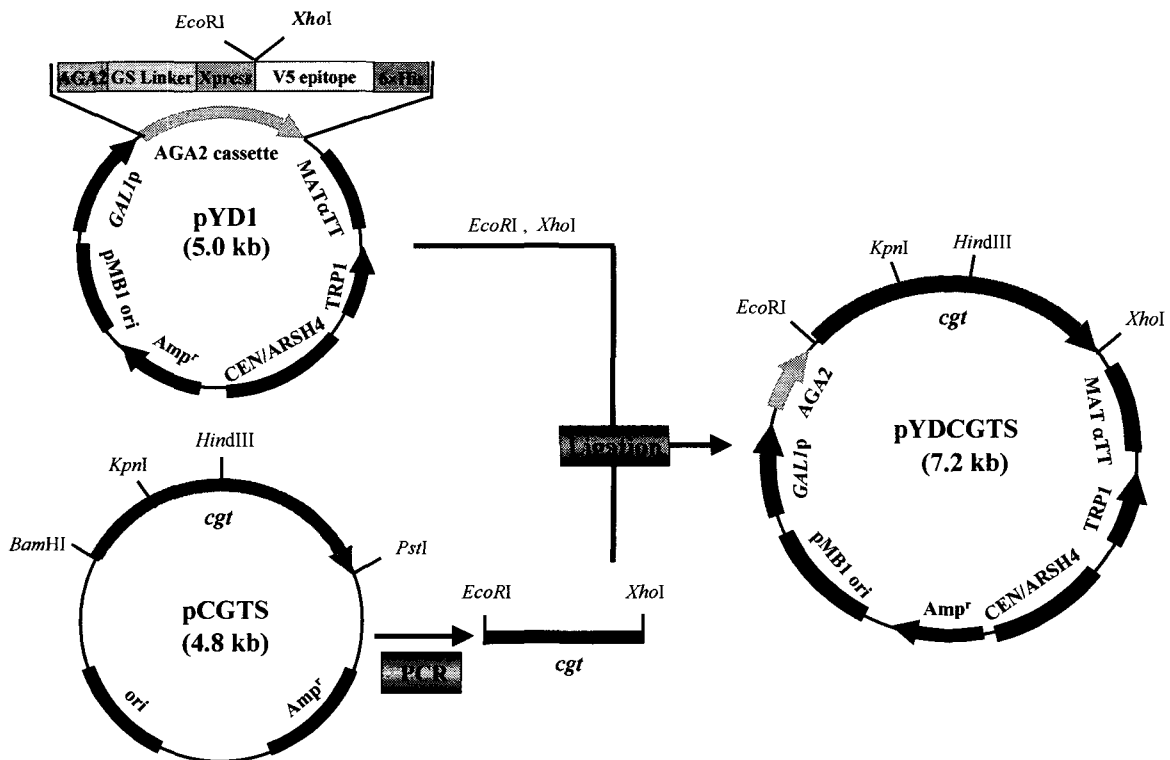


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant plasmid, pYDCGTS, constructed in this work.

에 형질전환하여 증폭, 추출한 후 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환시켜 uracil 결핍 최소배지(SD)에서 형질전환체를 1차 선별하였다(EBY100/pYDCGTS). Fig. 2 A와 같이 대조구인 EBY100, EBY100/pYD1는 starch 함유 YPGS 고체 배지 상에서 starch 분해 활성 환을 형성하지 않았고, 형질전환체 EBY100/pYDCGTS는 starch 분해 환을 형성하여 CGTase 활성을 나타내었다. 따라서 형질전환체 EBY100/pYDCGTS는 *cgt5*를 잘 발현함을 알 수 있었다.

균체증식 및 CGTase의 발현

활성 염색 결과(Fig. 2 B), 배양 상등액으로 분비 발현되는 CGTase 보다는 세포벽에 효소가 부착되어 분비 발현되는 표면발현 CGTase 활성이 낮아 보였으나 둘 다 CD는 효과적으로 생성하였다. 1% soluble starch와 CGTase 표면 발현 효모 세포를 반응시켜 생성물을 현미경으로 관찰한 결과, 시판 α -CD와 비슷한 육각형 결정 모양을 볼 수 있었다(Fig. 3). 또한 재조합 균주 *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS를 YPDG 배지에서 플라스크 배양하여 균체 증식과 CGTase 발현량을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 glucose가 완전히 소모되는

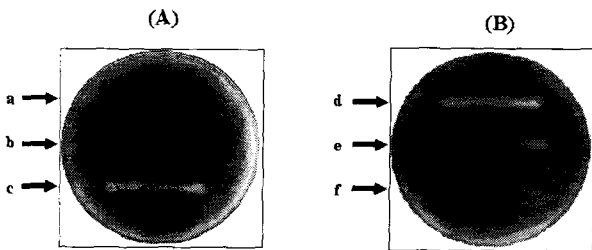


Fig. 2. Active staining of displayed CGTase with yeast transformant which are grown on glucose, galactose and starch medium.

(A): a, *S. cerevisiae* EBY100 ; b, *S. cerevisiae* EBY100/pYD1 ; c, *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS
 (B): d, *S. cerevisiae* SEY2102/pVT-CGT5; e, *S. cerevisiae* SEY2102/pYES-CGT5 ; f, *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS

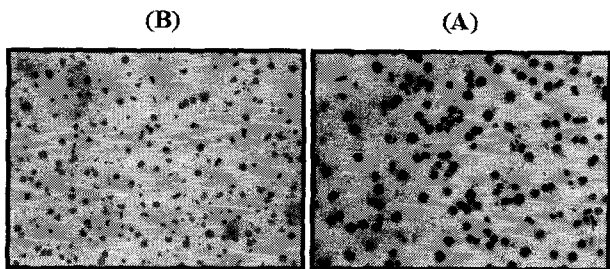


Fig. 3. Microscopic photographs of reaction products of with soluble starch for 3 hr reaction by *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS cell.

(A) 1 mM α -CD after iodine staining ; (B) reaction products after iodine staining

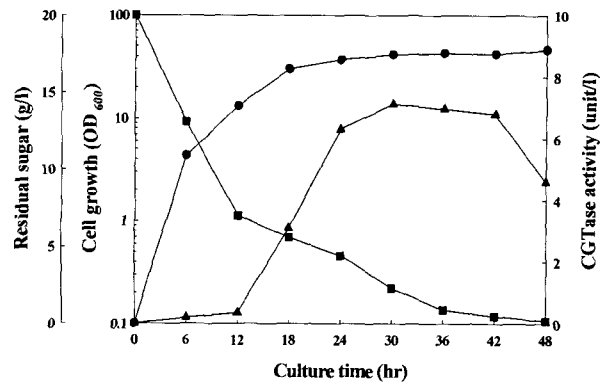


Fig. 4. Time profiles of cell growth, sugar consumption and CGTase production by flask culture of *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS on YPDG medium.

(●), cell growth; (■), residual sugar; (▲) CGTase activity

12시간부터 CGTase의 활성이 증가하기 시작하여 배양 30시간째 최대 활성인 6.5 unit/l로 나타났으며, 정지기 이후 42시간 이후에는 효소활성이 감소하였다. 반면 *B. stearothermophilus* CGTase를 episomal 발현의 경우[18], 최적 발효 조건인 pH5.5, 30°C에서 CGTase의 최대 발현량은 배양 48시간에서 0.624 unit/ml이었고, 발현된 효소의 87%가 세포 외로 분비 생산되어졌다. 이는 *B. stearothermophilus*의 signal peptide가 재조합 효모에서도 분비 기능을 발휘함을 나타낸다.

Episomal 발현보다 표면 발현의 활성이 떨어지는 이유로 효모세포 표면에 발현되는 a-agglutinin의 수가 약 10^4 개로 [9] 한정되어 있기 때문에 발현시킬 수 있는 효소의 양이 일정하다. 그리고 목적 단백질이 세포 밖으로 완전히 분비되지 못하게 잡아주는 역할을 하는 세포벽 부착 매개 단백질이 요구된다. 매개 단백질로는 자연적으로 효모 세포벽에 존재하는 다양한 세포벽 mannoprotein을 이용할 수 있는데, 일부 mannoprotein은 세포벽에 약하게 결합하는 단백질과 일부 plasma membrane 유래이며[16], 주로 분자량이 작은 단백질들이다[15]. 이들은 세포벽과의 결합력이 약하거나 세포의 표면과의 거리가 먼 위치에 존재하기 때문에 이들을 매개로 하여 외래 단백질을 표면발현 하였을 때 결합력이 약하거나 외래단백질이 충분히 표면에 노출되지 못하며 세포벽으로 흡수되지 못하는 기질과의 접촉할 수 없는 단점이 있다[16]. 따라서, 일반적인 episomal 발현에 비해 상대적으로 효소활성이 낮은 것으로 사료되었다. 또한, Washida 등[17]의 연구 결과에서 따르면, *Rhizopus oryzae* lipase를 a-agglutinin의 C 말단 하류에 유전적으로 융합하여 표면 발현시켰을 때와 a-agglutinin과 lipase 사이에 linker peptides를 삽입하여 표면 발현시켰을 때의 기질 친화성이 linker peptides의 수가 늘어감에 따라 증가하였다. 이는 표면 발현된 효소가 기질과 반응하기 위한 공간적인 확보가 일반 episomal 발현에 비해 어려워 기질과의 친화력이 감소하는 것으로 사료된다.

CGTase 표면 발현을 위한 최적 배양 조건

재조합 균주 *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS의 최적 배양 조건을 알아보기 위해 YPDG배지, pH4.0~10.0, 25℃와 30℃에서 회분 배양 하면서 균체증식과 CGTase 발현량을 조사한 결과, Fig. 5와 같이 glucose가 완전히 소모되고, galactose에 의해 유도, 발현되는 12시간부터 CGTase의 활성이 증가하기 시작하여 배양 36시간째 최대 활성에 도달하였다. 최대 활성은 20℃ 배양 시 21.3 unit/l, 30℃ 배양 시 16.5 unit/l로 나타났으며, 효소의 비활성 및 plasmid 안정성은 Table 1에서와 같이 25℃ 배양 시 1.7 unit/g-DCW와 86%로 30℃ 배양 때 보다 높게 나타났다. 최적 pH는 *B. macerans* CGTase 표면발현[8] 경우와 같은 pH 6.0이었다(data not shown). 결론적으로 배양 온도가 낮을수록 활성이 높게 나오는 것은 배양 온도가 높을 때는 endoplasmic reticulum (ER)에서의 정체와 단백질 접힘 효과가 떨어지기 때문으로 사료된다[3]. 또한, 정지기 이후 배양 36시간 이후부터 효소 활성이 급격히 감소하였다. 이는 정지기 이후 효소의 세포 용해에 의해 표면 발현된 효소가 함께 실활되는 것으로 사료된다.

TLC를 이용한 효소 반응 생성물의 비교

재조합 균주 *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS를 초기 pH6.0,

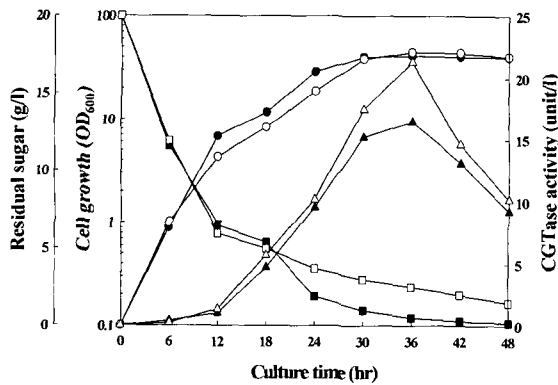


Fig. 5. Time profiles of cell growth, sugar consumption and CGTase production in batch fermentation of *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS on YPDG medium at 25 °C and 30°C.

Open and closed symbols indicate 25°C and 30°C culture conditions, respectively.
 Symbols : (●), cell growth; (■), residual sugar; (▲), CGTase activity

Table 1. Comparison of cell growth and CGTase activity in the batch fermentation of *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS.

	Cell Growth (OD ₆₀₀)	CGTase activity (unit/l)	Specific CGTase activity (unit/g-DCW)	Plasmid Stability (%)
25°C	44.6	21.3	1.73	86
30°C	41.3	16.5	1.45	82

25℃, YPDG 배지에서 48시간 회분 배양한 후 세포를 2% soluble starch와 함께 효소 반응시킨 후 전술의 방법에 따라 TLC로 반응 생성물을 비교하였다(Fig. 6). 그 결과 배양 12시간째부터 효소활성이 나타났고, 반응 10분 이후부터 CD가 생성되어 시간이 지남에 따라 CD 및 G1 (glucose), G2 (maltose), G3 (maltotriose) 등의 생성량이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 반응 12시간까지도 CD의 생성량이 계속 증가하였다. a-agglutinin를 사용하여 Kim 등[8]은 *B. macerans* CGTase를 표면발현시켰고, 기질인 soluble starch와 CGTase가 표면 발현된 형질전환체를 60시간이상 반응하여 α-CD를 생산하였다. 그 연구 결과에 따르면 episomal 발현에 의한 CGTase는 α-CD, glucose, maltose 분해 시 intermolecular transglycosylation에 의해 maltooligosaccharide 농도는 증가하고, 부수적으로 α-CD는 감소하는 반면, 표면발현에 의한 CGTase는 반응 49시간까지 coupling, disproportionation에 의해 저농도의 maltooligosaccharide로 분해되다가 감소되어 α-CD만 남게 된다. 결론적으로 보다 순도가 높은 α-CD를 생산할 수 있는 것과 그에 따른 안정성이 높은 것으로 나타났다. 이는 목적 단백질이 효모 세포표면의 glucan 구조와 공유결합에 의하여 결합되어 있어 반응 중 추출되지 않아 life time이 길어지기 때문이다. 따라서, 생촉매제(biocatalyst)는 전통적인 고정화에 의한 발효과정과는 달리 효소의 안정성 및 회수가 용이하여 생산성 저하 문제를 피할 수 있어 산업적 응용에 유리할 것으로 사료된다.

요 약

B. stearrowtherophilus 유래의 CGTase 유전자(cgtS)를 보유하고 있는 재조합 plasmid pCGTS (4.8 kb)을 효모 표면 발현

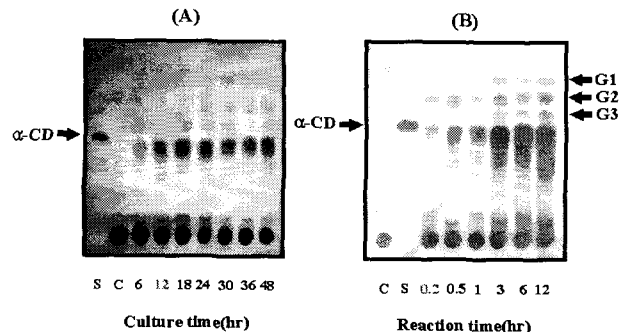


Fig. 6. Thin-layer chromatogram of the reaction products from soluble starch by CGTase produced in the batch fermentation of *S. cerevisiae* EBY100/pYDCGTS.

(A), Enzymatic reaction products with cells cultured at the indicated time.
 (B), Enzymatic reaction products at each reaction time with 48 hr cultured cells.
 S, standard ; C, starch without cells ; G1, glucose ; G2, maltose ; G3, maltotriose.

용 vector인 pYD1 (*GAL1* promoter)에 subcloning 하였다. 구축된 재조합 plasmid, pYDCGT (7.2 kb)는 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환하였고, tryptophan이 결여된 SD 배지에서 1차 선별된 형질전환체들을 YPGS 배지에서 배양 후 활성 염색을 통하여 CD가 생성됨을 확인하였다. 배양시간과 효소 반응시간에 따른 반응 산물을 TLC로 분석한 결과, 배양 12시간째부터 효소활성이 나타났고, 반응 10분 이후부터 CD가 생성되어 시간이 지남에 따라 CD 생성양이 증가하는 것을 확인하였다. 회분 배양한 결과 25℃와 30℃에서 CGTase의 최대 활성이 각각 21.3 unit/l 와 16.5 unit/l로 나타났고, plasmid 안정성은 각각 86%와 82%로 나타나 배양온도에 상관없이 plasmid는 비교적 안정하게 유지되었다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 동의대학교 교내연구과제(자유공모과제) 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

- Bender, M. I. and M. Komiyama. 1978. *Cyclodextrin Chemistry*. 3th eds., Springer Verlag, New York.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnol.* **15**, 553-557.
- Boder, E. T. and K. D. Wittrup. 2000. Yeast surface display for directed evolution of protein expression, affinity, and stability, pp. 430-444, *In* J. Thorner, S. D. Emr and J. N. Abelson (eds.), *Methods in Enzymology*. Vol. **328**, Academic Press Inc., New York.
- Coppellaro, C., C. Baldermann, R. Rache, and W. Tanner. 1994. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: Cell wall attachment and active site of α -agglutinin. *EMBO J.* **13**, 4737-4744.
- Fujiwara, S., H. Kakiyama, B. W. Kim, A. Leujeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi, and T. Imanaka. 1992. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH₂-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4016-4025.
- Georgiou, G., H. L. Poetschke, C. Stathopoulos, and J. A. Francisco. 1993. Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**, 6-10.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- Kim, K. Y., M. D. Kim, N. S. Han and J. H. Seo. 2002. Display of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 411-416.
- Lipke, P. N and J. Kurjan. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: Structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**, 180-194.
- Little, M., P. Fuchs, F. Breitling and S. Dubel. 1993. Bacterial surface presentation of proteins and peptides: and alternative to phage technology. *Trends Biotechnol.* **11**, 3-5.
- Romanos, M. A., C. A. Scorer and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* **8**, 423-488.
- Schreuder, M. P., A. T. Mooren, H. Y. Toschka, C. T. Verrips and F. M. Klis. 1996. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **14**, 115-120.
- Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology*. pp. 1-78. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Szejtli, J. 1990. The Cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydr. Polym.* **12**, 375-392.
- Valentin, E., E. Herrero, J. F. I. Pastor and R. Sentandreu. 1984. Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **130**, 1419-1428.
- Van der Vaart, J. M., L. H. P. Caro, J. W. Chapman, F. M. Klis, and C. T. Verrips. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**, 3104-3110.
- Washida M., S. Takahachi, M. Ueda and A. Tanaka. 2001. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 681-686.
- You, D. J., H. Y. Park, S. J. Jeon, H. J. Kwon, S. W. Nam and B. W. Kim. 2002. Expression of the *Bacillus stearothermophilus* NO2 CGTase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 206-209.