

*Saccharomyces cerevisiae*에서 *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase의 발현 특성

전현성 · 남수완 · 김병우*

동의대학교 미생물학과

Expression Characteristics of Recombinant Cyclodextrin Glucanotransferase in *Saccharomyces cerevisiae*

Hyun-Sung Jun, Soo-Wan Nam and Byung-Woo Kim*

Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract

The cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) gene of *Bacillus macerans* was subcloned at the downstream of yeast *ADH1* promoter, and then the resulting plasmid pVT-CGTM (9.15 kb) was introduced into the yeast host strain, *Saccharomyces cerevisiae* 2805. The transformed yeast, *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM, showed the starch-hydrolyzing activity on the starch-azure plate. The optimal conditions for the CGTase expression were found to be 2% dextrose, initial pH 5.5, 30°C, and 48 hr cultivation. Under this condition, the extracellular CGTase activity reached at 0.53 U/mL, whereas the intracellular activity was about 0.03 U/mL. This result indicates that the signal peptide of *Bacillus* CGTase functioned well in *S. cerevisiae*.

Key words – *Bacillus macerans*, cyclodextrin glucanotransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, secretion

서 론

Cyclodextrin glucanotransferase (CGTase; EC 2.4.1.19)는 전분이나 amylose, amylopectin, maltooligosaccharide 등의 기질에 작용하여 cyclodextrin (CD)을 합성한다. 이 효소는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과 분자간 당전이 반응인 coupling 반응 및 disproportionation 반응을 매개하는 다기능 효소이다. 하지만 CGTase의 주작용은 CD 합성반응, 즉 coupling 반응으로 기질인 전분으로부터 포도당 6~8개

가 α -1,4-glucoside 결합으로 환상 연결된 비환원성의 α -, β -, γ -CD를 생산한다[4,13,14].

CD의 화학적 구조는 안쪽에 동공(cavity)을 갖고 있으며 각 포도당의 외부로 노출되어 있는 C6 위치의 hydroxyl group이 친수성을 나타내는 반면, 내부는 수소결합과 ether 결합으로 인하여 소수성을 띄고 있다. 따라서 소수성 물질이 첨가되면 CD의 동공 내로 이 물질이 포접되어 복합체를 형성하여 포접된 물질을 보호하고 안정화시키는 역할을 한다. CD의 기능은 휘발성 물질의 불휘발화, 불안정한 화학 물질의 안정화, 지방의 유화 및 기포형성능, 독성 및 자극성의 제거, 쓴 맛과 불쾌한 맛의 제거, 유체 및 건조가 어려운 물질의 고체화 및 분말화, 색소 및 색채의 안정화, 콜레

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: +82-51-890-1536, Fax: +82-51-891-7740
E-mail: bwkim@dongeui.ac.kr

스테롤의 제거 등 포집된 물질의 물리적, 화학적 성질 (용해도, 색, 맛, 향기 등)을 변화시킬 수 있다[4,13,14].

이와 같이 CD는 식품, 의약, 농업, 화학공업 등 여러 분야에 응용이 가능한 화합물이지만, 아직은 생산단가가 높아서 그 사용이 제한되어 있는 실정이다. 따라서 여러 가지 방법으로 효소의 생산성을 높여 단가를 낮추게 된다면, 그 수요와 응용 범위가 획기적으로 확대될 전망이다. 그러므로 CD의 대량생산을 위해서 반응 특이성과 활성이 증강된 CGTase의 확보와 이의 대량생산이 우선적으로 해결되어야 한다. 지금까지 많은 연구자들에 의해 CD생산의 고효율·고반응 특이성·내열성 CGTase를 생산하는 균주를 자연계에서 분리하거나[1,3,10], CGTase유전자를 재조합하여 효소의 개량·개변 연구가 활발히 진행되고 있다[2,7,15]. 그리고 최근에는 식품산업 소재로 이용될 수 있는 효소들의 유전자를 재조합하여 GRAS 미생물인 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시킴으로써 목적 단백질을 대량생산하거나 효소의 활성을 개량하려는 연구도 활발히 진행되고 있다[6,11,12,17].

본 연구에서는 *Bacillus macerans* IAM 1243 유래의 CGTase 유전자를 효모 *S. cerevisiae*에서 발현할 수 있는 재조합 plasmid를 구축하고 이를 효모에 형질전환시켜 그 발현 특성과 최적발현조건 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용한 효모 숙주세포는 uracil 영양요구성 변이주이며 haploid인 *Saccharomyces cerevisiae* 2805 (*MAT α pep4::HIS3 prb1-1.6R can1 GAL2, his3-200 ura3-52*)를 사용하였으며, plasmid 구축 및 증폭을 위한 숙주세포는 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. CGTase 유전자 공여 plasmid는 pET21에 *Bacillus macerans* IAM 1243의 CGTase 유전자 (*cgfM*)가 subcloning된 pTCGT1[8]을 사용하였다. 효모 발현용 vector는 구성적 *ADH1* promoter를 가진 pVT103-U [16]를 사용하였다.

재조합 plasmid 제작 및 형질전환

pTCGT1 plasmid를 *Bam*HI과 *Sal*I으로 처리하여 CGTase

유전자를 함유하는 2.28 kb의 단편을 얻은 다음, *Bam*HI과 *Xho*I으로 미리 절단한 pVT103-U vector에 subcloning하였다. 구축된 재조합 plasmid pVT-CGTM (9.15 kb)은 *S. cerevisiae* 2805 숙주세포에 lithium acetate 법 [5]으로 형질전환시켰다.

효모 형질전환체 선별 및 배양조건

효모 형질전환체의 1차 선별을 위한 배지로는 SD 배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% Casamino acids, 2% dextrose)를 사용하였다. SD 배지에서 선별된 효모세포를 0.25% starch azure 함유 YPD 고체배지 (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose, 1.5% agar)에서 배양하여 가장 큰 starch 분해환을 보이는 균주를 2차 선별하였다. 탄소원의 영향은 YP 배지에 dextrose와 starch를 농도별로 첨가한 배지로 조사하였다. Flask 배양에서는 500 mL baffled-flask (working volume; 50 mL)로 30°C, 170 rpm에서 수행하였다.

균체농도와 Plasmid 안정성

균체 농도는 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계 (Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(OD₆₀₀)로 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100개의 colony를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비로 측정하였다.

CGTase 활성 측정

CGTase의 활성은 Leujeune 등 [9]에 의해 제안된 Methyl Orange 법으로 측정하였다. 효소반응은 3 ml의 50 mM 인산염 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 10분간 반응시켰다. 반응 후 6 N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16°C에서 30분간 방치한 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와 같은 조건에서 분당 1 μ mole의 α -CD를 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 비활성도(specific activity)는 각 효소 활성을 세포농도(OD₆₀₀)값으로 나누어서 계산하였다.

결과 및 고찰

고활성 효모 형질전환주의 선별

CGTase 유전자를 효모 *S. cerevisiae*에서 발현시키기 위해, 2.3 kb의 *B. macerans* IAM 1243 유래 CGTase 유전자 (*cgtM*)를 가진 pTCGT1 plasmid를 *Bam*HI과 *Sal*I으로 처리하여 2.28 kb의 CGTase 유전자 단편을 얻었다. 이를 *Bam*HI과 *Xho*I으로 미리 절단한 pVT103-U에 subcloning하여 pVT-CGTM (9.15 kb)을 구축하였다. 재조합 plasmid는 우선 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 CGTase 활성을 나타내는 형질전환주를 선별한 후 plasmid를 추출하였다. 대장균에서 증폭된 plasmid pVT-CGTM은 다시 uracil 요구성 변이주인 *S. cerevisiae* 2805에 형질전환시켜 uracil 결핍 최소배지인 SD 배지에서 1차적으로 형질전환주를 선별하였다. 1차 선별된 균주들을 다시 starch azure 함유배지에서 starch 분해활을 나타내는 효모주를 선별하는 과정을 5회 반복하여 CGTase 고활성 균주를 최종 선별하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, 숙주세포는 starch 분해활성을 보이지 않으나 pVT-CGTM를 함유하는 재조합 효모균주는 starch 분해활성을 강하게 보이며, 발현된 CGTase는 세포 밖으로 분비·생산됨을 알 수 있었다.

탄소원의 영향

효모에서 재조합 CGTase의 발현에 미치는 탄소원의 영향을 검토하기 위하여 YP배지에 dextrose와 starch를 농도별로 첨가하여 48시간 배양한 후 균체농도와 효소 발현량을

조사하였다. 그 결과, dextrose의 농도가 증가할수록 최종 균체농도는 대체로 증가하였으나 단위 균체농도 당 CGTase의 발현량은 2% dextrose일 때 가장 높은 9.7 mU/mL/OD₆₀₀의 비활성 값을 보였다(Table 1). 10% dextrose의 경우 오히려 균체증식이 낮았는데, 이는 에탄올 생성에 의한 증식저해효과 때문인 것으로 판단된다. 본 발현계에 사용된 *ADH1* promoter는 구성적 promoter이기 때문에 균체농도가 높으면 높을수록 발현된 CGTase 양이 많을 것으로 예상되었지만, 균체농도와 유전자 발현량이 정확히 비례하지 않음을 알 수 있었다.

CGTase의 기질인 starch가 균체증식 및 효소 발현량에 미치는 영향을 검토하기 위해서 dextrose 2%와 3%에 1%의 starch를 첨가하여 조사해 본 결과, starch 첨가에 의해 균체증식과 효소 발현량에는 큰 차이가 관찰되지 않았다 (Table 1). 이 결과와 앞의 starch 분해활성 결과 (Fig.1)를 종합해 보면, 재조합 CGTase의 발현으로 효모세포는 starch를 분해는 할 수 있으나, 그 분해산물을 탄소원으로 이용하지 않으며, 따라서 그 분해산물이 cyclodextrin 임을 간접적으로 알 수 있었다.

초기 pH의 영향

재조합 CGTase의 발현에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 배양 초기 pH를 4.0에서 6.5까지 변화시키면서 재조합 효모균주를 배양하였다. 48시간 동안 배양 한 결과, 최종 균체농도는 초기 pH에 관계없이 모두 32 OD₆₀₀ 값으로 비슷하였으며, plasmid 안정성 역시 초기 pH에 크게

Table 1. Effect of initial dextrose concentration on the cell growth, plasmid stability, and CGTase expression in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM

Carbon Source	Cell Growth (OD ₆₀₀)	Plasmid Stability (%)	CGTase Activity (U/mL)	Specific CGTase Activity (mU/mL/OD ₆₀₀)
1% Dextrose	21.3	96	0.14	6.6
2% Dextrose	30.9	98	0.30	9.7
2% Dextrose+1% Strach	31.6	95	0.28	8.9
3% Dextrose	45.8	98	0.29	6.3
3% Dextrose+1% Strach	22.0	97	0.15	6.8
5% Dextrose	42.0	98	0.23	5.5
10% Dextrose	29.7	95	0.20	6.7

*Culture conditions: initial pH 5.5, 30°C, 48 hr cultivation

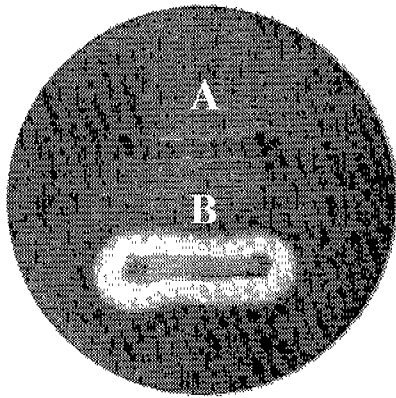


Fig. 1. Starch-hydrolyzing activity of yeast host cell (A) and yeast transformant *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM (B).

영향을 받지 않고 모두 95% 이상으로 매우 안정하게 유지되었다. pH 5.5 일 때 CGTase 발현량이 0.24 U/mL로 가장 높았으며, 단위 균체농도 당 CGTase 활성인 비활성도 7.3 mU/mL/OD₆₀₀로 가장 좋았다(Table 2).

배양온도의 영향

CGTase의 발현과 분비에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해 형질전환 효모균주를, 초기 pH는 5.5로 고정하고, YPD 배지에서 온도를 20℃에서 35℃까지 변화시키면서 배양하였다. 48시간 때의 배양 결과를 보면, 25℃ 이하와 35℃에서는 낮은 균체농도를 보이며, 30℃에서 OD₆₀₀ 값이 32 정도로 가장 높았다. CGTase 발현은 배양온도에

Table 2. Effect of initial pH on the cell growth, plasmid stability, and CGTase expression in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM

Initial pH	Cell Growth* (OD ₆₀₀)	Plasmid Stability (%)	CGTase Activity (U/mL)	Specific CGTase Activity (mU/mL/OD ₆₀₀)
4.0	32.1	97	0.18	5.6
4.5	31.9	95	0.20	6.3
5.0	32.9	98	0.22	6.7
5.5	32.8	97	0.24	7.3
6.0	32.6	100	0.21	6.4
6.5	31.9	98	0.20	6.3

*Culture conditions: 2% dextrose, 30℃, 48 hr cultivation

크게 영향을 받았으며, 30℃에서 CGTase 발현량은 0.29 U/mL로 가장 높았으며, 이 외의 온도에서는 발현량이 크게 감소하였다. 비활성도 30℃에서 가장 높은 8.9 mU/mL/OD₆₀₀ 값을 나타내었다 (Table 3).

균체증식과 CGTase 발현의 경시변화

형질전환 효모균주 *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM을 초기 pH 5.5, 30℃, YPD 배지에서 배양하면서 균체증식과 CG-

Table 3. Effect of culture temperature on the cell growth, plasmid stability, and expression of CGTase in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM

Culture Temperature (°C)	Cell Growth* (OD ₆₀₀)	Plasmid Stability (%)	CGTase Activity (U/mL)	Specific CGTase Activity (mU/mL/OD ₆₀₀)
20	21.2	91	0.06	2.8
25	23.2	100	0.11	4.7
30	32.6	100	0.29	7.7
35	20.9	88	0.06	2.9

*Culture conditions: initial pH 5.5, 30℃, 2% dextrose, 48 hr cultivation

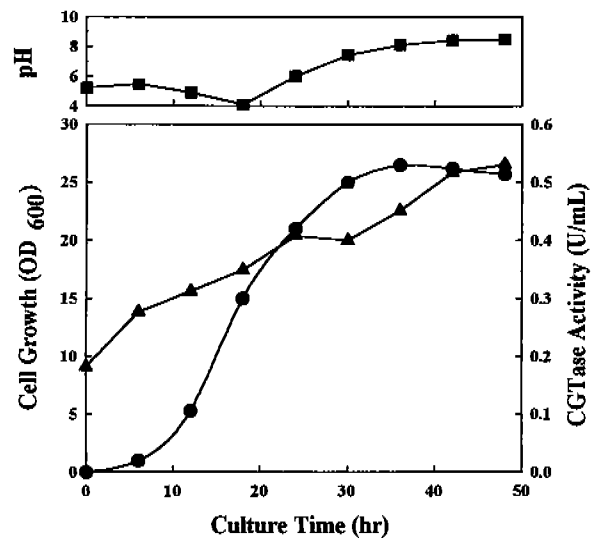


Fig. 2. Time courses of cell growth, culture pH, and CGTase expression when *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM cell was grown on YPD medium at the initial pH 5.5 and 30℃.

Symbols : ●, Cell growth ; ▲, Extracellular CGTase activity.

Tase의 발현량을 조사한 결과, 균체증식은 배양 12시간부터 시작하여 30시간까지 활발하게 일어났으며, 30시간 이후 정지기에 도달하였다 (Fig. 2). CGTase 발현은 배양 말기까지 계속 일어나며, 배양 48시간에 세포의 최대 활성은 0.53 U/mL 수준이었다. 세포내 CGTase 활성은 최대 0.03 U/mL 정도로 나타나 총발현된 CGTase의 90% 이상이 세포밖 배지로 분비됨을 알 수 있었다. 이와 같이 *Bacillus* 유래의 단백질 분비신호가 효모에서도 높은 분비 효율성을 보이는 예는 *B. amyloliquefaciens* 유래의 α -amylase 유전자를 *S. cerevisiae*에서 발현시킨 경우에서도 관찰된 바 있다 [12].

요 약

Bacillus macerans IAM 1243의 CGTase 유전자를 효모의 구성적 promoter인 *ADH1* promoter 하류에 subcloning하여 재조합 plasmid pVT-CGTM (9.15 kb)을 구축하였다. 이 plasmid를 효모숙주세포 *Saccharomyces cerevisiae* 2805에 형질전환시켜 형질전환주를 얻고 starch azure 평판배지에서 배양했을 때 starch 분해활성을 나타내었다. 형질전환주 *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM의 최적 탄소원농도는 2% dextrose였으며, 초기 pH는 5.5, 배양온도는 30°C에서 48시간 배양이 최적발효조건이었다. 이때 세포밖 CGTase의 활성은 0.53 U/mL였으며, 세포내 CGTase 활성은 최대 0.03 U/mL 정도로 나타나 총발현된 CGTase의 90% 이상이 세포밖 배지로 분비됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 핵심전문연구과제(과제번호 971-0604-032-2)로 수행된 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 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.
2. Fujiwara, S., H. Kakihara, K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1992. Analysis of mutations in cyclodextrin

- glucanotransferase from *Bacillus stearotheophilus* which affect cyclization characteristics and thermostability. *J. Bacteriol.* **174**, 7478-7481.
3. Gawande, B. N. and A. Y. Patkar. 1999. Application of factorial designs for optimization of cyclodextrin glycosyltransferase production from *Klebsiella pneumoniae* AS-22. *Biotechnol Bioeng.* **64**, 168-173.
4. Hara, K. and H. Hashimoto. 1986. Application of cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**, 152-161.
5. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
6. Kanai T, N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cyclodextrin-oligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4956-4960.
7. Kaneko, T., T. Kudo and K. Horikoshi. 1990. Comparison of CD composition produced by chimeric CGTases. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 197-201.
8. Lee, P. K. C. and B. Y. Tao. 1994. High-level expression of cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* using a T7 promoter expression system. *Starch* **46**, 67-74.
9. Lejeune, A., K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1989. A spectrophotometric assay for the cyclization activity of cyclomaltohexaose (α -cyclodextrin) glucanotransferase. *Anal. Biochem.* **181**, 6-11.
10. 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.
11. Nagao, T., Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga. 1996. Expression of lipase cDNA from *Fusarium heterosporum* by *Saccharomyces cerevisiae*: High-level production and purification. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 488-492.
12. Ruohonen, L., M. Penttila and S. Keranen. 1991. Optimization of *Bacillus* α -amylase production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**, 337-346.
13. Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology*. pp. 1-78., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
14. Tonkova, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 678-686.
15. van der Veen, B. A., J. C. Uitdehaag, D. Penninga, G. J. van Alebeek, L. M. Smith, B. W. Dijkstra and L. Dijkhuizen. 2000. Rational design of cyclodextrin gly-

- cosyltransferase from *Bacillus circulans* strain 251 to increase α -cyclodextrin production. *J. Mol. Biol.* **296**, 1027-1038.
16. Vernet, T., D. Dignard and D. Y. Themas. 1987. A family of yeast expression vectors containing the Phage f1 intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
17. Yanez, E., T. A. Carmona, M. Tiemblo, A. Jimenez and M. Fernandez-Lobato. 1998. Expression of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 amylase in *Saccharomyces cerevisiae*: role of N-glycosylation on activity, stability and secretion. *Biochem. J.* **329**, 65-71.

(Received March 15, 2001; Accepted April 9, 2001)