Korean Journal of Life Science
Vol. 11. No. 3. 230~234, 2001

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 재조합 cyclodextrin glucanotransferase의 생화학적 특성

박현이 · 남수완 · 김병우*

동의대학교 미생물학과

Biochemical Properties of Recombinant Cyclodextrin Glucanotransferase Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*

Hyun-Yi Park, 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 expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and the recombinant CGTase was partially purified from the yeast culture supernatant. The optimal pH and temperature of the CGTase were found to be 6.0 and 50℃, respectively. The pH and temperature stabilities of the recombinant enzyme were significantly enhanced and the half life at 55℃ was about 60 hr. When the recombinant CGTase was reacted with 5% soluble starch, the conversion yield of total cyclodextrin (CD) from starch was estimated to be 41% at 48 hr, whereas the wild type enzyme showed the yield of 21%. This improvement of conversion yield and thermal stability of CGTase may be useful for the development of low-cost CD production process.

Key words – *Bacillus macerans*, conversion yield, cyclodextrin glucanotransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, thermal stability

서 론

Cyclodextrin (CD) 생산에 이용되는 cyclodextrin glucanotransferases (CGTase; EC 2.4.1.19)들은 최적반응온도가 30℃~60℃의 범위라서 기질인 전분의 농도를 고농도로 사용할 수 없어 반응 효율이 낮을 뿐만 아니라, 효소반응 후 반응산물로부터 α-, β-, γ-CD를 따로 분리하는 공정이 까다로워 CD의 생산단가를 높이는 원인이 되고 있다. 따라서 내열성이 높으며, α-, β-, γ-CD 중 특정 CD를 선택적으로 다량 생산할 수 있는 반응 특이성이 높은 CGTase를 얻을 경우, 생산성과 단가 문제를 획기적으로 해결할 수 있다[9].

*Saccharomyces cerevisiae*에서 유용 단백질을 발현·생산할 경우 그 효모균체 자체가 식용으로 사용될 수 있기 때문에 (GRAS 미생물) 효모에서 생산된 단백질 역시 식품산업에 바로 이용되어도 안정성에 큰 문제를 야기하지 않는다. 또한 고농도 세포배양 기술이 확립되어 있어 재조합 단백질의 대량생산이 용이하고, 외래 유전자가 발현될 때 번역 후 수식과정 (post-translational modification)을 통하여 당

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

쇄부가 동에 의한 효소 구조의 변형에 따른 생화학적 특성이 달라진 새로운 효소 획득이 가능해 질 수 있다[6].

따라서, 본 연구에서는 *Bacillus macerans* 유래의 CGTase 유전자를 발현하는 효모 형질전환주(*S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM)를 배양하여 발현·분비·생산된 재조합 CGTase를 부분정제하고, 생화학적 특성 등을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균체 농도, Plasmid 안정성 및 CGTase 활성 측정

균체 농도, plasmid 안정성 및 CGTase 활성측정은 전보[4]와 같은 방법으로 측정하였다.

균체 배양 및 조효소액의 제조

Flask 배양은 50 mL YPD(1% Yeast extracr, 2% Bacto-peptone, 2% dextrose) 배지를 함유한 500 mL baffled-flask에서 30℃, 170 rpm에서 수행하였으며, 재조합 CGTase의 조효소액을 제조하기 위한 발효조 회분배양은 YPD 배지로 working volume 1.0 L, 배양온도 30℃, pH 5.5, 교반속도 300-800 rpm, 통기속도 1-2 vvm의 조건하에서 수행하였다. 48시간 배양 후 배양 상등액을 70% 포화 ammonium sulfate로 침전시킨 뒤 그 상등액을 증류수로 투석하였다. 계속해서 Resouce Q와 Superose 12HR column을 이용한 FPLC로 조효소액을 제조하였으며 최종 조효소액의 활성은 약 0.3 U/mL 정도였다.

재조합 CGTase의 반응 최적 pH 및 pH 안정성

pH 3.7~5.6 범위에서는 50 mM acetate buffer, pH 5.6~7.5 범위에서는 50 mM phosphate buffer, pH 8.0~10.6 범위는 50 mM glycine buffer를 사용하여 전체 pH 4.0~8.0 범위에서 재조합 CGTase의 반응 최적 pH와 pH 안정성을 조사하였다.

재조합 CGTase의 반응 최적온도 및 열안정성

재조합 CGTase의 반응 최적 온도는 35~65℃ 사이에서 10분간 반응하여 측정하였고, 열안정성 은 pH 6.0에서, 45~55℃ 범위에서 시간별로 측정하였다.

CGTase 활성측정 및 CD의 분석과 정량

효소활성 측정은 Methyl Orange 법을 사용하였으며, 분당 1 μmole의 α-CD를 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다[4].

부분 정제한 CGTase의 CD 생산 양상을 분석하기 위해 50 mM의 인산완충액 (pH 6.0)에 기질로 5% (w/v) soluble starch와 부분정제효소를 가하여(0.5unit/ml) 반응액을 50℃에서 반응시킨 후 시간별로 생성된 CD를 HPLC (LC Module I, Waters, U.S.A.)로 분석하였다. 사용한 column은 TSKgel Amide-80 (Tosoh Co., Japan)이며, acetonitrile : H_2O = 60 : 40의 용매로 분당 1 mL의 유속으로 용출하여 RI detector(Model 410, Waters, U.S.A.)로 검정하였다.

결과 및 고찰

반응 최적 pH 및 pH안정성

*S. cerevisiae*에서 발현된 재조합 CGTase의 효소반응의 최적 pH를 pH 4.0~8.0의 범위에서 측정한 결과, Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 6.0에서 최적활성을 보였다.

pH 안정성을 조사하기 위해 효소를 각 pH에서 반응시켜 시간에 따른 잔존활성을 측정하였다. pH 4.0~7.0 범위에서는 72시간 후에도 거의 실활되지 않고 80% 이상의 잔존활성을 나타내었으며, pH 7.5 이상에서는 효소활성이 급

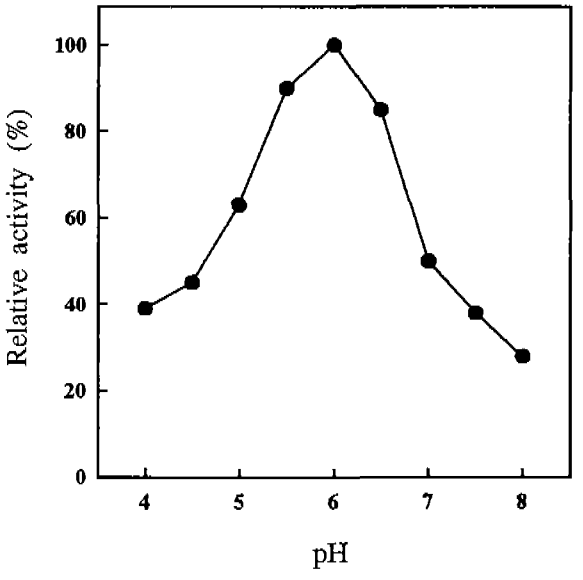

Fig. 1. Effect of pH on the recombinant CGTase activity.

격히 감소하여 72시간 후에는 10% 정도의 잔존활성을 나타내었다 (Fig. 2).

B. macerans 야생형 CGTase의 최적 pH는 6.0이고 pH 안정성은 4.0-7.0의 범위에서 약 50%의 잔존 활성을 가지는데[3] 비해 재조합 효소는 산성에서의 효소 안정성이 크게 증가되었다. 이것은 CGTase가 효모 *S. cerevisiae*에서 번역 후 수식과정을 거치면서 당쇄가 부가되고 [5], 이러한 당쇄 부가가 재조합 효소의 산 안정성을 크게 증가시킨 것으로 사료되어진다.

반응 최적온도 및 열안정성

재조합 CGTase의 효소반응 최적온도를 pH 6.0, 35~65 ℃의 범위에서 측정한 결과, Fig. 3에서 보는바와 같이 50 ℃에서 최적활성을 보였다. 열안정성에 있어서도 45~55℃에서는 48시간 열처리한 후에도 80% 이상의 잔존활성을 나타내었으며, 55℃에서는 60시간 열처리 후에도 약 50%의 잔존활성을 나타내어 55℃에서의 반감기가 약 60시간이었다(Fig. 4).

B. macerans 야생형 CGTase의 최적 온도는 50℃, 열안정성은 50℃ 24시간에 약 70%의 잔존활성에 비해 재조합 CGTase의 열안정성은 매우 향상되었음을 알 수 있고, 이는 재조합 효소에 발생한 과당쇄화에 기인하는 것으로 판

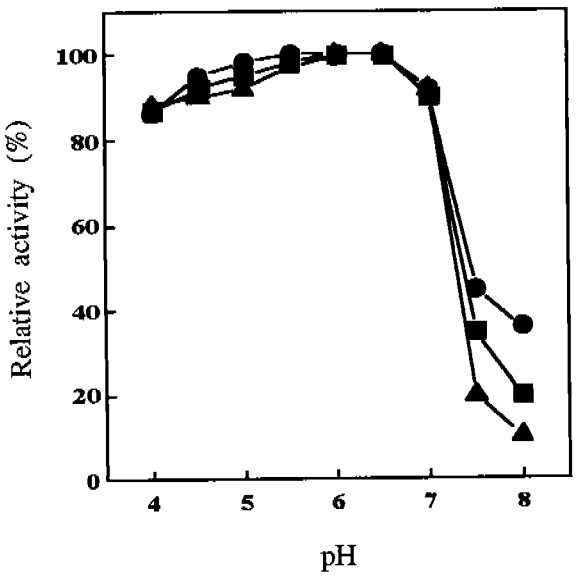

Fig. 2. pH stability of the recombinant CGTase activity.
Symbols : (●), 24 hr; (■), 48 hr; (▲), 72 hr.

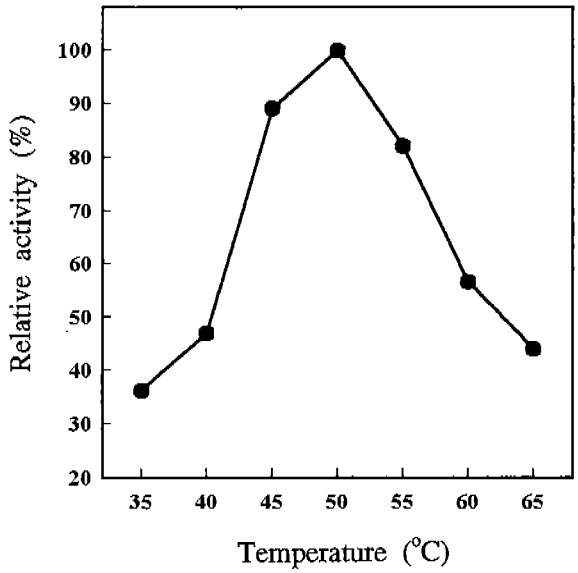

Fig. 3. Effect of temperature on the recombinant CGTase activity.

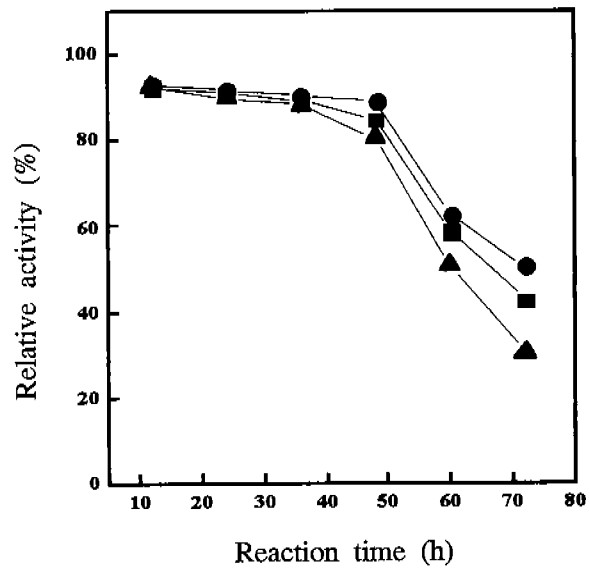

Fig. 4. Thermal stability of the recombinant CGTase activity.
Symbols : (●), 45℃; (■), 50℃; (▲), 55℃.

단된다. 실제로 당쇄부가에 의한 열안정성이 증가된 효소는 *Bacillus* endoglucanase [1], *Bacillus* cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase [2], *Bacillus*와 rice의 α-amylase [7,8] 등 다양하다.

반응 생성물의 분석

재조합 CGTase에 의한 α-, β-, γ-CD의 생산 양상과 그 비율을 검토하기 위해서 5% soluble starch를 기질로 50℃에서 효소반응 시킨 후 그 산물을 분석하였다. 48시간 반응 후, 야생형 CGTase의 α-, β-, γ-CD 생산 비율이 6 : 3 : 1인 반면, 재조합 CGTase의 경우 CD 생산비율이 3.5 : 2.4 : 1로 나타나, α-CD 비율이 낮아져 생산된 총 CD 중 50%에 불과하였다(Fig. 5). 하지만 *B. macerans*의 야생형 CGTase와 비교하면 각 CD의 생산량은 모두 증가함을 나타내었다. 기질인 starch에서 α-, β-, γ-CD로의 전환율은 야생형 CGTase의 경우 21%의 CD 전환율 (10.3 g/L)을 나타내었고, 재조합 CGTase의 경우 반응 48시간에서 CD 전환율은 41% (20.2 g/L)로 야생형 효소보다 훨씬 높았다 (Fig. 6). 반응 48시간 후 CD 생성량이 감소하는 경향을 보였는데, 이것은 생산된 CD량과 malto 올리고당이 많음으로 인해 CGTase 활성 중 coupling반응에 의해 CD가 다른 올리고당으로 전환되어지는 것으로 보여진다.

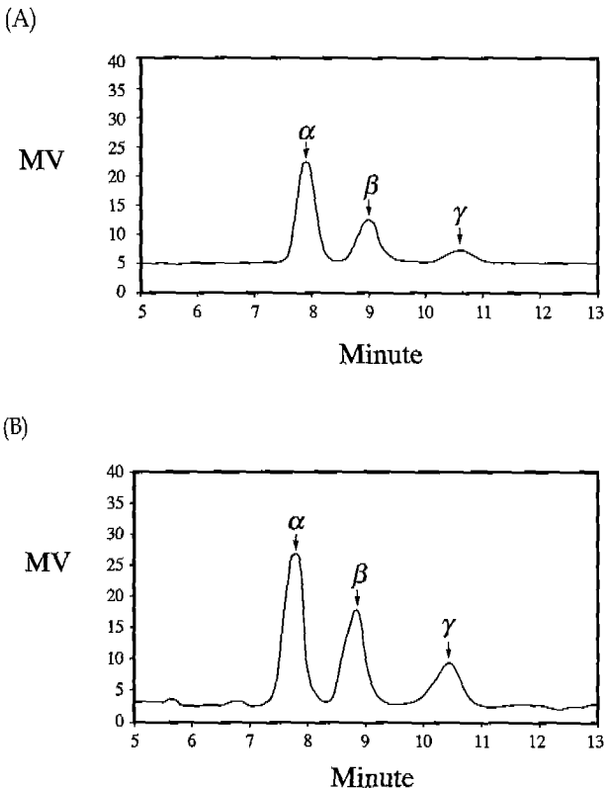

Fig. 5. HPLC chromatogram of reaction products after treatment of CGTase with 5% soluble starch.
(A) CGTase from *B. macerans*
(B) CGTase from *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTM.

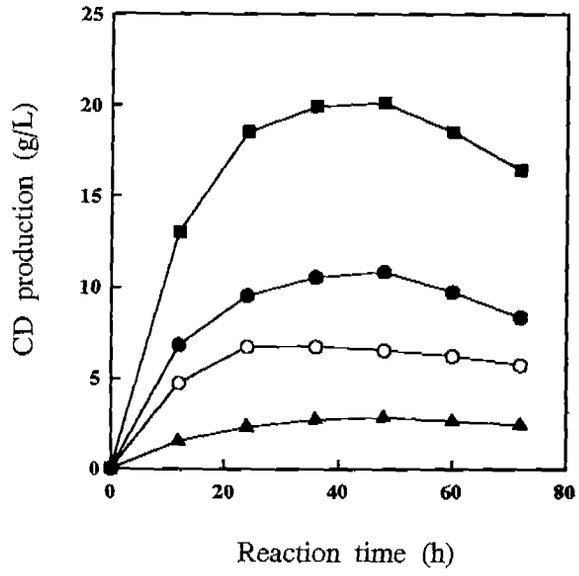

Fig. 6. Time course of CD formation by the recombinant CGTase.
Symbols : (■), total CD; (●), α-CD; (○), β-CD; (▲), γ-CD.

이와 같이 CD 생산비율의 변화와 CD 생성 양상의 변화는 재조합 CGTase에 부가된 당쇄 때문으로 보여지며, N-linked 당쇄부가에 따른 효소반응활성 및 분비효율성 등의 변화는 *Schwanniomyces* 속 유래의 α-amylase의 경우에서도 관찰된 바 있다 [10].

요 약

Bacillus macerans 유래 CGTase를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현·생산하여 부분정제하였다. 재조합 CGTase의 효소반응 최적활성은 pH 6.0, 50℃였으며, pH 4.0~7.0 범위에서 72시간 처리하여도 80% 이상의 잔존활성을 나타내었고, 열안정성에 있어서도 45~55℃에서 48시간 열처리한 후에도 80% 이상의 잔존활성을 나타내었다. 55℃에서의 반감기는 약 60시간이었다. 재조합 CGTase를 5% soluble starch와 반응시켰을 때, 총 CD 전환율은 41%로 야생형 CGTase의 21% 보다 CD 생산 효율이 증가되었다. 이상의 결과로, 효모에서 발현된 재조합 CGTase는 야생형에 비해, 높은 CD 전환율과 열안정성을 보여 CD 생산성의 증대와

생산단가의 저렴화가 기대되어 산업적 응용이 용이하리라 사료된다.

감사의 글

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

참 고 문 헌

1. Han, Y. J., D. O. Kang, S. J. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen and J. S. Ahn. 1994. Secretion of *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 24-29.
2. Kanai T, N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4956-4960.
3. Lee, K. C. P. and B. Y. Tao. 1994. High-level expression of cyclodextrin glucanotransferase in *E. coli* using a T7 promoter expression system. *Starch* **46**, 67-74.
4. Jun, H. S., S. W. Nam and B. W. Kim. 2001. Expression characteristics of recombinant cyclodextrin glucanotransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Life Sci.* 11, (in press)
5. Nam, S. W., H. Y. Park, J. H. Kim, J. H. Seo, N. S. Han and B. W. Kim. 2000. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* (in press)
6. Romanos, M. A., C. A. Scorer and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **8**, 423-488.
7. Ruohonen, L., P. Hackman, P. Lehtovaara, J. C. K. Knowles and S. Keranen. 1987. Efficient secretion of *Bacillus amyloliquefaciens* α-amylase by its own signal peptide from *Saccharomyces cerevisiae* host cells. *Gene.* **59**, 161-170.
8. Terashima, M., A. Kubo, M. Suzawa, Y. Itoh and S. Katoh. 1994. The roles of the N-linked carbohydrate chain of rice α-amylase in the thermostability and enzyme kinetics. *Eur. J. Biochem.* **226**, 249-254.
9. Tonkova, A. 1998. Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 678-686.
10. 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 23, 2001; Accepted April 12, 2001)