

## Yeast cell surface display of cellobiohydrolase I

Sun Kyoung Lee, Chang Woo Suh, <sup>1</sup>Sun Duk Hwang, <sup>1</sup>Whan Koo Kang,  
and Eun Kyu Lee<sup>†</sup>

Bioprocessing Research Laboratory, Dept. of Chemical Engineering,  
Hanyang University, Ansan 426-791, Korea

<sup>1</sup>Nano-Bio Technology Lab., Dept. of Chemical Engineering, Hannam University  
TEL: +82-31-400-4072, FAX: +82-31-408-3779

### Abstract

Recently, genetic engineering techniques have been used to display various heterologous peptides and proteins (enzyme, antibody, antigen, receptor and fluorescence protein, etc.) on the yeast cell surface. Living cells displaying various enzymes on their surface could be used repeatedly as 'whole cell biocatalysts' like immobilized enzymes. We constructed a yeast based whole cell biocatalyst displaying *T. reesei* cellobiohydrolase I (CBH I) on the cell surface and endowed the yeast-cells with the ability to degrade cellulose. By using a cell surface engineering system based on  $\alpha$ -agglutinin, CBH I was displayed on the cell surface as a fusion protein containing the N-terminal leader peptide encoding a Gly-Ser linker and the Xpress<sup>TM</sup> epitope. Localization of the fusion protein on the cell surface was confirmed by confocal microscopy. In this study, we report on the genetic immobilization of *T. reesei* CBH I on the *S. cerevisiae* and hydrolytic activity of cell surface displayed CBH I.

### 서 론

미생물의 세포 표면에 heterologous protein을 표면 발현 시키는 것은 그동안 활발하게 연구되었다. 특히, *S. cerevisiae*의 세포표면에 protein을 발현 시키는 것은 몇가지 장점을 가진다. 단백질과 화학물질의 산업적인 생산에서 *S. cerevisiae*는 많이 쓰이고 있으며, 효소로 코팅된 효모 세포는 세포벽에 공유결합으로 연결되어 있기 때문에 whole cell biocatalyst로서 사용할 수 있다. 또한 *S. cerevisiae*는 식용으로 안전해서 식품이나 의약품에 사용할 수 있다.<sup>1,2)</sup> Cellulose 분해효소는 1,4- $\beta$ -D-glucanglucanohydrolase(EC 3.2.1.4), 1,4-glucanocellobiohydrolase (EC

3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21)의 복합효소로 구성되어, 상호작용에 의해서 cellulose가 분해되는데, 이 중에서 1,4-glucan cellobiohydrolase (이하, cellobiohydrolase로 표기)는 다른 효소성분에 비해서 결정성이 높은 거대분자의 cellulose에 친화력이 높은 특성이 있다.<sup>3)</sup> 본 연구는 *T. reesei* 유래의 cellulose 분해 효소 CBH I 을 *S. cerevisiae* EBY100에 표면 발현시켜 고정화된 생촉매 효소로서의 특성을 규명하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmid

*T. reesei* 에서 얻은 CBH I gene, *E. coli* TOP10F'는 한남대학교 나노생명공학 실험실로부터 제공받았다. pYD1 yeast display vector kit( Invitrogen Corp., U.S.A) 를 이용하여 효모 표면 발현을 하였다. *S. cerevisiae* strain EBY100은 CBH I 효모 발현을 위해서 사용하였다.

### 배양조건

*E. coli* 는 100  $\mu$ g/mL ampicillin이 포함된 LB medium (1% tryptophan, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride)에서 배양하였다. Yeast 배양은 YPD medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose)과 2% glucose가 포함된 YNB-CAA medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 0.5% casamino acids)과 2% galactose가 들어있는 YNB-CAA medium을 사용하여 30°C에서 배양하였다. Galactose induction은 Invitrogen에서 제공하는 방법에 따라 실행하였다.<sup>4)</sup>

### CBH I 유전자의 cloning 및 형질전환

*T. reesei* 유래 CBH I gene은 *pfu* polymerase를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 쓰인 primer는 5CBH I Sac II (5'-TCC CCG CGG GAT GTA TCG GAA GTT GGC CG-3, GenoTech Corp., Korea)과 3CBH I Xho I (5'-AGA CTC GAG TTA CAG GCA CTG AGA GTA-3, Bionex Corp., Korea)을 사용하였다. pYD1 vector는 우선 EcoR I으로 절단한 후 Klenow enzyme을 이용하여 blunt 처리를 한다. CBH I PCR product와 blunt 처리한 pYD1 vector를 Xho I으로 절단하였다. 제한효소 처리한 CBH I gene과 pYD1 vector를 T4 ligase(Promega, U.S.A)로 16°C에서 4시간 ligation하여 *E. coli* TOP10F'의 competent cell에 electrotransformation 방법을 사용하여 형질전환시킨 후, ampicillin이 100  $\mu$ g/mL 함유된 LB 고체배지

에 도달하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 재조합된 CBH I plasmid는 LiAc yeast transformation 방법을 사용하여 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환 시킨 후, 0.01% leucine이 함유된 minimal dextrose plase (0.67% yeast nitrogen base without amino acid, 1.5% agar, 2% glucose)에 도달하여 30°C에서 48시간 배양하였다.<sup>5)</sup>

### CBH I 활성 측정

CBH I 활성은 100 mM acetate buffer(pH 4.5)에 현탁시킨 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC) 0.5 mL에 효소 용액 0.5 mL와 혼합하여 45°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 위 반응액 0.5 mL과 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약 0.5 mL을 첨가하여 끓는 물에서 10분 동안 방치하여 발색시킨 후 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소측정에 사용된 yeast cell은 10 mM PBS(pH 7.4)로 3회 세척하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건 하에서 1시간 동안 CMC로부터 1 μmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.<sup>6)</sup> 표준물질로 *T. reesei* 유래 cellulase 복합효소를 Sigma-Aldrich사에서 구입하였다.

### 표면발현 확인

효모표면에 CBH I이 발현되었는지 확인하기 위하여 Leica TCS SL confocal laser scanning microscope(Leica Microsystems Inc., German)를 이용하였다(FITC: Excitation and emission at 488 nm and 500~530 nm). Anti-Xpress<sup>TM</sup>-FITC antibody(Invitrogen Corp., U.S.A) staining을 위해 yeast cell은 Invitrogen에서 제공하는 방법에 따라 실행하였으며, 배양액은 direct ELISA 방법을 따라 실행하였다.

## 결과 및 고찰

### CBH I 유전자의 cloning 및 형질전환

CBH I gene의 PCR 결과를 Fig. 1에 제시하였다. Primer에 의해 Plasmid pYD1 CBH I을 Fig. 1에 나타내었다. PCR product의 크기는 1,560 bp이며 두 primer에 의해 5-말단과 3-말단에는 각각 Sac II와 Xho I 제한효소 인식부위가 생겼다. pYD1 vector는 제한효소 Sac II로 바로 절단할 수 없기 때문에 EcoR I으로 먼저 절단한 후 blunt 처리를 해주었다. *E. coli*에 형질전환된 재조합 plasmid를 추출한 후, Sac II와 Xho I으로 처리하여 pYD1 vector에 CBH I gene이 삽입되었는지 확인하였다 (Fig. 2). 효모 표면에 CBH I을 발현시키기 위한 재조합 plasmid를

Fig. 3에 나타내었다. 재조합 plasmid는 GAL promotor에 의해 작동되어 CBH I/ $\alpha$ -agglutinin fusion gene을 세포표면에 발현시킨다.

### CBH I 발현 및 활성 확인

CBH I 이 배양액에 분비되었는지 효모표면에 발현되었는지 결정하기 위하여 재조합 CBH I plasmid를 함유하고 있는 *S. cerevisiae* EBY100를 2% glucose를 함유한 YNB-CAA에서 OD<sub>600nm</sub>=5.0가 될 때까지 30°C에서 배양한 후, 원심분리를 하여 세포만 회수하여 2% galactose를 함유한 YNB-CAA로 OD<sub>600nm</sub>=1.0이 되도록 현탁시킨 후 20°C에서 72시간 동안 배양하였다. 배양액과 세포를 분리한 후 각각 활성을 측정하였더니 효모 표면에서는 CBH I 활성을 측정할 수 없었고 배양액에서 CBH I 활성을 확인하였다. 배양액 내의 총 단백질 mg당 2,400 unit로 측정되었다. 이는 표준 cellulase에 비해 활성이 약 12배 높은 수치이다. 또한, 효모 표면발현을 확인하기 위해 confocal microscopy를 사용하였는데, 효모표면에서는 FITC를 관찰할 수 없었고 배양액에서 FITC를 관찰하였다. 현재 배양조건을 달리하여 효모표면에 CBH I 발현 시키는 실험을 수행중이다.

### **References**

1. T. Murai, M. Ueda, M. Yamamura, H. Atomi, Y. Shibasaki, N. Kamasawa, M. Osumi, T. Amachi, A. Tanaka, Construction of a starch-utilizing yeast by cell surface engineering (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1362-1366.
2. T. Murai, M. Ueda, T. Kawaguchi, M. Arai, A. Tanaka, Assimilation of celooligosaccharides by a cell surface engineered yeast expressing  $\beta$ -glucosidase and carb oxymethylcellulase from *Aspergillus aculeatus* (1998), *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 4857-4861.
3. T. K. Oh, Purification of *Trichoderma viride* cellobiohydrolase by immunoaffinity chromatography (1990), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 390-393.
4. E. T. Boder and K. D. Wittrup, Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries (1997), *Nature biotechnology*, **15**, 553-557.
5. R. Kang and E.K. Lee, Rapid colorimetric assay and yeast surface display for screening of highly functional fungal lignin peroxidase (2002), *J. of Chemical Engineering of Japan*, **35**(6), 527-532
6. M. G. Tuohy, D. J. Walsh, P. G. Murray, M. Claeysens, M. M. Cuffe, A. V.

Savage, M. P. Coughlan, Kinetic parameters and mode of action of the cellobiohydrolase produced by *Talaromyces emersonii* (2002), *Biochimica et biophysica acta*, **1596**, 366-380.

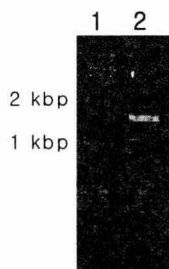


Fig. 1. Agarose(1.0%) gel electrophoresis of amplified CBH I by PCR. Lane1: 1 kbp DNA ladder(Elpis-biotech, Lab.), Lane2: amplified CBH I .

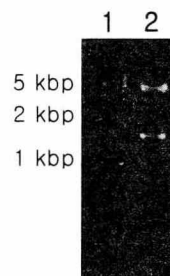


Fig. 2. Agarose(1.0%) gel electrophoresis of cleaved recombinant CBH I into pYD1 vector by restrict enzyme(EcoR I, Xho I). Lane1: 1 kbp DNA ladder (Elpis-biotech,Lab.), Lane2: cleaved recombinant CBH I into pYD1 vector.

Table. 1. Distribution of CBH I

|                    | Specific Activity (unit/mg) |
|--------------------|-----------------------------|
| Cell pellet        | ND <sup>a</sup>             |
| Culture medium     | 2,400                       |
| Standard cellulase | 189                         |

<sup>a</sup>ND, not detected.

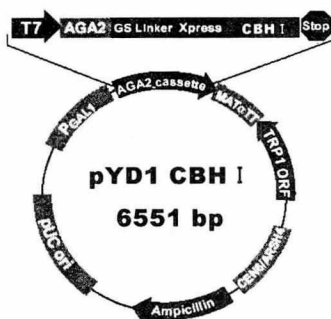


Fig. 3. Constructed plasmids for displaying of CBH I on the yeast cell surface.