Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 30, No. 3, 206–209 (2002)

Saccharomyces cerevisiae 내에서 *Bacillus stearothermophilus* NO2 CGTase 유전자의 발현

유동주 · 박현이 · 전숭종[1] · 권현주[2] · 남수완 · 김병우*
동의대학교 미생물학과, [1]일본산업기술종합연구소, [2]미쯔비시 화학생명과학연구소

Expression of the *Bacillus stearothermophilus* NO2 CGTase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. You, Dong-Ju, Hyun-Yi Park, Sung-Jong Jeon[1], Hyun-Ju Kwon[2], Soo-Wan Nam, and Byung-Woo Kim*. *Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan 614-714, Korea,* [1]*The special division for Human Life Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology(Kansai), Osaka 563-8577, Japan,* [2]*Mitsubishi Kagaku Institute of Life Sciences, Tokyo 194 8511, Japan* – For the expression of CGTase gene(*cgt*S) from *Bacillus stearothermophilus* NO2 in *Saccharomyces cerevisiae*, *cgt*S gene was subcloned into the *Escherichia coli*-yeast shuttle vector, pVT103-U. The constructed plasmid, pVT-CGTS was introduced to *S. cerevisiae* 2805 cell, and then the *cgt*S gene under the control of *adh1* promoter was successfully expressed in the yeast transformant and 87% of the total activity was detected into the fermentation medium. Therefore, the signal peptide of *B. stearothermophilus* NO2 CGTase showed high secretion efficiency in *S. cerevisiae*. Optimal conditions of the recombinant yeast cell for expression of CGTase was achieved, when *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS was cultivated on YP medium at 2% dextrose, pH 5.5, 30°C and the expression level of CGTase was 0.624units/mL for 48 h culture.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, cyclodextrin glucanotransferase, *E. coli*-yeast shuttle vector, *Saccharomyces cerevisiae.*

서 론

Cyclodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; CGTase)는 cyclodextrin(CD) 합성반응을 매개하는 효소로서 전분으로부터 포도당 6~8개가 α-1,4-glucoside 결합으로 연결된 비환원성의 환상 α, β, γ-CD를 생산한다. CD는 소수성 물질을 포접할 수 있는 성질을 가지고 있으며 포접 물질을 안정화시키는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성을 이용하여 식품, 의약, 농약, 화장품 등의 산업에서 유효 성분의 안정화, 가용화 및 유화 등 물성개선의 첨가제로 이용되고 있다[7,14].

CGTase는 생산 미생물의 기원에 따라 분자량이 35,000~88,000 Da범위이며, 일반적으로 온도 40~55°C, pH 5.5~6.5의 중성 부근에서 높은 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 그러나, alkalophilic *Bacillus* sp.[5]나 *B. firmus* var. *alkalophilus*[4] 유래의 CGTase는 pH 10 이상에서도 높은 활성을 가지는 호알칼리성 효소도 있고 *Thermoanaerobactor* sp.[12]와 같은 호열성 미생물이 생산하는 내열성 효소도 보고되고 있다. CGTase에 대해서는 지금까지 비교적 많은 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 아직까지 산업적 요구에 충분히 부응할 수 있는 고효율 · 고반응 특이성 · 내열성 CGTase는 없는 실정이다. 이러한 문제 해결의 일환으로 자연계에서 새로운 고기능 효소의 분리와 유전공학적 기법을 이용하여 CGTase 유전자를 재조합하여 효소의 기능을 개량하는 연구 등이 활발히 진행되고 있다.

한편, 식품산업 소재로 이용 될 수 있는 효소들의 유전자를 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시킴으로서 목적 단백질을 대량생산하거나 효소의 활성을 개량하려는 연구도 최근 활발히 진행되고 있다. 유용 단백질의 산업적 실용화를 위한 효모에서의 재조합 발현에 관한 연구는 주로 plasmid 안정성 제고를 위한 자가선택 변이주(autoselective mutant)개발, 전사 및 번역 효율성 제고, 분비 신호 peptide의 절단 효율성 증대, 초분비 변이주, 세포벽 결손 변이주 개발, 단백질 분해효소 결손 변이주 개발 등에 관한 연구로 집중되고 있다[3,9,16].

본 연구는 *B. stearothermophilus* NO2의 CGTase를 대량생산하기 위해 *S. cerevisiae*에서 발현할 수 있는 재조합 plasmid를 구축하고 발효조건의 영향을 분석하여 CGTase의 분비생산 극대화를 위한 발효조건 최적화를 시도하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

*Corresponding author
Tel. 82-51-890-1536, Fax 82-51-891-7740
E-mail: bwkim@dongeui.ac.kr

본 연구에 사용한 효모 균주는 재조합 단백질 발현 및 분비용으로 이용되는 *S. cerevisiae* 2805를 사용하였으며, plasmid 구축 및 증폭을 위해 *E. coli* DH5α를 사용하였다. *B. stearothermophilus* NO2의 CGTase 유전자(*cgt*S)는 pBR322에 *cgtS*가 subcloning된 pKBR1[6]을 사용하였다. *S. cerevisiae*에서 CGTase 발현을 위한 vector는 구성적 발현 vector로 *adh1* promoter와 선택표지로 *ura3*(orotidine-5'-phosphate decarboxylase) 유전자를 가진 pVT103-U[15]를 사용하였다.

Primer 제작, plasmid 구축 및 형질전환

B. stearothermophilus NO2의 CGTase 유전자의 효율적인 발현을 위해서 유전자 ORF 부위만 PCR로 증폭하였다. primer는 5'-GAATTCGGATCCCTGAATGAGAAGATGG-3' (sense primer)와 5'-GAATTCTCTAGATTAGTTCTGCCAATCCAC-3'(anti-sense primer)를 사용하였다. sense primer 부위에는 *Eco*RI 과 *Bam*HI 서열을 가지며, anti-sense primer에는 *Eco*RI 과 *Xba*I 서열을 가지고 있다. 주형 DNA로 *B. stearothermophilus* NO2의 *cgt*S 유전자를 함유한 pKBR1[6]을 사용하였으며, Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400(U.S.A.)에서 2.1kb의 유전자 단편(*cgtS*)을 대량 증폭하였다. 증폭된 *cgtS* 단편은 pUC118에 *Bam*HI/*Xba*I으로 연결하여 *E. coli* DH5α를 숙주세포로 $CaCl_2$법[1]으로 형질전환하여 *cgtS* 단편를 포함하는 plasmid를 확보하였다. CGTase 발현용 vector는 전술의 재조합 plasmid를 *Bam*HI/*Xba*I로 처리한 후, 얻어진 유전자 단편을 *adh1* promoter를 함유한 *E. coli-S. cerevisiae* shuttle vector인 pVT103-U에 재조합하여 *E. coli* DH5α에 형질전환시키고 재조합 plasmid pVT-CGTS을 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5α로부터 증폭, 추출하여 LiAc법[8]으로 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* 2805에 형질 전환하였으며, 효모에서 plasmid 추출은 Cryer 등[2]의 방법으로 추출하였다. 기타 재조합 plasmid의 구축에 사용된 유전자 재조합 기술은 Sambrook 등[13]의 방법을 사용하였다.

선별 배지 및 배양조건

효모 형질전환체의 선별을 위한 배지로는 SD 배지(0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose)를 사용하였고, 0.25%의 starch azure(Sigma co.)를 첨가하여 고체배지상의 CGTase 활성을 확인하였다. CGTase의 분비생산과 분리정제를 위해서는 YPD 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 2% dextrose)를 사용하였으며, 균체 증식과 유전자 발현에 미치는 초기 pH 및 배양온도의 영향을 조사하기 위해 YPD 배지를 100 mL 함유하는 baffled-flask로 실험하였다. 탄소원으로 dextrose와 starch의 영향을 알아보기 위해서는 dextrose와 starch를 농도별로 첨가된 YP배지를 사용하였다. 배양액의 환원당 농도는 배양액을 3,000 × g에서 5분간 원심분리 한 후 배양상등액을 dinitrosalicylic acid 방법[10]으로 잔존 농도를 측정하였다.

Plasmid 안정성

Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말 한 후 자란 100개의 colony를 SD 선별배지로 replica 한 다음 형성된 colony 수로 측정하였다.

CGTase의 분비 효율 및 효소 활성측정

균체 침전물을 Zymolase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads(0.45mm)를 사용하여 periplasmic space 분획과 전세포 분획을 얻었으며[11], 이들 분획과 배양상등액을 사용하여 각 분획에서의 CGTase 활성을 측정하였다. CGTase의 활성은 Leujeune등[6]의 methyl orange법으로 측정하였다. 효소 반응은 1.5 mL의 50mM 인산염 완충액(pH 6.0)에 기질 soluble starch와 methyl orange 최종농도가 각각 1%와 0.035mM이 되도록 첨가하여 잘 섞고 이 혼합액에 효소 용액을 가하여 50°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 6N HCl을 가하여 반응을 정지시키고 반응액을 16°C에서 30분간 방치한 후 508nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 위와 같은 조건에서 분당 1 μmole의 α-CD를 생성하는 효소량을 1 unit로 정의하였다. 비활성도(specific activity)는 각 효소 활성을 세포농도(OD_{600})값으로 나누어서 계산하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축 및 효모 형질전환주 선별

B. stearothermophilus NO2의 CGTase 유전자(*cgtS*)를 항구적(constitutive) promoter인 *adh1* promoter를 가진 pVT103-U(6.9kb) vector에 삽입하여 재조합 plasmid pVT-CGTS(9.0kb)를 구축하였다. 재조합 plasmid는 우선 *E. coli* DH5α에 subcloning하고 CGTase 활성을 나타내는 형질전환주를 선별한 후 형질전환주로부터 재조합 plasmid를 대량 확보하였다(Fig. 1). 대장균에서 증폭된 재조합 plasmid

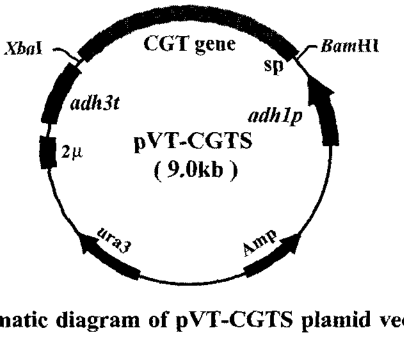

Fig. 1. Schematic diagram of pVT-CGTS plamid vector which was constructed with cgtS of *B. stearothermophilus* NO2 and *E. coli*-yeast shuttle vector pVT103-U. sp: signal peptide.

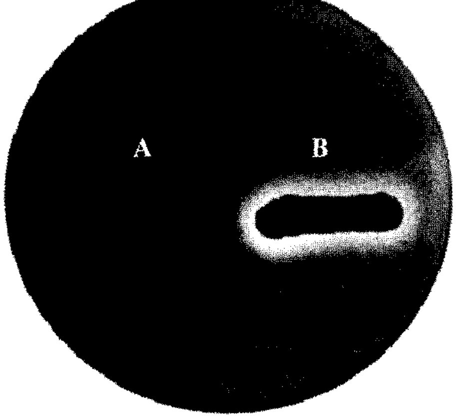

Fig. 2. Halo formation by CGTase expressed from *S. cerevisiae* which were grown on SD plus starch azure medium.
A : *S. cerevisiae* 2805 host cell, B : *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS recombinant cell.

pVT-CGTS는 다시 *S. cerevisiae* 2805에 LiAc법으로 형질전환 시켜 그 중 CGTase를 발현하는 효모 형질전환주를 uracil 결핍 최소배지(SD)에서 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주는 다시 starch azure 함유배지에서 비교적 큰 투명환을 나타내는 고활성 효모주를 선별하는 과정을 5회 반복하여 발현 효율이 높은 균주를 최종 선별하였다. 선별된 균주들은 *S. cerevisiae* 2805에서 항구적 promoter인 *adh1* promoter의 조절 하에서 안정적으로 CGTase가 발현되었다(Fig. 2).

CGTase 발현에 미치는 탄소원의 영향

효모에서 항구적 발현 벡터에 cloning된 CGTase 발현에 미치는 탄소원 영향을 검토하기 위해 YP배지에 dextrose와 starch를 농도별로 첨가하여 48시간 배양 후 균체 증식과 효소 발현량을 조사한 결과 균체 성장은 3% dextrose와 1% starch를 같이 첨가한 배양에서 가장 높은 균체 성장을 보였으나 CGTase 발현량과 비활성에서는 2% dextrose를 첨가한 배양에서 가장 높았다(Table 1). 항구적 발현계의 경우 균체 성장에 비례하여 효소의 발현양아 증가 하지만, 본 연구에서는 균체 성장과 재조합 단백질의 발현양상이 일치하지 않았다. 5% dextrose 첨가 배양에서는 오히려 낮은 균체 성장을 보였으며, 이는 효모의 발효 중에 생산되어지는 에탄올에 의해 균체 성장에 영향을 받은 것으로 사료된다. CGTase의 기질인 starch를 2% dextrose에 1%씩 첨가하여 그에 따른 균체 성장과 재조합 단백질의 발현양상을 검토해 보았다. 그 결과 starch의 첨가는 균체 성장과 발현에 아무런 효과를 나타내지 않았다. 이러한 사실로 *B. stearothermophilus* NO2에서 유도발현되던 CGTase가 *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS에서는 유도 발현되지 않고 항구적으로 발현된다는 것을 알 수 있다. Plasmid 안정성은 80% 이상으로 안정하였다.

재조합 효모 형질전환주에서 CGTase의 분비 효율

재조합 효모 형질전환주 CGTase의 분비 효율을 조사하기 위해 YPD배지에서 pH 5.5, 30°C, 48시간 배양하였다. 그 결과 Table 2에 나타내듯이 배지로의 CGTase 분비량은 배양 상등액에서 0.59 unit/mL로 87%의 효소 활성을 나타낸 반면, 세포내의 cytoplasm에서는 약 1.5%의 효소활성을 보여 생산된 CGTase가 대부분 분비되는 높은 분비효율을 나타내었다. Cloning된 *B. stearothermophilus* NO2의 *cgtS*에는 32개의 아미노산 잔기로 구성된 signal peptide를 포함하고 있는데[6] 이상의 결과로 이 단백질 분비신호가 효모에서도 효율적으로 작동된다는 것을 알 수 있었다.

배양시간에 따른 균체 증식 및 CGTase발현

S. cerevisiae 2805/pVT-CGTS를 YPD배지, pH 5.5, 30°C에서 회분배양하면서 균체 증식과 CGTase 발현량을 조사한 결과 Fig. 3와 같이 배양 6시간까지는 균체 증식이 활발히 일어나며, 잔존 glucose 농도가 3 g/L 이하로 고갈되는

Table 2. Expression and distribution of CGTase in *S. cerevisiae* 2805/pVT-CGTS at 48 h cultivation.

Cell conc. (OD_{600})	CGTase activity (unit/mL)			Secretion efficiency (%)
	Medium	periplasm	cytoplasm	
31.4	0.59	0.08	0.01	87

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

Initial dextrose conc.	Cell growth (OD_{600})	Plasmid stability (%)	CGTase activity (U/mL)	Sp. CGTase activity (mU/mL/OD_{600})
1% Dextrose	19.9	80	0.214	10.8
2% Dextrose	31.4	90	0.586	18.7
2% Dextrose/ 1% Starch	32.0	88	0.480	15.0
3% Dextrose	38.2	85	0.492	12.9
3% Dextrose/ 1% Starch	39.0	84	0.513	13.2
5% Dextrose	35.1	85	0.386	11.0

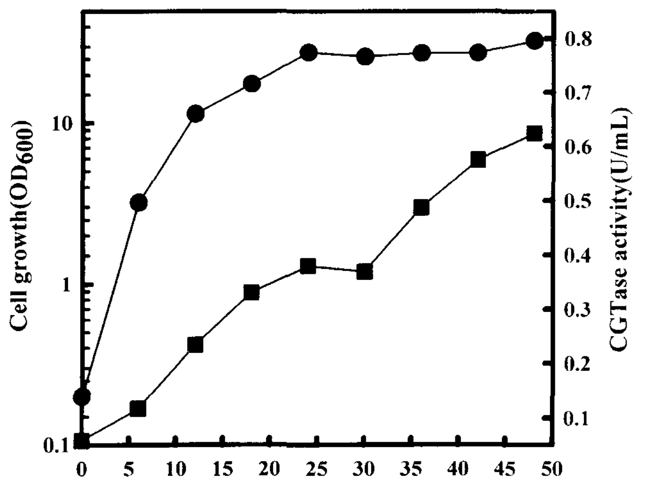

Fig. 3. Time courses of the cell growth and CGTase expression by recombinant *S. cerevisiae* 2805 harboring plasmid pVT-CGTS. The cell was cultivated on YPD medium at initial pH 5.5, 30 in baffled flask, ■-■, CGTase activity ;●-●, cell growth.

(data not shown) 12시간부터는 생성된 에탄올을 탄소원으로 이용하면서 느리게 성장하여 24시간에 정지기에 접어들었다. 이에 따른 CGTase 효소생산은 배양시간에 따라 증가하여, 48시간 배양에서 최고 0.624 unit/mL까지 생산되었다.

요 약

*Bacillus stearothermophilus*의 CGTase 유전자(*cgtS*)를 대장균과 효모의 shuttle vector로서 항구적 promoter인 *adh1* promoter를 함유한 pVT103-U(6.9Kb)에 도입하여 재조합 plasmid pVT-CGTS (9.0Kb)을 구축하고 효모 숙주 *S. cerevisiae* 2805에서 발현시켰다. 재조합 균주의 항구적 발현계인 2805/pVT-CGTS의 최적 발현조건은 YP배지에 dextrose 2%, pH 5.5, 30°C에서 최적 발효조건이었으며, CGTase의 최대 발현량은 48시간 배양시 0.624unit/mL을 나타내었다. *B. stearothermophilus*의 signal peptide가 재조합 효모에서도 높은 분비효율을 나타내어서 발현된 효소의 87%가 세포 외로 분비 생산되었다.

감사의 글

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

REFERENCES

1. Cohen, S. N., A. C. Y. Chang, and L. Hsu. 1973. Genetic transformation of *Escherichia coli* by R factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**: 2110.
2. Cryer, D. R., R. Eccleshall, and J. Marmur. 1975. In D. M. Prescott, *Methods in Cell Biology.* vol. 12, Academic Press, New York, 39-49.
3. De Baetselier, A., A. Vasavada, P. Dohet, V. Ha-Thi, M. De Beukelaer, T. Erpicum, L. De Clerck, J. Hanotier, and S. Rosenberg. 1991. Fermentation on a yeast producing *A. niger* glucose oxidase: scale-up, Purification and characteri- zation of the recombinant enzyme. *Bio. Technol* **9**: 559-561.
4. 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. alkalophillus producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
5. 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.
6. Fujiwara, S., H. Kakihara, B. W. Kim, A. Leujeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi, and T. Imanaka. 1992. Cyclization chracteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH_2-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4016-4025.
7. Hara, K. and H. Hashimoto. 1986. Application of Cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **3**: 152-161.
8. Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**: 163-168.
9. Melnick, L. M., B. G. Turner, P. Puma, B. Price-Tillotson, K. A. Salvato, D. R. Dumais, D. T. Moir, R. J. Broeze, and G. C. Avgerinos. 1990. Characterization of a nonglycosylated single chain urinary plasminogen activator secreted from yeast. *J. Biol. Chem.* **265**: 801-807.
10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anla. Chem.* **55**: 952-959.
11. Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae. Biotech. Lett.* **15**: 1049-1054.
12. Norman, B. E. and S. T. Jogensen. 1992. *Theroanaerobacter* sp. CGTase: Its properties and Application. *Denpun Kagaku* **39**: 101-108.
13. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
14. Szejtli, J. 1988. *Cyclodextrin Technology,* pp. 1-59. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
15. 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.
16. Wang, Z. and N. A. Da Silva. 1993. Improved protein synthesis and secretion through medium enrichment in a stable recombinant yeast strain. *Biotechnol. Bioeng.* **42**: 95-102.

(Received Mar. 5, 2002/Accepted July 11, 2002)