

*Saccharomyces cerevisiae*에서 발현된 Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase을 이용한 Cyclofructan의 생산

임채권¹ · 김현철² · 김광현¹ · 김병우¹ · 남수완*
동의대학교 생명공학과, ¹미생물학과, ²바이오물질제어학과

Production of Cyclofructan by Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase Expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Lim, Chae-Kwon¹, Hyun-Chul Kim², Kwang-Hyun Kim¹, Byung-Woo Kim¹, and Soo-Wan Nam. Department of Biotechnology & Bioengineering, ¹Department of Microbiology, ²Department of Bio-material Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – The cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) gene (*cfi*) from *Paenibacillus polymyxa* was subcloned into the *E. coli*-yeast shuttle vector, pYES2.0 (*GALI* promoter). The constructed plasmid, pYGCFT (9.9 kb) was introduced into *S. cerevisiae* SEY2102 cell and then the yeast transformant was selected on the synthetic defined media lacking uracil. Based on the cyclofructan (CF) spots on thin-layer chromatogram, the *cfi* gene under the control of *GALI* promoter was successfully expressed in the yeast transformant. The recombinant CFTase was not secreted into the medium and was predominantly localized in the periplasmic space. CF was started to be produced after 3 h of enzymatic reaction with inulin. The pH and temperature optimum for the CF production from inulin was pH 8.0 and 45°C, respectively. Enzyme activity was stably maintained up to the pH of 10.0. The examination of the inulin sources revealed that a dahlia tuber and Jerusalem artichoke were the best for the production of CF.

Key words: Cyclofructan, cycloinulooligosaccharide fructanotransferase, expression, inulin, *Paenibacillus polymyxa*, *Saccharomyces cerevisiae*

Cycloinulooligosaccharide(cyclofructan, CF)는 inulin으로부터 생산되는 환형올리고당이다. CF는 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase)의 분자내 당전이 반응에 의해 주로 fructose 분자 6~8개가 β -(2→1)결합으로 연결된 비환원성의 cycloinulohexaose(CF6), cycloinuloheptaose(CF7), 그리고 cycloinulooctaose(CF8)의 형태로 생산되며 [8], 생산 비율은 CF6(80%), CF7(20%), CF8(<1%)으로 보고되었다[9]. CFTase의 효소적 특성은 inulin과 같은 fructan 기질에 작용하여 CF를 합성하는 분자내 당전이 반응인 cyclization과 β -(2→1)-fructooligosaccharide 사이의 당전이 반응인 coupling 반응, disproportionation 반응 또는 가수분해 반응을 매개하는 다기능 효소(multifunctional enzyme)이다[10]. 이러한 다기능 효소 작용은 cyclomaltodextrin glucanotransferase(EC 2.4.1.19; CGTase)와 유사하다. 또한, CFTase는 분자내 당전이 반응, cyclization뿐만 아니라, β -(2→1) fructosidic 결합을 분해하고 β -(2→1) fructosidic 결합을 분해하는 효소인 β -fructofuranosidase(invertase, sucrase) (EC 3.2.1.26), levanase 및 inulinase 등과 amino acid sequence에서 높은 homology를 가지고 있다. 그래서 CFTase

도 β -fructofuranosidase family로 분류되어 질뿐만 아니라 [11], 단백질 구조와 촉매기작도 비슷할 것으로 추측되어진다.

CF의 구조는 bowl-shape 구조로 되어있고, 외부는 hydroxyl group이 친수성을 나타내며, 내부는 에테르 결합으로 인하여 소수성을 띄고 있다. 즉 CF는 cyclodextrin과 물리적, 화학적으로 유사한 구조로 되어 있다[18]. CF6의 crystal 구조 분석에서 18-crown-6-skeleton 구조로 밝혀졌으며[8, 17], 또한 CF6은 금속 양이온과 복합체를 형성한다 [20, 21]. 이 같은 CF의 물리적, 화학적 특성은 식품, 의약, 농업, 화학공업 등의 여러 분야에서 응용되어 이용될 수 있다[18]. CF는 여러 물질의 동결, 해동에 안정적 효과를 나타내기 때문에 빵 제조에서 밀가루 반죽이나, 화장품 또는 의약분야에서 liposome 등에 사용되어 질 수 있을 뿐만 아니라 산업적으로 널리 이용될 수 있을 것으로 기대된다[7].

CF의 생산에 이용되는 inulin은 돼지감자(Jerusalem artichoke), 치커리(Chicory), 다알리아(Dahlia) 등의 국화과(Compositae) 식물의 구근에 함유된 polyfructan으로 30-35개의 fructose가 β -1,2결합에 의해 직쇄상으로 연결되어 있고 그 말단에 D-glucose가 α -1,2결합을 하고 있다. 돼지감자는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력, 내병성 및 내충성이 강하고 단위 면적 당 수확량도 많아서 우리나라에서 재배하기가 용이한 식물 일뿐 아니라, inulin 가수분해에 의해 75% 이상의 fructose를 생산할 수 있다고 보고 되어 있어

*Corresponding author
Tel: 051-890-2276, Fax: 051-890-1619
E-mail: swnam@deu.ac.kr

감미 자원이 부족한 우리나라에서는 매우 유망한 감미 자원으로 활용할 수 있다[1, 4].

현재 CFTase는 *B. circulans* OKUMZ31B[8], *B. circulans* MCI-2554[13], *B. macerans* CFC1[11], *P. polymyxa* MGL21 [6] 등의 주로 *Bacillus* 속의 세균이 생산하는 것으로 알려져 있다. 한편, CFTase gene(cft)은 *B. circulans* MCI-2554, *B. macerans* CFC1, *P. polymyxa* MGL21 등으로부터 cloning 되어 염기서열이 밝혀졌다(Gen Bank/EMBL/DBJ accession no. D87672, AF222787 and AY077612). Kanai 등[7]은 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 α -factor 분비신호를 이용하여 효과적으로 발현시킨 바 있다. 따라서 유전자 재조합 기술을 사용하여 CRAS(Generally recognized as safe) 미생물인 효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질 형태로 생산하는 것이 CF 생산성 향상과 식품소재로서의 안정성 확보 및 기능(활성) 개선에 크게 유리하다.

본 연구에서 사용한 CFTase는 *P. polymyxa* MGL21 유래의 cft 유전자이며, ORF가 3999 bp이고 단백질 분자량은 148 kDa이다[6]. cft 효모 발현체를 구축한 뒤 *S. cerevisiae* 이 형질전환시켜 CFTase 발현과 분비 양상을 조사하고, CF의 경제성있는 대량생산공정 개발을 위한 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 연구에 사용한 숙주세포로는 *E. coli* DH5 α (*sup44* Δ lac U169(ϕ lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 Tri1 n1A1*)와 *S. cerevisiae* SEY2102를 사용하였다. *S. cerevisiae* SEY2102(*MAT α ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-419 suc2- Δ 9*)[2]는 invertase 결손 변이주(*suc2- Δ 9*) 및 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5 α 를 사용하였다. CFTase 유전자 공여 plasmid는 pUC18에 *P. polymyxa* MGL21의 CFTase 유전자를 cloning한 pDEP6을 사용하였다[6]. 효모 *S. cerevisiae*에서 CFTase 발현을 위한 vector로는 *E. coli*-*S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES 2.0(Invitrogen Co., USA)를 사용하였다.

재조합 Plasmid 제작 및 형질전환

효모에서의 유도적 발현을 위한 재조합 plasmid의 구축은 *P. polymyxa*의 cft 유전자를 함유한 pDEP6을 *EcoRI/XhoI*으로 처리하여 얻어진 cft 유전자 단편을 Gel extraction kit (Bioprogen Co., Korea)로 정제하였다. 얻어진 cft 단편을 *GAL1* promoter를 함유한 pYES 2.0(*EcoRI/XhoI*으로 미리 절단)에 재조합하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하여 재조합 plasmid pYCGTS(9.9 kb)을 구축하였다. 구축된 재조합

plasmid는 *E. coli* DH5 α 로부터 증폭, 추출하여 LiCl법[5]으로 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환하였다.

효모 형질전환체 선별 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, 재조합 CFTase의 생산을 위한 재조합 효모의 배양은 YPDG 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% dextrose, 1% galactose)를 사용하여 배양하였다. 균체 증식과 유전자 발현에 미치는 초기 pH 및 배양온도의 영향을 조사하기 위해 YPDG 배지를 100 mL 함유하는 baffled-flask로 실험하였다. 탄소원으로 dextrose와 galactose의 영향을 알아보기 위해서는 YPD배지에 dextrose와 galactose를 농도별로 첨가한 배지를 사용하였다.

재조합 효모 균주의 전배양은 SD 배지로 하였으며 flask 배양 및 fermentor 배양시 접종량은 0.1 OD₆₀₀/mL로 하였다. Flask 배양에서는 500 mL baffled-flask(working volume; 100 mL)로 30°C, 170 rpm에서 수행하였으며, 재조합 CFTase의 조효소액을 확보하기 위한 발효조(KoBiotech Co., Korea) 희분배양은 YPDG 배지로 working volume, 2 L; 온도, 30°C; 초기 pH, 5.5; 교반속도, 300~500 rpm; 통기속도, 1~1.5 vvm의 조건하에서 수행하였다.

균체 농도, 잔존환원당 및 Plasmid 안정성

균체 농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[14]을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100-200개의 colony를 SD 선별배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비(백분율)로 측정하였다.

균체 분획 및 CFTase 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T(Seikagaku Kogyo, Japan)와 glass beads(0.4-0.5 mm)를 사용하여 periplasmic space 분획과 전세포분획을 얻었으며[16], 이들 분획과 배양상등액을 사용하여 각 분획에서의 CFTase 활성을 측정하였다. CFTase의 활성 측정은 2% inulin-용액(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)과 45°C에서 0.2~12시간 반응시킨 후 반응액을 비등수에서 5분간 열처리 한 후, 반응액을 0.45 μ m filter로 여과한 후 TLC로 분석하였다[6].

재조합 CFTase의 pH 안정성 및 열 안정성

원충액으로 pH 4.0~5.0 범위에서는 50 mM acetate buffer, pH 6.5에서는 50 mM phosphate buffer, pH 8.0~10.0 범위

는 50 mM Tris-HCl buffer를 사용하였다. 열 안정성은 30~65°C 범위에서 측정하였다.

Thin-layer chromatography에 의한 효소반응생성물의 확인

효소반응 생성물은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 효소반응은 50 mM phosphate buffer에 녹인 2% inulin과 CFTase 조효소액을 1:1로 45°C에서 반응시켰다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리 한 후 각각의 반응액 5 µl씩을 TLC plate(MERCK)에 점적한 후 butanol:isopropanol:water(3:12:4, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray로 110°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다[6]. Urea spray는 1 M H₃PO₄(water-saturated n-butanol 93.22 ml, H₃PO₄ 6.78 ml)에 5 ml ethanol과 3 g의 urea를 첨가하여 제조하였다. Standard는 2% inulin 용액과 50 mM~100 mM의 FeCl₂, AlCl₃ 용액을 1:1로 혼합하여 5~10분간 100°C 끓는 물에서 가수분해하여 사용하였다.

CF의 정제

본 실험에서 CF의 정량에 사용할 목적으로 반응 혼합물로부터 CF 표준물질을 정제하였다. CFTase 조효소액과 6% inulin을 45°C에서 3시간 반응시킨 후 잔존 inulin 및 fructooligosaccharide를 제거하기 위하여 본 실험실에서 분리 정제한 exo-inulinase를 37°C에서 3시간 처리하였다. 이 과정에서 생성된 당당류를 제거하기 위하여 용액에 3% 농도로 calcium oxide를 첨가하고 80°C에서 10분 동안 반응시킨 후 pH가 9.0이 될 때까지 CO₂ gas를 불어넣었다. 이후 생성된 침전물을 원심분리(12,000 rpm, 10 min)로 제거하였다. 원심분리 상등액에 100% 차가운 ethanol을 3:7 비율로 혼합하여 원심분리(12,000 rpm, 5 min)하여 침전물을 회수하였다[6]. Ethanol 처리과정을 2, 3회 반복한 후 evaporator로 건조하여 분말화시켰다. 이렇게 정제한 CF를 본 실험의 CF 표준 물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축 및 효모형질전환체 선별

효모에서 CFTase 유전자(*cfi*)를 유도적으로 발현시키기 위한 방법으로 *cfi* 유전자를 포함하는 pDEP6를 *EcoRI/XhoI*로 처리하여 얻어진 *cfi*(자체 분비신호배열 포함) 단편을 pYES 2.0의 *GAL1* promoter 하류에 subcloning하여 pYGCF (9.9 kb) 구축하였다(Fig. 1). 구축된 발현 pYGCF를 효모에 도입하여 SD배지에서 1차 선별하고, 1차 선별된 균주는 시험관 배양 후 cell lysates와 2% inulin를 반응시켜 반응산물을 TLC로 분석하여 그 중 CF의 생성능과 균체증식이 높은 재조합균주(*S. cerevisiae* SEY2102/pYGCF #6)를 선별하였다(data not shown). 최종 선별된 재조합 균주의 배양에

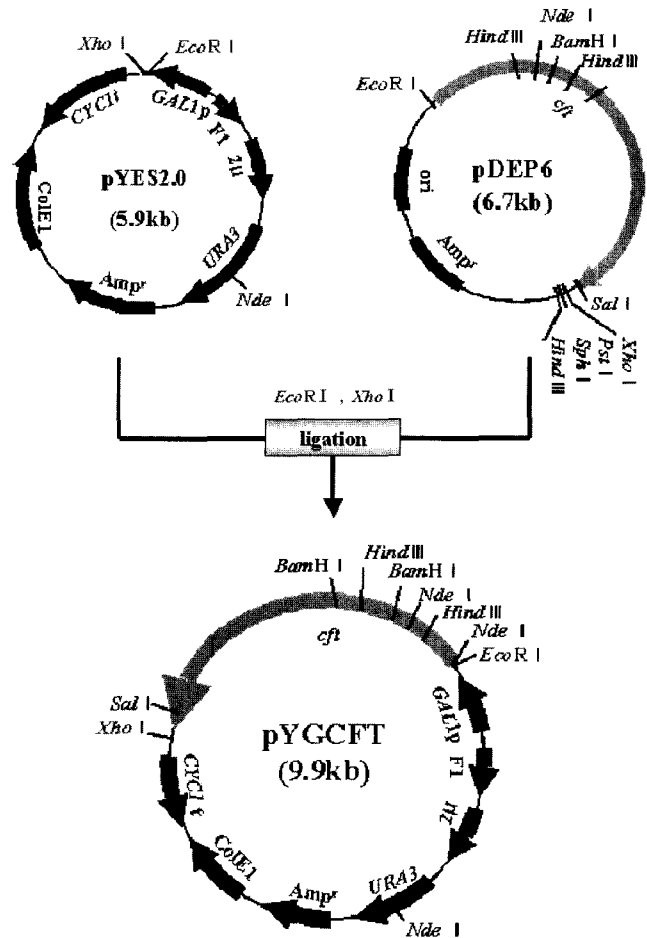


Fig. 1. Schematic diagram of pYGCF plasmid.

서 *GAL1* promoter의 유도제인 galactose 첨가하여 안정적으로 CFTase가 발현·생산됨을 확인할 수 있었다.

탄소원에 대한 영향

탄소원으로 dextrose와 galactose의 영향을 검토하기 위하여 YP배지에 dextrose와 galactose를 농도별로 첨가하여 48시간 배양 후 균체증식과 CF의 생성량을 조사해 본 결과, dextrose와 galactose의 농도에 따른 균체증식의 변화는 없었고, CF의 생성에서도 차이점을 보이지 않았다(data not shown). 따라서 이후의 실험은 dextrose와 galactose의 농도를 각각 1%로 하여 배양하였다.

재조합 CFTase 발현

재조합 균주 *S. cerevisiae* SEY2102/pYGCF를 초기 pH 5.5, 30°C의 조건으로 YPD배지에서 48시간동안 flask 배양한 배양상등액과 cell lysates로 반응시켜 CF의 생성을 확인한 결과, CFTase는 균체 내에만 존재하였고, 효소반응 3시간째부터 CF가 생성되었다(Fig. 2).

균체증식, CFTase의 발현, 분비국제성 등에 대해 조사하

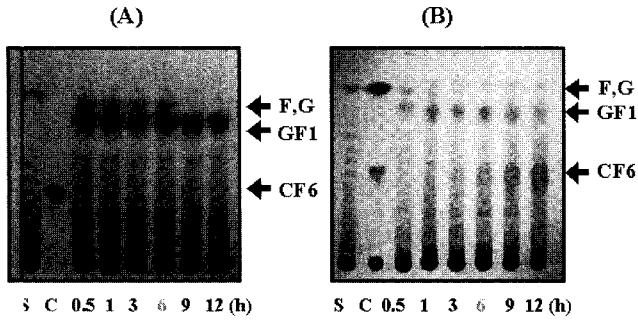


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of the reaction products from inulin by CFTase of *S. cerevisiae* transformant #6. (A) Reaction with the supernatant of *S. cerevisiae* 2102/pYGCFT #6; (B) Reaction with the cell lysates of *S. cerevisiae* 2102/pYGCFT #6. F, fructose; G, glucose; GF1, sucrose; S, inulin hydrolysate. C, CF6.

기 위해 회분배양을 한 결과를 Fig. 3 과 Fig. 4에 나타내었다. CFTase의 발현은 dextrose 소모 후 galactose를 이용하는 12시간 이후부터 발현되어 48시간까지 계속 발현량이 증가하는 양상을 나타내었고, 48시간 배양 시 균체농도인 OD₆₀₀가 43.5였다. CF의 생성은 periplasmic space와 cytoplasm 분획에서 나타났고, periplasmic space에 효소가 많이 존재함을 추정할 수 있었다. 세포의 분획에 의해서는 CF가 생성되지 않아 재조합 CFTase는 세포외로 분비되지 않음을 다시 확인할 수 있었다. Plasmid 안정성은 형질전환체의 배양초기부터 94% 이상의 높은 수준으로 유지되다가 최대 증식인 48시간에서도 80% 이상을 나타내었다.

자체 signal peptide을 사용하여 Nam 등[15]은 *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase(CGTase)를 효모에서 발현시켜 90%이상의 분비효율을 얻었고, Han 등[3]은 *Bacillus*의 endoglucanase를 효모에서 발현시켰다. 위 연구결과들은 효모의 분비경로에 *Bacillus* 자체 분비신호가 적용될 수 있음을 보여주었다. 또한, α -factor 분비신호(MF α 1)를 이

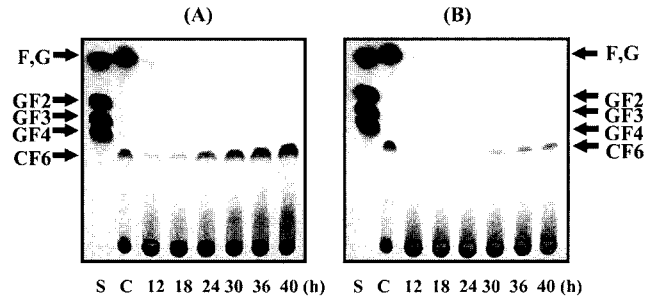


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of the reaction products from inulin by CFTase. (A) Reaction with the periplasmic space fraction of *S. cerevisiae* 2102/pYGCFT; (B) Reaction with the cytoplasmic fraction of *S. cerevisiae* 2102/pYGCFT. S, inulin hydrolysate; C, CF6; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

용하여 Kanai 등[7]은 *S. cerevisiae*에서 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 발현시켜 재조합 CFTase를 생산하였다. 그 결과에 따르면 전체 CFTase 유전자(N-말단에 3개의 repeat region과 C-말단에 1개의 repeat region, 그리고 그 사이에 invertase와 같은 core region으로 구성)를 N-말단의 3개 repeat region를 제거한 약 3 kb 단편과 α -factor 분비신호를 연결하고 그 사이에 Kex2 protease 인식서열을 삽입함으로써 높은 효소활성을 가지는 CFTase를 효과적으로 분비시켰다. 그러나 다양한 signal peptides(α -factor, invertase, acid phosphatase, *Bacillus amyloliquefaciens* α -amylase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비효율을 조사한 Scotti 등[19]의 연구에서는 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야만 ER에서 Golgi체로, Golgi체에서 분비과립으로, 분비과립에서 세포밖으로의 일련의 분비경로 중 율속단계를 해결할 수 있고 결과적으로 분비능을 향상시킬 수 있는 것으로 제안하였다. 따라서 본 연구에 사용된 *P. ploymyxa* CFTase

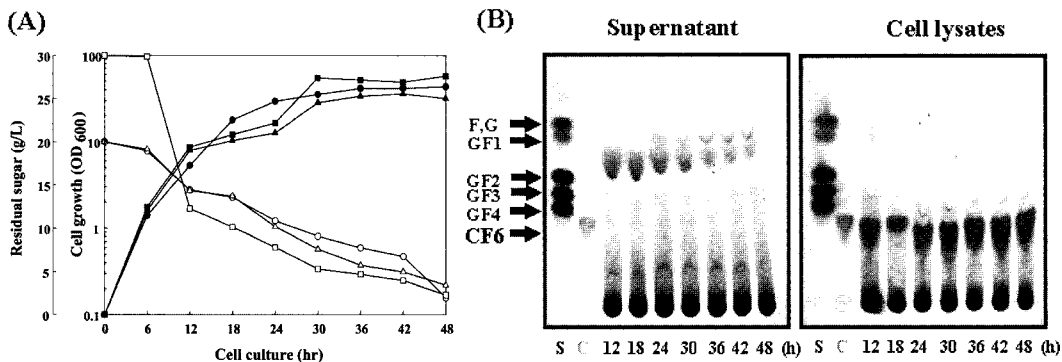


Fig. 3. (A) Time profiles of cell growth and residual sugar in the batch fermentation of *S. cerevisiae* SEY2102/pYGCFT. Symbols : (●), cell growth; (■), residual sugar. (B) Time profiles of thin-layer chromatogram of the reaction products from inulin by CFTase. S, inulin hydrolysate; C, CF6; GF1, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose

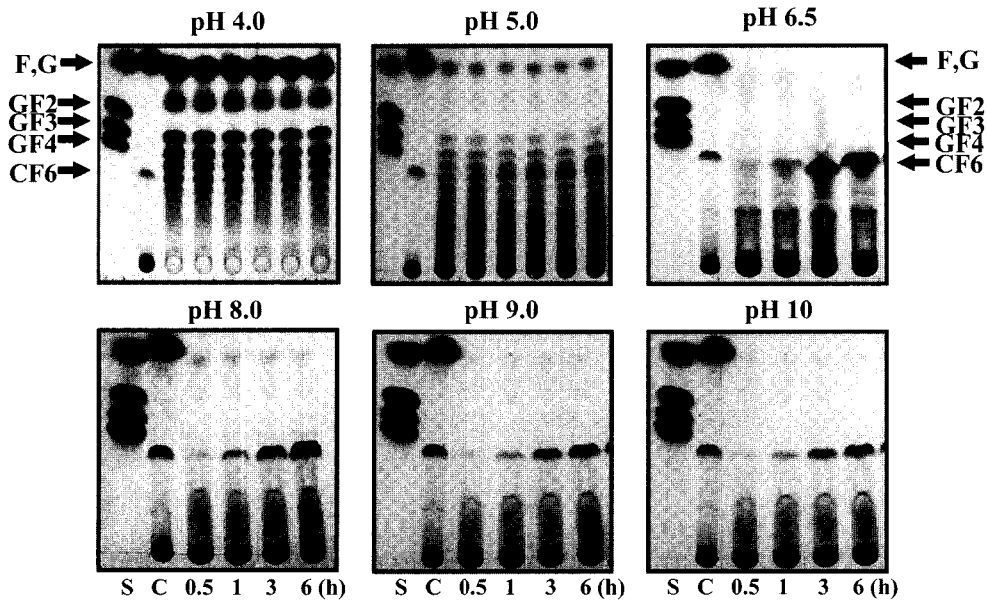


Fig. 5. The effect of reaction pH on the CF production by CFTase. S, inulin hydrolysate; C, CF6; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

의 N-말단 부분의 repeat region이 제거된 유전자와 여러 signal sequence를 이용하여 효모에서 발현시킨다면 분비효율이 높은 재조합 CFTase를 생산 할 수 있을 것으로 사료된다.

반응 최적 pH와 최적온도

재조합 CFTase의 효소반응의 최적활성 pH를 pH 4.0~10.0의 범위에서 측정한 결과, Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 8.0에서 최적 활성을 보였다. pH 4.0에서는 inulin의 산 가수분해에 의해 올리고당이 형성될 뿐 효소활성이 거의 나타나지 않았고, pH 5.0~10.0에서 반응시켜도 효소활성이 많이 남아있는 것으로 보아 효모에서 발현된 CFTase는 넓은 범위의 pH에서도 비교적 안정한 것으로 예상되었다. 재조합 CFTase의 효소반응의 최적온도를 30~65°C의 범위에서 측정한 결과, Fig. 6에서와 같이 45°C에서 최적 활성을 보였다. 또한, 55°C 이상에서 효소활성이 감소되었고, 65°C 이상에서는 효소활성이 나타나지 않았다. 이는 *P. polymyxa* 유래 CFTase를 사용하여 Jeon 등[6]이 대장균에서 발현시켰을 때와 차이점을 보이지 않았다. 본 연구에서 사용한 CFTase에는 약 10개의 N-형 당쇄부가 가능 부위[-Asn-Xaa-Thr (or Ser)-]가 존재한다[6, 12]. 그러나 55°C 이상의 고온에서 효소활성이 감소하는 것으로 보아 효모에서 발현된 재조합 CFTase의 당쇄부가는 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

Kanai 등[7]은 *S. cerevisiae*에서 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 α -factor 분비신호(MF α 1)를 이용하여 발현시켜 내열성이 향상된 재조합 CFTase를 생산하였다. 그 연구에서 발현된 CFTase는 5 군데의 당쇄부가 부위가 존재하며, endo-H 처리로 확인된 당쇄부가 정도가 크게 나타나

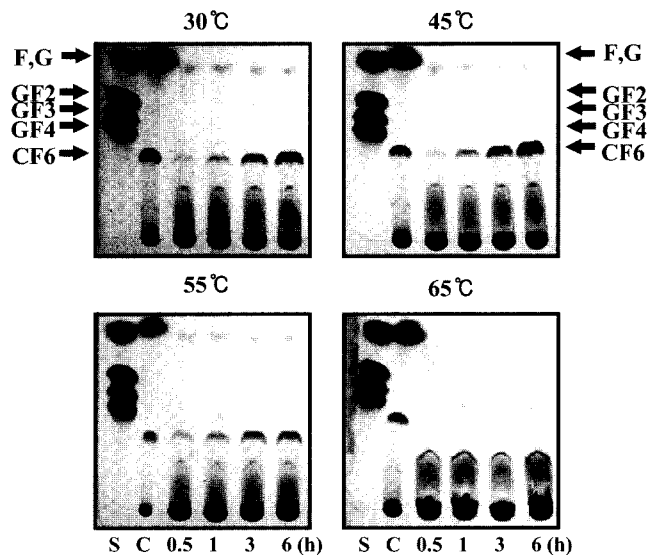


Fig. 6. The effect of reaction temperature on the CF production by CFTase. S, inulin hydrolysate; C, CF6; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

지는 않았으나 온도에 대한 안정성이 70°C에서 30분 처리 후에도 약 62%의 잔존활성이 남아 있었다. 그러나 당쇄부가 되지 않은 재조합 CFTase는 약 10%의 잔존활성이 남아 있었고, pH에 대한 안정성은 *B. circulans*의 CFTase와 큰 차이를 보이지 않았다.

Inulin에 대한 반응 생성물의 비교

Inulin의 종류(dahlia tuber, chicory root, Jerusalem artichoke)에 따른 효소반응의 차이점을 비교하였다(Fig. 7).

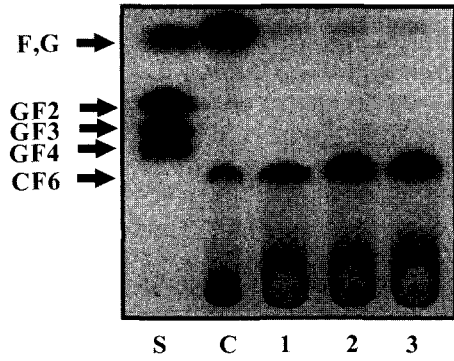


Fig. 7. Effect of inulin source on the CF production. Lane 1, Chicory root; lane 2, Dahlia tuber; lane 3, Jerusalem artichoke; F, fructose; G, glucose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose; S, inulin hydrolysate; C, CF6.

반응생성물의 분석 결과, 모두 효과적으로 CF를 생성하였고, Jerusalem artichoke와 dahlia tuber가 효과적이었다. Kim 등 [1]의 연구 결과에 따르면 CFTase의 기질특이성이 dahlia tuber, Jerusalem artichoke에 상대적으로 높게 나타났다. 따라서 이 결과는 기질의 fructose 평균중합도가 chicory root 보다 높은 Jerusalem artichoke와 dahlia tuber가 상대적으로 CF의 생성에 좋은 것으로 사료된다.

요 약

Paenibacillus ploymyxa 유래의 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase) 유전자(*cft*)를 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102에 발현시키기 위해 대장균과 효모의 shuttle vector인 pYES 2.0(*GAL1* promoter)에 subcloning 하였다. 구축된 pYGCFT(9.9 kb) plasmid를 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환하였고, uracil이 결핍된 SD 배지에서 선별하였다. 선별된 형질전환체(*S. cerevisiae* SEY2102/pYGCFT)는 galactose 첨가에 의해 성공적으로 발현되어 cyclofructan(CF)을 생성함을 TLC로 확인하였다. 그러나 균체외로의 효소 분비는 이루어지지 않았고 cytoplasm 보다 periplasmic space에 많이 존재하였다. 효소반응 3시간부터 CF가 생성됨을 확인하였고, 최적온도와 최적 pH는 각각 45°C와 pH 8.0로 나타났으며, pH 10.0에서도 효소활성이 안정적으로 유지되었다. Inulin 기질에 따른 반응산물 분석 결과, Jerusalem artichoke와 dahlia tuber로부터 CF가 가장 효과적으로 생성되었다.

감사의 글

본 연구에 연구비를 지원해준 한국과학재단(Korea Science and Engineering Foundation, 과제번호: R05-2003-000-12381-0)에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Bajpai, P. K. and P. Bajpai. 1991. Cultivation and utilization of Jerusalem artichoke for ethanol, single cell protein, and high fructose syrup production. *Enz. Microbial. Technol.* **13**: 359-362.
2. Emr, S. D., R. Schekman, M. C. Flessel, and J. Thorer. 1983. An *MFá1-SUC2* (α -factor-invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 7080-7084.
3. Han, Y. J., D. O. Kang, S. C. Lee, B. Y. Kim, H. H. Suh, J. M. Kim, T. I. Mheen, and J. S. Ahn. 1994. Secretion of a *Bacillus* endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* by its own signal sequence. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 24-29.
4. Hirst, E. L., D. J. Mcgilvary, and E. G. V. Percival. 1950. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.* **72**: 1279-1284.
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. Jeon, S. J., D. J. You, H. J. Kwon, S. Kanaya, N. Kunihiro, K. H. Kim, Y. H. Kim, and B. W. Kim. 2002. Cloning and characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase(CFTase) from *Bacillus polymyxa* MGL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 921-928.
7. 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.
8. Kawamura, M., T. Uchiyama, K. Takashi, T. Yukiyoishi, and M. Kenji. 1989. Formation of a cycloinulo-oligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **192**: 83-90.
9. Kawamura, M. and T. Uchiyama. 1994. Purification and some properties of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **260**: 297-304.
10. Kawamura, M. and T. Uchiyama. 1993. Reaction catalyzed by cycloinulooligosaccharide fructanotransferase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**: 343.
11. Kim, H. Y. and Y. J. Choi. 2001. Molecular characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 995-1000.
12. Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 631-664.
13. Kushibe, S., K. Mitsui, M. Yamagishi, K. Yamada, and Y. Morimoto. 1995. Purification and characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) from *Bacillus circulans* MCI-2554. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**: 31-34.
14. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
15. Nam, S. W., H. Y. Park, J. H. Kim, J. H. Seo, N. S. Han, and B. W. Kim. 2001. Expression of *Bacillus macerans* cyclo-

- dextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**: 727-730.
16. Nam, S. W., K. Yoda, and M. Yamasaki. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**: 1049-1054.
 17. Sawada, M., T. Tanaka, Y. Takai, T. Hanafusa, T. Taniguchi, M. Kawamura, and T. Uchiyama. 1991. The crystal structure of cyclodextrin produced from inulin by cyclodextrin oligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **217**: 7-17.
 18. Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production; yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **7**: 244-248.
 19. Sotti, P. A., M. Praestegaard, R. Chambert, and M. R. Petit-Glatron. 1996. The targeting of *Bacillus subtilis* levansucrase in yeast is correlated to both the hydrophobicity of the signal peptide and the net charge of the *N*-terminus mature part. *Yeast* **12**: 953-963.
 20. Takai, Y., Y. Okumura, S. Takahashi, M. Sawada, M. Kawamura, and T. Uchiyama. 1993. A permethylated cyclic fructo-oligosaccharide host that can bind cation in solution. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1**: 53-54.
 21. Uchiyama, T., M. Kawamura, T. Uragami and H. Okuno. 1993. Complexing of cyclodextrin-oligosaccharides with metal ions. *Carbohydr. Res.* **241**: 245-248.

(Received Dec. 27, 2003/Accepted Feb. 20, 2004)