

*Bacillus subtilis*에서 *Bacillus stearothermophilus* CGTase의 구성적 발현

허선연¹ · 김중균¹ · 권현주² · 김병우² · 김동은 · 남수완*

동의대학교 생명공학과, ¹부경대학교 생물공학과, ²동의대학교 미생물학과

Received January 16, 2004 / Accepted April 17, 2004

Constitutive Expression of *Bacillus stearothermophilus* CGTase in *Bacillus subtilis*. Sun-Yeon Heo¹, Joong Kyun Kim¹, Hyun-Ju Kwon², Woo-Byung Kim², Dong-Eun Kim and Soo-Wan Nam*. *Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Department of Biotechnology & Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea, ²Department of Microbiology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea* – To overproduce the cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) of *Bacillus stearothermophilus* NO2 in *B. subtilis*, the pJH-CGT1 plasmid (8.14 kb) was constructed, in which the ORF of CGTase gene could be transcribed by strong constitutive promoter, P_{JH}. To overproduce CGTase from a recombinant *B. subtilis*, the effect of media on the cell growth and expression level of CGTase were investigated with various media (LB, 2×LB, 5% molasses+2% CSL, CS, LBG) in the flask culture. Among them, [5% molasses+2% CSL] medium revealed the maximum expression level of CGTase with 1.8 unit/ml at 9 hr culture. In the batch culture on [10% molasses+5% corn steep liquor] medium the expression level of CGTase, the secretion efficiency, and plasmid stability were about 4.2 unit/ml, 90% and 90%, respectively, at 30 hr culture. The cell growth and expression level in the fermenter culture with the industrial molasses medium were increased by 2-folds over the flask culture.

Key words – constitutive P_{JH} promoter, cyclodextrin glucanotransferase, *Bacillus subtilis*, molasses

Cyclodextrin glucanotransferase (EC 2.4.1.19, CGTase)는 다기능성 효소로써 4가지 반응을 촉매(cyclization, coupling, disproportionation, hydrolysis) 한다. 이 중 cyclization 반응은 intramolecular transglycosylation 반응을 통해 전분을 cyclodextrin (CD)로 전환시키며, coupling 반응은 CD를 전환하고 생성된 linear maltooligosacchrides를 수용체로 전이시키며, disproportionation 반응은 intramolecular transglycosylation 반응을 통해 linear maltooligosacchrides를 수용체로 전이시킨다. Intramolecular transglycosylation 반응의 acceptor로 glucose, xylose, sorbose, inositol, sucrose, maltose, lactose, stenioside, heperidin, rutin, ascorbic acid 등이 알려져 있으며, 생성된 유도체들은 소수성 중앙부에 비극성, 소수성, 화합물을 포집하는 능력 때문에 그 기능성(감미도 증가, 수용성 증대, Bifidobacteria의 증식 촉진, 타 화합물에 대한 안정성 증대)이 크게 개선된다[13]. 따라서 α -, β -, γ -CDs와 그 유도체들은 식품, 화장품, 제약산업, 농업 등에 활발히 응용되고 있다[2,8,12,14,15,17]. 따라서 CD의 대량생산을 위해서 반응 특이성과 활성이 증강된 CGTase의 확보와 이의 대량생산이 우선적으로 해결되어야 한다.

특정 유전자의 과발현을 위해 *Bacillus*에서 가장 많이 이용되는 promoter로는 P43, PamyE, PsacB 등이 있다[16]. 이 중 β -galactosidase 발현에는 P43 > PamyE > PsacB 순으로 promoter의 전사 강도가 감소하였고, staphylokinase 발현생산

에는 PsacB와 P43 promoter가 훨씬 우수함이 보고되었다. Staphylokinase의 경우 P43 promoter에서 약 225 mg/L, PsacB promoter의 경우 유가배양에서 337 mg/L 수준으로 발현 생산됨이 보고 되었다. 그러나 구성적 P_{JH} promoter를 CGTase 유전자의 발현에 활용할 경우 포도당과 같은 값싼 배지를 사용할 수 있고 유가배양과 같은 오랜 시간의 배양에서도 CGTase 효소를 경제적으로 대량생산할 수 있다. Endoxylanase의 경우 구성적 P_{JH} promoter를 발현에 이용한 경우 endoxylanase 활성이 매우 높게 발현 생산되었다[6]. 최근 제조업 CGTase 생산 보고에 따르면, *B. macerans* CGTase 유전자를 α -amylase promoter 하류에 연결한 pUBACGT plasmid (amyR2 promoter+ribosome binding 서열+분비신호+cgt)로 형질전환된 *B. subtilis* LKS88로부터 포도당 함유 LB 배지에서 세포의 CGTase 활성은 매우 낮게 발현 생산되어 CGTase의 산업적 이용에는 한계가 있음을 나타내었다.

따라서, 본 연구에서는 내열성 CGTase를 생산하는 *B. stearothermophilus* NO2 균주로부터 cloning된 CGTase 유전자를 P_{JH} promoter 하류에 연결하여 유전자 제조업 CGTase 효소를 대량생산하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주와 plasmids

제조업 단백질의 발현을 위한 숙주세포로 *B. subtilis* DB431 (*trpC npr apr epr bpr isp1 isp11*)을 사용하였다. 또한 plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5 α 를 사용하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-82-051-890-2276, Fax : +82-051-890-1619

E-mail : swnam@deu.ac.kr

CGTase 유전자 공여 plasmid는 pVT103-U에 *B. stearothermophilus* NO2의 CGTase 유전자를 cloning한 pVT-CGTS[17]를 사용하였다. *B. subtilis*에서 CGTase 발현계 구축을 위해 P_{JH} promoter를 함유하는 *E. coli-B. subtilis* shuttle vector인 pBE1을 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction

B. stearothermophilus NO2의 CGTase 유전자의 증폭은 Perkin Elmer PCR System 2400을 사용하여 행하였다. 반응 조건은 denaturing 95°C, annealing 55°C, polymerization 72°C의 조건에서 35 cycles을 행하였다. CGTase 유전자 (*cgtS*) 증폭을 위한 primers는 PS-1, PS-2를 사용하였으며, 각각의 서열은 [PS-1] 5'-TGA GAA TTC AAG CTT ATG AGA TGG CTT-3', [PS-2] 5'-TCT AAG CTT GGA TCC ATT AGT TCT GCC AAT-3'로서 5'쪽에 *EcoRI*, *HindIII*를, 3'쪽에 *HindIII*, *BamHI* 부위를 가진다. 주형 DNA로 *B. stearothermophilus* NO2의 *cgtS* 유전자를 함유한 pVT-CGTS를 사용하여 2.1 kb의 성숙 단백질 유전자 단편(*cgtS*)만을 대량 증폭하였다.

Bacillus 형질전환체 선별

B. subtilis DB431에 형질전환시켜 kanamycin (10 µg/ml) LB agar 배지에서 1차 선별하여 얻어진 형질전환 균주들을 CS배지[1]에서 배양후 iodine법으로 colony 활성염색을 통해 고활성 균주를 2차 선별하였다. 즉, 전분이 함유된 CS 배지 (1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.02% $MgSO_4$)에 숙주세포인 DB431과 형질전환체를 도말하여 37°C에서 20시간 배양하여 iodine 증기로 colony 활성 염색을 하였다.

배지 및 배양조건

2차 선별된 형질전환 균주를 LB, 2×LB, LBG (0.5%~5% glucose), CS (1% soluble starch, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.1% K_2HPO_4 , 0.2% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$), [5% molasses+2% CSL (corn steep liquor)] 배지를 50 ml 함유하는 baffled-flask에서 37°C, 170 rpm 조건으로 배양하였다. 발효조(KoBiotech. Co., Korea) 회분배양은 LB와 [10% molasses +5% CSL] 배지로서 배양부피는 1.0 l, 배양온도는 37°C, 배양중의 pH 조절은 50% NH_4OH 와 3 N HCl를 사용하여 pH 7.0으로 조절하였다. 교반속도(300~600 rpm)의 조절로 용존산소(DO)를 공기포화의 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 1.5 vvm을 유지하였다. 2차 선별된 형질전환체는 LB 배지(0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% tryptone)를 50 ml 함유하는 baffled-flask에서 37°C, 180 rpm 조건으로 전배양하였다. 전 배양액 50 ml를 발효조(KoBiotech., Co., Korea)에 접종하여 회분배양 하였다. 회분배양 배지는 LBG (1% glucose)이며, 배양부피는 1.0 l, 배양온도는 37°C, 배양액중의 pH 조절은 50% NH_4OH 와 3 N HCl를 사용하여 pH 7.0

으로 조절하였다. 교반속도(300~600 rpm)의 조절로 용존산소(DO)를 공기포화의 30% 이상으로 유지하였고, 통기속도는 1.5 vvm을 유지하였다.

균체농도, 잔존환원당, 및 plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD_{600})로 측정하였다. 배양액을 3,000 ×g에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법[7]을 사용하여 잔존환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 LB 평판배지에 도말한 후 자란 colony를 kanamycin (10 µg/ml)이 함유된 LB 배지에서 toothpicking한 다음 형성된 colony 수의 비로 측정하였다.

균체 분획 및 CGTase 활성 측정

균체 침전물을 lysozyme (Sigma, USA)을 사용하여 cell lysate 분획을 얻고[4] 이들 분획과 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 CGTase활성을 측정하였다. CGTase 활성측정은 methyl orange method로 측정하였다[1]. 효소 반응 조건은 0.03 mM methyl orange, 1% soluble starch, 효소 용액 50 µl을 50 mM 인산 완충액(pH 6.0)에 전체 양이 1.5 ml이 되게 잘 섞은 다음 50°C에서 반응시켜 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 1.0 unit는 1분당 1 µmol의 α-cyclodextrin을 생산해 내는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

CGTase 발현 vector 구축

CGTase 유전자를 *Bacillus*에서 구성적으로 발현시키기 위해 *B. stearothermophilus* NO2의 CGTase 유전자는 pVT-CGTS를 주형으로 사용하고 PS-1과 PS-2 primers를 사용하여 PCR를 이용해 증폭시켰다. 증폭된 양말단에 *EcoRI*·*HindIII*-*HindIII*·*BamHI* 부위가 생기도록 primers를 설계하였고. 증폭된 단편을 *Bacillus*에서 유전자 발현이 균체증식과 비례하여 일어나는 구성적인 P_{JH} promoter를 함유하는 pBE1에 subcloning하여 pJH-CGT1 (8.14 kb)를 구축하였다(Fig. 1). 대장균에서 증폭된 재조합 plasmid pJH-CGT1로 다시 *B. subtilis* DB431에 형질전환하여 그 중 CGTase를 발현하는 *Bacillus* 형질전환주를 kanamycin 함유 LB agar 배지에서 1차적으로 선별하였다. 1차 선별된 균주는 다시 CS 배지에서 전분 분해환을 나타내는 고활성 균주 선별하는 과정을 3회 반복하여 발현 효율이 높은 균주를 최종 선별하였다(Fig. 2).

배지 최적화

B. subtilis DB431/pJH-CGT1를 LB, 2×LB, CS, [5% molasses+2% CSL], LBG (LB+glucose 0.5%~5%) 50 ml

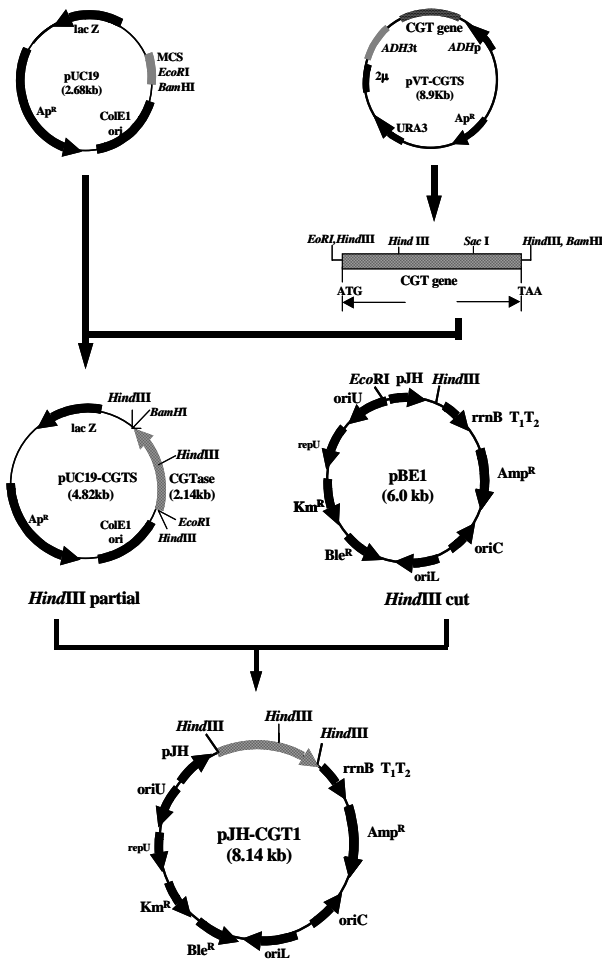


Fig. 1. Construction strategy of pJH-CGT1 plasmid.

flask 배양하여 균체증식과 CGTase 발현량을 토대로 최적 배지를 선정하였다. 균체증식은 [5% molasses+2% CSL] 배지가 다른 배지에서보다 높게 나왔고 다른 4가지 배지에서의 균체증식은 비슷한 양상을 보였다. 세포는 9시간까지 활발히 자라다가 12시간 이후에는 바로 정지기에 들어섰고, 균체증식과 비례하여 CGTase가 발현되었다(data not shown). 그 중 LB와 LBG (1% glucose), [5% molasses+2% CSL] 배지에서 9시간에 최대 CGTase 발현량이 각각 1.0 unit/ml, 1.5 unit/ml, 1.8 unit/ml로 나왔다. 제조합 CGTase의 세포막 배지로의 분비효율은 93% 이상이였다(Table 1).

LB배지에서 최적 포도당 농도를 결정하기 위해 0.5%~5%로 포도당 농도를 바꾸어 배양하였다. 배양결과, 넣어준 포도당을 거의 절반정도(2 g/l~23 g/l) 소모하였고, 포도당 농도가 2% 이상이 되면 균체 증식과 CGTase 발현량이 오히려 감소하였다(Table 2). 이는 *B. subtilis* 숙주세포 자체내 탄소원 대사 작용의 결핍 또는 배지내 증식제한 인자(들)의 존재로 사료된다. Endoxylanase 발현에서도 *B. subtilis* 숙주세포의 당 이용능이 효율적이지 못함이 관찰되었다[6].

결과적으로 균체증식과 CGTase 발현이 높은 1% 포도당을 최적 농도로 결정하였다.

발효조 회분배양에서의 균체 증식과 CGTase 발현

제조합 균주 *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1를 flask 배양 결과를 토대로 LBG 및 [10% molasses+5% CSL] 배지를 사용하여 pH 7.0, 37°C에서 발효조 회분배양 하면서 균체증식과 CGTase 발현량을 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 두 배지에서 배양 9시간까지는 균체증식이 활발히 일어났으며 그 이후에는 일정 수준에 도달하는 양상을 나타내었다. [10% molasses+5% CSL]배지에서의 균체증식은 LBG 배지에서보다 2배 정도 높은 균체농도를 나타내었다. 반면 세포밖의 CGTase 발현량은 1.5배 정도 증가한 값인 4.2 unit/ml과 90%의 분비 효율을 나타내었다.

LBG 배지의 경우 세포밖의 CGTase 발현량은 2.8 unit/ml와 90%의 분비 효율을 나타내었다. [10% molasses+5% CSL] 배지에서는 균체증식에 비해 CGTase 발현량은 상대적으로 낮은 값을 나타내었다. 잔존환원당의 경우 포도당보다 낮은

Table 2. Effect of initial glucose concentration on the cell growth, plasmid stability, and CGTase expression in *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1

Initial glucose conc.	Cell growth (OD ₆₀₀)	Plasmid stability (%)	CGTase activity (unit/ml)	
			Extracellular	Intracellular
0.5%	4.4	85	1.4	1.4
1.0%	6.0	87	1.5	1.5
2.0%	5.6	84	1.1	1.1
3.5%	4.2	86	0.9	0.9
5.0%	4.0	82	0.8	0.8

Table 1. Expression and localization of CGTase in the flask culture of *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1 on various media

Medium	Cell growth (OD ₆₀₀)	Plasmid stability (%)	CGTase activity (unit/ml)		Secretion efficiency (%)
			Extracellular	Intracellular	
LB	5.5	88	1.0	0.07	93
LBG(1% glucose)	6.0	87	1.5	0.08	94
CS	4.8	89	1.2	0.07	94
5%molasses+2%CSL	6.2	90	1.8	0.09	95
2×LB	5.8	90	1.4	0.07	95

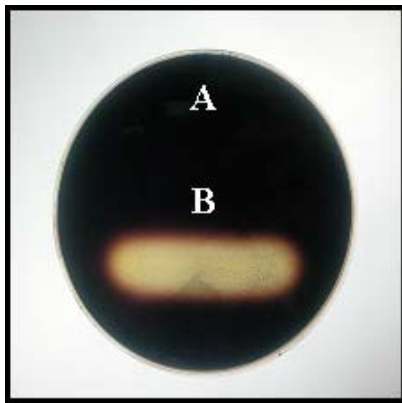


Fig. 2. Active staining of CGTase expressed in *Bacillus* transformants which were grown on CS medium. A: *B. subtilis* DB431, B: *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1.

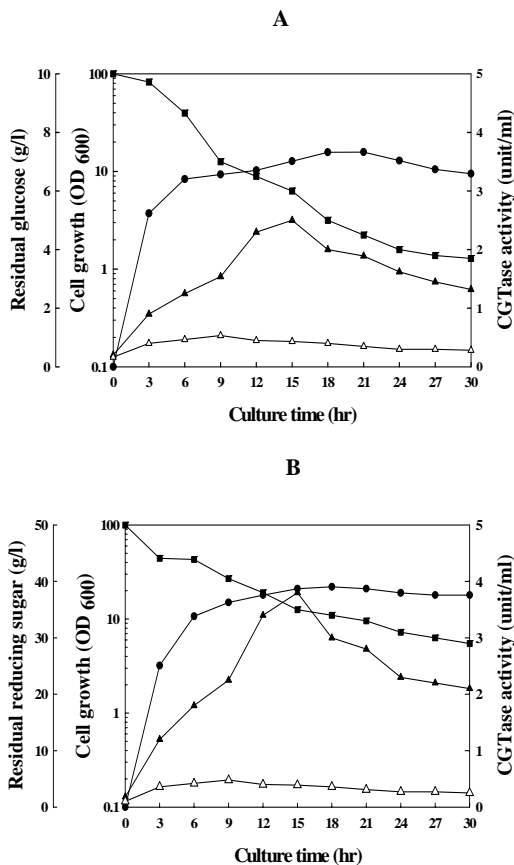


Fig. 3. Time courses of cell growth and CGTase expression in the batch fermentation of *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1 on LBG medium (A) and 10% molasses+5% CSL medium (B).

Symbols : (●), cell growth; (■), residual reducing sugar; (▲), extracellular CGTase activity; (△), intracellular CGTase activity.

당 소모를 나타내었는데, 이는 molasses의 주 당인 sucrose를 효율적으로 이용 못하고 비 발효성 당이 많이 포함되어

있기 때문에 사료된다. 효모의 invertase의 경우 폐당밀에는 sucrose가 고농도로 함유되어 있어 이를 이용하기 위해서는 효모 세포내 invertase의 활성이 높아야함이 보고된 바 있다[4]. 회분배양시 flask 배양보다 균체증식과 CGTase 발현량이 2배 증가된 값을 나타내었는데 이는 본 연구에 사용된 구성적 promoter의 특성인 growth-associated expression (균체 증식과 유전자 발현이 연관됨) 때문으로 사료된다[9]. Plasmid 안정성은 LBG와 [10% molasses+5% CSL]배지에서 배양초기와 말기까지 90% 이상의 수준으로 유지하여 비교적 안정하게 유지되었다(Fig. 3). 숙주세포로 *B. subtilis* NA-1이 사용된 CGTase의 발현과 비교 시 본 연구에서 사용된 숙주세포인 *B. subtilis* DB431에서 발현된 CGTase가 8배 정도 발현율이 높게 나왔으며 분비효율도 2배이상 높게 나옴을 관찰할 수 있었다[3]. 본 실험에서의 재조합 CGTase의 경우 분비효율이 매우 높음을 알 수 있는데, 이는 *B. macerans* 균주로부터 cloning된 CGTase의 발현에서도 관찰할 수 있었다[5].

결론적으로 산업용 배지인 molasses와 CSL을 이용한 발효조 배양을 통해 최대 발현량 4.2 unit/ml, 분비효율 90%, plasmid 안정성 90%를 얻었으며, 저렴한 산업용 배지를 이용한 고농도 세포 유가 배양을 할 경우 CGTase를 세포밖으로 대량 분비 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

B. stearothermophilus NO2의 CGTase 유전자 (*cgt5*)를 구성적 P_{HI} promoter 하류에 subcloning 하여 재조합 plasmid pJH-CGT1 (8.14 kb)을 구축하고 *B. subtilis* DB431에 형질전환하였다. *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1를 5가지 배지(LB, 2×LB, 5% molasses+2% CSL, CS, LBG)로 flask 배양하여 균체증식과 CGTase 발현량 및 분비특성을 조사하여 최적 배지를 결정하였다. 그 중 [5% molasses+2% CSL] 배지에서 9시간에 1.8 unit/ml의 CGTase가 발현·생산되었다. 이 결과를 토대로 *B. subtilis* DB431/pJH-CGT1를 [10% molasses + 5% corn steep liquor] 배지에서 발효조 회분 배양한 결과, 30시간 배양시 CGTase의 최대 발현량은 4.2 unit/ml, 90%의 분비 효율, 90% 이상의 plasmid 안정성을 나타내었다. 저렴한 산업용 molasses 배지로 발효조 회분배양시 플라스크 배양보다 균체증식과 CGTase 발현량이 2배 이상의 증가된 값을 얻었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구개발산업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다 (HMT-00-PT-21100-0002). 허선연은 2003년 교육부 BK21사업의 장학금 수혜 학생입니다.

참 고 문 헌

1. Fujiwara, S., H. Kakihara, B. W. Kim, A. Leujeune, M. Kanemoto, K. Sakaguchi and T. Imanaka. 1992. Cyclization characteristics of cyclodextrin glucanotransferase are conferred by the NH₂-terminal region of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 4016-4025.
2. Hara, K. and H. Hashimoto. 1986. Application of cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **3**, 152-161.
3. Jeon, S. J., S. W. Nam, J. W. Yun, S. K. Song and B. W. Kim. 1998. Effect of C- or D-Domain deletion on enzymatic properties of cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus* NO2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 152-157.
4. Kazuhido, T. and K. Ouchi. 1995. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. *J. Ferment. Bioen.* **79**, 513-515.
5. Kim, C. S., N. S. Han, D. H. D. H. Kweon and J. H. Seo. 1999. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 230-233.
6. Kim, J. H., J. H. Kim., S. C. Kim and S. W. Nam. 2000. Constitutive overexpression of the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 551-553.
7. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**, 952-959.
8. Misaki, M. 1984. Utilization of cyclodextrin for citrus fruit products. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **31**, 98-106.
9. Nam, S. W., D. K. Chung and B. H. Chung. 1997. Constitutive expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 430-437.
10. Neu, H. C. and L. A. Heppel. 1995. The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplast. *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
11. Park, H. Y., S. W. Nam and B. W. Kim. 2001. Biochemical properties of recombinant cyclodextrin glucanotransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Life Sci.* **11**, 230-234.
12. Suzuki, M and A. Satoh. 1983. Nutritional consequences of α -cyclodextrin. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* **30**, 240-246.
13. Szejtli, J. 1990. The Cyclodextrins and their applications in biotechnology. *Carbohydrate Polymers.* **12**, 375.
14. Szente, L. and J. Szejtli. 1986. Molecular encapsulation of natural and synthetic coffee flavor with β -cyclodextrin. *J. Food Sci.* **51**, 1024-1027.
15. Vokk, R., A. Mener and E. K. Saar. 1991. Biotechnology of β -cyclodextrin. *BFE.* **8**, 510-516.
16. Ye, R., J. H. Kim., B. G. Kim., S. Szarka., E. Sihota and S. L. Wong. 1998. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* **62**, 87-96.
17. You, D. J., H. Y. Park, S. J. Jeon, H. J. Kwon, S. W. Nam and B. W. Kim. 2002. Expression of the *Bacillus stearothermophilus* NO2 CGTase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 206-209.
18. Yu, E. K. C. 1988. Novel decaffeination process using cyclodextrin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 546-552.