

## *Saccharomyces cerevisiae*에서 *Paenibacillus macerans* 유래 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase의 발현

김현철<sup>1</sup> · 김정현 · 전승종 · 최우봉 · 남수완\*

동의대학교 생명공학과, <sup>1</sup>바이오품질제어학과

Received December 27, 2004 / Accepted March 10, 2005

**Expression of *Paenibacillus macerans* Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase in *Saccharomyces cerevisiae*.** Hyun-Chul Kim<sup>1</sup>, Jeong-Hyun Kim, Sung-Jong Jeon, Woo-Bong Choi and Soo-Wan Nam\*. *Department of Biotechnology & Bioengineering, <sup>1</sup>Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea* – The cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) gene (*cft*) from *Paenibacillus macerans* was subcloned into an *E. coli*-yeast shuttle vector, pYES2.0, resulting in pYGECFTN. The plasmid pYGECFTN (8.6 kb) was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102 cells and then the transformants were selected on the synthetic defined media lacking uracil. The *cft* gene expression in yeast transformant was demonstrated by the analyses cyclofructan (CF) spots on thin-layer chromatogram. The recombinant CFTase was not secreted into the medium and localized in the periplasmic space. The production of CF was observed after 5 min of the enzymatic reaction with inulin. The optimum pH and temperature for CF production were found to be at pH 8.0 and 45°C, respectively. Enzyme activity was stably maintained up to 55°C. The CF was produced from all inulin sources and was most efficiently produced from dahlia tubers and Jerusalem artichokes.

**Key words** – *Paenibacillus macerans*, *Saccharomyces cerevisiae*, cycloinulooligosaccharide fructanotransferase, cyclofructan, inulin

Inulin은 돼지감자(Jerusalem artichoke), 치커리(Chicory), 다알리아(Dahlia) 등의 국화과(Compositae) 식물의 근근에 함유된 polyfructan으로 30~35개의 fructose가  $\beta$ -1,2 결합에 의해 직쇄상으로 연결되어 있고 그 말단에 D-glucose가  $\alpha$ -1,2 결합을 하고 있다. 돼지감자는 기후와 토양에 대한 적응력과 번식력, 내병성 및 내충성이 강하고 단위 면적 당 수확량도 많아서 우리 나라에서 재배하기가 용이한 식물일뿐 아니라, inulin 가수분해에 의해 75% 이상의 fructose를 생산 할 수 있다고 보고되어 있어 감미 자원이 부족한 우리나라에서는 매우 유망한 감미 자원으로 활용할 수 있다[15]. Inulin 분해 효소는 작용 기작의 차이에 따라 exo-inulinase (EC 3.2.1.26 ;  $\beta$ -D-fructofuranosidase)[12,24], endo-inulinase (EC 3.2.1.7 ; 2,1- $\beta$ -D-fructan fructanohydrolase)[3], inulin fructotransferase (depolymerizing) (EC 2.4.1.93)[17], 및 cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase)로 분류되어진다.

CFTase는 inulin을 이용하여 분자내 당전이 반응에 의해 주로 fructose 분자 6~8 개가  $\beta$ -(2→1) 결합으로 연결된 비환원성의 cycloinulohexaose (CF6), cycloinulohexose (CF7), 그리고 cycloinulooctaose (CF8)을 생산하는 효소이다[9]. 현재 CFTase는 *Bacillus circulans* OKUMZ31B[9], *B. circulans* MCI-2554[11], *Paenibacillus macerans* CFC1[10], *P. polymyxa* MGL21[7] 등의 주로 *Bacillus* 속의 세균이 생산하는 것으로 알려져 있다. 이러한

미생물들이 생산하는 CFTase의 효소적 특성은 inulin과 같은 fructan 기질에 작용하여 CF를 합성하는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과  $\beta$ -(2→1) fructooligosaccharide 사이의 당전이 반응인 coupling 반응, disproportionation 반응 또는 hydrolyzing 반응을 매개하는 다기능 효소(multifunctional enzyme)이다. CFTase의 작용에 의해 inulin으로부터 생산되는 cycloinulooligosaccharide (cyclofructan)는 환상 과당 중합체이다. CF의 구조는 bowl-shape 구조로 되어있고, 외부는 hydroxyl group이 친수성을 나타내며, 내부는 에테르 결합으로 인하여 소수성을 띠고 있다. 즉 CF는 cyclodextrin과 물리적, 화학적으로 유사한 구조로 되어 있다[19]. CF6은 crystal 구조 분석에서 18-crown-6-skeleton 구조로 밝혀졌으며[9,18], 또한 금속 양이온과 복합체를 형성한다[21,22].

Open-chain fructooligosaccharide는 exo-type inulinase에 의해 쉽게 분해되는 반면에, CF의 경우는 exo-type inulinase에 의해 분해되지 않고, *Aspergillus niger*의 endo-type inulinase에 의해서 inulohexaose로 분해되어진다[9]. CF의 물리적, 화학적 특성은 식품, 의약, 농업, 화학공업 등의 여러분야에서 응용될 수 있다[11]. CF는 여러 물질의 동결, 해동에 안정적 효과를 나타내기 때문에 빵 제조에서 밀가루 반죽이나, 화장품 또는 의약품분야에서 liposome 등에 사용되어 질 수 있을 뿐만 아니라 산업적으로 널리 이용될 수 있을 것으로 기대 된다[8]. CFTase를 이용한 CF의 생산은 최근 급격히 높아지고 있는 기능성 식품, 건강식품 및 대체의약품에 대한 관심과 수요의 측면에서 그 유용성이 기대되고 있지만, 아직까지 CF를 산업적으로 생산하

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-51-890-1619  
E-mail : swnam@deu.ac.kr

여 판매되지 않고 있다.

한편, 식품산업 소재와 의약품으로 이용 될 수 있는 효소들의 유전자를 효모 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현시킴으로서 목적 단백질을 대량생산하거나 효소의 활성을 개량하려는 연구가 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 [23]. 또한 유전자 재조합 기술을 사용하여 GRAS (Generally recognized as safe) 미생물인 효모 *S. cerevisiae*에서 재조합 단백질 형태로 생산하는 것이 CF 생산성 향상과 식품소재, 의약품으로서의 안정성 확보에 크게 유리하다.

본 연구에서 사용한 CFTase는 *P. macerans* CFC1 유래의 *cft* 유전자이며, ORF가 2829 bp이고 단백질 분자량은 107 kDa 이다[10]. *cft* 효모 발현계를 구축한 뒤 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 *P. macerans*와 *P. polymyxa* CFTase 발현과 분비 양상을 비교·조사하고, CF의 경제성 있는 대량생산공정 개발을 위한 기초 자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용한 효모숙주세포는 *S. cerevisiae* SEY2102 (MAT *a ura3-52 leu2-3 leu2-112 his4-419 suc2-Δ9*)[2]로써 invertase 결손 변이주(*suc2-Δ9*) 및 uracil 영양요구성 변이주(*ura3-52*)이며 haploid이다. Plasmid 구축 및 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포는 DH5α를 사용하였다. CFTase 유전자 공여 plasmid는 pET23a에 *P. macerans*의 CFTase 유전자를 cloning한 pECFTN[10]을 사용하였다. 효모 *S. cerevisiae*에서 CFTase 발현을 위한 vector로는 *E. coli-S. cerevisiae* shuttle vector인 pYES2.0 (Invitrogen Co., USA)를 사용하였다. *P. polymyxa* 유래의 CFTase와의 활성 비교를 위하여 선행 연구에서 제조된 *S. cerevisiae* SEY2102/pY-GCFT를 이용하였다[13].

### 재조합 plasmid 제작 및 형질전환

효모에서의 유도적 발현을 위한 재조합 plasmid의 구축은 *P. macerans*의 *cft* 유전자를 함유한 pECFTN을 *SacI/XhoI*으로 처리하고 여기서 얻어진 *cft* 유전자 단편을 Gel extraction kit (Bioprogen Co., Korea)로 정제하였다. 얻어진 *cft* 단편을, *GAL1* promoter를 함유한 *SacI/XhoI*으로 미리 절단된 pYES2.0에 재조합하여 *E. coli* DH5α에 형질전환하여 재조합 plasmid pY-GCFTN을 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5α로부터 증폭, 추출하여 LiCl법[6]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.

재조합 효모 균주의 전배양은 SD 배지로 하였으며 flask 및 발효조 배양 시 접종량은 5% (v/v)로 하였다. Flask 배양은 500 ml baffled-flask (working volume; 100 ml)에서 30°C, 170 rpm의 배양조건에서 수행하였으며, 재조합 CFTase의 조효소액을 확보하기 위한 발효조(KoBio Tech 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(OD<sub>600</sub>)로 측정하였다. 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법[14]을 사용하여 잔존 환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 적당히 희석하여 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 100~200 개의 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 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 CFTase활성을 측정하였다. CFTase의 활성 측정은 2% dahlia tubers inulin (Sigma Co.), 2% chicory root inulin (Sigma Co.), 2% Jerusalem artichoke inulin (Sigma Co.) 용액(50 mM 인산 완충액, pH 8.0)과 45°C에서 0.1~12시간 반응시킨 후 반응액을 비등수에서 5분간 열처리한 후 반응액을 0.45 μm filter로 여과한 후 TLC로 분석하였다[7]. TLC의 spot은 image analyzer (FluorChem 5500, Alpha InnoTech, USA)를 이용하여 분석하였다.

### 재조합 CFTase의 pH 안정성 및 열 안정성

완충액으로 pH 4.0~5.0 범위에서는 50 mM 초산 완충액, pH 6.0~8.0에서는 50 mM 인산 완충액, pH 9.0~10.0 범위는 50 mM Tris-HCl 완충액을 사용하였다. 열 안정성은 30~65°C 범위에서 분석하였다.

**Thin-layer chromatography에 의한 효소반응생성물의 확인과 CF의 정제**

본 실험에서 효소반응 생성물은 thin-layer chromatography (TLC)로 분석하였고, CF의 정량에 사용할 목적으로 반응 혼합물로부터 CF 표준물질을 정제하였다[13].

**결과 및 고찰**

**재조합 plasmid의 구축 및 효모 형질전환체 선별**

효모에서 CFTase 유전자(*cft*)를 발현시키기 위해 유도적 발현계를 구축하였다(Fig. 1). *cft* 유전자를 포함하는 pECFTN를 *SacI/XhoI*으로 처리하여 *cft* 유전자 단편을 얻고, 이를 pYES2.0의 *GAL1* promoter 하류에 subcloning하여 pYGECFTN (8.6 kb)를 구축하였다. 구축된 *cft* 발현 plasmid (pYGECFTN)를

효모에 형질전환하여 SD배지에서 1차 선별하고, 1차 선별된 균주는 시험관에서 배양한 후 cell lysates와 2% inulin을 반응시켜 반응산물을 TLC로 분석하였다. CF의 생성능과 균체증식이 높은 재조합균주(*S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFTN)를 최종 선별하였다.

**재조합 CFTase 발현과 분비 국제성**

재조합 균주 *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFTN를 초기 pH 5.5, 30°C, YPDG 배지에서 48시간동안 flask 배양한 다음 배양 상등액, periplasmic space와 cytoplasm으로 분획 후 inulin과 반응 결과, periplasmic space, cytoplasm에서만 효소반응 5분째부터 CF가 생성되었고, 배양 상등액에서는 inulobiose (F2)가 생성되었다. CF는 cytoplasm 보다 periplasmic space에서 많이 생성되었다(Fig. 2). CF는 배양 상등액에서는 생성되지 않은

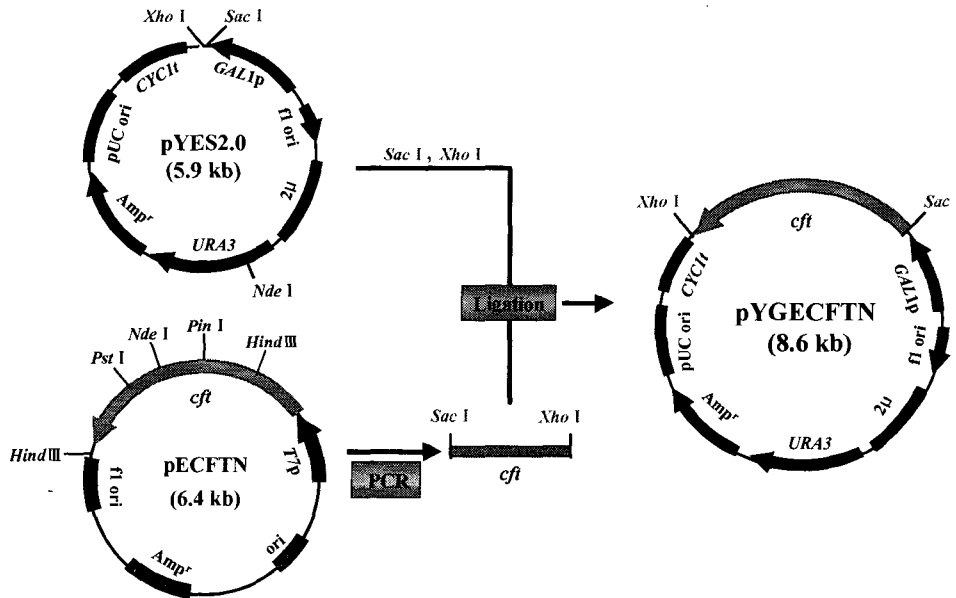


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant plasmid, pYGECFTN.

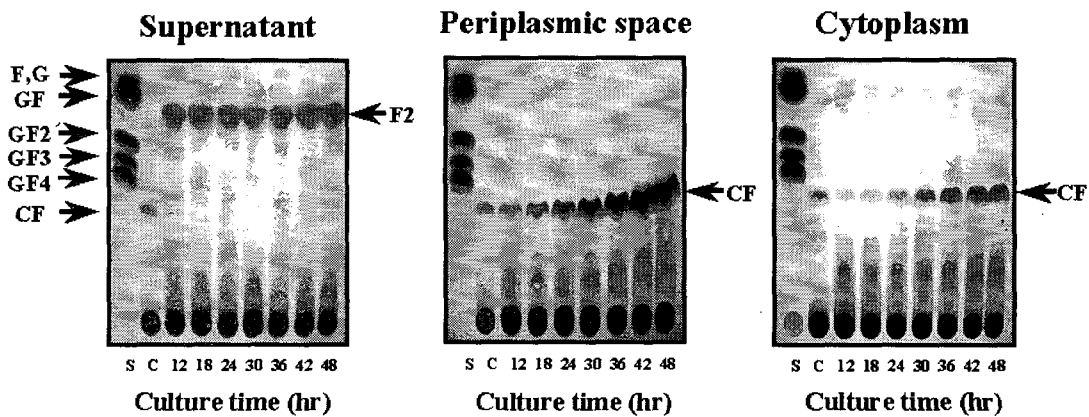


Fig. 2. The effect of cellular fractions on the hydrolysis of dahlia tubers inulin with yeast cells SEY2102/pYGECFTN cultured at the indicated time.

S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

것으로 미루어보아 CFTase는 세포외로 분비되지 않는 것 같다. *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFTN를 회분배양한 결과, 효모에서 *P. polymyxa* CFTase를 발현시켰을 때는 30시간 이후부터 발현된 결과[13]와는 달리, dextrose 소모 후 galactose를 이용하는 12시간 이후부터 발현되어 48시간까지 계속 발현량이 증가하는 양상을 나타내었고(Fig. 3 B), 배양 48시간에서 OD<sub>600</sub> = 44.7의 균체농도에 도달하였다. Plasmid 안정성은 형질전환체의 배양초기부터 96% 이상의 수준으로 유지되다가 48시간에서도 87% 이상을 나타내어 비교적 높게 유지되었다.

또한 효소 반응시간에 대한 결과로서 *P. polymyxa* CFTase은 3시간 이후부터 CF의 생성이 보였고(Fig. 4 A), *P. macerans* CFTase는 반응 5분 후부터 CF가 생성됨을 알 수 있었다(Fig. 4 B). Image analyzer에 의한 TLC 상의 CF spot을 비교해 보면,

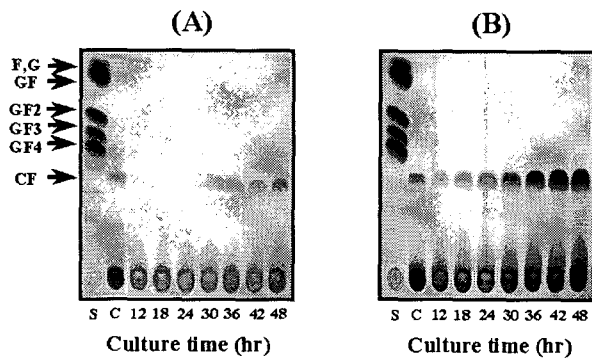


Fig. 3. The effect of culture time on the hydrolysis of dahlia tubers inulin by periplasmic CFTase. (A) *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFT, data from ref.(13). (B) *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFTN. S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

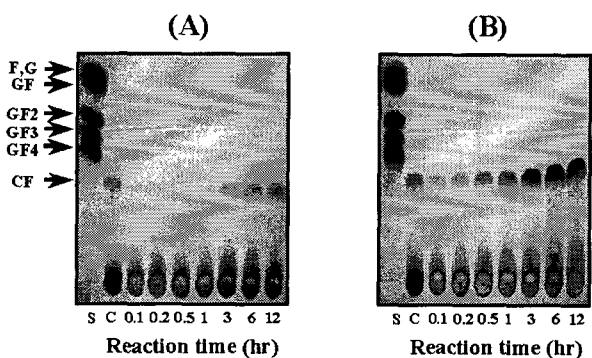


Fig. 4. The effect of reaction time on the hydrolysis of dahlia tubers inulin by CFTase. (A) *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFT, data from ref.(13). (B) *S. cerevisiae* SEY2102/pYGECFTN. S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

*P. macerans* CFTase의 CF spot의 signal이 *P. polymyxa*의 CF spot 보다 4.7배 더 강했다. 배양 시간과 반응 시간 측면에서 비교 해봐도 *P. polymyxa* CFTase 보다 *P. macerans* CFTase가 더 빠르게, 더 많이 CF를 생성시킴을 알 수 있었다. *P. macerans* CFTase와 *P. polymyxa* CFTase 유전자를 BLAST program을 이용하여 상동성을 비교 검토한 결과 96%의 아주 높은 상동성을 나타내었다[7]. 그러나 구축한 pYGECFTN은 *P. macerans* CFTase 전체 유전자(N-말단에 3개의 repeat region과 C-말단에 1개의 repeat region 그리고 그 사이에 invertase와 같은 core region으로 구성) 중 N-말단의 3개 repeat region가 제거된 유전자만 발현하였고, pYGECFTN은 *P. polymyxa* CFTase 전체 유전자를 발현시킨 차이로 CF의 생성에 차이점이 있다고 사료된다. 즉 N-말단에 3개의 repeat region의 제거로 효소활성이 증가됨을 추측할 수 있었다.

자체 signal peptide을 사용하여 Nam 등[15]은 *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)를 효모에서 발현시켜 90%이상의 분비효율을 얻었고, Han 등[4]은 *Bacillus*의 endoglucanase를 효모에서 발현시켰다. 위 연구결과들은 효모의 분비경로에 *Bacillus* 자체 분비신호가 적용될 수 있음을 보여주었다. 또한,  $\alpha$ -factor 분비신호(MF $\alpha$ 1)를 이용하여 Kanai 등[8]은 *S. cerevisiae*에서 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를 발현시켜 재조합 CFTase를 생산하였다. 그 연구결과에 따르면 전체 CFTase 유전자를 N-말단의 3개 repeat region를 제거한 약 3 kb 단편과  $\alpha$ -factor 분비신호를 연결하고 그 사이에 Kex2 protease 인식서열을 삽입함으로써 높은 효소활성을 가지는 CFTase를 효과적으로 분비시켰다. 그러나, 다양한 signal peptides ( $\alpha$ -factor, invertase, acid phosphatase, *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase)를 사용하여 *B. subtilis* 유래의 levansucrase에 대한 효모에서의 분비효율을 조사한 Scotti 등[20]의 연구결과에 따르면 성숙 단백질 N-말단의 net charge와 signal peptide의 소수성 core 영역 외에 성숙 단백질 전체의 net charge 등이 개선되어야 ER에서 Golgi체로, Golgi체에서 분비과립으로, 분비과립에서 세포밖으로의 일련의 분비능을 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에 사용된 *P. macerans* CFTase의 N-말단 부분의 repeat region이 제거된 유전자와 여러 signal sequence를 이용하여 효모에서 발현시킨다면 분비효율이 더 높은 재조합 CFTase를 생산할 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 최적활성을 보였다. pH 6.0~8.0에서 반응시 효소활성이 남아 있는 것으로 보아 효모에서 발현된 CFTase는 중성의 pH에서 비교적 안정한 것으로 나타났다. 재조합 CFTase의 효소반응의 최적온도를 30~65°C의 범위에서 측정한 결과 Fig. 6에서와 같이 45°C에서 최적활성을 보였다. 또한, 55°C 이상에서도 효소

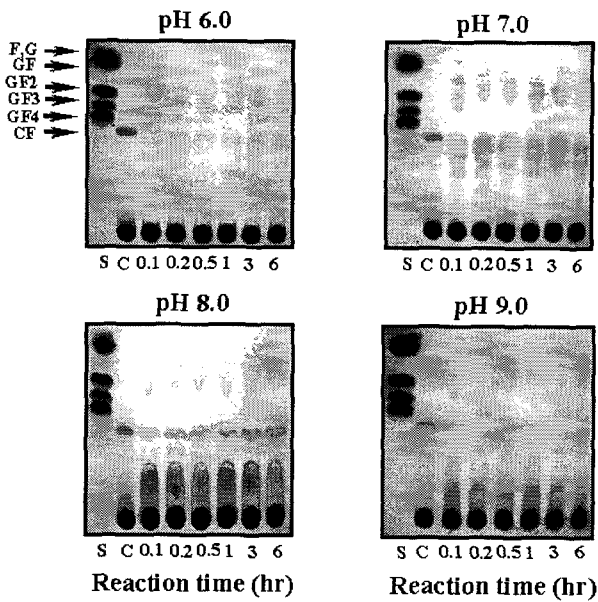


Fig. 5. The effect of reaction pH on the CF production by CFTase. S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

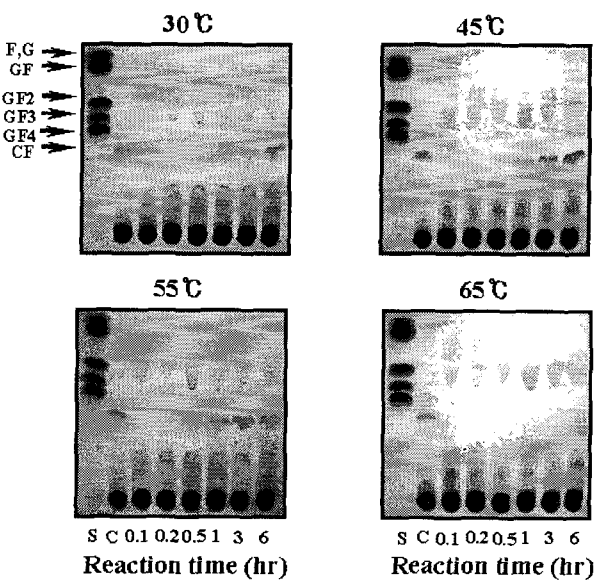


Fig. 6. The effect of reaction temperature on the CF production by CFTase. S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

활성이 보였으나, 65°C 이상에서는 효소활성이 나타나지 않았다. 이는 Kim 등[10]이 *P. macerans* 유래 CFTase를 사용하여 대장균에서 발현시켰을 때의 결과와 차이점을 보이지 않았다. 본 연구에서 사용한 CFTase에서는 약 6개의 N-형 당쇄부가 가능 부위[-Asn-Xaa-Thr (or Ser)-]가 존재하나[10] 당쇄부가에

의한 열안정성의 결과를 얻지 못한 것으로 보아 효모에서 발현된 재조합 CFTase의 당쇄부가는 이루어지지 않은 것으로 사료된다. Lim 등[13]의 약 10개의 N-형 당쇄부가 가능 부위를 가지는 *P. polymyxa* 유래의 CFTase 또한 *S. cerevisiae*에서 발현시켰으나 55°C 이상의 고온에서 효소활성이 감소하는 것을 알 수 있었다. Kanai 등[8]은 *S. cerevisiae*에서 *B. circulans* MCI-2554 유래의 CFTase를  $\alpha$ -factor 분비신호(MFa1)를 이용하여 발현시켜 온도에 대한 안정성이 높은 재조합 CFTase를 생산하였다. 그 연구의 효모에서 발현된 CFTase는 5 군데의 당쇄부가 부위가 존재하며, endo-H 처리로 확인된 당쇄부가 정도가 크게 나타나지는 않았으나 온도에 대한 안정성이 70°C에서 30분 처리시에도 약 62%의 잔존활성이 남아 있었다. 그러나, 당쇄부과되지 않은 재조합 CFTase는 약 10%의 잔존활성이 남아 있었고, 이와 같은 결과에서 CFTase는 당쇄부가에 의해 열안정성이 증가되는 것으로 사료된다.

**Inulin에 대한 반응 생성물의 비교**

Inulin의 종류(dahlia tubers, chicory root, Jerusalem artichoke)에 따른 효소반응의 차이점을 비교하였다(Fig. 7). 반응생성물의 분석결과 모두 효과적으로 CF를 생성하였고, Jerusalem artichoke와 dahlia tubers가 효과적이었다. Kim 등[10]의 연구 결과에 따르면 CFTase의 기질특이성이 dahlia tubers, Jerusalem artichoke에 상대적으로 높게 나타났다. 따라서 이 결과는 기질인 dahlia tubers, Jerusalem artichoke의 fructose 평균 중합도가 chicory root 보다 높기 때문에 상대적으로 CF의 생성이 좋은 것으로 사료된다.

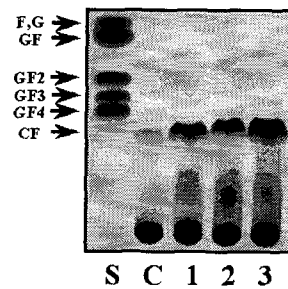


Fig. 7. The effect of inulin source on the CF production. Lane 1, Dahlia tubers; lane 2, Chicory root; lane 3, Jerusalem artichoke. S, inulin hydrolysate; C, CF6; F, fructose; G, glucose; GF, sucrose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose.

**요 약**

*Paenibacillus macerans* 유래의 cyclinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) 유전자(*cff*)를 *Saccharomyces cerevisiae* SEY2102에 발현시키기 위해 대장균과 효모의 shuttle vector인 pYES2.0에 subcloning 하였다. 구축된 pYGECFTN (8.6 kb)

plasmid를 *S. cerevisiae* SEY2102에 형질전환하였고, uracil이 결핍된 SD 배지에서 선별하였다. *gft* 유전자는 선별된 형질전환체 (*S. cerevisiae* SEY2102/pYGEFTN)에서 *GAL1* promoter 조절 하에 성공적으로 발현되어 cyclofructan (CF)을 생성함을 TLC로 확인하였다. 그러나, 균체 외로의 효소 분비는 이루어지지 않았고 cytoplasm보다 periplasmic space에 많이 존재하였다. *S. cerevisiae*에서 발현된 *P. polymyxa* 유래 CFTase 보다 *P. macerans* 유래 CFTase의 CF 생성이 image analyzer로 확인한 결과, 더 많음을 알 수 있었다. 효소반응 5분째부터 CF가 생성됨을 확인하였고, 최적온도와 최적 pH는 각각 45°C와 pH 8.0로 나타났으며, 55°C 까지 효소활성이 안정적으로 유지 되었다. Dahlia tubers, chicory root, Jerusalem artichoke 등의 inulin 기질에 따른 반응산물 분석 결과, 모든 기질로부터 CF가 생산되었으며, dahlia tubers 와 Jerusalem artichoke로부터 가장 효과적으로 생성되었다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단(Korea Science and Engineering Foundation, 과제번호: R05-2003-000-12381-0)의 지원에 의해 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- 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.
- Emr, S. D., R. Schekman, M. C. Flessel and J. Thorner. 1983. An *Mfa1-SUC2* (*a*-factor invertase) gene fusion for study of protein localization and gene expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**, 7080-7084.
- Eom, S. J., Y. M. Kwon and Y. J. Choi. 1995. Molecular cloning of *Pseudomonas* sp. inulinase gene and its expression in *E. coli*. *Kor J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 550-555.
- 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.
- Hirst, E. L., D. J. Mcgilvary and E. G. V. Percival. 1950. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.* **72**, 1279-1284.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and A. Kimura. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* **153**, 163-168.
- 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.
- Kanai, T., N. Ueki, T. Kawaguchi, Y. Teranishi, H. Atomi, C. Tomorbaatar, M. Ueda and A. Tanaka. 1997. Recombinant thermostable cycloinulooligosaccharide fructanotransferase produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4956-4960.
- Kawamura, M., T. Uchiyama, K. Takashi, T. Yukiyoshi and M. Kenji. 1989. Formation of a cycloinulooligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **192**, 83-90.
- Kim, H. Y. and Y. J. Choi. 2001. Molecular characterization of cycloinulooligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 995-1000.
- 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.
- Kwon, Y. M., H. Y. Kim and Y. J. Choi. 2000. Cloning and characterization of *Pseudomonas mucidolens* exoinulinase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 238-243.
- Lim, C. K., S. W. Nam, H. C. Kim, K. H. Kim and B. W. Kim. 2004. Production of cyclofructan by cycloinulooligosaccharide fructanotransferase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 60-66.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**, 952-959.
- Nam, S. W., H. Y. Park, J. H. Kim, J. H. Seo, N. S. Han and B. W. Kim. 2001. Expression of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **23**, 727-730.
- Nam, S. W., Yoda, K. and Yamasaki, M. 1993. Secretion and localization of invertase and inulinase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* **15**, 1049-1054.
- Park, J. B. and Y. J. Choi. 1996. Purification and characterization of inulin fructotransferase (depolymerizing) from *Arthrobacter* sp. A-6. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 402-406.
- Sawada, M., T. Tanaka, Y. Takai, T. Hanafusa, T. Taniguchi, M. Kawamura and T. Uchiyama. 1991. The crystal structure of cycloinulohexaose produced from inulin by cycloinulooligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **217**, 7-17.
- Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production; yield enhancement by over expression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **7**, 244-248.
- Scotti, 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.
- 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.
- Uchiyama, T., M. Kawamura, T. Uragami and H. Okuno. 1993. Complexing of cyclo-inulooligosaccharides with metal ions. *Carbohydr. Res.* **241**, 245-248.
- 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.
- Xiao, R., M. Tanida and S. Takao. 1989. Purification and characteristics of two exo-inulinases from *Chrysosporium panmorum*. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 331-334.