

Saccharomyces cerevisiae에서 Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase 유전자의 표층 발현

김현진¹ · 이재형¹ · 김현철² · 김연희³ · 권현주^{1,4} · 김병우^{1,4} · 남수완^{1,*}

*동의대학교 생명공학과, ¹동의대학교 대학원 바이오품질제어학과,

²(주)바이오니아, ³오사카대학 응용생물공학과, ⁴동의대학교 생명공학학과

Received October 24, 2006 / Accepted November 27, 2006

Cell Surface Display of Cycloinulooligosaccharide Fructanotransferase Gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Hyun-jin Kim¹, Jae-Hyung Lee¹, Hyun-Chul Kim², Yeon-Hee Kim³, Hyun-Ju Kwon^{1,4}, Byung-Woo Kim^{1,4} and Soo-Wan Nam^{1,*}. *Department of Biotechnology & Bioengineering, ¹Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Bioneer Corp., Daejeon, 306-220, Korea, ³Department of Biotechnology, Osaka University, Osaka, 565-0871, Japan, ⁴Department of Life Science & Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea* – The cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) gene (*cft*) from *Paenibacillus macerans* was subcloned into the surface display vector, pCTcon (*GAL1 promoter*). The constructed plasmid, pCTECFTN (9.0 kb) was introduced to *S. cerevisiae* EBY100 cell and then yeast transformants were selected on the synthetic defined medium lacking uracil and on the inulin containing medium. The surface display of CFTase was confirmed by immunofluorescence microscopy and its enzymatic ability to form cycloinulooligosaccharides (cyclofructans, CFs) from inulin. The total activity of the CFTase was reached about 5.52 unit/l by cultivation of yeast transformant on YPDG medium. The optimized conditions determined were as follows; pH, 8.0; temperature, 50°C; substrate concentration, 5%; inulin source, Jerusalem artichoke. By the reaction with inulin, CFs consisting of cycloinulohexaose (CF6), cycloinuloheptaose (CF7), and cycloinuloctaose (CF8) were produced and CF6 was the major product.

Key words – Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase, *Saccharomyces cerevisiae*, cell surface display, cyclofructan, inulin

서 론

Cycloinulooligosaccharide fructanotransferase (CFTase)는 inulin을 이용하여 분자내 당전이 반응에 의해 주로 fructose 분자 6~8개가 β -(2→1) 결합으로 연결된 비환원성의 cycloinulohexaose (CF6), cycloinuloheptaose (CF7), 그리고 cycloinuloctaose (CF8)을 생산하는 효소이다[7]. CFTase의 효소적 특성은 inulin과 같은 fructan 기질에 작용하여 CF를 합성하는 분자내 당전이 반응인 cyclization 반응과 β -(2→1) fructooligosaccharide 사이의 당전이 반응인 coupling 반응, disproportionation 반응 또는 hydrolyzing 반응을 매개하는 다기능 효소(multifunctional enzyme)이다[8].

CFs의 구조는 bowl-shape 구조로 되어있고, 외부는 hydroxyl group이 친수성을 나타내며, 내부에는 에테르 결합으로 인하여 소수성을 띄고 있다. 즉 CFs는 cyclodextrin과 물리적, 화학적으로 유사한 구조로 되어 있다[20]. CF6은 crystal 구조 분석에서 18-crown-6-skeleton 구조로 밝혀졌으며 [7,19], 또한 금속 양이온과 복합체를 형성한다[23,24]. CFs의

물리적, 화학적 특성은 식품, 의약, 농업, 화학공업 등의 여러 분야에서 응용될 수 있다[9]. CFs는 여러 물질의 동결, 해동에 안정적 효과를 나타내기 때문에 빵 제조에서 밀가루 반죽이나, 화장품 또는 의약분야에서 liposome 등에 사용될 수 있을 뿐만 아니라 산업적으로 널리 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

한편, 최근 연구가 활발히 진행중인 유용단백질의 표면발현 시스템은 비교적 최근에 발달한 유전공학 기술로서 자연적으로 미생물의 표면에 존재하는 단백질 유전자에 외래 유전자를 연결하여 발현함으로써 외래단백질을 세포의 표면에 부착시키는 방법이다. 세포 표면은 내부와 외부사이의 상호작용으로 인해 기능을 하게되는데 어떤 표면 단백질들은 plasma membrane을 지나서 기능을 하며, 또 다른 것들은 공유결합이나 비공유결합에 의한 세포표면 구성요소에 의해 결합한다[14]. 이러한 표면발현기술은 초기에는 미생물의 표면에 다양한 항원성 또는 항체성의 polypeptide를 노출시켜 항원 항체의 스크리닝에 목적을 두고 개발되었으며 각종 peptide 항원 library의 제조, 다양한 생백신(live vaccine)의 제조에 이용되고 있다[1,2,22]. 뿐만 아니라 세포표면에 다양한 생리활성효소나 금속이온 결합단백질의 고정화를 통하여 고부가가치의 물질생산을 위한 전세포 생물추매(whole cell

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2276, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : swnam@deu.ac.kr

biocatalyst)의 개발 등 그 이용성이 매우 다양하다[3,16,21]. 이러한 산업효소를 미생물의 표면에 발현한 전세포 생물촉매 시스템 경우의 장점은 다음과 같다. 첫째, 전통적 전세포 촉매제의 사용에서 기질과 생산물의 세포막 투과 장벽을 제거하기 위하여 사용해야 했던 세포투과공정이 필요 없고, 이에 의하여 야기되었던 효소의 불활성화를 방지할 수 있다. 둘째, 전세포 촉매제의 경우 cytoplasm 내에서 반응하므로 발생되었던 경쟁적 부반응에 의한 생산성 저하의 문제를 피할 수 있다. 셋째, 세포외에서의 반응으로 반응물과 생산물의 세포막 투과의 물질수송 문제를 피할 수 있다. 넷째, 표면발현은 세포표면에 고정으로 반응 후 반응액으로부터 사용한 생체촉매제의 재사용이 가능하다.

표면발현에 대한 연구는 bacteriophage나 원핵세포인 대장균 및 그람양성 세균 등에서 다양한 표면단백질을 매개로 이용하는 기술이 개발되었으며 산업적으로 응용성을 넓혀 나가고 있는 추세이다. 그러나 bacteriophage의 경우 고밀도 표면 발현이 가능한 경우는 약 50~60 amino acid로서 display할 수 있는 단백질의 크기에 한계가 있으며 대장균이나 그람양성세균의 경우에는 효소와 같은 분자량이 큰 단백질을 display할 수 있으나 표면발현의 밀도가 매우 낮은 문제점 등이 단점으로 지적되고 있다. 뿐만 아니라 식품이나 인체를 대상으로 하는 의약품 생산을 위한 효소반응의 경우 인체에 대한 안전성 문제도 심각하게 대두되고 있다. 따라서 최근에는 이러한 원핵세포를 이용한 표면발현의 단점을 보완할 수 있는 새로운 표면발현 시스템으로서 진핵세포인 효모 *S. cerevisiae*를 이용하려는 시도가 활발히 진행되고 있다. 제빵효모 *S. cerevisiae*는 GRAS (generally recognized as safe)이며 진핵세포로서 고등생물과 유사한 유전자 구조 및 당쇄부과 (glycosylation)를 포함하는 번역 후 단백질 수식 (post-translational modification) 과정을 가지기 때문에 고등세포 유래의 단백질을 활성상태로 발현할 수 있다[18]. 그리고 표면발현시의 단백질의 표면밀도의 측면에서도 효모에서 현재 알려진 agglutinin의 경우 효모세포 1개당 10^4 - 10^5 으로서 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다는 장점을 가지고 있다[14]. 본 연구에 사용된 단백질은 효모세포벽에 N말단이 공유결합된 형태로 존재하는 α -agglutinin을 사용하였다. 이 단백질은 Aga1과 Aga2의 소단위체로 구성되어 있으며 Aga1 단백질이 β -glucan 결합으로 세포벽에 고정되고 69개의 amino acid로 이루어진 Aga2가 disulfide 결합을 하고 있다.

따라서, 본 연구에서는 Aga2 단백질의 C 말단에 *P. macerans* 유래 CFTase를 유전적으로 subcloning하여 효모 *S. cerevisiae*의 세포표면에 CFTase 효소가 고정부착된 새로운 생체촉매제로부터 CF를 생산함으로써, 유용 산업효소를 *S. cerevisiae* 세포표면에 발현하는 표면 발현 시스템을 구축하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

E. coli DH5a (*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lacZAM15*)는 재조합 DNA 조작을 위해 host 균주로서 사용되었고, 효모 *S. cerevisiae* EBY100 (*MATa ura3-52 trp1 leu2-Δ1 his3Δ200 pep4::HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL1*)은 *P. macerans* CFTase의 발현과 surface display를 위해 사용되었다. *E. coli*는 50 μ g/ml ampicillin을 포함하는 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl)에서 배양하였다. YNBCAD (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and 0.5% casamino acids) 배지는 효모 형질전환의 선별과 seed culture를 위해 사용되었다. 그들의 표면에 display된 효모 형질전환체는 YPDG (1% yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, and 1% galactose) 배지를 사용하여 20°C, pH 6.0 에서 발효조 (KoBiotech Co., Korea)에서 희분배양을 수행하였다.

발현 plasmid의 구축

*P. macerans*의 2.8 kb의 *cft* 유전자는 template로서 pECFTN[11]을 사용하여 PCR 증폭하였다. 두 개의 primer는 [(forward primer) : (5'-3') ACGGCTAGCATGTTCCA AGC AAGTGATAGG와 (reverse primer) : (5'-3') GGGATCCGT TGTTAGT TTTCTTCTTTACCTGAACAGGTAC]로 제작하였다. Forward primer 부위에는 *NheI* 제한효소 인식부위를 가지며, reverse primer에는 *BamHI* 제한효소 인식부위를 가지고 있다. PCR 증폭후에 *cft* 유전자는 *NheI*와 *BamHI* 제한효소로 처리하여 surface display vector인 pCTcon에 재조합하여 재조합 plasmid pCTECFTN (9.0 kb)을 구축하였다.

효모 형질전환 및 선별

구축된 재조합 plasmid pCTECFTN는 DH5a로부터 증폭, 추출하여 LiCl 법[4]으로 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환 하였다. 형질전환체는 EBY100/pCTECFTN라 명명하였다. 효모 형질전환체는 SD 배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% casamino acids, 2% dextrose)를 사용하여 선별되었다.

Immunofluorescence Microscopy

최적 배양 조건인 YPDG 배지(1% yeast extract, 2% polypeptone, 1% dextrose, 1% galactose), 20°C, pH 6.0에서 48시간 배양한 균체를 원심분리 (8000 rpm, 10 분) 하여 균체를 phosphate-buffered saline (pH 7.4, PBS)에서 두 번 세척한 후 균체를 PBS에 OD₆₀₀ = 20로 희석하였다. 면역항체염색은 c-myc monoclonal antibody (mAb) 9E10 (Covance Inc., U.S.A.)를 1차 항체(1:500)로 4°C, 1.5 시간 반응 후 세척하고

fluorecein - isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse IgG (H+L) (KPL Co., U.S.A.)를 2차 항체 (1:100)로 4°C, 1 시간 반응 후 세척하였다. 면역항체 염색한 균체의 형광 분석은 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, LSM 510 META, Germany)를 이용하였다.

효소 반응

효소반응은 50 mM 인산완충용액 (pH 7.0)에서 수행하였다. Chicory, dahlia, 그리고 Jerusalem artichoke (Sigma Co., U.S.A.)을 기질로 하였다. 재조합 균주 *S. cerevisiae* EBY100/pCTECFTN과 대조구인 *S. cerevisiae* EBY100을 최적 배양 조건인 YPDG 배지, 20°C, 48 시간 배양한 배양액을 원심분리한 후 균체를 PBS(phosphate buffered saline)에 두 번 세척하였다. 균체를 PBS에 OD₆₀₀ = 20 (5.05 unit/l)로 희석하였다. CFTase 활성 측정은 5% inulin 100 µl와 조효소 100 µl를 50°C에서 1 시간 반응 후 반응 종결은 100°C, 10분 가열하였다. CFTase 활성 1 unit 정의는 50°C에서 1 µmol의 CF6 (cycloinulohexaose)을 생성하는 효소량으로 하였다. 반응 생성물은 TLC와 HPLC로 수행하였다.

Thin-layer chromatography에 의한 효소반응 생성물의 확인

효소반응 생성물은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 반응액은 비등수에서 5분간 열처리한 후 각각의 반응액 5 µl 씩을 TLC plate (MERCK)에 점적한 후 butanol:isopropanol:water (3:12:4, v/v)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 urea spray로 분무한 후 110°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다[5]. 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. CFs 생성 확인을 위한 표준물질로 fructooligosaccharides standard set (1-kestose, nystose, 1F-fructosylhystose (Wako, Japan)와 glucose, fructose, and sucrose (Junsei, Japan)를 이용하였다. TLC상의 반응생성물 분석은 image analyzer (FluorChem 5500, Alpha InnoTech., U.S.A.)를 사용하였다.

High Performance Liquid Chromatography

최종 생성된 CFs의 정량분석은 HPLC를 이용하였다. 효소적 반응을 통한 최종 반응액을 0.4 µm filter로 여과한 다음 여액을 HPLC로 분석하였다. Column은 TSK gel Amide-80 (Tosoh Co., Japan)을 사용하였고, 용출 용매는 탈기한 acetonitrile:H₂O (65:35, v/v), 유속 1.2 ml/min, column oven 온도는 85°C로 하였다. Sample은 30 µl씩 주입하였다. HPLC 기종은 Waters (Alliance 2690, Milford, MA, U.S.A.)를 사용

하였고, RI detector (Waters 410, U.S.A.)로 검출하였다.

분석 방법

잔존 환원당 농도는 dinitrosalicylic acid 방법을 사용하여 측정하였고, 그때 standard로서 glucose가 사용되었다. CFs를 포함하는 carbohydrate의 정량분석은 HPLC에 의해 수행되었다. 총 CFs의 양은 cycloinulohexaose (CF6), cycloinulohptaose (CF7), and cycloinulooctaose (CF8)의 합으로 산출 되었다. Jerusalem artichoke inulin으로부터 생성된 CFs를 100%로 하였을 때 다른 inulin으로부터 생성된 CFs의 상대적인 양(%)을 결정하였다. 반응 혼합물에서 전체적인 carbohydrate 양은 phenol sulfuric acid 법으로 측정하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축 및 효모형질전환체 선별

Galactose로 유도되는 표충발현 vector인 pCTcon (GAL1 promoter)에 *cft* 유전자를 subcloning 하여 pCTECFTN (9.1 kb)를 구축하였다(Fig. 1). 구축된 plasmid는 우선 *E. coli* DH5α에 형질전환하여 증폭, 추출한 후 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환시켜 uracil 결핍 최소배지 (SD)에서 형질전환체를 1차 선별하고, 1차 선별된 균주는 test tube culture 후 cell lysates를 5% inulin과 반응시켜 반응산물을 TLC와 HPLC로 분석하여 그 중 CFs의 생성능과 균체증식이 높은 재조합균주를 선별하였다. 최종 선별된 재조합균주에서 CFTase는 유도적 promoter인 GAL1 promoter의 조절 하에서 안정적으로 표충발현되었다.

Immunofluorescence microscopy

Anti-c-myc (1차 항체)와 FITC (2차 항체)로 labeling 후 immunofluorescence microscopy로 관찰한 결과, EBY100/pCTENIU은 형광을 나타내었고, EBY100 (control)은 그렇지

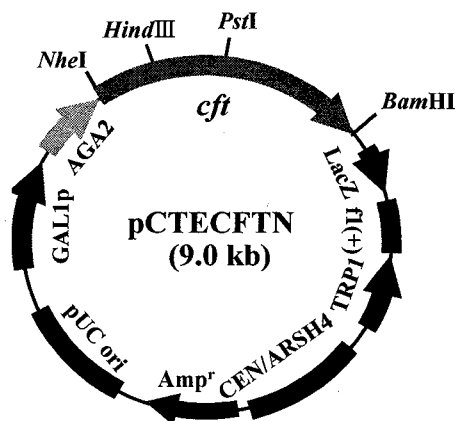


Fig. 1. Schematic diagram of recombinant plasmid, pCTECFTN (*cft* from *P. macerans*), used in this work.

않았다. 이 결과로 표층발현유무를 확인하였다(data not shown)

재조합 CFTase 발현과 분비국재성

YPDG 배지에서 48시간 배양 후 분획한 균체는 5.52 unit/l의 활성을 보였다. 대조구에서는 0.7 unit/l, 배양 상등액에서는 활성이 나타나지 않았다(Fig. 2). 표층 발현은 episomal 발현 (18.73 unit/l) 보다는 활성이 낮았다[11]. 표층 발현의 활성이 떨어지는 이유로 효모세포 표면에 발현되는 α -agglutinin의 수가 약 10^4 - 10^5 개로 한정되어 있기 때문에 발현시킬 수 있는 효소의 양이 일정하다. 그리고 목적 단백질이 세포 밖으로 완전히 분비되지 못하게 잡아주는 역할을 하는 세포벽 부착 매개 단백질이 요구된다. 매개 단백질로는 자연적으로 효모 세포벽에 존재하는 다양한 세포벽 mannoprotein을 이용할 수 있는데, 일부 mannoprotein은 세포벽에 약하게 결합하는 단백질과 일부 plasma membrane 유래이며[27], 주로 분자량이 작은 단백질들이다[26]. 이들은 세포벽과의 결합력이 약하거나 세포의 표면과의 거리가 먼 위치에 존재하기 때문에 이들을 매개로 하여 외래 단백질을 표면발현 하였을 때 결합력이 약하거나 외래단백질이 충분히 표면에 노출되지 못하며 세포벽으로 흡수되지 못하는 기질과의 접촉할 수 없는 단점이 있다[27]. 따라서, 일반적인 episomal 발현에 비해 상대적으로 효소활성이 낮은 것으로 사료되었다. 또한, Washida 등[28]의 연구결과에서 따르면, *Rhizopus oryzae* lipase를 α -agglutinin의 C 말단 하류에 유전적으로 융합하여 표면 발현시켰을 때와 α -agglutinin과 lipase 사이에 linker peptides를 삽입하여 표면 발현시켰을 때의 기질 친화성이 linker peptides의 수가 늘어감에 따라 증

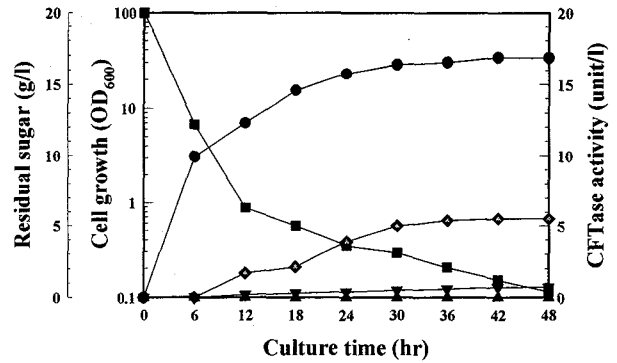


Fig. 2. Time profiles of cell growth, sugar consumption, and CFTase expression in the batch fermentation of *S. cerevisiae* EB100/pCTECFTN on YPDG medium (1% dextrose, 1% galactose).

Symbols: (●), cell growth; (■), residual sugar; (◆), CFTase activity of cell pellet; (▲), CFTase activity of culture supernatant; (▼), control activity of cell pellet.

가하였다. 이는 표면 발현된 효소가 기질과 반응하기 위한 공간적인 확보가 일반 episomal 발현에 비해 어려워 기질과의 친화력이 감소하는 것으로 사료된다. 따라서, 일반적인 episomal 발현에 비해 상대적으로 효소활성이 낮은 것으로 사료되었다.

반응 최적 pH와 최적온도

재조합 CFTase의 효소반응의 최적 활성 pH를 pH 4.0~10.0의 범위에서 측정한 결과 Fig. 3 에서 보는 바와 같이 episomal 발현 CFTase 최적 pH[11]와 동일하게 pH 8.0에서 최적 활성을 보였다. pH 3.0에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았고, pH 6.0~9.0에서 반응시에도 효소활성이 많이 남아

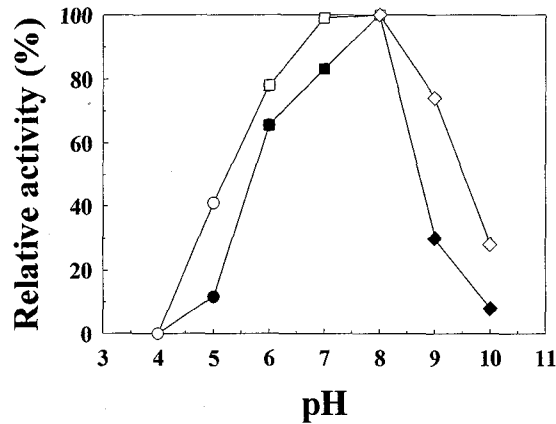
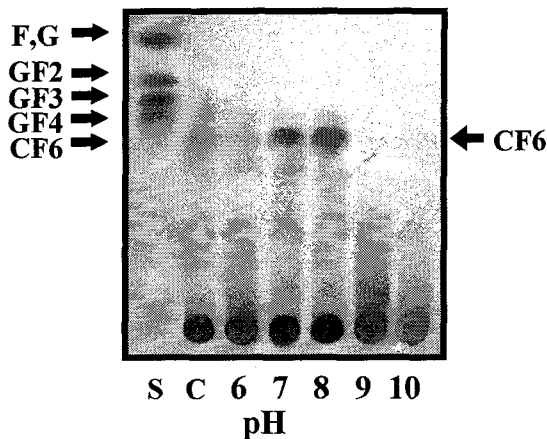


Fig. 3. Effects of pH on the activity and stability of cell surface-displayed CFTase. Dahlia inulin (5%) was used for the substrate. Enzyme activity in 50 mM acetate buffer (●), 50 mM phosphate buffer (■) and tris buffer (◆) were measured at 50°C at the indicated pHs. pH stability in 50 mM acetate buffer (○), 50 mM phosphate buffer (□) and Tris buffer (◇) were measured by incubating enzyme at the indicated pHs for 1 h at 50°C, and then the residual activity was measured in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) at 50°C.

F, fructose; G, glucose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose; C, CF6.

있는 것으로 보아 효모에서 표층발현된 CFTase는 넓은 범위의 pH에서도 비교적 안정한 것으로 나타났다. 재조합 CFTase의 효소반응의 최적온도를 30~60°C의 범위에서 측정 한 결과 Fig. 4에서와 같이 50°C에서 최적 활성을 보였다. 또한, 55°C이상에서 효소활성이 감소되었고, 60°C이상에서는 효소활성이 나타나지 않았다.

최적 기질농도와 최적 inulin source

최적의 기질농도를 결정하기 위해 다른 농도 (1-7%)의 dahlia inulin을 50°C에서 효소반응 한 결과 dahlia inulin 5%를 사용하였을 때 가장 높은 CFs 산물이 생성되었다(Fig. 5).

CFs의 최적 생성을 위하여 inulin의 종류 (dahlia, chicory, Jerusalem artichoke)에 따른 효소반응의 차이점을 비교하였다(Fig. 6). 각 inulin에 대한 효소반응생성물 CFs를 HPLC로 정량 분석한 결과, Jerusalem artichoke으로부터 생성된 CFs를 100%로 하였을 때, chicory는 70.8%, dahlia는 92.8%로 나타났다. Jerusalem artichoke와 dahlia가 효과적이었다. 이 결과로 Jerusalem artichoke와 dahlia은 산업적으로 활용가치가 거의 없던 농산부산물 inulin을 고부가가치 생물소재 생산원료인 CFs 생성에 유용할 것으로 사료된다. Ohta 등[17]의 연구 결과에 따르면 fructose 평균중합도가 dahlia는 40.3, chicory는 33.6, Jerusalem artichoke는 40이상으로 나타났다. Jerusalem artichoke의 높은 fructose 평균중합도는 균체증식을 증가시키고 inulooligosaccharide (IOSs)와 에탄올 생성에 효과적으로 나타났다[10,25]. 또한 inulin, Jerusalem artichoke powder와 Jerusalem artichoke juice를 *A. ficuum* endoinulinase와 반응한 결과 Jerusalem artichoke juice를 기질로 하였을 때 반응 72시간 때 가장 높은 IOSs 수율 (79.8%)을 얻었다[6].

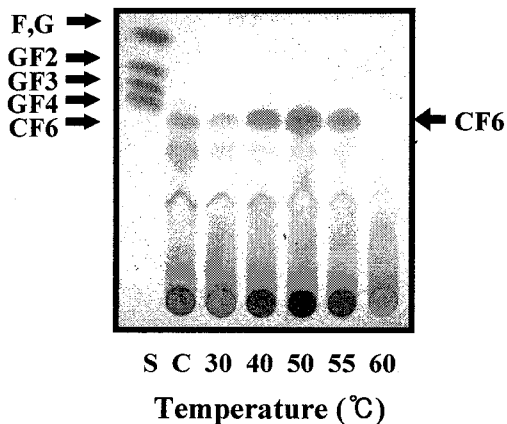


Fig. 4. Effects of temperature on the activity and stability of cell surface-displayed CFTase. Dahlia inulin (5%) was used for the substrate. Enzyme activity (▼) in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) was measured at the indicated temperatures. Thermostability (▽) was measured by incubating enzyme at the indicated temperatures for 1 h in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) and then the residual activity was measured at 50°C.

F, fructose; G, glucose; GF2, 1-kestose; GF3, nystose; GF4, 1F-Fructosyl Nystose; C, CF6.

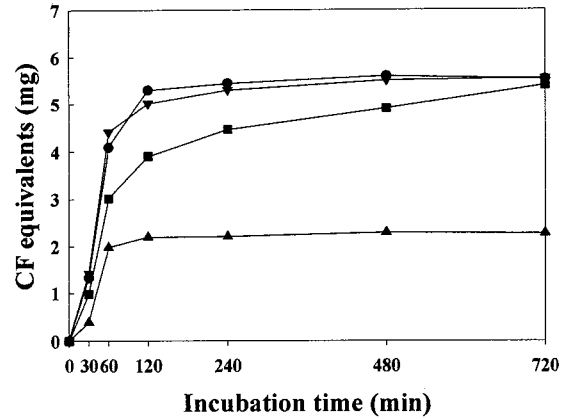


Fig. 5. Effect of different concentration of dahlia inulin on the cyclofructan production. The amount of 30 munit of CFTase was reacted at 50°C. Symbols: (▲), 1%; (■), 3%; (●), 5%; (▼), 7%

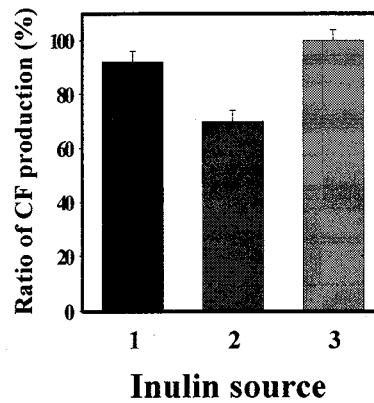
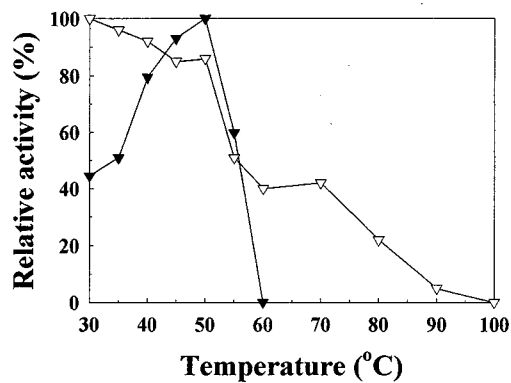


Fig. 6. Effect of inulin source on the cyclofructan production. Ratio of CFs production was calculated by HPLC data of inulin hydrolysates. Lane 1, Dahlia; 2, Chicory; 3, Jerusalem artichoke.



CFs 생성의 분석

재조합 균주 *S. cerevisiae* EBY100/pCTECFTN를 초기 pH 8.0, 50°C, YPDG 배지에서 48시간 회분 배양한 후 세포를 5% Jerusalem artichoke inulin과 함께 반응 후 TLC로 분석한 결과 생성된 CFs의 구성성분으로 cycloinuloheptaose (CF6), cycloinuloheptaose (CF7), and cycloinuloctaose (CF8)이 생성되었고, 이 중에서 CF6이 주생성물이었다. CF6, CF7, CF8 생성비율은 8:1:1이었다(data not shown). α -agglutinin를 사용하여 Kim 등[13]은 *B. macerans* CGTase를 표면발현시켰고, 기질인 soluble starch와 CGTase가 표면 발현된 형질전환체를 60 시간 이상 반응시켜 α -CD를 생산하였다. 그 연구 결과에 따르면 episomal 발현에 의한 CGTase는 α -CD, glucose, maltose 분해 시 intermolecular transglycosylation에 의해 maltooligosaccharide 농도는 증가하고, 부수적으로 α -CD는 감소하는 반면, 표면발현에 의한 CGTase는 반응 49시간까지 coupling, disproportionation에 의해 저농도의 maltooligosaccharide로 분해되다가 감소되어 저 α -CD만 남게 된다. 결론적으로 보다 순도가 높은 α -CD를 생산할 수 있는 것과 그에 따른 안정성이 높은 것으로 나타났다. 이는 목적 단백질이 효모 세포 표면의 glucan 구조와 공유결합에 의하여 결합되어 있어 반응 중 추출되지 않아 life time이 길어지기 때문이다. 본 연구에서도 CF6을 주성분으로 하는 순도 높은 CF를 안정적으로 생산할 수 있음을 알았다. 따라서, CFTase 표면발현계의 효모 생축매제는 전통적인 고정화에 의한 발효과정과는 달리 효소의 안정성 및 회수가 용이하여 생산성 저하 문제를 피할 수 있어 산업적 응용에 유리할 것으로 사료된다.

요 약

Paenibacillus macerans 유래의 cycloinuloooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) 유전자(*cft*, 2832 bp, 103.8 kDa)를 효모 표층발현 vector인 pCTcon (*GAL1* promoter)에 subcloning 하였다. 구축된 pCTECFTN (9.0 kb)를 숙주세포인 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환한 후, uracil이 결핍된 배지와 inulin 함유배지에서 선별하였다. *cft* 유전자는 *GAL1* promoter에 의해 효모 형질전환체에서 성공적으로 발현되었다. inulin으로부터 cyclofructans (CFs)로 생산하는 효소적 능력으로부터 표층발현 유무를 확인하였다. YPDG배지에서 48시간 배양 후 분획한 균체는 5.52 unit/ ℓ 의 활성을 보였다. CF 생산을 위한 효소의 최적 반응 조건으로 pH 8.0, 반응온도 50°C, 기질농도 5%, 기질은 Jerusalem artichoke로 최적화하였다. Dahlia, Chicory, Jerusalem artichoke 등의 inulin과 표층 발현 CFTase 효소반응 결과, cycloinuloheptaose (CF6), cycloinuloheptaose (CF7), 그리고 cycloinuloctaose (CF8)이 생성되었고, 이 중에서 CF6가 주 생성물이었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단(Korea Science and Engineering Foundation, 과제번호: R05-2003- 000-12381-0)의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이 연구에 참여한 김현진과 이재형은 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다.

참고 문헌

- Boder, E. T. and K. D. Wittrup. 1997. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* **15**, 553-557.
- Duagherty, P. S., M. J. Olsen, B. L. Linverson and G. Georgiou. 1999. Development of an optimized expression system for the screening of antibody libraries displayed on the *Escherichia coli* surface. *Protein Eng.* **12**, 613-621.
- Georgiou, G., H. L. Poetschke, C. Stathopoulos and J. A. Francisco. 1993. Practical applications of engineering Gram-negative bacterial cell surfaces. *Trends Biotechnol.* **11**, 6-10.
- 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 cycloinuloooligosaccharide fructanotransferase (CFTase) from *Bacillus polymyxa* MGL21. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 921-928.
- Jin, Z., J. Wang, B. Jiang and X. Xu. 2005. Production of inuloooligosaccharides by endoinulinases from *Aspergillus ficuum*. *Food Res. Int.* **38**, 301-308.
- Kawamura, M., T. Uchiyama, T. Kuramoto, Y. Tamura and K. Mizutani. 1989. Formation of a cycloinuloooligosaccharide from inulin by an extracellular enzyme of *Bacillus circulans* OKUMZ31B. *Carbohydr. Res.* **192**, 83-90.
- Kawamura, M. and T. Uchiyama. 1993. Reaction catalyzed by cycloinuloooligosaccharide fructanotransferase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57**, 343-350.
- Kawamura, M., H. Nakai, T. Uchiyama, Y. Takai and M. Sawada. 1997. Synthesis of methyl 6-O- β -inulotriosyl- α -D-glucopyranoside by intermolecular transglycosylation reaction of cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **297**, 187-190.
- Kim, D. H., Y. J. Choi, S. K. Song and J. W. Yun. 1997. Production of oligo-saccharides using endo-inulinase from *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Lett.* **19**, 369-371.
- Kim, H. C., J. H. Kim, S. J. Jeon, W. B. Choi and S. W. Nam. 2005. Expression of *Paenibacillus macerans* Cycloinuloooligosaccharide Fructanotransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Life Sci.* **15**, 317-322.
- Kim, H. Y. and Y. J. Choi. 2001. Molecular characterization of cycloinulo-oligosaccharide fructanotransferase from *Bacillus macerans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 995-1000.

13. Kim, K. Y., M. D. Kim, N. S. Han and J. H. Seo. 2002. Display of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 411-416.
14. Kondo, A. and M. Ueda. 2004. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 28-40
15. Lipke, P. N and J. Kurjan. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: Structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**, 180-194.
16. Little, M., P. Fuchs, F. Breitling and S. Dubel. 1993. Bacterial surface presentation of proteins and peptides: and alternative to phage technology. *Trends Biotechnol.* **11**, 3-5.
17. Ohta, K., S. Hamada and T. Nakamura. 1993. Production of high concentrations of ethanol from inulin by simultaneous saccharification and fermentation using *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 729-733.
18. Romanos, M. A., C. A. Scorer and J. J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast : a review. *Yeast* **8**, 423-488.
19. Sawada, M., T. Tanaka, Y. Takai, T. Hanafusa, T. Taniguchi, M. Kawamura and T. Uchiyama. 1991 The crystal structure of cyclo-inulohexaose produce from inulin by cycloinulooligosaccharide fructanotransferase. *Carbohydr. Res.* **217**, 7-17.
20. Schmid, G. 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production; yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* **7**, 244-248.
21. Schreuder, M. P., A. T. Mooren, H. Y. Toschka, C. T. Verrips and F. M. Klis. 1996. Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol.* **14**, 115-120.
22. Schreuder, M. P., C. Deen, W. J. A. Boersma, P. H. Pouwels and F. M. Klis. 1996. Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine* **14**, 383-388.
23. 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.
24. Uchiyama, T., M. Kawamura, T. Uragami and H. Okuno. 1993. Complexing of cycloinulooligosaccharides with metal ions. *Carbohydr. Res.* **241**, 245-248.
25. Vandamme, E. J. and D. G. Derycke. 1983. Microbial inulinase: fermentation process, properties, and applications. *Adv. Appl. Microbiol.* **29**, 139-176.
26. Valentin, E., E. Herrero, J. F. I. Pastor and R. Sentandreu. 1984. Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **130**, 1419-1428.
27. van der Vaart, J. M., L. H. P. Caro, J. W. Chapman, F. M. Klis and C. T. Verrips. 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**, 3104-3110.
28. Washida M., S. Takahachi, M. Ueda and A. Tanaka. 2001. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 681-686.