

고초균 포자를 이용한 *Zymomonas mobilis* 유래의 levansucrase 표면 발현

김준형^{1*}, 최수근², 정홍재², 반재구², 김병기³

Bacterial Surface Display of Levansucrase of *Zymomonas mobilis* Using *Bacillus Subtilis* Spore Display System

June-Hyung Kim^{1*}, Soo-Keun Choi², Heung-Chae Jung², Jae-Gu Pan², and Byung-Gee Kim³

접수: 2011년 5월 9일 / 계재승인: 2011년 6월 1일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Using *Bacillus subtilis* spore display system, with *cotG* as an anchoring motif, levansucrase from *Zymomonas mobilis*, was displayed on the outer surface of *Bacillus subtilis* spore. Flow cytometry of DB104 (pSDJH-*cotG-levU*) spore, proved the surface localization of CotG-LevU fusion protein on the spore compared to that of DB104. Enzymatic activity of DB104 (pSDJH-*cotG-levU*) spore showed more than 1.5 times higher levansucrase specific activity compared to that of the host spore, which is a remarkable increase of enzymatic activity considering the existence of *sacA* (sucrase) and *sacB* (levansucrase) in the *Bacillus subtilis* chromosome. The spore integrity, revealed by sporulation frequency test after heat and lysozyme treatment of spore, did not changed at all in spite of the CotG-LevU fusion protein incorporation into the spore coat layer during spore formation process. These data prove again that *Bacillus subtilis* spore could be considered as good live immobilization vehicle for efficient bioconversion process.

¹동아대학교 화학공학과

¹Department of Chemical Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Tel: +82-51-200-7719, Fax: +82-51-200-7728

e-mail: june0302@dau.ac.kr

²한국생명공학연구원

²Systems Microbiology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Oundong, Yusong, Daejeon 305-333, Korea

³서울대학교 화학생물공학부

³School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Keywords: surface display, *Bacillus subtilis*, spore, *Zymomonas mobilis*, levansucrase

1. 서론

미생물 표면 발현은 수주의 발현 모체를 이용하여, 목적 단백질을 미생물의 세포 표면에 발현시키는 방법이다. 미생물 표면 발현 기술은 combinatorial polypeptide libraries screening, 표면 발현된 효소를 이용한 전세포 반응 (whole cell bioconversion by levansucrase), 생백신 생산 (live vaccine production), organophospho hydrolase의 표면 발현을 이용한 환경 정화, 그리고, poly-His peptides와 중금속 흡착 단백질을 이용한 토양, 수계 환경에서의 중금속 흡착 등의 다양한 분야에 이용되어 왔다 [1-5]. 지금까지 그램 양성균 혹은 그램 음성균을 비롯한 많은 미생물 속주에서 미생물 표면 발현 시스템이 개발되어 왔다.

하지만, 기존의 모든 표면 발현 시스템에서는 미생물의 원형질 내부에서 발현된 “발현모체-목적 단백질”로 이루어진 융합 단백질이 미생물의 단백질 분비기구를 이용하여, 미생물의 원형질막과 세포벽을 통해 분비되어야 한다는 공통적인 특성을 가지고 있다. 이러한 형태의 표면 발현 방법은, “발현 모체-목적 단백질”이 세포막에 비이상적으로 축적되어 세포막의 전체성 (integrity)을 훼손하여, 세포의 성장을 방해하거나, 심한 경우 속주 세포의 사멸을 유도하거나, 세포의 분비 기구에 쉽게 적용될 수 없는 목적단백질의 크기가 큰 경우, 단일체가 아닌 multimer 형태의 목적 단백질 혹은, 조효소를 포함하는 단백질의 경우 표면 발현 자체에

어려움이 있었던 것이 사실이다 [6-9].

고초균 (*Bacillus subtilis*)은 생존환경에서 탄소 혹은 질소 원의 고갈 및 다양한 종류의 외부 스트레스에 대해서 비대칭 세포 분화를 통한 내생 포자를 형성함으로써 그 유전적 물질을 다음 세대에 전해주는 생존전략을 가지고 있다. 비대칭 세포분화를 통해 형성된 mother cell은 pre-spore를 만입하고, mother cell 내부에서 만들어진 다양한 포자 형성 단백질 (spore coat protein)은 pre-spore의 바깥쪽으로 여러 층의 coat layer를 만들면서 포자를 형성하게 된다. 포자가 충분히 완성되게 되면, 역할을 마친 mother-cell은 분해되면서 포자를 외부 환경으로 배출하게 된다. 이렇게 완성되어진 고초균의 포자는 열, 건조, 다양한 화학물질 등에 매우 강한 저항성을 지니며, 반면에 아미노산, 탄소원 등의 영양 성분에는 매우 민감하게 반응하여 새로운 life-cycle을 시작하는 특성을 가지고 있다.

올바른 포자 형성을 위해서는 약 150개 이상의 다양한 유전자의 발현이 순차적으로 정확하게 이루어지며, 이는 주로 mother-cell과 pre-spore의 유전자 발현에 관여하는 RNA Polymerase의 sigma factor (σ^A , σ^F , σ^G and σ^K) 사이의 정확한 신호 전달 체계에 의존하게 된다. 이러한 포자 형성 기구는 미생물 표면 발현의 관점에서 보면, 기존의 미생물 표면 발현 시스템이 제공하지 않았던 매우 큰 장점을 제공하게 된다. 만약, 목적 단백질을 포자 형성 단백질에 융합 발현하고, 이를 포자 형성 과정에서 포자의 표면으로 유도 한 후, mother cell이 분해가 되어 완성된 포자가 방출 된다면, 세포막이나, 세포벽을 통한 융합 단백질의 이동 없이 포자에 목적단백질이 표면발현된 것과 같은 결과를 얻을 수 있다 (Fig. 1).

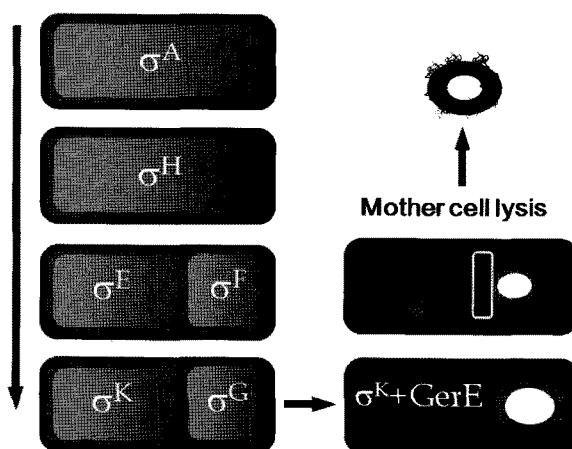


Fig. 1. Schematic diagram of life cycle of *Bacillus subtilis* and spore display system.

이를 극복하기 위하여 본 저자들은 고초균의 포자를 이용한 미생물 표면발현 시스템을 개발하였고, 이를 이용하여, β -galactosidase, streptavidin, GFPuv 등의 기존의 표면 발현 시스템에서는 용이하지 않았던, 다양한 목적 단백질들을 표면 발현하였다 [10-12].

본 논문에서는 이러한 고초균 포자에 기반한 표면발현 시스템의 용용처를 더욱 넓히고, 포자 발현된 효소의 전세포

반응에의 가능성을 확인하기 위하여, *Zymomonas mobilis* 유래의 levansucrase를 고초균 포자에 표면 발현하고, 그 특성을 분석하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양 조건

두 개의 단백질 분해 효소가 제거된 고초균인 DB104가 전 실험에 걸쳐서 발현용 속주로 사용되었다. 배양 배지로는 GYS 배지 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, yeast extract 2 g/L, K_2HPO_4 3.3 g/L, sodium citrate 0.1 g/L, glucose 0.1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, CaCl_2 0.16 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.82 g/L)를 사용하였으며, 37°C에서 진탕배양기를 통하여 배양하였다. DB104 (pSDJH-cotG-levU)의 선별과 배양을 위해서 chloramphenicol (5 mg/L)을 사용하였다.

2.2. 유전자 증폭 (PCR amplification)

DNA 중합효소 (polymerase)는 Boehringer Manheim (Expand Long Template PCR System, catalogue NO.1681834, Germany) 사에서 구입하여 사용하였다. 표면 발현 모체인 고초균의 *cotG* 유전자 서열을 얻기 위해서는 *Bacillus subtilis* genome site (<http://www.pasteur.fr/Bio/subtiList.html>)를 이용하였다. PCR 증폭을 위한 DNA primer는 Genotech (Taejeon, Korea)에서 주문, 구입하였다. PCR 증폭을 위해서는 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer, USA)을 사용하였다.

2.3. 유전자 조작 (DNA manipulation)

유전자 조작의 일반적인 방법은 Sambrook 등의 방법을 따랐다. 유전자 클로닝을 위해서는 대장균 JM109와 DH5a를 사용하였다. 제한 효소, DNA ligase, 기타 필요한 시약은 Boehringer Manheim에서 구입하였다. PCR 증폭단편 및 유전자 단편, plasmid vector의 정제를 위해서는 Qiagen 사의 제품을 이용하였다.

2.4. 고초균으로의 형질 전환 (Transformation into *Bacillus subtilis*)

완성된 발현벡터 pSDJH-cotG-levU를 고초균으로 도입하기 위해서는 Two-step (SP I, SP II) 방법을 이용하였다 [13].

2.5. 고초균 포자 분리 및 정제 방법 (Purification of *Bacillus subtilis* spore)

고초균 DB104, DB104 (pSDJH-cotG-levU)를 37°C에서 16-20시간 배양하였다. 배양액에 포함된 vegetative cells, sporulating cells, spores 등을 lysozyme 처리 혹은 renografin (sodium diatrizoate, S-4506, Sigma)을 이용한 밀도차이로 분리하였다. 분리 정제된 포자는 현미경 관측을 통하여, 순수한 포자만 존재하는 것으로 확인되었다.

2.6. 유세포 분석 (Flow cytometric analysis)

유세포 분석을 위해 분리 정제된 포자를 PBS 용액을 이용

하여 세 번 세척하였다. 세척된 포자는 anti-LevU Rabbit IgG (1:200)으로 1차 표지하여 1시간 동안 0°C에서 처리하였다. 다시 PBS 완충용액을 이용하여 3회 세척 후, FITC-labeled anti Rabbit IgG로 다시 1시간 동안 0°C에서 처리하였다. 그 후 다시 PBS로 3회 세척한 후, 0.5 mL의 PBS에 재부유되었다. 준비된 포자는 FACSort flow cytometer (FACSort, Becton Dickinson, Oxnard, CA)와, software CellQuest ver. 1.0을 이용하여 분석되었다.

2.7. levansucrase 효소 역할 측정

접종 후 24시간이 지난 고초균 대조군인 DB104와 levansucrase를 표면 발현하는 DB104 (pCSK-cotG-levU)의 포자를 배양액 4.5 mL에서 분리 정제하였다. 분리 정제된 포자를 이용하여 10%의 sucrose를 포함하는 PBS 용액에서 37°C에서 효소 반응이 수행되었다. levansucrase의 작용으로 유리된 포도당 농도의 측정은 Sigma사의 포도당 측정 kit를 사용하였다.

2.8. 포자 형성 빈도 측정 (Sporulation frequency measurement)

포자의 열안정성 측정을 위해서는 준비된 포자 혹은 포자가 포함된 배양액을 80°C에서 15분간 가열한 후, 멸균된 D.D.W (Deionized Distilled Water)에서 적절한 농도로 희석한 샘플을 TBAB (Tryptose Blood Agar Base) 배지위에 도말한 후, 37°C에서 24시간 배양하였다. 30-300개 정도의 colony를 가지는 TBAB plate를 선별하여 생존 세포의 개수를 계산하였다. 실험은 3회 반복하였으며, 각각의 실험에서 세 개의 plate에 도말하여 (triplicate) 그 평균값을 구하였다. Lysozyme 처리 후의 포자의 안정성을 측정하기 위해서는 분리 정제된 포자 혹은 포자가 포함된 배양액을 50 mg/L의 lysozyme를 함유하는 50 mM Tris-Cl (pH 7.2) 완충 용액에서 37°C에서 1시간 방치한 후, 위의 방법으로 도말, 생존한 세포의 빈도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. CotG-LevU 융합 단백질 발현 벡터 제작 및 고초균 군주의 구축

고초균에서 안정적인 융합 단백질의 발현을 위한 plasmid vector는 대장균/고초균 shuttle vector-인 pHP9S을 기반으로 하여 제작되었다. 먼저 pHP9S을 EcoR I과 Hind III, 두 가지 제한효소로 처리한 후, Klenow 효소로 말단부를 처리하였다. 이후, BssH II로 처리한 p123T (EMBL database accession number Z46733, Mobitec, INC.)의 짧은 단편을 상기 Klenow로 처리된 vector와 연결하여 multi cloning site를 가지는 pCSK1 vector를 완성하였다. cotG promoter를 포함하는 구조 유전자를 두 개의 DNA primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. (cotG 5' prime; 5'-GCC TTT GGA TCC AGT GTC CCT AGC TCC GAG-3', cotG-Linker 3' prime; 5'-CTA TTG CTG CAG TGA ACC CCC ACC TCC TTT GTA TTT CTT TTT GAC TA-3'). cotG-Linker 3' prime primer는 cotG 구조 유전자의 C-말단에 flexible linker (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)를 가지

도록 디자인되었다 [14]. 위의 pCSK1 vector와 PCR 증폭 단편을 제한 효소 Pst I과 BamH I으로 처리한 후, ligation하였다. 이렇게 만들어진 cotG를 표면 발현 모체로 가진 plasmid vector를 pSDJH-cotG라고 이름지었다. levansucrase를 클로닝 하기 위해서 *Zymomonas mobilis*의 chromosome을 template로 하여 다음 두 개의 DNA primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. (levU 5' prime; 5'-AAG TGC CTG CAG ATG TTG AAT AAA GCA GGC AT-3', levU 3' prime; 5'-AAT GAA AAG CTT TTA TTT ATT CAA TAA AGA CA-3') pSDJH-cotG와 위에서 PCR 증폭된 levansucrase gene을 제한 효소 Pst I과 Hind III로 처리한 후, ligation하였다. 이렇게 만들어진 cotG-levU를 융합 발현하는 plasmid vector를 pSDJH-cotG-levU라고 이름지었다. 완성된 plasmid vector를 고초균 DB104에 형질전환하여 chloramphenicol이 포함된 agar plate에서 선별하고, 이를 DB104 (pSDJH-cotG-levU)라고 이름지었다 (Fig. 2).

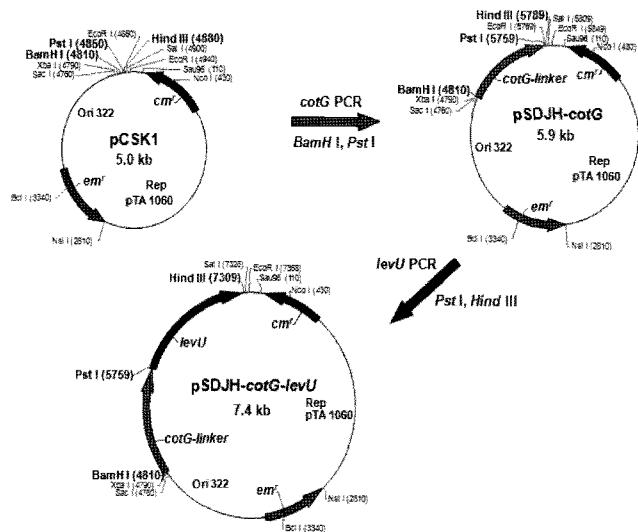


Fig. 2. Construction of pSDJH-cotG and pSDJH-cotG-levU, which expresses CotG-Levensucrase fusion protein on the spore of *Bacillus subtilis*. Precise construction method is described in the main text.

3.2. 유세포 분석기를 이용한 levansucrase의 포자 표면 발현

levansucrase의 포자 표면 발현을 증명하기 위하여 유세포 분석기를 이용하였다. 목적 단백질의 항체와 그 2차 항체에 대한 접근성을 이용하는 유세포 분석은 미생물 표면 발현 분야에서 목적 단백질의 위치에 관한 중요한 정보를 제공하는 실험 방법이다. 목적 단백질이 숙주세포의 표면에 존재할 경우에만 항체에 반응하여 형광 신호를 나타내며, 목적 단백질이 세포의 내부, 혹은 항체가 접근할 수 없을 정도의 위치에 존재하거나, 다른 층으로 덮여져 있는 경우, 항체에 대해 반응하지 못하는 것이다.

고초균 대조군인 DB104와 DB104 (pSDJH-cotG-levU)의 포자를 분리 정제한 후, levansucrase에 대항하는 항체인 anti-LevU Rabbit IgG [2]로 각각의 포자를 표지하고, 2차 항체인 FITC-labeled anti Rabbit IgG로 표지하였다 (Fig. 3). 대조군인 DB104인 경우에 비하여, 목적 단백질을 표면 발현하고

있는 DB104 (*pSDJH-cotG-levU*)의 경우, 각각의 포자가 나타내는 형광의 정도가 매우 크게 증가하여, 그레프가 오른쪽으로 이동한 것을 확인할 수 있다. 이는 실험에서 의도한 바와 같이, 목적단백질인 levansucrase가 고초균 포자의 표면 위에 항체가 접근할 수 있을 정도에 바깥쪽 위치에 존재한다는 것을 증명하는 것이다.

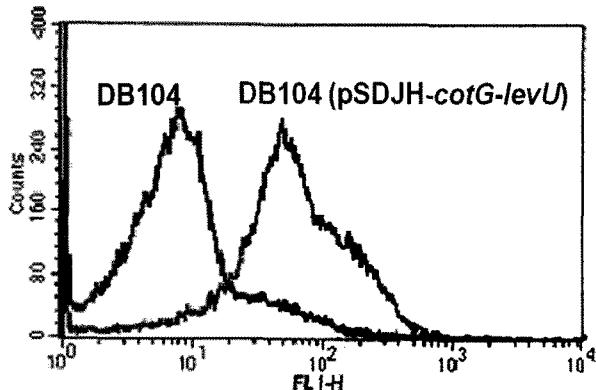


Fig. 3. Flow cytometric analysis of purified spore of DB104 (left) and DB104 (*pSDJH-cotG-levU*) (right).

3.3. 포자 표면 발현된 levansucrase 효소 활성 측정

levansucrase는 sucrose를 glucose와 fructose로 분해하므로, levansucrase 효소 활성은 반응에서 유리된 포도당의 농도를 측정함으로써 알 수 있다. 표면 발현된 levansucrase의 효소 활성 측정을 위해, 고초균 대조군인 DB104와 DB104 (*pSDJH-cotG-levU*)의 포자를 분리 정제하여 반응에 이용하였다 (Fig. 4). 84시간의 반응 동안 DB104와 DB104 (*pSDJH-cotG-levU*)의 포자 모두에서 유리된 포도당의 농도는 계속 증가하였다. 그러나, DB104 (*pSDJH-cotG-levU*)의 경우, DB104에 비하여 그 반응 속도가 전체 반응 과정에 있어, 1.5배 이상 빨랐다.

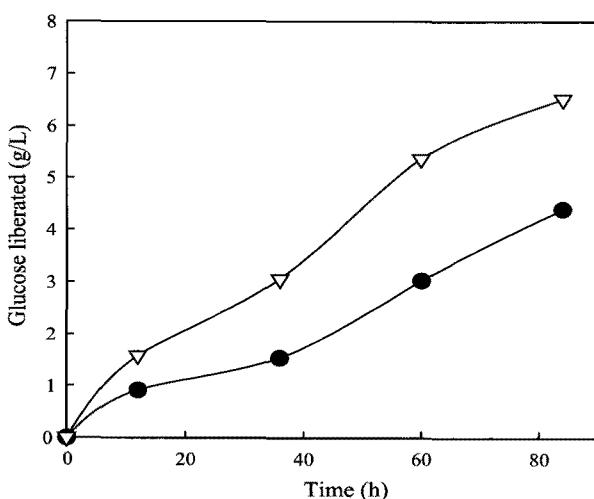


Fig. 4. Levansucrase activity measured by sucrose hydrolysis. DB104 (negative control) (●) and DB104 (*pSDJH-cotG-levU*) (▽).

대조군인 DB104의 경우 관찰되는 levansucrase 효소 활성

은 고초균이 가지는 두 개의 sucrose 분해 효소의 존재에 기인하는 것으로 추정된다. 본 실험에 사용된 고초균인 DB104의 경우 세포 내에서 발현되는 sucrase (*sacA*)와 세포 밖으로 분비되는 levansucrase (*sacB*)와 같은 두 개의 sucrose 분해효소를 가지고 있다. 이 두 개의 효소 모두 세포 내/외부로 발현된 다음 분리 정제된 포자의 표면에 남아 있을 가능성이 충분히 있으므로, 야생주인 DB104의 경우 관찰되는 levansucrase 효소 활성은 이 두 가지 효소 때문인 것으로 추정할 수 있다. 만약 *sacA*와 *sacB*가 제거된 고초균 변이주를 이용한다면, 표면 발현된 효소에 대한 더욱 확실한 효소 반응 정도의 차이를 볼 수 있으리라 사료된다.

3.4. 열처리와 lysozyme 처리를 통한 포자 안정성 검증

미생물 표면 발현의 많은 경우에 있어서, 표면 발현 모체와 함께 융합 발현된 외부의 목적 단백질이 숙주 세포의 세포막이나 세포벽에 흡입되어 그 안정성을 떨어뜨려, 세포의 성장을 방해하거나, 심한 경우 세포의 사멸을 유도하는 사례가 보고되어 있다. 미생물 표면 발현에서, 목적 단백질의 표면 발현 후 숙주세포의 안정성은 매우 중요한 사항이며, 본 연구에서도 열처리와 lysozyme 처리를 통하여 levansucrase가 표면 발현된 고초균 포자의 안정성을 조사해 보았다.

Table 1. Sporulation frequency test of DB104 and DB104 (*pSDJH-cotG-levU*) after heat and lysozyme treatment

Treatment	열처리, lysozyme 처리 후의 포자 형성 비율 (%)			
	Method	Strain	24 h	48 h
Heat	DB104	DB104	62.4	67.9
	DB104 (<i>pSDJH-cotG-levU</i>)	DB104 (<i>pSDJH-cotG-levU</i>)	61.4	65.6
Lysozyme	DB104	DB104	71.6	72.1
	DB104 (<i>pSDJH-cotG-levU</i>)	DB104 (<i>pSDJH-cotG-levU</i>)	79.2	77.5

DB104와 DB104 (*pSDJH-cotG-levU*) 두 가지의 균주에 대해 배양 시간에 따라 두 가지의 (24 h, 48 h) 샘플이 준비되었고, 각각의 샘플에 대해 열처리와 lysozyme 처리를 수행하였다. CotG-LevU 융합 단백질의 표면 발현은 Table 1에서 나타나 바와 마찬가지로 포자의 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 세 번씩 (Triplicate) 반복된 실험의 평균값에서, 대조군인 DB104와 융합 단백질을 표면 발현하는 DB104 (*pSDJH-cotG-levU*) 포자 모두, 유의미한 포자 안정성의 차이를 보이지 않았고, 이는 CotG-LevU 융합단백질의 표면 발현이 고초균 포자의 안정성에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

4. 결론

본 연구에서는 안정적인 목적 단백질의 표면 발현을 위해서, 고초균의 포자 형성 단백질인 *cotG*를 표면 발현 모체로 하여, *Zymomonas mobilis* 유래의 levansucrase를 고초균 포자위에 표면 발현하였다. 유세포 분석기를 통해서 목적 단백질의 표

면 발현을 증명하였고, levansucrase 효소 활성 측정을 통하여 표면 발현된 목적 단백질이 효소로서의 기능을 가지는 것을 보여주었다. 마지막으로 열처리 및 lysozyme 처리를 통해서, 표면 발현된 융합 단백질이 고초균 포자의 안정성에 영향을 미치지 않는 것을 입증하였다. 지금까지 발표된 다른 논문 결과들과 함께, 고초균의 포자를 이용한 표면 발현 시스템은, 포자가 가지는 안정성을 비롯한 다양한 장점으로 말미암아 그 응용범위를 넓혀갈 것으로 기대된다 [10-12,15].

감사

이 논문(저서)은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술 연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-331-D00135).

References

- Boder, E. T. and K. D. Wittrup (1997) Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 15: 553-557.
- Jung, H. C., J. M. Lebeault, and J. G. Pan (1998) Surface display of *Zymomonas mobilis* levansucrase by using the ice-nucleation protein of *Pseudomonas syringae*. *Nat. Biotechnol.* 16: 576-580.
- Georgiou, G., C. Stathopoulos, P. S. Daugherty, A. R. Nayak, B. L. Iverson, and R. Curtiss (1997) Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* 15: 29-34.
- Richins, R. D., I. Kaneva, A. Mulchandani, and W. Chen (1997) Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat. Biotechnol.* 15: 984-987.
- Sousa, C., A. Cebolla, and V. de Lorenzo (1996) Enhanced metalloadsorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* 14: 1017-1020.
- Georgiou, G., D. L. Stephens, C. Stathopoulos, H. L. Poetschke, J. Mendenhall, and C. F. Earhart (1996) Display of beta-lactamase on the *Escherichia coli* surface: outer membrane phenotypes conferred by Lpp'-OmpA'-beta-lactamase fusions. *Protein Eng.* 9: 239-247.
- Steidler, L., E. Remaut, and W. Fiers (1993) LamB as a carrier molecule for the functional exposition of IgG-binding domains of the *Staphylococcus aureus* protein A at the surface of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 236: 87-192.
- Kornacker, M. G. and A. P. Pugsley (1990) The normally periplasmic enzyme beta-lactamase is specifically and efficiently translocated through the *Escherichia coli* outer membrane when it is fused to the cell-surface enzyme pullulanase. *Mol. Microbiol.* 4: 1101-1109.
- Stathopoulos, C., G. Georgiou, and C. F. Earhart (1996) Characterization of *Escherichia coli* expressing an Lpp'-OmpA (46-159)-PhoA fusion protein localized in the outer membrane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 112-119.
- Kwon, S. J., H. C. Jung, and J. G. Pan (2007) Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with beta-galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2251-2256.
- Kim, J. H., C. S. Lee, and B. G. Kim (2005) Spore-displayed streptavidin: a live diagnostic tool in biotechnology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 210-214.
- Kim, J. H., C. Roh, C. W. Lee, D. Kyung, S. K. Choi, H. C. Jung, J. G. Pan, and B. G. Kim (2007) Bacterial surface display of GFP(uv) on *Bacillus subtilis* spores. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 677-680.
- Harwood, C. R. and S. M. Cutting (1990) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. pp. 67. A Wiley Interscience Publication, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, England.
- Goyal, A. and J. K. Batra (2000) Inclusion of a furin-sensitive spacer enhances the cytotoxicity of ribotoxin restrictocin containing recombinant single-chain immunotoxins. *Biochem. J.* 345 Pt 2: 247-254.
- Kim, J. and W. Schumann (2009) Display of proteins on *Bacillus subtilis* endospores. *Cell. Mol. Life. Sci.* 66: 3127-3136.