

## Cloning and developing mutants of *E.coli* BL21(DE)/CrdS-F and *E.coli* BL21(DE)/CrdS-C for producing soluble glucan

Chun-Ji Yin, Kyoung-Du Min and Jung-Heon Lee

Department of Chemical Engineering, Chosun University

TEL: +82-62-230-7259, FAX: +82-62-230-7226

### Abstract

Water-soluble glucan was produced by mutants of *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F and *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C in a fermentor. Mutants of *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F which has putative  $\beta$ -1,3-glucan synthase catalytic subunit (gi:40556679) gene and *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C which contains the active catalytic domain of partial curdlan synthase gene. The molecular weight of water-soluble glucan was analysed with HPLC.

### Introduction

미생물 대사 과정에서  $\beta$ -1,3-glucan은 *Agrobacterium* sp. ATCC31750으로 부터 생성되는 Biopolymer이다. 미생물 발효분야가 산업화 되면서 미생물을 이용하여 발효공정 실험을 실행하여  $\beta$ -1,3-glucan(curdlan)등을 생산하는 분야가 인기를 끌고 있다.  $\beta$ -1,3-glucan(curdlan)은 고온에서 가열하면 겔상태로 변하며 온도를 내리도 원상복귀되지 않는다. 또한, 산,염기를 이용하여 중화반응을 시켰을때 다공성 겔을 형성한다. 커들란은 특성이 특이하여, 식료품, 건축 등 분야에서 많은 관심을 받고 있으며, curdlan 생산을 비롯한 미생물 발효분야가 산업화 되면서 많은 인기를 보이고 있다.  $\beta$ -1,3-glucan을 생성하는 미생물 대사과정에서 UDP-glucose가  $\beta$ -1,3-glucan을 생성하는 유일한 전구체이다. 하지만 UDP-glucose는  $\beta$ -1,3-glucan을 생산하는 외에도 UDP-galactose등 산물로도 전환이 가능하다. UDP-glucose가  $\beta$ -1,3-glucan으로의 전환반응을 증가시키기 위하여서라면 합성효소인  $\beta$ -1,3-glucan synthase가 많이 발현되게 하여야 한다.  $\beta$ -1,3-glucan synthase gene이 바로 UDP-glucose에서  $\beta$ -1,3-glucan으로의 합성 정보를 함유있는 중요한 gene site이다. 본 연구에서는 UDP-glucose로부터  $\beta$ -1,3-glucan으로의 합성을 증가시키기 위하여  $\beta$ -1,3-glucan synthase gene site를 실은 벡터를 균주에 주입하여 재조합 균주를 개발하였다.

재조합균주를 개발하기 위하여 NCBI의 DataBase로부터 *Agrobacterium sp.* ATCC31749의 Putative  $\beta$ -1,3-glucan synthase catalytic subunit (gi:40556679)의 gene site를 이용하였다. 본 연구에서 개발된 균주인 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F는 Putative  $\beta$ -1,3-glucan synthase catalytic subunit의 Full gene site를 함유한 재조합균주이고 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C은 active catalytic domain인 partial curdlan synthase gene site<sup>1)</sup>를 함유한 재조합균주이다. *E. coli* BL21(DE)본균은 대사과정에서 glucan 을 합성하는 효소가 없기에 glucan 합성하지 않는다. 재조합 균주 *E.coli* BL21(DE)/CrdS-F와 *E.coli* BL21(DE)/CrdS-C는 소규모의 발효공정최적화 실험을 통하여 물에 용해하는 glucan을 생산성을 확인하였다.

## Materials and methods

### (1) Bacterial strains and growth condition

본 연구에서는 *E. coli* BL21(DE)균주를 사용하였으며 균주 배양은 pH7.0인 YP 배지(20g/l sucrose, 5g/l yeast extract, 5g/l peptone)에서 37°C, 150rpm을 유지시켜주면서 키웠다.<sup>2)</sup> 또한 cloning에 이용한 균주들은 Table 1에 보여주었다.

### (2) cloning of $\beta$ -1,3-glucan synthesis genes from *Agrobacterium sp.*ATCC31750

Genomic DNA extraction kit(QIAGEN)을 사용하여 *Agrobacterium sp.* ATCC31750로부터 Template DNA의 추출하였다. PCR cloning(PCR Premix Kit, Bioneer, Korea)을 하기 위한 primer design은 NCBI의 DB로부터 Putative  $\beta$ -1,3-glucan synthase catalytic subunit(gi:40556679)의 gene site<sup>2)</sup>에 의거하였다. 해당되는 enzyme의 Full gene site(*CrdS-F*)<sup>3)</sup>와 그중에서도 enzyme의 active catalytic domain인 active gene site(*CrdS-C*)<sup>3)</sup>을 함유한 균주를 cloning할 단편으로 선정하였고 제노텍에 올리고합성을 의뢰했다.

(1) Full gene site(*CrdS-F*)(1964bp):

5'-GAATTCATGTGATGTTTCAGATGCG-3'(sense oligonucleotide),

5'-AAGCTTATTTACCCGAATGCCCG-3'(antisense oligonucleotide);

(2) Active gene site(*CrdS-C*)(836bp):

5'-GAATTC ATGGAACCGACTGGTCA.-3'(sense oligonucleotide),

5'- AAGCTTATTTCCATGCAGATAGTG-3' (antisense oligonucleotide).

PCR 산물은 1% Agarose 겔로 확인하였다(Figure.1) PCR Cloning 한 두 DNA 단편은 정제하여서(Gel purification kit, Bioneer, Korea) pGEM-T Easy vector (Promega, USA)와 ligation 시켜 *E.coli* strain DH5a에 transformation 시켰다. sequencing 분석은 제노텍에 의거하였고 염기서열분석이 확인된후 plasmid pHCE19(II)와 ligation시켰다.  $T^4$  DNA ligase와  $T^4$ DNA ligase buffer는 Fermentas사의 것을 사용하였다.

**(3)Expression of  $\beta$ -1,3-glucan synthasis gene in *Escherichia coli* strain.**

유전자를 함유하고 있는 클로닝된 벡터 pHCE19(II)::*CrdS-C*와 pHCE19(II)::*CrdS-F*를 각각 *E. coli* BL21(DE) strain에 transformation 시켜서 재조합 *E. coli* strain 균주를 만든 후 37°C, Ampicillin(50mg/ml)을 넣은 LB배지에서 키웠다. OD600=1로 맞춘 동일한 조건하에서 *E. coli* BL21(DE) Strain에 Transformation 시킨 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/*CrdS-F*와 *E. coli* BL21(DE)/*CrdS-C*의 단백질발현을 SDS-PAGE (Figure.2)를 통하여 비교분석하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
<i>Agrobacterium</i> sp. ATCC31750 CrdS-F CrdS-C	Type strain; <i>Crd</i> <sup>+</sup> mutants contained <i>CrdS-F</i> (1964bp) gene mutants contained <i>CrdS-C</i> (836bp) gene	ATCC This study This study
<i>Escherichia coli</i> DH 5a BL21(DE3)(pLysS)	recA1 HSDr17 Res-Mod-ompT( $\lambda$ DE3 with T7 pol ) (pLysS withT7 lysozyme; Cmr)	Gibco-BRL Novagen
Plasmids : pHCE19(II)	plasmid vector; <i>Ap</i> <sup>r</sup>	

**Results and discussions**

**(1) PCR Cloning 산물 확인**

PCR Cloning 증폭한 *CrdS-F* DNA 단편과 *CrdS-C* DNA 단편은 1% Agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였을 때 Fig.1에서와 같이 각각 1964bp, 836bp에서 정확히 나타났다.

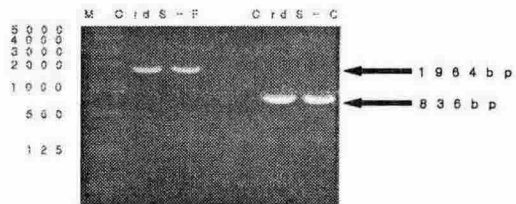


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR cloned DNA fragments of *CrdS-F* and *CrdS-C*. [Lanes: M, LambdaHindIII; *CrdS-F*(1964bp); *CrdS-F*(1964bp) ; *CrdS-C*(836bp); *CrdS-C*(836bp)]

(2) SDS-PAGE을 이용한 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C와 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F의 단백질발현확인

Partial curdlan synthase gene을 함유한 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C는 32kDa의 단백질을 생성하고 Full curdlan synthase gene을 함유한 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F는 72kDa의 단백질을 생성한다. OD600=1로 맞춘 동일한 조건하에서 *E. coli* BL21(DE) Strain에 Transformation 시킨 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F와 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C의 단백질발현을 SDS-PAGE(Fig.2)를 통하여 분석하였다.

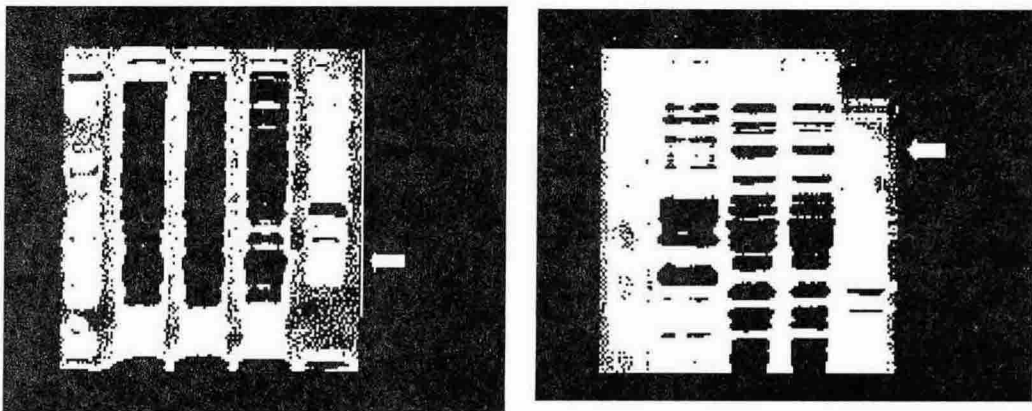
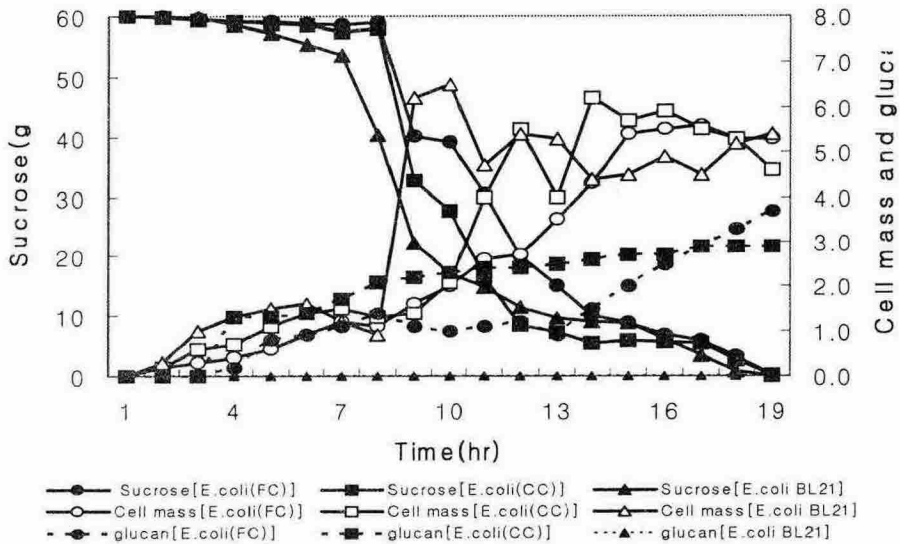


Figure 2. SDS-PAGE of recombinant *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C(Left) and *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F(right). [Lanes: M-marker; N/C-*E. coli* BL21(DE); W-whole cell of CrdS-C and CrdS-F; S-soluble protein of CrdS-C(L) and CrdS-F(R); IS-insoluble protein of CrdS-C(L) and CrdS-F(R)]

Fig. 2에서 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C는 32kDa의 위치에서 *E. coli* BL21(DE)보다 단백질 발현량은 큰 차이가 없었고 Fig.3에서 재조합균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F는 72kDa의 위치에서 *E. coli* BL21(DE)보다 상대적으로 많은 양의 단백질발현을 확인하였다.

(2) *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F와 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C를 이용한 soluble glucan 생산  
재조합 균주 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F는 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C보다 soluble glucan 생산량이 많은 성향을 보였다. HPLC를 이용하여 대장균 본 균인 *E. coli* BL21(DE) 및 재조합균주인 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-F와 *E. coli* BL21(DE)/CrdS-C의 대사과정을 동정 및 관찰하였다.



### References

1. Tara Karnezis, Helen C. Fisher, Gregory M. Neumann, Bruce A. Stone, and Vilma A. Stanisich, Cloning and Characterization of the Phosphatidylserine Synthase Gene of *Agrobacterium* sp. Strain ATCC 31749 and Effect of Its Inactivation on Production of High-Molecular-Mass(1→3)-β-D-Glucan(Curdlan) (2002), *J. Bacteriology*, 4114-4123
2. Mi-Kyoung Kim, Kang-Eun Ryu, Won-A Choi, Young-Ha Rhee, In-Young Lee, Enhanced production of (1→3)-β-D-Glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species(2003), *Biochem. Eng. J.*, Vol. 16, 163-168.
3. Stan J. Stasinopoulos, Paul R. Fisher, Bruce A. Stone and Vilma A. Stanisich, Detection of two loci involved in (1→3)-β-D-Glucan (Curdlan) biosynthesis by *Agrobacterium* sp. Strain ATCC 31749, and comparative sequence analysis of the putative curdlan synthase gene(1999), *Glycobiology* vol. 9(1), 31-41.