

## *Clostridium thermocellum*의 Cellulase 유전자의 Cloning

하지홍\*·한성숙·김옥한·이용현

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

### Cloning and Expression in *Escherichia coli* of a Cellulase Gene from *Clostridium thermocellum*

Ha, Ji-Hong\*, Sung-Sook Han, Uk-Han Kim, and Yong-Hyun Lee

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,  
Kyungpook National University, Taegu 635, Korea

**A cellulase gene of *Clostridium thermocellum* was transferred to *Escherichia coli* by molecular cloning with pBR322. The gene was carried in a Hind III digested DNA sequence of about 1.8 kb. This Hind III fragment expressed activities on carboxymethyl cellulose (CMC) and on filter paper in *E. coli*. The expression of clostridial cellulase gene in *E. coli* was studied and compared with the products of cellulase genes in *C. thermocellum*.**

호열혈기성 세균인 *Clostridium thermocellum*은 강력한 고온성 섬유소 분해효소를 분비할 뿐만 아니라 분해산물을 발효시켜 직접 ethanol을 생산하는 산업적으로 대단히 유용한 미생물로 알려져 있다(1). 최근 생물공학자들은 *C. thermocellum*의 이같은 분해, 발효 동시능력에 착안하여 종래의 2단계 발효법과는 다른 직접발효법에 의한 섬유소 자원의 에너지 변환을 검토하고 있으며 이에 따른 광범위한 연구를 수행하고 있다(2, 3).

*C. thermocellum*에 의해 생산되는 cellulase는 세포외 효소로서 복합체인 cellulosome을 형성하여 작용한다는 보고가 있으나(4), 지금까지 endoglucanase 활성을 나타내는 몇몇 단일 효소가 분리·정제되었다(5, 6). 분리된 고온성 cellulase는 곰팡이에 의해 생산되는 기존의 mesophilic cellulase에 비해 열안정성이 높으며(7), 분해산물에 의한 저해가 거의 없으며 높은 specific activity를 보이는 것으로 보고되고 있다(8, 9). 이와같은 연구들은 고온성

cellulase의 높은 산업적 가치를 시사하는 것으로서 재조합 DNA 기술에 의한 고온성 cellulase의 대량생산은 중요한 연구과제로 부각되고 있다.

Cornet 등은 endoglucanase A와 B를 생산하는 *C. thermocellum*의 *cel A*, *cel B* 유전자들을 cloning 했으며(10), Joliff 등은 *Escherichia coli*에 cloning된 *cel D* 유전자로 부터 endoglucanase D를 대량 생산한 후 결정화에 성공했다(11). 또한 Schwarz 등은 *C. thermocellum*의 전체 DNA로 부터 *cel* gene을 cloning했으며 *E. coli*로 부터 생산된 cellulase를 분리 정제한 결과 Cornet 등에 의해서 cloning된 바 있는 *cel A*와 같았다는 것을 보고하고 있다(7).

본인 등은 *C. thermocellum* 전체 DNA로 부터 CMCase 역가를 보이는 *cel* gene을 cloning했으며, cloning된 *cel* gene의 제한효소 분해양상이 다른 연구자들에 의해 주로 연구되고 있는 *cel A*, B, D와는 다름이 확인되었으므로 이에 대한 결과를 보고하는

**Key words:** Recombinant DNA, cellulase gene, *C. thermocellum*, gene expression.

\* Corresponding author

바이다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

Cellulase 생산균주로는 *Clostridium thermocellum* ATCC 27405, cloning을 위한 수용균주로는 *Escherichia coli* K12 strain HB101을 사용하였으며, cloning vector로는 pBR 322를 사용하였다.

### 배지 및 혐기성균 배양

*E. coli*의 배양은 LB 배지(tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g/d-H<sub>2</sub>O 1 l, pH 7.5)를 사용하였으며 37°C에서 진탕배양하였다. *C. thermocellum*의 배양은 CM3 배지(yeast extract 2.0g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.3g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2.9g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.0g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.15g, resazurin 2.0mg, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.25mg/d-H<sub>2</sub>O 1 l)를 사용하였는데 환원제로서 cystein-HCl(25.0mg/ml)되게 녹인 후 밀봉하여 autoclave한다)을 autoclave한 후 CM3 배지에 20 ml/l되게 첨가하였다. 탄소원으로는 α-cellulose 혹은 cellobiose를 0.97% 첨가하였으며 최초 pH는 7.8로 조절했다. 고체배지의 경우 2%의 agar를 첨가해서 사용하였으며 일단 환원제가 첨가된 모든 배지는 Hungate 기법(12)에 의해 N<sub>2</sub> gas로 공기를 치환한 뒤 산소와의 접촉을 차단시켰다. 소량배양의 경우 고무마개로 밀봉된 Bellco tube 혹은 3온스 Pharmaceutical bottle를 사용했으며 1-5%의 종균을 접종하여 60°C에서 48시간 정지배양하였다.

### DNA 분리와 cloning

Cellobiose를 탄소원으로 한 CM3 배지에서 배양한 균체를 원심분리한 후 0.1% SDS와 30 mg/ml pronase가 첨가된 TE buffer에 현탁시키고 60°C에서 75분간 정치시켜 세포를 용해시켰다. Cell lysate를 동량의 phenol에 1회, phenol과 chloroform(1:1) 혼합액에 2회, chloroform에 2회 추출한 후 2.5배량의 순수 ethanol(-20°C)를 가해 침전시키고 이를 유리막대로 spool해서 건조시켜 TE buffer에 녹여 사용하였다.

*C. thermocellum* 전체 DNA를 Hind III로 부분분해한 후 동일한 제한효소로 처리한 pBR 322와 ligation시켰으며 준비된 *E. coli* 수용균주내로 형질

전환시켰다. Cloning방법은 Molecular Cloning-A Laboratory Manual의 방법(13)을 따랐다.

### Cellulase gene을 가진 *E. coli* 형질전환체 선별

변형된 Theater 등의 congo red 방법을 이용하였다(10). 즉 insertional inactivation이 확인된 재조합 *E. coli* 균주들을 LB agar plate상에 균락을 이룰 때까지 키운 후 0.7% agar와 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)가 함유된 PC buffer(50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 mM citric acid, pH 6.3) 5 ml를 그위에 부었다. Top agar가 굳은 후 60°C에서 3시간 배양한 후 1% congo red 용액을 부어 상온에서 15분간 방치했으며, congo red 용액을 제거한 뒤 1 N NaCl 용액으로 씻은 후 붉게 변한 배지상에서 주위에 노란환을 형성한 균락을 선별했다.

### Cellulase 활성측정 및 효소액 조제

Cellulase 활성은 CMCase 및 FPase 활성으로 나타내었으며 Mandels 등(14)의 방법으로 측정하였다. 즉, endoglucanase(CMCase)의 활성은 1% carboxymethyl cellulose(CMC)용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 30분 동안 반응시킨 후 DNS법(19)으로 생성환원당을 측정하여 결정하였으며, 효소활성은 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{units/ml} = \text{mg glucose} \times 0.37 \times \text{회석배수}$$

전체 cellulase 활성을 나타내는 filter paper(FPase) 활성은 Whatman No. 1 filter paper 50 mg(1×6 cm)을 시험관에 넣고 0.05 M acetate-NaOH buffer(pH 5.0) 1 ml와 효소액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 DNS법으로 생성환원당을 측정하였으며 효소활성은 다음과 같이 나타내었다.

$$\text{units/ml} = \text{mg glucose} \times 0.185 \times \text{회석배수}$$

*E. coli* 형질전환체가 생산하는 CMCase의 성질을 조사하기 위하여 배양액을 초음파 처리하여 얻은 효소추출액을 60°C에서 2시간 열처리한 후 불용성분을 제거한 상등액을 효소액으로 하여 성질을 조사하였다.

### Cellulase의 존재위치 확인

형질전환된 *E. coli*가 생산하는 cellulase의 존재 위치는 Takizawa 등(15)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉, 배양액을 6000×g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 extracellular 효소로 사용하였다. 침전

물은 lysis buffer (lysozyme 0.5 mg/ml, 0.5 M sucrose, 50 mM Tris-HCl buffer, pH 6.5)에 현탁하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 periplasmic 효소로 사용하였다. 침전물은 다시 buffer에 현탁시킨 후 초음파 처리하여 이용액을 cytoplasmic 효소로 사용하였다.

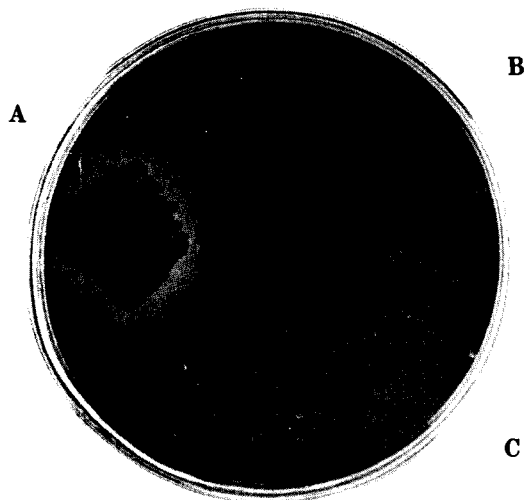
**결 과**

**Cellulase 유전자의 cloning**

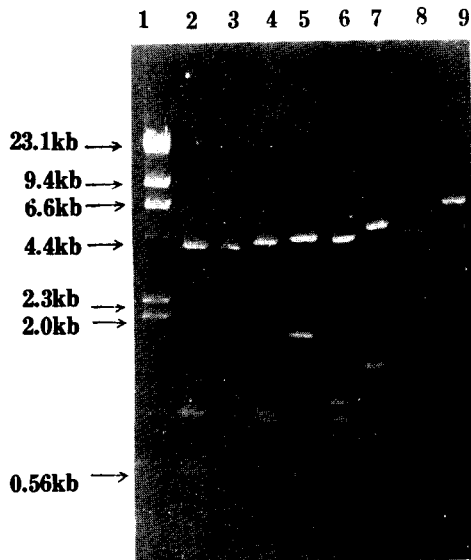
*C. thermocellum*의 전체 DNA를 분리정제하여 Hind III로 부분분해한 후 동일한 제한효소로 분해된 pBR 322와 ligation시킨 후 *E. coli* HB 101 수용균주내로 형질전환시켰다. LB agar 배지에서 Ap<sup>r</sup>, Tc<sup>r</sup>인 형질전환 *E. coli* 균주들을 1500주 선별하여 변형된 Theater 등의 congo red 방법으로 cellulase gene을 표현하는 *E. coli* 1주를 얻었다. Cellulase gene을 가진 형질전환 *E. coli*에 의해 형성된 균락 주위의 노란환은 Fig. 1에 나타나 있다.

**Cellulase 유전자의 제한효소 지도**

재조합된 plasmid를 pJH 11로 명명하고, 6개의 제한 효소 (Eco RI, Bam HI, Hind III, Sal I, Pst I, Xho I)로 분해시켜 제한효소 지도를 작성했다. Hind III로 부분 분해된 뒤 도입된 *C. thermocellum*의



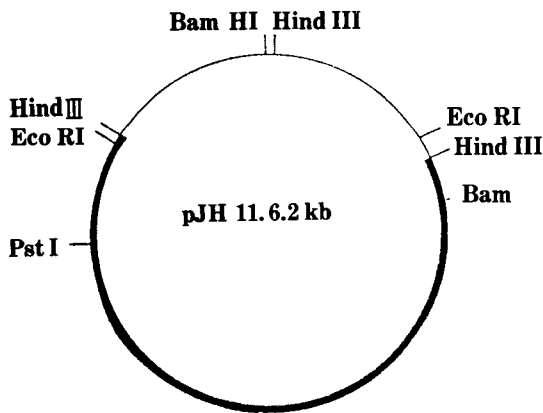
**Fig. 1.** Colonies of *E. coli* strain HB101 producing CMCase activity. A: pJH 11, B: pBR 322, C: No plasmid.



**Fig. 2.** Electrophoresis of pJH 11 digested with various restriction enzymes.

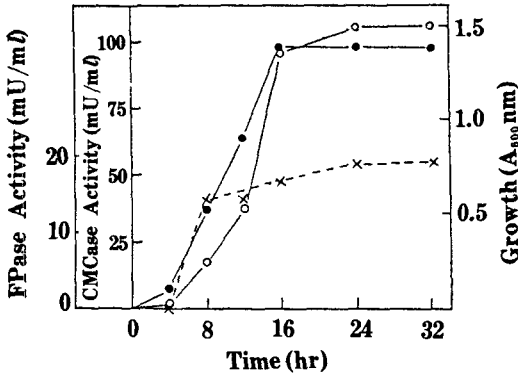
Lane 1: HindIII, λ DNA, Lane 2: BamHI + EcoRI, Lane 3: BamHI + HindIII, Lane 4: HindIII + EcoRI, Lane 5: EcoRI, Lane 6: HindIII, Lane 7: BamHI, Lane 8: HindIII, pBR322, Lane 9: PstI.

DNA 단편은 1.8 kb 정도로서 내부에 Hind III, Bam HI, Eco RI 분해부위가 각각 하나씩 있었으며 Sal I, Xho I, Pst I에 대해서는 분해부위가 없었다. 분해부위가 있는 Hind III, Bam HI, Eco RI의 분해 위치를 알기 위해 2중 분해를 하였으며 (Fig. 2), 이로부터 얻어진 분해지도는 Fig. 3에 나타나 있다.



**Fig. 3.** Restriction map of pJH 11 containing cellulase gene.

The heavy line correspond to pBR322 and the thin line to *C. thermocellum* DNA.



**Fig. 4.** Growth and cellulase production of recombinant *E. coli*. Growth (○ - ○), CMCase activity (● - ●), FPase activity (× - ×).

**형질전환체에 의한 cellulase 생산양상**

형질전환체의 생육에 따른 효소생산량의 변화는 Fig. 4와 같다. 균체의 생육정도에 따라 효소활성이 증가해서 휴지기에 도달한 16시간이후에는 거의 최대치에 이르렀으며 더 이상의 증가가 없었다. 이는 효소활성이 전체 cell mass와 유관하게 증가하는 것으로 세포성장의 전시기에 걸쳐 효소생성이 이루어짐을 보여주고 있다. 효소생성량으로 볼때 *E. coli*가 생산하는 cellulase는 CMCase 활성이 약 99 mU/ml로서 *C. thermocellum*의 CMCase 활성인 158 mU/ml에 비해 약 63%이었다. 그러나 *C. thermocellum*의 경우 α-cellulose를 탄소원으로 했을 때 휴지기에 도달하는 시간이 약 5일인데, *E. coli*는 약 16시간이므로 단위시간당 cellulase 생산량은 *E. coli*가 훨씬 높다는 것을 알 수 있다.

한편, FPase 활성도를 볼때 약 20 mU/ml로서 *C. thermocellum*의 활성인 85 mU/ml에 크게 미치지 못하여 대수증식기에 이미 최대치에 이르는 것으로 나타났다. 이는 단일효소의 두가지 다른 활성 즉 CMCase와 FPase 활성이 세포성장시기에 따라 차이가 남을 보여주는 것으로 흥미있는 연구소재로 사료된다.

**형질전환체에서의 cellulase 존재위치**

*C. thermocellum*은 대부분의 cellulase를 세포외로 분비하는데 (16) 비해 형질전환된 *E. coli*가 생산하는 cellulase의 CMCase 활성은 extracellular 부위에 27%, periplasmic space에 27%, 세포질내에 46%가 존재하는 것으로 나타났다 (Table 1). 그러나

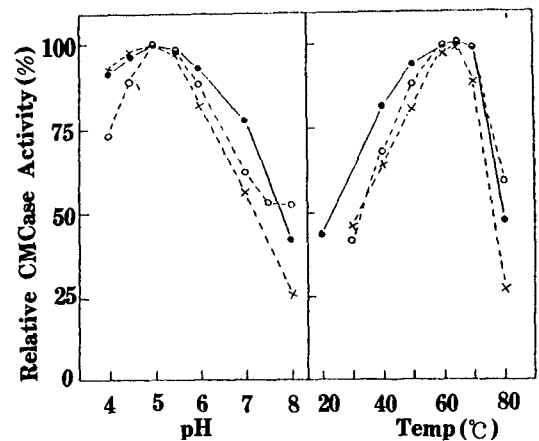
**Table 1.** Distribution of cellulase activity in recombinant *E. coli*.

Localization	CMCase activity (%)	FPase activity (%)
Extracellular	27	34
Periplasmic	27	34
Cytoplasmic	46	32

FPase 활성은 CMCase 활성과는 다소 다른 양상을 보이고 있는데 세포벽을 통과한 extracellular 부위에 34%, periplasmic space에 34%인 반면 세포질내에는 32%로 가장 낮게 나타났다.

**형질전환체에 의해 생산된 cellulase의 특성**

형질전환체에 의해 생산된 CMCase는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 최적온도가 60-70°C, 최적 pH는 5.0 이었다. 또한 이 효소는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 pH 4-6에서 안정하였으며, 각 온도에서 30분간 처리했을때 60°C까지는 매우 안정하였다. 그러나 70°C에서는 약 63%, 80°C에서는 약 36%의 잔존활성을 나타내었다. 이런 성질은 *C. thermocellum*의 crude enzyme이나 분리 정제된 CMCase (17)의 특성과도 흡사하였다.



**Fig. 5.** Effect of pH and temperature on the CMCase activity. ● - ● CMCase activity of *E. coli*, × - × purified CMCase activity of *C. thermocellum*, ○ - ○ Crude CMCase activity of *C. thermocellum*.

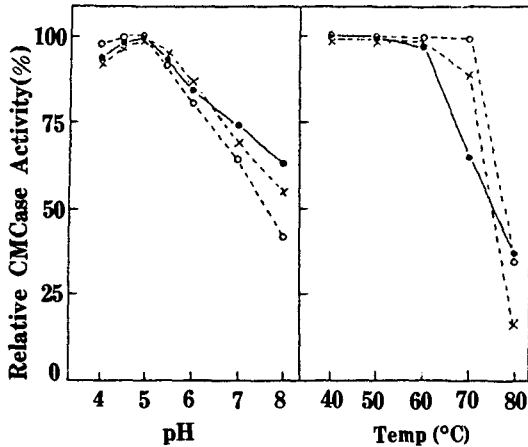


Fig. 6. pH and thermal stabilities of CMCase.

● - ● CMCase activity of *E. coli*, × - × Purified CMCase activity of *C. thermocellum*, ○ - ○ Crude CMCase activity of *C. thermocellum*.

## 고 찰

*E. coli*에 cloning된 후 표현된 *C. thermocellum*의 cellulase gene은 1.8kb의 Hind III 부분분해 단편으로서 내부에 Bam HI, Eco RI, Hind III 분해부위를 하나씩 가진 것으로 밝혀졌다(Fig. 3). 이는 Cornet(10), Joliff 등(11)에 의해 연구되어지고 있는 *cel A, B, D*와는 다른 제한효소 분해양상을 보이므로 이들에 의해 보고되어진 것들과는 다른 *C. thermocellum*의 새로운 cellulase gene으로 사료된다.

한편, Fig. 4에서 나타난 *E. coli*에서의 cellulase gene 표현양상은 생육과 때를 같이하여 전시기를 통해 나타났으며, cellulose 성분의 존재와는 관계없이 cellulase가 생산되는 것이 확인되었다. 이는 기질의 종류에 따라 cellulase의 종류와 생산량이 달라지는 clostridia 경우와는(18) 다른 양상을 보이는 것으로 *E. coli*에서의 cellulase gene 조절기작은 *C. thermocellum*과는 다른 것으로 사료된다. *C. thermocellum*에는 종류가 다른 13개 이상의 *cel* gene이 존재하는 것으로 알려진 사실을 고려해 볼 때(20) 단일종류의 *cel* gene이 cloning된 *E. coli*의 cellulase 생산량은 *C. thermocellum*에 비해 다소 낮은 63% 정도이나 단위시간당 생산량은 cellulose 성분의 존재와는 관계없이 비교적 높은 편이다. 이는 multiple copy로 존재하는 plasmid에 의해 *cel*

gene이 증폭됨과 아울러 *cel* gene의 promotor가 *E. coli* 세포내에서 약하지 않게 표현되기 때문인 것으로 사료된다.

*E. coli*에서 생산된 cellulase의 존재위치에 대한 연구결과는 다른 연구자들의 결과와는 다소 다른 양상을 보이고 있다. Cornet(10)의 경우 *cel A, cel B* gene이 *E. coli*에서 표현된 후 세포외로 거의 분비되지 않는다고 보고하고 있으며, Schwarz(7) 등은 표현된 *cel A* gene 산물의 70%가량이 periplasmic space에 있으나 전체의 10%미만만이 세포외로 분비된다고 보고하고 있다. 이에 비해 본 연구결과(Table 1)는 CMCase 활성은 약 27%, FPase 활성은 34%가 세포외에 존재하는 것으로 나타났다. 이와같이 세포외 활성이 비교적 높은 것은 새로 cloning된 *cel* gene이 *cel A, cel B*와 다름에 기인하는 것으로 사료되나 대량분비의 원인규명은 흥미있는 연구소재가 될 것으로 기대된다.

Fig. 5와 6에 나타난 바와 같이 형질전환된 *E. coli*가 생산한 cellulase의 최적 pH, 최적온도, 열안정성 등은 *C. thermocellum*이 생산하는 조효소의 특성과 거의 일치하고 있으며, 전보에(17) 발표한 cellulase complex로 부터 분리 정제된 CMCase의 특성에도 흡사하였다. 이는 mesophilic 세균인 *E. coli*에 의해 생산된 cellulase의 특성이 *C. thermocellum* 유래의 고온성 cellulase와 거의 동일한 것임을 보여주고 있으며, *E. coli*에서 표현된 cellulase gene이 *C. thermocellum*으로 부터 유래된 것이며 *E. coli* 숙주내에서 생합성된 cellulase의 구조적, 기능적 성질이 변하지 않았음을 시사해 주는 것으로 사료된다.

## 요 약

*Clostridium thermocellum*의 cellulase 유전자를 pBR 322를 이용하여 *Escherichia coli*에 cloning하였다. 삽입된 Hind III 분해 DNA 단편의 크기는 약 1.8kb였으며 이미 알려진 *C. thermocellum*의 cellulase gene과는 다른 제한효소 분해위치를 가진 새로운 cellulase gene으로서 *E. coli*에서 CMCase와 FPase 활성을 나타내었다. 이 유전자는 생육의 전시기를 통해 표현되었고 고온성 cellulase의 구조적, 기능적 특성이 그대로 유지되었을 뿐만 아니라 상당량이 세포외로 분비되었다.

## 사 사

본 연구는 1985-86년도 문교부 대학부설 유전공학 연구소 연구비로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Zeikus, J.G.: *Enzyme Microb. Technol.* **1**, 243 (1979).
2. Cooney, C.L., D.I.C. Wang, S.D. Yang, J. Gordon and M. Jiminez: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **8**, 103 (1978).
3. Saddler, J.N. and A.W. Khan: *Can. J. Microbiol.* **26**, 760 (1980).
4. Lamed, R., R. Kening and E. Setter: *Enzyme Microb. Technol.* **7**, 37 (1985).
5. Ng, T.K. and J.G. Zeikus: *Biochem. J.* **119**, 341 (1981).
6. Petre, J., R. Longin and J. Millet: *Biochimie* **63**, 629 (1981).
7. Schwarz, W.H., F. Gräbnitz and W.L. Staudenbauer: *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1293 (1986).
8. Johnson, E.A., M. Sakajoh, G. Halliwell, A. Madia and A.L. Demain: *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1125 (1982).
9. Ng, T.K. and J.G. Zeikus: *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 231 (1981).
10. Cornet, P., J. Millet, P. Béguin and J.-P. Aubert: *Bio/Technology* **1**, 589 (1983).
11. Joliff, G., P. Béguin, M. Juy, J. Millet, A. Ryter, R. Poljak and J.-P. Aubert: *Bio/Technology* **4**, 896 (1986).
12. Macy, J.M., J.E. Snellen and R.E. Hungate: *Amer. J. Clin. Nutr.* **25**, 1318 (1972).
13. Maniatis, T., F.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York. (1982).
14. Mandels, M., R. Andreotti and C. Roche: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 21 (1976).
15. Takizawa, N. and Y. Murooka: *Agr. Biol. Chem.* **48**, 1451 (1984).
16. Lamed, R., E. Setter and E.A. Bayer: *J. Bacteriol.* **156**, 828 (1983).
17. Kim, U.H., J.H. Ha, K.T. Chung and Y.H. Lee: *Kor. J. Microbiol.* **25**, 157 (1987).
18. Johnson, E.A., E.T. Reese and A.L. Demain: *J. Appl. Biochem.* **4**, 64 (1982).
19. Miller, G.L.: *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).
20. Ronanec, M.P.M., N.G. Clarke, and G.P. Hazlewood: *J. Bacteriol.* **133**, 1297 (1987).

(Received August 19, 1987)