

Pseudomonas sp. β -1,4-Glucosidase 유전자의 *Escherichia coli*와 *Bacillus subtilis*에의 Cloning 및 발현

김양우* · 전성식 · 김석재 · 정영철¹ · 성낙계
경상대학교 식품공학과, ¹진주전문대학 식품영양과

Cloning and Expression of β -1,4-Glucosidase Gene from *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*

Kim, Yang-Woo*, Sung-Sik Chun, Serk-Jae Kim,
Young-Chul Chung¹ and Nack-Kie Sung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang
National University, Chinju 660-701, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Chinju Technical College, Chinyang Munsan 127, Korea

Abstract — For the purpose of producing glucose from cellobiose or oligo saccharide and obtaining genetic information of β -1,4-glucosidase gene, a β -1,4-glucosidase gene of *Pseudomonas* sp. LBC505, potent cellulase complex and xylanase producing strain, was cloned in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* into pUC19 and pBD64, respectively. Recombinant plasmid pGL1 contained 1.2 kb *EcoRI* fragment was isolated from transformants forming blue color around colony on LB agar plate containing 20 μ g/ml of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside(X-glu) and ampicillin. The recognition sites of the 1.2 kb fragment contains one *SacI* and two *AluI* sites. The pGL1 was hybridized to the pattern of *EcoRI*-digested chromosomal DNA from *Pseudomonas* sp. LBC505. Immunodiffusion assays revealed that pGL1-encoded β -1,4-glucosidase showed homology with that of host strains. Enzyme activity was not influenced by the reverse orientation of 1.2 kb insert in pGL1, indicating that it contained a promoter of β -1,4-glucosidase gene cloned. The biosynthesis of β -1,4-glucosidase of pGL1 was derepressed in the presence of glucose. β -1,4-Glucosidase activity was observed in intracellular (37%), periplasmic (51%) and extracellular (12%) of *E. coli* carrying pGL1, and its activity was about 1.5 times higher than that of original cell for the gene.

Cellulase는 유용물질의 생산을 위한 산업적인 면 이외에도 작용양식의 특이성 때문에 학문적으로도 중요한 의미를 갖고 있으며, 그 중 β -1,4-glucosidase(EC 3.2.1.21)는 endo- β -1,4-glucanase(EC 3.2.1.4)와 exo- β -1,4-glucanase(EC 3.2.1.91)의 synergistic effect에 의해 유리되는 cellobiose와 oligosaccharide를 glucose 단위로 절단하는 효소로서 cellulose를 유용발효기질로 이용하기 위해서는 반드시 필요한 효소이다(1). Cellobiose가 glucose로 전환되는 대사는 단순히 가수분해 반응으로 cellobiose를 단당류로 전환하는 것과 인산화

반응(Pi-phosphorylisis)으로 glucose와 glucose-1-phosphate를 생성하는 과정 그리고 ATP-phosphorylisis로 glucose와 glucose-6-phosphate, ATP를 생성하는 세가지가 존재하는데 발효기질의 이용목적으로는 가수분해 반응으로 cellobiose를 분해시키는 효소로서 cellulose를 유용 발효기질로 이용하기 위해 이 효소의 유전자가 필요하다.

β -1,4-Glucosidase 유전자의 cloning에 관한 보고는 Donald 등(2)은 *Caldocellum saccharolyticum*, Kim 등(3)은 *Cellulomonas fimi*의 β -1,4-glucosidase 유전자를 *E. coli*에 cloning한 것을 보고하였으며, Penttila 등(4)은 이들 유전자를 효모에서 발현시켜 발효수율을 증대시켰으며 Misawa 등(5)과 Stephen 등(6)은 *Zymomonas*

Key words: β -1,4-glucosidase gene, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*

*Corresponding author

*mobilis*에서 발현시킨 결과를 보고하였다.

본 연구는 cellulase complex와 xylan계 분해효소를 생산하는 *Pseudomonas* sp. LBC505로부터 β -1,4-glucosidase 유전자를 *E. coli*에 cloning하여, 이 유전자의 특성을 조사한 다음 *B. subtilis*에 발현시켜 효소 생성능이 증가된 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

Pseudomonas sp. LBC505는 본 연구실에서 토양으로부터 분리한 균주로서 cellulase complex를 생성하여 β -1,4-glucosidase gene source균으로 사용하였다. *E. coli* JM109[*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyr96 relA1 thiD(lac-proAB) F'traD36 proAB⁻ lacI^q lacZ Δ M15*]와 *B. subtilis* RM141(*arg15 leu B8 hisA1 r, m*)가 host로 이용되었고, pUC19, pBD64는 *E. coli*와 *B. subtilis*의 cloning vector로 각각 사용되었다.

배지 및 배양

*E. coli*와 *B. subtilis*는 LB배지(Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 5 g/l)에서 37°C로 진탕 배양하였고 *Pseudomonas* sp. LBC505는 변형된 PY-CMC 배지(CMC, 1%; yeast extract, 0.5%; polypeptone, 0.3%; (NH₄)₂SO₄, 0.2%; NaCl, 0.5%; K₂HPO₄, 0.2%; MgSO₄·7H₂O, 0.05%; CaCl₂, 0.04%; FeSO₄·7H₂O, 0.002%; MnSO₄·H₂O, 0.001%)(7)에서 37°C로 진탕배양하였으며 그리고 *E. coli* JM109의 형질전환체 분리를 위한 선택배지로서는 MacConkey agar 배지가 사용되었다. β -Glucosidase 활성을 보이는 형질전환체 분리시에는 ampicillin과 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside(X-glu)를 함유한 LB배지를 사용하였다. 본 실험에서 재조합된 plasmid를 분리할 때 ampicillin(50 μ g/ml), kanamycin(50 μ g/ml), chloramphenicol(10 μ g/ml)을 필요에 따라 각각 첨가하였다.

β -1,4-Glucosidase 유전자의 cloning

Pseudomonas sp. LBC505의 염색체 DNA를 *EcoRI*로 절단하여 15~30% sucrose gradient로 1~10 kb 단편으로 분획한 5 μ g과 동일 효소로 절단하여 alkaline phosphatase로 처리한 pUC19 2.5 μ g을 T4 DNA ligase (Takara, Japan)로 12.5°C에서, 24시간 ligation하여 *E. coli* JM109의 competent cell에 형질전환시켜 ampicillin이 50 μ g/ml 함유된 MacConkey 고체배지에 도말

하여 37°C에서 36시간 배양하였다. 이때 흰색 colony를 형성하는 균주를 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside(X-glu) 20 μ g/ml과 ampicillin이 함유된 LB 고체배지에 이식하여 37°C에서 40시간 이상 배양하였을 때 청색을 나타내는 균주를 β -glucosidase gene을 함유하고 있는 형질전환체로 선발하였다.

Pseudomonas sp.의 염색체 DNA는 proteinase K(1 mg/ml; Sigma)와 RNase(20 μ g/ml, type II-A; Sigma)를 처리하는 것을 제외하고는 Miura법(8)에 준하였으며 plasmid의 대량정제는 Maniatis 등(9)의 방법, 그리고 재조합체를 함유하고 있는 plasmid의 신속한 분리는 Birnboim과 Doly의 방법(10)을 사용하였다.

DNA상동성 검정

Agarose gel상의 DNA 단편의 nitrocellulose filter에의 고정은 Southern의 방법(11), 그리고 DNA hybridization 실험은 Boehringer Mannheim사의 nonradioactive immunoassay kit를 사용하여 Maniatis 등의 방법(9)을 준용하였다.

면역학적 방법

Pseudomonas sp. LBC505를 PY-CMC 배지에서 37°C로 36시간 배양한 후 원심분리한 상청액에 4배의 차거운 ethanol(95%)을 첨가시킨 다음 침전액 1 ml (CMCase activity, 5.0 unit)를 complete Freund's adjuvant 1 ml과 잘 혼합하여 토끼에 주사하였다. Booster injection은 최초 주사 후 4주와 6주 후에 동일 방법으로 행하였고, 분리된 혈청은 Johnstone 등의 방법(12)에 따라 immunodiffusion 실험을 행하였다.

효소활성도 및 localization

β -1,4-Glucosidase 활성은 p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)를 사용하여 Kohchi 등의 방법(13)에 따랐다. 재조합체를 함유하고 있는 *E. coli*와 *B. subtilis*를 37°C에서 36시간 배양하여 조제한 조효소액 1 ml과 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.5)로 용해한 4 mM PNPG 1 ml을 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시킨 액에 0.5 M Na₂CO₃ 2 ml을 가하여 반응을 정지시킨 다음 원심분리한 상청액을 400 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 p-nitrophenol을 표준곡선에서 정량하였다. 효소활성단위는 μ M-PNP/ml·min로 표시하였다.

균체외 효소, periplasmic 효소, 균체내 효소의 분획은 Cornelis 등의 방법(14)으로 행하였다.

형질전환

*E. coli*의 형질전환은 Mandel과 Higa 등이 사용한 competent cell 방법(15)으로 행하였다.

*B. subtilis*의 형질전환은 Lenderberg와 Cohen 등의 protoplast에 의한 방법(16)으로 행하였다.

결과 및 고찰

pUC19에의 β-1,4-glucosidase gene의 클로닝

Pseudomonas sp. LBC505의 염색체 DNA를 *EcoRI*로 절단한 염색체 DNA 5 μg과, 동일효소로 절단하여 alkaline phosphatase로 처리된 pUC19 2.5 μg을 ligation시킨 후 형질전환시켜 ampicillin이 함유된 MacConkey 고체배지에서 37°C에서 36시간 배양하였다. 이때 pUC19의 *lacZ* gene site에 존재하는 *EcoRI* 부위에 외래 DNA가 삽입되어 흰색을 형성하는 3×10⁴개 콜로니를 1차 선발하여 X-glu 20 μg/m²과 ampicillin이 함유된 고체 배지에 이식하여 37°C에서 48시간 이상 배양하였을 때 β-1,4-glucosidase 활성으로 5-bromo-4-chloro-3-indolyl의 분해물이 생성되어 청색을 나타내는 4개 균주를 선발하였다. 효소활성이 비교적 높은 재조합 plasmid pGL1과 pGL2를 분리하였는데 이들의 외래 DNA 단편의 크기는 각각 1.2 kb와 4.2 kb로 나타났다.

pGL1을 10종의 제한효소로 single과 double digestion을 한 후 각 절편을 전기영동하였을 때 Fig. 1과 같이 *SacI* 인식부위는 하나, *AluI* 인식부위는 두개 존재함을 알 수 있었다.

DNA 상동성검정

pUC19에 구축된 pGL1의 1.2 kb *EcoRI* 절편이 유전자 공여균주인 *Pseudomonas* sp. LBC505에서 유래된 것인가를 확인하기 위하여 Boehringer Mannheim사 제품인 Nonradioactive immunoassay kit의 deoxyuridin-triphosphate에 재조합 DNA를 *EcoRI*로 절단한 후 labeling한 probe와 *EcoRI*로 절단한 LBC505 염색체 DNA와의 상동성을 조사하여 본 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 상동성이 인정되었다.

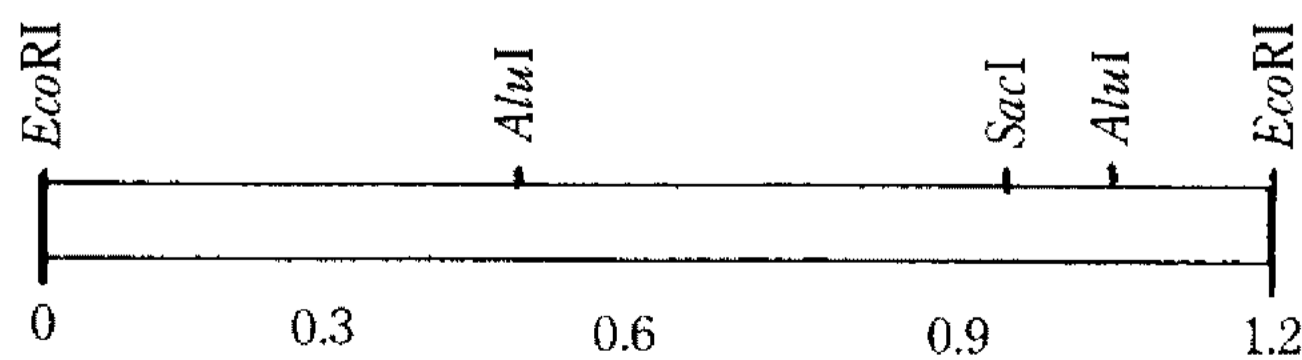


Fig. 1. Restriction map of β-1,4-glucosidase gene (1.2 kb).

Immunodiffusion assay

Pseudomonas sp. LBC505의 조효소액을 토끼에 주사하여 얻은 항체에 대하여 pGL1과 pGL2를 함유한 *E. coli* JM109가 생산하는 β-1,4-glucosidase, *Cellulomonas fimi*의 조효소 그리고 *Trichoderma viride*의 조효소 등과 immunodiffusion시킨 결과 pGL1과 pGL2에는 강한 침강선을 형성하였나, *T. viride*와 *C. fimi*와는 침강선을 형성하지 못하는 것으로 보아(Fig. 3) 클로닝된 *Pseudomonas* sp. LBC505의 β-1,4-glucosidase는 *T. viride*나 *C. fimi*의 효소와는 상이한 것으로 추측된다.

효소활성 및 localization

pGL1과 pGL2를 각각 함유하고 있는 *E. coli* JM109를 ampicillin이 함유된 LB배지에서 37°C로 36시간 배양하여 *E. coli* 세포내, periplasmic, 혹은 균체외에 효소가 존재하는가를 전술한 방법에 따라 조사한 결과는 Table 1과 같다.

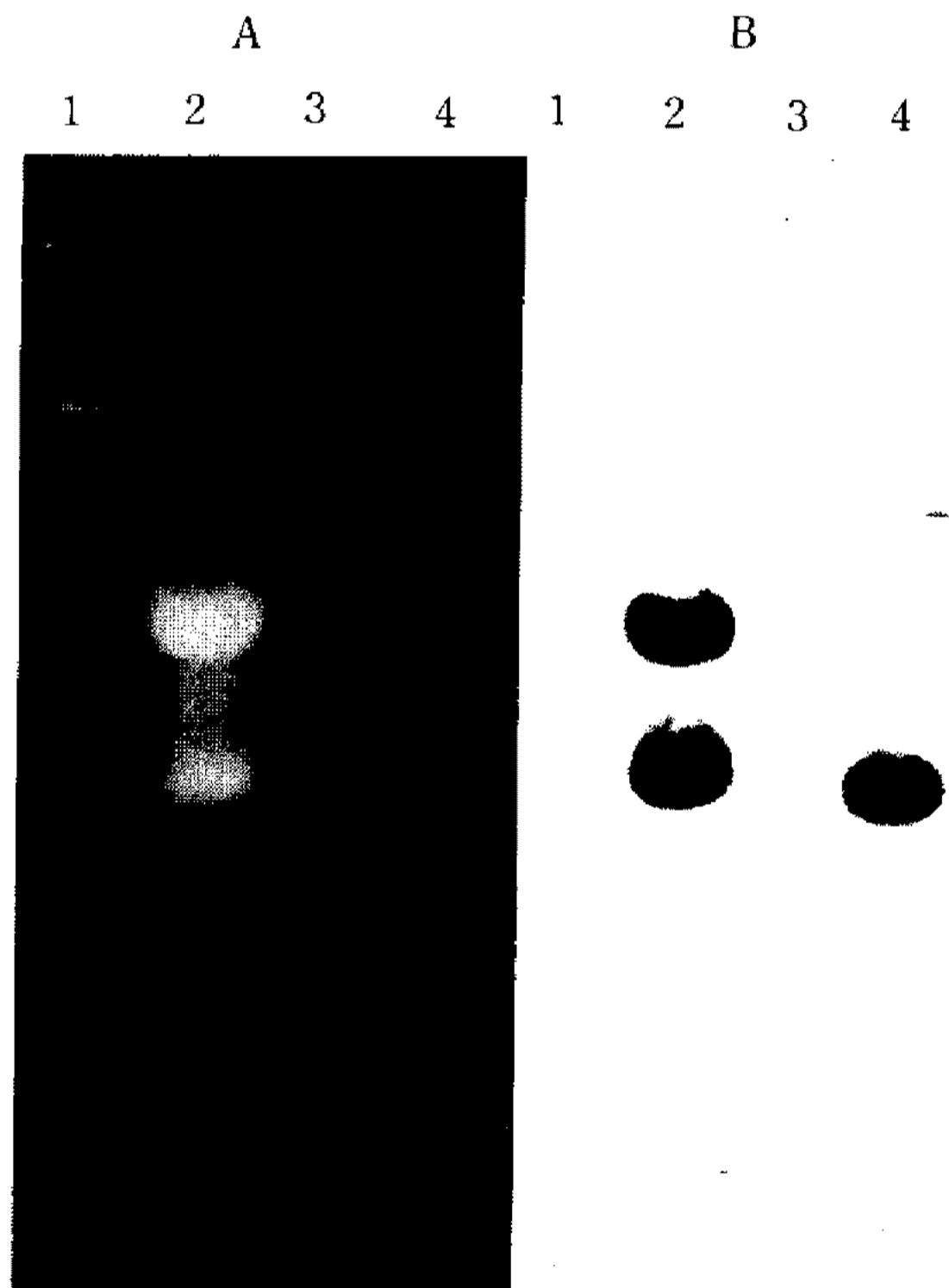


Fig. 2. Homology between pGL 1 and chromosomal DNAs.

A: Agarose (0.8%) gel electrophoresis of digests of various DNAs. lane 1: DNA-*HindIII*, lane 2: pGL1-*EcoRI*, lane 3: *E. coli* JM109 DNA-*EcoRI*, lane 4: *Pseudomonas* sp. LBC505 DNA-*EcoRI*
 B: Hybridization analysis by the Southern transfer from the gel A.

2개의 재조합체 중 pGL1의 효소활성은 친주보다 1.5배 높았고, pGL2는 약간 낮게 나타났다. 또한 *E. coli*에서 발현된 다른 대부분의 β -1,4-glucosidase 유전자의 연구결과와 비슷하게 많은 양의 효소가 periplasmic 분획과 세포내에서 검출되었고, 세포외로 분비되는 비율은 비교적 낮았다.

β -1,4-Glucosidase 유전자의 *B. subtilis*에의 도입
 재조합체 pGL1의 효소활성은 친주보다 약간 높았고

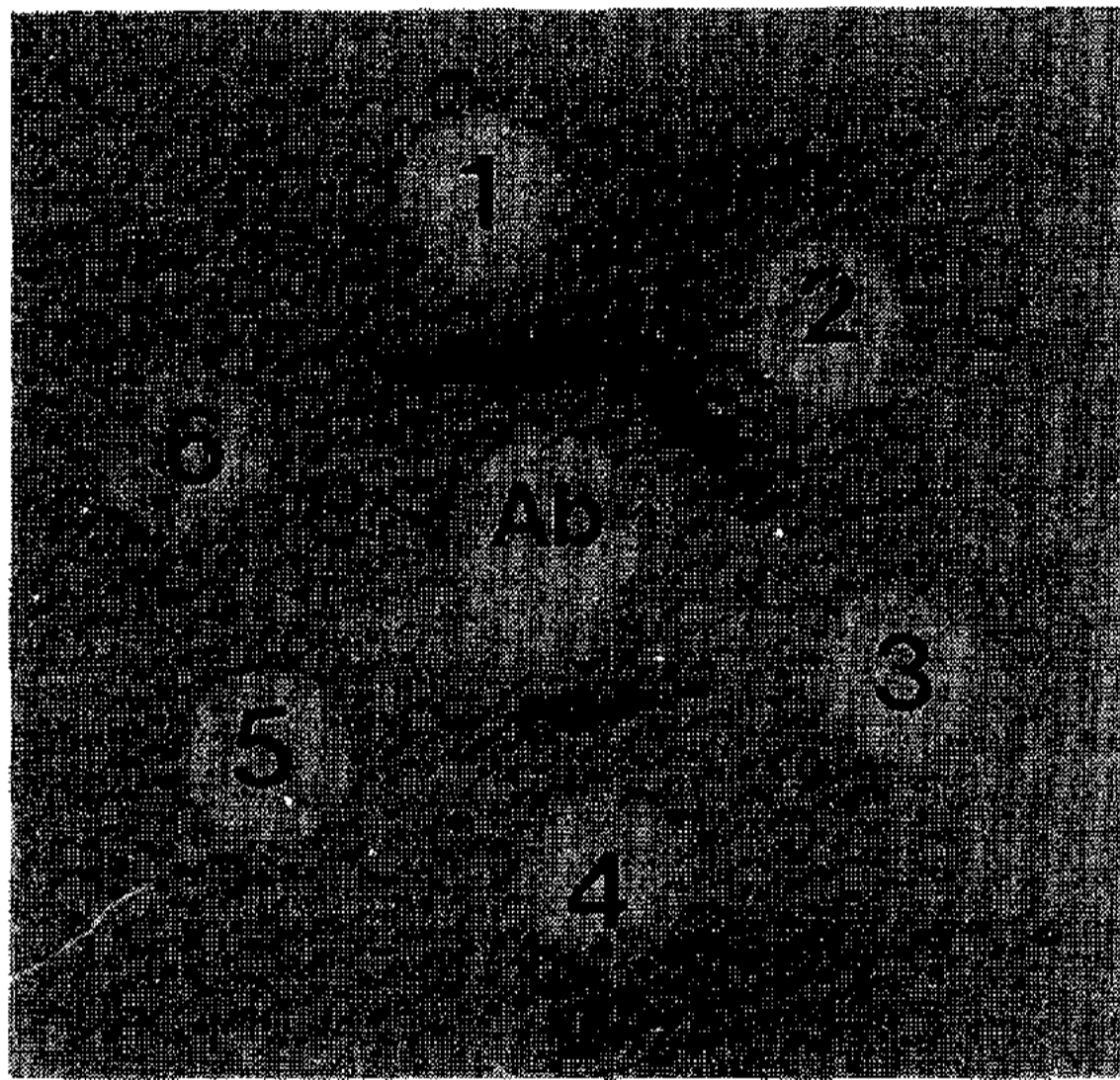


Fig. 3. Ouchterlony double immunodiffusion assay.
 Ab, antiserum to the purified enzyme of *Pseudomonas* sp. LBC505, well 1: crude enzyme of *Pseudomonas* sp. LBC505, well 2: crude enzyme of *E. coli* carrying pGL1, well 3: periplasm fraction of *E. coli* JM109 carrying pUC19, well 4: crude enzyme of *E. coli* carrying pGL2, well 5: crude enzyme of *T. viride*, well 6: crude enzyme of *C. fimi*.

또한 대부분의 효소활성은 세포내와 periplasmic 분획에서 검출되었기 때문에 세포외로 효소분비를 촉진시키고 *B. subtilis*에서 효소생성능을 조사하기 위하여 *Bacillus* 벡터인 pBD64에 삽입시켜 *B. subtilis* RM141의 형질전환을 실시하였다. 20 μ g/ml의 X-glu와 chloramphenicol, kanamycin이 첨가된 LB배지에서 37°C로 24시간 배양했을 때 청색을 형성하는 균주에서 재조합 plasmid pBGL40을 분리하였다. *E. coli*와는 달리 pBGL40을 가지는 *B. subtilis*는 다른 연구자들의 보고(17)와 동일하게 세포외로 효소를 분비하였으며 효소활성도 pGL1보다 1.6배 증가하였다(Table 1).

기질 특이성

Gene source균인 *Pseudomonas* sp. LBC505는 CMC-ase, avicelase, β -1,4-glucosidase, 그리고 xylanase를

Table 2. Substrate specificity of β -1,4-glucosidase encoded by pGL1 and pGL2

Substrate	Enzyme activity (unit)	
	pGL1	pGL2
CMC	—	—
Laminarin	—	—
Avicel	—	—
Xylan	—	—
PNPG	6.35	4.10
PNPX	—	—
Cellobiose	5.24	3.28

PNPG: p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNPX: p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, *E. coli* JM109 was cultured in LB for 36 hrs at 37°C

Table 1. Activity and distribution of β -1,4-glucosidase in *E. coli* and *B. subtilis* carrying plasmids

Strains and plasmids	β -1,4-glucosidase activity (U) ^a			
	Total	Extracellular (%)	Periplasmic (%)	Intracellular (%)
<i>E. coli</i>				
pUC19	—	—	—	—
pGL1	6.35	0.76(12)	3.24(51)	2.35(37)
pGL2	4.10	0.21(5)	1.72(42)	2.17(53)
<i>B. subtilis</i>				
pBD64	—	—	—	—
pBGL40	10.20	10.20(100)	—	—
<i>Pseudomonas</i> sp. LBC505	3.97	3.97(100)	—	—

Strains were aerobically grown for 36 hrs.

^aOne unit is defined as the amount of enzyme which liberated 1 μ mol of p-nitrophenol per min from PNPG
 —: not determined

분비하므로 기질에 대한 특이성을 조사하므로써 클로닝된 β -1,4-glucosidase gene이 어떤 gene을 encoding하고 있는지를 알 수 있다. 각 재조합체가 들어 있는 *E. coli* JM109를 LB배지에서 37°C로 36시간 배양하여 원심분리한 상청액을 조효소로 하여 각 기질에 대한 특이성을 조사한 결과 Table 2와 같이 pGL1과 pGL2는 PNPG와 cellobiose에서만 효소활성을 보였고, β -1,3-linkage를 가지는 laminarin이나 β -1,4-linkage를 가지는 CMC, avicel, xylan 및 PNPX 등에서는 효소활성이 검출되지 않았다.

요 약

섭유성 biomass의 효소적 가수분해시에 endo- β -1,4-glucanase와 exo- β -1,4-glucanase의 작용으로 유리되는 cellobiose 또는 oligosaccharide를 glucose 단위로 절단하는 β -1,4-glucosidase 유전자를 분리하여 분자수준에서 정보를 얻고자 *Pseudomonas* sp. LBC 505의 염색체 DNA를 *EcoRI*으로 절단하여 shot gun 방법으로 pUC19를 이용하여 *E. coli*에 형질전환시켜 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucopyranoside(X-glu)가 함유된 배지에서 청색을 형성하는 4개의 colony 중에서 2개의 재조합체 pGL1과 pGL2를 분리하였다. 이들은 각각 1.2 kb와 4.2 kb *EcoRI* insert를 함유하고 있었는데 pGL1의 1.2 kb 단편은 *SacI* 인식 부위는 하나, *AluI* 인식부위는 두개 존재하였고 이 단편에 dioxigenin labeled deoxyuridin triphosphate을 반응시켜 얻은 probe와 *Pseudomonas* sp. LBC505 염색체 DNA를 hybridization하였을 때 강한 상동성이 인정되었고 또한 면역학적 실험에서도 침강선이 형성되어 cloning된 β -1,4-glucosidase 유전자는 *Pseudomonas* sp. LBC505 유래임이 확인되었다. *E. coli*에서 pGL1의 효소활성은 모균주에 비하여 1.5 배 증가되었고 pGL2는 비슷한 수준이었으나 두 재조합체 모두 세포내와 periplasmic 분획에서 거의 검출되었다. 그리고 pBD64에 subcloning된 pBGL40은 *Bacillus subtilis*에서 효소활성이 pGL1보다 약 1.6 배 증가되었다. pGL1의 β -1,4-glucosidase의 효소적 특성은 모균주와 동일하였고 그리고 PNPG와 cellobiose 기질에서만 활성을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 1990년도 교육부 지원 유전공학 학술연

구조성비에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bisaria, V.S. and T.K. Ghose. 1981. Biodegradation of cellulosic materials: substrate, microorganisms, enzymes and products. *Enz. Microbiol. Technol.* **3**: 90-104.
2. Love, D.R. and M.B. Streiff. 1987. Molecular of a β -glucosidase gene from an extremely thermophilic anaerobe in *E. coli* and *B. subtilis*. *Biotechnol.* **5**: 384-387.
3. Kim, H.K. and M.Y. Paek. 1989. Cloning and Expression of *Cellulomonas fimi* β -glucosidase genes in *E. coli*. *Enz. Microb. Technol.* **11**: 313-316.
4. Penttila, M.E., K.M. Helena, A. Raynal and J.K.C. Knowls. 1984. Cloning of *Aspergillus niger* genes in yeast-Expression of the gene coding *Aspergillus* β -glucosidase. *Mol. Gen. Genet.* **194**: 494-499.
5. Misawa, N. and K. Nakamura. 1989. Expression and stability of a β -glucosidase gene of *Ruminococcus albus* in *Z. mobilis*. *Agr. Biol. Chem.* **53**(3): 723-727.
6. Stephen, P.S., F. Delaney and P.L. Rogers. 1989. Cloning and expression a β -glucosidase gene from *Xanthomonas albilineans* in *E. coli* and *Z. mobilis*. *J. Bacteriol.* **9**: 139-152.
7. Horikoshi, K., M. Nakao, Y. Kurono and N. Sashihara. 1984. Cellulases of an alkalophilic *Bacillus* strain isolated from soil. *J. Microbiol.* **30**: 774-779.
8. Saito, H. and K. Miura. 1963. Preparation of transforming DNA by phenol treatment. *Biochem. Biophys. Acta.* **72**: 619-629.
9. Maniatis, R., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning. Pp86. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
10. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extract procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
11. Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
12. Johnstone, A. and R. Thorpe. 1982. Immunochromatography in practice in precipitation techniques in agar and agarose. Pp131. Blackwell Scientific Publication Co., Oxford London.
13. Kohchi, C. and A. Tohe. 1986. Cloning of *Candida pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 89-94.

14. Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemat. 1982. Cloning and expression of a *B. coagulans* amylase gene in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* **186**: 507-517.
15. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159-162.
16. Lederberg, E.M. and S.N. Cohen. 1974. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **119**: 1072-1074.
17. Rehm, H.T. and G. Reed, *Biotechnology*, Vol. 3: Biomass, microorganism for special applications, microbial product, energy from renewable resources. Pp. 293. Weinheim. Deerfield Beach, Florida, Basel.

(Received February 6, 1993)