

목질계 Cellulose로부터의 Ethanol의 경제적인 생산공정을 위하여 분자진화에 의한 활성이 획기적으로 증가된 Cellulase의 대량 발현공정 개발

† 강 환 구 · 정 종 식 · 김 형 식 · 김 범 창 · 윤 지 선 · 박 형 수
한남대학교 나노생명화학공학과
(접수 : 2006. 8. 23., 게재승인 : 2006. 11. 14.)

The Development of Expression Process Leading to Ethanol Production with Highly Active Cellulase Modified by Directed Evolution

Whan-Koo Kang, Jong-Sik Jeung, Hyang-Sik Kim, Bum-change Kim, Ji-Sun Yun, and Hyang-Su Park
Department of Chemical Engineering & Nana-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea
(Received : 2006. 8. 23., Accepted : 2006. 11. 14.)

Although Energy demands of modern society increase rapidly, curent energy would be exhausted shortly. Therefore development of bio-ethanol production process from cellulose containing materials was extremly demanded. Therefore development of highly functional cellulase is requisite for this purpose. In this study cellobio-hydrolase (CBH1) gene from *Trichoderma reesei* was used to increase cellulase activity by directed evolution and highly functional cellobio-hydrolase was obtained and characterized.

Key Words : Cellulase, bio-ethanol, directed evolution, energy, cellulose

서 론

현대사회는 경제규모의 팽창에 따라 급격히 에너지 수요가 증대하고 있으나 에너지의 대부분을 차지하고 있는 석탄, 석유 그리고 천연가스 등 화석연료는 매장량이 지역적으로 편중되어 있으며 언젠가는 고갈될 수밖에 없는 한계성을 지니고 있다. 특히 화석연료는 연소과정에서 발생되는 CO₂, NO_x, SO_x 등의 공해물질로 환경오염과 지구의 온난화 현상 등 심각한 공해문제를 야기시키고 있다. 그래서 지속 가능한 청정 대체에너지의 개발이 절실히 요구되고 있는데, 현재 개발하고 있는 에너지원 중에 biomass (농작물, 목재 폐기물, 동물비료와 수생식물 등을 포함하는 식물성 물질)를 이용한 에너지는 biomass가 광합성에 의해 생산되기 때문에 재생 가능한 최고 에너지원의 하나로 꼽히고 있다. 특히 목질계 biomass는 지구상에서 가장 풍부한 자원으로 이를 이용한 연료용 에탄올로의 전환을 위한 기술개발에 많은 관심이 기울여지고 있다. 미국에서 2001

년에 발표된 예산자료에 따르면 2001년 한해에만 crop, tree, 그리고 다른 biomass를 fuel로 바꾸는 연구에 3000억 원 이상이 배정되어 DOE와 USDA에 지원하고 있는데 결국 DOE의 목표는 화석연료를 대체하는 biomass based 연료를 만드는데 있다. 이중 DOE의 2001년 최대목표는 activity가 높고 값싼 cellulase system을 개발하여 cellulose를 값싼 sugar로 만들어 bioenergy와 bio-based chemical을 만드는데 있다. 본 연구에서는 *Trichoderma reesei*로부터의 cellobiohydrolase (CBH1) gene을 이용하여 분자진화 방법을 이용한 활성이 증가된 분자진화 cellulase를 구하려 하였다. 효소의 활성을 증가시키기 위한 이러한 연구는 효소의 활성이 현재 활성 대비 커다란 증가가 없으면 원가경쟁력을 가질 수 없기 때문에 효소의 활성을 극대화하기 위해 일부 site directed mutagenesis에 의한 방법으로 진행되어왔다. 그러나 획기적으로 cellulase를 변화시키기 위해서는 원하는 방향으로의 유전자 다양성을 얻기 위한 방향적 분자진화 (directed molecular evolution)의 방법이 이용되어야 하며 지금까지 조사한 바에 의하면 아직 분자진화에 의한 cellulase 활성증가 연구는 보고된 바 없어 이의 신규성과 파급효과는 크다고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 활성이 획기적으로 증가된 개량형 cellulase의 개발을 진행하였다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering & Nana-Bio Technology, The University of Hannam, Daejeon 306-791, Korea

Tel : +82-42-629-7932, Fax : +82-42-623-9489

E-mail : whankoo@hanmail.net

재료 및 방법

Cellobiohydrolase (CBH) I 유전자의 확보

Cellobiohydrolase (CBH) I 유전자의 확보는 CBH I 유전자 cellulase 생산균주인 *Trichoderma reesei*를 배양, 수거하고 액체 질소를 이용하여 세포를 파쇄하였다. RNA prep kit를 이용하여 파쇄된 cell에서 RNA를 얻었으며, RT-PCR kit를 이용하여 CBH I gene을 합성하였다.

CBH I 유전자 cloning

CBH I 유전자 cloning은 RT-PCR에서 얻은 CBH I fragment를 5', 3' primer를 이용하여 PCR하였고 PCR product를 Xba I과 Sal I 제한효소로 처리한 후 발현벡터인 pYGAL에 cloning하였다.

CBH I 단백질 발현

재조합된 벡터가 안정한 형태로 도입된 균주를 선택하기 위하여 glucose 20 g/L, yeast nitrogen base (YNB) 6.7 g/L, amino acid 200 mg/L (histine 첨가)가 포함된 최소배지에서 재조합 벡터가 도입된 각 균주를 배양하였다. 최소배지 후 다시 복합배지에서 배양하는 단계를 3회 반복하여 벡터가 안정된 형태로 들어간 균주를 선택하였다.

최소배지 배양을 통하여 얻어진 균주들의 발현량 확인을 위한 기초적인 회분식 실험을 위하여 플라스크 배양을 진행하였는데, 플라스크로는 500 ml의 baffled flask를 이용하고 100 ml의 배지에 최소배지에서 선택된 균주를 접종한 후 250 rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. *S. cerevisiae* GAL promoter 배지조성은 yeast extract 20 g/L, glucose 20 g/L, galactose 30 g/L를 사용하였다.

CBH I 활성을 증대시키기 위한 분자진화 방법 개발

본 실험에서 error율을 높이기 위하여 사용한 PCR 조성은 CBH I template (plasmid 또는 PCR product), 10 X mutagenic buffer (70 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.1% gelatin), 10 X dNTP (2 mM dGTP, 2 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP), 각각 30 pmol의 primer, MnCl₂, Taq polymerase 5 U을 넣고 PCR을 수행하였다.

Error prone PCR을 통하여 선별된 cellulase 변이체를 대상으로 다시 DNA shuffling을 수행하였다. 선별된 cellulase 변이체에서 얻어진 CBH I 유전자를 같은 DNA 양으로 혼합 후 10 X digestion buffer (500 mM Tris-HCl (pH7.4), 100 mM MnCl₂)와 DNaseI 0.2 unit을 넣고 15°C에서 10분간 처리하여 100 bp 이하의 조각을 만들고 agarose gel로 수거, 정제하였다. 수거, 정제된 유전자 조각들을 Pfu polymerase를 이용하여 primer 없이 PCR하여 유전자들을 reassembly 하였다. Reassembly 조건은 정제된 DNA fragment, 10 X Pfu buffer, 0.4 mM dNTP, 1.25 unit Pfu polymerase를 혼합 후 96°C 2min, 60cycles (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min + 5 s/cycle), 72°C 10 min으로 하였다. Reassembly하여 얻어진 DNA를 template로 하여 5', 3' primer를 넣고 다시 PCR을 하여 shuffling된 CBH I 유전자를 얻었다. 얻은

CBH I 유전자를 발현 벡터에 삽입하고 효모에 transformation하여 이것을 다시 screening하였다.

CBH I 변이체의 screening 방법 개발

Trypan blue 염색법에 의한 cellulase 변이체 preliminary screening CBH I의 활성을 분석하기 위해서 modified trypan blue 방법을 최적조건으로 개선하였으며, 분석에 사용된 평판의 조성은 1.0% CMC (carboxymethyl cellulose) pH 4.5, 2.0% agar를 사용했다. 개선된 효율적인 trypan blue 평판 screening 방법은 다음과 같다. *S.cerevisiae* Y2805 (GAL promoter) original CBH I 발현 균주와 error-prone PCR과 DNA shuffling 방법을 이용하여 구한 cellulase 변이체 CBH I 발현 균주를 YDG (YE 2%, glucose 2%, galactose 3%) 배지를 사용하여 96 well plate에 30°C, 250 rpm으로 5일간 배양하여 발현시킨 상등액을 sampling하여 1.0% CMC agar에 trypan blue solution (Sodium chloride 0.81%, Potassium phosphate dibasic 0.06%, Trypan blue 0.4%)으로 5분동안 염색을 하고, 3 M sodium chloride로 15분동안 destaining 한 평판에, 20 μ l씩을 떨어뜨리고 45°C에서 4시간 반응을 시킨 후 생성된 clear zone을 측정하였다.

DNS (Dinitrosalicylic Acid) 환원당 측정법에 의한 cellulase 변이체 confirm test는 CBH I의 활성을 분석하기 위해서 trypan blue 평판 screening 방법으로 1차 선별된 cellulase 변이체를 DNS (Dinitrosalicylic Acid)를 이용하여 cellulose 분해 활성을 측정하였다. DNS solution의 조성은 Dinitrosalicylic acid 1%, Phenol 0.2%, Sodium sulfite 0.05%, Sodium hydroxide 1%이고, 1.0% CMC (pH 4.5) 0.5 ml에 sample 0.5 ml을 adding하여 1시간동안 45°C에서 반응시킨 후 DNS solution 3 ml을 첨가하여 90°C에서 15분간 반응시킨 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이에 대한 대조군으로 cellulose 대신에 D.W를 기질로 0.5 ml에 sample 0.5 ml을 첨가하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하였고, DNS법에 의한 cellulose분해 활성이 높은 cellulase 변이체를 선별하는 방법으로 선별하였다.

CBH I 생산 공정 Lab-scale에서 최적화

5 L 발효기를 이용하여 고농도 배양을 실험하였는데 C/N source 비율이 3/2인 feeding solution을 peristaltic pump와 feeding program을 이용하여 specific growth rate (μ)를 0.1 hr⁻¹로 유지하면서 pH 5~5.5, 배양온도 30°C, 600 rpm에서 O.D. 90까지 성장한 후 expression stage인 glucose, galactose가 함유된 feeding solution으로 shift하여 specific growth rate (μ)를 0.07 hr⁻¹로 유지하였다.

CBH I 생산 공정 scale-up

5 L 규모에서 확립된 최적 fed-batch 발효 공정을 300 L로 scale-up하여 실험하였다. Fed-batch 방법은 2-stage 방법으로 초기 growth 구간에서는 glucose, YE만 가지고 growth한 후 expression 구간에서 galactose, glucose, YE로 change하여 실험을 하였다. 배양 조건은 pH 5.0~5.5, 온도 30°C, D.O. 10%를 유지하여 진행하였다. 초기에 C/N ratio가 3/2인 feeding solution을 feeding program을 이용하여 specific

growth rate (μ)를 0.1 hr^{-1} 로 유지하면서 150 rpm에서 O.D. 250까지 growth한 후 expression stage에 galactose로 C-source shift하여 최종 O.D. 280까지 fed-batch로 진행하였다. 300 L Fermenter에서 초기 working volume은 150 L으로 종배양액이 5%가 되게 전배양액을 접종하였다. 접종한 후 약 18시간 정도 자란 후 O.D. 7 정도에서 fermenter D.O.도 떨어져서 0에 가깝게 되다가 glucose가 고갈되면서 D.O.가 상승하게 된다. 이때부터 fermenter growth feeding에 들어가게 되는데 초기 Y값은 0.6, μ 값은 0.1로 feeding하였다. growth stage O.D. 250에서 expression stage로 change하게 되며 이때 Y값은 0.6, μ 값을 0.09로 feeding하였다.

- fermenter 초기 batch 조건
Yeast extract 2%, glucose 2%,
- fermenter fed-batch growth stage feeding solution 조성
(C (Yeast extract) / N (Glucose) 비율 3 : 2)
- fermenter fed-batch expression stage feeding solution 조성
(glucose : galactose : YE = 3 : 3 : 3.5)

CBH I 정제 공정 최적화

- fed-batch fermentation으로 발효한 세포 배양액을 4°C 20,000 $\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 농축의 목적으로 원심분리하여 취한 상등액을 10,000 molecular weight cut-off membrane을 이용하여 20배 농축하였다.

- 이렇게 농축되어진 상등액을 T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 10 mM acetate buffer, pH 5.0으로 4°C cold chamber에서 교반하면서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하여 DNS 환원당 측정법에 방해가 되는 물질을 제거하였다.

- 10 mM acetate buffer, pH 5.0으로 평형화된 Sephadex G-50을 충전한 column ($5 \times 50 \text{ cm}$)을 이용하여 유속 45 ml/h로 4°C 에서 gel filtration chromatography를 수행하였다. DNS 환원당 측정법에 의해 활성이 확인된 fraction을 수집하였다.

- gel filtration chromatography에서 활성이 확인되어 수집된 sample을 4°C cold chamber에서 최종 포화 농도가 80%가 되게 Ammonium sulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)를 곱게 분쇄시켜 Ammonium sulfate를 30분간 천천히 가하고 천천히 교반을 하면서 염석을 행하였다. 이후 2시간 동안 천천히 교반하여 단백질을 침전시킨 후 4°C 20,000 $\times\text{g}$ 에서 30분간 원심분리하여 침전된 단백질을 10 mM acetate buffer, pH 5.0에 단백질을 완전히 녹였다.

- 이렇게 얻어진 시료 중의 염의 제거하기 위하여 T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 10 mM acetate buffer, pH 5.0으로 4°C cold chamber에서 교반하면서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하였다.

- 10 mM acetate buffer, pH 5.0으로 평형화된 DEAE FF column을 이용하여 Elution buffer로 상기의 buffer에 NaCl의 농도를 0~0.3 M로 농도구배 용출하여 DNS 환원당 측정법에 의해 활성이 보인 fraction을 수집하였다.

- T1 dialysis membrane MWCO 3,500을 이용하여 10 mM acetate buffer, pH 5.0으로 4°C cold chamber에서 교반하면

서 buffer를 2회 교환하여 주면서 overnight 탈염하였다.

결과 및 고찰

Cellobiohydrolase (CBH) I 유전자의 확보

CBH I에 대한 유전자 서열과 아미노산 서열은 Fig. 1, 2와 같고 밑줄로 표시된 유전자 서열과 아미노산 서열은 CBH I의 active site이다.

```

ATGTATCGGAAGTTGGCCGTCATCACGGCCTTCTTGGCCACAGCTCGTGCTC
AGTCGGCCTGCACTCTCCAATCGGAGACTCACCCGCTCTGACATGGCAGAA
ATGCTCGTCTGGTGGCACTTGCCTCAACAGACAGGCTCCGTGGTTCATCGAC
GCCAAGTGGCGCTGGACTCACGCTACGAACAGCAGCAGCAACTGCTACGAT
GGCAACACTTGGAGCTCGACCCTATGTCTGACAACGAGACCTGCGCGAAGA
ACTGCTGTCTGGACGGTGGCGCTACGCGTCCACGTACGGAGTTACCACGAG
CGGTAACAGCCTCTCCATTGGCTTTGTACCCAGTCTGCGCAGAAGAAGCTT
GGCGCTCGCCTTTACCTTATGGCGAGCGACACGACCTACCAGGAATTCACCC
TGCTTGGCAACGAGTTCTCTTTCGATGTTGATGTTTCGAGCTGCCGTGCGGC
TTGAACGAGCTCTCTACTTCGTGTCCATGGACGCGGATGGTGGCGTGAGCA
AGTATCCCAACAACAGCTGGCGCCAAGTACGGCACGGGGTACTGTGACA
GCCAGTGTCCCCGCGATCTGAAGTTCATCAATGGCCAGGCCAACGTTGAGGG
CTGGGAGCCGTCATCCAACAACGAAACAGGGCATTGGAGGACCGGAAG
CTGCTGCTCTGAGATGGATATCTGGGAGGCCAATCCATCTCCGAGGCTCTT
ACCCCCACCCTTGACGACTGTGCGCCAGGAGATCTGCGAGGGTGTGGGT
GCGGCGGAACCTACTCCGATAACAGATATGGCGCACTTGGCATCCCGATGG
CTGCGACTGGAACCCATACCGCCTGGGCAACACCAGTTCTACGGCCCTGGC
TCAAGCTTACCCTCGATACCACCAAGAAATTGACCGTTGTACCCAGTTCG
AGACGTGGGTGCCATCAACCGATACTATGTCCAGAATGGCGTCACTTTCCA
GCAGCCCAACGCGGAGCTTGGTAGTACTCTGGCAACGAGCTCAACGATGAT
TACTGCACAGCTGAGGAGACAGAATTCGGCGGATCTCTTTCTCAGACAAGGG
CGGCCTGACTCAGTTCAAGAAGGCTACCTCTGGCGGATGGTTCGTGGTTCATG
AGTCTGTGGGATGATTACTACGCCAACATGTGTGGTGGACTCCACCTACC
CGACAAACGAGACCTCTCCACACCCGGTGGCGTGGCGGAAGCTGTCCAC
CAGTCCGGTGTCCCTGCTCAGGTGCAATCTCAGTCTCCCAACGCCAAGGTC
ACCTTCTCAACATCAAGTTCGGACCCATTGGCAGCACCGGCAACCCTAGCG
GCGGCAACCCCTCCCGCGGAAACCGTGGCACCACCACCACCCGCGCCAG
CCACTACCCTGGAAGCTCTCCCGGACCTACCAGTCTACTACGGCCAGTG
CGGCGGTATTGGCTACAGCGGCCCCACGGTCTGCGCCAGCGGCACAACCTGC
CAGTCTGAAACCTTACTACTCTCAGTGCCTGTAA

```

Figure 1. The gene order against the Cellobiohydrolase I (1542 bp).

```

MYRKLAVISAFLATARAQSACTLQSEHPPLTWQKCSSGGTCTQQTGSSVIDAN
WRWTHATNSSTNCYDGNWSSSTLCPDNETCAKNCLDGAAYASTYGVTTSGN
SLSIGFVTQSAQKNVGARLYLMASDTTYQEFTLLGNEFSFDVDSQLPCGLNGA
LYFVSMADGGVSKYPTNTAGAKYGTGYCDSQCPRDLKFINQANVEGWEPSS
NNANTGIGGHGSCSEMDIWEANSISEALTPHPCTTVGQEICEGDGCGGTYSDNR
YGGTCDPDGCDWNPYRLGNTSFYGPSSFTLDTTKLTVVTQFETSGAINRYV
QNGVTFQQPNAELGYSNGELNDDYCTAEEAEFGSSPSDKGGLTQFKKATSGG
MVLVMSLWDDYYANMLWLDSTYPTNETSSTPGA VRGSCSTSSGVPAQVESQSP
NAKVTFSTNIKFGPIGSTGNPSGGNPPGGNRGTTTTRRPATTGSSPGTQSHYGQC
GGIGYSGPTVCASGTTCCQVLPYYSQCL

```

Figure 2. The amino acids order against the Cellobiohydrolase I (512 amino acid).

CBH I 유전자 cloning

CBH I 유전자 앞부분에는 CBH I 단백질이 cell 외부로 분비할 수 있도록 하는 ppL이 존재한다. 여러 다른 signal sequence 비교 후 ppL로 결정하였다. 사용한 primer는 다음과 같다.

5'-GCTCTAGATAAAAGGATGTATCGGAAGTTGGCCGTC-3'
5'-ACGCGTGCAGCTTACAGGCACTGAGAGTAGT-3'

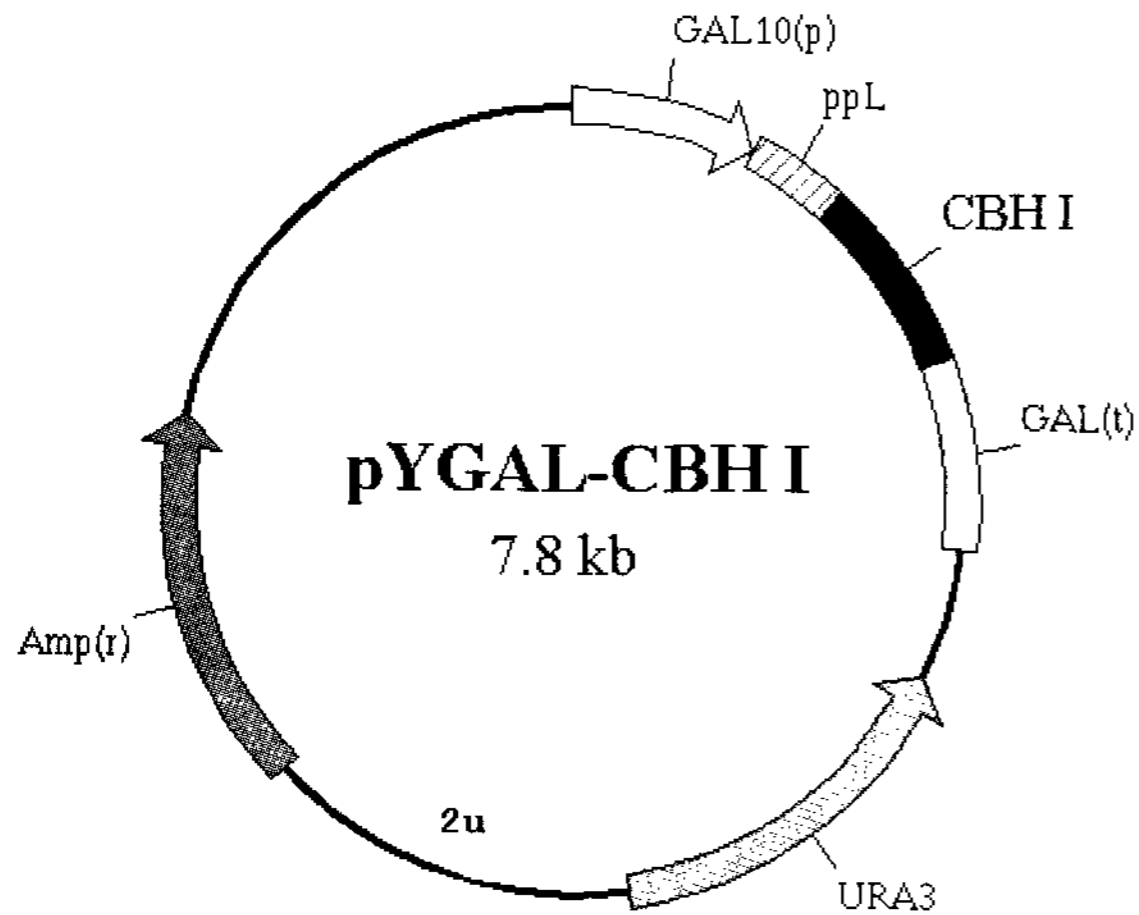


Figure 3. The *S. cerevisiae* expression vector where the CBH I becomes the cloning.

CBH I 단백질 발현

Fig. 4의 gel 결과를 통하여 발현을 확인하였다.

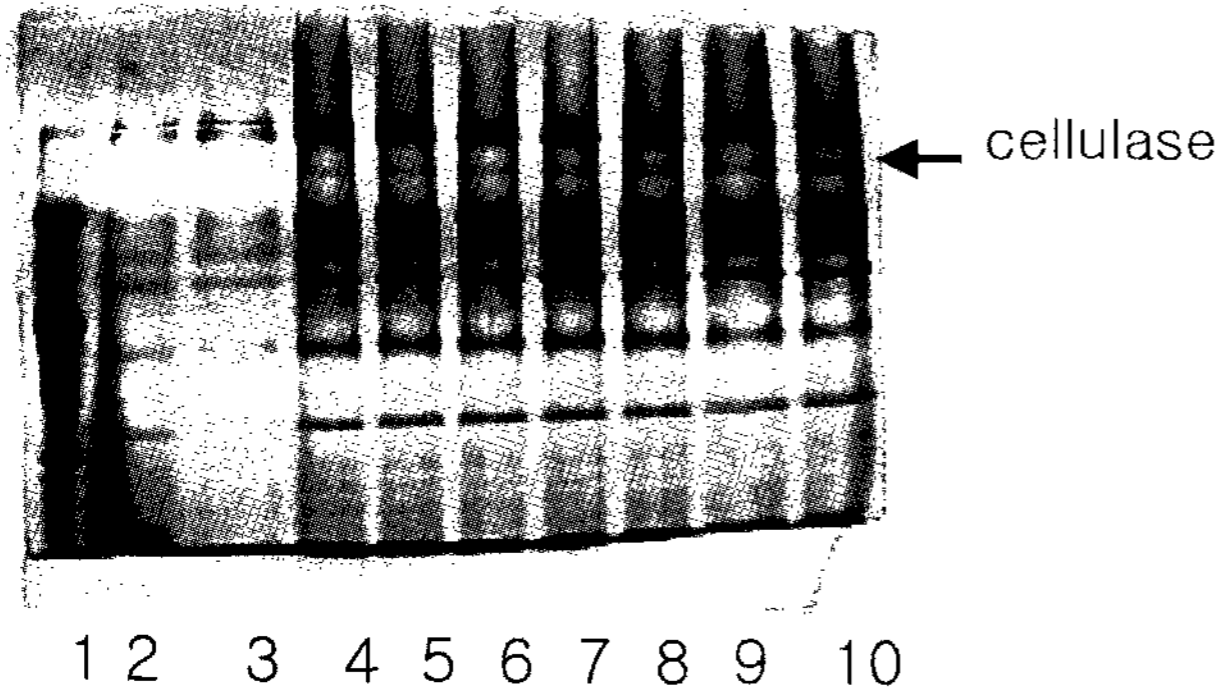


Figure 4. Gel analysis of CBH I protein (1: marker, 2: Y2805 cultivation supernatant, 3: galactose induction before cultivation supernatant, 4~10: after galactose induction time as CBH revelation supernatant I).

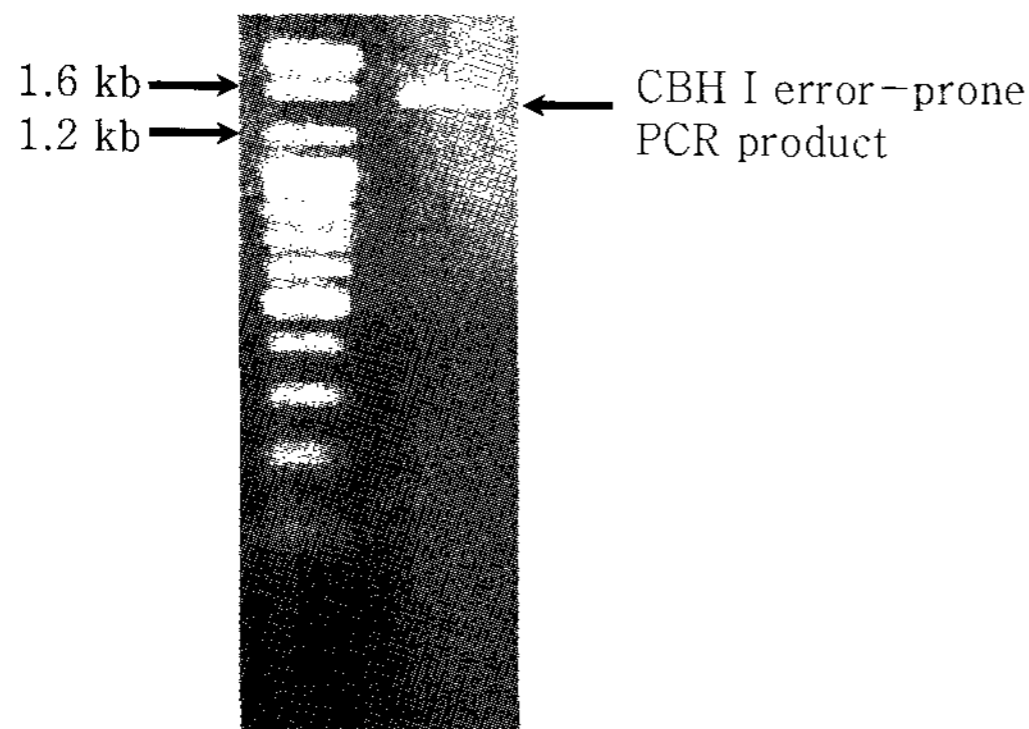


Figure 5. Agarose gel analysis of error-prone PCR CBI gene.

CBH I 활성을 증대시키기 위한 분자진화 방법 개발

CBH I 활성을 증대시키기 위하여 error prone PCR을 수행하였고 MnCl₂ 경우에는 여러 농도를 사용하여 screening을 한 결과 0.2~0.4 mM 사이의 MnCl₂의 농도를 사용하는 것이 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이 경우 error 유도율은 1-2% 내외이었으며, 이 때 사용한 error PCR 최적

조건은 94°C, 2 min, 15 cycles (94°C, 1 min, 60°C, 1 min, 72°C, 1 min 40 s), 72°C, 5 min이었다.

Error prone PCR을 통하여 선별된 cellulase 변이체를 대상으로 다시 DNA shuffling을 수행하여 shuffling된 CBH I 유전자를 획득한 후 발현 벡터에 삽입하고 효모에 transformation하여 이것을 다시 screening하였다.

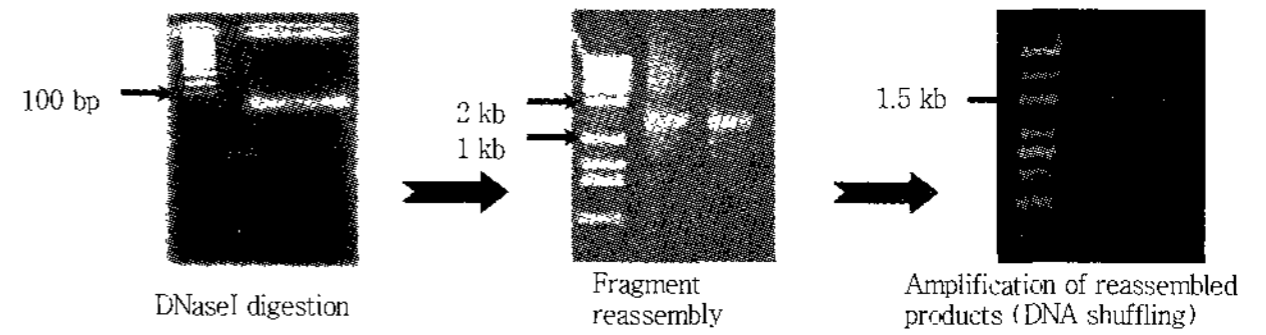


Figure 6. Each step agarose gel analysis of the CBH I gene which uses the DNA shuffling law.

CBH I 변이체의 screening

Fig. 7, 8은 cellulase 변이체 389-E3를 preliminary screening한 그림이다.

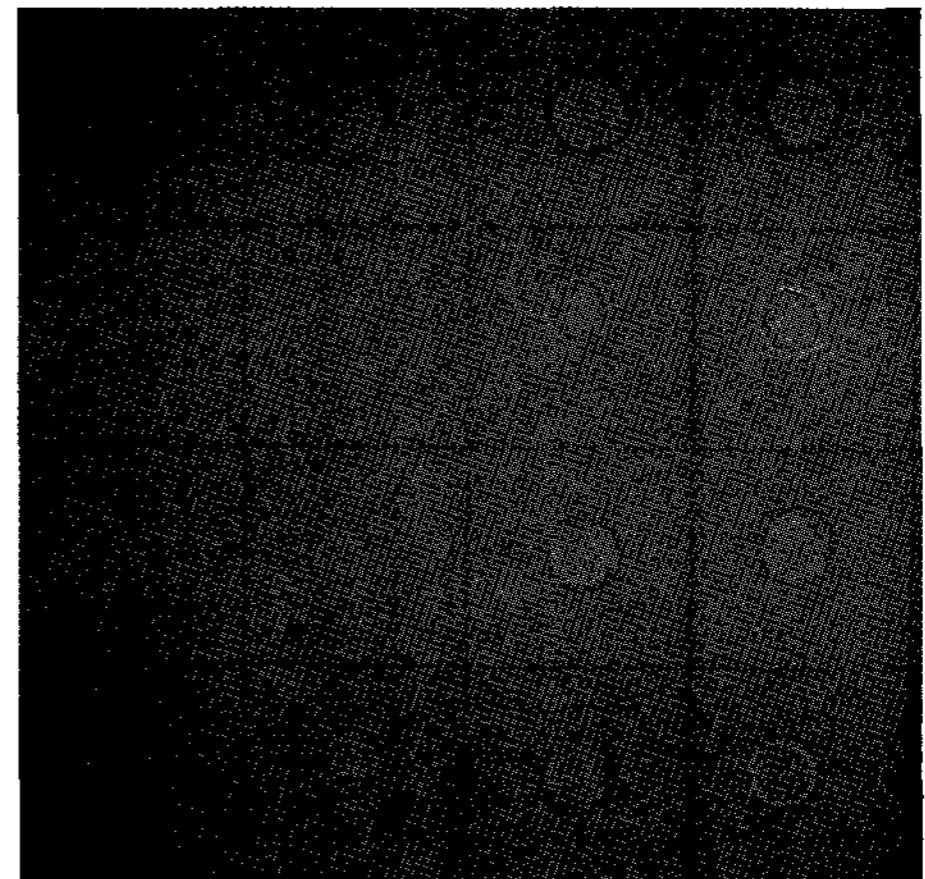


Figure 7. Cellulase revertant screening which uses trypan blue dyeing process.

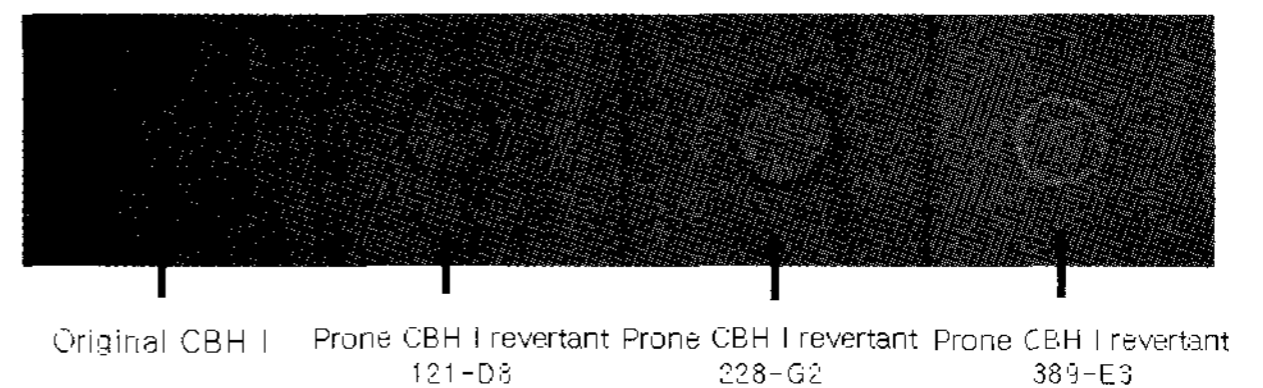


Figure 8. Cellulase activity measurement comparison of Original CBH I and prone cellulase revertant 121-D8, 228-G2, 389-E3.

Original CBH I, 선별된 CBH I 변이체 121-D8, 228-G2, 389-E3, 412-B4, 456-D2의 환원당 비교표를 Table 1에 정리하였다.

Table 1. DNS per reduction the original active comparison of the CBH I which uses the measurement law and CBH I mutation body

Sample	Original CBH I	121-D8	228-G2	389-E3	412-B4	456-D2
Cellulase activity (absorbance 550 nm)	0.22	0.35	0.68	1.04	1.06	1.22
an increasing rate (%)	100	160	310	470	480	510

Table 1에서도 볼 수 있듯이 1차 trypan blue staining법으로 선별된 cellulase 변이체 456-D2의 cellulose 분해 활성이 DNS법으로도 다시 확인할 수 있었으며, 분해활성 증가율은 original CBH I 에 비해 약 510% 증가된 것을 확인하였다.

분자진화된 CBH I sequence 분석

분자진화를 통하여 선별된 CBH I 변이체의 DNA를 획득하여 염기서열을 분석하였다. 분석결과 CBH I wild type 과 비교하였을 때 121-D8의 경우 변경된 9개의 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 6개, 228-G2의 경우 변경된 7개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 4개, 389-E3의 경우 변경된 13개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 9개, 412-B4의 경우 변경된 9개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 6개, 456-D2의 경우 변경된 10개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 7개이었다. 바뀐 염기와 아미노산을 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Analysis of the amino acids order which the CBH I mutation body is changed

CBH I a mutant	The amino acids order which the CBH I mutation body is changed
121-D8	9 T(ACG) → S(TCG), 179 N(AAC) → T(ACC), 258 D(GAT) → G(GGT), 313 T(ACG) → K(AAG), 353 T(ACA) → A(GCA), 432 K(AAG) → Q(CAG)
228-G2	9 T(ACG) → S(TCG), 179 N(AAC) → T(ACC), 353 T(ACA) → A(GCA), 371 K(AAG) → M(ATG)
389-E3	9 T(ACG) → S(TCG), 125 L(CTT) → P(CCT), 179 N(AAC) → T(ACC), 203 Q(CAG) → P(CCG), 205 N(AAC) → Y(TAC), 224 G(GGA) → E(GAA), 281 N(AAC) → S(AGC), 351 E(GAG) → A(GCG), 353 T(ACA) → A(GCA)
412-B4	9 T(ACG) → S(TCG), 179 N(AAC) → T(ACC), 351 E(GAG) → D(GAT), 353 T(ACA) → A(GCA), 371 K(AAG) → M(ATG), 498 S(AGC) → R(AGA)
456-D2	9 T(ACG) → S(TCG), 179 N(AAC) → T(ACC), 223 H(CAC) → L(CTC), 351 E(GAG) → D(GAT), 353 T(ACA) → A(GCA), 371 K(AAG) → M(ATG), 498 S(AGC) → R(AGA)

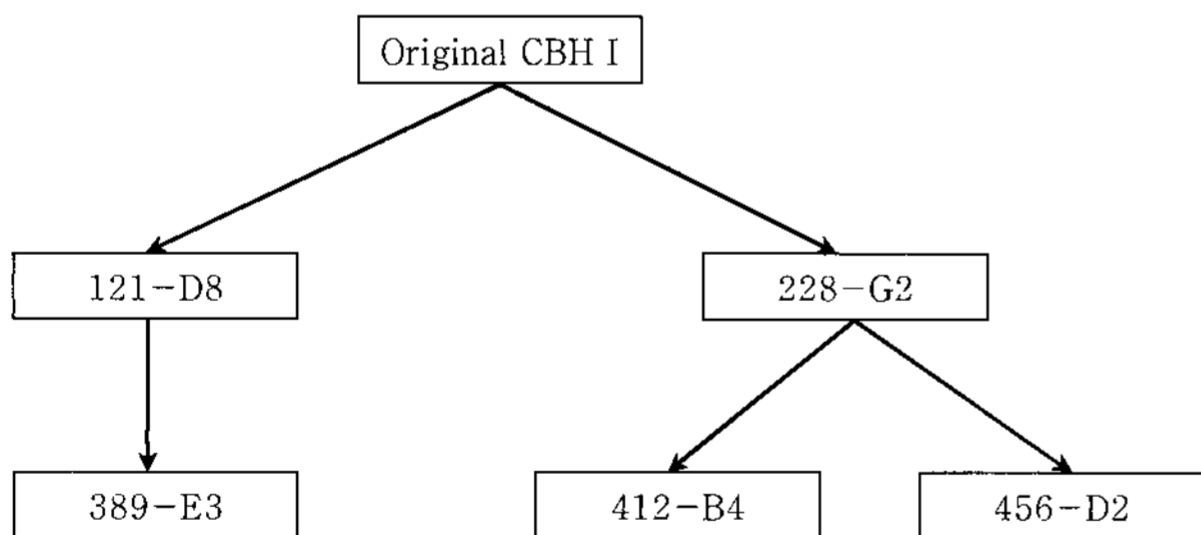


Figure 9. The element system diagram CBH I of the mutation body which evolved.

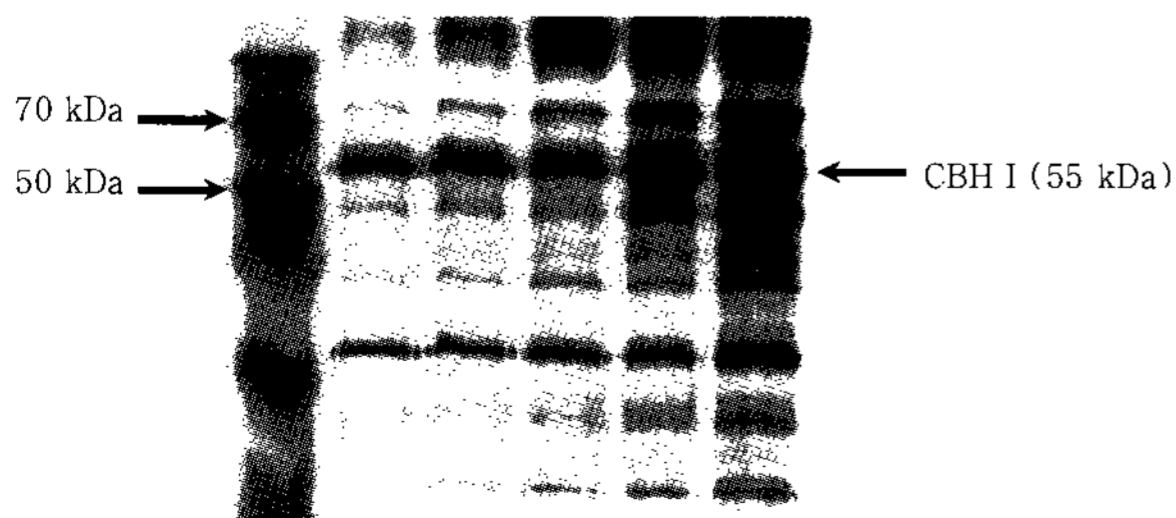


Figure 10. Method of peak concentration cultivation it is been revealed CBH I protein gel analyses.

CBH I 생산 공정 Lab-scale에서 최적화

5 L 발효기를 이용하여 고농도 배양을 실험한 결과 최종 O.D. 120까지 진행할 수 있었으며, 약 1.2 g/L의 cellulase를 얻을 수 있었다.

CBH I 생산 공정 scale-up

5 L 규모에서 확립된 최적 fed-batch 발효 공정을 300 L 로 scale-up하여 실험한 결과 최종 O.D.는 약 280 정도이며 cellulase의 발현량은 약 3.2 g/L 수준임을 확인하였다.

CBH I 정제 공정

정제 후 분석 결과 정제공정의 수율은 80%, 순도는 95% 이상이었다. 12% SDS-PAGE로 정제된 cellulase의 분석 결과는 Fig. 11, 12와 같다.

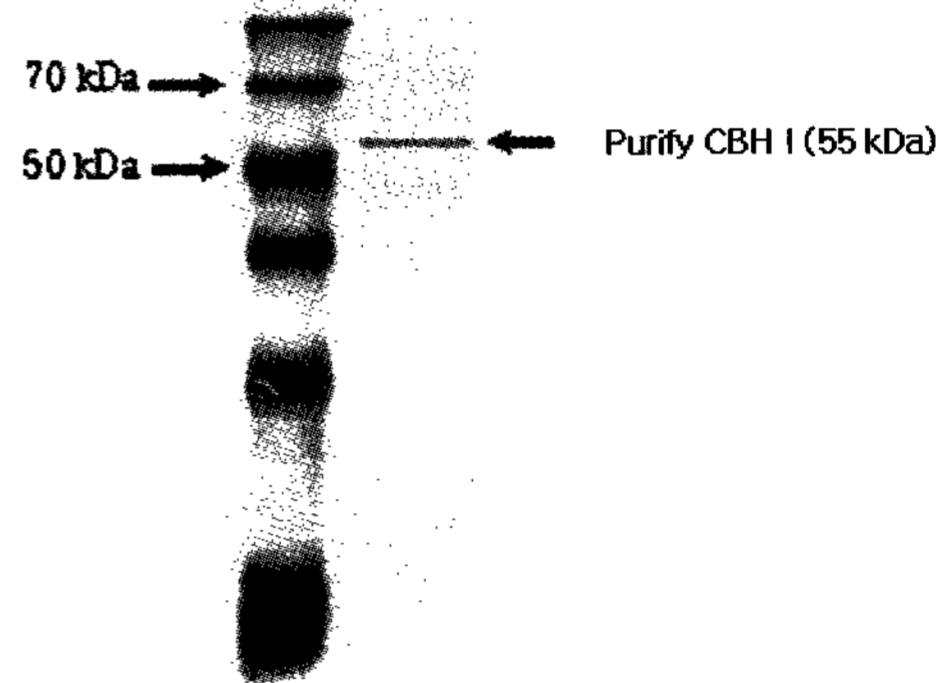


Figure 11. The CBH I which is purified protein gel analyses.

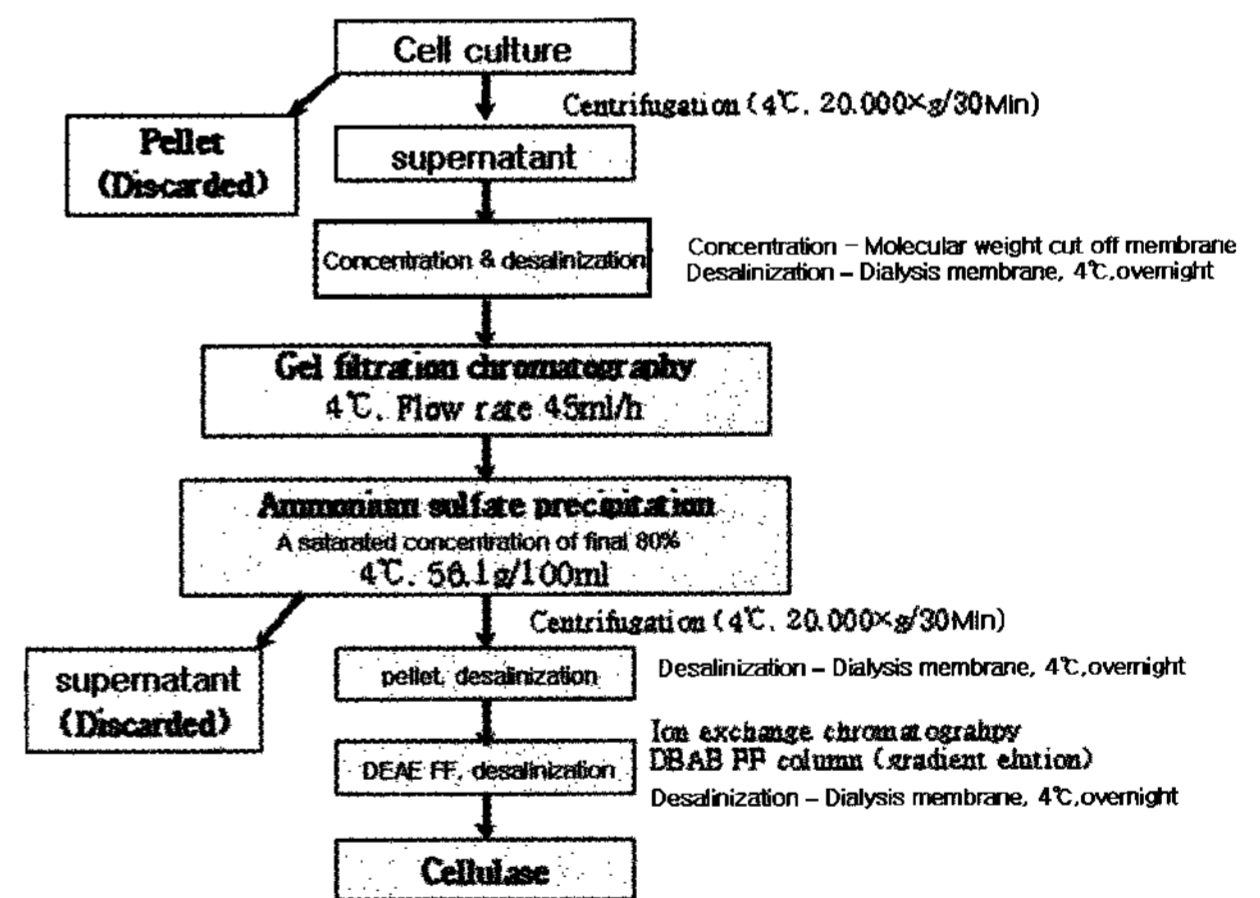


Figure 12. Refinding process flowchart.

요 약

Cellobiohydrolase (CBH) I 유전자의 확보는 CBH I 유전자 cellulase 생산 균주인 *Trichoderma reesei*를 배양, 수거하고 액체 질소를 이용하여 세포를 파쇄 후 RT-PCR kit를 이용하여 CBH I gene을 합성하였다. 그 후 발현벡터인 pYGAL에 cloning하였다. CBH I 유전자 앞부분에는 CBH I 단백질이

cell 외부로 분비할 수 있도록 하는 ppL이 포함되었다. CBH I 단백질 발현은 Protein gel 결과를 통하여 발현을 확인하였다. Cellulase 활성을 증대시키기 위한 분자진화 방법 개발은 error prone PCR과 DNA shuffling을 수행하였다. 얻은 CBH I 유전자를 발현 벡터에 삽입하고 효모에 transformation하여 이것을 다시 screening하였다. 1차 screening 후 confirm test하기 위해 DNS (Dinitrosalicylic Acid) 환원당 측정법을 이용하였으며, 이 결과 121-D8, 228-G2, 389-E3, 412-B4, 456-D2의 cellulase 변이체를 획득할 수 있으며, 456-D2의 경우 original CBH I과 비교하여 약 510%의 활성이 증가된 것을 확인할 수 있었다. 분자 진화 된 cellulase sequence 분석결과 CBH I wild type과 비교하였을 때 121-D8의 경우 변경된 9개의 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 6개, 228-G2의 경우 변경된 7개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 4개, 389-E3의 경우 변경된 13개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 9개, 412-B4의 경우 변경된 9개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 6개, 456-D2의 경우 변경된 10개의 바뀐 염기 중 아미노산의 변화에 영향을 준 염기는 7개이었다.

Cellulase 생산 공정 최적화는 5 L 발효기를 이용하여 고농도 배양을 실험한 결과 최종 O.D. 120까지 진행할 수 있었으며, 약 1.2 g/L의 cellulase를 얻을 수 있었다. Cellulase 생산 공정 scale-up 5 L 규모에서 확립된 최적 fed-batch 발효 공정을 300 L로 scale-up하여 실험하였다. 최종 O.D.는 약 280 정도이며 cellulase의 발현량은 약 3.2 g/L 수준임을 확인하였다.

Cellulase 정제 공정 최적화 결과 80%의 수율과 95%의 순도를 확보하였다.

감 사

본 연구는 에너지·자원 기술 개발 사업의 일환으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lee, Jae Y., Jung H. Kim, Dewey D. Y. Ryu (1983), Cellulase production by immobilized mycelia of *Trichoderma reesei* QM 9414, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 11(2), 105-110.
2. Zhang Ji-Hu, Glenn Dawes, Willem P. C. Stemmer (1997), Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4504-4509.
3. Zhao Huimin and Frances H. Arnold (1997), Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination, *Nucleic Acids Res.* 25(6), 1307-1308.
4. Zhao Huimin, Lori Giver, Zhixin Shao, Joseph A. Affholter, and Frances H. Arnold (1998), Molecular evolution by staggered extension process (StEP) *in vitro* recombination, *Nature Biotechnology* 16, 258-261.
5. Béguin P, Cornet P, and JP. Aubert (1985), Sequence of a cellulase gene of the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellu*, *J. Bacteriol.* 162(1), 102 - 105.
6. Ohmiya, K., Shimizu M., Taya, M., S. Shimizu (1982), Purification and Properties of Cellobiosidase from *Ruminococcus albus*, *J. Bacteriol.* 150(1), 407 - 409.