

## *Erwinia carotovora* 유래의 cellulase 유전자의 클로닝 및 대장균에서의 발현

### Cloning and expression of cellulase genes from *Erwinia carotovora* in *E. coli*

김 세 돈\*      최 신 건\*\*  
Kim, Se-Don    Choi, Shin-Geon

#### Abstract

New cellulase genes, named as *CelV2* and *CelN1*, respectively, were isolated from *Erwinia carotovora* ATCC15713 and expressed in *E. coli*. The *CelV2* and *CelN1* gene were PCR amplified with degenerated primers and PCR products were sequenced and expressed in *E. coli*. Two new cellulase genes showed 97% homologies with previously reported *Erwinia* cellulase genes. The recombinant cellulase were purified with Ni-NTA column chromatography and its enzymatic properties were characterized. The optimum temperature of two enzymes were about 50°C degree and optimum pH were around pH7.0. The newly isolated cellulase genes could be used for enhancing substrate range of alcohol-producing bacteria such as *Zymomonas mobilis*.

키워드 : *Erwinia carotovora*, 셀룰레이스, 유전자, 클로닝, 발현  
Keywords : *Erwinia carotovora*, cellulase, gene, cloning, expression

#### 1. 서론

계속되는 화석연료의 감소와 그 결과 나타나는 화석연료 가격의 상승은 전 세계적으로 이를 대체할 수 있는 에너지에 대한 관심을 가속화 시켰다.

그 중에서 미생물을 이용하여 셀룰로오스로부터 바이오에탄올을 생산하는 기술은 온실가스 저감효과 및 식용작물을 이용한 바이오에탄올 생산으로 발생하는 식량난을 극복할 수 있다는 점에서 각광 받고 있다.

현재까지 바이오에탄올 생산기술은 전 세계적으로 효모를 주로 이용하고 있다. 그러나 높은 산소

공급 비용, 높은 바이오매스의 생산, 온도와 에탄올에 대한 낮은 저항성 과 같은 단점을 이유로 과거 몇 년 동안 많은 종류의 미생물에 대해 에탄올 생산을 위한 연구가 진행되어왔다[1].

그 결과 *Zymomonas mobilis* 균주가 높은 에탄올 수율, 낮은 바이오매스 생산, 낮은 산소의존도, 그리고 원핵생물로서 유전적 개량의 용이성 등 바이오에탄올 생산에 있어서 많은 장점을 가지고 있다는 것을 알게 되었다[1],[2].

그러나 자연의 *Zymomonas mobilis* 균주는 에탄올 생성을 위한 발효에 이용 가능한 탄소원이 극히 한정되어 있기 때문에 유전공학적인 조작이 필요하다[3],[4].

특히 셀룰로오스를 탄소원으로 이용하기 위해서는 이를 분해하는 효소인 셀룰레이스 유전자를 유전공학적인 조작을 이용하여 균주내에 삽입하여 정상적으로 발현되도록 하여야 한다. 이러한 셀룰레이스 유전자를 가지고 있는 미생물은 자연계에

\* 강원대학교 대학원 생물공학과 석사과정

\*\* 강원대학교 공과대학 생물공학과 교수, Ph.D.  
교신저자

이미 많은 종이 알려져 있다[5]. 한편, *Erwinia*종에서 유래된 셀룰레이스 유전자는 같은 그람음성균으로서 다른 종류의 bacteria에서 유래된 셀룰레이스 유전자와 비교해 볼 때에 *Zymomonas mobilis* 균주에서 효소의 발현이 높다고 알려져 있다[6].

따라서 본 연구에서는 새로운 *Erwinia carotovora* 유래의 셀룰레이스 유전자를 얻고자 *Erwinia carotovora* ATCC15713으로부터 새로운 셀룰레이스 유전자를 PCR방법을 통하여 분리한 다음 대장균에 클로닝 및 발현시켜 그 특성을 살펴보았다.

## 2. 재료 및 연구방법

### 2.1 시약 및 재료

*Erwinia carotovora* ATCC 15713 균주는 강원대학교 농업생명과학대학 임춘근교수로부터 얻었다. 발현을 위한 운반체인 pET22b(+)는 Novagen에서 구매를 하였다. 발현 및 유전자 증폭을 위한 균주는 BL21(DE3)와 XL10-gold를 이용하였다. PCR을 위한 primer는 Bioneer(Korea)에 제작을 의뢰하였다. 발현을 유도하기 위한 유도제인 Isopropyl thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)는 TaKaRa로부터 구매하였다. 발현된 단백질의 정제를 위해 Chelating Excellose® Spin Kit을 바이오프로젠으로부터 구매하였다. 또한 본 실험에서 사용된 완충용액은 다음과 같다. 완충용액 1:50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 10mM imidazole, pH8.0, 완충용액 2:50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 10mM imidazole, 8M urea, pH8.0, 완충용액 3:50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 20mM imidazole, 8M urea, pH8.0, 완충용액 4:50mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 250mM imidazole, 8M urea, pH8.0.

Table 1. PCR primer list

Primer 1	5'-GCCATGGATATGTGGATGAGAAGGAAT-3'
Primer 2	5'-CCTCGAGCGGCTCCACACCCCATAC-3'
Primer 3	5'-CCTCGAGCGTCACCAGAACATAGCG-3'

### 2.2 연구방법

#### 2.2.1 단백질 발현을 위한 운반체 제작

단백질 발현을 위한 운반체에 CelV2와 CelN1 유전자를 삽입하여 만들었다. 각각의 유전자는 *Erwinia carotovora* ATCC 15713과 primer 1, 2와 primer 1, 3을 이용하여 Colony PCR을 통해서 증폭하였으며, 각각의 primer는 앞에는 *NcoI*과 뒤에

는 *XhoI*을 가지고 있다. 증폭과정은 PCR 기기 (Applied Bio)를 이용하여서 94℃에서 15초, 50℃에서 30초, 72℃에서 1분40초를 주었으며 이과정을 28회 반복하였다. 증폭된 DNA 절편은 Ethidium Bromide가 포함된 0.8% 아가로스젤을 이용하여서 확인하였다. 증폭된 DNA 절편은 발현운반체로 삽입을 하였다(Fig. 1).

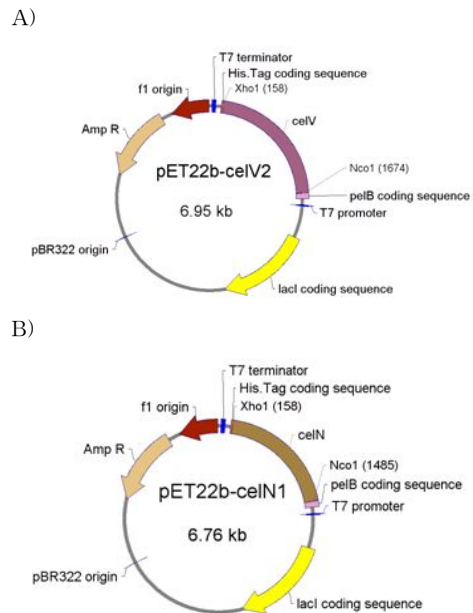


Fig. 1. Schematic maps of (A) pET22b-celV2, (B) pET22b-celN1

#### 2.2.2 BL21(DE3)에서 재조합 단백질의 발현

각각의 유전자가 삽입된 발현운반체를 *E. coli* XL10-gold에 먼저 삽입한 후 증폭된 플라스미드를 다시 BL21(DE3)에 넣었다. *E. coli* BL21(DE3)는 ampicillin(50mg/ml)이 포함된 LB배지에서 37℃, 200rpm의 조건으로 배양을 하여 A<sub>600</sub>에서 O.D.가 0.4-0.6정도 되었을 때 최종농도가 0.4mM이 되도록 IPTG를 넣어주어 발현을 유도하였으며, 그 후 배양조건을 30℃, 200rpm으로 변경하여 12시간동안 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 15,000rpm에서 10분 동안 원심분리를 통하여 배양액과 세포를 분리하였다.

#### 2.2.3 6xHis 융합단백질의 정제

원심분리를 통해서 얻어진 *E. coli* 세포에 완충용액 1을 넣고 재현탁한 후, 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄된 세포추출액을 15,000rpm에서 15분동안 원심분리를 통하여 고액

분리를 하였다. 그 후 상층액을 제거하고, 완충용액 2를 넣어주어 재현탁한 후, 15,000rpm에서 15분 동안 원심분리를 통하여 고액분리를 하였다. 얻어진 상층액을 Chelating Excellose<sup>®</sup> Spin column에 넣었다. 그리고 완충용액 3을 이용하여 비특이적인 단백질을 제거하고, 완충용액 4를 이용하여 목적단백질을 용출하였다.

목적단백질을 PBS로 투석하여 urea를 제거하였고, 이를 정제 시료로 사용하였다.

### 2.2.4 정제된 단백질의 확인

정제된 단백질을 확인하기 위해서 정제된 단백질을 SDS sample 완충용액과 섞은 후에 12% polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 하여 확인하였다. 단백질 정량은 Bradford(Bio-rad, USA) 방법을 이용하였다. 표준용액은 BSA(Sigma)를 이용하였다.

### 2.3.5 효소의 활성 측정

정제된 효소의 활성은 1% CMC가 첨가된 용액으로부터 생성되는 환원당의 양을 DNS 방법으로 측정하였다. CelV2, CelN1 각각 일정량의 효소액과 나머지 1% CMC가 첨가된 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충용액(pH7.0)으로 1ml을 채운 뒤 잘 혼합한 후 50℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후에 끓는 물에 5분간 정치하여 반응을 정지시킨 후 12,000rpm으로 5분간 원심분리 하여 상등액을 반응액으로 사용하였다. 반응액 600ul에 DNS 시약 solution A 600ul를 혼합하여 물증탕에서 15분간 끓인 다음 solution B 200ul를 첨가하여 급속히 냉각한 후 575nm에서 흡광도를 측정하였다. D(+)-Glucose를 표준용액으로 표준곡선을 작성하여 생성된 환원당을 정량하였다. 효소활성 1unit은 앞의 분석조건에서 1분당 1μmol의 D(+)-Glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 2.3.6 최적 온도 및 최적 pH

기질인 1% CMC가 함유된 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충용액(pH7.0)에 효소액을 혼합하여 각각 30, 40, 50, 60℃에서 30분간 효소반응을 주었고 끓는 물에 5분간 정치하여 반응을 정지시키고 원심분리 하여 상등액을 취하여 DNS 방법으로 최적 온도를 측정하였다.

CMC를 20mM citric acid-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 완충용액(pH5.0), 20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 완충용액(pH7.0), 20mM Glycine-NaOH 완충용액(pH10.0)에 각각 1%가 되게 녹인 후, 각각 효소액을 혼합한 후 50℃에서 30분간 효소반응을 주었고 끓는 물에 5분간 정치하여 반응을 정지시키고 원심분리 하여 상등액을 취하여 DNS 방법으로 최적 pH를 측정하였다.

## 3. 결과

### 3.1 CelV2와 CelN1 유전자 확인

Colony PCR에 의해 얻어진 CelV2와 CelN1 유전자를 확인하기 위해서 pGEM T-easy vector에 삽입하고 *E. coli* XL10-gold에 형질전환 하여 유전자를 발현운반체로 삽입하기 위한 유전자를 증폭하였다. 또한 증폭된 유전자를 염기서열분석을

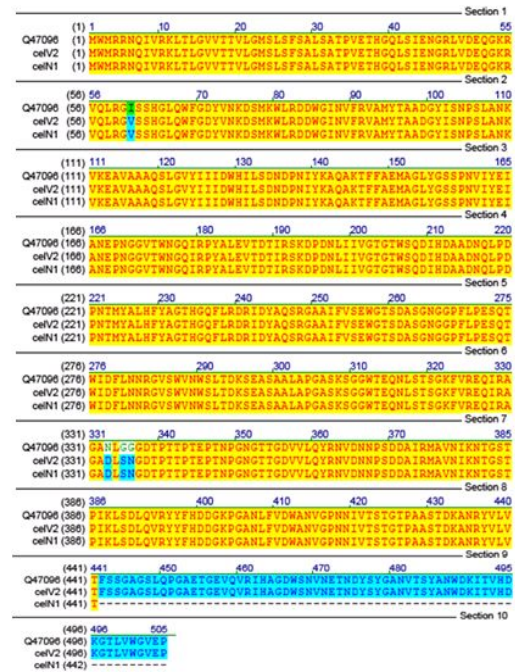


Fig. 2. Amino acid sequence analysis of celV2 and celN1. The DNA sequence of celV2 and celN1 was deposited into Genbank data base with an accession number of FJ89033, FJ89034, respectively.

통해서 유전자의 서열을 확인하였다. 확인된 유전자의 서열을 NCBI BLAST를 통하여 확인한 결과 CelV2은 X76000.1과 97%의 상동성을 가지고 있는 것으로 나타났으며, 아미노산으로 번역했을 시 X76000.1의 아미노산 Q47096과 4개의 아미노산 차이를 보였다. CelN1의 경우도 마찬가지로 X76000.1과 97%의 상동성을 가지고 있는 것으로 나타났으나, C-말단 아미노산 64개가 더 적은 것으로 확인되었다(Fig. 2).

### 3.2 CelV2, CelN1 발현 운반체 제작

pGEM T-easy vector에 포함되어있는 CelV2와 CelN1 유전자를 *E. coli* 발현 운반체인 pET22b(+)에 다시 삽입하였다. 최종적으로 발현운반체에 삽입

된 유전자는 제한효소 *NcoI*, *XhoI*을 처리하여 나온 DNA 절편의 크기를 이용하여 확인하였다(Fig. 3).

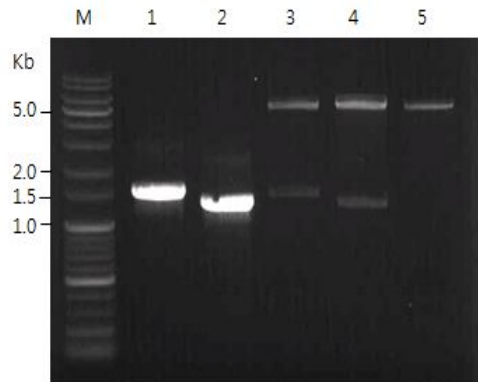


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis for insert gene confirmation of enzyme(*NcoI*, *XhoI*) digestion of fusion gene. lane 1 : CelV2 PCR product, lane 2 : CelN1 PCR product, lane 3 : CelV2 fusion gene digested enzyme(*NcoI*, *XhoI*), lane 4 : CelN1 fusion gene digested enzyme(*NcoI*, *XhoI*), lane 5 : pET22b(+) gene digested enzyme(*NcoI*, *XhoI*)

### 3.3 *E. coli* BL21(DE3)에서의 재조합 CelV2와 CelN1의 발현

재조합된 CelV2와 CelN1은 *E. coli* BL21(DE3)의 O.D.가 0.4-0.6에서 IPTG의 최종농도가 0.4mM이 되도록 하여서 발현을 유도하였다. 이 후 30℃에서 12시간동안 배양을 하였고 이 때 다량의 목적 단백질을 얻을 수 있었다. 이것은 SDS-PAGE에서 CelV2는 약 55kDa정도에서 관찰이 되었고, CelN1은 약 48kDa에서 관찰이 되었다. 그러나 전체 세포파쇄액과 원심분리를 통해 얻어진 상층액을 비교하여 확인한 결과, 목적 단백질이 대부분 불용성이라는 것을 알 수 있었다. 또한 0.1% CMC가 함유된 SDS-PAGE 분석 후 증류수를 이용하여 단백질 재결합 작업을 수행한 뒤, 40℃에서 1시간 동안 반응을 시키고, Congo red 염색법을 이용하여 CMCase 활성을 확인하였다(Fig. 4).

### 3.4 *E. coli* BL21(DE3)에서 발현된 재조합 CelV2와 CelN1의 정제

불용성으로 확인된 재조합 CelV2와 CelN1을 urea를 함유한 Chelating Excellose<sup>®</sup> Spin Kit을 이용해서 정제를 하였다. 정제한 결과 예상하던 밴드의 영역의 단백질을 얻을 수 있었다(Fig. 5).

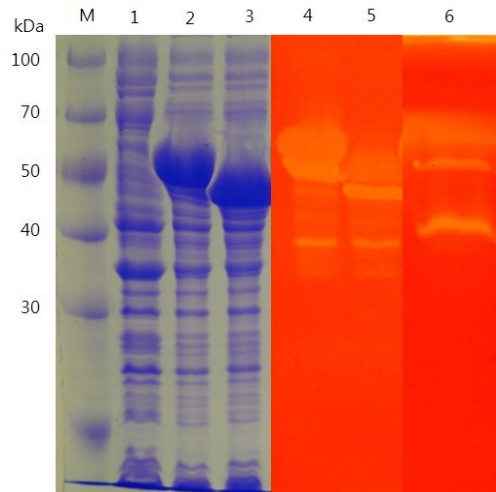


Fig. 4. SDS-PAGE(Lane1-3) and CMC-SDS-PAGE(Lane4-6) analyses of His-CelV2 and His-CelN1 fusions expressed in *E. coli* BL21(DE3). Lane 1: total cell lysate of vector control (pET22b(+)), lane 2: total cell lysate of His-CelV2 fusion(pET22b-celV2). lane 3: total cell lysate of His-CelN1 fusion(pET22b-celN1). lane 4: total cell lysate of His-CelV2 fusion(pET22b-CelV2). lane 5: total cell lysate of His-CelN1 fusion(pET22b-celN1). lane 6: total cell lysate of *Erwinia carotovora* ATCC 15713

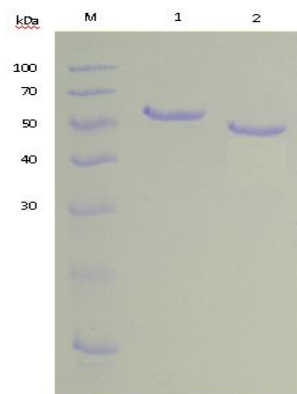
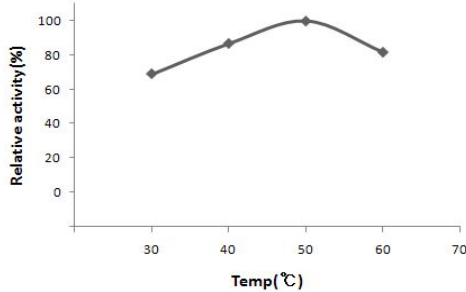


Fig. 5. SDS-PAGE analyses of purification of fusion protein using Chelating Excellose<sup>®</sup> Spin Kit. lane 1: purified His-CelV2 fusion protein, lane 2: purified His-celN1 fusion protein.

### 3.5 정제된 CelV2와 CelN1의 효소특성 분석

정제된 CelV2와 CelN1의 CMCase 활성 분석 결과 CelV2와 CelN1 모두 pH7에서 최적의 활성을

(A)



(B)

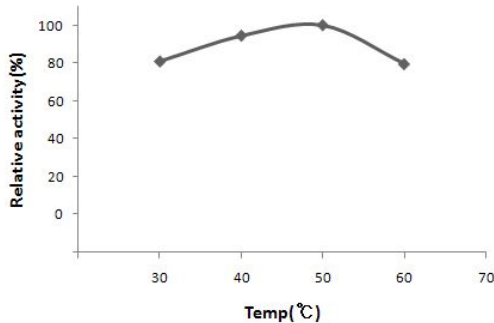


Fig. 6. Optimum temperature of (a)CelV2, (b)CelN1

보였다. 그렇기 때문에 pH7에서 각 효소의 최적 활성 온도를 측정해본 결과 50°C에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 6). 이 결과들은 기존에 발표된 *Erwinia carotovora* 유래의 셀룰레이스 유전자와 비슷하였다.

#### 4. 고찰

에탄올생성세균인 *Zymomonas mobilis*의 기질 특이성을 넓힐 목적으로 식물병원성세균인 *Erwinia carotovora* ATCC15713으로부터 셀룰레이스 유전자들을 PCR방법을 통하여 분석하였다. 기존에 발표된 유전자서열을 바탕으로 제작된 degenerated primer를 사용하여 PCR한 결과 이미 발표된 CelV와 CelN과 유사한 CelV2와 CelN1을 분리하였다. 아미노산의 경우 4개만이 상이점을 보였으며 효소적 특성은 거의 유사하였다. 본 연구로부터 얻어진 새로운 셀룰레이스 유전자는 그람 음성세균유래로서 기존의 *Bacillus sp.* 셀룰레이스처럼 그람양성세균의 *Z. mobilis*에서 낮은 효소활성에 비해 높은 활성이 기대되며 이것은 *E. coli-Z.*

*mobilis shuttle vector*에 유전자를 옮겨서 추후 확인할 예정이다. 본 실험에서 얻어진 CelV2와 CelN1 유전자는 신규성으로 Genbank에 FJ890933, FJ890934로 각각 등록되어 향후 균주개발에 유용하게 사용되리라 예상된다.

#### 참고 문헌

- [1] Parmjit S Panesar, Satwinder S Marwaha, John F Kennedy, "Zymomonas mobilis: an alternative ethanol producer.", *J Chem Technol Biotechnol* 81:623-635, 2006.
- [2] P. Gunasekaran, K. Chandra Raj, "Ethanol fermentation technology-Zymomonas mobilis.", *Curr Sci* 77:56-68, 1999.
- [3] Skotnicki ML, Warr RG, Goodman AE, Lee KJ, Rogers PL, "High-productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*." *Biochem. Soc. Symp.* 19:53-86, 1982.
- [4] H Yanase, K Nozaki, K Okamoto, "Ethanol production from cellulosic materials by genetically engineered *Zymomonas mobilis*.", *Biotechnol. Lett.* 27:259-263, 2005.
- [5] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, Pretorius IS, "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology.", *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):506-577, 2002.
- [6] Brestic-Goachet N, Gunasekaran P, Cami B, Baratti J, "Transfer and expression of an *Erwinia chrysanthemi* cellulase gene in *Zymomonas mobilis*.", *J Gen Microbiol* 135:893-902, 1989.