



Characterization of the recombinant cellulase B from *Thermotoga maritima*

Chung Ho Kim

Thermotoga maritima 유래 내열성 cellulase B 융합단백질의 특성 규명

김정호

Received: 21 November 2022 / Accepted: 30 November 2022 / Published Online: 31 December 2022
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2022

Abstract A gene encoding thermostable cellulase B (TmCelB) was isolated from *Thermotoga maritima*. The open reading frame (ORF) of TmCelB gene was 825bp long which predicted to encode 274 amino acid residues with a molecular weight of 31,732 Da. The 17 amino acid residues from N-terminal of the TmCelB was known as signal peptides. To analyze the enzymatic activity and biochemical properties, the ORF of TmCelB gene excluding a putative signal sequence encoding 17 amino acids were introduced into the *E. coli* expression vector, pRSET-B, and overexpressed in *E. coli* BL21. The optimum temperature of recombinant TmCelB was around 95 °C, and the optimum pH of recombinant TmCelB was around pH 4.5. The recombinant TmCelB was stable at temperature below 100 °C.

Keywords Cellulase · Cellulose · Thermostable · *Thermotoga maritima*

서 론

Cellulose는 D-glucopyranose가 β -1,4 glycosidic결합에 의해 연

결되어 있는 다당류로 식물 세포벽의 주성분이며 자연계에 가장 많이 존재하는 유기물이다[1]. 사람은 cellulose를 분해하는 효소를 가지고 있지 않아서 소화시키지 못하지만 초식동물은 소화기관에 공생하는 미생물들에 의해 cellulose를 소화시킬 수 있다. Cellulose는 종이나 섬유의 생산 원료로 사용되고 여러 물질로 변형이 가능하므로 경제적으로 유용한 물질이다[2]. Cellulose를 분해하는 효소들을 일반적으로 cellulase라고 하며, 세균, 곰팡이 등 많은 미생물로부터 분리되었고[3,4], 최근에는 일부 내열성 균주로부터 내열성 cellulase가 분리되었다[5].

*Thermotoga maritima*는 최적 생장온도가 80 °C이고 현재까지 확인된 미생물 중 가장 내열성이 높은 것으로 알려져 있다[6,7]. *T. maritima*는 xylan, strach, cellulose 등 많은 종류의 다당류 물질을 분해할 수 있어서 이로부터 산업적으로 매우 유용한 내열성 효소들을 분리할 수 있다. *T. maritima*의 전체 게놈 염기 서열이 이미 밝혀져 있으며 내열성 cellulase 효소의 유전자로 추정되는 유전자(GeneBank Z69341.1 1877-2701)도 확인되었다[8].

본 연구에서는 *T. maritima* 내열성 cellulase B 효소 유전자의 ORF(open reading frame)로 추정되는 DNA 부위를 PCR로 증폭 후 pRSET-B 벡터에 삽입하고, 대장균 BL21에서 과다발현시켰다. 6개의 His-tag와 융합되어 발현된 TmCelB 융합단백질을 순수분리하였고 생화학적 특성을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용된 *T. maritima* 균주의 genomic DNA는 ATCC (ATCC 43589D, Manassas, VA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 유전자 재조합 및 대장균 형질전환을 위해서는 *E. coli* TOP10 균주를 사용하였고, 재조합 TmCelB 유전자의 과다발현을 위해서는 *E. coli* BL21 균주를 사용하였다.

Chung Ho Kim (✉)
E-mail: chkim@seowon.ac.kr

Department of Food and Nutrition, Seowon University, Cheongju 28674, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

효소 및 시약

DNA 변형효소 및 제한효소들은 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하여 사용하였고, Ni²⁺-nitrilotriacetic acid (Ni²⁺-NTA) agarose resin은 Qiagen Inc. (Germantown, CA, USA) 제품을 사용하였다. Carboxymethylcellulose와 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다.

발현 벡터의 제조

TmCelB 유전자의 ORF는 PCR을 이용해 증폭하고 pRSET-B 발현 벡터에 삽입한 후 대장균 BL21에서 발현시켰다. TmCelB-specific primer는 5'-AAATTTGAATTCTCCGAGGTGGTTCTCACG-3'과 5'-AAATTTGAATTCTTATTTTACAACCTTCGACAGA-3'를 이용하였고, PCR 산물을 제한효소 *EcoRI*로 절단하고 pRSET-B 벡터에 삽입하여 pRBTmCelB를 제조하였다. PCR 반응은 2.5 U Taq DNA polymerase, 1 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPS, 100 ng *T. maritima* genomic DNA, TmCelB-specific primer 100 pmole을 포함해 50 µL로 제조하였고, 94 °C에서 3분 반응 후 94 °C에서 1분, 52 °C에서 1분, 72 °C에서 2분을 30회, 마지막 연장반응을 72 °C에서 5분 동안 수행하였다.

TmCelB 융합단백질의 발현 및 정제

Cellulase B 유전자를 포함하는 pRBTmCelB를 대장균 BL21에 형질전환하고, 37 °C에서 4시간 동안 0.7 mM IPTG를 첨가하여 반응하였다. 배양액을 원심분리하여 대장균 BL21을 회수하고 4 mL lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄/pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)를 첨가하고 4분 동안 초음파 분쇄하였다. TmCelB 융합단백질을 포함하는 추출물은 Ni²⁺-NTA-agarose column chromatography를 사용하여 정제하였고, 250 mM imidazole 용액의 농도 구배로 용출하였다. TmCelB 융합단백질은 SDS-PAGE로 분석하였고[9] 단백질 농도는 Bradford 방법에 의해 측정하였다[10].

TmCelB 융합단백질의 cellulose 분해활성을 측정하기 위하여 1% carboxymethylcellulose, 2 µL TmCelB 융합단백질, 50 mM McIlvaine buffer (pH 5.0)로 조성하고 반응최종부피를 300 µL로 하였다. 이를 90 °C에서 30분 동안 반응하였고 방출된 환원당의 양은 DNS(3,5-Dinitrosalicylic acid) 방법에 의해 측정하였다.

TmCelB 융합단백질의 생화학적 특성 규명

TmCelB 융합단백질의 활성 최적 pH를 측정하기 위해서 50 mM McIlvaine buffer (pH 2.5-6.0)와 Sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0)를 이용하여 cellulose 분해활성을 측정하였고, TmCelB 융합단백질의 활성 최적 온도를 측정하기 위해서 80-100 °C에서 cellulose 분해활성을 측정하였다.

TmCelB 융합단백질의 내열성 특성을 측정하기 위해서 TmCelB 융합단백질을 80, 85, 90, 95, 100 °C에서 반응하였고 총 180분 동안 매 30분마다 cellulose 분해활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

TmCelB 유전자 분리 및 발현

*T. maritima*의 내열성 cellulase B (TmCelB)로 추정되는 유전자 (GeneBank Z69341.1 1877-2701)는 *Thermotoga neapolitana*에서 cellulase B와 높은 서열 유사성(94.5%)을 가지는 것에 기초하여 *T. maritima* 게놈에서 선발하였다[11]. TmCelB로 추정되는 유전자의 ORF는 825 bp이고, cellulase B는 분자량이 약 31,732 kDa인 274개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이 중 N-말단의 17개 아미노산은 signal peptide로 추정되었고, 이를 제외한 257개의 아미노산 잔기로 구성된 단백질이 세포 내에서 cellulase B 효소로 작용할 것으로 예상되었다. 이를 증명하기 위하여 signal peptide를 제외한 TmCelB 유전자(774 bp)를 PCR로 증폭시키고 PCR 산물을 *EcoRI*로 절단한 후 pRSET-B 벡터에 삽입하여 pRBTmCelB를 제조하였다. 효소 활성과 재조합 TmCelB의 생화학적 특성을 분석하기 위해 pRBTmCelB는 대장균 BL21에서 과다발현시켰고 SDS-PAGE로 분석했다.

Fig. 1에 나타난 바와 같이 TmCelB 융합단백질은 대장균 BL21에서 과다발현되었고, 6개의 His-tag을 포함한 TmCelB 융합단백질의 분자량은 약 30 kDa로 확인되었다. 이 값은 유추된 아미노산으로부터 계산된 값과 거의 일치함을 알 수 있었다. TmCelB 융합단백질의 cellulose 분해활성은 1% carboxymethylcellulose와 2 µL TmCelB를 이용하여 측정하였고, TmCelB 융합단백질은 cellulose 분해활성이 있는 것으로 확인되었다.

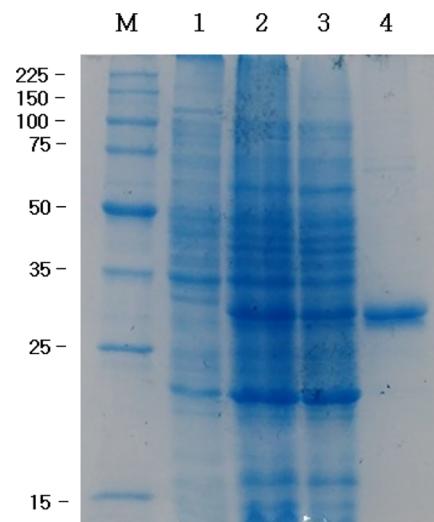


Fig. 1 Expression of recombinant TmCelB in *E. coli*. The open reading frame of the TmCelB gene was introduced into the pRSET expression vector and was expressed in *E. coli*. Protein extracts prepared from induced *E. coli* were analyzed by 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. Lane M: Molecular weight marker. Lane 1: total extract of *E. coli* harboring pRSET plasmid only. Lane 2: total extract of *E. coli* harboring pRBTmCelB. Lane 3: soluble fraction of *E. coli* extract harboring pRBTmCelB. Lane 4: purified recombinant TmCelB

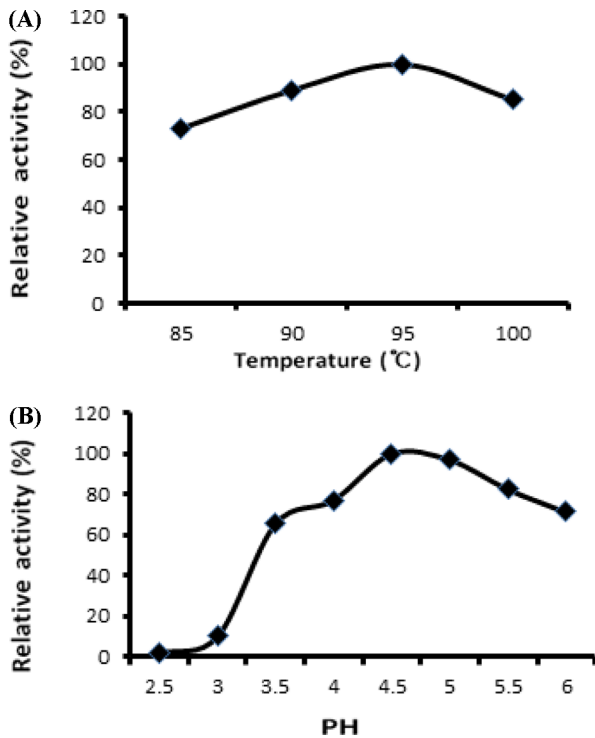


Fig. 2 Relative activities depending on temperature and pH of recombinant TmCelB. (A) Optimum temperature of recombinant TmCelB. A 1.0% of carboxymethylcellulose was incubated for 30 min with 2 μ L of purified recombinant TmCelB at various temperatures in a final volume of 300 μ L of a reaction mixture containing 50 mM Mcllvaine buffer (pH 5.0) (B) Optimum pH of recombinant TmCelB. For the pH test, 50 mM Mcllvaine buffer (pH 2.5-6.0) and sodium phosphate buffer (pH 6.0-8.0) were used. Carboxymethylcellulose (1.0%) was incubated at 90 °C for 30 min with 2 μ L of purified recombinant TmCelB at various pHs in a final volume of 300 μ L. The data represent the mean of three independent experiments

TmCelB 융합단백질의 생화학적 특성 분석

TmCelB 융합단백질의 최적 온도와 최적 pH를 측정하기 위하여 온도 범위는 80-100 °C, pH 범위는 pH 2.5-8.0에서 효소 활성을 측정하였다(Fig. 2). TmCelB 융합단백질은 약 95 °C 부근에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었고, 100 °C에서 최대 활성의 80% 이상을 유지하였다(Fig. 2A). TmCelB 융합단백질은 약 pH 4.5 부근에서 최대 활성을 나타내었고, pH 4.0-6.0 범위에서 최대 활성의 60% 이상을 유지하였다(Fig. 2B).

TmCelB 융합단백질의 내열성 분석

TmCelB 융합단백질 활성에 대한 온도의 영향은 Fig. 3에 나타내었다. 내열성 결정을 위해 TmCelB 융합단백질을 80-100 °C에서 배양하였다. 효소는 180분 동안 매 30분마다 추출했고, 잔류활성을 측정하였다. 그 결과 TmCelB 융합단백질은 100 °C에서 180분 후에도 효소활성을 80% 이상 유지하였다.

본 연구에서는 N-말단의 signal peptide를 제외한 *T. maritima* cellulase B 유전자를 PCR 증폭하고 pRSET 대장균 발현벡터에 삽입하여 pRBTmCelB를 제조하였다. 이로부터 발현되는

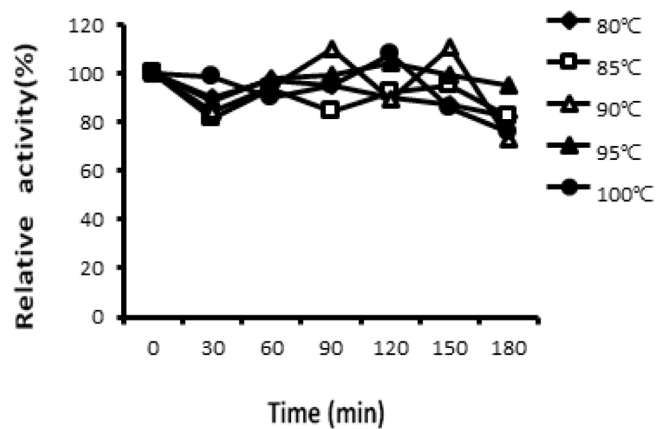


Fig. 3 Thermostability of recombinant TmCelB. Recombinant TmCelB was incubated at 80, 85, 90, 95, and 100 °C. The enzyme was extracted every 30 min over a 180 min period, and the residual activity was determined. The data represent the mean of three independent experiments

TmCelB 융합단백질은 N-말단 부위에 polylinker site, T7 gene 10 leader, 6-His tag를 포함하고 있는 융합단백질이다. 이러한 N-말단의 아미노산들은 TmCelB 융합단백질의 생화학적 특성에 영향을 줄 수 있다. TmCelB 융합단백질의 생화학적 특성을 분석한 결과, TmCelB 융합단백질은 약 95 °C 부근에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었고, 약 pH 4.5 부근에서 최대 활성을 나타내었으며 100 °C에서 180분 후에도 효소활성을 80% 이상 유지하였다. *T. maritima*에 존재하는 cellulase A (TmCelA) 융합단백질에 대한 기존의 연구 결과는 90-95 °C 부근에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었고, 약 pH 5.0 부근에서 최대 활성을 나타내었으며 90 °C에서 180분 후에도 효소 활성을 80% 이상 유지하였다[12]. 이 결과와 비교해 보았을 때 TmCelA 융합단백질과 TmCelB 융합단백질은 효소 활성의 최적 온도는 유사하나 최적 pH와 내열성 특성은 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 TmCelB 융합단백질도 고온에서 cellulose 분해활성을 유지하고 있으며, 이는 biomass 분해 관련 산업에 활용이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글 This work was supported by a research grant from the Seowon University.

초 록

Thermotoga maritima cellulase B 유전자의 The open reading frame (ORF)은 825 bp이고, cellulase B는 분자량이 약 31,732 kDa인 274개의 아미노산으로 구성되어 있다 이 중 N-말단의 17개 아미노산은 signal peptide로 추정된다. Signal peptide를 제외한 ORF를 pRSET 대장균 발현벡터에 삽입하여 pRBTmCelB를 제조하였다. 6-His tag를 포함하는 TmCelB 융합단백질의 cellulose 분해활성과 생화학적 특성을 분석하기 위해 pRBTmCelB를 대장균 BL21에서 과다발현하였고 순수분리하였다. TmCelB 융합단백질은 cellulose 분해활성을 나타내었고 이 있는 것으로 분석되었다. TmCelB 융합단백질은 약 95 °C 부근에서 가장 높

은 효소 활성을 나타내었고, 100 °C에서 최대 활성을 80% 이상 유지하는 것을 확인하였다. 또한 TmCelB 융합단백질은 약 pH 4.5 부근에서 최대 활성을 나타내었고, pH 4.0-6.0 범위에서 최대 활성을 60% 이상 유지하였다. TmCelB 융합단백질은 100 °C에서 180분 후에도 효소활성을 80% 이상 유지하였다.

Keywords 내열성 · 셀룰라아제 · 셀룰로오스 · 씨모토가 마리티마

References

1. Bayer EA, Chanzy H, Lamed R, Shoham Y (1998) Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* 8: 548–557. doi: 10.1016/S0959-440X(98)80143-7
2. Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M, Antranikian G (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 51: 711–729. doi: 10.1007/s002530051456
3. Kitamoto N, Go M, Shibayama T, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K, Tsukagoshi N (1996) Molecular cloning, purification and characterization of two *endo*-1,4-beta-glucanases from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Appl Microbiol Biotechnol* 46: 538–544. doi: 10.1007/s002530050857
4. Park YW, Lim ST, Cho SJ, Yun HD (1997) Characterization of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* LY34 *endo*-1,4-beta-glucanase genes and rapid identification of their gene products. *Biochem Biophys Res Commun* 241: 636–641. doi: 10.1006/bbrc.1997.7747
5. Liebl W, Ruile P, Bronnenmeier K, Riedel K, Lottspeich F, Greif I (1996) Analysis of a *Thermotoga maritima* DNA fragment encoding two similar thermostable cellulases, CelA and CelB, and characterization of the recombinant enzymes. *Microbiology* 142: 2533–2542. doi: 10.1099/00221287-142-9-2533
6. Huber R, Langworthy TA, Konig H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144: 324–333. doi: 10.1007/BF00409880
7. Chhabra SR, Shockley KR, Ward DE, Kelly RM (2002) Regulation of *endo*-acting glycosyl hydrolases in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* grown on glucan-and mannan-based polysaccharides. *Appl Environ Microbiol* 68: 545–554. doi: 10.1128/AEM.68.2.545-554.2002
8. Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC, Fraser CM (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323–329. doi: 10.1038/20601
9. Kim YH, Kwon TK, Park SS, Seo HS, Cheong JJ, Kim CH, Kim JK, Lee JS, Choi YD (2000) Trehalose synthesis by sequential reactions of recombinant maltotriose synthase and maltotriose synthase trehalohydrolase from *Brevibacterium helvolum*. *Appl Environ Microbiol* 66: 4620–4624. doi: 10.1128/AEM.66.11.4620-4624.2000
10. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
11. Bok JD, Yernool DA, Eveleigh DE (1998) Purification, characterization, and molecular analysis of thermostable cellulases celA and celB from *Thermotoga neapolitana*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4774–4781. doi: 10.1128/AEM.64.12.4774-4781.1998
12. Kim CH (2022) Characterization of the recombinant cellulase A from *Thermotoga maritima*. *J Appl Biol Chem* 64: 213–216. doi: 10.3839/jabc.2021.03