

## *Cellulomonas biazotea* cellobiase gene의 대장균에의 형질발현

박영길·연창석·최영길  
한양대학교 유전공학과

### Expression of *Cellulomonas biazotea* Cellobiase Gene in *E. coli*

Park, Young-Kil, Changsuck, Yon and Yong-Keel, Choi  
Dept. of Genetic Engineering, Han Yang Univ., Seoul 133, Korea

**ABSTRACT:** Cellobiase ( $\beta$ -glucosidase) is an enzyme of the cellulase system in cellulolytic microorganisms.

The chromosomal DNA fragment which include cellobiase gene of *Cellulomonas biazotea* was cloned in *Escherichia coli* via plasmid pBR 322 vector. Restriction enzyme Sal I was used to obtain adequate size of fragments from *C. biazotea* chromosomal DNA.

The transformant of *E. coli* HB101 with recombinant plasmid pBG 101 showed cellobiase activity, which is not ordinary in *E. coli* HB101.

The enzyme activity of the transformant was as of 20% lower than that of *C. biazotea*.

**KEY WORDS** □ *Cellulomonas biazotea*, Cellobiase gene, Gene expression.

많은 섬유소 분해 미생물들의 cellulase system에 대해 효소학적인 연구는 많이 이루어졌었다고 할 수 있으나(Bisaria 1981, Hankin 1977) 이들에 대한 DNA 수준에서의 연구는 아직 미비한 상태라고 볼 수 있다.

Cellulase는 Endo- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-glucan glucanase, Exo- $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-glucan glucanase, 그리고  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4)-glucosidase 혹은 cellobiase의 일군의 효소들로서 이루어진다(Bisaria 1981). 이들 중 cellobiase는 섬유소 분해의 마지막 단계에 관여하여 cellobiase를 2분자의 포도당으로 전환시킨다.

1981년 Armontrout 등이 cellobiase gene의 cloning에 최초로 성공한 이후 Whittle 등은 다른 속간에도 cellobiase가 cloning될 수 있음을 밝혔다. 국내에서도 배 무 등(1984)이 *Cellulomonas* sp. CS 1-1로부터 cellobiase gene을 *E. coli*에 성공적으로 cloning한 보고가 있다.

본 실험에서는 *E. coli*에 다른 속으로 부터 cellobiase gene을 cloning하여 여기에서 나타나는 효소학적인 특징과 gene 구조 등을 고찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

Cellobiase gene의 donor로는 *Cellulomonas biazotea* ATCC 486을 사용하였다. 수용균은 *Escherichia coli* K 12 HB 101이고 이는 proline, leucine, thiamine auxotroph이다(Ray 1979).

#### 배 지

균주의 보관과 배양을 위해서 Luria-Bertanii (LB) 배지를 사용하였다. LB 배지는 tryptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g을 1l의 증류수에 녹여서 pH를 7.5로 맞추고, 고체 배지의 경우 agar를 20g 첨가하여 사용하였다. 항생제의 첨가

시에는 ampicillin은 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tetracycline은 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 용액을 만든 후 여과 멸균하여 사용하였다. 최소 배지(MM)는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.14g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.2g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g, KCl 0.5g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  0.01g을 950 ml의 증류수에 녹이고 여기에 탄소원으로 cellobiose 0.5g, growth factor로 proline, leucine은 미량, thiamine은 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 50 ml의 증류수에 녹여 여과 멸균하여 첨가하였다.

#### 효소 및 시약

Lysozyme, RNase A, Sal I, Bacterial Alkaline Phosphatase, T4 DNA ligase, Hind III digested  $\lambda$  DNA, Agarose, p-Nitrophenyl-1- $\beta$ -D-glucopyranoside (PNPG) 및 cellobiose는 Sigma 제품을, Bam HI은 Promega Biotec. 제품을, 그리고 p-Nitrophenol (PNP)은 Merck 제품을 구입하여 사용하였다.

#### DNA 추출

Plasmid DNA의 추출은 Holmes와 Quigly (1981)의 boiling method를 사용하였다.

Chromosomal DNA 추출은 Davis(1980)의 방법을 변형시켜 다음과 같이 시행하였다. LB 배지에서 12시간 진탕 배양한 배양액 15 ml를 원심분리하여 세포를 수확하고, 이를 5 ml의 STE buffer(0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 현탁하였다. 여기에 lysozyme을 1 mg/ml되게 첨가하여 37°C에서 2시간 방치한 후 10% SDS를 200  $\mu\text{l}$  첨가하여 80°C에서 5분간 중탕 가열하였다. 여기에 5 M sodium acetate 1 ml를 첨가한 후 0°C에서 60분간 저온 처리하여 4°C, 15,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후 상등액에 동량의 iso-propanol을 첨가하고 -70°C에서 15분간 저온 처리하였다. 저온 처리 후 다시 4°C, 15,000 rpm으로 원심분리하여 DNA를 침전시켜 건조하였다.

#### 재조합 plasmid의 조립

15 ml씩의 배양액에서 추출한 plasmid와 chromosomal DNA를 각각 100  $\mu\text{l}$ 의 restriction enzyme buffer(High, Medium)에 녹인 후 제한 효소 Sal I과 Bam HI은 High buffer, Pst I과 Hind III는 Medium buffer에 각각 10 unit씩 가하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 plasmid

DNA에 2 unit의 Alkaline phosphatase를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 효소 처리가 끝난 DNA는 10 mM Tris-HCl, pH 7.0으로 포화시킨 재증류 phenol로 추출, 정화하였다. 얻어진 DNA들을 각각 50  $\mu\text{l}$ 의 ligation buffer에 녹여 같은 제한 효소 절단 DNA끼리 혼합하였다. 각각의 DNA 혼합액에 2 unit씩의 T4 DNA ligase를 가하여 12°C에서 18시간 ligation시켰다.

#### 형질 전환

형질 전환은  $\text{CaCl}_2$ 와 저온 처리에 의한 Mandel과 Higa(1970)의 방법을 사용하였다.

형질 전환된 수용균액을 고체 선택 배지(MM+ampicillin 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ +cellobiose 0.5%, 혹은 MM+tetracycline 14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ +cellobiose 0.5%)에 도말하여 37°C에서 3~4일간 배양하였다.

#### 전기 영동

전기 영동 방법은 Maniatis(1982)의 방법을 기초로 하였다.

Agarose의 농도는 0.7%로 하였으며 running buffer는 TAE, loading buffer는 type II를 사용하였다. Gel tray의 크기는 10×6 cm이고 8개의 well을 만드는 comb을 사용하였다. 전기 영동은 100 V로 약 2시간 동안 시행하였으며 염색은 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ethidium bromide 용액에서 1시간 하고 증류수에 담그어 10분간 탈색하여 UV-transilluminator로 DNA band를 확인하였다. 사진 촬영은 Yashica FR II 카메라에 25 A red filter를 부착시켜 하였고 film은 Kodak Microfilm(ASA 25)을 사용하였다.

#### Cellobiase 추출

37°C에서  $A_{600}=1$ 이 되기까지 진탕 배양한 100 ml의 LB 배지 배양액 35 ml를 4°C에서 15분간 3,500 rpm으로 원심분리하여 세포를 수확하였다. 이 세포 침전물을 생리 식염수로 세척한 후 다시 침전시켜 5 ml의 sodium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.5)에 녹여 효소액으로 사용하였다.

#### 효소 역가의 측정

효소 역가의 측정은 Srinivasan(1969)의 방법을 사용하였다. 먼저 2 ml의 sodium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.5)와 0.5 ml의 PNPG를 혼합하여 40°C에서 10분간 전처리한 후 이 혼합액에 효소액 0.5 ml를 첨가하고 43°C에서 30분간 반응

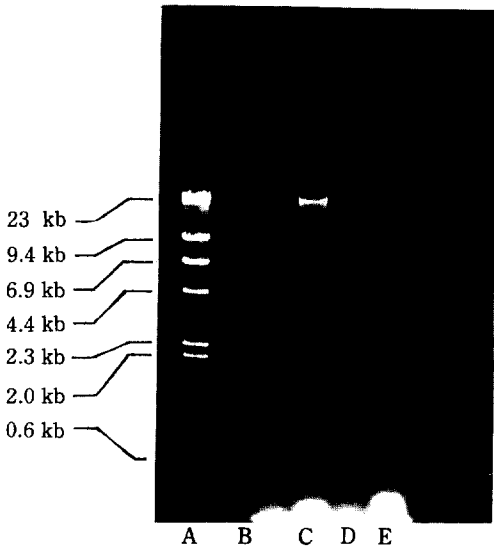
시킨 후 2ml의 1M sodium carbonate를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응이 끝난 후 용액을 spectrophotometer로 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

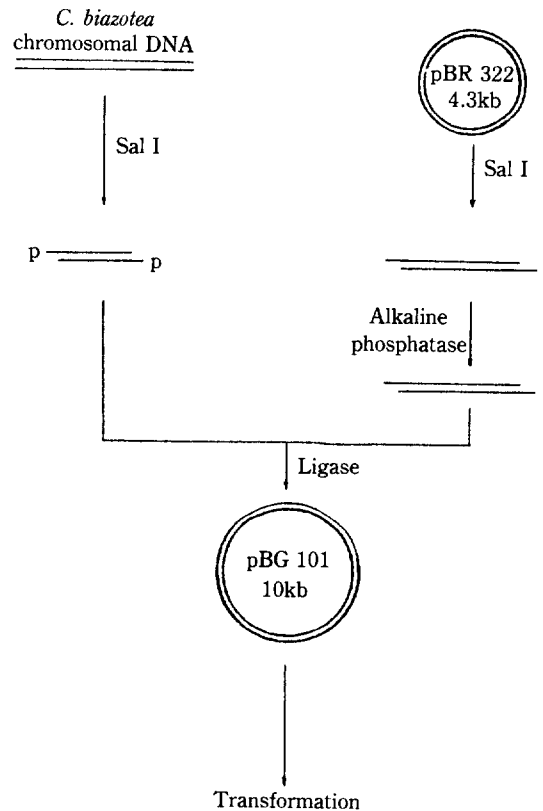
**재조합 plasmid의 조립**

*Cellulomonas biozotea*의 chromosomal DNA를 추출하여 BamHI, HindIII, Pst I, Sal I의 4가지 제한효소를 처리하여 그 단편들의 크기를 살펴 보았다(Plate 1). 결과의 BamHI 절단 단편들은 특징적으로 몇개의 band들을 보이고 있는데 이것은 chromosomal DNA내에 BamHI의 인식 부위가 비교적 규칙적으로 나타남을 보여 주었다. HindIII의 경우는 23kb 크기의 band만 나타났는데 그 원인은 이 효소의 인식 부위가 A↓AGCTT인데 반해 *C. biozotea*의 G+C content는 70% 이상이므로(Sneath 1986) 다른 제한효소의 인식 부위에 비해 이 효소의 인식 부위가 나타날 확률이 적기 때문이었다. 제한효소 Pst I은 1~10kb 정

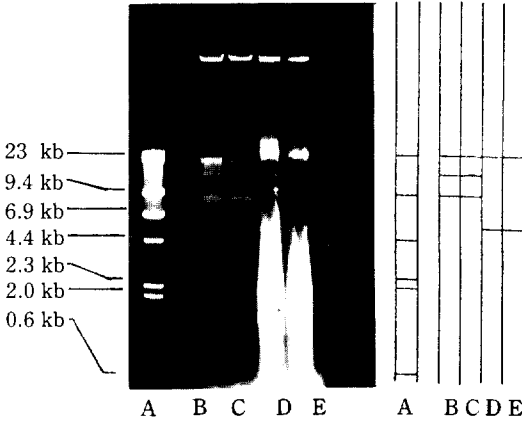
도의 절단편을 생성하였으며, SalI의 경우는 5~20kb 정도의 절단편을 생성하였다. 이들 제한효소중 BamHI과 Sal I은 plasmid pBR 322의 ampicillin 저항성을, Pst I은 tetracycline 저항성을 불활성화시킨다. 이들 제한효소로 절단한 chromosomal DNA 조각과 같은 제한효소로 절단한 plasmid pBR 322 DNA를 재조합시켜 수용균인 *E. coli* HB101에 형질 전환시켰다. 본 실험의 과정을 도표화 한 것이 Fig. 1이다. *E. coli*에 있어서의 형질 전환은 Mandel과 Higa(1970)이래 Cohen(1972) 등에 의해 CaCl<sub>2</sub>-저온 처리방법이 주로 이용되었으며 이후 Kushner(1978)는 RbCl 처리-형질 전환 방법을 개발하여 그 효율을 높게 되었다. 본 실험에서는 CaCl<sub>2</sub>를 사용하여 형질 전환을 유도하였으며 형질 전환된 수용균을 고체 선



**Plate 1.** Restriction pattern of *C. biozotea* chromosomal DNA.  
 Lane A; Hind III digested Lambda DNA  
 Lane B; Bam HI digested chromosomal DNA  
 Lane C; Hind III digested chromosomal DNA  
 Lane D; Pst I digested chromosomal DNA  
 Lane E; Sal I digested chromosomal DNA



**Fig. 1.** Strategy of cellobiase gene cloning via plasmid pBR 322 vector.  
 Sal I digested *C. biozotea* chromosomal DNA in various sizes(5-20kb) were ligated with Sal I digested, 5-OH pBR 322 and transformed in *E. coli*.



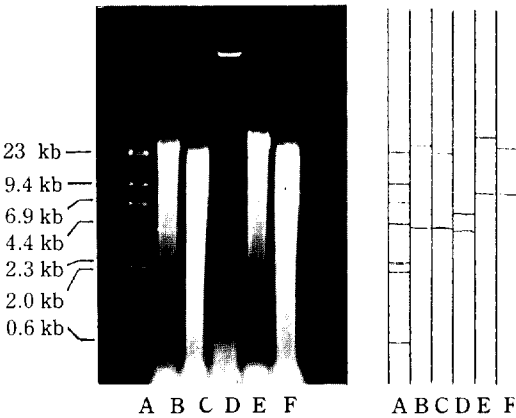
**Plate 2.** Recombinant plasmid pBG 101 and plasmid pBR 322.

Lane A; Hind III digested Lambda DNA  
 Lane B,C; plasmid pBG 101  
 Lane D,E; Bam HI digested plasmid pBR 322

택 배지에서 검증하였다. 즉, 형질 전환된 *E. coli* HB 101을 고체 선택 배지에 도말한 후 37°C에서 3일간 배양한 결과 Sal I으로 처리한 표본에서 colony가 나타났다.

**재조합 plasmid의 확인**

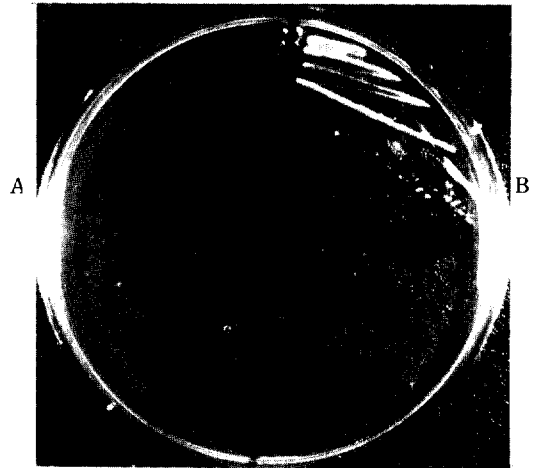
재조합 plasmid를 갖는 수용균 *E. coli* HB 101로부터 plasmid를 추출하여 그 크기를 plasmid pBR 322와 비교한 결과 약 10kb 정도의 크기를 갖는 것으로 나타났다(Plate 2). 이것은 plasmid pBR 322에 약 6kb 정도의 다른 DNA 조각이 삽



**Plate 3.** Sal I digested pBG 101

Lane A; Hind III digested Lambda DNA  
 Lane B,C; Bam HI digested plasmid pBR 322  
 Lane D; Sal I digested plasmid pBG 101  
 Lane E,F; plasmid pBG 101

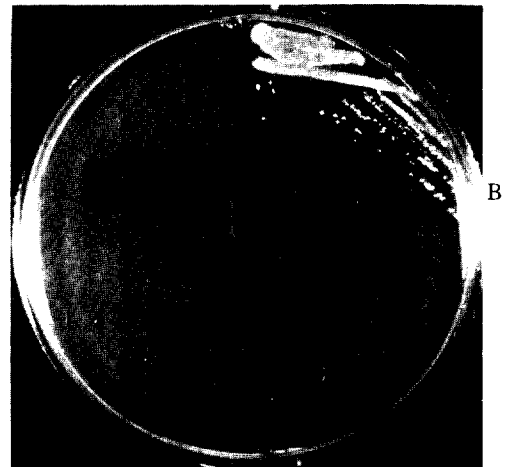
입되었음을 나타내었으며 같은 plasmid를 제한효소 Sal I으로 절단한 결과 4.3kb와 약 6kb의 두 band가 생성되었다(Plate 3). 이 큰 band의 DNA가 *C. biazotea*의 cellobiase gene을 포함하는 것으로 추측되며 그 gene의 발현은 plasmid pBR 322의 tetracycline gene의 promoter에 의한 것으로 생각되어졌다. 이렇게 만들어진 재조합 plasmid를 pBG 101이라고 명명하였다. Plasmid



**Plate 4.** Cellobiase activity test

*E. coli* HB101 pBG 101 could grow on cellobiose plate.

A; *E. coli* HB101 (no growth)  
 B; *E. coli* HB101 pBG 101



**Plate 5.** Ampicillin resistance test.

*E. coli* HB101 pBG 101 could grow on ampicillin plate.

A; *E. coli* HB101 (no growth)  
 B; *E. coli* HB101 pBG 101

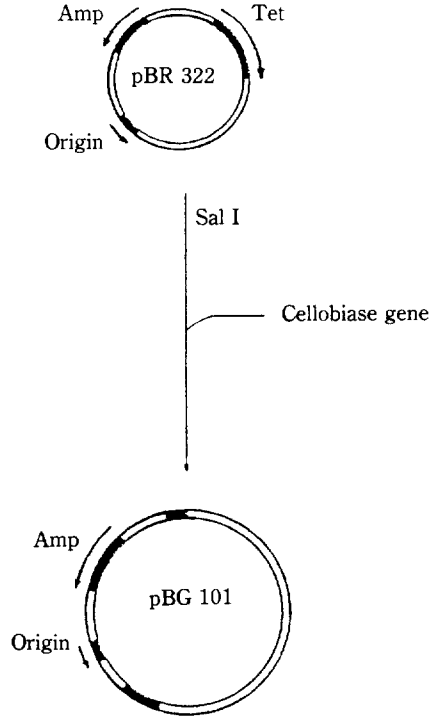


**Plate 6. Tetracycline resistance test.**  
*E. coli* HB101 pBG 101 couldn't grow on tetracycline pate.  
 A; *E. coli* HB101 pBR 322  
 B; *E. coli* HB101 pBG 101 (no growth)

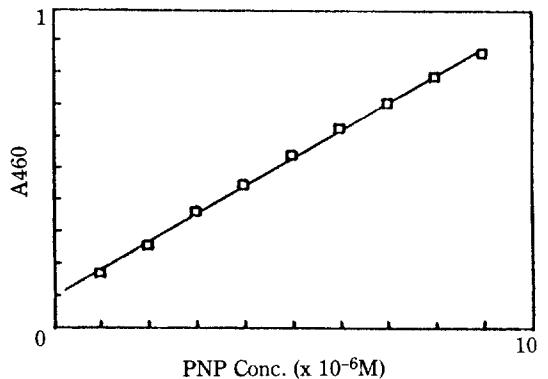
pBG 101의 표현형 확인 실험결과 형질 전환된 *E. coli* HB 101 pBG 101은 cellobiose와 ampicillin plate상에서 colony를 형성하였으며 tetracycline plate상에서는 자라지 못하였다 (Plate 4, 5, 6). 이상의 결과로 cellobiase gene이 plasmid pBR 322의 tetracycline 저항성 gene내로 삽입되어 이 gene의 발현을 중단시키고 대신 자신이 발현된 것으로 생각되었다 (Fig. 2).

**효소 역가의 측정**

섭유소 분해 미생물내에는 2 가지 cellobiase 가 존재한다. 이들은 aryl-β-D-glucosidase와 β-D-glucosidase로 전자는 PNPG의 β-glucosidic bond만을 가수분해하며, 후자는 PNPG와 cellobiose를 모두 가수분해한다 (Wakarachuk 1984). 효소 역가 측정에 사용된 기질은 PNPG로 이는 β(1→4)-glucosidic bond를 가지고 있으며 이 bond가 cellobiase에 의해 가수분해 되면 PNP가 형성되고 이 PNP는 노란색을 띄게 된다. 생성된 PNP의 양은 460 nm에서의 흡광도를 측정하여 이를 PNP에 대한 표준곡선과 비교하여 정량하였고 (Fig. 3) 정량된 PNP의 양으로 cellobiase의 역가를 측정하였다. 이러한 조건에서 A<sub>460</sub>이 0.1일 때 PNP는 약 6.5×10<sup>-6</sup> g/ml이며, 이때 cellobiase 1 unit는 1분 동안 6.5×10<sup>-6</sup>



**Fig. 2. Structure of pBG 101.**  
*C. biazotea* cellobiase gene was inserted in Sal I site at the Tet. resistance gene of pBR 322 to inactivate the Tet. gene.



**Fig. 3. Standard curve of PNP.**

g/ml의 PNP를 생산하는 효소의 양으로 결정하였다. 각 효소 표본들의 cellobiase 활성도는 Fig. 4와 같으며 *E. coli* HB 101 pBG 101의 cellobiase의 효소 역가는 *C. biazotea*의 그것에 비해 약 20% 정도로 낮았다. *C. biazotea*에 있어서

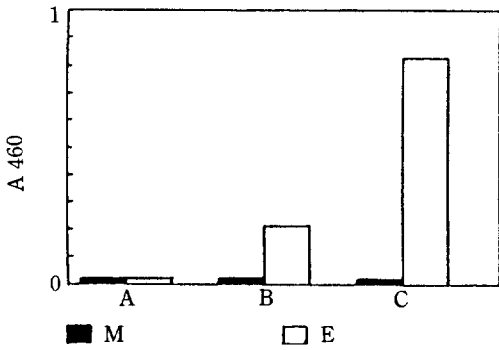


Fig. 4. Enzyme activity of transformant.

- A; *E. coli* HB101
- B; *E. coli* HB101 pBG101 (transformant)
- C; *C. biazotea*
- M; Medium
- E; Enzyme solution

cellobiase는 막 부착 효소이며 (Gong 1979) 형질 전환된 *E. coli*내에서도 역시 막 부착 효소인 것으로 나타났다 (Fig. 4). 이러한 사실은 수용균의 세포질에서 만들어진 이종 단백질인 cellobiase가 안정성을 가지고 있으며 또한 *E. coli*의 막 부착 기구를 사용하여 세포막에 부착된다는 것을 나타내는 것이었다.

이제 *E. coli*내로 cloning된 *C. biazotea*의 cellobiase의 amino acid 서열과 3차 구조 등의 단백질 성질 분석과 restriction mapping과 sub-cloning 등을 통한 plasmid pBG 101내의 cellobiase gene의 염기 서열을 밝힌다면 섬유소 분해 미생물의 cellulase system에 대한 이해를 좀더 명백히 할 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

Cellulase system에 대한 분자 수준에서의 연구의 일환으로 cellulase system 중의 한 효소인 cellobiase를 code하는 gene을 *Escherichia coli*에 cloning하였다.

Cellobiase gene의 donor cell로는 *Cellulomonas biazotea* ATCC 486을 사용하였고, 수용균은 *E. coli* K 12 HB101을 사용하였다.

*C. biazotea*의 chromosomal DNA를 제한효소 BamHI, HindIII, Pst I, Sal I 으로 각각 절단하여 역시 같은 제한효소들로 절단한 plasmid pBR 322에 삽입하여 수용균에 형질전환시켰다. 그 결과 제한효소 Sal I으로 절단한 포본에서 성공적으로 형질 전환이 이루어졌으며 새롭게 만들어진 재조합 plasmid를 pBG 101이라고 명명하였다.

Plasmid pBG 101의 크기는 약 10 kb 정도이었으며 형질 전환된 *E. coli* HB101 pBG 101의 cellobiase의 역가는 모균인 *C. biazotea*의 그것에 비해 약 20%가량으로 나타났다.

REFERENCES

1. Armentrout, R.W. and R.D. Brown. 1981. Molecular Cloning of Genes for Cellobiose Utilization and Their Expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(6), 1355-1362.
2. Bae, M. and J.M. Lee. 1984. Studies on Molecular Improvement of Cellulose Utilizing Bacterial Strains. *Kor. Jour. Microbiol.* **22**(3), 167-173.
3. Bisaria, V.S. and T.K. Ghose. 1981. Biodegradation of Cellulosic Materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 90-104.
4. Cohen, S.N. and C.Y. Chang. 1972. Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *E. coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**(1), 84-87.
5. Davis, R.W. and J.R. Roth. 1980. Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, 120-123.
6. Gong, C.S. and G.T. Tsao. 1979. Cellulase and Biosynthesis Regulation. *Annu. Rep. Ferment. Processes.* **3**, 111-140.
7. Hankin, L. and S.L. Anagnostakis. 1977. Solid Media Containing Carboxymethyl Cellulose to Detect Cx Cellulase Activity of Microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* **98**, 109-115.
8. Holmes, D.S. and M. Quigley. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.* **114**, 193.
9. Kushner, S.R. 1978. An improved method for

- transformation of *E. coli* with Col El-derived plasmids. Genetic Engineering. Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
10. Mandel, M. and A. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159-162.
  11. Maniatis, M., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, 150-169.
  12. Ray, Wu. 1979. Methods in Enzymology. Williams & Wilkins. Vol. 2, 1325-1329.
  13. Srinivasan, V.R. and Y.W. Han. 1969. Purification and Characterization of  $\beta$ -glucosidase of *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol. Dec.* 1355-1363.
  14. Stackebrandt, E. and O. Kandler. 1979. Taxonomy of the genus *Cellulomonas*, based on phenotypic characters and deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid homology, and proposal of seven neotype strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **29**, 273-282.
  15. Wakarchuk, W.W. and Y.W. Han. 1969. Purification and characterization of the  $\beta$ -glucosidase of *Cellulomonas fimi*. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1385-1389.

(Received Nov. 17, 1987)