

Clostridium acetobutylicum에서의 Gene Cloning

이 상 업

한국과학기술원 생물공정연구센터

*Clostridium acetobutylicum*은 전분·당분 그리고 그의 여러가지 탄소원으로부터 뷰탄올·아세트론·에탄올을 약 6:3:1의 비율로 생산한다. *C. acetobutylicum*은 acidogenic과 solventogenic phase로 불리는 두개의 distinct한 성장과정을 보이며, 엄격한 에너지 대사에 의해 조절되는 이균주의 primary metabolic pathway에 대해서는 최근 몇개의 총설에 정리되어 있다(1-3). 현재 화학공정에 의해 생산되는 뷰탄올·아세트론과의 가격경쟁을 위해 지난 10여년에 걸쳐 세계 각국의 여러 research units에서는 발효공정의 개선, 값싼 기질의 이용, solvent 분리공정의 개선 등에 대한 연구를 많이 해왔다(1). 최근 들어서는 이 외에도 균주 자체에 기인한 제한된 solvent 생산 능력을 대사 공학(metabolic engineering)에 의해 개선하려는 연구가 진행되고 있다. 대사공학을 위하여는 다른 총설(4)에서 이미 기술한 바와 같이 생화학·분자생물학·유전학의 지식이 총 집결되어야 하며, 이는 *Escherichia coli* & *Bacillus subtilis*와 같이 많이 연구가 되어온 균주들과는 달리 많은 시간과 노력의 투자가 요구된다.

이 논문에서는 대사공학에의 응용에 필수적이며 또한 그 자체의 기술이 학문적으로 상당히 관심을 끄는 *C. acetobutylicum*에서의 primary metabolic gene cloning에 대하여 정리해 보고자 한다. 우선 *C. acetobutylicum*의 primary metabolism과 일반적인 대사 조절에 대하여 간략히 살펴보고 이에 관련한 효소들과 gene cloning에 대하여 기술하고자 한다.

C. acetobutylicum의 대사와 조절

포도당으로부터 여러가지 acids와 solvents의 생성 과정을 간략히 살펴보면 다음과 같다. 포도당으로부터 pyruvate의 생성은 Embden-Myerhof path-

way에 의해서 이며 이때 2 mole의 ATP와 2 mole의 NADH가 생긴다. 이때 생긴 pyruvate는 pyruvate ferredoxin oxidoreductase에 의해 acetyl-CoA로 되며 acetyl-CoA로부터의 대사 과정을 Fig.1에 나타내었다. 물론 pyruvate로부터 acetyl-CoA 생성시 다른 side pathway들도 경쟁하는데 이는 acetoin과 lactate의 생성이 그것이다. 에탄올은 acetyl-CoA로부터 acetaldehyde를 거쳐 생성되는데, 이때 NAD(P)H를 reducing cofactor를 갖는 두개의 효소가 관여한다. 아세트산은 acetyl-CoA가 phosphotransacetylase에 의해 acetyl-phosphate로 바뀐뒤 acetate kinase에 의한 enzymatic hydrolysis에 의해 생기며 이때 ATP가 생성된다. 뷰티르산의 생성까지는 여러개의 효소가 작용하는데 그 중 첫번째인 thiolase (acetyl-CoA acetyltransferase)는 두개의 acetyl-CoA로부터 acetoacetyl-CoA를 만든다. 이 acetoacetyl-CoA는 acid와 solvent 생성에 있어서 여러가지 역할을 하는데 butyryl-CoA의 전구체, acetone의 생성, 그리고 아세트산·뷰티르산의 uptake 등이 있다. 아세트론은 acetoacetyl-CoA로부터 두개의 효소 작용을 거쳐 생성되는데 CoA transferase(acetoacetyl-CoA : acetate/butyrate : CoA transferase)와 acetoacetate decarboxylase)가 그들이다. Acetoacetyl-CoA는 fatty acid 대사에서 일어나는 것과 유사하게 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase, crotonase, 그리고 butyryl-CoA dehydrogenase 세 개의 효소에 의해 또 하나의 중요한 중간 생성물인 butyryl-CoA로 된다. 이 때 2개의 NADH가 산화된다. Butyryl-CoA는 아세트산이 생성되는 것과 마찬가지로 phosphotrasbutyrylase와 butyrate kinase에 의해 뷰티르산으로 바뀐다. 이때 역시 1분자의 ATP가 생성된다. 뷰탄올은 에탄올 생성과정과 유사하게 butyraldehyde dehydrogenase와 butanol

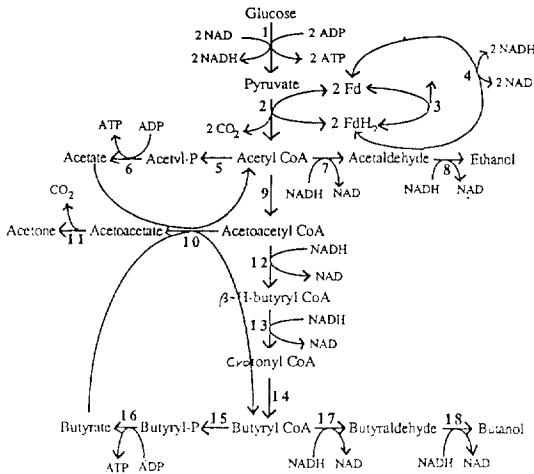


Fig. 1. Metabolic pathways in *C. acetobutylicum*. Enzymes are indicated by numbers as follows: (1) Embden-Meyerhof pathway enzymes; (2) pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; (3) hydrogenase; (4) NADH-ferredoxin oxidoreductase; (5) phospho-transacetylase; (6) acetate kinase; (7) acetaldehyde dehydrogenase; (8) ethanol dehydrogenase; (9) thiolase; (10) acetoacetyl-CoA: acetate/butyrate: CoA transferase (CoA transferase); (11) acetoacetate decarboxylase; (12) β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase; (13) crotonase; (14) butyryl-CoA dehydrogenase; (15) phosphotrans butyrylase; (16) butyrate kinase; (17) butyraldehyde dehydrogenase; (18) butanol dehydrogenase.

dehydrogenase에 의해 생성된다(1, 3).

대사 조절에 관여하는 많은 발효 및 효소 연구를 통해 현재 많이 알려져 있는데 gene cloning에 도움이 되는 사실들만을 간략히 살펴 본다. *C. acetobutylicum*의 발효과정은 acidogenic phase와 solventogenic phase로 나뉘는데 그로 인해 효소의 활성도도 발효과정에 있어서 다른 time profile을 보인다. Induction이 되는 효소로 알려진 것 중에는 CoA-transferase(5-7), acetoacetate decarboxylase(5,7-9), butyraldehyde dehydrogenase(9-11)와 butanol dehydrogenase(9-11)가 있다. 즉, 아세트산과 부탄올 생성에 관여하는 효소는 정도는 다르지만 적시에 induction이 되는 것을 알 수 있다. 부티르산에 관여하는 phosphotransbutyrylase와 butyrate kinase의 활성도는 실험실마다 결과가 조금씩은 다르지만 대체로 induction이 많이 안되는 것으로 알려져 있다(7, 8,

11). Acetoacetyl-CoA로부터 butyryl-CoA의 생성에 관여하는 세개의 효소에 대하여는 많은 연구가 되어 있지 않다.

또한 단백질 합성에 있어서 transcription을 방해하는 rifampin과 translation을 저해시키는 chloramphenicol을 발효중에 첨가하여 어떤 효소들의 합성과 활성도가 상대적으로 낮아지는가가 연구되었다(11, 12). 이중 부탄올 생성의 branch point enzyme인 butyraldehyde dehydrogenase는 단백질 합성 저해제 첨가후 다른 효소들에 비해 활성도가 급격히 떨어지는 현상이 나타나므로 부탄올 생성의 조절에 있어서 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다(11).

여러 group에서 solvent 생성에 필요한 효소의 induction mechanism에 대하여 주로 culture condition을 바꾸어 가면서 연구하였다(8, 11, 13, 14). 지금까지의 결과를 간략히 정리해보면 낮은 pH와 critical internal undissociated 부티르산의 농도가 solvent 생성 효소의 induction에 중요한 역할을 한다고 할 수 있다(15-19). 이것으로 *C. acetobutylicum*의 대사와 조절에 관여하는 미흡하나마 줄이기로 하고 *C. acetobutylicum*에서의 gene cloning strategy에 대하여 살펴보자.

*C. acetobutylicum*에서의 gene cloning 방법

*C. acetobutylicum*에서의 유전자 조작이 최근에 와서야 시작된 이유는 강한 activity를 갖는 exonuclease의 존재와 cell wall structure에 기인한 inefficient lysis가 genomic DNA의 분리에 어려움을 준 것이 첫번째 이유가 되겠다. 그러나 glycine을 첨가한 배지에서 cell을 배양하여 protoplast를 얻고 DNA 분리를 anaerobic 조건으로 함으로서 phage나 cosmid library를 만들기엔 충분한 40 Kb보다 큰 DNA를 얻을 수 있기 시작함으로써 본격적인 gene cloning이 진행되었다(20, 21). *C. acetobutylicum*에서의 gene cloning은 다음 세가지 방법에 의해 진행되었다.

i) Complementation of *E. coli* mutant : 이제까지 다른 bacteria로부터의 gene cloning시에도 자주 쓰였듯이 적당한 *E. coli* mutant(cloning하고자 하는

gene의 *E. coli* counterpart가 mutation된 strain)에 genomic library로 transform하여 그 corresponding activity를 갖는 것을 찾아내는 방법이다. 이 방법은 functional 한 protein expression이 이루어져야만 되며, 적절한 mutant와 growth condition을 이용하면 indicator plate에서의 positive screening이 가능하다. 그러나 *C. acetobutylicum*과 *E. coli*의 restriction/modification system이 다르므로 mutant에의 transformation은 주로 amplification step을 거친 후에 하는 것이 바람직하다.

ii) Immunological detection : 이 방법은 특별히 방법 (i)로 할 수 있는 mutant가 존재하지 않거나 activity가 외형적으로 나타나는 것이 아닐 때 주로 쓰여 왔다. 이는 우선 cloning 하고자 하는 gene의 단백질을 정제하여 그로부터 antibody를 만들고 이로서 library를 screening하는 것이다. 이 때는 반드시 functional한 protein expression이 필요치 않으며 단지 expression만 되면 된다. 보통 probe로서 쓰이는 항체는 polyclonal antibody mixture이기 때문에 미리 background cross-reaction을 예방하여야 한다. 이 방법은 주로 λ phage library의 plaque screening에 쓰였고, positive plaque은 screening에 쓰인 antibody를 인식하는 second antibody로서 detect한다. 만일 expression되는 recombinant protein이 unstable하면 β -galactosidase fusion vector와 같은 특수한 protein fusion vector들을 이용하면 되겠다(22).

iii) Oligonucleotide probe hybridization : 이 방법을 사용하려면 우선 cloning하고자 하는 gene의 단백질을 정제하여 적당한 길이의 amino acid sequence를 알아내어(주로 N-terminal protion) 그로부터 oligonucleotide probe를 reverse translation에 의해 만들어야 한다. *C. acetobutylicum*의 genomic DNA는 A+T%가 72%(23)로서 wobble position에 A나 T가 올 가능성이 많음을 미리 짐작할 수 있다. 그러므로 가능한 oligonucleotide mixture의 수는 줄일 수 있으나 A+T가 많아 melting temperature가 낮아지므로 보통 사용되는 probe보다 긴 probe가 사용되어야 한다. 이 방법은 위의 세가지 방법 등 기술적으로 가장 어렵다고 하겠다. 다음 section에서는 위의 방법으로 *C. acetobutylicum*에서의 cloning된 gene들을 정리해 본다.

Genes cloned from *C. acetobutylicum*

(i) Phosphotransbutyrylase and butyrate kinase

이 두 효소는 butyryl-CoA로부터 뷰티르산을 생성하는데 관여하는데 culture condition에 따라 reverse 방향으로도 반응할 수 있다(7, 24, 25). 이 reverse 반응을 이용하여 Cary *et al.*(26)은 *E. coli ato* mutant를 complementation함으로써 두개의 효소를 만드는 gene locus를 cloning하였다. *E. coli*는 *fadR* mutation에 의해 *ato*⁺인 경우 뷰티르산을 sole carbon source로서 사용하여 자랄 수 있으나, *ato* mutant의 경우는 뷰티르산을 활성화하지 못하여 못 자라게 된다. 이 때 사용된 mutant는 LJ32 (*fadR ato*)로서 뷰티르산이 첨가된 minimal media에서 pBR322 library를 screening함으로써 cloning하였다. 이 두개의 gene들은 서로 바로 옆에 붙어 있었으며 그들의 coordinated function과 structure로부터 operon을 형성하고 있음을 알았고, 이것은 최근 sequencing에 의해 다시 확인되었다(personal communication to Dr. Jeff Cary). 두개의 gene 중 어느 하나가 delete되면 뷰티르산을 carbon source로 이용하여 자라지 못했다. Transcription은 같은 방향으로 이루어지는 것을 알았고 두개의 gene이 250 bp 정도 떨어져 있었다. 또한 gene fragment를 반대방향으로 cloning 했을 때도 expression이 잘 되는 것으로부터 *E. coli* 내에서 이 operon의 promoter가 active하다는 것을 알았다. Phosphotransbutyrylase와 butyrate kinase는 *E. coli* 내에서 발현시 total cellular protein의 약 1% 정도였으며 Comma-ssie stained SDS-PAGE로 쉽게 detection 되었다.

(ii) Thiolase

*C. acetobutylicum*에서 thiolase는 acid uptake에 관여하는 열역학적으로 unfavorable한 반응인 두개의 acetyl-CoA를 condensation하여 acetoacetyl-CoA를 생성한다. *C. pasteurianum*에서는 2개의 thiolase(27)가 발견되었으나 *C. acetobutylicum*에서는 한개만이 발견되었다(28). 이는 Wiesenborn *et al.*(28)에 의해 분리 정제되었는데 native enzyme은 4개의 44 KDa monomer로 구성되어 있으며 physiological range인 pH 5.5~7.0에서 높은 활성도를 보였다. 이렇게 thiolase의 활성도가 internal pH에

따라 크게 변하지 않는 것은, 이 효소가 solvent 뿐 아니라 뷰티르산의 생성시에도 관여하기 때문일 것이라는 점이 흥미롭다. 이렇게 정제된 thiolase를 이용하여 Petersen과 Bennett(29)은 토끼에서 만든 anti-thiolase antibody로 λ phage library plaque를 screening하여 *C. acetobutylicum* thiolase gene을 cloning하였다. 처음에는 N-terminal amino acid sequencing을 하여 oligonucleotide probe를 만들려고 했으나 highly degenerate codon 때문에 probe design이 용이치 않아 antibody screening을 이용하게 되었다. Cloning된 thiolase gene은 western blot에 의해 *E. coli*에서 잘 expression되는 것을 알았고, enzyme assay 결과 thiolase gene을 갖는 *E. coli* DH5 α 에서 high level activity를 detection하였다. 이 cloned gene을 이용하여 genomic DNA에 hybridization study를 해본 결과 또 다른 homologous gene은 없었으며, 그러므로 만약 또 하나의 thiolase gene이 있다면 sequence가 많이 다를 것이라는 결론을 얻었다.

(iii) CoA-transferase

CoA-transferase는 acetoacetyl-CoA로부터 CoA moiety를 아세트산이나 뷰티르산에 전이시켜 CoA thioester로 만드는데 관여하는 효소이다. 최근에 *C. acetobutylicum* ATCC 824로부터 CoA-transferase가 분리 정제되었다(30). 이 효소는 M_w 26 KDa와 28 KDa의 두개의 subunit으로 구성된 heterotetramer이며, 이를 coding하는 gene은 Cary *et al.*(31)에 의해 oligonucleotide hybridization에 의해 cloning되었다. 정제된 단백질의 각각의 N-terminal amino acid sequencing을 하여 26 KDa subunit의 경우는 4-fold degenerate 18-mer를, 그리고 28 KDa subunit의 경우는 12-fold degenerate 20-mer를 design하였다. 이 probe들을 이용하여 λ phage library를 screening하여 cloning하였다. 두개의 CoA-transferase subunit gene들은 27 bp 떨어져서 같은 방향으로 transcription 되었고 이로부터 operon type이란 것을 알았다. 이 gene의 promoter는 *E. coli*에서 작동하지 않았고, subcloning할 때 쓰인 vector의 promoter에 의해 expression될 수 있었다(31). Termination codon 뒤에는 길고 안정된 hairpin structure가 발견되어 transcription termination sequence로 사용됨을 알았다(personal communication to

Dr. G. Bennett).

(iv) Acetoacetate decarboxylase

이 효소는 CoA-transferase에 의해 acid가 uptake될 때 생기는 acetoacetate를 decarboxylation하여 아세톤으로 만드는데 작용한다. *C. acetobutylicum*의 acetoacetate decarboxylase gene은 거의 동시에 두 group에서 cloning되었는데, 두 group 모두 oligonucleotide hybridization 방법을 사용하였으며 우리 group에서는 λ phage library(32)를, 독일에서는 pUC9 plasmid library(33)를 screening하여 cloning하였다. Sequencing 결과 ribosome binding site는 consensus sequence와 많은 homology를 보였고 gene은 tandem UAA stop codon에 의해 termination되었다(33). 흥미롭게도 acetoacetate decarboxylase gene의 terminator region에서도 stem loop가 발견되었는데, 더욱 놀라운 것은 이것이 CoA-transferase의 그것과 같은 것이라는 점이었다. 좀 더 자세히 살펴본 결과 이 두개의 gene은 서로 반대 방향에서 마주 보는 방향으로 transcription해 나와 이 stem loop에서 termination되는 것을 알았다(personal communication to Dr. G. Bennett and Dr. E.T. Papoutsakis). 아직 정확한 mechanism은 모르지만 이 stem loop가 아세톤 생성 pathway의 gene regulation에 관여할 것이라고 추측된다.

(v) Butanol dehydrogenase

*C. acetobutylicum*에는 각각 NADH와 NADPH를 cofactor로 갖는 두개의 distinct한 butanol dehydrogenase가 존재한다(1, 10, 34). NADPH-dependent butanol dehydrogenase는 pH 8 근처에서도 활성도를 보이는 등 넓은 pH optimum을 가지며 aerobic 조건에서도 활성도를 잃지 않았다(10). 반면, NADH-dependent butanol dehydrogenase는 *C. acetobutylicum*이 solvent 생성시 갖는 internal pH와 근접한 낮은 pH에서 활성도가 높았다(10, 34). Welch *et al.*(34)은 *C. acetobutylicum* ATCC 824로부터 NADH-dependent butanol dehydrogenase를 분리 정제하였다. Butyraldehyde를 기질로 할 때 Km값은 16 mM이었으며 뷰탄올 생성 방향으로의 활성도가 50 배 정도 높았다. 전형적인 세포내부의 butyraldehyde 농도는 1 mM 정도이므로(6) NADH-dependent butanol dehydrogenase의 활성도는 기질농도 변화에 민감할 것이라는 것을 알 수 있다. 그러나 butanol

dehydrogenase가 분리 정제되기 이전에 이미 행한 cloning study는 우리가 butanol dehydrogenase를 이해하는데 더욱 혼동을 불러 일으켰다. Youngleson *et al.*(35)은 *C. acetobutylicum* P262로부터 plasmid library를 만들고 allyl alcohol resistant *E. coli* mutant(*adh*)를 이용하여 3.2 kb DNA fragment안에 alcohol dehydrogenase gene을 cloning하였다. 그러나 cloning된 dehydrogenase의 특성이 발효에 의해 얻어진 결과와 많이 달랐고, 특히 에탄올을 기질로 해도 활성도가 높았고 뷰탄올을 기질로 썼을 때의 활성도는 4배 밖에 높지 않았다. 그리하여 이 gene은 alcohol dehydrogenase gene으로 분류되었다(35). 이 alcohol dehydrogenase는 NADPH를 cofactor로 하는데 정확한 세포내 역할은 연구가 좀 더 필요하다. 이 *adh1* gene은 1164 bp(388 amino acids)로 구성되어 있는데 이는 Welch 등이 정제한 NADH-dependent butanol dehydrogenase(34)와 크기면에서는 비슷하다. 최근에는 정제된 NADH-dependent butanol dehydrogenase의 N-terminal sequencing에 의해 oligonucleotide probe hybridization 방법으로 ATCC 824의 genomic phage library로부터 gene을 cloning하였다(49). 이미 충분히 복잡해진 butanol dehydrogenase에 관한 연구는 또 하나의 다른 NADH-dependent butanol dehydrogenase가 분리·정제되어 더욱 복잡해졌다(34). 이 둘은 pH optimum과 cofactor 사용 정도, Km(butyraldehyde), Km(NADH), 그리고 pI가 다르다. 나중에 정제된 것은(BDH I) 먼저 정제된 butanol dehydrogenase(BDH II)보다 에탄올 생산에 더 많이 관여할 것이라고 제안되었다. 남아프리카 공화국 Woods팀의 alcohol dehydrogenase와는 두개 모두 homology가 거의 없었다. 지금 우리 group에서는 BDH I, II가 동시에 cloning된 DNA fragment로부터 여러가지 연구를 진행중이다(personal communication to E.T. Papoutsakis).

(vi) Lactate dehydrogenase

이미 기술한 바와 같이 *C. acetobutylicum*은 어떤 특정 발효 조건하(iron limitation 등)에서 lactate도 생성한다. Lactate dehydrogenase는 DSM 1731로부터 분리·정제되었는데 tetramer로 되어 있고 pH optimum은 5.8이다(50). Gene cloning은 이 효소를 정제한 group과 다른 group에서 행해졌다. Contag

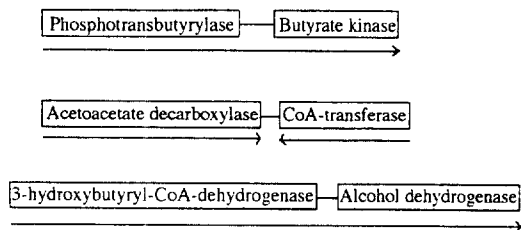


Fig. 2. *C. acetobutylicum* gene clusters. The arrows indicate the direction of transcription (5' to 3'). The sizes of the genes are not shown to scale.

et al.(36)은 포도당으로부터 anaerobic 조건에서 자랄 수 없는 *E. coli* mutant PRC436(*alhc adh⁺ acd*)를 plasmid library를 써서 *C. acetobutylicum* B643으로부터 cloning 하였다. 이 효소는 *E. coli*에서 functionally express되어 fermentation시 많은 lactate의 생성과 적은 에탄올, 아세트산의 생성이 보고되었다. 이 recombinant *E. coli*의 maxicell analysis 결과 38 kDa subunit이 prominent한 band로 얻어졌으며, 이는 strain DSM 1731로부터 정제된 것의 subunit size와 유사했다.

이제까지 소개한 7개의 cloned genes 이외에는 β -hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase gene이 alcohol dehydrogenase gene(35, 37)의 바로 옆 open reading frame subcloning에 의해 행운으로 cloning 되었다.

Analysis of cloned genes

이미 기술한 것과 같이 몇개의 gene들은 operon type으로 cluster되어 있다. 이를 transcription 방향과 함께 간략히 Fig. 2에 나타내었다. *C. acetobutylicum*의 promoter는 특별한 consensus sequence를 아직 알기 어렵다(특히 A+T rich nature 때문에). 이것은 regulation에 두 개 이상의 다른 promoter가 관여할지도 모른다는 추측에서 더욱 어려워진다(S.Y. Lee, unpublished results from PCR studies). 반면에 ribosome binding site는 비교적 쉽게 알 수 있었고, 따라서 fermentative gene 이외에도 이제까지 *C. acetobutylicum*에서 cloning된 gene들의 ribosome binding site를 Table 1에 나타내었다.

마지막으로 이제까지 기술한 것을 효소 정제는

Table 1. Sequence of ribosome binding sites of *C. acetobutylicum* genes.

Gene	Sequence ^a	Reference
<i>eng</i>	AAUAGGGGGUUAUAACUUG	40
<i>gln</i>	UAAAGGGGGAGUUGUAAAAUG	41
<i>adh</i>	UUAGGAGGUUAUGAUUUUAUG	36
<i>hbd</i>	UGAGGAGGAUUUAUCCUUG	37
<i>actB</i> (CoAT, 28 kDa)	UAAAGGAGCCUGCAUAAAAUG	42
<i>adc</i>	AGGAAGGUGACUUUUUAUG	33
<i>actA</i> (CoAT, 26 kDa)	AAAGGAGGGAUUAAAAUG	42
<i>buk</i>	GUGGAGGAAUGUUAACAUG	42
<i>ptb</i>	AAAGGAGUGUACGACCAGUG	42
<i>thl</i>	UUAGGAGGUUAGUUAGAAUG	42
<i>flox</i>	UUAGGAGGAUUUUUAUCAUG	43

^aThe region complementary to the 16S ribosomal RNA sequence and the initiation codons are underlined.

Table 2. Enzymes purified from *C. acetobutylicum*.

Enzyme	No. of subunits (size, kDa)	Reference
Butyrate kinase	2(39)	44
Phosphotransbutyrylase	8(31)	45
Thiolase	4(44)	28
Crotonase	4(43)	46
CaA-transferase	2(26)	30
	2(28)	
Acetoacetate decarboxylase	8(28)	47
Butanol dehydrogenase(NADH)	2(42)	48
Butyraldehyde dehydrogenase	2(56)	11
Lactate dehydrogenase	4(40)	50

Table 2에 gene cloning은 균주, 방법과 함께 Table 3에 정리하였다.

전 망

아직까지 clone되지 않은 metabolic gene 중에 중요한 것이 butyraldehyde dehydrogenase gene이다. 이 효소는 상당히 불안정해서 우리 lab을 비롯한 많은 lab에서 cloning을 시도하고 있으나 아직까지는 무위로 끝나고 있다. Hydrogenase gene 역시 효소의 불안정성과 assay의 어려움(anaerobic 조건에서) 때문에 cloning이 되지 않았다. 어쨌든 지금까지의

Table 3. Fermentative genes cloned from *C. acetobutylicum*.

Corresponding enzyme	Cloning method ^a	DNA source	reference
Butyrate kinase	GC	ATCC 824	26
Phosphotrasbutyrylase	GC	ATCC 824	29
Thiolase	AI	ATCC 824	29
3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	GC, Subcloning	P262	37
Co-A transferase	OH	ATCC 824	31
Acetoacetate decarboxylase	OH	ATCC 824	32
		DSM 792	33
Butanol dehydrogenase (NADH)	OH	ATCC 824	49
Alcohol dehydrogenase (NADPH)	GC	P262	35
Lactate dehydrogenase	GC	B643	36

^aThe abbreviations are GC for genetic complementation, AI for antibody immunoscreening, and OH for oligonucleotide probe hybridization.

cloning 결과를 종합해 볼 때 효소 정제 및 assay 때 anaerobic 조건으로 유지하는 것이 안전하며, 이미 앞에서 기술한 technique들을 이용하여 다른 gene들도 머지않아 cloning될 수 있을 것이다.

현재는 *C. acetobutylicum*의 primary metabolism에서 cloning된 acid와 solvent 생성에 관여하는 주요 효소들의 gene들을 이용하여 우리 lab을 중심으로 본격적인 metabolic engineering(대사공학)이 진행 중이다(4, 39, 51).

감 사

이 원고 작성에 도움을 준 생물공정연구센터 김미희양께 감사드립니다.

참고문헌

- Jones, D.T. and Woods, D.R. (1986) *Microbiol. Rev.* **50**, 484-524.
- Rogers, P. (1986) *Adv. Appl. Microbiol.* **31**, 1-60.
- 이상엽 (1992) 한국미생물학회지, in press.
- 이상엽 (1992) 생물산업, **5**, 3-10.
- Andersch, W., Bahl, H. and Gottschalk, G. (1983) *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 327-332.
- Hartmanis, M.G.N. and Gatenbeck, S. (1984) *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 1277-1283.
- Hüsemann, M.H.W. and Papoutsakis, E.T. (1989) *App. Microbiol. bitochnol.*, in press.
- Hüsemann, M.H.W. and Papoutsakis, E.T. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 435-444.
- Yan, R.-T., Zhu, C., Golemboski, C. and Chen, J. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 642-648.
- Dürre, P., Kuhn, A., Gottwald, M. and Gottschalk, G. (1987) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 268-272.
- Palosaari, N.R. and Rogers, P. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 2971-2976.
- Ballongue, J., Amine, J., Masion, E., Petitdemange, H. and Gay, R. (1985) *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 273-277.
- George, H.A. and Chen, J.S. (1983) *Appl. Environ. Microbiol.* **467**, 321-327.
- Ballongue, J., Janati-Idrissi, R., Petitdemange, H. and Gay, R. (1989) *J. Appl. Bacteriol.* **67**, 611-617.
- Hüsemann, M.H.W. and Papoutsakis, E.T. (1988) *Biotech. Bioeng.* **32**, 843-852.
- Hüsemann, M.H.W. and Papoutsakis, E.T. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1497-1500.
- Monot, F., Engasser, J.M. and Petitdemange, H. (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 422-426.
- Gottwald, M. and Gottschalk, G. (1985) *Arch. Microbiol.* **143**, 42-46.
- terracciano, J.S. and Kashket, E.R. (1986) *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 86-91.
- Allcock, E.R., Reid, S.J., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1982) *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 719-721.
- Zappe, H., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1986) *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1367-1372.
- Yong, R.A. and Davis, R.W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1194.
- Cummins, C.S. and Johnson, J.L. (1971) *J. Gen. Microbiol.* **67**, 33-46.
- Valentine, R.C. and Wolfe, R.S. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1948-1956.
- Meyer, C.L., Roos, J.W. and Papoutsakis, E.T. (1986) *Appl. Microbiol. Bitochnol.* **24**, 159-167.
- Cary, J.W., Petersen, D.J., Papoutsakis, E.T. and Bennett, G.N. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 4613-4618.
- Berndt, H. and Schlegel, H.G. (1975) *Arch. Microbiol.* **103**, 21-30.
- Wiesenbron D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2717-2722.
- Petersen, D.J. and Bennett, G.N. (1991) *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2735-2741.
- Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 323-329.
- Cary, J.W., Petersen, D.J., Papoutsakis, E.T. and Bennett, G.N. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1576-1583.
- Petersen, D.J. and Bennett, G.N. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3491-3498.
- Gerischer, U., and Dürre, P. (1990) *J. Bacteriol.*

- 172, 6907-6918.
34. Welch, R.W. (1990) Ph. D. Thesis, Rice University, Houston, TX, USA.
 35. Youngleson, J.S., Santangel, J.D., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 676-682.
 36. Contag, P.R., Williams, M.G. and Rogers, P. (1990) *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3760-3765.
 37. Youngleson, J.S., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1989) *J. Bacteriol.* **171**, 6800-6807.
 38. Lee, S.Y. (1991) Ph. D. Thesis, Northwestern University, Evanston, IL, USA.
 39. Mermelstein, L.D., Welker, N., Bennett, G.N. and Papoutsakis, E.T. (1992) *Biol/Technol.* **10**, 190-195.
 40. Zappe, H., Jones, W.A., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1988) *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1289-1292.
 41. Janssen, P.S., Jones, W.A., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 400-408.
 42. Petersen, D.J. (1991) PhD thesis, Rice University, Houston, TX, USA.
 43. Santangelo, J.D., Jones, D.T. and Woods, D.R. (1991). *J. Bacteriol.* **173**, 1088-1095.
 44. Hartmanis, M.G.N. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 617-621.
 45. Wiesenborn, D.P., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. (1989) *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 317-322.
 46. Waterson, R.M., Castellino, F.J., Hass, G.M. and Hill, R.L. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 5266-5271.
 47. Zerner, B., Coutts, S.M., Lederer, F. Waters, H.H. and Westheimer, F.H. (1966) *Biochemistry* **5**, 813-816.
 48. Welch, R.W., Rudolph, F.B. and Papoutsakis, E.T. (1989) *Arch. Biochem. and Biophys.* **273**, 309-318.
 49. Petersen, D.J., Welch, R.W., Rudolph, F.B. and Bennett, G.N. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 1831-1834.
 50. Freier, D. and Gottschalk, G. (1987) *FEMS Microbiol. Lett.* **43**, 229-233.
 51. Lee, S.Y., Mermelstein, L.D., Bennett, G.N. and Papoutsakis, E.T. (1992) *Ann. NY Acad. Sci.*: Biochemical Engineering VII, in press.