

섬유소기원 에탄올의 생산
(제 1 차년도 / 3 년 계획 연구결과보고)

Production of Cellulose Oriented Ethanol
(Report, First-Year Research of the Three-Year Plan)

연구기관
한국과학기술원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “바이오에너지 개발” 사업의 세부과제 “섬유소
기원 에탄올의 생산” 사업의 제 1 차년도 연구결과에 관한 최종보고
서로 제출합니다.

1986 년 6 월 일

연구기관명 : 한국 과학 기술 원

총괄연구책임자 : 이상기 (한국과학기술원 유전공학센터 선임연구원)

연구책임자 : 박무영 (한국과학기술원 교수)

연구원 : 박승환 (한국과학기술원 박사과정 학생)

윤기홍 (한국과학기술원 박사과정 학생)

이동석 (한국과학기술원 박사과정 학생)

김하근 (한국과학기술원 박사과정 학생)

황인규 (한국과학기술원 석사과정 학생)

박승길 (한국과학기술원 석사과정 학생)

요 약 문

1. 제 목 :

섬유소기원 에탄올의 생산

2. 연구의 목적 및 중요성

섬유소는 지구상에 가장 풍부한 유기물질이며, 식물의 광합성 작용을 통해 해마다 재생이 된다. 섬유소는 여러개의 포도당분자가 한줄로 연결된 물질이며, 필요한 기술만 개발된다면 포도당의 무진장한 원천이 된다. 포도당은 식품으로도 쓰이지만, 각종 발효제품의 원료가 된다. 에탄올은 포도당의 발효로써 얻어지며, 석유, 석탄에 대치될만한 좋은 에너지물질이다.

세균의 일종인 Zymomonas 는 효모균보다 더 좋은 알코올 생산균으로 알려져 있다. 그러나, 이 균을 이용하여 알코올을 생산할 경우, 원료는 포도당, 과당, 설탕만으로 국한되어 있어, 경제적인 생산은 불가능하다.

본 연구는, 알코올 생산균인 Zymomonas 속에 섬유소분해효소 유전자를 의식시켜, 이 균으로 하여금 값싼 섬유물질을 원료로 삼아 에탄올을 경제적으로 생산시키는 것을 궁극적인 목표로 삼는 것이다.

3. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구는 3년을 기간으로 삼고 계획된 것이며, 이 보고서

에 담긴 첫해의 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

3-1. pBR 2115 상의 CMCase 유전자 단편의 최소 유효부위의 결정
1984년 본 연구실에서 크로닝에 성공한 Bacillus subtilis의 섬유소분해 유전자(CMCcase gene)를 갖는 플라스미드 pBR2115(뒤에 pBSI으로 개칭)를 각종 제한효소로 잘라, 활성을 잃지 않는 최소한도의 유전자부위의 크기와 위치를 결정한다.

3-2. β -glucosidase 유전자를 크로닝

섬유소분자를 포도당까지 분해하려면, 이미 크로닝된 CMCcase 유전자 이외에, β -glucosidase 유전자가 참가하여야 한다. 이러한 목적으로, 강한 β -glucosidase 생산균으로 알려져있는 Alcaligenes faecalis로부터 해당 유전자를 따서 E. coli 속에 크로닝 시킨다.

3-3. β -glucosidase 유전자와 CMCcase 유전자를 한개의 플라스미드위에 옮김.

앞으로 이 두가지 유전자로써 알코올 생산균인 Zymomonas를 형질전환 시키기 위해, 동일 플라스미드가 β -glucosidase 유전자와 CMCcase 유전자를 공유하는 새로운 플라스미드를 만든다.

여기까지가 제 1차년도 연구목표였지만, 목표를 달성하고자 시간의 여유가 있어, 다음해의 과제인 Zymomonas와 E. coli 사이의 shuttle vector의 개발실험도 실시하였다.

4. 결과 및 활용에 관한 건의

섬유소분자를 포도당까지 분해할수 있도록, 두단계의 효소를 생산할수 있는 CMCcase 유전자와 β -glucosidase 유전자의 크로닝이 완성되었다. 더우기, 이 두 유전자는 동일 플라스미드에 직렬로 연

결되어 있어, 앞으로의 Bacillus 나 Zymomonas 의 형질전환작업에 편리하도록 되어 있다. 또, Zymomonas 와 E.coli 사이의 shuttle vector (pSR12)도 작성되었다.

앞으로 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 공유하는 플라스미드를 B. subtilis 나 B. megaterium 에 도입하여, 가용성 섬유물질을 포도당까지 분해시키는 두단계의 효소를 대량생산 하도록 한다. 그리하여, 여기서 생산된 포도당을 기질로 삼아 에탄올을 발효생산한다.

섬유물질로써 에탄올을 생산하는 다른 하나의 방법은, 에탄올 생산균인 Zymomonas 속에 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 동시에 도입하여, 이 세균으로 하여금 직접 섬유소를 분해하여 에탄올을 생산하게 하는 것이다. 이것을 위해서는 상기 두 유전자를 함유하는 플라스미드를 일단 이미 작성한 Zymomonas shuttle vector 인 pSR12 에 옮기고, 이어서 Zymomonas 속에 이 두 유전자를 도입시켜야 한다. 우리가 크로닝한 CMCase 유전자는 B. subtilis 속에서 모균보다 70 배나 높은 효소생성능을 보인바 있다. 이번에 크로닝한 β -galactosidase 유전자도 같은 플라스미드 상에서 CMCase 유전자에 연결되어 있어, 높은 활성을 나타낼 것으로 기대된다. 더 강력한 promotor 의 도입등으로 더욱 효소생산의 능률을 높여, 섬유물질에서 경제적인 에탄올 생산이 이루어질때까지 본 연구는 계속되어야 할 것이다.

5. 계획과 실적의 대비

3 개년 기한의 본 연구의 제 1 차년도 목표인 3 개항목, 즉

1) pBR2115 상의 CMCase 유전자 단편의 최소 유효부위의 결정,
2) β -glucosidase 유전자의 E.coli 속에서의 클로닝, 3) β -glucosidase 유전자와 CMCase 유전자를 공유한 하나의 플라스미드의 작성등은, 모두 100% 완성되었다. 그리고, 제 2 차년도 목표의 일부인 Zymomonas, E. coli 간의 shuttle vector 도 제작되었다.

SUMMARY

Production of Cellulose Oriented
Ethanol (Report of the 1st year
research of the 3 - year plan)

Cellulose is the most abundant organic material in the world and is renewable through the photosynthetic activity of green plants. Cellulose molecules are composed of numerous glucose units suggesting a tremendous potential source for glucose which may be used as food or substrate for various fermentation products. Should a proper technique is developed, ethanol can be one of the valuable endproducts which may be obtained from cellulose through glucose as an intermediate.

Recent studies have proved Zymomonas strains as a better producers of ethanol than yeasts in many respects. However, the narrow substrate range of these organisms limits their use in economical production of ethanol. The ultimate purpose of present study is to modify Zymomonas strains by introducing cellulase genes in them and to let the organisms produce ethanol economically using cellulosic materials as substrates.

The research was scheduled to complete in three years starting from May 1985, and the plans for the first year were

as follows : 1) localization of the CMCCase gene in plasmid pBS2115, 2) cloning of β -glucosidase gene in E. coli, and 3) construction of a single plasmid which has both CMCCase gene and β -glucosidase gene. These first-year research plans were completed, and a part of the second-year research, i.e., construction of a shuttle vector between Zymomonas and E. coli was also succeeded.

The Bacillus originated CMCCase gene which has been captured in our plasmid pBS2115 was found to be localized within a 1.6 kb chromosomal insert. A β -glucosidase gene of Alcaligenes faecalis was cloned in E. coli using pBR322 as a vector. The constructed plasmid containing the gene was named pBAF1200-p. The CMCCase on pBS2115 and the β -glucosidase gene of pBAF1200-p were relocated on a Baillus vector pUB110 and constructed two plasmids, pC_bC_x 8 and pC_bC_x 9. With these plasmids strains of Bacillus and Zymomonas will be transformed later. For the transformation of Zymomonas, a shuttle vector between Zymomonas and E. coli was constructed, and was named pSR12. This 7.7 kb plasmid, pSR12 has common restriction sites such as EcoRI, PstI, and XhoI, which can be used conveniently for introducing foreign genes in the plasmid. Especially, the XhoI site is flexible and accepts not only XhoI-cuts but also SalI- and AvaI-cuts of DNA fragments. Furthermore, this site is overlapped with the Km^r gene thus can be used to confirm an insertion of foreign gene.

CONTENTS

I. Introduction.....	13
II. Localization of CMCCase in pBS2115.....	18
II-1. Deletion of Hind III fragment.....	18
II-2. Deletion of 1.3 Kb PvuII-HindIII fragment from pBS2116.....	19
II-3. Subcloning of CMCCase gene from pBS2116 with San3A.....	21
II-4. Further deletion of 1.6 Kb with San3A.....	22
III. Cloning of β -glucosidase gene.....	24
III-1. Methods.....	24
III-2. Results.....	25
IV. Construction of CMCCase-Cellobiase plasmids.....	27
IV-1. Methods.....	27
IV-2. Results.....	31
V. Construction of shuttle vectors between <u>Zymomonas</u> and <u>E. coli</u>	33
V-1. Development of vectors.....	33

V-1-1. Construction of hybrid plasmids between pZA2 and pUC9.....	33
V-1-2. Construction of pRR222.....	35
V-1-3. Construction of Shuttle vectors.....	36
V-2. Transformation of <u>Zymomonas</u> with shuttle vectors..	36
VI. Conclusions.....	38
VII. References.....	40

목 차

제 1 장 서 론	13
제 2 장 pBS2115 상의 섬유소분해 유전자부위의 결정	18
제 1 절 Hind III 단편의 제거	18
제 2 절 pBS 2116 에서 1.3 kb PvuII-HindIII 단편의 제거	19
제 3 절 pBS 2116 에서 Sau 3A를 이용한 CMCase 유전자의 사브크로닝	21
제 4 절 Sau 3A를 통한 1.6 kb 까지의 축소	22
제 3 장 β -glucosidase 유전자의 크로닝	24
제 1 절 방 법	24
제 2 절 결 과	25
제 4 장 CMCase-Cellobiase 유전자 플라스미드의 작성	27
제 1 절 방 법	27
제 2 절 결 과	31
제 5 장 <u>Zymomonas</u> - <u>E. coli</u> 간의 shuttle vector 의 작성	33
제 1 절 Vector 의 개발	33
1. pZA2 와 PUC9 간의 잡종플라스미드의 제조	33
2. pRR 222 의 제조	35

3. Shuttle vector 의 제작	36
제 2 절 Shuttle vector 를 이용한 <u>Zymomonas</u> 의 형질 전 환	36
제 6 장 결 론	38
참고문헌	40

제 1 장 서 론

녹색식물의 광합성작용을 통해 해마다 지구상에 490억톤이 생산되는 섬유소의 일부를 당화시켜 포도당으로 만들어, 식량, 에너지 문제의 해결에 이바지할 것은 오래전부터 세계인의 과제이었으나 아직도 실용화된 예는 없다. 다행히 최근의 유전공학기술에 힘입어 이분야의 연구에 활력소가 가해지고 있다. Whittle 등(1), Collmer 등(2), Cornet 등(3) Sashihara 등(4)에 이어, 우리도 1984년에 섬유소분해유전자의 크로닝에 성공한 것을 계기로, 우리나라에서도 풍족히 얻을수 있는 섬유물질을 원료로한 에탄올 생산연구에 박차를 가하고 있다.

Bacillus subtilis가 가진 섬유소분해유전자를 pBR322에 실어 Escheichia coli속에서 크로닝 시켰다. 이렇게해서 만들어진 섬유소분해유전자를 가진 플라스미드 pBS 2115는 숙주세포인 E. coli속에서 그 수가 늘어나, 모균인 B. subtilis보다 40배나 높은 섬유소분해효소의 생산능을 보여, 연구에 밝은 전망을 제시했다.

이러한 결과를 바탕으로 삼고 본 연구는 시작되었다. 1985년 5월부터 1988년 5월까지, 연구기한은 3년으로 잡고 년차적인 연구개발목표와 소요예산액은 표 1과 같다. 이가운데 본 보고서에 담긴 제 1차년도 연구목표를 구체적으로 설명하기로 한다.

플라스미드 pBS 2115 (뒤에 pBS1으로 개칭)은 pBR 322에 B. subtilis의 염색체 DNA 단편을 부쳐서 만든 것이며, 7.5 kb의 크기를 갖었다. 이 가운데 3.2 kb가 염색체 단편인데, 이것을 각

중의 제한효소로 잘라 섬유소분해유전자가 차지하는 DNA의 크기와 위치를 밝히고 제한효소 작용부위를 세밀히 밝혀두는 것은 앞으로의 연구진행에 꼭 필요한 작업이다.

표 1. 년차별 연구개발 내용 및 범위 (연구개발신청서에서)

구분 년차별	연구개발내용	연구개발범위
1차년도 ('85. 5. 7- '86. 5. 6)	- pBS 2115 상의 CMCase 유전자 단편의 최소 유효 부위의 결정 - β -glucosidase 유전자를 <u>E. coli</u> 에 옮김 - β -glucosidase 유전자와 CMCase 유전자를 한개의 플라스미드 상에 올려 놓음	사브크로닝 지도작성 샤드간크로닝 사브크로닝
2차년도 ('86. 5. 7- '87. 5. 6)	- <u>Zymomonas</u> 속에 새로히 만들어진 플라스미드를 전입시켜 CMC를 glucose 까지 분해하도록 함 - <u>Zymomonas</u> 내에서의 플라스미드의 정착 및 에탄올의 생산대사 실험	전환실험 대사작용조사
3차년도 ('87. 5. 7- '88. 5. 6)	- <u>Zymomonas</u> 전환체에 의한 섬유소 기원 에탄올 발효 실험	발효 최적화 실험

pBS 2115 가 가진 유전자가 만들어내는 섬유소분해효소 (CMCase) 는 섬유소분자를 분해하여 oligosaccharide 까지는 만들지만

포도당까지는 가지 못한다. 따라서 또 하나의 유전자, β -glucosidase 유전자의 크로닝이 필요하다.

이렇게 하여 E.coli 속에 따로따로 크로닝된 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자는, 하나의 플라스미드에 공존하도록 작업을 하여 다음단계의 Zymomonas의 형질전환실험에 대비한다.

Gram 음성세균인 Zymomonas는 여태까지 알코올 발효에 주로 쓰여오던 Saccharomyces 호모에 비교하여, 다음과 같은 여러가지 장점을 갖고 있어 특히 산업용 알코올의 제조에는 이 세균이 주로 사용될 것으로 전망된다.

1) Zymomonas mobilis는 Saccharomyces cerevisiae나 S.uvarum에 비하여, 기질에 대한 에탄올의 생산률(p/s)이 높다. Bel-aich와 Seney(5)는 Z.mobilis를 2g/l의 glucose를 가진 복합, 금속, 합성배지로서, glucose 1g당 0.39 내지 0.40g의 에탄올 생산률을 보였다. 또, Dawes 들(6)은 배지속의 glucose 농도를 20g/l로 높은 발효에서, 0.43g/g의 에탄올 생산률을 얻었다. Glucose 농도를 더욱 높혀 46g/l로 한 배지를 이용하여 Millis(7)는 에탄올 생산률 0.49g/g을 보고했다. 이들의 보고를 종합하면 Zymomonas는 이론적생산률(theoretical yield)인 0.51g ethanol/g glucose의 76%에서 96%의 좋은 성적을 보이고 있는 셈이다. 참고로, S.uvarum은 이론적 에탄올 생산률의 86%로 보고되어 있다(8). 이렇게 Zymomonas가 사용된 기질량에 대해 높은 에탄올 생산률을 보이는 주 원인은, Saccharomyces가 glucose를 ATP 2분자가 생산되는 glycolysis 대사경로를 통해 에탄올을 생

산하는 반면, Zymomonas 는 1 분자의 ATP 를 만드는 Entner-Doudoroff 경로를 밟기 때문에 생각된다. 그리하여, Zymomonas 가 glucose 1mol 당 1.9 mol 의 에탄올을 생산하는 반면, biomass 의 생산량은 같은 조건하에서 Zymomonas 는 Saccharomyces 의 절반에 멈춘다 (8).

2) Zymomonas 는 알코올을 빨리 생산한다. Rogers 들(8)의 연구에 의하면 Z.mobilis 는 S.uvarum 에 비하여 glucose 비섭취율 (specific glucose uptake rate, g/g/h) 이 2 배, 에탄올비생산률 (specific ethanol production rate, g/g/h) 은 3 배로 높다.

3) Zymomonas 는 높은 농도의 기질에서도 자란다. Kluyver 와 Hoppenbrouwers (9)는 25% glucose 용액에서 10% (wt/vol) 의 에탄올의 생산을 보았다. 또, Swings 와 DeLey (10)는 그들이 가진 Zymomonas 균주들의 절반이 40% glucose 속에서 자랄수 있었다고 보고했다.

4) Zymomonas 는 세균유전자를 쉽게 받아 들인다. 최근의 유전공학의 대상이 되는 유전자들은 세균에서 만 것이 많고, 이것들은 대부분 1 차적으로 E.coli 에 크로닝 시킨다. 따라서 세균에서 분리한 섬유소분해유전자 같은 것도 진핵세포인 효모균보다, 같은 무핵세포 세균인 Zymomonas 에 쉽게 옮겨질 것이다.

이상의 장점들을 고려하여, B.subtilis 에서 크로닝한 CMC-ase 유전자와 A.faecalis 에서 만 β -glucosidase 유전자는, 마지막

으로 Zymomonas 에 옮겨 섬유물질을 원료로한 에탄올의 생산의 길을 개발하기로 한다.

제 2 장 pBS 2115 상의 섬 유소분해 유전자부위 결정

*Bacillus subtilis*의 염색체에서 섬 유소 분해유전자 (CMCase gene)를 분리하여 처음으로 pBR322에 부쳐서 만든 플라스미드 pBS2115는, 크기가 7.5 kb이고, 해당 유전자는 그 가운데 3.2 kb인 염색체 DNA속에 들어있다. 한편, 본 세균의 CMCase 단백질의 분자량이 본 연구실에서 약 32,000으로 밝혀짐에 따라, CMCase 유전자의 크기는 1.0 kb 미만으로 추정 됨으로, 염색체 DNA 3.2 kb를 더욱 축소시켜, CMCase 유전자가 차지하는 DNA부위를 결정하기로 했다. 여기서 얻어지는 결과는 앞으로 해야할 유전자의 염기분석 실험에 필요한 것이다.

제 1 절 Hind III 단편의 제거

그림 II-1에서 보는 바와 같이, pBS2115에는 2개의 Hind III

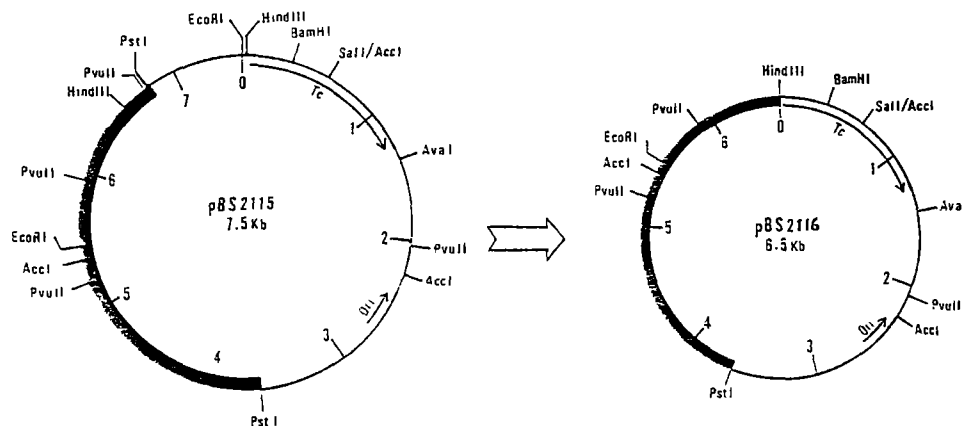


그림 II-1. pBS2115에서 Hind III 단편의 제거

부위가 있고, 그 하나는 염색체단편위에 있다. 따라서 이 두 Hind-III사이의 단편을 제거 하므로써, 염색체 DNA의 일부를 포함한 약 1.0 kb를 축소시킬수가 있다.

pBS2115를 HindIII로 소화시키고, 큰 DNA 단편을 agarose gel 전기영동으로 분리했다. 이것을 phenol, phenol/chloroform 추출법으로 순수화시킨 다음, T4 DNA ligase로 self-ligation 시켰다. Ligation mixture로써 E.coli HB101을 형질전환시킨 다음, Congo red 염색법으로 CMC-가수분해능을 조사했다. 모든 전환체가 크로니의 주위에 halo를 형성하였다. 플라스미드를 분화하여, 전기영동으로서 Hind III 단편의 제거가 확인되었다. 이 실험으로 pBS2115는 Hind III 단편을 잃어도 CMCase⁺의 표현형을 유지함을 알았다. 얻어진 플라스미드는 pBS2116으로 명명되었다(그림 II-1).

제 2 절 pBS2116에서 1.3 kb PvuII-Hind III 단편의 제거

pBR322 DNA를 Hind III와 Pvu II로 이중소화시킨 다음, replicon과 Amp^r 표식을 갖은 2.3 kb 단편을 전기영동으로 분리하고 순수화시켰다. 이어서, pBS2116을 먼저 Hind III로서 소화시킨 다음 Pvu II로 부분소화 시켰다. 소화된 용액을 1.0% agarose gel 전기영동으로 분석하고, 1.3 kb의 PvuII-Hind III 단편을 dialysis membrane bag과 3MM paper로서 분리하였다. 분리된 DNA 단편은 순수화한 다음, 미리 준비해둔 pBR322 DNA의 2.3 kb 단편에 연결시켰다(그림 II-2). E.coli HB101을 형질전환시킨 다음 Amp^r 크론을 선별하고, 이들에게 CMCase 생산능을 Congo red 염색법으로 조사했

다. 그러나, 이들 전환체들 가운데 하나도 halo 를 형성하는 것을 보지 못했다. PvuII 은 CMCase 유전자를 잘라버린 것이다.

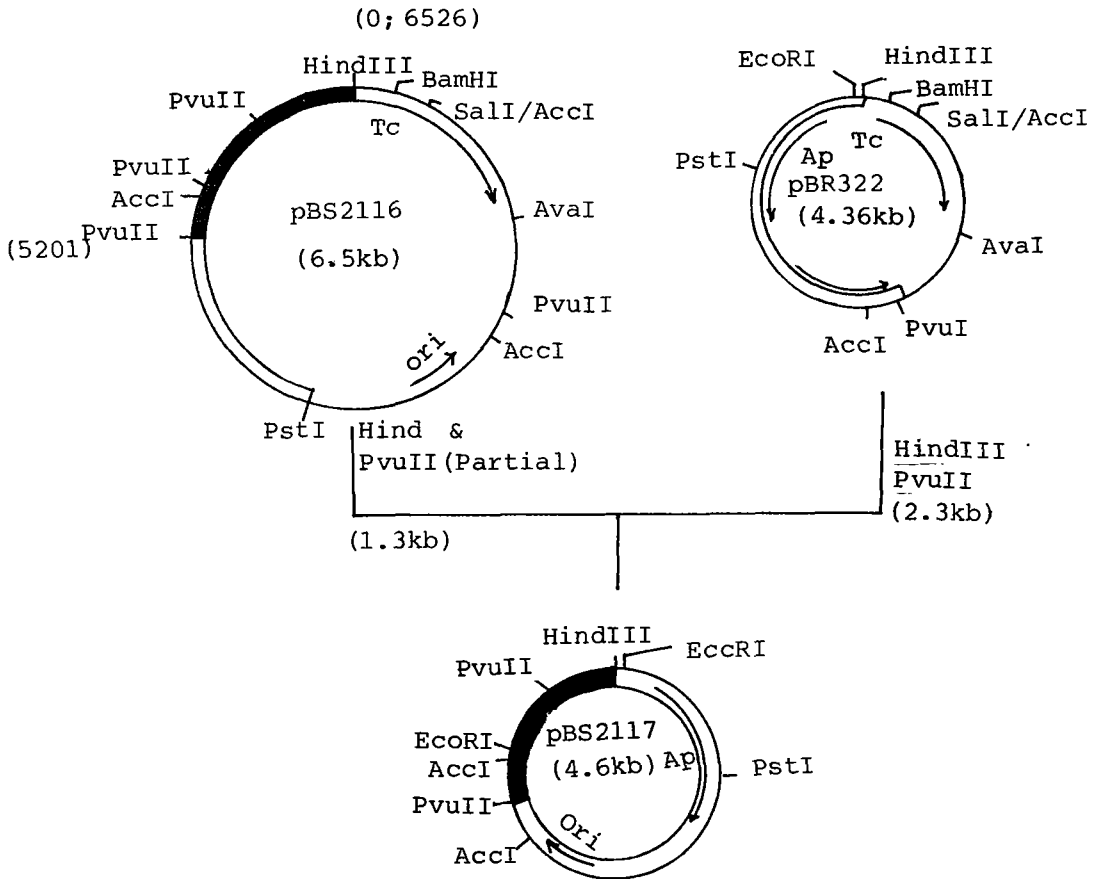


그림 II-2. pBS2116 에서 PvuII-HindIII 단편의 크로닝

제 3 절 pBS2116 에서 Sau 3A 를 이용한 CMCase 유전자의 사브크로닝

pBS2116 을 먼저, Bam HI 과 Pst I 으로 이중소화시킨 다음, Sau 3A 로써 부분소화 시켰다. 이 DNA 시료를 순수화시킨 다음, 미리 BamHI 으로 자르고, BAP 로써 탈인시켜둔 pBR322 에 연결 시켰다. 이 ligation mixture 로써 E. coli HB 101 을 형질전환 시키고, Amp^r 전환체를 선별 하였다. 계속 12 시간 배양 시킨 다음, 접시의 표면을 0.5% CMC 를 포함한 top agar 로써 덮고, 6 시간 더 배양시켰다. Cogo red 염색법으로 CMCase 양성 코로니를 찾은 결과, 합계 140 전환체가 깨끗한 halo 를 보였다.

이 가운데, 50 개의 CMCase 양성 전환체에서 재조합 플라스미드를 뽑아 agarose gel 전기영동으로 분석하여 제일 작은 플라스미드를 선별 하였다. 이 플라스미드를 제한효소로 소화시켜 agarose gel 전기영동으로 분석하고, 제한부위 지도를 작성 하였다 (그림 II-3). 이리하여, CMCase 유전자는 2.0 kb 의 염색체 DNA 단편 속에 존재함을 알았다.

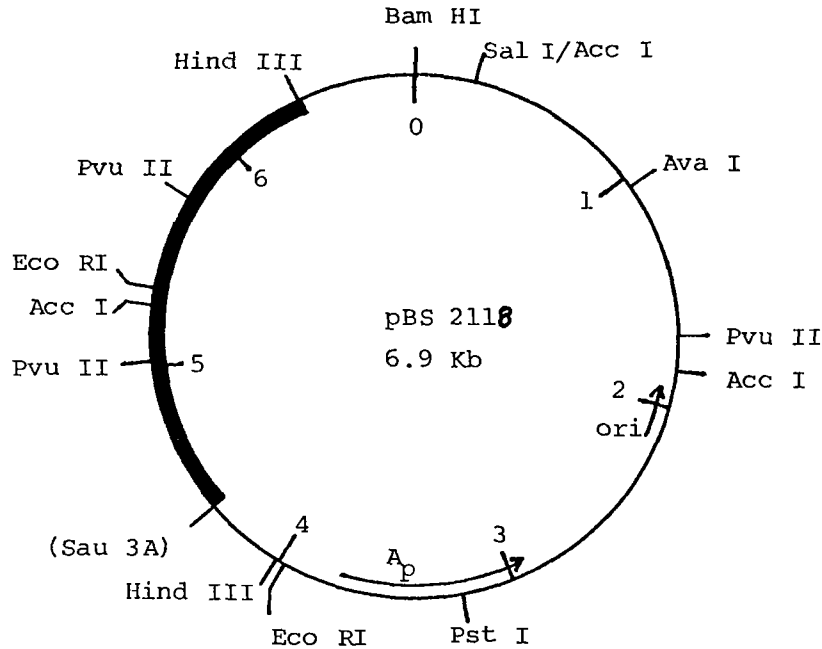


그림 II-3. pBS 2118의 제한지도

제 4절 Sau 3A를 통한 1.6 kb까지의 축소

예비실험을 통해, pBS 2118의 2.0 kb 염색체단편속에 다수의 Sau 3A 부위가 있음을 알고, 이 제한효소를 더욱 사브크로닝을 시도하였다. 이번에는 pBR 322 대신에 복수제한 부위를 갖는 pUC 9을 사용하였다.

먼저, pBS 2118을 Hind III로 소화시켜 CMCase 유전자를 함유하는 2.3 kb 단편만을 분리한 후, 이를 다시 Sau 3A로 부분소화시켰다. 이것을 agarose gel로써 전기영동한후, DNA 단편을 크기에 따라 다음 3그룹으로 나누어 분리하였다.

- A : group : > 1.8 kb
- B : group : 1.2 ~ 1.8 kb
- C : group : 8 ~ 1.2 kb

이들의 시료를 순수화 시킨 다음, BamHI-절단, CIP-처리한 pUC 9 에 연결시켜, E. coli JM83 을 형질전환 시켰다. 각 group 별로, 100 개씩의 전환체를 CMC 를 함유하는 LB 배지에 toothpicking 하여 배양한 후, Congo red 염색을 해 본 결과, A group 은 모두가 양성, B group 은 80 %가 양성, C group 은 모두 음성으로 나타났다.

B group 에서, CMCase 양성전환체 16 개로부터 플라스미드를 분리하여, 그중에서 가장 작은 것 하나를 선택하고, polyacrylamide gel 전기영동으로 제한부위지도를 작성하였다(그림 II-4). 이 그림에서 보는 바와 같이, CMCase 유전자의 존재 위치는 1.6 kb 내로 압축되었다. 1.0 kb 가까이 까지 줄어들지 않는 것은, 1.6 kb 단편속에 Sau 3A 부위가 더 이상 없기 때문으로 생각 된다.

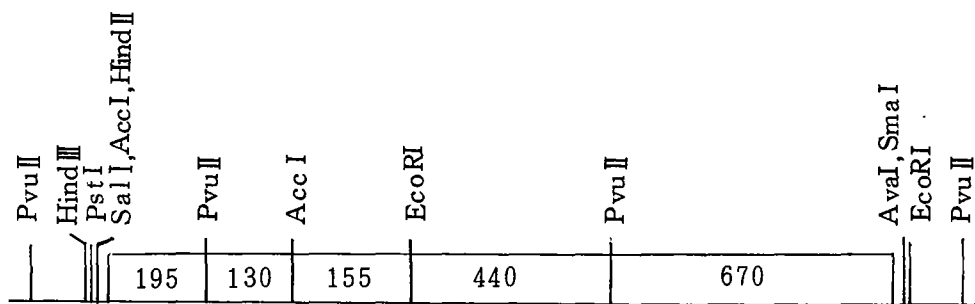


그림 II-4. pBS2119 의 제한지도 숫자는 염기쌍의 수 비모꼴은 Bacillus 염색체, 직선은 pUC 9 의 DNA

제 3 장 β -glucosidase 유전자의 크로닝

제 1 절 방 법

β -glucosidase 유전자의 공여체로는 Alcaligenes faecalis ATCC 21400 을 사용하였다. 숙주로서는 E. coli HB101, 운반체로서는 pBR-322 를 선정하였다. Shot-gun 크로닝법으로 유전자를 뽑아내었는데 여기에 따른 염색체 DNA 의 추출, 플라스미드 DNA 의 조제, 양쪽 DNA 의 절단, 접착 제한 효소 작용부위의 지도 작성등의 조작은 이미 상식화된 일반적인 방법에 따랐다. 우리가 사용한 특별한 방법으로 서 설명을 요하는 것은, β -glucosidase 양성 전환체 코로니를 선별하기 위한 방법이다.

P-Nitrophenyl-B-D-glucopyranoside (PNPG) 는 β -glucosidase 의 작용을 받아 황색의 물질로 분해된다. 이 원리를 이용하여 많은 코로니 가운데서 β -glucosidase 를 생산하는 균을 가려낸다. 이 작업의 순서는 다음과 같다.

일단 항생물질에 대한 저항성으로 선별한 1 차전환체 (pseudo-transformant) 들을 한개의 한천접시에 약 50 개씩 tooth-pick 하여 배양한다. 한편, 다른 접시에 phosphate buffer 를 준비하고, 이 속에 PNPG, lysozyme, Triton X-100 를 섞어 용액을 만들어 둔다.

코로니가 뚜렷이 형성되었을 때, Watmann No.1 여과지를 위의 용액속에 적신 다음, 코로니가 발생한 한천표면에 덮어두고, 37 °C에 방치해 둔다. 이 사이에 lysozyme 은 코로니의 세포벽을

녹히고 세포내용물이 방출된다. 그 세포내용물속에 β -glucosidase가 있으면, 기질인 PNPG를 분해하여 황색의 end-product가 하얀 여과지를 노랗게 물드려, 해당 코로니가 β -glucosidase 양성임을 알려준다.

제 2 절 결 과

운반체플라스미드 pBR322를 EcoRI으로 잘랐다. 이것은 항생물질표식 Amp^r, Tc^r 양쪽을 다 보존하여, 1차전환체의 선별에 사용하기 때문이다. 섬유소분해 유전자의 공여체인 A. faecalis의 염색체 DNA도 EcoRI으로 잘랐다. 크기 3.6 kb 이상의 염색체 단편을 sucrose density gradient ultracentrifugation으로 골라, pBR322의 EcoRI 부위에 부친 다음, 이것으로 E. coli HB101의 전환을 시도하였다. 그리하여, 합계 150,000개의 ampicillin 저항코로니를 얻었다.

이들의 1차전환체를 LB-ampicillin 한천 한접시당 50 개씩 toothpick 하고, PNPG-filter paper blotting 법으로, β -glucosidase 활성을 갖은 전화체임을 확인하였다.

이들 두개의 β -glucosidase 양성 코로니에서 플라스미드를 분리하여, 각각 pBAF 1200 과 pBAF 1400 으로 명명하였다. 그들의 크기는 전자가 11.6 kb 이고 후자가 13.6 kb 이다. 운반체 pBR 322가 4.3 kb 이므로, 이 두 플라스미드는 각각 7.3 kb 와 9.3 kb 의 염색체 DNA를 포함한 셈이다. 양쪽이 다 효소활성을 나타내므로, 후자가 갖인 2 kb 의 염색체 DNA는 β -glucosidase 유전자와는 관계가 없는 부분이다. 그리고, 제한효소 작용부위지도를 작성해 본 결과,

나머지 7.3 kb의 염색체 DNA 단편 부분은, 두 플라스미드가 꼭 같으므로 동일한 유전자가 양쪽에 크로닝된 것으로 판단하고, 앞으로의 연구를 pBAF 1200(그림 III-1)만으로 국한하기로 했다. 이에 따른 사브크로닝으로 11.6 kb의 pBAF 1200은 10.0 kb인 pBAF 1200-P.(그림 III-1)로 그 크기가 단축되었다.

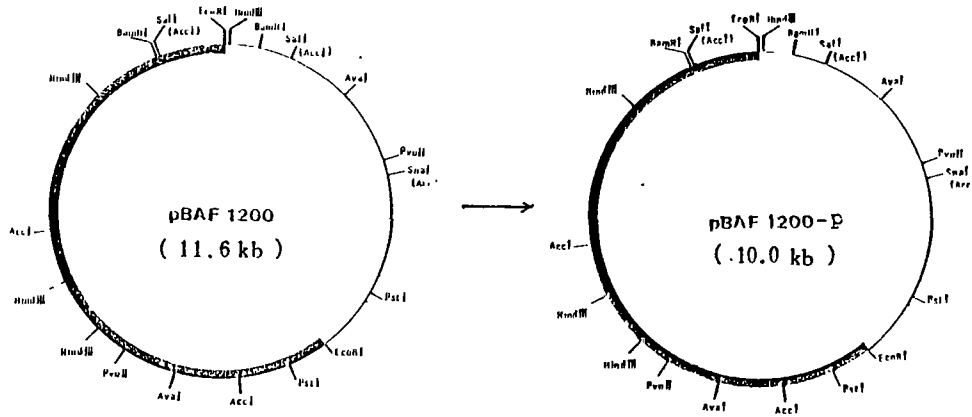


그림 III. pBAF 1200과 pBAF 1200-P의 제한지도. 굵은선은 *A. faecalis*의 염색체 단편이고, 가는선은 pBR 322의 DNA 부분이다.

제 4 장 CMC_{ase}-Cellobiase 유전자플라스미드의 작성

섬유소분자를 가수분해 하여 포도당 까지 만드는 데는, 3가지의 효소가 필요하다고 생각되고 있다. 먼저, 결정질 구조의 섬유소를 비정형의 느슨한 구조로 이완시켜, 물에 잘 녹고, 효소의 침입을 쉽게 해주는 소위 C₁ 효소, 다음에, 가용성 섬유소를 2 당류를 주된 oligomer 로 끊어주는 CMC_{ase} (Cx), 마지막으로, 2 당류를 포도당으로 분해하는 cellobiase (Cb) 가 그것 들이다. 이 첫 단계의 작용은 산이나 알칼리등을 이용한 화학처리나, 물리적인 처리로써 대체 되지만, 나머지 두단계는 효소의 힘을 빌리는 것이 효과적이다.

우리는 이미 CMC_{ase} 유전자와 cellobiase 유전자인 β -glucosidase 유전자의 크로닝에 성공하였다. 남은 작업은 이 두가지 유전자를 하나의 플라스미드에 실어서 Bacillus 등에 옮겨, 세포의 섬유소분해효소를 대량으로 생산 하거나, Zymomonas 같은 알코올 생산균에 넣어주어, 이들로 하여금 섬유물질을 원료로 삼아 알코올을 생산하게 하는 것이다. 먼저 두가지 유전자를 한줄로 연결해 가진 재조합 플라스미드를 작성한 연구를 보고한다.

제 1 절 방 법

CMC_{ase} (Cx) 유전자원으로는 pBS1 (7.5 kb)을, cellobiase (Cb) 유전자원으로는 pBAF 1200-P (10.0 kb)를, 그리고 운반체로는 Bacillus subtilis의 운반체 플라스미드인 pUB 110 (4.5 kb)을 사용하였

다. 두가지 섬유소분해유전자를 pUB 110에 실어, 재조합플라스미드를 만드는 과정은 그림 IV-1과 IV-2에 정리되어 있다.

즉, pUB110과 pBSI를 각각 Ava I과 BamHI으로 이중절단 하여서 생긴 단편 끼리를 T4 ligase로써 붙여 주면, 여러가지 조합의 플라스미드들이 생기는 가운데, 양편에서 온 큰 단편 끼리가 붙어서 10.8 kb 크기의 재조합플라스미드 pCK 108 (그림 IV-1)이 생겼다. 여기에는 pBSI에서 본 Cx 유전자와 E. coli에서의 복제 origin, 그리고 pUB 110에서 온 km^r과 B. subtilis에서의 복제 origin들이 포함되어 있다. 이것을 Hind III로 자르면, 9.8 kb의 pCK 98로 그 크기가 축소된다.

다음에, Cb 유전자를 함유한 pBAF 1200-P와, Cx 유전자를 함유한 pCK 108 사이의 융합작업에 들어간다. 이것을 위해서는, 각각을 BamHI과 PstI으로 이중절단을 한다. 그리하여, pBAF 1200-P로부터는 5.8 kb의 Cb 유전자함유절편을 얻고, pCK 108로부터는 km^r, E. coli 복제 origin, B. subtilis 복제 origin등을 갖인 6.5 kb의 큰절편과, Cx 유전자를 갖인 3.16 kb의 작은 절편을 따로 얻는다.

이어서, pBAF 1200-P의 5.8 kb 절편과, pCK 108의 6.5 kb 절편을 ligase로 붙혀 E. coli로 크로닝하여, 12.3 kb의 pCb1을 얻는다. 이 pCb1을 다시 Pst I으로 자른 다음, pCK 108의 Cx 함유 3.16 kb 절편과 섞어서 lagase로 붙혀, Cx 유전자의 orientation이 정방향인 pCbCx1(15.46 kb)과, 역방향인 pCbCx2(15.46 kb)를 얻는다. 이들의 플라스미드는 모두 Cx 유전자와 Cb 유전자를 동시에 가진다.

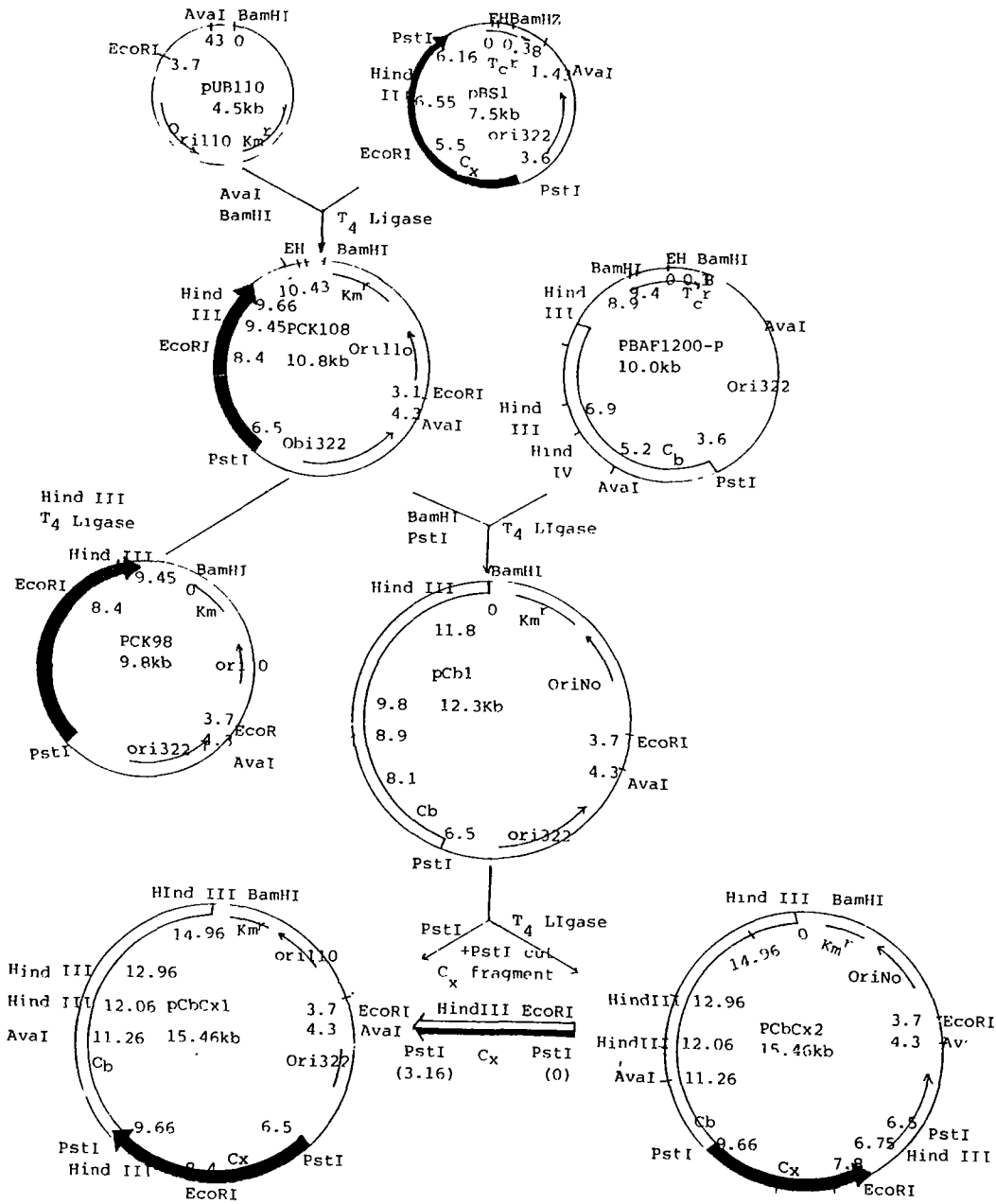


그림 IV-1. CMCase - Cellobiase 유전자 플라스미드의 작성.

■ ; CMCase 유전자 (Cx) ; □ ; Cellobiase 유전자 (Cb)

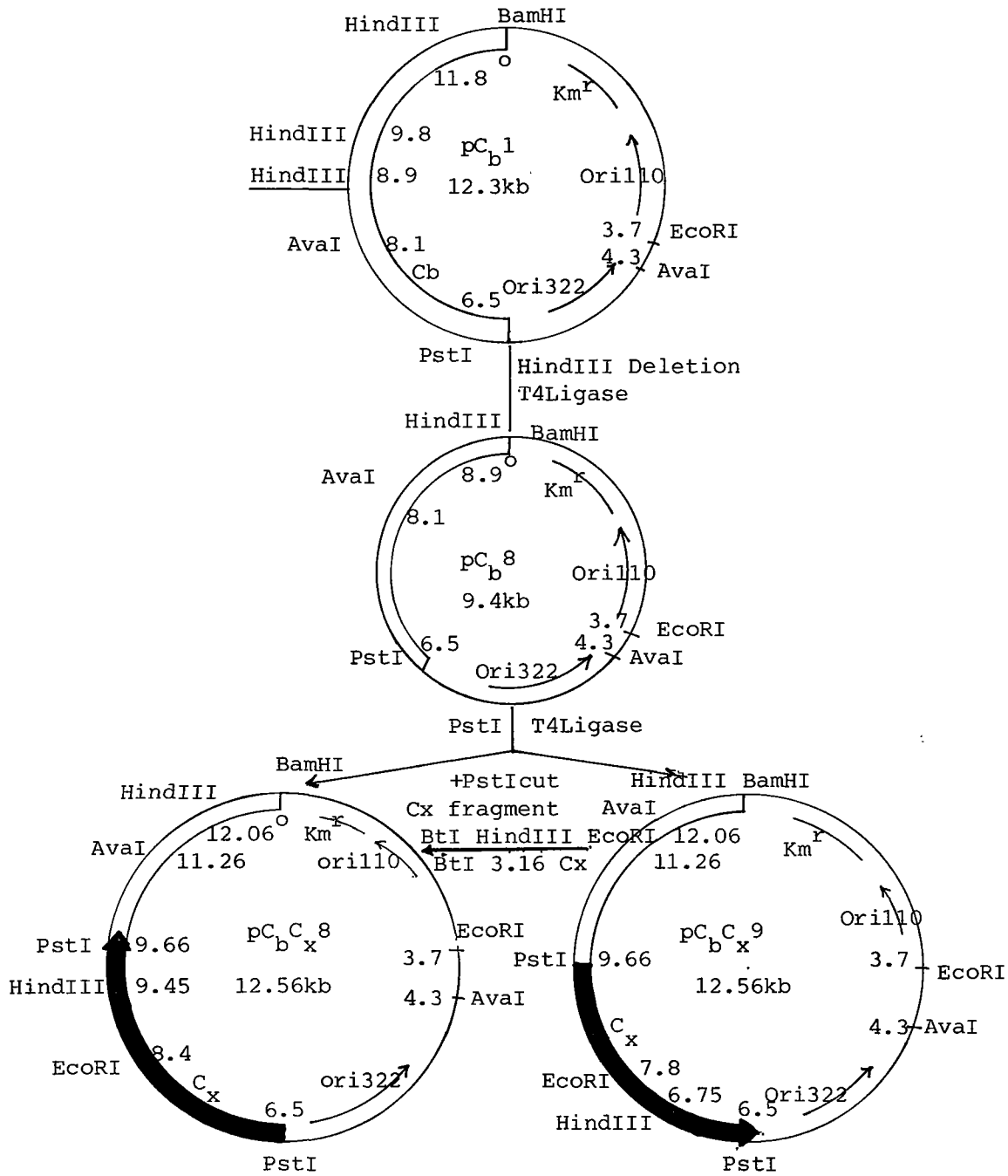


그림 IV-2. CMCase-Cellobiase 유전자 플라스미드의 축소, **■** ;
 CMCase 유전자 (Cx), **▬** ; Cellobiase 유전자 (Cb)

한편, pCb1, pCbCx1, pCbCx2 등의 크기를 줄이기 위해, 다음 과정을 또 거친다(그림 IV-2). 즉, pCb1(12.3 kb)을 Hind III 처리하여, 2.9 kb 절편을 떼내고, ligase로 self-ligation시켜 pCb8(9.4 kb)을 만든다. 다음에, 이 pCb8을 Pst I으로 절단 한후 pCK108의 Cx 함유 3.16 kb 절편을 삽입시켜, ligase로 붙여, Cx 유전자가 정방향인 pCbCx8(12.56 kb)과, 역방향인 pCbCx9(12.56 kb)를 얻는다.

제 2 절 결 과

새로히 제조된 재조합플라스미드를 열거하면, pCK108, pCK98, pCb1, pCbCx1, pCbCx2, pCb8, pCbCx8, pCbCx9의 8종류이다. 이들 중에, pCK108과 pCK98은 Cx 유전자만을 가지고 있고, pCbCx8, pCbCx9 등은 Cx 유전자와 Cb 유전자를 동시에 가지고 있다. 이들은 모두 E. coli, B. subtilis, B. megaterium의 shuttle vector에 도입되어 있으므로, E. coli 뿐 아니라, B. subtilis나 B. megaterium에도 크로닝이 가능할 것이다.

이들은 우선 E. coli HB101과 JM83에 크로닝 되어 있는데, Cx, Cb 유전자의 증폭 및 발현으로 두 효소의 동시 대량생산이 가능하게 되어 있다. 그러나, 이들의 산물이 세포밖으로 잘 분비 되도록 하기 위해서는, E. coli보다 B. subtilis나 B. megaterium에 크로닝시킬 필요가 있다.

이로써, 한 플라스미드에 Cx, Cb 두 섬유소분해유전자를 직렬접합시켜 인위적인 cellulose operon이 제작된 것이다. 만약, Cx 유

전자의 강한 promotor 가, 연이어 붙어 있는 Cb 유전자의 구조유전자도 지배하여, transcription 을 강력하게 해준다면, Cb 효소도 Cx 처럼 다량 증폭 생산될 것이다. 이때, Cx 유전자의 삽입방향이 역방향이면, 정방향에서는 나타나는 효과가 여기서는 기대할 수 없으므로 pCbCx2 는 pCbCx1 보다, pCbCx9 은 pCbCx8 보다 낮은 Cb 효소 생산력을 보일 것이다.

제 5 장 Zymomonas-E.coli 간의 shuttle vector 의 작성

알콜생산균으로 최근에 각광을 받고 있는 Zymomonas 균은, 여러면에서 종전의 알콜 생산자인 Saccharomyces 효모보다 유리한 반면, 기질로써 포도당, 과당, 사탕만을 요구하는 결점이 있다. 우리가 이미 크로닝한 섬유소분해유전자인 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 가지고, Zymomonas 의 형질을 전환시켜, 이 세균으로 하여금 섬유물질을 에탄올발효의 기질로 쓰게 할 것이다.

제 1 절 Vector 의 개발

Zymomonas 의 형질전환을 위한 유전자운반체 (vector) 의 작성은 여러사람들에 의해 시도되었지만 (11-15), 아직도 쓸만한 것은 없다. 따라서 본 연구에서는 Z. anaerobia NCIB 8227 에서 분리한 cryptic plasmid 를 토대로 vector 를 제작하여 사용하기로 했다. 이 플라스미드 pZA2 는 1.7 kb 의 크기이며, 여기에 pUC9, pBR322, pRK2501 등의 유용부위를 보충하여, 7.7 kb 의 재조합플라스미드 pSR12 를 작성하였는데, 그 수법은 그림 V-1 에 도시되어 있다.

1. pZA2 와 pUC9 간의 잡종플라스미드의 제조

플라스미드 pZA2 의 replication origin 을 보존하기 위해, 각기 다른 위치가 절단된 4 가지의 pZA2 단편을 pUC9 에 사브크로닝하였다. pZA2 를 BglII 로 절단한 것과 Sau3AI 으로 부분절단한

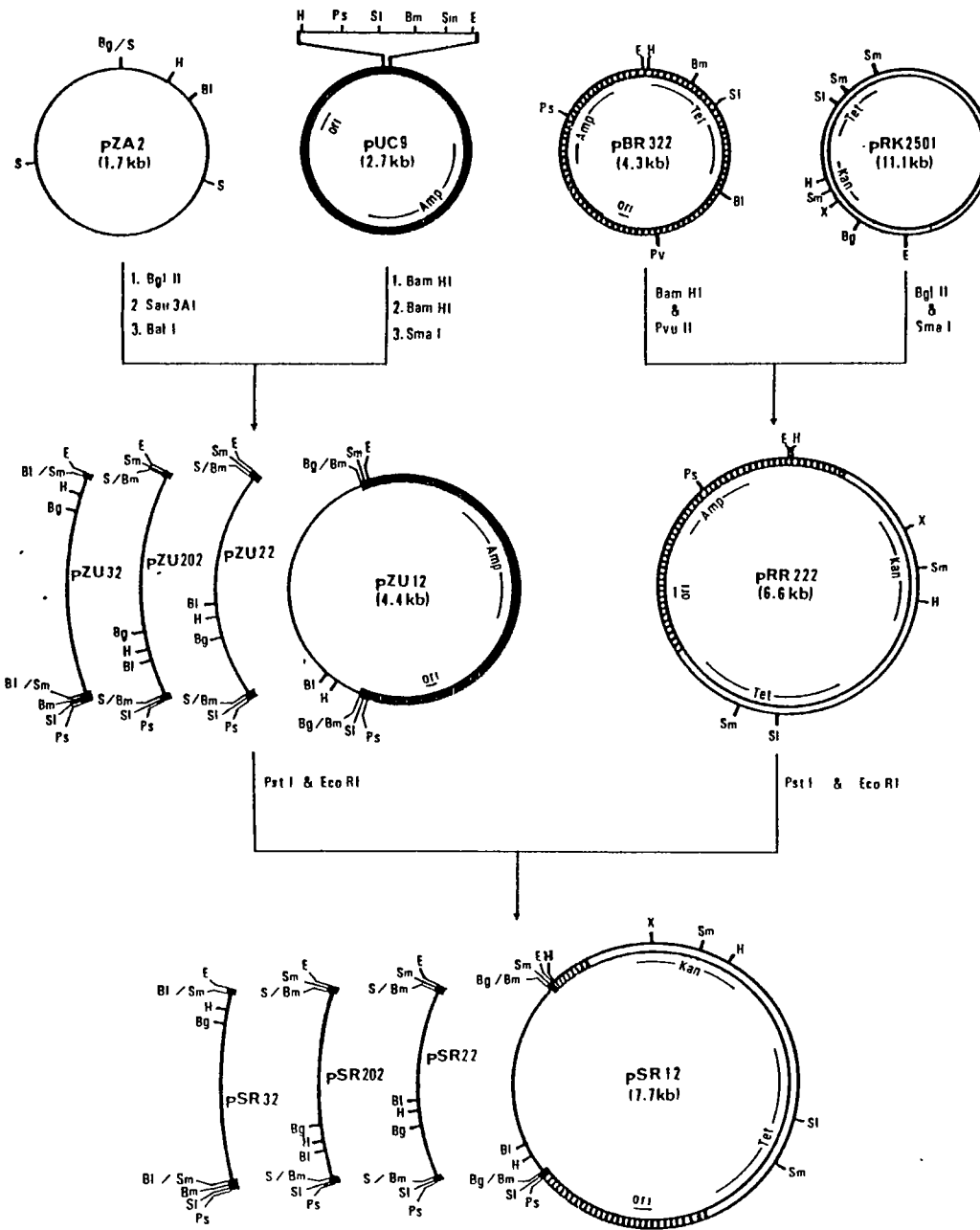


그림 V-1. *Zymomonas* - *E. coli* 간 shuttle vector 의 작성

것을 pUC9의 BamHI 부위에 각각 사브크로닝하고, pZA2를 Bal-I으로 자른 것을 pUC9의 Sma I 부위에 도입했다.

이렇게 해서 만들어진 4 종류의 잡종플라스미드를 각각 pZU-12, pZU22, pZU32, pZU202로 명명하였다. 이들은 크기가 모두 4.4 kb로 동일하며, 각기 다른 위치에서 절단된 pZA2 단편을 지닌 잡종플라스미드임이 밝혀졌다.

이들이 지니고 있는 pUC9의 Amp^r 유전자는, E. coli에서는 선별인자로 사용할 수 있으나, Zymomonas에서는 본래 ampicillin에 대한 내성이 강하므로 쓸수가 없다. 그러나 이들은 pUC9의 MRS (multiple restriction sites) 부위를 지니고 있으므로 다음단계의 DNA 조작에 유리하다.

2. pRR222의 제조

Z. mobilis에서 발현을 본 RK2의 Tc^r 유전자를 vector의 선별인자로 도입하기 위해, RK2의 유도체인 pRK2501의 Tc^r 유전자와 km^r 유전자를 pBR322에 도입시켜 다음조작이 유리하도록 하였다. 먼저, pRK2501을 Bgl II로 완전히 절단한후 Sma I으로 부분절단 하였다. 이것을 Pvu II와 BamHI으로 절단된 pBR322의 큰 절편과 ligation 시킨후 E. coli에 옮겼다. Tc^r, Km^r, Amp^r 크론을 얻어 플라스미드를 분리하여 여러가지 제한효소로 처리한 결과, 예상했던 형태의 잡종플라스미드임을 확인하고, 이것을 pRR222로 명명하였다. pRR222는 pBR322의 replicon과 Amp^r 유전자, 그리고 pRK2501의 Tc^r과 Km^r 유전자를 지니고 있으며, 그 크기가 6.6 kb 임이 확인되었다.

3. Shuttle vector 의 제작

앞에서 만들어진 pZU12, pZU23, pZU202 에서 pZA2 부분을 pRR222 에 도입하여, 최종의 shuttle vector 를 만들었다. 이들 4 종류의 잡종플라스미드를 각각 PstI 과 EcoRI 으로 이중소화시켜, pZA2 를 함유한 DNA 절편을 agarose gel 로써 추출하여, EcoRI 과 PstI 으로 절단된 pRR 222 의 큰 절편과 ligation 시켰다.

이들을 E. coli 에 전환시켜서 Tc^r, Km^r 그리고 Amp^s 의 크론을 얻었다. 다음에, 이들의 크론으로부터 플라스미드를 분리하여, 여러가지 제한효소로 조사한 결과, pZU12 와 pRR 222 사이의 잡종플라스미드인 pSR12, pZU22 와 pRR 222 사이의 잡종플라스미드인 pSR 22, pZU32 와 pRR 222 사이의 pSR 32, 그리고 pZU202와 pRR 222 사이에서 만들어진 pSR202 로 밝혀졌다.

이들 4 종류의 플라스미드는 자기 pRK2501 에서 유래한 Tc^r 과 Km^r 유전자, 그리고 pBR322 의 replication origin 과 Amp^r 유전자를 지니고 있으며, 또한 Z. anaerfia 에서 유래될수 있는 replicon 을 함유한, pZA2 가 서로 자기 다른 부위에서 절단된 상태로 존재한다. 따라서 이 잡종플라스미드들은 Zymomonas 속에서도 잘 유지, 발현될 것으로 기대된다.

제 2 절 Shuttle vector 를 이용한 Zymomonas 의 형질전환

끝으로, pSR12, pSR22, pSR32 와 pSR 202 를 각각 E. coli 전환체에서 분리하여, 이것들로 Z. anaerobia 의 형질전환을 시도하였다. Sodium acetate-MnCl₂ buffer 를 사용하였으며, 선별인자로는

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 tetracycline 을 이용하였다. 선택배지에 자라난 Z. anaerobia 전환체들 가운데서 10 코로니를 택하여, 이들로부터 플라스미드를 분리하였으나, agarose gel 상에서는 관찰되지 않았다.

그러나, 이러한 플라스미드 시료를 E. coli 에 역전환 (back-transformation) 시켜본 결과, Tc^r 과 Km^r 전환체를 얻을수 있었다. 이들로부터 플라스미드를 분리하여, 제한효소로 조사해본 결과 pSR12 플라스미드와 동일한 것이었다. 이로서 4 가지 플라스미드 가운데, pSR12 플라스미드만은 Z. anaerobia와 E. coli 사이의 shuttle vector 의 역할을 할수 있음이 확인되었다.

이렇게 pSR12 가 Z. anaerobia 에 들어갔음이 분명한데도 불구하고, agarose gel 로써 그것을 확인하지 못한것은, Z. anaerobia 세포속에서 외래의 pSR12 와 재래의 pZA2 의 두가지 플라스미드들이 서로 경쟁적으로 존재하기 때문에, pSR12 의 copy number 가 늘어나지 못해 agarose gel 상에 관찰이 불가능했던 것으로 생각된다. 그리고 pSR12 를 제외한 3 가지 잡종플라스미드들은 pZA2 를 자를때, replicon 이 제한효소에 의해 파괴되어 Z. anaerobia의 형질전환을 못한 것으로 추측된다.

Z. anaerobia 의 형질전환에 성공한 pSR12 플라스미드는 그림 V-1 에서 보는 바와 같이, 외부유전자를 크로닝하기엔 편리한 EcoRI, PstI, XhoI 작용부위를 가지고 있으며, 특히 XhoI 부위에는 XhoI 이외에, SalI 혹은 AvaI 으로 절단된 DNA 절편들도 도입될 수 있고, 동시에 km^r 유전자가 불활성화 됨으로, 외부유전자의 도입여부를 확인 할수가 있다. 앞으로 pSR12 의 불필요한 부분을 제거하고, 이들이 제대로 유지될 수 있는 숙주들을 개발할 필요가 있다.

제 6 장 결 론

“섭유소기원 에탄올의 생산”이란 제목 아래, 1985년 5월부터 3년동안의 연구 계획 가운데, 첫째의 연구목표는 100% 달성하고, 제 2차년도 계획의 일부도 실험하였다.

이미 본 실험실에서 크로닝에 성공한 Bacillus subtilis의 섭유소분해유전자 (CMCase gene)를 함유한 7.5 kb의 재조합 플라스미드 pBS2115 DNA 가운데, CMCase 유전자가 차지하는 부위는 1.6 kb의 염색체 단편속에 존재함을 알았다.

새로히, Alcaligenes faecalis가 가진 β -glucosidase 유전자를 pBR 322에 옮겨 E. coli 속에 크로닝 하였다. 제작된 β -glucosidase 유전자 함유 플라스미드는 pBAF 1200-P이고 10.0 kb의 크기를 지녔다.

이상의 두가지 섭유소분해유전자인 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 B. subtilis vector인 pUB110 플라스미드에 직접로 실어, 8종류의 재조합플라스미드를 만들었다. 이들의 이름은 pCK108, pCK98, pCb1, pCbCx1, pCbC2, pCb8, pCbCx8, pCbCx9이다. 이들가운데 pCbCx8과 pCbCx9는 CMCase 유전자와 β -glucosidase 유전자를 다 가지고 있다. 이들의 플라스미드는 앞으로 Bacillus나 Zymomonas의 형질전환에 쓰이게 될 것이다.

Zymomonas anaerobia에서 분리한 플라스미드 pZA2의 replication origine, E. coli에서 발현할 수 있는 replication origin, Tc^r, km^r, Amp^r의 유전자들을 구비한 재조합플라스미드들을

제작하였다. 그 가운데 하나인 pSR12는 Z. anaerobia를 형질전환시켜, Zymomonas - E. coli 간의 shuttle vector의 작성에 성공하였다. 이 플라스미드의 크기는 7.7 kb이며, 외래유전자의 도입에 편리한 각종 제한효소작용 부위와 항생물질표식들을 가지고 있어, 앞으로 널리 이용될 것으로 믿어진다.

참 고 문 헌

- (1) Whittle, D.J., Kilfurn, D.G., Warren, R.A.J. and Miller, R.C., *Gene*, 17, 139-145, 1982.
- (2) Collmer, A. and Wilson, D.B. : *Biootechnology* 1, 594-601, 1983.
- (3) Cornet, P., Tronik, D., Milser, J. and Aubert, J.P. : *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 137-141, 1983.
- (4) Sashihara, N., Kulo, T., and Horikoshi, K. : *J. Bacteriol.* 158, 503-506, 1984.
- (5) Belaich, J.P. and J.C. Senez : Influence of aeration and of pantothenate on growth yields of Zymomonas mobilis. *J. Bacteriol.* 89: 1195-1200, 1965.
- (6) Dawes, E.A., D.W. Ribbons, and P.J. Large : The route of ethanol formation in Zymomonas mobilis, *Biochem. J.*, 98 : 795-803, 1966.
- (7) Millis, N.F.: A study of the cider sickness faillus-a new variety of Zymomonas analrobia, *J. Gen. Microbiol.*, 15 : 521-528, 1956.
- (8) Rogers, P.L., D. Phil, K.J. Lee, M.E. and D.E. Tribe : High productivity ethanol fermentations with Zymomonas mobilis, *Procers Biochem.* Aug/Sep., 7-11, 1980.

- (9) Kluyver, A.J. and Hopperbrouwers, W.J. : Arch. Mikrobiol. 1931, 2, 245-260.
- (10) Swings, J. and De Ley : J. Bact. Reviews, 1977, 41, 1-46.
- (11) Skotricki, M.L., Tribe, D.E. and P.L. Roglrs : R-plasmid transfer in Zymomonas mobilis, Appl. Environ. Microbiol. 43:7-12, 1980.
- (12) Dally, E.L., Stokes, M.W. and Eveleigh, D.E. : A genetic comparison of strains of Zymomonas mobilis by analysis of plasmid DNA, Biotech. Letter. 4 : 91-96, 1982.
- (13) Carey, V.C., Walia, S.K. and Ingram, L.D. : Expression of a lactose transposon (Tm951) in Zymomonas mobilis. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 1163-1168.
- (14) Tonomura, T., T. Ohamoto, M. Yasui and H. Yanase ; Shuttle vectors for Zymomonas mobilis. Agric. Biol. Chem. 50 : 805-808, 1986.
- (15) Browre, G.M., Sdsotnilhi, M.L., Goodman, A.E. and Rogers, P.L. : Transformation of Zymomonas mobilis by a hybrid. Plasmid 12 : 211-214, 1984.

