The development of modified cellulase with higher activity by directed evolution

Whan-Koo Kang, Jeong-Il Son, Sun-Duk Hwang, Bum-Chang Kim, Hyoung-Sik Kim, Byung-Ryul Lee, Chul-Woo Lee
Department of Chemical Engineering, Hannam University
Tel : +82-42-629-8009, FAX : +82-42-623-9489

Abstract

In the study, we have obtained modified cellulase with higher cellulose degradation activity by molecular evolution method. Cellobiohydrolase(CBH Ⅰ) gene of *Trichorderma reesei* has been used. Cellulase mutant 228-G2 was selected and the activity of cellulase mutant 228-G2 was increased by 300% compared to original CBH Ⅰ. The 17 among 1542bases were found to be modified with mutant 228-G2.

서 론

섬유소를 포도당으로 전환시키기 위해서 사용되는 cellulase는 미생물, 식물, 동물 등 다양한 source로부터 생산되고 있고, 이는 여러 가지 여러 가지 이성질체 등 복합형태로 구성되어 있지만 대체로 다음과 같은 두세개의 효소 시스템으로 정의된다. 즉 endoglucanase (endo 1,4-β-glucanase), cellobiohydrolase (exo-1,4-β-glucanase) 와 cellobiase (β-glucosidase) 등이 그것이고, 현재 수입되어 사용되어지는 cellulase는 여러개의 이성질체 등 복합 효소의 형태를 취하고 있다. Cellulase는 amorphous 그리고 crystalline cellucose 모두를 convert할 수 있는 full-value cellulase와 amorphous cellulose만을 분해하는 low-value cellulase 가 있는데 일반적으로 endoglucanase와 cellobiohydrolase를 포함할 때 이를 full-value cellulase라 할 수 있다.[1) 2) 3)] 본 과제에서는 *Trichorderma reesei*로부터의 cellobiohydrolase (CBH Ⅰ) gene을 이용하여 분자진화 방법을 이용한 활성이 증가된 변형 cellulase를 구하려 한다. 효소의 활성을 증가시키기 위한 이러한 연구는 cellulase로부터 바이오에탄올 생성시 효소의 활성이 현재 활성 대비 커다란 증가가 없으면 원가경쟁력을 가질 수 없기 때문에 효소의 활성을 극대화하기 위해 DOE등에서 site directed mutagenesis에 의한 방법으로 진행되어져왔다. 그러나 획기적으로 cellulase를 변화

시키기 위해서는 원하는 방향으로의 유전자 다양성을 얻기 위한 방향적 분자진화 (directed molecular evolution)의 방법을 이용하여야하므로 본 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

벡터 및 균주조립

Cellulase 생산 균주인 *Trichoderma reesei*에서 CBH I 유전자를 획득했다. RNA prep kit를 이용하여 파쇄된 cell에서 RNA를 얻었으며, RT-PCR kit를 이용하여 CBH I gene을 합성하였다. 획득한 CBH I 유전자를 PCR하였고 PCR product를 Xba I과 Sal I 제한효소로 처리한 후 발현벡터인 pYGAL에 cloning 하였다.

분자진화

DNA shuffling방법은 선별된 cellulase 변이체에서 얻어진 CBH I 유전자를 같은 DNA 양으로 혼합 후 10X digestion buffer(500mM Tris-HCl(pH7.4), 100mM $MnCl_2$)와 DNaseI 0.2unit을 넣고 15℃에서 10분간 처리하여 100bp이하의 조각을 만들고 agarose gel로 수거, 정제하였다. 수거, 정제된 유전자 조각들을 *Pfu* polymerase를 이용하여 primer 없이 PCR하여 유전자들을 reassembly하였다. Reassembly 조건은 정제된 DNA fragment, 10X Pfu buffer, 0.4mM dNTP, 1.25unit Pfu polymerase를 혼합 후 96℃ 2min, 60cycles(94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min+5s/cycle), 72℃ 10min으로 하였다. Reassembly하여 얻어진 DNA를 template로 하여 5', 3' primer를 넣고 다시 PCR을 하여 shuffling된 CBH I 유전자를 얻었다. 얻은 CBH I 유전자를 발현벡터에 삽입하고 *Saccharomyces. cerevisiae*에 transformation하여 이것을 다시 screening 하였다.

배 양

재조합된 벡터가 안정한 형태로 도입된 균주를 선택하기 위하여 glucose 20g/L, yeast nitrogen base (YNB) 6.7g/L, amino acid 200 mg/L(histidine 첨가)가 포함된 최소배지에서 재조합 벡터가 도입된 각 균주를 배양하였다. 최소배지 후 다시 복합배지에서 배양하는 단계를 3회 반복하여 벡터가 안정된 형태로 들어간 균주를 선택하였다. 100ml의 최소배지가 들어있는 500ml의 baffled flask를 이용하여 선택된 균주를 접종한 후 30℃, 250rpm의 진탕배양기에서 실험하였다. *S. cerevisiae* 배지 조성은 yeast extract 20g/L, glucose 20g/L, galactose 30g/L를 사용하였다.

분석방법

1.0%CMCagar에 trypan blue solution(Sodium chloride 0.81%, Potassium phosphate dibasic 0.06%, Trypan blue 0.4%)으로 5분동안 염색을 하고, 3M sodium chloride로 15분동안 destaining 한 평판에, 20㎕씩를 떨어뜨리고 45℃에서 4시간 반응을 시킨 후 생성된 clear zone을 측정하였다. Clear zone을 확인한 sample은 1.0%CMC(pH4.5) 0.5ml에 sample 0.5ml을 adding 하여 1시간동안 45℃에서 반응 시킨 후DNS(Dinitrosalicylic Acid)환원당 측정법[4]으로 정량하였다.

결과 및 고찰

CBH I 단백질 발현

최소배지 배양을 통하여 얻어진 original CBH I 균주의 발현량 확인을 위한 기초적인 회분식 실험을 위하여 플라스크 배양을 진행하였으며, Figure 1.의 SDS-PAGE 결과를 통하여 발현을 확인하였다.

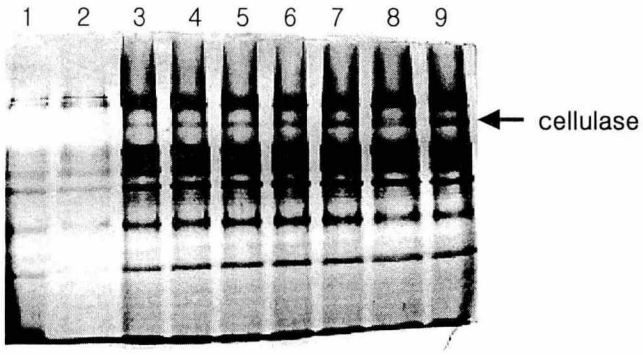

Figure 1. CBH I expression SDS-PAGE asay (lane1:Y2805 wild type, lane2: galactose induction 전, lane3 ~ 9:시간별 CBH I 발현).

Cellulose분해활성이 original CBH I에 비해 약300% 증가된 cellulase 변이체 228-G2 선별

Cellulase 변이체를 선별하기 위하여 96well plate에 30℃, 250rpm으로 5일간 배양하여 발현시킨 상등액을 sampling한 후 활성을 측정하였다. Figure 2.에서 볼 수 있듯이, wild type에서는 cellulose 분해 활성이 없었으며, cellulase 변이체 228-G2에서 original CBH I 보다 약300%의 cellulose분해 활성이 증가된 것을 확인하였다.

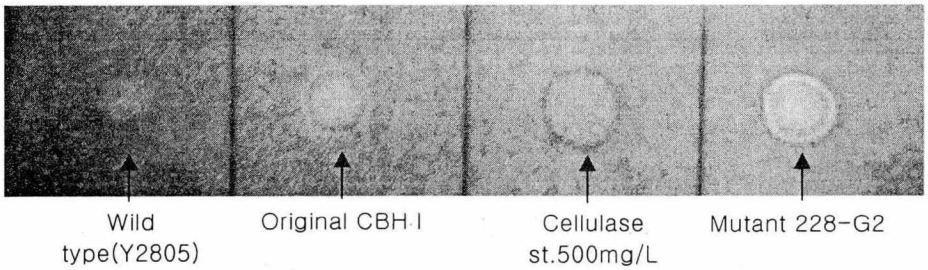

Figure 2. Original CBH I 과 error prone된 cellulase 변이체 228-G2의 cellulase activity 측정비교.

DNS 환원당 측정법에 의한 cellulase 변이체 confirm test

실험군으로 trypan blue법으로 선별된 변이체의 상등액과 cellulose를 반응시켰으며, 이에 대한 대조군으로 cellulose 대신에 D.W를 기질로 첨가하여 흡광도를 측정하였다. Table 1. 에서도 볼 수 있듯이 1차 trypan blue staining법으로 선별된 cellulase 변이체 228-G2의 cellulose분해 활성이 DNS(Dinitrosalicylic Acid)법으로도 다시 확인 할 수 있었으며, 분해활성 증가율은 original CBH I 에 비해 약300%증가된 것을 확인하였다.

Table 1. Original CBH I , 선별된 cellulase 변이체228-G2, cellulase 변이체 121-D8의 cellulase activity 비교

Sample	Original CBH I	Cellulase 변이체 121-D8	Cellulase 변이체 228-G2
Cellulase activity (흡광도, 550nm)	0.22	0.35	0.68
증가율(%)	100	160	310

선별된 cellulase 변이체 228-G2의 DNA sequence 분석

선별된 cellulase 변이체 228-G2의 DNA sequence를 확인한 결과 1542bp 중 17개의 염기서열이 바뀐 것을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 *Trichorderma reesei*의 cellobiohydrolase (CBH1) gene을 이용하여 분자진화 방법을 이용한 cellulose분해 활성이 증가된 cellulase 변이체를 선별하고

자 하였다. 재조합된 벡터가 도입된 균주의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 후, 분자 진화에 의한 cellulase 변이체를 trypan blue staining법으로 cellulase 변이체 228-G2를 선별하였으며, cellulose분해 활성을 DNS법으로도 다시 확인 할 수 있었다. Cellulase 변이체 228-G2의 분해활성 증가율은 original CBH I 에 비해 약300%증가된 것을 확인하였고, DNA sequence를 확인한 결과 1542bp 중 17개의 염기서열이 바뀐 것을 알 수 있었다.

References

1. J. D. Wright (1988), *Chemical Eng. Prog.* **62**.
2. G. Caminal, J. L. Santin, and C. Sola (1985), *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1282.
3. G. P. Philippidis, D. D. Spindler, and C.E. Wyman (1992), *Appl. Biochem. Biotech.* **34/35**, 543.
4. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.