

## *Bacillus cereus* ASK-202에서 cloning 된 agarase의 물리·화학적 특성

황선희, 하순득, 김봉조, 공재열  
부경대학교 식품생명공학부 생물화학공학연구소  
전화 & FAX (051) 620-6181

### Abstract

An agarase gene from *Bacillus cereus* ASK202 was expressed in high levels by *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1 using pET28a(+) vector system with the inducible T7 promoter in the presence of isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranoside. The open reading frame encodes 761 amino acid residues with a calculated molecular weight of 83,300 daltons and a potential signal peptide about 36 amino acid residues at the N-terminus. *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1 produce 1280 unit/ $\ell$  of agarase. The optimum physical condition for the agarase activity was pH 5.6, and 40 $^{\circ}$ C, respectively. The agarase activity was stable up pH 4.0~9.0 and 4~40 $^{\circ}$ C. The  $k_m$  and maximum rate of metabolism for agar were 0.068mg/ml and 0.094mg/ml  $\cdot$  min, respectively.

### 서론

현재까지 본 연구실에서는 우리 나라 연안의 대표적 해조류인 한천을 분해하는 효소에 대하여 연구해 왔다. 한천분해효소(agarase)는 여러 가지 활용방법이 있으나 그 중에서도 특히 한천분해산물인 고기능성을 지닌 한천올리고당(agarooligosaccharides)의 생산에 이용할 수 있다. Agarooligosaccharide는 저칼로리, 장내정균작용, 항암활성과 면역증강, 항산화 등의 다양한 기능성을 가지고 있어 식품첨가물이나 의약품 소재로 사용 가능하다. 본 연구에서는 agarase를 생산하는 해양미생물 중 *Bacillus cereus* ASK202를 이용, agarase 유전자를 cloning하여 염기배열순서를 결정하고, *E. coli*에서 고발현시키고, 생산되는 효소를 분리·정제하여 그 특성에 관하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

*Bacillus cereus* ASK202로부터 분리된 염색체(chromosomal) DNA는 *Hind*III로 부분 분해하였으며, multicopy plasmid인 pUC19도 *Hind*III로 restriction 하였다. 이 두 유전자들의 ligation mixture를 *E. coli* JM83에 형질전환(transformation)하였다.

형질전환된 *E. coli* JM83을 ampicillin, X-gal, IPTG가 첨가된 LB 한천평판배지 (LAXI)에 도말하여, 37°C에서 16시간 배양하였다. 흰 colony로 1차적으로 선별하고, 1차 선별된 21,000 개 가량의 colony를 lysozyme을 함유하는 soft agar로 overlay하여 37°C에서 12시간 반응시켜 cell 내부의 enzyme을 밖으로 유출시킨 후, Gran's iodine solution (0.05 M Iodine in 0.12 M Potassium Iodide)을 부어 한천이 분해될 때 나타나는 clear zone을 확인하였다(*E. coli* JM83/pBA41). 재조합 plasmid 제작에 사용된 pUC19 vector로는 agarase의 대량 생산을 유도할 수 없으므로 PCR을 이용하여 pBA41에서 agarase 만을 coding하고 있는 open reading frame 2.3kb를 증폭하여 T7 promoter를 갖는 pET28a(+)와 재조합하여 *E. coli* BL21(DE3)에서 고발현 실험을 수행하였다(Fig. 1).

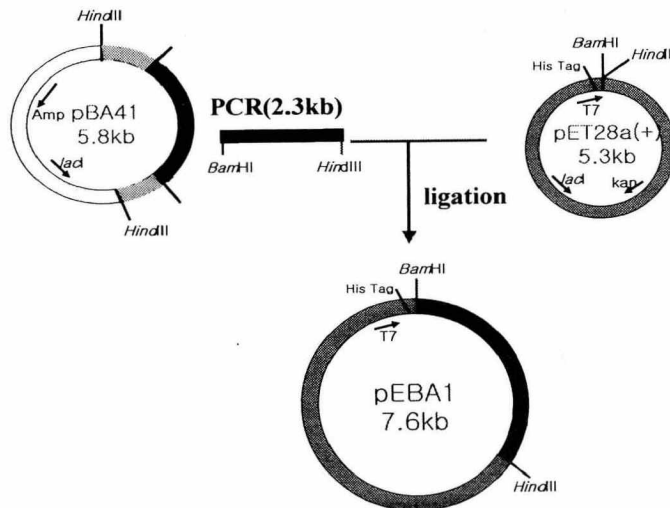


Fig. 1. Construction of expression plasmid pEBA1.

## 결과 및 고찰

### 1. Agarase 유전자의 cloning

*Bam*H I -*Hind*III 제한 효소 인식 부위를 가지는 PCR product가 삽입된 plasmid를 pEBA1이라 명명하고, 숙주세포로 T7 RNA polymerase를 가지고 있는 *E. coli* BL21(DE3)에서 새로이 제조한 발현벡터를 transformation 시켰다.

### 2. T7 promoter를 이용한 agarase의 고발현

생산되는 agarase의 분비위치를 정확하게 판단하기 위하여 plate상에 colony를 배양한 후 lysozyme이 함유되지 않은 soft agar를 처리한 colony 주위에는 투명한 환이 전혀 형성되지 않았으나(Fig. 2-1), lysozyme으로 세포벽을 파쇄한 경우 pEBA1

plasmid를 함유하는 colony 주위에 큰 환이 형성되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2-2). 또한 액체 배양한 균체를 sonication 한 실험에서도 intracellular 부분에 96% 이상 대부분의 agarase가 존재하고 있는 것으로 나타났다.

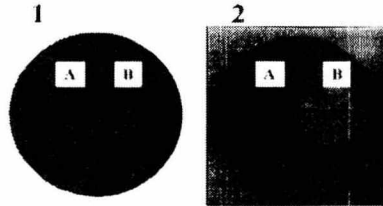


Fig. 2. Comparison of the agarase activity extracellular with intracellular site from the *E. coli* BL21(DE3) containing recombinant plasmid on the agar plate. The plate of No. 1 was extracellular agarase activity and the plate of No. 2 was treated with soft agar after the cell was crushed. A, *E. coli* BL21(DE3)/pET28a(+)(control); B, *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1

*E. coli* BL21(DE3)/pEBA1에서 발현된 agarase를 His·binding kit를 이용하여 분리 정제한 결과, 83.3kDa의 단일 band를 얻을 수 있었다. 1ℓ 배양액을 원심분리하여 얻어낸 균체를 sonication 하면 1280unit가 생산되었으며 최종적으로 분리·정제된 효소는 12.8unit/mg의 specific activity를 가지며, 이 agarase를 Eba1으로 명명하였다. 이때의 agarase의 발현량은 *E. coli* JM83/pBA41에 비하여 70배 정도 증가한 양이다.

### 3. 아미노산 조성 분석

DNA 염기 배열로부터 추정된 아미노산 조성을 분석한 결과, Asx(Aspartic acid, Asparagine), Glycine와 같은 산성 아미노산의 함량과 Alanine와 같은 중성 아미노산의 함량이 많은 반면, Histidine, Methionine, Cysteine 등은 함유량이 적은 것으로 나타났다. 또한, N-terminal 부위에 amino acid 36개 정도의 hydrophobic 한 potential signal sequence가 있는 것으로 예상되었다. 이 signal sequence N-말단에 양전하를 띤 Lysine이 존재하고 있었으며 helix destabilizing 아미노산인 Proline과 Glycine이 중간중간 4개 존재하는 hydrophobic core가 연속되어 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

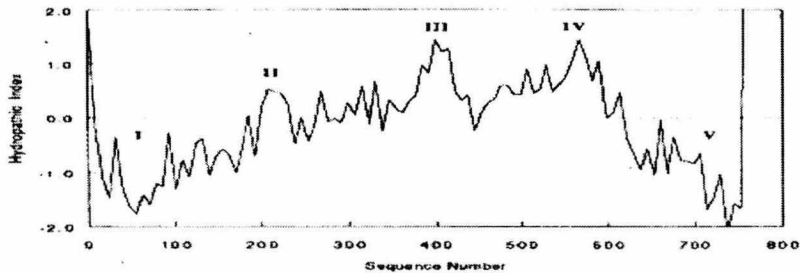


Fig. 3. Kyte Doolittle hydrophobic analysis of agarase deduced from pBA41. I and V regions describe the hydrophilic domains, and II~IV regions do the hydrophobic domains.

#### 4. 생산된 agarase의 특성 조사

효소는 40°C, pH 5.6, 10 mM citric acid-sodium citrate buffer에서 최대활성을 가지며, 4~40°C 범위, pH 4.0~9.0에서 24시간 방치하여도 효소 활성이 100% 유지되는 것으로 나타났다. 정제된 Eba1는 agar에 대해 가장 높은 기질 특이성을 가지고 있으며, 기질 친화력을 측정한 결과 Michaelis constant ( $k_m$ ) 값은 0.068 mg/ml 였으며,  $V_{max}$  값은 0.094 mg/ml · min인 것으로 확인되었다.

이러한 특성은, 원균주 *Bacillus cereus* ASK202와 mutant 균주 *Bacillus cereus* ASK202-N3 유래의 agarase와 다른 결과로, 원균주는 적어도 3가지 이상의 agarase를 생산하는 것으로 추정되어지며, 앞으로 이들의 발현기작에 대해 깊이 있는 연구가 필요할 것으로 사료되어진다.

#### 요약

본 연구에서는 기능성 식품 첨가물 소재 또는 의약품으로 사용 가능한 한천올리고당의 대량생산을 위하여 agarase 생산균주인 *Bacillus cereus* ASK202에 대해 유전자 cloning 방법을 이용하여 한천분해효소 고생산성 균주로의 개발을 시도하였다. 원균주의 chromosomal DNA를 무작위적으로 절단하여 agarase를 생산하는 gene 부위를 선별한 결과, 83,300 Da의 agarase(Eba1)를 생산하는 재조합 균주 *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1를 얻을 수 있었다. *E. coli* BL21(DE3)/pEBA1에서 유도물질로 IPTG를 첨가한 후 induction 5시간 후에 agarase가 원균주에 비해 8배 증가한 양이 고발현되었다. 발현된 agarase는 Asx(Aspartic acid, Asparagine), Glycine와 같은 산성 아미노산의 함량과 Alanine과 같은 중성 아미노산의 함량이 높았으며, pH 5.6, 40°C에서 최적의 활성을 나타내었다. 최적 기질 agar에 대한  $k_m$ 과  $V_{max}$  값은 0.068 mg/ml과 0.094mg/ml · min으로 한천의  $\beta$ -결합을 자르는  $\beta$ -agarase로 판명되었다.

#### 참고문헌

1. Kim, B. J., H. J. Kim, Ha, S. D., Hwang, S. H., Byun, D. S, Lee, T. H, and Kong, J. Y. (1999) Purification and characterization of  $\beta$ -agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Biotechnol. Lett.*, **21**, 1011-1015.
2. 황선희, 하순득, 김봉조, 김학주, 공재열, (1999) 한천분해효소의 고생산성 변이주의 분리 및 최적배양조건, *한국생물공학회지*, **14**(3) 351-357.
3. 김봉조, 황선희, 김학주, 강양순, 하순득, 공재열, (1999) 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는  $\beta$ -agarase의 특성, *한국생물공학회지*, **14**(1) 96-102.