

Bacillus licheniformis WL-12의 cellulase 유전자 클로닝과 발현

윤기홍^{1,2}

¹우송대학교 응용식품·영양학부, ²생물소재 응용연구센터

가정에서 제조된 된장으로부터 cellulase 생산균으로 분리된 고온성 WL-12는 형태적 특성, 생화학적 성질 및 16S rRNA의 염기서열에 근거하여 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다. *B. licheniformis* WL-12의 cellulase 유전자를 클로닝하여 그 염기서열을 결정된 결과 cellulase 유전자(*celA*)는 517 아미노산으로 구성된 단백질을 코드하며 1,551 뉴클레오티드로 이루어졌다. 아미노산 잔기배열을 분석한 결과 WL-12의 cellulase는 활성영역과 cellulose 결합영역으로 구성되어 있었으며, glycosyl hydrolase (GH) family 5에 속하는 *B. licheniformis*, *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*의 cellulase와 높은 상동성을 보였다. 클로닝된 *celA*를 발현용 vector에 도입하여 *B. subtilis*에서 발현시켜 cellulase 최대생산성이 7.0 units/ml에 이르렀다.

Key words □ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, cellulase, expression, nucleotide sequence)

*Bacillus licheniformis*는 *B. subtilis*와 더불어 산업용 효소의 생산에 사용되고 있으며, 유전자 재조합 숙주균으로서 산업적 이용이 가능한 유용한 GRAS 균주이다. *B. licheniformis*는 *B. subtilis*와는 달리 혐기적 성장이 가능한 생리적 특성을 지니고 있는데, 최근 *B. licheniformis* DSM13의 총염색체 염기서열이 결정되어 glucose를 이용하여 혐기적 성장에 중요한 대사과정이 밝혀졌다(19).

이러한 *B. licheniformis*는 고분자물질의 가수분해 효소 생산균으로 여러 종류가 다양한 장소에서 탐색되어 그들이 생산하는 효소와 그 유전자에 대한 특성이 다수 보고되었다. *B. licheniformis*에서 가장 많이 연구된 효소는 내열성 α -amylase로 밀기울을 이용하여 산업적으로 효소 생산을 위한 값싼 배지조성이 확립되었고(8), 열안정성이 더욱 향상된 α -amylase 변이효소도 개발되었다(4). 또한 내열성 α -amylase 유전자가 T7 promoter를 이용하여 대장균에서 과잉 발현되었으며, 생산된 효소가 균체 외로 분비될 때 대장균 분비체가 α -amylase의 signal peptide를 인지할 수 있는 것으로 알려졌다(15). Protease에 대한 연구도 활발히 이루어져 호알칼리성 protease를 생산하는 AP-1 (16)과 RSP-09-37 (14)의 효소 특성과 그 유전자가 클로닝되었으며, 2709의 알칼리성 protease 유전자는 *B. subtilis* WB600에서 과잉 발현되었다(17). 또한 케라틴 분해균인 PWD-1 (20)와 RG1 (12)가 분리되어 keratinase 생산성에 미치는 생리적 배양적 특성이 조사된바 있다.

이외에도 *B. licheniformis* 분리균 77-2의 xylanase (3), EGW039의 β -1,3-1,4-glucanase (18), B-41361의 endoglucanase (2), NBL420의 cellulase (7), NK-27 균의 mannanase (6)와 같은 섬유물질

분해에 관련된 효소의 특성이나 그 유전자가 분석되었다. 또한 chitosanase를 생산하는 *Bacillus licheniformis* MB-2가 인도네시아 온천에서 분리된 바 있으며(5), 펙틴분해에 관련된 효소(13)와 유전자(1)에 대한 연구도 이루어졌다. 본 연구에서는 국내 가정에서 제조된 된장에서 고온성 미생물로 분리된 *B. licheniformis*의 carboxymethyl cellulase (cellulase) 유전자를 분석하고 *B. subtilis*에 도입하여 생산성을 검토하였다.

재료 및 방법

Cellulase 생산균의 탐색과 동정

Cellulase를 생산하는 고온성 미생물 분리를 위해 가정에서 제조된 된장 시료 1g을 0.85% NaCl 용액 10 ml에 현탁하고 현탁액의 적당량을 취하여 0.5%의 carboxymethyl cellulose (CMC)와 trypan blue (70 mg/L)를 첨가한 LB 평판배지(5 g yeast extract, 10 g tryptone, 5 g NaCl, 15 g agar, per liter)에 도달한 후 60°C에서 배양하였다. 콜로니가 형성된 후 그 주위의 CMC의 분해 환이 나타난 균들을 선별하였다. 분리균이 동정을 위해서는 분리균의 16S rRNA 유전자 단편은 Lee 등이 실시한 방법(10)과 동일하게 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열을 primer로 사용하여 PCR로 증폭하고 그 염기서열을 결정하였다.

미생물 균주와 플라스미드 및 배지

B. licheniformis WL-12는 유전자 제공원으로 사용되었고 유전자 조작을 위한 숙주균으로는 *Escherichia coli* XL-1 blue와 *B. subtilis* WB700 (21)이 각각 사용되었으며, 플라스미드 pUC19는 *E. coli*의 vector로 pJ27A88U (9)은 *B. subtilis*의 vector로 사용하였다. 사용된 미생물은 LB 배지(5 g yeast extract, 10 g bacto-tryptone, 5 g NaCl per liter)로 배양하였으며, *E. coli*와 *B.*

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-630-9742, Fax: 042-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

subtilis 형질전환주의 선발을 위해서는 배지에 ampicillin (50 µg/ml)이나 kanamycin (10 µg/ml)을 각각 첨가한 LB 배지가 사용되었다. Cellulase 유전자를 함유한 *E. coli* 형질전환주 선발을 위해서는 0.5% CMC와 70 mg/L tryphan blue를 첨가한 LB 평판배지를 사용하였다.

CMCase 활성 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액 0.5 ml와 200 mM sodium citrate buffer (pH 5.5) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 CMC로부터 1 µmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

DNA 분리와 조작

LB 액체배지에서 배양한 *B. licheniformis*의 균체로부터 총 염색체 DNA를 분리하기 위해서는 Genomic DNA prep kit (Solgent, Daejeon, Korea), *E. coli*로부터 플라스미드 DNA를 분리하기 위해서는 Plasmid Mini-prep kit (Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하였다. 플라스미드를 이용한 *E. coli*과 *B. subtilis*의 형질전환은 competent cells 방법으로 각각 실시하였다. 염기서열은 크론된 유전자를 제한효소로 적절한 크기로 절단하여 얻은 단편을 pUC19에 도입함으로써 재조합 플라스미드를 제조한 후, 이를 template DNA로 하고 universal primer와 reverse primer를 사용하여 dideoxy-chain termination 방법으로 결정하였다.

Cellulase 활성염색

B. subtilis 형질전환주의 배양상등액을 SDS-PAGE한 후 polyacrylamide gel에서 SDS를 제거하기 위해 25% isopropanol을 포함한 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5)로 세척한 후 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5)에 15-30분간 방치하였다. Polyacrylamide gel을 꺼내어 동일한 완충용액에 70 mg/L tryphan blue, 0.3% CMC와 1.5% agar를 녹여 제조한 gel을 중층하여 비닐로 봉입한 후 50°C에서 일정시간 반응시킨 후 분해환을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Cellulase 생산균의 분리와 동정 및 특성

CMC와 trypan blue를 첨가한 LB배지를 사용하여 된장에서 분리된 고온성 미생물 중에서 CMCase 활성이 높은 균을 최종적으로 1주 분리하였다. WL-12로 명명한 분리균은 37°C보다 60°C에

서 성장이 우수하였고, 포자를 형성하는 그람양성 간균으로 catalase 활성을 보여 *Bacillus*속 균주로 판단되었다. 또한 WL-12는 CMC의 분해 활성외에도 skim mik, locust bean gum와 starch의 분해활성을 보여 protease, mannanase와 amylase도 생산하는 것으로 여겨진다. Vitek (bioMerieux사)의 *Bacillus* 동정용 카드(BAC)를 사용하여 분리균 WL-12의 생화학적 특성을 조사하였다. 이를 위해 분리균을 LB 액체배지에서 하룻밤 진탕배양한 균 배양액을 0.4% NaCl 용액으로 600 nm에서 흡광도가 0.3 정도가 되도록 희석한 후 BAC 카드에 주입하여 12시간 배양하였다. 그 결과 분리균은 sucrose, glucose, inositol, arabinose, mannitol, salicin, amygdalin, maltose, trehalose, palatinose, N-acetyl-D-glucosamine을 탄소원으로 이용하였으며 esculin을 가수분해하는 것으로 나타났다. VITEK BAC database와 분리균의 생화학적 특성을 비교한 결과, WL-12는 *B. licheniformis*와 97%의 유사도를 보인 것으로 확인되었다.

또한 PCR로 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정함으로써 1,520 bp 크기의 WL-12 16S rRNA 염기서열을 미국 NCBI의 BLAST 검색방법을 사용하여 기존에 등록된 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, *B. licheniformis* (Genbank accession No. AB039328, X68416, CP000002, AE017333, AJ582722, AB055006, DQ350834, AJ582721)와 99.7% 이상의 상동성을 보였다. 분리균의 이러한 특성으로 보아 WL-12는 *B. licheniformis*에 속하는 균으로 판단되었다.

Cellulase 유전자의 크로닝과 염기서열

B. licheniformis WL-12의 염색체 DNA를 *Pst*I로 부분 절단하고 크기가 약 1.5 kb 이상인 DNA 단편을 agarose gel에서 추출하였다. 이를 *Pst*I로 절단하고 CIP처리된 pUC19와 ligation한 후 *E. coli* XL-1 blue에 도입하여 얻은 형질전환주 중에서 CMC 분해환을 보이는 형질전환주를 1주 선별하였다. 대장균 형질전환주에서 플라스미드를 분리하고 클로닝된 DNA 단편 중 일부를 여러 제한효소로 절단하여 pUC19에 도입하고 총 2,162 bp의 염기서열을 결정하였다. 염기서열이 결정된 지역에 존재하는 ORF를 조사한 결과 cellulase 유전자로 예상되는 2개의 ORF₅가 발견되었다. 종결지역은 동일하나, ORF1 (염기위치 160~1,761)과 ORF2 (염기위치 211~1,761)는 판독 개시코돈이 다르며 모두 개시코돈 앞에 RBS로 예상되는 서열(ORF1의 경우 -GGAG-, ORF2의 경우 -GGAGG-)을 지니고 있었다. 또한 예상되는 단백질의 아미노 말단에 염기성 아미노산과 소수성 아미노산의 배열을 갖는 signal peptide로 예상되는 지역이 존재하고 있었다. Signal peptidase의 전형적인 절단위치로 예상되는 서열(A-X-A)이 ORF1의 아미노말단의 40 잔기서열 범위에서는 발견되지 않았고, ORF2에서 아미노말단 31-34번째 A-A-A-A 서열이 존재하고 있으므로 ORF2를 cellulase의 구조유전자로 추정하였다. 따라서 ORF2에 해당하는 *B. licheniformis* WL-12의 cellulase 유전자는 517 아미노산 잔기의 단백질을 코딩하는 1,551 bp로 구성되어 있음이 확인되었다(Fig. 1).

Cellulase의 염기서열을 NCBI의 염기서열 정보와 유사성을 비

AAGCTTGGCGTCACTAGTATTACAGACCTCCCATTTTATACGAAAAGAGAAATAGATAGATTTTTTAAAGCGCCAAAAACAAGAAATATGGTTGATAGACAATCGGTGAA 110
 TAGTTTATTACAATCAGTTCGTCTACAGGCAAGGAAAGAGTGAATAATGGCTGGCGAAAAGATTTTTTCGAAAAATAAATCATTTGGAGGAAAAGAAATGTCATATA 220
 TGAACAGTTCATCTCTGCTTCATCGCCCTGTTTTATGGTAGCGGCGCTGGCATCAGCGGTATCATTGCACCGAAAGCGGCTGCCGCTTCAAACACCGTGTGCTGTA 330
 M K R S I S V F I A C F M V A A L G I S G I I A P K A A A A S K T P V A V
 AACGGACAGCTTACCTTAAAGGTACGACGCTCGTCAATCAAACCGAAAAGCGGTTCAGCTGAAAGGAATCAGCTCCCACGGTCTACAGTGGTGTGGCGATTATGTCAA 440
 N G Q L T L K G T Q L V N Q N G K A V Q L K G I S S H G L Q W C G D Y V N
 CAAAGACTCGTTAAAATGGCTGAGAGACGACTGGGGCATCAATGTCTTCCGGCGCGCCATGTATACAGCTGAAGCGGCTATATTGACAATCCGTCGGTTAAAAACAAAG 550
 K D S L K W L R D D W G I N V F R A A M Y T A E G G Y I D N P S V K N K
 TGAAGGAAGCGTGAAGCGGCAAAGAACTCGGAATCTATGTGATCATTGACTGGCACA TACTGAGCGATGGCAATCAAACCAAAAACAAGCGAAAGCAAAGAAATTT 660
 V K E A V E A A K E L G I Y V I D W H I L S D G N P N Q N K A K A I R E F
 TTTAACGAAATGCAAGACTTTATGGCAAGCGCCAAACGTCATTTTGAATTTGCCAAGCAGCGCAAGCGGATGTCAACTGGAATCGCGACATTAACCTTACGCCGA 770
 P N E M S R L Y G K T P N V I F E I A N E P N G D V N W N R D I K P Y A E
 AGAAATCTGTCGCTGATTCCGCAAAACTCTCCGAAAAATATTGTGATTGTGCGAACAGGCACCTGGAGCCAGGATGTCAATGATGCGCGGGACAATCAGCTGAAGAGCG 880
 E I L S V I R K N S P K N I V I V G T G T W S Q D V N D A A D N Q L K D
 GCAATGTCATGACGCGCTCCATTTTATGCGGGCAGCAGCGTCTTTCGCGGATAGAGCGGATTTATGCCTCAGCAAAAGGAGCGCGATTTTCGTCACAGAAATGG 990
 G N V M Y A L H F Y A G T H G Q S L R D K A D Y A L S K G A P I F V T E W
 GGAACGAGCGATGCTCAGGAAAGGCTTACCTTGACCAATCCAGGAGTGGCTGAAATTTAGACAGCAAAAAAATCAGCTGGGAAATTCGAACTTATCCGGA 1100
 G T S D A S G N G G V Y L D Q S R E W L K Y L D S K K I S W V N W N L S D
 CAAACAAGAGTCGACGAGCTTAAACCCAGGCGCTCTAAAACCGGAGGATGGTGCATCCGACTTGTCCCATCAGGCAAAATTCGTCAGGCAATCAATCCGCGAGC 1210
 K Q E S S A A L N P G A S K N G G W S Q S D L S P S G K F V R D N I R
 GGTCAACGGTTCCTCAGGAGACTCGGATCGAATTCGAAAGGGTCAGATCAAAAAGACCAAAAAAAGGATCAGGATAAACAGGTCAGACAGCGGGCGTGCAGCAAC 1320
 F S N G S R L Y G K T P N V I F E I A N E P N G D V N W N R D I K P Y A E
 ACGATAGAAGTACATACAGAGCGGGGACAACATGTAACGGCAACCAAAATCCGCGCTCAGCTCAACATTA AAAACAACAGCAAAAAAACCGTGTCTTTAAATCGAAT 1430
 T I E V R A G D N N V N G N Q I R P Q L N I K N N S K K T V S L N R I
 CACTGTCGCTACTGTATAAAACGAATCGCAAAAGGACAAAATTTTGACTGGGACTATGCCAAATCGGCTCGAGCAAAATCAGCACAATTCGTTCAATTA AAAAAG 1540
 T V R Y W Y K T N R K G Q N F D C D Y A Q I G C S K I T H K F V Q L K K
 CGGTAACCGGACAGACAGTCTTGAAGTAGGATTTAAAATGGTACATGGCGCGGGGCTGATCCTGGCAAAATCCAGATCCGCTTTCACAAATCCGCTCGGAGC 1650
 A V N G A D T Y L E V G F K N G T L A P G A D T G E I Q I R L H N D G W S
 AATTATGCCAAAGCGGACTATTCATTTTAAATCAAACAGCTTTAAAATACGAAAAAATCAGCTTGTATGAGAACGGAAGCTGATTTGGGCGACTGAACCTAA 1760
 N Y A Q S G G D Y S F F N S N T F K N T K I T L Y E N G K L I W G T E P K
 ATAACGGCACTTTCAGGACACCGGATATGGTGTCCGTTTCGTATATATTATAATGGAAGGAATGAGGAATTTTGTAAACATGAAAGGAGATGGATGATGAAATGA 1870
 AACATTGCAGCAATACATGCTTGTCAAGGAACACTATGACAGTCAATGGACCGGATTAACAGAGCAAGGAGGAAGACATTGAAAAGAGAAAAGCAAAATCCGAGC 1980
 TTTACGCCAAAACGCTTCAGCAAGGCTTTTCAACAGATGATGACTATGATGAATTCGCAGATGCCGCTGATTAATGCCATACCGAGATCTGACGGTGAAGAATAGAA 2090
 ACGGTTATTCGGGAATTAACGCTCCATAATCAATAAAATAAGGGGGAGGAGAAGCATGAAAGACATGATCA

Fig. 1. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of cellulase gene. The amino acid deduced from the open reading frame is shown with the one-letter code below the nucleotide sequence. Putative ribosomebinding site (SD) is underlined. Putative amino acid sequence corresponding to the signal peptide is italicized. The numbers at the end of each line correspond to the nucleotide positions.

WL12	1	-----MSYMKRSISVFIACFMVAALGISGI IAPKAAASAKTPVAVNGQLTLKGTQLVNGQKAVQLKGISSHGLQWCGDYVNKDSLKWL RDDWG I NVF	
CAJ	1	-----MSYMKRSISVFIACFMVAALGISGI IAPKAAASAKTPVAVNGQLTLKGTQLVNGQKAVQLKGISSHGLQWCGDYVNKDSLKWL RDDWG I NVF	
CAE	1	-----MSYMKRSISVFIACFMVAALGISGI IAPKAAASAKTPVAVNGQLTLKGTQLVNGQKAVQLKGISSHGLQWCGDYVNKDSLKWL RDDWG I NVF	
YP	1	MAAEKVFSSKNKI IGGKR*****Y*****	
AAP	1	MAAEKVFSSKNKI IGGKR*****Y*****	
ABG	1	MAAEKVFSSKNKI IGGKR*****Y*****	
WL12	94	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
CAJ	94	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
CAE	94	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
YP	111	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
AAP	111	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
ABG9	111	RAAMYTAEGGYIDNPSVKNKVKAEAVEAAKELGIYVI IDWHILSDGNPNQNKAKAKEFFNEMSRLYGKTPNVI FEIANEPNGDVNWRD I KPYAE ILSVIRKNSPKN I V I	
WL12	204	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
CAJ	204	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
CAE	204	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
YP	221	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
AAP	221	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
ABG9	221	VGTGTWSQDVNDADNQLKDGVMYALHFYAGTHGQSLRDKADYALSKGAP I FVTEWGTSDASGNGGVYLDQSRW LKYLDSKK I SWVNWNLSDKQESSAALNPGASKNG	
WL12	314	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
CAJ	314	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
CAE	314	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
YP	331	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
AAP	331	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
ABG9	331	GWSQSDLSPSGKFRVDRNIRSGSNGSSGDSGNSKGSQDKQKDKQDKPQDQSGAAANT I EVQYRAGDNNVNGN QIRPQLN I KNN SKK I TVSLNR I TVRYWYKTRNKGQNF	
WL12	424	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(517)
CAJ	424	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(517)
CAE	424	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(517)
YP	441	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(534)
AAP	441	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(542)
ABG9	441	CDYAQIGCSK I THK FVQLKKA VNGADTYLEVGFKNGLTAPGADTGE I Q I R L H N D G W S Y A Q S G D Y S F F N S N T F K N T K K I T L Y E N G K L I W G T E P K	(531)

Fig. 2. Comparison of the *B. licheniformis* WL-12 cellulase with others. The amino acid sequences of six cellulases from *B. licheniformis* strains including WL-12 (WL12), F5 (CAJ), MD1 (CAE), ATCC 14580 (YP) and GXN151 (AAP), and *Bacillus* sp. CY1-3 (ABG) are given in the one-letter code and have been aligned by introducing gaps (hyphens) to maximize similarities. Residues identical to amino acid sequence of the WL-12 cellulase are indicated by asterisks in other sequences. Numbers at the beginning of each line correspond to the amino acid position in the protein.

교환 결과 여러종류의 *B. licheniformis*의 cellulase 유전자들 (Genbank accession No. AM183790, CP000002, AE017333, DQ841174, AJ616005, AY291583)과 그 염기서열이 상동성이 99% 이상이었으며, 가수분해활성 영역을 코드하는 유전자 지역의

일부(염기서열 위치 211~846)은 *B. amyloliquefaciens* (AJ576102)와 *B. subtilis* (DQ782954)의 cellulase 유전자들과도 그 상동성이 80% 이상으로 나타났다. 한편 내알칼리성 균주로 cellulase 활성과 chitosanase 활성을 동시에 지니고 있는 *B. licheniformis* NBL420의 cellulase 유전자와도 상동성이 94%로 확인되었다(7).

한편 유전자 서열에서 예측되는 cellulase는 GH family 5에 속하는 cellulase 활성영역(아미노산서열 위치 49~303)과 cellulose 결합영역(CBM; 아미노산서열 위치 374~455)으로 구성되어 있다. 아미노산 잔기배열을 비교한 결과 *B. licheniformis* strains F5 (CAJ70710), MD1 (CAE82178), ATCC 14580 (YP_079251), GXN151 (11)와 *Bacillus* sp. CY1-3 (ABG91147) 유래 cellulases와 97% 이상의 높은 상동성을 보였으며(Fig. 2), *B. subtilis* 168의 cellulase (CAA97610)와도 76% 상동성을 나타냈다.

*B. subtilis*에서 *B. licheniformis* WL-12 cellulase의 도입과 발현

*B. licheniformis*의 cellulase를 *B. subtilis*에서 발현시키기 위해 cellulase 구조유전자를 포함한 1.8 kb의 DNA단편을 *B. subtilis*의 유전자 발현용 vector인 pJ27Δ88U에 도입하여 재조합 플라스미드 pJHS1W이라 명명하였다(Fig. 3). *B. subtilis* WB700에 pJ27Δ88U과 pJHS1W를 각각 형질전환시켜 얻은 형질전환주를 kanamycin이 첨가된 LB 배지에서 배양하면서 배양시간에 따른 균의 성장과 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에 보인 바와 같이 cellulase 유전자를 함유한 pJHS1W의 형질전환주가 pJ27Δ88U의 형질전환주보다 유도기가 길어 초기성장이 늦었으나, 성장속도와 최대성장 정도는 유사하였다. 배양상등액에 존재하는 cellulase의 활성은 pJHS1W의 형질전환주가 균의 성장과 비례하

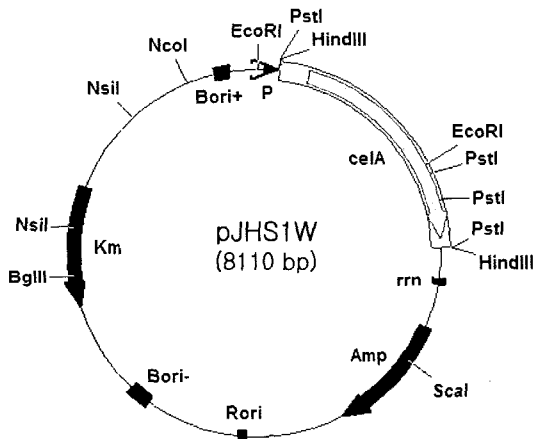


Fig. 3. Structure of recombinant plasmid pJHS1W containing the cellulase gene. Blank bar indicates the insert DNA containing cellulase gene. The arrows indicate the direction of transcription of genes. Abbreviations are as follows: P, BJ27Δ88 promoter; celA, cellulase gene; rrn, rrnBT₂ terminator; Amp, ampicillin resistance gene; Rori, replication origin of plasmid pBR322; Bori-, replication origin (minus strand) of plasmid pUB110; Km, kanamycin resistance gene; Bori+, replication origin (plus strand) of plasmid pUB110.

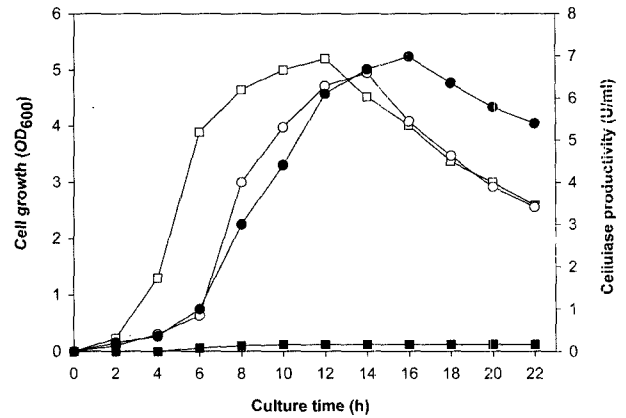


Fig. 4. Growth and cellulase production of the recombinant *B. subtilis* WB700 strains. Their growths and enzyme activities in the culture filtrates were observed periodically during growth in LB medium at 37°C. The cell growth was determined by measuring absorbance of the cell culture at wave length of 600 nm. Enzyme activities were determined with the culture filtrate. Symbols: Growth (□) and enzyme production (●) by *B. subtilis* containing pJ27Δ88U alone; Growth (○) and enzyme production (●) by *B. subtilis* containing pJHS1W.

여 증가하였으며 배양시간이 16시간 되었을 때 최대생산성이 7 U/ml에 이르렀다. 그러나 pJ27Δ88U의 형질전환주는 약 0.1 U/ml 정도의 낮은 효소 생산성을 보였는데, 이는 숙주균인 *B. subtilis* WB700 자체가 생산한 효소로 판단된다.

한편 배양상등액을 SDS-PAGE로 균체의 단백질을 조사한 결과 배양시간이 8시간 이후 부터는 *B. subtilis* (pJHS1W)의 배양액에는 *B. subtilis* (pJ27Δ88U)에서는 나타나지 않는 단백질 band가 출현하였으며, 배양시간이 오래될수록 이의 분해가 일어나 작은 단백질의 양이 증가하였다(Fig. 5A). Cellulase 활성염색을 행하였을 때 배양시간이 8시간 되었을 때는 1개의 활성 band만 보이다가 12시간, 16시간에서는 2개의 활성 bands가 보였으며, 시간이 지날수록 작은 단백질의 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 5B). 이로보아 재조합 *B. subtilis*가 생산하는 재조합 cellulase가 배양시간이 오래될수록 분해되는 것으로 판단되며, 분해된 단백질의 cellulase 활성이 유지되는 것으로 보인다. *B. subtilis* 79-23의 cellulase 유전자를 *B. subtilis* DB104에서 발현시켰을 때 배양시간에 따라 생성된 cellulase가 분해되는 현상을 보이는 것으로 보고되었다(9). 또한 배양액내의 cellulase 활성이 배양시간 8시간일 때 3.0 U/ml, 12시간일 때 6.1 U/ml, 16시간일 때 7.0 U/ml인데 비해 활성염색에서 CMC 분해정도는 효소의 활성보다 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이는 배양액내에서 분해된 cellulase 단백질의 활성이 액체반응액에서 CMC를 분해하는 정도와 활성염색의 gel에서 CMC를 분해하는 효율성의 차이 때문으로 추측된다.

참고문헌

- Berensmeier, S., S.A. Singh, J. Meens, and K. Buchholz. 2004.

A B

1 2 3 4 5 6 7 8 1 2 3 4 5 6 7 8

Fig. 5. SDS-PAGE and zymogram of the cellulase produced by *B. subtilis* transformants. *B. subtilis* WB700 containing pJ27Δ88U and *B. subtilis* WB700 carrying recombinant plasmid pJHS1W were grown at 37°C in LB medium. Culture filtrates were applied to 10% (w/v) polyacrylamide gel. Lanes 1~4 indicate the 4 hr, 8 hr, 12 hr and 16 hr cultures of *B. subtilis* containing vector alone as a control, respectively. Lanes 5~8 indicate the 4 hr, 8 hr, 12 hr and 16 hr cultures of *B. subtilis*(pJHS1W), respectively. (A) Coomassie blue-stained polyacrylamide gel, (B) Cellulase activity-stained gel.

- Cloning of the *pelA* gene from *Bacillus licheniformis* 14A and biochemical characterization of recombinant, thermostable, high-alkaline pectate lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 560-567.
2. Bischoff, K.M., A.P. Rooney, X.L. Li, S. Liu, and S.R. Hughes. 2006. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 28, 1761-1765.
 3. Damiano, V.B., R. Ward, E. Gomes, H.F. Alves-Prado, and R. Da Silva. 2006. Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic and thermophilic *Bacillus licheniformis* 77-2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 129-132, 289-302.
 4. Declerck N., M. Machius, P. Joyet, G. Wiegand, R. Huber, and C. Gaillardin. 2003. Hyperthermostabilization of *Bacillus licheniformis* α -amylase and modulation of its stability over a 50°C temperature range. *Protein Eng.* 16, 287-293.
 5. Ekowati, C., P. Hariyadi, A.B. Witarto, J.K. Hwang, and M.T. Suhartono. 2006. Biochemical characteristics of chitosanase From the Indonesian *Bacillus licheniformis* MB-2. *Mol. Biotechnol.* 33, 93-102.?
 6. Feng, Y.Y., Z.M. He, L.F. Song, S.L. Ong, J.Y. Hu, Z.G. Zhang, and W.J. Ng. 2003. Kinetics of β -mannanase fermentation by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 25, 1143-1146.?
 7. Hong, I.-P., H.-K. Jang, S.-Y. Lee, and S.-G. Choi. 2003. Cloning and characterization of a bifunctional cellulase-chitosanase gene from *Bacillus licheniformis* NBL420. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 35-42.
 8. Ikram-ul-Haq, H. Ashraf, J. Iqbal, and M.A. Qadeer. 2003. Production of α -amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. *Bioresour. Technol.* 87, 57-61.
 9. Jung, K.H., Y.C. Chun, J.-C. Lee, J.H. Kim, and K.-H. Yoon. 1996. Cloning and expression of a *Bacillus* sp. 79-23 cellulase gene. *Biotechnol. Lett.* 18, 1077-1082.
 10. Lee, E.-H., C.-J. Kim, and K.-H. Yoon. 2005. Characterization and xylanase productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 178-183.
 11. Liu, Y., J. Zhang, Q. Liu, C. Zhang, and Q. Ma. 2004. Molecular cloning of novel cellulase genes *cel9A* and *cel12A* from *Bacillus licheniformis* GXN151 and synergism of their encoded polypeptides. *Curr. Microbiol.* 49, 234-238.
 12. Ramnani, P. and R. Gupta. 2004. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RGI using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 40 (Pt 2), 191-196.
 13. Ryttersgaard, C., J. Le Nours, L. Lo Leggio, C.T. Jorgensen, L.L. Christensen, M. Bjornvad, and S. Larsen. 2004. The structure of endo- β -1,4-galactanase from *Bacillus licheniformis* in complex with two oligosaccharide products. *J. Mol. Biol.* 341, 107-117.
 14. Sareen, R., U.T. Bornscheuer, and P. Mishra. 2005. Cloning, functional expression and characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 27, 1901-1907.
 15. Shahhoseini, M., A.A. Ziaee, and N. Ghaemi. 2003. Expression and secretion of an α -amylase gene from a native strain of *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli* by T7 promoter and putative signal peptide of the gene. *J. Appl. Microbiol.* 95, 1250-1254.
 16. Tang, X.M., F.M. Lakay, W. Shen, W.L. Shao, H.Y. Fang, B.A. Prior, Z.X. Wang, and J. Zhuge. 2004. Purification and characterisation of an alkaline protease used in tannery industry from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 26, 1421-1424.
 17. Tang, X.M., W. Shen, F.M. Lakay, W.L. Shao, Z.X. Wang, B.A. Prior, and J. Zhuge. 2004. Cloning and over-expression of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 26, 975-979.
 18. Teng, D., J.H. Wang, Y. Fan, Y.L. Yang, Z.G. Tian, J. Luo, G.P. Yang, and F. Zhang. 2006. Cloning of β -1,3-1,4-glucanase gene from *Bacillus licheniformis* EGW039 (CGMCC 0635) and its expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 705-712.
 19. Veith, B., C. Herzberg, S. Steckel, J. Feesche, K.H. Maurer, P. Ehrenreich, S. Baumer, A. Henne, H. Liesegang, R. Merkl, A. Ehrenreich, and G. Gottschalk. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7, 204-211.
 20. Wang, J.J., W.B. Greenhut, and J.C. Shih. 2005. Development of an asporogenic *Bacillus licheniformis* for the production of keratinase. *J. Appl. Microbiol.* 98, 761-767.
 21. Ye, R., J.H. Kim, B.G. Kim, S. Szarka, E. Sihota, and S.L. Wong. 1999. High-level secretory production of intact, biologically active staphylokinase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 62, 87-96.

(Received December 8, 2006/Accepted December 19, 2006)

ABSTRACT: Cloning and Expression of A *Bacillus licheniformis* Cellulase Gene

Ki-Hong Yoon^{1,2} (¹School of Food Science & Biotechnology, ²Bioresource and Application Research Center, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, Korea)

A thermophilic bacterium producing the extracellular cellulase was isolated from soybean paste, and the isolate WL-12 has been identified as *Bacillus licheniformis* on the basis on its 16S rRNA sequence, morphology and biochemical properties. A gene encoding the cellulase of *B. licheniformis* WL-12 was cloned and its nucleotide sequence was determined. This cellulase gene, designated *celA*, consisted of 1,551 nucleotides, encoding a polypeptide of 517 amino acid residues. The gene product contained catalytic domain and cellulose binding domain. The deduced amino acid sequence was highly homologous to those of cellulases of *B. licheniformis*, *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* belonging to the glycosyl hydrolase family 5. When the *celA* gene was highly expressed using a strong *B. subtilis* promoter, the extracellular cellulase was produced up to 7.0 units/ml in *B. subtilis* WB700.