

대장균에서 과잉생산된 *Bacillus licheniformis* B1의 β -1,4-Glucanase 특성

송혜정 · 김황연 · 황재성 · 김한복*

호서대학교 자연과학대 생명공학과, 기초과학연구소

Characterization of *Bacillus licheniformis* B1 β -1,4-Glucanase Overproduced in *Escherichia coli*

Hye Jung Song, Hwang Yeon Kim, Jae Sung Hwang, and Han Bok Kim*

Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795,
Republic of Korea

(Received February 2, 2010/Accepted March 4, 2010)

The β -1,4-glucanase gene of *Bacillus licheniformis* B1 was expressed in *Escherichia coli* BL21, and a protein with a mass of 50 kDa that was soluble was overproduced. A protein with a mass of 37 kDa was secreted from *B. licheniformis*. It seems that the β -1,4-glucanase produced in *E. coli* contained the leader peptide and unprocessed carboxy-terminal region, but its processing occurred in the carboxy-terminal in *Bacillus*. The optimal temperature of β -1,4-glucanase was 40°C. The enzyme still had 76% maximal activity at 60°C. The optimal pH of the enzyme was 7. The enzyme retained considerable activities over the weak-acidic, neutral, and weak-basic pH range. Acidic fungal cellulases are used in food, detergent, pulp, paper, textile industries. However, studies about neutral and alkaline cellulase are not enough. The cellulase developed in this study may be useful for industrial applications in the fields of biofuel development.

Keywords: *B. licheniformis*, β -1,4-glucanase, cellulase, *E. coli*

청국장에는 미생물, 효소, 생리활성물질이 다양하게 존재한다. 청국장의 생리활성물질에 의한 항산화, 혈압강하, 면역조절 효과, estrogen receptor (ER) β 자극효과 등이 알려져 있다(9, 10, 13, 14, 20, 21). 청국장에는 단백질 분해효소의 일종인 혈전용해효소가 잘 알려져 있으나 그밖에도 amylase, pectinase, lipase 등 다양한 효소가 존재한다(10). 청국장 발효균주가 생산하는 β -1,4-glucanase (cellulase)의 특성에 대한 연구는 드문 편이다. 이 효소에 의해 저분자로 분해된 β -glucan은 암, 당뇨를 예방하는 등 다양한 생리활성을 갖고 있다(10). 청국장의 β -1,4-glucanase는 건강기능식품 소재 제조뿐만 아니라, 펄프, 섬유, 제재 등 산업계에서 많이 이용되고 있으며 최근 cellulose를 이용한 바이오에탄올 생산 분야에서도 관심이 집중되고 있다. Ligno-cellulose 바이오매스는 알코올 생산에서 전분을 대체할 잠재력을 갖고 있다. 그러나 이를 효율적으로 분해할 수 있는 효소개발이 필요한 실정이다. Cellulose의 완전분해를 위해서는, β -1,4-glucanase와 같은 endoglucanase, glucose dimer인

cellobiose를 생산하는 exoglucanase, 이를 최종적으로 glucose로 만드는 β -glucosidase의 협력이 필요하다(1). 본 연구에서 개발된 신규 β -1,4-glucanase는 이중 한 발효 분해과정에서 기여할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 *E. coli*에서, 청국장 발효균주인 *B. licheniformis*가 생산하는 β -1,4-glucanase를 대량생산하고 그것의 생화학적인 특성을 알아보았다. 또한 *Bacillus*에서 분비되는 해당효소의 processing 형태를 찾아냈다.

재료 및 방법

*E. coli*에서 과잉생산된 β -1,4-glucanase의 확인

B. licheniformis B1 β -1,4-glucanase 유전자를 pGEM-T-EASY vector (Promega, USA)에 cloning한 바 있다(10). 이 plasmid를 *E. coli* BL21에 transformation 시켰고, *E. coli* BL21를 Luria-Bertani (LB) 배지에서 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 수확한 세포를 sonication하고 원심분리한 후 침전물을 제외한 상등액을 얻었다. 상등액을 분석하기 위해 SDS-10% polyacrylamide gel 전기영동을 수행하였다.

* For correspondence. E-mail: hbkim@hoseo.edu; Tel: +82-41-540-5624; Fax: +82-41-548-6231

β -Glucanase의 효소활성 측정

Carboxymethyl cellulose (CMC)의 가수분해로 생성된 환원 당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 결정하였다(10).

효소활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

β -1,4-Glucanase가 cloning되어 있는 *E. coli* BL21를 LB 배지에서 37°C에서 하룻밤 배양한 후, 10,000×g에서 원심분리하여 상등액은 버리고 침전물에 있는 세포를 1× PBS buffer에 현탁한 후, sonication하였다. 다시 10,000×g에서 원심분리하여 상등액의 조효소액을 얻었다. 조효소액과 기질(0.1% CMC)를 혼합하여 20에서 80°C에서 한 시간 동안 반응시켜 최적 온도를 결정했다. 조효소액과 기질(0.1% CMC) 혼합액의 최적 pH를, pH 3-13까지의 다양한 영역에서 한 시간 동안 40°C에서 반응시키면서 결정하였다. 이 때 pH 3-5에서는 citrate, pH 6-8에서는 phosphate, pH 9-10에서는 glycine, pH 11-13에서는 1 N NaOH로 조절한 glycine buffer를 사용하였다.

B. licheniformis B1에서 분리된 β -1,4-glucanase의 정제

B. licheniformis B1을 2 L LB 배지에서 16시간동안 배양하고, 그 배양액을 10,000×g에서 원심분리한 후 세포를 제외한 배양액만 얻었다. 배양액을 Viva Flow (Cole-Parmer, USA)를 이용해 50 ml까지 농축하고 30% ammonium sulfate에 녹여주었다. 10,000×g에서 원심분리하여 남아있는 ammonium sulfate 침전물을 제거하고 나머지 액에 90% ammonium sulfate를 처리하였다. 침전물을 20 mM Tris-Cl buffer (pH 8.0)에 녹여준 후, 걸쭉하게 녹아있는 단백질 샘플의 투석을 30시간 동안 수행하였다. 삼투압현상으로 어느 정도 맑아진 sample의 활성을 CMC agar plate에서 확인하였다. Speed vacuum을 이용

해 2 ml까지 농축시킨 다음, Sephadex G-100 (Sigma, USA)으로 packing 되어있는 column에 sample을 주입하고 20 mM Tris-Cl buffer (pH 8.0)를 이용해 용출시켰다. 70 drop으로 설정하여 각 8 ml씩 수확하였으며, CMC agar plate와 zymogram을 통해 활성을 재확인하였다.

Zymogram 분석

Sample의 분석을 위해 0.1% CMC가 포함되어 있는 SDS-10% PAGE를 수행하였다. Gel에 0.1% Congo Red 용액을 처리한 후 30분간 실온에서 방치한 후, 1 M NaCl 용액으로 2시간 세척하고 빨간 배경 대비 투명 밴드로 활성을 확인하였다.

결과 및 고찰

*E. coli*에서의 β -1,4-glucanase 과잉생산

B. licheniformis B1의 β -1,4-glucanase 유전자가 *E. coli*에서 복제가 가능한 plasmid에 cloning 된 바 있다(10). *E. coli*에서 β -1,4-glucanase 유전자를 발현시킨 결과, 대략 50 kDa의 단백질이 과량 생산되었고(Fig. 1A) zymogram에서 효소활성을 보였으며(Fig. 1B), 이것이 바로 cloning 된 β -1,4-glucanase로 판단된다. *Bacillus*에서 생산된 mature 형태(35 kDa)에 비해(18) size가 더 큰 것으로 보아 *E. coli*에서 발현된 β -glucanase에는 leader peptide를 포함하여 processing에서 제거되어야 할 부분이 포함되어 있는 것으로 사료된다. *E. coli*의 단백질 분비 시스템이 *Bacillus*의 것과 다른 데서 이런 결과가 나오는 것으로 여겨진다(1, 2). 또한 *E. coli*에서 발현된 β -1,4-glucanase는 대부분이 수용성 band에서 관찰되었다(Fig. 1C). 통상 *Bacillus*에서 발현된 많은 β -1,4-glucanase가 불용성의 inclusion body를 형성하였다(2, 11). 본 β -1,4-glucanase 유전

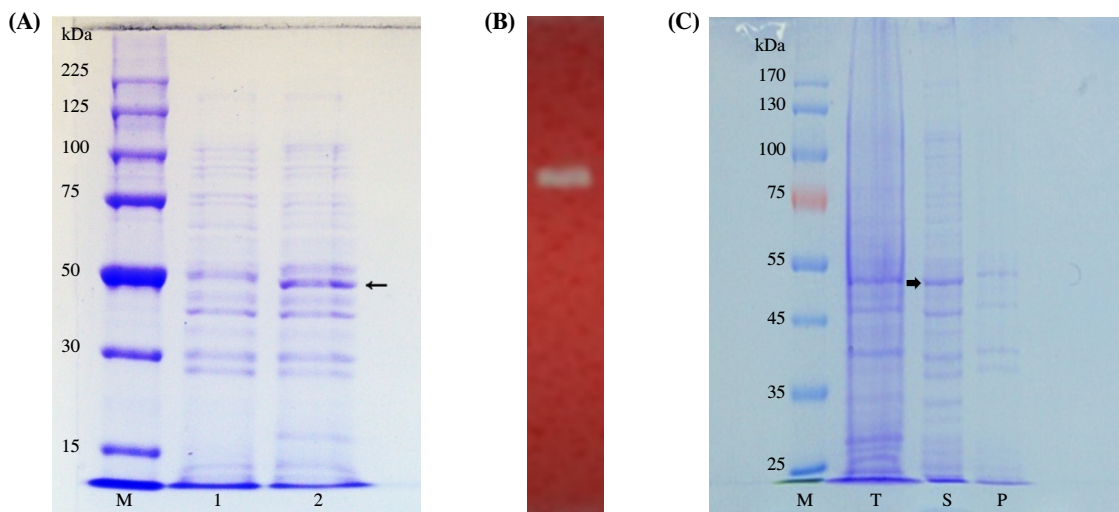


Fig. 1. (A) SDS-PAGE analysis of overproduced β -1,4-glucanase in *E. coli*. Soluble fraction of *E. coli* containing plasmid (lane 1) and that of *E. coli* containing plasmid having the cloned gene (lane 2) are shown. The arrow indicates the position of β -glucanase. (B) Zymogram analysis of β -1,4-glucanase in *E. coli*. The lane contained soluble fraction of *E. coli* having the cloned gene. (C) Solubility of β -1,4-glucanase. The lysates (T) were separated into supernatant (S) and pellet (P) fractions by centrifugation, and SDS-PAGE analysis was performed. The arrow indicates the position of β -glucanase.

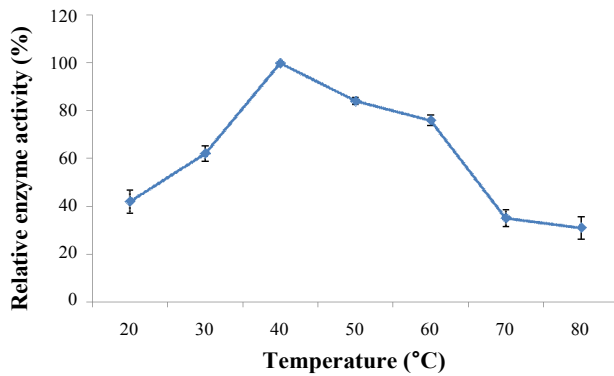


Fig. 2. Effect of temperature on the enzyme activity. The activities of β -1,4-glucanase overproduced in *E. coli* were determined at various temperatures using DNS method.

자는 plasmid 상에서 phage promoter 밑에 연결되어 있고, 또한 *E. coli* BL21에서는 *E. coli* BL21(DE3)와는 달리 phage RNA polymerase가 유도되지 않는다. β -1,4-Glucanase가 발현되었다는 것은 *E. coli* RNA polymerase가 phage RNA polymerase가 하는 정도는 아니지만, 어느 정도 phage promoter를 인지하여 transcription을 수행할 수 있음을 의미한다. Phage polymerase를 유도할 수 있는 균주를 사용하지 않은 것은 단백질의 과잉생산에 따른 inclusion body의 형성을 피하기 위해서였다. 그럼에도 불구하고 사용한 plasmid의 copy 수가 높아서 단백질 밴드로서 해당 단백질의 생산 결과를 충분히 확인할 수 있었다. 본 실험에서 *E. coli*에서 생산된 β -1,4-glucanase의 size는 본 효소와 homology가 높은 *B. subtilis* DLG β -1,4-glucanase의 size (51.5 kDa)와 일치하였다(17, 18). *B. licheniformis* B1과 *B. subtilis* DLG의 β -1,4-glucanase 아미노산 배열을 비교해 보면 전체 아미노산 중 16개를 빼고는 나머지 영역에서 전부 일치하는 homology를 보였다(10).

효소의 최적 온도 및 pH

*E. coli*에서 생산된 β -1,4-glucanase의 최적온도는 40°C이었지만, 60°C에서도 최대치의 76% 활성을 유지하여 어느 정도의 내열성도 있었다(Fig. 2). 효소의 최적 pH는 7이었고, pH 5에서 최대치 대비 62%의 활성을 나타냈으며 pH 9, 10에서는 각각 58, 29%의 활성을 보이는 등, 전체적으로 보면 효소의 활성이 약산성, 중성 및 약알칼리 영역에 널리 걸쳐 있었다(Fig. 3). 근래 알칼리성 *Bacillus* cellulase도 발견되고 있다(5-7, 12). Cellulase는 식품, 세제, 펄프, 제지, 섬유산업 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 주로 산성의 곰팡이계 효소가 이용되고 있으나, 중성 및 알칼리성 cellulase 연구 및 개발은 미흡한 편이다(4-7, 12, 16). 또한 *Bacillus* 균주는 배양상의 이점도 갖고 있다. 본 연구에서 개발된 중성 cellulase가 비전분 계열의 바이오 연료 개발 등의 분야에서 활용되기를 기대해 본다. β -1,4-Glucanase를 포함하고 있는 *B. licheniformis* B1 조 효소액의 최적 pH는 10이었다(10). β -1,4-Glucanase가 *E. coli*에서는 50 kDa, *B. licheniformis* B1에서는 35 kDa의 size를

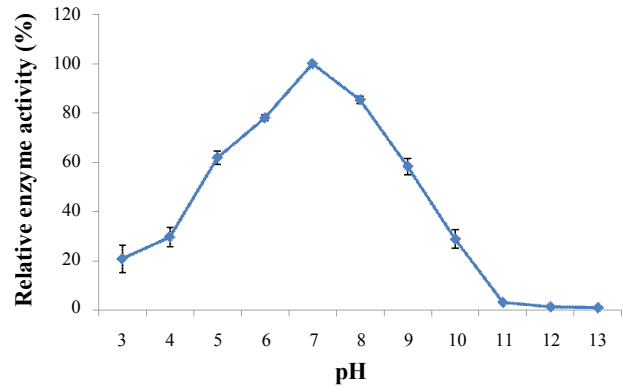


Fig. 3. Effect of pH on the enzyme activity. The activities of β -1,4-glucanase overproduced in *E. coli* were determined at various pHs and 40°C using DNS method.

가짐에 따라 3차 구조에서 큰 차이가 나고 이 때문에 최적 pH 차이를 보인다고 추정해 볼 수 있다(Figs. 1A and 4A). *B. licheniformis* B1 β -1,4-glucanase와 상동성이 가장 높은 *B. subtilis* DLG β -1,4-glucanase에서도 균주에 따른 동일 단백질의 size 차이를 확인할 수 있는 것으로 보아 *Bacillus*에서의 processing은 일반적인 것으로 사료된다(18). 앞으로 정확한 processing 부위를 규명하는 작업이 필요할 것이다.

*Bacillus*에서의 분비효소 확인

*B. licheniformis*에서 분비된 β -1,4-glucanase를 정제하고 분자량을 결정하였다. 정제된 효소에 대해 Congo Red 활성실험을 한 결과, *B. licheniformis*에서는 *E. coli*에서 발견되었던 50 kDa 단백질은 존재하지 않았고, 37, 35 kDa의 형태가 발견되었으며 zymogram에서 효소활성을 나타냈다(Figs. 4A, 4B, and 5). 35 kDa 형태는 37 kDa으로부터 부분분해된 것으로 보인

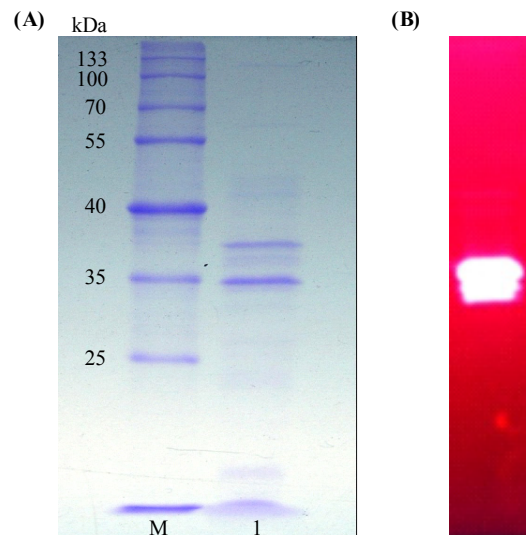


Fig. 4. (A) SDS-PAGE analysis of purified enzymes from *B. licheniformis* B1. They have molecular mass of 37 and 35 kDa (lane 1). (B) Zymogram analysis of purified β -1,4-glucanases from *B. licheniformis* B1.

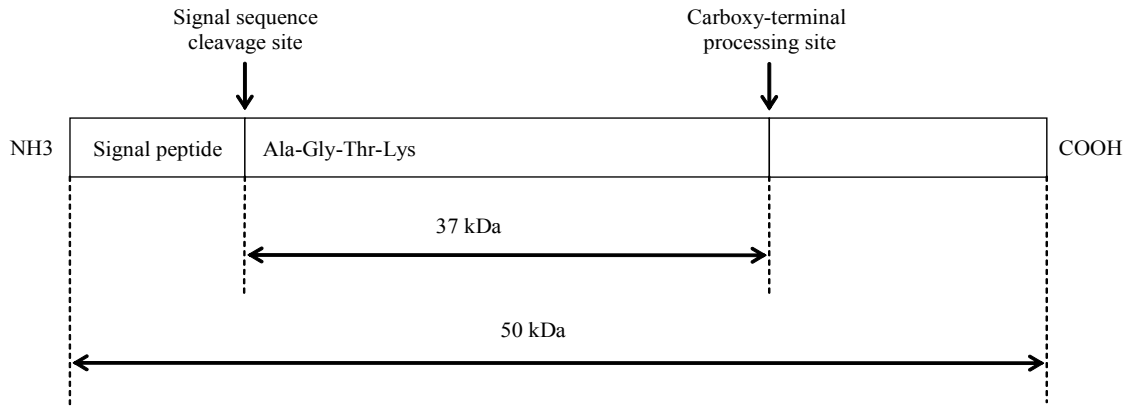


Fig. 5. The structure of β-1,4-glucanase. The unprocessed enzyme is 50 kDa and the processed mature one is 37 kDa. The mature form has Ala-Gly-Thr-Lys at its amino-terminal.

다. *B. subtilis* DLG β-1,4-glucanase는 leader peptide가 제거되고, 효소의 carboxy 말단 부분도 절단되어 결국 35 kDa의 형태가 생성된다고 보고하였다(17, 18). Leader peptide가 제거된 *B. subtilis* DLG β-1,4-glucanase의 35 kDa은 그 amino 말단에 Ala-Gly-Thr-Lys-Thr-Pro-Val-Ala-Lys을 갖고 있다고 알려져 있다(18). 이러한 processing이 *B. subtilis* DLG와 homology가 높은 *B. licheniformis* B1의 β-1,4-glucanase에도 적용되는 것으로 추정된다(Fig. 5). *B. licheniformis*에서 분비된 β-1,4-glucanase는 CMC 분해능을 갖고 있었지만 결정형 cellulose인 Avicel (Sigma, USA)의 분해능은 없었다. 반면에 *E. coli*에서 생산된 β-1,4-glucanase (50 kDa)는 Avicel 분해능을 갖고 있었으며 효소액의 단백질 농도에 의존적이었다(Fig. 6). 이는 *E. coli*에서 생산된 β-1,4-glucanase가 carboxy 말단 부위에 cellulose binding domain (CBD)를 갖고 있기 때문으로 보인다(1-3, 8, 15, 17-19). 반면에 *Bacillus*에서 생산된 β-1,4-glucanase가 Avicel을 분해하지 못하는 이유는 CBD가 없기 때문으로 사료된다(1, 2).

결정형의 cellulose의 분해에는 *E. coli*에서 생산된 본 β-1,4-glucanase을 사용하고, 비결정형의 cellulose 분해에는 *B. licheniformis* B1에서 생산된 효소를 사용할 수 있다. 이는 본 연구

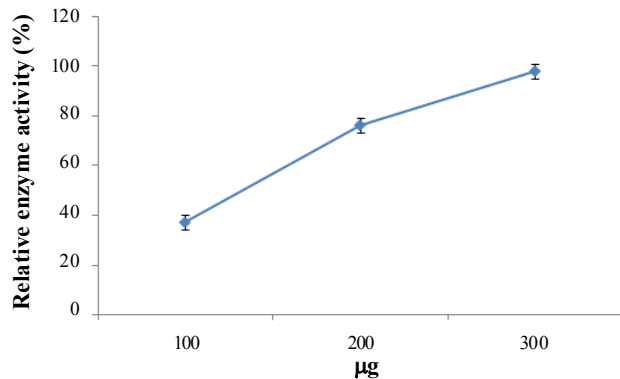


Fig. 6. Avicel degrading activity of β-1,4-glucanase overproduced in *E. coli*. The enzyme activities were determined at 40°C and pH 7.

에 의해 개발된 효소의 장점이라 할 수 있다. 결정형 cellulose의 분해 효율을 높이는 작업과, shuttle vector 등을 이용하여 cloning된 본 효소를 *Bacillus*에서 대량생산하는 연구가 앞으로 필요할 것이다.

적요

Bacillus licheniformis B1의 β-1,4-glucanase 유전자는 *Escherichia coli* BL21에서 발현되어, 이로부터 수용성의 50 kDa 단백질이 과량생산되었다. 반면에 *B. licheniformis*에서는 37 kDa의 형태가 분비되었다. *E. coli*에서 발현된 β-1,4-glucanase는 leader peptide가 제거되지 않고 포함되어 있고 *Bacillus*에서는 효소의 carboxy 말단에서 processing이 일어난 것으로 보인다. *E. coli*에서 생산된 β-1,4-glucanase의 최적온도는 40°C이었지만, 60°C에서도 최대치의 76% 활성을 유지하였다. 효소의 최적 pH는 7이었고, 효소의 활성은 전체적으로 보면 약산성, 중성 및 약알칼리 영역에 널리 걸쳐 있었다. Cellulase는 식품, 세제, 펄프, 제지, 섬유산업 등 다양한 분야에서 주로 산성의 곰팡이계 효소가 이용되고 있으나, 중성 및 알칼리성 cellulase 연구 및 개발은 미흡한 편이다. 본 연구에서 개발된 중성 cellulase가 바이오 연료 개발 등의 분야에서 활용되기를 기대해 본다.

감사의 말

본 연구는 2009년도 호서대학교 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었음(2009-0187).

참고문헌

- Bischoff, K.M., A.P. Booney, X. Li, S. Liu, and S.R. Hughes. 2006. Purification of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnol. Lett.* 28, 1761-1765.

2. Bischoff, K.M., S. Liu, and S.R. Hughes. 2007. Cloning and characterization of a recombinant family 5 endoglucanase from *Bacillus licheniformis* strain B-41361. *Process Biochem.* 42, 1150-1154.
3. Carrad, G., A. Koivula, H. Soderlund, and P. Beguin. 2000. Cellulose-binding domains promote hydrolysis of different sites on crystalline cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10342-10347.
4. Cavaco-Paulo, A. 1998. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydr. Polym.* 37, 273-277.
5. Christakopoulos, P., D.G. Hatzinikolaou, G. Fountoukidis, D. Kekos, M. Claeysens, and B.J. Macris. 1999. Purification and mode of action of an alkali-resistant endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 61-66.
6. Endo, K., Y. Hakamada, S. Takizawa, H. Kubota, N. Sumitomo, T. Kobayashi, and S. Ito. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties, and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 109-116.
7. Hakamada, Y., K. Endo, S. Takizawa, T. Kobayashi, T. Shirai, T. Yamane, and S. Ito. 2002. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 1570, 174-180.
8. Han, S.J., Y.J. Yoo, and H.S. Kang. 1995. Characterization of a bifunctional cellulase and its structural gene. *J. Biol. Chem.* 270, 26012-26019.
9. Hwang, J.S., S.J. Kim, and H.B. Kim. 2009. Antioxidant and blood-pressure reduction effects of fermented soybean, Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 45, 54-57.
10. Hwang, J.S., H.J. Yoo, S.J. Kim, and H.B. Kim. 2008. Characterization of β -1,4-glucanase activity of *Bacillus licheniformis* B1 in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 44, 69-73.
11. 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.
12. Kim, J., S. Hur, and J. Hong. 2005. Purification and characterization of an alkalophilic *Bacillus* sp. HSH-810. *Biotechnol. Lett.* 27, 313-316.
13. Kim, H.B., H.S. Lee, S.J. Kim, H.J. Yoo, J.S. Hwang, G. Chen, and H.J. Youn. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J. Microbiol.* 45, 256-261.
14. Matsui, T., H.Y. Yoo, J.S. Hwnag, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptidie from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 40, 355-358.
15. Mawadza, C., R. Hatti-Kaul, R. Zvauya, and B. Mattiasson. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *J. Biotechnol.* 83, 177-187.
16. Park, J.D., Y.A. Kim, and K. Yoon. 2009. Properties of a *Bacillus licheniformis* cellulase produced by recombinant *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 45, 257-262.
17. Robson, L.M. and G.H. Chambliss. 1986. Cloning of the *Bacillus subtilis* DLG β -1,4-glucanase gene and its expression in *Escherichia coli* and *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 165, 612-619.
18. Robson, L.R. and G.H. Chambliss. 1987. Endo- β -1,4-glucanase gene of *Bacillus subtilis* DLG. *J. Bacteriol.* 169, 2017-2025.
19. Yoda, K., A. Toyoda, Y. Nakamura, and H. Minato. 2005. Cloning, sequencing, and expression of *Eubacterium cellulosolvens* 5 gene encoding an endoglucanase (Cel5A) with novel carbohydrate-binding modules, and properties of Cel5A. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 5787-5793.
20. Yoo, H.J., J.S. Hwang, and H.B. Kim. 2007. Mass analysis of isoflavones in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 43, 54-58.
21. Yoo, H.J., S.H. Lee, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2002. Antioxidant activity of fermented barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* 38, 230-233.