

## *Bacillus subtilis*와 *Bacillus megaterium*에서의 $\beta$ -1,3-glucanase 유전자의 발현

김기훈 · 김지연<sup>1</sup> · 김한복<sup>2</sup> · 이동석\*

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, <sup>1</sup>인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터,

<sup>2</sup>호서대학교 자연과학부 생명과학전공

*Bacillus circulans* KCTC3004 기원의  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 pLM460과 pUB110을 이용하여 shuttle 플라스미드 pLMS1180을 제작하고 *Bacillus* 세포에 이동·발현시켰다. pLMS1180으로 형질전환된 *B. subtilis*와 *B. megaterium*은 효율적으로  $\beta$ -1,3-glucanase를 생산하였고, 이 효소들은 세포의 중식과 비례하여 생산되었다. 형질전환체가 생산하는  $\beta$ -1,3-glucanase의 최대 활성을 유전자 공여 균주인 *B. circulans*와 비교하여 보니, *B. subtilis*는 14배, *B. megaterium*은 5배 정도의 높은 활성을 나타내었다. 그리고 대장균 형질전환체는 분비율이 7% 정도인데 반하여 *B. subtilis* 형질전환체는 생산된 효소를 전부, *B. megaterium* 형질전환체는 약 97%를 세포 외로 분비하는 것을 알 수 있었다. SDS-PAGE를 통해 대장균과 *B. subtilis*, *B. megaterium*에서 발현된 효소의 분자량을 분석해 보니 약 38,000으로 추정되었다. 또한, 이들 형질전환체가 생산하는  $\beta$ -1,3-glucanase는 laminarin에 작용하여 주된 산물로서 laminaribiose (G2), laminaritriose (G3) 이상의 다양한 laminarioligosaccharide들을 생산함이 확인되었다. pLMS1180의 각 숙주 내에서의 안정성을 살펴본 결과 *B. megaterium*에서는 88%, 대장균에서는 75%, *B. subtilis*에서는 48%로 나타났다.

**Key words** □ *Bacillus circulans*, *B. subtilis*, *B. megaterium*,  $\beta$ -1,3-glucanase, shuttle vector, stability

$\beta$ -1,3-glucanase는 병원성 곰팡이나 효모의 세포벽 성분으로 잘 알려진  $\beta$ -1,3-glucan polymer, 즉 laminarin을 가수분해시켜 약간의 glucose를 포함한 laminaribiose (G2)와 laminaritriose (G3), laminaridextrin등의 혼합물을 만드는 효소로 세균과 방선균, 효모, 곰팡이, 고등식물 등에서 그 생산이 보고되어 왔다(6,11). 특히, *Trichoderma longibrachiatum*과 *Rizoctonia solani*, *Phytophthora infestans*, *Streptomyces* sp. *Arthrobacter*, 호알칼리성 *Bacillus* sp. 등에서 연구된 바 있으나 그 유전자에 대한 면밀한 분석이 이루어지지 않고, 그 생산량이 적어, 산업적 활용에는 제한되어 있었다. 이를 해결하기 위해서 선행과제로 본 효소의 다량 생산 및 효율적인 분비가 요구된다(1,14).

대장균과 *Bacillus*는 재조합 DNA 기술을 통한 단백질 생산에 가장 많이 이용되고 있는 숙주이다. 대장균은 유전적, 생리적 측면에서 그 기작이 잘 알려져 있고, 성장 속도가 빠르며, 형질전환을 용이하게 할 수 있으나 전반적으로 균체 내에 단백질을 함유하고 있기 때문에 단백질의 분비에 어려움이 따른다. *Bacillus*는 대장균 다음으로 유전학적 및 생리학적 기초연구가 많이 이루어진 세균이며, 지난 10여년 간 *Bacillus*를 외래단백질 생산을 위한 숙주로서 이용하려는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 대장균에서는 볼 수 없는 포자형성, competence 발현과 같은 흥미있는 생물학적 현상과 함께 배양이 용이하고 병원성이 없어 오랜 전부터 그람양성균의 대표적인 연구모델로서 이용되어 왔다. 뿐만

아니라 생산된 단백질을 대부분 세포 밖으로 분비하는 특성이 있어 실용적인 면에서 대장균보다 우월하여 산업적으로 유용한 효소들을 효율적으로 생산하는 산업미생물로서도 중요한 위치를 차지해 왔다.

우리는 *B. circulans* KCTC3004 유래의  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 pUC19를 vector로 하여 대장균 내에서 클로닝 및 발현시켜 재조합 플라스미드 pLM530을 얻어 기본적인 분자생물학적 연구를 수행한 바 있다(10).

본 연구에서는 산업적으로 유용한 효소인  $\beta$ -1,3-glucanase를 효율적으로 생산하기 위해 pLM460과 pUB110을 이용하여 대장균-*B. subtilis*-*B. megaterium* shuttle 플라스미드를 제작하고, 유용한 숙주인 *B. subtilis*와 *B. megaterium*에  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 이동·발현시켜, 효소 생산 및 분비, 분자량 측정, 분해산물의 확인, shuttle 플라스미드 안정성을 비교 연구하여 이 유전자의 과잉 발현을 시도해 보고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 플라스미드

형질전환을 위한 숙주로는 *E. coli* DH5 $\alpha$ [*supE44*  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80 *lacZ*  $\Delta$ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*], *B. subtilis* RM125[*leuA8* *arg15* *hsrM*<sup>-</sup> *hsmM*<sup>-</sup>] 및 *B. megaterium* ATCC14945 [wild type,  $\beta$ -glucanase negative]를 사용하였다. 본 연구에 사용된 shuttle 플라스미드 pLMS1180 제작을 위해서는  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 함유한 재조합 플라스미드

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-55-320-3262, Fax: 82-55-334-3426  
E-mail: mbdlee@ijnc.inje.ac.kr

pLM460과 pUB110 (7)을 사용하였다.

### 배지 및 생장조건

*B. subtilis*와 *B. megaterium*은 본 연구실에서 확립한 LN 배지 (0.3% beef extract와 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 1.0% tryptone)를 사용하여 37°C에서 진탕 배양하였으며, *E. coli* 역시 LB 또는 LN 배지를 사용하여 37°C에서 진탕 배양하였다. 한천 평판 배지의 경우에는 LB나 LN 액체배지에 한천을 1.5% 첨가하여 사용하였다. 그리고 원형질체의 세포벽 재생을 위한 배지로 DMP-3 (kanamycin, 100 µg/ml 첨가)(4)를 사용하였다. 효소활성 유무를 판별하기 위해서는 기질인 laminarin (0.3%)을 첨가하고 항생제로는 ampicillin (100 µg/ml)이나 kanamycin (50 µg/ml)을 사용하였다.

### 재조합 shuttle 플라스미드 제작

Shuttle 플라스미드를 제작하기 위해서 *B. subtilis* RM125로부터 pUB110 (4.5 kb, Km<sup>r</sup>)과 대장균으로부터 β-1,3-glucanase 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 pLM460 (4.6 kb, Ap<sup>r</sup>)을 각각 분리·정제하여 제한 효소 *EcoRI*로 절단한 후 두 DNA를 서로 ligation 시켰다. Ligation 시킨 재조합 shuttle 플라스미드의 분석 및 확인을 위해 제한효소로 자른 DNA 절편을 agarose gel (0.7~1.5%) 전기영동하였다.

### 형질전환

대장균은 변형된 Hanahan의 방법(5)으로 competent cell을 이용하여 형질전환하였다. *B. subtilis*와 *B. megaterium*으로의 형질전환은 Chang과 Cohen (4) 및 Brown과 Carlton (2)의 원형질체를 이용한 방법을 적절히 변형시켜 본 연구실에서 확립한 방법으로 수행하였다. *B. subtilis*와 *B. megaterium*을 LN 액체 배지로 37°C에서 진탕 배양하였다. 이 배양액을 18°C에서 5,500×g로 5분간 원심분리하여 세포 침전물을 얻어 0.5 M sorbitol이 첨가된 protoplasting buffer (SoMM') (4)로 현탁시킨 다음 lysozyme (40 mg/ml)을 넣었다. 원형질체 현탁액에 재조합 shuttle 플라스미드를 넣고 45% PEG 용액과 잘 섞어 주었다. 37°C에서 2-4시간 동안 예비 배양한 형질전환세포들을 DMP-3 (kanamycin, 100 µg/ml 첨가) 재생용 배지에 도말하고 24시간 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 이들을 0.3% laminarin이 함유된 LN (kanamycin, 50 µg/ml 첨가) 평판 배지에 각각 toothpicking하여 Congo-red 염색법(13)을 이용, 효소활성을 나타내는 형질전환체를 선별하였다.

### 효소활성 측정

형질전환체를 10 ml LN배지(ampicillin 50 µg/ml 또는 kanamycin 10 µg/ml 첨가)에서 37°C로 36시간 동안 진탕 배양한 후 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액과, 남은 세포 침전물은 적정 완충용액으로 현탁한 후 20 kHz에서 3분간 초음파로 파쇄처리한 후 12,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소활성 측정에 사용하였다. β-1,3-glucanase 활성

은 0.05 M 시트르산 완충용액(pH 5.4)에 laminarin (1%)을 녹여 기질로 사용하였으며, 효소액 0.5 ml과 기질 0.5 ml을 혼합하여 50°C에서 10분 동안 반응시켰다. 환원당 측정은 3,5-dinitro-salicylic acid (DNS) (12)에 의한 방법에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량하였으며 50°C에서 1분간 1 µmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

### SDS-PAGE 분석

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli (8) 방법에 따라 수행하였다. 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용, 150 V에서 80분간 전기영동하였으며 분리된 단백질 band는 Coomassie blue 염색약으로 염색하여 분자량을 추정하였다.

### 분해 생성물의 분석

Laminarin 가수분해 산물은 thin layer chromatography (TLC) 법을 이용, 분석하였다. 효소액 0.5 ml과 1% laminarin(pH 5.4 시트르산 완충용액) 0.5 ml이 혼합된 용액을 50°C에서 12 또는 24시간 동안 반응시킨 후 Silica Gel 60 TLC plate에 tip으로 20 µl씩 loading하였다. 이 때 isoamylalcohol : ethanol : ammonia : water (50 : 60 : 1 : 30) 혼합액을 전개용매로 사용한 후 공기 중에서 완전히 건조시키고, 5%의 4-methoxybenzaldehyde (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>)와 5%의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 소량의 glacial acetate, 90%의 ethanol이 혼합된 용액으로 spray한 후 120°C에서 15분간 반응시켰다.

### 플라스미드 안정성

25 ml의 LB 액체 배지에 항생제(kanamycin 50 µg/ml 또는 ampicillin 100 µg/ml 포함)를 넣고 여기에 재조합 플라스미드를 지닌 kanamycin 내성의 *Bacillus* 형질전환체 또는 ampicillin 내성의 대장균 형질전환체의 단일 콜로니를 접종하여 37°C에서 12-16시간 동안 진탕 배양하였다. 잘 자란 배양액 0.2 ml을 20 ml의 LB 액체 배지에 접종(1%)하고 다시 37°C에서 12-16시간 동안 배양하였다. 배양액을 새로운 LB 액체 배지로 24시간마다 1:1000 되게 희석하여 약 30 세대 이상 될 때까지 72시간 동안 배양한 후 LB 한천 평판 배지에 도말, 37°C에서 12-16시간 동안 배양하였다. 다음 날 비선택적 평판 배지인 LB 한천 평판 배지에 도말한 후 잘 자란 100개 단일 콜로니들의 항생제에 대한 저항성 여부를 알아보기 위해 항생제 kanamycin (50 µg/ml) 또는 ampicillin (100 µg/ml)이 포함된 LB 한천 평판 배지에 toothpicking하여 배양된 콜로니 수를 기록, 플라스미드 안정성을 살펴보았다.

## 결 과

### β-1,3-glucanase 유전자를 함유한 DNA 절편의 subcloning

pLM530의 β-1,3-glucanase 5.3 kb DNA 절편의 활성영역을 추정해 보기 위하여 여러 효소로 절단하여 subcloning을 실시하였다. 먼저, pLM530을 *EcoRI*로 절단하여 0.7 kb의 단편을 분리한 후 나머지 4.6 kb 절편을 self-ligation시켰더니, 이 재조합

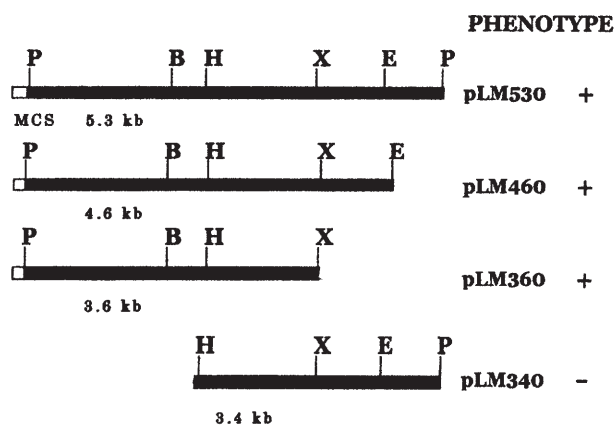


Fig. 1. Subcloning of  $\beta$ -1,3-glucanase coding region from the cloned pLM530. Symbols: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; MCS, multiple cloning site; P, *Pst*I; X, *Xba*I; +/−, plasmid conferring or not  $\beta$ -1,3-glucanase activity.

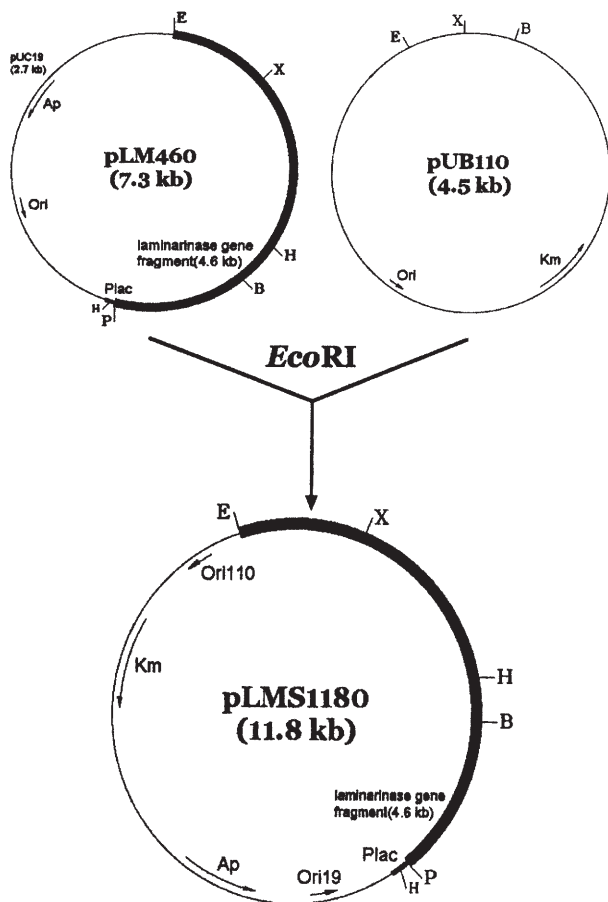


Fig. 2. Schematic representation of the construction of a recombinant shuttle plasmid pLMS1180. For detailed explanations, see the text in MATERIALS AND METHODS. Symbols: Ap, ampicillin resistance gene; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; Km, kanamycin resistance gene; Ori19, replication origin from pUC19; Ori110, replication origin from pUB110; P, *Pst*I; Plac, lac promoter; X, *Xba*I.

플라스미드는  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 나타내었다. 또한 pLM530의 5.3 kb 절편을 *Xba*I로 절단하여 나머지 3.6 kb를 pUC19에

subcloning 하였더니 역시  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 나타내었다. 그러나, pLM530의 5.3 kb 절편을 *Hind*III로 절단하여 나머지 3.4 kb를 subcloning 한 것은  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 나타내지 않았다. 여기서  $\beta$ -1,3-glucanase 활성을 나타내는 재조합 플라스미드를 각각 pLM460과 pLM360이라 명명하고, 그들의 제한효소 지도를 간단하게 표기하였다(Fig. 1). 또한, pLM460 (Fig. 2)을 *Bacillus* 세포로의 형질전환에 사용하도록 선정하였다.

### $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 함유한 shuttle 플라스미드의 제작

Fig. 2에서 나타내는 바와 같이  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 함유한 재조합 플라스미드 pLM460과 *Bacillus* 세포에서 발현이 가능하도록 kanamycin 내성을 가지고 있는 pUB110을 이용하여 shuttle vector pLMS1180을 제작하였다. 이 재조합 플라스미드 pLM460과 pUB110을 각각 제한효소 *Eco*RI로 절단하여 두 DNA 단편을 ligation 한 후 먼저 *E. coli*에 형질전환 시켰다. 이 재조합 플라스미드를 pLMS1180으로 명명하고, *B. subtilis*와 *B. megaterium*으로 다시 형질전환시켰다. 형질전환체의 선별은 kanamycin 내성의 콜로니를 분리한 후 laminarin을 함유한 평판 배지로 옮겨 Congo-red 염색법을 이용,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성 여부를 확인하였다.

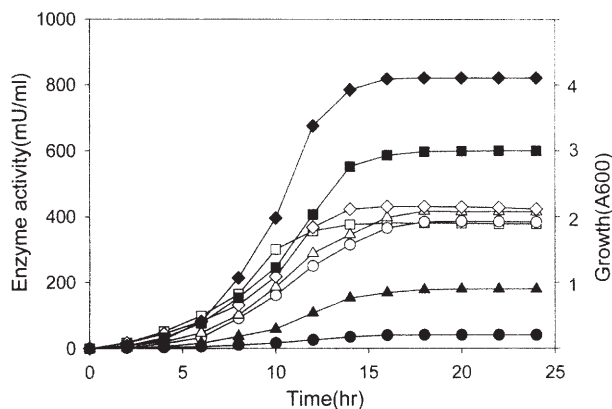
### 유전자 공여균과 재조합 형질전환 균주들이 생산하는 효소의 특성

세포 분획별 효소 활성을 알아보기 위해 시료를 배양 상등액과 세포 추출물로 나눈 후 기질인 laminarin에 대한 효소 활성을 검토한 결과 Table 1과 같았다. 즉, *B. circulans* 모균의  $\beta$ -1,3-glucanase는 세포 내에 존재하지 않았고 전부 세포 외로 분비되었었으며, pLMS1180을 함유한 *B. subtilis* 또한 전부 세포 외로 분비하였고, *B. megaterium*은 97% 정도 세포 외로 분비하였다. pLMS1180을 함유한 *E. coli*는 세포 내에 약 93%가 함유되어 있었고 7%만이 세포 외로 분비되었다. 그리고 기질인 laminarin에 대한 효소활성을 알아본 결과, pLMS1180을 함유한 *B.*

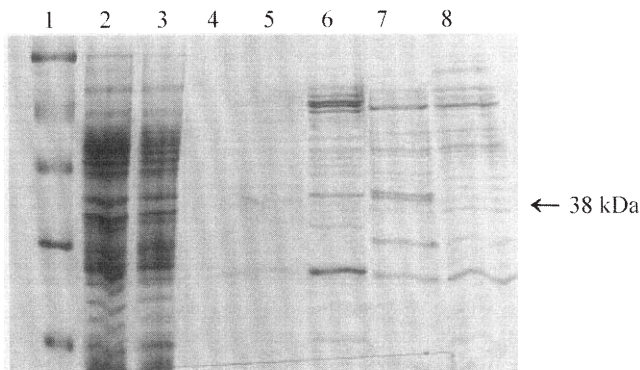
Table 1. Activity and localization of an  $\beta$ -1,3-glucanase in transformed cells of *E. coli*, *B. subtilis* and *B. megaterium*

| Strains                                   | Enzyme activity<br>(mU/ml of culture broth) in |              |       |       |
|---|--|--------------|-------|-------|
|   | Culture supernatant                            | Cell extract | Total | Ratio |
| <i>B. circulans</i> KCTC3004 (gene donor) | 40(100)  | 0            | 40    |       |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ (pLMS1180)    | 62(7)  | 759(93)      | 821   | 20    |
| <i>B. megaterium</i> ATCC14945 (pLMS1180) | 179(97)  | 5(3)         | 182   | 5     |
| <i>B. subtilis</i> RM125 (pLMS1180)       | 599(100)                                       | 0(0)         | 599   | 14    |

Strains of *Bacillus* and *E. coli* were grown in LN medium. All cultures were aerated vigorously for 16 hr at 37°C before the enzyme samples were harvested. Numbers in parentheses represent relative distribution (%) of the enzyme.



**Fig. 3.** Changes of  $\beta$ -1,3-glucanase activities in the culture broths during the growth of *E. coli* DH5 $\alpha$  (pLMS1180), *B. subtilis* RM125 (pLMS1180), *B. megaterium* ATCC14945 (pLMS1180) and *B. circulans* KCTC3004. The four strains were grown aerobically in LN medium at 37°C. Culture supernatants and whole cell extracts were prepared periodically and  $\beta$ -1,3-glucanase activities were assayed. Symbols: ● - ●, activity of *B. circulans*; ○ - ○, growth of *B. circulans*; ▲ - ▲, activity of *B. megaterium* (pLMS1180); △ - △, growth of *B. megaterium* (pLMS1180); ■ - ■, activity of *B. subtilis* (pLMS1180); □ - □, growth of *B. subtilis* (pLMS1180); ◆ - ◆, activity of *E. coli* (pLMS1180); ◇ - ◇, growth of *E. coli* (pLMS1180).



**Fig. 4.** SDS-PAGE analysis of  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *E. coli*, *B. subtilis* and *B. megaterium* transformants. Whole cell extracts were appropriately concentrated and applied to 12% polyacrylamide gel. Lane 1, high molecular weight markers (97, 68, 43, 29, 18K daltons); lane 2, *E. coli* (pLMS1180); lane 3, *E. coli* (pUC19) as a control; lane 4, blank; lane 5, *B. megaterium* (pUB110) as a control; lane 6, *B. megaterium* (pLMS1180); lane 7, *B. subtilis* (pLMS1180); lane 8, *B. subtilis* (pUB110) as a control.

*subtilis*는 모균에 비해 14배 정도 많은 효소를 증폭생산 하였으며, *B. megaterium*의 경우는 5배 정도의 효소활성을 보였다.

#### 균체 배양 시간에 따른 생육과 효소생산의 변화

*B. circulans*와 *B. subtilis* (pLMS1180), *B. megaterium* (pLMS1180)을 LN배지(kanamycin 첨가)에서 37°C로 16시간 동안 배양시킨 중 배양액을 10 ml의 LN배지에 1%(w/v) 되도록 각각 나누어 접종하여 배양 시간에 따른 효소의 활성을 경시적

으로 비교, 검토하였다. Fig. 3에서와 같이 *B. circulans*와 *B. subtilis* (pLMS1180), *B. megaterium* (pLMS1180)의 생육 정도는 거의 비슷하여 접종 후 16시간에 정지기에 도달하였다.  $\beta$ -1,3-glucanase의 발현 및 생산은 *B. subtilis* (pLMS1180)와 *B. megaterium* (pLMS1180) 모두 16시간만에 최대 활성에 도달한 후 안정한 값을 유지하였다. 즉,  $\beta$ -1,3-glucanase 활성은 생육 정도에 거의 비례하여 증가하다가 세포 생육 정지기 이후 정체됨을 알 수 있었다.

#### 분자량 측정

pLMS1180을 함유한 *E. coli*와 *B. subtilis*, *B. megaterium* 형질 전환체들이 생산하는 단백질을 polyacrylamide gel을 이용, 분리하는 방법을 통하여 비교 분석하였다. pLMS1180을 함유한 *E. coli*와 *B. subtilis*, *B. megaterium*에서 얻어진 band로부터 이 효소의 분자량은 38 kDa로 추정되었다(Fig. 4).

#### TLC를 통한 분해 산물의 확인

효소액 0.5 ml과 1% laminarin 용액(시트리트 완충용액, pH 5.4) 각 1 ml의 혼합액을 50°C에서 24시간 동안 반응시켜 TLC로 그 생성물을 조사한 결과 *E. coli* DH5 $\alpha$  (pLMS1180)와 *B. megaterium* ATCC14945 (pLMS1180), *B. subtilis* RM125 (pLMS1180)들에서 생산된  $\beta$ -1,3-glucanase는 laminarin에 작용하여 주된 가수분해 산물로서 laminaribiose (G2), laminaritriose (G3) 이상의 다양한 laminarioligosaccharide들을 생산함이 확인되었다(Fig. 5).

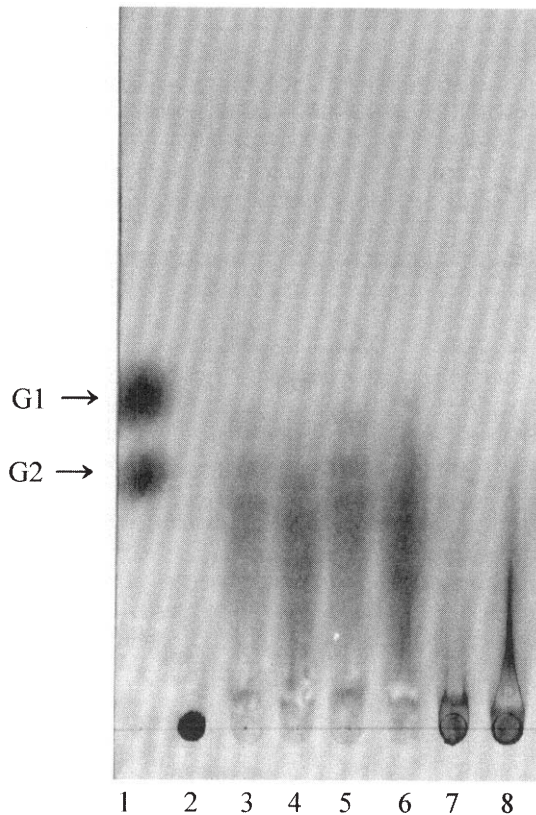
#### Shuttle 플라스미드 안정성

Shuttle 플라스미드의 안정성을 알아보기 위해서 항생제가 없는 배지에서 균주를 30세대 이상 배양하여 살펴보았다(Fig. 6). 숙주로는 *B. subtilis*, *B. megaterium*, *E. coli*를 사용하였고 대조균으로는 *B. subtilis* (pUB110), *B. megaterium* (pUB110), *E. coli* (pUC19)를 사용하였다. *B. megaterium*과 *E. coli*에서는 88%와 75%로 비교적 안정한 수준을 유지하였으나, *B. subtilis*에서는 대조균과 함께 48% 수준을 유지하였다(Fig. 6). 항생제를 첨가함으로써 플라스미드의 손실을 방지할 수 있었다.

## 고 찰

*B. circulans* 기원의  $\beta$ -1,3-glucanase의 다량 생산은 pLMS1180을 제작하여 *B. subtilis*와 *B. megaterium*으로 형질전환시킴으로써 가능하게 되었다. 효소의 활성은 모균인 *B. circulans*에 비해 형질전환된 *B. subtilis*는 14배, *B. megaterium*은 5배를 나타내었다(Table 1). *B. subtilis*가 *B. megaterium*에 비해 약 3배 정도 높은 활성을 보이는 것은 세포 안에서 복제 유지되는 재조합 플라스미드의 숫자와 전사 효율상의 차이가 크게 작용하리라 여겨진다. 대장균과 *B. subtilis*, *B. megaterium* 형질전환체에서 생산된  $\beta$ -1,3-glucanase의 분비 양상을 조사해 본 결과(Table 1) 대장균은 생산된 효소의 7%만 세포 외로 분비하였고, *B. subtilis*는

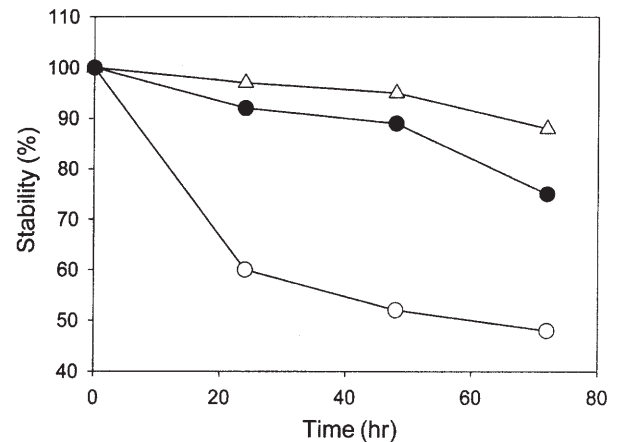




**Fig. 5.** Thin-layer chromatogram of the products released from the hydrolysis of laminarin by the  $\beta$ -1,3-glucanase in *B. megaterium* (pLMS1180), *B. subtilis* RM125 (pLMS1180), *E. coli* DH5 $\alpha$  (pLMS1180). 0.5 ml of culture supernatants were mixed with 1 ml of 1% laminarin (0.05 M citrate buffer, pH 5.4) and incubated for 24 hr (lanes 4, 6, 8) or 12 hr (lanes 3, 5, 7) at 50°C, and each sample was applied to the thin-layer chromatography plate. Lane 1, standard glucose and cellobiose; lane 2, before start of  $\beta$ -1,3-glucanase reaction; lanes 3, 4, after reaction of  $\beta$ -1,3-glucanase reaction from *B. megaterium* (pLMS1180); lanes 5, 6, after reaction of  $\beta$ -1,3-glucanase reaction from *B. subtilis* (pLMS1180); lanes 7, 8, after reaction of  $\beta$ -1,3-glucanase reaction from *E. coli* (pLMS1180).

100%, *B. megaterium*은 97%를 분비하였다. 이 결과로 *Bacillus* 세포가 대장균보다 효소의 생산 및 분비에 훨씬 적합함을 알 수 있다. 형질전환체가 세포의 성장 시기에 관계없이 성장된 세포의 양에 비례적으로 효소를 발현·생산하는 것으로 보아, 성장시기 별로 차등적 억제 혹은 유도 등을 받지 않는 constitutive한 발현 방식을 갖추고 있음을 알 수 있었다.

*Bacillus* 형질전환체가 생산하는  $\beta$ -1,3-glucanase의 분자량을 측정해 본 결과(Fig. 4) 38 kDa로 앞서 수행하여 얻은 분자량과 일치함을 알 수 있었다(10). 또한, 본 효소의 높은 열안정성은 산업적 응용성에 대단히 중요한 요소라 할 수 있겠다. 한편, 대장균과 *B. subtilis*, *B. megaterium*에서 생산된  $\beta$ -1,3-glucanase는 기질인 laminarin에 작용하여 최종 가수분해 산물로 laminaribiose (G2), laminaritriose (G3) 이상의 다양한 laminarioligosaccharide 들을 생산함이 확인되었다(Fig. 5).



**Fig. 6.** Stability of pLMS1180 in *E. coli*, *B. subtilis* and *B. megaterium* in LB medium. The culture was diluted 1:1000 with fresh medium every 24 hr. Symbols:  $\circ$  -  $\circ$ , stability of *B. subtilis* (pLMS1180);  $\bullet$  -  $\bullet$ , stability of *E. coli* (pLMS1180);  $\triangle$  -  $\triangle$ , stability of *B. megaterium* (pLMS1180).

Shuttle 플라스미드인 pLMS1180의 안정성을 살펴본 결과(Fig. 6), *B. megaterium* 형질전환체는 88%, 대장균은 75%를 나타내었고, *B. subtilis*는 48%의 안정성을 유지하였다. Lee 등(9)이 보고한 pCK108의 플라스미드 안정성과 비교해 볼 때, *B. megaterium*과 대장균에서는 각각 98%, 80%로 유사한 수준을 나타내었고 *B. subtilis*에서는 0.1%로 낮은 안정성을 나타내었다. *B. subtilis*에서는 플라스미드의 불안정성이 Castet 등(3)에 의해 보고된 바 있고, 이를 해결하기 위한 방안이 제시되기도 하였다.

상기와 같이 효소의 과잉생산을 위해서 사용한 숙주로는 *B. subtilis*와 *B. megaterium*이다. 플라스미드 안정성과 함께 발현 숙주의 적합성을 살펴보면, *B. subtilis*는 30세대 이상이 되면 안정성이 급격히 떨어지지만 생산성에 있어서는 *B. megaterium*보다 월등히 우수하다. 반대로, *B. megaterium*은 생산성에 있어서는 *B. subtilis*보다 못하지만 플라스미드 안정성은 매우 높은 것으로, 두 숙주 모두 장단점이 있으므로 활용 용도에 따라 취사선택하여 사용해야 될 것으로 판단된다.

본 연구에서는 고유의 promoter를 가지고 있는  $\beta$ -1,3-glucanase 유전자를 *Bacillus* 세포를 통한 과잉발현을 시도하였다. 더 나아가 강력한 promoter로 교체하여 생산성의 효율을 높이는 연구를 해 보아야 할 것이다. 앞으로 본 연구에서 구축한 생산 system을 활용하여 산업적으로 유용하게 쓰일 효소들을 다량 생산할 수 있을 것이며, 발현 생산된  $\beta$ -1,3-glucanase의 분해 산물인 다양한 올리고당들은 고기능성 생물소재로 활용할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 1999학년도 인제대학교 학술연구조성비 지원과 일부는 과학기술부·한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Bielecki, S. and H. Brzeski. 1989. Characterization of non-flocculent cells isolated from a culture of flocculent *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 1001. *FEMS Microbiol. Lett.* 52, 189-194.
2. Brown, B.J. and B.C. Carlton. 1980. Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 142, 508-512.
3. Castet, J.C., M. Craynest, J.N. Barbotin, and N. truffaut. 1994. Improvement of plasmid stability of recombinant *Bacillus subtilis* cells in continuous immobilized culture. *FEMS Microbiol. Reviews* 14, 63-68.
4. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* 168, 111-115.
5. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*, In D.M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford. p.109-135.
6. Jakob, B., H. Ursula, and R. Hans. 1985. Extracellular enzymes of *Phytophthora infestans*: endo-cellulase,  $\beta$ -glucosidase, and 1,3- $\beta$ -glucanases. *Can. J. Microbiol.* 31, 75-82.
7. Jalanko, A., I. Palva, and H. Soderlund. 1981. Restriction maps of plasmids pUB110 and pBD9. *Gene* 14, 325-328.
8. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
9. Lee, D.S. and M.Y. Pack. 1987. Use of bacilli for overproduction of exocellular endo- $\beta$ -1,4-glucanase encoded by cloned gene. *Enzyme Microb. Technol.* 9, 594-597.
10. Lee D.S. and H.G. Chang. 1995. Cloning and expression of a  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Bacillus circulans* KCTC3004 in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 17, 355-360.
11. Martin, D.F., F.G. Priest, C. Todd, and M. Goodfellow. 1980. Distribution of  $\beta$ -glucanase within the genus *Bacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 1136-1138.
12. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
13. Teather, R.M. and P.J. Wood. 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 777-780.
14. Watanabe, T., N. Yahata, and Y. Nakamura. 1989. Expression in *Escherichia coli* of the *Bacillus circulans* WL-12 structural Gene for  $\beta$ -1,3-glucanase. *Agric. Biol. Chem.* 53, 1759-1767.

(Received November 15, 2001/Accepted December 1, 2001)

**ABSTRACT: Expression of a  $\beta$ -1,3-Glucanase Gene from *Bacillus circulans* in *B. subtilis* and *B. megaterium***  
**Ki-Hoon Kim, Ji-Yeon Kim<sup>1</sup>, Han-Bok Kim<sup>2</sup> and Dong-Seok Lee\*** (Department of Medical Laboratory Science and <sup>1</sup>Biohealth Products Research Center, Inje University, Kimhae 621-749, Korea, <sup>2</sup>Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

A *Bacillus circulans* KCTC3004  $\beta$ -1,3-glucanase gene contained in a recombinant plasmid pLM460 derived from subcloning the original recombinant plasmid pLM530 was transferred into a new shuttle vector plasmid pLMS1180 by ligating linearized DNAs of pLM460 and pUB110. *B. subtilis* RM125 and *B. megaterium* ATCC14945 transformed with pLMS1180 produced the  $\beta$ -1,3-glucanase substantially. Most of the enzyme was produced during the exponential growth period. The maximum activities of the  $\beta$ -1,3-glucanase produced by the *Bacillus* transformants were compared with that of the *B. circulans* gene donor strain. The *B. subtilis* RM125 (pLMS1180) enzyme showed the activity 14 times higher than that of the gene donor cells, followed by the *B. megaterium* ATCC14945 (pLMS1180) enzyme with activity 5 times higher than that of the gene donor cells. While *E. coli* secreted about 7% of the produced enzyme, *B. subtilis* excreted the enzyme into the medium wholly and *B. megaterium* about 97% of the total product. The SDS-PAGE of this enzyme produced in *E. coli* (pLMS1180), *B. subtilis* (pLMS1180) or *B. megaterium* (pLMS1180) indicated a molecular weight of 38,000. The enzymes overproduced in three different host cells hydrolyzed laminarin to produce mainly laminaribiose, laminaritriose, and laminarioligosaccharides. The plasmid pLMS1180 was stable in *B. megaterium*, *E. coli*, but was unstable in *B. subtilis*.