

Bacillus circulans 유래 cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 염기서열 결정 및 분석

김지연*

인제대학교 기초대학

클로닝된 *Bacillus circulans* ATCC21367 유래 cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 염기서열을 결정·분석하였다. 본 유전자는 1,224 bp의 407개 아미노산을 암호하는 open reading frame (ORF)으로 구성되어 있었으며 염기서열로부터 산출된 유전자의 분자량은 45 kDa으로 효소의 SDS-PAGE로부터 측정된 분자량과 일치하였다. ATG 개시 코돈의 9 bp 위쪽에 Shine-Dalgarno (SD) 서열로 추정되는 5'-AAAGGAG-3' 서열이 확인되었고 그 상단에 promoter로 추정되는 -35 서열(TTTACA)과 -10 서열(TATACT)이 위치하고 있었으며, 이는 *B. subtilis* promoter consensus sequence와 유사하였다. 한편, 이 효소의 아미노산 서열은 이미 보고된 *B. circulans* KSM-N257의 alkaline endo- β -1,4-glucanase와는 97%, *B. circulans* WL-12의 endo- β -1,3-1,4-glucanase와는 75%, *Bacillus* sp. KSM-330의 endo- β -1,4-glucanase (cellulase)와는 45%의 유사성을 나타내었다. 또한 *bglBC2* 염기서열의 정보를 GenBank에 등록하였으며 등록번호는 AY269256이다.

Key words □ *Bacillus circulans*, *bglBC2*, cellulolytic xylanase, nucleotide sequence

자연계에 다량으로 존재하는 식물성 유기자원(biomass)의 주성분은 cellulose, hemicellulose, lignin이며 이들로부터 유용 화합물, 질, 식량 및 에너지로의 재활용에 관한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행되고 있다(3). 그러나 이들 biomass는 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 불수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부만 이용되어지고 있으며, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 산화되거나 폐기물로 취급되어 자원이 낭비되고 있다. 그러므로 이러한 biomass를 미래의 자원으로 효율적으로 활용하기 위한 여러 가지 방안이 절실히 요구된다.

Hemicellulose는 D-xylan과 D-galactan, D-mannan 등이 혼합되어 있는 복합 다당류(complex polymer)로서 다양한 분지와 측쇄를 가지고 있으며, 기본 골격도 6탄당 복합 중합체인 cellulose와는 달리 주로 5탄당으로 이루어져 있다. 이는 나무와 식물의 구성 성분으로 많은 양을 차지하고 있으며 식물의 종류와 부위에 따라 현저한 차이를 보인다.

Xylan은 hemicellulose의 60-80%를 차지하고 있는 일종의 heteropolymer로서 그 분포량은 cellulose보다 다소 적지만 cellulose에 비해 비교적 용이하게 효소에 의해 분해 될 수 있는 특성을 지니고 있다. 자연 상태의 xylan은 cellulose와는 달리 매우 복잡한 구조를 가지고 있다. β -1,4 polyxylose의 주결합체에 acetyl 및 arabinosyl, glucuronyl 등의 잔기가 결합된 다양한 측쇄를 가지고 있을 뿐만 아니라, xylan 분자 상호간 또는 xylan

분자와 lignin 분자가 서로 cross-linking되어 있다. 따라서 xylan은 분자량과 구성 성분, 측쇄의 수, acetylation의 정도에 따라 다양하다(4). 이와 같은 복잡한 구조의 natural xylan을 효율적으로 가수분해하려면 상기 분자간의 cross-linking과 측쇄 결합을 효과적으로 절단하는 ferulic acid esterase와 acetyl xylan esterase, α -arabinofuranosidase, glucuronidase 등의 효소와 β -1,4 주결합체 절단에 필수 분해 효소인 xylanase와 β -xylosidase 등과 같은 효소의 협동 작용(cooperative action)이 필요한 것으로 보고 되고 있다(24). 이 중에서 xylanase는 xylan의 기본골격을 분해하여 xylooligosaccharides로 전환시키는 효소로서 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 한다.

Xylan이 분해 되면 이용성이 증가되기 때문에 xylan을 분해하는 효소에 관하여 세균이나 곰팡이를 대상으로 오래전부터 많은 연구가 진행되어왔으며, 이들 미생물의 xylanase와 그 유전자의 특성이 보고 되었다(11, 18). 일반세균에서는 *Bacillus*와 *Clostridium* 속 균주를 중심으로 다양한 특성의 xylanase가 발견되었으며, 분자량이나 반응 특성이 곰팡이나 방선균 유래의 xylanase보다 더 다양하다(18). 곰팡이 중에서는 *Aspergillus* 속 균주와 *Trichoderma reesei*에 의해 생산된 xylanase가 많이 연구되었으며, 특히 *Trichoderma reesei*는 xylanase의 생산성이 높은 것으로 알려졌다(17, 20). 한편, *Clostridium thermocellum*에서도 상이한 두 효소가 보고 되었는데 그 중 하나는 단지 cellulase (CMCase) 활성을 보이는 반면에 다른 하나는 CMCase와 xylanase 활성을 모두 나타내었다(19). 그러므로 xylanase의 효소적 정의는 xylan과 cellulose간의 교차 기질 특이성을 조사한 후 결정되어야 옳다고 판단된다(9, 24).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-320-3737, Fax: 055-339-3734
E-mail: biokjy@inje.ac.kr

Xylanase의 산업적 유용성은 목질계로부터 양질의 펄프 생산, 가축의 사료효율 개선, 과일음료의 청징, 제빵의 고품질화, 농산 부산물 이용 등에서 주목 받고 있다(11, 23). 사료산업에서는 미생물 유래 xylanase가 사료 첨가용 효소로 사용되며 곡물 사료 섭취 시 hemicellulose로 인한 가축의 장내의 고점도를 저하시키는 기능을 함으로써 소화기 질병을 예방하고 사료효율을 향상시키는 것으로 알려져 있다(13). 또한 xylanase를 처리하여 빵의 품질을 개선하거나, β -xylosidase와 함께 xylanase 유전자가 도입된 효모를 이용하여 농·임산 부산물을 당화하고자 하는 연구가 진행되고 있다(6).

효율적인 xylan 자원의 활용을 위하여 좋은 xylanase 자원 확보는 중요하므로 xylanase들의 탐색과 그 유전자들에 관한 연구가 요구된다. 이를 위해서는 효소의 cloning 및 새로운 균주의 탐색 등 다양한 연구를 수행함이 선행되어야 한다. Xylanase 유전자의 cloning은 1983년 Bernier 등이 *B. subtilis*의 chromosomal DNA로부터 분리하여 *Escherichia coli*에 cloning한 것을 시초로 하여 현재까지 50여종의 xylanase 유전자가 cloning 되었으며 이중 *B. stearothermophilus*에서 유래된 xylanase 유전자 등 30여종의 xylanase 유전자의 염기배열 순서가 결정되어 xylanase의 발현기작, 분비기작 및 조절기작 등에 관한 기초적인 정보를 제공하고 있다(2, 7). 특히, *B. circulans*가 생산하는 xylanase에 대해서는 유전자 구조와 효소 활성 부위에 관한 보고가 있으며, Ashita 등은 cellulase 생산량이 적고 열과 알칼리에 강한 새로운 xylanase의 정제와 특성 등을 규명하였다(1, 4, 22, 26).

본 연구자는 *B. circulans* ATCC21367이 생산하는 cellulolytic xylanase 유전자를 클로닝하여 *E. coli* DH5 α 에 발현시킨 후 클로닝된 유전자 및 효소의 일반적인 생화학적 특성에 대한 결과를 분석 보고한 바 있다(10). 클로닝된 재조합 plasmid pXL180은 *B. circulans*로부터 유래된 0.5 kb와 1.3 kb *Pst*I 절편으로 이루어진 총 1.8 kb 삽입 절편을 포함하고 있었다. 따라서 본 연구에서는 클로닝된 cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 염기서열을 결정하여 그 특성을 분석·규명하고, 이미 보고된 다른 β -glucanase 유전자와의 상호 유사성을 비교해 보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 공여균주는 *B. circulans* ATCC21367이었으며, 형질전환을 위한 숙주로는 *E. coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*]가 사용되었다. 그리고 subcloning vector로는 pUC19와 pBluescriptII SK(+)를 사용하였다.

배지 및 성장조건

B. circulans DNA가 포함된 재조합 플라스미드를 지닌 *E. coli* DH5 α 는 100 μ g/ml의 LB (0.5% yeast extract와 1% tryptone, 1% NaCl 함유) 배양액에서 자라게 하였다. 형질전환체들은 MacConkey 한천 배지에 ampicillin을 100 μ g/ml되게 함유시켜 선

별하였다. 효소활성을 나타내는 형질전환체의 선별을 위해서는 기질인 xylan (oat spelt, 0.3%)이나 carboxymethyl cellulose (CMC, 0.3%), lichenan (0.3%)과 항생제인 ampicillin (100 μ g/ml)을 첨가하여 사용하였다.

DNA의 분리

플라스미드 DNA는 Wizard[®] plus Minipreps DNA Purification System (A7500 Promega, Madison, USA)을 이용하여 분리하였다.

Cellulolytic xylanase 유전자의 염기배열 순서 결정 및 분석

B. circulans cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 제한효소 지도에 근거하여 적절한 제한효소로 절단한 여러 가지 유전자 단편을 pBluescriptII(+) plasmid vector에 ligation 시켜 재조합 plasmid DNA를 제조한 후 각 subclone에 대한 염기배열 순서 결정을 dideoxy chain termination 방법으로 행하였다. 염기서열 분석은 GENETYX-MAC (6.0.2)과 DNA Strider (1.0.1) program을 이용하였고, 타 *Bacillus* sp. 유래의 β -glucanase 유전자와의 유사성을 비교해 보기 위해 <http://www.genome.ad.jp>와 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>의 인터넷 사이트를 찾아 조사하였으며 아미노산 서열의 유사성 정도를 정확히 알기 위해 BLASTX program을 이용하여 확인하였다. 또한 *bglBC2*의 정보를 GenBank에 등록하였으며 등록번호는 AY269256이다.

SDS-PAGE 및 Zymogram (Activity staining)

분자량 측정을 위해 효소 단백질의 분리 및 zymogram은 Kim 등의 방법에 따라 실시하였다(10).

결과 및 고찰

Subcloning 및 효소 활성 조사

본 연구자는 선행 연구에서 xylan 분해 관련 효소의 생산능을 가지고 있는 것으로 확인된 *B. circulans* ATCC21367를 이용, cellulolytic xylanase 유전자를 pUC19를 vector로 하여 대장균에 클로닝 및 발현을 시켰었다. 이 재조합 플라스미드를 pXL180이라고 명명하고 이 유전자의 제한효소 지도를 밝힌 바 있다(10). 염기서열 결정 및 분석을 위해 1.8 kb cellulolytic xylanase 유전자 절편을 포함하고 있는 재조합 플라스미드(pXL180)의 지도를 이용하여 여러 가지 제한효소로 절단한 후 다시 pUC19과 ligation시켜 각 subclone들의 효소 활성을 조사하였다. 삽입된 1.8 kb 크기의 유전자를 *Pst*I로 처리하여 1.3 kb와 0.5 kb 크기의 두 절편을 얻어 각각 pUC19과 ligation시킨 다음 활성을 알아보았으나 두 subclone 모두 효소 활성을 보이지 않았다. 그리고 pXL180을 *Eco*RI로 처리하여 약 500 bp의 절편을 제거하고 self-ligation시켰으나 이 또한 효소 활성을 나타내지 않았다. 그러므로 xylanase를 코딩하는 유전자가 0.5 kb *Pst*I 절편과 *Eco*RI 부위 내에 포함되어 있다고 추정하고 1.8 kb 절편 전체의 염기 서열을 결정하기로 하였다. 효소 활성은 xylan 또는 CMC

가 0.3% 포함된 LB (ampicillin 100 µg/ml) 한천 배지에서 효소 활성대(halo)를 관찰하여 확인하였다.

DNA 염기 서열 결정 및 분석

Cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)를 포함하고 있는 pXL180의 1.8 kb DNA 절편상의 유전 정보를 분석해 본 결과, 클로닝된 절편의 크기는 1,842 bp로 ATG를 개시 코돈으로 하는 1,224 bp (nucleotides 269-1,492)의 단일 open reading frame (ORF)이 발견되었다(Fig. 1). 본 유전자의 ORF는 407개 아미노산으로 구성되어 있으며 추정 분자량이 약 45 kDa인 polypeptide 분자를 암호화하고 NH₂-말단쪽에 31개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide (Met¹-Ala³¹)가 존재하였다. 이들 signal peptide는 NH₂-말단쪽에 염기성 아미노산(Arg와 Lys)이 존재하며 그 뒤를 이어 소수성 아미노산(Leu와 Phe, Val, Ile, Ala)이, COOH-말단 부위에는 극성 아미노산들이 위치하였다.

개시 코돈은 ATG, 종결 코돈은 TAA로 나타났고 개시 코돈의 9 bp 위쪽으로 Shine-Dalgarno (SD) 서열(5'-AAAGGAG-3')로 추정되는 염기서열이 발견되었다. Translation initiation 효율과 직접적인 관계를 가진 SD 서열과 개시 코돈의 종류, SD 서열과 개시 코돈 사이의 거리 등의 관점에서 볼 때 본 유전자는 ATG 개시 코돈의 9 bp 위쪽에 *B. subtilis* 16S rRNA 3' 영역의 consensus sequence와 높은 상보성을 나타내는 SD 서열(5'-AAAGGAG-3')이 존재함을 확인할 수 있었다(15). 또한 promoter로 추정되는 -35 서열(TTTACA)과 -10 서열(TATACT)은 같은 *Bacillus* 종들에서 밝혀진 것과 매우 유사한 염기 서열(TTGACA, TATAAT)을 보였다(Fig. 1). 이는 요즘 알려진 같은 균종의 promoter와 큰 차이가 없고 -35와 -10 서열 사이의 거리도 17 bp로 매우 효율적인 promoter 구조임을 보여주고 있으며, *E. coli* 숙주에서도 효과적으로 작동할 수 있을 것으로 판단되었다. 뿐만 아니라 COOH-말단쪽에서 mRNA의 전사를 종결시킬 수 있는 terminator로 추정되는 서열(5'-AAAGCCCTGATCC-3', 5'-GGATCAGGGTTT-3')도 발견되었다. 또한 3' 말단 부분에는 p-independent transcription terminator로 인정할 만한 stem-loop 구조도 발견할 수 있었다.

SDS-PAGE를 통한 cellulolytic xylanase의 분자량 측정

*bglBC2*를 지닌 대장균 형질전환체 *E. coli* DH5α (pXL180)와 대조구용으로 pUC19를 함유한 대장균 형질전환체 *E. coli* DH5α (pUC19)를 동일한 조건으로 배양하여 SDS-PAGE와 zymogram (activity staining)을 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *E. coli* DH5α (pUC19) 단백질에서는 효소의 활성대(halo)를 관찰할 수 없었으나 *E. coli* DH5α (pXL180)의 경우는 배양 상등액과 세포 추출물에서 동등한 위치에 오직 한 개의 활성대를 나타내었다. 따라서 클로닝된 cellulolytic xylanase 효소의 분자량은 약 45 kDa으로 추정되었으며, 이 결과는 open reading frame으로부터 수학적으로 계산된 분자량과 일치함을 알 수 있었다.

```

1  gaaagacggcgtttttgctgacggcgatccgctgtcacaataatttacaataatataca
66  ataataataactagtagtagataggaataattatcattatataaagatattacatatctaa
131  tcttctcaggattatatacatataaagcagcattctcctgcttccatcgatttgggaagggtggg
196  tttatttgaacccgttttaaccaactgtagcggttaattggctttccattcgaaaaacaaagac
261  gaagcgtg atg aaa ata ttc cca aat tca atc atc cgt aag tca gct atg
1      Met Lys Val Phe Arg Asn Ser Ile Ile Arg Lys Ser Ala Val
311  ttg ttc tat gct att cta cta atc ttg cca cca gaa ttg tct cta tca
15      Leu,Phe Cys Ala Val Leu Leu Ile Leu Pro Ala Gly Leu Ser Leu Ser
359  acc aac aag ccg ttt ccc cag cat acg tca tat acg aac ggt tca att
31      Ala Asn Lys Pro Phe Pro Gln His Thr Ser Tyr Thr Ser Gly Ser Ile
407  aaa cca aac aat gta acg cag tca acg atg aac aat cag gtc aag aac
47      Lys Pro Asn Asn Val Thr Gln Ser Ala Met Asp Asn Ala Val Lys Asn
455  aaa tgg aac aac tgg aaa ggg tct ttc cta aag cct gca cag aca ggg
63      Lys Trp Asn Ser Trp Lys Gly Ser Phe Leu Lys Pro Ala Ala Thr Gly
503  caa tat tac gta aaa tat aat tca gac gac gaa acg gta tcc gaa gct
79      Gln Tyr Tyr Val Lys Tyr Asn Ser Ala Gly Glu Thr Val Ser Glu Ala
551  cat gac tac ggg atg ctc ttc acc gtt cta atg cag gaa tac aac agt
95      His Gly Tyr Gly Met Leu Phe Thr Val Leu Met Ala Gly Tyr Asp Ser
599  aat acc cag tca tat ttc gaa gaa ctt tat cca tat tat aag cag cat
111     Asn Ala Gln Ser Tyr Phe Asp Gly Leu Tyr Arg Tyr Lys Thr Lys His
647  ccg agt aat aac aat cca tat cta atg gct tgg aag caa aac aac aac
127     Pro Ser Asn Asn Asn Pro Tyr Leu Met Ala Trp Lys Gln Asn Ser Ser
695  ttt cag aat ata ggg gaa acc aat tca gca acg gac gac aat atg aac
143     Phe Gln Asn Ile Gly Gly Ala Asn Ser Ala Thr Asp Gly Asp Met Asp
743  att gct tac gca ctc cta ctt cag cag aag cag tgg gaa aac aac gaa
159     Ile Ala Tyr Ala Leu Leu Leu Ala Asp Lys Gln Trp Gly Ser Ser Gly
791  tca att aat tac ctc cag gca gct aag gct att atc aat gct atc atg
175     Ser Ile Asn Tyr Leu Gln Ala Ala Lys Asp Ile Ile Asn Ala Ile Met
839  aac aat gac att aat cag tcc cag tgg acg cta cag tta gac gac tgg
191     Ser Ser Asp Val Asn Gln Ser Gln Thr Leu Arg Leu Gly Asp Trp
887  gca aca aac gac atc ttc gac acc acc aac cag cca tca gac ttc atg
207     Ala Thr Ser Gly Ile Phe Asp Thr Ala Thr Arg Pro Ser Asp Phe Met
935  cta aac cat atg aag gca ttc cgt gac gct act gac gac atc gct tgg
223     Leu Asn His Met Lys Ala Phe Arg Ala Ala Thr Gly Asp Val Arg Trp
983  gat aat gtc att aac aaa acc tat acc atc atc aac tcc atc tat aac
239     Asp Asn Val Ile Asn Lys Thr Thr Ile Ile Asn Ser Ile Tyr Asn
1031 gac tac aac tcc aat act gac tta ctt cag gat ttc gta gtc aag tca
255     Gly Tyr Ser Ser Asn Thr Gly Leu Leu Pro Asp Phe Val Val Lys Ser
1079 gac aac aat tat cag cct cag gaa gaa gaa ttc cta gaa gaa gaa aat
271     Gly Ser Asn Tyr Gln Pro Ala Gly Gly Gly Phe Leu Gly Ala Asn
1127 gat gaa aaa tac tat tac aat tca tcc cag act cct tgg cag att acg
287     Asp Gly Lys Tyr Tyr Tyr Asn Ser Ser Arg Thr Pro Trp Arg Ile Thr
1175 act gac tat cta atg acc gac gat acg cgt gac cta gac aat tta aac
303     Thr Asp Tyr Leu Met Thr Gly Asp Thr Arg Ala Leu Asn Gln Leu Asn
1223 aag atg aac acg ttc att aca tca gcc aca aac aac aat cct gcc aac
319     Lys Met Asn Thr Phe Ile Lys Ser Ala Thr Ser Asn Pro Ala Asn
1271 atc aaa gca ggg tat aac cta aac gcc acc gac cta gta act tat aac
335     Ile Lys Ala Gly Tyr Asn Leu Asn Gly Thr Ala Leu Val Thr Tyr Asn
1319 aat ggg gac ttc tat gct cct ttt gac gta aat gac atg act tca tcc
351     Ser Gly Ala Phe Tyr Ala Pro Phe Gly Val Ser Ala Thr Met Thr Ser
1367 aac cag cag aac tgg cta aat tca gta gaa aat tac acg gac aac aca
367     Ser His Gln Ser Trp Leu Asn Ser Val Trp Ser Tyr Thr Ala Asn Ala
1415 tcc gca gaa gaa tat tat gaa gaa aac atc aag cta ttc tca atg atc
383     Ser Ala Glu Gly Tyr Tyr Glu Glu Ser Ile Lys Leu Phe Ser Met Ile
1463 gta atg tca gaa aac tgg tgg aca tat taa acatcagcccttaagtttaag
399     Val Met Ser Gly Asn Trp Trp Thr Tyr ***
1516 gaatcataaataaagccctgacgctcattacgacggttttttagttcttcttccaata
1579 attgatttatagtaaaaaataaagaatttgcattgatatttaacatagagcatgtaaatct
1642 tattaataaataaacatttatataatgaataaattcagctgaagcttaactaaggcattgac
1705 atctgttttttttattgtgaagggtttacaagaatgaatcggaacgaagggaatcgta
1768 tgcacaagagcatgggtgtaagatgctgtcagggatagcggcagtttactggttggaggt
1831 ttaggctctgca

```

Fig. 1. Nucleotide sequences of the cellulolytic xylanase gene (*bglBC2*) from *B. circulans* ATCC21367 and the deduced amino acid sequences for the open reading frame (ORF). The putative promoter sequences are underlined and the possible Shine-Dalgarno (SD) sequence is shown by broken underlining. Facing arrows mark inverted repeat sequences that can work as putative transcription terminators. Asterisks represent proposed termination codon. The putative processing site of signal sequence of pre-protein is shown by the vertical arrow.

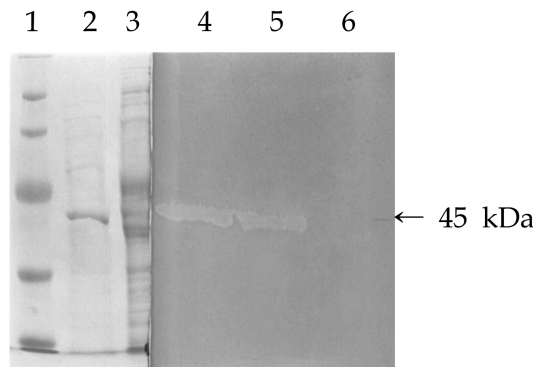


Fig. 2. SDS-PAGE analysis and zymogram of the cellulolytic xylanase produced by *E. coli* DH5 α (pXL180). The *E. coli* cells were grown for 16 hr at 37°C in LB medium. Whole cell extracts or culture supernatants were appropriately concentrated and applied to 12.5% (w/v) polyacrylamide gels containing 0.5% xylan. Lanes 1-3, Coomassie blue stained gel; lanes 4-6, Congo red stained gel; lanes 2, 4, cell extracts of *E. coli* DH5 α (pXL180); lanes 3, 6, cell extracts of *E. coli* DH5 α (pUC19); lane 5, culture supernatant of *E. coli* DH5 α (pXL180); lane 1, molecular weight markers (200, 97.4, 68, 43, 29, 18.4 and 14.3 K daltons).

Cellulolytic xylanase 유전자의 유사성 비교

B. circulans cellulolytic xylanase 유전자(*bglBC2*)의 염기서열을 각종 data bank에 수록된 모든 DNA 염기서열들과 비교·분석해 본 결과 유사성을 가진 유전자들을 발견할 수 있었으며, 이들의 단백질 서열은 glycosyl hydrolase family 8에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 3). Hakamada 등은 *B. circulans* KSM-N257로부터 endo- β -1,4-glucanase 활성을 가진 유전자, *Egl-257* (GenBank accession number AB059267)을 클로닝 하였는데 이는 1,221 bp의 단일 ORF로 구성되어 있었다(8). 그리고 이 효소는 호알칼리성으로 cellulose와 lichenan에 대한 기질 특이성은 보였으나 xylan은 전혀 분해하지 못하였으며 최적 pH와 온도는 각각 pH 8.5와 55°C이었다. 반면에 본 연구의 효소는 xylan과 carboxymethyl cellulose(CMC), lichenan에 대하여 기질 특이성을 보여 클로닝된 유전자, *bglBC2* (GenBank accession number AY269256)의 효소를 cellulolytic xylanase로 명명한 바 있으며 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.2와 60°C이었다. 그럼에도 불구하고 본 효소는 Hakamada 등의 *B. circulans* KSM-N257 alkaline endo- β -1,4-glucanase와 97%의 높은 유사성이 있음이 밝혀졌다. 한편, Bueno 등은 *B. circulans* WL-12의 endo- β -1,3-1,4-glucanase 유전

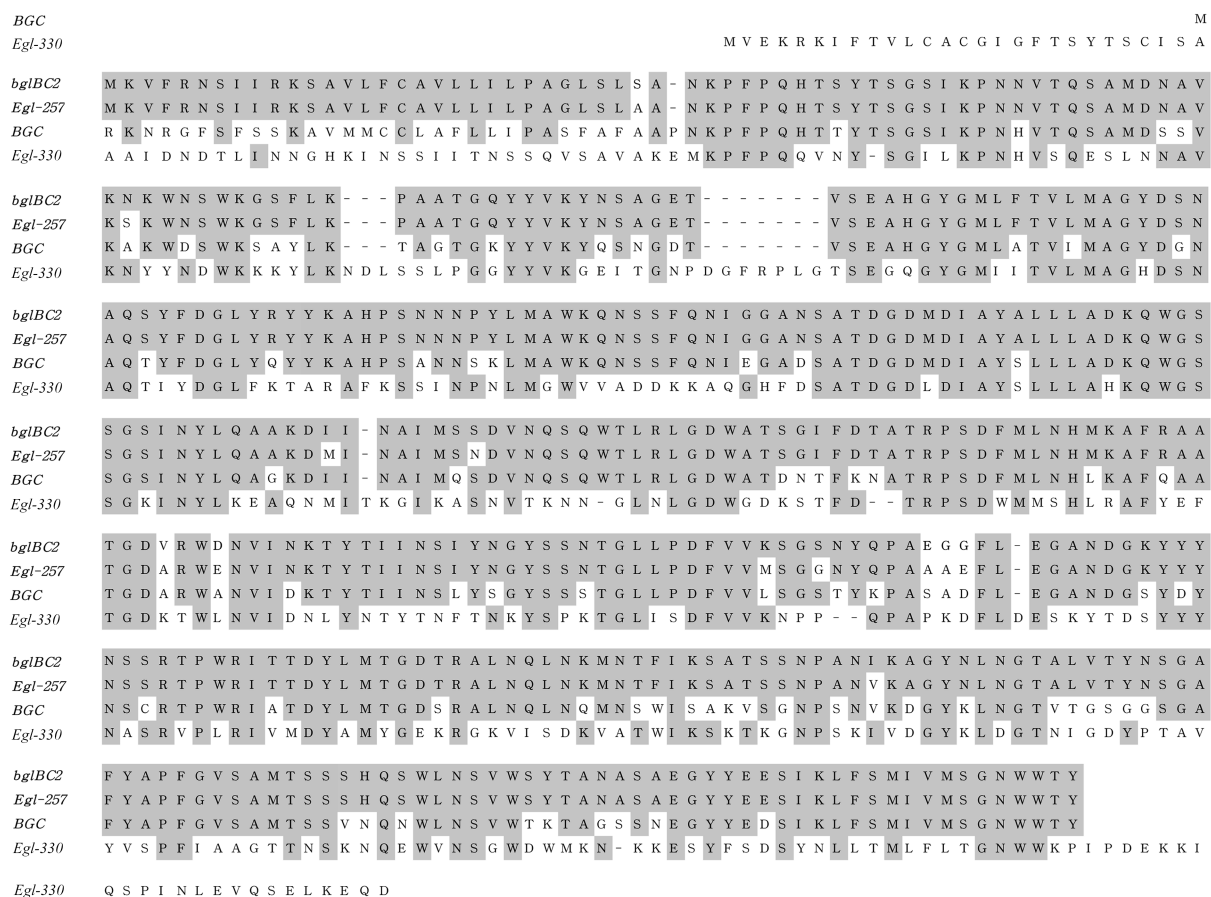


Fig. 3. Alignment of amino acid sequences belonging to several β -glucanases, using the BLASTX program. The introduction of gaps is indicated by dashes. Shadow boxes indicate identical amino acids residues. Abbreviations: *bglBC2*, cellulolytic xylanase gene from *B. circulans* ATCC21367; *Egl-257*, endo- β -1,4-glucanase gene from *B. circulans* KSM-N257; *BGC*, endo- β -1,3-1,4-glucanase gene from *B. circulans* WL-12; *Egl-330*, endo- β -1,4-glucanase (cellulase) gene from *Bacillus* sp. KSM-330.

자, BGC(GenBank accession number X52880)가 다른 *Bacillus* 종들과는 아미노산 서열에 있어서 뚜렷한 유사성이 없다고 보고 하였으나 본 cellulolytic xylanase와는 75%의 유사성을 나타내었다(5). 또한 *Bacillus* sp. KSM-330 endo- β -1,4-glucanase (Egl-330, GenBank accession number M68872)는 45%의 유사성을 나타내었다(16). Wakarchuk 등은 *B. circulans*가 생산하는 xylanase의 활성 부위에는 Glu⁷⁸과 Glu¹⁷²가 관여한다고 보고하였으며 *Clostridium thermocellum*, *Dictyoglomus thermophilum*, *Thermotoga neapolitana* 등에서도 glutamic acid 부위가 xylanase 활성 부위에 존재한다고 보고된 바 있다(12, 21, 22, 25). 그러나 Fig. 3에서 비교한 효소들은 지금까지 보고된 xylanase의 활성 부위와 일치하지 않음을 알 수 있었다.

따라서 본 연구의 cellulolytic xylanase는 glycosyl hydrolase family 8에 속하는 glucanase들과 높은 유사성을 나타내고 다른 xylanase에서 볼 수 있는 공통된 활성 부위가 존재하지 않으며, 이미 보고 된 바와 같이 lichenan에 대하여 높은 기질 특이성을 나타내는 점 등을 고려해 볼 때 xylanase 보다는 glucanase라고 보는 것이 더 적합하다고 사료된다(10).

참고문헌

- Ashita, D., J.K. Gupta, and S. Khanna. 2000. Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulase-poor thermostable, alkali-tolerant xylanase from *Bacillus circulans* AB16. *Process Biochem.* 35, 849-856.
- Bernier, R.Jr., H. Driguez, and M. Desrochers. 1983. Molecular cloning of a *Bacillus subtilis* xylanase gene in *Escherichia coli*. *Gene* 26, 59-65.
- Bhat, M.K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15, 583-620.
- Brice, R.E. and I.M. Morrison. 1982. The degradation of isolated hemicellulose and lignin-hemi-cellulose complex by cell-free, rumen hemicellulose. *Carbohydr. Res.* 101, 93-100.
- Bueno, A., C.R. Vazquez de Aldana, J. Correa, T.G. Villa, and F. del Rey. 1990. Synthesis and secretion of a *Bacillus circulans* WL-12 1,3-1,4- β -D-glucanase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 172, 2160-2167.
- Courtin, C.M., A. Roelants, and J.A. Delcour. 1999. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1870-1877.
- Gat, O., A. Lapidot, T.I. Alchana, C. Regueros, and Y. Shoham. 1994. Cloning and DNA sequence of the gene coding for *Bacillus stearothermophilus* T-6 xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1889-1896.
- 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.
- Hazlewood, G.P., M.P.M. Romaniec, K. Davidson, O. Grepinet, P. Beguin, J. Millet, O. Raynaud, and J.P. Aubert. 1988. A catalogue of *Clostridium thermocellum* endoglucanase, β -glucosidase and xylanase genes cloned in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 51, 231-236.
- Kim, J.Y., H.B. Kim, and D.S. Lee. 2000. Molecular cloning and expression of a cellulolytic xylanase gene from *Bacillus circulans* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Microbiol.* 36, 196-202.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 411-456.
- McCarthy, A.A., D.D. Morris, P.L. Bergquist, and E.N. Baker. 2000. Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 11, 1367-1375.
- McCracken, K.J., M.R. Bedford, and R.A. Stewart. 2001. Effect of variety, the 1B/1R translocation and xylanase supplementation on nutritive value of wheat for broilers. *Br. Poult. Sci.* 42, 638-642.
- McIntosh, L.P., G. Hand, P.E. Johnson, M.D. Joshi, M. Korner, L.A. Plesniak, L. Ziser, W.W. Wakarchuk, and S.G. Withers. 1996. The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: A 13C-NMR study of *Bacillus circulans* xylanase. *Biochemistry* 35, 9958-9966.
- Moran Jr, C.P., N. Lang, S.F.J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A.L. Sonenshein, J. Pero, and R. Losick. 1982. Nucleotide sequence that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186, 339-346.
- Ozaki, K., N. Sumitomo, and S. Ito. 1991. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding an endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus* sp. KSM-330. *J. Gen. Microbiol.* 137, 2299-2305.
- Siedenberg, D., S.R. Gerlach, K. Schugert, M.L.F. Giuseppin, and J. Hunik. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* 33, 429-433.
- Sunna, A., and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67.
- Tang, J.C.T., P. McGray, P. Chen, B. Ferguson, G. Carson, and W. S. Kelley. 1983. Properties of xylanase from *Clostridium thermocellum* using a trinitrophenyl-xylan assay, p. 287-301. In E.J. Soltes (ed.), Wood and agricultural residues. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- Tenkanen, H., J. Plus, and K. Poutanen. 1992. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 566-574.
- Velikodvorskaya, T.V., I.Y. Volkov, V.T. Vasilevko, V.V. Zverlov, and E.S. Piruzian. 1997. Purification and some properties of *Thermotoga neapolitana* thermostable xylanase B expressed in *E. coli* cells. *Biochemistry* 62, 66-70.
- Wakarchuk, W.W., R.L. Campbell, W.L. Sung, J. Davoodi, and M. Yaguchi. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of the *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* 3, 467-475.
- Wong, K.K.Y., and J.N. Saddler. 1992. Application of hemicelluloses in the food, feed, and pulp and paper industries, p. 127-143. In: Coughlen, P.P. and G.P. Hazlewood (eds.), Hemicellulose and hemicellulases. Portland press, London.
- Wong, K.K.Y., L.U.L. Tan, and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms; function and applications. *Microbiol. Rev.* 52, 305-317.
- Xie, H., H.J. Gilbert, S.J. Charnock, G.J. Davies, M.P. Williamson, P.J. Simpson, S. Raghothama, C.M. Fontes, F.M. Dias, L.M. Ferreira, and D.N. Bolam. 2001. *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry* 40, 9167-9176.
- Yang, R.C.A., C.R. MacKenzie, and S.A. Narang. 1988. Nucleotide sequence of a *Bacillus circulans* xylanase gene. *Nucleic Acids Res.* 16, 7187.

(Received December 19, 2005/Accepted February 18, 2006)

ABSTRACT : Nucleotide Sequence of Cellulolytic Xylanase Gene (*bglBC2*) from *Bacillus circulans*
Ji-Yeon Kim (College of General Education, Inje University, Gimhae 621-749, Korea)

The nucleotide sequence of the cloned cellulolytic xylanase gene (*bglBC2*) from *B. circulans* ATCC21367 was determined. *bglBC2* consists of an 1,224 bp open reading frame (ORF) coding for a polypeptide of 407 amino acids with a deduced molecular weight of 45 kDa. The Shine-Dalgarno (SD) sequence (5'-AAAGGAG-3') was found 9 bp upstream of the initiation codon, ATG. A promoter region corresponding closely to the *B. subtilis* consensus sequence (-35: TTGACA, -10: TATAAT) was detected, the putative -35 and -10 sequences of which were TTTACA and TATACT, respectively. The deduced amino acid sequence of the cellulolytic xylanase showed 97% homology with that of the alkaline endo- β -1,4-glucanase from *B. circulans* KSM-N257, 75% homology with that of the endo- β -1,3-1,4-glucanase from *B. circulans* WL-12, and 45% homology with that of the endo- β -1,4-glucanase (cellulase) from *Bacillus* sp. KSM-330. The *bglBC2* sequence was deposited in GenBank under the accession number AY269256.