

Bacillus circulans 기원의 Cellulolytic Xylanase 유전자의 대장균에서의 클로닝 및 발현

김지연¹ · 김한복² · 이동석*

인제대학교 의생명공학대학 임상병리학과, ¹인제대학교 생물건강산업육성지원센터,

²호서대학교 자연과학부 생명과학전공

Bacillus circulans ATCC21367의 cellulolytic xylanase 유전자를 pUC19을 vector로 하여 대장균 내에서 클로닝 하였다. 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. 1.3 kb 절편의 상류 영역에 있는 0.5 kb 절편은 클로닝된 유전자의 정상 발현뿐만 아니라 과잉발현에 대해서도 필수불가결함을 확인하였다. 형질전환체는 모균 *B. circulans*에 의해 생산된 것보다 135배 이상 많은 xylanase를 생산하였다. 클로닝된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.2와 60°C였다. 55°C에서 1시간 동안의 사전 열처리에도 이 효소는 활성의 감소를 일으키지 않았다. 이 효소는 xylan과 carboxymethyl cellulose (CMC), lichenan에 대하여 기질 특이성을 보였는데, 주요 산물로서 xylose(또는 G1)와 xylobiose(또는 G2), xylotriol(또는 G3)을 생산하였다. 그러므로 우리는 클로닝된 유전자의 효소를 cellulolytic xylanase로 명명하였다. 액체 배양된 *Escherichia coli* DH5 α (pXL180)의 전체 세포 추출물이나 배양 상등액으로부터 조제된 시료들의 SDS-PAGE와 zymogram을 통하여 이 효소의 분자량은 45 kDa이었으며, 대장균 내에서 주목할 만한 processing은 일어나지 않음을 알 수 있었다.

Key words □ *Bacillus circulans*, cellulolytic xylanase, cloning

자연계에서 고정된 탄소의 주요 저장소인 식물 세포벽은 cellulose와 hemicellulose의 두 주요 성분으로 구성되어 있다. 이들 두 다당류는 지구상에 풍부하게 존재하는 물질로서 에너지 위기와 식량난을 효과적으로 해결하기 위해 활용할 수 있는 중요한 biomass 자원이라고 하겠다(5,17,21). Hemicellulose는 D-xylan과 D-galactan, D-mannan 등이 혼합되어 있는 복합 다당류 (complex polymer)로서 자연계에서 두 번째로 풍부한 polysaccharide이며 그 중 xylan은 구성 비율이 60-80%로 가장 높다(1,16).

자연 상태의 xylan은 cellulose와는 달리 매우 복잡한 구조를 지니 β -1,4 polyxylose 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(4). 상이한 origin의 xylan은 분자량과 구성 성분, 측쇄의 수, acetylation의 정도에 따라 다양하다(3). 따라서 이와 같은 복잡한 구조의 natural xylan을 효율적으로 가수 분해하려면 상기 분자간의 cross-linking과 측쇄 결합을 효과적으로 절단하는 ferulic acid esterase 및 acetyl xylan esterase, α -arabinofuranosidase, glucuronidase 등의 효소와 β -1,4 주결합체 절단에 필수적인 분해 효소인 xylanase와 β -xylosidase 등과 같은

효소의 협동 작용(cooperative action)이 필요한 것으로 보고되고 있다(18).

한편, xylanase는 기질 특이성에 따라 다르게 정의할 수 있다. 몇 가지 효소는 단지 xylan만을 분해하는 반면에(13) 다른 효소들은 cellulase 활성도 나타내었다(9). 그러므로 xylanase의 효소적 정의는 xylan과 cellulose간의 교차 기질 특이성을 조사한 후 결정되어야 옳다(7,18). 또한, *Clostridium thermocellum*에서도 상이한 두 효소가 보고되었는데 그 중 하나는 단지 cellulase (CMCase) 활성을 보이는 반면에 다른 하나는 CMCase와 xylanase 활성을 모두 나타내었다(15). 우리는 섬유소 분해력이 있는 xylanase type을 cellulolytic xylanase로 부르기로 하고 이번 연구의 대상으로 삼고자 하였다.

본 연구에서는 *Bacillus circulans* ATCC21367이 생산하는 cellulolytic xylanase 유전자를 클로닝하여 *Escherichia coli* DH5 α 에 발현시킨 후 클로닝된 유전자 및 효소의 일반적인 생화학적 특성에 대한 결과를 분석 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

본 연구에 사용된 cellulolytic xylanase 유전자의 공여 균주는 *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

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-320-3262, Fax: 055-334-3426
E-mail: mbdsllee@ijnc.inje.ac.kr

cloning 및 subcloning vector로는 pUC19(2)과 pBR322(14)가 사용되었다.

배지 및 생장 조건

*B. circulans*는 본 연구에서 확립한 효소생산 최적배지인 LN 배지(0.3% beef extract와 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone 함유)를 사용하여 37°C에서 진탕 배양하였으며, *E. coli*는 LB(0.5% yeast extract와 1% tryptone, 1% NaCl 함유)나 LN 배지를 사용, 역시 37°C에서 진탕 배양하였다. 한천 평판배지의 경우에는 LN이나 LB 배지에 한천을 1.5%(w/v)로 첨가하였으며, 형질전환체들은 MacConkey 한천 배지에 ampicillin을 100 µg/ml로 첨가하여 선별하였다. 효소활성을 나타내는 형질전환체의 선별을 위해서는 기질인 xylan(oat spelt, 0.3%)이나 carboxymethyl cellulose(CMC, 0.3%), lichenan(0.3%)과 항생제인 ampicillin(100 µg/ml)이나 kanamycin(50 µg/ml)을 첨가하여 사용하였다.

DNA의 분리

Doi의 방법(12)을 적절히 개선하여 chromosomal DNA를 분리하였다. 플라스미드 DNA는 그 용도에 따라 rapid alkaline lysis 법(10)과 Wizard™ Minipreps DNA Purification System법을 이용하여 분리하였다.

재조합 플라스미드 제조 및 형질전환

분리 정제된 *B. circulans* ATCC21367의 chromosomal DNA를 *Pst*I 제한효소로 절단하여 크기 1~10 kb의 DNA를 얻은 후, CIP로 처리한 pUC19과 14°C에서 16시간 동안 ligation시켜 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 형질전환은 Hanahan이 확립한 과정(6)을 적절히 변형하여 실시하였다.

Cellulolytic xylanase 클론의 선별

Ampicillin 100 µg/ml이 첨가된 MacConkey 배지에서 생육하는 전체 형질전환체 중 육안으로 보아 흰색 colony를 형성하는 것들만을 선별하였다. 이들을 0.3%의 xylan이나 CMC, lichenan, laminarin이 첨가된 한천 평판배지에 toothpicking한 후 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 그리고 0.1% congo red를 처리, 약 30분 또는 경우에 따라 2시간 정도 반응시킨 후 1 M NaCl을 처리하여 각 기질 분해에 따른 투명환(halo) 형성 유무를 관찰하여 클론 여부를 가늠하였다(20).

효소액 조제

형질전환체를 10 ml LB(ampicillin 50 µg/ml 또는 kanamycin 10 µg/ml 함유) 배지에서 37°C로 16시간 동안 진탕 배양한 후 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 획득하고, 남은 침전 세포체의 적정 현탁액은 20 kHz에서 3분간 초음파로 파쇄처리한 다음 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 두 가지 효소액을 효소활성 측정과 xylan 가수분해 산물 확인 및 SDS-PAGE, zymogram을 위한 효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Xylan이나 CMC, lichenan(2%, w/v)이 첨가된 각각의 0.05 M 시트르산 완충용액(pH 5.2)을 고압 증기 멸균하고 12,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 효소 반응의 기질로 사용하였다. 기질용액 0.5 ml과 효소액 0.5 ml을 혼합하여 60°C에서 10분 동안 반응시켰다. Xylan이나 CMC 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 방법(11)에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량하였으며 60°C에서 1분간 1 µmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

분해 생성물의 분석

Xylan과 CMC 가수분해 산물은 thin layer chromatography (TLC)법을 이용, 분석하였다. 효소액 0.5 ml과 2% xylan 또는 CMC 용액(0.05 M 시트르산 완충용액, pH 5.2) 0.5 ml이 혼합된 용액을 45°C에서 12시간 또는 24시간 동안 반응시킨 후 Silica Gel 60 TLC plate(Merck 제)에 tip으로 10 µl씩, 또는 필요에 따라 30 µl씩 loading하였다. 이 때 isoamylalcohol : ethanol : ammonia : water(50 : 60 : 1 : 30, v/v) 혼합액을 용매로 하여 전개한 후 공기 중에서 건조시키고, 5% 4-methoxybenzaldehyde (C₈H₈O₂, Art822314, Merck제)와 5%의 H₂SO₄, 소량의 glacial acetate, 90%의 ethanol이 혼합된 용액을 분사한 후 120°C에서 10분간 발색시켰다.

SDS-PAGE 및 Zymogram(Activity staining)

효소 단백질의 분리 및 염색을 위해서 효소액 시료들은 Laemmli 방법(8)에 따라 실시하였다. 10 ml의 효소생산 최적배지에서 37°C로 24시간 동안 진탕 배양한 형질전환체를 14,000×g에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액과 세포 추출물 조제용 침전 세포체를 따로 얻어 효소액을 준비하였다. 1% xylan이 첨가된 12% SDS-polyacrylamide를 사용, gel을 크게 양분하여 시료들을 짝으로 loading한 후 200 V에서 60분간 전기영동한 다음 한 gel은 Coomassie blue 염색약으로 처리하였다. 다른 한 gel은 zymogram을 수행하기 위해 0.05 M 시트르산 완충용액(pH 5.2)으로 세척한 후 2.5% Triton X-100에 30분간 실온에서 방치시킨 다음 동일 완충용액에서 효소활성의 적정온도로 30분 또는 2-3시간 동안 효소-기질 반응을 진행시켰다. 이어서 0.1% Congo red 용액으로 15분간 염색하고 1 M NaCl로 충분히 세척한 후 효소활성대(halo)를 관찰한 뒤, 분자량 추정과 processing 여부 등을 확인하기 위하여 단백질 염색용 gel과 대조하여 비교 분석을 수행하였다.

결 과

B. circulans ATCC21367의 cellulolytic xylanase 활성조사 및 대장균에서의 클로닝

B. circulans ATCC21367의 xylan 및 CMC, lichenan에 대한 분해능을 살펴보았다. LN 배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 *B. circulans*는 각 기질에 대해 뚜렷한 분해 능력을 나타내었다.

Xylanase 등을 세포 외로 분비하는 *B. circulans* ATCC21367

균주로부터 분리 정제된 chromosomal DNA를 *Pst*I로 절단하여 분리 회수한 크기 1-10 kb의 DNA 절편들과 *Pst*I로 완전히 절단한 후 CIP를 처리한 pUC19 vector DNA를 ligation시킨 다음, *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 약 12,000개의 형질전환체를 얻었다. 이들을 0.3%(w/v) xylan 또는 CMC, lichenan을 함유한 LB 한천 평판배지에 접종, 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 Congo red로 염색하는 평판상에서의 클론 선별법을 이용하여 xylanase 클론을 선별한 결과 xylan 배지 외에 CMC나 lichenan 배지에서도 주위에 뚜렷한 투명환(halo)을 공통으로 형성하는 한 개의 클론을 분리할 수 있었다. 이 형질전환체로부터 플라스미드 DNA를 분리하여 다시 숙주 균주인 *E. coli* DH5 α 에 재형질전환시켜 본 결과 모두 xylanase(또는 CMCcase 또는 lichenase) 활성을 획득하였다. 이 재조합 플라스미드는 숙주 균주 내에서 안정하게 잘 유지됨을 항생제인 ampicillin 존재 하 또는 부재 하에서 수 차례 계대배양해 봄으로써 확인할 수 있었다 (결과 미 제시).

재조합 플라스미드의 제한효소 지도

Cellulolytic xylanase 활성을 나타내는 형질전환된 대장균 균주로부터 재조합 플라스미드 DNA를 분리하여 *Pst*I로 절단한 후 전기영동을 행한 결과 0.5 kb와 1.3 kb의 2가지 DNA band가 존재하고 있음을 확인함으로써 총 삽입길이 1.8 kb인 cellulolytic xylanase 유전자 함유 절편을 갖는 재조합 플라스미드를 획득하였고, 이를 pXL180으로 명명하였다.

각 절편의 삽입된 방향을 알아보고 각각의 기능을 유추해 보

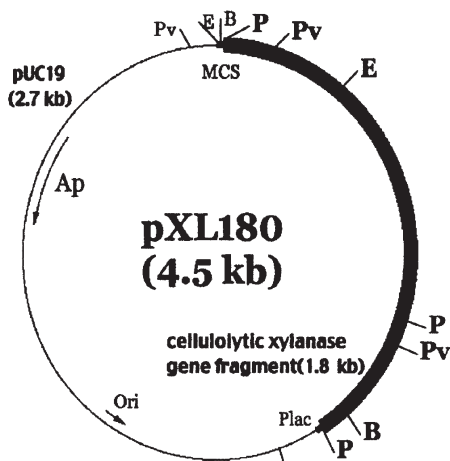


Fig. 1. Restriction map of recombinant plasmid pXL180. The thick bar represents *Pst*I fragments of *B. circulans* DNA inserted into the pUC19 vector indicated by the thin line. The recombinant plasmid carried the total 1.8 kb *Pst*I insert composed of 0.5 kb and 1.3 kb fragments which is responsible for the cellulolytic xylanase activity. Symbols: Ap, ampicillin resistance; B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; MCS, multiple cloning site; Ori, replication origin from pUC19; P, *Pst*I; Plac, lac promoter; Pv, *Pvu*II.

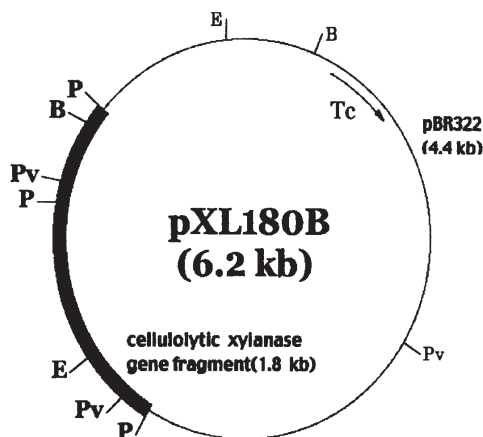


Fig. 2. Restriction map of recombinant plasmid pXL180B. The thick bar represents *Pst*I fragments of *B. circulans* DNA inserted into the pBR322 vector indicated by the thin line. The recombinant plasmid carried the total 1.8 kb *Pst*I insert composed of 0.5 kb and 1.3 kb fragments which is responsible for the cellulolytic xylanase activity. Symbols: B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; P, *Pst*I; Pv, *Pvu*II; Tc, tetracycline resistance.

Table 1. Activity and localization of xylanase, CMCcase and lichenase in *E. coli* transformants and *B. circulans*

Strains and fraction	Activity(mU/ml of culture broth)		
	Xylanase	CMCase	Lichenase
<i>E. coli</i> (pXL180)			
Culture supernatant	773	452	5346
Cell extract	6257	5178	48134
Total	7030	5630	53480
<i>E. coli</i> (pXL180B)			
Culture supernatant	596	553	3994
Cell extract	5374	4057	40386
Total	5970	4610	44380
<i>B. circulans</i>			
Culture supernatant	52	43	155
Cell extract	0	0	0
Total	52	43	155

E. coli and *B. circulans* strains were aerobically grown in LN medium for 16 hr at 37°C.

기 위하여 여러 효소로 절단하여 제한효소 지도 작성과 일련의 subcloning을 시도하였다.

Cellulolytic xylanase 활성을 나타내는 pXL180 재조합 플라스미드를 여러 가지 제한효소로 절단하여 제한효소 지도를 작성한 결과 Fig. 1과 같았다. 삽입된 DNA 절편에는 *Bam*HI과 *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II 자리는 존재하였으나 *Ava*I과 *Hind*III, *Xba*I, *Xho*I 자리는 존재하지 않았다.

Subcloning

pXL180의 cellulolytic xylanase 활성과 관련된 총 길이 1.8 kb의 *Pst*I 절편을 0.5 kb와 1.3 kb의 절편으로 분리하여 각각 하나씩 *Pst*I 효소로 절단한 pUC19에 subcloning하여 보았다. 그 결과 0.5 kb 또는 1.3 kb DNA 절편이 하나씩 삽입된 재조합 플라스미드는 cellulolytic xylanase 활성을 모두 보이지 않았다. 동일한 방식으로 pBR322에 subcloning하여도 같은 결과를 나타내었다. 그러나 pBR322와의 subcloning에서는 0.5 kb DNA 절편이 upstream 영역에 위치하고 그 뒤에 pUC19에 삽입되어 들어간 방향과 같은 정방향으로 1.3 kb DNA 절편이 위치할 때는 cellulolytic xylanase 활성을 보였다. pBR322 플라스미드에 삽입된 0.5 kb와 1.3 kb DNA 단편은 *Bam*HI 효소의 단일 절단과 *Bam*HI와 *Pvu*II 효소의 이중 절단에 의해 삽입조합과 방향이 pXL180과 동일함을 확인하고, 이 cellulolytic xylanase 활성을 나타내는 재조합 플라스미드를 pXL180B라고 명명하였다(Fig. 2).

모균이 생산한 효소와 재조합 형질전환체가 생산하는 효소의 특성 비교

세포 분획별 효소활성을 알아보기 위해 시료를 배양 상등액과 세포 추출물로 나눈 후 기질인 xylan과 CMC, lichenan에 대한 효소활성을 검토한 결과는 Table 1과 같다. 즉, *B. circulans*의 효소는 균체 내에 존재하지 않고 전부 균체 외로 분비되었으며, pXL180과 pXL180B를 함유한 *E. coli* DH5 α 의 xylanase (CMCase, lichenase)는 균체 세포 내에 88~92%가 함유되어 있었고 8~12%만이 세포 외로 배출되었다. 그리고 pXL180을 함유한 *E. coli*의 기질 특이성에 대한 전체 활성은 Table 2와 같았다. Xylan을 비롯하여 CMC, lichenan 등 각종 기질의 분해 정도를 측정하여 cellulolytic xylanase의 기질 특이성을 조사한 결과 CMC와 lichenan에 대해서도 매우 높은 활성을 나타내었다.

균체 배양 시간에 따른 생육과 효소활성의 변화

하룻밤 배양한 종 배양액을 10 ml의 LB 배지에 1%(v/v) 되도록 접종하여 배양 시간에 따른 효소의 활성을 비교 검토하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 *B. circulans*와 *E. coli* DH5 α 는 생육 정도가 거의 동일하여 접종 후 12~14시간에 정지기에 도달하였으며 cellulolytic xylanase 생산은 *B. circulans*의 경우 14~16시간에, *E. coli* DH5 α (pXL180)의 경우 12시간에 최대 활성에 도달하였다. 그리고 cellulolytic xylanase 효소는 생육 정도에 비례하여 생산됨을 알 수 있었다. 또 재조합 균주인 *E. coli* DH5 α (pXL180)는 공여 균주인 *B. circulans*에 비해 약 135배 정도 높은 cellulolytic xylanase 활성을 보였다.

효소활성에 미치는 pH의 영향

pXL180을 함유한 *E. coli* DH5 α 가 생산하는 cellulolytic xylanase의 일반적인 성질을 알아 보았다. Cellulolytic xylanase 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같았다. 재조합 균주는 pH 5.2에서 가장 활성이 높았고 pH 11에서 효소가 불활성화되었다.

Table 2. Substrate specificity of the cellulolytic xylanase produced in *E. coli*(pXL180)

Substrate	Activity(mU/ml of culture broth)
Xylan(oat spelt)	7030
CMC	5630
Lichenan	53480
Laminarin	0
Pustulan	0
Mannan	0
Starch	0
Pullulan	0

All reactions were carried out at 60°C in 0.05 M citrate buffer, pH 5.2. Activities were determined as described in Materials and Methods.

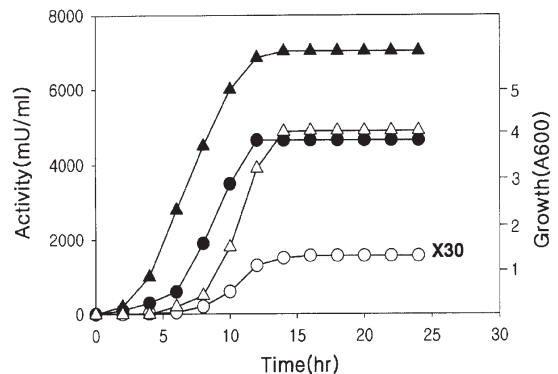


Fig. 3. Production of cellulolytic xylanase by *B. circulans* ATCC21367 and *E. coli* DH5 α (pXL180) transformant during growth. The two strains were grown aerobically in LN medium at 37°C. Culture supernatants and whole cell extracts were prepared periodically and cellulolytic xylanase activities of them were assayed. Symbols: ○ - ○, activity of *B. circulans*; ● - ●, growth of *E. coli*(pXL180); △ - △, growth of *B. circulans*; ▲ - ▲, activity of *E. coli*(pXL180); × 30, enzyme activity magnified thirty times.

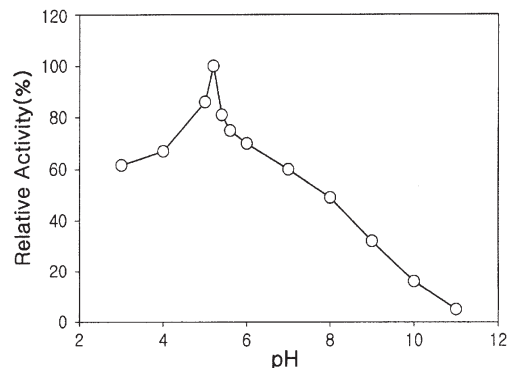


Fig. 4. Effect of pH on activity of the cellulolytic xylanase. The enzyme reaction was carried out at 60°C for 10 min in 0.05 M citrate(pH 3-6), 0.1 M phosphate(pH 7-8), and 0.1 M bicarbonate(pH 9-11) buffer.

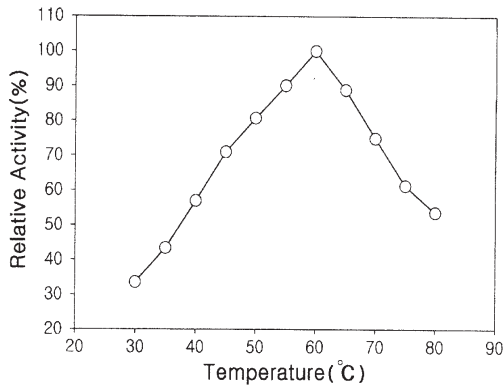


Fig. 5. Effect of temperature on activity of the cellulolytic xylanase. The enzyme reaction was carried out at various temperature for 10 min in 0.05 M citrate buffer(pH 5.2).

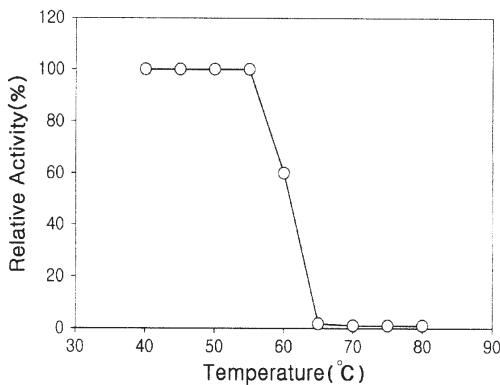


Fig. 6. Thermal stability of the cellulolytic xylanase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preincubating the enzyme solution at various temperatures for 1 hr.

효소활성과 안정성에 미치는 온도의 영향

각각 다른 온도에서 cellulolytic xylanase 활성을 측정하여 효소활성에 미치는 온도의 영향을 검토하였다. 재조합 균주의 cellulolytic xylanase 반응 최적 온도는 60°C에서 최고치의 활성을 보여 주었다(Fig. 5). 또한 cellulolytic xylanase의 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토하여 본 결과(Fig. 6, 7) 55°C까지 100%의 안정성을 보였으며 60°C에서는 그 활성이 약 60% 정도 감소되는 것으로 나타났다.

TLC를 통한 분해 산물의 확인

효소액 0.5 ml과 2% xylan 용액 또는 CMC 용액(0.05 M 시트르산 완충용액, pH 5.2) 각 1 ml의 혼합액을 45°C에서 12시간과 24시간 동안 반응시켜 TLC 상에서 그 생성물을 조사한 결과 *E. coli* DH5α에서 생산된 cellulolytic xylanase는 xylan에 작용하여 최종 가수분해 산물로서 xylose와 xylobiose, xylotriose를 생산하였다(Fig. 8). 그리고 효소 반응시간의 비교에서는 12시간보다 24시간 반응에서 더 선명한 최종 산물 생산의 spot들을 확인

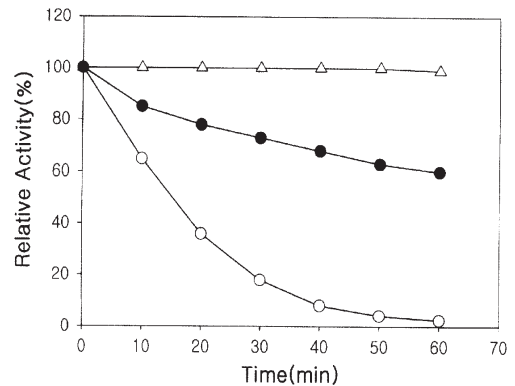


Fig. 7. Thermal stability of the cellulolytic xylanase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preheating the enzyme solution at the indicated temperatures for the different time periods. Symbols: ○ - ○, 65°C; ● - ●, 60°C; △ - △, 55°C.

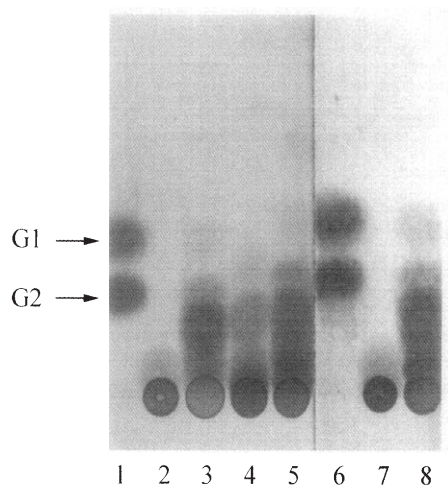


Fig. 8. Thin-layer chromatogram of the products released from the hydrolysis of xylan by the cellulolytic xylanase in *E. coli* DH5α(pXL180). 0.5 ml of whole cell extracts were mixed with 1 ml of 2% xylan(0.05 M citrate buffer, pH 5.2) and incubated for 0, 12 or 24 hr at 45°C, and each sample(lanes 3 and 4, 10 μl; lanes 5 and 8, 30 μl) was applied to the thin-layer chromatography plates. Lanes 1 and 6, standard xylose and cellobiose(G2); lanes 2 and 7, before start of xylanase reaction; lanes 4 and 5, xylanase reaction for 12 hr; lanes 3 and 8, xylanase reaction for 24 hr.

할 수 있었다. 또한 loading양을 3배 정도 높여 주면 Fig. 8의 lane 8에서 보는 바와 같이 더욱 선명하게 G1 등의 산물 생산을 확인할 수 있었다.

분자량 측정 및 Processing 여부 확인

SDS-PAGE 및 zymogram 방법으로 측정된 분자량은 Fig. 9에 표시되어 있는 바와 같이 약 45,000으로 산출되었다. *E. coli* DH5α(pXL180) 균주가 생산하는 단백질을 denaturing polyacrylamide gel을 이용하여 분리하고(Fig. 9B), 이 분리된 단백질의 활

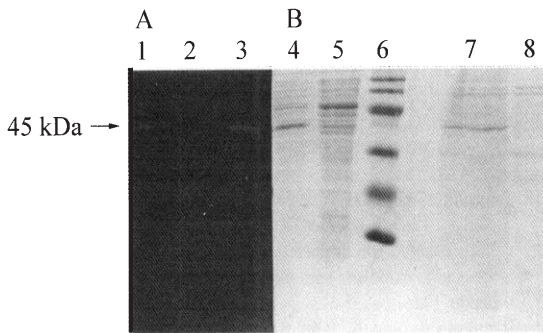


Fig. 9. SDS-PAGE analysis and zymogram of the cellulolytic xylanase produced by *E. coli*(pXL180). The *E. coli* cells were grown for 16 hr at 37°C in LN medium. Whole cell extracts or culture supernatants were appropriately concentrated and applied to 12%(w/v) polyacrylamide gel containing 1% xylan. Lanes 1-3, Congo red stained gel; lanes 4-8, Coomassie blue stained gel; lanes 1-5, cell extracts; lanes 7 and 8, culture supernatants; lanes 1, 3, 4 and 7, *E. coli*(pXL180); lanes 2, 5 and 8, *E. coli*(pUC19) as a control; lane 6, high molecular weight markers(220, 97.4, 66, 46, 30, 21.5 and 14.3 kDa).

성을 조사하여 본 결과 (Fig 9A), 대조 균주로 사용한 *E. coli* DH5 α (pUC19) 단백질에서는 cellulolytic xylanase의 활성대를 관찰할 수 없었으나 *E. coli* DH5 α (pXL180) 균주의 경우는 배양 상등액과 세포 추출물에서 동등한 위치에 오직 한 개의 활성대를 나타내었다. 이 결과로부터 분자량을 예측할 수 있었을 뿐 아니라 대장균의 periplasm 내에서 cellulolytic xylanase의 유의한 processing 현상이 일어나지 않음을 알 수 있었다.

고 찰

일반적으로 세균이 생산하는 xylanase는 endo-type으로 작용하여 xylan으로부터 xylose와 함께 주 생산물로 xylo-oligosaccharide를 생성하고, β -xylosidase는 xylo-oligosaccharide에 작용하여 xylose를 최종 산물로 생산한다(7,9,13,15,18,20). 자연계에 널리 분포되어 있는 xylan의(1,16) 효과적인 활용을 위해서는 xylan의 효율적인 효소적 분해법이 바람직한데, 이를 위해서는 우선 xylanase 관련 유전자들을 클로닝 및 발현시켜 기본적인 분자생물학적 연구를 수행함이 선행되어야 한다.

본 연구에서 채택한 *B. circulans*는 xylan 및 CMC, lichenan, laminarin, starch 등에 대한 가수분해 효소를 생산 분비하는 매우 유용한 균주로, 클로닝의 공여 균주로서 충분한 가치가 있다. 본 연구에서는 *B. circulans* 기원의 cellulolytic xylanase 유전자가 *E. coli* 내에 성공적으로 클로닝되고 잘 발현되었으므로 기본적인 분자생물학적 연구가 가능했다. 획득된 재조합 플라스미드 pXL180은 *B. circulans*로부터 유래된 0.5 kb와 1.3 kb *Pst*I 절편으로 이루어진 총 1.8 kb DNA 절편을 가지고 있었다. pXL180에 클로닝되어 있는 cellulolytic xylanase 유전자 DNA 절편의 제한효소 지도를 분석해 본 결과 Yang 등(19)이 *B. circulans* NRC9024에서 클로닝한 xylanase 유전자들을 함유하는 p549-R1

과 p549-P5의 제한효소 지도와는 상이함을 보여주었다. 또한 p549-R1과 p549-P5의 효소 단백질 분자량은 각각 22,000과 59,000인 반면에 pXL180의 단백질 분자량은 45,000으로서 역시 크게 달랐다. 그리고 Yang 등(19)이 클로닝한 효소들은 xylan만을 가수분해하는데 비해서 본 효소는 xylan 뿐만 아니라 CMC 및 lichenan을 가수분해하는 특성을 가지고 있었다. 이상을 종합해 볼 때 본 연구에서 얻어진 cellulolytic xylanase 유전자는 아직 보고된 바 없는 새로운 것으로 판단된다.

0.5 kb와 1.3 kb *Pst*I 절편이 pXL180에 삽입된 방향과 동일한 방향으로 삽입된 경우 pBR322 플라스미드(pXL180B)에서도 cellulolytic xylanase 활성이 잘 나타나는 것으로 보아 cellulolytic xylanase 유전자의 발현에 pUC19의 lac promoter가 직접 관여하지는 않는 것으로 사료된다. pXL180 균주가 pXL180B 균주에 비해 높은 활성을 보이는 것은 pUC19와 pBR322 두 vector 간의 copy수 등에 주로 기인 할 것으로 여겨진다.

형질전환체는 모균 *B. circulans*에 의해 생산된 것보다 xylanase는 135배, CMCase는 130배 그리고 lichenase는 345배 이상으로 높은 활성을 나타내었다. 이는 보통의 클로닝된 유전자가 30-40배 정도의 증폭된 활성을 나타내는 것을 감안한다면, 0.5 kb 절편에 고유의 강력한 promoter가 존재하는 것으로 사료된다.

한편, *E. coli* DH5 α (pXL180)가 세포의 생육 정도에 비례하여 cellulolytic xylanase 효소를 생산하는 것으로 보아(Fig. 3) 본 연구에서 클로닝된 유전자는 생육 시기별로 특별한 발현상의 조절을 받지 않는 constitutive한 발현 양식을 따르고 있음을 알 수 있다.

클로닝된 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 5.2와 60°C였다. 55°C에서 1시간 동안의 열 처리는 이 효소의 활성에 대해 저해를 일으키지 않았고, 60°C에서는 그 활성이 약 60% 정도 감소하는 것으로 볼 때 열안정성이 매우 강하다고 평가되므로 그 이용가치가 높다고 할 수 있다. 이 효소는 xylan(또는 CMC 또는 lichenan)을 가수분해하여 주요 산물로서 xylose(또는 G1)와 xylobiose(또는 G2), xylotriose(또는 G3)를 생성하는 것으로 보아 강력한 cellulolytic xylanase 활성을 가지는 것으로 추측된다 (Fig 8).

또한, *E. coli* DH5 α (pXL180)의 전체 세포 추출물과 배양 상등액으로부터 얻은 효소 시료를 가지고 SDS-PAGE와 zymogram을 수행하였을 때 효소의 활성대가 오직 한 곳에서만 나타나는 것으로 보아 *E. coli* 내에서 단백질의 주목할 만한 processing은 일어나지 않는 것으로 추측된다.

앞으로 본 연구에서 더 나아가 pXL180의 cellulolytic xylanase 유전자의 염기 서열 결정 및 분석, 효소 정제 및 특성 규명, *Bacillus* 속으로의 형질전환 및 효소 생산, 그리고 다른 여러 효소와의 공동작용에 의한 분해양상 규명 등을 수행해 본다면 분자생물학적, 생화학적 그리고 산업 응용적 측면에서 긴요한 정보를 얻을 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.
2. Bolivar, F. and K. Backman. 1979. Plasmid of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Meth. Enzymol.* 68, 245-280.

3. 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.
4. Chanda, S. K., E. L. Hirst, J. K. N. Jones, and E. G. V. Percival. 1950. The construction of xylan from Esparto Grass. *J. Chem. Soc.* 12, 1289-1297.
5. Chesson, A., C. S. Stewart, K. Delgamo, and T. D. King. 1986. Degradation of isolated grass mesophyll, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *J. Appl. Bacteriol.* 60, 329-336.
6. Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In D. M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford. p. 109-135.
7. 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.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
9. Lee, S. F., C. W. Forsberg, and J. B. Paitray. 1987. Purification and characterization of two endoxylanases from *Clostridium acetobutylicum* ATCC8824. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 644-650.
10. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1989. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
11. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
12. Rodríguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. Recombinant DNA Techniques, An Introduction. p. 162-163. Addison-Wesley Pub.
13. Sipat, A., K. A. Taylor, R. Y. C. Lo, C. W. Forsberg, and P. J. Krell. 1987. Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 477-481.
14. Sutcliffe, J. G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-81.
15. 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.
16. Weinstein, L. and A. Peter. 1979. Structure of cell walls. *Plant Physiol.* 63, 425-432.
17. Wilkie, K. C. B. 1979. The hemicellulose of grasses and cereals. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 36, 215-264.
18. 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.
19. Yang, R. C. A., C. R. MacKenzie, D. Bilous, and S. A. Narang. 1989. Identification of two distinct *Bacillus circulans* xylanases by molecular cloning of the genes and expression in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 568-572.
20. Zappe, H., D. T. Jones, and D. R. Woods. 1987. Cloning and expression of a xylanase gene from *Clostridium acetobutylicum* P262 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 57-63.
21. Zeikus, J. G. 1980. Chemical and fuel production by anaerobic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 423-464.

(Received August 21, 2000/Accepted September 8, 2000)

ABSTRACT : Molecular Cloning and Expression of a Cellulolytic Xylanase Gene from *Bacillus circulans* in *Escherichia coli*

Ji Yeon Kim,¹ Han Bok Kim², and Dong Seok Lee*(Department of Medical Laboratory Science and ¹Biohealth Industry Upbringing Center, Inje University, Kimhae 621-749, ²Department of Life Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

A gene for cellulolytic xylanase of *Bacillus circulans* ATCC21367 was cloned on pUC19 in *Escherichia coli*. The recombinant plasmid pXL180 contained an 1.8 kb insert composed of 0.5 kb and 1.3 kb *Pst*I fragments derived from *B. circulans*. The 0.5 kb fragment in the upstream region of 1.3 kb one was confirmed to be indispensable for not only expression but also hyperexpression of the cloned gene. The transformant over-produced the xylanase 135 times greater than that produced by the original *B. circulans*. The optimum pH and temperature of the cloned enzyme were pH 5.2 and 60°C, respectively. Heat pretreatment at 55°C for 1 hr did not cause inhibition of the activity of this enzyme. The enzyme could hydrolyze CMC and lichenan as well as xylan to produce xylose(or G1), xylobiose(or G2) and xylotriose(or G3) as main products. Hence We defined the cloned enzyme as a cellulolytic xylanase. The SDS-PAGE electrophoretic mobility and zymogram of this enzyme derived from whole cell extracts or culture supernatants of *E. coli*(pXL180) indicated a molecular weight of 45,000 and nonprocessing of the enzyme in the periplasm of *E. coli*.