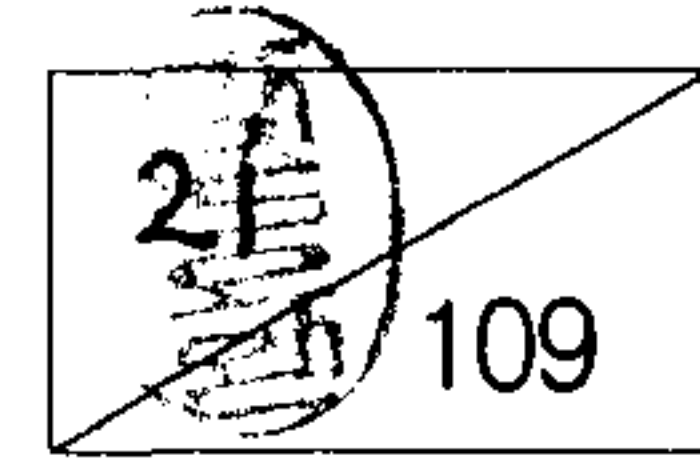


제 3 차년도
최종보고서



섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus*
균주의 분자육종과 공업적 응용

Molecular improvement of *Bacillus* strains
producing textile-treating enzymes,
and the industrial applications

연 구 기 관

한국과학기술연구원 부설
생명공학연구소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과
공업적 응용” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1998년 7월

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 박승환 (생명공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 반재구 (생명공학연구소 책임연구원)

신병식 (" 선임연구원)

최수근 (" 선임연구원)

정경화 (" 객원선임연구원)

김사열 (" 객원선임연구원)

공은미 (" 위촉연구원)

정희순 (" 위촉연구원)

임희경 (" 위촉연구원)

윤기홍 (우송대학교 식품생명공학과 교수)

정인범 ((주)상우화학 연구원)

위탁과제 1 : 박성수 (고려대학교 생명공학원 교수)

위탁과제 2 : 김 훈 (순천대학교 농화학과 교수)

여 백

요 약 문

I. 제 목

섬유가공용 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자육종과 공업적 응용

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근들어 섬유가공용 효소로서의 cellulase와 α -amylase의 유용성이 증대되고 있는데, α -amylase는 면사를 직조하기전에 직물 제조에 용이하도록 처리한 전분을 제거하기위한 호발제로서 사용되고 있다. 한편 청바지 염색에 사용된 indigo를 탈색시키기 위한 stone washing 공정과 면직물의 고품질화를 실현하기 위한 polishing 공정을 cellulase를 이용한 bio-stone washing 공정과 bio-polishing 공정으로 대체하는 기술이 개발되어 cellulase가 섬유가공을 위한 효소로 개발이 되었다.

이와같은 섬유가공 목적으로 효소를 이용하기 위해서는 섬유가공 공정단계에 적합한 중성 cellulase와 내열성 α -amylase를 필요로 하는데, 현재 효소 생산균으로서는 주로 *Aspergillus*와 *Trichoderma* 속을 비롯한 곰팡이가 이용이 되어지고 있다. 일반적으로 곰팡이 유래의 효소는 중온성 α -amylase와 산성 cellulase인데, 중온성 α -amylase로는 호발 효율이 낮으며 산성 cellulase로는 indigo의 균일한 탈색이 어려워 청바지에 얼룩이 지는 back-staining 문제점이 발생하기도 한다. 더군다나 곰팡이 유래의 cellulase에는 여러 성분의 cellulase가 존재하므로 최종 면직물의 강도를 저하시키기도 한다. 그런데 산업용 효소 생산균으로 널리 사용이 되어

지고 있는 *Bacillus* 속 균주가 섬유가공에 적합한 효소들을 생산한다는 것이 알려져 있다. 그러므로 섬유가공용 효소 생산을 위해서 유전자 재조합 기술에 의한 효소 고생산성 *Bacillus* 균주의 개발이 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 섬유가공 용도로서의 반응 특성이 우수한 섬유가공용 효소 유전자원을 확보하고 이들 효소를 산업화 수준으로 과잉생산하는 재조합 *Bacillus* 균주를 개발하고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 섬유가공용 효소 유전자원의 확보 및 분석
- 유전자 재조합 숙주균으로 이용하기 위한 *B. licheniformis* 균주의 유전자 조작법 확립
- 염색체 조작 기술에 의한 *Bacillus* 숙주균 개량
- 섬유가공용 효소 유전자의 고발현을 위한 plasmid 발현계와 염색체 발현계의 개발
- 섬유가공용 효소 고생산성 *Bacillus* 균주의 개발
- *Bacillus* sp. 79-23 cellulase의 섬유가공용 효소로서의 효용성 분석 및 *Bacillus* sp. 79-23 균주의 배지성분에 따른 효소 생산성 분석

IV. 연구개발 결과

1. 섬유가공용 효소 유전자원의 확보

- 전단계 연구에서 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보해놓은 내열성 α -amylase 생산균주 (*Bacillus* sp. 16-7 과 23-3)와 중성 cellulase 생

산균주 (*Bacillus* sp. 79-23)가 각각 *B. licheniformis*와 *B. subtilis* 균주로 밝혀짐.

- 내열성 α -amylase 유전자원으로 확보한 *Bacillus* sp. 16-7과 23-3으로부터 내열성 α -amylase 유전자를 크로닝하여 일차구조를 밝혀냄.
- 자연계에서 분리한 중성 cellulase 생산균주 (*Bacillus* sp. 79-23)로부터 cellulase 유전자를 크로닝하여 일차구조를 밝혀냄.
- 섬유가공용 효소 유전자원으로 사용할 미생물을 계속적으로 탐색하여 섬유소, xylan, starch, levan을 분해하는 균주 KD14와 KD1을 선발함.

2. 섬유가공용 효소 생산균으로 개발될 *B. licheniformis*

- *Bacillus* sp. 16-7로부터 분리한 6.7 kb 크기의 염색체 단편의 염기서열을 모두 분석하여 *B. licheniformis*의 clustered amylase gene structure를 밝혀냄.
- *B. licheniformis* 균주를 유전자 재조합 숙주균으로 이용하기 위해서 electroporation 방법을 이용한 형질전환 조건을 확립함.
- 외래유전자의 발현을 증진에 사용하기 위해 *B. licheniformis*로부터 transcription activator 유전자 (*sacQ*)를 크로닝함.
- 내열성 α -amylase 고생산성 균주로 개발된 *B. licheniformis* 변이주를 섬유가공용 효소 생산을 위한 재조합 숙주균으로 이용하기 위해서 변이주의 특성을 분석함.

3. 섬유가공용 cellulase 생산균으로 개발될 *Bacillus* sp. 79-23

- 재조합 *E. coli*와 모균으로부터 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase를 정제하여 반응특성을 비교 분석함.
- 배지성분에 따른 *Bacillus* sp. 79-23의 cellulase 생산성을 검토함.

- 산업용 배지를 이용한 *Bacillus* sp. 79-23의 소규모 배양연구를 통해서 경제성이 인정되는 수준의 생산성을 확보함.

4. Plasmid 상에서의 *Bacillus* sp. 79-23 cellulase 유전자의 과잉 발현

- *Bacillus* sp. 79-23 유래의 promoter와 S.D. sequence를 *B. subtilis* 유래의 강력한 promoter와 합성된 *B. subtilis*의 S.D. sequence로 대체된 새로운 재조합 plasmid pJCMC를 제조함.
- 이 pJCMC plasmid가 *B. subtilis* DB104 내로 도입된 형질전환체를 얻었음 이 *B. subtilis* 형질전환체를 LB 배지에서 flask 배양을 한 결과 약 9 unit/ml의 높은 효소 생산성을 보임.
- *B. subtilis* 형질전환체가 생산하는 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase는 섬유산업 실제 작업 현장에서의 효용성 조사를 통해서 섬유가공 용도로서의 그 성능이 아주 우수함을 확인함.

5. 염색체공학 기술을 이용한 섬유가공용 효소 생산균 개발

- 섬유가공용 효소 유전자를 *Bacillus* 숙주균의 염색체 DNA 상으로 도입하고 증폭시키기 위한 integration vector를 개발함.
- *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase 유전자가 *B. subtilis*의 염색체 내부에서 증폭이 된 새로운 재조합 *Bacillus* 균주 (BS7S-600)를 개발함. BS7S-600 균주를 항생제가 들어있지 않는 LB 배지에서 flask 배양을 한 결과, 야생주보다 약 30배의 높은 cellulase 생산성을 보였으며 plasmid에 의한 효소 생산보다 훨씬 안정된 생산성을 보임.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 섬유가공용 효소 고생산성 *Bacillus*속 균주의 개발에 따른 기술 및 자원을 본 연구에 참여하고 있는 기업체에 이전하여 산업화를 추진함.
- 가격 경쟁력이 있는 수준의 생산성이 확보되는대로 우선 국내 생산을 수행하여 섬유가공용 효소의 수입을 대체할 수 있도록함. 또한 계속적인 균주 개량과 발효기술 개발로 생산성을 향상시킴으로써 외국시장으로 진출케함.
- 개발균주에 의해서 생산되는 효소의 새로운 용도를 개발하여 섬유산업 뿐만 아니라 제지산업, 식품산업 등과 같이 다량의 효소를 사용하는 다른 산업분야에서 활용될 수 있도록 함.
- 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 속주균과 고분비발현계를 다른 종류의 재조합 단백질의 산업적 생산에 확대 적용하여 고부가가치 단백질의 국내 생산에 활용토록함.

여 백

SUMMARY

Cellulases have been studied mainly with respect to their potential industrial use for the exploitation of biomass resources. However, we have used cellulases to improve the texture as well as bleaching efficiency in the textile industry. A neutral action is essential for enzymes in the textile industry because an acidic pH may make blotches on the fabric. However, most known fungal and bacterial cellulases act at an acidic pH.

We had isolated a *Bacillus* strain as a producer of the neutral cellulase for potential use in the textile industry. This isolate, *Bacillus* sp. 79-23, was identified as a *B. subtilis* strain on the basis of its biochemical properties. The cellulases of *Bacillus* sp. 79-23 had a broad pH optimum and maximum activities at about pH 6.0 with more than 85% of the maximum activity at pH 7.0. And the cellulase was most active around 60°C.

The additional carbon sources such as wheat bran, rice straw, maltose and glucose markedly increased the cellulase productivity of *Bacillus* sp. 79-23. Especially, the cellulase activity in the culture supernatant of *Bacillus* sp. 79-23 reached a maximum level of 9.1 units/ml when the isolate was cultured in LB medium supplemented with 3% (w/v) wheat bran. That enzyme level was corresponded to 20-folds productivity of the isolate that cultured in LB medium only. The cellulase production was in association with the growth of *Bacillus* sp. 79-23 but wheat bran did not stimulate the growth of this

isolate. These facts imply that the cellulase biosynthesis in *Bacillus* sp. 79-23 was induced by wheat bran components.

A gene for encoding cellulase was cloned from *Bacillus* sp. 79-23 into *Escherichia coli* and the nucleotide sequence was determined. The cellulase gene, designated as *celS*, was composed of 1,497 base pairs and the nucleotide sequence of the *celS* gene was highly homologous to those of other *B. subtilis* cellulase genes. The enzyme encoded by *celS* was highly active on carboxymethylcellulose (CMC) but also exhibited activity towards avicel and *p*-nitrophenyl- β -D-cellobiopyranoside. The enzymatic hydrolysis of CMC caused a rapid decrease in viscosity of the reaction mixture. These facts suggested that the cellulase encoded by *celS* was a typical endo-type enzyme.

To overproduce the *Bacillus* sp. 79-23 cellulase for industrial use, two strategies can be considered for increasing the gene copy number in *Bacillus*; (i) transformation with a replicative plasmid harboring cloned genes and (ii) integration and/or amplification of cloned genes in the *Bacillus* chromosome.

Its native promoter and Shine-Dalgarno sequence were replaced with a strong *B. subtilis* promoter and a synthetic Shine-Dalgarno sequence matched perfectly with the 3' end of *B. subtilis* 16S rRNA. Then we constructed a recombinant plasmid, pJCMC, containing the modified *celS* gene. When the *B. subtilis* DB104 transformant harboring pJCMC was grown in LB medium, the extracellular cellulase was produced up to 8.5 units/ml in *B. subtilis*.

However, genetic stability of recombinant strains is one of the first properties required for their being used in industrial processes. In *B. subtilis*, it is well known that replicative plasmids harboring cloned genes can be prone to either segregational or structural instability. Furthermore, antibiotics can not be used in large-scale production for both economical and safety reasons although drug resistance is usually applied to construct and maintain recombinant strains in laboratories. A promising way to avoid these problems may be to use integrative vectors for introducing cloned genes into the *Bacillus* chromosome.

The modified *celS* gene was integrated into the chromosome of *Bacillus subtilis* 168 by homologous recombination. The integrated cellulase gene was spontaneously amplified by growing *B. subtilis* transformants with increasing concentrations of kanamycin. An amplified strain showed 27 times higher cellulase activity as compared to the parent strain, and cellulase production by the amplified strain was more stable than that of the plasmid-containing strain in antibiotic-free LB medium.

여 백

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	15
Chapter 2	State of the Art Report	18
Chapter 3	Methods and Results	24
	Materials and Methods	24
	Results and Discussion	32
Chapter 4	Goal achievement	82
Chapter 5	Further applications	84
Chapter 6	References	87
Chapter 7	Study on the gene expression and secretion system of <i>Bacillus</i> sp. and its application	91
Chapter 8	Study on the stability of textile treating enzymes	107

목 차

제 1 장	서 론	15
제 2 장	국내외 기술개발현황	18
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	24
제 1 절	연구수행 방법	24
제 2 절	연구수행결과	32
제 4 장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도	82
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	84
제 6 장	참 고 문 헌	87
위 탁 과 제 1	91
위 탁 과 제 2	107

제 1 장 서 론

효소의 산업적 응용은 유전공학과 단백질공학 등 기초학문의 눈부신 발전과 생물공정 분야의 많은 기술들이 개발됨으로써 여러 분야에서 적용이 되고 있는데, 섬유산업에서도 최근 cellulase와 α -amylase의 사용이 급격하게 증가하고 있다.

면사를 직조하기 전에 직물 제조에 용이하도록 전분을 처리하게 되는데, 이러한 전분은 직물을 염색하기 전에 완전히 제거되어야 한다. α -Amylase는 이러한 직물의 전분을 제거하는데 호발제로서 사용되고 있다. 섬유가공에 사용되는 α -amylase는 대부분이 *Bacillus* 유래의 효소인데, *B. licheniformis*와 *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefacience* 유래의 내열성 α -amylase가 호발제로써 개발되었다.

한편 청바지 염색에 사용된 indigo를 탈색시키기 위한 stone washing 공정과 면직물의 고품질화를 실현하기 위한 polishing 공정을 cellulase를 이용한 bio-stone washing 공정과 bio-polishing 공정으로 대체하는 기술이 개발되어 cellulase가 섬유가공을 위한 효소로 개발이 되었다. 종래의 경석을 이용한 청바지 탈색작업 공정은 기계적 손상이 클 뿐만 아니라 많은 노동력을 필요로 한다. 그러나 cellulase를 이용한 bio-stone washing 공정은 비용이 저렴할 뿐만 아니라 indigo의 균일한 탈색을 통해서 자연스러운 색상의 실현이 가능해진다. 그리고 bio-stone washing 공정은 직물 내의 잔존 경석을 제거할 필요가 없게 해주고 탈색작업 시간의 감소로 인하여 기계의 처리능력을 20-30% 증가시킬 수 있게 해준다. 그리고 직물에 있는 보푸라기를 제거하는 bio-polishing 공정을 통해서 면직류의 윤택도와 촉감 등을 향상시켜 면직물의 고품질화를 이룰 수도 있다.

이와같은 섬유가공 목적의 cellulase를 생산하기 위해서 현재 효소 생산균으로서 *Trichoderma*속을 비롯한 곰팡이가 주로 이용되어 지고 있다. 일반적으로 곰팡이 유래의 효소는 산성 cellulase이고 여러 성분의 cellulase가 같이 존재하는데 (16), 이러한 곰팡이 유래의 산성 cellulase로는 indigo의 균일한 탈색이 어려워 청바지에 얼룩이 지는 back-staining 문제점이 발생할 뿐만 아니라 최종면직물의 강도를 저하시키기도 한다. 그런데 *Bacillus*를 비롯한 수종의 세균에 의해서 세포외로 분비되는 중성 cellulase는 곰팡이 유래의 cellulase와는 달리 back-staining과 면직물 강도 저하의 문제를 야기하지 않기 때문에 면직류 가공 공정에 더욱 적합하다. 그러므로 섬유가공용으로 세균 유래의 중성 cellulase가 더욱 선호되고 있으며 그 가격도 곰팡이 효소보다 2~3배 가량 높은 편이다. 그러나 국내의 경우에 곰팡이의 고지배양으로 산성 cellulase를 생산하여 국내 수요량의 약 5% 미만 정도를 충당하고 있고 세균성 cellulase의 생산은 전무한 상태이다. 국내에서도 중성 cellulase의 수요가 계속적으로 증대되고 있음에도 불구하고 덴마크의 Novo Nordisk사에 의해 국내시장이 독점되고 있는 실정이다. 그러므로 섬유가공 공정단계에 더욱 적합한 세균 유래의 중성 cellulase를 대량 생산할 수 있는 효소 생산균의 개발이 절실하게 요구되고 있다.

그런데 *Bacillus*속 균주는 곰팡이와 더불어 여러 종류의 산업용 효소 생산균으로 널리 사용이 되어지고 있는데다가 섬유가공에 적합한 중성 cellulase와 내열성 α -amylase를 생산한다는 관점에서 생각해 볼 때, 섬유가공용 효소 생산을 위한 균주 개발에는 *Bacillus*속 균주들이 적합할 것으로 사료된다.

생물공학 산업에 있어서 *Bacillus* 균주가 유전자 재조합 숙주균으로서 지니고 있는 가장 큰 장점은 재조합 단백질을 효과적으로 세포외로 분

비하는 능력이라고 할 수 있는데, *Bacillus*는 산업용 효소 뿐만 아니라 비타민, 항생제, 살충제 등을 비롯한 생리활성 물질과 재조합 단백질의 생산균으로 개발되어지고 있다. 이와 같이 *Bacillus* 균주를 산업용 효소 생산균으로 개발하기 위해서 여러 방법을 이용한 *Bacillus* 균주의 분자유종이 이루어져 왔는데, 주로 유용 단백질의 안정적 생산을 위한 재조합 *Bacillus* 숙주균의 개발과 외래 유전자를 고효율로 분비발현시키기 위한 vector의 개발에 그 연구의 초점이 모아져 왔다. 그 이유는 *Bacillus* 균주를 이용하여 산업용 효소를 생산하기 위해서는 대규모 배양에서도 안정적으로 효소를 대량 생산할 수 있는 균주의 개발이 가장 핵심이 되는 기술이기 때문이다. 국내에서도 *Bacillus*를 이용하여 유용효소를 고수율로 발현 생산하고자 하는 시도가 여러 연구진들에 의해 이루어져왔으나 산업화 수준의 생산성에는 전혀 미치지 못하고 있다. 그런데 선진 외국에서는 유용효소의 산업화를 위한 다양한 종류의 *Bacillus* 숙주-vector계를 개발하고 특허화하여 많은 기술들을 독점 보호하고 있는 실정이다. 특히 효소생산 균주 개발에 관계된 기초 연구결과는 공개되어 있으나 균주 개발에 핵심이 되는 기술들은 Know-How로 보호되고 있으므로, 섬유가공용 효소생산 균주를 개발하기 위해서는 자체기술 개발이 필요하다고 하겠다. 더군다나 효소생산 공업은 자원이 부족한 국가에 있어서 자원활용이 매우 높은 산업임에도 불구하고 앞에서 언급한 바와 같이 섬유가공용 효소의 대부분을 수입에 의존하고 있는 국내현실에 비추어 볼때 중성 cellulase와 내열성 α -amylase 생산 균주의 개발이 절실하게 요구된다고 하겠다.

본 연구에서는 섬유가공 용도로서의 반응 특성이 우수한 섬유가공용 효소 유전자원을 확보하고 이들 효소를 산업화 수준으로 과잉생산하는 재조합 *Bacillus* 균주를 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

섬유소 자원의 무한한 이용 가능성 때문에 많은 연구진들에 의해서 *Trichoderma*속을 비롯한 곰팡이와 *Bacillus*속, *Clostridium*속을 비롯한 세균이 생산하는 cellulase에 대한 연구가 많이 이루어져서 cellulase는 자연계에 존재하는 효소들 중에서 가장 잘 알려진 효소 중의 하나이다 (1, 5). 현재까지 150가지 이상의 cellulase 유전자의 일차구조가 밝혀져 있고, 유전자 산물의 일차구조의 상동성 정도에 따라서 이들 효소들을 12개의 군(Family A~L)으로 분류하였다 (6, 16). 이와같은 분류는 각 cellulase들의 효소적 성질을 이해하는데 뿐만 아니라, cellulase 유전자 또는 cellulolytic organism의 진화적 관계를 규명하는데에도 중요한 근거가 되고 있다. 최근에는 여러 cellulase를 대상으로 domain 연구가 활발히 진행되고 있는데 (6), 특히 효소 활성화에 비필수적인 non-catalytic domain에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다 (11, 16). Cellulose binding domain (CBD)은 효소 활성화에 필수적인 것은 아니나 불용성 섬유소와 chitin에 대한 강한 결합력 때문에 오랫동안 주목을 받아왔고, 1998년에 미국에서 다른 단백질들을 CBD에 접합시킨 fusion protein을 이용하여 drug delivery, diagnostic kits, affinity separation등의 여러 응용분야에 대한 특허가 등록되었다. 또한 CBD 이외의 non-catalytic domain들 중에서 아직 그 기능이 명확하게 밝혀지지 않은 cell-associated S-layer-like domain (2)과 전혀 기능을 모르는 domain에 대한 기능분석 연구가 활발히 이루어지고 있을 뿐만 아니라, *Clostridium*속이 생산하는 cellulase 복합체인 cellulosome의 구성성분에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다 (1).

Cellulase는 위와 같은 기초 학문적 측면에서 뿐만 아니라 응용 측면에서도 많은 연구가 수행되었고 일부는 산업화 되었다. 오랫동안

cellulase의 연구는 섬유소의 당화에 초점이 맞춰져 왔는데, 특히 섬유소 자원의 당화를 통하여 농업 폐기물의 범람으로 인한 문제를 해결하고 운송 연료로서의 gasoline을 ethanol로 대체하려는 시도가 이루어져 오고 있다 (18). 또한 cellulase는 deinking 공정에 의해서 폐지를 재활용하는 데에도 이용이 되고 있고, 저칼로리 식품의 제조와 음식물 쓰레기의 발효, industrial slime의 제거, 사료 첨가제, 세제 첨가제 등의 다양한 용도에 적용이 되고 있으나 아직은 그 시장성이 미약한 편이다. 그런데 세제용 cellulase의 시장은 앞으로 많이 커질 것으로 예상되는 바, 세제용 alkaline cellulase에 대한 연구가 많이 이루어지고 있으며 그 결과들이 특허화 되고 있다.

한편 cellulase는 면직류 가공과 염색제의 균일한 탈색 등의 용도로 섬유산업에서도 유용성이 있으므로 섬유가공을 위한 효소로도 개발이 되었다. 이러한 섬유가공용 효소로서의 cellulase는 전체 cellulase 시장의 많은 부분을 차지하고 있는 실정으로서, 최근들어 급격한 시장 증가를 보였고 앞으로도 지속적인 성장을 할 것으로 예측하고 있다. 그런데 지금까지 섬유가공용 cellulase 생산균으로서 *Trichoderma*를 비롯한 곰팡이가 주로 이용되고 있는데, 곰팡이 유래의 cellulase를 섬유에 처리하게 되면 염료의 back-staining과 면직물 강도 저하의 단점이 생길 수 있기 때문에 이러한 문제점들을 해결하기 위한 효소 조성과 섬유처리 방법에 관한 연구가 많이 이루어져 특허화 되고 있다.

섬유가공에 사용되는 α -amylase는 대부분이 *Bacillus* 유래의 효소로써, 현재까지 *B. subtilis*의 중온성 α -amylase와 *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* 등에서 내열성 α -amylase가 정제되고 그 특성이 밝혀졌다. 이들 균주로 부터 분리된 α -amylase 유전자는 그 염기서열이 결정되어 *B. subtilis*와 *B. brevis*, *B.*

amyloliquefacience 등을 숙주균으로 하여 고분비 발현시킴으로써 고생산성 균주를 개발에 이용하기 위한 연구가 수행되었다. 또한 내열성 α -amylase는 고온에서도 안정한 상태로 반응을 진행시키며 2가의 Ca^{++} 이온을 첨가하였을때 열 안정성이 증가되는 것으로 알려져 있는데, 이와같은 내열성 α -amylase의 열안정성에 관여하는 요인에 대한 연구도 많이 이루어지고 있다. *Bacillus*를 고생산성 균주로 개량하여 산업화에 성공한 예로는 덴마크의 Novo Nordisk의 내열성 α -amylase와 일본의 Daiwa 내열성 α -amylase 등이 있다.

국내에서도 cellulase와 α -amylase에 관한 연구들이 많이 진행되어져 왔는데, 그 연구의 주된 내용이 여러가지 미생물로 부터 cloning된 유전자의 일차구조를 밝혀내고 유전자 산물의 물리·화학적 성질을 밝혀내는 일에 치중하였다. 또한 이들 효소를 고수율로 발현 생산하고자 하는 시도도 여러 연구진들에 의해 이루어져 왔으나 산업화 수준의 생산성에는 전혀 미치지 못하고 있다. 특히 섬유가공용 중성 cellulase에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

균체외로 효소를 분비 생산하는 *Bacillus*는 세균성 섬유가공용 효소의 생산균으로 개발될 여지가 충분한데, 실제 유전자 재조합 기술을 통해 *Bacillus*를 산업용 균주로 개발하고자 하는 시도는 효소 생산 차원에서 우선적으로 이루어졌다. 유전자 재조합 숙주균으로 주로 사용되고 있는 *B. subtilis*와 더불어 최근들어서는 그 숙주범위가 확대되고 있으며, 특히 *B. brevis*를 숙주균으로 이용하려는 시도가 활발히 이루어지고 있다. 또한 *B. amyloliquefaciens*와 *B. licheniformis*는 산업용효소 생산균주로 오랫동안 발효산업에 이용되어지면서 축적되어진 경험을 토대로 하여 이들 균을 유전자 재조합 숙주균으로 개발하고자 하는 연구가 시도되고

있다. 또한 고온에서의 미생물 발효의 장점을 실현하기 위해서 고온성 *Bacillus* 속주균을 개발하고자 하는 연구가 *B. stearothermophilus*를 중심으로 이루어지고 있다.

한편, *Bacillus* 속주균의 생리를 변화시켜 효소 생산성을 높이고자 하는 연구가 이루어지고 있는데, NTG와 같은 mutagen 처리를 이용하는 고전적 육종방법과 효소 생산성과 관련된 주요 유전인자를 발굴·분석하고 이를 직접 조작하는 분자유종 방법으로 체계적인 균주개발이 이루어지고 있다. 특히 *Bacillus* sporulation에 대한 연구결과가 산업균주 개발에 적용이 되고 있는데, 그 이유는 *Bacillus*에서 생산되는 여러가지 세포외 분비효소의 경우에 그 유전자의 발현이 직접 또는 간접적으로 sporulation 과정과 밀접하게 연계되어 일어나기 때문이다 (4, 14). Sporulation에 관여하는 조절단백질의 발현을 조절함으로써 목적하는 유용산물의 생산을 직접 향상시키거나, *Bacillus*균의 생리를 변화시켜 간접적으로 생산성을 증가시킬 수 있다. 이와같은 *trans*-acting regulator를 이용한 고발현 *Bacillus* 속주와 발현계가 특허화 되는 추세이다. 특히 최근에 4,200 kb에 이르는 *B. subtilis* 유전체의 전체 염기서열이 밝혀짐에 따라서 (10), 지금까지 그 기능이 밝혀지지 않았던 신규 유전자들 중에서 효소 생산성에 관련된 *trans*-acting 조절 유전자원을 밝혀내고 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주 개발 연구에 적용하려는 시도가 이루어지고 있다.

산업용 *Bacillus* 생산균주를 개발하기 위해서 위와같은 유용 단백질의 안정적 생산을 위한 재조합 *Bacillus* 속주균의 개발 연구와 더불어서 외래 유전자의 산물을 고효율로 생산, 분비시키기 위한 vector의 개발도 많이 이루어져 왔다. 주로 *Bacillus* 유래의 α -amylase, protease, levansucrase의 promoter 및 signal sequence를 이용한 expression vector의 개발이 많이 이루어져 왔고 그 중 일부는 특허화되어 있다. 또한

Bacillus 염색체 DNA로 부터 강력한 promoter 기능을 갖는 DNA 단편들을 cloning하여 expression vector에 적용하기도 하였다. 그러나 대장균과는 달리 *Bacillus*를 숙주균으로 하였을때는 재조합 plasmid의 일부가 생체 내에서 제거되거나 재배열되는 structural instability와 함께 재조합 plasmid가 세포분열시 상실되는 segregational instability가 높은 빈도로 일어나는 취약점이 있다 (3). 이러한 plasmid의 불안정성은 *Bacillus* vector로 개발된 대부분의 plasmid가 rolling-circle mechanism 방식에 의해서 복제가 된다는데에 기인한다. 또한 특정 유전자의 과잉발현을 유도하였을 때에도 이러한 plasmid의 불안정성은 자주 발생한다.

재조합 *Bacillus*를 산업적으로 이용하기 위해서는 이러한 문제점들은 해결되어야 하므로 이를 위해 *Bacillus* 숙주균 내에서 재조합 plasmid의 안정성을 유지시키려는 시도들이 이루어져 왔다. 일례로 *Bacillus*속 균주로 부터 θ -mode의 복제 방식을 갖는 cryptic plasmid를 분리하여 100세대 이상 항생제 없이도 안정하게 유지되는 *Bacillus* vector를 개발하기도 하였고, 영양요구성 *Bacillus* 돌연변이체에 숙주가 필요로 하는 영양요구 유전자를 재조합 plasmid에 도입하는 nutritional selection 방법으로 85세대 이상 100%의 plasmid 안정성을 실현하기도 하였다. 또한 특정 유전자의 과잉발현에 의한 plasmid의 불안정성을 해결하기 위해서 재조합 plasmid 내에 *lac* operator, levansucrase 유전자 유래의 sucrose-regulatable expression element, temperature-sensitive element 등을 도입한 induction system을 통하여 외래 유전자의 발현단계를 조절하여 *Bacillus* 숙주균 내에서 재조합 plasmid의 안정성을 유지시키려는 시도들도 이루어져 왔다. 그러나 일반적으로 염색체 상으로 도입된 외래 유전자는 plasmid 상에 있을 때보다 안정성이 훨씬 증가되므로 근본적으로 이러한 plasmid instability를 해결하기 위해서는 외래 유전자를

plasmid DNA 보다는 염색체 DNA 상으로 도입하는 것이 바람직할 것이다. 이를 위해서 상동성 재조합에 의해 외래 유전자를 *Bacillus* 염색체 DNA 내부로 도입한 후에 배지내의 항생제 농도를 증가시키면서 *Bacillus* 균주를 배양하여 염색체 상에 도입된 외래 유전자의 증폭을 유도하는 연구가 이루어져 왔다 (8, 15).

국내에서 *Bacillus*속 균주 개량과 유전자 발현계 개발은 주로 *B. subtilis*를 대상으로 이루어져 왔으며, *B. sphaericus*, *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens* 등을 숙주로 사용한 유용물질 생산의 시도도 있었다. 또한 *Bacillus*에서 외래유전자를 과잉발현시키기 위해서 강력한 promoter의 탐색과 이를 이용한 vector의 개발이 이루어져 왔으나, 아직 산업화에 연결시킨 예는 거의 없는 상태이다. 특히 *Bacillus*를 숙주로 사용하여 외래 유전자를 발현시킬때 대부분 plasmid system을 사용하고 있는데, 재조합 *Bacillus* 균주의 발효에서 빈번하게 발생하는 plasmid instability의 문제점을 극복하기 위한 시도는 많이 이루어지지 않았다. 그렇기 때문에 유전자 재조합 기술에 의해 개발된 고생산성 *Bacillus*의 발효기술도 재조합 균주의 불안정성 때문에 실험실 단계의 수준에 머물고 있는 실정이다. 또한 여러 세포외 분비효소 유전자의 발현과 밀접한 관계가 있는 *Bacillus* 균의 sporulation 과정을 제어하여 생리를 변화시킴으로써 효소 고생산 *Bacillus* 숙주균을 개발하려는 노력은 많지 않았다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. 재 료

가. 사용균주와 플라스미드

우수한 섬유가공용 효소의 유전자원을 확보하고자 전 단계 연구에서 자연계 미생물로부터 분리한 내열성 α -amylase 생산균주 (*Bacillus* sp. 16-7, *Bacillus* sp. 23-3)와 중성·내열성 cellulase 생산균주 (*Bacillus* sp. 79-23)를 섬유가공용 효소 생산균 및 유전자원으로 사용하였다. 야생주인 *B. licheniformis* ATCC 27811과 변이주인 *B. licheniformis* SK-5와 SK-2는 내열성 α -amylase 생산균으로 사용하였다. 그리고 *B. subtilis* 168 균주와 *B. subtilis* DB104 균주를 중성 cellulase 생산을 위한 유전자 재조합 숙주균으로 사용하였다. 또한 유전자 분리를 위한 숙주균으로는 *E. coli* DH5 α 가 사용되었다.

E. coli 내에서의 유전자 조작을 위해서는 pUC19 vector가 주로 사용되었으며, *Bacillus* 내에서의 유전자 조작을 위해서는 pUB110과 pBC16 등의 vector를 사용하였다. *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase 유전자를 *B. subtilis*에서 과잉발현시키기 위해서 plasmid 상에서의 과잉발현을 위한 vector로는 pJH4와 pJCMC를 사용하였고, 염색체 상에서 과잉발현을 위한 vector로는 pSI7과 pSI7-S plasmid를 사용하였다.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains / Plasmids	Relevant properties
<i>Bacillus</i> sp. 79-23	Cellulase producer identified as <i>B. subtilis</i>
<i>Bacillus</i> sp. 16-7	Amylase producer identified as <i>B. licheniformis</i>
<i>Bacillus</i> sp. 23-3	Amylase producer identified as <i>B. licheniformis</i>
<i>B. licheniformis</i> ATCC 27811	Wild-type strain
<i>B. licheniformis</i> SK-5	Thermostable α -amylase hyper-producing mutant
<i>B. licheniformis</i> SK-2	Thermostable α -amylase hyper-producing mutant
<i>B. subtilis</i> 168	Host for cellulase production
<i>B. subtilis</i> DB104	Host for cellulase production
<i>E. coli</i> DH5 α	Cloning host
<i>E. coli</i> XL1-blue	Cloning and subcloning host
pUC19	Cloning and subcloning vector (Ap ^r)
pUB110	Cloning vector for <i>Bacillus</i> (Km ^r)
pBC16	Cloning vector for <i>Bacillus</i> (Tc ^r)
pJH4	<i>E. coli</i> - <i>Bacillus</i> shuttle vector (Ap ^r , Km ^r)
pJCMC	Expression vector containing a <i>celS</i> gene (Ap ^r , Km ^r)
pSI7	Integration vector for <i>Bacillus</i> (Ap ^r , Km ^r)
pSI7-S	Integration vector containing a <i>celS</i> gene (Ap ^r , Km ^r)

나. 배 지

실험에 사용한 균주들에 따라 배지를 달리하여 사용하였는데, *E. coli* 배양을 위해서는 LB 배지 (Bacto-tryptone, 10 g; yeast-extract, 5 g; NaCl, 5 g; water per liter)를 사용하였고 *Bacillus* 균주의 배양에는 LB 배지와 Difco에서 구입한 Brain Heart Infusion (BHI) 배지를 주로 사용하였다. 그리고 *Bacillus*를 위한 최소배지로는 Spizizen의 최소배지 (SpC)를 사용하였다 (3).

2. 방 법

가. 섬유가공용 효소 유전자의 크로닝

전 단계 연구에서 토양으로 부터 분리한 내열성 α -amylase 생산 균주와 중성·내열성 cellulase 생산균주들로 부터 총염색체 DNA를 분리하였다. 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단하여 얻은 2~10 kb 정도의 염색체 DNA 조각을 *BamHI*으로 절단하여 CIP로 dephosphorylation 시킨 pUC19 vector에 ligation 시킨 후, DNA ligases를 electroporation 방법을 사용하여 *E. coli* DH5 α 로 형질전환시켜 유전자 은행을 제조하였다.

내열성 α -amylase 유전자를 지닌 *E. coli* 형질전환체를 선별하기 위해서 *E. coli* 형질전환체를 2%(w/v) 수용성 전분과 100 μ g/ml의 ampicillin을 함유한 LB 평판배지에 도말하여 37°C 에서 배양하였다. 콜로니가 생성된 LB 평판배지를 4°C 에서 overnight 보관을 한 후에 콜로니 주위에 전분 분해환이 생긴 *E. coli* 형질전환체를 선별하였다.

Cellulase 유전자를 지닌 *E. coli* 형질전환체를 선별하기 위해서 *E. coli* 형질전환체를 100 μ g/ml의 ampicillin을 함유한 LB 평판배지에 도말하여 37°C 에서 배양하였다. 콜로니가 생성된 LB 평판배지 위에 1 mM 4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside (MUC)를 포함한 5 ml의 LB 배지 (agar, 0.6% (w/v))를 부운 후에 55°C에서 2시간 동안 방치하여 MUC를 분해하여 UV상에서 형광을 보이는 형질전환체를 선별하였다.

나. 섬유가공용 효소 유전자의 염기서열 결정

크로닝된 섬유가공용 효소 유전자의 염기서열을 결정하기 위해서 먼저 제한효소 지도를 작성한 후에 제한 효소에 의해 적당한 크기로 절단

된 DNA조각을 pUC19 vector에 subcloning하였다. *E. coli* XL1-blue에서 분리된 재조합 DNA를 주형 DNA로하여 Sequenase ver 2.0 (USB Corp.) 과 [α -³⁵S]dATP 를 사용하여 dideoxy-chain termination방법으로 염기서열을 결정하였다.

다. *B. subtilis* 균주의 형질전환

Plasmid DNA를 사용하여 *B. subtilis* 균주들을 형질전환 시키기 위해서는 electroporation 방법을 사용하였다 (3). Electroporation cells을 만들기 위해서 50 ml의 LBSP 배지 (Bacto tryptone, 10 g; Bacto yeast extract, 5 g; NaCl, 5 g; sucrose, 250 mM; potassium phosphate buffer, 50 mM (pH 7.2) per 1liter)에 *Bacillus* 콜로니를 접종하여 37°C 에서 대수 말기 까지 진탕 배양한 후에 200 ml의 LBSP 배지에 10 ml의 LBSP 배양액을 다시 접종하였다. 37°C 에서 대수 말기 까지 진탕 배양한 후에 원심 분리하여 얻은 균체들을 200 ml의 ice-cold SHMG (sucrose, 250 mM; Hepes, 1 mM; MgCl₂, 1 mM; glycerol, 10% (w/v); pH 7.0) 로 세 번 세척하였다. 1.5 ml의 ice-cold SHMG 에 균체를 현탁시켜서 0.5 ml 씩 분주하여 -80°C 에서 보관하였다. *B. subtilis* 형질전환을 위해서 -80°C 에서 보관해두었던 0.5 ml의 electroporation cells을 꺼내어 재빨리 녹인 후에 1 μ g의 plasmid를 섞어서 0.2 cm electroporation cuvette 에 옮긴 후, 0°C 에서 20분 동안 방치하였다. 12.5 kV/cm, 25 μ F 의 조건으로 pulse를 준 후에 4.5 ml의 LBSPG 배지 (LBSP + 10% (w/v) glycerol)를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 진탕배양하고 나서 적당한 항생제가 들어있는 agar 배지에 도말하였다.

라. *B. licheniformis* 균주의 형질전환

B. licheniformis 균주를 형질전환시키기 위해서 electroporation 방법을 사용하였다. *B. licheniformis*를 3 ml의 BHI broth (0.25 M sucrose를 포함하는 BHI 배지)에 접종하여 30°C에서 overnight 진탕배양한 후에 200 ml의 BHI 배지에 1%되게 접종하였다. 30°C에서 OD₆₀₀ 값이 0.25~0.3 (초기 대수기에 해당)이 될때까지 진탕배양한 후에 ice에 20분간 방치하였다. 원심분리하여 얻은 균체들을 200 ml의 ice-cold EB 용액 (0.25 M sucrose, 1 mM MgCl₂)으로 세번 세척한 후에 0.2 ml의 ice-cold EB 용액에 균체를 현탁시켰다. *B. licheniformis*의 형질전환을 위해서 100 µl의 electroporation cell과 약 50 ng의 pBC16 plasmid를 완전히 섞은 후에 0.2 cm electroporation cuvette 으로 옮겨서 얼음에 정치해두었다. 7.5 kV/cm, 25µF capacitance, 300Ω resistance 의 조건으로 pulse를 준 후에 1 ml의 BHI 배지를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 그리고 나서 1 µg/ml의 tetracycline이 들어있는 BHI agar 배지에 도말하여 37°C에서 overnight 배양을 하였다.

마. Cellulase 유전자를 지닌 *E. coli* 와 *Bacillus* 형질전환체의 선별

Cellulase 유전자를 지닌 형질전환체를 선별하기 위해서 0.5% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC), 0.005% (w/v) trypan blue와 적당한 항생제를 함유한 LB 평판배지에 도말하여 37°C에서 overnight 배양을 하였다. 그 후에 LB 평판배지에 자란 콜로니 주위에 CMC 분해환이 생긴 콜로니들을 선별하였다.

바. 재조합 *E. coli* 가 생산하는 cellulase의 정제

pSW794를 지니고 있는 재조합 *E. coli*를 1 l의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 14시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은

균체를 200 ml 의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 현탁하여 sonication한 후 10,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 cell debris 를 제거하였다. 조효소액을 55°C에서 15분간 열처리를 하여 위와 동일하게 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 핵산을 제거하기 위해서 1% (w/v) streptomycin sulfate를 첨가한후 30분간 교반하고 1시간동안 정치시킨후 위와 동일하게 원심분리하였다. 여기서 얻어진 상등액에 35~70% (w/v) 의 ammonium sulfate로 분획한 침전물을 30 ml의 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)에 현탁하여 동일한 완충용액으로 투석을 한 후, DEAE-Sepharose column chromatography 를 수행하였다. 충전된 DEAE-Sepharose column (2.5cm×13cm)을 25 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 평형화시킨 후에 위의 효소액을 column에 주입하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0~0.5 M linear NaCl gradient를 통하여 1 ml/min 의 유속으로 분획당 3 ml씩 받았다. 활성을 보이는 세척 구간의 분획들을 모아서 ultrafiltration으로 농축하였다. 그 후에 효소액을 1 M ammonium sulfate가 들어있는 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 투석한 후에 동일한 완충용액으로 평형화시킨 phenyl-Sepharose column (2.5cm×13cm)에 동일 완충용액으로 투석된 sample을 column에 주입하고 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)로 1 M 에서 0 M ammonium sulfate의 역 linear gradient를 행하여 활성 분획을 모았다. 이 때의 유속은 1 ml/min이며, 분획당 5 ml씩 받았다.

사. *Bacillus* sp. 79-23 이 생산하는 cellulase의 정제

Bacillus sp. 79-23이 생산하는 cellulase 를 정제하기 위해서 5 l 의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 14시간 동안 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액을 ultrafiltration를 통하여 5 l 의 배양액을 850

ml로 농축하였다. 이 농축액을 0~75% (w/v)의 ammonium sulfate로 분획한 침전물을 40 ml의 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3)에 현탁하여 동일한 완충용액으로 투석을 한 후, DEAE-Sephrose column chromatography 를 수행하였다. 충전된 DEAE-Sephrose column (2.5cm × 22cm)을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3)로 평형화시킨 후에 위의 효소액을 column에 주입하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0~0.5 M linear NaCl gradient를 통하여 1 ml/min 의 유속으로 분획당 3 ml씩 받았다. 180 ml의 활성 분획을 모아서 ultrafiltration으로 농축하였다. 그 후에 효소액을 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)로 투석한 후에 동일한 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-Sephrose column (2.5cm × 13cm)에 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)로 투석된 sample을 column에 주입하고 동일한 완충용액으로 세척한 후 0~0.5 M linear NaCl gradient를 행하여 0.5 ml/min 의 유속으로 분획당 2.5 ml씩 받았다. 활성을 보이는 세척 구간의 분획들을 모아서 ultrafiltration을 통하여 2 ml로 농축을 하였다.

아. 효소 활성 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리되는 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 0.25 ml와 효소 용액 0.25 ml를 혼합하여 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 얻은 흡광도의 표준곡선과 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다.

α -Amylase 활성을 조사하기 위해서는 기질로 감자 전분을 다음과 같이 전처리하여 사용하였다. 감자 전분을 2 N NaOH 용액에 현탁시킨 후 실온에서 4시간 동안 방치하고 물을 첨가하여 완전히 녹였다. 여기에 2 N HCl 용액을 첨가하여 pH 7.0 이 되도록 하고 최종적으로 물을 첨가하여 0.2% (w/v) 전분 용액을 제조하였다. 효소 반응과 활성 측정 방법은 cellulase 활성 측정 때와 동일한 방법을 사용하였다.

효소 활성도 1 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 기질인 CMC나 전분으로부터 1 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법에 의해 정량하였다.

제 2 절 연구수행 결과

1. 연구 내용

전 단계 연구에서 섬유가공용 효소 유전자원으로 확보해 놓은 내열성 α -amylase 생산균주 (*Bacillus* sp. 16-7과 *Bacillus* sp. 23-3)와 중성·내열성 cellulase 생산균주 (*Bacillus* sp. 79-23)로 부터 각각의 유전자들을 *E. coli*로 크로닝하여 일차구조를 분석하였다. 특히 *B. licheniformis* 내에서의 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자의 존재 위치 및 발현 조절 기작에 관한 연구를 위해서 내열성 α -amylase 유전자 주위의 DNA 염기서열도 분석하였다.

산업용 효소 생산 균주로 오랫동안 발효산업에 이용되고 있는 *B. licheniformis* 균주를 유전자 재조합 숙주균으로 개발하기 위한 방법의 일환으로 electroporation 방법을 이용한 효과적이고 간단한 형질전환법을 확립하였다.

재조합 *E. coli*와 모균으로 부터 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase를 정제하여 섬유가공 용도로서의 반응특성을 분석하였다. 그리고 *Bacillus* sp. 79-23 cellulase의 섬유가공 용도로서의 효용성을 조사해보기 위해서 실제 섬유가공에 사용되는 천을 가지고 효소를 처리한 후에 천의 감량정도와 탈색정도를 조사하였다.

섬유가공용 효소 유전자를 *B. subtilis* 에서 과잉발현시키기 위한 plasmid 발현계와 염색체 발현계를 개발하였고, 이를 이용한 cellulase 고생산성 재조합 *Bacillus* 균주를 개발하였다. 또한 *Bacillus* sp. 79-23 균주를 섬유가공용 cellulase 생산균주로 이용하고자 배지성분에 따른 효소 생산성을 검토하였다.

2. 연구 결과

가. 섬유가공용 효소 유전자원의 확보

(1) 섬유가공용 효소 유전자원의 균 동정

전 단계 연구에서 토양에서 분리하여 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보해놓은 내열성 α -amylase 생산균주 (16-7, 23-3)와 중성·내열성 cellulase 생산균주 (79-23)의 생화학적 특성을 API 20E와 API 50 CHB 균동정 kit (bioMerieux Vitek, Inc.)를 이용하여 조사하였다 (Table 2). 그 결과 α -amylase 생산균주 (16-7, 23-3)의 생화학적 특성은 *B. licheniformis*의 특성과 대부분 일치하였으며, cellulase 생산균주인 79-23은 *B. subtilis*의 특성을 보였다.

(2) 내열성 α -amylase 유전자원의 확보

(가) 내열성 α -amylase 유전자의 클로닝

내열성 α -amylase 생산 균주들로 부터 α -amylase 유전자를 클로닝하기 위해 16-7과 23-3의 총염색체 DNA를 분리하여 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단하여 얻은 2-10 kb 정도의 DNA 조각을 pUC19을 사용하여 *E. coli* DH5 α 로 형질전환 시켰다. 대장균 형질전환체를 2% (w/v) 수용성 전분과 ampicillin을 함유한 LB 평판배지에 도말하여 얻은 각 10,000개 정도의 형질전환주 중에서 amylase 활성을 보이는 형질전환체를 16-7에서는 2개, 23-3에서는 1개를 얻었다.

Table 2. Morphological and biochemical properties of *Bacillus* isolates.

Characteristics	79-23	16-7	23-3
Gram staining	+	+	+
Motility	+	+	+
Cell form	Rod	Rod	Rod
Spore formation	+	+	+
Catalase	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+
β -Galactosidase	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
Indole production	-	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Acid from glucose	+	+	+
glycerol	+	+	+
ribose	+	+	+
galactose	-	+	+
fructose	+	+	+
rhamnose	-	+	+
inositol	+	+	+
mannitol	+	+	+
cellobiose	+	+	+
maltose	+	+	+
lactose	-	-	-
tagatose	-	+	+

+, Positive; -, Negative

그런데 *B. licheniformis*는 적어도 2개 이상의 amylase를 생산하는데, 그 중 두개의 amylase 유전자들이 분리되어 유전자의 구조 및 그 유전자들이 만드는 효소의 특성에 대한 연구 결과가 보고된 바가 있다 (9, 19). 내열성 α -amylase는 전분을 액화시키는 작용을 하며, 쉽게 이용할 수 있는 탄소원이 부족할 경우 세포 밖의 전분을 탄소원으로 이용하기 위하여 대수증식기가 끝날 무렵에 생산되어 세포밖으로 분비되는 것으로 알려져 있다. 두번째로, maltogenic amylase는 내열성 α -amylase와는 달리 모균 내에서 매우 늦은 정체기에 생산되어 세포질내에 남아있으며 전분에 작용하여 주로 maltose를 생산하고 pullulan에 작용하여 panose만을 생산한다고 보고가 되었다 (19). 또한, 내열성 α -amylase의 최적온도는 70~80°C 인데 비하여 maltogenic amylase의 최적온도는 40~50°C로 알려져 있다 (9, 19).

그러므로 클로닝된 16-7과 23-3 유래의 염색체 DNA가 어떤 종류의 amylase 유전자를 포함하고 있는지 확인해보기 위해서, amylase 활성을 보이는 *E. coli* 형질전환체들을 LB 배지에서 배양한 후에 세포 외부와 세포 내부의 starch와 pullulan에 대한 활성을 조사하였다. 그 결과, pSW167은 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자를 모두 포함하고 있었고, pSW161은 maltogenic amylase 유전자만을, pSW23은 내열성 α -amylase 유전자만을 포함하고 있다는 것을 알 수가 있었다 (Table 3).

또한, cellulase 생산 균주인 79-23으로 부터도 위와 같은 방법으로 클로닝을 시도하여 α -amylase 활성을 보이는 *E. coli* 형질전환체 1개를 얻었고, pSW793으로 명명된 재조합 plasmid를 분리하여 restriction map을 작성하였다. 그런데 pSW793 insert DNA의 restriction map은 기존에

보고가 되어있는 *B. subtilis* 168과 *B. subtilis* 2633의 restriction map과 동일하였다.

Table 3. Summary of the *E. coli* clones containing the *Bacillus* amylase genes.

Gene donor	Plasmid	Enzyme activity				Opt. temp.	Gene type
		Extracellular		Intracellular			
		Starch	Pullulan	Starch	Pullulan		
16-7	pSW161	-	-	+	+	40°C	maltogenic amylase
16-7	pSW167	+	-	+	+	80°C	α -amylase maltogenic amylase
23-3	pSW23	+	-	+	-	80°C	α -amylase
79-23	pSW793	+	-	+	-	60°C	α -amylase

(나) *Bacillus* sp. 16-7의 amylase 유전자 분석

*B. licheniformis*로 동정되어진 16-7 균주로 부터 분리한 amylase 유전자들의 일차구조를 부분적으로 조사한 결과, 이미 발표된 *B. licheniformis* 유래의 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자의 염기배열과 대부분이 동일하였다. 또한 *B. licheniformis* 유래의 amylase 유전자들의 restriction map과 16-7 유래의 amylase 유전자들의 restriction map이 거의 일치하였다 (Fig. 1). 이들 결과들로 미루어보아 16-7로 부터 분리한 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자는 모두가 이미 보고가 되어있는 *B. licheniformis*의 유전자들과 동

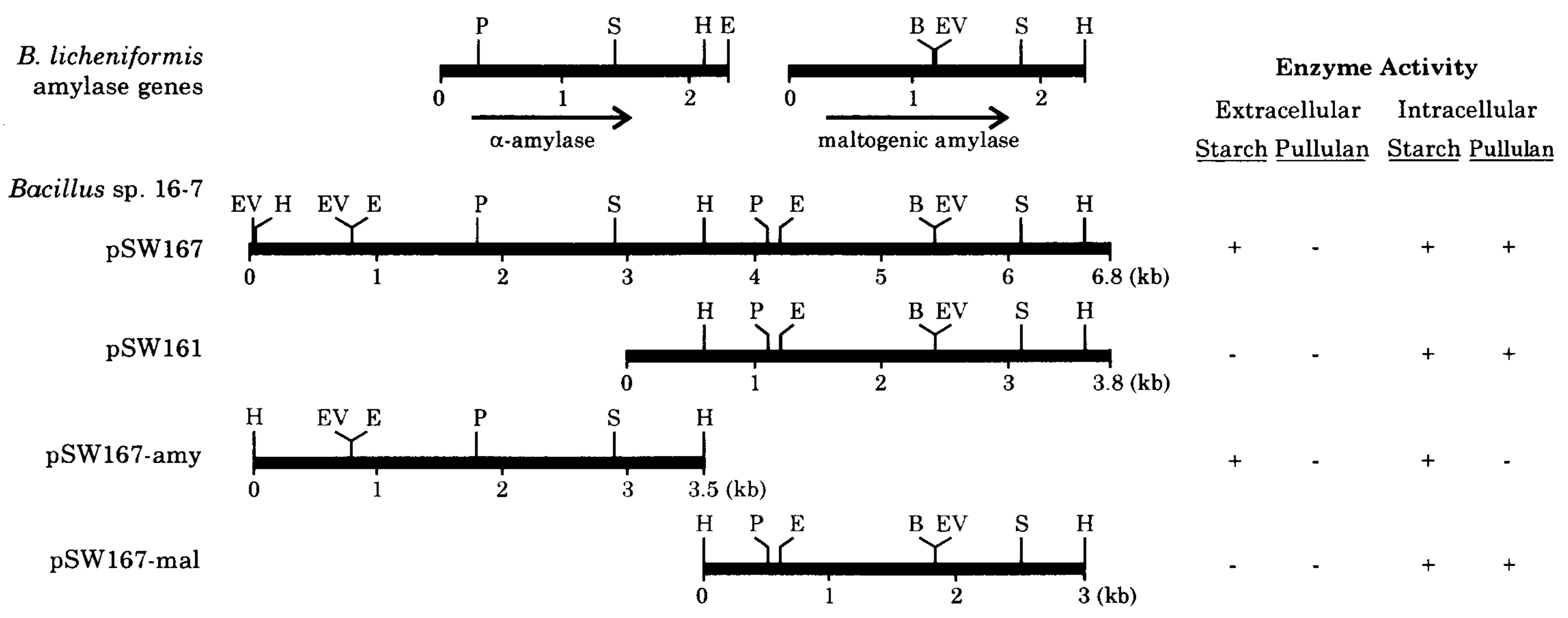


Fig. 1. Comparison of the restriction maps between *B. licheniformis* amylase genes and *Bacillus* sp. 16-7 amylase genes.

일한 것으로 여겨진다. 특히, pSW167은 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자 모두를 포함하고 있는 큰 크기의 insert DNA를 가지고 있다. 그러므로 pSW167은 *B. licheniformis* 내에서의 amylase 유전자들의 발현조절 기작과 maltogenic amylase의 생리적 역할을 연구하는데 좋은 재료가 될 수 있을것으로 판단된다.

(다) *Bacillus* sp. 16-7의 amylase 유전자 주위의 일차구조 분석

내열성 α -amylase 유전자원으로 확보한 *Bacillus* sp. 16-7로 부터 분리한 염색체 DNA 단편 중에서 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자 주위의 염기서열을 모두 결정하여 *B. licheniformis*의 clustered amylase gene structure를 최초로 밝혀냈다 (Fig. 2). 재조합 plasmid pSW167이 지니고 있는 6.9 kb 크기의 *Bacillus* sp. 16-7 DNA 단편내에는 내열성 α -amylase 유전자와 maltogenic amylase 유전자가 약 1.2 kb의 간격을 두고 존재한다는 사실이 처음으로 밝혀졌고, 이들 유전자외에도 3가지의 새로운 open reading frame (ORF)이 발견되었다.

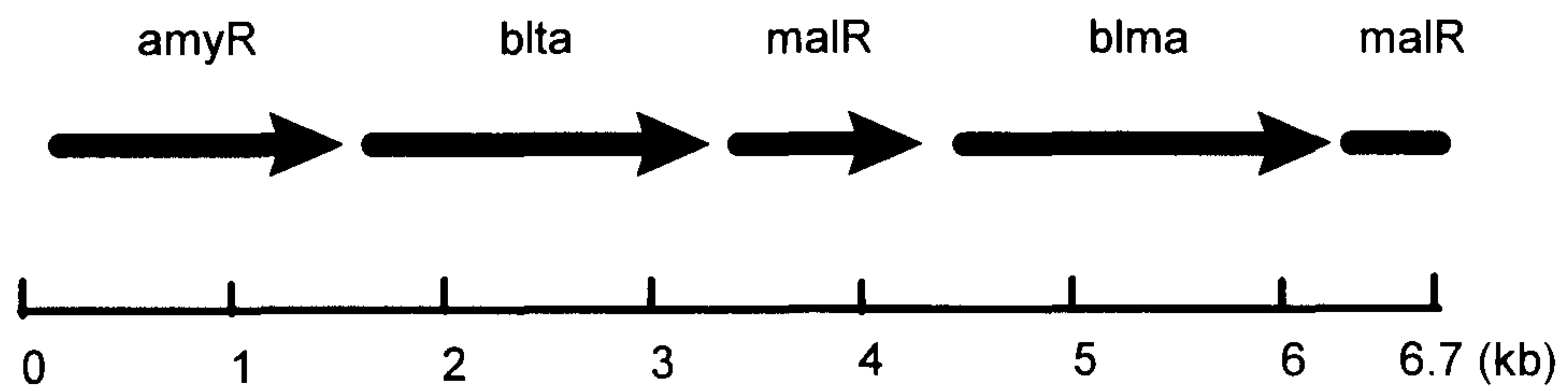
내열성 α -amylase 유전자의 129 bp upstream 부위에 1,380 bp로 이루어진 ORF가 발견되었고, 그 유전자를 *amyR*로 명명하였다 (Fig. 3). 이 *amyR* 유전자는 50 kDa의 분자량을 갖는 단백질을 coding하고 있는데, C-말단의 아미노산 서열이 콩과식물의 root nodulation에 관여하는 NodB protein의 N-말단의 아미노산 서열과 매우 높은 상동성을 보였다. NodB는 chitooligosaccharide deacetylase로서 root nodulation의 개시에 필요한 signal molecule의 합성에 중요한 역할을 하는 효소이다 (7). 그런데 *B. subtilis* 168의 일부 유전자 산물과 다른 세균 유래의 일부

xylanase에서도 NodB homologous domain들이 발견이 되어지고 있는데 그 기능은 전혀 밝혀지지 않고 있다 (10, 12, 17). 그러나 *B. licheniformis* α -amylase 유전자의 upstream의 일부 부위를 제거했을 때 α -amylase의 생산이 증가하였다는 다른 연구진의 보고로 미루어보아, 아마도 이 *amyR* 유전자는 sporulation과 catabolite repression, extracellular enzyme 합성 등에 관여하는 *trans*-acting global regulator를 coding하고 있는 것으로 추측된다.

또한 내열성 α -amylase 유전자의 163 bp downstream에서 시작하여 maltogenic amylase 유전자의 197 bp upstream 부위까지의 870 bp로 이루어진 ORF가 존재하였고, 이 유전자를 *malR*로 명명하였다 (Fig. 4). 이 유전자는 32 kDa의 분자량을 갖는 단백질을 coding하고 있는데, 그 아미노산 서열이 여러 종류의 repressor와 catabolite control protein의 아미노산 서열과 높은 상동성을 보였다. 그런데 maltogenic amylase는 내열성 α -amylase와는 달리 모균내에서 매우 늦은 정체기에 생산되어 전분에 작용하여 주로 maltose를 생산하는 것으로 미루어보아 *malR* 유전자는 maltogenic amylase 유전자의 발현에 negative control의 역할을 하는 repressor를 coding하고 있는 것으로 생각되어진다.

한편 maltogenic amylase 유전자의 98 bp downstream 부위에서 시작되는 또다른 ORF가 존재하였고 (Fig. 5), 이 유전자 (*malB*)가 coding하는 단백질의 아미노산 서열은 다른 세균 유래의 maltose-binding protein의 아미노산 서열과 높은 상동성을 보였다.

이와 같이, 내열성 α -amylase와 maltogenic amylase 유전자 주위에 amylase 생산에 관여하는 유전자들이 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 섬유가공용 효소 고 생산성 *B. licheniformis* 균주의 개발에 매우 유용한 정보이며, 이를 이용한 균주 개발이 현재 진행중에 있다.



amyR : NodB-homologue protein

blta : thermostable α -amylase

malR : repressor-homologue protein

blma : maltogenic amylase

malB : maltose-binding protein

Fig. 2. Clustered amylase gene structure from *B. licheniformis*

1 GATCTTAAAAAGAGCGATATCCGTTTGGATGAACATACGGCATTCTATTATACAA
 56 GCAGCGGAATTTCAATTGTATTTTCAGCAGTATGATATCGCCCCGTATGCAGCCGAAACCAGGAAATAAAGCTTCCGTCGACG
 139 CTTTTATATTAGCCCCGGCATTAGATCTAATATTTGTAATAGAAACAGAGAGAGCAAGTCGTGAAACAGGAGAGTGAGCAGCG
 SD
 222 ATG TCT GGC AAA CCA TCA TTT CGA TGG GTT AAA ATG TTG ATT TTT TTA ACG ATA TTA ATA GGT
 1 MET Ser Gly Lys Pro Ser Phe Arg Trp Val Lys MET Leu Ile Phe Leu Thr Ile Leu Ile Gly
 285 TTG GCA GGG TAC TCT TAC AAT AAA GTG TCA AGC AAC AGC CAA GAG CCC CCT CAG CCA AAA AAA
 22 Leu Ala Gly Tyr Ser Tyr Asn Lys Val Ser Ser Asn Ser Gln Glu Pro Pro Gln Pro Lys Lys
 348 GAC CGC GGA CAA TCC GGC CTC GGC GTC GAA TCC ATG GTC AAT GAC AGC AAA CAA GAG AGG TAT
 43 Asp Arg Gly Gln Ser Gly Leu Gly Val Glu Ser MET Val Asn Asp Ser Lys Gln Glu Arg Tyr
 411 GCC ATC CAT TAT CCG GTG TTT CAC ATA AAA GAA ATC GAT GAA CAA ATA AAA GAT TAT GTG AAT
 64 Ala Ile His Tyr Pro Val Phe His Ile Lys Glu Ile Asp Glu Gln Ile Lys Asp Tyr Val Asn
 474 CAA GAA TTG GCC GGT TTT AAA GAG GAT AAC GCA AAG GCC CAG GCT CAG GAT GAA GAC GGG CCT
 85 Gln Glu Leu Ala Gly Phe Lys Glu Asp Asn Ala Lys Ala Gln Ala Gln Asp Glu Asp Gly Pro
 537 TTT GAA CTG AAC ATT AAA TAT AAG GTT GTC TAT TAT ACA AAG GAT ACG GCT AGT GTT GTG CTG
 106 Phe Glu Leu Asn Ile Lys Tyr Lys Val Val Tyr Tyr Thr Lys Asp Thr Ala Ser Val Val Leu
 600 AAT CAA TAC ATA GAG GCC GGC GGC GTA TCG GGT ACA ACA TCT GTC AAG ACG TTT AAC GCT GAT
 127 Asn Gln Tyr Ile Glu Ala Gly Gly Val Ser Gly Thr Thr Ser Val Lys Thr Phe Asn Ala Asp
 663 TTA AAG CAG AAA AAG CTG CTG TCC CTT CAA GAT CTG TTT GAA GAG AAT TCA GAT TTT CTG AAC
 148 Leu Lys Gln Lys Lys Leu Leu Ser Leu Gln Asp Leu Phe Glu Glu Asn Ser Asp Phe Leu Asn
 726 AGG ATT TCA AGC ATT GCC TAT CAG GAA TTG AAA AAT CGG AAT CCG TCT GCT GAC ATG GCT TTA
 169 Arg Ile Ser Ser Ile Ala Tyr Gln Glu Leu Lys Asn Arg Asn Pro Ser Ala Asp MET Ala Leu
 789 TTA AAA GAA GGG ACG AGC CCT CAG GAA GAA CAT TTC AGC CGC TTT GCG CTT CTT GAA AAC GAG
 190 Leu Lys Glu Gly Thr Ser Pro Gln Glu Glu His Phe Ser Arg Phe Ala Leu Leu Glu Asn Glu
 852 GTG GAA TTT TAT TTT GAG AAA AAA CAA ACC GGT CTT GAA CAG TCT GTA AAA ATA AAA AAA GAA
 211 Val Glu Phe Tyr Phe Glu Lys Lys Gln Thr Gly Leu Glu Gln Ser Val Lys Ile Lys Lys Glu
 915 TGG GTA AAA GAT ATT TTA AAA GAC CGA TAT CAG GAT ATG AAA AAG AAT CGT CTT CAG GCC AAA
 232 Trp Val Lys Asp Ile Leu Lys Asp Arg Tyr Gln Asp MET Lys Lys Asn Arg Leu Gln Ala Lys
 978 CCT GAT CAG GAG CCT GTT CCG CTT CCG AAG CAA GCG AAA ATT AAT CCC GAT GAA AAA GTG ATT
 253 Pro Asp Gln Glu Pro Val Pro Leu Pro Lys Gln Ala Lys Ile Asn Pro Asp Glu Lys Val Ile
 1041 GCC CTC ACA TTT GAT GAC GGT CCG AAT CCC GCT ACA ACG AAT AAA ATA TTA AAC GTT TTA CAG
 274 Ala Leu Thr Phe Asp Asp Gly Pro Asn Pro Ala Thr Thr Asn Lys Ile Leu Asn Val Leu Gln
 1104 AAG CAT GAA GGG CAT GCG ACC TTC TTT GTG CTT GGA AGC AGA GCC CAA TAT TAT CCC GAA ACG
 295 Lys His Glu Gly His Ala Thr Phe Phe Val Leu Gly Ser Arg Ala Gln Tyr Tyr Pro Glu Thr
 1167 ATA AAA CGG ATG CTG AAG GAA GGA AAC GAA GTC GGC AAC CAT TCC TGG GAC CAT CCG TTA TTG
 316 Ile Lys Arg MET Leu Lys Glu Gly Asn Glu Val Gly Asn His Ser Trp Asp His Pro Leu Leu
 1230 ACA AGG CTG TCA AAC GAA AAA GCG TAT CAG GAG ATT AAC GAC ACG CAA GAA ATG ATC GAA AAA
 337 Thr Arg Leu Ser Asn Glu Lys Ala Tyr Gln Glu Ile Asn Asp Thr Gln Glu MET Ile Glu Lys
 1293 ATC AGC GGA CAC CTG CCT GTA CAC TTG CGT CCT CCA TAC GGC GGG ATC AAT GAT TCC GTC CGC
 358 Ile Ser Gly His Leu Pro Val His Leu Arg Pro Pro Tyr Gly Gly Ile Asn Asp Ser Val Arg

1356 TCG CTT TCC AAT CTG AAG GTT TCA TTG TGG GAT GTT GAT CCG GAA GAT TGG AAG TAC AAA AAT
379 Ser Leu Ser Asn Leu Lys Val Ser Leu Trp Asp Val Asp Pro Glu Asp Trp Lys Tyr Lys Asn

1419 AAG CAA AAG ATT GTC AAT CAT GTC ATG AGC CAT GCG GGA GAC GGA AAA ATC GTC TTA ATG CAC
400 Lys Gln Lys Ile Val Asn His Val MET Ser His Ala Gly Asp Gly Lys Ile Val Leu MET His

1482 GAT ATT TAT GCA ACG TCC GCA GAT GCT GCT GAA GAG ATT ATT AAA AAG CTG AAA GCA AAA GGC
421 Asp Ile Tyr Ala Thr Ser Ala Asp Ala Ala Glu Glu Ile Ile Lys Lys Leu Lys Ala Lys Gly

1545 TAT CAA TTG GTA ACT GTA TCT CAG CTT GAA GAA GTG AAG AAG CAG AGA GGC TAT TGA ATAAATG
442 Tyr Gln Leu Val Thr Val Ser Gln Leu Glu Glu Val Lys Lys Gln Arg Gly Tyr TER

1609 AGTAGAAAGCGCCATATCGGCGCTTTTCTTTTGAAGAAAATATAGGGAAAATGGCATTTGTTAAAAATCCGGAATATTTATA
-----> <----- -35 -10

1692 CAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATC ATG AAA CAA CAA AAA CGG CTT TAC GCC CGA TTG
SD MET Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu

1763 CTG ACG CTG TTA TTT GCG CTC ATC TTC TTG CTG CCT CAT TCT GCA G
Leu Thr Leu Leu Phe Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala

Fig. 3. Nucleotide sequence of the upstream region of *B. licheniformis* α -amylase gene. The amino acid deduced from the longest open reading frame is given in the three letter codon below the nucleotide sequence. Putative ribosome binding site (SD) and promoter sequence (-35 and -10) are underlined. Palindrome sequence that may act as a transcription terminator is indicated by arrows facing each other.

1 GATC TTA AAA GCG AGA AAA CAG TAT GCG TAC GGA GCA CAG CAT GAT TAT TTC GAC CAC CAT GAC
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp
65 ATT GTC GGC TGG ACA AGG GAA GGC GAC AGC TCG GTT GCA AAT TCA GGT TTG GCG GCA TTA ATA
Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile
128 ACA GAC GGA CCC GGT GGG GCA AAG CGA ATG TAT GTC GGC CGG CAA AAC GCC GGT GAG ACA TGG
Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg MET Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp
191 CAT GAC ATT ACC GGA AAC CGT TCG GAG CCG GTT GTC ATC AAT TCG GAA GGC TGG GGA GAG TTT
His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu Phe
254 CAC GTA AAC GGC GGG TCG GTT TCA ATT TAT GTT CAA AGA TAG AAGAGCAGAGAGGACGGATTTCTGAA
His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg Ter -----> <-
323 GGAAATCCGTTTTTTTTATTTTGCCCGTCTTATAAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAAGTGTGCATCAGCC

-35 -10
406 CTCAGGAAGGACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGATGAA ATG GCA ACG TTA TCT GAT GTA GCA
1 SD MET Ala Thr Leu Ser Asp Val Ala
482 AAG AAA GCA AAT GTG TCG AAA ATG ACG GTA TCG CGG GTG ATC AAT CAT CCT GAG ACT GTG ACG
9 Lys Lys Ala Asn Val Ser Lys MET Thr Val Ser Arg Val Ile Asn His Pro Glu Thr Val Thr
545 GAT GAA TTG AAA AAG CTT GTT CAT TCC GCA ATG AAG GAG CTC AAT TAT ATA CCG AAC TAT GCA
30 Asp Glu Leu Lys Lys Leu Val His Ser Ala MET Lys Glu Leu Asn Tyr Ile Pro Asn Tyr Ala
608 GCA AGA GCG CTC GTT CAA AAC AGA ACA CAG GTC GTC AAG CTG CTC ATA CTG GAA GAA ATG GAT
51 Ala Arg Ala Leu Val Gln Asn Arg Thr Gln Val Val Lys Leu Leu Ile Leu Glu Glu MET Asp
671 ACA ACA GAA CCT TAT TAT ATG AAT CTG TTA ACG GGA ATC AGC CGC GAG CTG GAC CGT CAT CAT
72 Thr Thr Glu Pro Tyr Tyr MET Asn Leu Leu Thr Gly Ile Ser Arg Glu Leu Asp Arg His His
734 TAT GCT TTG CAG CTT GTC ACA AGG AAA TCT CTC AAT ATC GGC CAG TGC GAC GGC ATT ATT GCG
93 Tyr Ala Leu Gln Leu Val Thr Arg Lys Ser Leu Asn Ile Gly Gln Cys Asp Gly Ile Ile Ala
797 ACG GGG TTG AGA AAA GCC GAT TTT GAA GGG CTC ATC AAG GTT TTT GAA AAG CCT GTC GTT GTA
114 Thr Gly Leu Arg Lys Ala Asp Phe Glu Gly Leu Ile Lys Val Phe Glu Lys Pro Val Val Val
860 TTC GGG CAA AAT GAA ATG GGC TAC GAT TTT ATT GAT GTT AAC AAT GAA AAA GGA ACC TAT ATG
135 Phe Gly Gln Asn Glu MET Gly Tyr Asp Phe Ile Asp Val Asn Asn Glu Lys Gly Thr Tyr MET
923 GCA ACA CGT CAC GTC ATT GGT CTG GGC GTC CGC AAT GTC GTC TTT TTT GGG ATC GAT TTG GAT
156 Ala Thr Arg His Val Ile Gly Leu Gly Val Arg Asn Val Val Phe Phe Gly Ile Asp Leu Asp
986 GAG CCC TTT GAA CGC TCA AGG GAA AAA GGC TAT CTT CAG GCG ATG GAA GGC AGT CTG AAA AAA
177 Glu Pro Phe Glu Arg Ser Arg Glu Lys Gly Tyr Leu Gln Ala MET Glu Gly Ser Leu Lys Lys
1049 GCA GAG ATT TTC CGG ATG GAA AAC AGT TCA AAA AAA AGT GAA GCA CGC GCG CGG GAA GTG CTT
198 Ala Glu Ile Phe Arg MET Glu Asn Ser Ser Lys Lys Ser Glu Ala Arg Ala Arg Glu Val Leu
1112 GCA TCC TTT GAC GCA CCT GCA GCG GTT GTT TGC GCT TCG GAC CGA ATC GCG CTC GGG GTT ATC
219 Ala Ser Phe Asp Ala Pro Ala Ala Val Val Cys Ala Ser Asp Arg Ile Ala Leu Gly Val Ile
1175 CGC GCG GTG CAA TCG CTT GGT AAA AGA ATT CCG GAA GAT GTC GCG GTC ACC GGC TAT GAC GGG
240 Arg Ala Val Gln Ser Leu Gly Lys Arg Ile Pro Glu Asp Val Ala Val Thr Gly Tyr Asp Gly

1238 GTG TTT CTC GAC CGG ATC GCT TCG CCT CGC CTG ACA ACC GTC AGA CAG CCT GTT GTT GAA ATG
261 Val Phe Leu Asp Arg Ile Ala Ser Pro Arg Leu Thr Thr Val Arg Gln Pro Val Val Glu MET

1301 GGA GAG CTT GCG CGA GAA TCC TGC TGA AAAAAATCAATGAAGACGGAGCGCCGCAAGGCAATCAATTTTTTGAG
282 Gly Glu Leu Ala Arg Glu Ser Cys TER ----- -> <- -----

1475 CCGGAGCTTATTGTCCGCGAATCGACTTTGTAGGGTGTCTCATTCTGTTACCGTTAACAAGCTGAAAATGATTGTTCTGTTA
-35

1458 CCGCCGTCATGATAATTCAGAATAAAAGCCGGTTTATCACAGCCGGACAACCAAAAGGGGGAAAC ATG ATG GAA TAT
-10 SD MET MET Glu Tyr

1536 GCA GCG ATA CAT CAT CAG CCT TTC AGC TCT GAT GCC TAT TCT TAC AAT GGA CGG ACA TTG CAC
Ala Ala Ile His His Gln Pro Phe Ser Ser Asp Ala Tyr Ser Tyr Asn Gly Arg Thr Leu His

1599 ATC AAG ATC C
Ile Lys Ile

Fig. 4. Nucleotide sequence of the downstream region of *B. licheniformis* α -amylase gene. The amino acid deduced from the longest open reading frame is given in the three letter codon below the nucleotide sequence. Putative ribosome binding site (SD) and promoter sequence (-35 and -10) are underlined. Palindrome sequence that may act as a transcription terminator is indicated by arrows facing each other.

```

1          GTC GAC ATT CAG CCA GGC GGA TTT TTC ATT TTG GGG GCG GTC TAA ATTCTGTTACC
          Val Asp Ile Gln Pro Gly Gly Phe Phe Ile Leu Gly Ala Val TER      - -

57 GGTAACAGGTTTAAAACTATTGTAACCGCTTTCTGTCGAGGATTACAATTGTCTCAGATTCCAAGATAGAAGGGGGAAAAAAG
   ---- -->          <-- ---- -          SD

140 ATG CAA CAT TTA AAA AAA GGA ATT TTA GTG CTG CTG GCG TCA GTT CTG CTG TTC GGT CTT GCC
   1  MET Gln His Leu Lys Lys Gly Ile Leu Val Leu Leu Ala Ser Val Leu Leu Phe Gly Leu Ala

203 GCC TGT TCA AGT TCA AAG GAA ACG GGA GGC AGC GGC GGG AAA AAA GTG CTG ACC GTG TCT GTA
   22 Ala Cys Ser Ser Ser Lys Glu Thr Gly Gly Ser Gly Gly Lys Lys Val Leu Thr Val Ser Val

266 GAA GAG GTC TAT AAA CCT TAC GTC GAA AGC ATA AAG GAA GGT TTT GAA AAA GAG AAT GAT GTG
   43 Glu Glu Val Tyr Lys Pro Tyr Val Glu Ser Ile Lys Glu Gly Phe Glu Lys Glu Asn Asp Val

329 ACA GTC AAA ATC GTT GAA AAG CCG ATG TTC GAC CAG CTT GAA GCG CTT CCG CTT GAC GGT CCG
   64 Thr Val Lys Ile Val Glu Lys Pro MET Phe Asp Gln Leu Glu Ala Leu Pro Leu Asp Gly Pro

392 GCA GGC AAT GCG CCC GAT GTC ATG CTT GCG GCA TAC GAC CGT ATC GGC GGC TTA GGA CAG CAA
   85 Ala Gly Asn Ala Pro Asp Val MET Leu Ala Ala Tyr Asp Arg Ile Gly Gly Leu Gly Gln Gln

455 GGT CAT TTG CTG GAA GTC AAA CCG TCT GAC ACA AAA AGC TTC GGA GAC AAA GAA ATG CAG CAG
  106 Gly His Leu Leu Glu Val Lys Pro Ser Asp Thr Lys Ser Phe Gly Asp Lys Glu MET Gln Gln

518 GTG ACG GTT GGC GGA AAA GTC TAT GGA ATC CCG CTT GTT ATT GAA ACT CTC GTA CTC TAT TAC
  127 Val Thr Val Gly Gly Lys Val Tyr Gly Ile Pro Leu Val Ile Glu Thr Leu Val Leu Tyr Tyr

581 AAC AAA GAC CTG TTA AAA ACG CCG CCA AAA ACT TTT AAC GAG CTC GAG GAT TTA ACA AAA GAC
  148 Asn Lys Asp Leu Leu Lys Thr Pro Pro Lys Thr Phe Asn Glu Leu Glu Asp Leu Thr Lys Asp

644 AAG AGG TTC GCT TTT TCT TCG GAA AAA GGA AGA TC
  169 Lys Arg Phe Ala Phe Ser Ser Glu Lys Gly Arg

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the downstream region of *B. licheniformis* maltogenic amylase gene. The amino acid deduced from the longest open reading frame is given in the three letter codon below the nucleotide sequence. Putative ribosome binding site (SD) and promoter sequence (-35 and -10) are underlined. Palindrome sequence that may act as a transcription terminator is indicated by arrows facing each other.

(3) 중성·내열성 cellulase 유전자원의 확보

(가) 중성·내열성 cellulase 유전자의 크로닝

자연계에서 분리한 중성·내열성 cellulase 생산균주인 *Bacillus* sp. 79-23으로 부터 cellulase 유전자를 크로닝하기 위해 제한효소 *Sau3AI*으로 부분 절단하여 얻은 2-10 kb 정도의 DNA 조각을 pUC19을 사용하여 *E. coli* DH5 α 로 형질전환 시켰다. 대장균 형질전환체를 ampicillin을 함유한 LB 평판배지에 도말하여 얻은 10,000여 마리의 콜로니 중에서 4-methylumbelliferyl- β -D-cellobioside (MUC)를 분해하여 UV상에서 형광을 보이는 2개의 형질전환체를 얻었다. 재조합 *E. coli*를 LB 배지에서 배양한 후에 조효소의 여러가지 기질에 대한 활성을 조사한 결과, pSW791은 β -glucosidase 유전자를 포함하고 있고 pSW794는 CMCase 유전자를 포함하고 있다는 것을 알 수 있었다. CMCase 활성을 보이는 형질전환체로부터 plasmid를 분리하여 제한효소지도를 작성하였으며, pSW794로 이름지어진 재조합 plasmid 내에 약 3 kb의 79-23 insert DNA가 존재한다는 사실을 알 수가 있었다 (Fig. 6).

(나) *Bacillus* sp. 79-23 cellulase 유전자의 일차 구조 분석

Bacillus sp. 79-23 유래의 CMCase 유전자의 염기서열을 결정하기 위해서 pSW794 plasmid의 insert DNA를 dideoxy-chain termination 방법으로 DNA sequencing을 하였다. 그 결과, ATG 코돈으로 시작되어 TAG 코돈으로 종결되어지는 1,497개의 염기로 구성된 중성·내열성 cellulase 유전자의 염기 서열을 모두 밝혀냈다 (Fig. 7). 이미 보고가

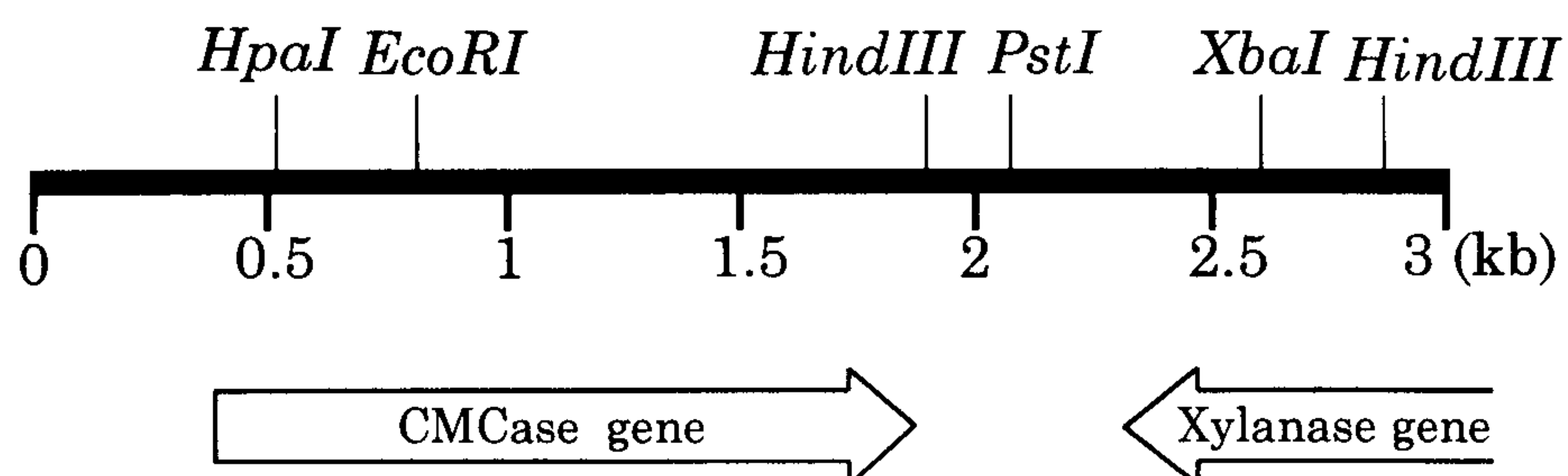


Fig. 6. Restriction map of the insert DNA of pSW794. The location and direction of the cellulase gene (*celS*) and xylanase gene are represented as open arrows. There were no restriction sites in the insert DNA for *EcoRV*, *KpnI*, *SalI*, and *SmaI*.

1 GATCCTGTATTCAAAGCGAAAAACATCCCAGGGCTGAAAAACGCTGAA
 49 ACATGGGAAGATGAGAAACAAGAAGTATAATATAAATATAAAACAAAGCTGCATTCAATAGTTGAATGCAGCTTTTTTCATTAT
 132 TTGAAATAAAATTAATTTTTTCGACTCGAATGAAAAATGACGTGTAAGTCCCAATTCAGTCCAGTTTTCTTTGTTCTATATGT
 215 GTCATGTGTGCTTATTTCATTGGAGGTAGAGCAAATTGACAGGCTTTTAAACCTCCAAAAACAAGAAATTAGGTTGATAGAC
 298 AATCATGAGAAAGATTTTTACAATGAGTTCGTGCTCATAAGAAGTGTAGAGCCAAAATGATGCGAAGGAGGAAAAGATCAGAT
 -35 -10 SD
 381 ATG AAA CGG TCA ATC TCT ATT TTT ATT ACG TGT TTA TTG ATT ACG TTA TTG ACA ATG GGC GGC
 MET Lys Arg Ser Ile Ser Ile Phe Ile Thr Cys Leu Leu Ile Thr Leu Leu Thr MET Gly Gly
 444 ATG ATA GCT TCG CCG GCA TCA GCA GCA GGG ACA AAA ACG CCA GTA GCC AAG AAT GGC CAG CTT
 MET Ile Ala Ser Pro Ala Ser Ala Ala Gly Thr Lys Thr Pro Val Ala Lys Asn Gly Gln Leu
 507 AGC ATA AAA GGT ACA CAG CTC GTT AAC CGA GAC GGT AAA GCG GTA CAG CTG AAG GGC ATC AGT
 Ser Ile Lys Gly Thr Gln Leu Val Asn Arg Asp Gly Lys Ala Val Gln Leu Lys Gly Ile Ser
 570 TCA CAC GGA TTG CAA TGG TAT GGA GAA TAT GTC AAT AAA GAC AGC TTA AAA TGG CTG AGA GAT
 Ser His Gly Leu Gln Trp Tyr Gly Glu Tyr Val Asn Lys Asp Ser Leu Lys Trp Leu Arg Asp
 633 GAT TGG GGT ATC ACC GTT TTC CGT GCA GCG ATG TAT ACG GCA GAT GGC GGT TAT ATT GAC AAC
 Asp Trp Gly Ile Thr Val Phe Arg Ala Ala MET Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Ile Asp Asn
 696 CCG TCC GTG AAA AAT AAA GTA AAA GAA GCG GTT GAA GCG GCA AAA GAG CTT GGC ATA TAT GTC
 Pro Ser Val Lys Asn Lys Val Lys Glu Ala Val Glu Ala Ala Lys Glu Leu Gly Ile Tyr Val
 759 ATC ATT GAC TGG CAT ATC TTA AAT GAC GGT AAT CCA AAC CAA AAT AAA GAG AAG GCA AAA GAA
 Ile Ile Asp Trp His Ile Leu Asn Asp Gly Asn Pro Asn Gln Asn Lys Glu Lys Ala Lys Glu
 822 TTC TTC AAG GAA ATG TCA AGC CTT TAC GGA AAC ACG CCA AAC GTC ATT TAT GAA ATT GCA AAC
 Phe Phe Lys Glu MET Ser Ser Leu Tyr Gly Asn Thr Pro Asn Val Ile Tyr Glu Ile Ala Asn
 885 GAA CCA AAC GGT GAT GTG AAC TGG AAG CGT GAT ATT AAA CCA TAT GCG GAA GAA GTG ATT TCA
 Glu Pro Asn Gly Asp Val Asn Trp Lys Arg Asp Ile Lys Pro Tyr Ala Glu Glu Val Ile Ser
 948 GTT ATC CGC AAA AAT GAT CCA GAC AAC ATC ATC ATT GTC GGA ACC GGT ACA TGG AGC CAG GAT
 Val Ile Arg Lys Asn Asp Pro Asp Asn Ile Ile Ile Val Gly Thr Gly Thr Trp Ser Gln Asp
 1011 GTG AAT GAT GCT GCC GAT GAC CAG CTA AAA GAT GCA AAC GTT ATG TAC GCA CTT CAT TTT TAT
 Val Asn Asp Ala Ala Asp Asp Gln Leu Lys Asp Ala Asn Val MET Tyr Ala Leu His Phe Tyr
 1074 GCC GGC ACA CAC GGC CAA TTT TTA CGG GAT AAA GCA AAC TAT GCA CTC AGC AAA GGA GCA CCT
 Ala Gly Thr His Gly Gln Phe Leu Arg Asp Lys Ala Asn Tyr Ala Leu Ser Lys Gly Ala Pro
 1137 ATT TTT GTG ACA GAG TGG GGA ACA AGC GAC GCG TCT GGC AAT GGC GGT GTA TTC CTT GAT CAA
 Ile Phe Val Thr Glu Trp Gly Thr Ser Asp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Val Phe Leu Asp Gln
 1200 TCG AGG GAA TGG CTG AAA TAT CTC GAC AGC AAG ACC ATC AGC TGG GTG AAC TGG AAT CTT TCT
 Ser Arg Glu Trp Leu Lys Tyr Leu Asp Ser Lys Thr Ile Ser Trp Val Asn Trp Asn Leu Ser
 1263 GAT AAG CAG GAA TCA TCC TCA GCT TTA AAG CCG GGG GCA TCT AAA ACA GGC GGC TGG CGG TTG
 Asp Lys Gln Glu Ser Ser Ser Ala Leu Lys Pro Gly Ala Ser Lys Thr Gly Gly Trp Arg Leu
 1326 TCA GAT TTA TCT GCT TCA GGA ACA TTC GTT AGA GAA AAC ATT CTC GGC ACC AAA GAT GCG ACG
 Ser Asp Leu Ser Ala Ser Gly Thr Phe Val Arg Glu Asn Ile Leu Gly Thr Lys Asp Ala Thr
 1389 AAG GAC ATT CCT GAA ACG CCA GCA AAA GAT AAA CCC ACA CAG GAA AAC GGT ATT TCT GTA CAA
 Lys Asp Ile Pro Glu Thr Pro Ala Lys Asp Lys Pro Thr Gln Glu Asn Gly Ile Ser Val Gln
 1452 TAC AGA GCA GGG GAT GGG AGT ATG AAC AGC AAC CAA ATC CGT CCG CAG CTT CAA ATA AAA AAT
 Tyr Arg Ala Gly Asp Gly Ser MET Asn Ser Asn Gln Ile Arg Pro Gln Leu Gln Ile Lys Asn

1515 AAC GGC AAT ACC ACG GTT GAT TTA AAA GAT GTC ACT GCC CGT TAC TGG TAT AAA GCG AAA AAC
Asn Gly Asn Thr Thr Val Asp Leu Lys Asp Val Thr Ala Arg Tyr Trp Tyr Lys Ala Lys Asn
1578 AAA GGC CAA AAC GTT GAC TGT GAC TAC GCG CAG ATT GGA TGC GGC AAT GTG ACA CAC AAG TTT
Lys Gly Gln Asn Val Asp Cys Asp Tyr Ala Gln Ile Gly Cys Gly Asn Val Thr His Lys Phe
1641 GTG ACG TTG CAT AAA CCA AAG CAA GGT GCA GAT ACC TAT CTG GAA CTT GGG TTT AAA AAC GGA
Val Thr Leu His Lys Pro Lys Gln Gly Ala Asp Thr Tyr Leu Glu Leu Gly Phe Lys Asn Gly
1704 ACG CTG GGA CCG GGA GCA AGC ACA GGG AAT ATT CAG CTT CGT CTT CAC AAT GAT GAC TGG AGC
Thr Leu Gly Pro Gly Ala Ser Thr Gly Asn Ile Gln Leu Arg Leu His Asn Asp Asp Trp Ser
1767 AAT TAT GCA CAA AGC GGC GAT TAT TCC TTT TTC AAA TCA AAT ACG TTT AAA ACA ACG AAA AAA
Asn Tyr Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Ser Phe Phe Lys Ser Asn Thr Phe Lys Thr Thr Lys Lys
1830 ATC ACA TTA TAT GAT CAA GGA AAA CTG ATT TGG GGA ACA GAA CCA AAT TAG TTAAGCTTTTTTTGG
Ile Thr Leu Tyr Asp Gln Gly Lys Leu Ile Trp Gly Thr Glu Pro Asn Ter
1896 CGGACATCAGTAACGATGTCCGTTTTTATCATCTAATAGGAGGTTTGC GTTGTGGATGAAATACTGAAACAGTATATGGTGCT
1979 GTACAAAAAATGAGTAATATGATAAATGGTCCGGACTATCCAGGTAAGGAAAAAGACATCCAGCATCAAAAAGATCAGATCG
2062 AAGTTTACGAAAAACAGCTGCAGCAAGGATTTTCTACAGATTATGACTATGATGTGTTTGCTGATTCTGTTATCAAATGCGCA
2145 TATGGCGATATGACGCTGGAGGATTTAGAAGCCGTTTATTATGGATTGACAACACCATTTTTTTGATTTGTCATTGAGCAGTA
2228 AAATTTCAAATTTCAACTTCTGTCTCACTAAGTATACTTTGATATTGAGACAGAAATTTATTTATTTTGTACTTC
2311 CTAGAATATATATTATGTAACATAAAAAAGATGAAGA TTA AGC ATT TCT GTT TTT ATG TAC ATC CTT CTT
2381 CTT CTT TCT GTA ATT CAG CAA CAA AAT AAA AAA GCG ATT TCC CAA TCG GAA AAT CGC CAA TTC
2444 AGA CAC TCT ATT ATT TAT GTG TGC CTT ATG TGC TCT TAA CGA ATT TAC AAC AAA TGT TGT CAC
2507 GCT TTG AGC TGG AAG ATG GGC CCA AAA ATG ATT GCC TGA TAC AGT GCG ATT CGT TCC AGG TTG
2570 TAG ATT GCT GCT GCT GCT CGT GAT CCA TCT AGA TAC GTT TGA AGC AGA TCC ATT CTG CAA AAC
2633 AAA GTT TTG GTT GAC TCC TGT GTT GCT TTT ATT GAT GGC AAC AAT AAC GAC CTT GTT GTC ACC
2696 TTT ATA GGC TGA CAC GTA AAC GTT CGC ATT AGG GTT TTT CGT TGC ATC AAT CCT TAC ATA GCC
2759 GGG ACG CAC AAA CTT TGA GAA ATG AGC CAT ATT GTA GCC GCG TTT GCT GAT CGT ACC ATC TTC
2822 TTT CAT AGG TCC ATA TGA TCT TCG GAT GTA CCA CCA TAC ATA AGC TTG AAA GTC CCC CTC TAC
2885 CAT CGC ATT GTG AAT ATG CTG TGA AAC ATC CAA TGC CTC AGG CCA TCG ATC

Fig. 7. Nucleotide sequence of the downstream region of *B. licheniformis* maltogenic amylase gene. The amino acid deduced from the longest open reading frame is given in the three letter codon below the nucleotide sequence. Putative ribosome binding site (SD) and promoter sequence (-35 and -10) are underlined. Amino acids corresponding to the signal sequence are italicized.

되어 있는 다른 *Bacillus cellulase* 유전자들의 염기서열과 비교해본 결과, 79-23의 cellulase 구조 유전자 염기서열은 *B. subtilis* BSE616, *B. subtilis* 168과 *Bacillus* sp. D04의 cellulase 유전자의 염기배열과 높은 유사성을 보였다. 특히, 각 유전자들이 coding하는 아미노산의 서열을 비교해 보았을 때, catalytic domain 부위의 아미노산 서열은 대부분 동일하였으나 상대적으로 linker 부위와 cellulose binding domain (CBD) 부위의 아미노산 서열은 많이 달랐다. 실제, *B. subtilis* BSE616의 CMCase는 *E. coli* 내에서 CBD 부위가 protease에 의해 분해되어 활성을 보이는 효소의 분자량이 33 kDa로 되지만 pSW794의 경우에는 38 kDa의 분자량을 확인할 수가 있었다. 재조합 plasmid pSW794 내에 존재하는 79-23의 cellulase 유전자를 *celS*로 이름지었고, *celS* 유전자에 의해서 만들어지는 효소를 CelS 로 명명하였다.

그리고 *celS* 유전자의 0.47 kb downstream 부위에 *B. subtilis* 168의 *ynfF* 유전자와 거의 유사한 ORF가 N-terminal이 결손된 채로 클로닝되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 아미노산 상동성 조사를 통하여 이 유전자는 xylanase를 coding하고 있는 것으로 여겨진다.

(다) *E. coli* 형질전환체에서 생산되는 cellulase

CelS의 섬유가공용 효소로서의 적합성을 규명하기 위해서 재조합 *E. coli*로 부터 CelS를 정제하여 효소의 반응 특성을 조사하였다. 그런데, 최근 효소시장에서 사용량이 급격한 증가 추세에 있는 섬유가공용 효소로서의 cellulase는 그 반응 온도와 pH가 매우 중요하다. Cellulase 처리를

하는 면직류의 가공단계가 주로 고온과 중성 pH에서 이루어지고 있는데, 경석을 이용한 청바지 부분탈색 처리방법을 효소적 방법으로 대체하기 위해서는 얼룩이 지는 것을 방지하기 위해 중성에서 효소 처리를 하여야 하므로 중성 cellulase가 요구된다. 그러므로, 온도와 pH에 대한 CMCase의 반응 특성을 우선적으로 분석하였다. 그 결과, 55°C 와 pH 6.0 에서 최적 활성을 보였으나 중성 pH 에서도 85% 정도의 활성을 유지하고 있는 것으로 나타나 CelS 는 섬유가공용 효소로서의 이용 가능성이 높다고 하겠다 (Fig. 8). 한편 CelS의 작용 기작을 알아보기 위해서 CMC를 기질로 하여 효소 반응을 시켰을 때, CMC의 점도가 반응 초기에 급격히 낮아지는 것으로 보아 CelS는 endo-glucanase로 여겨진다. 그러나 정제된 효소는 CMC에 대해서 높은 활성을 보였을 뿐만 아니라 exoglucanase의 기질인 pNPC에 대해서도 활성을 보였다 (Table 4). 이와 같은 CelS 의 endo-와 exo-glucanase 의 양 기질을 분해할 수 있는 능력은 섬유가공용 효소로서의 용도에 또 다른 잇점을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

(라) *Bacillus* sp. 79-23 에서 생산되는 cellulase

재조합 *E. coli*로 부터 정제된 CelS와 모균이 생산하는 cellulase의 반응 특성을 비교해 보기 위해서 모균인 *Bacillus* sp. 79-23 으로 부터 CMCase를 정제하였다. 그런데 온도와 pH에 대한 두 효소의 반응 특성과 분자량은 비슷하였으나, 모균으로 부터 정제된 CMCase의 아미노 말단 서열이 Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Tyr 로 밝혀져서 CelS의 아미노 말단과 전혀 일치하지 않았다. 이와 같은 결과는 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보한 *Bacillus* sp. 79-23 에서 적어도 두 가지 이상의 cellulase가 생산이 되고 CelS가 minor cellulase라는 것을 의미한다.

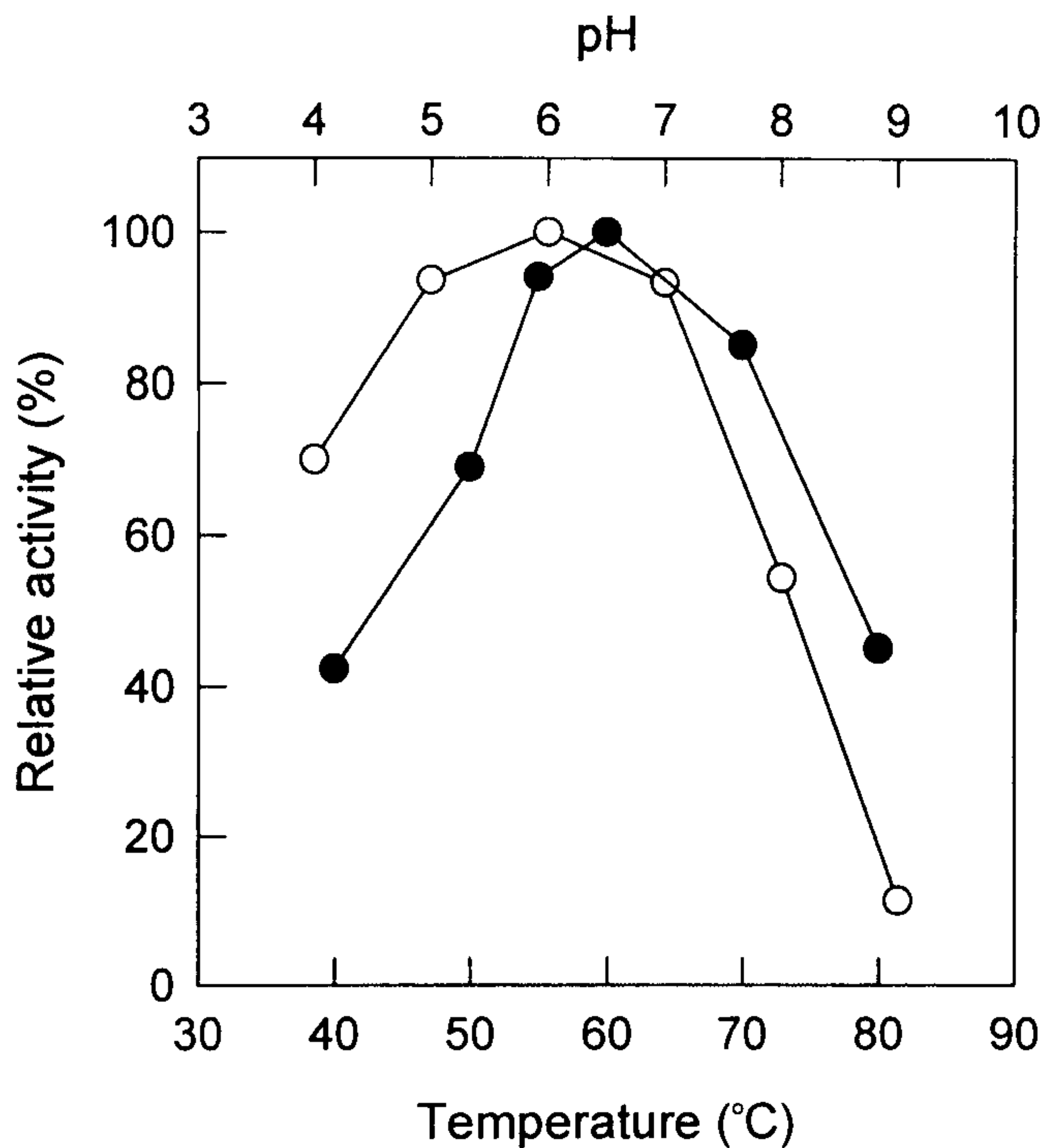


Fig. 8. Effects of temperature and pH on the CMCase activity. Temperature profile (-●-) was obtained by measuring the CMCase activities at pH 7.0 and different temperatures. The reactions were done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (-○-). The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 9.0, 50 mM Tris · HCl.

Table 4. Substrate specificity of cellulase encoded by the *celS* gene. All reactions were performed at 50°C in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) with the cellulase purified from the recombinant *E. coli* containing pSW794.

Substrate	Specific activity (Unit/mg protein)
Carboxymethylcellulose (CMC)	194.5
Lichenan	449.8
Laminarin	ND*
Oat spelt xylan	ND
Avicel	<0.1
<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-cellobiopyranoside (pNPC)	4.53
<i>p</i> -Nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG)	ND

*Not Detected.

나. *Bacillus licheniformis* 균주의 유전자 조작법 확립

산업용 효소 생산 균주로 오랫동안 발효산업에 이용되어지면서 축적되어진 경험을 토대로 하여 *B. licheniformis* 균주를 유전자 재조합 숙주균으로 개발하고자 하는 연구가 시도되고 있다. 그러나 형질전환법의 미확립으로 인하여 *B. licheniformis* 균주를 유전적으로 조작하여 산업용 효소 생산을 위한 재조합 균주를 개발하는 데에는 많은 어려움이 따르고 있다 (15). 지금까지 polyethylene glycol을 이용한 protoplast 방법에 의해 *B. licheniformis*의 형질전환이 시도되고 있으나, 형질전환 효율이 매우 낮을 뿐만 아니라 그 과정이 매우 복잡하고 시간이 너무 오래 걸린다는 단점이 있다. 그러므로 *B. licheniformis* 균주를 유전자 재조합 숙주균으

로 이용하기 위해서는 효율적인 형질전환법의 확립이 시급하다고 하겠다.

본 연구에서는 *B. licheniformis* ATCC 27811 균주와 pBC16 plasmid를 가지고 electroporation 방법으로 protoplast 방법보다 훨씬 효율이 좋고 빠르고 간단한 형질전환법을 개발하였다.

(1) 배양조건에 따른 형질전환의 영향

Electroporation cell을 만들기 위해서 *B. licheniformis* ATCC 27811 균주를 BHIS 배지에 접종하여 30℃에서 OD₆₀₀ 값이 0.25~0.3 (초기 대수기에 해당)이 될때까지 진탕 배양을 하였다.

그런데 *B. licheniformis* 균주를 osmotic stabilizer가 들어 있지 않은 일반 BHI 배지에서 배양을 하게 되면 electroporation buffer로 washing을 할 때 삼투압 변화에 매우 민감하여 대부분의 cell들이 죽게 된다. 그러나 osmotic stabilizer로써 0.25 M sucrose를 첨가한 BHI 배지 (BHIS)에서 *B. licheniformis* 균주를 배양을 했을 때, 세포의 생존율도 높아졌고 최적의 형질전환 효율을 나타냈다. 또한 30℃에서 배양을 하는 것이 37℃에서 배양을 하는 것 보다 형질전환 효율에 더욱 좋은 것으로 나타났다.

한편 *B. licheniformis* 균주의 성장 정도에 따른 영향을 조사하기 위해서 초기 대수기와 중기 대수기, 말기 대수기, 정체기에 있는 균체들을 회수하여 electroporation을 수행한 결과, early-exponential phase (OD₆₀₀ = 0.25-0.3) 상태에 있는 균체들을 사용했을 때가 가장 높은 형질전환 효율을 보였다.

(2) 전기장 변화에 따른 형질전환의 영향

Field strength에 따른 형질전환 효율에 대한 영향을 살펴보기 위해서 5.0-12.5 kV/cm의 범위의 pulse를 *B. licheniformis* 균체에 가했다. 그 결과, 7.5 kV/cm의 전기장에서 가장 높은 형질전환 효율을 보였다 (Fig. 9A). 또한 pulse controller를 이용하여 sample의 저항을 달리 했을 때 pulse length에 영향을 주어 형질전환 효율이 달라지는 경우가 많기 때문에 7.5 kV/cm의 전기장에서 0-400Ω 범위의 저항을 선택하여 형질전환을 시도하였다 (Fig. 9B). 그 결과 300Ω의 저항을 선택하였을 때 최고의 형질전환 효율을 나타냈으며, 저항을 선택하지 않았을 때 보다 약 3배의 높은 형질전환 효율을 나타냈다. 특히 7.5 kV/cm, 25μF capacitance, 300Ω resistance의 조건으로 반복적인 electroporation을 수행하였을 때, 1×10^4 에서 2×10^5 (transformants/μg plasmid) 범위의 형질전환 효율을 항상 얻을 수 있었다. 이 정도의 형질전환 효율은 *B. licheniformis*의 routine한 유전자 조작은 가능한 수준이라고 판단된다.

(3) Electroporation buffer 조성에 따른 영향

B. licheniformis 균주의 최적화된 형질전환 조건을 조사하기 위해서 기존에 보고가 되어 있는 여러 종류의 세균을 위한 electroporation buffer를 적용해 형질전환을 시도해 보았다. 그 결과 *B. thuringiensis*를 위한 low-conductivity buffer인 EB (0.25 M sucrose, 1 mM MgCl₂)가 *B. licheniformis* 균주의 electroporation에 가장 효과적인 것으로 나타났다. 특히 *B. brevis* (13)의 경우에 PEG 6000이 electroporation efficiency를 크게 증진시키는 것으로 보고가 되어 있으나, *B. licheniformis*의 경우에는 1 mM HEPES를 포함한 15% PEG 6000 buffer (pH 7.0)를 사용했을 때 오히려 형질전환 효율이 크게 감소하였다.

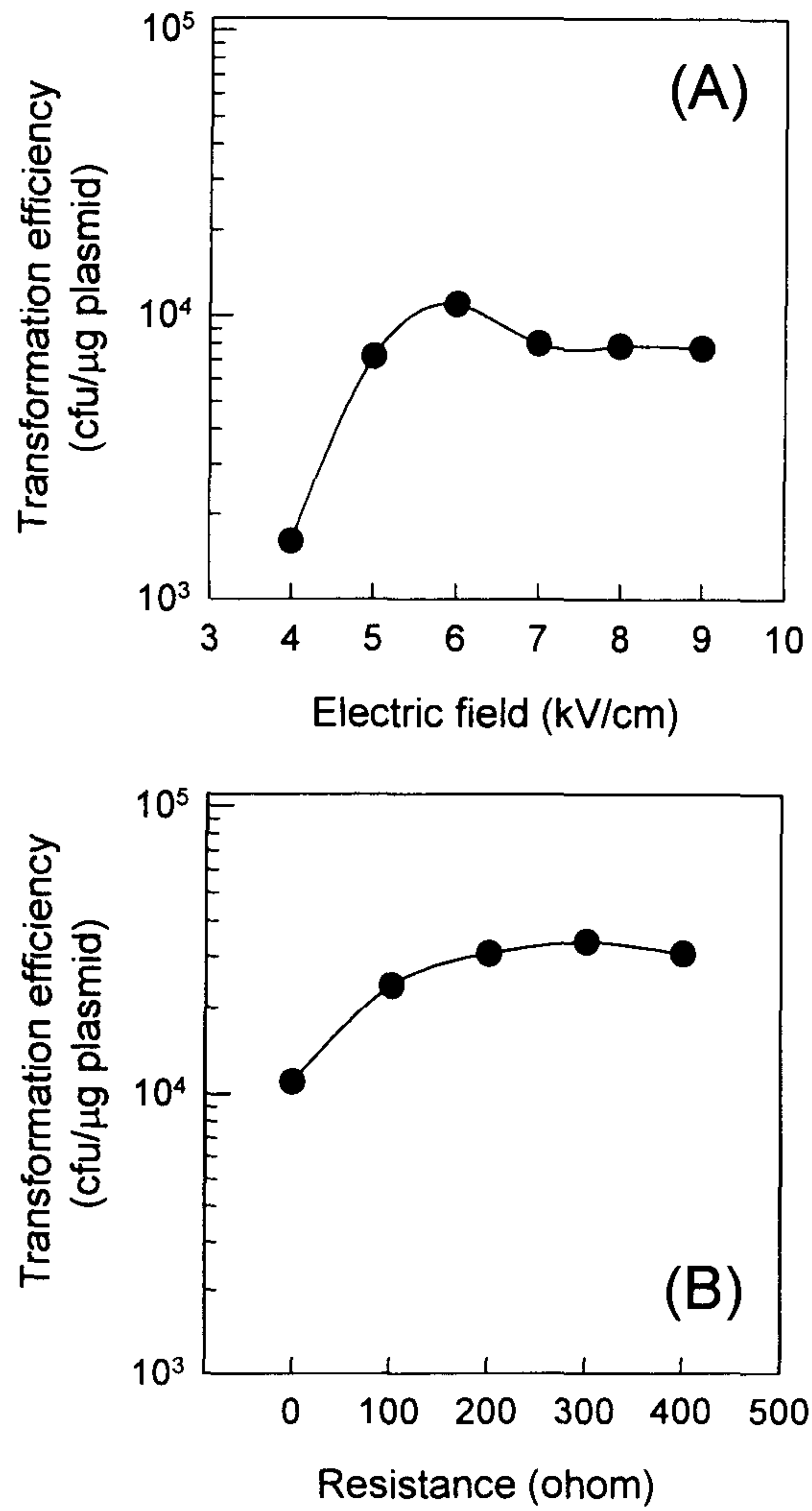


Fig. 9. Effect of field strength on transformation efficiency with *B. licheniformis* ATCC 27811. Panel A, effect on applied voltage; B, effect on sample resistance.

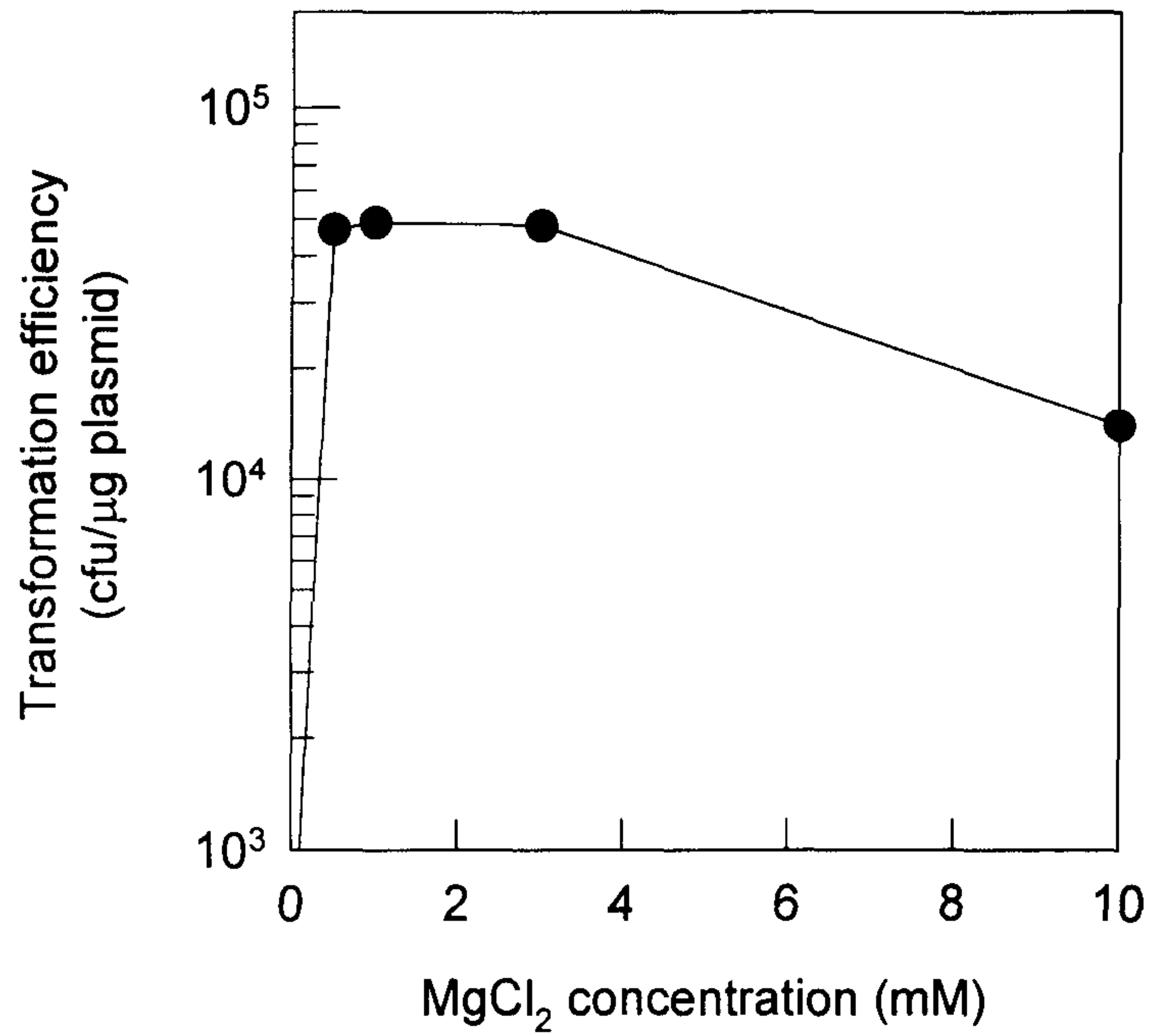


Fig. 10. Effect of MgCl₂ on transformation efficiency with *B. licheniformis* ATCC 27811.

한편 *B. licheniformis* 균주의 electroporation에 가장 효과적인 것으로 나타난 EB 용액 중의 $MgCl_2$ 농도를 달리하여 형질전환을 시도해 보았다 (Fig. 10). 그 결과, electroporation medium에 1 mM $MgCl_2$ 를 첨가하였을 때가 최고의 형질전환 효율을 나타냈으며 $MgCl_2$ 를 첨가하지 않았을 때 보다 형질전환이 약 100배 이상 높아졌다. 특히 1 mM $MgCl_2$ 대신에 1 mM $CaCl_2$ 를 첨가하였을 때는 오히려 형질전환 효율이 낮아지는 것으로 보아 균체의 세척과 electroporation medium에 1 mM $MgCl_2$ 를 사용하는 것이 중요한 인자 중의 하나라고 여겨진다.

다. *Bacillus* sp. 79-23 cellulase 유전자의 *Bacillus*에서의 과잉 발현

(1) Plasmid 상에서의 *celS* 유전자의 발현

Bacillus sp. 79-23 유래의 *celS* 유전자를 *Bacillus*에서 과잉발현시키고자 79-23 유래의 promoter와 S.D. sequence를 *B. subtilis* 유래의 강력한 promoter와 합성된 *B. subtilis*의 S.D. sequence로 대체하여 새로운 재조합 plasmid pJCMC를 제조하였다 (Fig. 11). 이 pJCMC plasmid가 *B. subtilis* DB104 내로 도입된 형질전환체를 LB배지에서 flask 배양을 했을 때, vector DNA 만을 포함하는 *B. subtilis* 형질전환체는 CMCase 활성을 거의 보이지 않는 반면에 *celS* 유전자를 포함하는 *B. subtilis* 형질전환체는 12시간 배양에서 8.5 unit/ml (1.4 units/ml/OD₆₀₀)의 최대 활성을 보였다 (Fig. 12). 이는 참여기업인 상우화학과 현재 세균성 cellulase를 상품화하기 위해서 경제성이 있다고 추정되는 생산성의 약 20% 정도에 해당되는 양이다. 또한, CelS의 분자량이 배양 시간이 지남에 따라서 52 kDa에서 38 kDa 으로 변하는 것을 확인할 수가 있었는데, 이것은 생성된

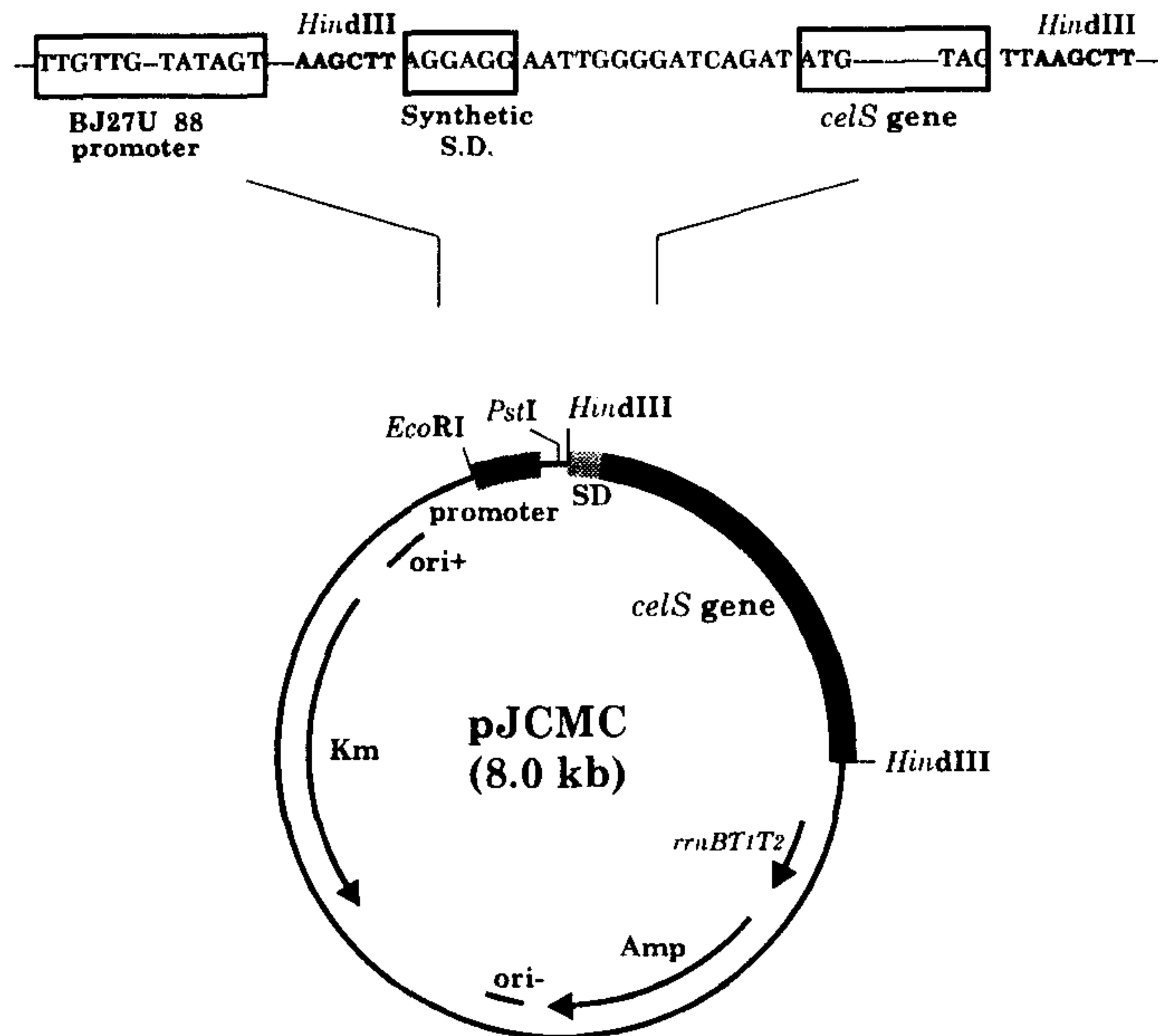


Fig. 11. Restriction map of the recombinant plasmid, pJCMC. *E. coli-Bacillus* shuttle vector, pJCMC, contains a modified *celS* gene by replacing its native promoter and Shine-Dalgarno sequence with a strong *B. subtilis* promoter and a synthetic SD sequence.

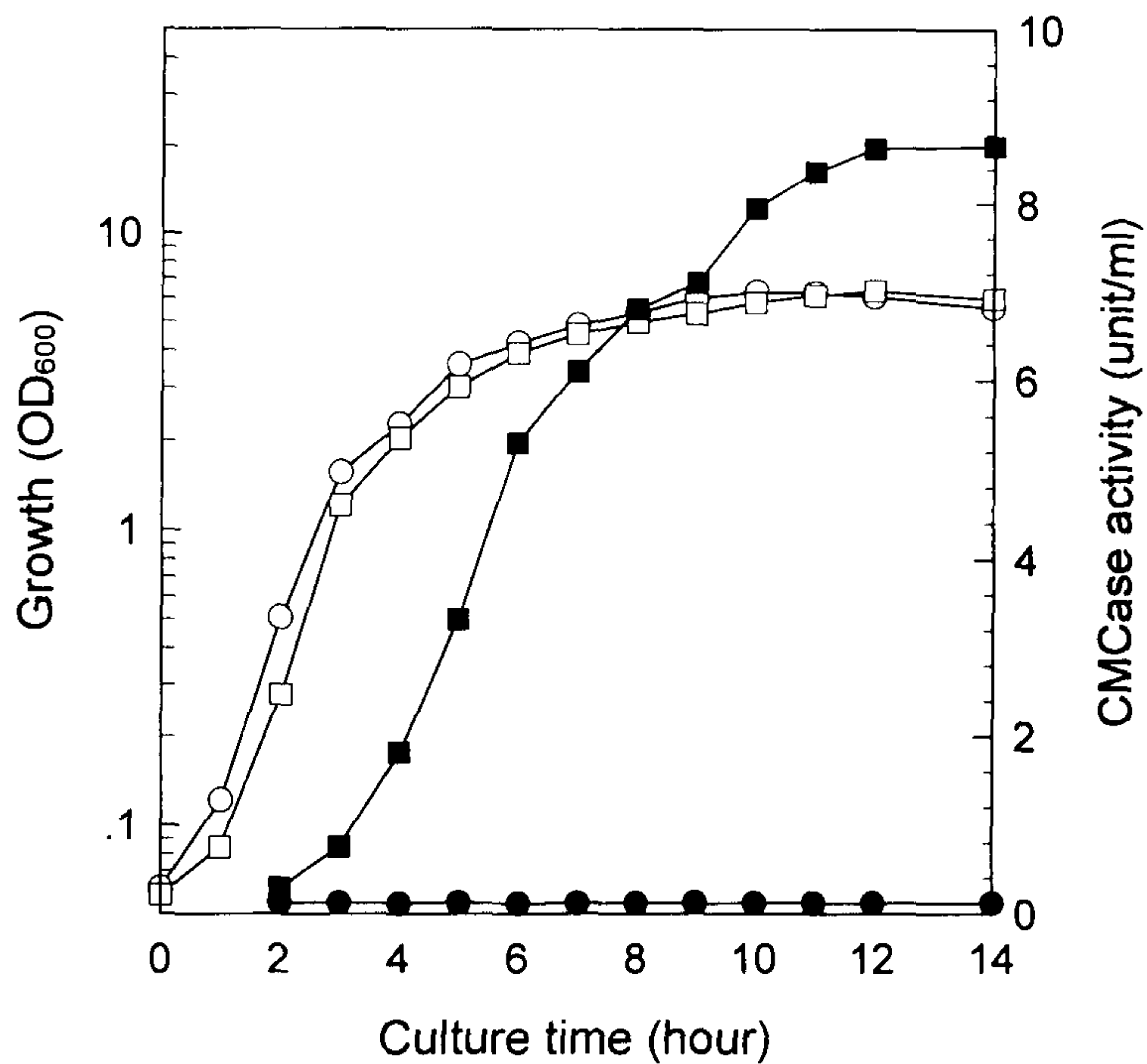


Fig. 12. Production of cellulase by the recombinant *B. subtilis* DB104 and their growth. Their growth and enzyme activities in the culture supernatants were observed periodically during growth in LB medium at 37°C. Symbols: Growth (○) and enzyme production (●) by *B. subtilis* containing vector alone; Growth (□) and enzyme production (■) by *B. subtilis* containing pJCMC.

단백질이 세포외 단백질 분해효소에 의해서 분해가 되어진 결과라고 추론된다.

그런데 *Bacillus* 형질전환체를 가지고 소규모의 flask 배양을 했을 때는 pJCMC plasmid가 안정하게 존재하는 것이 확인되었으나 항생제를 넣지 않은 배지에서 배양을 했을 때는 재조합 plasmid의 불안정성이 문제가 되었다. 일반적으로 *Bacillus*를 숙주균으로 하여 대량배양을 했을 때 재조합 plasmid의 일부가 생체 내에서 제거되거나 재배열되는 structural instability와 함께 재조합 plasmid가 세포분열시 상실되는 segregational instability가 높은 빈도로 일어난다 (3). 이러한 plasmid의 불안정성은 *Bacillus* vector로 개발된 대부분의 plasmid가 rolling-circle mechanism 방식에 의해서 복제가 된다는데에 기인한다. 또한 특정 유전자의 과잉발현을 유도하였을 때도 이러한 plasmid의 불안정성은 자주 발생한다. 재조합 *Bacillus*를 산업적으로 이용하기 위해서는 이러한 문제점들은 반드시 해결되어야 하는데, 일반적으로 염색체 상으로 도입된 외래 유전자는 plasmid 상에 있을 때보다 안정성이 훨씬 증가된다. 그러므로 근본적으로 이러한 plasmid instability를 해결하기 위해서는 외래 유전자를 plasmid DNA 보다는 염색체 DNA 상으로 도입하는 것이 바람직할 것이다.

(2) *Bacillus* 염색체 DNA 상에서의 *celS* 유전자의 발현

(가) Integration vector, pSI7 plasmid의 개발

Bacillus vector로 많이 사용되고 있는 *Staphylococcus aureus* 유래의 pUB110 plasmid는 rolling-circle mechanism에 의해서 복제가 되는데, 복제를 시작하기 위한 nick site로 이용되어지는 replication origin

(ori⁺)과 plasmid의 nick-closing의 활성을 갖는 replication initiation protein (Rep)의 존재가 필수적이다 (3). Integration vector, pSI7은 6.3 kb의 크기를 갖는 plasmid로써, pUC19 vector에 pUB110 유래의 단편들을 subcloning 한 것이다. pUC19 vector 내에 2개의 ori⁺ 단편을 가지고 있고, pUB110 유래의 kanamycin 저항성 유전자 (Km^r)를 가지고 있다. 또한, replication initiation protein을 coding하는 온전한 *rep* 유전자와 Rep protein을 만들 수 없는 불완전한 *rep* 유전자의 일부 단편 (Δrep)을 가지고 있다. pUB110 유래의 단편들의 사슬인 ori⁺- Δrep -Km^r- 와 -ori⁺-*rep*- 사이에 *Bacillus* 의 염색체 DNA와 상동성을 보이는 DNA 단편을 subcloning하기 위한 multiple cloning sites가 있다 (Fig. 13A).

새로이 개발된 integration vector, pSI7은 기존의 integration vector와는 전혀 다른 구조를 가지고 있다. 기존의 integration vector는 *E. coli*에서 작동하는 replication origin 만을 가지고 있어서 *Bacillus*내에서는 전혀 유지가 되지 않지만, pSI7은 *E. coli*에서 작동하는 replication origin과 *Bacillus*에서 작동하는 replication system을 모두 가지고 있다. Integration vector, pSI7을 *Bacillus* 내부로 도입을 하게 되면 *rep* 유전자의 발현에 의해서 Rep protein이 생겨날 뿐만 아니라, 2개의 ori⁺ 을 가지고 있기 때문에 pSI7 plasmid 내부의 2군데에서 nick-closing이 일어나게 된다. 따라서 *Bacillus* 내부로 도입된 pSI7 vector는 2개의 plasmid로 쪼개지게 되어있다 (15).

(나) *celS* 유전자를 *Bacillus* 염색체 내부로 도입하기 위한 integration vector, pSI7-S plasmid의 제조

Bacillus sp. 79-23 유래의 cellulase 유전자 (*celS*)를 plasmid DNA

상에서 발현시키는 대신에 *B. subtilis*의 염색체 DNA 상으로 *celS* 유전자를 integration시켜 *celS* 유전자를 안정적으로 과잉 발현시키기 위한 integration vector, pSI7-S를 제작하였다. Integration vector, pSI7-S는 pSI7 vector에 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 *celS* 유전자를 subclonig한 것이다 (Fig. 13B). 7.9 Kb의 크기를 갖는 pSI7-S vector를 *B. subtilis* 내부로 도입을 하게 되면, 4.1 kb의 크기를 갖는 plasmid (pSI7-S1)와 3.8 kb의 크기를 갖는 plasmid (pSI7-S2)로 나뉘지게 된다. pSI7-S1 plasmid는 ori^+ 와 *rep* 유전자를 가지고 있어서 복제는 가능하지만, Km^r 유전자가 없기 때문에 kanamycin이 들어있는 배지에서는 curing이 될 것이다. 또한, pSI7-S2 plasmid는 ori^+ 와 Km^r 유전자를 가지고 있지만 불완전한 *rep* 유전자를 가지고 있어서 Rep protein을 만들지 못하기 때문에 복제가 불가능하다. 따라서, pSI7-S2 plasmid 내부에 있는 *celS* 유전자와 염색체 상의 cellulase 유전자간의 homologous recombination에 의해서 pSI7-S2 plasmid가 염색체 내부로 intgration된 *B. subtilis* 형질전환체만이 kanamycin이 들어있는 배지에서 자랄 수 있을 것이다 (Fig. 14).

(다) *celS* 유전자의 *B. subtilis* 168 염색체 내부로의 도입

Bacillus sp. 79-23 유래의 *celS* 유전자를 *B. subtilis*의 염색체 상으로의 도입과 유전자 증폭을 도모하여 안정적으로 cellulase 유전자를 *Bacillus*에서 과잉 발현시키기 위해서, integration vector pSI7-S를 *B. subtilis* 168로 형질전환을 시도하였다. *Bacillus* sp. 79-23 유래의 *celS* 유전자와 *B. subtilis* 168 유래의 cellulase 유전자 간에는 높은 DNA 상동성을 보이기 때문에, pSI7-S의 progeny vector 중의 하나인 pSI7-S2 plasmid는 *B. subtilis* 168의 염색체 내로 homologous recombination에

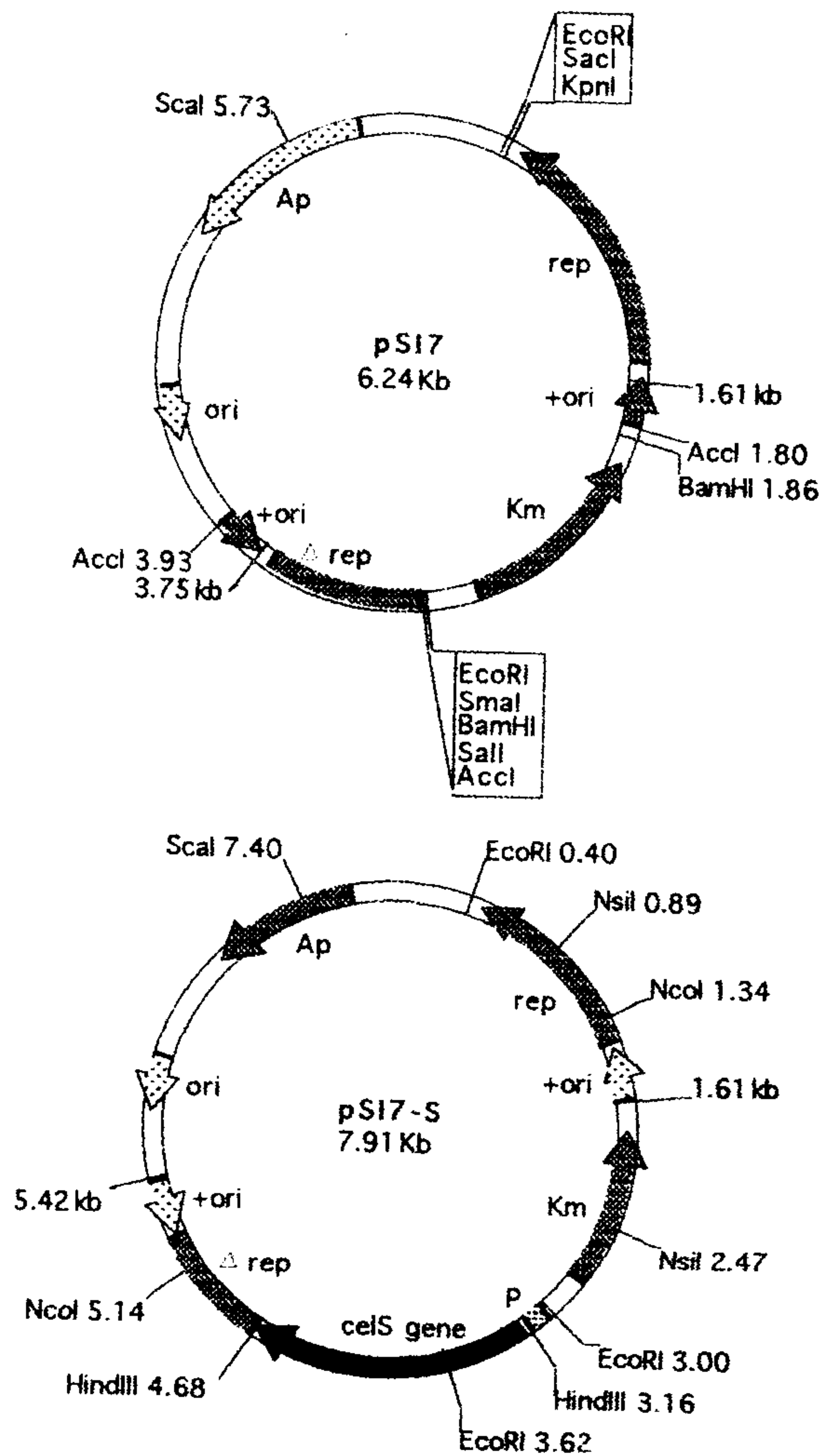


Fig. 13. Restriction map of integration vectors, pSI7 and pSI7-S. The numbers denote DNA size in kilobases. Abbreviations: rep, gene for replication initiation protein; Δ rep, truncated rep gene; celS gene, cellulase gene cloned from *Bacillus* sp. 79-23; Km, kanamycin-resistance gene; Ap, β -lactamase gene; P, *B. subtilis* promoter; +ori, plus origin of replication for pUB110; ori, replication origin for pUC19.

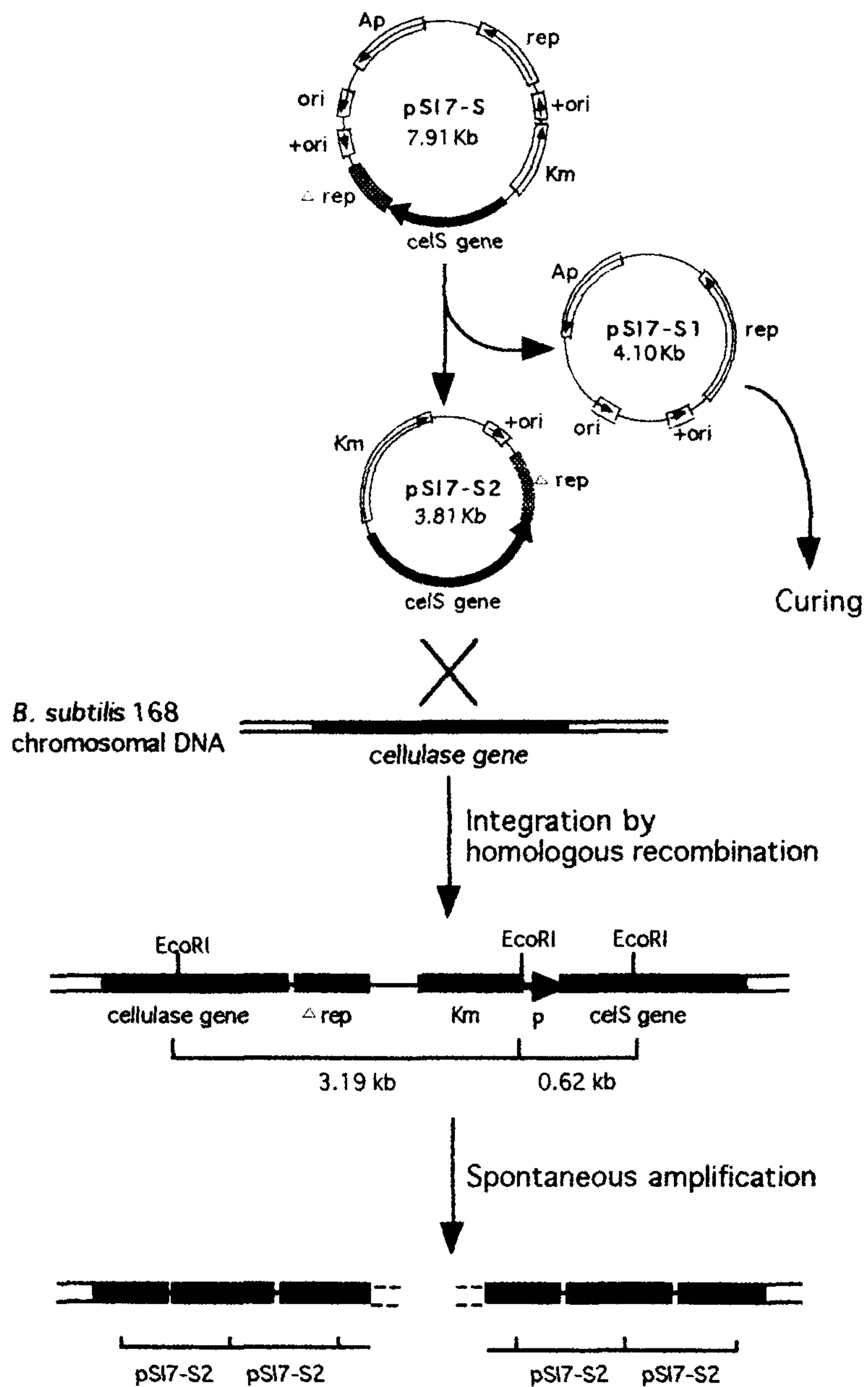


Fig. 14. Diagrammatic representation of the integration and amplification of the *celS* gene in the chromosome of *B. subtilis*.

의해서 integration이 될 것이다.

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin이 들어 있는 LB 배지에서 선별된 4마리의 *Bacillus* 형질전환체들을 항생제가 들어있지 않는 SpC 최소배지에서 2번 연속배양 후에 plasmid 분리를 시도하였다. 그러나 4마리의 형질전환체들 모두에서 integration에 사용된 plasmid가 존재하지 않는 것을 확인하였다. 그리고 형질전환체들의 CMC 분해환이 숙주균의 CMC 분해환보다는 아주 컸다. 특히 *Bacillus* 형질전환체들로부터 분리한 염색체 DNA를 사용하여 Km^r 유전자와 *celS* 유전자를 probe로 한 Southern hybridization 실험을 통해서, pSI7-S의 progeny vector 중의 하나인 pSI7-S2 plasmid가 *B. subtilis* 168의 염색체 내부로 integration 되었음을 확인할 수가 있었다.

(라) *B. subtilis* 168 염색체 DNA 내부에서 *celS* 유전자의 증폭

Kanamycin 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 들어 있는 SpC 배지에서 선별된 *Bacillus* 형질전환체들 중에서 1마리 (BS7S-20으로 명명함)를 가지고, 항생제 농도를 점차적으로 높여가면서 *B. subtilis* 168의 염색체상에서 cellulase 유전자가 증폭이 된 새로운 *Bacillus* 형질전환체를 선별하는 시도를 하였다. 먼저, SpC 최소배지 내의 kanamycin 농도를 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 점차적으로 높여가면서 37°C에서 진탕 배양을 하였다. 다음에는 kanamycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 자란 형질전환체를 가지고 kanamycin 농도를 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1 mg/ml 로 점차적으로 높여가면서 37°C에서 다시 진탕 배양을 하였다. Cellulase 유전자가 integration되어 있는 *Bacillus* 형질전환체는 kanamycin 1 mg/ml 의 농도에서도 잘 자랐다. 여러 가지의 항생제 농도에서 자란 *Bacillus* 형질전환체들의 cellulase 활성을 조사해 본 결

과, kanamycin 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 자란 형질전환체가 제일 높은 cellulase 활성을 보였다. BS7S-600으로 명명된 이 형질전환체로 부터 분리한 염색체 DNA를 분석해본 결과, *B. subtilis* 168의 염색체 DNA에 integration된 cellulase 유전자가 amplification이 된 것을 확인할 수가 있었다 (Fig. 15).

B. subtilis 168의 염색체 DNA 상에서 *celS* 유전자가 증폭이 된 BS7S-600 균주가 생산하는 cellulase의 효소 활성을 조사하기 위해서, kanamycin이 들어 있지 않은 LB 배지에서 flask 배양을 하면서 BS7S-600의 성장과 cellulase 활성을 조사하였다. 그 결과, BS7S-600은 13 시간 배양에서 2.7 units/ml의 최대 활성을 보였다. 이는 숙주균인 *B. subtilis* 168의 cellulase 활성보다 약 30배 가량 높아진 것이고, BS7S-20 보다는 약 7배가 증가한 것이다 (Fig. 16).

(마) 염색체 DNA 내부에서 증폭된 *celS* 유전자의 안정성

BS7S-600 균주의 염색체 DNA 내부에 존재하는 *celS* 유전자의 안정성을 살펴보기 위해서 항생제가 들어 있지 않은 LB 배지에서 12 시간 간격으로 계대 배양을 하면서 cellulase 활성을 측정하였다. BS7S-600 균주에서는 4번의 계대 배양 (48 시간 배양에 해당)을 했을 때에도 최초의 cellulase 활성의 약 70%를 유지하고 있음을 알 수가 있었다. 반면에, 재조합 plasmid를 가지고 있는 *B. subtilis* DB104 (pJCMC) 균주는 항생제가 들어있는 배지에서는 높은 cellulase 활성을 보였지만, 항생제가 없는 배지에서는 24 시간 배양 후부터 급격하게 cellulase 활성이 줄어들기 시작하더니 48 시간 배양에서는 최초 활성의 90% 이상이 실패되었다 (Fig. 17). 특히 *B. subtilis* DB104 (pJCMC) 균주에서는 pJCMC plasmid가

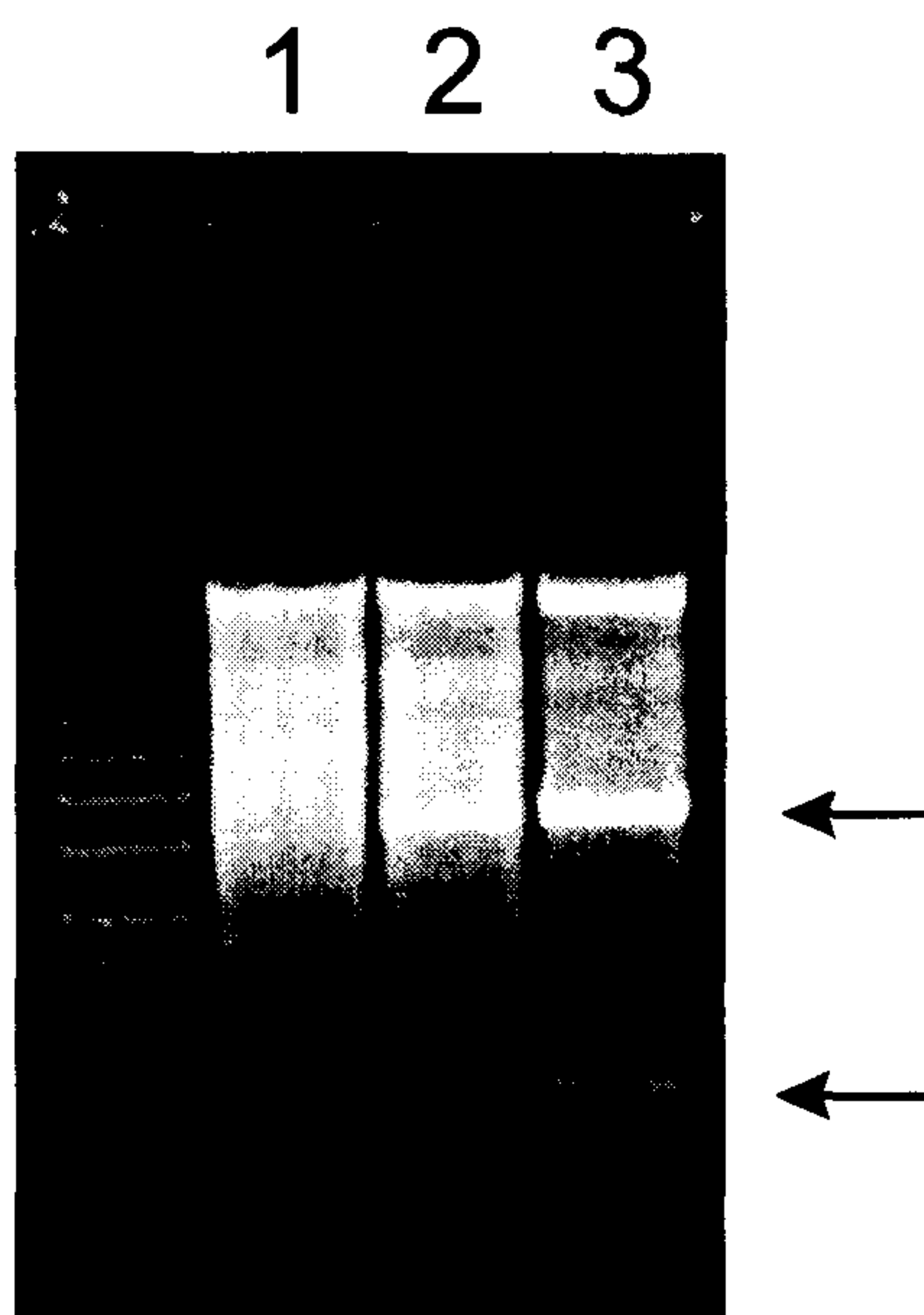


Fig. 15. Restriction analysis of the chromosomal DNAs prepared from *B. subtilis* strains. After complete digestion with *EcoRI*, the chromosomal DNAs were electrophoresed on a 0.8% agarose gel. Lane 1, *EcoRI*-digests of *B. subtilis* 168 chromosomal DNA; lane 2, *EcoRI*-digests of BS7S-20 chromosomal DNA; lane 3, *EcoRI*-digests of BS7S-600 chromosomal DNA.

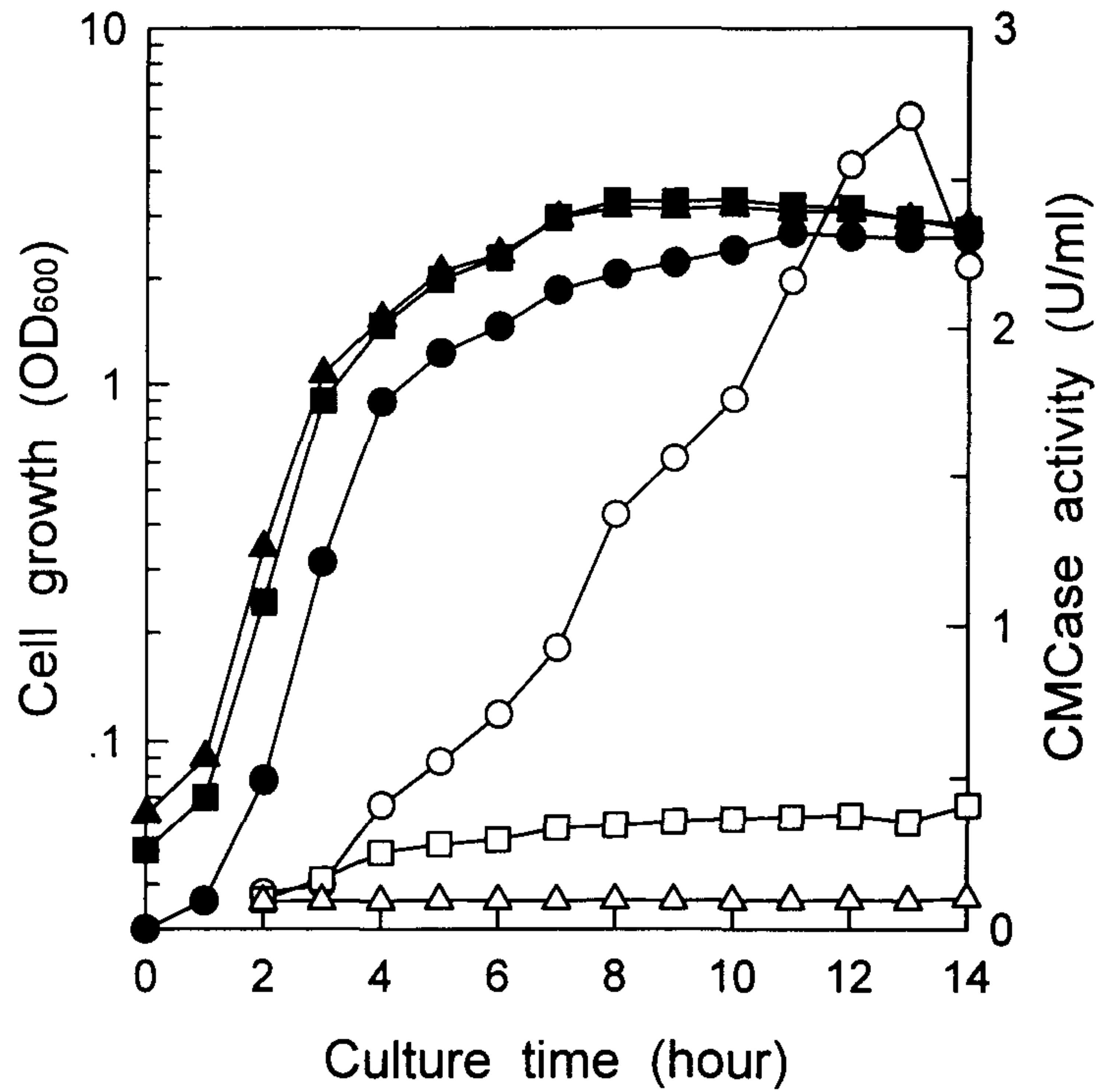


Fig. 16. Cellulase production by the derivatives of *B. subtilis* 168 during growth in antibiotic-free LB medium. Symbols: Growth (●) and enzyme production (○) by strain BS7S-600; growth (■) and enzyme production (□) by strain BS7S-20; growth (▲) and enzyme production (△) by *B. subtilis* 168.

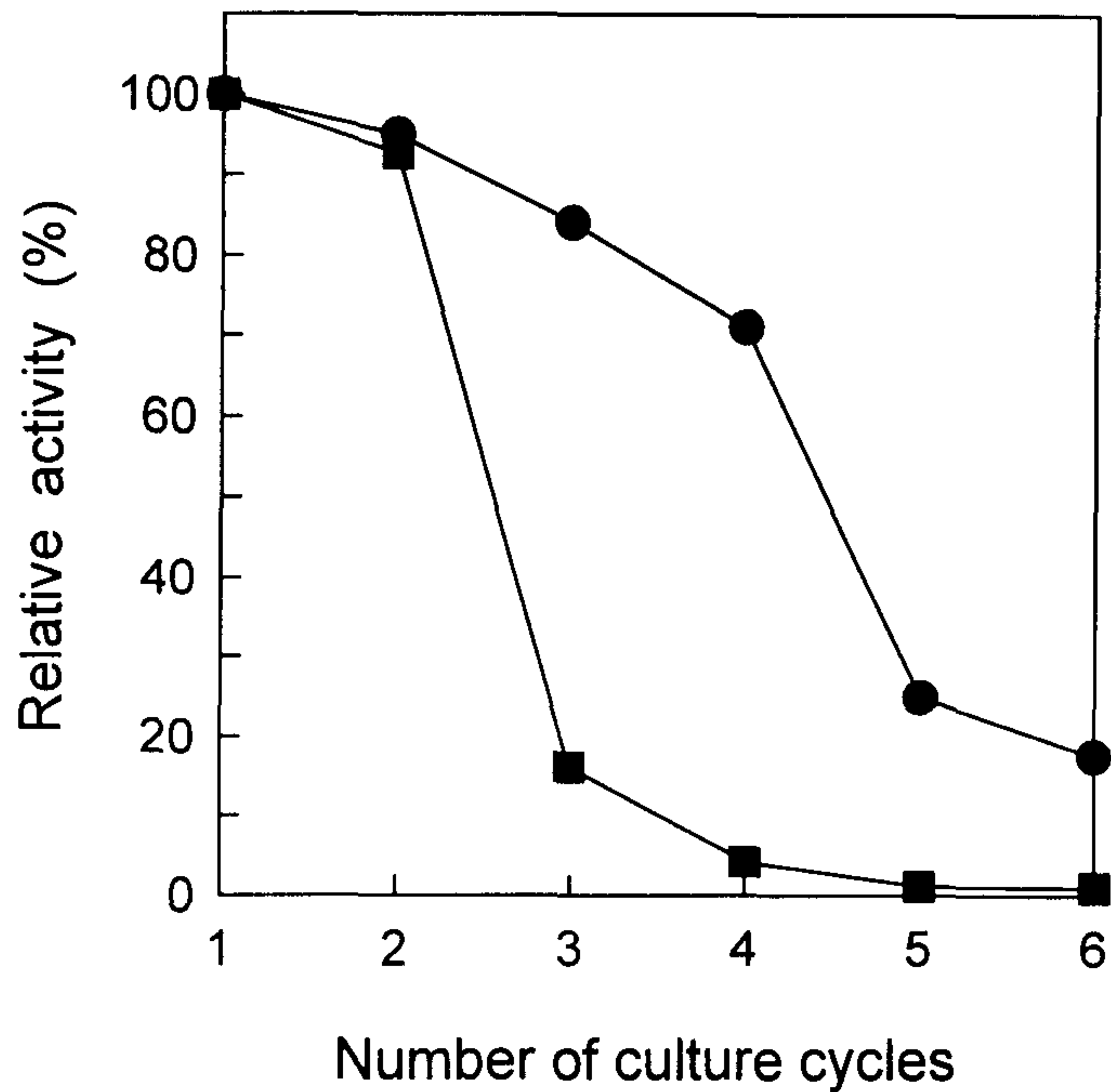


Fig. 17. Stability of cellulase production by BS7S-600 (●) and *B. subtilis* DB104 containing pJCMC (■) under non-selective conditions. BS7S-600 and *B. subtilis* (pJCMC) were streaked on agar plates supplemented with 600 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin, respectively. With fresh colonies, these *Bacillus* strains were grown in kanamycin-free LB broth for 12h at 37°C and then 1,000-fold diluted in 50 ml of fresh medium to start a new cycle.

모두 curing된 반면에 BS7S-600의 경우에는 6번의 연속적인 계대배양 후에도 어느정도 증폭된 *celS* 유전자 구조를 지니고 있었다. 이와 같이 염색체 상으로 도입된 *celS* 유전자가 plasmid 상에 있을 때보다 훨씬 안정성이 증가되는 것이 확인되었으므로, 재조합 *Bacillus*를 산업적으로 이용하기 위해서는 외래 유전자를 plasmid DNA 보다는 염색체 DNA 상으로 도입하는 것이 바람직할 것이다.

라. *Bacillus* sp. 79-23 cellulase의 섬유 가공에서의 효용성 조사

Bacillus sp. 79-23 유래의 cellulase (CelS)의 섬유가공 용도로써의 효용성을 조사해 보기 위해서 실제 섬유가공에 사용되는 천을 가지고 효소를 처리한 후에 천의 감량정도를 조사하였다. *B. subtilis* DB104 (pJCMC)가 생산하는 CelS를 농축한 후에 500 units의 효소를 순면에 처리했을 때, 외국에서 수입되고 있는 제품들에 의한 감량 효율과 비슷한 것이 확인되었다 (Table 5).

또한 실제 섬유가공에 사용되는 청바지 천 (denim)을 가지고 효소를 처리한 후에 denim의 감량정도와 탈색정도도 조사해 보았다. *B. subtilis* DB104 (pJCMC) 균주를 4ℓ의 LB 배지에서 배양한 후에, 배양상등액을 ammonium sulfate로 침전시켜 얻은 조 효소액에 Tween 80을 0.01%가 되게 첨가하여 약 7cm x 7cm 크기 (2.0 g)의 청바지 천에 효소 처리를 하였다 (pH 6.0, 40°C, 180 stroke (5cm)). 그 결과 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 CelS로 처리된 청바지 천의 감량정도는 12.5%로서, Novo사 제품을 사용하여 동일한 방법으로 효소 처리했을 때의 감량정도와 같게 나타났다. 또한, 효소 처리 후의 효소액의 색깔이 진한 청색을 보여 청바지 천의 탈색정도도 Novo사 제품과 비슷한 정도로 나타났다 (Table 6).

Table 5. Weight reduction of cotton fabric by cellulase-treatments

Cellulase	Fabric weight before cellulase-treatment	Fabric weight after cellulase-treatment*	Weight reduction
Control	0.65874 g	0.65812 g	0.09 %
핀란드 Noba	0.65536 g	0.62757 g	4.24 %
덴마크 Novo	0.61788 g	0.60042 g	2.82 %
CelS	0.68724 g	0.66264 g	3.57 %

* 500 Units of cellulase were used to investigate the weight reduction of cotton fabric. All reactions were performed at 50°C for 3 hours in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and then, the fabrics were dried at 80°C for 18 hours.

Table 6. Weight reduction and decolorization of denim fabric by cellulase-treatments

Cellulase	Fabric weight before treatment	Fabric weight after treatment	Weight reduction	Fabric color after treatment
Control	2.0 g	2.0 g	0.0 %	None
Novo 시제품	2.0 g	1.75 g	12.5 %	Deep blue
CelS 농축액	2.0 g	1.75 g	12.5 %	Deep blue

대규모 산업 현장에서의 효용성을 조사하기 위해서 *B. subtilis* DB104 (pJCMC) 균주를 30 l의 LB 배지에서 배양한 후에 얻은 배양 상등액을 thin layer vacuum evaporator를 이용하여 약 5배 정도로 농축하였다. 이 효소 농축액에 Tween 80을 첨가한 시료를 가지고 청바지 가공 공장에 의뢰를 하여 실제 산업 현장에서의 효용성을 조사하였다. 그 결과, 위에서와 마찬가지로 청바지 천의 감량정도와 탈색정도가 덴마크의 Novo사 제품과 비슷한 정도로 나타났다.

이와같은 순면과 denim에 대한 감량 효율과 denim의 탈색정도 조사를 통해서 *Bacillus* sp. 79-23 유래의 cellulase (CelS)가 섬유가공 목적에 적합한 것으로 판단되어진다. 또한, 단일 효소인 CelS가 그 성능면에 있어서 여러 종류의 cellulase가 들어있는 기존의 Novo사 제품에 뒤지지 않음을 확인하였다.

마. *Bacillus* sp. 79-23 균주의 효소 생산성 분석

아직까지 cellulase의 생합성 조절 기작이 확실하게 밝혀지지는 않았지만, 일반적으로 cellulase의 생합성은 섬유소보다 쉽게 대사될 수 있는 탄소원의 존재에 의해 억제되거나 섬유소와 섬유소 분해물에 의해 유도되는 2가지 조절 기작에 의해 cellulase의 합성이 이루어지는 것으로 알려져 있다 (1, 5). 전 단계 연구에서 토양으로 부터 분리하여 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보해놓은 중성·내열성 cellulase 생산균주 (*Bacillus* sp. 79-23)는 기존의 *B. subtilis* 표준균주 보다 높은 cellulase 생산성을 보였다. 그리고 미생물의 다당류 분해효소의 생산은 배양액 중의 탄소원에 의해 영향을 받는 경우가 많으므로 배지성분이 *Bacillus* sp. 79-23의 cellulase 생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

(1) 탄소원의 종류에 따른 효소 생산성

Bacillus sp. 79-23의 cellulase 생산성에 탄소원이 미치는 영향을 조사하기 위해서 LB 배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원으로 따로 멸균된 glucose, xylose, maltose, lactose를 1% (w/v), 전분, CMC, 볏짚 분말, 밀기울은 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 9~10 시간 배양하여 정지기에 이르렀을 때 배양상등액에 존재하는 cellulase 활성을 조사하였다 (Table 7). 밀기울, 볏짚 분말, maltose, glucose를 첨가하였을 때가 부가 탄소원을 첨가하지 않았을 때 보다 배양액당 효소의 생산성이 3배이상 향상되었다. 특히 밀기울과 볏짚 분말을 첨가한 경우에는 효소 생산량이 약 4배 이상 상승 되었음이 확인되었다.

Table 7. Effects of additional carbon sources on the CMCase production by *Bacillus* sp. 79-23.

Carbon	CMCase production (Unit/ml)	Relative productivity (%)
None	0.4	100
Glucose	1.3	325
Xylose	0.9	225
Maltose	1.4	350
Lactose	0.6	150
Starch	0.9	225
CMC	0.9	225
Rice straw	1.5	375
Wheat bran	1.7	425

(2) 질소원의 종류에 따른 효소 생산성

질소원이 cellulase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 *Bacillus*속 균주의 최소배지인 SpC 배지성분 중 ammonium sulfate를 제거하고 탄소원으로는 glucose (0.5%) 혹은 밀기울 (3.0%)을 첨가한 배지를 기본배지로 하여 질소원의 종류를 각각 달리하여 0.5%가 되도록 첨가한 후 배양하였다. 배양상등액에 존재하는 CMCase 활성을 측정된 결과, 무기질소원 보다는 유기질소원을 첨가하였을 때 효소 생산량이 많은 것으로 나타났으며 또한 부가 탄소원으로 glucose를 사용하였을 때 보다 밀기울을 사용하였을 때 효소 생산이 더 증대되었다 (Table 8). 특히 무기질소원을 함유한 배지에서는 탄소원으로 밀기울이 첨가되었을 때보다 glucose가 첨가되었을 때 훨씬 효소 생산량이 적었는데, 이는 밀기울에 존재하는 유기질소원의 이용에 따른 것으로 무기질소원만 이용할 때는 성장정도가 낮기 때문인 것으로 판단된다. 그리고, 사용된 유기질소원 중에서 polypeptone, yeast extract, casamino acid, tryptone, bacto peptone에 의해 비슷한 수준으로 효소 생산량이 증대되었으나, 이는 밀기울이 첨가된 LB 배지에서의 CMCase 생산성 보다는 낮았다.

(3) 벧짚과 밀기울의 첨가량이 효소 생산성에 미치는 영향

부가 탄소원 중 밀기울과 벧짚에 의한 효소 생산량의 증가는 이들 탄소원이 값싼 원료라는 측면에서 매우 의미가 있다고 평가된다. 그러므로 배지내 이들의 첨가량이 효소 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 배지에 이들의 양을 달리 첨가하고 효소 생산량을 조사한 결과, 밀기울 첨가량이 2%가 될 때까지 효소 생산량이 증가되었으며 그 이상에서는

Table 8. Effects of nitrogen sources on the cellulase production

Nitrogen	CMCase production (Unit/ml) in LB medium supplemented with	
	glucose	wheat bran
None	0.2	0.6
Ammonium sulfate	0.2	0.7
Ammonium chloride	0.2	0.6
Sodium nitrate	0.2	0.7
Yeast extract	0.5	1.0
Casamino acid	0.5	0.9
Bacto-peptone	0.4	0.9
Tryptone	0.4	0.9
Polypeptone	0.6	1.0
Skim milk	0.3	0.7
Soybean paste	0.2	0.6

Table 9. Effects of various amounts of wheat bran and rice straw on the CMCase production by *Bacillus* sp. 79-23.

	CMCase production (Unit/ml)	Relative productivity (%)
None	0.4	100
Wheat bran		
0.5%	1.6	400
1.0%	2.5	625
2.0%	3.8	950
3.0%	4.0	1,000
4.0%	3.9	975
5.0%	4.0	1,000
Rice straw		
0.1%	1.0	250
0.3%	1.0	250
0.5%	1.4	350
0.7%	1.0	250
1.0%	1.1	275
3.0%	0.8	200

효소 생산량의 변화가 크게 일어나지 않았다 (Table 9). 벧짚의 경우에는 0.5%를 첨가하였을 때 가장 효소 생산량이 높았으나, 그 이상이나 이하의 양에서는 생산량이 감소하였다. 또한, 밀기울을 그대로 첨가하였을 때 생산량이 가장 우수하였으며, 이에 비해 밀기울 중의 수용성 성분만을 첨가한 배지에서는 약 38%, 불용성 성분만을 첨가한 배지에서는 58%의 효소 생산성을 보이는 것으로 보아 밀기울에 존재하는 물질 중 불용성 성분과 수용성 성분이 모두 효소 생산량 증대에 관여하는 것으로 판단된다.

(4) *Bacillus* sp. 79-23의 성장에 따른 cellulase의 생산

효소 생산량 증가가 미생물의 성장정도의 증가에 기인된 것인지 아닌지를 검토하기 위해서 탄소원을 첨가하지 않은 LB 배지와 부가 탄소원으로 밀기울이 첨가된 LB 배지를 이용하여 미생물의 성장과 효소 생산과의 관계를 조사하였다 (Fig. 18). *Bacillus* sp. 79-23는 두 배지에서 모두 매우 빠른 성장을 하였으며 성장정도도 유사하여 약 6시간 후에는 정지기에 이르는 것으로 나타났다. LB 배지에서는 생산성 증가정도가 미약하여 0.39 unit/ml 이었으나 밀기울을 첨가한 배지에서는 4.0 unit/ml로 밀기울에 의해 약 10배 이상 효소 생산성이 높은 것으로 나타났다. 또한, 24시간 후에 배양액의 효소활성을 측정된 결과 LB 배지에서는 배양상등액의 CMCase 활성이 0.33 unit/ml로 약간 줄어들었지만 밀기울을 첨가한 배지에서는 5.2 unit/ml로 10시간 배양하였을 때 보다 증가된 것으로 확인되었다. 이와 같이 균의 성장정도에는 차이가 없는데도 불구하고 밀기울 첨가에 의해 효소의 생산성이 증가되는 것으로 보아 밀기울에 존재하는 물질들에 의해 CMCase 생산이 유도되는 것을 알 수 있었다.

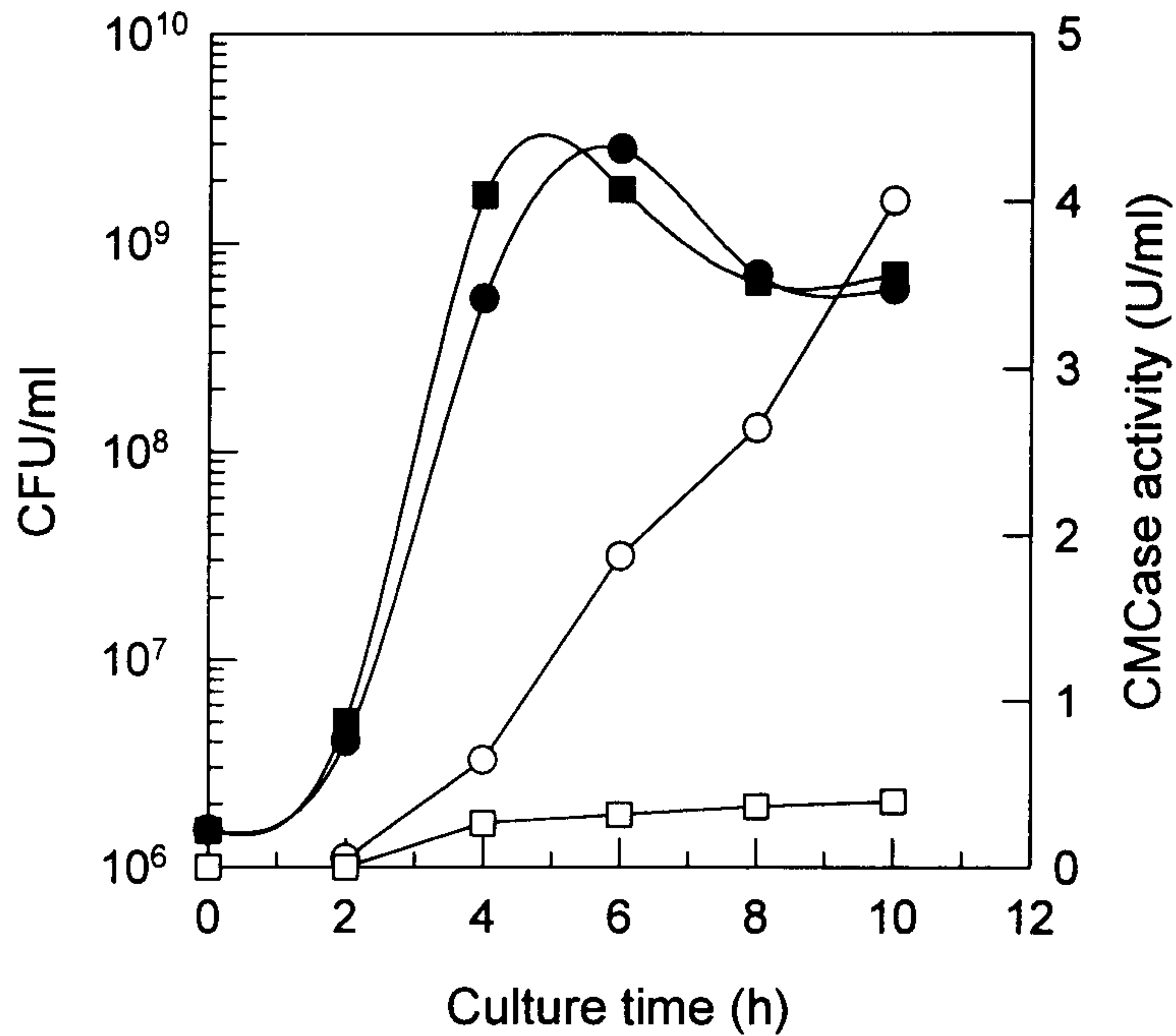


Fig. 18. Growth and CMCase production of *Bacillus* sp. 79-23. *Bacillus* sp. 79-23 was grown respectively in LB broth (squares) and LB broth supplemented with 3% wheat bran (circles) at 37°C with vigorous shaking. The colony forming units of culture broth (closed symbols) were determined by measuring numbers of colonies formed on the LB agar plates. CMCase activities (open symbols) were determined with the culture supernatants.

(5) *Bacillus* sp. 79-23 균주와 다른 *B. subtilis* 균주의 cellulase 생산성 비교

B. subtilis 균으로 동정된 *Bacillus* sp. 79-23 균주와 대조균주로서 *B. subtilis* 168 및 *B. subtilis* DB104 균주의 cellulase 생산성을 비교 검토하였다. 이들 세가지 균주들을 탄소원을 첨가하지 않은 LB 배지와 부가 탄소원으로 밀기울을 3% 첨가한 LB 배지에 각각 접종하여 37°C에서 14시간 진탕배양한 후에 생균수와 cellulase 활성을 조사하였다 (Table 10). 그 결과, LB 배지에서 배양을 했을 때 *Bacillus* sp. 79-23 균주의 cellulase 활성은 0.46 unit/ml로서 대조균주들의 효소 활성인 0.11 unit/ml 보다 약 4배가 높았다. 특히 고체배지 상에서 *Bacillus* sp. 79-23 균주에 의한 CMC 분해환이 대조균주들의 분해환 보다 훨씬 큰 것으로 보아 *Bacillus* sp. 79-23 균주의 cellulase 생산성이 우수함을 알 수 있었다.

Table 10. Cellulase production by *Bacillus* sp. 79-23, *B. subtilis* 168 and *B. subtilis* DB104 strains.

Medium and Strains	Viable cells (cfu/ml)	Cellulase production (unit/ml)
LB medium only		
<i>Bacillus</i> sp. 79-23	1.0×10^9	0.461
<i>B. subtilis</i> 168	6.0×10^8	0.112
<i>B. subtilis</i> DB104	7.5×10^8	0.113
LB containing 3% wheat blan		
<i>Bacillus</i> sp. 79-23	3.4×10^9	9.07
<i>B. subtilis</i> 168	4.5×10^9	0.285
<i>B. subtilis</i> DB104	6.8×10^9	0.284

한편, 밀기울이 첨가된 LB 배지에서 배양을 했을 때에는 *Bacillus* sp. 79-23 균주와는 달리 대조균주들의 cellulase 생산은 약간밖에 증가하지 않아서 밀기울에 의한 효소생산의 유도 효과는 없는 것으로 나타났다. 그러나 *Bacillus* sp. 79-23 균주는 밀기울에 의해 효소 생산이 크게 증진되어 대조균주들 보다 약 30배 정도 높은 cellulase 활성을 나타냈다. 이러한 *Bacillus* sp. 79-23의 효소 생산량 증가는 이 균주로부터 CMCase 유전자를 크로닝하여 *B. subtilis*에서 과잉발현 시킴으로써 증가된 효소 생산량인 8.5 unit/ml과 비견될 수 있는 수준으로 평가되었다. 또한 *Bacillus* sp. 79-23의 돌연변이 유도를 통한 변이주 개발과 배양 방법의 최적화를 통해 CMCase의 생산성을 더 향상시킬 수 있을 것으로 판단되므로, 현재 면직물 가공효소로 이용되고 있는 곰팡이 유래의 산성 cellulase를 중성 cellulase로 대체하는데 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

전 단계 연구에서 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보된 내열성 α -amylase 생산균주와 중성 cellulase 생산균주로 부터 섬유가공용 효소 유전자를 크로닝하여 일차구조 분석을 완료함으로써 섬유가공용 효소 고생산성 균주의 분자유종을 위한 기반 유전자의 확보가 목표대로 달성이 되었다. 특히 *B. licheniformis*의 clustered amylase gene structure를 밝혀냄으로써 내열성 α -amylase 고 생산성 균주의 개발에 매우 유용한 정보를 확보하게 되었다.

산업용 효소 생산 균주로서 오랫동안 발효산업에 이용되어져 오고 있는 *B. licheniformis* 균주를 유전자 재조합 숙주균으로 개발하기 위한 방법의 일환으로 electroporation 방법을 이용한 효과적인 *B. licheniformis* 형질전환법을 개발하였다. 그리고 전 단계 연구에서 내열성 α -amylase 고생산성 균으로 개발된 *B. licheniformis* 변이주 SK-5와 SK-2에서 생산되는 내열성 α -amylase의 배양액에서의 안정성 확인 연구가 예정되로 진행되었다. 또한 섬유가공용 효소의 유전자원으로 확보된 중성 cellulase 생산균주인 *Bacillus* sp. 79-23의 산업용 배지를 이용한 소규모 배양연구를 통해서 경제성이 인정되는 수준의 cellulase 생산성을 확보하게 되었다. 이와 같이 산업화 수준의 섬유가공용 효소 생산을 위한 *Bacillus* 균주의 분자유종을 위해서 *B. licheniformis* 균주와 *Bacillus* sp. 79-23 균주가 유전자 재조합 숙주균으로 개발됨으로써 당초 목표한대로 *Bacillus* 숙주균을 확보하게 되었다.

한편 *Bacillus* 유래의 강력한 promoter를 이용한 plasmid 고분비 발현계를 개발하였고 이를 이용한 cellulase 고생산 재조합 *Bacillus* 균주를 제작하였다. 또한 섬유가공용 효소 유전자를 *Bacillus*의 염색체 상으로

도입·증폭시켜 섬유가공용 효소 유전자를 안정적으로 과잉 발현시키기기 위한 염색체 발현계를 개발하였고 더불어서 염색체 공학 기술을 이용한 cellulase 고생산 균주를 개발하였다. 이와같이 섬유가공용 효소 유전자의 과잉발현을 위한 plasmid 발현계와 염색체 발현계가 성공적으로 개발되었다.

본 연구에서 개발된 유전자 고발현 system, 염색체 상에서의 유전자 증폭 system 및 기타 유전자 재조합 기술은 다른 종류의 효소 및 유용 물질 생산을 위한 균주 개발 연구에 널리 적용될 수 있으며 그 개발기간을 단축시키는데에 크게 기여할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

섬유가공용 효소 생산균의 개발과 이를 이용한 섬유가공용 효소의 산업적 생산을 위해서는 섬유가공 용도에 적합한 효소 유전자원의 확보와 외래 유전자를 고효율로 과잉 발현시킬 수 있는 숙주균 및 과잉 분비발현 계 그리고 재조합 미생물의 발효기술 개발이 요구된다고 하겠다. 특히 대규모 배양에서도 안정적으로 효소를 대량생산할 수 있는 재조합 *Bacillus* 균주의 개발이 가장 핵심이 되는 요소기술이라고 할 수 있을 것이다.

본 연구팀은 2단계 연구를 수행하는 과정에서 섬유가공에 적합한 효소 유전자원을 확보하여 특성 분석을 완료하였고, 실제 섬유산업 작업 현장에서도 섬유가공 용도로서의 그 성능을 검증받은 바 있다. 또한 *Bacillus* 형질전환법 및 외래 유전자의 고발현 system, 염색체상에서의 유전자 증폭 system 등 요소기술들을 구축함으로써 산업균주 개발의 토대를 마련하였다. 또한 2단계 연구에서 섬유가공용 효소 생산균으로 개발된 *B. licheniformis* 변이주와 *Bacillus* sp. 79-23 균주들의 소규모 배양연구를 통해서 경제성이 인정되는 수준의 효소 생산성을 확보하였다. 그러므로 이들 균들을 숙주균으로 사용하여 유전자 재조합 기술로 분자육종을 할 경우에 그 생산성은 외국과 경쟁할 수 있는 수준에 이를 수 있을 것으로 판단된다. 한편 참여기업인 (주)상우화학에서도 중온성 α -amylase 등 *Bacillus*가 생산하는 효소를 수년간 생산해 오면서 많은 *Bacillus* 배양기술이 축적되어 있는 상태이다. 그러므로 섬유가공용 효소생산 균주개발에 필요한 유전자 조작기술과 발효기술 등 본 연구팀에 축적된 기술 수준으로 보아 자체 연구에 의한 섬유가공용 효소 고생산성 균주 개발의 가능성

이 높다고 판단된다.

또한 효소와 재조합 단백질 생산성 향상을 위한 세계적 추세가 유전자 재조합 균주 개발을 통해 이루어지고 있다는 사실에 비추어 볼때, 고 생산성 산업 균주의 개발 기술은 국내 생물공학 기술의 선진화와 국제 생물공학 산업에 진출하기 위해서는 반드시 갖추어야 할 핵심 기술로 평가된다.

2. 타연구에의 응용

유전자 재조합 기술에 의해 섬유가공용 효소 유전자를 고효율로 분비할 수 있는 *Bacillus* 균주 개발에 대한 연구는 다른 종류의 유용효소를 비롯하여 고부가가치 유용물질, 의약품 단백질 등의 생산을 위한 균주개발 연구에 널리 적용될 수가 있으며 따라서 그 개발기간을 크게 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 개발된 여러가지 유전자 재조합 기술은 그 결과의 활용범위가 매우 넓어서 기술적, 경제적 파급효과가 매우 클 것으로 여겨진다.

3. 기업화 추진방안

가. 본 연구에서 개발하고 있는 효소 생산용 균주는 현재 산업적으로 절실히 요청되고 있는 것이며, 개발이 완료되는 즉시 산업적 생산에 이용이 될 수 있음.

나. 섬유가공용 효소 고생산성 *Bacillus* 속 균주의 개발에 따른 기술 및 자원을 본 연구에 참여하고 있는 기업체에 이전하여 산업화를 추진함.

- 다. 연구가 종료되기 이전이라도 가격 경쟁력이 있는 수준의 생산성이 확보되면 우선 국내 생산을 수행하여 섬유가공용 효소의 수입을 대체할 수 있도록함. 또한 지속적인 균주 개량과 발효기술 개발로 생산성을 향상시킴으로써 외국시장으로 진출케함.
- 라. 개발균주에 의해서 생산되는 효소의 새로운 용도를 개발하여 섬유 산업 뿐만 아니라 제지산업, 식품산업 등과 같이 다량의 효소를 사용하는 산업분야에서 활용될 수 있도록 함.
- 마. 본 연구에서 개발된 *Bacillus* 속주균과 고분비발현계를 다른 종류의 재조합 단백질의 산업적 생산에 확대 적용하여 고부가가치 단백질의 국내 생산에 활용토록함.

제 6 장 참 고 문 헌

1. Beguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* 44: 219-248.
2. Beveridge, T. J. *et al.* (1997) Functions of S-layers. *FEMS Microbiol. Rev.* 20: 99-149.
3. Bron, S. (1990) Plasmids. *In* Molecular Biological Methods for *Bacillus*, ed. by Harwood, C. R. and Cutting, S. M., John Wiley & Sons Ltd., UK, pp. 75-175.
4. Fleming, A. B., Tangney, M., Jorgensen, P. L., Diderichsen, B., and Priest, F. G. (1995) Extracellular enzyme synthesis in a sporulation-deficient strain of *Bacillus licheniformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3775-3780.
5. Gilbert, H. J., and Hazlewood, G. P. (1993) Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 187-194.
6. Gilkes, N. R., Henrissat, B., Kilburn, D. G., Miller, Jr., R. C., and Warren, R. A. J. (1991) Domains in microbial β -1,4-glycanases: sequence conservation, function, and enzyme families. *Microbiol. Rev.* 55: 303-315.
7. John, M., Rohrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., and Schell, J. (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 625-629.
8. Kallio, P., Palva, A., and Palva, I. (1987) Enhancement of α -amylase production by integrating and amplifying the α -amylase

- gene of *Bacillus amyloliquefaciens* in the genome of *Bacillus subtilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 64-71.
9. Kim, I.-C., Cha, J.-H., Kim, J.-R., Jang, S.-Y., Seo, B.-C., Cheong, T.-K., Lee, D. S., Choi, Y. D., and Park, K.-H. (1992) Catalytic properties of the cloned amylase from *Bacillus licheniformis*. *J. Biol. Chem.* 267: 22108-22114.
 10. Kunst, F. *et al.* (1997) The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390: 249-256.
 11. Linder, M. and Teeri, T. T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.* 57: 15-28.
 12. Millward-Sadler, S. J., Davidson, K., Hazlewood, G. P., Black, G. W., Gilbert, H. J., and Clarke, J. H. (1995) Novel cellulose-binding domains, NodB homologues and conserved modular architecture in xylanases from the aerobic soil bacteria *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* and *Cellvibrio mixtus*. *Biochem. J.* 312: 39-48.
 13. Okamoto, A., Kosugi, A., Koizumi, Y., Yanagida, F., and Udaka, S. (1997) High efficiency transformation of *Bacillus brevis* by electroporation. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 202-203.
 14. Stragier, P. (1996) Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* 30: 297-341.
 15. Tangney, M., Jorgensen, P. L., Diderichsen, B., and Jorgensen, S. T. (1995) A new method for integration and stable DNA amplification in poorly transformable bacilli. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 107-114.
 16. Tomme, P., Warren, R. A. J., and Gilkes, N. R. (1995) Cellulose

- hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 37: 1-81.
17. Tsujibo, H., Ohtsuki, T., Iio, T., Yamazaki, I., Miyamoto, K., Sugiyama, M., and Inamori, Y. (1997) Cloning and sequence analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 661-664.
 18. Van Rensburg, P. Van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S. (1998) Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast* 14: 67-76.
 19. Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., and Udaka, S. (1985) Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*. *J. Biochem.* 98: 1147-1156.

여 백

Bacillus 균주육종과 분비발현계 개발을 통한
산업적 이용 기술개발

(위탁과제 1)

연구책임자 : 박성수 (고려대학교 생명공학원)

연구원 : 성하진 (")

이영식 (")

이찬규 (")

조장훈 (")

여 백

1. 서 론

Bacillus licheniformis α -amylase는 29개의 아미노산으로 구성된 signal peptide를 가지며 483개의 아미노산으로 이루어진 분자량 약 55 kDa의 형태로 분비되는 효소이다. 그 유전자 (*amyL*)는 cloning 되어 완전한 염기서열이 밝혀졌다 (1).

몇 종의 *Bacillus* 균주들이 공업적으로 유용한 α -amylase를 분비하는데, *B. amyloliquefaciens*는 비교적 열에 불안정한 효소를 분비하고 *B. stearothermophilus*는 열에는 안정하나 염기성에서 쉽게 불활성화되는 효소를 생산한다. 이에 반해 *B. licheniformis*의 α -amylase는 높은 온도의 염기성 범위에서 실질적인 활성을 나타내는 것으로 알려진 열과 pH에 안정한 효소이다 (2). 이 같은 이유에 *B. licheniformis*의 α -amylase는 공업적으로 가장 광범위하게 사용되는 효소이다.

본 연구의 목적은 *B. licheniformis* wild-type 균주 (ATCC 27811)보다 α -amylase를 많이 생산하도록 인위적으로 돌연변이시킨 균주인 SK-5의 낮은 viability 단점을 극복하기 위해 SK-5 α -amylase 유전자를 *B. subtilis* 또는 *B. licheniformis* wild-type 균주에 도입시킴으로써 산업적으로 장점을 갖는 *B. licheniformis* α -amylase를 보다 더 대량생산하는데 있다.

2. 재료 및 실험방법

가. 사용균주와 plasmid

*B. licheniformis*는 SK-5와 ATCC 27811 균주들, *B. subtilis*는 WB600 (*trpC2 nprA apr epr bpf mpr nprB Cm^r*)과 KB600 (*trpC2 nprA apr epr bpf mpr nprB Cm^s*) 균주들, 그리고 *Escherichia coli*는 DH5a가 이용되었다. plasmid는 *E. coli* vector인 pUC18 또는 19, SK-5 *amyL* 유전자를 가지고 있는 pSW94H, *B. subtilis* vector인 pUB18, *cat* 유전자를 가지는 pEK106, *rpoD* operon의 promoter를 가지고 있는 pUC19-43R, *B. licheniformis* ATCC 27811로부터의 *sacQ* 유전자를 갖고 있는 pLSQ, *B. subtilis* subtilisin 유전자 (*aprE*)의 coding region만을 가지고 있는 pWP18 등이 사용되었다.

나. 배지

Plasmid 분리를 위하여 LB 배지가 이용되었고, *B. subtilis* 와 *B. licheniformis*의 sporulation 유도배지로 2×SG (1 mM Ca(NO₃)₂, 0.1 mM MnCl₂, 1 μM FeSO₄, 0.02% Glucose, 1.6% Nutrient broth, 0.05% MgSO₄, 0.2% KCl)가 사용되었고 plate 상에서 amylase 또는 protease의 활성을 조사하기 위해서는 이 배지에 최종 1% starch 또는 skim milk를 첨가하였다. *B. subtilis*의 형질전환을 위해서 Spizizen's minimal medium 이 이용되었고, *B. licheniformis* ATCC 27811 균주의 protoplast transformation을 위해서는 YTA (0.5% NaCl, 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract)와 ART (0.5% NaCl, 0.5% Yeast extract, 0.5% Tryptone, 0.6%

Tris, 0.5% Glucose, 17% Sucrose, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 0.5 mM MnSO₄, pH 8.4) 배지들이 사용되었다. *E. coli* 형질전환체의 선발을 위해서는 ampicillin이 최종 100 µg/ml의 농도에, *B. subtilis*의 경우는 kanamycin 또는 chloramphenicol이 각각 최종 5 µg/ml의 농도에, 그리고 *B. licheniformis*의 경우는 kanamycin 또는 chloramphenicol이 각각 최종 30 µg/ml의 농도가 이용되었다.

다. 유전자 조작

*E. coli*와 *B. subtilis*의 형질전환은 각각 CaCl₂ 그리고 natural transformation 방법을 이용하였다. restriction enzyme과 modifying enzyme들의 처리는 제조회사의 manual에 따라 이루어졌고, plasmid 및 chromosomal DNA의 분리는 각각 Maniatis *et al.* 과 Doi 방법을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *B. subtilis* 복합변이주 개발

*B. subtilis*에서 *B. licheniformis* SK-5의 α -amylase를 대량생산하는데 있어 *B. subtilis*로 부터 endogenous α -amylase가 생산되지 않도록 할 필요가 있다. 이러한 mutant 균주개발은 SK-5 α -amylase의 생산시 그 효소의 안정성 증대를 위해 6개의 단백질 분해효소 분비가 결여된 균

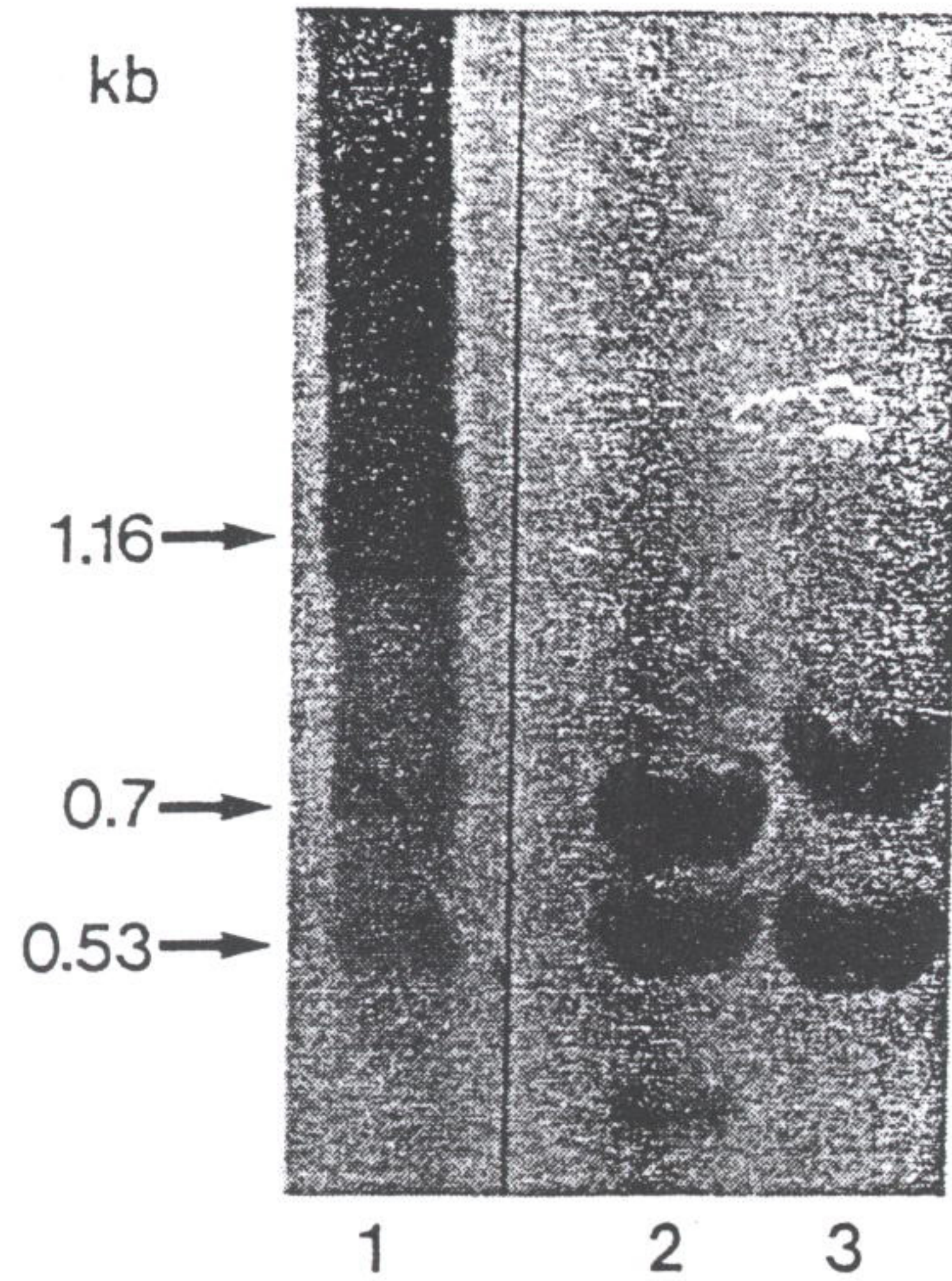


Fig. 1. Southern hybridization analysis with chromosomal DNAs from *B. subtilis* WB600 and KB700. This results shows that one *Sau3AI*-fragment within the probe binding region was absent in lane 3 because one *Sau3AI* site was deleted together with 0.28 kb *HpaI*-*NsiI* fragment. Lane 1, size marker (λ DNA cut with *DraI*); lane 2, chromosomal DNA of WB600 cut with *Sau3AI*; lane 3, chromosomal DNA of KB700 cut with *Sau3AI*.

주의 이용 (WB600), 그리고 gene conversion 방법 (3)을 이용해 균주내 염색체 상에 존재하는 α -amylase 유전자 (*amyE*)의 ribosome binding site를 포함하는 일정부위를 제거함으로써 이루어졌다 (Fig. 1). 개발된 mutant 균주 (KB700)는 α -amylase 활성을 나타내지 않았다.

나. *sacQ*-inducible system 개발

SacQ 단백질은 amylase를 포함하여 polymer들을 분해하는 효소들의 유전자 발현을 전사 (transcription) 단계에서 증대시킴으로써 결국 효소의 생산량을 증가시키는 인자이다. *B. subtilis* 보다는 *B. licheniformis*의 SacQ가 효소의 생산량 증대효과가 더 큰 것으로 알려져 있다 (4). 이 SacQ 단백질이 항상 생산이 되면 균주에 치명적인 악영향을 미치기 때문에 inducible system의 개발이 필요했다. *sacQ*-inducible system 개발을 위해 *B. licheniformis*의 *sacQ* 유전자를 이용하였고, 그 유전자의 induction은 temperature-sensitive cI repressor에 의해 조절되도록 하였다 (Fig. 2). 즉, 30°C에서 repressor는 활성을 가져 *sacQ* 유전자의 발현을 억제하는 반면, 42°C에서는 repressor가 활성을 잃어 *sacQ* 유전자의 발현이 가능하다. 개발된 *sacQ*-inducible cassette를 *B. subtilis* KB600 균주의 염색체에 삽입 (integration) 시킨 후 *sacQ* 유전자의 발현을 야기시켰을 때 그 균주 (KB601)의 endogenous α -amylase의 생산이 *sacQ* 유전자의 발현을 억제시켰을 때 보다 증가하였다 (Fig. 3).

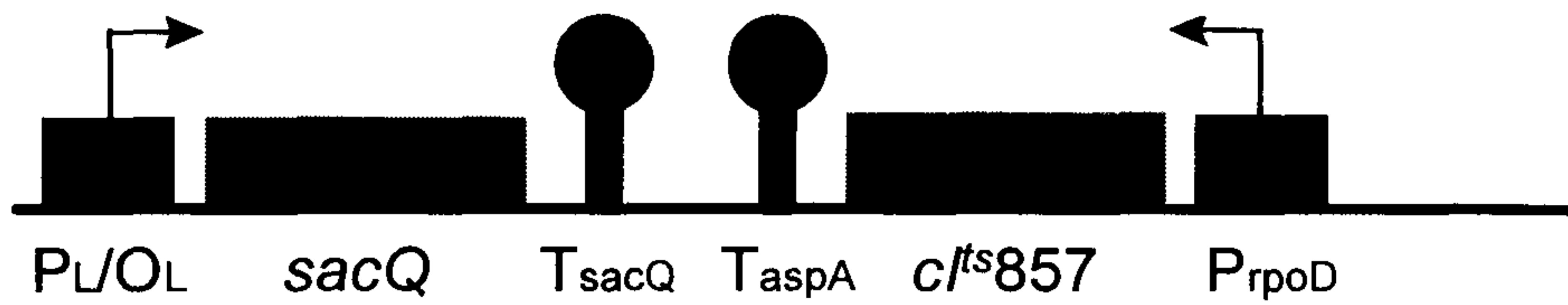


Fig. 2. Schematic representation of *sacQ*-inducible cassette. P_L/O_L , left promoter and operator of lambda; *sacQ*, *sacQ* gene from *B. licheniformis* ATCC 27811; T_{sacQ} , transcription terminator of *sacQ* gene; T_{aspA} , transcription terminator of *aspA* gene; cI^{ts857} , temperature-sensitive repressor gene of lambda; P_{rpoD} , promoter of *rpoD* operon.

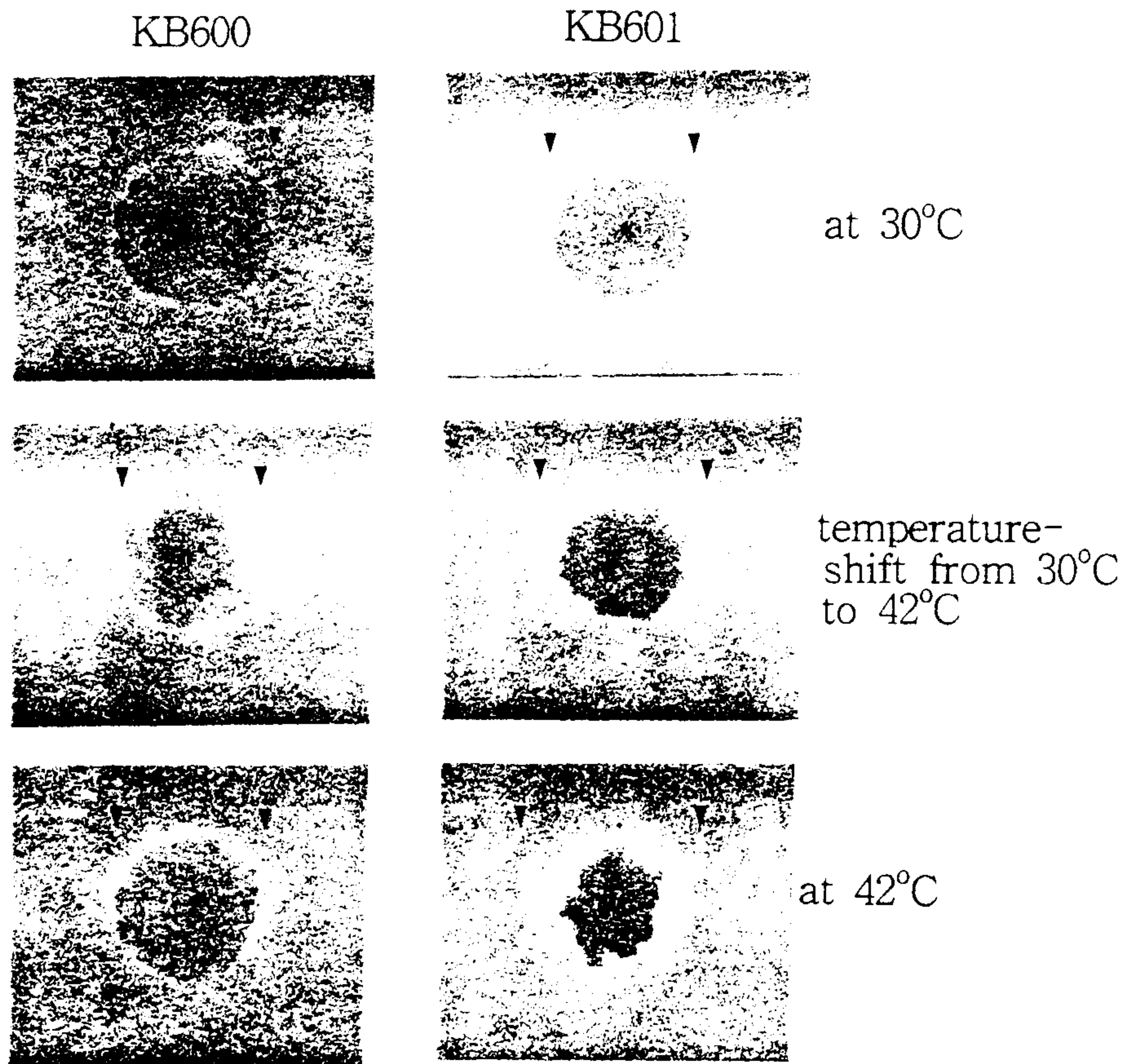


Fig. 3. Extracellular amylase levels of *B. subtilis* strains KB600 and KB601. *B. subtilis* strains KB600 and KB601 were grown on 2×SG plates containing 1% corn starch for 48 h at 30°C or 42°C. Temperature-shift from 30°C to 42°C was done after the incubation for 24 h at 30°C. The distance between two arrowheads is the diameter of halo generated from each strain.

다. fusion promoter의 개발

B. licheniformis SK-5의 *amyL* 유전자 발현은 예기치 않게도 SacQ 단백질에 의해 증가되지 않았다. 그러나 그 유전자의 promoter 활성은 매우 강하기 때문에 SacQ-responsive element를 *amyL* promoter의 upstream에 fusion을 시켜 SacQ 단백질에 의해 α -amylase의 생산을 더욱 증대시킬 수 있다. SacQ 단백질에 의해 발현이 증대되는 *B. subtilis amyE* 유전자로 부터 SacQ-responsive element를 가져와 현재 이 element를 *amyL* promoter의 upstream에 fusion을 시킨 후 exonuclease III를 이용해 deletion의 nested set을 만들어 위의 나항에서 만들어진 *B. subtilis* 균주내에서 SacQ 단백질에 대한 반응성을 조사하고 있다.

라. *B. licheniformis* ATCC 27811 균주의 형질전환 방법 확립

α -Amylase의 생산이 많은 *B. licheniformis* SK-5 균주는 electroporation 또는 protoplast 형질전환 방법들에 의해 형질전환이 되지 않았다. 그래서 *B. licheniformis*에서 SK-5의 α -amylase 대량생산 체계를 개발하기 위해서는 wild-type 균주인 ATCC 27811을 형질전환시키는 방법의 확립이 필요하였다. 개발된 형질전환 방법의 기본은 protoplast를 만드는데 있고 (Fig. 4), 형질전환율은 만족스러웠다.

마. SK-5 α -amylase를 대량생산하는 *B. licheniformis* 균주 개발

amyL 유전자를 multicopy plasmid인 pUB18에 도입시켜 만든 재조합 plasmid를 이용해 가항에서 개발된 *B. subtilis* 균주를 형질전환 시켰을때,

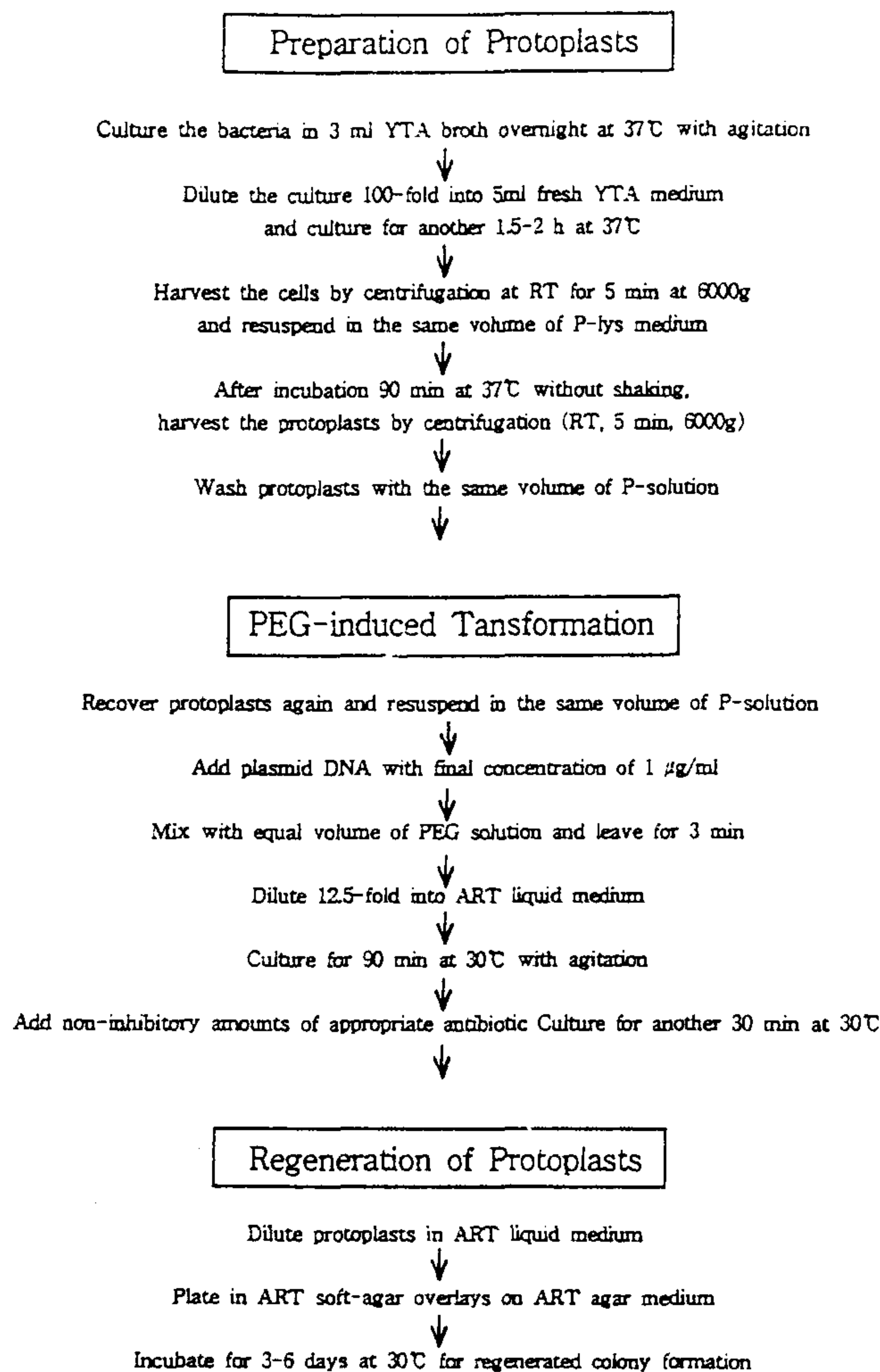


Fig 4. The procedure for transformation of *B. licheniformis* ATCC 27811 protoplasts by plasmid DNA. This procedure is composed of three steps, preparation of protoplasts, PEG-induced transformation and regeneration of protoplasts. 0.5 M sucrose was used in all media as osmotic stabilizer. P-solution, 1.25 g NH₄Cl, 15 g Tris, 0.075 g NaCl, 0.045 g KCl, 0.375 g Na₂SO₄·10H₂O, 5.33 g MgCl₂·6H₂O and 171.15 g sucrose per liter, pH 8.4; P-lys medium, P-solution containing 2 mg/ml lysozyme; PEG-solution, 60% (w/v) PEG6000 in P-solution; ART soft-agar and ART agar media, ART media containing 0.8% or 1.8% (w/v) agar, respectively.

그 형질전환체의 α -amylase 생산량은 *B. licheniformis* SK-5의 경우보다 적었다. 이에 반해 동일 재조합 plasmid를 이용해 *B. licheniformis* ATCC 27811를 형질전환시킨 경우 그 형질전환체가 *B. licheniformis* SK-5보다 많은 α -amylase를 생산하였다 (Fig. 5). 그러나 이 *B. licheniformis* 형질전환체는 재조합 plasmid를 계속 유지시키기 위해 kanamycin의 첨가를 필요로 하기때문에 산업적으로 이용하는데 있어 적절하지는 않다. 그래서 현재 kanamycin의 첨가가 없어도 *B. licheniformis* ATCC 27811 내에서 SK-5 *amyL* 유전자가 multicopy에 존재하도록, 그럼으로써 α -amylase의 생산량이 높은 균주를 transposon을 이용하여 개발중에 있다.

바. *B. licheniformis* SK-5로 부터 *amyL* 유전자의 activator 분리

B. licheniformis SK-5 *amyL* 유전자의 DNA 염기서열은 wild-type 균주의 *amyL* 유전자와 비교했을때 promoter에 2개의 염기 변화를 제외하고는 동일하다. *B. licheniformis* SK-5의 많은 α -amylase의 생산이 이 promoter의 up-mutation으로 부터 야기한 것인지를 확인하고자 SK-5 *amyL* 유전자를 wild-type 균주인 ATCC 27811의 염색체내로 삽입 (integration) 시켰으나 그 형질전환체는 wild-type 균주와 α -amylase의 생산에 있어 거의 유사하였다. 이러한 결과를 근거로 *B. licheniformis* SK-5 균주에는 wild-type과는 달리 *amyL* 유전자의 발현을 증가시키는 체계가 형성되어 있을 것이라고 단정할 수 있다. 지금까지 *Bacillus* species에서의 연구결과를 볼때 알려지지 않은 어느 유전자의 변이 (mutation)가 *amyL* 유전자의 발현을 증가 (activation)시키는 것이라고 생각된다. 이 activator를 cloning 하기 위해 먼저 SK-5 *amyL* 유전자의

promoter를 포함하는 DNA 절편의 downstream에 promoter가 제거된 *B. subtilis* subtilisin 유전자 (*aprE*)를 접합 (fusion)시켜 이를 *B. subtilis* KB600의 염색체내로 삽입 (integration)시켰다. 이후 이 균주와 *B. licheniformis* SK-5의 chromosomal DNA를 이용해 library를 만들어 증가된 subtilisin 활성을 보이는 형질전환체를 선발하였다 (Fig. 6). 형질전환체들로부터 plasmid를 분리하여 6개의 단백질 분해효소 분비가 결여된 *B. subtilis* KB600 균주를 형질전환 시켰을때 여전히 분비되어 나타나는 단백질 분해활성을 갖지 못하는 것으로 보아 plasmid내에 존재하는 insert는 SK-5 *amyL* 유전자의 발현을 전사 (transcription)단계에서 증가시키는 activator를 포함하고 있으리라 판단되고 현재 이 DNA 절편들을 분석중에 있다.

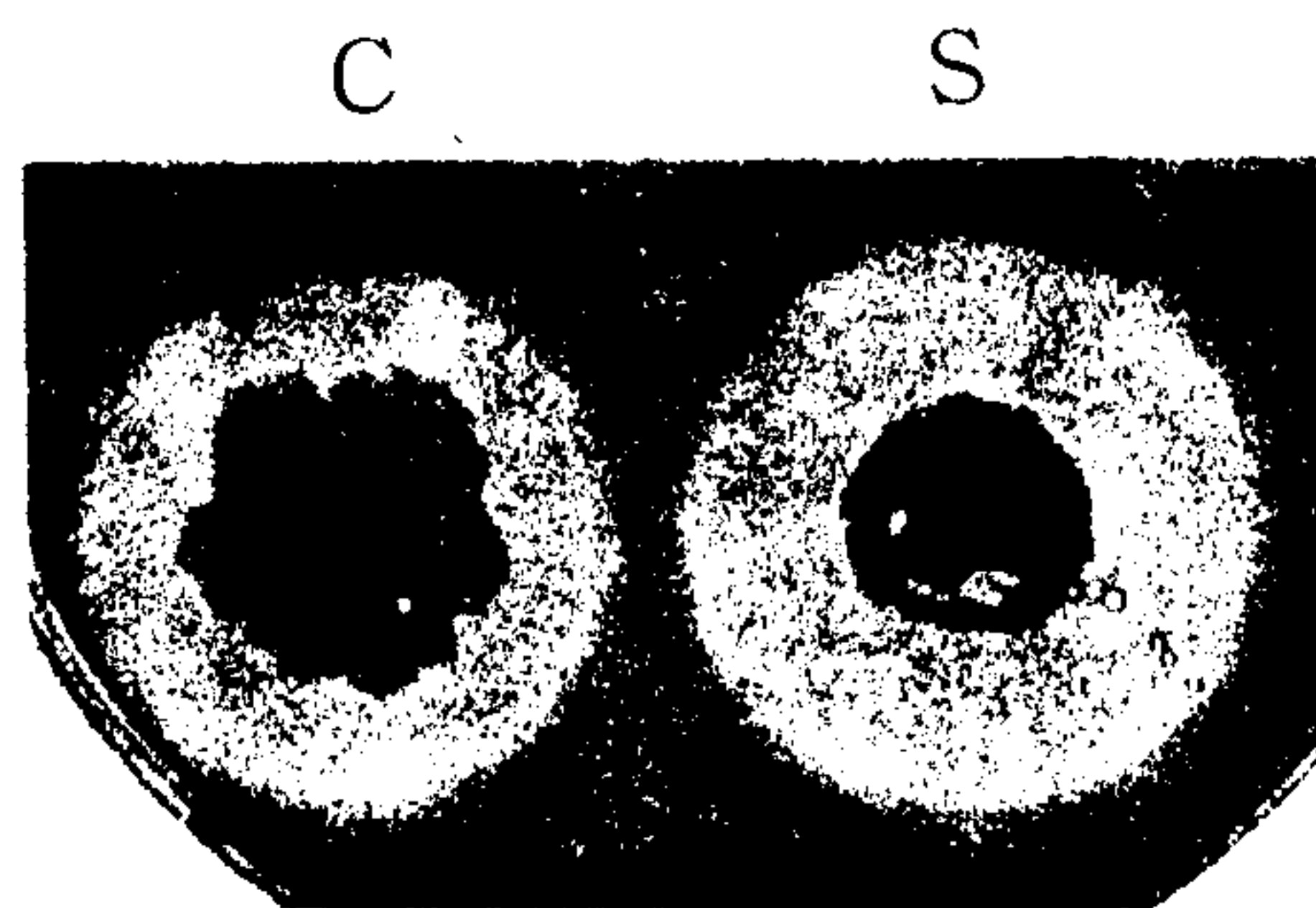


Fig. 6. Extracellular protease levels of two *B. subtilis* strains. C, control strain; S, control strain harboring pUB18 with activator gene.

4. 결론

B. licheniformis SK-5는 α -amylase를 대량생산하나 균주 자체가 불안정하고 growth rate이 너무 낮아 산업적 이용의 효율성이 낮았다. 본 연구의 결과, 즉 *B. licheniformis*의 형질전환 체계 확립, *amyL* 유전자의 activator 규명, *B. licheniformis* wild-type 균주내에 SK-5 *amyL* 유전자의 multicopy 확립등을 통해 SK-5 균주의 문제점을 해결하고 α -amylase를 *B. licheniformis* wild-type 균주에서 안정되게 대량생산할 수 있을 것이라고 생각되어진다.

5. 참고문헌

- ① Yuuki, T. et al. (1985). Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *B. licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α -amylase deduced from the DNA sequences. *J. Biochem.* 98, 1147-1156.
- ② Saito, N. (1973). A thermostable extracellular- α -amylase from *B. licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 290-298.
- ③ Iglesias, A., and Trautner, T. A. (1983). Plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: symmetry of gene conversion in transformation with a hybrid plasmid containing chromosomal DNA. *Mol. Gen. Genet.* 189, 73-76.
- ④ Amory, A. F. et al. (1987). Characterization of the *sacQ* genes from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169, 324-333.

여 백

전분과 섬유소분해효소의 구조변화 추적
및 안정성 증진

(위탁과제 2)

연구책임자 : 김 훈 (순천대학교 농화학과)

연구원 : 김 정 호 (")

“ : 정 허 진 (")

“ : 이 경 동 (")

여 백

제 1 장 서 론

외래유전자의 도입과 이의 발현, 그리고 이의 이용에 관한 관심들이 증가되면서 최근 이들의 세포외 분비생산 면에서의 투자가 급격히 늘어날 추세이다. 이의 수단으로 *B. subtilis*가 많은 각광을 받아 세포외 외래단백질 생산 균주로 선택되었고, β -lactamase를 비롯한 몇 호르몬 등의 유전자가 옮겨져 이들 유전자의 생성물을 얻는 데 성공하였다. 1992 년도에는 산업적으로 이용하는 효소시장이 8억 달러에 이르렀었고, 이의 약 3분의 2는 *Bacillus* 속에서 생산되었다. 그러나, 이들 생성물은 이 숙주세포의 세포외단백질 분해효소의 작용을 받아 자연상태에서 얻어지는 단백질과 다른 분자량 감소 등의 물리적 변화 및 이에 따른 화학적 성질의 변화 등이 관찰되었다. 이러한 문제를 극복하고자 *B. subtilis*의 세포외 단백질 분해효소 2 종류와 1 개의 세포내 단백질 분해효소의 유전자를 결손시켜 얻은 균주로 야생형의 균주보다 최고 9배의 cellulase를 얻은 사례도 있다. 그러나, 정지기 이후 생성 단백질들의 활성도는 미량의 여러 단백질 분해효소에 분해되는 문제점이 또한 발견되었다. *B. subtilis*의 cellulase가 *E. coli*나 *B. subtilis*에서 발현, 분비된 후 여러 종류의 크기의 단백질로 절단되는 유형의 결과도 보고된 바 있다 (1, 2).

본 과제 목적은 *B. licheniformis*의 α -amylase를 대상으로, 다량으로 발현 생산된 효소의 구조적인 변화의 유무와 효소의 안정성을 제공하는 요인을 확인하는 것이다. 이 효소의 존재와 유전자의 구조가 밝혀지고 (3, 4), 이 효소의 우수한 특성들이 보고되어 실제 산업에 이용하려는 단계에 까지 이르고 있으나 (5, 6, 7, 8), 경제적인 면에서의 다량의 α -amylase 생산부분과, 세포외 단백질 분해효소에 의한 효소 안정성의 문제점은 여전히 남아있다. 이러한 문제의 근본적인 해결을 위하여 균주 개

량의 차원과 *Bacillus* 속의 단백질분해효소의 결손주 제조 등의 각도에서의 접근이 이루어지고 있다. 실제 *B. subtilis*에서는 7개의 단백질 분해효소의 유전자의 구조가 밝혀졌고, 이들 모두를 불활성화시킨 돌연변이체들이 만들어졌다.

본 위탁과제에서는 세부과제에서 만든 α -amylase 다량 생산 돌연변이주들로 부터 생산한 α -amylase가 세포외로 분비된 후의 일차구조의 변화를 추적, 비교하려하며, 이 생산된 효소의 특성비교, 안정성 제공 물질 조사, 전분에 대한 결합력의 변화, 외부 단백질 분해효소에 따른 α -amylase의 인위적 절단, 효소반응산물의 비교 등을 조사하였다. 또한, 섬유가공용 효소생산을 위하여 α -amylase와 더불어 cellulase의 생산균의 분리와 특성, 이의 생산 뒤의 구조변화를 연구하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

최근까지 열안정성 α -amylase의 구조와 이용에 많은 연구들을 하여오고 있다 (9, 10, 11, 12, 13). 또한, 국외에서는 세균의 세포외 생산 효소단백질의 배양 시간에 따른 변화를 보고하고 있으나, 국내에서는 매우 미미한 편이다. 실제, 세포외로 분비된 섬유소분해효소가 단백질분해효소에 의하여 시간이 흐름에 따라 여러 형태로 잘려지며 효소의 활성의 변화가 일어난다는 결과들이 발표되고 있고, 이 부류의 연구가 유전자조작과 함께 균주육종의 면에서 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 현재까지는 *B. subtilis*가 그 주대상이 되어 왔으나, 산업적으로 실제 이용되고 있는 *B. licheniformis* 등에 대한 이러한 관점에서의 연구는 별로 보고되고 있지 않다.

제 3 장 연구개발수행내용 및 결과

제 1 절 연구방법

1. 재료

α -Amylase 생산 및 특성의 조사를 위하여 *Bacillus licheniformis* 변이주 SK-5와 SK-2를 하였다 (14). *Bacillus* sp. KD1-4 (후 KD1014로 명명)를 분리, 동정하여 cellulase 생산에 사용하였다.

2. 배양

B. licheniformis 변이주는 2% lactose, 0.5% beef extract, 1% polypeptone을 포함하는 배지를 사용하여 37°C에서 배양하였다. *Bacillus* sp. KD1-4은 0.2% CMC 를 포함하는 LB 배지에서 배양하였다.

3. α -Amylase의 정제방법

모균인 *B. licheniformis*는 SH 배지 (soluble starch: 40 g/l, ammonium phosphate dibasic: 3.5 g/l, yeast extract 6 g/l, magnesium sulfate heptahydrate: 0.5 g/l, sodium citrate: 2 g/l, calcium chloride dihydrate: 0.08 g/l, pH 7.2)에서 10일 정도 배양하여 80% ammonium sulfate 침전과 hydroxyapatite column chromatography 로 부분 정제 하였다. *B. licheniformis* SK-5와 SK-2를 위 배지에서 48 시간 진탕배양한 후에 원심분리기 (한일 Supra 25K)를 이용하여 6,900 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 모은 상층액은 한외여과 (Amicon 400 ml kit, PM 10 membrane)를하여 농축시켰다. 이 농축액을

12,000 rpm에서 15분간 원심분리하고, 상층액을 따로 모아 10 mM CaCl₂를 넣고 끓는물에서 20분 간 물중탕 한 다음 80% 황산암모늄으로 효소를 얼음 위에서 3시간 정도 침전시킨 후 15,000 rpm에서 원심분리하여 단백질 pellet을 얻었다. 얻어진 단백질 pellet은 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer로 회수하고 투석막을 이용하여 염을 제거했다. 이를 이용하여 활성 염색법 (activity staining)으로 효소의 종류 및 분자량을 예비적으로 조사하였고, hydroxyapatite (2.9 × 5.3 cm) column chromatography를 이용하여 정제를 수행하였다. 효소 정제의 각 단계에 대한 효소의 활성과 단백질 정량을 수행하였고 이의 순도와 분자량 결정을 SDS-PAGE로 확인하였다.

4. 단백질 정량과 효소활성 측정 방법

단백질 정량은 Lowry 법에 의해 결정하였는데, 표준물질로는 BSA (Bovine serum albumin)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α -Amylase 효소활성측정은 Miller 방법 (15)을 병행하여 사용하였는데, 기질로는 0.2% potato starch, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5와 적당량의 효소를 넣고 최종 반응물을 1 ml로 하여 10분간 50°C에서 반응시킨후 DNS 용액 3 ml를 넣고 끓는 물에서 5분 동안 방치한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 maltose를 사용하였다. 0.4% potato starch는 0.4 g의 고품 potato starch (Junsei)에 몇 방울의 증류수를 떨어 뜨리고, 400 μ l의 2 N NaOH를 넣어 잘 갠후 4-10시간 후에 적당량의 증류수를 넣어 열 교반하여 녹이고, 2 N HCl을 사용하여 pH를 7.0으로 맞춘 후 최종 부피가 100 ml가 되게 하여 사용하였다. 효소 1 U는 1분당 1 μ mole의 maltose로써의 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. 편의상 배양 및 정제 과정에서의 효소 1 U는 전분 (soluble starch)

을 기질로하여 50℃에서 1분 동안 흡광도 0.1을 변화시킬 수 있는 효소양으로 정의하였다. 한천배지 상에서 효소 활성의 확인은 2% soluble starch (Merck)가 들어있는 고체 배지에 균을 배양한 후, 4℃에서 12시간 이상 방치하여 투명한 환이 생기는 것으로 확인 하였다.

CMCase 활성은 0.5% CMC를 사용하여 DNS 방법으로 측정하였다.

5. α -Amylase의 구조 및 특성 조사

부분적으로 정제된 α -amylase의 분자량은 10% SDS-PAGE로 결정하였고, 각 정제 단계마다의 효소를 gel에 걸어 전기영동 후 gel상에서 나타나는 띠로 정제 정도를 살펴보았다.

최적 pH는 3가지 종류의 완충액 즉, sodium citrate buffer (pH 3.0 ~ 7.5), sodium phosphate buffer (pH 5.0 ~ 9.0)와 Tris-HCl buffer (pH 6.5 ~ 9.5)를 사용하여 각 pH 별로 DNS방법을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정함으로써 결정하였다.

최적 온도는 각 온도별 (50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃)로 효소활성을 측정하였다. 0.2% potato starch를 기질로 하여 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충액과 적당량의 효소를 넣고 효소활성을 측정함으로써 최적 온도를 측정하였다. 최적온도 측정시에는 10 mM CaCl₂를 첨가했을때와 첨가하지 않았을 때의 효소 활성 변화를 관찰하였으며, 10 mM CaCl₂를 첨가했을때와 첨가하지 않았을 때의 열 안정성도 함께 비교하여 Ca⁺⁺이 온도에 미치는 영향을 조사하였다.

여러가지 금속이온과 reagent들이 α -amylase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Mn⁺⁺, Zn⁺⁺, Cd⁺⁺, Ba⁺⁺, Co⁺⁺, Sr⁺⁺, Ca⁺⁺, K⁺, Fe⁺⁺⁺ 등의 금속이온과 NaHAsO₄, PCP, TCA 등의 reagent들을 효소에 처리하여 효소 활성의 변화를 조사하였다.

6. α -Amylase의 primary antibody 생산 및 Western blot

정제된 α -amylase를 adjuvant와 1:1로 섞어 1회에 100 μ g의 효소를 4주 간격으로 총 4회 토끼의 등에 피하주사 하였다. 처음에 토끼 귀의 혈관에서 약간의 혈액을 채취하여 5,000 rpm에서 5분정도 원심분리하여 상층액만 모아서 효소의 양과 antiserum의 양 별로 dot blotting을 해서 antibody의 생성여부를 확인하였고, 생성된 antibody를 다량 확보하였다. 이것을 사용하여 *B. licheniformis* SK-5와 SK-2의 α -amylase를 시간별로 준비하여 Western blotting (16)을 수행하여 구조변화를 추적하였다.

Western blot은 SDS-PAGE 후 gel에 NC (nitrogen cellulose) membrane을 붙여 Western blotting kit (Hoefer 사)을 사용하여 50 V, 240 ~ 300 mA에서 4시간 정도로 NC membrane에 단백질을 전이시켰다. NC membrane을 blocking solution (1% BSA)로 30분 동안 incubation 시켜 비특이적 결합부위를 포화시키고 5,000배 희석한 primary antibody를 plastic chamber에 넣고 30분 동안 천천히 흔들면서 incubation 시켰다. 이 때 희석 정도는 dot blotting으로 예비실험 후 사용하였다. 비결합 antibody를 제거하기 위하여 PBST (Tween 20 in phosphate-buffered saline)로 씻어주고, secondary antibody (anti-IgG AP, Promega 사)에 넣고 천천히 흔들면서 30분 동안 incubation 시킨 후 비결합 antibody를 제거하기 위해 PBST로 membrane을 씻어주고 Tween 20을 제거하기 위해 PBS로 씻어 주었다.

Membrane을 alkaline phosphatase에 1~15분 정도 발색반응시키고 색깔이 보이면 DI (deionized water)로 몇 분 동안 씻어서 반응을 정지시켰다.

7. 불용성 전분에 대한 결합력 측정

α -Amylase의 정제 과정을 간편하게 할 수 있게 하기 위한 실험으로 불용성 전분에 대한 α -amylase의 binding 실험을 하였다. 불용성 전분은 potato starch를 증류수에 넣고 24~48 hr 정도 교반시킨 후 수용성 분획은 버리고 비수용성 분획만 모아서 사용하였다. 준비한 비수용성 녹말을 50 mM phosphate pH 6.8 완충액에 넣고 증류수와 완충액을 교환하기 위해 4°C에서 하룻밤 동안 교반하였다. 간단한 spin으로 불용성 전분을 가라앉힌 다음 상층액을 버리고 전분 1g 당 4 ml의 완충액을 넣고 잘 섞는다. 이것을 튜브에 넣고, 효소를 넣은 다음 얼음 위에서 1시간 방치시킨 후 spin으로 상층액을 버린 후, 증류수를 넣고 50°C에서 20분 동안 방치시킨 다음 불용성 전분에 결합 후와 탈결합 후의 효소활성을 비교하고 SDS-PAGE로 확인하였다.

8. α -Amylase의 단백질 분해효소에 의한 절단

여러 protease 처리에 의한 구조변화분석을 위해 trypsin, chymotrypsin, papain으로 α -amylase를 처리하였다. 효소 30 μ g에 protease 300 μ g을 넣고 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 반응을 중지시키기 위해 trypsin, chymotrypsin에는 10 μ M PMSF (phenylmethane sulfonyl fluoride)를 papain에는 10 μ M iodoacetate를 각각 넣는다. 각각의 tube에 동일 부피의 SDS loading buffer를 넣고 1~2분 동안 끓는 물에서 끓여 SDS-PAGE를 수행하고, 활성 염색으로 효소활성의 변화를 관찰하였다.

9. SDS-PAGE와 활성 염색 (activity staining)

SDS-PAGE는 Laemmli 방법 (17)에 따라 수행하였다. 활성 염색은 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer에 1% agar와 1% soluble starch (Merk

사)를 hot plate 또는 autoclave에서 녹여, 깨끗한 유리판에 부어서 얇은 agar-starch sheet를 만들어 수행하였다. cellulase의 경우 CMC를 사용하였다. SDS-PAGE가 끝나면 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer에 25% isopropanol을 넣고 gel을 두세번 정도 씻어 주고, 동일 buffer에 두세번 정도 다시 씻어서 SDS를 제거하였다. SDS가 제거된 gel을 agar-starch sheet에 올려놓고 gel과 sheet 사이에 bubble이 없도록 제거한 다음 랩 등으로 유리판을 싸서 55°C 배양기에서 1시간 반응시킨 후 gel은 Coomassie staining 시키고 agar-starch sheet는 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 변화를 관찰한다.

10. Sephacryl S-200 HR column chromatography

α -Amylase의 aggregate를 추적하기 위하여 Sephacryl S-200 HR column (2.3×95 cm) chromatography를 수행하였다. 50 mM sodium phosphate - 150 mM NaCl, pH 7.2 완충액을 사용하였고, 유속은 15.6 ml/h, 표준 단백질로는 MW-GF-200 Kit (Sigma)의 gel filtration molecular weight marker 즉, cytochrome C (M.W 12,400), carbonic anhydrase (M.W 29,000), β -amylase (M.W 200,000), blue dextran (M.W 2,000,000)을 사용하였다.

11. HPLC를 이용한 효소의 반응 생성물 조사

두 변이주에서 생산된 α -amylase의 반응 생성물을 조사하기 위하여 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 완충액에 10 mM 올리고당 즉, glucose (G1), maltose (G2), maltotriose (G3), maltotetraose (G4), maltopentaose (G5), maltohexaose (G6), maltoheptaose (G7)과 적당량의 효소 (1 U/ml)를 넣고 50°C에서 30분 간 반응시킨 후 μ Bondapak NH₂ 124Å (10 μ m)

(3.9×30 mm) HPLC column (Waters, Acetonitrile:H₂O=70:30)을 사용하여 반응 생성물을 분석하였다. 0.5% soluble starch와 0.2% potato starch에 각각 적당량의 효소 (5 U/ml)를 넣고 1시간 반응시킨 후 동일한 방법으로 반응생성물을 분석하였다.

12. 우수 cellulase 생산균 동정

균주동정은 Biolog GP MicroPlate test panel을 이용하여 수행하였다. 이에 사용한 고체배지는 BUGM + 1% glucose로 만들었고, 신선한 균주를 0.85% saline에 접종한후 탁도가 35-42% (cell density 4.5×10^8 cell/ml)되게하여 GP MicroPlate에 접종하였다. 반응은 고체배지에서 배양한 온도와 같이 30°C에서 시켰고 4 hr, 6 hr, 24 hr에서 관찰하였다.

2. 연구내용

1. α -Amylase와 cellulase의 primary antibody 생산하여 Western blot을 수행하여 생산 분비되는 효소의 구조변화 유무를 조사하였다.
2. α -Amylase의 purify 과정을 간편하게 할 수 있게 하기 위한 실험으로 불용성 전분에 대한 α -amylase의 binding 실험을 하였다.
3. α -Amylase의 여러 protease 처리에 의한 구조 변화 분석을 위해 trypsin, chymotrypsin, papain으로 α -amylase를 인위적으로 절단하고, 구조변화에 따른 활성의 변화를 조사하였다.
4. SDS-PAGE 상에서 효소활성을 직접 확인하기위하여 activity staining을 수행하였다.

5. Aggregate의 존재여부와 분자량을 확인하기 위하여 Sephacryl S-200 HR column chromatography를 수행하였다.
6. HPLC를 이용하여 전분과 올리고당 기질의 효소의 반응 생성물을 조사하였다.
7. *B. licheniformis* mutants SK-5 과 SK-2의 물리화학적 성질을 비교하였다.
8. Cellulase 생산 균인 *Bacillus* sp. KD1-4를 선발하여 특성을 조사하였다.

3. 연구결과

1. Antibody 생산과 구조변화

정제한 α -amylase를 토끼에게 4주 간격으로 총 4회 주사하여 1차로 1 ml 정도의 혈액을 채취하여 dot blotting 으로 확인하였더니 antiserum이 생성되었다. 이렇게 확보한 α -amylase antibody를 이용하여 SK-5의 α -amylase를 배양시간별로 시료를 취하여 western blotting을 수행하여 구조변화를 추적하였는데 구조변화는 확인되지 않았다. SK-2의 α -amylase 경우에는 새로운 작은 분자량의 band가 확인되어 약간 다른 결과가 관찰되었다.

2. α -Amylase의 불용성 전분에 대한 결합력

여러가지 정제단계를 간단히 하기 위한 한 방법으로 불용성 전분에 대한 결합과 탈결합여부를 조사하였다. α -amylase는 얼음 위에서 불용성 potato starch에 거의 80-90%이상 결합하였고, 50°C water bath에서 증류수를 처리하여 20분 방치 후의 탈결합 정도는 60% 정도이다. 탈결합은 상온에서 0 - 5 M NaCl (0.5 M 간격)로 처리하였을 때보다 50°C에서 증류수 처리로 더 많은 효과를 얻었다. 온도가 높을수록 탈결합 효율은 약간씩 높아지나 60°C 정도에서는 전분이 변성되기 시작하므로 60°C에서 효소를 탈결합시키기는 어려울것 같다. 이것은 α -amylase의 정제단계 중 컬럼 크로마토그래피와 비교했을 때, 보다 더 높은 수율로 효소를 얻을 수 있으므로 α -amylase의 불용성 전분에 대한 결합·탈결합 성질을 이용하여 정제단계를 간단히 할 수 있을 것으로 생각된다. SK-5와 SK-2의 불용성 전분에 대한 결합력은 두 가지 균주에서 생산하는 효소 모두 불용성 전분에 결합이 잘 되고 탈결합도 잘 된다.

3. α -Amylase의 효소적 절단

α -Amylase의 여러가지 protease 처리에 의한 구조 변화를 확인하기 위하여, 3 가지의 protease (trypsin, chymotrypsin, papain)를 사용하여 효소의 구조변화를 조사하였다. chymotrypsin의 경우는 별다른 변화가 없었고, trypsin, papain 처리시에는 약간의 구조변화가 보이나, 효소활성에는 변화가 없었다.

이 α -amylase의 activity staining의 PAGE 분석 결과, 57,500 dalton 윗쪽에 dimer로 추측되는 것이 발견되었는데, 이 dimer 부분은 Coomassie staining으로는 염색이 잘 되지 않으나, activity staining에서는 강한 활성을 보이므로 monomer보다 dimer 형태가 효소 활성에 큰 역

할을 하고 있는 것으로 추측된다. 이를 확인하기 위하여 7.5% SDS-PAGE 후의 activity staining을 수행한 결과 57,500 dalton 보다 훨씬 윗쪽에서 나타났으며 훨씬 강한 activity를 보여주고 있다.

4. Sephacryl S-200 HR column chromatography

Aggregate의 존재여부와 분자량을 확인하기 위하여 Sephacryl S-200 HR을 충진물로 사용한 chromatography 상에서 분자량 측정을 시도하였다. 표준 단백질은 log (molecular weight) vs. V_e/V_o 그래프에서 정확히 직선상에 위치하였으나, 분석하려는 α -amylase는 monomer 분자량인 57,500보다 훨씬 작은 26,000에서 용출되었다. 이는 이 효소와 컬럼 충진제와의 상호작용으로 훨씬 늦게 용출 되었기 때문인 것으로 추정된다.

5. HPLC를 이용한 효소의 반응 생성물 조사

HPLC를 이용하여 효소의 반응 생성물을 분석한 결과 (Table 1), 실제 기질인 potato starch와 soluble starch인 경우 maltopentaose (G5) 이하인 oligomer로 생성되었고, 그 양은 G5, G3, G2, G1, G4 순으로 나타났다. G1부터 G7까지 oligomer를 기질로 사용한 결과, G5 까지는 분해가 거의 되지 않았으며, G6 부터가 좋은 분해력을 보여 이 α -amylase의 기질은 maltohexaose 이상이며 생성물이 G5 이하인 것으로 확인 되었다. G6인 경우에 glucose 생성량이 G7인 경우보다 많고, G7인 경우 G5와 G2의 생성량이 제일 많은 것으로 보아 효소에 기질이 결합한 후, 5번째와 6번째 사이의 glycosidic linkage의 절단이 제일 수월한 것으로 예측되었다.

Table 1. HPLC analysis of the reaction products by the SK-5 and SK-2 α -amylases

Products		glucose	maltose	malto triose	malto tetraose	malto pentaose	malto hexaose	malto heptaose
Substrates								
potato starch	SK-5	0.327 (12.5)	0.245 (18.9)	0.201 (21.9)	0.038 (4.6)	0.342 (42.1)		
	SK-2	0.349 (8.8)	0.315 (16.0)	0.341 (24.6)	0.081 (6.4)	0.542 (44.2)		
soluble starch	SK-5	0.254 (3.2)	0.688 (17.3)	0.708 (25.2)	0.114 (4.5)	1.169 (47.0)	0.062 (2.9)	
	SK-2	0.868 (9.3)	0.937 (20.3)	0.772 (23.7)	0.173 (5.8)	1.113 (38.6)	0.057 (2.3)	
maltotriose	SK-5			3.880 (100)				
	SK-2			4.500 (100)				
maltotetraose	SK-5				5.324 (100)			
	SK-2		0.019 (0.26)	0.077 (1.5)	4.599 (98.3)			
maltopentaose	SK-5		0.043 (0.5)			4.913 (99.5)		
	SK-2		0.180 (2.0)	0.180 (2.8)	0.023 (0.4)	5.315 (94.8)		
maltohexaose	SK-5	2.480 (11.6)	0.765 (7.2)	0.972 (13.0)	0.219 (3.2)	2.144 (32.4)	1.871 (32.8)	
	SK-2	3.490 (11.6)	1.233 (12.1)	1.395 (19.3)	0.018 (0.3)	3.235 (50.6)	0.052 (0.94)	
maltoheptaose	SK-5	0.870 (3.7)	3.317 (28.3)	0.813 (9.8)	0.174 (2.3)	3.764 (51.2)	0.270 (4.3)	0.034 (0.5)
	SK-2	0.740 (3.1)	3.197 (27.3)	1.044 (12.6)	0.180 (2.4)	3.999 (54.6)		

- Numerals represent the molar concentration of each product, in terms of mM.
- Numerals in parenthesis represent the relative ratios of each reaction sample.

특이한 것은 실험한 모든 경우 G4가 제일 적게 나타났다는 점이다. Chromatogram 분석 중 G8, G9, G10 등이 전혀 관찰되지 않은 것으로 보아 transglycosylation 활성이 전혀 없는 것으로 확인 되었고, 이들의 결과로 미루어 G4가 가장 나타난 것은 흥미로운 결과이다.

6. *B. licheniformis* mutants SK-5 & SK-2의 비교

가. 최적 pH와 최적 온도

효소의 반응특성을 조사한 결과 최적 pH는 SK-5가 생산하는 α -amylase의 경우 7.0-7.5이고, SK-2가 생산하는 α -amylase의 경우 SK-5의 α -amylase와 약간 다르게 5.5-6.5로 나타났다. 최적 온도는 Ca^{++} 이온의 존재 유무에 따라 다르게 나타났다. Ca^{++} 이온이 첨가되지 않는 상태에서는 최적온도가 70°C 이었으나, 10 mM Ca^{++} 이온 존재 시에는 80-90°C 이었으며, 80°C에서 30분간 preincubation 시켰을 때, Ca^{++} 이온이 없을 경우는 효소활성이 없었으나, Ca^{++} 이온 존재 시는 효소활성이 거의 없어지지 않았다 (Table 2, 3).

나. 저해제에 대한 영향

효소의 활성은 0.1 mM Mn^{++} , Zn^{++} , Cu^{++} 등의 금속 이온에 의하여 저해되었고, 1.0 mM로 증가시킴에 따라 저해정도가 증가되었다. EDTA의 경우 0.1 mM과 1.0 mM이 존재할 경우 각각 8%와 11%의 저해를 나타내 농도의존성 저해현상을 보이지 않았다. 이는 효소활성에 divalent cation이 필수적으로 요구되지 않는다는 것을 보여준다. 이들 결과로 Ca^{++} 이온은 효소활성의 촉진제로는 작용하지 않으나, 열안정성에 중요하게 기여하는 것으로 생각된다

Table 2. Heat stability of the α -amylase in the absence of Ca^{++}

Temperature (°C)	Relative Activity (%)	
	SK-5	SK-2
Control	100	100
50	88	110
60	2	24
70	0	0
80	0	0
90	0	0

- Control : Standard assay condition
- Heat stability was measured after preincubation of enzyme mixture for 30 min at indicated temperature.

Table 3. Heat stability of the α -amylase in the presence of 10 mM Ca^{++}

Temperature (°C)	Relative Activity (%)	
	SK-5	SK-7
Control	100	100
50	120	128
60	101	109
70	121	130
80	106	120
90	1	55

- Control : Standard assay condition with 10 mM Ca^{++}
- Heat stability was measured after preincubation of enzyme mixture with 10 mM Ca^{++} for 30 min at indicated temperature.

7. 우수 Cellulase 생산 균주 선발

후보로 선발된 균주 중에서 KD 1과 KD 14는 배양액의 viscosity가 높아 취급 및 효소정제 시 여러 문제를 보였다. 반면, KD 1-4, KD 4, KD 13-3 균주를 KD 1과 KD 14 균주와 비교할때 .CMC, Levan, Xylan, Starch, Filter Paper의 분해된 halo 크기와 배양액의 assay로서 분해능이 거의 비슷한 균주로 확인되었다.

이들 균은 모두 Gram positive였으며, 간균 형태였다. Biolog Test 결과 KD 1-4, KD 4, KD 13-3 균주 모두 *Bacillus* sp.로 나타났으며, KD 1-4, KD 4, KD 13-3 균주는 *Bacillus subtilis*에 가장 가까운 것으로 나타났다.

KD 1-4 균주는 최종 *Bacillus* sp. KD1014 (18)로 명명하였으며, 대조균으로 사용한 *Bacillus subtilis* BSE616 (19)보다 부피당 효소 생산량이 많았으며, CMC가 분해된 halo size도 큰것으로 조사되었다.

선발된 KD 1-4 균주를 30℃, 37℃, 45℃, 50℃, 55℃로 배양한 결과 45℃에서 효소활성이 제일 좋은 것으로 조사되었다. 조사한 모든 경우에 배양액 부피당 효소활성이 control로 사용한 BSE616 균주보다 더 높았다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

연구개발 목표는 α -amylase와 cellulase의 구조변화 추적과 α -amylase 안정성 증진이었다. 이를 위하여 분리, α -amylase의 항체를 확보하였으며, α -amylase 구조변화와 효소활성의 변화를 비교하여 변이주 SK-2로부터 열안정성 및 활성 증진을 확인하였다. 또한, 간편한 효소정제법 확립과 이를 통한 일단계의 효율적 효소농축법 개발, 열안정성 증진, 보관 안전성 증진, 우수 cellulase 생산균 선발, 두 변이주가 생산한 효소 안정성의 비교 등 연구개발 목표를 달성하였다.

이 결과들은 α -amylase와 cellulase를 산업적으로 생산할 때 수출의 증대에 기여될 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

SK-5과 SK-7을 사용하여 α -amylase를 생산할 경우 효소단백질의 내부 절단은 거의 일어나지 않음이 확인되었기 때문에 특별히 단백질분해 효소 저해제를 첨가할 필요는 없다. Ca^{++} 이온이 효소 활성 자체에는 직접 관여하지 않으나, 열안정성에 중요하게 관여하므로 5 mM Ca^{++} 이온이 처리가 유리할 것으로 판단된다.

제 6 장 참 고 문 헌

1. A. Sohma, T. Fujita, and K. Yamane. 1987. Protein processing to form extracellular thermostable α -amylase from a gene fused in a *Bacillus subtilis* secretion vector. J. Gen. Microbiol. 133:3271-3277.
2. Lo, A. C., Mackay, R. M., Seligy, V. L., and Willick, G. E. 1988. *Bacillus subtilis* β -1,4-glucanase products from intact and truncated genes are secreted into the extracellular medium by *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54:2287-2292.
3. N. Saito. 1973. A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. Arch. Biochem. Biophys. 155:290-298.
4. Yuuki, T., Nomura, T., Tezuka, H., Tsuboi, A., Yamagata, H., Tsukagoshi, N., and Udaka, S. 1985. Complete nucleotide sequence of a gene coding for heat- and pH-stable α -amylase of *Bacillus licheniformis*: comparison of the amino acid sequences of three bacterial liquefying α -amylase deduced from the DNA sequences. J. Biochem. 98:1147-1156.
5. P. Joyet, M. Guerineau and H. Heslot. 1984. Cloning of a thermostable α -amylase gene from *Bacillus licheniformis* and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. 21:353-358.
6. A. Tonkova, R. Manolov, and E. Dobрева. 1993. Thermostable α -amylase from derepressed *Bacillus licheniformis* produce in high yields from glucose. Process Biochem. 28:539-542.
7. S. Aiba, K. Kitai, and T. Imanaka. 1983. Cloning and expression of thermostable α -amylase gene from *Bacillus stearothermophilus* in *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus subtilis*. Appl. Environ. Microbiol. 49:1059-1065.
8. V. Ivanova, and E. Dobрева. 1994. Catalytic properties of immobilized

- purified thermostable α -amylase from *Bacillus licheniformis* 44MB82-A. Process Biochem. 29:607-612.
9. R. D. Wind, W. Liebl, R. M. Buitelaar, D. Penninga, A. Spreinat, L. Dijkhuizen, and H. Bahl. 1995. Cyclodextrin formation by the thermostable α -amylase of *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* EM1 and reclassification of the enzyme as a cyclodextrin glycosyltransferase. Appl. Environ. Microbiol. 61:1257-1265.
 10. T. Yamamoto. 1995. Enzyme chemistry and molecular biology of amylases and related enzymes. CRC
 11. T. Watanabe, N. Kasahara, K. Aida, and H. Tanaka. 1992. Three N-terminal domains of β -glucanase A1 are involved in binding to insoluble β -1,3-glucan. J. Bacteriol. 174:186-190.
 12. Y. Suzuki, N. Ito, T. Yuuki, H. Yamagata, and S. Udaka. 1989. Amino acid residues stabilizing a *Bacillus* alpha-amylase against irreversible thermoinactivation. J. Biol. Chem 264:18933-8.
 13. Kim, I. C., S. Y. Jang, J. H. Cha, Y. H. Ko, K. H. Pack, and H. M. Rho. 1988. Cloning and expression of thermostable alpha-amylase gene in *Escherichia coli* from *Bacillus licheniformis* ATCC 27811. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 16:369-373.
 14. Jeong, H. J., Jung, K. H., Chang, J. S., Yoon, K. H., Park, S. H. and Kim, H. 1998. Development of an α -amylase-hyperproducing mutant of *Bacillus licheniformis* and its characteristics. Agric. Chem. Biotechnol. 41:18-22.
 15. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.
 16. Harlow, E., and Lane, D. 1988. "Antibodies - A Laboratory Manual", CSH.
 17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
 18. Lee, K. D., Kim, J. H., and Kim, H. 1996. Isolation and characterization of

- Bacillus* sp. KD1014 producing carboxymethyl-cellulase. *J. Microbiol.* 34:305-310.
19. Park, S. H., and Pack, M. Y. 1986. Cloning and expression of a *Bacillus* cellulase gene in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 8:725-728.