

## *Xanthomonas* sp. YL-37의 Alkaline Protease 유전자의 클로닝

이대희 · 김수경 · 이승철 · 윤병대<sup>1</sup> · 황용일\*

경남대학교 식품공학과, <sup>1</sup>KIST 유전공학연구소

### Cloning of a Alkaline Protease Gene from *Xanthomonas* sp. YL-37

Dae-Hee Lee, Su-Kyoung Kim, Seung-Cheol Lee,  
Byung-Dae Yun<sup>1</sup> and Yong-Il Hwang\*

Department of Food Engineering, Kyungnam University, Masan 630-701, Korea

<sup>1</sup>Genetic Engineering Research Institute, KIST

**Abstract** — For the purpose of developing a new biodegradable detergent, we have isolated a gene encoding wide-range temperature applicable alkaline protease from *Xanthomonas* sp. YL-37 (Lee et al., 1994, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*). An alkaline protease gene was isolated from the gene bank that was prepared from the chromosomal DNA of *Xanthomonas* sp. YL-37. From the results of agarose gel electrophoresis and a restriction enzyme mapping, a 2.7 kb DNA fragment containing the alkaline protease gene was inserted in the plasmid pUC9. Extracellular activity of a clone having alkaline protease gene was detected on SDS-polyacrylamide gel with activity staining assay. The molecular weight of alkaline protease was determined to be about 64 kDa from 11% SDS-PAGE analysis. Alkaline protease activity, produced from *E. coli* which harboring the plasmid, showed no difference at reaction temperature 20, 30 and 40°C, respectively. This result showed that alkaline protease produced from *E. coli* harboring the plasmid was apparently the same as that of *Xanthomonas* sp. YL-37.

근래 환경오염의 여러 요인 중에서 생활하수가 차지하는 비율은 나날이 늘어가고 있으며, 특히 각종 유기세제의 사용이 주원인으로 들 수 있다. 생활폐수 중의 세제성분은 이차오염의 주원인으로 되며, 이로 인하여 수생 동식물 및 미생물의 사멸을 초래하여 환경자체의 정화능력의 소멸을 야기한다(1-3). 이러한 이유로 유기세제를 대체할 수 있는 세제로 효소 protease, lipase, amylase, cellulase 등을 함유한 생분해성 세제의 개발이 시도되고 있다. 이 중에서 protease는 Masaaki 등(4)에 의해 성질이 알려진 후, 산업사회의 발전과 더불어 그 다용성 — 식품공업, 피혁가공업, 제지공업, 식육연화, 주류의 혼탁방지 등 — 에 의하여 광범위하게 연구되어 왔다.

한편, alkaline protease는 그 성질상 피혁의 탈모 공정과 더불어 세제로의 사용시 종래의 화학약품보다 환경오염을 줄일 수 있는 장점이 있어 생분해성 세제의 주성분이 될 수 있다. Alkaline protease의 연구는 Horikoshi(5)에 의해 시작되어 *Bacillus* 속(6-9)

에서 생산되는 것이 보고된 후, 방선균(10-14), 곰팡이 등(15-17) 여러 미생물에서도 그 생산이 보고되고 있으나 실제 산업적인 이용을 위한 미생물로부터의 생산수준은 아직 미미한 실정이다. 특히 세제용으로 고려시 저온 및 염기성에서의 효소활성이 충분하게 발휘되어야 한다.

본 연구의 목적은 세제용 alkaline protease의 대량생산을 위한 기초연구로 이미 분리된 저온성 alkaline protease 생산균인 *Xanthomonas* 속의 미생물(18)에서 염색체 DNA를 정제하여 대장균의 vector계를 이용하여 gene bank를 제조하였다. 이로부터 alkaline protease 구조유전자를 분리하여 개략적인 구조를 밝혔으며 대장균에서의 생산여부를 효소활성 및 SDS-PAGE 상에서의 결과로부터 확인하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 plasmid

Alkaline protease 유전자의 공여균주로는 KIST의 이 등(18)이 하천으로부터 분리한 저온성 alkaline protease 생산균 *Xanthomonas* sp. YL-37을 사용하

**Key words:** Alkaline protease, cloning, activity staining

\*Corresponding author

였다. 사용한 *E. coli* 균주는 JM109 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ (lac-pro AB) F<sup>-</sup> [traD36 proAB<sup>-</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15]*)과 DH5α (*supE44 ΔlacU169 (φ80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)이다. 또한 cloning vector plasmids는 pUC9 (*Amp<sup>r</sup> LacZ'* (2.7 Kb))을 사용하였다.

### 배지

*Xanthomonas* sp. YL-37 균주배양에는 protease 생산배지(18)를 사용하였다. 대장균의 형질전환에는 LB 배지를 사용하였고 alkaline protease 활성측정(19)을 위한 전배양 및 본배양에도 LB 배지(20)를 사용하여 37°C 에서 배양하였다. 필요에 따라 최종농도 1 mM의 isopropyl thiogalactoside(IPTG) 또는 50 µg/ml의 ampicillin을 첨가하였다. 평판배지상에서의 alkaline protease 식별을 위해서는 LB 배지에 2% skim milk를 첨가한 배지(LBA-skim)를 사용하였다. 평판배지는 상기배지의 2%의 agar를 첨가하여 제조하였다.

### 사용 시약

Agarose, RNase, protease 등은 Sigma Co., T4 DNA ligase와 기타 모든 제한효소는 KOSCO, calf intestinal phosphatase(CIP)는 Pharmacia LKB Co.에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

### DNA의 분리 및 조작

염색체 DNA의 분리 및 정제는 Hereford 등의 방법(21)을 변용하여 사용하였다. 재조합 plasmid 확인을 위한 plasmid의 분리는 Clewell과 Helinski의 방법(22)을 사용하였다. 제한효소의 처리 및 ligase 처리 등 그 이외의 DNA 분자의 조작은 Sambrook 등의 방법(20)을 따랐다.

### 형질전환 및 형질전환체 선별

대장균의 형질전환은 Morrison의 방법(23)에 따라 실시하였다. Alkaline protease 유전자를 포함한 재조합 plasmid를 지닌 형질전환체의 선별 및 검정은 ampicillin이 함유된 LB 배지(LBA)에서 생존하는 colony 들을 선별하여 LBA-skim 평판배지에서 투명환을 형성하는 colony 만을 이용하였다.

### Alkaline protease 활성측정

세포배양액을 이용한 활성측정은 Antoine 등의 방법(19)을 변용하였다. 기질용액 [5 g azocasein/l, 50

mM Tris-HCl(pH 9.5)] 600 µl에 효소액 120 µl를 가하고 40°C 에서 20분간 반응시킨 후 15% trichloroacetic acid 용액 480 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소에 의해 가수분해되는 1 azocasein unit(U)는 1분당 분해된 1 µg의 azocasein 양으로 환산하였다.

### SDS-PAGE 및 activity staining assay

형질전환된 대장균에서 생성, 분비되는 alkaline protease를 조사하기 위해 11%의 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 Laemmli 방법(24)으로 전기영동하였다. 배지의 단백질 성분의 농축을 위해서는 최종농도 10%의 trichloroacetic acid를 첨가하여 단백질 침전 후, acetone으로 세척하여 sample buffer에 녹였다.

전기영동한 gel에서 alkaline protease의 활성을 직접 측정하기 위해 Christa 등의 방법(25)에 따라 0.1% gelatin을 함유한 SDS-polyacrylamide gel을 만들어 4°C 에서 전기영동한 후, gel을 renaturation하기 위하여 2.5%의 Triton X-100 용액과 0.1 M glycine-NaOH(pH 9.5) buffer에서 37°C, 3~5시간 반응시킨 후, 0.1% amido black 용액으로 1시간 염색하였다. 탈색은 (methanol : acetic acid : water = 30 : 10 : 60) 용액을 이용하여 gel에서 band가 나타날 때까지 약 30분간 행하였다.

## 결과 및 고찰

### Alkaline protease 구조유전자의 클로닝

Alkaline protease의 활성을 지닌 *Xanthomonas* sp. YL-37 균주의 염색체 DNA를 제한효소 *Sau3AI*로 부분 절단하여 0.8% agarose gel 전기영동을 하였다. 이로부터 정제한 2~9 kb의 DNA 단편과 vector로 이용한 plasmid pUC9를 제한효소 *BamHI*로 완전 절단한 후 CIP로 탈인산화 처리한 pUC9 DNA를 ligation 시켰다. 이 반응액을 정제하여 *E. coli* DH5α에 도입하여 약 10,000개의 형질전환체를 얻었다(Fig. 1).

상기 형질전환체로부터 alkaline protease 생산성의 클론을 선별한 결과 LBA-skim 배지상에서 생육된 colony 주위에 뚜렷한 투명환을 형성하는 3개의 colony가 분리되었다. 투명환을 형성한 세 colony로부터 분리 정제한 plasmid DNA를 숙주별 안정성 및 alkaline protease 생산능을 알아보기 위하여 *E. coli* JM109, DH5α 등을 숙주세포로 하여 수차에 걸친 형질전환과 계대배양을 하여 검정하였다. 이러한 실험결과로부터 한개의 plasmid DNA가 JM109 및 DH5α

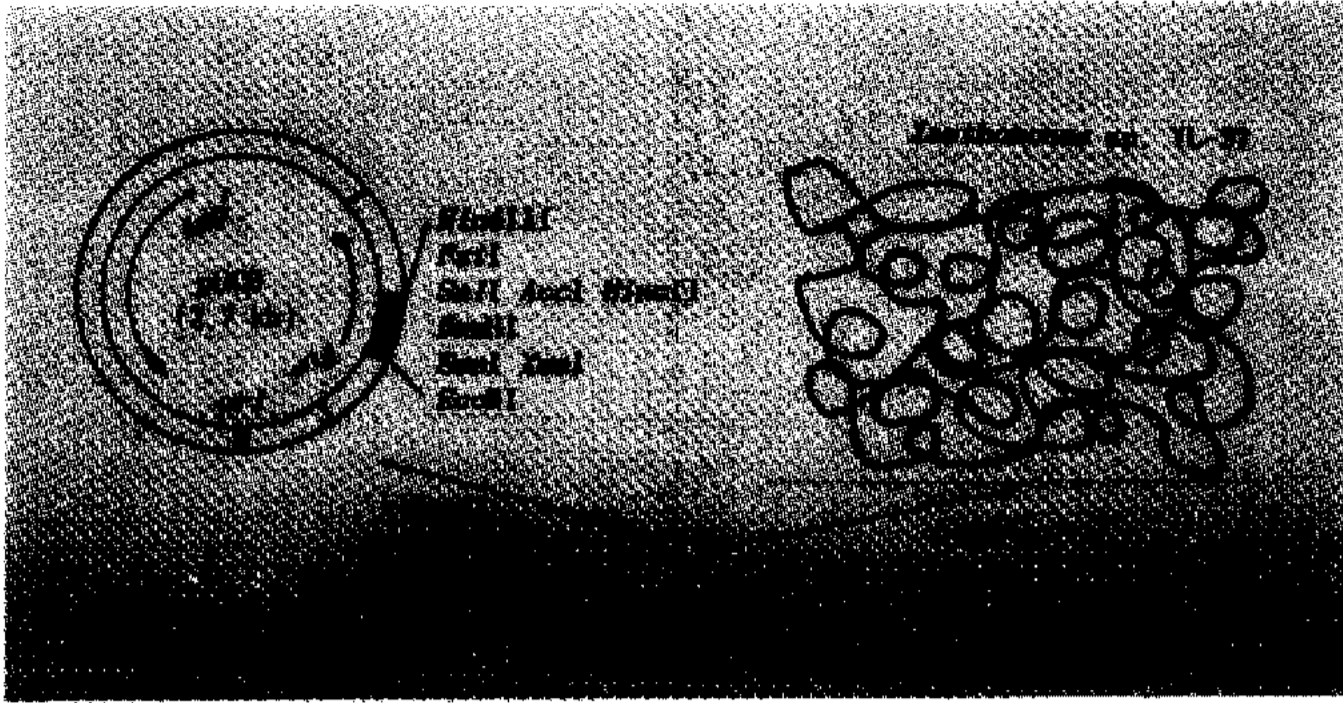


Fig. 1. Construction of a gene bank with the *Sau3AI* digested chromosomal DNA.

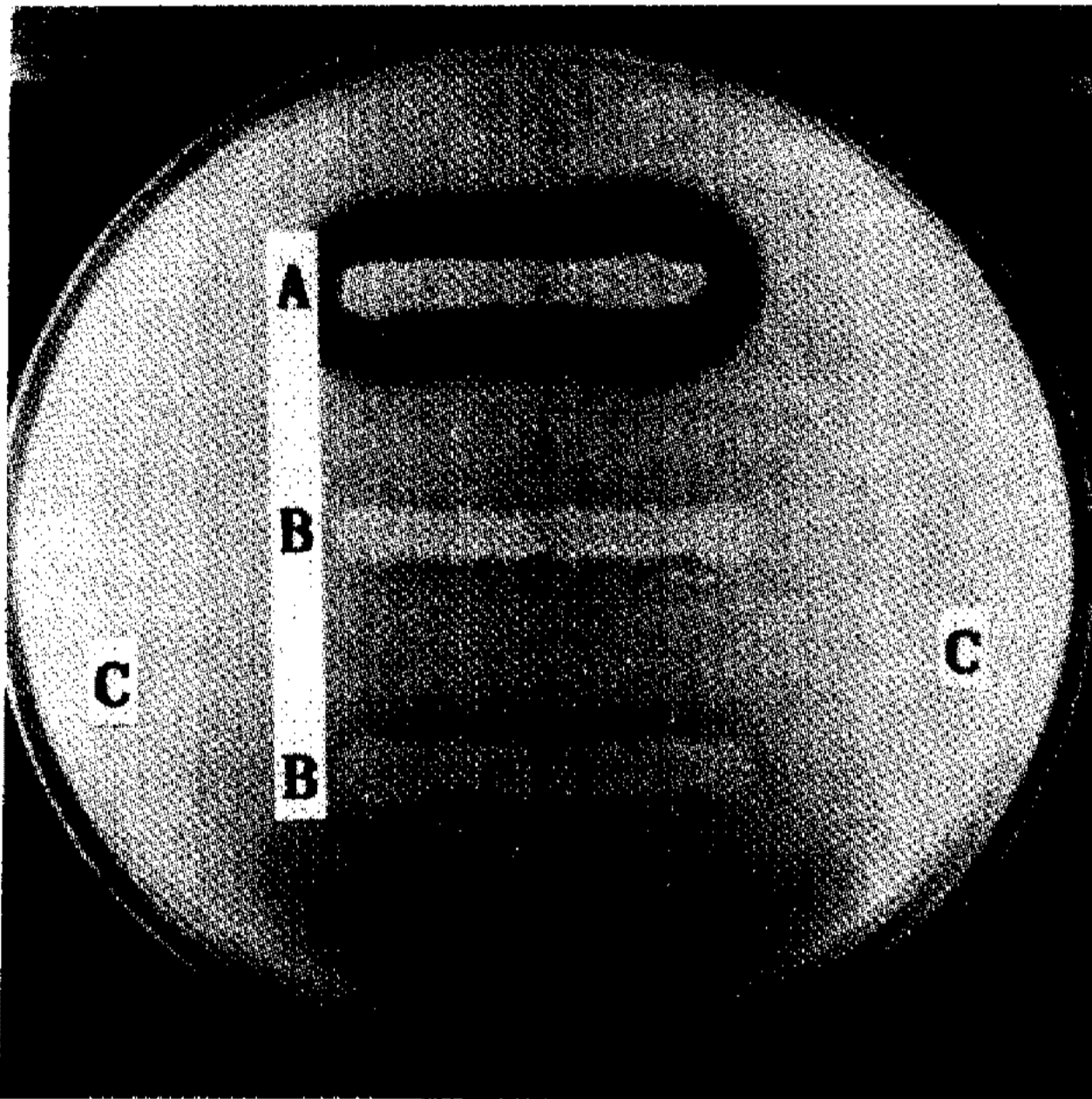


Fig. 2. Plate assay of alkaline protease producing cells. (A) Alkaline protease producing strain, *Xanthomonas* sp. YL-37. (B) *E. coli* DH5 $\alpha$  harboring plasmid 3191 containing the DNA fragment encoding alkaline protease. (C) *E. coli* DH5 $\alpha$  harboring plasmid pUC9.

등에서 안정하게 유지되며, 이후 이 plasmid를 p3191 이라고 명명하였다. Fig. 2에서와 같이 30°C, 16시간 배양에서 *Xanthomonas* sp. 37과 plasmid p3191을 지닌 형질전환체가 LBA-skim 배지상에서 명확한 투명환을 형성하였다. 이는 plasmid p3191 상에 alkaline protease 생산능을 지닌 DNA 단편이 삽입되었음을 시사한다.

**Plasmid p3191의 제한효소지도 작성**

상기 실험에서부터 alkaline protease 구조유전자를 지닌 DNA 단편의 plasmid pUC9 상에서의 삽입부위 및 기본적인 제한효소부위를 알기 위하여 제한효소 지도를 작성하기로 하였다. 기존의 제한효소 *AatII*,

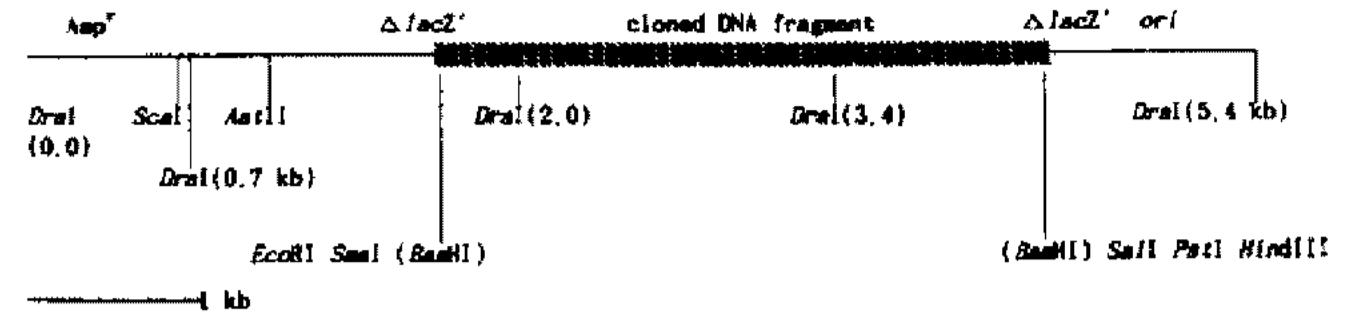


Fig. 3. Restriction enzyme map of the recombinant plasmid p3191.

A hatched region represents the cloned 2.7 kb DNA fragment and indicates approximate location. A solid line represents pUC9 derived DNA.

*BamHI*, *HaeII*, *PvuI*, *PvuII* 및 *ScaI*을 단독 혹은 병용하여 완전 절단하거나 *DnaI*을 이용하여 반응시간별 부분절단을 하여 0.8~1.5% agarose gel 전기영동을 하였다(결과 미제시).

Fig. 3에서와 같이 약 2.7 kb의 DNA 단편이 plasmid pUC9의 *BamHI* 부위에 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 그리고 보편적인 제한효소부위 *EcoRI*, *SmaI*, *SalI*, *PstI*, *HindIII* 등은 삽입된 DNA 단편상에서 발견되지 않았다. 구체적인 제한효소부위의 확인은 향후 DNA 염기배열의 결정에 의하여 하기로 하였다.

한편, 삽입된 DNA 단편상의 alkaline protease 구조유전자의 전사방향을 결정하기 위하여 IPTG 유무에 따른 효소활성의 변화를 관찰하였다. 37°C에서 배양 6시간 후 최종농도 1 mM이 되게 배양액에 IPTG를 첨가하여 배양 8시간 째에 세포의 alkaline protease의 활성을 측정하였다. IPTG 첨가시 0.80 unit였으나 무첨가시 0.35 unit를 나타내었다. 이러한 사실은 IPTG에 의하여 그 발현이 유도된 *LacZ'* promoter에 의하여 하류 *BamHI* 부위 이하에 연결된 alkaline protease 구조 유전자가 발현되었음을 나타낸다. 그리고 이는 삽입 유전자의 전사 방향이 *LacZ'* 유전자와 동방향으로 위치하고 있음을 시사하였다. 뿐만 아니라 gram 음성세균인 *Xanthomonas* 속의 유전자가 같은 gram 음성세균인 *E. coli*에서 발현가능함을 보였다.

**Alkaline protease 구조 유전자의 *E. coli*에서의 발현**

상기 실험에서 확인된 재조합 plasmid p3191을 지닌 *E. coli* DH5 $\alpha$  형질전환체에서의 alkaline protease 활성을 검정하기로 하였다. 본 효소가 이 등(18)의 연구에 의하면 *Xanthomonas* sp. YL-37에서 분비형 효소임을 감안하면 먼저, *E. coli*에서의 생산된 본 효소의 분비가능성을 알아보기 위하여 장시간 배양하여 사멸세포에 의한 세포내 효소의 배양중의 혼재가능성을 없애기로 했다. 10 ml의 LBA 액체배지에서 24시간 진탕배양 후 배양액 0.1%를 50 ml의 동일배

**Table 1. Extracellular alkaline protease activity of the DH5 $\alpha$  harboring the plasmid p3191**

Temp.	units/OD
20°C	0.45
30°C	0.40
40°C	0.35

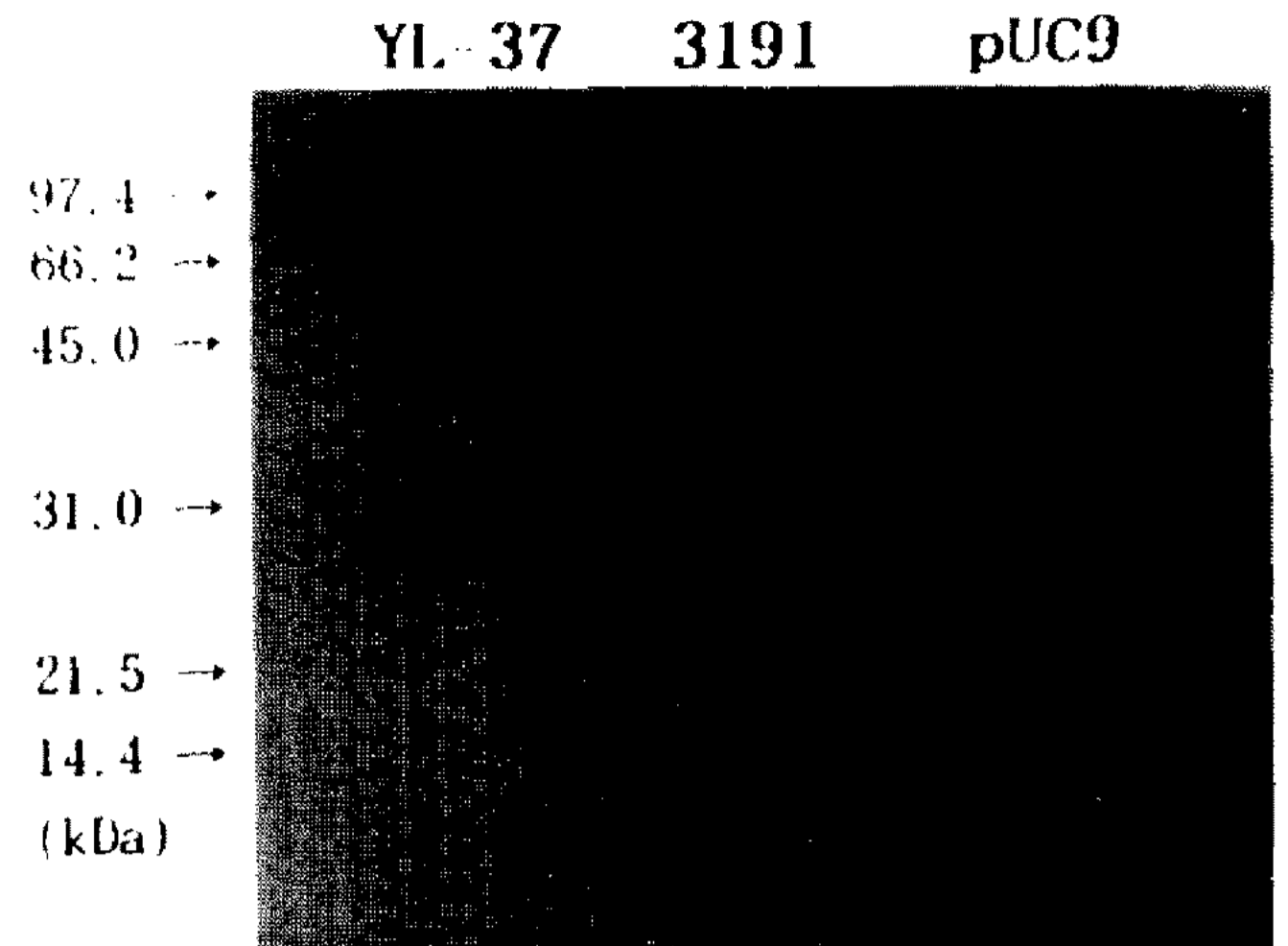
Cell density were 0.7~0.75 at 600 nm.  
units/OD means azocasein units per 440 nm.

지에 접종하여 8시간 진탕배양하여 그 상등액 층의 alkaline protease 활성을 조사하였다. 40 mM Tris buffer(pH 9.5) 상에서의 효소활성은 Table 1에서와 같이 나타났다.

이 등(18)의 결과에 의하면, 본효소는 50°C 이하에서 비교적 안정하므로 각각의 온도 20, 30, 40°C 에서 측정된 Table 1의 결과와 같이 뚜렷한 효소활성의 차이를 보이지 않았다. 이와 함께 배양세포내의 본효소의 활성도 유사한 결과를 보였다(결과 미제시). 이는 plasmid p3191 상의 클로닝된 유전자는 *Xanthomonas* sp. YL-37에서 유래된 것임을 간접적으로 시사한다.

한편, plasmid p3191 형질전환체와 *Xanthomonas* sp. YL-37에서 각각 생산되는 alkaline protease의 분자량 및 이들 효소가 동일효소임을 밝히고자 하였다. 37°C 및 20°C 에서 각각 형질전환체와 *Xanthomonas* sp. YL-37을 24시간 배양하여 11%의 SDS-PAGE를 실시하였다. 0.1%의 gelatin을 첨가한 SDS-polyacrylamide gel은 전기영동 후 pH 9.5, 37°C 에서 보온 후 amido black으로 활성염색하였다. 그 결과, Fig. 4에서 보는 바와 같이 amido black에 의한 활성염색의 결과에서 *Xanthomonas* sp. YL-37은 주 band가 약 64 kDa에서 나타났으며 이 보다 큰 약 100 kDa에서도 미세한 band가 관측되었다.

한편, 약 38 kDa에서도 band가 관찰되나 이는 실험조작상 효소의 분해물로 간주되었다. 그리고 vector pUC9를 지닌 대장균 형질전환체에서는 뚜렷한 band가 발견되지 않았다. 그러나 p3191의 형질전환체의 경우에는 38 kDa 부근에서 상당량의 분해물이 관측되나 64 kDa에서 *Xanthomonas* sp. YL-37 모 균주와 동일한 크기의 활성 band가 관측되었다. 이는 p3191 상의 DNA 단편은 정상적인 alkaline protease의 code 부분을 지나고 있음을 시사한다. 나아가, 염기쌍으로 환산할 때 약 1.7 kb에 해당하므로 일반적인 세균의 code 부인 0.8~1.8 kb에 상응함을 알 수 있었다. 이는 손상을 받지 않은 alkaline protease



**Fig. 4. Alkaline protease activity staining assay on the SDS-PAGE.**

After cultivation at 37°C, the concentrated supernatant was loaded on 11% SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. After incubating at 37°C, pH 9.5 for 6 hrs, the gel was stained in 0.1% solution of amido black.

code 부위가 클로닝되었음을 나타내었다. 최 등(26)이 분리한 *Streptomyces* 속에서 alkaline protease의 분자량이 약 31 kDa이고 Cecile 등(27)이 분리한 *Erwinia* 속에서의 경우에는 분자량이 각기 50, 53, 55 kDa로, 이러한 결과는 속간의 차이에 의하여 그 크기가 다를 수 있음을 시사한다.

## 요 약

생분해성의 세제를 개발하기 위해 alkaline protease 생산성 균주인 *Xanthomonas* sp. YL-37에서 분리한 염색체 DNA와 plasmid pUC9를 이용하여 대장균에서의 gene bank를 작성하여, 배지상에서 alkaline protease 생산성 균주를 분리하였다. Agarose gel 전기영동과 제한효소지도로부터 약 2.7 kb의 alkaline protease 구조유전자가 포함된 DNA 단편이 pUC 9 내에 클로닝된 것을 확인하였다. 배양상등액을 이용한 SDS-PAGE 상에서의 activity staining assay 결과로 alkaline protease가 세포외로 분비됨을 확인하였으며 분자량은 약 64 kDa으로 추정되었다. 생산된 alkaline protease 활성은 20°C, 30°C, 40°C 에서 차이를 보이지 않았다. 이들 결과로부터 클로닝된 plasmid를 함유하는 대장균에서 생산된 alkaline protease는 *Xanthomonas* sp. YL-37의 alkaline protease와 같음을 알 수 있었다.

## 참고문헌

1. Payne, W.J. 1963. Pure culture studies of the deg-

- radation of detergent compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **5**: 355.
2. Swisher, R.D. 1970. Surfactant biodegradation. New York, Marcel Dekker, Inc.
  3. Jungermann, E. 1970. Cationic surfactant. New York, Marcel Dekker, Inc.
  4. Masaaki, Y., S. Kazuo, and M. Mitsuo. 1984. Purification and properties of acid protease from *Monascus* sp. No. 3405. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1637-1645.
  5. Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganism. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
  6. 장신재, 김윤숙, 성하진, 최용준, 양한철. 1988. *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease에 관한 연구. *한국농화학회지* **31**: 356-360.
  7. 김태호, 박성희, 이동선, 권택규, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알카리성 *Bacillus* 속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. *한국산업미생물학회지* **18**: 159-164.
  8. Ichishima, E., V. Takada, K. Taira, and M. Takeuchi. 1986. Specificities of extracellular and ribosomal serine proteinases from *Bacillus natto*, a food microorganism. *Biochem. Biophys. Acta* **869**: 178-184.
  9. 심창환, 정광선, 신원철, 유주현. 1994. *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 Protease 생산 및 특성에 미치는 영향. *한국산업미생물학회지* **22**: 59-64.
  10. Nakanish, T., Y. Matamura, N. Minamiura, and T. Yamamoto. 1974. Purification and some properties of an alkalophilic proteinase of a *Streptomyces* species. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 37-44.
  11. 김경미, 이태경, 양한철. 1989. *Streptomyces rimous*가 생성하는 protease의 정제와 특성. *한국산업미생물학회지* **17**: 407-411.
  12. 윤성우, 이강표, 유주현, 신철수, 오두환. 1989. *Streptomyces* sp. YSA-130이 생산하는 alkaline protease의 정제와 특성. *한국산업미생물학회지* **17**: 358-364.
  13. Siegel, S., A.H. Brady, and W.M. Awad. 1972. The proteolytic enzymes of the K-1 strain of *Streptomyces griseus* obtained from commercial preparation. *J. Biol. Chem.* **247**: 4155-4159.
  14. 김경신, 한강완, 김형로. 1984. *Streptomyces alboniger*가 생산하는 protease의 특성에 관한 연구. *한국농화학회지* **27**: 174-179.
  15. Malathi, S. and R. Chakraborty. 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Appl. Env. Microbiol.* **57**: 712-716.
  16. 차원섭, 조영제, 최청. 1989. *Aspergillus fumigatus*에 의한 alkaline protease의 생산과 정제. *한국영양식량학회지* **18**: 279-286.
  17. Ito, M. and M. Sugiura. 1968. Studies on *Aspergillus* proteinase. *Yakugaku Zasshi.* **88**: 1576-1582.
  18. 이창호, 권태중, 강상모, 서현효, 권기석, 오희목, 윤병대. 1994. 알카리성 protease를 생산하는 *Xanthomonas* sp. YL-37의 분리 및 조효소의 성질. *한국산업미생물학회지* **22**: 515-521.
  19. Antoine, A., F.Kunst, E. Aubert, A. Klier, and G. Rapoport. 1987. Characterization of the sacQ genes from *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 324-333.
  20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
  21. Hereford, L., K. Fahrner, J. Woolford, M. Rosbash, and D.B. Kaback. 1979. Isolation of yeast histidine genes H2A and H2B. *Cell* **18**: 1261-1271.
  22. Clewell, D.S. and Helinski, D.R. 1969. Supercoiled circular DNA protein complex in *Escherichia coli*: Purification and induced conversion to an open circular form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **62**: 1159-1166.
  23. Morrison, D.A. 1977. Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J. Bacteriol.* **132**: 349.
  24. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
  25. Christa, H. and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* **102**: 196-202.
  26. 최청, 정영진, 성삼경, 최광수, 이재성, 조영제, 권오진. 1992. *Streptomyces* 속 균주가 생성하는 Alkaline Protease의 생산 및 정제. *한국산업미생물학회지* **20**: 169-177.
  27. Cecile, W., P. Delepelaire, S. Letoffe, and M. Schwartz. 1987. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* extracellular proteases: cloning and expression of the protease genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**: 5046-5053.

(Received 25 November 1994)