

재조합 균주 *Escherichia coli* (pLL200K)가 생산하는 *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase의 정제 및 특성

김지연

인제대학교 유전공학연구소

*Bacillus circulans*의 endo- β -1,3-1,4-glucanase 유전자를 발현 vector pQE30에 삽입시키고 *E. coli* M15에서 발현시켜 효소를 생산·정제하였다. 생산된 endo- β -1,3-1,4-glucanase는 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography 과정을 거쳐 단일 단백질로 정제되었다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE 전기영동법으로는 28 kDa이었다. 효소 최적 활성 pH와 온도는 각각 pH 6.8과 60°C였다. 이 효소는 pH 5.5-7.5와 55°C 이하의 온도에서 안정하였다. 또한 본 효소는 여러 가지 금속 이온에 의해 대부분의 활성이 억제되었고, 특히 Hg^{2+} 에서는 강하게 효소 활성이 저해됨을 보였다. 유기 용매에 대한 활성은 10%의 methanol이나 ethanol, isopropanol, 1-butanol에 대하여 모두 낮은 활성을 나타내었다.

Key words □ *Bacillus circulans*, endo- β -1,3-1,4-glucanase, Ni-NTA metal-affinity chromatography, purification

자연계에 다량으로 존재하고 있는 섬유소 물질은 주로 cellulose와 hemicellulose, lignin 세 가지 성분으로 구성되어 있다. 이 중에서 hemicellulose는 식물 세포벽의 주요 구성 성분으로 주요 종류로는 β -glucan과 mannan, xylan, laminarin 등이 있다.

β -Glucan은 glucose를 기본 단위로 구성된 β -1,3-1,4-glucan 상태의 homopolymer로서 자연계에서 흔히 볼 수 있는 보리나 귀리 등의 내배유(endosperm) 세포벽에 존재하며 일부 비내배유(non-endosperm) 조직에도 존재한다고 알려져 있다(8). 그 구조의 약 70%는 β -1,4 결합으로 이루어져 있고, 나머지 30%는 β -1,3 결합으로 이루어져 있으며 식물의 종류에 따라 결합 비율은 다양하다. 이러한 혼합 결합(mixed linkage) 형태는 lichenan에서도 볼 수 있다(4). β -Glucan의 β -1,3에 인접한 β -1,4 결합만을 특이적으로 가수분해시키는 endo- β -1,3-1,4-glucanase는 주요 반응 산물로 3-O- β -cellobiosyl-D-glucose (G3)를 생성하는 반면에, laminarin의 β -1,3 결합이나 carboxymethyl cellulose (CMC)의 β -1,4 결합은 기질로서 인식하지 못한다(1,9).

Endo- β -1,3-1,4-glucanase는 양조 산업과 맥아 제조에 효과적으로 이용되는데, 이 효소는 β -glucan으로부터 분해 산물을 최대한 얻을 수 있게 하고 맥아즙을 좀 더 빠르게 분리시킨다. 그리고 맥주에 형성되는 침전물을 감소시켜 줄뿐만 아니라 발효가 끝난 맥주의 여과 수율을 증진시켜 주는 등 생산 과정에서 발생하는 문제점들을 보완해 준다(2,3,7). 이 밖에도 가축들의 먹이로 사용되는 여러 β -glucan들을 처리하여 소화력을 증진시키는데 도움이 되기도 한다(6). β -Glucan의 산업적 이용을 위해서는 β -glucan의

가수분해, 특히 화학적 분해법에 비해 많은 장점을 가지고 있는 미생물을 이용한 효소적 분해법의 개발이 가장 중요한 선결과제라고 하겠다.

*Bacillus*는 분자유전학 측면에서 볼 때 그람 양성 세균에서 가장 잘 규명된 속 중 하나이다. *Bacillus* 속의 몇 가지 종들은 상이한 활성을 가진 세포 외 분해 효소를 다양하게 분비하여 여러 가지 기질들을 분해함으로써 유전자 및 효소 수준, 그리고 산업적으로 폭넓게 연구되고 있다(14). 대표적으로 여러 종류의 glucanase, amylase, protease, glucose isomerase와 같은 효소들이 잘 알려져 있다(15). 특히 endo- β -1,3-1,4-glucanase는 생성 균주가 제한되어 있을 뿐만 아니라 이 효소 이외에 여러 종류의 다당류 분해 효소가 복합적으로 분비되어 면밀한 생화학적 특성 연구나 산업적인 활용에 어려움이 따랐다. 이를 해결하기 위해서는 효소의 대량생산 및 효율적 분비가 필요한데 유전공학적인 방법을 이용함이 바람직하다.

본 연구자는 *B. circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase 유전자를 pUC19을 vector로 하여 대장균 내에서 클로닝 및 발현시켜 재조합 플라스미드 pLL200K를 얻어 기본적인 분자생물학적 연구를 수행한 바 있다(11). 본 연구에서는 endo- β -1,3-1,4-glucanase를 분리·정제하고 효소의 생화학적 특성을 조사하여 앞으로 산업적으로 활용하는데 있어서 기초 토대를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 발현 vector

본 연구에 사용된 endo- β -1,3-1,4-glucanase 유전자의 공여 균주는 *Bacillus circulans* ATCC21367이었으며, 효소 정제 시 사용된 발현 vector로는 QIAGEN의 pQE30이, 발현 숙주로는 *E. coli* M15 (pREP4)가 사용되었다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-320-3737, Fax: 055-321-2355
E-mail: biokjy@inje.ac.kr

배지 및 생장조건

*E. coli*는 LB (0.5% yeast extract와 1% tryptone, 1% NaCl) 배지를 사용, 37°C에서 진탕 배양하였다. 한천 평판배지의 경우에는 LB 배지에 한천을 1.5% (w/v)되게 첨가하였다. 효소 활성을 나타내는 형질전환체의 선별을 위해서는 기질인 lichenan (0.3%)과 항생제(ampicillin 100 µg/l과 kanamycin 25 µg/l)를 첨가하여 사용하였다.

Primer 합성

Endo-β-1,3-1,4-glucanase 유전자의 open reading frame (ORF) 만을 증폭시키기 위해 재조합 플라스미드 pLL200K를 제한효소 *Pst*I로 처리한 후 2.0 kb의 삽입 절편을 얻었다. Endo-β-1,3-1,4-glucanase 유전자의 ORF (771 bp)를 증폭하기 위해 ORF 시작 부위의 5' 쪽 염기 서열과 종결 부위에서 3' 쪽으로 연장한 염기 서열 말단에 일치하는 두 가지의 primer를 제조하였다. Forward primer의 5'에는 제한효소 *Bam*HI, reverse primer의 5'에는 *Sal*I의 인식 부위를 첨가하였다.

PCR 반응

PCR을 수행하기 위하여 1× 반응 완충용액(10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100)과 0.02 mM MgCl₂, 20 µM dNTPs, 10 pmol primer, 적당량의 주형 DNA, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 첨가하여 50 µl되게 반응 혼합물을 만들어 PCR 반응을 진행시켰다. 이 때 DNA thermal cycler (Gene-Amp[®] PCR system 2400-PERKIN ELMER, Norwalk, USA)를 사용하였다. 처음 94°C에서 3 분간 변성시킨 후 94°C에서 1 분, 55°C에서 1 분, 72°C에서 2 분씩 30 회 반복하여 DNA를 증폭시키고 마지막으로 72°C에서 10 분간 연장하여 PCR 반응을 종결시켰다. 증폭된 DNA는 1% agarose gel 상에 전기영동하여 확인하였다.

발현 vector로의 클로닝 및 형질전환

증폭된 ORF 유전자를 발현 vector인 pQE30에 subcloning하고 *E. coli* M15 (pREP4)에 형질전환하였다. 우선 PCR을 이용해 증폭된 DNA를 gel 상에서 회수하여 *Bam*HI과 *Sal*I로 처리한 다음, 다시 1% agarose gel에 전기영동하여 elution하였다. 이렇게 준비한 endo-β-1,3-1,4-glucanase 유전자와 동일 제한효소로 처리된 vector pQE30을 서로 ligation시켜 발현 숙주인 *E. coli* M15 (pREP4)로 형질전환시켰다. 형질전환은 Hanahan의 방법(10)을 적절히 변형시켜 수행하였다. 형질전환체는 기질인 lichenan이 0.3% 첨가된 LB (ampicillin 100 µg/ml과 kanamycin 25 µg/ml 포함) 한천 평판배지에서 congo red를 이용한 선별 방법을 통하여 확인하였다(17).

Subcloning된 ORF의 발현

효소 생산을 위한 최적 배양 조건을 확립하여 다음과 같이 수행하였다. LB (ampicillin 100 µg/ml과 kanamycin 25 µg/ml 포함) 한천 배지에서 잘 자란 형질전환체의 단일 colony를 20 ml의 LB (ampicillin 100 µg/ml과 kanamycin 25 µg/ml 포함) 액체 배지에

접종하여 37°C에서 12~16 시간 동안 배양하였다. 배양액을 다시 1 l의 LB (ampicillin 100 µg/ml과 kanamycin 25 µg/ml 포함) 액체 배지에 접종, 37°C에서 OD₆₀₀ 0.5~0.7이 될 때까지 배양하였다. 그런 다음 배양액에 IPTG를 최종 농도 1 mM 되게 첨가한 후 2 시간 동안 연속 배양하고 SDS-PAGE를 통하여 과발현된 단백질을 확인하였다. 나머지 배양액은 4,000×g에서 20 분 동안 원심분리하여 세포 침전물을 얻었다.

조효소액 조제

침전 세포체는 Triton X-100을 0.1%되게 첨가한 lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)로 현탁시켰다. 이 현탁액을 200 W에서 10 초 간격으로 6 회 초음파 파쇄처리한 후 12,000×g에서 20 분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소 정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소 정제

단백질 정제는 QIAGEN의 Ni-NTA agarose gel을 이용하여 정제하였다. 준비해 둔 조효소액을 Ni-NTA gel에 통과시킨 후 각 10 ml씩의 lysis buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole), wash I buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole), wash II buffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole) 순서로 세척하였다. 여기에 4 ml의 elution buffer I (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 100 mM imidazole)을 gel에 통과시켜 1 ml씩 회수하였고, 다시 4 ml의 elution buffer II (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)를 이용하여 1 ml씩 회수하였다. 마지막으로 100 mM EDTA가 첨가된 elution buffer III (50 mM NaH₂PO₄ pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, 100 mM EDTA) 4 ml을 통과시켜 1 ml씩 회수하였다. 회수한 효소액 중 10-20 µl를 취해 4× PAGE sample buffer와 섞어 SDS-PAGE를 수행하였다. 이를 통하여 효소의 정제 정도와 농도를 판별하여 효소 활성 측정에 이용하도록 하였다.

효소 활성 측정

Endo-β-1,3-1,4-glucanase의 효소 활성 측정을 위해서는 barley β-glucan (1%, w/v) 또는 lichenan (1%, w/v)이 첨가된 각각의 0.1 M 인산 완충용액(pH 6.8)을 고압 증기 멸균하여 효소 반응의 기질로 사용하였다. 기질 0.5 ml과 효소액 0.5 ml을 혼합하여 60°C에서 10 분 동안 반응시켰다. 기질 가수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)에 의한 방법에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량하였으며 60 ml에서 1 분간 1 µmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다(13).

단백질 정량

단백질 정량은 280 nm에서의 OD 값을 측정하는 자외선 흡광도법과 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하는 Lowry 법(12)을 이용하여 수행하였다.

효소의 일반적인 특성

효소 활성 최적 온도는 30°C부터 5~10°C 간격으로 온도를 달리하여 각 온도에서 10 분 동안 반응시킨 효소 활성을 측정하여 결정하였다. 온도에 대한 효소의 열 안정성은 정제된 효소액을 각 온도에서 1 시간 동안 보존한 다음 최적 온도에서 10분간 반응시켜 잔여 효소 활성을 측정하는 방법과, 일정 온도에서 10~60 분까지 10 분 간격으로 효소액을 미리 반응시킨 후 최적 온도에서 10 분 동안 반응시켜 잔여 효소 활성을 측정하는 방법을 이용하여 결정하였다. 효소 활성 최적 pH는 시트르산 완충용액(pH 3.0~6.0)과 인산 완충용액(pH 6.0~8.0), Tris 완충용액(pH 8.0~9.0), 탄산 완충용액(pH 9.0~11.0)을 사용, 각각의 pH에서 최적 온도로 효소 활성을 측정하여 결정하였다. 또한 각 pH별로 효소액을 40°C에서 24 시간 동안 방치한 다음 잔존 효소 활성을 측정하는 방법으로 pH에 대한 효소의 안정성을 측정하였다. 각종 금속 이온이 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 금속 이온을 1 mM 농도로 효소액에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 방치한 후 잔여 효소 활성을 측정하였다. 또한 효소액에 유기 용매의 농도를 10% (v/v)되게 첨가하여 효소 활성을 측정, 효소 활성에 대한 유기 용매의 효과를 측정하였다. 그리고 효소 활성 최적 pH 완충용액에 여러 가지 기질(lichenan이나 barley β-glucan, birchwood xylan, oat spelt xylan, CMC, soluble starch, chitin, pullulan, mannan 등)을 1%되게 첨가한 다음 효소액을 가하여 효소 활성을 측정하여 기질 특이성을 살펴보았다.

결과 및 고찰

효소 정제 및 분자량 측정

발현 vector인 pQE30을 이용하여 *E. coli* M15로 subcloning된 *B. circulans*의 endo-β-1,3-1,4-gluconase 유전자(Fig. 1)가 생산하는 효소를 정제하였다. 100 μg/ml ampicillin과 25 μg/ml kanamycin을 첨가한 LB 배지에서 과발현된 균체를 초음파 처리하여 조 효소액을 조제하고 이를 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography 방법으로 정제하였다. Table 1에 요약한 바와 같이 정제 효소의 수율은 2.6%였으며 specific activity는 23.6 units/mg으로서 specific activity가 0.95 units/mg이었던 정제 전의 조효소 용액에 비해 약 24.8 배 정제된 단일 단백질 형태의 endo-β-1,3-1,4-gluconase가 분리되었다. SDS-PAGE 전기영동법으로 측정된 정제 효소의 분자량은 Fig. 2에 표시되어 있는 바와 같이 약 28 kDa로 확인되었는데, 이 결과는 Kim 등(11)이 보고한 선행연구에서의 분자량과 일치하였다.

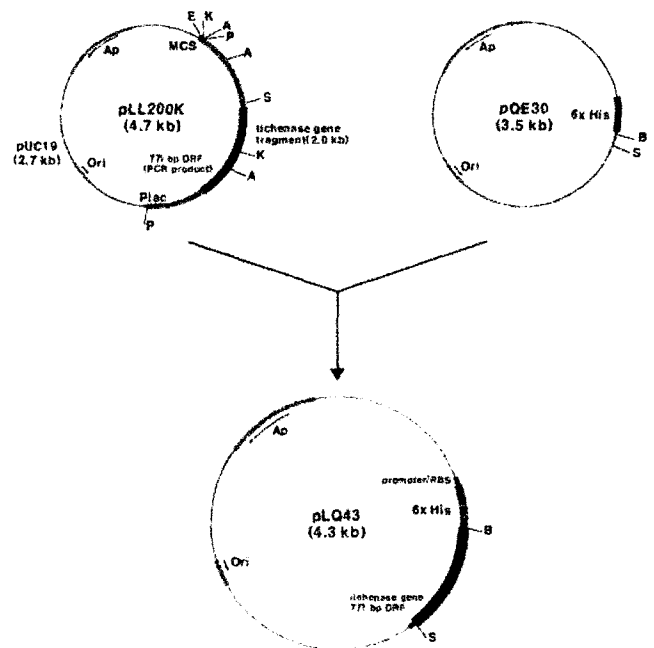


Fig. 1. Construction of the endo-β-1,3-1,4-gluconase expression vector, pLQ43. The 771 bp ORF was amplified from the pLL200K by PCR and cloned into pQE30 vector. The vector was transformed into *E. coli* M15. Symbols: A, AvaI; Ap, ampicillin resistance; B, BamHI; E, EcoRI; K, KpnI; MCS, multiple cloning site; ORF, open reading frame; Ori, replication origin; P, PstI; Plac, lac promoter; RBS, ribosome binding site; S, Sall.

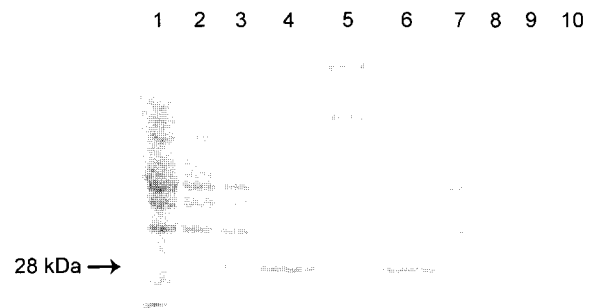


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified endo-β-1,3-1,4-gluconase. Protein was analyzed in 12% polyacrylamide gel and stained with coomassie brilliant blue R-250. An arrow indicates the purified endo-β-1,3-1,4-gluconase. Lane 1, *E. coli* M15 (pQE30); lane 2, *E. coli* M15; lane 3, crude extract; lanes 4, 6, purified enzyme; lane 5, standard protein molecular weight markers(kilodaltons); lanes 7, 8, overexpressed cells; lanes 9, 10, non-induced cells (pLQ43). Overexpression was induced by addition of 1 mM of IPTG and overexpressed His-tag protein was purified by Ni-NTA (QIAGEN).

Table 1. Purification of the *B. circulans* endo-β-1,3-1,4-gluconase from *E. coli* M15

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)	
Crude extract	Non-induced protein	780.9	738.1	0.95	100	1.0
	Overexpressed protein	3.7	53.1	14.4	7.2	15.2
Purified His-tag fusion protein	0.8	18.9	23.6	2.6	24.8	

효소 활성 최적 온도와 온도에 대한 효소 안정성

Endo- β -1,3-1,4-glucanase 활성에 미치는 반응 온도 효과를 측정하기 위하여 0.1 M 인산 완충용액(pH 6.8)에 lichenan을 1%로 용해시키고, 이 용액을 취하여 온도를 30~80°C까지 변화시키면서 정제된 효소액을 가하고 활성을 측정된 결과 Fig. 3에 표시되어 있는 바와 같이 60°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 40°C의 최적 온도를 가지고 있는 *Orpinomyces* strain PC-2의 endo- β -1,3-1,4-glucanase보다 높으며, 85°C에서 최적 온도를 지닌 *Rhodo-thermus marinus*의 초고온성 endo- β -1,3-1,4-glucanase를 제외하고는 비교적 높은 최적 온도를 가진 효소로 분류할 수 있다(5,16). 또한 본 효소의 온도에 대한 안정성을 조사해 본 결과 Fig. 4와 5에서 보는 바와 같이 60°C에서 60분 가열하여도 45% 전후의 잔여 활성을 유지함으로써 비교적 열에 안정하다고 사료된다.

효소 활성을 위한 최적 pH와 pH에 대한 효소 안정성

Endo- β -1,3-1,4-glucanase 활성에 미치는 최적 pH를 측정하기

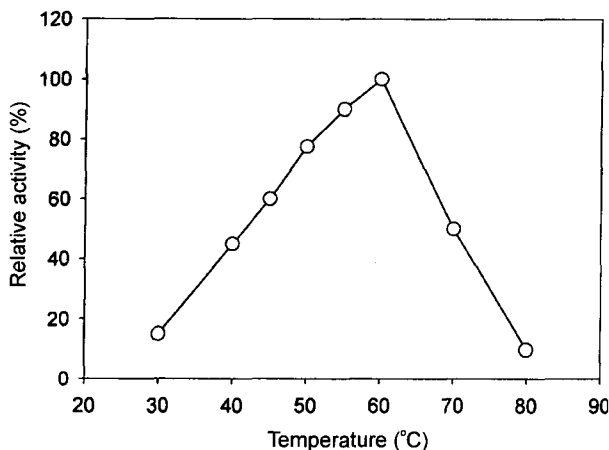


Fig. 3. Effect of temperature on activity of the endo- β -1,3-1,4-glucanase. The enzyme reaction was carried out at various temperatures for 10 min in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8).

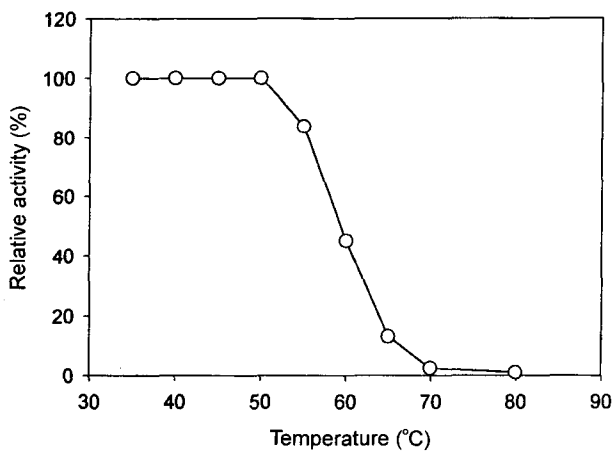


Fig. 4. Thermal stability of the endo- β -1,3-1,4-glucanase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preincubating of the enzyme solution at various temperatures for 1 hr.

위하여 pH 3.0~11.0 범위를 나타내는 네 가지 서로 다른 완충용액(시트르산 완충용액 pH 3.0~6.0, 인산 완충용액 pH 6.0~8.0, Tris 완충용액 pH 8.0~9.0 및 탄산 완충용액 pH 9.0~11.0)을 조제하여 lichenan을 1%로 용해시키고, 이 용액에 정제된 효소액을 가한 다음 그 활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. 본 효소는 반응액의 pH가 6.0~7.0일 때 비교적 높은 효소 활성을 보였으며 이 범위를 벗어나면 효소 활성이 현저히 감소하였고, 특히 pH 6.8에서 가장 높은 효소 활성을 보였다. 또한 각각 다른 pH (pH 3.0~11.0)로 조정된 정제 효소액을 4°C에서 24 시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 측정, pH에 대한 효소 안정성을 검토하여 Fig. 7과 같은 결과를 얻었다. 본 효소는 pH 5.5~7.5 범위에서 안정하였다. 클로닝된 효소의 활성에 미치는 최적 pH는 정제 전과 후에 각각 pH 5.6과 pH 6.8로 나타났다(11). 이러한 최적 pH의 차이는 정제되지 않은 조효소액에 있어서 endo- β -1,3-1,4-glucanase 이외의 다른 여러 가지 효소들의 간섭 작용 등이 관여하

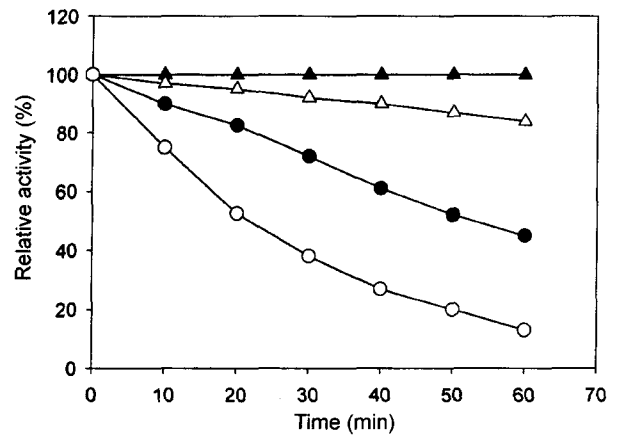


Fig. 5. Thermal stability of the endo- β -1,3-1,4-glucanase. The enzyme reaction was carried out at optimal condition after preheating of the enzyme solution at the indicated temperatures for the different time periods. Symbols: \circ , 65°C; \bullet , 60°C; \triangle , 55°C; \blacktriangle , 50°C.

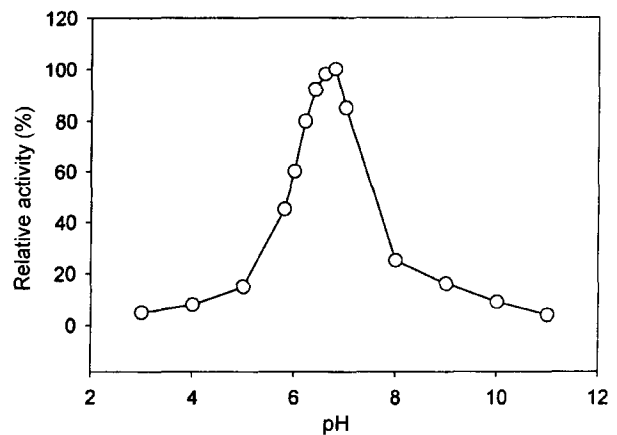


Fig. 6. Effect of pH on activity of the endo- β -1,3-1,4-glucanase. The enzyme reaction was carried out at 60°C for 10 min in 0.05 M citrate (pH 3.0~6.0), 0.1 M phosphate (pH 6.0~8.0), 0.1 M Tris (pH 8.0~9.0) and 0.1 M bicarbonate (pH 9.0~11.0) buffer.

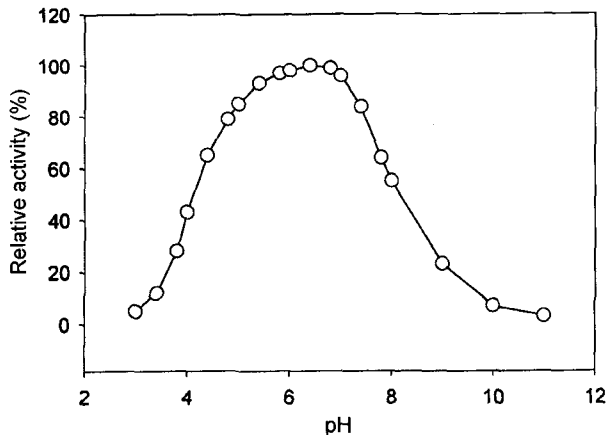


Fig. 7. pH stability of the endo- β -1,3-1,4-glucanase. The reaction was carried out at 60°C for 10 min after 24 hr preincubation at 4°C at the various pH buffer (0.05 M citrate pH 3.0~6.0, 0.1 M phosphate pH 6.0~8.0, 0.1 M Tris pH 8.0~9.0 and 0.1 M bicarbonate pH 9.0~11.0).

였을 것으로 사료되며 정제된 효소가 pH 5.5~7.5에서 안정한 특성을 미루어 볼 때 pH 5.6에서도 효소 활성은 안정하게 유지되었을 것으로 판단된다.

금속 이온의 영향

Table 2에 표시한 금속 이온을 1 mM 농도로 효소액에 첨가, 37°C에서 1 시간 동안 방치한 다음 잔존 효소 활성을 측정, 각

Table 2. Effect of metal ions and EDTA on the activity of purified endo- β -1,3-1,4-glucanase

Metal ions and EDTA (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
KCl	70
NaCl	75
BaCl ₂	35
CaCl ₂	75
CoCl ₂	67
HgCl ₂	7
MgCl ₂	68
NiCl ₂	120
ZnCl ₂	51
CuSO ₄	45
FeSO ₄	72
MnSO ₄	33
PbSO ₄	46
AgNO ₃	32
EDTA	67

Each enzyme solution was preincubated at 37°C for 1 hr in the presence of various metal ions and EDTA (final concentration of 1 mM) before measuring endo- β -1,3-1,4-glucanase activity. Enzyme reaction was carried out at 60°C for 10 min.

종 금속 이온이 효소 활성에 미치는 영향을 조사하였다. AgNO₃와 BaCl₂, CuSO₄, MnSO₄, PbSO₄, ZnCl₂와 같은 대부분의 금속 이온에 효소 활성이 30~50% 정도 크게 감소되었으며, 특히 HgCl₂에서는 거의 활성을 보이지 않았다.

유기 용매의 효과

Endo- β -1,3-1,4-glucanase 활성이 유기 용매의 영향을 얼마나 받는가를 알아보기 위하여 0.1 M 인산 완충용액(pH 6.8)에 methanol이나 ethanol, isopropanol, 1-butanol의 농도를 10%(v/v) 되게 하고, lichenan을 1% 되게 용해시켜, 정제된 효소액을 가하여 60°C에서 10 분간 반응시켜 활성을 측정한 결과, 모두 낮은 활성을 나타내었는데, 특히 1-butanol에서는 완전히 효소 활성을 상실하였다(Table 3).

기질 특이성

Endo- β -1,3-1,4-glucanase를 포함한 각종 탄수화물의 분해 정도를 측정, endo- β -1,3-1,4-glucanase의 기질 특이성을 조사한 결과 lichenan과 barley β -glucan에서만 높은 특이성을 보였을 뿐 다른 기질에서는 활성을 전혀 보이지 않았다(Table 4). 이는 *Orpinomyces* strain PC-2와 *Rhodothermus marinus*의 endo- β -1,3-1,4-glucanase와 같은 특성이라고 할 수 있다(5,16). 본 연구는 *B. circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase를 이용하여 β -glucan을 가수분해시키는데 기초적인 자료가 될 것으로 사료된다. 앞으로 본 연구를 바탕으로 효소 대량생산을 위한 심층 연구를 수행한다면

Table 3. Effect of organic solvents on the activity of purified endo- β -1,3-1,4-glucanase

Organic solvent (10%)	Relative activity (%)
None	100
Methanol	57
Ethanol	39
Isopropanol	27
1-Butanol	0

Table 4. Activity of the endo- β -1,3-1,4-glucanase against various substrates

Substrate (1%, w/v)	Relative activity (%)
Lichenan	100
Barley β -glucan	88
Oat spelt xylan	0
Birchwood xylan	0
CMC	0
Soluble starch	0
Chitin	0
Pullulan	0
Mannan	0

*Substrates were solubilized in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8).

산업적 응용 측면에서 중요한 정보를 더 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2001학년도 인제대학교 학술연구조성비 지원과 일부는 과학기술부·한국과학재단 지정 지역협력연구센터인 인제대학교 바이오헬스 소재 연구센터의 연구비 지원에 의해 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anderson, M.A. and B.A. Stone. 1975. A new substrate for investigating the specificity of β -glucan hydrolases. *FEBS Lett.* 52, 202-207.
- Bamforth, C.W. 1982. Barley β -glucans. Their role in malting and brewing. *Brew. Dig.* 57, 22-27.
- Bamforth, C.W. and H.L. Martin. 1981. β -Glucan and β -glucan solubilase in malting and mashing. *J. Inst. Brew.* 87, 365-371.
- Buliga, G.S., D.A. Brant, and G.B. Fincher. 1986. The sequence statistics and solution conformation of a barley (1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 4)- β -D-glucan. *Carbohydr. Res.* 157, 139-156.
- Chen, H., X.L. Li, and L.G. Ljungdahl. 1997. Sequencing of a 1,3-1,4- β -D-glucanase (lichenase) from the anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2: properties of the enzyme expressed in *Escherichia coli* and evidence that the gene has a bacterial origin. *J. Bacteriol.* 179, 6028-6034.
- Dierick, N.A. 1989. Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: enzymes and fermentation. *Arch. Anim. Nutr.* 39, 241-161.
- Enari, T.M. and P.H. Markkanen. 1975. Microbial β -glucanases in brewing. *Proc. Am. Soc. Brew. Chem.* 33, 13-17.
- Fincher, G.B., P.A. Lock, M.M. Morgan, K. Lingelbach, R.E.H. Wettlenhall, J.F.B. Mercer, A. Brandt, and K.K. Thomson. 1986. Primary structure of the (1-3,1-4) β -D-glucan 4-glucanohydrolase from barley aleurone. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 83, 2081-2085.
- Fleming, M. and K. Kawakami. 1977. Studies of the fine structure of β -D-glucans of barleys extracted at different temperatures. *Carbohydr. Res.* 57, 15-23.
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In D.M. Glover (ed.), DNA cloning, vol. I. IRL press, Oxford. p. 109-135.
- Kim J.Y., H.B. Kim, and D.S. Lee. 2002. Cloning and expression of the *Bacillus circulans* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (*bglBCI*) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 24, 53-57.
- Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41, 711-753.
- Priest, F.K. 1989. Products and applications, In C.R. Harwood (ed.), *Bacillus*. Plenum Press, New York. p.293-320.
- Spilliaert, R., G.O. Hreggvidsson, J.K. Kristjansson, G. Eggertsson, and A. Palsdottir. 1994. Cloning and sequencing of a *Rhodothermus marinus* gene, *bglA*, coding for a thermostable β -glucanase and its expression in *Escherichia coli*. *FEBS* 224, 923-930.
- Zappe, H., D.T. Jones, and D.R. Woods. 1987. Cloning and expression of a xylanase gene from *Clostridium acetobutylicum* P262 in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 57-63.

(Received October 28, 2002/Accepted November 20, 2002)

ABSTRACT: Purification and Characterization of an Endo- β -1,3-1,4-Glucanase from *Escherichia coli* (pLL200K)

Ji-Yeon Kim (Institute of Genetic Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea)

A gene coding for endo- β -1,3-1,4-glucanase of *Bacillus circulans* was subcloned into *Escherichia coli* M15 using pQE30 as an expression vector. Endo- β -1,3-1,4-glucanase produced by the recombinant expression plasmid pLQ43 was intactly purified to a single protein through a nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) metal-affinity chromatography method. The molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 28 kDa by SDS-PAGE. The optimum pH and temperature of the enzyme activity were pH 6.8 and 60 °C, respectively. This enzyme was fairly stable in the pH ranging 5.5 ~7.5 and at the temperatures lower than 55 °C. The enzyme appeared to be sensitive to most of the metal ions, especially to Hg²⁺, and also to methanol, ethanol, isopropanol or 1-butanol at a concentration of 10%(v/v).