

청국장 발효균주 *Bacillus licheniformis* B1의 β -1,4-gluconase 특성

황재성 · 유형재 · 김성조 · 김한복*
호서대학교 자연과학대 생명공학과, 호서대 기초과학연구소

대두가 발효된 청국장에는 미생물, 다양한 효소와 생리활성물질이 존재한다. 청국장의 탄수화물을 분해하는 cellulase에 대한 연구는 많지 않다. Oligosaccharide는 다양한 생리활성을 지니고 있다. Congo red test 및 활성염색을 통해, 효소액이 cellulase를 포함하는 것을 확인했다. 청국장 발효 균주 *Bacillus licheniformis* B1이 분비하는 cellulase활성의 최적 pH와 온도는 각각 10과 40°C이었다. TLC분석을 통해 효소액은 carboxymethyl cellulose (CMC)를 분해하여 2탄당 이상을 생성함을 확인하였다. 본 균주를 이용해서 제조한 보리 청국장에서는 효소의 활성이 증가되었다. 본 균주의 cellulase 유전자를 클로닝하여 분석한 결과, 본 효소는 β -1,4-gluconase였으며, 전체 coding 영역 10~460번째 아미노산 영역 중, 32군데서 polymorphism을 보였다.

Key words □ *Bacillus licheniformis*, β -1,4-gluconase, cellulose, Chungkookjang

대두가 발효된 청국장에는 미생물과 다양한 효소, 생리활성물질이 존재하며 장건강 및 혈액순환 개선 등의 효과로 요즘 크게 각광을 받고 있다(10). 청국장은 항산화(16), 혈압강하(12) 및 면역조절 효과(6) 등이 알려져 있다. 또한 대두식품은 유방암과 전립선암의 발생을 감소시킨다(17).

청국장에는 혈전용해효과가 있는 단백질분해효소가 존재하며 이에 대한 많은 연구가 진행 중이다. 그러나 그 밖에 청국장에서 탄수화물을 분해하는 효소에 관한 연구는 많지 않다. 고분자 탄수화물이 분해된 oligosaccharide는 다양한 생리활성을 지니고 있다(2, 8, 9). 본 연구에서는 청국장발효균주의 β -gluconase의 특성을 분석하고 유전자를 클로닝하였다. β -Glucan은 면역력을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(15), 또한 당뇨예방 효과도 보고되고 있다(9). β -Glucan 자체는 고분자 물질이며, 생체내에서 효율적으로 흡수되기 위해서는 이를 작은 단위로 분해할 수 있는 β -gluconase의 도움이 필요하다. 본 연구에서는 청국장에 보리를 첨가함으로써 효소의 활성을 증가시킬 수 있는지 여부도 알아보았으며, 본 효소의 유전자를 클로닝함으로써, 효소를 대량생산할 수 있는 발판을 마련하였다.

재료 및 방법

청국장발효

Bacillus licheniformis B1을 LB 배지에서 37°C, 18시간 동안 배양한 액을 starter로 이용하였다(10). 정선된 백태를 18시간 동안 수지하였다. 120°C에서 30분간 멸균한 원료 대두 500 g 혹은 여기에 5 g의 분말 보리가 포함된 대두에(보리청국장), 상기 균

주 배양액이 1%가 되도록 접종하였다. 접종 후 40°C 배양기에서 발효시켰다.

조효소액 제조

1% Cellulose가 첨가된 LB 액체배지에서, *B. licheniformis* B1을 16시간 동안 배양한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 3,000 Da의 membrane filter에 넣고 원심분리하여 3,000 Da 이상의 단백질을 얻었다. Filter에 붙어 있는 단백질을 pH 7.0의 PBS에 녹여 사용하였다.

Congo red test

0.3% (w/v) Carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma, USA)를 넣은 LB 한천배지에 *B. licheniformis* B1을 도말하여 37°C에서 14시간 동안 배양하였다. 배양된 평판배지에 0.1% (w/v) Congo red 용액을 처리한 후 30분간 방치하였다. 1 M NaCl 용액으로 Congo red 용액을 세척한 뒤 활성을 측정하였다.

활성염색

기질과 반응시키기 위해 SDS-denaturing polyacrylamide gel에 들어가는 증류수 대신 1% (w/v) CMC 수용액을 사용하였다. 조효소액을 전기영동한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7)로 세척한 후 2.5% (v/v) Triton X-100에 30분간 실온에 두었다. 동일 완충용액에서 40°C에서 4시간 동안 효소-기질 반응을 진행시켰다. 이어서 0.1% Congo red 용액으로 15분간 염색하고 1 M NaCl로 충분히 세척한 후 활성대를 관찰하였다.

β -Gluconase의 효소활성 측정

기수분해로 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)에 의한 방법에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(13).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-540-5624, Fax: 82-41-548-6231
E-mail: hbkim@hoseo.edu

효소의 최적 pH 및 온도의 결정

0.1 M Tris-Cl의 pH를 HCl이나 NaOH로 조절하여 다양한 범위의 pH buffer를 제조하였다. 조효소액 0.5 ml와 1% CMC를 녹인 기질 0.5 ml를 혼합하여 40°C, 각 pH에서 1시간 반응시킨 후, DNS법을 이용하여 흡광도를 측정하였다. pH 10의 0.1 M Tris-Cl에 1% CMC를 녹인 기질 0.5 ml와 조효소액 0.5 ml를 혼합하여 각 온도에서 1시간 반응시킨 후 DNS법을 이용하여 흡광도를 측정하였다.

TLC 분석

조효소액 0.5 ml와 1% CMC를 녹인 기질 0.5 ml를 혼합하여 40°C에서 24시간 동안 반응시킨 후 Silica gel 60 TLC plate (Merck, Germany)에 spot하였다. 이 때 isoamylalcohol:ethanol:ammonia:water를 50:60:1:30으로 혼합하여 전개용매로 사용하였다. 전개한 후 공기 중에서 건조시키고, 4-methoxybenzaldehyde:H₂SO₄:glacial acetate:ethanol을 5:5:1:90으로 혼합된 용액을 분사한 후 120°C에서 10분간 발색시켰다.

β-1,4-Glucanase 유전자의 cloning

*B. licheniformis*의 chromosomal DNA를 분리·정제하였다. PCR을 위한 primer로 forward primer는 5'-ATGAAACGGTCAA TCTCTAT-3', reverse primer로는 5'-CTAATTTGGTCTGTCC CCA-3'를 사용하였다. PCR은 1 cycle당 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 cycle을 수행하였다. 이 PCR 산물을 pGEM-T-EASY vector (Promega, USA)에 연결하였다.

Glucanase 아미노산 배열의 다중 비교

Bacillus licheniformis B1의 β-1,4-glucanase의 아미노산 배열을 *Bacillus licheniformis* strain K11 (cellulase) (GenBank EF070195), *Bacillus amyloliquefaciens* strain UMAS 1002 endoglucanase A (engA) (GenBank AF363635), *Bacillus subtilis* DLG endo-β-1,4-glucanase (GenBank M16185)와 비교하였다(http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/의 multiple sequence alignment with hierarchical clustering을 이용하여 분석하였다.).

결과 및 고찰

Congo red test 및 활성염색

CMC가 포함되어 있는 배지에 청국장 발효 균주를 접종했을 때 CMC가 분해되면서 Congo red로 염색되었다. 또한 gel상에서 효소활성을 알아보기 위해 활성염색을 사용했을 때도, 하나의 활성밴드가 확인되었다(자료 미제시). 이로써 청국장 발효 균주는 cellulase를 분비하는 것으로 사료되었다.

효소액의 최적 pH 및 온도

pH 7 이하에서는 효소의 활성이 약하다, pH 10에서 최고의 활성을 나타내었으며, 그 이상의 pH 범위에서도 상당한 활성을

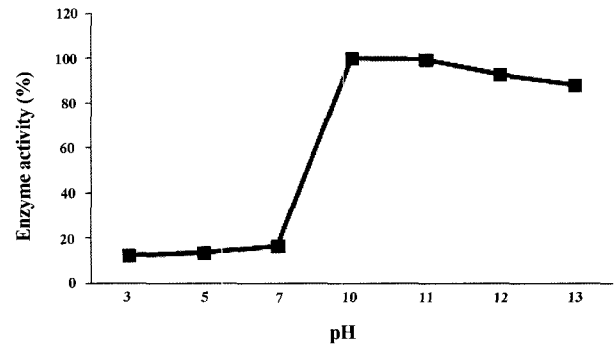


Fig. 1. Effect of pH on the enzyme activity. The enzyme activities were determined at various pHs using DNS. Relative enzyme activity is shown.

유지하였다(Fig. 1). 몇몇 호알칼리성 *Bacillus* β-1,4-glucanase가 보고되어 있다(1, 3, 5). 본 연구에서 확인된 효소는, pH 10의 강한 알칼리에서 최적 활성을 보이기 때문에, 세제로서 개발될 수도 있을 것이다. 대부분의 세제는 폼팡이에서 추출되었으나, *Bacillus* 균주의 배양 이점 등을 고려한다면, 경쟁력이 있을 것이다. 효소활성의 최적온도는 40°C이었으며, 20°C에서는 최대활성의 40%를, 50°C에서는 최대활성의 68%를 나타내어 어느 정도의 내열성을 보여 주었다(Fig. 2). 온도가 60°C가 넘어가자 효소의 활성은 급격히 떨어졌다(Fig. 2).

TLC 분석

조효소액에 의한 CMC의 가수분해 산물이 glucose 아래에 보이는 것으로 보아 가수분해물은 2탄당 이상의 oligosaccharide로 사료된다(Fig. 3). 또한 CMC를 분해하는 것으로 보아 조효소액은 cellulase를 함유할 것으로 사료된다.

보리청국장

대두에 균주를 접종하여 청국장 발효를 시킨 후에 일정량을 물에 녹인 상등액을 얻었다. 그 상등액의 DNS 분해능을 측정하면 배양 6시간부터 30시간 동안 활성이 더욱 증가하는 것을 볼

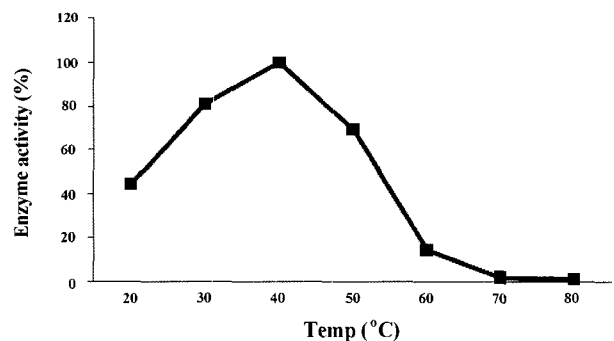


Fig. 2. Effect of temperature on the enzyme activity. The enzyme activities were determined at various temperatures using DNS method. Relative enzyme activity is shown.



Fig. 3. TLC analysis of CMC degraded by the enzyme solution. Carboxymethyl cellulose (CMC) was not treated with the enzyme solution (lane 1). The enzyme solution was added into 0.1% CMC solution (lane 2, 3). Glucose is shown as the arrow.

수 있었다(Fig. 4). 이는 균주의 분해효소가 배양 6시간부터 유도 되는 것으로 사료된다. 효소가 유도되는 것으로 보아 대두 자체 에도 효소의 기질이 다량 존재하는 것으로 추정된다. 또한 대두 에 보리를 추가로 포함시켜서 발효 시키면, 대두 단독의 경우보 다 효소의 활성이 더욱 증가하였다(Fig. 4). 보리에도 효소의 기 질이 상당량 존재하는 것을 뜻한다. 보리의 가수 분해물에 포함 되어 있을 β -1,3결합은 면역증강 효과가 있을 것으로 추정된다

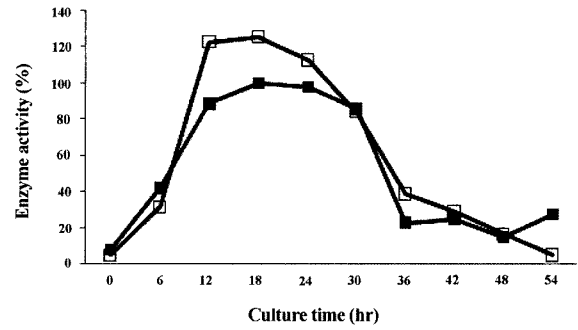


Fig. 4. Enzyme activity in Chungkookjang. The glucanase activities in Chungkookjang (■) and Chungkookjang containing barley (□) were determined using DNS method. Relative enzyme activity is shown.

(15). 보리 내배유의 β -glucan은 glucose를 기본단위로 구성되며 β -1,3-1,4 결합으로 이루어진 homopolymer이다(4, 7).

β -Glucanase에는 β -1,3, β -1,4, β -1,3-1,4-glucanase 등 3가지 종류가 있다(7). 이 중, β -1,3-1,4-glucanase는 보리나 lichenan의 β -1,3에 인접한 β -1,4 결합을 인식하여 절단한다(7, 11). 본 연구에서 사용한 청국장 발효 균주에서도 이러한 효소들이 존재하는 여부를, 해당 유전자의 클로닝과 효소 활성 등을 통해 확인한 결과, β -1,3-1,4-glucanase가 아닌 β -1,4-glucanase로 확인되었다(Fig. 5). 청국장에도 β -1,3 결합을 지닌 보리를 첨가, 발효시키므로써, 면역 효과를 증가시킬 수 있을 것이다.

유전자 분석

클로닝된 cellulase 유전자를 NCBI의 BLAST를 이용하여 검색한 결과, 상동성이 매우 높은 다음 3개의 β -1,4-glucanase 유전자를 확인하였다. *Bacillus licheniformis* B1 glucanase의 단백질 서

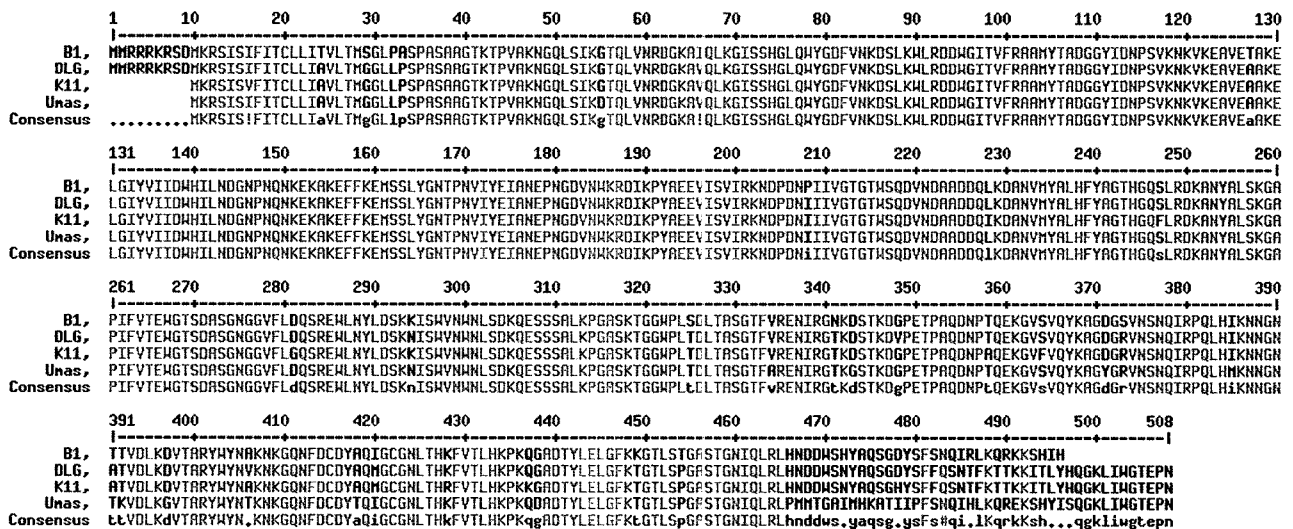


Fig. 5. Comparison of amino acid sequences of β -1,4-endoglucanases. B1; *B. licheniformis* B1, dlG; *B. subtilis* DLG; K11; *B. licheniformis* K11, eng; *B. amyloliquefaciens* UMAS 1002.

열을, *B. licheniformis* strain K11 (cellulase), *B. amyloliquefaciens* strain UMAS1002 endoglucanase A (engA), *B. subtilis* DLG endo- β -1,4-glucanase (14)와 비교하였다. 단백질을 코딩하는 영역 10~460번째 아미노산 영역 중, 4개의 glucanase는 32군데서 polymorphism을 보였다(Fig. 5). *B. licheniformis* B1과 *B. subtilis* DLG와 비교했을 때는 위의 영역 중, 16군데서 차이를 보였다(Fig. 5). 또한 *B. licheniformis* B1과 *B. licheniformis* K11과 비교했을 때는 같은 영역에서, 20군데서 polymorphism의 차이를 보였다(Fig. 5). Consensus sequence와 비교했을 때, *B. licheniformis* B1 glucanase는 12군데서 일치하지 않았으나 나머지 부분은 전부 일치하였다(Fig. 5). *Bacillus* sp. strain KSM-N252의 endo- β -1,4-glucanase (Egl)와 아미노산에서 상동성을 비교한 결과, 본 균주의 glucanase는 Egl등과는 전혀 다른 종류로 판명되었다(3, 5)(자료 미제시). 이미 알려진 DLG와 비교해서 유추해 본 결과(14), 본 endoglucanase의 signal sequence는 10~38이며 Ala³⁶-Ser-Ala³⁸의 Ala³⁸위 뒤에서 절단이 일어나고 mature 효소의 아미노말단은 Ala³⁹-Gly-Thr-Lys-Thr-Pro-Val-Ala-Lys⁴⁷를 포함할 것으로 사료된다. 본 효소의 signal sequence는 아미노 말단에는 Lys-Arg과 같은 염기성 아미노산의 반복, 그 뒤로 hydrophobic region이 따라오는 등 전형적인 signal sequence의 특징을 보여주고 있다(Fig. 5). *B. subtilis* DLG의 효소활성에 대해서는 간략한 보고가 있으나(14), 나머지 glucanase의 생화적인 특성에 대한 보고는 전혀 없는 상태이다. 특히 이들 3개 β -1,4-glucanase의 최적 pH가 염기성이란 보고는 아직까지 없었다. 일단 *B. licheniformis* β -1,4-glucanase 유전자가 클로닝되어 있기 때문에, 이를 바탕으로 본 효소 유전자 발현의 조절기작, 효소의 대량생산, 분리정제, 생화학적 특성 결정 등의 작업이 보다 용이할 것이다.

감사의 말

본 연구는 2007년도 호서대학교 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Christakopoulos, P., D.G. Hatzinikolaou, G. Fountoukidis, D. Kekos, M. Claeysens, and B.J. Macris. 1999. Purification and mode of action of an alkali-resistant endo-1,4- β -glucanase from *Bacillus pumilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364, 61-66.
- Chung, H.K., E.K. Bae, H.J. Je, J.S. Hwang, H.D. Park, J.E. Kim, H.J. Jung, H.U. Choi, D.S. Lee, and H.J. Youn. 2003. An oligosaccharide fraction from Korean mugwort herb suppresses death of the mouse thymocytes in culture by down-regulating the Fas death receptor gene. *Biotechnol. Lett.* 25, 1549-1553.
- Endo, K., Y. Hakamada, S. Takizawa, and H. Kubota. 2001. A novel alkaline endoglucanase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate: enzymatic properties and nucleotide and deduced amino acid sequences. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 109-116.
- 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.
- Hakamada, Y., K. Endo, S. Takizawa, T. Kobayashi, T. Shirai, T. Yamane, and S. Ito. 2002. Enzymatic properties, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1570, 174-180.
- Kim, H.B., H.S. Lee, S.J. Kim, H.J. Yoo, J.S. Hwang, G. Chen, and H.J. Youn. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J. Microbiol.* 45, 256-261.
- Kim, J.Y., H.B. Kim, and D.S. Lee. 2002. Cloning and expression of the *Bacillus* endo- β -1,3-1,4-glucanase gene (bglB1) in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 24, 53-57.
- Kim, K.H., Y.W. Kim, H.B. Kim, B.J. Lee, and D.S. Lee. 2006. Anti-apoptotic activity of laminarin polysaccharides and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Laminaria japonica*. *Biotechnol. Lett.* 28, 439-446.
- Kim, Y.W., K.H. Kim, H.J. Choi, and D.S. Lee. 2005. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol. Lett.* 27, 483-487.
- Lee, J.J., D.S. Lee, and H.B. Kim. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* 35, 296-301.
- Lloberas, J., J.A. Perez-Pons, and E. Querol. 1991. Molecular cloning, expression and nucleotide sequence of the endo- β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus licheniformis*. Predictive structural analyses of the encoded polypeptide. *Eur. J. Biochem.* 197, 337-343.
- Matsui, T., H.J. Yoo, J.S. Hwang, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 40, 355-358.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31, 426-428.
- Robson, L.R. and G.H. Chambliss. 1987. Endo- β -1,4-glucanase gene of *Bacillus subtilis* DLG. *J. Bacteriol.* 169, 2017-2025.
- Saijo, S., N. Fujikado, T. Furuta, S.H. Chung, H. Kotaki, K. Seki, K. Sudo, S. Akira, Y. Adachi, N. Ohno, T. Kinjo, K. Nakamura, K. Kawakami, and Y. Iwakura. 2007. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nature Immunol.* 8, 39-46.
- Yoo, H.J., S.H. Lee, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2002. Antioxidant activity of fermented barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* 38, 230-233.
- Yoo, H.J., J.S. Hwang, and H.B. Kim. 2007. Mass analysis of isoflavones in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 43, 54-58.

(Received February 13, 2008/Accepted March 5, 2008)

ABSTRACT : Characterization of β -1,4-Glucanase Activity of *Bacillus licheniformis* B1 in Chungkookjang
Jae Sung Hwang, Hyung Jae Yoo, Sung Jo Kim, and Han Bok Kim* (Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Ansan 336-795, Republic of Korea)

Fermented soybeans contain microorganisms, diverse enzymes, and bioactive compounds. Few studies on cellulase in Chungkookjang exist. Oligosaccharides play diverse roles of bioactivity. Through Congo red test and activity staining, it was confirmed that the enzyme solution contained cellulase. Optimal pH and temperature of the cellulase produced by *Bacillus licheniformis* B1 were 10 and 40°C, respectively. Through TLC analysis, it was demonstrated that the enzyme solution degraded carboxymethyl cellulose (CMC), whose main products contained dimer and trimer oligosaccharides. Cellulase activity of barley-Chungkookjang fermented by the strain increased, compared with that of Chungkookjang. The cellulase was found to be a β -1,4-glucanase through the analysis of the cloned gene, showing polymorphism at 32 amino acid sites in the coding range of amino acid 10 and 460.