

Production of Xylose from Xylan by Endoxylanase and β -Xylosidase Expressed in Yeast

허선연¹, 김성구¹, 남수완^{*}

^{*}동의대학교 생명공학과, ¹부경대학교 생물공학과,
전화 (051) 890-2276, FAX (051) 890-1619

Abstract

The endoxylanase (642 bp; 213 amino acids) and β -xylosidase (1,602 bp; 533 amino acids) genes from *Bacillus* sp. were amplified by PCR and separately inserted downstream of the yeast *ADHI* promoters, resulting in the pAEDX-1 and pAEX plasmid. When the yeast transformants, *S. cerevisiae* SEY2102 harboring pAEDX-1 or pAEX, were grown on YPD medium, the total activities of the enzymes reached about 9.8 unit/mL for endoxylanase and 2.9 unit/mL for β -xylosidase. When the three kinds of xylan from oat spelts, birch wood, and corncob were hydrolyzed by treatment of recombinant endoxylanase and β -xylosidase, it was found that xylose, xylobiose and xylotriose were produced and xylose was the major product after 12 h reaction. In addition, with the higher amount of enzymes, the more amount of xylose was produced.

서 론

Xylan은 hemicellulose의 주성분으로 농산 폐기물 또는 목재 성분의 약 30%를 차지하며 cellulose 다음으로 자연계에 풍부한 자원물질이다. Xylan은 xylose의 β -D-1,4 결합으로 이루어진 고분자 물질로서 xylan의 가수분해에는 endo- β -1,4-xylanase, β -D-xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase 등 여러 효소들의 상호작용이 필요하다. 이 중 주된 xylan 가수분해 효소는 endoxylanase와 β -xylosidase이며 endoxylanase는 주로 xylo-oligo 당을 생성하며, β -xylosidase는 xylo-oligo 당을 D-xylose로 가수분해한다. Xylan은 농가에서 흔하게 생산되는 농산부산물인 쌀겨나, 옥수수심에 많이 함유되어 있지만 대부분 그냥 버려지거나 값싼 동물 조사료로만 이용되고 있는 실정이다. 따라서 xylan을 산업적으로 활용도가 높은 고부가가치 물질로 변환시키면 그 응용가치는 매우 높아진다. 이때 xylan 분해기술이 필요한데 경제적, 환경적인 면 등을 고려하면 생물학적 분해기술이 바람직하다. 따라서 본 연구에

서는 *Bacillus endoxylanase*와 β -xylosidase를 *S. cerevisiae*에서 발견시켜 효소의 분비·생산 능력을 높이고, 생산된 재조합 효소들을 이용하여 xylan으로부터 xylose 생산공정을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

본 실험에 사용한 효모 숙주 세포는 haploid인 *S. cerevisiae* SEY 2102를 이용하였고 plasmid 구축 및 증폭을 위해서는 *E. coli* DH5a를 사용하였다. *Bacillus* sp. 유래 endoxylanase 유전자(0.56 kb)¹⁾와 β -xylosidase 유전자(1.6kb)²⁾를 pVT103-U vector에 각각 subcloning하여 pAEDX-1와 pAEX를 구축하였다(Fig. 1). pAEDX-1와 pAEX를 효모에 형질전환시켜 2종의 형질전환주(*S. cerevisiae* SEY 2102/pAEDX-1와 SEY2102/pAEX)를 얻어 YPD 배지를 함유한 flask에서 30°C, 170 rpm 조건으로 배양하였다.

각종분석법

균체 농도는 600 nm에서 흡광도로 측정하였고 배양액을 원심분리 한 후 배양 상등액을 얻어 dinitrosalicylic acid 방법을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. 균체 침전물을 Zymolyase 100T와 glass beads를 사용하여 전세포 분획을 얻었고 이 분획과 배양 상등액을 사용하여 endoxylanase와 β -xylosidase 활성을 측정하였다. Endoxylanase의 활성은 1% oat spelt xylan을 기질로 사용하여 pH 6.6 (0.02 M 인산 완충액), 60°C에서 분당 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. β -Xylosidase 활성은 5 mM *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside를 기질로 사용하였으며 pH 6.6 (0.02 M 인산 완충액), 40°C에서 분당 1 μ mol의 *p*-nitrophenyl을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

반응생성물 분석

3종의 xylan(oat spelts, birch wood, corncob)을 4% 농도로 사용하여 20 mM 인산 완충액 (pH 6.6), 두 효소액(10 unit/mL)을 첨가하여 total 60 mL 만든 후, 40~70°C에서 0~12 시간 반응시켰다. Xylan 가수분해 후 생성된 산물(xylose, xylobiose, xylotriose)은 thin-layer chromatography로 분석하였다. 반응액을 5분간 열처리하고 silica gel plate에 점적한 후 chloroform : acetic acid : water (6 : 7 : 1)을 전개용매로 하여 3회 전개하였다. 발색시약은 ethanol : H₂SO₄ (95 : 5)을 사용하여 100°C에서 10분간 가열하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

재조합 endoxylanase와 β -xylosidase의 발현과 분비

Xylan과 methylumbelliferyl- β -D-xylopyranoside가 포함된 agar plate에서 endoxylanase와 β -xylosidase 활성을 나타내는 colony로 선별하고(*S. cerevisiae* SEY 2102/pAEDX-1, SEY 2102/pAEX), YPD 배지에서 flask 배양한 결과, 48시간째 endoxylanase는 9.8 unit/mL β -xylosidase는 2.9 unit/mL의 효소활성을 나타내었다. Endoxylanase의 경우 60% 이상의 효소활성은 배양 상등액에 있는 반면, β -xylosidase는 84%의 효소 활성이 periplasmic space에서 검출되었다. 두 균주 모두 잔존환원당의 경우 비슷한 소모 양상을 나타내었다. Endoxylanase의 발현은 6시간 이후부터 발현되어 균체증식과 비례하여 12시간까지 발현되었으며, 12시간 이후의 낮은 증식속도 구간에서는 느리게 발현되는 양상을 나타내었다. β -Xylosidase의 발현에서는 균체증식과 같이 6시간 이후부터 발현되어 30시간까지 발현되다가 이후 일정 수준에 도달하였다. 세포질 분획에서도 periplasmic space와 유사한 양상으로 24시간 이후부터 활성이 검출되어 약 0.5 unit/mL 정도로 낮게 유지되었다(Fig. 2).

Xylan 가수분해

Oat spelt xylan, birch wood xylan, corncob xylan 등 3가지 기질을 재조합 endoxylanase와 β -xylosidase와 반응시켰을 때, xylose, xylobiose, xylotriose가 생성되었다. 이 때 사용한 최소 효소량은 5 unit/mL이며 효소 사용량을 25 unit/mL 이상으로 증가시켰을 경우에는 주로 xylose만 생성되었다. 기질 종류에 따른 영향에서는 3가지 기질에서 모두 xylotriose가 가장 많이 생성되었다(Fig. 3). 반응시간이 12시간 정도 되면 주된 산물은 xylose였다. 반응 온도의 영향을 알아보기 위해 40~70°C의 범위에서 반응시켰을 때, 반응온도와는 무관하게 xylose가 생성되었으며, xylotriose는 60°C 이상에서 생산량이 감소하였다.

참고문헌

1. Jeong, K. J., P. C. Lee, I. Y. Park, M. S. Kim, and S. C. Kim. "Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*" (1998), *Enz. Microb. Technol.*, 22, 599.
2. Chun, Y. C., K. H. Jung, J. C. Lee, S. H. Park, H. K. Chung, and K. H. Yoon. "Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene" (1998), *J. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 28.

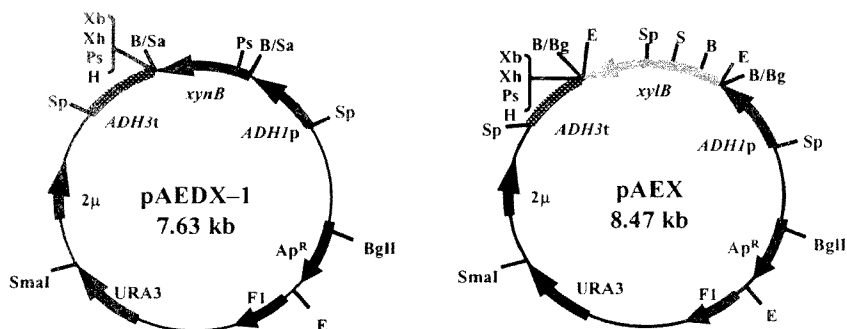


Fig. 1. Schematic diagram of plasmid pAEDX-1 and pAEX.

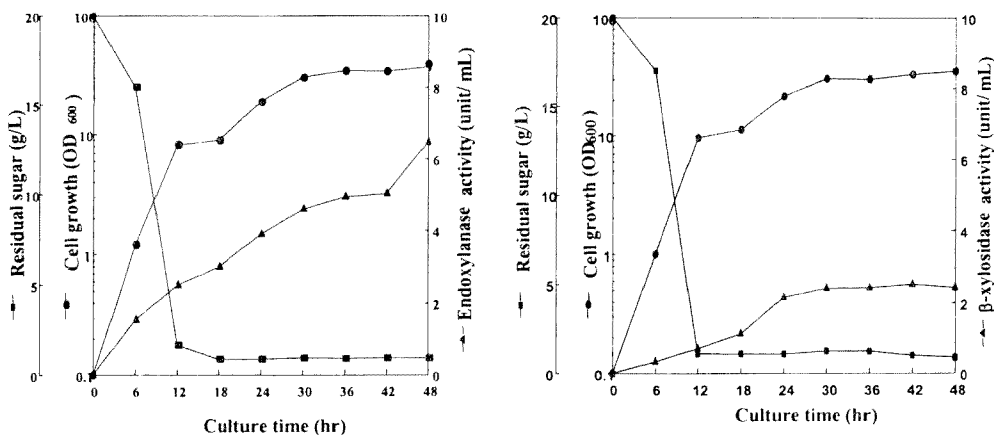


Fig. 2. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase and β-xylosidase expression in the flask cultures of *S. cerevisiae* SEY2102/pAEDX-1 (A) or SEY2102/pAEX(B).

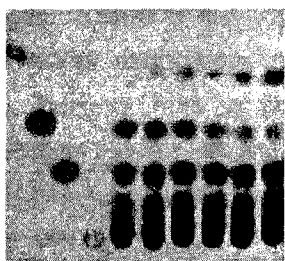


Figure 3. TLC analysis of the hydrolyzed xylan from oat spelt (A) and birch wood (B). X₁, xylose; X₂, xylobiose; X₃, xylotriose; C, xylan without enzyme reaction. Reaction time: lane 1, 10 min; lane 2, 30 min; lane 3, 1 hr; lane 4, 4 hr; lane 5, 5 hr; lane 6, 12 hr.