

Process Development for Concentration and Stabilization of Recombinant Endoxylanase Expressed in *Bacillus subtilis*

Young Rok Choi, Eun Jin Seo, Sun Yeon Heo¹, Soo Wan Nam¹, Hyun Ju Kwon, and
Byung Woo Kim*

Department of Microbiology, ¹Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui
University, Busan 614-714, Korea
TEL (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

Abstract

A strong constitutive P_{JH} promoter from *Bacillus* sp. was applied to overexpress the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. The expression plasmid, pJHKJ4, was designed to contain the P_{JH} promoter and open reading frame of endoxylanase including its own promoter. The plasmid was introduced into *B. subtilis* DB431 and the resulting transformant was grown on LB glucose medium. The endoxylanase activity in the culture supernatant reached about 140 unit/ml. The enzyme in the supernatant was efficiently concentrated to 70% by two-step treatments of ammonium sulfate saturation and ultrafiltration. The stabilization of concentrated enzyme solution at different storage temperatures was examined with various stabilizers such as NaCl, CaCl₂, sucrose, sorbitol, polyethylene glycol, and Tween-80.

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 효소인 endoxylanase는 주로 xylo-oligo 당을 생성한다. Xylan은 농가에서 흔하게 생산

되는 농가부산물인 짚겨나, 옥수수수심에 많이 함유되어 있지만 대부분이 그냥 버려지거나 값싼 동물 사료로만 이용되고 있는 실정이므로 xylan을 산업적으로 활용도가 높은 물질로 변화시키면 그 응용가치는 매우 높다. 따라서 농산 폐기물을 산업적으로 활용하기 위해 endoxylanase의 대량생산과 안정성에 대한 연구가 필수적이다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

본 연구에서 *B. subtilis* DB431를 숙주세포로 사용하였고 균주선별 및 보존은 kanamycin 함유 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) LB 평판배지를 사용하였다. *B. subtilis* DB431 숙주세포 및 재조합 균주 (DB431/pJHKJ4)의 기본배양을 위해 LB glucose (1% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% glucose)를 사용하였으며 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 kanamycin함유한 10 ml LB 배지에서 일정한 세포농도 ($\text{OD}_{600} = 1.0$)까지 전배양 후 플라스크에 접종하여 진탕배양하였다. 플라스크 배양은 배지 100 ml을 함유하는 500 ml baffled-flask로 150 rpm, 37°C에서 수행하였다.

분석법

균체 농도는 600 nm에서 흡광도로 측정하였고 배양액을 원심분리 한 후 배양 상등액을 얻어 dinitrosalicylic acid 방법을 사용하여 잔존 포도당 농도를 측정하였다. 균체 침전물을 lysozyme을 사용하여 세포분해를 얻었고 이 분획과 배양 상등액을 사용하여 endoxylanase 활성을 측정하였다. Endoxylanase의 활성은 1% oat spelt xylan을 기질로 사용하여 pH 6.5 (0.02 M 인산 완충액), 60°C에서 분당 1 μmol 의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 원심분리를 한 배양 상등액을 염석 투석 후에 ultrafiltration을 통해 농축하였다. 농축된 효소를 온도, pH 및 첨가제에 따른 효소 활성의 변화를 알아보았다.

결과 및 고찰

재조합 endoxylanase의 과발현 생산

재조합 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 균주의 플라스크 배양에서 균체증식, 잔존 포도당 농도, 세포내외의 endoxylanase 활성을 조사하였다. 균체 증식은 3시간 이후

로 급격한 성장을 보인 후 6시간 이후부터는 정지기에 도달하였다. 사용한 P_{JH} promoter가 구성적 promoter이기 때문에 균체증식과 비례하여 endoxylanase가 과발현 생산(growth-associated expression) 됨을 알 수 있었다. Endoxylanase 활성은 3시간 이후부터 나타나 18시간까지 활성을 보이다가 이후 일정한 140 unit/ml에 도달하였다. 세포내 활성은 거의 검출되지 않아 생산된 총 효소의 98%가 배양 상등액에 존재하였다(Fig. 1).

Endoxylanase의 농축 및 안정성

대량 생산된 효소를 산업적으로 경제적이고 안정적 및 장기적으로 사용하기 위해서는 분말화 효소로 사용하기보다는 효소 농축액으로 사용하는 것이 바람직하다. 따라서 효율적인 농축 및 안정화 공정이 개발되어야 한다. 과발현 생산된 endoxylanase의 안정화 공정을 개발하기 위해 우선 배양액으로부터 효소를 농축하는 공정을 두 단계의 ammonium sulfate 포화 (염석)와 ultrafiltration을 행하였다. Endoxylanase의 분자량이 20.4 kDa이기 때문에 10K와 50K ultrafiltration membrane을 사용하여 10K 이하 저분자량 단백질과 50K 이상의 고분자량 단백질을 제거하였다. 이런 2단계 처리로 배양 상등액에 존재하는 약 70%의 endoxylanase가 농축되었으며 (Table 1), 농축된 효소의 안정성에 미치는 각종 첨가제(NaCl, CaCl₂, sucrose, sorbitol, polyethylene glycol, and Tween-80)의 영향을 4°C, 10°C, 25°C에서 조사하여 최적의 안정제와 온도를 선택하였다.

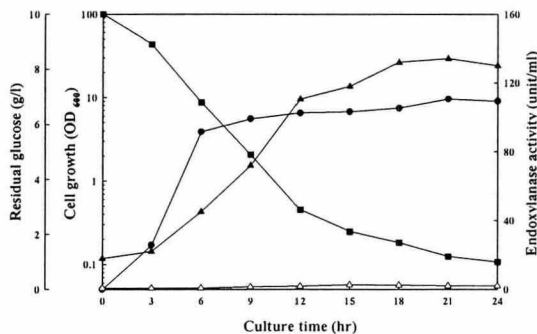


Fig. 1. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase expression in the flask culture of *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 on LB glucose medium. Symbols : ●, cell growth; ■, residual glucose concentration; ▲, extracellular activity; △, intracellular activity.

Table 1. Concentration of endoxylanase from *B. subtilis* DB431/pJHKJ4

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Yield (%)	Process time (hr)
Supernatant	209	6900	100	18
Ammonium sulfate 70%	125	4500	65	48
Ultrafiltration	146	4830	70	22

References

1. Kim, J. H. and S. W. Nam (2000), "Overexpression and secretory production of endoxylanase from recombinant *Bacillus subtilis*", *Kor. J. Life Sci.* **10**, 125-130.
2. Kim, J. H., J. H. Kim, S. C. Kim, and S. W. Nam (2000), "Constitutive overexpression of endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*", *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 551-553.