

Process to industrial production of xylanase from recombinant *Bacillus subtilis* DB431

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

Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea¹

TEL (051) 890-1536, FAX (051) 890-1532

Abstract

A strong constitutive P_{IH} promoter from *Bacillus* was applied to overexpress the endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. The expression plasmid, pJHKJ4, was designed to contain the P_{IH} promoter and endoxylanase promoter (P_B), and introduced into *Bacillus subtilis* DB431. The total activities of the enzymes reached about 140 unit/ml by cultivation of *B. subtilis* DB431 harboring pJHKJ4 in LB glucose medium. Ultrafiltration is effective its yield is 70%.

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 생산되는 농가부산물인 쌀겨나, 옥수수심에 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 xylanase의 대량생산과 안정성에 대한 연구가 필수적이다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

본 연구에서 *B. subtilis* DB431를 숙주세포로 사용하였고 균주선별 및 보존은 ka

namycin함유 ($25\mu\text{g/ml}$) LB평판배지를 사용하였다. *B. subtilis* DB431 숙주세포 및 재조합 균주 (DB431/pJHKJ4)의 기본배양을 위해 LB (1% tryptone, 1% yeast extract 0.5% NaCl)를 사용하였으며 $25\mu\text{g/ml}$ 의 kanamycin함유한 10ml LB 배지에서 일정한 세포농도 (OD_{600} 값이 약1.0)까지 전배양 후 플라스크에 접종하여 진탕배양 하였다. 플라스크 배양은 배지 50ml, 100ml을 함유하는 500ml baffled-flask로 150rpm에서 수행하였다. Glucose의 농도는 2%으로 하였다. 발효조 회분배양 배지는 LBG (1% tryptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl, 2% glucose)이며, 배양부피는 2.5 L, 배양 온도는 37°C , 배양중의 pH 조절은 50% NH_4OH 와 1N HCl를 사용하여 pH 7.0로 조절하였다. 교반속도 (300~600 rpm)의 조절로 용존산소를 공기포화의 30%이상으로 유지하였고, 통기속도는 1.5 vvm을 유지하였다.

분석법

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

결과 및 고찰

재조합 endoxylanase의 과발현과 생산

재조합 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 균주를 이용하여 cell growth, residual glucose concentration, extracellular endoxylanase activity, intracellular endoxylanase activity를 알아보았다. 균체 증식은 3시간 이후로는 급격한 성장을 보인 후 6시간 이후부터는 성장이 일정한 수준에 도달하였다. Endoxylanase activity는 3시간 이후부터 발현되어 18시간까지 발현율이 증가하다 이후 일정 수준으로 유지되었다. 배양 18시간 때 총활성 및 분비효율은 140 unit/ml, 98%의 분비효율을 보였다. (Fig. 1) 산업적 효소생산을 위한 경제적 효소 대량정제공정을 개발하기 위해 우선 배양액으로부터 효소를 농축하는 공정을 염석과 ultrafiltration으로 비교하여 보았다. Ultrafiltrat

ion을 통해 10K<xylanase<50K로 수행해서 yield가 70%로 되는 것을 알 수 있었다.

정제된 효소의 안정성

생산된 효소의 안정성분에 대한 4℃, 10℃, 25℃에 대해 안정성을 알아보았다. 대조군으로서는 액상효소에 아무런 첨가제를 넣지 않고, 안정성을 증가시키기 위한 첨가제로서 NaCl (5, 10, 15, 20%), PEG (5, 10, 30%), Tween-80 (0.5, 1, 2%)등의 농도로 첨가하여 각각의 온도에서 대조군에 비해 효소 안정성이 증가된 첨가제를 찾았다.

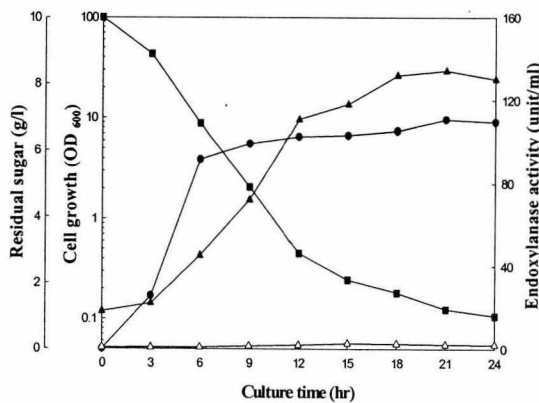


Fig. 1. Time profiles of cell growth, glucose consumption, and endoxylanase expression in the flask culture of *Bacillus subtilis* DB431/pJHKJ4 on LB medium supplemented 2% glucose.

Symbols: ●, cell growth; ■, residual glucose concentration; ▲, extracellular endoxylanase activity; △, intracellular endoxylanase activity

Table 1. Concentration of the *Bacillus* sp. endoxylanase from *Bacillus subtilis* DB431/pJHKJ4

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Yield (%)	Process step time (hr)
Supernatant	209	6900	100	18
Ammonium sulfate 70%	125	4500	65	48
Ultrafiltration 10K<xylanase<50K	146	4830	70	22

Referances

1. Chun, Y. C., K. H. Jung, J. C. Lee, S. H. Park, H. K. Chung, and K. H.

- Yoon (1998), "Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene" , *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 28.
2. Rani, D. S. and NAND, K. (2001), "Purification and characterisation of xylanolytic enzymes of a cellulase-free thermophilic strain of *Clostridium absonum* CFR-702." , *Anaerobe* **7**, 45-53.