

## 알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14 의 xylanase 유전자 cloning

유주현\*·박덕철·정용준·공인수

연세대학교 공과대학 식품공학과

### Cloning and Expression of a Xylanase Gene from Alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 in *Escherichia coli*

Yu, Ju-Hyun; Duck-Chul Park, Yong-Joon Chung and In-Soo Kong

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

**Chromosomal DNA fragments of *Bacillus* sp. YA-14 isolated from soil as a potent xylan hydrolyzing bacterium, were ligated to a vector plasmid, pBR322, and used to transfer *Escherichia coli* HB101 cells. The recombinant plasmid pYDC21 was found to enable the transformants to produce xylanase. pYDC21 was found to contain the 3 kb *Hind*III fragment originated from the *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA by southern hybridization. The optimum temperature and pH for the reaction of xylanase produced by *E. coli* (pYDC21) were appeared at 50°C and pH 7.0, respectively. The xylanase enzyme was stable between pH 5.0 and 7.0 and maintained stably up to 40°C.**

Hemicellulose 는 D-galactan, D-mannan, D-xylan 등이 혼합되어 있는 복합 다당류로서 그중 xylan 의 구성비율이 가장 높아 약 60-82% 를 차지하고 있다(1). 이 xylan 은 cellulose 다음으로 지구상에 많이 존재하는 물질로서 탄소원으로 이용하는 많은 방법들이 모색되고 있다(2, 3). 그중 xylan 을 분해하여 monomer 인 xylose 로 변환시키는 미생물이 분비하는 효소인 xylanase 에 대한 연구가 많이 되어 있다. 특히 중성에서는 불용성인 xylan 이 알카리에서는 잘 녹는다는 장점 때문에 호알카리성 *Bacillus* 속 미생물에서 많은 연구가 되어있다. Xylan 의 종류에는 극히 한정된 미생물만이 생산하는  $\beta$ -1,3 xylanase[exo-(1→3)- $\beta$ -D-xylanase EC. 3.2.1.72, endo-(1→3)- $\beta$ -D-xylanase EC. 3.2.1.32] (4)와 대부분의 *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 (1→4)- $\beta$ -D-xylan xylanohydrolase[Endo-xylanase EC. 3.2.1.8, exo-xylanase EC. 3.2.1.37]이 있다.

Yu 등(5)은 알카리 조건하에서 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. YA-14로부터 strong promoter (6)와 pectinase 유전자(7)를 분리하였다. 본 연구에서는 이 균주가 생산하는 xylanase 의 유전자를 cloning 하여 *E. coli* HB 101 에 발현시킨 후

cloning 된 유전자 특성을 밝히고 각 형질전환체가 생산하는 효소의 특성을 공여균주와 비교함으로써 D-xylan 의 효소적 분해방법에 의한 D-xylose 생산방법을 검토하였다. 본 논문은 그중 xylanase 의 유전자의 cloning 에 대한 결과를 기술하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주 및 배지조성

본 연구에 사용된 xylanase 공여균주로는 Yu 등(5)이 알칼리 조건하에서 흙으로부터 분리한 *Bacillus* sp. YA-14 를 사용하였고, 숙주 미생물로는 *E. coli* HB 101, plasmid vector 로는 pBR 322 를 사용하였다. 사용배지로는 형질전환체를 선별하기 위해 배지에 ampicillin 50  $\mu$ g/ml, tetracycline 12.5  $\mu$ g/ml 을 첨가하여 사용했다. Xylanase 검출 배지는 LB 한천평판배지에 xylan 0.5% 가 첨가된 배지를 사용하였다.

##### DNA 의 조제

*Bacillus* sp. YA-14 의 chromosomal DNA 는 Doi 등의 방법(8)을 사용하였고, plasmid DNA 의 분리

**Key words:** Xylanase gene, alkali-tolerant *Bacillus* sp., *Escherichia coli* HB101

\* Corresponding author

는 Birnboim 등의 방법 (9)을 사용하였다. DNA의 제한효소 처리와 ligation은 Davis 등에 의해 기술된 방법 (10)에 따라 행하였다. *E. coli* HB 101의 형질 전환은 Nogarú 등의 방법 (11)을 변형하여 사용하였다.

**재조합 plasmid DNA의 제조**

분리된 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA를 *Hind* III 제한효소로 부분 절단하고 동일 제한효소로 절단 후 bacterial alkaline phosphatase로 처리한 pBR 322와 ligation 시켜 *E. coli* HB 101에 형질전환시켰다. 생성된 형질전환체 중 ampicillin 함유배지에서 생육하고 tetracycline 함유배지에서 생육하지 않는 10,000여주의 형질전환체를 선별하여 xylan이 0.5% 첨가된 한천평판배지에 replica하였다. 12시간 동안 배양시킨 균체를 chloroform과 lysozyme으로 세포를 용균시켜 incubation 한 후 그 중에서 형질전환체 주위가 투명환을 나타내는 형질전환체 1주를 선별하였다. 이는 불용성의 xylan이 함유된 배지는 불투명하나 xylanase가 생성되면 xylan을 분해하여 배지가 투명하게 되는 것으로부터 확인하였다.

**효소활성 측정**

효소활성 측정은 pH 4-6은 0.5 M acetate 완충액, pH 6-8은 0.5 M phosphate 완충액, pH 8-11은 0.5 M glycine-NaOH 완충액을 사용하였다. 4°C에서 하룻밤 방치한 1% xylan 용액 200 µl와 각 pH의 완충액 200 µl을 섞은 다음 효소액을 첨가하여 40°C에서 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소안정성 측정은 pH 4-6은 0.005 M acetate 완충액, pH 6-8은 0.005 M phosphate 완충액, pH 8-12는 0.005 M glycine NaOH 완충액을 각 pH 별로 100 µl와 효소액 100 µl를 섞은 다음 40°C에서 1시간 반응시킨 후 0.05 M phosphate 완충액 (pH 7.0)을 200 µl 첨가하여 각 pH를 모두 7.0으로 맞추었다. 그후 50 mM phosphate 완충액에 녹아 있는 xylan 용액 200 µl를 첨가하여 40°C에서 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

Xylanase 활성은 Somogy와 Nelson의 환원당 정량방법 (12)을 사용하였다. β-galactosidase 활성측정은 p-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside 기질을 사용하여 효소작용 후 유리되어 나오는 p-nitrophenol의 양에 따른 발색 정도로 계산하였다. β-lactamase의 측정은 sergent의 rapid fixed time assay 방법 (13)을 사용하였다.

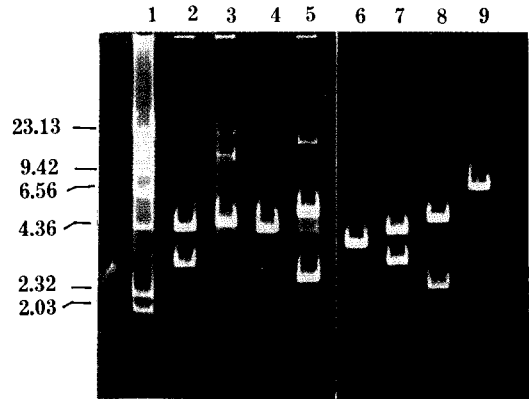
**결과 및 고찰**

**Xylanase 유전자의 cloning**

*Hind* III로 부분절단한 *Bacillus* sp. YA-14의 chromosomal DNA를 *Hind* III로 절단한 pBR 322와 ligation 시킨 후 *E. coli* HB 101에 형질전환시켜 10,000여주의 negative 형질전환체를 얻었다. 이 형질전환체를 0.5% (w/v) xylan을 함유한 LB 한천배지에 접종 배양한 다음 colony 주위에 투명환 환을 나타내는 형질전환체를 1주 얻었다. 이 형질전환체의 plasmid DNA를 분리하여 다시 숙주균주인 *E. coli* HB 101에 형질전환시켜 본 결과 모두 xylanase 활성을 가지는 형질전환체를 얻을 수 있었다. 따라서 얻어진 형질전환체가 가지고 있는 재조합 plasmid를 pYDC 21로 명명하고 이 재조합 plasmid는 숙주균주내에서 안정하게 유지됨을 확인하였다.

**재조합 plasmid DNA pYDC 21의 제한효소 지도**

재조합 plasmid DNA pYDC 21을 여러가지 제한 효소로 절단하여 본 결과 *Xba* I, *Bcl* I, *Kpn* I, *Bgl* II, *Sma* I, *Xho* I, *Sal* I, *Pvu* II 인식부위는 존재하



**Fig. 1. Agarose gel electrophoretic analysis of the recombinant plasmid pYDC21 carrying a xylanase gene of *Bacillus* sp. YA-14.**

lane 1; λcI857Sam7 DNA digested with *Hind*III (kb)  
 lane 2; Recombinant DNA digested with *Hind*III  
 lane 3; Recombinant DNA undigested  
 lane 4; pBR322 digested with *Hind*III  
 lane 5; pBR322 undigested  
 lane 6; Recombinant DNA digested with *Pst*I  
 lane 7; Recombinant DNA digested with *Ava*I  
 lane 8; Recombinant DNA digested with *Bam*HI  
 lane 9; Recombinant DNA digested with *Eco*RI  
 # No site: *Xba*I, *Bcl*II, *Bgl*II, *Sam*I, *Xho*I, *Sal*I, *Pvu*II, *Kpn*I

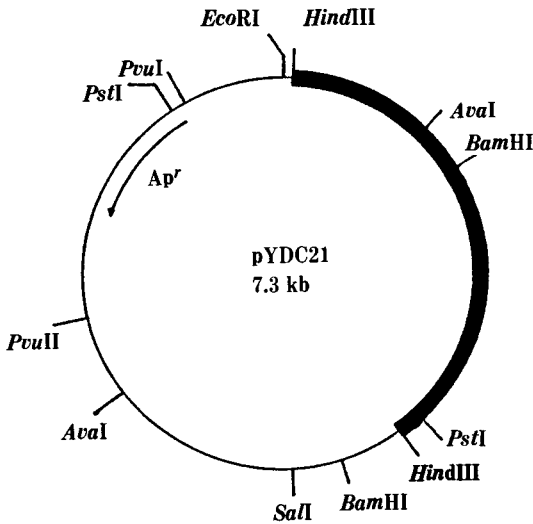


Fig. 2. Endonuclease cleavage map of recombinant plasmid pYDC21. A *Hind*III fragment containing xylanase gene fragment (closed thick line) was inserted into plasmid pBR322.

지 않았고 *Pst* I, *Ava* I, *Bam* HI, *Eco* RI 의 인식부위가 각각 1 개씩 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 위와 같은 제한효소 절단결과로부터, Fig. 2 와 같은 제한효소 지도를 작성할 수 있었다. Bernier 등(14)이 *B. subtilis* 에서 cloning 한 xylanase 유전자는 3.9 kb 의 *Pst* I fragment 로서 *Eco* RI, *Cla* I, *Bam* HI 부위가 있고 Horikoshi 등(15)이 alkalophilic *Bacillus* 미생물로부터 cloning 한 xylanase 유전자는 2.0 kb 로서 삽입된 유전자내에 *Hind* III 절단부위를 가지고 있는 것으로 보아 pYDC 21 에 cloning 된 xylanase 유전자는 이들과는 다른 새로운 유전자임을 알 수 있었다.

**Southern blotting**

Cloning 된 xylanase 유전자가 *Bacillus* sp. YA-14 의 chromosomal DNA 에서 유래된 DNA 라는 것을 확인하기 위해 southern hybridization 실험을 행하였다. *Hind* III 로 완전히 절단한 *Bacillus* sp. YA-14 chromosome 과 재조합 plasmid pYDC 21 을 전기영동한 다음 Southern 의 방법(16)에 따라 nitrocellulose filter 에 transfer 시킨 후 *Hind* III 로 절단한 pYDC21 을 biotin 으로 labeling 시켜 hybridization 한 결과 pYDC 21 에 있는 3.0 kb 의 외래 DNA 와 동일한 위치에서 *Bacillus* sp. YA-14 의 chromosomal DNA 와 probe 가 hybridization 된

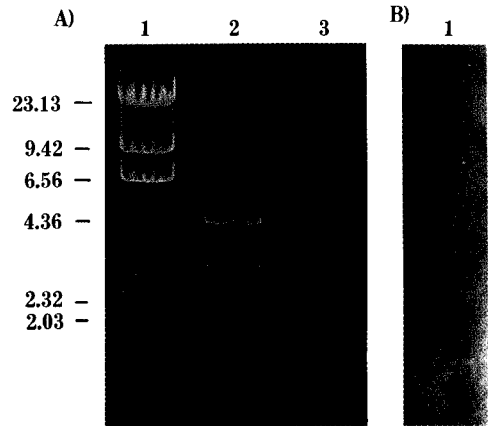


Fig. 3. Southern hybridization of the digested *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA and recombinant plasmid pYDC21 with xylanase gene probe.

- A) lane 1; DNA digested with *Hind*III
- lane 2; pYDC21 digested with *Hind*III
- lane 3; *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA digested with *Hind*III
- B) Hybridization patterns
- lane 1; *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA digested with *Hind*III

Table 1. Distribution of xylanase activity in *E. coli* HB101 containing recombinant plasmid DNA.

Enzyme	Distribution of enzyme in fraction (%)		
	Medium	Periplasm	Cytoplasm
<i>Bacillus</i> sp. YA-14 xylanase	100		0
<i>E. coli</i> HB101 (pYDC21) xylanase	15.3	36.3	48.4
$\beta$ -galactosidase	0	2.6	97.4
$\beta$ -lactamase	0	92.0	8.0
<i>E. coli</i> HB101 xylanase	0	0	0

band 가 나타났다(Fig. 3). 이 결과로서 pYDC 21 에 삽입된 외래 DNA 는 *Bacillus* sp. YA-14 DNA 유래임을 확인할 수 있었다.

**원균주가 생산하는 효소와 recombinant 가 생산하는 효소특성 비교**

**세포분획별 효소활성** : Conelis 등(17)의 방법에 따라 extracellular, periplasmic, cellular 분획으로 나누는 후 효소활성을 검토한 결과는 Table 1 과 같았다.

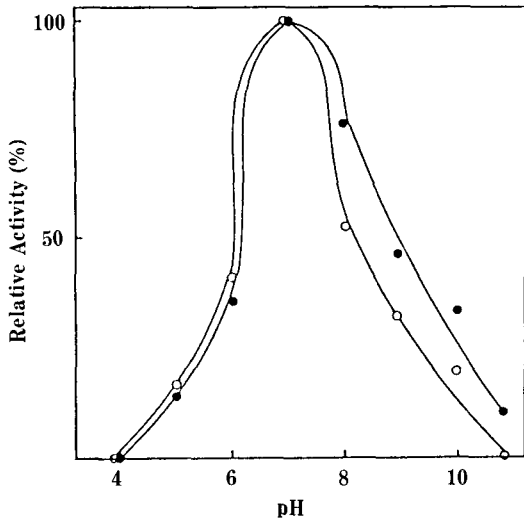


Fig. 4. Effect of pH on the xylanase activity of *E. coli* HB101 containing plasmid DNA pYDC21 (○) and *Bacillus* sp. YA-14 (●)

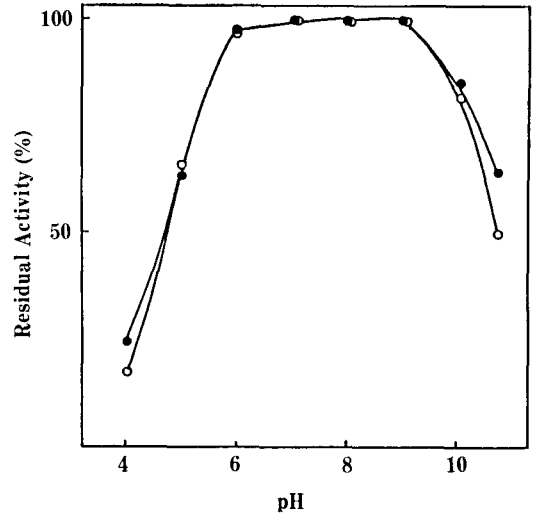


Fig. 5. Effect of pH on the xylanase stability of *E. coli* HB101 containing plasmid DNA pYDC21 (○) and *Bacillus* sp. YA-14 (●).

*Bacillus* sp. YA-14의 xylanase는 균체내에 존재하지 않고 대부분 균체외로 배출하였으며 숙주균주로 사용한 *E. coli* HB 101는 xylanase를 전혀 생산하지 않았다. pYDC 21을 함유한 *E. coli* HB 101의 xylanase는 균체의 periplasm 중에 36.3%, cytoplasm에 48.4%를 각각 함유하고 있었고 불과 15.3%만이 세포외로 배출되었다. Okada 등(18)이 *Bacillus pumilis*로부터 cloning하여 *E. coli*에 발현시킨 xylanase의 경우는 100%가 세포내에 존재하는 것으로 보고되어 있으므로 본 실험결과와 상이함을 알 수 있었다.

**효소활성과 안정성에 미치는 pH의 영향**: 공여균주 *Bacillus* sp. YA-14가 생산하는 xylanase와 pYDC 21을 함유한 *E. coli* HB 101이 생산하는 xylanase의 일반적 성질을 비교하였다. Xylanase 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같았다. 공여균주인 *Bacillus* sp. YA-14와 재조합 균주 모두 pH 7.0에서 가장 활성이 높았고 pH 11에서 모두 효소가 불활성화 되었다. Horikoshi 등이 분리하여 실험한 *Bacillus* sp. No. C-59-2(19)의 경우 최적 pH는 6.0-8.0 그리고 *B. subtilis* G-2(20)의 경우 pH 6.0-6.2로서 본 실험결과와 비슷하였다. Xylanase의 각 pH에 대한 안정성을 측정해 본 결과 Fig. 5와 같이 공여균주와 재조합 균주 모두 pH 6-9 범위에서 안정성을 보여주었다. *Bacillus* sp. No. C-2이 생산하는 xylanase의 경우는 5.5-9.0 사이에서 폭넓게 안정하였고 *Bacillus* sp. No.

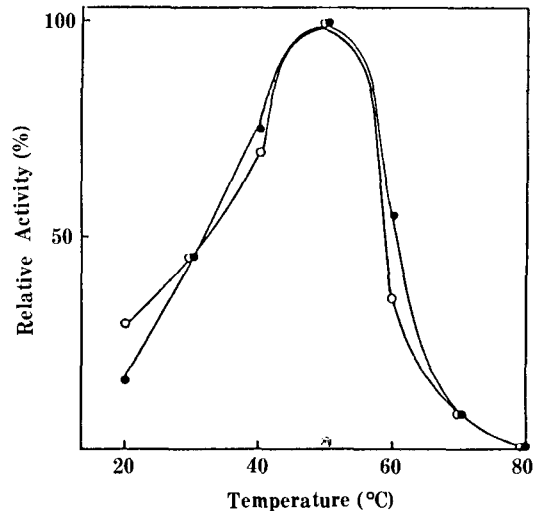


Fig. 6. Effect of temperature on the xylanase activity *E. coli* HB101 containing plasmid DNA pYDC21 (○) and *Bacillus* sp. YA-14 (●).

C-59-2의 경우 7.0-7.5의 좁은범위에서 효소가 안정하였다. 이것으로 보아 본 실험에 사용된 *Bacillus* sp. YA-14가 생산하는 xylanase는 *Bacillus* sp. No. C-2이 생산하는 xylanase와 유사하다고 할 수 있다.

**효소활성과 안정성에 미치는 온도의 영향**: 각각 다른 온도에서 xylanase 활성을 측정하여 효소활성에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과 Fig. 6과 같았

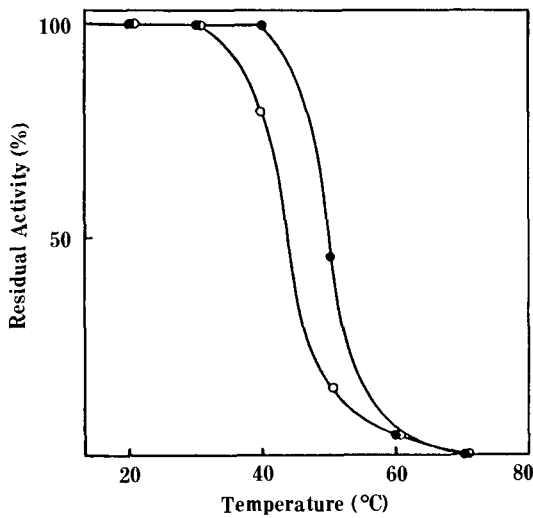


Fig. 7. Effect of temperature on the xylanase stability *E. coli* HB101 containing plasmid pYDC21 (○) and *Bacillus* sp. YA-14 (●).

다. 공여균주와 재조합 균주의 xylanase의 반응 최적온도는 모두 50°C에서 최고치의 활성을 보여주었으며 80°C에서 불활성화 되었다. Takahashi 등(20)의 보고로는 *B. subtilis* G-2의 경우 37-40°C에서 가장 활성이 높았다. 또한 xylanase의 안정성에 미치는 온도의 영향을 검토하여 본 결과(Fig. 7) 공여균주 *Bacillus* sp. YA-14는 40°C까지 100%의 안정성을 보인 반면 재조합 균주는 40°C에서 활성이 약 20% 감소되는 것으로 나타났다.

## 결 론

알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14로부터 xylanase 유전자를 cloning 하기 위해 *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA와 vector DNA pBR 322를 *Hind* III 제한효소로 절단한 후 ligation시켜 *E. coli*에 형질전환시킨 결과 xylanase 활성을 나타내는 형질전환체를 얻었다.

이 재조합체로부터 분리한 재조합 plasmid DNA pYDC 21의 전기영동 분석결과 약 3.0 kb의 외래 DNA가 삽입되어 있었고 또한 southern hybridization 결과 삽입된 외래 DNA는 *Bacillus* sp. YA-14에서 유래된 것이 확인되었으며 제한효소 부위로는 *Ava* I, *Bam* HI, *Pst* I 부위가 각각 1개씩 존재하였다.

*E. coli* HB 101(pYDC 21)이 생산하는 xylanase의 일반적 효소성질을 조사한 결과 생산된 xylanase

는 세포내에 48.4% 존재하였고 periplasm 중에 36.3%, 그리고 15%는 균체외로 배출하였다. Xylanase 반응의 최적 pH는 7.0 이고, 최적온도는 50°C이었다. 그리고 pH 6-9 사이에서 안정하였고 40°C 이하에서 안정한 효소이었다. 이 효소의 성질은 공여균주인 *Bacillus* sp. YA-14가 생산하는 xylanase의 성질과 유사하였다.

## 참고문헌

- Meyer, L.H.: "Food chemistry" p. 85 Reinhold Pub. Corp., New York (1960).
- Keim, C.R.: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 103 (1983).
- Maiocella, B.L., H.W. Bland and C.R. Wilke.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1003 (1984).
- Nisizawa, K., I. Morimoto, N. Handa and Y. Hashimoto: *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 152 (1962).
- Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung and D.H. Oh: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986).
- Yu, J.H., B.T. Koo, I.S. Kong, Y.J. Chung and Y.S. Park: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 126 (1988).
- Yu, J.H., Y.S. Park, J.M. Kim, I.S. Kong and Y.J. Chung: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 316 (1988).
- Rodriguez, R.L. and R.C. Tait: *Recombinant DNA Techniques, An Introduction*, Addison-Wesley Pub., Pp. 162-163 (1983).
- Birnboim, H.C. and J. Doly: *Nucleic Acid Research*, **7**, 1513 (1979).
- Davis, R.W., D. Botstein and J.R. Roth: *Advanced Bacterial Genetic*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 228-230 (1980).
- Nogard, M.V., K. Keem and J. Monahan: *Gene*, **3**, 279 (1978).
- Nogard, M.V., K. Keem and J. Monahan: *Gene*, **3**, 279 (1978).
- Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
- Sargent, M.G.: *J. Bacteriol.*, **95**, 1493 (1968).
- Bernier Jr. R., H. Driguez and M. Desrochers: *Gene*, **26**, 59 (1983).
- Honda, H., T. Kudo and K. Horikoshi: *J. Bacteriol.*, **784** (1985).
- Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
- Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemot: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 776 (1981).
- Panbangred, W., D. Kawaguchi, T. Tomita, A.

- Shinmyo, H. Okada: *Eur. J. Biochem.*, **138**, 267 (1984).
19. Horikoshi, K. and T. Akiba: Alkalophilic Microorganisms A New Microbial World "JAPAN SCIENTIFIC SOCIETY PRESS TOKYO p. 117-121 (1982).
20. Takahashi, M. and Y. Hashimoto: *J. Ferment. Technol.*, **41**, 181 (1963).

**(Received March 6, 1989)**