

알카리 내성 *Bacillus* sp. YA-14 의 β -Xylosidase 유전자의 Cloning 및 대장균에의 발현

박덕철 · 김진만 · 정용준 · 공인수 · 배동훈 · 유주현*

연세대학교 공과대학 식품공학과

Cloning and Expression of β -Xylosidase Gene from Alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 in *Escherichia coli*

Park, Duck-Chul, Jin-Man Kim, Yong-Joon Chung,
In-Soo Kong, Dong-Hoon Bai and Ju-Hyun Yu

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

Chromosomal DNA fragments of *Bacillus* sp. YA-14, isolated from soil as a potent β -xylosidase producing bacterium, were ligated to a vector plasmid pBR322 and used to transfer *Escherichia coli* HB101 cells. The recombinant plasmid pYXL22 was found to enable the transformants to produce β -xylosidase. pYXL22 was found to contain the 7.0 kb *Hind*III DNA fragment originated from the *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA by Southern hybridization. The optimum temperature for the reaction of β -xylosidase produced by *E. coli* HB101 (pYXL22) was appeared at 30°C. The enzyme was maintained stably up to 40°C when stored 1hr at 40°C. The β -xylosidase was repressed completely by 0.4% (w/v) glucose concentration in *E. coli* HB101 (pYXL22). The optimum concentration of xylose for the β -xylosidase production in *Bacillus* sp. YA-14 was 0.2% (w/v).

Xylan을 분해하는 방법으로는 화학적 또는 효소적으로 가수분해하는 방법이 있다(1, 2). 이 중 효소적 방법에서 사용되는 미생물효소는 대표적으로 xylan을 exo, 혹은 endo 방법으로 분해하여 xylose, xylobiose, xylotriose를 생산하는 xylanase와 xylobiose를 xylose로 분해하는 β -xylosidase가 있다(3, 4).

최근의 유전자 재조합기술의 발달에 따른 xylanase와 β -xylosidase에 대한 유전자적 연구는 인체에 무해하고 효소를 세포외로 분비한다는 점에서 주로 *Bacillus*속 균주에 집중되어 있다. Okada (5) 등은 *B. pumilis*에서 삽입된 단편의 크기가 다른 두 개의 β -xylosidase 유전자를 cloning하여 생성된 효소의 분자량과 일반적 특성이 서로 다르다는 것을 보고하였다.

전보에서 xylan으로부터 효소작용에 의해 monomer인 xylose를 얻기 위해 알카리 내성 *Bacillus*

sp. YA-14(6)로부터 이미 xylanase 유전자를 cloning한 바 있다(7).

본보에서 동일균주의 β -xylosidase 유전자를 cloning하여 유전자 특성과 효소적 특성을 검토하고 유전자 조작방법으로 xylan으로부터 직접 xylose를 제조하는 방법을 모색하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

β -Xylosidase을 생산하는 공어균주로는 Yu 등(6)이 알칼리 조건하에서 분리한 *Bacillus* sp. YA-14를 사용하였고, 숙주 미생물로는 *E. coli* HB101, plasmid vector로는 pBR322를 사용하였다. β -Xylosidase를 검출하기 위한 배지로는 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside(Koch-Light Lab, England)를 0.5 mg/ml 첨가한 LB 한천평판배지를 사용하여

Key words: β -Xylosidase, cloning, alkali-tolerant *Bacillus*

*Corresponding author

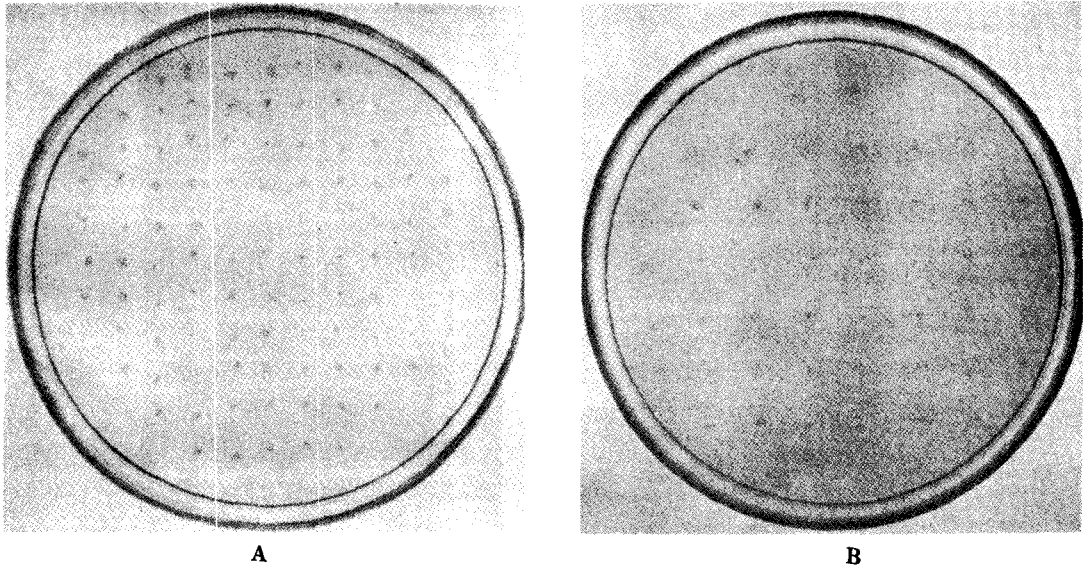


Fig. 1. Screening of the recombinant *E. coli* HB101 containing β -xylosidase gene.

A; β -xylosidase positive clone
 B; retransformation of β -xylosidase+ recombinant plasmid

β -xylosidase의 작용에 의해 생성된 *p*-nitrophenol의 노란색으로 효소생성여부를 측정할 수 있게 하였다.

DNA의 조제

Chromosomal DNA, plasmid DNA의 조제와 DNA의 제한효소처리, *E. coli*에 형질전환방법은 전보(7)와 동일하게 실험하였다.

β -Xylosidase 활성측정

효소활성측정에 사용된 원충액과 방법은 Yu 등과 동일한 방법(7)을 사용하였다. 효소의 활성측정은 기질 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside 용액(1 mg/ml in 50 mM phosphate buffer pH 7.0) 100 μ l에 효소액 100 μ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 0.4 M Na₂CO₃ 용액 2 ml을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 unit는 분당 1 μ mole의 *p*-nitrophenol을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

β -Xylosidase 유전자의 cloning

전보와 동일한 방법으로 gene bank를 조제한 후 *E. coli* HB101의 형질전환체 중에서 β -xylosidase 활성이 있는 clone을 얻었다. 선별방법은 LB agar

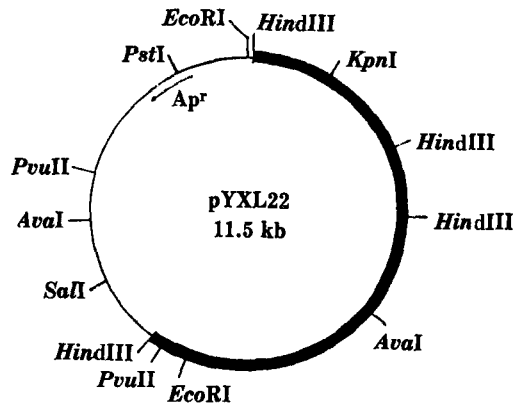


Fig. 2. Endonuclease cleavage map of the recombinant plasmid pYXL22.

A *Hind*III fragment containing β -xylosidase gene fragment (closed thick line) was inserted into plasmid pBR322.

에 첨가된 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside가 β -xylosidase에 의해 분해되어 유리된 *p*-nitrophenol이 노란색으로 발색하는 균주를 선별하였다(Fig.1). 이와 같은 방법으로 선별된 clone은 재조합 β -xylosidase 유전자를 안정하게 유지하였으며 이 재조합 plasmid DNA를 pYXL22로 명명하였다.

재조합 plasmid DNA pYXL22의 제한효소 지도

분리한 재조합 DNA를 여러가지 제한효소로 절단

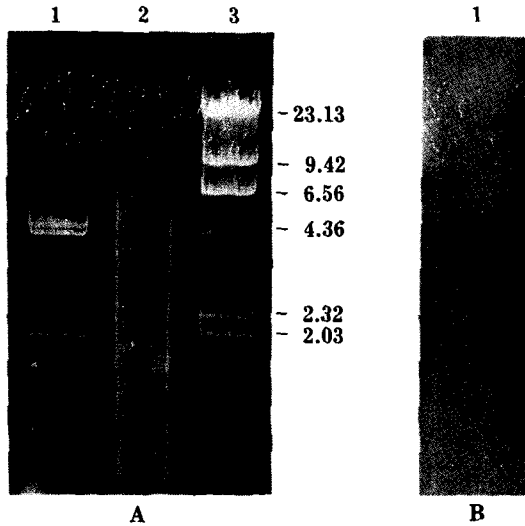


Fig. 3. Southern hybridization of the digested *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA and recombinant plasmid pYXL22 with pYXL22 plasmid probe.

A) lane 1; pYXL22 digested with *Hind*III
 lane 2; *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA digested with *Hind*III
 lane 3; λ DNA digested with *Hind*III
 B) Hybridization patterns
 lane 1; *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA digested with *Hind*III

하여 제한효소 지도를 작성한 결과 Fig.2와 같았다. 삽입된 DNA 단편에는 *Kpn*I, *Hind*III, *Ava*I, *Eco*RI, *Pvu*II site는 존재하였으나 *Xho*I, *Bgl*II, *Xba*I, *Hpa*I, *Cla*I, *Sma*I, *Bcl*II, *Sal*I, *Bgl*III, *Pvu*I site는 존재하지 않았다. 이 제한효소 지도 분석결과 Okada 등 (5)이 *Bacillus pumilis*에서 cloning한 β -xylosidase 유전자를 함유하는 pOXD28의 제한효소 지도와는 상이함을 보여주었다.

Southern blotting

Cloning된 β -xylosidase 유전자가 *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA에서 유래된 DNA라는 것을 확인하기 위해 Southern hybridization 실험을 행하였다. *Hind*III로 완전히 절단한 *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA와 재조합 plasmid DNA pYXL22을 전기영동 후 Southern의 방법(8)에 따라 nitrocellulose filter에 transfer시켰다. 다음 *Hind*III로 절단한 pYXL22을 probe로 hybridization시킨 결과 pYXL22의 *Hind*III fragment 4.65, 4.3, 2.0, 0.8kb가 *Bacillus* sp. YA-14 chromosomal DNA의 동일한 위치에서 hybridization된 것으로 나타났다(Fig.3). 이 결과로서 pYXL22에 삽입

Table 1. Distribution of β -xylosidase activity in *E. coli* HB101 containing recombinant plasmid DNA.

Enzyme	Distribution of enzyme in fraction (%)		
	Medium	Periplasm	Cytoplasm
<i>Bacillus</i> sp. YA-14 β -xylosidase	0	100	
<i>E. coli</i> HB101 β -xylosidase	0	0	0
<i>E. coli</i> HB101 (pYXL22) β -xylosidase	0	22.8	77.2
β -galactosidase	0	2.6	97.4
β -lactamase	0	92.0	8.0

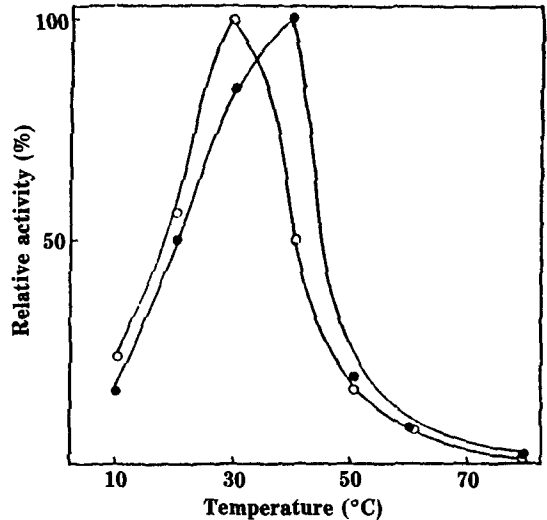


Fig. 4. Effect of temperature on the β -xylosidase activity of *E. coli* HB101 containing plasmid pYXL22 and *Bacillus* sp. YA-14.

●-●; *Bacillus* sp. YA-14
 ○-○; *E. coli* HB101 (pYXL22)

된 의래 DNA는 *Bacillus* sp. YA-14 DNA 유래임을 확인할 수 있었다.

원균주가 생산한 효소와 recombinant가 생산하는 효소특성 비교

전보에 기술한 방법과 마찬가지로 세포를 extra-cellular, periplasmic, cellular 효소로 분획한 후 효소활성을 관찰한 결과 공여균주와 재조합균주 모두 효소가 세포외로 전혀 분비되지 않고 세포내에 100% 존재하는 것으로 나타났다(Table 1). 이는 *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 β -xylosidase의 경우

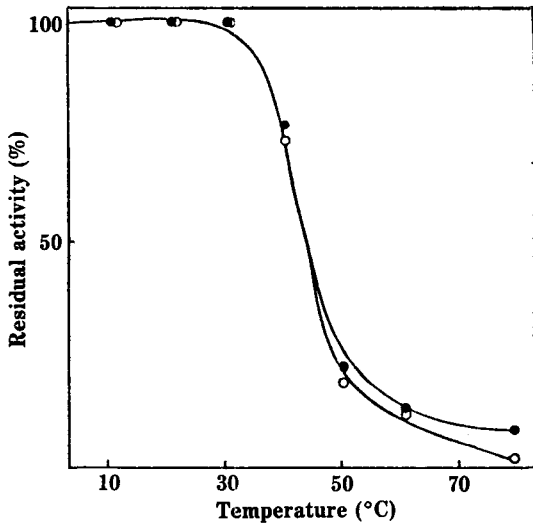


Fig. 5. Effect of temperature on the β -xylosidase stability of *E. coli* HB101 containing plasmid pYXL22 and *Bacillus* sp. YA-14.

●-●; *Bacillus* sp. YA-14
○-○; *E. coli* HB101 (pYXL22)

대부분 세포내 효소라는 것과 일치하였다(9).

효소활성과 안정성에 미치는 온도의 영향

각 온도에서 β -xylosidase 활성을 측정하여 본 결과 공여균주인 *Bacillus* sp. YA-14가 생산하는 효소는 40°C에서 가장 높은 활성을 보이고 있는 반면 재조합균주가 생산하는 효소는 30°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig.4). 효소안정성에 미치는 온도의 영향은 공여균주와 재조합균주 모두에서 30°C까지 100% 안정성을 나타내었고 80°C에서 모두 불활성화되었다(Fig.5).

효소생산에 미치는 인자

탄소원에 따른 β -xylosidase 생산의 효과

LB 배지에 각각 0.1%의 탄소원을 첨가하여 37°C에서 12시간 배양한 후 세포내의 효소활성을 측정하였다. Table 2와 같이 공여균주인 *Bacillus* sp. YA-14의 경우는 xylose와 xylan을 첨가하였을 경우만 효소활성이 나타났고 재조합균주의 경우는 glucose를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었다. 이 결과로부터 *Bacillus* sp. YA-14의 효소는 inducible 효소이고 재조합균주에서의 효소는 constitutive하다는 것을 알 수 있었다. 이는 *Bacillus* 속 균주들이 분비하는 β -xylosidase는 xylose 또는

Table 2. Effect of carbon source on β -xylosidase production.

Carbon source	β -xylosidase activity (mU)	
	<i>Bacillus</i> sp. YA-14	<i>E. coli</i> HB101 (pYXL22)
None	0	20
Glucose	0	23
Fructose	0	13
Xylose	16	16
Melibiose	0	13
Maltose	0	12
Galactose	0	17
Xylan	1.3	22

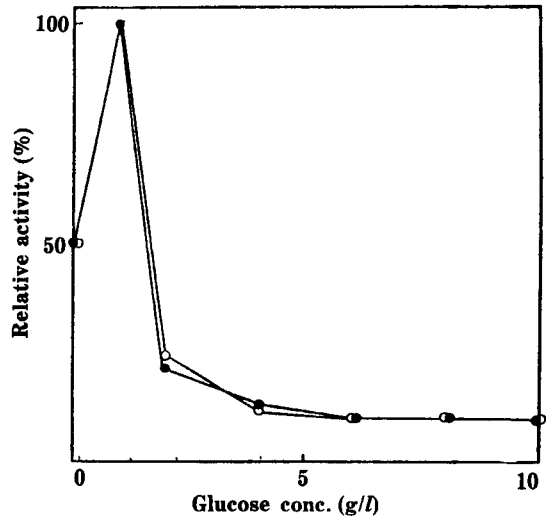


Fig. 6. Effect of glucose concentration on the β -xylosidase production of *E. coli* HB101 containing plasmid pYXL22 and *Bacillus* sp. YA-14.

●-●; *Bacillus* sp. YA-14
○-○; *E. coli* HB101 (pYXL22)

xylose 유사체에 의해 효소생산이 촉진된다는 보고(10, 11)와 일치하는 결과이었다. 이와 같은 결과는 원균주의 β -xylosidase 유전자는 operon과 같은 operator의 조절하에서 효소활성이 조절되는데 반해 cloning된 외래 DNA 내에는 repressor를 생성하는 조절 유전자 또는 작동 유전자의 해체에 있어서 constitutive하게 효소가 생성된다고 생각할 수 있다.

Glucose, xylose 농도에 따른 효소생산의 효과

Glucose 농도에 대한 효소활성은 공여균주와 재조

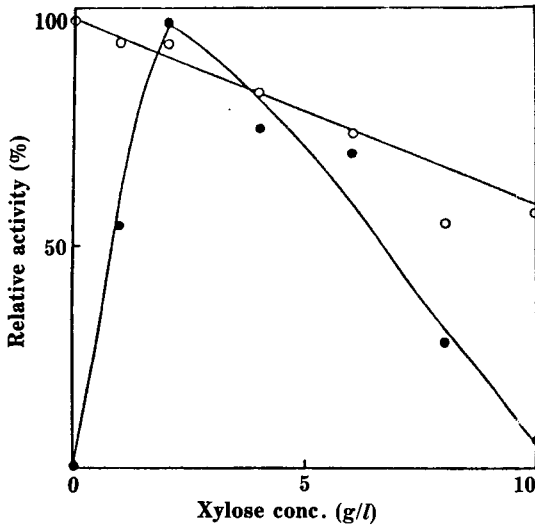


Fig. 7. Effect of xylose concentration on the β -xylosidase production of *E. coli* HB101 containing plasmid pYXL22 and *Bacillus* sp. YA-14.

●-●; *Bacillus* sp. YA-14
○-○; *E. coli* HB101 (pYXL22)

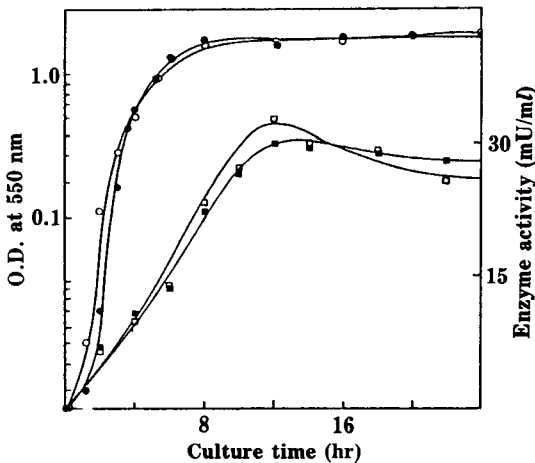


Fig. 8. Growth and enzyme production of *Bacillus* sp. YA-14 and *E. coli* HB101 (pYXL22).

●-●; Growth of *Bacillus* sp. YA-14
○-○; Growth of *E. coli* HB101 (pYXL22)
■-■; Enzyme activity of *Bacillus* sp. YA-14
□-□; Enzyme activity of *E. coli* HB101 (pYXL22)

합 균주 모두 0.1%에서 최고치를 나타내다가 glucose 농도가 증가하면서 급격히 감소하여 0.6%에서 활성이 1/10로 감소하였다(Fig.6). Okada 등(5)도 0.2% 이상에서 급격한 효소활성 감소를 보임을 보고한 바 있다. Xylose의 경우, 공여균주는 xylose를 첨가하지 않았을 때는 효소생산을 하지 못

했으나 xylose 농도가 0.2%까지 급격하게 효소생산이 증가하여 그 후 서서히 감소하여 1% 첨가하였을 때 전혀 효소활성이 검출되지 않았다(Fig.7).

세포성장에 따른 효소활성의 변화

하룻밤 배양한 증배양액을 LB 배지에 0.2%(v/v) 접종하여 37°C에서 배양하면서 각 시간별로 균의 생육과 효소활성을 비교 검토하였다(Fig.8).

Bacillus sp. YA-14와 *E. coli* HB101은 생육 정도가 거의 동일하며 배양시작 후 8시간에서 정지기에 도달하였다. 균 생육이 대사 증식기에서 급격하게 상승하는데 반해 효소활성은 10시간까지 서서히 증가하였다가 시간이 경과함에 따라 점차적으로 감소하였다.

결 론

알칼리 내성 *Bacillus* sp. YA-14의 β -xylosidase 유전자를 pBR322를 이용하여 cloning하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Cloning된 외래 DNA는 약 7.0 kb로서 *KpnI*, *AvaI*, *PvuII*, *EcoRI* site가 각 한 부위 *HindIII* site는 두 부위 존재하였다. 또한 효소특성을 조사한 결과 *E. coli* HB101 (pYXL22)가 생산하는 β -xylosidase는 100% 세포내에 존재하였다. 또한 최적 온도는 30°C였고 40°C까지 안정하였다. 효소생산은 *Bacillus* sp. YA-14의 경우 0.2% xylose를 첨가하여 12시간 배양시 최대활성을 나타내었고 *E. coli* HB101 (pYXL22)은 glucose 0.4%에서 효소생산이 1/10로 감소되었다. 또한 두 경우 모두 12시간 배양하였을 때 최대 효소활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지기술개발 사업비로 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Robert, F., H. Dekker: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1127 (1983).
2. Lee, Y.Y., C.M. Lin, T. Johnson and R.P. Chalmers: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 75 (1978).
3. Esteban, R., J.R. Villanueva and T.G. Villa: *Can. J. Microbiol.*, **28**, 733 (1982).
4. Hilderson, H.K., F.G. Loontjens, M. Claeysens and C.K. Debruyne: *Eur. J. Biochem.*, **7**, 434 (1969).

5. Panbangred, W., D. Kawaguchi, T. Tomita, A. Shimyo and H. Okada: *Eur. J. Biochem.*, **138**, 267(1984).
6. Yu, J.H., Y.J. Chung, K.S. Chung and D.H. Oh: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 239 (1986).
7. Yu, J.H., D.C. Park and Y.J. Chung: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 154 (1989).
8. Southern, E.M.: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503 (1975).
9. Gascoigne, J.A. and M.M. Guscoigne: *J. Gen. Microbiol.*, **22**, 242 (1960).
10. Kawaminami T. and H. Iizuka: *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1787 (1969).
11. Simpson, F.J.: *Can. J. Microbiol.*, **5**, 99 (1959).

(Received September 23, 1989)