

재조합 균주 *Escherichia coli*가 생산하는 *Bacillus stearo-thermophilus* Exo-xylanase의 정제 및 특성

문애란 · 최용진*

고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Purification and Characterization of Exo-xylanase from *Escherichia coli* Cells Harboring the Recombinant Plasmid pMG1

Mun, Ae-Ran and Yong-Jin Choi*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract — Exo-xylanase encoded by the xylA gene of *Bacillus stearo-thermophilus* was produced from *Escherichia coli* JM109 carrying a recombinant plasmid pMG1. Synthesis of the enzyme was observed to be cell-associated, and about 94% of the enzyme synthesized was located in the cytoplasmic region. The maximum production was attained when the *E. coli* strain was grown at 37°C for 8 hours on the medium containing 0.5% fructose, 1.0% tryptone, 1.0% sodium chloride, and 0.5% yeast extract. The exo-xylanase was purified to homogeneity using a combination of salting out with ammonium sulfate, DEAE-Sephadex CL-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration, and Sephadex G-150 gel filtration. The purified enzyme was most active at pH 6.0 and 45°C. Ca²⁺ and Co²⁺ activated the exo-xylanase activity by about 20% while Ag²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺ inhibited the enzyme activity by up to 60%. The K_m value on p-nitrophenyl-β-D-xylanopyranoside was 2.75 mM. The enzyme had a pI value of 4.7. The estimated molecular weight of the native protein was 200,000 dal. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis suggested that the native enzyme was a trimer composed of three identical 66,000 dal. polypeptides. The purified enzyme efficiently converted all the xylo-oligosaccharides tested to xylose. It was also confirmed that the enzyme split xylans in an exo-manner even though the degree of hydrolysis was fairly low. The xylanolytic enzyme was, therefore, classified to be one of the few bacterial exo-xylanases lacking transferase activity.

Xylan은 β-1,4-D-xylopyranoside 탄소 골격으로 구성된 복잡한 화학구조를 지닌 일종의 복합 다당류로서 plant hemicellulose의 주성분이며 자연계 분포량이 cellulose 다음을 차지하고있는 중요한 잠재 biomass 자원이 되고 있다(1,2).

이와 같은 xylan의 완전 가수 분해를 위해서는 몇 개의 서로 다른 관련 분해 효소, 즉 endo-xylanase, exo-xylanase, β-xylosidase, α-arabinofuranosidase 및 acetyl esterase 등의 효소가 상호 효율적으로 협동

작용을 하는 다단계과정을 거쳐야하는 것으로 알려져 있다(3).

따라서 본 연구실에서는 xylan biomass의 적극적 활용을 위한 집중적 연구 활동의 일환으로 세균으로서는 그 예가 극히 드문 exo-xylanase를 비롯한 multiple xylanases를 세포외로 다량 생산하는 균주를 토양으로부터 분리, *Bacillus stearo-thermophilus*로 동정하였으며(4) 또한 분리균주로부터 endo-xylanase, β-xylosidase 및 α-arabinofuranosidase 유전자를 각각 분리하여 *E. coli*에 크로닝하고 그 결과의 일부를 이미 보고한 바 있다(5,6).

본 연구에서는 전보에 보고한 바 있는(6) *B. stearo-*

Key words: Purification, chracterization, exo-xylanase, xylA, *Bacillus stearo-thermophilus*

*Cooresponding author

thermophilus β -xylosidase 유전자를 *E. coli* 세포를 이용 유전자 산물의 대량 생산, 생산 효소 단백질의 정제, 정제 효소의 정확한 특성 조사 등을 실시하였다. 그 결과 본 효소는 xylobiose를 비롯한 각종 xylooligomer를 효율적으로 분해할 뿐만 아니라 xylan도 분해, 다량의 D-xylose을 생산하는 매우 특이한 분해능을 가진 것으로 확인, 새로운 exo-type의 세균 xylanase로 판명되어 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

Exo-xylanase 생산 균주는 *Escherichia coli*[pMG1] 재조합 균주로서, *Bacillus stearothermophilus* exo-xylanase 유전인자를 포함하고 있는 *Pst*I DNA 단편(2.2 kb)을 pUC18 plasmid에 subcloning하여 얻은 recombinant plasmid를 *E. coli* JM109에 도입시켜 분리한 균주이다(Fig. 1 참조)(6).

효소 기질로 사용한 ρ NPX(ρ -nitrophenyl- β -D-xylopyranopyranoside), oNPG(o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside), ρ NPA(ρ -nitrophenyl- β -D-arabinofuranoside), oat-spelts xylan, 및 birchwood xylan 등은 Sigma사 제품을, 기타 일반 시약류는 시판 1급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

효소활성 측정

Exo-xylanase 활성 : 5 mM ρ NPX(ρ -nitrophenyl- β -D-xylopyranoside) 기질 용액(0.05 M 인산 완충 용액 pH 6.5) 0.1 ml에 효소용액 0.1 ml을 첨가하고 45°C 에서 20분간 반응시킨 후 0.4 M Na_2CO_3 용액 0.5 ml을 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 효소 반응에 의해 생성된 ρ -nitrophenol을 405 nm에서 비색 정량하여 효소 활성을 측정하였으며, 45°C 에서 1분간에 1 μ mole의 ρ -nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

α -Arabinofuranosidase 활성 : 5 mM ρ NPA(ρ -nitrophenyl- α -D-arabinofuranoside) 용액 (0.05 M 인산 완충 용액 pH 6.5)을 기질로 사용하였으며, 기타 활성 측정 방법은 β -xylosidase 활성 측정 경우와 동일하였다.

Lactate dehydrogenase 활성 : 0.1 M L-lactate를 기질로 사용, H.U. Bergmeyer 등(7)의 방법에 따라 실시하였다.

β -Galactosidase 활성 : 4 mg/ml oNPG(o-nitro-

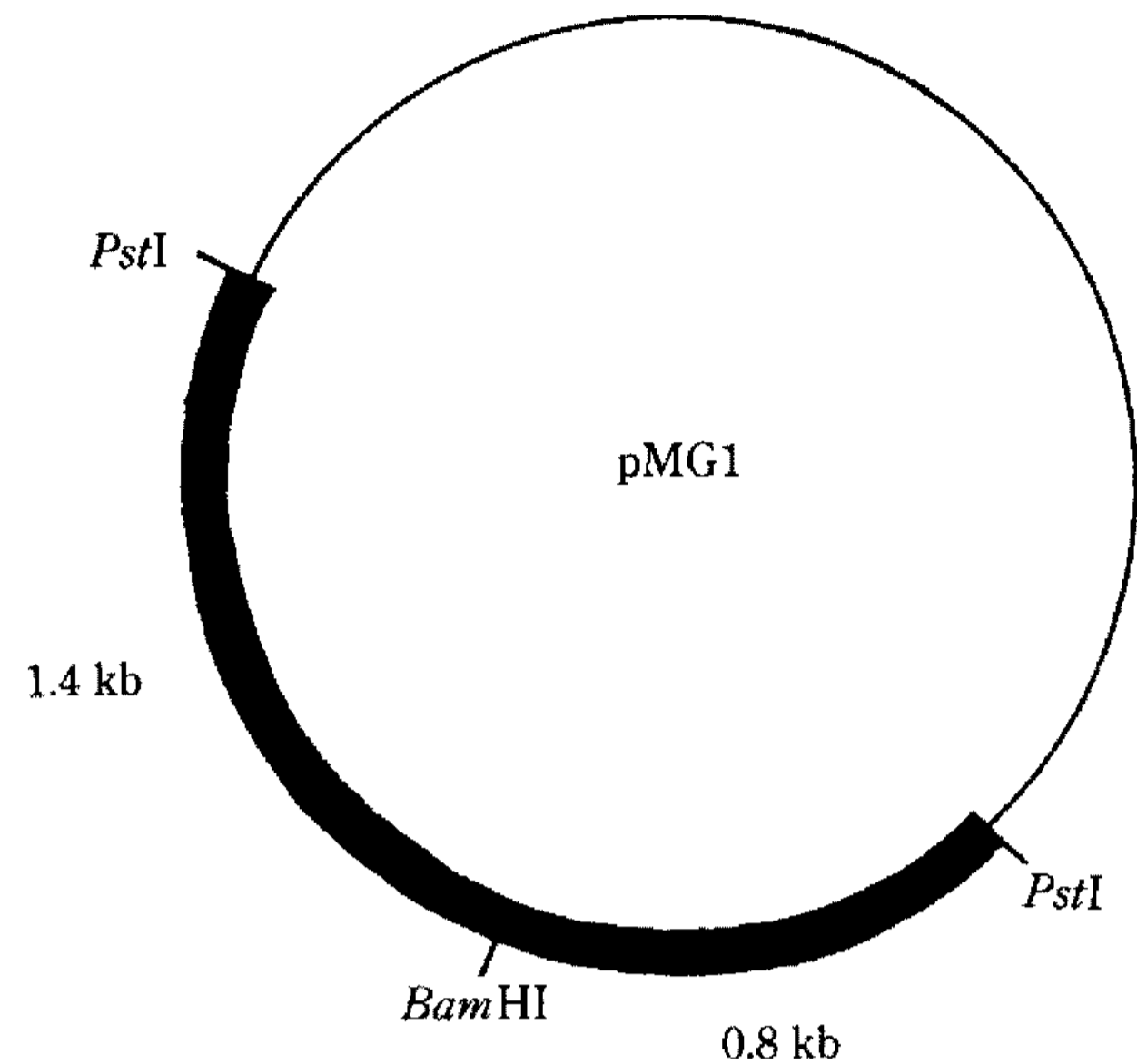


Fig. 1. Restriction enzyme map of pMG1.

The thick line represents 2.2 kb insert DNA and the thin line indicates pUC18.

phenylgalactopyranoside)를 기질로 사용, Evangeline (8) 등의 방법에 따라 실시하였다.

β -Lactamase 활성 : 20,000 unit/ml Penicillin용액을 기질로 사용, Michael(9)의 방법에 따라 실시하였다.

Xylanase distribution 분석

재조합 *E. coli* 균주가 생산하는 exo-xylanase의 extracellular, periplasmic 및 intracellular fraction은 osmotic shock을 이용한 Honda(10) 등의 방법에 따라 분별, 분석하였다.

단백질 정량

Column 용출액중의 단백질량은 자외선 흡광도법(O.D. 280 nm), 기타 시료의 경우는 bovine serum albumin을 표준단백질로한 Lowry법(11)을 이용, 측정하였다.

조효소액의 조제

효소 생산 최적 배지에서 8시간 동안 배양한 *E. coli*[pMG1] 배양액을 원심분리(Beckman, 7,000 rpm, 20 min)하여 균체를 분리하였다. 분리 균체는 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5)에 다시 현탁시켜 4°C 에서 10분간 초음파 처리(Sunill, 20 kHz, 10 min)한 다음 원심 분리(10,000g, 10 min)하여 얻은 상등액을 효소 정제용 조효소액으로 사용하였다.

효소 정제

Ammonium sulfate 분획 : 35~65% ammonium sulfate 포화 농도에서 침전 분리된 단백질을 0.1 M 인산 완충 용액(pH 6.5)에 용해하고 0.05 M의 동일 완충 용액중에서 18시간 투석, 효소 단백질을 분별하였다.

DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography : Ammonium sulfate 분획을 하여 얻은 효소액을 0.05 M 인산 완충 용액(pH 6.5)으로 평형시킨 DEAE-Sepharose CL-6B column(2.8×13.5 cm)에 흡착시키고 동일 완충 용액으로 세척하였다. 세척 후 0.5 M NaCl을 이용, 시간당 20 ml의 용출 속도(3 ml/tube)로 linear gradient 용출시켰다.

Sephadex G-100 gel chromatography : Ion exchange chromatography를 거쳐 부분 정제된 효소액을 0.05 M 인산 완충 용액으로 미리 평형시킨 Sephadex G-100-120 column(1.6×90 cm)을 사용하여 시간당 6 ml(3 ml/tube)의 속도로 여과하였다.

Sephadex G-150(superfine) gel filtration : Sephadex G-100 젤 여과한 효소액을 재차 Sephadex G-150-50 column(1×75 cm)을 이용, 시간당 2.5 ml의 속도(2 ml/tube)로 여과시켰다.

분자량 측정

정제 효소의 분자량은 SDS slab gel 전기 영동법(12)과 Sepharose CL-4B를 이용한 gel filtration(13)으로 측정하였다. SDS-slab gel 전기 영동에서는 albumin(egg) 45 kdal, albumin(bovine) 66kdal, phosphorylase b 97.4 kdal, β -galactosidase 116 kdal 등을 표준 단백질(Sigma co.)로 사용하였으며, gel filtration에서는 alcohol dehydrogenase 150 kdal, β -amylase 200 kdal, apoferritin 443 kdal, thyroglobulin 669 kdal을 표준 단백질(Sigma co.)로 사용하였다.

Exo-xylanase의 Isoelectric point 결정

Exo-xylanase의 isoelectric point는 horizontal slab gel(Mini IEF cell, Bio-Rad co.)을 이용한 isoelectric focusing방법을 이용, 측정하였다. 즉, 정제 효소 단백질을 25% glycerol 용액과 ampholyte(Biolyte pH 3~10, Bio-Rad co.)를 혼합한 5% polyacrylamide gel에서 100 V 15분, 200 V 15분, 450V 60분간 전개시켰다. pI 표준물질로는 Bio-Rad의 IEF standards를 사용하였고 분리 단백질대는 10% TCA(trichloroacetic acid) 용액에서 30분, 1% TCA 용액에서 24시간

세척한 후 Coomassie blue staining법으로 염색하여 확인하였다.

Xylan 및 xylooligosaccharide 가수분해생성물의 분석

Xylose 잔기의 함량과 측쇄 구조가 서로 다른 세 종류의 xylan(larchwood xylan, birchwood xylan, oat spelts xylan)을 기질로 사용, 효소 반응 시키고 분해 산물은 thin layer chromatography법(14)으로 분석하였다. 즉, Machery-Nagel TLC plate(20×20 cm)에서 butanol : pyridine : water(5 : 3 : 2, v/v) 혼합액을 전개 용매로 사용하여 2중 전개시킨 후 공기중에서 건조시키고 aniline hydrogen phthalate 용액으로 발색시켰다.

Xylooligosaccharide 가수분해생성물은 high-performance liquid chromatography(HPLC)를 이용, 분석하였다. HPLC는 Waters사 제품(Pump ; Model 510, Integrator ; Model 741, Column ; Carbohydrate analysis column(3.9×300 mm), Detector ; Differential refractometer R 401)을 이용하였고, acetonitril과 ddH₂O 혼합물(75 : 25, v/v)을 mobile phase로 사용, 1.5 ml/min의 속도로 용출시켜 분석하였다.

Polyacrylamide gel 전기 영동

정제 효소의 순도 검정은 7.5% polyacrylamide gel과 Tris-glycine 완충 용액(pH 8.3)을 사용한 Laemmli 전기 영동법(15)을 이용하였다.

결과 및 고찰

Exo-xylanase 생산 최적 배양 조건

다량의 효소를 생산, 정제를 보다 수월하게 하기 위한 목적으로 *B. stearothermophilus* exo-xylanase 생산 재조합균인 *E. coli* JM109(pMG1)에 의한 Exo-xylanase 생산 배지 조성을 조사하여 Table 1과 같은 최적 배지 조성을 확립하였다.

탄소원으로 0.25% fructose를 첨가하였을 때 0.5% xylan(*B. stearothermophilus*에 의한 exo-xylanase 생산 최적 탄소원) 첨가 경우에 비해 약 5배 이상의 높은 효소 생산량을 나타내었다.

이와같은 fructose의 현저한 효과는 *E. coli* HB 101 (pYK 44) 재조합 균주에 의한 β -xylosidase 생산에 관한 Yu 등의 연구(16)에서도 보고되고 있다. 이와 같은 효소 생산 증대 효과의 원인은 현재로서는 정확히

설명할 수 없으나 매우 흥미있는 현상으로 앞으로 보다 구체적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

또한 질소원의 경우 자료 제공은 하지 않았으나 일반적으로 무기질소원에 비해 유기질소원이 월등히 좋은 효소 생산 효과를 보였으며 yeast extract, peptone 및 tryptone 등이 매우 좋은 효과를 보였다. 특히 0.5% yeast extract와 1% tryptone을 혼합 첨가하여 약 10 시간 정도 배양했을 때(Fig. 2 참조) 세포 생육은 물론이고 효소생산량 역시 가장 높았다.

Exo-xylanase의 distribution

Reference enzymes로 β -lactase, β -galactosidas 및 lactate dehydrogenase를 사용, *E. coli* JM109(pMG1) 균주에 의해 생산된 exo-xylanase의 세포내외의 분포를 알아 본 결과 Table 2와 같이 생산 효소의 94% 이상이 세포내 분획에서 검출되었다. 이와같은 결과는 본 효소의 원생산 균주인 *B. stearothermophilus*에서는 생산 exo-xylanase의 대부분이 세포외로 분비되고 있는 것(4)과는 대조적인 현상으로 양 균주의 단백질 분비 기구의 차이가 원인으로 생각된다.

효소 정제

E. coli JM109(pMG1)을 효소 생산 최적 배지에서 배양하여 분리한 균체를 초음파 처리, 총 2,144 ml(8,240 units)의 조효소액을 조제하고 Table 3에 요약된 과정을 거쳐 exo-xylanase를 정제하였다.

즉 Fig. 3에 표시된 바와 같이 ammonium sulfate

분획(35~65%), DEAE-Sepharose CL-6B column(2.8×13.5 cm) chromatography, Sephadex G-100(1.6×90 cm) 및 Sephadex G-150(1×75 cm) gel filtration 과정을 거쳐 약 177.5배 정제된 단일 단백질 형태의 20.87 units의 exo-xylanase를 분리하였다.

정제 exo-xylanase의 일반 특성

최적 pH : pH 4~10 범위내에서 pH 1 unit 간격으로 조제한 네가지 서로 다른 완충 용액을 이용하여 exo-xylanase 활성에 미치는 반응액의 수소이온 농도의 영향을 조사, Fig. 4와 같은 결과를 얻었다.

본 효소는 pH 5~8 사이의 중성 반응액에서 완충 용액의 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 가장 높은 효소 활성을 보이고 있으며 이 범위를 벗어나면 효소 활성의 현저한 저하를 가져왔다. 이와 같은 효소 활성-pH 관계는 pH 6부근에서 가장 안정하면서 pH변화에 매우 민감한 반응을 보이고 있는 본 효소의 열안정

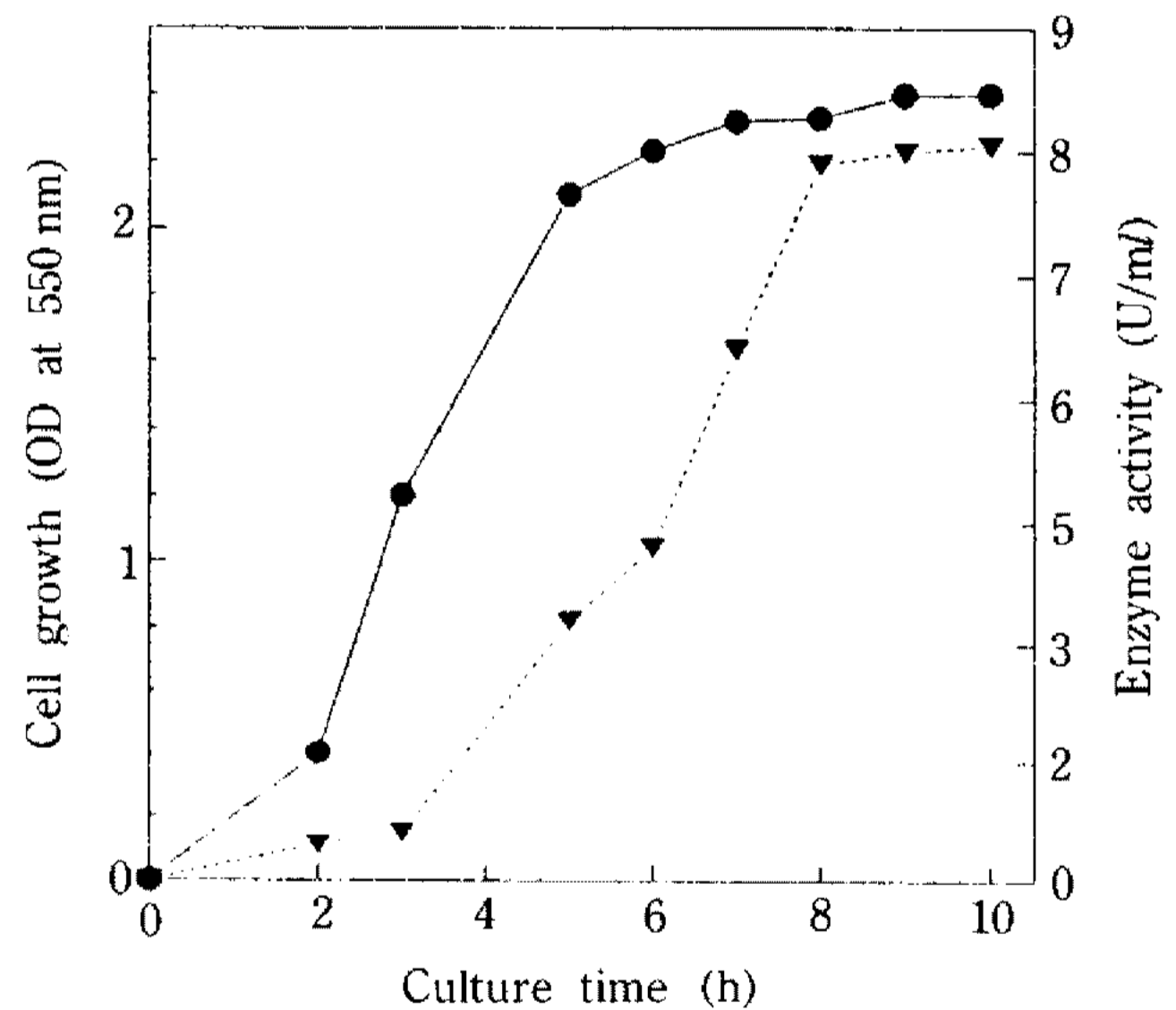


Fig. 2. Profile of exo-xylanase production during cultivation of *E. coli* JM109[pMG1].

The recombinant strain was grown at 37°C in the optimal medium vsupplemented with 50 µg/ml/ ampicilline. ●-●: cell growth, ▼-▼: enzyme activity

Table 1. Composition of the optimal medium for exo-xylanase production

Ingredients	Contents (g/l)
NaCl	10
Yeast extract	5
Tryptone	10
Fructose	5

Table 2. Subcellular distribution of the exo-xylanase activity in *E. coli* JM109 cells

Cell fraction	Enzyme activity (%)			
	Exo-xylanase	β -Lactamase	β -Galactosidase	Lactate dehydrogenase
Cytoplasm	94.42	15.19	96.30	8.10
Periplasm	4.06	73.86	3.70	74.30
Extracellular	1.52	10.95	0	17.60

Activities of exo-xylanase and marker enzymes were determined as described in 'Materials and Methods'.

Table 3. Summary of the purification of the exo-xylanase from *E. coli* JM109[pMG1]

Steps (ml)	Volume protein	Total activity	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract	2,144	23,467	8,240	0.35	100	1
Ammonium sulfate fractionation	32.5	4,462	2,499	0.56	30.33	1.6
DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	9	23.04	654	28.40	7.94	81.14
Sephadex G-100 filtration	1.70	2.40	87.75	36.56	1.06	104.45
Sephadex G-150 filtration	12	0.336	20.87	62.14	0.25	177.54

Enzyme activity was expressed as $\mu\text{mole } \rho\text{-nitrophenol released min}^{-1}$.

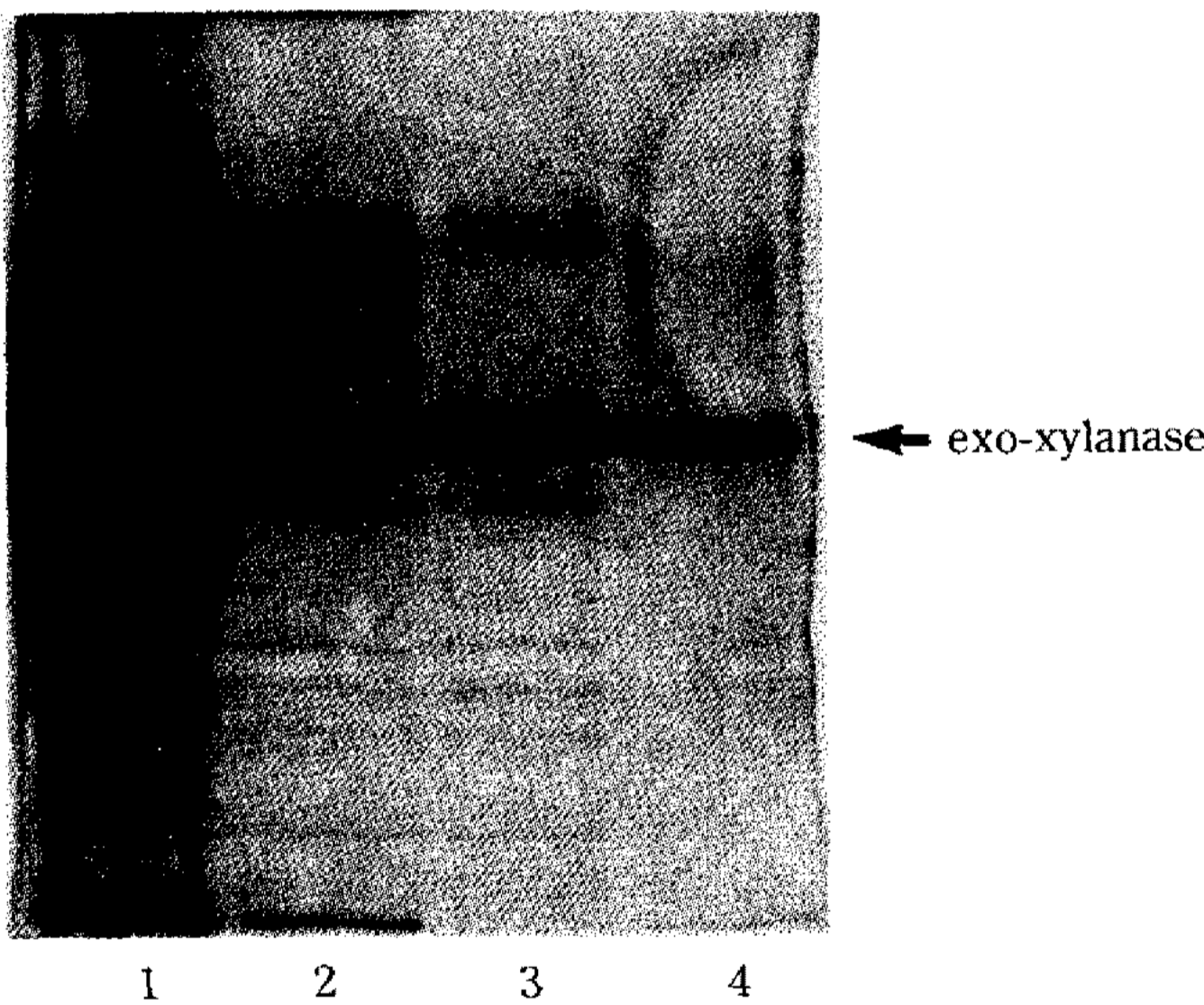


Fig. 3. Electrophoretic monitoring of the major steps of purification of the exo-xylanase.

Electrophoresis was performed in a 7.5% polyacrylamide gel. Lane 1, ammonium sulfate precipitate; lane 2, ion exchange column effluent; lane 3, Sephadex G-100 gel filtrate; lane 4, Sephadex G-150 gel filtrate.

성에도 관계가 있는 것으로 추측된다.

활성 최적 온도 및 열안정성: 본 효소는 Fig. 5와 같이 45°C 에서 가장 높은 활성을 보이고 있으며 반응 온도에 따라 효소활성의 큰 차이를 나타내었다. 또한 본 효소는 50°C 이상의 온도에서는 급속한 실활을 보이고 있어 대다수의 다른 *Bacillus* spp. xylanase에 비해(3) 비교적 내열성은 낮은 효소에 속하는 것으로 판단된다(Fig. 6 참조).

금속이온의 효과: 효소 반응액에 각종 금속이온을 1 mM 농도로 첨가, exo-xylanase 활성에 미치는 금속이온의 효과를 살펴본 결과 Co^{2+} 와 Ca^{2+} 이온이

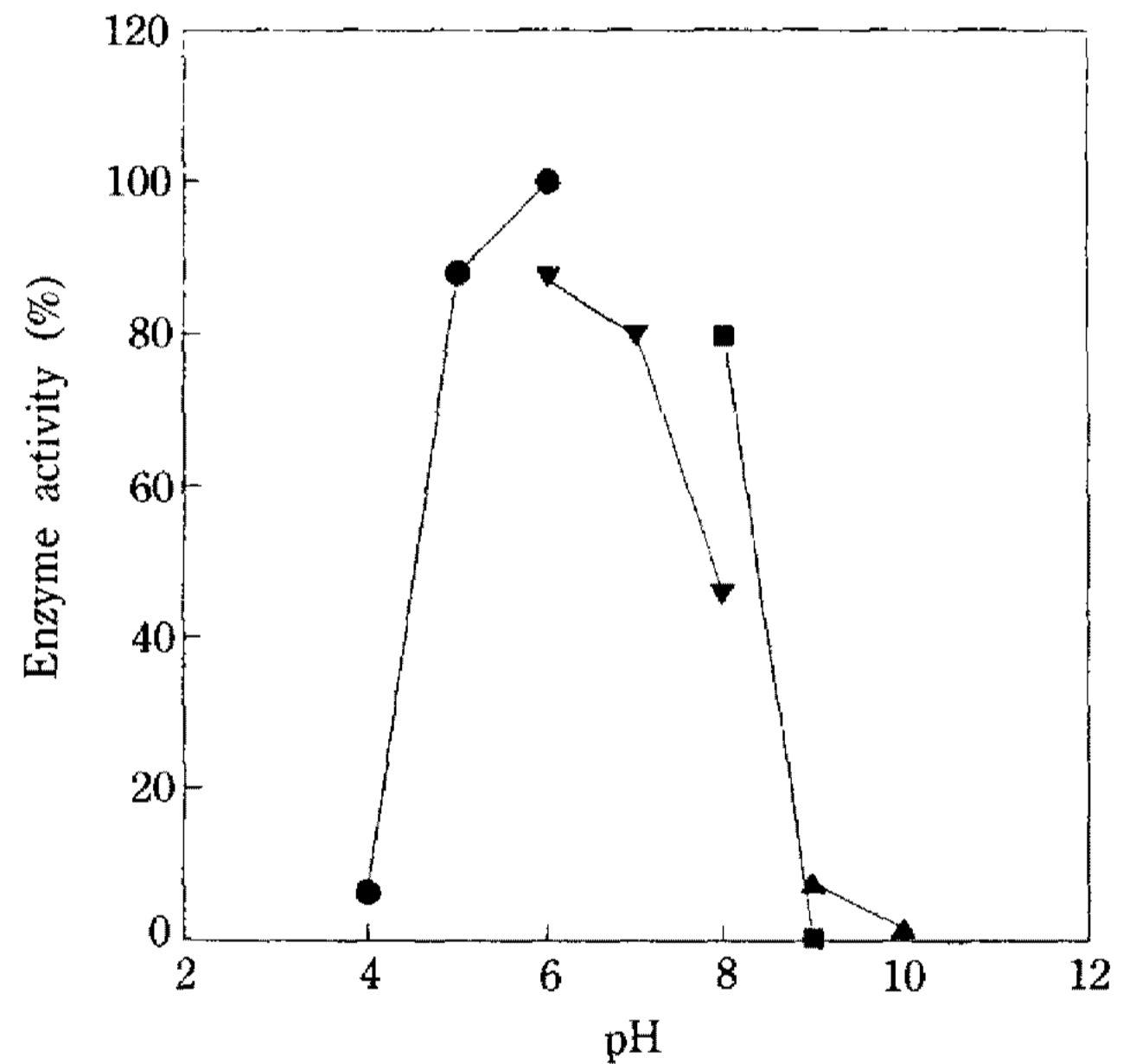


Fig. 4. Effect of pH on activity of the exo-xylanase. The enzyme reaction was carried out at 45°C for 20 min in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4~6), 0.1M phosphate buffer (pH 6~8), 0.1 M Tris buffer (pH 8~9), or 0.1 M glycine-NaOH buffer.

- : citrate-phosphate buffer (pH 4~6)
- ▼—▼: phosphate buffer (pH 6~8)
- : Tris buffer (pH 8~9)
- ▲—▲: glycine-NaOH buffer (pH 9~10)

25% 전후의 활성화 효과를 보였다. 반면 Ag^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} 및 Zn^{2+} 등의 금속이온은 현저한 활성 저하 효과를 나타내었으며 특히 Ag^{2+} 와 Hg^{2+} 의 경우 효소 활성의 거의 완전한 실활을 보임으로써 sulfhydryl enzyme의 한 특성을 나타내었다.

Isoelectric point: 표준물질로 Biorad의 IEF standards을 이용한 horizontal slab gel에 의한 정제 exo-

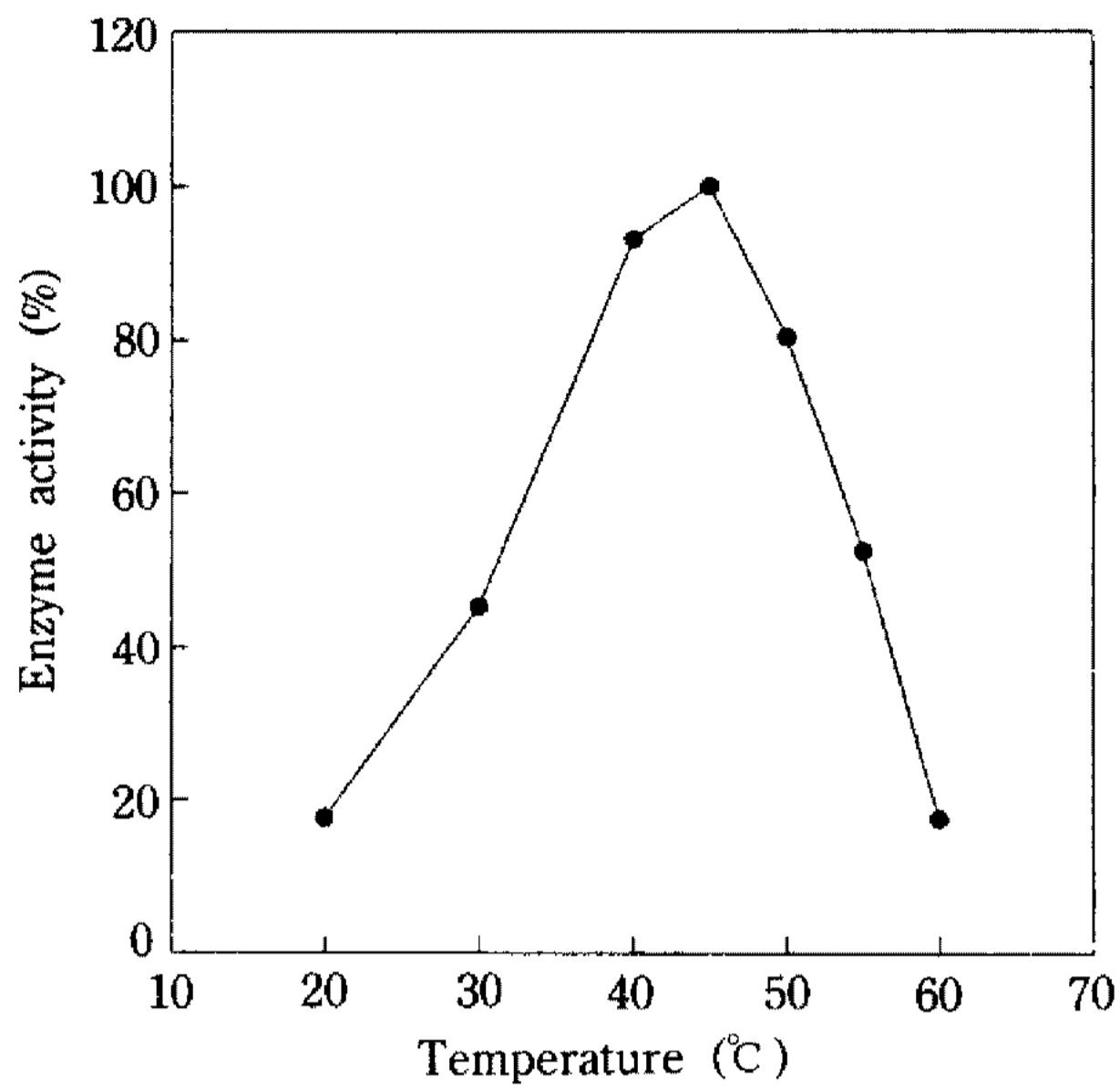


Fig. 5. Effect of temperature on activity of the exo-xylanase.

The enzyme reaction was carried out at each temperature shown in the figure for 20 min in 0.05 M sodium phosphate buffer.

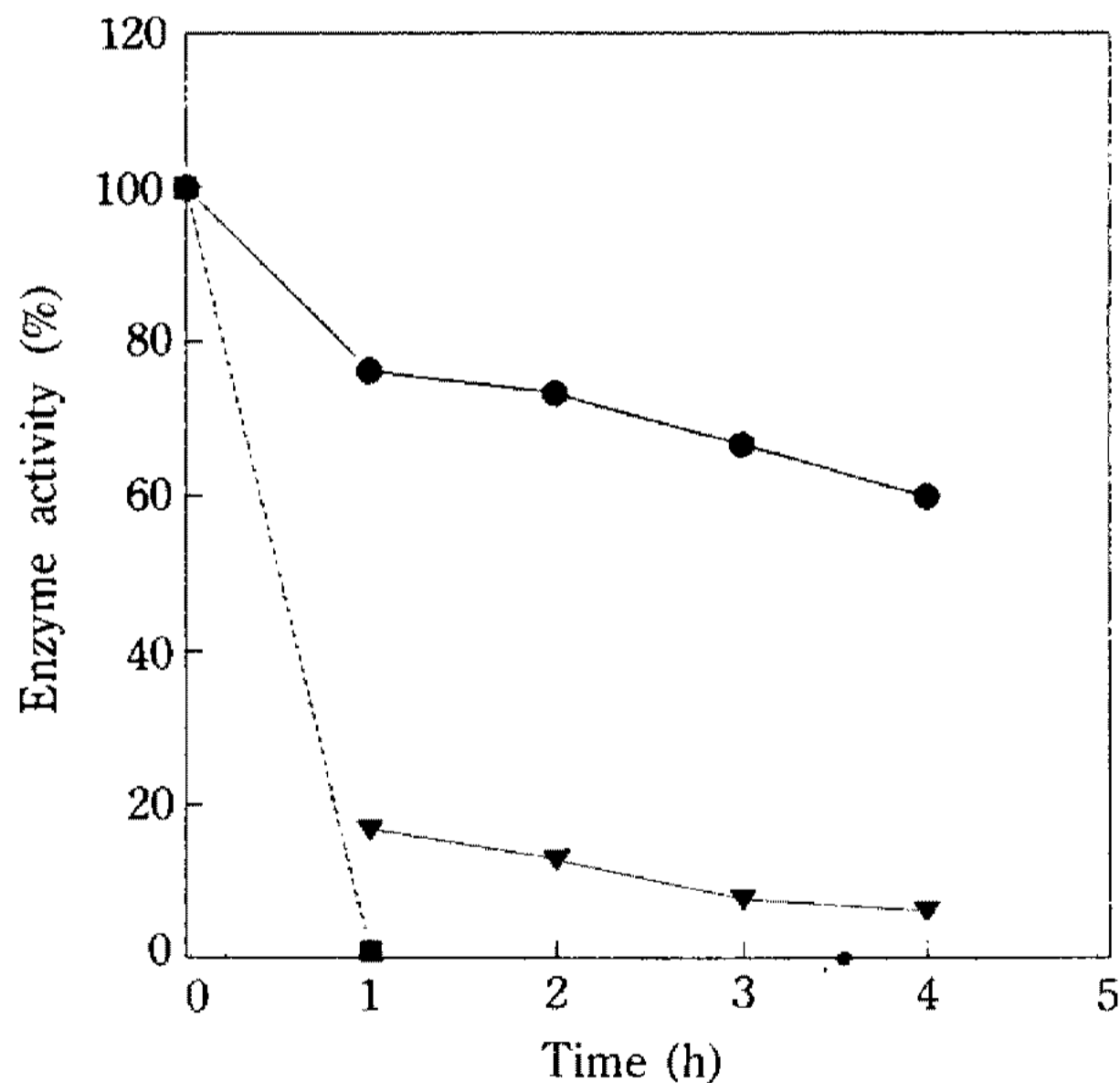


Fig. 6. Thermal stability of the exo-xylanase.

Exo-xylanase activity was measured under the standard conditions described in the 'Materials and Methods', after allowing the reaction mixture to stand in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) at the various temperatures indicated in the figure. Aliquots were taken at various time intervals and the residual activities were assayed and expressed as the percentage of the untreated control.

●—●: 40°C, ▼—▼: 50°C, ■—■: 60°C

xylanase의 pI값을 측정해본 결과 Fig. 7에 표시되어 있는 바와 같이 본 효소는 약 4.7의 pI값을 가지고

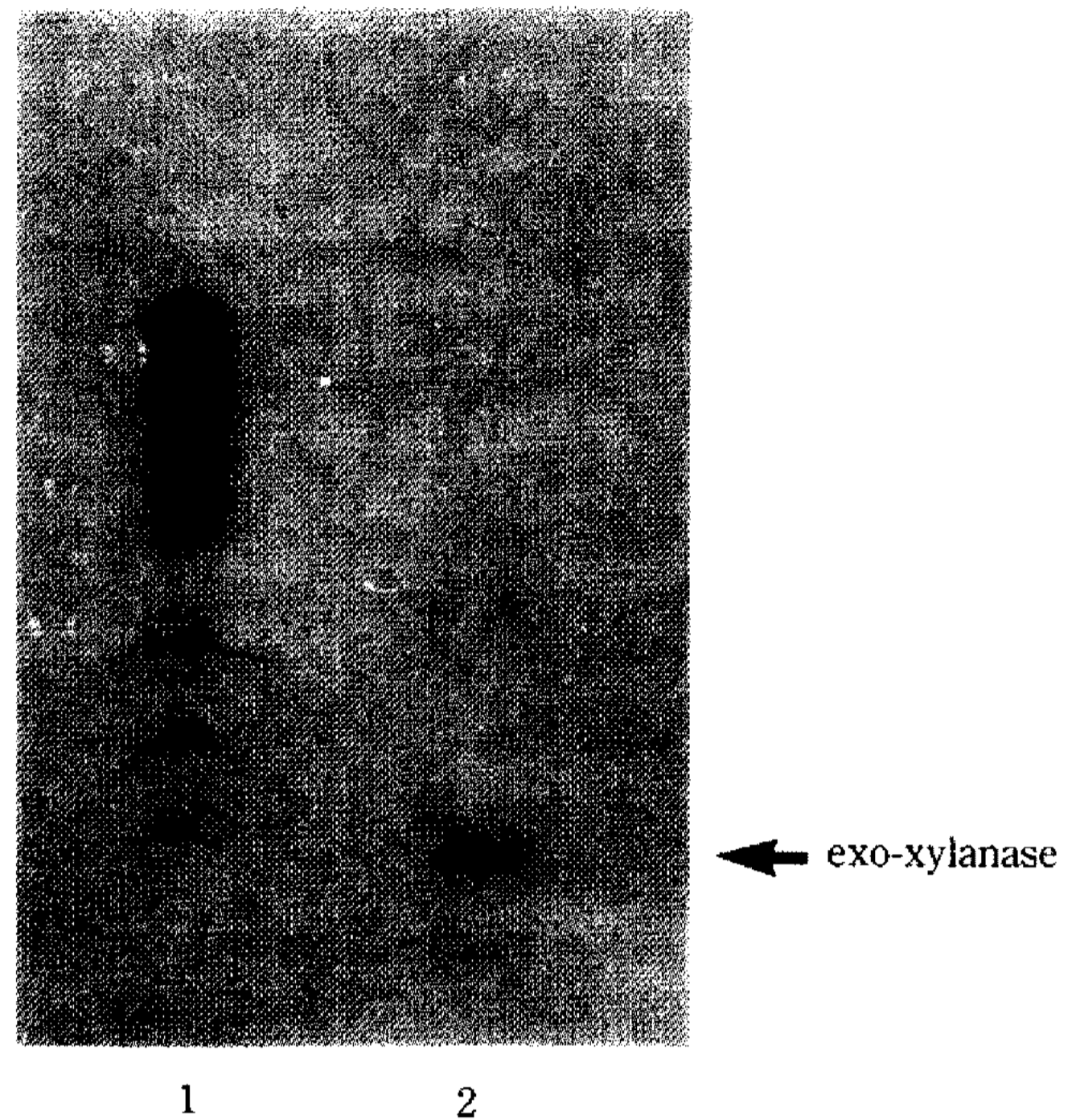


Fig. 7. Isoelectric focusing (pH 3~10) of the exo-xylanase.

Focusing was carried out in 5%(w/v) polyacrylamide horizontal slab gel containing Biolyte 3/10(pH 3~10) and runned under constant voltage conditions in a stepped fashion at 100V for 15 min, 200 V for 15 min, finally 450 V for 60 min.

Lane 1. Bio-rad IEF standards (from top to bottom)
 pI 9.6 Cytochrome C
 pI 7.8, 8.0, 8.2 Lentil lectin(3 bands)
 pI 7.5 Human hemoglobin C
 pI 7.1 Human hemoglobin A
 pI 7.0 Equine myoglobin
 pI 6.5 Human carbonic anhydrase
 pI 6.0 Bovine carbonic anhydrase
 pI 5.1 β-Lactoglobulin B
 pI 4.65 Phycocyanin
 Lane 2. Exo-xylanase

있는 것으로 분석되었다.

분자량 : 정제 효소의 분자량은 Sepharose CL-4B column을 이용한 gel filtration 방법으로는 200,000 dal.(Fig. 8), SDS-polyacrylamid gel 전기영동법으로는 약 66,000 dal.으로 측정되었다(Fig. 9). 따라서 본 *B. stearothermophilus* exo-xylanase는 세개의 동일 subunit로 구성된 일종의 trimer 형태를 가지고 있는 것으로 추정되었다.

Wang(3) 등에 의하면 *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Aspergillus* 및 *Trichoderma* spp. 등의 균종은 conserved function을 가지고 있는 multiple xylanases를 생산하고 있는 것으로 보고되고 있으며(1, 2,

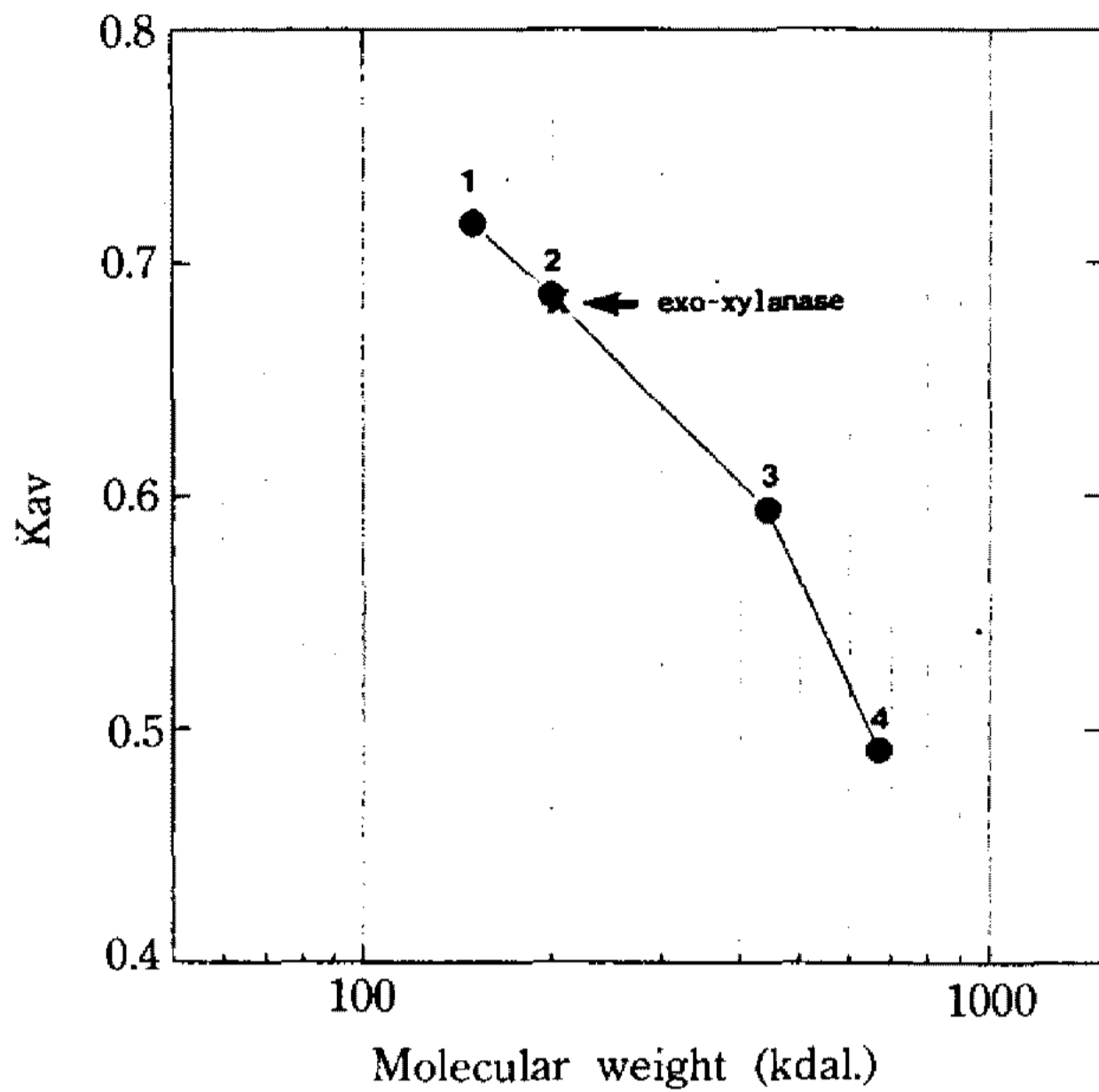


Fig. 8. Molecular weight estimation of the purified exo-xylanase by gel-filtration.

Sepharose CL-4B was used for gel matrix. The standard proteins used were the following:

1. Alcohol dehydrogenase 150,000 dal.
2. β -Amylase 200,000 dal.
3. Apoferritin 443,000 dal.
4. Thyroglobulin 669,000 dal.

17) 이들 xylanases는 분자량과 pI값과의 관계에 따라 basic/low molecular weight(pI : 8.3~10.0 ; 분자량 : 43,000~53,000) 효소와 acidic/high molecular weight(pI : 8.3~10.0 ; 분자량 : 43,000~53,000) 효소로 대별된다고 한다. 따라서 본 효소는 상기 분류 기준에 따르면 acidic/high M.W.에 속하는 Exo-xylanase인 것으로 판단된다.

기질 특이성 : p-Nitrophenyl기를 가지고 있는 몇 가지 합성 기질과 각종 천연 기질에 대한 정제 exo-xylanase의 기질 특이성을 조사해본 결과(Table 4) 본 효소는 비교적 좁은 기질 특이성을 가지고 있으면서 pNPX에 대해서만 높은 효소 활성을 보였으며 pNPX에 대한 K_m value는 2.75 mM이었다. 또한 본 *B. stearothermophilus* xylan 분해계 효소는 xylobiose, xylotriose 등의 각종 oligomer는 물론이고(Fig. 10) xylan에도 작용, xylose를 다량 생산하는 매우 특이한 exo-type의 xylanase라는 것을 확인할 수 있었다. 즉 구조가 다른 세종류의 xylan 기질에 본 정제 효소를 처리, 반응 시간에 따라 가수분해 산물을 TLC로 분석해 본 결과(Fig. 11 참조) xylose 잔기의 함량이 많고 측쇄 구조를 비교적 적게 가지고 있는 larchwood xylan과 birchwood xylan은 반응 3시간

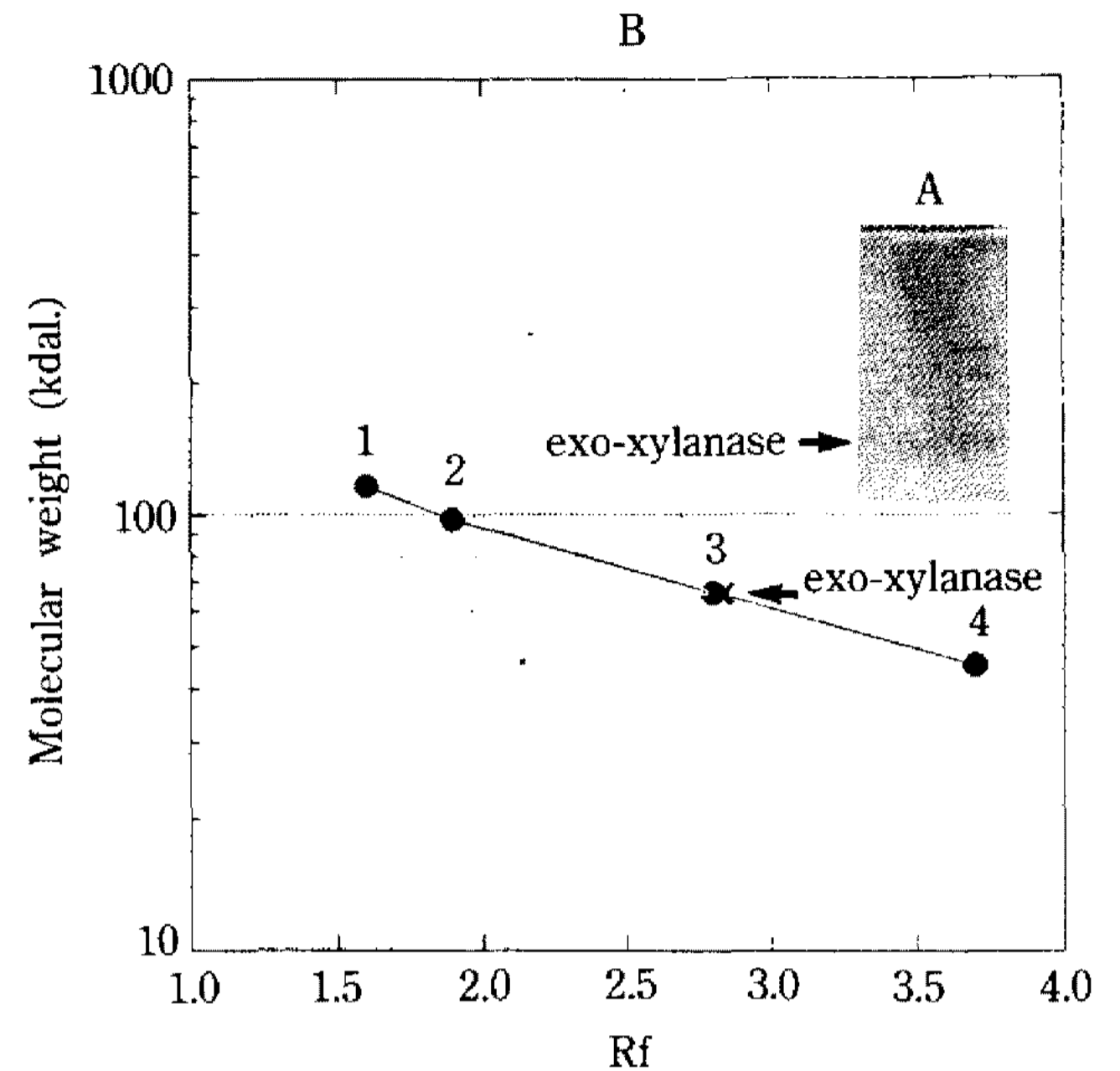


Fig. 9. Molecular weight estimation of the exo-xylanase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A. Gel electrophoresis was carried out in 7.5%(w/v) polyacrylamide gel containing 0.4% SDS using the SDS-discontinuous buffer system.

Lane 1. exo-xylanase, Lane 2. reference proteins: The reference proteins used were as follows:

1. β -Galactosidase 116,000 dal.
2. Phosphorylase b 97,400 dal.
3. Albumin from bovine 66,000 dal.
4. Albumin from egg 45,000 dal.

B. Calibration curves of log₁₀ molecular weight vs. distance of migration during SDS-PAGE in slab gels.

Table 4. Substrate specificity of the exo-xylanase

Substrate	Specific activity (U/mg)
p-Nitrophenyl xylopyranoside ¹	0.21
p-Nitrophenyl arabinofuranoside ¹	0.006
p-Nitrophenyl arabinopyranoside ¹	0.003
p-Nitrophenyl glucopyranoside ¹	0.001
p-Nitrophenyl galactopyranoside ²	0
Xylan (birch wood) ³	0.0002
Xylan (larch wood) ³	0.0002
Xylan (oat spelts) ³	0.0001
CMC ³	0
Arabinogalactan ³	0
Gum arabic ³	0

¹Specific activity was expressed as μ mole p-nitrophenol released min^{-1} per mg protein. ²Specific activity was expressed as μ mole o-nitrophenol released min^{-1} per mg protein. ³Specific activity was expressed as μ mole reducing sugar released min^{-1} , and the sugar was assayed by DNS method(40).

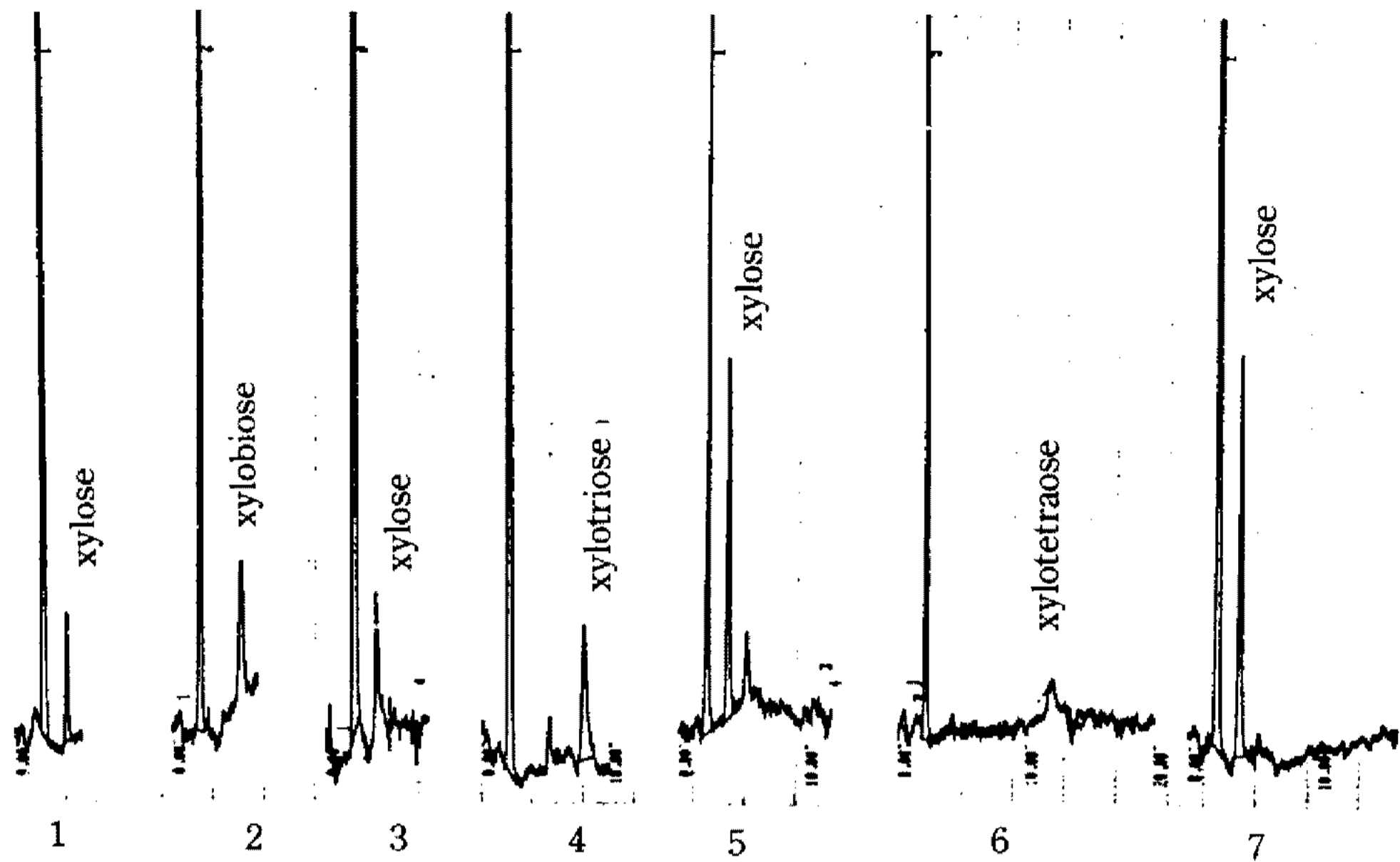


Fig. 10. HPLC chromatogram of the hydrolysate of xylooligosaccharides by the purified exo-xylanase. Oligosaccharides were incubated at 45°C for 8 hr in the presence of 0.7 unit exo-xylanase and 10 μM of each xylooligosaccharide.
 1. Xylose, 2. Xylobiose, 3. Hydrolysate of xylobiose, 4. Xylotriose, 5. Hydrolysate of xylotriose, 6. Xyloetraose, 7. Hydrolysate of xyloetraose

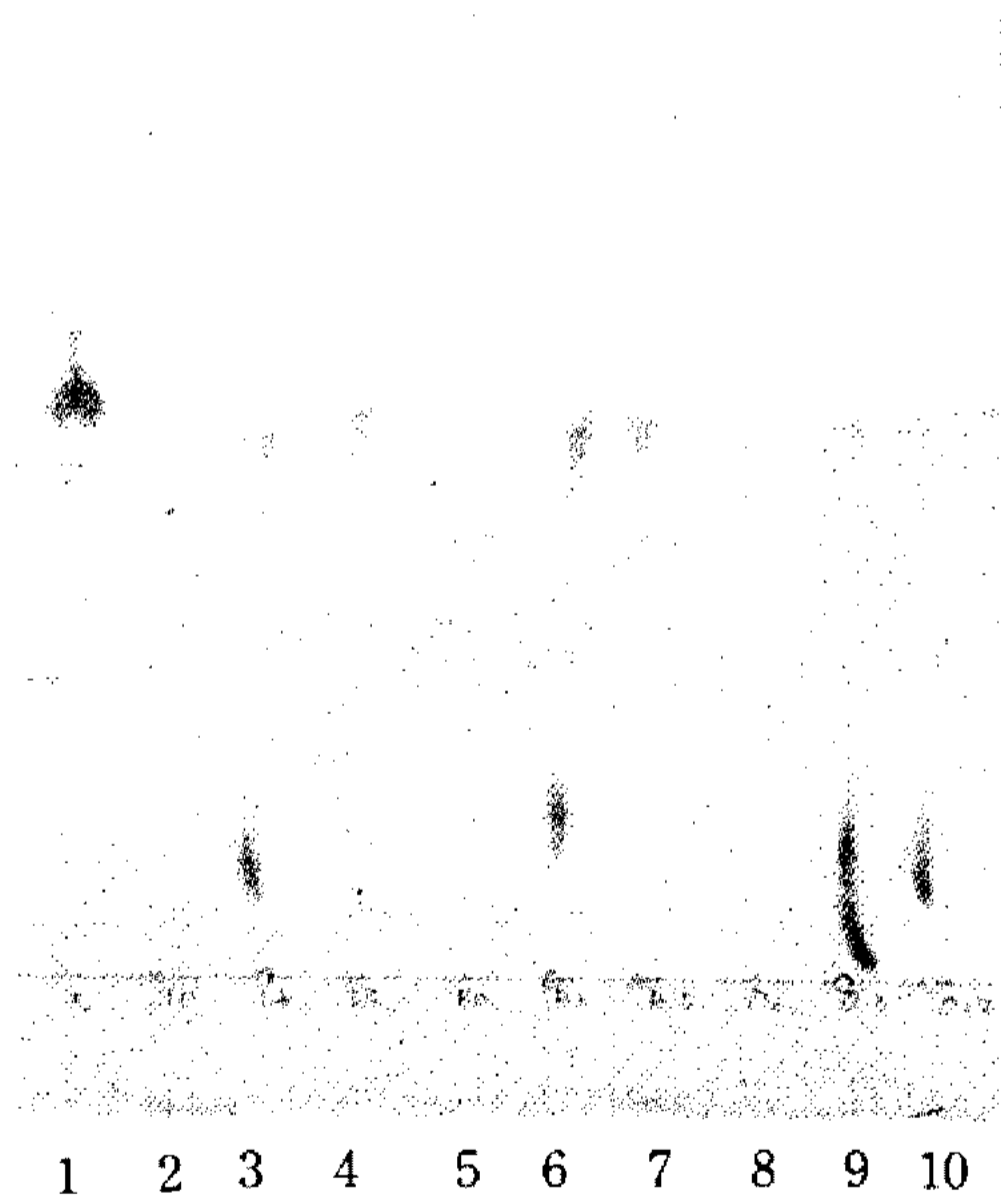


Fig. 11. TLC chromatographic analysis of the xylan hydrolysates by the purified exo-xylanase. Enzyme reaction was carried out at 45°C in the presence of 10 units exo-xylanase and 1 mg of each substrate.
 1. Xylose, 2. Larchwood xylan, 3. Hydrolysates of larchwood xylan obtained after 3hr incubation, 4. Hydrolysates of larchwood xylan obtained after 15hr incubation, 5. Birchwood xylan, 6. Hydrolysates of birchwood xylan obtained after 3 hr incubation, 7. Hydrolysates of birchwood xylan obtained after 15 hr incubation, 8. Oat spelts xylan, 9. Hydrolysates of oat spelts xylan obtained after 3 hr incubation, 10. Hydrolysates of oat spelts xylan obtained after 15 hr incubation.

후에는 상당량의 oligomer가 검출되었으나 반응 15 시간째에는 oligomer의 현저한 감소와 동시에 다량의 xylose를 검출할 수 있었다. 이에 반해 많은 측쇄구조를 가지고 있는 것으로 알려진 oat spelts xylan 경우는 가장 낮은 가수 분해율을 보이면서 반응 15 시간 후에도 다량의 oligomer가 검출되었다. 그러나 어느 반응에서도 transferase activity에 의한 가수분해 산물의 configuration inversion 현상은 관찰할 수 없었다. Exo-xylanase에 대해 본 연구자가 조사한 바로는 동일 균종인 *B. stearothermophilus*가 exotype xylanase을 생산한다는 간략한 일본 특허 보고(18) 외엔 세균 exo-xylanase에 대한 보고는 전혀 찾을 수 없었다. 따라서 본 xylan 분해효소는 그 예가 극히 드문 transferase activity를 가지고 있지않은 새로운 bacterial exo-xylanase라고 판단된다.

요 약

Bacillus stearothermophilus exo-xylanase 유전자 DNA가 삽입된 재조합 plasmid pMG1을 가지고 있는 *E. coli* JM109 exo-xylanase 생산 최적 배양 조건, 생산 효소의 정제 및 정제 효소의 특성 등을 조사 연구하였다. 상기 재조합 *E. coli* 균주는 0.5% fructose, 0.5% yeast extract, 1.0% tryptone 및 1.0% sodium chloride가 함유된 배지에서 약 10시간 배양했을 때

최대량의 효소를 생산하였으며 생산효소의 94%는 세포내에 존재하는 것으로 분석되었다. 생산 효소는 ammonium sulfate 분획, ion exchange chromatography 및 gel filtration 등의 과정을 거쳐 단일 단백질로 정제하였으며 정제 효소는 pH 6.0과 45°C 에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었다. 또한 1 mM Ca²⁺과 Co²⁺ 이온의 첨가는 각각 약 25% 정도의 활성화 효과를 나타내는 반면, 본 효소의 pNPX에 대한 K_m 값은 2.75 mM, pI값은 4.7, 그리고 분자량은 gel-filtration 법으로는 약 200,000 dal., SDS-polyacrylamide gel 전기영동법으로는 약 66,000 dal.으로 측정되어 세개의 동일한 subunit로 구성된 효소 단백질인 것으로 추정되었다. 본 정제 효소는 xylobiose, xylotriose 및 xylo-tetraose 등의 xylo-oligosaccharide를 효과적으로 분해함은 물론이고, 분해율은 낮으나 birchwood xylan, larchwood xylan 및 oatpelt xylan 등의 xylan에도 작용, xylose 생산을 확인함으로써 본 효소는 그 예가 극히 드문 bacterial exo-xylanase인 것으로 분류되었다.

참고문헌

1. Biely, Peter. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.* **3**: 286-290.
2. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulases: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
3. Ken K.Y. Wong., U.L. Larry and J.N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbial. Rev.* **52**: 305-317.
4. Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **17**: 289-294.
5. Cho, S.G., S.S. Park, Y.I. Park and Y.J. Choi. 1992. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* submitted for publication.
6. Oh, S.W., S.S. Park, Y.I. Park and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus Stearothermophilus* β -D-xylosidase gene in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* **20**: 136-142
7. H.U. Bergmeyer and B. Erich. 1974. Methods in enzymatic analysis. 2nd ed. Vol. 2. Pp. 574-602. Academic press, Inc. New York and London.
8. Evangeline C.E., P. Watanalai, S. Atsuhiko, and O. Hirotsuke. Expression of the cloned genes for xylan degradation from *Bacillus pumilus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Anal. Reports of ICME.* **6**: 75-85.
9. Michael G. Sargent. 1968. Rapid fixed-time assay for peicillinase. *J. Bacteriol.* **95**: 1493-1494.
10. Honda, H., K. Toshiaki and H. Koki. 1986. Extracellular production of alkalophilic *Bacillus* sp. by *Escherichia coli* carrying pCX311. **64**: 373-377.
11. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
12. Murray P. Deuser. 1990. Guide to protein purification. Academic press, Inc. Pp. 579-581.
13. Weber, K. and C.M. Osborn. 1956. The reliability of molecular weight determination. *J. Bio. Chem.* **244**: 4406-4434.
14. Wilson, C.M. 1956. Determination of sugars on paper chromatograms. *Anal. Chem.* **31**: 1199-1211.
15. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
16. Yu, J.H., S.K. Yun, and S.P. Young 1991. Cloning of a β -xylosidase gene from alkalophilic *Bacillus* sp. and its expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **1**: 17-21.
17. McCarthy, A.J., E. Peace and P. Broda. 1985. Studies on the extracellular xylanase activity of some thermophilic actinomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 238-44.
18. Novel xylanase and process for producing it. 1985. WPI-NO: JP600 58070 ACC-NO: 85-118644 WEEK-NO: 20.

(Received September 28, 1992)