

## 재조합 균주 *Escherichia coli*가 생산하는 *Bacillus stearothermophilus* Acetyl Xylan Esterase의 정제 및 특성

김인숙 · 이철우 · 최용진\*  
고려대학교 자연자원대학 유전공학과

### Purification and Characterization of Acetyl Xylan Esterase from *Escherichia coli* Cells Harboring the Recombinant Plasmid pKMG6

Kim, In-Sook, Cheol-Woo Lee and Yong-Jin Choi\*

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

**Abstract** — Acetyl xylan esterase was produced by *E. coli* HB101 harboring a recombinant plasmid pKMG6 which contained the *estI* gene of *Bacillus stearothermophilus*. The maximum production was observed when the *E. coli* strain was grown at 37°C for 12 hours in the medium containing 0.5% acetyl xylan, 1.0% tryptons, 1.0% sodium chloride, and 0.5% yeast extract. The esterase produced was purified to homogeneity using a combination of ammonium sulfate fractionation, DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography and Sephacryl S-200 gel filtration. The native enzyme had an apparent molecular mass of 60 kd and was composed of two identical subunits of 29 kd. The N-terminal amino acid sequence of the polypeptide was Ala-X-Leu-Gln-Ile-Gln-Phe-X-X-Gln. The acetyl esterase displayed a pH optimum of 6.5 and a temperature optimum of 45°C. The heavy metal ions such as Ag<sup>++</sup>, Hg<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup> inhibited nearly completely the activity of the esterase, and no specific metal ion was found to be required for the enzyme activity. The enzyme readily cleaved MAS, β-D-glucose pentaacetate, α-naphthyl acetate, p-nitrophenyl acetate as well as acetyl xylan, but had no activity on p-nitrophenyl propionate, β-nitrophenyl butyrate or β-nitrophenyl valerate. The Km and Vmax values for MAS were 2.87 mM and 11.55 μmole/min, respectively. Synergistic behavior was demonstrated with a combination of xylanase and esterase from *B. stearothermophilus* in hydrolyzing acetyl xylan.

중요 biomass 자원인 xylan은(1) β-1,4-D-xylopyranoside 주 탄소 골격에, 출처에 따라 다소의 차이는 있으나 acetic acid, arabinose 및 glucuronic acid 등의 잔기들로 구성된 다양한 측쇄를 가지고 있는 복잡한 화학 구조의 복합 다당류이다(2, 3). 아세틸화의 경우 hardwood xylan과 forage xylan은 구성 xylose 잔기의 60~70%가 아세틸화되어 있다고 하며(4) 이와 같은 xylan 분자의 아세틸화는 xylan 분해계 주효소 즉 β-1,4-interglycosidic linkage 절단 효소인 xylanase와 β-xylosidase 작용에 대한 xylan 분자의 저항성과 직접적인 관계를 가지고 있다는 것이 생체내외

실험에 의해 확인 보고되고 있다(5-7). 반대로, 화학적 혹은 효소적 전처리에 의한 native xylan의 탈 아세틸화는 그 정도에 비례적으로 xylan 가수분해율의 증가를 나타내는 실험결과가 보고되고 있는가 하면(6) acetyl xylan 기질에 대한 acetyl xylan esterase와 xylanase 및 β-xylosidase와의 혼합 사용에 의한 뚜렷한 가수 분해 상승 효과를 뒷받침하는 연구 결과도 보고되고 있다(6, 8-11). 그러므로 native xylan의 효율적인 활용을 목적으로 하는 xylan의 완전 가수 분해를 위해서는 xylan 분해계 주효소 외에 각종 탈측쇄 효소(debranching enzymes) 특히 acetyl xylan esterase가 필수적인 중요 인자가 되고 있음이 직·간접적으로 확인되고 있다(12). 본 연구자는 각종 xylan 분해계 효소를 세포 내외로 다량 생산, native xylan을 효과적으로 분해하는 *B. stearothermophilus* 균주를 분리

**Key words:** Purification, characterization, acetyl xylan esterase, plasmid pKMG6, *Bacillus stearothermophilus*

\*Corresponding author

하고(13) 본 분리 균주로부터 xylanase(14)와  $\beta$ -xylosidase(15) 생산 유전자는 물론이고 acetyl xylan esterase 생산 유전자도 분리, *E. coli*에 크로닝하여 그 결과를 이미 발표한 바 있다(16). 본 연구에서는 상기 *B. stearothermophilus* 생산 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli* 균주로부터 acetyl xylan esterase를 다량 생산하여 정제하고, 정제 효소의 중요 효소적 특성을 조사, 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 시약

Esterase 생산 균주는 *E. coli* HB101/pKMG6로서 pKMG6는 *B. stearothermophilus* acetyl xylan esterase 유전자를 포함하고 있는 3.5 kb *Hind*III DNA 단편을 pBR322에 크로닝하여 얻은 재조합 플라스미드였다(16). 또한 xylanase 공급 균주는 *E. coli* HB101/pMG12 재조합 균주(14)이었다.

효소 기질 중 methyl acetyl salicylate(MAS, Tokyo Kasei Co)와 SERVA사로부터 구입 사용한 SDS slab gel 영동 및 gel 여과 실험용 표준 단백질을 제외한 기타 본 연구에 사용한 대다수 시약은 Sigma사로부터 구입하였다.

### 효소 활성 측정

Esterase 활성 측정 : Methylacetylsalicylate(MAS)를 기질로 사용, Iwai 등의 방법(17)에 따라 45°C에서 30분 반응시켜 1분 동안에 1  $\mu$ mol의 methylsalicylate를 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

### 단백질 정량

효소 정제 과정 중 chromatography column 용출액 중의 단백질량은 자외선 흡광도법을, 기타 시료의 경우는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 한 Lowry 법(18)을 이용하여 측정하였다.

### 조효소액의 조제

*E. coli* HB101/pKMG6 재조합 균주를 ampicillin (100  $\mu$ g/ml)을 첨가한 4 l의 효소 생산 최적 배지에서 37°C, 12시간 배양한 다음 원심 분리(Hitachi, RPR 10-2 rotor, 5000 rpm, 20 minutes)하여 균체를 분리하고 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5)으로 두 차례 세척하였다. 다음, 세척 균체를 400 ml의 동일 완충 용액에 현탁시켜 French pressure를 이용, 균체를 파쇄하고 원심 분리(Hitachi, RPR 10-2 rotor, 5000 rpm, 20 minutes)하여 얻은 상등액을 효소 정제를

위한 조효소액으로 사용하였다.

### 효소 정제

Ammonium sulfate 분획 : 조효소액을 5% 농도 간격으로 ammonium sulfate 분획을 실시, 효소 활성이 높았던 25~40% 분획을 취하여 0.1 M 인산 완충 용액(pH 6.5) 5 ml에 용해하고 0.05 M의 동일 완충 용액으로 4°C에서 18시간 투석시켰다.

DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography : Ammonium sulfate 분획을 하여 분리한 효소액을 DEAE Sepharose CL-6B column(2.8×30 cm)에 흡착시키고 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5)으로 일차 세척한 후 0.5 M NaCl 용액을 이용, 시간당 20 ml의 용출 속도(3 ml/tube)로 linear gradient elution을 실시하였다.

Sephacryl S-200 gel filtration : Ion exchange chromatography에서 활성이 높은 분획들을 모아 Amicon YM10 membrane(molecular weight cut-off : 10 kdal)을 이용, 농축시킨 다음 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5)으로 미리 평형시킨 Sephacryl S-200 column(1.6×70 cm)에 흡착, 시간당 20 ml의 속도(2 ml/tube)로 여과 분리하였다.

### 정제 효소의 순도 검정 및 분자량 측정

정제 효소의 순도 검정은 SDS polyacrylamide gel 전기 영동법(19)을 이용하였다. 또한 정제 효소의 분자량은 SDS slab gel 전기 영동법과 gel 여과법(FPLC system, Suprose 6 HR column, Pharmacia Co.)을 이용하여 결정하였다.

### N-말단 amino acid 서열 결정

정제 효소 단백질의 N-말단 amino acid 서열은 Edman degradation 방법(20)을 활용한 Milligen 6600B protein sequencer를 이용, 결정하였다.

### 기질 특이성

Acetyl xylan의 경우는 10% 인산 완충 용액(0.05 M, pH 6.5) 500  $\mu$ l에 동량의 효소액을,  $\beta$ -D-xylose tetraacetate,  $\beta$ -D-glucose pentaacetate 및 triacetin은 10 mg/ml의 기질 용액 500  $\mu$ l에 효소액 100  $\mu$ l를 첨가, 반응시킨 후, 유리되는 acetic acid의 양을 High Performance Liquid Chromatography(HPLC, 7.8×300 mm HPX-87H column, Bio-Rad, Samsung Intelligent Pump/SLC 100, Shodex RI-71 detector)를 이용, 정량하였다. 이때 사용한 eluent는 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>였고 flow rate는 0.5 ml/min이었다. 1분에 1  $\mu$ mol의 ace-

tic acid를 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

$\alpha$ -naphthyl acetate 기질은 1 mM 용액 900  $\mu$ l에 효소 용액 100  $\mu$ l를 첨가, 반응시킨 후 10% Tween-20을 포함하고 있는 0.1% Fast Corinth V salt 1 ml를 첨가,  $\alpha$ -naphthol을 발색시킨 후 535 nm에서  $\alpha$ -naphthol의 양을 측정하였다. 이때 1분 동안 1  $\mu$ mole의  $p$ -naphthol을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

$p$ -Nitrophenyl ester의 경우는 10 mM 기질 용액 100  $\mu$ l에 효소 100  $\mu$ l를 가하고 반응시킨 후 생성된  $p$ -nitrophenol의 양을 405 nm에서 측정하였다. 1분에 1  $\mu$ mole의  $p$ -nitrophenol을 생성할 수 있는 효소의 양을 1 unit으로 정의하였다.

**Xylanase 촉매 활성에 미치는 acetyl xylan esterase의 효과 분석**

시판 Xylan을 Johnson 등의 화학적 방법(21)을 약간 변형시켜 만든 acetyl xylan을 기질로 사용, 기질 용액(5% in 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 0.5 ml에 동량의 acetyl xylan esterase 용액을 가하고 45°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 ml xylanase를 첨가하여, xylan을 분해시켰다. DNS 법(22)에 따라 생성 환원당을 측정하여 xylanase 활성에 미치는 탈

**Table 1. Effect of carbon sources on the esterase level in *E. coli* HB101/pKMG6**

Carbon source (0.5%, w/v)	Cell growth (O.D. at 550 nm)	Esterase activity (% activity)
glucose	2.45	21.7
maltose	2.60	63.3
fructose	2.50	68.4
sucrose	2.59	57.9
xylose	2.42	64.5
glycerol	2.59	32.9
starch	2.68	63.2
xylan(birchwood)	2.21	61.4
acetylated xylan (birchwood)	2.70	100
xylan(oat spelt)	1.91	68.3
acetylated xylan (oat spelt)	2.67	72.7
none	2.57	58.3

\*The rate of enzyme production with acetylated birchwood xylan as a carbon source was taken as 100%.

\*\*The cells were cultivated in the LB medium supplemented with 0.5% each of the carbon sources shown in the table.

아세틸화의 영향을 조사하였다.

**결과 및 고찰**

**효소 생산에 미치는 탄소 및 질소원의 영향**

**탄소원의 영향:** *E. coli* HB101/pKMG6에 의한 acetyl esterase 생산에 미치는 탄소원의 효과를 알아보기 위하여 ampicillin을 첨가한 LB에 각종 탄소원 0.5%를 첨가, 37°C에서 12시간 배양하여 세포 증식과 효소 생산량을 분석해 보았다. Table 1에 표시되어 있는 바와 같이 탄소원의 종류에 따라 균체 증식은 큰 차이를 보이지 않았으나 효소 생산량은 매우 큰 차이를 보였다. Acetylated xylan, 특히 acetylated birchwood xylan이 가장 높은 효소 생산 유도 효과를 보였으며 기타 대다수 다른 탄소원은 뚜렷한 첨가 효과를 나타내지 않았으나 glycerol과 특히 glucose는 현저한 효소 생산 저해 효과를 나타내었다. 이와 같은 결과는 앞으로 acetyl xylan esterase 생산 조절 기작 연구와 관련해서 흥미있는 현상이라고 생각된다.

**질소원의 영향:** 배지 중 질소원의 영향을 조사, Table 2와 같은 결과를 얻었다. 무기 질소원의 경우는 세포 증식 자체를 오히려 저해시키는 특이한 현상을 나타내었다. 이에 반해 대다수 유기 질소원은 세포 증식과 더불어 효소 생산에 매우 효과적이었으며 특히 yeast extract는 가장 효과적인 질소원인 것으로 밝혀졌다.

**효소 정제**

*E. coli* HB101/pKMG6를 앞 항의 연구 결과를 종합하여 확립한 4l의 효소 생산 최적 배지에서 12시간 배양하여 얻은 균체로부터 specific activity가 56.8 units/mg인 조효소액 400 ml을 조제하고 Table 3에 요약된 과정을 거쳐 esterase를 정제하였다. 즉 am-

**Table 2. Effect of nitrogen sources on the esterase production by *E. coli* HB101/pKMG6**

Nitrogen source (1%, w/v)	Cell growth (O.D. at 550 nm)	Esterase activity (% activity)
ammonium nitrate	0.08	24.9
ammonium sulfate	0.12	28.3
casamino acid	0.24	47.7
peptone	1.77	76.7
tryptone	2.00	74.4
yeast extract	2.73	100

\*The cells were cultivated in the medium supplemented with 0.5% fructose, 1.0% NaCl and 1.0% each of the nitrogen sources listed in the table.

Table 3. Summary of the purification of the esterase from *E. coli* HB101/pKMG6

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Culture broth	3785	214830	56.8	100	1
Ammonium sulfate fractionation	866	142360	164.4	66.3	2.9
DEAE-Sepharose CL-6B chromatography	2.5	75220	30112.9	35	530.5
Sephacryl S-200 gel filtration	0.8	29515	36894.0	13.7	650

\*Activity was expressed as  $\mu\text{mole methylsalicylate released min}^{-1}$ .

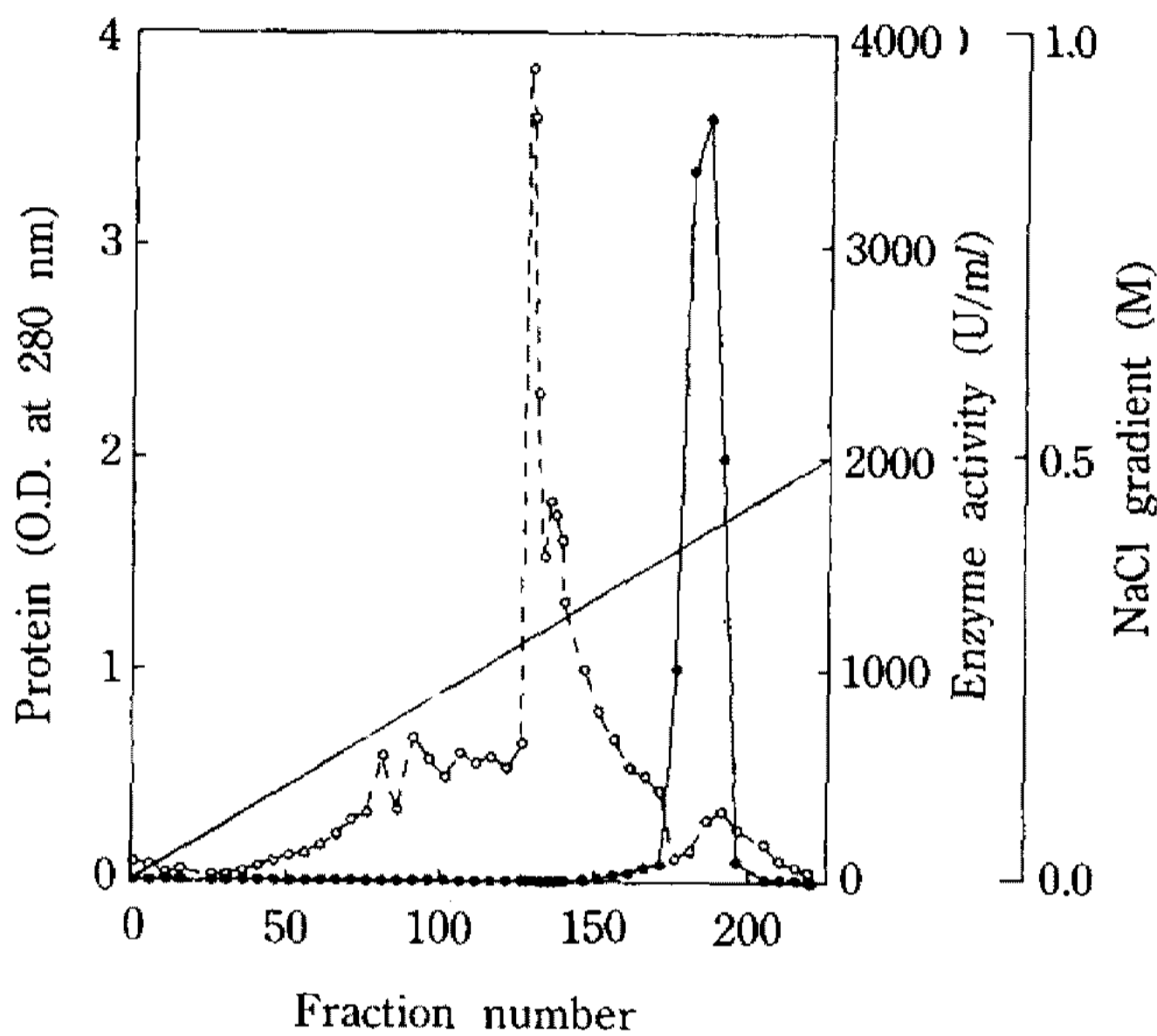


Fig. 1. Ion exchange chromatography of the esterase on DEAE Sepharose CL-6B.

The ammonium sulfate fraction was charged on the DEAE Sepharose CL-6B column ( $2.8 \times 30$  cm). After washing with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5), the column was eluted with a linear gradient of sodium chloride (0.5 M) at a flow rate of 20 ml/hr (3 ml/tube). Aliquots of each fraction were assayed to determine the distribution of the esterase and protein.

—◆—: enzyme activity (U/ml), --◇--: absorbance at 280 nm

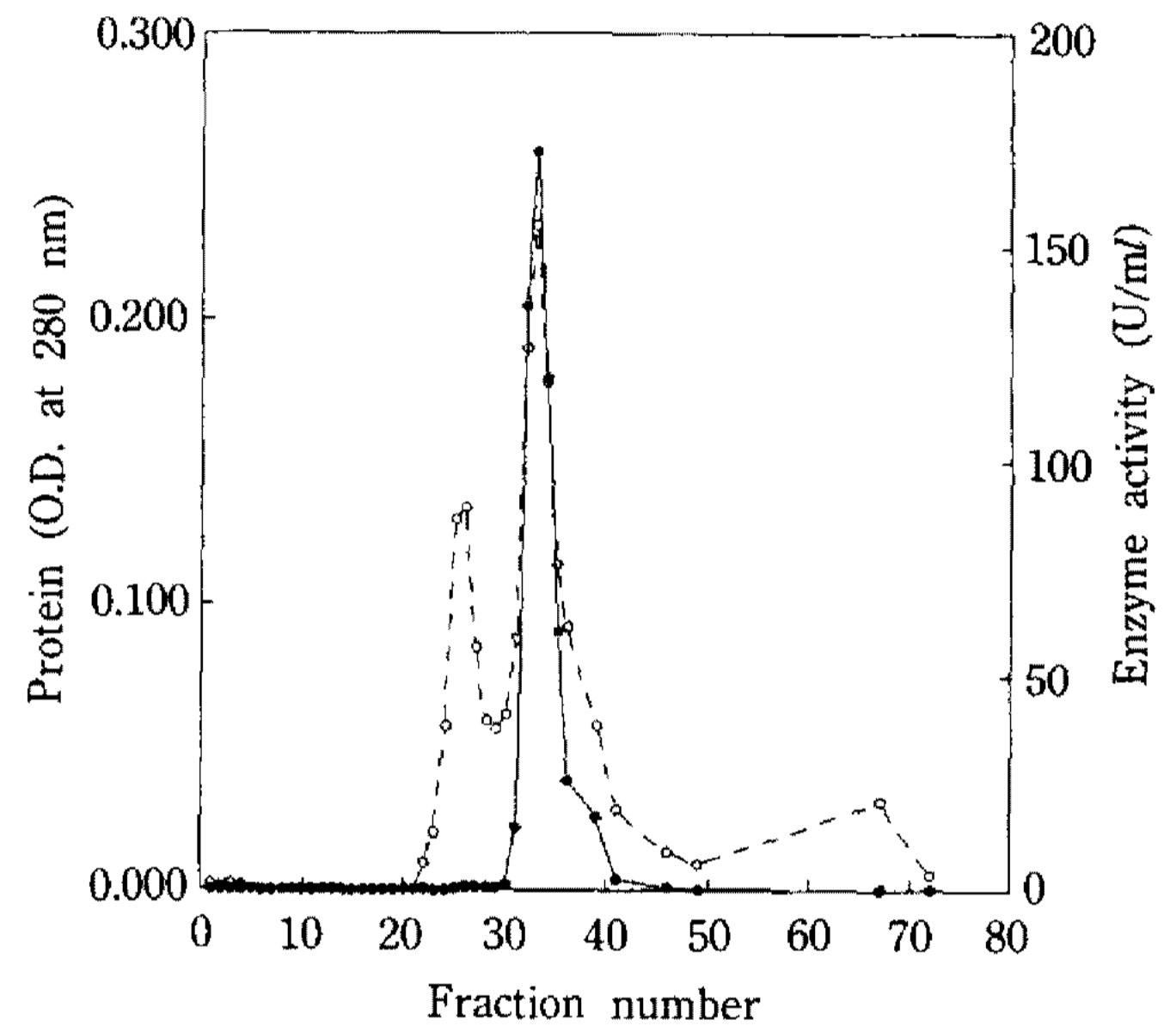


Fig. 2. Gel filtration of the esterase on Sephacryl S-200.

The active enzyme fraction obtained from DEAE Sepharose CL-6B chromatography was applied to the gel ( $1.6 \times 70$  cm). Elution was performed with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) at a flow rate of 20 ml/hr (2 ml/tube).

—◆—: enzyme activity (U/ml), --◇--: absorbance at 280 nm

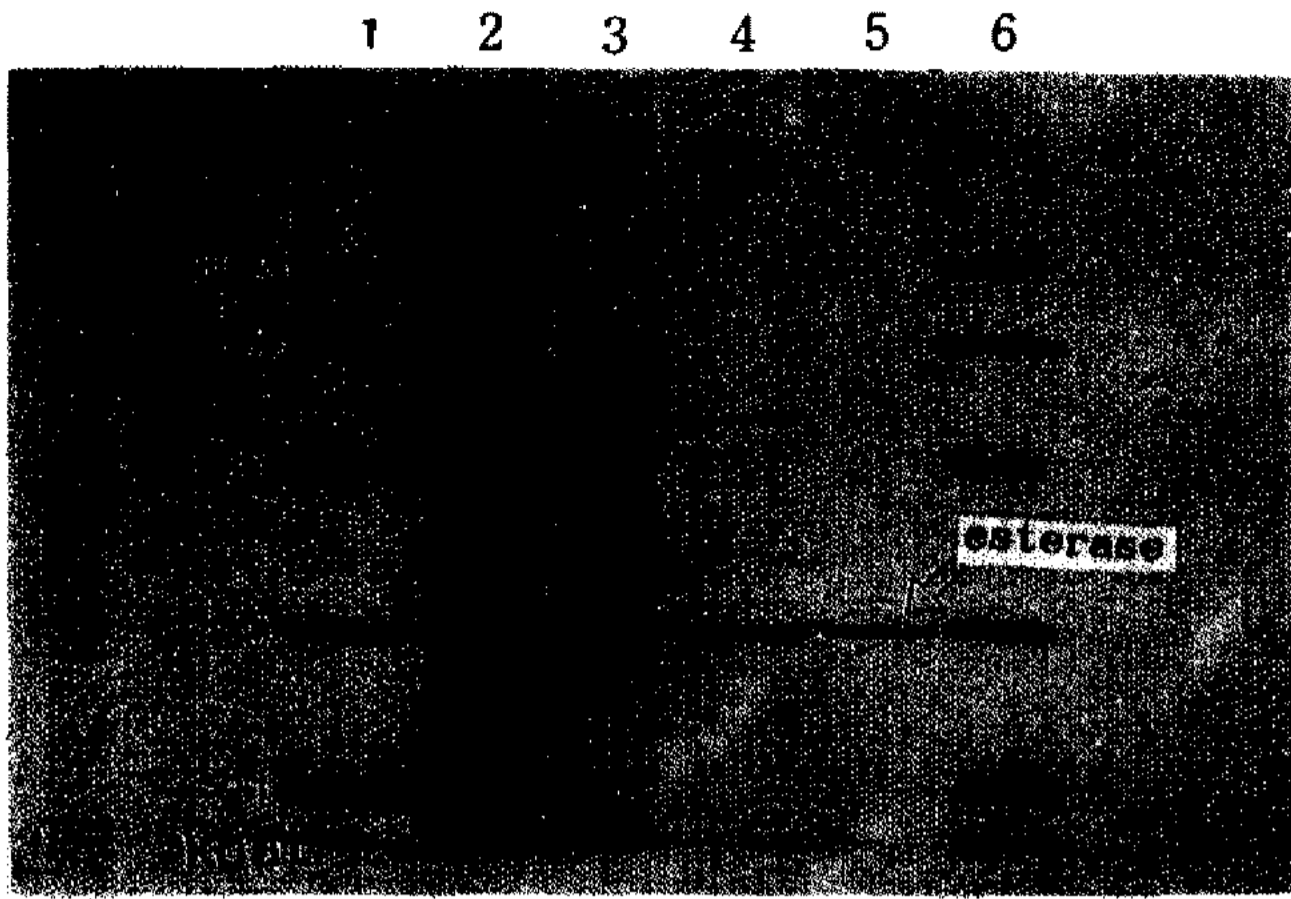
monium sulfate 분획(25~40%), DEAE-Sepharose CL-6B column( $2.8 \times 30$  cm) chromatography(Fig. 1 참조), Sephacryl S-200 gel filtration( $1.6 \times 70$  cm) 과정을 거쳐 최종적으로 650배 정제되어 specific activity가 36,894 unit/mg을 나타내는 총 29,515 units의 정제 효소를 얻었다. 본 정제 효소는 Fig. 2와 같이 효소 활성 peak와 단백질 peak가 완전 일치되고 있었으며 polyacrylamide gel 전기 영동 실험을 통해서도 단일 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 3 참조).

#### 효소의 일반 특성

최적 pH : pH 4~8 범위에서 pH를 0.5~1.0 unit 간격으로 조제한 두 종의 서로 다른 0.1M의 완충 용액을 이용하여 효소 활성에 미치는 반응액의 수소 이온 농도를 조사하여 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. 본 esterase는 pH 6.5에서 최대의 효소 활성을 보여 *Fibrobacter succinogenes* S85 acetyl xylan esterase와 같은 최적 pH를 나타내고 있으나(23) *F. succinogenes* S85 효소와는 달리 본 효소는 반응액의 pH에 매우 민감함을 보였다. 또한 효소 안정성에 미치는 pH 효과 역시 별도 자료 제시는 하지 않았으나 효소 활성에 미치는 pH 효과와 거의 완전 일치되는 경향을 나타내었다.

최적 온도 및 온도에 대한 효소 안정성 : 본 효소는

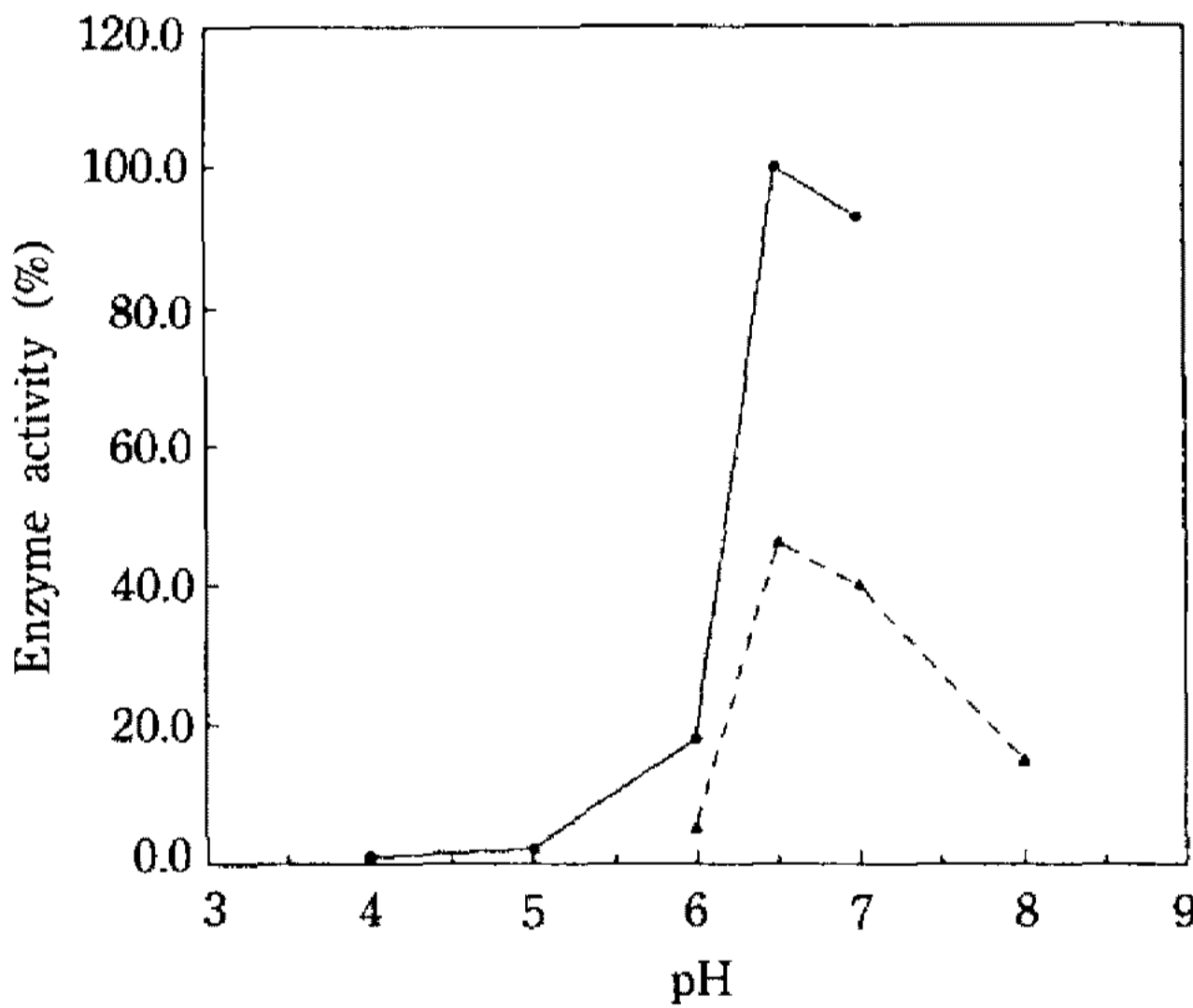




**Fig. 3. Electrophoretic monitoring of the major steps of purification of the esterase.**

Electrophoresis was performed in a 12% SDS-polyacrylamide gel.

Lane 1 and 6, protein size markers; lane 2, crude extract; lane 3, ammonium sulfate precipitate; lane 4, ion exchange column effluent; lane 5, Sephacryl S-200 gel filtrate.



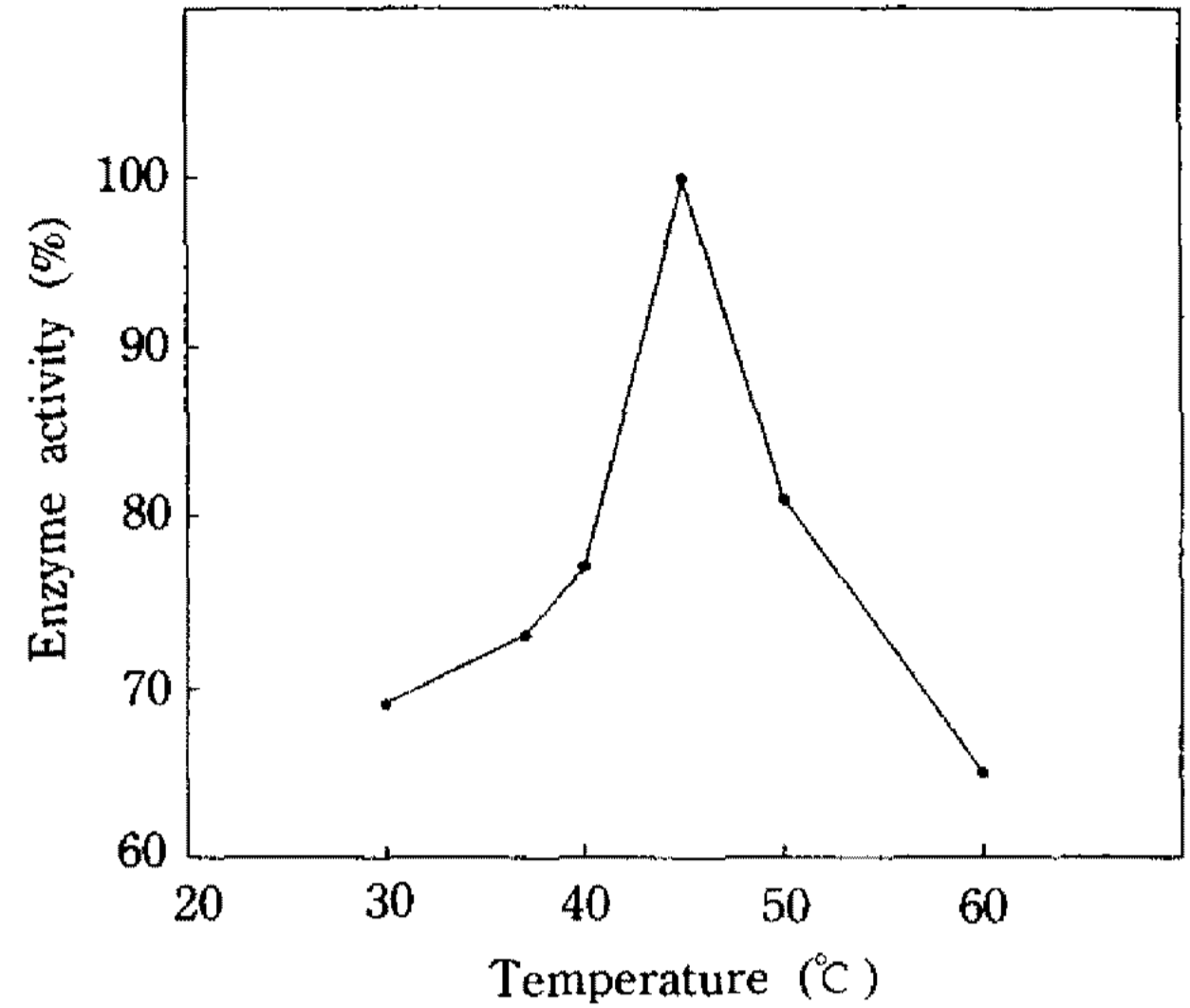
**Fig. 4. Effect of pH on the activity of esterase.**

The enzyme reaction was carried out at 45°C for 20 min in 0.1 M citrate-phosphate buffer (pH 4~7), or 0.1 M phosphate buffer (pH 6~8).

—◆—: citrate-phosphate buffer (4~7), --▲--: phosphate buffer (6~8)

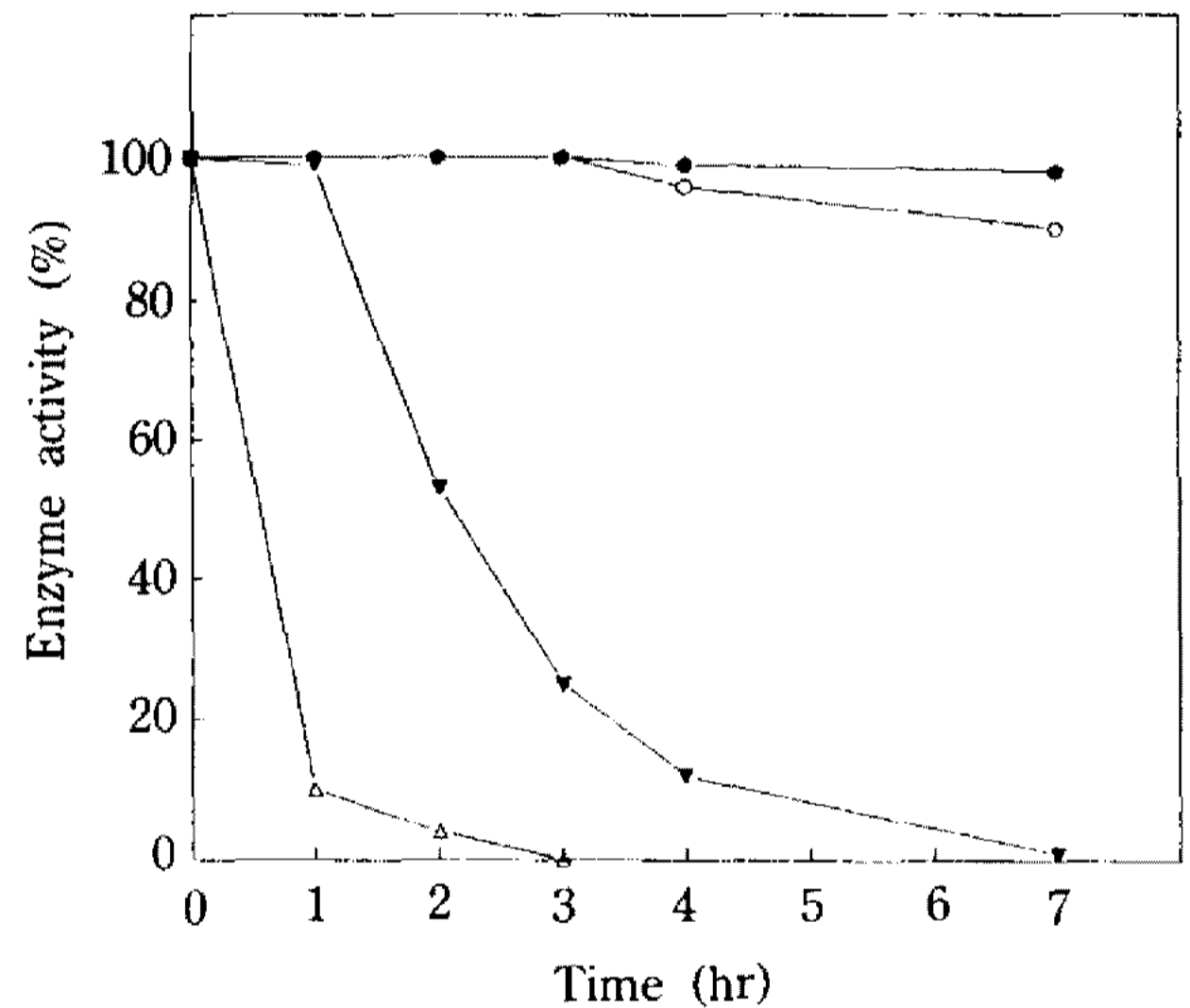
Fig. 5와 같이 활성 최적 온도가 45°C인 것으로 나타났으나 반응 온도에 매우 민감하여 최적 온도에서 약간만 벗어나도 급격한 활성 저하 현상을 보였다. 한편 *F. succinogenes* S85 효소 역시 45°C의 최적 온도를 보고하고 있으나(23) 최적 온도보다 낮은 온도에서도 비교적 높은 활성을 보이는 점이 본 효소와는 대조적이었다.

또한 본 효소 용액(pH 6.5, 0.05 M 인산 완충 용액)



**Fig. 5. Effect of temperature on activity of the esterase.**

The enzyme reaction was carried out for 30 min at various temperature indicated in the figure.



**Fig. 6. Thermal stability of the esterase.**

Esterase activity was measured under standard conditions at 45°C for 30 min after allowing the enzyme solution stand in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) at various temperatures indicated in the figure. Aliquots were taken at various times and the residual activities were assayed and represented as the percentage of untreated control.

—◆—: 37°C, -◇-: 40°C, -▼-: 50°C, -△-: 60°C

을 37~60°C에서 열처리하면서 처리 시간에 따른 잔존 효소 활성을 측정하여 열 안정성을 조사하였다. Fig. 6에 표시되어 있는 바와 같이 본 효소는 40°C에서 7시간 처리해도 약 95%의 활성을 그대로 유지하고 있어 열에 비교적 안정한 효소임을 알 수 있었다.

**금속 이온의 효과:** 1 mM의 최종 농도로 각종 금속 이온을 첨가한 효소 용액을 실온에서 60분 방치한

**Table 4. Substrate specificity of the esterase**

Substrate	Specific activity (U/mg)
oat spelt acetyl xylan <sup>1</sup>	23.2
birchwood acetyl xylan <sup>1</sup>	12.8
$\beta$ -D-xylose tetraacetate <sup>1</sup>	212.4
$\beta$ -D-glucose pentaacetate <sup>1</sup>	435.6
triacetin <sup>1</sup>	78.8
$\alpha$ -naphthyl acetate <sup>2</sup>	869.2
$\rho$ -nitrophenyl acetate <sup>3</sup>	960.0
$\rho$ -nitrophenyl propionate <sup>3</sup>	14.8
$\rho$ -nitrophenyl butyrate <sup>3</sup>	17.2
$\rho$ -nitrophenyl valerate <sup>3</sup>	8.0
MAS <sup>4</sup>	15640.0

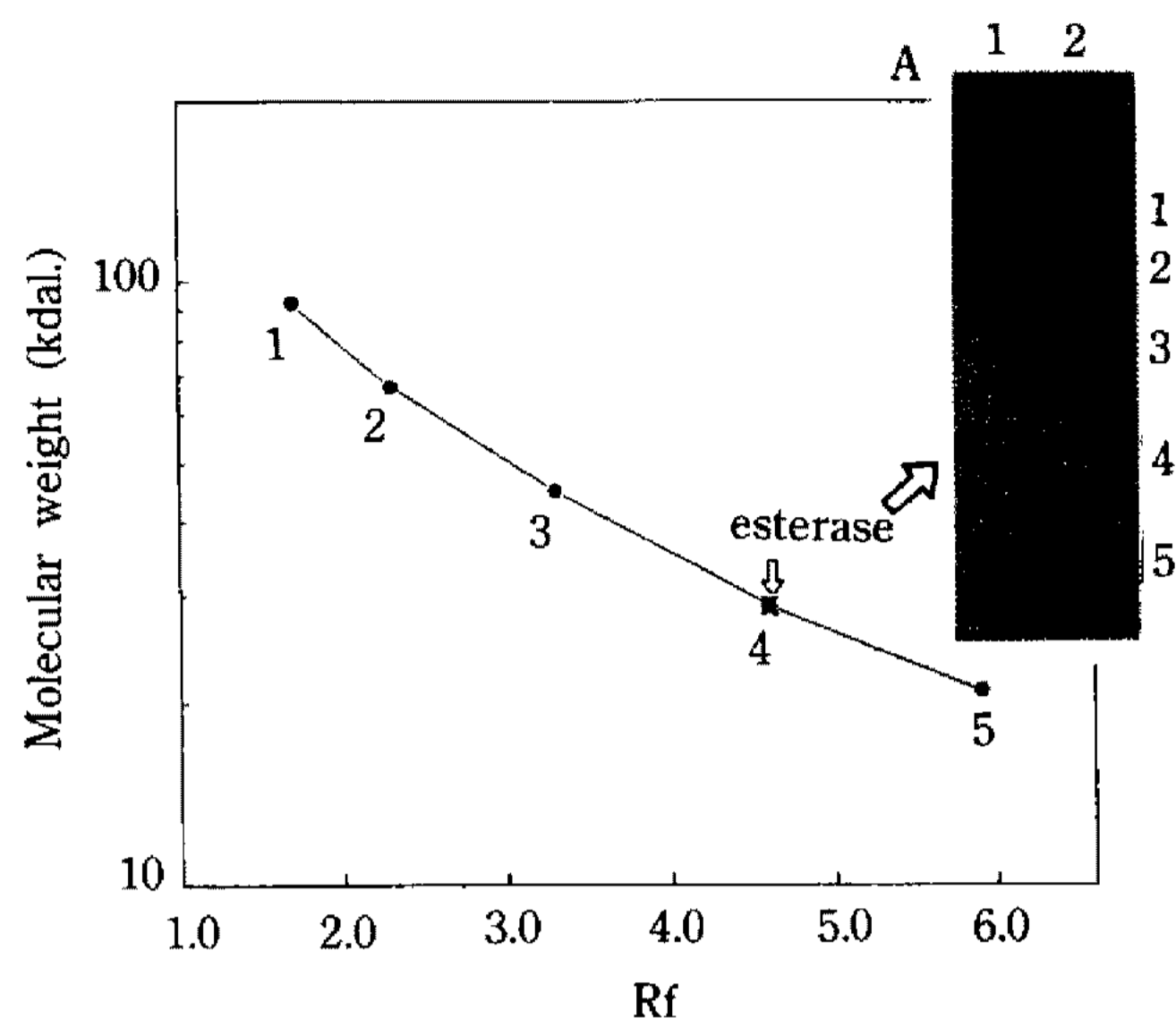
<sup>1</sup>Specific activity was expressed as mole acetic acid released per min, <sup>2</sup>The activity was expressed as  $\mu$ mole  $\alpha$ -naphthol released per min, <sup>3</sup>The value represented  $\mu$ mole  $\rho$ -nitrophenol released per min during the enzyme reaction, <sup>4</sup>Specific activity was expressed as  $\mu$ mole methylsalicylate released per min.

다음 효소 활성을 측정해 보았다. 그 결과  $Ag^{++}$ ,  $Hg^{++}$  및  $Cu^{++}$  등은 활성 측정이 불가능할 정도로 거의 완전한 활성 저해 효과를 보였으며  $Zn^{++}$  처리 경우도 45.3%의 잔존 효소 활성을 나타내었다. 그러나 다른 일반 금속 이온은 본 효소 활성에 별 다른 영향을 주지 않았으며 어떤 금속 이온도 뚜렷한 활성화 효과를 보이지 않는 것으로 나타났다(별도 자료 제시는 하지 않았음).

**기질 특이성 :** Table 4에 표시되어 있는 몇 가지 가능한 기질을 사용하여 본 효소의 기질 특이성을 살펴 보았다. 기질의 종류에 따라 활성 측정 방법이 다르기 때문에 정확한 비교는 불가능하나 그런대로 본 esterase는  $\beta$ -D-glucose pentaacetate,  $\alpha$ -naphthyl acetate,  $\rho$ -Nitrophenyl acetate 및 MAS 등의 기질에 대해서 높은 활성을 가진 것으로 판단된다. 특히 본 효소는, oat spelt acetyl xylan에 대해서 *F. succinogenos* S85 esterase(23)보다 약 2.7배 정도 높은 효소 활성을 나타내었다. 한편 가장 높은 활성을 보였던 MAS 기질에 대한 본 효소 반응의  $K_m$  값은 2.87 mM, 그리고  $V_{max}$  값은 11.55  $\mu$ mole/min로 계산되었다.

**분자량 측정 :** SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 이용, 정제 esterase의 분자량을 측정해 본 결과 Fig. 7 과 같이 약 29,000 dal에 해당하는 단일 단백질대를 확인하였다.

또한 Suprose 6 HR column을 이용한 분자량 측정에서는 분자량이 약 60,000으로 측정되었다(Fig. 8). 이상의 결과로부터 *B. stearotheophilus* acetyl xylan

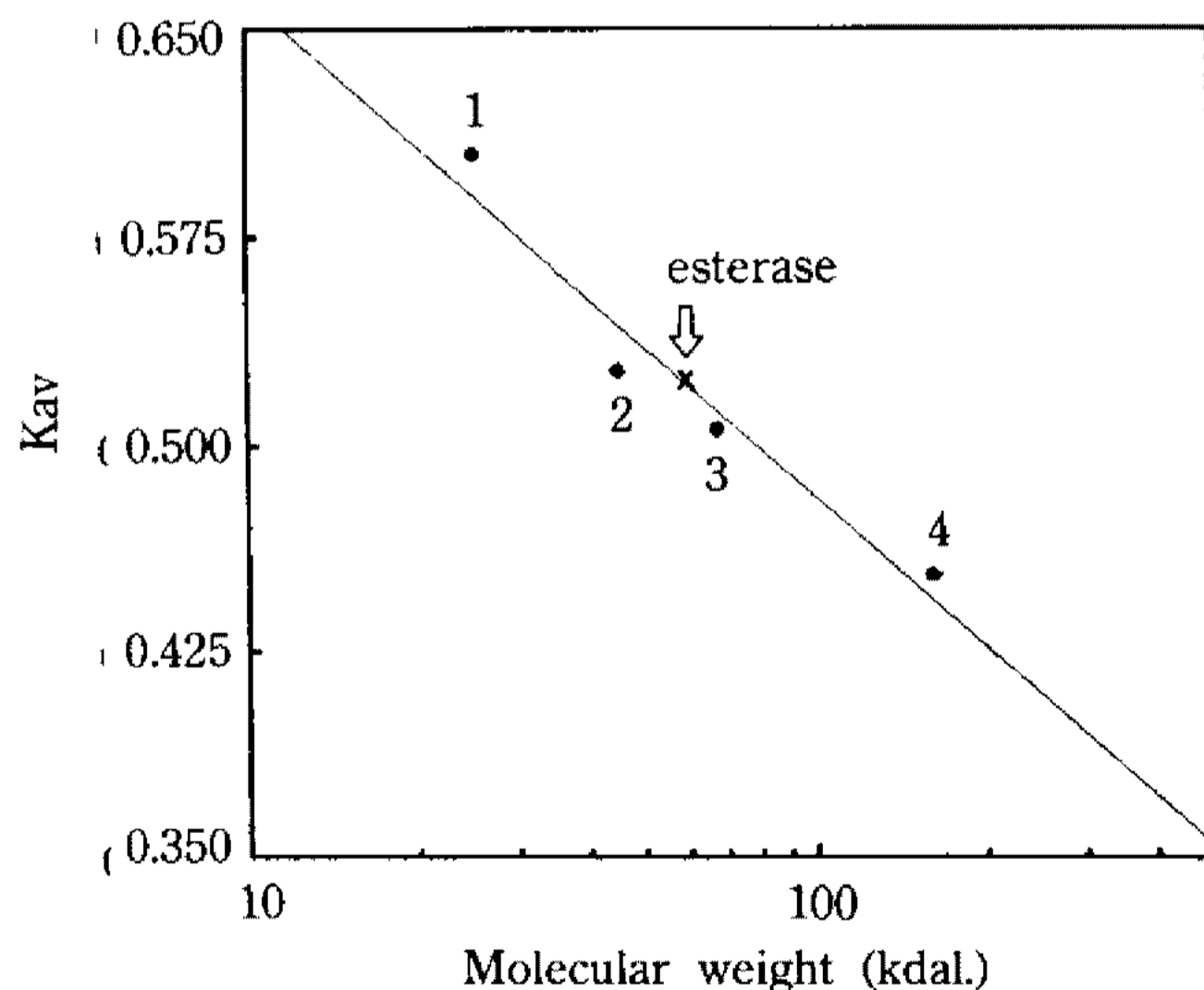
**Fig. 7. Molecular weight estimation of the esterase by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.**

A : Gel electrophoresis was carried out in 12% (w/v) polyacrylamide gel containing 0.4% SDS using the SDS-discontinuous buffer system.

Lane 1: esterase, lane 2: protein size markers

The protein size markers used were as follows: 1. phosphorylase B 92.5 kdal, 2. bovine serum albumin 67.0 kdal, 3. egg albumin 45.0 kdal, 4. carbonic anhydrase 29.0 kdal, 5. soybean trypsin inhibitor 21.0 kdal

B : Calibration curves of log 10 molecular weight vs. distance of migration during SDS-PAGE in slab gels.

**Fig. 8. Molecular weight estimation of the purified esterase by gel filtration.**

Suprose 6 HR column was used.

The standard proteins used were the following: 1. bovine pancrease chymotrypsin 25 kdal, 2. egg albumin 45 kdal, 3. bovine serum albumin 67 kdal, 4. rabbit muscle aldolase 160 kdal

esterase는 두개의 동일 subunit으로 이루어진 dimer 형태의 단백질인 것을 알 수 있었다.

**Table 5. Synergism of esterase and xylanase in hydrolysis of xylan**

enzymes used substrates	xylanase	acetyl xylan esterase + xylanase
	Reducing sugar produced ( $\mu\text{mole}$ )	
oat spelt xylan	2.78	2.66
birchwood xylan	2.76	2.88
acetylated oat spelt xylan	1.83	2.51
acetylated birchwood xylan	0.58	1.98

\*The enzymes used were 31 mU xylanase (on birchwood xylan) and 141 mU acetyl xylan esterase (on birchwood acetyl xylan) of *B. stearothermophilus*.

#### N-말단 아미노산 서열 결정

10  $\mu\text{g}$  정도의 정제 효소 단백질을 사용하여 본 acetyl esterase의 N-말단 아미노산 서열을 결정해 본 결과 Ala-X-Leu-Gln-Ile-Gln-Phe-X-X-Gln로 결정되었다(X: 본 실험에서 확인되지 못한 아미노산). 본 연구자가 조사한 바로는 현재까지 다른 acetyl xylan esterase의 N-말단 아미노산 서열이 결정 보고되고 있지 않아 다른 효소와 비교 분석은 불가능하나 본 실험 결과는 앞으로 pKMG6의 삽입 DNA 염기 서열 결정시에 유용하게 이용될 수 있을 것이라고 생각한다.

#### Esterase가 xylanase 활성에 미치는 영향

31 miliunits의 acetyl xylan esterase로 30분 전처리한 0.5% 각종 xylan 기질에 141 miliunits의 xylanase를 첨가, 30분간 반응시켜 기질의 가수분해 정도를 비교 분석함으로써 탈아세틸화가 xylanase 활성에 미치는 영향을 조사하여 Table 5와 같은 결과를 얻었다. Acetyl xylan 기질의 경우 esterase로 전처리했을 때와 전처리하지 않았을 때 유리 환원당량의 차이가 oat spelt acetyl xylan은 0.68  $\mu\text{mole}$ 이고 birchwood acetyl xylan은 1.4  $\mu\text{mole}$ 로, 뚜렷한 전처리 효과를 확인함과 동시에 xylan의 아세틸화는 그 정도에 비례해서 xylanase에 대해 저항성을 갖게 한다는

사실도 확인할 수 있었다. 따라서 상기 실험 결과는 *E. coli* HB101/pKMG6 재조합 균주가 생산하는 esterase가 일종의 acetyl xylan esterase로서 acetyl xylan 분자의 탈아세틸화 반응을 촉매, 그 결과로 xylanase에 대해 더욱 효과적인 기질로 전환시켰기 때문이라고 설명할 수 있다. P. Biely 등(6)도 본 연구 결과와 잘 일치되는 xylanase 활성에 대한 acetyl xylan esterase의 상승 효과를 보고한 바 있다.

반면 시판 xylan 기질은 제품 제조 과정 중에 포함되는 알카리 처리 단계에 의해 대다수 acetyl ester 결합이 이미 제거되었기 때문에 acetyl xylan esterase 전처리 효과가 관찰되지 않은 것으로 사료된다.

## 요 약

*Bacillus stearothermophilus*의 acetyl xylan esterase 유전자를 pBR322에 크로닝하여 얻은 재조합 플라스미드를 가진 *E. coli* HB101/pKMG6 균주에 의한 esterase 생산 최적 배지 조성을 조사, 탄소원으로 0.5% acetylated birchwood xylan, 질소원으로 1% yeast extract를 사용했을 때 최대량의 효소 생산 효과를 얻었다. 또한 상기 배지에서 다량의 효소를 생산하고 생산 효소를 ammonium sulfate 분획, DEAE Sepharose CL-6B column chromatography 및 Sephacryl S-200 gel filtration 등의 과정을 거쳐 단일 단백질로 정제하였다. 정제 esterase는 45°C; pH 6.5에서 가장 높은 효소 활성을 보였으며 1 mM  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Hg}^{++}$  등에 의해 거의 완전한 실활을 나타내었으며 촉매 활성을 위해 어떤 특별한 금속 이온을 요구하지 않는 것으로 분석되었다. 또한 본 효소의 분자량은 gel 여과법으로는 약 60,000 dal, SDS-polyacrylamide gel 전기 영동법으로는 약 29,000 dal로 측정됨으로써 본 효소는 동일 subunit로 구성된 dimer인 것으로 밝혀졌으며 N-말단 아미노산 서열은 Ala-X-Leu-Gln-Ile-Gln-Phe-X-X-Gln으로 결정되었다. 한편 본 esterase는 p-nitrophenyl propionate, p-nitrophenyl butyrate 및 p-nitrophenyl valerate 등의 기질에는 잘 작용하지 않으나 acetyl xylan,  $\alpha$ -naphthyl acetate,  $\beta$ -D-glucose pentaacetate, p-nitrophenyl acetate 및 MAS 등에는 매우 높은 활성을 나타내었다. MAS 기질에 대한 Km 값은 2.87 mM, Vmax 값은 11.55  $\mu\text{mole}/\text{min}$ 으로 측정되었다. 그리고 acetyl xylan 기질을 본 esterase로 전처리한 다음 xylanase로 가수분해시켰을 때 뚜렷한 상승 효과를 관찰함으로써 본 esterase가 일종의 acetyl xylan esterase임을 확인할 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 교육부의 유전공학 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 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.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Muller-Harvey, I., R.D. Hartley, P.J. Harris, and E.H. Curzon. 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.* **148**: 71-85.
- Lindberg, B., K.G. Rosell, and S. Svensson. 1973. Positions of the O-acetyl groups in pine glucomannan. *Svensk Papperstid.* **76**: 383-384.
- Grohmann, K., D.J. Mitchell, M.E. Himmel, B.E. Dale, and H.A. Schroeder. 1989. The role of ester groups in resistance of plant cell wall polysaccharides to enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **20/21**: 45-61.
- Biely, P., C.R. MacKenzie, J. Puls, and H. Schneider. 1986. Cooperativity of esterases and xylanases in the enzymatic degradation of acetylxylan. *Bio/technology.* **4**: 731-733.
- Bacon, J.S.D., A. Chesson, and A.H. Gordon. 1981. Deacetylation and enhancement of digestibility. *Agric. Environ.* **6**: 115-126.
- Poutanen, K., J. Puls, and M. Linko. 1986. Hydrolysis of steamed birchwood hemicellulose by enzymes produced by *Trichoderma reesei* and *Aspergillus awamori*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 487-490.
- Biely, P., J. Puls, and H. Schneider. 1985. Acetyl xylan esterases in fungal cellulolytic systems. *FEBS Lett.* **186**: 80-84.
- Puls, J., O. Schmidt, and C. Granzow. 1987.  $\alpha$ -Glucuronidase in two microbial xylanolytic systems. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 83-88.
- Ross, N.W., K.G. Johnson, C. Braun, C.R. MacKenzie, and H. Schneider. 1992. Enzymic hydrolysis of water-soluble lignin-carbohydrate complexes from *Populus deltoides*: Effects of combination of  $\beta$ -mannanases, xylanase, and acetyl xylan esterase. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 90-94.
- Chesson, A., A.H. Gordon, and J.A. Lomax. 1983. Substituent groups linked by alkali-labile bonds to arabinose and xylose residues of legume, grass and cereal straw cell walls and their fate during digestion by rumen microorganisms. *J. Sci. Food Agric.* **34**: 1330-1340.
- Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 289-294.
- Cho, S.G., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of an endo-xylanase gene from *Bacillus stearothermophilus* into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**: 271-279.
- Oh, S.W., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus Stearothermophilus*  $\beta$ -D-xylosidase gene in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**(2): 136-142.
- Kim, I.S., S.G. Cho, and Y.J. Choi. 1993. Molecular cloning and expression of the acetyl xylan esterase gene of *Bacillus stearothermophilus* in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **21**(6): 542-548.
- Iwai, M., S. Okumura, E.L. de Leal, and Y. Tsujisaka. 1983. Purification of four esterases from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 1865-1868.
- Lowry, O.H., N.J. Rasebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*. **227**: 680-685.
- P. Edman. 1970. Protein sequence determination. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 211-255.
- Johnson, K.G., J.D. Fontana, and C.R. MacKenzie. 1988. Measurement of acetyl xylan esterase in *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 551-560.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.
- McDermid, K.P., C.W. Forsberg, and C.R. MacKenzie. 1990. Purification and properties of an acetyl xylan esterase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3805-3810.

(Received August 5, 1994)