

효모 세포 표면 발현된 Endoxylanase를 이용한 Xylooligosaccharides의 생산

김현진¹ · 이재형¹ · 김연희^{1,2} · 남수완^{1,2*}

¹동의대학교 바이오품질제어학과, ²동의대학교 생명공학과

Production of Xylooligosaccharides by Yeast Cell Surface-Displayed Endoxylanase. Kim, Hyun-Jin¹, Jae-Hyung Lee¹, Yeon-Hee Kim^{1,2}, and Soo-Wan Nam^{1,2*}. ¹Department of Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Department of Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea – The yeast surface expression system, pCTXYN (6.8 kb), of *Bacillus endoxylanase* gene (*xynB*, 642 bp) was constructed and introduced into *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 cell. The transformed yeast cell showing the highest endoxylanase activity was selected through the active staining of colonies grown on YPDG medium containing xylan. With the yeast transformant, EBY100/pCTXYN, grown on galactose containing medium, it was found that the endoxylanase was successfully displayed on the yeast cell surface and the xylooligosaccharides were efficiently produced from xylan. The most of endoxylanase activity was detected in the cell fraction and reached about 1.9 unit/mL after 48 h cultivation. The optimized conditions for xylooligosaccharides production from xylan were determined as follows: substrate and its concentration, oat spelt xylan 6%; concentration of yeast whole-cell, 5 unit/mL; temperature, 50°C, and reaction time 2~4 h. When the oat spelt xylan and corncob xylan were hydrolyzed by treatment with cell surface-displayed endoxylanase, xylotriose was formed as a main product.

Key words: Cell surface display, *Saccharomyces cerevisiae*, xylan, endoxylanase, xylooligosaccharides

서 론

Hemicellulose의 주성분으로 cellulose 다음으로 지구상에 많이 존재하는 xylan은 최근 대체에너지원인 알콜 생산의 기질로서 주목을 받고 있을 뿐만 아니라 butanol과 butandiol과 같은 유기용매 내지는 xylitol과 같은 감미료 생산원료로서도 그 이용이 기대되고 있는 중요 바이오매스 자원이다. Xylan은 1,4-β-D-xylopyranoside 결합의 기본탄소골격을 갖는 D-xylose의 중합체로서 endo-1,4-xylanase(EC 3.2.1.8)와 β-xylosidase(EC. 3.2.1.37)의 작용에 의해 가수분해 된다[27]. Xylan 분해효소인 xylanases는 곰팡이나 세균과 같은 미생물뿐만 아니라 식물체, 곤충 그리고 원생동물 등 자연계에 광범위하게 존재하며, 이 효소를 이용하여 고급용지의 생산(biobleaching) 및 폐지재생, 과일음료, 사료첨가용 효소, 기능성 식품소재인 xylitol과 xylooligosaccharides(XOSs)의 생산, ethanol 생산에서의 응용 등 현재 그 이용성이 매우 높으며 앞으로도 다양한 용도로 개발될 것으로 기대되는 효소이다[2, 26, 29]. Xylan 분해 산물의 일종인 XOS는 xylose가 2개에서 5개 정도로 결합된 다당류로서 온화감미를 갖는 시럽 또는 분말상 물질이며 *Bifidus*, *Lactobacillus* 등과 같

은 장내 유용미생물을 선택적으로 증식시킴으로써 장기능을 개선시키는 기능성 식품소재이다. 특히 XOS 중 2당류(xylobiose), 3당류(xylotriose)가 장내 유용 미생물 증식에 가장 효과적이고 면역증강 활성까지 보임으로써, 그 효과가 다른 올리고당보다 우수하여 식품 외에도 의약품, 사료 및 농업분야를 포함하는 다양한 분야에서 폭넓게 사용될 수 있다[23, 24, 31].

XOS 생산을 위해 세균 및 곰팡이 유래의 endoxylanase 유전자 *Bacillus subtilis*[12], *Saccharomyces cerevisiae* [1, 6-9, 14-17, 19, 25], *Pichia pastoris*[3, 5, 20, 21, 36], *Kluyveromyces lactis*[32-34] 등에 도입되어 유전자 발현 시도가 이뤄졌으나, XOSs 생산용 전세포 생물촉매(whole cell biocatalyst) 개발에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 XOS와 같은 식품소재 생산을 위한 효소 반응용 및 취급 용이성과 효소 안정성 증대를 위한 생촉매 시스템으로, 효모 *S. cerevisiae*의 세포표면에 endoxylanase를 발현시키고자 한다. 진핵세포 *S. cerevisiae*는 인체에 대한 안전성 문제를 보완할 수 있는 GRAS (generally recognized as safe) 미생물이며 표면발현 모체로 agglutinin을 사용할 경우 단백질의 표면밀도가 효모세포 1개당 10⁴-10⁵개로써 원핵세포 시스템에 비하여 매우 높다는 장점을 가지고 있다[10, 13, 30]. α-Agglutinin 단백질은 Aga1과 Aga2의 소단위체로 구성되어 있으며 Aga1(725개 아미노산으로 구성)이 효모 세포벽 β-glucan에 공유결합으로 고정되고, 87개의 아미

*Corresponding author

Tel: 82-51-890-2276, Fax: 82-51-890-2632

E-mail: swnam@deu.ac.kr

노산으로 이루어진 Aga2가 disulfide 결합으로 Aga1과 연결되어 있다. 목적 단백질의 N-말단은 Aga2의 C-말단과 연결되며, 목적 단백질은 분비되고 난 후 효모 세포벽 바깥으로 display된다[11, 13, 19].

따라서 본 연구에서는 α -agglutinin을 이용한 endoxylanase의 효모세포 표면발현 시스템을 구축하고, endoxylanase를 고효율로 표면 발현하는 효모 형질전환체를 얻은 다음, 이를 생축매로 이용하여 xylan으로부터 XOS의 최적 생산조건(반응시간, 기질 종류, 기질 농도, 생축매 사용량, 반응온도 등)을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주, 배지 및 배양조건

E. coli DH5 α (*recA1 endA1 gyrA96 thi1 hsdR17 supE44 relA1 lacZM15*)는 재조합 DNA 조작을 위한 숙주세포로써 사용되었고, 효모 *S. cerevisiae* EBY100(MAT α *ura3-52 trp1 leu2-1 his3200 pep4::HIS3 prb11.6R can1 GAL1*)은 endoxylanase 표면발현을 위한 숙주세포로 사용되었다. *E. coli*는 50 μ g/mL ampicillin을 포함하는 LB 배지(1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, and 0.5% NaCl)에서 배양하였고, 효모 형질전환체의 선별과 전 배양을 위해 YNBCAD(0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose, and 0.5% casamino acids) 배지를 사용하였다. Colony 활성염색을 위한 형질전환체 배양과 플라스크 배양은 YPDG(1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% glucose, and 1% galactose) 배지를 사용하였다. Flask 배양은 500 mL baffled flask(working volume: 50 mL)로 30°C, 200 rpm에서 수행하였다.

표면발현 plasmid의 구축 및 형질전환

Bacillus sp. 유래 endoxylanase 유전자(*xynB*; 642 bp; 213 amino acids; GeneBank access code U5167)는 pAEDX-1[8]을 template로 사용하여 PCR 증폭하였다. 두 개의 primers는 sense primer로 5'-ACGGCTAGCATGTTAAG-TTTAAAAAGAAATTCTTAGT-3' 그리고 anti-sense primer로 5'-ACGGGATCCTTACCACACAGTTACATTAGAACT-TTC-3'을 제작하였다. Sense primer 부위에는 *NheI* 제한효소 인식부위를 가지며, anti-sense primer에는 *BamHI* 제한효소 인식부위를 가지고 있다. PCR 증폭 후 *xynB*는 *NheI*와 *BamHI* 제한효소로 처리하여 효모 표면발현 벡터인 pCTcon [4]에 subcloning하여 재조합 plasmid pCTXYN(6.8 kb)을 구축하였다. 구축된 재조합 plasmid는 *E. coli* DH5 α 에서 증폭, 추출하여 EZ-Yeast Transformation Kit(BIO 101, Vista, CA, USA)를 사용하여 효모 숙주세포 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환하였다.

균체농도, 잔존환원당 및 plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Simadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 배양액을 3,000 \times g에서 5분동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법[22]을 사용하여 잔존환원당(포도당+갈락토스) 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 YPD 평판배지에 도말한 후 자란 colony를 선별배지인 YNBCAD 배지로 toothpicking한 다음 형성된 colony수의 비(백분율)로 측정하였다.

Colony 활성 염색과 Endoxylanase 활성 측정

효모의 형질전환체 colonies로부터 endoxylanase의 발현유무를 조사하기 위해 Congo red 염색법[17]을 사용하였다. 즉, 1% xylan을 함유한 YPDG 평판배지에서 48시간 동안 자란 효모 형질전환체 colonies를 증류수로 세척·제거하고 0.1% Congo red 용액으로 30분간 반응 후, 1 M NaCl로 30분간 탈색하여 형성된 투명환을 측정함으로써 endoxylanase의 발현 유무를 확인하였다.

Endoxylanase 활성은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 사용하여 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0%(w/v) oat spelt xylan(Sigma, St. Louis, U.S.A) 용액 50 μ L와 100 mM 인산 완충액(pH 6.5) 100 μ L, 배양액 50 μ L를 혼합하여 반응한 후 DNS 시약 700 μ L를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분간 방치하였다. 이후 550 nm에서 흡광도를 측정하고, xylose를 표준시료로 사용하여 작성한 표준곡선과 비교하여, 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성의 1 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

Immunofluorescence Microscopy

YPDG 배지에서 48시간 배양한 균체를 원심분리(8000 rpm, 10분)하여 균체 침전물을 얻고, 이를 인산완충액(PBS, pH 7.4)에서 두 번 세척한 후 PBS에 OD₆₀₀ = 20로 희석하였다. 면역항체염색은 c-myc monoclonal antibody(mAb) 9E10 (Covance Inc., U.S.A.)를 1차 항체(1:500)로 4°C, 1.5시간 반응 후 세척하고 fluorescein-isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse IgG(H+L) (KPL Co., U.S.A.)를 2차 항체(1:100)로 4°C, 1 시간 반응 후 세척하였다. 면역항체 염색한 균체의 형광 분석은 confocal laser scanning microscope (Carl Zeiss, LSM 510 META, Germany)를 이용하였다.

Xylan 분해 효소반응과 Thin-layer chromatography 분석

20 mM 인산 완충액(pH 6.5)에 용해된 oat spelt xylan (OSX)과 corn cob xylan(CCX)을 endoxylanase 표면발현 생축매 효소반응의 기질로 사용하였다. Xylan 용액 5 mL과 효모 생축매 용액 5 mL을 혼합하여 40°C~70°C에서 1시간 반

응시킨 후 100°C에서 5분간 열처리하였다. 최종 기질 농도는 2~8%, 최종 생축매 농도는 0~25 unit/mL 범위에서 사용하였다. Endoxylanase에 의해 가수분해된 xylan 분해산물은 thin-layer chromatography(TLC)를 이용하여 분석하였다. 즉, 각각의 반응액 5 µL씩을 TLC plate(Merck Co., Darmstadt, Germany)에 점적한 후 chloroform:acetic acid:water(6:7:1, v/v)을 전개용매로 사용하여 3회 전개하였다. 전개된 TLC plate는 ethanol-sulfuric acid(95:5)를 sprayer로 사용하여 100°C에서 10분간 발색시켰다. Standards로는 xylose(Sigma, St. Louis, U.S.A), xylobiose, xylotriose(Megazyme, Ireland)를 사용하였다. TLC 상의 반응생성물 spots은 image analyzer(FluorChem 5500, Alpha InnoTech, U.S.A.)를 사용하여 정량분석하였다.

결과 및 고찰

재조합 plasmid의 구축 및 효모 형질전환체 선별

*xynB*의 자체 분비신호(27개 아미노산으로 구성)를 사용할 경우, *S. cerevisiae*에서 분비효율이 70% 이상으로 높게 유지되기 때문에[8, 17] mating factor α -1(MF α 1)과 같은 효모 분비신호를 사용하지 않았다. 즉, *xynB* 자체 분비신호를 포함한 전체 ORF(642 bp)를 PCR 증폭하였고, 증폭 후 *NheI*와 *BamHI*로 처리하고 미리 절단된 pCTcon의 AGA 유전자 하류에 연결시켰다. 구축이 확인된 *xynB* 표면발현체를 pCTXYN(6.8 kb)으로 명명하고 *S. cerevisiae* EBY100에 형질전환시켜 tryptophan 결핍 최소배지(YNBCAD)에서 형질전환체를 선별하였다.

효모 형질전환체(EBY100/pCTXYN)를 1% xylan이 포함된 YPDG 평판배지에서 배양한 후 Congo red 염색한 결과, 모든 형질전환체들의 colony 주위에는 투명환이 생성되었으며, 숙주세포 *S. cerevisiae* EBY100에서는 투명환이 생성되지 않았다. 이 결과로 *xynB*는 *GAL1* promoter에 의해 효모 형질전환체에서 성공적으로 발현되었음을 확인하였다. 형질전환체들 중 투명환이 가장 큰 2번 균주를 최종적으로 선별하였다. *xynB*의 표면발현 확인은 anti-c-myc(1차 항체)와 FITC(2차 항체)로 EBY100/pCTXYN 균체를 labeling 후 immunofluorescence microscopy로 관찰한 결과, EBY100/pCTXYN은 형광을 나타내었고, EBY100 (control)은 그렇지 않았다. 이 결과로 EBY100/pCTXYN 균체에서 *xynB*는 성공적으로 표면발현됨을 확인하였다(data not shown).

Flask 배양에서의 균체증식과 *xynB* 발현

효모 형질전환체 EBY100/pCTXYN를 YPDG 배지에서 48시간동안 flask 배양하여 균체증식, 탄소원 소모, endoxylanase 활성, plasmid stability 등을 조사하였다(Fig. 1). 배양 12시간까지 균체증식은 활발했으며(포도당 소모 구간), 갈락토스가 소모되는 배양 10시간부터 endoxylanase의 활성이

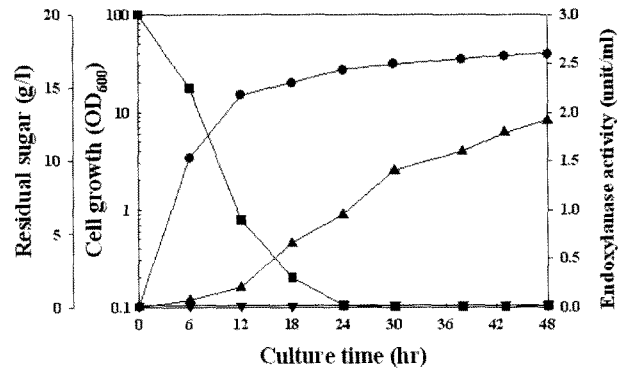


Fig. 1. Time profiles of cell growth, sugar consumption, and endoxylanase expression in the flask culture of *S. cerevisiae* EBY100/pCTXYN on YPDG medium. Symbols: ●, cell growth; ■, residual sugar; ▲, endoxylanase activity in the whole cell; ▼, endoxylanase activity in the culture supernatant.

증가하기 시작하여 배양 48시간째 최대 활성에 도달하였다. 또한 plasmid stability는 배양 말기에 접어들어도 90% 이상 안정하게 유지되었다. Endoxylanase 최대 활성은 1.9 unit/mL로 나타났으며, 배양 상등액에서는 활성이 나타나지 않았다. 즉, 발현된 endoxylanase는 대부분 표면발현됨을 알 수 있었다.

*S. cerevisiae*에서의 *xynB*의 발현율 약 8~10 unit/mL[8, 17]과 *Bacillus subtilis*에서의 발현율 857 unit/mL[12] 보다 효모 표면발현의 활성이 낮은 이유는 효모세포 표면에 발현되는 a-agglutinin의 수가 약 10⁴~10⁵개로[19] 한정되어 있기 때문에 발현시킬 수 있는 효소의 양이 일정하고, 따라서 상대적으로 효소활성이 낮은 것으로 추정된다. *Rhizopus oryzae* lipase를 효모 세포 표면에 발현시킬 때 α -agglutinin과 lipase 사이의 linker peptides 수가 늘어감에 따라 기질 친화성이 증가하였다[35]. 이를 볼 때 표면 발현된 효소가 기질과 반응하기 위해 필요한 공간 확보가 일반 episomal 발현보다 어려워 기질과의 친화력이 감소하는 것으로 사료된다. 따라서, 일반적인 episomal 발현에 비해 표면발현의 효소활성이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다.

기질 농도에 따른 XOS 생산

xynB 표면발현 효모세포를 생축매로 사용했을 때 최적의 기질 농도를 결정하기 위해 OSX(2~8%)과 생축매 5 unit를 50°C에서 12시간 반응시켰다. 이 반응 생성물을 TLC로 분석한 결과 OSX를 6% 사용하였을 때 가장 많은 XOS가 생성되었고, 기질농도가 높아지면 가수분해속도가 저하됨에 따라 생성물의 양도 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 주 반응산물은 xylotriose(X3)였으며 xylobiose(X2), xyloetraose(X4), xylopentaose(X5), xylohexaose(X6) 등도 소량 생성되었다.

*Pichia*에서 발현된 *Aspergillus niger*와 *B. licheniformis*의

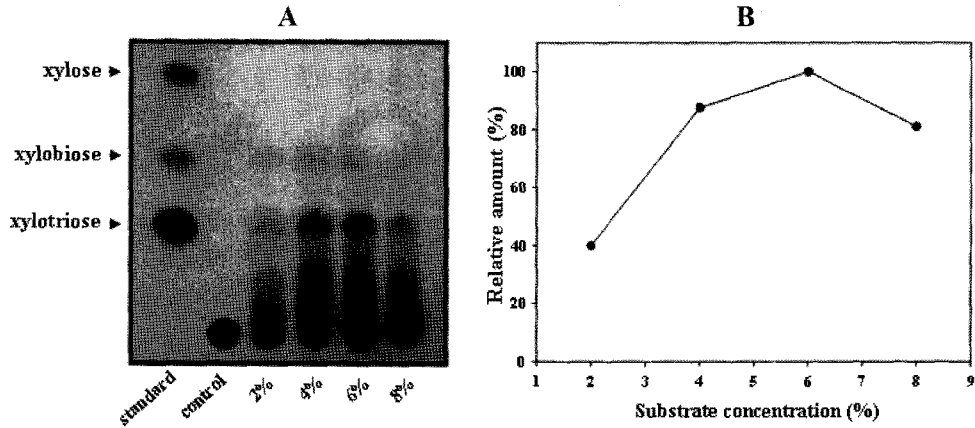


Fig. 2. (A) Effect of oat spelt xylan concentration on the production of xylooligosaccharides and (B) the relative amount of xylooligosaccharides produced by yeast cell surface-displayed endoxylanase.

xylanase 경우, 1% birchwood xylan(BWX)과 1% wheat bran insoluble xylan으로부터 X3가 주로 생성되었다[20, 21]. 곰팡이 *Plectosphaerella cucumerina* xylanase를 *Pichia* 에서 발현시킨 경우에서도 1% OSX가 최적 기질과 농도로 보고되었다[36]. *B. halodurans* endoxylanase를 *K. lactis*에서 발현한 경우, 중합도가 높은 XOSs(X4, X5 등) 생성이 관찰되기도 하지만 사용한 기질 농도는 2%였다[34]. *xynB* 를 *B. subtilis*에서 발현·생산한 재조합 endoxylanase 경우 4% BWX를 사용하였다[12]. 즉, 1~4% 기질농도가 일반적으로 사용된 것에 비해 표층발현 *xynB*의 경우 6% OSX에서 최적 XOSs 생산을 보임으로써 XOSs 수율과 생산성이 크게 개선될 것으로 예상된다.

생촉매 농도와 반응온도에 따른 XOSs 생산

효모 생촉매 농도에 따른 XOSs 생산 양상을 확인하기 위해 생촉매 농도(2.5~25 unit/mL)과 6% OSX를 50°C에서 30 분 동안 반응 후 반응 생성물을 TLC로 분석하였다(Fig. 3).

4가지 생촉매 농도에서 X2, X3가 생성되었고 이 중 X3가 주산물이었다. 10 unit/mL의 농도로 생촉매를 첨가하였을 때 가장 많은 XOSs가 생성되었으며, 이 이상의 생촉매 농도에서는 xylan 분해 속도는 빠르지만 5 unit/mL와 비교해서 그 리 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, XOS 생성 효율 및 생촉매 비용 등을 고려할 때 최적 생촉매 농도는 5 unit/mL로 판단되었다.

XOSs 생산을 위한 최적 온도를 확인하기 위해 40°C~70°C의 범위에서 6% OSX, 5 unit/mL 농도로 생촉매를 사용하여(총 반응액 부피 10 mL) 1시간동안 반응을 수행한 결과 50°C에서 최대 XOSs 생성 활성을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 반응액 부피를 60 mL로 늘려도 비슷하게 나타났다. 60°C에서 활성이 다소 감소하여 적은 양의 XOSs가 생성되었지만, 70°C에서도 XOSs 생성 활성이 어느 정도 나타나는 것을 확인하였다. 이와 같은 열안정성 증대는 *Rhizopus oryzae* lipase와 *Candida antarctica* lipase B를 *S. cerevisiae* 세포에 표면발현시킨 경우에도 관찰되었다[10, 26]

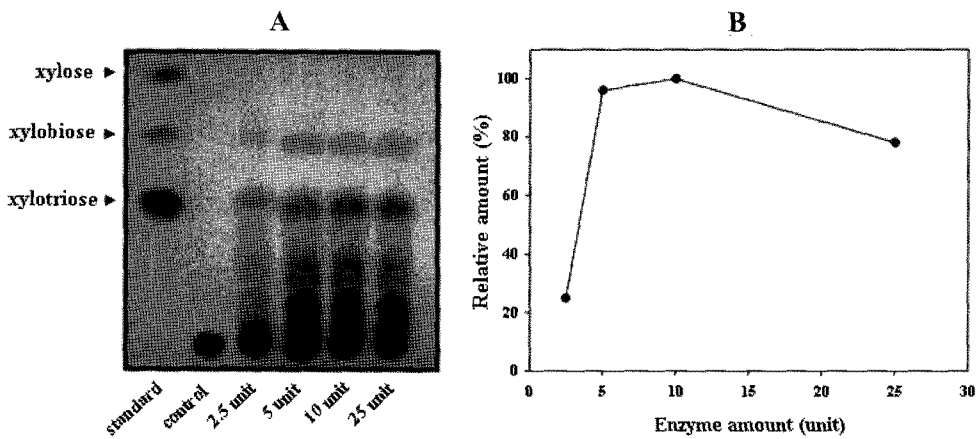


Fig. 3. (A) Effect of yeast surface-displayed enzyme concentration on the hydrolysis of oat spelt xylan and (B) the relative amount of xylooligosaccharides produced by yeast cell surface-displayed endoxylanase.

최적 조건에서 기질에 따른 XOSs 생성 양상

앞에서 결정된 최적 조건 하에서 xylan의 종류에 따른 XOSs 생성 양상을 조사하기 위해 생축매 농도 5 unit/mL를 사용하여 6% OSX 또는 6% CCX과 함께 50°C에서 12시간

반응시켰다. 반응 생성물을 TLC로 분석한 결과, OSX를 기질로 사용하였을 때는 효소반응 10분부터 X3가 생성되었으며 반응 30분 후에는 X2가 생성됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 또한 반응 2시간 이후에는 더 이상 X3와 X2의 생성이

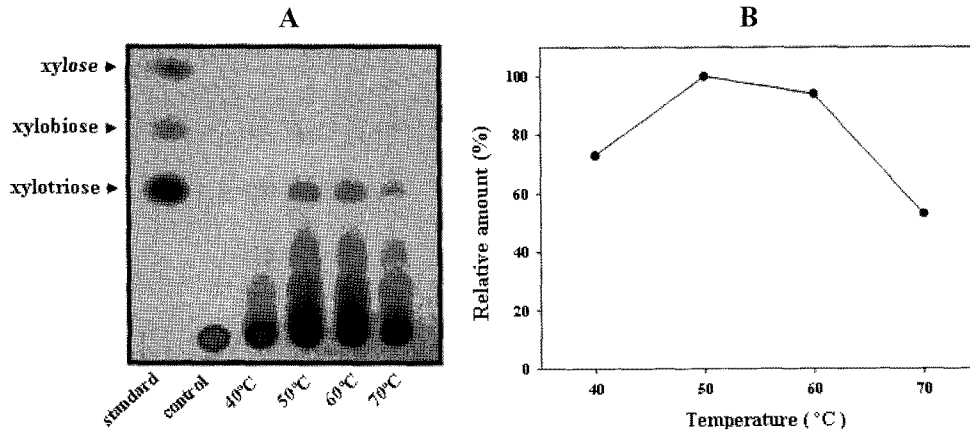


Fig. 4. (A) Effect of reaction temperature on the hydrolysis of oat spelt xylan and (B) the relative amount of xylooligosaccharides produced by yeast cell surface-displayed endoxylanase.

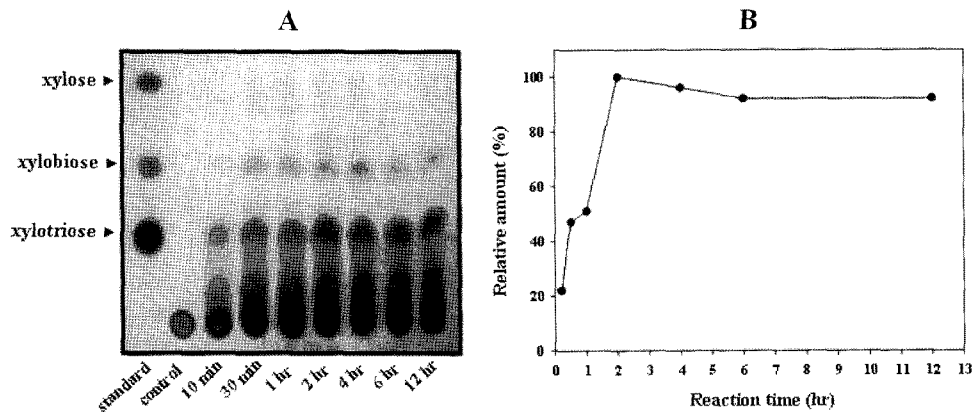


Fig. 5. (A) Hydrolysis of oat spelt xylan by yeast cell surface-displayed endoxylanase and (B) the relative amount of xylooligosaccharides produced by yeast cell surface-displayed endoxylanase.

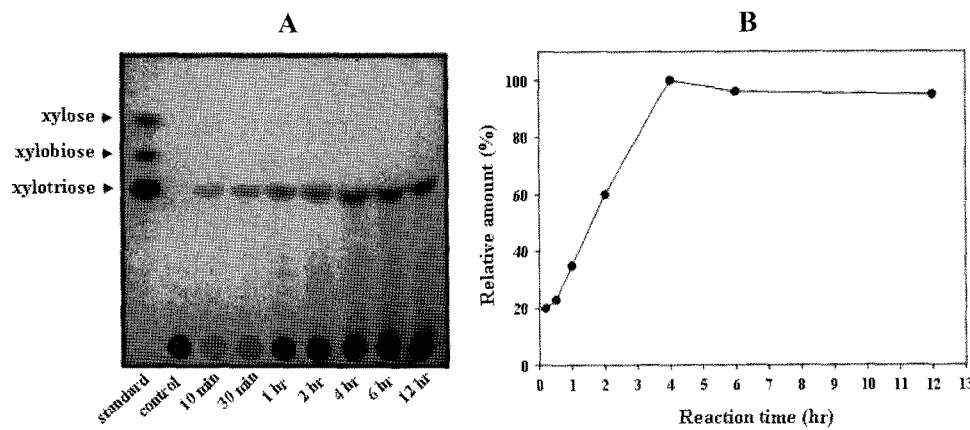


Fig. 6. (A) Hydrolysis of corncob xylan by yeast cell surface-displayed endoxylanase and (B) the relative amount of xylooligosaccharides produced by yeast cell surface-displayed endoxylanase.

증가하지 않았다. X4 이상의 중합도(Degree of Polymerization)가 높은 XOSs의 생성량 변화도 관찰되지 않았다. CCX를 기질로 사용한 경우 반응 10분부터 X3가 생성되었지만 X2는 거의 생성되지 않았으며, 반응 4시간째 이후는 더 이상 X3 또는 X2의 생성이 없어 endoxylanase 반응이 종결됨을 확인하였다(Fig. 6). 또 반응 12시간이 경과해도 X3의 분해가 일어나지 않았으며 xylose의 생성도 관찰되지 않았다.

*S. cerevisiae*에서 발현시킨 *Trichoderma reesei* xylanase의 경우, 재조합 효소는 생성된 XOSs에 친화성을 보여 결국 XOSs가 xylose로 전환되었다[15]. *B. halodurans* endoxylanase를 *K. lactis*에서 발현한 경우, 중합도가 높은 XOSs(X4, X5 등)가 생성되지만 이들은 X2 또는 xylose로 최종 가수분해되었다[34]. *B. licheniformis* xylanase와 *A. niger* xylanase를 *Pichia*에서 발현시킬 경우, BWX으로부터 다양한 중합도의 XOSs(X2~X6)가 생성되지만 결국 그 효소에 의해 단당류(환원당)로 가수분해되었다[20, 21]. 즉, 이들은 XOSs 생성에 적합하지 않음을 알 수 있고, 본 연구의 *xynB*를 이용할 경우, OSX로부터 X3 함량이 높은 XOSs를, CCX로부터 X3만 선택적으로 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 *S. cerevisiae* 세포 표면에 발현된 endoxylanase를 사용할 경우, 높은 기질 농도(6%)와 상대적으로 짧은 반응시간(2~4시간) 때문에 XOSs의 수율과 생산성을 크게 개선할 수 있고, 특히 기질에 따라 선택적인 XOSs 생산이 가능함을 알았다.

요 약

Bacillus sp. endoxylanase 유전자(*xynB*, 642 bp)의 효모 표면발현계 pCTXYN(6.8 kb)를 구축하고 *Saccharomyces cerevisiae* EBY100에 형질전환시켜 형질전환체 EBY100/pCTXYN를 얻었다. 형질전환체들을 xylan이 포함된 YPDG 배지에서 배양 후 활성염색을 통하여 고활성의 형질전환체를 최종 선별하였다. 갈락토스 배지에서 자란 효모 형질전환체로부터 *xynB*는 성공적으로 표면발현되었고, xylan으로부터 xylooligosaccharides를 효율적으로 생성함도 확인하였다. Endoxylanase 활성은 세포분획에서만 검출되었고 배양 48시간에 최종 1.9 unit/mL의 활성을 보였다. Xylooligosaccharides 생산을 위한 최적 반응 조건으로, 기질과 농도는 oat spelt xylan 6%, 효모 생축매 농도는 5 unit/mL, 반응온도는 50°C, 반응시간은 2~4시간이었다. 효모 생축매를 oat spelt xylan과 corn cob xylan에 처리한 결과, xylotriose가 주 성분이었다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 2006년 일반 연구과제 지원에 의하여 이루어졌으며, 이 연구에 참여한 김현진은 2단계 BK21

사업의 지원을 받았습니다.

REFERENCES

- Andrés, I., O. Gallardo, P. Parascandola, F. I. Javier Pastor, and J. Zueco. 2005. Use of the cell wall protein Pir4 as a fusion partner for the expression of *Bacillus* sp. BP-7 xylanase A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **89**: 690-697.
- Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G. S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
- Berrin, J.G., G. Williamson, A. Puigserver, J. C. Chaix, W. R. McLauchlan, and N. Juge. 2000. High-level production of recombinant fungal endo- β -1,4-xylanase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **19**: 179-187.
- Cochran, J. R., Y. S. Kim, M. J. Olsen, R. Bhandari, and K. D. Wittup. 2004. Domain-level antibody epitope mapping through yeast surface display of epidermal growth factor receptor fragments. *J. Immunol. Methods.* **287**: 147-158.
- Damaso, M. C., M. S. Almeida, E. Kurtenbach, O. B. Martins, N. Jr. Pereira, C. M. Andrade, and R. M. Albano. 2003. Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6064-6072.
- Fujita, Y., S. Katahira, M. Ueda, A. Tanaka, H. Okada, Y. Morikawa, H. Fukuda, and A. Kondo. 2002. Construction of whole-cell biocatalyst for xylan degradation through cell-surface xylanase display in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **17**: 189-195.
- Görgens, J. F., J. Planas, W. H. van Zyl, J. H. Knoetze, and B. Hahn-Hägerdal. 2004. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium. *Yeast.* **21**: 1205-1217.
- Heo, S. Y., J. K. Kim, Y. M. Kim, and S. W. Nam. 2004. Xylan hydrolysis by treatment with endoxylanase and β -xylosidase expressed in yeast. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 171-177.
- Katahira, S., Y. Fujita, A. Mizuike, H. Fukuda, and A. Kondo. 2004. Construction of a xylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 5407-5414.
- Kato, M., J. Fuchimoto, T. Tanino, A. Kondo, H. Fukuda, and M. Ueda. 2007. Preparation of a whole-cell biocatalyst of mutated *Candida antarctica* lipase B (mCALB) by a yeast molecular display system and its practical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**: 549-555.
- Kim, K. Y., M. D. Kim, N. S. Han, and J. H. Seo. 2002. Display of *Bacillus macerans* cyclodextrin glucanotransferase on cell surface of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 411-416.
- Kim, Y. H., S. Y. Heo, M. J. Kim, J. H. Lee, Y. M. Kim, and S. W. Nam. 2008. Optimal production of xylooligosac-

- charide by using recombinant endoxylanase from *Bacillus subtilis*. *J. Life Sci.* **18**: 52-57.
13. Kondo, A. and M. Ueda. 2004. Yeast cell-surface display-applications of molecular display. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**: 28-40.
 14. La Grange, D. C., I. S. Pretorius, and W. H. van Zyl. 1996. Expression of a *Trichoderma reesei* β -xylanase gene (XYN2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1036-1044.
 15. La Grange, D. C., M. Claeysens, I. S. Pretorius, and W. H. van Zyl. 2000. Coexpression of the *Bacillus pumilus* β -xylosidase (*xynB*) gene with the *Trichoderma reesei* β -xylanase 2 (*xyn2*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 195-200.
 16. La Grange, D. C., I. S. Pretorius, M. Claeysens, and W. H. van Zyl. 2001. Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* β -xylosidase (*xlnD*) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (*xyn2*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5512-5519.
 17. Lee, J. H., M. Y. Lim, M. J. Kim, S. Y. Heo, J. H. Seo, Y. H. Kim, and S. W. Nam. 2007. Constitutive coexpression of *Bacillus* endoxylanase and *Trichoderma* endoglucanase Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 2076-2080.
 18. Li, X. L. and L. G. Ljungdahl. 1996. Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and secretion of the xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 209-213.
 19. Lipke, P. N. and J. Kurjan. 1992. Sexual agglutination in budding yeasts: Structure, function and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol. Rev.* **56**: 180-194.
 20. Liu, M. Q. and G. F. Liu. 2008. Expression of recombinant *Bacillus licheniformis* xylanase A in *Pichia pastoris* and xylooligosaccharides released from xylans by it. *Protein Expr. Purif.* **57**: 101-107.
 21. Liu, M. Q., X. Y. Weng, and J. Y. Sun. 2006. Expression of recombinant *Aspergillus niger* xylanase A in *Pichia pastoris* and its action on xylan. *Protein Expr. Purif.* **48**: 292-299.
 22. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 23. Moure, A., P. Gullon, H. Dominiguez, and J. C. Parajo. 2006. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Proc. Biochem.* **41**: 1913-1923.
 24. Nabarlantz, D., D. Montane, A. Kardosova, S. Bekesova, V. Hribalova, and A. Ebringerova. 2007. Almond shell xylo-oligosaccharides exhibiting immunostimulatory activity. *Carbohydr. Res.* **342**: 1122-1128.
 25. Nuyens, F., W. H. van Zyl, D. Iserentant, H. Verachtert, and C. Michiels. 2001. Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo- β -xylanase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 431-434.
 26. Polizeli, M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim. 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 577-591.
 27. Reilly, P. J. 1981. Xylanase; structure and function. *Basic Life Sci.* **18**: 111-129.
 28. Shiraga, S., M. Kawakami, M. Ishiguro, and M. Ueda. 2005. Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole-cell biocatalyst in organic solvents. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4335-4338.
 29. Subramaniyan, S. and P. Prema. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33-64
 30. Ueda, M. and A. Tanaka. 2000. Cell surface engineering of yeast: construction of arming yeast with biocatalyst. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 125-136.
 31. Vazquez, M. J., J. L. Alonso, H. Dominguez, and J. C. Parajo. 2000. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.* **11**: 387-393.
 32. Walsh, D. J. and P. L. Bergquist. 1997. Expression and secretion of a thermostable bacterial xylanase in *Kluyveromyces lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3297-3300.
 33. Walsh, D. J., M. D. Gibbs, and P. L. Bergquist. 1998. Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, thermotoga strain FjSS3B.1, in *Kluyveromyces lactis*. *Extremophiles.* **2**: 9-14.
 34. Wamalwa, B. M., G. Zhao, M. Sakka, P. M. Shiundu, T. Kimura, and K. Sakka. 2007. High-level heterologous expression of *Bacillus halodurans* putative xylanase *xyn11a* (BH0899) in *Kluyveromyces lactis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 688-693.
 35. Washida, M., S. Takahachi, M. Ueda, and A. Tanaka. 2001. Spacer-mediated display of active lipase on the yeast cell surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 681-686.
 36. Zhang, G. M., J. Huang, G. R. Huang, L. X. Ma, and X. E. Zhang. 2007. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**: 339-346.

(Received Nov. 12, 2008/Accepted Dec. 12, 2008)