

Isolation, Purification and Characterization of the β -Xylosidase from *Klebsiella* sp. Sc.Yong-Seok Lee^{1,2}, In-Hye Park¹, Soon-Cheol Ahn^{2*} and Yong-Lark Choi^{1*}¹Department of Biotechnology, College of Natural Resources and Life Science, Dong-a University, Busan 604-714, Korea²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University school of Medicine, Yangsan 626-770, Korea

Received November 26, 2010 / Accepted December 8, 2010

A β -xylosidase encoding gene from *Klebsiella* sp. Sc was cloned in *Escherichia coli*. The β -xylosidase gene consisted of an open reading frame of 1,680 nucleotides and encodes 559 amino acids with a deduced molecular weight of 63 kDa. The deduced amino acid sequence of the β -xylosidase from *Klebsiella* sp. Sc exhibits 90% identities and 95% positives compared to those from *Klebsiella oxytoca* (KOX), *Lactobacillus lactis* (LAC, 82%, 90%), *Bacillus longum* (BLON, 69%, 81%) and *Escherichia coli* (ECOLI, 47%, 63%). The β -xylosidase was purified by GST-fusion purification system. The pH and temperature optima of the enzyme were 6.6 and 55°C, respectively. The β -xylosidase hydrolyzes xylobiose to xylose.

Key words : *Klebsiella* sp., β -xylosidase, glycosyl hydrolase family 43

서 론

Xylan은 xylose가 β -1,4 결합으로 연결된 중합체로 종종 4-O-methyl glucuronate와 arabinose와 같은 작용기를 가지며 고등 식물의 세포벽을 구성하는 것으로 널리 알려져 있다. 그러므로 endo- β -1,4-xylanase (EC 3.2.1.8), β -1,4-xylosidase (EC 3.2.1.37), α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, ferulic acid esterase와 acetyl-xylan esterase와 같은 다양한 헤미셀룰로스 가수분해 효소들이 협동작용을 하여야만 xylan을 완전하게 분해할 수 있다[15]. 이들 xylan 분해 효소들 중 endo- β -1,4-xylanase는 xylan을 무작위로 가수분해하여 주로 xylobiose 혹은 xylo-oligosaccharide들을 생산하는 것으로 알려져 있으며 β -1,4-xylosidase는 xylobiose 혹은 xylo-oligo saccharide들을 기질로 이용하여 xylose를 생산하는 효소로 알려져 있다[1,17]. β -Xylosidases는 많은 세균과 곰팡이들로부터 정제되고 특성이 밝혀졌다. 세균이 생산하는 β -xylosidases 세균의 외부로 분비 되지 않으며, 곰팡이의 경우에는 세포 성장의 초기 단계에는 세포의 내부에 머물다가 성장의 후기 단계에는 분비된다[5, 9]. β -Xylosidases는 최근 5개의 패밀리(family 3, 39, 43, 52와 54)들로 분류 되었다[6-8].

앞의 연구결과에서 우리는 식물 세포벽 분해 관련 효소를 생산하는 균주를 분리하였다. 16S rDNA와 RNA polymerase

B subunit 유전자의 염기서열을 이용하여 계통 분석을 하여 *Klebsiella* sp. Sc라고 명명하였다. 이 균주로부터 CMCase 유전자를 분리하였으며 그 단백질을 정제하여 그 특성을 밝혔다. 이 균주의 CMCase 유전자는 37,666 Da의 분자량을 가지는 333개의 아미노산을 암호화하고 있는 1,002개의 뉴클레오티드들로 구성된 것으로 밝혀졌다. 그리고 세균성 CMCase는 ASDGDTLIAWALLRAQKQW와 같은 보존 영역을 가지고 있었는데, 이는 glycosyl hydrolase family 8의 보존영역 (A-[ST]-D-[AG]-D-X(2)-[IM]-A-[SA]-[LIVM]-[LIVMG]-A-X(3)-[FW])와 일치하는 것으로 나타났다. 이는 *Klebsiella* sp. Sc의 CMCase는 glycosyl hydrolase family 8에 속한다는 것을 보고 하였다[13]. 최근 우리는 이 분리 균주로부터 강력하게 xylan을 분해하는 β -xylosidases 유전자를 찾아내었으며, 이를 분리, 정제하여 그 특성을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

Fosmid library kit를 이용한 게놈 라이브러리의 구축

Fosmid library 구축은 Epicentre사에서 판매되는 EpiFos™ Fosmid Library Production Kit (Cat. No. FOS0901)를 이용하여 구축하였다. Fosmid library 구축을 위해서 분리균주로부터 분리한 게놈 DNA (2.5 μ g)를 200여 회의 피펫팅을 통해서 대략 40 kb 정도의 단편으로 절단하였다. 이렇게 절단한 단편을 End-repair 효소를 이용하여 각 단편의 말단을 blunt end화 하였다. 이후 Et-Br이 함유되지 않은 1% low melting agarose 겔에 전기 영동하여 대략 40 kb 부근의 DNA 단편을 회수하였다. 이 회수 단편을 pEpiFOS-5 벡터와 몰 비율이 10:1이 되게 섞어서 라이게이션 하였다. 이를 MaxPlax Lambda Packaging

*Corresponding author

Yong-Lark Choi
Tel : +82-51-200-5747, 7585, Fax : +82-51-200-6536
E-mail : ylchoi@dau.ac.kr
Soon-Cheol Ahn
Tel : +82-51-510-8092, Fax : +82-55-382-8090
E-mail : ahnsc@pusan.a.kr

Extracts를 이용하여 packaging 하여 *E. coli* EPI100-T1에 형질 도입 하여 게놈 라이브러리를 구축하였다. 게놈 라이브러리는 xylan이 함유된 LB 배지에서 2일간 배양한 다음 2% KI과 0.2% I₂ 용액으로 염색하여 콜로니 주변에 clear zone이 형성되는 positive clones를 선별하였다. 이 재조합체들을 *Ban*HI으로 partial digestion 하여 pUC118/*Ban*HI · CIAP 벡터에 연결하여 2차 라이브러리를 구축하였다. 재차 *Sa*I을 이용하여 partial digestion 하여 pUC118/*Sa*I · CIAP 벡터에 연결하여 β -xylosidase의 전체 유전자 서열을 밝혔다.

GST-affinity chromatography를 이용한 정제를 위한 재조합 플라스미드의 구축

분리 균주의 β -xylosidase와 glutathione S-transferase (GST) 융합 단백질을 구축하기 위하여 바이오니아사에서 합성한 oligonucleotides 프라이머들을 사용하였다. 이 프라이머들은 GST tag 융합 단백질의 발현 벡터인 pGEX-6P-1에 쉽게 클로닝하기 위해서 프라이머 내부에 제한효소 *Eco*RI과 *Xho*I의 자리를 삽입하였다. PCR 반응액 50 μ l 속에는 100 pmol의 프라이머, 200 ng의 주형 DNA, 20 mM의 각각의 dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)와 1.0 U의 Taq DNA Polymerase를 함유하였다. 증폭 과정은 다음 단계를 30회 반복하였다: pre-denaturation 95°C에서 60 초를 실시한 후, denaturation 95°C에서 60 초, annealing 55°C에서 60 초, extension 72°C에서 90 초를 30 회 반복하였으며, 이후 마지막 extension 반응으로 72°C에서 10 분간 실시하였다. 증폭된 DNA 단편은 제한효소 *Eco*RI과 *Xho*I로 처리한 후, *Eco*RI과 *Xho*I 처리를 하고 5' -인산기가 제거된 pGEX-6P-1 벡터에 클로닝하였다. 그 결과, GST-xylosidase 융합 플라스미드인 pGESXYN를 구축하였다.

재조합 단백질 β -xylanase의 정제

GST-xylosidase fusion 플라스미드를 가진 *E. coli* BL21 (DE3)는 지수 성장기의 초기에 0.1 mM의 IPTG를 첨가하여 과발현 유도하였으며, 이후 37°C에서 3 시간 정도 더 배양하였다. 세포는 4°C, 6,000 rpm에서 15 분간 원심분리를 통해서 집균하였으며, 1X PBS buffer (10X PBS를 희석사용: 1.4 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄ [pH 7.3])를 이용하여 washing하였으며, 1X PBS를 이용하여 재현탁하였다. 세포는 sonicator를 이용하여 파쇄 하였으며, 그 상등액은 4°C, 13,000 rpm에서 30 분간 원심 분리하여 수집하였다. 상등액은 1X PBS로 평형화 되어있는 GSTrap FF column에 통과 시킨 후, 10 mM reduced glutathione을 이용해서 용출하였다. 용출 속도는 분당 1 ml의 속도를 유지 하였다. 용출된 fraction은 PreScission cleavage 버퍼 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT [pH 7.0])로 투석하고 Amicon Ultra-4를 이용하여 농축하였다. 농축된 GST-xylosidase 융합 단백질은 PreScission protease를 이용하여 5°C에서 12 시간 동안 반응시켜 GST 영역을 제거 하였다. 이 분리된

단백질들은 GSTrap FF column에 다시 통과시켜 컬럼에 결합하지 않은 unbounded 단백질을 회수하여 정제한 단백질로 사용하였다.

효소 활성 측정

β -Xylosidase의 효소 활성은 birchwood xylan로부터 생산되는 환원당의 양에 의해서 측정하였다. 반응액의 조성은 0.5% birchwood 50 μ l, 1X PBS 100 μ l와 β -xylosidase (1 μ g)을 첨가하였으며 최종 반응액을 250 μ l로 맞추었다. 반응액은 55°C에서 30 분 동안 반응 시켰으며 정지 반응을 위해서 100°C에서 10 분간 끓인 다음, 원심분리를 시행하고 DNS 시약을 첨가하여 환원당량을 측정하였다. 효소 활성(U)은 분당 1 μ mol의 환원당을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다[14].

가수분해 산물의 TLC를 통한 분석

β -xylosidase의 가수분해 산물을 thin layer chromatography를 통하여 분석하였다. 반응액의 조성은 0.5% birchwood xylan 10 μ l와 β -xylosidase (1 μ g)을 첨가하였으며 최종 반응액을 1X PBS를 이용하여 50 μ l로 맞추었다. 반응액은 55°C에서 1 시간 동안 반응 시켰으며 반응액 중의 1 μ l를 TLC판에 점적하였다. 전개용매는 *n*-butanol: acetic acid:water를 6:3:2의 비율로 섞어서 사용하였으며, 발색 시약은 aniline-diphenylamine 용액을 사용하였다. Aniline-diphenylamine 용액은 aniline 4 ml, diphenylamine 4 g, acetone 200 ml 그리고 85% phosphoric acid 30 ml을 혼합하여 만들었다. 발색 시약을 스프레이 한 후, 150°C에서 3 분간 구워서 가수분해 산물을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Klebsiella sp. Sc로부터 β -xylosidase 유전자의 클로닝 및 분석

Klebsiella sp. Sc로부터 강력하게 xylan을 분해하는 유전자를 얻기 위해서 Fosmid library kit를 이용하여 genome library를 구축하였다. Genome library 구축 과정은 Fig. 1에 그림으로 묘사하였다. 그 결과, 대략 5,000개의 재조합체를 획득하였다. 이들을 0.5% xylan이 함유된 LB 고체배지에서 2 일간 배양하였다. 이후 2% KI와 0.2% I₂가 함유된 용액을 부어서 콜로니 주변에 clear zone이 형성되는 것을 positive clone으로 선별하였다. 이 재조합체는 대략 40 kb 정도의 큰 insert 단편을 가지고 있었다. 이 단편을 다시 *Ban*HI과 *Sa*I과 같은 제한효소들로 순차적으로 절단하여서 그 사이즈 단편을 줄이며 활성을 가진 유전자를 찾아갔다. 최종적으로 대략 2.5 kb의 insert 단편을 가지는 positive 재조합체를 선별하였다. 이를 pSCXYN 이라고 명명하였다. 이 재조합체를 분석한 결과, 63,145 Da의 분자량을 가지는 559개의 아미노산을 코딩하는 1,680개의 염기서열로 β -xylosidase가 존재한다는 것을 밝혀 내었다(Fig. 2). 신

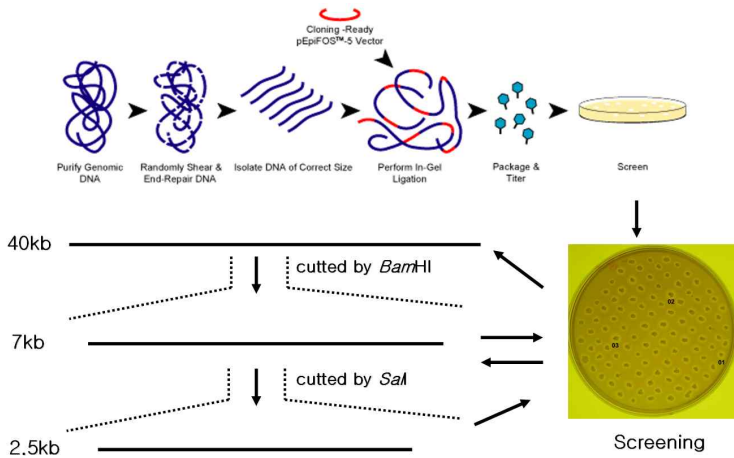


Fig. 1. Construction of genomic library with β -xylosidase from *Klebsiella* sp. Sc.

GCTGGATGAGATCCGCGTGTAGTTAAAAAATTATAAATCAGACCGATCCT
 TAACCTTCCATTTTAAAGGTGAATGAAATGTCACCTATTCAAACCCGA
 M S L I Q N P I
 TATTACGCGGCTTAAATGCCGACCCAGTATTATTCGCGTCGAGGATACGT
 L R G F N A D P S I I R V E D T Y
 ACTATATTGCCAACTCGACGTTTGAGTGGTCCCGGGCGTGCCTTACATG
 Y I A N S T F E W F P G V R L H E
 AGTCCAAAGACCTGAAAACTGGAACCTGCTGCCTTCGCGGCTCCTCACCA
 S K D L K N W N L L P S P L S T T
 CCACCCTGCTGGATATGAAGGGCAACCCCTCCTCGGCGGCATTGGGCGC
 T L L D M K G N P S S G G I W A P
 CGGCGCTCTCCTGGGCGCAGCGGCAATTCTGGTGGTGTATACCGATGTGA
 A L S W A D G Q E W L V Y T D V K
 AGGTCACCGAAGGCGCTTCAAAGACATGACCAACTATCTGACCACCGCAA
 V T E G A F K D M T N Y L T T A K
 AGGATATTGGGGCCCGTGGAGCGACCCGATCAAGCTGAACGGCGTGGGT
 D I R G P W S D P I K L N G V G F
 TTGACGCTCGCTGTTCCATGACGACGATGGCCGAAATATATCGTCCAGC
D A S L F H D D D G R K Y I V Q Q
 AAACCTGGGATACCGGGAGTACCATCACCCCTTCGATGGCATTACCTTAA
 T W D H R E Y H H P F D G I T L T
 CGGAGCTGGATACCAACACGCTGAAGTTAATGCCGAAACCGCGCACCA
 E L D T N T L K L M P E T A R T I
 TCTACCGCGCACCGCCGTGGCGCTGGTCGAGGGGCCACCTCTATAAAC
 Y R G T A V A L V E G P H L Y K L
 TGAACGGCTACTACTATCTGTTTCCCGCCAGGGCGGCACCGTGTACCC
 N G Y Y Y L F A A Q G G T V F T H
 ACCAGGAGGTGGTGGCGCGTCGAAAACCCCTCGAGCCGACAGCTTCGAAA
 Q E V V A R S K T L E A D S F E T
 CCGAGCCGGGTGACGTGTTCTTAACCAACGTCGACACGCCGACAGCTACA
 E P G D V F L T N V D T P D S Y I
 TCCAGAACAGGGCCATGCCGCGCTGGTCTCACCCCGAAGGGCAATGGT
 Q K Q G H G A L V S T P E G E W Y
 ATTACGCTCGCTCGCGCCGCCATGGAATCGCCCGGGGAATCCATCT
 Y A S L C A R P W N R P G E S I Y

ACGACCCGCGCGGCTGGTCAACCTCGGCCGGGAAACCGCGATCCAGAAAG
 D P R G W S T L G R E T A I Q K V
 TGTACTGGGACGACGAAAGGCTGGCCGCTATTGAAGCGGTACGCGCGGA
 Y W D D E G W P R I E G G H G G K
 AAACCTTTGTCGAAGGGCGAAAGACGCCATCTTACCAGAAAGCGCCAGCG
 T F V E G P K D A I F T E S A S D
 ATAATAGCCAGCAGGATGACTTTACCTCGCCAGCGCTCGACCGAACTGGA
 N S Q Q D D F T S P A L D P N W N
 ATACCTGCGGGTGGCGTTTACGGCCAAAATGGGCACCCCGCAACGGCA
 T L R V P F T A K M G T T G N G K
 AATTAACCTTAATCGGCCAGGGTTCGTTAGCCAAATACGCATGACCTGTGC
 L T L I G Q G S L A N T H D L S L
 TGATTGCCCGCGTGGCAGGCTTCTATTTTACGCCGCGGTGAAGGTGA
 I A R R W Q A F Y F D A A V K V K
 AATTCGAACCTTACAGTACCAGCAGATGGCCGGTTAACGAATTAATA
 F E P F S Y Q Q M A G L T N Y Y N
 ACGACCCGCACTGGAGCTTCTGCTTCTGACCTGGAATGAAATTAACGGCA
 D R H W S F V F L T W N E I N G K
 AGGTCATCGAAGTGGCGAAAATAACCGGGGAAATACACGTCGTACCTGA
 V I E V G E N N R G K Y T S Y L K
 AAGATAACGCCATCAAGGTGCCGAGCGCGTGAATACGCTGTTCCGGA
 D N A I K V P D G V E Y V W F R T
 CCAAGTCCGCAAGCAGACCTACAGCTATGAATACAGCTTCGATGGCGTGA
 K V R K Q T Y S Y E Y S F D G V T
 CCTTACCGAGATCCCGGTTCCAGCTGGATGCCGCGTACTGTCCGATGACT
 F T E I P V Q L D A A V L S D D Y
 ATGTGTTGCAGAGCTACGGCGGTTCTTTACCGGGCGTTCGTCGGCCTGG
 V L Q S Y G G F F T G A F V G L A
 CGGCGGTAGACTACGCCGGTACGGCACCCAGGCTGAGTTTATCAGTTG
 A V D Y A G Y G T Q A E F Y Q F E
 AGTATCAGGAGCTGGCGGATAGTTAGCGCCGATGGCAGCTACAGCTGGG
 Y Q E L G D R L A A D G S Y S W E
 AGGCTGGCAGACGCGGATAAGTAAGAGAGGGCGGGCCACGCTACCGGT
 A G E T R D K *
 GAGGTAGCGTGGGGTTTTGTGCTGTGTGTGATGTAATTAACGAGTGTCTG
 TCGGATGTCAGTCTCGGGGGCGACCGGGCTTACAGCTTCCGGGAGTAA

Fig. 2. Nucleotide sequence of the β -xylosidase gene and deduced amino acid sequence from *Klebsiella* sp. Sc. The amino acid residues that seem to be essential for β -xylosidase activity are marked by underline.

호 서열 같은 경우는 분리 균주 Sc의 β -xylosidase에는 존재하지 않는 것으로 분석되었다. 그리고 β -xylosidase은 glycosyl hydrolase family 43에 속하며 xynB의 기능적 도메인으로 구성되어 있는 것으로 분석되었다(Fig. 3)[4]. 분리 균주 Sc의 β -xylosidase와 기존에 알려진 4 종류의 세균성 β -xylosidase들과 상호간의 상동성을 비교하였다. *Klebsiella oxytoca* (KOX, AAQ62864.1) [10]와 90%의 identities와 95%의 positives를 나타내었으며, *Lactobacillus lactis* (LAC, AAK05603) [3]와 82%와 90%를 나타내었으며, *Bacillus longum* (BLON, ZP_00121429)과 69%와 81%를 나타내었으며, *Escherichia coli* (ECOLI, P77713) [2]와 47%와 63%를 나타내었다. Glycosyl hydrolase family 43에 속하는 단백질의 경우, 효소 촉매 작용과 기질 결합 과정에 D38, F114, D158과 E221의 아미노산들이 중요한 기능을 하는 것으로 알려졌으며, 이들은 여러 세균성 β -xylosidase 유전자에서 공통적으로 보존되어 있었다(Fig. 4)[10].

GST fusion 정제 시스템을 이용한 β -xylosidase의 정제
 분리 균주 Sc의 β -xylosidase를 GST tag를 이용한 affinity 크로마토그래피를 통해서 정제하였다. 이를 위해서 pGEX-

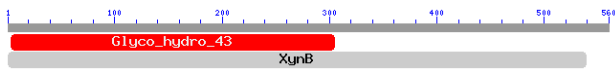


Fig. 3. Functional domains of the β -xylosidase from *Klebsiella* sp. Sc.

6P-1를 이용하였다. 벡터 pGEX-6P-1는 GST (Glutathione-S-transferase)와 같은 affinity 크로마토그래피용 tag를 가지고 있다. β -xylosidase를 코딩하는 유전자를 pGEX-6P-1에 재조합하였다. Host cell은 BL21(DE3)를 사용하였는데, BL21 (DE3)는 일반적인 정제를 위한 host cell로 많이 이용되는 균주이다. 재조합 플라스미드를 만드는데 있어서 β -xylosidase의 단백질 서열 속에 신호서열이 존재 하지 않았으므로 전체서열을 이용하여 재조합 플라스미드를 디자인하였다. 재조합 균주들은 대수증식기 초기에 IPTG에 의해 단백질의 대량 발현이 유도되었으며, GSTrap FF 컬럼과 PreScission protease를 사용하여 β -xylosidase를 정제하였다. 대량 발현된 단백질들은 SDS-PAGE를 통해서 발현의 유무를 확인한 뒤, 고체배지 위에서 활성의 유무를 확인하였다[11]. 확인 결과, 모든 재조합 단백질들은 대략 63 kDa의 분자량을 가지며 활성을 가지는 것으로 밝혀졌다(Fig. 5). 이 단백질들을 이용해서 앞으로 여러 가지 효소의 특성 실험을 수행하였다.

β -xylosidase의 특성

정제된 β -xylosidase의 최적 pH는 6.6을 나타내었으며, 대략 pH 6~8 사이의 범위에서는 높은 활성을 나타내었지만, 그 밖의 pH 범위에서는 효소의 활성이 급격하게 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었다. 최적 온도는 55°C를 나타내었으며, 주로 50~60°C의 범위에서는 높은 활성을 관찰 할 수 있었지만, 그 밖의 범위에서의 활성은 낮았다. 이런 *Klebsiella* sp. Sc에서 생



Fig. 4. Amino acid alignment of other bacterial β -xylosidases. The amino acid residues that seems to be essential for β -xylosidase activity are marked by asterisk (*).

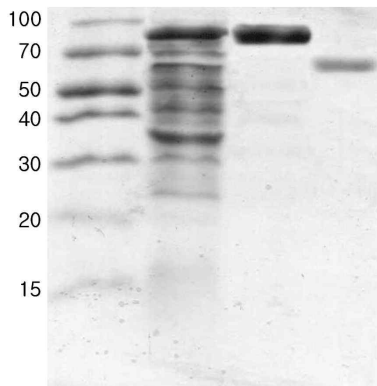


Fig. 5. Purification of β -xylosidase from the GST fusion protein. Lane 1, marker proteins; 2, soluble fraction; 3, GST-xylosidase fusion protein; 4, purified protein digested by PreScission Protease.

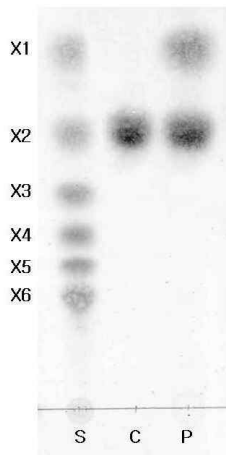


Fig. 6. TLC of hydrolysis products by β -xylosidase. Lane S, standard xylan oligosaccharides from xylose (X1) to xylohexose (X6); Lane C, control (xylobiose); Lane P, reaction products.

산된 β -xylosidase의 최적 pH와 온도 활성은 다른 세균성 β -xylosidase 들과 유사한 경향을 나타내었다[12,16]. 기질 특이성을 조사한 결과, birchwood xylan을 분해하는 활성을 100%로 보았을 때, laminarin에 대해서는 30%, lichenan에 대해서는 20%, CMC에 대해서는 10% 정도의 활성을 가지며 soluble starch에 대해서는 분해활성을 가지지 못하는 것으로 관찰되었다. TLC를 통하여 *Klebsiella* sp. Sc의 β -xylosidase가 생산하는 분해 산물의 형태를 확인한 결과, xylobiose를 기질로 이용하여 xylose를 생산함을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

감사의 말

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(한국연구재단-2009-351-F00009). 본 논문의 저자는 교육과학기술부 21C 프론티

어 미생물유전체활용기술개발사업의 지원으로 연구과제를 수행하고 있습니다. 본 논문에 서술된 내용의 일부는 상기 사업에서 지원받아 수행한 연구결과이며 이에 감사드립니다.

References

- Biely, P. Microbial xylanolytic systems. 1985. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290.
- Blattmer, F. R., G. Plunkett, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
- Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich, and A. Sorokin. 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* **11**, 731-753.
- Bourne, Y. and B. Henrissat. 2001. Glycoside hydrolases and glycosyltransferase: families and functional modules. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 593-600.
- Eriksson, K. E., R. A. Blanchette, and P. Ander. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1993. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.* **193**, 781-788.
- Henrissat, B. and A. Bairoch. 1996. Updating the sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Biochem J.* **316**, 695-696.
- Henrissat, B. and G. Davies. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 637-644.
- Herrmann, M. C., M. Vrsanka, M. Jurickova, J. Hirsch, and C. P. Kubicek. 1997. *Biochem J.* **321**, 375-381.
- Qian, Y., L. P. Yomano, J. F. Preston, H. C. Aldrich, and L. O. Ingram. 2003. Cloning, characterization, and functional expression of the *Klebsiella oxytoca* xylodextrin utilization operon (*xynTB*) in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5957-5967.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- La Grange, D. C., I. S. Pretorius, and Y. H. van Zyl. 1997. Cloning of the *Bacillus pumilus* β -xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 262-266.
- Lee, Y. S., I. H. Park, Y. Zhou, K. K. Kim, S. L. Choi, and Y. L. Choi. 2008. Isolation of bacteria producing cell wall degrading enzyme and characterization of CMCase. *J. Life Sci.* **18**, 639-645.
- Miller, L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 208-218.
- Polizeli, M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim. 2005. Xylanase from fungi:

- properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 577-591.
16. Tuncer, M. 2000. Characterization of β -xylosidase and α -L-arabinofuranosidase activities from *Thermomonospora fusca* BD25. *Turk J. Biol.* **24**, 753-767.
17. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317.

초록 : *Klebsiella* sp. Sc가 생산하는 β -xylosidase의 분리, 정제 및 특성

이용석^{1,2} · 박인혜¹ · 안순철^{2*} · 최용락^{1*}

(¹동아대학교 생명공학과, ²부산대학교 의학전문대학원)

Klebsiella sp. Sc로부터 birchwood xylan을 분해하는 β -xylosidase를 분리하였다. 이 β -xylosidase는 63 kDa의 분자량을 가지는 559개의 아미노산을 암호화하며 1,680개의 뉴클레오타이드로 구성 되는 것으로 밝혀졌다. 기존에 밝혀진 세균성 β -xylosidase와 상동성을 비교해 보았을 때, *Klebsiella oxytoca* (KOX)와 90% identities와 95% positives를 나타내었으며 *Lactobacillus lactis* (LAC, 82%, 90%), *Bacillus longum* (BLON, 69%, 81%) 그리고 *Escherichia coli* (ECOLI, 47%, 63%)를 나타내었다. 분리된 β -xylosidase는 GST-fusion 정제 시스템을 이용하여 순수 정제하였다. 이 효소 활성의 최적 pH는 6.6이었으면 최적 온도는 55°C였다. TLC를 통해 효소 분해 산물을 관찰한 결과, xylobiose를 분해하여 xylose를 생산하는 것을 관찰 할 수 있었다.