

Bacillus subtilis 유래 재조합 endoxylanase를 이용한 xylooligosaccharide의 최적 생산김연희¹ · 허선연² · 김미진³ · 이재형³ · 김영민⁴ · 남수완^{1,3*}¹동의대학교 생명공학과, ²한국생명공학연구원 분자생물공정연구센터, ³동의대학교 바이오물질제어학과, ⁴동의대학교 식품영양학과

Received November 14, 2007 / Accepted January 17, 2008

Optimal Production of Xylooligosaccharide by Using Recombinant Endoxylanase from *Bacillus subtilis*. Yeon-Hee Kim¹, Sun-Yeon Heo², Mi-Jin Kim³, Jae Hyung Lee³, Young-Man Kim⁴ and Soo-Wan Nam^{1,3*}. ¹Dept. Biotechnology & Bioengineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ²Molecular Bioprocess Research Center, KRIBB, Jeongup, 580-185, Korea, ³Dept. Biomaterial Control, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ⁴Dept. Food Science & Nutrition, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea - Xylan is a major hemicellulose component of the cell walls of monocots and hardwood, representing up to 30% of the dry weight of these plants. To efficiently hydrolyze xylan, the endoxylanase gene from *Bacillus* sp. was expressed in *B. subtilis* DB431 by introducing the plasmid pJHKJ4. The total activity of the recombinant endoxylanase reached about 857 unit/ml by batch fermentation of *B. subtilis* DB431/pJHKJ4 in LB maltose medium. The majority (>92%) of endoxylanase was efficiently secreted into the culture medium. The recombinant endoxylanase hydrolyzed more the birchwood xylan efficiently than the other xylans. When 4% concentration of xylan was used, the highest production of xylooligosaccharide was observed, and xylobiose and xylotriose were the major products. Optimal amount of enzyme and reaction time for producing xylooligosaccharide were found to be 10 unit and 1 hr, respectively. In addition, the temperature of 40°C~50°C gave the highest production of xylooligosaccharide. Consequently, the optimized conditions for the production of xylooligosaccharide through the hydrolysis of xylan were determined as follows: 10 unit endoxylanase, 50°C, 4% birchwood xylan, 1 hr reaction.

Key words : *Bacillus subtilis*, endoxylanase, optimization, xylan, xylooligosaccharide

서 론

식물체의 구성성분은 크게 cellulose, hemicellulose, lignin 등으로 나눌 수 있는데, 그 중 hemicellulose는 cellulose 다음으로 풍부한 탄수화물로 연간 약 450억 톤이 생산되고 있지만 아직 산업적으로 거의 활용이 되고 있지 않다. 특히 hemicellulose의 대부분을 차지하는 xylan은 농산 폐기물 또는 목재 성분의 약 30%를 차지하여 cellulose 다음으로 자연계에 풍부한 자원물질이다. Xylan은 xylose의 β -D-1,4 사슬결합으로 이루어진 고분자 물질로서 xylan의 가수분해에는 endo- β -1,4-xylanase, β -D-xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase, acetyl xylan esterase 등 여러 효소들의 상호작용이 필요하다[3,4,9,24,26]. 이 중 xylanase는 미생물이 생산하는 다양한 효소 중의 하나로써, 현재 그 이용성이 매우 높으며 앞으로도 다양한 용도로 개발될 것으로 기대되는 효소이다. 이 효소의 이용 가능성으로써 가장 중요한 것은 지구상에서 가장 풍부하고 태양에너지에 의해 재생 가능한 생물자원인 식물성 섬유물질을 분해·당화하여 에너지 자원화하는 것이지만, 현재 실용화되고 있는 것은 고급용지의 생산

(biobleaching) [2,22,23] 및 폐지재생[1,17,25], 과일음료 및 맥주의 혼탁물 제거, 커피와 식물성 기름 및 전분의 추출, 그리고 xylooligosaccharide 생산 등과 같은 산업적 응용을 들 수 있다. 최근 들어서는 ethanol생산에의 응용[21], 사료 첨가용 효소와 xylooligosaccharide의 생산효소로서 xylanase의 유용성이 증대되고 있다. 그러나, 아직까지 천연자원인 xylan의 활용은 본격화되지 못하고 있으며, xylose 및 xylose 유래 당화합물 등의 생물공학적 산물을 대량생산하려는 복합적인 연구(유전공학 및 생물화학공학의 접목)도 미비한 실정이다. 특히, xylan을 분해하는 화학적 분해법은 고온, 고압 또는 강산, 강알칼리 조건하에서 이루어지기 때문에 xylanase를 이용하는 효소적 분해법에 비해 경제성이 떨어지며, 부반응에 의한 부산물의 생산 및 그에 따른 부산물 제거문제, 분해 반응 후의 폐기물 양산에 따른 환경 오염문제 등 많은 문제점을 가지고 있다. 따라서, 이러한 문제를 해결하고 농산 부산물인 biomass (xylan)를 고부가가치 유용물질로의 전환, 심각해지는 자원난의 해결책 등으로 효소적 분해법의 개발이 필요하다. 또한 화학적 분해법의 문제점 해결을 위한 내열성 및 내알칼리성 xylanase의 발현 및 생산도 보고되어지고 있다[5,12].

Xylooligosaccharide은 xylose가 2개에서 5개 정도로 결합된 것의 혼합물로서 은화감미를 갖는 시럽 또는 분말상 물질이며 *Bifidus*, *Lactobacillus* 등과 같은 장내 유용미생물을 선택

***Corresponding author**

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

E-mail : swnam@deu.ac.kr

적으로 증식시킴으로서 장기능을 개선시키는 기능성 식품소재이다. 특히 식품분야에 사용하는 xylooligosaccharide 중 2당류(xylobiose), 3당류(xylotriose)가 장내 유용 미생물 증식에 가장 효과적이며[7,18,19], 그 효과가 다른 올리고당보다 뛰어나 식품 외에도 의약품, 사료 및 농업분야를 포함하는 다양한 분야에서 매우 유용하게 사용할 수 있다. 따라서 xylan의 생물학적 분해기술은 그 분해산물인 xylose, xylooligosaccharide, 대체 감미료 xylitol 등의 생산 기술로 연계되기 때문에 산업적 응용가치가 매우 크다.

현재 국내의 유전자 재조합 기술에 의해 xylanase 생산 *Bacillus* 균주 개발을 수행한 바는 있으나, 수십 리터의 대규모에서 효소 생산, xylan 분해 및 xylooligosaccharide 생산 연구는 거의 진행되고 있지 않고 있다. 또한 효소생산을 위한 고역가 재조합 균주의 개발이나 발효 최적화에 대한 연구는 최근 수년 간 그 기술이 급속도로 증진되어 일반화되었으나 아직까지 국내에서 산업화 효소 생산에 적용한 예는 많지 않은 실정이므로 결과적으로 xylanase 효소의 과발현 및 대량생산 연구가 절실히 요구된다. 이러한 측면에서 xylan을 이용한 유용하고 새로운 xylooligosaccharide 개발은 필수적이며, 산업적으로 활용 가능한 xylan 분해효소(endoxylanase) 생산능이 우수한 재조합 균주를 통한 효소의 대량 공정기술의 확립이 필요하다. 이에 본 연구에서는, 재조합 *Bacillus* 균주의 유가배양을 통해 endoxylanase를 대량생산하여 기능성 식품소재인 xylooligosaccharide의 최적 생산조건을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주, plasmid 및 형질전환

재조합 endoxylanase 발현을 위한 숙주세포로 *Bacillus subtilis* DB431 (*trpC apr npr epr bpr*)를 사용하였으며, plasmid 증폭을 위한 *E. coli* 숙주세포로는 DH5 α 를 사용하였다. *Bacillus* sp. 유래의 endoxylanase 유전자(639 bp) 발현은 강력한 구성적 P_{JH} promoter와 endoxylanase 유전자 자체 promoter (P_B)에 의해 조절되는 pJHKJ4 plasmid [10,13]를 사용하였고, Contente와 Dubnau법[6]을 사용하여 *B. subtilis* DB431에 형질전환을 실시했다.

회분, 유가배양의 배지 및 배양조건

pJHKJ4 plasmid를 함유하는 *B. subtilis* DB431의 배양은 LB 배지(0.5% Bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, 1% Bacto-tryptone)에 2% maltose를 첨가한 LBM 배지를 사용하였다. 재조합 *Bacillus* 균주의 전배양은 LB 배지로 하였으며 플라스크 배양 및 발효 배양 시 접종량은 1~5% (v/v)로 하였다. 플라스크 배양에서는 500 ml baffled flask (working volume: 50 ml)로 37°C, 170 rpm에서 수행하였으며, 발효조

(KoBiotech Co., Korea) 회분배양은 LBM 배지에서 다음 조건하에서 수행하였다: working volume, 2.0 l; 온도, 37°C; 초기 pH, 7.0, 교반속도, 300~800 rpm; 통기속도, 2~4 vvm. 간헐적 유가배양에서는 LB 배지로 5~6 시간 회분배양 후 농축배지(10% Bacto-yeast extract, 20% dextrose)를 50 ml 씩 4번 나누어 공급하였다. 초기 배양액 부피는 1.0 l, 통기속도는 2 vvm, 교반속도는 300~800 rpm (DO 30%), pH 7.0 등의 조건으로 유가배양하였다.

균체농도, 잔존환원당 및 plasmid 안정성

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 비율로 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD₆₀₀)로 측정하였다. 배양액을 3,000×g에서 5분 동안 원심분리한 후 배양 상등액을 얻고, dinitrosalicylic acid 방법[15]을 사용하여 잔존환원당 농도를 측정하였다. Plasmid 안정성은 배양액을 LB 평판배지에 도말한 후 자란 colony를 kanamycin (10 µg/ml)이 함유된 LB 배지에서 toothpicking한 다음 형성된 colony수의 비(백분율)로 측정하였다.

균체 분획 및 endoxylanase 활성 측정

균체 침전물을 Zymolyase 100T (Seikagaku Kogyo, Japan)과 glass beads (0.4-0.5 mm), lysozyme (Sigma, USA)을 사용하여 cell lysate 분획을 얻어[16], 이들 분획과 배양 상등액을 사용하여 각 분획에서의 endoxylanase 활성을 측정하였다. Endoxylanase의 활성은 DNS법[15]을 이용하여 1% oat speltis xylan을 기질로 사용하여 pH 6.5 (0.1 M 인산 완충액), 60°C에서 분당 1 µmol의 환원당(xylose equivalent)을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 각 효소들의 분비효율(secretion efficiency)은 전체 효소활성에 대한 균체 외 효소 활성비를 백분율로 나타내었다. 단백질 정량은 Bradford법으로 정량하였다.

조효소액의 조제

재조합 *Bacillus* 균주를 LBM 배지를 사용하여 2 l 발효조에 24시간 동안 회분배양하여 배양 상등액을 70% ammonium sulfate로 염석하여 단백질을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전시킨 후 침전을 적당량의 20 mM phosphate buffer (pH 6.0)에 녹이고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 불용성 침전을 제거한 다음 20 mM phosphate buffer (pH 6.0)로 4°C에서 24시간 투석하였다. 투석액을 ultrafiltration membrane (MW cut-off=10,000, Millipore, Bedford, MA, U.S.A.)을 이용하여 농축시켰다.

뜸밥과 옥수수수심으로부터 xylan 추출

효소의 기질이 되는 xylan를 추출하기 위해 쉽게 구할 수

있는 톱밥 20 g을 15 N NaOH 수용액 200 ml에 각각 혼합하여 80°C에서 8시간 동안 반응시킨 후 이를 원심분리 하여 잔류물을 80°C 온수 100 ml로 3회 세척한 후 여액을 35% HCl로 pH 4.5가 되도록 조정하였다. 이 여액에 2배의 에탄올을 첨가하여 10분간 교반한 후 여과포로 여과하여 잔류물을 100 ml 온수로 세척하고 50°C drying oven에서 12시간 건조하여 중량을 측정하였다. 옥수수시(20 g)의 경우도 톱밥과 같은 조건으로 처리하여 여액을 모았다. 이 여과액을 35% HCl로 pH 6.0으로 중화시킨 후 에탄올을 1 l 첨가하여 10분간 교반한 후 거름종이에 여과하여, 여과된 잔류물을 50°C에서 12시간 건조시켜 중량을 측정하였다.

TLC 및 HPLC 분석

Endoxylanase에 의해 가수분해된 xylan을 thin layer chromatography (TLC)와 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 분석하였다. 효소반응 생성물의 정성분석은 TLC를 이용하여 분석하였다. 효소반응은 250 ml 플라스크에 30 ml 2~8% oat speltis xylan, birchwood xylan, corncob xylan과 20 mM phosphate buffer (pH 6.0), enzyme solution (2.5~25 unit/ml)을 total 60 ml이 되도록 첨가한 후 40~70°C에서 반응 시켰다. 반응액은 5분간 열처리 후 각각의 반응액을 5 µl씩을 TLC plate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에 점적한 후 chloroform-acetic acid-water (6:7:1)을 전개용매로 3회 전개하였다. 생성물은 ethanol-sulfuric acid (95:5) spray로 100°C에서 5분간 발색하였다. Xylan 가수분해 후 생성된 xylooligosaccharide의 정량 분석은 carbohydrate analysis column (Waters)이 장착된 HPLC (Alliance 2690, Waters, Milford, MA, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 1 ml의 효소 반응액을 membrane filter (ADVANTEC MFS, Inc., Japan)을 이용하여 여과하여 불용성 물질을 제거하였다. 효소 반응액은 100°C에서 5분간 가열하여 정지시킨 후 evaporator (Bioneer, Taejon, Korea)를 이용하여 농축시켜 pellet을 증류수 100 µl에 현탁시켰다. 이동상으로는 75% acetonitrile을 사용하였고, column의 온도는 25°C, 유속은 분당 1.2 ml로 하여 주입량은 10 µl로 하였다. Standard로는 xylose (Sigma, St. Louis, U.S.A.), xylobiose와 xylotriose (Megazyme, Ireland)를 사용하였다.

결과 및 고찰

재조합 *Bacillus*의 발효조 회분배양 및 유가배양에서의 균체 증식과 endoxylanase 발현

재조합 균주 *B. subtilis* DB431/pJHKJ4를 이용한 플라스크 배양을 통해 탄소원인 glucose, maltose와 질소원인 yeast extract에서의 균체증식과 재조합 endoxylanase의 활성이 높은 최적 조건을 찾아보았다. 탄소원의 농도를 0.5~5%로 했

을 때 2%의 농도에서 glucose는 가장 높은 활성 166 unit/ml를 보였으며, maltose의 경우도 180 unit/ml로 나타났다. 질소원인 yeast extract의 경우 농도가 높을수록 균체증식과 활성이 높게 나왔으나, 1%의 yeast extract를 사용하였을 때 가장 높은 specific activity (29.8 unit/ml/OD₆₆₀)를 얻을 수 있었다. 따라서 회분배양시 배지로는 2% maltose, 1% yeast extract를 사용하기로 했다(data not shown).

실제로 *Bacillus*에 재조합된 endoxylanase를 LBM 배지에서 30시간 회분배양하여 균체증식, 균체내의 endoxylanase 활성, plasmid stability 등을 조사하였다(Fig. 1A). 2% maltose 함유 배지에서 12시간까지 균체증식은 활발했으며, endoxylanase 발현은 3시간째부터 서서히 발현되기 시작하여 배양 말기에 최대 활성 780 unit/ml로 나타났다. 세포내 활성은 70 unit/ml로 endoxylanase는 대부분 세포밖으로 분비됨을 알 수 있었다. 8시간까지의 비증식속도(μ)는 약 1.329 h⁻¹로 나타났고 배양 8시간 이후의 2차 증식기에서는 비증식속도가 0.08 h⁻¹로 크게 감소하였다. 공급해준 탄소원인 maltose의 소모양상은 서서히 소모하기 시작하여 배양말기에는 maltose를 거의 다 소모하였다. *B. subtilis* DB104에 재조합된

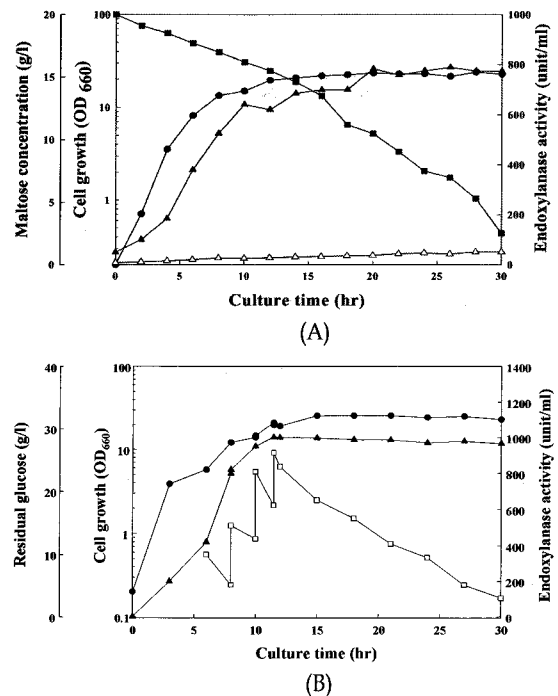


Fig. 1. Time profiles of cell growth, maltose and glucose consumption, and endoxylanase expression by batch culture on LBM medium (A) and intermittent fed-batch culture (B) of *B. subtilis* DB431 harboring pJHKJ4. Each feeding medium (50 ml) was consisted of 10% yeast extract and 20% glucose. Symbols: (●), cell growth; (■), residual maltose; (□), residual glucose; (▲), extracellular endoxylanase activity; (△), intracellular endoxylanase activity

endoxylanase가 같은 조건에서 배양 시 탄소원인 maltose를 절반밖에 소모하지 못한 결과에 비추어 볼 때[10], *B. subtilis* DB431에 재조합된 endoxylanase는 소모속도는 느리지만 거의 다 소모하였다. 또한, plasmid stability는 배양 말기에 접어들어도 90% 이상 안정하게 유지되었다.

이상의 플라스크와 발효조 회분배양의 결과로부터, 값싼 기질인 포도당을 이용하여 유가배양을 실시하였다(Fig. 1B). 초기에는 LB에 배양하다가 균체증식이 활발한 대수증식기 초반부터 20% glucose와 10% yeast extract 농축배지 50 ml을 매 2시간 간격으로 4번 50 ml을 대수 증식기 후반까지 4회 공급하였다. 포도당 소모 구간에서 균체증식은 활발히 일어나며 LBM배지에서의 회분배양과 비교해 보면 균체증식은 회분배양보다 2배 정도 증가함을 알 수 있었다. endoxylanase 발현은 3시간째부터 서서히 발현되기 시작하여 배양 12시간째 최대 활성 1,000 unit/ml로 나타났으며 이때의 단백질량은 846 mg/l로 나타났다. 회분배양에서는 8시간까지 균체증식이 활발히 일어나다가 그 이후에는 거의 유지함을 확인할 수 있었으며, 유가배양에서는 기질공급을 해준 15시간까지 계속 증가하다가 그 후에는 거의 유지됨을 알 수 있었다.

효소농도와 기질에 따른 xylooligosaccharide의 생산

효소농도에 따른 xylooligosaccharide의 조성 변화를 조사하기 위해서 농축된 endoxylanase 조효소액을 2.5, 5, 10 및 25 unit로 2% birchwood xylan, corncob xylan, oat speltz xylan 용액과 50°C에서 12시간까지 반응시켰다. 이 반응액의 생성물을 TLC로 분석한 결과를 Fig. 2 (birchwood xylan의

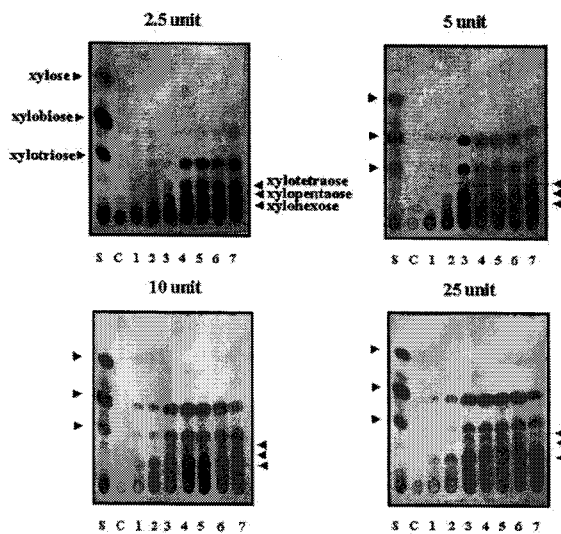


Fig. 2. The effect of enzyme amount (2.5-25 units) on birchwood xylan hydrolysis by recombinant endoxylanase. S, standard; C, xylan without enzyme. Reaction time: lane 1, 10 min; lane 2, 30 min; lane 3, 1 hr; lane 4, 2 hr; lane 5, 4 hr; lane 6, 8 hr; lane 7, 12 hr

경우)에 나타내었는데, 3가지 종류의 xylan기질에서의 xylooligosaccharide 생성양상은 비슷함을 알 수 있었다(data not shown). 즉, 2.5 unit 첨가 시 반응 30분 후에 xylotriose가 생성되었으며 반응 2시간 후에는 xylobiose가 생성됨을 확인할 수 있었다. 10 unit 이상의 효소량 첨가 시 반응 10분째 xylobiose, xylotriose를 관찰할 수 있었으며 반응 1시간째는 대부분의 반응이 다 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 10 unit의 효소를 첨가시켰을 때 가장 많은 xylooligosaccharide을 얻을 수 있었으며 그 이상의 효소량을 첨가시켰을 때에는 분해되는 속도가 빨랐으며 적은 양이지만 xylose도 생성됨을 확인할 수 있었는데 이런 결과는 xylooligosaccharide 생산 시에는 적합하지 않음을 나타낸다. 또한 위의 실험결과로부터 *B. subtilis* endoxylanase의 xylan 종류에 따른 분해정도도 조사할 수 있었는데, endoxylanase 효소액 10 unit를 기준으로 비교해 보았을 때, 3가지 기질 모두에서 xylobiose, xylotriose가 주 생성물이었으며, 이 중 birchwood xylan에서 가장 많은 xylobiose, xylotriose가 생산됨을 알 수 있었다. 따라서 xylooligosaccharide 생산을 위한 최적 효소농도는 10 unit이고, 반응시간은 1시간으로 충분하며 기질로서는 birchwood xylan이 적합함을 알 수 있었다.

반응온도에 따른 xylooligosaccharide 생산

Xylan을 *Bacillus* endoxylanase로 가수분해 시 반응온도에 따라 생성된 xylooligosaccharide의 조성 변화를 조사하기 위해 HPLC를 행하였다(Fig. 3). 농축된 10 unit xylanase를 함유하고 있는 2% birchwood xylan 용액을 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 1시간 반응시켰다. 각 온도에서 xylobiose가 xylotriose보다 많이 생성되는 패턴은 비슷하였지만 60°C이상이면 반응생성물인 xylobiose, xylotriose는 감소함을 알 수 있는데 이는 endoxylanase 최적온도는 60°C이지만 이 온도에서는 낮은 열안정성으로 인해 생성물 감소가 나타나는 것

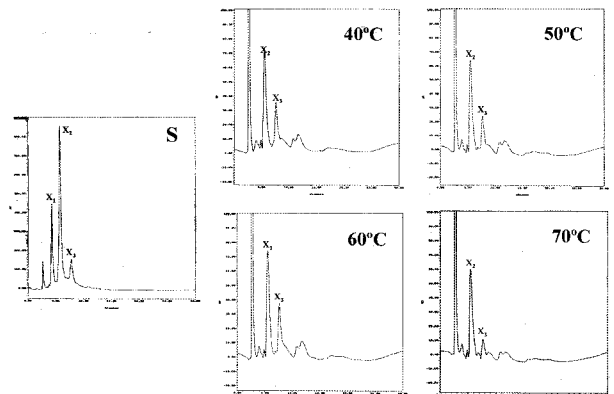


Fig. 3. The effect of reaction temperature (40-70°C) on birchwood xylan hydrolysis by recombinant endoxylanase. The amount of 10 units of endoxylanase reacted for 1 hr. S indicates standard.

으로 판단된다[14]. 주 생성산물인 xylobiose, xylotriose의 xylooligosaccharide은 장내세균 중의 *Bifidus*균의 증식을 촉진하는 탁월한 효과를 가지고 있다[20]. 따라서 xylooligosaccharide 생산시에는 endoxylanase 최적 반응온도 60°C가 아닌 그보다 낮은 40°C와 50°C에서 반응시키는 것이 적합하다고 판단된다. 또한 효모에서 발현된 재조합 endoxylanase의 경우 온도의 영향을 크게 받지 않고 xylobiose, xylotriose가 생성되는 것과 비교해볼 때(data not shown), *Bacillus*에서 발현된 endoxylanase의 경우 xylooligosaccharide 생산 시 온도에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었고 xylobiose의 생성율이 xylotriose보다 우세함을 알 수 있었다.

기질농도에 따른 xylooligosaccharide 생산

최적의 xylan 농도를 결정하기 위해 birchwood xylan (2~8%)과 endoxylanase 10 unit를 50°C에서 10분~12시간 반응시켰다. 이 반응생성물을 TLC로 분석한 결과, 기질농도가 높아짐에 따라 가수분해 되는 속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었는데, birchwood xylan을 4% 사용하였을 때 반응 시간에 비해 가장 많은 xylooligosaccharide을 생성했고, 주 생성물인 xylobiose와 xylotriose도 반응 10분부터 생성됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 또한 반응시간에 따른 환원당 (xylose equivalent)정량의 결과에서도 4% xylan을 사용했을 때 분해속도가 가장 빠르다는 것을 알 수 있었다. 같은 효소 농도를 사용했을 때, 기질의 농도가 낮은 2% xylan에서는 환원당 양의 저하가 관찰되었고, 고농도 xylan (6%와 8%)의 경우에는 기질 농도가 높아짐에 따른 가수분해 속도의 저하가 일어났을 것으로 생각된다. *E. coli*에서 발현된 *Bacillus sp.* endoxylanase의 경우 2% oat speltis xylan (w/v)을 40°C에서 10시간 반응시켰을 때 1시간 후에 주생성물인 xylobiose가 생성됨을 볼 수 있었는데[11], 본 연구에서의 xylan 가수분해 시스템에서는 더 높은 기질농도를 사용하여 반응시켰을 때 가수분해 속도가 더 빠름을 알 수 있었다.

요 약

식물체 구성성분의 하나인 hemicellulose의 대부분을 차지하는 xylan은 농산 폐기물 또는 목재 성분의 약 30%를 차지하는 풍부한 자원물질이다. 이러한 xylan을 효과적으로 분해하기 위해 *Bacillus*에서 발현시킨 재조합 endoxylanase를 이용하여 기능성 식품소재인 xylooligosaccharide의 최적 생산 조건을 조사하였다. *B. subtilis* 재조합 균주 DB431/pJHKJ4를 이용한 발효조 최적배양 결과, endoxylanase의 총 활성은 857 unit/ml이며, 대부분이 세포밖으로 분비됨을 알 수 있었고, 분비효율은 92%로 나타났다. 재조합 endoxylanase를 이용하여 xylan으로부터 xylooligosaccharide 생성을 위한 최적 반응조건을 검토한 결과, xylooligosaccharide

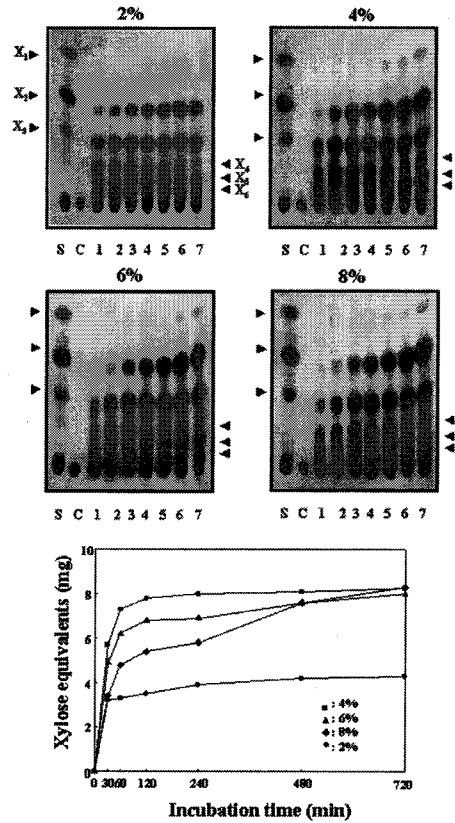


Fig. 4. The effect of birchwood xylan concentration (2-8%) on xylan hydrolysis by recombinant endoxylanase. The amount of 10 unit of endoxylanase reacted at 50°C. At each time point reducing sugar (xylose equivalent) release was quantitated by DNS method, and the values were plotted against the incubation times. S, standard; C, xylan without enzymes. Reaction time: lane 1, 10 min; lane 2, 30 min; lane 3, 1 hr; lane 4, 2 hr; lane 5, 4 hr; lane 6, 8 hr; lane 7, 12 hr. X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, and X₆ indicate xylose, xylobiose, xylotriose, xylo-tetraose, xylo-pentaose, and xylo-hexose, respectively.

생산을 위한 기질로는 birchwood xylan이 적합함을 알 수 있었고, 4%의 xylan 농도에서 가장 많은 xylooligosaccharide을 생산하며, xylobiose와 xylotriose가 주생성물임을 알았다. 효소의 농도와 반응시간의 영향은 10 unit의 endoxylanase를 첨가하여 1시간 반응시켰을 때 가장 많은 양의 xylooligosaccharide을 생산할 수 있었고, 반응온도는 40~50°C가 적합함을 알았다. 결론적으로 재조합 endoxylanase를 이용한 xylooligosaccharide생성에는 10 unit endoxylanase과 4% birchwood xylan을 기질로 이용하여 50°C에서 1시간 반응시키는 것이 최적반응 조건임을 알았다.

감사의 글

본 연구는 동의대학교 2005년 일반 연구과제 지원에 의하

여 이루어졌으며, 이 연구에 참여한 김미진과 이재형은 교육부의 2단계 BK21 사업의 지원을 받았습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

References

- Bajpai, P. 1999. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* **15**, 147-157.
- Beg. Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan and G. S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 326-338.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**, 286-290.
- Chun, Y. C., K. H. Jung, J. C. Lee, S. H. Park, H. K. Chung and K. H. Yoon. 1998. Molecular cloning and the nucleotide sequence of a *Bacillus* sp. KK-1 β -xylosidase gene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 28-33.
- Choi, J. H., O. S. Lee, J. H. Shin, Y. Y. Kwak, Y. M. Kim and I. K. Rhee. 2006. Thermostable xylanase encoded by xynA of *Streptomyces thermocyanoeviolaceus*: cloning, purification, characterization and production of xylooligosaccharides. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 57-63.
- Contente, S. and D. Dubnau. 1979. Characterization of plasmid transformation in *Bacillus subtilis*: kinetic properties and the effect of DNA conformation. *Mol. Gen. Genet.* **167**, 251-258.
- Degnan, B. A. and G. T. Macfarlane. 1991. Comparison of carbohydrate substrate preferences in eight species of *Bifidobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**, 151-156.
- Gupta, N., V. S. Reddy, S. Maiti and A. Ghosh. 2000. Cloning, expression, and sequence analysis of the gene encoding the alkali-stable, thermostable endoxylanase from alkalophilic, mesophilic *Bacillus* sp. Strain NG-27. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 2631-2635.
- 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.
- Jeong, K. J., I. Y. Park, M. S. Kim and S. C. Kim. 1998. High-level expression of an endoxylanase gene from *Bacillus* sp. in *Bacillus subtilis* DB104 for the production of xylobiose from xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 113-118.
- Jeong, K. J., P. C. Lee, I. Y. Park, M. S. Kim and S. C. Kim. 1998. Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus* sp. in *Escherichia coli*. *Enz. Microb. Technol.* **22**, 599-605.
- Johnvesly. B., S. Virupakshi, G. N. Patil, Ramalingam and G. R. Naik. 2002. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 153-156.
- Kim, J. H., J. H. Kim, S. C. Kim and S. W. Nam. 2000. Constitutive overexpression of endoxylanase gene in *Bacillus subtilis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 551-553.
- Lee, J. J. 1995. Characterization of an endoxylanase produced by isolated *Bacillus* sp. M. S. Thesis, KAIST, Taejeon, KOREA.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Neu, H. C. and L. A. Heppel. 1965. The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplast. *J. Biol. Chem.* **240**, 3685-3692.
- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler and G. Antranikian. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 711-729.
- Okazaki, M., S. Fujikawa and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharides on growth of *Bifidobacterium*. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **43**, 395-401.
- Petschow, B. W. and R. D. Talbott. 1990. Growth promotion of *Bifidobacterium* species by whey and casein fractions from human and bovine milk. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 287-292.
- Reilly, P. J. 1981. Xylanase: structure and function. *Basic Life Sci.* **18**, 111-129.
- Saha. B. C. and M. A. Cotta. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol. Prog.* **22**, 449-453.
- Srinivasan, M. C. and M. V. Rele. 1999. Microbial xylanases for paper industry. *Curr. Sci.* **77**, 137-142.
- Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sandquist and M. Linco. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 338-350.
- Whistler, R. L. and E. L. Richard. 1970. Hemicellulose. pp. 447-469, Pigman W, Horton D (eds), The carbohydrates. Academic Press, New York.
- Wong, K. K. Y., S. L. Nelson, and J. N. Saddler. 1996. Xylanase treatment for the peroxide bleaching of oxygen delignified kraft pulps derived from three softwood species. *J. Biotechnol.* **48**, 137-145.
- Wong, K. K. Y., U. L. Larry and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganism: functions and applications. *Microbiol. Rev.* **52**, 305-317.