

## Xylose 발효효모의 Xylanase 생성

배명애<sup>1</sup>·김남순<sup>1</sup>·방병호<sup>2</sup>·서정훈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경북대학교 자연과학대학 미생물학과 <sup>2</sup>서울보건전문대학 식품영양학과

### Nutritional Conditions of Xylanase Production from Xylose Fermenting Yeast

Bae, Myung-Ae<sup>1</sup>, Nam-Soon Kim<sup>2</sup>, Byung-Ho Bang<sup>2</sup> and Jung-Hwn Seu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Nutrition, Seoul Health Junior College, Seoul, Korea

Cultural conditions for the formation of extracellular xylanase by *Candida* sp. X-6-41 were investigated. The xylanase was not produced in culture medium containing polypeptone or yeast extract as a nitrogen source, respectively, whereas the enzyme was produced in chemically defined medium containing  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as a sole nitrogen source. The xylanase production was affected by the amino acids such as isoleucine and tryptophan. The enzyme production of the strain was completely inhibited by the addition of isoleucine in the culture medium, but enhanced by tryptophan below the concentration of  $25\mu\text{g/ml}$ .

Xylose 발효능이 있는 *Candida* 속의 균주들에 대해서는 이미 많이 연구된 바 있으나 현재까지 xylose 발효효모가 xylanase 를 생성한다는 결과는 아직 보고된 바가 없었다(1, 2). 한편, biomass 를 기질로 한 alcohol 발효효모의 개발을 위해서 본 연구실에서는 토양에서 분리한 xylose 발효효모 X-6-41 (*Candida* sp.) 균주의 발효능 등을 전보에서 보고하였다(3). 이 X-6-41 균주의 생리실험 과정에서 본 균주는 원래 xylose 발효효모였으나 배양조건에 따라서는 xylanase 도 생성할 수 있다는 특이한 생리적 현상을 발견하였다.

본 연구에 있어서는 이 점에 대해서 몇가지 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

#### 재료 및 방법

##### 공시균주

본 실험에 사용한 균주는 대구근교 토양에서 분리한 xylose 발효효모인 X-6-41 (*Candida* sp.) 이었다.

##### 배지조성 및 배양

효모균주의 생육 및 효모생성용 배지의 조성은 Table 1 과 같으며 액체배양 조건은 30°C에서 10 일간 진탕배양(120 strokes/min) 하였다.

Table 1. Composition of medium for xylanase production by X-6-41

Composition	Chemically	XSD	XPM
	defined medium		
Xylan	10g	10g	10g
Yeast extract	—	—	1g
Polypeptone	—	—	2g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3g	2g	1g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1g	0.5 g	1g
$\text{CaCl}_2$	1g	—	1g
YNB w/o a.a.	—	2g	—

per liter in distilled water. Initial pH 7.0

Key words: Xylanase, yeast, xylose fermentation, isoleucine repression.

\*Corresponding author.

**Xylanase 활성 측정**

효모 배양액을 효소용액으로 하여 xylanase 활성을 측정하였다. 유기질소원이 첨가되지 않은 minimal medium을 사용하여 30°C에서 10일간 진탕배양한 후 원심분리하여 균체와 잔존 xylan을 제거한 배양상등액 0.5 ml을 효소용액으로 하여 여기에 1% xylan 현탁액 0.5 ml와 50 mM phosphate buffer (pH 6.0) 0.5 ml를 가하여 45°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액을 10분간 열처리하여 반응정지시킨 다음 원심분리한 후 그 반응 상등액중에 유리된 환원당을 Somogyi-Nelson의 환원당 정량법에 따라 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**배지조성에 따른 xylanase의 생성**

Xylose 발효효모 X-6-41 균주의 배지조성에 따른 xylanase 생성 확인은 일차로 X-6-41 균주를 tooth-picking 하여 colony를 생성시킨 agar plate 상에 congo-red를 도포하여 나타나는 clear zone의 생성 여부로 판정하였다. 그 결과 배지조성과는 관계없이 colony의 크기(생육도)는 비슷하였으나 clear zone의 생성은 XSD 배지와 chemically defined 배지상에서만 확인되었다. 위의 결과로 X-6-41 균주의 xylanase 생성에는 Table 1의 배지조성중 N원으로 추정되는 특정한 성분이 xylanase 생성에 영향을 미치는 것으로 추측되었으므로 다음 실험으로서 배지 조성중 nitrogen source만을 변화시켜 xylanase 생성을 살펴보았다.

**Xylanase 생성에 미치는 질소원의 영향**

Table 1과 같이 X-6-41 균주의 xylanase 생성에 미치는 질소원의 영향을 보기 위하여 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, yeast extract, yeast nitrogen base w/o a.a.를 각각 0.2% 농도로 첨가하여 이들의 xylanase 생성을 조사하였다. Table 2에 나타난 바

**Table 2. Effect of nitrogen sources on xylanase production by X-6-41 strain.**

Nitrogen sources	Relative activity
Yeast extract (XPM medium)*	—
YNB w/o a.a. (XSD medium)*	79
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (CMC medium)*	100

Cells were cultured in xylan minimal medium containing various nitrogen sources.

\* Refer to Table 1.

와 같이 ammonium sulfate을 질소원으로 첨가했을 경우 xylanase 활성이 가장 높았으며 yeast extract 첨가시에는 균체생육은 좋았으나 xylanase은 생성되지 않았다. 따라서 X-6-41 균주의 xylanase 생성에는 아미노산 level의 factor가 관여하는 것으로 추측되어 효소생성에 미치는 아미노산의 영향을 조사해 보았다.

**Xylanase 생성에 대한 아미노산의 영향**

Mackenzie(4) 등과 Rapp(5) 등에 따르면 유도 효소생성에 있어서는 탄소원이나 질소원이 유도 효소생성에 중요한 factor로 관여한다고 보고하였다. 따라서 X-6-41 균주의 xylanase 생성에 미치는 아미노산의 영향을 조사하기 위하여 xylan 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%와 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05% 배지에 영양요구 변이주의 영양요구물질 확인시 사용되는 auxanograph을 응용하여 xylanase 생

**Table 3. Effect of amino acid on xylanase production by X-6-41 strain.**

Nitrogen sources	Conc. of N sources	Relative activity
Basal medium		100
Yeast extract	0.2%	0
Polypeptone	0.2%	0
YNB w/o a.a.	0.2%	76
Histidine	25 µg/ml	81
Tryptophan	25 µg/ml	150
Isoleucine	10 µg/ml	0
Isoleucine	25 µg/ml	0

Basal medium; xylan 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%.

**Table 4. Effect of tryptophan concentration on the xylanase production by X-6-41 strain.**

Conc. of tryptophan (µg/ml)	Relative activity
0	100
25	171.8
50	31.6
75	43.0
100	28.0
150	35.4

The composition of xylan minimal medium; xylan 1%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%.

성에 영향을 미치는 아미노산을 1차적으로 조사해 보았다. 이중 tryptophan 과 isoleucine 첨가구 배지에서 xylanase 활성이 차이가나므로 다시 tryptophan, isoleucine 과 histidine 을 각각 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  씩 첨가하여 xylanase 활성을 비교해본 바 Table 3 과 같다. Yeast extract, polypeptone 과 isoleucine 첨가시에는 xylanase 생성이 전혀되지 않은 반면 tryptophan 첨가시는 오히려 xylanase 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

#### Xylanase 생성에 대한 tryptophan 최적농도 조사

X-6-41 균주의 xylanase 생성에 대한 여러 아미노산의 영향을 조사해본 바 isoleucine 에 의해서는 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서도 효소생성이 완전 억제되는 반면 tryptophan 첨가시는 오히려 효소생성이 activation 됨을 알았다. 따라서 xylanase 생성에 있어서 tryptophan 의 최적농도를 조사해본 결과 Table 4 에서 보는 바와 같이 ml 당 25  $\mu\text{g}$  농도에서 xylanase 활성이 최대에 도달함을 알았다. X-6-41 균주의 xylanase 생성에 미치는 tryptophan 과 isoleucine 의 영향이 xylanase 합성 level 에 관여하는지 아니면 효소분비 level 에서 영향을 미치는지에 대해서는 앞으로 연구할 계획에 있다.

#### 요 약

토양으로부터 분리한 xylose 발효효모 X-6-41

(*Candida* sp.)의 xylanase 효소생성 조건을 조사해본 결과, 본 실험에 사용한 X-6-41 균주는 배지조성 중 yeast extract 혹은 polypeptone 이 첨가되면 xylanase 효소생성이 없었다. 즉 특정 아미노산인 isoleucine 에 의해서는 그 생성이 억제되었고, tryptophan 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 존재하에서는 xylanase 생성이 증가했다.

#### 사 사

본 연구는 1987년도 한국과학재단 목적기초 연구비에 의해 수행되었다.

#### 참고문헌

1. Toivola, A., D. Yarrow and W. Alexander Schefers: *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(6), 1121 (1984).
2. Preez, J.C. and J.P. van der Walt: *Biotechnol. Lett.*, 5(5), 357 (1983).
3. Kim, N.S. and J.H. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, (in press.).
4. Roger, C., D.B. Henry and K.G. Johnson: *Appl. Environ. Microbiol.*, 2835 (1987).
5. Rapp, P. and F. Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, 746 (1986).

(Received October 13, 1988)