

*Bacillus stearothersophilus*에 의한 Xylanase 생산

송현숙 · 최용진*

고려대학교 농과대학 유전공학과

Production of Xylanase by *Bacillus stearothersophilus*

Song, Hyeon-Suk and Yong-Jin Choi*

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

A bacterial strain capable of producing high level of extracellular xylanase was isolated from soil. The characteristics of the isolated strain No.236 were identified to be *Bacillus stearothersophilus*. The maximal xylanase production was observed in the medium containing 0.75% xylan, 0.35% yeast extract, 1.06% K_2HPO_4 and 0.05% $CaCO_3$ with initial pH of 6.5 when the strain was cultured at 50°C for 28 hrs with reciprocal shaking. Hydrolysis of xylan by the xylanase revealed that xylose was the only product of the reaction. This suggested that the enzyme produced by *Bacillus stearothersophilus* No. 236 was an exo-acting xylanase.

인류가 직면하고 있는 에너지위기와 식량난의 효과적 해결을 위해 우리가 활용할 수 있는 중요 biomass 자원으로는 cellulose와 hemicellulose를 들 수 있겠다(1).

이 중 cellulose는 분포량이 가장 많을 뿐만 아니라 D-glucose만의 중합체 1,4-β-D-glucopyranoside로 이루어져 있어 지금까지 대부분의 관련 연구가 cellulose 분해이용에 집중되어 왔다(2, 3).

그러나 cellulose는 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 견고한 분자구조를 가지고 있어 많은 연구에도 불구하고 기대만큼의 성과를 얻지 못하고 있는 실정이다(4). 이에 비해 hemicellulose는 비록 그 분포량은 cellulose보다 다소 적지만 산, 알칼리에 의해 쉽게 추출, 분해될 수 있어 cellulose 못지않은 중요자원으로 평가되고 있다(5). Hemicellulose는 출처에 따라 구조가 매우 다양하지만 xylan이 전체 hemicellulose의 절반 이상을 차지하고 있다고 한다(6). Xylan은 1,4-β-D-xylopyranoside 결합의 기본탄소골격을 갖는 D-xylose의 중합체로서 최근에 와서 다양한 용도의 개발로 그 중요성이 점차 높아지고 있는 D-xylose의 훌륭한 공급원이 될 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 폐자원인 xylan을

적극 활용하여 D-xylose를 효율적으로 생산하고자 하는 연구는 매우 가치있는 과제라고 하겠다. 특히 화학적 분해법에 비해 큰 장점을 가지고 있는 효소 분해법의 개발은 효율적인 xylan 이용의 주요 관건이라고 하겠다. Xylan 분해효소인 xylanase는 각종 동식물과 미생물 등 자연계에 널리 분포되어 있으나 지금까지 보고되고 있는 미생물 xylanase는 거의 대부분이 endo-type의 효소로 알려지고 있다(7). 그러므로 exo-type xylanase 생산균주의 분리 및 균주 분리에 의한 효소의 대량생산은 endo-type xylanase와의 적절한 혼합이용을 가능케함으로써 xylan 효소 분해를 보다 효율화할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구자는 exo-type으로 판단되는 xylanase를 세포외로 다량 생산하는 균주를 분리 동정함과 동시에 효소생산 최적 배양조건을 검토하여 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 시약

본 연구에 사용한 균주는 주로 경기지방에서 채취한 토양시료로부터 분리한 xylan 분해 이용 균주 중

Key words: Identification, *Bacillus stearothersophilus*, exo-acting xylanase

*Corresponding author



Fig. 1. Electron photomicrograph of the strain No. 236.

에서 3차의 선별과정을 거쳐 최종 분리한 토양분리 균이다.

배지의 탄소원 및 효소기질로 사용한 xylan 은 oat spelts 에서 분리한 Sigma 사 제품이였다.

균주분리

멸균증류수 10 ml 에 약 1g 의 토양시료를 첨가하여 얻은 현탁액 0.3 ml 을 0.2% xylan 과 0.2% peptone 이 함유된 10 ml 의 56 buffer (8) 에 가하고 50°C 에서 36 시간 진탕배양 (110 rpm) 한 후 환원당을 측정, 당 생성량이 가장 높았던 한 균주를 최종 선별하였다.

균주 동정

최종 분리균의 동정은 Manual of methods for general bacteriology (9) 와 Bergey's manual of systematic bacteriology (10) 에 수록되어 있는 일반 세균 동정법에 따라 실시하였다.

당정량

시료 중의 환원당량은 DNS 변법 (11) 을 이용하여 측정하였다.

조효소액 조제 및 효소활성 측정

균주분리용 기본배지에서 50°C, 28 시간 진탕배양한 배양액을 원심분리 (4000 rpm 10 분) 하여 균체를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소활성은 0.5% xylan 용액 0.5 ml 에 조효소액 0.5 ml 를 첨가, 50°C 에서 30 분 반응시킨 후 생성 환원당을 측정하여 활성을 나타내었으며 이 때 효소 1 ml 가 1 분간 1 μ mole 의 xylose 를 생성하는 효소량을 1 unit 로 표시하였다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain No.236.

Factor	Characteristics
Type and size	rods/1.0×4.0 μ m
Gram staining	positive
Endospore	endospore forming
Flagella	peritrichous
Colonies on agar plate	circular entire convex
Oxygen requirement	positive
Catalase production	negative
Growth temperature	30 - 65 (°C)
Growth pH	>5.8
NaCl tolerance	<4%
H ₂ S production	negative
Acid from carbohydrates	positive
Starch hydrolysis	positive
Gelatin liquefaction	positive
Nitrate reduction	positive
Indole production	negative
Voges-Proskauer test	negative
Oxidase test	negative
Methyl red test	positive
Casein hydrolysis	negative
Citrate utilization	negative

Xylan의 가수분해

Ammonium sulfate 로 침전분리한 효소를 사용, 50°C 에서 xylan 을 분해하면서 시간별 분해생성물을 paper chromatography 로 분석하였다. 전개용매로는 n-butanol : pyridine : water = 6 : 4 : 3 (v/v) 을 사용하였고 aniline phthalate 용액으로 발색시켰다 (12, 13).

결과 및 고찰

Xylanase 생산균의 분리

경기도 지방을 중심으로 채취한 산간토양 695 점으로부터 xylan 을 유일탄소원으로 이용할 수 있는 균주를 분리, 50°C 에서 36 시간 진탕배양하여 2.5 μ mole/ml 이상의 환원당 생산량을 나타내었던 65 균주를 일차로 선별하였다. 상기 일차 선별균주는 순수분리과정을 거친다음 제 2 차 배양 실험을 실시하여 4.5 μ mole/ml 이상의 당생성량을 보였던 10 균주를 2 차 선별하였다.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of xylanase by *Bacillus stearothersophilus* No. 236.

Carbon (0.5%)	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Xylanase activity (units/ml)
Xylan	6.72	0.75	0.45
Xylose	6.77	0.85	0.04
Arabinose	6.77	0.60	0.07
Glucose	6.99	0.60	0.04
Soluble starch	6.90	0.80	ND
Dextrin	6.99	0.80	0.04
Cellulose	7.00	0.60	ND
Glycerol	6.99	0.60	ND

Cultivation was carried out for 26 hrs at 50°C in the medium containing 0.1% peptone and 0.5% carbon source. ND: not detected

10 균주에 대한 배양시간별 환원당 생산량을 최종 비교 검토한 결과 배양 24 시간째 10.83 μmole/ml, 36 시간째는 9.33 μmole/ml 의 가장 높은 값을 나타내었던 No.236 균주를 최종 선별, 본 연구의 공시균주로 결정하였다.

No.236 분리균의 균학적 성질

No.236 분리균은 1.0×4.0 μm 의 크기를 가진 간균으로서 (Fig.1 참조) Table 1 에 표시되어 있는 형태적내지는 생리적 특성을 나타내었다. 특히 본 분리균이 나타내는 Gram 양성, endo-spore 형성, peritrichous flagella 의 형성과 운동성, 당의 산화적 발효내지는 65°C에서의 생육 등의 주요 특성과 기타 자료를 종합분석한 결과 No.236 균주를 *Bacillus stearothersophilus* 로 동정할 수 있었다.

Xylanase 생산을 위한 배양조건

탄소원의 영향 : 각종 탄소원 0.5% 를 함유한 기본 배지를 이용, 탄소원의 종류에 따른 효소생산량을 비교 검토한 결과 Table 2 와 같이 세포증식은 탄소원에 따라 큰 차이를 보이지 않았으나 xylanase 생산은 xylan 에 의해서만 유도되는 것을 알 수 있었다. 어떤 *Bacillus* spp.(14)와 *Bacterioides succinogenes* (15)는 xylan 은 물론이고 cellulose 첨가에 의해서도 xylanase 를 다량 생산하는 것으로 보고되고 있으며 *Aspergillus niger* 의 경우 carboxyl methyl cellulose 를 유일탄소원으로 이용하여 다량의 xylanase 를 생산했다는 보고도 있다(16).

Table 3. Effect of xylan concentration on the production of xylanase.

Xylan (%)	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Xylanase activity (units/ml)
0.50	6.79	0.90	0.45
0.75	6.78	0.94	0.55
1.00	6.76	0.95	0.45
1.25	6.75	1.05	0.45
1.50	6.73	1.20	0.40
2.00	6.71	1.35	0.40

Cultivation was carried out for 26 hrs at 50°C in the medium containing 0.1 % peptone.

이에 반해 *Bacillus stearothersophilus* 로 동정된 본 연구의 공시균은 xylan 첨가시에만 높은 효소생산량을 보이는 특징을 나타내었으며 xylan 의 효과적 첨가농도는 0.75% 인 것으로 확인되었다 (Table 3).

Inducer 의 효과

Bacillus stearothersophilus No.236 의 xylanase 생산기구에 대한 지식을 얻기 위하여 glucose 를 유일탄소원으로 첨가한 배지에서 증식시킨 non-in-

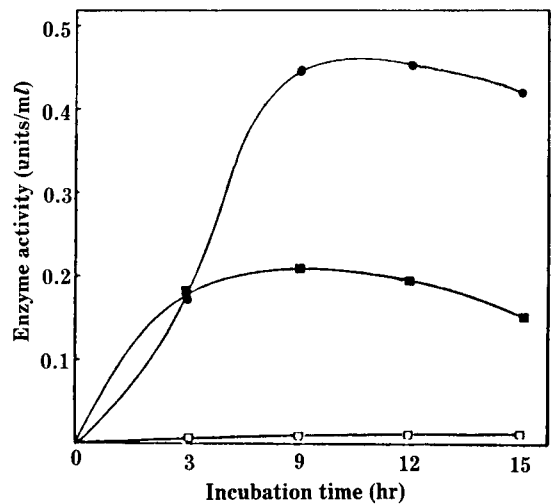


Fig. 2. Induction of the xylanase produced by *Bacillus stearothersophilus* No. 236.

Non induced cells were harvested from a 30 hr culture in the glucose medium, and then washed, transferred to the inducing culture medium containing 0.5% inducers. Temp. 50°C. Initial pH 7.0.

glucose: □ - □ xylan: ● - ● methyl-β-D-xylopyranoside: ■ - ■

Table 4. Effect of nitrogen sources on the xylanase production.

Nitrogen	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Xylanase activity (units/ml)
Control	7.00	0.85	ND
Peptone	6.58	0.99	0.54
Meat extract	6.66	1.10	0.54
C.S.L.	6.43	1.10	0.15
Yeast extract	6.23	1.50	0.84
Tryptone	6.29	0.61	0.15
Casein	6.80	1.40	0.21
Soytone	6.19	1.35	0.54
NH ₄ NO ₃	6.90	0.90	0.12
NH ₄ H ₂ PO ₄	6.62	0.90	0.18
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.00	0.90	0.18
(NH ₂) ₂ CO	7.12	0.84	0.12
NH ₄ Cl	6.81	1.10	0.21
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.85	0.90	0.24
KNO ₃	6.96	0.88	0.24

Cultivation was carried out for 26 hrs at 50°C in the medium containing 0.5% xylan and 1/50 M inorganic nitrogen compound or 0.5% organic nitrogen compound indicated in the table.

duced cell 을 glucose 와 xylanase 생산의 inducer로서의 효과가 이미 보고되고 있는 methyl-β-D-xylopyranoside (17) 및 xylan 을 첨가한 인산 원충용액에 현탁, 50°C에서 진탕배양하면서 배양시간별로 xylanase 생산량을 측정 비교하였다. Fig.2와 같이 xylan 이 methyl-β-D-xylopyranoside 에 비해 훨씬 높은 효소생산량을 가져왔으며 glucose 첨가에 의해서는 전혀 효소생산이 되지 않았다. 따라서 본 공시균은 xylan 과 xylan 의 유도체와 같은 inducer 존재시에만 xylanase 를 생산한다는 것을 알 수 있었다.

질소원의 영향: 각종 무기 및 유기질소원의 xylanase 생산에 미치는 효과를 조사해본 결과 (Table 4) 대체로 유기질소원이 무기질소원에 비해 높은 효소생산 효과를 보였다. 무기질소원 중에는 (NH₄)₂SO₄와 KNO₃ 등이 비교적 효과적이었다고 평가되나 yeast extract 의 월등한 효과와는 비교가 되지 않았다. 한편 yeast extract 의 첨가 농도에 따른 효소생산량을 조사한 바 0.35% 첨가시에 가장 높은 효소생산량을 보였다(별도 자료제공은 하지 않았음). 이와 같은 yeast extract 의 효과는 *Streptomyces xylophagus* nov. sp. 에 의한 xylanase 생산

Table 5. Effect of metal ion on the production of xylanase.

Metal ion	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Xylanase activity (units/ml)
Control	6.64	1.00	0.25
MnSO ₄	2.5 mM 6.64	1.10	0.12
	5.0 mM 6.64	0.95	0.51
	7.5 mM 6.62	0.72	0.17
	10.0 mM 6.61	1.10	0.27
MgSO ₄	2.5 mM 6.62	0.90	0.51
	5.0 mM 6.62	0.80	0.36
	7.5 mM 6.61	0.90	0.36
	10.0 mM 6.57	0.95	0.09
CaCO ₃	2.5 mM 6.74	0.85	0.28
	5.0 mM 6.81	1.10	0.36
	7.5 mM 6.80	1.10	0.28
	10.0 mM 6.86	1.40	0.04

Cultivation was carried out for 26 hrs at 50°C in the medium containing 0.75% xylan, 0.35% yeast extract, 1.06% K₂HPO₄, 0.61% NaH₂PO₄·2H₂O, and 0.20% (NH₄)₂SO₄.

Table 6. Effect of pH on the production of xylanase.

Initial pH	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Reducing sugar produced (μmole/ml)	Xylanase activity (units/ml)
6.0	5.9	1.5	4.50	0.30
6.5	6.2	1.5	18.33	0.79
7.0	6.7	1.4	22.50	0.64
7.5	7.0	1.4	23.33	0.55
8.0	7.3	1.3	17.50	0.49

Cultivation was carried out for 26 hrs at 50°C in the medium containing 0.75% xylan and 0.35% yeast extract.

에서도 보고되고 있다(18).

금속이온의 영향: 최적탄소원과 최적질소원을 첨가한 배지에 각종 금속염을 0.05% 첨가하고 50°C에서 26 시간 진탕배양하여 효소생산에 미치는 금속이온의 효과에 대한 예비실험을 실시한 결과 MnSO₄, MgSO₄ 및 CaCO₃만이 뚜렷한 첨가효과를 나타내었다(자료제공은 하지 않았음). 따라서 상기 금속염을 농도별로 첨가 효소생산량을 조사하였던 바 0.07% MnSO₄, 0.05% MgSO₄ 및 0.05% CaCO₃에서 가장 높은 생산량을 얻었다(Table 5).

Table 7. Effect of temperature on the production of xylanase.

Temperature (°C)	Final pH	Cell growth (O.D.640)	Reducing sugar produced (μ mole/ml)	Xylanase activity (units/ml)
30	6.6	1.3	9.17	0.31
37	6.6	1.3	13.33	0.42
45	6.5	1.4	16.33	0.48
50	6.6	1.4	16.33	0.48
50	6.6	1.4	25.73	0.84
55	6.7	1.4	18.33	0.80
60	6.8	1.5	6.58	0.25

Cultivation was carried out for 26 hrs at the various temperatures indicated in the table. The medium was consisted of 0.75% xylan and 0.35% yeast extract.

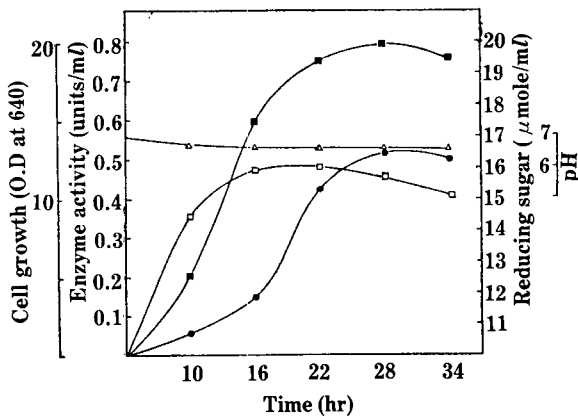


Fig. 3. The profile of the xylanase production during cultivation of *Bacillus stearothermophilus* No. 236 in shake-flask culture.

xylanase activity ■-■ pH Δ - Δ
cell growth \square - \square reducing sugar ●-●

배지 초기 pH와 배양온도의 영향: 이상의 실험결과를 종합하여 결정된 효소생산 최적배지의 초기 pH가 효소생산량에 미치는 효과를 조사 검토하였던 바 효소생산은 pH 6.5에서 최고치를 보였으나 환원당 생성은 pH 7.5에서 가장 높았다. 그러나 *Bacillus stearothermophilus* 인 본 공시균은 배지 중 수소이온 농도에 매우 민감하여 최적 pH를 약간만 벗어나도 효소생산의 현저한 감소를 보였다(Table 6).

또한 본 균은 50°C의 배양온도에서 최고의 효소생산량을 보였으며 55°C에서도 생산량의 큰 변화를 보이지 않아 다른 xylanase 생산균에 비해 (19) 높은

Table 8. Composition of optimal medium for the xylanase production.

Xylan	0.75%
Yeast extract	0.35%
K ₂ HPO ₄	1.06%
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.61%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.20%
MgSO ₄	0.05%
MnSO ₄	0.07%
CaCO ₃	0.05%

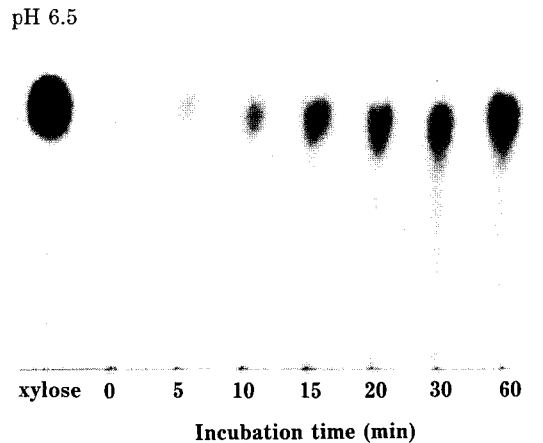


Fig. 4. Paper chromatogram of hydrolysates of xylan. Paper chromatography on Whatman No.1 filter paper. The developing solvent was composed of n-butanol: pyridine: water = 6:4:3 (v/v). Sugar spots on the paper were detected by aniline hydrogen phthalate method.

최적온도를 가진 것으로 나타났다(Table 7).

Flask 배양에 의한 xylanase 생산: 효소생산 최적 배지 (Table 8)와 최적배양조건하에서 공시균을 진탕 배양 (110 rpm)하면서 배양시간에 따른 균체증식, 배지 pH, 환원당 및 효소생산량 등의 변화를 분석하여 Fig.3과 같은 결과를 얻었다.

즉 균체증식은 배양 16 시간 전후에서 정지기에 도달하였으나 효소생산은 균체증식 정지기 말기에 해당하는 배양 28 시간째에 가장 높은 값을 나타내었다. 또 환원당 생성은 효소생산량과 거의 비례적으로 증가함을 보였고 pH는 약간의 감소현상을 보였으나 큰 변동은 없었다. 따라서 *Bacillus stearothermophilus* 로 동정된 본 토양 분리균은 산업적으로 매우 적합한 배양온도라고 평가되고 있는 (20) 50°C에서 28 시간 배양했을 때 최대의 효소생산량을 나타내었다.

Xylan의 가수분해: Ammonium sulfate로 침전 분리한 xylanase를 사용, xylan을 가수분해하면서 시간

별로 분해생성물을 분석 비교하였다.

Fig.4 와 같이 반응시간이 지남에 따라 분해산물인 xylose 는 비례적으로 증가함을 보이고 있으나 다른 가수분해산물 즉 각종 oligosaccharides 의 생성은 반응초기에도 전혀 관찰할 수 없었다.

이상의 결과는 지금까지 보고되고 있는 세균 xylanase 의 대다수가 endo-type 효소인데 반해 본 연구의 공시균이 생산하는 xylanase 는 *Clostridium acetobutylicum* (21)외에는 그 예가 극히 드문 exo-type xylanase 로 판단되어 매우 가치있는 효소라고 생각한다.

요 약

토양으로부터 세포의 xylanase 를 다량 생산하는 균주를 분리하고 분리균의 형태적 내지는 생화학적 인 특성을 조사하여 *Bacillus stearothermophilus* No.236 로 동정하였다. 본 분리균은 초기 pH 가 pH 6.5 인 0.75% xylan, 0.35% yeast extract, 1.06% K₂HPO₄, 0.61% NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.20% (NH₄)₂SO₄, 0.05% MnSO₄, 0.07% MgSO₄, 0.05% CaCO₃의 조성을 지닌 배지에서 50°C, 28 시간 진탕배양했을 때 배양액 ml 당 약 0.85 units 로서 가장 높은 효소생산량을 나타내었다. 또 본 xylanase 는 xylan 에 의해 유도 생산되는 세균 xylanase 로서는 그 예가 극히 드문 exo-type 의 효소인 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. Zeikus, J.G.: *Ann. Rev. Microbiol.* **34**, 423 (1980).
2. Georgl, F., L. Davis and S. Fred: *Biotech. Bioeng.* **24**, 2407 (1982).
3. Bisaria, V.S. and T. K. Ghose: *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 90 (1981).
4. Fan, L.T., Y.H. Lee and H. David: *Biotech. Bioeng.* **22**, 177 (1980).
5. Morita, M.: *Agr. Biol. Chem.* **29**, 564 (1965).
6. Han, M.H. and Y.D. Choi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **9**, 241 (1981).
7. Alexander, H.: *Trends in the Biology of Fermentations for Fuels and Chemicals.* 111 (1981).
8. Monad, J., G. Cohen-Bazire and M. Cohen: *Biochem. Biophys. Acta.* **17**, 585 (1951).
9. Gerhardt, P., G.E.G. Murray, R.N. Gostilow, F.W. Nester, A.W. Wood, N.R. Krig and G. B. Phillips: *Manual of methods for general bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington. (1981).
10. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology.* Williams and Wilkins Co. Baltimore. (1984).
11. Miller, G.L.: *Anal. Chem.* **31**, 426 (1959).
12. Jeanes, A., C.S. Wise and R.J. Dimler: *Anal. Chem.* **23**, 415 (1951).
13. Wilson, C.M.: *Anal. Chem.* **31**, 1199 (1951).
14. Uchino, F. and T. Nakane: *Agr. Biol. Chem.* **45**(5), 1121 (1981).
15. Cecil, W.F., J.B. Terrance and H. Anita: *Appl. Environ. Microbiol.* **42**(5), 886 (1981).
16. Lee, K.H. and H.J. Lee: *J. Kor. Agricul. Chem. Soc.* **18**(3), 109 (1975).
17. Nakanishi, K. and T. Yasui: *Agr. Biol. Chem.* **44**(8), 1885 (1980).
18. Kawaminami, T. and M. Iizuka: *Agr. Biol. Chem.* **33**(12), 1787 (1969).
19. Iwamoto, T., T. Sasaki and M. Inaoka: *Mem. Ehime Univ.* **17**, 185 (1973).
20. GrootWassink, J.W.D. and S.E. Fleming: *Enzyme Microb. Technol.* **2**, 45 (1980).
21. Lemmel, S.A., Rathin Datta and J.R. Frankiewicz: *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 217 (1986).

(Received May 2, 1989)