Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 20, No. 1, 14-19 (1992)

Exo-xylanase 생산균의 분리 및 동정

하재석 · 이영남 · 임재윤*
충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Identification of Exo-xylanase Producing Microorganism

Ha, Jae-Seok, Young-Nam Lee and Jai-Yun Lim*
Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 360-763, Korea

Abstract — The xylanase producing microorganisms occurring on rotten woods were selectively isolated on the modified Czapek-Dox medium supplemented with 0.5% xylan as a sole carbon source. Among more than three-hundred isolates of xylanase producing microorganisms, only two bacterial isolates were turned out to be more potent xylanase producer than the reference strain of xylanase producer, *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311. The exo-xylanase producer, bacterial isolate No. 33 was identified as a strain of *Pseudomonas* sp. on the basis of morphological and biochemical characterizations as well as cellular fatty acid composition. Optima of pH and of temperature for enzyme reactions of xylanase were 5.5 and 50℃, respectively. The enzyme was stable in a range of pH 5.0~7.0 and below 45℃. Among the number of carbohydrate substrates, xylose was turned out to be a potent inducer of *Pseudomonas* sp. No. 33 exo-xylanase. Among the raw materials tested, rice straw was the best material for xylanase production by *Pseudomonas* sp. strain No. 33.

농산 폐기물의 섬유질 bioamass는 cellulose, hemicellulose, 그리고 lignin 등으로 구성되어 있다. 이러한 섬유질 biomass는 해마다 많은 양이 생상되지만, 대부분 이용되지 않고 폐기되고 있다. 그러나 1970년대의 유류 파동 이후 섬유질 biomass부터 ethanol을 생산하여 액체 연료로 대체하려는 연구가 많이 이루어져 왔다. 이러한 연구는 주로 glucose가 β-1,4 결합으로 연결된 cellulose를 중심으로 이루어져 왔다(1-3). 그러나 cellulose는 화학적 또는 생물학적인 방법에 의해 효율적으로 가수분해되지 않기 때문에 많은 연구에도 불구하고 실질적인 이용은 미미한 실정이다. 반면에 xylan이 주요 구성성분인 hemicellulose는 알카리에 의해 쉽게 분해된다는 장점이 있고, 근래에 가수분해산물인 xylose를 발효하는 균이 발견되어 hemicellulose를 이용해 ethanol을 생산하려는 연구가 활성화되고 있다(4-6). Xylan은 자연계에 널리 존재하는 xylanase 생산균에 의해 xylose로 분해되는데, *Pachysolen tannophilus*(7), *Candida shehatae*(8), *Pichia stipitis*(9), 그리고 *Candida tropicalis*(10)와 같은 미생물이 xylose를 발효할 수 있음이 보고되어 있다.

본 연구에서는 자연계로부터 xylan 분해능이 우수한 exo-xylanase 생산균을 분리 동정한 후, 이들의 xylanase 생산조건들과 최적 반응조건을 살펴보았다.

Key words: Exo-xylanase production, *Pseudomonas* sp.
*Corresponding author

재료 및 방법

균의 분리

섬유소 분해 능력이 있는 미생물을 얻기 위하여 청주 근교에서 부패한 나무, 퇴비 그리고 제지공장의 폐지 야적장에 썩어있는 종이와 폐수를 시료로 하여 xylanase 생산균을 분리하였다.

배지의 조성

균의 분리 및 배양에 사용한 배지는 sucrose를 xylan으로 바꾼 Czapek-Dox 배지를 사용하였다. 배지의 조성은 다음과 같다. 1 liter당 xylan(from oat spelt) 5g, $NaNO_3$ 3g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, KCl 0.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g을 넣은 후 pH는 6.5로 조정하였다. 배지를 고형화할 때에는 agar 1.5%를 첨가하였다.

균의 선택

Xylan을 탄소원으로한 변형 Czapek-Dox 배지에 분산 도말하여 30℃에서 2일간 배양한 후 균체 주위에 clear zone을 크게 생성한 colony를 순수하게 분리했다. 순수 분리된 균을 같은 배지에 접종하여 비교적 높은 xylanase 활성을 보이는 균을 선발하였다. 이들을 액체 배지에서 배양하고 상등액속의 xylanase 활성을 측정하여 보다 우수한 xylanase 생산균을 선택하였다.

Xylanase 활성이 높은 것으로 알려진 *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311(11)을 ARS Culture Collection(Northern Regional Research Center)으로부터 구입하여 비교균으로 사용하였다.

균의 동정

Exo-type의 xylanase를 생산하는 33번 균주의 동정은 Bergey's manual(12)에 따라 균의 형태학적, 생화학적 특성들을 조사하고, 균체 지방산 조성을 조사하여(Micro Check, Inc. Vermont, USA) 동정하였다.

Xylanase 활성 측정

Xylanase 생성균을 변형된 Czapek-Dox 배지에 접종하여 30℃에서 3일간 진탕배양한 배양액을 원심분리(5000 rpm, 30분)하여 균체와 잔존 xylan을 제거한 후 배양 상등액의 xylanase 활성을 측정하였다. 1% xylan 현탁액 0.5 ml와 0.05 M sodium phosphate buffer(pH 6.5) 0.5 ml에 조효소액을 첨가하여 잘 섞은 다음 45℃ 진탕 수조에서 30분간 반응시킨 후, 반응액에 증류수를 첨가하여 총 2 ml로 만든 후 원심분리(3000 rpm, 20분)하고 상등액 0.5 ml을 취하여 Somogyi-Nelson(13)의 환원당 정량법에 의하여 xylanase 활성도를 측정하였다. Xylanase 1 unit는 1분간에 1 μmole의 xylose를 생산하는 효소활성으로 하였다.

pH의 영향

Xylanase 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해 pH 2.5~10까지의 완충용액(pH 2.5~7.5 : McIlvaine buffer, pH 8.0~10.0 : Clark & Lubs buffer)에 효소액을 4℃에서 60시간 동안 보관한 후 xylanase 활성을 측정하여 pH 안정성을 알아보았다. 효소활성의 최적 pH는 pH 4~10의 완충용액에서 기질-효소액을 30분간 반응 후 효소활성을 측정하였다.

온도의 영향

Xylanase 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 30~80℃ 범위에서 효소액을 30분간 처리하여 효소의 활성을 측정하였고, 효소활성의 최적 온도는 각각의 온도에서 30분간 기질과 반응시켜 효소의 활성을 측정하여 결정하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산균의 분리

청주 근교에서 부패한 나무, 퇴비 그리고 제지공장의 폐지 야적장에 썩어있는 종이와 폐수를 시료로 하여 300여종의 xylanase 생산균을 분리하였다. Xyla-

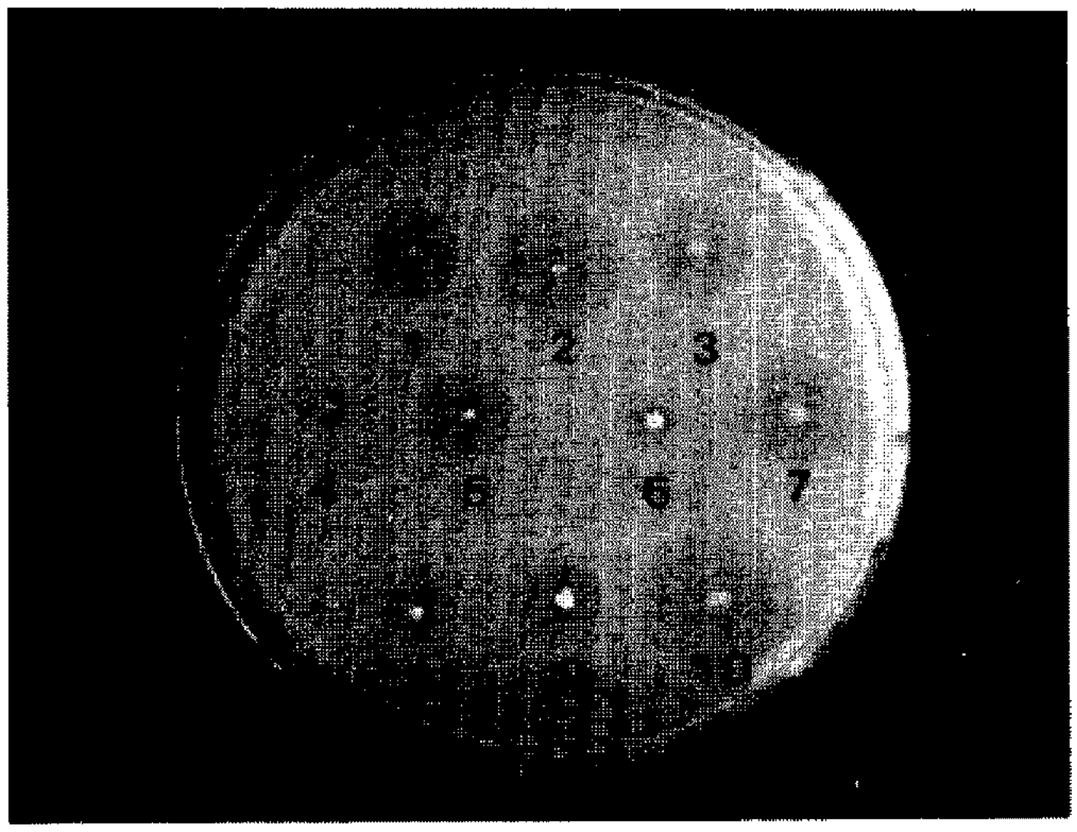

Fig. 1. Xylanase producing microorganisms showing clear zone by degrading xylan in the Czapek-Dox medium.
Cultivation was carried out for 36 hours at 30℃ in the Czapek-Dox medium containing 0.5% xylan.
1: strain 33, 2: 67, 3: 79, 4: 88, 5: 105, 6: 118, 7: 218, 8: 227, 9: 262, 10: *A. pullulans* NRRL Y-2311

Table 1. Xylanase production of various isolates

Strain No.	Final pH	Diameter of clear zone (cm)*	Xylanase activity (units/ml)
33	8.52	1.4	0.78
79	8.10	1.6	0.63
88	7.64	1	0.71
105	8.05	1.5	0.56
118	7.05	0.9	0.57
218	8.43	1.8	0.41
227	7.09	1.2	1.18
262	7.20	1.4	0.64
AP**	7.75	2.4	0.70

*Diameter of clear zone after cultivation on the xylan agar medium for 36 hours.
**Standard strain (*Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311)

nase 생산균주 중 생산능이 우수한 균주를 xylan(0.5 %)이 포함된 Czapek-Dox 배지에서 배양하였을 때 형성되는 clear zone의 예는 Fig. 1과 같다. 33번 균주는 다른 균들에 비해 clear zone의 크기는 작지만 선명한 분해환을 만드는 것을 볼 수 있다.

자연계로부터 분리한 300여종의 미생물 중 xylanase 활성이 높았던 8균주의 xylanase 활성을 Table 1에 나타냈으며 비교균주로 사용한 *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311보다 xylanase 활성이 뛰어난 33 및 227 두 균주를 얻을 수 있었다. Table 1의 결과로부터 xylan이 포함된 고체 배지에서 배양했을 때 형성된 clear zone의 크기와 액체 배지에서 배양하여 Somogyi-Nelson의 환원당 정량법으로 측정한 xylanase의 활성에는 직접적인 연관이 없는 것으로 나타났다. 33번 균주는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 xylan에 작용하여 xylose만이 생성되는 것으로부터 주로 exo-type의 xylanase를 생산하는 것으로 밝혀졌다.

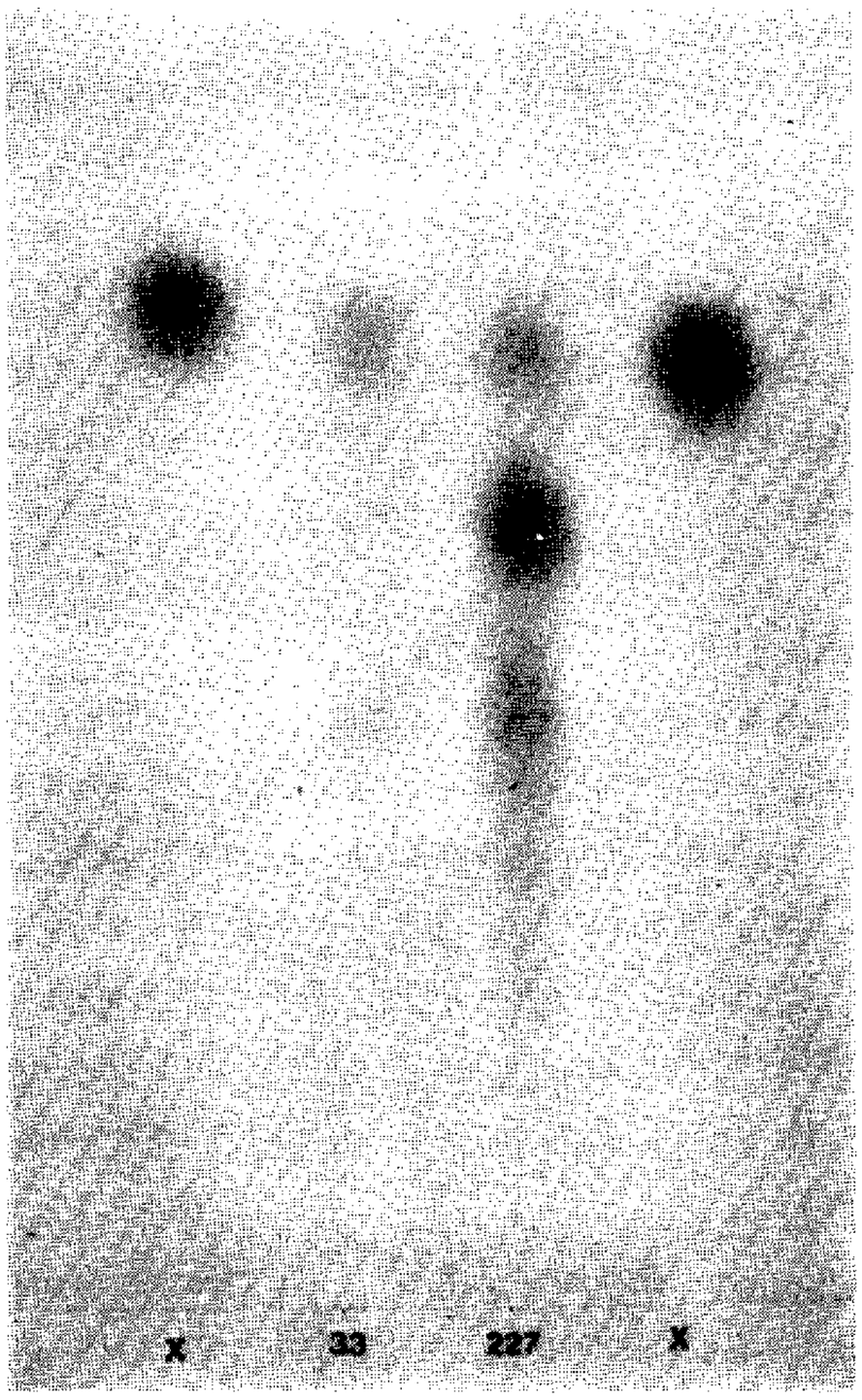

Fig. 2. Paper chromatogram of xylan hydrolysates.
Paper chromatography on Whatman No. 1 filter paper with the developing solvent, n-buthanol:acetic acid:water=4:3:3 (v/v). Sugar spots on the paper were detected by silver nitrate method.
X: xylose
227, and 33: strain No.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. No. 33

Gram staining	negative
Type	straight or slight curved
Size	1.1×1.95 μm
Spores	no
Flagellum	polar
Oxidase test	positive
Catalase test	positive
Indolase test	negative
Methyl red test	negative
Voges-Proskauer test	negative
Gelatin liquifaction	negative

분리균의 동정

Exo-type의 xylanase를 생산하는 33번 균주의 형태학적, 생화학적 특성은 Table 2와 같고 균체 지방산 조성(MICROCHEK, INC, VERMONT USA)의 profile에 의하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. 본 균주의 주사전자현미경 사진은 Fig. 3과 같다.

탄소원의 영향

Czapek-Dox 배지의 sucrose 대신에 각종 탄소원을 1% 첨가하여 만든 배지에 균을 접종하고 30℃에서 2일간 진탕배양하여 효소활성을 비교한 결과는 Table 3과 같았다. 탄소원으로 xylose를 넣은 배지에서 xylanase 활성이 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는

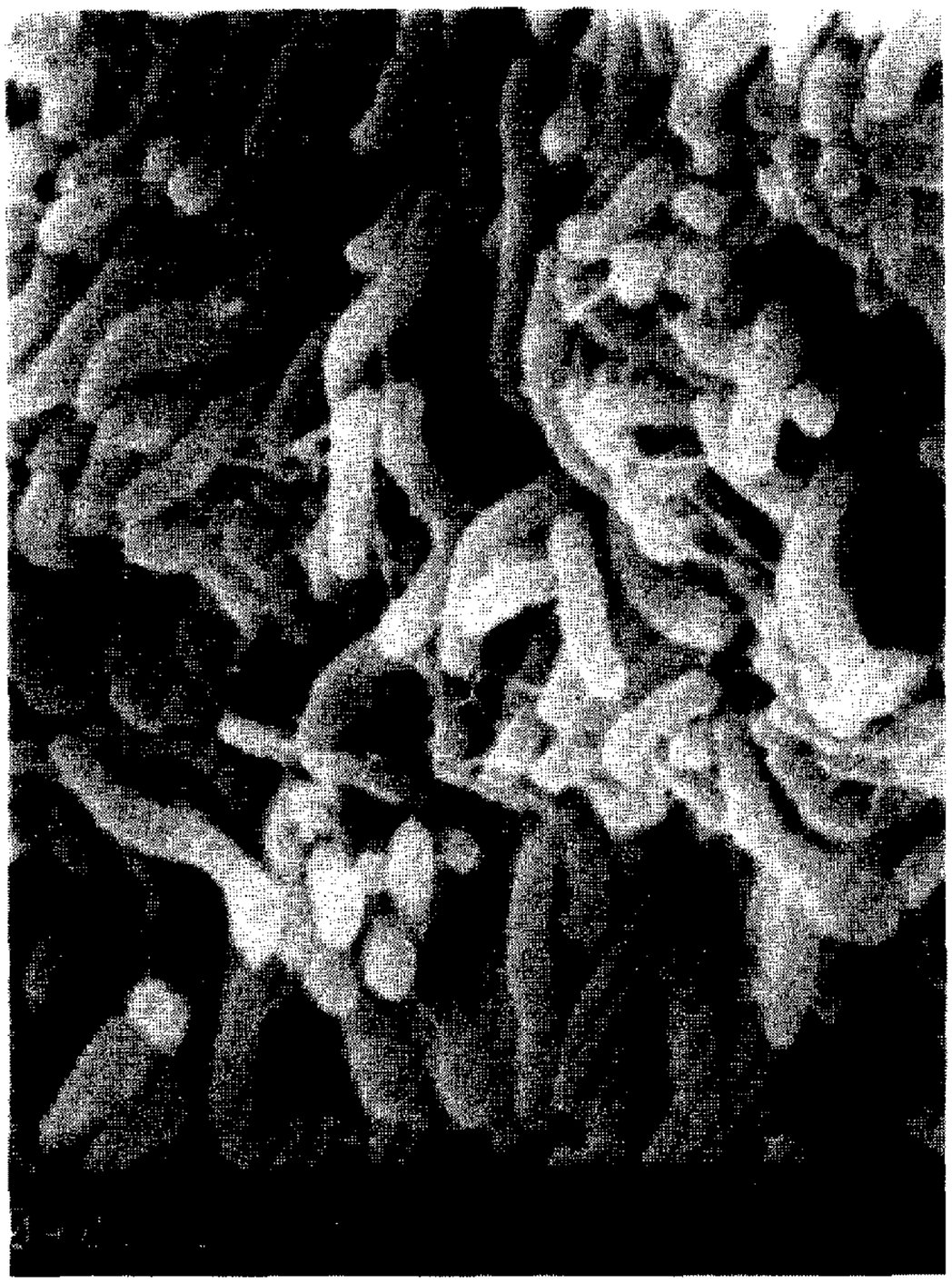

Fig. 3. Scanning electron micrograph of strain No. 33, identified as *Pseudomonas* sp. (×14,000)

Table 3. Effects of carbon sources on the xylanase production by *Pseudomonas* sp. No. 33

Carbon source	Final pH	Activity (units/ml)	Reducing sugar μg/ml)
cellulose	6.78	0.01	6.33
galactose	9.12	0.09	47.01
glucose	8.89	0.13	200.48
inulin	6.69	0.04	14.47
lactose	9.19	0.09	40.21
maltose	9.1	0.05	84.61
xylose	9.19	0.91	22.06
xylan	9.15	0.54	7.22
starch	9.25	0.17	7.66

Cells were cultured in the modified Czapek-Dox medium containing various carbon sources (1%) for 2 days.

Rapp와 Wagner(14)가 *Cellulomonas uda*의 β-xylanase의 효소생성이 xylan에 의해서는 유도되며 xylose와 glucose에 의해서는 효소합성이 억제된다는 보고와는 다르다.

Table 4. Effect of various nitrogen sources supplemented to Czapek-Dox medium on the xylanase production by *Pseudomonas* sp. No. 33

Nitrogen source	Final pH	Reducing sugar (μg/ml)	Relative activity (%)
Yeast extract	6.43	10.52	15.3
$NaNO_3$	8.92	2.16	94.4
KNO_3	8.65	2.60	100
$(NH_2)_2CO$	7.75	19.31	88.6
$Mg(NO_3)_2$	8.45	8.54	72.2

Cells were cultured in the modified Czapek-Dox medium containing various nitrogen sources (0.3%) for 2 days.

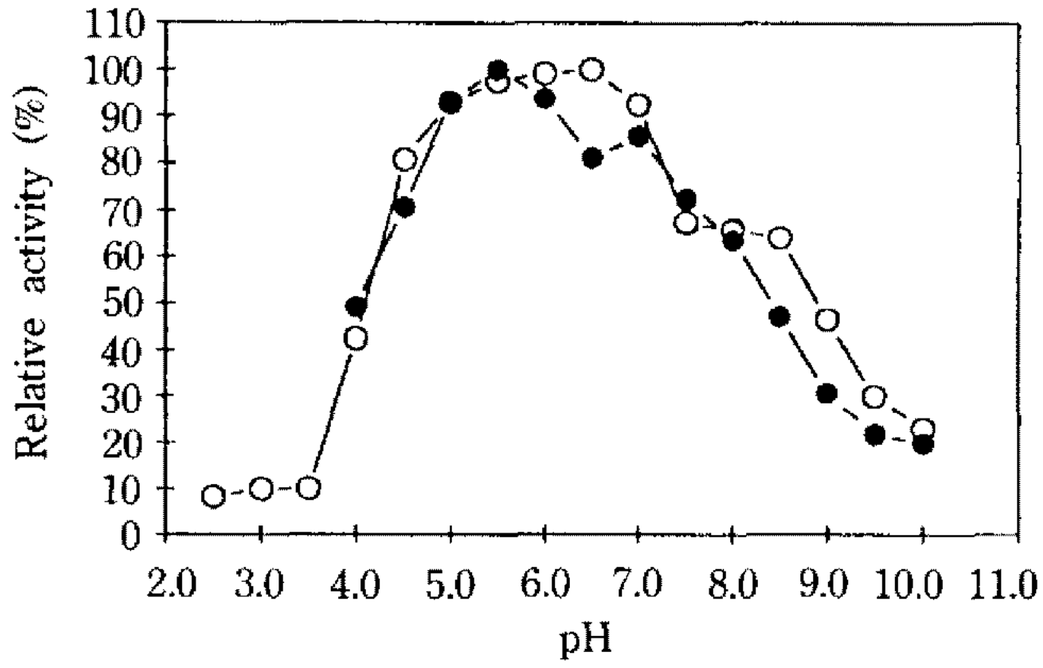

Fig. 4. Effect of pH on the xylanase activity.
○: stability curve at various pH
●: pH for optimal activity

질소원의 영향

Czapek-Dox 배지의 $NaNO_3$ 대신에 각각 여러 질소원을 첨가하여 만든 배지에 균을 접종하고 30℃에서 2일간 배양하여 xylanase의 활성을 알아본 결과 (Table 4), 질소원으로 KNO_3 첨가시 xylanase 활성이 가장 좋았다.

효소활성에 대한 pH의 영향 및 안정성

효소활성에 있어 최적 pH는 반응액을 pH 4.0~10.0으로 조절한 후 30분간 반응시켜 측정하였고, pH에 대한 안정성은 조효소액의 pH를 2.5~10.0으로 조절하여 4℃에서 60시간 동안 보관한 후 최적 pH로 조절한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 최적 pH는 5.5이었고, 효소의 활성은 4.5에서 7.0까지 안정하였다 (Fig. 4).

온도의 영향 및 안정성

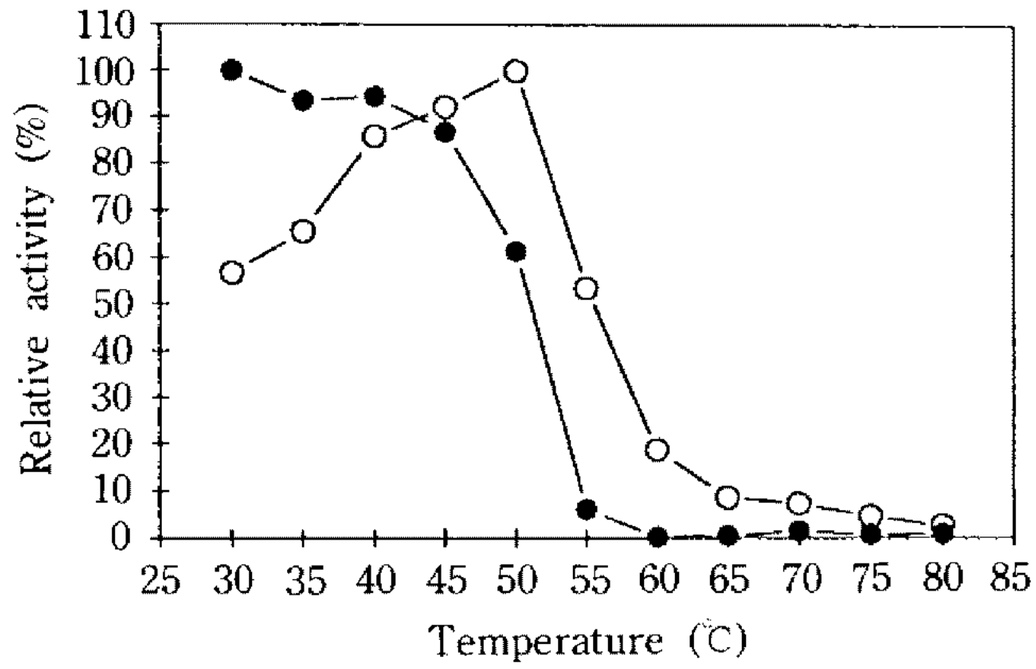

Fig. 5. Effect of temperature on the xylanase activity.
○: stability curve at various temperature
●: temperature for optimal activity

Table 5. Effect of carbon sources on the production of xylanase from *Pseudomonas* ps. No. 33

C-source	Size	Final pH	Relative activity (%)	Reducing sugar (μg/m*l*)
pin tree	40 mesh	6.46	2.2	13.81
bean stalk	20 mesh	7.60	84.6	15.35
acacia	20 mesh	6.58	3.2	17.74
news paper	7 mm	6.63	3.6	12.27
rice straw	1 mm	7.62	98.4	29.64
rice bran	4 mm	6.57	6.2	13.37
xylan(from oat spelt)		8.86	100	12.05

Cells were cultured in the modified Czapek-Dox medium containing various carbon sources (0.5%) for 70 hours.

최적 활성온도는 조효소액과 기질(pH 6.5의 0.05 M sodium phosphate buffer와 1% xylan액)을 혼합하여 30~80℃의 범위에서 30분간 반응시켜 측정하였다. 열안정성은 효소와 완충용액을 혼합하여 각 온도별로 30분간 방치한 후 잔존 효소활성을 측정하였다. Xylanase의 최적 온도는 50℃이었고, xylanase의 활성은 45℃까지 거의 유지되었고 50℃ 이상에서는 실활되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

섬유성 기질의 영향

Czapek-Dox 기초 배지성분에 여러가지 농산 폐기물과 폐자원을 탄소원으로 첨가하여 33번 균주를 배양한 후 배양액 중의 xylanase 활성을 측정한 결과(Table 5) 목본류보다는 초본류에서 xylanase 활성이 높게 나타났다. 볏짚을 탄소원으로 이용하여 균을 배양했을 때 xylan을 이용하여 배양한 것보다 균의 성장은 좋지 않지만 배양액내의 xylanase 활성은 매우 높은 것으로 나타났다.

Table 6. Xylanase production by *Pseudomonas* sp. No. 33 on rice straw substrate

Substrate	Final pH	Relative activity (%)	Reducing sugar (μg/m*l*)
cut into 1 mm long pieces	7.64	98.1	29.20
ground to 20 mesh particle size	7.40	106.8	24.15
ground to 40 mesh particle size	7.49	120.5	25.47
ground to 60 mesh particle size	7.51	126.9	23.49
xylan	8.86	100	12.05

Substrate concentration was 0.5% carbohydrate.

볏짚에서 xylanase의 유도 효과가 훨등하였기에 볏짚을 이용한 xylanase의 생산을 알아보고자 기질의 크기가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6에 나타내었으며 볏짚의 크기가 작을수록 xylanase 생산성이 높아지는 것으로 추정되었다.

요 약

부패한 나무, 퇴비, 제지공장의 폐지 및 폐수 등으로부터 분리한 300여 종류의 섬유소 분해균 중 xylanase 활성이 다른 균주에 비해 비교적 높았던 33번 균주를 균의 형태학적, 생화학적 특성과, 균체 지방산 조성에 의하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. Xylanase 활성의 최적 온도와 최적 pH는 각각 50℃와 5.5 이었고, 효소의 안정성은 45℃ 이하의 온도와 pH 5.0에서 7.0 사이에서 유지되었다. 이 균주가 생산하는 xylanase는 효소반응분해물의 paper chromatography에 의하여 주로 exo-type의 xylanase임이 밝혀졌다.

자연계에 존재하는 천연 섬유질 biomass를 탄소원으로 이용하여 균을 배양한 다음 xylanase의 생산성을 검토한 결과 볏짚을 탄소원으로 이용할 때 xylanase의 생산성이 가장 좋은 것으로 나타났다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단이 지원하는 서울대학교 분자미생물학 연구센터의 제 2연구부 연구비의 일부로

수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 율촌장학재단에서 대학원생 하재석에게 장학금을 지급하여 주신데 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. Gilkes, N.R., B. Henrissant, D.G. Kilburn, R.C. Miller, Jr. and R.A.J. Warren. 1991. Domains in microbial β-1,4-glycanases: sequence conversion, function and enzyme families. *Microbiol. Rev.* **55**: 303-315.
2. Tailliez, P., H. Girard, J. Millet and P. Beguin. 1989. Enhanced cellulose fermentation by an asporogenous and ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **55**: 207-211.
3. Laura A. Gow and T.M. Wood. 1988. Breakdown of crystalline cellulose by synergistic action between cellulase components from *Clostridium thermocellum* and *Trichoderma koningii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**: 247-252.
4. 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.
5. Sung, N.K., H.K. Chun, K.H. Shim, I.S. Kang and T. Akiba. 1989. Molecular cloning and expression of a xylanase gene from thermophilic alkalophilic *Bacillus* sp. K-17 in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 178-182.
6. Gokhale, D.V. and D.N. Deobagker. 1989. Differential expression of xylanases and endoglucanases in the hybrid derived from intergeneric protoplast fusion between a *Cellulomonas* sp. and *Bacillus subtilis*. *Appl. and Environ. Microbiol.* **55**: 2675-2680.
7. Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. Van Cauwenberge and C.P. Kurtzman. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Phachysolen tannophilus*. *Biotechnol. and Boieng.* **24**: 371-384.
8. Du Preez, J.C. and J.P. van der Walt. 1983. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **5**: 357-362.
9. Dellweg, H., M. Rizzi, H. Methner and D. Debus. 1984. Xylose fermentation by yeasts 3. comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *Biothechnol. Lett.* **6**: 395-400.
10. Elke Lohmeier-Vogel, Kerstin Skoog, Hans Vogel and Barbel Hahn-Hagerdal. 1989. ^{31}P Nuclear magnetic responce study of the effect of azide on xylose fermentation by *Candida tropicalis*. *Appl. and Environ. Microb.* **55**: 1974-1980.
11. Leathers, T.D., C.P. Kurtzman and R.W. Detroy. 1984. Overproduction and regulation of xylanase in *Aureobasidium pullulans* and *Cryptococcus albidus*. *Biotech. and Bioeng. Symp.* **14**: 225-240.
12. Krieg, N.R., J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 141-219. Williams & Wilkins, Baltimore.
13. Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375.
14. Rapp, P. and F. Wagner. 1986. Production and properties of xylan-degrading enzymes from *Cellulomonas uda*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 746-752.

(Received October 21, 1991)