

## **Bacillus sp. GS가 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성**

안준배 · 박현국\* · 이계호

서울대학교 식품공학과, \*동남보건전문대학 식품영양과

### **Purification and Characterization of Xylanase from *Bacillus sp. GS***

Jun-Bae Ahn, Heon-Kuk Park\*, Ke-Ho Lee

Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

#### **Abstract**

Xylanase from *Bacillus sp. GS* was purified through acetone precipitation, DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography and Sephadex G-100 gel filtration. The optimum reaction temperature of purified xylanase was 50°C. Its optimum pH was between pH 6.0 and pH 6.5. This enzyme was stable below 50°C for several hours and stable at between pH 5.5 and pH 8.0. The enzyme activity of xylanase was remarkably increased by Co<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup> ions. According to the study of hydrolysis mode of this enzyme, it was turned out to be endo type xylanase that can produce xylooligosaccharides, known as bifidogenic factor, from xylan.

Key words : *Bacillus sp. GS*, xylanase, purification, characterization

#### **서 론**

해마다 200억 ton(건물량)이 생산되는 hemicellulose의 주성분인 D-xylan은 D-glucose, L-arabinose 그리고 D-glucuronic acid 등의 측쇄를 가진 D-xylose의 β-1,4-linked polymer로서, 특히 벚짚, 보리짚, 옥수수숙 등 농산 폐기물의 30%이상을 차지하고 있으며, 또한 pulp와 paper 공업에서 막대한 양이 폐기물로 버려져 공해의 요인이 되고 있다.

이러한 xylan의 산업적 이용을 위해서는 xylan의 화학적 분해법에 비하여 반응 조건이 온화하고, 기질 특이성이 있으므로 반응 산물이 균일하며, 최종 산물의 정제가 쉬운 점 등의 유리한 점을 가진 효소적 가수분해법에 의한 효율적 분해 공정의 확립이 선결 과제라 하겠다. Xylan의 효소적 분해를 도모하기 위해서는 효소의 공업적 대량 생산이 가능한 미생물성 xylanase를 활용함이 가장 효율적이라고 할 수 있겠다. D-xylan은 cellulose나 starch에 비해 구조적으로

나 구성 성분면에서 더 복잡하므로 이를 분해하는 xylanase도 여러가지 다양한 기능을 갖는 효소들이 존재한다.<sup>1,2)</sup>

본 논문에서는 매년 막대한 양이 이용되지 못하고 그대로 버려지는 hemicellulosic biomass를 효율적으로 이용하기 위한 기초적 연구로, 분리 보관중이던 *Bacillus sp. GS*가 생산하는 xylanase를 정제하여 효소의 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

#### **재료 및 방법**

##### **1. 효소 생산 균주**

효소의 생산을 위하여 서울대학교 식품공학과에서 분리하여 보관 중이던 *Bacillus sp. GS*를 사용하였다.

##### **2. 배지**

효소 생산을 위한 배지로는 최적화 실험을 거쳐서 확인한 Table 1의 최적 배지를 사용하였다.

##### **3. 배양 조건**

분리 균주를 한 백금이 취하여 5ml의 효소 생산 최

**Table 1. The composition of the enzyme production medium**

Ingradients	Content
Xylan	1.5 %
Yeast extract	0.1 %
NaNO <sub>3</sub>	0.2 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02 %
Mineral salt	0.005%
pH 6.5	

적 배지에 접종한 후 37°C에서 24시간 진탕배양하여 이를 본배양용 효소 생산 최적 배지에 2% 접종하여 37°C에서 48시간 5 liter jar fermentor(한국 발효기 주식회사)에서 통기, 교반 배양하였다.

#### 4. 효소의 정제

1) DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography

Fig. 1에 의해 준비된 조효소액 15.5ml를 50mM Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 평형된 DEAE-Sephadex A-50 column에 가한 후 47ml/hr의 유속으로 10ml 씩 분획하였다. Salt gradient는 NaCl을 사용하여 0M에서 0.5M까지 직선적으로 걸어 주었다.

#### 2) DEAE-Sephadex G-100 gel filtration

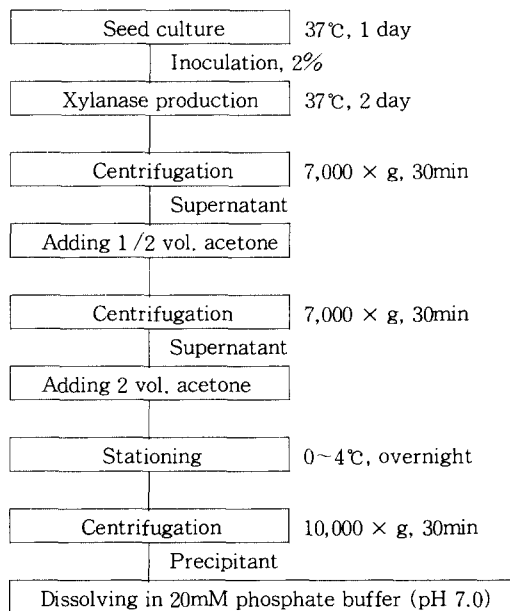
DEAE-Sephadex A-50 column을 통과시킨 효소액을 냉동 건조하여 농축한 후 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.2)로 평형된 DEAE-Sephadex G-100 gel filtration column에 가하고 18ml/hr의 유속으로 4.5ml씩 분획하였다(Fig. 2).

#### 5. Xylanase 역가 측정

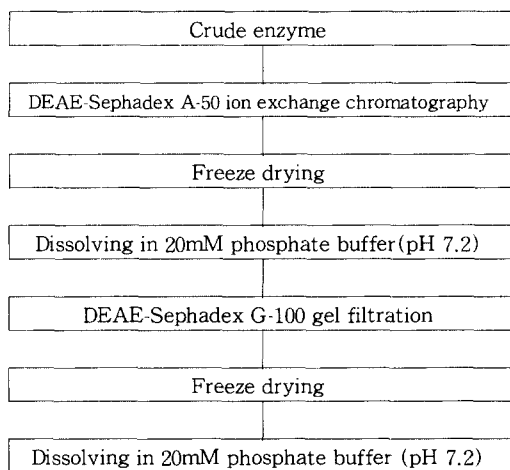
Xylanase의 역가는 Paice 등의 방법<sup>3)</sup>을 변형하여 측정하였다.

Birchwood xylan을 100mM phosphate buffer (pH 6.5)에 1% 되게 녹인 후 5000×g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 기질로 사용하였다.

기질 용액 0.6ml에 0.4ml의 조효소액을 넣고 40°C 진탕 항온 수조(40 strokes/min)에서 15분간 반응시



**Fig. 1. Schematic diagram of the procedure of crude enzyme preparation.**



**Fig. 2. Schematic diagram of partial purification of xylanase from *Bacillus* sp. GS.**

키고, 생성된 환원당을 DNS변법<sup>4)</sup>으로 발색시킨 후 550nm에서 xylose를 표준 물질로 하여 비색 정량하였다.

이때 효소의 역가 1 unit는 1분동안 13 μmol의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

## 6. 단백질 정량

배양액 및 정제 과정 중의 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Bradford 방법<sup>5)</sup>을 사용하였고, 그 밖의 경우는 280nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. 정제 효소에 의한 xylan 분해산물의 HPLC 분석

Birchwood xylan 2%를 100mM phosphate buffer (pH 6.5)에 녹인 후 원심 분리하여 불용성 고형분을 제거하여 효소 반응의 기질로 사용하였다.

기질 5ml에 1.4 unit의 정제 효소를 5시간, 10시간, 20시간 처리하여 HPLC로 분해 산물을 분석하였다. 분석 조건은 Table 2 와 같았다.

**Table 2. The analysis condition of the hydrolyzate of birchwood xylan with Waters HPLC system**

Column	: Carbohydrate analysis column
Solvent	: Acetonitrile : D.D.W = 78 : 22
Flow rate	: 1.20 ml /min
Detector	: Differential Refractive Index

## 결과 및 고찰

### 1. Bacterial xylanase의 정제

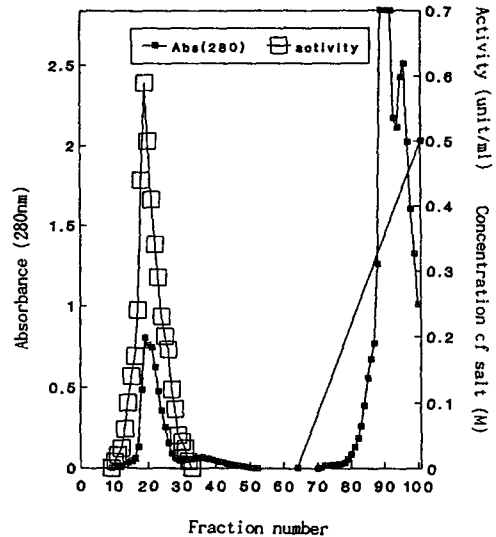
#### 1) Acetone precipitation

Xylanase 생산 최적 배지로 최적 조건에서 배양한 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거한 후 -68℃에서 보관된 acetone을 1/2 vol. 첨가하였다. 이때 침전된 물질을 원심 분리하여 제거하고 상정액에 다시 2 vol.의 acetone을 첨가하여 0~4℃에서 하룻밤 정치한 후 원심 분리하여 침전물을 20mM phosphate buffer (pH 7.0)에 녹여 다음의 정제 과정에 사용하였다.

#### 2) DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography

DEAE-Sephadex A-50 ion exchange chromatography를 행한 결과는 Fig. 3에 나타내었는데, 단백

질이 검출된 분획중 salt를 흘려주지 않은 부분에서 역가를 검출할 수 있었다. 즉, 이온 교환 수지에 역가가 없는 단백질들이 많이 흡착되었고, 필요한 xylanase는 소량의 단백질이 포함된 분획구에서 발견되었으므로 충분히 정제의 효과를 거둘 수 있었다.



**Fig. 3. Column chromatogram of xylanase on DEAE-sephadex A-50.**

Elution was carried out with 50ml Tris-HCl buffer (pH 7.2). Column dimension : 2.8 × 30 cm, Flow rate : 47 ml /hr

#### 3) DEAE-Sephadex G-100 gel filtration

DEAE-Sephadex G-100 gel filtration 결과는 Fig. 4에 나타내었는데, 역가를 나타내는 분획중 상대 역가가 50%이상 이었던 19번부터 24번까지의 분획을 모아 냉동 건조한 후 효소의 특성을 조사하는데 사용하였다.

이상의 정제 과정을 거쳐 정제된 효소는 Table 3에 요약된 바와 같이 325배 정제되었음을 알 수 있었다.

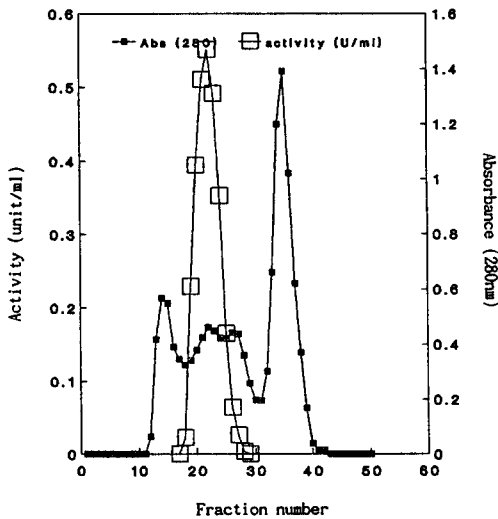
### 2. Bacterial xylanase의 특성

#### 1) 효소의 작용에 미치는 온도의 영향

0.1M phosphate buffer (pH 6.5)에 xylan 1%를 녹인 기질 용액을 각각 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃,

**Table 3. The summary of a xylanase purification**

Purification step	Total vol(ml)	Total activity(U)	Total protein(mg)	Specific activity(U/mg)	Yeild (%)
Culture filtrate	940	232.1	1,482.23	0.16	100
Acetone precipitation	15.5	32.5	6.125	5.31	14
DEAE-sephadex	2.75	17.02	1.54	11.1	7.3
DEAE-sephadex G-100	1.70	14.58	0.28	52	6.3



**Fig. 4. Column chromatogram of xylanase on DEAE-sephadex A-50.**

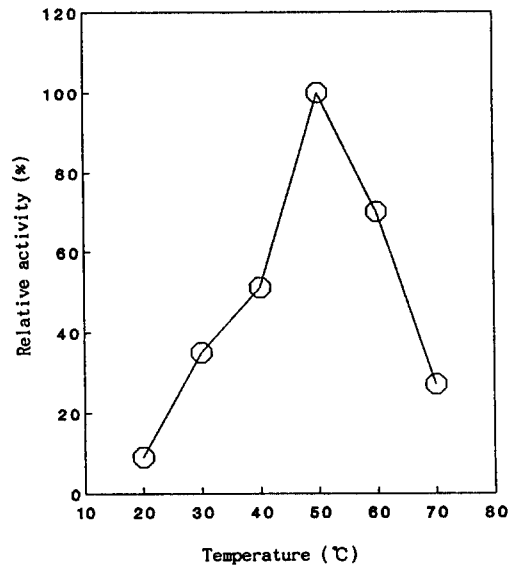
Elution was carried out with 50ml Tris-HCl buffer (pH 7.2). Column dimension : 1.6 × 90 cm, Flow rate : 18 ml/hr

70℃ 에서 10분간 방치하여 온도를 일정하게 맞춘 후 효소액 0.1 unit씩을 첨가하여 역가를 측정하였다.

결과는 Fig. 5와 같았으며 50℃ 에서 최대 역가를 보임을 알 수 있었다.

**2) 효소의 작용에 미치는 pH의 영향**

0.1M wide range buffer (pH 3.0~8.0) 와 0.1M Boric acid-NaOH buffer (pH 8.0~10.0)를 사용하여 효소 작용 속도를 측정한 결과는 Fig. 6과 같았으



**Fig. 5. Optimum temperature of the xylanase from *Bacillus* sp. GS.**

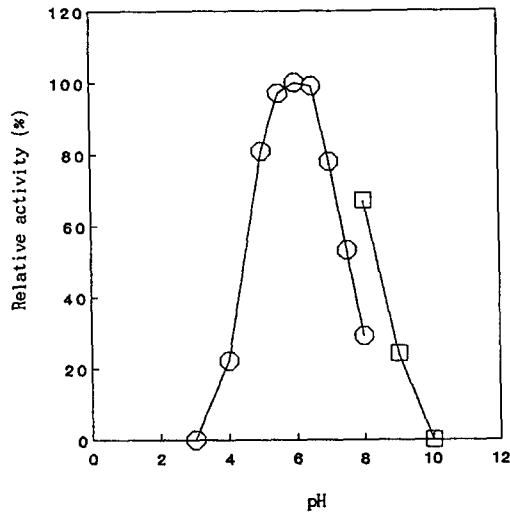
며, 최적 작용 pH는 6.0으로 나타났다.

**3) 효소의 열 안정성**

효소의 열 안정성을 알아 보기 위하여 40℃, 50℃, 60℃, 65℃ 각 온도에서 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 시간 방치한 후 잔존 역가를 측정한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. 50℃ 이상이 되면 효소는 급격히 불활성화 되는 것으로 나타나 열 안정성은 좋지 않음을 알 수 있었다.

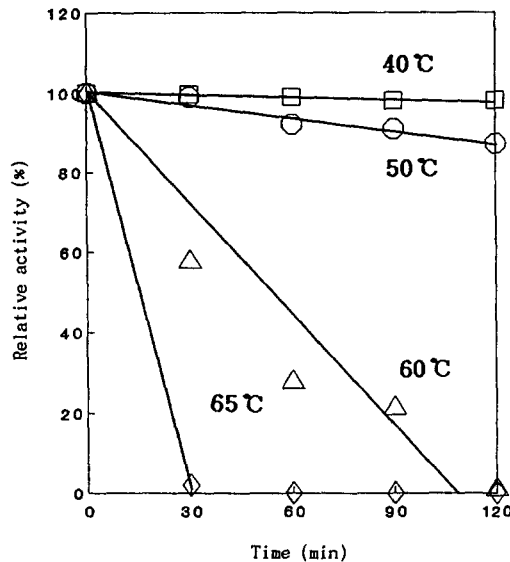
**4) 효소의 pH 안정성**

0.1M wide range buffer (pH 3.0~8.0) 와 0.1 M



**Fig. 6. Optimum pH of the xylanase from *Bacillus* sp. GS.**

The pH was adjusted with wide range buffer (pH 3.0~8.0) and boric acid - NaOH buffer (pH 0~10.0)



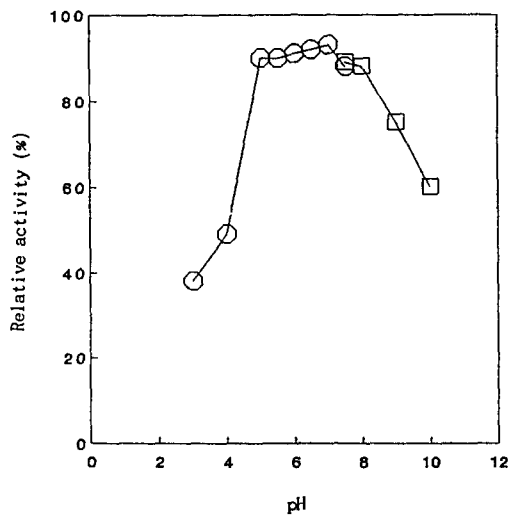
**Fig. 7. Thermal stability of the xylanase from *Bacillus* sp. GS.**

The enzyme was preincubated at each temperature for 12hrs.

Boric acid-NaOH buffer (pH 8.0~10.0)를 사용하여 효소액의 pH를 서로 달리 맞추어 37°C에서 12시간 방치한 후 잔존 역가를 측정 한 결과는 Fig. 8에 나타내었다. pH 5.5에서 8.0까지는 원래 역가의 80% 이상을 유지하였으므로 효소는 pH 5.5에서 8.0까지의 범위에서 안정함을 알 수 있었다.

#### 5) 효소의 작용에 미치는 금속 이온의 영향

금속 이온이 효소의 작용에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소 용액에 5mM의 금속 이온을 넣고 37°C에서 1시간 방치한 후 잔존 효소 활성을 비교하였다. 그 결과는 Fig. 9와 같았는데,  $\text{Co}^{++}$ 와  $\text{Cu}^{++}$ 이 현저하게 효소 활성을 증가시켰으므로 activator임을 알 수 있었다. 이는  $\text{Co}^{++}$ 이 *Bacillus stearothermophilus*의 xylanase역가에 좋은 영향을 끼친다는 보고<sup>6)</sup>와 일치하였으며  $\text{Hg}^{++}$ 는 다른 연구자들의 결과와 마찬가지로 거의 완전히 효소 활성을 지해하였으므로 inhibitor임을 알 수 있었다.



**Fig. 8. pH stability of the xylanase from *Bacillus* sp. GS.**

The pH was adjusted with wide range buffer (pH 3.0~8.0) and boric acid - NaOH buffer (pH 8.0~10.0)

#### 6) 분해 산물의 HPLC 분석

기질용액 5 ml에 효소 1.4 unit를 가한 후 시간별로

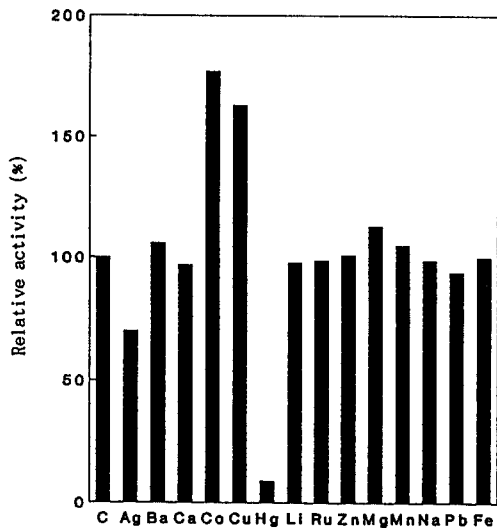


Fig. 9. The effect of metal ions on activity of the xylanase from *Bacillus sp. GS*.

5mM metal ions were added to enzyme and they were incubated for 1hr at 37°C.

C : control, Ag : AgNO<sub>3</sub>, Ba : BaCl<sub>2</sub>, Ca : CaCl<sub>2</sub>, Co : CoCl<sub>2</sub>, Cu : CuCl<sub>2</sub>, Hg : HgCl<sub>2</sub>, Li : LiCl, Ru : RuCl<sub>2</sub>, Zn : ZnCl<sub>2</sub>, Mg : MgCl<sub>2</sub>, Mn : MnCl<sub>2</sub>, Na : NaCl, Pb : Pb(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, Fe : FeSO<sub>4</sub>.

분해 산물을 HPLC에 의하여 분석한 결과는 Fig. 10과 같았다. 효소 반응 5시간 경과시의 chromatogram으로부터 xylobiose, xylotriose의 존재를 확인할 수 있었고, 효소의 반응 시간이 길어지면서 xylobiose, xylotriose, xylotetraose, xylopentaose 등의 함량이 많아짐을 확인할 수 있었다. 그러나 시간이 경과해도 xylose는 생성되지 않는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 본 bacterial xylanase는 xylan을 무작위적으로 가수 분해하여 xylooligosaccharide를 생성하는 전형적인 endo-type의 xylanase임을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하면 다음과 같다.

*Bacillus sp. GS*가 생산하는 xylanase는 induced enzyme으로, 작용 최적 온도와 pH는 각각 50°C와 6.0이었다. 본 효소의 열안정성은 좋지 않았으나 pH 5.5로부터 8.0까지는 안정하였고, Co<sup>++</sup>와 Cu<sup>++</sup>에 의해 효소 활성이 현저히 증가함을 알 수 있었다. 효소의 가수 분해 산물을 분석한 결과 xylan을 무작위적으로 절

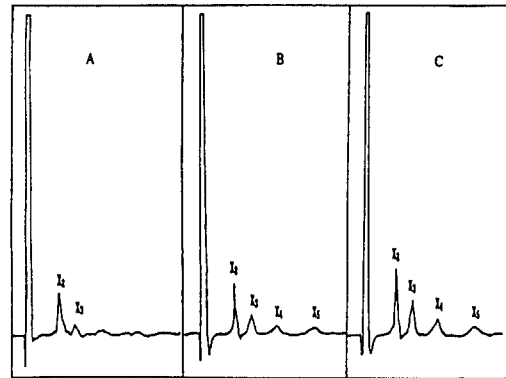


Fig. 10. HPLC chromatogram of birchwood xylan hydrolyzates.

A : Sample was treated for 5 hours with purified xylanase

B : Sample was treated for 10 hours with purified xylanase

C : Sample was treated for 20 hours with purified xylanase

X2 : xylobiose, X3 : xylotriose

X4 : xylotetraose, X5 : xylopentaose

단하여 xylobiose를 주성분으로 하는 xylooligosaccharide를 생성하는 endo형 xylanase임을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 본 효소가 bifidogenic factor인 것으로 알려진 xylooligosaccharide를 생산하기에 최적인 bacterial xylanase임을 시사한다. 1988년에 등록된 유럽 특허<sup>7)</sup>에는 xylooligosaccharide가 fructooligosaccharide보다 산과 열에 안정한 특성이 있고, 유익한 장내세균, 즉 *Bifidobacterium*속, *Lactobacillus*속의 세균 생육을 선택적으로 촉진함이 보고된 바 있다. Xylooligosaccharide는 물에 가용성이며, 열 안정성이 좋으므로 음료나 빵을 포함한 다양한 식품의 첨가물로 유용하기 때문에 산업적으로 xylooligosaccharide가 생산되기 시작했다. 그러나 현재 학문적으로 밝혀진 우수한 성질 등에 비해 xylooligosaccharide의 산업적 생산과 이용은 그리 활발하지 못하다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 가격이 싼 원료 xylan의 확보, 분해시 물리적인 처리를 병행하거나 분해 조건을 최적화 하는 등의 방안이 있겠으나 근본적으로는 본 효소와 같은 endo형의 효소를 강

력히 분비하는 미생물, 특히 배양 시간이 짧고, 유전자 조작이 용이하며, xylan은 알칼리에 약하여 쉽게 분해되므로 혐기성 조건하에서 안정하게 작용하는 효소를 분비하는 세균을 선발하는 것이 바람직하다고 하겠다.

7. European Patent Application, 0 265 970 A2 (1988)

(1994년 2월 14일 수리)

## 요 약

*Bacillus* sp. GS가 생산하는 xylanase를 DEAE-Sephadex A-50 ion chromatography, DEAE-Sephadex G-100 gel filtration을 통하여 정제한 후 그 특성을 조사 하였다. 최적 반응 온도와 pH는 각각 40℃, 6.5 이었으며 50℃ 이하에서는 안정하였으나 그 이상이 되면 급격히 불활성화 되는 것으로 보아 열 안정성은 좋지 않음을 알 수 있었다. pH 안정성을 조사한 결과 pH 5.5에서 8.0까지는 안정하였고, 금속 이온에 의한 영향을 살펴본 결과  $Co^{++}$ ,  $Cu^{++}$ 에 의하여 효소의 활성이 현저히 증가함을 알 수 있었고,  $Hg^{+}$ 에 의해서는 거의 완전히 효소의 활성이 저해됨을 알 수 있었다. 분리된 효소는 birchwood xylan을 기질로 하여 분해 산물을 분석한 결과 xylobiose가 주성분인 xylooligosaccharide를 생산하는 endo형의 효소임을 알 수 있었다. 따라서 본 효소는 xylan으로 부터 bifidogenic factor인 xylooligosaccharide를 생산하기에 적당한 효소라고 생각된다.

## 참고문헌

1. Northcote, D.H. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 113 (1984)
2. Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **32**, 277 (1976)
3. Paice, M.G. and Jurasek, L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 802 (1978)
4. Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1956)
5. Bradford, M.M. : *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976)
6. Bae, Seung-Ho and Choi, Yong-Jin : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **19**, 592 (1991)