

Xylanase를 생산하는 내열성 *Bacillus* 속 균주의 분리와 효소생산 조건

박영서* · 강미영 · 장학길 · 박귀근 · 강종백¹ · 이정기² · 오탈광²
경원대학교 식품생물공학과, ¹경원대학교 화학과, ²생명공학연구소 미생물효소 R.U.

Isolation of Xylanase-producing Thermo-tolerant *Bacillus* sp. and Its Enzyme Production. Park, Young Seo*, Mi-Young Kang, Hak-Gil Chang, Gwi-Gun Park, Jong-Back Kang¹, Jung-Kee Lee², and Tae-Kwang Oh². Department of Food and Bioengineering, ¹Department of Chemistry, Kyungwon University, Sunghnam 461-701, Korea, ²Microbial Enzyme R.U., Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, Korea - Thermo-tolerant bacterium producing the xylanase was isolated from soil and identified as *Bacillus pumilus*. This strain, named *Bacillus pumilus* TX703, was able to grow and produce xylanase at the culture temperature of 50°C. The maximum xylanase production was obtained when 1% (w/v) birchwood xylan and 1% (w/v) soytone were used as carbon source and nitrogen source, respectively. The biosynthesis of xylanase was under the catabolite repression induced by glucose in the culture medium, and it was completely inhibited in the presence of 0.2% (w/v) glucose. The maximum activity of xylanase was observed from pH 8.0 to 9.0 and from 50 to 60°C and the enzyme was highly heat-stable, whose activity remained was over 50% at 80°C, and was quite stable from pH 5.0 to 10.0.

Key words: xylanase, *Bacillus pumilus*, enzyme production

Bacillus 속 균주는 산업적 응용에 많은 장점을 지니고 있는 균주로서[5] α -amylase, cellulase, xylanase, protease 등과 같은 많은 종류의 산업효소를 생산하는데 이러한 효소들은 대부분 기질의 존재하에서 유도되는 유도효소이며, 또한 효소생산시 catabolite repression이나 feedback inhibition과 같은 생합성 대사 조절기구들에 의해 조절되기 때문에 산업적 대량생산시 낮은 효소 생산성을 보이고 있다. 이 중에서 xylanase (1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)[25]는 식물 세포벽의 주요 구성성분인 xylan을 가수분해하여 xylose 또는 xylooligosaccharide로 전환시키는 효소로서 자연계에 풍부한 목질계 바이오매스로부터 에탄올 등과 같은 바이오에너지의 생산, 목질계로부터 양질의 펄프 생산, 가축의 사료제조, 식품첨가물 등 생물공학산업에 유용하게 사용될 수 있어 최근 그 산업적 중요성이 강조되고 있다.

Xylanase의 생산성을 증대시키기 위한 접근방법으로서 catabolite repression과 같은 효소의 생합성 조절기구들을 분자적 수준에서 조절함으로써 효소의 산업적 생산시 효소 생산의 저해요인을 제거하여 발효환경의 변화에 상관없이 지속적으로 효소를 생산시킬 수 있다. Catabolite repression은 미생물의 성장배지에서 손쉽게 이용될 수 있는 catabolite의 존재에 의해 효소의 생합성이 억제되는 것으로, 특히 고농도의 glucose가 함유된 배지에서 생육시 많은 미생물들은 다른 에너지원의 이용에 관련된 당분해효소의 생합성이 억제되는 현상이 나타난다[13,14]. 이러한 glucose에

의한 catabolite repression은 효모와 그램 음성세균 및 그램 양성세균에서 서로 다른 기작을 나타내는 것으로 보고되고 있는데 가장 많은 연구가 되어 있는 *Escherichia coli*에서는 cyclic AMP(cAMP)의 세포내 농도에 따라 cAMP-cAMP receptor protein(CRP) 복합체가 효소 생합성 유전자의 promoter에 결합하여 유전자의 전사를 조절함으로써 catabolite repression을 일으키는 것으로 알려져 있다 [2, 20]. 이와는 달리 *B. subtilis* 등과 같은 그램 양성세균에서는 당대사에 관련된 phosphoenolpyruvate phosphotransferase system의 한 성분인 HPr 단백질이 kinase의 작용에 의해 인산화된 후 이 인산화 HPr이 catabolite control protein 등의 trans-acting 인자와 상호 반응하여 효소의 생합성에 관련된 유전자의 cis-acting catabolite responsive element에 결합함으로써 효소의 생합성을 조절하리라고 추론하고 있으나 아직까지 정확한 기작은 밝혀져 있지 않다 [3, 4, 7, 8, 10, 11, 16, 17, 18, 22, 24, 27].

본 연구에서는 *Bacillus*에서의 catabolite repression에 관한 조절기작을 연구하기 위한 첫 번째 단계로서 catabolite repression을 받는 xylanase를 생산하는 *Bacillus* 속 균주를 탐색하고 이 균주로부터의 효소 생산 특성을 조사함으로써 효소 생산에 관여하는 세포내 조절단백질이나 조절인자 등에 관한 연구를 수행하기 위한 기초자료를 얻고자 한다.

재료 및 방법

배지

토양으로부터 xylanase를 생산하는 미생물을 분리하기 위

*Corresponding author
Tel. 82-342-750-5378, Fax. 82-342-750-5273
E-mail: ypark@mail.kyungwon.ac.kr

하여 xylan이 함유된 기본 한천배지(0.5% oat-spelts xylan, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5% agar)를 사용하였다.

시약

Oat-spelts xylan, birchwood xylan, soluble starch, carboxymethyl cellulose와 그 밖의 탄소원으로 사용된 시약은 Sigma사 제품을 사용하였고 polypeptone, yeast extract 등 질소원으로 사용된 시약은 Difco사 제품을 사용하였다.

Xylanase 생산균주의 분리 및 동정

Xylanase를 생산하는 *Bacillus* 속 균주를 분리하기 위하여 경기도 지역의 토양을 채집한 후 1g의 토양을 10ml의 0.9% NaCl에 현탁시켰다. 현탁액을 10분간 정치한 후 상

등액 100 μ l를 xylan이 함유된 기본한천배지에 도말하고 50 $^{\circ}C$ 에서 1~2일간 배양하였다. 생육된 colony들 중에서 주위에 투명환을 생성하는 균주들을 선별하여 xylanase 활성을 확인하는 실험에 사용하였다.

균주동정은 그램 염색을 실시한 후 Biolog사의 Microbial Identification SystemTM 기체 크로마토그래피에 의한 세포내 지방산 분석법을 이용하여 수행하였다.

Xylanase 활성측정법

Xylanase 활성은 Somogyi와 Nelson의 환원당 정량방법 [21]을 변형하여 측정하였다. 기질용액으로는 1% oat-spelts xylan을 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액에 현탁한 후 100 $^{\circ}C$ 에서 30분간 가열하고 정치시켜 그 상등액을 이용하였다. 기질용액 0.4 ml에 0.1 ml의 조효소액을 첨가하여

Table 1. Carbon utilization pattern of the isolated strain TX703 obtained from the Biolog Microbial Identification SystemTM

Carbon source	Reaction	Carbon source	Reaction	Carbon source	Reaction
α -Cyclodextrin	-	β -Methyl-D-galactoside	-	Methyl pyruvate	+
β -Cyclodextrin	+	3-Methyl glucose	+	Mono-methyl succinate	-
Dextrin	+	α -Methyl-D-glucoside	-	Propionic acid	-
Glycogen	-	β -Methyl-D-glucoside	+	Pyruvic acid	+
Inulin	-	α -Methyl-D-mannoside	-	Succinamic acid	-
Mannan	-	Palatinose	+	Succinic acid	-
Tween40	-	D- Psicose	+	N-Acetyl L-glutamic acid	+
Yween80	-	D-Raffinose	-	Alaninamide	-
N-Acetyl-D-glucosamine	-	L-Mannose	-	D-Alanine	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	D-Ribose	+	L-Alanine	-
Amygdalin	-	Salicin	+	L-Alanyl-glycin	-
L-Arabinose	-	Sedoheptulosan	-	L-Asparagine	+
D-Arabitol	-	D-Sorbitol	+	L-Glutamic acid	-
Arbutin	+	Stachyose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
Cellobiose	+	Sucrose	+	L-Pyroglutamic acid	-
D-Fructose	+	D-Tagatose	-	L-Serine	-
L-Fucose	-	D-Trehalose	+	Putrescine	-
D-Galactose	-	Turanose	+	2,3-Butanediol	-
D-Galacturonic acid	-	Xylitol	-	Glycerol	+
Gentiobiose	-	D-Xylose	+	Adenosine	+
D-Gluconic acid	-	Acetic acid	-	2'-Deoxyadenosine	+
α -D-Glucose	+	α -Hydroxybutyric acid	-	Inosine	+
m-Inositol	-	β -Hydroxybutyric acid	-	Thymidine	+
α -D-Lactose	-	γ -Hydroxybutyric acid	-	Uridine	+
Lactulose	-	p-Hydroxyphenyl acetic acid	-	Adenosine-5'-monophosphate	-
Maltose	+	α -Ketoglutaric acid	-	Thymidine-5'-monophosphate	-
Maltotriose	-	α -Valeric acid	-	Uridine-5'-monophosphate	-
D-Mannitol	+	Lactamide	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Mannose	+	D-Lactic acid methyl ester	-	Glucose-1-phosphate	-
D-Melezitose	-	L-Lactic acid	-	Glucose-6-phosphate	-
D-Melibiose	-	D-Malic acid	-	D-L- α -Glycerol phosphatc	-
α -Methyl-D-galactoside	-	L-Malic acid	+		

+, positive; -, negative

40°C에서 20분간 반응시킨 후 alkaline copper reagent를 0.4 ml 첨가하고 100°C에서 10분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액을 수돗물로 냉각하여 0.4 ml의 Nelson's reagent를 가한 후 2.6 ml의 증류수를 첨가하여 희석한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-xylose를 0~1.0 μmol 사용하여 작성하였고, 효소 1 unit는 주어진 조건에서 분당 1 μmol의 D-xylose에 해당하는 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

효소생산을 위한 균주의 배양

효소생산의 최적조건을 결정하기 위하여 기본배지에서 하룻밤 생육시킨 균주의 종배양액을 1%(v/v)되게 본배양액에 접종하여 45°C에서 16시간 동안 250 rpm으로 진탕 배양한 후 15,000×g에서 5분간 원심분리하여 얻어진 배양 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산균주의 분리와 동정

Xylanase를 생산하면서 catabolite repression을 받는 *Bacillus* 속 균주를 탐색하기 위하여 토양 현탁액을 xylan이 함유된 기본 한천배지에 도달한 후 50°C에서 배양한 결과 colony 주위에 투명환을 형성하는 균주를 34주 분리하였다. 이 균주들을 기본배지에서 액체 배양한 후 xylanase 효소 활성을 측정한 결과 15 균주가 일정 수준(0.1 U/ml) 이상의 효소활성을 나타내 이 균주들을 1%의 glucose가 함유된 기본배지에 액체 배양한 후 배양상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 7 균주가 glucose에 의해 xylanase 생산이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고 그랜 염색결과 그랜 양성 균으로 밝혀졌다. 이 균주들 중 6 균주는 형태학적으로 *Bacillus* 속 균주일 것으로 예측되었고 1 균주는 방선균 계통의 균주일 것으로 사료되었다. *Bacillus* 속 균주로 예상되는 6 균주 중에서 xylanase 활성이 가장 높은 균주를 선택하여 형태학적 특성을 관찰한 결과 본 균주는 단간균으로서 호기성이며 운동성이 있고 포자를 형성하는 것으로 나타났다. 또한 미생물의 탄소원 이용성에 기초를 둔 Biolog사의 Microstation Microbial Identification System™을 이용하여 동정을 실시한 결과 이 균주는 *Bacillus pumilus*로 동정되었으며(Similarity 0.861, Distribution 3.61, Average Distribution 0.44, Maximum Distribution 1.57)(Table 1), 기체 크로마토그래피에 의한 세포내 지방산 분석에 의해서도 *Bacillus pumilus*로 동정되어 본 균주를 *Bacillus pumilus* TX703으로 명명하고 본 연구에 사용하였다. 온도에 따른 균주생육과 효소생산량을 조사해 본 결과 50°C까지 균주생육과 xylanase 생산이 가능하여 본 균주는 내열성 xylanase를 생산하는 내열성 균주로 판명되

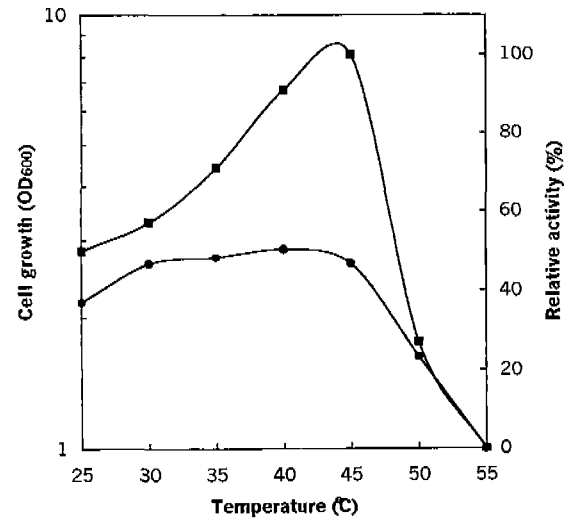


Fig. 1. Effect of temperature on the cell growth and xylanase production of *B. pumilus* TX703.

●, Cell growth; ■, relative activity.

었다(Fig. 1).

탄소원의 종류에 따른 효소생산성

미생물이 생산하는 다당류 분해효소의 생산성은 배지내 존재하는 탄소원의 종류에 영향을 받으므로 탄소원에 의한 xylanase의 생산성을 조사하였다. 탄소원이 결핍된 기본배지에 17종류의 탄소원을 1%(w/v)가 되도록 각각 첨가하여

Table 2. Effect of carbon sources on the xylanase production of *B. pumilus* TX703

Carbon sources (1%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity	
		U/ml	(%) /Cell growth
None	1.89	0.00	0
Glucose	1.29	0.00	0
Fructose	1.60	0.00	0
Maltose	2.06	0.04	26
Xylose	0.03	0.02	15
Galactose	1.56	0.01	7
Mannose	2.34	0.02	15
Arabinose	0.03	0.01	7
Ribose	0.09	0.00	0
Raffinose	2.23	0.02	11
Sucrose	2.00	0.00	0
Lactose	1.66	0.00	4
Glycerol	1.97	0.00	0
Mannitol	1.99	0.00	4
Oat-spelts xylan	0.16	0.02	19
Birchwood xylan	0.80	0.14	100
Soluble starch	1.26	0.00	0
Carboxymethyl cellulose	1.01	0.00	0

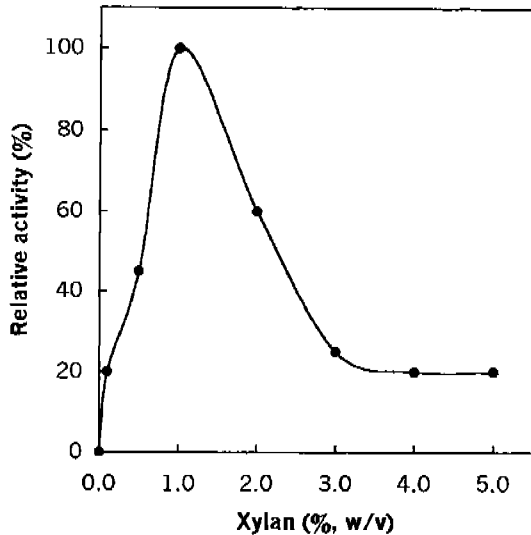


Fig. 2. Effect of birchwood xylan concentration on the xylanase production of *B. pumilus* TX703.

배양시킨 후 배양액에 존재하는 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 birchwood xylan을 탄소원으로 사용하였을 경우 효소의 생산성이 가장 좋았으며 birchwood xylan의 첨가농도에 따른 효소 생산성은 Fig. 2에서와 같이 1.0%(w/v)의 농도에서 가장 좋았다. Oat-spelts xylan의 경우 birchwood xylan의 경우와 비교하여 19%의 활성만을 유도할 수 있었는데 이는 xylan의 구조적 차이에 의해 이용도가 달라지기 때문이라 생각된다. Xylan은 그 구조적 특성에 따라 두 가지로 나눌 수 있는데 일반적으로 hardwood에는 acetylated xylan의 형태로, softwood에는 arabinoxylan으로 존재한다[23]. Acetylated xylan은 적어도 70개의 β -1,4-linked D-xylopyranose 잔기를 기본 골격으로 하여 10개의 잔기마다 2번 위치에 하나의 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid 단위를 지니고 있고 O-acetyl기가 β -D-xylopyranose 잔기와 1 \rightarrow 2 또는 1 \rightarrow 3 결합을 하고 있어 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid와 acetyl기가 각각 xylose 잔기의 약 10%와 70% 비율로 존재하고 있다. 한편 arabinoxylan은 13개의 (1 \rightarrow 4)-linked β -D-xylopyranose 잔기를 기본골격으로 하여 3개의 (1 \rightarrow 2)-linked 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid 단위와 하나의 (1 \rightarrow 3)-linked L-arabinofuranose 단위를 지니고 있어 4-O-methyl- α -D-glucuronic acid와 arabinose 잔기가 각각 xylose 잔기의 약 18%와 12% 비율로 존재하고 있다[1, 26]. 본 실험에 사용된 oat-spelts xylan은 그 구조에 약 10%의 arabinose와 15%의 glucose 잔기를 함유하고 있는데 반해 birchwood xylan은 대부분의 잔기들이 xylose로 이루어져 있다. 본 균주는 다당류인 soluble starch나 carboxymethyl cellulose를 탄소원으로 이용하지 못하는 것으로 나타나 amylase나 CMCase를 생산하지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of glucose concentration on the xylanase production of *B. pumilus* TX703

Glucose concentration (% w/v)	Xylanase activity (U/ml)	Relative activity (%)
0.0	0.29	100
0.1	0.22	76
0.2	0.02	7
0.4	0.01	3
0.6	0.01	3
0.8	0.01	3
1.0	0.00	0

한편 xylose, arabinose, ribose 등을 탄소원으로 이용하였을 경우에는 균의 생육이 거의 이루어지지 않았고 효소활성도 나타나지 않았는데 이로부터 본 균주는 5탄당의 이용성이 매우 낮다고 추측된다. Panbangred 등[15]은 *B. pumilus*가 생산하는 xylanase는 xylose에 의해 유도되며 glucose에 의해 저해된다고 하였고 Roncero 등[19]은 *B. subtilis*가 생산하는 xylanase는 glucose나 xylose에 의해 활성이 완전히 저해된다고 보고하였다. 따라서 본 연구에 사용된 *B. pumilus* TX703은 Panbangred 등이 보고한 *B. pumilus*가 생산하는 xylanase와는 그 생합성 특성에 있어서 큰 차이가 있음을 알 수 있었다.

Glucose에 의한 catabolite repression

Glucose 농도에 따른 효소 생산성은 Table 3에서와 같이 0.2%의 glucose 존재 하에서 생합성이 거의 정지되어 본 균주는 glucose에 의한 catabolite repression을 매우 민감하게 받는 것으로 나타났다.

Bacillus 속 균주는 포자형성, 효소전달체제나 세포외 합성 등의 세포성장과정 중에 catabolite repression을 받는 것으로 알려져 있다. Catabolite repression은 glucose 등과 같이 간단히 이용되는 탄소원의 존재시 분해 관련 효소 생합성이 억제되는 것을 말하는데 [3, 4] *E. coli*의 경우 cyclic AMP(cAMP)를 고농도로 첨가했을 때 glucose에 의한 repression이 해제되어 cAMP가 catabolite repression에 중요한 역할을 한다는 기구가 잘 알려져 있다[2, 20]. 그러나 *Bacillus* 속 균주에서는 glucose에 의한 catabolite repression 작용기작이 정확하게 알려져 있지 않고 있는데 Laoidc 등[12]은 *B. licheniformis amyL* 유전자의 catabolite repression은 전사과정 중에 일어나며 catabolite repression 관여 가능한 조절 단백질이 전사초기위치 근처에 존재하는 cis-acting 부위에 결합하여 glucose 존재시 전사를 지연시킨다고 제시하였다. 본 실험에 사용된 *B. pumilus* TX703의 xylanase 효소에 대한 catabolite repression 기작을 연구하기 위해서는 xylanase 유전자를 분리하여 이 유전자에 존재하는 cis-acting 부위를 조사하는 것이 필요하며 본 균주로

Table 4. Effect of nitrogen source on the xylanase production of *B. pumilus* TX703

Nitrogen source (1%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity		Xylanase activity /Cell growth
		U/ml	(%)	
None	0.02	0.00	0	0.00
Polypeptone	1.34	0.04	13	0.03
Yeast extract	0.30	0.05	16	0.17
Polypeptone(0.5%)+ Yeast extract(0.5%)	0.31	0.03	9	0.10
Malt extract	0.03	0.02	6	0.67
Soytone	1.89	0.32	100	0.17
Casamino acid	0.47	0.06	19	0.13
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.07	0.00	0	0.00
NH ₄ Cl	0.00	0.00	0	0.00
NH ₄ NO ₃	0.16	0.00	0	0.00

부터 catabolite repression에 관여하는 *trans*-acting 조절단백질을 생합성하는 유전자의 분리가 요구된다. 이에 본 연구실에서는 현재 xylanase 유전자에 대한 cloning 실험을 진행 중에 있다.

질소원의 종류에 따른 효소생산성

질소원에 따른 균주의 xylanase 생산성을 조사하기 위하여 1.0%(w/v)의 birchwood xylan을 탄소원으로 첨가하고 질소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 무기질소원과 유기질소원을 1.0% (w/v)가 되도록 첨가한 후 배양상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 무기질소원을 첨가하였을 경우 xylanase의 생합성이 전혀 이루어지지 않았고 유기질소원 중에서 soytone을 첨가하였을 경우 가장 높은 효

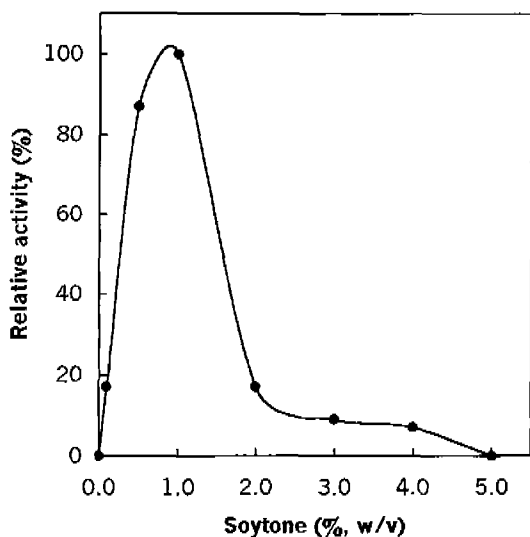


Fig. 3. Effect of soytone concentration on the xylanase production of *B. pumilus* TX703.

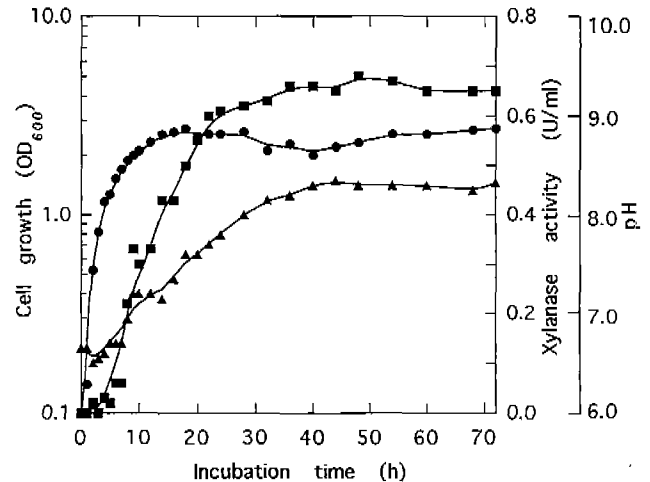


Fig. 4. Time course of cell growth and xylanase production of *B. pumilus* TX703.

●, Cell growth; ■, xylanase activity; ▲, pH.

소 생합성을 나타내었으며 세포의 성장도 가장 좋음을 알 수 있었다(Table 4). Soytone의 첨가농도에 따른 효소 생합성 정도는 Fig. 3과 같이 1.0%(w/v)의 농도에서 가장 좋음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 균주를 이용하여 효소를 생산하기 위한 최적 배지조건은 1% birchwood xylan, 1% soytone, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O, pH 6.8로 결정하였다. 본 최적생산배지를 이용하여 배양시간에 따른 효소생산을 조사한 결과 Fig. 4와 같이 배양 후 24시간까지 효소활성이 증가하여 72시간까지 활성이 계속 유지됨을 알 수 있었다.

효소활성의 최적 pH와 pH안정성

본 실험에 사용된 균주가 생산하는 xylanase의 효소적 특성을 경시적으로 관찰하기 위하여 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 효소반응의 최적 pH와 pH 안정성을 조사하였다. 효소반응의 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 3~7까지는 10 mM citrate-phosphate 완충용액, pH 7~9까지는 10 mM Tris-HCl 완충용액, pH 9~11까지는 10 mM sodium bicarbonate 완충용액을 사용하여 기질용액을 만든 후 효소액과 반응시켜 효소활성을 측정한 결과 Fig. 5A에서와 같이 pH 8~9에서 최대활성을 나타내었다. Fungi 유래의 xylanase는 넓은 pH 범위에서 최적활성을 유지하고 세균 유래의 xylanase는 일반적으로 fungi 유래의 xylanase 보다 높은 pH에서 최적활성을 지니는 것으로 알려져 있다. 호알칼리성 *Bacillus* No. C-59-2의 xylanase[9]는 pH 6~8에서 최대활성을 나타내며 *B. pumilus* IPO[15]의 경우 pH 6.5에서, *Aspergillus niger* str. 14[6]의 경우에는 pH 4.0에서 최대활성을 나타낸다고 보고되어 있다. 효소의 pH 안정성을 조사하기 위해 각 pH 별로 제조한 완충용액에 효소용액을 가해 40°C에서 30분간 방치한 후 10 mM Tris-

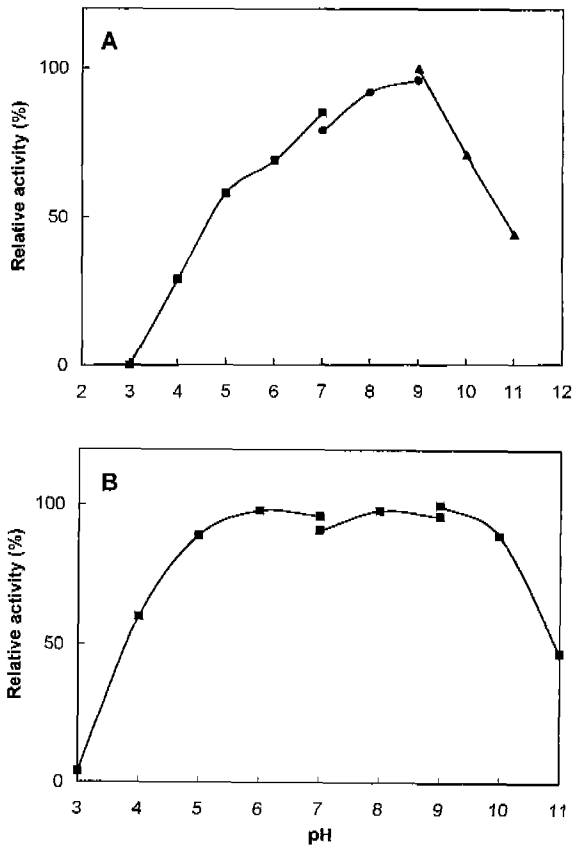


Fig. 5. Effect of pH on the activity (A) and stability (B) of the xylanase from *B. pumilus* TX703.

The buffers used were 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 3 ~ 7), 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7 ~ 9), 10 mM sodium bicarbonate buffer (pH 9 ~ 11).

HCl, pH 8.0 완충용액으로 pH를 조정한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 5B에서와 같이 본 효소는 pH 5~10까지의 넓은 pH 범위에서 안정하게 활성이 유지되었다. 호알칼리성 *Bacillus* No. C-59-2의 xylanase[9]는 pH 5~11에서, *B. pumilus* IPO[23]의 경우 pH 5~9에서, *Aspergillus niger* str. 14[6]의 경우에는 pH 5~10의 범위에서 안정하였다.

효소활성의 최적온도와 온도 안정성

효소활성의 최적온도를 알아보기 위해 30~80°C까지 각 온도별로 효소활성을 측정한 결과 50~60°C에서 최대활성을 나타내었다(Fig. 6A). Fungi 유래의 xylanase는 열 안정성이 높아서 대개 70°C 이상에서만 완전히 불활성화되고 중온성 세균 유래의 xylanase는 대개 50~60°C 범위에서 최적활성을 나타내며 65°C 이상에서는 불활성화된다. 호알칼리성 *Bacillus* No. C-59-2의 xylanase[9]는 60°C에서 최대활성을 나타내며, *B. pumilus* IPO[23]의 경우 45~50°C에서, *Aspergillus niger* str. 14[6]의 경우에는 50°C에서 최대활성을 보였다. 효소의 열 안정성을 조사하기 위해서

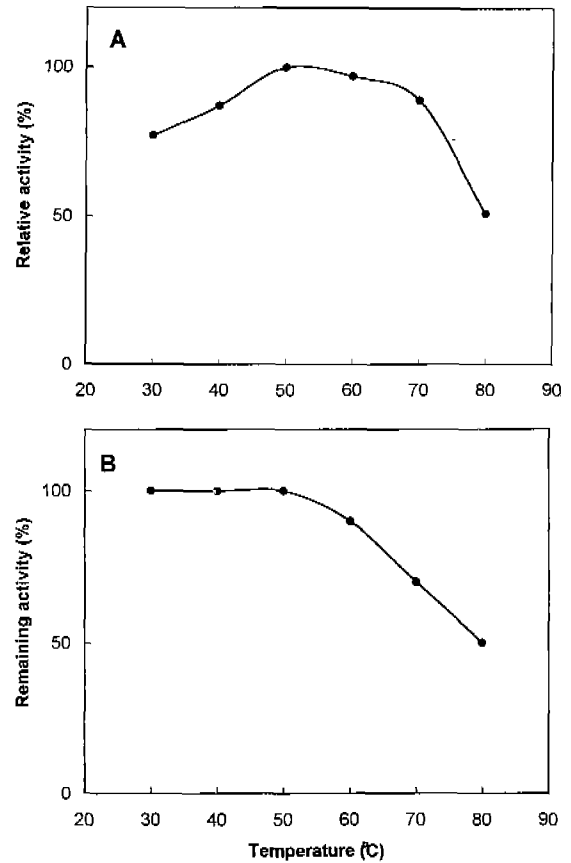


Fig. 6. Effect of temperature on the activity (A) and stability (B) of the xylanase from *B. pumilus* TX703.

각 온도별로 효소용액을 30분간 처리한 후 잔존활성을 측정한 결과 80°C에서도 50% 이상의 잔존활성을 유지하였다(Fig. 6B). 호알칼리성 *Bacillus* No. C-59-2의 xylanase[9]는 30~60°C에서 안정하였으며, *B. pumilus* IPO[15]의 경우 50°C에서 30분간 처리하였을 때 50%의 활성을 유지하였으며, *Talaromyces byssochlamydoideis* YH-50이 생산하는 xylanase[28]는 70°C까지 효소활성이 100% 유지되었고 95°C에서 5분간 처리하여도 30% 이상의 잔존활성을 보여 내열성을 나타내었다. 이상의 실험결과로부터 *B. pumilus* TX703이 생산하는 xylanase는 *B. pumilus* IPO의 xylanase와는 그 효소적 특성에 있어서 차이가 있음을 알 수 있었으나 보다 정확한 효소적 특성 규명을 위하여 효소의 순수정제를 수행 중에 있다.

요 약

Xylanase를 생산하는 내열성 세균을 토양으로부터 분리한 후 동정을 실시한 결과 *Bacillus pumilus*로 판명되었다. *Bacillus pumilus* TX703으로 명명한 본 균주는 배양온도 50°C까지 균주생육과 xylanase 생산이 가능하였다. 본 균주

는 배지 중에 탄소원과 질소원으로서 1%(w/v) birchwood xylan과 1%(w/v) soytone을 사용하였을 경우에 최대의 xylanase 생산성을 나타내었다. Xylanase의 생합성은 glucose에 의한 catabolite repression을 받았으며 0.2%(w/v) glucose에 의해 효소의 생합성이 거의 저해되었다. 조효소의 최적활성은 pH 8에서 9 사이와 50에서 60°C 사이에서 나타났으며, 효소의 열안정성이 매우 높아서 80°C에서 30분간 처리시 50% 이상의 잔존활성을 나타내었고 pH 5에서 10까지의 넓은 pH 범위에서 안정하게 활성이 유지되었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부에서 시행한 생명공학기술개발사업의 지원으로 수행된 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
2. Botsford, J. L. 1981. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.* **45**: 620-642.
3. Deutscher, J., E. Kster, U. Bergstedt, V. Charrier, and W. Hillen. 1995. Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **15**: 1049-1053.
4. Do, E. J., H. D. Shin, C. Kim, and Y. H. Lee. 1993. Selection and characterization of catabolite repression resistant mutant of *Bacillus firmus* var. *alkalophilus* producing cyclodextrin glucanotransferase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**: 78-85.
5. Ganesan, A. T. and J. A. Hoch. 1986. *Bacillus Molecular Genetics and Biotechnology Applications*. Academic Press, Orlando, Florida.
6. Gorbacheba, I. V. and N. A. Rodionova. 1977. Studies on xylan degrading enzymes. I. Purification and characterization of endo-1,4- β -xylanase from *Aspergillus niger* str. 14. *Biochim. Biophys. Acta* **484**: 79-93.
7. Grundy, F. J., D. A. Waters, S. H. G. Allen, and T. M. Henkin. 1993. Signal transduction by the bacterial phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **175**: 7348-7355.
8. Henkin, T. M., F. J. Grundy, W. L. Nicholson, and G. H. Chambliss. 1991. Catabolite repression of α -amylase gene expression in *Bacillus subtilis* involves a *trans*-acting gene product homologous to the *Escherichia coli* *lacI* and *galR* repressors. *Mol. Microbiol.* **5**: 575-584.
9. Horikoshi, K. and Y. Atsukawa. 1973. Xylanase produced by alkalophylic *Bacillus* no. C-59-2. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2097-2103.
10. Hueck, C. J. and H. Wolfgang. 1995. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: A global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol. Microbiol.* **15**: 395-401.
11. Kraus, A., C. Hueck, D. Gartner, and W. Hillen. 1994. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* *xyl* operon involves a *cis* element functional in the context of an unrelated sequence, and glucose exerts additional *xylR*-dependent repression. *J. Bacteriol.* **76**: 1738-1745.
12. Laoide B. M. and D. J. J. McConnell. 1989. Cis sequences involved in modulating expression of *Bacillus licheniformis* *amyL* in *Bacillus subtilis*: Effect of sporulation mutations and catabolite repression resistance mutations on expression. *J. Bacteriol.* **171**: 2443-2450.
13. Magasanik, B. 1970. Glucose effects: Inducer exclusion and repression, pp. 189-219. In J. R. Beckwith and D. Zipser (eds.), *The Lactose Operon*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
14. Magasanik, B. and F. C. Neidhardt. 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization, pp. 1318-1325. In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, B. Magasanik, K. B. Low, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (eds.), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
15. Panbangred, W., A. Shinmyo, S. Kinoshita, and H. Okada. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.* **47**: 957-963.
16. Postma, P. W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson. 1993. Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**: 543-594.
17. Reizer, J., A. H. Romano, and J. Deutscher. 1993. The role of phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, in the regulation of carbon metabolism in Gram-positive bacteria. *J. Cell. Biochem.* **51**: 19-24.
18. Reizer, J., S. L. Sutrina, M. H. Saier, Jr., G. C. Stewart, A. Peterkofsky, and P. Reddy. 1989. Mechanistic and physiological consequences of Hpr (ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in Gram-positive bacteria: Studies with site-specific mutants of HPr. *EMBO J.* **8**: 2111-2120.
19. Roncero, M. I. 1983. Genes controlling xylan utilization by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **156**: 257-263.
20. Saier, M. H. Jr. 1991. A multiplicity of potential carbon catabolite repression mechanisms in prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *The New Biologist* **3**: 1137-1147.
21. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
22. Stewart, G. C. 1993. Catabolite repression in the Gram-positive bacteria: Generation of negative regulators of transcription. *J. Cell. Biochem.* **51**: 25-28.
23. Timell, T. E. 1967. Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses. *Wood Sci. Technol.* **1**: 45-70.
24. Weickert, M. J. and G. H. Chambers. 1990. Site-directed mutagenesis of catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6238-6242.
25. 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.

26. Woodward, J. 1984. Xylanases: Functions, properties and applications. *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **8**: 9–30.
27. Wray, L. V., Jr., F. K. Pettengill, and S. H. Fisher. 1994. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis hut* operon requires a *cis*-acting site located downstream of the transcription initiation site. *J. Bacteriol.* **176**: 1894–1902.
28. Yoshioka, H., N. Nagato, S. Chavanich, N. Nilubol, and S. Hayashida. 1981. Purification and properties of thermostable xylanase from *Talaromyces byssochlamydoides* YH-50. *Agric. Biol. Chem.* **45**: 2425–2432.

(Received June 15, 1999)