

Xylanase 생산균 *Streptomyces* sp. WL-2의 특성과 효소 생산성

이은희 · 김창진¹ · 윤기홍*

우송대학교 의료영양식품과학부, ¹한국생명공학연구원

Characterization and Xylanase Productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. Lee, Eun-Hee, Chang-Jin Kim¹, and Ki-Hong Yoon*. School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, Daejeon 300-718, ¹KRIBB, Daejeon 305-600, Korea - A strain WL-2 was isolated from soil as a producer of the extracellular xylanase, which catalyzes the hydrolysis of oat spelt xylan. The strain WL-2 was identified as *Streptomyces* sp. on the basis of its 16S rRNA sequence, morphology, cultural and physiological properties. The xylanase of culture filtrate was the most active at 60°C and pH 6.0, and retained 90% of its maximum activity at range of pH 4.5~6.5. In order to optimize the culture medium for xylanase production, ingredients of G.S.S medium were replaced by several carbohydrates. The carbohydrates such as α -cellulose, oat spelt xylan and maltose increased dramatically the xylanase productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. The maximum xylanase productivity was reached to 120 U/ml in the modified medium containing 1% α -cellulose and 1% maltose.

Key words: *Streptomyces*, identification, xylanase, productivity

식물 세포벽에 존재하는 hemicellulose의 주요 구성 성분으로 알려져 있는 xylan은 기본골격이 β -1,4 결합을 하고 있는 D-xylose로 구성되어 있고 이러한 xylose 잔기에 acetyl group, L-arabinofuranose와 D-glucuronic acid 등이 측쇄로 연결되어 존재하고 있다[4]. 이러한 xylan의 가수분해에 관여하는 효소로는 xylanase(endo-1,4- β -xylanase), β -xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase와 acetylsterase 등이 있으며[2], xylanase는 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 한다. Xylanase는 제지의 표백공정, 사료 효율 개선, 과일음료의 청정, 제빵의 고품질화, 농산부산물 이용분야에서 산업용 효소로서의 활용가치에 대한 많은 연구가 진행되었다. 제지산업에서는 표백공정에 응용하기 위해서는 내알칼리성·내열성 xylanase[10], 또는 제지성분 중 섬유질의 손상을 방지하기 위해 cellulase의 활성이 없는 xylanase[8, 9]에 대한 관심이 높고 이들 효소를 사용하였을 때 표백공정에서 염소성분의 사용량을 저감시킬 수 있다고 알려졌다[3]. 현재 사료산업에서는 xylanase가 사료첨가용 효소로 시판되어 사용되고 있는데, 이 효소는 mannanase와 함께 곡물 사료 섭취시 hemicellulose로 인한 가축의 장내의 고 점질도를 저하시키는 기능을 함으로써 소화기 질병을 예방하고 사료효율을 향상시키는 것으로 알려져 있다[12].

여러 종류의 곰팡이와 세균이 xylanase 생산균으로 알려졌다. 이들 미생물의 xylanase와 그 유전자의 특성이 보고되었다. 곰팡이 중에서는 *Aspergillus* 속 균주[16]와

Trichoderma reesei[18]에 의해 생산된 xylanase가 많이 연구되었으며, 특히 *T. reesei*는 xylanase의 생산성이 높은 것으로 알려졌다. 일반세균에서는 *Bacillus*와 *Clostridium*속 균주를 중심으로 다양한 특성의 xylanase가 발견되었으며[17], xylanase 고생산성 재조합 *B. subtilis*가 개발되고 있다. 한편 *Streptomyces albus*[1], *S. lividans*[7], *S. galbus*[8]와 *S. halstedii*[14] 및 다수의 *Streptomyces* sp. 분리군[3, 5, 11]을 대상으로 xylanase의 유전자, 효소, 생산성 및 재조합 균주와 재조합 효소에 대한 연구가 활발히 진행되었다. 본 연구에서는 국내 토양으로부터 xylan 분해력이 우수한 방선균을 분리하여 이를 동정하고 xylanase 생산성에 미치는 배지 성분의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

미생물의 배양과 사용배지

방선균의 분리하기 위한 배지로는 humic acid vitamin 평판배지(humic acid 1.0 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/L, Na₂HPO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L, CaCO₃ 0.02 g/L, KCl 1.7 g/L, thiamine-HCl 0.5 mg/L, riboflavin 0.5 mg/L, niacin 0.5 mg/L, inositol 0.5 mg/L, pyridoxin-HCl 0.5 mg/L, Ca-pantothenate 0.5 mg/L, biotin 0.25 mg/L, aminobenzoic acid 0.5 mg/L, cycloheximide 50 mg/L, nalidixic acid 50 mg/L, agar 18 g/L (pH 7.2))를 사용하였으며, 토양시료를 생리식염수에 현탁하여 도말한 후 28°C에서 7일간 배양하였다. Xylanase 생산성을 조사하기 위해서는 G.S.S 배지(soluble starch 10 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, soybean meal 25 g/L, beef extract 1 g/L, yeast extract 4

*Corresponding author

Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676

E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

g/L, NaCl 2 g/L, glucose 20 g/L, CaCO₃ 2 g/L(pH 7.2))를 기본배지로 사용하여 그 성분을 변화시킨 배지를 사용하였다. 최종적으로 효소 생산을 위해서 사용한 배지인 G.S.S-1 α 의 G.S.S-1X는 G.S.S 배지성분 중 soybean meal을 1%로 하고 soluble starch 대신 1% α -cellulose 또는 1.5% oat spelt xylan을 각각 첨가한 배지이다.

분리균주 동정

분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic bacteriology[6]와 International Streptomyces Project (ISP) 방법[15, 19]에 준하여 실시하였다. 배양 특성의 조사는 ISP 방법에 따라 ISP 평판배지(Difco, USA) No. 2, 3, 4, 5, 7과 glucose asparagine 평판배지 및 Bennett 평판배지에 접종한 후 28°C에서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면색깔, 배지색깔, 생육정도, 가용성 색소 생성 유무 및 멜라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다. 탄소원 이용성은 arabinose, xylose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, raffinose 등을 부가탄소원으로 첨가한 Bennett 평판배지에서 배양한 후 성장정도를 비교하여 결정하였다. 분리균주의 형태적 특성은 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자형성능 등의 관찰을 통해 실시하였으며 포자형성능은 oatmeal 평판배지를 이용하여 28°C에서 21일간 배양한 후 조사하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자의 보존적 지역의 염기서열 5'-TGCCAGCAGCCGCCCTA-3' (*Escherchia coli* 16S rRNA 유전자 염기서열의 515~531 지역), 5'-TTGTACACACCGCCCGTC-3'(*E. coli* 16S rRNA 유전자 염기서열의 1389~1406 지역)을 primers로 사용하였으며, *Streptomyces* sp. WL-2로부터 분리한 총 염색체 DNA를 주형으로 사용하였다. PCR 반응액은 template DNA (20 ng), 10 mM Tris(pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP, 50 pmol primers와 2.5 U *Taq* polymerase로 구성되어 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 50초간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 전기영동하여 추출한 후 증폭시 사용한 oligonucleotides를 primers로 사용하여 염기서열을 결정하였다.

Xylanase 조효소액 제조

분리균을 G.S.S 배지에 접종하여 28°C에서 4일 동안 진탕 배양한 후 원심분리하여 얻은 배양상등액을 얻었다. 배양상등액에 15~70% ammonium sulfate를 처리하고 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 한 후 침전물을 취하여 20 mM

sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 녹이고 동일 buffer에 투석하여 조효소액을 제조하였다.

Xylanase 활성 측정

Xylanase 활성은 oat spelt xylan을 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[13]으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0%(w/v) oat spelt xylan 용액 0.5 ml와 200 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) 0.25 ml를 효소 용액 0.25 ml와 혼합하여 50°C에서 15분 동안 반응시켰다. DNS 시약 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 xylan으로부터 1 μ mol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Xylanase 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위하여 30°C~70°C까지의 온도에서 각각 효소 활성을 측정하였으며, 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위해서는 pH 3.5에서 pH 10.0까지의 범위에서 xylanase 활성을 각각 측정하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산균주의 분리와 동정

다양한 환경에서 채취한 시료를 생리식염수로 희석하여 humic acid vitamin 평판배지에 도말하고 28°C에서 7일간 배양하였다. 형태가 서로 다른 것으로 판단되는 수백개의 방선균 콜로니를 G.S.S 복합 액체배지에 접종하여 28°C에서 5일간 진탕 배양하여 얻은 배양상등액을 사용하여 oat spelt xylan의 분해활성을 조사하였다. 그 결과 다수의 분리균주가 xylanase를 생산하는 것으로 확인되었으며, 이들 중 oat spelt xylan을 분해하여 저당류로 전환하는 성질을 지닌 xylanase의 생산성이 높은 균주 WL-2를 선발하였다.

선발된 WL-2의 형태적 특성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 포자의 표면은 매끄럽고 실린더형이며 그 크기는 0.7~0.8 \times 0.8~1.0 μ m이었다. 포자는 10~20개 이상이 연결되어 직파형 구조를 이루는 것으로 확인되었다. WL-2의 배양학적 특성을 확인하기 위해 ISP 배지를 포함한 9종의 평판배지에서 균의 성장, 기균사의 색깔, 배면의 색깔, 수용성의 색소생성 등을 관찰한 결과 Table 1과 같이 glycerol-asparagine과 tyrosine 평판배지를 제외한 다른 배지에서 균의 성장이 양호하였다. 수용성 색소를 생성하지 않으며, 콜로니 표면의 색깔은 주로 회색을 띄고 콜로니 배면은 배지에 따라 차이가 있었다. 또한 분리균 WL-2는 35°C 이상의 온도에서는 자라지 못하였으나 10°C에서 30°C까지는 정상



Fig. 1. Scanning electron microscopic photogram (1.68×10 fold) of the isolate WL-2 grown on oatmeal agar medium for 2 days.

적인 성장이 일어나 저온에서 잘 성장하는 특성을 나타내었다.

WL-2 균주의 생리화학적 특성은 관찰한 결과 Table 2에서 보인바와 같이 탈지유와 전분의 가수분해능을 보이며 탈지유를 응고시키는 것으로 확인되었고 melanoid 색소를 생성하지 않았다. 또한 각종 탄수화물을 1%가 되도록 첨가한 배지와 이를 첨가하지 않은 배지에서 분리균의 성장정도를 비교한 결과 WL-2는 당 알코올과 cellulose를 제외한 여러 종류의 당을 탄소원으로 잘 이용하였다. 한편 분리균의 세포벽에 존재하는 diaminopimelic acid의 형태를 TLC를 통

해 분석한 결과 WL-2는 LL형의 diaminopimelic acid를 지니고 있어 *Streptomyces*속의 균주로 판단된다. 또한 PCR로 증폭된 1,494 bp 크기의 16S rRNA 유전자 염기서열 (GenBank accession No. DQ167410)을 결정하여 BLAST 조사 프로그램으로 NCBI database와 비교한 결과도 *Streptomyces*속 균주(GenBank accession No. AY996829)와 99% 이상의 유사도를 보였다.

Xylanase의 반응 특성

Streptomyces sp. WL-2의 배양상등액을 ammonium sulfate로 분획하여 얻은 xylanase 조효소액을 사용하여 oat splet xylan의 가수분해 반응성을 조사하였다. 반응온도와 pH를 달리하여 xylanase 활성을 측정함으로써 반응온도와 pH가 효소활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 2에서 나타난 바와 같이 반응온도 60°C 와 pH 6.0에서 최대 효소활성을 보였으며, pH 4.5에서 pH 6.5까지의 범위에서 90% 이상의 활성을 나타냈다. *Streptomyces* sp. K37[11]과 S38[5]이 생산하는 xylanase도 WL-2의 효소와 동일한 조건에서 최대 활성을 보이는 것으로 보고된 바 있으며, *S. galbus* NR[8]의 xylanase는 반응 최적온도가 50°C 이고, 반응 최적pH는 *S. albus*[1]의 효소와 동일하게 6.5로 알려졌다. 따라서 대부분의 *Streptomyces*속 균주가 생산하는 xylanase는 중성부근의 pH에서 효소활성이 높다는 것을 알 수 있다. 한편 WL-2의 xylanase 조효소액은 *para*-nitrophenyl- β -xyloside를 분

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. WL-2.

Media	Growth	Aerial mycelium color	Reverse side color	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	Good	Gray	Dark brown	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Gray	Dark brown	None
Inorganic salt-starch agar (ISP no.4)	Good	Pinkish gray	Dark brown	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Poor	Light gray	Light faint yellow	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	Good	Gray	Faint yellow	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	Poor	Light gray	Poor	None
Glucose-asparagine agar	Good	Gray	Brown	None
Bennet's agar	Good	Gray	Brown	None
Nutrient agar	Moderate	Gray	Faint yellow	None

Table 2. Physiological characteristics of *Streptomyces* sp. WL-2.

Unit character	Description	Unit character	Description
Melanoid pigment	-	Carbohydrate utilization	
Soluble pigment	-	D-Glucose	+
Coagulation of milk	+	L-Arabinose	+
Peptonization of milk	-	D-Xylose	+
Hydrolysis of starch	+	Inositol	-
Hydrolysis of skim milk	+	D-Mannitol	-
Cell chemistry		D-Fructose	+
Diaminopimelic acid	LL type	L-Rhamnose	+
		Sucrose	+
		Raffinose	+

+, positive; -, negative

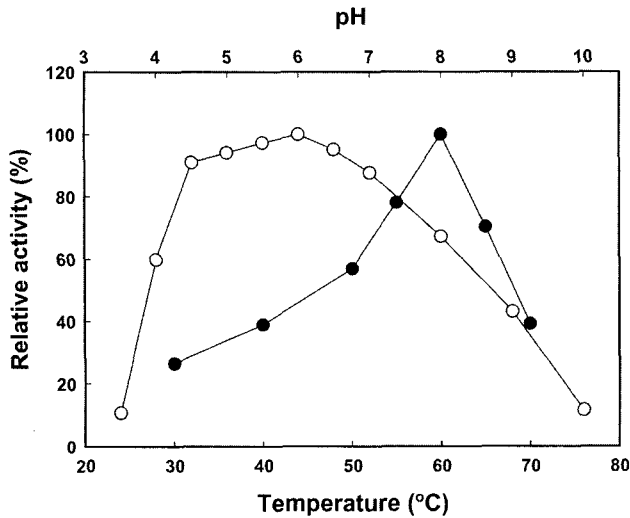


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the xylanase activity. Temperature profile (●) was obtained by measuring the xylanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions were done at 50°C and various pHs for determining the pH profile (○). The following buffer systems were used: pH 3.5 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate; pH 8.0 to 10.0, 50 mM KCl-borate.

해하지 못하였는데 이로부터 *Streptomyces* sp. WL-2는 β -xylosidase를 균체외로 생산하지 못하는 것으로 여겨진다.

G.S.S 배지성분에 따른 효소 생산성

G.S.S 배지를 기본 배지로 하여 xylanase 생산성에 미치는 배지조성을 최적화하기 위해 우선 배양시간에 따른 효소 생산성을 검토하였다. *Streptomyces* sp. WL-2 균주를 G.S.S 배지에 접종하여 28°C, 180 rpm으로 baffled flask에서 진탕 배양하면서 배양상등액에 존재하는 xylanase의 활성을 측정 한 결과 배양 4일째에서 효소 생산성이 가장 높았다. G.S.S 배지성분 중 어떠한 성분이 xylanase의 생산성에 큰 영향을 미치는가 조사하기 위해 G.S.S 배지성분 중 한가지씩을 제거한 배지에 WL-2 균주를 각각 4일간 배양하여 배양상등액의 효소활성을 측정하였을 때 soybean meal 또는 soluble starch를 제외한 배지에서 xylanase 활성이 감소하였다. 한편 glucose를 제거하였을 때도 효소활성이 크게 감소하였는데 이는 균의 성장이 거의 일어나지 못한 때문으로 확인되었다.

따라서 G.S.S. 배지성분 중 soluble starch와 soybean meal이 효소 생산에 중요한 성분으로 판단되어 다른 성분은 고정하고 이들 성분의 첨가량을 각각 0~5% 범위로 달리한 배지에서 효소 생산성을 검토하였다. 그 결과 가용성 전분의 경우 1%를 첨가하였을 때 가장 효소 생산성이 높았으며, 0.5% 이하 또는 3.0% 이상을 첨가하였을 때는 효소 생산성이 1% 첨가하였을 때보다 50%에도 미치지 못하였다. Soybean meal의 경우도 1%를 첨가하였을 때 가장 효소 생산성이 높았고 가용성 전분과 유사한 경향을 보였다. 이집

트에서 분리된 *S. lividans*는 peptone이나 soybean meal이 효소 생산성을 크게 증가시키는 것으로 보고된 바 있다[7].

Xylanase 생산성에 미치는 고분자 탄수화물의 영향

다수의 미생물에서 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많으며, *Streptomyces* sp. QG-11-3이 주요성분으로 밀기울과 eucalyptus kraft pulp를 함유한 고형배지에서 xylanase 생산성이 높은 것으로 알려졌다[3]. 그러므로 1% soybean meal을 함유한 G.S.S (G.S.S-1) 배지에 soluble starch 또는 그 대신 arabinoxylan, filter paper, microcrystallin cellulose, oat spelt xylan, 벚짚, 밀기울, α -cellulose를 1% 각각 달리 첨가하여 배양한 후 xylanase 생산성을 조사하였다. 그 결과 oat spelt xylan과 α -cellulose를 첨가한 배지에서 효소생산성이 soluble starch를 첨가하였을 때보다 약 6배 정도 증가되었으며, 밀기울을 첨가한 경우에는 약 50% 정도 증가하였고, 나머지의 경우는 약간씩 감소하였다. 특히하게 벚짚을 첨가하였을 때 xylanase의 생산성이 급격히 감소하여 거의 생산되지 않았다.

따라서 배지내 α -cellulose와 oat spelt xylan의 첨가량이 *Streptomyces* sp. WL-2의 xylanase 생산성에 미치는 영향을 검토하였다. G.S.S-1 배지를 대조구로 하고 가용성 전분 대신 α -cellulose 또는 oat spelt xylan의 농도를 각각 달리하여 첨가한 액체배지에 xylanase의 생산성을 조사한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 α -cellulose의 경우 첨가량이 1.0%인 배지에서 효소 생산성이 가장 높았으며 효소 생산 증가는 대조구의 8배에 달하였다. oat spelt xylan의 경우에는 1.5%를 첨가하였을 때 대조구의 9배에 달하는 효소가 생산되었다.

S. halstedii JM8의 xylanase 생산은 포도당에 의해 억제

Table 3. Effects of various amounts of oat spelt xylan and α -cellulose on the xylanase production.

Additional carbohydrate	Amount (%)	Xylanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
None		8.5	1.0
α -Cellulose ^a	0.5	39.9	4.7
	1.0	67.7	8.0
	1.5	63.7	7.5
	2.0	50.1	5.9
	3.0	36.2	4.3
Xylan ^b	0.5	26.6	3.2
	1.0	58.0	6.8
	1.5	77.3	9.1
	2.0	40.4	4.8
	3.0	29.7	2.1

^a α -Cellulose was substituted for soluble starch of G.S.S-1 medium.

^bOat spelt xylan was substituted for soluble starch of G.S.S-1 medium.

Table 4. Effects of maltose concentration on xylanase production.

Medium	Maltose* conc. (%)	Xylanase production (U/ml)	Relative productivity (fold)
G.S.S-1	0.0	8.5	1.0
G.S.S-1*	0.5	11.0	1.4
	1.0	117.3	13.8
	2.0	47.9	5.6
	3.0	17.9	2.1
G.S.S-1X	0.5	99.4	11.7
	1.0	105.4	12.4
	2.0	45.0	5.3
	3.0	19.6	2.3

*Maltose was substituted for glucose of both G.S.S-1 α and G.S.S-1X medium.

된다고 알려져 있어[14], 상기의 결과에 근거하여 가용성 전분을 제거한 G.S.S-1 배지에 가용성 전분을 대신하여 1% α -cellulose(G.S.S-1 α 배지) 또는 1.5% oat spelt xylan(G.S.S-1X 배지)을 첨가한 배지를 대조구로 하고 G.S.S-1 배지성분인 포도당 대신 과당, 엿당, 아라비노스, 갈락토오스를 각각 1% 첨가한 배지에서 WL-2의 xylanase 생산성을 조사하였다. 그 결과 엿당을 배지에 첨가하였을 때 xylanase 생산성이 가장 증가한다는 사실이 확인되어 엿당의 첨가량을 달리 하여 효소 생산성을 조사하였다. Table 4에 보인바와 같이 엿당의 첨가량에 따라 효소 생산성에 큰 차이가 있는 것을 알 수 있으며, 엿당이 1%가 첨가된 배지에서 가장 효소 생

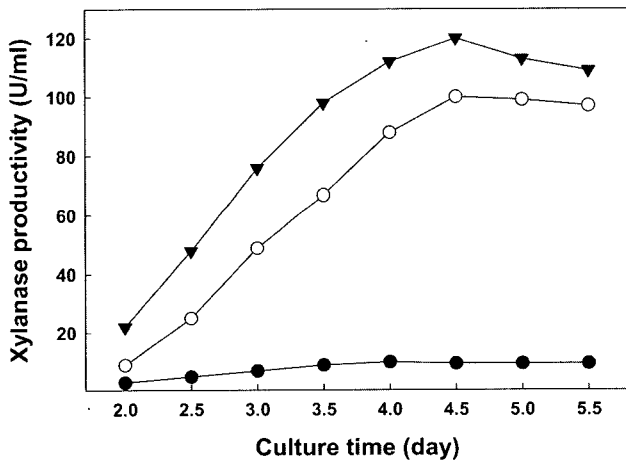


Fig. 3. Xylanase production of *Streptomyces* sp. WL-2. *Streptomyces* sp. WL-2 was grown respectively in G.S.S-1 medium (-●-) and its modified media, G.S.S-1a (-▼-) and G.S.S-1X (-○-) containing 1% maltose instead of glucose at 28°C with vigorous shaking. Xylanase activities were determined with the culture filtrates.

산성이 높았다. α -Cellulose 를 함유한 배지에서는 엿당 (1%) 첨가에 의한 효소 생산의 증가가 oat spelt xylan을 함유한 배지에서 보다 높았으며 대조구에 비해 약 14배 증가하였다.

배양시간에 따른 xylanase 생산성

앞에서 제조된 배지에서 *Streptomyces* sp. WL-2의 xylanase 생산성을 조사하기 위해 엿당 1%를 각각 함유한 G.S.S-1 α 배지와 G.S.S-1X 배지에 WL-2를 접종하여 28°C 에서 5일간 진탕배양하면서 배양시간에 따른 배양상등액의 xylanase 활성을 분석하였다(Fig. 3). 배양시간이 108시간이 될 때까지 배양액의 xylanase 생산성이 증가하였으며 그 이후에는 약간 감소하는 것으로 나타났고, 최대 xylanase 생산성은 G.S.S-1X 배지에서 100 U/ml, G.S.S-1 α 배지에서는 이보다 더 높은 120 U/ml로 확인되었다.

이러한 효소 생산성은 탄소원과 질소원으로 oat spelt xylan과 yeast extract를 함유한 배지에서 xylanase 최대생산성이 12 U/ml인 *S. albus* ATCC 3005[1]에 비해 매우 높은 편이다. 또한 *Streptomyces* sp. QG-11-3는 액상배양에서 약 80 U/ml의 효소를 생산하지만, 고체배지에서는 효소 생산성이 약 200 U/ml로 증가된다는 사실이 보고된 바 있으므로 [3] *Streptomyces* sp. WL-2의 고체배양 조건을 검토할 경우 xylanase의 생산성을 더 증가시킬 수도 있을 것으로 여겨진다.

요 약

토양으로부터 세포외로 xylanase를 분비 생산하는 방선균 WL-2가 분리되었으며, 분리균의 16S rRNA 염기서열과 형태·배양·생리적 특성을 조사한 결과 *Streptomyces* 속 균주로 확인되었다. 분리균의 배양상등액에 존재하는 xylanase는 pH 6.0과 60°C의 반응조건에서 반응성이 가장 높았으며, pH 4.5~6.5 범위에서 최대활성의 90% 이상을 나타냈다. Xylanase의 생산을 위한 배지를 최적화하기 위해서 G.S.S 배지성분을 여러 종류의 탄수화물로 대체하였다. α -Cellulose, oat spelt xylan과 엿당과 같은 탄수화물은 *Streptomyces* sp. WL-2의 xylanase 생산성을 급격히 증가시키는 것으로 확인되었다. α -Cellulose(1%)와 엿당(1%)을 함유한 변형배지에서 xylanase의 최대생산성이 120 U/ml로 확인되었다.

REFERENCES

- Antonopoulos, V. T., M. Hernandez, M. E. Arias, E. Mavrakos, and A. S. Ball. 2001. The use of extracellular enzymes from *Streptomyces albus* ATCC 3005 for the bleaching of eucalyptus kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 92-97.
- Bachmann, S. L. and A. J. McCarthy. 1991. Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-

- degrading system of *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2121-2130.
3. Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 459-466.
 4. Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
 5. de Lemos Esteves, F., V. Ruelle, J. Lamotte-Brasseur, B. Quinting, and J. -M. Frere. 2004. Acidophilic adaptation of family 11 endo-beta-1,4-xylanases: modeling and mutational analysis. *Protein Sci.* **13**: 1209-1218.
 6. Goodfellow, M., T. Cross, and H. A. Lechevalier. 1989. Suprageneric classification of *Actinomyces*, pp 2333-2450. In S.T. Williams, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 4, Williams and Wilkins, Baltimore.
 7. Kansoh, A. L., A. M-Ali, and A. A-El-Gammal. 2001. Xylanolytic activities of *Streptomyces* sp. 1--taxonomy, production, partial purification and utilization of agricultural wastes. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **48**: 39-52.
 8. Kansoh, A. L. and Z. A. Nagieb. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek.* **85**: 103-114.
 9. Kim, D. J., H. J. Shin, and K. -H. Yoon. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 304-310.
 10. Lee, Y. E., E. Lowe, B. Henrissat, and J. G. Zeikus. 1993. characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-R1. *J. Bacteriol.* **10**: 563-567.
 11. Mansour, F. A., A. A. Shereif, M. M. Nourel-Dein, M. I. Abou-Dobara, and A. S. Ball. 2003. Purification and characterization of xylanase from a thermophilic *Streptomyces* sp. K37. *Acta Microbiol. Pol.* **52**: 159--172.
 12. McCracken, K. J., M. R. Bedford, and R. A. Stewart. 2001. Effects of variety, the 1B/1R translocation and xylanase supplementation on nutritive value of wheat for broilers. *Br. Poult. Sci.* **42**: 638-642.
 13. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 14. Rodriguez, S., R. I. Santamaria, J. M. Fernandez-Abalos, and M. Diaz. 2005. Identification of the sequences involved in the glucose-repressed transcription of the *Streptomyces halstedii* JM8 *xysA* promoter. *Gene.* **351**: 1-9.
 15. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
 16. Siedenberg, D., S. R. Gerlach, K. Schugerl, M. L. F. Giuseppin, and J. Hunik. 1998. Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochem.* **33**: 429-433.
 17. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
 18. Tenkanen, H., J. Plus, and K. Poutanen. 1992. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 566-574.
 19. Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.

(Received Aug. 19, 2005/Accepted Sep. 12, 2005)