

흰 코뿔소 배설물로부터 분리한 *Bacillus pumilus* H10-1의 Xylanase 활성

윤영미^{1*}, 안기홍¹, 김중곤², 안승현¹, 차영록¹, 양정우¹, 유경단¹, 문윤호¹, 안종웅¹, 구본철³, 최인후¹

Xylanase Activity of *Bacillus pumilus* H10-1 Isolated from *Ceratotherium simum* Feces

Young Mi Yoon^{1*}, Gi Hong An¹, Jung Kon Kim², Seung-Hyun Ahn¹, Young-Lok Cha¹, Jungwoo Yang¹, Kyeong-Dan Yu¹, Jong-Woong Ahn¹, Youn-Ho Moon¹, Bon-Cheol Koo³, and In-Hoo Choi¹

접수: 2014년 8월 14일 / 게재승인: 2014년 9월 29일
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Xylanase have been used to convert the polymetric xylan into fermentable sugars from the production of ethanol and xylitol from plant biomass. The aim of this study was to isolate and identify xylanolytic bacterium from herbivore feces and was to used the xylanase for enzymatic hydrolysis of biomass. Xylanolytic strains were isolated from 59 different feces of herbivores from Seoul Grand Park located in Gwacheon Gyeonggi-do. The xylanolytic strains were selected by congo red staining and DNS method. Total 67 strains isolated from the herbivores feces were tested for xylanase activity. Among the strains, H10-1, which has the highest xylanase activity, was isolated from feces of *Ceratotherium simum*. The H10-1 strain was identified as *Bacillus pumilus* based on its morphological/biochemical characteristics and partial 16S rDNA gene sequences. Culture conditions of *B. pumilus* H10-1 such as initial medium pH, incubation temperature and incubation time were optimized for maximum xylanase production. And also xylanase produced by *B. pumilus* H10-1 was

applied for the saccharification of *Miscanthus sacchariflorus* cv. 'Geodae 1', which was pretreated with 1.5M NaOH. The optimized culture conditions of *B. pumilus* H10-1 were pH 9, 30°C incubation temperature, and 7 day incubation time, respectively. This xylanase activity under the optimized conditions was 20.4±3.3 IU. The crude xylanase produced by *B. pumilus* H10-1 was used for the saccharification of xylan derived from pretreated 'Geodae 1'. The saccharification conditions were 50°C, 200 rpm, and 5 days. Saccharification efficiency of pretreated 'Geodae 1' by *B. pumilus* H10-1 was 8.2%.

Keywords: Xylanase, *Bacillus pumilus* H10-1, Geodae 1, Saccharification

1. INTRODUCTION

바이오에탄올 생산의 원료가 되고 있는 섬유질계 바이오매스는 당질계나 전분질계와는 달리 식량작물과 경합하지 않으며, 지구상에 풍부하게 존재하고 있어 이용 가능성이 높다. 섬유질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌으로 주로 구성되어 있으며, 이들은 중요한 탄소원들이다. 현재 식물의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 이용한 바이오에탄올 생산에 관한 연구가 진행 중이며, 이들의 발효 가능한 당 전환을 위해 효소의 개발 또한 국내외적으로 연구되고 있다. 국내에서는 섬유질계 바이오매스로 벼짚, 보릿짚 등 농업

¹농촌진흥청 국립식량과학원
¹National Institute of Crop Science, RDA, Muan 534-833, Korea
Tel: +82-61-450-0134, Fax: +82-61-453-0085
e-mail: mi3710@korea.kr

²농촌진흥청 국립축산과학원
²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

³농촌진흥청 국제기술협력센터
³International Technology Cooperation Center, RDA, Jeonju 560-500, Korea

부산물과 역새 등 C₄ 식물들이 에너지 작물로 연구되고 있다 [1].

헤미셀룰로오스의 경우 자일란이 주요 구성원으로 자일로오스를 탄소원으로 이용하는 발효균주의 개발을 통해 섬유질계 바이오매스의 바이오에탄올 생산 수율을 향상시키기 위한 연구가 진행되고 있다 [2]. 또한 셀룰로오스는 헤미셀룰로오스와 구조적으로 서로 얽혀있는 상태이므로 자일란 분해효소와 셀룰로오스 분해효소의 공동 작용으로 셀룰로오스의 당전환 수율이 향상되었다는 연구가 있으며 이는 셀룰로오스 분해효소 뿐만 아니라 자일란 분해효소의 연구도 함께 진행되어야 함을 시사한다 [3,4].

자일란은 식물의 세포벽에 위치하는 헤미셀룰로오스의 주요 구성원으로 D-xylose가 β-1,4 결합한 고분자이다. 자일란은 식물체 총 건조중량의 20~35%를 차지하고 있으며, 미생물이 생산하는 자일라네이즈에 의해 자일로오스, 자일로올리고사카라이드, 자일로바이오스로 분해된다. 자일라네이즈(endo-1,4-β-D-xylan xylanohydrolase, EC 3.2.1.8)는 주로 박테리아, 곰팡이, 방선균, 효모 등이 생산하며, 산업적으로 식품, 동물사료, 펄프와 종이 산업, 바이오에탄올 생산 등에 유용하게 사용되고 있다 [5-9].

거대역새는 물억새 (*Miscanthus sacchariflorus*)의 일종으로, 농촌진흥청 바이오에너지작물센터에서 2009년 개발한 한국형 섬유질계 비식량 에너지작물이다. 거대역새는 초장이 4 m 이상이고, 수량이 20~30 ton/ha로 일반 물억새에 비하여 많아 바이오에탄올 생산을 위한 주요 바이오매스로 각광받고 있다 [10-12]. 역새는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이 41.2%, 21.2%, 25.1%로 구성되어 있으며, 1000 kg 역새를 0.4 M NaOH를 이용한 전처리와 연속적 당화 발효를 통해 180 kg 바이오에탄올을 생산할 수 있다고 보고되었다 [13].

본 연구에서는 자일라네이즈 활성 균주를 찾기 위해 섬유질을 먹이로 하는 초식동물의 배설물로부터 자일라네이즈를 생산하는 균을 분리 동정하였고, 균주의 효소생산을 최적화하기 위하여 배지의 초기 pH, 배양 온도, 배양 시간의 영향을 조사하였다. 또한 생산된 효소의 이용 가능성을 확인하기 위해 바이오매스 유망작물인 거대 역새의 당화에 적용하고 당화율을 알아보았다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 균주의 분리 및 선발

자일라네이즈 효소를 생산하는 균주의 분리를 위해 초식동물 배설물을 서울대공원 (Gyeonggi-do, Korea) 으로부터 숫과 (25종), 사슴과 (14종), 낙타과 (4종), 기린과 (1종), 코끼리과 (1종), 말과 (6종), 캥거루과 (4종), 하마과 (2종), 토끼과 (1종), 코뿔소과 (1종) 등 총 10과 (59종)에 대하여 분양받았다. 분양받은 배설물 1 g을 멸균한 9 mL의 0.85% NaCl 용액에 현탁한 후 희석하여 1% xylan (1% xylan, 0.5% bacto-peptone, 0.25% yeast extract)을 함유한 고체 배지에 도말하여 37°C에

서 24시간 배양하였다. 배양 후 단일 콜로니를 다시 1% xylan 배지에 37°C에서 24시간 계대 배양하였다. 배양 균주의 효소 활성 확인은 congo red 염색법에 의해 clear zone 유무로 이루어졌으며, 효소 활성이 있는 균주는 20% glycerol에 저장하여 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다 [14].

효소 활성이 확인된 균주는 1% xylan을 함유한 액체배지에 배양하였으며 효소의 활성은 GHOSE T. K. [15]의 실험에 준하여 측정하였다. 효소의 활성 측정을 위해 원심분리한 조효소 상등액 0.5 mL을 2% xylan 0.5 mL에 첨가한 후 50°C에서 30분간 효소와 기질을 반응시켰다. 반응이 끝난 후 즉시 DNS (Dinitrosalicylic acid) 용액 3 mL을 첨가하고, 100°C에서 5분간 반응시킨 후 증류수 20 mL을 첨가하여 냉각시키고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 정량을 위하여 xylose를 표준당으로 0.2~2.0 g/mL 범위의 정량곡선을 작성하였다. 이때 효소의 활성은 IU (International unit)로 나타내었으며, 이는 1분 동안 1 μmol의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

2.2. 선발 균주 동정

선발된 자일라네이즈 효소 생산 균주의 동정은 균주의 형태학적 특성, 생화학적 특성, 염기서열 분석 등을 통해 이루어졌다. 형태학적 특성분석은 PCA (Plate count agar)에 균주를 24시간 접종 배양한 후 colony의 형태, 특성 등을 조사하여 이루어졌다. 생화학적 특성은 그램염색과 API 50 CHB kit (bio Merieux Vitek, France)을 이용하여 이루어졌다. 16S rDNA 염기서열 분석을 위해 액체 배양한 균을 genomic DNA extraction kit (DyneBio, Korea)로 genomic DNA를 추출하고, 16S rDNA universal primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR product는 T-easy vector에 ligation 후 형질전환 재조합 균주를 선발하고 plasmid 추출 후 *Hind*III, *Bg*III로 DNA 크기를 확인하고 (쥬마크로젠 (Daejeon, Korea)에 sequence 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information), Genbank를 이용하여 다른 strain들과의 상동성을 분석하고, clustal X software version 1.81을 통해 염기서열을 정리하였다.

2.3. 효소생산을 위한 배지 및 배양조건 최적화

선발된 *Bacillus pumilus* H10-1의 효소 생산 최적화를 위해 배지의 초기 pH, 배양 온도, 배양 시간 등을 달리하여 생산된 효소의 활성을 측정하였다. 배지의 초기 pH는 1 N NaOH와 1 N HCl을 이용하여 배지의 pH를 4~10으로 조정하였으며, 배양 온도는 온도를 30~50°C로 달리하여 이루어졌다. 생산된 효소의 활성은 GHOSE T. K. [15]의 실험에 준하여 측정하였다.

2.4. *Bacillus pumilus* H10-1 생산효소를 이용한 전처리 거대역새의 자일란 분해

거대역새 시료는 2012년 무안에서 시험사업으로 재배된 것을 2013년 1월에 곤포의 형태로 수확한 것이다. 수확한 역새

시료는 3 mm로 미분쇄 후 1.5 M NaOH 용매와 1:9로 혼합하여 전처리하였다. 전처리 역사의 당화실험은 NREL (National Renewable Energy Laboratory)에서 제시한 NREL LAP (Laboratory Analytical Procedure)의 리그노섬유질계 바이오매스의 효소적 당화 실험에 준하여 이루어졌다 [16]. 자일란 0.1 g을 함유하도록 전처리 역사의 무게를 정확히 재고, 최적 조건에서 배양한 (배지의 초기 pH 9, 배양온도 30°C, 150 rpm, 7일 배양) 효소를 정제와 농축 과정 없이 5 mL (xylanase activity 100 IU)을 첨가한 뒤, 0.05 M citrate buffer를 1 mL 첨가한 후 최종 무게가 10 g이 되도록 멸균수를 첨가하였다. 당화 실험은 50°C에서 200 rpm으로 5일간 이루어졌다. 생성된 단당류 (글루코스, 자일로스, 아라비노스)의 분석은 굴절율 검출기 (refractive index detector, RID, Waters, USA)가 장착된 HPLC (high performance liquid chromatography, Waters, USA)를 이용하였으며, 컬럼은 Aminex HPX-87H column (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), 컬럼 온도와 검출기 온도는 40°C, 65°C이었다. 분석을 위해 이동상 5 mM H₂SO₄를 0.5 mL/min 유속으로 일정하게 유지하였다. Xylan 당화율은 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Xylan 당화율} = \frac{\text{당화된 xylose 양 (g)} \times 0.88}{\text{초기 xylan 투입량 (g)}} \times 100 \quad (1)$$

0.88 = xylose와 xylan의 분자량의 차이에 따른 보정 상수

3. RESULTS AND DISCUSSION

본 연구는 초식동물의 배설물로부터 자일라네이즈를 생산하는 균주들을 분리하고 활성이 우수한 균주를 선발, 동정하여 바이오매스 유망작물인 거대역사의 당화에 적용하기 위하여 수행되었다. 활성이 있는 균주의 탐색은 숫과 (25종), 사슴과 (14종), 낙타과 (4종), 기린과 (1종), 코끼릿과 (1종), 말과 (6

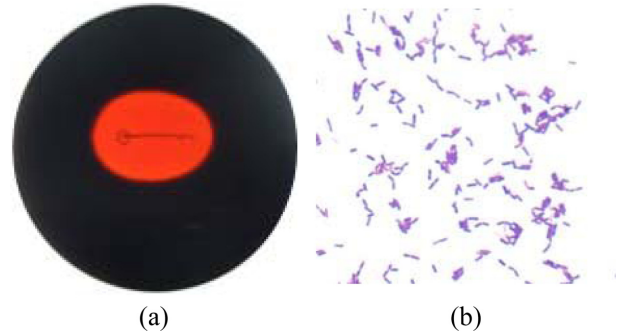


Fig. 1. Congo red (a) and Gram stain (b) of isolated H10-1 strain.

종), 캥거루과 (4종), 하마과 (2종), 토끼과 (1종), 코뿔소과 (1종)의 총 10과 59종 초식동물 배설물 (입수처: 서울대공원)에서 수행되었다. 1차적으로 균주의 선발을 위해 congo red 염색을 수행하고 clear zone을 형성한 colony는 다시 계대하여 순수 분리하였다 (Table 1). 순수 분리된 균은 1% xylan을 함유한 액체배지에 접종 배양하고 생성된 조효소를 2% CMC와 효소 기질반응시킨 후 반응에 의해 생성된 환원당의 양을 DNS 분석법으로 확인하였다 (Table 1). H9-1 (토끼), H10-1 (흰코뿔소), H25-4 (알라루)가 생산한 효소의 활성은 각각 11.44, 14.67, 11.92 IU로 높은 활성을 보였다. Fig. 1(a)는 H10-1 균주의 congo red 염색으로 확인한 자일라네이즈 활성으로 clear zone의 크기가 크고 선명하게 관찰되었다. 본 결과를 통해 흰 코뿔소에서 분리한 H10-1을 자일란 분해활성 우수 균주로 최종 선발하고 균주의 동정을 수행하였다. Fig. 1(b)는 H10-1의 그램염색 사진으로 본 균주는 그램 양성의 간균임을 확인하였다. 또한 colony의 형태는 불규칙하고 표면이 부드러우며 끈적끈적한 물질을 보였다 (Table 2). 형태학적 특성 분석은 그램양성균 실험을 위해 API 50 CHB kit를 이용하였으며, 분석결과 H10-1균은 glycerol, L-arabinose, D-ribose, D-xylose, D-fructose, D-mannose, inositol, D-mannitol, D-sorbitol, arbutin, esculin ferric citrate, salicin, D-cellobiose, D-mal-

Table 1. Xylanase activities of selected strains by intensities of halos on xylan agar and DNS method from feces of herbivores. +++: strong, ++: middle, +: weak

| No. | Strain | Family of herbivore | Xylanase activity | | No. | Strain | Family of herbivore | Xylanase activity | |
|-----|--------|---------------------|-------------------|----------|-----|--------|---------------------|-------------------|----------|
| | | | Clear zone | DNS (IU) | | | | Clear zone | DNS (IU) |
| 1 | H1-1 | Cattle | + | 5.93 | 14 | H16-1 | Camel | +++ | 7.97 |
| 2 | H8-1 | Hippopotamus | + | 1.66 | 15 | H17-2 | Camel | +++ | 7.58 |
| 3 | H9-1 | Rabbit | +++ | 11.44 | 16 | H17-3 | Camel | +++ | 8.33 |
| 4 | H9-2 | Rabbit | +++ | 9.71 | 17 | H18-1 | Horse | +++ | 8.19 |
| 5 | H10-1 | Rhinoceros | +++ | 14.67 | 19 | H18-2 | Horse | +++ | 2.04 |
| 6 | H10-2 | Rhinoceros | +++ | 9.02 | 19 | H24-2 | Deer | +++ | 2.08 |
| 7 | H11-1 | Cattle | ++ | 8.29 | 20 | H24-3 | Deer | +++ | 7.65 |
| 8 | H11-3 | Cattle | ++ | 6.47 | 21 | H25-1 | Kangaroo | ++ | 8.92 |
| 9 | H12-2 | Cattle | +++ | 6.21 | 22 | H25-2 | Kangaroo | +++ | 9.70 |
| 10 | H13-1 | Deer | +++ | 3.79 | 23 | H25-4 | Kangaroo | +++ | 11.92 |
| 11 | H13-2 | Deer | +++ | 4.85 | 24 | H41-1 | Cattle | +++ | 1.67 |
| 12 | H13-3 | Deer | + | 1.61 | 25 | H55-1 | Cattle | +++ | 1.75 |
| 13 | H13-4 | Deer | +++ | 5.16 | 26 | H59-2 | Cattle | +++ | 1.86 |

Table 2. Morphological characteristics of *Bacillus pumilus* H10-1 colony

| Family of herbivore | Morphology of H10-1 [PCA] | | | | | | | Gram Stain |
|---------------------|---------------------------|---------|---------|-------------|----------|---------|-------|------------|
| | Form | Surface | Texture | Elevation | Margin | Opacity | Color | |
| Rhinoceros | Irregular | Smooth | Moist | Crateriform | Undulate | Opaque | White | G(+) |

Table 3. Biochemical characteristics of *Bacillus pumilus* H10-1

| Characteristics | Result | Characteristics | Result |
|---------------------------|--------|---------------------------|--------|
| Control | - | Esculin ferric citrate | + |
| Glycerol | + | Salicin | + |
| Erythritol | - | D-cellobiose | + |
| D-arabinose | - | D-maltose | + |
| L-arabinose | + | D-lactose (bovine origin) | - |
| D-ribose | + | D-melibiose | - |
| D-xylose | + | D-saccharose (sucrose) | - |
| L-xylose | - | D-trehalose | + |
| D-adonitol | - | Inulin | + |
| Methyl-βD-xylopyranoside | - | D-Melezitose | - |
| D-galactose | - | D-Raffinose | - |
| D-glucose | + | Amidon (starch) | - |
| D-fructose | + | Glycogen | - |
| D-mannose | + | Xylitol | - |
| L-sorbose | - | Gentiobiose | - |
| L-rhamnose | - | D-turanose | - |
| Dulcitol | - | D-lyxose | - |
| Inositol | + | D-tagatose | - |
| D-mannitol | + | D-fucose | - |
| D-sorbitol | + | L-fucose | - |
| Methyl-αD-mannopyranoside | - | D-arabitol | - |
| Methyl-αD-glucopyranoside | - | L-arabitol | - |
| N-acetylglucosamine | - | Potassium glucoNaTe | - |
| Amygdalin | - | Potassium 2-ketogluconate | - |
| Arbutin | + | Potassium 5-ketogluconate | - |

+ positive; - negative.

tose, D-trehalose, Inulin 등에서 활성을 보였다 (Table 3). H10-1의 16S rDNA 분석결과 *Bacillus pumilus* strain들과 유사성 (99%)을 보였으며, 해당 strain들과 상동성을 비교하여 phylogenetic tree를 작성하였다 (Fig. 2). 상기 서술한 결과를 바탕으로 흰코뿔소 배설물에서 분리한 xylanase 우수 활성 균주를 *Bacillus pumilus* H10-1로 명명하였으며, 이 후 동정균의 자일

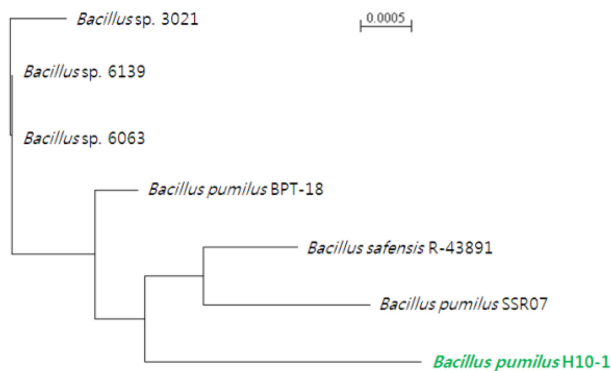


Fig. 2. Phylogenetic relationship of isolated H10-1 strain with other *Bacillus* species based on partial 16S rDNA gene sequences.

라네이즈 활성에 관한 연구를 수행하였다.

B. pumilus 균의 자일라네이즈 생산에 관한 연구는 보고되어 있으며 [14,17-18], 이에 기존의 알려진 *B. pumilus* 균과 본 연구를 통해 선발된 *B. pumilus* H10-1간의 자일라네이즈 효소활성을 비교하여 보았다. *B. pumilus* 균은 농촌진흥청 농업과학원 농원유전자원센터로부터 분양받았으며 배양 및 효소 활성 측정 조건 등은 모두 동일 조건에서 수행되었다. Fig. 3은 *B. pumilus*의 효소 활성을 나타낸 그래프이다. 시험에 사용된 *B. pumilus* 모든 균주들이 자일라네이즈 활성을 나타내었고, 이 가운데 H10-1균주의 효소활성이 다른 균주에 비해 배양 5일째 1.5~7배 더 높게 나타나 자일란의 분해에 더 효과적이었다.

*B. pumilus*는 프로테아제, 리파아제, 셀룰레이즈, 자일라네이즈, α-아라비노푸라노시다아제 등의 효소 생산에 관한 연구가 진행되어 있다 [19-21]. 또한 *B. pumilus*가 생산한 자일라네이즈는 열안정성과 pH 안정성을 나타낸다고 보고되어 있다 [22-24]. 본 연구에서 흰코뿔소 배설물로부터 분리한 *B. pumilus* H10-1은 자일라네이즈 활성을 나타냈으며, 본 균주의 이용성 향상을 위해 배지의 pH, 배양 온도, 배양 시간에 대한 효소생산영향을 조사하여 효소생산최적화 연구를 수행하

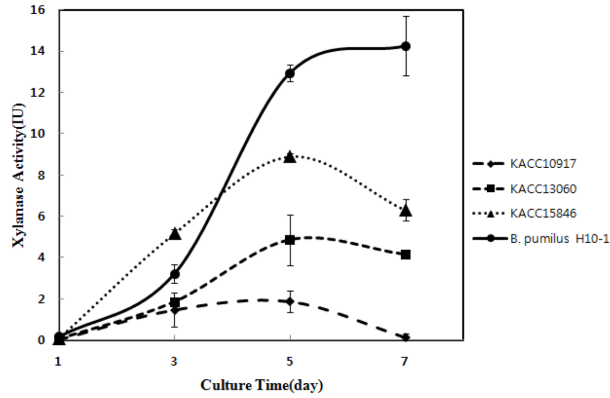


Fig. 3. Comparison of xylanase activities of *B. pumilus* strains and *B. pumilus* H10-1.

였다. 본 균주는 배지의 초기 pH가 9일 때 생산된 자일라네이즈의 활성이 가장 높게 나타났으며, pH 5~10 범위에서 활성이 25~83%를 유지하였다 (Fig. 4(a)). Poorna & Prema [22]는 셀룰레이즈 활성이 없이 자일라네이즈 활성만을 가진 *B. pumilus*를 이용한 고상발효 (밀기울)의 배지 최적화 연구에서 효소의 생산이 pH 9에서 가장 높았다고 보고하였으며, Nagar [23] 등은 pH 5~11 범위에서 효소의 생산이 안정적이며, pH 10에서 최고의 값을 나타냈다고 보고하였다. 이러한 결과는 *B. pumilus* 균주들이 알칼리 조건에서 효소의 생산에 더 안정적임을 알 수 있게 한다. 배양 온도에 따른 생산효소의 활성을 Fig. 4(b)에 나타내었다. 30°C 배양을 통해 생산한 효소 활성이 20.4 IU로 가장 높게 나타났으며, 25~45°C 범위에서는 효소 활성이 20% 이상을 유지하였고, 50°C에서는 효소 활성이 관찰되지 않았다. Nagar [23] 등도 생산된 자일라네이즈 활성이 50°C 배양에서는 활성을 보이지 않았다고 서술하여 같은 결과를 나타냈지만, 37°C에서 배양한 효소가 가장 높은 활성을 보여 본 균주보다는 고온에서 최적화되었다.

Fig. 4(c)는 최적화 조건인 배지의 초기 pH 9, 배양온도 30°C 조건에서 배양하면서 배양 일수에 따른 생산 효소의 활성을 나타낸 그래프이다. 배양 2일에서 7일까지 효소의 활성은 직선적으로 증가하였으며 ($y=3.3721x-3.2477$), 7일 이후부터는 감소하다가 완만한 증가를 보였다. 이러한 결과는 질소원 및 탄소원 등의 배지조건과 접종량 등의 최적화를 통해 경제적인 효소 생산을 위해서는 배양 기간을 더욱더 단축할 필요가 있음을 시사한다. Fig. 5는 배양온도와 배지의 초기 pH를 30°C, 9로 한 후 *B. pumilus* H10-1의 생장을 관찰한 그래프이다. 배양과정 중 자일란의 침전과 분해로 OD₆₀₀의 측정을 통한 균주 생장 곡선은 일정한 경향을 보이지 않았다. 따라서 배양시간별로 생균수를 측정하여 생장곡선을 작성하였다. *B. pumilus* H10-1은 배양 8시간 후에 정지기에 들어섰고, 배기 시간은 24분이었다.

역사는 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 유망작물로 농촌진흥청 바이오에너지작물센터 (Jeonnam, Korea)에서는 2009년부터 현재 (2014년)까지 1500점의 역사 유전자원을 수

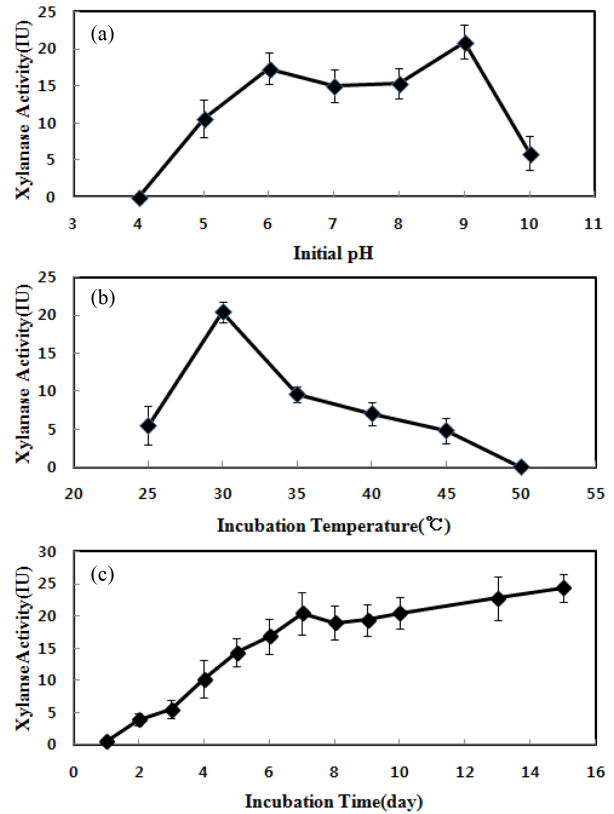


Fig. 4. Effect of culture conditions (a; initial pH, b; incubation temperature, c; incubation time) on the production of xylanase by *B. pumilus* H10-1.

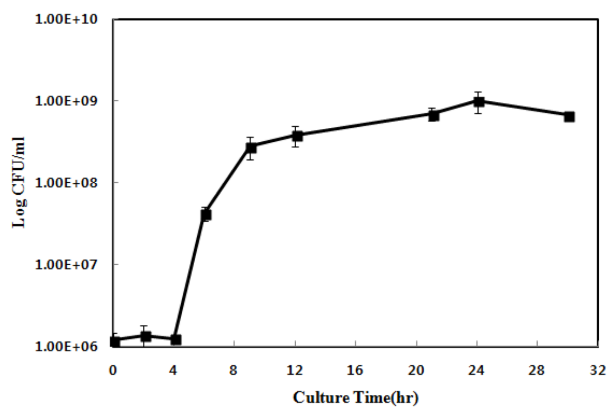


Fig. 5. Cell growth by *B. pumilus* H10-1 (initial medium pH 9, 30°C, 150 rpm).

집하였으며, 4 m 이상 (일반 역새 2 m)의 역새 ‘거대1호’를 개발하였다. 이러한 유망 바이오매스 작물인 거대1호의 이용성 향상을 위해 본 과제에서는 최적화 조건에서 분리한 효소를 전처리 거대역새의 당화에 이용하였다. 거대1호의 전처리는 1.5 M NaOH를 이용하였으며, 전처리물의 글루칸, 자일란의 함량은 62.6%, 24.4%, 수분 함량은 76.54%이었다. *B. pumilus*

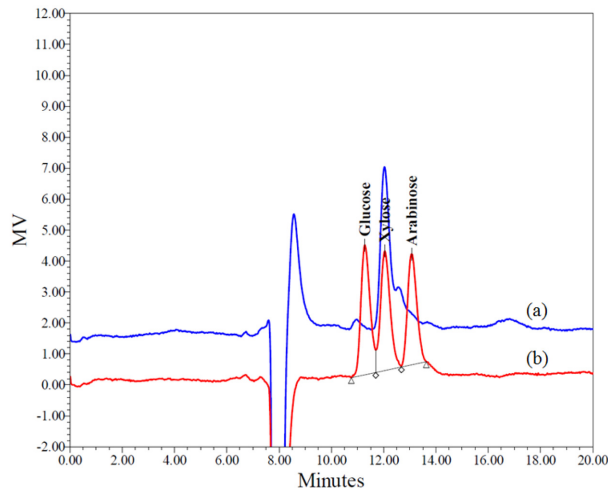


Fig. 6. Xylose production by enzymatic saccharification of pretreated *Miscanthus sacchariflorus* cv. ‘Goedae 1’ using xylanase from *Bacillus pumilus* H10-1 (a; sample, b; standard).

H10-1이 생산한 효소는 전처리된 억새를 xylose까지 분해할 수 있었으며, 이때 생산된 xylose 양은 9.37 mg으로 당화율은 8.2%이었다. Fig. 6은 전처리된 억새로부터 *B. pumilus* H10-1이 생산한 효소를 이용한 당화에 의해 생산된 xylose의 분석 크로마토그램이다. 이러한 결과는 상업화된 효소와 비교했을 때 높은 활성은 아니지만 앞으로 배지 최적화와 정제, 농축을 통해 당화율을 향상시킨다면 효소의 활용이 가능하리라 기대된다.

4. CONCLUSION

초본계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산을 위해서는 섬유질을 당으로 전환할 수 있는 섬유소 분해효소를 필요로 한다. 섬유소의 분해는 헤미셀룰로오스와 리그닌의 분해에 의해 촉진될 수 있다. 본 연구에서는 헤미셀룰로오스의 주요 구성성분인 자일란을 분해하는 *B. pumilus* H10-1을 초식동물인 흰코벨소 배설물로부터 분리하고 본 균주의 효소생산을 극대화하기 위해 배지의 초기 pH, 배양온도, 배양시간 등을 최적화하였다. *B. pumilus* H10-1은 배양온도 30°C, 배지의 초기 pH 9 조건에서 7일 배양했을 때 자일라네이즈 효소 활성이 20 IU로 가장 높게 나타났다. 또한 이 조건에서 생산된 조효소를 1.5 M NaOH로 전처리한 억새의 당화에 이용하였다. 전처리된 억새에 포함된 자일란 성분은 *B. pumilus* H10-1이 생산한 자일라네이즈 효소의 작용으로 자일로오스로 분해되었으며, 이때 자일란의 당화율은 8.2%이었다.

Acknowledgements

본 논문은 농촌진흥청 연구사업 (세부과제명: 섬유소 분해 균

주 선발 및 효소 생산 최적 조건 구명, 세부과제번호: PJ0093 0503)의 지원에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

- Sarkar N., S. K. Ghosh, S. Bannerjee, and K. Aikat (2012) Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renew Energy* 37: 19-27.
- Erdei B., B. Franko, M. Galbe, and G. Zacchi (2013) Glucose and xylose co-fermentation of pretreated wheat straw using mutants of *S. cerevisiae* TMB3400. *J. Biotechnol.* 164: 50-58.
- Tabka M. G., I. herpoel-Gimbert, F. Monod, M. Asther, and J. C. Sigoillot (2006) Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase, xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme Microbiol. Technol.* 39: 897-902.
- Xue Y., H. Jameel, R. Phillips, and H. M. Chang (2012) Split addition of enzymes in enzymatic hydrolysis at high solids concentration to increase sugar concentration for bioethanol production. *Ind. Eng. Chem.* 18: 707-714.
- Polizeli M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 577-591.
- Kulkarni N., A. Shendye, and M. Rao (1999) Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 411-456.
- Juturu V. and J. C. Wu (2012) Microbial xylanases: Engineering, production and industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 30: 1219-1227.
- Collins T., C. Gerday, and G. Feller (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 3-23.
- Bajaj B. K. and K. Manhas (2012) Production and characterization of xylanase from *Bacillus licheniformis* P11(C) with potential for fruit juice and bakery industry. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1: 330-337.
- Moon Y. H., B. C. Koo, Y. H. Choi, S. H. Ahn, S. T. Bark, Y. L. Cha, G. H. An, J. K. Kim, and S. J. Suh (2010) Development of ‘Miscanthus’ the promising bioenergy crop. *Kor. J. Weed Sci.* 30: 330-339.
- An G. H., S. I. Lee, B. C. Koo, Y. H. Choi, Y. H. Moon, Y. L. Cha, S. T. Bark, J. K. Kim, B. C. Kim, and S. P. Kim (2011) The effects of application of solidified sewage sludge on the growth of bioenergy crops in reclaimed land. *Korean J. Crop Sci.* 56: 299-307.
- An G. H., B. C. Koo, Y. H. Choi, Y. H. Moon, Y. L. Cha, S. T. Bark, J. K. Kim, Y. M. Yoon, K. G. Park, and J. T. Kim (2012) The effect of solidified sewage sludge as a soil cover material for cultivation of bioenergy crops in reclaimed land. *Korean J. Crop Sci.* 57: 238-247.
- Kang K. E., M. H. Han, S. K. Moon, H. W. Kang, Y. Kim, Y. L. Cha, and G. W. Choi (2013) Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from *Miscanthus*. *Fuel.* 109: 520-526.
- Bajaj. B. K., Y. P. Khajuria, and V. P. Singh (2012) Agricultural re-

- sidues as potential substrates for production of xylanase from alkali-thermotolerant bacterial isolate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 1: 314-320.
15. Ghose T. K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
 16. Selig, M., Weiss, N., and Y. Ji (2008) *Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP)*. National Renewable Energy Laboratory.
 17. Nagar S., A. Mittal, D. Kumar, and V. K. Gupta (2012) Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *Int. J. Biol. Macromol.* 50: 414-420.
 18. Kapoor, M., L. M. Nair, and R. C. Kuhad (2008) Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus Pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*. *Biochem. Eng. J.* 30: 88-97.
 19. Degrassi G, A. Vindigni, and V. Venturi (2003) A thermostable α -arabinofuranosidase from xylanolytic *Bacillus pumilus*; purification and characterisation. *J. Biotechnol.* 101: 69-79.
 20. Sharma. D. C. and T. Satyanarayana (2006) A marked enhancement in the production of a highly alkaline and thermostable pectinase by *Bacillus pumilus* dcsr1 in submerged fermentation by using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 97: 727-733.
 21. Guan, Z. B., C. M. Song, N. Zhang, W. Zhou, C. W. Xu, L. X. Zhou, H. Zhao, Y. J. Cai, and X. R. Liao (2014) Overexpression, characterization, and dye-decolorizing ability of a thermostable, pH-stable, and organic solvent-tolerant laccase from *Bacillus pumilus* W3. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 101: 1-6.
 22. Asha Poorna. C. and P. Prema (2006) Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. *Biochem. Eng. J.* 32: 106-112.
 23. Nagar. S., A. Mittal, D. Kumar, and V. K. Gupta (2012) Production of alkali tolerant cellulase free xylanase in high levels by *Bacillus pumilus* SV-205. *Int. J. Biol. Macromol.* 50: 414-420.
 24. Battan. B., J. Sharma, S. S. Dhiman, and R. C. Kuhad (2007) Enhanced production of cellulase-thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme Microb. Technol.* 41: 733-739.