

Xylanase를 분비하는 효모 균주의 분리 및 성질

배명애·서정훈*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Identification of Xylanase Secreting Yeast

Bae, Myung-Ae and Jung-Hwn Seu*

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Among the new yeast strains which were isolated from soils by incubating in the xylan containing minimal medium at 30°C, one strain(XB-33) was finally selected by the results of extracellular xylanase production test. The characteristics of XB-33 was almost consistent with those of the *Cryptococcus ater*. The formation of xylanase activity was induced by xylan and repressed by xylose or glucose. The xylanase was partially purified from the culture supernatant with DEAE-Sephadex A50 chromatography. The enzyme had a pH optimum for activity at 5.0 and its stability range was pH 5-7. The temperature optimum was at 50°C, but the enzyme activity was greatly lost by heating at 70°C for 60 minutes. The hydrolysis products from xylan by crude enzyme detected by TLC, were xylose and a series of higher oligosaccharides. The Km value of xylanase was 20 (mg/ml).

일반적으로 목질 농산폐기물중의 Hemicellulose 함량은 20~30%를 차지하며 그 대부분은 xylan과 같은 petosan 성분으로 알려져 있다. xylan 그 자체는 이용가치가 별로없으나 xylose 단위로 분해한다면 이용성은 증가됨으로 xylan를 분해하는 효소에 대해서는 세균이나 곰팡이를 대상으로 오래전부터 많은 연구가 되어 왔다(1-4). 뿐만 아니라 최근 Biomass를 이용한 alcohol 생산에 대한 관심이 고조됨에 따라 xylan의 alcohol 발효에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 이들 연구 또한 세균이나 곰팡이를 대상으로 하고 있는 실정이다(5, 6). 그러나 효모를 대상으로 한 xylan의 이용에 관한 연구로는, xylanase생성 효모에 대한 연구인 Notario(7), Bley(8) 등이 발표한 *Cryptococcus albidus*의 xylanase 및 β -xylosidase에 대한 것 이외에는 거의 없으며 xylan 발효성 효모에 대한 연구는 전혀 보고된 바가 없다. 한편, 세균이나 곰팡이를 이용할 경우 xylan으로부터 생성된 xylose를 다시 효모를 이용하여 alcohol로 발효시켜야 하는 문제점이 있다. 따라서 본 연구에서는 xylan를 분해하는 효모를 분리하고

xylose 발효 효모와 cell fusion를 하여 xylan으로부터 직접 alcohol를 생성하는 효모 균주의 개발을 목적으로 하였으며 그 일환으로 xylanase 분비성 효모를 토양시료로부터 분리하고 이 균주의 동정 및 xylanase 생성조건 및 이의 효소학적 기본성질을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

본 실험에 사용한 효모는 대구 근교에 있는 과수원의 토양 및 퇴비에서 채취한 균원시료에서 분리하였다. 먼저 xylan (Oat Spelts; Sigma Chemical Co.) 0.5%를 단일 탄소원으로 첨가한 고체배지에 tooth-picking 하여 30°C에서 6일간 배양한 후 1% congo red로 colony를 발색시켜 5균주를 1차 선별하였고, 선별된 균주를 다시 액체 최소배지와 효소생성 배지에 접종하여 30°C에서 8일간 진탕배양한 다음 각 배양액의 xylanase 활성을 측정하여 XB-33 균주를 최종적으로 분리 선별하였다. 이 때 사용한

Key words; Xylanase, yeast, xylan hydrolysis

*Corresponding author

Table 1. Composition of minimal, complete and enzyme production medium

Ingredients	Minimal medium	Complete medium	Enzyme production medium
Xylan	0.5%	—	1%
Xylose	—	1%	—
Yeast extract	—	0.5%	0.1%
Polypeptone	—	0.5%	0.2%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%	—	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.1%	—	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1%	—	0.1%
CaCl ₂	0.1%	—	0.1%

All media were adjusted to pH 6.0-7.0 before autoclave and sterilized at 121 °C for 15 minutes.

각 배지의 조성은 Table 1과 같으며, XB-33 균주의 동정은 Lodder(9) 및 Kreger-Van Rij(10)의 분류기준에 따랐다.

Xylanase의 조정제

XB-33 균주를 효소생성 배지에 접종하여 30°C에서 6일간 배양한 후 균체를 제거한 배양 상등액을 50°C에서 1/5 volume되게 감압농축한 다음 acetone 66.5% 농도로 침전시켜 얻은 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 5.0)에 녹여 하룻밤 투석시킨 다음 DEAE-Sephadex A 50을 통과시켜 조효소액으로 사용하였다.

Xylanase 활성 측정

효모 배양의 상등액 혹은 조정제한 것을 효소액으로 하여 xylanase 활성을 측정하였다. 효소액 0.1 ml에 1% xylan 현탁액 0.5 ml와 50 mM phosphate buffer(pH 5.0) 0.5 ml를 가하여 잘 섞은 다음 50°C 진탕수조에서 1시간 반응시킨 후 이의 원심상등액 1 ml를 취하고 여기에 DNS용액 1 ml를 가하여 100°C에서 15분간 열처리한 다음 냉각시켜 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소활성은 상대활성도로 나타내었다.

Thin Layer Chromatography

XB-33 균주가 분비하는 xylanase의 xylan에 대한 작용양상을 조사하기 위하여 thin layer chromatography(TLC)를 행하였다. 이때 사용한 TLC plate는 Kieselgel 60F₂₅₄, Art. 5735, Sigma사의 제품이었으며, 전개용매는 *n*-butanol; acetic acid; water (3; 1; 1) 이었고 전개후의 spot.는 silver nitrate

Table 2. The physiological and cultural characteristics of XB-33

Description; cream, tan or dark colonies, multilateral budding, no filaments, no sexual reproduction		
Fermentation; none		
Growth		
D-Galactose	- Inositol	+
D-Ribose	± Adonitol	+
D-Xylose	+ Fructose	•
L-Arabinose	± Mannose	+
L-Rhamnose	± Citrate	-
Sucrose	+ Methanol	-
Maltose	+ Ethanol	-
Trehalose	+ Nitrate	-
Salicin	+ Nitrite	-
Arbutin	+ L-Lysine	+
Melibiose	- at 27°C	+
Lactose	+ at 30°C	+
Melezitose	± at 37°C	-
Raffinose	+ at 42°C	-
Inulin	+ 0.01% Cycloheximide	-
Starch	± 0.10% Cycloheximide	-
Xylitol	+ 50% D-Glucose	-
Sorbitol	+ 60% D-Glucose	-
Additional characteristics		
Acetic acid production	- Urea hydrolysis	+
Diazonium Blue B reaction +		

Codes in table: + positive; - negative; +/- variable

reagent(11)로 확인하였다.

결과 및 고찰

공시균의 분리 및 동정

탄소원으로 xylan만을 첨가한 최소배지상에 나타난 colony를 다시 액체배양하여 각각 균주의 xylanase 활성을 측정하여 효소활성이 가장 강한 XB-33 효모 균주를 최종 선별하였다. XB-33 균주의 형태 및 생리, 생화학적 특성을 Lodder(9) 및 Kregervan Rij(10) 분류기준에 따라 조사해본 바 *Cryptococcus ater* 유연균으로 나타났다(Table 2, Fig.1).

Xylanase 생성조건

XB-33 균주의 xylanase 생성조건을 검토하였다.

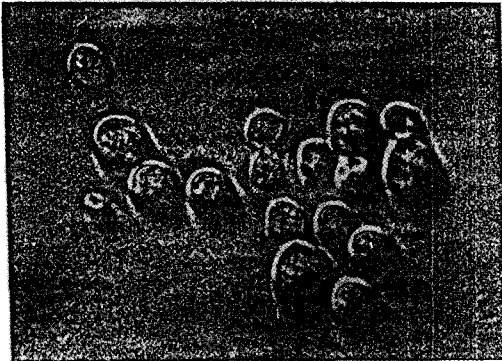


Fig. 1. Photomicrographs of strain XB-33.
The strain was grown on YM medium at 30 °C for 36hrs.

Table 3. Effect of carbon sources on the xylanase production of XB-33 strain

carbon sources(1%)	Growth	Relative activity(%)
Xylan	Moderate	100
Xylose	"	6
Soluble starch	No growth	—
Galactose	No growth	—
Glucose	Moderate	2

Cells were cultured in the enzyme production medium containing various carbon sources for 8 days.

먼저 xylanase가 기질에 의해 유도되는 효소인지 알아보기 위하여 탄소원을 첨가하지 않은 효소생성 배지에 각각의 탄소원을 1% 첨가하여 조사해본 바 Table 3의 결과와 같이 xylan을 기질로 첨가했을 경우 xylanase 생성이 최대가 되었으며 xylose와 glucose에 의해서는 오히려 억제됨을 알았다. 이는 Rapp(12) 등이 *Cellulomonas uda*의 β -xylanase의 효소의 생성이 xylan에 의해서는 유도적이며 xylose와 glucose에 의해서는 효소 합성이 억제된다는 보고와 일치하였다. XB-33 균주의 xylanase 생성에 대한 xylan의 최적농도를 조사한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 xylan 1% 첨가시 효소 생성이 최대였으며, xylan을 1% 첨가한 효소 생성 배지에서 6일간 진탕배양할 때 효소 생성이 최대에 도달하였다.

효소의 조정제

XB-33 균주를 효소 생성 배지에서 6일간 배양한 뒤 균체를 제거한 배양상등액을 1/5부피로 감압농축한 다음 acetone 66.5%로 하여 효소를 침전시키고 그 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)에

Table 4. Effect of xylan concentration on the xylanase production of XB-33 strain

Xylan concentration(%)	Relative activity(%)
0.5	39
1.0	100
2.0	86
3.0	36

*Composition of basal medium; yeast extract; 0.1%, polypeptone; 0.2%, KH₂PO₄; 0.1%, (NH₄)₂SO₄; 0.1%, MgSO₄·7H₂O; 0.05%, CaCl₂; 0.1%; pH 5.0.

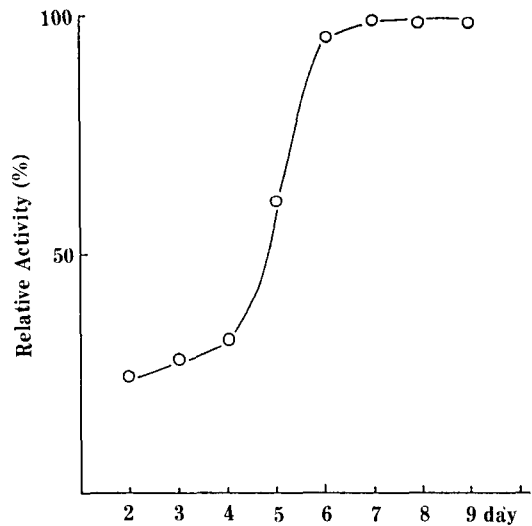


Fig. 2. Time courses of the xylanase production. Cells were grown at 30°C for various intervals.

Xylanase activity was measured at 50 °C for 1hr in the phosphate buffer. (pH 5.0)

다시 녹여 투석하였다. 투석된 효소용액을 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 평형시킨 DEAE-Sephadex A 50((ϕ)2.5×45 cm(L))에 loading 하여 시간당 20 ml 속도로 3.5 ml 씩, KCl-gradient elution 시켰다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 0 M KCl에서 0.6 M KCl까지 gradient한 결과 초기의 30번째 fraction 부근에서 가장 높은 xylanase activity가 나타났다.

Thin Layer Chromatography

XB-33 균주의 xylan에 대한 작용양상을 조사하기 위하여 thin-layer chromatography를 행하였다. 조정제된 효소용액을 1% xylan용액에 가하여 반응시킨 다음 xylan과 xylose를 표품으로 하여 TLC 해본 결과 Fig. 4에서와 같이 최종산물로서 xylose가

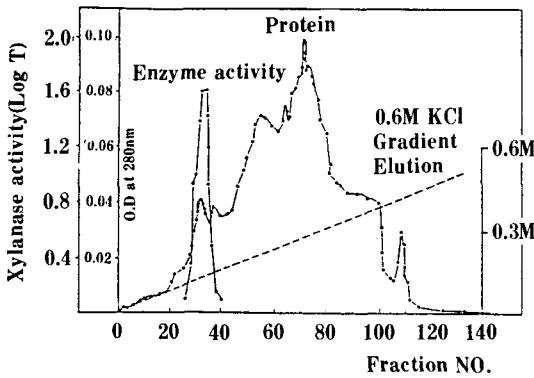


Fig. 3. Gradient chromatography of the xylanase on DEAE-Sephadex A50.

Elution was carried out with continuous linear salt gradient between 0 and 0.6M KCl in chromatographic 50mM phosphate buffer, pH 7.0. Column size was 2.5 × 45 cm and the flow rate was 20 ml/hr with 3.5 ml/tube fraction. ○; adsorbancy at 280 nm. ●; xylanase activity.

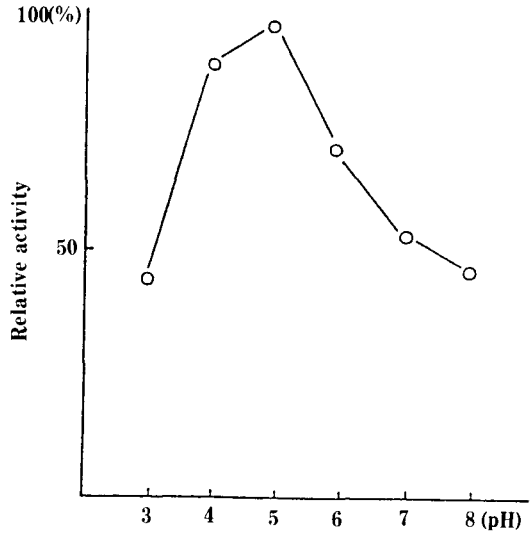
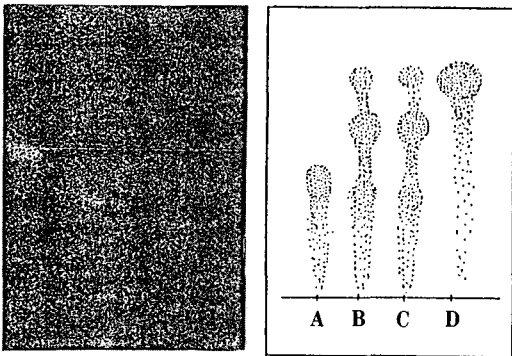


Fig. 5. Effect of pH on the xylanase activity. pH dependency secreted from XB-33 was examined in the various pH (3.0 to 8.0) at 50°C for 1 hour.



A: xylan B,C: xylan + enzyme D: xylose

Fig. 4. Thin layer chromatography.

Enzymatic hydrolysis pattern of xylan with the xylanase produced by strain XB-33. The coloration of the spot was carried out by silver nitrate reagent.

확인되었으며 extra spot는 xylan의 미분해 산물인 di 혹은 oligosaccharide인 것으로 사료된다.

효소의 성질

XB-33 균주가 분비하는 xylanase의 효소학적 성질을 조사하였다. 먼저 xylanase의 작용 최적 pH와 pH 안정성을 조사하기 위해 pH 3.0에서 8.0까지 상대활성도를 측정함과 동시에 반응액을 각각의 pH에서 한시간씩 전처리하여 효소활성을 비교 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 반응 최적 pH는 pH 4.0~5.0의 약산성 범위로 이는 *Thermoascus aurantiacus* (13)의 xylanase 작용 최적 pH와 유사하

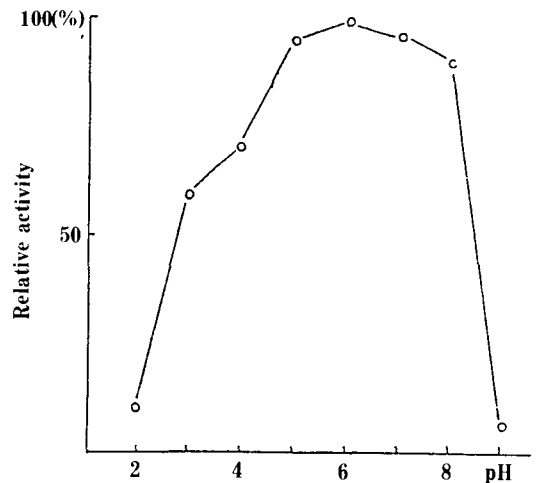


Fig. 6. pH stability of the xylanase.

The enzyme solutions adjusted to various pH (2.0 to 8.0) and the solutions were preincubated at 50°C for 1 hour. The remaining activity of xylanase was measured according to materials and methods.

였다. pH 안정성도 약산성 범위인 pH 5.0~7.0에서는 비교적 안정하여 각 pH에서 전처리 1시간으로도 효소활성을 잃지 않았으나, 그 이외의 pH범위에서는 급격히 실활됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 또한 반응 최적온도 및 열안정성은 측정해 본 결과 반응 최적온도는 50°C로서 비교적 내열성 xylanase임을 알 수 있었고, 열안정성 역시 60°C 온도까지는 반응 1시간으로 효소활성을 거의 잃지 않았으나 70°C에서 1시

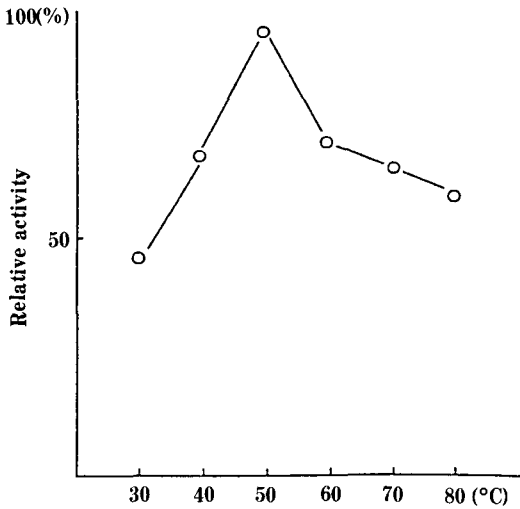


Fig. 7. Effect of temperature on the xylanase activity. The xylanase activity of XB-33 was measured at each temperature for 1 hour in the 0.05M phosphate buffer. (pH 5.0)

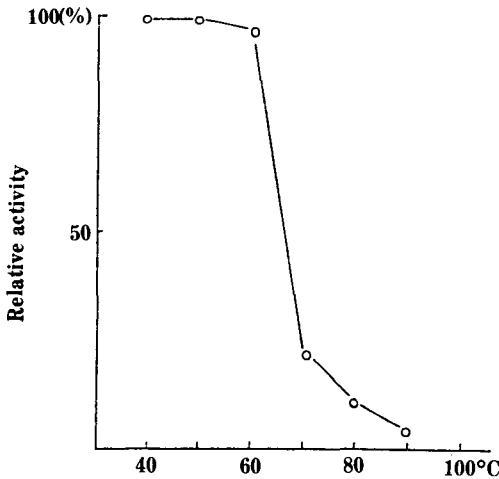


Fig. 8. Thermal stability of xylanase. The enzyme solutions were preincubated at various temperature for 1 hour. The remaining activity of xylanase was measured according to DNS methods.

간 전처리로 약 80%의 효소활성이 실행됨을 알았다 (Fig. 7, 8). 이는 Ernest (13)의 thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*의 xylanase 효소 성질과 거의 유사함을 알 수 있었다.

Xylanase의 Km치

Xylan을 기질로 하여 XB-33 균주가 분비하는 xylanase의 반응속도에 대한 기질농도의 효과를 조

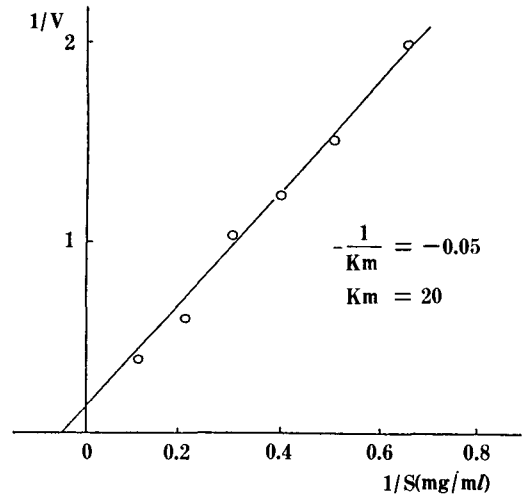


Fig. 9. Lineweaver-Burk plots of the xylanase activity. substrate; Xylan (oat spelts, Sigma Chemical Co.)

사하였다. 반응조건으로는 pH 5.0, 반응온도는 50°C로 하여 각각의 xylan 기질 농도에서 효소반응 시킨 후 Michaelis-Menten 식으로 환산하고 Lineweaver-Burk 방식으로 plot하였다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 XB-33 균주가 분비하는 xylanase의 Km치는 20 mg/ml이었다.

요 약

Xylan를 기질로 직접 alcohol 발효를 목적으로 각종 토양을 균원시료로 하여 xylan를 분해, 자화하는 효모를 분리하여 동정하고 몇가지 중요한 성질을 조사하였다.

Xylanase를 생산하는 XB-33 효모는 *Cryptococcus ater* 유연균으로 동정되었다.

XB-33 균주의 xylanase 생성은 xylan에 의해 induction 되고 xylose나 glucose에 의해서는 repression 되었다. 또한 xylan 농도는 1% 수준에서 가장 높았으며, 배양일수 6일째 그 활성이 최고치를 나타내었다.

XB-33 균주가 생성 분비하는 xylanase를 DEAE-Sephadex A50으로 colum chromatography 하여 부분 정제한 후 이의 생화학적 특성을 검토한 결과 xylanase의 최적작용 pH는 5.0, 최적 온도는 50°C였으며 pH 5.0~7.0에서와 온도 60°C 이하에서의 효소활성은 비교적 안정하였고 xylan에 대한 xylanase의 작용양상을 조사하기 위해 TLC한 결과 최종 산물로서 xylose가 확인되었다. 그리고 xylanase의 xylan에 대한 Km치는 20(mg/ml)이었

다.

사 사

본 연구는 1986년도 한국과학재단 목적기초연구비에 의해 수행되었다.

참고문헌

1. Mitsuishi, Yasushi., Takashi Yamanobe and Mitsuo Yagisawa: *Agric. Biol. Chem.*, **52**(4), 921-827 (1988).
2. Uchino, Fuji and Toshihiko Nakane: *Agric. Biol. Chem.*, **45**(5), 1121-1127 (1981).
3. Shamala, T.R., K.R. Sreekantiah: *Enzyme. Microb. Technol.*, **9**, 97-101 (1987).
4. Khan, A.W., D. Trembly and Anh Leduy: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 373 (1986).
5. Lemmel, S.A., R. Dotta and J.R. Frankiewicz: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 217 (1985).
6. Hespell, R., R. Wolf and R.J. Bothast: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(12), 2849 (1987).
7. Notario, V., T.G. Villa and J.R. Villanueva: *Can. J. Microbiol.*, **22**, 312 (1976).
8. Biely, P., M. Vrsanska and Z. Kratky: *Eur. J. Biochem.*, **108**, 313 (1980).
9. Lodder: *The Yeasts.*, N.H.C., 2nd (1971).
10. Kreger-van Rij N.T.W.: *The yeasts*, Elsevier, 3rd (1984).
11. Dawson, E. and E. Jones: *Data for biochemical research*, Oxford, 3rd (1986)
12. Rapp, P. and F. Wagner: *Appl. Environ. Microbiol.*, **9**, 746 (1986).
13. Ernest, K.C., Yu, L. L., Tan. Larry, K.-H. Chan Maria and S. John: *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 16 (1987).

(Received October 13, 1988)