

## *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성

배성호 · 최용진\*

고려대학교 농과대학 유전공학과

### Purification and Characterization of an Extracellular Xylanase of *Bacillus stearothermophilus*

Bae, Seong-Ho and Yong-Jin Choi\*

Department of Genetic Engineering, College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Abstract**— An extracellular xylanase of *Bacillus stearothermophilus* was purified to a single protein through a sequence of operations including ammonium sulfate fractionation, DEAE Sepharose CL-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel filtration and heat treatment. The purified enzyme had a molecular weight of 170,000. The pH and temperature optima for the enzyme activity were pH 9.0 and 55°C, respectively. The activity was enhanced by  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$ , and inhibited by  $\text{Hg}^{2+}$ . Pattern of hydrolysis demonstrated that the xylanase was an endo-splitting enzyme able to break down larchwood xylan at random giving xylobiose and xylotriose as the main end products.

D-xylan은 plant hemicellulose의 주성분으로 자연계에 존재하는 수화물 중 cellulose 다음으로 분포량이 많은 다당류이다(1). 이와 같은 xylan은 최근 대체에너지원인 알콜생산의 기질로서 주목을 받고 있을 뿐만 아니라 butanol과 butandiol과 같은 유기용매 내지는 xylitol과 같은 감미료 생산원료로서도 그 이용이 기대되고 있는 중요 biomass 자원이다(2, 3). Xylan의 산업적 이용을 위해서는 xylan의 가수분해, 특히 화학적 분해법에 비해 많은 장점을 가지고 있는 효소적 분해법의 효율화에 의한 D-xylose의 경제적 대량생산이 가장 중요한 선결 과제라고 하겠다. 따라서 본 연구자 등은 xylan 분해효소를 세포외로 다량 분비하는 세균을 분리, *Bacillus stearothermophilus*로 동정함과 아울러 효소생산 최적조건을 조사 검토한 바 있으며(4) 본보에서는 상기 분리균의 xylan-degrading enzyme system 중 일차로 endo-type의 xylanase를 분리 정제하고 효소적 특성을 조사,

그 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 시약

Xylanase 생산균으로 사용한 균주는 *B. stearothermophilus*로 동정된 토양 분리균이었으며 효소 생산 배지의 탄소원과 효소활성 측정용 기질은 oat-spelts xylan(Sigma 제품)을, 가수분해 생성물 분석을 위한 효소기질은 larchwood xylan(Sigma 제품)을 사용하였다. DEAE-sepharose CL-6B, sephadex G-100-120 및 p-nitrophenyl-D-xylopyranoside(pNPX) 등은 Sigma 제품, 그리고 기타 일반시약은 1급 이상의 시판 분석용 시약을 사용하였다.

#### Xylooligosaccharides의 조제

Y. Mitsuishi 등의 방법(5)에 따라 xylan에 0.1 N HCl을 가하고 20분간 물중탕으로 가수분해시킨 후 냉각시키고  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 를 가해 중화시켰다. 이 중화 반응액을 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 다음 활

**Key words:** Purification, characterization, xylanase, *Bacillus stearothermophilus*

\*Corresponding author

성탄과 Dowex 1×8(chloride form) 수지를 사용, 일차 정제하고 최종적으로 Bio-Gel P-2 column chromatography 방법으로 정제 분리하였다.

### 조효소액 조제

효소생산 최적 배양조건(4)에서 *Bacillus stearothermophilus*를 배양하고 배양액을 6,000 rpm(Hitachi 20 PR-52, RPR10-2-594 Rotor)에서 30분간 원심분리하여 균체를 분리제거시킨 상등액을 효소정제용 조효소액으로 사용하였다.

### 효소정제

ammonium sulfate 분획 : 조효소액에 20~60% 포화농도의 ammonium sulfate를 가해 침전 분리시킨 효소단백질을 소량의 0.1 M 인산완충용액(pH 6.5)에 용해하고 4°C에서 0.05 M 인산완충용액(pH 6.5)로 12 시간 투석시켰다.

Ion exchange column chromatography : Ammonium sulfate 분획을 하여 얻은 효소액을 0.05 M 인산완충용액(pH 6.5)로 평형시킨 DEAE-Sepharese CL-6B column(2.6×16)에 흡착시키고 동일한 완충용액을 사용, 세척하였다. 용출은 0.5 M NaCl 용액을 이용한 linear gradient로 실시하였으며 용출속도는 20 ml/hr, 분취량은 5 ml/tube이었다.

Gel Filtration : Ion exchange chromatography를 거쳐 부분 정제한 후 효소는 다시 Sephadex G-100 column(1.8×85 cm)을 사용, 0.05 M 인산완충용액(pH 6.5)으로 gel 여과하였다.

열처리 : Gel Filtration을 거친 효소액을 60°C에서 30분간 가열한 후 원심분리(13,000 rpm, 10 min)하여 침전 단백질을 제거, 정제도를 높였다.

### 효소활성 측정

2% xylan 인산완충용액(0.1 M : pH 6.5)을 약 30초간 vortexing한 다음 4°C에서 24시간 방치한 후 12,000 rpm(Beckman J2-21, JA20 Rotor)에서 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소반응의 기질로 사용하였다.

기질용액 0.5 ml를 55°C에서 5분간 예열한 후 효소액(0.05 M pH 6.5 인산완충용액) 0.5 ml를 가하고 30분 반응시켰다. Xylan 가수분해에 의해 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(6)으로

540 nm에서 비색정량하였으며 효소활성은 55°C에서 1분간에 1 μmol의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

### 단백질 정량

Column 용출액의 단백질량은 자외선 흡광도법으로 기타 시료의 경우는 bovine serum albumin을 표준 단백질로 한 Lowry법(7)으로 측정하였다.

분자량 측정 : 정제효소의 분자량은 SDS slab gel 전기영동법(8)을 이용, 측정하였으며 표준단백질은 phosphorylase b(M.W. 97,000), β-galactosidase(M.W. 116,000) 및 myosin(M.W. 205,000)을 사용하였다. 또한 전기영동법으로 측정된 분자량은 sepharose CL-6B을 사용한 gel-filtration법으로 확인하였다.

### 효소반응 생성물의 분석

5% Larchwood xylan(0.1 M 인산완충용액 ; pH 6.5) 0.5 ml에 0.5 ml의 효소액을 첨가하고 55°C에서 일정시간 반응시켜 xylan을 가수분해시켰으며 가수분해 생성물은 HPLC를 이용, 다음과 같은 조건에서 분석하였다.

Pump ; Waters model 510

Detector ; R.I.(R 401)

Integrator ; Waters model 741

Flow rate ; 1 ml/min

Column ; carbohydrate analysis column(3.9×300 mm)

Mobile phase ; acetonitrile : water mixture(75 : 25 ; v/v)

## 결과 및 고찰

### 효소정제

플라스크 진탕배양하여 얻은 8,325 ml의 조효소액을 Table 1에 표시되어 있는 4단계의 정제과정을 거쳐 최종적으로 20.81배 정제된 xylanase를 얻었다. 정제 xylanase는 결과 자료 제공은 하지 않았으나 polyacrylamide gel 전기영동(9)으로 단일 단백질임을 확인하였다.

### 효소의 일반성질

활성 최적 pH와 온도 : 정제 xylanase는 Fig. 1에

Table 1. Summary of the purification of xylanase from *B. stearrowthermophilus*

Purification step	Total volume (ml)	Total volume (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Culture broth	8.325	10.423	6719.60	0.64	100.00	1
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation (20~60%)	120	1.110	1596.05	1.44	23.75	2.25
DEAE-Sepharose CL-6B	6.75	66.02	158.29	2.40	2.36	3.75
Sephadex G-100	1.90	3.32	57.12	17.68	0.85	27.63
Heat treatment (60°C, 30 min)	1.80	3.01	40.08	13.32	0.60	20.81

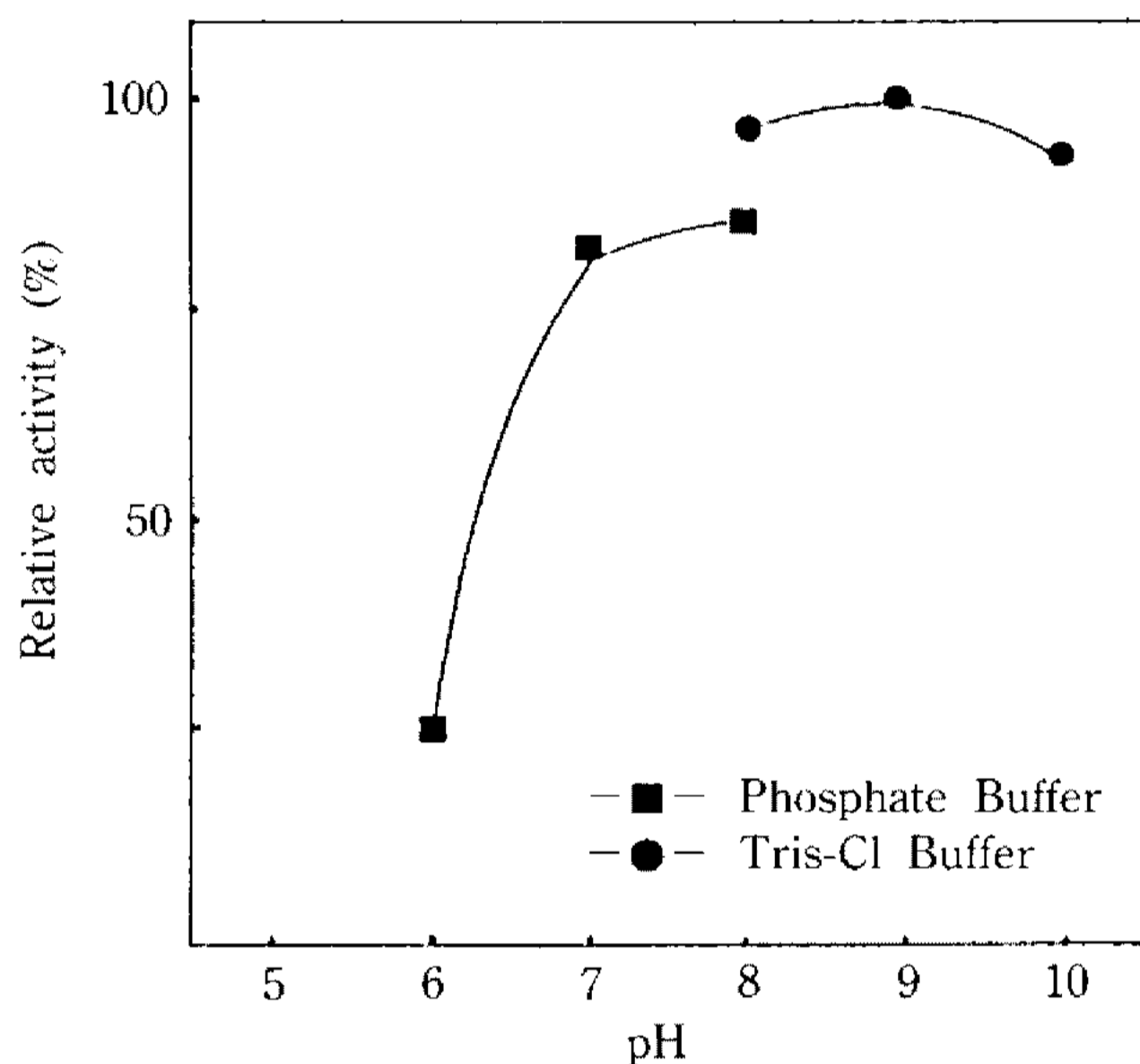


Fig. 1. Effect of pH on activity of the xylanase. The enzyme reaction was carried out at 55°C for 30 min in phosphate (pH 6~8) and tris-Cl (pH 8~10) buffer.

표시되어 있는 바와 같이 pH 8에서 pH 10 사이의 알칼리 pH에서 거의 같은 수준의 효소활성을 나타내었다. 따라서 본 효소는 지금까지 보고되고 있는 다른 어떤 내알칼리성 못지않게 알칼리성 용액에서 높은 효소활성을 나타내는 매우 특이한 성질을 가지고 있음을 알 수 있었으며(10-13) 이와 같은 특성은 실제 산업적 응용에 극히 유리한 잇점이 될 수 있으리라고 생각된다. 최적 반응온도는 55°C로 측정되었으나 60°C에서도 비교적 높은 활성을 보였다(Fig. 2 참조). *Ceratocystis paradoxa*(14), mesophilic fungus strain Y-94(15) 및 thermophilic acidophilic *Bacillus* sp. (16)에서 극히 높은 최적온도(80°C 전후)를 가진 xylanase가 분리, 보고되고 있으나 이들은 매우 드문 예외적인 경우라고 할 수 있으며 또한 실제 산업적 이용면에서도 이상과 같은 높은 최적온도는 가열을

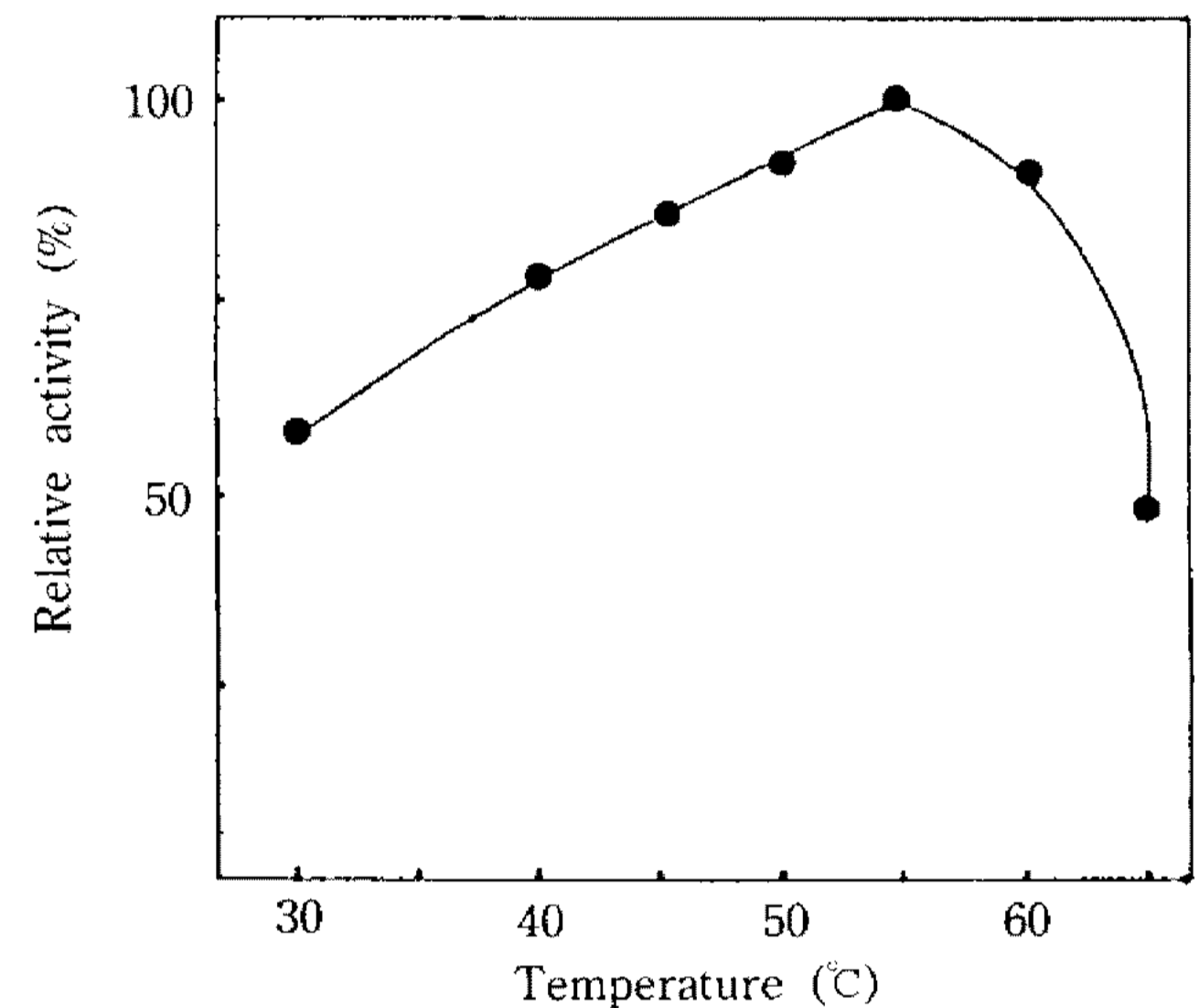
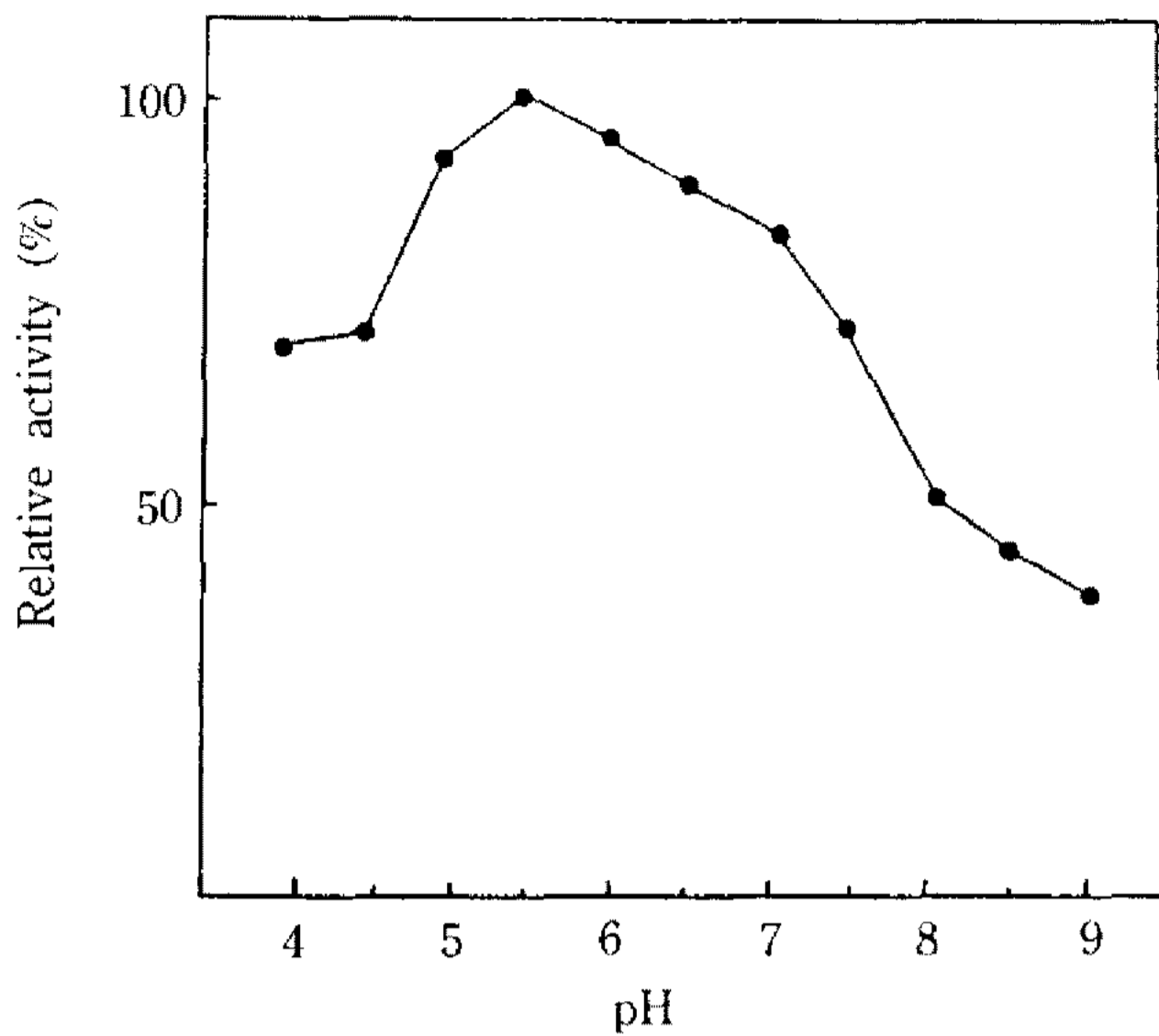


Fig. 2. Effect of temperature on activity of the xylanase.

The reaction was carried out at the various temperatures shown in the figure 55°C for 30 min in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5).

위한 에너지를 필요로 하므로 본 효소의 최적온도가 오히려 더 유리할 것으로 생각된다.

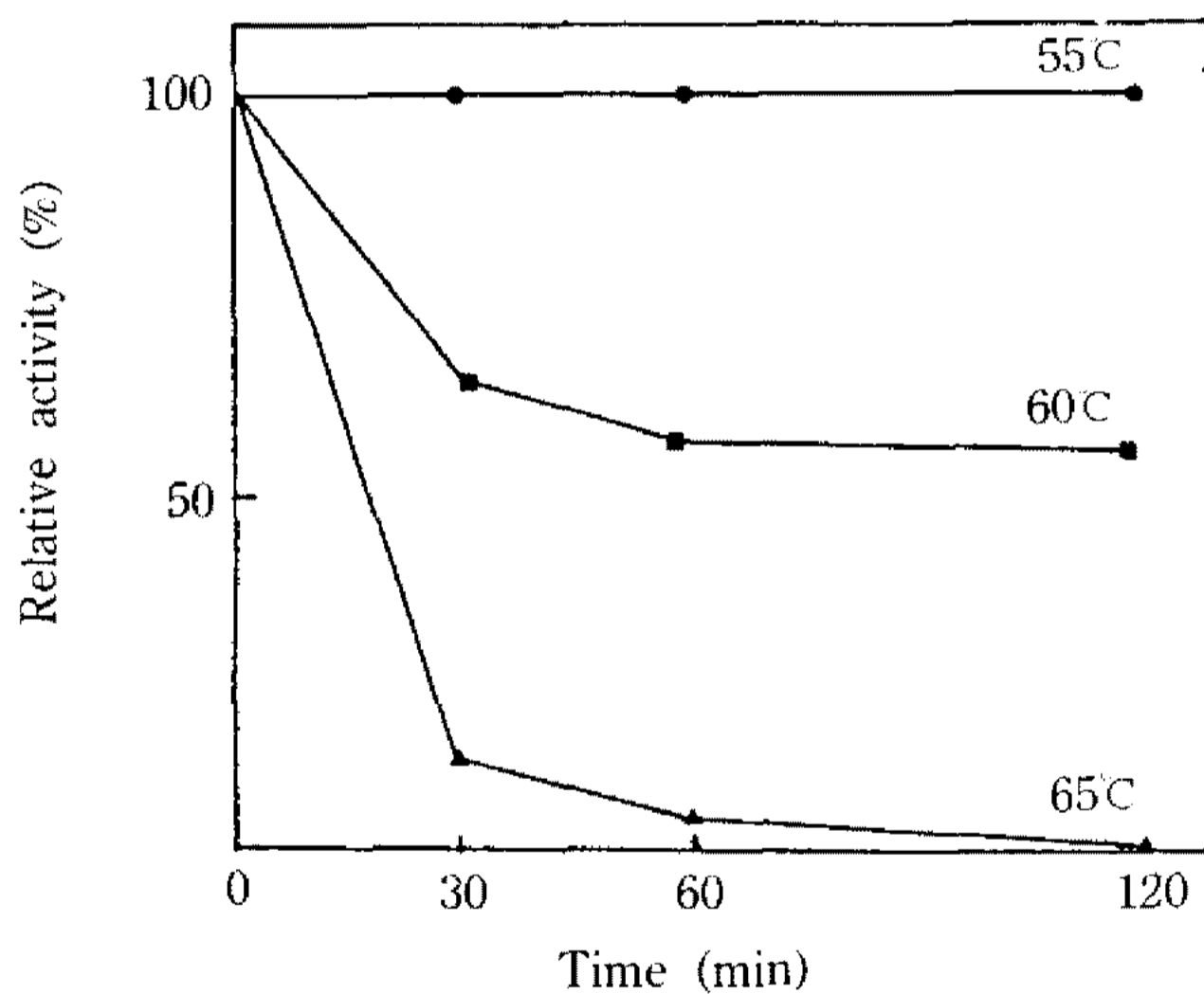
pH 및 열안정성 : acetate buffer(pH 4.0~5.0), phosphate buffer(pH 5.5~8.0) 및 tris buffer(pH 8.5~9.0)를 사용, 각각 다른 pH로 조정된 정제 효소액을 4°C에서 24시간 방치한 후 잔존효소활성을 측정, pH에 대한 효소안정성을 검토, Fig. 3와 같은 결과를 얻었다. 본 효소는 pH 5.0~7.0 사이에서 비교적 안정하였으며 *Gliocladium virens*(17)가 생산하는 xylanase의 pH 안정성과 비슷하였다. 또한 본 효소는 Fig. 4에 표시되어 있는 바와 같이 60°C에서 120분 가열하여도 50% 전후의 활성을 유지하였으며 55°C에서 가열하였을 때는 거의 활성의 변화를 나타내지 않았다. 이와 같은 결과는 *Streptomyces* sp.(10)나 *Gliocladium virens*(17)의 xylanase 등 대다수의 다른



**Fig. 3. pH stability of the xylanase.**

The reaction was carried out at 55°C for 30 min after 24 hr preincubation at 4°C at the various pHs indicated in the figure.

pH 4.0~5.0: sodium acetate-acetic acid buffer (0.1 M)  
 pH 5.5~8.0: sodium phosphate buffer (0.1 M)  
 pH 8.5~9.0: tris-Cl (0.1 M)



**Fig. 4. Thermal stability of the xylanase.**

The reaction was carried out at 55°C for 30 min after preincubation at various temperatures indicated in the figure.

xylanase에 비해 비교적 열에 안정한 편이라는 것을 보여주고 있다. 물론, *Clostridium stercorarium*(18)이 생산하는 xylanase와 같이 65°C에서 15일간 배양해도 효소활성에 손실이 거의 없을 정도로 열에 극히 안정한 것도 보고되고 있다.

**금속이온의 영향** : Table 2에 표시한 금속이온을 1 mM 농도로 효소액에 첨가, 37°C에서 1시간 병치한

**Table 2. Effect of metal ions on xylanase activity**

Metal (1 mM)	Relative activity (%)
None	100.00
Ag <sup>2+</sup>	96.55
Ba <sup>2+</sup>	92.88
Ca <sup>2+</sup>	100.92
Co <sup>2+</sup>	131.92
Cu <sup>2+</sup>	98.07
Fe <sup>2+</sup>	95.55
Hg <sup>2+</sup>	0.00
Li <sup>2+</sup>	91.70
Mg <sup>2+</sup>	97.63
Mn <sup>2+</sup>	136.80
Zn <sup>2+</sup>	97.77

**Table 3. Effect of metal ions of various concentrations on xylanase activity**

Concentration (mM)	Relative activity (%)	
	Mn <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>
None	100.00	100.00
10	120.10	112.99
5	130.31	133.52
1	136.80	131.92
0.5	128.25	118.15
0.1	127.15	102.06

다음 잔존 효소활성을 측정, 각종 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Mn<sup>2+</sup>과 Co<sup>2+</sup>는 효소활성을 현저히 증가시켰으며 반대로 Hg<sup>2+</sup>는 100%의 저해효과를 나타내었다. 기타 금속이온은 효소활성에 뚜렷한 영향을 주지 않았다. 이와 같은 결과는 alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp.(19)나 *Cryptococcus foavus*(20)가 생산하는 xylanase가 Mn<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>에 의해 큰 활성화효과를 보이지 않았다는 보고와 매우 대조적이다. 또한 Mn<sup>2+</sup>과 Co<sup>2+</sup>의 영향을 농도별로 살펴본 결과 Table 3과 같이 Mn<sup>2+</sup>은 1 mM일 때, Co<sup>2+</sup>는 5 mM일 때 최고의 활성을 나타내었다.

**기질 특이성**

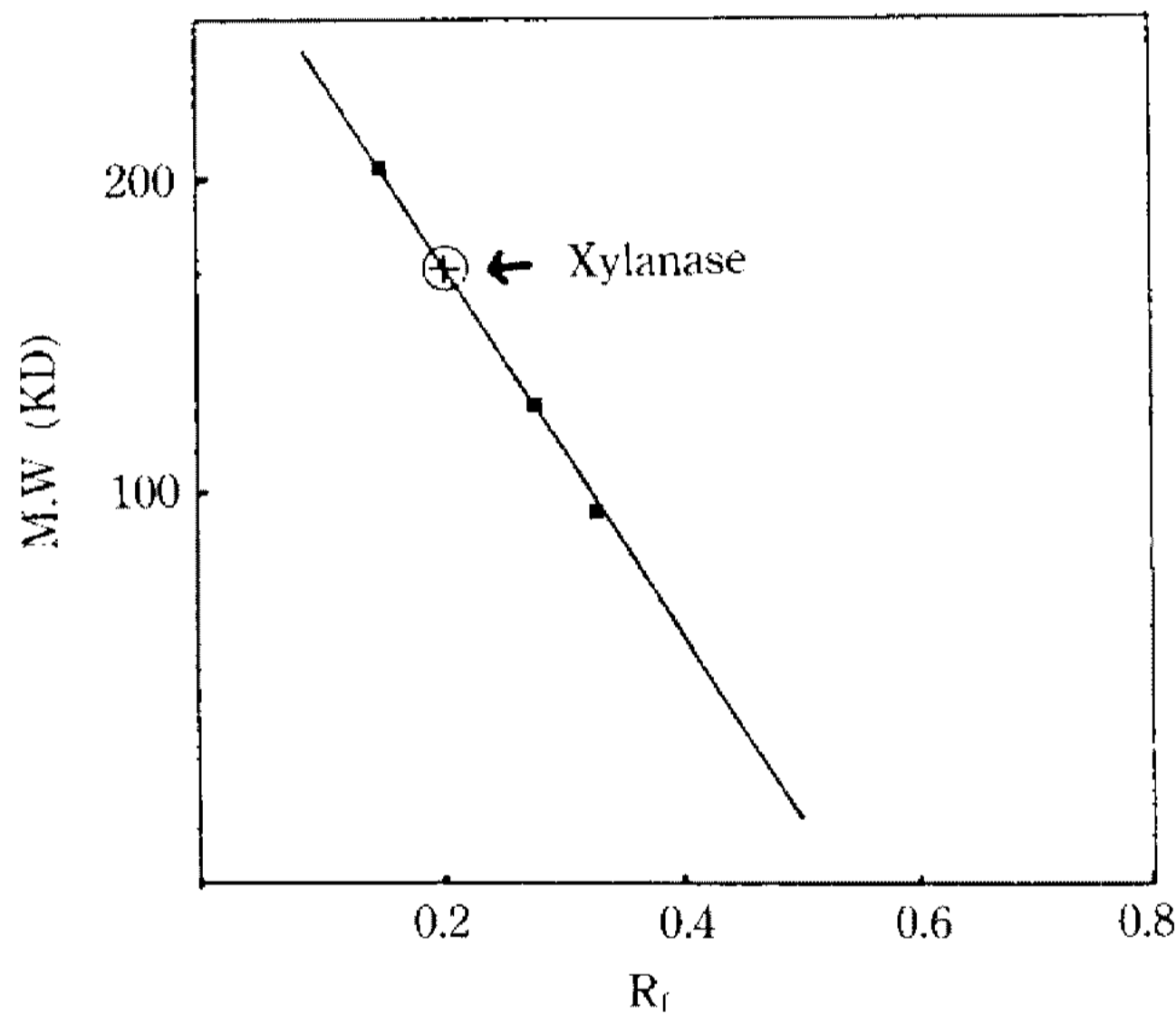
Xylan을 비롯 starch, cellulose 등 각종 탄수화물의 분해 정도를 측정, xylanase의 기질 특이성을 조사한 결과 Avicel과 CMC에 약간의 활성을 보이고 있어 (Table 4 참조). 본 효소는 cellulose-degrading sys-

**Table 4. Activity of the xylanase against various substrates**

Substrate <sup>a</sup>	Relative activity
Larchwood xylan	100.00
Avicel <sup>b</sup>	12.64
Cellobiose	0.00
Carboxymethyl cellulose	15.23
Dextrin	0.00
Starch	0.00

<sup>a</sup>Substrates (1%) were solubilized in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5).

<sup>b</sup>Avicel was suspended in the phosphate buffer solution.



**Fig. 5. Estimation of molecular weight by SDS slab gel electrophoresis.**

1. Myosin (rabbit muscle): M.W. 205,000
2. β-galactosidase: M.W. 116,000
3. Phosphorylase B. (rabbit muscle): M.W. 97,400

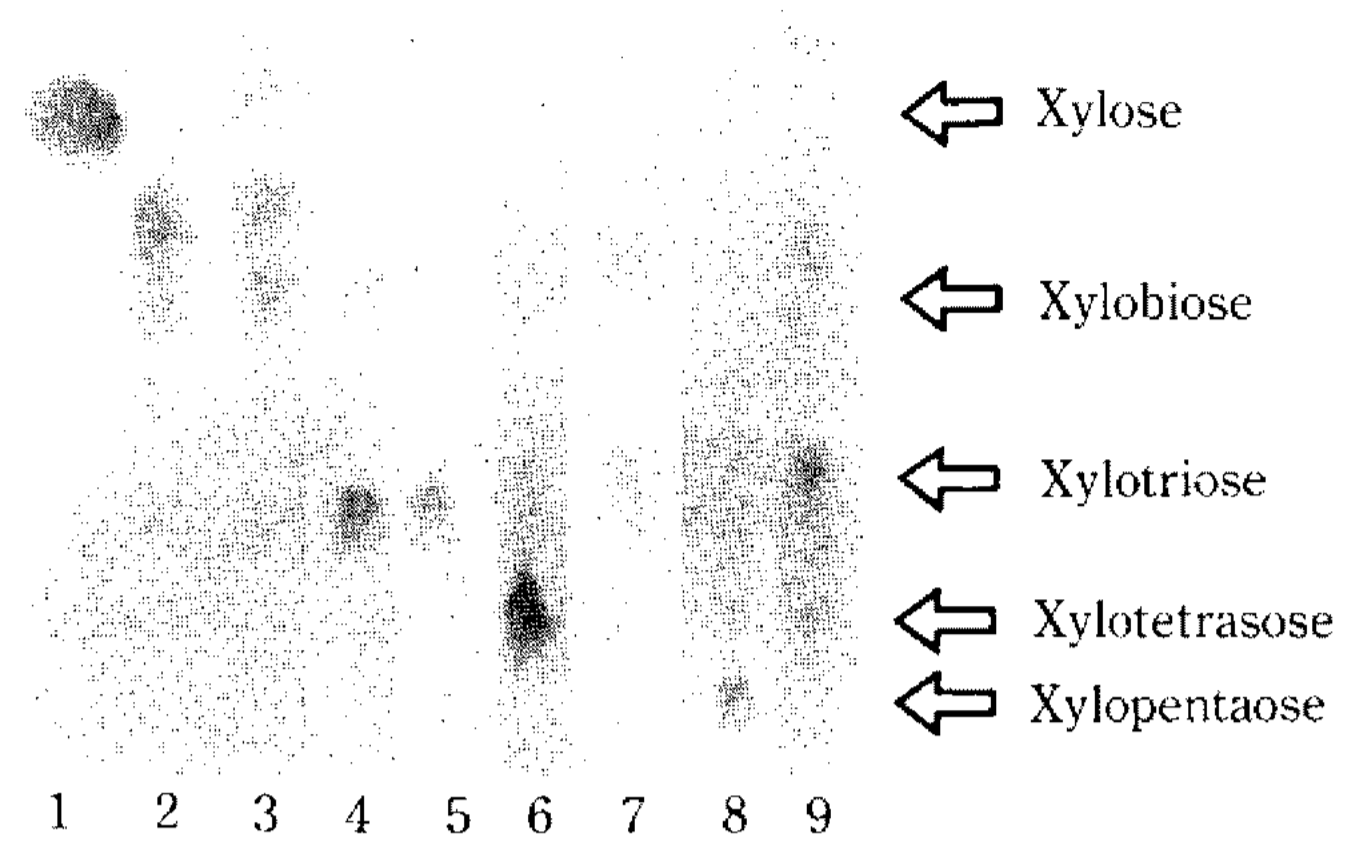
tem에도 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 추측된다.

**분자량 측정**

SDS slab gel 전기영동법으로 측정한 정제효소의 분자량은 Fig. 5에 표시되어 있는 바와 같이 약 170,000으로 산출되어 지금까지 보고되고 있는 많은 다른 미생물 xylanase(20,000 전후)보다 월등히 큰 분자임을 알 수 있었다(21).

**효소 반응생성물의 분석**

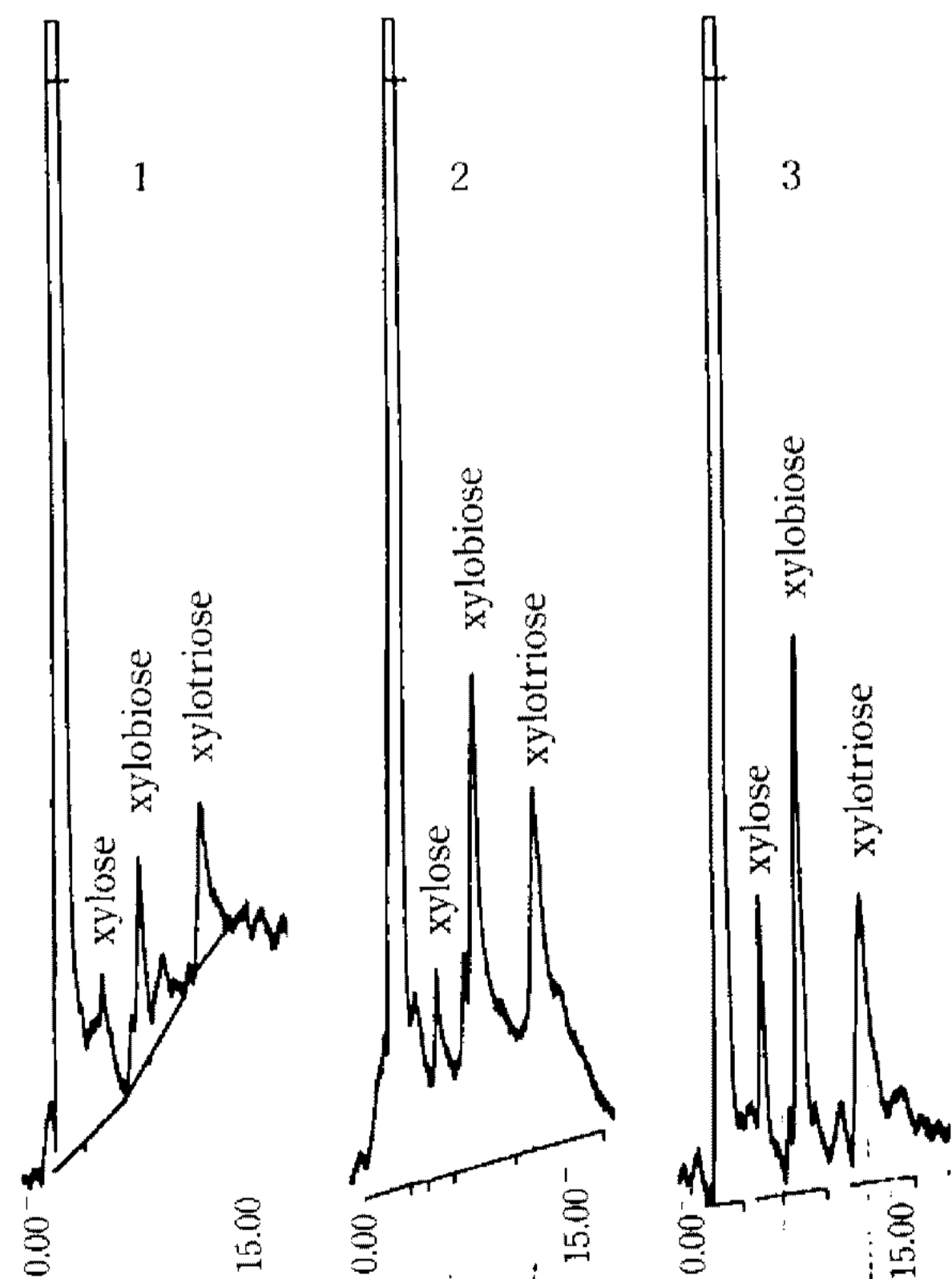
정제효소를 사용, 각종 xylooligomer를 가수분해시킨 후 분해산물을 paper chromatography법(22)으로



**Fig. 6. Paper chromatograms of the products of hydrolysis of xylooligosaccharides by the xylanase.**

The end products of the hydrolyses were separated by triple development on Whatman No.1 paper with a mixture of butanol-pyridine-water (5:3:2), and the spots were visualized with aniline-phthalate spray.

1. standard (xylose), 2. standard (xylobiose), 3. hydrolysate of xylobiose, 4. standard (xylotriose), 5. hydrolysate of xylotriose, 6. standard (xylotetrasose), 7. hydrolysate of xylotetrasose, 8. standard (xylopentose), 9. hydrolysate of xylopentose



**Fig. 7. HPLC chromatograms of larchwood hydrolysed by the purified xylanase.**

Reaction time: 1. 6 hr, 2. 12 hr, 3. 24 hr.

분석해 본 결과 Fig. 6과 같이 본 효소는 xylobiose는 전혀 분해하지 못하나 xylotriose 이상의 중합도를

지닌 oligomer는 기질로 이용하였으며 중합도가 클수록 더 잘 분해시키는 것으로 나타났다. 한편 HPLC chromatogram에 의하면 xylan의 주 가수분해 생성물은 xylobiose와 xylotriose인 것으로 분석됨으로서 (Fig. 7 참조) 본 정제효소는 전형적인 endo-type xylanase임을 알 수 있었다.

## 요 약

토양 분리균인 *B. stearothermophilus*가 생산하는 xylanase를 ammonium sulfate 분획, DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography, Sephadex G-100 gel 여과 및 열처리 등의 과정을 거쳐 단일 단백질로 분리 정제하였다. 170,000의 분자량을 지닌 본 정제 xylanase는 pH 8과 pH 10 사이의 넓은 최적 pH를 보였으며 55°C에서 최대 활성을 나타내었다. 55°C에서 2시간의 열처리에 의해서도 활성의 손실이 거의 없을 정도로 열에 매우 안정하였으며  $\text{Co}^{2+}$ 와  $\text{Mn}^{2+}$ 에 의해서 현저한 활성화 효과를 보였다. 또한 larchwood xylan의 가수분해 산물로 주로 xylobiose와 xylotriose를 생성하였으며 약간의 xylose도 생성하였다. 따라서 본 정제효소는 endo-xylanase(EC 3.2.1.8)로 분류할 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 동력자원부 에너지관리공단의 대체에너지기술개발사업비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Dekker, R.F.): *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*, Academic Press, Orlando, 505

- (1985)
2. Song, F.L., C.W. Firsberg, J.B. Rattray: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 644 (1987)
  3. Ganju, R.K., P.J. Vithayathil and S.K. Murthy: *J. Microbiol.*, **35**, 836 (1986)
  4. Song, H.S. and Y.J. Choi: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 289 (1989)
  5. Mitsuishi, M., T. Yamanobe and M. Yagisawa: *Agri. Biol. Chem.*, **52**, 921 (1988)
  6. Miler, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
  7. Peterson, G.L.: *Anal. Biochem.*, **100**, 201 (1979)
  8. Weber, K.M. Osborn: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
  9. Davis, B.J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
  10. Nakajima, T., K.T. Tsukamoto, T. Watanabe, K. Kainuma and Katsuda: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 269 (1984).
  11. Yu, J.H., D.C. Park, Y.J. Chang, I.S. Kang: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 154 (1989)
  12. Sung, N.K., H.K. Ckun, K.H. Shim, I.S. Kang, T.A. Kiba: *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **17**, 182 (1989)
  13. Honde, H., T. Kudo, Y. Ikura, K. Horikoshi: *Can. J. Microbiol.*, **31**, 528 (1985)
  14. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards: *Carbohydrate Res.*, **42**, 107 (1975)
  15. Mitsuishi, Y., T. Yamanobe, M. Yagisawa and Y. Takasaki: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3207 (1987)
  16. Uchino, F. and T. Nakne: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1121 (1981)
  17. Takahashi, M and S. Kutsumi: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 434 (1979).
  18. Berenger, J.F., C. Frixon, J. Bigliardi and N. Creuzeti: *Can. J. Microbiol.*, **31**, 635 (1985)
  19. Okazaki, W., t. Akiba, K. Horikoshi and R. Akahoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2033 (1985).
  20. Nakanishi, K., H. Arai and T. Yasui: *Ferment. Technol.*, **62**, 361 (1984)
  21. Ken, K., Y. Wong, L.U.L. Tam, and J.N. Sadler: *Microbiol. Rev.*, **52**, 305 (1988).
  22. Wilson, C.M.: *Anal. Chem.*, **31**, 1199 (1956)

(Received August 29, 1991)