

Xylanase 생산성 *Bacillus* sp. GS의 분리 및 동정

안준배 · 박현국* · 이계호

서울대학교 식품공학과, *동남보건전문대학 식품영양과

Isolation and Identification of *Bacillus* sp. GS Producing Xylanase

Jun-Bae Ahn, Heon-Kuk Park* , Ke-Ho Lee

Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Dongnam Health Junior College, Suwon 440-714, Korea

Abstract

To utilize hemicellulosic biomass efficiently, the microorganism producing xylanase was isolated from fermented sawdust. It was a Gram positive, aerobic and rod shape bacterium. It had endospore and secreted strong hydrolases, such as amylase and protease. Through morphological, cultural and physiological tests, it was identified as *Bacillus* sp. GS. To increase the productivity of xylanase from *Bacillus* sp. GS, the enzyme production medium was optimized. The composition of the medium and incubation conditions were like follows : xylan 1.25%, yeast extract 0.1%, NaNO₃ 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.02%, mineral salt 0.005%, pH 6.5, incubation temperature 37°C.

Key words : *Bacillus* sp. GS, xylanase, screening, identification

서 론

Plant hemicellulose의 주성분인 D-xylan은 D-glucose, L-arabinose 그리고 D-glucuronic acid 등의 측쇄를 가진 D-xylose 의 β -1,4-linked polymer로서, 특히 벧짚, 보리짚, 옥수수숙 등 농산 폐기물의 30%이상을 차지하고 있으며, 또한 pulp와 paper 공업에서 막대한 양이 폐기물로 버려져 공해의 요인이 되고 있다.

D-xylan의 가수 분해 산물인 D-xylose는 미생물 균체 단백질의 생산¹⁾, 에탄올²⁻⁶⁾ 및 acetone-butanol발효⁷⁾와 당뇨병 환자와 충치 예방을 위한 감미료인 xylitol⁸⁻¹⁰⁾의 생산에 이용될 수 있고, 최근에는 D-xylan의 가수 분해 산물인 xylobiose, xylotriose, xylotetraose 등의 xylooligosaccharide 들이 bifidogenic factor인 것으로 알려져 이들 xylooligosaccharide의 산업적 생산이 이루어지고 있다¹¹⁾. 이러한 xylan의 산업적 이용을 위해서는 xylan의 화학적 분

해법에 비하여 반응 조건이 온화하고, 기질 특이성이 있으므로 반응 산물이 균일하며, 최종 산물의 정제가 쉬운 점 등의 유리한 점을 가진 효소적 가수 분해법에 의한 효율적 분해 공정의 확립이 선결 과제라 하겠다. 따라서 xylanase를 강력히 분비하는 균주의 선발과 효소의 특성 규명¹²⁻¹⁶⁾ 및 xylanase 유전자의 분자생물학적 연구¹⁷⁻²¹⁾가 활발히 진행중이다.

Xylanase는 척추동물의 조직을 제외하고는 거의 모든 생물체, 즉 곰팡이나 세균과 같은 미생물을 포함하여 모든 식물체 및 곤충과 원생동물 등에서도 발견됨이 알려져 있다²²⁻²³⁾. 이제까지 보고된 microbial xylanase에 대한 연구는 *Aspergillus*속²⁶⁻²⁸⁾, *Gliocladium*속²⁹⁾, *Talamyces*속¹⁴⁾, *Trichoderma*속³⁰⁾, *Chaetomium*속³¹⁾, *Schizophyllum*속³²⁾ 등의 곰팡이와 *Trichosporum*속³³⁾, *Cryptococcus*속³⁴⁾ 등의 효모, *Bacillus*속^{12-16, 35-36)} 등의 세균과 *Streptomyces*속³⁷⁻³⁸⁾의 방선균 등에서 분리한 효소를 대상으로 이루어졌다. 효소의 효율적인 생산을 위해서는 생육 속도가 느린 곰팡이나 효모보다는 생육 속도가 빠르고 효소를 세포외로 다량 분비하며 유전자 조작이 용이한 세균을 이용

Corresponding author : Heon-Kuk Park

하는 것이 바람직하다.

본 논문에서는 매년 막대한 양이 이용되지 못하고 그대로 버려지는 hemicellulosic biomass를 효율적으로 이용하기 위한 기초적 연구로 xylanase 생산성 미생물을 선발하고, 그 중에서 역가가 우수한 *Bacillus* 속의 세균을 분리, 선발한 후 xylanase 생산 최적 조건을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

Xylan은 Sigma사(社)의 제품을 사용하였는데 균분리와 효소 생산을 위해서는 Oat spelt xylan을, 효소 반응의 기질로는 Birchwood xylan을 사용하였다.

2. 균 분리원

서울대학교 식품공학과에서 보관중인 세균과 전국 각지에서 수집한 토양 및 부식 목재 시료로부터 xylan 분해성 미생물을 분리하였다.

3. 배지

Xylanase 생산균주의 분리 배지로는 screening media를, 분리 균주의 보관 배지로는 Nutrient Agar Xylan (N.A.X.) 배지를, 생육 배지로는 Nutrient

Table 1. The composition of a screening medium

Ingredients	Content
Xylan	0.5 %
Yeast extract	0.1 %
K ₂ HPO ₄	0.07 %
KH ₂ PO ₄	0.03 %
NH ₄ SO ₄	0.1 %
Mineral solution*	0.1 % (V/V)
Agar	2 %
pH 7.0	

*Mineral solution: FeSO₄ 5g, MnSO₄ 1.6g, ZnSO₄ 1.4g, CoCl₂ 2.0g, D.D.W 1l

Broth (N. B.) 또는 Nutrient Agar (N. A.) 배지를 사용하였으며 그 조성은 Table 1 및 Table 2와 같았고 효소 생산의 최적 조건을 확립하기 위한 기본 배지의 조성은 Table 3과 같았다.

Table 2. The composition of N.A.X. medium

Ingredients	Content
Beef extract	0.3 %
Peptone	0.5 %
Agar	2 %
Xylan	1 %

Table 3. The composition of the basal medium

Ingradient	Content
Xylan	0.5 %
Yeast extract	0.05 %
Poly peptone	0.5 %
K ₂ HPO ₄	0.1 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 %
pH 7.0	

4. 균주의 선발 및 동정

1) 균주의 선발

수집 시료 1g을 100ml의 멸균 증류수에 넣어 격렬히 교반한 후 10분간 정지하였다. 상정액 100 μl를 취하여 Table 1의 선발 배지에 도말하여 37℃에서 2~3일간 배양한 후 4℃에서 24시간 저온 처리하여 clear zone을 형성하는 미생물을 1차 선발하였다.

1차 선발된 균주를 agar를 포함하지 않는 선발 배지에서 37℃, 48시간 진탕 배양한 후 원심 분리하고 상정액의 xylanase 역가를 측정하여 2차 선발하였다.

2) 분리 균주의 동정

균체의 형태 및 크기와 Gram staining, spore staining 등을 통해 형태학적 특성을 관찰하고 nutrient agar slant와 plate 상에서 색, 생육 상태, colony 형태 등의 배양학적 특성, 전분 및 카제인 분해성, catalase, IMViC test 등을 통해 생리학적 특성을 조사하였다.

실험 방법은 *Microbiology a laboratory manual*³⁹⁾과 *Microbiological Applications*⁴⁰⁾을 따랐으며, 전체적인 균의 동정은 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*⁴¹⁾에 준하였다.

5. Xylanase 역가 측정

Xylanase의 역가는 Paice 등의 방법³²⁾을 변형하여 측정하였다.

Birchwood xylan을 100mM phosphate buffer (pH 6.5)에 1%가 되게 녹인 후 5000×g에서 10분간 원심 분리하여 상정액을 기질로 사용하였다.

기질 용액 0.6ml에 0.4ml의 조효소액을 넣고 40℃ 진탕 항온 수조(40 strokes /min)에서 15분간 반응시키고, 생성된 환원당을 DNS변법⁴²⁾으로 발색시킨 후 550nm에서 xylose를 표준 물질로하여 비색정량하였다.

이때 효소의 역가 1 unit는 1분동안 1μmol의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

1. Xylanase 생산 세균의 선발 및 분리

발효된 톱밥으로부터 Table 4와 같이 0.18 unit /ml의 비교적 높은 역가를 보이는 GS 균주를 선발하여 순수 분리하였다.

Table 4. Selection of the microorganism showing the highest xylanase activity

Strain	B-30	B-22	DM	LG	GS	N-25	Z-20
Activity	0.03	0.05	0.03	0.04	0.18	0.07	0.05

2. 분리 균주의 동정

Xylanase 생산성이 우수하여 분리 선정된 세균은 Gram 양성균의 호기성 간균이었으며, Nutrient Agar 배지에서 72시간 이상 배양시 내생 포자를 형성하였다. 그외 배양학적, 형태학적, 생리학적 검사를 통해 Table 5~7과 같은 결과를 얻었다. 이와 같은 사실을 종합하여 분리 균주를 *Bacillus* sp. GS로 동정하였다.

Table 5. The morphological characteristics of isolated *Bacillus* sp. GS

Cell shape	:	Rod
Cell size	:	0.9~1.23, 6.0~7.4 (μm)
Gram staining	:	Positive
Spores	:	Exist, ellipsoidal form
Spore size	:	0.8~1.0, 1.2~1.6 (μm)
Motility	:	Motile

Table 6. The cultural characteristics of isolated *Bacillus* sp. GS

Oxygen requirement	:	Need (aerobe)
〈Nutrient Agar Plate〉		
i) Configuration	:	L-Form
ii) Margin	:	Irregular
iii) Elevation	:	Umbonate
〈Nutrient Broth〉		
i) Growth form	:	Pellicle
〈Nutrient Agar slant〉		
i) Amount of growth	:	Abundant
ii) Color	:	White
iii) Opacity	:	Opaque

Table 7. The physiological characteristics of isolated *Bacillus* sp. GS

Acid from	Glucose	:	+++	
	Lactose	:	-	
	Sucrose	:	++	
	Mannitol	:	+	
	Arabinose	:	-	
	Xylose	:	++	
Gas from	Glucose	:	+	
	Hydrolysis of	Starch	:	+
		Casein	:	+
Gelatin		:	+	
Indole formation	:	-		
Methyl red test	:	-		
V-P test	:	-		
Citrate utilization	:	+		
Catalase	:	+		
Oxidase test	:	+		

3. 효소 생산 배지 조성 및 배양 조건의 결정

1) 배양 온도의 영향

Table 3의 기본 배지에서 배양 온도를 바꾸어 xylanase 생산성 실험을 행한 결과는 Fig. 1과 같이 37°C에서 배양했을 때 xylanase 생산성이 가장 높았음을 알 수 있었다.

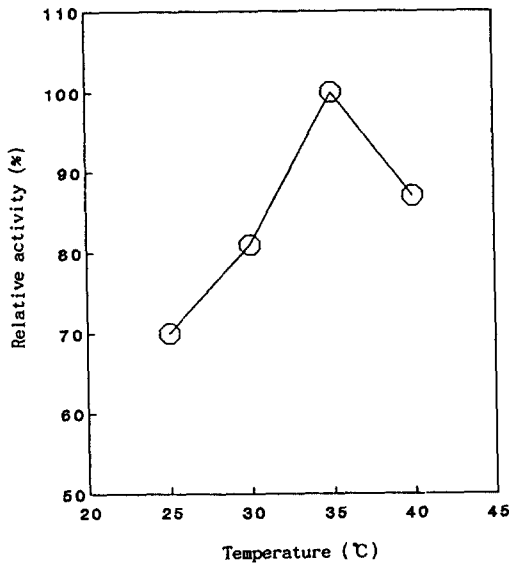


Fig. 1. The effect of incubation temperature on xylanase production.

2) 배지의 초기 pH의 영향

Table 3의 기본 배지의 초기 pH를 각각 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5로 맞추어 xylanase 생산성 실험을 행한 결과는 Fig. 2와 같이 배지의 초기 pH가 6.5일 경우에 xylanase 생산성이 가장 높았음을 알 수 있었다.

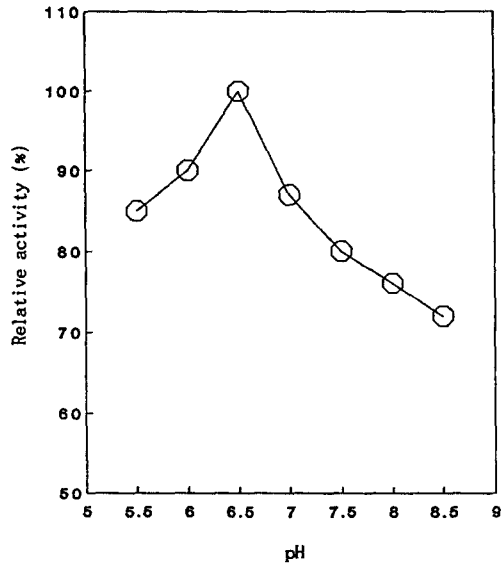


Fig. 2. The effect of initial pH on xylanase production.

3) 탄소원의 영향

효소 생산 기본 배지에서 탄소원을 바꾸고 pH 6.5, 37°C에서 2일간 배양하여 생성된 효소의 역가를 비교한 결과는 Fig. 3과 같았다. 여러가지 탄소원 중 xylan 첨가구가 효소 생산성이 가장 좋았음을 알 수 있었다.

한편, cellobiose의 경우도 좋은 영향을 주었으므로

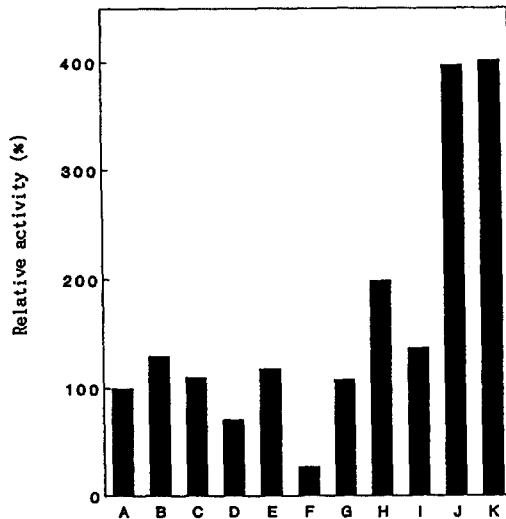


Fig. 3. The effect of C-sources on xylanase production.

A : basal medium B : CM-cellulose C : cellulose
 D : Avicel E : starch F : lactose G : maltose
 H : cellobiose I : glucose J : Xylan
 K : xylan+cellobiose

xylan과 cellobiose를 함께 섞어 배지에 첨가하여 실험하여 보았으나 효소 생산성이 크게 증가하지 않는

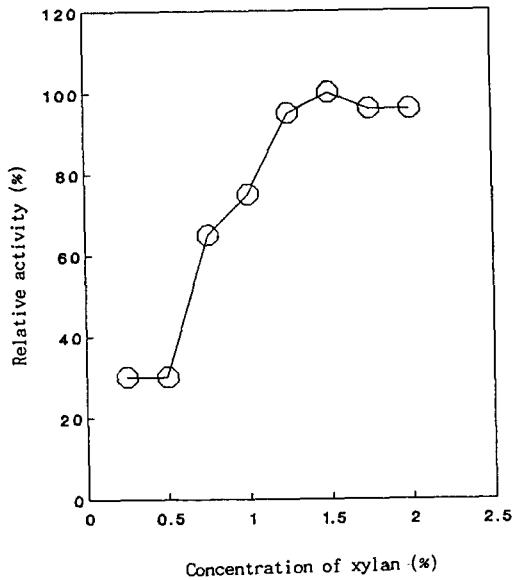


Fig. 4. The effect of the concentration of xylan on xylanase production.

것으로 보아 최적 탄소원은 xylan임을 알 수 있었다.

탄소원의 최적 첨가량을 결정하기 위하여 첨가 농도를 변화시켜 실험한 결과는 Fig. 4과 같았다.

Xylan의 농도가 1.5%에 이를 때까지는 효소의 생산성이 급격히 증가하나 그 이상이 되면 효소 생산성의 증가가 없는 것으로 보아 본 균주가 생산하는 xylanase는 induced enzyme임을 알 수 있었고, 탄소원으로서 xylan의 첨가 농도는 1.5%로 결정하였다.

4) 질소원의 영향

Xylanase 생산 기본 배지에서 질소원을 바꾸고 pH 6.5, 37°C에서 2일간 배양하여 생성된 효소의 역가를 비교한 결과는 Fig. 5와 같았다.

질소원의 최적 첨가량을 결정하기 위하여 농도를 변화시켜 실험한 결과는 Fig. 6과 같았다.

가장 좋은 영향을 미치는 질소원은 NaNO₃이었으며, 최적 첨가 농도는 0.2%였다. 보통의 다른 세균들의 효소 생성 배지의 최적 질소원은 대개의 경우 유기 질소 화합물로 고가 시약인 peptone, tryptone, casein hydrolyzate 등인데 반해 본 균주는 무기 질소 화합물이며 저렴한 NaNO₃이었음은 특기할만한 흥미로운 결과임을 알 수 있었다.

5) 무기 염류의 영향

Xylanase 생산 기본 배지에 각각 다른 무기 염류를

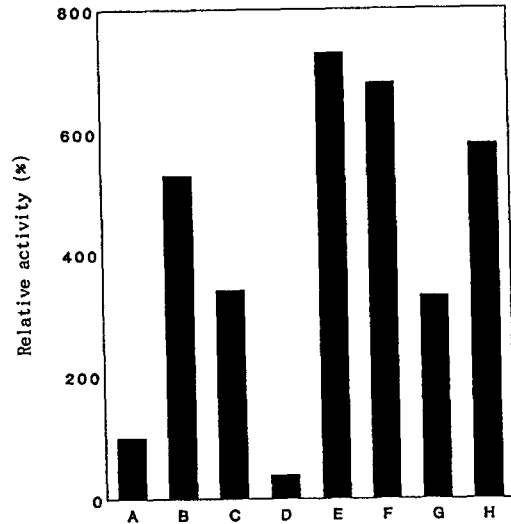


Fig. 5. The effect of N-sources on xylanase production.

A: basal medium B: casein C: casamino acid D: urea E: NaNO₃ F: (NH₄)₂SO₄ G: NH₄NO₃ H: KNO₃

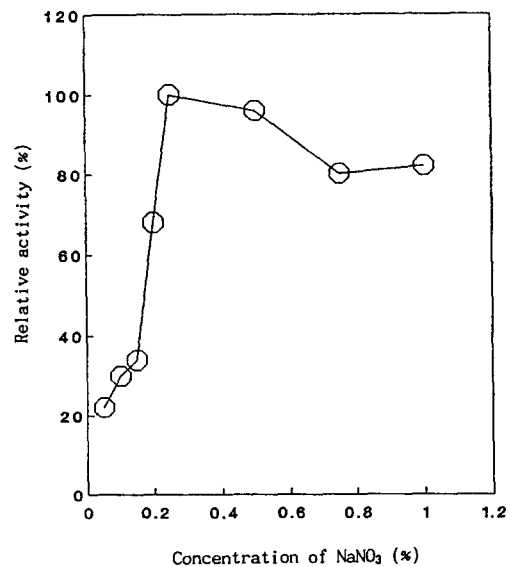


Fig. 6. The effect of the concentration of NaNO₃ on xylanase production.

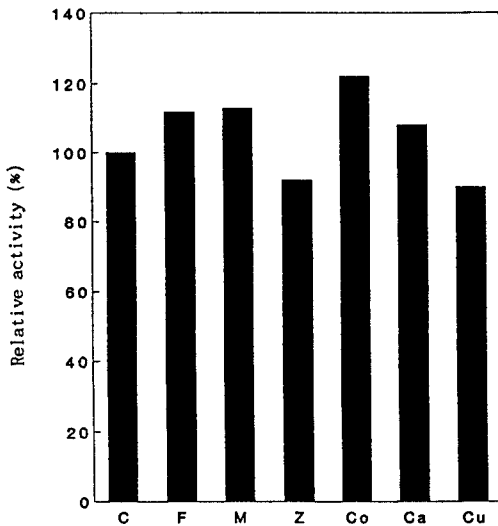


Fig. 7. The effect of mineral salts on xylanase production.

A : basal medium F : FeSO₄ M : MnSO₄
Z : ZnSO₄ Co : CoCl₂ Ca : CaCl₂ Cu : CuCl₂

첨가하여 배양한 후 생성된 효소의 역가를 측정하
는 Fig. 7과 같았다.

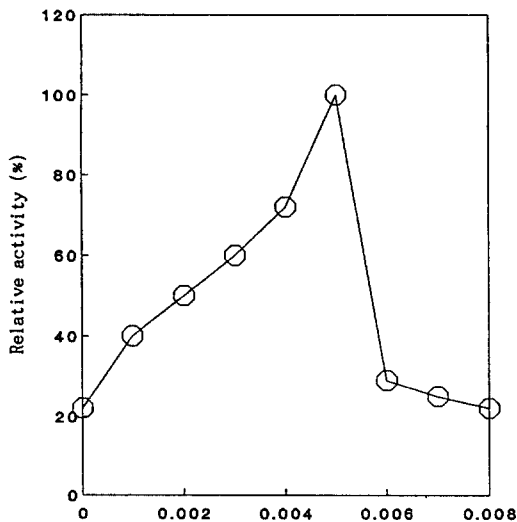


Fig. 8. The effect of the concentration of mineral salts on xylanase production.

무기 염류로서 좋은 영향을 미친 것은 FeSO₄, MnSO₄, CoCl₂, CaCl₂이었다. 이들 4가지 화합물을 함께 섞어 mineral salt로 하고 농도를 달리하여 배지에 첨가한 후 최적 첨가 농도를 알아본 결과는 Fig. 8과 같았는데, 0.005% 첨가시 xylanase 생산성이 가장 우수하였음을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합하여 Table 8과 같이 xylanase 생산 배지의 조성 및 효소 생산 최적 배양 조건을 결정할 수 있었다. Xylanase의 역가는 screening medium과 basal medium에서 각각 0.18, 0.11 unit/ml이었으나, Table 8의 improved medium에서는 0.78 unit/ml로 현저히 증가하였음을 알 수 있었다.

Table 8. The composition of the improved medium

Ingradient	Content
Xylan	1.5 %
Yeast extract	0.1 %
NaNO ₃	0.2 %
K ₂ HPO ₄	0.1 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02 %
Mineral salt	0.005 %
	pH 6.5

요 약

D-xylan은 최근 대체 에너지원인 알콜 생산의 기질로서 주목받고 있을 뿐만 아니라 butanol과 butandiol과 같은 유기 용매와 xylitol과 같은 감미료, xylooligosaccharide와 같은 bifidogenic factor 등의 원료로 사용된다. 본 논문에서는 발효된 톱밥으로부터 xylanase 강력 생산성 균주를 분리하고 제 특성을 확인하여 *Bacillus* sp. GS로 동정하였다. Xylanase 생산성을 높이기 위해 효소 생산 배지 성분과 배양 조건을 최적화 하였는데, 각각 xylan 1.25%, yeast extract 0.1%, NaNO₃ 0.2%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ 0.02%, mineral salt 0.005%와 pH 6.5, 배양 온도 37°C였다.

참고문헌

1. Chahal, D. S., Moo-Young, M. and Dhillon, G. S. : *Can. J. Microbiol.*, **25**, 793(1979)
2. Zeikus, J.G., Ben-Bassat, Aire and Reilly, P.J. : in A. Hollaender(ed.), *Trend in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals*, pp.111-441, Plenum Press, New York, 1980,
3. Jeffies, T.W. : *Biotech. Lett.*, **3**, 213 (1980)
4. Schneider, H. and Wang, P.Y. : *Biotech. Lett.*, **3**, 99 (1981)
5. Wang, P.Y. and Johnson, B.F. : *Biotech. Lett.*, **2**, 273 (1980)
6. 안동균 : 서울대석사학위 논문 (1992)
7. Rosenberg, S.L. : *Enz. Micro. Technol.*, **2**, 185 (1980)
8. Aminoff, C. and Gehring, F. : In J. N. Counsell(ed.), *Xylitol*, Applied Science Publishers Ltd., London, 1977
9. Barnett, J.A. : *Adv. Carb. Chem.*, **32**, 125 (1976)
10. Moore, K.K. : *Food. Pro. Dev.*, **11**, 66 (1977)
11. Xylooligo 糖 : Suntory(株), 제품 설명서, Japan
12. Yoshioka, H. and Chavanich, S. : *Agr. Biol. Chem.*, **45**, 579 (1981)
13. Bernier, R. Jr. and Desrochers, M. : *Appl. Env. Microbiol.*, **46**, 511 (1983)
14. Okazaki, W. and Akiba, T. : *Appl. Microbiol. Biotech.*, **19**, 335 (1984)
15. Honda, H. and Kudo, T. : *Can. J. Microbiol.*, **31**, 538 (1985)
16. Song, H.S. and Choi, Y.J. : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, (1989)
17. Bernier, R. Jr. and Driquez, H. : *Gene*, **896**, 59 (1983)
18. Honda, H. and Kudo, T. : *J. Bacteriology*, **161**, 784 (1985)
19. Sandhu, J.S. : *Enz. Micro. Technol.*, **6**, 271 (1984)
20. Panbangred, W., Kondo, T. and Negoro, S. : *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 335 (1983)
21. Kudo, T., Ohikoshi, A. and Horikoshi, K. : *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2825 (1985)
22. Dekker, R.F. : *Biosynthesis and Biodegradation of wood components*, Academic press, Orlando, **505** (1985)
23. Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **32**, 277 (1976)
24. Northcote, D.H. : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **23**, 113 (1984)
25. Dekker, R.F.H. and Richards, G.N. : *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **32**, 277 (1976)
26. Gorbacheva, I.V. and Rochinova, N.A. : *Biochem. Biophys. Acta*, **484**, 79 (1977)
27. Takenish, S. and Tsujisaka, Y. : *Agr. Bio. Chem.*, **39**, 2315 (1975)
28. Baker, C.J. : *Physiol. Biochem.*, **67**, 1250 (1977)
29. Takahashi, M. : *J. Ferment. Technol.*, **57**, 434 (1979)
30. Nomura, K. and Yasui, T. : *J. Ferment. Technol.*, **46**, 634 (1968)
31. Kawaminami, Y. : *J. Ferment. Technol.*, **48**, 161 (1976)
32. Paice, M.G. and Jurasek, L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **36**, 802 (1978)
33. Stuttegn, E. and Sabm, H. : *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **15**, 93 (1982)
34. Notario, V. and Villa, T.G. : *Can. J. Microbiol.*, **22**, 312 (1976)
35. Okasaki, W. and Akiba, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **49**, 2033 (1985)
36. Uchino, F. and Nakane, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **45**, 1121 (1981)
37. Iizuka, H. and Kawaminami, T. : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 520 (1965)
38. Kusakabe, I., Yasui, T. and Kobayashi, T. : Studies on xylanase system of *Streptomyces*

VIII., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 51, 439
(1977)

39. Cappuccino, James G. and Sherman, Natalie
: in *Microbiology a laboratory manual*, The
Benjamin/Cummings Publishing Company,
California, 1987
40. Benson, Harold J. : in *Microbiological
Applications*, Wm. C. Brown Publishers, 1990
41. Holt, J.G. ed. : *Bergey's manual of Bacteri-
ology*, The Williams and Wilkins Co.,
Baltimore, 1984
42. Miller, G.L. : *Anal. Chem.*, 31, 426 (1956)

(1994년 2월 14일 수리)