

## Xylanase를 생산하는 *Bacillus* sp. AMX-4 균주의 분리와 효소 생산성

윤기홍\* · 설숙자 · 조효찬 · 이미성<sup>1</sup> · 최준호<sup>1</sup> · 조기행<sup>1</sup>  
우송대학교 식품생명과학부, <sup>1</sup>씨티씨바이오 중앙연구소

**Isolation and Enzyme Production of a Xylanase-producing Strain, *Bacillus* sp. AMX-4. Yoon, Ki-Hong\*, Suk Ja Seol, Hyo-Chan Cho, Mi-Sung Lee<sup>1</sup>, Joon Ho Choi<sup>1</sup>, and Ki Haeng Cho<sup>1</sup>.** School of Food Science & Biotechnology, Woosong University, 17-2, Jayang-dong, Dong-gu, Daejeon 300-718, <sup>1</sup>R&D Center, CTCBio Inc., Seoul 305-600, Korea – A bacterium producing the extracellular xylanase was isolated from soil and has been identified as a *Bacillus* sp. strain. The isolate, named *Bacillus* sp. AMX-4, was shown to be similar to *B. subtilis* strain on the basis of its chemical compositions. The xylanase of culture supernatant was most active at 50°C and pH 6.0. The additional carbon sources including monosaccharides, disaccharides, wheat bran, and rice straw increased the enzyme productivity. Especially, the maximum xylanase productivity was reached 29.2 units/ml in LB medium supplemented with 1.5% (w/v) xylose, which was 16-folds more than that in LB medium. As the results of investigating the effects of xylose on cell growth and xylanase productivity of *Bacillus* sp. AMX-4, increase of xylanase production was owing to the induction of xylanase biosynthesis. It was also found that the enzyme production was in association with the growth of *Bacillus* sp. AMX-4.

**Key words :** *Bacillus*, identification, xylose, xylanase production

식물 세포벽에 존재하는 hemicellulose의 주요 구성 성분으로 알려져 있는 xylan은 기본골격이  $\beta$ -1,4 결합을 하고 있는 D-xylose로 구성되어 있고 이러한 xylose 잔기에 acetyl group, L-arabinofuranose와 D-glucuronic acid 등이 측쇄로 연결되어 존재하고 있다[3]. 그러므로 xylan의 분해에는 xylanase(endo-1,4- $\beta$ -xylanase),  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -glucuronidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase와 acetyl esterase 등이 공동으로 관여하며[1] 이 중에서 xylanase는 xylan의 기본골격을 분해하여 xylooligosaccharides로 변환시키므로 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 한다.

Xylanase의 산업적 유용성은 제지의 표백공정, 사료효율 개선, 과일음료의 청징, 제빵의 고품질화, 농산 부산물 이용 등에서 주목을 받고 있다. 제지산업에서는 표백공정에 응용하기 위한 내알칼리성 또는 내열성 xylanase가 여러 세균으로부터 분리되었으며[9], cellulase의 활성이 없는 xylanase 생산균도 다수 보고되었다[5,6]. 사료산업에서는 미생물 유래 xylanase가 사료 첨가용 효소로 사용되며 곡물 사료 섭취시 hemicellulose로 인한 가축의 장내의 고 점질도를 저하시키는 기능을 함으로써 소화기 질병을 예방하고 사료효율을 향상시키는 것으로 알려져 있다[12]. 또한 xylanase를 처리하여 빵의 품질을 개선하거나[4],  $\beta$ -xylosidase와 함께

xylanase 유전자가 도입된 효모를 농임산 부산물을 미생물이 이용할 수 있도록 당화하고자 하는 연구가 진행되고 있다[8].

그러므로 여러 종류 미생물로부터 다양한 xylanase가 분리되어 그 특성이 보고되었다. 곰팡이 중에서는 *Aspergillus* 속 균주[16]와 *Trichoderma reesei*[18]에 의해 생산된 xylanase가 많이 연구되었다. 이들 곰팡이 유래 효소는 주로 분자량이 작고(<35,000 Da), 최적 반응온도가 40~60°C 범위 내에 있으며, 산성 pH 부근에서 최대 활성을 보인다. 방선균 중에서는 주로 *Streptomyces* 속 균주의 xylanase에 대한 연구가 활발하며, 이들 균주가 생산하는 xylanase는 곰팡이 유래의 xylanase에 비해 반응온도 및 반응 pH가 다양한 것으로 알려져 있다. 특히 최적 반응 pH가 중성이나 약 알칼리성이며, 65°C 이상의 고온에서 최대 반응활성을 보이는 것이 보고되었다[19]. 일반세균에서는 *Bacillus*[17]와 *Clostridium* 속 균주[7]를 중심으로 다양한 특성의 xylanase가 발견되었으며, 분자량이나 반응특성이 곰팡이나 방선균 유래의 xylanase보다 더 다양하다. 최근에는 *Thermotoga* 속의 초고온성 균주로부터 105°C에서 최대 활성을 나타내는 xylanase가 보고되었다[20].

본 연구에서는 국내 토양으로부터 xylan 분해력이 우수한 미생물을 분리하여 이를 동정하고 배지조성이 분리균의 xylanase 생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

\*Corresponding author  
Tel. 042-630-9742, Fax. 042-636-2676  
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

### 재료 및 방법

#### Xylanase 생산균의 탐색



sucrose, trehalose는 이용하였으나, 다른 탄수화물은 이용하지 못하는 것으로 확인되었다. 이러한 AMX-4의 형태적 특성과 생화학적 특성으로 볼 때 *Bacillus* 속 균주 중 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 및 *B. pumilus*와 유사성을 보이는 것으로 나타났으나, 일치도가 높지는 않았다.

따라서 분리균의 정확한 동정을 위해서 추가적으로 *Bacillus* sp. AMX-4의 세포막 지방산 조성을 분석한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같으며, *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens*의 지방산 조성은 각각 0.753과 0.683의 유사도 값을 보였다. 또한 AMX-4 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 다른 균주와 비교하기 위해 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열 중 보존 염기서열을 primers로 사용하여 분리균의 총 염색체 DNA를 template로 하여 PCR을 수행함으로써 증폭된 DNA 단편의 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 분리균으로부터 증폭된 DNA 단편인 892 bp 크기의 염기서열은 16S rRNA 유전자 염기서열의 일부에 해당되며, 이를 다른 균주의 것과 비교한 결과 *B. subtilis* 유전자의 염기서열과 가장 상동성이 높은 것으로 나타났다(data not shown). 상기 여러 특성으로 보아 분리균은 *B. subtilis*에 가까운 것으로 판단된다.

#### Xylanase의 반응특성

*Bacillus* sp. AMX-4가 세포외로 분비 생산하는 xylanase의 반응특성을 조사하기 위해 배양상등액을 ammonium sulfate로 분획하여 얻은 침전물을 20 mM Na · phosphate buffer(pH 6.0)에 현탁한 후 동일한 완충용액으로 투석하였다. 분획된 단백질 중 xylanase 활성을 갖는 부분을 조효소

액으로 사용하여 반응온도와 pH를 달리하여 xylanase 활성을 측정함으로써 반응온도와 pH가 xylanase 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보인 바와 같이 50°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보였다. 그런데 *Bacillus* sp. AMX-4 유래의 xylanase는 단위동물의 소장온도인 37°C에서 최대활성의 약 70%에 해당하는 활성을 보였으며, 특히 단위동물의 소장 pH인 pH 6.5에서 최대활성의 90% 정도의 활성을 나타냈다. 곰팡이 유래의 xylanase는 산성 xylanase로서 중성 pH에서 그 활성이 낮다는 점을 고려할 때 중성 pH에서도 그 활성이 높은 *Bacillus* sp. AMX-4의 xylanase는 사료첨가용 효소제로서의 용도가 높을 것으로 기대된다.

#### 탄소원의 종류에 따른 xylanase 생산성

미생물의 다당류 분해효소는 배양액 중의 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많은데 xylanase 경우 일반적으로 xylan이나 다른 탄수화물을 첨가한 배지에서 생산이 유도되거나 또는 항시적으로도 생산된다. *Aspergillus awamori*[16]와 *Streptomyces* sp. QG-11-3[2]은 xylan에 의해 xylanase 생산성이 유도되며, *T. reesei*[21]와 *Sclerotium rolfsii*[15]는 L-sorbose에 의해 효소 생산이 유도된다고 알려져 있다. 이외에도 xylose, 밀기울, 벚짳, 옥수수대, 사탕수수 분 등의 성분도 미생물에 따라 xylanase 생산성을 유도한다고 보고되었다.

따라서 탄소원이 *Bacillus* sp. AMX-4의 xylanase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB 배지를 기본배지로 하여 부가 탄소원으로는 glucose, galactose, xylose, maltose, lactose, arabinose, mannose, fructose, sucrose, mannitol 이 1% (w/v)가 되고, avicel, 전분,  $\alpha$ -cellulose, oat spelt xylan, 벚짳, 밀기울은 0.5%(w/v)가 되도록 각각 첨가하여 37°C에서 약 16 시간 진탕배양하여 배양상등액에 존재하는 xylanase 활성을 조사하였다. 이때 부가 탄소원으로 첨가한 다당류와 이당류는 따로 멸균하여 배지 제조에 사용하였다. PTS 당인 glucose와 같이 쉽게 이용될 수 있는 당이 존재하면 xylanase의 생합성이 억제되는 현상을 보이는 경우가 있는데, AMX-4 균주는 첨가된 다당류와 이당류의 종류에 따라 생산성이 큰 차이를 보이지 않으며 fructose의 경우를 제외하고는 부가 탄소원을 첨가하지 않았을 때 보다 효소의 생산성이 약 2-3 배 정도 향상되었다. 특히 xylose를 첨가하였을 때 첨가하지 않았을 때보다 약 15 배정도 생산성이 증가하는 것으로 확인되었다(Table 2). *Bacillus* sp. BP-7[11]과 *Trichosporon cutaneum* SL409[10]의 경우도 xylose에 의해 xylanase 생산성이 증가되지만 glucose에 의해서는 효소 생산성이 저해되는 것으로 보고되었다. 그러나 *Bacillus* sp. AMX-4는 glucose를 첨가한 배지에서도 xylanase 생산이 저해되지 않고 오히려 2배 정도 증가한 것으로 나타났다.

또한 고분자 탄수화물을 첨가한 배지에서 xylanase 생산성은 약 2배 정도 증가하였으나, 탄수화물 종류에 따라 크

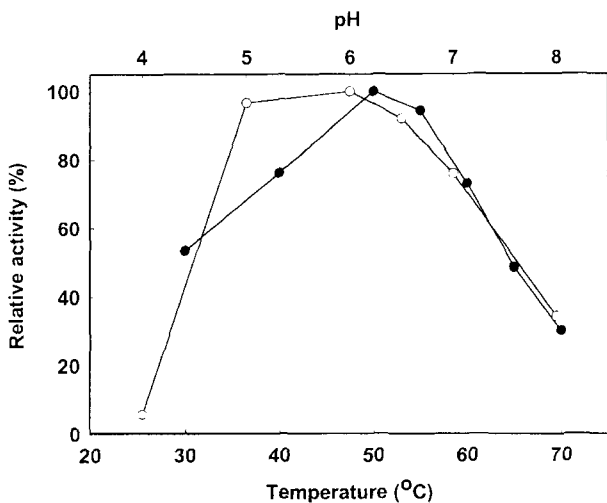


Fig. 2. Effects of reaction temperature and pH on the xylanase activity. Temperature profile (—●—) was obtained by measuring the xylanase activities at pH 6.0 and different temperatures. The reactions were done at 45°C and various pHs for determining the pH profile (---○---). The following buffer systems were used: pH 4.0 to 6.0, 50 mM citrate; pH 6.0 to 8.0, 50 mM sodium phosphate.

**Table 2. Effects of additional carbon sources on the xylanase production.**

Carbon Sources	Xylanase production (unit/ml)	Relative productivity (fold)
None	1.7	1.0
Galactose	3.9	2.3
Maltose	4.7	2.8
Arabinose	6.3	3.7
Xylose	25.5	15.0
Fructose	1.3	0.8
Glucose	4.2	2.5
Mannose	4.5	2.6
Sucrose	4.0	2.4
Lactose	6.1	3.6
Mannitol	4.0	2.4
Avicel	2.9	1.6
Starch	3.7	2.1
Oat spelt xylan	3.2	1.8
$\alpha$ -Cellulose	3.0	1.7
Rice straw	3.6	2.0
Wheat bran	3.9	2.2

게 차이가 나지 않았다. 특히 xylan을 첨가한 배지에서 xylanase 생산성이 크게 향상되어지는 것은 여러종류의 미생물에서 관찰된 일반적인 현상이지만 AMX-4의 경우에는 xylanase 생산성 향상에는 다른 고분자성 물질보다 특이할 정도의 생산성 증대를 보이지는 않았다.

#### 탄수화물 첨가량에 따른 효소 생산성

부가 탄소원 중 효소 생산성에 미치는 영향이 가장 큰 것으로 확인된 xylose와 값싼 원료인 밀기울과 벼짚의 첨가량에 따른 *Bacillus sp.* AMX-4의 xylanase 생산성을 조사하기 위해 LB 배지에 이들의 양을 달리 첨가한 후 배양상등액의

**Table 3. Effects of various amounts of additional carbon sources on the xylanase production.**

Amount (%)	Relative productivity (fold) of xylanase by addition of		
	Xylose	Wheat bran	Rice straw
None	1.0	1.0	1.0
0.1	10.9	ND <sup>a</sup>	ND
0.3	11.9	ND	ND
0.5	13.6	1.8	1.8
0.7	14.6	ND	ND
1.0	14.6	1.7	2.0
1.5	15.5	2.2	1.9
2.0	14.6	1.9	2.7
3.0	13.9	3.1	2.6
4.0	13.7	2.9	3.2
5.0	14.2	2.6	3.3

<sup>a</sup>ND, not determined.

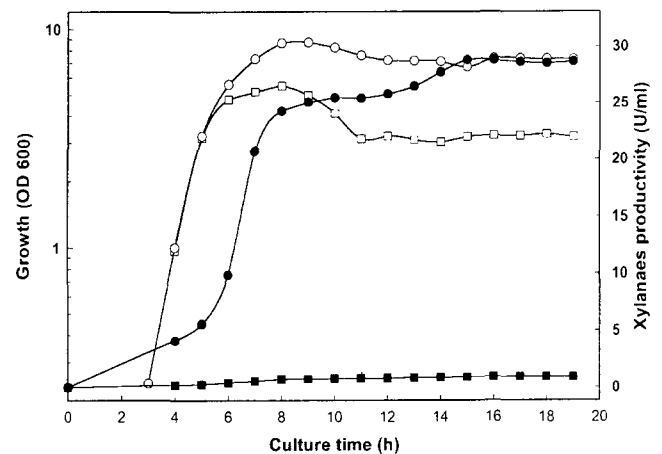
효소 활성을 측정하였다. 밀기울과 벼짚의 경우 첨가량에 따른 효소 생산성 향상의 차이가 크지 않았으며, 약 3% 정도 첨가되었을 때 효소 생산성이 최대로 이르는 것으로 판단된다. Xylose의 경우는 1.5%가 되도록 첨가하였을 때 효소 생산성이 가장 높았으며, 0.1% 정도의 소량만 첨가하여도 xylanase 생산성이 10배 이상 증가하는 것으로 나타났다 (Table 3). 소량의 xylose를 첨가한 배지에서도 *Bacillus sp.* AMX-4의 xylanase 생산성이 급격히 증가하는 것으로 보아 xylose가 xylanase 생합성을 유도하는 것으로 추측된다.

한편 xylose(1.5%)와 동시에 밀기울이나 벼짚을 첨가한 LB 배지에서 *Bacillus sp.* AMX-4의 xylanase 생산성을 조사한 결과 밀기울이나 벼짚의 첨가량에 관계없이 xylose 만을 첨가하였을 때 보다 xylanase 생산성이 증가되지 않는 것으로 나타났다(data not shown).

#### *Bacillus sp.* AMX-4의 성장과 xylanase 생산

효소 생산성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 확인된 xylose를 사용하여 효소 생산량 증가가 미생물의 성장 정도의 증가에 기인된 것인지 아닌지를 검토하였다. 탄소원을 첨가하지 않은 LB 배지와 부가 탄소원으로 xylose가 1.5% 되도록 첨가한 LB 배지 200 ml을 포함한 1-liter baffled 플라스크에 미리 LB 배지에서 배양된 *Bacillus sp.* AMX-4 배양액을 1%가 되도록 접종하여 37°C에서 진탕배양하면서 일정 시간 마다 미생물의 성장과 효소 생산과의 관계를 조사하였다. 이때 미생물의 성장은 배양액의 흡광도를 측정하여 결정하였고, 배양액에 존재하는 xylanase의 활성을 측정함으로써 효소 생산성을 결정하였다.

*Bacillus sp.* AMX-4는 Fig. 3에서 보인바와 같이 증기 대



**Fig. 3. Growth and xylanase production of *Bacillus sp.* AMX-4. *Bacillus sp.* AMX-4 was grown respectively in LB broth (squares) and LB broth supplemented with 1.5% xylose (circles) at 37°C with vigorous shaking. The cell growth (open symbols) was determined by measuring the absorbances of the cell cultures at 600 nm. Xylanase activities (closed symbols) were determined with the culture supernatants.**

수증식기까지는 동일한 성장형태를 보였으나 약 6시간 후부터 성장정도에 차이를 보였다. 정지기에 이르는 시간은 두 배지에서 모두 약 8시간 걸렸으나 xylose를 첨가한 배지에서 균의 성장정도가 우수한 것으로 나타났다. Xylanase 생산은 균의 성장형태와 일치하여 성장 정지기에 이르는 시기까지 효소 생산성이 급격히 증가하였다. Xylose를 첨가한 배지에서 배양시간이 8시간일 때 약 25 U/ml의 효소 생산성을 보였으며, 시간이 지나면서 균의 사멸이 일어나는 시간에도 효소 생산성은 약간씩 증가하는 현상을 보였다. Xylose를 첨가하지 않은 배지에서도 효소 생산성은 낮지만 균의 사멸이 일어나는 시간에도 효소 생산성은 큰 변화를 보이지 않고 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다.

균의 성장과 xylanase의 생산성을 비교해 볼 때 xylose를 첨가한 배지에서는 xylanase 생산성뿐만 아니라 균의 성장도 증가한 것을 알 수 있는데 이로부터 xylose 존재하에서 xylanase 생산성의 증가는 균 성장에 의한 요소가 있을 것으로 판단된다. 그러나 xylose에 의해 균의 최대 성장정도가 2배에 미치지 못하는데 비해 xylanase 생산성 증가가 약 16배 이상 일어난 것으로 보아 xylanase 생산성의 향상이 균 성장에 의한 것만 이라고 할 수 없을 것이다. 더구나 xylose를 0.1% 첨가한 배지에서도 약 10배 이상의 효소 생산성이 증가한 결과(Table 3)로 보아 xylose는 *Bacillus* sp. AMX-4의 탄소원으로 사용됨과 동시에 xylanase 생합성의 유도제로 작용하고 있는 것으로 판단된다.

## 요 약

도양으로 부터 xylan 분해능이 우수한 *Bacillus* sp. AMX-4를 분리하고 동정하였는데 분리균의 화학조성은 *B. subtilis*와 유사성을 보였다. 분리균이 생산하는 xylanase는 50°C와 pH 6에서 최대활성을 보였다. 배지의 부가 탄소원을 첨가하여 *Bacillus* sp. AMX-4를 배양한 결과 xylose를 첨가한 배지에서 xylanase 생산성이 가장 증가하는 것으로 나타났으며, xylose를 1.5%(w/v)가 되도록 첨가하였을 때 배양상등액의 xylanase 활성이 29.2 U/ml로 약 16배 정도 생산성이 증가하였다. Xylose를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지에서 *Bacillus* sp. AMX-4를 배양하여 균의 성장과 효소 생산성을 비교한 결과 xylose를 첨가한 배지에서 효소 생산성뿐만 아니라 분리균의 최대 성장정도도 증가한 것으로 보아 xylose는 균의 성장과 xylanase 생합성을 동시에 유도하는 것으로 판단된다. 또한 xylanase는 균의 성장과 연계되어 생산되는 것으로 확인되었다.

## 감사의 글

본 연구는 2001년도 산업자원부 공통핵심기술개발 과제에 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- 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.
- Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 396-402.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Courtin, C. M., A. Roelants, and J. A. Delcour. 1999. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 1870-1877.
- Khashin, A., I. Alchnati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
- 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.
- Kosugi, A., K. Murashima, and R.H. Doi. 2001. Characterization of xylanolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans*: expression of xylanase activity dependent on growth substrates. *J. Bacteriol.* **183**: 7037-7043.
- La Grange, D. C., M. Claeysens, I. S. Pretorius, and W.H. Van Zyl. 2000. Coexpression of the *Bacillus pumilus* beta-xylosidase (*xynB*) gene with the *Trichoderma reesei* beta-xylanase 2 (*xyn2*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 195-200.
- Lee, Y. E., E. Lowe, B. Henriessat, 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.
- Liu, W., Y. Lu, and G. Ma. 1999. Induction and glucose repression of endo- $\beta$ -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochem.* **34**: 67-72.
- Lopez, C., A. Blanco, and F. I. J. Pastor. 1998. Xylanase production by a new alkali-tolerant isolate of *Bacillus*. *Biotechnol. Lett.* **20**: 243-246.
- 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.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Rodriguez, R. L. and R. C. Tait. 1983. *Recombinant DNA Techniques-An introduction*. p. 45-46. Addison-Wesley Pub. Co.
- Sachslehner, A., B. Nidetzky, K. D. Kulbe, and D. Haltrich. 1998. Induction of mannanase, xylanase and endoglucanase

- activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 594-600.
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. Wang, P., J.C. Mason, and P. Broda. 1993. Xylanases from *Streptomyces cyaneus*: their production, purification and characterization. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1987-1993.
20. Winterhalter, C. and W. Liebl. 1995. Two extremely thermostable xylanase of the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1810-1815.
21. Xu, J., M. Nogawa, H. Okada, and Y. Morikawa. 1998. Xylanase induction by L-sorbose in a fungus *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 1555-1559.

(Received Feb. 24, 2002/Accepted Mar. 28, 2002)