Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 20, No. 5, 559-564 (1992)

Bacillus sp. N-25 가 생산하는 Xylanase의 특성

김원곤* · 이찬용[1] · 이계호
서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과, [1]대전대학교 이과대학 미생물학과

Characterization of a Xylanase Produced by *Bacillus* sp. N-25

Kim, Won-Gon*, Chan-Yong Lee[1] and Ke-Ho Lee
Department of Food science and Tech., College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea
[1]Department of Microbiology, College of Sciences, Daejon University, Daejon 300-716, Korea

Abstract — To increase the efficency of utilizing cellulosic biomass, a potent xylanase producing bacteria was isolated and identified as *Bacillus* sp. N-25. Extracellular xylanase from *Bacillus* sp. N-25 was partially purified by ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sephadex A-25 and Sephadex G-100 column chromatographies. The xylanase was single fraction on chromatography and was true xylanase without cellulase activity. The enzyme was stable at pH 6~8 and 80% activity was remained at 50℃ for 30 min, but was inhibited by Hg^{2+} , Ag^{2+} and Mn^{2+}. From the fact that the major end product was xylose, we suggested that the enzyme is an exo-xylanase which may be a prime candidate for industrial use.

D-xylan은 D-glucose, L-arabinose 그리고 D-glucuronic acid의 측쇄를 가진 D-xylose의 β-1,4-linked polymer로써 매년 200억 ton이 생산되는 hemicellulose의 주성분으로 이것의 가수분해산물인 D-xylose은 미생물 균체 단백질(1), 에탄올(2), acetone-butanol(3) 그리고 당뇨병과 충치예방에 탁월한 감미료로 관심받고 있는 xylitol(4)의 생산에 이용된다. 따라서 xylan의 xylose로의 경제적인 당화방법개발이 중요하며 부산물이 많이 생기는 화학적 가수분해공정보다는 선택성이 높은 xylanase에 의한 생물학적 가수분해공정에 관심이 집중되고 있다.

D-xylan은 cellulose나 starch와 비교할때 구조 및 구성성분 면에서 훨씬 복잡하여 cellulase나 amylase보다 더 많은 종류의 xylanase가 존재(5)하는데 Zeikus(6) 등은 xylanase를 β-xylosidase, exo-xylanase 그리고 4종류의 endo-xylanase 등 모두 6종류로 분류하였는데 산업적 이용에 가장 적합한 유형은 xylan을 바로 xylose 로 분해하는 exo-xylanase이다. Xylanase는 곰팡이나 세균과 같은 미생물 뿐만 아니라 식물체, 곤충 그리고 원생동물 등 자연계에 광범위하게 존재(5)하는데, 생육속도가 빠른 세균이 산업적으로 xylanase를 생산하는데 가장 유리하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 xylanase을 강력하게 생산하는 세균을 분리, 선발한 후 그 xylanase를 부분정제하여 특성을 조사하였다.

Key words: *Bacillus* sp., xylanase, exo-type
*Corresponding author

재료 및 방법

시약

Xylan(from oat spelts), P-nitrophenyl-β-D-xyloside, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100은 Sigma 회사제품을 사용하였고 기타시약은 GR 또는 EP 등급의 것을 정제없이 사용하였다.

Xylanase 생산균주 분리

Present address: Lab. of Microbial Ecology, Genetic Engineering Research Institute, KIST, Daeduk Science Town P.O. BOX 17, Daejon, 305-606, Korea

전국의 산, 논, 밭에서 수집한 토양시료 각 1 g을 시험관에 넣고 멸균수 1 m*l* 을 가하여 교반시킨후 상등액을 isolation 배지(xylan 5.0 g, yeast extract 1.0 g, K_2HPO_4 0.7 g, KH_2PO_4 0.3 g, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $ZnSO_4$ 0.001 g, agar 15 g, pH 7.0, distilled water 1 liter)에 streak plating하여 30℃에서 3~5일간 배양한 뒤 clear zone을 형성하는 colony를 다시 streak plating 해서 순수분리하여 xylanase 생산균으로 일차선발하였다. 일차선발한 균주를 isolation 액체배지에서 30℃에서 3일간 진탕배양한 뒤 그 상등액의 xylanase 역가를 측정하여 우수균주를 선발하였다.

분리균주의 동정

형태학적 특성, 배양학적 특성, 생리학적 특성을 상법(7, 8)으로 검사하였고 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의거 동정하였다.

효소역가 측정

Xylanase의 역가는 Paice 등의 방법(9)을 변형하여 측정하였다. Oat spelts xylan을 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 0.5%(w/v)로 용해시킨 후 500 g에서 10분간 원심분리하여 불용성 물질을 제거시킨 기질용액 0.5 m*l*에 0.5 m*l*의 효소용액을 첨가하고 40℃의 진탕항온수조(40 strokes/min)에서 30분간 반응시킨후 생성된 환원당을 DNS법(10)으로 발색시킨후 550 nm에서 xylose를 표준물질로 비색 정량하였다.

이때 효소역가 1 unit는 주어진 조건하에서 1 μmol의 xylose를 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

β-xylosidase 역가는 Panbangred 등(11)의 방법을 변형하여 측정하였다. 1 m*l*의 p-nitrophenyl-β-xyloside 용액을(0.1% w/v, pH 7.0)에 효소액 1 m*l*을 첨가해 37℃에서 10분간 반응시킨 후 생성된 p-nitrophenyl(PNP)의 비색정도를 450 nm에서 측정하였다. 역가단위는 arbitrary unit으로 주어진 조건하에서의 ΔAbs./10 min으로 하였다.

Cellulase 역가는 0.5 m*l*의 carboxymethyl cellulose 용액(1% w/v, pH 6.5)에 0.5 m*l*의 효소액을 첨가해 40℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법으로 550 nm에서 측정하였다.

단백질 정량

Chromatography를 실행한 분획구의 단백질 정량은 다음식에 의한 spectrophotometric method을 이용하였다.

$$\text{Protein(mg/m}l\text{)} = 1.55\ A_{280} - 0.76\ A_{260}$$

그밖의 경우에는 bovine serum albumin을 표준물질로 Lowry 등(12)의 방법에 의해 정량하였다.

효소생산

매주 계대한 *Bacillus* sp. N-25를 slant에서 한 백금이를 nutrient broth에 접종하여 30℃에서 20시간 동안 진탕배양하여 전배양시킨 후 효소생산배지(xylan 10 g, KH_2PO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.0 g, urea 2.5 g, cellobiose 1.0 g, yeast extract 1.0 g, distilled water 1 liter, pH 7.0)에 2%(w/v) 접종하여 flask로 30℃에서 3일간 진탕배양(60 strokes/min)하였다.

효소의 부분정제

Step 1. Culture filtrate ; 배양액을 4℃에서 10,000×g로 10분간 원심분리하여 상등액을 취했다.

Step 2. Ammonium sulfate precipitation ; culture filtrate에 $(NH_4)_2SO_4$를 80% 포화하게 천천히 용해시켜 4℃에서 하룻밤 방치시킨 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 회수하였다. 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 하룻밤 투석하여 염을 제거하였다.

Step 3. DEAE-Sephadex A-50 column chromatography ; 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 사용하였고 1.8×70 cm column에 flow rate는 20 m*l*/hr로 하였다. 0~1.5 M의 NaCl linear gradient를 사용하여 elution하였다. 효소역가가 있는 분획구를 모아 ultrafiltration(Ami co. YM10 membrane)으로 농축하였다.

Step 4. Sephadex G-100 gel filtration ; 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)를 사용하였고 2.5×120 cm colum에 flow rate는 20 m*l*/hr로 하였다.

HPLC에 의한 당분석

RI detector을 이용하였고 column은 sugar No. 1을 사용하였으며 이동상은 물을 사용하였다. Column 온도가 90℃였고 flow rate은 0.5 m*l*/min였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

Table 1. Characteristics of the isolated strain N-25.

1. Morphological characteristics	
Form	rod
Size	0.8×3.7−5 μm
Motility	motile
Gram stain	positive
Spore	0.8×1−1.2 μm
	elipsoidal, central
Sporangium swollen	negative
2. Cultural characteristics	
Nutrient agar slant	white, echinulate
Nutrient broth	uniformly turbid
Gelatin liquefaction	positive
Colony	
form	irregular
elevation	raised
margin	lobate
pH for growth in nutrient broth	pH 5~9
Temp. for growth in nutrient borth	20~50℃ at pH 7
3. Physiological characteristics	
Hydrolysis of starch	positive
Hydrolysis of casein	positive
Catalase	positive
Indole production	negative
Methyl-red	positive
Voges-proskauer	positive
Utilization of citrate	positive
Reduction of nitrate to nitrite	positive

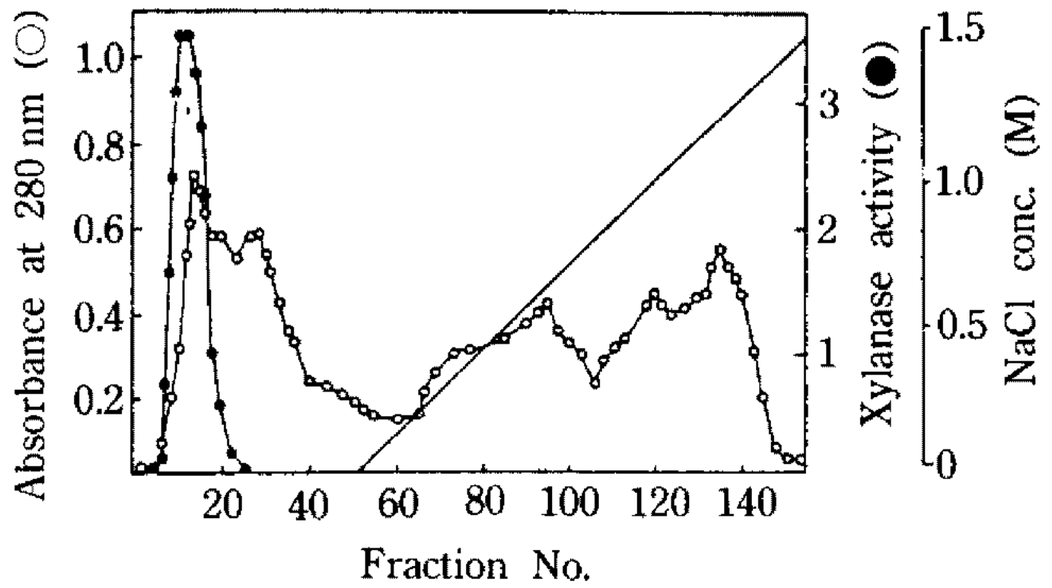

Fig. 1. Column chromatogram of xylanase from *Bacillus* sp. N-25 on DEAE-Sephadex A-50.
The elution was carried out 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). Column dimension was 1.8×70 cm and flow rate; 20 m*l*/hr.

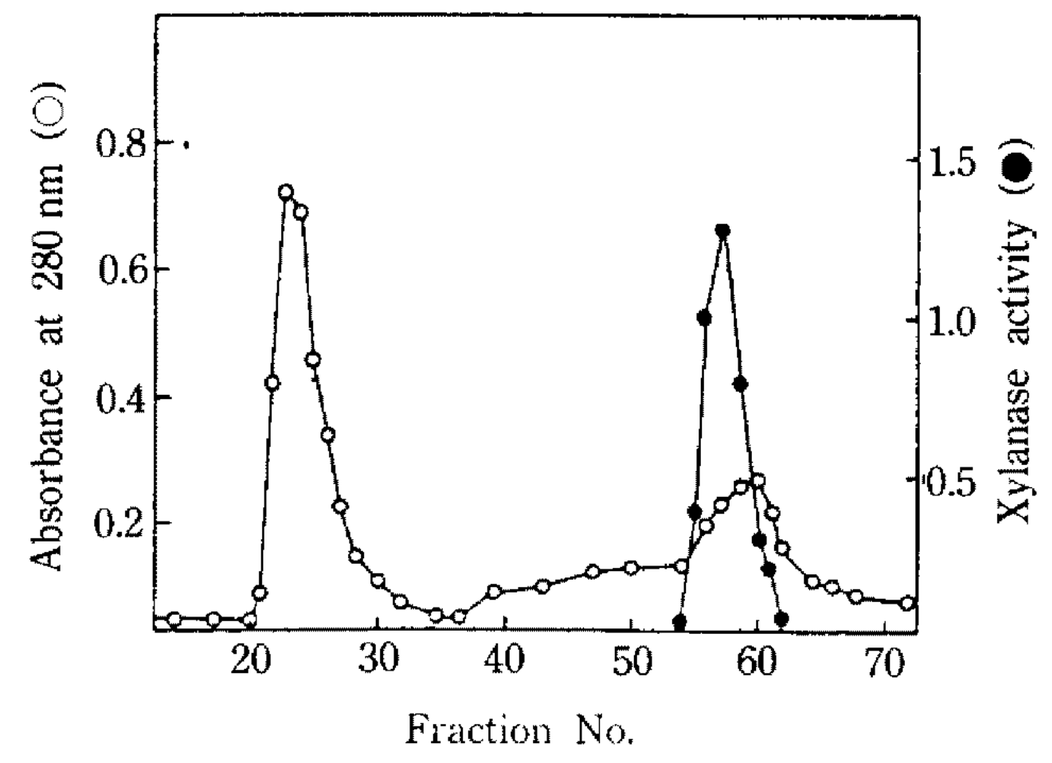

Fig. 2. Gel filtration of xylanase from *Bacillus* sp. N-25 on Sephadex G-100.
Elution was carried out with 50 mM phosphate buffer (pH 6.5). Column dimension was 2.5×120 cm and flow rate was 20 m*l*/hr.

순수분리된 xylanase 생산 균주 중 역가가 가장 높은 N-25 균주를 선정하였고 이에 대하여 형태학적, 배양학적 그리고 생리학적 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. N-25 균주는 포자를 형성하는 Gram 양성의 호기성 간균이며 운동성이 있고 catalase 양성이므로 *Bacillus* 속임이 분명하여 *Bacillus* sp. N-25로 동정하였다. 그리고 이 균주는 pH 9.0과 50℃에서도 생육이 왕성하므로 alkaline과 열에 내성이 있는 세균임을 알 수 있었다.

효소의 부분정제

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography에서는 Fig. 1과 같이 초기 단백질구에서 xylanase 활성이 나왔으며, 0~1.5 M NaCl linear gradient에서 나온 단백질구에서는 xylanase 역가가 없었다. Sephadex G-100 gel filtration에서는 Fig. 2와 같이 두 번째 단백질구에서 역가가 나왔다. 본 효소의 분리정제 과정에서 얻어진 결과를 요약하여 Table 2에 나타냈다. 효소는 culture filtrate에 비해 약 7.6배 정제되었고 수율은 약 2.9%이었다.

효소의 특성

열안정성과 pH 안정성 : 열안정성을 살펴보기 위해 효소를 50, 55, 60, 65℃에서 각각 10, 20, 30분 처리 후 잔존효소활성을 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 50℃에서 30분간 처리 후에도 80%의 활성이 잔존하였으므로 비교적 열에 안정한 효소임을 알 수 있었

Table 2. Purification summary of xylanase from *Bacillus* sp. N-25

Purification step	Total vol. (m*l*)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)
Culture filtrate	910	991.9	1161.6	0.85	100
Ammonium sulfate precipitation	150	481.3	334.7	1.43	48.5
DEAE-Sephadex A-50	90	225.3	45.6	5.7	25.7
Sephadex G-100	30	29.7	4.6	6.5	2.9

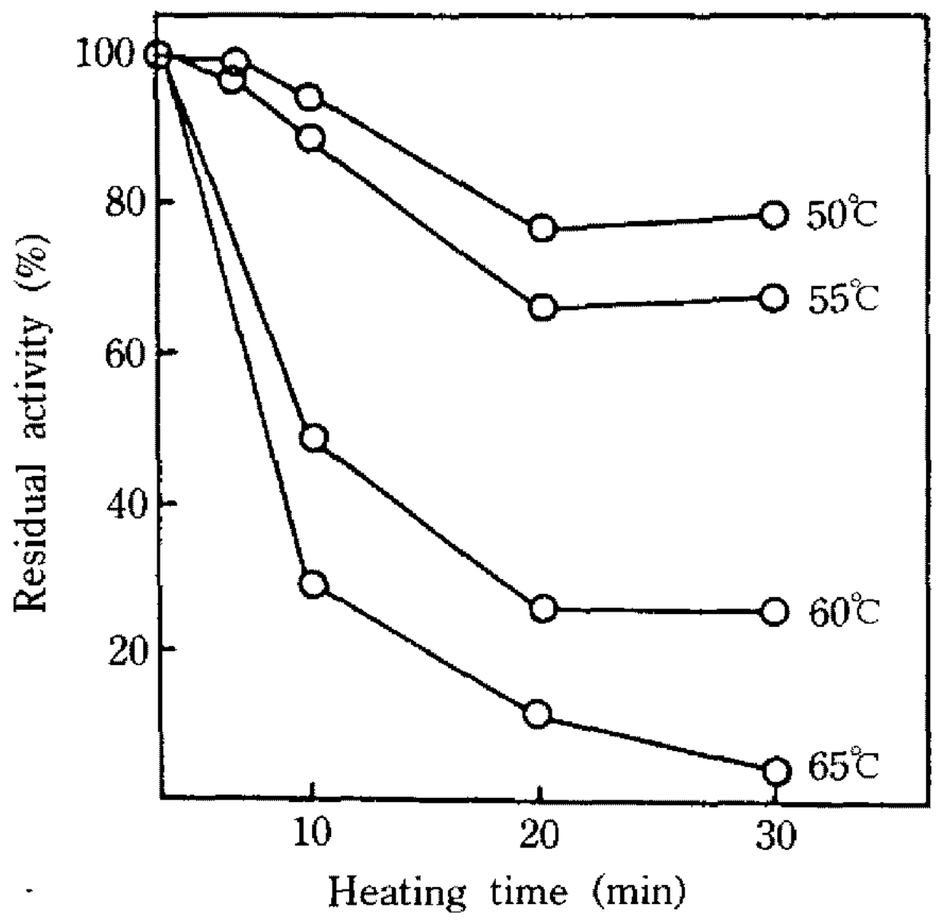

Fig. 3. Thermal stability of *Bacillus* sp. N-25 xylanase. The enzyme was preincubated at 50, 55, 60 and 65 ℃, respectively for various lengths of times and the residual activity was determined.

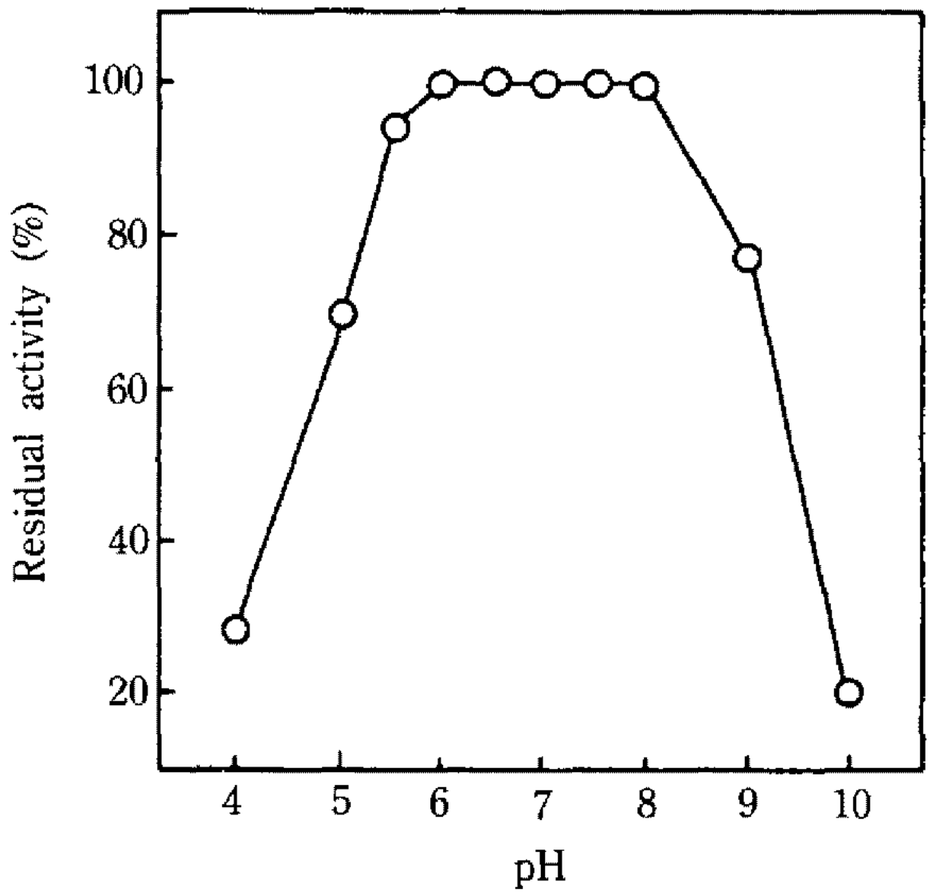

Fig. 4. pH stability of *Bacillus* sp. N-25 xylanase. The pH was adjusted with 25 mM acetate (pH 4~5.5), 25 mM maleate (pH 6, 6.5), 25 mM Tris-HCl (pH 7~8) and 25 mM glycine-NaOH (pH 9, 10). The mixture was incubated at 30℃ for 10 hr and the residual was determined.

다.

pH 안정성을 살펴보기 위하여 효소를 각 pH에 30 ℃에서 10시간 방치시킨 후 잔존효소 활성을 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 pH 6~8 범위에서 효소활성이 그대로 유지되었고 pH 9 이상에서는 불안정하였다.

금속이온의 영향 : 효소를 5 mM의 각 금속이온을 포함한 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 30℃ 에서 1시간 방치시킨후 역가를 측정하여 상대활성으로 나타내었다. Table 3에서와 같이 Hg^{2+}, Ag^{2+}, Mn^{2+}에 의해 저해되었다. Hg^{2+}에 의해서 100% 저해되어 다른 균의 xylanase와 같이 sulfhydryl group이 active site로(5) 추정된다.

기질특이성 : Table 4에서와 같이 carboxylmethyl cellulose와 p-nitrophenyl-β-xyloside를 전혀 분해하지 못해, cellulase 역가를 동시에 가지는 *Trichoderma viride*(12)나 *Pseudomonas fluorescens*(14)의 xylanase와는 다른 , 그러나 대부분의 세균의 xylanase와는 같은 기질특이성을 갖는 것(11)으로 추정된다.

Table 3. Effects of various compounds on xylanase from *Bacillus* sp. N-25

Compound (5 mM)	Relative activity (%)
Control	100
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	49
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	92
$MgSO_4$	94
EDTA	91
$AgNO_3$	36
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	92
$CoCl_2$	64
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	73
$HgCl_2$	0

효소분해 산물의 분석 : 효소분해 산물을 HPLC로

Table 4. Substrate specificity of xylanase from *Bacillus* sp. N-25

Substrate	activity
Xylan	1.68
Carboxymethyl cellulose	0
p-Nitrophenyl-β-xyloside	0

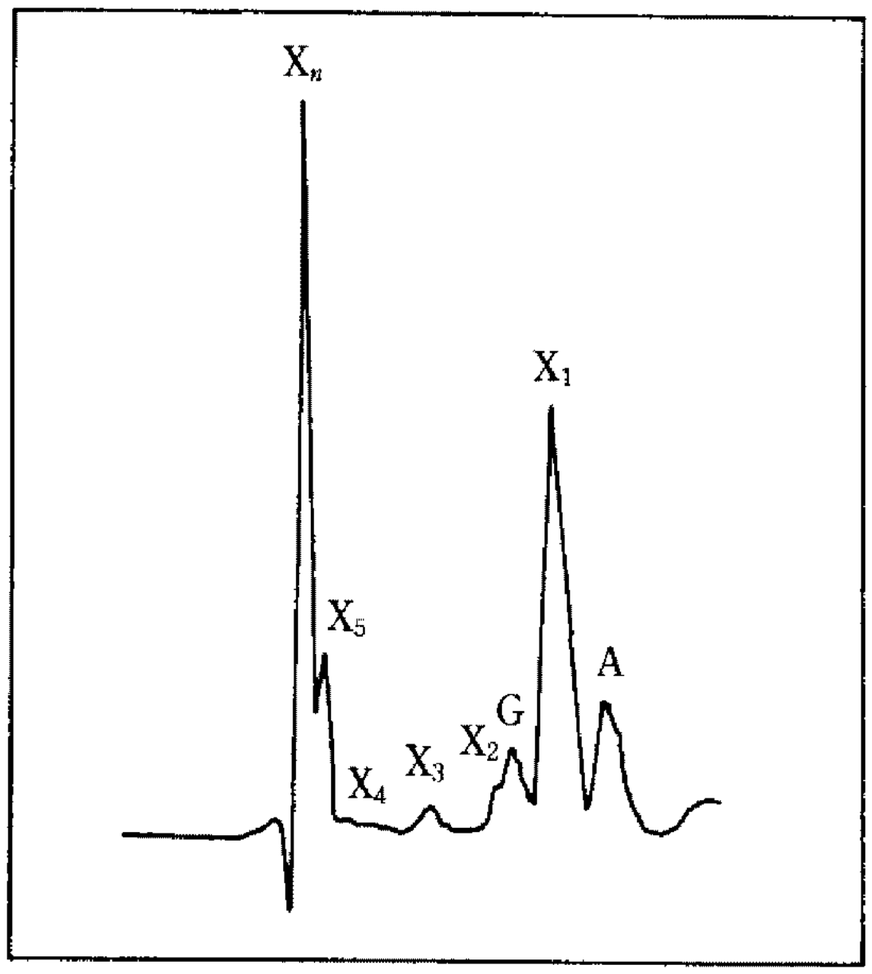

Fig. 5. HPLC chromatogram of hydrolyzates of xylan. A mixture of Oat spelts xylan (10 mg) suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 6.5) and xylanase (12.5 units) was incubated at 40℃ for 12 hr (X_n; xylan, X_1; xylose, G; glucose)

분석한 결과는 Fig. 5와 같다. Standard sugar의 retention time과 비교한 결과, 효소분해산물의 당조성은 38% xylose(X_1), 7.5% glucose(G) 확인되었고, 13.2% arabinose(A), 2.4% xylobiose(X_2), 1.9% xylotriose (X_3), 0.2% xylotetraose(X_4), 6.9% xylopentose(X_5)으로 추정되어 주 분해산물은 xylose임을 알 수 있었다. 따라서 *Bacillus* sp. N-25의 xylanase는 Samen 등(15)의 *B. pumilus*나 Lemmel 등(16)의 *Clostridium acetobutylicum*의 xylanase와 같은 type인 exo-xylanase로 추정된다.

요 약

섬유소 자원의 효율적 이용을 위하여 강력한 xylan 분해효소 생산 세균을 분리 및 선발하였으며, 형태학적, 배양학적 생리학적 특성을 확인한 결과 *Bacillus* sp.N25 로 동정하였다.

이 균주에 의해서 생산된 효소를 ammonium sulfate precipitation, DEAE-sephadex A-50, Sephadex G-100 column으로 부분 정제하여 얻은 효소의 열안정성은 50℃ 에서 30분간 처리시 80%의 역가가 잔존했으며, pH 안정은 pH 6~8 범위에서 30℃ 에서 10시간 방치 후에도 안정했으며, cellulose 분해능력은 없었으며, Hg^{2+}, Ag^{2+}, Mn^{2+}에 의해 저해되었다. 그리고 최종분해산물은 주로 xylose이므로 exo-type xylanase로 추정된다.

참고문헌

1. Chahal. D.S, M. Moo-Young and G.S. Dhillon. 1979. Bioconversion of wheat straw and wheat straw components into single cell protein. *Can.J. Microbiol.* **25**: 793-797.
2. Wang, P.Y. and B.F. Johnson. 1980. Fermentation of D-xylose by yeasts using glucose isomerase in the medium to convert D-xylose to D-xylulose. *Biotech. Lett.* **2**: 273-278.
3. Rosenberg, S.L. 1980 . Fermentation of pentose sugars to ethanol and other neutral products by microorganisms. *Enz. Microbiol. Technol.* **2**: 185-193.
4. Moore, K.K. 1977. Xylitol; uncut gem among sweeteners. *Food. Pro. Dev.* **11**; 66-70.
5. Dekker, R.F.H. and G.N. Richards. 1976. Hemicellulase; their occurence, purification, properties and mode of action. *Adv. Carb. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
6. Zeikus, J.G., Ben-bassat Arie and P.J. Reilly. 1980. *Trends in the Biology of Fermentation for Fuels and Chemicals.* ed., Plenum Press, New York, 441-461.
7. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1983. *Microbiology-A Laboratory Manual.* Addison wesley, Menlo Park.
8. Gerhardt, P. and R.G.E. Murray. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington.
9. Paice, M.G. and L. Jurasek. 1978. Production, characterisation, and partial amino acid sequence of xylanase A. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 802-808.
10. Miller, G.L. 1956. Use of dinitrosalcylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
11. Panbangard, W. and A. Shinmyo. 1983. Purification and properties of endoxylanase produced by

Bacillus Pumillus. Agr. Biol.Chem. **47**: 957-963.
12. Lowry, O.H. and N.T. Rosebrough. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
13. Toda, S. and H. Suzuki. 1971. Some enzymatic properties and substrate speciticities of *Trichoderma* cellulases with special reference to their activity toward xylan. *J. Ferment. Technol.* **49**: 499-521.
14. Yamane, K. and H. Suzuki. 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase components of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa. J. Biochem.* **67**: 19-35.
15. Samen, E., M. Claeyssens and C.K.De Brujne. 1978. Study of the sulfhydryl groups of β-D-Xylosidase from *Bacillus pumillus. Eur. J. Biochem.* **85**: 301-307.
16. Lemmel, S.A., R. Data and J.R. Frankiewicz. 1986. Fermentation of xylan by *Clostridium acetobutylicum. Enz. Microbiol. Technol.* **8**: 217-221.

(Received September 19, 1992)