

내열성 Xylanase를 생산하는 *Paenibacillus* sp. DG-22 균주의 분리 및 효소 특성

이용억*

동국대학교 생명공학과

Isolation and Characterization of Thermostable Xylanase-producing *Paenibacillus* sp. DG-22. Lee Yong-Eok*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Sukjang-dong, Kyungju 780-714, Korea – A new moderate thermophilic bacterial strain DG-22 which produces thermostable xylanase was isolated from a timber yard soil in Kyungju, Korea. On the basis of morphological, biochemical and phylogenetic studies the new isolate was identified as a *Paenibacillus* species. Production of xylanase in this strain was strongly induced by adding xylan to the growth medium and repressed by glucose or xylose. No cellulase activity was detected. The temperature and pH for optimum activity were 80°C and 5.0-5.5, respectively. The crude xylanase was stable at 60°C and retained 60% of initial activity after 2 h at 70°C. Zymogram analysis of the culture supernatant showed two xylanase active bands with molecular masses of 22 and 30 kDa.

Key words: Isolation, thermostable xylanase, *Paenibacillus* sp.

Xylan은 식물 세포벽을 구성하는 hemicellulose의 주된 성분으로 자연에서 cellulose 다음으로 많이 존재하며 연료나 화학물질의 생산을 위한 기질의 재활용이 가능한 탄수화물이다. Xylan은 xylopyranose들이 β -1,4 결합으로 연결된 중합체 골격에 arabinose, 4-O-methyl-D-glucuronic acid와 acetic acid 등이 치환된 이질 탄수화물이다[4]. 따라서 xylan의 완전한 분해를 위해서는 endoxylanase, β -xylosidase 및 α -arabinosidase와 acetyl esterase와 같은 치환기를 끊는 효소들의 협동 작용이 필요하다. 이들 중 xylan 분해를 위한 주된 효소인 endoxylanase는 xylan을 xylooligosaccharides와 xylose로 가수분해하며 β -xylosidase는 xylooligosaccharides의 비환원 말단으로부터 xylose기를 방출한다. 이들 xylan 분해 효소들은 다양한 미생물들에 의해서 생산되는데 곰팡이 유래의 xylanase는 보통 산성에서 중성범위의 pH에서 최적 활성을 나타내는 반면 세균 유래의 xylanase들은 균주의 종류에 따라 산성에서 알칼리성까지 광범위한 pH 범위에서 활성을 나타내며 내열성 또한 다양하다[7, 28]. 미생물들이 xylan을 분해하기 위해 가지고 있는 효소적 구성은 매우 복잡한데 다양한 크기의 xylanase들이 존재하는 것 외에 여러 다른 기질 특이성을 가진 효소들로 구성되어 있다[31]. 비록 많은 미생물들로부터 xylanase들이 연구되어 왔지만 세균들에서 xylanase 생산이 어떻게 조절되는지에 대해서는 아직 완전히 이해되고 있지 않다. Xylanase의 생산은 보통 배지

의 탄수화물 종류에 의해 조절되는데, 많은 곰팡이와 세균에서 xylanase의 합성은 일반적으로 xylan에 의해 유도되며 glucose 또는 xylose에 의해 억제된다[11, 13, 14].

미생물 유래의 xylanase들은 그들의 잠재적인 산업적 유용성 때문에 매우 흥미로운 연구의 대상이 되어왔다. Xylanase는 농업폐기물의 생물학적 재활용, 식품 및 사료산업, 제지의 생물학적 표백 등과 같은 다양한 분야에 응용될 수 있다[3, 28]. 이 중에서도 제지의 표백에 xylanase를 사용하는 것은 환경적 관심 때문에 최근에 상당한 주목을 받고 있는데 이는 종이 펄프를 xylanase로 전처리하면 종이를 회계 하는 과정에 필요한 염소의 양을 줄일 수 있기 때문이다[30]. 이러한 생물학적 표백의 목적으로 사용되는 xylanase는 cellulose 섬유의 가수분해를 피하기 위해 cellulase 활성이 없어야 하며 분자량도 펄프 섬유에서의 확산을 촉진하기에 충분할 만큼 작아야한다. 이외에도 제지공정 과정의 높은 온도에서 안정된 활성을 나타내는 내열성 xylanase가 요구된다[3, 25, 32].

본 연구에서는 cellulase 활성이 없고 열에 안정한 xylanase를 생산하는 미생물 균주를 목재 저장소의 토양으로부터 분리하여 이를 동정하고, 이 분리균에서 생산되는 xylanase에 대한 대략적인 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Xylanase 생산균주의 분리

Xylanase를 생산하는 미생물은 경주지역에 있는 목재 저장소에서 채취한 토양으로부터 분리하였다. 채취된 시료를

*Corresponding author

Tel: 82-54-770-2226, Fax: 82-54-770-2226

E-mail: yelee@mail.dongguk.ac.kr

멸균된 생리식염수에 현탁시킨 후 일정 시간 방치한 다음 상등액의 일부를 XEM 배지($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 6.0 g; KH_2PO_4 , 3.0 g; NH_4Cl , 1.0 g; NaCl , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; yeast extract, 0.5 g; CaCl_2 , 0.015 g; and birchwood xylan, 2.0 g, pH 7.0, 1 liter)에 접종하여 50°C에서 2일간 농화배양을 실시하였다. 농화배양된 배양액은 희석하여 동일한 배지에 한천(1.5%, w/v)과 Remazol Brilliant Blue R(RBB)-xylan(0.2%, w/v)이 첨가된 평판배지에 도말 하였다. RBB-xylan은 Biely 등의 방법[5]으로 준비하였다. Xylanase 활성을 나타내는 균주들은 평판배지 상에 형성된 콜로니 주위의 투명환의 크기를 비교하여 1차 선별하였다. RBB-xylan 배지에서 선별된 콜로니들은 배양 상등액에 존재하는 xylanase 활성을 측정하는 2차 선별과정을 거친 후 몇 번의 순수배양을 통해 최종적으로 가장 높은 활성을 나타내는 균주 DG-22를 선발하여 본 실험에 사용하였다.

분리균의 동정

선택된 분리균의 분류를 위한 형태적, 생화학적 특성들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[21]에 기술되어 있는 방법에 준하여 조사하였다. 성장을 위한 최적 pH는 10 mM의 완충액(benzoic acid, pH 4; acetate buffer, pH 5; phosphate buffer, pH 6; Tris-HCl, pH 7-9; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 10)으로 완충시킨 50 ml의 LB 배지(1% trypton, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride)로 결정하였다. 최적 성장온도는 30°C에서 70°C 범위의 다른 온도에서 배양하여 결정하였다. 세균의 성장은 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 측정하였다. 분리된 세균의 형태 및 크기는 주사전자현미경(Model 1450VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, England)을 이용하여 관찰하였다. 세균의 지방산 조성은 Microbial Identification System(MIDI Inc., U.S.A)으로 분석하였다. Genomic DNA는 Marmur 방법[16]으로 분리하였으며 16S rRNA 유전자는 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1522r(5'-AAGGAG-GTGATCCARCCGCA-3')의 두 primer[9]를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)으로 증폭하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분간, 50°C에서 2분간, 72°C에서 3분간의 단계를 30회 반복하여 실시하고 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. PCR로 증폭된 16S rRNA 유전자 단편은 전기영동한 다음 agarose gel에서 회수하여 pGEM-T Easy vector에 삽입시켜 *Escherichia coli* DH5 α 에 형질전환하였다. 염기서열은 SequenaseTM version 2.0 kit(United States Biochemical)를 사용하여 dideoxy chain termination 방법[26]으로 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자의 염기서열은 BLAST 프로그램[1]을 이용하여 GeneBank EMBL DNA sequence database에 있는 알려진 염기서열들과 비교하였다. 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위해서는 CLUSTAL W 프로그램(version 1.81)

[29]과 neighbor-joining method[24]를 이용하였다.

효소의 활성 측정 및 특성조사

Xylanase의 생산은 분리균인 DG-22를 0.2% birchwood xylan(w/v)이 첨가된 LB배지에 접종한 후 45°C에서 18시간 배양하여 이루어졌으며, 원심분리에 의해 균체를 제거하고 얻은 상등액을 xylanase 조효소로 사용하였다. Xylanase 활성은 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 현탁시킨 1.0% (w/v) birchwood xylan을 사용하여 Bailey 등의 방법[2]에 따라 결정하였다. 유리된 환원당의 양은 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법[17]으로 D-xylose를 표준으로 하여 측정하였다. 반응은 60°C에서 10분간 수행하였으며, 1 unit의 xylanase 활성은 위의 분석조건에서 1분 동안 1 μmol 의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의 하였다. 효소 활성을 위한 최적 pH는 100 mM의 sodium citrate 완충액(pH 3.0-6.0), phosphate 완충액(pH 6.0-7.5), Tris-HCl 완충액(pH 7.5-9.0)과 glycine-NaOH 완충액(pH 9.0-10.5)을 사용하여 60°C에서 결정하였다. 효소 활성에 미치는 온도의 영향은 조효소를 birchwood xylan을 기질로 하여 pH 5.0에서 30°C에서 95°C 사이의 여러 온도에서 반응시킴으로서 평가하였다. 효소의 내열성을 결정하기 위해서는 조효소를 기질 없이 60°C, 70°C와 80°C의 온도에서 각각 정치하면서 10분 간격으로 시료를 채취하여 바로 얼음에 식힌 후 잔존 효소활성을 표준활성 측정조건 하에서 측정하였다.

Zymogram 분석

Sodium dodecyl sulphate(SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Laemmli의 방법[12]으로 수행하였다. SDS-PAGE를 위해 조효소액을 YM-10 Amicon membrane (Amicon Corp., Lexington, MA, USA)을 이용한 ultrafiltration으로 20배 가량 농축시켰다. 0.2% birchwood xylan이 첨가된 13.5% gel에 시료를 중복하여 전기영동한 후 gel을 절단하여 받은 Coomassie brilliant blue R250으로 염색하고 나머지 남은 Morag 등의 방법[18]에 따라 다음과 같이 activity staining을 수행하였다. 2.5% Triton X-100 용액에 30분간 gel을 담가 SDS를 제거한 후 50 mM sodium acetate 완충액(pH 5.0)에 담가 60°C에서 1시간 반응시킨 다음 0.1% Congo Red 용액으로 20분간 염색한 뒤 1 M NaCl 용액으로 탈색시켰다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산균의 분리와 동정

경주지역의 목재저장소 토양으로부터 xylanase를 생산하는 호열성균을 xylan을 포함한 농화배양으로 분리하였다. 농화배양된 배양액을 RBB-xylan 평판배지에 도말하여 콜로니 주위에 형성된 투명환의 크기를 비교하여 xylanase 활성이

높은 균주들을 1차 선별하였다. 선별된 균주들은 액체배양을 실시하여 배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 60°C에서 xylanase활성을 측정하여 가장 높은 xylanase 활성을 나타내는 균주를 최종 선별하였고 DG-22로 명명하였다. 이 분리균은 호기성인 그람양성균으로 세포의 크기가 0.5-0.7 μm × 2-3 μm인 간균이었다. 이 균주는 5.0에서 8.0까지의 pH 범위와 30°C에서 60°C까지의 온도에서 자랐으며 최적성장 pH와 온도는 6.0과 45°C이었다(data not shown). 분리균의 세포 지방산조성을 Microbial Identification System (MIDI Inc., U.S.A)으로 분석한 결과 주된 지방산은 anteiso-C_{15:0} (40.76%)와 iso-C_{16:0}(32.34%)로 이들은 총 지방산의 73.1%를 차지하고 있었다(Table 1). 이는 Shida 등[27]이 *Paenibacillus* 속의 균주들은 대부분 anteiso-C_{15:0}와 iso-C_{16:0}이 지방산의 주성분이라는 보고와 일치한다. 보다 정확한 동정을 위하여 DG-22 균주의 16S rRNA 유전자를 PCR을 이용하여 증폭하고 염기서열을 결정하였다(Fig. 1). 결정된 1,500 bp 크기의 염기서열을 알려진 다른 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과 비교한 결과 *Paenibacillus* 속의 종들과 93-94%의 상동성을 나타내었다. 이를 토대로 하여 neighbor-joining method[24]에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성한 결과 분리균 DG-22는 *P.*

Table 1. Major cellular fatty acids of the strain DG-22.

Fatty acid	Composition (%)
14:0 iso	4.19
15:0 iso	4.07
15:0 anteiso	40.76
16:0 iso	32.34
16:0	4.80
17:0 anteiso	7.87

*curdlanolyticus*와 *P. kobensis*에 가까운 것으로 나타났다(Fig. 2). 이들 결과들을 볼 때 분리균은 *Paenibacillus* 속에 속하는 것으로 판단되었으며 최종적으로 이 분리균을 *Paenibacillus* sp. DG-22로 명명하였다.

효소생산에 미치는 탄소원의 영향

탄소원이 *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 LB배지에 여러 탄수화물을 0.2%(w/v)가 되도록 각각 첨가하여 45°C에서 18시간 배양하여 배양상등액에 존재하는 xylanase 활성을 조사하였다. Xylanase 활성은 부가 탄소원에 상관없이 배양 상등액에서만 발견되었다. Xylanase 활성은 cellulose, carboxymethyl

```

1   AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCTTCGA
71  GGGAGCTTGCTCCGAGAAGGTTAGCGGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCCTTTAGACCG
141 GGATAACATTCGGAACGGATGCTAAGACCGGATAAGCAGCCTCATCGCATGAGGGGCTGGGAAAGACG
211 GAGCAATCTGTCACTAAAGGATGGGCCTGCGGCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC
281 GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGG
351 GAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGTGAGTGAGGAAGG
421 CCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAATAAGGTCCAGTTCCTGCTGAGCCGATGACGGTAC
491 CTGAGAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGGAGCGTTGTCCGG
560 AATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTGGTGTAAAGTGGGGCTCAACCCCGT
630 GACGCACTGGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCACGTTGATAGCGGTGAATGC
701 GTAGAGATGTGGAGAACACCACTGGCGAAGCGGCTTTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGCGCGAAAG
771 CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGTTAGTCCACGCCGTAACAGATGAGTGTAGTGTGGGGG
841 GGTCCACCCCTCGGTGCCGAAGTTAACACATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCCGAAGACTGAAA
911 CTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTTAAATCGAAGCAACCGGAAGAAC
981 CTTACCAGGTCTTGACATCCCTCTGACCGGTTAGAGATGGACCTTTCCTTCGGGACAGAGGAGACAGGT
1051 GGTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAGT
1121 TCTAGTTGCCAGCACGGAAGGTGGGCACTCTAGAGCGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGCGGGGAT
1191 GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACTGGGCTACACGTAATAAGTACGCTGACGCGGGCAGC
1261 GAAGGAGCGATCCGGGGCAATCTAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTCAACTCGCTGCA
1331 TGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTACACAC
1401 CGCCCGTCACACCAGGAGTTTACAACACCCGAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCGAA
1471 GGTGGGTAGATGATTGGGGTGAAGTCGTA
    
```

Fig. 1. The nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of *Paenibacillus* sp. DG-22.

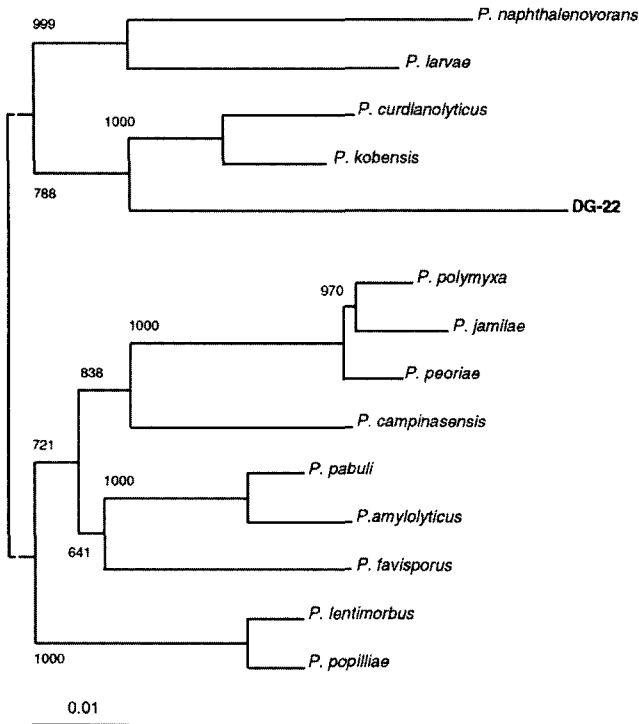


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method, showing the positions of strain DG-22 and other *Paenibacillus* species. A total of 1,500 aligned nucleotide sites were subjected to the analysis. Numbers at nodes indicate bootstrap values obtained with 1,000 resamplings. Bar = 0.01 nucleotide substitution per site.

(CM)-cellulose와 xylan에 의해 유도되었는데 최대 활성은 xylan이 첨가된 배지에서 발견되었다(Table 2). Xylan이 첨가된 배지에서의 xylanase 생산은 부가 탄소원이 첨가되지 않은 LB 배지에서 보다 약 40배가 증가하였다. 많은 세균들에서 xylanase의 발현은 xylan에 의해 유도된다[13, 15, 19].

Table 2. Extracellular xylanase activities in *Paenibacillus* sp. DG-22 culture supernatants on LB medium containing different substrates.

Substrate (0.2%, w/v)	Growth (A_{600})	Xylanase production (U/ml)
None	0.78	0.52 (± 0.008)
L-Arabinose	1.43	0.18 (± 0.007)
D-Glucose	0.99	0.12 (± 0.007)
D-Mannose	1.35	0.80 (± 0.012)
D-Xylose	1.06	0.10 (± 0.006)
Cellobiose	1.12	0.13 (± 0.008)
Maltose	1.01	0.12 (± 0.004)
Sucrose	1.18	0.18 (± 0.007)
CM-Cellulose	0.82	6.06 (± 0.016)
Cellulose	0.75	2.16 (± 0.052)
Galactomannan	0.84	0.78 (± 0.013)
Starch	1.02	0.24 (± 0.008)
Xylan (birchwood)	0.99	21.02 (± 0.038)

그러나 항시적으로 생산되는 xylanase에 대한 예도 드물게 보고되어있다[6, 8]. 본 연구에서 발견된 결과는 많은 *Bacillus* 균주들에 대해 보고된 것들과 가까운데 이들에서 xylan은 강한 유도효과를 나타낸 반면 xylose는 유도효과를 나타내지 않았다[22, 23]. Xylanase 생합성의 조절기작은 아직 정확히 알려져 있지 않다. 중합체인 xylan은 세포를 직접 침투하지 못하므로 xylobiose, xylotriose와 xylooligosaccharides와 같은 낮은 분자량의 xylan 분해산물들이 xylanase 생산을 위한 유도체로 작용할 것으로 생각되고 있다. 이들은 항시적으로 소량 생산되고있는 xylanase의 작용으로 xylan으로부터 유리된다[11, 28]. *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase 활성은 xylan에 의해 크게 유도되었지만 부가 탄소원이 첨가되지 않은 LB 배지에서도 xylanase 활성이 어느 정도는 존재하였다(Table 2). *Paenibacillus* sp. DG-22에서는 이러한 소량의 항시적인 xylanase의 생산이 초기에 xylan을 xylanase 생산을 유도할 수 있는 저 분자량의 물질로 분해할 것으로 생각된다. Cellulose 또한 몇몇 보고에서 xylanase의 유도체로 작용하는 것으로 나타났지만[10,20] 이 유도효과가 순전히 cellulose에 의한 것인지 아니면 cellulose에 오염되어 있는 소량의 xylan에 의한 것인지는 명확하지 않다. Glucose에 의한 억제효과는 xylanase 생합성에서 흔하게 관찰되는 현상이다[11, 28]. DG-22 균주를 arabinose, glucose, xylose, cellobiose, maltose, 또는 sucrose로 배양했을 때는 매우 낮은 수준의 xylanase 활성이 탐지되었다(Table 2). 이 결과는 *Paenibacillus* sp. DG-22에서의 xylanase 발현은 쉽게 대사 되는 단당류나 이당류에 의해 억제된다는 것을 나타내는 것이다. Glucose 또는 xylose 존재 하에서 xylanase 생산이 억제되는 현상은 여러 *Bacillus* 종들에서도 밝혀진바 있다[8, 15, 22]. Cellulase의 활성은 cellobiose, CM-cellulose와 cellulose를 효소반응의 기질로 사용하였을 때 발견되지 않았다. 또한 이 균주는 농화배양에 사용된 XEM 배지에 xylan 대신 CM-cellulose나 cellulose를 첨가하였을 때는 자라지 않았는데 이것은 이 균주가 cellulase 활성을 갖고있지 않음을 나타내는 것이다.

효소의 일반적인 특성

Paenibacillus sp. DG-22가 생산하는 xylanase의 특성을 조사하기 위해 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 효소활성에 미치는 pH와 온도의 영향을 조사하였다. 효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 조효소액을 pH 3.0에서 10.5까지의 각 완충액을 사용하여 60°C에서 birchwood xylan과 반응시킨 후 활성을 측정하였다. 분리균 DG-22로부터 생산되는 xylanase는 Fig. 3A와 같이 4.0에서 7.0사이의 넓은 범위의 pH 구간에서 높은 활성을 나타냈으며 최적 pH는 5.0-5.5이었다. 이 결과는 지금까지 알려진 대부분의 세균 유래의 xylanase들이 산성에서 중성사이의 최적 pH를 가지고 있다는 것과 유사하다[11, 28]. 그러나 본 효소는 pH

8.0에서 최대활성의 70%를, pH 9.0에서는 40% 이상의 활성을 보임으로서 알칼리성 pH에서도 비교적 높은 활성을 나타내었다. 효소활성에 미치는 최적 반응온도를 조사하기 위해 30°C에서 95°C까지 각 온도에서 반응시킨 후 활성을 측정하였다. DG-22 균주로부터 생산되는 xylanase는 55°C와 90°C 사이의 넓은 온도범위에서 활성을 나타내었다. 최적 활성온도는 80°C이었지만 90°C에서도 최대활성의 80%를 나타내었다(Fig. 3B). 이 값은 다른 중온성과 호열성 세균들에 의해 생산되는 xylanase들보다 높은 것이다. 본 연구에서 이것은 특이한 현상인데 왜냐하면 균주의 최적 성장온도는 45°C인데 비해 효소의 최적 활성온도는 80°C로 매우 높기 때문이다. 대부분의 xylanase들은 초호열성균에서 생산되는 xylanase를 제외하고는 최적 반응온도가 70°C이하이다[11, 28].

Xylanase의 내열성을 알아보기 위하여 조효소액을 기질 없이 60°C, 70°C와 80°C의 각 온도에서 10분 간격으로 2

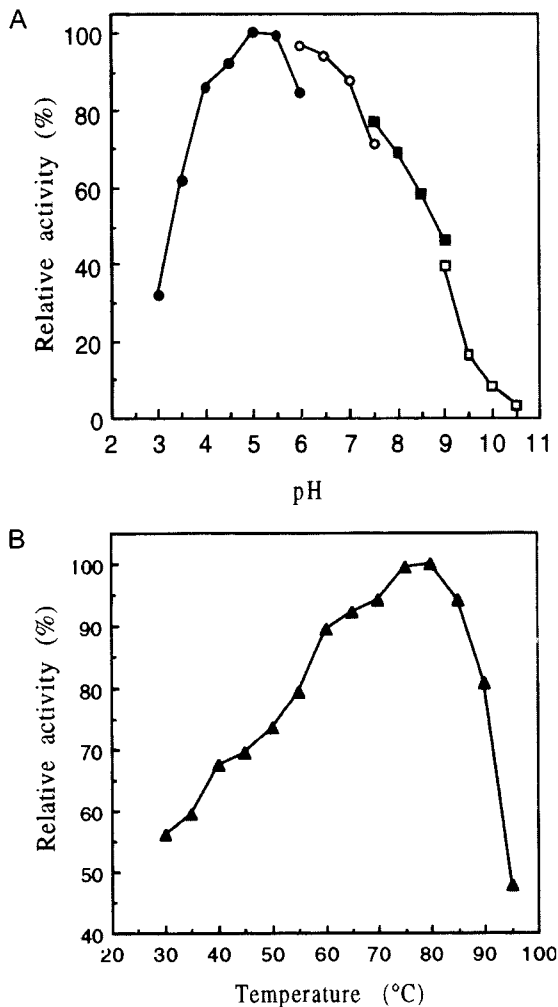


Fig. 3. Effect of pH (A) and temperature (B) on the activity of crude xylanases produced by the strain DG-22. Buffers (100mM) used include sodium citrate (●), phosphate (○), Tris-HCl (■) and glycine-NaOH (□).

시간 동안 열처리한 후, 급냉각시켜 표준 조건 하에서 잔존 효소활성을 측정하였다. DG-22 균주에서 생산되는 xylanase는 Fig. 4에서 나타난 것과 같이 60°C에서 안정하였다. 70°C에서는 60% 이상의 활성이 2시간동안 유지되었으며, 80°C에서는 25분의 반감기를 나타내었다. 종이펄프를 제조하는 과정은 비교적 높은 온도를 요구하기 때문에 효소의 내열성은 생물표백의 목적으로 사용되는 xylanase에 요구되는 중요한 특성이다[3].

Zymogram 기술은 효소활성의 일차적인 특성분석을 위해 매우 유용한 방법이다. 분리균 DG-22로부터 생산된 조효소액을 SDS-PAGE와 zymogram으로 분석한 결과 약 22 kDa과 30 kDa 크기의 위치에서 xylanase 활성 band가 나타났다(Fig. 5). DG-22 균주에서 xylanase 활성이 xylan에 의해 유도된다는 사실은 SDS-PAGE의 결과로도 확인할 수 있다. Xylan이 첨가되지 않은 LB배지에서 생산된 조효소액의 단백질 band 양상과 비교하여 xylan이 첨가된 배지에서 생산된 조효소액에서는 zymogram에서 나타난 활성 band와 같은 위치의 22 kDa과 30kDa의 두 band가 강해졌음을 알 수 있다. 한 균주에서 여러 종류의 xylanase가 생산되는 것은 많은 미생물에서 흔히 발견되는 현상이다[28, 31]. 많은 미생물들에 있어서 xylan 분해효소계는 매우 복잡한데 여러 크기의 xylanase들이 존재하는 것뿐만 아니라 다양한 효소특성 및 기질 특이성을 가진 효소들로 구성되어 있다. 이들 다형태의 xylanase들은 differential mRNA processing, 해독 후 변형 및 여러 개의 유전자 또는 동일 유전자의 다른 대립인자의 결과로 생산될 수 있다[31]. 일반적으로 세균 유래의 xylanase들은 전형적으로 높은 분자량의 산성 단백질이거나 낮은 분자량의 염기성 단백질이다.

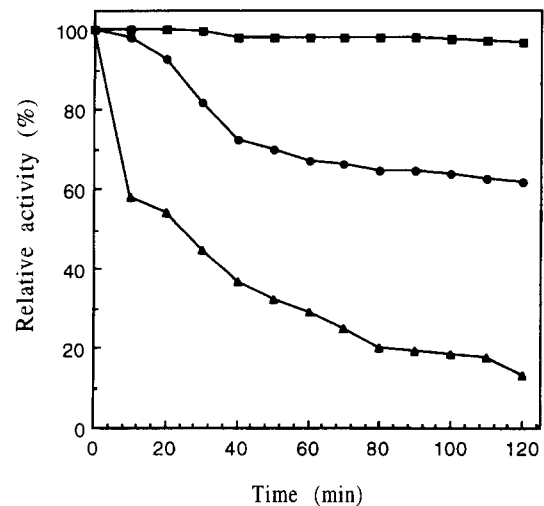


Fig. 4. Thermostability of the xylanase activity produced by *Paenibacillus* sp. DG-22. The enzyme was incubated in buffer at pH 5.0 at different temperatures (■, 60°C; ●, 70°C; ▲, 80°C) and the residual activity was assayed with birchwood xylan at 60°C for 10 min.

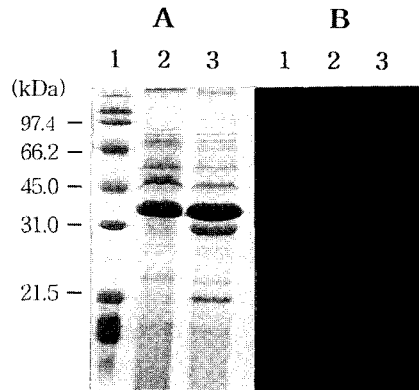


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and zymogram (B) analysis of xylanase activity in the culture supernatant of *Paenibacillus* sp. DG-22 grown on LB and LB+xylan. Lane 1, size marker; lane 2, crude enzyme preparation from LB; lane 3, crude enzyme preparation from LB+xylan (0.2%, w/v).

제지산업에서 펄프의 표백과정의 한 단계로 xylanase를 사용하는 것은 표백에 필요한 화학물질의 양을 줄일 수 있는 가능성 때문에 많은 환경적 관심을 끌고 있다[30]. 펄프의 제조과정 때문에 알칼리성 조건과 높은 온도에서 활성을 나타내는 xylanase가 바람직하다. 또한 cellulose의 손실을 줄이기 위해서는 cellulase 활성이 없는 xylanase가 요구된다 [3,28]. *Paenibacillus* sp. DG-22에서 생산되는 xylanase는 60°C에서 안정한 활성을 나타내며 알칼리성 pH에서도 비교적 좋은 활성을 나타내고 cellulase 활성은 없는 것으로 나타났다. 그러므로 DG-22 균주에서 생산되는 xylanase는 펄프의 표백에 사용될 수 있는 가능성을 가진 효소라 생각되며 앞으로 이 효소에 대한 연구를 계속하고자한다.

요 약

경주지역에 있는 목재 저장소의 토양으로부터 내열성 xylanase를 생산하는 호열성 세균인 DG-22 균주가 분리되었다. 형태적, 생화학적, 계통학적 연구에 근거하여 이 분리균은 *Paenibacillus* 속에 속하는 종으로 판명되었다. 이 균주에서 xylanase의 생산은 성장배지에 xylan을 첨가함으로써 유도되었고 glucose 또는 xylose에 의해서 억제되었다. Cellulase 활성은 탐지되지 않았다. 효소 활성을 위한 최적 온도와 pH는 각각 80°C와 5.0-5.5이었다. 이 조효소는 60°C에서 안정하였고 70°C에서는 2시간 후에도 60%의 활성을 유지하였다. 배양상등액의 zymogram 분석을 통해 22 kDa와 30 kDa 크기의 xylanase 활성 band를 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 2003년도 연구비 지원으로 이루어졌음.

REFERENCES

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- Bailey, M. J., P. Biely, and K. Poutanen. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**: 257-270.
- Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, and G. S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Biely, P., D. Mislovicova, and R. Toman. 1988. Remazol Brilliant Blue-Xylan: A soluble chromogenic substrate for xylanases. *Method Enzymol.* **160**: 536-542.
- Brodel, B., E. Samain, and P. Debeire. 1990. Regulation and optimization of xylanase production in *Clostridium thermo-lacticum*. *Biotechnol. Lett.* **12**: 65-70.
- Dekker, R. F. H. and G. N. Richards. 1976. Hemicellulase: their occurrence, purification, properties, and mode of action. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **32**: 277-352.
- Esteban, R., A. Chordi, and T. G. Villa. 1983. Some aspects of a 1,4-β-D-xylanase and β-D-xylosidase secreted by *Bacillus coagulans* strain 26. *FEMS Microbiol. Lett.* **17**: 163-166.
- Johnson, J. L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, p. 683-700. In P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood and N. R. Krieg (eds.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C. U.S.A.
- Khanna, S. and Gauri. 1993. Regulation, purification, and properties of xylanase from *Cellulomonas fimi*. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 990-995.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 411-456.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lee, Y.-E., S. E. Lowe, and J. G. Zeikus. 1993. Regulation and characterization of xylanolytic enzymes of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 763-771.
- Lindner, C., J. Stuke and M. Hecker. 1994. Regulation of xylanolytic enzymes in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **140**: 753-757.
- 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.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**: 208-218.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.

18. Morag, E., E. A. Bayer and R. Lamed. 1990. Relationship of cellulosomal and noncellulosomal xylanases of *Clostridium thermocellum* to cellulose-degrading enzymes. *J. Bacteriol.* **172**: 6098-6105.
19. Okazaki, W., T. Akiba, K. Horikoshi, and E. Akahoshi. 1984. Production and properties of two types of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 335-340.
20. Perez-Avalos, O. and T. Ponce-Noyola. 2002. Synthesis and regulation of D-xylanase from *Cellulomonas flavigena* wild type and a mutant. *Biotechnol. Lett.* **24**: 813-817.
21. Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, Williams and Wilkins Co., Baltimore.
22. Rajaram, S. and A. Varma. 1990. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermoalkalophilus* grown on agricultural wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 141-144.
23. Ratto, M., K. Poutanen, and L. Viikari. 1992. Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 470-473.
24. Saito, N. and M. Nei. 1987. A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
25. Samain, E., P. Debeire and J. P. Touzel. 1997. High level production of a cellulase-free xylanase in glucose-limited fed batch cultures of a thermophilic *Bacillus* strain. *J. Biotechnol.* **58**: 71-78.
26. Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
27. Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, L. K. Nakamura, and K. Komagata. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 289-298.
28. Subramaniyan S. and P. Prema. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33-64.
29. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
30. Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist, and M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 335-350.
31. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms: function and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
32. Zamost, B. L., H. K. Nielson, and R. L. Starnes. 1991. Thermostable enzymes for industrial applications. *J. Ind. Microbiol.* **8**: 71-82.

(Received Nov. 10, 2003/Accepted Feb. 16, 2004)