

털두꺼비하늘소(*Moechotypa diphysis*)로부터 Xylanase를 생산하는 *Paenibacillus* sp. HY-8 균주의 분리 및 특성

허선연 · 오현우 · 박두상 · 김향미 · 배경숙 · 박호용*

한국생명공학연구원 생물자원센터

Isolation and Characterization of Xylanase-producing *Paenibacillus* sp. HY-8 from *Moechotypa diphysis*

Sun-Yeon Heo, Hyun-Woo Oh, Doo-Sang Park, Hyangmi Kim, Kyung Sook Bae and Ho-Yong Park*

Biological Resource Center, KRIBB, Daejeon, 305-806

ABSTRACT : From the course of screening of useful xylanase producing microorganism from a phytophagous longicorn beetle, we isolated an extra-cellular xylanase producing strain, *Paenibacillus* sp. HY-8 from the intestine of *Moechotypa diphysis* adult. On the basis of morphological, biochemical and phylogenetic studies of 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. The highest xylanase production was attained in the M9 media containing 1% yeast extract and 0.5% birchwood xylan when cultured at 25°C for 24 hrs. HY-8 producing xylanase showed superior hydrolytic activities against various plant source feedstuff than control xylanase produced by *Tricoderma* sp. at pH 6.0.

KEY WORDS : *Paenibacillus* sp. HY-8, *Moechotypa diphysis*, Xylanase, Insect symbiotic microorganism

초 록 : Xylan이 풍부한 식물체를 먹이로 하는 하늘소의 장내에 존재하는 xylanase 생산 미생물의 탐색 과정에서 털두꺼비하늘소(*Moechotypa diphysis*) 성충의 장으로부터 우수한 xylanase 생산균주 *Paenibacillus* sp. HY-8을 분리하였다. 생화학적, 계통학적 분석결과를 바탕으로 이 분리균은 *Paenibacillus* 속에 속하는 종으로 분석되었다. HY-8 균주에서 xylanase 생산은 제한배지에 xylan을 첨가함으로써 유도되는 특성을 나타내었고 1%의 yeast extract와 0.5%의 birchwood xylan이 포함된 M9배지에서 25°C, 24시간의 배양에 의해 xylanase의 생산이 최대치에 도달하였다. HY-8 균주가 생산하는 xylanase는 pH 6.0에서 여러 가지 식물성 사료의 원료에 대하여 대조구로 사용된 *Tricoderma* sp. 유래의 xylanase에 비해 우수한 분해능을 나타내었다.

검색어 : *Paenibacillus* sp. HY-8, 털두꺼비하늘소, 자일라나제, 곤충공생미생물

*Corresponding author. E-mail: hypark@kribb.re.kr

Xylan은 식물의 세포벽을 구성하는 hemicellulose의 주 성분으로 cellulose 다음으로 자연계에 풍부하며 재생 가능한 탄수화물이다. Xylan은 xylopyranose의 β -1,4 결합으로 이루어진 고분자 물질로서 일반적으로 acetyl group, L-arabinofuranose와 D-glucuronic acid 등이 치환된 이질 탄수화물로 존재하고 있다(Biely, 1985). 그러므로 xylan을 완전하게 분해하여 당화하기 위해서는 endo-1,4- β -xylanase, β -xylanase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranose와 acetylerase 등의 몇 가지 효소의 협동적 작용이 필요하며(Bachmann and McCarthy, 1991), 이 중 xylanase는 기질에 대한 분해 양식에 따라 엔도자일라나제(endo- β -xylanase), 엑소자일라나제(exo- β -xylanase), 자일로시다제(xylosidase)의 세 가지 종류로 구분 되어질 수 있으며 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 담당한다.

Xylanase는 제지의 표백공정, 사료효율 개선, 과일음료의 청징, 제빵의 고품질화, 농산 부산물 이용 등에서 널리 이용되고 있으며 다양한 미생물에 의해 생산된다. 제지산업에서는 표백공정에 응용하기 위한 내알칼리성 또는 내열성 xylanase가 여러 세균으로부터 분리되었으며(Tenkanen *et al.*, 1992), cellulase의 활성이 없는 xylanase 생산균도 다수 보고되어 제지용 cellulose의 손실을 줄이고자 하는 연구결과 또한 보고되고 있다(Khashin *et al.*, 1993; Kosugi *et al.*, 2001). 또한 xylanase를 처리하여 빵의 품질을 개선하거나(Courtin *et al.*, 1999), β -xylosidase와 xylanase 유전자가 도입된 효모로서 농임산 부산물을 미생물이 이용할 수 있도록 당화하고자 하는 연구가 보고되었다(La Grange *et al.*, 2001). 현재 사료산업에서는 xylanase가 사료첨가용 효소로 시판되어 사용되고 있는데, 이 효소는 곡물 사료 섭취시 hemicellulose로 인한 가축의 장내의 점질도를 낮추어주는 기능을 함으로써 가축의 소화기 질병을 예방하고 사료효율을 향상시키는 것으로 알려져 있다(McCracken *et al.*, 2001).

사료 첨가용 자일라나제의 생산에 사용되고 있는 미생물은 현재 fungi를 많이 이용하고 있으며 그 중에서도 트리코더마(*Trichoderma*) 속 균주들이 주로 이용되어 왔는데 이들의 효소 생산성은 자일라나제를 생산하는 세균에 비해 우수한 경우가 많으며 효소의 활성은 주로 산성조건에서 최대를 나타낸다(Tenkanen *et al.*, 1992). 그러나 돼지나 닭의 소화기관의 생리적 조건은 부위별로 다르지만 자일라나제가 작용해야 할 소장 이후의 pH 조건은 6.5 부근이다. 따라서, pH 5.0 부근에서 활성이 높은 곰팡이 유래의 자일라나제보다는 산도가 중성 부근의 조건에

서 활성이 높은 자일라나제가 사료첨가용 효소로 사용할 경우 장내조건에서 보다 효과적인 사료의 분해가 가능하며 사료의 효율이 증가될 수 있다(Collins *et al.*, 2005).

곤충은 지구상에서 가장 번성한 생물군으로서 다양한 먹이습성과 높은 생물학적 다양성을 나타내고 있다. 이러한 곤충의 생물특성을 고려한 곤충공생미생물을 유용한 생물자원으로 활용하고자 하는 연구가 증가되고 있으며, 특히 곤충의 생육과 밀접한 관련이 있는 장내 미생물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Dillon and Dillon, 2004). 특히 식물의 목질부를 가해하는 주요 곤충인 흰개미의 장내미생물로부터 cellulase, xylanase, ligninase를 분리하고자 하는 연구가 오래 전부터 집중적으로 수행되어 왔으며 다양한 연구결과들이 보고되어 있다(Varma *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1998). 그 외에도 초식성 곤충의 섭식특성에 착안하여 자일라나제(xylanase) 또는 셀룰라제(cellulase)를 생산하는 균주를 분리한 사례(Teunissen *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1998)와 동물성 먹이를 포식하는 무당거미로부터 고효율의 단백질 분해 효소를 생산하는 균주를 분리하여 산업적으로 응용하고 있는 사례(Lee *et al.*, 2004), 톱하늘소의 장으로부터 고효율의 lipase를 생산하는 균주를 분리하고 동정한 사례(Park *et al.*, 2007)와 그 외 나비목, 딱정벌레목을 포함하는 여러 가지 곤충에서 분자생물학적 기법을 활용한 장내 미생물의 생태적 연구들이 보고되고 있다(Egert *et al.*, 2003; Broderick *et al.*, 2004).

본 연구에서는 xylan이 딱갈나무나 일년생 농작물에 다량 함유되어 있는 것에 착안하여 단단한 나무껍질을 먹이로 하는 딱정벌레목 하늘소과에 속하는 털두꺼비하늘소의 장으로부터 xylanase를 생산하는 미생물을 탐색하고, 그 중 가장 우수한 xylanase 생산균주를 분리하여 동정하였으며 xylanase의 생산 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

곤충 및 장내미생물의 분리

Xylanase 생산 활성을 가지는 미생물의 탐색에 이용된 털두꺼비하늘소는 주로 5월-8월 사이에 대전 인근 야산에서 채집하여 살아있는 상태로 연구실로 운반하여 분류 후 사용하였다. Xylanase를 생산하는 세균의 분리를 위해 대상 곤충을 70% (w/w) 에탄올에 1-2분 정도 침지하여 총체표면의 오염원을 제거한 후, 총체에 묻어 있는 에탄올

을 제거하기 위하여 멸균된 증류수로 2회 세척하였다. 세척한 총체를 해부하여 내장을 분리한 다음 완충액 (Phosphate buffered saline; 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na₂HPO₄, 0.024% KH₂PO₄)을 넣고 분쇄하였으며, 여기서 얻어진 추출물을 단계적으로 희석하여 0.5% birchwood xylan을 첨가한 고체배지에 도달한 다음 25°C에서 2일간 배양후 Congo-red 염색법(Skipper *et al.*, 1985)으로서 자라난 콜로니 주변에 투명환을 형성하는 균주를 1차적으로 선별하였다. 상기의 방법으로 선별된 균주들을 0.5% birchwood xylan이 함유된 제한 배지(K₂HPO₄ 7 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.1 g/L, yeast extract 0.6 g/L) 3 ml에 접종하여 25°C의 진탕 배양기에서 48시간 배양 및 원심분리한 후 상등액을 회수하여 xylanase 활성을 측정하고, 그 중 xylanase 활성이 가장 우수한 균주를 최종적으로 선별하였다.

분리균의 동정

분리균주의 동정은 형태학적, 생화학적 특성, 지방산 조성 및 16S rRNA 유전자의 염기서열을 조사함으로써 실시하였다. 분리균주의 형태학적 특성을 관찰하기 위해 Gram 염색, 포자염색을 실시하였고 투과전자현미경 (TEM)을 사용하여 외형을 조사하였다. 미생물의 16S rRNA 유전자의 증폭을 위한 PCR amplification은 균주로부터 분리한 total DNA를 template로 하여 FastStart Taq polymerase kit (Roche, Germany)을 이용하였으며 PCR에 이용된 primer는 27F: 5'-agagtttgatcmtggctcag-3', 1492R: 5'-ggttacctgttacgactt-3'를 각각 forward 및 reverse primer로 사용하였다. PCR 반응은 94°C에서 30초, 65°C에서 30초, 72°C에서 1분간 반응을 30회 반복하여 16S rRNA를 코딩하는 DNA 단편을 증폭하였다. 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 전기영동하여 elution한 후 증폭시 사용한 oligonucleotides를 primers로 사용하여 염기서열을 결정하고 GenBank database 검색을 통하여 16S rRNA 유전자의 상동성을 조사하였다. 계통수를 작성하기 위해서는 CLUSTAL W (ver. 1.83) 프로그램(Thompson *et al.*, 1994)과 neighbor-joining method (Saito and Nei, 1987)를 이용하였다. 생리·생화학적 조사는 30°C에서 수행하였으며, oxidase 활성, catalase 활성, indol 생성, nitrate 환원과 탈질산화는 Smibert and Krieg (1994)의 방법을 사용하였고, 추가적인 생화학실험은 API 20E (Bio-Merieux)의 상용되는 kit를 이용하였다. 세포지방산의 성분 분석과 정량은 MIS library generation software

(Microbial ID)를 이용하여 수행하였으며, 결과는 MIDI Aerobe Library (ver. 3.8)와 비교하였다.

Xylanase 활성 측정

미생물의 생장은 일정시간마다 채취한 배양액을 적당 한 비율로 희석하여 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 탁도(OD₆₀₀)로 측정하였다. Xylanase의 활성은 birchwood xylan을 기질로 하여 효소반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)로서 정량하는 방법(Miller, 1959)으로 다음과 같이 측정하였다. 일정비율로 희석한 100 μ l의 효소용액에 100 μ l의 기질용액(1% birchwood xylan in 50 mM sodium phosphate buffer, pH6.0)을 넣고 50°C에서 10분간 반응시킨 후 700 μ l의 DNS 용액을 가하고 100°C에 5분간 방치 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며 xylose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소의 1 unit은 1분 동안에 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

식물성 사료에 대한 분해활성 측정

다양한 식물성 사료에 대한 xylanase의 분해활성 측정을 위하여 xylan이 풍부한 식물성 사료인 대두박, 면실박, 채종박, 배아박, 소맥피, 대두, 야자박 및 루핀종실을 막자 사발에서 분쇄하여 분말로 만든 후 1 g의 사료를 10 ml의 50 mM phosphate buffer (pH 6.0)로 현탁한 다음, 배양액 으로부터 얻어진 xylanase를 10 unit/ml로 첨가하여 37°C, 24시간 처리하고 효소에 의해 생성된 환원당의 양을 분석 하였다. 이때 현재 사료첨가제로 시중에 유통되고 있는 *Trichoderma* sp. 유래의 xylanase를 동일 unit로 첨가하여 처리균과 비교하였다. 또한 미생물 배양액 내 cellulase나 다른 glucoside hydrolase의 영향을 배제하기 위하여 cellulose, starch 등의 중합체를 동일조건에서 처리하여 배양액에 의한 환원당의 생성 여부를 검정하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산 균주의 분리

곤충의 장내에 존재하는 xylanase 생산 미생물의 탐색을 위하여 털두꺼비하늘소(*Moechotypa diphyssis*) 성충의

장으로부터 분리된 미생물을 0.5% birchwood xylan이 첨가된 기본한천평판배지에 도말 후 25°C에서 2일간 배양하여 형성된 콜로니 주위에 xylan을 분해함으로써 형성되는 투명환의 크기를 비교하여 xylanase 활성이 높은 균주들을 1차 선별하였다. 그 결과 총 10종의 xylanase 생산균주를 분리하였으며 부분적인 16S rDNA 염기서열 결정 및 GenBank 검색 결과 각각 *Erwinia* sp., *Burkholderia* sp., *Serratia* sp., *Cellulomonas* sp., *Isophtericola* sp., *Leifsonia* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp. 및 *Paenibacillus* sp. 등의 균주들이임을 알 수 있었다(Table 1). 그 중 RB-35, RB-62, RB-01 균주의 경우 16S rDNA 염기서열 상동성이 기존에 보고된 균주에 비해 96-97%에 도달하여 신종 미생물의 가능성이 매우 높을 것으로 판단되며 향후 동정과정을 통한 추가적 연구가 필요하다. 선별된 균주들을 대상으로 액체배양을 실시한 다음 배양 상등

액을 조효소액으로 사용하여 50°C에서 xylanase 활성을 측정하였을 때 HY-8 균주가 상대적으로 가장 우수한 xylanase 생산능을 나타내었으며 이 균주를 xylanase 생산을 위한 균주로 최종 선발하였고 추가적인 동정을 통하여 *Paenibacillus* sp. HY-8로 명명하였다.

Xylanase 생산균주 동정

우수한 xylanase 생산균주로 선정한 *Paenibacillus* sp. HY-8 균주는 형태적 관찰 시 포자를 생산하는 그람양성 균으로 전자현미경 관찰에 의해 균주의 크기는 1.1 μm \times 2.5-4.0 μm 의 세포폭과 길이를 가지며 편모를 가지지 않는 비운동성의 간균으로 확인되었다(Fig. 1). PCR로서 1430 bp 크기의 16S rRNA 유전자 단편을 증폭하고 염기서열을 결정한 다음 data base 상동성을 조사한 결과

Table 1. Identification of microorganisms isolated as xylanase producing strains from *Moechotypha diphyis*

Bacterial strain	Highly matched type strain	Accession No.	16S rDNA Similarity (%)	Xylanase activity ^a
RC-02	<i>Erwinia persicina</i> ATCC 35998T	U80205	97.7	++
RC-07	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400T	U86373	98.2	++
PC-06	<i>Serratia plymuthica</i> DSM 4540T	AF286872	98.7	+
RC-04	<i>Serratia quinivorans</i> DSM 4597T	AJ233435	99.0	+
RC-08	<i>Cellulomonas denverensis</i> W6929T	AY501362	99.5	++
RB-35	<i>Isophtericola dokdonensis</i> DS-3	DQ387860	96.7	++
RB-62	<i>Leifsonia poae</i> VKM Ac-1401	AF116342	96.7	+
RB-01	<i>Microbacterium terregens</i> str. 88 IFO 12961T	AB004721	97.4	++
RB-24	<i>Bacillus megaterium</i> DSM 32T	X60629	99.5	+++
HY-8	<i>Paenibacillus pabuli</i> JCM 9074T	AB073191	99.5	+++

^a +++ represents excellent clear zone formation on screening medium; ++good, +fair.

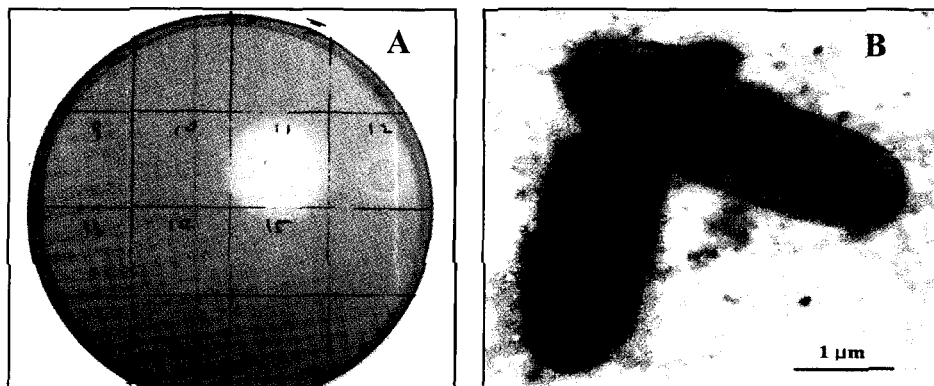


Fig. 1. Isolation of xylanase producing strain, *Paenibacillus* sp. HY-8. A: xylanolytic halo by the *Paenibacillus* sp. HY-8 on 1% xylan agar. B: transmission electron microscope image of HY-8.

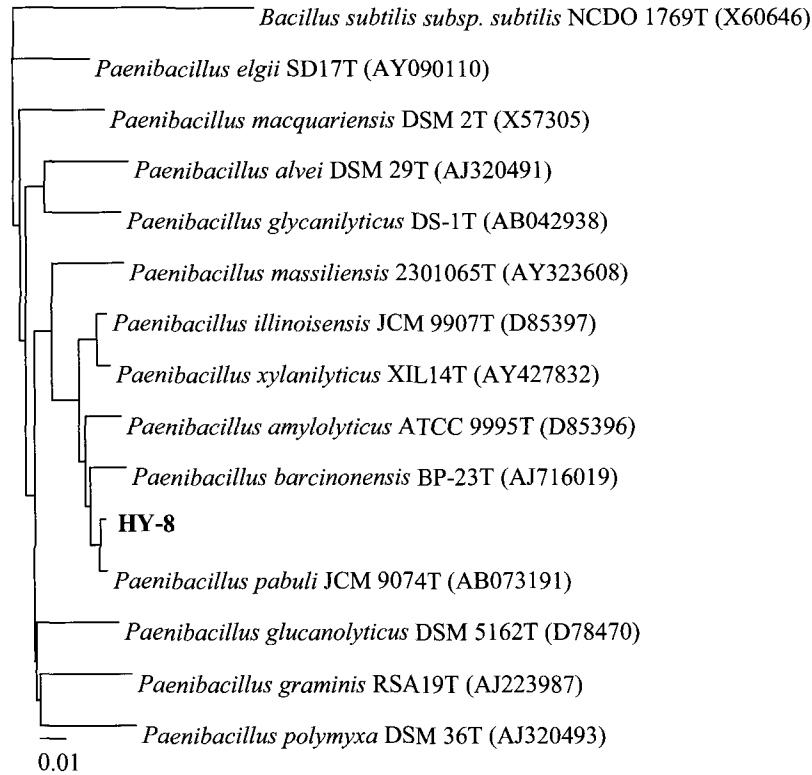


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method, showing the positions of *Paenibacillus* sp. HY-8 (HY-8) and other *Paenibacillus* species. The bar corresponds to 0.1 substitutions per nucleotide position.

Paenibacillus pabuli 균주와 99.5%로 가장 높은 상동성을 나타내었다. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 계통수(phylogenetic tree) 분석에 의하면 *P. xylanilyticus*, *P. barcinonensis*, *P. amylolyticus* 등의 균주와 가까운 group을 형성하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2). 또한 균주의 추가적인 동정을 위하여 생리·생화학적 특성을 조사하였을 때 *Paenibacillus* sp. HY-8 균주는 Biolog를 이용한 carbon source assimilation test에서 α -cyclodextrin, dextrin, glycogen, cellobiose, D-fructose, D-galactose, gentiobiose, α -D-glucose, α -D-lactose, lactulose, maltose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, β -methyl-D-glucoside, D-raffinose, sucrose, D-trehalose, turanose, inosine, uridine, thymidine, glycerol 등에 대해 positive로 나타났으며 API 50CH에 의한 carbone assimilation은 erythritol, ribose, β -methyl-D-xyloside, galactose, glucose, fructose, mannose, manitol, α -methyl-D-glucoside, N-acethyl-Glucosamine, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, trehalose, raffinose, starch, glycogen, gentiobiose, D-turanose에 대해 positive로 나타났다(Table 2). 분리균의 정확한 동정을 위해서 추가적으로 *Paenibacillus* sp. HY-8의 세포막 지방산 조성을 분

Table 2. Morphological and physiological characterization of *Paenibacillus* sp. HY-8

Characteristics	
Gram staining	+
Mortality	-
Cell form	Rod-cocci
Spore formation	+
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	-
H2S production	-
Urease	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Acetone production	-
Proteolysis of gelatin	-
Acid production from	
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	+
Saccharose	+
Melibiose	+
Amygdaline	+
Arabinose	+
Osidade	+

+: positive, -: negative

석한 결과 anteiso-C_{15:0} (67.64%)와 iso-C_{16:0}이 지방산의 72.37%를 차지하고 있었다(Table 3). 이는 Shida등(1997)이 *Paenibacillus* 속의 균주들은 대부분 anteiso-C_{15:0}와 iso-C_{16:0}이 지방산의 주성분이라는 보고와 일치한다. 상기 여러 특성으로 보아 분리균은 *Paenibacillus pabuli*에 가까운 종으로 판단되었다.

Paenibacillus sp. HY-8 균주의 xylanase 생산 특성

미생물의 다당류 분해효소는 배지에 존재하는 탄소원에 의해 그 생산성이 영향을 받는 경우가 많은데 xylanase 경우에도 xylan이나 다른 탄수화물을 첨가한 배지에서 효소 생산이 유도되거나 구성적으로 생산된다. 따라서 탄소원이 *Paenibacillus* sp. HY-8의 xylanase 생산성에 미치는 영향을 조사하기 위해 M9 배지에 여러 탄소원을 0.5% (w/v)가 되도록 각각 첨가한 다음 25°C에서 24시간 배양하여 xylanase의 생산을 조사하였을 때 glucose와 같

Table 3. Major cellular fatty acids of the *Paenibacillus* sp. HY-8

Fatty acids	%
14:0 iso	4.9±0.8
14:0	1.8±0.7
15:0 anteiso	67.5±3.5
16:1 w7c alcohol	1.1±1.4
16:0 iso	7.7±2.8
16:1 w11c	1.8±2.2
16:0	4.2±1.0
17:0 iso	1.0±0.5
17:0 anteiso	5.0±2.7

이 쉽게 이용할 수 있는 단당류나 이당류의 첨가 시 낮은 수준의 xylanase 활성을 관찰할 수 있었으며 xylan이 첨가된 배지에서 glucose나 xylose와 같은 단당류 첨가시 보다 약 6-7배 우수한 xylanase 활성을 나타냄을 확인할 수 있었다(Table 4). 이 결과로 보아 *Paenibacillus* sp. HY-8 균주의 xylanase의 생합성이 평소에 적은양의 구성적 발현이 이루어지지만 xylan에 의해 생산이 유도되는 것을 알 수 있었다. 또한 M9 배지에 탄소원으로 xylan을 첨가하는 대신 LB 배지를 기본배지로 사용하여 xylanase 생산성을 비교한 결과에서도 균체의 증식은 두 배지에서 비슷한 양상을 보였으나 xylanase 생산은 xylan이 함유된 배지에서 5배 정도 높은 생산성을 보였다(Fig. 3B). 이와 같은 결과는 본 연구에 이용된 균주에서 생산되는 xylanase의

Table 4. Effect of carbon sources on the xylanase production

Substrate	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity (unit/ml)
None	1.87	1.52
Glucose	4.26	1.17
Fructose	4.41	1.41
Maltose	5.15	1.21
Xylose	2.27	1.25
Galactose	4.87	2.41
Mannose	5.18	1.75
Arabinose	2.16	1.02
Sucrose	3.35	2.31
Lactose	4.42	0.98
Mannitol	4.24	1.47
Cellobiose	2.41	0.86
Birchwood xylan	3.55	7.56

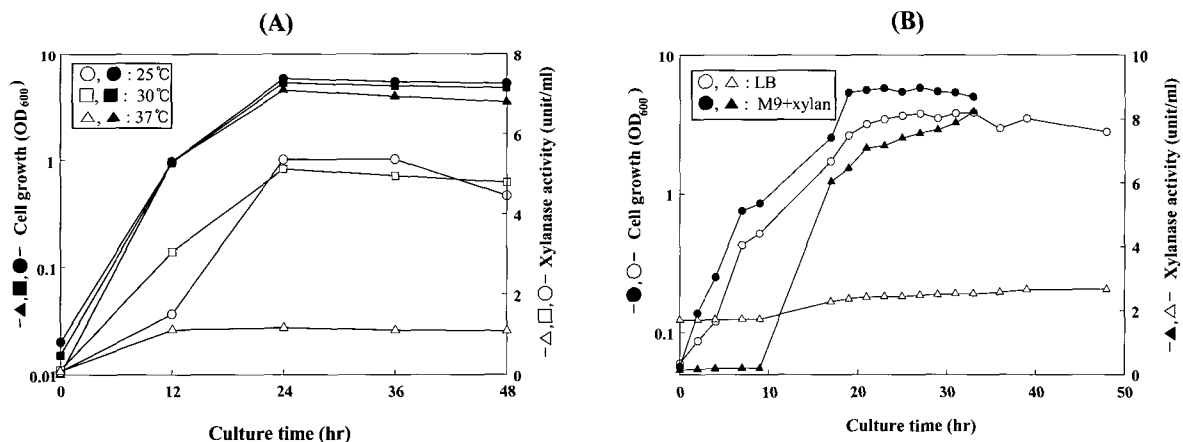


Fig. 3. Time profiles of xylanase production of *Paenibacillus* sp. HY-8 at various conditions.

A: effect of temperatures on cell growth and xylanase production. B: effect of media on cell growth and xylanase production.

경우 xylan에 의해 유도되는 효소임을 확인할 수 있었다. 보고되어진 xylanase의 생합성 조절기작에 의하면(Kulkarni et al., 1999) xylan의 경우 분자량이 큰 중합체로 세포내로 바로 유입되지 못하고 구성적으로 소량 생산되고 있는 xylanase에 의해 작은 분자량 단위로 분해되고 이들이 세포 내로 유입되어 xylanase 합성을 유도하게 된다. *Paenibacillus* sp. HY-8이 생산하는 xylanase의 경우 xylan에 의해 생산이 유도되었지만 xylan이 첨가되지 않은 배지에서도 xylanase의 활성이 어느 정도 존재함을 확인할 수 있는데 이는 xylanase의 생합성 조절기작에 따른 결과로 해석할 수 있다. *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI (Lee et al., 1993), *Aspergillus awamori* (Siedenberg et al., 1998)와 *Streptomyces* sp. QG-11-3 (Beg et al., 2000)도 xylan에 의해 xylanase 생산성이 유도된다고 보고되었는데 이는 본 연구결과와 유사한 결과를 나타내었다. 질소원에 따른 xylanase 생산성을 조사하기 위하여 0.5% (w/v)의 birchwood xylan을 탄소원으로 첨가하고 질소원이 결핍된 기본배지에 여러 가지 종류의 무기질소원과 유기질소원을 1.0% (w/v)가 되도록 첨가한 후 배양 상등액의 효소활성을 측정하였다. 그 결과 질소원을 첨가하지 않았을 경우에 균의 생육은 질소원을 첨가한 경우에 비해 3-4배정도 감소함을 확인할 수 있었으며 xylanase의 생합성 역시 저조하게 이루어짐을 관찰할 수 있었다. 또한 균의 생육과 효소생산을 의해서는 반드시 적절한 질소원을 첨가해야 함을 알 수 있었다. 유기질소원과 무기질소원에 따른 xylanase 생산은 크게 차이하지 않았으며 yeast extract를 1% (w/v)를 첨가하였을 경우 가장 높은 효소 생합성을 나타내었다. 따라서 본 균주를 이용하여 효소를 생산하기 위해서는 유기질소원인 yeast extract를 1% (w/v)을 사용하는 것이 바람직함

을 알 수 있었다(Table 4). 배양온도에 따른 xylanase 생산성을 조사하기 위하여 25°C, 30°C, 37°C에서 진탕배양하면서 일정시간 마다 미생물의 성장과 효소생산과의 관계를 조사하였다(Fig. 3A). 이때 미생물의 성장은 배양액의 흡광도를 측정하여 결정하였고, 배양액에 존재하는 xylanase의 활성을 측정함으로써 효소 생산성을 결정하였다. Fig. 3A에서 보인 바와 같이 균체증식의 경우 조사된 온도에서 모두 배양 후 24시간까지는 균체증식이 활발히 일어났으며 그 이후에는 일정 수준에 도달하는 비슷한 양상을 나타내었고 효소생산은 25°C와 30°C에서 비슷한 생산성을 보인 반면 37°C에서는 xylanase의 생산이 3배정도 감소함을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 본 균주를 이용하여 효소를 생산하기 위한 최적 조건은 탄소원으로 birchwood xylan 0.5% (w/v), 질소원으로는 유기질소원인 yeast extract를 1% (w/v) 첨가하여 25°C에서 24시간 배양함으로써 얻어질 수 있다. 본 연구는 초식성 곤충의 섭식특성에 초점을 맞춰 곤충 장내미생물을 유용한 효소의 탐색대상으로 하여 산업적 이용 가능성에 대해 조사하였으며 더 나아가 효소를 대량으로 생산하기 위해 저렴한 비용의 산업용 배지를 이용하여 생산조건을 검토해야 할 것으로 사료된다.

식물성 사료에 대한 분해 특성

분리된 xylanase에 대하여 사료첨가제로서의 유용성을 조사하기 위하여 xylan이 풍부한 식물성 사료인 대두박, 면실박, 채종박, 배아박, 소맥피, 대두박, 야자박 및 루핀 종실을 대상으로 xylan의 분해효율을 조사하였다. 그 결과 *Paenibacillus* sp. HY-8 유래의 xylanase는 면실박, 소맥피, 대두박, 대두, 야자박 및 루핀 등 조사된 대부분의

Table 5. Effect of nitrogen sources on the xylanase production

Nitrogen sources (1%, w/v)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Xylanase activity (unit/ml)
None	1.87	2.12
Polypeptone	4.26	4.15
Yeast extract	4.41	12.7
Polypeptone (0.5%) + Yeast extract (0.5%)	5.15	5.36
Malt extract	2.27	4.65
Soytone	4.87	5.85
Casamino acid	5.18	10.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.16	7.27
NH ₄ Cl	3.35	5.94
NH ₄ NO ₃	4.42	5.21

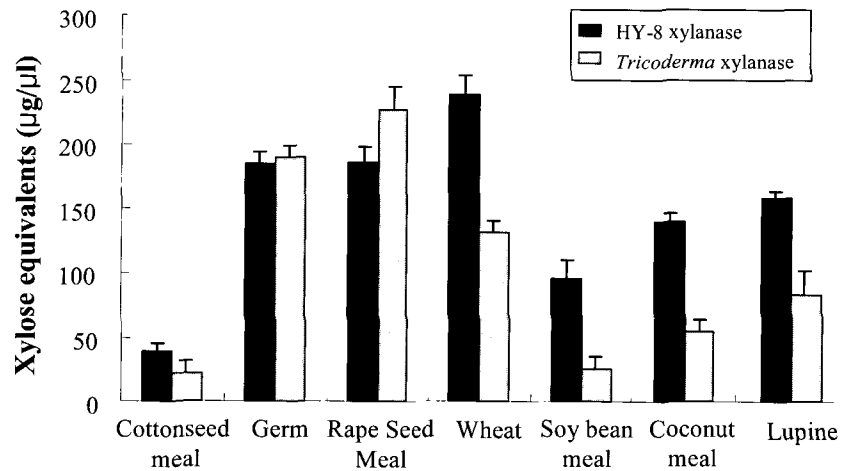


Fig. 4. Hydrolytic properties of xylanase from *Paenibacillus* sp. HY-8 against various plant source feedstuff.

식물성 사료에 대해 대조군으로 사용된 *Tricoderma* 속 곰팡이 유래의 xylanase에 비해 우수한 xylan 분해효과를 나타내었으며 배아박에 대해서는 대조군과 유사한 정도의 분해효과를 보였고 채종박에 대해서는 대조군이 조금 더 우수한 분해효과를 나타내었다(Fig. 4). HY-8 균주의 배양액에 존재하는 cellulase나 다른 glucoside hydrolase의 활성에 의한 식물성 사료의 분해여부를 확인하기 위하여 cellulose, starch 등의 중합체를 동일조건에서 반응하였을 때 xylanase 활성 외의 다른 glucoside hydrolase 활성은 나타나지 않았다(data not shown). 따라서 분리된 xylanase의 경우 열에 대한 안정성이 높고 가축의 장내환경과 비슷한 중성 pH에서 가장 우수한 효소활성을 나타낸다는 점(Heo *et al.*, 2006)과 식물성 사료에 대한 우수한 분해효율을 나타낸다는 점 등을 고려할 때 효소의 발현시스템 개선 등을 통하여 생산효율을 높일 수 있다면 사료첨가제로 개발할 수 있는 높은 가능성을 가지고 있는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 과학기술부에서 지원하는 미생물유전체활용 기술개발사업(MG05-0305-2-0)에 의해 지원되었습니다.

Literature Cited

- 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.
- Broderick, N.A., K.F. Raffa, R.M. Goodman and J. Handelsman. 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 293-300.
- Collins, T., C. Gerday and G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases, *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 3-23.
- Courtin, C.M., A. Roelants and J.A. Delcour. 1999. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endo-xylanases in bread-making. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1870-1877.
- Dillon, R.J. and V. M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49: 71-92.
- Egert, M., B. Wagner, T. Lemke, A. Brune and M. Friedrich. 2003. Microbial community structure in the midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6659-6668.
- Heo, S.Y., J. Kwak, H.W. Oh, D.S. Park, K.S. Bae, D.H. Shin, and H.Y. Park. 2006. Characterization of an extracellular xylanase in *Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1753-1759.
- 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.
- 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.
- Kulkarni, N., A. Shendye and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 411-456.
- La Grange, D.C., I.S. Pretorius, M. Claeysens and W.H. Van Zyl.

2001. Degradation of xylan to D-xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* coexpressing the *Aspergillus niger* beta-xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* xylanase II (xyn2) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5512-5519.
- Lee, G.E., C.H. Kim, H.J. Kwon, J. Kwak, D.H. Shin, D.S. Park, K.S. Bae and H.Y. Park. 2004. Biochemical characterization of an extracellular protease in *Serratia proteomaculans* isolated from a spider. *Kor. J. Microbiol.* 40: 269-274.
- Lee, Y.E., S.E. Lowe, B. Henrissat and J.G. Zeikus. 1993. Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *J. Bacteriol.* 175: 5890-5898.
- 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.
- Park, D.S., H. W. Oh, K.S. Bae, H.M. Kim, S.Y. Heo, N.J. Kim, K.Y. Seol and H.Y. Park. 2007. Screening of bacteria producing lipase from insect gut: Isolation and characterization of a strain, *Burkholderia* sp. HY-10 producing lipase. *Korean J. Appl. Entomol.* 46: 1-9.
- Saito, N. and M. Nei. 1987. A neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 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.
- Siedenberg, D., S.R. Gerlach, K. Schugert, 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.
- Skipper, N., M. Sutherland, R.W. Davies, D. Kilburn, R.C. Miller and R. Wong. 1985. Secretion of a bacterial cellulase by yeast. *Science.* 230: 958-960.
- Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1994. Phenotypic characterization. pp 607-654 in *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, D.C. American Society for Microbiology.
- Tenkanen, M., J. Puls and K. Poutanen. 1992. Two major xylanases of *Trichoderma reesei*. *Enzyme. Microb. Technol.* 14: 566-574.
- Teunissen, M.J., A.A. Smits, H.J. M. Op den Camp and G.D. Vogels. 1991. Fermentation of cellulose and production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivores. *Arch. Microbiol.* 156: 290-296.
- 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.
- Varma, A., B.K. Kolli, J. Paul, S. Saxena and H. Konig. 1994. Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite gut: a survey on the present state of art. *FEMS Microb. Rev.* 15: 9-28.
- Watanabe, H., H. Noda, G. Tokuda and N. Lo. 1998. A cellulase gene of termite origin. *Nature.* 394: 330-331.

(Received for publication May 28 2007;
accepted August 20 2007)