

용인 함박산 토양에서 분리한 *Paenibacillus* sp. HX-1의 동정과 endo- β -1,4-xylanase 생산 증가를 위한 배지최적화

지원재¹, 김종희², 홍순광^{1*}

¹명지대학교 생명과학정보학부

²서일대학교 식품영양과

Received : April 9, 2013 / Revised : May 10, 2013 / Accepted : May 11, 2013

Enhanced Production of Endo- β -1,4-xylanase from *Paenibacillus* sp. HX-1 Newly Isolated from Soil Samples at Ham-bak Mountain in Yongin city, Korea. Chi, Won-Jae¹, Jonghee Kim², and Soon-Kwang Hong^{1*}. ¹Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ²Department of Food and Nutrition, Seoil College, Seoul 131-702, Korea

A xylanase-producing bacterium was isolated from a soil sample collected in Yongin city, Korea. The strain was aerobic and gram positive, and grew between pH 5.0 and 11.0, forming a yellow-colored colony. The strain was classified as a novel sub-species bacterium of *Paenibacillus barcinonensis* by 16S rRNA gene sequence similarity, phylogenetic analysis, phenotypic, and biochemical characteristics, and thus named *Paenibacillus* sp. HX-1. This strain produced extracellular endo- β -1,4-xylanase, and the best xylanolytic activity (205.17 unit/ml) was obtained at 96 h in an optimized TNX medium containing 1% (w/v) bacto tryptone, 1% (w/v) NaCl, and 0.7% (w/v) beechwood xylan at pH 7.0, 37°C and 200 rpm. The endo- β -1,4-xylanase produced by the strain HX-1 yielded xylobiose as the end product from beechwood xylan hydrolysis. The enzyme exhibited optimum pH and temperature at pH 7.0 and 45°C, respectively. The remarkable enhancing effect of the TNX medium on xylanase production by HX-1, in spite of its simple formula, may have great advantages for industrial applications of xylanase.

Keywords: Xylanase, endo- β -1,4-xylanase, xylobiose, *Paenibacillus* sp. HX-1

서 론

헤미셀룰로오스(hemicellulose)는 자일란(xylan), 갈락탄(galactan), 아라비난(arabinan) 등을 포함한 비셀룰로오스 다당류이며, 주로 식물의 세포벽에서 발견된다[1, 3]. 자일란은 식물세포벽 헤미셀룰로오스의 주성분이며, 자연계에서는 셀룰로오스 다음으로 풍부한 다당류이다[9]. 자일란은 D-xylopyranose 단당체가 β -1,4-결합으로 연속적으로 연결된 골격구조에 O-acetyl, 4-O-methyl-D-glucuronosyl, α -L-arabinofuranosyl 그룹이 결가지로 수식되어 있는 이질성 다당류(heterogeneous polysaccharide)이다[10, 25].

최근 자일란은 바이오 연료나 화학 원료로 사용될 수 있는 재생 가능한 바이오메스라는 점에서 많은 관심을 모으고

있다[1]. 자일란의 생물학적 분해는 β -1,4-endoxylanase, β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -glucuronidase, acetyl xylan esterase, phenolic acid esterase와 같은 다수의 효소에 의해 이루어진다[18]. 이들 중 β -1,4-xylanases는 β -1,4-xylan의 골격을 무작위로 가수분해하는 능력을 갖고 있어 자일란 분해 시작단계에 우선적으로 작용하는 효소이다. 마지막 단계에서는, β -xylosidases가 xylooligosaccharides를 더 작은 oligosaccharides로 분해하며, 자일란을 수식하고 있는 결가지 그룹들은 α -arabinofuranosidases, α -glucuronidases, acetyl xylan esterases에 의해 분해된다[9]. 아미노산 서열의 상동성에 따라, 자일라네이즈(xylanase)는 glycosyl hydrolase 10 (GH10)과 GH11 family로 분류된다. GH10 family 자일라네이즈는 산성 pI 값을 갖고, 분자량이 큰 편이며(>30 kDa), 치환 그룹이 있는 자일란에 특이성을 보인다[2]. 반면, GH11 family 자일라네이즈[11]는 알칼리 또는 산성 pI 값을 갖고, 저분자량 효소이며 자일란 기질에 높은 기질 특이성을 갖는다는 점에서 서로 다르다.

*Corresponding author

Tel: +82-31-330-6198, Fax: +82-31-335-8249

E-mail: skhong@mju.ac.kr

© 2013, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

미생물 유래의 자일라네이즈는 다양하게 산업적으로 응용된다는 점에서 최근 큰 흥미를 끌고 있다[3]. 펄프나 종이의 블리칭(bleaching) 공정에서 자일라네이즈를 이용한 전처리는 염소가 함유된 블리칭용 화학약품 사용을 줄여 환경오염 문제를 크게 줄일 수 있다. 그러나, 펄프나 종이 공장에서는 광범위한 pH 및 온도에서 작용할 수 있는 cellulase-free한 자일라네이즈를 필요로 한다[1]. 자일라네이즈는 또한 주스 청정화(clarifying juices) 및 농업용 사일리지(agricultural silage) 생산에도 중요하게 이용된다. 제빵산업에서도, 빵의 질감을 부드럽게 하기 위한 목적으로 자일라네이즈를 사용하며, 자일란을 효소분해하여 감미료인 자일로오스(xylose)와 자일로올리고당을 제조하는 공정에도 자일라네이즈가 사용된다[3]. 헤미셀룰로오스로부터 소화되지 않고 남는 섬유질은 동물의 장내에서 음식물의 점도를 증가시키고, 결과적으로 섭취한 음식물의 영양 가치를 저하시킨다[24]. 자일라네이즈는 음식물 내의 헤미셀룰로오스를 분해하여 동물의 영양상태를 개선시키고 소화도를 증가시키는 목적으로도 사용된다. 최근에는 자일라네이즈를 이용하여 발효가능한 당인 자일로오스를 생산하는 연구가 주목을 받고 있는데, 이는 리그노셀룰로오스 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산이 획기적인 비용절감 공정이 될 수 있기 때문이다[9]. 따라서, 리그노셀룰로오스를 분해하는 미생물이 바이오에탄올 산업에서도 점점 중요한 관심사가 되고 있다. 이러한 이유로 지금까지 많은 자일라네이즈 생산 균주들이 보고되었고, 이들이 생산하는 자일라네이즈의 효소적 특성과 유전자에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다[4, 5, 9]. 본 연구 그룹은 명지대학교 근처에 소재하는 함박산에서 토양샘플을 채취하였고, 이로부터 자일라네이즈를 효율적으로 생산하는 균주 HX-1을 분리하였다. 본 논문에서는 균주 HX-1의 분류학적 동정, 균주 HX-1으로부터 자일라네이즈 생산을 증가시키기 위한 배지 조성 최적화, 생산된 자일라네이즈의 효소학적 특성을 보고한다.

재료 및 방법

Isolation of xylan-degrading bacteria from soil sample

자일라네이즈(xylanase)를 생산하는 토양 미생물을 동정하기 위해, 경기도 용인시 처인구 남동에 위치한 함박산에서 토양샘플을 채취하여 멸균수에 10^{-1} - 10^{-5} 로 희석하였다. 희석액 200 μ l를 0.2% beechwood xylan (Sigma, USA)이 포함된 Luria-Bertani (LB) 고체배지에 도말한 후 37°C에서 2일간 배양하였다. 1,500개 이상의 콜로니를 같은 고체배지에 옮겼으며, replica를 만들어 같이 배양하였다. 2일간 배양 후 2.0% Congo red 용액으로 염색하여 콜로니 주변에 자일

란 분해환을 형성하는 콜로니를 선별하였다. 선별된 콜로니(약 300개)는 replica로부터 새로운 배지로 옮기고, 단일 콜로니를 얻기 위해서 3번 이상의 희석 및 도말 과정이 반복되었다. 콜로니들은 형태적인 특성에 따라서 5종류로 분류되었다. 이들 중에서 노란색을 띠며 자일라네이즈 활성이 가장 강한 그룹의 균(총 40개의 콜로니 중에서 대표 균주로 3개의 콜로니 선택)에 대한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열분석 결과, 3균주 모두 동일한 균으로 밝혀졌기 때문에, 하나의 균주를 HX-1으로 명명하고 본 연구에 사용하였다. 실험에 사용한 배지 및 완충액 그리고 분석용 시약은 Sigma사(USA)로부터 구입하였고 제한효소 및 Taq Polymerase는 Takara사(JAPAN)로부터 구입하여 사용하였다.

Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence

균주 HX-1의 염색체 DNA는 genomic DNA extraction kit (DyneBio, Korea)를 사용하여 추출하였다. 16S rRNA 유전자는 bacterial universal primer (27F; 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3', 1492R; 5'-TACCTTGTACACTT-3')를 사용하여 염색체 DNA를 주형으로 하는 polymerase chain reaction (PCR)법으로 증폭하였다[4]. 증폭된 DNA 단편은 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 클로닝하여. Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 균주 HX-1의 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용하여 NCBI의 BLASTN search를 수행하여 염기서열에 상동성을 갖는 균주를 탐색하였다. 상동성을 보이는 표준균주(type strain)의 16S rRNA 유전자 염기서열은 EzTaxon server [6]로부터 얻었다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 계통수(phylogenetic tree)는 PHYLIP suit 프로그램[7]의 Neighbour-joining (NJ) 법[21]을 사용하여 작성하였다. Sequence alignment는 ClustalW 소프트웨어 프로그램[23]을 사용하여 수행하였고, 5'과 3'의 gap은 BioEdit 프로그램[8]을 사용하여 편집하였다. Bootstrap 지수는 1,000회의 연속된 수행결과를 토대로 계산되었으며 계통수의 각 분지점에 표시하였다. Evolutionary distance matrix는 Kimura two-parameter 모델[12]에 따라서 측정하였다.

Chemotaxonomy analysis

균주 HX-1의 주요 respiratory quinone은 Komagata에 의해 제시된 방법에 따라 역상-HPLC로 분석하였고[14], 균체의 지방산은 기존의 알려진 Miller 방법[17]에 준하여 methyl ester화 시켰으며, 전 처리된 fatty acid methyl esters (FAME) 혼합물의 분석은 Microbial Identification system (MIDI)의 지침에 따라 Agilent technologies 6890

GC에 HP-1 capillary column (cross-linked methyl siloxane, 30 m × 0.320 mm × 0.25 μm)을 장착하여 가스-크로마토그래피 분석법에 따라 수행하였다[22]. DNA G+C content는 역상-HPLC를 이용한 Mesbah 등의 방법에 따라서 분석하였다[15].

Biochemical characteristics

균주 HX-1의 성장을 위한 최적 온도조건을 알아보기 위해서, 0.3% beechwood 자일란이 포함하는 LB 고체배지에 균을 접종 한 후, 5-55°C(5°C 간격)의 조건에서 배양하였다. 또한 최적 pH 조건을 조사하기 위해, pH 4.0-12.0(pH 1.0 간격)으로 pH를 조정된 LB 고체배지에 균을 접종한 후, 37°C에서 균의 성장을 관찰하였다. 균의 성장을 위한 NaCl 농도는 0-15%(1% 간격)의 NaCl이 첨가된 고체배지에 균을 접종한 후, 37°C에서 배양하여 균의 성장을 관찰하였다. 균주 HX-1의 대사특성과 효소생산은 API 50CH kit (Biomrieux, France)와 API Staph kit (Biomrieux, France), API ZYM kit (Biomrieux, France)를 사용하였는데, 각 키트에 제공된 배지에 NaCl을 최종농도 1%가 되도록 첨가한 후 제시된 방법에 따라 실험을 수행하였다. 균주 HX-1의 현탁액은 0.5 McFarland에 해당하는 농도로 희석하여 접종하였으며, 37°C에서 24시간 배양 후 strip의 색깔 변화를 관찰하였다.

Optimization of carbon and nitrogen sources for xylanase production

균주 HX-1의 자일라네이즈 생산을 향상시키는 배지조건을 탐색하고자 하였다. 기본배지는 질소원으로 bacto tryptone (1%)과 탄소원으로 beechwood 자일란 (0.3%) 그리고 NaCl (1%)이 포함되었고 배지의 pH는 7.0으로 조정하였다. 배지내 최적 질소원을 조사하기 위해서, bacto tryptone 대신에 bacto peptone과 meat extract 그리고 soytone 등을 각각 최종 농도 1%가 되도록 기본배지에 첨가하였다. 균주 HX-1을 접종 후 37°C에서 5일간 200 rpm으로 진탕 배양하였으며 24시간 간격으로 10 ml씩 배양액을 샘플링하였다. 각각의 샘플은 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액만을 취하였고, 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)법[16]을 응용하여 0.2% beechwood 자일란을 기질로 사용하는 효소반응을 20분간 실시한 후 540 nm에서 탁도를 측정하여 자일라네이즈 활성을 측정하였다. 효소활성(unit/ml)은 서술한 효소반응조건에서 조효소가 포함된 반응액 ml 당 자일란으로부터 1분당 분해되어 생성되는 환원당 xylose의 양(μmole)을 나타낸다.

배지내 최적 탄소원을 조사하기 위해서, 결정된 질소원(bacto tryptone, 1%)이 포함된 기본배지에 beechwood 자일란 외에 xylose, maltose, glucose, lactose, sucrose, fructose,

carboxymethylcellulose (CMC) 등을 각각 최종 농도 0.3%가 되도록 첨가하였다. 균주 HX-1을 접종 후 37°C에서 5일간 진탕 배양하면서 24시간 간격으로 배양액 시료를 채취하여 자일라네이즈 활성을 측정하였다. 최적 탄소원으로 선정된 자일란의 농도별 효과를 알아보기 위해서, 0.1-1.0% (0.1% 간격)의 beechwood 자일란을 액체배지에 각각 첨가하여 균주 HX-1을 배양하고, 상기와 같은 방법으로 배양한 후 생산된 자일라네이즈 활성을 측정하여 최적 탄소원 농도를 탐색하였다. 본 연구로부터 질소원과 탄소원 및 탄소원의 농도 등이 결정된 최적화된 배지는 TNX (Tryptone-NaCl-Xylan)로 명명하였다. 배양 시 균체의 성장 측정은 각각의 샘플에 대한 600 nm에서의 탁도를 측정하여 비교 사용하였다.

Enzymatic characteristics of secreted xylanases by strain HX-1

균주 HX-1을 500 ml TNX 액체 배지에서 3일간 진탕 배양한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 제거하고 400 ml의 상등액만을 취하였다. 준비된 상등액에 최종농도 70%가 되도록 황산암모늄을 천천히 첨가하여 단백질을 농축하였다. 15,000 rpm에서 1시간 원심분리하여 단백질을 침전시키고 상등액을 제거한 침전물을 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0) 10 ml에 현탁시킨 후, 동일 완충액으로 12시간 투석하여 효소반응을 위한 조효소액으로 사용하였다. 조효소액에 함유된 자일라네이즈의 효소반응을 위한 최적 pH 조건을 탐색하기 위해, 준비된 조효소액을 pH 6.0-10.0 (pH 1.0의 간격) 완충액 조건으로 40°C에서 10분간 효소반응을 유도하여 효소활성을 측정하였다. 사용된 완충액은 20 mM MOPS 완충액(pH 6.0-7.0), 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0-9.0), 20 mM Glycine-NaOH 완충액(pH 9.0-10.0)이다. 효소반응의 최적 온도 조건을 탐색하기 위해서, 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)을 사용하여 다양한 온도(20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C) 조건에서 10분간 효소반응을 유도하여 활성을 측정하였다. 균주 HX-1이 생산하는 자일라네이즈에 의한 자일란 가수분해산물을 분석하기 위해서, 앞에서 결정된 최적 효소반응 조건(20 mM Tris-Cl 완충액, pH 7.0, 45°C)에서 조효소와 beechwood 자일란을 24시간 동안 반응시킨 후 Chi 등[5]에 의해서 서술된 방법에 따라 Silica Gel 60 TLC plate (Merck, USA)를 이용한 Thin layer chromatography (TLC)를 수행하였다.

결과 및 고찰

Phylogenetic analysis of newly isolated strain HX-1 based on 16S rRNA gene sequence

경기도 용인시 처인구에 위치한 함박산에서 채취한 토양

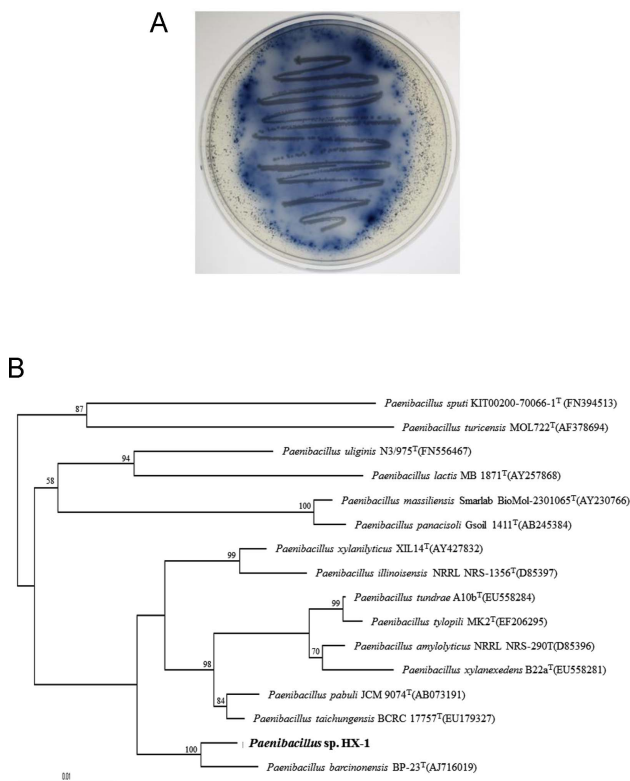


Fig. 1. Isolation of xylanolytic bacterium from soil sample. (A) Xylanolytic activity on agar plate. Strain HX-1 was cultured on LB agar plate containing 0.2% xylan-azure at 37°C for 48 h, and then 2.0% Congo red solution was overlaid on the plate to detect xylanolytic activity. (B) Neighbor-Joining phylogenetic tree. The N-J tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences of strain HX-1 and other *Paenibacillus* species. Distances were determined according to the Kimura's 2-parameter model and bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates are listed as percentages at nodes. GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in parentheses. Scale bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotides.

샘플로부터 분리된 자일라레이즈 생산 균주 HX-1을 동정하기 위해, 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다 (Fig. 1A). Bacterial universal primer를 사용한 PCR 방법으로 증폭한 유전자 단편의 염기서열 분석 결과, 균주 HX-1의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Paenibacillus barcinonensis* BP-23^T, *Paenibacillus taichungensis* BCRC 17757^T, *Paenibacillus pabuli* JCM 9074^T, *Paenibacillus amylolyticus* NRRL NRS-290^T, *Paenibacillus tundrae* A10b^T, *Paenibacillus xylanilyticus* XIL14^T, *Paenibacillus tylopili* MK2^T, *Paenibacillus illinoisensis* NRRL NRS-1356^T, *Paenibacillus xylanexedens* B22a^T 등과 각각 99.088%, 98.100%, 97.811%, 97.320%, 97.257%, 97.187%, 97.046%, 97.033%, 96.695%의 상동성을 보였다. 따라서 균주 HX-1은 *Paenibacillus* 속

(genus)에 속하는 하나의 종(species)으로 판단된다. 최종 해석된 1,432 bp의 16S rRNA 유전자 염기서열은 GenBank에 JX853820으로 등록하였다.

균주 HX-1의 16S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 phylogenetic tree를 제작하여 상동성이 높은 표준균주들과의 계통발생적 연관관계를 조사하였다. PHYLIP suit program의 NJ method를 이용한 phylogenetic tree 제작 결과, HX-1은 *P. barcinonensis* [20]와 같은 branch를 형성 (bootstrap value = 100%)하여 계통발생적 연관관계가 가장 높은 것으로 관찰되었다(Fig. 1B). 그 외 *P. taichungensis* BCRC 17757^T, *P. pabuli* JCM 9074^T, *P. xylanilyticus* XIL14^T 등과도 높은 계통발생적 연관관계를 보였다. 따라서 16S rRNA gene sequence와 phylogenetic tree를 이용한 계통발생적 연관관계분석 결과로부터 균주 HX-1은 *P. barcinonensis* BP-23^T와 동일한 균주이거나 아종일 것으로 판단하였다.

Phenotypic and chemotaxonomic characteristics

균주 HX-1은 그람 염색법을 통하여 그람 양성균으로 관찰되었고, LB 및 TNX 고체 배지에서 2일간 배양하였을 때 콜로니는 표면이 부드럽고 옅은 노란색을 띠었다. 균주 HX-1은 20-45°C 사이에서 성장이 가능하며 35-40°C 사이에서 가장 활발한 성장이 관찰되었다. 성장을 위하여 Na⁺ ion을 필요로 하지 않지만 1%의 NaCl이 포함된 배지에서 가장 활발하게 성장하고, 5% 이상의 NaCl 농도에서는 성장이 저해되었다. 또한 pH 5.0부터 11.0까지의 넓은 pH 조건에서 성장하는 특성을 보였다. 중성(pH 6.0-8.0)에서 빠른 성장이 관찰되었고, 특히 pH 7.0의 조건에서 가장 활발한 성장을 보였다.

균주 HX-1의 유전체 DNA G+C 함량은 49.79%이고 주요 respiratory quinone은 MK-7으로 분석되었다. 현재까지의 보고에 의하면, *Paenibacillus* 속은 DNA G+C 함량이 39-54% 정도이고, 주요 respiratory quinone으로 MK-7을 포함하고 있는 것으로 알려져 있는데, 균주 HX-1도 이러한 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다. 또한 HX-1에서 발견된 주요 지방산은 anteiso-C_{15:0} (41.21%), C_{16:0} (24.02%), C_{14:0} (7.94%), iso-C_{14:0} (6.67%), iso-C_{16:0} (6.70%)이었는데, 이들은 *Paenibacillus* 속의 종들에게서 일반적으로 발견되는 주요 지방산들의 범주에 속한다. 따라서 균주 HX-1의 DNA G+C content, respiratory quinone, 지방산 등의 분석 결과로부터 *Paenibacillus* 속에 속할 것으로 판단된다.

하지만, 균주 HX-1의 G+C 함량(49.79%)은 계통발생적 연관관계가 가장 높은 *P. barcinonensis* BP-23^T의 G+C 함량(45.0%)과 비교하여 상당히 높은 수치이다. 또한 Table 1에 제시한 결과와 같이 균주 HX-1과 *P. barcinonensis* BP-23^T

Table 1. Phenotypic characteristics of strain HX-1 and phylogenetically related type strains of genus *Paenibacillus*.

Characteristic	Strain HX-1	<i>P. taichungensis</i> BCRC 17757 ^T	<i>P. babuli</i> JCM 9074 ^T	<i>P. amylolyticus</i> NRRL NRS-290 ^T	<i>P. barcinonensis</i> BP-23 ^T	<i>P. illinoisensis</i> NRRL NRS-1356 ^T	<i>P. xylanilyticus</i> XIL14 ^T
Nitrate reduction	+	-	-	+	-	+	-
Growth at:							
5°C	-	+	+	+	+	-	+
45°C	+	-	-	-	-	+	+
2% NaCl	+	+	+	+	+	-	+
7% NaCl	-	+	+	-	-	+	+
pH 4.0	-	-	-	w	-	+	+
pH 10.0	+	+	+	-	+	+	+
pH 11.0	+	+	+	-	+	-	+
pH 12.0	-	-	-	-	-	-	+
Enzyme activity:							
β-galactosidase	+	+	+	+	-	+	+
Urease	+	-	-	+	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	+	-	-
α-Chymotrypsin	+	+	+	-	+	+	+
Acid phosphatase	+	+	-	+	+	+	+
N-Acetyl-β-glucosaminase	-	+	+	+	+	+	-
α-Fucosidase	-	-	-	+	-	-	-
Acid production from:							
Glycerol	w	+	+	-	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	+	-	-
Inulin	-	+	+	-	-	+	+
Melezitose	-	+	+	-	+	-	-
Starch	+	+	+	+	-	+	+
Glycogen	+	+	+	+	-	+	+
Gluconate	-	-	-	-	+	+	+
DNA G+C content (mol%)	49.8	46.7	45.0	46.4	45.0	48.1	50.5
Predominant menaquinone	MK-7	MK-7	ND	MK-7	MK-7	MK-7	ND

Symbols: +, positive; -, negative; w, weak positive.

는 5°C에서의 성장과 nitrate reduction 활성 및 β-galactosidase, urease, trypsin, N-acetyl-β-glucosaminase 등의 효소생산 그리고 D-arabinose, melezitose, starch, glycogen, gluconate의 발효 능력 등 많은 특성에서 차이를 보이고 있다. 따라서 본 연구를 통해서 분류된 균주 HX-1은 *P. barcinonensis* BP-23^T와 높은 16S rRNA gene sequence의 유사성으로 동일한 종일 가능성이 있으나, 많은 유전적, 생리적, 화학적 특성의 차이로부터 다른 아종으로 판단된다. 계통발생적 연관관계가 높은 6종의 균주들과의 형태적·생리적

특성에 관한 비교를 Table 1에 나타내었다.

Medium optimization for xylanase production from strain HX-1

자일라네이즈 생산촉진을 위한 배지의 최적 질소원을 결정하기 위해, bacto tryptone, bacto peptone, meat extract, soytone 등이 각각 포함된 기본배지에 균주 HX-1을 배양하여 생산되는 자일라네이즈 활성을 관찰하였다. 그 결과 bacto peptone, meat extract, soytone 등으로 질소원이 대체된 배

지의 배양액에서는 자일라네이즈 활성이 거의 관찰되지 않는 반면, bacto tryptone이 첨가된 배양액에서는 높은 자일라네이즈 활성($OD_{540} = 0.198$)이 관찰되었다(Fig. 2A). 이러한 결과에 기초하여, bacto tryptone을 최적의 단일 질소원으로 선택하였다. 다음으로 배지의 최적 탄소원을 결정하기 위해, bacto tryptone을 질소원으로 사용하고, 탄소원으로는 beechwood 자일란, xylose, maltose, glucose, lactose, sucrose, fructose, carboxymethylcellulose (CMC) 등을 각각 첨가한 액체배지에 HX-1을 배양하여 배양액에 생산되는 자일라네이즈 활성을 측정하였다. 그 결과, beechwood 자일란과 CMC가 첨가된 배지의 배양액에서 높은 자일라네이즈 활성이 관찰되었고, 그 외의 다른 탄소원들이 첨가된 배지의 배양액에서는 효소활성이 거의 관찰되지 않았다(Fig. 2B). 특히, Beechwood 자일란이 첨가된 배지의 경우, CMC가 포함된 배

지보다 배양기간 동안 계속해서 최대 약 1.3배 정도의 높은 자일라네이즈 활성이 관찰되어 단일 탄소원으로 자일란을 선택하였다. 선택된 beechwood 자일란의 최적 농도를 결정하기 위해서, beechwood 자일란을 0.1-1.0%(0.1% 간격) 농도로 포함하는 배지에 균주 HX-1을 배양하고, 배양액으로부터 생산된 자일라네이즈 활성을 측정하였다(Fig. 2C). Beechwood 자일란의 농도가 최종 농도 0.7%일 때 가장 높은 효소활성이 관찰되었는데, 이 값은 기본배지의 약 1.6배에 해당한다. 따라서 본 실험을 통하여 질소원으로는 1% bacto tryptone과 탄소원으로는 0.7% beechwood 자일란이 선택되었다. 이러한 결과 HX-1의 자일라네이즈 생산을 위해 최적화된 배지는 TNX로 명명되었고, TNX 배지는 1% bacto tryptone, 0.7% beechwood 자일란, 1% NaCl 을 포함하며, pH 7.0으로 조정하여 사용하였다.

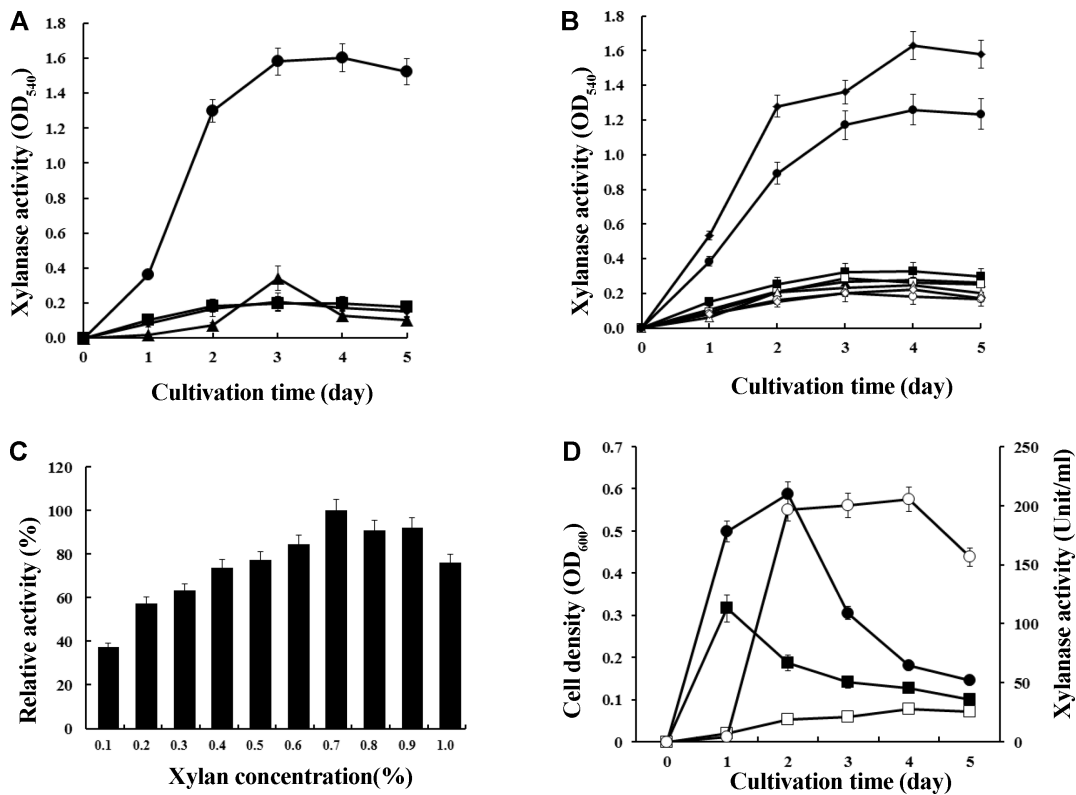


Fig. 2. Optimization of medium composition for xylanase production by strain HX-1.

(A) Determination of nitrogen source. Strain HX-1 was cultured in liquid medium containing bacto tryptone (●), bacto peptone (◆), meat extract (▲), and soytone (■), respectively. (B) Determination of carbon source. Strain HX-1 was cultured in liquid medium containing beechwood xylan (◆), xylose (■), maltose (▲), glucose (□), lactose (△), sucrose (○), fructose (◇), and carboxymethylcellulose (CMC) (●), respectively. (C) Determination of optimum concentration of xylan as sole carbon source. Strain HX-1 was cultured in liquid medium containing various concentrations (0.1-1.0%, increment of 0.1%) of xylan at 37°C for 96 h with vigorous shaking. (D) Cellular growth and xylanase production in the optimized medium. Strain HX-1 was cultured in optimized medium (TNX) at 37°C with vigorous shaking. LB medium was used as a control. The cellular growth and xylanase activity was measured at 600 nm and at 540 nm, respectively. All data are the average values of three parallel experiments. ■, cell growth in LB; □, xylanase activity in LB; ●, cell growth in TNX; ○, xylanase activity in TNX.

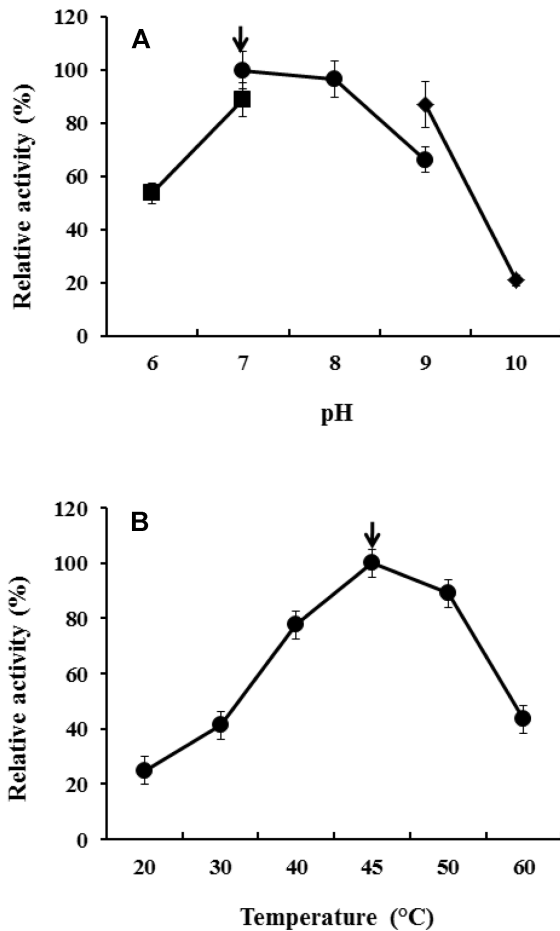


Fig. 3. Enzymatic properties of xylanase produced by strain HX-1.

(A) Effect of pH on xylanase activity. The reaction was carried out at 40°C for 10 min. The values obtained at pH 7.0 using 20 mM Tris-Cl buffer were taken to be 100%. ■, 20 mM MOPS buffer; ●, 20 mM Tris-Cl; ◆, Glycine-NaOH buffer. The relative activities are the averages from three independent experiments. (B) Effect of temperature on xylanase activity. The reaction was carried out at different temperatures in 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0). The values obtained at 45°C were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments.

Cellular growth and xylanase production of strain HX-1

균주 HX-1은 TNX 액체배지에서 진탕배양 하였을 때, LB 액체배지에서 진탕배양 한 경우에 비해 약 1.9배 정도의 높은 세포성장률을 보였다(Fig. 2D). LB 액체배지의 경우 배양 1일째 가장 높은 세포성장($OD_{600} = 0.316$)을 보이고 배양 5일째까지 천천히 감소하는 반면, TNX 액체배지에서는 배양 2일째 가장 높은 성장($OD_{600} = 0.588$)을 보인 후 배양 3일째($OD_{600} = 0.305$) 급격히 감소하였다. LB 액체배지에서의 자일라네이즈 활성은 배양기간 내내 낮게 (최대 27.61 unit/

ml) 관찰된 반면, TNX 액체배지에서는 자일라네이즈 활성이 배양 2일째 급격히 증가하여 배양 4일째 최대활성(205.17 unit/ml)이 관찰된 후 배양 5일째는 감소하였다(Fig. 3). 이와 같은 배지성분의 최적화를 통해서 균주 HX-1의 세포성장의 증가는 물론 자일라네이즈 생산이 약 7.4배 증가된 것으로 측정되었다. 이러한 결과로부터, HX-1 균주의 자일라네이즈 생산이 배지에 첨가한 탄소원인 자일란에 의해서 발현이 유도되고 있는 것으로 추측된다. 최근, Zheng 등[27]은 *Paenibacillus campinasensis* BL11과 G1-1균주를 합성배지 (0.5% $NaNO_3$, 0.3% K_2HPO_4 , 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002% $MnSO_4$, 0.002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5% 자일란; pH 7.0)에서 배양했을 때, 각각 10.5 unit/ml와 143.98 unit/ml의 자일라네이즈를 생산할 수 있음을 보고하였다. 이에 비해 TNX 배지는 아주 간단한 배지 조성 성분만을 갖는다는 장점이 있으며, HX-1 균주의 자일라네이즈 생산성도 월등하게 높은 것으로 판단되었다. 따라서, 본 연구에서 최적화된 TNX 배지에 포함된 성분 이외의 다른 성분 (metal ion 및 유기산 등)들의 효과에 대한 추가연구가 진행된다면, 본 연구를 통해 분리한 HX-1 균주로부터 보다 높은 자일라네이즈 생산을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

Enzymatic properties of extracellular xylanase produced by strain HX-1

균주 HX-1이 세포 외부로 분비·생산하는 자일라네이즈는 pH 7.0-8.0의 중성 pH 조건에서 높은 활성을 띄고, 특히 20 mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충액에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 3A). 이러한 반응 조건은 *P. campinasensis* G-1 [27]의 XynG1-1 (pH 7.5)과 *Paenibacillus* sp. 12-11 [26]의 Xyn7c (pH 8.0) 보다는 낮은 pH 이지만, *P. curdolanolyticus* B-6 [19]의 Xyl10A (pH 7.0)와 *P. campinasensis* BL11 [13]의 XylIX (pH 7.0) 등과는 비슷한 결과이다. 다양한 반응 온도에서의 자일라네이즈 활성 측정 결과, 45°C에서 최대 활성이 관찰되었고 50°C에서도 비교적 높은 활성(최대 활성의 약 90%)이 유지되었다(Fig. 3B). 이러한 최적반응 온도는 기존에 연구된 *P. campinasensis* G-1의 XynG1-1 (60°C), *Paenibacillus* sp. 12-11의 Xyn7c (55°C), 그리고 *P. curdolanolyticus* B-6의 Xyl10A (60°C) 등과 비교하여 낮은 온도이다.

균주 HX-1 자일라네이즈에 의한 자일란 분해산물을 TLC로 분석한 결과, 본 HX-1 자일라네이즈는 xylobiose를 주요한 최종산물로 생산하는 전형적인 endo- β -1,4-xylanase의 일종으로 판단되었다(Fig. 4). Xylobiose를 포함하는 xylooligosaccharide는 항산화 활성, 항박테리아 활성, prebiotic 활성 등 다양한 생리적 활성이 보고되어, 식품 첨가제, 사료 첨가제, 제약 및 화장품 산업 등에 널리 사용될 수 있다[3]. 이러한 점에서 균



Fig. 4. Thin layer chromatogram of the hydrolyzed product of beechwood xylan by HX-1 xylanase.

The enzyme reaction was carried out at 45°C for 24 h in 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0) containing 0.2% beechwood xylan and crude xylanase, and then the hydrolyzed products were separated on a Silica Gel 60 TLC plate. X1, xylose; X2, xylobiose; X4, xylotetraose; S, hydrolyzed product.

주 HX-1이 생산하는 자일라네이즈는 추후 연구를 통해 위에서 언급한 다양한 산업 분야에도 활용이 가능할 것으로 기대된다. 또한 최종 산물인 xylobiose는 β -xylosidase에 의해서 xylose 단당으로 완전 분해될 수 있는데, 이 단당은 효모에 의한 에탄올 발효를 위한 좋은 원료로 사용될 수 있다. 따라서 균주 HX-1은 plant biomass를 원료로 하고 미생물유래 효소를 이용하는 친환경적 바이오에너지 생산에도 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

요약

균주 HX-1은 토양샘플로부터 분리된 자일라네이즈 생산 미생물로서 16S rRNA 유전자 염기서열 분석과 이를 이용한 phylogenetic tree 제작을 통하여 *Paenibacillus* 속의 한 종으로 동정되었다. 그러나 HX-1 균주가 계통발생적 연관관계가 높은 기존에 알려진 표준균주들과는 상당히 다른 생리적-생화학적 특성을 나타내는 사실로부터 HX-1이 신아종일 것으로 판단하고, *Paenibacillus* sp. HX-1으로 명명하였다. 균주 HX-1로부터의 자일라네이즈 생산을 증가시키는 배지 조건을 탐색하여 최적화된 TNX 배지(1% bacto tryptone, 0.7% 자일란, 1% NaCl; pH 7.0)에서 약 7.4배에 달하는 자일라네이즈 생산량의 증가가 가능하였다. 균주 HX-1이 분비하는 자일라네이즈는 pH 7.0과 45°C에서 최적의 효소활성을 나타냈으며, beechwood 자일란을 기질로 하는 효소반응으로부터 xylobiose를 최종산물로 생산하는 endo- β -1,4-

xylanase임을 확인하였다. 본 연구로부터 동정된 *Paenibacillus* sp. HX-1은 다양한 산업에 응용이 가능한 새로운 자일라네이즈를 제공할 수 있는 중요한 균으로 사료된다.

Acknowledgments

This work was supported by Grant No. 2012-R1A1B3002174 from the Basic Research Program of the National Research Foundation (KRF) of Korea.

References

1. Ali MK, Rudolph FB, Bennett GN. 2005. Characterization of thermostable Xyn10A enzyme from mesophilic *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 12-18.
2. Amaya-Delgado L, Mejia-Castillo T, Santiago-Hernandez A, Vega-Estrada J, Amelia FGS, Xoconostle-Cazares B, et al. 2010. Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*. *Bioresour. Technol.* **101**: 5539-5545.
3. Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanase and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
4. Chi W-J, Park DY, Park J-S, Hong S-K. 2012. Isolation and characterization of a xylanolytic bacterium, *Bacillus* sp. MX47. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 419-423.
5. Chi W-J, Park DY, Chang Y-K, Hong S-K. 2012. A novel alkaliphilic xylanase from the newly isolated mesophilic *Bacillus* sp. MX47: production, purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **168**: 899-909.
6. Chun JS, Lee JH, Jung YY, Kim MJ, Kim SI, Kim BK, et al. 2007. Extaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259-2261.
7. Felsenstein J. 2009. PHYLIP (phylogeny inference package), v3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences. University of Washington, Seattle, USA.
8. Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95-98.
9. Heo S, Kwak J, Oh HW, Park DS, Bae KS, Shin DH, et al. 2006. Characterization of an extracellular xylanase in *Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 1753-1759.
10. Ito Y, Tomita T, Roy N, Nakano A, Sugawara-Tomita N, Watanabe S, et al. 2003. Cloning, expression, and cell surface localization of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 5, a multidomain xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6969-6978.
11. Kim DY, Han MK, Park DS, Lee JS, Oh HW, Shin DH, et al. 2009. Novel GH10 xylanase, with a fibronectin type 3 domain,

- from *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13, a bacterium in the gut of *Eisenia fetida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7275-7279.
12. Kimura M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, UK.
 13. Ko CH, Tsai CH, Tu J, Lee HY, Kua LT, Kuod PA, *et al.* 2010. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochem.* **45**: 1638-1644.
 14. Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.
 15. Mesbah M, Premachandran U, Whitman WB. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 159-167.
 16. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 17. Miller L, Berger T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. Hewlett-Packard Application note. pp. 228-241.
 18. Ratanakhanokchai K, Kyu KL, Tanticharoen M. 1999. Purification and properties of a xylan-binding endoxylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain K-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 694-697.
 19. Rattiya W, Pason P, Kyu KL, Sakka K, Kosugi A, Mori Y, *et al.* 2009. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a multidomain endo- β -1,4-xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and characterization of the recombinant enzyme. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 277-285.
 20. Sánchez MM, Fritze D, Blanco A, Spröer C, Tindall BJ, Schumann P, *et al.* 2005. *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 935-939.
 21. Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
 22. Sasser M. 1997. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
 23. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 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.
 24. Valenzuela SV, Daiz P, Pastor FIJ. 2010. Recombinant expression of an alkali stable GH 10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.* **58**: 4814-4818.
 25. Watanabe S, Viet DN, Kaneko J, Kamio Y, Yoshida S. 2008. Cloning, expression and transglycosylation reaction of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 951-958.
 26. Zhang J, Matti SA, Terhi P, Ming T, Maija T, Liisa V. 2011. Thermostable recombinant xylanases from *Nonomuraea flexuosa* and *Thermoascus aurantiacus* show distinct properties in the hydrolysis of xylans and pretreated wheat straw. *Biotechnol. Biofuels* **4**: 12-25.
 27. Zhao Y, Meng K, Luo H, Yang P, Shi P, Huang H, *et al.* 2011. Cloning, expression, and characterization of a new xylanase from alkalophilic *Paenibacillus* sp. 12-11. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 861-868.
 28. Zheng H, Liu Y, Liu X, Wang J, Han Y, Lu F. 2012. Isolation, purification, and characterization of a thermostable xylanase from a novel strain, *Paenibacillus campinasensis* G1-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 930-938.