

제주도 토양에서 분리한 xylanase 생산 균주 *Streptomyces glaucescens* subsp. WJ-1의 동정 및 효소의 생화학적 특성 연구

김다솜¹, 정성철², 배창환¹, 지원재^{1*}

¹국립생물자원관 생물자원활용부 유용자원분석과

²국립산림과학원 난대·아열대산림연구소

Received: November 8, 2016 / Revised: January 9, 2017 / Accepted: January 10, 2017

Identification and Biochemical Characterization of Xylanase-producing *Streptomyces glaucescens* subsp. WJ-1 Isolated from Soil in Jeju Island, Korea

Da Som Kim¹, Sung Cheol Jung², Chang Hwan Bae¹, and Won-Jae Chi^{1*}

¹Biological and Genetic Resources Assessment Division, National Institute of Biological Resources, Incheon 22689, Republic of Korea

²Warm-temperature and Subtropical Forest Research Center, Korea Forest Research Institute, Jeju 63582, Republic of Korea

A xylan-degrading bacterium (strain WJ-1) was isolated from soil collected from Jeju Island, Republic of Korea. Strain WJ-1 was characterized as a gram-positive, aerobic, and spore-forming bacterium. The predominant fatty acid in this bacterium was *anteiso*-C_{15:0} (42.99%). A similarity search based on 16S rRNA gene sequences suggested that the strain belonged to the genus *Streptomyces*. Further, strain WJ-1 shared the highest sequence similarity with the type strains *Streptomyces spinoveruucosus* NBRC 14228, *S. minutiscleroticus* NBRC 13000, and *S. glaucescens* NBRC 12774. Together, they formed a coherent cluster in a phylogenetic tree based on the neighbor-joining algorithm. The DNA G+C content of strain WJ-1 was 74.7 mol%. The level of DNA-DNA relatedness between strain WJ-1 and the closest related species *S. glaucescens* NBRC 12774 was 85.7%. DNA-DNA hybridization, 16S rRNA gene sequence similarity, and the phenotypic and chemotaxonomic characteristics suggest that strain WJ-1 constitutes a novel subspecies of *S. glaucescens*. Thus, the strain was designated as *S. glaucescens* subsp. WJ-1 (Korean Agricultural Culture Collection [KACC] accession number 92086). Additionally, strain WJ-1 secreted thermostable endo-type xylanases that converted xylan to xylooligosaccharides such as xylotriose and xylo-tetraose. The enzymes exhibited optimal activity at pH 7.0 and 55°C.

Keywords: Xylanase, *Streptomyces glaucescens*, identification, characterization, phylogenetic analysis

서론

Xylan은 식물체 세포벽의 약 20–40%를 차지하는 hemicellulose의 주요 구성 성분이며, 주로 arabinosyl기, acetyl기, glucuronosyl기 등으로 치환된 xylose 단위체가 β-1,4 결합으로 연결된 복잡한 구조를 형성한다. 자연계에 존재하는 xylan은 활엽수에서 acetylated xylan으로 존재하고, 침엽수에서는 arabinoxylan으로 존재한다[1]. Hemicellulose의 구

성성분 중에서 xylan의 비중은 떡갈나무에서 약 60–80%, 보릿짚 및 벼짚에서 30–35% 정도가 존재한다고 보고되어 있다. 따라서 식물체 유래 바이오매스의 가수분해는, 자연계에 거대한 양으로 존재하는 hemicelluloses 계 물질을 유용하게 사용하기 위한 가장 중요한 공정이다. Xylan의 화학적 분해는 쉽고 빠르게 분해할 수 있는 장점으로 산업적으로 널리 사용되고 있으나, 이 방법은 반친환경적이고 공정에서 발생한 독성물질의 중화에 소비되는 비용적 부담이 단점이다[2]. 이에 비해, xylanase에 의한 xylan의 효소적 가수분해는 보다 선택적이며 특이적으로 가수분해가 가능하고 친환경적인 방법이기 때문에 화학적 처리법을 대체할 수 있는 차세대 공정으로 주목받고 있다[3].

*Corresponding author

Tel: +82-32-590-7113, Fax: +82-32-590-7472

E-mail: wjchi76@korea.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Xylan은 β -1,4-endoxylanases (EC 3.2.1.8)와 β -xylosidase (EC 3.2.1.37)에 의해서 기본 골격이 충분히 분해되지만, 완전한 가수분해를 위해서는 다양한 side chain 방출 효소인 β -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55), β -D-glucuronidase (EC 3.2.1.1), acetyl xylan esterase (EC 3.2.11.6) 등과의 공동 작용이 필요하다[4]. Xylanase는 펄프에 붙어 있는 hemicellulose를 제거하기 위한 pulp-prebleaching 과정, 가축사료의 소화 촉진 개선, 식품 및 제빵 첨가물, 과일 및 채소 가공 과정, 에탄올 및 자일리톨 생산, 제지 분야 등의 다양한 분야에 이용되고 있는데, 각 분야에 적합한 xylanase의 특성에 관한 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는, 산업적으로 유용한 미생물 유래 xylanase를 탐색하기 위해 토양으로부터 높은 xylanase 활성을 갖는 미생물을 분리·동정하였고 분리한 미생물이 생산하는 xylanase의 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Xylanase 생산 미생물의 분리

제주도 송악산에서 썩은 나무조각들이 섞여 있는 토양 샘플을 수집하여 멸균수에 10^{-1} – 10^{-5} 으로 희석하였다. 희석액을 각각 100 μ l씩 0.2% Azurine-crosslinked (AZCL) xylan (Sigma, USA)이 함유된 Luria-Bertani (LB) 고체배지에 도말한 후 40°C에서 48시간 배양하였다. 콜로니 주변에 푸른색을 형성하는 균을 회수하여 0.2% beechwood xylan이 함유된 새로운 LB 배지에 계대한 후 40°C에서 배양하였다. AZCL-xylan은 β -1,4-endoxylanase에 의해서 분해되면 푸른색을 나타내는 성질이 있다. 0.2% beechwood xylan이 함유된 LB 배지에서 효소활성은 congo red 용액(Sigma, USA)으로 염색하여 관찰하였다. 최종적으로 xylanase 활성이 가장 강한 균주를 선택하여 본 연구에 사용하였다. 선택된 균주는 WJ-1로 명명하였다.

균주 WJ-1의 형태적·생리적 특성 분석

그람 염색은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 제시된 방법에 따라 균체를 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다. 생리학적 특성은 API 20NE와 API ZYM kit (Biomérieux, France)를 사용하여 제시된 방법에 따라 조사하였다. 단, 배지는 kit에서 제공된 AUX 배지에 trace element [5]와 NaCl (최종 농도 1%)을 첨가하여 사용하였다. 동정된 균의 성장에 미치는 pH, NaCl 농도, 온도 조건 등을 조사하였다. 우선, WJ-1 균주는 pH 4.0–10.0 (pH 1.0의 간격)의 고체배지에 접종하여 40°C에서 5일간 배양하여 성장을 관찰하였다. 성장에 미치는 온도의 영향은 접종 후 4, 20, 30, 37, 40, 50, 55°C의 조건에서 5일간 배양하여 판단하였다. 균주

WJ-1의 성장에 미치는 배지내 NaCl 농도는 동정된 균을 0–20% (1% 간격) NaCl이 포함된 고체배지에 접종하여 40°C에서 5일간 배양하여 관찰하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 해독 및 계통수 제작

균주 WJ-1을 LB 액체배지에 접종하여 40°C에서 2일간 배양한 후 액체배양액을 10,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체로부터 genomic DNA Extraction kit (DyneBio, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 균주 WJ-1의 16S rRNA 유전자는 bacterial universal primer (27F와 1492R)를 사용하여 genomic DNA로부터 증폭하였고[6], 증폭된 유전자 단편의 염기서열 분석은 Genotech (Daejeon, Korea)에 의뢰하여 수행하였다. 균주 WJ-1의 16S rRNA 유전자 염기서열 결과는 GenBank에 JN578483으로 등록하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 염기서열의 상동성 검사는 BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 사용하여 수행하였고, 표준 균주(type strain)들과의 유사성(similarity) 조사 및 관련된 분류군의 16S rRNA 유전자 염기서열의 확보는 EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>)에서 수행하였다[7]. Multialignment는 ClustalW software [8]를 사용하여 수행하였고, 5' 및 3'의 gap은 BioEdit program [9]를 사용하여 편집하였다. 균주 WJ-1에 대한 phylogenetic tree는 PHYLIP suit program [10]을 사용한 Neighbor-Joining (NJ)법[11]과 Maximum Parsimony (MP)법[12]으로 작성하였다. Bootstrap value는 1,000회의 재구성된 자료로부터 계산되었고, evolutionary distance matrices는 Kimura's two-parameter model [13]의 algorithm에 따라서 계산하였다.

균주 WJ-1의 생화학적 특성 분석

균주 WJ-1의 지방산 분석은 Miller 등[14]의 방법에 준하여 methyl ester화 시킨 fatty acid methyl esters (FAME) mixture를 제작한 후, Microbial Identification system (MIDI)의 지침에 따라 gas chromatography (GC)를 사용하였다[15]. Genomic DNA 내 G+C content는 Meshbah 등 [16]에 의해서 제시된 방법에 따라 reverse phase HPLC를 사용하여 분석하였다. 퀴논은 Komagata 등의 방법[17]에 따라서 reverse phase HPLC를 사용하여 분석하였다.

DNA-DNA hybridization

DNA-DNA hybridization (DDH) 분석을 위해서, 균주 WJ-1와 16S rRNA 유전자 염기서열 상동성 및 계통분석발생적 유연관계가 가장 높은 표준 균주 *Streptomyces spinoveruucosus* NBRC14228, *S. minutiscleroticus*

NBRC13000, *S. glaucescens* NBRC12774, *S. glaucescens* NBRC12774를 LB 고체배지에서 배양하고 각 균체로부터 genomic DNA를 DNA Extraction Kit로 추출하여 준비하였다. Negative standard는 *E. coli* KCCM12119 DNA를 사용하였다. 탐침용 DNA 준비 및 hybridization 반응은 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Germany)를 사용하여 수행하였다. Hybridization signal은 Quantity One Program (Bio-rad, USA)으로 측정하였고, 균주 WJ-1의 signal을 100%로 하여 hybridization 정도를 환산하였다. 각 균주들에 대한 hybridization 값은 세 번의 반복 실험을 통하여 얻은 평균값으로 표시하였다.

균주 WJ-1의 성장 및 xylanase 생산 측정

균주 WJ-1을 LB 액체배지, 0.2% beechwood xylan이 포함된 LB 액체배지(LBX), 0.2% glucose가 포함된 LB 액체배지(LBG) 등에 접종한 후 40°C에서 4일간 진탕 배양하였다. 세포배양액은 일정한 간격으로 채취하여 균의 성장을 흡광도 600 nm에서 측정하였고, 균체 배양액을 10,000 × g에서 20분간 원심분리 후 균체를 제거한 상등액을 회수하여 세포 외로 분비 생산된 xylanase 활성을 측정하였다. Xylanase 활성은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법[18]에 따라 수행하였으며, 흡광도 540 nm에서 효소 반응으로 유리되는 환원당의 양을 측정하였다. 효소활성의 1 U (unit)는 beechwood xylan으로부터 1분간 1 μmol의 xylose를 생산하는 효소의 양으로 기준하였다.

Xylanase 효소의 생화학적 특성

균주 WJ-1이 세포외부로 분비하는 xylanase의 효소 반응을 위한 최적 조건을 조사하기 위해서, 균주 WJ-1의 24시간 배양액에 (NH₄)₂SO₄를 최종 농도 70%가 되도록 첨가하여 단백질을 농축, 침전시킨 후 10 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)으로 투석하여 조효소액을 준비하였다. 준비된 조효소액을 사용하여 최적 반응 pH, 최적 반응 온도, 온도 안정성 등을 조사하였다. 최적 반응 pH 조건 탐색은 다양한 pH 완충액 - 20 mM MOPS 완충액(pH 6.0과 7.0), 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0-9.0, pH 1.0 간격)을 사용하여 40°C에서 효소 반응을 수행하였다. 반응 최적 온도조건의 탐색은 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)을 사용하였고 40-70°C (5°C 간격)에서 반응을 수행하였다. 균주 WJ-1이 생산하는 xylanase의 온도 안정성은, 조효소액을 60-70°C (5°C 간격)에서 2시간 동안 열처리하면서 일정한 시간 간격으로 효소액을 샘플링하여 잔존 효소활성을 최적온도인 55°C에서 30분간 반응을 유도하여 확인하였다.

반응산물의 Thin layer chromatography 분석

균주 WJ-1이 생산하는 xylanase에 의한 xylan의 가수분해산물을 thin layer chromatography (TLC)로 분석하였다. 조효소액을 0.5% xylan이 함유된 20 mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충액에 첨가하여 55°C에서 48시간 반응시켰다. 효소반응 동안에 일정한 간격으로 효소반응액을 샘플링하여 Silica gel 60 plate (Merck, Germany)에 점적하였다. 전개용매는 n-부탄올:아세트산:증류수(2:1:2) 혼합물을 사용하였으며, 발색시약은 에탄올:황산(9:1) 혼합액을 사용하였다. 전개 후 발색시약을 골고루 분사하고 120°C에서 가열하여 분해산물을 확인하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 생산 균주 WJ-1의 분리 및 형태적 특성

Xylan 분해능을 보이는 균주 중 가장 분해능력이 탁월한 균주를 선별하여 WJ-1로 명명하고(Fig. 1A), Korean Agricultural Culture Collection (KACC)에 *Streptomyces glaucescens* subsp. WJ-1 (KACC 92086)으로 기탁하였다. 균주 WJ-1은 그람 양성균이며, 고체배지의 형태 관찰 및 현미경 관찰결과 포자를 형성하는 것으로 확인되었다. 균주 WJ-1은 0-7% 사이의 NaCl 농도에서는 자라는 반면, NaCl 농도가 8% 이상에서는 자라지 않았다. 또한 20-50°C에서 활발한 성장이 관찰되었고, 55°C에서는 약한 성장, 그 이상 온도에서는 성장이 관찰되지 않았다. 균주 WJ-1은 ISP-2, IPS-4, YMPD, R2YE 등의 고체배지에서는 흰색의 기균사 및 회색의 포자를 형성하는 반면, LB 고체배지 및 xylan 함유 LB 고체배지에서는 기균사와 포자를 형성하지 못하는 것으로 관찰되었다. 균주 WJ-1의 배지별 형태분화의 특성은 Table 1에 정리하였다.

균주 WJ-1의 생리적 특성

균주 WJ-1의 API ZYM strip을 이용한 효소생산분석 결과는 Table 2에 비교하였고, API 20NE strip을 이용한 효소 생산 및 탄소원의 이용에 관한 관찰 결과는 Table 3에 나타내었다. 균주 WJ-1의 주요 cellular fatty acid는 C_{15:0} anteiso (42.99%)이며, 기타 분석한 cellular fatty acid 성분을 Table 4에 나타내었다.

균주 WJ-1의 계통발생학적 연관관계 규명

균주 WJ-1의 16S rRNA 유전자 염기서열은 PCR 법으로 증폭된 유전자 단편(1,422 bp)를 분석하여 결정하였으며, GenBank에 JN578483으로 등록하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 EzTaxon database에 등록되어 있는 표

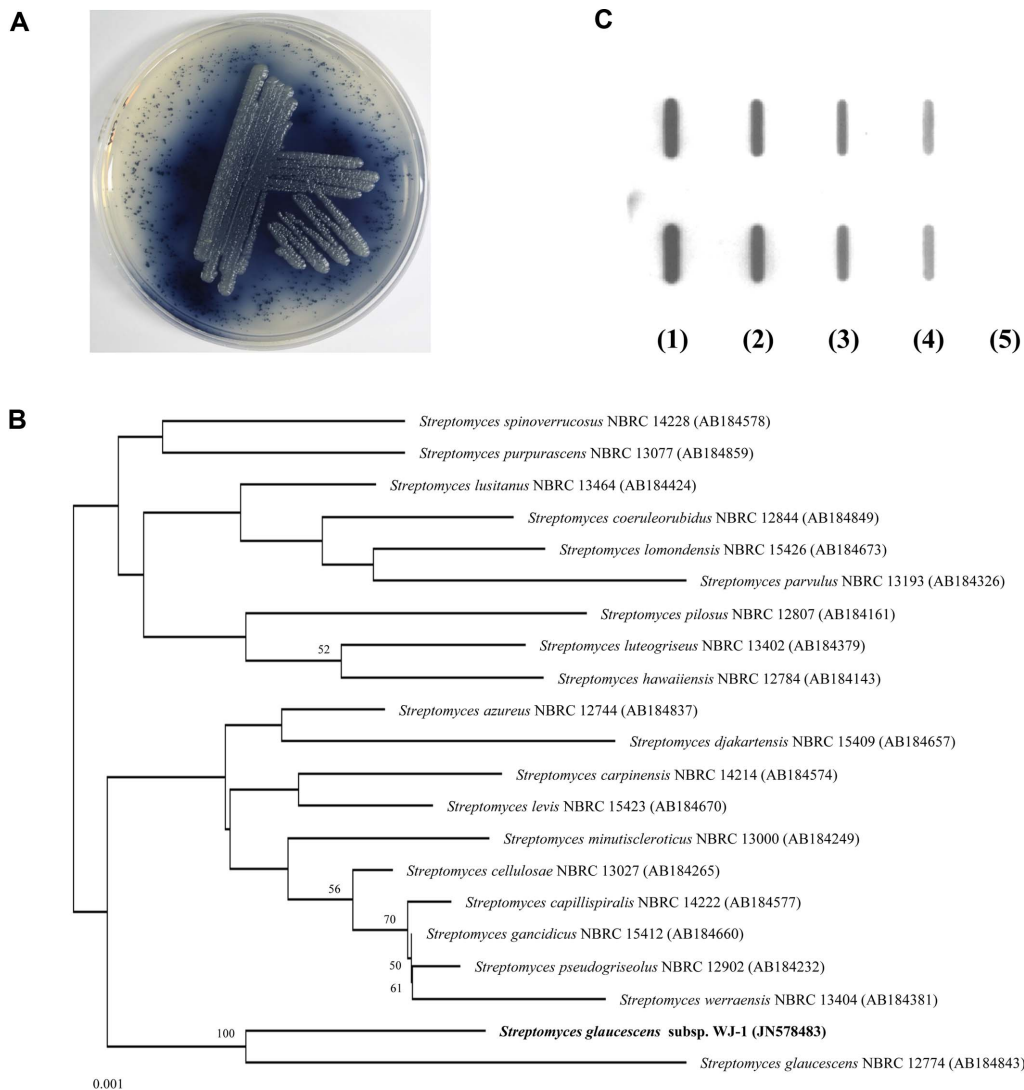


Fig. 1. Isolation of strain WJ-1. (A) Xylanase activity on agar plate. Strain WJ-1 was cultured on LB agar plate supplemented with 0.2% AZCL-xylan at 40 °C for 3 d. (B) Neighbor-Joining phylogenetic tree. The tree was constructed based on 16S rRNA gene sequences. Distances was determined according to the Kimura's two-parameter model and bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates are listed as percentages at nodes. Nucleotide sequence accession numbers are given in parentheses. Scale bar, 0.001 substitutions per 100 nucleotides. (C) DNA-DNA hybridization analysis. The values obtained from self hybridization of WJ-1 were taken to be 100%. (1), WJ-1; (2), *S. glaucescens* NBRC12774; (3), *S. spinoverrucosus* NBRC14228; (4), *S. minutiscleroticus* NBRC13000; (5), *E. coli* KCCM12119 as the negative control.

Table 1. Growth and phenotype of strain WJ-1 on different media.

Media	Growth	Spore mass	Substrate mycelium	Aerial mycelium	Soluble pigments
LB	Good	None	Beige	None	None
LBX	Good	None	Beige	None	None
ISP-2	Good	Abundant, gray	Beige	White	None
ISP-4	Good	Abundant, gray	Beige	White	None
YMPD	Good	Abundant, gray	Beige	White	None
R2YE	Good	Abundant, gray	Beige	White	None

Strain WJ-1 was cultured on different medium at 40 °C for 5 d. LBX is LB medium supplemented with 0.2% (w/v) xylan.

Table 2. Determination of enzymatic activity of strain WJ-1 by API ZYM kit.

Enzyme	Result
Alkaline phosphatase	+
Esterase (C4)	-
Esterase (C8)	+
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	v
Cystine arylamidase	-
Trypsin	-
α -chymotrypsin	-
Acid phosphatase	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -galactosidase	+
β -galactosidase	+
β -glucuronidase	-
α -glucosidase	+
β -glucosidase	+
N-acetyl- β -glucosaminase	+
α -mannosidase	+
α -fucosidase	-

Symbols: +, positive; -, negative; v, very weak positive.

Table 3. Determination of chemotaxonomic characteristics of strain WJ-1 by API 20NE kit.

Reaction	Result
Enzymes	
Reduction of nitrates to nitrites	-
Indole production	-
Glucose fermentation	-
Arginine dihydrolase	-
Urease	-
Esculin hydrolysis (β -glucosidase)	+
Gelatin hydrolysis (protease)	+
β -galactosidase	+
Assimilation	
Glucose	+
Arabionose	+
Mannose	+
Mannitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Potassium gluconate	+
Capric acid	-
Adlpic acid	-
Malate	+
Trisodium citrate	+
Phenylacetic acid	-

Symbols: +, positive; -, negative.

Table 4. The cellular fatty acid composition (%) of strain WJ-1.

Fatty acid	WJ-1
C _{13:0} iso	2.10
C _{13:0} anteiso	0.71
C _{14:0}	1.25
C _{15:0} iso	8.06
C _{15:0} anteiso	42.99
C _{15:0}	2.09
C _{16:1} iso H	0.99
C _{16:0} iso	8.43
C _{16:0} cis 9	5.71
C _{16:0}	9.32
C _{16:0} 9-methyl	0.92
C _{17:1} anteiso C	2.28
C _{17:0} iso	1.77
C _{17:0} anteiso	13.38

준균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과의 상동성 조사 결과, WJ-1은 *S. spinoveruucosus* NBRC14228 (99.225%), *S. minutiscleroticus* NBRC13000 (99.156%), *S. glaucescens* NBRC12774 (99.015%), *S. purpurascens* NBRC13077 (99.015%), *S. lusitanus* NBRC13464 (99.015%), *S. gancidicus* NBRC15412 (99.015%) 등의 방선균속의 표준균주들과 99% 이상의 높은 상동성을 보였다. PHYLIP suit 프로그램의 NJ 법을 사용하여 phylogenetic tree를 제작한 결과, 균주 WJ-1은 *S. glaucescens* NBRC 12774와 독립된 branch (100% bootstrap value)를 형성하였다(Fig. 1B). 이는 MP 프로그램을 이용한 tree에서도 동일하였다(결과 미제시).

균주 WJ-1 유전체의 G+C 농도는 74.7 mol%로 측정되었는데 일반적으로 *Streptomyces* 속에 속하는 미생물의 경우 70-90%에 이르는 높은 G+C 농도를 갖는 것으로 보고되고 있다.

균주 WJ-1은 형태적 특성뿐만 아니라 유전학적 특성을 통해서 방선균속에 속하는 균으로 판단되었으며, 그 중에서 *S. glaucescens* NBRC 12774, *S. spinoveruucosus* NBRC14228, *S. minutiscleroticus* NBRC13000 등과 16S rRNA 유전자 염기서열상의 상동성이 가장 높았다. 따라서 상동성이 가장 높은 3종의 표준균주 *S. glaucescens* NBRC 12774, *S. spinoveruucosus* NBRC14228, *S. minutiscleroticus* NBRC13000을 대조균주로 선택하여 균주 WJ-1과의 DNA-DNA hybridization (DDH)을 수행하였다.

DNA-DNA hybridization 분석

DDH 분석 결과, 균주 WJ-1은 *S. glaucescens* NBRC 12774와 85.7%, *S. spinoveruucosus* NBRC14228와 55.3%, *S. minutiscleroticus* NBRC13000와 39.3%의 DNA

hybridization 값을 보였다(Fig. 1C). 일반적으로 DDH 값이 70~90%일 때 새로운 아종(subspecies)으로 간주되며, 그 값이 90% 이상일 때는 같은 종으로 간주되고, 70% 이하일 때는 다른 종으로 간주된다[19]. 따라서, 본 연구에서 수행된 16S rRNA 유전자 염기서열 분석, phylogenetic tree 제작, DDH 분석 및 형태학적·생리학적 특성 분석 등의 결과들로부터 균주 WJ-1은 *S. glaucescens*의 아종으로 결론하고, 균주 WJ-1을 *S. glaucescens* subsp. WJ-1로 명명하였다. *S. glaucescens*는 1958년 Pridham 등[20]에 의해서 처음 동정된 후 현재까지 아종이 보고된 바가 없다.

균주 WJ-1의 액체배지에서의 성장 및 xylanase 생산

WJ-1 균주의 성장은 LB 액체배지에서의 성장과 비교하여 탄소원으로 glucose가 함유된 배지(LBG)에서는 최대 1.3배

($A_{600} = 6.7$) 증가된 반면, xylan이 함유된 배지(LBX)에서는 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2A). 반면, 생산된 xylanase 활성의 경우 LBG 배지에서는 LB 배지와 비슷하였지만 LBX 액체배지에서는 1.8배(21.2 U/ml) 증가하였다(Fig. 2A). 이 결과로부터, WJ-1 균주는 glucose가 제공되면 세포 성장은 촉진되지만 xylanase 생산은 오히려 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 WJ-1의 xylanase는 탄소원으로 xylan이 제공되면 그 생산량이 증가되는 것을 알 수 있었다. 이는 탄소원에 의해서 조절받는 carbon catabolite repression (CCR)에 의한 현상으로 판단된다[3, 21]. 일반적으로 CCR은 glucose 등과 같은 탄소원의 존재시 단백질 생합성이 억제되는 현상을 일컫는데, *Streptomyces* 속의 균주들에서는 효소, 항생제, 생리활성물질 등의 생산이 CCR에 의해서 영향을 받는 것으로 알려져 있다. *S. coelicolor*와 *S. griseus*에서는 glucose

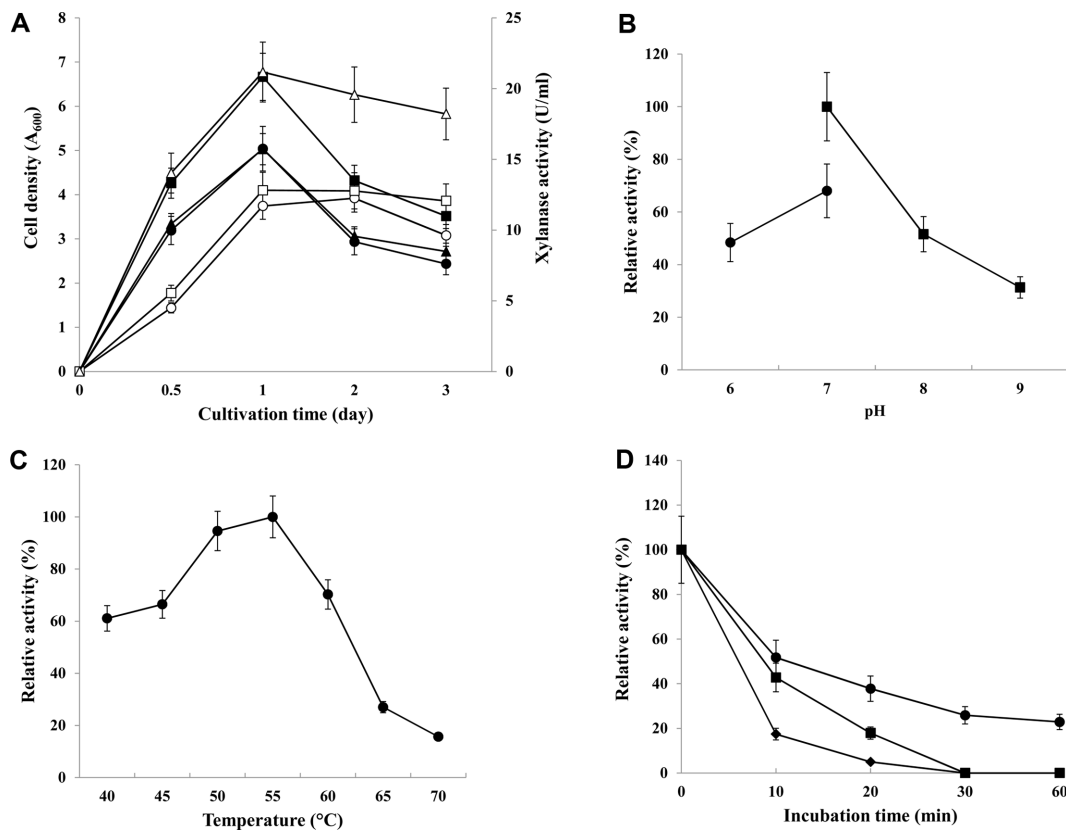


Fig. 2. Enzymatic properties of xylanases secreted by strain WJ-1. (A) Cell growth and xylanase production. Strain WJ-1 was cultured in different liquid medium such as LB, LB supplemented with glucose, and LB supplemented with xylan at 40 °C for 3 d. Cell density and xylanase activity were measured at 600 nm and 540 nm, respectively. ●, cell density in LB; ■, cell density in LB supplemented with glucose; ▲, cell density in LB supplemented with xylan; ○, xylanase activity in LB; □, xylanase activity in LB supplemented with glucose; △, xylanase activity in LB supplemented with xylan. (B) Optimum pH. The reaction was carried out at 40 °C at different pH conditions. The values obtained at pH 7.0 were taken to be 100%. ●, 20 mM MOPS buffer; ■, 20 mM Tris-Cl buffer. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. (C) Optimum temperature. The reaction was carried out at pH 7.0 at different temperatures. The values obtained at 55 °C were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments. (D) Thermostability. The reactions were carried out at different temperatures, 60 °C (●), 65 °C (■), and 70 °C (◆), respectively. The values obtained at zero-incubation time were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments.

kinase에 의해서 매개되는 것으로 보고되어 있다[22]. 특히 *S. coelicolor*의 세포의 agarase인 DagA는 glucose에 의해서 생합성이 억제되는 것으로 보고되어 있다[23]. 따라서 WJ-1 균주의 산업적 발효를 위한 배지를 개발하기 위해서는 glucose 등의 CCR에 관한 탄소원의 선별이 선행되어야 할 것으로 판단된다.

Xylanase 효소의 생화학적 특성

WJ-1 균주의 조효소액을 이용하여 xylan을 기질로 하는 활성염색을 실시하여 최소 4개 이상의 xylanase 활성 band를 확인하였다(결과 미제시). 이러한 조효소액을 이용하여 xylanase 활성을 위한 최적 pH 및 온도 조건을 탐색하였다. 다양한 pH에서 효소반응을 유도하였을 때 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)에서 가장 높은 xylanase 활성이 관찰되었다(Fig. 2B). 20 mM Citrate 완충액(pH 6.0)과 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0)의 조건에서는 최대 활성의 약 50%의 활성이 관찰되었고, 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 9.0)의 조건에서는 약 40%의 활성이 관찰되었다. 따라서 WJ-1 균주가 외부로 분비하는 xylanase 들은 중성 pH 조건에서 활성이 가장 좋은 것으로 판단되었다. 이러한 특성은 다른 방선균으로부터의 xylanase 들에 대한 최적 pH 조건(pH 5.0-7.0)과 유사하였다[3, 24-26]. 20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0)에서 실시한 최적반응 온도 실험 결과, WJ-1 조효소의 xylanase 활성은 55°C에서 최대활성을 나타냈으며, 65°C에서는 최대활성의 70% 활성을 보였다(Fig. 2C). 또한 55°C에서 60분간 방치하였을 때 초기 10분 동안 약 50% 정도의 활성을 잃지만 60분 동안 약 30% 정도의 활성을 유지하는 것으로부터 WJ-1 균주가 생산하는 xylanase는 고온에서 일정시간을 견딜 수 있는 효소로 판단되었다(Fig. 2D). 이와 같이 50°C 이상의 고온에서 내성을 갖는 방선균 xylanase들은 지금까지 소수의 예가 보고되었다[3, 24-26].

반응산물의 Thin layer chromatography 분석

Beechwood xylan을 기질로 사용하여 위에서 결정된 최적 반응조건(20 mM Tris-Cl 완충액(pH 7.0) 및 55°C)에서 수행된 효소반응물을 TLC 법을 이용하여 분석하였다(Fig. 3). 반응 초기부터 주요 반응물로서 xylotriase 및 xylotriase 등이 확인되었다. 이러한 TLC 결과는 일반적인 endo-type xylanase에서 확인되는 패턴이지만, 앞에서 언급하였듯 활성염색에서 4개 이상의 xylanase 활성을 보이는 단백질 band가 포함된 조효소를 이용한 효소반응인 점을 감안하면 조효소내 각각의 xylanase의 순수정제를 통한 특성 규명이 이뤄져야 할 것으로 판단된다. 효율적인 바이오매스 이용을 위해서는 xylanase를 이용하여 xylan을 완전 분해하는 것도 중요하지만, 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고된 xylotriase

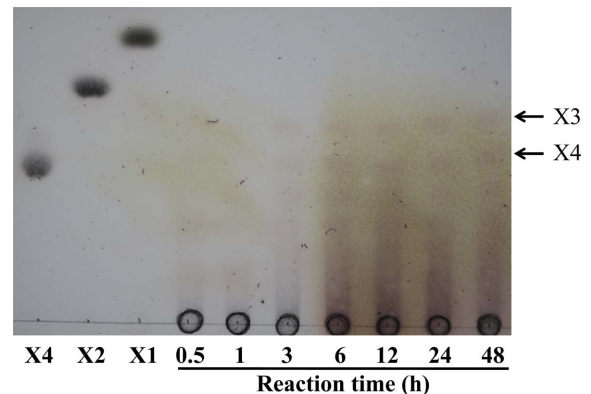


Fig. 3. Thin layer chromatography analysis. The reaction was performed in 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0) at 55°C for 48 h. X1, xylose; X2, xylobiose; X4, xylotriase.

및 xylotriase 등의 xylooligosacchades (XOSs)의 생산에 xylanase를 이용하는 공정도 산업적으로 유용할 것으로 예상된다[27]. 따라서, 본 연구를 통해서 확보된 새로운 생물자원인 WJ-1 균주로부터 생산되는 xylanase의 기능 연구 및 대량발현 시스템을 구축한다면 향후 바이오산업에 응용 가능하리라 판단된다.

요약

본 연구로부터 WJ-1 균주는 제주도에서 수집된 토양샘플로부터 동정되었는데, 형태분화관찰 및 16S rRNA 유전자 염기서열분석과 DNA-DNA hybridization 분석을 통하여 *S. glaucescens*의 신아종으로 분류되었다. 균주 WJ-1의 주요 cellular fatty acid와 게놈내 G+C 농도는 각각 C_{15:0} anteiso (42.99%)와 74.73 mol%였다. 이 균은 배양액으로부터 준비된 조효소액의 xylanase 활성은 중성 pH 조건 및 55°C에서 활성이 가장 높았다. *S. glaucescens*의 조효소액을 이용하여 xylan으로부터 xylotriase 및 xylotriase를 포함하는 xylooligosaccharide를 제조할 수 있다. 본 연구는 *S. glaucescens*의 아종에 관한 최초의 보고이며, 관련 종에서 xylanase 활성에 관한 최초의 보고이다. 본 연구 결과로부터, WJ-1 균주는 lignocellulosic biomass의 이용 및 기능성 xylooligosacchade 생산에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the National Institute of Biological Resources (NIBR), funded by the Ministry of Environment (MOE) of the Republic of Korea (NIBR201629101).

References

- Subramaniyan S, Prema P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: Enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33-64.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
- Bajaj BK, Singh NP. 2010. Production of xylanase from an alkali-tolerant *Streptomyces* sp. 7b under solid-state fermentation, its purification, and characterization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162**: 1804-1818.
- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophile xylanases. 2005. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 3-23.
- Kieser H, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. 2000. Practical *Streptomyces* genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541-555.
- Chun J, 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.
- Thomson 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.
- 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.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Kluge AG, Farris FS. 1969. Quantative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- Kimura M. 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Miller L, Berger T. 1985. Bacterial identification by gas chromatography of whole cell fatty acid. *Hewlett-Packard Application note*. pp. 228-241.
- Sasser M. 1990. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Inc., Newark, DE, USA.
- 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.
- Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Van Trappen S, Tan TL, Yang J, Mergaert J, Swings J. 2004. *Altermonas stellipolaris* sp. nov., a novel, budding, prosthecate bacterium from Antarctic seas, and emended description of the genus *Altermonas*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1157-1163.
- Pridham, TG, Hesseltine CW, Benedict RG. 1958. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups; placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* **6**: 52-79.
- Virupakshi S, Babu KG, Gaikwad SR, Naik GR. 2005. Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. *Proc. Biochem.* **40**: 431-435.
- Miyazono K, Tabei N, Morita S, Ohnishi Y, Horinouchi S, Tanokura M. 2012. Substrate recognition mechanism and substrate-dependent conformational changes of an ROK family glucokinase from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **194**: 607-616.
- Angell S, Lewis CG, Buttner MJ, Bibb MJ. 1994. Glucose repression in *Streptomyces coelicolor* A3(2): a likely regulatory role for glucose kinase. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 135-143.
- Georis J, Giannotta F, Buyl ED, Granier B, Frere JM. 2000. Purification and properties of three endo- β -1,4-xylanases produced by *Streptomyces* sp. strain S38 which differ in their ability to enhance the bleaching of kraft pulps. *Enz. Microbiol. Technol.* **26**: 178-186.
- Ninawe S, Kapoor M, Kuhad RC. 2008. Purification and characterization of extracellular xylanase from *Streptomyces cyaneus* SN32. *Bioresour. Technol.* **99**: 1252-1258.
- Wang SL, Yen YH, Shih IL, Chang AC, Chang WT, Wu WC, et al. 2003. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enz. Microbiol. Technol.* **33**: 917-925.
- 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.