

대한민국 제주도 연안 해수에서 새롭게 분리한 *Aestuuriibacter* sp. PX-1이 생산하는 자일라네이즈의 생화학적 특성

김종희*

서일대학교 식품영양학과

Received: January 14, 2020 / Revised: February 29, 2020 / Accepted: March 3, 2020

Biochemical Characterization of an Extracellular Xylanase from *Aestuuriibacter* sp. PX-1 Newly Isolated from the Coastal Seawater of Jeju Island in Korea

Jong-Hee Kim*

Department of Food and Nutrition, Seoil University, Seoul 02192, Republic of Korea

The marine microorganism PX-1, which can hydrolyze xylan, was isolated from coastal sea water of Jeju Island, Korea. Based on the 16S rRNA gene sequence and chemotaxonomy analysis, PX-1 was identified as a species of the genus *Aestuuriibacter* and named *Aestuuriibacter* sp. PX-1. From the culture broth of PX-1, an extracellular xylanase was purified to homogeneity through ammonium sulfate precipitation and subsequent adsorption chromatography using insoluble xylan. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration chromatography estimated the molecular weight of the purified putative xylanase (XylA) as approximately 64 kDa. XylA showed xylanase activity toward beechwood xylan, with a maximum enzymatic activity at pH 6.0 and 45°C. Through thin-layer chromatographic analysis of the xylan hydrolysate produced by XylA, it was confirmed that XylA is an endo-type xylanase that decomposes xylan into xylose and xyloligosaccharides of various lengths. The K_m and V_{max} values of XylA for beechwood xylan were 27.78 mM and 78.13 $\mu\text{M}/\text{min}$, respectively.

Keywords: *Aestuuriibacter*, xylanase, marine bacterium, phylogenetic analysis, purification

서론

자일란은 자일로스 단위체로 이루어진 다당류이며, 지구 상에서 셀룰로오스 다음으로 가장 풍부하게 존재하는 천연 다당류이다[1]. 이들 고분자화합물은 목재나 벚짚과 같은 육상식물 세포벽을 구성하는 헤미셀룰로오스의 주요 성분이며, 또한 많은 해조류의 세포벽에서도 발견된다. 자일란을 분해할 수 있는 효소는 endo-1,4- β -xylanase, β -xylosidase, α -arabinofuranosidase, acetylxylan esterase로 구성된다[2]. 이 중, 자일라네이즈는 자일란에서 1,4- β -D-자일로시드 결합을 가수 분해하는 효소이다. 자일라네이즈는 펄프 및 제지산업의 biobleaching 공정[3], 동물 성장 촉진을 위한 사료 제

조[4], 식품 및 베이커리 산업을 포함한 다양한 생명공학 및 산업 분야에서 중요하며[5], 특히 헤미셀룰로오스 바이오매스를 연료 및 화학물질로 생물전환하기 위한 청정공정용 효소로서도 많은 관심을 받고 있다[2].

자일라네이즈 효소는 박테리아, 사상균, 효모, 해조류, 갑각류, 원생동물, 곤충 및 달팽이와 같은 다양한 생물체에 의해 생산된다[6]. 이러한 다양한 생물체 중에서도, 미생물은 생육이 빠르고 스케일업이 쉬운 장점이 있어 산업용 효소의 생산 분야에서 월등한 경쟁력을 갖고 있다. 또한, 자일라네이즈의 생명공학분야에서의 중요성이 확대됨에 따라, 미생물을 이용하여 자일라네이즈를 생산하기 위한 연구도 점점 증가하고 있다[5]. 따라서 보다 유용하고 새로운 특성을 가진 새로운 자일라네이즈 효소의 공급원으로서, 신규의 자일라네이즈 생산 균주를 분리하려는 연구가 활발하게 이루어지고 있다[7-10].

본 연구에서는 대한민국 제주도 연안의 해수에서 우수한

*Corresponding author

Tel: +82-2-490-7508, Fax: +82-2-490-7820

E-mail: jonghee@seoil.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

자일란 분해 활성을 갖는 새로운 미생물을 분리하고, 미생물이 생산하는 자일라네이즈의 특성을 규명하고자 하였다. 우리는 북태평양의 제주도 연안 바닷물에서 분리한 자일란 분해 미생물이 *Aestuariibacter* 속에 속하는 미생물임을 밝히고, *Aestuariibacter* 속에서는 처음으로 세포 외로 분비되는 자일라네이즈의 특성을 규명하였다. 본 연구에서 밝힌 새로운 해양 미생물자원과 자일라네이즈 효소는, 헤미셀룰로스의 이용과 식품산업 등에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

Bactopeptone, yeast extract 등 배지 성분은 BD Biosciences사(USA)에서 구매하였고, 분석용 시약은 Sigma-Aldrich 사(USA)에서 구입하였다. Beechwood xylan은 Megazyme (Ireland)에서 구입하였으며, 기타 특별한 재료는 별도로 명시하였다.

자일라나아제를 생산하는 해양 미생물의 분리

자일라나아제 생산 균주 PX-1을 대한민국 제주도 연안의 해수로부터 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 해수 샘플을 멸균 식염수(9 g NaCl in 1 L distilled water)를 사용하여 10^{-3} 에서 10^{-5} 배로 연속 희석하였다. 희석 용액 100 μ l를 0.2% (w/v) beechwood xylan (Sigma-Aldrich)을 첨가한 인공해수 배지(ASW, artificial sea water) 조성[11]을 갖는 평판배지에 도말하고, 40°C에서 3일간 배양하였다. 자일라네이즈 활성을 나타내는 박테리아 콜로니를 시각적으로 구별하기 위해, 2% (w/v) congo red 용액으로 염색하여 콜로니 주변에 자일란 분해환을 형성하는 콜로니를 선별하였다. 자일라네이즈 생산자 후보로 선별된 각 콜로니를 빠르게 성장시키기 위해, ASW 배지에 0.02% yeast extract와 0.3% bactopeptone을 첨가한 ASW-YP 한천 플레이트에 도말하고 28°C에서 1일 동안 배양하였다. 단일 콜로니를 골라 다시 새로운 ASW-YP 플레이트로 옮겨 배양하는 과정을 반복하여, 순수한 배양체를 확보하였다. 분리한 박테리아 균주는 20% (v/v) 글리세롤에 현탁하고, -80°C에서 보관하면서 사용하였다.

16S rRNA 유전자 서열 및 계통발생학적 분석

균주 PX-1의 염색체 DNA는 ASW-YP 액체 배지에서 40°C에서 1일간 배양 한 세포로부터 Genomic DNA preparation kit (DyneBio, Korea)를 사용하여 제조사 지침에 따라 분리하였다. 16S rRNA 유전자는, 염색체 DNA를 주형으로 하고 bacterial universal primers [12]를 사용하여 PCR법으로 증폭하였고, 증폭된 DNA의 유전자 서열은 Genotech 사

(Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems 3730xl DNA 분석기(Applied Biosystems, USA)로 분석하였다. 16S rRNA 유전자 서열을 이용하여 NCBI의 BLAST [13] 검색을 실시하였으며, 그 결과, 균주 PX-1이 *Aestuariibacter* 속에 속함을 예상하였다. 기존에 보고된 표준 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 EzTaxon 서버[14]로부터 수집하고, 관련 균주와의 서열을 Clustal W 소프트웨어를 사용하여 분석하였다[15]. 계통발생도는 PHYLIP 프로그램[16]의 Neighbor-joining (NJ) 방법[17]을 사용하여 구성하였다. 진화상의 거리는 Kimura's-two 파라미터 모델 방법[18]으로 계산하였으며, 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새롭게 tree를 작성하여 계산하였다[19].

PX-1 균주의 형태학적 및 생화학적 특성

미생물의 그람염색은 Gram Stain Kit (Becton Dickinson, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 세포의 형태 및 크기, 편모의 존재 등은 1% phosphotungstic acid 염색 후, 투과전자현미경(JEM1010; JEOL, Japan)으로 관찰하였으며, ASW-YP 평판배지에서 배양하며 대수증식기에 있는 세포를 대상으로 관찰하였다. 미생물 성장 온도 범위는 ASW-YP 평판배지상에서의 성장 유무를 4-50°C에서 배양하여 관찰하였다. 미생물 성장 pH 범위는, 0.1 M HCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 4.0-10.0 범위로 조정된 ASW-YP 평판배지상에서의 미생물의 성장 유무를 40°C에서 배양하여 판별하였다. 미생물의 내염성 범위는 0-20% (w/v) 농도로 NaCl을 첨가한 ASW-YP 평판배지상에서의 미생물의 성장 유무를 40°C에서 배양하여 관찰하였다. 항생제 감수성은 ASW-YP 평판배지 위에서 agar-diffusion method로 측정하였다. 즉, PX-1 현탁액을 도말한 평판배지 위에 항생제액(30 μ l)을 적신 paper disc (직경 5 mm)를 올려 놓고, 항생제에 의한 미생물 성장 억제 여부를 40°C에서 배양하여 판별하였다. 항생제는 ampicillin, kanamycin, thiostrepton, chloramphenicol, neomycin을 각각 100 μ g 농도로 사용하였다. 미생물의 생화학적 특성 및 효소 생산 능력은 API 20NE, API Staph, API ZYM galleries (BioMérieux, France)를 사용하였으며, 시험 방법은 제조사의 지침을 준수하였다. 단, 접종에 사용한 미생물 현탁액은 2% (w/v) NaCl을 첨가한 ASW 혹은 AUX 배지(BioMérieux)를 사용하였다. Fatty acid methyl ester (FEME) 분석은 Microbial Identification (MIDI) system [20]에 제시된 표준 프로토콜을 준수하였다. PX-1 균주의 주요 키는 및 DNA G+C 함량은 역상 HPLC로 분석하였다[21, 22].

세포 성장 및 자일라네이즈 활성 측정

자일라네이즈 생산을 유도하기 위해, PX-1 균주를 0.2%

(w/v) 자일란이 포함된 ASW-YP 액체배지 100 ml (500 ml baffled flask)에 접종하고 40°C에서 3일간 진탕배양 (150 rpm) 하였다. 주기적으로 배양액 1 ml를 채취하여, 분광광도계로 600 nm에서 세포농도를 측정하여 성장곡선을 완성하였다. 배양액을 14,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 자일라네이즈 효소활성을 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하였다[23]. 간략히, 효소액 100 μl를 0.2% (w/v) beechwood xylan을 함유한 20 mM Tris buffer (pH 7.0) 3.9 ml와 섞어 총 4 ml의 반응액을 준비하였다. 40°C에서 10분간 효소반응 후, DNS reagent 용액 (dinitrosalicylic acid 6.5 g, 2 M NaOH 325 ml, glycerol 45 ml in 1 L distilled water) 4 ml를 첨가하였다. 반응액을 10분간 끓는 물에 증탕하고, 얼음물에서 식힌 후 분광광도계로 540 nm에서 자일라네이즈에 의해 분해되어 방출된 환원당의 농도를 측정하였다.

PX-1 균주 배양액으로부터 자일라네이즈 정제

PX-1 균주를 0.2% (w/v) 자일란을 함유한 ASW-YP 액체배지 250 ml (1,000 ml baffled flask)에 접종하고 40°C에서 3일간 진탕배양하였다. 배양액을 14,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 자일라네이즈 정제에 사용하였다. 상등액(230 ml)에 ammonium sulfate를 최종 75% (w/v)가 되도록 조금씩 첨가하고 4°C에서 12시간 방치 후, 20,000 ×g에서 1시간 원심분리 하여 단백질을 침전시켰다. 침전물을 10 ml의 완충액 A (10 mM Tris-Cl, pH 8.0)에 현탁시키고, 동일한 완충액으로 투석(MWCO 2000, Sigma-Aldrich 사) 하여 염을 제거하였다. 단백질 용액 (10 ml)에 불용성의 oat spelt xylan (400 mg)을 넣은 후, 4°C에서 30분간 진탕하면서 자일라네이즈를 흡착시켰다. 반응물을 14,000 ×g에서 10분간 원심분리 한 후, 침전된 자일란-단백질 복합체를 회수하고 이를 다시 1 M NaCl 함유 완충액 A 10 ml로 세척하였다. 자일란-단백질 복합체를 8 M Urea (10 ml)에 현탁시켜 단백질을 유리시킨 후, 원심분리로 얻은 상등액만을 완충액 A로 투석하고, 0.1% sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 용출된 단백질을 분석하였다[24].

겔여과 크로마토그래피에 의한 단백질의 분자량 측정

정제한 단백질의 분자량을 겔 여과 크로마토그래피로 측정하였다. 겔 여과 크로마토그래피는 ÄKTA-FPLC 시스템 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, USA)을 사용하였다. 컬럼은 Superose 12 10/300 GL을 사용하였고, 이동상은 100 mM NaCl을 함유하는 완충액 A를 적용하였다. 겔 여과는 실온에서 0.5 ml/분의 유속으로 수행하였고, 단백질 용출을 280 nm에서 모니터링하였다.

정제한 자일라네이즈의 특성

효소의 최적 pH를 조사하기 위해 pH 4.0에서 10.0 (pH 1.0 간격) 범위에서 활성을 측정하였으며, 반응온도는 40°C에서 실시하였다. 각 pH 구간에 따라 완충액은 20 mM citrate buffer (pH 4.0–6.0), 20 mM MOPS buffer (pH 6.0–7.0), 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0–9.0), 20 mM glycine buffer (pH 9.0–10.0)를 사용하였다. 효소 활성의 최적 온도 결정 시험은, 20 mM MOPS buffer (pH 6.0)를 사용하여 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 반응을 실시하였다. 효소 활성에 미치는 미량원소(NaCl, KCl, ZnCl₂, CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂, CoCl₂, EDTA)의 영향은, 20 mM MOPS buffer (pH 6.0)에 각 미량원소를 최종 5 mM 넣고 45°C에서 효소 반응을 실시하였다. Michaelis-Menten 상수 (K_m)와 최대반응속도(V_{max}) 등의 동역학 계수는 Lineweaver and Burk의 방법[25]을 적용하였다. 간단히, 효소 반응은 20 mM MOPS buffer (pH 6.0)로 45°C에서 수행하였고, 기질은 beechwood xylan (1.0–20.0 mg/ml)을 사용하였다. 효소 활성은 DNS 방법으로 측정하였다. 자일라네이즈 1 unit는 상기 조건에서 1분당 1 μmol의 자일로스를 생산하는 효소량으로 정의하였다. 정량을 위한 표준곡선 작성에는 자일로스를 표준물질로 사용하였다.

박층트로마토그래피(Thin layer chromatography)에 의한 효소 반응물 분석

효소액(0.8 μg)과 0.5% beechwood xylan을 함유한 20 mM MOPS 완충액(pH 6.0)을 최종 부피 80 μl가 되도록 혼합하였다. 40°C에서 24시간 반응 후, 반응물 7 μl를 silica gel 60 plate (Merck, Germany)에 스폿팅하였다. 박층트로마토그래피의 이동상은 n-Butanol: Acetic acid: Water (2:1:2, v/v/v)를 사용하였으며, 해상도를 높이기 위해 동일한 이동상에서 전개를 2회 연속 실시하였다. 전개된 당들은 10% (w/v) sulfuric acid/EtOH 용액을 스프레이 한 후, 120°C에서 색이 나타날 때까지 가열하였다.

결과 및 고찰

해양미생물 PX-1 균주의 분리

제주도 연안의 해수로부터 자일라네이즈 활성을 보이는 26개의 콜로니를 분리하였다. 이 중, 균주 PX-1이 가장 큰 자일란 분해환을 보였으므로, 본 연구의 대상으로 선정하였다 (Fig. 1A). PX-1 세포는 그램-음성이며, 형태는 가로 0.5–0.6 μm, 세로 1.2–1.5 μm의 막대형이다. 음성염색을 한 PX-1 세포의 투과전자현미경 분석 결과 1개의 극성 편모를 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 일반적으로, 새롭게 분리한 미생물의 동정에는 16S rRNA 유전자 서열 분석과 생화학적-형

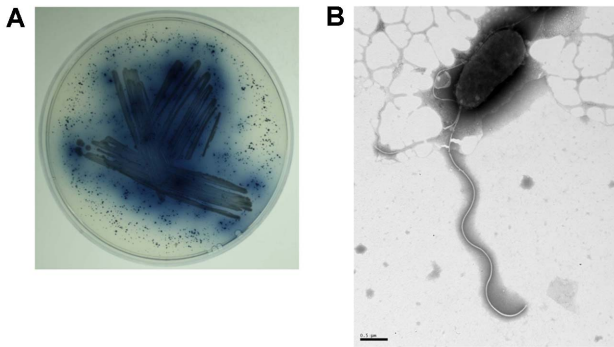


Fig. 1. Characteristic features of strain PX-1. (A) Detection of xylanase activity by Strain PX-1. PX-1 was streaked on ASW-YP agar plate containing 0.2% (w/v) xylan azure and incubated at 40 °C for 2 days. (B) Transmission electron microscopy (TEM) analysis. Strain PX-1 grown on ASW-YP agar plate at 40 °C for 2 days was negatively stained and observed using transmission electron microscope. Scale bar=0.5 μm.

태학적 분석들이 사용된다. 따라서, PX-1 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석을 우선적으로 실시하고, 서열을 유전자은행에 등록(GenBank accession number; JF309276) 하였다.

16S rRNA 유전자 서열 분석

균주 PX-1의 16S rRNA 유전자 서열(1,423 bp)을 EzTaxon Server 2.1에서 추출할 수 있는 유사 16S rRNA 유전자 서

열과 비교하였다. 그 결과, 16S rRNA 유전자 서열은 표준 균주 *Aestuariibacter aggregatus* WH169^T [26]의 유전자 서열과 99.91%의 상동성을 보였다. 그 외, *Aestuariibacter halophilus* JC2043^T (95.45%), *Aestuariibacter salexigens* JC2042^T (95.45%), *Alteromonas genovensis* LMG24078^T (95.42%)와도 높은 상동성을 보였다. 이러한 상동성 결과는 계통발생분석 결과와도 잘 일치한다(Fig. 2). 계통수 그림에서, PX-1은 가장 상동성이 높은 *A. aggregatus* WH169^T와 함께 분기(clade)를 이루고, 이외의 상동성 높은 균주들이 이루는 분기와는 확실히 구분이 가능하다. 일반적으로, 두 균주 사이에 16S rRNA 유전자 서열의 상동성이 98.7% 이하이면, 서로 다른 종(species)으로 구분할 수 있다[27]. 따라서, 16S rRNA 유전자 서열 분석 결과 PX-1 균주는 표준 균주 *A. aggregatus* WH169^T에 속할 것으로 예상되었다.

PX-1 균주의 형태학적, 생화학적 특성

PX-1은 ASW-YP 평판배지에서 40°C에서 2일간 배양했을 때, 직경 1 mm 내외의 원형 콜로니를 형성하였고, 표면은 부드럽고 베이지색의 콜로니를 형태를 나타냈다. PX-1은 20–42°C (최적 온도, 30–40°C) 온도 범위에서 성장하지만, 4°C 또는 45°C에서는 성장하지 않았다. 또한, PX-1은 pH 6.0과 pH 8.0 (최적 pH, pH 6.0–7.0) 사이에서는 성장할 수 있지만, pH 5.0과 pH 9.0에서는 성장하지 않았다. 특히, PX-1은 성장에 1–5% (w/v)의 NaCl (최적 농도, 2–3%)을 요구하였

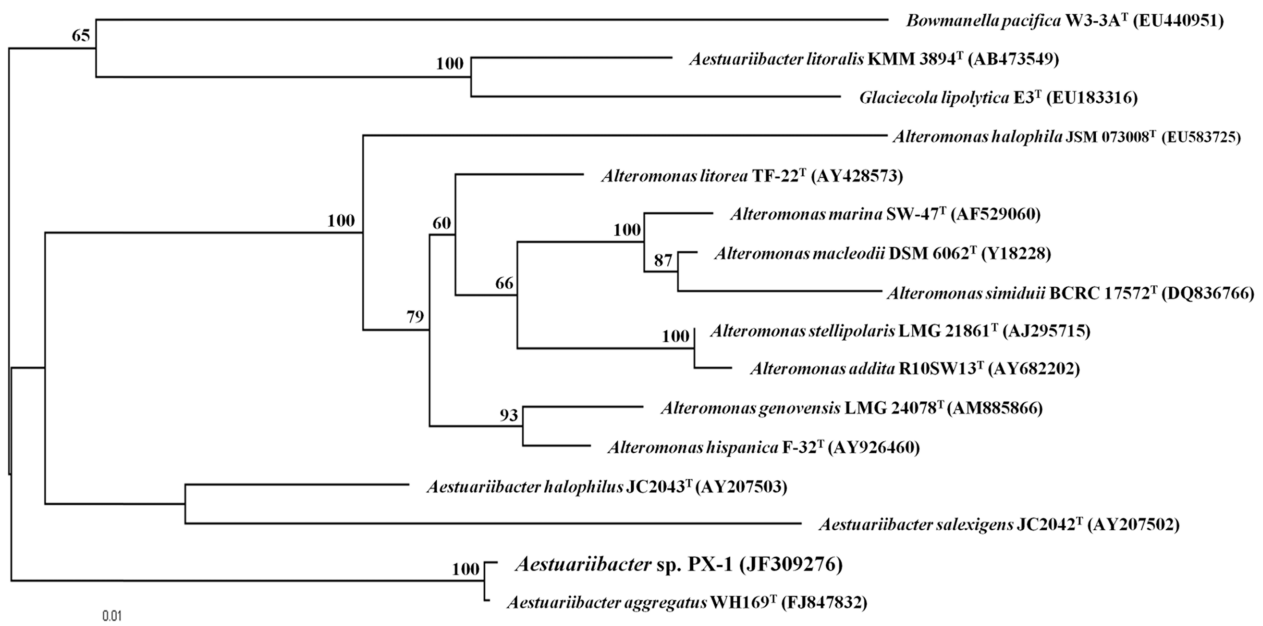


Fig. 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. Distances was determined according to the Kimura-two model and bootstrap values (>50%) based on 1,000 replicates are listed as percentages at nodes. Nucleotide sequence accession numbers are given in parentheses. Scale bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotides.

으며, 0%와 10% NaCl 농도에서는 성장하지 않았다. PX-1은 chloramphenicol에는 감수성을 보였지만, ampicillin, kanamycin, thiostrepton, neomycin에는 저항성을 나타냈다. 생화학적으로 nitrate reduction, alkaline phosphatase, gelatinase, esterase (C4), esterase (C8), lipase (C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin (weak positive), acid phosphatase, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, arginine dihydrolase 등에 대해 양성 반응을 나타냈다. 그러나, indole 생산, α -chymotrypsin, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, *N*-acetyl- β -glucosaminase, α -mannosidase, α -fucosidase, urease 등에 대해서는 음성반응을 보였다. 탄소원 이용 능력에서는 D-maltose에 대해서는 양성을, D-glucose, L-arabinose, D-mannose, D-mannitol, *N*-acetylglucosamine, potassium gluconate, capric acid, adipic acid, malic acid, trisodium citrate, phenylacetic acid에 대해서는 음성 반응을 보였다. 유기산 생성 시험에서는 D-glucose (weak positive), D-maltose, D-trehalose (weak positive), D-melibiose, D-raffinose (weak positive), D-xylose, methyl- α D-glucopyranoside (very weak positive), D-saccharose (weak positive) 등에서 유기산 생성이 검출되었다. 그러나, D-fructose, D-mannose, D-lactose, D-mannitol, xylitol, *N*-acetylglucosamine 등에서는 유기산 생성이 검출되지 않았다. 주요한 지방산은 summed feature 3 (C_{16:1} ω 7c/iso-C_{15:0} 2-OH, 28.6%), C_{16:0} (20.4%), C_{18:1} ω 7c (11.57%) 등의 순서로 존재하였다. PX-1의 DNA G+C 함량은 51.14 mol%, 주요 ubiquinone은 ubiquinone-8 (Q-8)로 나타났다.

PX-1은 16S rRNA 유전자 서열 분석에서 *A. aggregatus* WH169^T (LMG 25283^T)와 가장 가까우며, 같은 종에 속할 것으로 예상되었다. 그러나, 두 균주의 비교 결과, PX-1은 nitrate reductase, esterase (C4), lipase (C14), cystine arylamidase, D-xylose로부터 유기산 생성에 대해 양성 반응을 보인 반면, *A. aggregatus* WH169^T는 음성 반응을 보였다. PX-1은 45°C, pH 9.0 및 10% NaCl에서 성장할 수 없었지만, 균주 WH169^T의 동일한 조건에서 좋은 성장 능력을 보여주었다. 특히, 균주 WH169^T은 ASW-YP 평판배지 상에서 PX-1과는 달리 xylanase 활성을 확인할 수 없었다. 또한, PX-1은 kanamycin (100 μ g) 및 neomycin (100 μ g)에 대한 내성을 보인 반면, 균주 WH169^T는 두 항생제에 대해 감수성을 나타냈다. 이러한 생화학적 차이로 인해, 균주 PX-1은 *A. aggregatus* WH169^T과 동일한 종으로 판단하기는 어려우며, 따라서 새롭게 분리한 PX-1 균주를 *Aestuuriibacter* sp. PX-1으로 명명하였다. *Aestuuriibacter* sp. PX-1 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC 23763).

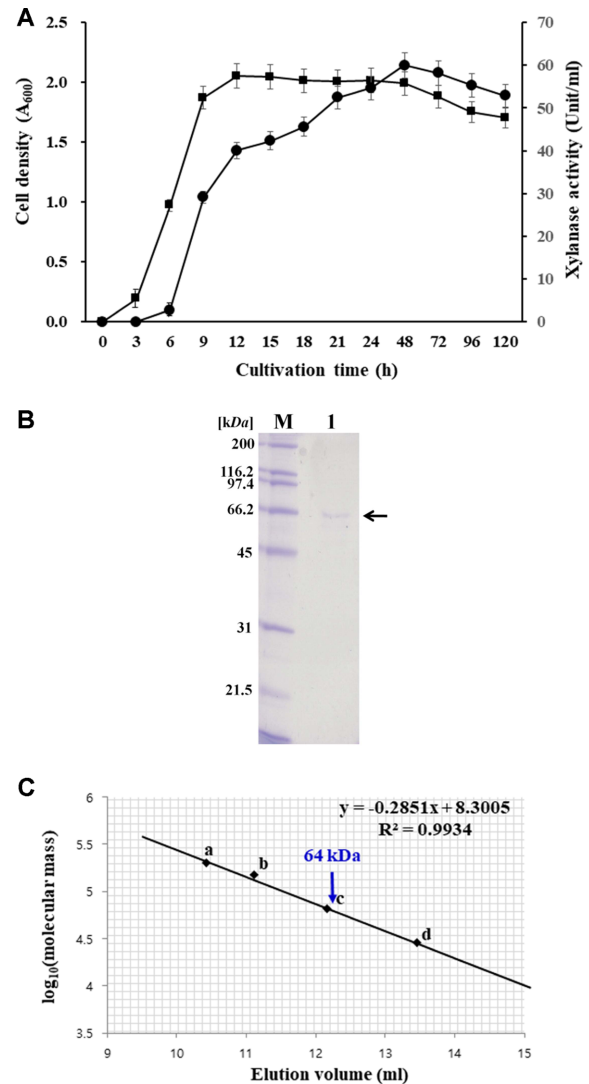


Fig. 3. Production and purification of extracellular xylanase from liquid culture of strain PX-1. (A) Cell growth and xylanase production depending on cultivation time. Strain PX-1 was cultivated in ASW-YP broth. Cell density was measured at 600 nm and xylanase activity was measured by DNS method at 540 nm using UV/VIs spectrophotometer. -■-, cell growth; -●-, xylanase activity. (B) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis of the purified xylanase. The purified protein from culture broth of strain PX-1 was separated on 0.1% SDS-12% PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. M, molecular weight standards; lane 1, protein sample after xylanase-affinity purification. The arrow indicates purified protein. (C) Determination of molecular mass by gel filtration chromatography. Gel filtration chromatography of the purified protein (XylA) and size marker proteins was performed on a Superose 12 10/300 GL column: position a, beta-amylase (200 kDa); position b, yeast alcohol dehydrogenase (150 kDa); position c, bovine serum albumin (66 kDa); position d, bovine carbonic anhydrase (29 kDa). The position of the elution peak for XylA is indicated with an arrow.

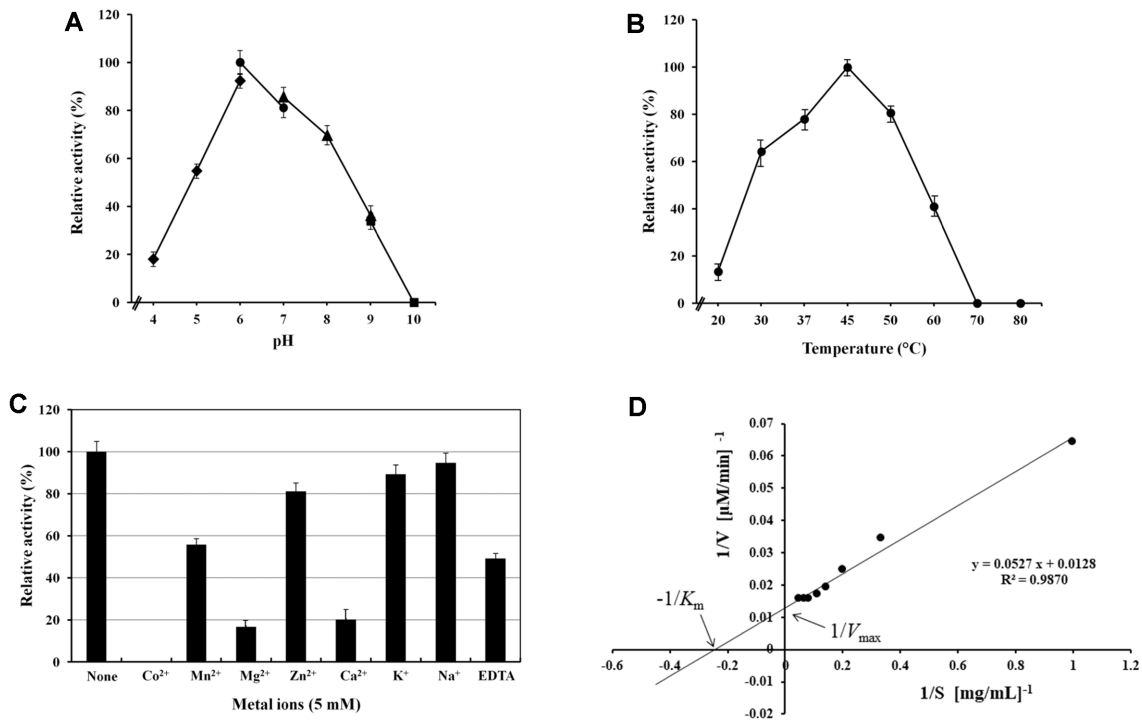


Fig. 4. Enzymatic properties of the purified xylanase, XylA. (A) Effect of pH on xylanase activity of XylA. The reaction was carried out at 40 °C at various pH conditions. The values obtained at pH 6.0 were taken to be 100%. -◆-, 20 mM citrate buffer; -●-, 20 mM MOPS buffer; -▲-, 20 mM Tris-Cl buffer; -■-, 20 mM glycine-NaOH buffer. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. (B) Effect of temperature on xylanase activity of XylA. The reaction was carried out at pH 6.0 at various temperatures. The values obtained at 45 °C were taken to be 100%. The relative activities are the averages from three independent experiments. (C) Effect of metal ion and chelator on xylanase activity of XylA. The reaction was carried out at 45 °C for 30 min in 20 mM MOPS buffer (pH 6.0) containing different chemicals. The activity value without chemical was taken to be 100%. All data shown are mean values from at least three replicate experiments. (D) Lineweaver-Burke double-reciprocal analysis of XylA. The enzyme activity was measured at 45 °C at pH 6.0.

균주 PX-1이 생산한 자일라네이즈의 특성

ASW-YP 액체 배지에 균주 PX-1을 접종한 후, 배양 시간에 따른 세포 성장 및 균주가 생산한 자일라네이즈 활성을 측정하였다. 세포 성장은 초기부터 급격히 증가하기 시작하여 배양 12시간에 정지기에 도달하였다. 자일라네이즈 활성 또한 세포 성장에 비례하여 증가하였고, 배양 48시간에 최대값에 도달한 후 천천히 감소하였다(Fig. 3A).

균주 PX-1의 배양액으로부터 순수하게 정제 한 단백질은 SDS-PAGE (Fig. 3B) 및 겔여과 크로마토그래피(Fig. 3C) 분석 결과 대략 64 kDa의 분자량을 갖으며, monomer로 존재할 것으로 예상되었다. 정제된 단백질은 beechwood xylan을 효율적으로 분해할 수 있는 자일라네이즈 활성을 보였으므로 XylA로 명명하였다. XylA는 pH 6.0에서 최대 활성을 보였고 중성 pH 범위(pH 7.0과 pH 8.0)에서 상대적으로 높은 활성을 보인 반면, 낮은 pH 범위(<pH 5.0) 또는 높은 pH 범위(>pH 9.0)에서는 활성을 거의 소실하였다(Fig. 4A). 다양한 반응온도에서 자일라네이즈 효소 활성을 측정했을 때,

XylA의 효소 반응 최적 온도는 45°C였으며, 30-50°C 범위에서 최대 활성의 60% 이상의 활성을 유지하였다. 그러나, 70°C 이상에서는 활성을 완전히 소실하였다(Fig. 4B). 자일라네이즈 활성은 Co²⁺에 의해 완전히 억제되었고, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺에 의해서도 강한 억제(각각 16.8, 20.2% 및 55.9%)가 야기되었다. 금속 킬레이트제 EDTA는 효소 활성을 49.2% 억제하였다(Fig. 4C). Beechwood xylan에 대한 XylA 효소의 동력학적 계수를 계산한 결과, K_m은 27.78 mM (4.17 mg/ml), V_{max}는 78.13 μM/min이었다(Fig. 4D).

Beechwood xylan을 XylA로 24시간 가수분해한 반응물을 박층크로마토그래피로 분석하였다(Fig. 5). 그 결과, XylA는 자일란을 자일로스와 자일로테트라오스보다 큰 xylooligosaccharides (XOSs)로 분해하는 자일라네이즈임을 확인하였다.

현재까지 *Aestuariibacter* 속에 속하는 미생물 중에는 *A. halophilus* JC2043^T [28], *A. salexigens* JC2042^T [28], *A. aggregatus* WH169^T [26], *A. litoralis* KMM 3894^T [29]

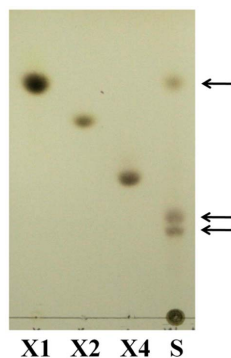


Fig. 5. Thin layer chromatography analysis of the hydrolysate of xylan by XylA. The reaction was performed in 50 mM MOPS, pH 6.0, at 45 °C for 24 h. X1, Xylose; X2, Xylobiose; X4, Xylo-tetraose; S, hydrolysate of xylan by XylA. Xylose and xylooligo-saccharides (XOSs) are indicated by arrows.

등 4종의 해양미생물이 보고되었다. 이 중에서 *A. litoralis* KMM 3894^T는 *Aliiglaciecola litoralis* KMM 3894^T로 재분류되어[30], 현재는 *Aestuuriibacter* 속에는 3종만이 표준 균주로 남아있다(Fig. 2). *Aestuuriibacter* 속에 관련된 보고는 모두 미생물의 분류에 대한 내용이며, 다른 특성에 관해서는 보고된 바가 전혀 없다. 본 논문에서는 *Aestuuriibacter* 속에 속하는 미생물 *Aestuuriibacter* sp. PX-1이 높은 자일라네이즈 활성을 보이며, 이로부터 자일라네이즈를 정제하고 효소의 특성을 규명한 최초의 보고이다. 특히, *Aestuuriibacter*와 계통수에서 가장 가까우면서 많은 종을 포함하는 *Alteromonas* 속에서도 자일라네이즈 효소는 전혀 보고된 바 없으므로, 이러한 보고는 학문적으로 큰 의미가 있다.

자일라네이즈는 제지 및 펄프 산업의 생표백 공정에서 독성 염소 화학 물질의 대안으로 널리 사용될 수 있는 생체 촉매이지만, 이 공정에는 셀룰레이즈가 오염되지 않은 순수한 자일라네이즈를 사용하는 것이 효과적이다[3, 31]. 균주 PX-1은 배양액 또는 한천 플레이트에서 셀룰레이즈 활성이 전혀 검출되지 않았기 때문에, 셀룰레이즈가 오염되지 않은 상태의 자일라네이즈를 생산할 수 있는 중요한 자원으로 예상되었다. 균주 PX-1로부터 정제된 XylA는 자일로스 및 XOS의 혼합물을 생성한다. 이와 같은 효소적 특징은 다양한 미생물로부터 보고된 자일라네이즈들의 특성과 아주 유사하다[5, 32]. XOS는 프리바이오틱 활성, 항산화 및 항균 작용과 같은 다양한 생리활성을 나타내기 때문에 식품 및 사료 첨가제, 약학 및 화장품 산업에서 광범위하게 사용될 수도 있다[33]. 또한, 자일라네이즈에 의해 생성된 자일로스는 효모 발효에 이용되어 바이오에탄올로 전환이 가능하다. 이런 의미에서 *Aestuuriibacter* sp. PX-1 균주와 이 균주가 생산하는 자일라네이즈는 충분한 산업적 활용 가치가 있을 것

으로 예상된다.

XylA의 자일라네이즈 활성에 대한 반응 최적 조건은 pH 6.0, 반응 온도 45 °C였다. 효소 활성은 50 °C에서 최대 활성의 80% 이상, 60 °C에서 최대 활성의 40% 이상을 유지하는 등, 비교적 고온에서도 활성을 유지하는 장점을 갖고 있다. 이에 반해 저온성 해양미생물 *Pseudoalteromonas haloplanktis*에서 보고된 자일라네이즈는 10 °C 이하의 저온에서 활성이 높은 것으로 알려져 있다[1]. 그러나, 생리활성화합물의 제조, 제지 펄프의 생물학적 표백, 바이오연료 생산을 위한 리그노셀룰로스 바이오매스의 당화, 식품 및 베이커리 산업과 같은 산업 공정에는 저온성 효소보다는 고온성 효소가 더 적합한 것으로 알려져 있다[5]. 이러한 점에서도 *Aestuuriibacter* sp. PX-1 균주 및 자일라네이즈는 충분한 활용 가치가 있을 것으로 판단된다. 따라서, *Aestuuriibacter* sp. PX-1의 유전체 분석을 통한 *xylA* 및 기타 유용한 유전자원을 새롭게 발굴하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

요 약

자일란(xylan)을 가수 분해할 수 있는 해양 미생물 PX-1을 제주도 연안의 해수로부터 순수하게 분리하였다. 16S rRNA 유전자 서열 및 생화학적 분류 결과에 기초하여, PX-1은 *Aestuuriibacter* 속의 한 종으로 확인되어 *Aestuuriibacter* sp. PX-1로 명명하였다. PX-1을 액체 배양한 배양액으로부터 암모늄 설페이트 침전법과 불용성 자일란을 이용한 흡착 크로마토그래피 방법을 이용하여, 세포 외로 분비된 자일라네이즈 후보 단백질을 순수하게 정제하였다. 정제한 후보 자일라네이즈 단백질(XylA)은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis 및 겔여과 크로마토그래피 분석결과, 분자량이 대략 64 kDa인 것으로 추정되었다. XylA는 실제로 beechwood xylan을 가수분해하는 자일라네이즈 활성을 보였으며, pH 6.0과 45 °C에서 최대의 효소 활성을 나타냈다. XylA에 의한 자일란 가수 분해산물을 TLC로 분석한 결과, XylA는 자일란을 자일로스 및 자일로올리고당으로 분해하는 endo-type의 자일라네이즈임을 확인하였다. Beechwood xylan에 대한 XylA의 K_m 및 V_{max} 값은 각각 27.78 mM (4.17 mg/ml), 78.13 μ M/min이었다.

Acknowledgments

The present research has been conducted by the Research Grant of Seoil University in 2020.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Collins T, Gerday C, Feller G. 2005. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**: 3-23.
- Uday US, Choudhury P, Bandyopadhyay TK, Bhunia B. 2015. Classification, mode of action and production strategy of xylanase and its application for biofuel production from water hyacinth. *Int. J. Biol. Macromol.* **82**: 1041-1054.
- Wu H, Cheng X, Zhu Y, Zeng W, Chen G, Liang Z. 2018. Purification and characterization of a cellulase-free, thermostable endo-xylanase from *Streptomyces griseorubens* LH-3 and its use in biobleaching on eucalyptus kraft pulp. *J. Biosci. Bioeng.* **125**: 46-51.
- Duarte ME, Zhou FX, Dutra WM Jr, Kim SW. 2019. Dietary supplementation of xylanase and protease on growth performance, digesta viscosity, nutrient digestibility, immune and oxidative stress status, and gut health of newly weaned pigs. *Anim. Nutr.* **5**: 351-358.
- Alokika, Singh B. 2019. Production, characteristics, and biotechnological applications of microbial xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**: 8763-8784.
- Beg QK, Kapoor M, Mahajan L, Hoondal GS. 2001. Microbial xylanase and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 326-338.
- 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.
- Chi WJ, Park DY, Park JS, Hong SK. 2012. Isolation and characterization of a xylanolytic bacterium, *Bacillus* sp. MX47. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 419-423.
- Lo LC, Chu CY, Pan YR, Wan CF, Li YK, Lin JJ. 2006. Rapid and selective isolation of beta-xylosidase through an activity-based chemical approach. *Biotechnol. J.* **2**: 197-202.
- Shahid S, Tajwar R, Akhtar MW. 2018. A novel trifunctional, family GH10 enzyme from *Acidothermus cellulolyticus* 11B, exhibiting endo-xylanase, arabinofuranosidase and acetyl xylan esterase activities. *Extremophiles* **22**: 109-119.
- Lyman J, Fleming RH. 1940. Composition of seawater. *J. Mar. Res.* **3**: 134-146.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541-555.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- 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.
- 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.
- Felsenstein J. 2009. PHYLIP (phylogeny inference package), v3.69. 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.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Sasser M. 1997. Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. Newark, DE: MIDI Inc.
- Komagata K, Suzuki K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. *Methods Microbiol.* **19**: 161-207.
- 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.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lineweaver H, Burk D. 1934. The determination of enzyme dissociation constant. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
- Wang Y, Wang H, Liu J, Lai Q, Shao Z, Austin B, et al. 2010. *A. aggregatus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from seawater of the Yellow Sea. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**: 48-54.
- Stackebrandt E, Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **33**: 152-155.
- Yi H, Bae KS, Chun J. 2004. *Aestuariibacter salexigens* gen. nov., sp. nov. and *Aestuariibacter halophilus* sp. nov., isolated from tidal flat sediment, and emended description of *Alteromonas macleodii*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 571-576.
- Tanaka N, Romanenko LA, Frolova GM, Mikhailov VV. 2010. *Aestuariibacter litoralis* sp. Nov., isolated from a sandy sediment of the Sea of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 317-320.
- Jean WD, Hsu CY, Huang SP, Chen JS, Lin S, Su MH, Shieh WY. 2013. Reclassification of [*Glaciecola*] *lipolytica* and [*Aestuariibacter*] *litoralis* in *Aliiglaciecola* gen. nov., as *Aliiglaciecola lipolytica* comb. nov., and *Aliiglaciecola litoralis* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 2859-2864.
- Subramaniyan S, Prema P. 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**: 1-7.
- Lee CC, Kibblewhite-Accinelli RE, Wagschal K, Robertson GH, Wong DW. 2006. Cloning and characterization of a cold-active xylanase enzyme from an environmental DNA library. *Extremophiles* **10**: 295-300.
- Craig AD, Khattak F, Hastie P, Bedford MR, Olukosi OA. 2019. Xylanase and xylo-oligosaccharide prebiotic improve the growth performance and concentration of potentially prebiotic oligosaccharides in the ileum of broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* **30**: 1-9.