

Paenibacillus donghaensis JH8에서 세포외 Xylanase의 특성

임채성 · 오용식 · 노동현*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of Extracellular Xylanase from *Paenibacillus donghaensis* JH8

Chae-Sung Lim, Yong-Sik Oh, and Dong-Hyun Roh*

Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received March 8, 2011 / Accepted March 23, 2011)

Xylanase is a class of enzymes that hydrolyze the linear polysaccharide β -1,4-xylan into xylose. This enzyme is applied in the process of paper making and may be used for the process of biofuel production in the future. The *Paenibacillus donghaensis* JH8, isolated from Donghae deepsea sediment and reported as a novel bacterium, was known to degrade xylan and its xylanase was characterized in this study. The enzyme was maximally induced in the presence of 0.1% xylan. The production of xylanase was started at early logarithmic phase and reached about 55 miliunit at stationary phase of growth. The optimal temperature and pH of extracellular xylanase were found to be 40°C and pH 6.0, respectively. The activity of xylanase was inhibited by the presence of Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} or EDTA, and activated by K^{+} , Ag^{+} or DTT. This xylanase was stable at 40°C for 120 min, but lost almost their activity in 30 min at 60°C. Zymography analysis of concentrated culture supernatant revealed one major band at 42 kDa and two faint bands at 68 and 120 kDa.

Keywords: *Paenibacillus donghaensis* JH8, characterization, extracellular xylanase

Xylan은 식물 세포벽을 구성하는 hemicellulose의 주요 구성성분으로 기본 골격이 β -1,4 결합을 하고 있는 D-xylose로 구성되어 있고 이러한 xylose 잔기에 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등이 측쇄로 연결되어 존재하고 있다(3). 이러한 xylan의 가수분해에 관여하는 효소로는 xylanase (endo-1, 4- β -xylanase), β -xylosidase, α -glucuronidase, α -L-arabinofuranosidase와 acetylerase 등이 있으며 이중 xylanase는 xylan의 β -1,4 결합을 절단하여 xylose 또는 xylooligosaccharides로 변환시키므로 xylan의 가수분해 과정에서 가장 중요한 역할을 한다(19). Xylan은 그 자체로는 이용가치가 별로 없으나 xylose 단위로 분해되면 이용성이 증가되기 때문에 xylanase를 생산하는 세균이나 곰팡이에 대한 연구가 오래 전부터 많이 진행되어 왔다(10, 17).

Xylanase는 목질계로부터 양질의 pulp 생산, 식품성분인 xylitol, xylooligo 당의 생산, 과일음료의 청징, 농업 부산물

이용 등의 이용분야에서 산업용 효소로서의 활용가치가 있어 많은 연구가 진행되었다(7, 10). 제지산업에서는 표백공정에 활용하기 위해 내알칼리성이나 내열성 xylanase (15), 또는 제지성분 중 섬유질의 손상을 방지하기 위해 cellulase의 활성이 없는 xylanase (8, 9)에 대한 관심이 높고, 사료산업에서는 xylanase가 mannanase와 함께 곡물 사료 섭취시 hemicellulose로 인한 가축의 장내의 높은 점질도를 저하시키는 기능이 있어 소화기 질병을 예방하고 사료효율을 향상시키는데 활용되고 있다(13). 특히 최근에는 대체에너지의 중요성이 대두되면서 식물성 biomass로부터 연료 및 유기용매인 알코올 생산에 xylanase의 활용이 많이 연구되고 있다.

현재 발견된 미생물은 지구상의 미생물의 1% 보다도 적으며 배양되지 않은 많은 미생물이 존재하고 있고 특히 심해나 심해 퇴적물에 존재하는 미생물에 대해서는 진행된 연구가 많지 않다. 근래 미생물 균주가 생산하는 대사산물이 중요한 고부가가치 산업의 소재로 주목 받으면서 해양 미생물 및 심층 퇴적물에서 분리된 균주와 그 대사산물에 많은 관심이 주목되

* For correspondence. E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr; Tel: +82-43-261-3368; Fax: +82-43-264-9600

고 있다. 특히 해양 심층 환경은 저온을 유지하는 특성을 가지므로 분리되는 저온 적응성 미생물이 생산하는 효소는 매우 중요한 자원의 하나가 될 수 있어 식품산업 분야 등 특정 산업분야에서 주목을 받고 있다(4).

Xylan 분해 효소인 xylanase를 생산하는 미생물에 대한 연구는 많이 진행되었지만 대부분이 산업적으로 유용한 내열성 xylanase, 내알칼리성 xylanase나 cellulase 활성이 없는 xylanase를 생산하는 미생물(6, 12, 15)에 국한되어 있을 뿐 해양미생물이 생산하는 xylanase에 대한 연구는 알려진 것이 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 동해의 심층퇴적물로부터 분리한 *Paenibacillus donghaensis* JH8이 생산하는 세포외 xylanase 특성에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 *P. donghaensis* JH8은 동해 심층 퇴적물로부터 분리된 저온적응성 세균으로 xylan을 분해한다고 보고되었다(5). 균주배양을 위한 기본배지는 Marine Broth (MB) 배지(Difco)에 0.1% birchwood xylan (Sigma)를 첨가하여 사용하였고, 균주 콜로니의 투명환(clear zone)을 확인 시에는 1.0% xylan과 1.5% 한천(Junsei)를 첨가하여 사용하였다.

Xylanase 조효소액 제조 및 효소활성측정

조효소액 제조를 위하여 먼저 1% xylan을 첨가한 MB 한천배지를 사용하여 25°C에서 일주일간 배양하여 투명환을 형성하는 콜로니를 확인하였다. 이 균주를 25°C에서 125 rpm으로 3일간 상기 기본배지에서 종배양한 후, 동일배지 250 ml에 1% 접종하여 같은 조건에서 90시간 동안 진탕배양한 다음, 4°C에서 15,800×g로 20분간 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

Xylanase 활성은 1.0% (w/v) birchwood xylan을 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0)에 현탁시킨 기질을 사용하여 Bailey 등의 방법(1)을 참고하여 측정하였다. 유리된 환원당의 양은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 D-xylose를 표준당으로 하여 다음과 같이 측정하였다. 조효소액 0.3 ml와 상기의 기질용액 0.3 ml, 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 0.4 ml를 혼합하여 40°C의 수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 DNS 시약 1.5 ml를 첨가하고 15분 동안 끓는 물에서 반응을 정지시키고 방치시켜 발색시킨 후 얼음물에서 냉각시켜 반응액의 온도를 상온까지 떨어뜨린 다음 분광광도계(Libra S22, Biochrom)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 이를 D-xylose를 표준시료로 사용하여 동일조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 측정하였다. 분광광도계의 blank는 xylanase 조효소액 대신 100°C에서 10분간 중탕시켜 활성이 사라진 xylanase 조효소액을 첨가한 반응액을 사용하였다. 효소 활성도 1 unit (U)은 위의 분석조건에서 1분 동안 1 μmol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의

하였으며, 결과 값은 3회 측정값의 평균과 표준편차로 표시하였다.

유도기질 농도와 배양시간에 따른 xylanase의 생산

유도기질의 농도와 효소 생산성과의 관계를 조사하기 위하여 유도기질인 birchwood xylan을 각각 다른 농도(0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0%)로 첨가한 MB 배지 50 ml에 상기와 같은 조건에서 접종, 배양하여 그 상등액을 취하여 효소활성을 측정하였다.

균주의 성장과 효소 생산성과의 관계를 조사하기 위하여 기본배지 250 ml에 종배양액을 상기와 같이 접종하여 진탕배양하면서 매 6시간마다 5 ml씩 배양액을 채취하여 균주의 성장과 효소 생산성을 측정하였다. 균주의 생장은 배양액을 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 탁도를 측정하였고, 효소 생산성은 상기의 효소활성 반응조건에서(40°C, 1시간) 반응시킨 후 효소의 활성으로 나타내었다.

Xylanase 활성에 미치는 반응 온도와 pH의 영향

반응온도 또는 pH와 xylanase 활성과의 관계를 조사하기 위하여 각각 10°C에서 5°C 간격으로 70°C까지의 조건 또는 pH 4.0에서 pH 9.0까지의 범위에서 효소 활성을 측정하였다. 효소 활성 측정 방법은 온도 또는 pH 조건을 제외하고 상기에 기술된 xylanase 측정 방법을 사용하였으며, pH를 달리하기 위하여 pH 4.0-5.0는 100 mM citrate buffer, pH 6.0-8.0는 100 mM sodium phosphate buffer, pH 9.0는 100 mM carbonate buffer를 각각 사용하였다.

Xylanase의 활성에 대한 첨가물질의 영향

금속이온들과 EDTA, dithiothreitol (DTT)이 xylanase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 효소반응시 반응액의 첨가물질 최종 농도가 각각 1 mM과 5 mM이 되도록 증류수에 금속이온 CaCl₂, MnSO₄, NaCl, FeCl₂, MgCl₂, KCl, AgNO₃, CuSO₄, AlCl₃와 EDTA, DTT를 녹여 첨가물질 용액을 만들었다. 먼저 첨가물질 용액 0.2 ml와 조효소액 0.3 ml를 혼합한 후 30°C에서 10분간 예비반응시켰으며, 이때 대조구로 첨가물질 용액대신 증류수와 조효소액을 같은 조건으로 반응시켰다. 여기에 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) 0.4 ml와 1.0% birchwood xylan 용액 0.3 ml를 첨가하여 40°C에서 60분간 반응시킨 후 상기의 기술방법으로 활성을 측정하여 첨가물질 용액을 넣은 반응액의 활성과 증류수만 넣은 반응액의 활성과 상대적으로 비교·표시하였다.

Xylanase의 열 안정성

Xylanase의 내열성을 조사하기 위하여 조효소액에 기질을 첨가하지 않고 40°C, 50°C와 60°C의 각 온도에서 30분 간격으로 2시간 동안 방치한 후 상기 기술한 xylanase 측정 방법으로 활성을 측정하고 비교를 위해 열처리를 하지 않은 조효소액의 활성을 같은 방법으로 측정하였다. 열처리한 조효소액의 활성과 열처리하지 않은 조효소액의 활성을 비교하여 잔존

효소활성을 조사하였다.

전기영동과 효소활성 염색

SDS-polyacrylamide 젤 전기영동(SDS-PAGE)은 0.06% xylan을 첨가한 8% 젤에서 Laemmli의 방법(11)에 준하여 시행되었으며, 젤의 단백질을 Coomassie brilliant blue R250 (Sigma)로 염색하였으며, xylanase 활성은 Beguin (2)이 기술한 방법에 준하여 다음과 같이 염색하였다. 전기영동의 시료는 배양 상등액을 Amicon Ultra-15 (10K NMWL, Millipore) 장치를 사용하여 67배 농축하여 사용하였다. 전기영동 후 젤을 2.5% Triton X-100 용액으로 30분간 renaturation 반응시킨 다음, 0.1 M sodium phosphate 완충액(pH 6.0)으로 37°C에서 여러번 세척하고, 0.1% Congo red 용액에서 2시간 염색시킨 후 1 M NaCl 용액으로 탈색시켰다. 단백질 크기 표준물질은 SeeBlue Plus2 (Invitrogen)를 사용하였다.

결과

Xylanase의 생산특성

배양시 유도기질로 배지에 첨가되는 birchwood xylan의 농도가 xylanase의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. MB 배지에 0%부터 1.0%까지 각각 농도를 다르게 하여 첨가하고 90 시간 배양한 결과 Fig. 1에서 나타난 것과 같이 *P. donghaensis* JH8은 유도기질이 없을 때에는 xylanase를 생산하지 않았고 0.1% 농도에서 최고 생산성을 나타내었다. 0.1%에서 0.5%까지의 범위에서 높은 생산성을 나타내었지만, 0.5% 이상에서는 xylanase의 생산성이 크게 떨어졌다.

균의 성장곡선과 xylanase의 생산과의 관계를 조사하기 위하여 birchwood xylan이 0.1% (w/v)가 되게 첨가된 MB 배지

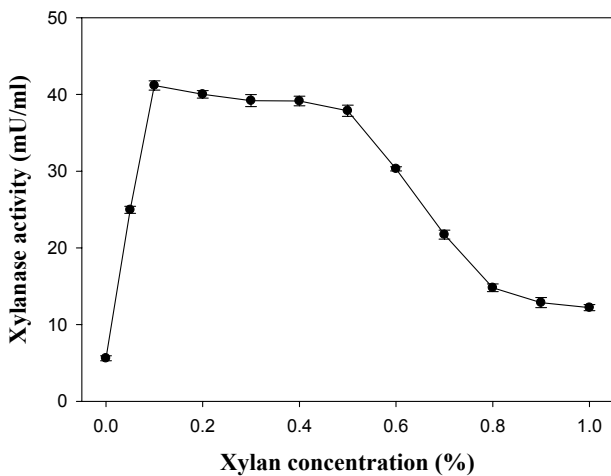


Fig. 1. Effect of xylan concentrations on the xylanase production. Cell-free supernatants were harvested after 90 h and assayed for enzyme activities as described in ‘Material and Methods’. The results are expressed as the means and standard deviations from of three replicated assays.

에서 *P. donghaensis* JH8을 배양하면서 균의 탁도와 xylanase의 활성을 측정하였다. Figure 2에서 같이 *P. donghaensis* JH8은 대수증식기 초기(18시간 이내)에 소량의 일정한 xylanase를 생산하였으며, 대수증식기 초기에서부터 중반기(18-24시간)까지 급격한 생산증가를 보여주었다. 이후 정지기에 이를 때 (24-66시간)까지 생산성이 완만히 증가한 후 정지기에 도달하는 66시간 이후부터 사멸기 초기까지 일정하게 유지되었다.

***P. donghaensis*가 생산하는 xylanase의 일반적인 특성**

반응 온도가 xylanase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응 온도를 달리하여 활성을 측정하였다. *P. donghaensis* JH8이 생산하는 xylanase는 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 25°C에서 55°C까지의 넓은 온도범위에서 활성을 나타내었다. 40°C에서 최대 활성을 나타내었지만 35°C에서도 최대의 86% 활성을 보여주었다. 50°C에서 최대활성의 70%로 떨어진 활성이 55°C에서는 80% 정도로 다시 증가하였다가 55°C 이상의 온도에서는 크게 떨어졌다.

반응 pH가 xylanase의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH를 달리하여 활성을 측정하였다. Figure 3B에서 나타난 것과 같이 *P. donghaensis* JH8이 생산하는 xylanase는 pH 6.0에서 최대 활성을 나타내었고, pH 7.0에서 66%의 활성을 나타내었다. pH 6.0 이하와 pH 7.0 이상에서는 활성이 매우 낮았다.

여러 금속이온 및 금속 결합물질인 EDTA와 효소의 이황화결합 환원물질인 DTT를 반응액에 1 mM과 5 mM이 되도록 첨가하여 xylanase의 활성을 측정하였다. Table 1에서 나타난 것과 같이 Na⁺, Mg²⁺, K⁺은 xylanase의 활성에 크게 영향을 미치지 않았다. Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Al³⁺, EDTA는

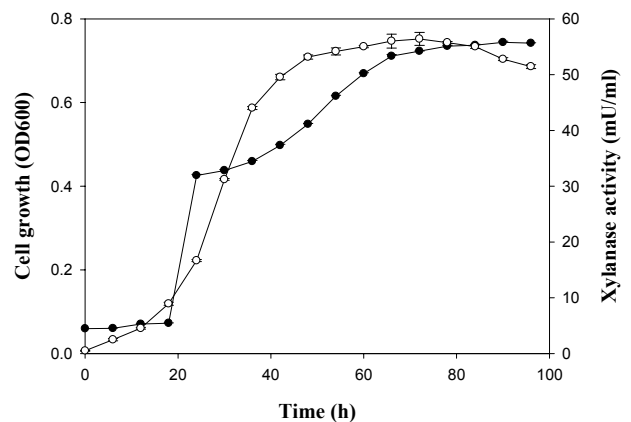


Fig. 2. Growth and xylanase production of *P. donghaensis* JH8. The strain was grown in MB medium supplemented with 0.1% birchwood xylan at 25°C by shaking at 250 rpm. The cell growths (open circle -○-) were determined by the measuring optical densities of the cell cultures at 600 nm. Xylanase activities (Close circle -●-) were determined with culture supernatants. The results are expressed as the means and standard deviations from of three replicated assays.

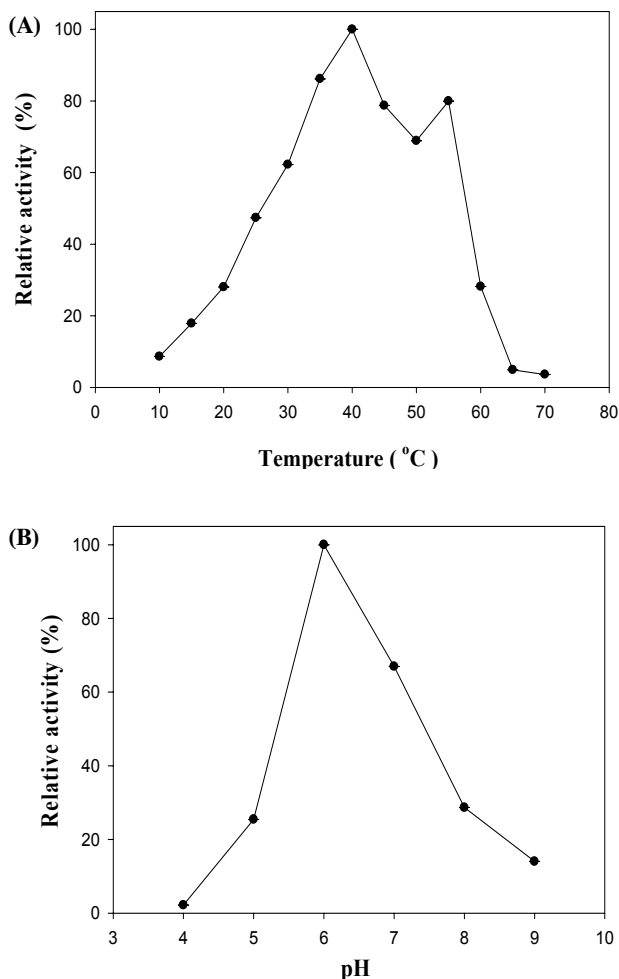


Fig. 3. Effects of temperatures and pH on the xylanase activity. The standard enzyme reaction was performed at 40°C, pH 6 for 60 min. The different condition at each reaction was either temperatures from 10°C to 70°C (A) or pHs from pH 4.0 to pH 9.0 (B). The results are expressed as the means and standard deviations from of three replicated assays.

xylanase의 활성을 감소시켰고, 특히 Fe²⁺는 5 mM에서 xylanase의 활성을 완전히 억제하였다. Ag⁺와 DTT는 xylanase의 활성을 촉진시켰고, 특히 DTT는 5 mM에서 효소 활성이 60% 증가하였다.

P. donghaensis JH8이 생산하는 xylanase의 내열성을 조사하였다. Figure 4에서 나타낸 것과 같이 40°C에서는 효소의 활성이 변화가 거의 없이 안정하였다. 50°C에서는 30분 만에 약 40%의 활성으로 떨어진 후 2시간 동안 유지되었고, 60°C에서는 30분 만에 활성이 효소의 활성이 4%까지 떨어지고 60분 부터는 활성이 완전히 사라졌다.

P. donghaensis JH8이 생산하는 xylanase의 종류를 알아보기 위하여 배양 상등액을 농축하여 SDS-PAGE로 분리한 후 활성염색을 수행한 결과 Fig. 5과 같이 42 kDa 부근에 아주 강한 활성밴드가 관찰되었으며, 68과 120 kDa 부근에도 아주

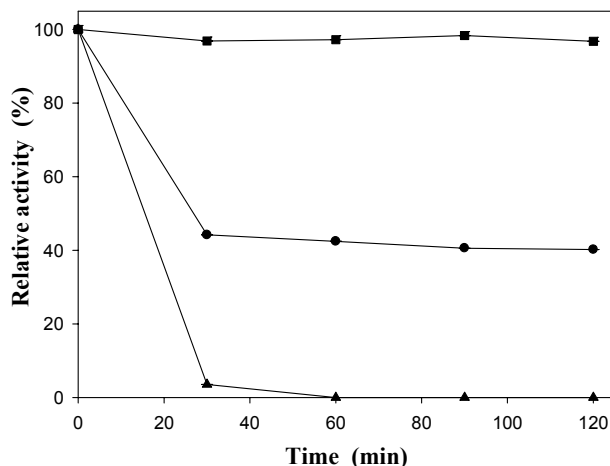


Fig. 4. Thermostability of the xylanase activity. The enzyme was incubated at different temperatures (■, 40°C; ●, 50°C; ▲, 60°C) and the residual activities were assayed with 1% birchwood xylan at pH 6.0. The results are expressed as the means and standard deviations from of three replicated assays.

희미한 활성밴드를 보여주었다.

고찰

세균이나 효모가 생산하는 xylan 분해효소인 xylanase는 산업적인 유용성 때문에 많은 연구가 진행되었다. 특히 제지산업에 사용되는 내열성 xylanase나 내알카리성 xylanase를 생산하는 *Bacillus* 속과 *Paenibacillus* 속 미생물에 대한 연구는 국내에서도 많이 이루어져 왔다(12, 15).

Table 1. Effects of metal ions, EDTA and DTT on xylanase activity

| Metal ion | Relative activity (%) | |
|-------------------|-----------------------|-------|
| | 1 mM | 5 mM |
| None | 100±1 | 100±1 |
| CaCl ₂ | 97±2 | 95±2 |
| MnSO ₄ | 76±1 | 54±2 |
| NaCl | 100±1 | 100±2 |
| FeCl ₂ | 83±1 | 0±0 |
| MgCl ₂ | 100±2 | 97±2 |
| KCl | 102±1 | 99±1 |
| AgNO ₃ | 146±5 | 135±6 |
| CuSO ₄ | 93±2 | 33±1 |
| AlCl ₃ | 79±2 | 11±1 |
| EDTA | 63±6 | 24±1 |
| DTT | 109±1 | 160±4 |

Enzyme assays were performed as described in 'Material and Methods'. Relative activity was defined as percentage of residual activity compared to a control. The results are expressed as the means and standard deviations from of three replicated assays.

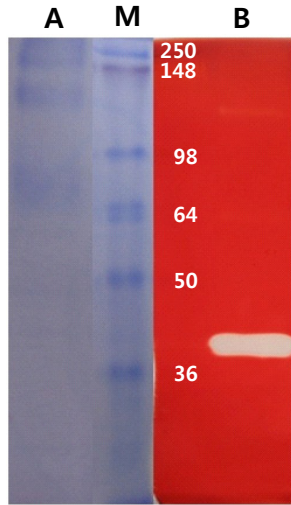


Fig. 5. Xylanase activity profile in culture supernatant of *P. donghaensis* JH8. The 4 µg of concentrated culture supernatants were boiled for 10 min and applied to lane A and B of SDS-8% PAGE gel. Lanes were either stained with Coomassie brilliant blue R250 (Lanes A and M) or examined for xylanase activities (lane B) by the Congo red procedure.

본 연구에서는 동해의 심층 퇴적물에서 분리한 *P. donghaensis* JH8가 생산하는 세포의 xylanase의 특성을 조사해 보았다. 미생물이 xylan을 분해하기 위하여 생산하는 효소로는 대표적으로 xylanase와 β-xylosidase가 있는데 β-xylosidase는 세균이나 효모에서는 주로 세포 내에 존재한다(18). *P. donghaensis* JH8는 세포외로 xylanase를 분비하여 세포배양 상등액을 조효소액으로 사용하여 활성을 조사하였으며, 유도 기질인 birchwood xylan이 존재하지 않으면 소량의 xylanase만을 생산하였다. 배지에 0.1%-0.5%의 xylan 존재시 10배 많은 xylanase를 유도생산 하였으며, 0.5% 이상의 농도에서는 오히려 생산성이 크게 감소하였으며 이런 특성은 Lee(12)의 내열성 *Paenibacillus* sp. DG-22과 같은 양상을 보였다. *P. donghaensis* JH8은 기질의 존재 하에 대수증식기에서 xylanase의 생산성이 급격히 증가하였고 정지기에서 최대생산성을 일정하게 유지하였다. 사멸기에도 생산성은 떨어지지 않고 일정하게 유지하였다. 그러나 Park 등(15)의 *Bacillus alcalophilus* AX2000는 사멸기에서 효소 생산성이 증가하고, Na 등(14)의 *Bacillus* sp. YA-14는 정지기에서 효소 생산성이 줄어드는 것과는 다른 특성을 나타내었다. *P. donghaensis* JH8은 MB 배지에서 birchwood xylan의 존재하에 최대 55 mU의 활성을 나타내었는데 토양이나 목재에서 분리한 다른 *Paenibacillus* 속과 *Bacillus* 속의 미생물이 생산하는 xylanase의 활성보다 4-500배 낮은 활성을 보였다. 이러한 결과는 해양 심층퇴적물에서 존재하는 미생물과 xylan 분해가 활발히 일어나는 토양과 목재에서 존재하는 미생물의 차이 때문이라고 생각된다.

P. donghaensis JH8가 생산하는 xylanase는 40°C, pH 6.0

에서 최대 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 대부분의 초호열성균을 제외한 중온성과 호열성 세균들에 의해 생산되는 xylanase의 최적온도가 70°C 이하에 있다는 것과 부합하였으며(10, 16), 최적온도가 보고된 것 보다 다소 낮은 편이었고, 지금까지 알려진 대부분의 세균 유래의 xylanase들이 산성 또는 중성의 최적 pH를 가지고 있다는 것과 유사하였다(10, 16). 또한 xylanase의 활성이 40°C 이상의 온도에서 감소하다 55°C에서 다시 증가한 후 감소하는 특이한 결과가 나타났다. 이런 결과는 배양 상등액에 상이한 효소의 존재 가능성이 있어 zymography 분석을 시행한 결과 42 kDa 부근에 아주 강한 활성밴드와 68과 120 kDa 부근에 아주 약한 활성밴드가 관찰되었다. 그러나 고분자의 두 밴드 양이 미미하여 다른 종류의 효소인지 아니면 조효소액 획득과정 중의 세포내 효소들의 오염에 의한 것인지 연구가 필요하며, 더불어 활성밴드의 크기가 기존에 보고된 같은 속의 *Paenibacillus* sp. DG-22와는 다른 크기를 보여 주어 연구의 가치가 있을 것으로 사료되었다(12).

P. donghaensis JH8가 생산하는 xylanase는 Na⁺, Mg²⁺, K⁺에 의해서는 거의 영향을 받지 않았고, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Cu²⁺, Al³⁺와 금속 결합물질인 EDTA에 의해서는 활성이 억제되었으나, Ag⁺에 의해서는 활성이 강하게 증가되었다. 단백질 이황화 결합의 환원제인 DTT에 의해서는 활성이 촉진되어 cysteine 효소의 활성화에 영향을 미쳤다. 이런 결과는 *Paenibacillus* sp. DG-22의 xylanase가 Ca²⁺과 EDTA에 의해 활성화되는 것과 다른 특성을 보였다(12). 열 안정성에 있어서는 60°C에서는 30분 만에 활성이 거의 사라져 중온성 균이 생산하는 효소들 보다 낮은 안정성을 보였으며, 이런 결과를 종합하면 같은 *Paenibacillus* 속에서도 다양한 xylan 분해효소들이 존재한다는 것을 알 수 있었다.

동해 심층 퇴적물로부터 분리한 *P. donghaensis* JH8가 생산하는 xylanase는 저온 적응성 미생물이 생산하는 유용한 효소라는 이점과 토양 및 목재에서 분리한 미생물이 생산하는 xylanase와 많은 유사한 특성을 가지면서도 상이한 특성을 가지고, 그 생산성이 너무 낮아 산업적으로 활용하거나 정제된 효소의 정확한 특성을 알기 위해서는 *P. donghaensis* JH8의 xylanase 유전자 클로닝을 통한 대량생산의 필요성이 있는 것으로 판단되었다.

적요

Xylanase는 선형복합다당인 β-1,4-xylan을 xylose로 가수분해하는 효소의 한 종류이며, 종이제조공정에 응용되고 미래에 바이오 연료의 생산에 사용 될 수 있다. 동해 심층 퇴적물로부터 신종세균으로 보고된 *Paenibacillus donghaensis* JH8은 배지중의 xylan을 분해한다고 알려져 있으며, 여기에서는 이 효소의 특성을 조사하였다. 효소는 0.1% xylan 존재에서 최고로 유도되었으며, xylanase의 생산은 초기 대수성장기에 효소를 생산하기 시작하여, 정지기에서 약 55 miliunit에 도달하였다. 세포외성 xylanase의 최적온도와 pH는 각각 40°C와 pH 6.0

이었다. Xylanase의 활성은 Ca^{2+} 및 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , EDTA의 존재에 의해 억제되었고, K^+ , Ag^+ , DTT에 의해 활성화되었다. 이 xylanase는 40°C에서 120분간 활성을 유지하며 안정하였지만, 60°C에서는 30분에서 거의 모든 활성을 잃어버리는 특성을 보여주었다. 농축된 배양 상등액의 zymography 분석시 42 kDa의 주 밴드와 68과 120 kDa에 두 개의 아주 희미한 밴드를 나타내었다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2009).

참고문헌

- Bailey, M.J., P. Biely, and K. Poutanen. 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* 23, 257-270.
- Beguín, P. 1983. Detection of cellulase activity in polyacrylamide gels using Congo red-stained agar replicas. *Anal. Biochem.* 131, 333-336.
- Biely, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* 3, 286-290.
- Cavicchioli, R., K.S. Siddique, D. Andrews, and K.R. Sowers. 2002. Low-temperature extremophiles and their application. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 253-261.
- Choi, J.H., W.T. Im, J.S. Yoo, S.M. Lee, D.S. Moon, H.J. Kim, S.K. Rhee, and D.H. Roh. 2008. *Paenibacillus donghaensis* sp. nov., a xylan-degrading and nitrogen-fixing bacterium isolated from East Sea sediment. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 189-193.
- Johnvesly, B., S. Virupakshi, G.N. Patil, Ramalingam, and G.R. Naik. 2002. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12, 153-156.
- Jose, H.B., F. Fava-De-Moraes, and G.M. Zanin. 1999. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 713-722.
- Kansoh, A.L. and Z.A. Nagieb. 2004. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp. *Antonie van Leeuwenhoek* 85, 103-114.
- Kim, D.J., H.J. Shin, and K.H. Yoon. 1995. Isolation of a thermophilic *Bacillus* sp. producing the thermostable cellulase-free xylanase, and properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 304-310.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 411-456.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee, Y.E. 2004. Isolation and characterization of thermostable xylanase-producing *Paenibacillus* sp. DG-22. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 22-28.
- 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.
- Na, K.H., J.M. Kim, H.K. Park, D.H. Bai, and J.H. Yu. 1990. Recombinant plasmid DNA containing xylanase and β -xylosidase gene of *Bacillus* sp. YA-14. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 195-198.
- Park, Y.S. and T.Y. Kim. 2003. Isolation of *Bacillus alkalophilus* AX2000 producing alkaline xylanase and enzyme production. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 157-164.
- Subramanian, S. and P. Prema. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 22, 33-64.
- Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17, 39-67.
- Wong, K.K.Y. and J.N. Saddler. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 413-435.
- Yoon, K.H., S.J. Seol, H.C. Cho, M.S. Lee, J.H. Choi, and K.H. Cho. 2002. Isolation and enzyme production of a xylanase-producing strain, *Bacillus* sp. AMX-4. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 123-128.