

Xylanase를 생산하는 호알칼리성 균주의 분리 및 동정

최지휘 · 배동훈*
단국대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Alkalophilic Microorganism Producing Xylanase

Ji-Hwi Choi and Dong-Hoon Bai*

Department of Food Engineering, Dankook University

Abstract

An alkalophilic microorganism named DK-2386, which produces xylanase, was isolated from soil of Taejo-mountain, Cheonan-si, Chungnam, Korea. The isolated strain was characterized as Gram-positive, with size of $0.4 \times 2.5 \mu\text{m}$, spore forming, anaerobic, catalase positive, possessed with hydrolysis abilities of casein, starch, sodium carboxy methyl cellulose, and xylan, reduction of nitrate to nitrite, resistant against lysozyme, urease positive, and motility positive. The color of culture broth was reddish yellow. The strain DK-2386 was identified as *Bacillus agaradhaerens* by whole cell fatty-acid composition analysis and 16S rDNA sequence analysis. However, it was not identical to *Bacillus agaradhaerens* 40952 obtained from the Korean Culture Center of Microorganism in its colour of culture broth. Therefore, we have named the newly isolated strain as *Bacillus agaradhaerens* DK-2386.

Key words: *Bacillus agaradhaerens*, alkalophiles, xylanase

서 론

Hemicellulose는 cellulose에 이어 자연계에 두 번째로 널리 존재하는 다당류로서 기본적으로 D-xylan과 D-mannan로 구성되어 있으며 이외에도 여러 당류들의 다양한 결합을 가지는 이형다당류(heteropolysaccharide)이다(Lee, 1999). Hemicellulose의 주성분을 이루는 xylan 및 xylan 유도체의 함량은 침엽수에는 20-45%, 활엽수에는 80-90%, 밀, 보리, 벼, 귀리 등의 짚에는 68-78% 정도로 식물체의 종류에 따라 다양하다. 그 중 일년생 농작물 및 자작나무에서 주로 발견되는 xylan은 5탄당인 D-xylose가 β -1,4 결합으로 구성되어 있는 중합체로서 D-glucose, L-arabinose, D-gluconic acid가 일부 결합되어져 있으며 해조류에서 발견되는 xylan의 경우 D-xylose가 β -1,3 결합으로 구성되어있다(Horikoshi & Akiba, 1982). Xylan을 분해하기 위해서는 산이나 알칼리 처리와 같은 화학적 방법 이외에 미생물이 생산하는 xylan 분해효소를 이용하는 방법 혹은 이 두 가지 방법을 병용하

여 D-xylose를 생산하는 방법이 있다(Dekker, 1983). 이 중 xylan에 대한 가수분해 효소는 동식물 및 미생물에 의해 널리 생산되고 있으며 각각 그 기질에 대한 특성을 가지고 있다. 특히 xylanase를 생산하는 토양미생물의 경우 종 다양성의 풍부함에 비하여 현재 1%미만의 종만이 알려져 있고 나머지 99%는 미개발 자원으로서 유용 생물소재가 고온, 고염, 알칼리 등 특수 환경 미생물에서 다수 탐색되고 있으므로 이에 대한 체계적인 탐색이 요구되고 있다(Chiara & Mario, 2005).

Xylanase는 1,4- β -D-xylan의 1,4- β -D-xylopyranosyl 결합을 절단하는 효소로서 절단 위치에 따라 xylanohydrolase, endo-xylanase, exo-xylanase로 나눌 수 있다. 이러한 xylanase를 생산하는 미생물 중 세균의 경우 주로 endo-type으로 작용하고 곰팡이 유래의 xylanase는 exo나 endo-type으로 작용하는 것으로 보고되고 있으며(Nascimento, 2002) 이러한 xylanase를 생산하는 미생물로는 *Bacillus licheniformis*(Kim, 2008), *Bacillus circulans*(Heck, 2006), *Thermomyces lanuginosus*(Puchart, 2008), *Aspergillus fumigatus*(Wase, 1985), *Aspergillus niger*(Liu, 2008), *Aspergillus ficuum*(Lu, 2008)등을 들 수 있다.

현재 xylanase의 산업적 응용 가치는 생화학과 분자생물학 분야의 지속적인 연구를 통하여 점차 중요한 효소로서 자리매김 하고 있다. 특히 pulp 및 제지의 생산과 표백에

Corresponding author: Dong-Hoon Bai, Department of Food Engineering, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Tel: +82-41-550-3562; Fax: +82-41-550-3566
E-mail: baidh@dankook.ac.kr

Received July 8, 2010; revised August 16, 2010; accepted August 18, 2010

있어 공정 중 알칼리성 조건 하에서 필수적으로 사용되고 있어 xylanase의 특성과 합성기작 및 반응에 대한 분석이 중요시되고 있다(Jose et al., 1999). 아울러 자연계에 풍부한 목질계 바이오매스로부터 대체에너지로 활용성이 대두되고 있는 bioethanol 등과 같은 바이오에너지의 생산 및 가축의 사료제조에 유용하게 사용될 수 있다(Wong & Saddler, 1992). 특히 근래까지 D-xylose를 ethanol 발효에 이용하지 못하였으나 1980년대 들어 D-xylose로부터 ethanol을 생산할 수 있는 미생물인 *Pachysolen tannophilus*, *Candida tropicalis* 등이 발견됨으로써 D-xylose의 이용가능성이 높아지게 되었다(Watson et al., 1984; Sebastin, 2008). 현재 식품첨가물 중 감미료로서 각광 받고 있는 xylitol의 경우 D-xylose의 당알콜로서 다른 당류에 비해 인체 내 흡수가 적고 설탕의 1/2 정도의 칼로리를 가지며 혈당치는 상승시키지 않으면서 설탕과 유사한 당도를 지니고 있어 인슐린 비의존성 당뇨병환자를 위한 중요한 당 대체 원료로의 이용성이 점차 확대되고 있으며 xylan의 분해 산물인 D-xylose를 *Candida*속 등의 효모를 이용하여 xylose로부터 xylitol을 생산하는 연구가 많이 진행되고 있다(Mayerhoff et al., 1997; Parajet al., 1998).

Xylanase는 지금까지 주로 *Bacillus*속 미생물과 *Aspergillus*속 미생물이 생산하는 것으로 알려져 있는데 특히 세균인 *Bacillus*에 의해 생산되는 xylanase의 경우 곰팡이인 *Aspergillus*속 곰팡이에 비해 배양시간이 짧고 많은 효소를 단 시간 내에 얻을 수 있으며 중성, 알칼리성 등의 환경적 조건에 적합한 효소를 쉽게 생산할 수 있다는 장점을 가지고 있다(Bindu et al., 2007). 특히 물에 불용성인 xylan이 알칼리 조건에서는 쉽게 용해된다는 장점 때문에 호알칼리성 미생물이 생산하는 xylan 분해효소에 관하여 많은 관심이 집중되고 있다. 따라서 본 연구에서는 xylanase를 생산하는 호 알칼리성 세균을 토양으로부터 분리하여 동정하였다.

재료 및 방법

Xylanase를 생산하는 균주의 분리 및 선별

충남 천안시 태조산에서 서식중인 나무의 뿌리 주변 토양 및 죽은 나무 주변의 토양을 채취하여 알칼리성 배지에서 생육하는 균주를 선별하였다. 균주 선별 방법은 각각의 토양시료 1 g을 생리식염수 10 mL에 현탁하여 20분 동안 정지시킨 후 상등액 100 μ L를 취하여 Horikoshi I 평판배지에 각각 도말하고 20, 30, 40, 50, 60°C의 각 온도에서 24시간 배양하여 온도별로 생육한 균주를 1차로 선별하였다(Table 1).

1차 선별된 균주들 중 xylan 분해효소 활성을 확인하기 위하여 xylan(oat spelt)이 1% 농도로 함유된 Horikoshi I 평판배지에 균주를 천자 점종하여 24시간 배양한 뒤 Congo red 시약을 가하여 20분간 염색하고 1 M NaCl로

Table 1. Formulation for Horikoshi I medium

Componet	(g/L)
Glucose*	10.0
Polypeptone	5.0
Yeast extract	5.0
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Na ₂ CO ₃ *	10.0
Agar	20.0
pH	10.2

*Separate sterilization

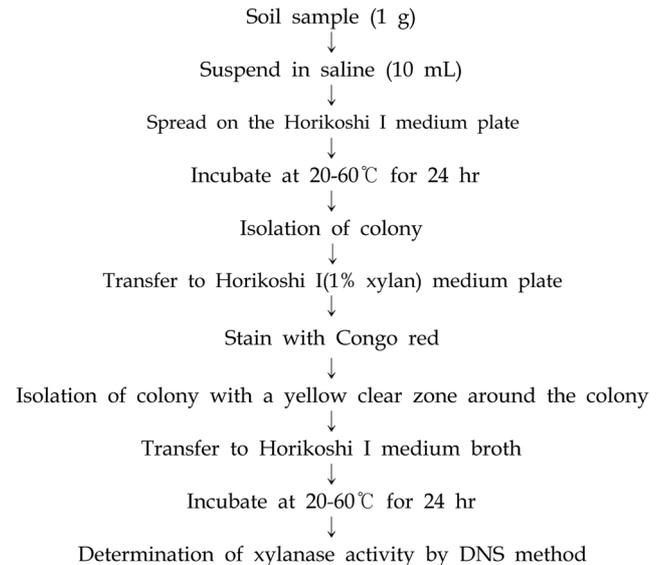


Fig. 1. Screening procedure of xylanase-producing bacteria from soil.

2-3회 수세하여 균의 집락 주위에 황색의 clear zone을 형성하는 균주를 xylanase 활성을 갖는 균주로 2차 선별하였다. 2차 선별한 균주를 Horikoshi I 액체배지에 접종하여 24시간 진탕배양한 후 원심분리하고 상등액에 존재하는 xylanase 활성을 측정하여 상대적으로 효소활성이 가장 높은 균주를 선별하였다(Fig. 1).

Xylanase 활성측정

Xylanase 활성은 DNS법(Nelson, 1944)에 의한 환원당 정량법을 사용하였다. 1% Xylan 용액(oat-spelt xylan in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) 800 μ L에 효소액 200 μ L를 혼합하여 60°C에서 20분간 반응시킨 후 반응액 300 μ L에 dinitrosalicylic acid(DNS)용액 3 mL를 가하여 반응을 정지시키고 100°C에서 10분간 가열하였다. 냉각 후 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 2). 표준곡선은 D-xylose(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)로 0-1,000 μ g/mL를 사용하였고 1 unit는 분당 1 μ mol의 D-

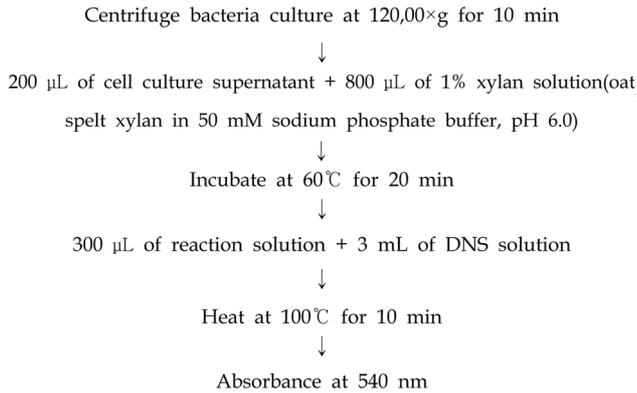


Fig. 2. Measurement of xylanase activity using DNS method.

xylose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. DNS 시약은 dinitrosalicylic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.5 g과 potassium sodium tartrate tetrahydrate 150 g을 2 M NaOH 용액 50 mL와 혼합한 후 증류수 250 mL에 희석하여 사용하였다.

균주의 형태적, 생화학적 특성

균주의 형태적 특성은 24시간 배양한 균체를 Gram staining(Philipp et al., 1944a) 후 광학현미경을 이용하여 관찰하였으며, 또한 주사현미경(SEM)을 이용하여 균주 표면을 입체적으로 관찰하였다. 균주의 생화학적 특성은 Methods for General and Molecular Bacteriology(Philipp et al., 1944b)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(Kreig & Halt, 1984), 그리고 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria(Macfaddin, 1980)에 준하여 균주의 특성을 조사하였다.

(1) 포자형성 확인

Horikoshi I 배지에 24시간 배양된 균주배양액을 1 mL 취하여 100°C에서 20분간 증탕하였다. 이를 100 μL 취한 후 Horikoshi I 한천배지에 pouring하여 40°C에서 24시간 배양하고 colony 형성여부 확인을 통하여 포자형성능력을 확인하였다. 재확인을 위하여 spore staining method(Philipp et al., 1944c)중 Schaeffer and Fulton's method를 이용하였다. 균체를 slide glass 위에 도말하고 불꽃 고정한 후 0.5% malachite green 수용액으로 염색하고 불꽃으로 30초 동안 김이 날 정도로 가온 염색하였다. 증류수로 수세 후 Safranin O로 30초간 대조염색하고 재차 수세하여 포자유무를 광학현미경으로 관찰하였다.

(2) Catalase 활성 확인

균주를 백금으로 취하여 slide glass 위에 도말하였다. 35% H₂O₂를 도말된 균체위에 가하여 표면의 기포생성 유무를 확인하였다.

(3) Oxidase 활성 확인

균주를 화염 멸균한 백금으로 취하여 여과지에 고르게 도말한 후 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride(Sigma Co.) 시약을 2-3방울 가하여 10초 이내 색이 청색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

(4) 혐기성 확인

균주를 Horikoshi I medium에 희석 접종하여 gas pack(BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)과 함께 anaerobic jar에 넣고 40°C에서 3일간 배양하여 균체의 생육여부를 확인하였다.

(5) Voges-Proskauer 확인

세균이 glucose를 이용 시 생성된 유기산으로부터 acetoin을 생성하는지 여부를 확인하기 위하여 균주를 MR-VP 배지에 접종하여 40°C에서 24시간 배양하였다. 균 배양액에 Barrit's 시약 A용액 0.6 mL를 가하고 B용액 0.2 mL를 가한 후 1분간 흔들어서 대기 중에서 산화시키고 10-15분간 방치한 후 적색화합물 형성여부를 통해 결과를 판정하였다. A용액은 α -naphthol(Samchun Chemical Co., Seoul, Korea) 0.5 g을 99.9% ethyl alcohol(Duksan Chemical Co., Ansan, Korea) 10 mL에 용해하고, B용액은 KOH(Duksan chemical Co.) 4 g을 증류수 10 mL에 용해하여 사용하였다.

(6) 탄소원으로부터 산 생성 유무 확인

Horikoshi I 액체배지(pH 10.2)에 탄소원으로 D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol을 각각 1%씩 함유한 배지를 제조하고 각 배지에 균주 종배양액을 1% 농도로 접종하여 40°C에서 4×g로 24시간 진탕 배양하였다. pH meter(model 7, CORNING, Pennsylvania, USA)를 사용하여 각 배양액의 pH를 측정하고 산 생성여부를 확인하였다.

(7) Glucose로부터 가스 생성유무 확인

시험관 내에 durham관을 뒤집어 넣은 Horikoshi I 배지(Agar 0.3%)를 제조하고 균주를 접종하여 40°C에서 24시간 배양한 후 durham관 내부에 gas 포집 유무를 확인하였다.

(8) Casein, gelatin, starch, CMC, xylan 가수분해 확인

Horikoshi I 배지에 casein 1%, gelatin 20%, starch 1%, sodium carboxy methyl cellulose(CMC) 1%, xylan(oat-spelt) 1%를 각각 첨가하여 배지를 제조하였다. 균주를 각 배지에 희석 접종하여 40°C에서 24시간 배양 후 casein은 clear zone의 생성 여부를 확인하였고, gelatin은 배양 후 4°C에 냉각하여 gelatin의 액화 여부를 확인하였으며, starch는 배지 표면에 iodine solution을 가하여 clear zone의 생성 여부를 확인하였다. Sodium carboxy methyl cellulose(CMC)와 xylan은 Congo-red 시약을 가하여 20분간 염색 후 1 M NaCl로 2-3회 탈색하여 황색의 clear zone 생성여부를 확인하였다. Congo-red 시약은 Congo-red(Junsei Chemical Co., Tokyo, Japan) 1 g을 증류수 100 mL에 용해하여 사용하였다.

(9) Citrate 이용능 확인

NaCl 0.5%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, (NH₄)₂HPO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1%, sodium citrate 0.2%, Na₂CO₃ 1%, agar 2%

가 함유된 배지의 pH를 9.0으로 조절하고 thymophtalene (Junsei Chemical Co.) 0.008%를 첨가하여 사용하였다. 균주를 배지에 희석 접종하고 40°C에서 24시간 배양하여 파란색의 색변화 시 양성으로 판정하였다.

(10) Phenylalanine 탈아미노화 확인

Yeast extract 0.2%, L-phenylalanine 0.1%, disodium hydrogen phosphate 0.1%, sodium chloride 0.5%를 함유한 배지에 Na_2CO_3 0.5%를 첨가하여 pH 9.0으로 조절하였다. 배지에 균주를 접종한 후 40°C에서 3일간 배양하여 균체 주변에 10% ferric chloride solution을 5-6 drops 가하여 녹색으로 변하는 것을 양성으로 판정하였다.

(11) 난황 분해효소 생성 유무 확인

Tryptone 1%, disodium hydrogen phosphate 0.5%, potassium dihydrogen phosphate 0.1%, sodium chloride 0.2%, magnesium sulfate $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, glucose 0.2%, agar 2%를 함유한 배지의 pH를 9.0로 조절하여 멸균한 후 egg yolk를 1.5%농도로 첨가하여 사용하였다. 균주를 접종한 후 상온에서 1, 3, 5, 7일간 관찰하여 colony 주변의 배지표면에 cloudy(opaque) zone의 생성 여부를 확인하였다.

(12) Nitrate 환원능 확인

Horikoshi I 배지조성에 KNO_3 0.1%(w/v), agar 0.2%(w/v) 농도로 가하여 배지를 제조하였다. 균주 종배양액을 위 배지양의 1% 농도로 접종하고 40°C에서 24시간 배양하여 기포생성 유무를 확인한 후 배양액 100 μL 를 취하고 A용액과 B용액을 1 mL씩 가하여 혼합하였다. 15분 뒤 색변화를 관찰하여 적자색을 나타내는 경우를 양성으로 판정하고 무색인 경우 zinc powder 첨가하여 적색을 나타내면 음성으로 판정하였다. A용액은 *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride(Sigma Co.) 0.02 g을 1 N HCl 100 mL에 용해하여 사용하였으며, B용액은 황산 1 mL를 1 N HCl 100 mL에 용해하여 사용하였다.

(13) Indole 생성능 확인

SIM agar 배지에 균주를 백금선으로 취하여 중앙부에 천자 접종하여 Kovac's 시약 0.2-0.5 mL를 가하여 가볍게 흔든 후 상층시약중층부에 적색환을 생성하면 양성으로 판정하였다. SIM agar는 beef extract 0.3%, peptone 3%, ferrous ammonium sulfate 0.02%, sodium thiosulfate 0.003%, agar 0.3%에 Na_2CO_3 1%를 가하여 pH 9.0으로 조절하여 배지를 제조하였다. Kovac's 시약은 butyl alcohol 15 mL, *p*-dimethylaminobenzaldehyde(Daejung chemical Co.) 1 mL, conc. HCl 5 mL을 혼합하여 사용하였다.

(14) Lysozyme 내성 확인

Peptone 0.5%, beef extract 0.3%, glycerol 7%, Na_2CO_3 1%의 배지를 멸균 후 lysozyme(Sigma-Aldrich) 0.01 g을 0.01 N HCl 10 mL에 용해한 효소액을 0.2 μm membrane syringe filter로 배지의 0.05%양을 가하여 배지를 제조하였다. 균주를 접종하여 40°C에서 4 xg로 3일간 진탕 배양하

여 균체의 생육여부를 확인하였다.

(15) 운동성 확인

Horikoshi I 배지에 agar를 0.3% 첨가한 고층배지를 제조하였다. 균주를 백금선으로 접종하여 균체가 배지내부에 퍼져서 생육하는지 여부를 관찰하였다.

(16) Urease 활성 확인

Horikoshi I 배지에 phenol red(Sigma-Aldrich) 0.01%를 혼합하여 배지를 멸균한 후 urea 2%(syringe filter filtration)를 첨가하여 사면배지를 제조 하였다. 균주를 백금으로 경사면에 희석 접종하여 40°C에서 24시간 배양 후 색의 변화를 확인하였다.

균주의 지방산 조성분석

균주의 whole cell fatty acid 조성을 확인하기 위하여 gas chromatography(HP 6890, Hewlett-Packard Co., New York, NY, USA)를 사용하였다. 표준 지방산으로는 HP사의 표준지방산(calibration standard kit, Hewlett-Packard Co.)을 이용하였다. 균주의 배양은 Horikoshi I 배지를 사용하여 40°C에서 24시간 배양된 균체를 시험관에 취하여 saponification을 위하여 reagent 1(Table 2)을 1 mL 가하고 30분간 100°C에서 중탕 후 흐르는 물에 냉각하였다. Methylation을 위하여 reagent 2(Table 2)를 2 mL 가한 후 80°C에서 10분간 반응시키고 흐르는 물에 냉각하였다. Extraction을 위하여 reagent 3(Table 2)을 1.25 mL를 가한 후 10분간 상온에서 천천히 진탕한 후 하층액을 제거하였다. Washing은 reagent 4(Table 2)를 3 mL가하여 5분간 천천히 진탕하였으며, 층 분리를 위하여 포화 NaCl 용액 500 μL 를 가하여 분리된 상등액을 취해 분석용 시료로 사용하였다. 이것을 GC로 분석 후 Sherlock program(Apple, Inc., Cupertino, CA, USA)을 통하여 분석하였으며 대조군으로서 호알칼리성 세균인 *Bacillus alcalophilus*를 사용하였다.

Table 2. Compositions of reagents for analysis of whole cell fatty acid

No.	Reagents	Composition
I	No.1 (for saponification)	45 g sodium hydroxide
		150 mL methanol 150 mL deionized distilled water
II	No.2 (for methylation)	325 mL 6 N hydrochloric acid
		275 mL methanol
III	No.3 (for extraction)	200 mL hexane
		200 mL methyl <i>t</i> -butyl ether
IV	No.4 (for base washing)	10.8 g sodium hydroxide
		150 mL deionized distilled water

16S rDNA 염기서열 확인

선별균주의 16S rDNA의 염기서열의 분석은 다음과 같은 방법을 따라 행하였다. 균체를 Horikoshi I medium broth로 40°C 4×g로 진탕 배양 후 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체로부터 chromosomal DNA를 lysozyme-sodium dodecyl sulfate-proteinase K 방법으로 추출하였다. 분리된 chromosomal DNA를 template로 사용하여 polymerase chain reaction(PCR) 방법에 의하여 16S rDNA를 증폭하였다. PCR에 사용된 primer는 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal primer(forward primer: Eubacterial 27F: 5'-AGAG TTTGATCATGGCTCAG-3', reverse primer: Universal 1492R: 5'-GGATACCTTGITACGACTT-3')를 사용하였다(Yoon et al., 1996).

증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, Wisconsin, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 DNA Analyzer(ABI PRISM 3730, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X 와 Mega 2 program 을 이용하여 비교분석하였다(Thompson et al., 1994).

결과 및 고찰

Xylanase를 생산하는 균주의 분리 및 선별

채집한 토양으로부터 호알칼리성 균주 중 xylanase를 생산하는 균주의 선별은 alkaline 조건에서 생육하는 균주 3,000주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주 중 균체 주위의 황색 clear zone 형성 및 크기에 의한 xylanase 활성을 확인하여 균주 5주를 2차 선별하였다. 2차 선별한 균주의 배양상등액으로부터 DNS법을 이용하여 xylanase 효소활성을 측정된 결과 40°C에서 가장 활성이 좋은 균주를 1주 선별할 수 있었으며, 이를 strain DK-2386이라 명명하였다.

균주의 형태적, 생화학적 특성

(1) 형태적 특성

Strain DK-2386 균주의 형태적 특성은 Gram 양성 간균으로 확인되었다. Gram 염색여부를 재확인하기 위하여 KOH 법⁽³³⁾을 이용한 결과 KOH법 음성, 즉 Gram 양성임을 재확인하였다. SEM 촬영결과 균체의 크기는 0.4×2.5 μm 정도의 크기였으며 매끈한 균체표면을 가지고 있었다(Fig. 3).

(2) 생화학적 특성

Strain DK-2386 균주의 포자형성 유무를 확인한 결과 균주의 생육이 관찰되었다. 또한 Schaeffer and Fulton's method를 이용하여 포자염색 후 광학현미경을 사용하여 확인한 결과 균체 내부에 내생포자가 malachite green에 의해 녹색으로 염색되어 관찰되었다. 도말된 균체위에

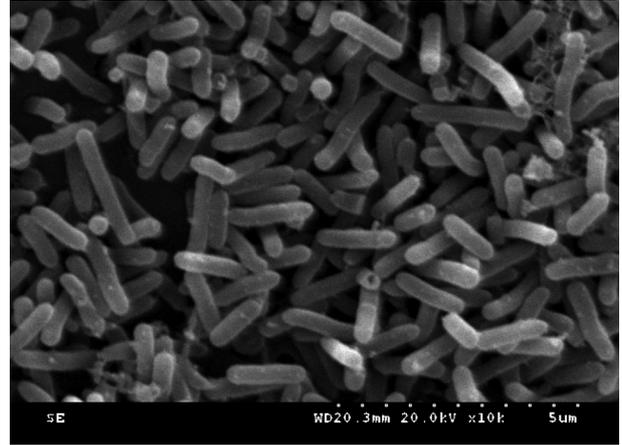


Fig. 3. Scanning electron microscopic photograph of strain DK-2386.

H₂O₂를 가한 결과 기포생성이 관찰되어 catalase 양성임을 확인 할 수 있었다.

Oxidase 활성 확인 결과 1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine-dihydrochloride를 2-3방울 가하고 10초 이내에 색이 변하는 경우가 80%에 해당하였으며 10초 이후에 색이 변하는 경우가 20%에 해당하였다. 따라서 의양성으로 판정하였다. 또한 혐기적인 조건하에서 균체를 배양한 결과 관찰 1일째에서 균체의 생육이 육안으로 관찰되어 혐기성 양성임을 확인할 수 있었다.

Voges-Proskauer test에 있어 용액 A, B를 가하여 대기 중에서 산화시킨 후 방치하여 관찰한 결과 적색화합물이 관찰되지 않아 음성임을 확인할 수 있었으며, 탄소원을 각각 달리하여 제조한 Horikoshi I(pH 9.0) 액체배지에 균주를 40°C에서 24시간 진탕배양 후 pH를 측정된 결과 각 배양액의 pH가 8.0 부근으로 낮아져 사용된 탄소원으로부터 산을 생성함을 확인할 수 있었다. 또한 glucose로부터 gas 생성여부를 판단하기 위하여 시험관의 배지 내에 Durham관을 뒤집어 넣고 배양한 결과 Durham관 내부에 포집된 기포를 육안으로 확인할 수 있었다.

Casein을 함유된 Horikoshi I 배지의 균체주위에 clear zone이 관찰되었으며, starch가 함유된 배지에 있어서도 iodine 용액을 가하자 균체주위의 clear zone을 확인할 수 있었다. CMC와 xylan(oat spelt)을 첨가한 배지에 Congo red로 배지를 염색하고 1M NaCl로 탈색한 결과 균체주위의 황색 clear zone을 육안으로 확인할 수 있었다. 그러나 gelatin을 가수분해할 수 있는 능력은 없는 것으로 확인되었다.

Citrate 이용능을 확인한 결과 배양 후 배지의 색이 변화하지 않았으므로 음성임을 확인할 수 있었다. Phenylalanine 탈아미노화에 있어서도 균체주변의 색변화를 관찰할 수 없었으며, 또한 난황 분해효소 생성 유무 실험에 있어서도 배지 표면에 cloudy(opaque) zone이 형성되지 않아 음성임을 확인할 수 있었다.

Nitrate를 nitrite로 환원하는 능력을 확인한 결과 nitrate를 첨가한 Horikoshi I 배지에 기포가 포집되어 있음을 육안으로 확인할 수 있었다. A용액과 B용액을 가한 후 무색으로 색의 변화가 나타나지 않아 배지내부에 존재하는 nitrate를 검출하기 위하여 zinc powder를 가하였으나 zinc powder를 가한 뒤에도 색의 변화가 나타나지 않았다. 따라서 배지 내에 nitrite가 더 환원되어 검출되지 않은 것으로 판단하여 nitrate 환원능 양성으로 판정하였다.

Indole 형성 실험에 있어서는 strain DK-2386 균주가 배양된 SIM 배지에 Kovac's 시약을 가하여 혼합한 결과 무

Table 3. Physiological characteristics of strain DK-2386

균 번호	Strain DK-2386	<i>B. alcalophilus</i>
Broth color	redish yellow	yellow
Form	rod	rod
Gram staining	+	+
Spore forming	+	+
Catalase	+	+
Oxidase	d	+
Anaerobic	+	-
Voges-proskauer test		
<6	-	-
>7	-	-
Acid		
D-glucose	+	+
L-arabinose	+	+
D-xylose	+	+
D-mannitol	+	+
Gas from glucose	+	-
Hydrolysis		
casein	+	+
gelatin	-	+
starch	+	+
carboxymethyl cellulose	+	-
Xylan(oat spelt)	+	-
Utilization		
citrate	-	-
Deamination of phenylalanine	-	-
Egg-yolk lecithinase	-	-
Nitrate reduced to nitrite	+	-
Formation of indole	-	-
NaCl and KCl required	-	-
Growth at pH		
6.8, nutrient broth	-	-
5.7	-	-
Growth with lysozyme present	+	-
Autotrophic with H ₂ + CO ₂ or CO	-	-
Gas from nitrate	+	-
Growth at pH 5	-	-
Motility	+	-

Table 3. Physiological characteristics of strain DK-2386 (continued)

균 번호	Strain DK-2386	<i>B. alcalophilus</i>
SIM	-	-
Urease	+	-
Growth at NaCl (%) solution		
2	+	d
5	+	-
7	+	-
10	+	-
15	-	-
17	-	-
18	-	-
20	-	-
Growth temp (°C)		
20	-	-
30	+	+
40	+	+
50	-	+
60	-	-

"+" : positive

"-" : negative

"d" : 11-89% of strains are positive.

색으로서 색의 변화가 나타나지 않아 음성임을 확인할 수 있었다. 그러나 lysozyme 내성 실험에 있어 lysozyme을 배지농도의 0.05%가한 배지에서 배양 1일째 균체의 생육이 관찰되어 균주가 lysozyme에 대한 내성이 있는 것을 확인할 수 있었다.

운동성을 확인하기 위하여 agar를 0.3% 첨가한 Horikoshi I 배지의 천자점종 부위에서 점종주위 주변으로 균체가 퍼져가며 자라나 운동성을 확인할 수 있었으며 urease 활성에 있어서도 strain DK-2386 균주를 urease test agar에 획선 점종하여 배양한 점종부위의 색이 적색으로 변하여 양성임을 확인할 수 있었다.

실험균주로 사용된 strain DK-2386균주의 경우 호알칼리성 균주인 관계로 생화학적 실험에 있어 모든 배지의 조건을 pH 9.0 이상의 알칼리 조건으로 설정하여야 하는 제한이 있어 반응에 이용되는 지시약도 알칼리성 부근에서 변화범위를 측정할 수 있는 지시약을 사용하였다. 각 실험의 양성, 음성 절대대조균으로는 실험서에 기술된 균주를 사용하였다. 본 실험에 있어 대조균으로는 (사)한국중균협회에서 분양 받은 *B. agaradhaerens* 40952 균주와 *B. alcalophilus* 를 사용하였다. 대조실험결과 배양액의 색상을 제외한 모든 결과에 있어 strain DK-2386과 *B. agaradhaerens* 40952균주가 동일한 특성을 가지고 있음을 확인하였으며, *B. alcalophilus*와는 다른 특성을 가지는 것을 확인하였다 (Table 3).

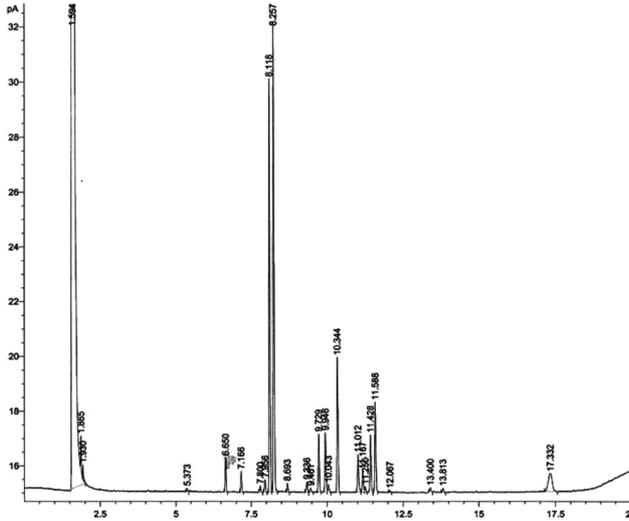


Fig. 4. Whole cell fatty acid composition of strain DK-2386 by gas chromatography.

균주의 지방산 조성 분석

호알칼리성 미생물인 strain DK-2386 균주의 whole cell fatty acid를 gas chromatography로 분석하였다(Fig. 4). Strain DK-2386은 C_{15:0} ISO 27.35%와 C_{15:0} ANTEISO 31.54%, C_{16:0} 9.70%로 분석되었으며 C_{17:0} ANTEISO 6.65%가 있는 것으로 확인되었다(Table 4). 이는 대조균으로 사용한 호알칼리성 세균인 *B. alcalophilus*와 매우 유사한 지방산 분포를 갖는 것을 확인할 수 있었으며 또한 MIDI data base 상에서도 *Bacillus* 속으로 동정되었다.

16S rDNA 염기서열 확인

호알칼리성 strain DK-2386 균주의 16S rDNA sequence

Table 4. Cellular fatty acid composition of strain DK-2386

Strain DK-2386 <i>B. alcalophilus</i>		
Fatty acid composition	(%)	(%)
C ₁₄ : ^{a b d} ISO	2.11	0.6
C ₁₄ :0	1.37	0.5
C ₁₅ :0 ISO	27.35	31.8
C ₁₅ :0 ANTEISO ^c	31.54	42.9
C ₁₅ :0	0.60	0.3
C ₁₆ :0 ISO	4.09	1.0
C ₁₆ :0	9.07	2.1
C ₁₇ :0 ISO	4.20	4.3
C ₁₇ :0 ANTEISO	6.65	11.2
C ₁₇ :0	0.14	ND
C ₁₈ :0	0.33	ND

a : number of carbon
 b : number of double bond
 c : anteisomer
 d : isomer
 ND : not detected

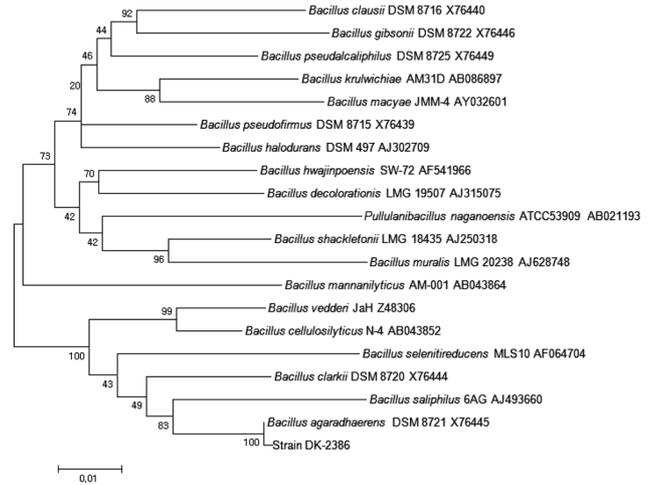


Fig. 5. Dendrogram of strain DK-2386 through 16S rDNA gene sequence homology, scale bar, 0.01 estimated substitution per nucleotide position.

를 분석한 결과 1,398 bp의 염기서열을 확인할 수 있었으며, 이를 Genbank에서 유사성을 검정한 결과 등록된 균주 중 *B. agaradhaerens*과 일치하는 것으로 나타내었다. 그러나 생화학적 특성에 있어 배양액의 색이 (사)한국종균협회로부터 분양받은 *B. agaradhaerens* 40952에 비하여 붉은 빛을 띠고 있어 속과 종은 같으나 미세하게 다른 균주임을 확인할 수 있었다. 따라서 본 균주를 *B. agaradhaerens* DK-2386으로 명명하였다. 균종간의 유의성은 Genbank에 등록된 균주의 16S rDNA를 사용하여 dendrogram을 통해 확인하였다(Fig. 5).

요 약

Xylanase를 생산하는 호알칼리성 균주를 토양으로부터 분리하여 동정하였다. 토양으로부터 분리한 호알칼리성 균주 3000여종 중 xylanase 활성이 가장 높은 균주인 strain DK-2386 균주를 선별하였다. Gram 염색과 SEM을 통한 형태학적 특성을 관찰하였으며, Methods for General and Molecular Bacteriology와 Bergey's manual of systematic bacteriology, 그리고 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 준하여 생화학적 특성을 확인한 결과 배양액의 색은 붉은 빛을 나타내었으며, Gram양성 간균, 내생 포자형성, catalase 양성, oxidase 양성, 혐기성 양성, glucose로부터 gas 형성 양성, casein 가수분해 양성, starch 가수분해 양성, CMC 가수분해 양성, xylan 가수분해 양성, nitrate 환원능 양성이며 10% NaCl 농도에서도 생육하는 것을 확인하였다. 균체의 지방산 조성 분석 결과 C_{15:0} ISO 27.35%와 C_{15:0} ANTEISO 31.54%, C_{16:0} 9.70%로 이루어져 *Bacillus*속으로 동정되었으며, 16S rDNA 염기서열 분석결과 *B.*

*agaradhaerens*와 100%의 유사성을 갖는 것을 확인하였다.

(사)한국중균협회로부터 분양받은 *Bacillus agaradhaerens* 40952, *B. alcalophilus*와 strain DK-2386 균주사이의 생화학적 특성을 비교한 결과 *B. agaradhaerens*와 속과 종이 같으나 미세하게 특성이 다른 균주로 판단되어 *B. agaradhaerens* DK-2386이라 명명하였다.

참고문헌

- Bindu B, Saurabh SD, Ramesh CK. 2007. Enhanced production of cellulase-free thermostable xylanase by *Bacillus pumilus* ASH and its potential application in paper industry. *Enzyme Microbial Technol.* 41: 733-739.
- Chiara S, Mario DR. 2002. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends Biotechnol.* 20: 515-521.
- Dekker RFH. 1983. Bioconversion of hemicellulose - Aspects of hemicellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 1127-1146.
- Horikoshi K, Akiba T. 1982. Alkalophilic microorganism. Springer-Verlag Publ. co., New York, NY, USA. pp. 117-119.
- Jose HB, Fava-De-Moraes F, Zanin GM. 1999. Bleaching of kraft pulp with commercial xylanase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77: 713-722.
- Heck JX, Barros Soares LH, Hertz PF. 2006. Purification and properties of a xylanase produced by *Bacillus circulans* BL53 on solid-state cultivation. *Biochem. Eng.* 32: 179-84.
- Kim MJ, Lim SJ, Kang DK. 2008. Isolation of *Bacillus licheniformis* DK42 Producing Cellulase and Xylanase, and Properties of the Enzymes. *J. Anim. Sci. Technol.* 50: 429-436.
- Kreig NR, Halt JG. 1999. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA.
- Lee SY, Papoutsakis ET. 1999. *Metabolic Engineering*. Marcel Dekker INC., New York, NY, USA. p. 287.
- Macfaddin JF. 1980. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, pp. 4-12.
- Mayerhoff ZDVL, Roberto IC, Silva SS. 1997. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *J. Biotechnol.* 19: 407-409.
- Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S. 2002. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soi., *Enzyme Microbial Technol.* 31: 549-555.
- Nelson N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375-380.
- Parajó JC, Dominguez H, Dominguez JM. 1998. Biotechnological production of xylitol. part 3 : operation in culture media made from lignocellulose hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 66: 25-40.
- Philipp, G, Murray RGE, Wood WA, Noel RK. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*. American society for Microbiology, New York, NY, USA. pp. 607-700.
- Sebastián S. 2008. Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 709-716.
- 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.
- Wase DAJ, Raymahasay S., Wang, CW. 1985. Production of β -d-glucosidase, endo-1,4- β -d-glucanase and d-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enzyme Microbial Technol.* 7: 225-229.
- Watson NE, Prior BA, Lategan PM. 1984. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from d-xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microbial Technol.* 6: 451-456.
- Wong KKY, Saddler JN. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries. In: *Hemicellulose and Hemicellulases*. Portland Press, London, UK, pp. 127-143.
- Liu X, Lu X, Liu L, Jia X. 2008. Effect of culture temperature alteration of *Aspergillus niger* A-25 on its production of xylanase. *J. Biotechnol.* 136(Supplement 1): S290-S344.