

화학수식제에 의한 *Bacillus alcalophilus* AX2000 유래 Xylanase의 활성에 관여하는 아미노산 잔기의 확인

박영서*

경원대학교 생명공학부, 한국표준미생물은행

Identification of Amino Acid Residues Involved in Xylanase Activity from *Bacillus alcalophilus* AX2000 by Chemical Modifiers. Park, Young-Seo. Division of Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea, Type Culture Bank of Korea, Seongnam 461-701, Korea – The purified xylanase from *Bacillus alcalophilus* AX2000 was modified with various chemical modifiers to determine amino acid residues in the active site of the enzyme. Treatment of the enzyme with group-specific reagents such as carbodiimide or *N*-bromosuccinimide resulted in complete loss of enzyme activity. These results suggested that these reagents reacted with glutamic acid or aspartic acid and tryptophan residues located at or near the active site. In each case, inactivation was performed by pseudo first-order kinetics. Inhibition of enzyme activity by carbodiimide and *N*-bromosuccinimide showed non-competitive and competitive inhibition type, respectively. Addition of xylan to the enzyme solution containing *N*-bromosuccinimide prevented the inactivation, indicating the presence of tryptophan at the substrate binding site. Analysis of kinetics for inactivation showed that the loss of enzyme activity was due to modification of two glutamic acid or aspartic acid residues and single tryptophan residue.

Key words: *Bacillus alcalophilus*, xylanase, chemical modification, active site

식물 세포벽의 구성성분인 xylan은 5탄당인 D-xylose가 β -1,4 결합을 하고 있는 hemicellulose계 중합체로서 일반적으로 acetyl기, arabinosyl기, glucuronosyl기 등의 측쇄를 지니고 있는 복합 구조를 가지고 있다[7,18]. 자연계에서 cellulose 다음으로 많이 존재하는 xylan의 가수분해에는 β -1,3 xylanase[exo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase(EC.3.2.1.72), endo-(1 \rightarrow 3)- β -D-xylanase(EC.3.2.1.32)]와 (1 \rightarrow 4)- β -D-xylan xylanohydrolase[endo-1,4- β -D-xylanase(EC.3.2.1.8), exo-xylanase(EC.3.2.1.37)]가 관여하는데 이 중에서 주요 효소인 endo-1,4- β -D-xylanase의 작용에 의하여 xylan이 xylose나 xylooligosaccharide로 가수분해된다[22].

Xylanase는 자연계에 풍부한 목질계 바이오 메스로부터 에탄올과 같은 바이오에너지의 생산, 목질계로부터 양질의 펄프 생산, 가축의 사료제조, 과일음료의 청징, 식품첨가물 등 생물공학산업에 유용하게 사용될 수 있어 최근 그 산업적 중요성이 강조되고 있다[3, 10, 24]. 제지산업에서는 표백 공정에 내알칼리성 또는 내열성 xylanase를 사용함으로써 염소성분의 사용량을 저감시키고 있으며[2], 사료산업에서는 mannanase와 함께 xylanase를 사료에 첨가함으로써 사료 효율을 향상시키고 곡물사료 섭취시 가축의 소화기 질병을 예

방할 수 있는 것으로 보고되고 있다[13]. 특히 중성에서는 불용성인 xylan이 알칼리에서는 잘 용해되고, 펄프 제조공정에서는 강알칼리 조건에서 표백공정이 이루어지기 때문에 제지산업에서 내알칼리성 xylanase의 응용성이 높다. 또한 내알칼리성 효소의 구조와 기능과의 관계를 연구하기 위한 분자 모델시스템으로도 유용하게 이용될 수 있어 내알칼리성 xylanase의 효소반응에 관한 많은 연구가 수행되어 왔지만 xylanase의 효소반응 메커니즘에 관해 완전히 규명하지 못하고 있는 실정이다. 현재까지의 연구결과에 의하면 xylanase에 의한 xylan의 분해는 산촉매와 nucleophile이 관여하는 double displacement reaction에 의한 것으로 추측되고 있다[22].

본 연구에서는 알칼리 내성 *Bacillus alcalophilus* AX2000으로부터 xylanase 유전자(*xynT*)를 cloning한 후 그 유전자의 염기서열을 결정한 바 있는데, 이 유전자는 340개의 아미노산을 coding하는 open reading frame 1,020 bp로 구성되어 있으며, pH 10.5에서 최적 활성을 지니는 알칼리성 xylanase를 생합성한다[16, 17]. 본 연구에서는 *B. alcalophilus* AX2000의 배양 상등액으로부터 xylanase를 정제한 다음 여러 가지 화학수식제를 사용하여 정제효소의 특정 아미노산 잔기를 불활성시킨 후 그 효소 활성도를 측정함으로써 알칼리성 xylanase의 효소활성부위를 규명하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-31-750-5378, Fax: 82-31-750-5273

E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

재료 및 방법

균주와 효소생산

본 연구에 사용된 알칼리성 xylanase를 생산하는 균주로는 본 연구진에 의해 토양으로부터 분리된 *B. alcalophilus* AX2000을 사용하였다[17]. *B. alcalophilus* AX2000은 LB 한천 고체배지에서 계대배양하여 4°C에 보관하면서 필요할 경우 사용하였으며, 효소 생산을 위해서는 LB 한천 고체배지에서 생육한 colony를 10 ml의 기본배지[0.5% birchwood xylan(Sigma Co., MI. U.S.A.), 0.5% glucose, 0.25% polypeptone, 0.25% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 1% Na₂CO₃, pH 10.5]에 접종한 후 37°C에서 250 rpm으로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 1,000 ml의 기본배지에 1%(v/v)가 되도록 접종한 후 37°C에서 250 rpm으로 24시간 배양한 다음 5,000×g에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 효소정제를 위한 조효소액으로 사용하였다.

효소정제

모든 정제과정은 4°C에서 수행하였다. 조효소액에 냉각한 에탄올을 80% 포화도가 되도록 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리하여 얻어진 단백질을 침전물을 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 9.0)으로 용해하였다. 이를 CM-cellulose column(4×25 cm)에 30 ml/h의 속도로 통과시킨 후 0.1~0.5 M NaCl 용액으로 농도구배를 걸어 흡착된 단백질을 용출시켰다. 용출되는 단백질 용액은 9 ml씩 분획하여 xylanase 효소활성이 있는 분획을 모아 한외여과에 의해 농축시킨 다음 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 9.0)으로 평형화되어 있는 Sephadex G-100 column(1.8×90 cm)에 10 ml/h의 속도로 통과시켜 3 ml씩 분획하였다. 활성 분획을 모아 농축시킨 다음 10 mM sodium phosphate 완충용액(pH 6.8)으로 평형화된 hydroxylapatite column(1.5×8 cm)에 통과시키고 0.01~0.4 M sodium phosphate 완충용액(pH 6.8)으로 농도구배를 걸어 용출되는 활성분획을 모아 농축시켰다. 농축 효소액을 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 9.0)으로 평형화되어 있는 Sephadex G-75 column(1.8×80 cm)에 10 ml/h의 속도로 통과시켜 2 ml씩 분획한 다음 활성분획만을 모아 정제효소로 사용하였다. 효소의 정제도는 Laemmli의 방법[11]을 이용하여 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis를 수행한 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 확인하였다.

효소활성과 단백질 함량 측정

Xylanase 활성은 Somogyi와 Nelson의 환원당 정량방법[19]을 변형하여 측정하였다. 기질용액으로는 1% oat-spelts xylan을 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 9.0)에 현탁한 후 100°C에서 30분간 가열하고 정지시켜 그 상등액

을 이용하였다. 기질용액 0.4 ml에 0.1 ml의 조효소액을 첨가하여 40°C에서 20 분간 반응시킨 후 alkaline copper reagent를 0.4 ml 첨가하고 100°C에서 10분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 반응액을 수돗물로 냉각하여 0.4 ml의 Nelson's reagent를 가한 후 2.6 ml의 증류수를 첨가하여 희석한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 D-xylose를 0~1.0 μmol의 농도로 사용하여 작성하였고, 효소 1 unit는 주어진 조건에서 분당 1 μmol의 D-xylose에 해당하는 환원당을 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였다. 단백질 함량은 Bradford의 방법[5]에 따라 측정하였고 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였다.

화학수식제의 처리

화학수식제에 의한 효소활성의 저해도를 알아보기 위하여 특정 아미노산 잔기에 선택적으로 작용하는 여러 가지 화학수식제를 효소반응용액에 각각 20 mM씩 첨가한 후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 정제효소는 각 반응용액 당 0.05 unit를 사용하였고 반응용액의 최종부피는 0.5 ml로 하였다. Cysteine 잔기를 수식하기 위해서는 iodoacetic acid, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), *N*-ethylmaleimide, *p*-chloromercuribenzoic acid를, lysine 잔기를 수식하기 위해서는 pyridoxal-5'-phosphate, acetic anhydride, 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid를, histidine 잔기를 수식하기 위해서는 phenylglyoxal과 2,3-butanedione을 사용하였으며, tryptophan 잔기를 수식하기 위해서는 *N*-bromosuccinimide를, glutamic acid 또는 aspartic acid를 수식하기 위해서는 carbodiimide를 첨가한 후 37°C에서 20분간 방치한 다음 5 μl를 채취하여 xylanase의 잔존활성을 측정하였고, 화학수식제의 작용은 화학수식제를 사용하지 않은 효소활성의 상대 %로 나타내었다.

기질에 의한 효소의 보호효과를 알아보기 위해서는 0.5% (w/v) oat-spelts xylan과 0.5 mM의 *N*-bromosuccinimide 또는 2.5 mM의 carbodiimide를 0.05 unit의 효소가 존재하는 반응용액에 첨가하여 37°C에서 20분간 방치한 다음 10 μl를 채취하여 xylanase의 잔존활성을 측정하였다.

효소저해의 반응치수를 계산하기 위해서는 *N*-bromosuccinimide 또는 carbodiimide를 여러 가지 농도로 반응용액에 첨가한 후 37°C에서 일정시간 간격으로 10 μl를 채취하여 효소의 잔존활성을 측정하였다. 모든 실험은 최소한 3번 이상 반복하였으며 실험 결과치는 그 평균값으로 나타내었다.

결과 및 고찰

Xylanase의 정제

B. alcalophilus AX2000의 배양 상층액 1,000 ml로부터 "재료 및 방법"에 기술한 정제과정을 통하여 약 0.4 mg의 정제효소를 얻을 수 있었으며 정제도는 62.6배로 확인되었다(Table 1). 정제효소의 SDS-polyacrylamide gel electro-

Table 1. Purification of xylanase from *B. alcalophilus* AX2000.

Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Culture supernatant	1278.3	738.2	1.73	100.0	1.0
Ethanol precipitation	912.2	148.9	6.13	71.4	3.5
CM-cellulose	334.5	12.6	26.55	26.2	15.3
Sephadex G-100	125.3	2.8	44.75	9.8	25.9
Hydroxylapatite	69.2	0.8	86.50	5.4	50.0
Sephadex G-75	43.3	0.4	108.25	3.4	62.6

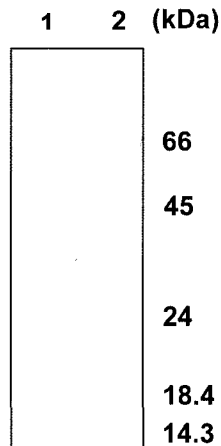


Fig. 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified xylanase from *B. alcalophilus* AX2000. 1, Purified xylanase; 2, molecular weight marker.

phoresis를 실시한 결과 약 40 kDa의 분자량을 지니는 단일 band를 확인할 수 있었으며 이는 xylanase 유전자의 염기배열에서 추론한 분자량과 동일한 것으로 나타났다(Fig. 1).

화학수식제에 의한 영향

여러 가지 화학수식제를 효소용액에 첨가하고 효소활성을 측정된 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 여러 가지 화학수식제 중에서 tryptophan 잔기에 선택적으로 작용하는 *N*-bromosuccinimide와 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기 등 산성 아미노산에 선택적으로 작용하는 carbodiimide 만이 효소활성을 완전히 저해하였다. 한편 cysteine, lysine 또는 arginine에 작용하는 화학수식제들은 효소활성을 부분적으로 저해시켰으며 serine 잔기와 histidine 잔기는 화학수식제의 영향을 거의 받지 않음을 알 수 있었다. 이 결과로부터 xylanase에는 tryptophan, glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기들이 효소의 촉매 부위 또는 기질 결합부위에 직접적으로 관여하거나 활성중심 구조 형성을 포함한 전반적인 구조에 영향을 미쳤을 것으로 추정되었다.

기질에 의한 효소의 보호효과

화학수식제에 의한 효소활성 저해시 반응용액에 기질인 xylan을 첨가하여 효소에 기질을 결합시킴으로써 첨가 기질

Table 2. Effect of chemical modifiers on the xylanase activity.

Chemical modifiers (20 mM)	Relative activity (%)
Cys modifying	
Iodoacetic acid	21
5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)	19
<i>N</i> -ethylmaleimide	43
<i>p</i> -Chloromercuribenzoic acid	76
Lys modifying	
Pyridoxal-5'-phosphate	45
Acetic anhydride	81
2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid	37
Ser modifying	
Phenylmethylsulfurfluoride	92
His modifying	
Diethylpyrocarbonate	94
Arg modifying	
Phenylglyoxal	65
2,3-Butanedione	57
Trp modifying	
<i>N</i> -Bromosuccinimide	0
Glu and Asp modifying	
Carbodiimide	0

Table 3. Protection from modifying reagents by interaction between xylanase and its substrate.

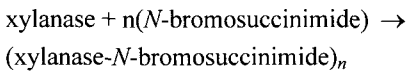
Reaction conditions	Remaining activity (%)
Control	100
+ 0.5% (w/v) xylan	100
<i>N</i>-Bromosuccinimide (0.5 mM)	
+ 0.5% (w/v) xylan	94
Carbodiimide (2.5 mM)	
+ 0.5% (w/v) xylan	7

에 의해 화학수식제의 저해반응으로부터 효소활성이 보호되는지를 확인함으로써 화학수식제가 효소의 기질결합 부위에 직접 작용하는 것인지를 확인하였다. 효소활성을 완전 저해시킨 *N*-bromosuccinimide와 carbodiimide를 사용하여 효소를 수식할 때 기질인 oat-spelts xylan을 효소용액에 첨가하여 보호한 후 효소의 잔존활성을 측정된 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 carbodiimide를 사용하여 효소를 불활성화시켰을 때 기질의 첨가가 효소의 불활성화를 방지하지 못하였다. 이는 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 기질 결

합부위가 아닌 촉매활성부위임을 보여주는 것이다. *N*-bromosuccinimide에 의한 효소활성 저해 시 기질 첨가에 의해 효소의 잔존활성이 대조군과 비교하여 94%를 나타내 기질에 의해 효소가 보호되는 것을 알 수 있었으며, 이로부터 기질결합부위에 tryptophan이 관여하는 것을 확인할 수 있었다.

***N*-bromosuccinimide에 의한 효소활성저해**

N-bromosuccinimide는 매우 선택적으로 tryptophan을 수식한다. 여러 가지 농도의 *N*-bromosuccinimide를 효소와 반응시킨 후 시간에 따른 효소 실행 속도, 즉 inhibition rate K_i 를 구한 다음 *N*-bromosuccinimide의 농도와 inhibition rate K_i 와의 관계를 도식화하였을 때 Fig. 2(A)와 같이 직선 관계를 보여주었는데 이는 *N*-bromosuccinimide에 의한 효소의 수식이 단순 이분자반응임을 나타낸다[6]. 이 수식반응의 second-order rate constant는 $0.89 \times 10^3 \text{ min}^{-1}\text{M}^{-1}$ 로 계산되었다. *N*-bromosuccinimide와 반응하는 tryptophan 잔기의 수를 결정하기 위하여 실행과정을 다음과 같이 표시하였다[4, 20].



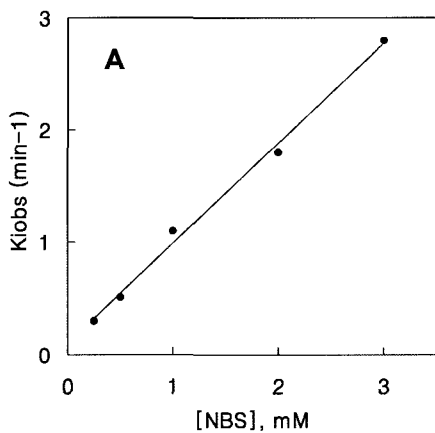
여기서 $(\text{xylanase-N-bromosuccinimide})_n$ 은 *N*-bromosuccinimide에 의해 수식된 효소를 나타내고 n 은 효소를 불활성화하는데 필요한 tryptophan 잔기와 반응하는 *N*-bromosuccinimide의 mol수를 나타낸다. 실행속도는 다음과 같이 표시할 수 있다.

$$-d[\text{xylanase}]/dt = K_i[\text{xylanase}][\text{N-bromosuccinimide}]^n$$

만일 $[\text{N-bromosuccinimide}] \gg [\text{xylanase}]$ 라면 윗 식은 다음과 같이 적분할 수 있다.

$$\log K_{i\text{obs}} = n \log[\text{N-bromosuccinimide}] + \log K_i$$

따라서 $\log K_{i\text{obs}}$ 와 $\log[\text{N-bromosuccinimide}]$ 와의 관계를 도



식화하면 그 직선의 기울기로 n 값을 알 수 있다. $\log K_{i\text{obs}}$ 와 $\log[\text{N-bromosuccinimide}]$ 와의 관계를 도식화한 것을 Fig. 2(B)에 나타내었는데 이 직선의 기울기 $n = 0.90$ 로부터 1개의 tryptophan 잔기가 효소활성에 요구되는 것을 알 수 있었다.

한편 화학수식제에 의해 수식되지 않은 효소의 K_m 값을 Lineweaver-Burk plot으로 측정한 결과 3.58 mg/ml로 계산되었으나 *N*-bromosuccinimide에 의해 수식된 효소의 K_m 값인 97.27 mg/ml과 비교하였을 경우 수식된 효소의 K_m 값이 30배 가까이 증가함을 알 수 있었다(data not shown). 이는 tryptophan이 기질의 결합에 관여하며 tryptophan이 수식됨에 따라 기질의 친화도가 감소함에 따라 K_m 값이 증가하였음을 의미한다.

또한 *N*-bromosuccinimide에 의한 저해방식을 알아보기 위하여 *N*-bromosuccinimide의 농도를 달리하여 반응속도를 측정 후 Dixon plot을 작성한 결과 xylanase는 *N*-bromosuccinimide에 의해 경쟁적 저해방식에 의해 저해됨을 알 수

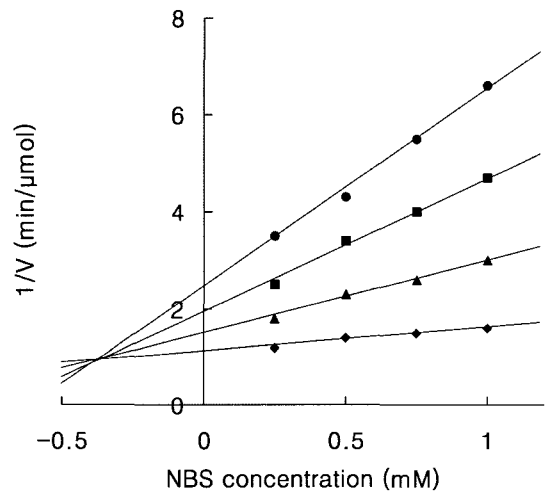


Fig. 3. Dixon plot for the determination of the inhibition constant (K_i) for *N*-bromosuccinimide on the xylanase activity. Oat-spelts xylan concentrations used were 0.25 (●), 0.5 (■), 0.75 (▲), and 1.0 (◆) mg/ml.

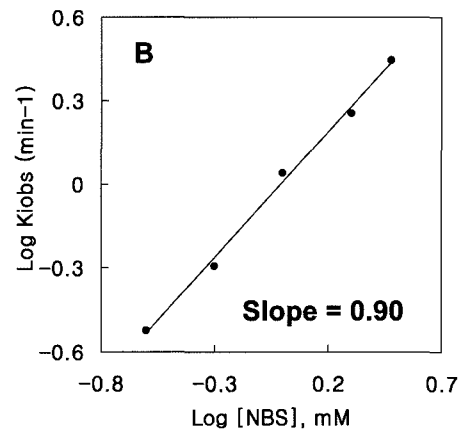


Fig. 2. The inactivation of xylanase with *N*-bromosuccinimide. A: Determination of the second-order rate constant of inactivation. B: Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

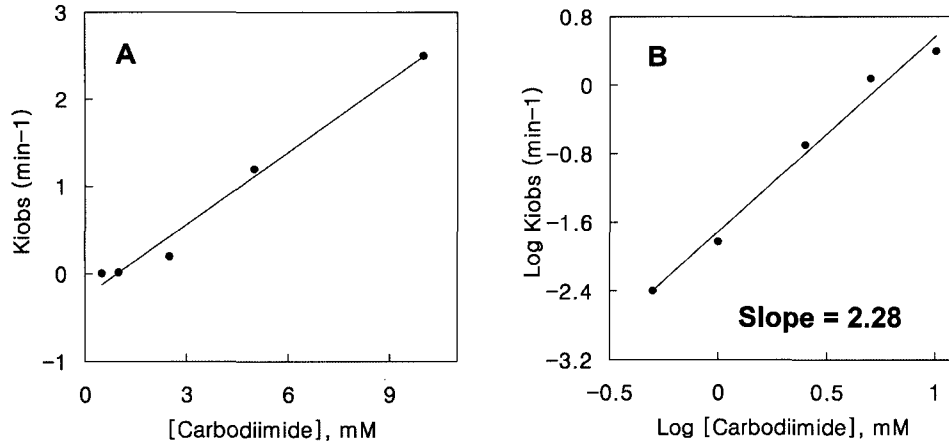


Fig. 4. The inactivation of xylanase with carbodiimide. A: Determination of the second-order rate constant of inactivation. B: Apparent order of reaction with respect to reagent concentration.

있었고 저해상수 K_i 는 0.37 mM로 계산되었다(Fig. 3). 이상의 결과로부터 xylanase는 기질 결합부위에 1개의 tryptophan 잔기가 관여하는 것을 알 수 있었다.

Carbodiimide에 의한 효소활성저해

효소를 여러 가지 농도의 carbodiimide와 반응하였을 때 시간이 지남에 따라 효소활성이 소실됨을 알 수 있었고 carbodiimide의 농도와 inhibition rate K_i 와의 관계를 도식화하였을 때 Fig. 4(A)와 같이 직선관계를 나타내 carbodiimide에 의한 효소의 수식은 단순 이분자반응임을 알 수 있었으며[6], carbodiimide에 의한 수식반응의 second-order rate constant는 0.28 min⁻¹M⁻¹로 계산되었다. log K_{iobs} 와 log[carbodiimide]와의 관계(Fig. 4(B))로부터 carbodiimide의 농도에 대한 반응차수는 2.28로 계산되었는데 이로부터 효소 1 mol당 2 mol의 carbodiimide가 반응함을 알 수 있었다.

한편 carbodiimide에 의해 수식된 효소의 K_m 값을 Lineweaver-Burk plot으로 측정된 결과 21.64 mg/ml로 계산되어 *N*-bromosuccinimide에 의해 수식된 효소의 K_m 값과 비교하였을 경우 5배 정도 낮은 수준임을 알 수 있었다(data not shown). 이는 산성 아미노산 잔기인 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 tryptophan 잔기와 비교하여 기질에 대한 친화력이 매우 낮은 것을 의미하며, 이 결과로부터 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기가 기질 결합부위에 관여하지 않는 것으로 추측하였다.

또한 carbodiimide에 의한 저해방식을 알아보기 위하여 carbodiimide의 농도를 달리하여 반응속도를 측정 후 Dixon plot을 작성한 결과 xylanase는 carbodiimide에 의해 비경쟁적 저해방식에 의해 저해되는 것으로 나타나 aspartic acid나 glutamic acid는 기질결합부위가 아닌 것으로 확인되었으며 저해상수 K_i 는 0.74 mM로 계산되었다(Fig. 5).

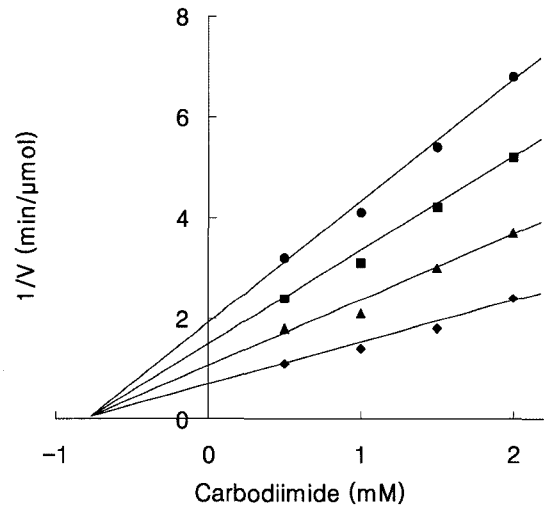


Fig. 5. Dixon plot for the determination of the inhibition constant (K_i) for carbodiimide on the xylanase activity. Oat-spelts xylan concentrations used were 0.5 (●), 1.0 (■), 1.5 (▲), and 2.0 (◆) mg/ml.

다른 xylanase와의 유사성

Xylanase는 구조와 아미노산서열에 기초한 glycoside hydrolase의 분류상 GH10과 GH11 family로 분류되는데 GH10 family에 속하는 xylanase는 모두 (β/α)₈ 구조를 지니는 촉매 부위를 지니고 있으며 GH11 family에 속하는 xylanase는 β-jelly 구조를 지니고 있는 것으로 알려져 있다[3]. 본 xylanase의 아미노산 서열을 NCBI Blast 프로그램을 이용하여 database를 검색한 결과 GH10에 속하는 xylanase로 확인되었으며 다른 생물 유래의 xylanase와의 유사성을 알아보기 위하여 CLUSTAL W program을 이용하여 multiple amino acid homology alignment를 작성한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 여러 xylanase 중에서 본 연구에 사용된 *B. alcalophilus* AX2000의 xylanase와 가장 유사성이 높은 xylanase는 alkalophilic *Bacillus* strain N137 유

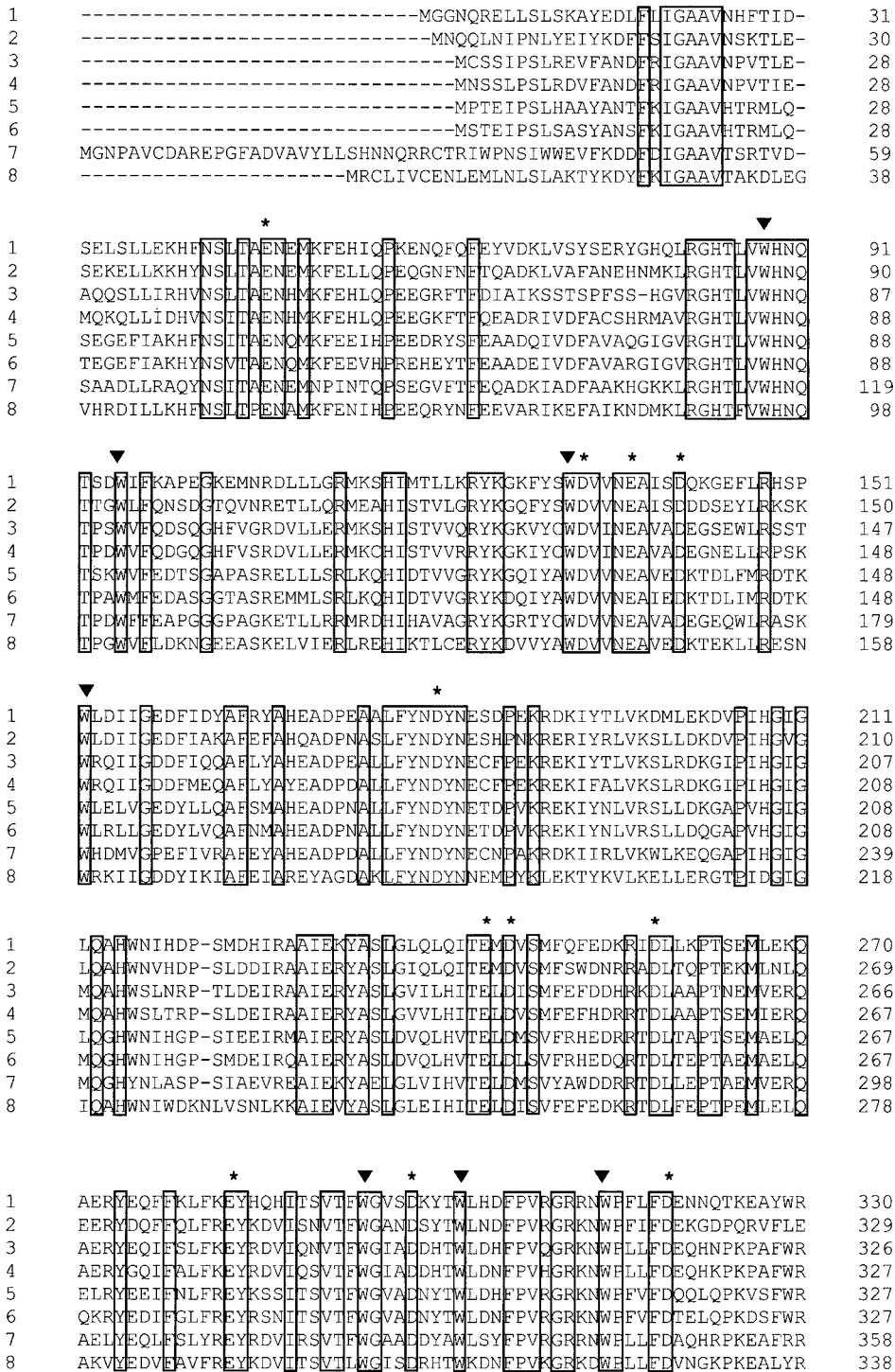


Fig. 6. Alignment of amino acid sequence of xylanases. The conserved amino acid residues in all xylanases compared in the study were boxed and the glutamic acid and aspartic acid among the conserved residues were shown as asterisk and the tryptophan residues were shown as reverse triangle. 1, *B. alcalophilus* AX2000; 2, alkalophilic *Bacillus* strain N137 (63%); 3, *Geobacillus stearothermophilus* No.21 (60%); 4, *Geobacillus stearothermophilus* T-6 (60%); 5, *Aeromonas punctata* ME-1 (56%); 6, *Bacillus* sp. BP-23 (54%); 7, *Thermobacillus xylanilyticus* D3 (55%); 8, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (51%).

래의 alkaline xylanase로 63%의 아미노산이 동일하였으며 그 다음으로 *Geobacillus stearothermophilus* No.21(60%), *Geobacillus stearothermophilus* T-6(60%)와 *Aeromonas*

punctata ME-1(56%) 유래의 xylanase 순으로 유사성이 높았다. 비교한 8종류의 모든 xylanase에서 공통적으로 보존되고 있는 아미노산 잔기는 98개로 이 중에서 tryptophan 잔

기는 Trp⁸⁸, Trp⁹⁵, Trp¹³², Trp¹⁵², Trp²⁹⁴, Trp³⁰², Trp³¹⁴ 등 7개의 tryptophan 잔기가 보존되고 있어 이 tryptophan 잔기들 중 하나의 잔기가 효소의 기질결합부위에 관여하고 있다고 판단되었다. 또한 산성 아미노산은 Asp¹³³, Asp¹⁴¹, Asp¹⁸¹, Asp²⁴⁶, Asp²⁵⁸, Asp²⁹⁸, Asp³¹⁹와 Glu⁴⁷, Glu¹³⁷, Glu²⁴⁴, Glu²⁸³이 모든 xylanase에서 보존되고 있는 것으로 나타나 이들 11개의 산성 아미노산 잔기 중에서 2개의 아미노산 잔기가 효소의 촉매부위에 관여하고 있는 것으로 추측되었다.

현재까지 xylanase의 활성부위에 관한 연구가 여러 연구진들에 의해 보고되었는데, Bandivadekar 등[1]은 *Chainia* sp.의 xylanase에는 3개의 tryptophan 잔기가 존재하며 이 잔기들 중에서 하나의 잔기가 기질의 결합에 필수적이라 보고하였다. 또한 *Fibrobacter succinogenes*의 XynC[26]와 호열성 *Bacillus* sp.[15]를 비롯한 여러 *Bacillus* sp.[9,14]에서 분리한 효소의 활성에 tryptophan 잔기가 중요하다고 보고하고 있었으며 그 외의 다수 xylanase에서 tryptophan이 기질결합부위로 작용하고 있는 것으로 알려져 있어 본 연구결과와 일치하였다. 한편 Wakarchuk 등[23]과 Davoodi 등[8]은 *B. circulans*가 생산하는 xylanase의 활성부위에는 glutamic acid가 관여한다고 보고하였고 *Clostridium thermocellum*[25], *Dictyoglomus thermophilum*[12], *Thermotoga neapolitana* [21] 등에서도 glutamic acid가 xylanase의 촉매부위에 존재한다고 보고되어 본 연구와 동일한 결과를 나타내었다. 본 연구에서는 특정 아미노산에 선택적으로 작용하는 화학수식제를 사용하여 xylanase의 활성부위를 간접적으로 확인하였는데 보다 직접적으로 효소활성부위를 결정하기 위해서는 cloning된 xylanase 유전자를 사용한 site-directed mutagenesis 연구가 뒷받침되어야 한다고 사료된다.

요 약

Bacillus alcalophilus AX2000으로부터 xylanase를 정제한 후 효소의 활성부위를 조사하기 위하여 여러 가지 화학수식제를 사용하여 효소활성의 저해도를 측정하였다. 여러 가지 화학 수식제 중에서 carbodiimide와 *N*-bromosuccinimide가 효소 활성을 완전히 저해시켜 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기와 tryptophan 잔기가 효소의 활성부위에 관여하리라 추측되었다. 각각의 경우에 효소 실험은 수식제의 첨가 농도에 따라 pseudo first-order kinetics 양식을 보여주었으며, carbodiimide와 *N*-bromosuccinimide는 각각 비경쟁적 저해와 경쟁적 저해방식을 나타내었다. 기질첨가에 의한 효소활성 보호실험을 통하여 tryptophan 잔기가 기질결합부위라 판단 되었다. 효소 실험속도의 분석에 의해 효소활성에는 2개의 glutamic acid 또는 aspartic acid 잔기와 1개의 tryptophan 잔기가 관여하는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 2005년도 경원대학교 지원에 의한 결과임.

REFERENCES

- Bandivadekar, K. R. and V. V. Deshpande. 1996. Structure-function relationship of xylanase: fluorimetric analysis of the tryptophan environment. *Biochem. J.* **315**: 583-587.
- Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Enhanced production of a thermostable xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and its application in biobleaching of eucalyptus kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **27**: 459-466.
- Biele, P. 1985. Microbial xylanolytic systems. *Trends Biotechnol.* **3**: 286-290.
- Blanke, S. R. and L. P. Hager. 1990. Chemical modification of chloroperoxidase with diethylpyrocarbonate. Evidence for the presence of an essential histidine residue. *J. Biol. Chem.* **265**: 12454-12461.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Church, F. C., R. L. Lundblad, and C. M. Noyes. 1985. Modification of histidines on human prothrombin. Effect in the interaction of fibrinogen with thrombin from diethylpyrocarbonate-modified prothrombin. *J. Biol. Chem.* **260**: 4936-4940.
- Das, N. N., S. C. Das, A. K. Sarkar, and A. K. Mukherjee. 1984. Lignin-xylan ester linkage in mesta fiber (*Hibiscus cannabinus*). *Carbohydr. Res.* **129**: 197-207.
- Davoodi, J., W. W. Wakarchuk, R. L. Campbell, P. R. Carey, and W. K. Surewicz. 1995. Abnormally high pKa of an active site glutamic acid residue in *Bacillus circulans* xylanase. The role of electrostatic interactions. *Eur. J. Biochem.* **232**: 839-843.
- Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1725-1730.
- 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.
- McCarthy, A. A., D. D. Morris, P. L. Bergquist, and E. N. Baker. 2000. Structure of XynB, a highly thermostable beta-1,4-xylanase from *Dictyoglomus thermophilum* Rt46B.1, at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **11**: 1367-1375.
- 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.
14. Nakamura, S., K. Wakabayashi, R. Nakai, R. Aono, and K. Horikoshi. 1993. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 2311-2316.
 15. Nath, D. and M. Rao. 1998. Structural and functional role of tryptophan in xylanase from an extremophilic *Bacillus*: assessment of the active site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **249**: 207-212.
 16. Park, Y. S. 2005. Molecular cloning and nucleotide sequence of xylanase gene (*xynT*) from *Bacillus alcalophilus* AX2000. *J. Life Sci.* **15**: 734-738.
 17. Park, Y. S and T. Y. Kim. 2003. Isolation of *Bacillus alcalophilus* AX2000 producing alkaline xylanase and its enzyme production, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 157-164.
 18. Scalbert, A., B. Monities, J. Y. Lallemand, E. Guittet, and C. Rolando. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry* **24**: 1359-1362.
 19. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
 20. Takeuchi, M., A. Asno, Y. Kameda, and K. Matsui. 1986. Chemical modification by diethylpyrocarbonate of an essential histidine residue in 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase. *J. Biochem.* **99**: 1571-1577.
 21. Velikodvorskaya, T. V., I. Y. Volkov, V. T. Vasilevko, V. V. Zverlov, and E. S. Piruzian. 1997. Purification and some properties of *Thermotoga neapolitana* thermostable xylanase B expressed in *E. coli* cells. *Biochemistry* **62**: 66-70.
 22. Wang, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1988. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: Function and applications. *Microbiol. Rev.* **52**: 305-317.
 23. Wakarchuk, W. W., R. L. Campbell, W. L. Sung, J. Davoodi, and M. Yaguchi. 1994. Mutational and crystallographic analyses of the active site residues of *Bacillus circulans* xylanase. *Protein Sci.* **3**: 467-475.
 24. Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. Applications of hemicellulases in the food, feed, and pulp and paper industries, In: *Hemicellulose and Hemicellulases* (Coughlen, P. P. and G. P. Hazlewood, eds), pp. 127-143, Portland Press, London.
 25. Xie, H., H. J. Gilbert, S. J. Charnock, G. J. Davies, M. p. Williamson, P. J. Simpson, S. Raghobama, C. M. Fontes, F. M. Dias, L. M. Ferreira, and D. N. Bolam. 2001. *Clostridium thermocellum* Xyn10B carbohydrate-binding module 22-2: the role of conserved amino acids in ligand binding. *Biochemistry* **40**: 9167-9176.
 26. Zhu, H., F. W. Paradis, P. J. Krell, J. P. Phillips, and C. W. Forsberg. 1994. Enzymatic specificities and modes of action of the two catalytic domains of the XynC xylanase from *Fibrobacter succinogenes* S85. *J. Bacteriol.* **176**: 3885-3894.

(Received Mar. 28, 2006/Accepted June 12, 2006)