

Paenibacillus woosongensis의 Xylanase 11B 유전자 클로닝과 특성분석

윤기홍*

우송대학교 바이오식품과학전공

Received: April 28, 2017 / Revised: May 23, 2017 / Accepted: May 25, 2017

Cloning and Characterization of Xylanase 11B Gene from *Paenibacillus woosongensis*

Ki-Hong Yoon*

Food Science & Biotechnology Major, Woosong University, Daejeon 34606, Republic of Korea

A gene coding for the xylanase predicted from the partial genomic sequence of *Paenibacillus woosongensis* was cloned by PCR amplification and sequenced completely. This xylanase gene, designated *xyn11B*, consisted of 1,071 nucleotides encoding a polypeptide of 356 amino acid residues. Based on the deduced amino acid sequence, Xyn11B was identified to be a modular enzyme, including a single carbohydrate-binding module besides the catalytic domain, and was highly homologous to xylanases belonging to glycosyl hydrolase family 11. The SignalP4.1 server predicted a stretch of 26 residues in the N-terminus to be the signal peptide. Using DEAE-Sephacel and Phenyl-Sephacel column chromatography, Xyn11B was partially purified from the cell-free extract of recombinant *Escherichia coli* carrying a copy of the *P. woosongensis xyn11B* gene. The partially purified Xyn11B protein showed maximal activity at 50°C and pH 6.5. The enzyme was more active on arabinoxylan than on oat spelt xylan and birchwood xylan, whereas it did not exhibit activity towards carboxymethylcellulose, mannan, and *para*-nitrophenyl- β -xylopyranoside. The activity of Xyn11B was slightly increased by Ca^{2+} and Mg^{2+} , but was significantly inhibited by Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , and Mn^{2+} , and completely inhibited by SDS.

Keywords: *Paenibacillus woosongensis*, xylanase, cloning, characterization

서론

Xylan은 D-xylose 잔기간에 β -1,4 배당결합의 골격을 하고 있는 다당류로 목재, 초본류와 곡류를 두루 포함한 식물에서 섬유소, 리그닌과 함께 존재하는 반섬유소의 구성성분이다. Xylan은 식물의 종류에 따라 xylose 잔기의 2번 또는 3번 탄소위치에 acetyl, L-arabinofuranosyl과 4-O-methyl- α -D-glucuronopyranosyl 잔기가 서로 다른 함량으로 결합되어 있으며 homoxylan, glucuronoxylan, arabinoxylan, glucuronoarabinoxylan으로 구분된다[1, 2]. Xylan의 분해에는 여러 종류의 효소가 관여하는데 endo- β -1,4-xylanase

(xylanase)는 D-xylosyl 잔기간 β -1,4 결합을 무작위로 절단하며 xylan의 분해에 가장 중요한 역할을 한다. 그러므로 xylanase는 식물자원을 이용하는 산업에 활용되는 유용 효소이며 제빵, 과일 청징, 펄프와 제지가공, 직물 가공, 바이오매스의 당화 공정을 비롯하여 사료첨가용 효소로 사용되고 있다[2, 3].

여러 종류의 미생물로부터 수 많은 종류의 xylanase가 알려졌으며 효소의 생산성, 반응성, 3차 구조, 특성 개량과 활용 및 그 유전자에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[4]. 최근에는 실험적 결과가 제시된 것은 아니지만 미생물 유전체의 염기서열로부터 추론되는 xylanase에 대한 정보도 크게 증가하고 있다. Xylanase는 대부분 균체의 분비효소이며 일부는 세포벽과 결합된 상태[5, 6] 또는 균체내 효소로 알려져 있다[7]. 또한 xylanase는 활성영역으로만 이루어진 단일영역 효소이거나[8, 9], 활성영역과 탄수화물 결합영역

*Corresponding author

Tel: +82-42-630-9742, Fax: 82-42-630-9389

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

(CBM)이나 S-layer-homologous (SLH) 영역을 포함한 다영역 효소로 알려져 있다[10, 11]. 특히 활성 영역의 아미노산 배열 상동성에 따르면 xylanase는 12 종류의 glycosyl hydrolase family (GH)에 광범위하게 속하는 것으로 보고되었으며 GH10과 GH11에 속하는 효소가 주류를 이룬다.

*Paenibacillus*는 1993년에 새로운 속으로 분류된 이후 신규가 활발하게 분리되었으며 이들 중 xylan 분해균이 다수 포함되어 있다. Xylanase의 효소적 특성이나 유전자에 관한 연구가 수행된 *Paenibacillus*속 균주로는 *P. barcinonensis*, *P. campinasensis* BL11, *P. campinasensis* G1-1, *P. curdolanolyticus*, *Paenibacillus* sp. W-61, *Paenibacillus* sp. HC1, *Paenibacillus* sp. DG-22, *Paenibacillus* sp. JDR-2, *P. terrae* HPL-003, *P. favisporus*, *Paenibacillus* sp. XJ18, *Paenibacillus* sp. NF1, *P. montaniterrae*, *P. xylanilyticus* KJ-03, *Paenibacillus* sp. 12-11, *P. polymyxa*, *Paenibacillus* sp. HPL-001, *Paenibacillus* sp. E18와 *Paenibacillus* sp. KCTC 8848P가 알려져 있다. *P. woosongensis*는 xylan 분해균으로 분리되었으며[12], 이로부터 β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase [13]와 GH11 xylanase의 유전자와 효소 특성이 보고된 바 있다[8]. 본 연구에서는 *P. woosongensis*로부터 신규 GH11 xylanase 유전자를 클로닝하고 효소 반응특성을 조사하였다.

재료 및 방법

Xylanase 유전자 클로닝

Genome Sequencer FLX Titanium (Roche, Germany)으로 부분적으로 결정된 *P. woosongensis*의 유전체 염기서열로부터 xylanase 유전자로 유추되는 DNA 단편을 증폭하기 위한 primers YB45C70-57F (GCATCTGCAGATGACGAGATGCAGTTTAAAC; 밑줄은 *Pst*I 위치)와 YB45C70-57R (CTTCGAATTCCTTAATTGATTTCCAAATAATCGAG; 밑줄은 *Eco*RI 위치)을 설계하였다. *P. woosongensis* KCTC 3953를 tryptic soy broth 배지에서 배양하여 얻은 균체로부터 분리한 유전체 DNA를 주형, YB45C70-57F와 YB45C70-57R을 primers로 하고 *pfu*-X DNA polymerase를 사용하여 xylanase 유전자를 증폭하였다. PCR은 95°C에서 3분간 처리 후 95°C (25초), 56°C (40초), 72°C (1분)의 반응을 25회 반복하고 최종적으로 72°C에서 20분간 반응함으로써 수행하였다. 증폭된 DNA 단편은 제한 효소로 절단하여 pUC19에 도입하였다. 이를 *Escherichia coli* DH5 α 에 형질전환하고 oat spelt xylan (0.5%)과 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 도말한 후 형성된 콜로니 중 주변의 oat spelt xylan이 분해되어 투명환을 보이는 것을 xylanase를 생산하는 형질전환주로 선발하였다.

Xylanase의 부분정제

*P. woosongensis*의 xylanase 유전자가 도입된 재조합 대장균을 LB 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 진탕 배양한 후 균체를 회수하고 50 mM Tris 완충액(pH 8.0)에 현탁하였다. 균체를 초음파 파쇄하고 원심분리한 후 균체 파쇄 상등액을 채취하여 ammonium sulfate (25–70%)로 침전하여 단백질을 분획하였다. 침전된 단백질을 50 mM Tris 완충용액(pH 8.0)으로 현탁하고 동일 완충용액으로 투석하였다. 동일한 완충용액으로 평형화한 DEAE-Sepharose column (Sigma-Aldrich, USA)에 단백질 용액을 주입하여 크로마토그래피를 진행하였다. Xylanase가 컬럼에 흡착되지 않고 용출되었으므로 용출된 효소 용액에 고농도의 ammonium sulfate 용액을 첨가하여 최종적으로 1 M ammonium sulfate와 20 mM Tris (pH 8.0)을 포함하는 용액이 되도록 하였다. 동일 용액으로 평형화 시킨 Phenyl-Sepharose 컬럼 (Sigma-Aldrich, USA)에 효소 용액을 주입하여 흡착시키고 ammonium sulfate의 농도를 1 M에서 0 M까지 역으로 농도구배를 주어 흡착된 단백질을 분획하였다. 활성 분획을 모아 10 mM potassium phosphate 완충액(pH 6.5)으로 투석하여 부분정제 효소액으로 사용하였다.

Xylanase 반응특성 분석

Xylanase 활성은 xylan (0.5%)을 기질로 하여 적정 반응 조건에서 15분 동안 반응 후에 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 정량하여 측정하였으며, 효소 활성도 1.0 unit은 1분 동안 xylan으로 부터 1 μ mol의 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다[14]. 효소 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위하여 30–65°C와 pH 4.5–9.0의 범위에서 xylanase 활성을 각각 측정하였다. 이때 pH 4.5–6.0은 citrate 완충용액, pH 6.0–8.0은 sodium phosphate 완충용액과 pH 8.0–9.0은 Tris 완충용액을 각각 사용하였다. 열안정성은 20–60°C 범위의 온도에서 xylanase 효소액을 1시간 동안 방치한 후 잔존활성을 측정하여 결정하였다. 금속이온과 화합물이 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 최종 농도가 5 mM이 되도록 반응액에 첨가하고 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

Xylanase 유전자 클로닝과 염기서열

Paenibacillus 속의 균주 중에서 *P. campinasensis* 균주 BL11과 G1-1은 한 종류의 xylanase를 생산하는 것으로 보고되었지만[15, 16], *P. curdolanolyticus* B-6 [17, 18], *P. barcinonensis* [5, 9], *Paenibacillus* sp. DG-22 [10], *Paenibacillus* sp. W-61 [6], *Paenibacillus* sp. HC1 [19]과 *Paenibacillus*

sp. KCTC 8848P [20]는 2종류 이상의 xylanases가 확인된 바 있다. *P. woosongensis*의 유전체 분석 결과 이미 보고된 GH11 xylanase [8]와는 다른 별개의 xylanase로 예상되는 유전자가 발견되었으며 이를 PCR 클로닝하기 위한 primers를 제조하였다. 증폭된 유전자를 pUC19의 *lac* promoter와 일치되도록 삽입하기 위해 upper primer YB45C70-57F와 lower primer YB45C70-57R에 *Pst*I과 *Eco*RI 절단서열을 각각 도입하였다. PCR을 수행한 결과 예상되는 크기의 1.1-kb DNA 단편이 증폭되었으며 이를 *Pst*I과 *Eco*RI로 절단하여 동일한 효소로 절단된 pUC19에 도입하여 재조합 플라스미드 pXY70를 제조하였다. 클로닝된 DNA 단편의 유전자 염기서열을 결정 한 결과 유전체 분석에서 결정된 서열과 동일하였고 356 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코드하는 1,071 bp 크기의 xylanase 유전자가 확인되었으며 이를 *xyn11B* 유전자로 명명하였다. PePPER webserver (<http://pepper.molgenrug.nl>)를 이용하여 *xyn11B* 유전자의 상부지역을 분석한 결과 ATG 개시 코돈의 상부 167-196번째 염기서열(TTGACGATAGAA GCTTTATTTTATTACAAG)이 promoter에 해당하는 것으로 예측되었다(GenBank accession no. KY964450).

유전자 염기서열로부터 유추된 아미노산 배열에 따르면 *P. woosongensis* Xyn11B (PwXyn11B)는 GH11 xylanase의 활성영역(38-218 잔기)과 CBM36 (240-355 잔기)이 배열된 다영역 효소로 확인되었다. 그리고 SignalP4.1 프로그램으로 분석한 결과 아미노 말단의 26개 잔기가 signal peptide로 예측되어 PwXyn11B는 signal peptidase I에 의해 절단되는 전형적인 잔기 배열(A-X-A)을 포함하지 않았으며 절단 부위는 A-V-S-A 잔기로 배열되었고 이는 Fig. 1에 보인 바와 같이 다른 xylanase와 차이가 있었다. PwXyn11B의 아미노산 배열을 미국의 NCBI database에 등록된 다른 효소 비교한 결과 *P. ihumii*의 유전체 염기서열에서 예측된 xylanase (WP_055108594)와 상동성이 93%로 가장 높았다. 이외에 *P. campinasensis* BL11 (ABB77852), *P. campinasensis* G1-1 (AEI54132), *P. curdlanolyticus* B-6 (ADB54799), *Bacillus* sp. YA-335 (CAA41784)와 *Bacillus* sp. 41M-1 (BAA82316)의 xylanases와는 74-79% 상동성을 보여 PwXyn11B는 신규의 xylanase로 확인되었다(Fig. 1). 활성영역과 CBM을 각각 비교하였을 때는 80-84%와 75-84%의 상동성을 보였고 활성 잔기로 예상되는 119Glu와 209Glu가 활성영역에 존재하였다. 또한 활성영역과 CBM을 연결하는 linker 서열은 그 길

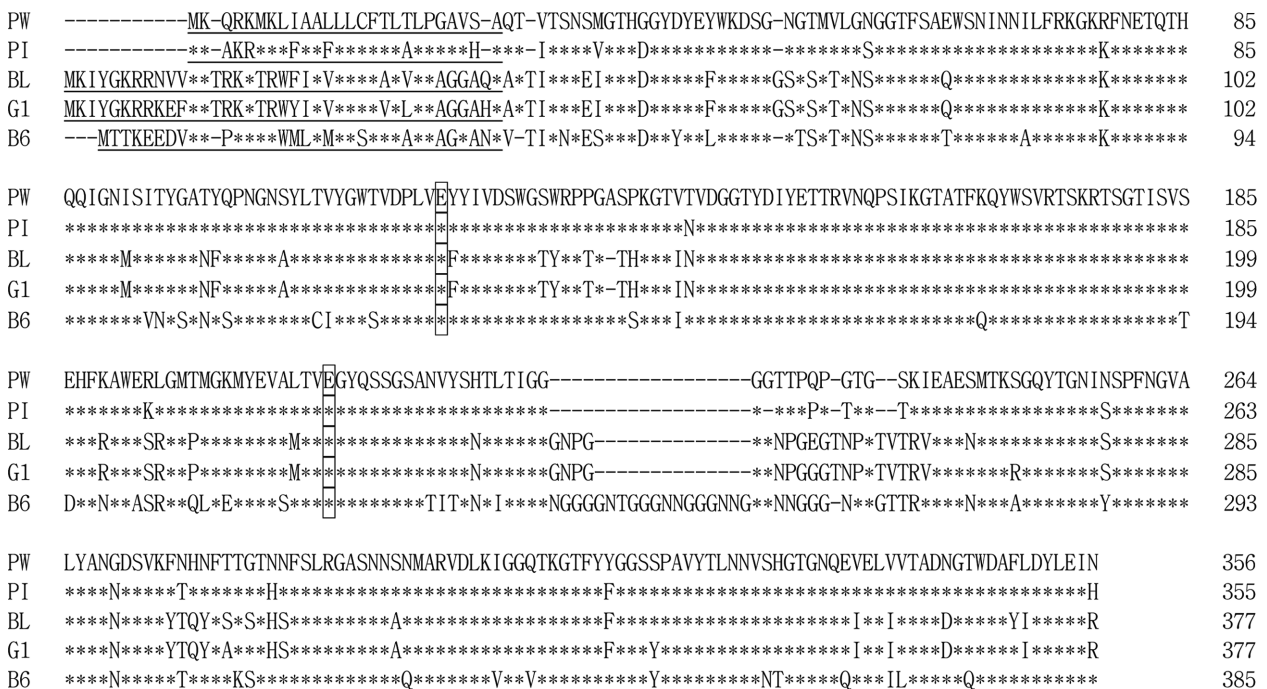


Fig. 1. Comparison of the *P. woosongensis* xylanase with others. The amino acid sequences of five xylanases from *P. woosongensis* (PW), *P. campinasensis* BL11 (BL: ABB77852), *P. campinasensis* G1-1 (G1: AEI54132), *P. curdlanolyticus* B-6 (B6: ADB54799), and *P. ihumii* (PI: WP_055108594) are aligned to maximize similarities with gaps (hyphens) by Clustal W method. Residues identical to the amino acid sequence of the *P. woosongensis* xylanase are indicated by asterisks in other sequences. Amino acids corresponding to the signal peptide predicted by SignalP4.1 server are underlined. A putative catalytic residues are marked by box in the amino acid. Numbers at the end of each line correspond to the amino acid position in the protein.

이와 배열이 다른 효소와 차이가 큰 것으로 나타났고 Gly과 Thr 잔기가 많았다.

한편 *P. campinasensis* BL11 [15], *P. campinasensis* G1-1 [16]과 *P. curdlanolyticus* B-6 [17]의 xylanases는 PwXyn11B보다 아미노 말단이 11개 잔기 또는 8개 잔기를 더 긴 것으로 보고되어 아미노 말단이 일치하지 않았다. 그러므로 *pwxyn11B* 유전자의 개시 코돈을 확인하기 위해 구조유전자의 상부 지역의 염기서열에서 리보솜 결합위치 (RBS)에 해당하는 염기서열을 조사하였다. 그 결과 *pwxyn11B* 유전자의 개시 코돈 ATG로부터 7 nucleotides가 떨어져 있는 지역에는 RBS로 예측되는 염기서열(GGGAGG)이 존재하였으나, *P. campinasensis* 균주 BL11과 G1-1의 xylanases (XylX와 XynG1-1)와 아미노 말단의 크기가 일치하도록 11개 아미노 말단 잔기 코돈을 추가적으로 포함한 지점의 ATG 코돈의 상부 지역에는 RBS 서열이 없었으므로 예측된 PwXyn11B의 개시 코돈은 맞는 것으로 판단되었다. *P. curdlanolyticus* B-6 xylanase (PcXyn11A)의 유전자와 그 주변의 염기서열 (FJ956758)을 분석한 결과 개시 코돈으로 보고된 ATG의 상부지역에는 RBS 서열이 없으며, 9번째 코돈인 ATG의 상부 지역으로 7 nucleotides가 떨어져서 RBS로 예측되는 서열 (GGGAGG)이 존재하였다. XylX (DQ241676)와 XynG1-1 (JF830005)의 경우는 오직 구조 유전자의 염기서열만 보고되어 있으므로 개시 코돈의 상부 지역에서 RBS 서열의 존재 유무를 분석할 수 없었다. 그러나 이들 유전자의 12번째 코돈인 ATG로부터 7 nucleotides가 떨어진 상부지역에 RBS로 판단되는 AGGAGGAA와 AGGAAGGA의 염기서열이 각각 존재하였다. 따라서 RBS에 해당하는 서열을 감안하여 개시 코돈을 추정하면 XylX, XynG1-1과 PcXyn11A는 PsXyn11B와 아미노산 배열은 다르지만 아미노 말단의 길이가 동일하다고 하겠다. 또한 XylX와 XynG1-1의 구조유전자를 과잉 발현용 vector인 pET25b와 pET22b에 각각 도입하고 형질 전환하여 얻은 재조합 *E. coli* BL21 (DE3)에서 두 효소는 모두 과잉발현이 유도되지 않은 것으로 밝혀진 바 있다[15, 16]. 이와 같이 두 효소가 모두 재조합 대장균에서 과잉발현되지 못한 것은 signal peptide를 포함한 상태의 유전자를 도입한 때문이거나, 예측된 개시 코돈보다 12번째 다음의 ATG가 실제로 개시 코돈으로 작용하게 됨에 따라 개시 코돈과 pET vector에 구축된 RBS 서열간의 거리가 멀리 떨어지게 되어 관독과정이 효율적으로 진행되지 않은 때문일 수 있다고 하겠다.

Xylanase의 부분정제

PwXyn11B의 효소 특성을 조사하기 위해 재료 및 방법에서 기술한 대로 *pwxyn11B* 유전자를 함유한 *E. coli* DH5 α 배양 균체로부터 PwXyn11B를 부분 정제하였다. 균체 파쇄상등

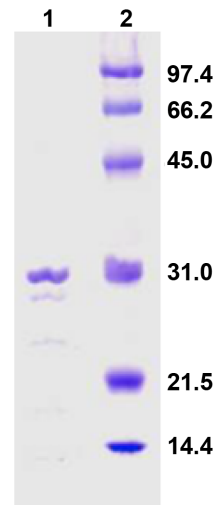


Fig. 2. SDS-PAGE of the partial purified PwXyn11B. Lane 1, partial purified enzyme; lane 2, the molecular weight markers. Molecular size is shown in kilodaltons to the right side of the gel.

액을 ammonium sulfate로 처리하여 얻은 단백질 용액을 DEAE-Sepharose 컬럼에 주입한 결과 PwXyn11B는 컬럼에 흡착되지 않고 그대로 용출되었다. 염기서열에서 유추된 PwXyn11B의 pI 값은 signal peptide가 제거되지 않은 전구체 단백질의 경우 8.42, mature protein의 경우 6.61로 예상되었는데 pH 8.0으로 평형화한 DEAE-Sepharose에 결합되지 않은 것으로 보아 재조합 대장균에서 생산된 효소가 전구체 단백질 형태로 존재하거나 또는 대장균의 peptidase에 의해 분해되어 활성은 있으나 pI 값이 높은 단백질로 존재할 가능성이 있다.

결합되지 않은 효소액을 Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피를 수행한 결과 PwXyn11B는 Phenyl-Sepharose 컬럼에 흡착되었으며 0.5–0.25 M ammonium sulfate 농도에서 용출되었다. Xylanase 활성을 보이는 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과 30 kDa 단백질이 검출되었으며 이를 농축하여 분석한 결과 크기 작은 여러 단백질이 적은 양으로 함께 관찰되었다(Fig. 2). Xylanase 활성을 갖는 분획에서 *pwxyn11B* 유전자로부터 예측되는 mature protein (35.8 kDa)의 크기보다 작은 단백질만 관찰된 것으로 보아 재조합 대장균에서 생산된 단백질은 분해가 일어난 것으로 여겨졌다.

Xylanase의 반응특성

Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피 과정을 통해 얻은 분획 중 효소활성이 높은 분획의 부분정제 효소액을 사용하여 PwXyn11B의 특성을 조사하였다. 반응온도와 pH가 xylanase 활성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 3A에 보인 바와 같이 50°C와 pH 6.5에서 46.3 U/ml의 최대활성을

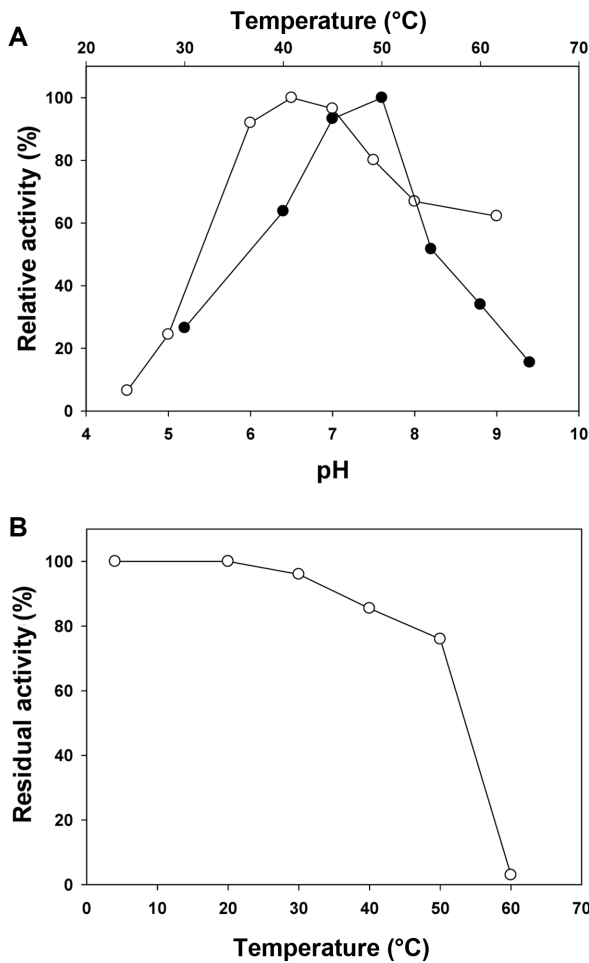


Fig. 3. Temperature and pH optima (A), and thermostability (B) of the PwXyn11B. Temperature profile (closed symbols) was obtained by measuring the xylanase activity at different temperatures with fixed pH 6.5 for oat spelt xylan hydrolysis. The pH profile (open symbols) was obtained by measuring the enzyme activities at various pHs with constant temperatures of 50 °C. Thermostability was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 h at different temperatures. Each curve represents the average of three independent experiments.

보였으며 pH 6.0–7.0 범위에서 최대활성의 90% 이상의 활성을 나타냈다. 열안정성 조사를 위해 조효소액을 여러 온도에서 1시간 방치 후 잔존활성을 측정하였는데 30°C에서도 실활이 일어나기 시작하였으며 50°C에서 76% 정도의 활성을 유지하였고 60°C에서는 완전히 실활되었다(Fig. 3B).

*P. campinasensis*의 XylX [15]와 XynG1-1 [16]은 60°C와 pH 7.0에서 동일하게 최대 효소활성을 보이며, 열안정성도 높아 XynG1-1은 70°C와 80°C에서 각각 1시간 방치한 후에도 77.1%와 50.2%의 잔존활성을 보였으며, XylX는 60°C에서 8시간 동안 방치하였을 때도 거의 실활되지 않았다. 분자량이 37 kDa인 *Paenibacillus* sp. NF1의 XynNF는 60°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보이며, 70°C와 80°C에서 1시간 방치 후 70.6%와 42.6%의 잔존활성을 보였다[21]. 또한 *P. curdlanolyticus* B-6의 PcXyn11A는 최적 반응조건이 60°C와 pH 6.0으로 보고되었으며[22], 이들은 모두 PwXyn11B보다 최적 반응온도가 10°C 정도 높았다. 한편 그 크기가 20.6 kDa인 *P. barcinonensis* BP-23의 Xyn11E는 최적 반응온도와 pH가 PwXyn11B와 동일하였으며[9], *Paenibacillus* sp. HC1의 xylanase-I과 xylanase-II는 모두 최적 반응조건이 45°C와 pH 5.0로 알려져 PwXyn11B보다 낮은 온도에서 최대 활성을 보였다[19]. PwXyn11B와 G1-1, XylX 및 Xyn11A간에 활성영역과 CBM의 아미노산 배열의 상동성이 75% 수준인데 최적 반응온도와 내열성이 크게 낮은 것은 재조합 대장균에서 생산된 PwXyn11B의 카르복실 지역이 분해되어 CBM의 기능이 파괴되었기 때문으로 추정된다. 실제 *P. terrae* HPL-003의 xylanase는 CBM에 의해 열안정성이나 최적반응 조건과 기질에 대한 반응성도 변화가 일어나는 것으로 확인되었고[11], XynG1-1의 CBM도 열안정성이나 pH 안정성에 기여한다고 보고되었다[23].

기질에 따른 반응성을 조사한 결과 PwXyn11B는 oat spelt xylan와 birchwood xylan에 대한 분해활성은 거의 유사하였으나 이들에 비해 arabinoxylan에 분해활성은 약 1.4배 수준으로 높았다(Table 1). 반면에 carboxymethyl cellulose, locust bean gum과 같이 xylan이 아닌 섬유질계 물질을 분

Table 1. Comparison of Hydrolyzing Activity for Xylans between PwXyn11B and others.

Substrates	Relative activity (%) of					
	PwXyn11B ^a	XylX ^b	XynNF ^c	PcXyn11A ^d	Xyl-I ^e	Xyl-II ^e
Oat spelt xylan	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Birchwood xylan	101.7	100.5	98.9	148.3	97.1	165.6
Arabinoxylan	139.5	ND	ND	55.5	ND	ND

ND, not determined.

^aXylanase of *P. woosongensis* in this study; ^bxylanase of *P. campinasensis* BL11 [15]; ^cxylanase of *Paenibacillus* sp. NF1 [21]; ^dxylanase of *P. curdlanolyticus* B-6 [22]; ^exylanases of *Paenibacillus* sp. HC1 [19].

Table 2. Effects of metal ions and other reagents on the xylanase activity.

Effectors (5 mM)	Relative activity (%) of			
	PsXyn11B ^a	XynG1-1 ^b	XylX ^c	XynNF ^d
None	100.0	100.0	100.0	100.0
KCl	99.3	94.3	96.4	97.2**
CaCl ₂	118.0	123.1	88.2	132.4**
MgCl ₂	108.9	94.6	98.1	96.6**
CuCl ₂	55.4	88.0	20.3	80.6**
FeCl ₂	101.0	53.6	45.3	52.4**
FeCl ₃	49.5	22.9	23.2	20.3**
MnCl ₂	65.8	97.7	65.4	97.5**
NiCl ₂	77.1	68.0	70.5	NT
EDTA	93.6	48.0	50.1	41.2**
SDS	ND	23.5	36.5*	20.6**

ND; not detected, NT; not tested.

*SDS of 0.25% was added, **all effectors of 10 mM were added.

^aXylanase of *P. woosongensis* in this study; ^bxylanase of *Paenibacillus campinasensis* G1-1 [16]; ^cxylanase of *P. campinasensis* BL11 [15]; ^dxylanase of *Paenibacillus* sp. NF1 [21]; ^exylanases of *Paenibacillus* sp. HC1 [19].

해하지 못하였고 *para*-nitrophenyl- β -xyloside나 *para*-nitrophenyl- β -glucoside도 분해하지 못하였다. XylX [15]와 *Paenibacillus* sp. NF1의 XynNF [21]는 PwXyn11B와 같이 oat spelt xylan과 birchwood xylan에 대한 분해활성이 거의 유사하였다. 그러나 PcXyn11A는 birchwood xylan, oat spelt xylan과 arabinoxylan의 순서로 분해활성이 높았으며 arabinoxylan에 비해 birchwood xylan에 대한 분해활성은 약 3배 정도 높았다[22]. 한편 PwXyn11B와 최적 반응 조건이 동일한 *Paenibacillus* sp. HC1의 Xyl-1은 oat spelt xylan에 비해 birchwood xylan에 대한 활성이 각각 97.1%로 PwXyn11B와 유사하였으나 Xyl-II는 165.6%로 차이가 있었다[19].

금속이온을 비롯한 화합물이 PwXyn11B 활성에 미치는 영향을 분석하여 XynG1-1, XylX와 XynNF와 비교하였다 (Table 2). PwXyn11B는 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해서는 활성이 약간 증가되었으며 K⁺과 Fe²⁺에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다. 반면에 Cu²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ 이온에 의해 활성이 크게 감소하였다. PwXyn11B는 다른 3종의 효소와는 달리 SDS에 의해 효소활성이 완전히 저해되었으나, EDTA, Fe²⁺와 Fe³⁺에 의해서는 저해를 받지 않거나 저해 정도가 낮았다. Cu²⁺와 Mn²⁺은 효소마다 저해 정도가 달랐으며, Ni²⁺에 의한 저해 정도는 유사 수준이었다. 한편 XynG1-1과 XynNF도 PwXyn11B와 같이 Ca²⁺에 의해 활성이 증가되었는데 이와 달리 XylX의 활성이 Ca²⁺에 의해 저해된 것으로 알려졌다.

다. XylX는 XynG1-1과 활성영역의 아미노 잔기 배열이 같고 최적 반응조건이 동일하였는데도 불구하고 Ca²⁺이 활성화에 미치는 차이가 나는 것은 Ca²⁺이 결합하는 아미노 잔기를 포함하는 CBM의 아미노산 배열의 차이에서 비롯되었을 수 있다고 추정되었다.

요 약

*Paenibacillus woosongensis*의 유전체 부분 염기서열로부터 유추된 xylanase 유전자를 PCR 증폭하여 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. 클로닝된 xylanase 유전자는 *xyn11B*로 명명되었으며, 356 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하는 1,071 뉴클레오티드로 이루어졌다. Xyn11B의 아미노산 배열을 분석한 결과 glycosyl hydrolase family 11에 속하는 xylanase와 상동성이 높은 활성영역과 탄수화물 결합영역을 포함하고 있는 다영역 효소로 확인되었다. SignalP4.1 server로부터 아미노 말단의 26개 잔기가 signal peptide로 예측되었다. DEAE-Sepharose와 Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피 과정을 통해 *xyn11B* 유전자를 함유한 재조합 대장균의 균체 파쇄상등액으로부터 Xyn11B를 부분 정제하였다. 부분 정제된 Xyn11B의 반응특성을 조사한 결과 pH 6.5와 50°C에서 최대 반응활성을 보였고 birchwood xylan이나 oat spelt xylan보다 arabinoxylan에 대한 활성이 높았으며 셀룰로스, 만난과 *para*-nitrophenyl- β -xylopyranoside에 대해서는 분해활성이 없었다. Xyn11B의 활성은 Ca²⁺과 Mg²⁺에 의해서는 약간 증가한 반면에 Cu²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺에 의해서는 크게 저해되었고 SDS에 의해서 완전히 저해되었다.

References

- Bastawde KB. 1992. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 353-368.
- Moreira LR, Filho EX. 2016. Insights into the mechanism of enzymatic hydrolysis of xylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 5205-5214.
- Subramanian S, Prema P. 2002. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. *Crit. Rev. Biotechnol.* **22**: 33-64.
- Chakdar H, Kumar M, Pandiyan K, Singh A, Nanjappan K, Kashyap PL, Srivastava AK. 2016. Bacterial xylanases: biology to biotechnology. *3 Biotech.* **6**: 150. doi:10.1007/s13205-016-0457-z.
- Gallardo O, Diaz P, Pastor FJ. 2003. Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 226-233.
- Fukuda M, Watanabe S, Yoshida S, Itoh H, Itoh Y, Kamio Y, Kaneko J. 2010. Cell surface xylanases of the glycoside hydrolase

- family 10 are essential for xylan utilization by *Paenibacillus* sp. W-61 as generators of xylo-oligosaccharide inducers for the xylanase genes. *J. Bacteriol.* **192**: 2210-2219.
7. Sudo M, Sakka M, Kimura T, Ratanakhanokchai K, Sakka K. 2010. Characterization of *Paenibacillus curdolanolyticus* intracellular xylanase Xyn10B encoded by the xyn10B gene. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 2358-2360.
 8. Yoon K-H. 2012. Cloning and characterization of xylanase gene from *Paenibacillus woosongensis*. *Korean J. Microbiol.* **48**: 141-146.
 9. Valenzuela SV, Diaz P, Pastor FJ. 2014. Xyn11E from *Paenibacillus barcinonensis* BP-23: a LppX-chaperone-dependent xylanase with potential for upgrading paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 5949-5957.
 10. Lee SH, Lee YE. 2014. Cloning and characterization of a multi-domain GH10 xylanase from *Paenibacillus* sp. DG-22. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 1525-1535.
 11. Kim DR, Lim HK, Lee KI, Hwang IT. 2016. Identification of a novel cellulose-binding domain within the *endo*- β -1,4-xylanase KRICT PX-3 from *Paenibacillus terrae* HPL-003. *Enzyme Microb. Technol.* **93-94**: 166-173.
 12. Lee J-C, Yoon K-H. 2008. *Paenibacillus woosongensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 612-616.
 13. Kim YA, Yoon K-H. 2010. Characterization of a *Paenibacillus woosongensis* β -xylosidase/ α -arabinofuranosidase produced by recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 1711-1716.
 14. Miller ML, Blum R, Glennon WE, Burton AL. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.* **2**: 127-132.
 15. Ko C-H, Tsai C-H, Tu J, Lee H-Y, Kua L-T, Kuod P-A, Lai Y-K. 2010. Molecular cloning and characterization of a novel thermostable xylanase from *Paenibacillus campinasensis* BL11. *Process Biochem.* **45**: 1638-1644.
 16. Zheng H, Liu Y, Liu X, Wang J, Han Y, Lu F. 2012. Isolation, purification and characterization of a thermostable xylanase from a novel strain *Paenibacillus campinasensis* G1-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 930-958.
 17. Pason P, Kosugi A, Waeonukul R, Tachaapaikoon C, Ratanakhanokchai K, Arai T, et al. 2010. Purification and characterization of a multienzyme complex produced by *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 573-580.
 18. Imjongjairak S, Jommuengbout P, Karpilanondh P, Katsuzaki H, Sakka M, Kimura T, et al. 2015. *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6 xylanase Xyn10C capable of producing a doubly arabinose-substituted xylose, α -L-Araf-(1 \rightarrow 2)-[α -L-Araf-(1 \rightarrow 3)]-D-Xylp, from rye arabinoxylan. *Enzyme Microb. Technol.* **72**: 1-9.
 19. Harada KM, Tanaka K, Fukuda Y, Hashimoto W, Murata K. 2008. *Paenibacillus* sp. strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicelluloses. *Microbiol. Res.* **163**: 293-298.
 20. Lee H-J, Shin D-J, Cho NC, Kim H-O, Shin S-Y, Im S-Y, et al. 2000. Cloning, expression and nucleotide sequences of two xylanase genes from *Paenibacillus* sp. *Biotechnol. Lett.* **22**: 387-392.
 21. Zheng HC, Sun MZ, Meng LC, Pei HS, Zhang XQ, Yan Z, et al. 2014. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. NF1 and its application in xylooligosaccharides production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 489-496.
 22. Sermsathanaswadi J, Pianwanit S, Pason P, Waeonukul R, Tachaapaikoon C, Ratanakhanokchai K, et al. 2014. The C-terminal region of xylanase domain in Xyn11A from *Paenibacillus curdolanolyticus* B-6 plays an important role in structural stability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8223-8233.
 23. Liu Y, Huang L, Li W, Guo W, Zheng H, Wang J, Lu F. 2015. Studies on properties of the xylan-binding domain and linker sequence of xylanase XynG1-1 from *Paenibacillus campinasensis* G1-1. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 1591-1599.