Korean Journal of Microbiology (2016) Vol. 52, No. 4, pp. 463-470
DOI https://doi.org/10.7845/kjm.2016.6068
Copyright ⓒ 2016, The Microbiological Society of Korea
pISSN 0440-2413
eISSN 2383-9902

Article

Paenibacillus amylolyticus 유래 xylanase GH10 및 GH30의 xylan 가수분해 특성

남경화† · 장명운† · 김민정 · 이정민 · 이민재 · 김태집*
충북대학교 대학원 축산·원예·식품공학부 식품공학전공

Enzymatic characterization of *Paenibacillus amylolyticus* xylanases GH10 and GH30 for xylan hydrolysis

Gyeong-Hwa Nam†, Myoung-Uoon Jang†, Min-Jeong Kim, Jung-Min Lee, Min-Jae Lee, and Tae-Jip Kim*
Division of Animal, Horticultural and Food Sciences, Graduate School of Chungbuk National University, Cheongju 28644, Republic of Korea

(Received November 29, 2016; Revised December 16, 2016; Accepted December 19, 2016)

ABSTRACT: The enzymatic degradation of xylans is the most versatile way to obtain the high value-added functional compounds or the fermentable sugars for renewable energy. The *endo*-β-xylanases are the major enzymes which hydrolyze the internal β-1,4-linkages of xylan backbones to produce the mixtures of xylooligosaccharides including xylobiose and xylotriose. Among them, glucuronoxylanase GH30 can exclusively hydrolyze the internal β-1,4-linkages of xylans decorated with methylglucuronic acid branches. In the present study, two xylanolytic enzyme (PaXN_10 and PaGuXN_30) genes were cloned from *Paenibacillus amylolyticus* KCTC 3005, and expressed in *Escherichia coli*, respectively. PaXN_10 (38.7 kDa) belongs to the *endo*-β-xylanase GH10 family, while PaGuXN_30 (58.5 kDa) is a member of glucuronoxylanase GH30. They share the same optimal reaction conditions at 50°C and pH 7.0. Enzymatic characterization proposed that *P. amylolyticus* can utilize the hardwood glucuronoarabinoxylans via the cooperative actions of xylanases GH10 and GH30. The extracellular PaGuXN_30 is secreted into the medium and hydrolyzes glucuronoarabinoxylans to release a series of aldouronic acid mixtures with a methylglucuronic acid branch. The resultant products being transported into the microbial cell are successively degraded into the smaller xylooligosaccharides by the intracellular PaXN_10, which will be utilized for the cellular metabolism.

Key words: *Paenibacillus amylolyticus*, glucuronoxylanase GH30, xylan hydrolysis, xylanase GH10

Xylan은 hemicellulose에 속하는 대표적인 식물성 다당체로, D-xylose가 β-1,4-결합을 이루는 주사슬에 *O*-acetyl, *O*-methyl-D-glucuronic acid (MeGlcA) 또는 L-arabinofuranoside 등이 수식된 다양한 형태의 중합체로 존재한다. 침엽수 계통의 xylan은 L-arabinose가 수식된 형태의 arabinoxylan이 주를 이루며, 활엽수 xylan의 경우 대부분 acetyl glucuronoxylan의 형태이다(Saha, 2003; Chaikumpollert *et al*., 2004). 최근 이러한 xylan 중합체의 효소적 가수분해를 통해 얻어지는 D-xylose, L-arabinose 및 그 올리고당 등 오탄당 기반의 탄수화물은 장내 probiotics 미생물의 생장을 선택적으로 촉진시키는 prebiotics 소재로 주목 받고 있다(Falck *et al*., 2013; Moon *et al*., 2015). 자연계에 존재하는 xylan은 다양한 측쇄 잔기가 수식된 복합구조를 가지며, 이를 저분자화하기 위해서는 다양한 가수분해효소 및 보조효소의 확보와 특성 연구가 필요하다.

Xylanase는 xylan 주사슬의 β-1,4-xyloside 결합을 *endo*-형태로 가수분해하는 핵심 효소이다. 특히, 목질계 부산물을 이용한 펄프 생산, 가축사료의 효율 개선, 과일음료의 청징, 제빵의 고품질화, xylitol 등 기능성 식품소재 생산을 위한 주요 산업용 효소로 널리 연구되고 있다. 또한 식물성 바이오매스의 저분자화 및 당화를 통한 바이오에탄올 생산공정에서 xylanase의 중요성이 강조되고 있다(Collins *et al*., 2005). Xylanase는 *Paenibacillus* (Gallardo *et al*., 2010; Valenzuela *et al*., 2010), *Thermotoga* (Ihsanawati *et al*., 2005), *Cellvibrio* (Andrews *et*

†These authors contributed equally to this work.
***For correspondence.** E-mail: tjkim@cbnu.ac.kr;
Tel.: +82-43-261-3354; Fax: +82-43-271-4412

al., 2004), *Aspergillus* (Do *et al*., 2013), *Streptomyces* (Fujimoto *et al*., 2004) 속을 포함한 다양한 미생물에서 보고되었다. Xylan의 다양하고 복잡한 화학구조로 인해 xylanases의 종류에 따라 서로 기질특이성 및 작용특성이 크게 다르며(Sunna and Antranikian, 1997), 따라서 새로운 가수분해특성을 가지는 유용한 xylanases를 확보하는 것은 산업적으로 매우 중요하다. CAZy 탄수화물효소 데이터베이스(Carbohydrate Active enZYmes; http://www.cazy.org)에 따르면, 일반적인 *endo*-1,4-β-xylanase (EC 3.2.1.8)는 1차, 3차 구조 및 효소반응 기작 등에 의해 다양한 Glycoside Hydrolase (GH) 계열의 효소로 분류되며, 주로 GH10 및 GH11 계열에 속하는 것으로 알려졌다 (Uday *et al*., 2016). 반면, GH30 계열의 xylanase는 목질계 유래 methylglucuronoxylan에 특이적인 가수분해 활성을 나타내어 glucuronoarabinoxylan *endo*-1,4-β-xylanase (또는 glucuronoxylanase; EC 3.2.1.136)로도 불리운다. 최근 들어 xylan 분해능이 높은 *Paenibacillus* 속 미생물이 생산하는 고활성 효소에 대한 관심이 높아지면서, *P. barcinonensis* (Valenzuela *et al*., 2010, 2012), *Paenibacillus* sp. W-61 (Fukuda *et al*., 2010), *P. curdlanolyticus* (Waeonukul *et al*., 2009), *Paenibacillus* sp. HC1 (Harada *et al*., 2008), *Paenibacillus* sp. JDR-2 (St. John *et al*., 2006a)로부터 다양한 xylanases가 보고되었다.

본 연구에서는 *P. amylolyticus* KCTC 3005로부터 GH10 및 GH30 계열로 예상되는 2종의 xylanase 유전자를 분리, 대장균 내에서 대량 발현 및 정제하고, 각각의 효소특성과 xylan 가수분해 특성을 상호 비교하여 이들 효소의 세포 내 역할과 산업적 이용 가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

미생물 및 유전자

Paenibacillus amylolyticus KCTC 3005 (ATCC 9995) 균주는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures; KCTC)에서 분양받았다. 유전자 클로닝과 대장균 내 항시발현을 위한 플라스미드 벡터는 pHCE II/*Nde*I (BioLeaders)를 일부 변형시킨 pHCXHD (Kang *et al*., 2009) 벡터를 사용하였으며, 유전자 조작과 발현을 위한 균주로는 *Escherichia coli* MC1061를 사용하였다.

Xylanases 유전자 클로닝

P. amylolyticus KCTC 3005를 배양하여 염색체 DNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 PCR을 수행하였다. Xylanase GH10 (PaXN_10) 유전자의 PCR 증폭은 PaXN-N (5'-TTTTCATATGCCAACTGAAATTCC-3')과 PaXN-C (5'-TTTTCTCGAGGGACATAGGGTTAATGA-3') 프라이머, 그리고 glucuronoxylanase GH30 (PaGuXN_30) 유전자의 증폭에는 PaGuXN-N (5'-TTTTGAATTCGCCAGCGATGCCAACAT-3')과 PaGuXN-C (5'-TTTTCTCGAGTTGTGCTGCGGTAACATTAA-3') 프라이머를 사용하였다. Pyrobest DNA polymerase (TaKaRa Biomedical)를 사용하여 98°C 30초, 52°C 30초, 72°C 90초의 조건에서 30 cycles의 PCR 반응을 실시하였으며, 증폭된 PaXN_10 DNA 단편을 *Nde*I과 *Xho*I, PaGuXN_30 DNA 단편을 *Eco*RI과 *Xho*I으로 각각 절단한 후, 항시발현 벡터 pHCXHD에 삽입하여 재조합 플라스미드인 pHxPaXN과 pHxPaGuXN을 얻었다. DNA의 염기서열은 SolGent Co.에 의뢰하여 분석하였다.

Xylanases 유전자 발현 및 효소 정제

pHxPaXN과 pHxPaGuXN이 각각 형질전환된 재조합 *E. coli* MC1061을 100 μg/ml의 ampicillin을 포함한 LB 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양한 균체를 원심분리로 회수하였고, ultrasonicator (VCX750, Sonics & Materials)로 파쇄하였다. 세포 파쇄액을 4°C에서 10분간 원심분리하여 조효소액을 얻고, Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

Xylanases 활성 측정

PaXN_10과 PaGuXN_30의 효소활성은 2.5% beechwood xylan (BEX, Sigma-Aldrich), birchwood xylan (BIX, Sigma-Aldrich), oat-spelt xylan (OSX, Megazymes), wheat arabinoxylan (WAX, Megazymes) 또는 rye arabinoxylan (RAX, Megazymes)을 기질로 하여 50°C, 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에서 10분간 반응한 후, 유리된 환원당량을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하였다(Miller, 1959). 각 기질 별로 1분간 1 μmol D-xylose equivalent의 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 최적의 효소반응 온도를 결정하기 위하여 반응액의 pH를 7.0으로 고정하고 25~75°C의 온도 범위에서 각각 효소활성을 측정하였으며, 최적 pH는 반응 온도를 50°C로 고정하고 pH 3.0~12.0의 범위에서 측정하였다. 이 때 pH 3.0~5.0 범위는 citrate, pH 6.0~8.0은 sodium phosphate, pH 7.0~9.0은 Tris-HCl, pH 8.0~10.0은 borate-NaOH, pH 11.0~12.0은 disodium phosphate 완충용액을 각각 사용하였다.

Xylanases 반응산물 분석

PaXN_10과 PaGuXN_30에 의한 xylan 가수분해산물 분석을 위하여 효소의 최적 반응조건에서 다양한 xylan 기질에 대해 12시간 동안 반응한 후, 반응산물을 thin layer chromatography (TLC)로 분석하였다. Ethyl acetate, acetic acid, 증류수를 2:2:1 (v/v)로 섞은 전개용액과 TLC plate (Silica gel 60 F_{254}; Merck)를 사용하여 시료를 분리하였으며, 건조된 TLC plate는 발색시약(3g N-[1-naphtyl]-ethylenediamine, 50 ml H_2SO_4, 970 ml methanol)에 담근 후 120°C에서 5분간 방치하여 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

Xylanases의 유전자 클로닝 및 발현

P. amylolyticus KCTC 3005의 xylanases 유전자를 클로닝하기 위해 CAZy 및 NCBI 데이터베이스를 검색하였으며, 다양한 *Paenibacillus* 속 미생물의 유전체 서열을 분석하여 xylanase로 예상되는 유전자 정보를 상호 비교하였다. *Paenibacillus* sp. FSL H7-689의 유전체 정보로부터 xylanase로 추정되는 2종의 유전자를 발견하였으며, *endo*-β-1,4-xylanase (ID: ETT41903) 예상 서열을 기반으로 PaXN-N 및 PaXN-C 프라이머, 그리고 *O*-glycosyl hydrolase (ID: ETT51061) 예상 서열로부터 signal peptide를 제외한 PaGuXN-N 및 PaGuXN-C의 PCR 프라이머를 설계하였다.

P. amylolyticus KCTC 3005 염색체 DNA를 주형으로 PCR을 수행하여, PaXN_10 (1,002 bp, GenBank accession No. KY264022)과 PaGuXN_30 (1,596 bp, KY264023)으로 예상되는 DNA 단편을 증폭하였다. 각 DNA 단편을 항시발현 벡터인 pHCXHD에 클로닝하여 재조합 플라스미드를 제조하고, pHxPaXN (4,725 bp) 및 pHxPaGuXN (5,328 bp)으로 명명하였다. pHxPaXN과 pHxPaGuXN을 각각 *E. coli* MC1061에 형질전환하여 재조합 대장균을 얻었으며, 이를 배양하여 C-말단에 6개의 histidine 잔기가 결합된 형태의 재조합 PaXN_10과 PaGuXN_30를 얻었다. Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 재조합 효소단백질을 정제하고, SDS-PAGE로 정제도를 확인한 결과 PaXN_10은 38.7 kDa, PaGuXN_30은 58.5 kDa의 분자량을 나타내었다(Fig. 1).

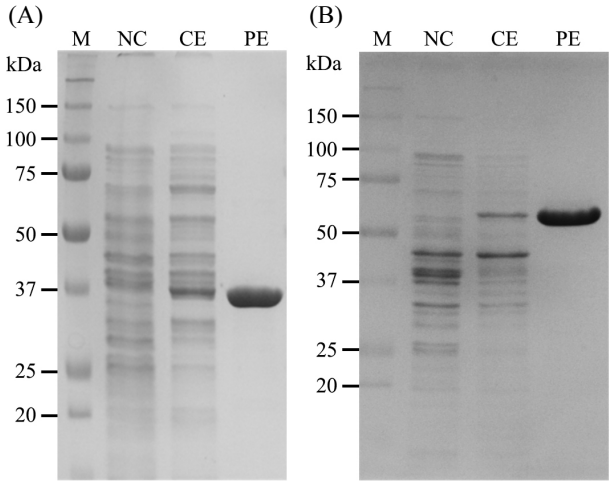

Fig. 1. Gene expression and purification of recombinant (A) PaXN_10 and (B) PaGuXN_30 from *E. coli*. SDS-PAGE analyses showed PaXN_10 and PaGuXN_30 with C-terminal His-tag purified by Ni-NTA column chromatography. M, protein molecular weight markers; NC, cell extract from *E. coli* harboring an empty vector (negative control); CE, cell extract from recombinant *E. coli* harboring xylanase gene; PE, purified enzyme, respectively.

Xylanases의 1차 및 3차 구조 분석

PaXN_10 유전자는 333개의 아미노산을 암호화하는 1,002개 염기의 open reading frame으로 구성되며, SignalP 3.0 Server (http://www.cbs.dk/services/SignalP)를 이용한 분석 결과 signal peptide 서열이 존재하지 않으므로, 세포 내에서 발현될 것으로 예상하였다. 반면에 PaGuXN_30의 경우 signal peptide 예상 서열을 제외하고 1,596개의 염기로 구성된 유전자를 클로닝하였으며, 이는 총 531개의 아미노산을 암호화한다.

염기 서열로부터 유추한 PaXN_10과 PaGuXN_30 상호간의 아미노산 서열 상동성은 5.5%에 불과하며, phylogenetic tree 분석에서도 이들이 서로 다른 GH 계열에 속하는 효소임을 확

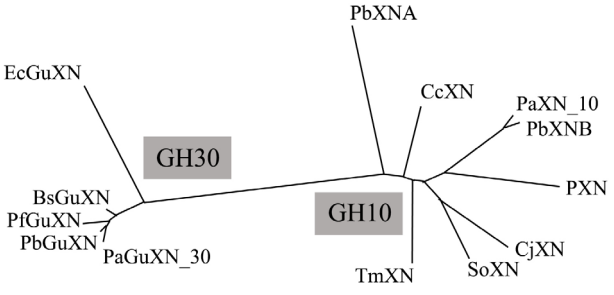

Fig. 2. Phylogenetic relationship among various xylanases GH10 and GH30. PaGuXN_30, glucuronoxylanase from *Paenibacillus amylolyticus* KCTC 3005; PbGuXN, *P. barcinonensis* BP-23; PfGuXN, *P. favisporus* CC02-N2; BsGuXN, *Bacillus subtilis* 168; EcGuXN, *Erwinia chrysanthemi*; PaXN_10, xylanase from *P. amylolyticus* KCTC 3005; PXN, *Paenibacillus* sp. JDR-2; PbXNA and PbXNB, *P. barcinonensis* BP-23; CjXN, *Cellvibrio japonicus*; SoXN, *Streptomyces olivaceoviridis* E-86e; CcXN, *Clostridium cellulolyticum* H10; TmXN, *Thermotoga maritima* MSB8, respectively.

인하였다(Fig. 2). 다른 xylanase 계열 효소들과 서열 상동성을 비교한 결과, PaXN_10은 *P. barcinonensis* Xyn10B (Gallardo *et al*., 2010)와 83.5%의 가장 높은 서열 상동성을 보였으나, *Paenibacillus* sp. JDR-2 xylanase (St. John *et al*., 2006a)와는 30.3%의 낮은 상동성을 나타내었다. 또한 *Thermotoga maritima* MSB8 유래의 내열성 효소인 xylanase 10B (Ihsanawati *et al*., 2005)와 30.3%, *Cellvibrio japonicus* xylanase (Andrews *et al*., 2004)와 21.0%의 상동성을 보였다. PaXN_10은 대부분의 GH10 계열 xylanases에서 공통적으로 발견되는 상동부위 III (WDVVNEA)과 VI (TELD) 내의 catalytic acid-base (Glu134)와 nucleophile (Glu241) 아미노산 잔기(Fukumura *et al*., 1995)를 공유하였다. 한편, PaGuXN_30는 *P. barcinonensis* BP-23 Xyn30D (Valenzuela *et al*., 2012)와 78.8%, *Bacillus subtilis* 168 XynC (St. John *et al*., 2006b)와 55.0%, *Erwinia chrysanthemi* XynA (Vršanská *et al*., 2007)와 28.9%의 아미노산 서열 상동성을 나타내었다. PaGuXN_30도 xylanase GH30 계열 효소들의 주요 활성부위 잔기인 Glu169 및 Glu259를 공유하였다.

일반적으로 xylanase GH10 계열 효소는 cellulose binding domain과 catalytic domain으로 구성되는 $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel 구조를 가지며, β-jelly roll 구조의 GH11 계열 효소에 비해 분자량이 큰 특징을 보인다(Ahmed *et al*., 2009; Juturu and Wu, 2012). Glucuronoxylanase라고도 불리우는 GH30 계열 xylanase는 측쇄에 MeGlcA가 수식된 형태의 glucuronoxylan 기질에 대해서만 활성을 나타내며, 일반적으로 $(\beta/\alpha)_8$ TIM-barrel 구조에 9개의 β-strand로 이루어진 extra-domain을 가지는 것으로 알려졌다(St. John *et al*., 2006b; Vršanská *et al*., 2007; Valenzuela *et al*., 2012). Phyre2 server (http://www.sbg.bio.ic. ac.uk/phyre2)의 단백질 구조 예측 프로그램을 통한 얻어진 PaXN_10과 PaGuXN_30의 입체구조 모델은 기존에 알려진 GH10 및 GH30 계열 xylanase 효소들의 구조와 매우 유사하였다(자료 미제시). 따라서 PaXN_10과 PaGuXN_30의 1차 구조 서열 비교 및 3차 구조 모델링 결과 등을 종합적으로 고려할 때, 이들이 서로 상이한 구조를 가지며 각각 xylanase GH10 및 glucuronoxylanase GH30 계열에 속하는 효소일 것으로 판단하였다.

Xylanases의 효소 특성

재조합 PaXN_10은 50°C에서 BEX 기질에 대한 최대 가수분해 활성을 보였으나, 40°C에서 69.1%, 55°C에서 52.4%로 활성이 감소하였다. PaGuXN_30의 최적 반응온도는 50°C로 동일하지만, PaXN_10에 비해 25~60°C의 넓은 온도 범위에서 60% 이상의 효소활성을 나타내었다(Fig. 3A). 한편, 두 효소 모두 50 mM sodium phosphate (pH 7.0) 완충용액에서 가장 높은 가수분해 활성을 보였으나, PaXN_10은 pH 5.0 이하 또는 pH 10.0 이상의 반응조건에서 효소활성이 30% 이하로 급격하게 감소하였다. PaGuXN_30는 PaXN_10과 유사한 pH 의존도를 보였으나, 낮은 pH에서 상대적으로 높은 활성을 보였다(Fig. 3B). GH10 계열의 *P. barcinonensis* BP-23 유래 XynA는 60°C와 pH 6.5에서 최대활성을 보였으며(Valenzuela *et al*., 2010), Xyn10B는 50°C와 pH 5.5에서 최대 활성을 나타내었다(Blanco *et al*., 1996). 대부분의 *Paenibacillus* 유래 xylanase는 40~60°C, pH 5.0~7.0의 범위에서 최적 활성을 나타내었다(Harada *et al*., 2008; Waeonukul *et al*., 2009). GH30 계열 xylanase 중 *B. subtilis* 168 XynC는 65°C, pH 6.0에서 최대 활성을 보였고(St. John *et al*., 2006b), *P. barcinonensis* BP-23의 Xyn30D는 50°C, pH 6.5에서 최대 활성을 나타내었다(Valenzuela *et al*., 2012). PaGuXN_30은 pH 5.0~11.0의 넓은 범위에서 12시간 방치 후에도 잔존활성이 80% 이상 유지되는 등 pH 안정성이 우수하여 산업적인 활용 가치가 높을 것으로 기대한다.

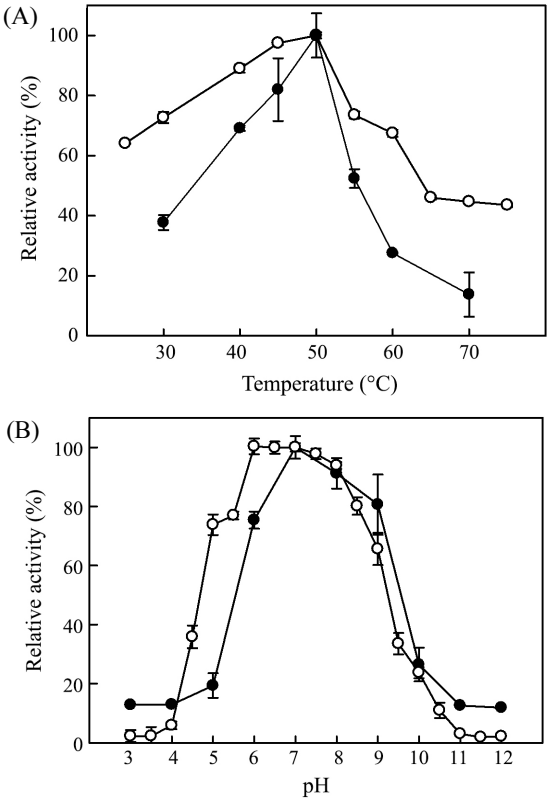

Fig. 3. Effect of temperature and pH on the activities of PaXN_10 and PaGuXN_30. (A) Enzymatic activities were determined at various temperatures in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) (B) Enzymatic activities were measured at various pH and 50°C; closed circles, PaXN_10; open circles, PaGuXN_30.

Xylanases의 기질 특이성

BEX, BIX, OSX, WAX, RAX 등 다양한 xylan 중합체에 대한 각 효소의 가수분해 활성을 측정하였다(Table 1). PaXN_10은 WAX에 대해 32.5 U/mg의 비활성을 보였고, BEX에 대해서도 31.8 U/mg으로 높은 활성을 나타내었다. 또한 대부분의 xylan 중합체 기질에 대한 비활성이 20 U/mg 이상이었다. 그러나, PaGuXN_30의 경우 목질계 glucuronoxylan 기질인 BEX 및 BIX에 대해 각각 22.2 U/mg과 25.9 U/mg의 높은 활성을 나타낸 반면, OSX, RAX, WAX 등의 초본계 arabinoxylan 계열 기질에 대해서는 8.1~9.2 U/mg의 상대적으로 낮은 활성을 보였다. 이는 xylan 기질 마다 화학구조 및 측쇄의 수식 정도가 서로 다르므로 각 효소의 기질 별 친화도와 활성에 차이가 발생하는 것으로 판단하였다. 예를 들면, 일반적인 GH10 계열 xylanase의 일종인 PaXN_10은 측쇄의 종류와 수식 정도에 무관하게 대부분의 기질을 잘 분해하여 저분자 xylooligosaccharides (XOS)로 전환하지만, PaGuXN_30은 전형적인 glucuronoxylanase GH30 계열의 효소로서 MeGlcA 측쇄를 가진 특정 구조의 목질계 glucuronoarabinoxylan에 대해서만 효소활성을 나타냄을 알 수 있다. 따라서 MeGlcA의 수식 정도가 낮은 초본계 arabinoxylan 기질에 대해 비교적 낮은 활성을 보이는 것으로 판단하였다.

P. barcinonensis BP-23 유래 XynA GH10은 PaXN_10과 약 20%의 낮은 아미노산 서열 상동성을 보이지만, BEX 기질에 대해 41.2 U/mg, OSX 및 WAX 기질에 대해 31.7 U/mg, 32.5 U/mg의 비활성을 나타내며, PaXN_10과 유사한 BEX 가수분해 특성을 보인다(Valenzuela *et al*., 2010). 반면 동일 미생물에서 유래한 Xyn10B GH10의 경우는 PaXN_10과 83.5%의 매우 높은 서열 상동성을 보이지만, BIX에 대한 비활성이 0.2 U/mg으로 PaXN_10에 비해 매우 낮았다(Blanco *et al*., 1996; Gallardo *et al*., 2003, 2010). 한편, *B. subtilis* 168 유래 XynC GH30은 BIX에 대한 비활성이 21.9 U/mg으로 PaGuXN_30과 유사하였으며(St. John *et al*., 2006b), *P. barcinonensis* BP-23 유래 Xyn30D는 BIX에 대해 28.2 U/mg의 비활성을 보이지만, PaGuXN_30에 비해 OSX, RAX, WAX를 거의 분해하지 못하는 특징을 가진다(Valenzuela *et al*., 2012).

Table 1. Substrate specificities of *Paenibacillus amylolyticus* xylanases

Substrates	Specific activity (U/mg)[a]	
	PaXN_10	PaGuXN_30
Beechwood xylan	31.8±2.8	22.2±3.4
Birchwood xylan	21.4±1.9	25.9±4.0
Oat-spelt xylan	21.7±1.9	9.2±1.4
Rye arabinoxylan	28.0±2.4	8.1±1.3
Wheat arabinoxylan	32.5±2.8	8.1±1.3

[a] Enzyme activities were determined by DNS reducing sugar assay

Xylanases의 가수분해 특성

각 효소의 가수분해 특성을 구명하기 위해, BEX를 비롯한 xylan 중합체 및 XOS 기질에 대한 가수분해산물을 TLC로 분석하였다. PaXN_10의 경우, xylobiose에 대해 매우 약한 분해활성을 보였으나, xylotriose 이상의 XOS에 작용하면 xylobiose와 소량의 xylose를 생성하였다(자료 미제시). Xylan 기질과 반응할 경우, 다양한 XOS를 중간산물로 생성하며, 이러한 결과로부터 PaXN_10이 전형적인 *endo*-1,4-β-xylanase의 일종임을 확인하였다. BEX 또는 BIX와 반응하면 주로 xylobiose (Fig. 4A의 b; XX)와 aldotetraouronic acid (Fig. 4A의 c; UXX)

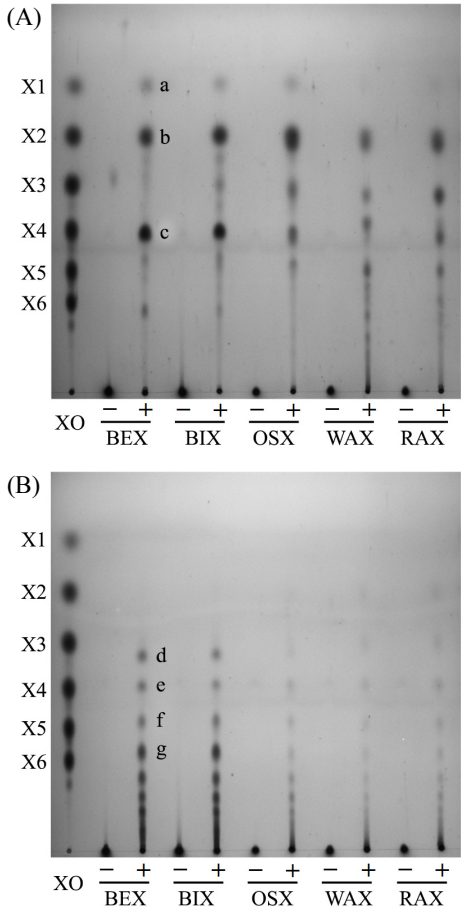

Fig. 4. TLC analyses of various xylan hydrolysates by (A) PaXN_10 and (B) PaGuXN_30. Each substrate was reacted with 0.1 unit of the corresponding enzyme for 12 h. XO, xylooligosaccharides standard from xylose (X1) to xylohexaose (X6); a, X1; b, X2; c, UXX; d, UX; e, XUX; f, XXUX; g, XXXUX, respectively.

를 생성하며, 소량의 xylose (Fig. 4A의 a; X)가 부산물로 관찰되었다. 한편 초본계 xylan 중합체인 OSX, WAX, RAX로부터 생성된 분해산물의 경우, 대부분 L-arabinose 측쇄를 가지는 XOS로 예상되며, 따라서 TLC 분석 시 일부 산물의 전개도와 위치에서 BEX 분해산물과 차이를 보였다. 일반적으로 GH10 계열 xylanases들의 기질결합부위는 중합도 약 4~5 이하의 XOS에 대해 친화도가 높으며, 이로 인해 xylotriose 이하의 짧은 올리고당을 주 반응산물로 생성하며, 이러한 가수분해 특성은 PaXN_10과 유사하였다.

PaGuXN_30은 MeGlcA 측쇄가 없는 직쇄형 XOS에는 작용하지 못하였다(자료 미제시). Xylan 기질 중, MeGlcA 측쇄를 가진 목질계 glucuronoxylan인 BEX와 BIX에 대해 상대적으로 많은 가수분해산물을 생성하며, OSX, RAX, WAX 등의 초본계 xylan 기질에는 매우 약한 활성을 보이는 것을 확인하였다 (Fig. 4B). 이러한 결과는 Table 1에서 OSX 등 arabinoxylan 기질에 대한 PaGuXN_30의 비활성이 BEX 및 BIX 등 glucuronoxylan 기질의 30% 내외로 낮았던 결과와 일치하였다. BEX와 BIX는 목질계 xylan으로 측쇄가 대부분 MeGlcA로 구성되어있고 xylose와 MeGlcA의 비율이 8:1인 반면(Teleman *et al*., 2000; Wang *et al*., 2016), 초본계 xylan인 OSX는 MeGlcA와 L-arabinose 측쇄로 구성되며, MeGlcA, arabinose, xylose의 비율이 1:3:24로 MeGlcA의 양이 상대적으로 적기 때문에 PaGuXN_30의 활성이 낮은 것으로 판단하였다(Wang *et al*., 2016). *B. subtilis* XynC의 가수분해산물 분석 결과(St. John *et al*., 2006b)를 토대로 PaGuXN_30의 가수분해산물을 예측한 결과, 중합도 4~12의 직쇄형 XOS에 한 분자의 MeGlcA가 결합되어 있는 다양한 중합도의 aldouronic acid 혼합물이 생성되는 것으로 예상된다. 기존에 보고된 glucuronoxylanase의 경우도 대부분 MeGlcA 측쇄구조의 xylan에 특이적인 가수분해효소로 알려졌으며, 기질의 종류와 측쇄구조에 따라 각 효소의 비활성에 큰 차이가 발생하였다(St. John *et al*., 2006b; Vršanská *et al*., 2007; Valenzuela *et al*., 2012). PaGuXN_30을 비롯한 대부분의 미생물 유래 glucuronoxylanase는 signal peptide를 가지며, 따라서 이들 효소는 세포 외로 분비되어 glucuronoxylan 중합체를 올리고당 단위로 분해하는 역할을 수행할 것으로 예상하였다.

결론적으로 Fig. 5에서 제안하는 바와 같이, *P. amylolyticus* KCTC 3005 균주는 PaGuXN_30 효소를 생산하여 세포 외로 분비하며, 이 효소는 BEX, BIX와 같은 목질계 glucuronoxylan에 작용하여 MeGlcA 측쇄를 포함하는 다양한 XOS (또는 aldouronic acid 혼합물)로 분해한다. 생성된 XOS는 transporter 단백질을 통해 세포 막을 통과하며, 다시 세포 내에 존재하는 PaXN_10에 의해 aldotetraouronic acid 및 xylobiose 수준의 직쇄형 저분자 XOS로 전환되어 세포 내 대사과정에 이용되는 것으로 생각된다(Collins *et al*., 2005). 따라서, PaXN_10의 경우 β-xylosidase와의 시너지효과를 이용하여 D-xylose, xylobiose 등의 소당류 생산에 적합하며, PaGuXN_30의 경우 좀 더 긴 사슬의 XOS 생산에 이용할 수 있다. 이처럼 다양한 효소 작용 및 가수분해 특성을 구명함으로써 미생물의 생리작용 및 대사과정에 대한 이해를 높일 수 있으며, 새로운 효소를 발굴함으로써 다양한 기능성 당 및 올리고당 생산기술 개발에 활용 가능할 것으로 기대한다.

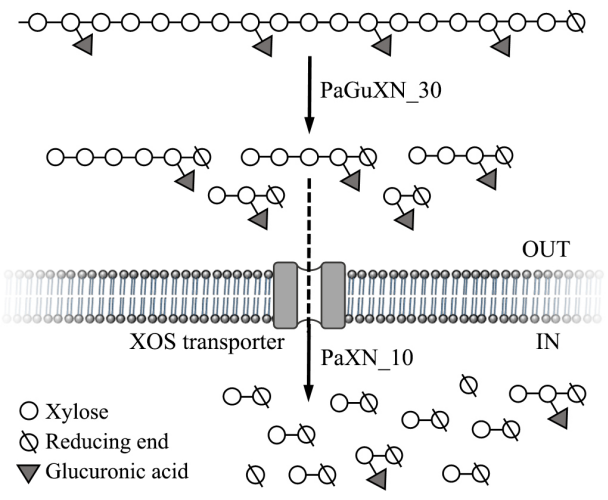

Fig. 5. Proposed scheme for the enzymatic degradation of methylglucuronoxylan with *endo*-xylanases, PaXN_10 and PaGuXN_30, in *Paenibacillus amylolyticus* KCTC 3005.

적 요

Xylan의 효소적 가수분해는 고부가가치 기능성 물질 또는 바이오에너지 생산을 위한 발효성 당을 얻는 가장 유용한 방법 중 하나이다. *endo*-β-Xylanase는 xylan 주사슬 내부의 β-1,4-결합을 가수분해하여 xylobiose, xylotriose를 포함한 다양한 XOS를 생산하는 핵심 효소이다. 이들 효소 중에서 glucuronoxylanase GH30은 methylglucuronic acid가 측쇄에 수식된 xylan에 특이적으로 작용한다. 본 연구에서는 *Paenibacillus amylolyticus* KCTC 3005에서 유래한 2종의 xylan 가수분해효소(PaXN_10과 PaGuXN_30) 유전자를 클로닝하고, *Escherichia coli*에서 각각 발현시켰다. PaXN_10 (38.7 kDa)은 β-xylanase GH10 계열, PaGuXN_30 (58.5 kDa)은 glucuronoxylanase GH30에 해당하는 효소이며, 50°C와 pH 7.0에서 최대 활성을 나타내었다. 가수분해 특성 연구를 통해 *P. amylolyticus*가 목질계

glucuronoxylan을 분해하는 효소 시스템을 제안하였다. 세포 외로 분비되는 PaGuXN_30은 glucuroxylan을 가수분해하여 methylglucuronic acid 측쇄를 가지는 다양한 aldouronic acid mixtures를 생성하며, 이러한 분해산물은 세포 내로 이동하여 PaXN_GH10에 의해 xylose, xylobiose와 같은 저분자 XOS로 분해되어 세포 내 대사경로에 이용될 수 있다. 또한 이들 효소의 가수분해특성을 이용하여 다양한 탄수화물 소재 생산이 가능할 것으로 기대한다.

감사의 말

이 논문은 2013년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. NRF-2013R1A1A2063848).

References

Ahmed, S., Riaz, S., and Jamil, A. 2009. Molecular cloning of fungal xylanases: An overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 19–35.

Andrews, S.R., Taylor, E.J., Pell, G., Vincent, F., Ducros, V.M.A., Davies, G.J., Lakey, J.H., and Gilbert, H.J. 2004. The use of forced protein evolution to investigate and improve stability of family 10 xylanases: The production of Ca^{2+}-independent stable xylanases. *J. Biol. Chem.* **279**, 54369–54379.

Blanco, A., Diaz, P., Martinez, J., Lbpez, O., Soler, C., and Pastor, F.I.J. 1996. Cloning of a *Bacillus* sp. BP-23 gene encoding a xylanase with high activity against aryl xylosides. *FEMS Microbiol. Lett.* **137**, 285–290.

Chaikumpollert, O., Methacanon, P., and Suchiva, K. 2004. Structural elucidation of hemicelluloses from Vetiver grass. *Carbohydr. Polym.* **57**, 191–196.

Collins, T., Gerday, C., and Feller, G. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 3–23.

Do, T.T., Quyen, D.T., Nguyen, T.N., and Nguyen, V.T. 2013. Molecular characterization of a glycosyl hydrolase family 10 xylanase from *Aspergillus niger*. *Protein Expr. Purif.* **92**, 196–202.

Falck, P., Precha-Atsawanan, S., Grey, C., Immerzeel, P., Staišlbrand, H., Adlercreutz, P., and Karlsson, E.N. 2013. Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 7333–7340.

Fujimoto, Z., Kaneko, S., Kuno, A., Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Mizuno, H. 2004. Crystal structures of decorated xylooligosaccharides bound to a family 10 xylanase from *Streptomyces olivaceoviridis* E-86. *J. Biol. Chem.* **279**, 9606–9614.

Fukuda, M., Watanabe, S., Yoshida, S., Itoh, H., Itoh, Y., Kamio, Y., and 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.

Fukumura, M., Sakka, K., Shimada, K., and Ohmiya, K. 1995. Nucleotide sequence of the *Clostridium stercorarium xynB* gene encoding an extremely thermostable xylanase, and characterization of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 40–46.

Gallardo, O., Diaz, P., and Pastor, F.I.J. 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.

Gallardo, Ó., Pastor, F.I.J., Polaina, J., Diaz, P., Łysek, R., Vogel, P., Isorna, P., González, B., and Sanz-Aparicio, J. 2010. Structural insights into the specificity of Xyn10B from *Paenibacillus barcinonensis* and its improved stability by forced protein evolution. *J. Biol. Chem.* **285**, 2721–2733.

Harada, K.M., Tanaka, K., Fukuda, Y., Hashimoto, W., and Murata, K. 2008. *Paenibacillus* sp. strain HC1 xylanases responsible for degradation of rice bran hemicellulose. *Microbiol. Res.* **163**, 293–298.

Ihsanawati, Kumasaka, T., Kaneko, T., Morokuma, C., Yatsunami, R., Sato, T., Nakamura, S., and Tanaka, N. 2005. Structural basis of the substrate subsite and the highly thermal stability of xylanase 10B from *Thermotoga maritima* MSB8. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **61**, 999–1009.

Juturu, V. and Wu, J.C. 2012. Microbial xylanases: engineering, production and industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1219–1227.

Kang, H.J., Jeong, C.K., Jang, M.U., Choi, S.H., Kim, M.H., Ahn, J.B., Lee, S.H., Jo, S.J., and Kim, T.J. 2009. Expression of cyclomaltodextrinase gene from *Bacillus halodurans* C-125 and characterization of its multisubstrate specificity. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 776–781.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426–428.

Moon, J.S., Shin, S.Y., Choi, H.S., Joo, W., Cho, S.K., Li, L., Kang, J.H., Kim, T.J., and Han, N.S. 2015. *In vitro* digestion and fermentation properties of linear sugar-beet arabinan and its oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* **131**, 50–56.

Saha, B.C. 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279–291.

St. John, F.J., Rice, J.D., Preston, J.F., and John, F.J.S. 2006a. *Paenibacillus* sp. strain JDR-2 and XynA1: a novel system for methylglucuronoxylan utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 1496–1506.

St. John, F.J., Rice, J.D., and Preston, J.F. 2006b. Characterization of XynC from *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain 168 and analysis

of its role in depolymerization of glucuronoxylan. *J. Bacteriol*. **188**, 8617–8626.

Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**, 39–67.

Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., and Dahlman, O. 2000. Characterization of acetylated 4-*O*-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydr*. *Res*. **329**, 807–815.

Uday, U.S.P., Choudhury, P., Bandyopadhyay, T.K., and Bhunia, B. 2016. 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.

Valenzuela, S.V., Díaz, P., and Pastor, F.I.J. 2010. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric*. *Food Chem*. **58**, 4814–4818.

Valenzuela, S.V., Díaz, P., and Pastor, F.I.J. 2012. Modular glucuronoxylan-specific xylanase with a family CBM35 carbohydrate-binding module. *Appl*. *Environ*. *Microbiol.* **78**, 3923–3931.

Vršanská, M., Kolenová, K., Puchart, V., and Biely, P. 2007. Mode of action of glycoside hydrolase family 5 glucuronoxylan xylanohydrolase from *Erwinia chrysanthemi*. *FEBS J*. **274**, 1666–1677.

Waeonukul, R., Pason, P., Kyu, K.L., Sakka, K., Kosugi, A., and Mori, Y. 2009. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a multidomain *endo*-β-1,4-xylanase from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6, and characterization of the recombinant enzyme. *J. Microbiol*. *Biotechnol*. **19**, 277–285.

Wang, W., Yan, R., Nocek, B.P., Voung, T.V., Leo, R. Di, Xu, X., Cui, H., Gatenholm, P., Toriz, G., Tenkanen, M., Savchenko, A., and Master, E.R. 2016. Biochemical and structural characterization of a five-domain GH115 α-glucuronidase from the marine bacterium *Saccharophagus degradans* 2-40T. *J. Biol*. *Chem*. **291**, 14120–14133.