*Paenibacillus woosongensis*로부터 대장균에 Xylanase 10A의 유전자 클로닝과 정제 및 특성분석

윤기홍*

우송대학교 바이오식품과학전공

Received: February 20, 2020 / Revised: May 26, 20 / Accepted: June 3, 2020

Gene Cloning, Purification and Characterization of Xylanase 10A from *Paenibacillus woosongensis* in *Escherichia coli*

Ki-Hong Yoon*

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

A gene coding for the xylanase was cloned from *Paenibacillus woosongensis*, followed by determination of its complete nucleotide sequence. This xylanase gene, designated as *xyn10A*, consists of 1,446 nucleotides encoding a polypeptide of 481 amino acid residues. Based on the deduced amino acid sequence, Xyn10A was identified to be a modular enzyme composed of a catalytic domain highly homologous to the glycosyl hydrolase family 10 xylanase and a putative carbohydrate-binding module (CBM) in the C-terminus. By using DEAE-sepharose and phenyl-sepharose column chromatography, Xyn10A was purified from the cell-free extract of recombinant *Escherichia coli* carrying a *P. woosongensis xyn10A* gene. The N-terminal amino acid sequence of the purified Xyn10A was identified to exactly match the sequence immediately following the signal peptide predicted by the Signal5.0 server. The purified Xyn10A was a truncated protein of 33 kDa, suggesting the deletion of CBM in the C-terminus by intracellular hydrolysis. The purified enzyme had an optimum pH and temperature of 6.0 and 55–60°C, respectively, with the kinetic parameters V_{max} and K_m of 298.8 U/mg and 2.47 mg/ml, respectively, for oat spelt xylan. The enzyme was more active on arabinoxylan than on oat spelt xylan and birchwood xylan with low activity for *p*-nitrophenyl- β -xylopyranoside. Xylanase activity was significantly inhibited by 5 mM Cu^{2+} , Mn^{2+} , and SDS, and was noticeably enhanced by K^+ , Ni^{2+} , and Ca^{2+} . The enzyme could hydrolyze xylooligosaccharides larger than xylobiose. The predominant products resulting from xylooligosaccharide hydrolysis were xylobiose and xylose.

Keywords: *Paenibacillus woosongensis*, xylanase 10A, purification, characterization

서론

셀룰로스, 리그닌과 함께 리그노셀룰로스 자원을 구성하는 헤미셀룰로스는 그 주성분이 xylan, mannan, β -glucan, xyloglucan, galactan 및 arabinan으로 알려져 있다. 식물의 종류에 따라 헤미셀룰로스의 성분과 조성에 큰 차이가 있지만 xylan이 각종 목초와 작물류에 가장 널리 분포한다. Xylan은 D-xylose 잔기 사이에 β -1,4 결합의 다당체이며 acetyl, L-arabinofuranosyl, 4-O-methyl- α -D-glucuronopyranosyl 또

는 D-xylosyl 등의 여러 종류 치환체 잔기가 xylose 잔기의 2번 또는 3번 탄소위치에 측쇄로 결합되어 있는 복합적인 구조를 가지고 있다. Xylan은 xylose에 결합된 치환체의 종류에 따라 glucuronoxylan, arabinoxylan, glucuronoarabinoxylan과 galactoglucuronarabinoxylan으로 구분된다. 이와 달리 치환체 잔기가 없는 homoxylan은 β -1,3 또는 β -1,3과 β -1,4 결합한 xylose 잔기만으로 구성되며 자연계에서 드물게 존재한다. Xylan은 자일리톨, 바이오 연료, 바이오 계면 활성제인 알킬 자일로사이드, 자일로올리고당의 생산 원료로 활용되고 있으며, 효과적인 활용을 위해서는 효소적 전환 과정이 필요하다[1].

Xylans의 분해에는 다양한 종류의 효소가 관여하는데 이들 중 D-xylosyl 잔기간 배당결합을 절단하는 endo- β -1,4-

*Corresponding author

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

E-mail: ykh@wsu.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

xylanase (xylanase)가 가장 중요한 역할을 한다. Xylanase는 활성영역만으로 구성된 단일영역 효소[2-4], 또는 활성영역과 별개로 탄수화물 결합영역 (CBM)과 같은 기능성 영역을 동시에 포함하는 다영역 효소로 존재한다[5, 6]. 활성영역의 아미노산 배열의 상동성을 기준으로 할 때 xylanase는 glycosyl hydrolase family (GH) 2, 5, 7, 8, 10, 11, 16, 30, 35, 43과 52에 속하는 효소로 보고되었으며, 이들 중 GH10과 GH11에 속하는 xylanase가 주류를 이룬다. Xylanase는 그 크기가 다양하여 약 200-1,500 아미노산 잔기로 구성되어 있는데 이러한 크기의 차이는 활성영역의 크기 차이가 아니라 주로 기능성 영역의 존재여부에 따라 좌우된다.

최근 미생물의 유전체 정보를 기반으로 재조합 효소를 발현하고 활성을 분석함으로써 한 종류 미생물에서 2 종류 이상의 다형 xylanases 생산 예가 다수 보고되었다. 특히 식물체 xylan은 측쇄 종류와 조성의 차이가 크므로 자연계 미생물이 이를 효과적으로 분해하기 위해서 β -xylosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, acetylxylan esterase, feruloyl esterase와 α -galactosidase 등의 보조 효소도 필요하며, 동시에 기질의 특이성을 비롯한 반응특성에 차이가 있는 다형의 xylanases를 생산하는 것이 유리하다고 하겠다. Xylan 분해균으로 탐색된 *Paenibacillus*속 균주 중 *P. panacisoli* SD1201, *P. curdlanolyticus* B-6, *P. barcinonensis* BP-23, *P. amylolyticus* KCTC 3005, *Paenibacillus* sp. JDR-2, *Paenibacillus* sp. DG-22, *Paenibacillus* sp. W-61, *Paenibacillus* sp. HC1과 *Paenibacillus* sp. KCTC 8848P로부터 2종류 이상의 xylanase 유전자와 효소 특성이 밝혀졌다[3, 7-12]. 최근에는 분해가 잘 되지 않는 것으로 알려진 옥수수 섬유의 xylan을 효율적으로 분해하는 *Paenibacillus* sp. H2C가 분리되었으며, 배양상등액으로부터 4종류의 xylanases (Xyn5A, Xyn10B, Xyn11A, and Xyn30A)가 확인되었다[13]. 본 연구에서는 이미 두 종류의 GH11 xylanases의 유전자와 효소 특성이 보고된 바 있는, *P. woosongensis*로부터 신규 GH10 xylanase 유전자를 클로닝하고 재조합 대장균에서 생산된 효소를 정제하여 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 플라스미드

Tryptic soy broth (TSB; 17 g of tryptone, 3 g of soytone, 2.5 g of dextrose, 5 g of NaCl, 2.5 g of K_2HPO_4 per liter, pH 7.2)를 사용하여 37°C에서 약 20시간 진탕 배양하여 얻은 *P. woosongensis* YB-45 (KCTC 3953)의 균체로부터 유전체 DNA를 분리하였다. *Escherichia coli* DH5 α (F⁻ λ -

glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 deoR nupG purB20 ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 hsdR17(r_m⁻ m_k⁺))와 플라스미드 pUC19는 유전자조작을 위한 숙주와 vector로 사용되었다.

Xylanase 유전자 클로닝

*P. woosongensis*의 부분적인 유전체 염기서열로부터 유추된 신규 xylanase 유전자를 클로닝하기 위해 upper primer YB45C37-10F (CTTGCTGCAGATGGAATCGCGCAAAGAAAGC; 밑줄은 *Pst*I 위치)와 lower primer YB45C37-10R (ACTCTCTAGATTAATTCCACAAATATACGTTATCC; 밑줄은 *Xba*I 위치)를 합성하였다. *P. woosongensis*의 유전체 DNA를 주형, YB45C37-10F와 YB45C37-10R을 primers로 하고 *pfu-X* DNA polymerase (Solgent Co., Korea)를 사용하여 xylanase 유전자를 증폭하였다. PCR은 95°C에서 3분간 처리 후 95°C (25초), 56°C (40초), 72°C (1분 30초)의 반응을 25회 반복하고 최종적으로 72°C에서 20분간 반응함으로써 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 *Pst*I과 *Xba*I으로 동시에 절단하여 agarose gel 전기영동을 한 후 xylanase 유전자를 함유한 DNA를 추출하여 동일한 효소로 처리한 pUC19에 도입하였다. 이를 *E. coli* DH5 α 에 형질전환하고 oat spelt xylan (0.5%)과 ampicillin (100 μ g/ml)이 첨가된 LB 배지에 도말하여 투명환을 보이는 콜로니를 xylanase 유전자가 클로닝된 형질전환주로 선발하였다.

Xylanase의 정제

*P. woosongensis*의 xylanase 유전자가 도입된 재조합 대장균을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양한 후 균체를 회수하고 50 mM Tris 완충액(pH 8.0)에 현탁하였다. 초음파로 균체를 파쇄하고 원심분리한 후 균체 파쇄상등액을 채취하여 ammonium sulfate (30-75%)로 침전시키고 투석하였다. 동일 완충용액으로 평형화한 DEAE-Sepharose 컬럼(Sigma-Aldrich Co., USA)에 단백질을 주입하고 컬럼에 흡착되지 않은 효소 용액을 회수한 후 고농도의 ammonium sulfate 용액을 첨가하여 최종적으로 1 M ammonium sulfate와 20 mM Tris (pH 8.0)을 포함하는 용액이 되도록 하였다. 효소액과 동일 용액으로 활성화된 Phenyl-Sepharose 컬럼에 효소액을 주입하고 정제를 실시하였으며 컬럼에 흡착된 효소는 ammonium sulfate의 농도를 1.0 M에서 0 M까지 역으로 농도구배를 주어 용출하였다. Xylanase 활성을 갖는 분획을 SDS-PAGE로 분석하여 정제된 분획만을 10 mM sodium phosphate 완충액 (pH 6.0)으로 투석하여 정제 효소로 사용하였다. 정제된 효소의 아미노 말단의 아미노산 배열을 결정하기 위해서는 기초과학연구소 서울분원의 Procise 491 protein sequencer

(Applied Biosystems, USA)를 사용하였다.

Xylanase 반응특성 분석

Xylanase 활성은 적정 반응조건에서 15분 동안 반응 후에 xylan (0.5%)으로부터 유리된 환원당을 3, 5-dinitrosalicylic acid 방법으로 정량하여 결정하였다. 발색단 기질인 *para*-nitrophenyl- β -xylopyranoside (pNPX)의 분해활성을 측정하기 위해서는 기질 농도를 1 mM로 하고 적정 반응조건에서 10분 동안 반응 후 반응액의 2배 부피의 1 M Na₂CO₃ 용액을 첨가하여 반응을 종결시키고 405 nm에서 흡광도를 측정함으로써 방출된 pNP의 양을 결정하였다. 효소의 활성도 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 환원당 또는 pNP를 유리시키는 효소량으로 정의하였다[4, 14]. 반응 온도와 pH가 효소 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30–65°C와 pH 4.5–9.0의 범위에서 xylanase 활성을 각각 측정하였다. 열안정성은 55–65°C 범위의 온도에서 xylanase 효소액을 방치하면서 시간별로 채취한 효소액의 잔존활성을 측정하여 결정하였다. 금속이온이나 화합물을 반응액에 5 mM이 되도록 첨가하여 효소활성을 측정함으로써 각 물질이 효소 활성에 미치는 영향을 결정하였다. 효소의 반응동력학 계수는 oat spelt xylan을 기질로 하여 최적조건에서 초기 반응속도를 측정한 후 Lineweaver-Burk plot에서 결정하였으며 정제효소의 단백질 농도는 Bradford 방법으로 결정하였다. Xylanase에 의한 최종 가수분해산물을 조사하기 위해 1% 자일로올리고당을 과량의 정제 효소로 45°C에서 4시간 동안 처리하였다. 반응액을 95°C에서 3분간 방치하고 원심분리하여 효소단백질을 제거한 후 반응상등액을 silica gel-precoated thin layer plate (Merck, Germany)에 점적하여 TLC를 수행하였다. 전개용매로는 chloroform, acetic acid와 증류수(4.3 : 5 : 0.7, (v/v)) 혼합용액을 사용하였고 발색제로는 9 ml ethanol, 0.5 ml *p*-anisaldehyde, 0.5 ml sulfuric acid와 glacial acetic acid 몇 방울을 혼합한 용액을 사용하였다[4].

Xylanase 활성 염색

효소 단백질의 SDS-PAGE를 수행한 후, polyacrylamide gel을 25% isopropanol과 50 mM sodium phosphate (pH 6.0) 혼합용액으로 세척하고 추가적으로 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)로 세척하였다. Polyacrylamide gel 위에 0.2% 수용성 oat spelt xylan과 50 mM sodium phosphate (pH 6.0)를 함유한 agarose gel을 증충한 후 50°C에서 1시간 반응하였다. Polyacrylamide gel은 단백질 염색을 하였으며, 증충한 agarose gel은 0.2% congo red 용액으로 30분간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 탈색하여 xylan 분해 단백질을 관찰하였다.

결과 및 고찰

P. woosongensis xylanase 유전자의 클로닝과 염기서열

Paenibacillus 속의 균주 중에서 *P. curdolanolyticus* B-6의 7 종류 xylanases (Xyn10E, Xyn10C, Xyn11A, Xyn10D, Xyn10A, Xyn10B, PcMulGH9) [3, 5, 6], *P. barcinonensis* BP-23의 5종류 xylanases (Xyn10A, Xyn10B, Xyn10C, Xyn30D, Xyn11E) [2, 7, 8], *Paenibacillus* sp. H2C의 4 종류 xylanases (Xyn5A, Xyn10B, Xyn11A, Xyn30A) [13], 그리고 *Paenibacillus* sp. W-61의 3 종류 xylanases (Xyn1, Xyn3, Xyn5) [10, 11]에 대한 유전자나 효소 특성이 조사되었다. 이들 효소는 GH10, GH11, GH30 또는 GH5에 속하는 것으로 GH10 xylanase가 가장 많았다. *P. woosongensis*의 유전정보로부터 이미 보고된 2 종류의 GH11 xylanases 외에 GH10 xylanase로 추정되는 유전자가 확인되어 이를 PCR로 클로닝하기 위한 primers를 제조하였다. Primers YB45C37-10F와 YB45C37-10R를 사용하여 PCR을 수행한 결과 예상되는 크기의 1.5-kb xylanase 유전자 단편이 증폭되었으며 이를 *Pst*I과 *Xba*I로 절단하여 pUC19에 도입함으로써 재조합 플라스미드 pYX7을 제조하였다.

클론된 유전자 단편의 염기서열을 결정한 결과 481개 아미노산 잔기의 단백질을 코딩하는 1,446 bp의 xylanase 유전자가 확인되었다 (GenBank accession number MF062088). 유전자로부터 유추된 아미노산 배열을 SignalP5.0 프로그램 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)으로 분석한 결과 아미노 말단의 32개 잔기가 signal peptide로 예측되었다 (Fig. 1). Signal peptide는 아미노산 배열이 매우 다양하므로 그 상동성을 비교하기 어려운 것으로 알려져 있지만[15], 예측된 signal peptide는 염기성 아미노산이 배열한 아미노 말단과 소수성 아미노산이 배열한 중앙 지역 및 signal peptidase의 절단 지점 앞에 AXA 배열을 포함하고 있어 signal peptide의 전형적인 특징을 보였다[16, 17]. 한편 개시코돈으로부터 6 bp가 떨어진 상부 지역에 리보솜 결합위로 판단되는 염기서열 (AGGAGGT)이 관찰되었다.

다른 xylanase와 *P. woosongensis* xylanase의 상동성

클론된 *P. woosongensis*의 xylanase는 GH10에 속하는 xylanase의 활성영역(33–318 잔기)과 CBM으로 추정되는 영역(319–481 잔기)이 배열된 다영역 효소로 확인되었으며 Xyn10A로 명명하였다. *P. woosongensis*의 Xyn10A (PwXyn10A)를 미국의 NCBI database에 등록된 다른 효소와 아미노산 배열을 비교한 결과 *P. macerans*의 xylanase (KFM94218; 484 잔기)와 상동성이 76%로 가장 높았다. 이외에 *Paenibacillus* sp. KCOM 302 (RRJ62552; 478 잔기),

PW	<u>MLKSKSLAVLTTVAIMASLFSSALVKDAHAGI</u> ANGSKFLGNI IANNVPSNFATYWDQVTPENSTKWGAVESTRNSMNSAADTAYNYAKSRGMPFKFH	100
UB	-----VL*LVGV*L*VM*GN*S*ALT*P*****SGG*AS*G***N*****A*****G***N***G***S***V*QNI*****	87
PD	**NV***SVN*-LLAFALIASVFAFQAQK*D*ALTS*****SS*****G***N*****A***S**GS*****Q**L*****TN*L*****	99
PB	***RWFKT--VG*L*LVGV*AA*VA*GSVS*L*K*****GQ*****SP*N*****G***V***GQ**M*****QN*F*****	98
PC	*FRT*RFRT--*VLVA*V*IL*TLVAAS*D*L*R-----V*GS*****N*****G*****Q**M*****Q***FQ*****	97
PS	*RT*VGKL--VSSL*LAGV*L*V*NQ*D*L*****GS**PSYG**N*****ES*GS*N***H-*****R*N*F*****	98
PW	TLVWGSQEPWSISGLSASEQKAEVTQW IQAAGQRYGNSEFVDVNEPLHAKPSYRNAIGGDGATGWDWVIWSFQARQAFPNKLLINDYGIISDPNAAA	200
UB	*****VA***QAD*S*L*S*S*****SQ*A*****S*****E***A***A*H**E*****GLTD	187
PD	*****G*****AD*R**I*****AA**D*****S*****E*****E*****T	199
PB	*****A*N*NN**AD*R**L**R**X**SQ*****F*****Q*****E*****E*****G*PK*D	198
PC	*****G**G***QD****Q**A**A**K**AA*****E**K*****E*****S**	197
PS	*****A**G*VK**AD*****K*****P*AA*****Q*****S*****A*H*****N*SL*D	197
PW	QYVQIINLLKARGLVDGIGIQCHYFNMDNVSISTMNSVLNLTAAATGLPIYVSELDITGDDNTQLQRYQQKFPVLWEHPSVKGITLWGYIQGTWASNTHL	300
UB	***T***H*****I*****Q***T***V***T***K*S*****A**KE*****N*A***V*****I*****	287
PD	***N*****A*****Q*V*****I***S*****M***A***S***T*****N*****D***	299
PB	**I*****N*****A*****V***T***K*****I**K*****N*N*VNGS**	298
PC	K*****S**I*****Q***T***V***K*****S***A**A*KE*****S*****KA***	297
PS	***N**Q**S***I*****H*S*****VN**T***K*S*****A**KE*****QN*****V*****KDG***	297
PW	VTSSGAERPAMQWLKQYLGGGG--GQPGTGTGSGAYANFESGTDGWSASN-----VSGPSSADWSSKDTRSLKSTINMSSSGHYMFKS---	384
UB	LN*N*T***L*****-S--TGG*G*TTS***D*****E**TG*-----I*G**W*TTA***N*H**QVDVA**PN*Q*TVS*I---	370
PD	I*****LT*****STNPTA*AAPT*LT*T*GNGQV*IS***SGATSYTVRRSEFSG**YTNI--ATNV*STSYTDT*VTN*RPY*YVV*ASN	397
PB	*N*N*T*****T*M-ANN-P-----	320
PC	*N*N*S*****T*M-STH-----	318
PS	LN*N*T***L**R***-KR-----	317
PW	-----GNADFTGYNQLRATVKGANSNGYSGGLG-VKL---YVKYGNNYAWADSGWKTISAGGQTDL	441
UB	-----V*N*SAHTK*K**H*SEW*GY*****F*H**A*TFT***A***KS*TI**	427
PD	SAGSSVNSSQVSATPTGTNGGGGGTTPPTGSLVAQYK*VNGNAND**IY*FNIK*T**TAVN*SD***RYYFT*DSSATLNSYVD*AQ*G*SNNVRT	497
PW	TLNLSGVDKANIKEYGVQF----IGASNAGQTSVYVDNVLWN-----	481
UB	**D*TT*NA*D*R***I*-----D***S***A*****SN-----	467
PD	FNVT**TNADTYL*LSFSSSAGS*P*GGQT*EIQIRISKSDWS*FNESNDYSFDGKTSTFVDWNKITLLQGGTIVWGVAP	577

Fig. 1. Comparison of the *P. woosongensis* xylanase 10A with others. The amino acid sequences of six xylanases from *P. woosongensis* (PW; AVI01408), uncultured bacterium (UB; ACJ48973), *P. curdlanolyticus* B-6 (PD; BAK22544, PC; BAM22646), *P. barcinonensis* BP-23 (PB; CBA13561), and *Paenibacillus* sp. KCTC8848P (PS; AAG23527) are aligned to maximize similarities with gaps (hyphens) by Clustal W method. Residues identical to the amino acid sequence of the *P. woosongensis* Xyn10A are indicated by asterisks in other sequences. Amino acid sequence corresponding to the signal peptide predicted by SignalP5.0 server is italicized and underlined. Two 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.

Paenibacillus sp. 598K (GBF76989; 478 잔기) 및 *Planifilum fulgidum* (SFG13237; 480 잔기)의 xylanases와는 크기가 유사하고 70~77% 수준의 상동성을 보여 PwXyn10A는 신규의 xylanase로 확인되었다. 상기의 상동성이 높은 xylanase는 모두 유전체에서 추론된 아미노산 배열과 비교한 결과이며 효소적 특성이 확인된 xylanase와 비교하였을 때 아미노산 배열과 그 크기가 가장 유사한 것은 발효 분뇨의 유전체 은행에서 탐색된 xylanase (ManF-X10)이며[18], 그 크기가 14개 아미노산이 차이가 있고 아미노산 배열 상동성이 69%

로 확인되었다. 실제 ManF-X10은 아미노 말단이 완전하게 클로닝되지 못한 상태이다(Fig. 1).

P. curdlanolyticus B-6의 xylanase D (PcXyn10D; BAK22544)는 활성영역과 Fn3 및 CBM3로 구성되어 있으며[5], 활성영역이 PwXyn10A와 79% 정도 상동성을 보이지만 CBM은 상동성이 거의 없다. 반면에 ManF-X10는 상동성이 70%로 PcXyn10D 보다는 낮지만 활성영역 뿐 아니라 CBM의 아미노산 배열도 PwXyn10A와 유사성이 있다. 한편 활성영역으로만 구성된 *P. curdlanolyticus* B-6의 xylanase

C (PcXyn10C; BAM22646), *P. barcinonensis* BP-23 xylanase A (PbXynA; CBA13561) 및 *Paenibacillus* sp. KCTC 8848P xylanase B (PsXynB; AAG23527)는 PwXyn10A의 활성영역과 상동성이 각각 76%, 74%, 74%로 나타났다.

Xylanase의 정제

탄수화물에 작용하는 많은 수의 효소들이 아미노산 배열의 유사성에 근거하여 CAZy 데이터베이스에서 분류되었지만, 실제로는 일부 효소만이 그 기능과 특성에 대해 분석되었다. PwXyn10A의 효소 특성을 조사하기 위해 재료 및 방법에 기술한 대로 *pwxyn10A* 유전자를 함유한 *E. coli* DH5a 배양 균체로부터 PwXyn10A를 정제하였다. 균체 파쇄상등액을 ammonium sulfate로 처리하여 얻은 단백질을 용액을 DEAE-Sepharose 컬럼에 주입한 결과 PwXyn10A는 컬럼에 흡착되지 않고 그대로 용출되었다. 결합되지 않은 효소액을 Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피로 정제한 결과 PwXyn10A는 Phenyl-Sepharose 컬럼에 흡착되었으며 0.6–0.3 M ammonium sulfate 농도에서 용출되었다. 정제 단계별 단백질을 SDS-PAGE와 활성염색으로 분석한 결과 균체 파쇄상등액, 황산암모늄 침전단백질과 DEAE-Sepharose 컬럼에 결합되지 않는 단백질 용액에서 동일하게 47 kDa 및 33 kDa의 상이한 분자량을 갖고 xylanase 활성을 보이는 두 개의 단백질 밴드가 관찰되었다(Fig. 2A). Phenyl-Sepharose 컬럼에 흡착되지 않은 용액에서는 효소활성이 관찰되지 않았으며 ammonium sulfate 농도차에 의해 용출된 분획 중 활성을 갖는 분획에서 오직 33 kDa의 단백질만이 정제 효소로 관찰되었다(Fig. 2B).

*pwxyn10A*의 유전자로부터 signal peptide가 제거된 단백

질의 분자량이 48.5 kDa으로 추정되었으며 이것은 SDS-PAGE에서 활성을 보이는 큰 단백질과 유사하였다. 최종적으로 정제된 33 kDa 크기의 xylanase는 분자량이 예상보다 매우 작으므로 정제된 xylanase가 PwXyn10A의 어느 부분에 해당하는지 확인하기 위해 정제효소를 SDS-PAGE로 전개한 후 PVDF 막으로 옮겨 아미노 말단의 서열을 분석하였다. 그 결과 아미노 말단 배열이 GIANSGSK로 확인되었으며 이는 *pwxyn10A* 유전자로부터 유추된 PwXyn10A의 33–40번째 잔기에 해당하였다. 이러한 결과는 SignalP5.0 프로그램에서 아미노 말단의 32 잔기가 signal peptide로 예측된 결과와 일치하였다(Fig. 1). PwXyn10A의 활성 영역으로 예상되는 33–318 aa의 분자량은 31.8 kDa로 계산되며 정제된 단백질과 거의 일치하는 것을 알 수 있다. 이로 보아 카르복실 말단의 CBM으로 추정되는 영역이 절단된 것으로 판단되며 정제된 효소를 PwXyn10A-CD로 명명하였다. 재조합 대장균에서 생산된 단백질이 균체내 단백질 분해효소에 의해 분해되어[19], 크기가 다른 여러 개 활성 단백질로 생산된 예가 *Paenibacillus* sp. DG-22의 GH10 xylanase [20]와 *Clostridium josui* Xyn10A [21]에서도 보고되었다. 이들 효소는 카르복실 말단이 서로 다르게 절단되어 크기가 다르지만 아미노 말단이 동일한 3개의 활성효소 단백질로 생산되었다.

비록 큰 단백질은 정제되지 못하였지만, PwXyn10A의 mature protein의 예상 분자량과 일치하고 또한 크기가 33 kDa인 PwXyn10A-CD의 아미노 말단 배열이 signal peptide로 예측된 배열 다음인 것으로 보아 재조합 대장균에서 생산된 PwXyn10A는 세포질에서 periplasm으로 이동하는 과정에서 signal peptide가 제거되었을 것으로 예상된다. 실제 재조합 대장균에서 signal peptide를 함유한 여러 종류의 단백질이 signal peptide가 제거된 mature protein의 형태로 periplasm에 존재한다고 보고되었다[22, 23]. 한편 크기 및 활성영역과 CBM의 배열이 PwXyn10A와 유사한 ManF-X10은 카르복시 말단에 hexahistidine이 융합된 상태로 재조합 대장균으로부터 생산되어 Ni-NTA 컬럼을 통해 정제되었으며 정제 단백질의 크기는 약 50 kDa로 보고되었다[18]. 이로 보아 ManF-X10은 *Paenibacillus* sp. GH10 xylanase [20]나 PwXyn10A와는 달리 재조합 대장균에서 카르복시 말단이 절단되지 않았거나, Ni-NTA 컬럼 크로마토그래피를 통해서 카르복시 말단에 His tag이 융합된 형태의 단백질만이 정제된 때문에 차이가 있는 것으로 추측된다.

Fig. 2. Xylanase zymogram (A) and SDS-PAGE (B) of PwXyn10A-CD purified from cell-free extract of *E. coli* (pYX7). Lanes: 1, cell-free extract; lane 2, precipitate with ammonium sulfate (30–75%); 3, unbound protein on DEAE-Sepharose column; 4, purified PwXyn10A-CD; M, molecular weight markers. Molecular size is shown in kilodaltons to the right side of the gel.

Xylanase의 반응특성

Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피 과정을 통해 최종적으로 정제된 PwXyn10A-CD를 사용하여 효소의 특성을 조사하였다. 반응온도와 pH가 xylanase 활성에 미치는 영향

Fig. 3. Temperature and pH optima (A), and pH stability (B) of the PwXyn10A-CD. Temperature profile (open symbols) was obtained by measuring the xylanase activity at different temperatures with fixed pH 6.0 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. Buffers (50 mM) used were as follows: sodium citrate (—●—, pH 4.0–6), sodium phosphate (—▲—, pH 6–8), and Tris (—◆—, pH 8–9). pH Stability was determined by measuring the residual activities after pre-incubation for 1 h at different pH buffers. Each curve represents the average of three independent experiments with standard errors of 3%.

을 조사한 결과 Fig. 3A에 보인 바와 같이 55–60°C와 pH 6.0에서 최대활성을 보였으며 pH 완충액 종류에 따라 활성에 차이가 크게 나타났다. pH 6.0의 경우 citrate 완충액 보다는 phosphate 완충액의 활성이 높으며 특히 pH 8.0은 Tris 완충액이 phosphate 완충액 보다 약 2.3배 이상의 활성을 보였다. 열안정성 조사를 위해 55–65°C에서 효소를 방치하면서 시간별 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 60°C에서 6시간동안 방치한 후에도 활성이 완전하게 유지하였으나, 65°C에서는 1시간 방치하였을 때 잔존활성이 1–2% 수준으로 확인되었다(결과 미제시). pH에 대한 안정성을 측정하기 위해 pH 3–9 범위의 완충액에서 1시간동안 방치한 후 잔존활성을 결정하였다. pH 3과 4에서 약 66%와 84%의 잔존활성을 보였고 pH 6–9 범위에서는 전혀 실패되지 않고 활성이 그대로 유지되었다(Fig. 3B).

GH10의 활성영역으로만 구성된 xylanase인 PcXyn10C [3]와 *P. amylolyticus* KCTC 3005의 PaXN₁₀ [9]은 pH 7.0과 50°C에서 모두 최대 활성을 보여 최적온도가 PwXyn10A-CD보다 약간 낮았다. PcXyn10C는 60°C에서 1시간 방치후에 그 활성이 그대로 유지되지만 70°C에 1시간 방치하면 완전히 실패되어 열안정성이 PwXyn10A-CD와 유사하였다. pH에 대한 안정성은 산성과 중성 부근에서는 PcXyn10C와 PwXyn10A-CD는 유사하였지만, pH 9.0에서 PwXyn10A-CD는 안정하여 실패가 일어나지 않는데 비해 PcXyn10C는 크게 실패되어 25% 잔존활성을 보이는 차이가 있었다. ManF-X10은 pH 7과 40°C에서 최대 활성을 보이며 열안정성이 낮아 50°C에서 30분간 방치하였을 때 잔존활성이 4%로 보고되었다. ManF-X10은 PwXyn10A-CD와 상동성이 높음에도 불구하고 온도가 효소활성과 안정성에 미치

는 영향이 큰 차이를 보였다. CBM이 효소의 열안정성을 높이고 pH 안정성이나 반응조건에 영향을 미치는 경우가 있는데, 정제된 ManF-X10은 정제된 PwXyn10A-CD와는 달리 CBM 영역을 포함하고 있는데 열안정성이 낮았다. ManF-X10의 CBM은 mannan, xylan과 cellulose에 결합하는 기능을 하는 것으로 밝혀졌다[18]. *P. terrae* HPL-003의 xylanase (KRICT PX-3)는 CBM을 함유한 GH10의 효소인데 CBM을 제거할 경우 열안정성이 약 40% 감소하였고, 최적온도도 55°C에서 45°C로 낮아진 것으로 보고되었다[24]. 그러나 *Bacillus* sp. SN5의 GH11 xylanase는 CBM을 제거할 경우 도리어 열안정성이 증가하는 것으로 보고된 바 있다[25]. 한편 PwXyn10A의 활성영역과 76% 상동성을 보이는 *P. barcinonensis* BP-23의 PbXynA는 pH 9.5와 60°C에서 최대 활성을 보여 최적반응조건이 PwXyn10A-CD와는 큰 차이가 있었으며 알칼리 조건에서 안정한 유사한 경향을 보였다[2]. *Paenibacillus* sp. NF1의 xylanase (XynNF) 분자량은 37 kDa이며 PwXyn10A-CD와 유사하게 60°C와 pH 6.0에서 최대 활성을 보였다. 반면에 70°C와 80°C에서 1시간 방치 후 70.6%와 42.6%의 높은 잔존활성을 보여 XynNF는 PwXyn10A-CD 보다 열안정성이 높을 뿐 아니라 *Paenibacillus* 속 균주의 xylanase 중에서 열안정성이 높았다[26].

기질에 따른 반응성을 조사한 결과 Table 1에 보인 바와 같이 PwXyn10A-CD는 arabinoxylan에 대한 분해활성이 가장 높았고, oat spelt xylan의 분해능이 birchwood xylan 보다 약간 높았으며 carboxymethyl cellulose (CMC), locust bean gum과 같이 xylan이 아닌 섬유질계 물질을 분해하지 못하였다. *P. curdianolyticus* B-6의 Xyn10D에서 CBM을 제거하고 활성영역만 존재하는 PcXyn10D-rCD는 birchwood

Table 1. Comparison of specific activity between PwXyn10A and others.

Substrates	Specific activity (U/mg)				
	PwXyn10A-CD ^a	PcXyn10C ^b	PcXyn10D-rCD ^c	PcGH43B6 ^d	XynNF ^e
Oat spelt xylan	220.9	188.25	218.4	1.46	3,081.1
Birchwood xylan	211.6	357.90	252.2	2.86	3,045.9
Arabinoxylan	301.2	-	-	0.03	-
CMC	ND	-	-	-	ND
pNPX	0.05	-	-	0.30	-
pNPGc	0.02	-	-	ND	-
pNPGa	0.01	-	-	ND	-

pNPX; pNP-β-xylopyranoside, pNPGc; pNP-β-glucopyranoside, pNPGa; pNP-β-galactopyranoside, ND; not detected, -; not tested.

^a; Xyl10A-CD of *P. woosongensis* in this study, ^b; Xyn10C of *P. curdlanolyticus* B-6 [3], ^c; Xyn10D-rCD of *P. curdlanolyticus* B-6 [5], ^d; PcGH43B6 of *P. curdlanolyticus* B-6 [14], ^e; XynNF of *Paenibacillus* sp. NF1 [26].

xylan과 oat spelt xylan에 대한 비활성이 PwXyn10A-CD와 유사하였으며[5], PcXyn10C는 birchwood xylan에 대한 활성이 oat spelt xylan에 비해 2배 정도 높았다[3]. *Paenibacillus* sp. NF1의 XynNF는 oat spelt xylan에 대한 정제 효소의 비활성이 3,081 U/mg으로 다른 효소들에 비해 매우 높았으며, birchwood xylan에 대한 활성도 유사하였고 CMC는 분해하지 못하였다[26]. ManF-X10은 wheat arabinoxylan에 대한 활성이 가장 높고 oat spelt xylan이 birchwood xylan에 대한 활성보다 약간 높았다[18]. 한편 pNP 화합물을 분해하지 못하는 다수의 xylanase와는 달리 PwXyn10A-CD는 pNPX, pNP-β-glucopyranoside와 pNP-β-galactopyranoside에 대해 높지는 않지만 분해 활성을 갖는 특성을 보였다. *P. curdlanolyticus* B-6의 PcGH43B6 [14]는 GH43에 속하는

효소로 xylanase 활성과 arabinofuranosidase, β-xylosidase 활성을 모두 보였으며, pNPX에 대한 활성은 PwXyn10A 보다 약 6배 수준으로 높았으나, xylan 분해활성은 PwXyn10A에 비해 약 1.5% 미만에 해당하는 미약한 수준이었다.

최적 반응조건에서 oat spelt xylan을 기질로 하여 5–10 mg/ml의 농도 범위에서 PwXyn10A-CD의 초기 반응속도를 구해 V_{max} 와 K_m 값을 결정한 결과 298.8 U/mg과 2.47 mg/ml로 측정되었다. XynNF는 3,364 U/mg과 5.64 mg/ml로 보고되어 비활성과 같이 V_{max} 값이 PwXyn10A-CD에 비해 매우 높았다[26]. *P. barcinonensis* BP-23의 PbXynA는 birchwood xylan을 기질로 하여 V_{max} 와 K_m 이 50.67 U/mg과 2.93 mg/ml [2], ManF-X10은 rye arabinoxylan에 대해 49.5 U/mg과 2.8 mg/ml로 각각 결정된 바 있다[18].

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

Chemicals (5 mM)	Relative activity (%) of			
	PwXyn10A-CD ^a	ManF-X10 ^b	KRICT PX-3 ^c	XynNF ^d
None	100.0	100.0	100.0	100.0
KCl	121.5	-	101*	97.2**
CaCl ₂	117.2	103*/94**	102*	132.4**
MgCl ₂	111.7	129*/87**	93*	96.6**
CuCl ₂	72.1	97*/2**	26*	80.6**
FeCl ₂	110.0	120*/74**	-	52.4**
FeCl ₃	99.3	-	88*	20.3**
MnCl ₂	80.1	107*/48**	98*	97.5**
NiCl ₂	120.7	-	-	-
EDTA	93.3	-	54*	41.2**
SDS	11.5	-	-	20.6**

-; not tested.

*; effectors of 1 mM were added. **; all effectors of 10 mM were added.

^a; Xyn10A-CD of *P. woosongensis* in this study, ^b; xylanase of uncultured bacterium [18], ^c; xylanases of *P. terrae* HPL-003 [27],

^d; XynNF of *Paenibacillus* sp. NF1 [26].

Fig. 4. Thin-layer chromatogram of hydrolysis products of β -1,4-linked xylooligosaccharides with purified PwXyn10A-CD. The reaction mixtures containing the purified xylanase and 1% xylooligosaccharides in 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0) were incubated for 4 h at 45 °C, respectively. Numbers 1 to 5 stand for xylose to xylopentaose in bottom and right side, respectively. Lanes 2E to 5E represent each hydrolyzate of xylobiose to xylopentaose with purified PwXyn10A-CD.

금속이온을 비롯한 화합물이 PwXyn10A-CD 활성에 미치는 영향을 분석하여 ManF-X10, KRICT PX-3 및 XynNF와 비교하였다(Table 2). 5 mM의 화합물이 존재할 때 PwXyn10A는 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} 과 K^{+} 에 의해서는 활성이 증가되었으며 Fe^{3+} 에 의해서는 거의 영향을 받지 않았다. 반면에 Cu^{2+} 와 Mn^{2+} 에 의해 활성이 20–30% 정도 감소하였다. 금속이온의 농도에 따라 차이는 있지만, Ca^{2+} 이나 Mg^{2+} 는 xylanase 활성을 저해보다는 향상시키는 경우가 많았다. Fe^{2+} 의 경우 효소에 따라 향상시키거나 심하게 저해하였으며, Fe^{3+} 와 Cu^{2+} 는 대부분의 효소활성을 저해하였으며 효소간에 차이가 컸으며, 농도에 따라서도 큰 편차를 보였다. PwXyn10A-CD는 5 mM EDTA에 의해 미약하게 저해되는 것과는 달리 KRICT PX-3 [27]과 XynNF는 약 50% 수준의 활성이 저해되었고, PwXyn10A-CD와 XynNF는 모두 SDS에 의해서 심하게 활성이 저해되었다.

PwXyn10A에 의한 xylobiose, xylotriose, xyloetraose와 xylopentaose의 가수분해 산물을 TLC로 분석한 결과 xylobiose는 거의 분해하지 못하였다. Xylotriose 이상의 중합도를 갖는 올리고당은 동일하게 xylobiose와 xylose로 분해되었다(Fig. 4). *Paenibacillus* sp. HC1의 xylanase-I은 xylo 올리고당을 xylose와 xylobiose로 분해하여 PwXyn10A-CD와 유사하였다[12]. PwXyn11A는 xylotriose 이상의 중합도를 갖는 XOS을 분해하였으며 주된 분해산물이 xylose로 나타났으며, xylobiose는 소량 생성되었다[4]. 또한 PwXyn10A-

CD와는 달리 xylotriose, xyloetraose와 xylopentaose에 대한 분해능이 높지는 않았다.

요 약

*Paenibacillus woosongensis*의 xylanase 유전자를 클로닝하고 그 염기서열을 결정하였다. Xylanase 유전자는 *xyn10A*로 명명되었으며, 481 아미노산기로 구성된 단백질을 코딩하는 1,446개 뉴클레오티드로 구성되었다. 추론된 아미노산 배열에 따르면 Xyn10A는 glycosyl hydrolase family 10 xylanase와 상동성이 높은 활성영역과 카르복실 말단에 탄수화물을 결합하는 것으로 추정되는 영역이 포함된 다영역 효소로 확인되었다. DEAE-Sephacrose와 Phenyl-Sepharose 컬럼 크로마토그래피 과정을 통해 *P. woosongensis* *xyn10A* 유전자를 함유한 재조합 대장균의 균체 파쇄상등액으로부터 Xyn10A를 정제하였다. 정제된 Xyn10A의 아미노 말단 배열이 GIANGLSKF로 결정되었으며 이는 SignalP5.0 server로 예측된 signal peptide의 다음 아미노산 배열과 정확하게 일치하였다. 정제된 Xyn10A는 33 kDa 크기의 절단된 단백질이며 균체내 분해에 의해 카르복실 말단에서 CBM이 제거된 것으로 판단된다. 정제된 효소는 최적 pH와 온도가 6.0과 55–60°C이며 oat spelt xylan에 대한 반응 동력학적 계수 $V_{\max}$ 와 K_m 이 298.8 U/mg과 2.47 mg/ml로 각각 나타났다. 효소는 birchwood xylan이나 oat spelt xylan보다 arabinoxylan에 대한 활성이 높았으며 *para*-nitrophenyl- β -xylopyranoside에 대해 낮은 활성을 보였다. Xyn10A의 활성은 Cu^{2+} , Mn^{2+} 과 SDS에 의해서 크게 저해되었으며 K^{+} , Ni^{2+} 과 Ca^{2+} 에 의해서는 상당히 증진되었다. 또한 이 효소는 xylobiose 보다 중합도가 큰 자일로올리고당을 분해하였으며, 자일로올리고당의 최종 가수분해 산물은 xylose와 xylobiose로 확인되었다.

Acknowledgments

This research is based on the support of 2019 Woosong University Academic Research Funding.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Sharma N, Sharma N. 2017. Microbial xylanases and their industrial applications as well as future perspectives: a review. *Global J. Biol. Agric. Health Sci.* **6**: 5-12.
- Valenzuela SV, Díaz P, Javier Pastor FI. 2010. Recombinant expression of an alkali stable GH10 xylanase from *Paenibacillus*

- barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 4814-4818.
3. Imjongjairak S, Jommuengboub P, Karpilanondh P, Katsuzaki H, Sakka M, Kimura T, *et al.* 2015. *Paenibacillus curdlanolyticus* 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.
 4. Yoon K-H. 2012. Cloning and characterization of xylanase gene from *Paenibacillus woosongensis*. *Korean J. Microbiol.* **48**: 141-146.
 5. Sakka M, Higashi Y, Kimura T, Ratanakhanokchai K, Sakka K. 2011. Characterization of *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 Xyn10D, a xylanase that contains a family 3 carbohydrate-binding module. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 4260-4263.
 6. Phakeenuya V, Ratanakhanokchai K, Kosugi A, Tachaapaikoon C. 2020. A novel multifunctional GH9 enzyme from *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 exhibiting endo/exo functions of cellulase, mannanase and xylanase activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* doi: 10.1007/s00253-020-10388-3.
 7. 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.
 8. Valenzuela SV, Díaz P, Pastor FI. 2012. Modular glucuronoxylan-specific xylanase with a family CBM35 carbohydrate-binding module. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 3923-3931.
 9. Nam G-H, Jang M-U, Kim M-J, Lee J-M, Lee M-J, Kim T-J. 2016. Enzymatic characterization of *Paenibacillus amylolyticus* xylanases GH10 and GH30 for xylan hydrolysis. *Korean J. Microbiol.* **52**: 463-470.
 10. Fukuda M, Watanabe S, Yoshida S, Itoh H, Itoh Y, Kamio Y, *et al.* 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.
 11. Watanabe S, Viet DN, Kaneko J, Kamio Y, Yoshida S. 2008. Cloning, expression, and transglycosylation reaction of *Paenibacillus* sp. strain W-61 xylanase 1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 951-958.
 12. 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.
 13. Hagiwara Y, Mihara Y, Sakagami K, Sagara R, Bat-Erdene U, Yatsunami R, *et al.* 2020. Isolation of four xylanases capable of hydrolyzing corn fiber xylan from *Paenibacillus* sp. H2C. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **84**: 640-650.
 14. Wongratpanya K, Imjongjairak S, Waeonukul R, Sornyotha S, Phitsuwan P, Pason P, *et al.* 2015. Multifunctional properties of glycoside hydrolase family 43 from *Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 including exo- β -xylosidase, endo-xylanase, and α -L-arabinofuranosidase activities. *BioResour.* **10**: 2492-2505.
 15. Freudl R. 2018. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact.* **17**: 52. doi: 10.1186/s12934-018-0901-3.
 16. Tjalsma H, van Dijk JM. 2005. Proteomics-based consensus prediction of protein retention in a bacterial membrane. *Proteomics* **5**: 4472-4482.
 17. Rusch SL, Kendall DA. 2007. Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry* **46**: 9665-9673.
 18. Li R, Kibblewhite R, Orts WJ, Lee CC. 2009. Molecular cloning and characterization of multidomain xylanase from manure library *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 2071-2078.
 19. Ogle CT, Mather WH. 2016. Proteolytic crosstalk in multi-protease networks. *Phys. Biol.* **13**(2): 025002.
 20. 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.
 21. Feng JX, Karita S, Fujino E, Fujino T, Kimura T, Sakka K, *et al.* 2000. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding a cell-bound multi-domain xylanase from *Clostridium josui*, and characterization of the translated product. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 2614-2624.
 22. Ytterberg AJ, Zubarev RA, Baumgarten T. 2019. Posttranslational targeting of a recombinant protein promotes its efficient secretion into the *Escherichia coli* periplasm. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**(13): e00671-19.
 23. Dalbey RE, Kuhn A. 2012. Protein traffic in Gram-negative bacteria--how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**: 1023-1045.
 24. 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.
 25. Bai W, Xue Y, Zhou C, Ma Y. 2015. Cloning, expression, and characterization of a novel alkali-tolerant xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. SN5. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **62**: 208-217.
 26. 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.
 27. Song HY, Lim HK, Kim DR, Lee KI, Hwang IT. 2014. A new bi-modular endo- β -1,4-xylanase KRICT PX-3 from whole genome sequence of *Paenibacillus terrae* HPL-003. *Enzyme Microb. Technol.* **54**: 1-7.