

고온성 사상균의 효소에 관한 연구

(제4보) 고온성 사상균의 Xylanase와 Laminaranase

鄭 東 孝 · 李 啓 瑚*

중앙대학교 농과대학 · 서울대학교 농과대학*

(1972. 11. 10 수리)

Studies on Enzyme of the Thermophilic Mold

(Part 4) Xylanase and Laminaranase from Thermophilic Mold

Dong Hyo Chung and Ke Ho Lee*

College of Agriculture

Chung-Ang University

College of Agriculture*

Seoul National University,

(Received November 10, 1972)

Summary

In order to investigate the action of thermophilic fungi on the xylan and its related substances, xylanase and laminaranase were examined using *Myriococcum albomyces*. In the extract from bran culture of *Myriococcum albomyces*, xylanase and laminaranase activity were recognized.

- 1) The optimum pH for xylanase and laminaranase activity were found to be pH 5.0 and pH 6.0.
- 2) The optimum temperature for xylanase and laminaranase activity were found to be 55°C.
- 3) Thermal stability of xylanase for 55 minutes at 65°C and laminaranase for 60 minutes at 65°C did not influence their stability.

머 리 말

육상식물의 세포벽의 주요 성분은 xylose 다당류(xylan)로 섬유소와 같이 널리 분포되어 있다. 특히 목재나 화본과(禾本科) 식물체에는 그 함량이 많아 5~50%나 달하고 있다.⁽¹⁾ 육상식물의 xylan은 β -1, 4'-xylopyranoside 결합이지만⁽²⁾ 그의 기원에 따라 glucose, arabinose, glucuronic acid 등을 약간 함유하기도 한다.⁽³⁾ 그러나 해조류에는 β -1, 3'-xylopyranoside 결합을 한 xylan도 발견되었다. xylan의 당의 중합도는 그 기원과 식물의 재배시기에 따라 심한 변동이 있으나 xylose unit는 50~200 정도라 한다.⁽⁴⁾ 그러나 측쇄는 겨우 1분자당 1개 정도의 β -1, 3'-결합을 하고 있다.

Seiliere⁽⁵⁾와 McCollum⁽⁶⁾은 토기와 소의 창자내에 xylan을 분해하는 미생물이 있다는 것을 처음 발표하였고 아울러 달팽이에도 이들 분해효소가 있다고 하였다. Schmidt⁽⁷⁾씨는 토양에서 분리된 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속 등은 옥수수의 xylan을 분해시킨다 하였고, Tenny⁽⁸⁾씨도 곰팡이, 방사선균, 세균 등이 hemicellulose를 분해한다고 하였다.

그러나 xylan이 효소적으로 분해된다는 것은 Ehrenstein⁽⁹⁾씨가 처음으로 달팽이의 소화액으로써 증명하였다. 이 이후 xylan의 분해효소 β -1, 4-xylan xylanohydrolase(이후 xylanase)는 맥아⁽¹⁰⁾ 중, *Aspergillus oryzae*,⁽¹¹⁾ *Aspergillus batatae*,⁽¹²⁾ *Penicillium*속,⁽¹³⁾ *Penicillium chrysogenum*,⁽¹⁴⁾ Ch-

*aetomium*속⁽¹⁵⁾ 특히 *Chaetomium trilaterale* No. 2264 균주는 각종 xylan을 24 시간동안 92%까지 xylose로 분해한다 하였고,⁽¹⁶⁾ 이들 효소를 결정화시켰다.⁽¹⁷⁾ *Aspergillus niger*,⁽¹⁸⁾ *Streptomyces*속⁽¹⁹⁾ (20)⁽²¹⁾ (22) 특히 日下씨 등은 방사선균의 균체의 xylanase에 대하여 연구한바 있고,⁽²³⁾ Iizuka씨 등은 토양에서 xylanase 생성균을 분리하여 *Streptomyces xylophagus nov. sp*라는 새로운 종으로 명명하였다.⁽²⁴⁾ 이들 외도 *Fusarium oxysporium*⁽¹⁴⁾, *Schizophyllum*, *Trametes*, *Echinodontium*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cercospora*, *Glomerella*, *Marcosporium* 속에도 xylanase activity가 있다고 하였다.⁽²¹⁾

Whistler⁽²⁵⁾씨는 *Aspergillus foetidus*에서 생산되는 xylanase는 2종이 있다 하였고, Simpson⁽²⁶⁾ (27)은 xylanase는 유도효소(inductive enzyme)라 하였다. 한편 Sørensen⁽²⁸⁾씨는 어떤 세균이나 *Streptomyces* 속의 xylanase에는 xyloside 결합을 xylobiose unit로 가수분해하는 효소와 xylobiose를 D-xylose로 가수분해하는 2종의 효소가 있다고 하였다. Inaoka⁽²⁹⁾씨 등은 *Bacillus subtilis*의 배양액에서 결정 xylanase의 효소표품(標品)을 얻고 이 순수효소의 작용양식에 따라 액화형(endoenzyme)과 당화형(exo-enzyme) xylanase가 있음을 알았다. 곧 이어 Fukui⁽³⁰⁾ 등은 *Aspergillus batatae* 444와 *Bacillus subtilis*에서 액화형 효소를 결정화하였다. 한편 *Chaetomium globosum* AZ의 반합성 배양액중에는 β -1,4'-xylanase(β -1,4-xylan xylanohydrolase)와 성질이 다른 β -1,3'-xylanase(β -1,3-xylan 3-xylanhydrolase)라는 새로운 효소를 단리(單離)하였다.⁽³¹⁾ (32)

근래 효소화학의 급속한 진보와 더불어 xylan의 효소적 분해의 목적으로 bacterial xylanase의 연구에서, 기초적 배양조건, 효소의 결정화와 효소 화학적 성질을 밝힌바 있으며,^(23,33-36) cellulase생성균으로 알려진 *Trichoderma viride*의 한 균주⁽³⁹⁾는 xylan의 당화력도 강하여 광엽수(廣葉樹)의 xylan을 15%까지 분해한다는 보고도 있어⁽⁴⁰⁾ xylan의 효소분해 공업의 가능성을 예시하고 있다. 이렇게 제조된 xylose는 당뇨병 환자용 감미 영양제로 되는 xylitol의 원료로 그의 수요가 증가될 수 있을 것으로 생각된다.

저자는⁽⁴¹⁾ 고온성 사상균인 *Myriococcum albomyces*는 cellulase activity가 상당히 강하다는 것을 보고 한바 있다. 이 균은 부패증인 퇴비에서 분리

되었으므로 cellulase 뿐만 아니라 다른 효소도 있을 것을 생각하여 본보에서는 xylanase (β -1,4-xylan xylanohydrolase) activity와 laminaranase (β -1,3(4)-glucan glucanohydrolase) activity를 조사하고 그 결과 일부를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 기질 Xylan, Laminarin : 사용된 기질은 日本和光회사 특급품을 사용하였다.

2. 사용균주 : *Myriococcum albomyces*⁽⁴¹⁾

3. 배양방법과 효소용액 : 다음 Table 1 조성의 밀기울 액체배양기를 45°C에서 jar fermentor로 5.5일간 배양한 배양액을 6,000 rpm으로 원침하고 그 상등액을 pH 4.5로 조절하여 황산암모늄 0.2 포화도에서 생기는 침전을 버리고 0.8포화도에서 얻은 갈색 침전 부분만을 동결건조시켜 두었다. 필요에 따라 100배로 희석하여 fish skin tube로 수도수에서(0°C) 2일간 투석하여 투명한 조효소액을 얻고 다시 pH 4.5에서 하룻밤 투석하였다가 xylanase와 laminaranase의 여러 성질을 검토하였다.

Table 1. Composition of wheat bran liquid medium

Wheat bran	5%
C.M.C.	1%
Ammonium citrate (dibasic)	0.3%
KH ₂ PO ₄	1%
NaNO ₃	0.3%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05%
Initial pH	5.5

4. Xylanase activity : Monod 진탕기용 L형 시험관(내경 17~19 mm, 수직부 70 mm, 수평부 115 mm)에 1% xylan 현탁액 5 ml, pH 4.5 McIlvaine 4 ml, 투석한 조효소용액 1 ml를 넣고 Monod 항온진탕기에서(45°C) 일정시간 반응시켜 그 반응액 2.5 ml를 취하여 이때 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson^(42,43) 법으로 정량하고 이를 활성으로 표시하였다.

5. Laminaranase activity : Xylanase activity 측정과 같이 L형 시험관에 0.5% laminarin 용액 1 ml, pH 4.5, 0.01M phosphate buffer 1 ml와 투석한 조효소용액 1 ml를 혼합하여 50°C에서 1시간 동안 진탕하여 생성된 환원당을 위와 같이 측

정하여 표시하였다.

결과 및 고찰

1. Xylanase와 Laminaranase 최적 pH : Xylanase와 laminarin 용액을 완충용액으로 pH 2.5에서 pH 8.0으로 조절한 다음 45°C~50°C에서 효소활성을 상대활성으로 표시한바는 Fig. 1과 같다.

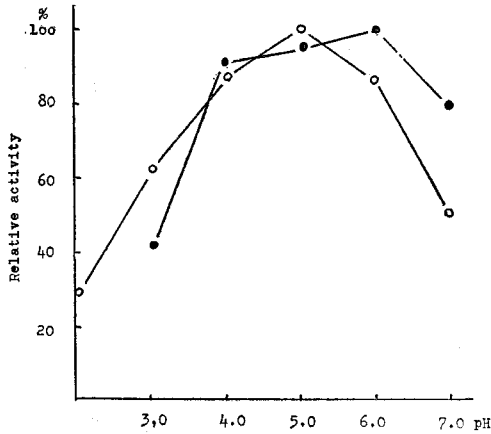


Fig. 1. pH Dependence of crude xylanase and laminaranase activity
—○— : Xylanase, —●— : Laminaranase

Fig. 1에서와 같이 xylanase는 pH 5에서, laminaranase는 pH 6.0에서 각각 최대의 효소활성을 나타내고 있다.

다른 미생물들의 xylanase들에서 *Chaetomium trilaterale*⁽¹⁶⁾의 경우는 pH 4~5, *Asp. batatae*에서 pH 4.5~5.0,⁽³²⁾ *Asp. niger*에서 pH 4.2, *Trichoderma viride*⁽³⁰⁾에서 pH 4.2~5.6, *Chaetomium globosum* AZ⁽³¹⁾에서 pH 3.5이나, *Streptomyces xylophagus nov. sp*⁽²³⁾는 pH 4.5~7.0 범위이고 세균⁽³⁵⁾은 pH 6.0~7.2로 xylanase의 최적 pH는 곰팡이에서는 미산성이고, 세균이나 방사선균은 중성인 것 같다.

2. Xylanase의 안전 pH : 조효소용액을 0.1N-HCl, 0.1N-NaOH, 및 완충용액으로 pH를 2.5에서 pH 8.0까지 조절하고 같은 온도에서 일정시간 방치한 후 잔존효소력을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2와 같이 pH 4.0에서 pH 7.0 범위내에서는 100분간 방치한 후에도 효소역가는 저하되지 않았으나 pH 2.5에서 20%, pH 8.0에서 15% 정도 불활성되는 것을 알 수 있다.

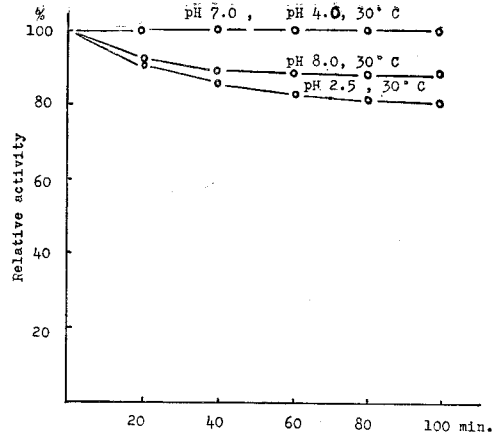


Fig. 2. pH Stability of crude xylanase activity

다른 미생물의 경우를 보면 *Chaetomium trilaterale*⁽¹⁶⁾에서 pH 4.2~8.0, *Streptomyces xylophagus nov. sp*의 그것은 pH 5.0~7.5로 상당히 좁은 pH 범위를 가져 pH 4 이하이나 pH 8 이상에 쉽게 불활성화 된다고 한다.⁽²³⁾

이와 같이 최적 pH와 안전 pH는 균종, 균주에 따라 상당히 다른 것을 알 수 있다.

3. Xylanase와 Laminaranase의 최적온도 : 반응용액을 최적 pH로 조절한 다음 30~80°C에서 효소활성을 상대활성으로 나타낸 결과는 Fig. 3과 같다.

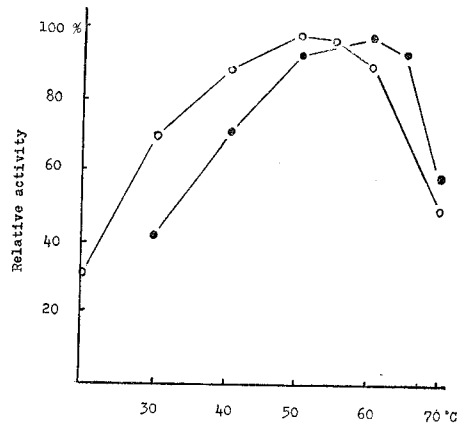


Fig. 3. Temperature dependence of crude xylanase and laminaranase activity
—○— : Xylanase, —●— : Laminaranase

Fig. 3과 같이 xylanase는 50~55°C에서, laminaranase는 60°C에서 각각 최적온도를 가진 것

을 알 수 있다.

이는 다른 미생물의 최적온도보다 5°C 내지 15°C가 높다는 것으로 보아 역시 고온성 미생물의 경우는 최적 pH보다 최적온도가 특이하다는 것을 알 수 있다. 고온성 미생물이 아닌 *Streptomyces xylophagus nov. sp.*⁽²³⁾의 xylanase의 최적온도가 65°C인 것으로 알려져 있으나, 70°C에서 30분간 90% 이상이 실활(失活)되는 것으로 보아 사실은 최적온도가 이보다 낮은 것이 아닌가 추측된다.

4. Xylanase와 Laminaranase의 열안정성 : 조효소용액을 65°C에 방치하면서 잔존효소 역가 내 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

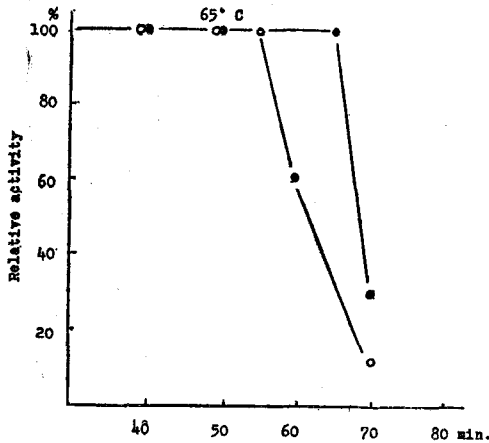


Fig. 4. Thermal stability of crude xylanase and laminaranase activity
—○— : Xylanase, —●— : Laminaranase

Fig. 4와 같이 xylanase는 65°C에서, 55분간은 안정하였으나 그 후는 효소활성이 급격히 저하되었다. 그러나 laminaranase는 xylanase activity보다 더욱 내열성이 있는 것을 알 수 있었다.

다른 미생물인 *Chaetomium trilaterale*⁽¹⁶⁾의 경우는 70°C에서 10분간에 거의 실화된다고 하며 bacterial xylanase⁽⁸⁵⁾도 50°C에서 안정하나 70°C에서 순식간에 불활성화된다고 한다.

이상의 결과로 *Myriococcum albomyces*의 배양추출액에는 cellulase뿐만 아니라⁽⁴¹⁾ β-1.4'-xylan(xylan)을 가수분해는 효소와 β-1.3'-glucan(laminarin)을 가수분해하는 효소가 있음을 알 수 있다.

이와 유사한 고온성 사상균인 *Chaetomium thermophilum*, *Humicola lanuginosa*와 고온성 방사선균, *Micropolyspora*속에도 β-1.3-glucanase 활성이⁽⁴⁴⁾ 있으므로, 급후 이들 효소를 정제하여 β-1.4

-xylan(육상 xylan), β-1.3 xylan(해조 xylan), β-1.3'-glucan(laminarin)과 같은 기질에 대하여 어떤 기작으로 가수분해하며 그 분해 생성물이 무엇인가는 다음에 논하기로 한다.

요 약

1. 고온성 사상균인 *Myriococcum albomyces*의 밀기울 액체배양액에는 xylanase와 laminaranase활성이 있었다.

2. Xylanase와 laminaranase의 최적 pH는 각각 5.0과 6.0이었다. 그리고 xylanase의 pH안전범위는 pH 4.0~pH 7.0이었다.

3. Xylanase의 최적온도는 55°C이고 laminaranase의 최적온도는 65°C였다.

4. Xylanase의 열안정성은 65°C에서 55분간, laminaranase는 70분간 안전하였다.

참 고 문 헌

- Whistler, R.L. and Smart, C. L.: *Polysaccharide Chemistry*, p. 136, Academic Press, New York (1953).
- Whistler, R. L. and Tu, C. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1389 (1951).
- Adams, A. A. and Castange, A. E.: *Can. J. Chem.*, **29**, 109 (1951).
- Husemann, E.: *J. Prakt. Chem.*, **155**, 13 (1940).
- Seilliere, G.: *Compt Rend. Soc. Biol.*, **64**, 941 (1908).
- McCollum, E. V. and Brannon, W.A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **31**, 1253 (1909).
- Schmidt, E. G., Peterson, W. H. and Fred, E. B.: *Soil, Sci.*, **15**, 479 (1923).
- Tenny, F. G. and Waksman, S. A.: *Soil Sci.*, **28**, 55 (1929).
- Ehrenstein, M.: *Helv. Chim. Acta*, **2**, 332, (1926).
- Lueers, H. Und Volkmer, W.: *Wochenschr. f. Brauerei*, **45**, 83 (1928).
- 陽川又夫, 山根東一; *日農化*, **8**, 586 (1932).
- Fukii, S. and Sato, M.: *Agr. Biol. Chem.*, **21**, 392 (1952)
- Soerensen, H.: *Nature*, **172**, 305 (1953).
- Lyr, H., und Novak, E.: *Zeit. Allg. Mikrobiol.*, **2**, 86 (1961).

- 15) Soerensen, H.: *Nature*, **176**, 74 (1955).
- 16) Kawaninami, T. and Iizuka, H.: *J. Ferm. Technol. (Japan)*, **48**, 161 (1970).
- 17) Kawaninami, T. and Iizuka, H.: *J. Ferment. Technol.*, **48**, 169 (1970).
- 18) Youndt, A. P.: *Tappi.*, **34**, 92 (1951).
- 19) Soerensen, H.: *Nature*, **177**, 845 (1955).
- 20) Inaoka, M.: *Mem. Ehime Univ.*, **6**, 105 (1961).
- 21) Iizuka, H. Kawaninami, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1257 (1969).
- 22) Kawaninami, T. and Iizuka, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1787 (1969).
- 23) 日下部功, 安井恒男, 小林達吉: *日農化*, **43**, 145 (1969).
- 24) Iizuka, H. and Kawaninami, T.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 520 (1965),
- 25) Whistler, R. L. and Mask, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **177**, 1241 (1955).
- 26) Simpson, F. J.: *Can. J. Microbiol.*, **1**, 131 (1954).
- 27) Simpson, F. J.: *Can. J. Microbiol.*, **2**, 28 (1956).
- 28) Soerensen, H.: *Physiol. Plantarum*, **5**, 183 (1952).
- 29) Inaoka, M. and Sōdā, H.: *Nature*, **178**, 202 (1956).
- 30) Fukui, S. and Sato, M.: *Bull. Agr. Chem. Soc.*, **21**, 392 (1957).
- 31) 福井作藏, 鈴木武夫, 北原覺雄, 三輪知雄: *日農化*, **34**, 48 (1960).
- 32) Fukui, S., Suzuki, T., Kitahara, K. and Miwa, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **6**, 270 (1960).
- 33) 高橋光雄: *醸工誌*, **41**, 116 (1963).
- 34) 高橋光雄: *醸工誌*, **41**, 119 (1963).
- 35) 高橋光雄, 橋本楊之助: *醸工誌*, **41**, 182 (1963).
- 36) 高橋光雄, 橋本楊之助: *醸工誌*, **41**, 186 (1963).
- 37) 高橋光雄: *醸工誌*, **41**, 309 (1963).
- 38) 高橋光雄: *醸工誌*, **41**, 312 (1963).
- 39) 乃材和宏, 安井恒男, 清岡繁夫, 小林達吉: *醸工誌*, **46**, 634 (1968).
- 40) 乃材和宏, 安井恒男, 清岡繁夫, 小林達吉: *醸工誌*, **47**, 313 (1969).
- 41) 鄭東孝: *農化*, **14**, 59 (1971).
- 42) Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.*, **198**, 19 (1952).
- 43) Nelson, N.: *J. Biol. Chem.*, **1953**, 375 (1944).
- 44) 岡岐博司, 飯塚廣: *日農化*, **45**, 461 (1971).