

Trichoderma viride 균체의 효소로부터 Xylanase의 정제 및 Xylan의 분해*¹

嚴 泰 振*²

Purification of an Xylanase from the Extracellular Xylanolytic Systems of *Trichoderma viride* and Hydrolysis of Xylan*¹

Eom Tae-Jin*²

SUMMARY

The endo-1.4- β -xylanase was extracted and purified from the extracellular xylanolytic systems of *Trichoderma viride*.

The crude enzyme was chromatographed with ion-exchange resins of DEAE-Sepharose CL-6B, Sepharose, S-Sepharose CL-6B and the resulting xylanase was turned out to be a single protein as 20KD by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The xylooligomers were obtained from xylan by incubation with the purified xylanase up to 50%.

The β -xylosidase lost its activity completely by incubation of crude enzyme for 24hr. with buffer solution of pH 2.8at 27°C.

And also, the xylooligomers were obtained from xylan as a main product by incubation with the crude enzyme treated with acidic buffer.

1. 서 론

Xylan은 cellulose 다음으로 지구상에 많이 존재하는 재생산성 탄수화물(polysaccharide)이다. 활엽수의 화학 pulping 공정중에 부산물로서 얻어질 수 있지만 대개는 pulp폐액으로

되어 하천의 오염원이 되고 있다. 그러나 xylan은 그 적절한 처리에 의해 D-Xylose, Xylitol, Furfural 등으로 변환시켜 식품첨가제, 감미료, 플라스틱의 원료¹⁾, 또는 미생물 발효에 의해 사료등으로 이용 가능한 것으로²⁾ 이중 일부는 상품화 되어 시판되고 있다. 한편으로 근

*1. 接受 1991年 2月 7日 Received February 7, 1991.

*2. 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

래 분자생물학의 발전과 더불어 단백질이나 핵산과 같은 생체성분 뿐만 아니고 당질인 oligo당이나 다당의 당쇄에 의해 생물정보를 표현하고 있는 것이 명백해지고 있으며, 이러한 당질은 세포 또는 조직의 인식이나 면역에 중요한 역할을 하고 있는 것이 알려져 있다³⁾. Xylan은 다른 다당류들과 마찬가지로 효소에 의해 가수분해되며 총칭 Xylanase로 불리는 Xylan분해효소는 Cellulase와 마찬가지로 원생동물, 연체동물, 세균, 균류 등 생물계 전역에 널리 분포하고 있다. Xylanase의 Xylan 분해가구에 대해서는 여러가지 총설^{4,6)}이 있지만 Cellulase의 그것에 비하면 아직 충분치 않다고 할 수 있다. 이는 Xylan이 Heteropolymer이라는 점과 자원으로서 그다지 주목 받지 못하였기 때문이라고 생각된다. Biely⁷⁾에 의하면 Xylan은 endo-1, 4- β -xylanase(EC 3.2.1.8)에 의해 xylooligomer를 생성하고 β -xylosidase(EC 3.2.1.27), α -glucuronidase, α -L-arabino-furanosidase등에 의해 monomer까지 분해된다. 따라서 Xylan을 순수한 endo-1, 4- β -xylanase만으로 가수분해 시키면 Xylose의 생성을 억제하고 Xylooligomer를 주산물로 얻을 수 있다.

본 연구는 *Trichoderma viride*가 생성하는 탄수화합물 분해효소균으로부터 endo-1, 4- β -xylanase의 정제법과 β -xylosidase의 실활성법을 모색하고 그들효소에 의하여 가수분해된 xylan분해산물의 수율 및 분자량을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시효소

균주는 *Trichoderma viride*(QM9414)를 사용했다. Mandels와 Reese⁸⁾의 배지를 변형하여 2.0% xylose, 0.1% Tween80, 0.75% proteose peptone등을 포함하는 배지에 30°C에서

10일간 진탕배양 했다. 배양액을 여과하고 1/10mol 초산 buffer(pH4.7)로 세정했다. 세정액과 여과액을 냉장고 속에 하루밤 방치한후 냉장 황산암모니움으로 90%까지 포화 시켰다. 냉장고 속에 다시 하루밤 방치 후 원심분리기에 의해 침반부를 회수하여 cellulose투석막을 사용하여 황산 이온이 검출되지 않을때까지 투석을 계속했다. 불용물을 제거한후 농축, 동결 건조하여 조효소 분말을 얻었다.

2.2 Xylanase 및 β -xylosidase기질의 조제

중해, 폭쇄된 자작나무 chip으로부터 추출제한 xylan 0.5g을 50ml의 증류수에 현탁시켜 비등수욕조중에 15분간 가열해 투명한 용액이 되었을때 0.1M의 sodium acetate buffer(pH 4.7)를 첨가하여 100ml로 했다(0.5% substrate/0.05M sodium acetate buffer). β -xylosidase의 기질로서는 시판의 phenyl- β -xyloside를 sodium acetate buffer에 용해 시킨 것을 사용했다.

2.3 효소활성 및 단백질의 정량

기질 2ml에 적당히 희석된 효소액 소정량을 가해 10~60분간 incubation시킨후 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson법⁹⁾에 의해 측정했다. 효소의 활성단위는 40°C에서 분당 1 μ mol의 기질을 변환시키는 효소량으로 했다.

효소단백질은 bovine serum albumin(SIGMA)을 표준물질로 하여 Lowry법¹⁰⁾에 의하여 정량했다. Column chromatography의 용출액은 280nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 측정했다.

2.4 전기영동

정제된 효소는 SDS-PAGE 전기영동법(Phast-system, Pharmacia, Co.)¹¹⁾에 의해 전기영동을 행했다. Gradient gel 10~15, LMW calibration kit를 사용했으며 은염색법에 의해 염

색했다.

2.5 β -Xylosidase의 실험성

pH 2.4~8.0의 완충액을 준비하고 각종 pH의 완충액 200ml중에 1% 조효소액 1ml를 첨가하여 27°C에서 24시간동안 교반 하였으며 각각의 pH로 처리된 조효소액에서의 xylanase 및 β -xylosidase의 활성을 검토했다.

2.6 Xylan의 효소가수분해

Xylan 1g을 50ml의 sodium acetate buffer (pH4.7)에 용해시켜 정제 xylanase 및 실험 2.5.에서 β -xylosidase의 활성을 없앤 조효소액으로 40°C에서 4시간 동안 교반, 가수분해시켰다.

가수분해액을 원심분리하여 상등액을 hollow fiber(10,000 Molecular mass cut off, Micron Co.)로 3회 반복해서 농축하였다. 여과액을 음이온 교환수지(DOWEX 1×8, 50cc)로 산성당과 중성당을 분리하여 농축 정량 하였다. 중성당부분은 G.P.C.(Toyo soda Co-8000, G-2500 PWXL)에 의해 분자량 분포를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 *Trichoderma viride*의 호기적 액체배양에 의한 Xylanase의 생산

*Trichoderma viride*의 Xylanase 생산에 미치는 인자로서는 배양기간, 탄소원과 inducer의 종류와 농도, 배지의 pH등이 있다.

10일간의 배양으로 조효소 약 150mg(단백질량 84.0%, xylan 분해활성;668unit/mg)을 얻었으며 이는 탄소원으로 첨가된 xylose의 7.5%에 해당된다. Fig.1에 액체 배양 중의 효소의 생성과 배지의 pH 변화를 나타냈다.

접종후 2일이 지나면 pH가 낮아지기 시작하여 4일이 경과하면 1.7전후로 낮아졌다. 이것

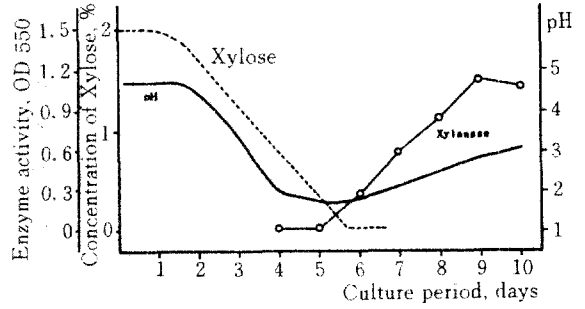


Fig.1. Enzyme production and pH change of culture medium by *Trichoderma viride* in submerged culture.

은 Shimamoto등¹²⁾의 연구결과와 마찬가지로 탄수화합물 분해대사의 대사산물로서 Oxalic acid를 접적하기 때문으로 생각되며, 이때 pH를 억제해 주며 조효소의 수율은 현저히 증가될 것으로 기대된다. 본 연구에서는 효소의 생산이 목적이 아니므로 효소생산 증가를 위한 실험을 행하지 않았다. Nakanishi등¹³⁾은 탄소원으로서 xylan 대신에 inducer로서 cyclohexinol- β -xyloside등을 써서 다량의 xylolytic enzyme을 생산하는데 성공하고 있다.

3.2 이온 chromatography에 의한 xylanase의 분획 및 정제

일반적으로 xylanase의 활성은 각종 chromatography나 전기영동적 수법에 의해서도 cellulase의 활성과 겹치는 일이 많아 두 효소를 완전히 분리하는 것은 매우 곤란한 것으로 알려져 있다¹⁴⁻¹⁵⁾.

조효소액을 Sephadex-G 25 gel column에 용출시켜(Fig.2.) xylanase활성을 보이는 fraction만을 수집해서 한외여과(Mw 10,000 cut off membrane)에 의해 농축한후 DEAE-Sephacrose에 의해 분획 시켰다(Fig.3.)

단백질 용출곡선에 의하면 크게는 3분획 되어 있으며 fraction number 2-11(이하, FX-I)에서 xylanase활성을 주로 보이고 있다. Fraction No. 13-26(이하, FX-II)에서 보이는

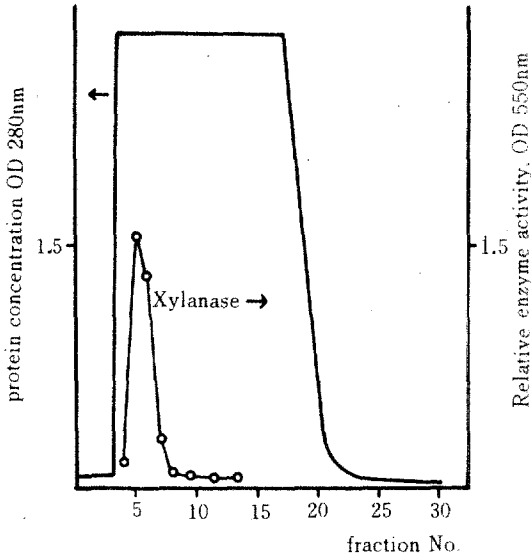


Fig.2. Sephadex-G25gel chromatography of Crude enzyme. Fraction volume:10ml.

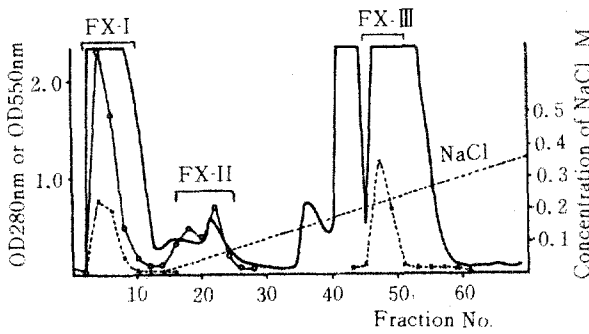


Fig.3. DEAE-Sepharose CL-6B column chromatogram of crude enzyme. Fraction volume:6ml
protein:—, Xylanase activity:—o—, β -Xylosidase activity:—x—.

xylanase의 활성은 최초 buffer에 용출되지 않고 column중에 남아 있던 xylanase의 효소단백질이 NaCl에 의해 용출되어 나오는 것으로 생각된다. 또 β -xylosidase의 활성은 FX-I과 fraction No.45-50(FX-III)에서 주로 보이고 있다.

FX-I, FX-II, FX-III의 단백질 함량은 조효소의 단백질량에 대해 각각 25.5%, 5%, 58.8%로서 column중의 DEAE-Sepharose gel

수지에의 흡착은 소량에 지나지 않다는 것을 알 수 있다. 또 FX-I, FX-II의 xylanase활성은 각각 637unit/mg, 87unit/mg으로서 조효소의 xylanase 활성에 가까운 수치를 보였다.

계속해서 FX-I과 FX-II를 G-10T Diafilter(Bio-Engineering Co., Cut off Mw10,000)를 사용하여 10ml가 되도록 농축하여 농축 효소액을 S-Sepharose gel column에 의해서 재차 분획 하였다.

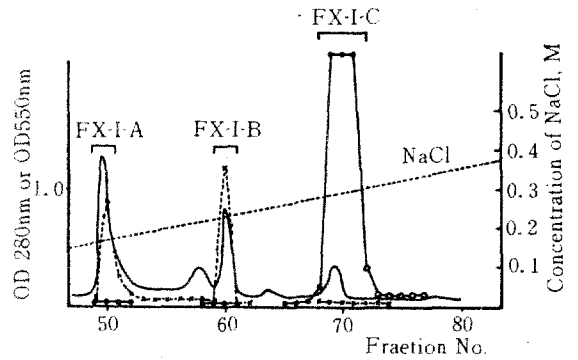


Fig.4. S-Sepharose column chromatogram of FX-I
Fraction volum:4ml, protein:—, Xylanase activity:—o—, β -Xylosi-

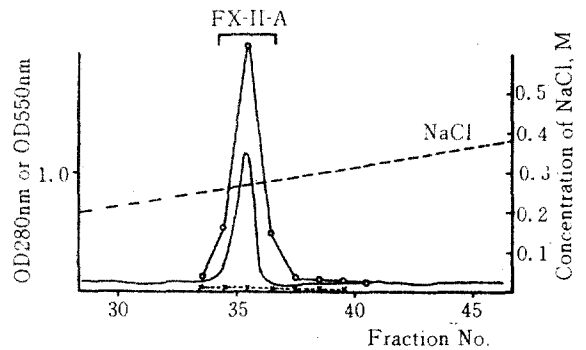


Fig.5. S-Sepharose column chromatogram of FX-II.
Fraction volum:4ml, Protein:—, Xylanase activity:—o—, β -Xylosidase activity:—x—.

FX-I의 S-Sepharose 이온교환 chromatography(Fig.4)의 결과 FX-I-A, B에서 β -xylosidase의 활성이 나타나고 FX-I-C의

단백질 용출 정점과 xylanase의 활성 정점이 잘 일치하는 것으로 S-Sepharose 이온교환 수지에 의해서 xylanase와 β -xylosidase가 충분히 분리된 것으로 판단된다. 이와 같은 결과는 xylanase와 β -xylosidase는 같은 효소단백질이 아니고 엄연히 다른 종류의 단백질임을 증명하는 것이며 xylobiase의 경우도 완전히 독립된 효소단백질인 것이 확인 되어 있다.¹⁵⁾ 아울러 FX-II의 S-Sepharose 이온교환 chromatography(Fig. 5)의 경우에도 단백질 용출 정점과 xylanase의 활성정점이 잘 일치하고 있으며 β -xylosidase의 활성은 보이지 않는다.

xylanase의 정제순도를 높이기 위하여 xylanase 활성을 보이는 각 분획을 농축하여 Sepharose CL-6B column에 다시 한번 용출시켰다.

단백질량이 현저하게 감소하여 최종적으로 FX-I-C:1.0mg, FX-II-A:1.5mg의 xylanase단백질이 얻어졌다. 이는 효소단백질중의 일부가 column중의 이온교환수지나 gel에 흡착되는 것으로 생각할수 있으나, 본 실험에서는 한외 여과시 Mw10,000cut의 분리막을 사용한 결과 상당량의 효소단백질이 이 막을 통과하는 것으로 추정되었다. Xylanase의 분자량은 *Trichoderma*의 경우 Mw18,000이상으로 보고

되고 있으나¹⁷⁾, 효소 단백질의 형태적 구조에 따라서는 Mw 10,000cut의 분리막을 통과한 예를 보고한 경우도 있다¹⁸⁾.

본 실험에서도 같은 농도의 조효소액 같은 양을 Mw 10,000과 Mw 5,000의 통과 분리막을 사용하여 농축했을 경우 여과액의 UV-spectrum을 통해서 상당량의 단백질이 Mw10,000의 분리막을 통과 하는 것을 알 수 있었다 (Fig.6. 참조).

Chromatography에 의한 분획 방법으로 비교 정제순도(u/p)가 상당히 높은 정제 xylanase가 얻어졌으며, 정제된 xylanase FX-I-C, FX-II-A는 SDS-polyacrylamidegel 전기영동에 의해 분자량이 20,000전후의 단일 단백질임을 확인 했다(Fig.7).

3.3 β -xylosidase의 실활성

Sternberg¹⁹⁾는 cellulose의 당화에 있어서 *Trichoderma* 균주가 생산한 β -glucosidase의 역할과 합성에 관한 연구를 통하여 cellulase (CMC-ase)의 경우 pH 2 부근에서도 70% 이상의 활성을 유지하는데 비해 β -glucosidase는 pH3 전후에서 그 활성이 급격히 떨어지는 것을 보고하고 있다. Xylan분해효소군중에서 비교적 손쉽게 β -xylosidase의 활성을 없애

Table.1. Recovery of protein and xylanase in purification steps

Purification step	Protein mg	Recovery %	Xylanase units	Recovery %	Relative purity
Crude enzyme	840	100	668	100	1
DEAE-separose					
CL-6B					
FX-I	214.2	25.5	637	95	3.73
FX-II	42.0	5	87	13	2.6
S-separose					
FX-I-C	8.6	1	327	49	49
FX-II-A	3.4	0.4	30	4	10
S-separose					
CL-6B					
FX-I-C	1.0	0.2	80	12	60
FX-II-A	1.5	0.17	20	3.0	17.6

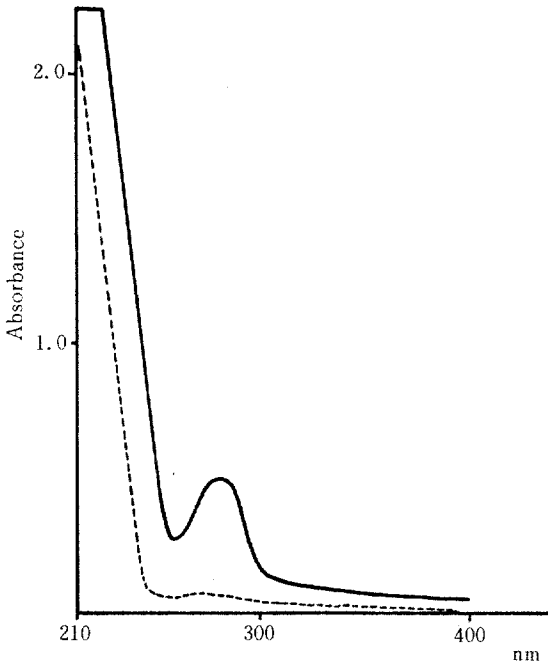


Fig.6. UV-Spectrometers of the passed solution through Diafilter of G-10T.
 — : Cut-off \bar{M}_w 10,000 Filter
 : Cut-off \bar{M}_w 5,000 Filter

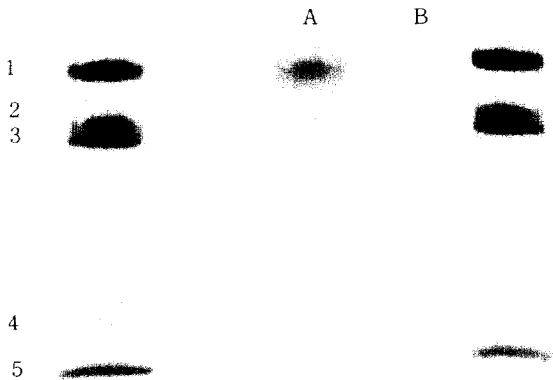


Fig.7. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified xylanase
 FX-I-C(A), FX-II-A(B).
 1. Trypsin Inhibitor(Mw 20,100)
 2. Carbonic Anhydrase(Mw 30,000)
 3. Ovalbumin(Mw 43,000)
 4. Albumin(Mw 67,000)
 5. Phosphorylase b(Mw 94,000)

는 방법으로 xylanase와 β -xylosidase의 pH 안정성을 검토 했다. Fig.8에서 볼 수 있듯이 xylanase는 pH2.2 부근에서도 70% 이상의 활성이 유지되고 있는 것에 비해 β -xylosidase는 pH 3.4부근에서 그 활성이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다. 동시에 pH 8 부근에서도 같은 경향을 보였다.

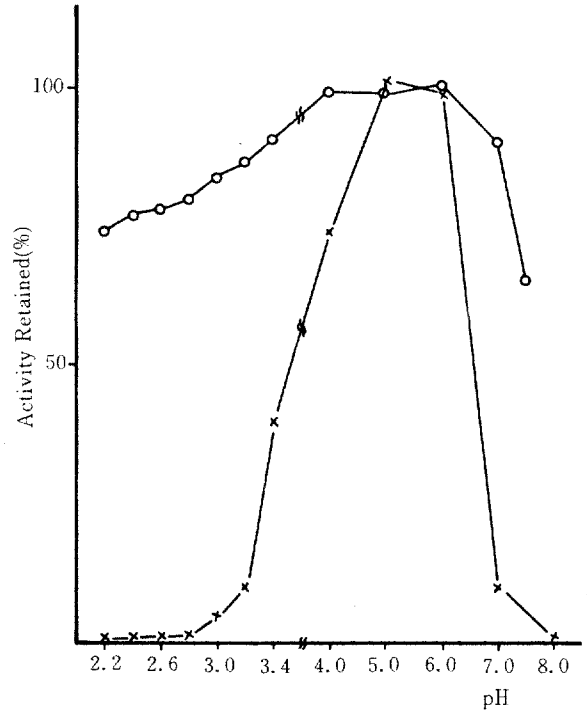


Fig.8. pH inactivation of crude enzyme.
 Xylanase activity, -O-
 β -Xylosidase activity, -x-

β -xylosidase의 실활성 여부를 보다 정확히 파악하기 위하여 pH2.8에서 처리된 조효소액을 phenyl- β -xyloside를 포함하고 있는 기질액 중에 한 시간이상 incubation시켰다. 한 시간 이상을 incubation시켜도 전혀 환원당이 생성되지 않는 것으로 β -xylosidase의 활성이 완전히 상실된 것으로 판단된다. 동시에 pH 2.8에 처리된 조효소액 중의 xylanase의 활성은 557unit/mg으로서 처리전 효소액의 83.6%가 유지되고 있었다. 따라서 본 방법에 의하여 선택적인 β -xylosidase의 실활성이 가

능 하다고 판단 되었다.

3.4 Xylan의 효소가수분해

Xylan을 정제된 xylanase FX-I-C, FX-II-A 및 산성처리된 조효소액으로 가수분해시킨후 잔사, 중성당, 산성당의 수율을 Table 2에 표시했다.

Table.2. The yields of enzymic hydrolyzate(%).

	I-C	II-A	Crude Enzyme*
Residues	22	25	33
Neutral-sugar	63	59	50
Acidic-sugar	9	13	11

☆ : treated with pH 2.8

어느 경우나 20% 이상의 잔사(Mw 5,000cut off)를 보이고 있으며 50% 이상의 중성당이 얻어졌다. 중성당 부분의 G.P.C.곡선(Fig.9.)을 보면 FX-I-C, FX-II-A에 의한 경우는 xylose의 생성이 거의 억제되고 xylobiose를 포함하여 중합도 7~10의 oligomer가 주로 생성되었다. β -xylosidase를 실험성 시킨 조효소액에 의해 생성된 중성당은 정제 xylanase에 의한 것 보다는 약간 xylose의 생성이 많은 듯

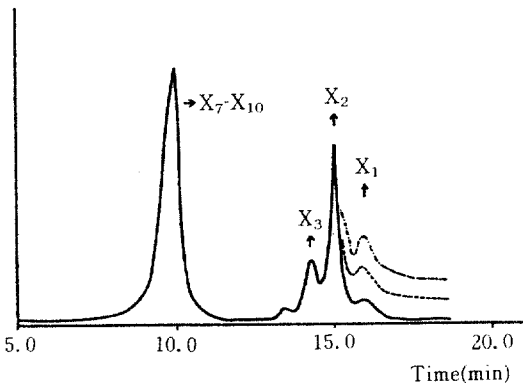


Fig.9. GPC curves of neutral fraction of xylan hydrolyzate with enzymes.
 — : Xylanase of FX-I-C
 : Xylanase of FX-II-A
 - - - : Crude enzyme treated with pH.2.8.

하지만 원효소액으로 가수분해 시킨 경우 거의 대부분이 xylose로 변환하는 것에 비하면 xylooligomer를 생성하기 위한 방법으로는 적합한 처리라고 생각 되어진다.

고도로 정제된 xylanase에 의해서도 xylose의 생성이 억제 되지 않는 것은 xylan의 고분자 사슬의 말단에 해당하는 부분은 xylanase에 의해 가수분해 되어 xylose를 생성하기 때문이다. Wang¹⁸⁾등도 *Trichoderma harzianum*가 생성한 효소액으로부터 정제한 xylanase를 통하여 본 실험과 같은 결과를 보이고 있다.

4. 결 론

Xylan으로부터 xylooligomer를 생성할 목적으로 *Trichoderma viride*균체의 효소로부터 xylanase를 분리, 정제하였다.

DEAE-Sepharose CL-6B, S-Sepharose, S-Sepharose CL-6B 이온교환 수지를 이용한 chromatography에 의해 20KD의 단일 단백질로 구성된 정제 xylanase를 얻었다.

정제된 xylanase에 의해 xylan으로 부터 xylobiose 이상의 xylooligomer를 50% 이상의 수율로 얻을 수 있었다. 또 pH 2.8로 처리된 조효소액 중에는 xylanase의 활성은 80% 이상 잔존하고 있으나 β -xylosidase의 활성은 완전히 없어졌으며 이 조효소액으로 xylooligomer의 생산이 가능했다.

참 고 문 헌

1. Tompson, S.T. 1981. Organic chemicals from biomass.(I.S.Goldstein) p.125, CRC press, Boca Raton, Florida.
2. 일본 일간 공업신문, 1988. 6월 30일.
3. Hitaka Hidesho. 1988. Biomass 변환 연구회 요지, Sukuba, p 10.
4. Dekker, R.F.H and Richards, G.N. 1976.

- Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32, 277-355.
5. Reilly, P.J. 1981. In trends in biology of fermentations for fuels and chemicals(Hoellander, A.E., ed), p111-129, Plenum press.
 6. Woodward, J.Top. 1984. Enzyme Ferment. Biotechnol.8, 9-30.
 7. Biely, P. 1985. Trends in biotechnology, 3, N 11.
 8. Mendels, M., and Reese, E.T. 1957. J. Bacteriol, 73, 269-278.
 9. Somogi, J. 1952. J.Biol.Chem., 195, 19.
 10. Hartree, E.F. 1972. Analytical biochemistry, 48, 422-427.
 11. Takaki의 3명 1976. 蛋白質 核酸 酵素, 21, 811.
 12. Shimamoto, T. 1952. Fukuzumi, T., Yamagawa, T.; Bull.Tokyo Univ.Forest, 43, 105.
 13. Nakanishi의 2명 1976. 醱酵工業, 54, 813.
 14. Urbanek, H., Zalewska-Sobczak, Borowinska. 1978. J. Arch. Microbiol, 118, 265.
 15. Zalewska-Sobczak, J., Urbanek, H. 1981. Arch. Microbiol, 129, 247.
 16. Ishihara, M., Shimizu, K., Ishihara, T. 1975. Mokuzai Gakkaishi, 21, 680.
 17. Sinner, M., Dietrichs, H.H. 1976. Horzforschung, 30, 50.
 18. Wang, K., Tan, L., Saddler, J., Yamaguchi, M. 1986. Can. J. Microbiol. 32, 570.
 19. Sternberg, D. 1976. Applied and Environmental Microbiology, 31, (5) 648.