

## *Penicillium verruculosum*의 Xylan분해활성도의 생성에 대한 Xylan의 영향

조남철<sup>†</sup> · 정두레 · 유영균

동신전문대학 식품영양과

### Effect of Xylan on Production of Xylanolytic Activity from *Penicillium verruculosum*

Nam-Chul Cho<sup>†</sup>, Doo-Le Chung and Young-Kyun Yoo

Dept. of Food and Nutrition, Dongshin Junior College, Kwangju 500-714, Korea

#### Abstract

During the cultivation of *Penicillium verruculosum* in the medium containing xylan as a sole carbon source for 26 days, xylanolytic activity and some changes were investigated. Protein content and xylanolytic activity, *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside (PNPX), *p*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (PNPG) hydrolytic activities were increased until 8 days but reducing sugar content was not correlated to protein content. When crude proteins from the culture broth were separated on SDS-PAGE, distribution of proteins was different from the culture broth of cellobiose octaacetate (COA) medium. The culture broth of xylan medium had high hydrolytic activity on xylan but not on cellulose. Furthermore, xylanolytic products were showed xylose, xylobiose and oligosaccharides on thin layer chromatography, and xylobiose was major product. Those result suggested that xylanolytic activity of culture broth was endo-type hydrolysis. Optimum temperatures of xylanolytic activity and PNPG hydrolytic activity of culture broth were 50 ~ 60°C and 60 ~ 70°C, respectively and optimum pHs were 3.0 ~ 4.0 and 4.0 ~ 5.0, respectively.

**Key words :** *Penicillium verruculosum*, xylanolytic activity

#### 서 론

농산폐기물의 섬유질 biomass는 cellulose, hemicellulose, 그리고 lignin 등으로 구성되어 있다. 이러한 섬유질 biomass는 해마다 많은 양이 생산되지만 대부분 이용되지 않고 폐기되고 있는 실정으로서 그 이용을 위해 cellulose를 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 그러나 cellulose는 화학적, 생물학적 방법에 의해 효율적인 분해가 어렵기 때문에 많은 연구에도 불구하고 실질적인 이용이 미미한 실정이다. 반면에 xylan이 주

요구성 성분인 hemicellulose는 알칼리에 의해 쉽게 분해되며 그 분해산물인 xylose를 발효할 수 있는 미생물들이 발견됨으로써 hemicellulose의 이용이 주목되어지고 있다. 지금까지 xylan분해에 대해 연구되어온 미생물들은 *Aspergillus niger*<sup>1)</sup>, *Aspergillus spp.*<sup>2)</sup>, *Bacillus stearothermophilus*<sup>3)</sup>, *Bacillus spp.*<sup>4)</sup>, *Streptomyces lividans*<sup>5)</sup>, *Schizophyllum radiatum*<sup>6)</sup>, *Pullularia pulluans*<sup>7)</sup> 등으로서 균류로부터 생산되는 D-xylanase는 다른 미생물들에 비해 비교적 많이 연구되었다. 정 등<sup>8,9)</sup>이 자연계로부터 분리한 *Penicillium verruculosum*은 cellulose 분해능이 매우 높은 균주로 보고된 바 있으며 이 균주

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

의 cellulose분해효소계에 대한 연구가 이루어 졌다<sup>10-13)</sup>.

본 연구에서는 *P. verruculosum*을 탄소원으로 xylan을 함유시킨 배지에서 배양함으로써 배양중 xylan 분해활성도의 생성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 균주배양

*P. verruculosum*을 효소생성유도물질로써 xylan (from oat spelts, Sigma)을 1% 첨가한 효소생산배지에서 26일간 30°C에서 진탕배양하면서 일정간격으로 배양액을 소량씩 취하여 원심분리한 후 상정액을 사용시 까지 -20°C에 얼려 보관하였다.

### 효소 활성도 측정

Xylanase의 xylan 분해활성도는 xylan을 1% 함유한 0.1 M McIlvaine 완충용액 (pH 4.0)에 일정량의 효소액을 가하여 30분간 50°C에서 진탕반응시킨 다음 생성된 환원당을 dinitrosalicylic acid 방법<sup>14)</sup>으로 정량하였으며 1분 동안에 xylose로 환산한 환원당 1 μmole을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

*p*-Nitrophenyl-β-D-xylopyranoside (PNPX), *p*-Nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside (PNPC), *p*-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNPG)에 대한 활성도는 0.5 mM의 PNPX, PNPC 또는 PNPG를 포함하는 0.1M McIlvaine 완충용액 (pH 4.0)에 효소액을 가하여 30분간 50°C에서 반응시킨 후 1.0M sodium carbonate용액을 가하여 생성된 *p*-nitrophenol (PNP)의 양을 400 nm에서의 흡광도를 측정<sup>15)</sup>하여 산출하였으며 1분동안에 1 μmole의 PNP를 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

### pH의 영향

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 pH 2.5~10.0까지의 0.1 M 완충용액 (pH 2.5~7.0 : McIlvaine buffer, pH 8.0~10.0 : tris-HCl buffer)에서 효소용액을 일정시간 동안 방치후 효소활성도를 측정함으로써 pH에 대한 안정성을 조사하였으며 효소활성도에 대한 최적 pH는 각각의 완충용액에 기질을 가하여 30분간 반응시킨 후 효소활성도를 측정하였다.

### 온도의 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해 30~80°C범위에서 효소용액을 일정시간 동안 방치후 효소활성도를 측정함으로써 온도에 대한 안정성을 조사하였으며 효소활성도에 대한 최적온도는 각각의 온도에서 30분간 반응시킨 후 효소활성도를 측정하였다.

### 단백질 정량 및 전기영동

단백질 농도측정은 Lowry 변법<sup>16)</sup>을 이용하였으며 단백질시료를 Laemmli의 방법<sup>17)</sup>으로 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 포함한 10% acrylamide gel에서 전기영동하였다.

### 반응 생성물의 확인

효소반응 상정액에 포함된 환원당은 silica gel이 입혀진 thin layer chromatography (TLC)로 확인하였다. 전개용매로서는 n-butanol : ethanol : water (5 : 3 : 2)계<sup>18)</sup>를 이용하였으며 발색시약으로는 silver nitrate-sodium hydroxide를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 배양시간에 따른 단백질량 및 xylan 분해활성도의 변화

*P. verruculosum*을 유일한 탄소원으로 xylan을 포함한 액체배지에서 배양했을 때 Fig. 1에서 보는 바와 같이 배양여액 중의 총단백질량은 배양 2일 후 부터 6일째 까지 3.3 mg/ml로 급격히 증가한 후 배양말기까

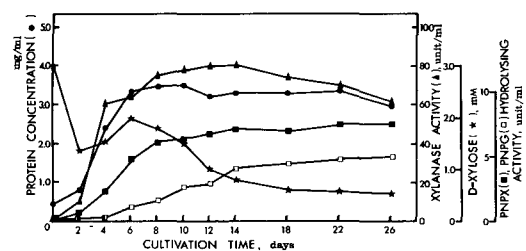


Fig. 1. Changes of protein and xylan hydrolytic activity by *P. verruculosum* in medium containing xylan as a sole carbon source.

Protein concentration (●), xylanolytic activity (▲), PNPG hydrolysing activity (■), PNXP hydrolysing activity (□), reducing sugar (★)

지 그 수준을 유지하였다. 또한 xylan과 PNPX 분해활성도도 단백질과 함께 배양 8일째까지 증가하였으며 그 후 xylan 분해활성도는 배양후기에 다소 낮아지는 결과를 보였으나 PNPX분해활성도는 비교적 그 수준을 유지하였다. 또한 PNPX 분해활성도가 PNPG 분해활성도보다 더 크게 증가하였으며 이는 탄소원으로 사용한 xylan에 의해  $\beta$ -glucosidase보다는  $\beta$ -xylosidase의 생성이 보다 많이 유도되었기 때문으로 추정되었으며 xylan분해활성도가 최고 80unit/ml까지 증가함으로써 다른 미생물<sup>2,3,19,20</sup>에 비해 그 활성도가 훨씬 높았다. 한편 배양중 배양여액 중의 환원당의 함량 변화는 배양 2일까지 감소되다 다시 6일째까지 증가하였으나 그후 계속 감소함으로써 PNPX나 xylan분해활성도의 변화와는 비례하지 않았으며 이는 환원당함량 변화가 xylan분해활성도의 증가와 일치한 *Bacillus stearothermophilus*<sup>9</sup>의 경우와는 달랐다. 한편 본 균주를 탄소원으로서 cellobiose octaacetate (COA)를 가한 cellulase유도배지에서 배양하였을 때 섬유소분해효소의 생성은 배양 8일부터 증가함으로써<sup>10</sup> xylan분해효소보다 생성되는 시간이 더 늦었다.

단백질의 양상과 xylan 분해생성물

배양 12일째 배양여액을 취하여 섬유소 분해효소 유도물로서 COA를 유일한 탄소원으로 배양한 배양여액과 함께 전기영동한 결과 Fig. 2와 같이 나타났다. COA 배지의 배양여액에서는 40kDa와 60kDa, 그리고 66 kDa의 단백질이 가장 많은 분포를 보였으며 이들은 각각 CMCase와 cellobiohydrolase I과 II로 각각 정제 보고된 바 있다<sup>10-13</sup>. 또한  $\beta$ -glucosidase로 보고된 105 kDa<sup>12</sup>보다 약간 아래 위치에서 진한 단백질 band를 보였으며 COA배지의 단백질 분포양상과는 대체로 서로 다른 단백질 양상을 보였다. 12일째의 배양여액을 취하여 xylan과 반응시켰을 때 반응산물로서 xylose뿐만 아니라 xylobiose를 포함한 소당류들이 확인되었으며 이는 xylan분해활성이 endo-type임을 나타내며 이때 생성물 중에서 xylobiose가 가장 많이 생성되었다(Fig. 3). 이러한 결과는 하 등<sup>19</sup>이 자연계에서 분리한 227균주의 xylan 분해형태와 같았으나 exo-type의 가수분해 형태로서 xylose만을 생성하는 *Bacillus stearothermophilus*<sup>9</sup>와는 달랐다. 한편 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus foetidus*<sup>9</sup>의 경우 xylan에 대해 본 균주처럼 endo-type의 가수분해를 하였으나 xylobiose보다 xy-

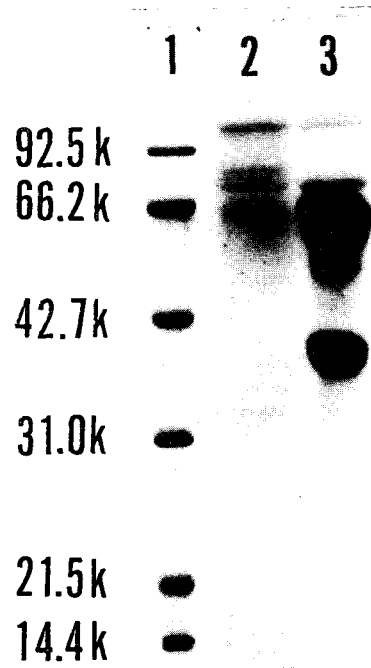


Fig. 2. SDS-PAGE of crude extract from culture broth of *P. verruculosum*. Crude proteins were separated by 10 % SDS-PAGE. The gel was stained with Coomassie blue. Lanes : 1, molecular weight standard : 2, crude extract from xylan medium : 3, crude extract from COA medium

lose를 훨씬 더 많이 생산한다는 점에서 본 균주와 차이를 보였다.

Xylan 및 PNPX 분해활성도에 대한 온도 및 pH의 영향

배양 12일째 배양여액을 각각의 온도에서 일정시간 노출시킨 다음 55°C에서 xylan 및 PNPX 분해활성도를 비교한 결과 두 활성도 모두 50°C에서는 24시간 이후에서도 활성도의 변화가 관찰되지 않았으며 60°C에서는 약간의 감소가 일어났다. 그러나 80°C에서는 노출 10분후에 측정했을 때 완전히 실패됨을 알 수 있었다. 효소활성도에 대한 최적온도를 조사한 바 xylan분해활성도는 50~60°C에서 그리고 PNPX분해활성도는 60~70°C에서 가장 높은 활성도를 보였다(Fig. 4). 동일 배양여액을 각각의 pH에서 일정시간 노출시킨 다음 pH 4.0에서 활성도를 비교한 결과 거의 모든 pH에

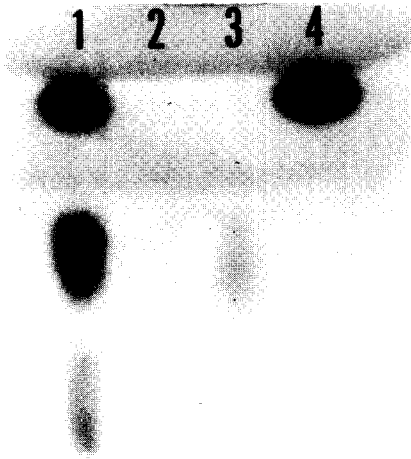


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of the hydrolysis products of xylan by crude extract from xylan medium. Lanes : 1, crude extract + 1 % xylan : 2, 1 % xylan; 3, xylobiose : 4, xylose

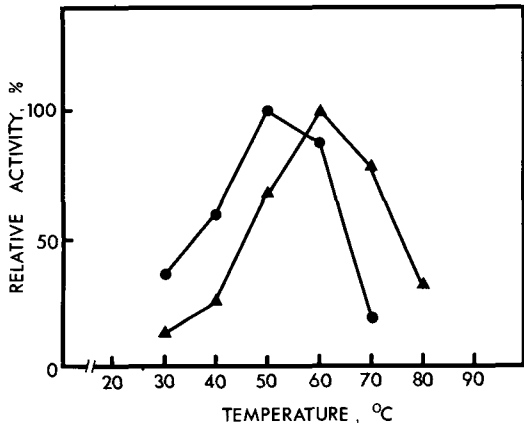


Fig. 4. Effect of temperature on enzyme activity. Xylanolytic activity (●), PNPX hydrolysing activity (▲)

서 안정한 것으로 나타났으며 효소활성도에 대한 최적 pH를 조사한 바 xylan분해활성도에 대해서는 pH 3.0 ~ 4.0에서 그리고 PNPX분해활성도에 대해서는 pH 4.0 ~ 5.0에서 가장 높은 활성도를 보였다(Fig. 5). 하 등<sup>19)</sup>이 분리한 *Pseudomonas spp.*의 xylan분해에 대한 최적 온도는 본 균주보다 약간 낮은 50°C였으며 50°C이상의 온도에서는 활성도를 상실하였다. 그러나 최적 pH는 5~6으로서 본 균주의 경우보다 더 높았다. *Streptomyces lividans*<sup>5)</sup>의 경우 xylan분해에 대한 최적온도는 60°C로서 본 균주와 비교적 비슷한 반면 *Bacillus spp.*<sup>4)</sup>는 65~70°C로서 높았으며 최적 pH 또한 6.0~7.0으로 본균주에 비해 높은 편이었다.

섬유소에 대한 분해 활성도

결정성 섬유소로써 Avicel, cotton 그리고 가용성섬유소로써 CMC를 기질로하여 분해활성도를 측정한 바 Table 1에서와 같이 xylan에 대한 분해활성도는 매우 높은 반면에 이들 섬유소에 대한 분해 활성도는 거의 나타나지 않았다. 이는 Fig. 2의 조효소 용액의 단백질

Table 1. Hydrolytic activity of culture broth on various substrates

Substrates	Relative activity (%)
Avicel	0
Cotton	0
Carboxymethyl cellulose	5
Xylan	100

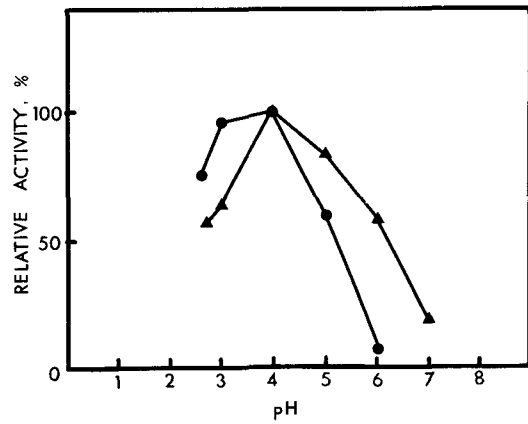


Fig. 5. Effect of pH on enzyme activity. Xylanolytic activity (●), PNPX hydrolysing activity (▲)

분포양상에서 나타나듯 섬유소분해에 관련된 효소단백질들이 탄소원으로 xylan을 가했을 때 COA배지의 조효소 용액에 비해 그 생성량이 훨씬 더 낮았기 때문에 사료되며 이는 배양액에 첨가되는 탄소원의 종류에 따라 생성되는 세포외효소의 양상이 다를 뿐만 아니라 각 효소성분의 생성량도 달라짐을 알 수 있다.

요 약

Penicillium verruculosum을 xylan을 함유한 액체배지에서 26일간 배양하면서 xylan분해활성도를 비롯한 몇가지 변화를 관찰하였다. Xylan과 PNPX분해활성도는 단백질량의 증가와 함께 배양 8일까지 급격히 증가하였으나 배양액 중의 환원당의 변화와는 비례하지 않았다. 배양 12일째의 배양상징액을 탄소원으로서 cellobiose octaacetate를 가한 배양상징액과 함께 전기영동하였을때 서로 다른 단백질 분포양상을 보였으며 본 배양상징액에 있어 섬유소 성분들에 대한 분해활성도는 거의 나타나지 않은 반면 xylan에 대해서는 매우 높은 활성도를 나타냈다. 배양 상징액에 xylan을 가했을 때 반응 생성물로서 xylose와 xylobiose를 비롯하여 소당류들이 생성됨으로서 endo-type의 분해활성도로 추정되었으며 이때 xylobiose가 가장 많은 비율을 차지했다. Xylan과 PNPX분해 활성도에 대한 배양 상징액의 최적온도는 각각 50~60°C와 60~70°C였으며 최적 pH는 각각 3.0~4.0과 4.0~5.0이었다.

문 헌

1. 최양도, 이희중, 한문희 : Aspergillus niger의 Hemicellulase계 효소에 관한 연구(D-xylanase계 효소의 정제와 재조합). 한국산업미생물학회지, 11, 23(1983)
2. Bailey, M. J. and Poutanen, K. : Production of xylanolytic enzymes by strains of Aspergillus. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 5(1989)
3. 송현숙, 최봉진 : Bacillus stearothermophilus에 의한 Xylanase생산. 한국산업미생물학회지, 17, 289(1989)
4. Okazaki, W., Akiba, T., Horikoshi, K. and Akahoshi, R. : Production and properties of two types xylanases from alkalophilic thermophilic Bacillus spp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19, 335(1984)
5. Kluepfel, D., Shareck, F., Mondou, F. and Morosoli,

- R. : Characterization of cellulase and xylanase activities of Streptomyces lividans. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 230(1986)
6. Cavazzoni, V., Manzoni, M., Parini, C. and Bonferoni, M. C. : D-xylanase produced by Schizophyllum radiatum. Appl. Microbiol. Biotechnol., 30, 247(1987)
7. Juana, P. L. and Driguez, H. : D-xylose as an inducer of the xylan-degrading enzyme system in the yeast Pullularia pulluans. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 134(1987)
8. Chung, K. C., Kwawai, K., Yashima, S. and Eguchi, Y. : Production of cellulolytic enzymes by Penicillium verruculosum. Hakkokogaku, 60, 335(1982)
9. 정기철 : 미생물에 의한 섬유성물질분해효소의 생산 (I). 한국산업미생물학회지, 12, 57(1984)
10. 조남철, 김강화, 전순배, 정기철 : Penicillium verruculosum의 Avicelase생성에 대한 cellobioseoctaacetate와 Avicel 및 KC-flock의 영향. 한국산업미생물학회지, 18, 383(1990)
11. 조남철, 김강화, 전순배, 정기철 : Penicillium verruculosum으로 부터 cellobiohydrolase의 정제 및 특성에 관한 연구. 한국생화학학회지, 24, 431(1991)
12. Chun, S. B., Kim, D. H., Kim, K. and Chung, K. C. : Purification and characterization of  $\beta$ -glucosidase from Penicillium verruculosum. J. Microbiol. Biotechnol., 1, 188(1991)
13. 김연희, 조남철, 김강화, 최원기, 전순배, 이용규, 정기철 : Penicillium verruculosum의 Endo- $\beta$ -1,4-Glucanase의 정제 및 특성, 한국생화학학회지, 25, 95(1992)
14. Miller, G. I. : Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31, 426(1959)
15. Pangangred, W., Kawaguchi, O., Tomita, T., Negoro, S., Shinmyo, A. and Okada, H. : Isolation of two  $\beta$ -xylosidase gene of Bacillus pumilus and comparison of their gene products. Eur. J. Biochem., 138, 267(1984)
16. Lowry, O. H., Rowebrrough, N. T., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265(1951).
17. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. Nature, 227, 680(1970)
18. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate analysis, apractical approach. IRL Press, p.42(1987)
19. 하재석, 이영남, 임재윤 : Exo-xylanase 생산균의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 20, 14(1992)
20. Okada, H. and Shinmyo, A. : Xylanase of Bacillus pumilus. Methods in enzymology, 160, 632(1988)

(1992년 6월 24일 접수)