

곰팡이가 생산하는 세포외 β -Xylosidase의 정제 및 특성

고명선 · 이상준 · 이종근*
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Characterization of Extracellular β -Xylosidase from Fungi

Ko, Myung-Seun, Sang-Joon Lee and Jong-Kun Lee*

Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract — The β -xylosidase from *Penicillium* sp. FX-102 was purified by 40~80% ammonium sulfate saturation, CM-Cellulose column chromatography, Sephadex G-200 gel filtration, and isoelectric focusing. The optimum pH and temperature for the activity of the β -xylosidase was pH 4.5 and 50°C, respectively. The enzyme was stable at the pH range of 4.5~5.5, and at 55°C for 10 min. The molecular weight of the enzyme was estimated to be about 300,000 daltons by Sephadex G-200 gel filtration and 310,000 daltons of monomer by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Isoelectric point of the enzyme was determined to be pH 4.4. The enzyme activity was strongly inhibited by Hg^{2+} , Ag^{2+} , *n*-bromosuccinimide and *p*-chloromercuribenzoate. Xylobiose (10 mM) was completely decomposed to xylose after 8 hrs enzyme reaction with 2 units of the β -xylosidase.

지구상에 존재하는 많은 식물체 및 농산 폐자원의 세포벽에는 종류에 따라 차이는 있으나, 일반적으로 cellulose 45%, hemicellulose 20%, lignin 20%가 존재한다(1). 따라서, 이들은 biomass 자원으로서 유용하며, 이들을 산 또는 미생물 효소를 이용하여 biomass로 변환시켜 에너지, 식량, 사료, 공업 원료 등으로 재이용하려는 시도는 다년간 계속 되어 왔다. 이들 중 특히, hemicellulose의 효소적 분해에 관한 연구가 계속되어 온 이유는 하수처리, 연료생산, rumen digestion 등에 적용할 수 있기 때문이다(2, 3). 생성된 xylose를 기질로 이용하는 효모의 알코올 생성, xylitol 생산, single cell protein 생산을 위해 hemicellulose의 가수분해에 의한 xylose의 대량 생산은 매우 중요하다(4).

Matsuo 등(5)은 *Penicillium wortmanni*로부터 4가지 type의 β -xylosidase를 정제하였는데, 이들의 분자량은 110,000, 195,000, 210,000, 180,000이었으며, 분자량 195,000의 subunit 분자량은 115,000, 105,000, 분자량 210,000의 sununit 분자량은 101,000, 100,000이었다고 보고하였다. Uziie 등(6)은 *Chaetomium tri-*

*laterale*의 β -xylosidase를 정제한 후에도 β -glucosidase의 활성이 함께 공존하고 있음을 발견하고, 정제된 효소의 동력학적 연구를 통해, 이들 두 효소의 활성이 같은 효소의 두 활성 부위에 동력학적으로 다른 뚜렷한 두개의 결합 부위를 가질 것이라고 추정하였다.

저자는 토양으로부터 강력한 세포외 β -xylosidase 생산균인 *Penicillium* sp. FX-102를 분리하였으며, 본 실험에서는 폐자원을 활용할 목적으로, 주정 공장의 알코올 발효 부산물인 distillers dried solubles(이하 DDS)을 첨가하여, 유도 생산된 β -xylosidase를 정제하고, 정제효소의 물리적 성질 및 각종 glycoside에 대한 가수분해율 및 가수분해 산물을 검정하여, 산업 폐기물의 재이용, xylose를 이용한 알코올 연료의 생산 및 xylitol 감미원의 조제 등 산업적 이용면에 기초 자료를 제공하고자 본 실험을 실시하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주배양 및 시약

본 연구에서는 β -xylosidase 생산이 가장 우수한 균주를 분리, 선별하여 동정한 *Penicillium* sp. FX-

Key words: DDS, β -xylosidase, purification, characterization

*Corresponding author

102를 사용하였다. 균주의 배양배지는 0.5% xylan, 2% DDS, 2% yeast extract, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pH 5.0)를 사용하였으며, 30°C에서 5일간 배양하였다. 효소활성 측정용 기질은 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (PNPX, Sigma)를 사용하였다.

조효소액의 조제

배양액을 멸균 가아제로 1차 여과한 다음 냉동 원심 분리(10,000 rpm, 15 min)하여 균체를 제거한 후, Toyo filter paper No.1 (diameter, 15 cm)으로 2차 여과시킨 액을 조효소액으로 사용하였다.

β -Xylosidase의 활성측정

합성 기질인 *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (PNPX)를 0.1 M sodium acetate buffer (pH 5.5)에 1 mg/ml 되게 만든 기질에 효소액 1 ml를 가하여 30°C 진탕 수조에서 10분간 반응시킨 후, 5 ml의 0.05 M Na_2CO_3 로 반응 정지 및 발색시켰다. 생성된 *p*-nitrophenol은 405 nm에서의 흡광도 차에 의해 측정하였으며, 효소 역가 1 unit는 1분간에 1 μmol 의 *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정하였다.

단백질의 정량 및 등전점 분리

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등(7)의 방법에 준하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 정량하였다. 효소는 pH 3.5~10인 ampholine과 pH 4~6인 ampholine을 1:3의 비율로 섞은 액을 사용하여, 110 ml 용량의 column에서 등전점에 의해 분리를 시도하였다(26).

효소의 순도 검정

정제 효소의 순도는 Davis(8)의 방법에 의하여 disc gel 전기 영동으로 확인하였다. 즉, pH 8.0으로 제조한 7% polyacrylamide gel 상에 정제 효소를 중층하고 column 1개 당 2.5 mA의 전류를 통하여 영동하였다. 전극용 완충액으로서 pH 7.0의 Tris-babital 완충액을 사용하였으며, 영동 후 gel은 0.25% coomassie brilliant blue R 250에서 30분간 염색한 후 7% 초산 용액으로 하룻밤 탈색하였다.

분자량 측정

효소의 분자량은 Andrews(10)의 방법에 따라 Sephadex G-200을 사용한 gel 여과에 의해서 측정하였다. 효소의 subunit 분자량은 Weber와 Osborn(11)의 방법에 따라 SDS polyacrylamide disc gel 전기

영동에 의해 측정하였다. 표준 단백질로서는 bovine serum albumin (M.W. 66,000), alcohol dehydrogenase (M.W. 150,000), β -amylase (M.W. 200,000), apo-ferritin (M.W. 443,000) 등을 사용하였다.

세포외 β -xylosidase의 성질 검토

Ultraviolet absorption spectrum: 완전 정제된 것으로 생각되는 세포외 β -xylosidase는 280 nm에서 흡광 계수와 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 의 측정을 위하여 이온 강도가 0이 되도록 투석시킨 다음, 동결 건조하여 분말로 만들었으며, 3차 증류수에 재용해시켜 사용하였다.

당함량: 정제된 세포외 β -xylosidase의 당함량 측정은 페놀-황산법(9)으로 측정하였다.

효소활성에 미치는 pH와 온도의 영향: 0.02 M sodium acetate buffer, 0.02 M sodium citrate buffer, 0.02 M potassium phosphate buffer를 각각 pH 2.5~8.0으로 조절하여 검토하였다. 활성화 에너지는 최적 조건의 pH와 PNPX 기질 농도를 2 mM로 한 반응계에서 온도 변화에 따른 효소 활성과의 상관 관계를 Arrhenius plot 하여 계산하였다.

효소 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향: 안정성에 미치는 pH의 영향은 pH 3.5에서 6.0까지 0.02 M sodium citrate buffer를 사용하여 효소의 pH를 조절하고 4°C에서 24시간 방치한 후, 잔존 활성을 측정하였으며, 안정성에 미치는 온도의 영향은 0.02 M sodium citrate buffer (pH 4.5)의 조건에서 30°C에서 80°C까지의 각 온도에 10분간 방치한 후 잔존 활성을 측정하였다.

기질특이성 및 기질농도의 영향: 각종 glycoside에 대한 β -xylosidase의 기질 특이성은 oligosaccharides의 경우 2 mM, polysaccharides의 경우는 1%의 농도로 하여 40°C에서 10분간 반응시켜 생성된 환원당을 측정하였다. PNPX에 대한 K_m 값 및 V_{max} 는 기질 농도를 1~8 mM까지 변화시켜 반응 개시 후, 1분 동안의 초속도를 측정하여 구하였다. 기질이 methyl- β -D-xyloside인 경우 효소의 활성 측정은 PNPX에 대한 측정방법과 동일하며, 반응 정지 후 1 ml의 phenol을 첨가하여 발색시킨 후, 660 nm에서 측정하였다. 생성된 환원당은 Somogyi 법(12)에 의해 측정하였으며, 전당 측정은 페놀-황산법(9)에 의해 측정하였다. 각종 glycoside에 대한 β -xylosidase의 가수분해율은 상기의 조건으로 측정한 전당에 대한 생성 환원당의 백분율로써 산정하였다.

금속 이온 및 효소 저해제의 영향: 효소 활성에 미치는 금속 이온 및 효소 저해제의 영향은 정제된 β -xylosidase (5 units/ml)를 각 금속 이온 및 효소 저

해제를 함유한 0.02 M sodium citrate buffer(pH 5.0)에서 4°C에서 10분간 처리한 다음 잔존 활성을 측정하였으며, 잔존 활성은 처리되지 않은 군에 대한 백분율로 나타내었다.

Xylobiose에 대한 β -xylosidase의 가수분해율과 가수 분해 산물의 검정

10 mM xylobiose에 2 units/ml의 정제된 β -xylosidase를 20 ml의 0.02 M sodium citrate 완충액(pH 4.5)에 녹여 50°C에서 반응시켜 시간에 따른 가수분해율을 측정하였으며, xylobiose에 대한 가수분해 산물은 TLC에 의해 검정하였다. 즉, 일정 시간 효소와 반응시킨 후, 생성된 가수 분해 산물은 cellulose plates에 약 20 μ l 씩 spot 하였으며, *n*-butanol-pyridine-water(6 : 4 : 3) 용액을 사용 전개하였다. 실온에서 2회 전개한 후, silver nitrate-sodium hydroxide reagent를 균일하게 분무하여 발색시켰다. 최종 가수분해 산물은 HPLC(Waters associates M-031)에 의해 분석하였다. Column은 Aminex HPX-87C를 사용하였고 detector는 refractive index(RI a 32x) analyzer를 사용하였으며, flow rate 0.6 ml/min, column 온도는 85°C 이었다.

결과 및 고찰

세포외 β -xylosidase의 정제

황산암모늄분획 : *Penicillium* sp. FX-102가 생산하는 세포외 β -xylosidase의 효소학적인 성질을 검토하기 위하여 균체를 제거한 배양 상등액에 황산 암모

늄을 첨가하여 40%로 포화시켜 침전물을 제거하였다. 여기에 다시 황산 암모늄을 80%로 포화시켜 하룻밤 방치시킨 다음 얻어진 침전물을 소량의 0.02 M sodium citrate buffer(pH 4.0)에 녹여 동일 완충액으로 충분히 투석한 후 재 원심 분리하였다.

CM-Cellulose chromatography : 0.02 M sodium citrate buffer(pH 4.0)으로 평형화시킨 CM-Cellulose column(3×30 cm)에 농축시킨 효소액을 중층한 후, 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 용출시킨 후, 0.02 M sodium citrate buffer의 NaCl 농도를 0에서 0.5 M로 linear gradient하여 흡착 단백질을 3.7 ml 씩 용출시켰다. 용출 양식은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 효소 활성 부분은 0.2 M NaCl 농도 부근에서 용출되었다. 그러나, 각 효소의 활성 peak가 단백질 peak와 일치하지 않고, 각 fraction의 비활성이 일치하지 않으므로, fraction No. 80~110 부분을 모아 gel 여과를 행하였다. 이 단계에서 효소의 비활성은 95.1(units/ml)으로 크게 증가하였다.

Gel filtration : 전 단계에서 얻은 효소액을 ultrafilter를 사용하여 약 2.9 ml 정도까지 농축한 후, 다시 원심 분리(10,000 rpm, 15 min)하여 침전물을 제거하였다. 농축 효소는 0.1 M NaCl 함유 0.02 M sodium citrate buffer(pH 4.5)로 평형화시킨 Sephadex G-200 column(2.5×90 cm)에 농축시킨 효소액을 첨가하여 gel 여과를 실시하였다. 전개액으로 동일 완충액을

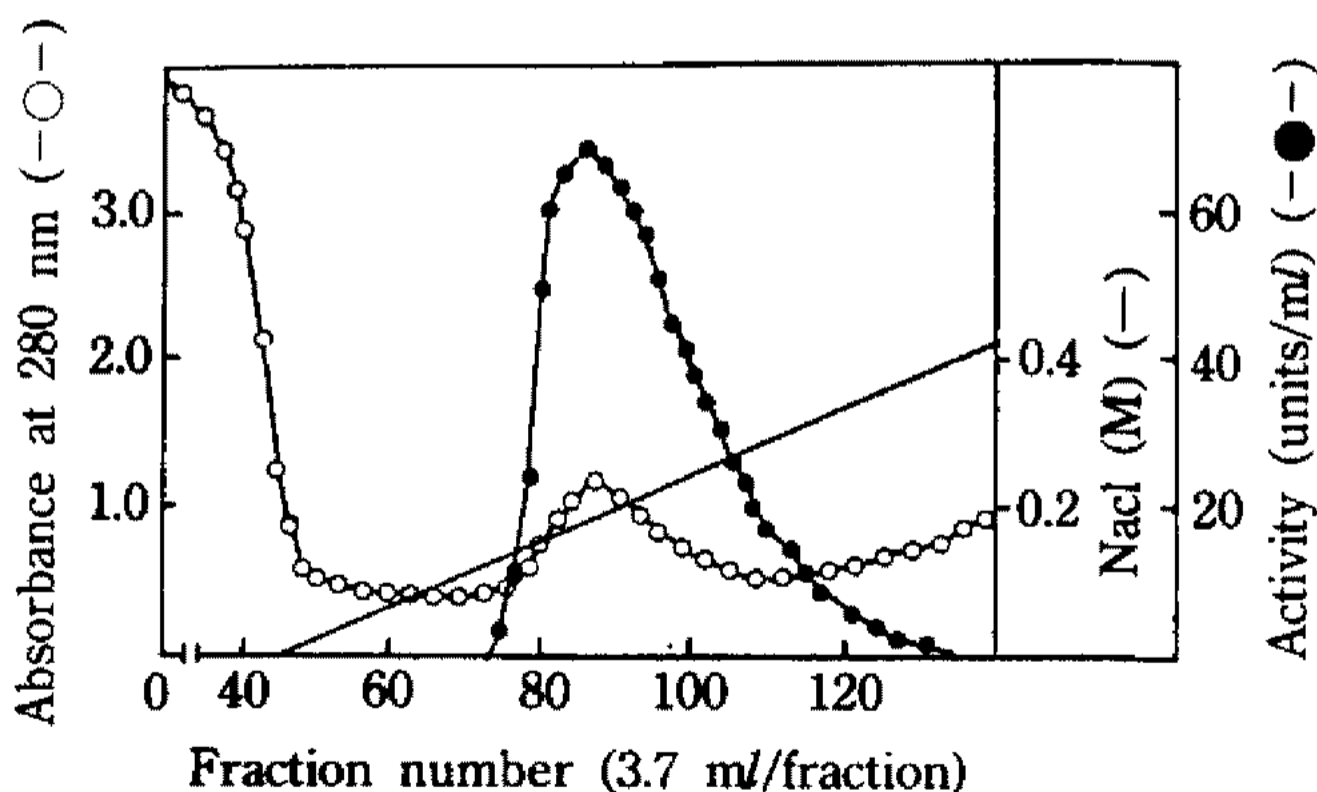


Fig. 1. Column Chromatography on CM-Cellulose of extracellular β -xylosidase.

Crude enzyme solution (150 ml) after ammonium sulfate precipitation was charged on a column (3×30 cm) of CM-Cellulose which had been equilibrated with 0.02 M sodium citrate buffer at pH 4.0. Elution was carried out by the application of linear gradient of 0~0.5 M NaCl.

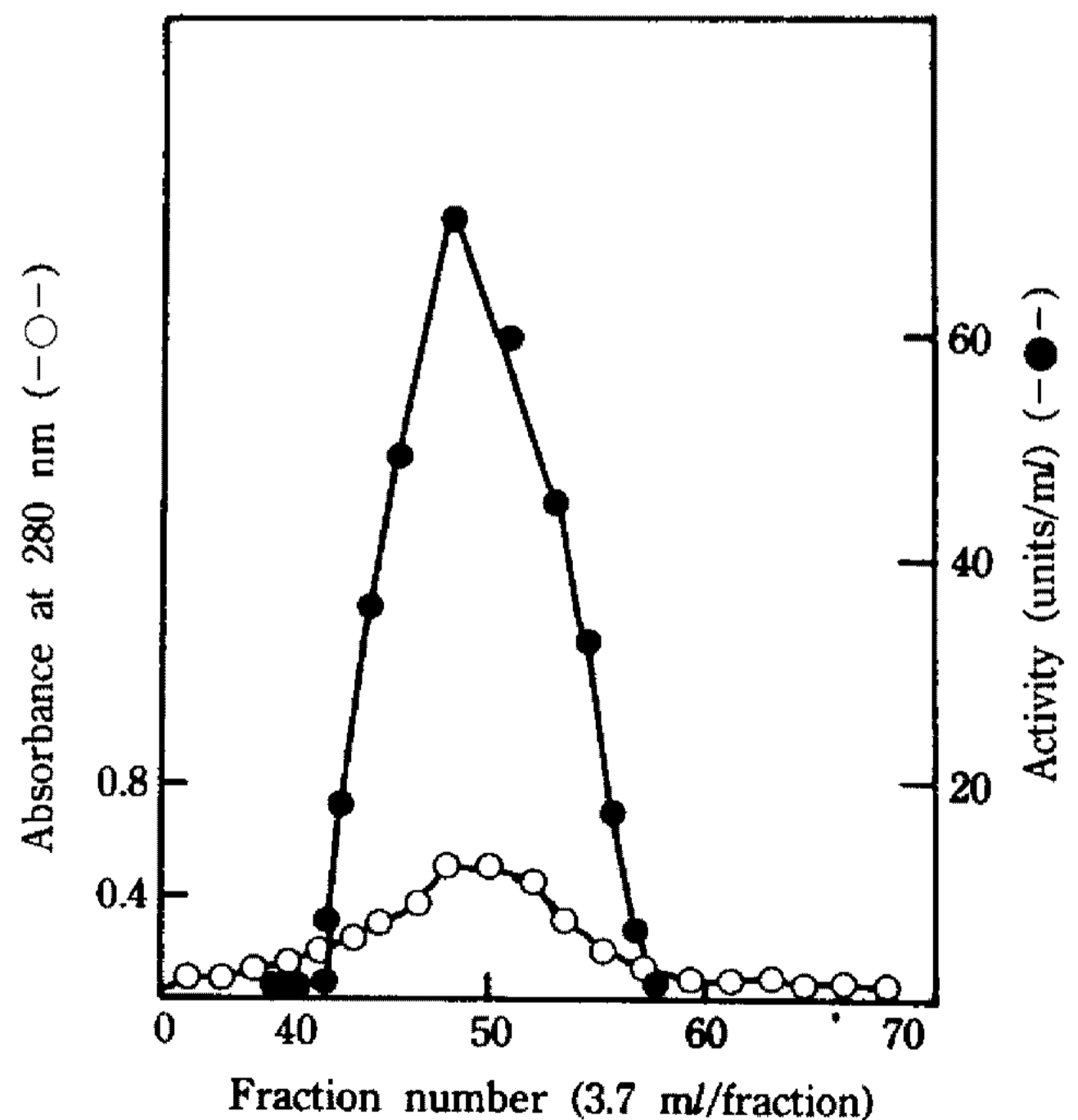


Fig. 2. Sephadex G-200 column chromatography of β -xylosidase.

The column was eluted with 0.02 M sodium citrate buffer containing 0.1 M NaCl (pH 4.5).

사용하였으며, 용출액은 3.7 ml 씩 fraction 하였다. 이때 효소의 용출 양식은 Fig. 2에 나타내었다. Fraction No.50에서 단백질과 효소 활성 peak가 최대이고, 활성 peak가 단일 peak로 나타나며, protein peak와 일치할 뿐 아니라 각 fraction의 비활성도 거의 동일한 것으로 보아 본 효소는 거의 정제된 것으로 판단되었으나, polyacrylamide disc 전기 영동에서 약간의 불순물을 포함한 band를 나타내었으므로, 등전점 분리에 의한 정제를 시도하였다. 따라서, 활성 부분의 효소액을 모아 ultrafilter로 농축하였다. 이와 같은 조작에 의해 얻어진 효소는 비활성이 187(units/mg protein)이었으며, 조효소액에 비해 89.1배로 정제되었다.

등전점 분리 : Sephadex G-200 gel 여과에 의해서 얻어진 효소액은 pH 3.5~10과 4~6 범위의 ampho-line을 사용하여 isoelectric focusing 하였다. 본 효소는 pH 4.4 부근에서 활성이 검출되었으므로(Fig. 3), 활성 부분의 fraction을 모아 disc gel 전기영동을 실시하였다. 이상의 조작에 의해 얻어진 β -xylosidase는 비활성이 400(units/mg protein)이었으며, 조

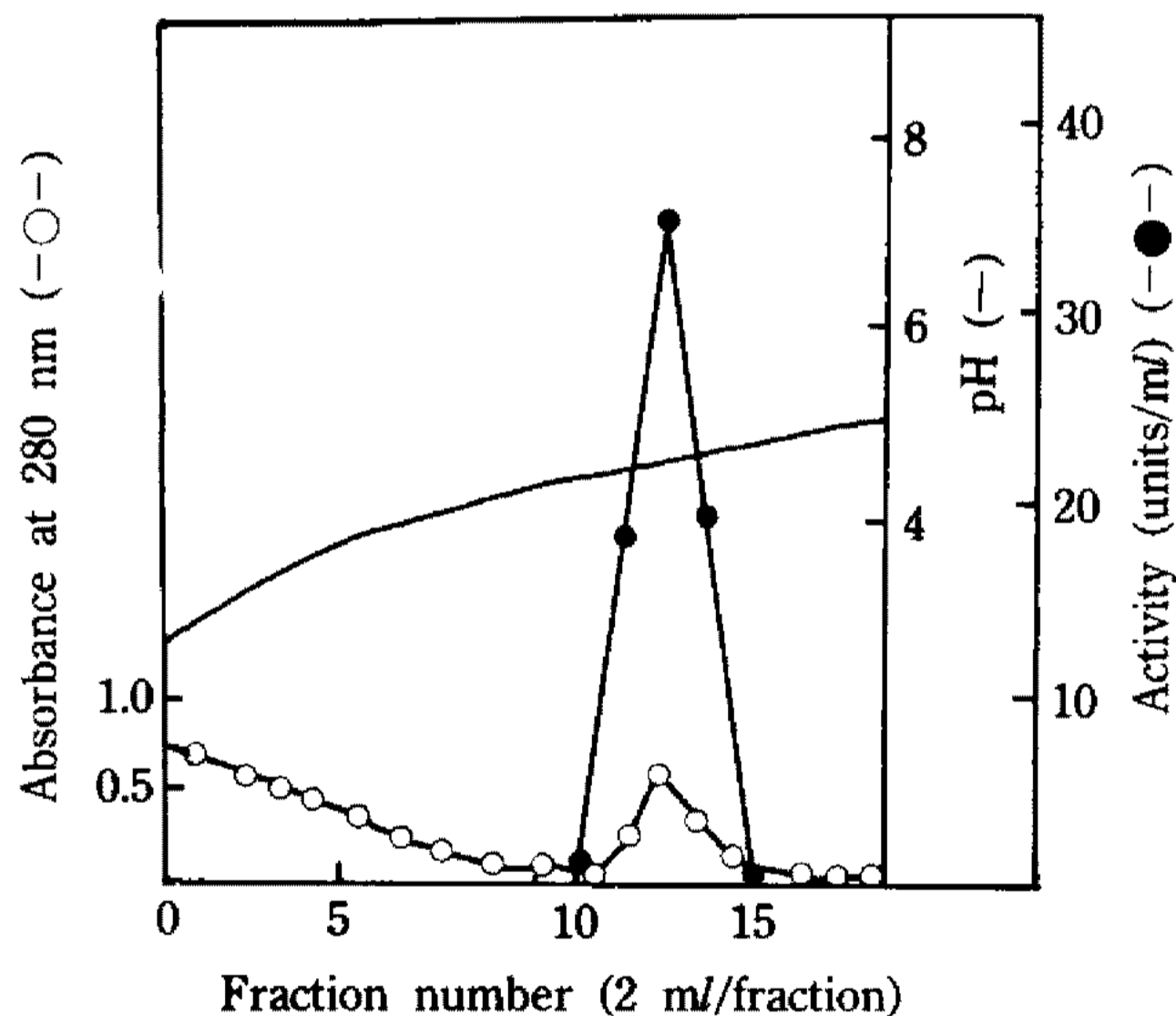


Fig. 3. Isoelectric focusing of the β -xylosidase. Isoelectric focusing was carried out at 4°C for 48 hr at 500 V.

효소액에 비해 190배로 정제되었다. 이상과 같은 일련의 과정을 거친 *Penicillium* sp. FX-102의 세포외 β -xylosidase의 정제 과정을 Table 1에 요약하였다.

정제 효소의 순도 검정 : 정제 효소의 순도를 검정하기 위하여 Davis 방법에 따라 Disc gel 전기 영동을 실시한 결과, 단일 band를 나타내었으므로(Fig. 4), 본 효소는 정제된 것으로 판명되었다.

세포외 β -xylosidase의 성질 검토

Ultraviolet absorption spectrum : 자외선 영역에서 β -xylosidase의 정제 효소액 0.83 mg/ml의 흡광도를 측정한 결과 275 nm에서 최대 흡광도를, 255 nm에서 최소 흡광도를 나타내었다. 본 효소의 $E_{1cm}^{1\%}$ (280 nm)는 10.4이었다.

당함량 : 정제된 β -xylosidase는 약 3.2%의 당을 함유한 glycoprotein이었으며, *Aspergillus niger* KG (18)가 생산한 β -xylosidase의 당함량이 22.5%인 것에 비해 본 효소의 당함량은 매우 적었다.

효소 활성에 미치는 pH와 온도의 영향 : 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 검토한 결과는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 β -xylosidase는 pH 4.5의 0.02 M sodium citrate buffer에서 최대 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 *Chaetomium trilaterale*(13)과 *Emmericella nidulans*(14)와 *Trichoderma viride*(15)가 생산하는 β -xylosidase의 최적 pH와 같았다. 효소 활성에 미



Fig. 4. Polyacrylamide disc gel electrophoresis of the purified β -xylosidase.

Table 1. Summary of the purification procedure of β -xylosidase from *Penicillium* sp. FX-102

purification step	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Culture filtrate	12,400	26,550	2.1	100
(NH ₄) ₂ SO ₄ saturation	3,186	22,978	7.2	87
CM-Cellulose	154	14,640	95.1	55
Sephadex G-200	15.4	2,883	187	11
Isoelectric focusing	3.2	1,280	400	4.8

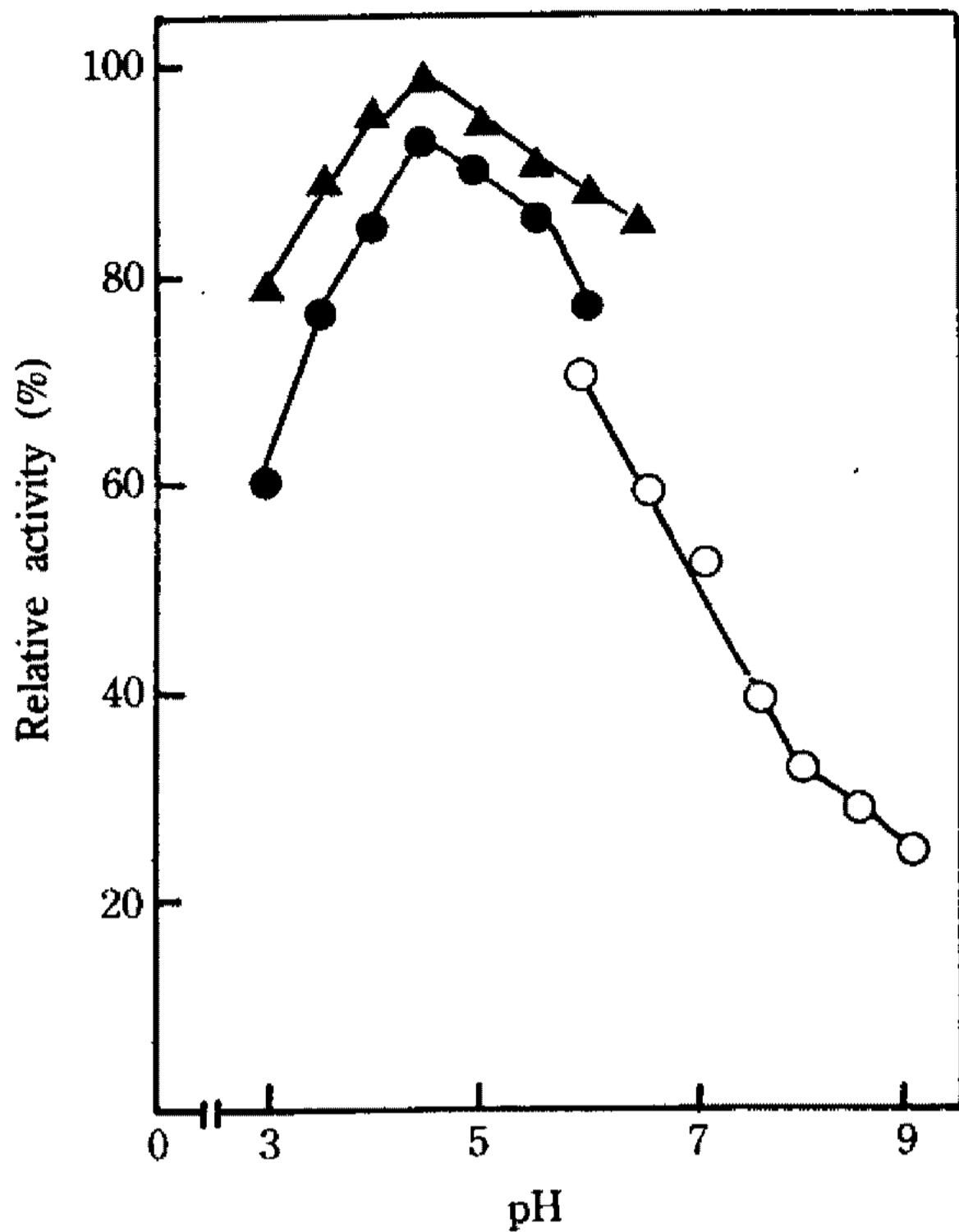


Fig. 5. Effects of pH on the activity of β -xylosidase. The buffers used were sodium acetate buffer (-●-), sodium citrate buffer (-▲-), potassium phosphate buffer (-○-).

치는 온도의 영향은 활성이 가장 양호한 것으로 나타난 완충액을 사용하여 검토하였으며, 효소의 온도에 따른 활성도로부터 Arrhenius plot 하였다. β -xylosidase의 반응 최적 온도는 50°C 이었으며, 활성화 에너지는 3.2 Kcal/mol이었으며(Fig. 6), *Chaetomium trilaterale*(13)과 *Emericella nidulans*(14)와 *Trichoderma viride*(15)의 최적 온도 55°C와 *Penicillium wortmanni*가 생산하는 4종류의 β -xylosidase의 최적온도가 55°C에서 65°C인 것보다 낮았다.

효소 안정성에 미치는 pH와 온도의 영향: β -xylosidase의 안정성에 미치는 pH의 영향은 pH 4.0에서 5.5 사이에 비교적 안정하였으며, pH 안정성은 *Penicillium wortmanni*가 생산한 β -xylosidase 효소들이 pH 5.0에서 6.0 사이에서 안정하다는 Matsuo 등(5)의 보고와 유사하였다. 열에 대한 효소 안정성은 55°C에서 10분간 처리하여도 안정하였으며, 60°C에서 10분간 처리시 약 5%, 65°C에서 약 38%, 70°C에서 약 62%, 75°C에서 약 85%의 활성이 소실되었으며, 80°C에서 10분에 완전히 실활되었다(Fig. 7). 이러한 결과는 *Trichoderma viride*(15)가 생산한 β -xylosidase가 55°C에 안정하다는 보고와 일치하였으며, *Penicillium wortmanni*(5)가 생산한 β -xylosidase 효소들 중 xylosidase-2가 60°C까지 안정하였다는 보고보다 열에

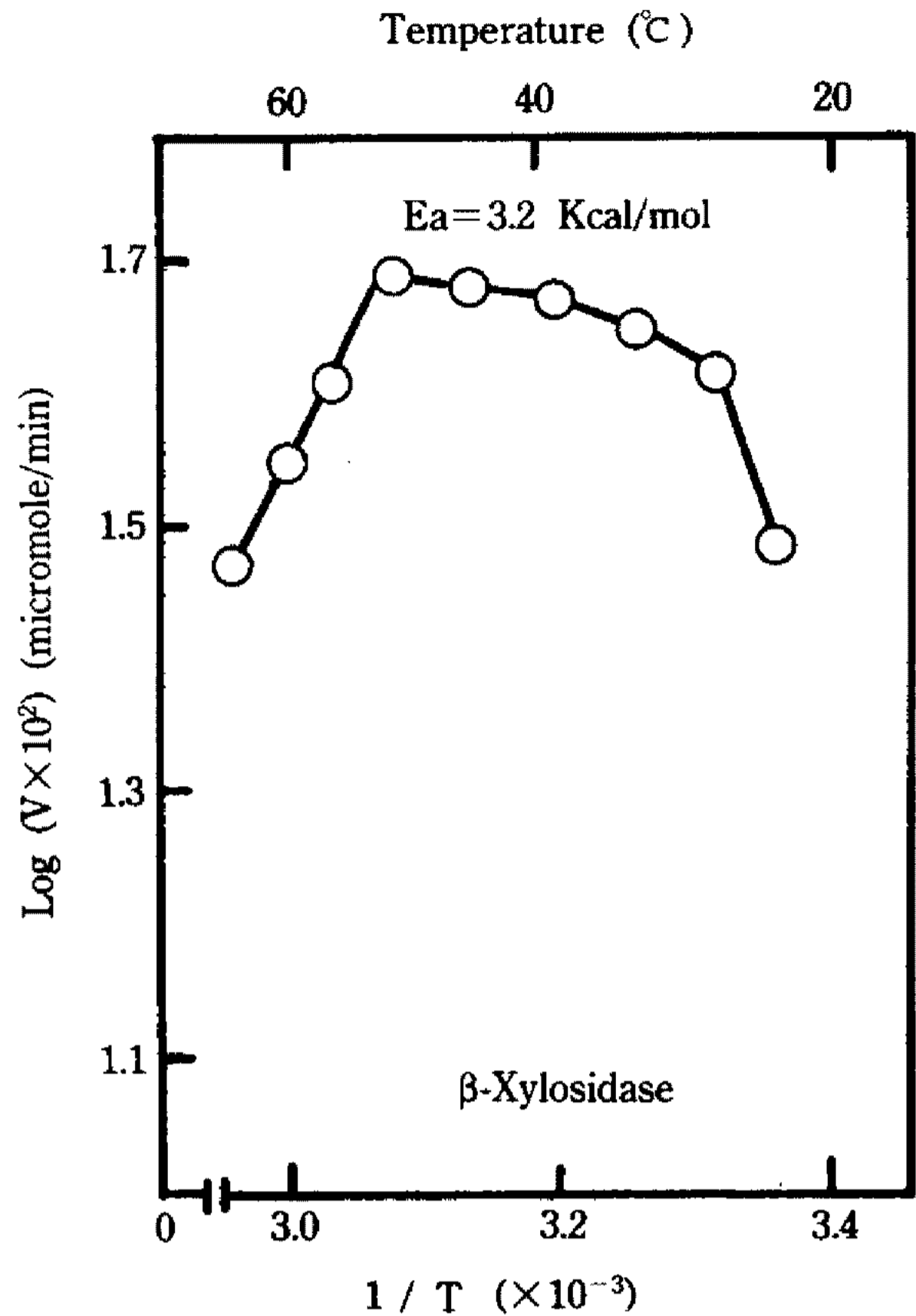


Fig. 6. Activation energy on PNPX hydrolysis. Buffer used was 0.02 M sodium citrate buffer (pH 4.5) for the β -xylosidase. Reducing sugar was determined by Somogyi's method.

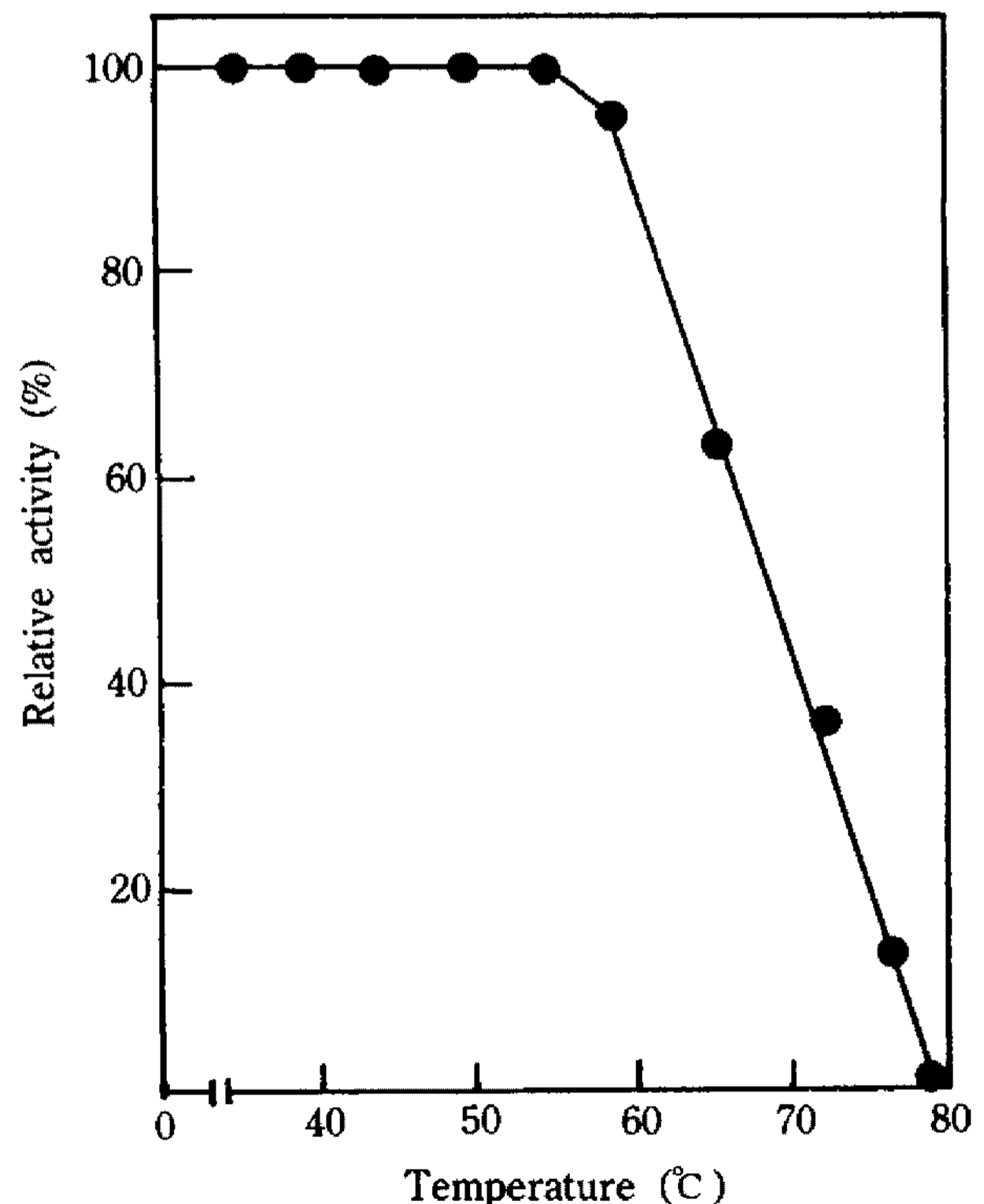


Fig. 7. Effects of temperature on the stability of extracellular β -xylosidase.

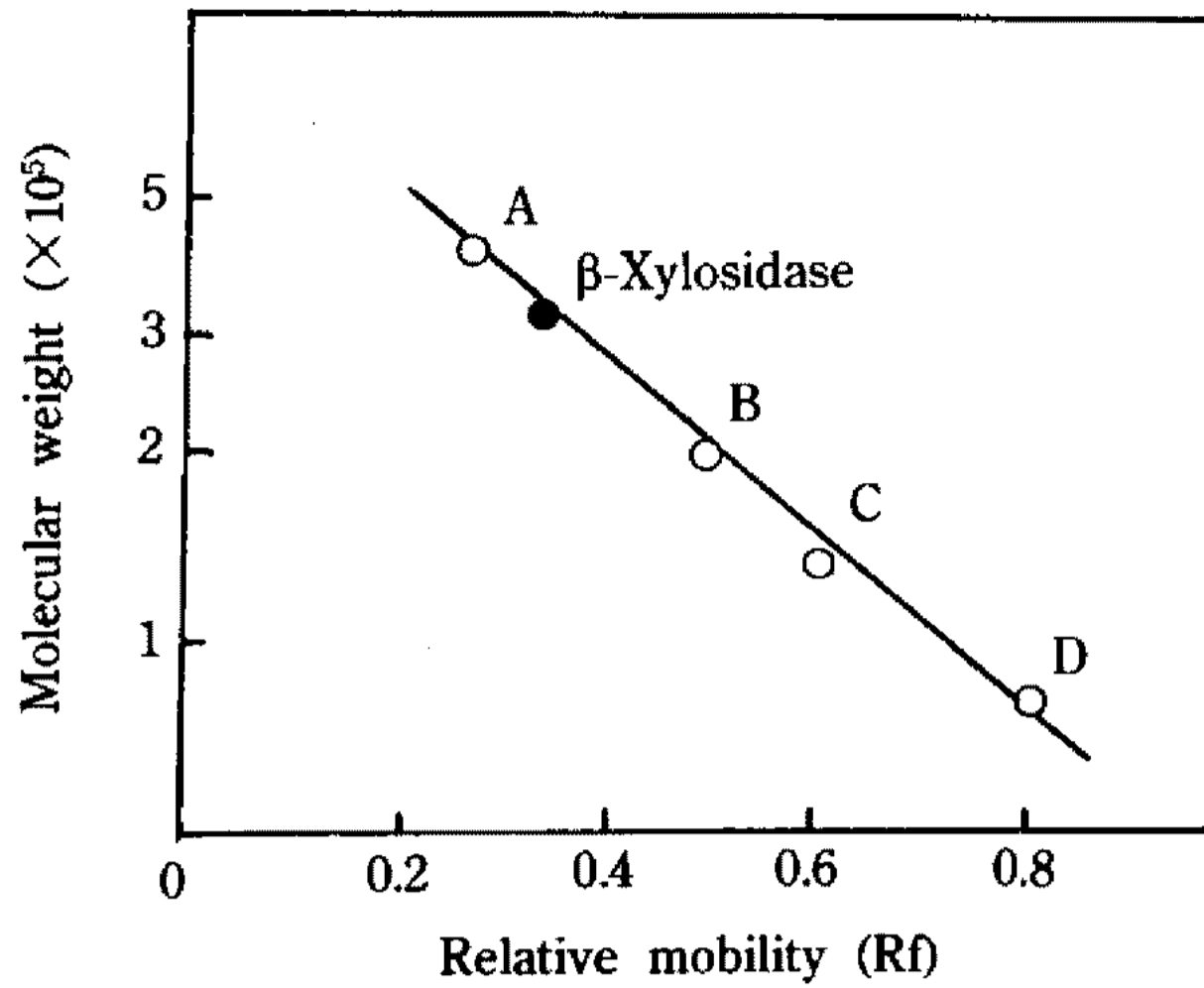


Fig. 8. Determination of the molecular weight of the purified β -xylosidase by 5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

A: apoferritin, B: β -amylase, C: alcohol dehydrogenase, D: bovine serum albumin

대한 안정성이 낮았다.

분자량: Sephadex G-200에 의한 gel 여과에 의해 효소의 분자량을 측정된 결과, 정제된 β -xylosidase의 분자량은 약 300,000으로 추정되었으며, SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 지금까지 보고된 바 없는 분자량 약 310,000의 monomer로 추정되었다 (Fig. 8). 세포외 β -xylosidase의 경우 그 기원에 따라 분자량이 아주 다양하다. *Aspergillus niger*(6)가 생산한 β -xylosidase는 Sepharose 6B gel 여과에 의해 분자량 약 480,000, SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 128,000의 tetramer이었으며, *Chaetomium trilaterale*(13)이 생산한 β -xylosidase는 Sephadex G-200 gel 여과에 의해 분자량 약 240,000, SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 118,000의 dimer로 보고되었으며, *Bacillus* K-17(16)이 생산한 β -xylosidase는 SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 분자량 약 51,000, *Emericella nidulans*(14)가 생산한 β -xylosidase는 Sephadex G-200 gel 여과에 의해 분자량 약 240,000, SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의해 116,000의 dimer이었고, *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48(17)이 생산한 β -xylosidase는 Sephadex G-200 gel 여과에 의해 분자량 약 26,000으로 보고되었다.

기질 특이성 및 기질 농도의 영향

기질특이성: 각종 glycoside에 대해서 기질 특이성을 검토한 결과, 2 mM xylobiose에 대한 β -xylosidase 활성을 100으로 하였을 때, 2 mM xylotriose, xylo-

Table 2. Hydrolysis of various glycosides and synthetic glycosides by purified β -xylosidase

Glycosides (%)	Concentration	Relative activity
Glycosides		
Xylopentaose	2 mM	79.8
Xylo-tetraose	2 mM	85.7
Xylo-triose	2 mM	92.1
Xylo-biose	2 mM	100
Cellobiose	2 mM	0.5
Laminarin	2 mM	0.0
Xylan(oat spelt)	1%	20
Soluble starch	1%	0.0
DDS	1%	8
CMC	1%	0.1
Synthetic glycosides		
ONPG	2 mM	0.4
PNGP	2 mM	5.1
PNPX	2 mM	100
MXP	2 mM	0

ONPG: o-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNGP: p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, PNXP: p-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside, MXP: methyl- β -D-xyloside

raose, xylopentaose를 각각 92%, 86%, 80% 가수분해하였고, 1% xylan을 20% 분해하였으며, 1% DDS를 8% 분해하였고, CMC를 소량 분해하였으며, laminarin, soluble starch는 분해하지 못하였다(Table 2). 합성 기질에 대한 가수 분해율은 2 mM PNXP를 2 units/ml의 β -xylosidase로 가수분해하여 생성된 p-nitrophenol을 100으로 하였을 때, ONPG를 0.4%, PNGP를 5.1% 가수분해 하였고, MXP에는 전혀 작용하지 못하였다(Table 2). *Penicillium* sp. FX-102가 생산하는 β -xylosidase가 ONPG와 PNGP를 분해하는 현상은 β -glucosidase 활성과 함께 공존함을 시사하며, *Chaetomium trilaterale*의 β -xylosidase 활성이 β -glucosidase 활성과 함께 공존한다는 Uziie 등(6, 13)의 보고와 *Stachybotrys atra*의 정제된 β -glucosidase 활성이 β -xylosidase 활성을 나타내며, 이들 두 효소 활성이 같은 효소에 기인한다는 Bruyne 등(19)의 보고와도 일치하는 결과였다. 그러나, 이들 두 효소 활성에 관계하는 독립적인 촉매 부위가 존재한다는 반대 의견도 있다(20, 21). 따라서, 정제된 β -xylosidase와 β -glucosidase 활성이 같은 촉매 부위에 존재하는지의 공존 여부에 관하여는 추후 동력학적 연구를 통해 검토할 예정이다. 또한, MXP 분해에 관하여는 *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48의 β -xylosi-

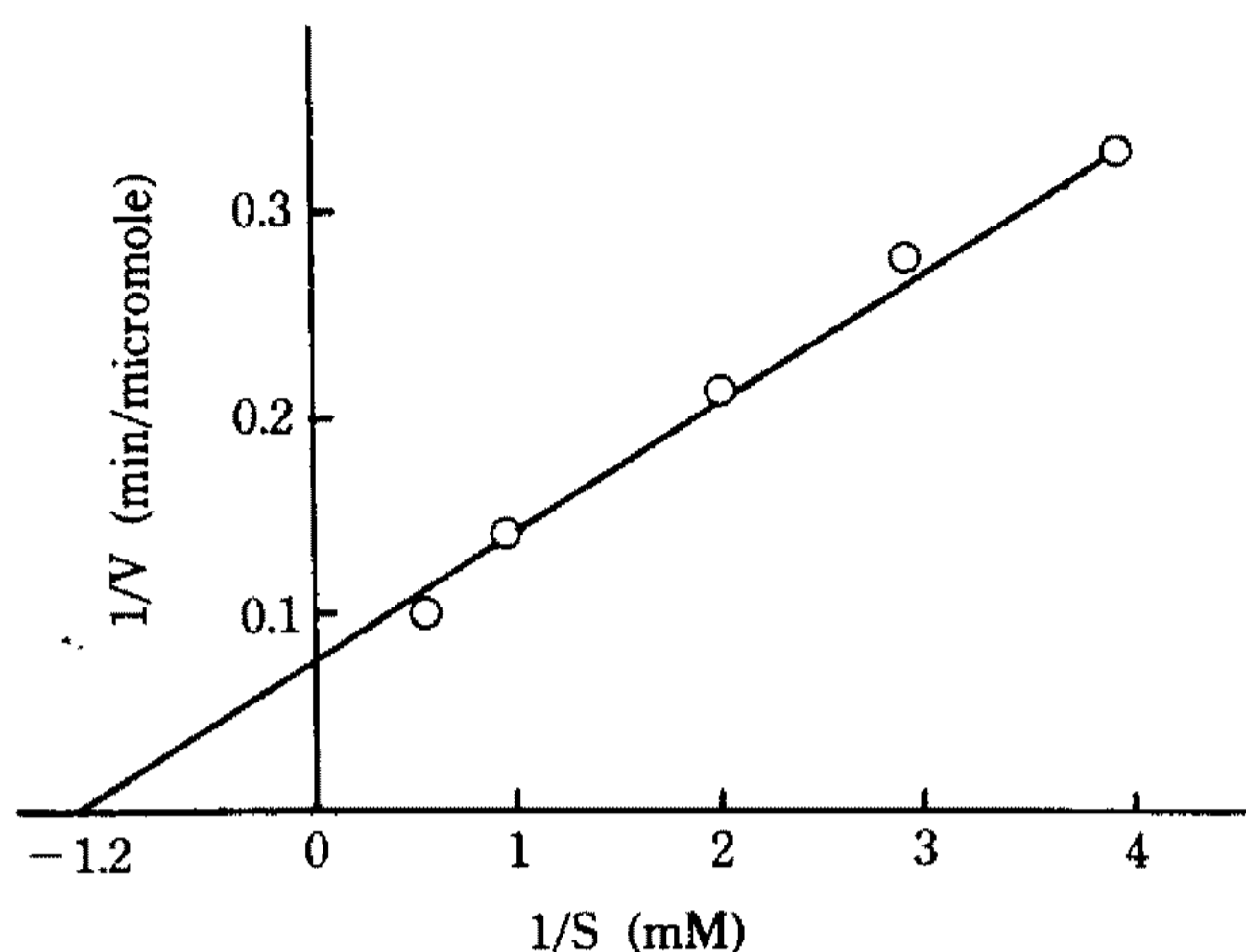


Fig. 9. Lineweaver-Burk plot of β -xylosidase.

Table 3. Effects of various metal ions and some reagents on the activity of extracellular β -xylosidase

Reagents	Relative activity (%)		
	1.0 mM	0.1 mM	0.01 mM
None	100	100	100
Metal Ions			
MnCl ₂	95	92	
ZnCl ₂	100	86	
CdCl ₂	96	101	
SnCl ₂	70	84	
HgCl ₂	0	15	30
MgCl ₂	97	89	
BaCl ₂	106	89	
CoCl ₂	92	95	
SrCl ₂	103	88	
CaCl ₂	109	96	
KCl	91	100	
FeCl ₂	61	82	
FeCl ₃	27	51	
CuSO ₄	32	67	
AgNO ₃	0	36	58
Reagents			
SDS	92	96	
EDTA	91	95	
NBS	0	0	42
p-CMB	0	82	98
L-Cystein	100	95	
Na ₂ HAsO ₄	103	86	
PCP	95	94	
2-Mercaptoethanol	98	92	
MIA	85	80	
TCA	104	100	

SDS: sodium dodesylsulfate, EDTA: ethylenediaminetetraacetate, NBS: *n*-bromosuccinimide, *p*-CMB: *p*-chloromercuribenzoate, PCP: pentachlorophenol, MIA: monoiodoacetate, TCA: trichloroacetate

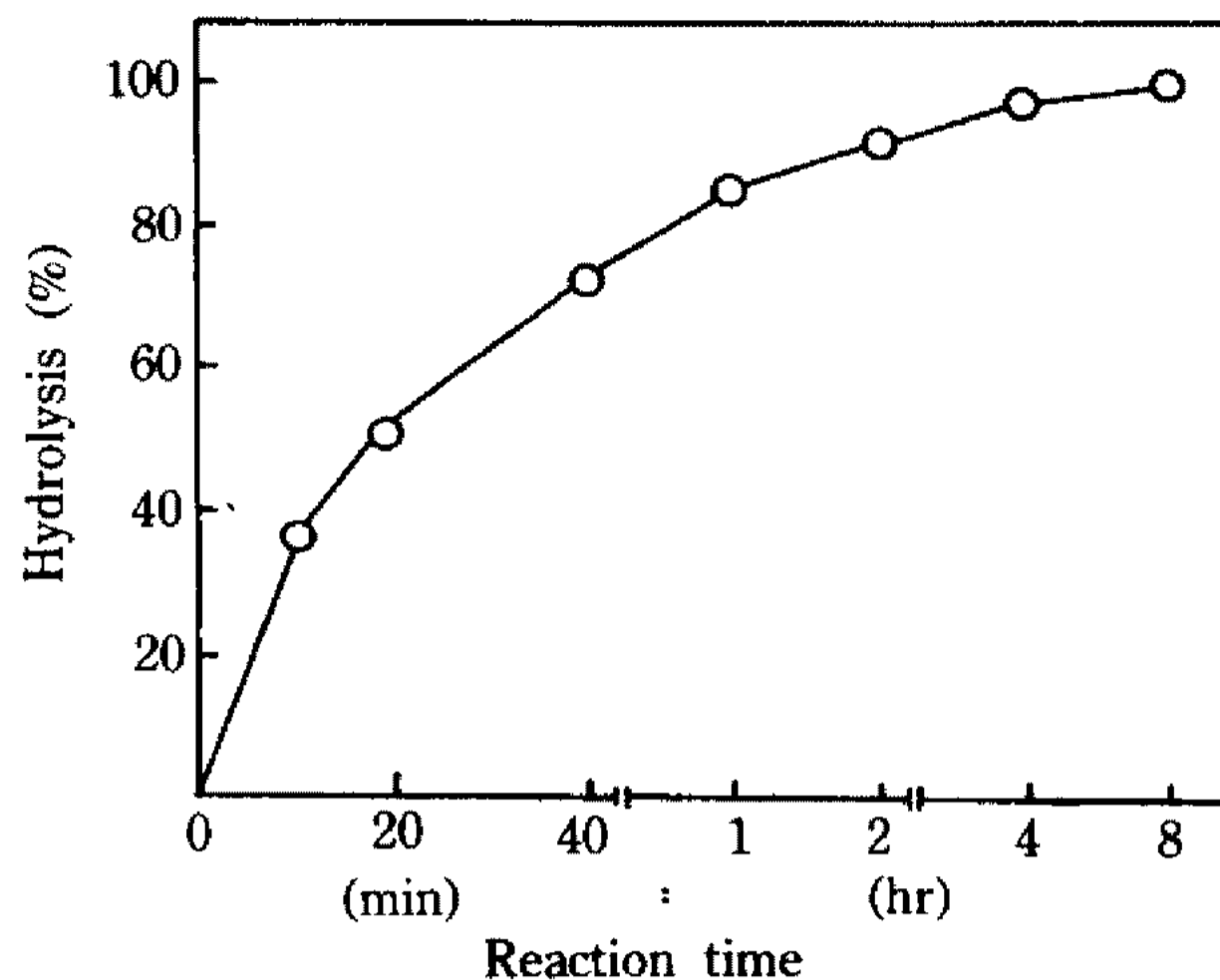


Fig. 10. Time course of hydrolysis of xylobiose by β -xylosidase.

dase가 MXP를 분해하지 않았다는 Win(25)의 결과와 일치하였으나, *Aspergillus niger*의 β -xylosidase는 MXP를 분해하였다는 Takenishi 등(23)의 보고와는 상반되는 결과를 나타내었다.

Km 및 V_{max}: 0.02 M Sodium citrate buffer(pH 4.5)에서 β -xylosidase의 PNPX에 대한 Km 값을 Lineweaver-Burk plot(24)으로부터 측정된 결과, Km 값은 0.83 mM/m^l이었으며, V_{max}는 1.33 mole/min이었다(Fig. 9).

금속 이온 및 효소 저해제의 영향: β -xylosidase 활성에 미치는 금속 이온의 영향은 1 mM Hg²⁺ 및 1 mM Ag²⁺에 완전히 활성이 저해되었으며, 0.1 mM Hg²⁺에 85%, 0.01 mM Hg²⁺ 및 1 mM Fe³⁺, Cu²⁺에 70% 저해되었다. 효소 저해제가 β -xylosidase 활성에 미치는 영향을 검토한 결과, 1 mM NBS, *p*-CMB 및 0.1 mM NBS에 강하게 저해되었으며, 0.01 M NBS에 60% 저해되었다(Table 3). 이러한 결과는 *Penicillium wortmanni*(5)가 생산하는 β -xylosidase가 1 mM NBS, *Trichoderma viride*, *Chaetomium trilaterale*, *Penicillium wortmanni* IFO 7237 및 *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48 등(5, 13, 15, 22)의 β -xylosidase가 1 mM Hg²⁺ 및 NBS에 강하게 저해되었다는 결과와도 유사하였다.

Xylobiose에 대한 β -xylosidase의 가수분해율과 가수 분해 산물의 검정

Xylobiose는 반응 20분에 50%, 40분에 70% 정도 분해되었고, 반응 8시간에 완전히 분해되었다(Fig. 10). 10 mM xylobiose에 대한 정제된 β -xylosidase의 가수 분해 산물을 TLC에 의해 검정한 결과, 반응 20분부터 단당인 xylose가 검출되었고, 반응 8시간에 완전히

요 약

Penicillium sp. FX-102로부터 세포의 β -xylosidase를 생산한 후, 효소를 정제하여 효소학적 성질을 검토하였다.

세포의 β -xylosidase는 배양 상등액으로부터 40~80% 황산 암모늄 분획, CM-Cellulose column chromatography, Sephadex G-200에 의한 gel 여과 및 isoelectric focusing에 의해 정제되었으며, 비활성은 400(units/mg), 회수율은 약 4.8%로 약 190배 정제되었다. 정제된 β -xylosidase의 $E_{1cm}^{1\%}(280\text{ nm})$ 는 10.4이었으며, 3.2%의 당 함유 glycoprotein이었다. 효소 활성 최적 pH는 4.5이었으며, 반응 최적 온도는 50°C였으며, 활성화 에너지는 3.2 Kcal/mol이었다. β -Xylosidase는 sodium citrate buffer pH 4.5에서 안정하였으며, 열에 대한 안정성은 50°C에서 10분에 안정하였으나, 80°C에서 10분에 완전히 실활되었다. 분자량은 Sephadex G-200에 의한 gel 여과에 의하여 약 300,000, SDS polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 분자량 약 310,000의 monomer로 추정되었으며, β -xylosidase의 등전점은 4.4이었다. PNPX에 대한 β -xylosidase의 K_m 값은 0.83 mM/m/이었으며, 기질 특이성은 laminarin, soluble starch를 분해하지 못하였으며, 합성 기질인 ONGP와 PNGP를 분해하였으므로 본 효소는 β -glucosidase 활성과 공존하고 있음을 추정할 수 있었다.

β -Xylosidase는 Hg^{2+} , Ag^{2+} , *n*-bromosuccinimide 및 *p*-chloromercuribenzoate에 강하게 활성이 저해되었다. 2 units/ml의 정제된 β -xylosidase는 10 mM xylobiose를 반응 8시간에 완전히 분해하였다.

감사의 말

본 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비 지원(KOSEF 921-0400-044-1)에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. 田中三男. 1980. 셀로스성 資源의再利用. 醱酵工學 58: 145-155.
2. Yasui, T., B.T. Nguyen, and K. Nakanishi. 1984. Inducers for xylanase production by *Cryptococcus flavus*. *J. Ferment. Technol.* 62: 353-359.
3. Mackenzie, C.R., D. Bilous, H. Schneider, and K.G. Johnson. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme system in *Streptomyces* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 153: 2835-2839.

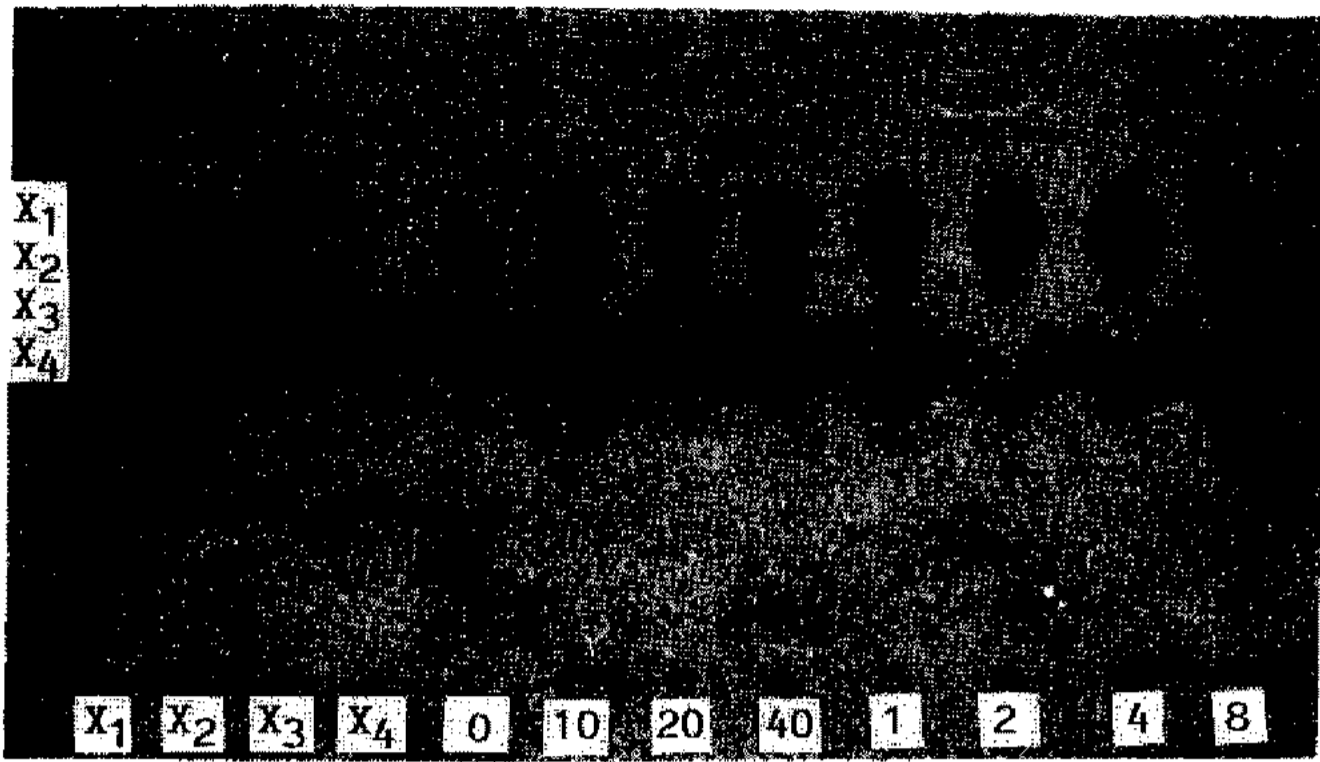


Fig. 11. Thin layer chromatogram of xylobiose hydrolysates by β -xylosidase.

X₁: xylose, X₂: xybiose, X₃: xylotriose, X₄: xyloetraose as standard

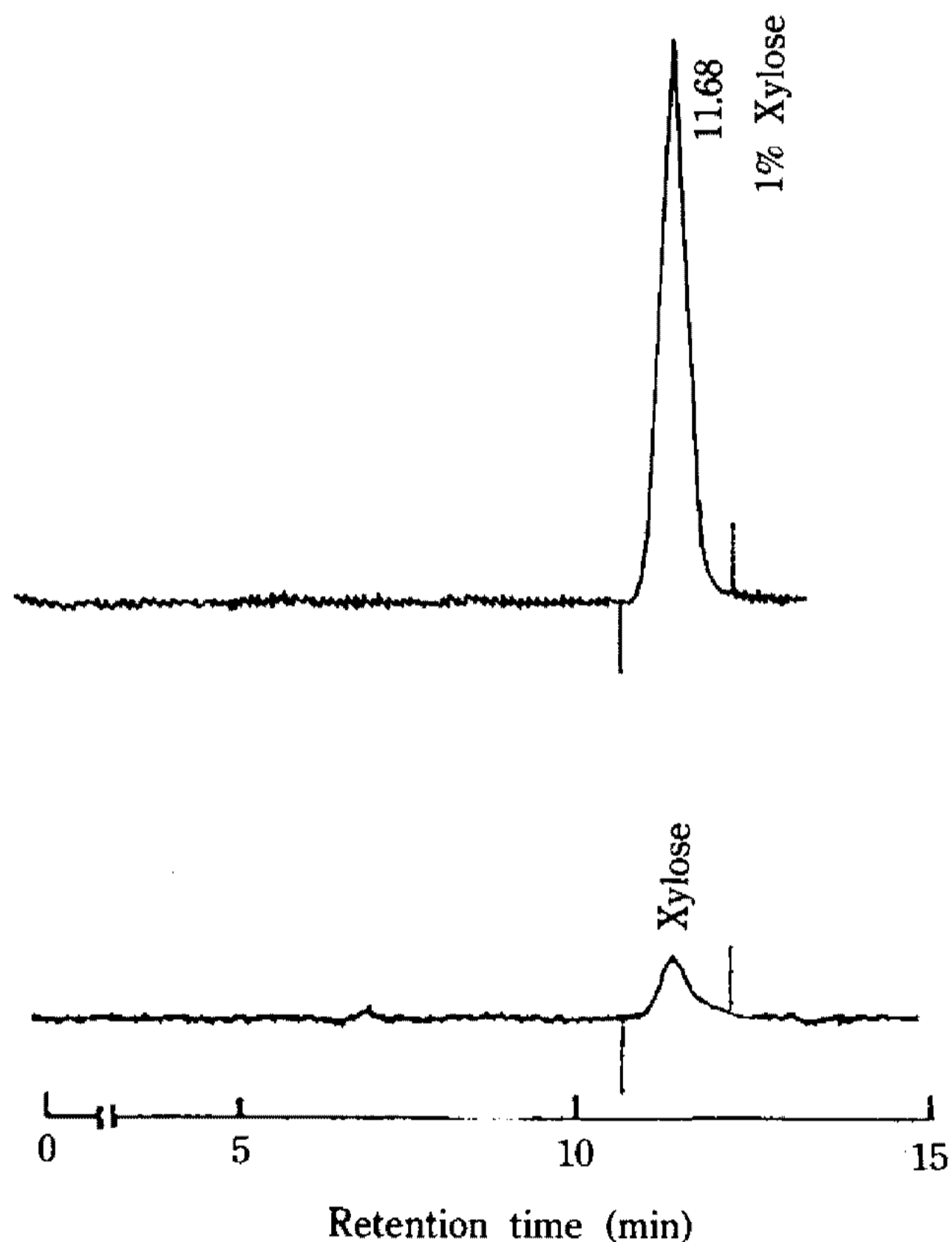


Fig. 12. HPLC of xylobiose hydrolysates by β -xylosidase.

xylose로 분해되었다(Fig. 11). 이러한 결과는 *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48이 생산하는 β -xylosidase가 2% xylobiose를 7시간에 완전히 분해하였다는 Matsuo 등(22)의 보고와도 유사하였으며, Win 등(25)의 *Penicillium wortanni* IFO 7237이 생산하는 β -xylosidase와 같은 transxylosilation activity는 없었으며, HPLC에 의한 정량 분석에 의해서도 같은 결과를 얻었다(Fig. 12).

4. Mishra, C., S. Keskar, and M. Rao. 1984. Production and properties of extracellular endoxylanase from *Neurospora crassa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 224-228.
5. Matsuo, M., A. Fujie, M. Win, and T. Yasui. 1987. Four types of β -xylosidase from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2367-2379.
6. Uziie, M., M. Matsuo, and T. Yasui. 1985. Purification and some properties of *Chaetomium trilaterale* β -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1159-1166.
7. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal. 1951. Proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* **91**: 222-233.
8. Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
9. Dubois, M., K.A. Hamilton, P.A. Rebers, and F. U.K. Laemmi. 1970. *Nature* **227**: 680-681.
10. Andrews, P. 1965. The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606.
11. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weights determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
12. Somogyi, M.J. 1952. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-20.
13. Uziie, M., M. Matsuo, and T. Yasui. 1985. Possible identity of xylosidase and β -glucosidase of *Chaetomium trilaterale*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1167-1173.
14. Matsuo, M. and T. Yasui. 1984. Purification and some properties of β -xylosidase from *Emericella nidulans*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1853-1860.
15. Matsuo, M. and T. Yasui. 1984. Purification and some properties of β -xylosidase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1845-1852.
16. Sung, N.K., I.S. Kang, H.K. Chun, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1987. Purification and properties of extracellular β -xylosidase from alkalophilic *Bacillus* sp. K-17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 267-272.
17. Matsuo, M., T. Yasui, and T. Kobayashi. 1977. Purification and some properties of β -xylosidase from *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No.48. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1593-1599.
18. Lee, H.J., Y.D. Choi, and M.H. Han. 1983. Studies of hemicellulose system in *Aspergillus niger* (II). *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 93-100.
19. De Bruyne, C.K., G.M. Aerts, and R.L. De Gussem. 1979. *Eur. J. Biochem.* **102**: 257.
20. Grover, A.K., D.D. Macmurchie, and R.J. Cushley. 1977. *Bio. Chem. Biophys. Acta.* **482**: 98.
21. Grover, A.K. and R.J. Cushley. 1977. *Bio. Chem. Biophys. Acta.* **482**: 109.
22. Matsuo, M., T. Yasui, and T. Kobayashi. 1977. Enzymatic properties of β -xylosidase from *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* No. 48. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1601-1606.
23. Takenishi, S., Y. Tsujisaka, and J. Fukumoto. 1973. *J. Biochem.* **73**: 335.
24. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
25. Win, M., Y. Kamiyama, M. Matsuo, and T. Yasui. 1988. Transxylosylation products of xylobiose by β -xylosidase from *Penicillium wortmanni* IFO 7237. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 1151-1158.
26. Vesterberg, O. 1981. *Method in Enzymology* 22, Pp. 389-390. Academic press, New York.
27. Kitprechavanich, V., M. Hayashi, and S. Nagai. 1986. Purification and characterization of extracellular β -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1703-1711.

(Received September 6, 1994)