

## *Pseudomonas* sp. CB-33이 생산하는 $\beta$ -Xylosidase의 특성

유진환 · 김현구<sup>1</sup> · 김치경 · 임재운\*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>영동전문대학 호텔조리과

**Characterization of  $\beta$ -xylosidase from *Pseudomonas* sp. CB-33.** Jin-Whan Yu, Hyun-Ku Kim<sup>1</sup>, Chi-Kyung Kim and Jai-Yun Lim\*. Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Koera, <sup>1</sup>Department of Culinary, Young Dong Junior College, 213-840, Korea — The  $\beta$ -xylosidase was purified 99-fold from the culture supernatant of *Pseudomonas* sp. CB-33 by ammonium sulfate precipitation, PEI precipitation, DEAE-Sephadex column chromatography, Sephadex G-75 gel filtration chromatography and preparative disc gel electrophoresis. Molecular weight of the enzyme was estimated to be 44,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The enzyme has a pH optimum for activity at 7.0 and is stable over pH 6.5~9.0. The optimal temperature of the enzyme was 45°C, and its enzymatic activity was completely inactivated at 55°C for 30 min. Km value of the enzyme for *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside was calculated to be 4.6 mM. The effect of various reagents on the  $\beta$ -xylosidase activity was investigated. The enzyme activity was completely inhibited by Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup>. The  $\beta$ -xylosidase was inactivated by tryptophan-specific reagent, N-bromosuccinimide and tyrosine-specific reagent, iodine. The enzyme could degrade xylo-oligosaccharides to xylose and the enzyme was competitively inhibited by xylose. The  $\beta$ -xylosidase and endoxylanase from *Pseudomonas* sp. CB-33 hydrolyzed xylan synergically. The purified enzyme also showed  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity.

자연계에 풍부하게 존재하는 hemicellulose의 주 구성성분인 xylan은 xylan 분해효소에 의해 xylose로 분해된 다음 *Pachysolen tannophilus*(1), *Candida shehatae*(2), *Pichia stipitidis*(3), 그리고 *Candida tropicalis*(4)와 같은 xylose 발효균에 의해 ethanol로 전환될 수 있다. Xylan은 최근 대체에너지원인 알콜생산의 기질로서 주목을 받고 있을 뿐만 아니라, butanol과 butanediol(5)과 같은 유기용매, xylitol(6, 7)과 같은 감미료 생산원료로서도 그 이용이 기대되고 있는 중요한 biomass 자원이다(8).

Xylan과 같은 고분자 물질을 효율적으로 이용하기 위해서는 xylose와 같은 구성 단위물질로 전환하는 공정이 선행되어야 한다. 이와같은 전환공정에는 산 또는 알칼리에 의한 가수분해 공정과 효소에 의한 전환공정이 있다. 전자의 경우에는 반응 속도가 빠르다는 장점이 있으나 당화 과정에서 섬유소의 분해산물과 함께 생성될 수 있는 유해물질이 미생물의 발효를 저해할 수 있다. 이에 비해서 효소 당화법은 상온 상압에서 반응이 가능하고 또 당화산물이 다음단계의 발효기질로 활용시 불순물에 의한 발효 저해를 유발하지 않는 등 많은 장점이 있기 때문에 화학적 당화보다는 미생물 효소에 의한 효소학적 당화가 보다 유리하다(9). 그러므로 xylan의 산업적이용을 위해서는 화학적 분해법에 비해 많은 장점을 가지고 있는 효소적 분해법을 이용한 D-xylose의 경제적 대량 생산이 중요한 선결과제라 하

겠다.

Xylan 분해에 xylanase와 함께 가장 중요한 역할을 하는  $\beta$ -xylosidase는 대부분의 hemicellulose 분해균주에서 생산되며, *Aspergillus niger*(10), *Aspergillus fumigatus*(11), *Penicillium wortmanni*(12), *Trichoderma viride*(13), *Chaetomium trilaterale*(14) 등 많은 종류의 곰팡이에서 분리 정제되어 그 물리 화학적 특성이 연구되었다. 그러나 지금까지 보고된 세균에서 생산되는 대부분의  $\beta$ -xylosidase는 intracellular enzyme이며 fungal  $\beta$ -xylosidase보다 산업적 응용성이 낮기 때문에 bacterial  $\beta$ -xylosidase에 대해서는 비교적 많은 연구가 이루어 지지 않았다. 그러나 본 연구실에서 분리한 *Pseudomonas* sp. CB-33은 endoxylanase와  $\beta$ -xylosidase를 체외로 분리하여 xylan을 분해하며 그 대부분을 D-xylose로 전환시킨다는 점에서 우수한 생물자원으로 평가할 수 있다.

본 연구에서는 상기 분리균으로부터 D-xylose의 생산에 중요한 역할을 하는  $\beta$ -xylosidase를 분리 정제하고 그 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 배양방법

자연계로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. CB-33을 탄소원을 xylan으로 대체한 Czapek-Dox 배지(0.5% xylan, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)에서 배양하였다. 균주의 대량배양은 배지 3 liter가 포함된 5 liter jar fer-

\*Corresponding author.

Key words:  $\beta$ -xylosidase, xylan, hemicellulose, *Pseudomonas* sp.

menter(한국 발효기)에서 수행하였다. 동일배지 200 ml에 30°C로 24시간 배양한 종균 배양액을 소포제(10%) 10 ml과 함께 접종하고, 300 rpm, 0.75 vvm의 조건으로 30°C에서 통기교반하며 37시간 동안 배양하였다. 배양액을 8,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 효소정제에 사용하였다.

### 효소반응액의 조제 및 활성측정

Xylanase 활성은 Somogyi와 Nelson의 환원당 정량 방법(15)을 사용하여 결정하였다. 1% xylan 용액 0.5 ml, 0.05M sodium phosphate(pH 6.5) 완충용액 0.5 ml에 효소 0.2 ml를 첨가하여 45°C의 수조에서 15분 동안 효소반응을 한 후 유리되는 환원당의 양을 측정하였다. Xylanase의 활성은 1분 동안 1  $\mu$ mole의 xylose를 생성하는 효소량을 1 unit로 계산하였다.

$\beta$ -Xylosidase 활성은 *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside(pNPX)을 기질로 이용하여 효소반응 후 유리되는 *p*-nitrophenol의 양을 측정하여 결정하였다. 0.1% pNPX 0.5 ml, 0.05M sodium phosphate(pH 7.0) 완충용액 0.4 ml에, 효소 0.1 ml를 첨가하여 45°C 수조에서 10분간 반응 시켰다. 반응액에 1M sodium carbonate( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) solution 2 ml를 첨가하여 효소반응을 중지시킨 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다(Beckman, Du-65 spectrophotometer, U.S.A).  $\beta$ -Xylosidase의 활성은 1분 동안 1  $\mu$ mole의 *p*-nitrophenol을 생성하는 효소량을 1 unit로 계산하였다.

### 단백질의 정량

단백질 양의 측정은 Sigma사의 단백질 정량 kit(No. p5656)를 사용하고 Lowry 등(16)의 방법으로 수행하였다.

### 효소의 정제

세포배양액을 4°C, 8,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 얻은 상등액을 효소원으로 이용하였다.

**Ammonium sulfate 침전법** 조효소액에 95% 포화 농도의 ammonium sulfate를 첨가하여 침전시킨 후, 침전물을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하였다. 침전 분리시킨 효소단백질을 0.02M sodium phosphate 완충용액(pH 7.5)에 12시간, 3회 투석하였다.

**DEAE-Sephadex column chromatography** 투석한 효소는 0.02M sodium phosphate(pH 7.5) 완충용액으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex column에 흡착시킨 후 0~1M NaCl로 linear gradient elution을 행하여 10 ml씩 분획하였다. 각 분획의 단백질 농도는 280 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

**Ultrafiltration** DEAE-Sephadex column chromatography에서 분획된 효소를 모은 후, NaCl을 제거하고 효소용액을 농축하기 위하여 Ultrafiltrator(TCF 10/

TCF 10A)를 이용하였다. Membrane은 Amicon PM 10 (>10,000 MW)을 사용하였다.

**Sephadex G-75 gel filtration chromatography** 농축한 효소용액을 0.02M sodium phosphate(pH 7.5) 완충용액으로 평형화시킨 Sephadex G-75 column(2×80 cm)을 이용하여 gel filtration을 실시하였다. 동일한 완충용액을 사용하여 elution시킨 다음 효소활성을 갖고 있는 분획을 모았다.

**Preparative disc gel electrophoresis** Gel filtration을 끝낸 후 preparative disc gel electrophoresis를 실시하였다. 전기영동은 Davis(17)의 방법을 기초로 하여 실시하였으며, gel의 조성은 separation gel의 경우 10%를, stacking gel의 경우 3% acrylamide를 사용하였다. 전기영동은 running buffer로 Tris-glycine buffer (100 mM, pH 8.3)를 사용하고, gel column(0.6×10 cm) 당 4 mA의 전류를 2.5시간 동안 통하게 하여 4°C에서 실시하였다. 전기영동이 끝난후 gel은 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색하고 methanol, acetic acid, water(3 : 1 : 6)의 용액으로 탈색하였다.

### pH 및 온도가 효소활성에 미치는 영향

pH 3~6의 구간은 McIlvaine 완충용액(0.1M), pH 6.5~8는 sodium phosphate 완충용액(0.1M), pH 8.5~10는 Clerk and Lubs 완충용액(0.1M), pH 10.5~11.5는 phosphate 완충용액(0.1M), pH 12~13의 구간은 hydroxide-chloride 완충용액(0.1M)을 사용하여 효소반응액을 각각의 pH로 맞추어 준 후 pH에 의한 영향을 조사하였다. pH에 대한 효소의 안정성 실험은 각각의 pH에서 48시간 동안 4°C에 방치한 후 잔존 효소활성을 조사하였다. 온도에 대한 영향은 10~60°C의 구간에서 효소반응을 수행하여 최적 반응온도를 조사하였고, 열에 대한 안정성의 검사는 10~55°C서 30분간 열처리한 후 잔존 효소 활성을 검사하였다.

### 분자량 측정

정제된  $\beta$ -xylosidase의 분자량은 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 Laemmli (18)의 방법에 준하여 측정하였다. 전기영동 gel은 10% acrylamide running gel(두께 1.2 mm)과 3% acrylamide stacking gel을 사용하였다. 상온에서 25 mA로 4~5시간 전기영동 하였다. 표준 단백질로는 phosphor-ylase B (97,400), bovine serum albumin (66,200), glutamate dehydrogenase (55,000), ovalbumin (42,700), aldolase (40,000), carbonic anhydrase (31,000), soybean trypsin inhibitor (21,500), lysozyme (14,400) (Promega Co. Mid-Range Protein Molecular Weight Markers)을 이용하였다. 전기영동 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 30분 동안 염색시킨 후, destaining solution I(50% methanol, 10% acetic acid)에서

30분, 그리고 destaining solution II(5% methanol, 7% acetic acid)로 탈색하였다.

**SDS-polyacrylamide disc gel electrophoresis**

Gel의 조성은 분자량 측정 방법과 동일하며, 전기영동 조건은 tube당 4 mA로 상온에서 4~5시간 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 Commassie brilliant blue G-250으로 염색한 후 5% methanol이 포함된 7.5% acetic acid로 탈색하였다.

**효소에 대한 금속이온의 영향**

효소활성에 영향을 줄 수 있는 금속이온들을 효소에 최종농도 1 mM과 10 mM로 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후에 효소활성을 측정하였다. 효소의 활성에 영향을 준  $Hg^{2+}$  경우에는 각 농도별로 효소와 처리한 후 활성억제 정도를 더 세밀하게 측정하였다.

**Paper chromatography**

효소의 반응산물을 Whatman No. 1 filter paper에 spotting하였다. 전개용매로는 n-butanol, acetic acid, water(4 : 3 : 3)를 사용하였고, 12시간 동안 전개하였다. 발색시약으로는 silver nitrate(19)를 사용하였다.

**기질특이성**

정제된 효소의 기질특이성을 알아보기 위하여 여러 기질에 대한 효소활성을 조사하였다. 기질로는 2.5 mM sucrose, 2.5 mM pNPX, 2.5 mM oNPX, 2.5 mM pNPA, 2.5 mM pNPGal, 1% oat spelt xylan, 1% cellulose, 1% carboxymethylcellulose를 사용하여 효소활성을 측정하였다.

**화학 변형시약의 영향**

효소의 활성부위에 존재하는 아미노산 잔기를 알아보기 위하여 amino acid 수식시약인 iodine, N-bromosuccinimide(NBS), glyoxal,  $\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonic acid(NQS), p-chloromercuri-benzoic acid(PCMB), N-ethylmaleimide, monoiodoacetic acid, sodium borohydride, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS), potassium cyanide 그리고 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid(DTNB)로 효소와 반응시켜 효소활성을 측정하였다. 화학 변형시약의 처리방법은 효소에 각각의 반응시약을 농도별로 처리하여 30°C에 일정시간 처리한 후 잔존 효소활성을 측정하였다.

**Chemical의 영향**

각종 chemical이 효소에 미치는 영향을 알아보기 위하여 0.1% SDS, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide와 6M urea를 각각 효소 반응액에 첨가한 후 10분간 반응시켜 효소활성을 측

정하였다.

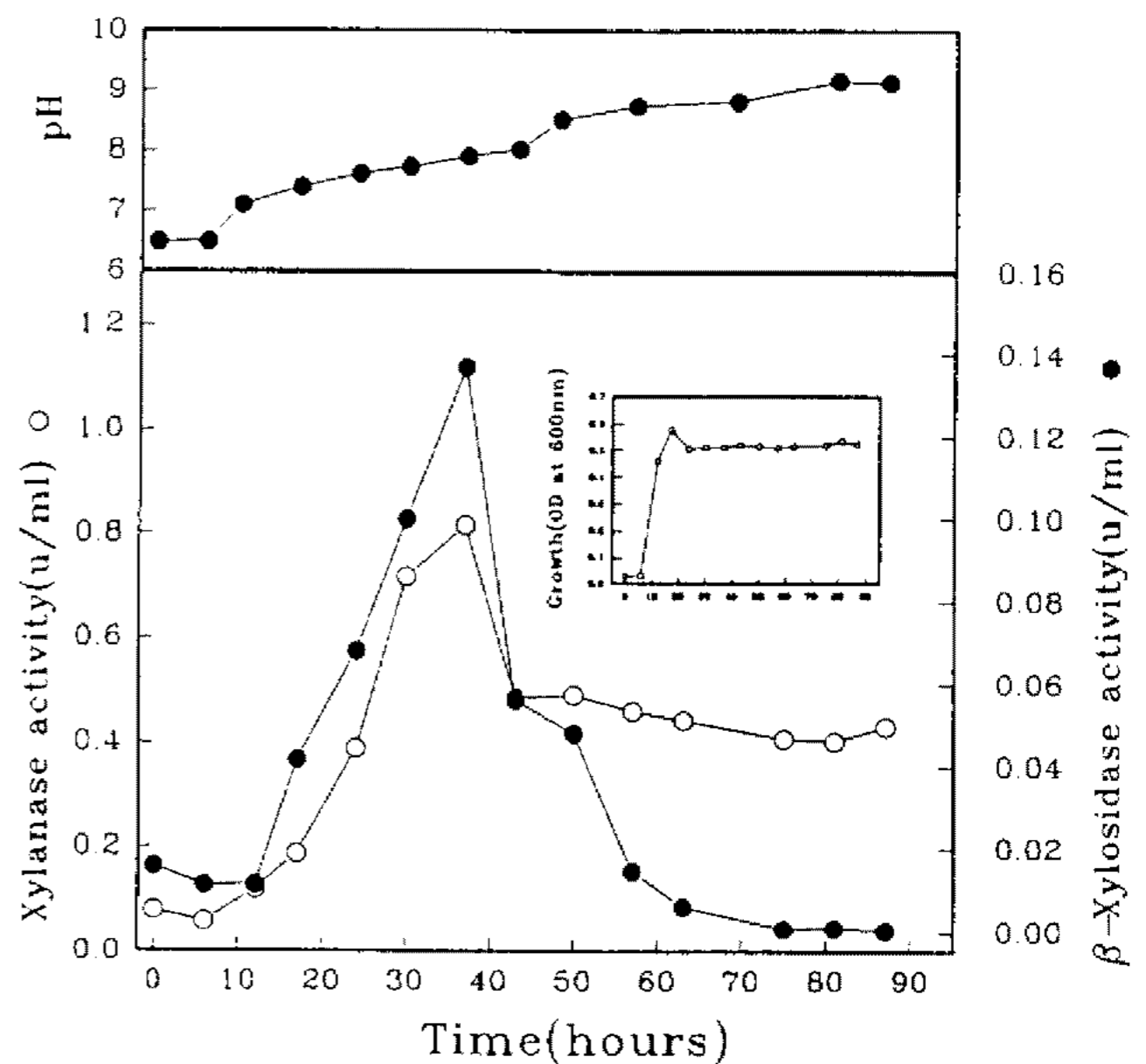
**Xylan 분해에 대한 협동작용**

Xylan에 대한  $\beta$ -xylosidase와 endoxylanase의 협동작용을 알아보기 위하여, 두가지 다른 xylan에 반응시킨 다음 환원당의 생성정도를 알아보았다. 0.5% xylan (oat spelt xylan 또는 birchwood xylan) 8 ml에 2 unit의 endoxylanase와 0.2 unit의  $\beta$ -xylosidase를 각각 또는 함께 첨가하여 30°C에서 반응시키면서 시간이 경과함에 따라 Somogyi와 Nelson의 환원당 정량방법을 사용하여 환원당의 생성량을 측정하였다. Endoxylanase는 *Pseudomonas sp. CB-33* 균주에서 분리한 효소를 사용하였다.

**결과 및 고찰**

**효소의 생산**

Fig. 1의 결과에서 보는 바와같이 *Pseudomonas sp. CB-33*의 성장은 17시간에 정지기에 달하였고 87시간까지 거의 일정한 수준을 유지하였다. Xylan 분해효소의 생산은 37시간에 최대에 달한 이후 활성이 떨어져 40시간 부터는 일정한 수준을 유지하였다. 효소활성의 급격한 감소는  $\beta$ -xylosidase 활성의 감소와 일치하였고, 이  $\beta$ -xylosidase가 전체적인 효소의 활성에 큰 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 배양시간에 따라 37, 50, 87시간대의 효소를 가지고 1% xylan과 반응시켜, 반응산물을 paper chromatography로 분석하였다. 위의



**Fig. 1. Time course of the cell growth and  $\beta$ -xylosidase production by *Pseudomonas sp. CB-33*.** Cultivation was carried out at 30°C and pH 6.5 in a 5-liter jar fermenter. It was aerated at 0.75 vol/vol per min and agitated at 300 rpm. Xylanase activity (○-○) and  $\beta$ -xylosidase activity (●-●) in the supernatant

Table 2. Effect of metal ions on the  $\beta$ -xylosidase activity

Metal ions*	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
None	100	100
HgCl <sub>2</sub>	0	0
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	4.7	0
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	15	4.5
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	49	35
ZnCl <sub>2</sub>	13	0
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	135	108
NaCl	141	70
MnCl <sub>2</sub> ·5H <sub>2</sub> O	104	75
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	109	91
KCl	106	112
LiCl <sub>2</sub>	129	77
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	49	11

\* $\beta$ -xylosidase was incubated with various metal ions at pH 7.0, 30°C for 30 min before assay of residual activity.

**화학 수식제의 영향** 각종 화학 수식제에 의한 효소활성의 저해를 Table 3에 나타내었다.  $\beta$ -xylosidase는 tryptophan specific reagent인 N-bromosuccinimide (NBS)와 tyrosine 변형 시약인 iodine에 의하여 불활성화 되었다. 그러나 sulfhydryl 변형시약(monoiodoacetic acid, *p*-chloromercuri-benzoic acid, *N*-ethylmaleimide 그리고 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid)과 lysine 변형시약인 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid와  $\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonic acid, 그리고 arginine 변형시약인 glyoxal에 의해서는 불활성화 되지 않았다. 정제된  $\beta$ -xylosidase는 가수분해 산물인 xylose에 의해 경쟁적으로 저해를 받았고, 이러한 product inhibition은 거의 모든  $\beta$ -xylosidase들에게서 공통적이다. 여러가지 금속염들과(Hg<sup>2+</sup> 포함) *p*-chloromercuribenzoate에 의해 대부분의  $\beta$ -xylosidase들의 활성이 저해되는데(10), *Pseudomonas* sp. CB-33이 생산하는  $\beta$ -xylosidase도 비슷한 양상을 보이고 있다. 효소에 *N*-bromosuccinimide(NBS)를 처리하였을 경우 효소활성이 저해된다는 사실은, 효소활성에 tryptophan 잔기가 중요하다는 것을 나타낸다. 이러한 NBS에 의한 효소활성의 저해는 거의 모든  $\beta$ -xylosidase에서도 공통적이지만, *Pseudomonas* sp. CB-33이 생산하는  $\beta$ -xylosidase는 NBS뿐 아니라 iodine에 의해서도 저해를 받아 tyrosine 잔기 또한 중요한 역할을 하리라 추정된다.

**Chemical의 영향** 각종 chemical의 효소에 대한 영향을 검토한 결과는 Table 4와 같았다. 방부제인 sodium azide를 1 mM 첨가시 76%의 잔존활성을 유지하였고 단백질 변성제인 SDS와 urea의 경우는 각각 0.1%와 6M의 농도에서 대부분의 활성을 상실하였다. Chelating agent인 EDTA의 경우도 효소의 활성에 영

Table 3. Effect of group-specific reagents on the  $\beta$ -xylosidase activity

Reagents*	Relative activity (%)	
	1 mM	10 mM
None	100	100
Iodine	0	0
<i>N</i> -bromosuccinimide	0	0
$\beta$ -naphthoquinone-4-sulfonic acid	101	154
2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid	79	95
Monoiodoacetic acid	79	70
Glyoxal	93	95
<i>p</i> -chloromercuri-benzoic acid	21	13
<i>N</i> -ethylmaleimide	95	78
5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid	104	61

\*Modification reactions were carried out at 30°C in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0. Modification reactions were initiated by adding reagents to the enzyme solution. Aliquots of reaction mixture were taken after 30 min incubation and subjected to activity assay.

Table 4. Effect of chemicals on the  $\beta$ -xylosidase activity

Chemicals*	Concentration	Relative activity (%)
None		100
SDS	0.1%	17.9
$\beta$ -mercaptoethanol	1 mM	93
EDTA	1 mM	57
Sodium azide	1 mM	76
Urea	6M	4.8

\*The effect of various chemicals on the enzyme activity was determined by adding reagent to the standard assay mixture.

향을 주었다.  $\beta$ -Mercaptoethanol, EDTA, SDS의 농도별 영향은 Fig. 7과 같았다. SDS의 경우 농도가 증가함에 따라 단백질 변성에 의한 활성의 감소를 알아 볼 수 있었고, EDTA도 효소의 활성을 저해하였다.

**Xylose에 의한 저해**  $\beta$ -Xylosidase의 반응산물인 xylose에 의한 산물저해의 기작을 알아보기 위해 xylose를 각 농도별로 반응액에 처리하여 효소활성을 측정하였다. Lineweaver-Burk plot으로 나타내어 본 결과  $\beta$ -xylosidase는 D-xylose에 의해 경쟁적으로 저해되었다(Fig. 8).

#### 기질특이성

여러 다른 기질에 대한 효소활성을 알아보았다(Table 5). 정제된 효소가 pNPX와 pNPA에 대해서 활성을 나타내어 두가지 기질에 대하여 작용하는 것을 알 수 있었다. 지금까지 보고된  $\beta$ -xylosidase 중에는 종종  $\beta$ -

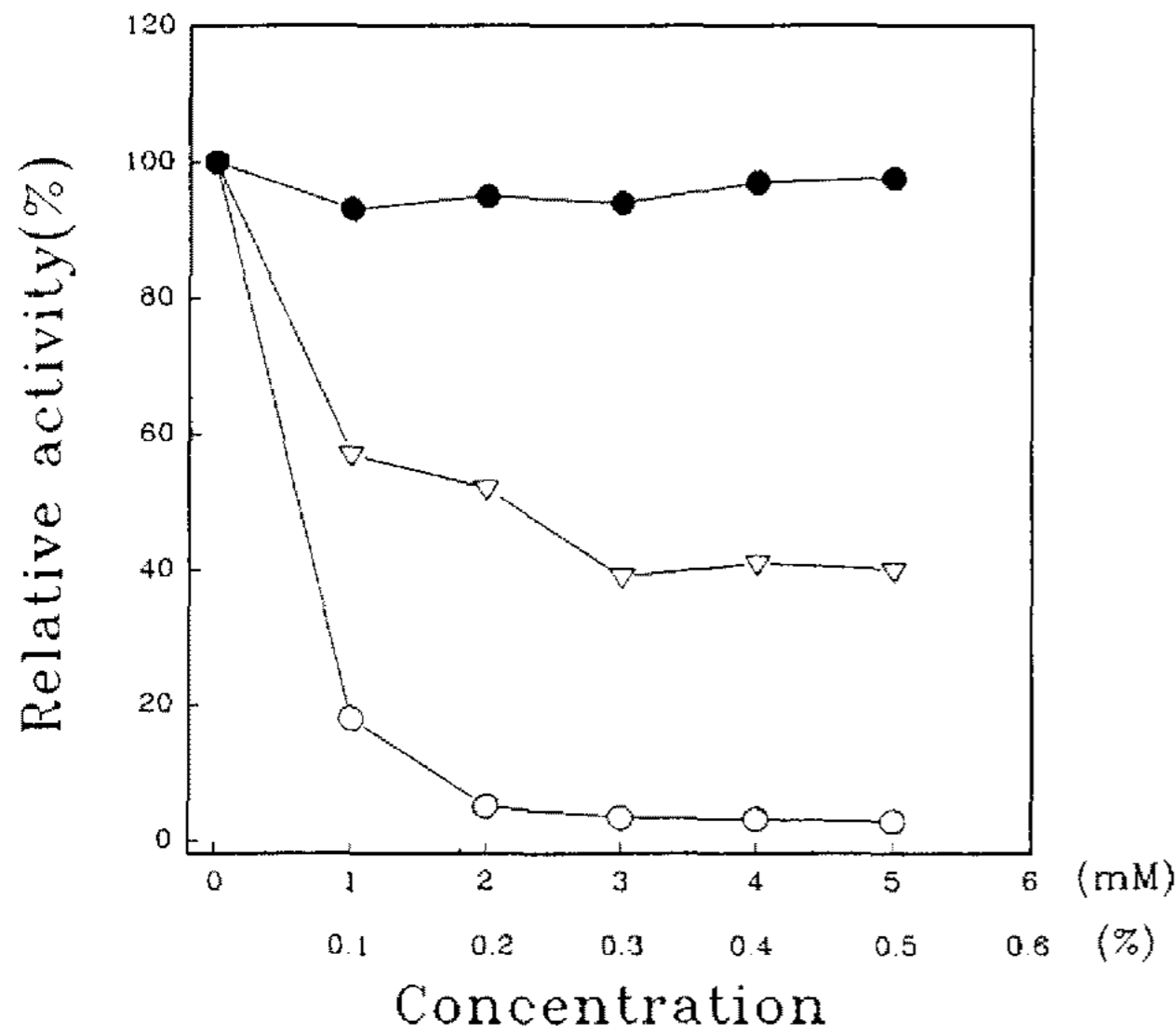


Fig. 7. Effect of  $\beta$ -mercaptoethanol, EDTA and SDS on the  $\beta$ -xylosidase activity.

●-●,  $\beta$ -mercaptoethanol;  $\triangle$ - $\triangle$ , EDTA;  $\circ$ - $\circ$ , SDS(%).

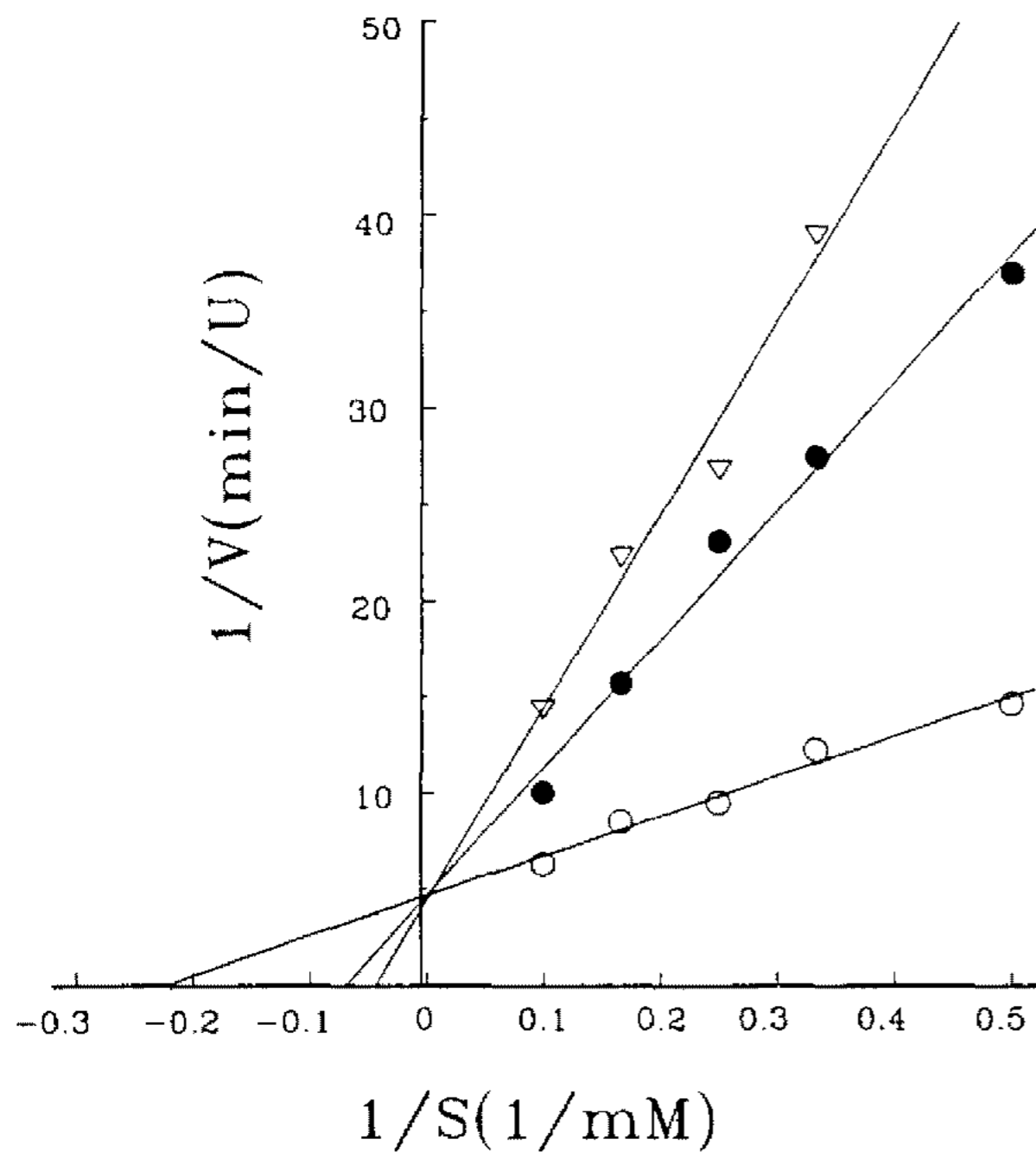


Fig. 8. Lineweaver-Burk plots for the  $\beta$ -xylosidase with pNPX as substrate, and showing competitive inhibition by xylose.

○-○, control; ●-●, 0.1M xylose;  $\triangle$ - $\triangle$ , 0.25M xylose.

glucosidase 활성(24) 또는  $\alpha$ -arabinofuranosidase 활성 (25-27)을 가진 효소들이 있다. *Pseudomonas sp. CB-33*으로 부터 정제된 효소는  $\beta$ -xylosidase 활성 뿐만 아니라 비교적 높은  $\alpha$ -arabinofuranosidase 활성도 보이고 있으므로, xylan 가수분해에 매우 유리할 것으로 생각되는 bifunctional enzyme인 것으로 추측되었다. 이렇게 두가지 기질에 대하여 활성을 가지는 것은 xylose에  $\alpha$ -1,3-glycosidic bond로 연결된 arabinofuranose 잔기의

Table 5. Substrate specificity of the purified  $\beta$ -xylosidase

Substrate*	Concentration	Relative activity (U/ml)
Xylan	1%	0
CMC	1%	0
Cellulose	1%	0
Sucrose	2.5 mM	0
<i>p</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	2.5 mM	0.36
<i>o</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside	2.5 mM	0
<i>p</i> -nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside	2.5 mM	0
<i>p</i> -nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside	2.5 mM	0.1

\*The substrate specificity of  $\beta$ -xylosidase was determined by adding substrate to the standard assay mixture.

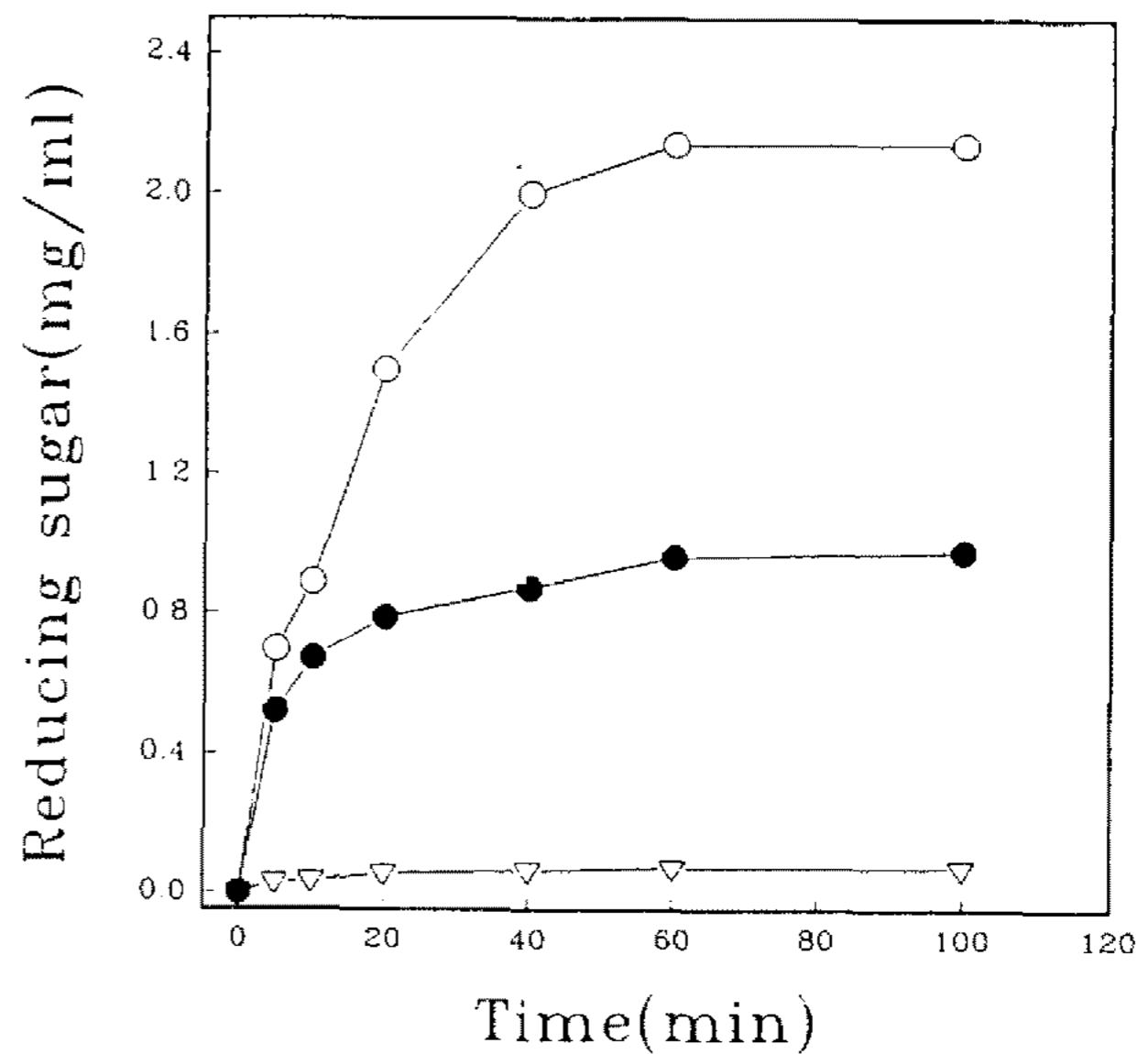


Fig. 9. Synergism between  $\beta$ -xylosidase and endoxylanase in the hydrolysis of birchwood xylan.

Birchwood xylan (40 mg) was hydrolyzed with 2 U of endoxylanase or combination with 0.2 U of  $\beta$ -xylosidase.  $\nabla$ - $\nabla$ ,  $\beta$ -xylosidase; ●-●, endoxylanase; ○-○, endoxylanase +  $\beta$ -xylosidase.

rotation이 xylose 잔기 사이의  $\beta$ -1,4-linkage conformation과 유사하여 하나의 활성부위가 두 효소의 활성을 나타내는 것으로 생각된다(26).

#### Xylan 분해에 대한 협동작용

Xylan에 대한  $\beta$ -xylosidase와 endoxylanase의 협동작용을 알아보기 위하여, 두가지 다른 xylan에 반응시킨 다음 환원당의 생성정도를 알아보았다. Endoxylanase는 birchwood xylan을 기질로 사용하였을 때 100분 동안

약 19% 정도의 가수분해도를 나타내었지만, endoxylanase와  $\beta$ -xylosidase를 함께 반응시켰을 때는 42% 정도의 가수분해도를 보여 2배 이상의 상승효과를 나타내었다(Fig. 9). 또한 기질로서 oat spelt xylan을 사용하였을 경우 100분 동안 약 25%의 가수분해도를 나타내었다. 따라서 *Pseudomonas* sp. CB-33 균주가 생산하는 두 효소는 초본식물에서 추출한 oat spelt xylan보다 목본식물에서 추출한 birchwood xylan을 더 효율적으로 분해하였다.

## 요 약

*Pseudomonas* sp. CB-33 균주의 배양 상등액으로부터 ammonium sulfate 침전법, PEI 침전법, DEAE-Sephadex column chromatography, gel column chromatography 그리고 preparative disc gel electrophoresis를 이용하여  $\beta$ -xylosidase를 정제하였다. 정제된 효소의 Km 값은 4.6 mM이었다. 효소활성의 최적 pH는 7.0이었으며 pH 6.5~9 범위에서 안정하였다. 최적 활성온도는 45°C였으며, 각 온도에서 30분 동안 정치하였을 때 35°C까지 안정하였다. SDS-PAGE에 의해 효소의 분자량을 측정해 본 결과 약 44,000 dalton이었다.  $Hg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  그리고  $Zn^{2+}$ 는 효소활성을 저해하였고, 여러 화학변형제로 효소에 처리해 본 결과 tyrosine과 tryptophan이 효소활성에 관여하고 있을 것으로 추정된다. 여러가지 기질에 대한 특이성을 조사해 본 결과 pNPX 뿐만 아니라 pNPA도 분해하였다. Xylan에 endoxylanase만을 작용시켰을 때보다  $\beta$ -xylosidase와 endoxylanase를 혼합작용 시켰을 때 xylan의 가수분해도는 약 2배 정도 증가하였다. 그리고 *Pseudomonas* sp. CB-33 균주가 생산하는 xylan 분해효소는 oat spelt xylan보다 birchwood xylan에 보다 효과적으로 작용하였다.

## 감사의 말

본 연구의 일부는 1994년도 교육부 기초과학육성연구비(과제번호: BSRI-94-4432)의 지원으로 이루어졌으며 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Sliniger, P.J., M.P.L. Bolen, and C.P. Kurtzman. 1987. *Pachysolen tannophilus*: Properties and process considerations for ethanol production from *D*-xylose. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 5-15.
- Du Preez, J.C. and J.P. van der Walt. 1983. Fermentation of *D*-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 357-362.
- Sliniger, P.J., R.J. Bothast, M.R. Ladish, and M.R. Okos. 1990. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 727-731.
- Lohmeiere-Vogel, E., K. Skoog, H. Vogel, and B. Hahn-H gerdal. 1989.  $^{31}P$  nuclear magnetic resonance study of the effect of azide on xylose fermentation by *Candida tropicalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1974-1980.
- Ernest K. C. Yu., L. Deschatelets, and J.N. Saddler. 1984. The combined enzymatic hydrolysis and fermentation of hemicellulose to 2,3-butanediol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 365-372.
- Meyrial, V., J.P. Delgenes, R. Moletta, and J.M. Navarro. 1991. Xylitol production from *D*-xylose by *Candida guilliermond* II: Fermentation behaviour. *Biotechnol. Lett.* **13**: 281-286.
- Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase, and S. Nagai. 1989. Conversion of *D*-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 356-360.
- Song, H.S. and Y.J. Choi. 1989. Production of xylanase by *Bacillus stearothermophilus*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 289-294.
- Gong, C.S., L.F. Chen, M.C. Flickinger and G.T. Tsao. 1981. Conversion of hemicellulose carbohydrates. *Adv. Biochem. Eng.* **20**: 93-118.
- Rodionova, N.A., I. Tavobilov, and A. Bezborodov. 1983.  $\beta$ -xylosidase from *Aspergillus niger* 15. Purification and properties. *J. Appl. Biochem.* **5**: 300-312.
- Kitpreechavanch, V., M. Hayashi, and S. Nagai. 1986. Purification and characterization of extracellular  $\beta$ -xylosidase and  $\beta$ -glucosidase from *Aspergillus fumigatus*. *Agric. Biol. Chem.* **50**: 1703-1711.
- Deleyn, F. and M. De Bruyne Ck. 1982.  $\beta$ -D-xylosidase from *Penicillium wortmanni*. *Meth. enzymol.* **83**: 639-644.
- Matsuo, M. and T. Yasui. 1984. Purification and some properties of  $\beta$ -xylosidase from *Trichoderma viride*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1853-1860.
- Uziie, M., M. Matsuo, and T. Yasui. 1985. Purification and some properties of *Chaetomium trilaterale*  $\beta$ -xylosidase. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1159-1166.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination. *J. Biol. Chem.* **153**: 375.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **153**: 65-275.
- Davis, B.J. 1964. Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227**: 680-685.
- Chaplin, M.F. 1986. Monosaccharides, p.15. In Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy (Editors), Carbohydrate analysis: a practical approach. Vol. 2. IRL press. Oxford, U.K.
- Lappalainen, A. 1986. Purification and characteriza-

- tion of xylanolytic enzymes from *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 437-448.
21. Lee, H.J., Y.D. Choi, and M.H. Han. 1983. Studies of hemicellulase system in *Aspergillus niger* (Purification and characterization of  $\beta$ -xylosidase). *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **11**: 93-100.
  22. Sung, N.K., I.S. Kang, H.K. Chun, T. Akiba, and K. Horikoshi. 1987. Purification and properties of extracellular  $\beta$ -xylosidase from thermophilic alkalophilic *Bacillus* K-17. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 267-272.
  23. Hudson, R.C., L.R. Schofield, T. coolbear, R.M. Daniel, and H.W. Morgan. 1991. Purification and properties of an aryl  $\beta$ -xylosidase from a cellulolytic extreme thermophile expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **273**: 645-650.
  24. Schwarz, W.H., H. Adelsberger, S. Jauris, C. Hertel, B. Funk, and W.L. Staudenbauer. 1990. Xylan degradation by the thermophile *Clostridium stercorarium*: cloning and expression of xylanase, and  $\alpha$ -arabinofuranosidase genes in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **170**: 368-374.
  25. Poutanen, K. and J. Puls. 1988. Characteristics of *Trichoderma reesei*.  $\beta$ -xylosidase and its use in the hydrolysis of solubilized xylans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 425-432.
  26. Utt, E.A., C.K. Eddy, K.F. Keshav, and L.O. Ingram. 1991. Sequencing and expression of the *Butyrivibrio fibrisolvens* xyIB gene encoding a novel bifunctional protein with  $\beta$ -D-xylosidase and  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1227-1234.
  27. Oh, S.W., S.S. Park, Y.I. Park, and Y.J. Choi. 1992. Molecular cloning and expression of *Bacillus stearothermophilus*  $\beta$ -D-xylosidase gene in *E. coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 136-142.

(Received 18 November 1995)