

## *Bacillus* sp. DSNC 101이 생산하는 $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase의 정제 및 특성

조 남 철 · 진 종 언\*

동강대학 식품영양과, \*동강대학 피부미용과

### Purification and Characterization of an $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase from *Bacillus* sp. DSNC 101

Nam-Chul Cho and Jong-Eon Chin\*

Department of Food and Nutrition, Dongkang College, Kwangju 500-714, Korea

\*Department of Cosmetology, Dongkang College, Kwangju 500-714, Korea

#### Abstract

$\alpha$ -L-Arabinofuranosidase was purified from the culture supernatant of *Bacillus* sp. DSNC 101. The enzyme had a molecular weight of 56 kDa. Optimum temperature and pH for  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity were 55°C and 7.0 respectively. The Michaelis constant(Km) and maximal reaction velocity(Vmax) for p-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside were 1.0 mM and 113.6 U/mg protein, respectively.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase was completely inhibited by HgCl<sub>2</sub> and CuSO<sub>4</sub>. The enzyme was specific for the  $\alpha$ -linked arabinoside in the furanoside configuration. The enzyme was produced during growth on agricultural residue such as rice straw, but not during growth on spelt xylan, glucose or cellobiose.

Key word :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.

#### 서 론

Xylan은 식물의 세포벽의 hemicellulose 중 가장 많이 존재한다. 이 복잡한 다당류는 xylopyranoside가  $\beta$ -D-1,4 방식으로 결합된 골격에 arabinosyl, acetyl, uronyl 그리고 glucosyl 결사슬이 존재함으로써 분지된 구조를 지닌다. 가축의 주 사료인 목초와 곡류의 xylan은 일반적으로 D-xylose의 O-3 위치에 L-arabinose 잔기들이  $\alpha$ -glycoside 결합한 arabinoxylan 형태로 존재한다.  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase(EC 3.2.1.55)는 arabinoxylan으로부터 L-arabinose 결사슬을 제거함으로써 endoxylanase가 효과적으로 작용할 수 있도록 한다<sup>1,2,3,4,5</sup>. 따라서 endoxylanase와  $\alpha$ -L-ara-

binofuranosidase로 전처리를 한 arabinoxylan은 동물의 소화율을 크게 증진시킴으로써 동물의 성장에 도움이 된다고 보고되어 있으며<sup>6</sup> 이러한 이유로  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase에 대한 연구는 사료의 품질향상 면에서 중요하다고 할 수 있다.

본 연구자는 토양으로부터 xylan 분해능이 뛰어난 *Bacillus* sp. DSNC 101을 분리하였으며 그 세균이 생산하는 xylanase를 정제하여 그 특성을 보고한 바 있다<sup>7</sup>. *Bacillus* sp. DSNC 101을 탄소원으로 벼집을 이용하여 배양할 때 배양액 중에서  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase가 생산됨이 관찰되었다. 본 연구에서는 *Bacillus* sp. DSNC 101이 생산하는 또 다른 xylan 분해 관련 효소인  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase를 정제하여

\* Corresponding author : Nam-Chul Cho

그 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 배양 및 조건

본 연구에는 본 연구실에서 분리한 *Bacillus* sp. DS-NC 101을 사용하였다.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 생산을 위해 0.3% yeast extract와 1.0% 벗집 분말이 함유된 액체 배지에서 30°C에서 48시간 배양한 다음 배양 상정액을 효소 정제용으로 이용하였다.

### 2. 효소 활성의 측정

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 효소 활성도를 측정하기 위해 기질로써 0.5mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside(Sigma, N-3641)를 사용하였으며 190  $\mu$ l의 기질용액에 10  $\mu$ l의 효소용액을 가한 다음 60°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응은 1.0M sodium carbonate 용액을 가해 정지시켰으며 생성된 *p*-nitrophenol은 420nm에서의 흡광도를 측정하고 후 nitrophenol의 molar coefficient<sup>8)</sup>를 이용하여 계산하였다. 효소반응 중 1분동안 1  $\mu$ mole의 *p*-nitrophenol을 생산하는 효소의 양을 1 unit라 하였다. 단백질의 양은 Lowry 등의 방법<sup>9)</sup>을 이용하여 측정하였으며 표준 단백질로서 bovine serum albumin(Sigma, A6918)을 사용하였다.

### 3. 단백질의 정제도 및 분자량 확인

단백질의 정제도는 Laemmli의 방법<sup>10)</sup>을 이용한 10% SDS-PAGE를 실시하여 확인하였으며 분자량이 알려진 표준단백질들을 동시에 전기영동함으로써 정제된 단백질의 분자량을 계산하였다.

### 4. 효소단백질의 정제

배양상등액은 한외여과(Amicon filter PM 10)를 이용하여 농축한 다음 20mM의 pH 7.6의 Tris-HCl 완충용액으로 투석하였다. 투석된 시료는 음이온 교환수지(DEAE-Sephadex A-50, 3cm $\times$ 25cm)에 가한 다음 분당 1.5ml의 유속으로 0에서 0.5M의 KCl 농도 기울기를 주면서 용출하였다. 용출된 분획들 중에서 활성도가 있는 분획들을 모아 농축한 다음 20mM의 pH 7.6의 Tris-HCl 완충용액으로 다시 투석하여 염을 제거한 후 미리 pH 7.6의 20mM Tris-HCl 완충용액으로 평형시킨 HPLC용 음이온 교환수지(TSK DE-AE-5PW for HPLC, 0.8 $\times$ 7.5cm)를 통과시켰으며 분당 1ml의 유속으로 KCl의 농도가 0에서 0.4M이 되도록

농도기울기를 주었다. 활성분획들은 한외여과를 이용하여 농축한 다음 HPLC gel 여과(Bio-Sil TSK-250 for HPLC, 0.75 $\times$ 60cm)를 하였으며 각각의 분획들을 전기영동한 후 정제된 활성분획들을 모아 centricon 30 microcentrator(Amicon)을 이용하여 농축하였다.

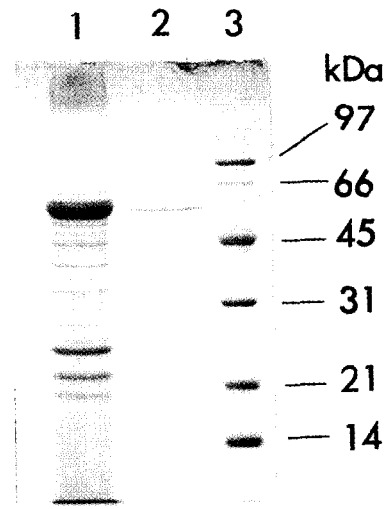
## 결과 및 고찰

### 1. 단백질의 분자량

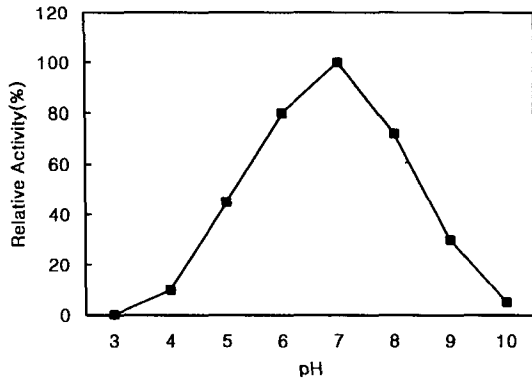
정제된 단백질을 전기영동상에서 표준단백질들의 분자량과 비교한 결과 분자량은 56 kDa였다(Fig. 1). 이 분자량은 *Bacillus polymixa*<sup>11)</sup>가 생산하는  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 분자량과 큰 차이가 없었다.

### 2. 효소활성도에 대한 pH의 영향

pH를 3.0에서 10.0까지 변화시키면서 효소활성도의 차이를 조사한 결과 정제된 효소는 pH 7.0에서 가장 높은 활성도를 나타냈으며 pH 5.0과 9.0에서는 각각 최대 활성의 45%와 30%를 나타냈다(Fig. 2). 이러한



**Fig. 1. SDS-PAGE of purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase.** Samples were analyzed in 12% polyacrylamide gel. Lane 1, concentrated culture supernatant; lane 2, purified  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase; lane 3, molecular weight standards: phosphorylase(97kDa), bovine serum albumine (66kDa), ovalbumin(45kDa), carbone anhydrase (31kDa), trypsin inhibitor(21kDa), lysozyme (14kDa). The amount of purified enzyme loaded in the gel was 1  $\mu$ g for protein staining.



**Fig. 2. Effect of pH on enzyme activity.** The enzyme activity was assayed at various pHs. The following buffers were used: 50mM sodium citrate(pH 3.0 to 4.0), 50mM sodium acetate(pH 4.0 to 6.0), 50mM sodium phosphate (pH 6.0 to 8.0), 50mM Tris-HCl(pH 8.0 to 9.0) and 50mM sodium glycine(pH 9.0 to 11.0).

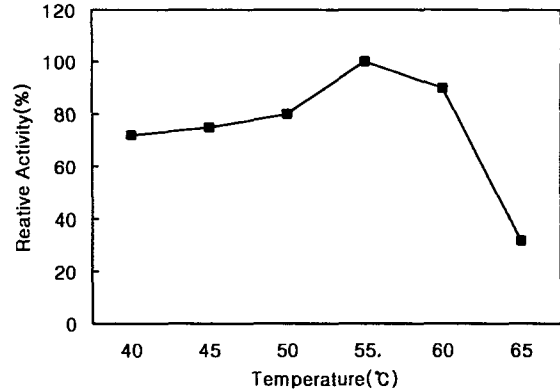
pH 양상은 지금까지 보고된 많은  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase들이 대개 pH 4.0에서 6.0 사이의 최적 pH를 보이는 것에 비해 더 높았다<sup>12,13,14</sup>.

**3. 효소활성도에 대한 온도의 영향**

50mM의 pH 7.0 sodium phosphate 완충용액에 들어 있는 정제된 효소용액을 40에서 65°C까지의 온도에서 다양한 시간동안 방치한 후 30°C에서 효소 반응을 시킨 결과 10분간의 열처리한 시료들 중 55°C에 방치한 효소용액의 활성이 가장 높았다(Fig. 3). 그 외의 40, 50, 60, 그리고 65°C의 시료에서는 각각 최고 활성의 72, 80, 90 그리고 32%를 나타냈다.

**4. 효소활성도에 대한 금속이온의 효과**

$\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 활성에 미치는 각종 금속이온들의 영향을 조사하기 위해, 효소 반응액에 Table 1과 같은 각종 금속이온들을 1mM의 농도로 첨가하여 활성에 미치는 영향을 비교하였다. 1.0mM의 Hg<sup>2+</sup>과 Cu<sup>2+</sup>이 첨가된 반응액에서는 효소활성이 전혀 나타나지 않았으며 Zn<sup>2+</sup>이 함유된 반응액에서는 금속이온을 넣지 않은 반응액 활성의 46%가 나타났고 Mn<sup>2+</sup>이 함유된 반응액에서는 약간의 활성의 증가가 나타났다. 그 외의 금속이온들을 함유된 반응액에서는 뚜렷한 활성의 증가나 감소가 나타나지 않았다. Hg와 Cu는 histidine과 tryptophan 뿐만 아니라 sulfhydryl기와 반응하는 것으로 알려져 있다. 이는 본 연구에서 정제된  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 활성부위



**Fig. 3. Effect of temperature on enzyme activity.** The enzyme activity was assayed at various temperatures.

**Table 1. Effect of metals on the  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity**

Metal ions(1mM)	Relative activity(%)
None	100
MnSO <sub>4</sub>	124
FeSO <sub>4</sub>	104
MgCl <sub>2</sub>	94
ZnSO <sub>4</sub>	46
CaCl <sub>2</sub>	106
HgCl <sub>2</sub>	0
CuSO <sub>4</sub>	0
CoCl <sub>2</sub>	94
EDTA	100
KCN	97.0

에 histidine이나 tryptophan 또는 -SH기를 지닌 아미노산 잔기들이 존재함을 의미한다. 또한 EDTA의 첨가가 효소활성에 영향을 주지 않음으로써 본 연구에서 정제된 효소는 효소반응에 금속이온을 요구하지 않음을 알 수 있으며 이런 결과는 *Pichia capsulata* X91이 생산하는  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 성질과 같았다<sup>14</sup>.

**5.  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 V<sub>max</sub> 및 K<sub>m</sub> 측정**

기질로서 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside를 이용하여  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase의 V<sub>max</sub> 및 K<sub>m</sub>을 측정하였다. 55°C에서 기질의 농도를 달리하여 반응시킨 후 V<sub>max</sub>와 K<sub>m</sub>값을 측정한 결과 각각 113.6 units/mg과 1.0mM으로 나타났다.

## 6. 여러 가지 기질에 대한 효소활성도의 차이

여러 종류의 *p*-nitrophenyl-glycoside들에 대한 정제된 효소의 활성도를 측정한 결과 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside에만 높은 활성을 나타냈으며 그 외의 기질들에 대해서는 전혀 활성이 나타나지 않았다. 또한 *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside가 기질로 존재하는 효소 반응액에 50mM의 L-arabinose를 가하여 반응시킨 결과 효소 활성도에 변화가 나타나지 않았으며 이는 최종산물 저해효과가 없음을 나타낸다. 정제된 효소는 cellulose, carboxymethyl cellulose, 그리고 xylan에 대한 분해활성 또한 나타나지 않았다.

## 요 약

*Bacillus* sp. DSNC 101의 배양 상정액으로부터  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase를 정제하여 그 특성을 조사하였다. 정제된 효소의 분자량을 SDS-PAGE를 이용하여 측정한 결과 56kDa로 나타났으며 효소 활성도에 대한 최적 온도와 최적 pH는 각각 55°C와 7.0이었다. *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-arabinofuranoside에 대한 Km 값과 Vmax는 1.0mM과 113.6U/mg이었으며 Hg<sup>2+</sup>과 Cu<sup>2+</sup>의 첨가는 효소 반응을 완전히 저해하였다. *Bacillus* sp. DSNC 101은 탄소원으로 벃짚을 사용할 때  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase를 생산하였으나 xylan이나 glucose, cellulose를 탄소원으로 배양할 때는 생산되지 않았다.

## 참고문헌

- Lee, S. F. and Forsberg, C. W. : Purification and characterization of an  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *Can. J. Microbiol.*, 33, 1011~1016(1987).
- Poutanen, K. : An  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase of *Trichoderma reesei*, *J. Biotechnol.*, 7, 271~281(1988).
- Bachmann, S. L. and McCarthy, A. J. : Purification and cooperative activity of enzymes constituting the xylan-degrading systems of *Thermomonospora fusca*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2121~2130(1991).
- Komelink, F. J., Searle-Van Leewen, M. J. F., Wood, T. M. And Voragen, A. G. : Purification and characterization of a (1,4)- $\beta$ -D-arabinoxylan arabinofuranohydrolase from *Aspergillus awamori*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 753~758(1991).
- de Vries, R. P., Kester, H. C., Poulsen, C. H., Benen, J. A. and Visser, J. : Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides, *Carbohydr. Res.*, 7, 401~410(2000).
- Reche, N., Desgranges, C. and Durand, A. : Study on the solid-state production of a thermostable  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase of *Thermoascus aurantiacus* on sugar beet pulp, *J. Biotechnol.*, 38, 3(1994).
- Cho, N. C. and Bai, S. : Purification and Characterization of xylanase from *Bacillus* sp. Strain DSNC 101, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 386~390(1997).
- Greve, L. C., Labavitch, J. M. and Hungate, R. E. :  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Ruminococcus albus* 8: purification and possible role in hydrolysis of alfalfa cell wall, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1135~1140(1984).
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. H., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biochem.*, 193, 265~275(1951).
- Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>, *Nature*, 227, 680~685(1970).
- Morales, P., Sendra, J. M. and Perez-Gonzalez, J. A. : Purification and characterization of an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa* expressed in *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44, 112~117(1995).
- Ferre, H., Broberg, A., Duus, J. O. and Thomsen, K. K. : A novel type of arabinoxylan arabinofuranohydrolase isolated from germinated barley analysis of substrate preference and specificity by nano-probe NMR, *Eur. J. Biochem.*, 267, 6633~6641(2000).
- Christakopoulos, P., Katapodis, P., Hatzinikolaou, D.G., Kekos, D. and Macris, B. J. : Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Fusarium oxysporum*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 87, 127~133(2000).
- Yanai, T. and Sato, M. : Purification and characterization of a novel  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase from *Pichia capsulata* X91, *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 64, 1181~1188(2000).

(2001년 1월 30일 접수)