

## *Pseudomonas* sp. LG2의 Ferulic acid esterase 및 Xylanase 유도과 부분적 특성

김용균\* · 이상몽 · 박현철 · 김근기 · 손홍주

부산대학교 생명환경화학과

Received March 19, 2007 / Accepted April 16, 2007

**Partial Characterization and Induction of Ferulic Acid Esterase and Xylanase from *Pseudomonas* sp. LG2.** Kim Yong Gyun\*, Lee Sang Mong, Park Hyun Chul, Kim Keun Ki, Son Hong Joo. *Dept. of Life Science & Environmental Biochemistry, College of Natural Resources & Life Science, Pusan National University, Samryangjin, Miryang 627-703, Korea* – Lignin degrading bacterium *Pseudomonas* sp. LG2 was able to degrade lignin substrate to a lot of APPL compound. APPL compound was detected in culture supernatants from *Pseudomonas* sp. LG2 grown with BSG(brewer's spent grain). FAE(ferulic acid esterase) and xylanase are induced from *Pseudomonas* sp. LG2 in the presence of carbon sources such as oat spelt xylan, HBSG I, II (hydrolyzed brewer's spent grain I, II) and AFBSG(autoclaved fraction from brewer's spent grain). However, xylanase and FAE are not induced by growth of *Pseudomonas* sp. LG2 on xylose and arabinose. *Pseudomonas* sp. LG2 is grown on medium containing oat spelt xylan, HBSG I, II and AFBSG and the induction of FAE and xylanase activities of extracellular proteins determined during 14 days. Maximum level of xylanase activity(5.3 U/mg) found at 6 days in culture contained oat spelt xylan as carbon source, whereas maximum level of FAE activity(15.4 mU/mg) was found at 8 days in culture contained AFBSG as carbon source. Most ferulic acid was released in culture supernatants when *Pseudomonas* sp. LG2 grown on oat spelt xylan, HBSG I, II and AFBSG. FAE of extracellular enzymes was also specific activity on methyl ferulic acid, methyl caffeic acid and methyl *p*-coumaric acid respectively, but not methyl sinapinic acid, methyl vanillic acid and methyl gallic acid.

**Key words** – *Pseudomonas* sp. LG2, ferulic acid esterase, xylanase

### 서 론

Ferulic acid는 여러 가지 식물 세포벽에 비교적 고농도로 존재하는 hydroxycinnamic acid이다. 식물에 있어서, ferulic acid는 유리된 형태로는 거의 발견되지 않는다. 대부분 탄수화물 복합체로서 여러 가지 탄수화물과 결합하여 광범위하게 존재 할 뿐만 아니라 많은 천연물들과 여러 가지 ester 및 amide 형태로 monomeric 혹은 dimeric 형태로 다당류에 결합하여 존재한다[5,6,14]. 그리고 flavonoid 및 malic acid, tartaric acid, tartronic acid, hydroxycitric acid, quinic acid, gluconic acid, hydroxy 지방산 같은 여러 가지 hydroxycarboxylic acid의 ester로 존재하거나, 비극성 ferulic acid ester들은 여러 가지 식물 sterol과 긴 사슬 alcohol들과 결합하여 존재한다[24]. Putrescine, tyramine 혹은 tryptamine과 amide인 ferulic acid의 함량은 식물에 있어서 환경 스트레스의 척도로도 연구되고 있다[32]. Ferulic acid esterase(FAE)는 몇몇 lignocellulose 분해 미생물에서만 보고된 유도성 세포의 효소로서 FAE는 ferulic acid와 hemicellulose 간의 ester 결합을 가수분해하고, hemicellulose의 효소적 분해에 대

한 접촉 능력을 증가시키며, 또한 FAE는 식물 세포벽의 미생물적 분해를 극대화 하기위하여 xylanases와 pectinases 같은 다른 hemicellulases와 협동적으로 작용한다[13]. 이 협동적 효소는 현재 lignocellulose성 폐기물의 생물학적 전환과 bio-pulping, bio-bleaching 산업 응용 등을 위해 광범위하게 연구되고 있다. FAE의 세포의 유도에는 wheat bran, oat-spelt xylan 혹은 Avicel같은 lignocellulose성 기질들이 필수적임을 *Streptomyces olivochromogenes*[12], *Streptomyces* sp. C-248과 C-254의 방선균과 *Aspergillus*[4,6], *Pseudomonas*속 [1,3], *Penicillium*속[7,9]등에서 보고되었다. 맥주 제조 과정에서 버려지는 부산물인 brewer's grain(BG)에는 39% hemicellulose(주로 arabinoxylan), 24% pectin, 17% cellulose, 6% lipid, 4% lignin으로 구성되어 있다. 제분 시 기계적 분쇄로 얻어지는 외피층(과피, 종피, 호분 및 배유)을 함유하고 있는 폐 wheat bran(WB)에는 주로 38% glucuronoarabinoxylan, 16% cellulose, 6.6% lignin, 25% 단백질, 몇몇 혼합 결합된  $\beta$ -D-glucan과 호분층에 있는 arabinoxylan으로 구성되어 있으며, BG와 WB 모두에는 소당류 및 다당류와 작은 phenolic 화합물 같은 많은 유용한 화합물이 함유되어 있다[2,14]. Monomeric 혹은 dimeric 형인 ferulic acid는 arabinoxylan 및 pectin에 arabinosyl과 ester 결합을 하고 이들 diferulic acids(diFA)는 세포벽 다당류 및 리그닌에 교차 결합하고, 세

\*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5541, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : kygyun@pusan.ac.kr

포벽 보호에 영향을 준다[14,25,32]. 식물 세포벽에 ester 결합된 ferulic acid의 화학적 추출은 높은 추출 수율을 이끌 수 있는 반면에, 효소적 가수분해 산물에서 얻어지는 ferulic acid는 antiviral[10], 천연 항산화제 및 광보호제[27], 성인병 예방제[29], 항암제[16,22,30]등으로 이용될 수 있어 보다 친환경적인 원료로 사용될 수 있어 이에 관한 연구가 진행되고 있다. 이에 본 연구는 미생물에 의한 농산 폐 부산물의 조사료 활용을 위한 lignocellulose성 물질의 분해와 가능성이 있는 aromatic acid 산물인 ferulic acid 생성 및 FAE를 생산하고자 *Pseudomonas* sp. LG2를 이용하여 세포외 효소의 유도 및 그 조효소의 특성을 연구했다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양 조건

*Pseudomonas* sp. LG2는 lignocellulose를 분해 할 수 있는 균주로서 이미 보고한 균주이며[17], *Pseudomonas* agar F (Merck, Germany)배지에 배양 보관하며 사용하였다. 실험에 사용된 배지는 1% 탄소원, 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02% NaCl, 0.005%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.6% yeast extract, pH 7.0인 배지를 250 ml 삼각플라스크에 50 ml 분주하여 살균하였으며, 균주는 MRS 배지에 48시간 동안 중균 배양한 균을 1%가 되도록 접종하고 30°C에서 150 rpm으로 일정 기간 동안 배양했다. 배양액을 각 기간마다 채취한 후, Whatman No. 1로 여과하여 회수하고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 배양액은 연구의 목적에 따라 40%에서 70% ammonium sulfate로 염석 및 투석하고 사용할 때 까지 4°C에 보관 또는 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

### 효소활성 및 단백질 함량 측정

Ferulic acid esterase(FAE)의 활성과 ferulic acid 측정은 Ralet[24]의 방법을 변형하여 0.95 mM methyl ferulic acid와 MOPS buffer(pH 6.0), 동결 건조한 조효소 단백질 10 mg을 증류수 10 ml에 용해한 조효소액을 혼합 교반하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 100°C에서 5분간 처리하여 효소반응을 정지시킨 후 UV spectrophotometer(UA-3000, Pharmacia, Sweden)를 사용하여 315 nm에서 측정하였다. 효소활성은 분당 1  $\mu\text{M}$ 의 ferulic acid를 유리시키는 효소의 양으로 계산했다. 또한 ferulic acid는 *u*-bondapack C18(25 cm column)을 이용한 HPLC(AKTA system, Sweden)로도 확인했다. 분석 조건은 column을 먼저 0.02 M NaOH와 0.02 M phosphoric acid가 함유한 15% acetonitrile로 평형화 했고, 4단계 acetonitrile 구배로 용출 했다. 즉, 15-35% acetonitrile로 10분, 35-70% acetonitrile로 5분, 70-97% acetonitrile로 1분, 97-15%acetonitrile로 용출하면서 315 nm에서 확인하였다.

Xylanase 활성은 이미 앞에서 보고한 bincinhonic 방법에 따라 1% oat spelt xylan을 분해하여 생성되는 환원당의 양을 조사하여 효소활성을 측정하였다[8]. 효소활성은 37°C, pH 6.0에 분당 1  $\mu\text{M}$ 의 환원당을 분리하는 양을 1 unit로 정의했다. 배양액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하는 Coomassie 단백질 분석 시약(Bio-Rad)을 사용한 Bradford의 방법으로 측정했다.

### Ferulic acid-rich fractions의 제조

Ferulic acid-rich fraction은 Bonnin[5]등의 방법에 따라 맥주박(brewer's spent grain)을 이용하여 제조했다. 시료에 50 mM trifluoroacetic acid로 100°C에서 1시간 30분 처리한 산 추출물에 4 배의 ethanol을 첨가하여 침전시키고 상등액을 분리하여 동결 건조한 시료를 탄소원 HBSG I (hydrolyzed brewer's spent grain I)로 했다. 불용성 시료와 ethanol 침전물을 합하여 다시 150 mM trifluoroacetic acid로 동일한 조건에서 가수분해 시켜 ethanol 침전과 여과 후 얻은 상등액을 동결 건조하여 본 실험의 탄소원인 HBSG II로 사용했다. AFBSG(autoclaved fraction from brewer's spent grain)의 제조는 Saulnier[28]등의 방법에 따라 autoclave(120°C, 60 분)했다. 용해된 분획은 원심 분리 및 여과로 회수하여 동결 건조한 시료를 AFBSG(autoclaved fraction from brewer's spent grain)으로 했다.

### APPL의 측정

*Pseudomonas* sp. LG2에 의해 생성되는 APPL(acid-precipitable polymer lignin)의 측정은 앞에서 보고한 방법에 따라 extractive-free lignocellulose를 제조하여 조사하였다[17].

### 전기영동 및 효소 활성 염색

Polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Laemmli의 방법[19]을 수정하여 사용하였다. 3% acrylamide로 된 stacking gel과 10% acrylamide로 된 separating gel을 사용하여 시료 단백질 30  $\mu\text{g}$ 을 loading한 후 전기영동을 실시했다. 전기영동 후 gel을 조심스럽게 분리하여 효소 활성 염색에 사용하였다. Xylanase의 효소 활성 염색은 Royer 방법[26]을 변형하여 사용하였다. Agarose (Sigma type I) 2 g을 phosphate buffer(pH 6.8) 100 ml에 용해하고 xylan 또는 remazol brilliant blue-xylan 2% 용액을 1:2로 혼합하여 gel을 제조하였다. 제조한 gel을 단백질 gel에 덮고 기포를 제거한 후 밀봉하여 37°C에서 1시간 반응 시키고 95% ethanol에 30 분 처리하였다. 한편 FAE의 활성 염색은 Ferreira [15]등의 방법에 따라 기질로서 70 mM phosphate buffer (pH 6)에 0.05% 4-methyl umbelliferyl trimethyl ammonium cinnamate chloride (MUTMAC)를 함유한 용액에 37°C에서 1시간 반응시키고 312 nm에서 활성 형광 band를 확인하였다.

결과 및 고찰

APPL의 측정

*Pseudomonas* sp. LG-2는 lignin(aldrich 제품)을 분해하여 중간 분해산물인 APPL을 생성한다[17]. *Pseudomonas* sp. LG2가 천연 lignocellulose의 분해 가능성을 조사하기 위하여 BSG(brewer's spent grain)를 extractive-free lignocellulose 시료로 사용하여 *Pseudomonas* sp. LG2가 천연의 lignocellulose를 분해하여 APPL 화합물을 생성하는지 1주일 간격으로 함량을 측정 한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 각 배양기간마다 배양액에서 측정 한 APPL의 함량은 배양기간 4주까지 계속 증가하여 배양 4주에는 83±5 mg/100 ml이 생성되었으나 그 이후부터는 감소하는 경향을 보였다. 이는 생육동안에 필요한 탄소원 획득을 위해 효소의 분비에 의한 분해산물이 증가 하였으나 그 이후 부터는 분해 산물이 각종 세포의 효소에 의해 산에 침전되지 않는 물질로 분해되는 것으로 생각된다. Monties[21]등의 보고에 따르면 *Streptomyces viridosporus* T7A의 경우 lignocellulose의 분해는 산화적 탈리그닌화 방법으로 intermonomeric β-ether 결합을 파괴하고 리그닌 중합체에 phenylhydroxyl, α-carbonyl 및 carboxyl acid group을 만든다고 했으며, APPL 혹은 리그닌 분해물에는 ethylated p-hydroxybenzoic acid(4-hydroxybenzoic acid), protocatechuic acid(3,4-dihydroxybenzoic acid), vanillic acid (4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid), syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid)가 함유되어 있었으며, 또한 APPLs에는 유기질소(2-3%) 탄수화물(2-3%) 회분(4-5%)를 포함한 약간의 비 리그닌 성분이 들어 있다고 했다. 그러나 *S. viridosporus*에서는 aromatic acid의 함량이 높았으나, *S. badii*에서는 APPLs은 매우 낮게 생산되었다. Benzoic acid 비을 역시 사용된 초기 기질이 softwood, hardwood 혹은 grass lignocellulose에 따라 APPL 분해물에는 p-hydroxybenzoic

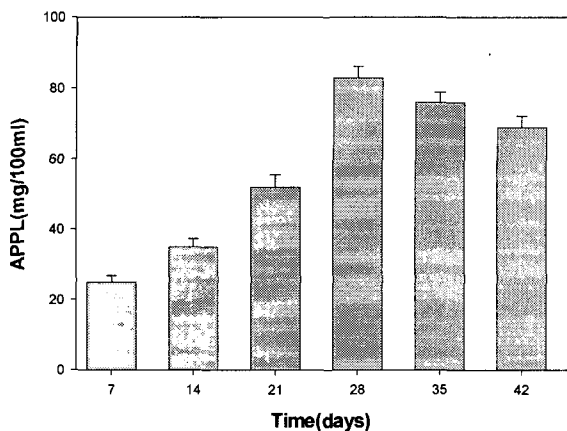


Fig. 1. Production of APPL compound by *Pseudomonas* sp. LG2 during growth on media contained BSG (brewer's spent grain)

acid, vanillic acid, syringic acid, ferulic acid(4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid) 및 p-coumaric acid 같은 aromatic acid가 많이 함유되어 있었다. *Sterptomyces*는 lignocellulose 분해 시 ester결합을 가수분해하여 aromatic acid를 유리시켜 그들을 탄소원 및 에너지원으로 대사 이용한다는 등의 결과를 미루어 볼 때 *Pseudomonas* sp. LG2 역시 천연의 lignocellulose를 분해 이용하기 위하여 여러 가지 세포의 효소가 유도된다고 생각되었다.

효소 생산에 관한 탄소원의 영향

여러 가지 탄소원을 이용하여 *Pseudomonas* sp. LG2로부터 유도 분비되는 FAE와 xylanase 세포의 조효소는 기초배지에 탄소원을 1% 함유한 배지에 5일 동안 배양한 후 배양 상등액의 효소활성을 조사하여 Table 1에 나타냈다. FAE 효소의 경우, 탄소원으로 단당류를 첨가하여 배양한 배양액에서는 FAE의 활성이 없었으며, 이는 *Pseudomonas* sp. LG2가 glucose, xylose 및 arabinose 같은 단당류에 의해 FAE의 생성이 유도되지 않는 것을 미루어 볼 때 생육에 필요한 에너지원으로 이들을 우선 이용하는 것으로 생각된다. 이에 반해 oat spelt xylan, 맥아박(brewer's spent grain)으로부터 제조한 ferulic acid-rich fraction인 HBSG(hydrolyzed brewer's spent grain) I 및 II, AFBSG(autoclaved fraction from brewer's spent grain)를 탄소원으로 첨가한 배지에서 FAE의 활성은 비슷하였으나 이들 중 AFBSG를 첨가 했을 때 효소의 활성(0.71 mU/mg)이 가장 높은 것으로 나타났다.

한편 xylanase의 경우, 단당류 중에서 glucose를 첨가한 배지에서만 xylanase의 활성(0.24 U/mg)이 조사되어 FAE의 경우와는 차이가 있었다. 그러나 oat spelt xylan과 HBSG I 및 II와 AFBSG를 첨가한 배지에서는 xylanase의 활성이 모

Table 1. Effect of different carbon sources on ferulic acid esterase and xylanase activity in culture supernatants from *Pseudomonas* sp. LG2

Carbon source	Ferulic acid esterase activity (mU/mg)	Released ferulic acid contents (mg)	Xylanase activity (U/mg)
Glucose	ND	ND	0.24
Xylose	ND	ND	ND
Arabinose	ND	ND	ND
Oat spelt xylan	0.56	0.07	1.34
HBSG I	0.33	0.63	0.78
HBSG II	0.60	0.67	0.71
AFBSG	0.71	0.77	0.84

Maximum ferulic acid contents determined in culture supernatants from *Pseudomonas* sp. LG2 grown in media containing different carbon sources. Results are the means of triplicate assays.

\* ND. not detected

두 조사되었으며, 특히 oat spelt xylan을 첨가한 배양에서 최대 활성(1.34 U/mg)을 나타냈다. *Pseudomonas sp.* LG2는 탄소원으로 HBSG I 및 II와 AFBSG, oat spelt xylan을 기질로 사용하여 배양한 결과 FAE와 xylanase를 모두 생산하는 것으로 나타났는데 이는 탄소원에 의해 식물 세포벽을 구성하는 cellulose, hemicellulose 및 리그린 분해 이용에 필요한 효소가 유도 분비 될 것으로 생각된다. 이러한 결과는 lignocellulose를 분해하는 *Phanerochaete chrysosporium*[8], *Penicillium xepansum*[9], *Aspergillus niger*[6]같은 Fungi와 *Streptomyces*속 [5], *Pseudomonas*속[1,3]과 같은 미생물에서도 이러한 cellulase, hemicellulase, ligninperoxidase 및 각종 esterase를 생산 한다는 보고와 유사한 경향을 보였다. FAE의 활성 유도 기질인 각종 탄소원을 기질로 사용한 배양에서 *Pseudomonas sp.* LG2에 의해 분해 생산된 ferulic acid의 함량을 비교해 볼 때 oat spelt xylan을 기질로 배양한 배양액에서의 ferulic acid 함량은 매우 낮았으며, 전처리된 탄소원의 종류에 따라서는 생성량에 큰 차이가 없었다. 또한 FAE의 활성과 ferulic acid의 분리와는 상호 관계가 없는 것으로 생각되었다. 이러한 결과는 효소의 생산과 ferulic acid 분리와는 상호연관이 없다는 Tenkanen[31]의 보고와 유사하였다.

**효소 생산**

효소 유도 탄소원인 oat spelt xylan, HBSG I,II 및 AFBSG를 함유한 배지에서 배양기간에 따라 *Pseudomonas sp.* LG2가 생산하는 세포외 단백질의 FAE와 xylanase의 효소 활성을 조사하여 Fig. 2에 나타냈다. 3종류의 탈 전분된 탄소원과 oat spelt xylan을 기질로 하여 FAE의 활성을 측정할 결과 HBSGI의 경우 배양기간이 10일 경우 최대 활성(7.6 mU/mg)을 보였으며, HBSG II의 경우 배양 12일에 최대 활성(12.4 mU/mg) 보였다. 또한 AFBSG는 배양 8일에 최대 활성(15.4 mU/mg)을 나타냈다. 그러나 탄소원인 oat spelt xylan 경우 FAE의 활성이 배양 8일에서 최대 활성(4.4 mU/

mg)을 보였다. Xylanase의 활성 역시 모든 탄소원을 기질로 사용한 배지에서 조사 됐는데, HBSG I, II의 경우 배양 8일까지 효소 활성(1.5 U/mg 및 1.3 U/mg)이 각각 증가하다 그 이후부터는 점차 감소하는 경향을 보였으며, AFBSG를 탄소원으로 했을 때도 같은 경향을 보였다(1.7 U/mg). 그러나 oat spelt xylan의 경우 배양 6일(5.3 U/mg)까지 증가하다 8일(2.1 U/mg) 이후부터는 급격하게 감소하였다. Ralet[24]등은 전분을 제거한 wheat bran에는 feruloylated arabinoxylan들이 함유되어 있어 미생물에 의해 생산된 상업용 복합 효소제인 Celluclast(주로 proteinase, β-glucanase, xylanase 함유)를 wheat bran에 전처리하여 arabinose의 C<sub>5</sub>에 ferulic acid가 ester 결합된 feruloylated oligosaccharides를 제조하고, 이 Celluclast로 가용화하여 얻은 feruloylated oligosaccharides를 탄소원으로 사용하여 *Aspergillus niger*로부터 FAE 최대 활성(191 mU/ml)이 유도되는 것으로 보고했으며, 그때 xylanase의 활성 역시 최대인 것으로 보고했다. 한편 전분을 제거한 sugar-beet pulp에는 feruloylated pectins이 함유되어 있으므로 미생물에 의해 생산된 상업용 복합효소제인 Driselase(arabinase, cellulase, xylanase, polygalacturonase 등과 같은 glycosidase 함유)를 sugar-beet pulp에 전처리하여 arabinose의 C<sub>2</sub> 혹은 galactose의 C<sub>6</sub>에 ferulic acid가 ester 결합된 feruloylated oligosaccharides를 제조하여 이 Driselase로 가용화한 feruloylated oligosaccharides를 기질로 사용하여 조사한 결과 FAE 최대 활성이 56.1 mU/ml 였으며, 그때 xylanase의 활성 역시 최대인 것으로 보고했다. 본 실험의 결과는 MacKenzie와 Ralet 등[20,24]이 보고한 것과는 많은 차이를 보였는데, 이는 탄소원으로 사용된 원료의 종류 및 귀리, 폐 당밀, 보리, 옥수수 등의 원료 전처리에서 발생하는 lignocellulose의 분해 정도에 기인한 것으로 생각 된다. 그러나 사용된 탄소원의 종류에 따라 xylanase의 활성과 FAE 활성이 성장기간 동안 차이는 있었지만 탄소원을 분해하여 대사물질 또는 에너지원으로 이용하기 위하여 xylanase의 작용

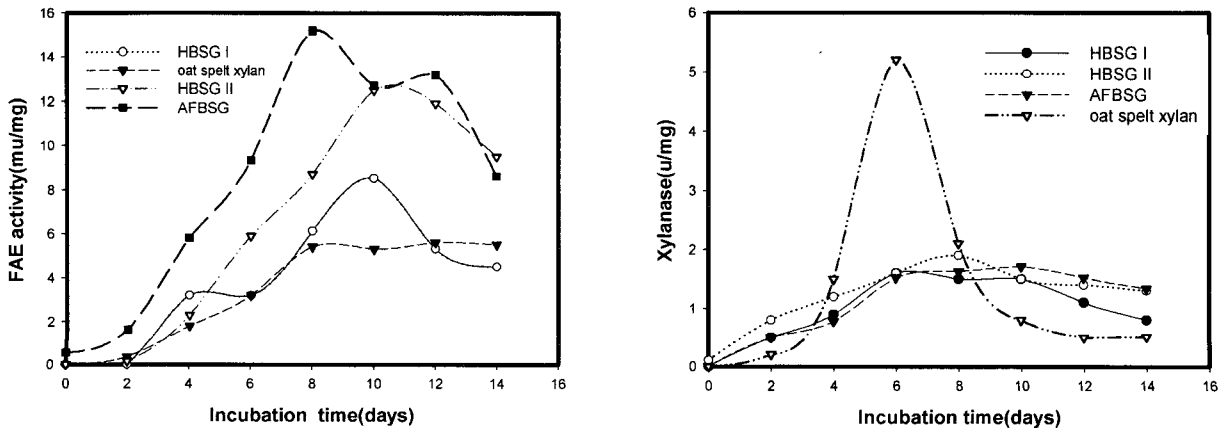


Fig. 2. Times course of ferulic acid esterase (FAE) and xylanase production by *Pseudomonas sp.* LG2 grown on media contained different carbon sources such as oat spelt xylan, HBSG I, II and AFBSG

과 FAE의 작용이 서로 상호협동 작용이 있는 것으로 생각된다. 한편 Bartolome[3]과 Faulds[13]등은 *Aspergillus niger*와 *Pseudomonas fluorescens* subsp *cellulosa*를 이용한 feruloylated hemicellulose 기질(de-starched wheat bran)의 분해에 관한 연구에서 oligosaccharide chain과 ferulic acid unit 간의 결합 형태에 따른 차이점은 없다고 했다.

**효소의 Phenolic acid의 methyl esters에 대한 반응**

*Pseudomonas* sp. LG2를 탄소원인 HBSG I, HBSG II, AFBSG 및 oat spelt xylan을 사용하여 일정기간 배양한 후 얻은 조효소 단백질을 phenolic acid의 methyl ester인 methyl ferulic acid(MFA), methyl sinapinic acid(MSA), methyl caffeic acid(MCA), methyl *p*-coumaric acid(MpCA), methyl vanillic acid(MVA), methyl gallic acid(MGA)를 사용하여 조효소의 esterase활성을 조사했다(Table 2). *Pseudomonas* sp. LG2의 조효소는 methyl ferulic acid보다 methyl caffeic acid에 대해 더 높은 활성을 보였다. 그러나 같은 cinnamic acid의 유도체인 methyl sinapinic acid에 대해서는 효소활성 검출되지 않았다. 한편 vanillic acid는 lignocellulose를 구성하는 *p*-coumaric acid 및 ferulic acid에서 유도되지만 methyl vanillic acid의 methyl기 가수분해 활성이 없었으며, methyl gallic acid에 대해서도 esterase의 활성 역시 없는 것으로 조사되었다. Faulds[13] 등의 보고에 의하면 *Aspergillus niger*를 이용하여 생산된 상업용 효소제에서 분리한 FAE-I, III는 효소의 종류에 따라 phenolic acid 환의 C<sub>5</sub>에 결합된 methoxy기는 효소반응을 저해하고, 다른 효소는 C<sub>3</sub>의 methoxy기에 의해 반응이 활성화 되지만, C<sub>3</sub>에 hydroxy기는 반응을 저해한다고 했다. 또한 이들 효소의 기질은 cinnamic acid의 골격이 필요하고, C=C 2중 결합이 없으면 활성이 없다고 보고했다. 이러한 결과로 볼 때 본 실험에 사용된 탄소원에 의해 *Pseudomonas* sp. LG2가 생육 증식 동안에 유도되는 세포의 조효소에는 C=C 2중 결합이 없는 methyl vanillic acid 나

methyl gallic acid에 대해 효소활성이 없는 것으로 보아 이에 관련된 효소는 유도되지 않는 것으로 추측된다. 한편 Fauld[12]등은 *S. olivochromogenes*의 의해 생산된 FAE는 methyl caffeic acid에 대해서는 esterase의 활성이 없었다는 보고와는 차이가 있었다. 또한 Ferreira[15]등은 DSWB(de-starched wheat bran), SBP(sugar beet pulp), soluble feruloylated oligosaccharides(SFO)-DSWB 및 SFO-SBP 같은 탄소원을 사용하여 *S. avermitilis*가 생산한 세포의 효소를 이용하여 methyl esters phenolic acid를 기질로 ferulic acid의 분리 반응을 10분에서 30분 반응 시간 결과 최저 6%에서 최고 66%의 ferulic acid가 생성되었으나, SBP를 탄소원으로 사용한 배지에서 얻은 효소는 2%에서 16%의 ferulic acid가 생성되었다고 보고하였다. *Pseudomonas* sp. LG2의 세포의 조효소의 FAE 활성이 *S. olivochromogenes* 및 *S. avermitilis*에 의해 유도된 FAE의 methyl ferulic acid와 methyl caffeic acid에 대해 다르게 나타났는데, 이는 esterases의 유도에 사용된 기질의 차이 또는 유도되는 세포의 구성효소에 차이가 있는 것으로 생각되며 이에 관한 연구가 필요하다고 생각 된다.

**Gel상의 효소 활성 염색**

본 연구에서 *Pseudomonas* sp. LG2에 의해 유도 분비되는 세포의 단백질에 FAE 및 xylanase 효소 단백질의 존재 유무를 확인하기 위하여 zymogram을 실시하였다. Gel상의 효소활성을 조사하기 위하여 polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 앞의 실험 방법에 따라 FAE 및 xylanase의 활성을 umbelliferyl trimethyl ammonium cinnamate chloride (MUTMAC)과 oat spelt xylan을 기질로 각각 사용하여 조사한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 동결 건조한 *Pseudomonas* sp. LG2의 세포의 조단백질로 전기영동한 후 xylanase zymogram (A)을 실시한 결과

Table 2. Esterase activity(mU/mg protein) of extracellular protein in culture supernatants collected on the 8day of growth containing different carbon sources from *Pseudomonas* sp. LG2

Substrates	Cultures			
	Xylan	HBSG I	HBSG II	AFBSG
MFA	0.8±3.6	11.3±1.5	14.9±2.5	17.1±1.3
MSA	ND	ND	ND	ND
MCA	ND	10.6±2.1	15.2±1.7	21.±1.5
MpCA	0.5±1.2	2.5±2.2	2.3±2.1	1.6±1.8
MVA	ND	ND	ND	ND
MGA	ND	ND	ND	ND

Results are the means of triplicate assays.

\* ND. not detected

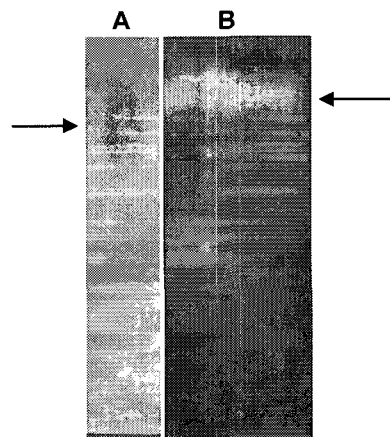


Fig. 3. PAGE showing xylanase(A) and FAE(B) activity of extracellular proteins produced by *Pseudomonas* sp. LG2. The cultures were grown on AFBSG. PAGE and enzyme activity are carried out as described in material and method.

반응 gel에 투명한 활성 band를 눈으로 확인되어 탄소원에 의해 *Pseudomonas* sp. LG2로부터 유도 생성된 세포의 단백질에 xylanase가 존재함을 알 수 있었다. FAE의 zymogram 분석 역시 동일한 방법으로 전기영동 한 후 70 mM phosphate buffer(pH 6)에 0.05% 4-methyl umbelliferyl trimethyl ammonium cinnamate chloride(MUTMAC)를 함유한 용액에 37°C에서 1시간 반응시키고 312 nm에서 활성 형광 band를 확인하였다. 312 nm에서 조사한 결과 MUTMAC를 가수분해하여 생성된 형광 band를 확인 할 수 있었다. Ferreira [15]등이 여러 가지 탄소원을 이용하여 *Streptomyces avermilitis* CECT3339가 생산하는 FAE의 전기영동 결과와 유사하였다. 그러나 Ferreira 등은 여러 가지 탄소원에 의해 몇 종의 cinnamic acid esterases가 유도된다고 추정하였으나, 본 실험의 PAGE 단백질 분리 pattern을 조사한 결과로는 탄소원의 종류에 따라 다른 esterase가 유도되는지는 확인이 어려웠다.

## 요 약

리그닌 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. LG2는 lignocellulose 기질을 분해하여 APPL 화합물을 생성하는 균주이다. 이 균주를 BSG(brewer's spent grain)가 함유된 배지에서 배양한 배양액에서 APPL 화합물을 확인하였다. 세포의 조효소들의 유도에 관한 여러 가지 탄소원의 영향을 조사한 결과 glucose 배지에서는 xylanase의 효소활성만 확인 되었고 xylose, arabinose에서 배양한 조효소에서는 FAE 및 xylanase의 효소활성이 없었다. Oat spelt xylan, HBSG I (hydrolyzed brewer's spent grain I), HBSG II (hydrolyzed brewer's spent grain II) 및 AFBSG(autoclaved fraction from brewer's spent grain)를 탄소원으로 배양한 조효소에서는 FAE 및 xylanase의 효소활성이 확인됐다. *Pseudomonas* sp. LG2를 oat spelt xylan, HBSG I, HBSG II 및 AFBSG를 탄소원으로 사용하여 14일 동안 배양하면서 배양기간에 따른 세포의 효소들의 FAE와 xylanase 활성을 조사하였다. Xylanase의 최고 활성은 xylan을 탄소원으로 6일간 배양 했을 때 5.3 U/mg으로 가장 높았으며, FAE의 최고 활성은 AFBSG를 탄소원으로 배양 했을 때 배양 8일째 15.4 mU/mg으로 가장 높았다. Oat spelt xylan, HBSG I, HBSG II 및 AFBSG를 탄소원으로 사용하여 배양한 배지에 분리된 ferulic acid가 확인되었다. 세포의 효소의 FAE 활성은 methyl ferulic acid, methyl caffeic acid, methyl *p*-coumaric acid에 대해 esterase의 활성을 보였으나, methyl sinapinic acid, methyl vanillic acid 및 methyl gallic acid에 대해서는 esterase의 활성이 없었다.

## 감사의 글

이 연구는 부산대학교 2006년 자유과제 학술연구지원비에

의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Andreoni, V., S. Bernasconi and G. Bestetti. 1995. Bio-transformation of ferulic acid and related compounds by mutant strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Micro. Biotechnol.* **42**, 830-835.
2. Bartolome, B. and C. Gomez-Cordoves. 1999. Barley spent grain: Release of hydroxycinnamic acids by commercial enzyme preparations. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 435-439.
3. Bartolome, B., C. B. Faulds., P. A. Kroon, K. Waldron, H. Gilber, G. Hazlewood and G. Williamson. 1997. An *Aspergillus niger* esterase(ferulic acid esterase III) and a recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* esterase (XylID) release a 5,5'-ferulic dehydrodimer(diferulic acid) from barley and wheat cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 208-212.
4. Bonnin, E., L. Saulnier, M. Brunel, Y. Gougy, L. Lesage-Meessen, M. Asther and J. F. Thibault. 2002. Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme Micro. Technol.* **31**, 1000-1005.
5. Bonnin, E. L., M. Asther and J. F. Thibault. 2000. A new process using *Aspergillus niger* and its enzymes for the production of vanillin and related compounds from agro-industrial by-products. *AFINIDAD LVII.* **489**, 357- 364.
6. Brezillon, C., P. A. Kroon, C. B. Faulds, G. M. Breet and G. Williamson. 1996. Novel ferulic acid esterases are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar beet pulp. *Appl. Biotechnol.* **45**, 371-376.
7. Castanares, A., S. I. McCrae and T. M. Wood. 1992. Purification and properties of a feruloyl/*p*-coumaryl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**, 875-884.
8. Copa-patino, J. L., Y. G. Kim and P. Broda. 1993. Production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 69-76.
9. Donaghy, J. and A. M. Mckay. 1997. Purification and characterization of a feruloyl esterase from the fungus, *Penicillium xepansum*. *J. Appl. Microbiol.* **83(6)**,718-726.
10. Edeas, M., K. Khalfoun, Y. Laizi, L. Vergnes, S. Labidalle and A. Lindenbaum. 1995. Effects of the liposolubility of free radical scavengers on the production of antigen P24 from a HIV infected monocytic cell line. *C R Seances Soc. Biol. Fil.* **189**, 367-73.
11. Faulds, C. B., M. C. Ralet, G. Williamson, G. P. Hazlewood and H. J. Gilbert. 1994. Specificity of an esterase(XYLD) from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*. *Biochim. Biophys. Acta* **1243**, 265-269.
12. Faulds, C. B., M. C. Ralet and G. Williamson. 1991. The purification and characterization of ferulic acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 2339-2345.

13. Faulds, C. B. and G. Williamson. 1994. Purification and characterization of a ferulic acid esterase(FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Microbiology*. **140**, 779-787.
14. Faulds, C. B., G. Mandalari, R. LoCuroto, G. Bisignano and K. W. Waldron. 2004. Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 644-650.
15. Ferreira, P. F. N., C. Gutierrez, J. Soiveri and J. L. Copapatio. 1999. *Streptomyces avermitilis* CECT3339 produces a ferulic acid esterase able to release ferulic acid from sugar beet pulp soluble feruloylated oligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 440-442.
16. Kawavata, K., T. Yamamoto, A. Hara, M. Shiizu, Y. Yamada, K. Matsunaga and T. M.-H. Tanaka. 2000. Modifying effects of ferulic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats. *Cancer Lett.* **157**, 15-21.
17. Kim, Y. G., H. J. Joo, K. K. Kim, H. S. Kim and Y. G. Lee. 2002. Isolation of a lignolytic bacterium for degradation and utilization of lignocellulose. *K. J. of Life Science.* **12(4)**, 392-398.
18. Kroon, P. A., M. T. Gracia- Conesa, I. J. Fillingham, G. P. Hazlewood and G. Williamson. 1999. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 428-434.
19. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **22**, 680-685.
20. Mackenzie, C. R. and D. Bilous. 1988. Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1170-1173.
21. Monties, B. 1988. Preparation of dioxane lignin fractions by acidolysis, pp 31-47. In Willis A. Wood and Scott T. Kellogg(eds.), *Methods in Enzymology.* **161**, Academy press Inc., New York.
22. Murakami A., Y. Nakamura, K. Koshimizu, D. Takahashi, K. Matsumoto, K. Hagihara, H. Taniguchi and E. Nomura. 2002. FA15, a hydrophobic derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory responses and skin tumor promotion; comparison with ferulic acid. *Cancer Letters* **180**, 121-129.
23. Peiqiang Y., D. David, J. J. Maenz, J. Racz and D. A. Christensen. 2002. Release of ferulic acid from oat hols by *Aspergillus* Ferulic acid esterase and *Trichoderma* xylanase *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1625-1630.
24. Ralet, M. C., C. B. Faulds, G. Williamson and J. F. Thibault. 1994. Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research.* **263**, 257-269.
25. Rosazza, J. P. N., Z. D. Huang, T. Volm and B. Rousseau. 1995. Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *J. Ind. Microbiol.* **15**, 457-471.
26. Royer, J. C. and J. P. Nakas. 1990. Simple sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gel. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(6)**, 1516-1517.
27. Saija, A., A. Tomaino, T. Drombetta, N. Uccella, T. Barbuzzi, D. Paolino, A. De Pasquale and F. Bonona. 2000. In vitro and vivo evaluation of caffeic and ferulic acid as topical photoprotective agents. *International J. Pharmaceutics.* **199**, 39-47.
28. Saulnier, L., C. Marot, E. Igorriaga, E. Bonnin and J. F. Thibault. 2001. Thermal and enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. *Carbohydr. Polymer.* **45**, 269-275.
29. Suzuki, A., D. Kagawa, A. Fuji, R. Ochiai, I. Tokimitsu and I. Saito. 2002. Short-and long-term effects of ferulic acid on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension.* **15**, 51-357.
30. Taniguchi, H., A. Hosoda, T. Tsuno, Y. Maruta and E. Nomura. 1999. Preparation of ferulic acid and its application for the synthesis of cancer chemopreventive agents. *Anticancer Res.* **19**, 3757-3761.
31. Tenkanen, M., J. P. Schuseil and K. Poutanen. 1991. Production, purification and characterization of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulose. *J. Biotechnol.* **18**, 69-82
32. Vera V., T. A. Lozovaya, N. I. Gorshkovva, V. Alexander and J. M. Widholm. 2000. Cell wall-bound phenolics in cells of maize(*Zea mays*, *Gramineae*) and buckwheat (*Fagopyrum tataricum*, *Polygonaceae*) with different plant regeneration abilities. *Plant Science.* **152**, 79-85.