Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 21, No. 6, 588-593 (1993)

*Penicillium verruculosum*으로부터 D-Xylanase II의 정제 및 특성

조남철* · 강영태[1] · 이태훈[2] · 정기철[3] · 김강화[4]
동신전문대학 식품영양과, [1]목포전문대학 임상병리과, [2]전남대학교 낙농과,
[3]전남대학교 유전공학과, [4]전남대학교 식품영양학과

Purification and Characterization of D-Xylanase II from *Penicillium verruculosum*

Cho, Nam-Chul*, Young-Tae Kang[1], Tae-Hoon Lee[2], Ki-Chul Chung[3], Kang-Hwa Kim[4]

Department of Food & Nutrition, Dongshin Junior College, Kwangju 500-714, Korea
[1]Department of Clinical Pathology, Mokpo Junior College, Mokpo 530-350, Korea
[2]Department of Dairy Science, [3]Department of Genetic Engineering
[4]Department of Food & Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract — Xylanase(1,4-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8) II was purified from *Penicillium verruculosum* by using the techniques of two anion exchange chromatographies, and gel filtration. The molecular weight of this enzyme was about 22,000 as determined by SDS-electrophoresis. The enzyme showed hydrolytic activity toward xylan but did not catalyze hydrolysis of ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside, and celluloses such as Avicel, cotton, filter paper, carboxymethylcellulose. Specific activity of the xylanase against xylan as a substrate was 270 units per mg of protein. The optimum pH and temperature of the enzyme were pH 3.0~4.0 and 50~60℃, respectively, and the enzyme was stable in the wide pH range from 3.0 to 10.0 at 50℃ for 24 hrs. The purified enzyme split xylan to yield xylooligosaccharides containing xylobiose, and xylobiose was major product, while xylose was produced very little. Those properties were similar to that of D-xylanase I showing a M.W 35,000 from the same fungus, *P. verruculosum*.

Xylanase(1,4-β-D-xylan xylanohydrolase ; EC 3.2.1.8) 는 농산폐기물의 주요 구성분의 하나인 xylan의 1,4-β-D-xylanopyranoside결합을 가수분해하는 효소로서 효모, 곰팡이 그리고 세균을 포함한 다양한 미생물들에 의해 생산된다. 이들 미생물들중 *Schizophyllum radiatum*(1)을 비롯한 몇가지 균류들과 세균들에 의해 생산되는 xylanase들이 정제되어 그 특성이 보고된 바 있다. 정 등(2)에 의해 자연계로부터 분리된 *Penicillium verruculosum*은 강력한 섬유소분해효소를 생산하는 균주로서 조 등에 의해 두 종류의 cellobiohydrolase(3)를 비롯하여 각각 한 종류의 D-xylanase(4)와 β-xylosidase(5)가 정제되어 그들의 효소적 특성이 보고된 바 있다. 본 연구에서는 *P. verruculosum*으로부터 앞서 보고된 D-xylanase와는 분자량이 다른 또 하나의 D-xylanase를 정제하여 그 효소적 특성을 조사하였다.

Key Words: *Penicillium verruculosum*, xylanase
***Corresponding author**

재료 및 방법

*Penicillium verruculosum*의 배양조건

*Penicillium verruculosum*은 정 등(6)이 제조한 기본배지에 탄소원으로 oat spelt xylan(Sigma X-0627)를 가하여 전보(7)에서와 같은 방법으로 8일 동안 배양하였으며 배양액을 원심분리한 다음 상징액을

한외여과(Amicon filter PM 10)하여 농축한 후 그 농축액을 효소정제를 위한 조효소용액으로 사용하였다.

Xylanase의 활성도 측정 및 단백질량 측정

기질의 조제는 oat spelt xylan을 pH 4.0의 100 mM McIlvaine buffer에 1%가 되도록 현탁시켰다. 효소 활성도의 측정은 1% xylan 0.1 ml에 효소액 20 μl를 가한후 60℃ 에서 20분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법(8)을 이용하여 측정하였으며 효소활성단위는 1분 동안 1 μmole의 xylose에 해당하는 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다. 인공기질들에 대한 활성도는 0.05 M McIlvaine buffer(pH 4.0)에 ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside 그리고 ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside를 각각 10 mM의 농도로 가한 다음 효소용액을 10 μl를 가해 60℃ 에서 20분간 반응시킨 후 1.0 M sodium carbonate 용액을 가해 400 nm에서 흡광도를 측정함으로서 생성된 ρ-nitrophenol의 양을 측정하였다. 단백질의 양은 Lowry 등(9)의 방법을 이용하여 측정하였다.

효소반응의 특성

최적 pH 및 pH에 대한 안정성 : 효소의 최적 pH를 검토하기 위해 pH 2에서 10까지 1간격으로 각각 제조된 완충용액에 효소를 가하고 60℃ 에서 20분간 반응시켜 활성도를 비교하였다. 사용된 완충용액은 pH 2에서 pH 7.0까지는 McIlvaine buffer를, 그리고 pH 7.0에서 pH 10까지는 Tris-HCl buffer를 사용하였다. 효소의 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해 pH 2에서 pH 10까지의 1 간격으로 각각 제조된 완충용액에 효소를 가하고 실온에서 30분간 방치한 후 기질을 가해 60℃ 에서 20분간 반응시켜 남아있는 활성도를 비교하였다.

최적온도 및 온도에 대한 안정성 : 50 mM McIlvaine buffer(pH 4.0)에서 1%의 xylan을 기질로하여 30℃ 부터 80℃ 까지 10℃ 간격으로 각각의 온도에서 20분간 반응시켜 활성도를 비교하여 최적온도를 정하였다. 효소의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해 30℃ 에서 80℃ 까지 10℃ 간격으로 각각의 온도에서 30분간 방치시킨 후 기질을 가해 60℃ 에서 20분간 반응시켜 남아있는 활성도를 비교하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동

SDS를 포함한 polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli의 방법(10)을 이용하여 12.5% gel에서 실시하였으며 저분자량 표준단백질(Low molecular weight standard, Bio-Rad)을 동시에 전기영동한 후 분자량을 측정하였다.

Xylan 분해생성물에 대한 Thin layer chromatography(TLC)

50 mM McIlvaine buffer(pH 4.0)에 1%가 되도록 현탁시킨 xylan 용액 0.2 ml에 효소용액 0.1 ml를 가한 다음 60℃ 에서 30분간 반응시킨 후 상징액을 silica gel plate(Merk)에서 전개시켰으며 전개용매로서 n-butanol : ethanol : water(5 : 3 : 2) 혼합용액을 사용하였으며 $AgNO_3$-NaOH 용액을 분사하여 xylan 분해생성물을 확인하였다(11).

효소의 정제

배양상징액으로부터 제조된 조효소용액을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)에 대해 투석한 다음 미리 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-25 column(3.0×25 cm)에 가한 후 0.0 M에서 0.4 M KCl까지의 linear gradient로 분당 1 ml씩 용출하였다. 용출된 분획 중 xylan 분해활성이 있는 분획들을 모아 농축하여 탈염한 후 미리 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)로 평형시킨 HPLC DEAE column(TSK DEAE-5PW for HPLC, 0.8×7.5 cm)에서 위와 동일한 방법으로 단백질들을 용출시킨 다음 xylan 분해활성이 있는 분획들을 모아 농축하여 HPLC gel 여과(Bio-Sil TSK-250 for HPLC, 0.75×60 cm)를 하였다. HPLC gel 여과는 20 mM HEPES(pH 7.0) buffer로 평형시킨 상태에서 분당 0.5 ml의 유속으로 행하였다.

결과 및 고찰

D-xylanase의 정제 및 분자량 측정

D-xylanase의 정제를 위해 농축된 조효소액을 DEAE-sephadex A-25 column chromatography를 하여 Fig. 1-A의 결과를 얻었다. D-xylanase의 활성은 0.16 M에서 0.35 M KCl 농도의 넓은 범위에서 나타났으며, 35번에서 68번 분획까지의 xylan 분해활성도는 각 분획들을 전기영동하여 단백질 양상을 활성도와 비교한 바 이미 정제하여 보고한 바 있는 SDS-PAGE에서의 분자량이 35,000인 xylanase(4)와 그리

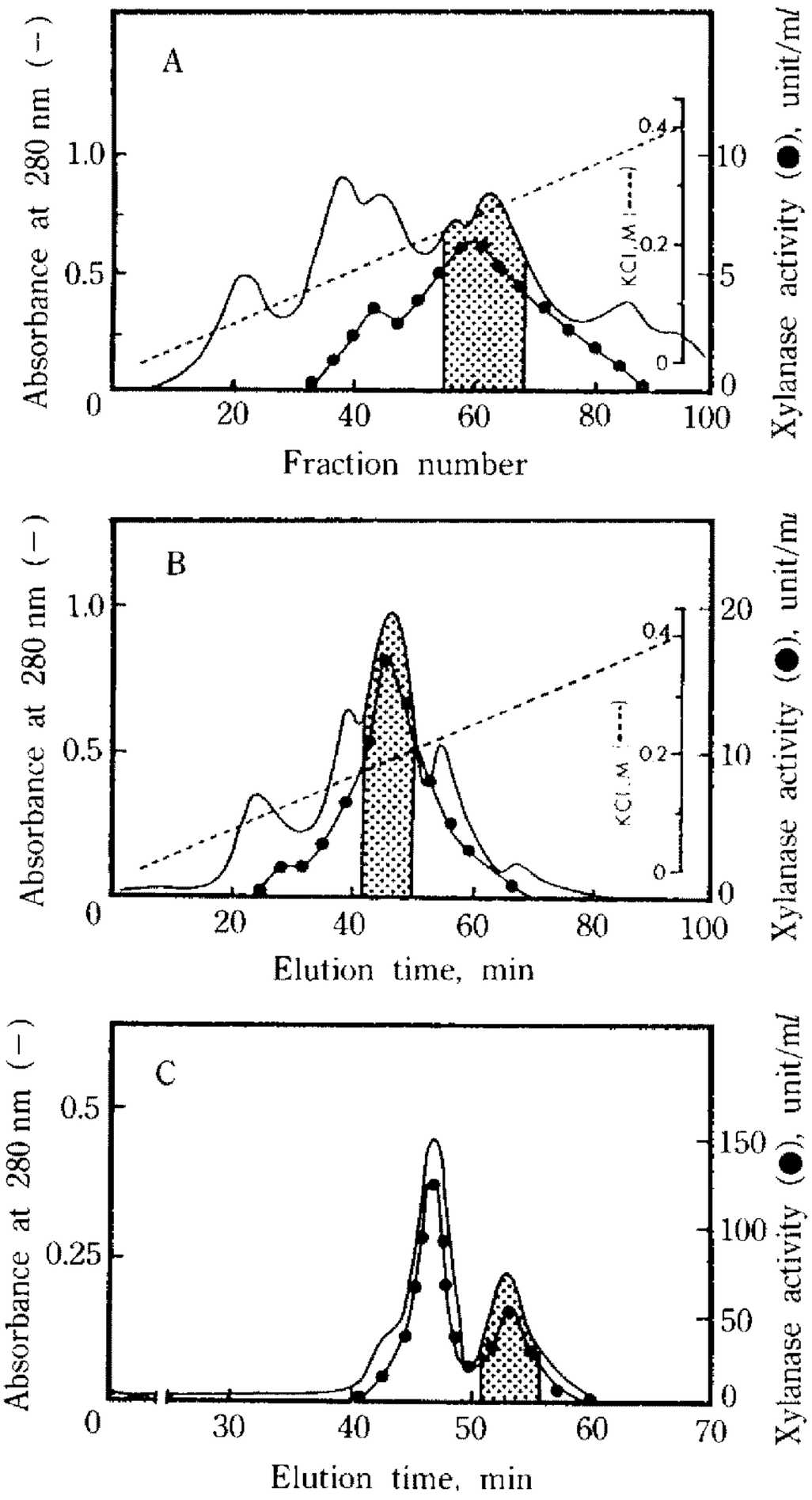

Fig. 1. Purification of D-xylanase from *P. verruculosum*.
Detailed procedures on column chromatography steps were described under "Experimental Procedures". A, DEAE-Sephadex chromatography; B, HPLC-DEAE chromatography on DEAE-5PW; C, HPLC-gel filtration chromatography on Bio-Sil TSK-250. One unit was defined as the amount of enzyme which produced 1 mole of reducing sugar in 1 min.

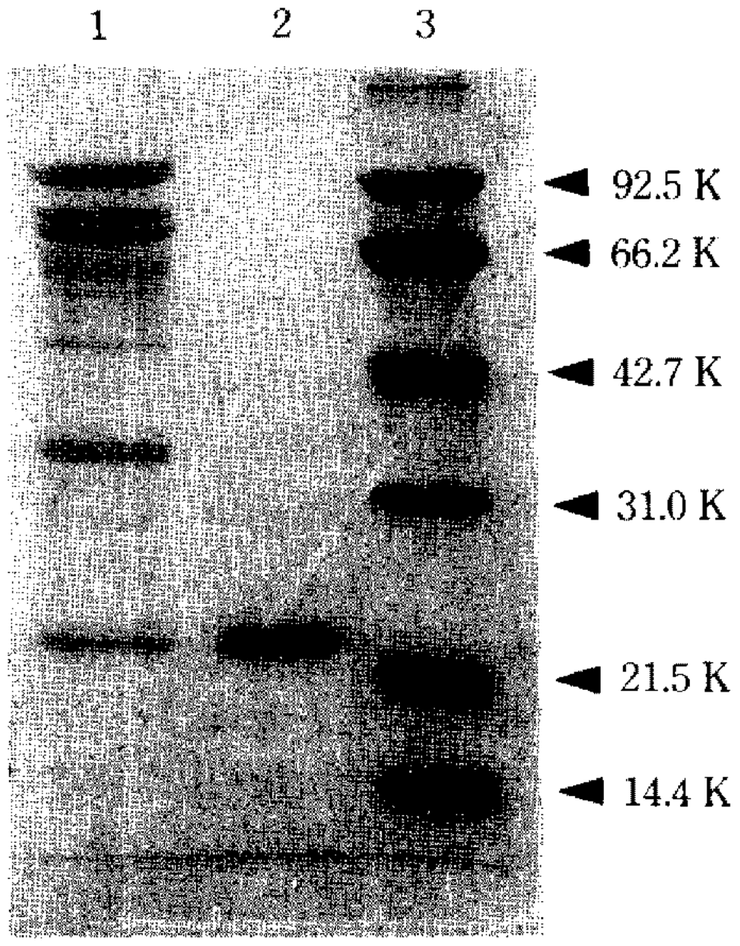

Fig. 2. The purified D-xylanase of *P. verruculosum* was seperated by 12% SDS-PAGE and the gel was stained with Coomassie blue.
Lanes: 1, crude enzyme; 2, D-xylanase; 3, molecular weight standard containing phosphorylase b (92.5 K), bovine serum albumin (66.2 K), ovalbumin (42.7 K), carbonic anhydrase (31.0 K), trypsin inhibitor (21.5 K), and lysozyme (14.4 K).

고 그것과는 분자량이 다른 또 하나의 xylanase에 의한 것으로 나타났다. 따라서 55번에서 68번까지의 분획들을 모아 70% 포화농도의 ammonium sulfate를 가해 침전 분리시킨 효소단백질을 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.6)에 용해한 다음 centricone 30(Amicone)으로 농축탈염하여 HPLC DEAE-5PW column chromatography를 하였다(Fig. 1-B). Xylanase의 활성도는 DEAE-sephadex A-25 column chromatography에서와 같이 비교적 넓은 범위에서 나타났으며 30번 분획에서 60번 분획까지의 각 분획들을 전기영동하여 단백질 양상과 활성도를 비교한 결과 분자량이 35,000인 단백질 밴드와 약 22,000인 단백질 밴드가 xylan 분해활성도와 일치하였으며 두 단백질 밴드 중 분자량이 35,000인 단백질이 더 많은 량을 차지하였다. Xylanase 활성도가 높고 주로 분자량이 35,000과 22,000인 단백질들이 다른 분자량의 단백질들에 비해 비교적 많이 존재하는 42번 분획에서 50번 분획까지를 모아 농축한 후 HPLC gel filtraion을 하였다(Fig. 1-C). HPLC gel filtration을 한 결과 분자량이 다른 두 종류의 단백질 peak가 나타났으며 이들 두 peak 모두 xylanase 활성도와 일치하였다. 두 peak의 분획들을 각각 농축하여 전기영동한 결과 첫번째 peak는 주로 분자량 35,000의 xylanase가 존재하였으며 두번째 peak는 분자량이 22,000인 또 하나의 xylanase로서 전기영동상에서 단일밴드를 나타냈다. 따라서 *P. verruculosum*으로부터 이미 정제되어 보고된 바 있는 분자량이 35,000인 D-xylanase를 D-xylanase I으로 그리고 본 연구에서 새로이 정제된 D-xylanase를 D-xylanase II로 명명하였다. 새로이 정제된 xylanase II의 분자량은 약 22,000으로서 이미 보고된

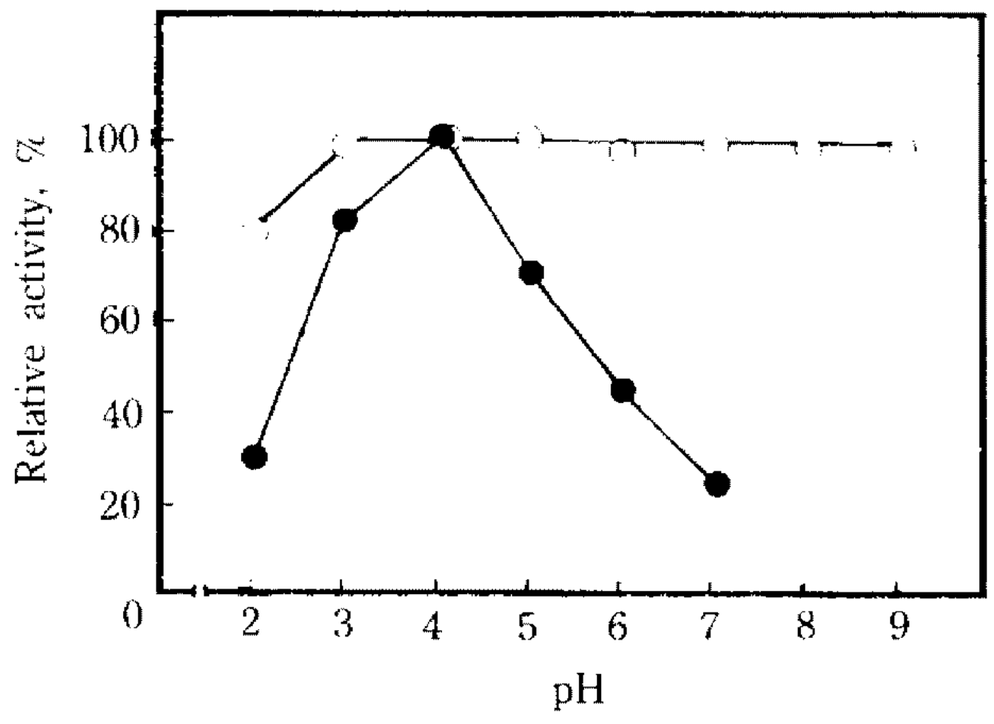

Fig. 3. Effect of pH and pH stability on the xylanase activity.
The assay conditions were same as described in Methodes. The buffers (0.1 M) used were as follow: pH 2.0~7.0, McIlvaine buffer; pH 8.0~10.0, Tris-HCl buffer. ●: pH for optimal activity, ○: pH for enzyme stability

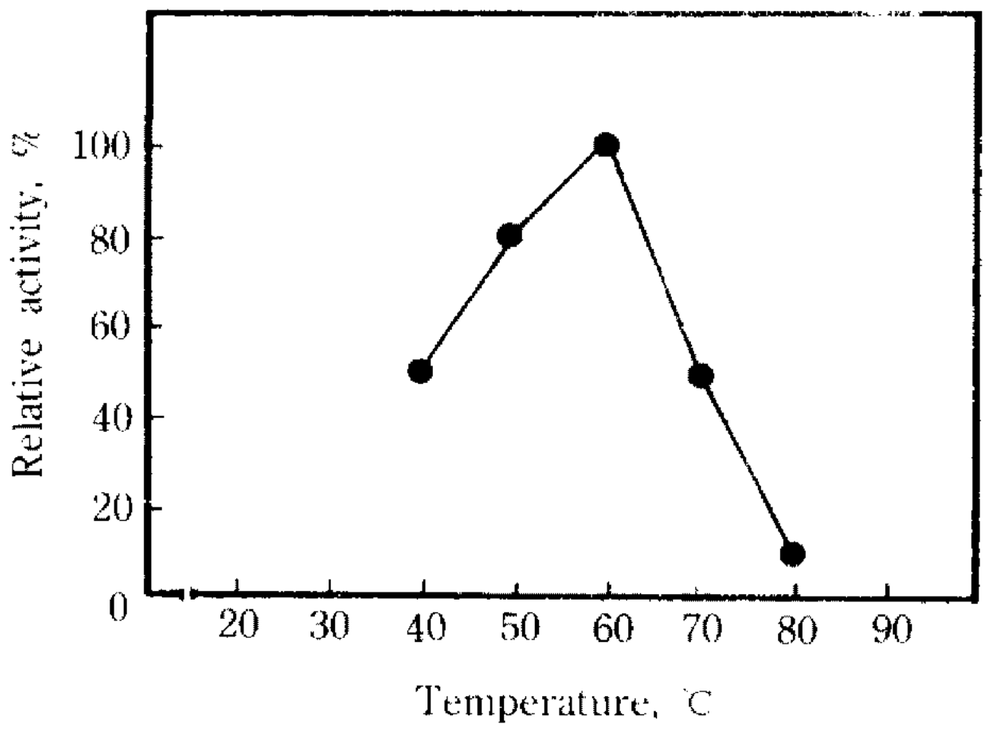

Fig. 4. Effect of temperature on the xylanase activity.
The assay conditions were same as described in Methodes.
●: temperature for optimal activity

바 있는 *Schizophyllum radiatum*(1), *Schizophyllum commune*(12), *Trichoderma lignorum*(13), 그리고 *Auerobasidium pullulans*(17)으로부터 생산되는 xylanase들의 분자량들(20,000에서 25,000 사이)과 유사하였다.

Xylanase II의 활성도에 대한 온도와 pH의 영향

Xylanase II의 활성도에 대한 최적 pH의 측정은 pH 2.0에서 pH 7.0까지 1.0 단위로 조사하였다(Fig. 3). 효소활성도에 대한 최적 pH는 pH 3.0~4.0의 범위로서 xylanase I과 그리고 분자량이 21,000인 *T. lignorum*의 Xylanase A(13)의 최적 pH와는 같았으나 지금까지 보고된 많은 xylanase들(1, 12-18)의 최적 pH인 pH 4.5-6.5 보다는 조금 낮았다. 또한 xylanase II는 pH 2에서 pH 10까지의 넓은 범위에서 안정함으로서 Streptomyces(14)의 xylanse 경우와는 비슷한 정도였으나 지금까지 보고된 다른 많은 xylanase들(1, 12, 13, 15)에 비해 매우 안정하였다.

xylanase II의 활성도에 대한 최적온도는 50℃ ~60℃로서 최적온도가 55℃인 *S. radiatum*의 D-xylanase와 같았으며 50℃에서는 24시간 이상에서도 안정하였으나 70℃ 이상에서는 급격히 활성이 감소하였다. 한편, *S. radiatum*(1), *Thielaviopsis basicola*(15)로부터 정제된 xylanase들은 50℃ 이상에서 급격히 실활됨으로서 본 균주로부터 생산되는 xylanase가 열에 대한 안정성이 매우 우수함을 알 수 있었다.

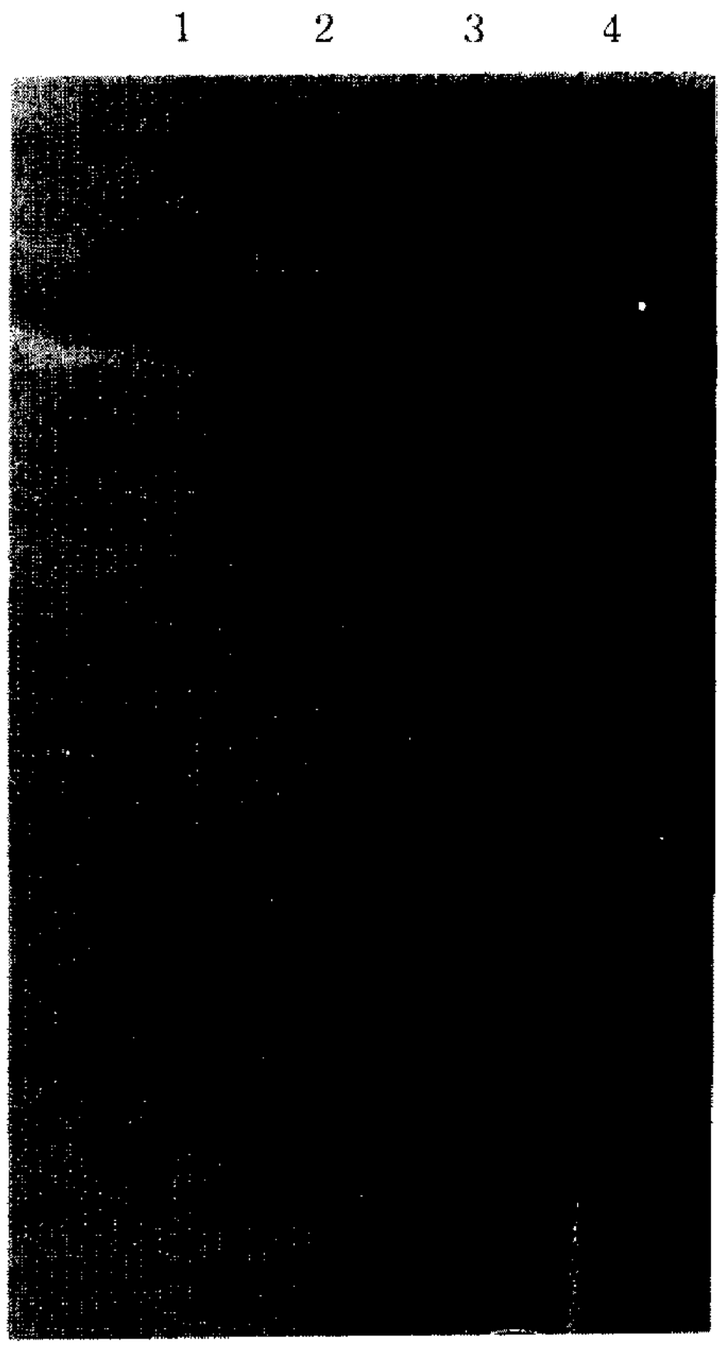

Fig. 5. Thin-layer chromatogram of the hydrolysing products of xylan by D-xylanase from P. verruculosum.
Reaction mixture containing 1% oat spelt xylan suspended in 50 mM McIlvaine buffer, pH 4.0 and purified D-xylanase was incubated for 20 minute at 60℃. The reaction mixture was separated using n-butanol:ethanol:water (5:3:2) as a developing solvent system on precoated silica gel plate and reducing sugars were detected by silver nitrate-sodium hydroxide reagent. Lanes: 1, D-xylose; 2, D-xylobiose; 3, reaction mixture; 4, reaction mixture without D-xylanase.

Table 1. Hydrolysis of various glycosides by *P. verruculosum*

Glucoside	Substrate concentration	Specific activity (unit/mg protein)
ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside	0.5 mM	0
ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside	0.5 mM	0
ρ-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside	0.5 mM	0
Avicel	1.0%	0
carboxymethylcellulose	1.0%	0
xylan	1.0%	270

TLC에 의한 Xylan 분해생성물의 확인

정제한 효소를 50 mM McIlvain buffer(pH 4.0)에 oat spelt xylan이 1%의 농도로 현탁되어 있는 기질 용액에 가한 다음 60℃에서 30분간 반응시킨 후 pre-coated sillica gel 판을 이용하여 TLC를 행한 결과 분해생성물로서 xylobiose를 포함한 xylooligosaccharide들이 확인되었며 그중 xylobiose가 가장 많이 생성되었고 xylose는 매우 소량이 생성되어 정제된 xylanase가 endo-type의 가수분해효소임을 추정할 수 있었다(Fig. 5). 이러한 xylan 분해작용방식은 xylanase I과 같으며 다른 균주로부터 정제된 몇가지 xylanase들(1, 12, 16, 17, 18)의 분해작용방식과도 일치하였다.

기질특이성 및 효소비활성도 측정

정제된 xylanase의 xylose를 비롯한 여러가지 기질들에 대한 분해율을 측정한 결과는 Table 1과 같았다. 정제된 xylanase는 앞서 동일 균주로부터 정제된 xylanase I과 같이 인공기질인 ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside 뿐만 아니라 Avicel, cotton, filter paper, carboxymethylcellulose와 같은 섬유소를 가수분해하지 못함으로서 정제된 xyalnase II가 β-xylosidase나 섬유소분해효소활성을 갖고 있지 않음을 알 수 있었다. 정제된 xyalnase II의 xylan분해에 대한 비활성도는 단백질 mg당 270 units로서 xylanase I의 xylan 분해에 대한 비활성도인 단백질 mg당 300 units와 큰 차이가 없었다.

요 약

*Penicillium verruculosum*으로부터 D-xylanase(1,4-β-D-xylan xylanohydrolase ; EC 3.2.1.8) II를 분리정제하여 일반적 특성을 조사하였다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE상에서 22,000으로 추정되며 xylan 이외에 인공기질인 ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside, ρ-nitrophenyl-β-D-cellobiopyranoside 뿐만 아니라 Avicel, cotton, filter paper, carboxymethylcellulose와 같은 섬유소를 가수분해하지 못했다. 정제된 효소의 xylan에 대한 비활성도는 단백질 mg당 270 units였으며 효소활성도에 대한 최적 pH와 최적 온도는 각각 3.0~4.0과 50~60℃ 였고 50℃에서는 pH 3.0~10.0의 비교적 넓은 범위에서 24시간 동안 효소활성도가 안정하게 유지되었다. 정제된 효소를 xylan과 반응시켰을 때 분해산물로서 xylobiose를 비롯하여 여러가지 xylooligosaccharide들이 생성되었으며 그 중 xylobiose가 가장 많이 생성되었다. 그러나 xylose는 이들에 비해 매우 소량 생성되었으며 이러한 xylan 분해양상은 앞서 *P. verruculosum*으로부터 정제되어 보고된 D-xylanase I과 동일하였다.

감사의 글

본 연구는 1993년도 교육부 유전공학연구비의 지원에 의해 수행된 연구의 일부이며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Cavazzoni, V., Manzoni, M., Parini, C. and M.C. Bonferoni. 1989. D-xylanase produced by *Schizophyllum radiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 247-251.
2. Chung, K.C., Kwawai, K., Yashima, S. and Y. Eguchi. 1982. Production of cellulolytic enzymes by *Penicillium verruculosum*. *Hakkokokogaku*. **60**:

355-357.
3. 조남철, 김강화, 전순배, 정기철. 1991. *Penicillium verruculosum*으로부터 Cellobiohydrolase의 정제 및 특성에 관한 연구. 한국생화학회지 **24**: 431-436.
4. 조남철, 권수진, 김강화, 정기철. 1992. *Penicillium verruculosum*으로부터 D-xylanase의 정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **25**: 670-675.
5. 조남철, 김강화. 1992. *Penicillium verruculosum*으로부터 β-xylosidase의 정제 및 특성. 한국생화학회지 **25**: 631-635.
6. 정기철. 1987. 섬유소분해효소 생산증진을 위한 *Penicillium verruculosum*의 균주 개량. 한국산업미생물학회지 **15**: 388-395.
7. 조남철, 김강화, 정기철, 전순배. 1990. *Penicillium verruculosum*의 Avicelase 생성에 대한 Cellobio Octaacetate와 Avicel 및 KC-flock의 영향. 한국산업미생물학회지 **18**: 383-389.
8. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, **31**: 426-428.
9. Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Follin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
11. White, C.A. and J.F. Kennedy. 1987. Oligosaccharides. Pp. 37-54. *In* Chaplin, M. F., and J. F. Kennedy(eds.) *Carbohydrate analysis*. IRL Press, Oxford. Washington DC.
12. Jurasek, L. and M.G. Paice. 1988. Xylanase A of *Schizophyllum commune*. *Meth. Enzymol.* **160**: 659-662.
13. John, M. and J. Schmidt. 1988. Xylanase and β-Xylosidase of *Trichoderma lignorum*. *Meth. Enzymol.* **160**: 662-671.
14. Yasui, T., Marui, M., Kusakabe, I. and K. Nakanishi. 1988. Xylanase of *Streptomyces*. *Meth. Enzymol.* **160**: 648-654.
15. Ghosh, V. K. and J. K. Deb. 1988. Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 44-47.
16. Mishra, C., Forrester, I.T., Kelley, B.D., Burgess, R.R., and G.F. Leatham. 1990. Characterization of a major xylanase purified from *Lentinula edodes* cultures grown on a commercial solid lignocellulosic substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 226-232.
17. Dobberstein, J. and C.C. Emeis. 1989. β-xylanase produced by *Auerobasidium pullulans* CBS 58475. *Appl Microbiol Biotechnol.* **32**: 262-268.
18. Matsuo, M. and T. Yasui. 1988. Xylanase of *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. *Meth. Enzymol.* **160**: 671-674.

(Received October 22, 1993)