

## 벼짚분해과정 중에 생산하는 *Fomitopsis palustris* 균체 외 Xylanase의 분리정제 및 효소특성\*<sup>1</sup>

윤 정 준\*<sup>2</sup> · 이 영 민\*<sup>3</sup> · 최 두 열\*<sup>3</sup> · 김 영 균\*<sup>3</sup> · 김 영 숙\*<sup>3†</sup>

### Purification and Characterization of Xylanase from *Fomitopsis palustris* in Rice Straw Culture\*<sup>1</sup>

Jeong-Jun Yoon\*<sup>2</sup> · Young-Min Lee\*<sup>3</sup> · Doo-Yeol Choi\*<sup>3</sup> ·  
Young-Kyoon Kim\*<sup>3</sup> · Yeong-Suk Kim\*<sup>3†</sup>

#### 요 약

본 논문에서는 갈색부후균 *Fomitopsis palustris*가 벼짚을 분해하는 과정 중에 생산하는 xylanase를 확인하여 분리 정제하고, 아미노산 서열분석을 통해 동정하였다. 그리고 동정된 단백질의 효소특성을 조사하였다. 분리 정제된 단백질은 SDS-PAGE분석에서 43 kDa의 분자량을 나타내었고, 아미노산 서열분석에서는 Glycoside Hydrolase family 10에 속하는 xylanase와 높은 상동성을 나타내었다. 정제효소의 기질에 대한  $K_m$ 치는 31 mg/ml,  $V_{max}$ 는 252.3 U/mg,  $K_{cat}$ 은  $2.3 \times 10^4$ /min이고, 최적 pH 범위는 pH 4.0~5.0, 최대 활성 온도는 70°C로 밝혀졌다.

\*<sup>1</sup> 접수 2007년 10월 10일, 채택 2007년 10월 24일

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호 20050401034819)의 지원으로 수행되었음.

\*<sup>2</sup> 건국대학교 생명공학과, Dept. of Bioscience and Biotechnology, Konkuk University, Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-701, Korea

\*<sup>3</sup> 국민대학교 임산공학과, Dept. of Forest Products, Kookmin University, Jeongnung-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-702, Korea

† 주저자(corresponding author) : 김영숙(e-mail: yskim@kookmin.ac.kr.)

## ABSTRACT

An extracellular xylanase from the brown-rot fungus *Fomitopsis palustris* grown on rice straw culture was purified to a single protein band. On SDS-PAGE, the molecular mass of purified enzyme was estimated to be about 43 kDa. The amino acid sequence of the proteolytic fragments showed high homology with fungal glycoside hydrolase family 10 xylanases. The  $K_m$ ,  $K_{cat}$  and  $V_{max}$  for birch xylan were 31 mg/ml,  $23 \times 10^4$ /min and 2523 U/mg, respectively. The optimal activity of the purified xylanase from *F. palustris* was observed at pH 4.0~5.0 and 70°C.

**Keywords:** *Fomitopsis palustris*, xylanase, lignocellulosic biomass, rice straw

## 1. 서 론

목질계 바이오매스는 지구상에서 가장 많이 존재하는 유기물로서 유용 당류, 화학제품 및 액체연료와 같은 다양한 산물을 생산할 수 있는 중요한 자원이다. Xylan은 목질계 바이오매스의 주요성분인 cellulose 다음으로 다량 존재하는 다당류이다. Xylan은 대체에너지자원인 바이오에탄올 생산의 기질로서도 주목 받고 있을 뿐만 아니라 xylitol과 같은 감미료의 생산원료로서도 이용가능성이 기대되고 있는 바이오리파이너리의 자원이다(배와 최, 1991).

목재부후균은 목질계 바이오매스를 완전하게 분해할 수 있는 유일한 미생물로서 그 분해메카니즘에 관한 연구는 상당히 중요하다. 일반적으로 목재부후균은 분해특징에 따라 백색부후균, 갈색부후균 및 연부후균으로 대별된다. 백색부후균은 리그닌을 선택적으로 분해하는 효소시스템을 갖고 있으나, 갈색부후균은 리그닌을 거의 분해하지 못하는 반면, 분해 초기에 빠른 속도로 목질성분을 분해하는 능력을 갖고 있다(Kerem 등, 1999).

백색부후균 및 연부후균이 생산하는 cellulolytic enzyme에 관한 연구는 오래전부터 활발히 진행되어 왔으나(Eriksson and Pettersson, 1975; Claeysens *et al.*, 1989; Eriksson *et al.*, 1990), 갈색부후균에 의한 목질성분의 가수분해에 관한 메카니즘은 아직도 불분명한 점이 많으며, 특히 cellulose 및 hemicellulose 분해효소에 관한 연구보고는 *Gloeophyllum*

(*Lenzites*) *sepiarium* (Bhattacharjee and Majumder, 1993), *G. trabeum* (Herr *et al.*, 1978), *Polyporus schweinzii* (Keilich *et al.*, 1969) 등과 같은 일부 갈색부후균을 제외하고는 많지 않은 것이 사실이다. Yoon 등은 갈색부후균 *Fomitopsis palustris* 이 목질계 바이오매스를 분해하는 과정 중에 생산하는 효소균을 밝혀내었고, 특히 결정형 cellulose 분해효소인 cellobiohydrolase가 생산된다는 연구결과를 보고하였다(Yoon and Kim, 2005; Yoon *et al.*, 2007). 그러나 갈색부후균에 의한 xylan과 같은 hemicellulose의 가수분해 관련 효소시스템에 관한 연구논문은 거의 전무하여 이 분야에 대한 연구필요성이 큰 실정이다.

따라서 갈색부후균의 효소당화시스템을 산업화에 적용하기 위해서는 생물공학적인 방법을 이용하여 효소의 개량 및 대량생산 기술의 확보가 매우 중요한 시점에 있다. 목질계 바이오매스를 효율적으로 당화할 수 있는 기술을 바이오에너지산업에 적용시키는 경우, cellulase를 포함하여 xylanase와 같은 hemicellulose 분해효소의 screening system을 확립하여 고역가의 cellulases 및 xylanase를 생산할 필요성이 절실하다.

이에 본 논문에서는 목질계 바이오매스의 주요성분 중의 하나인 xylan의 효율적 가수분해를 위해 갈색부후균 *F. palustris*가 벧짚을 분해하는 과정 중에 생산하는 xylanase의 효소활성을 검토하고 본 효소를 분리·정제 및 아미노산 서열분석을 통해 본 단백질을 동정함과 동시에 효소특성을 조사하여 그 결

과를 보고하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시균 및 배양조건

본 연구에서 사용한 공시균으로는 일본삼림총합연구소에서 분양받은 *F. palustris* FFPRI-0507 (Berkeley et Curtis) Murill를 사용하였다. PDA (potato dextrose agar)에서 7일간 전배양한 *F. palustris*의 균사체를 PDB (potato dextrose broth) 액체배지에 접종하여 27°C에서 6일간 진탕배양을 수행하여 2%의 벚꽃이 포함되어 있는 4 ℓ의 배양액에 접종한 후 27°C에서 14일간 Bio-reactor (Samsung Science, Seoul, Korea)를 이용하여 배양하였다.

### 2.2. 효소활성 측정

배양 4, 8, 12일의 배양액으로부터 1 ml의 샘플을 채취하여 xylanase의 효소활성을 측정하였다. 2% xylan sodium acetate 완충용액(100 mM: pH 5.0)을 vortexing한 후, 실온에 24시간 방치한 다음 상등액을 효소반응 기질로 사용하였다. 기질용액 45 µl에 정제효소 5 µl를 첨가하여 섞은 다음 50°C 항온조에서 30분간 반응시킨 후 Somogyi-Nelson법 (1952)의 환원당량 정량법에 의하여 xylanase 활성을 측정하였다. 표준반응조건에서 단위분당 1 µmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 데 필요한 효소량을 1 unit (U)로 정의하였다.

### 2.3. 조효소액 추출 및 농축

접종 후 14일이 경과한 벚꽃배양액(4 ℓ)을 filter paper로 여과한 후, 여과액을 조효소액으로 사용하였다. 여과액은 10 kDa cut-off polyethylenesulfone membrane (PM 10 membrane, Millipore Corp.)을 장착한 여과농축기(model 8400: Millipore Corp.,

Bedford, MA.)를 사용하여 100 ml로 농축하여 정제 샘플로 사용하였다.

### 2.4. 효소정제

Ion exchange column chromatography (Toyopearl DEAE650S) : 농축액을 20 mM phosphate 완충액(pH 7.0)으로 평형화시킨 Toyopearl DEAE-650S (2.0 × 20 cm)에 흡착시키고 동일한 완충용액을 사용하여 세척한 후, 0.5 M NaCl 용액을 이용하여 linear gradient로 용출하였다. 용출조건은 20 ml/h, 15 ml/fraction이었다.

Gel filtration : 이온교환 크로마토그래피로부터 부분 정제한 후, 다시 Sephacryl 300-S HR (Amersham Biosciences) column (1.6 × 60 cm)을 사용하여 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 5.0)으로 겔여과를 수행하였다.

Ion exchange column chromatography (MonoQ HR5/5) : Gel filtration으로부터 얻은 분획에서 xylanase 활성을 나타내는 fractions를 회수하여 20 mM sodium acetate (pH 5.0) 완충용액을 사용하여 평형화시킨 후, MonoQ HR5/5 (Amersham Biosciences) column (0.5 × 5.0 cm)에 흡착시키고 동일한 완충용액을 사용하여 세척한 후, 0.5 M NaCl 용액을 이용하여 linear gradient로 용출하였다. 용출조건은 1.0 ml/h, 1.0 ml/fraction이었다. SDS gel 전기영동을 통해 정제효소의 순도를 확인하였다.

### 2.5. 단백질 정량 및 분자량 측정

단백질량은 Protein Assay Kit를 사용하여 Bradford법(Bradford, 1976)으로 측정하였다. 정제효소의 분자량은 SDS gel 전기영동법을 이용하여 측정하였으며 표준단백질은 lysozyme (M.W. 20,000), soybean trypsin inhibitor (M.W. 29,000), carbonic anhydrase (M.W. 37,000), ovalbumin (M.W. 51,000), bovine serum albumin (M.W. 97,000), β-galactosidase (115,000) 및 myosin (M.W. 205,000)을 사용하였다.

## 2.6. 아미노산 서열 분석

정제효소의 N-terminal 및 internal amino acid sequences는 한국기초과학연구소(서울분원)에 의뢰하여 분석하였다. 각각의 아미노산 서열의 BLAST 검색은 NCBI 및 JGI의 genome database를 이용하여 수행하였다.

## 2.7. 효소반응상수

기질의 농도를 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 mg/ml로 변화시켜 Lineweaver and Burk식(Lineweaver and Burk, 1934)을 이용하여 효소반응상수( $K_m$ ),  $K_{cat}$  및  $V_{max}$ 를 구하였다.

## 2.8. 효소활성에 미치는 최적 pH 및 반응온도

Xylanase 활성에 대한 최적 pH를 구하기 위하여 0.1 M citrate (pH 3~4), 0.1 M sodium acetate (pH 4~7), 0.1 M Tris-HCl (pH 7~9) 완충용액에 정제효소를 첨가하여 위에서 서술한 효소측정방법에 따라 xylanase 활성을 측정하였다.

Xylanase의 최적 반응온도는 정제효소를 첨가하여 30~90°C 범위에서 기질과 30분간 반응시킨 후 위에서 서술한 효소측정방법에 따라 효소활성을 측정하였다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3.1. Xylanase의 생산

2%의 볏짚액체배양에서 4, 8, 12일간 배양한 배양액으로부터 xylanase의 효소활성을 측정된 결과 배양기간의 증가에 따라 xylanase의 비활성이 증가함을 확인하였다(Fig. 1). 본 균이 볏짚 분해에 관여하는 여러 효소단백질 중 xylanase가 균체 외로 분비되어 볏짚의 hemicellulose 성분을 분해하는 점을 시

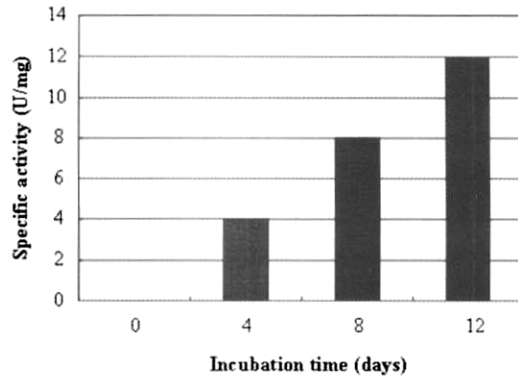


Fig. 1. Changes in the activity of extracellular xylanase of *Fomitopsis palustris* grown on 2.0% rice straw culture.

Table 1. Purification of xylanase from the rice straw culture of *F. palustris*

Step	Total activity (U)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Activity yield (%)
Crude solution	3860	320	84	100
Toypearl DEAE650S	2666	112	238	69
Sephacryl S300HR	1599	23	69.2	41
MonoQ 5/5HR	580	23	252	15

사하였다.

## 3.2. 효소정제 및 아미노산 서열 분석

본 균이 볏짚을 분해하는 과정 중에 생산하는 xylanase의 특성을 밝히기 위하여 효소정제를 수행하였다. Bio-reactor를 이용하여 2%의 볏짚을 함유한 액체배양액으로부터 얻은 4 l의 조효소액을 100 ml로 농축하여 Table 1에 표시되어 있는 3단계의 정제 과정을 거쳐 최종적으로 30배 정제된 xylanase를 얻었다.

본 정제 단백질은 SDS gel 상에서 약 43 kDa의 분자량을 갖는 단일 단백질을 확인하였다(Fig. 2). 일반적으로 균류가 생산하는 xylanase는 20 kDa에서 90 kDa에 이르기까지 다양한 크기의 분자량을 갖는다(Polizeli *et al.*, 2005). Wong 등은 미생물의

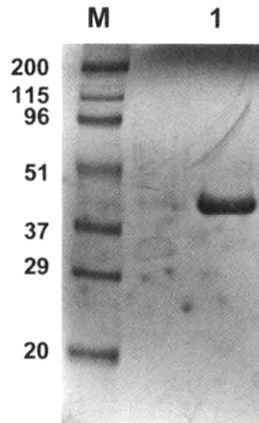


Fig. 2. SDS-PAGE analysis of extracellular proteins and purified xylanase from *F. palustris*. Lane M, molecular marker; 1, purified xylanase.

endoxylanase를 분자량과 같은 생리화학적 특성에 따라 다음과 같이 2그룹으로 분류하였다. 즉, 30kDa 이하의 분자량을 갖는 xylanase를 엽기성 효소로, 30 kDa 이상의 분자량을 갖는 xylanase를 산성 endoxylanase로 나누었다(Wong *et al.*, 1988).

정제효소의 아미노산 서열을 분석하여 NCBI의 genome database를 이용하여 BLAST검색을 통해 정제효소를 동정하였다. 본 정제효소는 *Cryptovalsa* sp. BCC 7197 (100%), *Thermoascus aurantiacus* (65%), *Volvariella volvacea* (60%), *Aspergillus terreus* NIH2624 (60%)의 GH family 10에 속하는 xylanase의 부분 아미노산 서열과 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 3). 따라서 본 정제효소가 *F. palustris* 유래의 xylanase로 추측하여 그 효소특성을 조사하였다.

GQFNLAQADYLDVWATENNK	<i>Fomitopsis palustris</i>
80 GQFNLAQADYLDVWATENNK	99 <i>Cryptovalsa</i> sp. BCC 7197
85 GNFNFAGADYLVNWAQQNGK	104 <i>Thermoascus aurantiacus</i>
125 GQFNYGADTLVNWAIISNGK	144 <i>Volvariella volvacea</i>
84 GQFSFGGADYLVNYATSNGK	103 <i>Aspergillus terreus</i> NIH2624

Fig. 3. Partial amino acid sequence comparisons between xylanase from *F. palustris* and other organisms.

### 3.3. 효소특성

정제효소의 효소반응속도 상수( $K_m$ )를 구하기 위하여 기질인 xylan 용액의 농도를 0, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 mg/ml로 변화시켜 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과, *F. palustris*의 균체 외 효소액으로부터 정제한 xylanase의 기질에 대한  $K_m$ 치는 31 mg/ml,  $V_{max}$ 는 252.3 U/mg,  $K_{cat}$ 은  $2.3 \times 10^4$ /min이었다. 또한  $K_{cat}/K_m$ 으로 표현되는 효소의 기질에 대한 촉매효율은 77/min이었다.

정제효소의 최적 pH를 구하기 위해 pH 3.0~9.0 범위에서 xylanase 활성을 측정하였다. 그 결과, 본 정제 xylanase의 최적 pH범위는 pH 4.0~5.0임을 확인하였다(Fig. 4A). 대부분의 균류가 생산하는 xylanase의 최적 pH는 *F. palustris*가 생산하는 xylanase와 같이 산성 pH를 나타낸다(Wong *et al.*, 1988). 그러나 *Aspergillus nidulans* KK-99 (pH 8.0; Taneja *et al.*, 2002) 및 *A. terreus* (pH 7.0; Ghanen *et al.*, 2000)과 같이 약알칼리성 및 중성 pH를 갖는 xylanase와 *Cryptococcus* sp. (pH 2.0; Iefuji *et al.*, 1996) 및 *Penicillium* sp. (pH 2.0; Kimura *et al.*, 2000)과 같이 강산성 pH를 갖는 xylanase도 보고되었다.

또한 본 효소의 최적 반응온도를 조사하기 위하여 20~100°C 범위에서 xylanase 활성을 측정하였다. 최대활성을 나타낸 온도는 70°C이었고, 30~80°C에 이르기까지 광범위한 온도에서 50% 이상의 효소활성을 나타냈다(Fig. 4B). 미생물이 생산하는 xylanase의 최적 반응온도는 대부분 50°C에서 75°C 이하의 범위를 나타낸다(Wong *et al.*, 1988).

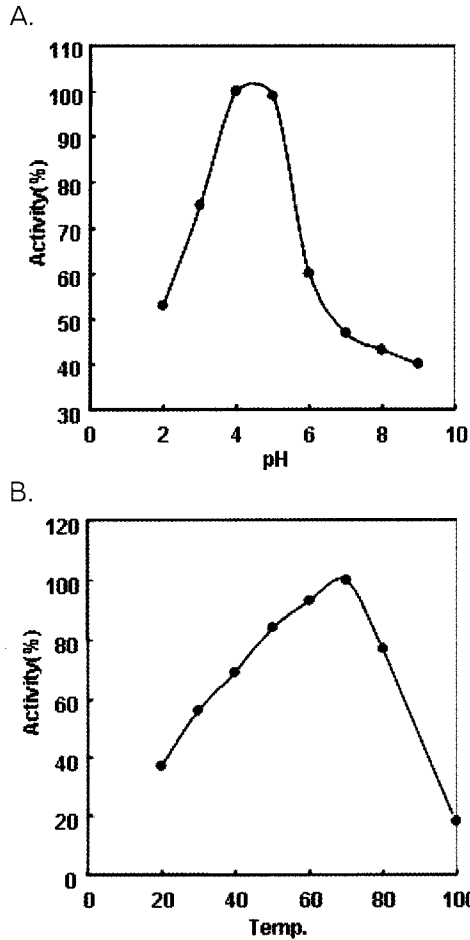


Fig. 4. Effects of pH (A) and temperature (B) on the activities of extracellular xylanase of *F. palustris* grown on 2.0% rice straw culture.

#### 4. 결 론

본 논문에서는 갈색부후균 *F. palustris*이 볏짚을 분해하는 과정 중에 생산하는 xylanase를 처음으로 확인하여 분리 정제하고, 아미노산 서열분석을 통해 동정하고, 이들 단백질의 효소특성을 조사하였다. 분리 정제된 단백질은 SDS-PAGE분석에서 43 kDa의 분자량을 나타내었고, 아미노산 서열분석에서는 Glycoside Hydrolase family 10에 속하는 xylanase로 추정되었다. 정제효소의 기질에 대한  $K_m$ 치는 31

mg/ml,  $V_{max}$ 는 252.3 U/mg,  $K_{cat}$ 은  $2.3 \times 10^4$ /min이고, 최적 pH범위는 pH 4.0~5.0, 최대 활성 온도는 70°C로 밝혀졌다. 이상의 결과로부터 얻어진 볏짚기질에서 *F. palustris*의 균체 외 xylanase 효소특성 및 아미노산 정보는 목질계 바이오매스 당화에 요구되는 고역가의 효소개발에 유용하게 활용될 수 있는 중요한 정보로 판단된다.

#### 참 고 문 헌

1. 배성호, 최용진. 1991. *Bacillus stearothermophilus*가 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 19, 592~597.
2. Bhattacharjee, B., A. Roy, and A. L. Majumder. 1993. Carboxymethylcellulase from *Lenzites saepiaria*, a brown-rotter. Biochem. Mol. Biol. Int. 30: 1143~1152.
3. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248~254.
4. Claeysens, M., H. Van Tilbeurgh, P. Tomme, T. M. Wood, and I. McCrae. 1989. Fungal cellulase systems. Comparison of the specificities of the cellobiohydrolases isolated from *Penicillium pinophilum* and *Trichoderma reesei*. Biochem. J. 261: 819~826.
5. Eriksson, K.-E., R. A. Blanchette, and P. Ander. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer, Berlin Heidelberg, New York.
6. Eriksson, K. E. and B. Pettersson. 1975. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose I. Separation, purification and physico-chemical characterization for five endo-1,4- $\beta$ -glucanases. Eur. J. Biochem. 51: 193~206.
7. Ghanem, N. B., H. H. Yusef, and H. K. Mahrouse. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett-Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. Bioresour. Technol. 73: 113~

- 121.
8. Herr, D., F. Baumer, and H. Dellweg. 1978. Purification and properties of an extracellular endo-1,4- $\beta$ -glucanase from *Lenzites trabea*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 5: 29~36.
  9. Iefuji, H., M. Chino, M. Kato, and Y. Iimura. 1996. Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2 purification, characterization, cloning, and sequencing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60: 1331~1338.
  10. Keilich, P., P. J. Bailey, E. G. Afting, and W. Liese. 1969. Cellulase from the wood-degrading fungus *Polyporus schweinitzii* fr. *Biochim. Biophys. Acta.* 185: 392~401.
  11. Kerem, Z., K. A. Jensen, and K. E. Hammel. 1999. Biodegradative mechanism of the brown rot basidiomycete *Gleophyllum trabeum*: evidence for an extracellular hydroquinone-driven fenton reaction. *FEBS Lett.* 446: 49~54.
  12. Kimura, T., J. Ito, A. Kawano, T. Makino, H. Kondo, S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase from *Penicillium* sp. 40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1230~1237.
  13. Lineweaver, H. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* 56: 658~666.
  14. Polizeli, M. L. T. M., A. C. S. Rizzatti, R. Monti, H. F. Terenzi, J. A. Jorge, and D. S. Amorim. 2005. Xylanase from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 577~591.
  15. Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195: 19~23.
  16. Taneja, K., S. Gupta, and R. C. Kuhad. 2002. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour. Technol.* 85(1): 39~42.
  17. Yoon, J.-J., C.-J. Cha, Y.-S. Kim, D.-W. Son, and Y.-K. Kim. 2007. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 800~805.
  18. Yoon, J.-J. and Y.-K. Kim. 2005. Degradation of crystalline cellulose by the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *J. Microbiol.* 43: 487~492.
  19. Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1998. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52: 305~317.