

Aspergillus niger에 의한 Xylanase 生産性 및 그 酵素 特性에 관한 研究

高 正 三 · 康 順 善 · 李 啓 瑚*

A study on the production and its characteristics of xylanase by *Aspergillus niger*

Koh, Jeong Sam · Kang, Soon Sun · Lee, Ke Ho*

Summary

The xylanase of *Aspergillus niger*-SM 6 was examined with respect to its optimum conditions of production and the reaction characteristics of its semi-purified enzyme treated with 0.8 saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 80% ethanol. The highest xylanase production was obtained at pH 5.0-6.0 in 5 days, and increased with the addition of carboxy methyl cellulose, defatted soybean powder, orange peel powder and corn steep liguor.

Maximum xylan hydrolysis with the semi-purified enzyme was obtained in the 2% substrate concentration at pH 3.5 and 60°C after 2 hrs.

The Km value of xylanase was 1.07%.

In the strain of *Aspergillus niger*-SM 6, there was high activity of xylanase and CMCase.

I. 序 論

농산폐기물 중에는 15~30%의 Xylan이 함유되어 있으며(Whistler, 1950, 1953) 이를 利用하기 위하여 微生物性 Xylanase에 관한 많은 研究가 있었던바 Xylanase生産菌株로는 *Bacillus* sp. (Inaoka, 1956), *Bacillus subtilis*(高橋, 1963), *Streptomyces xylophagus*(Iizuka, 1965), *Trichoderma viridae*(Nomura, 1968), *Chaetomium trilaterale*(Kawaminami, 1970), *Penicillium janthinellum*(Takenshi, 1973), *Myriococcum albomyces*(金等, 1974), *Aspergillus niger*(李等, 1975)등 많은 例가 報告되어 있다.

Xylanase는 農産廢기물을 利用한 醱酵飼料製造뿐만 아니라 菜蔬 및 果實가공에 있어서 品質을 손상치 않고 組織을 연화시키는데 利用可能하며(金等, 1971) 果汁의 澄清효과가 있는 것으로 알려져 있으며 당농도환자의 감미제로 使用할 수 있어 Xylanase의 重要性은 增加할 것으로 여겨진다.

本實驗에서는 李等(1976)이 분리한 菌株중에서 Xylanase生産能이 우수한 *Aspergillus niger*를 사용하여 生産最適條件, 酵素의 諸特性을 검토하여 그 結果를 이에 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試菌株

李等(1976)이 分離한 菌株중에서 Xylanase活性이 特히 강한 *Aspergillus niger*-SM6을 供試菌株로 하여 實驗을 行하였다.

2. 酵素液의 調製

250ml 삼각 flask에 밀기울 20g과 水道水 15ml을 넣고 加壓殺菌後 接種하여 30°C에서 所要日數 培養한후 여기에 증류수 100ml를 加하고 Waring blender로 마쇄후 여액을 遠心分離(7,000 rpm, 20min.)한 다음 상등액을 粗酵素液으로 사용하여 生産條件을 검토하였다.

또한 最適生産條件에서 生産한 粗酵素液에 $(\text{NH}_2)_4$

* 서울大學校 農科大學

SO₄ 0.2 포화도에서 생기는 침전물을 버리고 0.8 포화도에서 생기는 침전물을 小량의 증류수로 용해시킨후 Cellophane 투석튜브에 넣고(NH₄)₂SO₄를 제거한 다음 Ethanol을 加하여 80% 濃度에서 生成하는 침전물을 지은건조하고 乾物量을 200倍로 희석하여 粗精製酵素로 사용 酵素의 諸特性을 검토하였다.

3. 酵素生産條件의 검토

培養日數에 따른 酵素活性의 變化와 培養時 pH의 영향을 검토 하였으며 培養時 각종 營養源을 첨가 하였을때 酵素生産에 미치는 영향을 알아보기 위해 數種의 炭素源(1%), 질소원(0.5%), 生長要素(0.1%) 및 有機物質(5%)를 加하여 培養한후 각각의 酵素活性을 測定하여 비교검토하였다.

4. 粗精製酵素의 特性

酵素作用의 最適條件을 알아보기 위하여 pH, 溫度 作用時間을 달리하여 酵素活性을 測定하였으며 여러 濃度의 基質에 15分間 最適溫度, 最適pH에서 反應시킨후 生成還元糖을 Xylose로 定量하여 km值를 求하였다.

5. 酵素活性의 測定

Xylan(Sigma製)을 1N NaOH용액에 溶解시킨후 當量의 HCl로 中和하여 基質溶液으로 사용하였다.

1% Xylan 2ml, 완충액 2ml와 粗酵素液 1ml의 組成으로 하여 反應시킨후 反應液 1ml을 取하여 그중에 유리되는 還元糖을 Somogyi變法으로 定量하였다.

II. 結果 및 考察

1. 酵素生産條件의 검토

1) 培養日數에 따른 영향

1일부터 7일까지 培養日數를 달리하였을때 酵素活性을 測定한 結果는 그림 1과 같이 培養 3일까지 급격히 증가하여 5일만에 最高의 活性을 나타내며 그후 약간 감소라는 경향을 보이고 있어 酵素生産은 正常的인 生長曲線과 일치함을 보여주고 있다.

生長過程을 보면 1일후에는 白色菌絲가 培地表面의 약 1/3가량 덮으며 2일후 褐色포자가 形成하기 始作하여 3일째에는 培地表面과 後面의 절반가량 포자가 着生하였고 5일째 완전히 포자가 形成되었다.

배양여액은 pH 4.0~5.6 범위이며 배양일수에 따라 점차 농후 해지며 색깔을 띄었다.

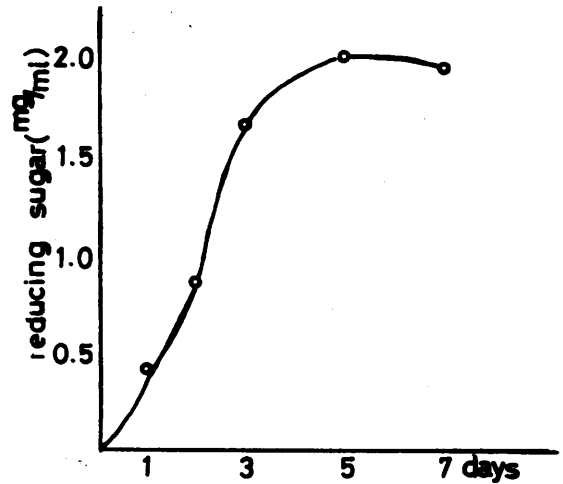


Fig 1. Time courses of xylanase production

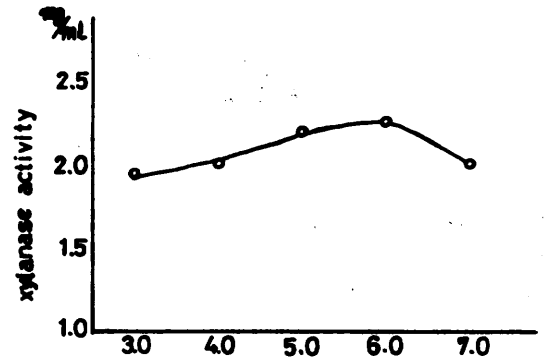


Fig 2. Effect of pH on xylanase production

2) pH의 영향

밀기울에 加하는 水道水대신 McIlvaine 완충액을 사용하여 pH를 3.0~7.0으로 달리하여 5일간 培養하였을때 粗酵素의 活性은 그림 2와 같다.

pH 5.0~6.0에서 最高의 酵素活性을 보여주고 있으며 pH 3.0~7.0의 넓은 범위에서 큰 차이를 나타내지 않고있다. 李等(1976)이 *Aspergillus niger* 培養時 最適 pH는 5.0~6.0이라는 보고와 비슷하였다.

3) 탄소원의 첨가영향

밀기울 배지에 加하는 水道水 대신에 Czapek培地중 탄소원을 1%의 CMC, Filter paper, Cellulose powder 및 빗짚에서 조제한 Xylan을 加하여 5일간 培養後 粗 酵素의 活性을 測定한 結果 表1과 같으며 탄소원을 加 했을때 酵素生産性은 증가를 보여주고 있다.

Table 1. Effect of carbon sources on xylanase production

Carbon sources added(1%)	Xylanase activity(%)
C. M. C.	120
Filter paper	116
Cellulose powder	113
Absorbent cotton	113
Crude xylan	100
Control	100

CMC첨가는 20%의 효소생산 증가로 좋은 結果를 나타내고 있으며 Kawaminami等(1969)은 Xylan 첨가가 inducer로 作用한다고 보고한 바 있으며 高橋等(1963)은 細菌性 Xylanase研究에서 Xylose나 Xylan 첨가시 Xylanase活性이 증가한다고 보고 하였고 李等(1975)은 CMC첨가로 Aspergillus niger의 Xylanase 生産性이 9~21%의 증가를 가져 왔다고 보고한 바 있어 비슷한 結果를 나타내고 있다.

4) 질소원 첨가의 영향

Czapek media중 질소원(0.5%)을 각각 달리하여 밀기울에 加한후 培養하여 生成하는 還元糖으로 酵素 活性을 測定한 結果는 表2와 같다.

Table 2. Effect of nitrogen sources on xylanase production

Nitrogen sources added (0.5%)	Xylanase activity(%)
NH ₄ NO ₃	108
(NH ₄) ₂ CO	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	108
NH ₄ Cl	100
NaNO ₃	96
Control	100

질소원을 첨가하였을때 다소의 증감을 보여주고 있으나 효소생산에는 큰 영향을 나타내지 않았다. 高橋

(1963)와 李等(1975)도 같은 結果를 보고한 바 있고 효소생산을 위해서는 질소원을 따로 첨가할 필요가 없다고 여겨진다.

5) 有機物質 첨가의 영향

밀기울배지에 농산폐기물이라고 생각되는 有機物質을 20mesh以下로 분쇄하여 5% 첨가한후 5일간 培養하여 粗酵素의 活性을 測定한 結果 5~14%의 증가를 나타내었다.

Table 3. Effect of organic substances on xylanase production

Organic substances added(5%)	Xylanase activity(%)
Rice bran	105
Corn-cob powder	109
Orange peel	109
Defatted soybean	114
Rice hull	95
Control	100

李等(1976)이 감귤피 및 탈지대두를 첨가하여 培養하였을때 Aspergillus niger의 Cellulase 生産性이 증가한다고 보고한바 있으며 本實驗에서도 비슷한 結果를 나타내고 있어 농산폐기물을 利用한 酵素生産의 여지가 있으리라 여겨진다.

6) 生長要素첨가의 영향

밀기울배지에 生長要素를 각각 달리하여 첨가한후 5일간 배양하고 酵素活性을 測定한 結果는 表4와 같다

Table 4. Effect of natural nutrient sources on xylanase production

Natural nutrients added (0.1%)	Xylanase activity(%)
Proteose peptone	119
Yeast extract	109
Corn steep liquor	126
Vit. free casamino acid	123
Control	100

表4에서 보는 바와 같이 9~26%의 酵素活性의 증가를 나타내고 있으며 Corn steep liquor 를 첨가하였을때 좋은 結果를 가져왔다.

李等(1975)은 CSL첨가구만 증가하였다고 보고하였고 Kawaminami等(1969)은 細菌性 Xylanase生産에

있어서 Yeast extract 첨가는 별 효과가 없다고 보고한 바 있어 菌株에 따라 다소 차이가 있음을 나타내고 있다.

2. 粗精製酵素의 特性

1) 精製方法에 따른 回收性

(NH₄)₂SO₄ 포화도 별 酵素의 回收성을 포화도 별로 遠心分離(9,000rpm, 20min., 0°C)하여 침전물에 대한 효소활성을 測定한 結果는 그림 3과 같이 0.8포화도에서 가장 좋았다.

또한 배양여액에 ethanol을 加하여 40~90%의 濃度에서 生成하는 침전물에 대한 回收성을 검토한 結果 40%의 濃度에서는 酵素蛋白이 거의 침전되지 않았으며 80%의 濃度에서 95%以上이 回收되었다.

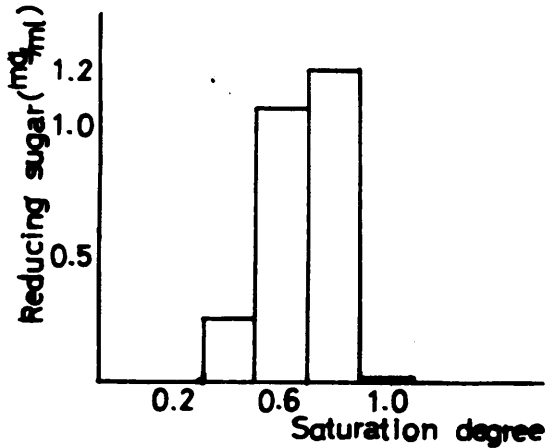


Fig3. Partial purification of xylanase by ammonium sulfate

李等(1976)은 *Aspergillus niger*의 Cellulolytic enzyme complex는 0.6포화도에서 가장 좋았다고 하였으며 成(1971)은 *T. viride*의 경우 0.6포화도가 효과적이라고 보고한바 있다.

2) 最適活性 pH

粗精製酵素의 最適活性 pH를 알아보기 위해 KCl-HCl 및 McIlvaine Buffer로 각각 다른 pH에서 作用시켜 生成되는 還元糖으로 酵素活性를 測定한 結果는 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는 바와 같이 pH 3.5에서 최고의 活性를 나타내어 약간 산성쪽에 치우쳐 있었으며 적정 pH 이외에서는 酵素活性가 급격히 떨어졌다.

Takenishi等(1973)은 *Penicillium janthinellum*의 Xylanase의 최적 pH는 4.7~5.3, 高橋等(1963)은

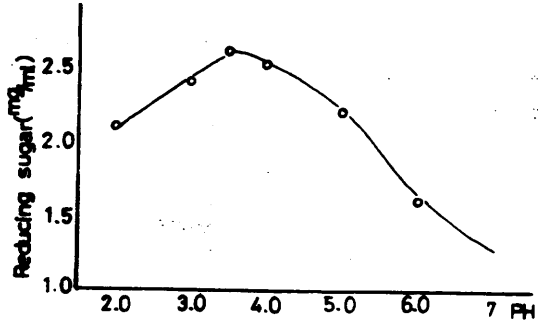


Fig4. Effect of pH on xylanase activity Incubation at 40°C for 30min.

Bacillus subtilis 경우 pH 6.0~6.2, Iizuka等(1965)의 細菌性 Xylanase는 pH 6.2, 金等(1974)은 *Mycococcum albomyces*의 Xylanase은 pH 5.0, Kawaminami等(1970)은 *Chaetomium trilaterale* 경우 pH 4.5라고 보고한 바있어 各菌株에 따라 生成되는 酵素의 作用最適 pH가 相異함을 알 수 있으며 李等(1975)이 보고한 *Asp. niger*의 Xylanase가 pH 3.0와 비슷한 性質을 가지고 있음을 알 수 있었다.

3) 最適活性溫度

30°C에서 70°C까지 각 온도에서 粗精製酵素를 30분간 作用시킨후 酵素活性를 測定한 結果는 그림 5와 같다.

온도상승에 따라 효소활성이 증가하여 60°C에서 最高의 活性를 나타내었으며 그후 감소하였다.

Iizuka等(1965)이 *Streptomyces xylophagus*의 Xyl-

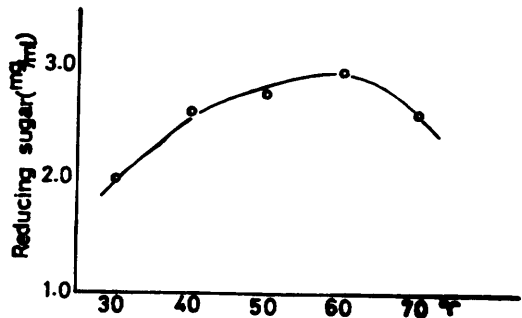


Fig 5. Effect of reaction temperature on xylanase activity

anase 최적활성온도가 55~60°C라 하였고 Kawaminami等(1970)은 *Chaetomium trilaterale* 경우 55°C라고 보고한바 있는데 *Asp. niger*가 生産하는 Xylanase도 고온성임을 알 수 있었다.

4) 作用時間에 대한 영향

粗精製酵素의 作用時間에 대한 영향을 살펴본 결과 그림6과 같으며 30분까지는 作用時間에 비례하여 還元糖生成이 증가하였으며 그후에는 적은 變化를 나타내었고 2時間후에는 거의 變化가 없었다.

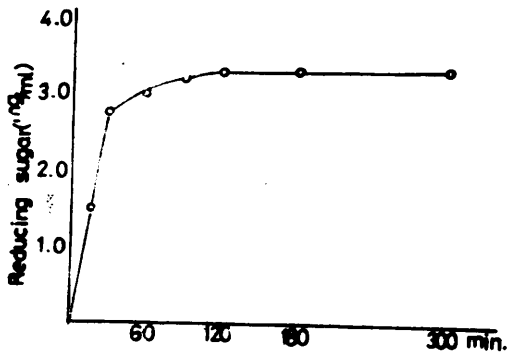


Fig. 6. Effect of reaction time on xylanase activity.

李等(1975)이 分離한 *Asp. niger*의 Xylanase의 最適作用時間이 3時間이라고 한데 비하여 作用時間이 짧고 活性이 강한 것으로 보여진다.

5) 基質濃度の 영향

基質濃도에 따른 酵素活性을 測定하기 위하여 0.5~2% Xylan용액 2ml에 粗精製酵素 1ml를 加한후 60°C에서 2時間 作用시켰을때 그림7과 같이 기질농도가 증가함에 따라 生成되는 還元糖量은 0.5%까지 비례적으로 증가하였으며 그후에도 급격한 증가를 나타내지 않는 酵素活性을 보여주었다.

6) Xylanase의 Km值

효소활성에 관한 反應速度를 測定하는 것은 매우 중요하며 Michaelis-menten式에 의하여(1971) plot한 結果 그림8과 같이 $K_m = 1.07\%$ 였으며 매우 높은 酵素活性을 나타내고 있었다.

Kawaminami等(1970)은 *Chaetomium trilaterale*의 Xylanase가 β -Phenyl-D-Xyloside에 대한 K_m 值는 $3.05 \times 10^{-3}M$ 이 었다고 보고한 바있다.

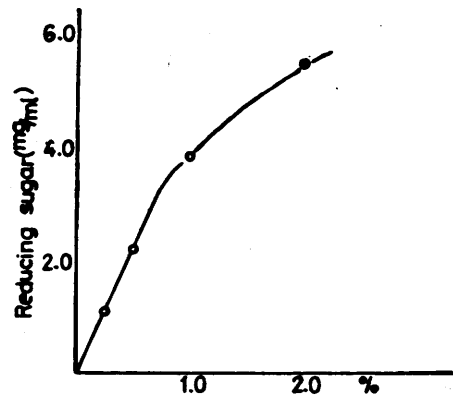


Fig 7. Effect of xylan concentration on xylanase activity

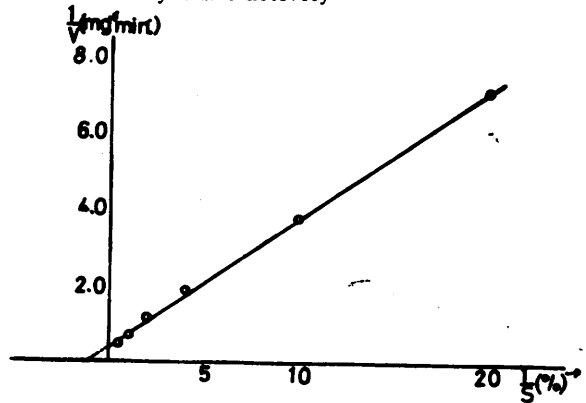


Fig 8. Lineweaver-Burk plot for the reaction of xylanase

The reaction mixture consisted of 2ml of xylan solution and 1ml of enzyme solution. Incubated at pH 3.5, 60°C for 15min. $k_m = 1.07\%$

IV. 要 約

농산폐기물을 이용할 目的으로 分離한 菌株中에서 Xylanase 生産能이 우수한 *Aspergillus niger*의 Xylanase 生産最適條件과 酵素의 諸特性을 검토하였으며 그 結果는 다음과 같다.

1. 酵素生産은 最適條件의 培養時 pH5.0~6.0에서 培養 5일째 最高의 酵素生産性을 나타냈으며 培養時 C. M. C와 脫脂大豆粕, 柑橘皮, C. S. L 등의 첨가로 酵素生産이 증가하였으며 질소원은 영향이 없었다.

2. 酵素蛋白은 $(NH_4)_2SO_4$ 0.8포화도에서 回收성이 가장 좋았으며 80% Ethanol濃度에서 95%以上 回收되었다.

3. 粗精製酵素의 反應最適條件은 pH 3.5, 反應溫度 60°C, 作用時間 2時間이었으며 基質濃도는 2%였다.

4. 反應最適條件에서의 Km値는 1.07%로 酵素活性이 높았다.

인 용 문 헌

- Kawaminami, T., Iizuka, H.: 1970 Studies on Xylanase from microorganisms. J. Ferment. Technol. 48(3) 161~168
- 高橋光雄, 橋本揚之助: 1963 細菌キシラナーゼに關する研究 日醸工 41(3) 11~119, 119~121.
- 김관, 김양희, 정동효: 1974 고온성 사상균 酵素에 關한 研究, 産業微生物學會誌 2(3) 133~140
- 金鍾君, 李瑞來: 1971 *Aspergillus niger*의 효소 제에 의한 채소 및 과실의 분해, 韓國食品科誌 3(3) 191~192.
- Nomura K., Yasui T., Kiyooka S., Kobayashi T.: 1968 Xylanase of *Trichoderma viride*. J. Ferment. Technol. 46 (8) 634~640.
- Takenishi S., Tsujisaka Y.: 1973 Purification and some properties of three Xylanases. J. Ferment. technol. 51:458~463.
- 東京大學 農學部 農藝化學教室: 1959 實驗農藝化學下卷 587 朝倉書店.
- Bergmeyer H. U.: 1971 Methods of enzymatic analysis vol. 1. 144~150 Academic press New York
- 成洛突: 1971 *Trichoderma viride*가 生成하는 섬유소 分解酵素의 分別 및 酵素學的 性質에 關한 研究 진주농대 논문집 1~29.
- 李啓瑚, 李炳周: 1975 농산폐기물에서 발효사로 生産에 關한 研究 韓農化18(3) 109~116.
- 李啓瑚, 高正三, 朴性五: 1976 *Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride*에 依한 Cellulase 生産성에 關하여 韓農化 19 (3) 130~138.
- Inaoka M., Soda H.: 1956 Crystalline Xylanase. Nature 178. 202~203.
- Iizuka H., Kawaminami : 1965 Studies on the Xylanase from *Streptomyces*. Agr. Biol. Chem. 29 (6) 520~524
- : 1969 Studies on Xylanase from microorganisms Agr. Biol. Chem. 33 (9) 1257~1263.
- Whistler R. L.: 1950 Advances in Carbohydrate Chemistry 5. 269
- Whistler, R. L., Smart. C. L.: 1953 Polysaccharide Chemistry 136 Academic Press. New York.