

Myriococcum albomyces 에 있어서 Cellulase 유도생성에 관한 연구

건국대학교 공과대학 발효공학과

정 동 효(鄭 東孝)

1971년 12월 16일 수리

Studies on Cellulase Induction in Myriococcum albomyces

by

Dong Hyo Chung

Department of Fermentation Technology

College of Engineering, Kon-Kuk University Seoul, Korea

(Received Dec. 16, 1971)

Abstract

1. Formation of cellulase in *Myriococcum albomyces* was investigated using shaking culture with addition of CMC or Avicel as an inducer to 5% wheat bran medium.
2. Three different types of cellulase fraction I, fraction II and fraction III in the culture filtrate were purified by elution column chromatography on a DEAE-Sephadex A-25.
3. By the addition of CMC as an inducer, CMCcase activity was stronger than that of Avicelase. On the other hand, the addition of Avicel increased Avicelase activity.

서 언

Cellulase는 단일의 효소가 아니라 적어도 2~3개 성분이라는 것은 Reese 씨의 연구⁽¹⁻²⁾ 이후에도 많이 연구되어 왔다.^(3, 4, 5)

최근 저자도 *Chaetomium globosum*의 cellulase는 역시 단일의 성분이 아니라는 것을 보고한바 있다.⁽⁶⁾ 이와같이 cellulase는 다양성이면서도 유도효소라는 것도 알려진 사실이나⁽⁷⁾ 그 기작을 밝힌 연구는 거의 없다. 고로 필자는 기본배지에다 일반적으로 cellulase 생성의 inducer로 생각되는 CMC와 Avicel을 각각 첨가하여 그 효소를 분별 정제한 결과 inducer에 따라 효소계가 다르다는 것을 확인하고 그 실험의 일부를 보고하는 바이다.

실 험

1. 균주: *Myriococcum albomyces*⁽⁸⁾
2. 시약: 1) CMC: 純正화학제품

2. Avicel: American Viscose Co. Marcus, Hook, Pa., U.S.A. 제품

3) 여지분말: 東洋여지제품, 100~200 mesh

4) DEAE-Sephadex A-25: Pharmacia, Uppsala 제품(Sweden)

Table 1. Composition of wheat bran liquid medium for jar fermentor

	CMC medium	Avicel medium
CMC	1.0g	—
Avicel	—	1.0g
Wheat bran	5.0"	5.0"
Ammonium citrate	0.3"	0.3"
KH ₂ PO ₄	1.0"	1.0"
NaNO ₃	0.3"	0.3"
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05"	0.05"
Tap water	100ml	100ml
Initial pH	5.5	5.5

3. 효소의 생산: Table 1과 같이 cellulase의 유도생

성을 알기 위하여 inducer로서 CMC와 Avicel을 기본 배지에다 각각 첨가 하였다.

위의 배지를 5l jar fermentor (Marubishi Laboratory Equipment Co. Ltd., Japan)에 1l를 넣고 Table 2의 조건으로 효소를 생산하였다.

Table 2. 효소생산조건

1. 실용량 :	5l
2. 사일량 :	1l
3. 살 균 :	1kg/cm ² , 60 min.
4. 내 압 :	0.5 kg/cm ²
5. 교 반 :	200 r.p.m.
6. 통기량 :	15l/min.
7. 온 도 :	45°C±1°C

4. 조효소의 조제 : 5일간 배양한 배양액을 6,000 r.p.m.으로 원심하여 그 상등액을 취하여 pH 4.5로 조절하고 황산암모니움 0.2 퍼센트에서 생긴 갈색 침전물을 동결건조시켜 조효소(crude enzyme)로 하고 fish skin으로 2일간 투석하여 사용하였다.

5. Cellulase 활성도 측정

1) CMC 당화활성 : 시험관에 0.5% CMC 용액 1ml, pH 4.5 McIlvaine buffer 1ml, 투석한 조효소용액 0.5 ml을 가하고 50°C에서 10분간 반응시켜 그 반응액 1ml를 취하고 생성된 환원당을 Somogyi-Nelson 법으로 정량하고 (10 11) 그 활성을 µg/ml로 나타내었다.

2) Avicel 당화활성 : Monod 진탕기용 L형 시험관에 1% Avicel 현탁액 5ml, pH 4.5 McIlvaine buffer 4ml, 투석한 조효소용액 1ml를 넣고 Monod 항온진탕기에서 (45°C) 12시간 반응시켜 그 반응액 중에 유리되는 당을 1)과 같이 정량하여 그의 활성을 표시하였다.

3) 여지분말당화활성 : 위의 L형 시험관에 여지분말 1% 현탁액 5ml, pH 4.5 McIlvaine buffer 4ml, 그리고 투석한 조효소액 1ml를 넣고 위와 같이 그의 활성을 나타내었다.

4) CMC 점도감소활성 : Ostwald 점도계에 비리 50°C로 예열한 0.1% CMC 수용액 5ml와 pH 4.0 McIlvaine buffer 4ml를 넣고 잘 혼합하여 50°C에서 10분간 방치하여 두고 같은 온도로 가열된 투석효소 용액 1ml를 가하여 곧 공기를 불어 넣어 잘 혼합시킨다. 반응 개시 후 3분간에 혼합액의 유하시간(초)을 측정하여 아래의 식으로 점도감소률을 산출하였다.

$$V(\%) = \frac{A-B}{A-C} \times 100$$

V ; Rate of decrease in viscosity

A ; The flow time(second) for the mixture of substrate, buffer and destroyed enzyme solution.

B ; The flow time(second) of the mixture of substrate, buffer and dialyzed enzyme solution.

C ; The flow time(second) of water, buffer and enzyme solution.

Substrate ; Five ml of 0.1% CMC solution.

Buffer ; Four ml of McIlvaine buffer solution(pH 4.0)

Enzyme ; One ml of dialyzed enzyme solution.

5) 단백질의 정량 : 각 fraction의 단백질 함량을 Spectrophotometer Model EPU-2A (Hitachi Co. Ltd., Japan) 280mµ에서 optical density를 측정하여 구하였다.

6) DEAE-Sephadex A-25 : Sephadex ion exchange인 DEAE-Sephadex A-25는 다음과 같이 처리 하였다. 즉 DEAE-Sephadex A-25 1g 당 물 100~200ml로 한 시간 이상 팽윤시켜 교반 정지 및 경사를 반복하여 미립자를 제거하고 0.5 N-HCl 용액으로 처리하여 수세한 후 다시 0.5N NaOH 용액으로 처리하여 수세하고 pH 5.0, 0.02M acetate buffer로 평형화시켜 기포가 없게 column (1.8×30cm)에 압력을 가하면서 충전시켰다. 그 위에다 같은 완충용액에 2일간 투석시킨 조효소를 적당량 첨가하고 step-wise로 용출시켜 fraction collector에서 용량법으로 5ml씩 분취하였다. 분취된 각 fraction에 대하여 단백질과 효소의 활성을 측정하였다.(6)

결과 및 고찰

1. 황산암모니움 염석에 의한 분별

Inducer로서 CMC와 Avicel 첨가한 배양액을 여과하고 각각 황산암모니움으로 염석, 침전시켜 다음 Table 3과 같이 하여 각 효소를 분별하였다.

2. DEAE-Sephadex A-25 chromatography

황산암모니움 분획으로 얻은 침전물은 갈색을 띠고 있으므로 먼저 탈색과 동시에 효소를 분별 농축할 목적으로 DEAE-Sephadex A-25에 의한 column chromatography를 행하였다. 즉 황산암모니움 침전물을 소량의 물에 녹여 처음에는 증류수에 24시간 투석시키고 다시 같은 완충용액으로 하루밤 투석시킨 후 DEAE-Sephadex A-25 column (1.8×30cm)에 흡착시켰다. 처음은 pH 5.0, 0.05M acetate buffer 용액으로 다음에 0.2M NaCl의 0.02M acetate buffer 용액, 0.4M NaCl, 0.6M NaCl 용액을 사용하여 step-wise로 용출시켰다. 이 때 얻어진 용출곡선과 효소활성은 Fig.1과 Fig.2와 같다.

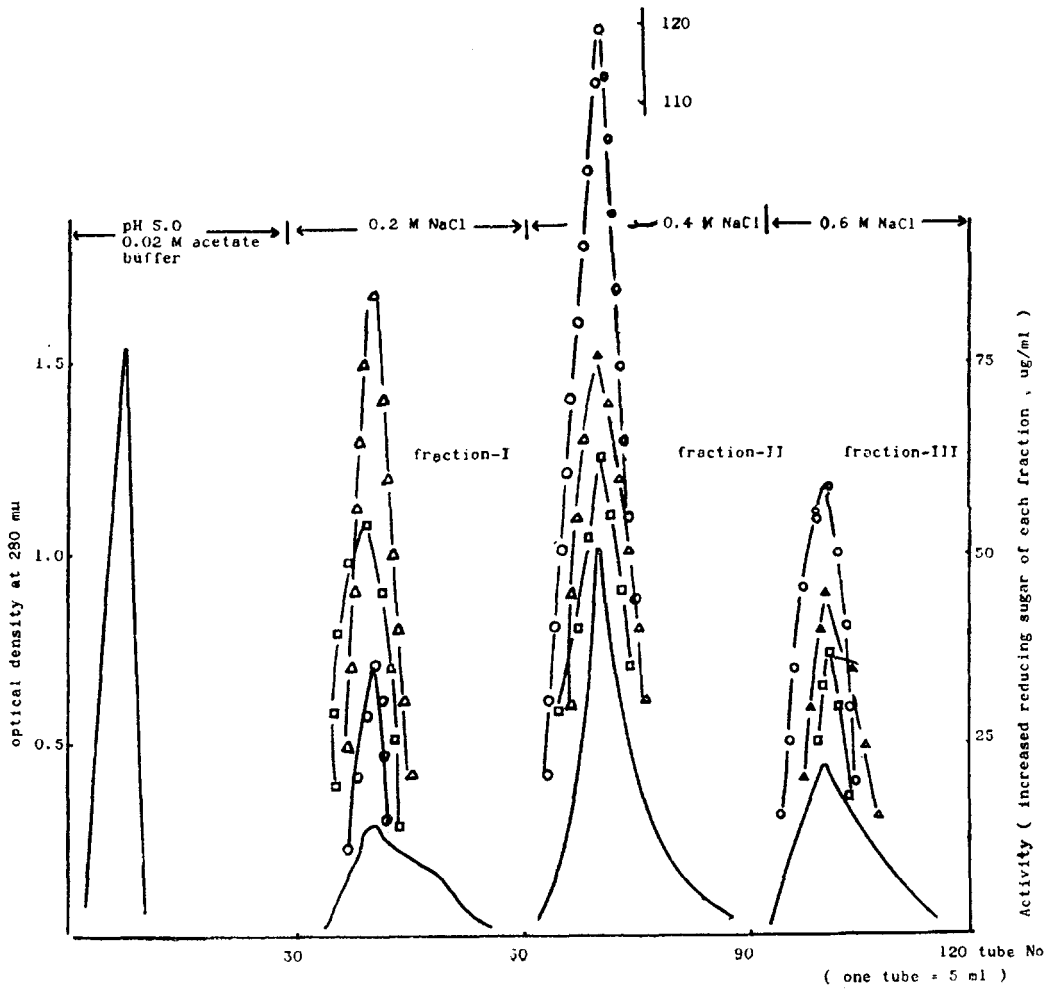


Fig. 1. Chromatogram of cellulase produced from Avicel wheat bran medium on a column of DEAE-Sephadex A-25 (1.8×30cm) eluted with pH 5.0 acetate buffer

—○—○—; CMC-saccharifying activity, —▲—▲—; Avicel saccharifying activity
 —■—■—; cellulose powder saccharifying activity, —; protein

Fig.1, Fig.2 와 같이 처음의 pH 5.0, 0.02M acetate buffer 용출구분에는 cellulase 활성은 전연 없었으며 특히 착색 부분만 용출되었다. 여기서 DEAE-Sephadex A-25 column 에 의한 최초의 0.2M NaCl 용액 용출회분을 fraction I, 0.4M 및 0.6M NaCl 용출회분을 각각 fraction II, fraction III 라 명명하였다.

이로서 본 균주가 생산하는 cellulase 는 inducer 의 종류에 관계없이 적어도 3 구분으로 된 것을 알수 있었다

특히 fraction I 은 자연섬유의 분해효소활성, fraction III 는 반대로 CMC 당화효소활성이 강하였으며, fraction II 는 효소활성이 제일 많은 구분으로 CMC 당화활성과 Avicel 당화활성이 더욱 강하였다. 그러나 CMC 점도 감소활성은 세 fraction 에 다 같이 공존해 있었다.

한편 첨가된 inducer 가 달라짐으로서 생성되는 효소계의 활성이 달라져 Fig. 1 과 같이 Avicel 만 첨가한 경우는 fraction I 과 fraction III 의 자연섬유 당화활성이

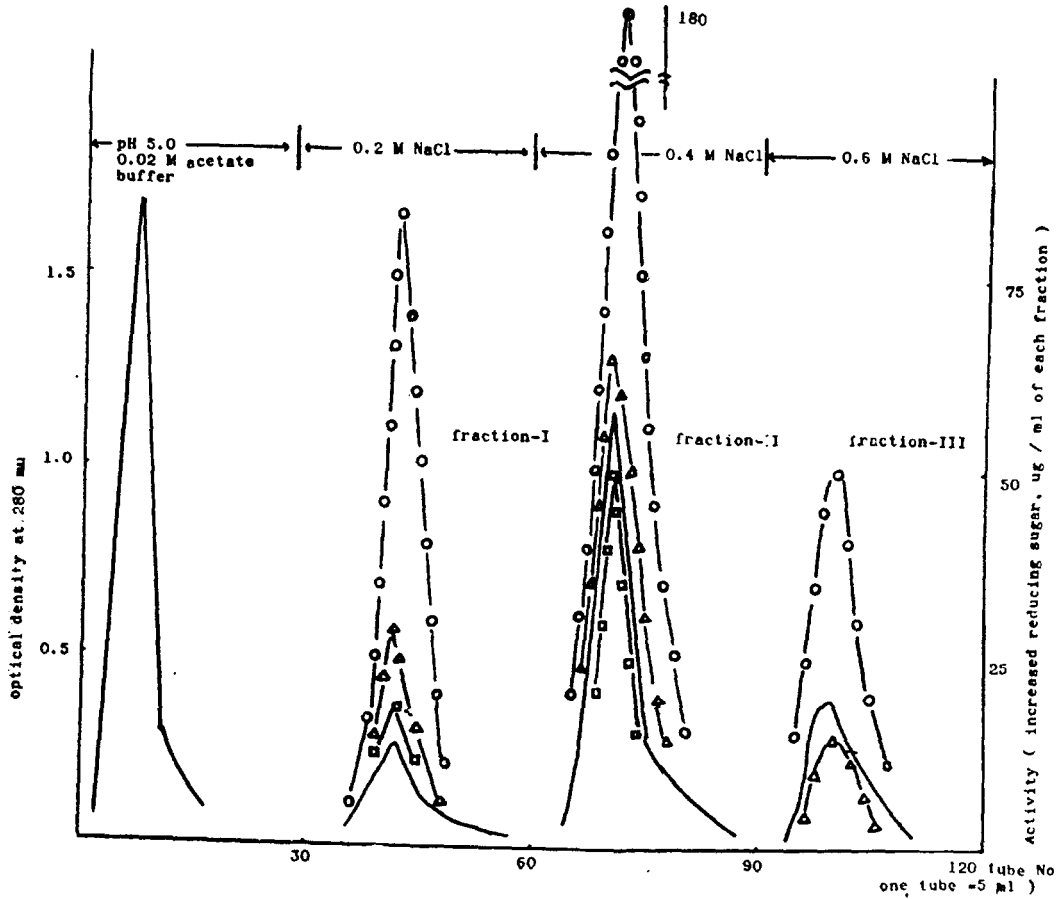


Fig. 2. Chromatogram of cellulase produced from CMC wheat bran medium on a column of DEAE-Sephadex A-25(1.8×30cm) eluted with pH 5.0 acetate buffer

○-○-○; CMC-saccharifying activity, ▲-▲-▲; Avicel saccharifying activity
 ■-■-■; cellulose powder saccharifying activity, —; protein

CMC 만 첨가한 경우에 비하여 2 배나 증가되었다. 그리고 Fig. 2 와 같이 CMC 만 첨가한 경우는 fraction I 과 fraction III 에는 Avicel 당화활성이 거의 없었으며 fraction II 의 CMC 당화활성이 Avicel 첨가의 경우보다 강하다는 것을 알 수 있었다.

이와 같이 cellulase 는 단일의 효소가 아니라 inducer 를 첨가 하므로 효소의 system 이 달라져 CMC 를 첨가 할 경우는 CMC 당화활성 (CMCase) 이 강해지며 반대로 Avicel 을 첨가한 경우는 Avicel 당화활성 (Avicelase) 이 강하다는 것을 알 수 있다.

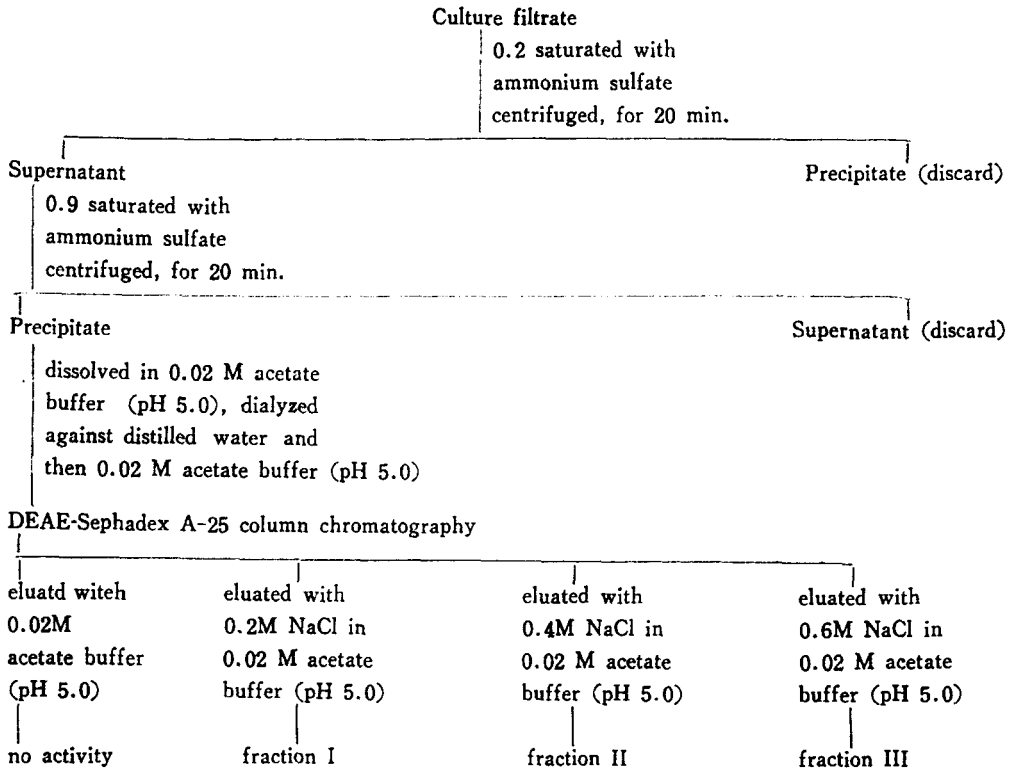
고로 같은 균주라 할지라도 배지의 조성에 따라 cellulase 는 다른 성분으로 유도 될 수 있을 것 같고 자

연계의 미생물에서 생성되는 cellulase 는 CMC 같은 것 에서 유도되는 것이 아니기 때문에 Avicelase 활성이 강하여 더욱 자연섬유질을 보다 빨리 분해 시킬지도 모른다.

한편 Mandels⁽⁷⁾ 씨가 지적한 바와 같이 Avicelase 의 작용으로 cellobiose 가 생성되면 더욱 좋은 inducer 가 되므로 그의 생성은 크게 유도될 수 있을 것 같다.

또 유도물질의 농도와 효소 생성량과의 관계는 효소반응에 있어서 효소와 기질의 관계와 같이 Lineweaver-Burk 식이 성립될 것 같으나 유도물질이 기질과 같은 물질이라도 그들의 작용점이 다르기 때문에 기구도 달라질 것 같다.⁽¹²⁾

Table 1. Purification procedure of cellulase



요 약

1. 5% 밀기울 기본배지에다 inducer로서 CMC 혹은 Avicel을 첨가하여 Myriococcum albomyces를 접종하여 진탕배양할 때의 cellulase 유도생성을 검토하였다.
2. DEAE-Sephadex A-25 column chromatography 방법으로 배양액에서 cellulase 활성이 다른 3개의 부분, fraction I, fraction II와 fraction III를 분리하였다.
3. Inducer로서 CMC 첨가의 경우는 CMCase가 강해지고 반대로 Avicel을 가한 경우는 Avicelase가 강하였다.

인 용 문 헌

1. Miller, G.L. and Blume, R.; J. Biol. Chem., 218, 131 (1956)
2. Gilligan, W. and Reese, E.T.; Canad. J. Microbiol., 1, 90 (1954)
3. Selby, K. and Maitland, C.C.; Biochem. J., 104, 716 (1967)
4. Wood, T.M.; Biochem. J. 109, 217 (1968)
5. 神田, 若林, 西澤; 醸工誌, 48, 607 (1970)
6. 鄭 東孝; 韓農化, 12, 33 (1969)
7. Mandels, M. and Reese, E.T.; J. Bacteriol., 79, 816 (1960)
8. 鄭 東孝, 井上, 林田, 本江; 日本農藝化學會講演要旨集 p. 137 (1970)
9. Somogyi, M.; J. Biol. Chem., 160, 61 (1945)
10. Somogyi, M.; ibid., 195, 19 (1952)
11. Nelson, N.; ibid., 153, 375 (1944)
12. Pollock, M. R.; Biochem. J., 66, 419 (1957)