

*Stachybotrys atra*에서 추출한 섬유소 분해효소에 관한 연구(I)

—효소의 활성에 미치는 온도와 pH의 영향—

김 은 수 · 김 영 민 · 강 영 희 · *최 태 주
(연세대학교 생물학과 · *연세대학교 의과대학 미생물학교실)

Studies on the Cellulolytic Enzymes of *Stachybotrys atra*(I)

—Effects of temperature and pH on the enzyme activities—

KIM, W.S., Y.M. KIM, Y.H. KANG, and *T.J. CHOI

(Department of Biology, Yonsei University.)

*Department of Microbiology, Medical School, Yonsei University)

ABSTRACT

When the enzyme preparations were heated at various temperatures for 1 hour, the thermal stability for the enzyme was maximum at 30°C. The optimum temperature for the enzyme activity was at 40°C. When the enzyme preparations were exposed to various pH's for 22 hours, the enzyme stability was maximum at pH 3.8, and it was decreased gradually as the pH rose up to 4.8, above which the stability was greatly restored. When the exposure period was extended from 22 to 168 hours, the maximum stability was found at pH 4.8 and the minima were at pH's 3.0 and 5.9, but the stability tended to rise at pH's below 3.0 and above 5.9. The optimum pH for the enzyme activity was obtained at 4.8.

緒 論

현재 선진 각국에서 크게 각광을 받고 있는 섬유질 분해효소(cellulases)에 관해서는 많은 학자들에 의해 미생물, 특히 곰팡이의 대다수가 이 효소를 보유하고 있다는 사실이 보고되었고, 또 이방면에 대한 많은 연구가 진행되어 사료공업, 식품, 의약품, 섬유가공 등에 널리 이용하고 있어 이 효소의 이용가치는 지대하다 하겠다.

Reese 등 (1950)은 *Myrothecium verrucaria*로 부터 C₁, C₂ 두 종류의 cellulase를 분리하여 cellulase가 두 개의 구성성분으로

되어 있다고 했고, 반대로 Whitaker 등 (1963)은 동일한 균주인 *M. verrucaria*에서 단순효소론을 주장했다. 또 Iwasaki 등 (1964)은 *Trichoderma koningi*로 부터 cellulase I, II를 보고했고 Storvick과 King(1960)은 *Cellvibrio gilbus*에서, Pettersson과 Porath(1963)는 *Polyporus versicolor*에서 cellulase의 다양성을 보고한 바 이는 균주에 따라 cellulase의 성질이 각기 상이함을 암시한다.

Reese 등 (1950)은 *A. luchuensis*등에서 cellulase의 pH에 대한 안정도 및 기질과의 작용시의 최적온도 및 pH에 대한 보고를

한 바 있고, Storvick과 King(1960)은 *C. gilbus*에서 최적 pH에 대해, Ikeda(1967) 등은 *A. niger*에서, Okada(1975)는 *T. viride*에서 온도와 pH에 대한 안정도 및 최적 온도, 최적 pH에 관한 보고를 했으며, Youatt(1958)와 Jermyn(1955)은 *S. atra*에서 pH에 대한 보고를 한 바 있다.

이 논문에서는 최근 연구가 부진한 *S. atra*를 합성배지가 아닌, 우리 주위에서 쉽게 구할 수 있는 밀기울에서 배양하여 추출한 cellulase를 순화하기 전단계로서 온도 및 pH의 변화가 이 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰했다.

材料 및 方法

1. 재 료

1) 균 주

S. atra Corda SANK 16373(일본三共주식회사 발효연구소)

2) 기 질

가용성인 기질로 Na-CMC(일본化成산업)를 사용했다.

2. 실험방법

1) 효소제조

밀기울 3gr을 100ml 삼각플라스크에 넣고 증류수 5ml을 끌고루 뿌린 후 멸균하여 *S. atra*를 접종, 30°C에서 8일간 배양하여 반 고체화된 배지를 탁자사발로 마쇄하여 증류수 30ml를 가하고, 상온에서 3시간 동안 추출후 원심분리(3,000g/30min)하여 상등액을 (NH₄)₂SO₄로 30% 포화시켜 4°C에 하룻밤 방치하였다가 다시 원심분리(3,000g/20min) 후 상등액을 (NH₄)₂SO₄로 70% 포화시켜 4°C에 하룻밤 방치한다. 이것을 원심분리(3,000g/20min) 후 침전물을 소량의 증류수로 녹인 다음 다시 원심분리(3,000g/20min)하여 불용성 물질을 제거하고 상등액을 효소액으로 사용했다(Ikeda *et al.*, 1967).

2) 열에 대한 안정도

효소액을 각기 다른 온도에서 1시간 동안 예열후 실온으로 식힌 다음, 0.5ml씩을 각기 취하여 0.6% Na-CMC 1.0ml 및 0.1M

acetate buffer(pH 5.0) 0.6ml와 섞어 40°C에서 1시간 동안 반응시켜 생성되는 glucose의 양을 본 연구실에서 고안한 Somogyi-Nelson의 변법으로 측정, 잔여활성을 비교했다.

3) 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

효소액 0.5ml, 0.6% Na-CMC 0.1ml, 0.1M acetate buffer(pH 5.0) 0.6ml를 섞어 각기 다른 온도에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성되는 glucose의 양을 측정, 비교했다.

4) pH에 대한 안정도

효소액을 12°C에서 여러 pH상태로 방치 후, 22시간 및 168시간 후 각각 pH 5.0로 재조정하여 각기 0.5ml를 취해 0.6% Na-CMC 1.0ml 및 0.1M acetate buffer(pH 5.0) 0.6ml와 섞어서 40°C에서 1시간 동안 반응시켜 생성된 glucose의 양을 측정, 비교했다.

5) 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

반응에 사용하는 0.1M acetate buffer를 여러 pH로 만들어, 효소액 0.5ml와 0.6% Na-CMC 1.0ml 및 각기 다른 pH의 buffer 0.6ml를 섞어 40°C에서 1시간 동안 작용시켜 생성된 glucose의 양을 측정, 비교했다.

結 果

1. 열에 대한 안정도

열에 대해서 이 효소는 Fig. 1에서와 같이 30°C에서 가장 안정하고, 40~50°C에서는 85~90%의 안정도를 유지하나 그 이상에서는 심한 불안정성을 나타냈다.

2. 효소의 활성에 미치는 온도 영향

Fig. 2에서와 같이 이 효소는 40°C에서 가장 강한 활성을 나타내며, 60°C에서는 50%, 80°C에서는 거의 활성이 중지되었다.

3. pH에 대한 안정도

Fig. 3에서와 같이 효소는 22시간후에 pH 3.8에서 가장 안정하고 pH 4.8에서 각기 안정도가 떨어지나 pH 5.9이상에서 다시 회복이 됨을 보여준다. 그러나 168시간 후에는 pH 4.8이 가장 안정하고 pH 3.0과

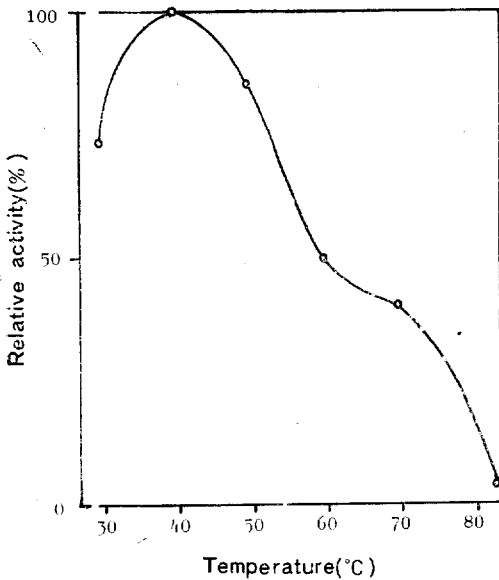


Fig. 1. Thermal stability of crude cellulase.

After heating the crude enzyme solution at various temperatures for 1 hour and cooling, the residual activity of the enzyme was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 40°C/1 hour at pH 5.0.

pH 5.9에서 심한 불안정성을 보이다가 더 강한 산과 알칼리쪽에서는 오히려 안정도가 높아지고 있다.

4. 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

Fig. 4는 이효소의 기질과의 반응시의 최적 pH가 4.8로서 이보다 산 또는 알칼리쪽에서는 활성이 심하게 감소함을 보여준다.

考 察

본 실험의 결과에서 나타난 열에 대한 안정도 및 기질과의 반응시에 온도가 이 효소의 활성에 미치는 영향은 현재까지 *S. atra*를 이용한 보고가 없어 비교할 수 없으나, Reese 등 (1950)이 *A. luchuensis*에서 효소의 활성을 나타내는 최적온도가 65°C라고 한 것과 Ikeda 등 (1967)이 *A. niger*에서

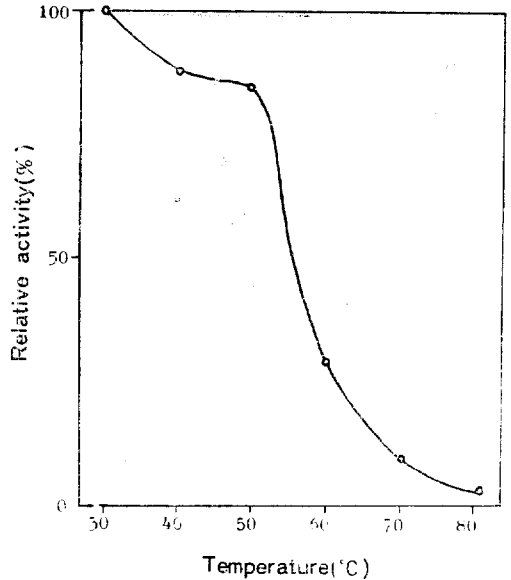


Fig. 2. Effect of temperature on the activities of crude cellulase.

The enzyme activity was determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour at various temperatures.

50°C에서 가장 안정하고 40~65°C에서 효소의 활성이 가장 활발하다고 보고한 사실 및 Okada(1975)가 *T. viride*에서 30~60°C에서 가장 안정하고 50~60°C에서 가장 강한 활성을 나타낸다고 한 것과는 달리, 30°C에서 가장 안정하고 기질과의 반응시의 활성을 나타내는 최적온도도 40°C로서, 60°C 이상에서는 급격한 활성의 저하를 나타내고 있다.

pH에 대한 안정도는 방치시킨 후 22시간 후에는 pH 3.8에서 가장 안정한 바, 특이한 것은 pH 4.8에서 강한 불안정성을 나타내다가 pH 5.9에서 부터 서서히 안정도가 높아져 pH 8.0에서는 95%의 회복을 보이고 있고, 168시간후에는 불안정했던 pH 4.8에서 가장 안정하며 pH 3.0, 5.9에서 불안정성을 나타내다가 다시 더 강한 산과 알칼리쪽에서 서서히 회복되다가 pH 8.0에서는 85%가

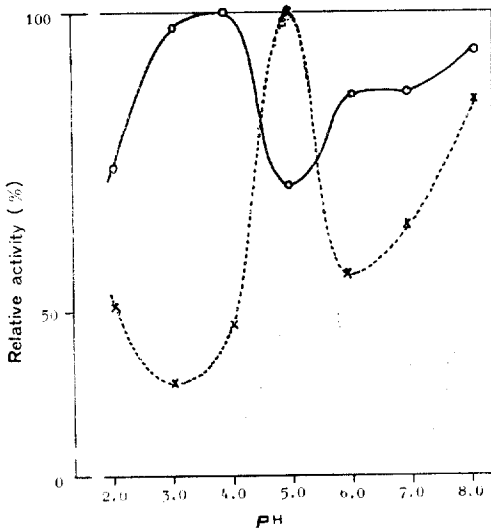


Fig. 3. pH stability of crude cellulase.

After exposure the crude enzyme solution for 12°C/22-168 hours at various pH's, the enzyme was readjusted to pH 5.0, and the residual activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 40°C/1 hour at pH 5.0.

—○—○— After 22 hours.
 ...×.....×... After 168 hours.

지 회복되어짐으로 보아 이 효소가 산보다는 알칼리쪽에서 더 안정함을 보여준다. 기질과의 반응시의 최적 pH는 4.8로서 이보다 산 또는 알칼리쪽에서는 활성이 크게 떨어졌다. 이 결과는 Reese등 (1950)이 *A. luchuensis*에서 22시간후에 pH 5.0~7.0에서 가장 안정하며 기질과의 반응시 최적 pH가 5.0라고 보고한 것 및 Storvick과 King(1960)이 *C. gilbus*에서 반응시의 최적 pH가 6.0이라한 것과 Ikeda등 (1967)이 *A. niger*에서 24시간후에는 pH 4~6, 100시간후에는 pH 4.0이 가장 안정하다고 보고한 사실, Okada(1975)가 *T. viride*에서 24시간후에 pH 5.0~7.0에서 가장 안정하고, 반응시의 최적 pH가 4.5~5.0이라고 보고한 것, Jermyn(1955)이 *S. atra*에서 24시간후에

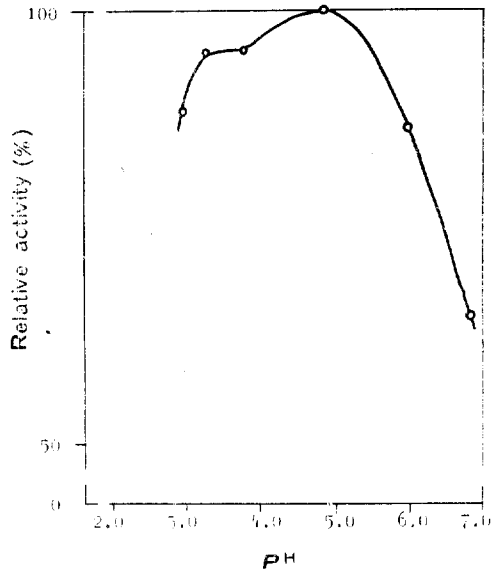


Fig. 4. Effect of pH on the activities of crude cellulase.

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 40°C/1 hour at various pH's.

pH 4~5가 가장 안정하고 pH 4.0이하에서는 안정성이 갑자기 감소한다고 한 것과 Youatt(1958)가 *S. atra*에서 활성을 나타내는 최적 pH가 5~6이라고 보고한 사실등과 많은 차이를 나타내고 있는 바 이는 온도의 경우와 마찬가지로 균주의 차이에서 오는 효소의 다양성 및 배지의 상이함에서 초래된 동일 균주효소의 변화로 생각된다.

한편 Fig. 2에서와 같이 40~60°C에서 급격한 활성의 저하를 보이다가 60~70°C에서는 변화가 적으나 그 이상에서 다시 급한 변화를 보이고 있는 것과 Fig. 3에서 pH와 시간의 변화에 따른 안정도의 다양성 및 Fig. 4에서 효소의 활성이 pH 3~4에서 변화가 없는 것 등은 이 효소가 여러가지 특징을 지닌 다양한 섬유질 분해효소들의 복합체라는 것을 암시해 준다.

이상의 결과와 같이 *S. atra*의 cellulase

는 단일효소가 아님을 짐작할 수 있어 앞으로 요구된다.
로 여러가지 순화방법에 의한 더 많은 연구

摘 要

1. 효소액을 여러 온도에서 1시간 동안 가열시 가장 안정된 온도는 30°C였다.
2. 기질과의 반응시의 최적온도는 40°C였다.
3. 효소액을 여러 pH에 22시간 방치시 가장 안정된 pH는 3.8이며, pH 4.8에서 갑자기 안정도가 떨어지나, 보다 강한 알칼리쪽에서 회복이 되었다. 168시간후에는 pH 4.8에서 가장 안정하였으며 pH 3.0, 5.9에서 불안정성을 나타내다가 더 강한 산과 알칼리쪽에서 오히려 안정도가 회복되었다.
4. 기질과의 반응시의 최적 pH는 4.8이었다.

引 用 文 獻

1. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulases from *Aspergillus niger*. *Agri.Biol. Chem.* 31(10), 1201.
2. Iwasaki, T., K. Hayashi, M. and Funatsu, 1964. Purification and characterization of two types of cellulase from *Trichoderma koningi*. *J. Biochem. Japan* 55(2), 209.
3. Jermyn, M.A., 1955. Fungal cellulases. V. Enzymic properties of *Stachybotrys atra* β -glucosidase. *Australian J. Biol. Sci.* 8, 563-602.
4. Okada, G., 1975. Enzymic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* 77, 33.
5. Pettersson, G., and J. Porath, 1963. Cellulolytic enzymes. II. Multiplicity of the cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta* 67, 1.
6. Reese, E.T., R.G.H. Siu, and H.S. Levinson, 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* 59, 485.
7. Storvick, W.O., and K.W. King, 1960. The complexity and mode of action of the cellulase system of *Cellvibrio gilbus*. *J. Biol. Chem.* 235, 303.
8. Whitaker, D.R., K.R. Hanson, and P.K. Datta, 1963. Improved procedures for preparation and characterization of *Myrothecium* cellulase. II. Purification procedures. *Can. J. Biochem. Physiol.* 41, 671.
9. Whitaker, D.R., 1971. Cellulases. *The enzymes* (3rd ed.) 5, 273. Ed. by Boyer, P.D. Academic Press Inc., New York.
10. Youatt, G., 1958. Fungal cellulases. IX. Growth of *Stachybotrys atra* on cellulose and production of a β -glucosidase hydrolyzing cellobiose. *Australian J. Biol. Sci.* 11, 209.