

Cellulase 활성에 대한 몇가지 금속이온의 영향

*최명자 · 김영민 · 김은수

(연세대학교 생물학과 *신광여자고등학교)

Influence of some Metal Ions on the Cellulase Activity

*CHOI, M.J., Y.M. KIM, and W.S KIM

(Department of Biology, Yonsei University. *Sinkwang Girl's High School)

ABSTRACT

Three commercial cellulases prepared from *Penicillium notatum*(cellulase[K]), *Trichoderma viride*(cellulase[J]) and *Aspergillus niger*(cellulase[A]) were analyzed with respect to their relative purity, activity and the effects of several metal ions on their activities. The activity of cellulase[K] was the strongest of all and that of cellulase[A] being the weaker. The purity of cellulase[K] was the highest while that of cellulase[J] was the lowest. Under the assay conditions, the optimum concentrations of Zn⁺⁺ and Mg⁺⁺ ions for the activity of cellulase[K] were 2 and 7mM while those of cellulase[A] were 5 and 6 mM respectively and those of cellulase[J] were 3 mM for both ions. Cellulase[K] and cellulase[J] were more strongly activated by Zn⁺⁺ than Mg⁺⁺ and cellulase[J] by Mg⁺⁺ than Zn⁺⁺. Both Cu⁺⁺ and Mn⁺⁺ ions inhibited enzyme activities, but cellulase[K] was weakly and cellulase[A] was strongly inhibited by these metal ions. The inhibitory effects of Mn⁺⁺ ions for enzyme activities were stronger than Cu⁺⁺ ions. The Ki values of Cu⁺⁺ and Mn⁺⁺ for cellulase[K] were found to be 6.1 and 0.7 mM, those of cellulase[J] were 2.6 and 0.32 mM, and those of cellulase[A] were 2.0 and 0.2 mM respectively. Both Cu⁺⁺ and Mn⁺⁺ ions showed a pattern of competitive inhibition of the enzyme activity. When Na-CMC was used as substrate, the Km and V values of cellulase [K] were calculated to be 2.0×10^{-4} mM and 3.43mmoles/hour, those of cellulase[J] were 2.5×10^{-4} mM and 3.77mmoles/hour, and those of cellulase[A] were 4.0×10^{-4} mM and 4.00mmoles/hour respectively.

緒 論

현재까지의 보고에 의하면 cellulase는 주로 곰팡이에서 발견되고 있는데 이들은 단일효소가 아니고(Okada, 1975; Okada et al, 1969; Selby와 Maitland, 1967; Wood, 1971; Wood와 McCare, 1972) 균주의 종류와 배양방법 등에 따라 활성 및 물리화학적 성질을 달리함을 알 수 있다(Chetkarov와 Kolev, 1969; Ikeda et. al, 1967, 1973; Wood,

1968, 1969; Okada, 1975).

본 연구의 목적은 현재 한국, 일본 및 미국에서 시판되고 있는 세가지 cellulase의 활성을 비교하는 동시에 이들 각 효소의 활성에 미치는 몇가지 금속이온의 영향 및 반응속도를 비교 연구하는데 있다.

材料 및 方法

1. 재료

효소는 국내의 동아제약의 제품(*Penicilli-*

*um notatum*에서 추출, 이하 cellulase[K]로 명명)과 일본天野製약의 제품(*Trichoderma viride*에서 추출, 이하 cellulase[J]로 명명) 및 미국 SIGMA의 제품 Type I(*Aspergillus niger*에서 추출, 이하 cellulase[A]로 명명)을 사용하고 기질로는 Na-CMC(일본花城산업제품, 분자량; 약 115,000)를 사용했다

2. 방법

1) 효소의 활성측정

0.6% Na-CMC 1.0ml, 0.1M acetate buffer(pH5.0) 0.6ml 및 0.5%의 효소액 0.2ml를 각기 섞어 40°C에서 1시간동안 반응시킨후 생성되는 환원당의 양을 Somogyi-Nelson의 방법으로 Beckman Spectrophotometer DB-G로써 540nm에서의 흡광도를 측정함으로써 각 효소의 활성을 결정했다.

2) 효소의 순도측정

0.1M acetate buffer(pH5.0) 1.6ml 및 0.5%의 각 효소액 0.2ml를 섞어 효소의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 각 효소자체가 함유하고 있는 환원당의 양을 측정함으로써 각 효소의 순도를 비교했다.

3) 효소단위 (Enzyme unit)

효소의 활성측정법에 의해 효소를 40°C에서 1시간동안 기질과 반응시켰을 때 효소가 생성하는 glucose 1 μ mole을 1unit로 결정했다.

4) 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향 반응에 사용하는 0.1M acetate buffer(pH5.0)에 Zn⁺⁺, Mg⁺⁺, Cu⁺⁺ 및 Mn⁺⁺의 염을 여러농도를 녹인후 효소의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 각 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향을 여러농도에서 관찰했다.

5) 효소역학(Enzyme Kinetics)

가. Michaelis 상수(Km) 및 최대반응속도(V)

여러농도의 Na-CMC를 사용, 효소의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정, Lineweaver-Burk plot에 의해 각 효소의 Km 및 V값을 결정했다

나. 저해상수(Ki)

서로 다른 두 농도의 Na-CMC 용액과 효소의 활성을 저해하는 금속이온이 여러농도로 포함된 0.1M acetate buffer(pH5.0)를 사용, 효소의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정하여 Dixon의 방법에 의해 각 금속이온의 효소에 대한 Ki값을 결정했다.

結 果

1. 효소의 활성

(Table 1)은 각 효소의 활성을 효소단위(unit)로 나타내고 있는 바, cellulase[K]가 1.65 unit/mg으로 활성이 가장 높고, cellulase[J]가 0.84unit/mg, cellulase[A]가 0.76unit/mg임을 보여준다.

2. 효소의 순도

(Table 1)에서와 같이 각 효소자체가 함유하고 있는 환원당의 양은 glucose를 기준으로 하여 cellulase[K]가 3.8×10^{-3} mg/mg으로 가장 불순물이 적으며, cellulase[A] 6.6×10^{-3} mg/mg, cellulase[J]가 6.8×10^{-2} mg/mg으로 불순물이 가장 많이 들어 있음을 나타내고 있다.

Table 1. Activities and purities of each commercial cellulases.

Cellulases	Activity (unit/mg)	Reducing sugar contents in terms of gluc- ose(mg/mg)
Cellulase[K] (<i>P.notatum</i>)	1.65	3.8×10^{-3}
Cellulase[J] (<i>T.viride</i>)	0.84	6.8×10^{-2}
Cellulase[A] (<i>A.niger</i>)	0.76	6.6×10^{-3}

3. 효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향
금속이온의 영향이 없을 때의 효소활성을 100%로 할 경우, (Fig. 1)은 Zn⁺⁺의 cellulase[K]에 대한 활성촉진 최저농도는 2mM로 약 145%의 활성을 나타내고 cellulase[J]에 대한 최저농도는 3mM로 120%의 활성을 나타내며 cellulase[A]에 대한 최저농도는 5mM로 약 115%의 활성을 나타내고

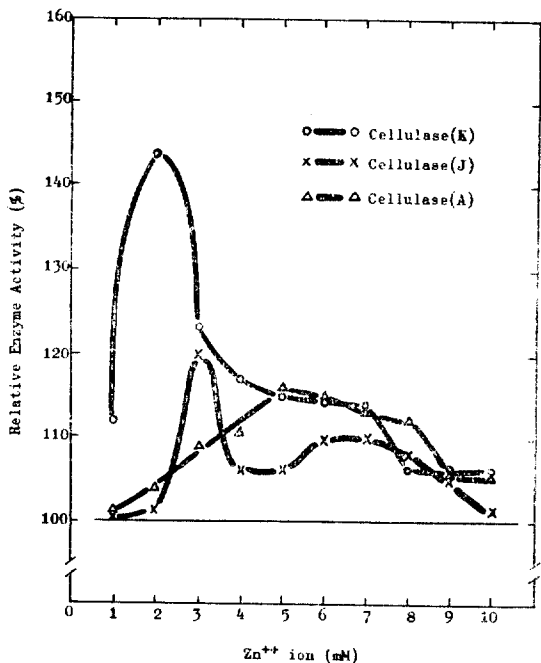


Fig. 1. Effect of Zn⁺⁺ ion on the activities of commercial cellulases.

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0. The optimum concentrations of Zn⁺⁺ for cellulase[K], cellulase[J] and cellulase[A] were at 2, 3 and 5mM respectively.

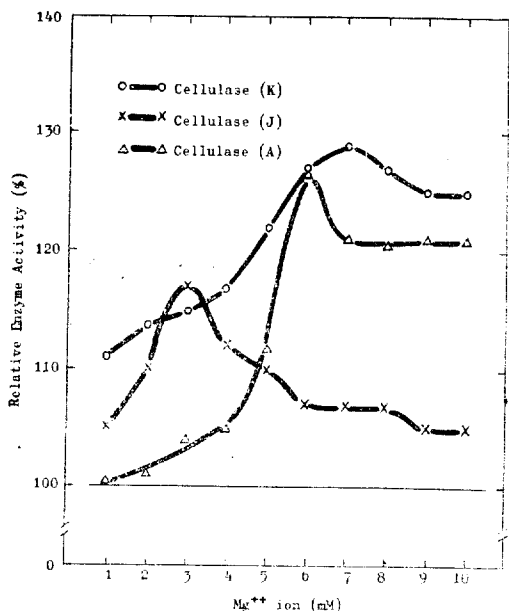


Fig. 2. Effect of Mg⁺⁺ ion on the activities of commercial cellulases.

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0. The optimum concentrations of Mg⁺⁺ for cellulase[K], cellulase[J] and cellulase[A] were at 7, 3 and 6 mM respectively.

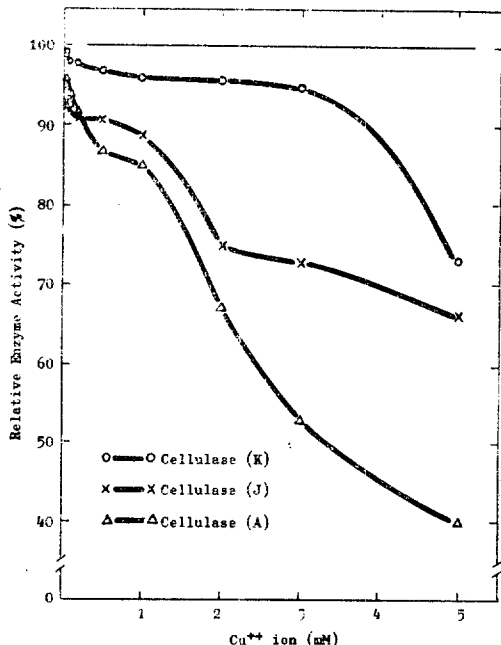


Fig. 3. Effect of Cu⁺⁺ ion on the activities of commercial cellulase.

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0.

있음을 보여준다. (Fig. 2)는 Mg⁺⁺의 cellulase(K)에 대한 활성촉진 최적 농도가 7mM로 약 130%의 활성을 나타내며, cellulase(J)에 대한 최적농도는 3mM로 117%의 활성을 나타내고, cellulase(A)에 대한 최적농도는 6mM로 127%의 활성을 나타내고 있음을 보여준다. 또 이들 두 그림은 Zn⁺⁺와 Mg⁺⁺가 공히 cellulase(K)의 활성을 가장 강하게 촉진시키며, cellulase(K)와 cellulase(J)는 Zn⁺⁺에 의해 cellu-

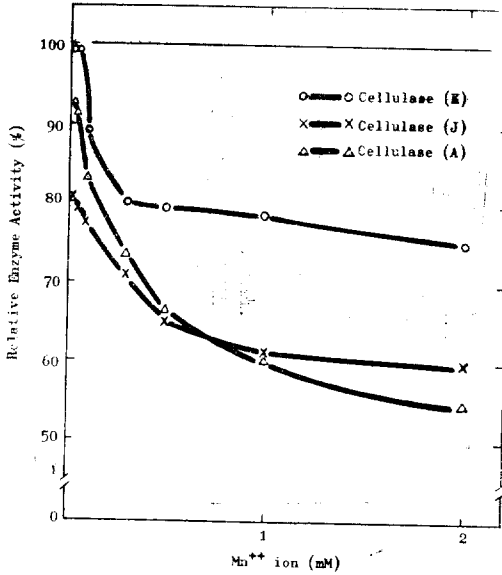


Fig. 4. Effect of Mn^{++} ion on the activities of commercial cellulases.

The enzyme activity was determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme, metal ion and Na-CMC for 1 hour/40°C at pH 5.0.

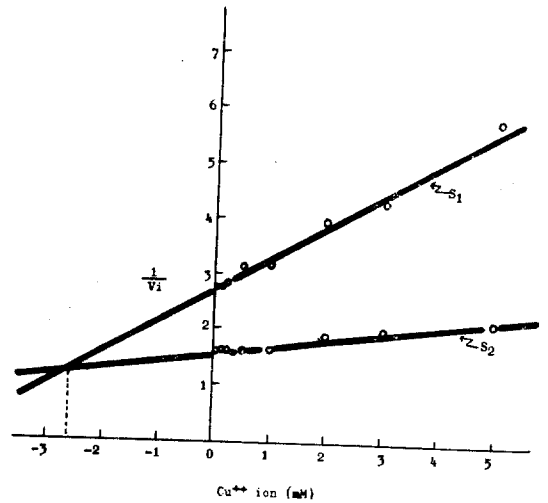


Fig. 6. Plot for the inhibition constant of Cu^{++} on the activity of cellulase(J).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 2.6mM.

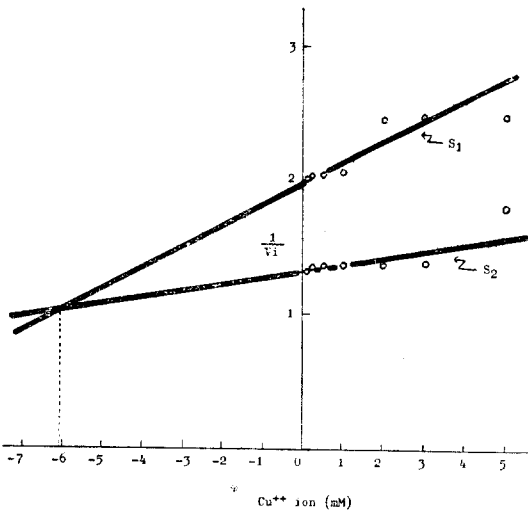


Fig. 5. Plot for the inhibition constant of Cu^{++} on the activity of cellulase(K).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 6.1mM.

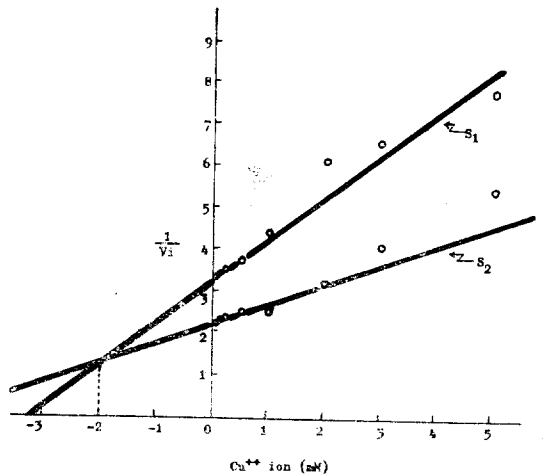


Fig. 7. Plot for the inhibition constant of Cu^{++} on the activity of cellulase(A).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 2.0 mM.

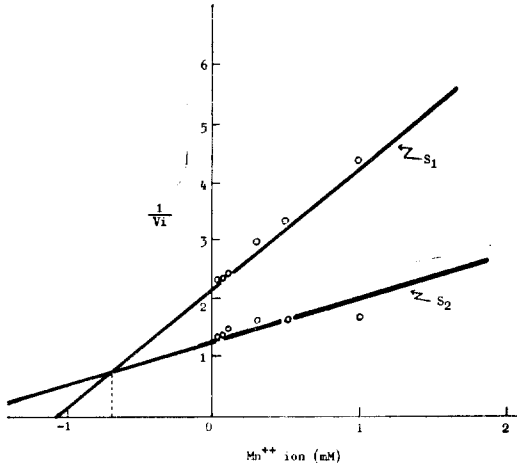


Fig. 8. Plot for the inhibition constant of Mn^{++} on the activity of cellulase(K).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 0.7 mM.

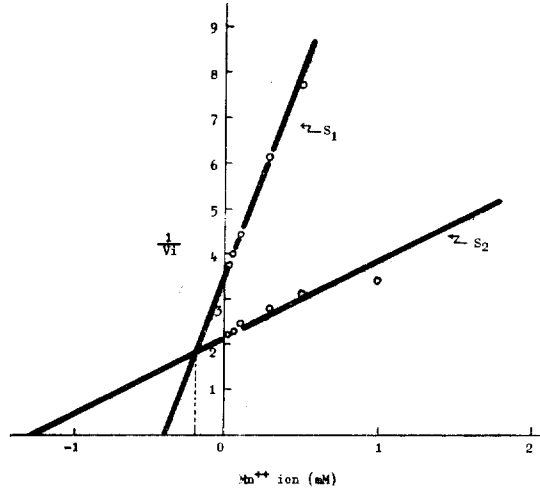


Fig. 10. Plot for the inhibition constant of Mn^{++} on the activity of cellulase(A).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 0.2 mM.

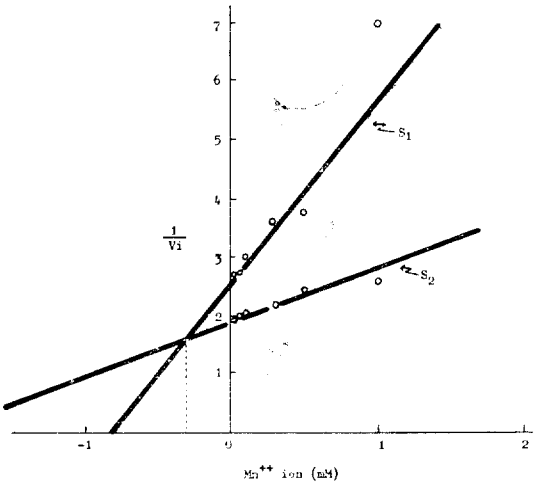


Fig. 9. Plot for the inhibition constant of Mn^{++} on the activity of cellulase(J).

S_1, S_2 means substrate concentrations, and are 3.13×10^{-5} and 5.22×10^{-5} mM respectively. The K_i value was calculated to be 0.32mM.

cellulase(A)는 Mg^{++} 에 의해 활성이 더 강하게 촉진되고 있음을 보여준다. (Fig. 3)은 Cu^{++} 의 저해작용에 대해 cellulase(K)가 영향을 가장 적게 받고 cellulase(A)가 가장 강한 저해작용을 받으며 5mM에서 cellulase(K)

는 73%, cellulase(J)는 66%, cellulase [A]는 40%의 잔여활성을 나타내고 있음을 보여준다. (Fig. 4)는 2mM의 Mn^{++} 에 의해 cellulase [K]가 75%, cellulase [J]가 60%, cellulase[A]가 55%의 잔여활성을 가지고 있음을 나타내어 cellulase(K)가 가장 영향을 적게 받으며, 동시에 세 효소에 대한 Mn^{++} 의 효과가 Cu^{++} 보다 더 강하다는 것을 알 수 있고, cellulase(J)는 Cu^{++} 의 경우와 동일하게 0.5mM 이하에서는 cellulase[A] 보다 강한 저해 작용을 받으나 그 이상에서는 cellulase[A]보다 영향을 적게 받고 있음을 알 수 있다.

4. 저해상수(K_i)

pH 5.0에서 3.13×10^{-5} mM 및 5.22×10^{-5} mM의 Na-CMC를 기질로 할 경우, (Fig. 5)는 cellulase(K)에 대한 Cu^{++} 의 K_i 값이 6.1mM이며, (Fig. 6)은 cellulase [J]에 대한 Cu^{++} 의 K_i 값이 2.6mM이고, (Fig. 7)은 cellulase[A]에 대한 Cu^{++} 의 K_i 값이 2mM임을 나타내고 있다. 또 (Fig. 8)은 cellulase(K)에 대한 Mn^{++} 의 K_i 값이 0.7mM이고, (Fig. 9)는 cellulase(J)에 대

한 Mn^{++} 의 K_i 값이 0.32mM이며, (Fig. 10)은 cellulase[A]에 대한 Mn^{++} 의 K_i 값이 0.2mM임을 나타내며 Cu^{++} 와 Mn^{++} 가 각 효소에 대해 경쟁적 저해작용을 하고 있음을 보여준다.

각 효소의 저해상수를 표로 나타내면 [Table 2]와 같다.

Table 2. K_i values of Cu^{++} and Mn^{++} ions to each commercial cellulases

Metal ions Cellulases	Cu^{++} (mM)	Mn^{++} (mM)
Cellulase[K] (<i>P. notatum</i>)	6.1	0.7
Cellulase[J] (<i>T. viride</i>)	2.6	0.32
Cellulase[A] (<i>A. niger</i>)	2.0	0.2

*5. Michaelis 상수 및 최대반응속도

pH 5.0에서 Na-CMC를 기질로 할 경우, (Fig. 11)은 cellulase[K]의 K_m 값이 2.0×10^{-4} mM이며 V 값이 1시간당 3.43mmole임을 나타내고, (Fig. 12)는 cellulase[J]의 K_m 값이 2.5×10^{-4} mM이고 V 값은 1시간당

3.77mmole이며, (Fig. 13)은 cellulase[A]의 K_m 값이 4.0×10^{-4} mM이며, V 값은 1시간당 4.00mmole임을 나타내고 있다.

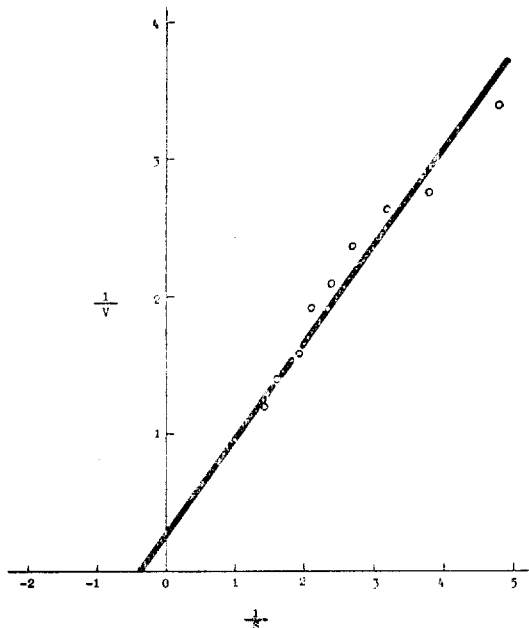


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of cellulase[J]. The values of K_m and V were calculated to be 2.5×10^{-4} mM and 3.77 mmoles/hour respectively.

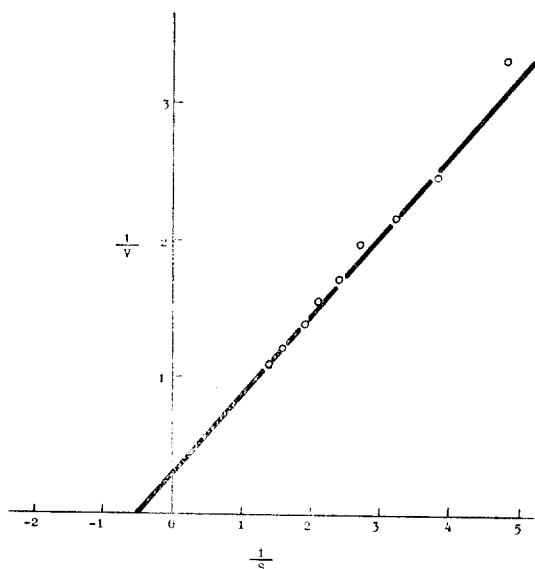


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of cellulase[K]. The values of K_m and V were calculated to be 2.0×10^{-4} mM and 3.43 mmoles/hour respectively.

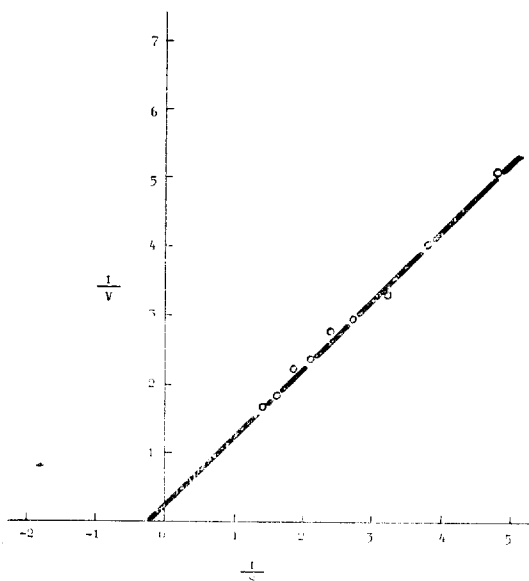


Fig. 13. Lineweaver-Burk plot of cellulase[A]. The values of K_m and V were calculated to be 4.0×10^{-4} mM and 4.00 mmoles/hour respectively.

각 효소의 Michaelis 상수 및 최대반응속도를 표로 나타내면 [Table 3]과 같다.

Table 3. Km and V values of each commercial cellulases.

Cellulases	Km(mM)	V(mmole/hour)
Cellulase[K] (<i>P.notatum</i>)	2.0×10^{-4}	3.43
Cellulase[J] (<i>T.viride</i>)	2.5×10^{-4}	3.77
Cellulase[A] (<i>A.niger</i>)	4.0×10^{-4}	4.00

考 察

현재 약품 및 실험용으로 시판되고 있는 국내 및 일본, 미국에서 제조된 3가지 cellulase에 대한 역가를 측정, 비교한 결과 국내의 cellulase[K]가 1.65 unit/mg으로 일본이나 미국에서 제조된 효소보다 약 2배의 활성을 나타내고 있음은 물론 순도면에서 보더라도 타제품에 비해 불순물이 적은 것이 입증되었다.

각 효소에 대해 Zn⁺⁺와 Mg⁺⁺는 효소의 활성을 촉진시키고 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺는 효소의 활성을 억제시켰다. cellulase[K]는 Zn⁺⁺와 Mg⁺⁺에 의해 다른 효소보다 월등히 높은 촉진현상을 나타내었는 바, 특히 Zn⁺⁺에서는 2mM에서 145%의 촉진현상을 보여 이것을 효소산업에 응용하면 유용할 것으로 생각된다. cellulase [K]와 cellulase [J]는 Mg⁺⁺보다 Zn⁺⁺에 의해 활성이 더 촉진되었으나 cellulase[A]는 Mg⁺⁺에 의해 활성이 더 강하게 나타나고 있어 이것은 각 효소들의 구조상의 차이에서 유발된 것이 아닌가 생각된다. 이 결과는 *A.niger*(Ikeda et. al, 1973)에서 5mM의 Zn⁺⁺과 Mg⁺⁺가 cellulase의 활성을 억제시킨다고 한 보고와 *Trichoderma koningi* (Iwasaki et. al, 1965)에서 1mM의 Mg⁺⁺가 활성을 억제시킨다고 한 보고와 상반되고 있다.

한편 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺는 공히 각 효소의 활성을 억제시켰고 Mn⁺⁺이 Cu⁺⁺보다 더 강한 저해작용을 나타내었으며 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺이 공히 cellulase[K] < cellulase [J]의 순으로 영향을 미쳤다. 한편 Cellulase[J]는 약 0.5mM 이하의 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺에서는 cellulase[A] 보다 더 많은 저해작용을 받았으나 그 이상에서는 cellulase[A]가 더 저해되고 있다. 이들의 결과는 *T.viride* (Okada, 1975)와 *T. koningi*(Iwasaki et. al, 1965)의 보고와는 일치하나 Clarke와 Stone(1965)이 *A.niger*에서 1.0mM의 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺가 영향을 미치지 않는다고 한 것과 Ikeda등(1973)이 *A. niger*에서 5mM의 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺에 의해 각기 86%와 70%의 잔여활성을 나타낸다고 한 보고와는 상반되고 있다.

한편 cellulase[K]에 대한 Cu⁺⁺와 Mn⁺⁺의 저해상수는 각기 6.1mM과 0.7mM이었고 cellulase[J]에 대한 저해상수는 각기 2.6mM과 0.32mM이었으며 cellulase[A]는 2mM과 0.2mM이었는데, 이 결과도 위의 금속이온의 영향과 일치되어 cellulase [K]에 대한 영향이 가장적이고 cellulase[A]가 가장 쉽게 저해되고 있음을 보여주며 이들 각 금속이온은 효소에 대해 모두 경쟁적 저해작용을 하고 있어 다량의 기질을 첨가하면 저해작용을 완화 또는 제거할 수 있음을 알 수 있다.

Na-CMC를 기질로 했을때 효소들의 Km 값과 V 값은 cellulase[K]가 2×10^{-4} mM과 3.43 mmoles/hour, cellulase[J]가 2.5×10^{-4} mM과 3.77mmoles/hour, cellulase[A]가 4.0×10^{-4} mM과 4.00 mmoles/hour로 cellulase[K]의 기질에 대한 친화력이 가장 강하고 cellulase[A]가 가장 약함을 알 수 있는 바 이는 앞에서의 각 효소의 활성과 비교할 때 그 결과가 일치되어 기질에 대한 친화력이 클수록 효소의 활성이 더 강하게 나타남을 알 수 있다.

摘 要

시판되고 있는 cellulase[K](한국 동아제약, *Penicillium notatum*에서 추출), cellulase[J](일본天野제약, *Trichoderma viride*에서 추출) 및 cellulase[A](미국 SIGMA, *Aspergillus niger*에서 추출)로서 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 효소의 활성은 cellulase[K]가 가장 크고 cellulase[A]가 가장 작았으며, cellulase[K]는 다른 효소의 약 2배의 활성을 나타냈다.

2. 효소의 순도는 cellulase[K]가 가장 높았고 cellulase[J]가 가장 낮았다.

3. 효소의 활성을 촉진시키는 Zn^{++} 와 Mg^{++} 의 최적농도는 cellulase[K]의 경우 각각 2mM과 7mM, cellulase[J]는 모두 3mM, cellulase[A]는 각각 5mM과 6mM이었고, cellulase[K]와 cellulase[J]는 Zn^{++} 에 의해, cellulase[A]는 Mg^{++} 에 의해 더 강하게 촉진되었다.

4. Cu^{++} 와 Mn^{++} 는 각 효소의 활성을 억제시켰는 바, cellulase[K]가 가장 영향을 적게 받고 cellulase[A]가 가장 영향을 많이 받았으며, Mn^{++} 의 효과가 Cu^{++} 보다 더 강했다.

5. cellulase[K]에 대한 Cu^{++} 와 Mn^{++} 의 K_i 값은 각각 6.1mM과 0.7mM이었고, cellulase[J]에 대해서는 2.6mM과 0.32mM, cellulase[A]에 대한 값은 2.0mM과 0.2mM이었으며, Cu^{++} 와 Mn^{++} 이 각 효소에 대해 모두 경쟁적 저해작용을 하였다.

6. Na-CMC를 기질로 했을때 cellulase[K]에 대한 K_m 과 V 값은 각각 2.0×10^{-4} mM과 3.43 mmoles/hour이었고, cellulase[J]에 대한 값은 각각 2.5×10^{-4} mM과 3.77mmoles/hour이었으며, cellulase[A]에 대한 값은 4.0×10^{-4} mM과 4.00mmoles/hour였다.

謝 辭

본 연구를 수행하는데 있어 많은 실험재료를 제공해주신 동아제약 주식회사에 감사드립니다.

引 用 文 獻

1. Chetkarov, M., and D. Kolev, 1969. Viscometric determination of the Michaelis-Menten constant of β -1,4-glucanohydrolase(E.C.3.2.1.4)[Cx-Cellulase Enzyme]. *Monatsh. Chem.* 100(3), 986.
2. Clarke, A.E., and B.A. Stone, 1965. Properties of a β -(1-4)-Glucan Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Biochem.J.* 96, 802.
3. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulase from *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* 31(10), 1201.
4. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M. Funatsu, 1973. Chemical and enzymatic properties of acid-cellulase produced by *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* 37(5), 1169.
5. Iwasaki, T., R. Ikeda, K. Hayashi, and M. Funatsu 1965. Biochemical studies on cellulase. II. Properties of two types of cellulase from *Trichoderma koningi*. *J. Biochem.* 57 (4), 478.
6. Nelson, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375.
7. Okada, G., 1975. Enzymic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* 77, 33.
8. Okada, G., K. Nisizawa, and H. Suzuki, 1968. Cellulase components from *Trichoderma viride*. *J. Biochem.* 63(5), 591.
9. Selby, K., and C.C. Maitland, 1967. The cellulase of *Trichoderma viride*. -separation of the components involved in the solubilization of cotton-. *Biochem. J.* 104, 716.
10. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195, 19.
11. Wood, T.M., 1968. Cellulolytic enzyme

- system of *Trichoderma Koningii*.-separation of components attacking native cotton-. *Biochem. J.* **109**, 217.
12. Wood, T.M., 1969. The cellulase of *Fusarium solani*-resolution of the enzyme complex-. *Biochem. J.* **115**, 457.
13. Wood, T.M., 1971. The cellulase of *Fusarium solani*-purification and specificity of the β -(1 \rightarrow 4)-glucanase and the β -D-glucosidase components-. *Biochem. J.* **121**, 353.
14. Wood, T.M., and S.I. McCare, 1972. The purification and properties of the C₁ component of *Trichoderma Koningii* cellulase. *Biochem. J.* **128**, 1183.