

*Aspergillus niger*가 生産하는 纖維素 分解酵素의 精製 및 特性

朴官和 · 吳太廣 · 申載斗*
서울대학교 食品工學科 · *農化學科
(1981년 9월 15일 수리)

Purification and Characterization of Cellulolytic Enzymes from *Aspergillus niger*.

Kwan-Hwa Park, Tae-Kwang Oh and Jae-Doo Shin*

Department of Food Science and Technology, *Dept. of Agricultural Chemistry,
Seoul National University, Suwon, Korea

ABSTRACT

Three fractions of carboxymethyl-cellulase (F-I, F-II, and F-III) and β -glucosidase from *Aspergillus niger* were partially purified by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-150 and DEAE-Sephadex column chromatography. The optimum conditions such as pH and temperature and thermal inactivation properties of the enzymes were investigated. Arrhenius plots of F-II and F-III appeared as straight lines, whereas that of F-I was biphasic. The Z-values of F-II and F-III were 8°C and 10°C respectively, while that of F-I was 4°C over 60~70°C and 383°C over 70~98°C. Three fractions and the crude extract of carboxymethyl-cellulase exhibited a similar optimum pH of 4.3 and temperature of 60°C, while Z-value of crude extract (21.5°C) was much higher than that of the purified enzyme. Maximum activity of both purified and crude extract of β -glucosidase was shown at pH 4.7 and 60°C, and z-value of the enzyme was 7°C.

結 論

纖維素 分解酵素는 果汁의 澄清化, 澱粉製造, 大豆蛋白質의 分解溶出, 單細胞蛋白質의 消化率 向上, 寒天製造, 農産廢棄物의 利用, 消化劑등에 利用^{1,2)}되며 최근에는 食糧資源과 代替에너지란 次元에서 활발히 研究되고 있다. 纖維素 分解方法으로는 酵素³⁻²⁰⁾나 산, 알칼리^{21,22)}를 使用하는 方法이 있으며 산알칼리 使用시는 실제 應用時 難點이 있어서 최근 酵素에 대한 研究가 활발히 이

루어져 왔다. 酵素에 대한 研究는 酵素源으로서 *Cytophaga* 屬, *Clostridium* 屬, *Cellulomonas* 屬, *Actinomyces* 屬 등의 細菌類와 *Irpex* 屬, *Myrothesium* 屬, *Penicillium* 屬, *Chrysosporium* 屬, *Fusarium* 屬, *Aspergillus* 屬, *Trichoderma* 屬 등의 곰팡이가 主이며 이외에도 Avocado, 토마토 등의 植物體나 달팽이에 存在하는 纖維素分解酵素가 보고되었다. 纖維素分解酵素는 纖維素自體의 重合度, 多孔性, 물에 의한 膨脹程度, 結晶性, 分子配列狀態, 非均一性 등의 差異에 따라 各各 作用이 다른 酵素와 아이소자임(Isozymes)이 存在하는

* 이 논문은 1980년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

複合酵素狀態로 存在한다고 알려져 있다. Selby,^{4,5)} Wood,⁶⁻¹⁰⁾ Churilova,¹¹⁾ Tiunova,¹⁴⁾ Tanaka,¹⁵⁾ Kamamoto,¹⁷⁾ 鄭²⁰⁾ 등은 複合酵素를 各기 分離했으며 各기 作用이 다른 酵素의 機作을 Reese²⁴⁾는 C₁-C_x 概念으로 說明했고 그의 여러가지 機作^{5,6,9,10,15)}이 제안되었다.

代替에너지로서 에탄올 生産시 증류의 필요성, 메탄 생산시 高溫醱酵 및 農産加工에서 熱處理과정의 중요성에 비하여 各기 作用이 다른 酵素에 대한 熱力學的인 데이터는 현재까지의 실험에서는 不足한 實情이다. 本實驗에서는 *Aspergillus niger sherumanni IAM 2059*를 培養해서 얻은 纖維素 分解酵素를 Sephadex G-150, DEAE-Sephadex A-50을 利用해서 部分精製한 後 各酵素의 熱抵抗性과 特性을 조사하고 粗酵素와 比較檢討하였으며 그 熱力學的인 資料를 收集하였다.

材料 및 方法

가. 材料

使用菌株로는 서울大學校 農科大學 食品工學科에 보관중인 *Aspergillus niger sherumanni IAM 2059* (이하 *A. niger*로 表示)를 사용하였다. 試藥으로는 Sigma 사의 salicin, WAKO 사의 sodium carboxy methyl cellulose (이하 C.M.C.로 表示)를 사용하였다.

나. 實驗方法

- 1) 菌培養 : Toyama의 方法²⁶⁾에 의해서 밀기울을 培地로 하여 배양하였다.
- 2) 酵素의 精製 : 전체적 정제과정은 Fig. 1로 도시하였다.

(1) 抽出 및 유안((NH₄)₂SO₄) 鹽析

*A. niger*의 培養培地에 0.025M 檸檬酸 완충용액(citrate buffer, pH 4.8)을 10배 加하고 Waring blender로 磨碎한후 24시간 침출, 遠心分離한다. 遠心分離한 上澄液을 유안으로 20~80% 飽和시킨 沈澱物을 同一한 완충용액으로 녹이고 이를 Sephadex G-25 column을 통과시켜서 脫鹽한다.

(2) Sephadex G-150 column chromatography.

동일한 완충용액으로 Sephadex G-150 column (3×85cm)을 充分히 平衡시키고, 여기에 脫鹽한 용액을 加하고 流速 20ml/h로 10ml씩 分획하였다. 分획중 Carboxymethyl cellulase (이하 CM-cellulase로 表示)부분은 冷凍乾燥하여 농축시켰

다.

(3) DEAE-Sephadex A-50 column chromatography

同一한 citrate buffer로 DEAE-Sephadex column (2.5×20cm)를 充分히 平衡시킨후 농축된 CM-cellulase를 加하고, 먼저 bed volume의 5배 정도의 완충용액으로 흡착되지 않는 부분을 씻어낸다.

씻어낸 후, NaCl의 농도가 0.0 M에서 0.5M까지 직선적(linear gradient)으로 변화시켜서 흡착된 蛋白質을 溶출시켰다. 流速은 20ml/h로 하여 10ml씩 分劃하였다.

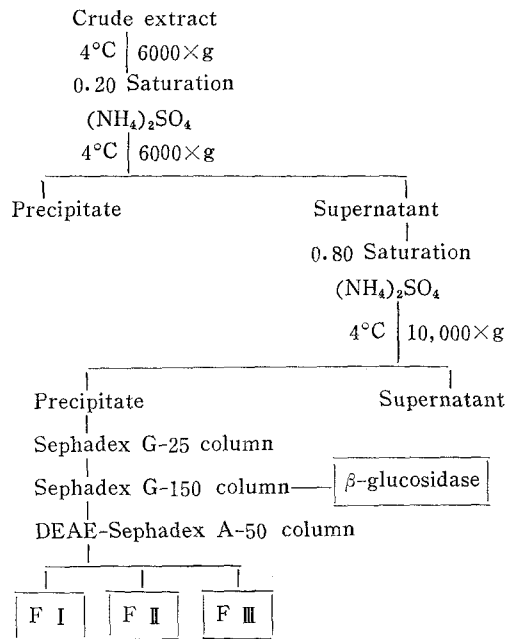


Fig. 1. Schematic diagram for purification

3) 基質의 調製

(1) 1% salicin 溶液

0.05M, pH 4.8 檸檬酸 완충용액 100ml에 salicin 1g을 녹인後 냉장고에 보관하고 使用하기 직전에 50°C로 하여 使用하였다.

(2) 1% CM-cellulose 溶液

80~90°C의 증류수 800ml에 10g C.M.C.를 添加하면서 棼棼히 攪拌한 後 100ml의 0.5M pH 4.8 檸檬酸 완충용액과 10ml의 merthiolate를 넣고 1로 맞춘후 냉장고에 보관하고 使用時 50°C로 加溫한 후 잘 혼들어 使用하였다.

4) 酵素力價測定 : 酵素의 力價測定 方法은 Mandels의 方法²⁷⁾을 使用하였으며 1% CM-cellulose

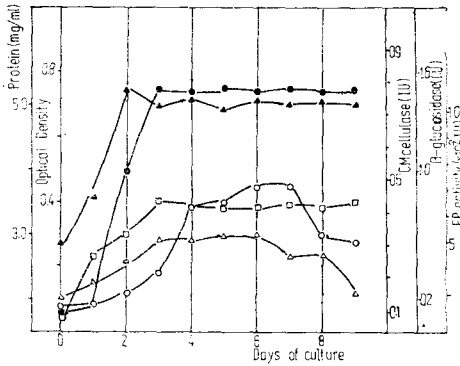


Fig. 2. Growth and cellulolytic enzyme production of *A. niger*: ○—○ turbidity (A 600): △—△ protein: ●—● β-glucosidase activity: ▲—▲ CM-cellulase activity: □—□ cellulase activity on filter paper

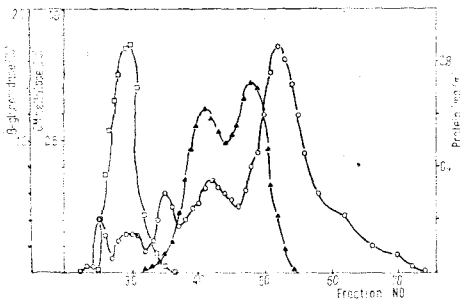


Fig. 3. Chromatogram of the ammonium sulfate precipitate from Sephaedx G-150 column (3×85cm): flow rate; 20ml/h, ○—○ protein: ▲—▲ CM-cellulase activity: □—□ β-glucosidase activity

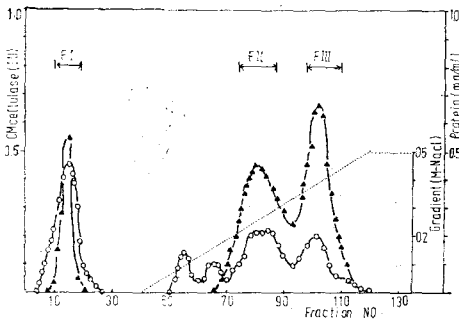


Fig. 4. Chromatogram of the CM-cellulase from DEAE-Sephadex column (2.5×20cm): flow rate; 20ml/h, ○—○ protein: ▲—▲ CM cellulase activity at pH 4.8

용액 0.5ml 와 1% salicin 용액 0.5ml 에 효소액 0.5ml 적 넣고 50°C 恒溫槽에서 20分間 反應시킨 後 生成된 還元糖을 定量하여 各各 CM-cellulase 力價와 β-glucosidase 力價로 하였다. 濾紙分解力은 Whatman No. 1 濾紙를 1×3cm 로 자른후 여기에 0.025M pH 4.8 씨트르산 완충용액 1ml 를 添加한 후 효소액 0.5ml 를 넣고 50°C에서 40分間 反應시킨 후 還元糖을 定量하였다. 各 효소의 力價 單位는 生成된 還元糖 μmol/min·ml 로 表示하였다.

5) 蛋白質 定量: 蛋白質 定量은 色素가 많은 粗 효소溶液은 Folin-Lowry 方法²⁸⁾으로 하고 標準蛋白質로는 bovine blood albumin 을 사용했다. Chromatography 후는 double beam spectrophotometer UV-200 (Schimazu)으로 280, 260nm 에서 吸光度를 測定하고 Kalcker²⁹⁾式에 의하여 계산하였다.

6) 還元糖 定量: 還元糖은 Miller³⁰⁾ 등의 glucose-DNS 方法으로 測定시로 1ml 에 D.N.S. 溶液 3ml 을 添加하고 끓는 물에 5分間 둔 후 10ml 증류수로 희석하여 550nm 에서 吸光度를 測定하여 미리 作成된 glucose 표준곡선에서 還元糖을 定量하였으며 저농도에서 정밀도를 증가시키기 위해서 시료당 0.05mg 의 glucose 를 加했고 이때 얻어진 還元糖量을 Somogyi-Nelson³¹⁾ 方法으로 比較하였다.

7) 효소溶液의 熱不活性化: 효소溶液의 熱處理는 마개가 달린 시험관에 9ml 의 씨트르산 완충용액을 미리 넣고 격렬히 攪拌하면서 重湯槽에서 熱處理하고자 하는 溫度로 만든 후 1ml 의 효소용액을 가하고 일정시간 가열한 후 피펫으로 0.5ml 적취하여 얼음으로 冷却된 시험관에 옮겼다.

結果 및 考察

1) 最適培養日數: 最適培養 日數를 決定하기 위해서 날짜別로 培養한 結果 Fig. 2 에서 보는 바와 같이 混濁度는 전형적인 生育曲線을 나타냈고 蛋白質의 生成, 濾紙分解力, β-glucosidase 및 CM-cellulase 의 力價는 모두 3~4日에 最大値를 나타냈다.

2) 효소의 精製: 20~80% (NH₄)₂ SO₄ 飽和溶液으로 分割한 粗 효소를 Sephadex G-150 column chromatography 로 分別한 結果는 Fig. 3 에서 보는 바와 같다.

分割區 26~32 사이에 β-glucosidase 가 분리되

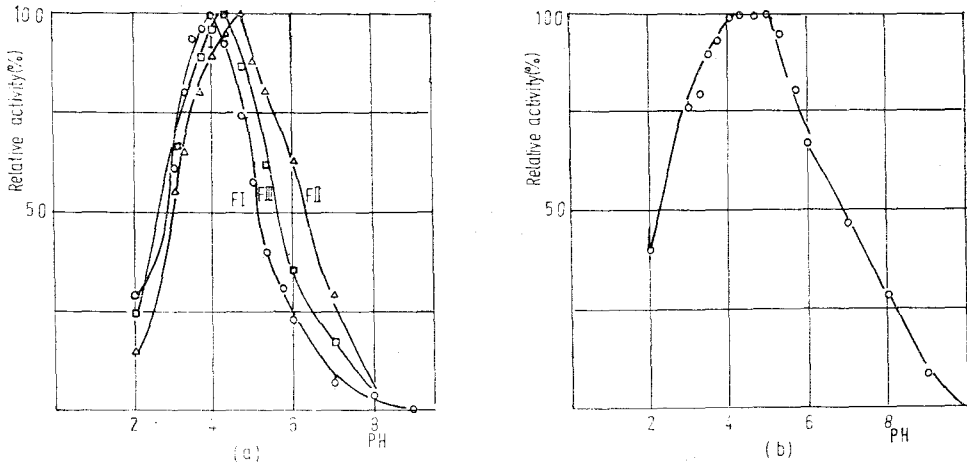


Fig. 5. pH-activity curves of F I, F II, F III (a) and crude cellulase (b) for CMC saccharifying at 50°C: (a) ○—○ F I; △—△ F II; □—□ F III

고 CM-cellulase는 分割區 38~52 사이에서 2개의 peak를 보였다. 이는 *Afoetidus*,¹¹⁾ *Fusarium* 屬⁸⁾, *Geotrichum* 屬¹⁴⁾에서 抽出한 酵素의 chromatography 모양과는 類似한 點을 보이고 있으나 *Trichoderma* 屬⁹⁾과는 樣相이 다른 것으로 나타났다. 또한 β -glucosidase의 力價가 CM-cellulase의 力價¹⁶⁾보다 훨씬 높았다. 分割區 38~52을 冷凍乾燥한 後 DEAE-Sephadex column chromatography 한 結果는 Fig. 4와 같다. 吸着되지 않은 部分과 NaCl 0.2~0.28M 및 0.33~0.40M에서 溶出되는 3개의 分割區로 分離했으며 이들을 各各 F I, F II, F III로 命名하였는데 CM-cellulase의 아이소자임(Isozyme)으로 생각된다. 이들 粗 CM-cellulase의 F I, F II, F III의 力價比率는 0.27,

0.32, 0.41로 나타났다.

3) 最適 pH 및 最適 溫度: 각 CM-cellulase fraction에 대한 最適 pH는 Fig. 5에서와 같다. F I은 4.0, F II는 4.7 F III는 4.3에서 各各 最適 pH를 나타냈고 粗酵素는 pH 4~5의 範圍에서 最適을 나타냈다. 各 fraction의 最適 pH는 서로 다르기는 하나 粗酵素가 나타내는 最適 pH 範圍內에 있는 것으로 보아 粗酵素의 最適 pH는 各 fraction에 基因한 것이라 볼 수 있다.

β -glucosidase의 경우는 Fig. 6에서와 같이 粗酵素와 精製酵素와 다같이 pH 4.7에서 最適 pH를 나타냈다.

各 fraction의 最適 溫度는 Fig. 7에서와 같이 CM-cellulase의 경우 F I와 F II는 50°C, F III와 粗酵素液은 60°C를 나타냈고, β -glucosidase의 경우에는 精製酵素와 粗酵素가 다같이 60°C에서 最適 溫度를 나타냈다.

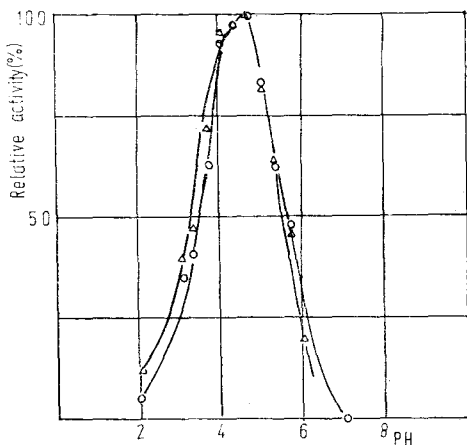


Fig. 6. pH-activity curve of β -glucosidase for salicin at 50°C: ○—○ purified enzyme; △—△ crude enzyme

4) 熱不活性化: DEAE Sephadex column에서 얻은 3개의 CM-cellulase fraction F I, F II, F III와 粗 CM-cellulase, 精製 β -glucosidase와 粗 β -glucosidase의 熱不活性化 實驗을 한 結果는 Fig. 8과 같다. F I의 熱不活性化 曲線은 初期에 급격히 力價가 떨어지나 200秒가 지난 後에는 長時間 加熱하여도 熱不活性化가 일어나지 않고 力價가 10~20% 정도 남아 있다. F II는 70°C 및 75°C에서 꺾여지는 點을 보이면서 一次反應을 따르지 않았고 F III는 加熱時間에 따라 力價가 대수적으로 減少함을 보여주고 있다. 粗 CM-cellulase는 各溫度에서 꺾여지는 點을 나타내고 있는데 이

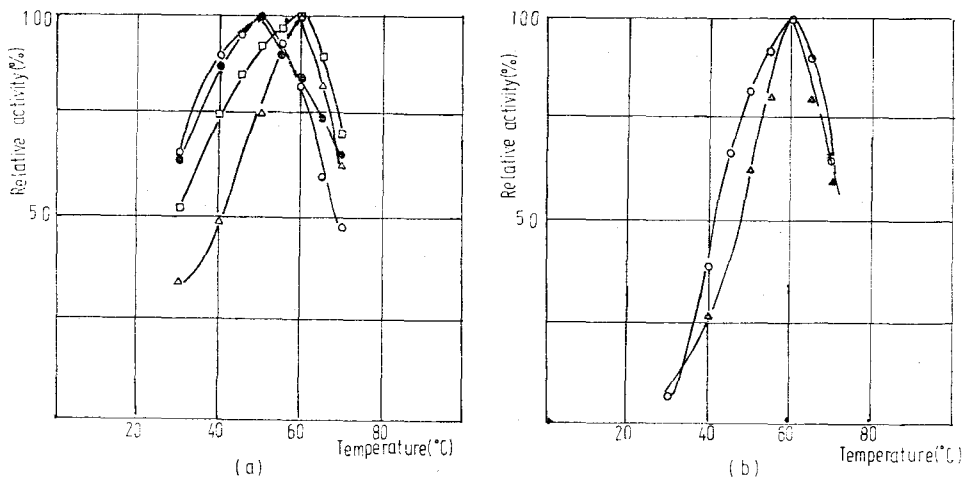
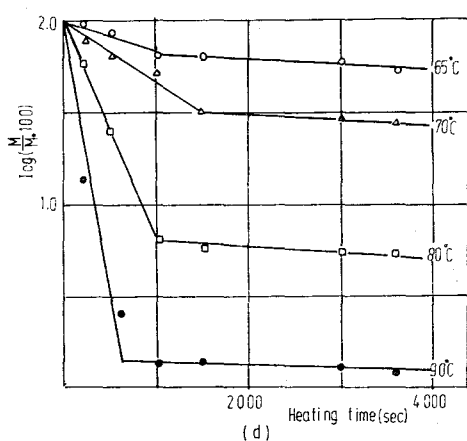
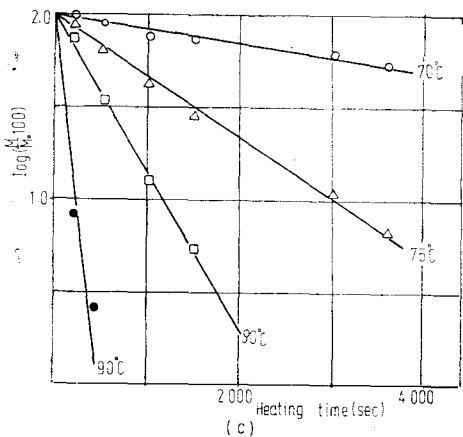
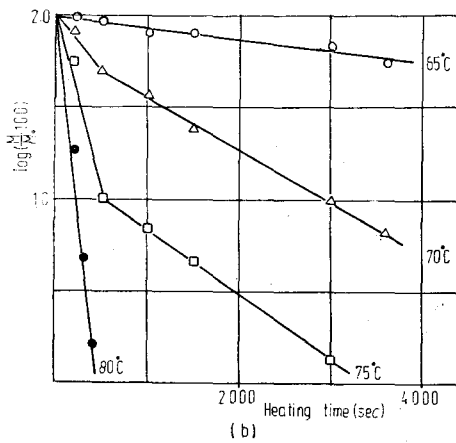
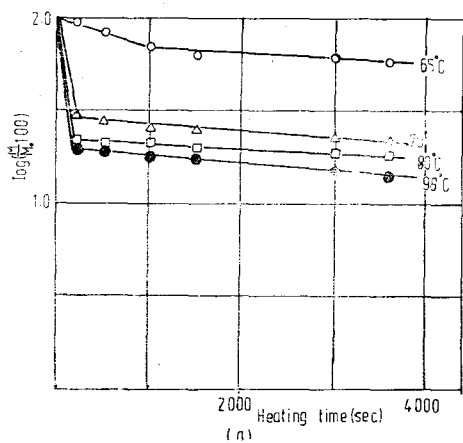


Fig. 7. Temperature dependence of cellulase for C.M.C. saccharifying activity (a) and β -glucosidase for salicin saccharifying activity (b) at pH 4.8: (a) O—O F I: ●—● F II: □—□ F III: △—△ crude enzyme (b) O—O purified enzyme: △—△ crude enzyme



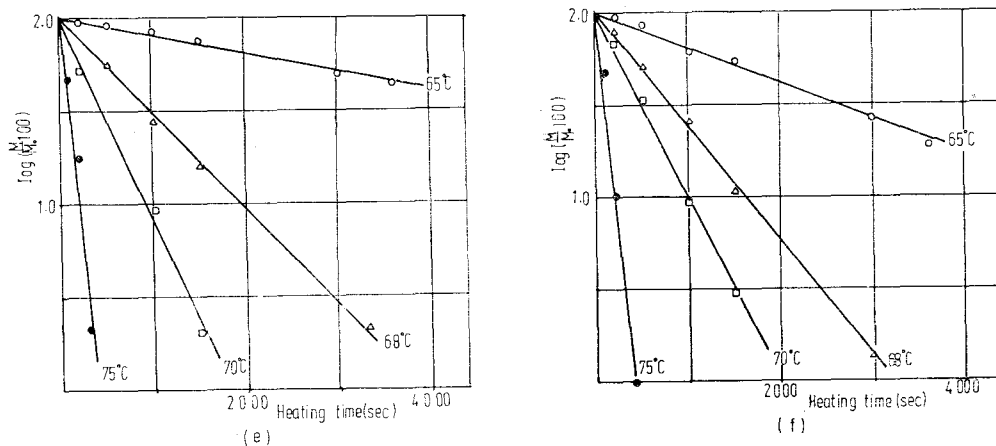


Fig. 8. Thermal inactivation of F I (a), F II (b), F III (c), crude cellulase (d), purified β -glucosidase (e) and crude β -glucosidase (f) as function of time and temperature: M_0 ; enzyme activity at $t=0$; M ; enzyme activity at $t=t$

Table 1. First order reaction rate constants and D-values for inactivation of CM cellulases and β -glucosidase

Heating Temp. (°C)	D-value (s)						Reaction rate constant k ($\text{sec}^{-1} \cdot 10^4$)					
	F I	F II	F III	crude CM cellulase	purified β -glucosidase	crude β -glucosidase	F I	F II	F III	crude CM cellulase	purified β -glucosidase	crude β -glucosidase
65	6250	10000		5263	5263	10526	3.68	2.303		4.38	438	2.19
68					161.3	1935					14.28	11.89
70	380	1667	12903	3000	1000	910	60.61	13.82	1.78	7.68	23.03	25.31
75	303	500	2985	1620	200	200	76.01	46.06	7.72	14.21	115.15	115.15
80	294	120	1176	960			78.33	191.91	19.58	23.98		
90	285		118	344			80.81		195.17	66.95		
98	266						86.38					
Z-value (°C)	4*											
	383	8	10	21.5	7.25	7						

* Temperature range: 60~70°C

Table 2. Thermodynamic quantities for inactivation of CM-cellulases and β -glucosidase at 70°C

Thermodynamic constants	F I	F II	F III	crude CM-cellulase	purified β -glucosidase	crude β -glucosidase
ΔH^\ddagger (kJ/mol)	578.9 3.2	267.9	233.5	106.4	292.8	356.0
ΔG^\ddagger (kJ/mol)	102.5	102.4	105.4	104.7	101.9	102.4
ΔS^\ddagger (J/mol°K)	1386.9* -289.6	482.7	373.3	4.9	556.7	739.2

* Temperature range: 60~70°C

는 熱安定性이 서로 다른 F I, F II 및 F III 등의 fraction 이 複合되어 나타난 것으로 생각된다.

Fig. 8에서 D-값을 구하여 Table 1에 기술하였고 이들을 溫度에 따라 그린 結果는 Fig. 9와 같다.

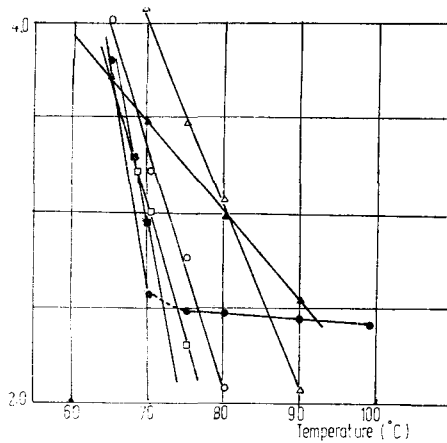


Fig. 9. Thermal destruction curves of CM-cellulase and β -glucosidase: ●—● F I: ○—○ F II: △—△ F III: ▲—▲ crude CM-cellulase: □—□ purified β -glucosidase: ■—■ crude β -glucosidase

Fig. 9에서 z-값을 구하고 이들을 Eyring 方法³⁵⁾에 의해서 熱力學的 상수를 算出하여 Table 2에 기술하였다.

D-값을 比較하면, 70°C에서 F I 383秒 F II 1667秒 F III 12903s秒 粗 CM-cellulase가 3000秒로 나타나서 F III가 熱에 대해서 가장 安定된 것으로 나타나지만 90°C에서는 F I 285秒, F III가 118秒로 오히려 F I이 더 安定된 것으로 보인다. 粗 CM-cellulase의 熱不活性化 曲線은 初期에 다소 급격한 傾斜를 보이다가 一定時間 後에는 완만한 速度로 熱不活性化 되고 있는 것을 알 수 있는 데 이는 약 30%의 力價를 차지하는 F I의 열특성에 基因한 듯하다. 이와같이 오랜 加熱時間 後에도 酵素의 力價가 殘存하게 되어 食品의 熱處理 공정 後에도 CM-cellulase의 殘存力價가 남게 될 可能性이 높음을 示唆하고 있다. 또한, F I의 Z 값은 75~98°C 사이에는 383°C로서 溫度의 變化에 鈍感한 반면 60~70°C에는 4°C로서 溫度變化에 敏感하게 나타났다.

β -glucosidase의 熱不活性化 曲線은 分離된 것과 粗酵素에서 다같이 一次反應을 따르며 熱不活性化 정도가 비슷한데, 이는 아이소자임이 없고 단한개의 β -glucosidase가 粗酵素에 存在하기 때문에 推측된다.

Table 2에서 活性化 自由에너지는 酵素와 溫度와 관계없이 $100 \pm 5 \text{ kJ/mol}$ 을 나타내는데 이것은 Multon과 Gilbot³³⁾의 結果나 노³⁴⁾ 등의 結果와

도 잘 一致한다. 이는 Eley와 Leslies의 이론³³⁾과 Eyring의 제시³⁵⁾와 같이 水素結合의 破壞가 蛋白質 熱變性에 주된 反應이란 理論과도 잘 一致한다.

要 約

*Aspergillus niger*가 분비하는 纖維素分解酵素를 Sephadex G-150 column을 통과시켜서 β -glucosidase와 CM-cellulase을 分離하고 CM-cellulase는 다시 DEAE-Sephadex A-50 column을 통과시켜서 세개의 CM-cellulase F I, F II, F III를 분리하여 그 特性을 자기 조사 하였다. F I의 最適條件은 pH 4.0 및 50°C였고 熱不活性化特性은 Arrhenius plot에서 2개의 기울기가 다른 직 선을 나타냈다. 즉 60~70°C 사이에서는 Z 값이 4°C이고 70~98°C 사이에서는 383°C였다. F II는 pH 4.7 및 50°C에서 最適條件을 보였고 Z 값은 8°C, F III는 pH 4.3 및 60°C에서 높은 活性을 가졌고 Z 값은 10°C였다. 粗 CM-cellulase의 경우 最適條件이 pH 4.3 및 60°C로 F I, F II 및 F III와 비슷한 경향을 보였으나 Z 값은 21.5°C로 큰 差異를 보였다. 한편 β -glucosidase는 精製酵素 및 粗酵素가 다 같이 pH 4.7 및 60°C에서 가장 높은 活性을 나타냈으며 Z 값은 7°C였다.

참 고 문 헌

1. 相澤孝亮, 小野正之, 手塚隆久, 柳田藤治: "酵素利用 핸드북" p. 243 地人書館(1981)
2. 毛利威德: 日本食品科學 23: 94 (1981)
3. 襄武, 金炳弘, 尹愛海: (한국) 산업미생물학회 지 1: 31 (1973)
4. Selby, K. and Maitland, C.C.: Biochem. J. 94: 578 (1965)
5. Selby, K. and Maitland, C.C.: Biochem. J. 104: 716 (1967)
6. Wood, T.M.: Biochem. J. 109: 217 (1968)
7. Wood, T.M.: Biochem. J. 115: 457 (1969)
8. Wood, T.M.: Biochem. J. 121: 353 (1971)
9. Wood, T.M.: and McCrae, S.I.: Biochem. J. 128: 1183 (1972)
10. Wood, T.M. and McCrae, S.I.: Biochem. J. 176: 61 (1978)
11. Churilova, I.V., and Klesov, A.A.: Biochemistry 45: 516 (1980)

12. Marinchenko, V.A., Nosik, S.V. and Tiunova, N.A.: Appl. Biochem. Microbiol. 15 : 670 (1979)
13. Sinitsyn, A.P., Agafonov, M.N., Khasanov, Kh. Kh., Rakhimov, M.M. and Klosov, A.A.: Appl. Biochem. Microbiol. 16 : 31 (1980)
14. Tiunova, N.A., Rodinova, N.A. and Martinovich, L.I.: Appl. Biochem. Microbiol. 16 : 30 (1980)
15. Tanaka, M., Takenawa, S., Matsuno, R. and Kamikubo, T.: J. Ferment. Technol. 55 : 137 (1977)
16. Herr, D., Luck, G. and Dellweg, H.: J. Ferment. Technol. 56 : 273 (1978)
17. Kanamoto, J., Sakamoto, R., Arai, M. and Murao, S.: J. Ferment. Technol. 57 : 163 (1979)
18. Murao, S., Kanamoto, J. and Arai, M.: J. Ferment. Technol. 57 : 151 (1979)
19. Ryu D.Y. and Mandels, M.: Enzym. Microb. Technol. 2 : 91 (1980)
20. 鄭東孝 : 한국농화학회지 14 : 59 (1971)
21. 成洛葵 : 한국농화학회지 12 : 25 (1966)
22. Tanaka, M., Morita, T., Taniguchi, M., Matsuno, R. and Kamikubo, T.: J. Ferment. Technol. 58 : 517 (1980)
23. Awad, M. and Lewis, L.N.: J. Food Sci. 45 : 1625 (1980)
24. Reese, E.T., Stu, R.G.H. and Levinson, H.S.: J. Bacteriol. 59 : 485 (1950)
25. Pettersson, L.G.: SITRA. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose, Helsinki, p.255 (1975)
26. Toyama, N. and Ogawa, K.: SITRA. Symposium on enzymatic hydrolysis of cellulose, Aulanko Finland, p.375 (1975)
27. Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C.: Biotech. Bioeng. Sym. 6 p.17 (1976)
28. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.L. and Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193 : 263 (1951)
29. Kalcker, H.M.: J. Biol. Chem. 167 : 461 (1947)
30. Miller, G.L.: Analytical Chem. 13 : 426 (1959)
31. Somogyi, M.: J. Biol. Chem. 195 : 19 (1952)
32. Joffe, F.M. and Ball, C.O.: J. Food Sci., 27 : 587 (1962)
33. Duckworth, R.B.Ed.: "Water Relations of Food," p.379, Academic Press, N.Y.(1975)
34. 盧奉洙, 朴官和 : 한국식품과학회지 12 : 209 (1980)
35. Eyring. H. and Stearn. A.E.: Chem. Rev. 24 : 253 (1939)