

Aspergillus phoenicis K.U. 175 이 생성하는 셀룰라아제의 분리, 精製 및 酵素學的 性質

金 鳳 秀 · 李 永 祿

(高麗大學校 生物學科)

Isolation, Purification and enzymatic characterization of the Cellulase produced by *Aspergillus Phoenicis*

KIM, Bong Soo and Young Nok LEE

(Dept. of Biol., Korea University)

Abstract

Avicelase, CMCase and salicinase of *A. phoenicis* K.U. 175 were purified from wheat bran culture by salting out with ammonium sulfate, dialysis and successive column chromatography Sephadex G-100.

Optimum pH and temperature of avicelase were pH 3.8-4.8, 35-55°C and that of CMCase, salicinase were pH 4.5-5.5, 45-60°C and pH 4.5-6.0, 45-60°C respectively.

These enzymes were relatively thermostable, alkali unstable and inhibited by Ca⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, and Hg⁺⁺.

Km values of avicelase, CMCase and salicinase were calculated to be 1.5×10⁻⁴M, 5.5×10⁻⁴M and 2.75×10⁻⁵M and Vmax values 1.66×10⁻⁴mM/min, 3.38×10⁻⁴ mM/min and 1.14×10⁻⁴mM/min, respectively.

緒 論

셀룰라아제는 여러가지 微生物로 부터 複合的
섬유질 加水分解酵素로서 추출되고 있다.

糸狀菌과 細菌에서 生成된 셀룰라아제 종류는
學者에 따라 여러가지 주장이 있는데 Whitaker
등 (1953)은 *M. verrucaria*에서 단일효소론을
주장하였고, Reess 등 (1950), Wakabayash 등
(1966)은 *M. verrucaria*, *Irpex lacteus*에서 C₁,
Cx 두 종류를 각각 주장하였고, Stutzenberger
(1972), Okada (1975)는 *Thermomonospora*

curvata, *Tri. viride*에서 각각 두가지 셀룰라아
제를 分離하였다.

Wood et al (1972), Wood (1968)는 *Tri.*
*koningii*에서 세가지 酵素를 주장하였는데 이들
은 C₁, Cx, β-glucosidase로 불리우며 이들 세
효소는 각각 독립해서 섬유질을 分解 할 수는
없고 서로 협동적인 상태에서 섬유질을 分解 할
수 있다고 주장하고 이들을 각각 分離하였다.

또한 Yamane et al. (1970)는 *Pseudomonas*
fluorescens var. *cellulosa*에서 두가지 extracel-
lular cellulase와 하나의 cell-bound cellulase
를 각각 分離하였고, Shikata et al. (1975)는

*Tri. viride*에서 세가지 exo-cellulase을 分離하였으며, Yoshikawa *et al* (1974)는 *Pseudomonas var. cellulosa*에서 다섯가지의 셀룰라아제 종류를 調査하였다.

Matsumura (1963), Wakabayashi (1966)는 *Asp.saitoi*와 *Irpox lacteus*에서 最適 pH 및 온도 그리고 열안정성을 調査하였으며, Shikata (1975), Okada (1975),는 *Tri. viride*에서 最適 pH 및 온도를 각각 調査하였다.

本 研究에서는 *Asp. phoenicis*가 生成하는 셀룰라아제를 Avicelase (C₁), CMCase (Cx) 및 Salicinase (β -glucosidase)로 分離하고 이들을 精製하였다. 이들 세효소의 最適 pH, 온도 및 安定성을 각각 調査하였으며 동시에 이들 각 酵素의 활성에 미치는 금속이온의 영향과 반응속도를 調査해 보았다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

本 研究室에서 分離한 섬유질 加水分解活性이 비교적 높은 菌株로 *Asp. phoenicis* K.U. 175을 使用하였다.

2. 酵素의 分離

Asp. phoenicis K.U. 175을 wheat bran 액체 배지에서 30°C로 3日間 培養하였다. 배양액을 원심분리(8,000 rpm, 20分間)하여 침전물을 제거하고 그 상등액에 30% (NH₄)₂ SO₄ 용액을 가하여 4°C에서 24hr 방치한 後 원심분리로 침전물을 제거하였다. 상등액에 다시 80% (NH₄)₂ SO₄를 가하여 4°C에서 24 hr을 방치한 後 生成된 침전물을 원심분리로 分離하고, 이를 소량의 0.02M acetate buffer (pH 5.0)에 녹여 같은 buffer 속에서 여러차례 buffer를 갈아주면서 48 hr 동안 투석하였다.

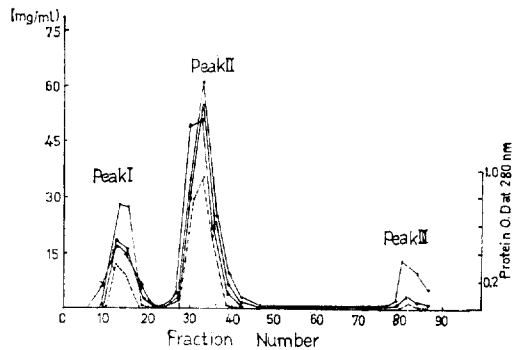
3. 酵素의 精製

Ammonium sulfate에 의한 염석과 이에 이은 투석으로 分離한 酵素粗製品은 column chromatography로 0.02M acetate buffer (pH 5.0)로 충전시킨 DEAE-Sephadex A-50 column (3×60cm)에 酵素粗製品을 加하여 점차로 그 농도를 높이면서 (0.2M-0.6M) NaCl을 첨

가한 acetate buffer로 용출시켰다. 각각의 용출액은 fraction tube 당 5ml로 하였고, 1時間 당 60ml의 속도로 계속 溶出시켰다. Cellulase 活性이 높은 분획들을 모아서 ammonium sulfate로 재침전시킨 後, 투석으로 염류를 제거하고, 원심분리하여 얻은 침전물을 소량의 acetate buffer에 녹여서 Sephadex G-100 column chromatography로 더욱 순화시켜, 活性이 높은 분획의 酵素溶液을 써서 酵素의 여러가지 特性을 調査하였다.

4. 酵素活性의 測定

Avicelase의 活性은 Somogi-Nelson 法에 의거하여 測定하였다. 기질용액으로는 0.2% avicel을 使用하여 이 용액 1ml에 0.4 M acetate buffer (pH 5.0) 0.5ml와 효소액 0.5ml를 넣고 50°C에서 1시간 反應시킨 다음 Somogi (1952)의 low alkalinity copper 시약 2ml를 加하고 30分間 가열한 後 완전히 냉각시켜 Nelson (1944)의 arsenomolybdate 시약 1ml를 加하여 20分間 실온에서 방치한 다음 20ml의 증류수를 加하여 500nm의 파장에서 吸光度를 測定하였다. avicelase의 活性度는 효소액 1ml이 1시간에 avicel로부터 生成한 포도당의 量으로 표시하였다. Carboxymethyl Cellulase 및 Salicinase 活性度도 같은 方法으로 測定하였다. 단 기질용액은 CMC 또는 Salicin으로 하였고 反應時間은 50°C에서 30分間 反應시켰다.



●; Avicelase, ○; CMCase, △; Salicinase

Fig. 1. Column chromatography on DEAE-Sephadex A-50. The column was eluted with 0.02M acetate buffer (pH 5.0) with increasing concentration of NaCl.

Table 1. Purification and specific activity of avicelase, carboxymethyl cellulase and salicinase from *A. phoenicis*

Enzyme Preparation	Total Volume (ml)	Total Protein (mg)	Avicelase		CMCase		Salicinase	
			unit	Specific activity	Unit	Specific activity	Unit	Specific activity
Crude enzyme	470	220.9	9402	42.6	24360	110.3	18800	85.1
Dialysis	30	41.0	5895	143.8	14616	356.5	12000	292.7
DEAE-Sephadex A-50								
Peak I	40	5.4	799.5	148.1	2069.3	383.2	1598.7	296.0
Peak II	60	7.2	4395.3	610.4	2892.0	401.6	2404.4	333.9
Peak III	35	3.5	7012.0	200.3				
Sephadex G-100								
Peak II-1	50	1.5					1066.6	711.1
Peak II-1	35	1.1			1009.0	917.3		
Peak II-3	110	2.8	1099.7	392.8				

5. 蛋白質의 定量

단백질의 定量은 bovine plasma albumin 을 기질로 使用한 표준곡선을 기준으로 하여 Lowry *et al* (1950)의 方法에 따라 Folin phenol reagent 로 썬서 500nm 에서 吸光度로 測定하였다. 그러나 chromatography 의 경우에 있어서는 column 을 통해 溶出되어 나온 蛋白質의 量을 280nm 에서 吸光度로 測定하였다.

結果 및 考察

1. 酵素의 精製

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, ammonium sulfate 에 의한 염석과 투

석을 통해 얻어진 30ml 의 酵素용액을 0.02M acetate buffer (pH 5.0)로 충전시킨 DEAE-

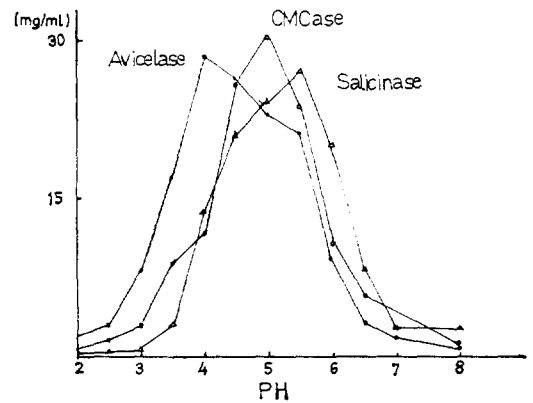


Fig. 3. Effect of pH on the cellulase activity

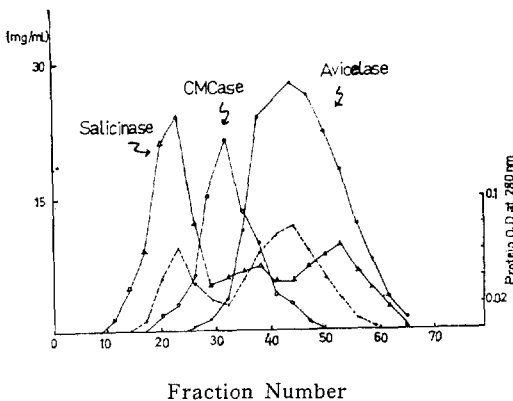


Fig. 2. Sephadex G-100 column chromatography of cellulase

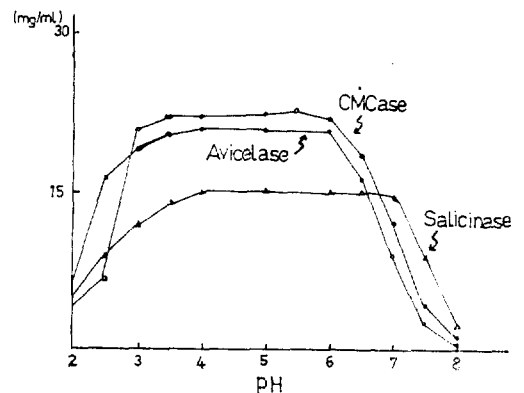


Fig. 4. Stability of pH on the cellulase activity

Sephadex A-50 column (3×60cm)에 加하고 column 에 흡수된 酵素를 0.2M~0.6M의 NaCl 을 포함한 acetate buffer (pH 5.0)로 계속 溶出시켜 Fig. 1 과 같은 結果를 얻었다. avicelase 活性을 나타내는 3개의 peak 를 얻었는데 peak II의 活性이 가장 높았고 蛋白質의 量도 세 peak 중 가장 많았다. 그러나 이 分획에서는 비교적 높은 Salicinase 및 CMCCase 活性도 나타났으므로 이 分획을 모아 Sephadex G-100 column chromatography로 avicelase, CMCCase 및 salicinase를 각각 分離하였다(Fig. 2). 이러한 조작으로 *Asp. phoenicis*가 生成하는 세가지 종류의 avicelase를 分離하였는데, 그 중 Sephadex G-100을 통한 2차 chromatography로 비교적

순화된 각각 1 종류의 avicelase, CMCCase, 및 salicinase (Table 1)의 分획을 모아 酵素의 여러가지 性質을 調査하였다.

2. 酵素의 活性 및 安定度에 미치는 pH의 影響

세 酵素의 活性 및 安定度에 미치는 pH의 影響을 Fig. 3, Fig. 4에 각각 表示하였다. 이들 세 酵素의 pH 安定度는 대체로 산성 및 중성 영역에서 安定性을 나타내었는데, avicelase는 pH 2.5-6.6, CMCCase는 pH 3.0-6.5 그리고 Salicinase는 pH 3.0-7.0에서 安定性을 보였고, 最適 pH는 avicelase가 pH 3.8-4.8, CMCCase 및 salicinase가 각각 pH 4.5-5.5 및 pH 4.5-6.0을 나타내었다. CMCCase의 경우 最適 pH는 Wood (1968)가 *Tri. koningii*에서 얻은 結果와 똑 같았으며, pH 安定度는 모두 Matsumura *et al.* (1963)이 *Asp. saioi*에서 얻은 結果와 거의 비슷하였다.

3. 酵素의 活性 및 安定度에 미치는 溫度의 影響

Fig. 5 및 Fig. 6에서 보는 바와 같이 avicelase 活性에 미치는 最適 溫度는 35-55°C 인데 비해 CMCCase 및 salicinase의 最適 溫度는 45-60°C 이었고 열에 대한 安定度는 salicinase는 70°C에서의 1시간처리에도 活性에 변화가 없었으나 avicelase나 CMCCase는 60°C 이상에서는 그 活性이 급격히 저하하였다. 열안정성에

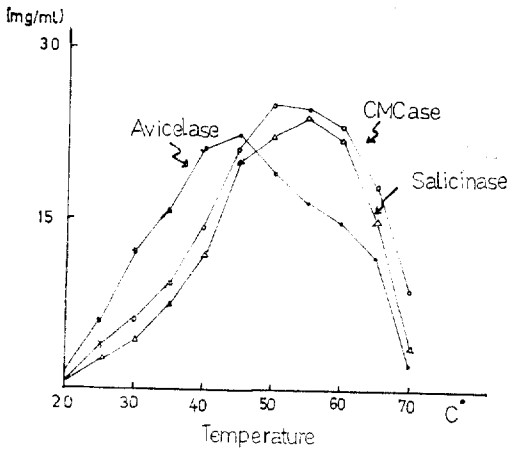


Fig. 5. Effect of temperature on the cellulase activity

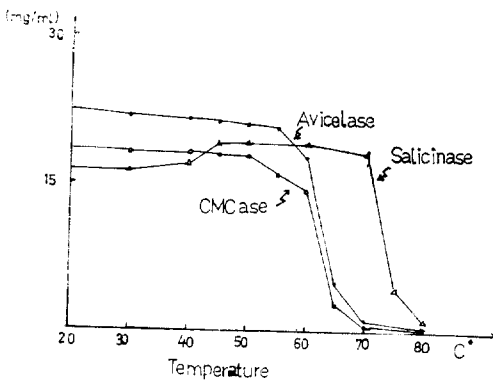


Fig. 6. Thermal stability of cellulase activity

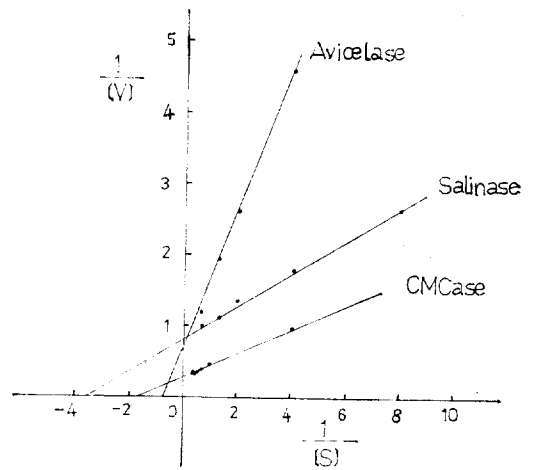


Fig. 7. Lineweaver and Burk plot of avicelase, carboxymethyl cellulase and salicinase

Table 2. Effect of metal ion on the activity of cellulase from *A. phoenicis*

Treatment ($2 \times 10^{-3}M$)	Relative Activities(%)		
	Avicelase	CMCase	Salicinase
none	100	100	100
ZnSO ₄	75.6	52.9	52.4
CuSO ₄	81.4	45.2	38.1
MnSO ₄	91.9	79.3	33.3
CaCl ₂	70.5	62.5	47.6
MgCl ₂	102.3	79.3	85.7
FeSO ₄	111.6	117.8	57.1
CoCl ₂	114.0	62.5	90.5
Ba(NO ₃) ₂	105.8	88.9	52.4
HgCl ₂	82.6	39.4	42.9

대해서는 Okada (1975)가 *Tri. viride*에서 실험한 결과 II-A와 II-B가 avicelase, CMCase와 거의 일치하였으나 最適 溫度는 여러사람의 實驗 結果(Yamane, Matsumura, okada 등) 보다 약 5°C 씩 차이가 나타났다.

4. 酵素의 最大反應速度 및 Km 值

이들 세 酵素의 기질농도에 따른 反應速度의 변화를 Lineweaver-Burk plot 하여 Fig.7에 표시하였다. Avicelase, CMCase 및 salicinase의 Km 값은 각각 $1.5 \times 10^{-4}M$, $5.5 \times 10^{-4}M$ 및 $2.75 \times 10^{-5}M$ 이었고 Vmax 값은 각각 $1.66 \times 10^{-4} mM/min$, $3.33 \times 10^{-4} mM/min$ 및 $1.14 \times 10^{-4} mM/min$ 로 算出되었다. 이는 기질에 대한 酵素의 親和力의 尺度가 되는 Km 값이 avicelase가 다른 두 酵素에 비해 월등히 크다는 것을 나타내고 있다. 그러나 Vmax의 값은 salicinase보다 약간 떨어졌었다.

5. 酵素活性에 미치는 금속이온의 影響 및 저해효과

이들 세 셀룰라아제에 대한 여러가지 금속이온의 影響을 Table 2에 表示하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 $2 \times 10^{-3}M$ 의 CaCl₂ 용액은 avicelase의 活性을 현저히 저하시켰고, MnSO₄ 및 CuSO₄는 salicinase 活性을 크게 저하시켰으나, HgCl₂는 CMCase에서 보다 강한 억제 效果를 나타내었다. 이는 Hong, S.W와 Rhee, Y.H (1976)가 *Tri. koningii*에서 행한 실험과 거의 비슷하였다. Fig. 8, 및 Fig. 9에서 보는 바와

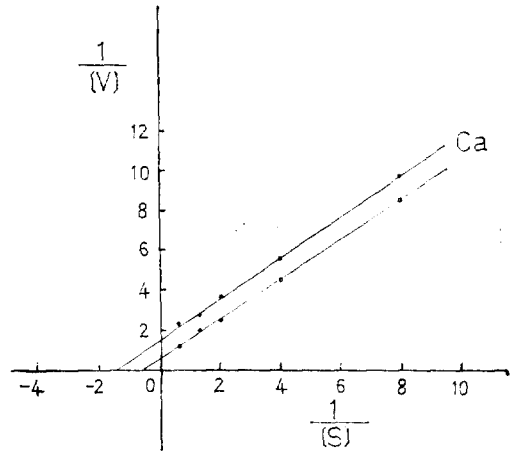


Fig.8. Plot for the inhibition constant of Ca⁺⁺ ion on the activity of avicelase

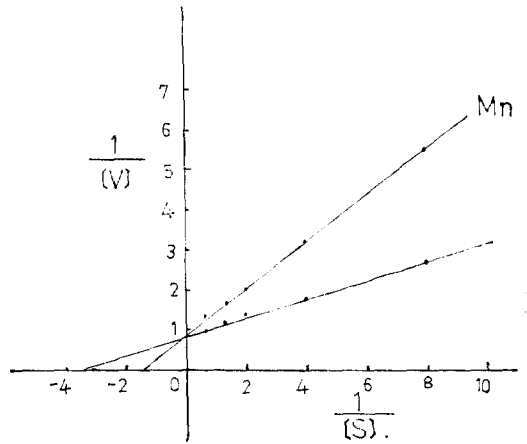


Fig.9. Plot for the inhibition constant of Mn⁺⁺ ion on the activity of salicinase

같이 avicelase에 대한 Ca⁺⁺ 이온의 阻害效果는 uncompetitive inhibition 이었으나 salicinase에 대한 Mn⁺⁺ 이온의 阻害效果는 경쟁적 阻害作用 (competitive inhibition)이었다. 이는 Choi, M.J et al. (1976)이 *P. notatum*, *Tri. viride*, *Asp. niger* 등에서 추출한 셀룰라아제의 Mn⁺⁺ 이온에 대한 阻害效果에서 경쟁적 阻害作用을 나타낸 것과 일치하였다.

摘 要

Ammonium sulfate에 의한 鹽析과 透析 그리고 DEAE Sephadex A-50 및 Sephadex G-100 column chromatography를 통해 *A. phoenicis* K.U. 175로 부터 세가지 셀룰라아제 avicelase, CMCase, salicinase를 각각 分離·精製하였고 이들 酵素의 活性에 미치는 pH, 溫度, 阻害作用 및 금속이온등의 影響과 基質 농도에 따른 反應速度를 測定 비교하였다.

1. 分離·精製한 세가지 셀룰라아제는 粗酵素에 비해 약 8.3~9.2배 순화되었다.

2. Avicelase, CMCase, Salicinase에 미치는 pH의 安定성은 대체로 산성 및 중성영역에서 나타났고, pH의 影響은 각각 pH 3.8~4.8, 4.5~5.5 및 4.5~6.0으로 나타났다.

3. Avicelase 活性에 미치는 最適 溫度는 35~55°C인데 비해 CMCase 및 Salicinase의 最適 溫度는 45~60°C이었고 열安定성은 salicinase 경우 70°C에서도 活性에 변화가 없었다.

4. Avicelase, CMCase, Salicinase의 Km 값과 Vmax 값은 각각 1.5×10^{-4} M, 및 1.66×10^{-4} mM/min, 5.5×10^{-4} 및 3.33×10^{-4} mM/min, 그리고 2.75×10^{-5} M, 및 1.14×10^{-4} mM/min으로 기질에 대한 親和力이 avicelase가 높았다.

5. 이들 세 酵素의 금속이온에 대한 影響에서 Ca^{++} , Hg^{++} , Mn^{++} 등이 avicelase, CMCase, salicinase에 크게 阻害시켰으며, avicelase에 대한 Ca^{++} 의 阻害作用은 uncompetitive inhibition이었으나 salicinase에 대한 Mn^{++} 의 效果는 competitive inhibition이었다.

REFERENCE

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farrl., and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**:265-275
- Matsumura, C., and K. Maejima. 1963. Studies on cellulolytic enzymes produced by *A. saitoi*. Action of partially purified cellulase (I). *J. Ferment. Tech.* **41**(3):154-158
- Nelson, H. 1944. A photometric adaption of the Somogi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem* **153**:375-380
- Nisizawa, T., H. Suzuki. and K. Nisizawa. 1971. De novo synthesis of cellulase induced by sophorose in *T. viride* cells. *J. Biochem.* **70**:387-393
- Okada, G. 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *T. viride* (II). Purification and properties of two cellulase. *J. Biochem.* **77**:93-42
- 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
- Shikata, S. and K. Nisixawa. 1975. Purification and properties of an exo-cellulase component of novel type from *T. viride*. *J. Biochem.* **78**:499-512
- Stutzenberger, R.J. 1972. Cellulolytic activity of *Thermomonospora curvata*. Optimal assay conditions, partial purification, and product of the cellulase. *Appl. Microbiol.* **24**(1):83-90
- Yamane, K., H. Suzuki. and K. Nisizawa. 1970. Purification and properties of extracellular and cell-bound cellulase component of *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa*. *J. Biochem.* **67**(1):19-35
- Yamane, K., T. Yoshikawa., H. Suzuki. and K. Nisizawa. 1971. Localization of cellulase components in *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa*. *J. Biochem.* **69**:771-780
- Yoshikawa, T., H. Suzuki. and K. Nisizawa. 1974. Biogenesis of multiple cellulase components of *Pseudomonas fluorescens var. cellulosa*. *J. Biochem.* **75**:531-540
- Wakabayashi, K., T. Kanda., and K. Nisizawa. 1966. Separation of two cellulase components

- from a culture filtrate of *Irfex lacteus* and some of their properties. *J. Ferment. Technol.* **44**(9):669-681
13. Whitaker, D.R. 1953. Purification of *Myrothecium verrucaria* cellulase. *Arch. Biochem. Biophys.* **42**:253-267
 14. Wood, T.M. and S.I. McCRAE. 1972. The purification and properties of the C1-component of *Tri. koningii* cellulase. *Biochem. J.* **128**:1183-1192
 15. Wood, T.M. 1968. Cellulolytic enzyme system of *T. koningii*. *Biochem. J.* **109**:217-227
 16. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**(16):4406-4411
 17. Hong, S.W., K.H. Min. and Y. H. Rhee. 1976. Partial purification and some properties of cellulase components from *T. koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **14**:84-94
 18. Choi, M. J., Y.M. Kim. and W.S. Kim. 1976. Influence of some metal ions on the cellulase activity. *Kor. J. Microbiol.* **14**:75-83
 19. Kim, W.S. and S.J. Lee. 1976. Investigation of cellulase of microbial origin (I). Studies on some properties of cellulase isolated from *Alternaria sp.* *Kor. J. Microbiol.* **14**:64-74
 20. Kim, Y. M. and W.S. Kim. 1976. Studies on the cellulolytic enzymes of *Stachybotrys atra*. Partial purification of cellulase and effects of temperature, pH and metal ions on the enzyme. *Kor. J. Microbiol.* **14**: 117-127