

人蔘腐敗菌中 *Rhizopus* sp. G-211 이 생성하는 Cellulase에 관한 研究

盧惠媛 · 金相達 · 都在浩 · 姜成浩*

韓國人蔘煙草研究所

*梨花女子大學校 化學科

(1981년 12월 16일 수리)

Studies on the Cellulolytic Enzyme System of *Rhizopus* sp. G-211 Isolated from Rotting Ginseng

Hye Won Noh, Sang Dal Kim, Jae Ho Do and Sung Ho Kang*

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Seoul, Korea

*Dept. of Chemistry, Ewha Womens University, Seoul, Korea

(Received December 16, 1981)

Abstract

A *Rhizopus* sp. was selected for its strong cellulolytic activity among various strains of molds found in rotting ginseng roots. Studies were made on some properties of the cellylytic enzyme produced by the strain.

The results obtained were summarized as follows: The optimum pH of the enzyme was 4.5 and the range of its stability to the pH was 3.0 to 7.0. The optimum temperature was 50°C, while the enzyme was instantly inactivated above 60°C. Mn^{++} and Co^{++} ions increased enzyme activity and the metal ions were found to increased the thermostability of the enzyme. This enzyme was inhibited by sodium dodecyl sulfate and 2,4-dinitrophenol. This enzyme had a strong cellulolytic enzyme activity on various native cellulose given a sufficient reaction time. The addition of 0.5% saponin solution into reaction mixture increased the enzyme activity.

緒 論

수확한 人蔘의 根部, 즉 水蔘을 생체상태로 長期間 貯藏하면 각종 人蔘의 腐敗菌의 生育에 依해 人蔘根 組織이 수일내에 붕괴되어 버린다.

식물조직의 붕괴에는 cellulase群 및 pectinase群이 주원인이라고 알려져 있는데⁽¹⁻³⁾ 그중 cellulase(E. C. 3.2.1.4. β -1, 4-glucan-4-glucano hydrolyase)는 Whitaker⁽⁴⁾가 지적한 것처럼 각종 cellulose에 作用하는 酵素의 총칭이다.

Native cellulose가 cellulase에 의해 分解되

어 가용성 당으로 되는 과정에 대해 많은 연구가 되어왔으나⁽⁵⁻¹¹⁾ Native cellulose는 그 구조가 복잡한 고차구조를 하고 있어^(12,13)이 分解過程이 단순한 加水分解만이 아니라는 사실이 알려져 있다. Native cellulose의 分解는 C_x enzyme, C_1 enzyme, β -glucosidase 등에 의해 단계적으로 이루어지며 微生物菌株別 C_1 및 C_x 각 cellulase의 생성차이와 성질에 대해 많은 연구가 되어왔다.⁽¹⁴⁻¹⁹⁾

인삼부패의 원인균에 대해서는 鄭⁽²⁰⁾, Mauto 등^(21,22)의 *Cylindrocarpon* sp.와 *Fusarium* sp. 등

이 보고되어 있으나 부패균의 인삼조직 부패 기작을 酵素學的으로 설명한 연구는 李等⁽²³⁾의 *Cylindrocarpon*이 생성하는 cellulase와 pectinase에 대한 연구외에는 진무한 실정이다.

本 實驗에서는 人蔘腐敗菌中 人蔘組織崩壞力 및 cellulase 分泌力이 강한 *Rhizopus*속의 한 菌株를 選定하여 이 菌株가 生成하는 cellulolytic enzyme을 대상으로 酵素學的 特性을 調査하였다.

材料 및 方法

使用 菌株

本 實驗에 使用한 菌株는 부패된 貯藏水蔘에서 分離 培養한 12종의 mold류 중 cellulase 분비력 및 수삼조직붕괴력이 가장 강한 *Rhizopus*속에 속하는 한 균주를 選定하여 G-211로 명명하여 使用하였다.

菌의 培養

酵素生成을 위하여 배양액을 glucose 5%, peptone 1%, KH_2PO_4 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2%, NH_4NO_3 0.05% 되도록 tap water로 조제하여 pH를 5.0으로 調節한 후 15psi에서 15분간 그압살균하여 malt extract agar 배지로 계대배양한 菌사체를 무균적으로 接種하여 Shaking Incubator를 使用하여 30°C에서 100rpm의 속도로 7일간 회전진탕배양시켰다.

酵素液의 調製

培養한 培養液을 여과하여 ammonium sulfate로 완전포화시켜 5°C에서 24시간 침전시켜 4,500g로 원심분리하여 生成된 침전단백을 소량의 증류수에 溶解시킨 후 냉각된 증류수로 5°C에서 24시간 dialysis하고 여과시켜 조효소액으로 使用하였다.

酵素活性度 測定方法

其質로 1% Carboxymethyl Cellulose-Na (CMC-Na, Kanto Chemical Co.) 용액 3ml와 McIlvaine buffer (pH 4.5) 2ml, 酵素液 0.5ml를 50°C에서 1시간 反應시켜 生成된 환원당

을 Dinitrosalicylic Acid 方法⁽²⁴⁾에 依해 포도당을 표준물질로 測定했다. 이때 540nm에서 吸光度를 測定하여 對照區와의 相對值로 酵素活性度を 나타냈다.

한편 불용성 고체기질은 2mm²로 절단하여 0.1g을 McIlvaine buffer (pH 4.5) 5ml에 넣어 酵素液 0.5ml를 加하여 上記 方法과 같이 酵素活性度を 測定하였다.

특별히 지적하지 않은 실험에서는 CMC-Na를 기질로 使用하였다.

結果 및 考察

酵素活性에 미치는 pH의 影響

McIlvaine buffer를 使用하여 pH 3.0에서 7.0까지 조절하면서 40°C에서 1시간 반응시켜 酵素活性度を 測定하여 그 結果를 Fig. 1에 나타냈다.

Fig. 1에서와 같이 本 酵素의 最適活性 pH는 4.5로 비교적 낮은 pH범위였다. 이러한 結果는 今田等⁽²⁵⁾의 *Rhizopus*속 R-302 菌株가 生成하는 酵素의 最適活性 pH가 4~5인 結果와 비슷하였다. 한편 *R. javanicus*에 대한 大健等⁽²⁶⁾의 경우와 成⁽²⁷⁾의 *Rhizopus*속 酵素의 最適活性 pH는 모두 5.0으로 보고되어 있다.

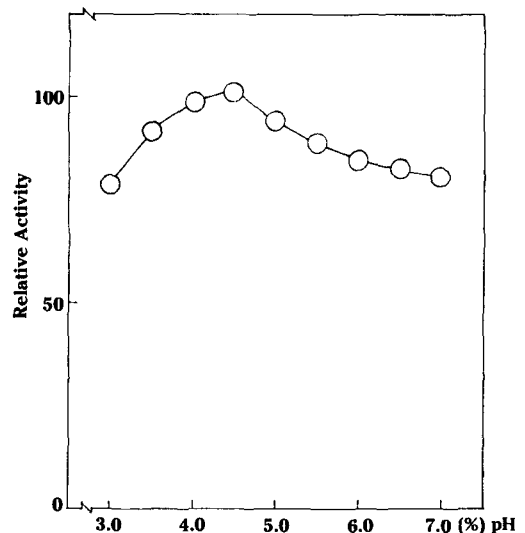


Fig. 1. Effects of pH on Cellulase Activity of *Rhizopus* sp. G-211.

酵素活性에 미치는 温度의 影響

本 酵素의 最適活性 温度를 알아보기 위하여 反應液 pH를 4.5로 調節하여 30°C에서 70°C사이의 温度에서 1시간씩 反應시킨 후 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에 나타난 바와 같이 本 酵素의 最適活性 温度는 50°C이었는데, 이는 金⁽²⁸⁾의 *Asp. penicilloides*에서 얻은 cellulase의 最適活性 温度인 30°C, 鄭⁽²⁹⁾의 실험에서의 40°C에 비하여 훨씬 高温이었다.

pH 安定性

Mcllvaine buffer (pH 3.0-8.0)와 Clark and Lubs solutin (pH 8.0-10.0)으로 pH를 조절하여 각 pH別 buffer용액 2ml와 酵素液 0.5ml를 30°C의 water bath에서 5시간 전처리시킨 후 反應액의 pH를 4.5로 조절하여, 1% CMC-Na 3ml를 加하여 50°C에서 1시간 反應시켜 殘存活性度를 Fig. 3에 나타냈다.

Fig. 3에서와 같이 酵素는 pH 3.0~7.0가 본지 비교적 넓은 범위에 걸쳐 상당히 安定하였으며, 이와같은 結果는 可溶性 澱粉소기질에 작용하는 Grimes等⁽³⁰⁾의 結果와 유사하며, Chang等⁽³¹⁾의 菌株에서 얻은 cellulase보다 비교적 넓다

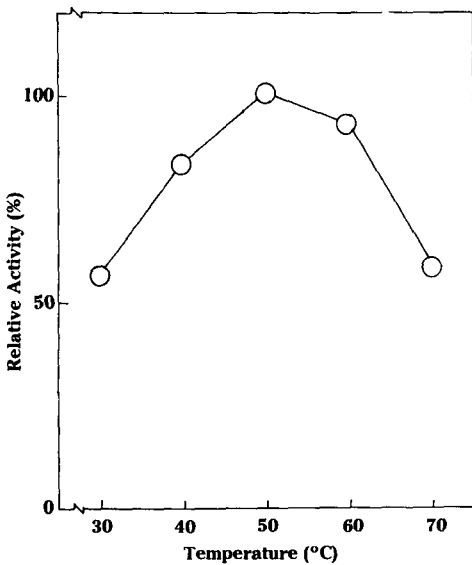


Fig. 2. Effects of Temperature on Cellulose Activity of *Rhizopus* sp. G-211.

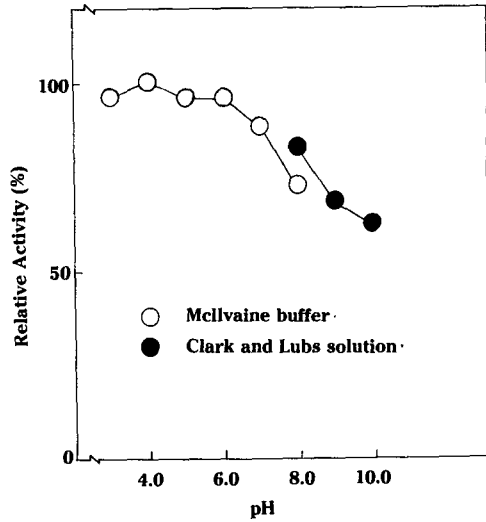


Fig. 3. Effects of pH on Cellulase Stability of *Rhizopus* sp. G-211.

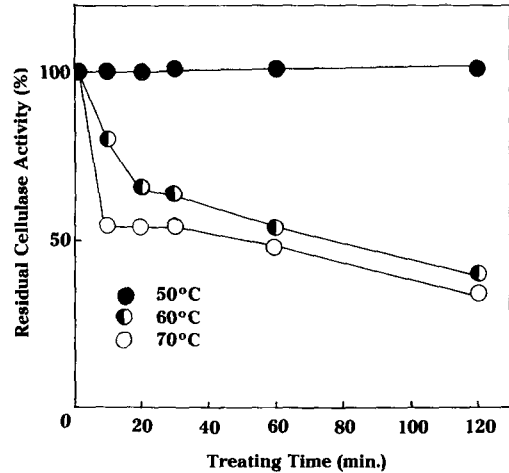


Fig. 4. Thermalstability of Cellulase of *Rhizopus* sp. G-211.

고 생각된다.

熱 安定性

本 酵素의 熱 安定性을 調査하기 위하여 40°C에서 70°C까지의 温度에서 2시간까지 pH를 4.5로 調節한 酵素液을 經時的으로 熱處理시키면서 酵素의 殘存活性을 測定하여 Fig. 4에 나타냈다.

Fig. 4에서 보여주는 바와같이 本 酵素는 50°C

까지는 별다른 영향이 없었으나, 그 이상의 온도에서는 급격히 失活되어 70°C의 경우 10分間の 熱處理로 약 60% 정도가 失活되었다. 이는 70°C에서 10分 熱處理함으로써 44% 정도의 活性化가 파괴된다는 Sisin⁽³²⁾의 cellulase 보다는 훨씬 不安定하나, 70°C에서 10分 熱處理하여 85%, 60°C에서 30分 熱處理로 50% 정도가 失活한다는 金⁽³³⁾의 cellulase 보다는 훨씬 熱에 처한 安定성이 큰 cellulase인 것으로 생각된다.

금속 이온의 영향

여러가지 금속 이온이 本 酵素에 미치는 영향을 조사하기 위하여 FeCl₃ 등 16종의 금속염용액을 0.1ml씩 반응액에 加하여 금속염의 최종 농도가 10⁻³M이 되도록 한 후 上法에 따라 酵素活性도를 測定하여 그 結果를 Table 1.에 나타냈다.

Table 1.에서 보는 바와같이 Mn⁺⁺, Co⁺⁺ 이온들에 의해 酵素가 活性化되었으나, 그 밖의 다른 금속 이온은 효소활성에 거의 영향을 주지 않았다.

Table 1. Effect of Metal Ions on Cellulase Activity of *Rhizopus* sp. G-211.

Metal Salt	Relative Activity (%)
FeCl ₃ ·6H ₂ O	106.3
CoCl ₂ ·6H ₂ O	113.8
ZnCl ₂	96.9
BaCl ₂ ·2H ₂ O	100.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	100.0
LiNO ₃	96.9
Na ₂ NasO ₄ ·7H ₂ O	90.6
Ma ₂ MoO ₄ ·7H ₂ O	100.0
SnCl ₂ ·2H ₂ O	90.5
AlCl ₃ ·6H ₂ O	100.0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	100.0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	98.8
AgNO ₃	98.8
MnSO ₄ ·6H ₂ O	132.5
HgCl ₂	98.8
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	95.0
None	100.0

Mn⁺⁺, Co⁺⁺ 이온의 농도에 대한 影響

本 酵素에 대해 비교적 강하게 活性化作用을 하는 Mn⁺⁺, Co⁺⁺ 이온들의 농도가 酵素活性에 미치는 影響을 알아보기 위해서 MnSO₄와 CoCl₂ 용액을 0.1ml씩 반응액에 加하여 최종농도가 10⁻⁷M에서 10⁻²M이 되도록 하여 50°C에서 1시간 反應시킨 結果는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에 나타난 바와같이 Co⁺⁺ 이온은 10⁻³M에서 125%의 最大 酵素活性을 나타냈고, Mn⁺⁺ 이온은 농도가 증가할수록 酵素活性이 증가하여 10⁻²M에서 178%의 酵素活性을 나타냈다.

酵素活性에 미치는 여러가지 化合物의 영향

Ethylene diamine tetraacetate(EDTA) 등 8종의 物質을 使用하여 本 酵素에 미치는 影響을 調査하기 위하여 阻害物質의 최종농도가 10⁻³M이 되도록 용액으로 만들어 pH를 4.5로 조절하여 0.1ml씩 反應液에 添加하여 結果를 Table 2에 나타냈다.

Table 2에 나타난 것처럼 citrate 등 6종은 本 酵素에 별다른 影響을 나타내지 않았으나, SDS와 2.4-DNP에 의해 各各 82.3%, 43.1%의 阻害를 나타냈다. 이러한 阻害는 本 酵素 단 백질의 conformation에 變化를 가져오기 때문

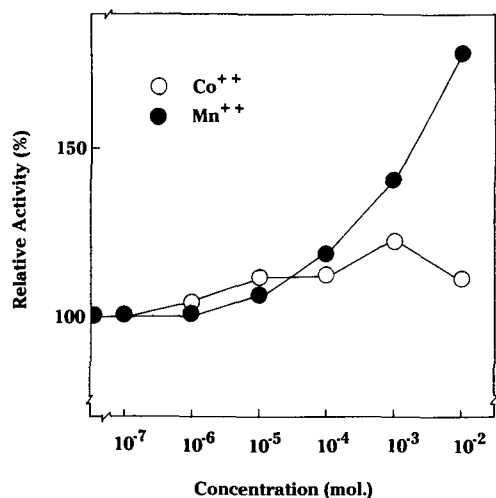


Fig. 5. Effects of Co⁺⁺ and Mn⁺⁺ on Cellulase Activity of *Rhizopus* sp. G-211.

Table 2. Effects of Chemicals on Cellulase Activity of *Rhizopus* sp. G-211.

Chemical	Relative Activity
Citrate	92.3
Oxalate	107.7
Thiourea	102.3
EDTA 2Na*	100.8
o-Phenathroline	107.7
SDS**	17.7
Monoiodoacetate	96.2
2,4-DNP***	56.9
None	100.0

* Ethylene diamine tetraacetate

** Sodium dodecyl sulfate

*** 2,4-Dinitrophenol

Table 3. Hydrolyses of Cellulosic Materials by *Rhizopus* sp. G-211 Cellulase

Substrate	Relative Activity (%)	
	1hr	5hr
CMC-Na	100	125.4
D(+)-Cellobiose	42.3	
Laminaran	330.1	
Xylan	147.9	
Filter paper	0	12.0
News paper	4.9	53.5
Toilet paper	0	11.3
Ginseng peelings	108.5	412.0
Ginseng leaves	34.5	119.7

인 것으로 보여지며, 한편 metalloenzyme를 강하게 阻害하는 EDTA에 의해서 影響을 받지 않았으므로 metal을 含有하고 있지 않은 것으로 생각된다.

基質에 對한 作用特異性

각종 基質에 對한 本 酵素의 作用特異성을 알아보기 위하여 filter paper (Toyo filter paper No. 51) 등 9종의 基質을 使用하여 50°C에서 各 1시간, 5시간씩 作用시켰으며, 그 結果는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와같이 本 酵素에 依해

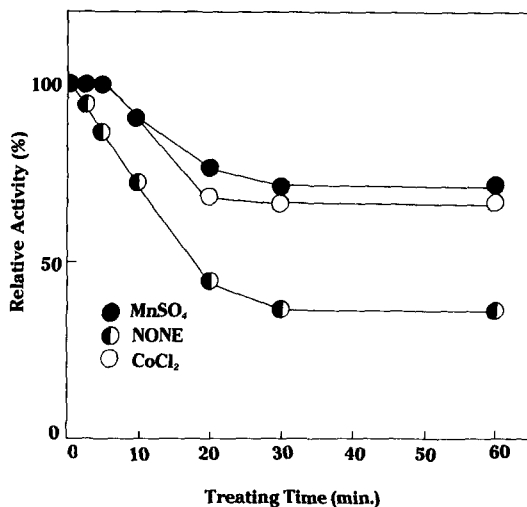


Fig. 6. Effects of CoCl₂ and MnSO₄ on the Heat Resistance of Cellulase produced by *Rhizopus* sp. G-211

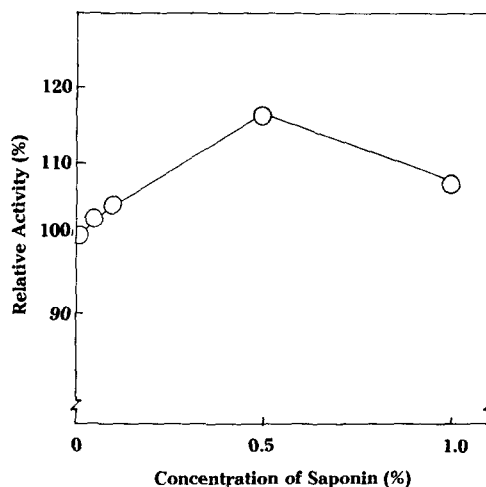


Fig. 7. Effect of Saponin on Cellulase Activity

Laminaran, Xylan, 人蔘皮 등은 1시간 酵素反應시켜도 상당히 分解되었으며, 결정성 cellulose인 filter paper, 신문지, 화장지 등의 불용성 기질에 대해서는 酵素反應에 소요되는 시간이 더 필요함을 알 수 있었다. Mandels⁽³⁴⁾는 樹의 浸出液 농도를 1~4%로 하여 1~5일 酵素反應시킨 結果, 시간이 경과함에 따라 더 많이 分解되었다고 보고했으며, Whitaker⁽³⁵⁾는 결정성 cellulose를 4시간 分解했을 때보다 24시간 分解시켰을 때 그 分解力이 3배 증가한다고

하였다. 本 酵素도 결정성 cellulose를 基質로 使用하였을 때 1시간 反應시켰을 때 보다 5시간 反應시켰을 때 分解力이 상당히 증가하였으므로 결정성 cellulose나 가용성 cellulose 어느 것에도 강하게 作用하는 酵素라고 생각된다.

Co⁺⁺, Mn⁺⁺이온의 열보호작용

本 酵素의 熱變성에 對한 Co⁺⁺, Mn⁺⁺ 이온의 열보호작용을 調査하기 위하여 酵素液 0.5ml와 5.6×10⁻³M의 CoCl₂, MnSO₄ 용액 0.1ml를 60°C에서 1시간까지 經時的으로 熱處理시킨 후 남아있는 殘存酵素活性을 測定하여 Fig. 6에 그 結果를 나타냈다

Fig. 6에 나타난 것처럼 MnSO₄, CoCl₂ 모두 酵素에 對해 열보호작용을 하였으며 CoCl₂가 MnSO₄보다 더 많은 열보호작용을 하였다.

Saponin의 影響

人蔘의 有效成分中の 하나로 알려진 saponin이 微生物性 酵素作用을 촉진한다는 사실이 알려져 있다^(3,6).

本 酵素의 活性에 對한 saponin의 影響을 알아보기 위하여 人蔘 saponin (순도: 98%) 0.1ml를 反應液에 첨가하여 최종농도 1.0%까지 농도별로 酵素活性에 미치는 影響을 調査하였으며 그 結果는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서와 같이 saponin 농도가 0.5%일 때 가장 酵素活性을 촉진시켜 116%의 酵素活性을 나타냈다.

要 約

섬유소 분해효소를 강하게 생성하는 *Rhizopus* 속의 속하는 菌株를 人蔘의 뿌리에 번식하는 부패균에서 분리하여, 이 菌株가 生成하는 cellulase에 대한 酵素의 特性에 關하여 調査한 結果,

(1) 本 酵素의 最適 pH는 4.5, 最適溫度는 50°C이었다.

(2) 本 酵素는 pH 3.0~7.0의 범위에서 安定하며, 50°C의 溫度에서는 安定하나, 60°C 이상의 溫度에서는 熱에 의해 급격한 失活이 일어난다.

(3) Co⁺⁺, Mn⁺⁺ 이온에 의해 酵素活性이 촉진되었으며 이때 Co⁺⁺ 이온은 10⁻³M일 때 最大活

性을 나타냈고, Mn⁺⁺ 이온은 농도가 증가할 수록 活性이 촉진되었다.

(4) EDTA 등에 의해서는 影響을 받지 않았으나, 2,4-DNP와 SDS에 의해 강하게 阻害를 받았다.

(5) 결정성 cellulose를 基質로 使用하였을 때에도 反應시간을 길게 하면 상당히 分解되었으며, 人蔘皮, 人蔘葉, Laminaran, Xylan에 對해 特別히 分解力이 강하였다.

(6) Co⁺⁺, Mn⁺⁺ 이온이 本 酵素에 열보호작용을 하였으며 saponin을 反應液에 添加하였을 때 최종농도 0.5%에서 酵素活性이 가장 촉진되었다.

참고문헌

- 1) Wood, T.M.: *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **11**, 299 (1960)
- 2) 島菌平雄: *食品工学.*, **9**, 52 (1966).
- 3) 石井藏孝: *日本農芸化学会誌.*, **44**, 306 (1970).
- 4) Whitaker, D.R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **43**, 253 (1953)
- 5) Selby, K. and C.C. Maitland: *Biochem. J.*, **104**, 76 (1967)
- 6) Okada, G., T. Niwa, H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Ferment. Technol.*, **44**(9), 682 (1966)
- 7) Wood, T.M.: *Biochem. J.*, **109** 217 (1968)
- 8) Halliwell, G. and M. Riaz: *Biochem. J.* **116**, 35 (1970)
- 9) Liu, T.H.: Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia (1970)
- 10) Lang, T.A.: Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, Virginia (1971)
- 11) Petterson, G.: *Arch. Biochem. Biophys.* **123**, 307 (1968)
- 12) Cowling, E.B. and T.K. Kirk: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, No. 6, p. 95 (1976)
- 13) Kim, B. Hong: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **6**, 197 (1978)
- 14) Reese, E.T.: *Appl. Microbiol.*, **4**, 39 (1956)
- 15) White, A.L. and R.M. Brown, Jr.: *Proc. Nalt. Acad. Sic. USA* **78**(2), 1047 (1981)
- 16) Wood, T.M., S.I. McCrae and C.C. MacFarlane: *Biochem. J.*, **189** 51 (1980)
- 17) Shoemaker, S.P. and R.D. Brown, Jr.: *Biochem.*

- Biophys. Acta*, **528**, 133 (1978)
- 18) Wood, T.M. and S.I. McCrae: *Biochem. J.*, **182**, 61 (1978)
 - 19) Takahisa, K., W. Kazumasa and N. Kazutosi: *J. Biochem.* **87**, 1635 (1980)
 - 20) Chung, H.S. and C.H. Kim: *Proc. 2nd Int. Ginseng Sym.* p. 67, Korean Ginseng Res. Inst., Seoul, Korea (1978)
 - 21) Matuo, T. and Y. Mitazawa: *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **9**, 109 (1969)
 - 22) Matuo, T. and E.C. Synder: *Phytopath.* **62**, 731 (1972)
 - 23) Lee, J.W. and H.S. Chung: *Korean J. Protect.*, **13**(1), 1 (1974)
 - 24) Miller G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
 - 25) 今田, 友田, 和田: *醸工誌*, **40**, 140(1962).
 - 26) 大健, 相川, 高原: *工技研報*, **26**, 65(1964).
 - 27) 成洛癸: *한국미생물학회지*, **6**, 87(1968).
 - 28) 金燦祚: *한국농화학회지*, **11**, 84(1969).
 - 29) 鄭東孝: *한국농화학회지*, **11**, 109(1969).
 - 30) Grimes, R.M., C.W. Duncan and C.A. Hoppert: *Arch. Biochem. Biophys.*, **68**, 412 (1957)
 - 31) Chang, W.S., S. Usami and N. Taketomi: *J. Ferment Assoc.*, **23**, 375 (1965)
 - 32) Sisin, B.: *Arch. Biochem.*, **75**, 260 (1958)
 - 33) 金相達: *배영학숙학술논문집*, **3**, 1 (1976).
 - 34) Mandels, M. and E.T. Reese: *Dev. Industrial Microbiol.* **5**, 5 (1964)
 - 35) Whitaker, D.R.: *Canadian J. Biochem. Physiol.*, **34**, 488 (1956)
 - 36) 趙成桓, 趙漢玉, 朴洪球: *고려인삼학회지*, **3**, 114 (1979).