

*Aspergillus niger*가 생산하는 섬유소 분해효소의 기질에 대한 특이성

吳太廣 · 朴官和 · 申鉉炯* · 金載勛

서울대학교 農科大學 食品工學科, *韓國科學技術院
(1985년 8월 25일 수리)

Substrate Specificity of Cellulase from *Aspergillus niger*

Tae-Kwang Oh, Kwan-Hwa Park, Hyun-Kyung Shin* and Ze-Uook Kim

Department of Food Science and Technology, College of Agriculture,
Seoul National University, Suwon, *Korea Advanced
Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

Abstract

Three isozymes of Carboxymethyl Cellulase (FI*, FII*, FIII) and two fractions of β -1, 4-D-Cellobiohydrolase (CI, CII) from *Aspergillus niger* were purified by Sephadex G-150, DEAE-Sephadex and Sephadex G-75 column chromatography.

From the results of enzymatic hydrolysis and X-ray diffraction, β -1, 4-D-Cellobiohydrolase has a high activity toward highly crystalline cellulose such as filter paper and acts synergistically with Cx enzyme.

緒 論

섬유소 분해 효소의 분해 기작은 Reese 등¹⁾의 假說에서 C₁ 成分에 의해서 非反應性인 結晶性의 섬유소가 反應性의 無定形 섬유소로 변한 후 Cx 효소와 β -glucosidase의 作用으로 포도당 單位까지 분해된다는 C₁-Cx 개념을 세웠지만 이런 가설을 뒷받침할 C₁ 成分에 대한 분리는 Garden 등²⁾의 노력에도 불구하고 현재까지 이루어지지 않은 상태이다. Umbeit 등³⁾은 C₁ 成分의 역할은 물에 대한 親和力을 높여서 섬유소를 膨脹시킴으로써 Cx 효소의 작용을 容易하게 한다는 보고를 했다. 最近, Reese 등이 提案한 C₁-Cx 개념과는 달리 결정형 섬유소는 C₁ 成分을 포함한 Cx 효소의 여러

이조자임들(Isozymes)에 의해서 섬유소에 동시에 또는 각기 작용하는 분해 모델⁴⁻⁸⁾이 보고되었고 또는 물에 용해되지 않은 섬유소는 다른 여러 가지 효소 작용에 의해서 조금씩 분해된다는 보고도 있다. 이와같이 섬유소 분해 효소의 분해 기작 및 기질의 종류에 따른 특이성에 대한 연구는 잘 알려져 있지 않은 상태에 있다.

본 연구에서는 前報⁹⁾에서 Sephadex G-150, DEAE-Sephadex에서 분리된 FI, FII, 및 FIII의 이조자임을 Sephadex G-75를 이용해서 더 정제한 후 효소 분해 특성, X-선 회절도 및 IR 스펙트럼을 통해서 *Aspergillus niger*가 생산하는 섬유소 분해 효소의 기질에 대한 특이성 및 분해 기작에 대해서 연구하였다.

結果 및 考察

1. 섬유소의 결정성 조사

여지, Sigmacell type 100 및 CMC 를 구조를 유지하면서 용매 건조 시킨후 X-선 회절을 한 결과는 Fig. 2 에서와 같이 섬유소의 결정성을 나타내는 2θ 가 22° 의 강도를 조사해 보면, 여지와 Sigmacell 에서는 peak 를 가져서 결정성이 높은 것을 알 수 있는데, 반해서 C.M.C. 는 이 각도에서 전혀 peak 을 가지지 않은 결과로서 무정형의 섬유소가 많음을 알 수 있다. 이와같은 결과를 Segal 의 공식을 이용해서 세 가지 섬유소의 결정도를 계산하면, 여지의 경우 83.3%, Sigmacell 이 63.1% 및 C.M. C가 46.7%로 나타나서 여지가 결정성이 가장 높고 C.M.C.가 가장 무정형으로 존재함을 알 수 있다.

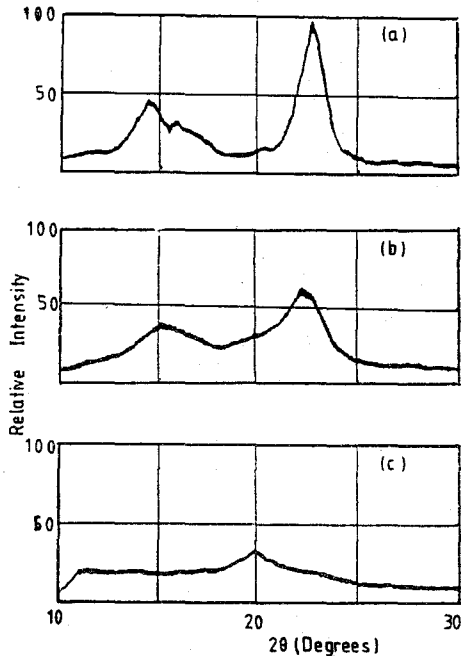


Fig. 2. X-ray diffractograms of various celluloses: Filter paper (a) : Sigmacell Type 100 (b) : C.M.C. (c).

2. 효소의 정제 및 기질에 대한 각 분리효소의 상대적 역가

前報에서 분리한 FI, FII 및 FIII 를 C.M.C. 분해력과 여지 분해력을 비교한 결과를 Table 1에 표시하였다.

Table 1. Relative enzyme activities of three fractions on C.M.C. and filter paper

Fraction	FI	FII	FIII
Substrate			
C.M.C.	1.00	1.11	1.46
Filter paper	4.67	1.17	1.00

FI은 FIII에 비해서 C.M.C. 분해능력이 1.46배 작은데 비해서 여지 분해능력은 4.67배 크게 나타났다. 즉, FI이 고분자의 結晶性이 높은 섬유소로 분해할 수 있는 능력을 가졌음을 알 수 있다. FI을 농축시킨 후 Sephadex G-75를 사용하여 분리한 결과를 Fig. 3에 도시하였다.

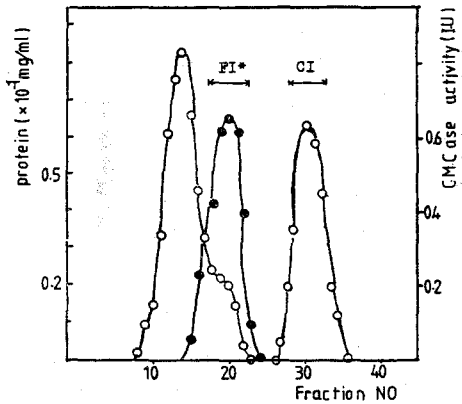


Fig. 3. Chromatogram of the FI on Sephadex G-75 column(2.2×65cm) : flow rate 20 ml/h : ○—○ protein : ●—● C.M. Case activity at pH 4.8.

단백질 2개의 分劃區를 얻었고 한 개의 분획구는 C.M.C. 분해 능력을 가진데 비해서 다른 구는 전혀 분해하지 못했으며 이들은 각기 FI*와 CI로 명명하였다. Fig. 4 에서와 같이 FI*이 단백질 peak의 shoulder에 나타나기 때문에 Sephadex G-75로 rechromatography하여 정제하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 단백질 peak와 효소 역가 peak가 일치되는 FI* 효소액을 얻었다. FI*과 Fig. 2에서 분리된 CI 분획구를 기질을 달리하여 C.M.C. 여지 및 탈지면에 대한 분해능력을 비교한 결과는 Table 2에서와 같다. FI*에 CI를 첨가하였을 때 모든 기질에서 상승 효과를 보였다. 그 중에서도 탈지면에서 상승 효과가 가장 컸다. 즉 고분자의 높은 결정성을 가진 섬유소 일수록 CI 분획구에 의한 상승 효과가 큰 것으로 나타났다.

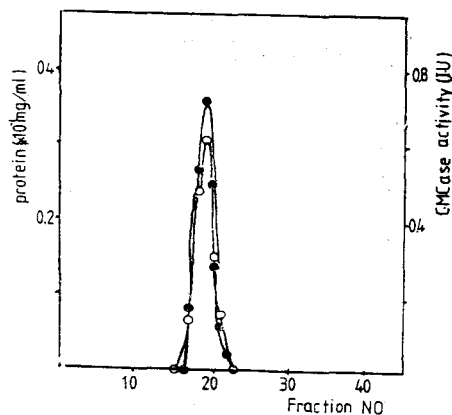


Fig. 4. Chromatogram of the FI* on Sephadex G-75 column(2.2×65cm) : flow rate 20 ml/h : ○—○ protein : ●—● C.M. Case activity at pH 4.8.

Table 2. Relative enzyme activities of CI, Cx components from FI.

Fraction	CI	FI*	CI+FI*
C.M.C.	0	1	1.30
Filter paper	0.38	1	2.06
Cotton fiber	0.43	1	2.43

또한 CI 분획구는 여지와 탈지면에 작용하여 분해할 수 있음을 알 수 있다. 이는 Reese가 제시한 단순한 성분이 아닌 섬유소를 분해할 수 있는 효소로 생각된다.

FII의 분획구를 Sephadex G-75로 분획한 결과 2개의 단백질 peak를 얻었다. C.M.C. 분해능이 있는 분획구와 분해능이 아주 작은 2개의 단백질

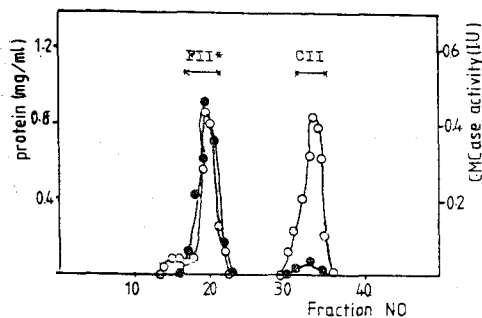


Fig. 5. Chromatogram of the FII on Sephadex G-75 column(2.2×65cm) flow rate 20 ml/h : ○—○ protein : ●—● C.M. Case activity at pH 4.8.

peak를 얻었고 이들을 각기 FII*와 CII로 명명하였다(Fig. 5). 또한 FIII의 Sephadex G-75 분획 결과는 Fig. 6과 같다. 한 개의 단백질 분획구가 C.M.C. 분해력 peak와 잘 일치되어 나타났다.

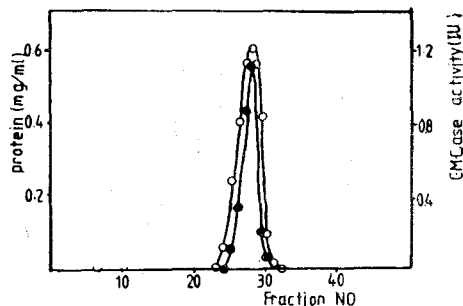


Fig. 6. Chromatogram of the FIII on Sephadex G-75 column(2.2×65cm) : flow rate 20 ml/h : ○—○ protein : ●—● C.M. Case activity at pH 4.8.

이상에서와 같이 FI, FII 및 FIII를 Sephadex G-75로 분획한 결과 FI와 FII에서는 2개의 단백질 분획구를 분리했고 동시에 분리된 CI 및 CII는 고 결정성 상승 효과를 보였다. 따라서 FI이 FIII에 비해서 C.M.C. 분해능이 낮는데 반해 여지 분해능이 높은 것은 CI 성분과의 복합 작용으로 볼 수가 있다. 또한 FIII는 Reese 등이 주장하는 Cx의 성질과 유사함을 알 수 있었다.

3. 섬유소 분해의 효소적 특성

분리된 CI 및 CII 효소가 섬유소 분해시 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위해서 FIII 분획구를 Cx 효소로 간주하고 사용하여 고 결정성의 여지와 무정형인 C.M.C.를 기질로 분해 특성을 조사하였다 Fig. 7 및 Fig. 8에서 보는 바와 같이 CI와 CII 자체는 무정형 섬유소인 C.M.C.에 대해서는 전혀 분해력을 보이지 않았고 Cx 효소와 동시 반응시는 상승 효과를 보였다. 그러나 여지에 대해서는 CI 및 CII 자체도 약간의 분해능을 보였으며 Cx 효소와 동시 반응시는 현저한 상승 효과를 나타내었다.

이상과 같은 결과에서 CI 및 CII 성분은 주로 결정성 섬유소에 가수 분해작용을 하며 또한, Cx 효소와 공동 작용할 때에는 섬유소의 결정형에 작용하여 상승작용을 하는 β-1,4-D-cellobiohydrolase라고 추측된다. 따라서, Reese 등이 제시한 CI 성분과는 다른 특성을 가지며 본 실험에 사용

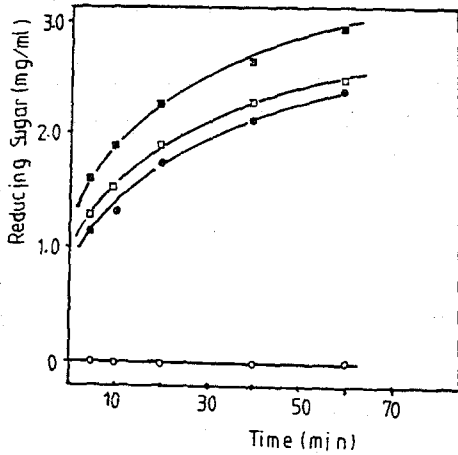


Fig. 7. Hydrolysis of C.M.C. by various cellulolytic enzyme components : ○—○ CI or CII : ●—● Cx : ■—■ CI+Cx : □—□ CII+Cx.

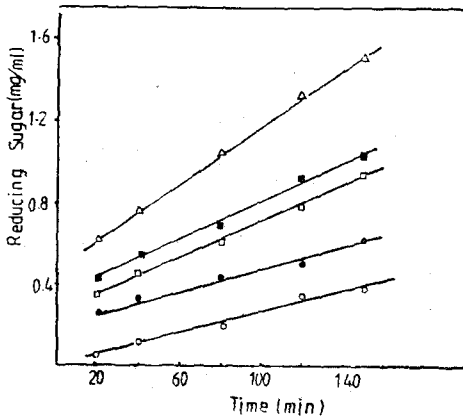


Fig. 8. Hydrolysis of Filter paper by various cellulolytic enzyme components : ●—● CI : ○—○ CII : □—□ Cx : ■—■ CII+Cx : ▲—▲ CI+Cx.

한 *Aspergillus niger*가 생산하는 섬유소 분해효소는 Parallel 분해 기작¹²⁻¹⁴⁾에 의해서 분해됨을 알 수 있다.

要 約

*Aspergillus niger*가 생산하는 섬유소 분해 효소를 Sephadex G-150, DEAE-Sephadex 및 Sephadex G-75를 통해서 세개의 C.M.C. 분해 효소

와 2개의 高結晶形 섬유소 분해능을 가진 효소인 β -1, 4-D-cellobiohydrolase로 분리하고 기질에 대한 특이성을 연구하였다. 효소의 기질에 대한 분해 특성 및 기질의 X-선 회절결과로 β -1, 4-D-cellobiohydrolase는 무정형 섬유소에 대한 분해력은 거의 없고 주로 결정형 섬유소에 특이성이 컸다. Cx 효소와 β -1, 4-D-cellobiohydrolase가 동시에 작용할 때는 상승효과를 보였다.

참 고 문 헌

1. Reese, E.T., Stu, R.G.H. and Levinson, H.S.: J. Bacteriol., 59 : 485(1950).
2. Garden, E.L. Jr.: Technology and Application Symposium Proceedings, Sept. 8~10 : 9 (1976).
3. Umbeit, W.W.: Advans. Appl. Microbiol., 9 : 91(1967).
4. Selby, K. and Maitland, C.C.: Biochem. J., 104 : 716(1967).
5. Wood, T.M. and McCrae, S.I.: Biochem. J. 128 : 1183(1972).
6. Wood, T.M. and McCrae, S.I.: Biochem. J. 176 : 61(1978).
7. Ryu, D.Y. and Mandels, M.: Enzym. Microb. Technol., 2 : 91(1980).
8. Fan, L.T., Lee, Y.H. and David, H.B.: Biotech. Bioeng., 222 : 177(1980).
9. 朴官和, 吳太廣, 申載斗 : 한국농화학회지, 24 : 186(1981).
10. Browning, B.L.: In 'The chemistry of Wood' Browning, B.L. (ed.) Interscience, New York (1963).
11. Segal, L., Creely, J.J., Martin, A.E. and Conrad, C.W.: Text. Res. J., 29 : 786(1959).
12. Pettersson, L.G.: SITRA. Symposium on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, Helsinki : 255(1975).
13. Wood, T.M.: Biotech. Bioeng. Symp., 5 : 111(1975).
14. Sasaki, T., Takashi, T., Noriko, N., Yohko, S., and Keiji, K.: Biotech. Bioeng., 21 : 1031 (1979).