

β-Glucosidase를 생산하는 균주의 분리 및 조효소의 특성

박석규* · 문일식¹ · 최옥자 · 성낙계²

순천대학교 식품영양학과, ¹화학공학과, ²경상대학교 식품공학과

Isolation of β-Glucosidase-Producing Fungi and Properties of Its Crude Enzyme

Park, Seok-Kyu*, Il-Sik Moon¹, Ok-Ja Choi and Nack-Kie Sung²

Department of Food and Nutrition, ¹Chemical Engineering, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

²Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract— The fungi SFN 416 strain which produced a stable β-glucosidase was isolated from nature and identified to *Aspergillus niger*. Optimal conditions of enzyme reaction were temperature-36°C, pH-5.0, reaction time-40 minutes. The enzyme was stable below 60°C and in the range of pH 4.5~6.5. The enzyme was greatly inhibited by Ag⁺ and slightly activated by Ca²⁺ (0.5 mM) and Cu²⁺ (5 mM).

자연계에 다량으로 존재하는 cellulose 및 hemicellulose로부터 유용화학물질, 식량 및 에너지를 값싸게 얻을려는 연구는 biomass의 효과적인 이용이라는 관점에서 최근에 주목을 받고 있지만(1-3), cellulose는 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 불수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부분만이 이용되고 있다. cellulose의 생물학적 가수분해 방법(1, 4)은 화학적 방법에 비하여 많은 장점을 지니고 있으나, 반응속도가 늦고 분해율이 극히 낮을 뿐 아니라 효소생산 비용이 매우 높아 섬유소 자원 이용에 큰 저해요인이 되고 있다. 이런 문제점을 보완하기 위해서는 무엇보다도 섬유소분해 관련 효소를 생산하는 균주를 지속적으로 탐색 및 육종하고, 효과적인 효소 반응조건을 모색할 필요가 있다고 생각된다. 지금까지 cellulase를 생산하는 곰팡이로는 주로 *Trichoderma*속(3, 4), *Aspergillus*속(5), *Penicillium*속(6), *Fusarium*속(7), *Eupenicillium*속(8), *Thermoascus*속(9), *Irpex*속(10) 등이 주로 알려져 있다.

본 연구에서는 수용액상에서 섬유소분해 효소반응

의 난점을 극복하기 위한 기초적 연구의 일환으로 유기용매상의 효소반응을 이용하여 폐신문지로부터 발효성당을 효율적으로 얻기 위하여, 우선 자연계로부터 유기용매에 비교적 안정한 β-glucosidase(1I)를 우수하게 생산하는 1균주를 분리·동정하고, 분리균주가 생산한 조효소의 최적 반응조건을 구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선정

썩은 나무, 퇴비, 폐휴지, 토양 등 균분리용 시료 1g을 시험관에 넣고, 멸균수 10 ml를 가하여 잘 현탁시켜, 그 상징액 0.1 ml를 가압살균한 곰팡이 분리용 배지에 도말하여 3일간 배양한 다음, 0.1% congo red를 가하여 halo zone이 명확하고 크며 성장속도가 빠른 colony만을 순수분리하여 1차 선정하였다. 1차 순수분리균을 효소생성 액체배지에 진탕배양(30°C, 120 rpm)하여 균주 각각에 대해 효소활성을 측정 한 후, 그 중에서 가장 우수한 곰팡이를 최종적으로 선정하였다.

Key words: *Aspergillus niger*, β-glucosidase

*Corresponding author

배지

곰팡이 분리용 배지는 Czapeck-Dox 배지에서 glucose 대신 carboxy methyl cellulose(CMC)를 첨가하고 세균의 생육을 억제시키기 위해서 penicillin을 50 µg/ml 농도가 되도록 첨가하였고 colony의 크기를 줄이기 위해서 0.1% triton X-100을 첨가하였다. 보존 및 포자형성용 배지는 각각 potato dextrose agar (PDA) 및 malt extract agar(MEA) 배지를 사용하였다. 효소 생성배지는 Mandels 배지(12), 즉 KH_2PO_4 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, urea 0.3 g, CaCl_2 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, Bacto peptone 1.0 g, CMC 10.0 g, trace sol'n 1.0 ml($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14%, CoCl_2 0.2%), tween 80 2.0 g, DW 1.0 L로 조제하여 사용하였다.

동정

2차선정에서 효소활성이 가장 우수한 균주의 균학적 성상을 조사하기 위하여 colony의 형태와 발육속도는 Czapeck-Dox 평판배양에서 관찰하였고, 또한 균의 분생자두, 분생자, 정낭, 경자 및 분생자병의 크기와 형태 등은 block plate 슬라이드 배양을 행한 다음 현미경하에서 면밀히 관찰하여 The Genus *Aspergillus*법(13)에 준하여 조사하였다.

균주배양

효소 생산용 액체배지 10 ml를 L-type 시험관에 넣어 살균(121°C, 10 min)하고, 포자현탁액 0.5 ml를 무균상내에서 접종하여 30°C에서 4일 동안 진탕배양(120rpm, stroke 5.4 cm)한 다음, 배양액을 원심분리(6000 rpm, 10 min)한 후 그 상징액의 효소활성도를 측정하였다.

조효소액의 조제

배지 1.5 L를 mini jar fermentor(EYELA M-100 type, 2 L)에 넣고 살균하여 포자현탁액을 1%(v/v) 수준으로 무균적으로 첨가한 다음 4일간 배양(rpm 200, pH 4.0, 30°C)하였다. 흡인여과한 배양액에 대하여 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 포화염용액을 만들어 냉장고에서 하룻밤 방치하여 효소단백질을 침전시킨 다음, 원심분리하여 효소단백질을 분리한 후 탈이온수로 용해하고 투석시켜 조효소액으로 사용하였다.

β -1,4-Glucosidase 효소활성 측정

효소활성의 측정은 Kohchi법(14)에 따라 10 ml 소

형시험관에 효소액 1 ml과 0.05 M-sodium phosphate buffer(pH 5.5)로 용해한 4 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG) 1 ml를 혼합한 다음, 37°C에서 10분간 반응시키고, 0.5 M Na_2CO_3 2 ml를 가하여 반응을 정지시켜 4°C로 냉각하였다. 원심분리하여 상징액을 400 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 p-nitrophenol을 표준곡선에서 정량하였으며, 효소활성단위는 $\mu\text{M-PNP/ml} \cdot \text{min}$ 으로 표시하였다.

결과 및 고찰

공시균주의 선정

균원시료로 부터 clear zone을 형성하는 458균주를 1차 분리하여 효소생성배지에서 활성이 비교적 높은 12균주를 선발한 결과는 Table 1과 같으며, SFN 416 균주가 가장 효소생성능이 우수하였고 균체생육도 양호하였으며 halo size는 Fig. 1과 같다. 특히 고체배지에 첨가된 CMC분해정도에 따라 나타나는 halo size가 액체배양의 CMCase 활성과 비교하여 정확하게 일치하지 않는 것은 고체배지의 agar량, 분주량 및 균의 성질 등에 따라서 약간씩 차이가 나타나는 것으로 생각된다.

Table 1. Enzyme activity of fungi isolated from nature

Strains	DCW (mg/ml)	Final pH	Halo size	β -Glucosidase activity (U/ml)
SFN 31	7.54	5.12	++	1.36
SFN 79	8.51	4.38	+++	1.73
SFN 145-1	7.93	4.85	++	1.28
SFN 152	8.96	4.62	+	0.95
SFN 238	9.12	5.39	++	1.42
SFN 416	9.17	5.17	++++	2.63
SFN 647	8.52	5.10	++	1.39
SFN 682-3	7.35	4.61	+	1.01
SFN 766	10.15	4.14	+++	2.06
SFN 817	8.61	5.37	++	1.28
SFN 922	7.97	4.13	+	0.88
SFN 985	8.48	5.06	++	1.42

Cells were cultured in the medium for enzyme production at 30°C for 4 days with shaking culture.

*growth at 30°C for 5 days on Czapeck-Dox agar containing 1% CMC.

Halo size: +, >1 mm; ++, 1~3 mm; +++, 4~6 mm; +++++, 7 mm<.



Fig. 1. Microscopic photos and halo size of strain SFN 416 on Mandels agar medium containing 1% CMC.

A: halo formation, B: 20 \times , C: 200 \times
Bar represents 10 μ m.

Table 2. Morphological characteristics of the strain SFN 416

Characteristics		SFN 416
Colonies*	Color	Carbon black
	Reverse color	Pale yellow or brown
	Size	6.7 cm in diameter
	Texture	Rough
	Growth	Rapidly spreading
	Sporulation	Heavy, zonate
Conidial heads	Color	Carbon black
	Shape	Globose
	Size	60~120 μ m in diameter
Conidiophores	Color	Pale brown
	Marking	Thin, smooth
	Size	3.0~5.2 mm in length 10~15 μ m in diameter
Vesicles	Color	Pale brown
	Shape	Globose, clavate swelling
	Size	30~50 μ m in length
Sterigmata		Double series
	Primary	Color: Pale dark brown Size: 10~15 μ m in length 5 μ m in diameter
Secondary	Size	6~9 μ m in length 3~5 μ m in diameter
Conidia	Color	Carbon black
	Shape	Globose, basipetal
	Size	3~4 μ m in diameter
	Marking	Rough

*Growth at 30 $^{\circ}$ C for 5 days on Czapek-Dox agar

Table 3. Effect of temperature on β -glucosidase activity

Temperature ($^{\circ}$ C)	Relative activity (%)
27	81.3
30	90.2
33	95.2
36	100.0
39	97.6
42	92.6
45	80.8
48	77.5
51	70.1

선정균의 균학적 성상

슬라이드 배양을 행하여 광학 현미경으로 여러 가지 형태적 성질을 검경한 결과는 Table 2, Fig. 1과 같다. 균사에 격막이 존재하고 병주세포가 관찰되었으며, 분생자병의 끝 부분이 팽윤되어 정낭을 형성하였다. 콜로니 색은 포자가 성숙함에 따라 흰색에서 검은색으로 전환되었고, 분생포자두 모양은 구형으로 그 주위가 짙은 검은색을 나타내었다. 분생자병은 평활한 형태의 무색이었고 2단의 경자를 가지는 균주로서 포자는 원심적 형성을 하였으며 모양은 구형을 나타내었다. 이상의 결과로 SFN 416균주는 *Aspergillus niger*로 추정되는데, 기존의 *Aspergillus niger* 균주와 거의 동일하였다.

조효소의 활성

최적 온도 및 열안정성: 효소의 최적 작용온도는 36 $^{\circ}$ C 였고 45 $^{\circ}$ C 이상에서는 급격한 효소활성의 저하를 나타내었는데(Table 3), 이 등(10)의 *Irpex lacteus*의 40 $^{\circ}$ C 와는 비슷하였으나, 박 등(15) 및 Okada(16)의 *Aspergillus niger*, Kawamori 등(9)의 *Thermoascus aurantiacus*와 Kurosawa 등(17)의 *Corticium rolfsii* (60, 50, 70 $^{\circ}$ C) 생성효소보다는 낮았다.

효소는 50 $^{\circ}$ C 이하의 온도에서 1시간 동안 가열하였을 때에는 효소활성의 변화를 나타내지 않았으며, 70 $^{\circ}$ C 이상에서는 급격한 감소를 보였다(Table 4).

본 효소의 열안정성은 Okada(16)의 *Aspergillus niger*의 경우 70 $^{\circ}$ C 까지 효소활성이 100% 유지되는 것과 Kurosawa 등(17)의 *Corticium rolfsii* 생성 효소가 65 $^{\circ}$ C 까지 아주 안정하였다는 것보다는 약간 떨어졌다.

최적 pH 및 안정성: 최적 효소작용 pH는 5.0이었는데(Table 5), Kawamori 등(9)의 *Thermoascus au-*

Table 4. Thermal stability of β -glucosidase

Temperature ($^{\circ}$ C)	Relative activity (%)
10	100.0
20	100.0
30	100.0
40	100.0
50	100.0
60	93.9
70	57.3
80	10.1
90	0.0
100	0.0

Table 5. Effect of pH on β -glucosidase activity

pH	Relative activity (%)
2.0	59.5
2.5	63.8
3.0	76.1
3.5	83.4
4.0	96.0
4.5	98.6
5.0	100.0
5.5	97.3
6.0	95.8
6.5	82.9
7.0	76.7
7.5	70.5
8.0	63.2

*rantiacus*와 Kurosawa 등(17)의 *Corticium rolfii* 경우 각각의 최적 pH가 pH 5.0, 4.5라는 보고와는 비슷하였으며, Okada(16) 및 박 등(15)의 *Aspergillus niger*, 김 등(18)의 *Aspergillus phoenicis* cellulase의 경우보다는 약간 알칼리성임을 알았다.

Citrate phosphate buffer(pH 2.0~6.5) 및 phosphate buffer(pH 7.0~8.0)를 사용하여 각각 다른 pH로 처리한 후(40 $^{\circ}$ C, 1시간) 잔존하는 효소활성을 측정된 결과(Table 6), pH 4.5~6.5 사이에서 비교적 안정하였는데, Okada(16)의 *Aspergillus niger*의 pH 5~6 범위와 비슷하였고, 이 등(10)의 *Irpex lacteus*의 cellulase 경우인 pH 3~6보다는 약간 알칼리성쪽으로 안정하였으며 그 폭은 비슷하였다. Kawamori 등(9)의 *Thermoascus aurantiacus*와 Kurosawa 등(17)의 *Corticium rolfii*의 pH안정성이 pH 3~7 범위라는 보

Table 6. pH stability of the β -glucosidase

pH	Relative activity (%)
2.0	21.9
2.5	32.4
3.0	40.7
3.5	56.2
4.0	85.6
4.5	98.6
5.0	100.0
5.5	100.0
6.0	99.4
6.5	90.2
7.0	85.6
7.5	79.8
8.0	72.1

Table 7. Effect of metal ions on β -glucosidase activity

Metal (1 mM)	Relative activity (%)
None	100.0
Ag $^{+}$	74.4
Ba $^{2+}$	102.9
Ca $^{2+}$	106.5
Co $^{2+}$	102.3
Cu $^{2+}$	103.6
Fe $^{2+}$	100.6
Hg $^{2+}$	97.3
K $^{+}$	101.5
Mg $^{2+}$	98.2
Mn $^{2+}$	98.5
Pb $^{2+}$	100.1
Sn $^{2+}$	96.8
Zn $^{2+}$	92.3

고와 Fumiyasu 등(19)의 *Bacillus*속의 pH 안정성이 pH 6~11이라는 보고와는 차이가 있었다.

금속이온의 영향: 금속이온을 1 mM 농도로 효소액에 첨가, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치한 다음 잔존효소활성을 측정된 결과(Table 7), Ca $^{2+}$ 및 Cu $^{2+}$ 는 효소활성을 약간 증가시켰으나 Ag $^{+}$, Zn $^{2+}$, Hg $^{+}$, Sn $^{2+}$ 등은 저해효과를 나타내었다. 본 효소는 Okada(16)의 *Aspergillus niger* 생성효소가 Ag $^{+}$, Hg $^{+}$, Fe $^{2+}$ 에 의해 저해되었고, Fumiyasu 등(19)의 *Bacillus*속 생성효소는 Na $^{+}$, K $^{+}$, Ba $^{+}$ 에 의해 촉진된 반면 Zn $^{2+}$, Cd $^{2+}$, Hg $^{2+}$, Ni $^{2+}$ 에 의해서는 강하게 억제되었다는 보고와

Table 8. Effect of concentration of metal ion on β -glucosidase activity

Concentration (mM)	Relative activity (%)	
	Ca ²⁺	Cu ²⁺
None	100.0	100.0
11	83.7	86.1
9	85.4	89.2
7	91.3	95.7
5	102.2	108.5
3	103.1	106.9
1	106.5	103.6
0.5	110.8	101.5
0.3	106.2	96.9
0.1	102.4	94.7

Table 9. Time course of β -glucosidase reaction

Reaction time (min)	Relative activity (%)
10	44.5
20	48.9
30	62.5
40	92.1
50	96.3
60	98.9
70	100.0

는 상이하였다.

또한 Ca²⁺와 Cu²⁺의 영향을 농도별로 살펴본 결과 (Table 8), Ca²⁺는 0.5 mM일 때, Cu²⁺는 5 mM일 때 최고의 활성을 나타내었다.

반응시간의 영향: 반응시간에 따른 효소활성을 조사한 결과 (Table 9), 20분 이후부터 급격한 증가를 나타내다가 40분 이후부터는 효소활성의 상대적 증가가 낮았는데, 이 등(10)의 *Irpex lacteus*의 cellulase 경우 30분 이후부터 효소반응이 서서히 증가하다가 2시간에서 최대 효소활성을 나타낸 것보다는 짧았다.

요 약

토양, 퇴비 등의 자연계 분리원으로부터 β -glucosidase 활성이 높은 우수한 1균주를 분리하여 동정한 결과, *Aspergillus niger* SFN 416 균주로 확인되었다. 조효소의 최적 반응조건은 온도 36°C, pH 5.0, 반응 시간 40C 였으며, pH 4.5~6.5 및 60C 이하에서는 안정하였다. Ag⁺ 금속이온은 효소반응을 상당히 억

제시켰으나, Ca²⁺, Cu²⁺ 금속이온은 효소반응을 약간 촉진하였고 각각 0.5 mM, 5 mM 농도에서 양호하였다.

참고문헌

- Gorbacheva, I.V. and N.A. Rodionove. 1977. Studies on xylan degrading enzyme(1). *Biochem. Biophys. Acta.* **484**: 79-93.
- Ishaque, M. and D. Kluepfl. 1980. Cellulase complex of a mesophilic *Streptomyces* strain. *Can. J. Microbiol.* **26**: 183-189.
- John, W. 1982. Improvement of *T. reesei* strain through mutation and selective screening techniques. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 241-243.
- Chosh, A. 1981. Cellulase secretion from a hypercellulolytic mutant of *Trichoderma reesei* Rut-C 30. *Arch. Microbiol.* **140**: 126-133.
- Murao, S., R. Sakanoto and M. Arai. 1985. Purification of two avicelase from *Aspergillus aculeatus*. *Agri. Biol. Chem.* **49**: 3511-3515.
- Yoichi, K. 1986. Purification and properties of two endo-cellulase from *Penicillium purpurogenum*. *Agri. Biol. Chem.* **50**: 2989-2994.
- Wood, T.M. 1971. The cellulase of *Fusarium solani*: Purification and specificity of the β -(1,4)-glucanase and the β -D-glucosidase components. *Biochem. J.* **121**: 358-365.
- Tanaka, M., M. Taniguchi, T. Morinaga, R. Matsuno and T. Kamikubo. 1980. Cellulase productivity of *Eupenicillium javanicum*. *J. Ferment. Technol.* **58**: 149-154.
- Kawamori, M., K. Takayama and S. Takasawa. 1987. Production of cellulases by a thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* A-131. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 647-653.
- 이계호, 고정삼. 1975. 농산폐기물에서 발효사료의 생산에 관한 연구(제 2보), *Irpex lacteus*에 의한 cellulase의 생산 및 그 발효특성에 관하여. *한국농화학회지* **18**: 117-124.
- 문일식, 임한진, 이광열. 1992. 유기용매계 당화공정에 의한 목질계 연료용 알콜제조공정개발. 동자부대체에너지 개발사업보고서 92/C202-617API.
- Mandels, M. and E.T. Reese. 1957. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* **73**: 269-278.
- Raper, K.E. and D.I. Fennell. 1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Kohchi, C. and A. Tohe. 1986. Cloning of *Can-*

- didia pelliculosa* β -glucosidase gene and its expression in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **203**: 89-94.
15. 박관화, 오태광, 신재두. 1981. *Aspergillus niger*가 생산하는 섬유소 분해효소의 정제 및 특성. *한국농화학회지* **24**: 186-192.
16. Okada, G. 1985. Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 1257-1263.
17. Kurosawa, K., M. Hosoguchi, J. Hariantono, H. Sasaki and S. Takao. 1989. Degradation of tough materials by cellulase from *Corticium rolfsii*. *Agric. Biol. Chem.* **53**: 931-937.
18. 김봉수, 이영록. 1981. *Aspergillus phoenicis* K.U. 175이 생성하는 셀룰라제의 분리, 정제 및 효소학적 성질. *한국미생물학회지* **19**: 31-37.
19. Fumiyasu, F., T. Kudo and K. Horikoshi. 1985. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. No. 1139. *J. General Microbiol.* **131**: 3339-3347.

(Received July 14, 1993)