

*Lampteromyces japonicus*가 생산하는 Carboxymethyl Cellulase의 정제 및 특성

유관희* · 김준호¹ · 장형수²

상지대학교 이공과대학 생명과학과, ¹화학과, ²식품영양학과

Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Lampteromyces japonicus*

Kwan-Hee Yoo*, Jun-Ho Kim¹ and Hyung-Soo Chang²

Department of Life Science, ¹Chemistry and ²Food & Nutrition, Sang-Ji University, Wonju 220-702, Korea

(Received November 11, 2004)

ABSTRACT: A carboxymethyl cellulase (CMCase) has been isolated and purified from *Lampteromyces japonicus*. The molecular weight of CMCase was estimated to be 42 kDa by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis. The maximum activity of the purified CMCase was observed at pH 6.0 and 30°C, and stable for pH 4 to 7 to maintain 40% activity. The CMCase activity was activated by Al₂(SO₄)₃ and inhibited by SDS. Also, the enzyme activity was decreased by the addition of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), suggesting that the purified CMCase is metalloenzyme.

KEYWORDS: CMCase, *Lampteromyces japonicus*, pH

자연계에 널리 분포하고 있는 섬유소는 연간 약 40억톤 생산되는(Coughlan, 1990) 지구상에서 제일 많이 존재하는 유기물질로 대부분 육지식물의 줄기나 잎의 세포벽을 구성하는 성분을 이루고 있다. 고분자 유기물질인 섬유소는 활용가치가 높은 재생자원이나 현재 대부분 폐기되고 있다(Lee, 1976). 섬유소 중 미생물이 생산하는 미생물 섬유소는 99% 이상이 순수한 β -1,4-glucan 결합의 섬유소로 microfibril이 수소결합하여 3차원적 망상구조를 이루고 있다(Yamanaka *et al.*, 1989). 이에 따라 섬유소결정도, 습윤성, 흡수성 및 고강도, 고탄력성 등의 특성을 가지고 있어서 음향, 방위, 의료 등의 다양한 산업에 응용, 개발되고 있으며(Benziman *et al.*, 1980; Ko *et al.*, 2000), 최근에는 신소재로서 새롭게 부각되고 있다(Park *et al.*, 1997). 난소화성, 고점성을 이용한 섬유소는 지구상에서 가장 풍부한 탄소원으로, 연료, 식품, 화학약품 생산에 쓰이는 포도당을 섬유소분해효소(cellulase)를 이용하여 포도당의 생산을 증대시키는 면으로 많은 연구가 이루어 지고 있다(Saddler, 1993; Wyman *et al.*, 1986; Tagagi, 1978).

Cellulase 중 CMCase는 가축 장내에서 섬유소의 이용성 증진을 위해 xylanase와 혼용으로 가축의 생산성 증대, 사료 효율의 증대, 더 나아가서는 환경오염의 방지대책으로 연구가 진행되고 있다(정 등, 2003). 또한 섬유소 폐기

물로부터 섬유소 분해효소의 고생산(유 등, 2002)과 섬유소 펙틴 분해력이 있는 새로운 진균의 분리(서 등, 2003)에 대한 연구 등도 활발히 수행되고 있다.

본 실험에 사용한 화경버섯(*Lampteromyces japonicus*)은 주름버섯목 송이과에 속하는 야생버섯으로, 야긴에는 청백색의 인광을 발생하며 소화기 장애를 일으키는 버섯이나, 섬유소 분해능력이 매우 뛰어나다. 본 연구에서는 이 균주가 생산하는 섬유소분해효소(CMCase)를 분리·정제한 후 이 효소의 특성을 조사하여 섬유소를 이용한 가축의 사료화, 포도당 생산의 증대 등에 활용할 수 있는 기초적인 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

죽은 서나무에서 분리한 후 농업과학기술원 응용미생물과에서 배양하여 보관중인 *Lampteromyces japonicus*를 분양받아 공기균주로 사용하였다. PDA 사면배지에서 생육된 공기균주를 4°C 냉장고에 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

배지 및 배양방법

전보(유, 2003)와 같이 기본배지 1L에 dextrose 12g, yeast extract 17g, (NH₄)₂HPO₄ 2g, glutamine 2g,

*Corresponding author <E-mail: khyoo@mail.sangji.ac.kr>

$Al_2(SO_4)_3 \cdot 14H_2O$ 1.5 g을 첨가한 후 pH 6.0으로 조정된 최적배지 6 L를 121°C에서 15 psi로 20분간 고온가압살균한 다음 공시균주를 접종하여 15일간 배양한 배양액을 실험재료로 사용하였다.

효소의 활성측정 및 정량

CMCase 활성은 Kanda *et al.*(1976)의 방법으로 측정하였다. 1% carboxymethyl cellulose(CMC)를 함유한 0.2 M sodium acetate buffer(pH 5.0) 0.5 ml에 조효소액 0.5 ml을 가하여 40°C 항온수조에서 30분간 반응시킨 후 유리되는 환원당을 Somogyi(1962) 법으로 520 nm에서 비색정량하였다. Glucose 표준품을 사용하여 같은 방법으로 standard curve를 작성하였으며, 효소활성도는 1분당 1 μ mol의 glucose를 생성하는 효소량을 1 unit로 하여 활성의 비교단위로 하였다. 효소의 단백질 정량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 측정하였으며 bovine serum albumin 표준곡선을 이용하여 환산하였다.

효소의 정제

모든 효소의 정제 과정은 4°C에서 수행하였으며, 각 정제과정마다 CMCase 활성과 효소의 농도를 측정하였다. 최적화배지에서 15일간 배양한 배양액을 4°C에서 4,500×g로 20분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 ammonium sulfate로 30%에서 80%까지 분별 침전시키고 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)에 녹인 다음 같은 완충용액으로 24시간 투석하였다.

투석한 침전물을 동일한 완충용액으로 평형화한 DEAE-sepharose CL-6B 컬럼(20×200 mm)에 주입하고 NaCl 용액 0~0.5 M을 이용한 농도구배법으로 용출시켰다. 활성부분은 80% ammonium sulfate로 침전시키고 24시간 동안 20 mM sodium phosphate 완충액(pH 6.5)에 투석시킨 후 동일한 완충용액으로 미리 평형시킨 Sephacryl S-200 컬럼(20×700 mm)에 흘려주었다. 활성 부분을 모아 농축·투석한 후 fast protein liquid chromatography(FPLC)의 MonoQ 컬럼(5.0×100 mm)에 주입하였다. 완충용액 3 ml로 씻어준 후 0~0.8 M NaCl의 농도기울기로 분획당 용출량은 1 ml, 용출속도는 분당 1 ml로 용출시켰으며, 각 분획의 효소활성을 측정하고 후 활성이 있는 부분을 모아 실험에 사용하였다.

분자량 측정

분리한 단백질의 분자량은 12% SDS-PAGE를 이용하여 측정하였다. 표준단백질로는 phosphorylase b(96 kDa), bovine serum albumin(69 kDa), ovalbumin(43 kDa), carbonic anhydrase(30 kDa), soybean trypsin inhibitor(20 kDa), α -lactalbumin(14.4 kDa)를 사용하였으며, gel은 coomassie blue R-250과 silver staining kit로 염색하였다.

효소의 이화학적 특성 조사

L. japonicus 균주가 생산하는 CMCase의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 10°C에서 90°C까지 각각의 온도에서 효소를 30분간 열처리한 다음 40°C에서 30분간 기질과 반응시킨 후 잔류활성을 Somogyi(1962) 방법으로 조사하였다. pH에 대한 안정성 조사를 위해 pH를 3.0에서 11.0까지 조정하여 40°C에서 효소를 30분간 처리한 후 최적 조건을 pH 6.0으로 조정하여 기질을 첨가하고 40°C에서 30분 반응시킨 다음 잔류활성을 위와 동일한 방법으로 조사하였다. CMCase의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 KCl, Al_2O_3 , $CaCl_2$, $FeCl_3$, $AgNO_3$, $BaCl_2$, $MgSO_4$, $CuSO_4$, $HgCl_2$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$ 등 11 종류의 금속염을 효소반응액에 최종농도가 각각 1 mM이 되도록 첨가한 다음 40°C에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 Somogyi(1962) 방법을 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성에 미치는 각종 저해제에 대한 영향을 조사하기 위하여 PMSF, SDS, EDTA, 1,10-phenanthroline, KCN, L-cysteine 등 6 종류의 저해제를 효소반응액에 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 위와 동일한 방법으로 조사하였다. 한편, EDTA 농도에 의한 효소의 활성변화를 조사하기 위하여 효소반응액에 EDTA를 10^{-1} 에서 10^{-6} M의 농도가 되도록 첨가하여 40°C에서 30분간 처리한 후 위와 동일한 방법으로 조사하였다.

결과 및 고찰

효소의 정제

*L. japonicus*가 생산하는 CMCase는 Table 1에서와 같이 4단계를 거쳐 분리·정제하였다. Ammonium sulfate(30~80%)로 분별 침전시킨 후 활성을 갖는 효소를 DEAE-Sephacryl S-200 컬럼에 흘린 결과 활성을 갖는 CMCase는 컬럼에 붙었으며, 0~0.5 M NaCl 농도기울기에 의해 활성효소가 용출되었다.

활성 부분을 Sephacryl S-200을 이용한 분리과정에 이용하였다(Fig. 1). Sephacryl S-200의 결과 활성이 있는 부분을 농축 및 투석한 후 최종단계인 Mono Q 컬럼을 이용한 FPLC의 분리 결과 한개의 피크가 나타나는 chromatogram을 보였으며, 이 피크에서 CMCase 활성을 확인하였다(Fig. 2).

분자량 측정

FPLC에 의해 정제된 CMCase의 분자량을 측정하기 위하여 12% SDS-PAGE를 사용하여 전기영동을 실시한 결과 Fig. 3과 같이 단일 밴드를 보였으며, 본 효소의 분자량은 전기영동의 결과로부터 표준단백질과 상대 이동거리를 비교한 결과 42 kDa인 것으로 나타났다. *L. japonicus*가 생산하는 CMCase의 분자량은 *Bacillus stearothermophilus*(Kim *et al.*, 1997)가 생산하는 92 kDa의 CMCase와 *P.*

Table 1. Purification of carboxymethyl cellulase from *Lampteromyces japonicus*

Purification step	Total activity ^a (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg protein)	Recovery (%)	Purification fold
Crude extract	29,803	12,800	2.3	100.0	1.0
Ammonium sulfate	17,408	273.2	63.7	58.4	27.7
DEAE-Sepharose CL-6B	6,125	27.7	221.1	20.6	96.1
Sephacryl S-200	5,534	4.0	1,383.5	18.6	601.5
MonoQ (FPLC)	1,169	0.3	3,896.7	3.9	1,694.2

^aEnzyme assay for the CMCase was carried out with 1% CMC in phosphate buffer (pH 6.5) at 40°C for 30 min. The reaction was stopped by 98°C for 10 min. The absorbance of the reaction mixture was measured at 280 nm. Enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme producing 1 μ mole of glucose per min. Protein concentration was determined according to the Lowry method.

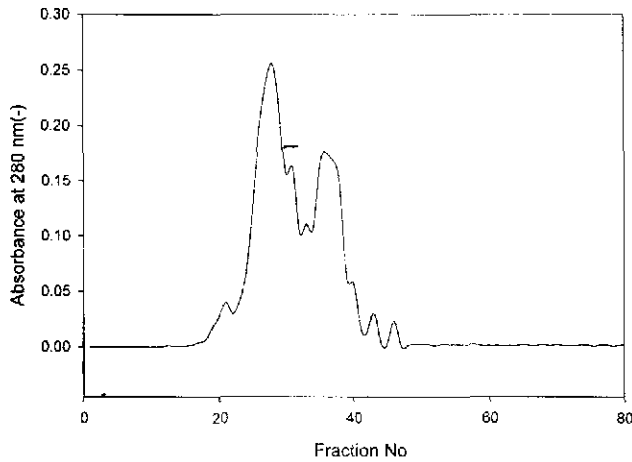


Fig. 1. Elution profile of cellulase with Sephacryl S-200 column. Fractions containing CMCase activity were pooled and indicated as a bar in the chromatogram.

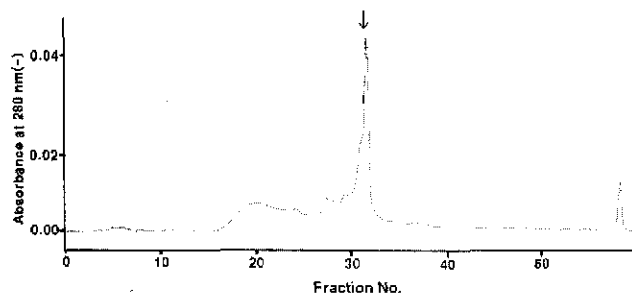


Fig. 2. FPLC profile of the fractions obtained from Sephacryl S-200 column chromatography. Mono-Q ion exchange column was used and the indicated peak by an arrow showed a CMCase activity.

oryzae (Kim *et al.*, 1982)가 생산하는 80 kDa, *Penicillium verruculosum* (Kim *et al.*, 1993)이 생산하는 52 kDa, *S. rugosoannulata* (유 등, 2002)가 생산하는 54 kDa의 CMCase 보다는 작은 것으로 나타났다.

효소의 특성

열에 대한 안정성: *L. japonicus*가 생산하는 CMCase의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여 10°C에서 90°C

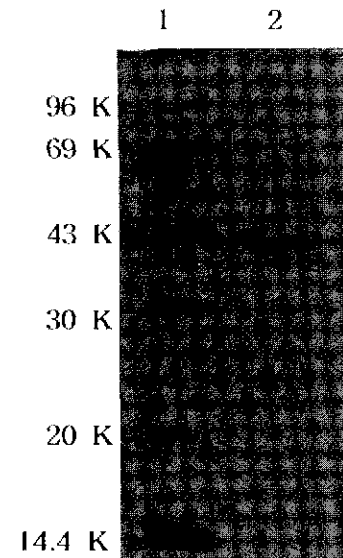


Fig. 3. SDS-PAGE of the purified CMCase. Lane 1. protein marker; lane 2. CMCase indicated by an arrow.

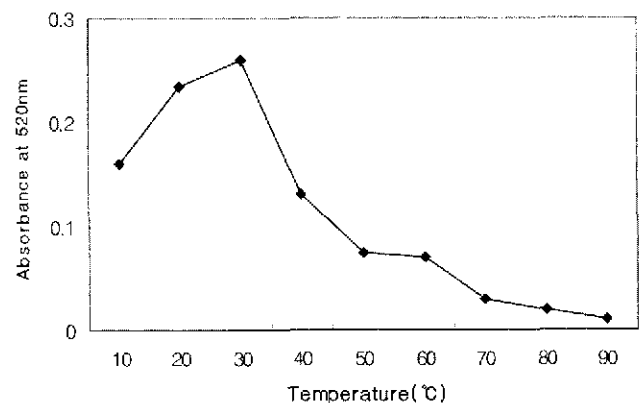


Fig. 4. Thermal stability on carboxymethyl cellulase activity.

까지 온도를 달리하여 각각의 온도에서 30분간 열처리한 후 40°C에서 기질과 반응시켜 그 잔존활성을 조사한 결과 Fig. 4에서와 같이 20°C부터 40°C 사이에서는 비교적 안정하였으나, 50°C 이상에서는 불안정한 것으로 보아 이효소는 중온성 효소인 것으로 판단된다. *S. rugosoannulata* (유 등, 2002)와 *B. stearotherophilus* (Kim *et al.*, 1997)

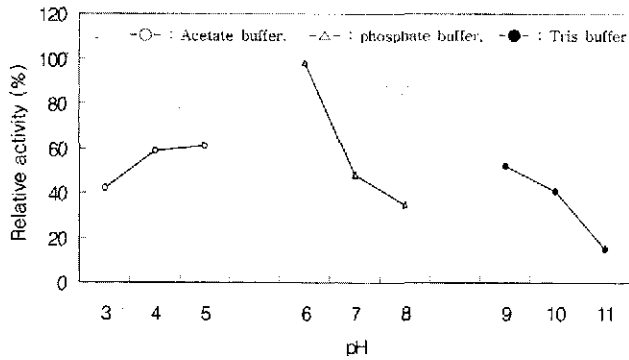


Fig. 5. pH stability on carboxymethyl cellulase activity. Enzyme reaction was carried out at 30°C for 30 min.

는 50°C까지 안정하나 60°C 이상에서 불안정한 것으로 나타났으며, *P. oryzae*(전, 1979)는 40°C까지는 안정하나 50°C 이상에서는 불안정한 것으로 보고되었다.

pH에 대한 안정성: pH 3.0에서 11.0 조건에서 CMCCase의 잔존활성을 측정한 결과 Fig. 5와 같이 pH 6.0에서 최적 효소활성을 나타냈으며, pH 4, 5, 6에서 60% 이상의 안정성을 나타냈다. 이 결과로 보아 이 효소는 산성 섬유소분해효소인 것으로 판단된다.

금속염의 영향

분리 정제한 CMCCase의 활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 최종농도가 1 mM이 되도록 13종류의 금속염을 첨가하여 40°C에서 30분간 효소를 처리시킨 후 효소의 활성을 조사한 결과는 Table 2와 같았다. 조사 결과, 본 효소는 $Al_2(SO_4)_3$ 에서 가장 활성이 높았고, $BaCl_2$ 첨가 시에도 비교적 활성이 좋았으나, 그 외의 금속염에서는 비

Table 2. Effect of inorganic salts on carboxymethyl cellulase activity

Inorganic salts (1 mM)	Relative activity	Final pH
None	100	6.2
KCl	46	6.3
$BaCl_2$	121	6.2
$CaCl_2$	2	6.1
$CoCl_2$	29	6.1
$CuSO_4$	2	5.1
Li_2SO_4	2	6.1
$MnSO_4$	25	6.0
$ZnSO_4$	45	5.3
$FeSO_4$	23	5.7
$MgSO_4$	4	6.2
$AgNO_3$	16	6.1
$Al_2(SO_4)_3$	182	3.4
Na_2MoO_4	7	4.6

The enzyme was preincubated with various metal ions in 0.2M sodium acetate buffer (pH 6.0) for 30 min at 40°C. After incubation, the mixture was subjected to the CMCCase assay. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

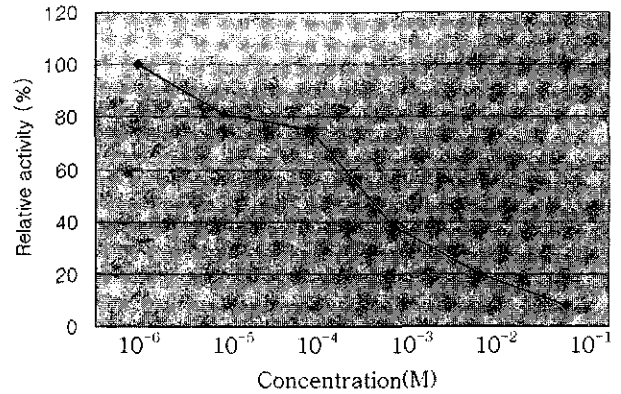


Fig. 6. Effect of ethylene diamine tetraacetic acid on carboxymethyl cellulase activity from *Lampteromyces japonicus*.

교적 활성이 낮았다. 독청버섯아재비(유 등, 2002)에서 $CoCl_2$ 첨가시 효소활성이 좋았다는 결과와는 상이하게 나타났다.

EDTA 농도에 따른 영향

EDTA의 농도에 따른 효소활성의 변화는 Fig. 6과 같았다. CMCCase는 EDTA 농도가 증가함에 따라 활성은 상대적으로 감소하였으며, 10^{-3} M EDTA를 첨가 하였을 때부터 활성이 급격히 감소하였다. 이 결과로 보아 *L. japonicus*가 생산하는 CMCCase는 효소 구성성분에 금속이온을 갖고 있는 metalloenzyme으로 추정되며, apoenzyme과는 약하게 결합되었을 것으로 추정된다.

저해제에 대한 영향

효소활성에 미치는 6종의 저해제에 대한 영향을 조사하기 위하여 저해제의 최종농도를 1 mM로 조정된 후 효소에 첨가하여 50°C에서 30분간 효소를 작용시킨 후 잔존활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. SDS와 EDTA 첨가시 효소 활성이 크게 감소하는 것으로 나타났다. 본 효소가 EDTA 첨가 농도에 따라 상대적으로 효소활성이 감

Table 3. Effect of inhibitors on carboxymethyl cellulase activity

Inhibitors	Relative activity (%)	
	1 mM	
None	100	
PMSF	100	
SDS	42	
EDTA	38	
1,10-phenanthroline	100	
Cysteine	98	
KCN	90	

The enzyme was preincubated with various inhibitors in sodium acetate buffer (pH 6.0) for 30 min at 40°C. After incubation, the mixture was subjected to the enzyme assay. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none. EDTA; ethylenediamine tetraacetic acid, PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride, SDS; sodium dodecylsulfate.

소되었으며, 10^{-3} M EDTA 첨가시 효소활성이 크게 감소하는 것으로 보아 효소 구성성분에 cofactor로 금속이온이 존재할 것으로 추정되며, 또한 apoenzyme과는 약하게 결합되어 있을 것으로 판단된다. 또한 SDS에 크게 저해받는 것으로 보아 이 효소에는 S-S기가 존재할 것으로 생각되며, 소수성 상호작용이 이 효소활성에 영향을 주는 것으로 판단된다. 환경버섯이 생산하는 CMCCase는 독청버섯아재비(유 등, 2002)가 생산하는 CMCCase에서 KCN과 cysteine에 의해 저해된다는 결과와는 상이하게 나타났다.

적 요

섬유소분해효소(CMCCase)를 산업적으로 이용하기 위한 기초자료를 제공하고자 섬유소분해능이 우수한 *L. japonicus*로부터 CMCCase를 분리·정제하였다. *L. japonicus*의 배양액으로부터 4단계를 거쳐 분자량이 42 kDa인 CMCCase를 분리 정제하였다. 이 효소는 pH 6.0에서 최적의 활성을 보여주는 acidic CMCCase로서 30°C에서 최대 활성을 나타냈다. EDTA에 의해 활성이 저해되는 것으로 보아 metalloenzyme으로 추정되며, SDS에 의해 저해되는 것으로 보아 S-S기를 갖고 있는 효소로 판단된다. $Al_2(SO_4)_3$ 와 $BaCl_2$ 에서는 효소 활성이 높았으나 그 이외의 금속염에서는 효소 활성이 낮았다.

감사의 글

본 연구를 수행하는 데 많은 도움을 주신 농촌진흥청의 김양섭 박사와 석순자 연구원님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한 본 연구는 2002년도 상지대학교 교내 연구비의 지원으로 이루어졌음을 밝히며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 서원숙, 홍진영, 최홍서, 김주환, 김영민. 2003. 섬유소-펙틴 분해력이 있는 새로운 *Aspergillus tubingensis*의 분리와 특성 규명. 한국균학회지 **31**(2): 124-128.
- 유관희. 2003. 환경버섯의 배양조건에 따른 균사생장 및 섬유질 분해효소 활성에 관한 연구. 한국균학회지 **31**(1): 12-21.
- _____, 장형수. 2002. 독청버섯아재비가 생산하는 Carboxymethyl Cellulase의 정제 및 효소학적 특성. 한국균학회지 **30**(2): 113-118.
- 유승수, 김경철, 오영아, 정선용, 김성준. 2002. 섬유소 폐기물을 이용한 사상균 FJ1의 섬유소분해효소의 고생산. 한국미생물·생명공학회지 **30**(2): 172-176.
- 정원형, 양시용, 송민동, 하종규, 김창원. 2003. Xylanase, cellulase의 생산성이 높은 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소생산을 위한 배지조건의 최적화. 한국미생물·생명공학회지 **31**(4): 383-388.
- Benziman, M., Haigler, C. H., Brown, Jr. R. M., White, A. R. and Cooper, K. M. 1980. Cellulose biogenesis; Ploymerization and crystallization are coupled processes in *Acetobacter xylinum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 6678-6682.
- Coughlan, M. 1990. In "Microbial Enzymes and Biotechnology" (W. M. Fogarty and C. T. Kelly, eds.), pp. 1-36. Elsevier Applied Science, London.
- Kanda, T., Wakabayashi, K. and Nishizawa, K. 1976. Purification and properties of an endocellulase of avicelase type from *Irpex lacteus* (*Polyporus tuliferge*). *J. Biochem.* **79**: 977-988.
- Kim, J. H., Lee, J. C., Lee, Y. K., Kim, K. H., Chun, S. B. and Chung, K. C. 1993. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase IV from *Penicillium verruculosum*. *J. Mycology* **21**: 28-37.
- Kim, S. H., Cho, S. G. and Choi, Y. J. 1997. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 305-309.
- Ko, J. Y., Shin, K. S., Yoon, B. D. and Choi, W. Y. 2000. Isolation and identification of *Acetobacter xylium* GS11 producing cellulase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 139-146.
- Lee, K. J. 1976. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Kor. J. Pharmacogn.* **7**: 85.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J. and Randall, A. J. 1951. Protein measurement with the floin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265.
- Saddler, J. N. 1993. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. C. A. B, International, Oxford.
- Somogyi, M. 1962. Note on sugar determination. *J. Biochem.* **195**: 19-23.
- Tagagi, M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in the presence of manganese compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 165-170.
- Wyman, C. E., Spindler, D. D., Grohman, K. and Lastick, S. M. 1986. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brethanomyces clausenii*. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 221-228.
- Yamanaka, S., K. Watanabe, N. Kitamura, M. Iguchi, S. Mitsuhashi, Y. Nishi and M. Uryu. 1989. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. *J. Mat. Sci.* **24**: 3141-3145.
- Yoshinaga, F. 1996. Development of production process and application of biocellulose, a new material. *Bioscience and Industry.* **54**: 22-25.