

연구노트

Trichoderma reesei KCTC 6952로부터 분비된 β-glucosidase의 특성

박성희 · 오민정 · 이정래¹ · 권석형^{1,2} · 최영욱² · 이민원² · 김근성*
중앙대학교 식품공학과, ¹(주)렉스진바이오텍, ²중앙대학교 약학대학

Characteristics of β-Glucosidase Secreted by Trichoderma reesei KCTC 6952

Sung-Hee Park, Min-Jung Oh, Jeongrai Lee¹, Suk-Hyung Kwon^{1,2},
Young-Wook Choi², Min-Won Lee², and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹Rexgene Biotech Co. Ltd.

²College of Pharmacy, Chung-Ang University

Trichoderma reesei KCTC 6952 possesses cellulase system consisting of three enzymatic components necessary to synergistically hydrolyze crystalline cellulose, among which β-glucosidase effectively releases glucose from glycoside derivatives. β-Glucosidase of *T. reesei* KCTC 6952 grown in modified Mandels' medium showed maximum activity (1.33 unit/mL) 4 days after initiation of growth. Optimal reaction conditions of the enzyme were 50 mM sodium acetate (pH 5) at 70°C for 10 min. Enzymatic activities stabilized below 50°C at pH range of 4-5. Results show β-glucosidase exerted its catalytic activities at relatively high temperatures and broad pH range.

Key words: *Trichoderma reesei*, β-glucosidase, activity, stability, spent culture medium

서 론

식물세포막의 주요 구성성분인 cellulose는 포도당이 β-1,4-glycosidic linkage로 결합된 중합체로 자연계에 널리 분포하는 고분자의 탄수화물자원이다. 그러나 고분자 섬유소인 cellulose 자체의 이용면에 있어서는 매우 제한적이고 특히 초식동물 이외의 대부분 포유동물들의 경우에 cellulose가 함유하고 있는 영양학적 유효성분의 이용면에서도 극히 미미하며, 단지 반추동물에서 cellulose를 분해하는 *Ruminococcus*와 같은 장내 미생물들만이 영양원으로 이용하고 있을 뿐이다(1). 따라서 이와 같이 이용이 미미한 cellulose의 이용효율을 향상시키기 위하여 cellulose를 효소에 의하여 glucose, cellobiose, cello-oligosaccharide 혹은 저분자 섬유소로 가수분해를 하여 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이와 같은 고분자 섬유소인 cellulose의 가수분해에 이용되는 대표적인 분해 효소인 cellulase는 한 종류의 효소가 아닌 세 종류의 효소로 구성된 복합효소이다. 이러한 cellulase는 cellulose에 무작위로 작용하여 oligomer를 형성시키는 endoglucanase(carboxymethyl cellulase), 형성된 oligomer를 cellobiose 단위로 분해 시키는 exoglucanase(avicel-

lase), 그리고 마지막으로 cellulose로부터 최종산물인 glucose를 유리시키는 β-glucosidase(cellobiase)로 이루어져 있다(2-5). 그러므로 cellulase는 생산하는 미생물에 따라서 endoglucanase, exoglucanase 그리고 β-glucosidase의 분비량이 각기 다르기 때문에 사용목적에 따라서 가장 적합한 cellulase를 선정해야한다.

Cellulose로부터 glucose를 유리시키는데 직접적으로 영향을 미치는 β-glucosidase는 cellulose 뿐만 아니라 다양한 기질을 인식할 수 있어서 식품, 화학, 세척제 및 직물공업 등에서는 전분당으로부터 여러 소당을 유리시키는데 이용되며, 특히 오랜 지 슈스와 와인생산 공정 중에도 이용되고 있는 유용한 효소이다(6). 이 효소는 식물, fungi, yeasts, bacteria와 동물의 조직 등에 분포하며(7) 또한 많은 미생물로부터 생산되어지는데, 특히 *Trichoderma*속, *Clostridium*속, *Bacillus*속, *Pyrococcus*속 등을 비롯하여, *Aspergillus niger*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Pediacoccus halophilus*, *Bifidobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. 등이 생산하는 β-glucosidase에 관한 연구가 현재까지 이루어진 바 있다(8-12). 한편 Tamas 등(6)은 *A. niger*와 *T. reesei*를 혼합배양하여 β-glucosidase의 활성을 개별 배양할 때 보다 높이기 위한 연구를 수행한 바 있으며, 그리고 β-glucosidase를 이중간에 발현시켜서 효소수율을 증대시키기 위한 연구도 진행된 바 있다(2,13). 그리고 Son 등(1)은 분해중인 볏짚에서 분리한 *Trichoderma* sp.가 활성이 높은 β-glucosidase를 생산하며, 또한 조효소가 50°C, pH 5에서 안정하다고 보고한 바 있다. 그러나 *Trichoderma*속은 강한 활성의 cellulase를 생산하는 것으로 알려져져 cellulase의 활성에 대하여는 많은 연구가 이루어져 왔으나

*Corresponding author: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansong-Si, Gyunggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3032
Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

이 속이 생산하는 β -glucosidase의 활성에 대한 연구는 아직 미미하다.

그러므로 본 연구에서는 cellulose뿐만 아니라 isoflavone glycoside와 같이 glucose를 함유한 다른 glycoside 유도체들로부터 glucose를 효율적으로 유리할 수 있는 β -glucosidase를 확보하기 위하여 위에서 언급한 바와 같이 비교적 높은 활성을 갖는 cellulase system을 보유한 것으로 알려진 T. reesei KCTC 6952가 생산하여 분비하는 β -glucosidase의 조효소액을 준비하여 그 조효소액의 효소활성을 측정하고 또한 효소활성이 온도와 pH에 대하여 어느 정도 안정한 지를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

T. reesei KCTC 6952는 KCTC(Korean Collection For Type Culture)로부터 분양받았다. 균주보존 및 포자형성용 배지는 potato dextrose agar(PDA) 배지를 사용하였으며, 전배양배지는 Emerson의 YpS배지를 사용하여 3일간 전배양 하였다(14). 효소생성유도용 배지는 변형된 Mandels의 배지를 제조하여 사용하였다(6,13).

균주배양 및 조효소액 조제

한천고체배지상의 T. reesei KCTC 6952를 1 백금이정도 취하여 YpS배지에 접종하고 26°C에서 3일간 진탕 배양하여 전배양액을 준비하였다. 그리고 효소생성유도용 배지에 전배양액을 1% 접종하여 26°C에서 5일간 200 rpm으로 진탕 배양하면서 초기 2일간은 12시간 간격으로 그 후엔 24시간 간격으로 균사체가 포함된 배양액을 취하여 원심분리(17,000×g, 5 min) 후 얻어진 상층액으로 β -glucosidase 활성을 측정하였으며, 상층액이 제거되고 남은 균사체를 95°C에서 일정무게가 유지될 때까지 건조하여 그 무게를 건조균체량(mg/mL)으로 표기하였다. 실험에 이용된 조효소액은 효소생성유도용 배지에 전배양액을 1% 접종하여 26°C에서 4일간 200 rpm으로 진탕 배양한 후 배양액을 원심분리하여 얻어진 상층액을 사용하였다.

β -Glucosidase 활성 측정법

Kim 등(2)이 사용한 Kohchi법을 응용하여 5 mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG)를 포함한 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) 1 mL와 조효소액 0.1 mL을 혼합하여, 50°C에서 10분간 반응시킨 후 미리 냉각된 1 M Na₂CO₃ 1 mL를 가하여 반응을 정지시킨 후, 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 반응조건에서 1 μ mol/min의 p-nitrophenol(PNP)를 생산하는데 필요한 효소활성을 1 unit로 정의하였다(1).

효소활성과 효소안정성에 대한 pH의 영향

β -Glucosidase 활성에 미치는 pH의 영향을 알아보기 위하여 pH 3은 50 mM sodium acetate/HCl, pH 4와 5는 50 mM sodium acetate/acetic acid, pH 6과 7은 50 mM sodium phosphate와 pH 8과 9는 50 mM Tris/HCl buffer system을 이용하여 pH 3에서부터 pH 9까지 각기 다른 pH를 갖는 반응용액을 준비하였다(15). 그리고 조효소액을 각각 다른 pH를 갖는 반응용액과 혼합한 후 β -glucosidase 활성을 측정하였다. 그리고 β -glucosidase의 pH에 대한 활성안정성을 측정하기 위하여 위와 같이 조효소액을 pH 3에서부터 pH 9까지 각기 다른 pH별 반응용액과 혼합한 후 30°C에서 1시간 동안 방치하였다(8). 그리

고 각기 다른 pH별로 방치된 조효소액내의 β -glucosidase의 잔여활성을 측정하였다.

효소활성과 효소안정성에 대한 온도의 영향

β -Glucosidase 활성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 조효소액을 반응용액(pH 5)과 혼합한 후 30°C부터 80°C까지 10°C 간격으로 각기 다른 온도에서 효소활성 반응을 시킨 후 β -glucosidase 활성을 측정하였다. 그리고 β -glucosidase의 온도에 대한 활성안정성을 측정하기 위하여 조효소액을 50 mM sodium acetate buffer(pH 5)와 혼합한 후 위와 같이 30°C에서부터 80°C까지의 각기 다른 온도에서 2시간 동안 방치 후 실온으로 방냉하였다(15). 그리고 방치된 조효소액내의 β -glucosidase의 잔여활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

생장시간별 β -glucosidase 활성 측정

T. reesei KCTC 6952를 β -glucosidase 생성유도용 배지에서 배양하면서 배양시간별 균체량 및 β -glucosidase 효소활성의 변화를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 균체량은 배양 3일째까지 증가하였으며 이때 증가 속도는 배양시간이 경과하면서 서서히 감소하였으나, 배양 3일 이후에는 서서히 균체량이 감소되는 경향을 보였다. 반면 β -glucosidase의 활성은 배양 1일째까지는 효소활성이 거의 나타나지 않았으나, 배양 1.5일째부터 효소활성의 측정이 가능할 만큼 효소가 생성되었다. 배양 2일째에는 0.63 unit/mL로 최고 효소활성치의 48%에 달하는 효소활성을 보였으며, 정지기상태인 배양 4일째에는 효소활성이 1.33 unit/mL로 최고활성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나 배양 4일째이후부터 효소활성이 급격히 감소하여 배양 5일째에는 효소활성이 0.40 unit/mL를 나타내어 효소활성이 배양 4일째의 최고치보다 70%가 감소한 활성을 관찰 할 수 있었다. Son 등(1)이 보고한 분리균 Trichoderma sp. C-4의 경우 배양 6일 후 최고의 효소활성을 나타내었다는 결과와는 다소 시간적 차이가 있으나 효소활성이 배양 중 계속 증가하거나 유지되지 않고 어느 시점이후부터 감소하는 동일한 경향을 나타냈다. 한편 Fig. 1의 결과와 관련하여 배양액중의 β -glucosidase의 활성을 저해할 수 있는 물질인 β -glucosidase 가수분해 효소, 혹은 효소억제제나 산성물질 등이 배양 4일 이후에 균체 외로 분비되기 때문에 효소활성이 그와 같이 급격히 감소한 것으로 유추

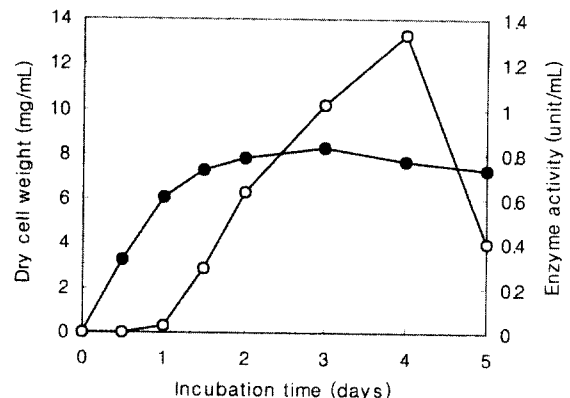


Fig. 1. Cell growth (-●-) and β -glucosidase activity (-○-) of T. reesei KCTC 6952 in modified Mandels' medium during incubation at 26°C.

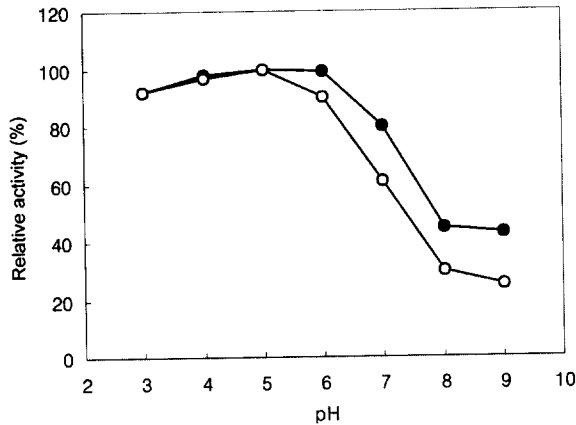


Fig. 2. Effect of pH on activity (●) and stability (○) of β -glucosidase from *T. reesei* KCTC 6952.

되나 정확한 원인은 추후 보충실험을 통하여 규명이 되어야 할 것으로 사료된다.

효소활성과 효소안정성에 대한 pH의 영향

효소와 기질을 pH 3과 pH 9범위에서 각기 다른 pH를 갖는 완충반응용액과 혼합한 후 효소활성을 측정된 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 pH 5에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH 6 이상에서 감소하기 시작하여 pH 8과 pH 9에서는 최대효소활성과 비교하여 55% 이상 활성이 감소하였다. 그러나 pH 4과 pH 6에서는 최대효소활성을 보였던 pH 5와 비슷한 효소활성을 나타내었으며, pH 3에서는 최대 효소활성의 92% 정도의 활성을 나타낸 것으로 미루어 보아 산성에 안정적인 β -glucosidase임을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는 *Trichoderma* sp. Sp-571의 cellulase활성에서와 동일한 경향을 보였다(16). 그리고 이와 같은 결과는 또한 *Sporotrichum cellulophilum*, *Xylaria regalis*, *Penicillium verrucosum*에 의하여 생산된 β -glucosidase의 최적 pH와 유사하였으나(9,15,17), pH 3.5에서 최대활성을 보인 *Aspergillus niger* SNF-416의 β -glucosidase 보다는 최적 반응 pH가 약산성으로 나타났다(8). 한편 β -glucosidase의 pH에 대한 활성안정성을 측정된 결과도 Fig. 2에 나타내었다. 본 연구에 이용된 *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase는 pH 5와 pH 6사이에서 비교적 안정적이었으며 이는 *S. cellulophilum*과 *P. verrucosum*의 β -glucosidase와 유사한 pH범위에서 활성안정성을 나타내었다(9,17). 반면 *A. niger*의 β -glucosidase는 pH 4.5 이상에서 급격히 효소활성이 감소한다고 보고하였다(8). 그러므로 본 연구에 이용된 *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase는 *A. niger*의 β -glucosidase에 비하여 더 넓은 pH의 범위에서 안정적임을 알 수 있었다. 그러므로 pH에 대한 효소의 활성과 활성안정성에 관한 연구 결과에 의하면 *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase는 pH 5에서 가장 안정적이며 pH 6 이상에서 활성이 급격히 감소됨을 알 수 있었다. 한편 Tamas 등(6)은 *T. reesei*와 *A. niger*를 혼합하여 배양할 때 배양기간 중 배양액의 pH를 pH 5로 지속적으로 적정하여 줌으로서 혼합균주가 생성한 β -glucosidase의 최대 활성을 지속적으로 유지할 수 있었다고 보고하였다.

효소활성과 효소안정성에 대한 온도의 영향

최적 pH 5에서 반응온도별로 *T. reesei* KCTC 6952 조효소액의 효소활성과 효소안정성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내

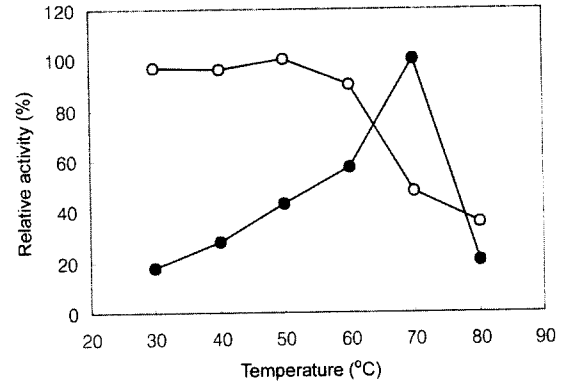


Fig. 3. Effect of temperature on activity (●) and stability (○) of β -glucosidase from *T. reesei* KCTC 6952.

었다. *T. reesei* KCTC 6952 조효소액은 Fig. 3에 제시된 바와 같이 70°C에서 최대 효소활성을 나타내었으며, 이러한 결과는 *S. cellulophilum*과 *P. verrucosum*의 β -glucosidase의 반응온도에 대한 효소활성 실험에서 얻은 결과와 동일한 경향을 나타내었다(9,17). 그러나 *Cellulomonas* sp.와 *A. niger* 그리고 *Trichoderma* sp. SO-571들의 β -glucosidase는 각각 42°C, 58°C 그리고 60°C에서 최대 효소활성을 갖는 것으로 보고 되었다(5,8,16). 본 연구를 위하여 선택된 *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase 조효소액은 전자의 경우와 같이 비교적 높은 온도에서 최대 효소활성을 갖으며 비교적 고온에서 안정적이라고 사료된다. Sung 등(8)과 Park 등(18)은 동일한 균주가 생산한 β -glucosidase의 조효소액과 정제된 효소액의 최대 활성온도를 비교하는 연구를 수행하여 정제된 효소액은 58°C에서 최대 효소활성을 갖는 반면, 조효소액은 36°C에서 최대효소활성을 나타냈음을 보고하였다. 한편 본 연구에서 *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase 조효소액의 온도에 대한 활성안정성을 측정된 결과도 또한 Fig. 3에 나타내었다. 조효소액은 50°C까지는 열에 대한 안정성을 보여 효소활성이 안정적이었으나 60°C 이상에서는 효소활성이 감소하기 시작하여 70°C에서는 최대 효소활성에 비하여 52% 정도 감소한 효소활성을 나타냈다. *T. reesei* KCTC 6952의 β -glucosidase 조효소액은 Chun 등(17)이 보고한 *P. verrucosum*의 β -glucosidase의 열안정성에 대한 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 그리고 *Trichoderma* sp. C-4의 β -glucosidase가 60°C 이상에서 효소활성이 감소한다는 Son 등(1)의 결과와도 유사하였다. 그러나 Kurosawa 등(19)은 *Corticium rolfsii*가 생산하는 β -glucosidase는 65°C까지 활성이 아주 안정하다고 보고하였다.

요 약

Trichoderma reesei KCTC 6952는 고분자 섬유소인 cellulose를 분해하는데 관여하는 3종류의 효소로 구성된 cellulase system을 보유하고 있다. 그 중 β -glucosidase는 glucose를 함유한 glycoside 유도체들로부터 glucose를 효율적으로 유리할 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 변형된 Mandels의 배지를 사용하여 *T. reesei* KCTC 6952를 배양하면서 배지로 분비된 β -glucosidase를 조효소액으로 회수하여 조효소액내의 β -glucosidase 활성을 측정하고, 또한 효소활성이 온도와 pH에 대하여 어느 정도 안정한 지를 조사하였다. 그 결과 배양 4일째에 β -glucosidase의 효소활성이 최고(1.33 unit/mL)에 도달하였으

며, 조효소액내의 β -glucosidase의 최적 반응 조건은 pH 5과 70°C에서 10분간 반응하는 것이었으며, 그리고 효소의 안정성을 실험한 결과에 의하면 pH 4-5의 범위에서, 50°C 이하에서는 안정적이었다. 그러므로 결론적으로 본 연구를 위하여 선택된 β -glucosidase 조효소액은 비교적 높은 온도와 넓은 pH범위에서 촉매반응을 일으킬 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 건강기능제품개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(01515-FS00-0501-0025).

문헌

1. Son YJ, Sul OJ, Chung DK, Han IS, Choi YJ, Jeong CS. Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulases. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 4: 346-353 (1997)
2. Kim JH, Lee BR, Moo YP. Overproduction and secretion of β -glucosidase in *Bacillus subtilis*. J. Microbiol. Biotechnol. 8: 141-145 (1998)
3. Kim DW, Kim GS, Koh SD, Whang HS, Chung CH, Kim TS. Sugar production mechanism by the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials: Adsorption of cellulase components from *Trichoderma viride* on cellulose. HWAHAK KONGHAK. 30: 99-105 (1992)
4. Park JN, Kim HO, Shin DJ, Kim HJ, Lee HB, Chun SB, Bai S. Cloning of a *Paenibacillus* sp. endo- β -1,4-glucanase gene and its coexpression with the *Endomyces fibuliger* β -glucosidase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Biotechnol. 11: 685-692 (2001)
5. Kim DM, Lee KH. Development of extracellular β -glucosidase producing strains by intergeneric protoplast-fusion between *Bacillus pumilus* and *Cellulomonas fimi*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotech. 2: 115-120 (1990)
6. Tamas J, Krisztina K, Zsolt S, Kati R. Production of β -glucosidase in mixed culture of *Aspergillus niger* BKMF 1305 and *Trichoderma reesei* RUT C30. Food Technol. Biotechnol. 41: 49-53 (2003)
7. Lee HS, Min KH, Bae M. Biosynthetic regulation and enzymatic properties of β -glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS 1-1. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 2: 119-125 (1988)
8. Sung CK, Lee SW, Park JR, Moon IS. Purification and characterization of β -glucosidase from *Aspergillus niger* SFN-416. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 44-50 (1997)
9. Kim JH, Nam DH. Purification and properties of β -glucosidase from *Sporotrichum cellulosophilum*. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. 12: 21-26 (1984)
10. Min HK, Yi HK, Moon JW, Kang KH. Purification and properties of α -glucosidase from *Pediococcus halophilus*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 143-149 (1992)
11. Jeon KS, Geon EJ, Hwang IK. Assay of β -glucosidase activity of Bifidobacteria and the hydrolysis of isoflavone glycosides by *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 12: 8-13 (2002)
12. Kim YW, Chun SS, Chung YC, Roh JS, Sung NK. Enhanced stability of *Pseudomonas* sp. endo-1,4- β -glucanase and β -1,4-glucosidase gene. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 659-664 (1995)
13. Kim YW, Chun SS, Kim SJ, Chung YC, Sung NK. Cloning and expression of β -1,4-glucosidase gene from *Pseudomonas* sp. in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 113-118 (1993)
14. Robinson M, Riov J, Sharon A. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 5030-5032 (1998)
15. Wei DL, Kohtaro K, Shoji U, Lin TH. Purification and characterization of an extracellular β -glucosidase from the wood-grown fungus *Xylaria regalis*. Current Microbiol. 33: 297-301 (1996)
16. Oh SH, Kim MS, So S, Suh HJ. Studies on the production of cellulase by *Trichoderma* sp. SO-571 and the enzyme treatment for cellulosic fabrics. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 31: 42-45 (2003)
17. Chun SB, Kim DH, Kim KH, Chung KC. Purification and characterization of β -glucosidase from *Penicillium verruculosum*. J. Microbiol. Biotechnol. 1: 188-196 (1991)
18. Park SK, Moon IS, Choi OJ, Sung NK. Isolation of β -glucosidase-producing fungi and properties of its crude enzyme. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21: 440-445 (1993)
19. Kurosawa K, Hosoguchi M, Hariantono J, Sasaki H, Takao S. Degradation of tough materials by cellulase from *Corticium rolfsii*. Agric. Biol. Chem. 53: 931-937 (1989)

(2005년 2월 24일 접수; 2005년 3월 30일 채택)