

纖維素 分解酵素에 關한 研究 (第 5 報)

Trichoderma viride(O₂-1)가 生成하는 Cellulytic Complex 의 分別에 對하여

成 洛 癸

(晉州農大)

(1969. 7. 31 受理)

Studies on the Cellulase. (V)

Fractionation of Cellulytic Complex produced by *Trichoderma viride*(O₂-1)

Nack Kie Sung

(Chinju Agricultural College)

Summary

The yield of cellulase derived from *Trichoderma viride*(O₂-1) was remarkably varied with various concentration of ethanol and acetone in purification of the enzyme. In the purification with ethanol of β -glucosidase, the best result was obtained in the concentration of 60% and, of CMCase and of filter paper disintegrating enzyme 80%. And in the purification with acetone of β -glucosidase, filter paper disintegrating enzyme, and CMCase, in the concentration of 60%, 80%, and 90% respectively, was shown the best yield. The activities of crude Cellulase preparation could be separated into few of fractions by column chromatography with Silica gel, Cellulose powder, and gauze.

Most of CMCase, avicelase, and β -glucosidase were eluted, but most of filter paper disintegrating enzyme and the rest of enzymes mentioned the above were absorbed, and were eluted with water. Therefore, it was considered that CMCase is different from filter paper disintegrating enzyme in properties. The relative activity of CMCase was different from that of avicelase in the peak of elution part.

And it was considered that filter paper disintegrating enzyme and cellulose powder saccharifying enzyme was separated respectively as absorption

part and non absorption part. The auther came to the conclusion that at least there were more than three sorts of cellulase in *Trichoderma viride*(O₂-1) cellulase preparation.

緒 言

前報 (13)에서는, *Trichoderma Viride*(O₂ 1)가 生成하는 粗酵의 性質에 對한 實驗을 하여 이菌株의 Cellulase는 적어도 3種以上の Cellulase 成分이 混在한다는 것을 假定하였다. 微生物 Cellulase의 種類 및 特異性 各個의 分別, 單離, 分解機作, 精製에 對해서는 많은 學者들에게 依하여 研究되고 있다. 即 *Trichoderma viride*에 對해서는 Mandeles等 (2, 4, 8), *Myrothecium verrucaria*에 對해서는 Grimes (9), *Chaetomium globosum*에 對해서는 渡邊 (14), *Stachy botrysstrata*에 對해서는 Jermyn (6), *Cellvibrio gilvus*에 對해서는 Cole (1), *Irpex lacteus*에 對해서는 若林 (15), *Streptomyces antibioticus*에 對해서는 Enger (5), 等에 依한 報文이 있는데, 菌株 및 培養條件에 따라서는 相當한 差異가 있기에 本菌株에 (12) 對해서도 Cellulase, component에 對한 相異點이 있을 것으로 생각되어 本實驗을 企圖하였다. 本報에서는 이를 混在된 酵素의 個數를 알기 爲하여 Paper electrophoresis를 하였고, 混在된 酵素를 分別하기 爲하여 Aceton, Alcohol, 濃度別, 硫安飽和度別에 따른 各各의 回收率과, Column chromatography에 依한 分別實驗을 하였다. 本實驗에서는 純粹한 Cellulase를 單離하지 못하였으나

몇개의 區分으로 分別할 수 있었기에 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

1. 使用菌株

Trichoderma viride (O₂-1) (12)

2. 酵素生成培地 및 培養, 粗精製

前報 (11)와 같이 하였다.

3. 酵素活性 測定法

1) C.M.C 分解力(C.M.C-SA): 前報 (13)에 의한 方法

2) β -glucosidase 活性(β .G-SA): 前報에 의한 方法

3) 濾紙崩壞力(F.P-DA): 前報에 의한 方法.

4) 濾紙糖化力 (F.P-SA): 前報에 의한 方法.

5) Cellulose powder 糖化力 (C.P-SA) Cellulose powder (片山化學製)를 1.25%로 쪼갬 pH 5.0 McIlvaine Buffer 에 懸濁하여, 8 ml를 L型 test tube 에 넣고 酵素液 1 ml를 加한 다음 60°C에서 恒溫 株盪(70 r.p.m. 振巾 4 cm) 하여 即時 N-NaOH 1ml를 넣고 酵素作用을 停止시킨 後, 遠心分離하였다.

上澄液 5 ml를 Somogyi 法으로 還元糖으로 定量하였다.

6) Avicel 糖化力(A-SA); 1.25% Avicel (旭化成) 懸濁液 8 ml와 酵素液 1 ml를 L型 test tube 에 넣고, 上記 cellulose powder 糖化力 測定方法과 같이 하였다.

4. 電氣泳動

Sibata Type(MR-65)인 電氣泳動機에 粗精製 酵素를 蒸溜水에 溶解시킨 後 M/15 磷酸緩衝液을 溶媒로 하여 105 mv, 90 mA 로 75 分間 electrophoresis 하였다.

5. Ethanol 및 Acetone 에 의한 各 酵素의 回收率

酵素液을 混合한 Ethanol 및 Acetone 의 濃度를 40, 50.....90%로 하여 냉장고에서 1時間 放置한 後 遠心分離하고 그 沈澱物에 對한 活性度를 測定하여 回收率을 相對的으로 表示하였다.

6. 硫酸飽和度別에 따른 各 酵素의 回收率

粗醇液 200 ml를 0.2 飽和시키고 沈澱物을 얻고 上澄液을 다시 0.2 飽和한後 그 沈澱物을 回收하였다. 이 操作을 되풀이 하여 各各 얻은 沈澱物을 充分히 透折 하고 Acetone 으로 沈澱, 回收하여 各各의 活性을 試驗하였다.

7. Column 의 調製와 各 Cellulase 의 分離法.

1) Cellulose powder column chromatography: Cellulose powder 11 gr 을 內經 16 mm 의 glass column 에 充填하여 높이 20~22 cm 의 층을 만들었다. 여기에 pH 3 의 McIlvaine 緩衝液 10 ml를 流出시킨 後 酵素液 2 ml를 加하여 30 分間 吸着시킨다. 溶出은 蒸溜水 (流出速度 10 ml/40 min)를 使用하였을 境遇와 pH 7 의 McIlvaine 緩衝液을 使用하였을 境遇와 pH 3~7 의 McIlvaine 緩衝液을 各各 15 ml씩 溶出하여 溶出液이 透明하게 된 다음 蒸溜水로서 透明하게 될 때까지 溶出하였을 境遇와 또 pH 7 의 McIlvaine 緩衝液 100 ml를 溶出한 後 蒸溜水로서 透明하게 될 때까지 溶出하였을 境遇에 對하여 檢討하였다.

2) Gauze column chromatography; gauze (大韓藥典) 9 gr 을 粉碎하여 上記와 같은 Column 에 約 20 cm 높이에 充填하여 pH 3 의 McIlvaine 緩衝液 10 ml를 流出하고 酵素液 2 ml를 30 分 吸着시킨後 pH 7 의 McIlvaine 緩衝液을 透明하게 될 때까지 溶出시킨 後, 蒸溜水로서 溶出하여 各 酵素에 對한 活性을 測定하였다.

3) Silicagel chromatography; Silicagel (Merck 製) 15 gr 을 上記 Column 에 約 22 cm 높이에 充填하여 pH 3 의 McIlvaine 緩衝液 10 ml를 流出시키고 酵素液 2 ml를 30 分間 吸着시킨 後, 緩衝液 및 蒸溜水로서 溶出하여 各 酵素에 對한, 活性을 測定하였다.

實驗結果 및 考察

1. paper electrophoresis

그림에서 보는 바와 같이, 6 個의 component 가 있음을 알았다. 粗精製하였으므로 Cellulase 以外 다

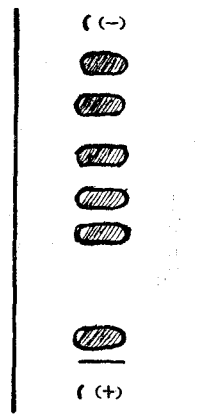


Fig. 1. Paper Electrophoreses of Cellulolytic Complex Condition: pH 2.3 Phosphate Buffer 75 min 105 mv 90 mA

른 酵素도 混合되어 있을 것이다.

2. Ethanol 및 Acetone 에 의한 各酵素의 回收率

微生物酵素의 精製方法으로써, Alcohol類, Acetone 등은 많이 利用되고 있으며 酵素의 種類에 따라서는 處理濃도와 處理時間等に 따라 많은 影響을 받고 있다는 것이 報告되고 있다. 本粗酵素에 대해서도 各濃度別로 處理하여 各各의 酵素活性을 測定하여 回收率을 求하였다.

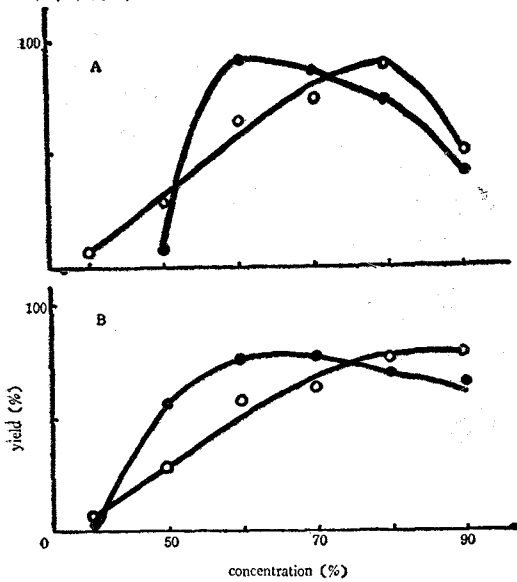


Fig. 2. Yield of Enzyme treated with Ethanol and Acetone A: Ethanol B: Acetone
●—● β.G-SA ○—○ G.M.C-SA

Fig. 2와 Tab. 1은 各濃度別 各酵素의 活性度를 相對活性으로 表示하였는데, Cellulase의 成分에

라 相違한 結果를 나타내었다. 卽 Ethanol을 使用

Table. 1. Disintegrating Activity of Filter Paper

time(min)	conc(%)				
	60	80	110	120	130
Control	●				
40					
50					
60					
70				○	△
80	○		△		
90		○		△	

○ Acetoece △ Acohol

하였을 境遇 C.M.C-SA는 Ethanol濃度 80%, β.G-SA는 60% FP-DA는 80%, 90%일때가 가장 좋은 結果를 나타내었다. 그러나 F.P-DA는 Control때가 60분만에 宗全崩壞되었는데 Ethanol處理後에는 110분만에 崩壞되었으니, 失活이 많이 되었다고 생각된다.

Acetone을 使用하였을 때는 C.M.C-SA는 Acetone濃度 90%, β.G-SA는 60%, 70%, F.P-DA는 80%일때가 가장 좋았다. 大體로 β.G-SA는 低濃度の Acetone, Ethanol에서 回收率이 좋았고, C.M.C-SA, F.P-DA는 高濃度の Acetone, Ethanol에서 回收率이 좋았다. Pectinas는 30%의 Ethanol濃도일때가 回收率이 가장 좋았는데 (10), 本酵素는 大部分 高濃度에서 回收 되었다.

3. 硫安飽和度別에 따른 各酵素의 回收率

硫安飽和度에 따른 各酵素의 回收率은 다음 Fig.

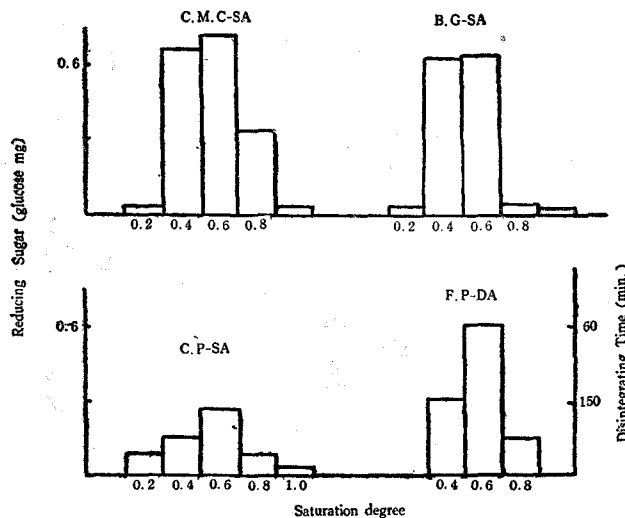


Fig. 3. Partial Fractionation of cellulolytic complex by $(NH_4)_2 SO_4$

3과 같다. 각 cellulase는 飽和度 0.6 일때가 가장 좋은 결과를 나타 내었다.

4. Column chromatography 에 의한 각 cellulase 의 分別

1) Silicagel column 에 의한 分別

粗精製 酵素液(20% W/V) 2 ml 를 使用하여 實

驗한 結果는 다음 Fig. 4 와 같다.

그림에서 보는 바와 같이 大部分의 酵素는 거의 같은 peak 를 나타내는 데, 이것은 吸着이 되지 않는다는 것을 暗示 하는 것 같다. Avicel 分解力과 濾過紙崩壞에 對한 peak 는 若干 差異가 있으나 이 程度의 差異로서는 區分이 곤란하므로 다음 實驗을 하였다.

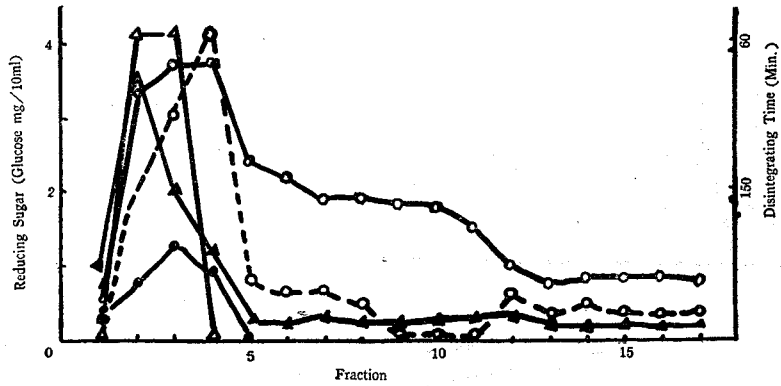


Fig. 4. Fractionation of cellulase by silicagel column chromatography. Elution with McIlvaine buffer pH 7 and H₂O ○—○ C.M.C-SA, ▲—▲ β.G-SA, ○··○ Avicel-SA ●—● C.P-SA, △—△ F.P-DA

2) Cellulose powder column 에 의한 分別 cellulase powder 를 吸着劑로 하여 각 cellulase 의 分別을 試圖하였다.

pH 7의 McIlvaine 緩衝液으로서 溶出하였을 때의 結果는 Fig. 5 와 같으며, 蒸溜水로서 溶出하였을 때의 結果는 Fig. 6 과 같다. 緩衝液으로서 溶

出하였을 때는 C.M.C 및 cellulase powder 分解 酵素만 溶出되었고 蒸溜水만으로서 溶出하였을 때는 濾紙崩壞酵素가 다른 區分에서 나타났으므로 각 cellulase 는 cellulase powder 에 對한 吸着性이 相異한 것을 알았다.

pH 3~7의 McIlvaine 緩衝液 및 pH 7의 McIlvaine

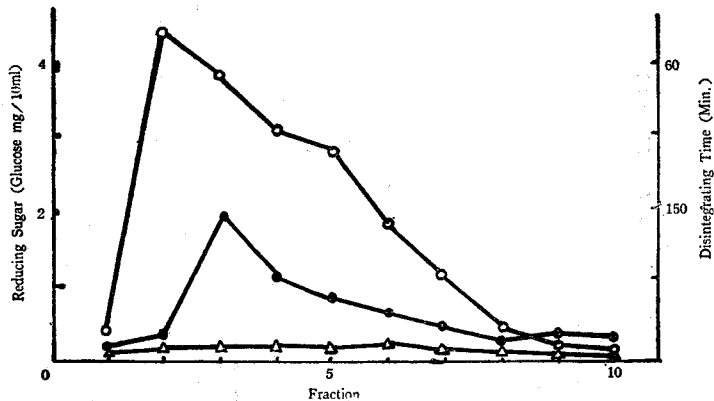


Fig. 5. Fractionation of cellulase by cellulose powder column chromatography. Elution with Buffer 7.0 ○—○ C.M.C-SA, ●—● C.P-SA, △—△ F.P-DA

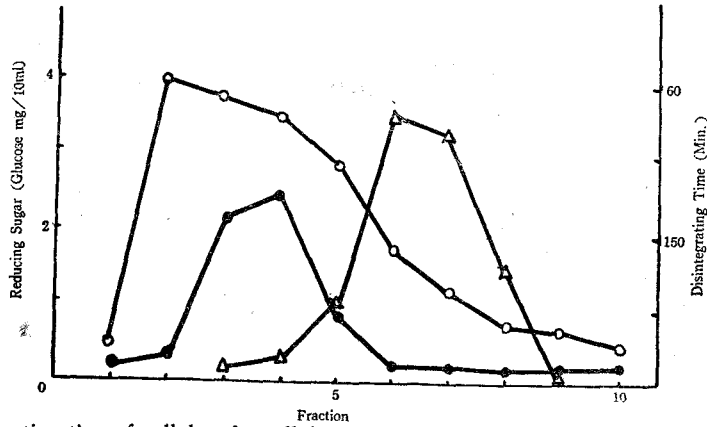


Fig. 6. Fractionation of cellulase by cellulose powder column chromatography. Elution with H₂O
○—○ C.M.C-SA, △—△ FP-AD, ●—● C.P-SA

緩衝液으로서 溶出한 後 蒸溜水로서 透明하게 될 때 까지, 溶出하였을 때의 結果는 다음 Fig. 7. Fig. 8 과 같다.

黑褐色의 酵素液은 4 區分까지 나타났고 10 區分에서 거의 透明液이 되었을 때 蒸溜水로서 溶出하니

次次 白濁液이 溶出 되었다. 그림에서 보는 바와 같이 完全히 두개의 peak로 分離되었다. 2~4 區分에는 C.M.C 活性外 Cellulose powder, 糖化活性, β -glucosidase 活性이 나타났고 12~14 區分에서는 主로 濾紙崩壞活性의 酵素가 溶出되었다. 그러는, 약

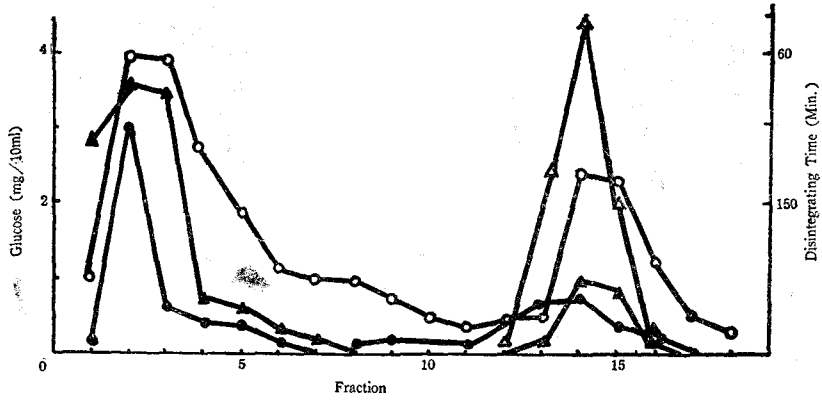


Fig. 7. Fractionation of cellulase by cellulose powder column chromatography. Elution with Buffer 3-7 and H₂O ○—○ C.M.C-SA, ▲—▲ β .G-SA, ●—● C.P-SA, △—△ FP-DA

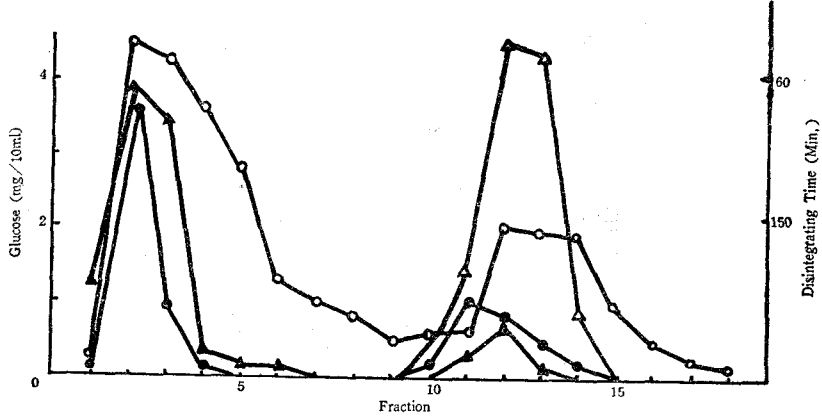


Fig. 8. Fractionation of cellulase by cellulose powder column chromatography Elution with Buffer 7 and H₂O ○—○ C.M.C-SA, ▲—▲ β .G-SA, ●—● C.P-SA, △—△ F.P-DA,

區分에서도 若干 C.M.C의 分解酵素와 Cellulose powder 分解酵素가 溶出되었다. 即 cellulose powder column에 依하여 cellulase를 吸着區와 非吸着區로 區分할수 있었다.

小川 (8)는 吸着區와 非吸着區의 C.M.C. 分解酵素와 Avicel 分解酵素에 對한 實驗을 하여 耐酸性, 耐熱性, 最高溫度 등이 各各 相異하다고 報告하고 있다. 이것은 같은 種類의 酵素일지라도 吸着성과 差異에 따라 成分組成이 다른 것을 暗示하는 것 같다.

또 西澤 (15)은 *Irpex lacteus* 製劑 cellulase를

cellulose powder와 sephadex column chromatography에 依하여 前者로서는 less random 型的 C.M.C 活性이 높은 區分을 얻고, 後者로서는 Avicel 分解活性이 높은 區分을 얻었다. 이 두 酵素는 exwise에 가까운 random 機作으로 作用한다고 하였는데 本菌株의 C.M.C 分解酵素와 Avicel 分解酵素는 이것과 若干 相異할 것으로 생각되어 追究中이다.

3. Gauze column chromatography.

粗精製 酵素液 2ml를 gauze 粉末을 吸着劑로 하여 分別한 結果는 Fig 9와 같다.

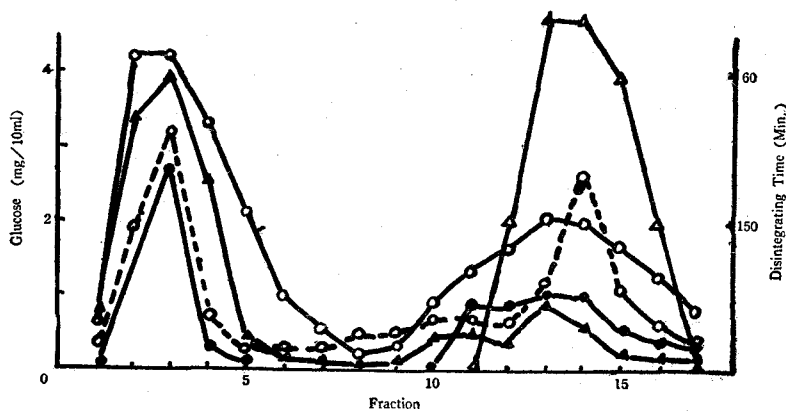


Fig. 9. Fractionation of cellulase by gauze column chromatography. Elution with Buffer 7.0 and H₂O
○—○ C.M.C-SA, ▲—▲ β-G-SA, □—□ Avicel-SA, ●—● C.P-SA, △—△ FP-DA

Cellulose powder column chromatography 때와 거의 비슷하나 本實驗에서는, Avicel 分解酵素의 相當한 量이 吸着되었다가 蒸溜水로서 溶出되었다는 것을 알았다.

概報에 依하면 Li(3)는 *Trichoderma viride* 製劑 酵素를 綿으로서 調製한 Hydrocellulose에 作用시켜 C1 活性(Avicel 分解活性)을 濁度, 減少에 依하여 測定하고 또 이 C1 活性은 常溫에서 Avicel과 Hydrocellulose에 쉽게 吸着되어 이것을 phosphate 緩衝液으로서 流出하면 C×(C.M.C 分解酵素)는 大部分 溶出되나 C1은 溶出되지 않았다고 報告되고 있다. 그러나, 小川(7)은 Li의 結果와 若干 相異한 結果를 나타 내었다. 即, C1을 吸着區分과 非吸着 區分으로 分別하였는데 本實驗 結果도 이와 一致하였다. 그리고 C2 活性(濾紙崩壞活性)이 豊富한 區分은 白濁이 되고, 蒸溜水 以外로서는 거의 溶出이 되지 않는 結果는 既報(3, 7)와 一致 되었다. 또 *Aspergillus niger* 製劑를 같은 方法으로 實驗한 結果를 보면 最初流出 區分에서 C2 活性이 높았다.

따라서 各 cellulase의 吸着性은 菌株의 種類 및 培養方法, 培養基質에 따라 相異한 것으로 推察된다. 以上の 몇가지 實驗에서 cellulase 各 性分을 吸着 區分과 非吸着 區分으로 分別할 수 있었고, C.M.C 分解酵素와, 濾紙崩壞酵素, Avicel 分解酵素는 各 各 相異한 成分의 cellulase라는 것을 認定하였고 이들이 對한 各成分의 單離, 相乘效果和 濾紙崩壞酵素, 濾紙糖化 酵素의 相異點에 對해서는 계속 追究中이다.

要 約

Trichoderma viride(O₂-1)의 粗酵素를 Ethanol 및 Acetone 濃度別에 따른 回收率을 實驗한 結果 各 cellulase는 顯著한 差異가 나타났다. 即 Ethanol을 使用하였을 경우 β-glucosidase는 60% C.M.C 分解酵素, 濾紙崩壞 酵素는 80% 일때가 좋았고 Acetone을 使用하였을 경우 β-glucosidase는 60% 濾紙崩壞 酵素는 80%, C.M.C 分解酵素는 90% 濃度일때가 좋은 結果를 나타내었다.

粗精製한 Cellulase 를 Silicagel, cellulose powder, Gauze 를 使用한 column chromatography 에 依하여 分別한 結果 數個의 區分으로 分別 할 수 있었다. C.M.C 分解酵素와 Avicel 分解酵素, β -glucosidase 의 大部分은 吸着이 되지 않고 流出되었으며, 大部分의 濾紙崩壞酵素와 一部分의 Avicel 分解酵素는 吸着되었다가 蒸溜水로서 流出함으로써 溶出되었다. 따라서 C.M.C 分解酵素와 濾紙崩壞酵素는 相異한 Cellulase 成分임을 알았다. 또 C.M.C 分解酵素와 Avicel 分解酵素는 溶出區分에 있어 peak 가 相異한 다른 區分에서 相對活性이 다르므로 역시 別個의 種類로 區分되었다. 또 濾紙崩壞酵素와 Cellulose powder (濾紙粉沫) 糖化酵素는 吸着區分과 非吸着 區分으로 分別되니 相異한 Cellulase 成分이라고 생각된다. 따라서 *Trichoderma viride* (O₂-1) 의 Cellulase 는 적어도 3種以上の Cellulase 成分으로 되어 있다고 推察된다. 끝으로 이 實驗을 도와 주신 奇宇京先生과 崔相道 李鍾祐 金均泰 林在錫諸君에게 謝意를 표합니다.

參 考 文 獻

1. F. Cole, K.W. King: Biochem. Biophys. Acta., 81, 122 (1964)
2. G. Okada, T. Niwa, H. Suzuki, K. Nisizawa: J. Ferm. Tech. 44, 682 (1966)
3. L. Li, R.M. Flora, K.W. King: Cellulase Symp. 2, 3 회 (1961)
4. M. Mandeles, E.T. Reese: Dev. Ind. Microbio. 5, 5 (1964)
5. M.D. Enger, B.P. Sleeper: J. Bacteriology 89, 23 (1965)
6. M.A. Jermyn: Aust. J. Biol. Sci. 15, 769 (1962)
7. 小川喜八郎, 外山信男: 醸工 42, 199 (1964)
8. " : ibid. 46, 367 (1968)
9. R.M. Grims, C.W. Duncanand, C.A. Hoppert: Arch. Biochem. Biophys., 68, 412 (1957)
10. 徐正墳: 慶大生技 2, 57 (1967)
11. 成洛癸: 韓微誌 6, 87 (1968)
12. " : 晋農大論文集 8, 56 (1969)
13. " : 韓農化誌 12, 25 (1969)
14. 渡邊敬: 醸工 46, 303 (1969)
15. 林和正 神田鷹久 西澤一俊: ibid 43, 739 (1965)

1. F. Cole, K.W. King: Biochem. Biophys. Acta.,