

*Piricularia oryzae*로부터 추출한 cellulase의 몇가지 성질에 대한 연구

전 상 윤

(연세대학교·생물학과)

Studies on Some Properties of Cellulase Isolated from *Piricularia oryzae*

CHUN, Sang Yoon

(Dept. of Biology, The Graduate School, Yonsei University)

ABSTRACT

Studies on some properties of cellulase isolated from *Piricularia oryzae*. Crude cellulases were prepared from dried rice plant powder (Tong-il, Pal-dal) culture of *P. oryzae* (N-2, C-8, T-2). The best yield of enzyme was obtained from the medium using Tong-il rice plant powder for *P. oryzae* cav. N-2 and 2%-sucrose concentration in preculture media. Two units of the enzyme were incubated at 60°C for 1 hour with 1.0ml, 0.6% Na-CMC.

The optimum temperature for the enzyme activity was at 60°C and the optimum pH was at pH4.0.

When Na-CMC₁ was used as substrate the K_m values of crude enzyme were calculated to be 1.05×10^{-4} mM and V_{max} was 2.8 mmole/hour.

A 10-fold partial purification was achieved by $(NH_4)_2SO_4$ precipitation followed by column chromatography on DEAE Sephadex A-25.

서 론

진균류(fungus)에서 생성되는 cellulase에 대해서 많은 연구가 이루어졌다(Selby, 1967; Ikeda; 1967; Wood, 1971; Petterson; 1968; Okada, 1975).

Reese(1950)은 *Myrothecium verrucaria*로부터 C₁, C_x 등 두 종류의 cellulase를 처음 순화하였다. *P. oryzae* cav.에서는 cellulase를 Nagayama(1973)가 처음 분리하였으며 그는 N-1, C-3, T-1, 등의 균 계통에서 cellulase를 분리 비교했다. 본 연구에서는 한국에서 분리한 N-2, T-2, C-8 등 균주를 사용하여 cellulase를 분리할 목적으

로 했고, 특히 N-2에 대한 순화를 기도했는데, 여기에 더한 실험 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재 료

균주는 *Piricularia oryzae* cav.의 변종인 N-2, C-8, T-1, 등(한국 농촌진흥청, 식물병리과)을 사용했고, 배지는 Nagayama(1973)가 사용한 배지에서 preculture glucose의 양을 조절해 보았고, *P. oryzae*의 main culture에 건조한 팔달, 통일벼의 잎과 줄기를 각각 사용했다. 기질로는 Na-CMC(일본 花城산업, 분자량 약 115,000)를 사용했으

며, DEAE Sephadex A-25-120(Sigma)을 효소 순화를 위한 column chromatography에 사용했다.

2. 방법

1) 효소제조

효소는 Nagayama가 사용한 배지를 약간 개량 사용하여 10일간 배양하고 거즈로 여과 후 원심분리(6000rpm/10min at 4°C)하여 상등액을 (NH₄)₂SO₄로 70% 포화시켜 4°C에 하루밤 방치한 후 이것을 다시 원심분리(6000rpm/15min at 4°C)하여 침전물을 acetate buffer(pH 4)에 녹여 사용했다.

2) 효소의 활성 측정

0.6% Na-CMC를 0.1~1.2ml까지 변화를 주었고, 효소액 0.1-0.3ml로 변화를 주어 acetate buffer 0.6ml와 각각 섞어 60°C에서 10min~70min 변화를 주어 반응시켜 생성되는 glucose의 양을 Somogyi-Nelson의 변법으로 Beckman Spectrophotometer DB-G로써 540nm에서의 흡광도를 측정, 활성을 비교했다.

3) 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

효소액 0.2ml, 0.6% Na-CMC 0.1ml, 0.1M acetate buffer 0.6ml를 섞어 각기 다른 온도에서 1시간 동안 반응시킨 후 생성되는 glucose의 양을 측정하여 비교했다.

4) 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

반응에 사용하는 0.1M acetate buffer를 여러 pH로 만들어, 효소액 0.2ml와 0.6% Na-CMC 1.0ml 및 각기 다른 pH의 buffer 0.6ml를 섞어 60°C에서 1시간 동안 작용시켜 생성된 glucose의 양을 측정, 비교했다.

5) 효소의 순화

0.05M acetate buffer(pH 4.0)에 용해시킨 crude cellulase 5ml를 동일한 buffer(pH 4.0)에 의해 평행상태를 이룬 DEAE-Sephadex A-25 Column (2.0×40cm)에 올려 0.05M, 0.1M acetate buffer (pH 4.0) 및 0.1M, 1M NaCl의 용액의 차례로 0.5ml/min의流速(flow rate)으로 한 시험관에 5ml씩 받았다.

pH에 대한 순화 정도를 보기 위해 0.05M

acetate buffer의 pH를 3.5~5.5로 변화시키며 순화한 후 1M NaCl로 순화하였다.

6) 효소역학

여러 농도의 Na-CMC를 사용, cellulase의 활성 측정법과 동일한 방법에 의해 생성되는 환원당의 양을 측정 Lineweaver-Burk plot에 의해 K_m 및 V값을 결정했다.

결 과

1. 최적 배지 선택

1) Preculture의 sucrose 농도

Fig. 1에서 보듯이 preculture에 사용된 여러 sucrose의 농도 가운데서 2%인 때에 main culture에서 추출되는 효소의 양이 현저히 높았고, 10일간 배양에서 최고로 나타났다. 그러나 30%와 60%의 Sucrose용액에서는 효소생성이 극히 적게 나왔다.

2) 버 품종에 따른 효소 생성도

Fig. 2는 버 품종에 따르는 효소의 생성을 보여준다. 통일버가 팔달버보다 월등하게 높은 효소의 생성을 보였다.

3) *P. oryzae*의 변종에 대한 효소생성

Fig. 3은 *P. oryzae*가 버기질에 생성되는 cellulase의 함성을 보여준다. N-2가 C-8과 T-2보다 월등히 효소의 생성이 많이 나

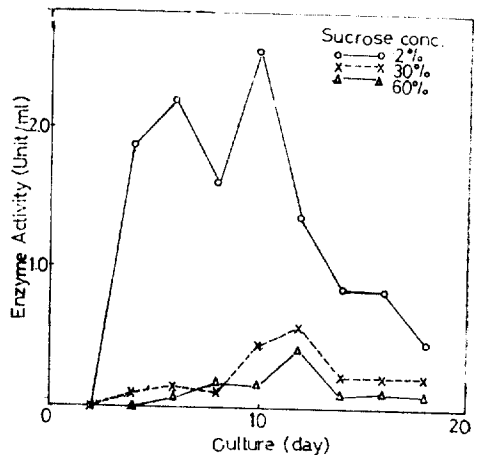


Fig 1. Concentrations of sucrose in the preculture and their influence on the production of cellulase in the main culture of *P. oryzae*. At 2% sucrose significantly large amount of enzyme is produced.

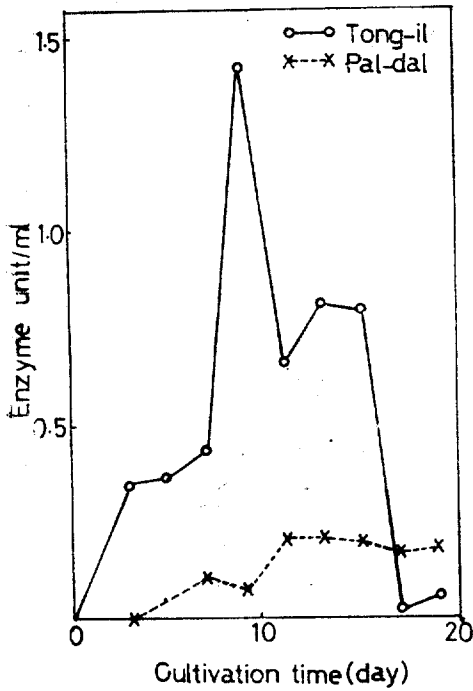


Fig 2. Cellulase production from *P. oryzae* (N-2) culture on strains of 2 rice variations, Tong-il and Pal-dal.

Fig. 4는 cellulase가 통일벼에 *P. oryzae* N-2를 접종시키고, 이때 preculture의 sucrose 농도는 2%로 한 배지에서 합성되는 상황을 보여준다. 배양 5일에서 급격히 증가하여 10일에 최고로 도달한다.

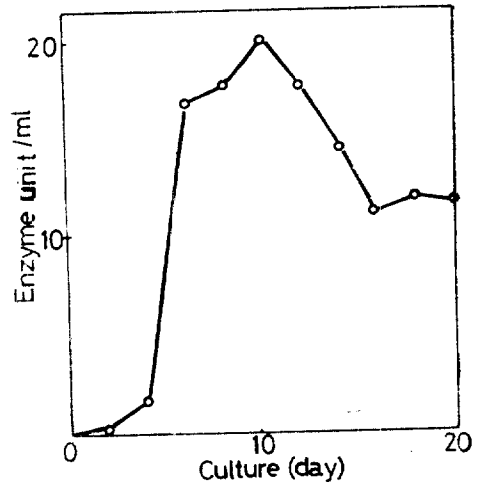


Fig 4. Enzyme production from the 20 days culture of *P. oryzae* (N-2) on Tong-il rice strain.

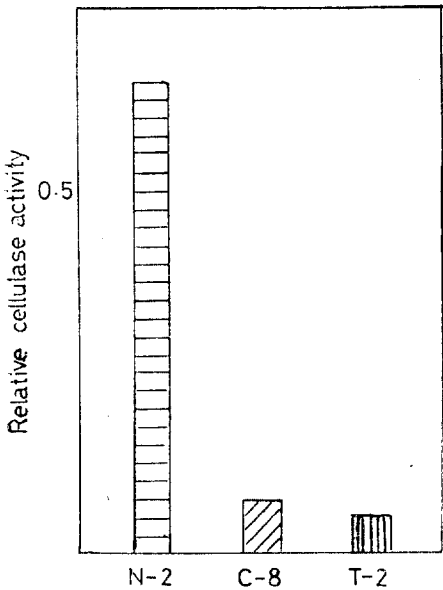


Fig 3. Yield of cellulase from 3 different strains of *P. oryzae*.

2. 효소의 활성특성

1) 효소의 양에 따른 환원당 생산량 1.0ml Na-CMC를 기질로 사용하여 60°C에서 1시간 반응시켰을 때 효소의 양에 환원당 생산량은 Sigmoid curve를 나타내는데 0.2ml정도부터 거의 비슷한 효과를 나타낸다(Fig. 5).

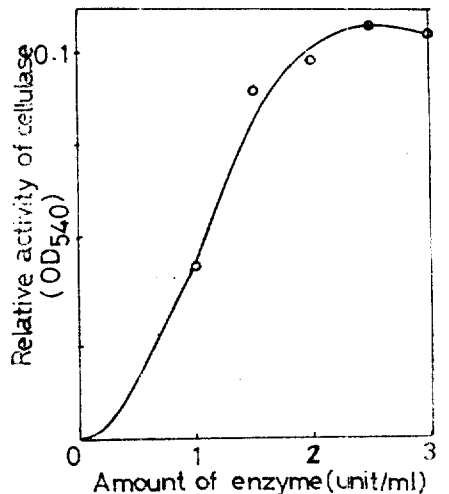


Fig 5. Substrate (Na-CMC) and enzyme relation at pH4.0, 60°C/hour.

왔다.

4) 효소의 합성곡선

2) 기질의 양에 따른 환원당 생산량

0.2ml의 cellulase를 60°C에서 1시간 반응시킬 때, Na-CMC의 양에 따른 환원당 생산량은 0.8 ml부터 비슷해져 1.0 ml에서 최고로 나타난다. (Fig. 6)

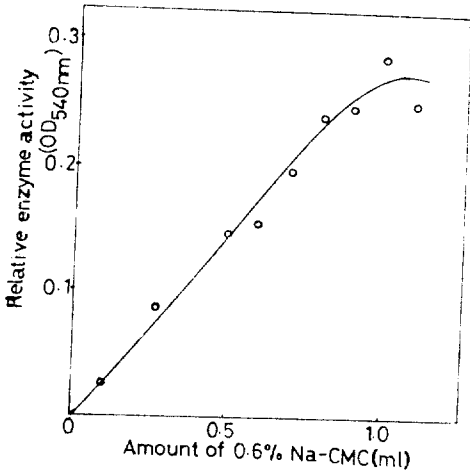


Fig 6. Effect of substrate(Na-CMC) on enzyme activity at 60°C, pH 4.0/60 min.

3) 반응시간에 따른 환원당 생산량

0.2ml의 crude cellulase에 1.0ml의 Na-CMC를 60°C에서 여러 반응시간에 따른 환원당 생산량은 60분에서 최고로 나타난다. (Fig. 7)

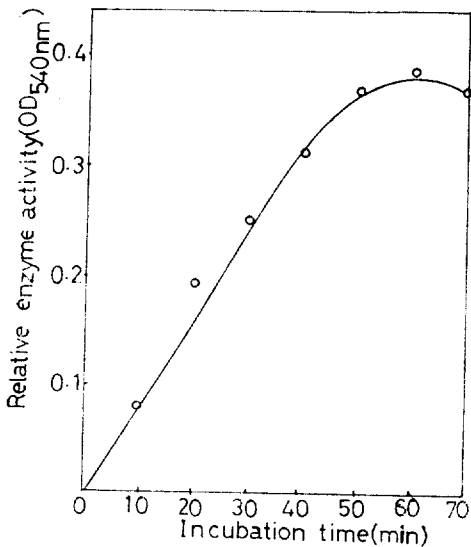


Fig 7. Enzyme activity in relation to incubation time at 60°C and pH 4.0.

3. Crude enzyme의 성질

1) 효소활성에 미치는 pH의 영향이 효소의 기질과의 반응시 최적 pH가 4.0으로서 이보다 산 또는 알카리쪽에서는 활성이 감소한다.

2) 효소활성에 미치는 온도의 영향

이 효소는 60°C에서 가장 강한 활성을 나타내며, 20°C, 80°C에서는 이것의 50% 정도도 안 나타났다.

3) Michaelis 상수(K_m) 및 최대반응속도 (V)

pH4.0에서 Na-CMC를 기질로 할 경우 crude cellulase의 K_m 값이 $10.5 \times 10^{-5} \text{mM}$ 이며 V값이 1시간당 28mmole을 나타낸다. (Fig. 8).

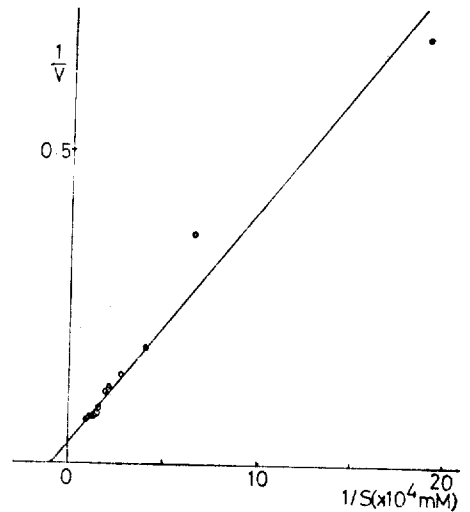


Fig 8. Lineweaver-Burk plot of cellulase from *P. oryzae*(N-2). The calculated $K_m = 1.05 \times 10^{-4} \text{mM}$ $V_{max} = 2.8 \text{m mole/hour}$

4. Cellulase의 순화

1) DEAE, Sephadex column chromatography

효소의 대부분이 pH4.0의 0.05M acetate buffer(F_1 , F_2)와 IM NaCl(F_3)에서 획득되며 cellulase의 활성은 F_1 과 F_2 의 약간 벗어난 지점에서 나타나며 F_3 에서는 거의 안 나타났다 (Fig. 9).

2) pH gradient에 의한 DEAE Column Chromatography.

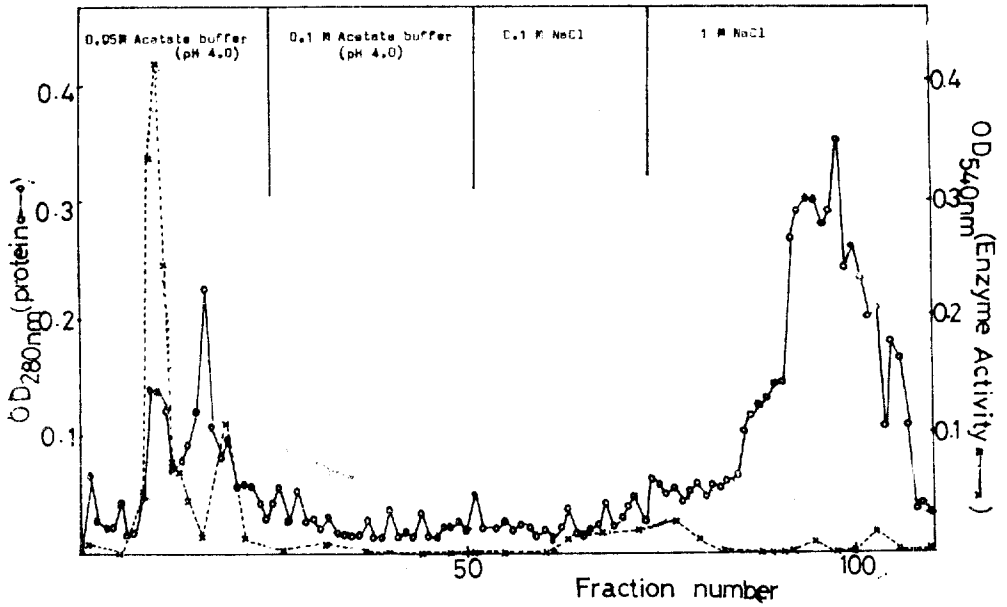


Fig 9. Column chromatograph of crude enzyme on DEAE-Sephadex A-25 column.
 Column size; 2.0×40 cm, Flow rate; 0.5 ml/min
 1 tube volume; 5ml, Enzyme volume; 5ml

이 DEAE column chromatography에서 위치에서도 피 높은 cellulase 활성을 나타냈는 pH 3.8의 위치에서 가장 높은 cellulase 다(Fig. 10).
 의 활성을 나타나는 F₁을 얻었고 pH 4.0의

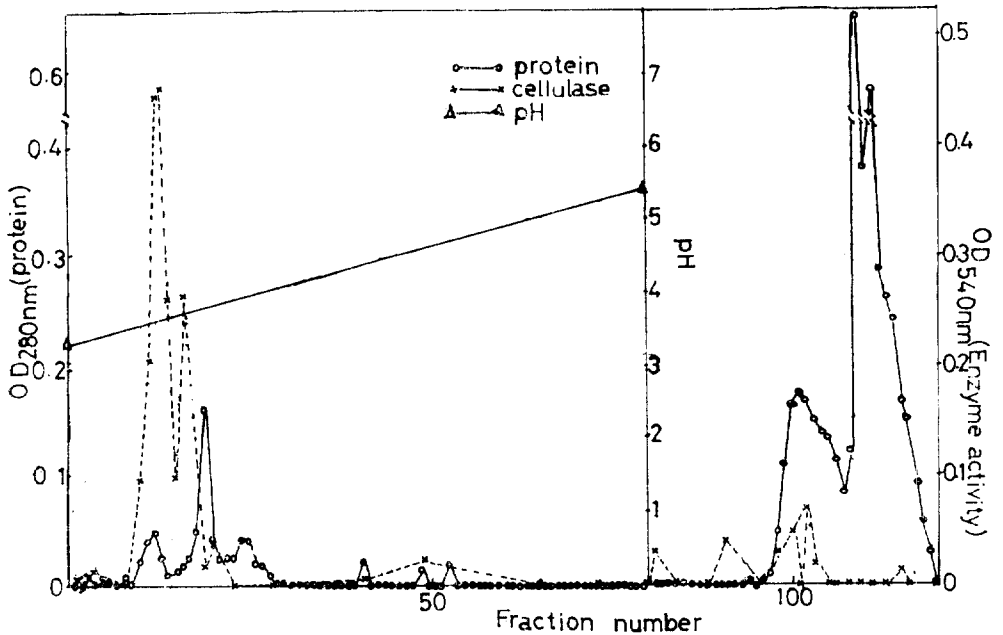


Fig 10. pH gradient of Enzyme DEAE-Sephadex A-25 Column chromatography
 Column size; 2.0×40cm, Flow rate; 0.5ml/min
 Tube volume; 5ml, Enzyme volume; 5ml

고 찰

Magayama(1973)의 실험에선 *P. oryzae* cav.의 T-1변종이 가장 높은 cellulase활성을 나타내고, C-3가 가장 낮은 cellulase활성을 나타내며, N-1은 중간에 위치에 있었으나, 이 실험에서는 N-2가 제일 높았고, T-2와 C-0은 거의 활성을 나타내지 않았다. 이것은 통일벼의 *Piricularia oryzae* 대한 저항성이 있는 것으로 해석되나, 통일벼와 팔달벼를 N-2 변종으로 비교했을 때 통일이 더 높은 활성을 나타냈다. 한편 preculture에서 sucrose농도의 변화에서 나타난 결과 즉 2%의 농도가 적합함을 보인 것은 과다한 sucrose의 양이 이 균을 성장시키는데 저해함을 보여주고 있다. 그리고 culture day는 Nagayama(1978) *Piricularia oryzae*로 한 것과 똑같이 나왔다.

Kim(1976)이 *Stachybotrys atra*의 cellulase 활성측정에는 crude enzyme이 0.5ml 들어갔으나 여기서는 0.2ml만 들어가도 되는 것을 보여 주었으며, 기질의 양과 incubation time은 Kim(1976)과 똑 같았다. 기질과의 반응시 최적온도는 60°C를 나타냈는데, 이것은 *A. niger*(Ikeda et al., 1967)의 40°C 및 65°C, *T. viride*(Okada, 1975)의 50°C 및 60°C, *T. koningi*(Iwasaki et al., 1965)의 55°C, *Stachybotrys atra*(Kim, 1976)의 40°C 및 50°C와 약간씩 차이를 보

이고 있다. 한편 통일균주 *P. oryzae*(Nagayama, 1976)의 40°C 및 60°C와 유사한 점도 있었다.

기질과의 반응시 최적 pH는 4.0이었는데 이것은 *T. Koningi*(Iwasaki et al., 1965; Wood, 1968)의 pH 4.5~5.0) *A. niger*(Ikeda) et al, 1967)의 pH 4.0~5.0, 및 2.3~2.5, *S. atra*(Jermyn, 1955) (Thomas, 1956)의 pH 4.5~5.0 및 6.0~7.0, *Alternaria* (Lee, 1976)의 pH 4.0 및 6.0등과 통일균주 *P. oryzae*(H. Nagayama, 1979)의 5.0과 비교할 때 산성효소임을 알 수 있었다.

이상 온도 및 pH가 순화된 cellulase에 미치는 영향이 다양한 것은 cellulase의 다양성에 기인된 것으로 생각되며, 배양조건 또는 순화과정등의 차이에서 오는 것임을 알 수 있다.

Crude enzyme에 대해 Na-CMC를 기질로 했을 때 K_m 값은 1.05×10^{-4} mM, V_{max} 값은 2.8mmole/hour이었으며, 이 결과는 Jermyn(1962)이 *S. atra*에서 *p*-Nitro phenyl- β -glucoside를 기질로 했을때의 값 3.9×10^{-4} M 및 2.0×10^{-4} M, Chetkavov와 Kolev(1969)가 *Aspergillus oryzae*에서 Na-CMC를 기질로 했을때 3.6×10^{-5} M과 Kim(1976)이 *Stachybotrys atra*에서 Na-CMC를 기질로 했을 때 5×10^{-4} mM등을 비교할 때 사용한 기질 및 사용균주의 상이함에서 오는 결과의 차이라고 볼 수 있겠다.

적 요

*Piricularia oryzae*를 재료로 하며 cellulase를 분리 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Enzyme 생성은 sucrose 2%의 preculture 후 통일벼에 N-2 변종을 접종하여 28°C에서 배양하며 10일간 배양했을 때 가장 많음을 보였다.
2. Crude enzyme을 Na-CMC 기질에서의 효소 작용 특성은 최적온도가 60°C였고 pH가 4.0임을 나타냈다.
3. Na-CMC를 기질로 했을 때 crude enzyme의 K_m 값은 1.05×10^{-4} mM, V_{max} 값은 2.8mmole/hour였다.
4. DEAE Sephadex A-25로 Cellulase를 분리하여 Na-CMC 기질로 활성을 측정하였을 때 0.05M Acetate buffer의 pH 4.0에서 분리됨을 나타냈다. 부분순화는 10배 정도였다.

REFERENCES

1. Chetkarov, M. and D. Kolev, 1969. Viscometric determination of the Michaelis-Menten constant of B-1, 4-glucano-hydrolase (E.C. 3.2.1.4.) (Cx-cellulase enzyme). *Monatsh. Chem.* **100**(3), 986.
2. Ikeda, R., T. Yamamodo and M. Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulases from *Aspergillus niger*. *Agri. Biol. Chem.* **31**(10), 1201.
3. Iwasaki, T., R. Ikeda, K. Hayashi and M. Funatsu, 1965. Biochemical studies on cellulase. II. Properties of two types of cellulase from *Trichoderma koningii*. *J. Biochem.* **57**(4), 478.
4. Jermyn, M.A., 1962. Fungal cellulases. X. Further purification of the β -glucosidase of *Stachybotrys atra*. *Aust. J. Biol. Sci.* **15**, 769.
5. Jermyn, M.A., 1955. Fungal Cellulases. VI. Substrate and inhibitor specificity of the β -glucosides of *Stachybotrys atra*. *Aust. J. Biol. Sci.* **8**(4), 563.
6. Kim Y.M., 1976. Studies on some properties of cellulase isolated from *Stachybotrys atra*. Master's thesis, Yonsei Univ.
7. Lee S. J., 1976. Studies on some properties of cellulase isolated from *Alternaria* sp. *Kor. Jour. Microbiol.* **14**, 65.
8. Nagayama, H., T. Hirayama and K. Tamari, 1976. Number and interrelation of components of Cxenzyme from *Piricularia oryzae*. *Agri. Biol. Chem.* **40**(11), 2137.
9. Nagayama H., T. Sudo and K. Tamari, 1973. Occurrence and some properties of cellulase in the filtrates of conidiospores and mycelia of *Piricularia oryzae cavara*. *Agri. Biol. Chem.* **37** (7), 1651.
10. Nagayama H., T. Hirayama, K. Matsuda and K. Matsuda, 1978. Studies on cellulases of phytopathogenic fungus, *Piricularia oryzae* cav. II. Purification and properties of a β -glucosidase. **84**, 27.
11. Nagayama, H., T. Hirayama and K. Matsuda, 1979. Studies on Cellulases of a phythogenic fungus, *Piricularia oryzae* cav. III. Multiplicity of β glucosidase, and properties of second component. *J. Biochem.* **85**, 591.
12. Okada, G., 1975. Enzymatic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of two cellulase. *J. Biochem.* **77**, 33.
13. Petterson, G., 1968. Studies on cellulolytic enzymes III. Isolation of a cellulase from *Penicillium notatum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 776.
14. Reese, E.T., R.G.H. Sui and H.S. Levinson, 1950. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, **59**, 483.
15. Selby, K. and C.C. Maitland, 1967, The cellulase of *Trichoderma viride*. Separation of the components involved in the solubilization of cotton. *Biochem. J.* **104**, 716.
16. Somogyi, M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19.
17. Thomas, R., 1956. Fungal cellulase. VII. *Stachybotrys*: Production and properties of the cellulolytic enzyme. *Aust. J. Biol. Sci.* **9**, 159.
18. Wood, T.M., 1968. Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. *Biochem. J.* **109**, 217.
19. Wood, T.M., 1971. The cellulase of *Fusarium solani*, purification and specificity of the B-1, 4-glucanase and the B-D glucosidase components. *Biochem. J.* **121**, 353.