

초호열성 극한미생물 *Sulfolobus shibatae* B12로부터 endoglucanase의 분리 및 특성 규명

윤경현, 김성훈, 이선복*
포항공과대학교 화학공학과

Partial Purification and Characterization of Endoglucanase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus shibatae* B12

Gyung Hyun Yun, Seonghun Kim and Sun Bok Lee*

Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology,
San 31, Hyoja Dong, Pohang 790-784, Korea

서론

Cellulose, hemicellulose 그리고 lignin의 세 가지 물질로 구성되는 목질계 기질로부터 알콜을 생산하는 과정은 난분해성 lignocellulose를 cellulose 및 hemicellulose로 만들어주는 전처리와 섬유소의 당화 공정을 거치게 된다. 현재 이용되고 있는 증기폭쇄의 고온처리법은 효소를 이용한 섬유소 당화과정을 위해서는 크게 증대시킬 수 있으나 높은 온도의 섬유소액을 냉각해야 하는 과정이 필요하게 되어 공정의 복잡성과 냉각과정으로 인하여 생물학적 에탄올 생산과정에서 단가를 높이는 원인이 되어왔다. 또한 염산이나 황산등을 이용한 전처리 방법의 경우 일반적으로 중성 미생물 유래의 효소는 불안정하여 전처리와 당화공정을 동시에 수행할 수 없다. 본 연구에서는 최근 활발히 연구되고 있는 극한환경 미생물 중, 특히 70°C 이상의 고온에서 성장하고 강산에서 안정한 효소를 보유한 초호열성 미생물 유래의 섬유소 당화 효소의 탐색 및 특성 규명을 통하여 냉각과정 없이 고온, 고압의 증기폭쇄의 전처리 과정과 섬유소 당화과정을 동시에 수행할 수 있는 극한효소이용 기술을 마련하고자 한다.

실험 방법

1. 균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 *Thermus* sp. KCTC 2654, *Sulfolobus solfataricus* P2, *S. tokodaii* strain 7, *S. shibatae* B12를 사용하였고 각 균주들의 배양을 위한 배지는 *Thermus* sp. KCTC 2654는 Castenholz TYE medium(1)을 사용하였고 *S. solfataricus* P2는 DSM medium #182(2), *S. tokodaii* strain 7와 *S. shibatae* B12는 JCM medium #165(3)를 사용하였으며 *Thermus* sp. KCTC 2654는 70°C에서 나머지 균주들은 78°C에서 48시간 배양하여 본 실험에 사용하였다.

2. 효소의 활성측정

1) Cellulase 활성측정

Endoglucanase 활성측정은 CMC를 기질로 사용하여 효소와 반응 시킨후 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 방법으로 다음과 같이 정량하였다(4). 2% CMC 0.5ml과 50mM potassium chloride buffer(pH 3.5) 1ml에 조효소액 1ml을 혼합하여 78°C에서 30분간 반응시

킨 후 DNS solution을 1ml 첨가하여 반응을 정지시키고 100°C에서 10분간 가열하여 발색시킨 후 생성된 환원당을 540 nm에서 측정하였다. Endoglucanase 1 unit은 1분 동안 1 μ mole의 glucose를 생성하는 양으로 하였다. Filter paper 활성측정은 1% Whatman No.1 filter paper를 HCl을 이용하여 pH 2.0로 맞추어 80°C에서 12시간 전처리한 기질용액 1ml에 조효소액 1ml을 가하여 78°C에서 30분간 반응시켰으며 효소의 활성측정과 unit 결정은 endoglucanase와 동일하게 행하였다. Avicelase 활성측정은 1% Avicel을 기질로 사용하여 endoglucanase와 동일한 방법으로 측정하였다.

2) β -Glucosidase 활성측정

β -Glucosidase 활성측정은 PNPG (p-nitrophenyl- β -D-glucoside)를 기질로 하여 Kohchi et al의 방법에 따라 측정하였다(5). 5mM PNPG 1ml에 조효소액을 첨가하여 78°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5M Na₂CO₃ 1ml 첨가하여 반응을 정지시키고 유리된 p-nitrophenol의 양을 400 nm에서 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 1 μ mole의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

3. Endoglucanase의 분리 정제

효소 생산용 배지에 선발균주를 접종하여 78°C에서 180rpm으로 72시간 진탕배양한 후 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 여기에 (NH₄)₂SO₄를 이용하여 분별염석하여 50%~70%에서 침전되는 단백질을 회수하였고 20 l의 증류수로 투석 및 동결건조한 후 이를 -70°C에서 보관하면서 효소정제를 위한 조효소로 사용하였다. 이 조효소를 50mM sodium citrate buffer (pH 6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (2.5 \times 100 cm)에 loading한 후 동일 buffer로 유속 15ml/h으로 용출시켜 두 차례의 gel filtration 행하여 endoglucanase 활성부분을 회수하였다.

결과 및 고찰

1. Endoglucanase 활성 균주의 선별

각 균주들의 endoglucanase와 filter paper 활성은 Table 1에서 보는 바와 같이 *Thermus* sp. KCTC 2654의 경우 세포내외에서 endoglucanase 활성과 filter paper 활성을 전혀 나타내지 않았다. 반면 *S. solfataricus* P2, *S. shibatae* B12, *S. tokodaii* strain 7에서는 endoglucanase 활성과 filter paper 활성을 나타내었는데 *S. shibatae* B12와 *S. tokodaii* strain 7의 배양 상등액의 분비 단백질의 경우가 *S. solfataricus* P2에 비해 상대적으로 강한 활성을 나타냈다.

Table 1. Cellulase activity from hyperthermophiles

Microorganism	Endoglucanase activity(U)		Filter paper activity(U)		β -Glucosidase activity(U)	
	E	I	E	I	E	I
<i>Thermus</i> sp. ATCC 27737	0	0	0	0	0	0
<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2	11.2	0	9.3	0	0	1.6
<i>S. shibatae</i> B12	31.4	0	42.4	0	0	3.9
<i>S. tokodaii</i> strain 7	29.6	0	38.6	0	0	0.8

a) One unit of Endoglucanase activity and filter paper activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of glucose per min and one unit of β -glucosidase activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μ mol of p-nitrophenol per min.

Enzyme activity was determined at 78°C and pH 3.5.

b) E: extracellular activity, I: intracellular activity

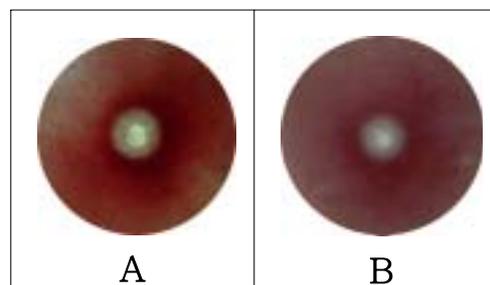


Fig. 1 Formation of clear zone on agar plate containing 1% CMC.

A : *S. shibatae* B12

B : *S. tokodaii* strain 7

After incubation at 75°C for 72 hours, the plates were stained with 0.1% Congo Red.

β -Glucosidase 효소활성은 Table 1에서 보는 바와 같이 *S. solfataricus* P2, *S. shibatae* B12, *S. tokodaii* strain 7는 세포내의 분비 단백질에서 β -glucosidase 활성을 나타내었고 특히 *S. shibatae* B12는 다른 균주들에 비해 강한 활성을 나타내었다.

CMC 분해활성과 filter paper activity가 높은 *S. shibatae* B12와 *S. tokodaii* strain 7를 대상으로 재확인 실험인 1% CMC가 함유된 고체 배지 상에서 48시간 배양하여 endoglucanase 활성을 조사하였는데 Figure 1에서 보는 바와 같이 균 주위에 cellulose 분해 효소를 분비하여 분해된 환을 명확히 확인 할 수 있었다.

이러한 결과는 Danila et al(6)이 발표한 *S. solfataricus* P2가 endoglucanase 활성을 나타낸다는 보고와 일치한 것이었으며 Anwar et al(7)이 발표한 *S. shibatae* B12가 β -glucosidase 활성을 갖고있다는 보고와도 일치하였다.

2. 효소 생산 조건 조사

1) CMC 농도의 영향

가장 endoglucanase 활성이 높은 *S. shibatae* B12를 대상으로 CMC 농도에 따른 효소생산 최적조건을 찾기 위하여 CMC의 농도를 0~2.0%까지 변환시켜 배양한 결과 CMC의 농도 0.4%까지는 cell growth가 증가하였고 이후의 농도에서는 cell growth가 감소하는 양상을 나타내었다. 그러나 효소 생산성에 있어서는 계속 증가하다가 1.0%에서 최대를 나타내었고 이후의 농도에서는 감소하였다. 따라서 *S. shibatae* B12의 효소 생산에 미치는 CMC의 농도는 1.0%로 정하였다(Fig. 2A).

2) 배양 시간

S. shibatae B12를 대상으로 효소 생산에 미치는 배양 시간의 영향을 알아보기 위하여 24시간 단위로 sampling하여 효소활성을 측정하였다. Figure 2B에서 보는 바와 같이 78°C에서 72시간 배양하였을 때 cell growth는 최대를 나타내었고 효소생산성은 80% 이상으로 나타났다.

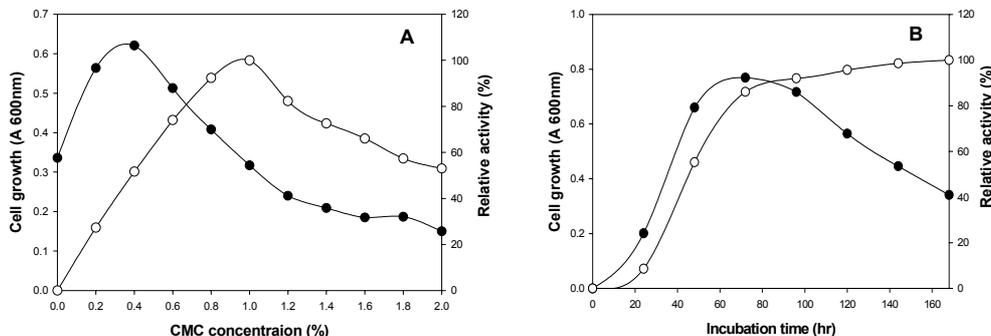


Fig. 2 Effects of CMC concentration and incubation time on the growth and enzyme production of *Sulfolobus shibatae* B12. -●- Cell growth, -○- Enzyme production
(A) Effect of CMC concentration on cell growth and enzyme activity
(B) Time course profiles of cell growth and enzyme production during cell cultivation in the presence of 1.0% CMC

3. 효소의 부분정제

1% CMC를 첨가한 배양 배지를 78°C에서 72시간 진탕배양한 후 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후 (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 단백질을 회수하였다. 침전된 단백질을 투석시킨 후 50mM sodium citrate buffer (pH 6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (2.5 × 100 cm)에 loading한 후 동일 buffer로 유속 15ml/h으로 용출시켜 효소의 활성을 나타내는 부분인 fraction 13~22까지(Fig. 3A)를 동결건조하여 농축시켜 이를 다시 50mM sodium citrate buffer (pH 6.0)으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column (2.5 × 100

cm)으로 gel filtration(Fig. 3B)을 행하여 불순 단백질이 제거하고 endoglucanase 활성부분을 분리할 수 있었다.

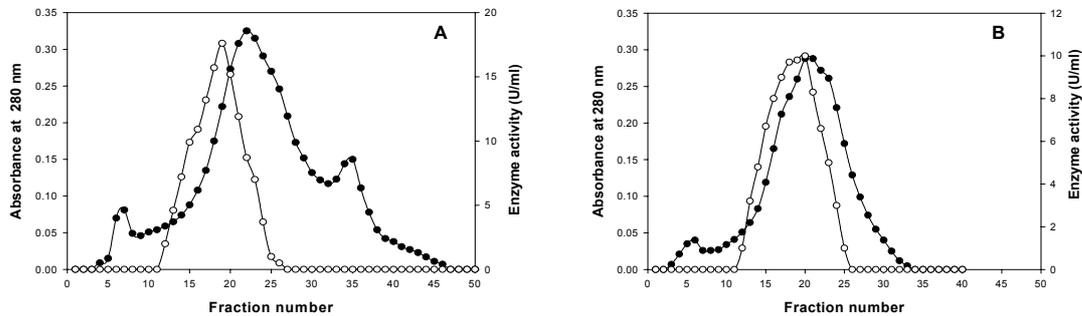


Fig. 3 Sephadex G-100 gel filtration of the endoglucanase produced from *Sulfolobus shibatae* B12.
 ●- Absorbance at 280 nm, ○- Enzyme activity
 A : Chromatogram after the first Sephadex G-100 gel filtration
 B : Chromatogram after the second Sephadex G-100 gel filtration

4. 부분 정제된 효소의 기질특이성

위의 과정을 통해 부분 정제된 효소를 CMC, Avicel, filter paper, PNPG에 대해 반응시켜 보았다. Table 2에서 나타난 바와 같이 Avicel에서는 6.7 unit, filter paper에 대해서는 6.2 unit을 나타내었고 특히 CMC에 대해서는 39.7 unit의 가장 높은 활성을 나타내었다. 한편, PNPG에 대해서는 활성을 나타내지 않아 부분정제된 효소에는 β -glucosidase가 포함되지 않았음을 알 수 있었다.

Table 2. Substrate specificity of partial purified enzyme

Substrate	Activity(U/ml)
CMC	39.7
Avicel	6.7
Filter paper	6.2
PNPG	0

Concentration of enzyme was 34.7 μ g/ml. Cellulase activity was defined as the amount of enzyme that released 1 μ mol of glucose per min and one unit of β -glucosidase activity was defined as the amount of enzyme liberating 1 μ mol of p-nitrophenol per min. Enzyme activity was determined at 78°C and pH 3.5.

참고 문헌

1. Castenholz, R. W. and Boone, D. R. : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", 2nd ed., Springer-Verlag., 404(2001)
2. Zillig, W., Stetter, K. O., Wunderl, S., Schulz, W., Priess, H. and Scholz, J. : Arch. Microbiol., 125, 259(1980)
3. Grogan, D., Palm, P. and Zillig, W. : Arch. Microbiol., 154, 594(1991)
4. Miller, G. L. : Anal. Chem., 31, 426(1959)
5. Kohchi, C. and Tohe, A. : Mol. Gen. Genet., 203, 89(1986)
6. Danila, L., Raffaele, C., Gabriella, F., Mose, R. and Simonetta, B. : Extremophiles., 5, 213(2001)
7. Anwar, S., Marco, M., Mose, R. and Garabed, A. : Extremophiles., 1, 2(1997)