

## 몇 종류의 곰팡이에서 분리되는 Crude Cellulase의 다당류 분해능력의 조사

김 은 수 · 김 영 민 · 이 인 규 · \*최 태 주  
(연세대학교 이공대학 생물학과 · \*연세대학교 의과대학 미생물학교실)

### Investigation of the Hydrolysis of Polysaccharides by Crude Cellulases prepared from Several Species of Fungi

KIM, Woon Soo, Young Min KIM, In Kyu LEE, and \*Tae Joo CHOI  
(Dept. of Biology, College of Science and Engineering, Yonsei University  
\*Dept. of Microbiology, Medical School, Yonsei University)

#### ABSTRACT

Crude cellulases freshly prepared from cultures of *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma viride* 16274 and *Trichoderma viride* 16374 were assayed on 4 different substrates including Na-CMC, cellulose powder, starch and sucrose. Enzyme prepared from *A. niger* contained highly active hydrolytic enzymes of the 4 substrates assayed. *P. notatum* yielded relatively lower amount of cellulase but the extracts were also highly reactive on starch and sucrose. *Trichoderma viride* 16274 yielded very little cellulase and invertase, but the extracts showed a high degree of amylase activity. *Trichoderma viride* 16374, however, yielded cellulase comparable to that of *Penicillium notatum*, but lower activities of amylase and invertase were seen. Commercial cellulases prepared from *Penicillium notatum* (cellulase [K]) and *Trichoderma viride* (cellulase [J]) indicated enzyme activities closely parallel to the crude enzymes freshly prepared from fungus cultures. The optimum pH's of cellulolytic activities of cellulase [K] and cellulase [J] were 4.0 and 5.0 respectively. The optimum temperatures of the cellulolytic activities of cellulase [K] and cellulase [J] were 60°C and 50°C respectively. Assuming the average molecular weight of Na-CMC is about 115,000, the Km values of cellulase [K] and cellulase [J] were found to be  $3.3 \times 10^{-5}$  mM and  $3.3 \times 10^{-4}$  mM respectively.

#### 緒 論

곰팡이에서 얻어지는 cellulase에 관해서는 이미 많은 연구가 되어있다. (Whitaker, 1971; Marshall, 1974; Kim *et al.*, 1975). 현재 시판되고 있는 cellulase들은 *Aspergil-*

*lus niger* (Sigma), *Trichoderma viride* (Onozuka, 日本 天野製藥), *Penicillium notatum* (東亞製藥) 등에서 분리한 것들이다.

본 논문에서는 이들 곰팡이에서 추출되는 cellulase의 역가 및 몇가지 물리화학적 성질을 비교 연구한 결과를 보고 하는 바이다.

These studies were aided by grants from the Korean Traders Scholarship Foundation.

## 材料 및 方法

### 1. 재 료

1) 균주 : *A. niger* NRRL 13(연세대의대 미생물학교실)

*P. notatum*(연세대의대 미생물학교실)

*T. viride* Pers. ex Fr. SANK 16274(일본 三共주식회사 발효연구소)

*T. viride* Pers. ex Fr. SANK 16374(일본 三共주식회사 발효연구소)

2) 시판용 cellulase: 동아제약의 제품(*P. notatum*에서 추출, 이하 cellulase [K]로 명명)과 일본 天野제약의 제품(*T. viride*에서 추출, 이하 cellulase [J]로 명명)을 사용했다.

3) 기질 : 가용성인 기질로 Na-CMC(일본 花城산업, 분자량 ; 약 115,000), sucrose(일본 林純공업), soluble starch(일본 石津제약)를 사용하고, 고도로 중합된 cellulose기질로 cellulose powder(Merck)를 사용했다.

### 2. 방 법

1) 효소제조 : 본 연구자들이 이전의 실험에 사용한 방법(Kim *et al.*, 1975)을 사용했다.

2) 각 기질에 대한 효소의 활성도 : 0.6% Na-CMC, 1% starch, 1% sucrose 용액 및 1% cellulose suspension을 사용하여 4가지 균주로부터 추출한 효소액과 0.1% cellulase [K], cellulase [J] 효소액을 사용하여 각각의 활성도를 Kim *et al.*(1975)의 방법으로 비교했다.

3) cellulase의 활성에 미치는 pH의 영향 : 0.1% cellulase [K]와 *T. viride* 16374에서 추출한 효소액이 0.6% Na-CMC의 작용시 미치는 pH의 영향을 Kim *et al.*(1975)의 방법으로 관찰했다.

4) cellulase의 활성에 미치는 온도의 영향 : 0.1% cellulase [K]와 *T. viride* 16374에서 추출한 효소액이 0.6% Na-CMC와의 작용시 미치는 온도의 영향을 Kim *et al.*(1975)의 방법으로 관찰했다.

5) 효소의 Na-CMC에 대한 친화력 : 0.6% Na-CMC용액 1ml에 cellulase [K] 및 cellulase [J] 효소액을 각기 다른 농도로 제각기 반응(40°C/1 hr.)시켜 최대활성을 나타내는 효소의 농도를 구한 다음, 이 농도의 효소 0.4ml을 취해 각기 다른 농도의 Na-CMC용액과 반응(40°C/hr.)시켜 기질의 농도 변화에 따른 반응속도의 변화를 측정, Lineweaver 및 Burk의 표식에 의해서 Km 값을 구하여 이 기질에 대한 두 효소의 친화력을 비교하였다.

## 結 果

### 1. 기질에 대한 효소의 활성도

1) 4가지 균주로부터 추출한 효소액의 활성도 : Table 1은 각 균주들로부터 추출한 crude enzyme의 기질에 대한 활성이다

Table 1. Activities of polysaccharide-hydrolyzing enzymes extracted from 4 fungi (unit/ml)

Substrates Fungi	Na-CMC	Cellulose powder	Starch	Sucrose
<i>Aspergillus niger</i>	12.46	1.87	33.43	29.21
<i>Penicillium notatum</i>	4.39	0.29	47.44	49.03
<i>Trichoderma viride</i> 16274	1.02	0.06	30.47	0.05
<i>Trichoderma viride</i> 16374	4.67	1.18	22.16	0.70

양함을 보여주고 있는데 amylase에 대한 활성이 공통으로 큰 것을 알 수 있고 C<sub>1</sub>의 활성이 극히 약함을 보여준다. 또 cellulase의 활성은 *A. niger*가, amylase와 invertase의 활성은 *P. notatum*이 가장 강함을 나타내고, 동일 균주인 *T. viride*에서도 cellulase와 invertase의 활성이 극히 약한 16274가 amylase에서는 16374보다 더 강한 활성을 나타내고 있다.

2) cellulase [K]와 cellulase [J]의 기질에 대한 활성도 : Table 2는 시판되는 cellulase [K]와 cellulase [J]의 다당류 기질에

대한 활성도를 나타내고 있는데, 두 제품이 모두 amylase의 활성이 가장 강하고 cellulase의 활성은 약함을 알 수 있으면 전반적으로 cellulase [K]가 cellulase [J]보다 당류 분해의 역가가 더 높음을 알 수 있다. 또 cellulase [K]가 *P. notatum*으로 부터, cellulase [J]가 *T. viride*로 부터 추출한 효소라는 것을 알고 이 결과를 Table 1과 비교할 때 두 가지 결과가 서로 일치됨을

Table 2. Activities of commercial cellulases on polysaccharides (unit/mg)

Substrates Enzymes	Na-CMC	Cellulose powder	Starch	Sucrose
Cellulase [K] ( <i>P. notatum</i> )	7.96	0.97	43.85	13.13
Cellulase [J] ( <i>T. viride</i> )	7.11	1.42	25.74	4.66

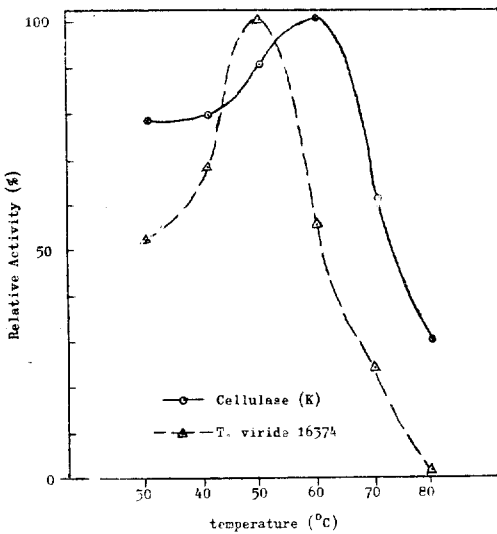


Fig. 1. Effect of pH on the activities of cellulase [K] and the cultural extract of *Trichoderma viride* 16374.

The enzyme activities were determined by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 40°C/hour at various pH's.

알 수 있다.

3) cellulase의 활성에 미치는 pH의 영향 Fig. 1은 cellulase [K]가 pH 4.0에서 가장 강한 활성을 나타내며 이보다 더 알칼리성에서는 산성에서 보다 활성이 급격히 억제됨을 나타내고, 또 *T. viride* 16374에서 추출한 효소는 pH 5.0에서 가장 활발하며 이를 중심으로한 산과 알칼리 영역에서는 활

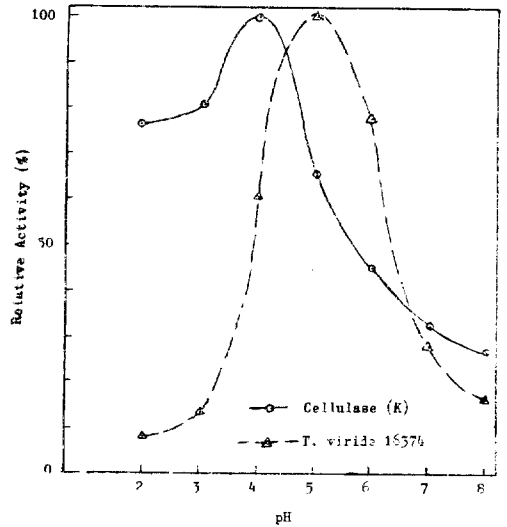


Fig. 2. Effect of temperature on the activities of cellulase and cultural extract of *Trichoderma viride* 16374.

The enzyme activities were determined at pH 5.0 by measuring the reducing power of glucose after incubation of the mixture of enzyme and Na-CMC for 1 hour at various temperatures.

성이 급격히 떨어짐을 보여주고, 또한 이 효소는 cellulase [K]에 비해 산성쪽에서의 활성이 크게 억제됨을 보여준다.

4) cellulase의 활성에 미치는 온도의 영향 : Fig. 2는 cellulase [K]의 활성이 60°C에서 가장 활발하며 그 이상에서는 활성이 크게 떨어지고, *T. viride* 16374의 효소는 50°C에서 가장 활발하고 80°C에서는 거의 완전히 활성이 억제됨을 보여주고 있다.

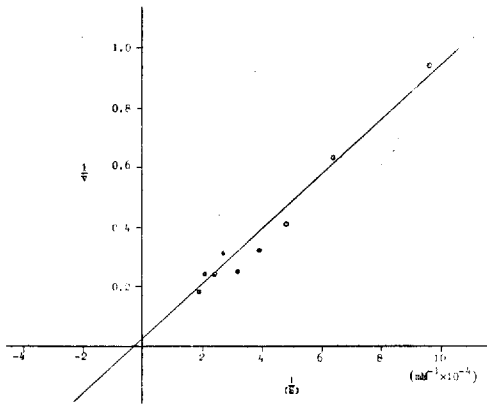


Fig. 3. Lineweaver and Burk plot of the action of cellulase [K].

5) 효소의 Na-CMC에 대한 친화력 :

a) cellulase [K] : cellulase [K]가 0.6 % Na-CMC 1 ml에서 최대 활성을 나타내는 농도는  $3.5 \times 10^{-1}$  mg/ml이었다. Fig. 3은 이 농도의 효소액을 사용, 여러 농도의 Na-CMC와 작용시 나타나는 반응속도와 기질의 농도의 역수를 위한 Lineweaver 및 Burk의 표현으로 이 효소의 Km 값이  $3.3 \times 10^{-4}$  mM임을 나타낸다.

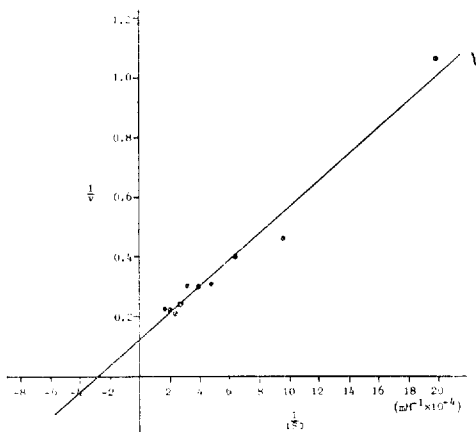


Fig. 4. Lineweaver and Burk plot of the action of cellulase [J].

b) cellulase [J] : cellulase [J]가 0.6% Na-CMC 1ml에서 최대활성을 나타내는 농도는  $3.5 \times 10^{-1}$  mg/ml이었다. Fig. 4는 이 농도의 효소액을 사용하여 여러 농도의 Na-CMC와 작용하였을시 나타나는 반응속도와

기질의 농도의 역수에서 이 효소의 Km값이  $3.3 \times 10^{-5}$  mM임을 보여준다.

## 考 察

본 실험의 결과와 같이 4가지 균주로 부터 얻어진 crude enzyme를 4가지 기질에 작용시킨 바, 각 균주에서 동일하게 amylase의 활성이 가장 높고, 불용성인 cellulose powder에 대한 활성인  $C_1$ 의 활성이 가장 낮게 나타났으며, 가용성인 Na-CMC에 대한 활성인  $C_2$ 가  $C_1$ 에 비해 더 큰 것으로 보아 이들이 모두 가용성인 cellulose 유도체에 더 강하게 작용함을 알 수 있다. 또  $C_1$ 과  $C_2$ 의 활성은 *A. niger*가 가장 강하기 때문에 cellulase를 다량 얻기 위해서는 *A. niger*가 가장 유리하며, amylase와 invertase의 활성은 *P. notatum*이 가장 좋기 때문에 이 두 효소를 얻기 위해서는 *P. notatum*이 유리함을 알 수 있다. *T. viride* 16274와 16374에서 cellulase 및 invertase의 활성은 16374가 월등히 크나 amylase는 16274가 더 큰 것으로 보아 종류가 다른 균주뿐만 아니라 동일 균주내에서도 제통에 따라 효소의 수량이나 활성에 차이가 나타나고 있는 것으로 보인다.

시판되고 있는 cellulase [K]와 cellulase [J]의 각 기질에 대한 활성은 본 연구자들이 동일 균주에서 얻은 결과인 Table 1과 일치되기는 하나 효소의 상품명을 cellulase라고 한 두 제품이 모두 순수한 cellulase가 아닌 것은 물론, cellulase의 활성보다 amylase와 invertase의 활성의 더 크게 나타나고 있어 제품의 명명은 물론 좀 더 순화된 효소의 제조, 판매가 요구된다. 그러나 동아제약의 cellulase [K]의 경우 이 효소를 소화제에 첨가한다면 쌀을 주식으로 하는 우리의 입장에서 볼 때 다당류 분해효소가 끌고루 들어있어 소화제의 첨가물로서는 적당하다고 하겠다.

*P. notatum*에서 분리한 cellulase [K]는 최적 pH가 4.0이며 이보다 알칼리 영역에

서는 산성영역에서 보다 활성이 크게 억제되고 있는 바, 이는 Pettersson(1968)이 동일 균주에서 보고한 최적 pH 4.5~7.0과 큰 차이를 보이고 있으며, *T. viride* 16374에서 추출한 효소는 pH 5.0에서 가장 활발한 바 이는 Okada(1975)가 동일 균주에서 보고한 pH 4.5~5.0과 비슷한 결과를 보이고 있다. 또한 Fig. 1에서 알 수 있는 것과 같이 *T. viride* 16374의 효소가 cellulase [K]에 비해 산성에서의 활성억제가 커서 이 효소의 실험에서는 pH의 변화에 많은 주의를 기울여야 할 필요가 있겠다.

한편 cellulase [K]의 최저온도는 60°C인 바 이는 pH의 경우와 같이 Pettersson(1968)이 *P. notatum*에서 보고한 25°C와 상당한 차이를 보이고 있어 실험상의 차이에서 오는 결과로도 예상할 수 있으나 cellulase가 여러효소의 복합으로 되어 있다는 점을 감안하여 순화에 의한 더 많은 물리화학적 고찰이 필요하다 하겠다. *T. viride* 16374의

경우는 50°C에서 가장 활성이 강한 바 이것은 Okada(1975)가 동일 균주에서 보고한 30~60°C와 일치되는 부분이 있기는 하나 30°C와 60°C에서 활성이 크게 억제되고 있어 이것도 더 많은 연구가 필요하며 또 전반적으로 cellulase [K]에 비해 온도변화에 대단히 민감함을 알 수 있다.

Na-CMC(분자량 : 약 115,000)를 사용해 cellulase [K]와 cellulase [J]의 Km값을 구한 결과 각각  $3.3 \times 10^{-4}$  mM과  $3.3 \times 10^{-5}$  mM으로 cellulase [J]가 cellulase [K]보다 Na-CMC에 대한 친화력이 더 크게 나타났으며 또 Youatt(1958)가 *Stachybotrys atra*에서 cellobiose를 기질로 사용했을 때의 값  $3.9 \times 10^{-4}$  M과 Chetkarov(1969)가 *A. oryzae*에서 Na-CMC를 기질로 사용했을 때의 값  $3.6 \times 10^{-5}$  M과 비교할 때, 물론 균주와 기질의 차이도 있겠으나 이 두 효소의 Na-CMC에 대한 친화력이 대단히 강하다는 사실을 알 수 있다.

### 摘 要

1. *A. niger*, *P. notatum*, *T. viride* 16274 및 *T. viride* 16374의 4가지 균주에서 얻은 crude cellulase로 Na-CMC, cellulose powder, starch, sucrose 등 4가지 기질에 대한 활성을 조사했다.

1) *A. niger*는 4가지 기질에 대해 매우 높은 활성의 가수분해효소를 가지고 있다.

2) *P. notatum*은 cellulase의 양은 적으나 starch와 sucrose에 대해서는 높은 활성을 나타냈다.

3) *T. viride* 16274는 극히 소량의 cellulase와 invertase를 가지나 amylase 활성은 높았다.

4) *T. viride* 16374는 *P. notatum*과 비슷한 정도의 cellulase 활성을 지니나 amylase와 invertase의 활성은 낮았다.

2. *P. notatum* (cellulase [K])과 *T. viride* (cellulase [J])로 부터 얻은 시판 cellulase는 곰팡이를 배양하여 추출한 crude enzyme과 비슷한 활성을 나타냈다.

3. cellulase [K]와 cellulase [J]의 섬유소 분해활성 최적 pH는 각각 4.0 및 5.0이었다.

4. cellulase [K]와 cellulase [J]의 섬유소 분해활성 최적온도는 각각 60°C 및 50°C이었다.

5. Na-CMC의 평균 분자량을 115,000이라고 할 때, cellulase [K]와 cellulase [J]의 Km 값은 각각  $3.3 \times 10^{-4}$  mM과  $3.3 \times 10^{-5}$  mM이었다.

### 謝 辭

본 연구를 수행하는데 있어 많은 실험재료를 제공하여 주신 동아제약주식회사에 감사드립니다.

### 引 用 文 獻

1. Chetkarov, M., and D. Kolev, 1969. Viscometric determination of the Michaelis-Men-

**Table 1.** The paper electrophoretic analysis of rabbit antisera to *F. ferrooxidans* and *T. thiooxidans*

Antiserum Serum fraction	<i>F.</i>	<i>F.</i>	<i>F.</i>	<i>F.</i>	<i>T.</i>	control
	<i>ferrooxidans</i> strain 2	<i>ferrooxidans</i> strain 3	<i>ferrooxidans</i> strain 4	<i>ferrooxidans</i> strain 6	<i>thiooxidans</i>	
Albumin (%)	57.36	51.20	50.70	51.83	50.49	63.74
$\alpha$ -Globulin (%)	5.08	7.23	6.03	6.69	6.00	7.60
$\beta$ -Globulin (%)	15.73	9.04	13.57	14.23	16.30	15.79
$\gamma$ -Globulin (%)	21.83	32.53	29.65	27.20	26.80	12.87

**Table 2.** The titers of antiserum to *F. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* according to different titration methods

Antisera	Titration method	Immunodiffusion test	Agglutination test	Hemagglutination test
<i>F. ferrooxidans</i> strain 2		1 : 32	1 : 64	1 : 256
<i>F. ferrooxidans</i> strain 3		1 : 16	1 : 16	1 : 256
<i>F. ferrooxidans</i> strain 4		1 : 8	1 : 8	1 : 32
<i>F. ferrooxidans</i> strain 6		1 : 8	1 : 8	1 : 32
<i>T. thiooxidans</i>		1 : 8	1 : 8	1 : 64
Control		1 : 0	1 : 0	1 : 0

30% in average to compare with that of 12% in control normal rabbit serum.

In immunodiffusion, agglutination and hemagglutination tests, the antisera to *F. ferrooxidans* strains and *T. thiooxidans* were reactive with their own antigen, however, the overall reactivity was low except the antisera to *F. ferrooxidans* strain 2 and 3 which was represented the highest titer of 256 in hemagglutination test, respectively.

It appeared, therefore, that most of the antibodies to the whole bacterial crude antigen were easily elicited in rabbits and among the titers, the hemagglutination test was most reactive than others.

According to our previous publications (Rhee, 1973 a, b), the cell components of *F. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* contained some typical substances such as

ornithine-containing amino-lipid and large amounts of polysaccharides in their cell constituents which may play a key role in preparation of antibody (Shively, 1969; Knoche, 1969 and 1972).

It is generally accepted the polysaccharide and protein moieties endow the active antigenic properties with serological specificities.

The increase of antibody to *F. ferrooxidans* and *T. thiooxidans* from experimental animal was due to the major antigenic substance such as polysaccharide and small portion of protein.

Particularly, in our experiment, the phospholipid in these organism may be related to haptene-like substance for the production of antibody.

To investigate the antigenic relationship between *F. ferrooxidans* strain and *T. thiooxidans*, the hemagglutination tests were made with their homologous and heterologous antisera to whole bacterial antigen.

The results were listed in Tables 3, 4 and 5, respectively. The hemagglutination test of various antisera to organisms showed the titers of 256 and 64 when they were reacted with their own antigen, however, they also showed cross reactivity between *F. ferrooxidans* strain and *T. thiooxidans*.

In particular, very similar cross-reactivities were observed between *F. ferro-*