

섬유질 문화재로부터 분리된 *Aspergillus clavatus* 의 섬유소분해효소에 관한 연구

丁姬鎭 · 韓成熙 · 安喜均 · 閔庚喜*

文化財研究所 保存科學研究室, *淑明女子大學校 生物學科

Studies on the cellulase properties of *Aspergillus clavatus* from the Cellulose-Cultural Properties

Hee Jin Chung, Sung Hee Han, Hee Kyun Ahn and Kyung Hee Min *

Laboratory of Conservation Science, National Research Institute
of Cultural Properties, and * Department of Biology,
Sookmyung Women's University, Seoul 140, Korea

ABSTRACT: Cellulolytic microorganisms were isolated from the cellulose-cultural properties. Among them, *Aspergillus clavatus* with the highest cellulase activity was identified by the morphological characteristics and its enzyme activities were compared on the various cultural conditions. It was found that the induction of carboxymethylcellulase(CMCase), avicelase and salicinase in CMC liquid media showed the highest enzyme activity on five day's cultivation at 30°C and thereafter their activities were gradually decreased with time. After crude extracellular enzymes precipitated with the 70% saturated ammonium sulfate solution were dialyzed with 20 mM acetate buffer pH 6.0, each crude enzyme was examined. The optimal activities of CMCase and avicelase were both found to be at 50°C and pH 6.0. Their thermal stability was appeared at the 50°C. CMCase and avicelase had the maxima activities with 1.5% and 2.2% substrate concentration, respectively. The concentration of 5 mM Mg⁺⁺ or Ca⁺⁺ was found to have a maximum cellulase activity and its activity was inhibited with more than 5 mM Cu⁺⁺ and Zn⁺⁺ concentration. Cellulase activity was also inhibited sensitively by the inhibitors such as 2-mercaptoethanol, iodine and sodium azide.

KEYWORDS: *Aspergillus clavatus*, CMCase, Avicelase

우리나라 문화재중에는 여러종류가 많이 있지만 그 중에서도 의류, 지류, 가구류 등의 문화재가 상당한 비율을 차지하고 있다. 이들은 그 주성분요소가 섬유소로 되어 있어 섬유질문화재라 부른다. 섬유질문화재는 오래되면 물리 화학적으로 훼손의 가능성이 많으며 미생물의 침해를 받기가 쉽다. 그러므로 이들 문화재를 영구히 보존하기 위해서는 피해를 주는 미생물의 연구가 시급하다 할 수 있다.

섬유질문화재의 피해균의 연구에 관해서는 민 등(1981, 1984)이 유물에 부착하는 부착균과 유물고내의 공중균을 분리하였으며 섬유질문화재의 미생물에 의한 훼손에 대하여 보고하였고, 大槻虎男(1956)은

미술품에 피해를 주는 균과 방지에 관하여, 新井英夫(1974)는 문화재의 생물에 의한 열화(劣化)와 건축채색에 발생하는 사상균의 방제법에 대하여, 高橋旨象(1975)은 목재의 부후(腐朽) 균에 관해서 보고하였다.

섬유소는 섬유소분해효소인 cellulase에 의하여 분해된다. Cellulase는 β -1,4-glucan을 가수분해시키는 β -1,4-glucan glucanohydrolase(EC No.3, 2, 1, 4)가 정식명칭인데 cellulase는 단일효소가 아닌 서로 다른 몇개의 component의 작용으로 섬유소 분해기능을 가진 복합효소이다(Reese 등, 1950; Nisizawa 등, 1972; Okada 등, 1966;

Shibata 등, 1969; Wood 등, 1972; Nisizawa 등, 1972).

Cellulase에 의한 가수분해 기작에 관한 C₁-C_x의 개념은 Reese 등(1950)에 의해 처음으로 제기되었는데 cellulase 중 어느 성분은 soluble cellulose derivatives인 CMC(carboxymethyl cellulose)를 잘 가수분해시키며 또 어느 성분은 native cellulose나 insoluble cellulose인 avicel을 분해시키는 것의 두 가지 cellulase 성분이 있다는 것이다. 기질에 대한 특이성에 따라 전자를 C_x, 그리고 후자를 C₁이라 하였으며 Nisizawa 등(1972)에 의하여 CMCase와 Avicelase라고 불리우게 되었다. Cellulase를 생성하는 균들은 여러종류가 있는데 fungi로서는 *Myrothecium verrucaria*, *Actinomyces* sp., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus luchuensis*(Reese 등, 1950), *Rhizopus* sp.(성 등, 1968), *Trichoderma viride*(Nisizawa 등, 1972), *Trichoderma koningii*(Wood 등, 1972; Hong 등, 1976), *Sporotrichum pulverulentum*(Eriksson 등, 1975), *Penicillium chrysogenum*(Hong 등, 1976), *Geotrichum candidum*(Marinchenko 등, 1979), *Pyricularia oryzae*(전, 1979) 등에 관한 연구가 있고 그 밖의 세균이나 방선균으로서는 *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*(Yamane 등, 1970), *Thermononospora curvata*(Stutzenberger, 1972), *Stachybotrys atra*(김 등, 1976), *Cytophage* sp.(Chang 등, 1981), *Cellulomonas flavigena*(Kim 등, 1981), *Schizophyllum commune*(Rho 등,

Table I. Isolation medium for cellulolytic fungi from cellulose-cultural properties

Cellulose Powder	0.50 g
NaNO ₃	0.10 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0.12 g
KH ₂ PO ₄	0.09 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
KCl	0.05 g
Yeast extract	0.05 g
Casamino acid	0.05 g
Agar	1.50 g
D. W.	100ml
pH	6.8

Table II. Culture medium for cellulase producing fungi

NaNO ₃	3.0 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g
KCl	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g
CMC	10.0 g
D. W.	1,000 ml
pH	6.0

1982) 등에 관한 연구가 있다. 미생물에서 C₁과 C_x cellulase component의 생성은 미생물이 성장할 때의 생리적인 조건에 영향을 받는다(Hong 등, 1976).

본 연구에서는 섬유질문화재에 부착하여 직접적인 피해를 주는 곰팡이가 섬유소를 어떻게 분해하는지의 근본적인 연구를 수행하기 위해서 부착균의 cellulase의 성질에 대해서 검토하였다. 따라서 cellulase의 활성에 영향을 주는 pH, 온도, 기질농도, 금속이온, 그리고 저해제에 관해서 조사하였다.

材料 및 方法

균주의 분리

실험에 사용된 부착균은 창덕궁의 유물고에 소장되어 있는 의류와 가구류에서 채취하여 다음과 같은 방법으로 분리하였다. 유물의 내부 깊숙이에서 피해를 주는 부착균만을 채취하기 위하여 표면에 묻어있는 균은 알코올로 닦아 제거시켰다. 손상된 부위를 핀셋으로 끊어서 멸균된 captube 안에 넣어 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵배까지 saline 용액으로 희석하였다. 각각 희석된 포자 현탁액은 cellulolytic fungi를 분리하기 위한 분리용 배지(Table 1)에 1 ml 씩 넣어 골고루 잘 퍼지게 한 다음 10일간 배양하였다. 배양후 집락이 많이 생성되었는데 약 20개의 균주로나눌 수 있었고 육안으로 보아 plate에서 비교적 집락의 직경이 크고 성장속도가 빠른 균주를 일차적으로 6개 분리하였다. 일차분리된 6개의 균주를 CMC가 포함된 액체배지(Table 2)에 접종하고 rotary shaker에서 10일간 배양하면 24시간마다 효소활성측정법에 의하여 활성도를 측정할 결과 한 균주의 활성도가 뛰어나게 높았으므로 이 균주를 본

실험에 사용하였다.

배집

1) 균분리 배지

Cellulolytic fungi 를 분리하기 위한 배지의 조성은 Table I 과 같다.

2) 균배양 배지

Cellulase 를 생성하는 fungi 를 배양하기 위한 배지의 조성은 Table 2와 같다.

균의 동정

균주를 동정하기 위한 배지는 Czapek's agar 배지, malt extract agar 배지, potato dextrose agar 배지를 사용하였다.

액체배양

배양용 배지(Table 2)를 250 ml 삼각플라스크에 50 ml 씩 넣고 Autoclave 에서 120°C, 15분간 가압 멸균하여 보관중인 *Aspergillus clavatus* loop 를 채취, 접종한 다음 30°C 의 rotary shaker (200 rpm)에서 액체 배양하였다.

효소의 활성측정

Rotary shaker 에서 배양중인 배양액을 매일 일정량 취한뒤 원심분리 (10,000×g/25 min)하여 상등액을 효소액으로 하였다. CMCase 의 활성은 1% CMC 0.4 ml, pH 6.0인 20 mM acetate buffer 0.4 ml, 효소액 1 ml 를 반응시켜 40°C에서 30분동안 incubation 시킨후 생성되는 glucose 의 양을 끓인 효소액을 control 로 하여 Somogyi (1952)-Nelson (1944)의 방법으로 Perkin-Elmer SS2S UV/Vis spectrophotometer (660 nm)에서 흡광도를 측정하고 단백질량은 Lowry (1951)의 Folin-phenol 방법에 의해 정량하여 (standard 는 bovine serum albumin 사용) 활성도를 정하였다.

Avicelase 와 Salicinase 의 활성측정도 위의 방법과 동일하게 하였다.

단백질 정량

단백질량은 Lowry (1951)의 Folin-phenol 방법에 의해 정량 (Standard 는 bovine serum albumin 사용)하여 활성도를 정하였다.

효소제조

효소의 활성도가 가장 큰 배양후 5 일째의 배양액을 원심분리 (10,000×g/25 min)하여 침전물을 버리고 상등액을 취하여 황산암모늄 (70% 포화)으로 4°C 에서 하룻밤동안 침적시켰다. 다시 원심분리 (10,000×g/25 min)하여 상등액은 버리고 침전물을 소량의 20 mM acetate buffer (pH 6.0)로 녹인후, 같은

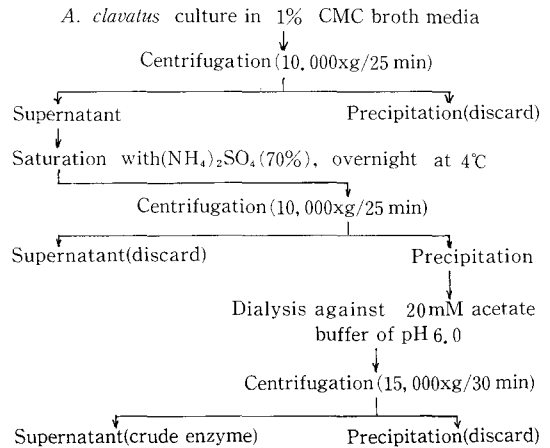


Fig.2. A diagram of crude enzyme preparation.

acetate buffer 에서 약 48시간동안 dialysis 를 시킨 뒤 얻은 용액을 다시 원심분리 (15,000×g/30 min)하여 맑은 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다 (Fig.2).

結果 및 考察

균주의 분리 및 동정

부착균을 채취하여 분리용 배지 (Table 1)에서 육안으로 6 개의 균주를 분리하였고 다시 이들을 CMC 가 포함된 액체배지 (Table 2)에서 효소의 활성 측정법에 의하여 활성도를 조사한 결과 한 균주의 활성도가 뛰어나게 높았다. 이 균주를 동정하기 위하여 Czapek's agar 배지, malt extract agar 배지, P.D.A.배지에 접종하여 각 배지의 특성에 따른 성장과정을 관찰한 결과 Czapek's agar 배지에서는 1 주일이 지나면 완전한 형태가 나타나기 시작하나 Malt extract Agar 배지는 2 주일쯤 지나야 나타나며 P.D.A.배지는 20일이 경과한 후에야 완전한 형태를 관찰할 수 있었다. 집락의 조직에서 보면 Czapek's agar 배지에서는 양털이 뭉친 것처럼 conidial head (분생자두)가 밀집되어 있고 균사가 수북이 올라와 있었으며, malt extract agar 배지에서는 띠를 두른것 같이 포자가 퍼져나가 집락을 형성하였고 P.D.A.배지에서는 용단같이 부드럽게 퍼져 있었다.

또한 균체를 염색 고정하여 균주의 conidial head, conidiophore, vesicle, sterigmata, conidium 등을 현미경으로 관찰하였는데 균체 염색은 lacto-phenol

Table III. Characteristics of *A. clavatus* on Czapek's medium

1. Colony morphology	3.5-4.0 cm in diameter floccose texture grayish blue-green color faintly brown in reverse color inconspicuous exudate odorless
2. Conidial head	split shape grayish blue-green color 115-165×60-80 μm in size
3. Conidiophore	colorless 1.5-3.0 mm×20-30 μm in size
4. Vesicle	clavate shape whole fertile colorless 105-155×50-70 μm in size
5. Sterigmate	uniseriate arrangement 9.8-12.5×2.5-2.7 μm in size
6. Conidium	ellipsoid shape 3.5-4.0×2.8-3.5 μm in size

용액(phenol 20 ml, lactic acid 16 ml, glycerin 31 ml 및 증류수 20 ml)과 lacto-fuchsin 용액(lactic acid 10 ml, fuchsin acid 0.1g)을 사용하였다.

균의 동정은 Czapek's agar 배지에서 15일간 배양한 후 여러가지 특성을 고찰하였다. 육안으로 관찰할 때 plate의 앞면은 pale blue-green 색깔에서 시간이 경과할 수록 grayish blue-green 색이 되며, plate의 뒷면은 처음엔 색깔이 없다가 시간이 경과하게되면 약간 brown 빛을 띠었다. 냄새는 전혀 없었고 균사의 길이는 4~5 μm쯤 되었다. Conidial

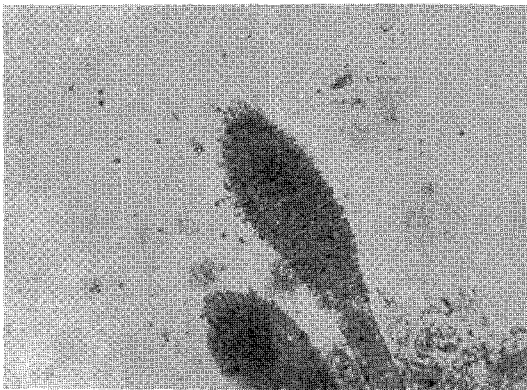


Plate 1. *A. clavatus* (×300).

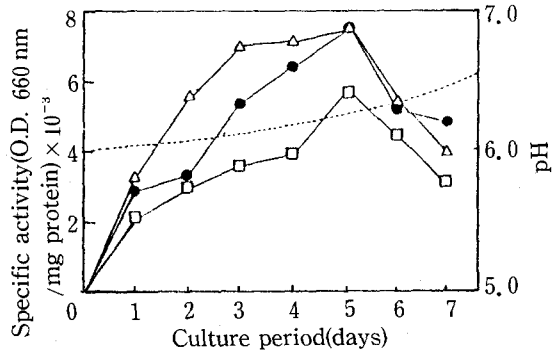


Fig.1. Time course of the CMCase, Avicelase, Salicinase induction on CMC-culture media. ●-●, CMCase; △-△, Avicelase; □-□, Salicinase; ·····, pH.

head는 column 형태로 갈라져 있었고, 색깔은 grayish blue-green을 띠고 있었으며 크기는 115-165×60-80 μm 이었고, conidiophore는 색깔은 없었으며 길이는 1.5-3.0 μm 직경은 20-30 μm 이었다(Table 3). Vesicle의 모양은 뚜렷한 곤봉모양이었고 크기는 105-155×50-70 μm이었으며 fertile area는 전범위였다(plate 1). Sterigmata의 배열상은 single 이었으며 크기는 9.8-12.5×2.5-2.7 μm 이었다. Conidium의 표면은 부드럽고 매끈하였으며 약간 타원형이고 크기는 3.5-4.0×2.8-3.5 μm 이었다. 이상의 여러가지 특성을 Raper-Fennell(1965)의 동정방법에 따라 동정한 결과 *Aspergillus clavatus*로 동정이 되었다.

효소의 활성도

CMC가 함유된 배양용 배지에 *A. clavatus*를 접종하여 CMC, avicel, salicin을 기질로 하여 24시간마다 활성도를 측정된 결과 배양 1 일째에서부터 활성이 나타나기 시작하여 배양 5 일째에 가장 높은 활성도를 나타내었다(Fig.1). 각 효소에서 보면 avicelase가 비교적 높은 활성도를 나타냈는데 CMC가 inducer로 작용할 때 *A. clavatus*는 avicelase를 많이 생성함을 나타내 준다. 또한 Salicinase는 낮은 활성도를 보였는데 *A. clavatus*는 여러 종류의 효소가 함유되어 있으나 salicin을 분해하는 효소는 미약함을 암시하고 있다. Hong 등(1976)에서 보고된 바에 따르면 *Trichoderma koningii*와 *Streptomyces* sp.는 CMCase의 활성도가 avicelase의 활성도보다 컸으며 *Penicillium chrysogenum*과 *Aspergillus niger*에서는 avicelase가 CMCase의 활성도보다 더 큰것과 비교해 볼 수

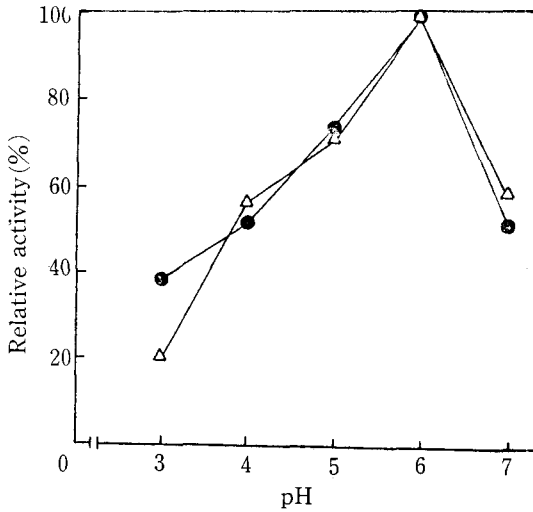


Fig.3. Optimal PH's of CMCase and avicelase of crude enzyme from *A. clavatus*. ●-●, CMCase; △-△, Avicelase.

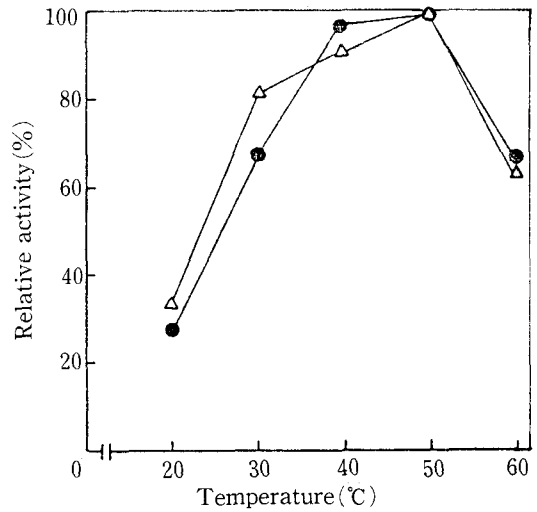


Fig.4. Influence of temperature on CMCase, and avicelase of crude enzyme from *A. clavatus*. ●-●, CMCase; △-△, Avicelase.

있었다. 또한 김 등(1975)은 *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Trichoderma viride* 16274와 *Trichoderma viride* 16374에서 모두 불용성인 cellulose powder가 기질로 작용할 때 보다도 가용적인 CMC가 기질로 작용할 때 활성도가 크게 나타났음을 보고하였고 김 등(1976)은 *Alternaria* sp.에서 CMCase의 활성이 불용성인 cellulase의 활성보다 크게 나타났음을 보고하였다.

효소의 활성에 미치는 pH의 영향

비교적 효소의 활성도가 높은 기질인 CMC와 avicel을 사용하여 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. 20 mM acetate buffer를 pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0로 다양하게 한 뒤 CMC와 avicel을 기질로 하여 효소의 활성 측정법과 동일한 방법으로 활성도를 비교하였다. CMCase와 avicelase 모두 기질과의 반응시 최적 pH는 6.0으로서 거의 중성에 가까우며 이보다 산성 또는 알칼리성에서는 효소의 활성이 감소하였다(Fig. 3). Reese 등(1950)은 *Aspergillus luchuensis*에서 pH 6.0일때 CMCase의 활성이 최고로 나타남을 보고하였고 Wood(1968)는 *Trichoderma koningii*로부터 CMCase의 활성을 측정했을 때 pH 5.4에서 최고의 활성을 타나낸다고 보고했다. 또한 김 등(1975)은 *Trichoderma viride* 16374로부터 pH 5.0, *Penicillium notatum*에서는 pH 4.0일때 기질은 CMC에서 cellulase의 활성이 최고로 나타남을 보고

하였으며 Hong 등(1976)은 CMCase의 활성에 있어서 최적 pH는 *Trichoderma koningii*에서는 pH 6.0, *streptomyces* sp.에서는 pH 5.0, *Aspergillus niger*와 *Penicillium chrysogenum*에서는 pH 4.8로 나타남을 보고하였고 avicelase의 활성에 있어서 최적 pH는 *Trichoderma koningii*와 *Streptomyces* sp., *Penicillium chrysogenum*에서는 pH 5.4, *Aspergillus niger*에서는 pH 4.8로 나타남을 보고

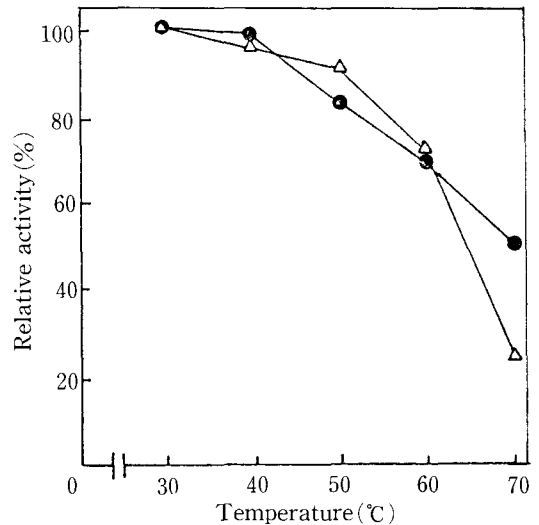


Fig.5. Thermal stability of CMCase and avicelase of crude enzyme from *A. clavatus*. ●-●, CMCase; △-△, Avicelase.

하였다.

효소의 활성에 미치는 온도의 영향

1% CMC 혹은 1% Avicel 0.4 ml, 20 mM acetate buffer(pH 6.0) 0.4 ml, 효소액 1 ml 을 반응시켜 온도 조건을 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 로 다양하게 한 뒤 생성되는 glucose 양을 효소활성 측정법과 같은 방법으로 활성도를 비교하였다(Fig. 4). CMCase, avicelase 의 활성을 높여주는 최적온도는 50°C로 나타났으며 40°C에서는 비교적 높은 활성도를 나타내나 20°C와 60°C에서는 효소의 활성도가 감소하였다. Reese 등(1950)은 CMCase 의 활성에서 최적온도는 *Myrothecium verrucaria* 에서 50°C, *Actinomyces* sp.와 *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus luchuensis*에서는 60°C로 나타났음을 보고하였다. 또한 Hong 등(1976)은 CMCase 의 최고 활성을 나타내는 온도는 *Trichoderma-koningii* 와 *streptomyces* sp., *Aspergillus niger*에서는 50°C, *Penicillium chrysogenum*에서는 40°C였음을 보고하였고 avicelase 의 활성에서 최적온도는 *Trichoderma koningii* 와 *Penicillium chrysogenum*에서는 40°C, *Streptomyces* sp.와 *Aspergillus niger*에서는 50°C였음을 보고하였는데 fungi 에 있어서 균주와 기질에 따라 최적온도가 다를 수 있었다.

효소의 열에 대한 안정도

효소에 열을 가했을 때 잔여활성도가 얼마나 되는지를 알아보기 위하여 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 30분동안 예열시킨 효소액을 취해 효소의 활성측정법과 동일한 방법으로 잔여활성도를 측정하

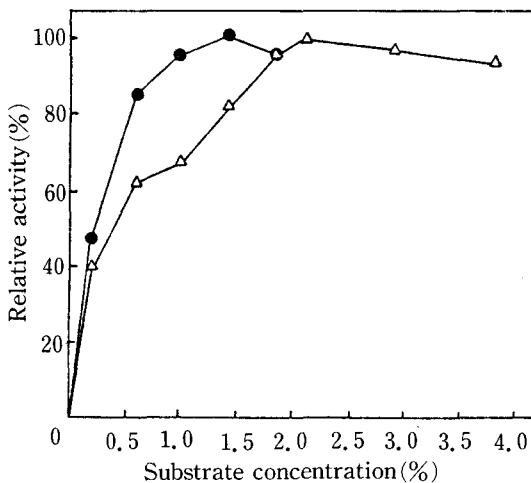


Fig.6. Effects of substrate concentration. ●-●, CMCase; △-△, Avicelase.

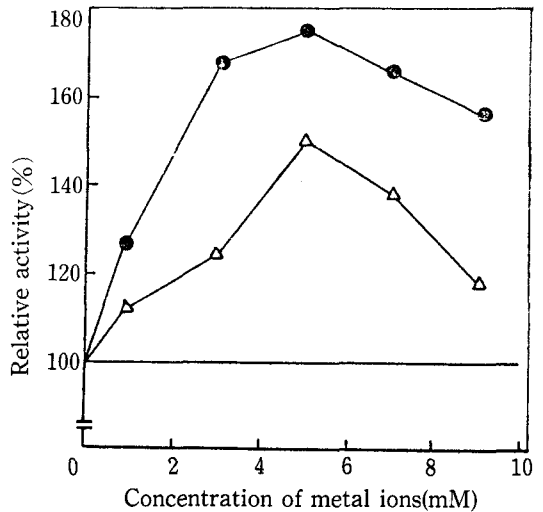


Fig.7. Effect of Mg²⁺ (●-●) and Ca²⁺ (△-△) ions on the activities of cellulase.

여 열에 대한 안정도를 실험하였다(Fig.5). 실험결과 CMCase, avicelase 모두 50°C에서 80% 이상의 잔여활성도를 보여주며 CMCase가 avicelase보다 더 안정함을 나타냈다. Hong 등(1976)은 *Trichoderma koningii*에서 CMCase와 avicelase의 열안정성을 살펴본 결과 60°C에서 70% 이상의 잔여활성도를 나타냈다고 보고하였는데 대체로 fungi에서의 cellulase는 열에 대하여 안정함을 알 수 있었다.

기질농도에 따른 효소의 활성

기질농도를 높여 줄수록 효소의 활성도가 어떻게 변화하는지 조사하였다(Fig.6). CMC와 avicel의 농도를 다양하게 하여 효소의 활성측정법과 동일한 방법으로 활성도를 비교하였다. 실험결과 기질농도가 증가될수록 활성도도 증가하나 일정한 농도에 이르면 다소 감소되었는데 CMCase는 1.5%, avicelase는 2.2%에서 최고의 활성도를 보였다.

효소의 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온이 효소의 활성에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 반응에 사용하는 20 mM acetate buffer(pH 6.0)에 금속염을 여러 농도로 녹인 후 기질(CMC)에 첨가시켜 효소의 활성측정법과 동일한 방법에 의해 활성도를 비교하였다. 금속이온을 첨가하지 않은 효소의 활성도를 100%로 하였을 때 Mg²⁺와 Ca²⁺는 각각 5mM에서 178%와 150%의 활성을 나타내 효소의 활성을 촉진시켰으며 5mM보다 감소하거나 증가한 농도에서는 효소의 활

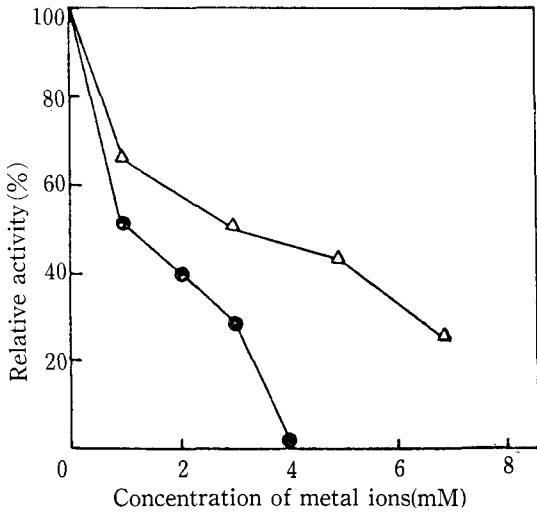


Fig.8. Effect of Cu⁺⁺ (●-●) and Zn⁺⁺ (△-△) ion on the activities of cellulase.

성숙진이 약간 감소하였다(Fig.7). 또한 Cu⁺⁺ 와 Zn⁺⁺ 은 농도가 증가할 수록 효소의 활성을 저해시키는데 Cu⁺⁺ 의 저해하는 속도가 더 빨랐다(Fig.8). 최 등(1976)은 *Penicillium notatum*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger* 에서 Mg⁺⁺ 가 효소활성을 촉진시켰으며 Cu⁺⁺ 는 저해하였다고 하였는데 본 실험과 일치하였다. 또한 Ni⁺⁺, Pb⁺⁺, K⁺, Ag⁺ 도 효소의 활성을 저해시키는 것을 알 수 있었다(Table III). Hong 등(1976)의 보고에 의하면 *Trichoderma koningii* 에서 Pb⁺⁺, K⁺, Ag⁺ 의 존재하에 효소

Table III. Effect of metal ions on the activities of cellulase

Metal ion	Relative activity (%)	
	1 mM	0.1 mM
None	100.	100
Cr(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	75.0	41.6
NiCl ₂ ·6H ₂ O	37.5	69.3
SnCl ₂ ·2H ₂ O	88.5	40.5
CoCl ₂ ·6H ₂ O	102.7	89.8
Pb(NO ₃) ₂	51.7	88.9
NaCl	74.3	55.7
FeCl ₃ ·6H ₂ O	96.6	43.2
KCl	65.9	75.3
AgNO ₃	52.7	88.9

Table IV. Effect of enzyme inhibitors on cellulase activities

Inhibitor	Relative activity (%)	
	10 mM	1 mM
TCA ^a	- ^b	99.6
EDTA·2Na ^c	97.9	105.1
NaN ₃	51.7	94.8
2-Mercaptoethanol	98.0	42.0
I ₂	0.7	50.9
None	100	100

a Trichloroacetic acid

b Not detected

c Ethylenediamine tetraacetic acid, disodium salt.

의 활성이 저해된다고 하였는데 본 실험과 일치하였다.

효소의 활성에 미치는 저해제의 영향

효소의 저해제로 쓰이는 여러가지 저해제(TCA, EDTA·2Na, NaN₃, 2-Mercaptoethanol, I₂)를 기질(CMC)에 첨가시켜 효소의 활성측정법과 동일한 방법으로 활성도를 비교하였는데 저해제를 전혀 넣지 않은 효소의 활성도를 100%로 하였다. 저해제는 20 mM acetate buffer(pH 6.0)에 녹여 10 mM 과 1 mM 의 농도로 제조하였다. 실험결과 TCA, EDTA·2Na 와 NaN₃, I₂에서 효소의 활성이 크게 저해됨을 알 수 있었다(Table V).

요 약

창덕궁의 유물고에 소장되어 있는 섬유질 문화재로부터 섬유소 분해균을 분리하기 위하여 두 단계의 선별을 거쳐서 섬유소 분해능이 강력한 Cellulolytic fungus 를 분리하였다. 이 균주는 형태학적인 분류 기준을 통하여 *Aspergillus clavatus* 로 동정되었다.

이 균주에서 CMC 액체배지에서의 CMCase, avicelase 와 salicinase 의 생성은 30°C 의 shaking culture 조건에서 5 일에 가장 높았으며, 그 이후는 점차 감소하였다. crude extracellularenzyme 을 70%(NH₄)₂SO₄ 포화용액에서 침전시켜 20 mM acetate buffer(pH 6.0)로 dialysis 시킨후 효소에 대한 여러가지 성질을 비교하였다. CMCase 와 avicelase 의 최적 pH 는 모두 pH 6.0으로 중성에

가까웠으며 두 효소의 최적온도는 모두 50°C이었다. 효소의 열에 대한 안정도에서는 CMCase, avicelase 모두 30-50°C에서 안정성을 유지하였고 또한 효소의 활성에 미치는 기질농도의 영향을 보면 CMCase는 1.5%에서 avicelase는 2.2%에서 최고의 활성을 나타냈다. 금속이온의 영향을 살펴본 결과 Mg^{++} 와 Ca^{++} 는 5mM에서 효소의 활성이 최고에 달하였으며 Cu^{++} 와 Zn^{++} 에서는 농도가 증가할 수록 효소의 활성이 저해되었다. 또한 이 균주의 섬유소 분해효소는 2-mercaptoethanol, I_2 , $NaNO_3$ 등의 저해제에 의하여 활성이 크게 저해되었다.

參考文獻

- Chang, W.T.H. and Thayer, D.W.(1981) : The cellulase system of *Cytophage* sp. *Can. J. Microbiol.*, **27** : 1260-1266.
- Eriksson, K.E. and B. Pettersson(1975) : Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum*(*Chrysosporium lignorum*) for the break down of cellulose, *Eur. J. Biochem.* **51** : 193-206.
- Hong, S.W., Y.C. Hah, K.H. Min and Y.H. Rhee (1976) : Isolation of cellulolytic microorganisms and their physiological characteristics. *Kor. J. Microbiol.* **14** : 17-24.
- Hong, S.W., K.H. Min and Y.H. Rhee(1976) : Partial purification and some properties of cellulase components from *Trichoderma koningii*. *Kor. J. Microbiol.* **14** : 84-94.
- Kim, B.H. and J.W.T. Wimpenny(1981) : Growth and cellulolytic activity of *Celulomonas flavigena*. *Can. J. Microbiol.* **27** : 1260-1266.
- Kim, S.H. and W.S. Kim(1982) : Studies on the isolation, purification and characterization of a Cx enzyme produced by *Pyricularia oryzae* C-7. *Kor. J. Mycol.* **10**(2) : 67-73.
- Lowry O.H., J.N. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Rahdall(1951) : Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **13** : 265-275.
- Marinchenko, V.A., S.V. Nosik and N.A. Tiunova(1979) : Effect of fungal cellulases on enzymic activity of malt. *App. Biochem. Microbiol.* **15**(6) : 670-673.
- Nelson, H.(1944) : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* : 375-380.
- Nisizawa, K., Y.Tomita, T. Kanda, H. Suzuki and K. Wakabayashi(1972) : Substrate specificity of C_1 and Cx cellulase component from fungi. *Proc. IV. IFS: Ferment Technol.* today, 719-725.
- Okada, G., T. Niwa, H. Suzuki and K. Nisizawa (1966) : Purification of a cellulase component from *Trichoderma viride* and some of its properties. *J. Ferment. Technol.* **44**(9) : 682-690.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell(1965) : The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Reese, E.T., G.H. Sin. and H.S. Levinson (1950) : The biological degradation of soluble cellulose derivatives. *J. Bacteriol.* **59** : 485.
- Rho, D., M. Desrocher's, L. Jurasek, H. Driguez and J. Defaye(1982) : Induction of cellulase in *Schizophyllum commune*: Thiocellobiose as a new inducer. *J. Bacteriol.* **149**(1) : 47-63.
- Shibata, Y. and K. Nisizawa(1969) : Cellulases of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Ferment. Technol.* **47**(9) : 573-586.
- Somogyi, M.(1952) : Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195** : 19.
- Stutzenberger, F.J.(1972) : Cellulolytic activity of *Thermonospora curvata*: Nutritional requirements for cellulase production. *App. Microbiol.* **24**(1) : 77-82.
- Wood, T.M.(1968) : Cellulolytic enzyme system of *Trichoderma koningii*. *J. Biochem.* **109** : 217.
- Wood, T.M. and S.I. McCrae (1972) : The purification and properties of the C_1 component of *Trichoderma koningii* cellulase. *J. Biochem.* **128** : 1183-1192.
- Yamane, K., H. Suzuki and K. Nishizawa (1970) : Purification and properties of extracellular and cell-bond cellulase component of *Pseudomonas fluorescens* var. *cellulosa*. *J. Biochem.* **67**(1) :
- 김영민, 김은수(1976) : *Stachybotrys atra*에서 추출한 섬유소분해효소에 관한 연구(II), **14** : 117-127.
- 김은수, 김영민, 이인규, 최태주(1975) : 몇 종류의 곰팡이에서 분리되는 crude cellulase의 다당류 분해능력의 조사. *한국미생물학회지.* **13** : 85-90.
- 김은수, 이순진(1976) : 미생물 유래의 섬유소분해

- 효소의 연구—[1] *Alternaria* sp.로부터 추출한 cellulase의 몇가지 성질에 대하여—한국미생물학회지. **14**: 65-74.
- 민경희, 안희균(1981): 지류 및 섬유질 문화재의 미생물에 관한 연구. 문화재. **14**: 131-144.
- 민경희(1984): 섬유질 문화재의 미생물에 의한 훼손. 보존과학연구. **5**: 24-36.
- 성낙계(1968): 섬유소분해효소에 관한 연구(제 1보)—*Rhizopus* sp.가 생성하는 cellulase의 성질에 대하여. 한국미생물학회지. **6**(3): 87-91.
- 전상운(1979): *Piricularia oryzae*로부터 추출한 cellulase의 몇가지 성질에 대한 연구. 한국미생물학회지. **17**(2): 58-64.
- 전순배, 박종영(1979): *Trichosporon*의 CMCase 활성에 관하여, **17**(4): 187-192.
- 최명자, 김영민, 김은수(1976): Cellulase 활성에 대한 몇가지 금속이온의 영향, **14**: 75-83.
- 高稿旨象(1975): 木材の軟腐朽について. 防菌防微. **3**(5).
- 朴槻虎男(1956): 美術品微害防止の研究第 1 報. 古文化財の科學 第 13 號, 昭和. 31.
- 新井英夫(1974): 文化財の生物劣化, 防菌微誌. **2**(3).
- 新井英夫(昭和 54.3) 建築彩色に發生する糸狀菌の防除去, 保存科學 18.

Accepted for Publication 19 February 1987