

섬유소분해효소 생산증진을 위한 *Penicillium verruculosum*의 균주개량

丁 基 無

全南大学校 生物工学研究所

Strain Improvement of *Penicillium verruculosum* for High Cellulase Production by Induced Mutation

Chung, Ki-Chul

Institute of Biotechnology, Chonnam National University, Kwangju 505, Korea

In order to obtain a regulatory mutant strain with high cellulase activity, a newly isolated *Penicillium verruculosum*, strain F-3 was used as parental strain since it was proved to be an efficient cellulase producer. A number of experiments were conducted to determine the optimum conditions to induce mutagenesis and isolate the desirable mutant strains. Out of several restriction compounds tested, 1.5% oxgall was found to be most effective to restrict the colony size by suppressing overgrowth. Derepression of catabolites was employed as a criterion in selecting mutant strains with high cellulase productivity. Production of cellulase by *Penicillium verruculosum* F-3 was suppressed when cultured on the media with more than 1% of glucose or glycerol. It was found that either irradiation with UV light for 19 mins or treatment with nitrosoguanidine at 200 μ g/ml for 60 mins, induced mutagenesis at desired level, when the survival rate of the spore was 0.2% and 48%, respectively. Three mutant strains of F-3, UV-9, UV-10, and NTG-3 that had the highest cellulase productivity were finally selected, based on filter paper degradation rate, size of clearing zone on the screening plate and cellulase activity in the medium containing cellulose powder. When the mutant strains were compared with parental strain F-3, on the KC-M-W medium containing cellulose powder, the filter paper activities of UV-9, UV-10, and NTG-3 were increased by 34%, 55%, and 41%, respectively. However, the assimilation of cellobiose octaacetate by UV-9 or NTG-3 was markedly reduced. When the mutant UV-10 was grown on cellobiose octaacetate medium (CCA-4) in shaking flasks, the cellulase activities of the mutant increased by 20 to 50% compared to the parental strain. Excretion of soluble protein from the mutant also elevated up to 30%. The mutant also constitutively produced both CMCCase and β -glucosidase, though at relatively low level, in the presence of glucose or cellobiose as carbon sources.

지구상에서 가장 풍부한 재생자원 (renewable resource)인 섬유소의 미생물학적 변환은 대체에너지, 화학공업원료, 식량 또는 사료 등 부족한 자원난의 극복 뿐만 아니라 환경정화면에 있어서도 매우 중요한 과제로 판단되고 있다.

섬유성 물질을 보다 효율적으로 이용하기 위해서는 glucose 등의 저분자물질로 분해되어야 한다는 점과 섬유소의 효소당화에 있어서 효소생산비가 차

지하는 비중이 60%나 되는 문제점을 지니고 있다
(1). 따라서 강력한 활성을 갖는 효소를 염가로 생산하는 것이 섬유소자원 유효이용의 관건이 된다.

섬유소 분해효소의 생산증진 방법으로는 효소합성 시 유전적대사조절을 받지 않는 구성변이주(constitutive mutant)로의 개량이며, 이러한 변이주를 이용함으로써 섬유소자원의 효소 당화에 필요한 경비를 절감시켜 섬유소의 식량자원화 내지는 에너지자

Key words: *Penicillium verruculosum*, mutagenesis, cellulase activity

원화를 도모할 수 있다(2).

섬유소 분해효소는 세균, 방선균, 사상균에 의해 생성되나 실용적인 면에서 *Trichoderma*속에 관한 것이 많이 연구되었고, 특히 미국 육군 Natick 연구소의 연구진에 의해 분리된 *T. reesei* QM6a 및 효소 생산성을 높인 인공 돌연변이주에 관한 연구가 주류를 이루고 있다(3-12). *Trichoderma* 이외의 균주로서는 *Sclerotium rolfsii*(13), *Aspergillus phoenicis*(14)로 부터 섬유소 분해효소 생산성이 향상된 변이주가 유도되었다.

근래 강력한 cellulase 생성균으로서 새로이 분리된 *Penicillium verruculosum* F-3은 천연섬유소 분해활성이 *T. reesei* QM6a에 비해 우수할 뿐만 아니라 본 효소의 유도기구도 *T. reesei*와는 다름이 밝혀졌다(15).

본 실험에서는 *P. verruculosum* F-3을 모 균주로 사용하여 돌연변이 처리에 의한 유전적 개량을 시도함으로써 cellulase 생산성이 증진된 변이주를 얻고자 변이주 유도조건, 변이주에 의한 cellulase 생성 최적 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

Penicillium verruculosum F-3을 사용하였다. 이 균주는 Chung 등(1982)(15)에 의해 자연계로 부터 새로이 분리된 균주로 천연섬유소 분해활성이 우수한 균으로 알려져 있다.

배지

Table 1 및 2에 나타낸 cellulase 생산배지 및 변이주 분리배지를 사용하였다. KC flock W-200은 일본 Sanyo Kokusaku Pulp Co. 제품, Avicel SF는 일본 Asahi Kasei Co. 제품, cellobiose octaacetate(COA)는 미국 Aldrich Chemical Co.제품, cellobiose는 일본 Wako Pure Chemical Co.제품을 사용하였고 팽윤 cellulose는 Walseth(16) 방법에 의해 조제하였다.

Cellulase 생산을 위한 KC-M-W 배지는 *T. reesei* 계의 균주(야생주 QM6a, cellulase 고생산능변이주 QM 9123 및 QM 9414)의 cellulase 생산 최적배지로서 섬유소분해 고활성균주의 검색 등에 선택배지로 사용돼 왔다(15).

A-3 배지는 KC-M-W 배지를 개변한 것으로 탄소

Table 1. Media for cellulase production by *P. verruculosum* F-3.

Component(g/l)	KC-M-W	A-3	COA-3	COA-4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	5.6	4.2	4.2
KH_2PO_4	2.0	2.0	2.0	2.0
Urea	0.3	0.3	0.3	0.3
CaCl_2	0.3	0.3	0.3	0.3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3	0.3	0.3	0.3
Trace elements solution ^{a)} (m/l)	1.0	3.0	3.0	3.0
KC flock W-200	10.0	0	0	0
Avicel SF	0	5.0	0	0
Cellobiose octaacetate	0	0	10.0	10.0
Proteose peptone	1.0	1.0	1.0	0
Wheat bran	0	0	0	10.0
Tween 80	2.0	2.0	2.0	2.0

a) Composition of the mixture (%): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.14; CoCl_2 , 0.2.

Table 2. Media for screening of high cellulase-producing mutants of *P. verruculosum* F-3.

Component(g/l)	SCA	FP	SC-A-3	G-A-3	CB-A-3
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.4	1.4	5.6	5.6	5.6
KH_2PO_4	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Urea	0.3	0	0.3	0.3	0.3
CaCl_2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
MgSO_4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Trace elements solution ^{a)} (m/l)	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0
Proteose peptone	1.0	0	1.0	1.0	1.0
Glucose	0	0	0	5.0	0
Cellobiose	0	0	0	0	5.0
Swollen cellulose	5.0	0	20.0	0	0
Filter paper ^{b)}	0	1.0	0	0	0
Tween 80	0	0	0	2.0	2.0
Oxgall	0	0	15.0	0	0
Agar	20.0	0	20.0	0	0

a) Composition of the mixture(%): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.14; CoCl_2 , 0.2.

b) A filter paper strip(Toyo No. 1, 1 × 10cm) was added to 4ml of medium in 16.6 × 165mm test tube.

원으로서 KC flock W-200 대신 Avicel SF를 함유하며 *P. verruculosum* F-3에 의한 cellulase 생산 최적

배지로 인정된 배지이며, COA-3 및 COA-4 배지는 탄소원으로서 당 유도체인 cellobiose octaacetate를 함유하며 전자는 유기영양원으로서 proteose peptone을 후자는 wheat bran을 함유하며 이를 배지는 Avicel함유 배지인 A-3 배지에 비해 cellulase 생산에 더욱 효과적인 배지로 알려져 있다(15).

SCA 배지는 KC-M-W 배지에서 KC flock w-200 대신 swollen cellulose 0.5%, agar 2%가 첨가된 배지로서 colony 소형화제의 선택을 위하여 사용되었다

Cellulase 고생산 변이주의 선별을 위한 배지로서 제 1차 screening용으로 사용한 FP 배지 역시 그 조성은 KC-M-W와 같으나 단지 KC flock W-200 대신 탄소원으로서 여지편(Toyo No.1 1×10 cm)이 첨가되었음이 다를 뿐이다. 제 2차 screening용으로 사용한 SC-A-3 배지는 상기의 A-3 배지중의 Avicel 대신 swollen cellulose 2%, agar 2%가 첨가된 배지이며, G-A-3 및 CB-A-3 배지는 A-3 배지중의 Avicel 을 각각 glucose 0.5%, cellobiose 0.5%로 대치한 배지로. catabolite repression이 해제된 변이주의 선발을 목적으로 사용되었다.

변이주의 유도

UV 조사 : Glass beads로 20분간 처리한 포자현탁액(2×10^7 spores/ml) 5ml을 2.5cm의 wire stirrer를 넣은 plate(ϕ 9cm)에 넣고 교반하면서 UV lamp(National GL-5 15W) 수직 45cm의 거리에 위치시키고 19분간 UV 조사(생존율 0.2%) 후, 0.1ml을 potato dextrose agar(PDA) slant에 접종시키고 30°C 7일간 중간 배양하였다.

N-methyl-N'-nitrosoguanidine(NTG) 처리

M/20 tris-maleic acid buffer(pH6.0)에 혼탁한 포자현탁액(2×10^7 spores/ml) 4.5ml에, 상기완충액(pH 6.0)에 용해한 0.2% NTG용액 0.5ml를 가하고 (최종농도 200 μg/ml), 30°C, 1시간 정지 보존 후 원심분리(21,000×g, 15분)하여 집균하고 탈염수로 2회 세척했다. 탈염수 5ml에 혼탁한 포자현탁액 0.1ml를 PDA slant에 접종하고, 30°C에서 7일간 중간 배양했다.

배양방법

Colony 소형화제의 선택 : Colony 소형화제로서

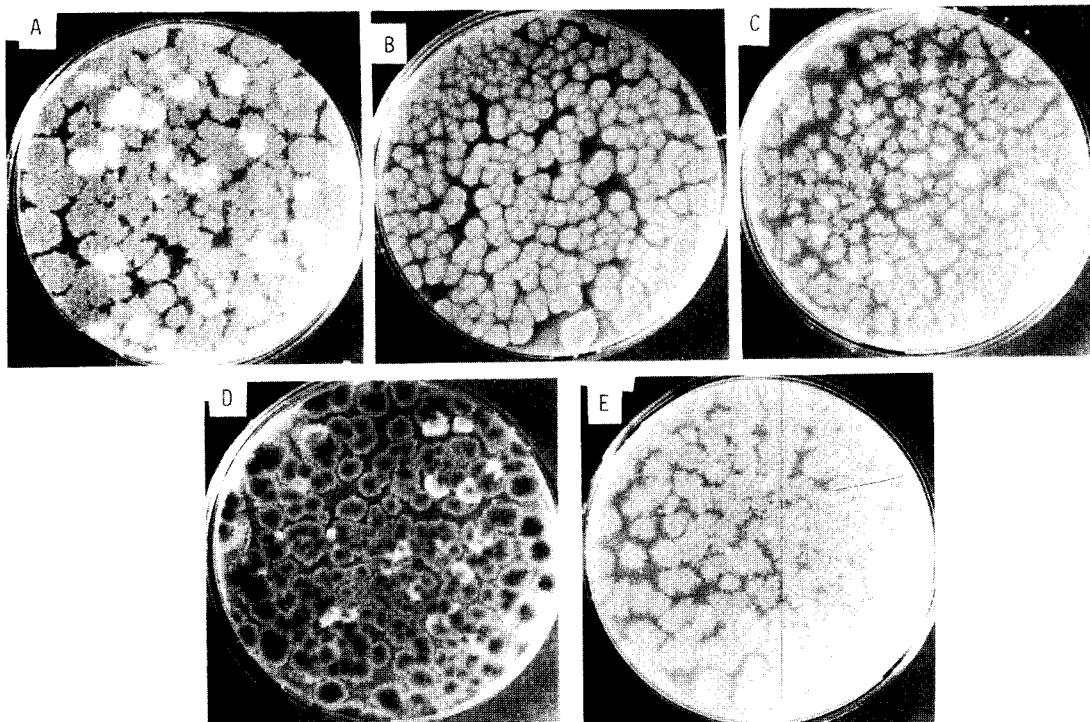


Fig. 1. Effects of several compounds on colony size of *P. verruculosum* F-3 on SCA medium.

A : Control, B : Oxgall, C : Triton X-100, D : Rose bengal, E : SDC

Oxgall(Difco), Triton X-100(Osaka 약리화학), Rose bengal(Wako pure chemical Co.), Sodium deoxycholate(Difco)를 사용하였다. PDA 배지에 30°C, 7일간 배양한 균을 glass beads로 20분간 처리하고 gauze로 여과하여 포자현탁액을 만들고 이 포자현탁액(2×10^4 spores/ml) 0.1 ml을 1.5% Oxgall, 0.1% Triton X-100, 0.005% Rose bengal, 0.08% Sodium deoxycholate(SCD)를 colony 소형화제로서 첨가한 상기 Table 2의 SCA 배지에 접종하고, 30°C, 8일간 배양하였다.

대사산물억제(catabolite repression) 범위의 선택 및 대사산물 억제기구가 해제된 cellulase 생산성 변이주의 분리

상기의 포자현탁액 0.1 ml을 SCA 배지에서 peptone을 제하고 Oxgall 1.5%, glucose 또는 glycerol을 0.1% 이상의 각종 농도로 첨가한 배지에 접종하고 30°C, 11-13일간 또는 45°C, 7일간 배양했다.

Cellulase 고생산성 변이주의 분리

UV 및 NTG로 변이처리하고 PDA slant에 30°C, 7일간 중간 배양한 균을 Table 2의 FP 배지에 접종하고 30°C, 7-14일간 진탕배양(spm 136, 5 cm)했다. 상기의 배양 회색액($\times 10^4$) 0.1 ml을 SC-A-3 plate에 접종하고 30°C, 14일간 배양했다. 이 배지에서

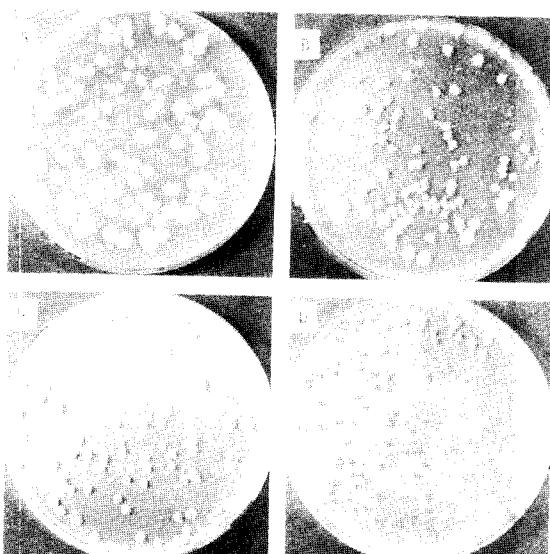


Fig. 2. Repression of cellulase formation of *P. verrucosum* F-3 by glucose.

A: 0.5%, B: 1.0%, C: 2.0%, D: 4.0%

clear zone^o] 비교적 큰 colony를 PDA slant에 옮겨 접종하고 30°C, 7일간 배양했다. 이 균을 다시 KC-M-W 배지에 접종하여 30°C, 14일간 진탕배양하여 cellulase 고생산성 변이주를 선별하였다.

Cellulase 생산성의 검토

포자현탁액 1 ml을 A-3, COA-3, COA-4, G-A-3, CB-A-3 배지 각 100 ml에 접종하고 30°C, 10일간 진탕배양했다.

조효소액의 조제

30°C에서 일정기간 배양하고 배양액을 원심분리(21,000×g, 5분)하고 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성의 측정

Avicel 분해활성 : 0.05 M citrate buffer(pH 5.0)에 5% (w/v)가 되게끔 Avicel을 넣고 이 현탁액 0.5 ml, 효소 0.5 ml을 왕복진탕항온수조(spm 124, 3.6 cm)에서 50°C, 1시간 반응시키고 반응여액중의 환원당을 DNS법(17)으로 측정하였다.

여지분해활성(18) : Whatman No.1 여지 50 mg (1×6 cm), 0.05 M citrate buffer(pH 5.0) 1 ml, 효소액 0.5 ml를 50°C, 1시간 반응시켜 생성된 환원당을 측정하였다.

CMC 분해활성 : 0.05 M citrate buffer(pH 5.0)에 용해한 1% carboxymethyl cellulose(D.S. 0.6-0.7, DP 450-500, Wako pure chemical Co.) 0.25 ml, 효소액 0.25 ml를 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 측정하였다.

Salicin 분해활성(19) : 0.05 M citrate buffer(pH 5.0)에 용해한 0.5% salicin(Wako pure chemical Co.) 0.4 ml, 효소액 0.1 ml를 50°C, 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 측정하였다.

효소역가 및 단백질 정량

Avicel, 여지, CMC 및 salicin 분해활성의 효소단위는 환원당을 glucose로 환산하고 1분간 1 μmole의 glucose를 생성하는 효소량을 1단위로 했다. 배양여액중의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준으로 사용하여 Lowry 등(20)의 방법에 의해 측정했다.

결과 및 고찰

Colony 소형화제의 선택

P. verruculosum F-3의 변이주를 분리함에 있어 plate 당의 colony 수를 다수 형성시키기 위하여 colony size를 소형화 할 필요가 있어 colony 소형화제의 이용을 검토했다.

*T. reesei*의 colony size 제한제로서 유효하다고 보고된 SDC(4), Oxgall 및 Rose bengal(21), Triton X-100(22-23)을 공시 재료로 사용하여 1.5% Oxgall, 0.1% Triton X-100, 0.005% Rose bengal, 0.08% SDC가 되도록 SCA 배지에 첨가하고, 포자현탁액(2×10⁴ spores/ml) 0.1 ml을 접종해서 30°C, 8일간 배양한 결과 Fig.1에 나타낸 바와 같이 Oxgall이 효과적으로 적경 3-5 mm의 소형화한 compact colony에 clear zone 형성이 관찰되었다. 따라서 이후의 변이주의 분리에는 Oxgall 1.5%를 첨가한 agar plate를 사용하였다.

대사산물 억제범위의 검토

대사산물 억제가 해제된 cellulase 생산성 변이주의 분리는 섬유소 자원의 유효 이용을 위한 효소생산원으로서 매우 중요하다. 이미 대사산물로서 glucose나 glycerol을 첨가한 배지를 이용하여 대사산물억제가 해제된 변이주를 용이하게 검출할 수 있음이 Montenecourt(21)나 Hyun 등(11)에 의해 보고된 바 있다.

재료 및 방법에 기술한 방법으로 *P. verruculosum* F-3을 배양하고, clear zone 형성을 관찰하여 cellulase 생성시 대사산물 억제범위를 검토했던 결과 Fig.2에 나타낸 바와 같이 glucose 1% 이상을 첨가한 경우 대사산물 억제를 받음을 알 수 있었다.

변이주 유도조건의 검토

포자현탁액을 UV 조사 또는 NTG로 처리하고 1.5% Oxgall을 함유하는 SCA 배지에 30°C, 7일간 배양하여 각 처리조건이 생존율에 미치는 영향을 조사하였다. Table 3 및 4에 나타낸 바와 같이 UV 조사의 경우는 19분 처리한 결과 약 0.2%, NTG 처리의 경우는 200 µg/ml 농도에서 1시간 처리한 결과 48%의 생존율을 나타냈다. 따라서 상기조건을 본 균주의 변이처리 최적조건으로 정하고 이후의 변이주 유도 실험에 적용하였다.

Table 3. Effect of UV irradiation* time on survival rate of *P. verruculosum* F-3.

Irradiation time(min)	Survival number ($\times 10^4/\text{ml}$)	Survival rate (%)
0	581.0	100.0
13	3.6	0.62
14	1.6	0.28
15	1.9	0.32
16	1.7	0.29
17	1.9	0.32
18	1.7	0.30
19	1.1	0.19

*15 watt, 45cm.

Table 4. Effect of NTG concentration and treatment time on survival rate of *P. verruculosum* F-3.

NTG concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Treatment time (hr)	Survival number ($\times 10^4/\text{ml}$)	Survival rate (%)
0	0	607	100
20	1	527	87
20	2	518	85
200	1	293	48
200	2	152	25

Cellulase 고생산성 변이주의 분리

제 1차 screening : Cellulase 고생산성 변이주를 얻기 위하여 *P. verruculosum* F-3의 포자현탁액에 UV 조사 및 NTG 처리로 변이를 유도한 후 PDA slant에 30°C, 7일간 중간배양한 120주를 FP 배지를 이용하여 진탕배양하고 여지봉피도가 양호한 cellulase 고생산성 변이주를 screening하였다. 이 과정에서 UV 조사한 것으로 부터 5주, NTG 처리한 것으로 부터 3주를 선발하였다. Fig.3에 나타낸 바와 같이 친주는 30°C, 7일 배양시에는 여지가 봉피되지 않고 완전한 형태를 유지하고 14일째에야 완전히 봉피됨에 반하여 이들 변이주 8주(No.3-10)는 7일 배양으로 여지가 완전히 봉피됨이 인정되었다.

제 2차 screening : 제 1차 screening 결과 선별된 8주의 배양액을 희석($\times 10^{-4}$ 배)하여 0.1 ml를 SC-A-3 배지에 접종하고 30°C, 7-14일간 배양했다. 비교적 clear zone이 큰 colony 18주와 전혀 clear zone을 형

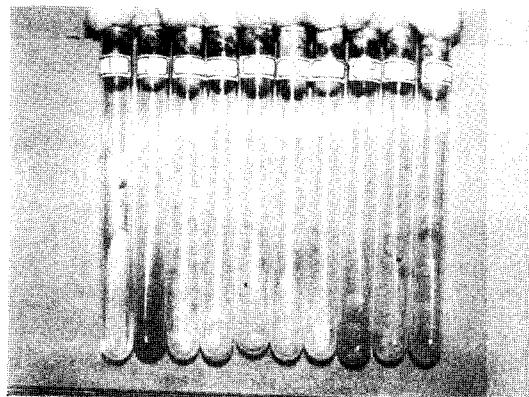


Fig. 3. High cellulase producing mutants selected from *P. verruculosum* F-3 by filter paper degradation method.
1: Parent at 30°C for 7-days culture, 2: Parent at 30°C for 14-days culture, 3, 4, 5, 6, 7: NTG treated, 8, 9, 10: UV treated.

성치 않은 1주(NTG 3)를 선발하였다. 그 일례를 Fig.4에 나타냈다.

제 3차 screening: 상기 제 2차 screening에서 선발된 19주를 KC-M-W 배지로 30°C, 14일간 진탕배양(spm 136, 5 cm) 하여 여지분해활성이 높은 3주(UV-9, UV-10, NTG-3)를 최종 선발하였다.

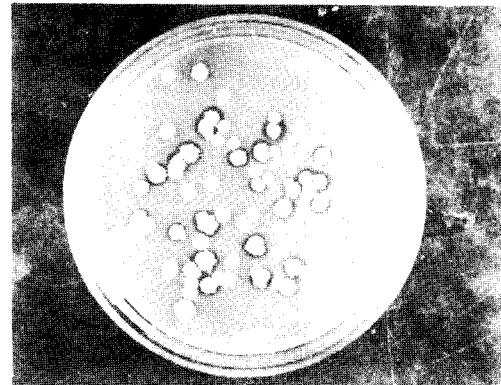


Fig. 4. A plate culture of UV-treated *P. verruculosum* F-3.

Cellulase 생산성의 검토

Cellulase 고생산성 변이주로 최종선발한 3주를 A-3, COA-3, COA-4, G-A-3 및 CB-A-3 배지로 30°C, 10일간 진탕배양하여 cellulase 생산성을 조사하였다.

Table 5에 나타낸 바와 같이 NTG-3은 상기의 SC-A-3 배지에서는 전혀 clear zone을 형성치 않은 균주였으나 KC-M-W 배지로 배양시 여지분해활성을 친주보다 41%, 그리고 UV-9는 34%, UV-10은 55%

Table 5. Comparison of cellulase production between mutants and parent strain, *P. verruculosum* F-3 in varying culture media

Strain	Medium	pH	Protein (mg/ml)	Cellulase activities (U/ml)			
				Avicel	FP	CMC	Salicin
F-3	KC-M-W ^{a)}	6.2	0.73	0.35	0.29	1.24	0.57
	A-3	6.0	1.23	1.27	0.69	0.18	1.06
	COA-3	4.9	0.80	0.98	0.47	5.03	0.48
	COA-4	3.4	2.56	2.66	1.80	25.46	1.33
UV-9	KC-M-W ^{a)}	ND ^{b)}	1.37	ND	0.39	ND	ND
	COA-3	7.0	0.23	0.03	0.03	0.12	0
UV-10	KC-M-W ^{a)}	ND	1.48	ND	0.45	ND	ND
	G-A-3	5.9	0.23	0.01	0	0.18	0.22
	CB-A-3	6.9	0.39	0.01	0	0.20	0.22
	A-3	6.5	0.59	0.70	0.35	4.59	1.02
	COA-3	4.0	1.60	1.60	0.64	7.40	0.97
	COA-4	3.5	3.31	3.55	2.16	25.46	1.97
NTG-3	KC-M-W ^{a)}	ND	0.92	ND	0.41	ND	ND
	COA-3	5.3	0.19	0.14	0.05	0.03	0.14

a) Cultivated for 14-days.

b) Not determined.

증가되었다. 그러나 UV-9 및 NTG-3은 COA-3 배지에서는 cellulase 생성이 현저히 저하되었음을 알 수 있었다. 이는 COA 자화유전자의 변이에 기인된 것으로 추찰되었다. 한편 UV-10은 COA-3, COA-4 배지 모두 단백질량이나 효소활성이 상당히 증가하였다. 배지 COA-4의 경우를 친주와 비교하면 단백질량은 약 30%, Avicel 분해활성은 약 30%, 여지분해활성은 20%, Salicin 분해활성은 50%의 증가가 인정되었다. 그러나 CMC 분해활성의 증가는 인정되지 않았다. 아울러 흥미있는 일로서는 친주는 glucose나 cellobiose를 함유하는 배지에서는 전혀 cellulase를 생산치 않으나, UV-10은 glucose나 cellobiose를 함유하는 G-A-3, CB-A-3 배지에서 그 활성을 낮으나 CMC 분해활성, salicin 분해활성을 갖고 있음이 인정되었다. 이는 변이처리에 의해 cellulase의 구성적 생산능이 획득된 것으로 추찰되며 금후 더욱기 이 변이주를 친주로하여 CMC나 salicin 분해활성 뿐만 아니라 기타의 cellulase 성분도 다량 구성적으로 생산할 수 있는 변이주로의 유도를 시도해야 할 필요가 있다고 판단되었다.

요 약

천연섬유소 분해활성이 우수하고 그 효소 유도기구도 *Trichoderma reesei* 와는 다른 *Penicillium verruculosum* F-3을 모균주로 사용하여 돌연변이 처리에 의한 유전적 개량을 시도함으로써 cellulase 생산성이 증진된 조절변이주를 얻고자 변이주 유도조건, 변이주에 의한 cellulase 생성조건을 검토하였다. 한천평판상에서의 변이주의 선택분리 효율을 향상시키기 위하여 각종 colony 소형화제의 영향을 검토한 바 Oxoall을 배지에 1.5% 첨가하였을 때가 가장 좋았다. Cellulase 고생산성 변이주 선정의 한 지표로서 대사산물 억제의 해제를 선택했다. *P. verruculosum* F-3은 glucose 또는 glycerol 농도 1% 이상에서 본 효소생성이 억제되었다. 변이주 유도조건으로서 UV 조사의 경우는 19분처리로 약 0.2%, NTG 처리의 경우는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 1시간처리로 48%의 생존율을 나타냈다. 변이처리 한 균주를 여지붕괴도, cellulose agar plate에서의 clear zone의 크기, cellulose powder 배지로 배양한 조효소액의 여지분해활성을 조사하여 우수균주로서 UV-9, UV-10 및 NTG-3을 최종 선발했다. 각종 탄소원을 함유하는 배지에서의 cellulase 생산성을 조사한 바 KC-M-W

배지로 배양한 UV-9, UV-10 및 NTG-3의 여지분해활성은 친주보다 각각 34%, 55%, 41% 증가되었으나, UV-9 및 NTG-3은 COA 자화능이 현저히 저하되었다. 변이주 UV-10은 COA-4 배지로 배양했을 때 친주에 비해 단백질량 30%, Avicel 분해활성 30%, 여지분해활성 20%, salicin 분해활성 50% 증가가 인정되었고, 비록 역가는 낮았지만 glucose 및 cellobiose를 함유하는 배지에서 CMC 및 salicin 분해활성을 구성적으로 생산하였다.

사 사

본 연구는 84-85 과학재단연구비 지원으로 일부 수행되었으며, 본 연구를 수행하는데 많은 조언과 협력을 해주신 日本 北海道大學 農學部 微生物工學教室 Y. Eguchi 명예교수와 S. Yashima 교수 등에 깊이 감사드립니다.

참고문헌

1. Ghose, T.K. and P. Ghosh: *Process Biochem.*, **14**(11), 20(1979).
2. Reese, E.T.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6, 9(1976).
3. Ryu, D.D.Y., and M. Mandels: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 91(1980).
4. Mandels, M., and J. Weber: *Adv. Chem. Ser.* **95**, 391 (1969).
5. Mandels, M., J. Weber, and R. Parizek: *Appl. Microbiol.*, **21**, 151(1971).
6. Gallo, B.J., R. Andreotti, C. Roche, D. Ryu, and M. Mandels: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 8, 89(1978).
7. Montenecourt, B.S., and D.E. Eveleigh: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 777(1977).
8. Montenecourt, B.S., and D.E. Eveleigh: Proc, 2nd Annual Fuels from Biomass Symposium, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York, p. 613(1978).
9. Montenecourt, B.S., and D.E. Eveleigh: *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 289(1979).
10. Cuskey, S.M., D.H.J. Schamhart, T. Chase, JR, B.S. Montenecourt, and D.E. Eveleigh: *Dev. Ind. Microbiol.*, **21**, 471(1980).
11. Hyun, H.H., H.S. Baik, I.B. Lee, and S.Y. Lee: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **6**(3), 129(1978).
12. Song, E.K., T.L. Huh, and S.Y. Lee: *Korean Biochem. J.*, **15**, 228(1982).

13. Sadana, J.C., J.G. Shewale, and M.V. Deshpande: *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 730(1979).
14. Lee, Y.N., and S.K. Koh: *Kor. Jour. Microbiol.*, **20**, 125 (1982).
15. Chung, K.C., K. Kawai, S. Yashima, and Y. Eguchi: *Hakkokogaku* **60**, 355(1982).
16. Walseth, C.S.: *Tappi*, **35**, 228(1952).
17. Miller, G.L.: *Anal. chem.*, **31**, 426(1959).
18. Mandels, M., R. Andreotti, C. Roche: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6. 21(1976).
19. Sternberg, D., P. Vijuyakumar, E.T. Reese: *Can. J. Microbiol.*, **23**, 139(1977).
20. Lowry, O.H., N.J. Rowebrough, A.L. Farr, R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
21. Montenecourt, B.S., D.E. Eveleigh: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 178(1977).
22. Nevalainen, K.M.H., E.T. Palva: *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 11(1978).
23. Nevalainen, K.M.H. E.T. Palva, M.J. Bailey: *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 59(1980).

(Received September 30, 1987)