

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(연세대 의대 미생물학교실)

*P. notatum*(연세대 의대 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 균주로 부터 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 균주로 부터 추출한 효소액의 활성도: Table 1은 각 균주들로 부터 추출한 crude enzyme의 기질에 대한 활성이 다

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

Substrates Fungi	Na- CMC	Cellu- lose 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 다당류 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	Cellu- lose 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

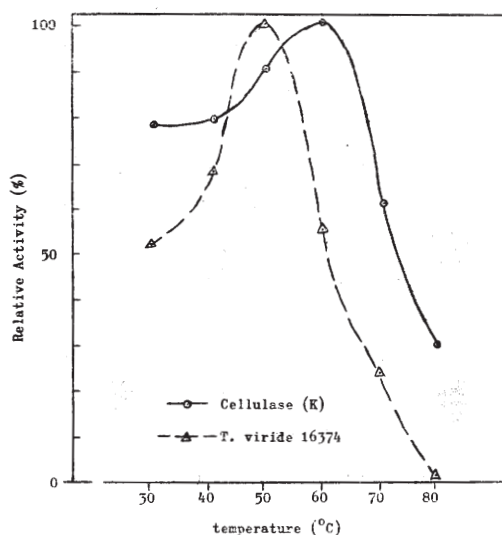


Fig. 1. Effect of pH on the activities of cellulase [K] and the cultural extract of *Trichoderma viride* 16374.

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

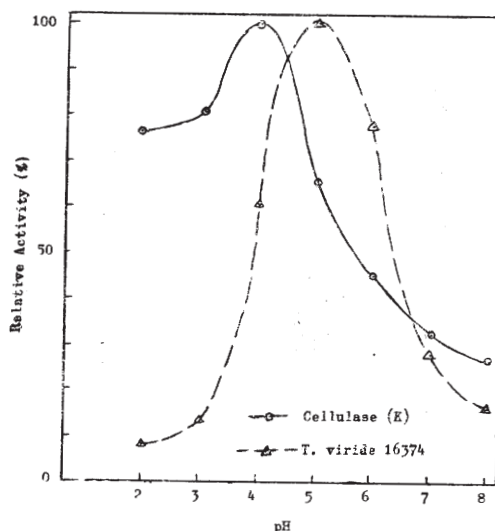


Fig. 2. Effect of temperature on the activities of cellulase and cultural extract of *Trichoderma viride* 16374.

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.

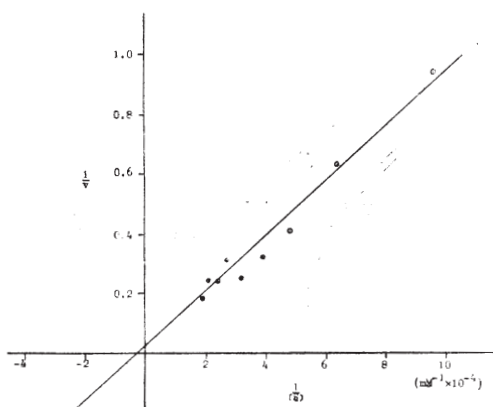


Fig. 3. Lineweaver and Burk plot of the action of cellulase [K].

5) 효소의 Na-CMC에 대한 친화력 :

a) cellulase [K] : cellulase [K]가 0.6 % Na-CMC 1 ml에서 최대 활성을 나타내는 농도는  $3.5 \times 10^{-1} \text{ mg/ml}$ 이었다. 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  $3.3 \times 10^{-4} \text{ mM}$ 임을 나타낸다.

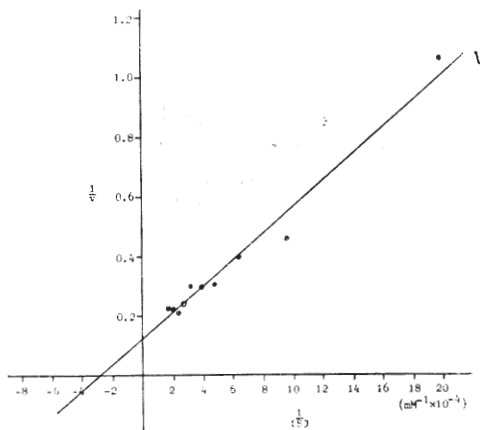


Fig. 4. Lineweaver and Burk plot of the action of cellulase [J].

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

기질의 농도의 역수에서 이 효소의 Km 값이  $3.3 \times 10^{-5} \text{ mM}$ 임을 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<sub>1</sub>의 활성이 가장 낮게 나타났으며, 가용성인 Na-CMC에 대한 활성인 C<sub>x</sub>가 C<sub>1</sub>에 비해 더 큰 것으로 보아 이들이 모두 가용성인 cellulose 유도체에 더 강하게 작용함을 알 수 있다. 또 C<sub>1</sub>과 C<sub>x</sub>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 계통에 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 분해 효소가 골고루 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 최적온도는 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-



- ten constant of  $\beta$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase (E.C. 3.2.1.4) [C<sub>x</sub>-Cellulase Enzyme]. *Monatsh. Chem.* **100**(3), 986—97.
2. Kim, W.S., Y.M. Kim, Y.H. Kang, and T.J. Choi, 1965. Studies on the cellulolytic enzymes of *Stachybotrys atra*. I. Effects of temperature and pH on the enzyme activities. *Kor. Jour. Microbiol.* **13**, 164—168
  3. Marshall, J.J., 1974. Application of enzymic methods to the structural analysis of polysaccharides. *Advances in Carbohydrate; Chemistry and Biochemistry.* **30**. p. 257—370, Academic Press, New York.
  4. Okada, G., 1975. Enzymic studies on a cellulase system of *Trichoderma viride*. II. Purification and properties of two cellulases. *J. Biochem.* **77**, 33—42.
  5. Pettersson, G., 1968. Structure and function of a cellulase from *Penicillium notatum* as studied by chemical modification and solvent accessibility. *Arch. Biochem. Biophys.* **126**, 776.
  6. Whitaker, D.R., 1971. Cellulases. *The enzymes*. 3rd., **5**, p. 273—290, Academic Press, New York.
  7. Youatt, G., 1958. Fungal Cellulase. IX. Growth of *Stachybotrys atra* on cellulose and production of a  $\beta$ -glucosidase hydrolyzing cellobiose. *Aust. J. Biol. Sci.* **20**(1), 193—220.