

*Penicillium chrysogenum*에서 추출한 cellulase에 관한 연구

盧 明 姬

(信興 保健專門大學)

Studies on Cellulases of *Penicillium chrysogenum*

RHO, Myong Hi

(Sinhung Public Health College, Eujongbu, Korea)

ABSTRACT

Cellulases were isolated from both healthy(PC) and virus-infected *Penicillium chrysogenum*(PCV) in the wheat bran culture, and some properties of the enzymes were studied.

(1) At 37°C, pH 6.4 and 6 day's culture the maximal enzyme yield was obtained in both PC and PCV.

(2) The optimum temperature for the PC cellulase was at 50°C, and that for the PCV enzyme was the same.

(3) The optimum pH for the PC enzyme was at 5.0, whereas the PCV enzyme was at 6.0, indicating that they are isozymes.

(4) When Na-CMC was used as a substrate, PC enzyme was twice as high as the activity of PCV enzyme.

서 론

Cellulase는 미생물, 흔히 곰팡이들에 보유했고 있다는 사실이 많은 학자들에 의해 보고된 바 있다. Reese등(1950)은 *Myrothecium verucaris*로부터 C₁, C_x의 두종류의 cellulase를 분리하였으나, Whitake등(1963)은 같은 *M. verucaris*로부터 단일의 Cellulase만을 분리보고하였다. Selby와 Matland(1967)는 *Trichoderma viride*에서, Eriksen과 Goksøyr(1977)는 *Chaetomium thermophile*에서 C₁, C_x, Cellobiase를 순화하여 서로 상호작용이 있다고 보고하였다. 또한 Iwasaki등(1964)은 *Trichoderma koningi*로부터 Cellulase I, II를 분리 보고하였고, Storvick와 King은 (1960) *Celli-*

*brio gilbus*에서, Petterson과 Porath(1963)는 *Polyporus versicolor*에서 Cellulase의 다양성을 보고한 바 있다. 또 Reese등(1950)은 *Aspergillus luchuensis*에서 Cellulase의 pH에 대한 안정도 및 기질과의 반응시 최적온도 및 pH에 대해 보고하였고, Storvick와 King(1960)은 *C. gilbus*에서 최적 pH에 대해, Ikeda등(1967)은 *A. niger*에서, Okada(1975)는 *T. viride*에서 온도와 pH에 대한 안정도 및 최적온도와 최적 pH에 관한 보고를 한바 있다.

그러나 대부분의 곰팡이로부터는 Cellulase가 생산되에도 불구하고 단지 *Penicillium*의 생산에만 주로 이용되는 *Penicillium chrysogenum*의 Cellulase에 대한 연구는 보고된바 없다. 본 실험에서는 건전주와 virus 감염주의 *P. chrysogenum*에서 생산되는

Cellulase의 활성도, 그리고 온도 및 pH에 대한 효소반응에 관한 기초적인 문제들을 다루었고 그 결과를 여기 보고하는 바이다.

재료 및 방법

[1] 재 료

본 실험에 이용한 주요 재료는 다음과 같다.

1) 균주는 *Penicillium chrysogenum* Q 176(이하 PC라 함)과 바이러스 감염균주(이하 PCV라 함)는 연세대학교 미생물학교실에서 분양받았다.

2) 배양액은 밀기울 7.5g에 Czapek액 150 ml을 골고루 뿌린후 멸균하여 사용하였다.

3) 효소반응기질로는 가용성인 소듐 카르복시 메틸 셀룰로오즈(Na-CMC)를 0.6% 액으로 만들어 사용했는데 이는 일본 化城 산업에서 제조된 것이었다.

4) 완충액은 0.1M 아세트산(Acetic acid)와 0.1M 소듐 아세테이트(Na-Acetate)를 사용하여 pH5.0으로 만들었다.

[2] 실험방법

1) 효소생성을 위해서 밀기울 7.5g을 1,500 ml의 삼각플라스크에 넣고 Czapek액 500ml을 골고루 뿌린후 멸균하여 둔 배양액에 PC 건전균 및 PCV감염균을 접종하여 37°C의 수조식 shaker(120 strokes/min)에서 10일까지 배양하여 배지의 여과액을 적온에서 원심분리하여(40°C, 6,000g/30min) 거친액을 만들어 4°C에서 하룻밤 방치한후 상등액을 65% (NH₄)₂SO₄로 포화시켜 다시 하룻밤 방치시킨다. 이것을 다시 저온에서 원심분리하여 생기는 침전물을 그 침전물의 25배 되게 pH5.0 Actetate buffer로 녹여 PC와 PVC효소액으로 사용하였다.

2) 각 균주의 생장에 따른 배양액의 pH변화를 보기 위해서 배지에 PC와 PCV균을 접종한 후 37°C에서 배양하였으며 격일로 배양액을 채취하여 10일까지 pH를 측정하였다.

3) 균주의 생장에 따른 효소액의 활성을

비교하기 위해서 PC와 PCV효소액을 0.6% Na-CMC 기질액 1.0ml과 pH 5.0 acetate buffer 0.6ml로 40°C에서 1시간 반응시켜 생성되는 glucose의 양을 Somogyi-Nelson의 방법으로 격일로 측정하여 비교하였다.

4) 효소의 활성에 미치는 기질과의 반응시 미치는 pH의 영향을 보기 위해 PC와 PVC 효소액을 0.6% Na-CMC 기질액 1.0ml과 acetate buffer 0.6ml로 40°C, 50°C, 그리고 60°C에서 1시간씩 반응시킬 때 acetate buffer의 pH를 각각 pH3.0, pH4.0, pH5.0, pH6.0 그리고 pH7.0으로 변화시켜 반응시켰을 때 각 pH에 따라 생성되는 glucose의 양을 측정하여 pH에 따른 효소 활성의 정도를 비교 관찰하였다.

5) 효소 활성에 미치는 기질액과의 반응시 온도의 영향을 알아 보기 위해서 다음과 같이 하였다.

효소액을 0.6% Na-CMC 기질액 1.0ml과 pH4.0, pH5.0, 및 pH6.0의 acetate buffer 0.6ml씩 사용하여 1시간씩 반응시킬때에 온도를 각각 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 그리고 70°C로 변화시켰을 때 각 온도에 따라 생성되는 glucose의 양을 측정하여 온도에 따른 효소 활성의 정도를 비교 관찰하였다.

6) 효소 활성에 미치는 기질액과의 반응시 효소액농도를 변화시킬때의 영향을 알아보기 위해 다음과 같이 하였다. PC와 PVC 균 효소액을 각각 0.1ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.5ml 및 1.0ml로 증가시키고 0.6% Na-CMC기질액을 1.0ml로 고정하여 pH5.0인 acetate buffer 0.6ml로 50°C에서 1시간 반응시켰을 때 생성되는 glucose의 양을 측정하여 효소액 농도를 변화시켰을 때의 효소 활성의 정도를 비교 관찰하였다.

결 과

1) 각 균주의 생장에 따른 영양액의 pH변화를 본 결과 Fig. 1에서와 같이 나타났다. PC와 PCV균주를 접종하기 전의 배지의 pH는 6.4였다. 배양 2일에는 두 균주가 동일

하게 pH 5.2와 pH 5.4로 감소하였고 배양 6 일에는 pH 6.4로 균주를 접종하기 전의 배양액의 pH와 같은 pH였다. 배양 6일 이후 pH는 계속 증가하여 배양 10일에는 pH 8.4 까지 증가하였다.

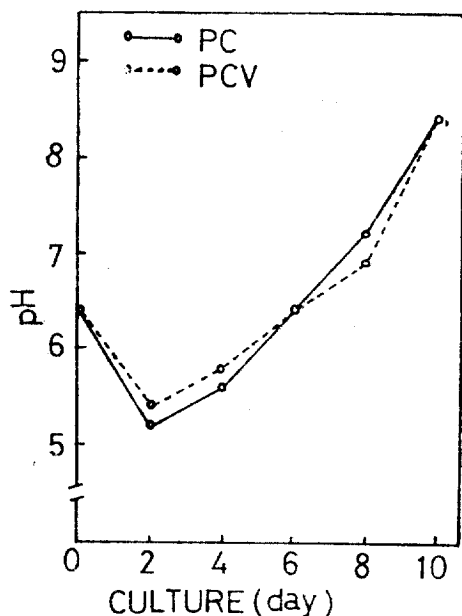


Fig. 1. The change of pH values during the culture (37°C) of *Penicillium chrysogenum*. Both healthy (PC) and virusinfected fungi (PCV) show identical pattern in pH change.

2) 각 균주의 생장에 따른 효소액의 활성을 비교한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 즉 PC와 PCV균 효소액은 모두 배양 6일에 가장 높은 활성을 나타냈다. 그러나 효소의 활성도는 PCV에서는 PC의 50% 정도로 저하되었다. 배양 4일이 가장 낮은 활성을 나타냈고 배양 6일이후부터는 계속 낮아져서 두 균주 다 배양 10일에는 배양 6일의 50% 이하로 낮아졌다.

3) 효소의 활성에 미치는 기질액과의 반응시 pH의 영향은 Fig. 3-1에서 보는 바와 같이 PC균 효소액의 활성은 온도에 따라 다른 pH 적정치를 보여 주었다. 효소반응을 40°C에서 시키면 pH 3.0에서, 50°C에서 시키면 pH 5.0에서, 60°C에서는 pH 5.0에서 그 최적치를 나타냈다. 또한 Fig. 3-2에서 보는 바와 같이 PCV균 효소액의 활성 정도도

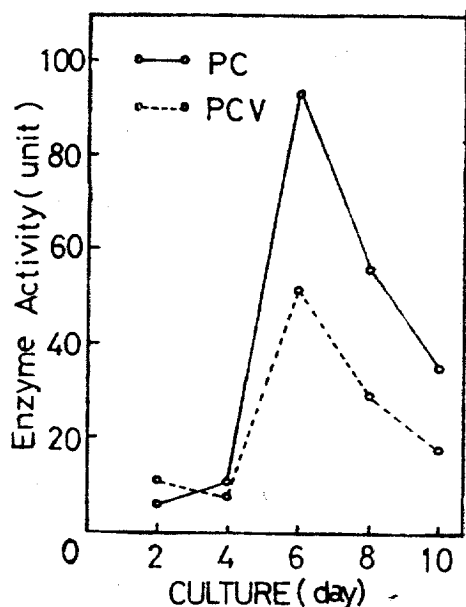


Fig. 2. Enzyme (cellulase) production during 10 day culture from healthy (PC) and virus-infected (PCV) *Penicillium chrysogenum*. Both produce cellulase optimally on 6th day but the PCV yields only 50% of PC.

온도에 따라 다른 pH 적정치를 보여 효소 반응을 40°C에서 시키면 pH 4.0에서, 50°C

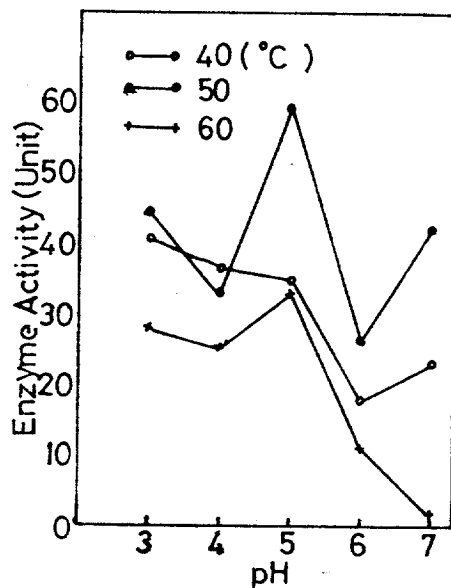


Fig. 3-1. Effects of temperature and pH's on the production of cellulase from healthy *Penicillium chrysogenum* (PC). Best yield of enzyme was obtained at pH 5.0, 50°C.

에서는 pH 6.0에서 60°C에서 시키면 pH 4.0에서 그 최적치를 나타냈다.

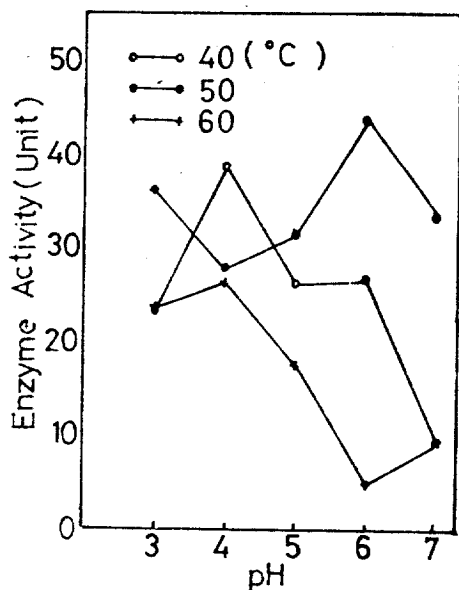


Fig. 3-2. Effects of temperature and pH's on the production of cellulase from virus-infected (PCV) *Penicillium chrysogenum*. Best yield of enzyme was obtained at pH 6.0, 50°C.

4) 효소의 활성화에 미치는 온도의 영향을 본 결과 Fig. 4-1에서 보듯이 PC균 효소액의 활성화도에서 효소 반응액의 pH에 따라 다른 온도 적정치를 나타냈다. pH 4.0에서 반응시키면 40°C에서, pH 5.0과 pH 6.0에서 반응시키면 각기 50°C에서 가장 활발한 활성을 나타냈으며 pH 5.0에서는 40~60°C사이에서 효소반응의 안정성을 나타냈고 70°C에서는 15% 정도로 감소하였다. Fig. 4-2에서 보듯이 PCV 효소액의 활성화도 역시 pH에 따라 다른 온도 적정치를 나타내 pH 4.0에서 반응시킬 때는 40°C에서, pH 5.0과 pH 6.0에서 반응시킬 때는 50°C에서 가장 활발한 활성을 나타냈다. pH 6.0에서는 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈으며 pH 5.0에서는 40~60°C사이에서 효소반응의 안정성을 나타냈고 70°C에서는 거의 0%로 감소하였다. pH 6.0에서는 70°C에서 다시 증가하여 50°C때의 25% 정도의 활성을 나타냈다.

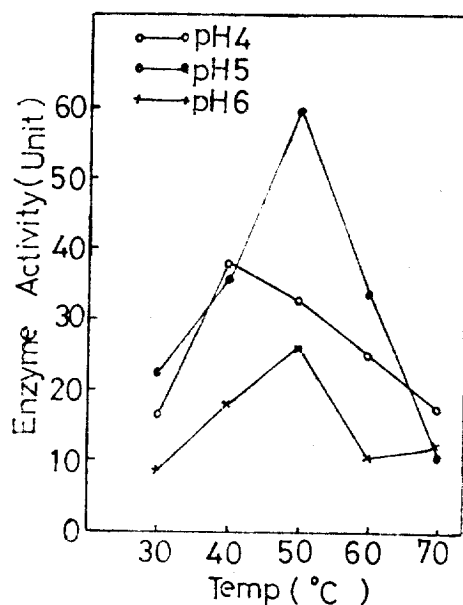


Fig. 4-1. Effects of pH and temperatures on the production of cellulase from healthy *Penicillium chrysogenum* (PC). As in Fig. 3-1, best yield of enzyme was obtained at pH 5.0, 50°C.

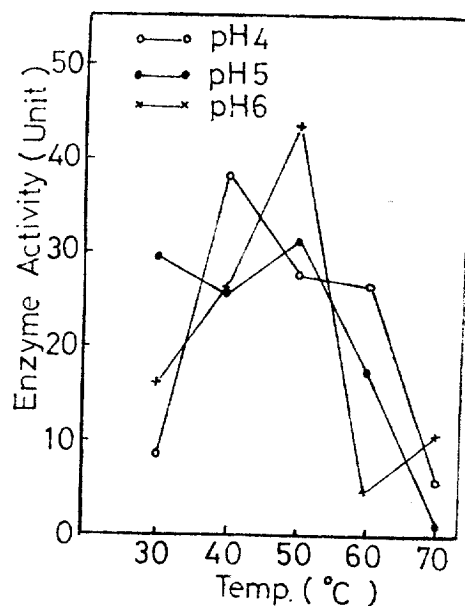


Fig. 4-2. Effects of pH and temperatures on the production of cellulase from virus-infected (PCV) *Penicillium chrysogenum*. As in Fig. 3-2, best yield of enzyme was obtained at pH 6.6, 50°C.

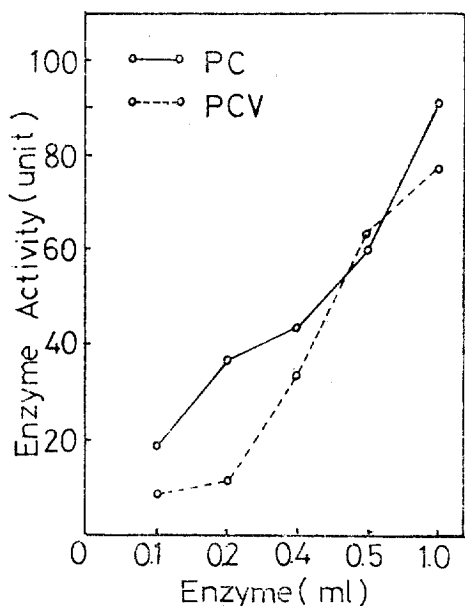


Fig 5. Effects of enzyme concentration and substrate concentration on the production of cellulase from healthy and virus infected *P. chrysogenum*.

5) 효소 활성에 미치는 기질액과의 반응시 효소액 농도를 변화시켜 보았을 때의 결과는 Fig. 5에서 보듯이 PC와 PCV균 효소액을 0.1ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.5ml 및 1.0 ml로 증가시키에 따라 두 균주 모두 계속적인 증가현상을 나타냈다.

PC균 효소액보다 PCV균 효소액의 증가가 0.2ml~0.5ml사이에서는 더욱 많았다.

고 찰

penicillium sp.를 이용한 Penicicillin과 Citrinin에 관한 연구는 Reiss, J (1977), Patrick등(1977), Peter, S. 등(1978), Seo, Y. H. (1978) 등에 의해 보고된 바 있다. 그러나 *Penicillium* sp. 중 *Penicillium chrysogenum*을 이용한 Cellulase에 대한 연구는 보고된 바 없고, 단지 *T. viride* (Selby와 Maitland, 1967; OKada, 1975), *A. niger* (Ikeda, 1967), *Cellvibrio gilbus* (Storvick와 King, 1960), *Myrothecium verucaris* (Reese, 1950; whitaker등, 1963), 그리고

Chaetomium thermophile var *dissitum* (Eriksen과 Gkosóyr, 1977) 등의 균들을 이용한 연구는 많이 보고되었었다. 그러나 이들의 연구는 대부분이 효소 활성의 최적 pH, 및 온도등의 조건을 규명하였다. 본 실험에서 PC와 PCV균주의 생장에 따른 효소액의 pH변화를 본 결과 PC와 PCV균들을 접종하기 전의 배양액과 같은 pH6.4가 최적 pH로 나타났고 이때가 배양 6일로 가장 높은 활성을 나타내 배양일은 PC와 PCV균 모두 다 배양 6일이 적정 배양일임을 알 수 있었다. 그러나 PC균과 PCV균의 효소 활성도를 비교해 볼 때 PCV균의 효소 활성이 PC균의 효소 활성의 50%밖에 안되는 것은 감염균주인 PCV는 바이러스에 감염되어 건전균주의 정상 유전인자에 변화를 일으켜 효소의 생성이 줄어든 것이 아닐까 생각된다.

배양 2일과 4일에 낮은 활성을 보인 것은 pH가 6.4이하일 때로 배양액의 pH와 배양액의 효소 활성과는 밀접한 상관이 있는 것으로 사료된다.

효소의 활성에 미치는 기질액과의 반응시 pH와 온도의 영향을 본 결과 최적 pH는 PC균 효소액에서는 pH5.0이고 PCV균 효소액에서는 pH6.0으로 나타났으며 최적 온도는 PC균 효소액에서는 50°C로, PCV균 효소액에서는 50°C로 나타났다. 그리고 PC균 효소액이 PCV균 효소액보다 그 활성이 30% 정도 더 높게 나왔는데 이는 바이러스 감염으로 PCV균 효소액중 Cellulase의 성분이 줄어든 것이 아닐까 생각된다. 왜냐하면 Penicillin 항균력은 오히려 PCV균이 더 높았기 때문이다(Seo, Y. H., 1978).

또한 PC와 PCV균 효소액이 모두 다 온도를 변화시킬 때에 따라 다른 pH 적정치를 나타내고, pH를 변화시키에 따라 다른 적정 온도를 나타내는 것으로 보아 단일종류가 아닌 복합된 Cellulases라는 것을 알 수 있겠다.

이상과 같은 결과는 Ikeda 등이 (1967) *A. niger*에서 50°C에서 가장 활발한 활성을 보이고 40°~65°C에서 안정하다고 한 보

고와 거의 일치하는 결과를 보여주었고, Kim, Y. H. 등이 (1975) *stachybotry atra* 에서 40°C에서 가장 활발한 활성을 나타내며 60°C에서는 50%, 80°C에서는 거의 활동이 중지되었다는 보고와 달리 본 실험에서는 50°C에서 PC와 PCV균 효소액이 다 가장 활발한 활성을 보여주었고 70°C에서 거의 활성이 떨어진 경향을 볼 수 있었다. 이는 균주자체에서 오는 차이점이라고 볼 수 있겠다. 또한 pH의 영향을 보면 Petterson이 (1968) *P. notatum*에서 최적 pH가 4.5~7.0이라고 한 보고와는 달리 본 실험에서는 PC균 효소액인 경우 pH5.0이 최적 pH로 나왔고 PCV균 효소액인 경우 최적 pH는 pH6.0으로 나왔다. Okada가 (1975) *T. viride* 16374에서 최적 pH가 pH4.5~5.0이라고 한 보고와, Reese등이 (1950) *A. luchuensis*에서 기질과의 반응시 최적 pH가 pH5.0이라고 한 보고와 본 실험결과 PC

균 효소액의 최적 pH5.0과 일치하고 있다.

또한 Storvick와 King등이 (1960) *C. gibbus*에서 최적 pH가 pH6.0이라고 한 보고와 본 실험의 결과 PCV균 효소액의 최적 pH6.0과 일치하고 있었다. 이는 PC전전균과 PCV감염균사이의 차이도 여러 다른 종류의 곰팡이들 사이의 최적 pH 차이와 같은 것으로 생각할 수 있었다. 즉 바이러스가 PC전전균의 유전인자에 변형을 일으켜 새로운 형의 PCV균을 만들어냈다고 볼 수 있었다.

이상의 모든 결과로 보아 PC와 PCV균 효소액은 PC가 PCV보다 cellulase의 경우 더 많은 효소 활성을 나타낸다고 생각되며 기질액과의 반응시 다양한 변화를 보여줌으로 순화하여 분리하면 여러 종류의 cellulase를 분리할 수 있으리라 사료돼 앞으로 더 연구가 진행되어야 하리라 생각된다.

적 요

*Penicillium chrysogenum*의 전전균(PC)과 바이러스감염균(PCV)을 사용하여 cellulase의 존재여부와 그 활성 정도를 알아보기 위해 밀기울에 배양하여 효소액으로 만들어 균의 생장에 따른 배양액의 최적 pH와 최적 배양일 및 Na-CMC 기질액을 이용하여 효소액의 활성에 미치는 최적 pH, 온도, 및 효소농도를 알아보고자 본 실험에 착수하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

- 1) PC와 PCV균의 생장에 따른 배양액의 최적 pH는 균주 접종전 배지와 같은 pH6.4로 나타났다.
- 2) 최적 배양일은 최적 pH를 나타낸 배양 6일이 가장 높은 활성을 나타냈고, PCV는 PC의 50%의 활성이었다.
- 3) PC균 배양 효소액이 기질과 반응시 효소 활성이 가장 높은 최적 pH는 pH5.0으로 나타났고, PCV균 배양 효소액에서는 pH 6.0으로 나타났다.
- 4) PC와 PCV균 배양 효소액 모두 기질과 반응시 효소 활성이 가장 높은 최적 온도는 50°C로 나타났다.

이상의 결과에서 cellulase의 활성도는 PC전전균이 PCV감염균보다 높은 활성을 나타낸 것을 알 수 있었다.

REFERENCES

1. Cho, H.O., H.S., Lee, and H.C., Kim, 1975. Studies on the Application of Cellulase and Hemicellulase in farm products processing (I). *J. Nuclear Sciences* 9, 49~58.
2. Eriksen, J. and J. Goksoyr, 1977. Cellulases from *Chaetomium thermophile* var *Dissitum*. *Fur. J. Biochem.* 77, 445~450.
3. Ikeda, R., T. Yamamoto, and M., Funatsu, 1967. Purification and some properties of cellulases from *Aspergillus niger*. *Agri.*

- Biol. Chem.* **31**, 1201
4. Iwasaki, T., K. Hayashi, and M., Funatsu, 1964. Purification and characterization of two types of cellulases from *Trichoderma koningi*. *J. Biochem. Japan.* **55**, 209.
 5. Kim, W.S., Kim, H.Y., Kang, Y.H., and Choi, T.J., 1975. Studies on the Cellulolytic enzymes of *Stachybotry atra*. (I). Effects of temperature and pH on the enzyme activities. *Korean J. Microbiol.* **13**, 59~63.
 6. Okada, G., 1975. Enzymic studies on a Cellulases system of *Trichoderma viride* II. Purification and properties of two Cellulases. *J. Biochem.* **77**, 33.
 7. Patrick, H.J., and J.D., Nelson, 1977. A pharmacologic Evaluation of penicillin in children with purulent Meningitis. *N. Engl. J. Med.*, **277**, 410~413.
 8. Petterson, G., and J., Porath, 1963. Cellulolytic enzymes II. Multiplicity of the Cellulolytic enzymes of *Polyporus versicolor*. *Biochem. Biophys. Acta.* **67**, 1.
 9. Peter, S., and S., Ortrud, 1978. Clucosere pression und pH-abhangige kontrolle der Zellspezialisierung submerser kulturen von *Penicillium cyclopium*. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* **173**, 37~43.
 10. Pierre, B., and E., Hawey, 1977. Free and Cellulose-bound Cellulases in a *Cellulomonas species*. *J. Gen. Microbiol.* **101**, 191~196
 11. Reese, E.T., R.C.H., Siu, and H.S., Levinson, 1950. The biological degradation of soluble cellulase derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.* **59**, 485.
 12. Reiss, J., 1977. Mycotoxins in food stuffs X. Production of Citrinin by *Penicillium chrysogenum* in Bread. *Food Cosmet. Toxicol.* **15**, 303~307.
 13. Selby, K. and C.C., Maitland, 1967. *Biochem. J.* **104**, 716.
 14. Seo, Y.H. 1978. Studies on the growth patterns and antibacterial activities of virus infected *Penicillium chrysogenum*. Dissertation of Master degree Yon Se Univ. Graduate School. Seoul.
 15. Storvick, W.D., and K.W., King, 1960. *J. Biol. Chem.* **235**, 303.
 16. Whitaker, D.R., 1971. Cellulases. The enzymes 13th ed, 5, 273. Ed. by Boyer, P.D., Academic press Inc., New York.