

Chaetomium globosum 이 生成하는 Cellulose 分解酵素에 關한 研究

第 1 報 粗酵素의 性質

鄭 東 孝

建國大學校 食品加工科

(1968. 8. 24 受理)

Studies on Cellulolytic Enzymes Produced by *Chaetomium globosum*

Part. 1; Properties of Crude Cellulolytic Enzymes

Dong Hyo Chung

Department of Food Science and Technology, Kon Kuk University

SUMMARY

We have obtained the following results, at the production of cellulase of *Chaetomium globosum* and its properties of crude enzyme.

1. At the production of enzyme, wheat bran solid culture was more active than surface or shaking culture.

2. The production of enzyme was maximum between the eighth and the tenth days, but slightly decreased thereafter.

3. The optimum condition of the reactions in saccharification with CMC were obtained the following results.

1) The optimum pH was within the range of from 4.0 to 5.0 and stable pH range was within 3.5 to 6.5.

2) The optimum temperature was 40°C and thermal stability was below 50°C and completely inactivated at 70°C.

4. Dialyzed crude enzyme was activated by Mn⁺⁺ Mg⁺⁺ Fe⁺⁺ and Mo⁺⁺ respectively but Hg⁺⁺ was inhibited its enzyme action.

緒 言

cellulose (β -1,4-glucan)은 植物의 세포막의 主成分으로서 自然界에 널리 分布되어 있다. 특히 木綿

섬유는 거의 大部分이 cellulose 이며 곡물 果實에도 少量의 섬유소를 含有하고 있다. 또 cellulose 는 어떤 種類의 細菌이나 海上動物의 被膜成分의 一部를 形成하고 있다.

cellulose 는 主로 細胞膜中에 hemicellulose 와 pectin 과 같이 共存되어 세포構造를 強固히 하여 内容物을 保持하고 있다. 이것 때문에 食品이나 飼料의 消化, 때로는 食品加工에서 cellulose 를 除去하지 않으면 안된다. 이와 같은 cellulose 分解酵素(β -1,4-glucan 4-glucano hydrolase, cellulase)⁽¹⁾는 下等動物보다⁽²⁾ 여러 微生物에서 인지되어 많은 研究가 進行되고 있다.

即 *Aispergillus oryzae* 의 cellulase 에 關하여는 Grassmann⁽³⁻⁾과 Freudenberg 의 研究⁽⁵⁾, *Aspergillus niger* 의 그것에 關하여는 King 과⁽⁶⁻⁷⁻⁸⁾ 三澤等의 研究⁽⁶⁾, 및 Ikeda 의 研究⁽¹¹⁹⁾ *Aspergillus saitoi* 의 cellulase 에 關하여 松村의 前鳥等の 研究⁽¹⁰⁻¹⁴⁾, 또 *Rhizopus* 屬의 cellulase 에 關하여는 今田와 金野⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ 및 大健의 研究⁽¹⁷⁻¹⁸⁾, *Neurospora* 屬의 그것에 關하여는 黑田의 研究⁽¹⁹⁻²⁰⁾, *Penicillium variable* 의 그것에 關하여는 雨村의 研究⁽²¹⁻²³⁾ *Myrothecium verrucaria* 의 그것에 關하여는 究가 Whitaker 와⁽²⁴⁻²⁷⁾ Reese⁽²⁸⁻²⁹⁾, Hash 의 연구있다.⁽³⁰⁾ 또 *Irpex lacteus* 의 cellulase 에 關하여는 西澤과⁽³⁴⁻³⁸⁾ Reese 의 研究⁽³⁰⁾, *Trametes sanguinea* 의 그것에 關하여 吉野의 研究가 있다.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ 또 *Pseudomonas fluorescens* 의 cellulase 에 關하여는 山根

等の研究와⁽⁴⁵⁾ *Stachybotrys atra*의 그것에 關하여는 Thomas의 研究가 있다⁽⁴⁶⁾. 더우기 上記의 微生物外에 最近 많이 研究되고 있는 cellulase는 *Trichoderma koningi*와 *Trichoderma viride*이다. 特別히 菌株의 酵素들은 分別 精製까지 되었으며 外山等^(45-57, 53-63)과 張氏等은 수십편의 論文을 發表하였다⁽⁶⁴⁻⁷²⁾.

한편 cellulase는 現在 食品의 利用 및 加工의 目的으로 開發되어 細胞內容物의 利用度를 높이며 釀造時에 大豆分解의 利用⁽⁷³⁻⁷⁸⁾ 海藻內容物의 抽出⁽⁷⁹⁻⁸²⁾ 진분抽出에 利用⁽⁸³⁻⁸⁵⁾ 기타 食品加工에 利用外도⁽³⁶⁻⁸⁷⁾, 消化劑에도 利用되고 있다⁽⁸⁸⁾.

이에 反하여 *Chaetomium globosum*이 生成하는 cellulase에 關하여는 渡邊와⁽³⁰⁻³²⁾ Greathouse의 研究⁽⁹³⁾ 및 Buston의 研究 外는⁽⁹⁴⁾ 거의 없으므로 이가 生成하는 酵素의 性質을 究明할려고 아래와 같은 實驗의 結果 그 一部를 報告한다.

實 驗

1. 菌株 :

Chaetomium globosum

2. 培養法 :

培養法은 아래와 같다.

a) 麩培養 : 밀기울 30g에 井水 25ml와 잘 混和하여 이를 1l의 3角후라스크에 넣고 1.3 kg/cm²에서 30分間 증기 살균하여 上記 菌株을 接種, 30°C에서 15日間 培養하였다.

b) 無機鹽培養

(NH₄)₂SO₄ : 10g

KH₂PO₄ : 3.0g

MgSO₄ · 7H₂O : 0.5g

KCl : 0.5g

FeSO₄ · 7H₂O : 0.01g

위의 無機鹽을 물에 녹혀 1l로 하고 pH를 5.0로 調節하고 이를 밀기울 30g에 25ml을 加하여 a) 培養法과 같이 한 培養이다.

c) 澱粉粕培養 : 乾燥澱粉粕 30g에 위의 無機鹽 混濁 50mg을 加하여 a)와 같이 培養한 것이다.

d) 菌體培養 : Czapek液 200ml을 500ml容 3角후라스크에 넣고 殺菌 後에 上記 菌株을 接種하여 30°C에서 15日間 培養하였다.

e) 振盪培養 : 밀기울 2.5g와 b)의 無機鹽液 100ml을 500ml 振盪用 후라스크에 넣고 殺菌 接種하여 30°C에서 진탕 배양하였다.

3. 酵素液의 調製

a) 固體培養의 경우 : 固體培養 a), b), c)의 경우는 所要 日數 培養 한 후 10倍의 물을 加하여 培養物을 Waring blender로 3分間 마쇄하고 여기에 toluol을 加하여 냉장고에 하루밤 放置한 後 遠心(9,000 rpm/min)하고 그 上澄液을 다시 濾過하여 粗酵素液으로 供하였다.

b) 液體培養의 경우 : 液體培養 d) e)의 경우는 所要 日數 培養後 그대로 Waring blender로 1分間 마쇄하여 a)와 같이 하였다.

4. Cellulase 活性度の 測定

cellulase의 測定法으로는 (a) 木綿切斷法⁽⁵⁴⁾, (b) 濾紙崩壞法⁽⁹⁴⁾, (c) 殘存 cellulose 定量法⁽⁹⁵⁻⁹⁶⁾ (d) Hydro cellulose 比濁法⁽⁹⁷⁾, (e) HEC 粘度法, 還元糖法⁽⁹⁸⁾, (5) CMC 粘度法, 還元糖法^(37, 100-103) 등이 있다.

本實驗에서 濾紙崩壞法은 培養別 cellulase 活性의 測定에만 使用하였고 CMC (carboxy methyl cellulose)를 基質로 하여 그의 粘度底下 및 還元糖 增加를 cellulase 活性으로 表示하였다.

a) 基質 : cellulase 活性 測定에 使用된 基質은 CMC이며 濾紙崩壞活性은 東洋濾紙 No. 51A를 使用하였다.

b) 濾紙崩壞活性度測定⁽⁶⁴⁻⁸⁴⁾ : L型 試驗管(內徑 17~19 mm, 垂直部 길이 70 mm, 水平部 길이 115 mm)에 基質로서 東洋濾紙 No 51A(10×10 mm) 2枚를 넣고 上記의 粗酵素溶液 7ml와 緩衝液(McIlvaine pH 4.0) 3ml을 加하여 輕하게 고무栓을 하고 Monod式恒溫振盪培養裝置(진폭 : 4 mm, 往復 : 48回/分) 37°C에서 濾紙가 完全히 崩壞되는 時間을 分으로 表示하여 比較하였다. Control은 酵素液 代身에 물을 加하였으며 기타는 위와 같은 條件으로 하였다.

c) 粘度測定에 依한 cellulase 活性測定. 0.1% CMC溶液 5.0ml, 緩衝液(McIlvaine pH 4.0) 4.0ml, 酵素液 1.0ml을 混和하여 所定의 溫度인 Ostwald 粘度計에 一定 時間 동안(3分間) 保持하여 그의 粘度減少를 아래 式으로 表示하였다.

$$V(\%) = \frac{A-B}{A} \times 100$$

但 V: 度減少率

B: (基質液+酵素液)의 流下時間(秒)

A: (基質液+酵素(原液)破壞液)의 流下時間(秒)

그러나 溫度와 pH가 CMC에 미치는 영향을 알기 위한 比粘度는 0.25% CMC溶液으로 하였다.

d) 還元糖測定에 依한 cellulase 活性測定法⁽⁸⁸⁻¹⁰²⁾

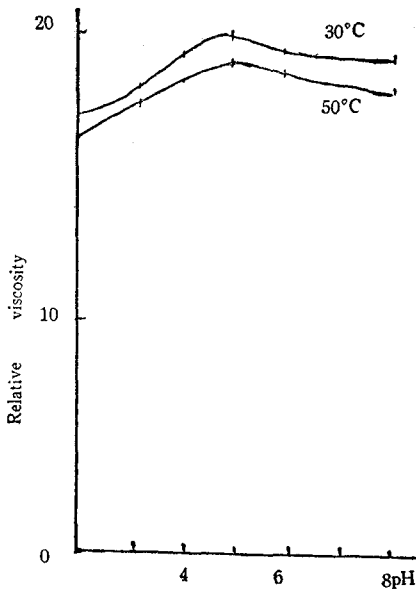


Fig. 1. The influence of pH in viscosity of CMC solution (0.25)

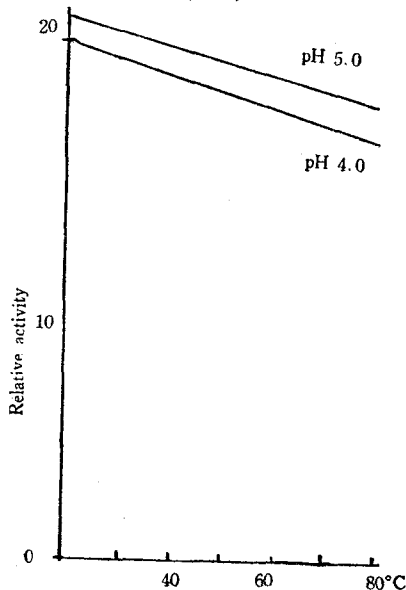


Fig. 2. The influence of temperature upon viscosity of CMC solution (0.25%)

還元糖에 의한 cellulase 活性測定에 사용된 反應混液은 다음과 같다.

0.5% CMC 溶液 1.0 ml
緩衝液(McIlvaine) 1.0 ml
粗酵素液 0.5 ml

이 反應液을 所定의 溫度 및 pH에서 10分間 방치 後 이 反應液 1 ml을 取하여 그 中에 遊離되는 還元糖을 Somogyi-Nelson 法으로 比色定量하여(波長 660 m μ) mg/ml으로 表示하였다⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾.

結果 및 考案

1. 培養中의 Cellulase 活性變化

本實驗의 基質은 CMC 이므로 이가 pH와 溫度에 如何한 影響을 받는가는 問題가 된다. 그래서 먼저 이들의 影響을 檢討한 結果는 다음 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 이 Fig. 1에서 보는 바와 같이 pH 2.2~8까지 범위는 pH 5.0 前後에서 粘度가 약간 높다. 그리고 같은 pH에서도 溫度가 높으면 比粘度는 底下되는 傾向을 보여준다.

또 Fig. 2에서는 溫度의 上昇과 같이 比粘度는 比例的으로 底下되며 같은 溫度에서도 pH가 낮은 것이 比粘度가 若干 낮은 것을 알 수 있다.

이런 結果로 봐서 CMC는 pH와 溫度에 若干의 影響을 받으나 本實驗의 基質로서 使用해도 無妨할 것 같다.

a) 濾紙崩壞에 의한 cellulase 活性度測定 前記의 여러 粗酵素液을 L型試驗管에서 濾紙崩壞力을 試驗한 結果는 Table 1과 같다.

Table 1에서 麩培養과 數無機鹽培養은 酵素의 生成이 相當한것 같으나 그 外의 培養은 本菌株의 酵素生成培養으로는 適當하지 않은것 같다.

b) 粘度測定에 의한 cellulase 活性測定: 各種 培地의 培養 日數와 粘度減少度는 다음 Fig. 3과 같다.

前記 培養中 麩培養과 數無機鹽培養의 固體培養의 경우는 粘度減少도가 현저하나 이와 反對로 液

Table 1. Filter paper destroy activity of each crude enzyme solution.

活性度	培養	數 培 養	數無機鹽培養	澱粉粕培養	振盪培養	比較試驗
濾紙崩壞時間(分)		170(分)	160(分)	300(分)	300(分)	無限
相對活性度		94.1	100	53.0	53.0	

體培養인 czapek 培養이나 振盪培養의 경우는 그것 이 아주 낮다. Table 1에서 보는 바와 같이 液體 培養과 澱粉粕培養은 本菌의 cellulase 生成에 적합

하지 않음을 暗示해 준다. 그래서 次後의 實驗은 省略하였다.

c) 還元糖 測定에 의한 cellulase 活性測定法: 培

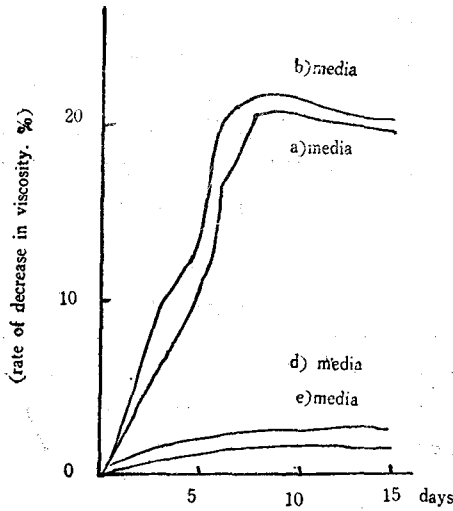


Fig. 3. Change in cellulase activity in cultivation of each media. (40°C, pH 4.5)

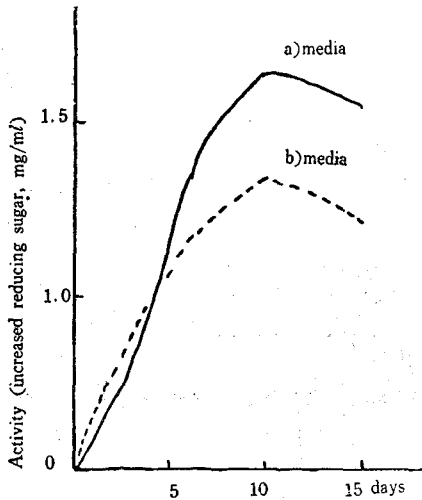


Fig. 4. Change in cellulase activity in cultivation of each media (40°C, pH 4.0)

養과 數無機鹽培養의 日數와 cellulase 活性은 Fig. 4 와 같다.

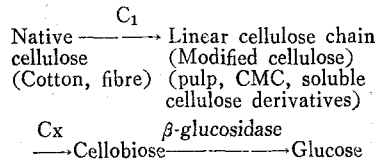
Fig. 3의 粘度減少 活性과는 달리 數培養이 數無機鹽培養보다 還元糖을 많이 生成하며 또 粘度減少 活性은 8日이 最高이나 還元力 增大活性은 10日이 最高이다. 이것으로 봐서 本菌株의 cellulase 도

單一 種類가 아니라 여러 酵素가 있음을 지적해 주는 것 같다(38,108-10).

Aspergillussaitoi(14) 및 絲狀菌에서(16)에서 酵素를 生成하는 경우는 團體培養보다 振盪培養과 液體培養이 酵素를 生成하지 않는 것 처럼 本菌株에서도 液體培養에서와 振盪培養에서 酵素를 生成하지 않으며(14) 特히 液體培養이 固體培養보다 濾紙崩壞力이나 CMC 糖化力이 相當히 낮다. 그 理由는 生育菌絲의 生理的 性質의 變化에 基因되는 것 같다. 또 數無機鹽培養이 數培養보다 CMC 糖化力이 낮은 것은 질소원이 많은 것이 오히려 酵素生成을 阻害시키는 것 같다(14).

cellulose는 glucose가 β -1.4 結合으로 연결된 鎖狀高分子이나 天然 cellulose의 경우는 cellulose 鎖狀分子 相互間의 水素結合에 依하여 cellulose 分子는 規則的으로 配列된 微結晶格子(micell)를 形成하고 있거나 cellulose 分子가 不規則(random)으로 配列된 非結晶部分을 含有하고 있다. 또 이들 外에 鎖狀分子 間에 共有結合을 하는 cross linkage에 依한 結合도 있다(111).

이와 같이 복잡한 構造를 가진 不溶性의 基質을 酵素的으로 分解하는 처음의 作用으로서는 hydrogen-bondase(118), swelling factor 或은 weathering(28), 또는 swelling activity(111-112)라 불리는 어떤 酵素作用이 관여되는 것으로 생각해 왔다. 그러므로 pringsheim(108)은 cellulose 分解 酵素는 여러 成分인 것을 提示해 주었다. 한편 Reese 과(39,109,113-114) Levinson은 cellulose 分解는 다음과 같이 된다고 생각하였다.



여기서 C_1 은 섬유소分解性的의 絲狀菌에 인정되어 未知의 方法으로 cellulose를 침식하여 木綿의 抗張力을 빨리 減少시키는 酵素이다. 이렇게 해서 變質된 cellulose는 C_x 에 依하여 水溶性 物質로도 된다. C_x 는 대개의 cellulose 分解 絲狀菌에 存在하나 약간은 非分解性 絲狀菌에도 인정되는 酵素로 CMC 같은 可溶性의 섬유소誘導體를 分解할 수 있는 것이다. 그러나 whitaker 等은 天然섬유소부터 cellobiose 까지의 基質을 單一 酵素가 分解하는 것으로 C_1 와 C_x 를 否定하였다(101). 그러나 그 後에 多樣性的의 cellulase를 分離 結晶함으로(10-14, 28, 28, 63, 115, 116)이 主張은 넘어지고 말았다.

이와 같은 cellulose의 복잡한 構造와 多樣性的의

cellulose 分解酵素中 C_1 酵素는 단지 β -1.4 結合을 끊는 것만 아니라 共有結合을 한 cross linkage 을 끊지 않으면 안된다. 이와 같이 되어 天然 cellulose 의 micell 이 開裂한 後는 β -1.4 結合을 끊는것 같다.

本 *chaetomium globosum* 이 生成하는 cellulose 分解酵素絲는 單一成分이 아니라 濾紙崩壞活性으로 봐서 (Table 1) 天然 cellulose 를 分解하는 C_1 酵素成分과 CMC 粘度減少活性으로 봐서 (Fig. 3) C_x 酵素成分이 있는 것 같다. 또 CMC 의 糖化力의 增加로는 β -glucosidase 가 있는 것비 같다. 이것 들은 마치 α -amylase 가 糊精化 澱粉에 作用하여 그 粘度를 감소시키는 것같으며 또 β -amylase 가 作用하여 glucose 를 生成하는 것 처럼 생각난다. 即 cellulose 分解酵素인 C_1 酵素, C_x 酵素 및 β -glucosidase 는 澱粉加水分解 酵素에 比하면 α -amylase, β -amylase 및 gluco-amylase 의 關係와 같이 推想된다.

各種 培養液中的 最適 pH, 最適溫度, 安全 pH, 熱安全度 및 金屬이온의 影響은 數培養液만 관찰하였다.

2. 粗酵素의 最適 pH

還元糖 增大 活性은 CMC 液을 McIlvaine 緩衝液으로 pH 2.2 에서 pH 8.0 로 調節한 다음 40C 에서 10 分間 放置하여 遊離되는 糖을 Somogyi-Nelson 法으로 定量하여 反應液 1ml 中の 糖을 mg/ml 로 表示한 結果는 Fig. 5 와 같다.

그리고 粘度減少率은 McIlvaine 緩衝液으로 pH 를

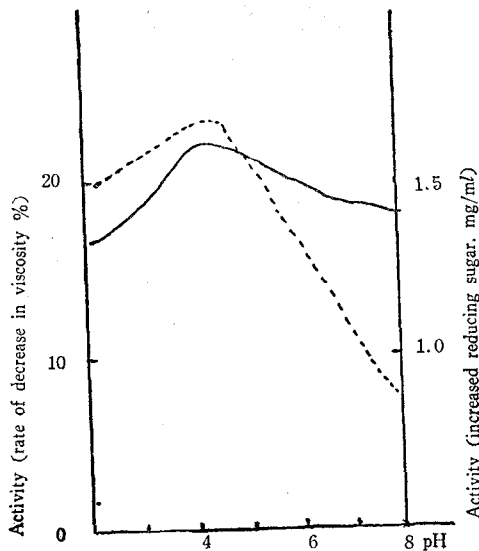


Fig. 5. The pH dependence of crude cellulase activity (40°C)

調節하여 40C 에서 3 分間 방치하여 Ostwald 粘度計로 測定하였다. 그 結果는 Fig. 5 와 같다.

또 濾紙崩壞力은 McIlvaine 緩衝液으로 pH 를 調節하고 38°C 의 Monod 振盪培養裝置에서 濾紙가 崩壞되는 時間을 分으로 表示하여 다음 Table 2 을 얻었다. 그리고 이것을 相對活性으로 나타내면 Fig. 6 과 같다.

Table 2. Filter paper destroy activity of crude enzyme solution

活活性度	pH	2.2	3	4	5	6	7	8
崩壞時間		350(分)	210	170	180	200	250	280
相對活性		48.5	84.3	100	94.4	85.0	68.0	64.3

Fig. 5 에서 보는바와 같이 本 粗酵素의 還元糖 增大力 活性은 pH 4.5 이고 粘度減少 活性은 pH 4.0 이다. 그리고 濾紙崩壞活性은 Fig. 6 과 같이 pH 4.0 이다.

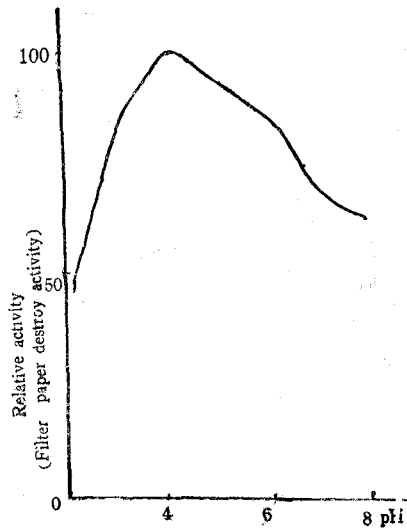


Fig. 6. The pH dependence of crude cellulase activity (38°C)

本 酵素의 粘度減少는 (Fig 5) 最適 pH 보다 酸性側에서 더욱 減少되고 還元糖 增大力은 反對로 鹽基性에서 급격히 低下된다. 또 濾紙崩壞力은 最適 pH 보다 酸性側에서 相對活性이 低下된다.

一般的으로 cellulase 의 最適 pH 는 菌株 및 培養條件에 따라 生成되는 cellulose 의 性質이 다르게 된다. 即 *Irpex lacteus* 의 CMC ase (著者の CMC 還元糖 增大力)는 pH 3.7 이며⁽³⁶⁾, *Aspergillus* 가 生成하는 耐酸性 cellulase 는 pH 3.6⁽¹¹⁷⁾, 또 *Aspergillus saitoi* 에서 CMC-ase 는 pH 5.0 이고 膨潤

5. 粗酵素의 熱安全性

30°C에서 60°C까지의 各 溫度에서 粗酵素를 120分間 放置한 後 그 一部를 30分間마다 取하여 殘存型 CMC 糖化 活性를 遊離되는 糖으로 測定하여 相對活性으로 表示한 結果는 다음 Fig 9와 같다. Fig 9에서 보는 바와 같이 30, 40, 50°C에서 120分間 거의 失活되지 않으나 60°C에서 10分間

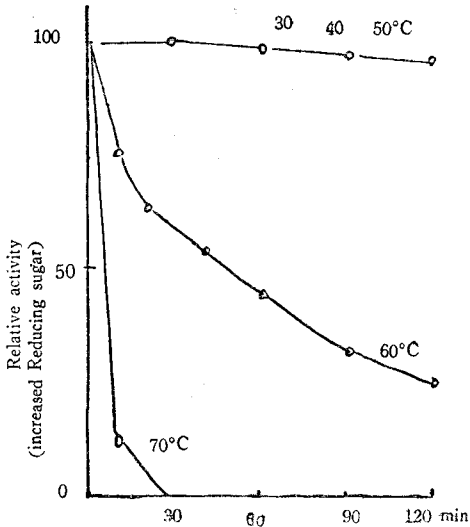


Fig. 9. Heat stability of crude cellulase activity

은 20%가, 120分後는 80%가 失活되었다. 또 70°C에서는 30分間이면 거의 失活됨을 알수가 있다. *Aspergillus saitoi*의 CMC-ase는 50°C에서 120分間에도 酵素活性이 失活되지 않으나 膨潤 cellulose에 作用하는 酵素는 이와 反對로 熱에는 不安全하다 하였다⁽¹⁰⁾ 또 *Rhizopus*屬은 60°C에서 3時間 放置하여도 酵素의 活性이 失活되지 않는다고 한다⁽¹⁵⁾. 그리고 *Trichoderma viride* Cellulase中 濾紙 崩壞 活性은 50°C, 30分間 處理로 約 30%가 失活되나 CMC 糖化力은 거의 영향이 없다고 한다⁽⁶⁴⁾.

本菌株의 熱安全性은 *Rhizopus*屬에 比하여 아주 약하며 *Aspergillus saitoi*와 *Trichoderma viride*의 CMC 糖化力 活性과는 거의 같음을 알 수 있다.

6. 金屬이온에 依한 粗酵素 活性의 영향

粗酵素液을 pH 7.0 구연산緩衝液에서 air bladder로 充分히 透析을 하고 透析 前後의 酵素活性度를 還元糖 増大力 活性으로 測定하였다. 얻어진 透析 酵素에 對하여 各種의 金屬 이온의 影響을 알기 위하여 Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Mo^{2+} 의 最終 濃度를 $10^{-3}ml/l$ 로 되게 反應 混液에 各各 加하여 酵素 活性을 測定한

結果는 다음 Table 3과 같다.

위의 表와 같이 透析에 依하여 酵素의 活性은 약간 낮아지며 Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mo^{2+} 등을 $10^{-3} mole/l$ 濃度에서 cellulase 活性을 賦活하나 다른 이온은 약간 阻害하며 特히 Hg^{2+} 은 현저한 阻

Table 3. Activation and inhibition of crude Cellulase by metal ions

Preparation	Relative activity
Crude cellulase	100
Dialyzed crude cellulase	89
Dialyzed crude cellulase + Mg^{2+}	105
+ Fe^{2+}	103
+ Fe^{3+}	91
+ Ba^{2+}	70
+ Cd^{2+}	80
+ Ca^{2+}	80
+ Mn^{2+}	124
+ Zn^{2+}	96
+ Hg^{2+}	5.6
+ Mo^{2+}	105

害를 준다. *Aspergillus saitoi*의 金屬이온의 影響을 보면 Hg^{2+} 이 阻害가 第一 크며 Ag^{1+} 는 $10^{-4}mol/l$ 에서도 阻害된다고 한다. Ca^{2+} , Mn^{2+} 은 약간 阻害하며 Na^{+} , Z^{2+} , Fe^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Al^{2+} 은 影響이 없으며 Cu^{2+} 은 $10^{-3}mole/l$, Co^{2+} 은 $10^{-4}mol/l$ 에서도 1.6倍의 效과를 나타낸다 하였다. 그러나 Cd^{2+} , Fe^{2+} , k^{+} 은 效果가 없다 한다⁽¹³⁾. 그리고 *Trichoderma koningi*의 濾紙崩壞 活性度는 Mn^{2+} 가 현저히 賦活한다⁽⁷⁾. 本 酵素의 CMC 還元糖 増大力 活性(CMCCase)의 賦活劑로는 Mn^{2+} 이 第一 크며 이는 *Trichoderma koningi*와는 一致되나 Mn^{2+} 은 *Aspergillus saitoi*의 경우는 약간 阻害된다. 이들 金屬이온의 影響도 相當한 差異를 보인다.

要 約

*Chaetomium globosum*의 Cellulase 生産과 粗酵素의 性質은 試驗한바 다음의 結果를 얻었다.

1. 酵素生成培養은 黴固體培養이 다른 어떤 液體 或은 振盪培養보다 좋은 結果를 나타낸다.
2. 酵素生産은 8~10日이 最高이며 그 後는 減少된다.
3. 還元糖 測定에 依한 Cellulase 活性 測定法으로

最適 pH, 最適 溫度, pH 安全 및 熱安全은 다음 같다.

- (1) 粗酵素의 最適 pH는 4.0~4.5 이다.
 - (2) 粗酵素의 最適 溫度는 40°C 이다.
 - (3) 粗酵素의 安全 pH는 3.5~6.5 이다.
 - (4) 粗酵素의 熱安全은 50°C 以下이다.
4. 透析粗酵素는 Mn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mo^{2+} 에 相當히 賦活되며 Hg^{2+} 은 현저히 阻害된다.

參 考 文 獻

1. 田宮信雄 譯: 酵素 酵素反應記號一覽 共立出版 p. 113 (1963).
2. Seilliere, E.S.; *Compt-rend, Soc. Biol.*, **63**, 515 (1907).
3. Grassmann, W., Stadler, R., Bender, R.; *Ann.* **502**, 20(1933).
4. Grassmann, W., Zechmeister, I., Toth, G., Stadler, R.; *Naturwiss.*, **20**, 639 (1932).
5. Freudenberg, K., Ploetz, T.; *Z. Physiol. Chem.*, **259**, 19 (1939).
6. King, K.W.; *J. Ferm. Technol.*, **41**, 98 (1963).
7. King, K.W., Smibert, R.M.; *Appl. Microbiol.*, **11**, 315 (1963).
8. Li, L.H., King, K.W.; *Appl. Microbiol.*, **11**, 320 (1963).
9. 三澤 豊, 松原 良, 羽田 野誠: *食工誌*; **14**, 286 (1967).
10. 松村 親, 前島 一孝: *醸工*, **41**, 154 (1963).
11. idem.: *ibid.*, **41**, 158 (1963).
12. idem.: *ibid.*, **41**, 164 (1963).
13. idem.: *ibid.*, **41**, 169 (1963).
14. idem.: *ibid.*, **43**, 731 (1965).
15. 今田 伊助, 友田 勝己, 和田 正三: *ibid.*, **40**, 140 (1962).
16. 金野, 範之, 上田 芳子, 照井 堯造: *ibid.*, **40**, 143 (1962).
17. 大健 祥松, 相川 忠治, 高原義昌: *ibid.*, **42**, 363 (1964).
18. idem.: *ibid.*, **42**, 368 (1964).
19. 黒田 秀穂: *ibid.*, **45**, 283 (1967).
20. idem.: *ibid.*, **45**, 341 (1967).
21. 雨村 明倫, 照井 堯造: *ibid.*, **43**, 275 (1955).
22. idem.: *ibid.*, **43**, 28 (1935).
23. 雨村 明倫, 小川隆平, 照井 堯造: *ibid.*, **45**, 879 (1967).
24. Whitaker, D.R.; *Nature*, **158**, 1070 (1951).
25. idem.; *Science*, **116**, 90 (1952).
26. Basu, S.N., Whitaker, D.R.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 12 (1953).
27. Whitaker, D.R., Colvin, J.R., Cook, W.H.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **49**, 257 (1954).
28. Reese, E.T., Gilligan, W.; *Arch. Biochem. Biophys.*; **45**, 74 (1953).
29. Gilligan, W., Reese, E.T.; *Can. J. Microbiol.* **I**, 6 (1954).
30. Grimes, R.M., Ducan, C.W., Hoppert, C.A.; *Arch. Biochem. Biophys.*; **68**, 412 (1957).
31. M., Miller, G.L., Saltrr, R.W. Jr.; *ibid.* **93**, 115 (1961).
32. Miller, G., Blum, R.; *J. Biol. Chem.*, **218**, 131 (1956).
33. Hash, K.H., King, K.W.; *ibid.*, **232**, 381 (1958).
34. 西澤 一俊, 小林: *日農化*, **27**, 242 (1953).
35. idem.: *ibid.*, **27**, 239 (1953).
36. 若林 和正, 西澤 一俊: *醸工*, **42**, 347 (1964).
37. 若林 和正, 神田 鷹久, 西澤 一俊: *ibid.*, **43**, 43, 739 (1965).
38. 若林 和正, 神田 鷹久: *ibid.*, **44**, 669 (1966).
39. Reese, E.T., Levinson, H.S.; *Physiologia plantarum* **5**, 345 (1952).
40. 番野 剛 奈良 潔, 吉野 弘: *醸工*, **42**, 405 (1964).
41. idem.: *ibid.*, **42**, 410 (1964).
42. idem.: *ibid.*, **43**, 653 (1965).
43. 山根國男, 鈴木 恕, 山口 和男, 塚田 美重子, 西澤 一俊: *ibid.*, **43**, 721 (1965).
44. Thomas, R., *Aust. J. Biol. Sci.*; **159** (1956).
45. 石丸 義夫, 外山 信男: *醸工*, **30**, 409 (1952).
46. 外山 信男: *醸山*, **31**, 315 (1953).
47. idem.: *ibid.*, **32**, 300 (1954).
48. idem.: *ibid.*, **33**, 266 (1955).
49. idem.: *ibid.*, **33**, 406 (1955).
50. idem.: *ibid.*, **34**, 274 (1956).
51. idem.: *ibid.*, **35**, 356 (1957).
52. idem.: *ibid.*, **35**, 362 (1959).
53. idem.: *ibid.*, **36**, 348 (1958).
54. idem.: *ibid.*, **36**, 375 (1958).
55. idem.: *ibid.*, **37**, 267 (1959).
56. idem.: *ibid.*, **38**, 81 (1960).
57. idem.: *ibid.*, **39**, 262 (1961).

58. 小川喜 八郎, 外山 信男: *ibid.*, **42**, 199 (1964).
59. *idem.*: *ibid.*, **43**, 661 (1965).
60. 外山 信男, 小川喜 八郎: *ibid.*, **44**, 741 (1966)
61. 小崎 吉久, 山田雄 次郎, 江澤 和美, 五井 仁, 原毅: *ibid.*, **42**, 115 (1964).
62. 丹羽 富造, 岡田巡 太郎, 石川 哲夫, 西澤 一俊: *ibid.*, **42**, 124 (1964).
63. Tomizo, Niwa, Kenji, Kawamura; *ibid.*, **43** 286 (1965).
64. 張 文雄, 宇佐美 昭次, 武富 昭, 醸協誌, **23** 375 (1965).
65. *idem.*: *ibid.*, **23** 378 (1965).
66. *idem.*: *ibid.*, **24**, 27 (1966).
67. *idem.*: *ibid.*, **24**, 421 (1966).
68. 張 文雄, 宇佐美 昭次: 醸協誌, **25**, 349 (1967).
69. *idem.*: *ibid.*, **26**, 69 (1968).
70. *idem.*: *ibid.*, **26**, 73 (1968).
71. 張文雄, 加藤 佐二, 宇佐美 昭夫: *ibid.*, **26**, 155 (1968).
72. 張文雄: *ibid.*, **26** 160 (1968).
73. 赤塚, 慎一郎, 右田 溜美子 外山 信男: 醸工 **42**, 356 (1964).
74. 尾崎 八郎, 西澤 一俊, 田崎 龍一: *ibid.*, **42**, 415 (1964).
75. 中山 重徳, 竹田 云作, 外上 信男: *ibid.*, **43**, 648 (1965).
76. 原田 安正, 外山 信男: *ibid.*, **44**, 835 (1966).
77. 田崎 龍一, 大上 清治: *ibid.*, **40**, 195 (1962).
78. 田崎 龍一: 食品工業 5 No 16, 25 (1962).
79. 八賀 森: 醸工 **42**, 207 (1964).
80. 八賀 森: *ibid.*, **43**, 440 (1965).
81. 八賀 森: *ibid.*, **44**, 753 (1966).
82. 外山 信男: *ibid.*, **40**, 199 (1962).
83. 外山 信男 藤井 昇, 小川喜 八郎: *ibid.*, **43** 756 (1965).
84. 藤井 昇, 外山 信男: *ibid.*, **45**, 681 (1967).
85. 高橋 禮治, 小島 隆壽, 吉村 健吉: *ibid.*, **44**, 842 (1966).
86. 外上 信男: 食品工業, 5, No. 16, 10 (1962).
87. 三澤 豊, 松原 良, 羽田野 誠, 原 稔, 犬塚 猛雄: 食工誌, **15**, 84 (1968).
88. 中川 越: 食品工業 5, No 16, 29(1962).
89. 渡邊 敬: 醸工, **41**, 228 (1963).
90. *idem.*: *ibid.*, **41**, 231 (1963).
91. *idem.*: *ibid.*, **46**, 299 (1968).
92. *idem.*: *ibid.*, **46**, 303 (1968).
93. Grethaus G. A Ames, L.M.; *Mycologia*, **37**, 138 (1945).
94. Buston, H.W., Jabbar, A.; *Biochimica et Biophys. Acta.* **15**, 543 (1954).
95. 北御門 敬之, 外山 信男, 醸工 **40**, 85(1962).
96. 小川喜 八郎, 外山 信男, *ibid.*, **41**, 282(1963)
97. Halliwell, G.; *Biochem. J.*, **68**, 605 (1958).
98. King, K.M.; *J. Ferm. Technol.*, **41**, 98 (1953).
99. Iwashiki, T., Hayashi, K., Funatsu, M.; *J. Biochem.*, **57**, 467 (1965).
100. Niwa, T., Kawamura, K., Nishizawa, K., *J. Ferm. Technol.* **43**, 289 (1995).
101. Whitaker, D.R.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 253 (1953).
102. Levinson, H.S., Reese, E.T.; *J. Gen. Physiol.*, **33**, 601 (1950).
103. Miller, G.L.; *Anal. Biochem.* **2**, 133 (1960).
104. Somogyi, M.; *J Biol. Chem.* **125**, 399 (1938).
105. *idem.*; *ibid.*, **160**, 61 (1954).
106. *idem.*, *ibid.*, **189**, 19 (1952).
107. Nelson, N.; *ibid.*, **153**, 375 (1944).
108. Pringsheim, H.; *Z. Physiol. Chem.*, **78**, 226 (1933).
109. Reese, E.T.; *Appl. Microbiol.*, **4**, 39, (1955).
110. Hiller, L.A., Paseu, E.; *Text. Res. J.*, **16**, 490 (1946).
111. Marsh, P.B.; *Tex. Res. J.*; **27**, 913 (1957).
112. Marsh, P.B., Bollenbacher, K., Butler, M.L., M.L.; *Text. Res. J.*, **23** 878 (1953).
113. Reese, E.T., Siu, R.G.H., Levinson, H.S.; *J. Bacteriol.* **59**, 485 (1950).
114. Reese. E.T., Gilligan. W.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **45**, 74 (1953).
115. Petterson, G., Gowling, E.B., Porath, J., *Piochim. Biophysys Acta* **67**, 1 (1963).
116. Petterson, G., Porath, J.; *ibid.*, **67**, 9 (1963).
117. 金野範之 照井堯造 上田芳子 國米和世 食品工業, **5**, 467 48 (1962)..
118. Reese, E.T.; *Friday Habor Symposia, Univ., Washington Press, Seattle* (1959).
119. Ryoko Ikeda, Tatsuto Yamamoto and Masaru Funatsu; *Agr. and Biol. Chem.*, **31**, 1201 (1967).