

纖維素分解酵素에 관한 研究(第 1 報)

Rhizopus 屬이 生成하는 Cellulase 의 性質에 對하여

成 洛 葵

(晉州農科大學 農化學科)

Studies on the Cellulase (I)

On the character of cellulase by *Rhizopus* strain.

Sung, Nack Kie

(Chinju Agricultural College)

Abstract

To research the characteristic of cellulase produced from one strains of *Rhizopus*(R-B 14) when it acts on the carboxyl methyl cellulose, this experiment was carried out in crude purified cellulase.

The results obtained were as follows:

1. The optimum pH of cellulase was from 4.5 to 5.5, and the range of its stability to the pH was considerably extensive and it was from 4 to 7.
2. The optimum temperature of cellulase was 50°C and the activity of it was instantly inactivated at 70°C.
3. The inhibition of the metal ions to the activity of cellulase was as follows; Hg²⁺ > Ag⁺ > Fe²⁺ > Pb²⁺.

But the activity of cellulase was not affected at all by Na⁺, K⁺ and Mg²⁺.

緒 論

Cellulase 는 Whitaker 가指摘한 것처럼 各種의 Cellulase 系 基質에 作用하는 酵素의 總稱으로서 여러 植物界뿐만 아니라 一部分의 動物界에도 널리 分布하고 있는 酵素이다.

오늘날 많이 研究하고 있는 것은 菌類 및 細菌等의 cellulase 이다. 各國에서는 cellulase 에 對한 研究가 1950 年을 前後하여 急速히 進展되었다고 보겠다. 例를 들면 美國에서는 木材, 網, 紙, 衣料品 等の 軍需品の 防衛對策이 重要한 問題로 되어있고 日本等地에서는 飼料를 醱酵함으로써의 利用性을 檢討함을 爲始해서 이에 對한 研究가 始作되었다고 하겠다. cellulase 의 全般的인 總說에 對해서는 많은 著書와 報文이 나와 있다. 그中 cellulase 의 微生物 및 酵素에 依한 分解에 對해서는

Siu, Siu and Reese, Gascoigne J. and Gascoigne M. King, 西澤, 外山 等の 總說이 있다.

近來에 와서는 이에 對한 研究가 더욱 왕성하고 많은 報文이 나와 있으나 cellulase 의 特異性 및 活性에 對하여는 論議의 對象이 되어 있다. Reese 等에 依해 微生物의 大部分은 水溶性의 cellulose 誘度體를 쉽게 分解하나 天然 cellulose 는 그中 一部分이 分解할 수 있다는 것이 알려져지고 天然 cellulose 를 分解하는데는 적어도 二種類 以上の 相異한 酵素가 存在한다는 것을 示唆하였다. 여기에 對하여 Whitaker 는 *Myrothecium verrucaria* 의 培養濾液에서 單一 cellulase 를 얻어 粉碎 cellulose, 膨潤酸 分解 cellulose, CMC 및 cellobiose 를 含有한 cello-oligo 糖을 分解한다는 事實에서 하나의 cellulase 가 天然 cellulose 에서 D.P.의 짧은 基質까지 分解한다는 單一酵素說을 主張하여 現在까지 論議의 對象으

로 되어 있다.

이 점을 參酌하여 著者는 自然界에 分布되어 있는 各種의 絲狀菌의 cellulase를 對象으로 하여 活性 및 特異성을 研究하고 食品加工의 利用開發을 目的으로 先爲分離한 Rhizopus 屬 1 菌株에 對하여 C₃ 活性 cellulase 의 性質에 對한 實驗을 하여 그 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 實驗方法

1) 菌源試料

學校構內에 腐朽한 木材 및 半腐熟한 糞, 보리 糞, 乾草, 空氣中에 放置된 濕氣있는 糞.

2) 菌分離 및 保存用培地

分離時에는 各種 人工合成固體培地 即 C'zapek-Dox, Omelianskü, Nageli, Pfeffer, Mayer, 坂口王氏, Raulin, Henneberg 氏 等의 培地를 基本으로 하여 cellulose Powder 0.5%~2% glucose 0.5%~1%를 添加하여 使用하였는데 그中 C'zapek-Dox 및 Omelianskü 培地가 가장 良好하였으며 그 培地組成은 다음과 같이 하였다.

C'zapek-Dox 培地	Omelianskü 培地
NaNO ₃ 3g	K ₂ HPO ₄ 1g
KH ₂ PO ₄ 1g	MgSO ₄ 0.5g
KCl 0.5g	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1g
MgSO ₄ 0.5	CaCO ₃ 2g
FeSO ₄ 0.01g	cellulose powder 0.5~2%
cellulose powder 0.5~2%	
glucose 0.5~1%	glucose 0.5~1%
H ₂ O(증류수) 1l.	H ₂ O(증류수) 1l.

以上の 培養基에 2~3% agar powder 를 蒸溜水에 溶解하여 넣고 pH 를 5로 調節한 다음 auto clave 에서 1 kg/cm² 에서 30 分間 殺菌하여 使用하였다. 保存用 培地로서는 上記培地에 glucose 含量을 5% 로 한 것을 使用하였다.

3) 菌株選別

上記 菌源試料를 平板法으로 30°C 에서 2~3 日間 培養하여 菌株 各各의 Spore 를 分離하여 稗기을 培養基에 接種하여 30°C 에서 3 日間 培養한 것을 風乾하여 CMC 分解力이 강한 菌株 R-B 14(未同定)을 擇하여 供試菌株로 하였다.

4) 酵素 生成培地

水道水와 稗기을을 1:1.2로 混合하여 1l 容 三角 Flask 에 50g 씩 넣고 1 kg/cm² 에서 30 分間 殺菌

한 培地를 使用하였다.

5) 酵素的 粗精 및 酵素液調整方法

稗기을 培地에 3 日間 培養한 것에 2~6°C 의 H₂O 를 加하여 遠心分離하고 그 上澄液을 取하여 再結晶한 (NH₄)₂SO₄ 로 飽和시켜 Overnight 한 다음 그 沈澱物을 透析하여 (NH₄)₂SO₄ 를 完全히 除去하고 Acetone 을 3% 以上 加하여 다시 遠心分離하고 低温에서 乾燥하여 供試하였다. 乾燥粗酵素를 便宜上 H₂O 로 100 배 희석하여 試驗酵素液으로 使用하였다.

6) 酵素力試驗方法

1% CMC 液 50cc 에 磷酸緩衝液($\frac{M}{15}$ 인산加里 98.5 cc + $\frac{M}{15}$ 인산=나트륨 1.5 cc. pH 5). 30 cc 를 加하여 50°C water bath 에 15 分間 두었다가 試驗 酵素液 20 cc 를 加하여 50°C 에서 30 分間 反應시킨 다음 20 cc 를 取하여 Bertrand 法으로 還元糖을 定量하여 相對活性度(%)로 表示하였다.

結果 및 考察

1) 最適活性 pH.

1% CMC 液에 酵素液 및 磷酸緩衝液을 넣고 $\frac{N}{10}$ HCl 또는 $\frac{N}{10}$ NaOH 로 pH 를 調整하여 50°C 에서 30 分間 反應시켜 相對活性度를 시험한 結果는 Table. 1 및 Fig. 1 과 같다. 但 反應液의 濃度는 一定하게 調節하였다.

Table. 1 Relative activity at various pH.

pH	4	4.5	5	5.5	6	7
Relative Activity	69.4	90	100	94.6	87.5	55.4

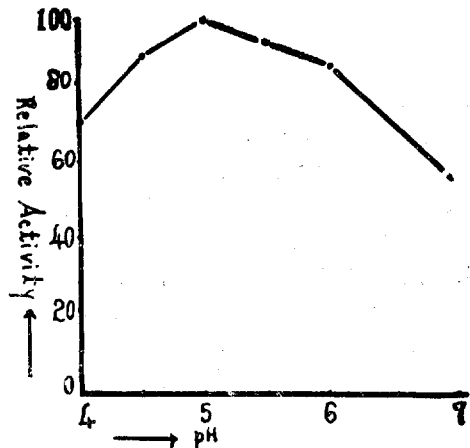


Fig. 1. Relative activity of cellulase at various pH

Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와같이 最適 pH는 5, 5.5, 4.5의 順序로 되어 있다. 大健氏等の *R. javanicus* (醱研 3號)에 對한 最適 pH는 5.0, 5.5, 6.0, 4.5 順으로서 比較的 至適 pH의 範圍가 넓으며 今田氏等の *Rhizopus* 屬 R-302에 對한 至適 pH는 4~5로서 比較的 낮은 pH에서 活性을 나타내었다. 即 *Rhizopus* 屬의 至適 pH 範圍는 菌株에 따라 若干의 差異는 있으나 大體로 pH 4~6 이라고 할 수 있겠다.

2) pH와 安定性

酵素液을 $\frac{N}{10}$ HCl, $\frac{N}{10}$ NaOH로 pH를 2, 3, ... 9로 調節하여 40°C, 50°C, 60°C의 water bath에서 30分間 두었다가 다시 pH를 5로 調節하여 基質液 및 緩衝液을 넣고 30分間 50°C에서 反應시켜 相對活性度를 試驗한 結果는 Table 2. 및 Fig. 2와 같다. 但 酵素液의 濃度는 pH 調節時 添加된 HCl 및 NaOH로 말미암아 差異가 생기는데 蒸溜수를 追加하여 그 濃度를 一定하게 하였다. 또 50°C

Table 2 Stability of pH at various temperature

Temp. pH	Relative Activity		
	40°C	50°C	60°C
2	8.5	2.4	0
3	43.2	18.8	6.5
4	89.8	88.8	58.9
5	100	100	56.8
6	97.1	90.4	52.4
7	74.6	58.9	25.1
8	50.3	23.6	2.0

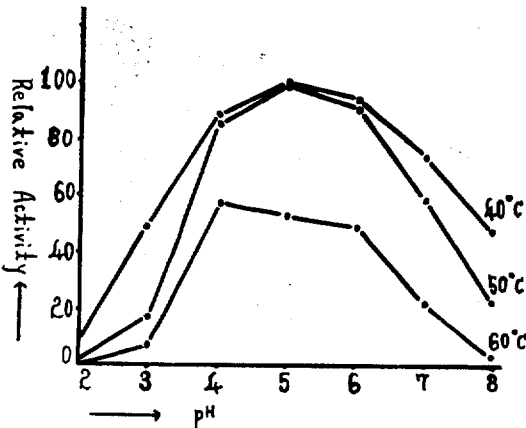


Fig. 2. Stability of cellulase against various pH

에서 處理時間을 延長하였을 때의 活性度의 變化狀態는 Table. 3 및 Fig. 3과 같다.

Table. 3 Stability of pH various time

Time pH	Relative Activity			
	30 mins	1 hour	2 hours	3 hours
3	18.8	0	—	—
4	88.8	87.4	82.5	80.2
5	100	100	96.3	94.5
6	90.4	88.9	84.1	81.2
7	58.9	56.5	47.3	35.5
8	23.6	15.2	8.2	—

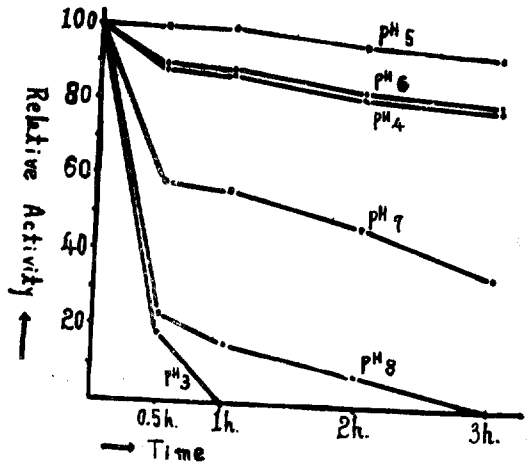


Fig. 3 Stability of cellulase against various pH(at 50°C)

그림에서 보는 바와같이 이 酵素의 安定 pH는 4~7로서 이보다 酸性側 또는 Alkali 性側에서는 그 活性度가 急히 低下된다. 40°C, 50°C에서는 活性度가 높는데 比하여 60°C에서는 相當히 낮은데, 이것은 熱로 因하여 失活되겠다고 보였으며 또 60°C에서는 活性度가 pH 4에서 가장 높았는데 이것은 絲狀菌의 Proteinase의 경우와 비슷한 傾向을 나타내었다.

또 低溫에서는 安定 pH의 範圍가 크나 高溫일수록 安定 pH의 範圍가 적다.

*Trichoderma viride*의 cellulase의 安定 pH는 3~5인데 比하여 本 實驗結果는 이 菌株과 一致하지 않는데, 이것은 酵素組成의 多元性 및 活性의 前提에 因한 것으로 生覺된다. 即 *Trichoderma viride*의 cellulase는 濾紙崩壞力, 濾紙膨潤效果는 큰데

比하여 CMC 分解力은 弱할 것이다.

3) 最適 作用溫度

pH는 5로 하고 基質과 酵素液의 反應溫度를 35°C, 40°C.....65°C로 하여 30分間씩 反應시킨 後 相對活性度의 結果는 Table. 4 및 Fig. 4와 같다.

Table. 4 Optimum temperature

Temp. (°C)	35	40	45	50	55	60	65
Relative Activity	46.5	62.3	86.7	100	94.5	82.1	56.7

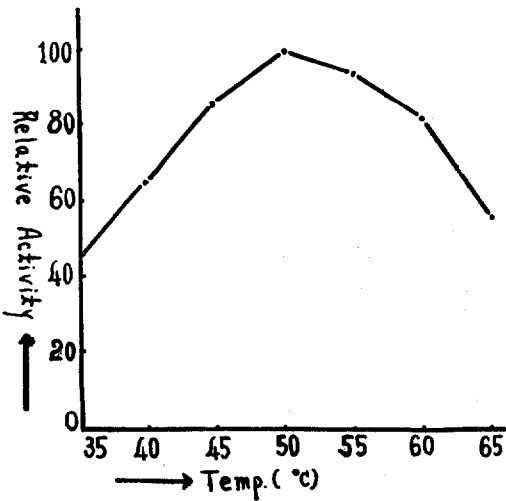


Fig. 4 Relative activity of cellulase at various temperatures

4) 熱에 對한 安定性

pH 5로 調節한 酵素液을 試驗管에 取하여 55°, 60°...70°C의 water bath 中에 넣고 20分, 40分, 60分 두었다가 急速히 冷却하여 前記와 같은 方法으로 酵素의 活性度를 測定한 結果는 Table. 5 및 Fig. 5와 같다.

但 反應條件은 pH 5, 50°C에서 30分間 作用시켰음.

Table. 5 Stability at temperature.

Temp. (°C)	Relative Activity			
	min.	20	40	60
55		94.5	76.7	66.9
60		70.8	46.8	25.2
65		56.5	18.2	0
70		0	0	0

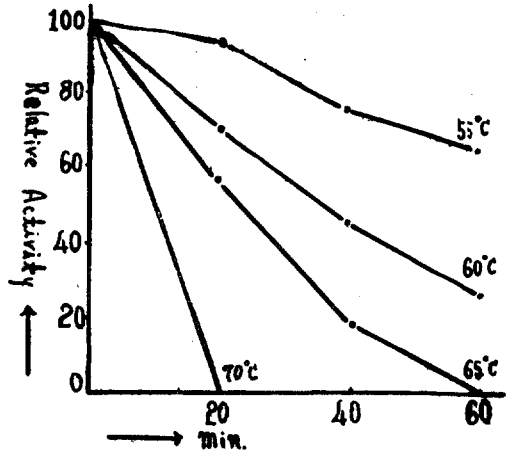


Fig. 5 Stability of cellulase against various temperatures

加熱溫度 및 時間에 따라 酵素의 活性度가 減少된다는 것은 모든 酵素에 該當된 問題이거나 이 酵素도 亦是 熱에 對해서는 不安定하다. 70°C에서는 순간적으로 失活되며 65°C에서는 40分만에 거의 失活된다.

5) 金屬 Ion에 對한 影響

다음 金屬鹽類를 $\frac{1}{250}$ mol.로 調製하여 同量의 酵素液과 混合하여 常溫에서 30分間 放置하였다가 前記方法과 같이 反應시킨 結果는 다음 Table. 6과 같다.

Table. 6 Inhibition of metallic Ion

Metallic Ion	Relative activity
Nontreated	100
Ag ⁺ (AgNO ₃)	16.00
Hg ⁺ (HgCl ₂)	11.11
Pb ⁺ (Pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O)	49.00
Cd ⁺ (Cd(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O)	75.11
Sn ⁺ (SnCl ₂ ·2H ₂ O)	88.88
Fe ⁺ (Fe ₂ (SO ₄) ₃)	21.56
Al ⁺ (AlCl ₃)	81.11
Mn ⁺ (Mn(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O)	64.00
Zn ⁺ (Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O)	90.20
Ca ⁺ (CaCl ₂)	95.52
K ⁺ (KCl)	100.00
Na ⁺ (NaCl)	100.00
Mg ⁺ (MgSO ₄)	100.00
Cu ⁺ (CuSO ₄)	40.11

阻害作用이 가장 甚한 것은 Hg⁺⁺, Ag⁺, Fe⁺⁺, Pb⁺⁺의 順으로 나타났으며 Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 등은 阻害作用이 全然 없고 Ca⁺⁺, Sn⁺⁺, Zn⁺⁺ 등도 거의 影響을 주지 않았는데 絲狀菌의 다른 酵素와 거의 같은

結果를 나타내었다. 끝으로 이 實驗을 指導하여 주신 金昌湜, 徐正埜, 兩教授任께 감사를 드리며 또 직접 實驗을 도와준 鄭二根, 金圭容君에게 謝意를 表합니다.

摘 要

Rhizopus 屬 1 菌株(R-B 14)를 分離하여 이 菌株가 生産하는 纖維素分解酵素를 粗精製하여 CMC 를 分解할때 그 性質에 對한 實驗을 하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) 本酵素의 最適作用 pH는 4.5~5.5 이며 安定 PH는 4~7 로서 其 範圍가 比較的 넓다.
- 2) 本酵素의 作用最適溫度는 50°C 이며 70°C 에서는 순간的으로 失活되었다.
- 3) 金屬 Ion 에 對한 影響은 Hg⁺⁺>Ag⁺>Fe⁺⁺⁺>Pb⁺⁺의 順으로 阻害되었으며 Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺ 는 全然 影響이 없었다.

References

<ol style="list-style-type: none"> 1. 張, 宇佐美, 1967. 日農化會誌 29. 85 2. 大健, 相川, 高原, 1964. 工技研報 26. 65 3. Gascoigne, J.A. and Gascoigne, M.M., 1960: "Biological degradation of cellulose" p. 53 Butter woths, London. 4. 橋本, 西澤, 1963. In symp. Enzymic hydrolysis of cellulose and related mater, Washington. 5. 川杏, 丹羽, 西澤, 1965. 醸工誌 43. 286. 6. King, K.W., 1965. Microbiol. Degradation of cellulose, Virginia Agricultural Experiment station Tech, Bull. 154 7. 松島, 1955. 日農化會誌 29. 87. 8. 農藝化學實驗書, 1956. 東京大 199. 9. 西澤, 1957. 蛋白質 核酸 醱酵 2. 12. 10. 西澤, 1962. 醸工誌 40. 150. 11. Reese, E.T., Siu. R. G. H., 1950. J. Bacterial. 	<ol style="list-style-type: none"> 59. 485. 12. Siu. R.G.H., 1951. Microbiol. decomposition of cellulose rein hold. 13. _____ and Reese. E.T., 1953. Decomposition of cellulose by microorganism, Botanical Rev. 19. 377 14. 外山, 1952. 醸工誌 30. 89 15. 外山, 1957. 醸工誌 35. 196. 247 16. _____, 1961. _____ 39. 511. 627 17. _____, 1962 食品工業 9. 346 18. _____, 1963 醸協誌 21. 415 19. _____, 1965. _____ 23. 485 20. Whitaker. D.R., 1953 Arch. Biochem. Biophys 43. 253 21. 今田, 友田, 和田, 1962 醸工誌 40. 140
---	---