

## 纖維素 分解酵素에 關한 研究 (第4報)

*Trichoderma viride*(O<sub>2</sub>-1)가 生成하는 粗酵素의 性質에 對하여

成 洛 癸

(晉州 農大)

(1969. 7. 31 受理)

### Studies On the Cellulase [IV.]

On the Properties of Crude Cellulase produced by *Trichoderma viride*(O<sub>2</sub>-1)

Nack Kie Sung

(Chinju Agricultural College)

#### Summary

The characteristics of crude enzyme produced from *Trichoderma viride*(O<sub>2</sub>-1) which isolated from half spoiled Locust acacia wood (*Robinia Pseudacacia* Linne) were examined in this paper.

The results obtained were summarized as follows:

1) As a results of enzymatic action on serveral cellulose substrate it was found that there were some sorts of cellulase in crude enzyme.

2) The acty of C.M.C. ase and  $\beta$ -glucosidase were decreased in accordance with increasing concentration of substrate, and filter paper saccharifying enzyme relatively increased in accordance with increasing concentration of substrate and enzyme in couse of time.

3) The optimal pH of each enzyme was 5.0 and the range of stability on pH generally from 3 to 6.

4) In disintegrating activity on filter paper, in decomposing activity on C.M.C. and *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside, and in saccharifying activity on filter paper, the optimal temperatures were 50°C., 60°C. and 65°C.

5) The order of stability on temperature was as follow; saccharifying activity on filter paper >

decomposing activity on C.M.C. > disintegrating activity on filter paper > decomposing activity on *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside.

6) The activity of the enzymes was inhibited with mercuric and silver ion, and activated with potassium.

#### 緒 言

前報<sup>(20)</sup>에서는 比較的 培養이 쉽고, 濾紙崩壞活性, 可溶性纖維質 分解活性이 강한 菌株를 半 腐朽한 아까시아나무(*Robinia Pseudacacia* Linne)에서 分離하여, 그 性狀에 對한 實驗을 하여 *Trichoderma Viride*에 屬한다는 것을 알았다.

近年 纖維素 分解酵素는 應用 開發에 關心이 큰 것으로, 많은 사람에 依하여 研究 되어왔다. 많이 研究되고 있는 對象의 菌株로서는 *IrpeX lacteus*(15, 33) *Penicillium variable*(1, 7, 14), *chaetomium globosum* (34), *Neurospora*(12), *Myrothecium verrucaria*(5, 26), *Rhizopus* 屬(24, 27), *Cellvibrio gilvus*(8), *Aspergillus* 屬(18, 25, 28), *Trichoderma* 屬(2, 9, 11, 16, 19, 20, 22, 31, 32)等이다. 上記 菌株에서 生産된 酵素는 基質 特異性, 分解, 活性度 分解機構 等이 相異할 뿐만 아니라, 적어도 2種 以上の 酵素로서 되어 있다고 報告되고 있다. 前報에서 分離한 菌株 *Trichoderma viride*(O<sub>2</sub>-1)는 粗酵素로서 既報된 菌株에

比해서 酵素活性가 强하였다. 即 上記 報文에 依하면 *Trichoderma* 製劑의 酵素는 可溶性基質의 分解力은 弱하나, 不溶性基質의 分解力은 强하다고 하였는데, 本 菌株의 酵素는 兩者의 基質에 對한 活性化가 높았다. 따라서 이 菌株의 酵素에 對한 利用開發을 目的으로 먼저 粗酵素에 對하여 酵素學의 性質을 實驗하여, 몇가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

## 材料 및 實驗方法

### 1. 菌株

아까시아(*Robinia Pseudacasia Leinne*)에서 分離한 *Trichoderma viride* O<sub>2</sub>-1(29)

### 2. 酵素生成 培地 및 培養

前報(27)와 같이 하였는데 밀기울에 왕겨 20%를 追加 하였다.

### 3. 酵素 粗精製 및 實驗酵素液

前報(28)와 같이 하였다.

### 4. 酵素活性 測定方法

1) CMC 分解力: 松葉 方法(21)에 依하였다.

即 0.625% C.M.C.(片山化學 Na 鹽 ether 0.5度) 溶液(PH 5) 4 ml에 酵素液 1 ml을 加하여 一定時間 作用시킨 後, Somogy 法으로 生成 還元糖을 定量 하였다. 便宜上 C.M.C.-S.A 로 表示하였다.

2)  $\beta$ -glucosidase 活性: 0.2% *p*-nitro phenyl- $\beta$ -glucoside(片山化學) 液(pH 5) 4 ml와 酵素液 1 ml를 加하여 15分 또는 30分間 反應 시킨후, 生成 還元糖을 定量하였다.  $\beta$ .G.-S.A.로 表示하였다.

3) 濾紙 崩壞力: 外山 方法(17)에 依하여 測定하였다. 即 L 型試驗管(7 cm×14 cm)에 東洋濾紙 No. 51 A. 2枚(1 cm×1 cm)를 넣고 完全 崩壞되는 時間을 測定하였다. F.P.-D.A.로 表示하였다.

4) 濾紙 糖化力: L 型試驗管에 基質液(Toyo No. 51 A를 粉碎하여 PH 5 M/20 McIlvaine Buffer에 混合, 1.25%의 濾紙懸濁液) 8 ml.와 酵素液 1 ml.를 加하여 所定時間 振盪(70 r.p.m 振幅 4 cm)한後, N-NaOH 1 ml.를 即時 加하여 還心分離한 다음 5 ml에 對한 還元糖을 定量하였다. F.P.-S.A.로 表示하였음.

### 5. 基質濃도에 따른 酵素活性의 影響

1) CMC 分解力: pH 5의 Buffer 液에 溶解한 基質液(2.50, 0.625, 0.312, 0.25, 0.166, 0.125%) 8 ml에 酵素液 2 ml을 넣고 water bath에서 10, 30, 60, 120分 反應 시킨後, 1 ml를 取하여 還元糖을 定量하여 1 ml當 환원당 生成量과 基質 10 mg

當 還元糖 生成量을 定量하였다. 但 酵素 反應液의 PH는 5.0으로 하였으며 作用溫度는 60°C로 하였다.

2)  $\beta$ -glucosidase 活性: 基質液을 緩衝液에 0.6% 濃度로 溶解하여 4, 8, 10, 16, 20倍 稀釋한 基質液을 各各 8 ml 取하여 酵素液 2 ml를 加하고 10, 30, 60, 120分 酵素反應을 시킨다음 그 2 ml에 對한 還元糖 生成量을 定量하였다. 酵素 反應時의 基質液의 濃度는 0.48, 0.12, 0.06, 0.048, 0.03, 0.024%였으며 反應液의 PH는 5.0이었고 作用 溫度는 60°C로 하였다.

3) 濾紙糖化力: 東洋濾紙 No. 51 A.의 懸濁液(PH 5) 8 ml에 酵素液 1 ml를 넣고 90分 反應後 5 ml의 生成 還元糖量을 定量하였다. 濾紙 懸濁液과 酵素를 첨가한 反應液의 濃度는 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%였다. 但 酵素反應 混合液의 PH는 5.0으로 하였고 作用溫度는 65°C로 하였다.

### 6. 酵素量에 따른 濾紙糖化活性의 影響

濾紙懸濁液 1.25% 8 ml(PH 5)에 酵素 1 ml(50, 25, 19.5, 12.5, 6.25, 3.125 mg/ml)를 加하여 30...180分 反應한 後 上澄液 5 ml中의 還元糖을 定量하였다.

### 7. 最適活性 PH와 安定 PH

1) 最適 PH: 酵素反應 PH를 2.2, 3...8로 하여 30分 反應시킨 後 glucose를 定量하여 相對 活性化도를 求하였다. 但 酵素 作用溫度는 C.M.C.-S.A.  $\beta$ .G.-S.A는 60°C F.P.-S.A는 65°C F.P.-D.A는 50°C로 하였다.

2) 安定 PH: 酵素液의 PH를 2.2...8.0로 調節하여 室溫(27°C) 50°C에서 3時間 放置한 後 PH를 다시 5로 조절한다음 相對 活性化도를 求하였다. 또 CMC-SA F.P.-DA에 對해서는 50°C 6, 24時間 延長한 後 相對活性化도를 求하였다.

### 8. 最適溫度와 熱安定性

1) 最適活性化溫度: 酵素反應液의 溫度를 water bath에서 40, 45...75°C로 하여 30分 反應 시킨後 還元糖으로서 glucose를 定量하여 相對 活性化도를 求하였다. 但 作用 PH는 5로 하였다.

### 2) 熱 安定性

PH 5인 酵素液을 27, 50, 60, 70, 80°C의 water bath에서 20, 40, ...300分 처리한後 各各 最適溫度에서 30分 酵素作用을 시킨後 活性化도를 測定하였다.

### 9. 金屬Ion에 對한 影響

여러가지 濃度の 金屬 Ion에 酵素液을 添加하여 30°C에서 4時間 放置後 活性 또는 沮害 效果를 檢

討하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 基質濃도에 따른 酵素活性의 影響

酵素의 濃度を 固定하고 CMC *p*-nitrophenyl- $\beta$ -glucoside 濾紙懸濁液의 濃度を 달리하여 酵素活性에 미치는 影響을 實驗한 結果는 다음과 같다.

#### 1) C.M.C 分解力

各各의 基質 濃度에서 反應한 後의 生成還元糖量을 定量하여 反應液 1ml 當 生成量은 다음 Fig. 1 과 같은데 基質 10mg 當 生成된 還元糖의 量은 Fig.2와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와같이 單位 時間에 生成되는 還元糖의 量은 基質의 濃度가 增加됨에 따라 많이 生成되었다. 그러나 基質 10mg 當 生成된 還元糖의 量은 基質의 濃度가 낮을수록 많이 生成되었다. 基質의 濃度가 0.125%일 경우 2時間 酵素反應 시킨結果 生成된 還元糖의 量은 基質 100mg 當 4mg의 還元糖이 生成되었는데 粗酵素로서 基質 40%를 分解한 셈이다. 또 酵素反應의 時間이 經過함에 따라 基質의 分解度는 增加되었는데 King(16)의 *Trichoderma viride*, Reese(6)의 *Aspergillus niger* 製劑에 對한 實驗結果와 類似하였다.

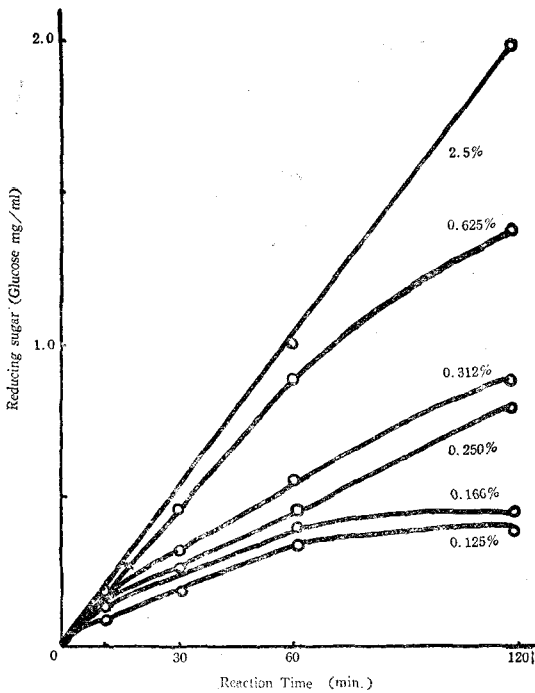


Fig. 1 Effect of C.M.C concentration on Activity of Crude Cellulase  
Conditions: PH. 5.0, 60°C

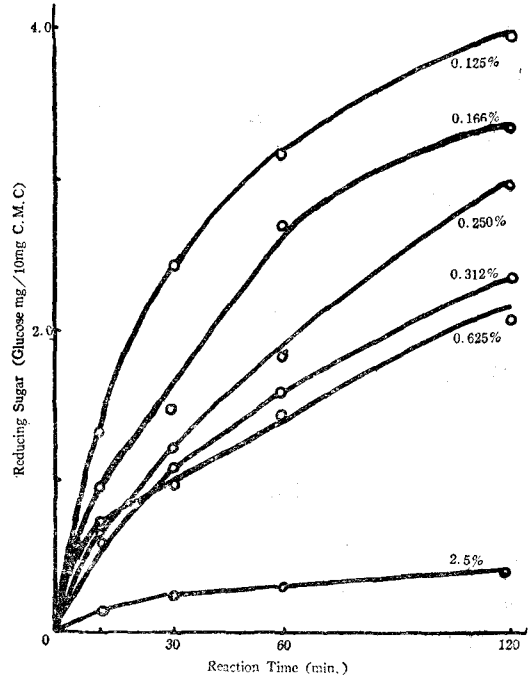


Fig. 2 Effect of C.M.C. concentration on Activity of Crude Cellulase

### 2) $\beta$ -glucosidase 活性

各各의 濃度에서 反應한 後의 還元糖 生成量을 定量하여 反應液 2ml 當 還元糖 生成量은 다음 Fig.3 과 같다.

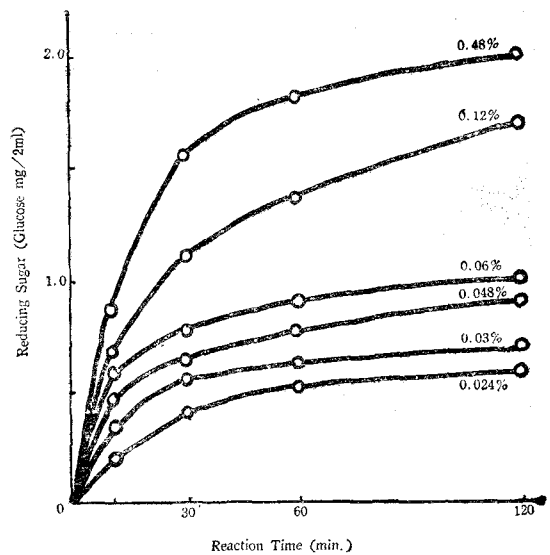


Fig. 3 Effect of *p*-nitrophenyl- $\beta$ -Glucoside concentration on Activity of crude cellulase

### 3) 濾紙糖化力

濾紙糖化活性이 基質濃도에 미치는 影響을 實驗한 結果는 Fig. 4 와 같다. 그림에서 보는바와 같이 基質의 濃度가 높을수록 生成還元糖은 增加 되었다. 時間의 經過에 따른 結果는 實驗하지 않았으나 Mandeles(20)의 實驗에 依하면 cotton의 濃度를 4%로 하고 1日 5日間 作用한 結果 比例的으로 分解 되었다고 하였다. Whitaker는 *Myrothecium cellulase*에 對하여 Swollen cellulose의 加水分解를 經時에 따라 調査한 結果 4時間 作用하였을 때 보다 24時間 作用하였을 때가 3培 增加하였다고 報告하고 있다. (4) 따라서 不溶性 基質에 對한 糖化活性은 基質의 濃度에 미치는 影響이 적을 뿐만 아니라 分解所要 時間이 다른 加水分解酵素보다는 길다고 생각된다.

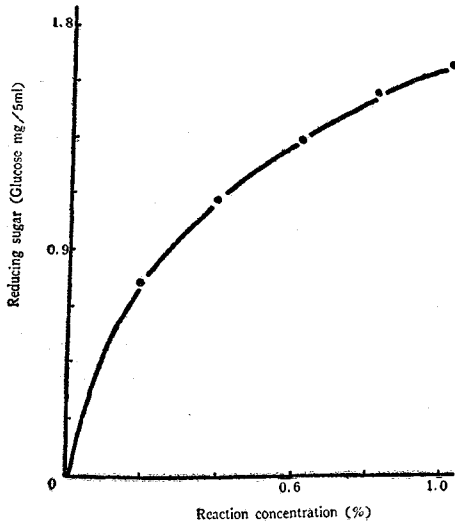


Fig. 4 Effect of Filter paper concentration on Activity of crude cellulase

### 2. 酵素量에 따른 濾紙糖化活性의 影響

一定한 基質에 酵素 添加量을 다르게 하여 反應시킨 結果는 Fig. 5와 같다. 即 酵素 25mg가 反應하였을 때 보다 50mg가 反應하였을 때는 分解率이 相對的으로 增加됨을 나타내었고 濾紙의 糖化率은 18%였다. 따라서 不溶性 纖維質의 分解는 以上 몇가지 實驗을 통하여 基質의 濃度, 酵素液의 濃度, 反應 時間 등이 다른 酵素에 比하여 어느 程度까지의 制限을 받지 않는다고 생각된다.

### 3. 最適活性 pH와 pH 安定性

#### 1) 最適活性 pH

粗酵素의 最適活性 pH는 다음 Fig. 6과 같다.

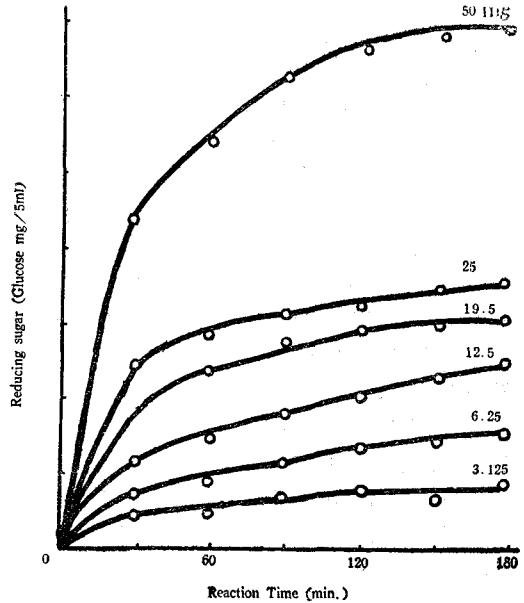


Fig. 5 Effect of Enzyme concentration on Filter paper scuharifying Activity

一般的으로 cellulase의 最適活性 pH는 菌株에 따라 相異하나 本 酵素의 最適活性 pH는 5.0이었다. 이 結果는 다른 報文과 一致된다. (3, 6, 16, 19) 純粹하게 fraction된 各各의 cellulase의 pH는 若干의 差가 있는 것으로 報告되고 있다. (20, 30, 31) 其他 絲狀菌 cellulase의 最適活性 pH는 大部分 pH 4~5.5의 범위 內에 있다고 報告되고 있으며 (24,

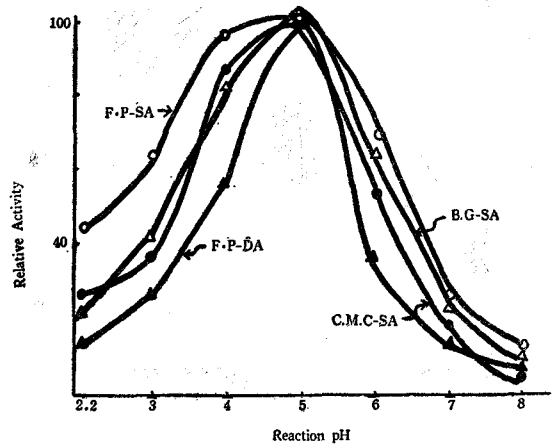


Fig. 6 Effect of pH on Activity of crude cellulase condition

C.M.C-SA } 60°C, 30min.  
βG-SA }  
F.P-DA 50°C 30 min.  
F.P-SA 65°C 30 min.

26, 27, 28, 33, 34) 또 培養條件에 따라 生成되는 cellulase 의 性質은 相異하다고 하였다. 例를 들면 耐酸性 *Aspergillus cellulase* 는 pH 3에서 最高活性을 나타내고 있다.(13)

2) pH에 對한 安定性

pH 安定性을 調査하기 위하여 酵素液을 27°C, 50°C에서 3時間 處理한 後의 實驗結果는 Fig. 7과 같으며 50°C에서 時間을 延長하였을 때의 結果는 Fig. 8과 같다. 그림에서 보는바와 같이 pH에 對한 安定性은 cellulase의 種類에 따라 相違함을 나타내고 있다. 그러나 大體로 安定 pH의 범위는 3~6으로 다른 報文(3, 11, 16)과 類似한 結果를 나타내고 있다. 各 活性이 pH의 變化에 따라 差異가 있다는 것은 複合成分系로 띄어 있다는 것을 暗示하는것 같다. 그리고 C.M.C.-SA, F.P.-DA는 24時間 處理 後의 活性이 6時間 處理하였을 때와 比較해서 큰 差異가 없었다.

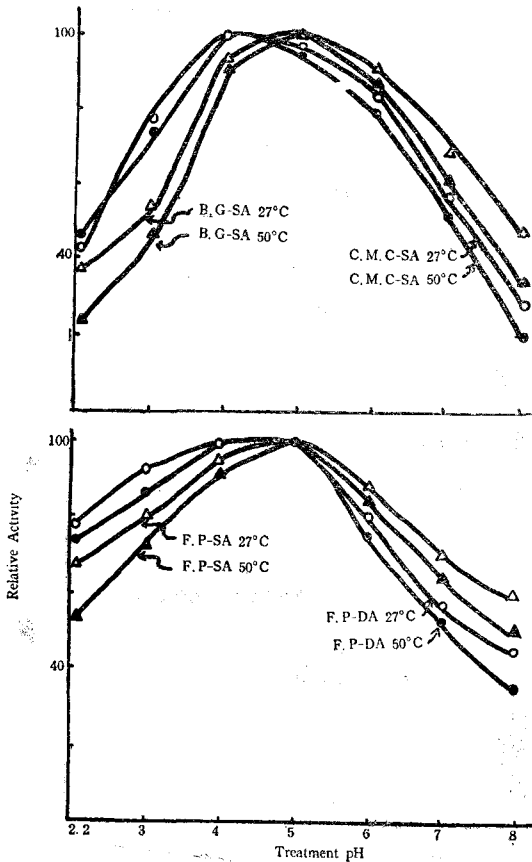


Fig. 7 pH-stability curves of crude cellulase condition: 3 hrs

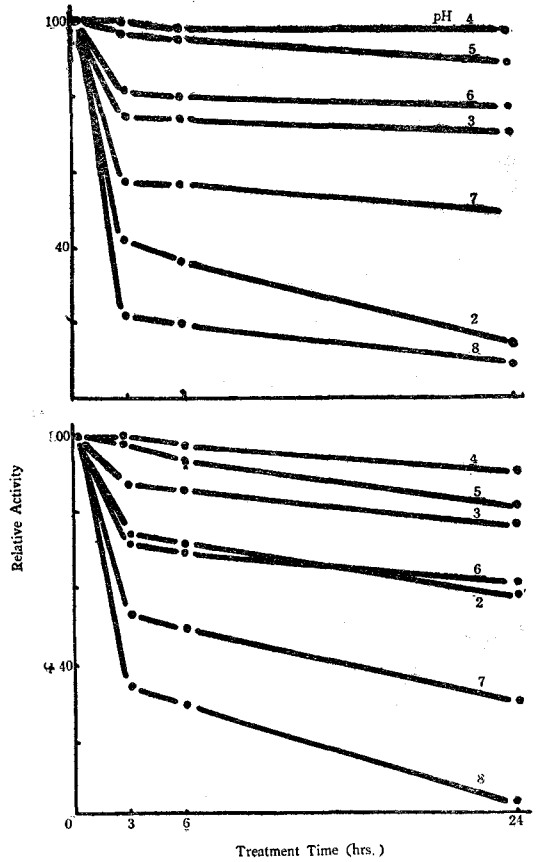


Fig. 8 pH-stability curves of crude cellulase condition: Tre. Temp 50°C

4. 最適 活性 溫度와 熱安定

1) 最適 活性 溫度: 粗酵素의 最適 活性 溫度에 對한 實驗 結果는 다음 Fig. 9와 같다. 最適 pH에서의 活性 溫度는 各各 다르게 나타났다. 即 F.P.-DA는 50°C, F.P.-SA는 65°C C.M.C.-SA와 β.G.-SA는 60°C에서 最高活性을 나타내었다. C.M.C.-SA에 對해서는 張(3) Mandeles(20)의 實驗結果와 같으며 F.P.-DA와 β.G.-SA의 活性溫度도 現在까지 報告(2,6)된 바와 거의 같은 結果를 나타내었다. 그리고 FP-SA는 試較的 높은 溫度에서 活性을 나타내었다. '濾紙에 作用하는 酵素로서는 濾紙崩壞酵素, 濾紙糖化酵素로 나눌수 있겠는데 從來에는 이 두 酵素를 같은 種類의 cellulase로 取扱하였다. 本實驗 結果 最適 pH와, pH 安定性, 最適活性溫度, 熱安定性 등이 各各 다르게 나타남으로 이 두 酵素는 各各 相異한 酵素라고 생각되었다.

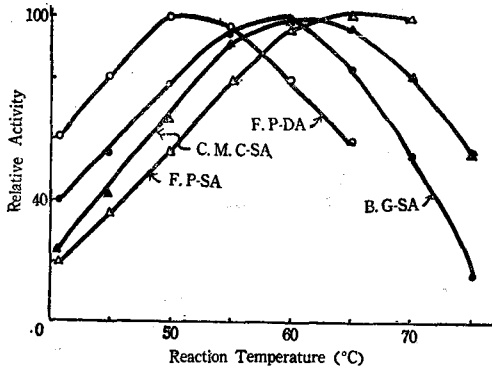


Fig. 9 Effect of Temperature on Activity of Crude Cellulase  
condition : pH 5 30 min

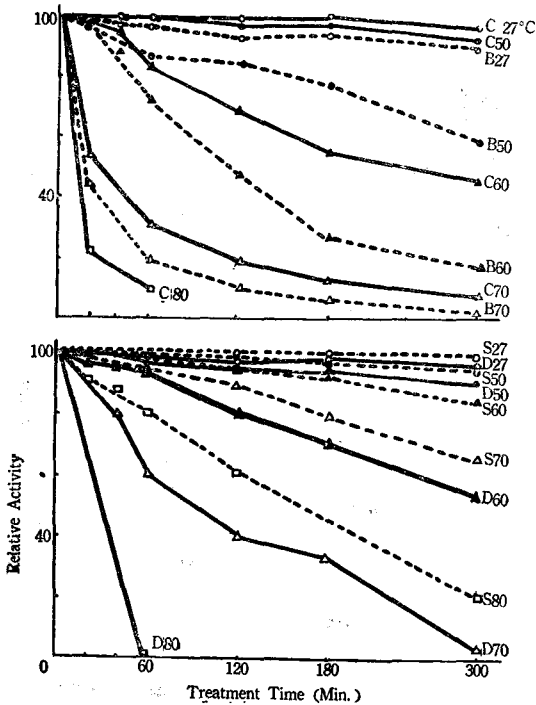


Fig. 10 Temperature-stability curves of crude cellulase  
C: C.M.C.-SA, β: β-G.-SA, D: F.P.-DA  
S: F.P.-SA.

## 2) 熱安定性

各粗酵素의 熱에 對한 安定性을 實驗한 結果는 다음 Fig. 10 과 같다. *Trichoderma* 劑 cellulase 의 熱에 對한 安定性은 菌株 및 精製度, cellulase 의 種類에 따라 差異가 있다고 報告되고 있으며 그 中에서도 C.M.C.-SA 는 熱에 對해서 比較的 失活이 잘 안되나 濾紙崩壞酵素 Cotton 分解酵素 Avicel 分解酵素 等은 熱에 對해서 失活이 잘 된다고 하였다. (3, 20, 23, 30) 外山(23)은 gauze column 의 吸着區와 非吸着區에 對하여 70°C에서 10分 處理하여 非吸着區의 C.M.C.分解 活性은 거의 失活 되었으나 吸着區의 C.M.C.分解 活性은 50%나 殘存하였다고 報告하였다. 또 avicel 分解活性도 C.M.C.와 同一한 結果를 나타내었다. 따라서 以上 몇가지의 結果를 보아 本粗酵素에도 數種의 cellulase 가 存在한다고 생각된다.

## 5. 金屬 Ion 에 對한 影響

여러가지 金屬 Ion 에 對한 影響을 實驗하여 그 中에서 阻害 또는 活性化하는 몇가지 金屬 Ion 에 對하여 Ion 의 濃度 別에 따라 미치는 影響을 實驗하였다.  $K^+$ 는 C.M.C 濾紙 糖化力을 活性化 하였으며  $Ba^{2+}$ 는 濾紙 糖化力을 阻害하였으나 C.M.C.分解力에는 큰 影響을 미치지 않았다. 그리고  $Ag^+$   $Hg^{2+}$ 는 다 같이 酵素活性을 阻害하였다. 그러나  $Ag^+$  이 濾紙 崩壞活性을 阻害하지 않는다는 結果를 나타내어 注目된다. (2)

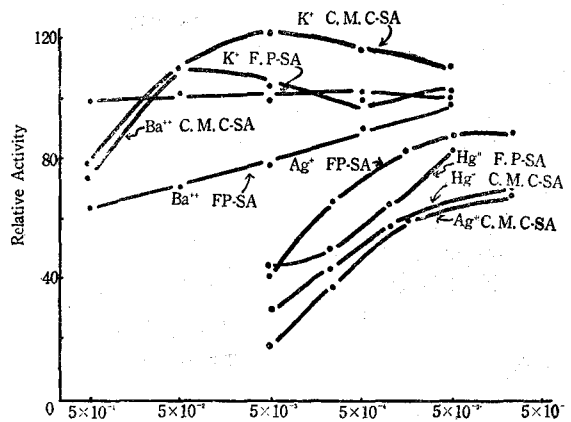


Fig. 11 Effect of metallic Ions on Activity of cellulase

## 要 約

半腐朽 아카시아나무(*Robinia Pseudacacia* Linne) 에서 分離한 *Trichoderma viride* ( $O_2-1$ )가 生成하는

粗酵素의 性質을 實驗하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1) 各種의 纖維素基質에 反應시켜본 結果 數種類의 cellulase 가 混存함을 알았다.

2) C.M.C 및  $\beta$ -glucoside 分解酵素는 基質의 濃度가 增加함에 따라 分解率이 낮았으며 濾紙糖化酵素는 基質 및 酵素量이 增加되고 時間의 經過에 따라 分解率이 相對的으로 增加되었다.

3) 各酵素의 最適活性 pH는 5.0 이었으며 pH 安定性은 大體로 pH 3~6 이었다.

4) 最適活性溫度는 濾紙崩壞力이 50°C C.M.C. 및 *p*-nitro-phenyl- $\beta$ -glucoside 分解力이 60°C 濾紙糖化力이 65°C 에서 最高活性을 나타내었다. 熱에 對한 安定性은 濾紙糖化力, C.M.C 糖化力, 濾紙崩壞力,  $\beta$ -glucoside 糖化力의 順位였다.

5) 金屬 Ion 에 對한 影響은  $Hg^{2+}$ ,  $Ag^{+}$  는 各酵素에 對하여 阻害하였으며  $K^{+}$  는 各酵素를 活性化하였다.

끝으로 이 實驗을 도와주신 奇宇京先生과 鄭泰圭, 孫在均, 宋淑喜, 高永薰, 李鍾祜諸君에게 謝意를 表합니다.

### 參 考 文 獻

1. 雨村明倫, 小川隆平, 照井堯造: 釀工, **45**, 879 (1967)
2. 張文雄, 宇佐美昭次: 釀協, **25**, 349(1967)
3. 張文雄, 宇佐美昭次, 武富昇: 釀協, **23**, 375 (1965)
4. D.R. Whitaker: Canad. J. Biochem. Biophys., **35**, 733(1957)
5. \_\_\_\_\_: Arch. Biochem. Biophys., **53**, 439(1954)
6. E.T. Reese, R.G.H. Siu, H.S. Levinson: J. Bact., **59**, 485(1950)
7. E.F. Reese, H.S. Levinson: Physio. Plant., **5**, 345. (1952)
8. F.E. Cole, K.W. King: Biochem. Biophys. Acta., **81**, 122(1964)
9. G. Okada, T. Niwa, H. Suzuki, K. Nisizawa: J. Fer. Tech., **44**, 682(1966)
10. 今田伊助, 友田勝己 和田正三: 釀工, **40**, 140 (1962)
11. 鄭東孝: 韓農化, **11**, 109(1969)
12. 黑田秀穂: 釀協, **25**, 283(1967)
13. 金野・照井・上田・田米: 食品工業, **5**, 48(1962)
14. 金野國未: 釀工, **41**, 385(1963)
15. K. Nisizawa, Y. Hashimoto: Arch. Biochem. Biophys., **81**, 211(1959)
16. K.W. King: J. Fer. Tech., **43**, 79(1965)
17. 北御門敬之, 外山信男: 釀工, **40**, 85(1962)
18. 金燦祚・崔宇永: 韓農化, **11**, 89(1969)
19. L.H. Li, R.M. Flora, K.W. King: Arch. Biochem. Biophys., **111**, 439(1965)
20. M. Mandeles, E.T. Reese: Dev. Ind. Microbiol., **5**, 5(1964)
21. 松葉豐, 若松靖弘, 岡本昇, 小卷利章: 釀工, **41**, 47(1963)
22. 小川喜八郎, 外山信男: 釀工, **42**, 199(1964)
23. \_\_\_\_\_: ibid, **46**, 367(1968)
24. 大健祥松, 相川忠治・高原義昌: 發研報, **26**, 67(1964)
25. R. Ikeda, T. Yamamoto, M. Funatsu: Agr. Biol. Chem., **31**, 1201(1967)
26. R.M. Grimes, C.W. Duncan, C.A. Hoppert: Arch. Biochem. Biophys., **68**, 412(1957)
27. 成洛癸: 韓微, **6**, 87(1968)
28. \_\_\_\_\_: 晉農研論, **7**, 1(1968)
29. \_\_\_\_\_: ibid., **8**, 56(1969)
30. T. Niwa, K. Kawamura: J. Fer. Tech., **43**, 286(1965)
31. T. Iwasaki, K. Hayashi, M. Funatsu: J. Biochem. **57**, 467(1965)
32. T. Wakazawa, T. Niwa, K. Ichinose, T. Tauka: J. Fer. Tech., **41**, 40(1963)
33. 若松和正, 神田鷹久, 西澤一俊: 釀工, **43**, 739 (1965)
34. 渡邊敬: 釀工, **46**, 299. 303(1968)