

Chaetomium globosum 이 생성하는 Cellulose 분해 효소에 관한 연구

(제2보) Cellulase 의 정제

鄭 東 孝

건국대학교 식품가공과

(1969. 7. 31受理)

Studies on Cellulolytic Enzyme Producing by *Chaetomium globosum*

Part 2. Purification of Cellulase

Dong Hyo Chung

Department of Food Science and Technology,
Kon-Kuk University, (Seoul, Korea)

Summary

1. Crude cellulase extracted from wheat bran media of *Chaetomium globosum* with pH 7.0 McIlvaine buffer was fractionated by precipitation with ammonium sulfate and by treatment with the cellulose powder, DEAE-Sephadex A-25 and Amberite XE-65 (IRC-50) column chromatography.

2. Consequently two cellulases C-1 and C-2 were obtained by cellulose column chromatography. Cellulase C-1 was a powerful CMC-saccharifying and CMC-liquefying activity but cellulase C-2 was stronger CMC-liquefying activity compared to CMC-saccharifying activity and cellulase C-2 had smaller protein than that of cellulase C-1. And cellulase C-2 was fractionated by DEAE-Sephadex A-25 column chromatography into cellulase C-1-1 and cellulase C-1-2,

3. It can be obtained, therefore, that cellulase produced *Chaetomium globosum* consisted, at least, of three cellulases C-2, C-1-1 and C-1-2.

4. Cellulase C-1-1 was homogenous in the ultraviolet and the ultracentrifuge pattern. And cellulase C-1-1 had enzyme for CMC-saccharifying activity.

5. The optimum pH for the enzyme activity of cellulase C-1-1 was 4.0 in any methods of meas-

urement reducing sugar and viscosity. The optimum temperature was 40°C in any methods.

6. The pH stability of cellulase C-1-1 was within pH 5.0 to pH 6.0 at 40°C and fairly stable in acidic solution.

7. The heat stability was below 50°C at pH 4.0 and complete heat inactivation of this cellulase occurred at 70°C.

머 리 말

전보에서 논한바와 같이 *Chaetomium globosum* 밀기울 배양 조효소액은 환원당 측정법으로 측정된 최적 pH는 4.5이고 점도감소 측정법과 여지붕피법으로 측정된 값은 각각 4.0이었다. 또 배양기간 동안 cellulase의 생성은 점도감소활성은 8일이 최고 환원당 증가활성은 10일이 최고였다. 한편 다른 미생물이 생성하는 cellulase의 경우도 여러가지 성분이 있는 것으로 봐서 (1-13) *Chaetomium globosum*이 생성하는 cellulase도 단일성분이 아니고 몇종의 성분으로 된 것을 암시해 주고 있다.

한편 cellulase의 성분중에는 CMC의 점도감소활성으로 봐서 장쇄의 기질을 random으로 끊는 성분과 환원당 생성으로 봐서 기질의 말단에서 포도당 단위로 끊는 성분이 존재해 있는것 같다.

전자는 endo type 후자는 exo-type 이라고 부르는 것이 좋겠다. 이는 마치 전분에 대하여 α -amylas와

β -amylase 나 gluc-amylase 와의 관계가 있는것[같이 추상이 된다.

교로 *Chaetomium globosum* 이 생산하는 cellulase 성분을 더욱 규명하기 위하여 이를 분별 정제하고 그 실험의 일부를 보고하는 바이다.

실 험

1. 균주 :

Chaetomium globosum

2. 배양법 :

전보에서 여려가지 배지를 검토한 결과 본 실험은 밀기울 배양법으로 하였다. 즉 밀기울 30g 을 우물물 25ml와 잘 혼합하고 이를 1l의 삼각 후라스 크에 넣고 1.3kg/cm²에서 30분간 증기 살균하여 상기 균주의 포자를 접종하고 30°C에서 10일간 배양하였다.¹⁴⁾ 이를 50개 정도 다량 배양하여 다음과 같이 조효소액을 얻었다.

3. 조효소액의 조제 :

소요 일수 동안 배양한 후 각 배양후라스크의 밀기울 응괴물을 꺼내고 여기에 10배의 pH 7.0의 구연산-인산염 완충용액을 가하여 냉장고에서 하루 밤 방치한 후 여과하여 그 여액을 조효소액으로 하여 황산암모늄으로 염색하였다.

4. Cellulase의 활성도 측정 :

Cellulase의 활성도는 전보와 같이 환원당 증가활성법과 점도 감소활성법으로 측정 하였다.¹⁴⁾

5. 단백질의 정량 :

각 fraction의 효소량은 단백질로서 Spectrophotometer Model EPU 2A (Hitachi Co Ltd) 280 m μ 에서 optical density를 측정하였다.

6. Sephadex G 25의 정제 :

Molecular sieve인 Sephadex G 25를 10배의 증류수로 하루 밤 팽윤시켜 상층의 미립자는 경사시키고 pH 7.0의 완충액을 가하여 평형화하여 Column에 충전시켜 사용 하였다.

7. Cellulose의 처리 :

Cellulose 분말은 옥화성공업 KK의 미결정분말 (Avicel-SF)이 었으나 cellulose 분말 중에는 자의선을 흡수하는 물질이 함유 되어 있는 수가 있기 때문에 다음과 같이 처리하였다. 즉 cellulose 분말 200g에 무수알콜 500ml를 가하여 한 시간_지나후 알콜을 경사하고 처리된 분말은 감압 건조 후 다시 수세 조작을 7,8회 반복하여 상층액의 미립자를 경사하면서 입자를 선정하였다. 이와 같이 처리된 cellulose 분말은 pH 5.0의 구연산-인산염 완충액으로 평형화 하였다.

8. DEAE-Sephadex A-25 :

Sephadex ion exchange인 DEAE-Sephadex A-25는 다음과 같이 전 처리를 하였다. 즉 DEAE-Sephadex A-25 1g 당 물 100~200ml로 한 시간 이상 팽윤시켜 교반 정치 경사를 반복하여 미립자를 제거하고 0.5N HCl로 처리 다시 충분히 수세하고 다음에 0.5N NaOH로 처리하여 다시 수세하였다. 최후에는 DEAE-Sephadex A-25를 pH 5.0의 구연산인산염 완충액으로 평형화 시켜 기포가 없게 하여 column에다 충전 하였다.

9. Amberlite XE-64 (IRC-50)의 정제 :

Amberlite XE-64는 carboxylic acid 형의 양이온 교환수지이나 상당한 물분자를 함유 하므로 다음과 같이 정제 하였다.¹⁵⁾ 즉 Amberlite XE-64 (200~400mesh)을 물에다 몇번 경사 후 풍건하고 4배량의 acetone에다 분산시켜 3시간 교반 하였다. 이 건조 수지 100g에 대하여 약 400ml의 증류수를 가하여 여기에 다시 10N NaOH 용액 100ml를 가하고 가끔 교반하여 3시간 이상 방치 하였다가 NaOH 용액을 경사한 후 물로 세액이 pH 10이 될때까지 세척하고 3N HCl로 중화후 물로 잘 세척 하였다가 이 수지에 pH 5.9인 인산염 완충액을 가하여 NaOH로 변동된 pH를 조절하였다.

10. Column의 조제 :

이온 교환수지의 경우는 팽윤체의 약 2배량의 출발용액으로 현탁하고 때때로 교반하여 1~2시간 방치 후 수직으로 세운 column 하단의 목크를 단아 놓고 수지가 수 cm 침적이 되면 목크를 열어서 다시 수지 현탁액을 목적되는 길이로 추가하였다. 일정한 길이가 되면 출발 용출액을 다량 흘려 내리 평형화 시켰다.

11. 시료의 첨가 :

시료는 미리 column의 완충화에 사용한 완충액에 충분히 평형화 시킨 효소 용액을 column 위에 조용히 첨가하고 자연 낙하로서 흡착시킨 후 소량의 같은 완충용액으로 column 벽면을 씻어 내리 시료의 첨가를 끝낸다. 시료의 양은 미리 소 Scale의 bath 법으로 간단히 정하여서 가하였다.

12. 용 출 :

Column에 첨가한 효소용액은 linear gradient elution으로 4°C에서 용출하였다. 유속은 1분간에 1ml씩 낙하되게 하여 fraction collector에 분취하였다.

13. 유출액의 분석 :

Column에서 나온 유출액은 fraction collector에서 용탕법으로 5.5ml씩 분취 하였다. 분취된 각 frac-

tion에 함유된 단백질량은 280m μ 에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 그 일정량을 취하여 환원당 증가활성과 점도 감소활성을 측정하였다. 또 식염의 농도는 Mohr 법으로 Cl을 측정하였다. 즉 용출액의 일정량을 취하여 휘석하고 여기에 0.5% K₂CrO₄ 용액을 지시약으로서 0.5ml 가하여 0.1N AgNO₃ 용액으로 적정하여 Ag₂CrO₄의 적갈색이 나타나는 점을 종말점으로 하였다.

결과 및 고찰

1. 황산암모늄에 의한 염석 :

조효소액을 pH 7.0로 조정하고 각 농도별로 황산암모늄을 가하여 하루밤 염석시키고 원침 후 그 침전물을 취하여 pH 7.0의 완충용액에 녹여 불용성의 점질물을 제거하고 그 상등액의 일정량을 Sephadex G-25 column에 통과하여 황산암모늄을 제거하고 이들 각 부분의 효소 활성을 측정한 결과는 다음의 Table 1과 같다.

Table 1. Fractionation with Ammonium Sulfate

Added (NH ₄) ₂ SO ₄ Concentration	Relative CMC-Saccharifying activity
20% saturation	22
40% "	100
60% "	85
80% "	30
100% "	0

위 Table 1과 같이 0.2 포화의 경우는 cellulase의 활성은 거의 없으나 0.4와 0.6 포화의 침전 부분에는 cellulase 활성이 있는 것을 알수 있다. 그래서

이 후의 실험은 0.2포화의 침전물은 버리고 0.4~0.6 포화의 부분을 탈염하여 다음 과정에 따라 분별하였다.

2. Cellulose 분말에 의한 분별 :

Cellulase는 기질 cellulose를 분해 하므로서 양자는 용액 중에서 어떤 상호 작용이 있는 것으로 생각하고 cellulose 분말 column으로 다음과 같이 분별을 행했다.

Cellulose column에 탈염된 황산암모늄 염색 부분에 함유된 cellulase를 흡착 시키고 용출은 pH 5.0의 구연산-인산염 완충용액에 대하여 pH 7.0의 구연산-인산염 완충용액을 가하는 linear gradient elution으로 행한 결과는 다음의 Fig. 1과 같다.

Fig. 1과 같이 황산암모늄 부분은 다시 2개의 부분으로 나누어 지며 fraction No. 13의 부분은 환원당 증가활성이 강하여 점도 감소활성은 약하고 fraction No. 37의 부분은 반대로 점도감소활성이 강하며 환원당 증가활성이 약하였다. 그리고 단백질량은 fraction No. 13에 많고 fraction No. 37 부분에는 적었다. 차후 fraction No. 13부분을 cellulase C-1(C-1) fraction No.37부분을 cellulase C-2(C-2)라고 명명한다.

3. DEAE-Sephadex A-25 Column에 의한 분별 :

Cellulose column의 cellulase C-1 부분만을 다시 황산암모늄 0.6포화로 침전 시킨후 pH 7.0의 구연산-인산염 완충액에 용해 시키고 불용성 부분을 제거하고 그 상등액만을 Sephadex G-25에 통과시켜 황산암모늄을 제거 하였다. 얻어진 粗 cellulase는 더욱 정제하기 위하여^{16,17)} Sephadex ion excha-

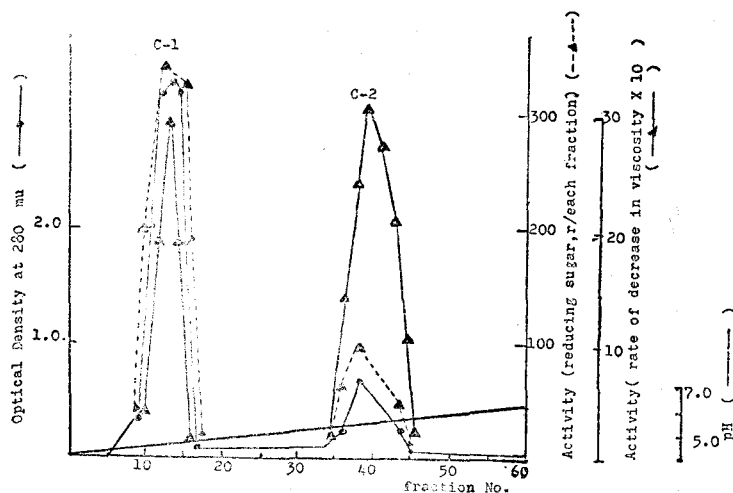


Fig. 1. Chromatograms of cellulase C-1 and C-2 on a column of cellulose powder

에 강하게 흡착된 부분 (착색된 부분)을 용출시키기 위하여 2M NaCl을 함유한 pH 7.0의 구연산-인산염 완충용액으로 linear-gradient elution을 한 결과는 다음의 Fig. 2와 같다.

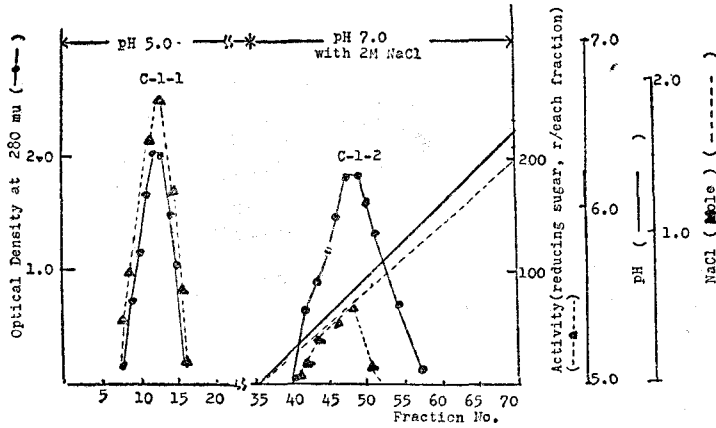


Fig. 2. Chromatograms of cellulase C-1-1 and C-1-2 on a column of DEAE-Sephadex A-25

Fig. 2와 같이 C-1 부분은 다시 2개의 부분으로 나누워진다. 최초의 용출 부분을 cellulase C-1-1 (이후 C-1-1) 후의 부분을 cellulase C-1-2 (이후 C-1-2)이라 명명한다.

위의 Fig. 2와 같이 C-1-1은 단백질량과 환원당 증가활성이 일치되나 (C-1-2의 부분은 단백질과 환원당 증가 활성과는 일치되지 않고 아주 그 효소 활성이 약하였다. 더욱 약간의 갈색을 띠며 DEAE-Sephadex A-25에 아주 강하게 흡착되었다. 그리고 소금 농도를 높게 할때 겨우 용출이 되는 것으로 봐서 C-1-1과는 아주 다른 효소 단백질로 생각된다.

4. Amberlite XE-64 (IRC-50)에 의한 분별;

Amberlite XE-64 (IRC-50)는 carboxylic acid 형의 cation 교환 수지로 단백질의 분별에 옛날부터 사용되어 왔다.^{18,19)} DEAE-Sephadex A-25의 column에서 C-1-1 부분을 황산암모늄 0.6모라에서 침전시키고 이것을 pH 7.0 완충용액에 녹여 불용부분을 제거하고 상등액을 Sephadex G-25 column에 통과시켜 황산암모늄을 제거하였다. 이렇게하여 C-1-1을 농축시켜 미리 정제한 Amberlite XE-46 column에 추가 하여 pH 5.9 인산염 완충액으로 용출시킨 결과는 다음의 Fig. 3과 같다.

위의 Fig. 3와 같이 C-1-1은 단일의 peak가 되었다. 고로 이는 상당히 균일한 단백질 (효소)로 생각된다.

이상의 column chromatography 법으로 *Chaetomium globosum*이 생산하는 cellulase는 적어도 3개 (C-1-1 C-1-2 C-2)의 효소가 있는것 같다. 그러나 C-2 부분의 cellulase 활성이 강하여 흥미있는 것으로 생각은 되나 그 단백질의 양이 아주 미량이라 정제 할만한 량을 얻기가 곤란하여 끝까지 추궁하지 못한 것을 유감으로 생각한다. 한편 이는 minor component로 생각되며 본군이 천연 cellulose를 자화하는 이유는 이 성분에 의하지 않나 생각이 된다.

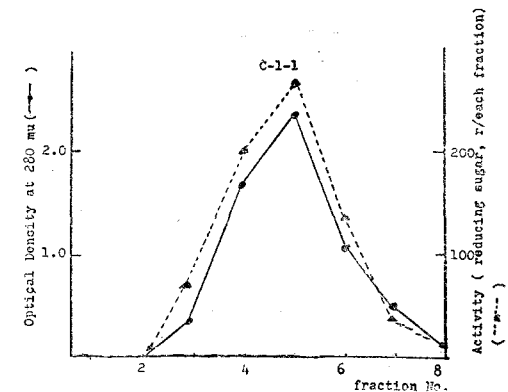


Fig. 3. Chromatogram of cellulase C-1-1 on a column of Amberlite XE-64

효소의 연구를 행할때는 그 효소가 단일의 단백질인가를 조사하지 않으면 안되므로 단백질 분포에

관한 단일성을 관찰하기 위하여 초원심상을 보거나 하전적 성질의 균일성을 표현하기 위하여 전기영동 현상을 관찰하지 않으면 안된다.

저자는 이 점을 생각하여 cellulase C-1-1에 대하여 초원심(침강상)과 자외선 흡수 Spectrum 등을 관찰하여 단일성을 확인하였다.

5. 초원심 분리 :

위와 같이 하여 조제된 cellulase C-1-1 fraction을 동결건조 시켜 단백질을 1.0% 이상으로 농축하였다. 이것을 Spinco Ultracentrifuge Model E (54, 300 rpm; at 10°C)에서 원심분리한 초원심 침강상은 Fig. 4와 같다.

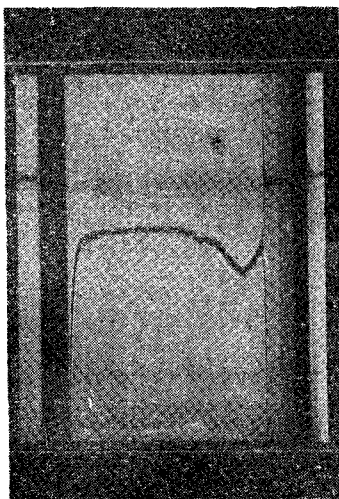


Fig. 4. Ultracentrifugal Sedimentation Pattern of Cellulase C-1-1.

이 침강상에서와 같이 cellulase C-1-1은 초원심적으로 균일한 것을 알 수 있다.

6. 자외선 흡수에 의한 Spectrum:

Cellulase C-1-1 용액(pH 5.9 인산염완충용액)을 Photo-Electric Spectrophotometer Model EPU 2A (Hitachi Co Ltd)를 사용한 자외선 흡수 spectrum은 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서와 같이 명백히 극대흡수는 280m μ 이고 극소흡수는 250m μ 으로 전형적인 단백질의 흡수대를 나타 내었다.

7. 효소활성의 pH 의존성 :

효소 단백질은 양성 단백질 이므로 그 용액의 pH에 따라 해리상태의 변화가 일어나서 그 결과 효소의 활성에 영향을 미치게 되거나 또 기질이 해리되는 경우에는 큰 영향을 받는다. 그래서 효소 활성이 pH의 변화에 어떤 변화를 받는가를 조사 하였다.

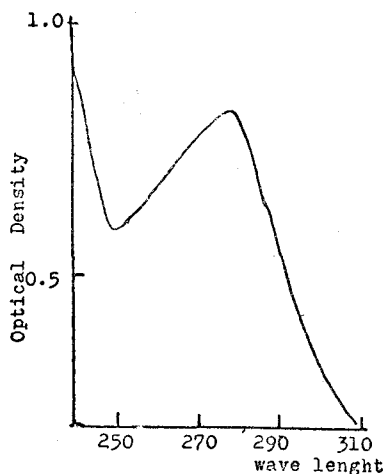


Fig. 5. UV Spectrum of Cellulase C-1-1

7-1. 환원당 측정에 의한 pH 의존 : 측정법은 전보에 따라 행하고 상대활성으로 표시한 결과는 다음의 Fig. 6와 같다.

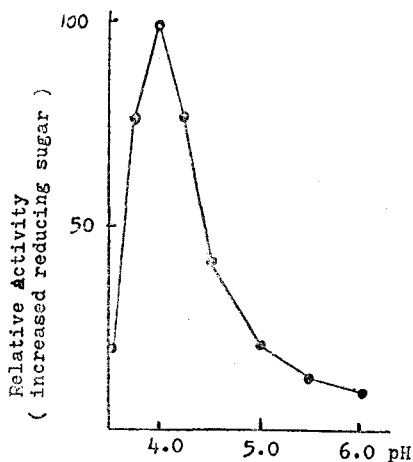


Fig. 6. pH Dependence of cellulase C-1-1 Activity (40°C)

Fig. 6와 같이 cellulase C-1-1의 최적 pH는 4.0이었다. 조효소의 경우는 pH 4.5인 것에 비하여 정제되는 경우는 약간 낮아지는 것을 알 수 있다.

7-2. 점도 측정법에 의한 pH 의존 : 효소활성 측정법은 전보에 따라 행하고 얻어진 결과는 다음 Fig. 7과 같다.

Fig. 7과 같이 cellulase C-1-1의 최적 pH는 4.0이다. 이는 조효소의 경우와 같다.

한편 정제 cellulase C-1-1의 최적 pH가 환원당 증가 측정법과 점도 감소측정법에서 일치되는 것으로 보아서 거의 순수한 단백질로 생각이 된다. Fig.

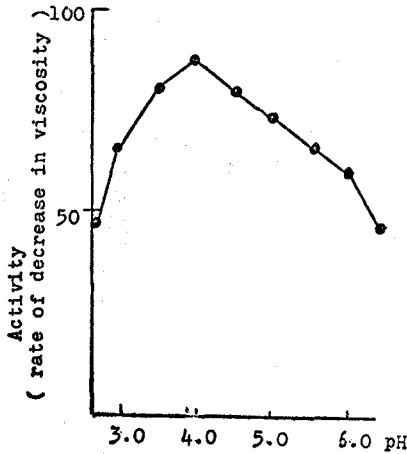


Fig. 7. pH Dependence of cellulase C-1-1 Activity (40°C)

6과 Fig. 7과 같이 환원당 증가 활성은 pH 나 온도에 따라 상관히 예민하나 점도감도 활성은 그렇지 않다.

지금까지 여러가지 미생물의 cellulase의 최적 pH에서 *Asp. niger*의 cellulase는 2.3~5.0²⁰⁾ *Asp. saitoi*의 그것은 5.0²¹⁾ *Pen. Sp.*의 경우 5.0²²⁾ *Rhizopus sp.*의 경우는 4.0~5.0²³⁾ *Trametes sanginea*의 경우 4.0~4.5^{24,25)} *Trichoderma viride (koningi)*의 경우는 4.0~4.5이라 보고 되어 있다.^{8,9,26,27,28)} 그리고 *Myrothecium verrucaria* cellulase의 최적 pH는 cotton fibre에서는 5.0~6.0이고²⁹⁾ swollen cellulose의 경우는 5.0이다.²⁹⁾ 또 *Stachybotry atra*의 cellulase의 최적 pH는 CMC 환원당 증가 활성의 경우는 6.5이고 점도 감소활성의 경우는 8.0으로 유례없이 높다³⁰⁾ *Cellvibrio gilvus* cellulase의 최적 pH는 6.0이다.²⁾

본 *Chaetomium globosum*의 경제 cellulase의 경우도 거의 같은 최적 pH를 가지고 있음을 알수가 있다.

8. 효소활성의 온도 의존성 :

효소반응은 촉매 반응이며 온도의 상승에 따라 Arrhenius식에 따라 그 반응의 속도는 증가되나 어느 범위를 넘으면 불활성화 되므로 그 최적온도는 아주 중요하게 된다.

8-1. 환원당 측정법과 점도 감소측정법에 의한 온도 의존 : 효소 활성은 pH에서 전보에¹⁴⁾ 따라 측정하고 그 결과는 Fig. 8 Fig. 9과 같다.

Fig. 8 Fig. 9과 같이 그의 최적온도는 다 같이 40°C이며 이는 조효소의 경우와 같고 최적온도를 중심으로 해서 비교적 대칭적인 관계가 있다.

다른 미생물의 경우를 보면 *Aps. saitoi*의 CMC

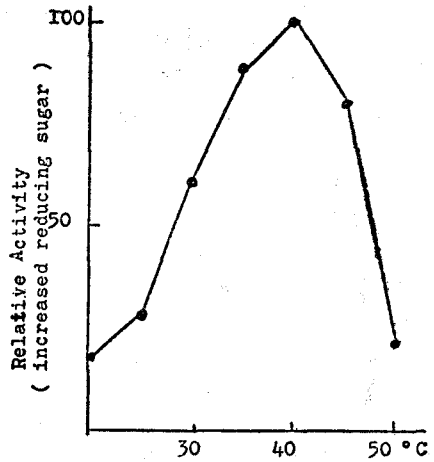


Fig. 8. Temperature Dependence of Cellulase C-1-1 (at pH 4.0)

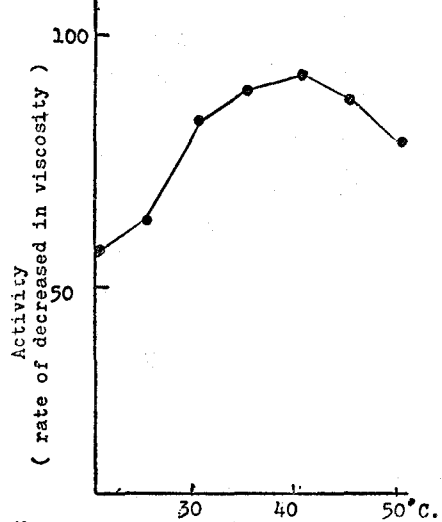


Fig. 9. Temperature Dependence of cellulase

ase의 최적온도는 45°C 이고 팽윤 cellulose에 작용하는 cellulase의 경우는 50°C 이나 정제 되면 CMC ase가 60°C로 상승된다 하였다.³¹⁾ 한편 곰팡이 경우 60°C의 것도 있으며 *Trichoderma viride*의 cellulase에서는 여지 분괴력의 경우는 40°C 이고 CMC 당화력은 55°C 이라 한다.²⁸⁾ 그리고 *Poria vaillantii*의 CMC-ase 최적 온도는 60°C로 비교적 높다.³²⁾

그러나 *Chaetomium globosum*의 cellulase는 그의 최적 온도가 다른 균주의 cellulase보다 약간 낮은 것을 알수가 있다.

9. pH 안전성 :

Cellulase C-1-1을 pH 4.0 5.0 6.0 7.0 및 8.0으로 조절하고 40°C에서 4시간 방치 한 후 잔존활성(%)을 측정 한 결과는 다음의 Fig. 10과 같다.

Fig. 10과 같이 안정 pH 영역은 pH 5.0에서 6.0이며 6.0에서 더욱 안정하였다. 그러나 pH 8.0의 경우는 아주 빨리 불활성화 되었다. 조효소의 안정 pH는 3.5에서 6.5까지 이나 정제 효소의 경우는 범위가 상당히 좁은 것을 알 수 있다. 그리고 이 효소는 미산성역에서 더욱 안정함을 알 수 있다.

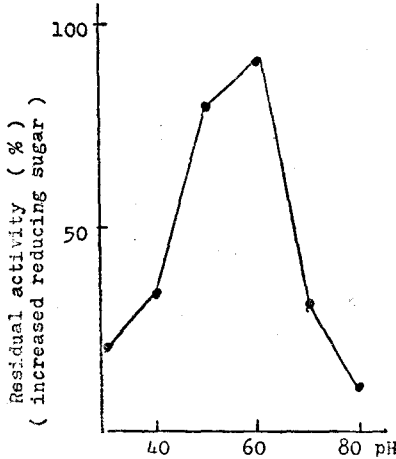


Fig. 10. pH Stability of cellulase C-1-1, at 40°C (after standing for 4 hrs. at each pH)

한편 다른 미생물의 경우를 보면 *Asp. saitoi* CMC ase의 안정 pH는 2.6~8.0이고³¹⁾ *Rhizopus* 속은 pH 16.0에서 1일간 방치 하여도 그 활성을 잃지 않는 것도 있다³²⁾ 그리고 *Asp. niger*의 안정 pH는 3.0~5.0이다.³⁴⁾

10: 열 안정성: Cellulase C-1-1을 pH 4.0에서 40 50 60 및 70°C로 60분간 처리하여 환원당 증가법으로 그의 잔존 활성을 측정할 결과는 다음의 Fig. 11과 같다.

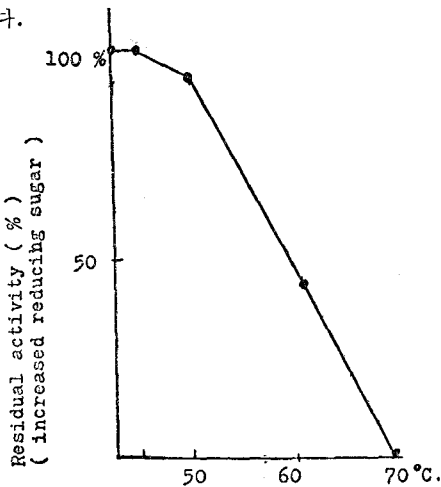


Fig. 11. Heat stability of cellulase C-1-1. at pH 4.0 (after standing for 60 min. at each temperature)

위 Fig. 11과 같이 cellulase C-1-1은 60°C에서 53%가 70°C에서는 완전히 실활되는 것을 알 수가 있다.

다른 미생물의 경우 더욱 *Rhizopus* 속은 60°C에서 3시간 방치 하여도 그 활성이 떨어지지 않고³³⁾ *Poria vaillantii*의 cellulase는 70°C에서 10분간에 44%가 실활이 되는 것도 있다³²⁾ 그러나 cellulase C-1-1은 *Asp. saitoi*, *Trichoderma viride*의 CMC ase와 같이 열에 비교적 약하다.^{8,9,35,36)}

cellulase의 다양성은 최근 cellulase의 분별 정제로 많은 새로운 사실이 알려져 있다. 松村氏는 *Asp. Saitoi*의 배양액에서 CMC ase를 정제하고 CMC에만 작용하는 부분을 결정화 하였고³⁷⁾ 福井씨는 *Asp. niger*의 cellulase는 3종이 있으며 cellulase I은 CMC점도 감소활성이 강하고 cellulase II는 CMC 환원당 활성이 강하나 천연 cellulose에는 천연 작용하지 못한다고 하였다.³⁸⁾ 또 Ikeda 씨등은 *Asp. niger*의 cellulase 제품에서 4개의 성분을 분리하여 FI-2-a FI-2-b 성분은 glycol cellulose에만 작용하고 그의 최적 온도는 40°C 최적 pH 4.0~4.5였으나 F-1-1-b는 최적 pH가 2.3~2.5 최적온도는 65°C이라 하였다. 그리고 F II는 cellobiose에만 작용한다고 보고 하였다.²⁰⁾ 雨村씨는 *Pen. Variable*의 cellulase 계에는 pulp cellulose 분말의 천연 cellulose에 작용하는 cellulase C₁ (분자량 25,000)과 CMC에 작용하는 CMC ase (분자량 35,000) 및 cello-oligo-saccharide에 작용하는 효소 (분자량 100,000)가 존재하여 cellulose를 glucose까지 분해한다고 하였다.¹⁸⁾ 若林 씨등은 *Irpex lacteus*의 cellulase 계에는 Isozyme이 있고 이들은 아주 넓은 기질의 특이성을 가지고 more random type과 less random type으로 cellulose를 분해한다 하였고 이들이 서로 협동하여 한개의 효소계를 형성한다 하였다. 또 sephadex gel의 여과로서 CMC 가수분해 활성과 Avicel이나 cellulose 분말등에 대한 활성등의 다른 성분이 있음을 지적하였다.^{30,40)} 또 Iwasaki 씨등은 *Trichoderma koningi*가 생산하는 cellulase제품의 cellulase를 정제하여 cellulase I과 cellulase II로 분리 하였고 cellulase I (분자량 26,000)은 cellobiose를 잘 분해하고 cellulase II (분자량 50,000)는 섬유소의 glycosidic bond를 잘 분해한다 하였다.^{8,9)} 한편 張씨등은 *Trichoderma viride* WV 123CA의 액체 배양액에서 효소액의 열석으로 효소 분말을 얻고 cellulase 외에 chitinase laminaranase pectinase protopectinase 등의 여러가지 효소계가 있다고 하였다. 특히 균체의 용균작용이 있음을 알았

다.⁴¹⁾ 또 다른 *Trichoderma viride*가 생산하는 cellulase 조제품에는 β -glucosidase와 3-4개의 isozyme이 존재하여 그 중에 CMC ase의 활성이 강하고 여지분해력과 여지당화력은 약하다 하였다.⁴²⁾ 또 Li 등은 *Trichoderma viride*의 cellulase 성분 중에는 endo gluconase와 exogluconase 1개 성분이 있으며 다 같이 17개의 amino acid로 구성되어 있음을 알았다.⁴³⁾ Reese 씨는 *Myrothecium verrucaria*의 cellulase에는 천연 cellulase의 cross linkage를 끊는 효소 C₁과 직쇄 glucan을 가수분해하는 효소 C₁가 있다 하였다.⁴⁴⁾ 한편 *Celliobrio gilvus*의 배양액에서 β -1.4 glucan hydrolase을 분리하였다.⁴⁵⁾ 김野씨 등은 *Trametes sanginea*의 배양액에서 hydroxy cellulose 미결정성 분말 cellulose에 대하여 강력히 작용하나 CMC에 대한 작용이 약한 cellulase를 분리 하였다.^{24,25)} 이와 같이 미생물이 생산하는 cellulase는 단일의 성분이 아니고 적어도 1개 이상의 성분임을 알수가 있다.

이상 여러 결과로서 *Chaetomium globosum*이 생산하는 cellulase는 C-1-1 C-1-2 및 C-3의 3성분으로 되었다는 것을 알수가 있다. 이 중 C-3는 점도감소 활성이 강하며 C-1-1는 CMC 당화활성이 강하였다. 그리고 C-1-2는 단백질은 많으나 그 활성은 상당히 낮았다. 이는 아마 밀기울 단백질의 일부가 이행 된것으로 생각이 된다. C-2와 C-1-2는 끝까지 추궁하지 못한것을 심히 유감으로 생각한다.

요 약

1. *Chaetomium globosum*의 밀기울 배양기에서 조효소를 추출하고 황산암모니움 염석 부분을 cellulase 분말 column으로 2개의 cellulase 활성 부분(C-1, C-2)을 분리 하였다. 그 하나는 환원당 증가 활성이 강하며 (C-1) 다른 하나는 점도 감소 활성이 강하였다. (C-2) 그러나 단백질 양은 C-1부분이 많았고 C-2 부분은 적었다.

2. 환원당 증가 활성이 강한 부분 (C-1)을 DEAE-Sephadex A-25 column에서 분리한 결과 다시 2개의 성분 (C-1-1 및 C-1-2)으로 나누어 졌다. 그리고 C-1-2는 column에 강하게 흡착되었고 2M-NaCl의 용액으로 용출되었다. 이는 착색 된것으로 봐서 C-1-1과는 아주 다른 단백질로 생각이 된다.

3. Cellulase C-1-1을 다시 Amberlite XE-64 column으로 분별하여 단일의 peak를 얻었다.

4. Cellulase C-1-1 부분의 초원심 침강계 면은 단일의 peak로 나타나고 또 자외선 흡수 spectrum도 전형적인 단백질의 흡수 spectrum을 나타 내었

다.

5. Cellulase C-1-1의 최적 pH는 환원당 증가활성법으로나 점도 감소 활성법으로 다 같이 pH 4.0이었다.

6. 그리고 그의 최적 온도는 40°C였다.

7. Cellulase C-1-1의 pH 안정성은 40°C에서 pH 5.0 내지 pH 8.0의 범위 내였다.

8. 그리고 열안정성은 pH 4.0에서 50°C 이하였다

참 고 문 헌

1. Hash, J.H., King, K.W.; J.Biol. Chem., 232, 381 (1958)
2. Strovick, W.O., King, K.W.; J.Biol. Chem., 235, 303 (1960)
3. Nshizawa, K., Horimoto, I., Hanada, N. and Hashimoto, Y.; Arch. Biochem. Biophys. 96, 152 (1962)
4. Hashimoto, Y., Nishizawa, K.; Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials, Pergamon Press. p. 93 (1963) New York.
5. Peterson, G., Cowling, E.B. and Porath, J.; Biochem. Biophys. Acta, 67, 1 (1963)
6. Peterson, G. and Porath, J.; J.Biol. Chem., 67, 7 (1963)
7. 丹羽 富造, 岡田巖大郎, 石川 哲夫, 西澤 一俊: 醸工, 42, 124 (1964)
8. Iwasaki, T., Ikeda, L., Hayashi, K. and Funatsu, M.; J.Biochem., 57, 478 (1965)
9. Iwasaki, T., Hayashi, K., Funatsu, M.; J. Biochem., 57, 467 (1965)
10. 若林 和正, 神田 篤久, 西澤 一俊: 醸工, 44, 669 (1966)
11. Okada, G., Niwa, T., Suzuki, H. and Nishizawa, K.; J. Ferm. Technol. (Japan), 44, 682 (1966)
12. 小川喜 八郎, 外山 信男: 醸工, 43, 661 (1965)
13. 雨村 明倫, 小川 隆平, 照井 堯造: 醸工, 45, 879 (1967)
14. 鄭東孝; 農化, 10, 23 (1968)
15. 垣花, 成田: 廣川書店, 最新 Ion 交換 p. (1961)
16. Porath, J., Lindner, E.B.; Nature, 191, 69 (1961)
17. Nyman, P.O.; Biochim. Biophys. Acta, 52, 1 (1961)
18. Hirs, C.H.W., Stein, W.H. and Moore, S.; J.

- Am. Chem. Soc., 73, 1893 (1951)
19. Hirs, C.H.W., Stein, W.H. and Moore, S.; J. Biol. Chem., 200, 473 (1953)
 20. Ikeda, R. Yamamoto, T. and Funatsu, M.; Agr. Biol. Chem., 31, 1201 (1967)
 21. 松村 親, 前島 一孝: 醸工, 41, 168 (1963)
 22. 金野 範之, 上田 芳子, 照井 堯造: 醸工, 40, 143 (1962)
 23. 今田 伊助, 友田 勝己, 和田 正三: 醸工, 40, 140 (1962)
 24. 奈良 潔, 番野 剛, 吉野 弘: 醸工, 42, 405, 410 (1964)
 25. 奈良 潔, 番野 剛, 吉野 弘: 醸工, 43, 653 (1965)
 26. 北御門 敬之, 外山 信男: 醸工, 40, 83 (1962)
 27. 松葉, 若松, 岡本, 小巻: 第3回 Cellulase Symposium (1963)
 28. 張文雄, 宇佐美 昭次, 武富 昭: 醸協誌, 23, 375 (1965)
 29. Saunders, P.R., Sui, R.G.H. and Genest, R. N.; J. Biol. Chem., 174, 697 (1948)
 30. Thomas, R.; Austral. J. Biol. Science, 9, 159 (1956)
 31. 松村 親, 前島 一孝: 醸工, 41, 164 (1963)
 32. Sison, B.C. Jr., Schubert. W.J. and Nord, F. F.; Arch. Biochem. Biophys., 75, 260 (1958)
 33. 今田 伊助, 友田 勝己, 和田 正三: 醸工, 40, 140 (1962)
 34. 三澤 豊, 松原 良, 羽田野誠: 食工誌, 14, 286 (1967)
 35. 渡邊 敬: 醸工, 46, 303 (1968)
 36. 松村 親, 前島 一孝: Ibid., 41, 154 (1963)
 37. 松村 親, 前島 一孝: Ibid., 41, 158 (1963)
 38. 辻阪 好夫, 福本 壽一郎: 科學と工業, 37, 494 (1963)
 39. 若林 和正, 西澤 一俊: 醸工, 42, 347 (1964)
 40. 若林 和正, 神田 鷹久: Ibid., 43, 739 (1965)
 41. 張文雄, 加藤 佐二, 宇佐美 昭夫: 醸協誌, 26, 155 (1968)
 42. Niwa, T., Kawamura, K.; J. Ferm. Technol., 43, 286 (1965)
 43. Li, L.H., Flora, R.M. and King, K.W.; Arch. Biochem. Biophys., 111, 439 (1965)
 44. Reese, E.T.; Appl. Microbiol., 4, 39 (1956)
 45. Storvick, W.V., Cole, F.E. and King, K.W.; Biochem., 2, 1106 (1963)