

토양에서 분리한 *Penicillium* sp. 가 생산하는 Cellulase에 관한 연구(제1보)

광능지역 토양으로부터 *Penicillium* sp. C8-14株의 분리

김용배 · 이병국 · 최승호
동아제약 주식회사 효소과

Studies on the Cellulase of *Penicillium* sp. Isolated from Soils.

(1) Isolation of *Penicillium* sp. C8-14 strain from Kwangneung soil

Yong Bae Kim, Pyung Kuk Yi and Seung Ho Choi

Enzyme Section, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd, Seoul, Korea

Abstract : The soil of Kwangneung area (Kyeonggi-Do) was inoculated directly into wheat-bran-media and after 3~4 days of incubation, a *Penicillium* species whose cellulase activity was 1011u/g was isolated.

With the treatment of mutagenic agents an improved strain (cellulase activity: 1303u/g) was obtained. This strain was screened again by mono-spore isolation method. Finally a strain C8-14 (cellulase activity: 2351u/g) which had lesser spores than the wild strain was obtained.

서 론

최근의 효소공업의 종아로서 cellulase는 식물의 주요 구성성분인 cellulose 및 식물첨가제로서의 C.M.C.를 분해하는 활성이 있으므로 의약품, 식품, 사료 및 공해요인 분해제 등으로서 각광을 받고 있으며, 이러한 효소를 생산하는 것으로는 초식동물은 물론, 미생물 특히 곰팡이(Reese and Levinson, 1952) 전반에 걸쳐 있음도 주지의 사실이다.

Kislitsyna(1968) 등은 *Sporocythophaga* sp., *Actinomyces rosea*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Dematium hispidulus*, *Trichoderma lignorum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Alternaria tenuis*, *Chaetomium globosum*, *spirale* 등을 토양에서 분리하여 이에서 cellulase를 얻어 냈으며 Chandrasekaran (1969) 등은 *Pestalotiopsis weterdijkii*, *Sporotri-*

chum pruinosum 등으로 cellulase 생산의 경제적 방법등을 연구하였으며, 인근 일본에서도 수년전부터 *Aspergillus* sp. 및 *Trichoderma* sp.의 균으로부터 공업적으로 다량 생산하기에 이르고 있다.

그러나 한국에서는 *Aspergillus* sp. 몇종에 대하여 연구적 단계에 머무르고 있는 실정일 뿐이다. 저자들은 역가면에서는 우월할 수는 있어도 短菌糸 多胞子로 작업상 많은 애로점이 있는 *Aspergillus* sp. 보다는 생산상 수월한 신종의 개발을 시도하게 되었으며 그 일환으로 枯死木 및 古木이 많은 경기도 광능지구를 택하여 수개소의 토양을 채취하고 이에서 黴배지에 대한 적응성이 있는 야생주 30종을 분리하여 각각 그 cellulase의 역가를 측정 검토하여 *Penicillium* sp.의 1종을 얻었다. 이 야생주에 대하여 黴배지 순화 및 수회에 걸친 번이제 처리로 포자가 적어 거의 비산하지 않고 균사가 많은 종을 얻었으므로 이를 우선 보고코자 한다.

실험 방법 및 재료

1. 토양채취 및 균주 분리방법

- a) 토양채취 : 부식토 및 枯死木 根部
- b) 균주분리법 : 멸균한 麩배지 15g에 1g의 토양을 넣고 30°C, 3~4일 배양후 발아 성숙한 곰팡이류만을 slant에 이식, 증배한 후 수회 plate 하여 단리함.

c) Slant 및 plate용 배지

wheat bran Ex.	1000ml
페당밀	10g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5g
Agar	20g

2. 배양방법

麩배지 15g을 100ml flask에 넣고 15th, 30분간 멸균후 slant에서 증식한 균을 접종하여 30°C, 3일간 배양한다.

3. 역가 측정법

pH4.5 Na-Acetate Buffer 10% 함유한 0.625% CMC-Na 용액 4ml를 K.P. II Nessler tube에 취해 40°C, 5분간 예열후 희석효소액(註1) 5ml를 가하여 40°C, 30분간 작용후 Somogyi-Nelson 법에 의하여 생성환원당을 측정한다(E). 별도로 40°C, 30분간 작용을 생략하고 동일 조작을 하여 흡광도 E'를 측정한다(효소액 사용).

※ 檢量曲線 작성 : 80°C, 5시간 건조한 포도당을 5ml 중 0.05mg, 0.1mg, 0.2mg, 0.3mg, 0.4mg씩 함유하도록 각각 液을 조제한다. 이 각각의 5ml에 Somogyi 新시액 2ml를 가하고, 이하 Somogyi-Nelson 법에 따라 환원당량과 흡광도를 Graph에 표시한다.

역가표시 : 檢량곡선에서 E-E'에 대응되는 포도당량을 구하여 상기조건에서 1분간에 1mg의 포도당에 상당하는 환원당을 생성하는 경우를 100unit로 한다.

cellulase 역가 : $\frac{G}{30} \times 100 \times D$

G: 포도당에 상당하는 환원당의 mg수

D: 효소액의 희석배수

측정기계 : spectronic-20(Bausch & Lomb)

註 1) 3일간 배양한 Koji를 Mixer에서 분쇄후 10g씩 달아서 일부는 수분측정, 일부는 30°C 물100ml를 넣어 침출, 여과후 여액을 粗효소 원액으로 한다. 이것을 E-E'가 0.5이하 되도록 희석하여 희석효소액으로 한다.

4. 변이제 처리법

a) U.V. 조사 :

포자 현탁액(1×10⁵⁻⁷/ml)을 petri-dish에 넣고 암

실에서 U.V. 조사한다.

b) Nitroso-Methyl-Urethane(N.M.U.) 처리법 :

농후한 포자 현탁액(1×10¹⁰⁻¹²/ml)을 수회 원심여과하여 만든후 이에 1000γ의 N.M.U.를 넣고 30분간 작용시킨다음 원심분리로 3회 세척, 단포자 분리를 시행한다.

c) N.T.G. 처리법 :

방법은 上同이며, 농도는 500γ, 작용시간은 30分으로 한다.

실험 결과 및 고찰

토양으로부터 균주 분리의 일반적 방법(實驗農藝

Table I. Cellulase activity of various fungi isolated from the soils of Kwangneung area.

Strain No.	O.D. Bl.=0.046	Moisture in Koji (%)	Activity (u/g)	Genus
C1-1	0.332	59	742	<i>Penicillium</i> sp.
-2	0.1	57	133	
-3	0.455	59	1011	
-4	0.200	57	381	
-5	0.215	57	418	
-6	0.140	55	222	
-7	0.105	57.5	148	
-8	0.170	62	347	
-9	0.160	61	311	
-10	0.120	60	197	
-11	0.190	59	374	
-12	0.09	55	104	
-13	0.05	58	15	
-14	0.114	58	172	
-15	0.10	55.5	129	
-16	0.09	55.5	105	
-17	0.08	54	79	
-18	0.35	61	829	<i>Aspergillus</i> sp.
-19	0.365	62.5	905	
-20	0.235	62	529	
-21	0.270	62	627	
-22	0.150	59	270	
-23	0.270	59	581	
-24	0.058	55	283	
-25	0.098	52.5	107	
-26	0.095	55	113	
-27	0.09	59	114	
-28	0.085	52	86	
-29	0.09	51	95	
-30	0.205	59	412	

1960, 友因等 1964) 및 사상균을 얻기위한 세균 발육 억제제 furacin(微生物學 Hand book 1964)의 사용 결과는 바람직 하지는 않았으며, 최종의 생산 배지에의 적응성 여부도 고려하여 麴배지에 직접토양을 넣어 배양한 바 좋은 결과를 얻었으며, 이를 더욱 확대 배양하여 단리하여 얻은株에 대한 1차의 역가 측정으로 C1-03 및 C1-19株를 선발했다(Table I).

前者는 Czapek 배지상에서 colony는 녹색, 毛氈狀이며 자낭은 산재하고, 파우 상칭이 아닌 密生한 penicillus를 가지고 있는 *Penicillium* sp., 後者는 분생자柄의 벽이 무색 평활하고 분생자는 暗色이며 分生子頭는 흑갈색이고 Czapek 배지상에서는 colony는 흑갈색으로 *Aspergillus niger*群의 일종으로 사료되었다(Thom et al, 1945; Raper et al, 1965; Raper et al, 1949).

Kislitsyna(1968), 雨村明倫(1965)등이 밝힌 바르 *Penicillium* sp.의 cellulase 생산균주로서의 우수 가능성이 있어 이를 중점으로 하여 다시 단포자 분리를 하여 Table II와 같은 결과를 얻었으며 대체적으로 $\bar{x}=913$ $\sigma=130$, C.V.=0.14인 안정된 단일균임을 알 수 있었다.

Table II. Results of the mono-spore isolation with the wild strain, *Penicillium* sp. C1-03

Strain No.	O.D.Bl. = 0.04	Moisture in Koji(%)	Activity (u/g)
<i>Penicillium</i> sp. C2-01	0.215	62	960
-02	0.208	60	854
-03	0.215	60	930
-04	0.185	61	792
-05	0.200	61	872
-06	0.255	59	1120
-07	0.228	63.5	1096
-08	0.214	60	926
-09	0.227	60	994
-10	0.236	61	1070
-11	0.169	61	704
-12	0.211	62	958
-13	0.207	62	934
-14	0.165	62	700
-15	0.165	63	718
-16	0.206	61	930

따라서 단포자 분리반으로는 더 나은株를 기대할 수 없어 번이계 처리를 시도했으며 U.V., N.T.G., N.M.U.등을 동시에 처리한 결과, Table III과 같은 결과를 얻었다.

Table III. Variation of the cellulase activity after treatment of mutagenic agents for the *Penicillium* sp. C2-06 strain.

Blank		U.V.		N.T.G.		N.M.U.	
Moist. in Koji (%)	Activ-ity (u/g)	Moist. in Koji (%)	Activ-ity (u/g)	Moist. in Koji (%)	Act. (u/g)	Moist. (%)	Act. (u/g)
62	837	62	837	61	913	62	843
60	932	62	865	60	473	62	717
62	1000	62	839	61	913	60	768
62	917	62	710	60	700	61	754
62	952	63	859	61	562	61	486
62	721	62	750	63	789	61	902
62	779	62	923	60	683	59	388
		62	923	60	876	63	778
		63	978	62	798	63	896
		63	830	63	663	62	901
		61	803				
		63	830				
		63	711				

Table IV. Activity variation of the N.M.U. and second N.T.G. treatments for the *Penicillium* sp. C2-06 strain.

Strain No.	N.T.G.			Strain No.	N.M.U.		
	O.D.Bl. = 0.05	Moist. (%)	Activ-ity (u/g)		O.D.Bl. = 0.04	Moist. (%)	Activ-ity (u/g)
<i>Penicillium</i> sp. C4-41	0.435	57	981	<i>Penicillium</i> sp. C5-01	0.35	58	809
-42	0.414	57	928	-02	0.385	58	900
-43	0.408	58	934	-03	0.390	59	936
-44	0.395	58	848	-04	0.380	56	847
-45	0.420	59	990	-05	0.400	54	857
-46	0.385	59	896	-06	0.420	60	1042
-47	0.430	60	1042	-07	0.395	58	926
-48	0.400	57	893	-08	0.385	58	900
-49	0.410	56	896	-09	0.370	58	861
-50	0.300	51	559	-10	0.380	58	887
-51	0.320	57	688	-11	0.383	60	940
-52	0.365	57.5	812	-12	0.405	59	976
-53	0.330	56	698	-13	0.455	60	1138
-54	0.385	58	874	-14	0.380	57	866
-55	0.360	58	809	-15	0.415	59	1003
-56	0.418	58	960	-16	0.405	57	931
-57	0.410	58	939	-17	0.375	59	923
-58	0.390	58	887	-18	0.413	59	998
-59	0.345	59	789	-19	0.385	59	922
-60	0.380	57	841	-20	0.405	60	1000

Table V. Activity variation of the 3rd N.T.G. treatment for *Penicillium* sp. C2-06 strain.

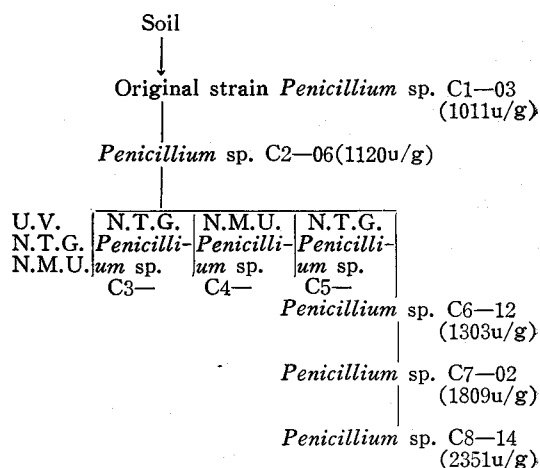
Strain No.	O.D. Bl=0.039	Moisture in Koji (%)	Activity (u/g)
<i>Penicillium</i> sp. C6-01	0.183	60	855
-02	0.1905	60	900
-03	0.1985	60	947
-04	0.169	59	753
-05	0.1915	59	886
-06	0.170	61	907
-07	0.177	60	819
-08	0.188	60	885
-09	0.195	60	929
-10	0.222	60	1086
-11	0.197	60	944
-12	0.250	60	1303
-13	0.148	60	506
-14	0.190	61	1029
-15	0.161	60	724
-16	0.215	60	1045
-17	0.1925	58	868
-18	0.1825	59	831
-19	0.226	60	1110
-20	0.155	60	688
-21	0.2035	61	1002
-22	0.1425	58	585
-23	0.1365	59	565
-24	0.1725	58	755
-25	0.1915	62	928

이에서 U.V.는 Blank와 대차없어 역가의 변동에 영향을 크게 주지 못하는 것으로 간주하여 N.T.G. 및 N.M.U.에 역점을 두었다. *Penicillium* sp. C2-06 株에 대한 2次 N.T.G. 및 N.M.U.처리 결과(Table IV)에서 포자의 생성이 없는 것이 (*Penicillium* sp. C4-50)나타났으나 역가 면에서 너무 뒤지고 있었으며 N.M.U.가 변이 유기체로서는 N.T.G.에 뒤지는 경향이 있어 N.T.G.만을 중점 사용했다.

그 결과 1303u/g의 *Penicillium* sp. C6-12를 얻었으며(Table V), 이를 다시 단포자 분리하여 Table VI.와 같은 결과를 얻었으나 代가 이행됨에 따라 심한 역가 변동이 있었으며 이는 포자의 출현 여부와

관계가 있었다. 포자가 많은 것은 역가가 저조했고, 균사가 많은 것은 역가가 높았으며, 이중 비교적 안정된 *Penicillium* sp. C7-02를 原株로 한 단포자 분리를 하여 Table VII과 같은 결과를 얻었으며 이것은 포자가 거의 없었고,

이를 再試한 결과(Table VII)도 배양수분에 관계한 인자를 고려하면 전과 거의 비슷한 역가선율 유지하는 안정성을 보인점을 고려하여 저 역가의 주 요인인 다포자 인자가 제거된 것으로 사료되며, 이 株 (*Penicillium* sp. C8-14)를 얻기까지의 분리계통을 총괄하면 다음과 같다.



Scheme I. Isolation of *Penicillium* sp.

결론

1. 광능지구의 토양을 黴배지에 직접 접종하여 이에 적응성 있는 *Penicillium* sp. C1-03 株(역가 : 1011u/g)를 분리했다.

2. *Penicillium* sp. C1-03에 대한 U.V., N.T.G., N.M.U.등의 변이체 처리결과 N.T.G.가 가장 효과적이었으며, cellulase 역가 1303u/g인 *Penicillium* sp. C6-12를 얻었으며, 이를 단포자분리하여 포자가 거의 없는 *Penicillium* sp. C8-14(역가 2351u/g) 株를 분리했다.

끝으로 本稿작성에 많은 도움을 주신 서울 대학교 약학대학 김병각 교수님께 심심한 사의를 포함합니다.

Table VI. Results of the mono-spore isolation with the *Penicillium* sp. C6-12 and F₁, F₂ activity of the selected strain.

Strain No.	Original strain			Strains of 2 nd generation			Strains of 3 rd generation		
	O.D. B=0.085	Moist. (%)	Act. (u/g)	O.D. B=0.08	Moist. (%)	Act. (u/g)	O.D. B=0.07	Moist. (%)	Act. (u/g)
<i>Penicillium</i> sp.									
C7-01	0.7125	55.5	1391	0.32	63	640			
-02	0.695	58	1433	0.74	64	1809	0.4275	63	1147
-03	0.725	58	1503	0.30	63	587			
-04	0.725	57.5	1486	0.295	64	589	0.2975	62	711
-05	0.630	57	1200	0.332	63	673			
-06	0.585	56	1121	0.270	63	507			
-07	0.640	58	1304	0.245	63	494			
-08	0.580	54.5	1073	0.2975	63	580			
-09	0.60	56.5	1168	0.270	63	507			
-10	0.565	54	1029	0.220	64	384			
-11	0.55	56	1043	0.335	63	680			

Table VII. Results of the mono-spore isolation with the *Penicillium* sp. C7-02 and second test of the selected strain.

Strain No.	1 st Experiment				2 nd Experiment		
	O.D. B=0.11	Moist.(%)	Act.(u/g)	Spore	O.D. B=0.00	Moist.(%)	Act.(u/g)
<i>Penicillium</i> sp.							
C8-01	0.435	61	1883	+			
-02	0.4275	62	1794	+			
-03	0.155	62	269	‡			
-04	0.50	61	2260	+	0.2305	67	1799
-05	0.425	61	1851	+			
-06	0.490	62	2261	+	0.225	68	1791
-07	0.475	63	2228	+			
-08	0.195	61	493	‡			
-09	0.205	63	580	‡			
-10	0.4675	63	2183	+			
-11	0.490	63	2347	+	0.221	68	1780
-12	0.2125	63	626	‡			
-13	0.465	62	2111	+	0.237	67	1850
-14	0.495	63	2351	+	0.2375	67	1854
-15	0.225	62	684	‡			
-16	0.270	62	951	‡			
-17	0.435	63	1985	+			
-18	0.190	61	463	‡			
-19	0.190	62	476	‡			

References

- Chandrasekaran, A. and M.S. Shanthamma (1969): A new technique for the economic production of cellulase, *J. Food Sci. Technol.* **6**: 12.
- 張大雄(1965): Cellulase에 관한 연구(第一報)糸狀菌의 分維 및 cellulase 活性에 미치는 pH, 온도의 영향, 醱協誌, *Jap.* **23**: 8.
- 鄭東孝(1971): *Myriococcum albomyces*에 있어서 cellulase 유도생성에 관한 연구, *Kor. J. Food Sci. Tech.* **3**: 1.
- Kislitsyna, V.P. and K.A. Kozlov(1968): The effects of various nitrogen and carbon nutrient sources on the accumulation of cellulases by microorganisms isolated from soils of Eastern Siberia, *Prikladnaya Biokhimiya Mick.* **4**: 97.
- 松村 親(1965): *Aspergillus Saito*; 生産するセルロース 分解酵素 の 研究(第5報) 셀로로스分解酵素生産における 培養條件, 醱工, **43**: 275.
- 微生物學 핸드ブック(技報堂)(1964): 3版 p.12 25.
- Nelson, N.(1944): A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**: 375.
- Raper, K.B. and D.I. Fennel(1965): *The genus Aspergillus*, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Raper, K.B. and C. Thom(1949): *A manual of the Penicillia*, The Williams and Wilkins Co, Baltimore.
- Reese, E.T. and H.S. Levinson(1952): A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms *Physiol. Plantarum* **5**: 345.
- Somogyi, M.(1952): Notes on sugar determination, *J. Biol. Chem.* **195**: 19.
- Somogyi, M.(1945): A new reagent for the determination of sugars, *J. Biol. Chem.* **160**: 61.
- Thom, C. and K.B. Raper(1945): *A manual of the Aspergilli*, The Williams and Wilkins. Co, Baltimore.
- 東京大學農學部農藝化學教室(1960): 實驗農藝化學(朝倉書店), p.186.
- 友田宣孝, 坂口謹一郎(1964): 抗生物質醫藥品(共立出版), p.4.
- 雨村明倫(1965): 糸狀菌の 生産する 셀라제에 關する 研究(第一報) 페니실리움 셀라제의 바르브 纖維에 對する 作用에 について, 醱工, **43**: 275.