

*Trichosporon*의 CMCase 활성에 관하여

全 順 培 · 朴 宗 榮

(全南大學校 文理科大學 生物學科)

—On the CMCase Activity from Two Species of *Trichosporon*—

Chun, Soon Bai and Park Jong Young

(Dept. of Biology, Chonnam National University)

ABSTRACT

Dennis (1972) reported that *Trichosporon cutaneum* FRI-425 from the petioles of *Rheum rhamponiticum* var. had showed the cellulolytic activity. Chun (1977) also suggested that *Trichosporon pullulans* 225 isolated from the saline water of the Yeoung San River had a similar properties. However, the assay conditions for enzyme activity were not yet investigated. Thus, the present work was undertaken to examine some conditions for CMCase activity and at the same time to compare the activities of crude enzyme produced from above two species of *Trichosporon pullulans*.

The results are as follows;

1. The maximum production of total reducing sugar by crude enzyme of *Tr. pullulans* was after 30 minutes, whereas that of *Tr. cutaneum* FRI-425 was after 90 minutes. This fact showed that the reaction velocity of enzyme from *Tr. pullulans* 225 was more faster than that of *Tr. cutaneum* FRI-425.
2. Two species showed a similar trend to increase the production of reducing sugar in proportion to the increment in substrate concentration and to arrive at maximum level at 1mg/ml of substrate concentration.
However, *Tr. pullulans* 225 produced more 50ug of reducing sugar compared to *Tr. cutaneum*.
3. The optimum PH for CMCase activity is 5.0 for *Tr. pullulans* 225 as well as *Tr. cutaneum* FRI-425, and PH stability lie within the range of 6 and 8. In the activity and stability of enzyme on PH changes, enzyme of *Tr. cutaneum* FRI-425 was more unstable than that of *Tr. pullulans* 225.
4. The optimum temperature for CMCase activity was 40°C, and enzyme activity from *Tr. pullulans* 225 was more sensitive to temperature changes compared with that of *Tr. cutaneum*. The heat stability was within 40°C, but that was rapidly decreased above 40°C.

In comparison of the heat stability for enzyme of *Tr. cutaneum* FRI-425 with that of *Tr. pullulans* 225 at the same temperature of 80°C, the former was some 10 percent more stable than the latter.

緒 論

纖維素는 자연계에 존재한 가장 풍부한 有機化合物로 微生物에 의하여 분해되고 있으므로 微生物이 분비한 Cellulase의 種類도 多樣하다 (Mander: 1974). 곰팡이類와 細菌類에는 纖維素分解能이 우수한 菌種이 分離되어 왔고 현재에는 섬유소 분해효소 생산과 여러가지 種類의 纖維素 및 纖維素 폐기물에 대한 효소적 糖化方法 등 많은 연구가 진행되고 있다. (Mandels et al: 1974) 그러나 효모류에는 섬유소분해능이 없을 뿐만 아니라 (Ingram: 1958), 약간의 活性이 있더라도 *Trichoderma viride*의 그것보다 1/30 정도 밖에 되지 않는다고 한다. (Dennis: 1973) 그러나 곰팡이類나 細菌類등을 이용할 수 없는 특수한 조건하에서는 酵母類를 이용할 수 있기 때문에 보다 活性이 좋은 菌種을 찾아내는 것도 흥미로운 課題일 것이다. 그런데 Dennis(1972)가 분리한 酵母類中 *Trichosporon cutaneum* FRI-425가 섬유소분해능이 가장 좋다고 보고한 바 있는데 효소활성의 生理的 特性이 규명되어 있지 않다. 따라서 本人은 *Tr. cutaneum* FRI-425와 *Tr. pullulans* 225 (全: 1977)의 CMCase에 대한 몇가지 효소 활성조건을 조사하여 약간의 결과를 얻었기에 이에 보고한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

Tr. cutaneum FRI-425는 Norway 식품연구소 Dennis(1972)로부터 입수했고, *Tr. pullulans* 225는 全(1977)이 영산강 중류 수역에서 분리 보관한 균주를 使用하였다.

2. CMCase 조제

Park(1973)의 基本無機鹽類 배지에 1% CMC 용액을 만들어 200ml들이 flask에 100ml씩 넣고 autoclave속에서 15lb에서 15분간 멸균한 배지에 菌을 接種하여 7일간 20°C에서 배양시킨 후 원심분리기(Hitach: 65~94) 5000rpm 4°C에서 30분간 원심분리 시킨후 상층액을 취하여 粗酵素로 使用하였다.

3. CMCase 定量

粗酵素의 活性은 기질인 CMC를 NaOH/succinate buffer(pH 5.0)에 0.1%로 하여 8ml와 조효소 2ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 반응시킨 다음 1ml를 취해 총환원당량을 Somogyi-Nelson(1952) 法으로 定量하였다,

단백질량은 粗酵素를 24시간 40°C에서 투석시킨 후 Lowry(1951)의 Folin-phenol法에 의해 定量했으며, standard로 bovine serum albumine을 使用하였다.

4. 反應時間에 따른 酵素活性

粗酵素 2ml와 0.1% CMC 8ml를 혼합하여 pH 5.0, 40°C에서 각기 30分, 60分, 90分, 120分간 反應시켜 시간별 총 환원당량을 측정했다.

5. 基質濃도에 따른 酵素活性

粗酵素 2ml와 CMC 1mg/ml, 0.8mg/ml, 0.5mg/ml, 0.3mg/ml의 각 기질농도 8ml를 혼합하여 pH5, 4°C에서 30분간 반응시켜 각 농도별 총 환원당량을 測定했다.

6. 最適活性 pH와 安定 pH

1) pH영향

粗酵素 2ml와 각기 pH3,4(Citrate buffer), 5(NaOH/succinate buffer), 7(phosphate buffer), 10(Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer)에 0.1% CMC 8ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 반응시킨 후 생성되는 총 환원당량으로 측정하였다.

2) pH安定性

pH安定性은 pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10의 완충용액 2ml에 각각 조효소 2ml를 넣어 3시간동안 방치해 둔 다음 조효소완충혼합액 2ml와 0.1% CMC 8ml를 혼합하여 40°C, pH 5에서 30분간 반응시킨 다음 생성되는 환원당량으로 상대잔존활성을 측정하였다.

7. 最適溫度와 熱安定性

1) 最適온도

조효소 2ml와 0.1% CMC 8ml를 혼합하여 20°C, 30°C, 40°C, 60°C, 80°C에서 30분간 반응시켜 총 환원당량을 측정하여 온도에 대한 상대효소활성도를 조사하였다.

2) 열안정성

각기 30°C, 40°C, 60°C, 80°C에서 조효소를 한시간 동안 방치한 후 조효소 2ml를 취해 0.1%

CMC 8ml와 혼합하여, pH 5.0, 40°C에서 30분간 반응시킨 후 방치온도별 조효소의 상대잔존활성을 조사하였다.

結果 및 考察

1. 酵素의 定量

Tr. Pullulans 225와 *Tr. cutaneum*의 조효소활성을 비교해 보면 반응시킨 30분후에 *Tr. pullulans* 225는 총환원당량이 170 μ g/ml만큼 생성되었고 *Tr. cutaneum*은 118 μ g/ml 생성되었다. 앞으로 조효소 정제를 통한 정확한 효소활성의 정도를 비교하여야 하겠지만 본 실험의 결과로써는 *Tr. cutaneum*보다 *Tr. pullulans* 225 섬유소분해능이 더 좋은것 같다.

한편 Dennis(1972)는 *Tr. cutaneum*을 가지고 filter paper에 培養시켜 복합섬유분해효소(C₁+Cx)를 생성했었는데, 그중 CMCase는 2시간에 총환원당량이 4 μ g/ml이 생성되었다고 보고한 바 있다. 그런데 그는 섬유소원으로 filter paper를 사용했고 본인은 CMC를 사용하였다는 기질상에 차가 있었지만 CMCase 활성만을 비교해보더라도 *Tr. cutaneum* FRI-425보다 *Tr. Pullulans* 225가 더 좋다고 볼 수 있었다.

2. 時間別 酵素의 反應速度

Fig. 1에서 본바와 같이 *Tr. Pullulans* 225가 30분시에 총환원당량의 생성이 최대치에 달했고 *Tr. cutaneum*은 90분때에 최대치에 달했다. 이와같은 차이는 두種 酵素 特性의 차이에 기인한 것 같다. 한편 成(1969)과 李(1976) 등은 *Tricho-*

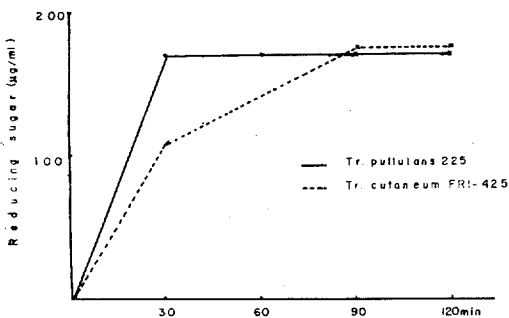


Fig. 1. Effect of reaction time on CMCase activity. Incubation at pH 5.0 and temp 40°C.

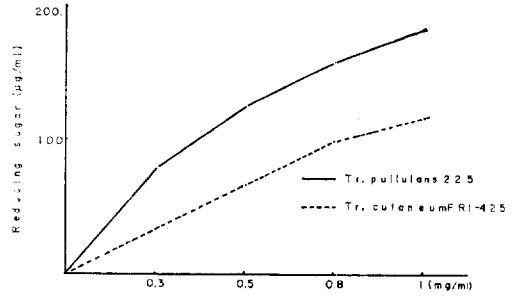


Fig. 2. Effect of CMC concentration on CMCase activity. Incubation at pH 5.0 and temp. 40°C for 30min.

*derma viride*와 *Aspergillus niger*에서 60에 最大値에 到達된다고 報告한바 있다. 上記 곰팡이 類와 比較해보면 *Tr. Pullulans* 225는 빠르게 *Tr. cutaneum*은 더 느리게 最大値에 到達됨을 알 수 있었다.

3. 基質濃度에 따른 영향

Fig. 2에서 본바와 같이 基質濃度가 증가함에 따라 비례하여 總환원당량이 증가하여 基質濃度/mg/ml에서 最大値에 到達하였다. 각 基質濃度에서 보면 약 50 μ g/ml 만큼씩 *Tr. pullulans* 225가 *Tr. Cutaneum*보다 환원당량이 增加함을 보아 *Tr. Pullulans* 225가 보다 纖維素 分解能이 좋은것 같다. 한편 李(1976)는 *Trichoderma viride*에서 총환원당량이 30分間에 1.9mg/ml가, *Aspergillus niger*는 1.2mg/ml이 생성되었다고 報告한 바 있다. *Tr. Pullulans*의 總환원당량을 *T. viride*에 비해 11배 *A. niger*에 대해서는 7배만큼 낮았고, 또한 *Tr. cutaneum*의 경우에서 보면 *Tr. viride*에 비해 15.0배, *A. niger*에 대해서는 10.5배만큼 낮았다. 이와같이 *Tr. pullulans* 225와 *Tr. cutaneum*이 纖維素 分解에서 곰팡이 類보다 活性이 낮지만 Dennis(1972)가 지적한 바와같이 酵母類에서도 纖維素 分解能이 存在함은 分類學的인 意義가 있다고 볼 수 있다.

4. pH의 變化에 따른 酵素活性

Fig. 3에서 본바와 같이 最適活性 pH는 5.0이며 酸性쪽에 치우치며, pH 5를 中心으로 볼때 *Tr. pullulans* 225는 *Tr. Cutaneum*에 비해 pH 變化에 따른 酵素活性의 變化폭이 낮았다. 그러

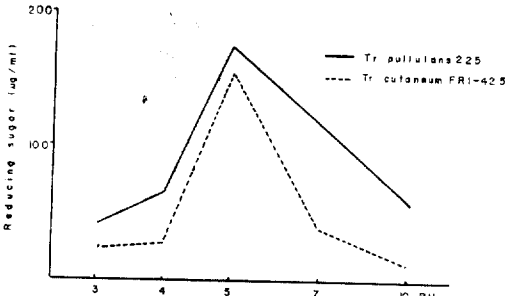


Fig. 3. Effect of pH on CMCase activity. Reaction mixture consisted of 2ml crude enzyme plus 8ml of 0.1% CMC in different buffer pH. Incubation at 40°C for 30min.

므로 *Tr. pullulans* 225가 *Tr. cutaneum*에 비해 pH변화에 따른 효소활성의 영향이 덜 민감함을 알 수 있었다. 한편 T.M. Wood(1968)는 *Trichoderma Konigii*에서最適活性 pH가 5.5였다고 報告한 바 있고 Tomizo(1965), 李(1976), 成(1969) 등은 *Trichoderma viride*에서는 4~4.5였다고 하였고 洪(1976)은 *Aspergillus niger*에서 4.8이었다고 報告한 바 있다. 이들 곰팡이류의 CMCase는最適活性 pH가 酸性쪽에 存在하는데 본 實驗에서도 이들의 結果와 거의 一致하고 있었다. 그런데 King과 Smibert(1963)는 CMCase의最適活性 pH가 낮은 이유를 CMC의 陰ionic性質에 기인한다고 報告한 바 있는데 본 實驗의 두 酵母類에서도 곰팡이類의 경우와 비슷한 結果일 것

으로 보여진다.

5. pH 安定性

各 pH緩衝溶液에 방치한 粗酵素의 殘存活性의 程度를 측정한 結果는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 본바와 같이 最大安定 pH는 7.0이었고, 두 菌株 다같이 pH 6~8까지는 대체로 安定하였는데, *Tr. pullulans* 225는 *Tr. cutaneum*보다 變化幅이 적었다. 따라서 *Tr. pullulans* 225는 *Tr. cutaneum*보다 더 pH變化에 安定함을 알 수 있었다. 李(1976)는 *Trichoderma viride*에서 pH安定範圍가 3.5~6.5였고 *Aspergillus niger*에서는 2.8~6.5에서 安定하다는 報告를 한 바 있다. 이들 곰팡이類와 위 두 酵母類와는 pH安定에서 약간의 差異가 있음을 알 수 있었다.

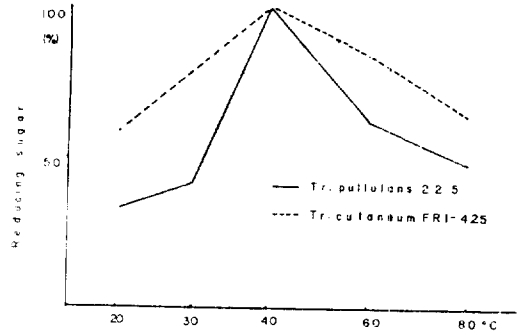


Fig. 5. Effect of reaction temperature on CMCase activity. The reaction mixture consisted of 2ml crude enzyme plus 8ml of 0.1% CMC. Incubation at pH 5.0 for 30min.

6. 溫度變化에 따른 효소활성

Fig. 5에서 본바와 같이 *Tr. pullulans* 225와 *Tr. cutaneum* 두 균주 다같이 40°C에最適活性을 보여주었다. 그런데 *Tr. cutaneum*이 *Tr. pullulans* 225보다 溫度變化에 따른 효소활성의 變化幅이 적었는데 이는 *Tr. cutaneum*이 *Tr. pullulans* 225보다 溫度變化에 따른 효소활성이 덜 민감함을 알 수 있었다. 한편 最適活性溫度를 洪(1976)은 *Trichoderma Konigii*에서와 *Aspergillus niger*에서 同一하게 50°C, 成(1969)는 *Trichoderma viride*에서 50°C~60°C였다고 報告한 바 있는데 *Tr. pullulans* 225와 *Tr. cutaneum*은 各各 40°C가最適活性溫度로서 이들 곰팡이類에 비해 10°C정도 낮다는 것을 알 수

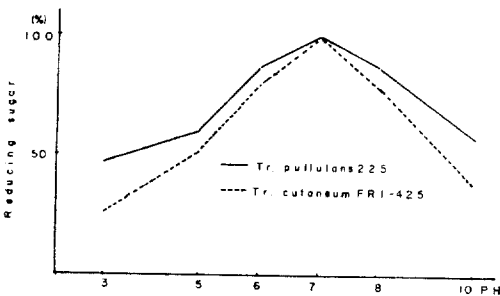


Fig. 4. pH stability of CMCase activity. After crude enzyme of two species were standing at different buffer pH for 3hrs, total reducing sugar was determined. Incubation at pH 5.0 and 40°C for 30 min.

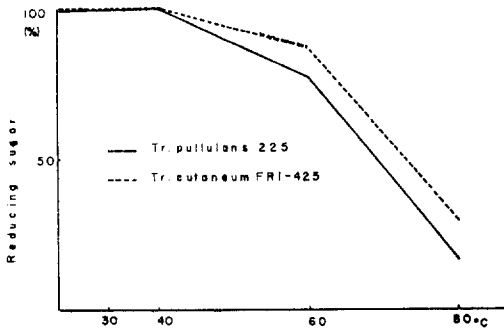


Fig. 6. Heat stability of CMCase.

After crude enzyme of two species were standing for 1hr. at each temp. total reducing sugar were estimated. Incubation at pH 5.0 and temp 40°C for 30min.

있었다. 이것은 아마 *Tr. pullulans* 225와 *Tr. cutaneum*이 낮은 온도(20°C)에서最適生長에 기인된 듯 하다.

摘 要

Dennis(1972)는 대황의 葉柄으로부터 分離한 *Tr. cutaneum* FRI-425가 纖維素 分解活性이 좋다고 報告한 바 있고, 全(1977)이 榮山江 中流水域에서 分離한 *Tr. pullulans* 225도 纖維素 分解能이 있다고 하였으나 이들 酵素에 對한 生理的 特性을 규명한 바 없어 本實驗에서는 CMCase에 對한 몇가지 生理的 特性을 比較조사 하였다. 그 結果는 다음과 같다.

1. *Tr. Pullulans* 225의 粗酵素에 의해 總환원당의 最大生産은 30分 後였고, *Tr. cutaneum* FRI-425의 그것은 90分 後였다. 이런 사실은 *Tr. Pullulans* 225의 酵素反應速度가 *Tr. cutaneum* FRI-425의 그것 보다 빠르다는 것을 보여준다.
2. 두균주는 基質濃度에 비례하여 환원당 生成이 증가하는 경향이 비슷했고 基質濃度 1mg/ml에 最高值에 到達함을 보였다. 그러나 *Tr. pullulans* 225는 *Tr. cutaneum*보다 약 50μg의 환원당을 더 많이 生成했다.
3. CMCase 活性을 위한 最適活性 pH는 두균주 다같이 5.0이었고, pH안정성은 6~8내에 들었다. 그러나 pH變化에서 酵素는 *Tr. cutaneum*의 그것보다 變化幅이 적었다.
4. CMCase 活性에 對한 最適活性溫度는 40°C였고 *Tr. pullulans* 225의 酵素活性은 *Tr. cutaneum*의 그것에 비해 溫度變化에 보다 민감하였다. 熱안정성은 40°C 이내였고, 40°C이상 溫度에서는 급하게 감소했다. 80°C에서 *Tr. cutaneum*의 酵素와 *Tr. pullulans* 225의 그것과 熱안정성을 比較해 볼때 前者는 後者보다 10% 더 安定하였다.

REFERENCE

1. Bland S. Mantencort and E. Eveleigh Donglas, 1977, Semiquantitative plate Assay for Determination of Cellulase production by *Trichoderma viride* Applied and Environmental Jan. p.178~

7. 熱안정성

Fig. 6에서 본바와 같이 各溫度에서 한 時間 방치한 酵素活性은 40°C이내에서는 두균주 다같이 安定하였고, 그 以上の 溫度에서는 不安定했다. 80°C에서는 *Tr. cutaneum*의 殘存活性이 25%였고, *Tr. pullulans* 225는 15%였다. 그러므로 前者가 後者보다 더 安定함을 알 수 있었다. 한편 李(1976)는 *Trichoderma viride*에서 分離한 CMCase가 40°C에서 60分間 방치한 것이 100%의 活性을 60°C에서는 75%, 80°C에서는 8% 정도의 殘存活性을 보였다고 報告한 바 있었는데 이 곰팡이의 CMCase와 이 두 酵母類의 그것과 比較해 보면 60°C 부근에서는 비슷한 減少를 보였으나 80°C에서는 약 10% 정도 차이가 있었다. 따라서 熱에 對한 酵素의 活性이 위 두 酵母類가 위 곰팡이類보다 高溫에서 安定성이 있음을 알 수 있었다.

183.

2. Chun S.B. 1977: Ecological Studies on Yeasts in the water of the Yeoung San River Estuary. Thesis ph. D. Chonnam National University.
3. Dennis. C. 1972, "Breakdown of cellulose by Yeast species". *Journal of General Microbiology*, 71, 409~411.

4. Hong. S.W *et al.*, 1976, "Isolation of cellulolytic Microorganisms and their physiological Characteristics", *Kor. Jour. microbiol.* **4**, 17~24.
5. Ingram, M. 1958, "In Chemistry & Biology of Yeast", p.603, Edited by A.H. Cook London & New York Academic press.
6. King K.W. & R.M. Smibert, 1963, *Appl. Microbiol.* **11**, 315.
7. Luh. B.S. & M.J. Phaff, 1951, "Studies on poligalacturonase of Certain Yeasts" *Achieves of Biochemistry and Biophysics*, **33**, 212~227.
8. Lowry' O.H., J.N. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Rahdall, 1951, Protein Measurement with to Folin-phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, **13**, 265~275.
9. Lee, K.H, Ko. J.S, Lee. K.H, 1976, "On the Characteristics of cellulose by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*", *J. Korean Agricultural Chemistrhy.* Vol. **10**.
10. Mandels M.: H. Lloyd & J. Nystran. 1974, "Enzymatic Hydrolysis of waste cellulose", *Biotechnology and Bioengineering* Vol. XVI. 1471~1493.
11. Mastasmura C & Maejimak, 1963, *Femt. Technol.* **46**, 154.
12. Nelson. N.C. 1944, *J. Biol. Chem.*, **153**, 376.
13. Park. D, 1973 "A Modified medium for isolation and Enumeration of Cellulose-decomposing Fungi" *Trans Brmycol So(604)* printed in Great Britain.
14. Sung. Li. K., 1969, "On the properties of Crude Cellulase produced by *Trichoderma viride*" *J. Korean Agricultrnal Chemical Soc.*, Vol. **10**.
15. Somogy. M. 1952, *J. Biol, Chem.*, **153**, 376.
16. Tomizo Niwa & Kenji Kawamura 1965, "Fractionation and some properties of Cellulase-Components in Meicelase, a Cullulase preparation form *Trichoderma viride*"
17. Wood. T.M. 1968, "Cellulolytic Enzyme System of *Trichoderma Konigii*" *Biochem. J.* printed in Great Britain.