

Cellulose 분해효소를 분비하는 *Trichoderma* sp. C-4 균주의 분리 및 특성

손영준 · 설옥주 · 정대균¹ · 한인섭 · 최윤재² · 정춘수*
울산대학교 미생물학과, ¹경희대학교 유전공학과 및 유전공학연구소,
²서울대학교 동물자원학과

Isolation and Characterization of *Trichoderma* sp. C-4 Producing Cellulases. Young-June Son, Ok-Ju Sul, Dae-Kyun Chung¹, In-Seob Han, Yun-Jae Choi² and Choon-Soo Jeong*. Department of Microbiology, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea, ¹Institute and Department of Genetic Engineering, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea, ²Department of Animal Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea - During the screening of cellulase producing microorganisms, a fungal strain C-4 was selected from etiolated leaves. Based on taxonomic studies, the fungus could be classified as a strain of *Trichoderma* sp. When the strain C-4 was cultured in Mandels' media at 28°C for 6 days, the enzyme activities detected in broth were as follows: 8.2 U/ml (28.1 U/mg) of CMCcase activity, 0.75 U/ml (2.58 U/mg) of Avicelase activity, 1.67 U/ml (5.68 U/mg) of β -glucosidase activity. The optimum pH for enzyme induction was 6.2. The crude enzyme retained 100% of its original CMCcase activity at 50°C for 1 hr (pH 5.0), and at 4°C for 24 hrs (pH 5.0). There was no effect on the CMCcase activity in the presence of 1 mM of CsCl, LiCl, MgCl₂ and FeCl₂, respectively. When the crude enzyme was treated with trypsin and chymotrypsin (2% w/w) for 10 minutes, the remaining CMCcase activity was 70%, but there was no further loss of activity for 60 minutes treatment at 30°C. The crude enzyme showed the synergism with rumen fluid for the hydrolysis of Avicel and CMC by 118% and 130%, respectively.

Cellulose는 포도당이 β -1,4-glycosidic 결합으로 이루어진 중합체로서 식물 생체 건조중량의 약 40% 이상을 차지하고 있다. Cellulose분해는 주로 곰팡이와 박테리아가 분비하는 cellulase에 의해 이루어지고 있으며, *Trichoderma reesei*(1-4), *Trichoderma koningii*(5-8), *Sporotrichum pulverulentum*(9-10), *Aspergillus niger*(11), *Irpex lacteus*(12), *Clostridium thermocellum*(13-14), *Thermomonospora fusca* (15) 등의 많은 균주들에 대하여 연구가 이루어지고 있다. Cellulase에 의한 cellulose 분해기작은 sequential mechanism에 의한 상승작용이 관여함이 받아들여지고 있으며, Wood와 Eriksson(16)은 endoglucanase, exoglucanase 및 β -glucosidase가 동시에 존재할 때 이들의 상승작용에 의하여 결정형 cellulose를 분해할 수 있다고 보고하였다. 또한 상승작용은 *T. reesei*의 CBHI(cellobiohydrolase I)과 CBHII와 같이 cellobiohydrolase사이에서도 상승작용이 일어난다고도 보고되었으며(17), *T. koningii*와 *C. thermocellum*과 같이 다른 균주에서 분리된 효소 사이의 상승작용도 보고되었다

(18). 그러나 현재까지 개발된 균주들은 cellulose를 분해하는 속도가 느리기 때문에 새로운 균주의 지속적인 탐색이 요구된다. 반추동물은 cellulase를 분비하는 *Ruminococcus*와 같은 장내 미생물을 이용하여(19) 자연계의 식물체를 energy source로 이용하고 있다. 하지만 현대의 대량 사육되는 가축은 자연계에서 섭취하는 섬유질과는 달리, 옥수수나 곡류와 같이 전분을 많이 함유하는 사료를 섭취함으로써, 장내 pH가 저하되어 장내 cellulase 분비균주의 생육이 억제되고, 소화체계에 많은 장애를 일으키는 것으로 알려졌다(20, 21). 이러한 문제를 해결하기 위해서는 cellulase를 인위적으로 사료에 첨가시키는 것이 좋은 방법의 하나라고 사료된다. 현재, *Aspergillus oryzae* 또는 효모의 배양액을 사료에 첨가하여 고품질의 가축을 사육하고 있는데, 이들 미생물 배양액은 소의 체중을 증가시키고, 사료의 흡수율을 증가시키는 등의 효과를 보이고 있다(22). 그러나, 이들 균주는 cellulose 분해능력이 대단히 약하거나(23), 거의 없다. 따라서 이들 균주에 cellulase를 재조합에 의하여 발현시킨다면 사료의 이용율을 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 기존에 알려져 있는 cellulose 분해 균주들 보다 우수한 균을 탐색하여 이러한 목적에 사용하고자 하였다. 따라서 본 연구에서는 균주를 탐색하고, 탐

*Corresponding author
Tel. 82-522-259-2358, Fax. 82-522-259-2353
E-mail: csjeong@uou.ulsan.ac.kr
Key words: *Trichoderma* sp., Isolation, Identification, Cellulases

색된 균주의 효소가 사료로서 사용될 수 있는지 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

균주의 탐색 및 선별

부식토, 낙엽, 벚짚, 분변토 등을 시험관에 넣고 멸균 생리식염수(0.85 % NaCl) 10 ml을 가하여 vortex mixer로 진탕하고 30분 동안 정지한 후 상등액을 섬유소를 유일 탄소원으로 공급한 배지에[배지-1, Mandels' media; (g·l⁻¹): Avicel, 5.0; carboxymethylcellulose(CMC), 5.0; peptone, 1; urea, 0.3; (NH₄)₂SO₄, 1.4; KH₂PO₄, 2.0; MgSO₄·7H₂O, 0.3; CaCl₂, 0.3; agar 15.0, (mg·l⁻¹): FeSO₄·7H₂O, 5.0; MnSO₄·H₂O, 1.6; ZnSO₄·7H₂O, 1.4; CoCl₂, 2.0 (24), 또는 배지-2; (g·l⁻¹): Avicel, 5.0; CMC, 5.0; yeast extract, 0.5; (NH₄)₂SO₄, 2.5; KH₂PO₄, 2.7; Na₂HPO₄, 5.3; MgSO₄·7H₂O, 0.2; NaCl, 0.2; agar, 15.0 (mg·l⁻¹): CaCl₂, 50.0 (25)] 희석 접종하여 25°C에서 배양하였다. 각 배양접시에서 성장한 균을 각각 분리한 후 새로운 배지의 중앙에 접종하고 bacteria는 3일 후, 곰팡이는 7일 후 Congo red를 사용하여 clear zone의 크기를 측정하였다. Congo red법은 0.1% Congo red를 부은 후 30분 동안 방치하고 1 M NaCl 용액으로 세척하여 시행하였다(26). 위와같은 방법으로 1차 선별된 균주는 액체 배지에서 배양하면서 8일 동안 배양액을 채취하여 CMC (Junsei), Avicel(Fluka), 및 *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(PNPG, Sigma Chem. Co.)를 기질로 사용하여 효소활성을 측정하여 2차 선별을 행하였다.

효소활성 측정

Avicel 및 CMC에 대한 활성을 위하여 0.5%의 Avicel 현탁액(50 mM 초산완충용액, pH 5.0) 또는 0.5% CMC 용액 0.4 ml과 효소용액 0.1 ml을 섞은 반응혼합물을 각각 40°C에서 1시간(Avicel) 또는 15분간(CMC) 반응시켜 Somogyi-Nelson 방법(27)으로 환원당을 측정하였다. 표준반응조건에서 1 μmole min⁻¹의 포도당에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. β-Glucosidase 활성은 50 mM 초산완충용액(pH 5.0)에 녹인 1 mM PNPG 0.4 ml과 효소용액 0.1 ml을 섞어 40°C에서 30분간 반응시킨 후 1 ml의 1 M Na₂CO₃를 가하고 증류수 5 ml로 희석하여 유리된 PNP의 양을 420 nm에서 흡광도로 측정하였다. 표준 반응조건에서 1 μmol min⁻¹의 PNP를 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. 단백질의 정량은 Lowry 등(28)의 방법에 따랐다.

대조균주 및 효소활성 측정

분리된 균의 활성 비교를 위한 대조 균주로는 *Aspergillus terreus* ATCC 52430, *Myrothecium verrucaria* ATCC 9095, *Sporotrichum cellulophilum* ATCC 20494, *Trichoderma reesei* QM9414, *Trichoderma koningii* ATCC 26113, *Irpex lacteus* ATCC 44426 등을 사용하였다. 이들 균주는 배지-1을 사용하여 28°C(*S. cellulophilum*은 37°C)에서 배양하였다.

분리한 균주의 동정

위와 같이 분리한 균주 중에서 효소활성이 가장 우수한 곰팡이로 나타난 C-4의 분류를 위하여 형태학적 특성 및 배양학적 특성 등을 조사하였다(29, 30).

분리균주의 효소유도조건

선별된 균의 효소유도조건을 알아보기 위하여 선별된 균이 가장 높은 활성을 보인 배지-1(Mandels' media)에 대하여 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 각각 3.5, 4.0, 4.4, 5.5, 6.2, 6.5, 7.0, 7.5, 7.8로 조절하여 8일 동안 배양하면서 24시간 간격으로 시료를 채취하여 효소유도 정도를 측정하였다.

분리균주에서 유도된 효소의 효소학적 특성조사

선별된 균주에서 유도된 효소가 조사료서의 가치가 있는지를 확인하기 위하여 배지-1(pH 6.2)에서 6일 동안 배양한 후 배양액을 조효소로 사용하여 아래와 같은 실험을 행하였다: 조효소의 최적온도를 알기 위하여 CMCase, Avicelase, β-glucosidase활성을 30°C 부터 80°C까지(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 10°C 간격으로 측정하였으며, 열안정성 검사를 위하여 조효소를 30°C부터 70°C까지 10°C 간격으로 각각(초산완충용액 pH 5.0, 100 mM) 10-60분 동안 방치한 후 40°C에서 잔여활성을 검사하였다. pH안정성은 조효소를 pH 3.0-8.0의 범위의 완충용액에 5°C에서 24시간 방치하고, 초산완충용액(pH 5.0, 500 mM)를 사용하여 pH 5.0으로 조절한 후 잔여활성을 검사하였다. 금속 및 reducing agent 효과를 알기 위하여 조효소를 최종적으로 1 mM로 조정된 금속용액과 reducing agent용액(pH 5.0 acetate buffer, 100 mM)에 상온에서 1 시간 방치한 후 잔여활성을 측정하였다. Protease 저항성 검사를 위하여 조효소를 인산완충용액(pH 7.8, 50 mM)로 교환하고 여기에 2%(w/w) 되도록 protease(trypsin, chymotrypsin)를 첨가하였다. 상온에서 1시간 방치하면서 5, 10, 30, 60분 간격으로 채취하고 이를 초산완충용액(pH 5.0, 500 mM)에 넣은 후 잔여활성을 측정하였다. 소의 rumen fluid에 대한 안정성 및 rumen fluid내의 cellulase와의 상승작용을 확인하기 위하여 rumen fluid를 추출하여 12,000×g에서 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 조효소와 혼합하

였다. 안정성 검사를 위해서는 rumen fluid와 조효소의 비율을 90:10으로 하였고, 상승효과 분석을 위해서는 rumen fluid를 표준반응조건에서 환원당 생성량이 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되도록 희석하였다. 소의 rumen fluid와의 반응값은 5회 실험의 평균값으로 구하였다.

전기영동 및 활성염색

전기영동은 Davis(31)의 방법을 변형하여 행하였으며 acrylamide 농도는 7.5%(w/v), cross linkage는 2.7%인 slab gel을 사용하였다. 전기영동 후 gel을 500 mM 초산완충용액(pH 5.0)에 10분 동안 담그어 pH를 보정하고 잠시 표면을 건조시킨 후에 0.5% CMC, 1.5% agar를 녹인 gel slab(50 mM, pH 5.0 초산완충용액)과 40°C에서 15분동안 반응시킨 후 Congo red염색으로 CMCCase활성을 갖는 band를 확인하였다(26). 활성염색 후 acrylamide gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. 단백질의 양은 80-100 mU의 CMCCase활성을 갖도록 하였다.

결과 및 고찰

cellulase 분비균주 탐색

Cellulose를 유일 탄소원으로 하는 배지-1, 2에서 분리된 균주 중에서 Congo-red법에 대한 halo-size가 비교적 크게 나타난 6종의 fungi와 6종의 bacteria를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주와 대조균주를 배지-1, 2 broth에서 배양하면서, 8일 동안 매일 1 ml씩 채취하여 CMC, Avicel 및 PNPG와 같은 기질에 대하여 효소활성을 측정하였다. 이와 같은 과정을 거쳐 선별된 균 중에서 가장 높은 활성을 보인 균을 C-4라 명명하였다. Congo-red 법에서 C-4는 배양 5일 후에 직경 9 cm의 배양접시를 모두 덮을 만큼 성장하였으며 배지의 대부분이 NaCl 용액에 의하여 탈색되었기 때문에 환의 크기를 제시할 수 없었다. 액체 배지에서의 배양 결과, 분리균들 중에서 가장 높은 활성을 보인 C-4의 배양일에 따른 효소활성도를 측정한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 C-4는 배지-1(tween 80, 2.0 ml/l; anti-foaming agent 0.5 ml/l 첨가)에서 배양 6일 후 CMCCase 활성이 최고에 달해 8.2 units/ml(28.1 U/mg)을 나타내었고, Avicelase 활성은 0.75 units/ml(2.58 U/mg)을 보였으며, β -glucosidase활성은 1.67 units/ml(5.68 U/mg)을 나타내었다. 대조균의 CMCCase활성은 *S. cellulophilum*, *T. reesei* QM9414에서 비교적 높은 활성을 보였고, Avicelase활성은 *T. reesei* QM9414에서 β -glucosidase 활성에 대해서는 *A. terreus*, *S. cellulophilum* 등의 균에서 비교적 높게 나타났다. 분리한 균주 C-4는 이미 우수 cellulose 분해균으로 알려진 대조균들과 비교할 때 CMCCase,

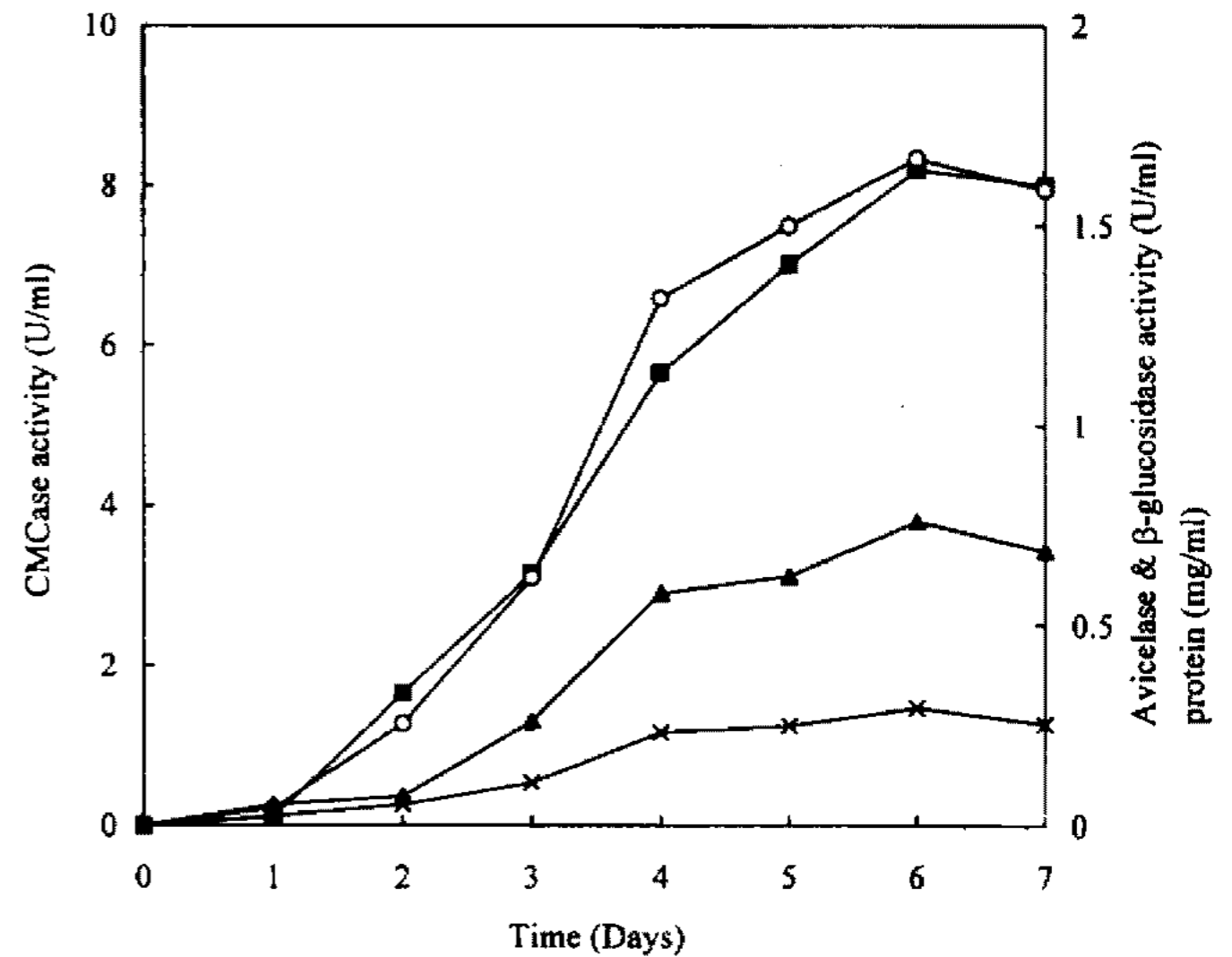


Fig. 1. Cellulase activity of *Trichoderma* sp. C-4 in Mandels' media.

■; CMCCase, ▲; Avicelase, ○; β -glucosidase, × protein.

Avicelase 및 β -glucosidase 활성에서 모두 우수한 것으로 나타났다. 본 실험에서 사용된 대조균 중에서 비교적 높은 활성을 보인 균주들에 대하여는 이미 보고된 바가 있다. CMCCase 활성은 본 실험과 같은 조건에서 *T. reesei* QM9414의 경우 7.8-7.86 U/ml(9.4 U/mg; 32, 33), *S. cellulophilum*의 경우 *T. reesei*의 80%(34)의 활성을 분비한다고 보고되었으며, Avicelase 활성은 *T. reesei*에서 0.37 U/ml(0.44 U/mg; 32), *S. cellulophilum*에서 *T. reesei*의 65%(34)로 보고되었다. β -glucosidase 활성은 *T. reesei*에서 0.09-0.18 U/ml(0.11-0.22 U/mg; 32, 33), *S. cellulophilum*에서 *T. reesei*의 180%, *Thielavia terrestris*에서 *T. reesei*의 375%로 보고된바 있다(34). 이러한 결과는 본 실험에서 대조균으로 배양하면서 측정된 값과 대단히 유사하였다. 특히 C-4 균주는 *Trichoderma* 속의 균들이 일반적으로 갖고 있는 단점 중의 하나인 β -glucosidase활성이 낮다는 점을 극복하고 있기 때문에 이용가능성이 높다고 사료되었다. 대조균 중에서 비교적 효소 활성이 높게 측정된 균의 활성을 *T. reesei*에서 분비된 효소 활성의 상대치로서 Table 1에 나타내었다. 위에서 언급한 바와 같이 배양액 단위 부피당 효소활성도는 대조균에 비하여 약간 높은 정도였으나 Table 1에 제시한 것 처럼 specific activity는 대조균에 비하여 월등히 높았다. 이상의 결과로부터 본 실험에서 분리된 C-4는 대단히 우수한 균주라고 사료되었다.

분리균주의 동정

선발된 균주 C-4의 생육상태는 MEA(malt extract agar) 배지에서 5일(28°C) 배양시 직경이 9 cm인 배양접시를 모두 덮을 만큼 신속하게 생육하였으며, 집락은 배지 표면에 낮고 넓게 흰색 균사체를 형성하였다. 이때

Table 1. Comparison of the cellulase activities of *Trichoderma* sp. C-4 and *Sporotrichum cellulophilum* enzymes compared to those of *Trichoderma reesei* QM9414

Strains	CMCase	Avicelase	β -glucosidase	References
<i>Trichoderma</i> sp. C-4	298	611	2,640	
<i>T. reesei</i>	100	100	100	33,34
<i>S. cellulophilum</i>	85(80)	75(65)	200(180)	34

The enzyme solution of each strain contained 1 mg/ml protein in acetate buffer (100 mM, pH 5.0). When necessary the enzyme solution was diluted to give a maximum 150 μ g/ml reducing sugar liberated at the end of the reaction time. The results are expressed as the percentage of the corresponding activities displayed by *T. reesei* enzymes. The values in parentheses are quoted from the report of Durand (34).

분생자는 주로 margin 부근에 밝고 흐릿한 청록색으로 생성되었으며, 배양이 진행됨에 따라 짙고 어두운 녹색으로 균사체에 불균일하게 분포하였다. 집락의 배면은 옅은 갈색을 나타내었다. 생육 온도는 25-30°C에서 최대였으며, 5°C와 37°C에서는 생육하지 못하였다. 형태적 관찰에 의하면 균사는 격막이 있고, 무색 투명하였다. 분생자병은 분절분지가 많이 되어 있으며 곤봉형을 이루고 크기는 4-5 \times 1.5-2.5 μ m 정도였으며 분생자병의 끝에 몇 개의 분생자가 덩어리로 점착된 형으로 발생하였다. 분생자는 벽이 매끄러운 모양이었고, 색상은 짙은 녹색이었으며 크기는 1.5 μ m 정도였다. 이상의 특성을 근거로 C-4균주는 *Trichoderma* sp.로 동정되었다(29, 30). 한편, *T. reesei* QM9414, *T. koningii* ATCC26113, *T. harzianum* ATCC 32086 등 *Trichoderma* 속에 속하고 이미 우수 cellulase 분비균들로 알려진 균들과 Mandels의 배지에서 7일 동안 배양한 후 분비된 단백질을 전기영동과 CMCase 활성염색에 의하여 비교하였다(Fig. 2). Fig. 2-A에 나타난 바와 같이 C-4에서 분비된 단백질은 전기영동상에서 *T. reesei*나 *T. koningii*에서 분비된 단백질과는 차이를 보이고 있으며, *T. harzianum*에서 분비된 단백질과는 비슷한 위치에 나타나는 단백질과 다른 위치에 나타나는 단백질이 모두 존재하였다. 그러나 Fig. 2-B에 나타난 활성염색은 다른 균주로 부터 유도된 효소와는 상당히 다른 양상으로 나타났다. 이상으로 부터 분리된 C-4는 이들과는 다른 균임을 알 수 있었다.

분리균주의 효소유도조건

Fig. 1에서 제시한 바와 같이 C-4균주는 Mandels 배지에서 높은 활성을 나타내었기 때문에 이 배지에서 효소유도 최적 pH를 알기 위하여 이 배지의 pH를 HCl과 NaOH를 이용하여 각각 3.5, 4.0, 4.5, 5.5, 5.8, 6.2, 6.5, 7.0, 7.5, 7.8로 조절하여 8일 동안 배양하면서 효소 유도

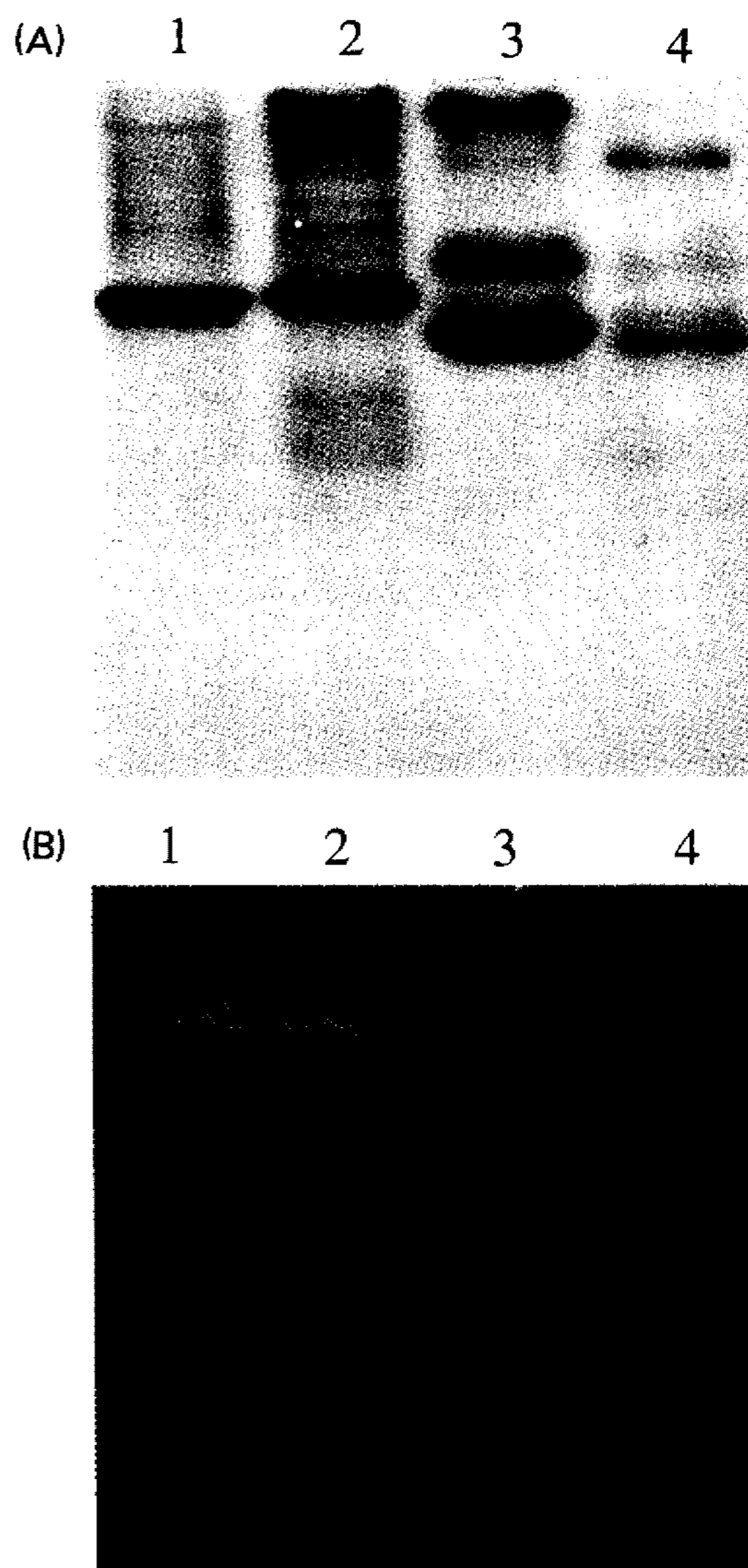


Fig. 2. Comparison of the extracellular proteins induced from *Trichoderma* species on Mandels' media.

(A) Extracellular proteins were analyzed by 7.5% PAGE and were visualized by Coomassie staining. (B) The CMCase activity of the proteins on the gel was detected using Congo-red. Lane 1; *Trichoderma* sp. C-4, 2; *T. harzianum* ATCC 32086, 3; *T. reesei* QM9414, 4; *T. koningii* ATCC 26113.

정도를 측정하였다. Fig. 3에 8일 중 최대의 활성을 보인 6일째의 결과를 제시하였다. C-4 균주는 pH 6.2의 배지에서 최대의 효소유도를 보였고, 대체로 약산성에서 높은 효소유도를 나타내었으며 pH 7.0 이상에서는 효소생산성이 급격히 감소하였다.

효소의 반응 최적조건 및 안정성

조효소는 Fig. 4에 제시한 바와 같이 30°C-60°C의 조건에서(acetate buffer pH 5.0, 100 mM) 비교적 높은 활성을 나타내었고, 최적온도는 50°C로 나타났다. 열안정성에 대한 시험에서 Fig. 5에 제시한 바와 같이 50°C까지는(acetate buffer pH 5.0, 100 mM) 1시간 동안

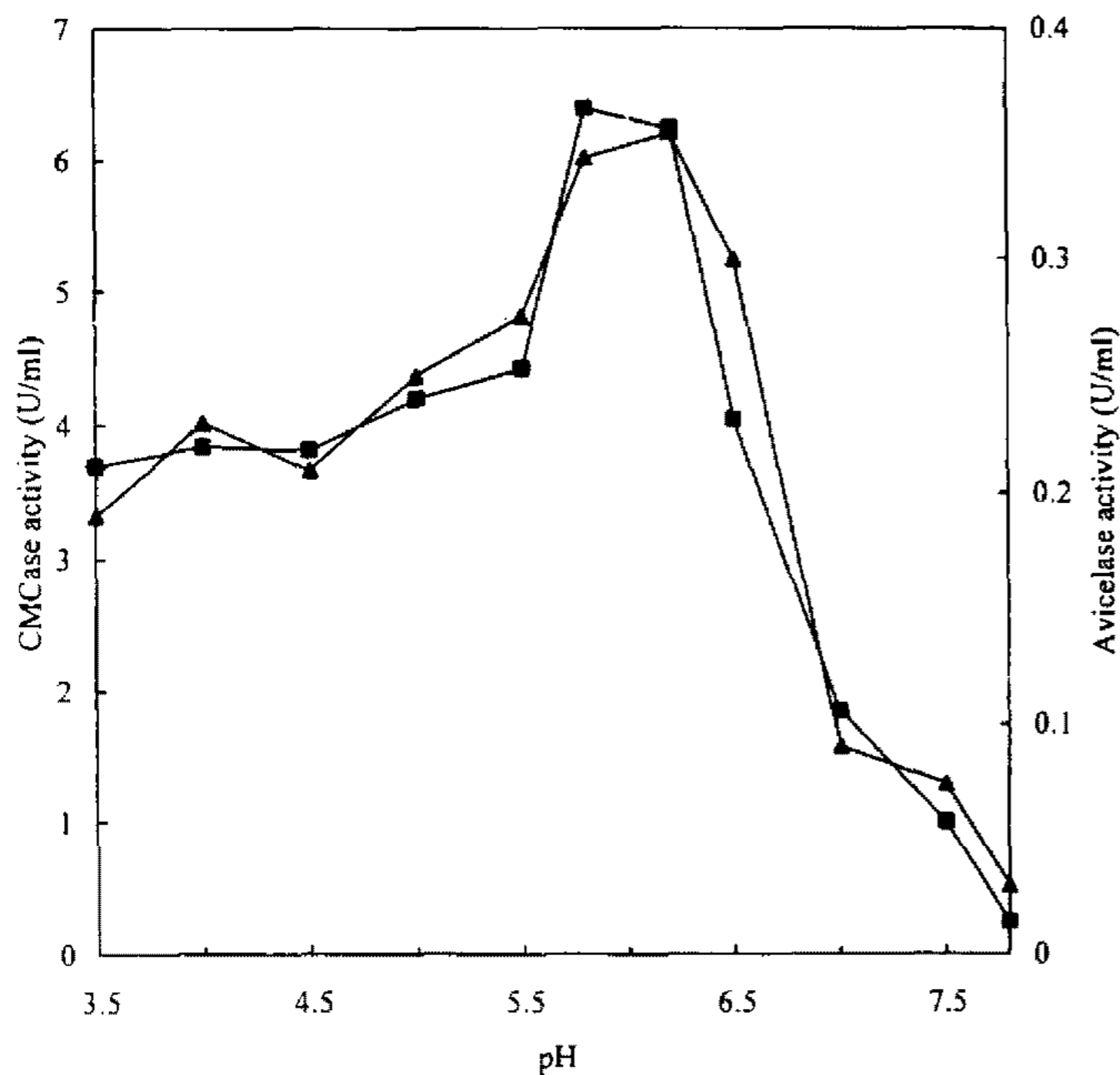


Fig. 3. Effect of initial pH on the induction of cellulase of *Trichoderma* sp. C-4. ■; CMCase, ▲; Avicelase.

CMC에 대한 효소활성을 거의 잃지 않았다. 그러나 60°C에서는 25분 동안 50%의 활성을 상실했으며 70°C에서는 10분 동안 60%의 활성을 상실하였다. 그러나 60-70°C에서 1시간 후에 남은 활성이 20% 정도인 것으로 미루어 대단히 열안정성이 높은 효소가 있을 가능성을 시사하였다. Avicelase와 β -glucosidase 대한 열안정성도 CMCase에 대한 결과와 유사하게 나타났다. 두 종류의 활성 역시 50°C에서는 1시간 동안 전혀 활성을 잃지 않았다. 60°C에서의 효소활성의 반감기는 Avicelase

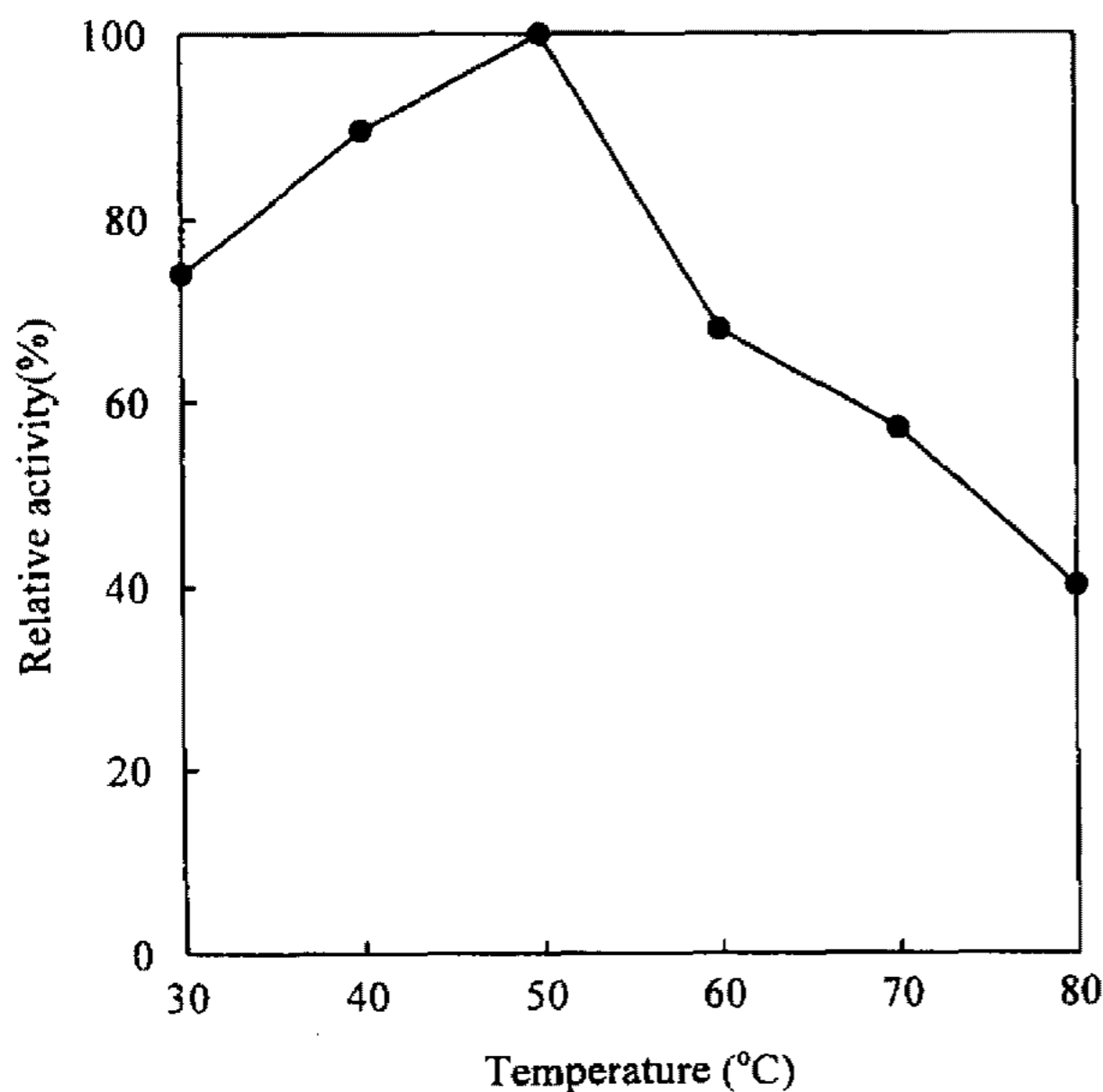


Fig. 4. Optimum temperature of CMCase from *Trichoderma* sp. C-4.

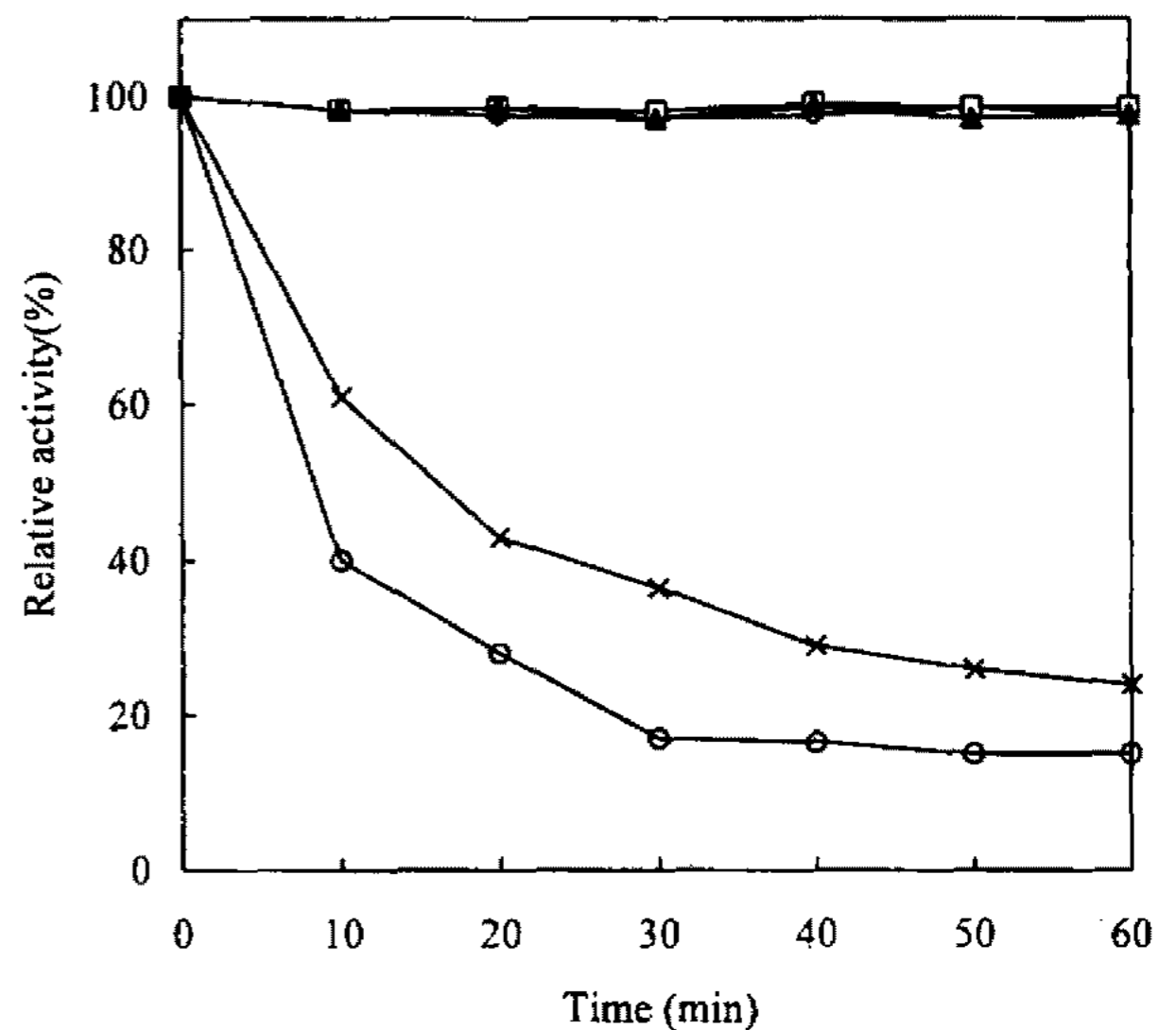


Fig. 5. Effect of temperature on the stability of CMCase from *Trichoderma* sp. C-4.

◇; 30°C, □; 40°C, ▲; 50°C, ×; 60°C, ○; 70°C.

는 10분, β -glucosidase는 25분으로 나타났다. pH 안정성에서 Fig 6에 나타난 것처럼 pH 5.0에서 대단히 안정하였고, pH 4.0-7.0 사이에서 비교적 안정하였다. 조효소를 최종적으로 1 mM로 조정된 금속용액과 reducing agent용액(pH 5.0 acetate buffer, 100 mM)에 상온에서 1시간 방치한 후 잔여활성을 측정하여 Table 2와 같은 결과를 얻었다. 금속이온에 대하여서는 대체로 영향 받지 않았으나 Ca 이온에 대하여서는 1시간 동안에 15%의 활성이 감소되었다. 그러나 시험한 다른 이온에 대해서 전혀 활성의 감소가 없었으므로 조사료로 사용하는데 문제가 없는 것으로 판단되었다. 1 mM로 처리한

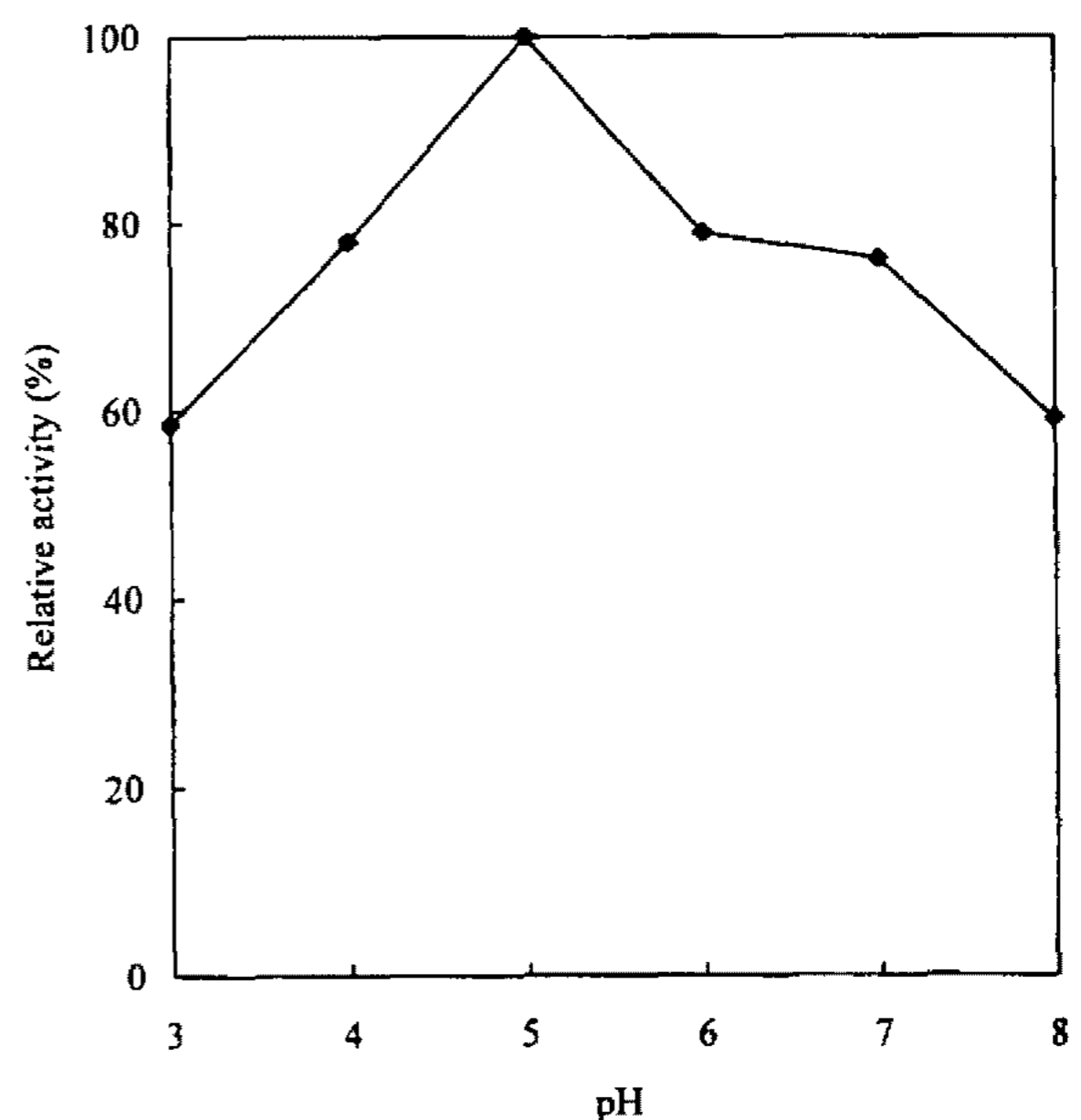


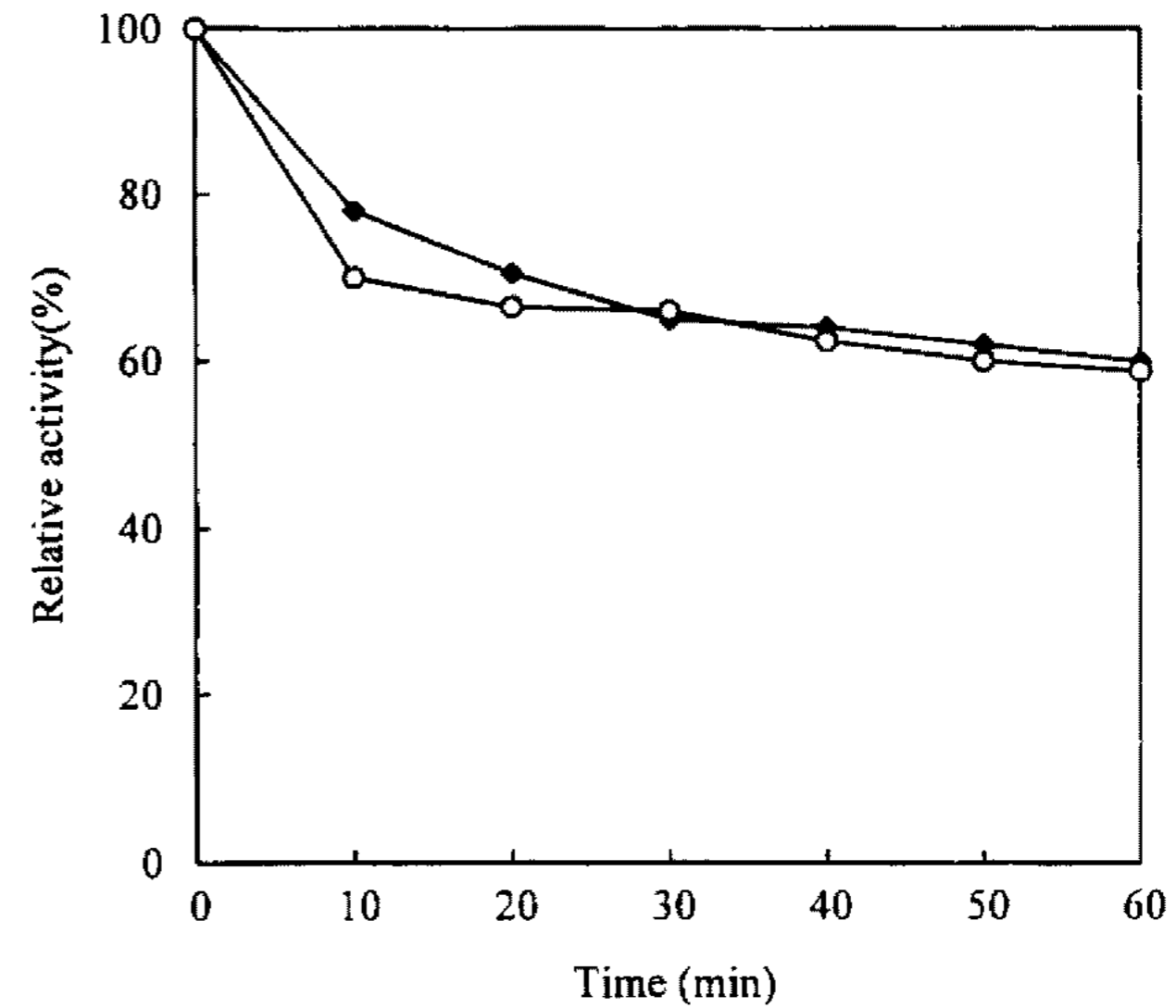
Fig. 6. Effect of pH on the stability of CMCase from *Trichoderma* sp. C-4.

The enzyme was incubated for 24 hrs at 4°C.

Table 2. Effect of metal ions and reducing agents on CMCase activity

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
Metal ions	
CaCl ₂	84.74
CsCl	102.1
LiCl	106.9
MgCl ₂	118.7
CoCl ₂	118.4
FeCl ₂	124.4
Reducing agents	
β-Mercaptoethanol	127.6
Dithiothreitol(DTT)	132.6
EDTA	125.8
L-Ascorbic acid (Vitamin-C)	134.8
Cysteine	126.5

reducing agent는 모두 CMCase활성을 증가시킴을 관찰할 수 있었다. 인산완충용액(pH 7.8, 50 mM)로 교환된 조효소에 2%(w/w)의 protease(trypsin, chymotrypsin)를 첨가하고 상온에서 방치한 결과, 반응 10분 후 protease에 의하여 각각 30% 정도의 CMCase활성을 상실하였으나, 그 후로 1시간 동안 거의 활성의 감소가 없었다(Fig. 7). 이는 C-4균주의 CMCase가 한 종류 이상이고 그 중에서 protease에 대단히 저항성이 높은 효소의 존재를 시사하였다. 또한 이는 조사료로서 가축의 장내에서 오랜 시간 동안 활성을 갖을 것을 시사하였다. 실제로 소의 rumen fluid에 조효소를 섞은 결과 24시간 후에도 90% 정도의 활성을 유지하였다. 즉, 소의 rumen fluid액 0.9 ml에 C-4 조효소 0.1 ml(8.2 U/ml)을 섞고 24시간 동안 37°C에서 방치한 후 잔여활성을 측정하였다. 그 결과 반응초(0 hr)에는 1.28 U/ml의 CMCase 활성을 나타냈으며 24시간 후에는 1.15 U/ml의 CMCase 활성을 나타내었다. 이 결과에서 초기 값이 C-4의 조효소 활성값보다 높게 나타난 것은 rumen fluid 자체에 0.2 U/ml의 CMCase활성을 갖는 한편 rumen fluid에 존재하는 효소와 C-4 조효소 사이의 상승작용에 의한 것으로 사료되었다. 이 두 조효소 사이의 상승작용을 확인하기 위하여, rumen fluid의 효소활성이 35%(0.1 U/ml, CMCase), C-4 조효소의 효소활성이 65%(0.19 U/ml, CMCase) 되도록 각각 희석하여 섞은 효소용액의 활성도가 CMCase에 대하여서 0.38 U/ml의 활성을 나타내어 약 130%의 상승효과를 나타냄을 알 수 있었다. Avicel에 대하여서는 118%로 나타나 C-4조효소는 rumen fluid 내의 효소와 상승작용을 나타내었다. 본 연구의 목적 중의 하나가 국내에서 사육되는 소의 장내 pH가 6.0이하로 저하되어 장내 cellulose 분해균의 활동이 억제되는데(20, 21, 35) 따른 문제를 해결하기 위하여, 인위적으로 cellulosic biomass를 분해할 수 있는 효소를 대량생산 할

**Fig. 7. Effect of protease on CMCase from *Trichoderma* sp. C-4.**

수 있는 균주들을 선택, 개발하여, 그 균주들의 배양액 또는 분비되는 효소들을 정제하여 사료에 첨가하고자 함이었다. 본 연구에서 발견된 균은 이 목적에 잘 부합될 것으로 사료되었다.

요 약

분해중인 벚짚으로부터 cellulase를 분비하는 곰팡이 C-4를 분리하였다. 분리된 균주의 형태적 배양적 특성을 조사한 결과 *Trichoderma* sp.로 분류되어 *Trichoderma* sp. C-4라고 명명하였다. 균을 Mandels 배지에서 6일 동안 28°C에서 진탕배양한 후 배양액에 분비된 효소의 활성을 조사한 결과 CMCase 활성은 8.2 U/ml(28.1 U/mg), Avicelase 활성은 0.75 U/ml(2.58 U/mg), β-glucosidase 활성은 1.67 U/ml(5.68 U/mg)로 나타났다. 균 배양 및 효소유도의 최적조건은 28°C, pH 6.2였다. 조효소는 50°C, pH 5.0에서 안정하였다. 1 mM의 CsCl, LiCl, MgCl₂, CoCl₂에 대하여 CMCase활성이 영향받지 않았다. Trypsin과 chymotrypsin(2% w/w)에 의하여 10분 동안 30%의 활성이 상실되었으나 그 후 60분 동안 더 이상의 활성 감소는 없었다. Rumen fluid에 대하여 24시간 동안 비교적 안정하였고, rumen fluid에 존재하는 효소와 CMCase 및 Avicel에 대하여 각각 130% 및 118%의 상승효과를 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 특정연구개발사업 (UR 대응 농업기술개발사업; 95-U-18)과 1995년 교육부 학술연구 조성비(유전공학)에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원

에 감사드립니다.

참고문헌

1. Berghem, L. E. R., L. G. Pettersson and U. B. Axio-Fredriksson. 1975. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Characterization and enzymatic properties of a β -1,4-glucan cellobiohydrolase from *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem* **53**: 55-62.
2. Berghem, L. E. R. and L. G. Pettersson. 1974. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Isolation and some properties of β -glucosidase of *Trichoderma viride*. *Eur. J. Biochem.* **46**: 295-305.
3. Berghem, L. E. R. and L. G. Pettersson. 1973. The mechanism of enzymatic cellulose degradation: Purification of a cellulolytic enzyme from *Trichoderma viride* active on highly ordered cellulose. *Eur. J. Biochem.* **37**: 21-30.
4. Chirico, W. T. and R. D. Brown. 1987. β -Glucosidase from *T. reesei*; substrate-binding region and mode of action on [1-³H] cellooligosaccharide. *Eur. J. Biochem.* **165**: 343-351.
5. Halliwell, G., M. N. B. A. Wakabe and A. H. Patel. 1985. The contribution of endo-1,4- β -D-glucanase to cellulolysis in *T. koningii*. *J. Appl. Biochem.* **7**: 43-54.
6. Halliwell, G. and M. Griffin. 1973. The nature and mode of action of the cellulolytic component C1 of *T. koningii* on the native cellulose. *Biochem. J.* **135**: 587-594.
7. Wood, T. M. and S. I. McCrae. 1982. Purification and some properties of the extracellular β -D-glucosidase of the cellulolytic fungus *Trichoderma koningii*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 2973-2982.
8. Wood, T. M. and S. I. McCrae. 1978. The cellulase of *Trichoderma koningii*: Purification and properties of some endoglucanase components with special reference to their action on cellulose when acting alone and in synergism with the cellobiohydrolase. *Biochem. J.* **171**: 61-72.
9. Eriksson, K. E. and S. G. Hamp. 1978. Regulation of endo-1,4-glucanase production in *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* **90**: 183-190.
10. Deshpande, V., K. E. Eriksson and B. Pettersson. 1978. Production, purification and partial characterization of 1,4- β -glucosidase enzymes from *Sporotrichum pulverulentum*. *Eur. J. Biochem.* **90**: 191-198.
11. Enari, T. M., M. L. N. Paavola, L. Harju, A. Lappalainen and M. Nummi. 1981. Purification of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* β -glucosidase. *J. Appl. Biochem.* **3**: 157-163.
12. Kanda, T., S. Nakakubo, K. Wakabayashi and K. Nisizawa. 1978. Purification and properties of an exocellulase of avicelase type from a wood-rotting fungus, *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*). *J. Biochem.* **84**: 1217-1226.
13. Ait, N., N. Creuzet and J. Catteno. 1979. Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**: 537-546.
14. Ait, N., N. Creuzet and J. Catteno. 1982. Properties of β -glucosidase purified from *Clostridium thermocellum*. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 569-577.
15. Lin, E. and D. B. Wilson. 1987. Regulation of β -1,4-endoglucanase synthesis in *Thermomonospora fusca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1352-1357.
16. Eriksson K-E, Wood T. M. 1985. Biodegradation of cellulose. In: Higuchi T. (ed) Biosynthesis and biodegradation of wood components. Academic Press, New York, 469-503.
17. Henrissat B., H. Driguez, C. Viet, M. Shulein. 1985. Synergism on cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Bio/Technol.*, **3**: 722-726.
18. Gow L, A, Wood T. M. 1988. Breakdown of crystalline cellulose by synergistic action between cellulase components from *Clostridium thermocellum* and *Trichoderma koningii*. *FEMS Microbiol Lett.* **50**: 247-252.
19. Groleau, D. and C. W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogens*. *Can. J. Microbiol.* **27**: 517-530.
20. Mould, F. L., E. R. Orskov and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementaion and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Echnol.* **10**: 15-30.
21. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on rumen function. *J. Animal Sci.* **43**: 910-929.
22. Martin, S. A. and D. J. Nisbet. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **75**: 1736-1744.
23. Mega, T. and Y. Matsushima. 1979. Comparative studies of three exoglucosidases of *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.* **85**: 335-341.
24. Mandels, M. and E. T. Reese. 1960. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.* **79**: 816-826.
25. Don L Crawford and Elizabeth Mccoy. 1972. Cellulase of *Thermonospora fusca* and *Streptomyces thermodia-staticus*. *Applied Microbiol.* **24**: 150-152.
26. Wood, W. A. and S. T. Kellogg(ed). 1988. Methods in enzymology, **160**: 63-65.
27. Somogyi, M. 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
28. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
29. Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* **116**: 1-54.
30. Domsch, K. H., W. Gams and T. H. Anderson. 1980. Composition of soil fungi. pp. 814-820. Academic press, London.
31. Davis, B. J. 1964, Disc electrophoresis-II. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
32. Montenecourt, B. S. and D. E. Eveleigh. 1977. Pre-

- paration of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 777-782.
33. Ng, T. K. and J. G. Zeikus. 1981. Comparison of extracellular cellulase activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 231-240.
34. Durand, H. 1984. Comparative study of cellulases and hemicellulases from four fungi: mesophiles *Trichoderma reesei* and *Penicillium* sp. and thermophiles *Thielavia terrestris* and *Sporotrichum cellulophilum*. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**: 175-180.
35. Russell, J. B. and D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 604-610.

(Received 3 March 1997)