

셀룰라아제

Cellulase

정의 이 품목은 *Aspergillus niger* 및 그 변종, *Trichoderma reesei* 및 그 변종, *Humicola insolens* 및 그 변종, *Penicillium funiculosum* 및 그 변종의 배양물에서 얻어진 효소제이다. 다만, 역가 조정, 품질보존 등을 위하여 희석제, 안정제 등을 첨가할 수 있다.

이 품목은 셀룰로스의 β -1,4 글루코시드 결합을 endo형으로 가수분해하여 β -덱스트린을 생성한다.

성상 이 품목은 백~진한 갈색의 분말, 입상, 페이스트상 또는 무~진한 갈색의 액상이다.

확인시험 이 품목의 활성시험법에 따라 시험할 때 활성을 나타내어야 한다.

순도시험 (1) 비소 : 이 품목을 비소시험법에 따라 시험할 때, 그 양은 4.0ppm 이하이어야 한다.

(2) 납 : 이 품목 5.0g을 취하여 원자흡광광도법 또는 유도결합플라즈마발광광도법에 따라 시험할 때, 그 양은 5.0ppm 이하이어야 한다.

(3) 대장균군 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균군에 따라 시험할 때, 제품 1g당 30 이하이어야 한다.

(4) 살모넬라 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 살모넬라균시험법에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

(5) 대장균 : 이 품목은 「식품의 기준 및 규격」 일반시험법의 미생물 시험법 중 대장균에 따라 시험할 때, 음성(-)이어야 한다.

활성시험법(역가)

분석원리 : 본 역가시험은 pH 4.5, 온도 40℃에서 카복시메틸셀룰로스 기질의 내부 Glucosidic 결합의 효소적 가수분해에 근거를 두고 있다. 기질의 점도에 있어서 해당하는 감소는 눈금보정이 된 점도계를 사용하여 측정한다.

시험용액의 조제 : 최종희석액 1mL가 본 시험방법의 제시된 조건하에서 5분 안에 0.18~0.22 사이의 상대유동성 변화를 생성하도록 물로 희석하여 시험용액을 조제한다. 검체 일정량을 유리분쇄기에 취하고 물을 넣어 준다. 이를 적당한 용량의 메스플라스크에 옮겨 물로 일정량으로 희석하고 사용 전에 왓트만 No.1 또는 동종의 여지로 여과한다.

시험조작 : 눈금 보정된 점도계를 미리 충분한 양의 세제에 담근 다음 물을 사용하여 깨끗이 닦은 다음 40±0.1℃의 유리수욕조에 정확하게 수직으로 장치한다. 기질용액 20mL와 초산염완충액(pH 4.5) 4mL를 50mL 공전삼각플라스크에 취하고 1 검체당 효소시험용 2개, 기질공 시험용 1개를 준비한다. 효소시험용 플라스크에 마개를 하고 수욕조에서 15분간 방치하여 온도를 평형시킨 다음 이에 시험용액 1mL를 정확히 취하여 가해주고 시간을 측정하기 시작하며 용액을 잘 혼합한다. 즉시 이 혼액 10mL를 취하여 점도계의 큰 가지에 가하고 약 2분 후 반응용액을 점도계의 가늠자란 가지입구에 고무관을 부착하여 상부눈

금 위까지 빨아올린다. 용액이 상부눈금에 도달할 때까지의 시간(분)을 측정하고 이를 T_R 이라고 하고, 다시 상부눈금을 통과하여 하부눈금을 통과하는 시간(초)을 측정하여 이를 T_T 라 한다. 다시 반응용액을 상부 눈금위로 빨아 올리고 액의 표면이 상부의 눈금에 도달할 때까지의 시간(분)을 즉시 측정하여 이를 T_R 로 하고 상부눈금에서 하부눈금까지 도달하는 시간(초)을 측정하여 이를 T_T 라 한다. 15분 이내에서 반응시간(T_R)에 대하여 "다시 반응용액을 상부 눈금위로 빨아" 이하의 조작을 총 4회 반복한다. 기질공시험용에는 기질용액 20mL와 초산염완충액(pH 4.5) 4mL의 혼액에 물 1mL를 가하여 혼합하고 이 혼액 10mL를 즉시 취하여 점도계의 큰 가지에 넣은 다음 액을 상부눈금에서 하부눈금까지 도달하는 시간 T_S (초)를 5회 반복 측정하여 평균한 값을 T_S 로 한다. 물 공시험용에는 미리 $40 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 로 평형 시킨 물 10mL를 취하여 점도계의 큰 가지에 넣고 두 눈금사이에 도달하는 시간 T_W (초)를 5회 반복 측정하여 평균한 값을 T_W 로 한다.

다음 계산식에 따라 4회의 유출시간(T_T)과 반응시간(T_R) 각각에 대하여 상대유동성(F_R)과 T_N 값을 구한다.

$$F_R = \frac{T_S - T_W}{T_T - T_W}$$

$$T_N = \frac{1}{2} (T_T / 60\text{초} / \text{분}) + T_R = \frac{T_T}{120} + T_R$$

- F_R : 각 반응시간에 대한 상대유동성
- T_S : 기질공시험에 대한 평균 유출시간(초)
- T_W : 물공시험에 대한 평균 유출시간(초)
- T_T : 효소반응용액에 대한 유출시간(초)
- T_R : 반응의 경과시간(분)
(시험용액을 가한 시간에서 유출시간(T_T) 측정시작시간까지)
- T_N : 반응시간(T_R)(분)+시험용액 유출시간(T_T)(분)의 1/2

4개의 반응시간(T_N)에 대한 4개의 상대유동성(F_R)을 사용하여 검량선을 작성한다. 이 때 하나의 직선이 그려져야 한다. 선의 기울기는 분당 상대유동성변화에 대응하며 효소의 양에 비례한다. 일련의 시험점을 통과하는 최선의 기울기는 단독의 상대유동성값 보다는 좋은 효소역가의 기준이 된다. 검량선으로부터 10분과 5분에서 F_R 값을 측정한다. 유동성의 차이는 0.18~0.22이어야 한다.

다음 계산식에 따라 효소제의 역가를 구한다.

$$\text{역가(CU/g)} = \frac{1,000(F_{R10} - F_{R5})}{W}$$

- F_{R10} : 반응시간 10분에서 상대유동성
- F_{R5} : 반응시간 5분에서 상대유동성
- 1,000 : g을 mg으로 환산
- W : 시험용액 1mL에 함유된 검체의 양(mg)

역가의 정의 : 1 Cellulase unit(CU)는 상기시험조건 하에서 카복시메틸셀룰로스 기질에서 5분 동안에 1 상대유동성변화를 생성하는 효소의 양이다.

장 치

점도계 : 싸이즈-100의 눈금보정이 된 캐논-팬스케형 점도계 (Cannon-Fenske Type Viscometer)를 사용하거나 이와 동등한 것을

사용한다.

유리수욕조 : $40\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ 의 유리 항온수욕조를 사용하거나 이와 동등한 것을 사용한다.

시약 및 시액

초산염완충액(pH 4.5) : 0.4N 초산나트륨용액을 0.4N 초산 400mL에 계속 저어주면서 가하여 pH를 4.5 ± 0.05 로 조절한다.

카복시메틸셀룰로스나트륨 : 카복시메틸셀룰로스나트륨[셀룰로스검, Hercules

(Aqualon) Type 7HF 또는 이와 동등한 것]을 사용한다.

기질용액 : 혼합기그릇에 물 200mL를 가하고 혼합기를 저속에 맞춘다. 건조물로서 1g의 카복시메틸셀룰로스나트륨을 용기내에서 튀어 나오지 않도록 천천히 그릇내에서 분산시킨다. 고무폴리스만을 사용하여 더운물로 그릇기벽을 씻어 내린 다음 그릇에 뚜껑을 하고 고속에서 1분간 혼합한다. 이를 500mL 메스플라스크에 옮겨 물을 가하여 500mL로 하고 사용 전에 거즈로 여과하여 사용한다.

보존기준

냉암소에서 밀봉 보존하여야 한다.