

Cellulase 生成菌에 關한 研究 (第1報)

有用菌의 分離 및 그 培養條件에 對하여

金 燦 祚 · 崔 宇 永

忠南大學校 農科大學

(1969年 2月 20日 受理)

Studies on the Cellulase Producing Microorganisms(Part I)

Isolation of the Cellulase Producing Molds and their Cultural Conditions

Chan Jo Kim, Woo Young Choi

College of Agriculture, Choongnam University

Summary

94 Cellulase producing strains were isoated from soils, composts, rotten woods and straws, and gastric contents and feces of herbivorous animals in various places. Among them, the strain MC-9, MC-10, MC-53 and MC-61 were found to be highly active in the degradation of carboxy methyl cellulose. Their cultural conditions adequate for the cellulase formation and effects of inorganic salts and various organic substances added to the wheat bran media were investigated.

The results obtained are as follows;

1. Optimum conditions for the cellulase formation were

MC-9: pH 5.5, temp. 35°C, incubation time 5 days,

MC-10: pH 5.5-6.0, temp. 30°C, incubation time 5 days,

MC-53: pH 3.5, temp. 30°C, incubation time 5 days,

MC-61: pH 3.5-4.0, temp. 30-35°C, incubation time 5 days.

2. Their cellulase activity in their optimum conditions were

MC-9: CMC-LP(liquefying power) 87.7%, CMC-SP(saccharifying power) 3.20 glucose mg./gm. of the cultures/min.,

MC-10: CMC-LP 82.9%, CMC-SP 2.48 glucose mg./gm. of the cultures/min.,

MC-53: CMC-LP 72.4%, CMC-SP 1.76 glucose mg./gm. of the cultures/min.,

MC-61: CMC-LP 87.1%, CMC-SP 2.68 glucose mg./gm. of the cultures/min.

3. Additions of inorganic salts to the wheat bran media were not significant for the cellulase formation, but additions of soybean film and orange-peel pomace promoted the CMC-liquefying power 3 to 5 percent in wheat bran cultures of the strains.

緒 論

産業面에 넓은 利用途를 가지는 cellulose 分解酵素에 對해서는 現在 여러 微生物을 對象으로 많은 研究가 이루어지고 있는 것으로 即 公廣이 cellulase 로서 *Aspergillus niger* 에 關한 King 等^{1,2,3}의 研究 *Aspergillus sojae* 에 關한 中山等⁴의 研究, *Aspergillus saitoi* 에 關한 松村等⁵의 研究, *Aspergillus phoenicis* 에 關한 崔⁶의 研究, *Penicillium variable* 에 關한 金野等⁷의 研究, *Rhizopus* 屬의 것에 關한 成⁸, 今田等⁹ 및 大健等¹⁰의 研究, *Chaetomium globosum* 에 關한 鄭¹¹ 및 渡邊¹²의 研究等이 있으며 細菌 cellulase 에 對해서는 *Pseudomonas fluorescens* 에 關한 朝井等^{13,14,15} 및 岡本等¹⁶의 研究 *Bacteroides succinogenes* 에 關한 Hungte¹⁷ 및 赤司¹⁸의 研究가 있고 不完全菌 cellulase 에 對해서는 *Irpeza lacteus* 에 關한 西澤等¹⁹의 研究, *Myrothecium verrucaria* 에 關한 Whitaker²⁰의 研究가 있고 그리코 *Trichoderma viride*(Koningi)에 關하여는 外山^{21,22,23,24,25} 및 張等²⁶이 菌學的, 酵素學的 및 그 應用面에 걸쳐 報告한바 있다. 著者等은 이와같은 cellulase 에 關하여 研究하고자 土壤, 堆肥各種腐朽

木·葉類 및 여러 草食動物의 糞과 胃內容物에서 炭素源으로서 cellulose를 利用할 수 있는 94株의 菌株를 分離하고 이들菌의 CMC 分解力 및 濾紙崩壞力을 測定하여 4株의 優良菌을 選定하고 이 選定菌株들의 cellulase 生成을 爲한 培養條件과 無機·有機物質 添加培養의 效果等을 檢討하여 結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

本研究는 1968年度 文敎部 研究 助成費의 補助에 依하여 이루어진 것으로 이에 깊이 感謝하는 바이며 아울러 始終 獻身의 功로 助力하여준 申斗鎬君에게 謝意를 表한다.

實驗 方法

1. Cellulase 生成菌株의 分離

大田, 禮山, 唐津, 水原, 釜山, 慶州 等지에서 土壤, 堆肥, 腐朽木, 葉類 및 草食動物의 糞과 胃內容物을 蒐集하고 朝井等¹³⁾의 方法을 參考하여 Schale에 濾紙를 깔고 Sucrose를 除外한 Czapek液에 前記試料를 2分間 懸濁시켜 그 上液을 注入하여 30°C, 10日間 培養後 나타난 Colony를 特徵에 따라 類別 分離하고 이들 分離菌株를 malt agar slant에 30°C, 3日間 前培養하여 100 ml 三角 flask에 糞기을 10 gm, 水道水 10 ml를 加하고(pH 4.5) 滅菌한 것에 接種하여 張의 方法²⁶⁾을 參考로 30°C, 5日間 培養後 그 CMC 分解力을 測定比較함으로써 優良菌株를 選定하였다.

※ 酵素液의 調製: 糞기을 培養物을 乾燥(水分含量 約 5%) 磨碎하여 蒸溜水로 30°C, 2時間 抽出 그 濾液을 CMC 糖化力 測定時는 麩麩乾物 10倍液으로, 粘度低力 測定時는 100倍液으로 하여 使用하였다.

※ CMC 粘度 低下力 測定法: 1% CMC 溶液 9ml를 넣은 徑 18 mm의 試驗管을 40°C 水槽中에서 5分間 豫熱시킨 後에 酵素液 1 ml를 넣어 15分間 作用시킨 다음 沸騰浴中에서 3分間 處理하여 20°C로 冷却後 그 7 ml를 Ostwald 粘度計²⁷⁾에 注入, 20°C로 保存하면서 그 5 ml의 流下速度를 測定하였다(Vt). 한편 基質에 沸騰浴中에서 3分間 處理하여 不活性化시킨 酵素液을 加해서 같은 方法으로 測定하고(Vo) 또한 蒸溜水에 酵素液을 加한 것의 流下速度를 測定하여(Vs) 下式^{28,29)}과 같이 그 粘度低下度를 百分率(A)로 表示하였다.

$$A = \frac{V_0 - V_t}{V_0 - V_s} \times 100$$

※ 糖化力測定法: 金等³⁰⁾의 方法에 準하여 100 ml 三角 flask에 3% CMC 溶液 5 ml를 넣어 40°C 水

槽中에서 5分間 豫熱시켜 여기에 各 酵素液 0.5 ml를 加하여 直時 Somogyi 變法³¹⁾으로 還元糖을 定量하고 다시 20分間 作用시킨 後 그 還元糖을 定量하여 前後의 差를 glucose mg.으로 換算하여

$$\text{glucose mg./糖乾物 gm./分}$$

으로 表示하였다.

2. Cellulase 生成 最適條件 檢討

a) pH 및 溫度: 滅菌後에 糞기을 培地의 pH가 3.0~6.0 사이에서 一定한 差를 가지도록 調定하고 3日間 malt agar slant에 前培養한 選定菌株를 接種하여 20, 25, 30, 35 및 40°C 下에서 各各 5日間 培養한 것의 酵素液을 調製하고 CMC 粘度低下力을 測定 比較하여 最適 pH 및 溫度를 檢定하였다.

b) 培養日數: 各菌株에 따르는 最適 pH의 糞기을 培地에 該當菌株를 接種하고 그 菌의 最適溫度에서 3, 5 및 7日間 培養後 調製한 酵素液으로 CMC 粘度低下力 및 糖化力을 測定 比較하여 最適培養日數를 檢定하였다.

3. Cellulase 生成에 미치는 無機 및 有機物質의 效果

a) 無機鹽類: NaNO₃ 및 K₂HPO₄는 0.1, 0.2, 0.5%, KCl 및 MgSO₄는 0.01, 0.05, 0.1%, Fe-SO₄는 0.001, 0.005, 0.01% 로 各各 添加한 滅菌 糞기을 培地에 選定菌을 接種하여 各菌의 最適條件 下에서 5日間 培養後 그 力價를 對照區와 比較하여 效果를 檢討하였다.

b) 有機物質: 大豆皮³²⁾, 柑橘皮³²⁾, 大豆煮汁³²⁾, 蠟粕, 들깨粕 및 小麥粉을 各各 1, 5% 添加한 滅菌 糞기을 培地에 選定菌株를 接種하고 各 最適條件 下에서 5日間 培養後 그 力價를 對照區와 比較하여 이들 物質의 效果를 檢討하였다.

結果 및 考察

1. Cellulase 生成菌株의 分離 및 選定

前記 實驗方法에 依하여 94 菌株를 分離하고 이中 CMC 分解力이 比較的 強한 MC-9, MC-10, MC-53 및 MC-61의 4 菌株를 選定하였다.

2. 最適의 條件

a) pH 및 溫度

選定菌株를 實驗方法에 記載한바와 같은 pH 및 溫度 下에서 培養하여 CMC 粘度低下力을 比較한 結果는 圖 1, 2, 3 및 4와 같다.

MC-9: 培養溫度 20°C 및 40°C 에서는 力價가 顯著히 弱하였으며 35°C, pH 5.5에서 가장 높은 力

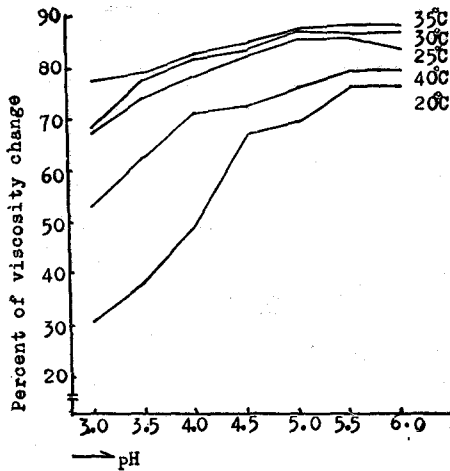


Fig. 1. CMC-liquefying power of MC-9 in various incubation temp. and initial pH of wheat bran media.

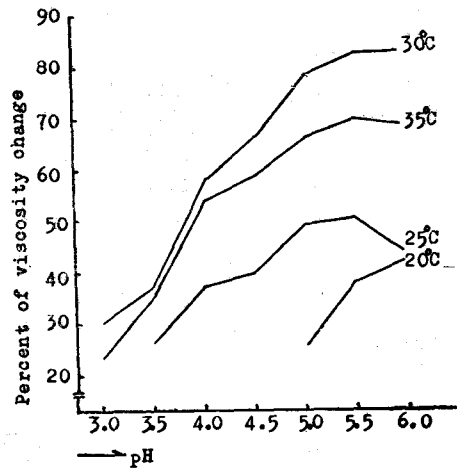


Fig. 2. CMC-liquefying power of MC-10 in various incubation temp. and initial pH of wheat bran media.

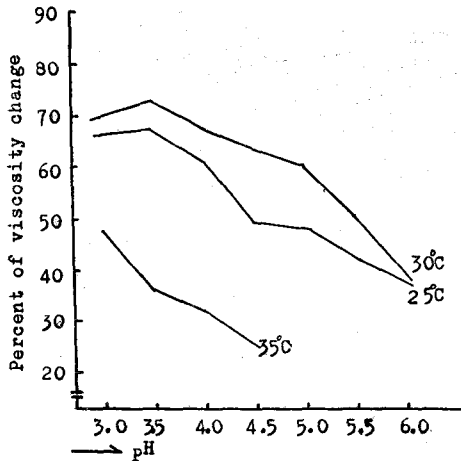


Fig. 3. CMC-liquefying power of MC-53 in various incubation temp. and initial pH of wheat bran media.

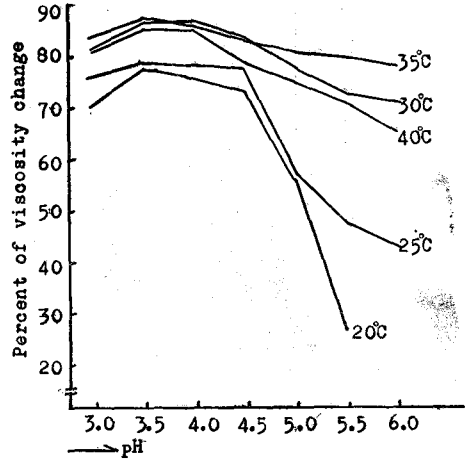


Fig. 4. CMC-liquefying power of MC-61 in various incubation temp. and initial pH of wheat bran media.

價를 보였다.

MC-10: 20°C의 pH 4.5 이하 및 40°C에서는 CMC 粘度低下力이 거의 없거나 20% 이하의 낮은 力價를 나타내었고 30°C, pH 5.5~6.0에서 가장 높은 力價를 보였다.

MC-53: 20°C에서와 35°C의 pH 5.0 이상 및 40°C에서는 力價가 거의 없거나 20% 이하였으며 30°C, pH 3.5附近에서 가장 強하였다.

MC-61: 20°C 및 25°C에서는 力價가 弱하였으며 30°C와 35°C의 pH 3.5~4.0에서 높은 力價를 나타내었고 그 이하 또는 그 이상의 pH 下에서는 力價가 漸次 低下하였다.

上記와 같이 cellulase 生成에 있어서 最適 pH는 菌株에 따라 差異가 있었으며 最適 温度는 各菌株마다 共通의므로 30~35°C임을 알수 있었다.

이와같은 結果는 最適條件이 pH 4.6, 35°C라고 한 崔의 結果⁶⁾, pH 5.0, 30°C라고 한 鄭의 結果¹¹⁾ 및 pH 4.0, 30°C라고 한 張의 結果²⁰⁾와 菌株는 다르나 Cellulase 生成條件은 大體의므로 符合됨을 보였다.

b) 培養日數

前記方法으로 培養하면서 經時的으로 CMC 粘度低下力 및 그 糖化力을 測定 比較한 結果는 表 1 및 圖 5, 6과 같다.

Table 1. Cellulase activity in process of incubation time in wheat bran cultures.

Strains	Time	3 days		5 days		7 days	
		CMC-SP*	CMC-LP**	CMC-SP	CMC-LP	CMC-SP	CMC-LP
MC-9		2.49	82.2	3.20	87.7	3.04	86.5
MC-10		2.28	79.7	2.51	82.9	2.48	82.6
MC-53		0.57	37.5	1.76	72.4	1.76	72.0
MC-61		2.41	85.4	2.68	87.1	2.12	68.7

* CMC-saccharifying power, glucose mg./gm. of the cultures/min.

** CMC-liquefying power, percentage of viscosity change.

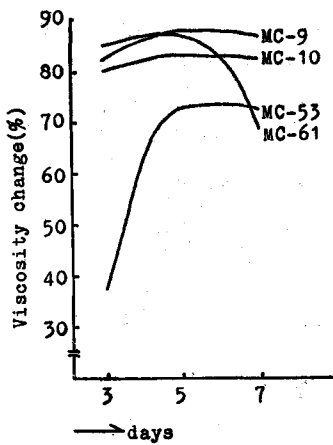


Fig. 5. CMC-liquefying power in process of incubation time in wheat bran cultures.

酵素力은 各菌株마다 5日後가 높았으며 MC-53은 7日後에도 같은 程度의 力價를 維持하였으나 MC-9 및 MC-10은 7日後 多小 低下하였고 MC-61은 急激히 低下하였다.

最適培養日數에 對해서는 供試菌株가 各各 다르나 張等²⁶⁾은 5日間, 鄭¹¹⁾은 8~10日間이라고 報告한바 있다.

3. 無機 및 有機物質의 添加效果

a) 無機鹽類

無機鹽類를 밀기울 培地에 添加 培養한 結果 無添加區에 比하여 뚜렷한 力價의 差異가 없었으며 NaNO_3 添加區에서는 無添加區와 비슷한 力價를 나타내었으나 其他 鹽類區의 力價는 低下함으로서 選定菌株의 cellulase 生成에 이들 無機鹽類의 效果를 認定할수 없었다. 이와같은 結果는 崔의 報告⁶⁾에서도 볼수있으며 한편 山田等³⁸⁾은 *Stenothermophi-*

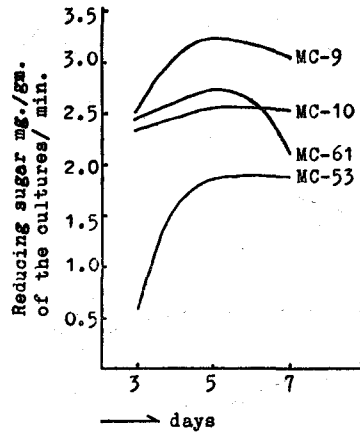


Fig. 6. CMC-saccharifying power in process of incubation time in wheat bran cultures

lus屬 菌의 cellulase 生成에 燐酸과 吡土가 重要하다고 하였으며 Mandels等²⁴⁾도 *Trichoderma viride*의 cellulase 生成에 Mg이 必須的이고 Ca과 Sr은 Mg과 共存할 때에 그 效果가 있음을 發表한 바 있다.

b) 有機物質

前記한 各種 有機物質을 添加 培養하여 CMC 粘度 低下力을 比較한 結果는 圖 7과 같다.

MC-9에서는 大豆皮 5% 添加 및 柑橘皮 添加區, MC-10은 大豆皮 5% 添加區, MC-53은 大豆皮 및 小麥粉 5% 添加區, MC-61은 大豆皮 및 柑橘皮 添加區에서 CMC 粘度 低下力이 3~5% 增加되었으며 蛹粕, 들깨粕, 大豆煮汁 및 小麥粉 등의 添加區에서는 菌體의 生長은 良好하였으나 cellulase 力價는 오히려 低下되는 傾向을 나타내었다. 한편 外山²²⁾은 cellulase 生成에서 감귤皮의 效果는 主로 그 中에 含有되는 有機酸의 影響일것이라고 한바 있다.

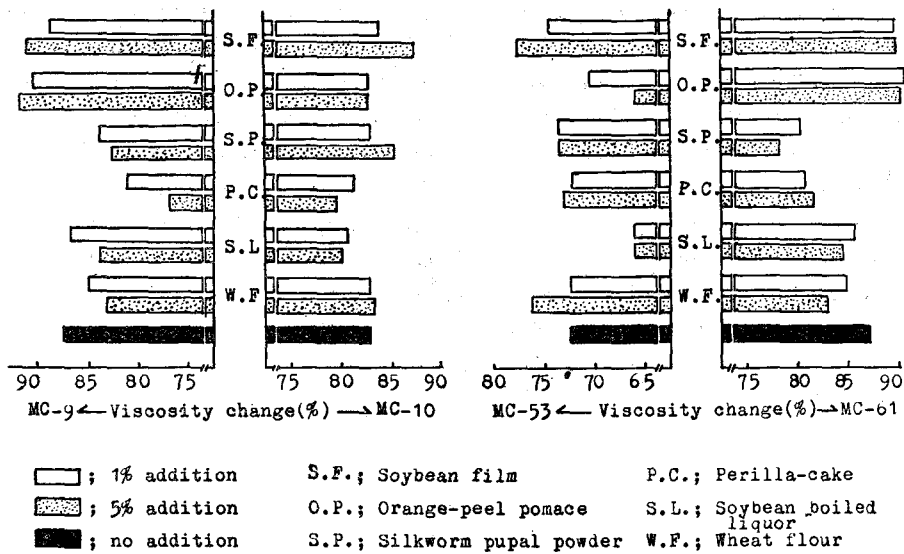


Fig. 7. Effects of organic substances on the cellulase formation in wheat bran cultures.

要約

各地에서 蒐集한 土壤, 堆肥, 腐朽木·藻類 및 草食動物의 糞과 胃內容物を 試料로 하여 94 株의 cellulase 生成菌을 分離하고 이中 CMC 分解力이 比較的 強한 MC-9, MC-10, MC-53 및 MC-61 의 4 菌株를 選定하여 이들 菌의 cellulase 生成에 對한 最適培養條件 및 無機, 有機物質의 添加效果를 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. 選定한 4 菌株의 cellulase 生産에 있어서의 最適 外的條件은

MC-9: pH 5.5, 溫度 35°C, 培養日數 5 日

MC-10: pH 5.5~6.0, 溫度 30°C, 培養日數 5 日

MC-53: pH 3.5, 溫度 30°C, 培養日數 5 日

MC-61: pH 3.5~4.0, 溫度 30~35°C, 培養日數 5 日 이었다.

2. 選定菌株의 cellulase 力價는 最適培養條件下에서

MC-9: CMC 粘度低下力 87.7%, CMC 糖化力 3.20 glucose mg./麴乾物 gm./分

MC-10: CMC 粘度低下力 82.9%, CMC 糖化力 2.48 glucose mg./麴乾物 gm./分

MC-53: CMC 粘度低下力 72.4%, CMC 糖化力 1.76 glucose mg./麴乾物 gm./分

MC-61: CMC 粘度低下力 87.1%, CMC 糖化力 2.68 glucose mg./麴乾物 gm./分 이었다.

3. 選定菌을 밀기를 培養할 時에 無機鹽類 添加의 效果는 認定할 수 없었으며 有機物質로서 大豆皮와 柑橘皮의 添加는 3~5%의 CMC 粘度低下力을 向上시키는 效果를 보였다.

參考文獻

- 1) King, K.W.: J. Ferm. Technol. **41**, 98 (1963)
- 2) King, K.W., Smibert, R.M.: Appl. Microbiol. **11**, 315 (1963)
- 3) Li, L.H., King, K.W.: Appl. Microbiol. **11**, 320 (1963)
- 4) 中山, 竹田: 日酸協誌 **24**, 319 (1966)
- 5) 松村, 前島: 日酸工誌 **41**, 154, 158, 164, 169 (1963)
- 6) 崔宇永: 忠南大學校大學院 碩士學位論文(1967)
- 7) 金野, 雨村, 國米, 照井: 日酸工誌 **41**, 385 (1963)
- 8) 成洛癸: 第 14 回 韓國農化學會學術發表會抄錄 (1968. 5)
- 9) 今田, 支田, 和田: 日酸工誌 **40**, 140 (1962)
- 10) 大健, 相川, 高原: 日酸工誌 **42**, 363 (1964)
- 11) 鄭東孝: 農化學會誌 **10**, 23 (1968)
- 12) 渡邊 敬: 日酸工誌 **41**, 228, 231 (1963)
- 13) 朝井, 山田, 上田: 日農化誌 **22**, 121 (1948)
- 14) 朝井, 山田, 上田, 岡本: 日農化誌 **23**, 549 (1949)
- 15) 朝井, 上田: 日農化誌 **23**, 303 (1951)

- 16) 岡本, 朝井: 日農化誌 26, 137 (1962)
- 17) Hungte, R.E.: Bact. Reviews 14, 1 (1950)
- 18) 赤司 景: 日農化誌 34, (1960)
- 19) 西澤, 小林: 日農化誌 27, 239, 242 (1953)
- 20) Whitaker, D.R.: Science 116, 90 (1952)
- 21) 外山 信男: 日醸工誌 32, 300 (1954)
- 22) Idem.: ibid. 38, 81 (1960)
- 23) Idem.: ibid. 41, 282, 542 (1963)
- 24) Idem.: ibid. 39, 511 (1961)
- 25) 北御門, 外山: 日醸工誌 40, 85 (1962)
- 26) 張, 宇佐美, 武富: 日醸協誌 24, 421 (1966)
- 27) 金野, 上田, 照井: 日醸工誌 40, 143 (1962)
- 28) Kertesz, Z. I.: The Pectic Substances 382, Interscience Publishers, Inc., N.Y. (1951)
- 29) Roboz, E., R.W. Barratt and E.L. Tattum: J. Biol. Chem. 195, 459 (1952)
- 30) 金浩植, 李瑞來, 田南秀: 農化誌 3, 9 (1962)
- 31) 小林, 田淵: 日農化誌 28, 171 (1954)
- 32) 外山 信男: 日醸協誌 21, 415, 459 (1963)
- 33) 山田, 藤本, 船田: 日農化誌 25, 200 (1951)
- 38) Mandels, M. and E.T. Reese: J. Bact. 73, 269 (1956)