

## Cellulase 生成菌에 關한 研究(第 2 報)

— 分離菌株의 同定 및 그 利用에 對하여 —

金 燦 祚 · 崔 宇 永

忠南大學校 農科大學

(1969 年 2 月 28 日 受理)

### Studies on the Cellulase Producing Microorganisms (Part II)

Identification of the Selected Molds and their Utilization

Chan Jo Kim, Woo Young Choi

College of agriculture. Choongnam university

#### Summary

The strains selected in the previous paper<sup>1)</sup> were identified according to the manual of *Aspergilli* by Thom and Raper<sup>2)</sup>, and the preparation of the crude enzymes with the strains were investigated. The fermented fodders were made with wheat bran and chaffs containing 20% wheat bran by the strains, and the feeding experiments concerned was conducted.

The results obtained are as follows:

1. The selected strains were identified as below;

MC-9 was a similar strain of *Aspergillus niger* van Tieghem,

MC-10 was a similar strain of *Aspergillus flavus* Link,

MC-53 was a similar strain of *Aspergillus penicilloides* Spegazzini and MC-61 was a similar strain of *Aspergillus niger* mut *Schiemanni* n. comb.

2. Percentages of crude enzymes obtained from the dried matters of the wheat bran cultures were MC-9: 2.9%, MC-10: 3.9%, MC-53: 6.4% and MC-61: 2.6%. And the cellulase activity of MC-9 was the most active among the crude enzymes as the same as the filtrates of wheat bran cultures.

3. As the results of the feeding experiments, changes of body weights showed no trends to be significant as compared with the control group, and

the groups of MC-9 and MC-61 showed the increasing significance with  $P < 0.05$  in egg-laying rate.

#### 緒 論

Cellulase의 使用 目的은 植物의 柔組織中에서 蛋白質 및 澱粉等의 分離와 回收率을 높이고 特殊成分을 含有하는 植物(茶, 人蔘, 寒天) 및 菌體에 作用시켜 그 內容物 抽出의 效果를 올리며 細胞膜을 柔軟하게 하거나 除去시켜 消化性 및 食感을 向上시키는 것 등으로 생각할 수 있으며 이와같은 cellulase의 利用面을 研究하고자 著者等은 前報<sup>1)</sup>에서 分離 選定한 菌株로서 醱酵飼料를 製造하여 產卵鷄에 對한 飼養試驗을 하고 또한 이들 選定菌의 利用으로 粗 cellulase 劑 製造에 對한 檢討와 아울러 이들 菌株의 同定을 하여 結果를 얻었으므로 이에 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와 趙允喆 兩君에게 謝意를 表한다.

#### 實 驗 方 法

##### 1. 選定菌株의 同定

Raper 와 Thom 의 manual<sup>2,3)</sup>에 依하여 Czapek agar plate 및 孢子形成 促進培地<sup>2)</sup>上의 colony의 特徵을 調查하고 slide 培養 및 濕室培養으로 形態的 特徵을 檢鏡하여 同定하였다.

## 2. 粗 cellulase 의 調製 및 그 力價測定

### a) 粗 cellulase 의 調製

MC-9 및 MC-61 은 柑橘皮, MC-10 및 MC-53 은 大豆皮를 各 5% 添加한 밀기를 培地에서 各 菌株의 最適條件으로 五日間 培養하고 風乾後 外山<sup>4)</sup> 및 朝井<sup>5)</sup>의 方法을 參考하여 그 10 倍 抽出濾液(pH 6.2~6.8)을 rotary evaporator 內에서 半量으로 濃縮後 60% 以上の 濃度로 ethanol 을 加하고 冷藏庫中에서 一夜 靜置하여 上澄液을 傾斜法으로 除去한 다음 遠心分離 (3,000 r.p.m.)하여 沈澱을 回收하고 이를 乾燥磨碎 하였다.

### b) 粗 cellulase 의 力價測定

上記 粗 cellulase 를 1% 溶液(pH 4.5, 0.5M acetate buffer soln.)으로 하여 前報<sup>1)</sup>의 方法으로 CMC 糖化力을 測定하였으며 1% 溶液을 다시 10 倍 稀釋하여 CMC 粘度 低下力을 測定하였다. 한편 Amano

cellulase(日本 天野製藥社製) 1% 溶液의 力價를 同一方法으로 測定 比較하였다.

## 3. 醱酵飼料製造 및 飼養試驗

### a) 醱酵飼料의 製造

미리 各 選定菌株의 最適 pH로 調節한 밀기울 및 밀기울 20% 含有 양겨에 選定菌株를 接種하여 25~30°C의 麴子室에서 常法에 따라 5 日間 培養하여 風乾後 使用하였다.

### b) 飼養試驗

忠南大學校 農科大學 附屬牧場에서 飼育중인 2 年生 單冠白色 Leghon 90 首를 表 1 과 같이 各 實驗群別로 10 首씩 任意配置하고 單飼 cage 에 收容하여 給水를 充分히하고 C.P=16.52, T.D.N=69.64 인 配合飼料에 5 日間の 豫備飼育期間中에는 5%의 醱酵飼料를 添加給餌하고 다음 30 日間은 10%<sup>8)</sup>의 醱酵飼料를 添加하여 不斷給餌하면서 產卵率과 아

Table 1. Disposition of the experimental groups.

Groups	Rations
A	Control ration
B	Control ration contained 10% wheat bran cultures of MC-9
C	Control ration contained 10% chaffs* cultures of MC-9
D	Control ration contained 10% wheat bran cultures of MC-10
E	Control ration contained 10% chaffs* cultures of MC-10
F	Control ration contained 10% wheat bran cultures of MC-53
G	Control ration contained 10% chaffs* cultures of MC-53
H	Control ration contained 10% wheat bran cultures of MC-61
I	Control ration contained 10% chaffs cultures of MC-61

\*; Chaffs containing 20% wheat bran.

을 每週 體重을 測定比較하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 選定菌株의 同定

Thom 과 Raper 의 同定法에 따라 檢鏡한 結果는 表 2 와 같으며 이들의 colony 를 撮影한 것은 다음 圖 1, 2, 3 및 4 와 같다. 各 菌株의 特徵은

MC-9 : Czapek's agar plate 上에서 3 日後 colony 의 直徑은 3.8 cm 로서 生育速度는 빠른편이었고 conidial head 는 球型으로 黑色이었다. 梗子는 複條이며 第一 梗子의 長이는 25~28 μ 이었고 分生子의 長이는 3 μ 으로 그 表面에 小突起가 認定되었다. 따라서 *Aspergillus niger* van Tieghem 의 近緣 菌株로 推定하였다.

MC-10 : Czapek's agar plate 上에서 3 日後 colony 의 直徑은 2.9 cm 로서 生育速度는 比較的 빨랐으며 黃綠色을 띠었다. 梗子는 複條이며 分生

子柄壁은 無色으로 粗面이었고 그 長이는 600~800 μ 이어서 *Aspergillus flavus* Link 의 近緣菌株로 推定하였다.

MC-53 : Czapek's agar plate 上에서는 生長이 極히 制限되었으며 20% sucrose 含有 Czapek's agar<sup>2)</sup>에서 보다 잘 生育하여 2 週後의 直徑은 5.4 cm 에 達하였다. Colony 는 暗綠色에서 漸次 暗色으로 變하였으며 表面에 주름이 있었다. 梗子는 單條로서 40~70 μ 크기의 흩어진 圓筒型의 conidial chain 을 着生하였으므로 *Aspergillus penicilloides* Spegazzini 의 類緣菌株로 推定하였다.

MC-61 : Czapek's agar plate 上에서 3 日後 colony 의 直徑은 3.5 cm 로서 生育速度는 빨랐으며 conidial head 는 黑色으로 疏着하는 傾向이었으나 Moyer 等의 孢子形成培地<sup>2)</sup>上에서는 豊富히 着生되었다. 梗子는 複條이며 分生子는 直徑 4.5 μ 으로 그 表面은 平滑하였다. 따라서 *Aspergillus niger* mut. Schie-

Table 2. Descriptive sheet of the strains.

Strains		MC-9	MC-10	MC-53	MC-61
Parts					
Colony	Rate of growth	spread rapidly	spread rapidly	growing slowly	spread rapidly
Character	Texture	roughly velvety	velvety	velvety wrinkled	floccose
	color: above reverse	black white	yellowish-green yellow	dark-green with pale edge greenish-brown	black yellowish-white
Heads	color	blackish-brown	yellowish-green	dull green	carbonaceous black
	form	globose	radiate	columnar ragged	globose
	measurements	250 to 300 $\mu$ in diam.	170 to 250 $\mu$ in diam.	40 $\mu$ by 70 $\mu$ .	360 to 420 $\mu$ in diam.
Conidiophore	length	1 to 2 millimeters	600 to 800 $\mu$	180 to 260 $\mu$	2 to 4 millimeters
	diameter	15 to 18 $\mu$	12 to 15 $\mu$	6 to 8 $\mu$	19 to 23 $\mu$
	wall: thickness	thick	thin	thin	thick
	markings	smooth	rough	smooth	smooth
	color	yellow near the vesicle	colorless	colorless	fawn-colored near heads
Vesicle	shape	globose	flask-shaped	ovate	globose
	size	30 to 45 $\mu$	40 $\mu$ in long axis	25 $\mu$ in long axis	68 to 72 $\mu$
	color	yellow-brown	brown	brown over the upper half	fawn-colored
Primary sterigmata	measurements	25 to 28 $\mu$ by 4 $\mu$	15 $\mu$ by 4 $\mu$	12 $\mu$ by 2.8 $\mu$	45 to 53 $\mu$ by 5.7 $\mu$
	color	brown	brown	dull green	fawn-colored
Secondary Sterigmata	measurements	6 $\mu$ by 3 $\mu$	8 $\mu$ by 3 $\mu$	none	8 $\mu$ by 4 $\mu$
Conidia	color	fuscous	pale green	dull green	pale fuscous
	measurements	3 $\mu$ in diam.	4 to 6 $\mu$ in diam.	2.5 to 3.5 $\mu$ in diam.	4.5 $\mu$ in diam.
	shape and markings	globose and spinulose	globose and rough with color bar	globose and rough	globose and smooth
Perithecia		not produced	not found	not produced	not produced
Sclerotia		not produced	not found	not produced	not produced

\* Incubated in Czapek's agar (PH 5.0) for days at 30°C.

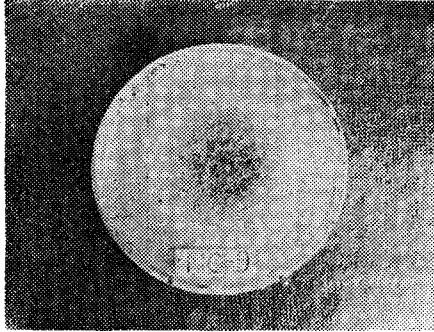


Fig. 1. Colony of the strain MC-9 incubated in Moyer's sporulation media at 30°C for 5 days.

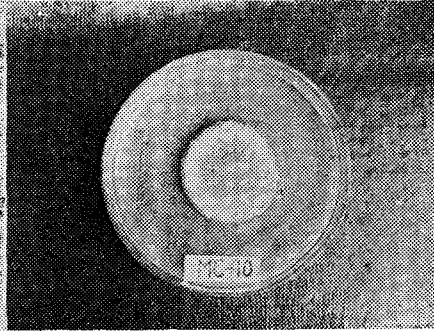


Fig. 2. Colony of the strain MC-10 incubated in Czapek's agar at 30°C for 5 days.

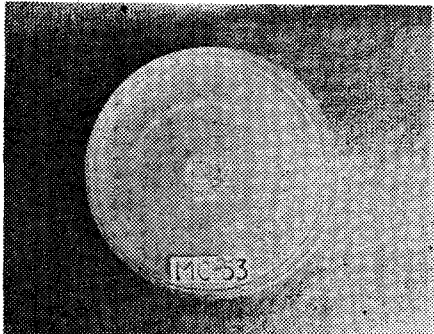


Fig. 3. Colony of the strain MC-53 incubated in 20% sucrose containing Czapek's agar at 30°C for 5 days.

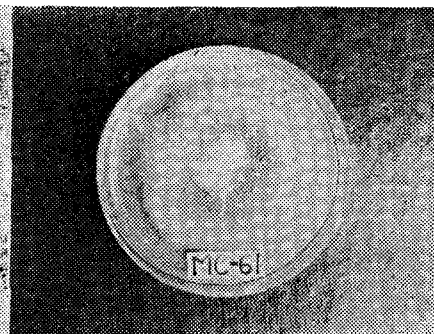


Fig. 4. Colony of the strain MC-61 incubated in Moyer's sporulation media at 30°C for 5 days.

manni n. comb.의 近緣菌株로 推定하였다.

### 2. 粗 cellulase 의 調製 및 그 力價測定

前記方法에 依하여 MC-9 및 MC-61 에서는 灰色, MC-10 은 褐色, MC-53 은 灰白色의 粉末을 얻었으며 이들의 乾燥麩에 對한 收率은 MC-9 : 2.9%, MC-10 : 3.9%, MC-53 : 6.%, MC-61 : 2.6%로서 이들 粗酵素劑의 力價測定 結果는 表 3 과 같다.

Table 3. Cellulase activity and amount of crude enzymes.

Strains	CMC-SP	CMC-LP	Amount of crude enzymes*
MC-9	26.13	91.0	28.5 gm.
MC-10	12.42	81.4	39.1 gm.
MC-53	9.88	79.5	63.7 gm.
MC-61	14.72	90.2	26.4 gm.
Amano**	29.00	92.5	—

\*; Obtained per kilogram of the wheat bran cultures.

\*\*; Commercial cellulase preparation of Amano pharm. Co., Japan.

表 3 의 結果로서 調製한 各 粗酵素劑의 CMC 分

解力은 이들의 밀기를 培養物, 抽出 酵素液<sup>1)</sup>에서와 같이 MC-9, MC-61, MC-10 및 MC-53 順의 力價를 나타내었다. 한편 이들 粗酵素劑의 力價를 密기를 培養物 抽出 酵素液과 同濃度로 換算 比較하면 酵素力이 失活되어진 것을 볼 수 있으며 이것은 外山<sup>2)</sup>가 指摘한 바와 같이 粗酵素調製 過程인 蒸發, 溶劑沈澱等에 依한 것으로도 생각된다.

그리고 粗酵素劑中 CMC 分解力이 가장 강한 MC-9의 것은 日本產 Amano cellulase 의 力價와 거의 같았다.

### 3. 醱酵飼料製造 및 飼養試驗

産卵鶏의 供試群別 體重變化는 表 4 와 같으며 每週 各群間에 一定한 變化 傾向없이 勤少한 增減 現象을 나타내었고 有意差를 認定할 수 없었으므로 基本飼料에 10%의 醱酵飼料 添加 給餌는 産卵鶏의 體重變化에 別影響을 주지 못하였다. 1 週後에 體重이 有意差는 없었으나 若干 低下된 傾向이었는데 이것은 單飼 cage 飼養에 依한 環境條件變化에 基 因한 것으로 생각된다.

産卵率은 表 5 에서와 같이 F 檢定 結果를 보면 各群間에 있어서  $P < 0.01$  水準의 有意性을 나타냈

Table 4. Changes of body weight during the experimental period.

Groups	A	B	C	D	E	F	G	H	I	F-v- alue	Duncan's M.R. Test
Week s											
0	1845 ±93.9	1890 ±73.6	1839 ±113.2	1881 ±49.2	1875 ±78.5	1893 ±43.8	1806 ±64.4	1837 ±103.5	1834 ±97.2	1.28	GIHCA- EDBF
1	1788 ±107.2	1827 ±46.1	1792 ±71.8	1826 ±92.6	1807 ±93.4	1824 ±47.1	1797 ±73.1	1805 ±95.5	1799 ±75.4	1.53	ACGIIH- EFDB
2	1823 ±71.8	1865 ±55.2	1845 ±117.3	1890 ±85.9	1836 ±47.6	1833 ±82.6	1795 ±41.3	1852 ±123.8	1810 ±57.4	2.06	GIAFE- CHBD
3	1848 ±63.2	1875 ±85.4	1830 ±125.9	1891 ±47.4	1859 ±55.8	1881 ±81.3	1817 ±118.9	1840 ±79.8	1892 ±49.9	0.93	GCHAE- BFDI
4	1840 ±82.5	1884 ±92.3	1867 ±67.1	1848 ±42.6	1870 ±71.4	1862 ±69.2	1826 ±85.6	1845 ±71.2	1831 ±76.3	1.04	GIAHD- FCEB
5	1842 ±76.4	1875 ±57.2	1850 ±101.8	1860 ±55.5	1863 ±35.6	1902 ±73.4	1812 ±62.7	1847 ±94.5	1825 ±48.6	0.66	GIAHC- DEBF

Table 5. Effects of furnishing the ration contained 10% of the cultures upon the egg-laying rate.

Groups	A	B	C	D	E	F	G	H	I	F-value
Mean	52.36	54.86	58.21	54.14	52.56	52.27	49.98	59.03	59.64	16.39**
S.D.	2.70	3.53	2.21	3.16	2.26	2.63	2.03	2.43	2.54	

\*\*; p<0.01

Duncan's new multiple range test at 50% level.

G	F	A	E	D	B	C	H	I
49.98	52.27	52.36	52.56	54.14	54.86	58.21	59.03	59.64

코 Duncan's M.R. Test 結果는 G,F,A 群間 A,E, D,B 群間 및 C,H,I 群間에는 各各 有意差가 없으나 G,F 와 E,D,B 群 및 A,E,D,B 와 C,H,I 群 사이에는 P<0.05 水準의 有意差가 認定되었다. 이와 같은 結果는 確實한 實驗에 依한 推理는 아니나 MC-61 및 MC-9의 培養物이 高田<sup>9)</sup> 및 愛知縣種雞場<sup>10)</sup>의 報告와 같이 菌體 自體가 營養給源으로서 또한 cellulase 및 其他 共存酵素가 消化酵素로서의 補充의 效果를 나타낸 것으로 생각된다.

### 摘 要

前報<sup>1)</sup>에서 分離 選定한 菌株로 밀기를 및 밀기를 20% 含有 왕겨에 培養하여 만든 醱酵飼料를 産卵 鷄의 基本飼料에 10% 添加하여 飼養試驗을 하고 또한 粗 cellulase 劑 製造에 對한 檢討와 이들 菌의 同定을 한 結果는 다음과 같다.

1. 選定한 4 菌株는

MC-9 : *Aspergillus niger* van Tieghem

MC-10 : *Aspergillus flavus* Link

MC-53 : *Aspergillus penicilloides* Spegazzini

MC-61 : *Aspergillus niger* mut. Schiemanni n. comb.

等과 近緣의 菌株이었다.

2. 選定 菌株의 밀기를 培養에서 얻은 粗酵素劑의 收量은 培養風乾物에 對하여 MC-9에서는 2.9%, MC-10 : 3.9%, MC-53 : 6.4%, MC-61 : 2.6% 등이었으며 이들 粗酵素劑의 力價도 밀기를 培養物 抽出 酵素液에서와 같이 MC-9의 것이 가장 強하였다.

3. 飼養試驗 結果, 體重變化에 있어서는 對照群에 比하여 有意差가 없었으나 産卵率은 MC-9 및 MC-61의 醱酵飼料 給餌群에서 P<0.05 水準의 增加 有意差를 나타내었다.

### 參 考 文 獻

1. 金燦祚, 崔宇永 : 農化誌 11, 83(1969)
2. Thom, C. and K.B. Raper: A Manual of the *Aspergilli*, Williams & Wilkins Co.(1951)
3. Raper, K.B. and C. Thom: A Manual of the *Penicillia*, Williams & Wilkins Co.(1949)
4. 外山 信男 : 日農工誌 32, 300(1954)
5. 朝井, 齊藤 : 日農化誌 25, 307(1951)
6. 佐藤清次著 : 微生物 醱酵飼料의 基礎と 實際, 畜産飼料研究所發行(1959)
7. 外山 信男 : 日農協誌 21, 415, 459(1963)