

## 農産廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 關한 研究〔第四報〕

*Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride*에 의한 Cellulase의 特性에 關하여

李啓瑚 · 高正三 · 李康治\*

서울大學校 農科大學 食品工學科

(1976년 9월 1일 수리)

## Studies on the Production of Fermented Feeds from Agricultural Waste Products(Part IV)

On the Characteristics of Cellulase by *Aspergillus niger*  
and *Trichoderma viride*

Ke-Ho, Lee · Jeong-Sam, Koh and Kang-Hup, Lee\*

Dept. of Food Technology, College of Agriculture, Seoul National University. Suwon Korea

(Received September 1, 1976)

### SUMMARY

In order to investigate the properties of enzymes from two strains of mold, reported in the previous paper, (1) studies have been made concerning the characteristics of cellulase of *Aspergillus niger*-SM6 and *Trichoderma viride*-SM10, and summarized as follows.

1. In the semi-purification the recovery of  $\beta$ -glucosidase was the highest when 80-90% ethanol was used and 0.8 saturation of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .
2. The characteristics of the semi-purified enzyme were as follows.

	<i>Aspergillus niger</i> -SM6	<i>Trichoderma viride</i> -SM10
Optimum pH	3.5	4.0
pH stability	3.0-6.0	3.0-6.0
Optimum temperature	60°C	60°C
Heat stability	below 60°C	below 50°C
Optimum reaction time	30 min.	60 min.
Optimum CMC concentration	3%	3%

3. The  $K_m$  values of CMCase were 0.8% and 1.01 for *Aspergillus niger*-SM6 and *Trichoderma viride*-SM10, respectively.
4. In the strain of *Aspergillus niger*-SM6, there were high activity of xylanase and pectinase.

### 緒 論

Cellulase 종류가 다양함에 따라서 精製方法에 있어서도 여러 研究者들에 의하여 많은 검토가 이

루어졌다. 즉 *Myrothecium verrucaria*에 대해서는 Miller, Reese, Grimes, Thomas等<sup>(2,3,4,5,6)</sup>이, King등<sup>7)</sup>은 *Celvibris gilvas*에 대하여 *Aspergillus niger*에 대해서는 Ikeda等の 研究<sup>8)</sup>, *Trichoderma*

\* 仁荷大學校 工科大學(College of Engineering, In Ha University)

*viride*에 대해서는 成<sup>9)</sup> 및 鄭<sup>10)</sup> 등의 研究, *Chaetomium globosum*에 대해서는 渡邊과 鄭<sup>11,12)</sup>이 *Irpex lacteus*에 대해서는 若林, 西澤<sup>13,14)</sup>의 研究, 奈良은 *Trametes sanguinea*에 대한 보고<sup>15)</sup> 이외에도 各種 微生物이 분비하는 cellulase에 관한 여러 보고가 있다.

本實驗에서는 前報<sup>1)</sup>에서 검토한 cellulase 生産 最適條件下에서 生成한 배양여액의 遠沈, 上澄液을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 鹽析 및 ethanol에 의한 酵素의 粗精製와 酵素에 對한 酵素學的 諸特性을 검토하여 몇가지 結果를 얻었으므로 이에 보고한다.

## 材料 및 方法

### 1. 酵素液의 調製

前報<sup>1)</sup>에서 검토한 酵素生産最適條件에서 培養한 후 증류수대신 McIlvaine buffer (pH 5.0~6.0)을 밀기울량의 10배를 加하고 추출여과한 후 遠心分離(8000rpm, 20min.)하였다. 상등액에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2포화도에서 生成되는 침전물을 버리고 0.8포화도에서 생기는 침전물을 小量의 증류수로 용해하여 cellophane 투석튜브에 넣고 투석시켜 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제거하였다.

투석조효소에 ethanol을 加하여 80% 濃度에서 생기는 침전물을 저온건조하고 건물량을 200배로 희석하여 粗精製酵素로 사용하여 酵素의 諸特性을 검토하였다.

### 2. 酵素活性的 測定方法

#### 1) CMC 分解力

1% CMC溶液 4ml와 酵素液 2ml의 組成으로 作用시킨 후 反應液 1ml을 取하여 그중에 유리되는 還元糖을 Somogyi 變法으로 定量하였다.

#### 2) Xylan 分解力

前報<sup>1)</sup>의 方法에 準하였다.

#### 3) 粘度降下에 의한 Pectinase 活性測定

前報<sup>1)</sup>의 方法에 準하였다.

### 3. 粗精製酵素의 特性

#### 1) 精製方法에 따른 各 酵素의 回收性

##### ① (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度別 各 酵素의 回收性

조효소를 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 염석시켜 0.2포화도에서 생기는 침전효소를 回收하고 다시 상등액에 단계적으로 0.2로 포화시켜 각 포화도에 따른 회수율을 測定하였다.

##### ② Ethanol 濃度에 따른 各 酵素의 回收性

조효소를 ethanol 濃度 40~90%로 처리하여 냉각고에서 1時間 放置한 다음 遠心分離하여 얻어진

침전효소에 대하여 각각의 活性을 測定하고 相對 活性으로 表示하였다.

#### 2) 粗精製酵素의 特性

효소작용에 의한 最適條件을 알아보기 위하여 pH 및 pH안정성, 溫度 및 熱안정성과 作用時間을 달리하였을 때 그리고 基質濃度를 달리하였을 때 生成되는 還元糖을 定量하여 酵素活性을 測定하고 비교검토하였다. 또한 粗精製酵素를 여러 濃度의 基質에 15分間 最適溫度, 最適 pH에서 反應시킨 후 生成糖을 glucose로서 定量하여 Km值를 求하였다. 그리고 xylanase, pectinase 및 amylase에 대한 粗精製酵素의 活性도 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 精製方法에 따른 各 酵素의 回收性

#### 1) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度別 各 酵素의 回收性

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 포화도별에 따른 각 효소의 회수성에 대한 실험결과는 Fig.1과 같이 0.6포화도일 때 가장 좋았다.

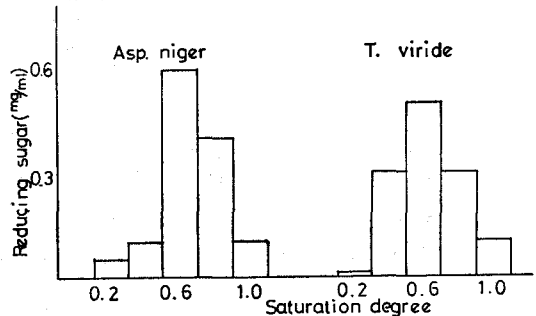


Fig. 1. Partial purification of cellulolytic enzyme complex by ammonium sulfate

#### 2) Ethanol 濃度에 따른 各 酵素의 回收性

배양여액을 ethanol을 加하여 各濃度에서 生成하는 침전물에 대한 回收性은 Fig. 2와 같다.

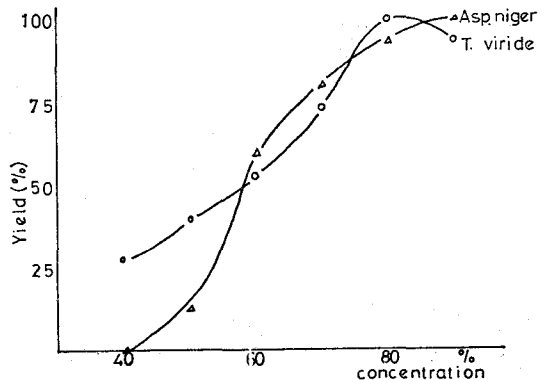


Fig. 2. Yield of enzyme treated with ethanol

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Asp. niger*는 40% 농도에서 효소단백이 전혀 침전되지 않았으며 90% 농도에서 완전 회收到었고, *T. viride*는 80% 농도일 때가 가장 좋았다.

## 2. 粗精製酵素의 特性

### 1) 最適 pH 및 pH 安定性

#### ① 最適活性 pH

粗精製酵素의 最適pH를 알아보기 위하여 각각 다른 pH에서 作用시켜 生成되는 還元糖으로 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 3과 같다.

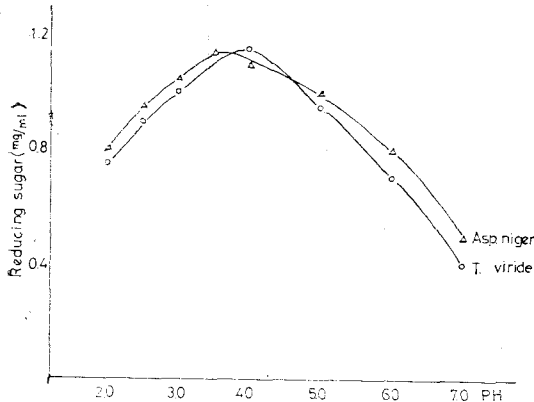


Fig. 3. Effect of pH on cellulase activity. Incubation at 40°C for 1hr.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 3.5~4.0 부근에서 最高의 活質을 나타내어 약간 산성쪽에 치우쳐 있다.

Ikada등<sup>5)</sup>은 *Asp. niger*의 glycol cellulose에 대한 최적 pH가 4.0~5.0이라고 하였으며 鄭<sup>10)</sup>은 *T. viride*의 粗酵素의 最適 pH가 4.0~5.5이며 成<sup>9)</sup>은 pH 5.0인데 비하여 약간 相異한 結果를 보여 주었다. 李<sup>16)</sup>은 *Irpex lacteus*의 배양여액이 pH 3.5~4.0 부근에서 鄭<sup>17)</sup>은 *Myriococcum albomyces*는 pH 4.0~4.5, 黑田<sup>18)</sup>은 *Neurospora*屬의 cellulase는 pH 4.5~6.0, 松村<sup>19)</sup>은 *Asp.saitoi*의 CMCase는 pH 4.0, 鄭<sup>12)</sup>은 *Chaetomium globosum*이 pH 4.0이라는 보고를 하였다. 따라서 각 균주가 生成하는 효소에 대한 최적 pH가 다소 相異하며 粗精製酵素에 대한 최적 pH는 조효소의 최적 pH와 다르다고 하였다. 本酵素의 最適活性 pH는 *Asp. niger*-SM6은 pH 3.5이며 *T. viride*-SM10은 pH 4.0임을 알았다.

#### ② pH 安定性

粗精製酵素를 KCl-HCl 및 McIlvaine 완충액으로 pH를 2.0~7.0으로 조절하여 30°C 수욕조에서 3時間 放置한 후 다시 McIlvaine 완충액으로 pH

4.0으로 조절하고 CMC 糖化活性으로 酵素의 殘有活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

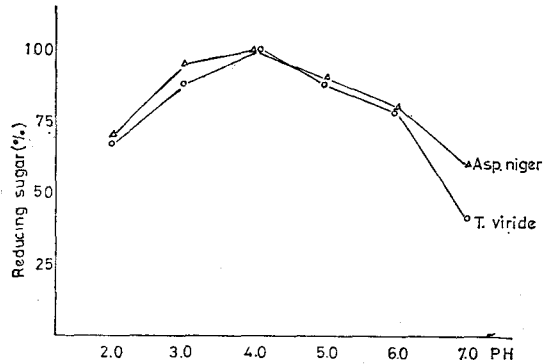


Fig. 4. pH stability curves of cellulase activity. Enzyme were treated with various pH at 30°C for 3 hrs.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 酸性쪽보다 中性쪽에 비교적 不安定한 것을 알 수 있으며 pH 3.0~6.0까지는 비교적 安定하다는 것을 알았다.

鄭<sup>10)</sup>은 分離한 *T. viride*가 pH 3.5~6.5까지 安定하다고 보고한 바와 거의 一致하였다. 또한 pH 安定性은 李<sup>16)</sup>이 *Irpex lacteus*의 粗酵素가 pH 3.0~6.0, 松村<sup>19)</sup>이 *Asp. saitoi*가 pH 2.8~6.5, 成<sup>9)</sup>이 *T. viride*가 pH 4.0~6.0이라고 보고한 바와 거의 비슷하며 松村<sup>20)</sup>이 *Asp. saitoi*의 結晶 CMCase는 pH 2.8~7.5, 鄭<sup>17)</sup>이 *Myriococcum albomyces*가 pH 3.5~8.0, 또한 今田<sup>21)</sup>은 *Rhizopus*屬이 pH 10.6에서 24時間까지 安定하다는데 反하여 本酵素는 비교적 좁은 pH 活性曲線을 나타내고 있는 것 같다.

#### ③ Xylanase 活性

1% xylan 2ml에 완충액 2ml와 酵素液 1ml을 組成으로 40°C에서 30時間 作用시켰을 때 xylan 分解力은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 3.5~4.0 사이에 最高의 活性을 나타내고 있으며 *Asp. niger*-SM6은 CMCCase뿐만 아니라 xylan에 대해서도 높은 分解力을 가지고 있음을 알 수 있다.

#### ④ Pectinase에 대한 活性

粘度降下に 依한 粗精製酵素의 pectinase活性을 測定한 結果 Fig. 6과 같으며 대체적으로 pH 變化에 따라 큰 變化는 없으나 *Asp. niger*-SM6은 pH 4.0~5.0에서 *T. viride*-SM10은 pH 4.0에서 最高의 活性을 나타내고 있었다. 두 균주 모두 粗精製 過程중에 효소활성에 별 손실없이 pectinase에 대하여 높은 活性을 나타내고 있었다. 그리고 amylase에 대한 활성은 두 균주 모두 미약하였다.

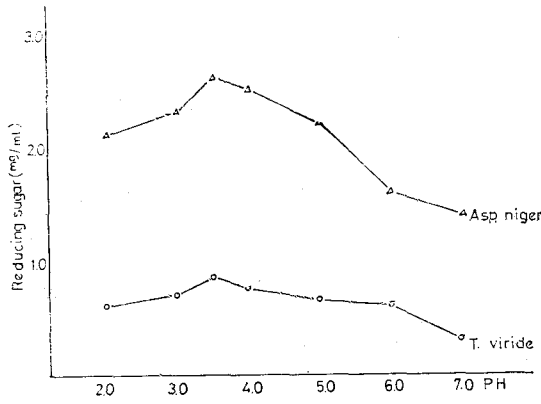


Fig. 5. Effect of pH on xylanase activity.

The reaction mixture consisted of 2ml of 1% xylan soln. 2ml of buffer soln. (pH 2.0-7.0) and 1ml of enzyme soln. Incubated at 40°C for 30 min.

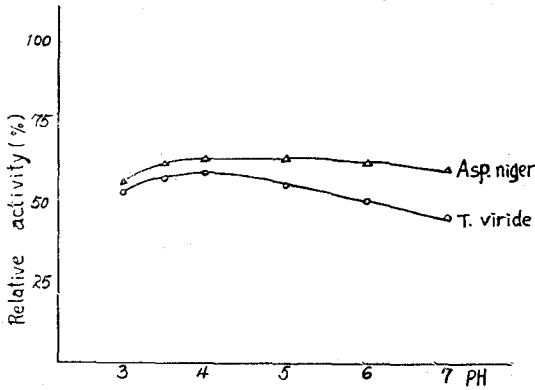


Fig. 6. Effect of pH on pectinase activity.

The reaction mixture consisted of 5ml of 1.5% pectin, 4ml of buffer soln. and 1ml of enzyme soln. Incubated at 30°C for 12 hrs. The activity was determined by the rate of decrease in viscosity.

## 2) 最適活性溫度와 熱安全性

### ① 最適活性溫度

30°C에서 70°C까지 각 온도에서 粗精製酵素를 30分間 作用시킨 후 生成된 還元糖을 定量한 結果는 Fig. 7과 같다.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 온도가 상승함에 따라 효소활성이 증가하여 60°C에서 최고의 활성을 나타내었으며 그 후 급격히 감소되었다.

Ikeda등<sup>8)</sup>이 *Asp. niger*의 glycol cellulase에 대한 효소활성이 40°C, 鄭<sup>10)</sup>이 *T. viride*의 효소활성이 40~45°C에서 가장 높았다는데 비해 최적활성 온도가 높았으며 成<sup>9)</sup>이 *T. viride*의 최적활성 온도가

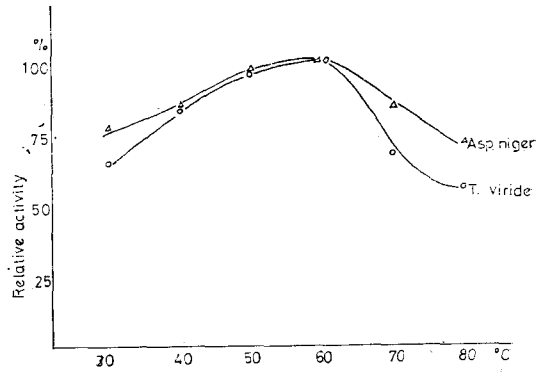


Fig. 7. Effect of reaction temperature on cellulase activity.

The reaction mixture consisted of 4ml of 1% CMC soln. (pH 3.5-4.0) and 2ml of enzyme soln.

60°C라고 보고한 바와 一致하였다. 따라서 本酵素의 最適活性溫度는 두균주 모두 60°C로 판정된다.

### ② 熱에 대한 安定性

粗精製酵素를 30°C에서 80°C까지 10°C 간격으로 각 온도에서 放置한 후 殘存 CMC 糖化活性을 測定하는 還元糖으로 測定한 結果는 Fig. 8과 Fig. 9와 같다.

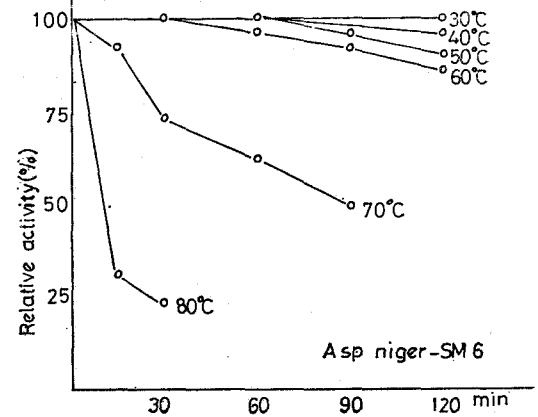


Fig. 8. Heat stability on cellulase of *Aspergillus niger*-SM6

Fig. 8 및 Fig. 9에서 보는 바와 같이 두 균주에 대한 열안정성은 다소 相異한 結果를 나타내고 있는데 *Asp. niger*-SM6은 60°C까지 비교적 安定한데 反하여 *T. viride*-SM10은 60°C에서 2시간 후에 효소활성이 35%가 失活되었다. 鄭<sup>10)</sup>이 *T. viride*가 70°C에서 不活性化되었다는 보고와 마찬가지로 *T. viride*-SM10도 70°C 90分 後에 殘存酵素活性이 10% 以下임을 알 수 있다.

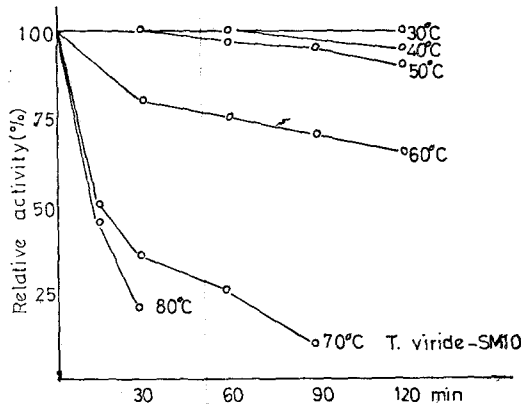


Fig. 9. Heat stability on cellulase of *Trichoderma viride*-SM10

*T. viride*의 열안정성이 成<sup>9)</sup>은 30°C, 鄭<sup>10)</sup>은 50°C 이하라는 相異한 結果를 보고한 바 있으며 今明<sup>21)</sup>은 *Rhizopus*의 cellulase가 60°C에서 3時間後에도 거의 失活되지 않았다고 하였고 黑田<sup>18)</sup>은 *Neurospora*屬의 cellulase는 60°C에서 24時間後 여지 불활성은 完全 失活된 있으나 Avicel 糖化力은 45% 殘存한다고 보고한 바 있다. 本菌株의 열에 대한 安全性은 *Asp. niger*-SM6은 60°C, *T. viride*-SM10은 50°C 이하임을 알았다.

### 3) 作用時間에 대한 영향

粗精製酵素의 作用時間에 대한 영향을 살펴 본 결과는 Fig. 10과 같다.

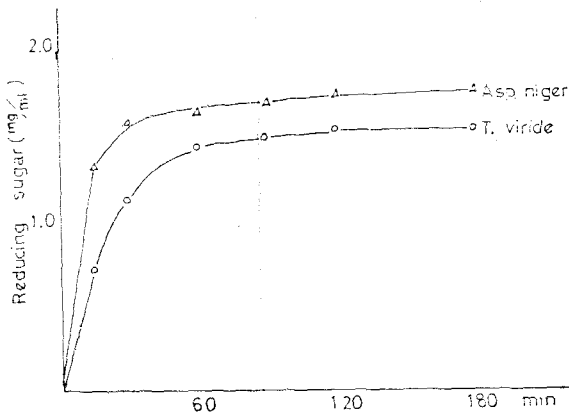


Fig. 10. Effect of reaction time on cellulase activity.

The reaction mixture consisted of 4ml of 1% CMC soln. and 2ml of enzyme soln. After incubation at 60°C at pH 3.5-4.0, the enzyme activity was determined.

Fig. 10에서 보는 바와 같이 *Asp. niger*-SM10은

30분까지 *T. viride*-SM10은 1시간까지 거의 作用時間에 비례하여 환원당생성이 증가하였으며 그후에는 극히 적은 변화만을 나타내고 있었다. 大鍵<sup>22)</sup>이 *Rhizopus*屬의 cellulase가 60분, 李<sup>16)</sup>은 *Irpey lacteus*의 粗酵素가 2時間이라고 보고한 바 있다. *Aspergillus niger*-SM6은 30분, *T. viride*-SM10은 1時間이 최적작용시간임을 알았다.

### 4) 基質濃度の 영향

기질농도에 따른 효소활성을 알아보기 위하여 0.5~3% CMC 2ml에 粗精製酵素 1ml을 加한 후 60°C에서 1時間 作用시켰을 때 生成되는 還元糖量은 Fig. 11과 같다.

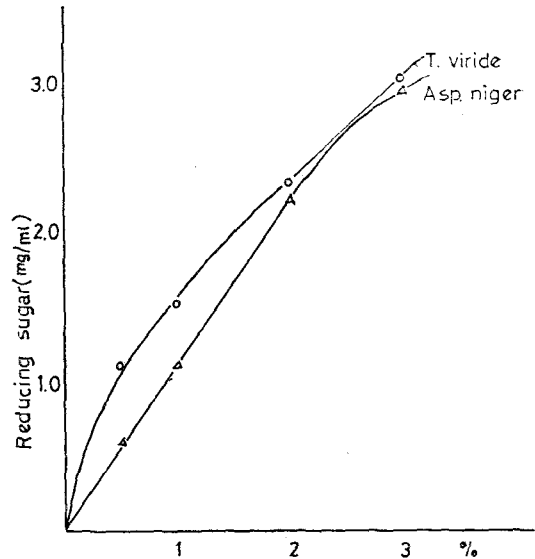


Fig. 11. Effect of CMC concentration on cellulase activity.

The reaction mixture consisted of 2ml of CMC soln. and 1ml of enzyme soln., incubated at 60°C for 1hr.

Fig. 11에서 보는 바와 같이 기질농도가 증가함에 따라 生成되는 환원당량은 거의 비례적으로 증가함을 보여주고 있다. *Asp. niger*-SM6은 CMC 농도가 2%까지 비례하였고 *T. viride*-SM10은 3%까지도 거의 비례적으로 증가하여 높은 효소활성을 나타내고 있었다.

### 5) CMCase의 Km值

粗精製酵素의 CMCase에 대한 基質濃度和 反應速度와의 관계는 Fig. 12와 같이 *Asp. niger*-SM6은  $K_m=0.8\%$ 이며 *T. viride*-SM10은  $K_m=1.01\%$ 이며 이는 이미 보고된 成<sup>9)</sup>의 결과보다 높은 活性을 나타내고 있다.

參考文獻

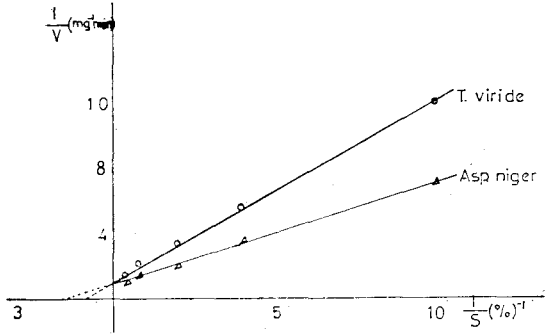


Fig. 12. Lineweaver-Burk plots for the reaction of CMCase.

The reaction mixture consisted of 4ml of CMC soln. and 2ml of enzyme soln., Incubated at pH 4.0, 60°C for 15 min. *Asp. niger*-SM 6: Km=0.8%, *T. viride*-SM 10: Km=1.01%.

要約

前報에서 검토한 효소생산 최적조건에서 생성하는 cellulase의 특성에 대한 實驗을 行하여 다음의 結果를 얻었다.

1. 粗精製時에 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 0.6포화도일 때 그리고 ethanol 濃도가 80~90%일 때 回收性이 가장 좋았다.

2. 두 균주가 생산한 cellulase의 효소작용 최적 조건은 다음과 같다.

	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. viride</i> -SM10
最適 pH	3.5	4.0
pH 安定性	3.0~6.0	3.0~6.0
最適溫度	60°C	60°C
熱安定性	60°C以下	50°C以下
最適作用時間	30分	60分
最適基質濃度	3%	3%

3. CMCase에 대한 Km値는 *Aspergillus niger*-SM6이 0.8%, *Trichoderma viride*-SM10이 1.01%였다.

4. *Aspergillus niger*-SM6은 xylanase 및 pectinase도 높은 活性을 가지고 있었다.

- 李啓瑚, 高正三; 韓農化., 19, 130 (1976)
- Reese E.T. Gilligan W.; Arch. Biochem. Biophys., 45, 74 (1953)
- Hash J. J.H. King K.W.; J. Biol. Chem., 232, 381 (1958)
- Whitaker D.R.; Arch. Biochem. Biophys., 43, 253 (1953)
- Thomas R, Whitaker D.R.; Nature, 181, 715 (1958)
- Miller G.L. Brizgalis; Arch. Biochem. Biophys., 95, 19 (1961)
- Storvick W.O. King K.W.; J. Biol. Chem., 235, 303 (1960)
- Ikeda R. Yamamoto T. Funatsu M.; Agr. Biol. Chem., 31, 1201 (1967)
- 成洛癸; 晋州農大論文集, 10, 1 (1971)
- 鄭東孝; 韓農化., 11, 109 (1969)
- Watanabe T.; J. Ferment. Technol., 46, 299 (1968)
- 鄭東孝; 韓農化., 12, 33 (1969)
- Wakabayashi K., Kanda T., Nisizawa K.; J. Ferment. Technol., 43, 739 (1965)
- Wakabayashi K., Kanda T., Nisizawa K.; J. Ferment. Technol., 44, 669 (1966)
- Nara K., Fugono T. Yoshino H.; J. Ferment. Technol., 42, 405 (1964)
- 李啓瑚, 高正三; 韓農化., 18, 117 (1975)
- 鄭東孝; 韓農化., 14, 59 (1971)
- 黑田秀穗, 望月輝也; 日釀工., 45, 341 (1967)
- Matsumura C., Maejima K.; J. Ferment. Technol., 41, 154 (1963)
- Matsumura C., Maejima K.; J. Ferment. Technol., 41, 164 (1963)
- 今田伊助, 友田勝己, 和田正三; 日釀工., 40, 140 (1962)
- Oete S., Aikawa T. Funatsu M.; J. Ferment. Technol., 42, 363 (1964)