

# 農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究

(第五報) 纖維素分解酵素 生産 곰팡이의 分離 및 選別

裴武 · 金炳弘 · 李啓準

韓國科學技術研究所 · 應用微生物研究室

## Studies on the Microbial Utilization of Agricultral Wastes

(Part 5) Isolation and Selection of Cellulase Producing Fungi

Moo Bae, Byung Hong Kim and Kye Joon Lee

Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received June 30, 1976)

### Abstract

In the studies of microbiological utilization of cellulosic wastes, cellulolytic fungi were isolated and screened out.

At the first stage, 221 cellulolytic fungi were isolated from different sources such as soils, humus, composts and rotten wood debris by enrichment culture techniques. In the second stage, 36 strains of fungi out of those previously isolated were selected for their cellulase activities estimated by means of filter paper degradation, carboxy methyl cellulose liquefaction and cup method.

Activities of C<sub>1</sub>-cellulase, C<sub>x</sub>-cellulase and filter paper activity were adopted on the final screening stage and five different strains which are tentatively identified as *Aspergillus* sp. (strain No. AS-9), *Penicillium* sp. (strain No. KNI-1-2), *Trichoderma*, sp. (strain No. KI-7-2, KI-7-5, KI-4-1-1B) were selected for their high potency of C<sub>1</sub> and C<sub>x</sub>-cellulase activities.

When rice straw milled and treated with NH<sub>4</sub>OH was hydrolyzed with the crude enzyme prepared from the culture broth of *Trichoderma* sp. (strain No. KI-4-1-1B), saccharification rate was obtained up to 26%.

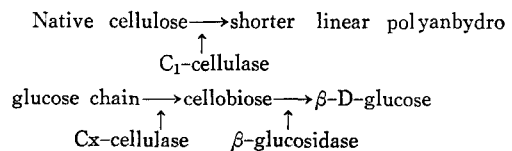
### 序 論

각종 농산폐자원의 이용성을 증진시키기 위하여 저자들은 섬유질을 산분해 시킨후 당화액을 사용하며<sup>(1)</sup> 또는 섬유질을 직접 기질로 사용하여 단세포 단백을 생산하는 조건을 보고한바 있다<sup>(2-4)</sup>.

섬유질의 산분해 당화보다는 효소분해 당화가 많은 이점을 지니며 한편 섬유소 분해 효소(Cellulase)는 전분 및 단백질 추출공업<sup>(7,8)</sup>, 식품가공<sup>(9)</sup>, 의약품등 광범위하게 사용되고 있는 실정이다.

Cellulase는 섬유소의 β-1, 4 glucan을 분해하여 β-

D-glucose을 생산하는 β-1, 4-glucan-4-glucohydrolase로 정의하고 있는데<sup>(10)</sup> 실제 미생물이 분비하고 있는 cellulase는 최소한 2종이상의 효소가 존재하여 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며 이들의 작용기전은 다음과 같이 설명되고 있다<sup>(11)</sup>.



Cellulase를 분비하는 미생물은 세균, 사상균등 비교적 광범위하나 공업적으로 이용될수 있는 것은

곰팡이인 *Trichoderma* 속, *Aspergillus* 속 등이 다<sup>(12)</sup>.

곰팡이에서의 cellulase 생성은 적응효소이고 inducer의 영향을 많이 받으며 사용균의 종류에 따라 효소의 구성 및 작용에 특이성 있는 것으로 알려져 있다<sup>(13)</sup>.

Mandels 등은 *Trichoderma viride* QM6a 을 모균으로 하여 C<sub>1</sub>-cellulase의 역가가 우수한 변이주 QM9123을 얻어 섬유소 당화에 매우 효과적으로 이용할 수 있다고 보고 하였다<sup>(14)(15)</sup>.

현재 세계적으로 부존된 에너지자원의 고갈이 예견됨에 따라 인류에게 가장 풍부한 자원인 섬유소를 에너지자원으로 이용할 수 있는 방법의 개발에 있어서 cellulase의 중요성은 더욱 인식강조되고 있다<sup>(16,17)</sup>.

본 연구에 있어서는 cellulase을 생산하는 곰팡이를 자연계에서 분리, 선별하였고 C<sub>1</sub>-cellulase을 포함하는 cellulase을 강력히 생산하는 균주를 선택하였기에 그 역가에 관해 보고하고 저한다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌株分離源

부식토 퇴비 섞은나무 및 토양등 주로 섬유질이 많이 포함되어 부식하고 있는 것을 전국 각처에서 수집하여 菌分離源으로 하였다.

### 2. 使用培地

분리용배지는 NaNO<sub>3</sub> 0.3%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, KCl 0.05%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%, Agar 1.5%에 pulp powder 1.0%와 CMC 0.5%을 탄소원으로 첨가하여 섬유소를 자화할 수 있는 곰팡이를 분리 하였다

분리된 균주는 pulp powder 0.5%, CMC 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05% CaCl<sub>2</sub> 0.03%, 및 Agar 1.5%에 밀기울 100g을 증류수 1.5l에 넣어서 121°C에서 15분간 추출한다음 가제로 여과한 여액을 증류수 대신 사용하였다.

분리균주로부터 섬유소분해능이 강한 균주를 선별하는데는 Agar를 뺀 보존용 배지의 조성으로 하였다.

### 3. 纖維素資化 곰팡이의 分離

전국 각처에 수집한 균분리원 섞은나무등의 시료 1g를 멸균된 생리식염수에 넣고 충분히 현탁시킨 뒤 상등액을 10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup> 정도로 희석시켜 분리용배지 20ml로 조제한 평판배지에 도말하였다.

28~30° 에서 3~7일간 배양하여 생성된 독립 취락을 선택하여 보존용 사면배지에 이식하여 Cellulase 생산균주 선별에 사용하였다.

### 4. 分離菌의 培養

분리균의 배양은 선별용배지 20ml가 담긴 100ml 삼각 flask에 접종하여 28°C로 조절된 진탕배양기에서 200rpm으로 진탕하면서 5일간 배양하였다. 배양액은 3,000×G로 10분간 원심분리하여 상등액을 섬유소분해능을 측정하는 조효소액으로 하였다.

### 5. Cellulase 活性 測定 및 優秀菌株의 選別

분리균으로부터 cellulase생성균주를 일차 선별할때는 여과지붕괴속도<sup>(18)</sup>, carboxy methyl cellulose액화법<sup>(19)</sup>및 cellulose agar plate위에 cup method<sup>(20)</sup>로서 cellulase 活性을 측정하였으며 최종선별에서는 C<sub>1</sub>-cellulase, C<sub>x</sub>-cellulase 및 filter paper activity 를 측정하였다.

가. 여과지붕괴법 (filter paper breakdown method)<sup>(18)</sup>

L형 시험관에 0.05M acetate buffer pH 5.0 4.0 ml와조효소액 1.0ml을 넣고 40°C water bath에서 10분간 예열한 뒤 1×6cm로 잘른 여과지 (whattmanNO.1) 2매를 넣고 Monods shaker에서 60~70rpm으로 진탕하면서 여과지 붕괴정도를 5분 간격으로 관찰하여 여과지가 완전 붕괴되는데 요하는 시간을 분으로 나타내었다.

나. Carboxy methyl cellulose 액화법<sup>(19)</sup> (C. M. C. liquefaction method)

Acetate buffer에 4% CMC용액을 만들어 내경이 12.5mm인 시험관에 7ml씩 넣고 수직으로 세워 기질층을 만들고 그 위에 0.5ml의 조효소액을 넣고 40°C 항온기에서 24시간 정치시켜 반응시킨다. 액화된 층의 깊이를 cm로 표시하였다.

다. Cup method.<sup>(20)</sup>

0.05M acetate buffer PH5.0에 agar 1.5%를 가열하여 녹인 다음 petridish에 20ml씩 일정하게 붓고 수평하게 굳힌다. 같은 buffer에 agar 1.5% bacto-cellulose 0.1%을 녹인 다음 4ml 씩을 그위에 부어 역시 응고시켜 cellulose agar 평판을 만든다. cellulose agar 평판 위에 stainless steel cup (내경 6mm 높이 10mm)을 중심에서 반경 2.8cm 되는 원위에 사이가 90° 되도록 4개를 세우고 조효소액 0.2ml씩 채운다. 40°C 항온기에서 24시간 반응시킨 뒤 I<sub>2</sub>용액으로 염색시켜 반응원의 직경을 측정하였다.

라. C<sub>1</sub>, C<sub>x</sub> 및 F.P-activity 측정<sup>(12)</sup>

여과지 붕괴속도를 측정하는 방법과 동일하게 하는데 C<sub>1</sub>-cellulase의 기질로 탈지면 50mg을 사용하여 24시간 반응시키고 생성된 환원당의 양을 D-glucose 기준으로 Somogyi-Nelson 법으로<sup>(21)</sup> 측정하여 조효소액 1ml에 의해 생성된 glucose 1mg을 1 unit로 한다. Cx-cellulase는 CMC 1% 용액을 사용하여 F. P. -cellulase의 경우는 여과지 (1×6cm) 1매를 사용한다. 1시간 반응시킨 뒤 생성된 glucose 1mg을 1 unit로 한다.

다. 벚지당화율

벚지을 3~4mm로 분쇄하여 18% NH<sub>4</sub>OH 로서 상온에서 24시간 처리후 중성이 될때까지 수세한 뒤 60°C에서 감압 건조시킨다. 이렇게 처리된 벚지분말 25mg을 C<sub>1</sub>-cellulase와 동일하게 반응시키고 분석하여 생성된 glucose의 양을 기질에 대한 백분율로 표시하였다.

實驗結果 및 考察

1. 纖維素資化 곰팡이의 分離

전국각처에서 수집한 시료에서 섬유소분해력이

있는 곰팡이를 분리할때 배지중의 탄소원으로써 pulp powder와 CMC만을 사용하므로 섬유소를 차화할수 있는 균만을 성장케 했으며 filter paper 로 평판배치 표면을 덮으면 곰팡이만이 여과지 위로 취락을 형성시키므로 잡균의 제거가 용이하였다.

일단 분리된 균주는 보존용배지에 접종하여 형태학적으로 관찰하여 *penicillium*속, *Aspergillus*속 *Trichoderma*속, *Neurospora* 속 및 기타로 구분하여 총 221균주를 분리하였다.

2. Cellulase 生産菌의 選別

가. 一次選別

분리한 총 221주의 사상균을 선별용배지에 접종 배양하여 조효소액을 얻고 조효소액중의 cellulase 활성을 여과지 붕괴속도 CMC 액화법 및 cup method 로서 cellulase의 활성을 측정하여 일차선별된 36주의 cellulase 활성은 Table 1 과 같다. 천연물인 밀기를 침출물이 첨가되므로 분리균주들이 잘 자랐으나 cellulase의 활성에는 차이가 많았다.

활성측정 방법간에 상호 반드시 일치하지는 않았으나 전체적으로 활성이 강하게 나타나는 것을 일차 선별하였고 이를 배지성분을 변화시켜 배양

Table 1. Cellulase Activities of Fungi at the First Selection.

Isolants.	Cellulolytic activities			
	Filter paper degradation (min.)	CMC liquefaction	Cup method (cm)	
<i>Aspergillus</i> sp.	AS-9	130	1.7	3.40
	CH-9-2	120	1.0	2.60
	KY-4-2	140	2.0	2.93
	KY-10-1	140	1.2	2.49
	KW-2-3	140	1.7	3.27
	M-12	85	1.5	2.95
	M-13	130	1.35	3.03
	SU-2-3	220	1.7	3.31
<i>Neurospora</i> sp.	CH1-6	90	1.6	3.18
	CH-2-6	90	1.6	3.18
	KI-5-4	120	2.1	3.24
	O-1	230	1.55	2.98
	SO-4-2	—	2.0	3.17
<i>Penicillium</i> sp.	CH-9-3	120	1.3	3.40
	KI-1-4F	240	1.4	2.28
	KN-1-2	170	1.2	2.17
	KY-10-3	160	1.0	2.76
	J-11-3	240	1.7	2.51
	SU-7-2	—	1.5	3.89
<i>Trichoderma</i> sp.	CM-2	125	1.3	2.67

	KI-4-1-1B	240	1.0	3.74
	KI-4-1-2	260	1.2	3.15
	KI-7-2	130	1.3	2.40
	KI-7-5	180	1.1	3.11
	KN-1-1	210	1.1	2.71
	KW-2-4	240	1.4	3.14
	KW-5-8	260	1.2	3.18
	SU-4-2B	100	1.7	2.94
Unidentified strains	CH-10-2	240	1.3	2.70
	J-8-2	230	1.3	2.20
	J-10-1	230	1.3	2.72
	J-11-2	200	1.8	2.30
	J-11-6	250	1.0	1.80
	KI-4-1-1	240	1.3	2.99
	KI-5-5	250	1.25	2.14
	KW-3-1	260	1.5	3.57

하브로써 cellulase의 활성의 변화를 측정하였다.

나. 二次選別

곰팡이로서 cellulase을 생산함에 있어 탄소원으로 사용하는 섬유소의 종류와 효소유도제의 종류에 따라 cellulase의 활성이 각각 다르게 나타난다

고 보고 된바<sup>(22)</sup> 있으므로 탄소원으로 glucose, maltose, lactose, cellobiose, cellulose carboxymethyl cellulose 및 ammonia 처리후 수세한 벚짚분말을 사용하였을 때의 cellulase 활성을 측정하였다. 즉 Table 2 에서 보는 바와 같이 ammonia 처리 벚짚

Table 3. Effects of Carbon Sources on the Formation of Cellulase by the Cellulase Producing Fungi (II).

Strain No.	Carbon sources	Reacted zone (cm)						
		Glucose	Maltose	Lactose	Cellobiose	Cellulose	CMC	Rice straw
<i>Penicillium</i> sp.	J11-3	1.43	1.82	—	1.50	2.32	1.90	2.67
<i>Penicillium</i> sp.	KN-1-2	2.67	1.91	2.04	1.51	2.19	2.71	2.51
<i>Penicillium</i> sp.	KI-1-4F	1.38	2.56	—	2.08	2.32	2.08	1.82
<i>Trichoderma</i> sp.	CM-2	—	2.16	2.04	1.58	1.50	2.12	2.36
<i>Trichoderma</i> sp.	KI-4-1-1B	2.18	2.30	1.88	2.18	1.98	2.32	2.40
<i>Trichoderma</i> sp.	KI-7-2	2.31	2.10	2.01	2.53	2.11	2.48	2.47
<i>Trichoderma</i> sp.	KI-7-5	2.02	2.41	2.67	2.26	1.88	2.48	2.74

Culture medium:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.3%,  $\text{NaNO}_3$  0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.83%, Malt ext. 0.5%, Carbon sources 1%

Culture condition: 28°C, 200rpm, 5days.

Activities were measured by cup method.

을 기질로 사용하였을 때 cellulase 활성이 가장 좋았다. 이러한 결과는 Gupta<sup>(18)</sup> 등의 결과와 일치하였다.

일차 선별된 36주 중에서 탄소원의 영향을 검토하면서 15주를 선별하였고 이들 균주의 질소원을 urea,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{NaNO}_3$  등으로 변화하였으나 cellulase 활성에는 큰 차이가 없었으므로 Gupta<sup>(23)</sup> 등의 보고에서 사용했던 대로  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

urea 및 peptone을 동시에 사용하여 3차 최종선별하도록 하였다.

다. 최종선별

탄소원으로 ammonia 처리 벚짚을, 질소원으로는  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  urea, pepton을, inducer로서 glucose을 첨가한 선별용 배지에 2차 선별된 15균주를 배양하여 cellulase 활성을  $C_1$ ,  $C_x$  및 FP-activity를 측정하여 최종적으로 선별된 균주와 그역가

는 Table 3 과 같다.

일차 선별시에 사용한 cellulase 활성측정 방법 보다는 C<sub>1</sub>, C<sub>x</sub>-cellulase 활성을 측정하는 것이 최종선별에서는 적당하였다. 즉 결정성 섬유질에 최초로 작용하여 섬유소의 효소분해에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 C<sub>1</sub>-cellulase을 측정하여의 C<sub>1</sub>-cellulase. 활성이 강한 균주를 선별하

는 것이 필요하기 때문이다.

분리균주중 *Trichoderma* 속 곰팡이가 타숙 균주보다 C<sub>1</sub>-cellulase을 강하게 분비하는 것으로 나타났다.

이상 최종선별된 균주로부터 얻은 조효소액으로 처리벼짚을 당화시킨 결과 Table 3 에서 보는바와 같이 26%까지 당화되었는데 그결과는 C<sub>1</sub>-cellulase

Table 3. Cellulase Activities of Fungi at the Final Selection.

Strains selected	Cellulolytic activities*1			Rice straw Saccharification Rate %
	C <sub>1</sub> -cellulase (mg/ml/24hr)	C <sub>x</sub> -cellulase (mg/ml/hr)	FP-cellulase (mg/ml/mr)	
<i>Aspergillus</i> sp. As-6	0.65	2.00	2.1	12.5
<i>Penicillium</i> sp. J-11-3	1.53	1.37	2.79	27.3
KN-1-2	1.53	1.47	2.87	26.3
<i>Trichoderma</i> sp. CM-2	1.44	1.98	2.92	20.0
KI-4-1-1B	1.83	2.09	2.98	26.4
KI-7-2	1.83	1.58	3.00	18.9
KI-7-5	2.06	1.68	3.25	24.3

Culture medium; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.3%, NaNO<sub>3</sub> 0.3%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.05%, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.03%, Pepton 0.01%, Glucose 0.1%, Treated rice straw 1%

Culture condition; 28°C, 200rpm 5days

\*1 C<sub>1</sub>-cellulase; mg of D-glucose produced/lml of crude enzyme/24hr.

C<sub>x</sub>, FP-activities; mg of D-glucose produced/lml of crude enzyme/1hr.

활성과 반드시 일치하지는 않았다. 이러한 결과는 효소의 기질특이성 및 C<sub>x</sub>-Cellulase 에 기인하는 것으로 판단 된다.

이상 섬유소를 당화할 목적으로 Cellulase생산균주를 분리 선별하였는바 그 균주의 배양조건들은 차후에 보고할 예정이다.

KI-1-2 *Trichoderma* sp. strain No. KI-7-2, KI-7-5, 및 KI-4-1B을 선별하였다.

이상 최종적으로 선별된 균주중의 strain No. KI-4-1-1B 조효소액으로 ammonia 처리벼짚을 당화시킬때 24시간 작용으로 26%가 당화되었다.

## 참 고 문 헌

## 要 約

곰팡이를 이용하여 섬유소분해효소를 생산한 목적으로 전국각처에서 수집한 102종의 시료로부터 총 221주의 곰팡이를 분리하였다.

이들 분리균주의 섬유소분해능을 여과 지붕괴법 CMC 액화법 및 cup method로서 1차 36 균주를 선별하였고 1차선별된 균주를 탄소원을 변경하여 배양한뒤 활성을 추정하여 2차로 15균주를 선별하였다.

15균주를 개선된 배지에서 배양한뒤 C<sub>1</sub>, C<sub>x</sub> 및 filter paper-activity을 측정하여 최종적으로 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub>-Cellulase 의 활성이 강한 균주인 *Aspergillus* sp. strain No. AS-9, *Penicillium* sp. strain No.

- (1) Bae, M. and B.H. Kim: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 1 (1973)
- (2) Bae, M. and B.H. Kim: *ibid*, 2, 1 (1974)
- (3) Bae, M. and B.H. Kim: *ibid*, 2, 79 (1974)
- (4) Bae, M. and K.J. Lee now in press
- (5) Katz, M. and E. T. Reese: *App. Microbiol.*, 16, 419 (1968)
- (6) Ghose, T.K. and J. Kostick: *Biotech, and Bioeng.* XI 239 (1969)
- (7) 高橋禮治: *Fermentation Technol.*, 44, 842 (1966)
- (8) 田奇龍一: *ibid*, 40, 195 (1962)
- (9) 外山信男: *ibid*, 44, 830 (1966)

- (10) Report of the Commission on Enzymes of International Union of Biochem. Oxford Pergamon Press (1961)
- (11) Rees, E. T., R. G. H. Siu: *J. Bacteriol.*, **59**, 485 (1950)
- (12) Mandels, M. and J. Weber: *Adv. Chem. Ser.*, **95**, 391-414 (1969)
- (13) Mandels, M. and E. T. Reese: *J. Bacteriol* **79**, 816 (1960)
- (14) Mandels, M., J. Weber and R. Perizek: *Appl. Microbiol.*, **21**, 152 (1970)
- (15) Chose, T. K., ; *U.S. Patent* 3,642,580 Feb. 15 (1972)
- (16) Mandels, M., L. Hontz and J. Nystrom. : *Biotech. and Bioeng.*, XVI 1471 (1974)
- (17) Hottel, H. C. and J. B. Howard: *New Energy Technology* MIT Press 1971
- (18) Takayuki, T. and N. Togama: *Ferment. Technol.*, **40**, 85 (1962)
- (19) Harza, A. F., S. K. Rose and B. C. Guha: *C. A.*, **54**, 13269 e
- (20) Tansey, M. R: *Arch. Microbiol.*, **77**, 1 (1971)
- (21) Somoigyi, Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944), *ibid*, **195**, 19 (1952)
- (22) Mandels, M., F. W. Parrish, and E. T. Reese: *J. Bacteriol.*, **83**, 400 (1961)
- (23) Gupta, J. K., N. B. DAS and Y. P. Gupta: *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 1961 (1967)