

農産廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 關한 研究〔第二報〕

*Irpex lacteus*에 依한 Cellulase 의 生産 및 그 酵素特性에 關하여

李 啓 瑚 · 高 正 三

서울大學校 農科大學 食品工學科

(1975년 6월 18일 수리)

Studies on the Production of Fermented Feeds from Agricultural Waste Products〔Part II〕

On the Production and Characteristics of Cellulase by *Irpex lacteus*

Ke-Ho, Lee and Jeong-Sam, Koh

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

(Received June 18, 1975)

SUMMARY

In order to utilize the agricultural waste products for animal feeds, studies have been made concerning the production of cellulase of *Irpex lacteus* and its properties of crude enzyme, and summarized as follows.

1. At the production of cellulase, the culture of wheat bran added with rice bran was more active than any other cultures.
2. The optimum incubation time is 5 days in shaking culture.
3. The optimum condition of reaction in saccharification with CMC were obtained the following results.
 - 1) The optimum pH was within the range of from 3.5 to 4.0 and stable within 3.0 to 6.0.
 - 2) The optimum temperature was 40°C and thermal stability was below 40°C.
 - 3) The optimum reaction time was 2 hours.
 - 4) The optimum crude enzyme concentration was 50%V/V and substrate concentration 1%.

I. 序 論

食生活의 改善을 爲해 動物性 단백질의 供給源
인 畜産業의 進흥에 對한 必要性은 일찍부터 대두

되고 있으나 사료의 供給사정 이 圓滑치 못하여 畜
産業의 發達에 制限因子가 되고있다.

매년 多量生産되는 農産廢棄物은 극히 一部만 사
료로 利用되고 大部分은 폐기처분되고 있다. 이는

* 本 研究는 1974年度 産學協同 財團 學術研究費의 補助로 이루어졌으며 아울러 財團에 謝意를 表하
는 바이다.

農産廢棄物의 化學的 組成이 cellulose, xylan, pectin 등으로 되어 있기 때문에 가축은 이를 소화 흡수하지 못하는 까닭이다. 그러므로 이들 化學組成을 加水分解하는 酵素資源開發은 더욱 有益한 것이라 생각된다.

Cellulose分解酵素는 하등동물보다. 여러 微生物에서 인지되어 많은 研究가 있었는데 cellulase를 生産하는 菌株로는 *Aspergillus sp.* (1,2,3,4) *Penicillium sp.* (5) *Rhizopus sp.* (6,7,8) *Chaetomium globosum* (9,10) *Myrothecium verrucaria* (11,12,13) *Trichoderma viride* (Koningi) (14,15,16,17) *Trametes sanguinea* (18,19) *Myriococcum albomyces* (20) *Irpex lacteus* (21,22,23,24) 이외에도 많은 研究가 보고되어 있다. 上記 菌株에서 生産된 酵素는 基質特異性, 分解, 活性度 및 分解機構 등이 相異할 뿐만 아니라 적어도 2種以上の 酵素로 되어 있다고 보고되고 있다. 즉 천연섬유에 作用하여 어느 정도의 重合도를 가진 β -1, 4-glucan으로 分解하는 cellulase(C₁)와 部分的으로 分解된 glucan이나 재생섬유소와 같이 結晶性を 잃은 섬유소에 作用하는 cellulase(C₂)가 存在한다. (25) 따라서 酵素의 精製過程을 거쳐 C₁型이나 C₂型이 강한 活性를 나타내는 순화된 製品을 얻을 수 있으나 本實驗에서는 이의 복합적인 效果를 얻기 위하여 粗酵素液을 出發酵素로 사용하였다.

Cellulase生産성이 우수한 *Irpex lacteus*가 生産하는 微生物性 酵素를 利用하여 農産廢棄物을 발효사료화하고 사료 수급문제를 타개하기 위한 그 기초적인 단계도 cellulase의 生産條件 및 酵素의 諸特性을 살펴 보았으므로 그 結果를 이에 보고한다.

II. 材料 및 方法

1. 供試菌株

Centraal bureau voor Schimmel Cultures에서 入手한 本大學 소장인 *Irpex lacteus*를 供試菌株로 하였다.

2. 培地 및 培養

- 1) 밀기울
- 2) 밀기울과 옥수수숙을 1:1로 混合
- 3) 옥수수숙 (20mesh 분쇄물)
- 4) 밀기울과 쌀겨를 10:1로 混合

上記와 같은 組成의 培地 3g에 水道水 100ml을 加하고 500ml진탕용 flask에 넣고 15lb 15分間 加壓殺菌 接種後에 25°C의 恒温실에서 rotary shaker

(약 120rpm)로 진탕배양하였다.

3. 粗酵素液의 調製

所要日數別 培養後에 Waring blender로 40초간 가볍게 마쇄한 다음 200mesh nylon布로 여과하고 培養濾液을 0°C. 7000rpm으로 30分間 냉동원심분리한 다음. 上澄液에 toluol을 加하여 냉장고에 보관하며 粗酵素液으로 사용하였다.

4. 粗酵素活性的 測定

1% CMC (Carboxy methyl cellulose) 용액을 기질로 그의 粘度降下 및 生成還元糖의 測定으로 cellulase活성을 測定하였다. 生成된 還元糖量은 비등욕중에서 10分間 처리하여 不活性化시킨 粗酵素液을 加하여 같은 方法으로 처리한 粗酵素液중의 糖量을 測定하여 배준 값을 酵素作用에 의한 生成糖量으로 환산하였다.

1) 粘度降下測定에 의한 Cellulase 活性測定

1% CMC 4ml, 완충액(McIlvaine buffer pH 4.0) 4ml, 粗酵素液 2ml를 15ml容 screw-cap test tube에 넣어 잘 混和하고 40°C 수욕조에서 30分間 作用시킨 후 그 反應液 6ml를 Ostwald 粘度計에 넣어 30°C 3分後 流下時間을 測定하고 粘度降下를 다음 式으로 表示하였다.

$$V(\%) = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100$$

V : 粘度降下率

V₀ : (基質液 + 효소과외액)의 流下時間(秋)

V_t : (基質液 + 粗酵素液)의 流下時間(秋)

2) 還元糖 測定에 의한 cellulase 活性 測定.

위 反應液 1ml를 取하여 그 中에 유리되는 還元糖을 Somogyi變法(26)으로 定量하였다.

5. 粗酵素 特性的 검토

酵素作用에 대한 최적조건을 알아보기 위해 최적온도 및 熱安全性, 최적 pH 및 pH 安全度, 作用時間, 효소농도와 基質濃度를 달리하였을 때 生成되는 還元糖量을 定量하여 相對活性으로 나타내었다.

III. 結果 및 考察

1. 培 養

쌀겨를 加한 糠培地가 生育이 가장 良好하였으며 옥수수숙만 사용한 培地가 가장 나빴다. 培地는 培養 1日後 배양액이 현탁되었고 3日이 지나면 서 균체 증식을 볼 수 있었으며 4日後부터 菌體의 granule이 급격히 증가하며 점성이 커졌다. 培養濾液은 white yellowish에서 培養日數가 경과한 것 일 수록 대체적으로 투명한 적갈색으로 着色되었

으며 pH범위는 4.1~6.8의 넓은 범위를 나타내었다.

2. 培養基 및 培養日數의 영향

배양일수에 따른 酵素生産을 알아보기 위해 3일부터 9일까지 2일간격으로 배양일수를 달리하였을 때 粗酵素 活性을 測定한 結果는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다.

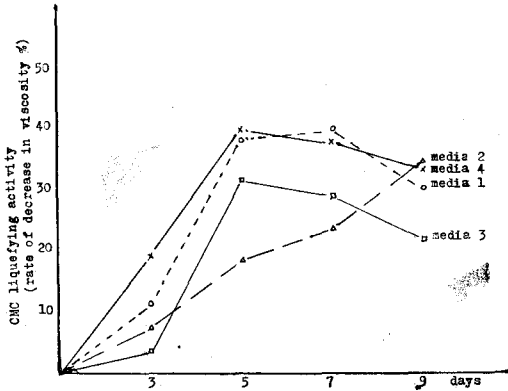


Fig. 1. Change in crude cellulase activity of each media. (40°C. 30min. incubation)

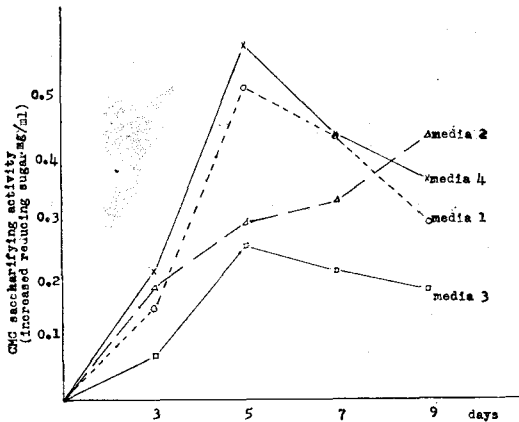


Fig. 2. Change in crude cellulase activity

도표에서 보는 바와 같이 培養 5일만에 粘度降下 및 還元糖 生成이 최고에 이르렀으며 그후 약간 감소하는 경향을 보이고 있음을 알 수 있다. 이는 生菌體 增加가 粗酵素活性에 比例함이 아니고 培養開始 5日 以後에는 오히려 活性이 감소하고 있음을 알 수 있다.

또한 살거를 加한 數培地區가 밀기울만 사용한 培養基區보다 酵素活이 가장 良好했으며 옥수수숙

만 사용한 培養基區가 가장 不良하였다. 옥수수숙에 밀기울을 混和한 培養基區의 효소는 培養日數 경과에 따라 cellulase에 대한 還元糖 生成能이 점차 증가함을 보여주고 있는데 이는 흥미있는 일이라 생각된다. 酵素生産을 위한 最佳배양일수는 5일이며 살거를 加한 數培地區가 가장 좋은 효소생성 배지임을 알았다.

3. 粗酵素의 特性

1) pH의 영향

培養最適條件(살거를 加한 數培地에서 5日間 shaking culture한)에서 生成한 crude cellulase의 最適 pH를 알아 보기 위해 각각 다른 pH에서 作用시켜 粗酵素의 活性을 비교한 結果 Fig. 3과 같다.

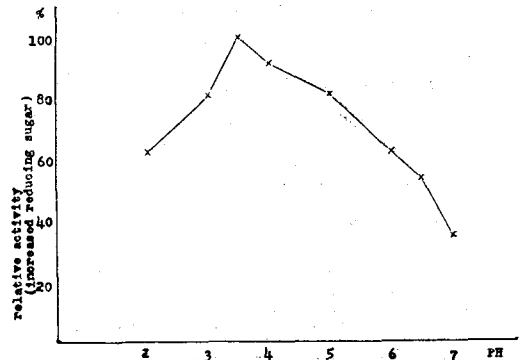


Fig. 3. Effect of pH on crude cellulase activity (40°C. 4hrs. incubation)

Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 3.5~4.0 부근에서 최고의 活性을 나타내어 약간 산성쪽으로 치우쳐 있다. 尾崎⁽²³⁾ 등이 *Irpex lacteus*의 CMC-ase 最適 pH가 3.7이라고 보고한 바와 거의 일치하였으며 *Trichoderma viride*⁽¹⁷⁾와 *Rhizopus sp.*⁽¹⁷⁾의 最適 pH가 pH 5.0이라고 보고한 것에 비하여 本菌株의 最適 pH는 약간 산성인 pH 3.5~4.0임을 알았다.

2) pH 安全度

粗酵素液을 KCl-HCl 및 McIlvaine 완충액으로 pH를 2.0~7.0까지 조절하여 이를 30°C 수욕조에서 4時間 放置한 後 다시 McIlvaine 완충액으로 pH 4.0으로 조절하고 CMC糖化力로 殘有酵素의 活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 pH 3.0~6.0까지는 安全하다 또한 本酵素는 酸性測보다 中性測이 매우 不安全함을 알 수 있다. 若林⁽²⁴⁾ 등이 報告한

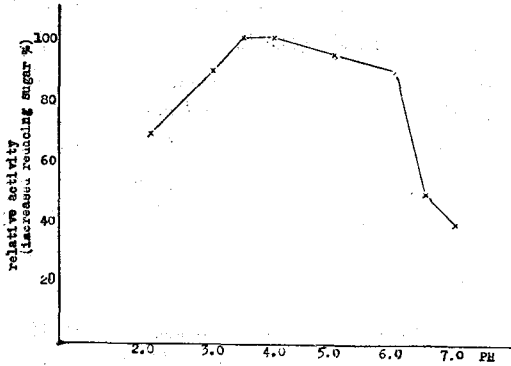


Fig. 4. pH stability of crude cellulase activity

*Irpex lacteus*의 두 희분의 pH安全도가 각각 pH 2.5~6.0 pH 3.5~6.0이라고 보고 한 바 있으며 이는 이들 효소가 精製區分이 되는 그 pH가 각각 다르게 된다는 보고⁽³⁾를 뒷받침하고 있으며 *Myriococcum albomyces* CMC-ase의 pH가 3.5~8.0의 넓은 pH 活性曲線을 가지고 있으며⁽²⁰⁾ *Rhizopus* 속이 生成하는 효소가 pH 10.6에서 24시간후 전혀 失活이 되지 않는다.⁽⁶⁾는 보고에 비하여 本酵素는 비교적 좁은 pH活性曲線을 나타내고 있는 것 같다.

3) 溫度的 영향

30°C에서 70°C까지 各溫度에서 粗酵素를 30分間 作用시킨후 生成된 還元糖을 定量한 결과 Fig. 5와 같다.

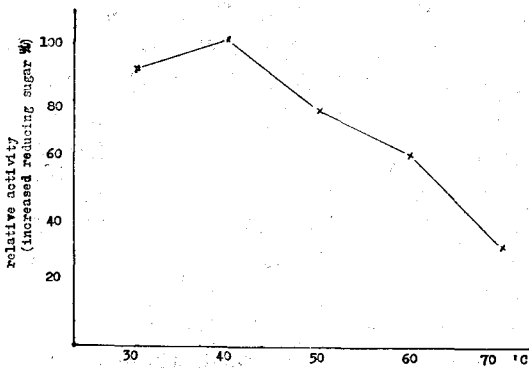


Fig. 5. Temperature dependence of crude cellulase activity. (30 min. incubation)

Fig. 5에서 보는 바와 같이 40°C에서 最高活性을 나타냈으며 온도상승에 따라 급격히 活性이 저하되었다. 이는 若林⁽²⁴⁾등의 結果와 거의 비슷한 結果를 나타내었다.

4) 粗酵素의 熱安全性

30°C에서 70°C까지 10°C간격으로 각 온도에서 粗酵素를 120分間 放置한 후 30分마다 그 一部를 取하여 殘存 CMC 糖化活性을 測定되는 還元糖으로 測定한 結果 그 相對活性은 Fig. 6과 같다.

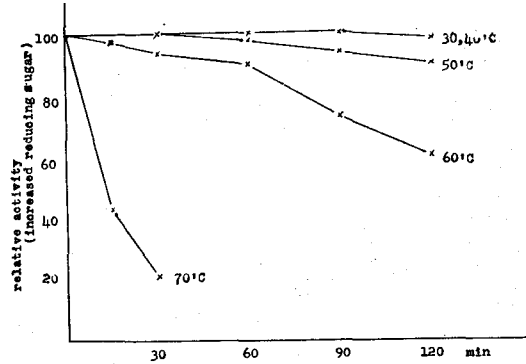


Fig. 6. Heat stability of crude cellulase activity

Fig. 6에서 보는 바와 같이 30°C, 40°C에서는 120分間 거의 失活되지 않았으나 50°C에서는 10%, 60°C에서는 30%, 70°C에서는 30分後에 80%가 失活됨을 알 수 있었다. 尾崎⁽²³⁾ 등은 80°C 10分後에 完全히 失活된다고 보고한 바 있다. 粗酵素의 熱安全性은 40°C 以下임을 알았으며 이는 *Trichoderma viride*⁽¹⁷⁾나 *Myriococcum albomyces*⁽²⁰⁾의 cellulase가 각각 熱安全性이 60°C인데 반하여 낮은 熱安全性을 나타내고 있다.

5) 作用時間에 대한 영향

粗酵素의 作用時間에 따른 영향을 살펴본 結果 Fig. 7과 같다.

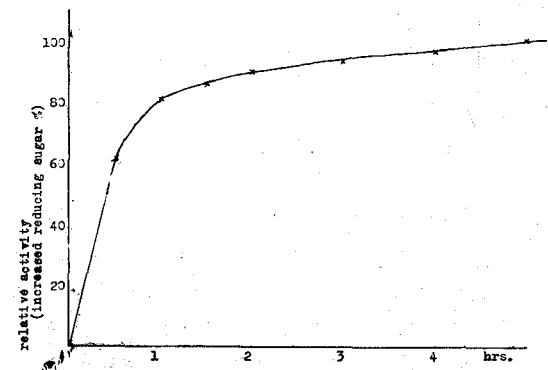


Fig. 7. Time courses of crude cellulase activity.

Fig. 7에서 보는 바와 같이 30分까지는 作用時間에 비례하여 還元糖生成이 증가하였으며 2時間

以後에는 극히 작은 變化만을 나타내고 있다. 따라서 最適酵素作用時間은 2時間以內로 判定할 수 있다.

6) 粗酵素 濃度の 영향

粗酵素的 濃度を 달리 하였을 때 酵素活性은 Fig. 8과 같다. 粗酵素液 1ml까지는 거의 첨가한 粗酵素液量에 비례하여 酵素活性이 증가하였으나 2ml 이상에서는 별다른 차이를 볼 수 없었다. 最適粗酵素的 濃度は 溶液 4ml중 2ml(50%V/V)로 判定되었다.

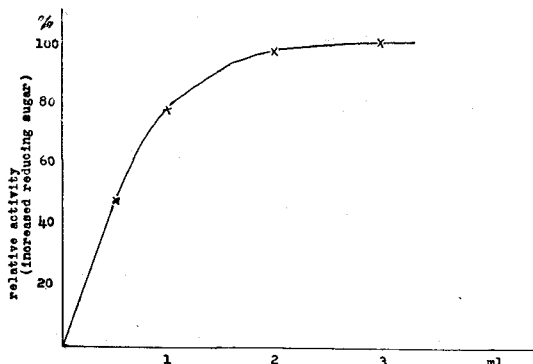


Fig. 8. Effect of crude enzyme concentration on cellulase activity (40°C. 1 hrs. incubation)

7) 基質濃度の 영향

基質인 CMC溶液的 농도를 달리 하였을 때 粗酵素活性은 Fig. 9와 같다.

CMC 濃도가 1%까지는 基質濃도에 비례하여 粗酵素的 活性도가 증가하여 60分間에 基質의 88%를 糖化하였으나 1%以上에서는 매우 완만한 증가를 나타내었다. 따라서 最適基質濃度は 1%로 判

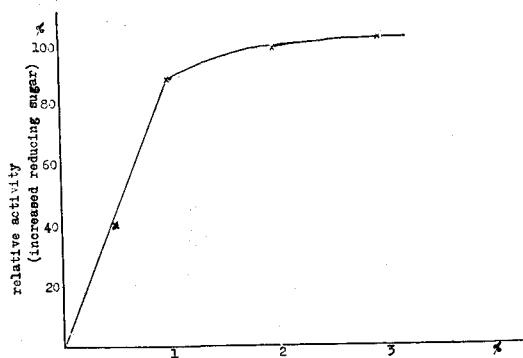


Fig. 9. Effect of substrate concentration on crude cellulase activity.

정된다.

要 約

農産廢棄物을 利用할 目的으로 *Irpex lacteus*가 生成하는 cellulase에 對하여 實驗하여 다음 結果를 얻었다.

1. 쌀겨를 加한 數培養基의 粗酵素 活性이 他培養基보다 우수하였다.
2. 진탕배양시 최저배양일수는 5일이 가장 좋았다.

3. 生成되는 還元糖 定量에 依한 粗酵素的 特性은 *Irpex lacteus*가 生産한 cellulase의 酵素反應 最適條件은 CMC分解로 生成한 還元糖量으로 본 결과 다음과 같다.

- 1) 最適 pH는 3.5~4.0이다.
- 2) pH安全度는 pH 3.0~6.0이다.
- 3) 最適溫度는 40°C이며 熱安全性은 40°C以下이다.
- 4) 粗酵素 作用時間은 2時間이다.
- 5) 最適 粗酵素濃度は 50%V/V(전용액중)이며 基質濃度は 1%이다.

參 考 文 獻

1. R. Ikeda T. Yamamoto. M. Funatsu; Agr. Biol. Chem. **31**, 1201(1967)
2. 金燦祚·崔宇永; 韓農化 **11**, 83, 94(1969)
3. 松村親. 前島一孝; 日釀工, **41**, 154, 158, 164, 168(1963)
4. 松村親 前島一孝; 日釀工. **43**, 731(1965)
5. 兩村明倫. 照井堯造; 日釀工. **43**, 275(1965)
6. 今田伊助·友田勝己. 和田正三; 日釀工. **40**, 140(1962)
7. 大健祥松·相川忠治·高原義昌; 日釀工. **42**, 363(1964)
8. 成洛癸; 韓國微生物學會誌. **6**, 87(1968)
9. 鄭東孝; 韓農化. **10**, 23(1968)
10. 度邊敬; 日釀工. **41**, 228, 231(1963)
11. D.R. Whitaker; Science. **116**, 90(1952)
12. J.H. Hash, K.W. King; J. Biol. Chem. **232**, 381(1958)
13. D.R. Whitake; Arch, Biochem. Biophys. **43**, 253(1953)
14. 外山信男; 日釀工, **35**, 356, 362(1957)
15. 外山信男; 日釀工, **37**, 267(1959)
16. 小川喜八郎·外山信男; 日釀工, **42**, 199

- (1964)
17. 成洛癸；韓農化, 12, 25, 99 (1969)
 18. 奈良潔. 畚野剛. 吉野弘；日釀工, 42, 405, 410(1964)
 19. 奈良潔. 畚野剛. 吉野弘；日釀工, 43, 653 (1965)
 20. 鄭東孝；韓農化, 14, 59(1971)
 21. 西澤一俊. 小林敏雄；日農化 27, 239, 242 (1953)
 22. 若林和正・西澤一俊；日釀工, 42, 347(1964)
 23. 尾崎八良. 西澤一俊. 田崎龍一；日釀工, 43, 415(1964)
 24. 若林和正. 神田鷹久. 西澤一俊；日釀工, 44, 669(1966)
 25. K. Nisizawa; J. Ferment.technol; 51, 267 (1973)
 26. 東京大學. 農藝化學教室；實驗農藝化學, 下卷 639 朝創書店(1960)