

토양에서 분리한 *Penicillium* sp.가 생산하는 Cellulase에 관한 연구

(II) *Penicillium* sp. C13-13 株의 배양조건 검토

김 용 배 · 이 병 국 · 최 승 호

동아제약 주식회사 효소과

Studies on the Cellulase of *Penicillium* sp. Isolated from Soils

(II) Culture Conditions of *Penicillium* sp. C13-13 Strain.

Yong Bae Kim, Pyung Kuk Yi and Seung Ho Choi

Enzyme Section, Dong-A Pharmaceutical Co., Ltd, Seoul, Korea

Abstract : 1. *Penicillium* sp. C 13-13 strain was obtained with the treatment of mutagenic agents(N.T.G.) and by single spore isolation method from the *Penicillium* sp. C8-14 strain, which was reported in the previous paper.

2. The above strain had a few spores and to obtain seed culture, it was cultured at 30°C and initial pH 4.5~5.0, with air rate 6l/min., and agitation 600 rpm for 48 hours in 10% wheat bran medium in 20l-Jar fermenter.

When the broth that had above 70ml of mycelium was inoculated into wheat bran medium and incubated at 29~33°C for 72 hrs, the cellulase activity of the koji was higher.

3. Adding calcium chloride and magnesium sulfate to the wheat bran medium to 1.5% and 0.015% respectively, the cellulase activity of the koji was higher than that of the control.

緒 論

저자들은 前報(1973) 에 광 능지역 토양으로부터 *Penicillium* sp. C8-14 株를 분리한 바를 보고하였다.

이에 이어 이 株를 더욱 순화, 번이를 시도하여 *Penicillium* sp. C13-13 株를 얻었으며, 이 株를 이용하여 생산성을 검토하기 위하여 증식배양 방법을 모색하였다.

Kislityna (1968), 雨村(1965), 金野 (1962) 등은 *Penicillium* sp. 株를, 松村(1965)은 *Aspergillus* sp. 株를 이용하여 액체배양으로 Cellulase를 생산하였으나, 저자들은 이후의 정제방법을 고려하여 고체배양법을 택하였으며, 점중원으로서 본 균주는 균사가 많은 반

면, 포자는 거의 없으므로 소규모의 액체배양으로 증식 배양한 것을 사용키로하여 이에 대한 제 조건을 검토하였으며, 또한 徐(1971)는 *Aspergillus* sp.에, Mandels (1957) 등은 *Tricoderma* sp. 등에 대해 Ca^{++} 및 Mg^{++} ion을 첨가한 보고가 있어 이에 대한 *Penicillium* sp. 의 경우를 실험하여 그 결과를 얻었기에 보고한다.

材料 및 方法

1. 사용균주

저자들이 분리한 *Penicillium* sp. C 13-13 株를 사용하였다.

2. 효소 역가 측정법

前報에 준하여 CMC-Na 용액에 조효소 회석액을 넣어 반응시킨 후 생성된 환원당량을 Varian Techtron uv-vis Spectrophotometer Model 635를 사용하여 Somogyi-Nelson 법 (1944, 1945, 1952)에 의하여 측정하였다

3. 균체량 측정법

액체 배양액 100ml를 취하여 150mesh체로 여과 수세한 잔사를 100ml mess cylinder에 넣고 물을 넣어 100ml로 한 후 진탕하여 정치시켜고 15분 경과후에 갈아엎은 부분의 양을 ml로 읽었다.

4. 변이제 처리법

前報에 준하여 N.T.G.로 500 γ ×30분간 처리하였다.

結果 및 考察

1. *Penicillium* sp. C13-13株의 분리

前報에서 분리, 보고한 *Penicillium* sp. C8-14株를 사용하여 N.T.G. 처리를 한 결과 *Penicillium* sp. C9-33 (역가 2838u/g)株를 얻었으며, 이를 다시 단포자분리하여 *Penicillium* sp. C10-6 (역가 2955u/g)株를 얻었다. 이 株에 대한 N.T.G. 처리 결과(表1) *Penicillium* sp. C13-13 (역가 3171u/g)株를 얻게 되었으며, 이 株를 공업적 생산과 결부시킨 배양조건을 검토하였다.

2. 진탕배양에 의한 증식배양의 재조건

본 균주는 백색 균사가 많고 포자는 거의 없으므로 액체배양에 적합하다고 사료되나, 농후한 효소 발효액을 얻기 어려워 고체배양법을 적용키로 하고 이의 집종원 증식배양방법으로 스쿠모의 액체배양을 시도하기로 했다. 이것은 최종 생산용 배지가 아니며 또한 생산용 배지는 소맥피이므로 이를 고려하여 액체배양용 배지도 소맥피를 택하였다. 소맥피를 50mesh 체로 쳐서 나온 것을 500ml shaker 병에 2%~20%, 초발 pH 5.0 (金野, 1962)으로 하고 30°C, 48시간, 왕복 150회 전으로 진탕배양한 것을 麩배지에 접종한 후의 역가와 배지량 및 균체량과의 관계는 그림 1과 같아, 약 10%의 배지를 적정량으로 하였으며 집종시의 균체량과 역가의 관계를 도시하면 그림 2와 같다.

이로써 48시간 배양이면 균체량이 70ml 이상으로서 麩역가가 최고 수준에 달한다는 것을 알았으며, 최적 초발 pH를 알기 위하여 다시 초발 pH별로 실험한 결과 pH 4.5~5.0이 좋음을 알았다(그림 3).

이러한 상태하에서 계속 배양을 한 결과 pH 및 균체량 변동은 그림 4와 같았으며 이를 종합한 결과, sh-

aker 배양에 있어서는 麩배지 농도 10%, 초발 pH 4.5~5.0, 30°C, 48시간 배양에서 균체량 70ml 이상인 것을 검증할 경우 좋은 역가를 보임을 알았다.

3. Jar fermenter에 의한 증식 배양의 재조건

이러한 실험적 자료를 기초하여 scale up의 한 과정으로 Jar fermenter(關東理化工器製作所 20L型)를 이용하여 통기량과 균체량 및 교반 속도와 균체량과의 관계를(小林, 1965) 조사한 결과 그림 5, 그림 6과 같은 결과를 얻어 6l/min×600rpm일 경우 발육이 왕성함을 알았다.

4. 효소 생산배지 및 배양조건

이러한 조건에서 배양한 배양액을 cellulase 생산배지인 소맥피(121°C×30분간 고압멸균)에 접종하여 배양 시간 및 배양온도와 역가의 관계를 조사한 결과 그림 7과 같은 결과를 얻어 29~33°C에서 72시간 배양하는 것이 경제성에 있어 무난하다는 결론을 얻었다.

5. CaCl₂ 및 MgSO₄ 첨가효과

본주에 대한 CaCl₂ 및 MgSO₄의 첨가효과를 검토하기 위하여 이를 단독 및 조합하여 麩배지에 넣어 배양하여 그림 8, 그림 9, 그림 10과 같은 결과를 얻었으며, 이에서 CaCl₂ 및 MgSO₄의 단독효과 보다는 복합효과 면에서 1.5% CaCl₂와 0.015% MgSO₄인 경우가 양호하다는 결론을 얻었다.

Table.1. Cellulase activity after treatment of N.T.G. for the *Penicillium* sp. C10-6 strain

Strain No.	O. D.	Moisture in Koji (%)	Activity(u/g)
<i>Penicillium</i> sp. C 13-1	0.331	62	2212
-2	0.347	63	2381
-3	0.313	62	2092
-4	0.295	62	1971
-5	0.372	63	2253
-6	0.296	65	2148
-7	0.363	63	2491
-8	0.370	64	2610
-9	0.390	63	2677
-10	0.312	64	2201
-11	0.400	65	2903
-12	0.385	65	2794
-13	0.462	63	3171
-14	0.339	64	2391
-15	0.387	63	2656
-16	0.350	64	2469

-17	0.382	63	2622
-18	0.419	63	2876
-19	0.364	63	2498
-20	0.404	64	2850

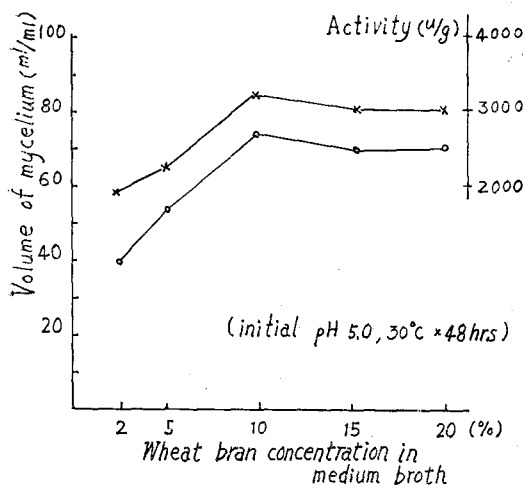


Fig. 1. Relation between the wheat bran concentration, the volume of mycelium and cellulase activity on the shaker culture (initial pH 5.0, 30°C × 48 hrs)

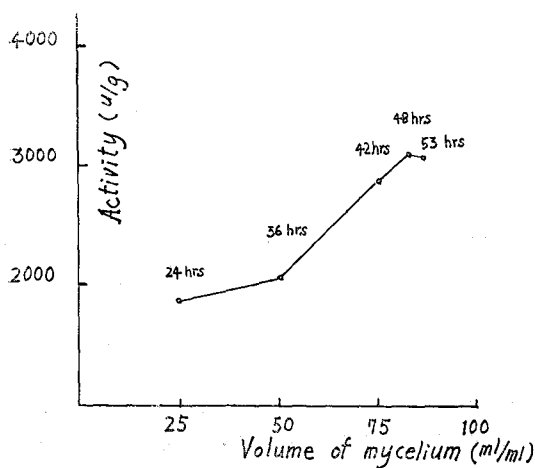


Fig. 2. Relation between the volume of mycelium and cellulase activity after 72 hrs culture

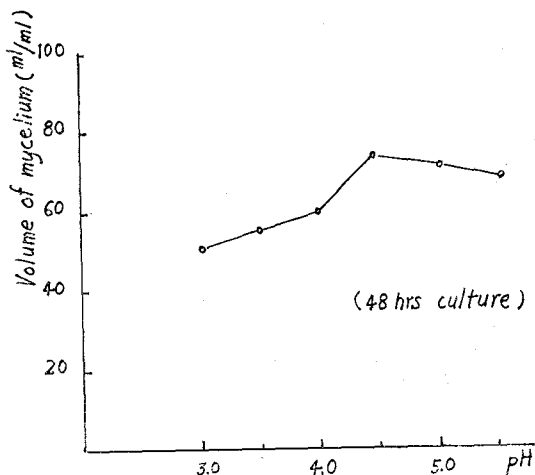


Fig. 3. Volume of mycelium changes by different initial pH value on the shaker culture (48 hrs culture)

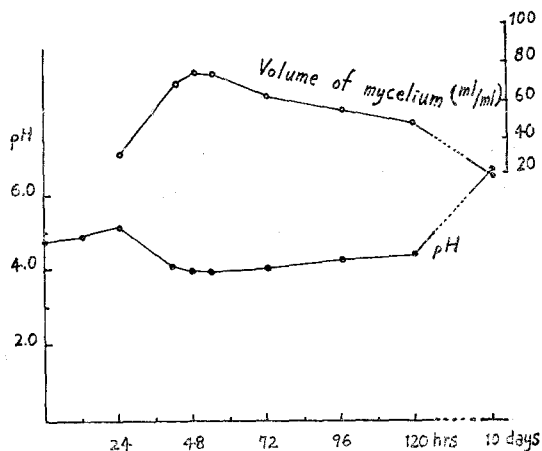


Fig. 4. pH and volume of mycelium changes during the fermentation on the shaker

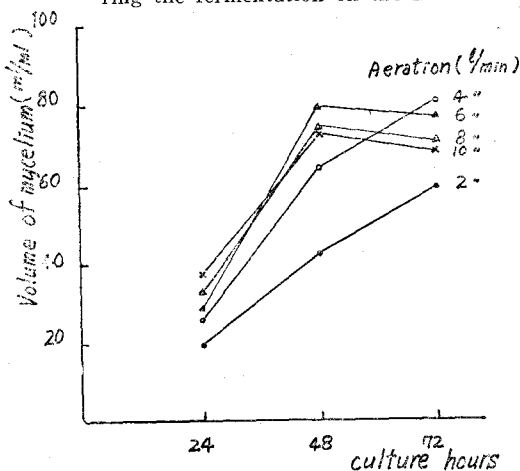


Fig. 5. Volume of mycelium changes by aeration at 500 rpm

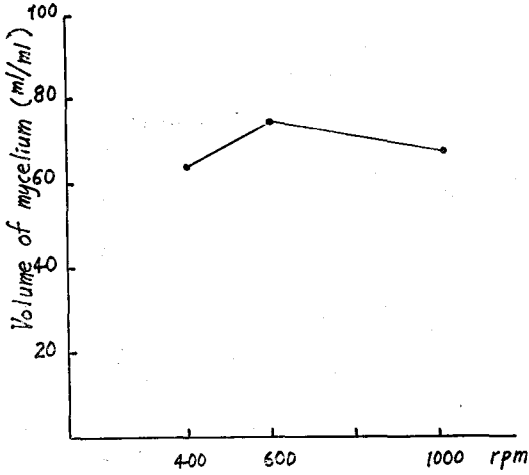


Fig. 6. Effect of the agitation on the production of the mycelium

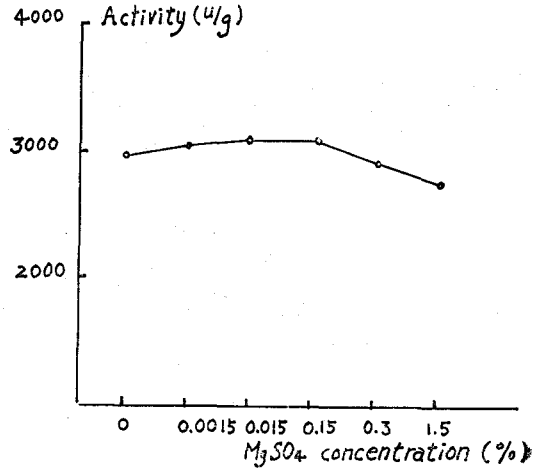


Fig. 9. Effect of Magnesium sulfate on the cellulase production

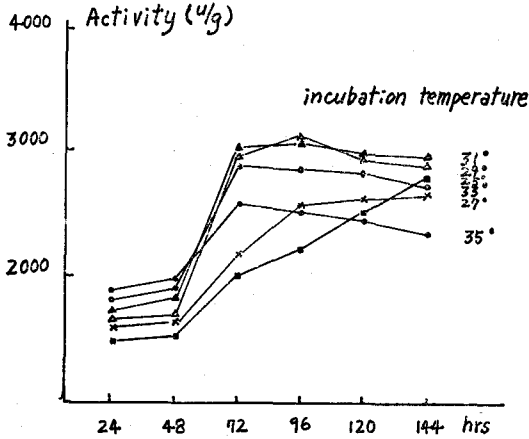


Fig. 7. Cellulase activity changes during the culture

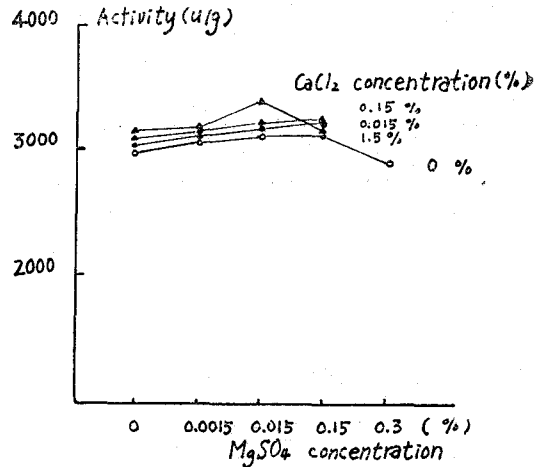


Fig. 10. Effect of CaCl₂ and MgSO₄ on the cellulase production

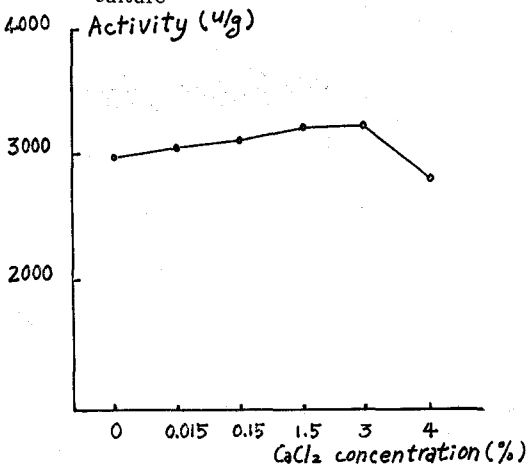


Fig. 8. Effect of the Calcium chloride on the cellulase production

摘 要

1. *Penicillium* sp. C8-14株를 계속 단포자 분리 및 번이 처리를 하여 *Penicillium* sp. C13-13(역가 3171u/g) 株를 얻었다.

2. 고체배양에 적용하기 위하여 증식용 액체배양을 하였으며, 초발 pH 4.5~5.0, 10% 麩배지를 사용하여 48시간동안 30°C, 통기량 6l/min, 교반속도 600rpm

(20l-Jar fermenter)으로 배양하여 균체량이 70ml이상 일 경우에 접종한 것이 29~33°C, 72시간의 麩배지 배양에 있어서 가장 좋은 역가를 보였다.

3. 麩배지에 1.5% CaCl₂ 및 0.015% MgSO₄를 가한 것이 control 보다 높은 역가를 보였다.

끝으로 本稿작성에 많은 도움을 주신 서울 대학교 약학대학 김병자 교수님께 심심한 사의를 표합니다.

References

김용배, 이병국, 최승호(1973) : 토양에서 분리한 *Penicillium* sp.가 생산하는 cellulase에 관한 연구(제1보) 평능지역 토양으로부터 *Penicillium* sp. C8-14株의 분리 · 韓國菌學會誌 1(1) : 23-28

徐恒原(1971) : 컬럼크로마토그래피에 의한 *Aspergillus* 계통의 α-아미라제 및 프로테아제의 결정화(제1보) *Aspergillus oryzae* S.H.W. 131의 Neutral protease에 대한 결정화 및 理化學的 性質 · 미학지, 24 : 163.

金野範之, 熙井堯造, 上田芳字, 國米和世(1962) : 深部培養法에 의한 cellulase의 生産, 食品工業 · 5(16) : 48.

小林達吉(1965) : 糸狀菌의 連續培養, 醱協誌 · 23(12) : 541.

松村親, 前島一孝(1965) : *Aspergillus saitoi*가 生産하는 cellulase分解酵素의 研究(第5報) cellulase分解酵素 生産에 있어서 培養條件 · 醸工, 43 : 732.

雨村明倫, 熙井堯造(1965) : 糸狀菌이 生産하는 cellulase에 관한 研究(第1報) *Penicillium* cellulase의 pulp 纖維에 對한 作用에 關하여 · 醸工, 43 : 275.

Kislityna, V. P. and Kozlov, K. A. (1968) : The effect of various nitrogen and carbon nutrient sources on the accumulation of cellulases by microorganisms isolated from soils of Eastern Siberia. *Prikladnaya Biokhimiya Mick.*, 4(1) : 97.

Mandels, M. and Reese, E. T.(1957) : Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, 73 : 270.

Nelson, N. (1944) : A photometric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153 : 375.

Somogyi, M. (1945) : A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160 : 61.

Somogyi, M. (1952) : Notes sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195 : 19.