

## 農産廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 關한 研究〔第一報〕

*Aspergillus niger*에 依한 Xylanase의 生産 및 그 酵素特性에 關하여

李 啓 瑚 · 李 炯 周

서울대학교 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 I〕

On the Production and Characteristics of Xylanase by  
*Aspergillus niger*

Ke-Ho, Lee and Hyung-Ju, Lee

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, two high xylanase-producing mold strains were selected from various sources of samples.

The optimum conditions of xylanase production and the characteristics of the mold enzyme were investigated, and summarized as follows.

1. Two *Aspergillus niger* strains (experimental No. 1701 and 430) showed the high xylanase activity.
2. The highest xylanase production was obtained at pH 5.0-6.0 in two days.
3. Xylanase production in strain 1701 was increase with the addition of carboxy methyl cellulose,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  and corn steep liquor as carbon sources and natural nutrients, as respectively, while the other carbon, nitrogen, phosphate sources, natural nutrients and minerals gave no remarkable effect.

In the strain 430, the enzyme production was not effected with the above substrate sources.

4. Maximum xylan hydrolysis reaction with the crude enzyme extract (33.3% v/v) was obtained in the 2% substrate concentration at pH 5.0 and 60°C in three hours in both strains.
5. Maximum xylan hydrolysis rate was 95% at the optimum conditions for xylanase activity.

\* 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하는 바이다.

## 서 론

국민 식생활 개선을 위하여 축산진흥의 필요성은 일찍부터 대두되었으나, 식량 자급자족도 안되고 있는 현 상황에서 사료의 수급문제는 크게 염려되고 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로 매년 국내에서 다량 생산되고 있는 농산폐기물<sup>(1)(2)</sup>을 이용하여 사료를 제조하는 것에 관하여 여러 보고<sup>(3-7)</sup>가 있었다.

농산폐기물 중에는 15~30%의 xylan<sup>(8)(9)</sup>이 함유되어 있으며 xylan의 구조 및 특성에 관해서는 비교적 잘 알려져 있다.<sup>(9)</sup>

농산폐기물을 이용할 수 있는 xylanase에 관하여 많은 연구가 있었는 바, xylanase를 생산하는 균주로는 *Aspergillus foetidus*<sup>(10)</sup>, *Aspergillus oryzae*<sup>(11)</sup>, *Aspergillus batadae*<sup>(12)</sup>, *Penicillium sp.*<sup>(13)</sup>, *Trichoderma viride*<sup>(14)</sup>, *Chaetomium trilaterale*<sup>(15)</sup>, *Mycrococcum albomyces*<sup>(16)</sup>, *Aspergillus niger*<sup>(5)(7)</sup><sup>(17)</sup> 등 많은 예가 보고 되고 있다.

일찍부터 xylanase라고 하는 효소에는 여러가지가 있는 것으로 알려져 왔고<sup>(10)</sup>, Soerensen<sup>(18)</sup>은 xylobiose단위로 가수분해하는 효소와 D-xylose단위로 가수분해 하는 효소를, Inaoka<sup>(19)</sup> 등은 endo-xylanase와 exo-xylanase를, Fukui<sup>(20)</sup> 등은  $\beta$ -1,4'-xylanase와  $\beta$ -1,3'-xylanase를, Kawaminami<sup>(19)</sup> 등은 xylobiose를 분해하는 효소와  $\beta$ -Phenyl-D-xyloside를 분해하는 효소를 각각 연구 발표하고 있다.

이상에서 대략 살펴 본 xylanase는 농산폐기물을 이용한 사료제조 이외에 채소 및 과일가공에 이용 가능<sup>(20)</sup>하며, 생성되는 xylose는 식품 또는 당뇨병 환자용 감미제로 사용될 수 있는 만큼 xylanase의 중요성은 발전하는 효소공업에 따라 증가할 것으로 보인다.

본 실험에서는 xylanase생성능이 강한 곰팡이 균주를 선발하고 선발균주에 의한 xylanase의 생산 최적조건, 효소의 제 특성등을 살펴 보았으므로 그 결과를 이에 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 우수균주분리 및 동정

#### 1) 균분리 및 일차선발

서울 및 수원 근교에서 수집한 균분리용 시료 부식목, 부패굴겉질, 두엄, 우분, 마분, 계분등 8점의 시료에서 1g을 취하여 screw cap test tube에

넣고 멸균수를 10ml 가한 후 흔들어 현탁액을 만들었다.

이 현탁액 1ml를 건열 살균한 petri dish에 적하고 가압 살균한 Table 1의 배지를 20ml정도 가하여 29°C의 항온기에서 3일간 평판 배양 후 성장속도가 빠른 독립취락만을 Table 1의 사면배지에 이식하여 일차선발을 하였다.

**Table 1.** Composition of culture medium for isolation

Constituent	Amount
Cellulose	5 g
C.M.C.	5
Pectin	5
NaNO <sub>3</sub>	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KCl	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
Agar	20
Dist. water	1,000ml

pH was adjusted to 5.0 Sterilized at 15lbs. for 15 mins.

#### 2) 이차선발

250ml삼각플라스크에 밀기울 25g과 수도수 20ml를 넣고 가압 살균한 후에 일차선별된 균을 접종, 29°C의 항온기에서 7일간 배양하였다. 이에 증류수 225ml를 가하고 효소액 조제 과정을 거쳐 효소액 10ml를 얻었다.

Xylan 0.5%용액 4ml에 (pH : 4.2) 이 효소액 1ml를 가하고 50°C의 수욕조에서 4시간 작용시켜 이 중에서 효소역가가 강한 균주를 선발하였다.

#### 3) 우수균주의 동정

2차선발에서 효소역가에 의해 선정된 균주를 *The Genus Aspergillus*<sup>(21)</sup>에 준하여 동정하였다.

## 2. Xylan

Xylang수분해 효소 활성을 측정하기 위하여 기질로 사용한 xylan은 스위스 「CALBIOCHEM」회사 제품으로 하였다.

xylan은 1N NaOH에 먼저 용해하고 당량의 HCl로서 중화하여 기질용액으로 사용하였다.

### 3. 효소액의 조제

#### 1) 제 1방법

대형시험관(직경2cm, 길이 18cm)에 밀기울 3g과 증류수 3ml를 넣어 혼합, 사면배지로 한 후 가

압살균하고 균을 접종하였다. 이를 29°C 항온기에서 5일간(배양일수 실험 제외) 배양한 후 증류수 20ml를 가하여 1시간 진탕시키고 이를 여과하여 조효소액을 얻었다.

이 방법에 의한 효소액으로 효소생산 조건 실험과 효소 특성중 최적 효소농도, 기질농도, 효소작용시간 실험을 행하였다.

#### 2) 제2방법

250ml삼각플라스크에 밀기울 25g과 수도수 20ml를 넣고 가압살균한 후에 균을 접종, 29°C 항온기에서 7일간 배양하였다.

이에 증류수 225ml를 가하여 Waring blender로 40초간 마쇄하고 1시간 추출한 후에 여과하였다. 여액을 원심분리 (2,000RPM 20 mins.)하고 상등액에 황산암모늄 0.8포화도 용액을 가하여 생성되는 침전을 2~3ml의 증류수로 용해, 투석튜브에 넣고 24시간 투석시켜 황산암모늄을 제거하고 이 용액을 10ml로 하여 조효소액으로 하였다.

이 방법에 의한 효소액으로 우수균주 2차선발, 효소특성중 최적온도와 최적 pH실험을 행하였다.

#### 4. 효소 생산조건의 검토

배양일수에 따른 효소역가의 변화를 알기위해 1일부터 5일간 배양일수를 달리하여 효소역가를 측정하였고, 배양시 pH와 효소역가의 관계를 알기 위하여 밀기울에 가하는 증류수 대신 McIlvaine buffer (pH3~pH7)를 가해 배양하고 각각 효소역가를 측정하였다.

배양시 각종 영양원을 첨가했을 때 효소생산에 미치는 영향을 알아 보기 위해 수중의 탄소원 (1%), 질소원 (0.5%), 인산염 (0.4%) 성장요소 (0.1%), 무기염 (0.0002%)을 가하고 각각의 효소역가를 측정하였다.

#### 5. 효소특성의 검토

효소작용에 대한 최적조건을 알아보기 위해 온도, pH, 시간, 기질농도, 효소량을 달리 했을때의 효소역가를 측정하였다.

#### 6. 효소역가의 측정

Xylan 1~2% 용액 2ml와 효소액 0.5~2ml, McIlvaine buffer 2~3.5ml를 시험관에 넣어 60°C (최적온도 시험제외)의 수욕조에서 4시간 작용시킨 후 생성되는 환원당의 양을 Fehling Lehman Schoorl변법<sup>(22)</sup>에 의해서 정량하였다. 이렇게 계산된 환원당량에서 효소액 자체에 함유된 당량을 빼준 값을 효소작용에 의한 당 생성량으로 계산하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. 우수균주 분리 및 동정

서울 및 수원근교에서 수집한 부식목, 부패균 접질, 두엄, 우분, 마분, 계분 등, 48점의 시료에서 xylanase역가가 강한 균주를 선발 및 동정하였다. 1차선별에서는 성장속도가 빠른 26개 균주를 선발하였다. 1차 선발된 26개 균주로 효소액을 조제하고 그중 효소역가가 가장 강한것 두 균을 2차 선발하였다.

선정된 균주의 형태 배양적 특성은 Table. 2와 같으며 The Genus *Aspergillus*<sup>(11)</sup>의 방법에 의한 결과 *Aspergillus niger*에 해당하므로 *Aspergillus niger*-1701 및 *Aspergillus niger*-430으로 동정하였다.

*Aspergillus niger*에 의해서 xylanase의 생성을본 것으로는 Grassman등<sup>(23)</sup>, Youndt<sup>(17)</sup>, 조등<sup>(5)</sup>, 우등<sup>(7)</sup>의 예가 있었다.

#### 2. 효소생산조건

##### 1) 배양일수의 영향

배양일수에 따른 효소 생산을 알아보기 위해 1일부터 5일간 배양일수를 달리하여 효소역가를 측정 한 결과는 Fig. 1과 같다.

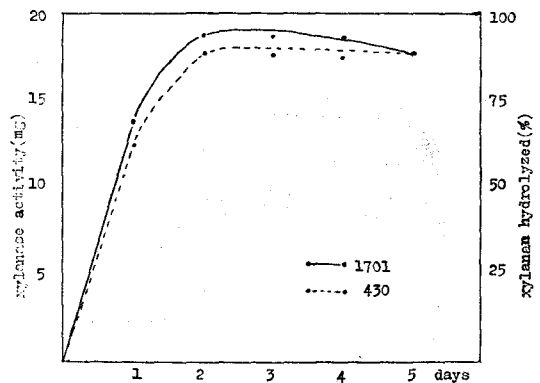


Fig. 1 Time courses of xylanase production

Medium: Wheat bran 3g. Tap water 3ml

Cultivation: 29°C

Enzyme activity: 2ml of enzyme soln. was added to 2ml of 1% xylan soln. (pH 3.0, adjusted with McIlvaine buffer). After incubation for 4hrs. at 60°C, the reducing sugar was determined by Fehling Lehman Schoorl method. The enzymatic activity is expressed by the amount of reducing sugar produced.

Table. 2. Description of selected mold strains

Morphological character		Strain No. 1701	Strain No. 430
Colony Character	rate of growth,	slowly spreading	rapidly spreading
	texture	roughly velvety	rough
	color above	carbon black	purple brown
	reverse	orange	uncolored
Heads	color	carbon black	deep purple brown
	form	globose	globose
	measurement	40—70 $\mu$	80—120 $\mu$
	length	3.5—4.0mm	2.5—3.5mm
Conidiophore	width	9—18 $\mu$	9—18 $\mu$
	wall thickness	thin	thin
	marking	smooth	smooth
	color	pale brown	pale brown
Vesicle	origine	mostly substratum	mostly substratum
	shape	flask or globose	globose
	size	20—40 $\mu$	60—80 $\mu$
	color	pale brown	pale brown
Sterigmata		double series	single series
Primary	length	10 $\mu$	20—25 $\mu$
	width	4 $\mu$	4—6 $\mu$
Secondary	length	6—8 $\mu$	
	width	3—4 $\mu$	
Conidia	form	globose	subglobose
	color	pale dark brown	pale brown
	size	4—5 $\mu$	2.5—4 $\mu$
	marking	irregular rough end	rough
Perithecia		not produced	not produced
Ascospore		not produced	not produced

Medium: Czapek's agar (pH 5.6) Incubation: 6 days at 30°C

도표에서 보는 바와 같이 배양 2일만에 xylan분해를 90% 이상을 나타내고 이후 5일까지 별 변화가 없거나 오히려 약간 감소하는 경향을 보이고 있다.

효소생산을 위한 두 균주의 최적배양일수는 2일이라고 판정된다.

생장과정을 보면 1일후에 백색균사가 70—80% 가량 배지 표면을 덮으며 2일째엔 균사가 배지 전 표면을 덮은 위에 약간의 흑색포자를 형성하고, 3일째 이후엔 완전히 흑색포자로 덮이며 4일째 이후엔 배지후면까지 균사가 덮이고 있었다. 효소역가가 높은 2일째에 포자형성이 그다지 없는 것으로 미루어 보면 본 선발균주의 xylanase는 균사부분에서 유래되는 것으로 추정된다.

Kawaminami등이 실험한 *Chatomium trilaterale* (24) 균이 배양 6일째에 최고 역가에 도달한 것 대비

하면 효소생산 속도가 매우 빠른 것으로 나타났는데, 빠른 생장속도는 많은 접종량(밀기를 배지 6g에 15mg 정도의 균주고지 접종)에도 기인된 것으로 생각된다.

### 2) pH의 영향

최초 pH를 달리하여 5일간 배양했을때의 효소역가는 Fig. 2와 같다.

두 균주는 pH 5.0—6.0에서 최고의 효소역가를 보여 주고 있으나 pH 3.0—7.0의 넓은 범위에서 큰 차이를 나타내지 않고 있다.

일반적으로 곰팡이의 배양시 최적 pH는 4.0—6.0으로 되어 있으며 두 균주도 대체로 비슷한 결과를 보이고 있다.

두균주의 효소생산을 위한 배양시 최적 pH는 5.0—6.0으로 판정된다.

### 3) 탄소원 첨가의 영향

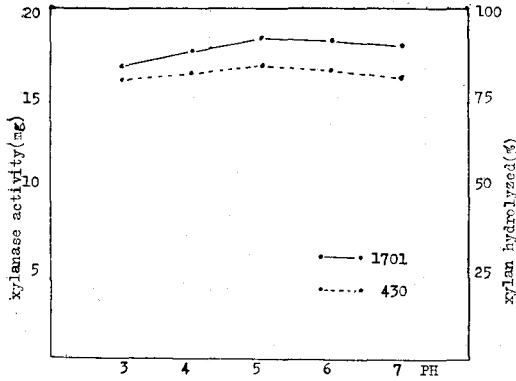


Fig. 2. Effect of pH on xylanase production.

Cultivation: 29°C, 5 days

pH: Adjusted with McIlvaine buffer. medium and enzyme activity is expressed as in Fig. 1

밀기를 배지에 1%의 xylose, glucose, carboxy methyl cellulose (이하 C.M.C), xylan을 가하고 5일간 배양했을 때 효소생산성은 Table. 3와 같으며 탄소원을 가했을때 효소생산성이 6-21%의 증가를 보여주고 있다.

Table 3. Effect of carbon sources on xylanase production

Carbon sources added (1%)	Xylanase activity (%)	
	#1701	#430
Xylose	106	108
Glucose	110	108
Carboxy methyl cellulose	121	109
Xylan	112	110
Control	100	100

Cultivation: 29°C, 5 days

그중 No. 1701균주에 대해서는 특히 C.M.C의 첨가가 21%의 생산증가로서 좋은 효과를 나타내었고 xylan을 가했을때는 약 10%의 효소역가 증가를 나타내었다.

高橋등도 세균 xylanase에 관한 연구<sup>(25)</sup>에서 xylose나 xylan을 가했을때 xylanase역가가 증가함을 보고한 바있다.

두균주 모두 C.M.C., xylan의 첨가로 효소생산성이 증가하므로, cellulose와 xylan이 주성분을 이루는 농산 폐기물의 이용에서 기대를 가질만 할 수 있다.

#### 4) 질소원 첨가의 영향

밀기를 배지에 0.5%의 6가지 질소원을 첨가하여 5일간 배양했을때 효소생산성은 Table 4와 같다 즉 질소원을 첨가배양했을 때 효소생산이 다소 증가를 보여주고는 있으나 큰 영향을 볼 수 없었다.

Table. 4. Effect of nitrogen sources on xylanase production

Nitrogen sources added (0.5%)	Xylanase activity (%)	
	#1701	#430
NaNO <sub>3</sub>	94	98
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	102	98
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	95	105
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	101	97
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO+NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1:1)	103	97
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1:1)	96	100
Control	100	100

Cultivation: 29°C, 5 days

高橋<sup>(25)</sup>도 질소원 첨가가 효소생산에 별로 영향을 주지 않았다고 보고하고 그 이유를 기본 배지에 충분히 함유된 질소원 때문일 것으로 추정했는데 본 실험에서도 비슷한 결과를 보여주었다고 생각되고 효소생산을 위해 질소원을 따로 첨가할 필요는 없다고 판단된다.

#### 5) 인산염 첨가의 영향

밀기를 배지에 0.4%의 인산염을 첨가하여 5일간 배양하여 생성된 효소역가를 비교한 결과는 Table 5와 같다.

인산염을 첨가했을때 대체로 효소역가는 오히려 감소하였는데 이것은 高橋<sup>(25)</sup>가 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>첨가에 의해 xylanase 효소생산이 감소됨을 보고한 것과비

Table. 5. Effect of phosphate sources on xylanase production

Phosphate sources added (0.4%)	Xylanase activity (%)	
	#1701	#430
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	90	97
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80	96
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	119	95
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +NaHPO <sub>4</sub> (1:1)	86	95
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> %NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1:1)	90	90
Control	100	100

Cultivation: 29°C, 5 days

슷한 결과를 보였다. 그러나 No. 1701균주에서만  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 에 의해 효소생산이 19% 증가했으며 흥미있는 결과임을 알 수 있다.

6) 성장요소 첨가의 영향

밀기를 배지에 0.1%의 성장요소를 첨가하여 5일간 배양하여 생산된 효소의 역가를 측정된 결과는 Table 6과 같다.

일반적으로 성장요소 첨가에 의해 효소역가는 감소되었으나 corn steep liquor (이하C.S.L.)첨가구만은 증가를 보여 주었다.

밀기를 배지에는 두 균이 필요로 하는 아미노산과 비타민이 충분하게 함유된 것으로 생각되며 C.S.L.에는 효소생산을 촉진하는 미지의 요소가 있는 것으로 추정된다.

Table 6. Effect of natural nutrients on xylanase production

Natural nutrients added (0.1%)	Xylanase activity (%)	
	#1701	#430
Yeast ext.	93	88
Peptone	93	98
Vit-free casamine acid	94	98
Corn steep liquor	120	101
Control	100	100

Cultivation: 29°C 5 days

7) 무기염류 첨가의 영향

밀기를 배지에 각종 무기염을 첨가하여 5일간 배양하고 생산된 효소의 역가를 비교한 결과는 Table 7과 같다.

무기염류 첨가가 효소생산에 별 영향을 주지 않은 것으로 나타났는데 이것도 배지에 이미 미량이

Table 7. Effect of minerals on xylanase production

Minerals added	Concentration (%)	Xylanase activity (%)	
		# 1701	# 430
$\text{FeSO}_4$	0.0002	102	96
$\text{CuSO}_4$	0.0002	97	106
$\text{MnSO}_4$	0.0002	94	94
$\text{ZnCl}_2$	0.0002	90	108
$\text{MgCl}_2$	0.0002	94	100
$\text{CaCO}_3$	0.01	104	102
Control		100	100

Cultivation: 29°C, 5 days

나마 필요한 무기염류가 포함되었기 때문이라고 추정된다.

高橋<sup>(25)</sup>의 연구에서는  $\text{CaCl}_2$ 와  $\text{MgSO}_4$ 의 첨가구에서 좋은 효과가 있다고 보고된 바 있다.

3. 효소특성

1) pH의 영향

선발된 우수균주 No. 1701 및 No. 430이 배양 최적조건에서 생성한 효소의 최적조건을 알아보기 위해 각각 다른 pH에서 효소작용을 시켜 효소역가를 비교한 바 그 결과는 Fig. 3과 같다.

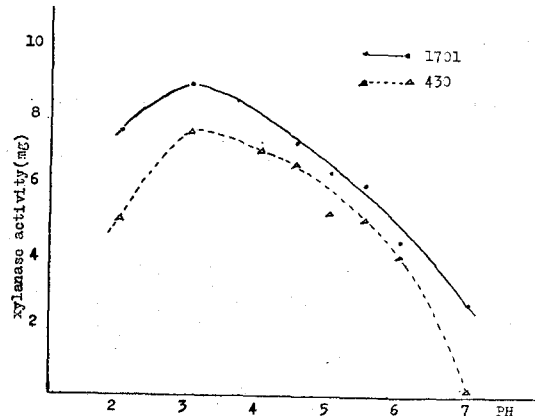


Fig. 3. Effect of pH on xylanase activity

The reaction mixture consisted of 0.5ml of enzyme soln. and 4ml of 0.5% xylan soln. adjusted to each pH value with McIlvaine Buffer. After incubation for 4 hrs. at 50°C, the reducing sugar was determined by Fehling Lehman School methods. The enzymatic activity is expressed by the amount of reducing sugar produced.

도표에 나타난 바와 같이 pH 3.0 부근에서 최고 효과를 나타내 최적 pH가 산성쪽으로 치우쳐져 있다.

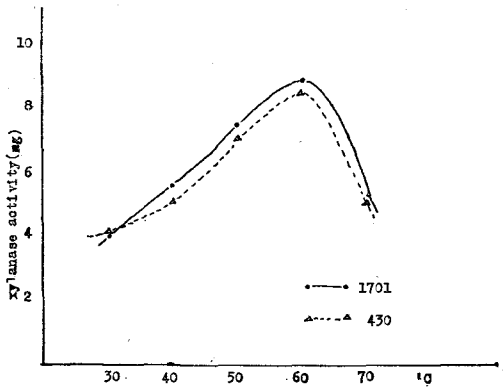
No. 430균주는 No. 1701균주에 비해 적정 pH이외에서 효소역가가 보다 급격히 떨어졌다.

두균주 모두 최적 pH는 3.0부근으로 판정되었다.

2) 온도의 영향

선발된 두 균주가 생성한 효소를 각각 다른 온도에서 효소작용을 시켰을 때의 효소역가는 Fig. 4와 같이 나타났다.

도표에 나타난 바와 같이 최적온도는 두 균주 모두 60°C부근으로서 약간 고온이고 No. 430균주는 약간 완만한 곡선을 보여주고 있다.



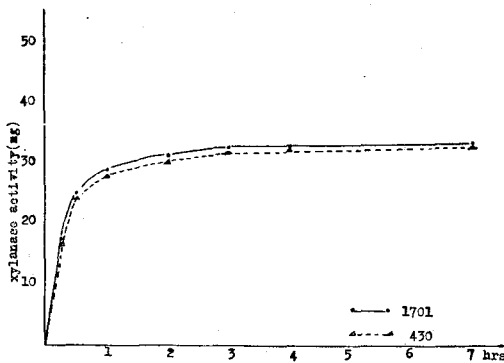
**Fig. 4.** Effect of temperature on xylanase activity. pH: Adjusted to 4.2 with McIlvaine buffer. The reaction mixture, incubation, enzymatic activity are expressed as in Fig. 3.

3) 효소작용시간의 영향

효소작용시간에 따른 효소역가는 Fig. 5와 같이 나타났다.

도표에서 보는 바와 같이 효소작용은 1시간까지 급격히 일어났으며 3시간 이후엔 극소량의 변화만 나타내고 있다.

최적 효소 작용시간은 두 균주 모두 3시간으로 판정되었다.



**Fig. 5.** Time courses of xylanase activity. The reaction mixture consisted of 2ml of enzyme soln. and 2ml of 2% xylan soln. After incubation at 60°C, at pH 3.0, the enzymatic activity was determined.

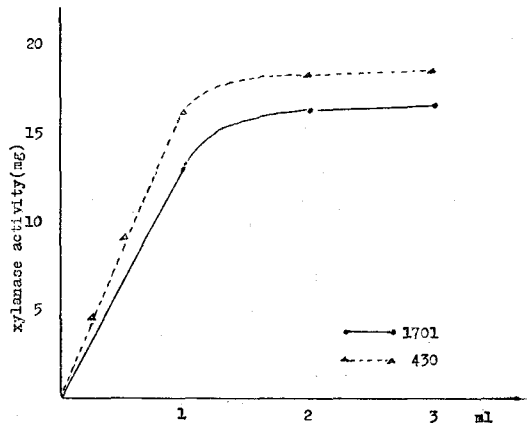
4) 효소농도의 영향

효소농도를 달리했을때 효소역가를 측정 한 결과 Fig. 6과 같이 나타났다.

효소액 1 ml까지는 거의 첨가한 효소액량에 비례해서 효소역가가 증가 하였으나 2ml 이상에서

는 별 차이를 볼 수 없었다.

No. 430균주는 2ml 농도에서 xylan분해율 95%의 우수한 효소역가를 나타내었고 두 균주 모두 최적효소농도는 용액 6ml중 2ml(33.3% v/v)로 판정되었다.

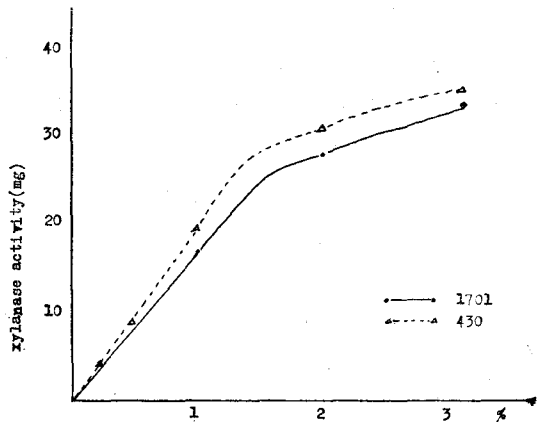


**Fig. 6.** Effect of enzyme concentration on xylanase activity

The enzyme soln. was added to 2ml of 1% xylan soln. Incubation and enzymatic activity are expressed as in Fig. 5

5) 기질농도의 영향

기질인 xylan의 농도를 달리했을때 효소역가는 Fig. 7과 같은 결과를 보였다.



**Fig. 7.** Effect of substrate concentration on xylanase activity

The reaction mixture consisted of 2ml of enzyme soln. and 2ml of xylan soln. Incubation and enzymatic activity are expressed as in Fig. 5.

