

## 農産廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 關한 研究〔第三報〕

*Aspergillus niger* 와 *Trichoderma viride* 에 依한  
Cellulase의 生産性에 關하여

李 啓 瑚·高 正 三·朴 性 五\*

서울대학교 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 III)

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

Ke-Ho, Lee · Jeong-Sam, Koh and Sung-O, Park\*

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

(Received September 1, 1976)

### SUMMARY

In order to utilize the agricultural waste products, two strains of mold producing powerful cellulolytic enzyme were screened from various soils, composts, rotten wood and others. The optimum condition of cellulase production was studied. The results obtained were summarized as follows.

1. Two strains of mold which showed remarkably high cellulolytic activity were identified as *Aspergillus niger*-SM 6 and *Trichoderma viride*-SM 10.
2. The highest cellulase production was obtained at pH 5.0—6.0 in 5 days.
3. Cellulase production in strain *Aspergillus niger*-SM 6 increased with the addition of C.M.C.,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , C.S.L., orange peel powder and rice hull. The rice hull, treated with 3N NaOH at 120°C for 15 min. and neutralized with various acids, was used. Up to 50% of wheat bran could be substituted by the treated rice hull without any decrease of cellulase activity.
4. In the strain of *Trichoderma viride*-SM 10, cellulase production increased with the addition of C.M.C.,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Vitamin-free casamino acid and orange peel powder, while the other carbon, nitrogen, phosphate sources, natural nutrients and organic substances gave no remarkable effect.

### 緒 論

섬유소는 hemicellulose, pectin 등과 같이 식물

세포막의 主要成分을 이루고 있으며 自然界에 널리 分布하며 量的인 面에서도 澱粉보다도 많이 存在하나 그중 一部分이 微生物이나 反추동물에 依

\* 서울女子大學 食品科學科(Dept. of Food Science, Seoul Wooman's College)

하여 이를 分解利用될 大部分이 효과적으로는 利用되지 못하고 있다. 따라서 微生物性 cellulase 를 利用하여 섬유소를 糖化 후 還元糖을 직접 利用하던가 섬유소를 용출시킨 후 다른 有效成分을 利用하려는 시도는 오래전부터 이루어져 왔다. 이는 人口增加에 따른 食糧難을 해결하기 위하여 수산자원인 海藻類의 利用<sup>1)</sup>이나 農産物 및 그 폐기물을 cellulase 처리에 依한 分解活用등<sup>2)</sup>의 문제와 부합된다고 보겠으며 最近 都市 주변에서 工場의 폐수 및 폐기물을 生物化學의 처리에 依해 공해를 경감시킬 수 있는 面에서도 중요한 意義를 가지고 있다고 할 수 있다.

Cellulase는  $\beta$ -1,4-glucan, 4-glucohydrolase라고 命名되었으나<sup>3)</sup> 最近 Nisizawa<sup>4)</sup>는 CMC와 같은 可溶性基質에 作用하였을 때는 다른 型의 cellulase 存在가 확인되었으므로 이를  $\beta$ -1,4-glucan glucohydrolase라고 불리워져야 할 것 같다고 하였다.

Cellulase에 관한 研究는 Karrer 등이 달팽이 cellulase 研究를 始初로 하여 Reese 등<sup>5)</sup>은 C<sub>1</sub>型의 cellulase와 C<sub>x</sub>型의 cellulase와 區分하여 作用機作을 보고하였으며 그 후 各種 微生物이 분비하는 cellulase가 分別精製됨에 따라서 여러 種류의 酵素가 相助의 作用하여 分解된다는 것이 확인되었으며,<sup>6,7)</sup> 각 효소의 基質特異性이나 物理化學的인 性質이 검토되었다. 또한 微生物에 依한 酵素生産條件 및 그 利用面에도 다양하여 cellulase 生産性이 강한 우수균주의 選定<sup>8,9,10)</sup>이나 變異菌株의 利用<sup>11)</sup> 그리고 inducer 첨가효과<sup>12,13,14)</sup> 및 生産條件을 검토하므로써 <sup>13,14,15,16,17,18)</sup> cellulase 生産 및 그 利用을 위한 기초적연구에 대한 報告들을 볼 수 있다.

Cellulase 利用에 관한 研究는 다른 효소들에 비하여 비교적 늦게 始作되었으나 衣類의 放徽對策, 발효사료화 및 食品加工分野에 利用할 目的으로 개발되어 가고 있다.<sup>1,21,22,23,24,25)</sup> 最近 *Trichoderma viride*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus*屬 등의 菌株에서 cellulase의 工業的 生産의 기초가 이루어지고 있으며<sup>26)</sup> 研究의 方向도 cellulolytic component의 isozyme과 섬유소 분해의 mechanism, 섬유소의 食糧化문제, cellulase에 依한 섬유질의 分解産物利用, 木質 및 농산폐기자원의 사료화, 공장 폐기물치리에 依한 공해문제해결 등에 대한 적극적인 研究가 진행되고 있다.<sup>2)</sup>

Cellulase는 食品分野나 産業的 利用에 있어서 섬유소구조 및 作用機作이 복잡하여 酵素活성에 制

約을 받으므로 그 효율을 증가시키기 위하여는 배양조건 및 inducer에 따른 영향과 효소활성 증가를 얻는 方向을 모색함이 필요하리라 보며 우수균주의 分離選定 및 生産條件의 검토 그리고 酵素의 諸特性 및 효과적인 精製過程을 검토하는 것이 중요하다고 생각된다.

Stutzenberger<sup>15)</sup>는 *Thermonospora curvata*에 대하여, 張 등<sup>18)</sup>은 *Trichoderma viride*의 液內培養條件에 대하여, Kuroda<sup>14)</sup>는 *Neurospora*屬에 대하여 松村 등<sup>16)</sup>은 *Aspergillussaitoi*에 대하여, 鄭<sup>17)</sup>은 *Myriococcum albomyces*에 대하여, 大建 등<sup>18)</sup>의 *Rhizopus*屬에 대한 연구보고 이외에도 배양조건에 대한 많은 검토가 있었으며 Reese<sup>12)</sup>등은 cellulose 첨가시 cellulase 生成이 우수했음을 보고한 바 있다.

以上の 여건하에서 농산폐기물의 醱酵飼料化, 食糧化, 工場廢水의 淨化등에 目的을 두고 cellulase 生産에 기초적 연구를 시도하여 本實驗에서는 cellulase 生産性이 우수한 菌株를 부식목등에서 分離選定하였으며 選定菌의 cellulase 生産 및 利用에 있어서 배양최적조건 및 영양요소 첨가등을 검토하였고 농산폐기물인 왕겨의 알칼리 처리물을 첨가배양하여 몇가지 結果를 얻었으므로 이를 보고하고자 한다.

## 材料 및 方法

### 1. 優秀菌株의 分離 및 同定

#### 1) 菌分雜 및 一次選定

水原근교에서 수집한 菌分離用 試料인 부식목, 우분, 계분, 토양, 두엄 및 부패갈 껍질등 25點의 試料에서 1g을 取하여 screw cap test tube에 넣

Table 1. Composition of culture medium for isolation

Constituent	Amount
Filter paper or CMC	50g
Na NO <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(Difco)	20
Dist. Water	1l

Initial pH 5.6. strilized at 15Lb, 15min.

고 멸균수를 가한 후 현탁액 1ml를 petri dish에 넣은 다음 가압살균한 Table 1의 培地를 약 20ml 정도 가하고 30°C 항온기에서 5일간 培養한 후 成長速度가 빠른 독립취탁을 取하여 사면배지에 이식하는 것으로 1次選定하였다.

菌保存用 培地는 上記培地에 cellulose powder와 pectin을 각각 0.5% 가하여 사용하였다.

#### 2) 二次選定

250ml 삼각 flask에 밀기울 20g과 水道水 15ml를 넣고 가압살균 후 一次 選定菌株를 접종하여 30°C에서 7日間 培養하였다. 여기에 증류수 100ml를 가하고 酵素調製過程을 거쳐서 얻은 粗酵素를 사용하여 CMC 및 xylan과 pectin을 基質로 하여 酵素活性를 測定하고 우수한 菌株를 二次選定하였다.

#### 3) 우수균주의 同定

二次選定에서 酵素活性가 강한 菌株를 The genus *Aspergillus*<sup>27)</sup> 및 Bisby<sup>28)</sup>, Chang<sup>29)</sup>, Nomura<sup>30)</sup>, 成<sup>8)</sup>의 方法에 準하여 同定하였다.

#### 2. 酵素液의 調製

250ml 삼각 flask에 밀기울 20g과 水道水 15ml를 넣고 加壓殺菌後 接種하여 30°C에서 所要日數 培養 후 여기에 증류수 100ml를 가하고 waring blender로 40초간 마쇄하고 실온에서 3시간 추출 후 여과하여 여액을 遠心分離(7000 rpm, 20min.)한 다음 상등액을 粗酵素로 사용하였다.

#### 3. 酵素生産條件의 검토

培養日數에 따른 酵素活性의 變化를 알아보기 위하여 1일부터 7일간 培養日數를 달리하여 酵素活性를 測定하였으며 培養時 pH와 효소활성과의 關係를 알기 위해 밀기울에 加하는 증류수 대신 McIlvaine buffer (pH 3.0~7.0)을 加하여 배양하고 효소활성을 測定하였다.

또한 培養時 各種 營養源을 첨가하였을 때 酵素生産에 미치는 影響을 알아보기 위하여 數種의 탄소원(1%), 질소원(0.5%), 인산염(0.5%), 生長要素(0.1%) 有機物質(5%)을 加하여 培養한 후 각각의 효소활성을 測定하여 비교 검토하였다. 그리고 농산폐기물의 利用을 目的으로 왕겨를 사용하여 배양하였을 때의 酵素活性도 검토하였다.

#### 4. 酵素活性의 測定方法

CMC 및 xylan, pectin 등을 基質로 하여 그의 粘度降下 및 生成還元糖量은 비등욕중에서 10분간 처리하여 不活性化시킨 조효소액을 加하여 같은 方法으로 작용시켜 조효소액중의 당량을 측정하여 표준값을 酵素作用에 依한 生成된 還元糖量으로

환산하였다.

#### 1) 粘度降下에 依한 Cellulase 活性測定

前報<sup>20)</sup>의 方法에 準하였다. 즉 1% CMC 5ml, McIlvaine buffer(pH 4.0) 4ml와 粗酵素液 1ml를 40°C 수욕조에서 1時間 作用시킨 후 反應液 6ml를 Ostwald Viscometer에 넣어 30°C에서 3분 후 粘度降下를 測定하고 다음 式으로 換算 表示하였다.

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

V; 粘度강하율

V<sub>0</sub>; (基質液+酵素不活性液)의 流下時間(초)

V<sub>t</sub>; (基質液+酵素液)의 流下時間(초)

#### 2) CMC 分解力

위 反應液 1ml를 取하여 그중에 유리되는 還元糖을 Somogyi 變法<sup>31)</sup>으로 定量하였다.

#### 3) Xylan 分解力

Xylan (Sigma製)을 1N NaOH에 용해한 후 當량의 HCl로 中和하여 基質溶液으로 사용하였다. 1% xylan 2ml, 완충액 2ml와 粗酵素液 1ml의 組成으로 CMC分解力과 같은 方法으로 測定하였다.

#### 4) 粘度降下에 依한 Pectinase 活性測定

McIlvaine buffer (pH 4.0)를 50°C로 加溫한 다음 pectin을 1.5% W/V 加하여 현탁액으로 한 후 waring blender로 1분간 균일액으로 한후 여과하여 基質液으로 사용하였다. CMC와 같은 組成으로 30°C에서 12時間 作用시킨 후 점도강하를 測定하였다.

### 結果 및 考察

#### 1. 우수균주 分離 및 同定

##### 1) 우수균주의 分離 및 選定

수원근교에서 수집한 25點의 菌分離用 試料에서

Table 2. Enzyme activity of isolated Microorganisms.

Isolates	CMCase	Xylanase	Pectinase
SCM-6	0.9mg/ml	2.1mg/ml	63%
7	0.8	0.85	61
8	0.7	1.4	56
10	1.0	1.05	57
12	0.6	0.95	55
15	0.6	0.85	20
21	0.9	1.5	59
27	0.7	0.45	60
34	0.9	1.85	63
39	0.5	1.0	61

cellulase活性이 강한 菌株를 選定하고 이를 同定 하였다. 1次選定에서는 성장속도가 빠른 43個 菌株를 선별하여 粗酵素液을 調製하고 그중에서 효소활성이 비교적 강한 菌株에 대한 酵素活性은 Table 2와 같다.

Table 2에서 보는 바와 같이 CMCase 活性이 강

한 SCM-10과 CMCase 活性이 비교적 강하며 xylanase 및 pectinase 活性이 우수한 SCM-6, 두 균주를 選定하고 이를 供試菌株로 하여 實驗을 行 하였다.

2) 二次選定菌株의 同定

二次選定菌株를 Czapek medium에서 30°C 6일

Table 3. Morphological Characteristics of isolates SCM-6

Colony character	rate of growth	slowly spreading
	texture	roughly velvety
	color above reverse	brownish black slightly olive
Heads	color	dark brown
	form	globose
	measurement	80~120 $\mu$
Conidiophore	length	2.0~3.0mm
	diameter	12~18 $\mu$
	wall thickness	thin
	markings	smooth
	color	pale brown
Vesicle	origin	mostly substratum
	shape	flask or globose
	size	40~60 $\mu$
	color	pale brown single series
Sterigmata	length	12~20 $\mu$
	width	3~4 $\mu$
	color	pale brown
Conidia	form	globose
	color	pale dark brown
	measurement	2.5~4 $\mu$
	marking	slightly rough
Perithecia		not produced
Ascospore		not produced

Czapek's agar(PH5.6) at 30°C, 6 days incubation.

Table 4. Comparision to *Trichoderma* genus.

Organ	Strains				
	<i>T. viride</i> *	<i>T. viride</i> **	<i>T. viride</i> ***	<i>T. koningi</i>	Isolates SCM-10
Mycelium	3.0-3.5 $\mu$	1.5-6.0 $\mu$	2.0-3.0 $\mu$	3.0 $\mu$	2.5-3.5 $\mu$
Spore	3.0-3.5	2.0-3.5	2.0-3.5	2.8-4.3	2.0-3.5
Spore lump	7.0	—	6.0-8.0	4.3-11.4	5.0-8.0
Sterigmata	3.5	3.0-3.5	3.5	3.0	3.0-3.5
Sterigma	3.5-10.5	2.0-10.0	3.0-10.0	—	3.0-10.0

\* Chang, \*\*Nomura, \*\*\*Sung

간 培養하였을 때 그의 形態上의 특징은 Table 3 및 Table 4와 같다.

SCM-6은 The genus *Aspergillus*<sup>27)</sup>의 方法에 依한 結果 *Aspergillus niger*에 해당되므로 *Aspergillus niger*-SM6으로 同定하였다.

부식목에서 分離한 SCM-10을 30°C에서 평판배양하였을 때 발아초기에는 短線毛狀의 白色菌絲가 培養基 全表面에 퍼지며 約 50時間 後 有綠色의 胞子가 生겼다. 胞子形成은 全表面에 생기는 경우는 드물어 不規則하게 形成되며 培養基뒤편은 暗녹색을 띠었다. 胞子着生狀態는 梗子先端에 約 20個가 約 7 $\mu$ 의 球狀으로 集合되어 있었다. 分生子柄은 不規則的으로 分岐되며 色은 無色이고 分生胞子는 粘質덩어리로 되어 있었다.

以上の 結果는 Bisby<sup>28)</sup>, Chang<sup>29)</sup>, Nomura<sup>30)</sup> 및 成<sup>8)</sup>의 記載사항과 一致되어 *Trichoderma*屬으로 推定된다. 이 屬의 것으로는 *T. lignorum*, *T. koningi*,와 *T. viride*等 3種으로 알려졌으나 Bisby는 이들 사이에 明確한 區別이 없으므로 單一名으로 *Trichoderma viride*를 提案하였다. 따라서 SCM-10을 *Trichoderma viride*-SM10으로 同定하였다.

## 2. 酵素生産條件의 검토

### 1) 培養日數에 따른 영향

배양일수에 따른 酵素生産을 알아보기 위하여 1일부터 7일간 배양일수를 달리하였을 때 효소활성을 測定한 結果는 Fig. 1 및 Fig. 2와 같다.

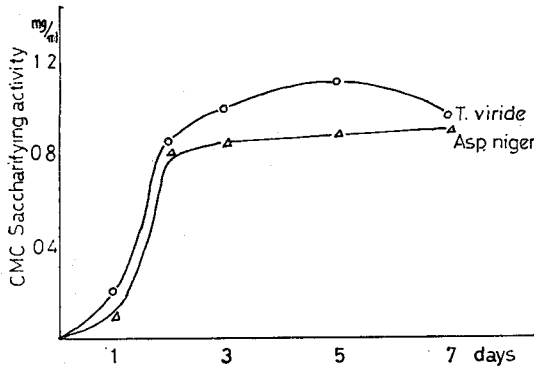


Fig. 1. Time courses of cellulase production.

Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 培養 후 3일까지는 효소활성이 급격히 증가하여 5일만에 最高의 活性을 나타내며 그 후 별 變化가 없거나 약간 감소하는 경향을 보이고 있다. 효소생산을 위한 最適배양일수는 5일로 判定된다.

生長過程을 보면 培養 1일후에는 白色菌絲가 培

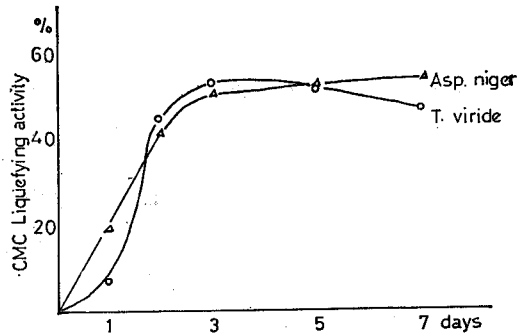


Fig. 2. Time courses of cellulase production.

地表面의 約 1/3가량 덮으며 2일째에는 *Asp. niger*의 菌사가 배지표면을 거의 덮으며 褐色포자를 形成하기 시작하는데 反하여 *T. viride*는 約 70% 정도가 菌사로 培地表面을 덮고 있었다. 3일째에는 *Asp. niger*는 培地表面全體와 後面의 절반가량 포자가 着生하였으며 *T. viride*는 培地表面全體가 菌사로 덮으며 部分的으로 綠色胞子가 着生하였고 배양 5일째는 完全히 胞子가 形成되었다.

배양여액은 pH 5.0~6.0 범위이며 대체적으로 培養日數가 경과함에 따라 色이 농후해지며 불투명해지는 경향을 나타내었다.

### 2) pH의 영향

밀기울에 加하는 水道水대신 McIlvaine buffer를 加하여 pH 3.0~7.0으로 달리하여 5일간 배양하였을 때의 粗酵素의 活性은 Fig. 3과 Fig. 4와 같다.

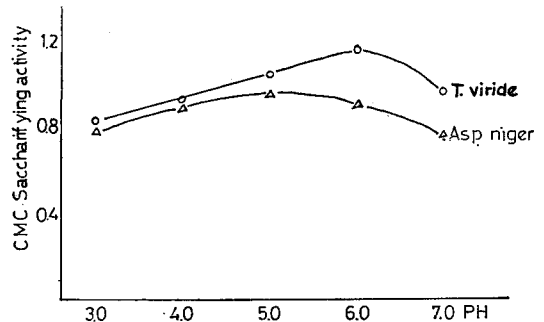


Fig. 3. Effect of PH on cellulase production.

Fig. 3과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 CMC 液化活性은 큰 變化를 나타내지 않고 있으나 糖化活性은 다소 큰 차이를 나타내고 있다. *Asp. niger*는 pH 5.0에서 *T. viride*는 pH 6.0에서 각각 最高의 活性을 보여 주고 있다. 培養時에 있어서 *T. viride*는 pH가 微酸性부근에서는 靑綠色胞子를 形成하나 pH가 中性쪽으로 치우침에 따라서 연두

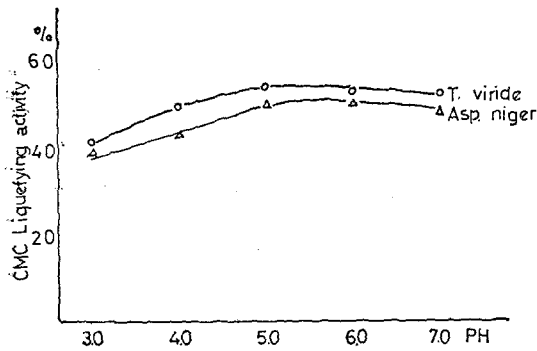


Fig. 4. Effect of PH on cellulase production.

색에서 黃綠色으로 變하며 배양액도 다소 농후해지는 결과를 나타내어 흥미있는 現象을 보여 주었다. 두 균주의 酵素生産을 위한 培養時 最適 pH는 pH 5.0~6.0임을 알 수 있다.

金 등<sup>21)</sup>의 *Asp. niger* 배양시 pH 5.5에서 가장 좋았다는 보고와 거의 一致하며 *Asp. saitoi*는 pH는 3~4<sup>16)</sup>, *Thermonospora curvata*는 pH 7~8<sup>15)</sup>에서 培養하였을 때 活性이 증가하였다는 보고가 있어 菌株 및 배양조건에 따라 最適 pH가 각각 相 異함을 알 수 있다.

### 3) 탄소원 첨가의 영향

밀기울배지에 1%의 CMC, filter paper, cellulose powder, absorbent cotton 및 벚짚에서 調製한 xylan을 加하고 5일간 배양하였을 때 酵素生産性은 Table 5와 같다.

Table 5. Effect of carbon sources on cellulase production.

Carbon sources added (1%)	Cellulase activity(%)	
	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. viride</i> -SM10
Carboxy methyl cellulose	118	114
Filter paper	100	105
Cellulose powder	116	111
Absorbent cotton	112	109
Crude xylan	88	105
Control	100	100

Cultivation; 30°C 5 days.

Table 5에서 보는 바와 같이 CMC첨가시 효소 활성이 14~18% 증가하였다. 밀기울배지에 加한 탄소원이 inducer로서 作用한다고만 볼 수는 없으나 CMC 첨가가 CMCase 生成 증가와 다스의 경향을 나타내고 있다고 보겠다.

Stutzenberger<sup>15)</sup>는 cellobiose 첨가시에 성장이 촉진되었으나 효소활성의 증가에는 영향을 준다고는 볼 수 없다고 하였으며 張 등<sup>13)</sup>은 cellulose powder와 filter paper를 첨가하였을 때 4배 이상의 활성이 증가한다고 하였고 黑田 등<sup>14)</sup>은 *Neurospora*屬이 pulp powder와 같은 천연섬유소를 첨가하므로써 여지분괴활성이 좋았다고 보고한 바 있다.

### 4) 질소원 첨가의 영향

밀기울培地에 Czapek medium中の 질소원(0.5%)을 각각 달리하여 5일간 배양한 후 生成하는 還元糖으로 酵素活性을 測定한 結果는 Table 6과 같다.

Table 6. Effect of nitrogen sources on cellulase production.

Nitrogen sources added(0.5%)	Cellulase activity(%)	
	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. Viride</i> -SM10
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	120	140
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO	113	110
NH <sub>4</sub> Cl	127	130
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	133	125
Control(NaNO <sub>3</sub> )	100	100

Cultivation; 30°C 5 days

Table 6에서 보는 바와 같이 NaNO<sub>3</sub> 첨가구에 비하여 10~40%의 酵素活性이 증가를 보여주고 있는데 *Asp. niger*는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 첨가시 33%, *T. viride*는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 첨가시 40%의 효소활성이 증가를 나타내어 酵素生産에 있어서 비교적 多量의 질소원을 필요로 하는 것 같다.

張 등<sup>13)</sup>이 *T. viride* 液內培養에서 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 첨가시 효소활성이 증가했다는 보고와 일치하며 鄭<sup>17)</sup>은 *Myriocum albomyces* 경우 무기류첨가가 효소활성에 영향을 주지 않는다고 하였고, 松村 등<sup>16)</sup>은 *Asp. saitoi*의 cellulase는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 1% 첨가구가 3% 첨가시 보다 효소생산에 좋은 결과를 얻었다고 하였다.

### 5) 인산염첨가의 영향

1% CMC를 加한 밀기울培地에 질소원으로는 *Asp. niger*는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 *T. viride*는 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>를 첨가한 Czapek medium中の 인산염(0.5%)을 각각 달리하여 5일간 배양 후 酵素生産에 미치는 영향을 살펴 본 결과는 Table 7과 같다.

Table 7에서 보는 바와 같이 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가구가

**Table 7.** Effect of phosphate sources on cellulase production.

Phosphate sources added(0.5%)	Cellulase activity(%)	
	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. viride</i> -SM10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	119	118
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	100	114
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	119	109
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	88	91
Control	100	100

\* No addition of nitrogen source.

18~19%의 효소生成이 증가하였으나 대체적으로 인삼염 첨가구가 효소생산에 별다른 영향을 미치지 않은 것 같다. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 첨가시 효소활성의 감소는 다른 첨가구에 비하여 질소원이 제외되었기 때문인데 효소생산에 있어서는 인삼염보다 질소원을 더 필요로 하는 것 같다.

張等<sup>13)</sup>이 *T. viride* 액내培養에서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 첨가구가 다른 區보다 酵素活性이 높았다는 보고와 일치하는때 이는 완충작용을 나타내어 pH가 유지되는 이유때문이 아닌가 여겨진다.

6) 生産要素 첨가의 영향

밀기울培地에 生長要素를 각각 달리하여 첨가하고 5일간 培養한 후 효소활성을 測定한 結果는 Table 8과 같다.

**Table 8.** Effect of natural nutrient sources on cellulase production.

Natural nutrients added (0.1%)	Cellulase activity(%)	
	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. viride</i> -SM10
Proteose peptone	114	109
Yeast extract	107	118
Corn steep liquor	121	111
Vit-free casamino acid	100	127
Control	100	100

Cultivation; 30°C 5 days.

Table 8에서 보는 바와 같이 *Asp. niger*는 corn steep liquor 첨가시 21% 증가를 나타내고 있으며 *T. viride*는 Vit-free casamino acid 첨가시 27% 증가하였다. 鄭<sup>17)</sup>은 *Myriococcum albomyces*가 poly peptone이나 casamino acid 첨가시에, Stutzenberger<sup>15)</sup>는 *Thermonospora curvata*가 thiamine이나 biotin 첨가시에 효소활성이 증가하였다는 보고가 있으며 松村等<sup>16)</sup>은 *Asp. saitei*가 corn steep

liquor가 탄소원에 비해 大量 요구한다고 하였으며 黑田等<sup>14)</sup>은 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>보다 탈지대두나 corn steep liquor가 *Neurospora*屬의 cellulase 生産에 더 적합하다고 보고한 바 있다.

7) 有機物質 첨가의 영향

밀기울배지에 有機物質을 20mesh 以下로 분쇄한 분쇄물을 5% 첨가하여 5일간 배양하여 還元糖 定量으로 cellulase 活性을 測定한 結果는 Table 9와 같다.

**Table 9.** Effect of organic substances on cellulase production.

Organic substances (20mesh) added(5%)	Cellulase activity(%)	
	<i>Asp. niger</i> -SM6	<i>T. viride</i> -SM10
Rice bran	93	100
Corn cob	100	82
Orange peel	121	118
Defatted soybean	107	86
Rice hull	100	73
Control	100	100

Cultivation; 30°C 5 days.

Table 9에서 보는 바와 같이 밀기울만 사용한 control 區보다 대체적으로 효소生成이 감소를 나타내고 있으나 감귤피를 첨가한 區는 18~21%의 효소生成이 증가를 보여 주고 있다. 金等<sup>21)</sup>이 감귤피를 3~5% 첨가시에 CMC 점도강화활성이 좋았다는 보고와 거의 비슷한 결과를 보여주고 있으며 농산폐기물을 利用한 효소생산의 여지가 있으리라 보겠다.

8) 前處理한 왕겨 첨가의 영향

농산폐기물중에서 비교적 섬유소 구조가 견고하여 分解利用이 어려운 왕겨에 3N NaOH를 가한 후 120°C에서 15분간 加壓처리한 다음 當량의 HCl이나 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub>로 각각 중화한 후 밀기울과 혼합비를 달리하여 배양하였을 때 생성된 還元糖으로 酵素活性을 測定한 結果는 Table 10과 같다.

농산폐기물 利用에 대한 왕겨의 알칼리처리하는 中和하는 酸의 종류에 따라 다스의 차이를 나타내고 있으나 酵素生産에 있어서 밀기울을 왕겨로 대체할 수 있는 限界는 HCl로 中和하였을 때는 50%까지, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 30%까지 가능하다고 보며 전처리로 인하여 왕겨의 섬유소 구조는 붕괴되어 미생물의 영양원으로 利用하므로써 control 區에 비하여 5% 첨가시에 21~28%의 효소생성의 증가를 나타내고

Table 10. Effect of pretreated rice hull addition on cellulase production.

Pretreated rice hull added		Cellulase activity of <i>Asp. niger</i>
Neutralized with HCl	5% addition	121%
	10% addition	114
	30% addition	107
	50% addition	100
Neutralized with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5% addition	128
	10% addition	121
	30% addition	100
Neutralized with HNO <sub>3</sub>	5% addition	114
	10% addition	100
Control(5% rice hull powder)		100

Rice hull is pretreated with 3N NaOH at 15 lb for 15 min. and neutralized with various acids. Cultivation; 30°C 5 days.

있는 것은 흥미있는 사실이라 하겠다.

金등<sup>32)</sup>은 왕겨를 함유한 발효사료에 대한 사양 실험을 행한 보고가 있으며 外山<sup>33)</sup>은 여러가지 농산폐기물을 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 NaOH에 의한 전처리가 *T. viride* 배양여액의 당화력을 증가시켰다는 보고가 있다. 위의 實驗結果 효소생산에 있어서 밀기울량과 어느정도 대체가 가능하며 전처리한 왕겨를 완전중화하는 문제나 가축의 대사에 미치는 저해를 절제거등의 문제가 해결된다면 발효사료생산에 더 연구해 볼 만한 가치가 있으리라 여겨진다.

### 要 約

농산폐기물을 利用한 醱酵飼料 生産에 관한 기초적인 연구로서 25點의 試料에서 cellulase 生産性이 우수한 두개의 균주를 選定하여 同定하였다. 選定된 두 균주에 대하여 cellulase의 生産 最適조를 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Cellulase 生産性이 우수한 菌株로 *Aspergillus niger*-SM6과 *Trichoderma viride*-SM10 두 균주를 選定하였다.

2. 두 균주 모두 培養時 pH 5.0~6.0에서 培養 5일째에 最高의 酵素生産性을 나타내었다.

3. *Aspergillus niger*-SM6은 培養時 첨가한 CMC가 18%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 33%, CSL이 21%, 감글피가 21%의 酵素生産 증가를 나타내었다. 또한 전처리한 왕겨를 첨가하여 배양하였을 때 21~28% 효소생성이 증가하였으며 효소생산에 있어서 50%까지 밀기울과 대체가능하였다.

4. *Trichoderma viride*-SM10은 배양시 첨가한 CMC가 14%, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 40%, Vit-free casamino acid가 27%, 감글피가 18%의 효소생산 증가를 나타 내었다.

### 참 고 문 헌

- Hachiga M. Hayashi K; J. Ferment. Technol. **42**, 207 (1964).
- 外山信男; 化學と 生物 **7**, 630 (1969).
- Bergmeyer H.U; Methods of Enzymatic Analysis **3**, 1132 Academic press (1974).
- Nisizawa K; J. Ferment. Technol., **51**, 267 (1973).
- Reese E. T. Siu R.G.H and Levinson H.S; J. Bacteriol., **59**, 485 (1950).
- Reese E.T. Gilligan W; Arch. Biochem. Biophys., **45**, 74 (1953).
- Hash J.H. King K. W; J. Biol. Chem., **232**, 381 (1958).
- 成洛癸; 晋州農大論文集 **10**, 1 (1971).
- Ueda K. Ishikawa S. Itami T and Asai T.; Agr. Biol. Chem., (Japan) **26**, 35 (1952).
- 조한옥, 이홍식, 김희창; 原子力研究論文集 **9**, 49 (1969).
- Mandels M. Weber J. Parizek R; Applied Microbiol., **21**, 152 (1971).
- Mandels M. Reese E.T; J. Bacteriol., **79**, 816 (1960).
- 張文雄, 宇佐美昭次; 日釀工., **47**, 447 (1969).
- 黒田秀穂, 望月輝也; 日釀工., **45**, 341 (1967).
- Stutzenberger F.J; Applied Microbiol., **24**, 77 (1972).
- 松村親, 前島一孝; 日釀工., **43**, 731 (1965).
- 鄭東孝; 韓農化., **14**, 59 (1971).
- Oete S. Aikawa T. Takahara Y; J. Ferment. Technol., **42**, 363 (1964).
- Ikeda R. Yamamoto T. Funatsu M; Agr. Biol. Chem., **31**, 1201 (1967).
- 李啓瑚, 高正三; 韓農化., **18**, 117 (1975).
- 金燦祚, 崔宇永; 韓農化., **11**, 83 (1969).
- Nakayama S. Takada R. Toyama N; J. Ferment. Technol., **43**, 648 (1965).
- Takahashi R. Ojima T. Yoshimura K; J. Ferment. Technol., **44**, 842 (1966).
- Toyama N. Fujii N. Ogawa. K; J. Ferment.



- Technol., **44**, 731 (1966).
25. 三澤豐, 松原良, 羽田野誠; 日食工誌., **15**, 83 (1968).
26. 外山信男; 纖維工學 **22**, 1 (1969).
27. Raper K.B. Fernel D.I; The genus *Aspergilli* 293 The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1973).
28. Bisby G.R; Trans. Brit. Myc., **23**, 149 (1939).
29. Chang W.S. Usami S and Taketomi N; J. Ferment. Assoc., **24**, 421 (1966).
30. Nomura K. Yasui I. Kiyooka S. Kobayashi T; J. Ferment. Technol., **46**, 634 (1968).
31. 東京大學 農藝化學教室; 實驗農藝化學 下 639 朝創書店 (1974).
32. 金燦祚, 崔宇永; 韓農化., **11**, 89 (1969).
33. 外山信男; 日釀工., **36**, 375 (1958).