

廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 관한 研究

(第五報) 분리균 *Cellulomonas* 속 균주의 이용성

沈奇煥 · 成洛葵 · 尹漢大

慶尙大學 食品加工學科

Studies on the Fermentative Utilization of Cellulosic Wastes.

(Part V) Utilization of *Cellulomonas* sp.

Ki-Hwan Shim, Nack-Kie Sung and Han-Dae Yun.

Dept. of Food Processing Gyeong-Sang University, Jinju, Korea

(Received February (10, 1977))

Abstract

For the production of microbial cells from cellulosic materials by cellulose-assimilating bacteria, *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1, isolated by authors, utilization of this organism on some microbiological properties was investigated.

The results of these studies were summarized as follows;

1. When the organism was incubated in the growth medium at pH 7.0 for 50 hours, its growth was the most effective and the level of excreted total protein in the menstruum increased continuously during the stationary phase of cell growth.
2. The optimal enzyme activity was observed in the pH region of 5 to 7 and culture period of 40 to 50 hours.
3. The microbial digestibility of cellulosic wastes such as sawdust, rice hull, rice straw, peanut hull and used newspaper was less than 30%, whereas that of cellulose powder was 47.1% and rice straw was digested 77% by NaOH treatment.
4. Bacterial cells incubated in the growth medium were increased up to 8% of substrate concentration and showed a decrease on further concentration.
5. The production of microbial cells from NaOH treated rice straw was obtained 10.6mg/ml of culture medium.

서 론

고등 식물체의 주성분을 이루고 있는 섬유소는 그 구조가 견고하고 화학적인 분해반응이나 미생물에 의한 분해 혹은 소화가 어려우며, 특히 효소

의 작용을 거의 받지 않는 lignin 이 결합되어 있어 섬유소 분해효소가 기질인 섬유소와 접촉하기 어렵게 구성되어 있어 섬유성물질의 이용성이 늦어진 것 같다.

근래에 와서 인구의 증가와 더불어 새로운 식량 자원의 일환으로써 자연계에 널리 분포되어 있는

이러한 섬유성물질을 산업적으로 이용하기 위한 연구가 많은 학자들에 의하여 진행되고 있다.

섬유질을 기질로 한 섬유소 단세포 생산에 관한 연구로서는 Han 등⁽¹⁻³⁾은 사탕수수밭에서 분리한 *Cellulomonas* 속의 세균을 알카리처리한 볏짚과 bagasse 에서 배양하여 섬유소 단세포단백을 생산하였고, Updegraff 는 토양에서 분리한 사상균의 1 주인 *Myrothecium verrucaria* 가 신문지를 기질로 하여 균체를 배양하였을 때 30%의 단백질을 생산하였음을 보고⁽⁴⁾하였다.

저자는 비교적 효율적으로 이용되고 있지 않은 섬유성물질의 이용성을 높이고 섬유소 자화세균에 의한 섬유소 단세포단백을 생산할 목적으로 전보⁽⁵⁾에서 분리, 동정한 섬유소 자화세균의 몇 가지 균학적 성질을 통한 이용성을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 사용균주

전보⁽⁵⁾에서 분리, 동정한 *Cellulomonas flavigena* GFB24-1 을 사용하였다.

2. 기질 및 배지조성

볏짚, 왕겨, 톱밥, 땅콩껍질은 전보⁽⁶⁾와 같은 시료를 분쇄하여 20 mesh screen 을 통과시킨 것을 사용하였고, 폐신문지와 여지(동양여지 NO. 51A)는 분쇄하여 사용하였으며 볏짚의 전처리는 20mesh로 분쇄한 볏짚에 4% NaOH 를 10배 가하고 100°C에서 15분간 처리하여 물로써 중성(pH 7.6)에 가깝

Table 1. Growth medium for cellulose-assimilating bacteria

(NH ₄) ₂ SO ₄	6.0g
KH ₂ PO ₄	1.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1g
CaCl ₂	0.1g
yeast ext.	0.5g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	16.7mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.18mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.16mg
CoCl ₂	0.18mg
E. D. T. A.	20.1mg
Cellulosic substrate	10~50g
Distilled water	1l
pH	7.0~7.2

도록 세척하여 건조한 후 다시 20 mesh screen 을 통과시켜 사용하였다. 그리고 균체 생육배지는 Table 1 과 같은 조성의 배지를 사용하였다.

3. 섬유질 자화세균의 배양

배지 50ml 를 500ml 용 진탕 flask 에 넣고 1kg/cm²에서 30분간 살균한 다음, 공기균을 일정량씩 균액상태로 접종하여 30°C로 조정된 진탕배양기(진폭 5cm, 진탕회수 120rpm)에서 4일간 배양하였다. 단, 목적에 따라 배양시간을 조정하였다.

4. 균체량 측정

균체량은 Lowry 법⁽⁷⁾으로 균체중의 단백질을 정량하여 미리 준비한 표준곡선에서 균체량으로 환산하여 Huang 등⁽⁸⁾의 방법으로 균체를 측정하였으며 이와 병행하여 목적에 따라 탁도법⁽⁹⁾에 의해서 균체증식을 측정하였다.

5. 효소활성 측정

섬유소 자화세균 생육배지에 *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1 을 접종하여 시간별, pH 별로 배양하고 8,000 rpm 에서 20분간(4°C)원심분리한 상장액을 효소액으로 하여 다음과 같은 방법으로 효소활성을 측정하였다.

1) CMC 분해력

Matsuba 방법⁽¹⁰⁾에 의하였다. 즉 0.625% CMC (Na鹽, ester 度 0.5)기질액 (pH 6.0)4ml 에 효소액 1ml 를 가하여 60°C water bath 에서 반응시킨 후 즉시 Somogyi A 액 5ml 를 가하고 Somogyi 변법에 의하여 환원성을 glucose 로 정량하였다 (CMC 분해력은 편의상 CMC-SA 로 표시함).

2) 여지 당화력

L 형 시험관에 기질액(동양여지 NO. 51A 를 분쇄하여 pH 6.0, 1/20M McIlvaine 완충액과 혼합한 1.25% 현탁액) 8ml 와 효소액 1ml 를 가하여 60°C에서 1시간 진탕(진폭 4cm, 진탕회수 80rpm)한 다음, 1N NaOH 1ml 를 즉시 가하여 효소반응을 정지시킨 다음 잔존하는 여지분말을 원심분리하여 제거하고 그 상장액 5ml 에 대하여 somogyi 변법으로 환원당을 정량하였다. (FP-SA로 표시함)

3) Avicel 당화력

1.25% Avicel 현탁액 8ml 와 효소액 1ml 를 가하여 여지당화력과 같은 방법으로 측정하였다. (A-SA 로 표시함)

실험결과 및 고찰

1. 균체증식 및 효소활성

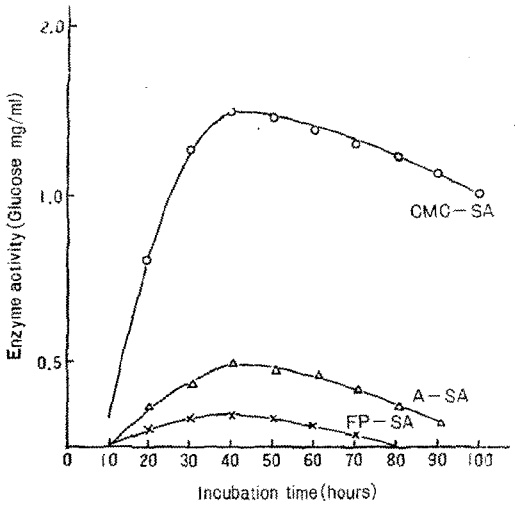


Fig. 1 Time course of growth and excretion of protein of *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1

1) 배양시간에 의한 영향

탄소원으로 여지분말을 넣은 섬유질 자화세균 생육배지 50ml를 진탕 flsak에 넣고 살균한 다음, 왕복진탕배양기에서 배양하여 균체중식과 배양액을 원심분리한 상정액 중의 단백질과 효소활성을 경시적으로 측정할 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 탁도로써 균체중식량을 측정할 결과 50시간 배양하였을 때 균체중식율이 가장 높았고 배양액을 8,000rpm에서 20분간 원심분리하여 그 상정액중에 유리되어 있는 단백질을 Lowry법으로 측정할 결과 균체중식이 가장 높은 50시간까지 급격히 증가하다가 그후에는 완만한 증가를 보였다. 균체중식은 30시간까지는 급격히 증가하였으며 50시간 배양하였을 때 가장 높았는데 이 결과는 Han 등의 보고²⁾와 거의 일치하였다.

그리고 효소활성을 측정할 결과 40시간 배양하였을 때 모든 효소활성이 가장 높았다(Fig. 2). 40시간 이상 배양시 효소의 활성이 감소하였는데 이것은 생성효소가 불안정하였거나 체의 단백질효소의 활성에 의하여 효소가 파괴되기 때문인 것으로 생각된다.

2) pH에 의한 영향

배지의 pH를 4~9로 조절하여 공시균을 접종한

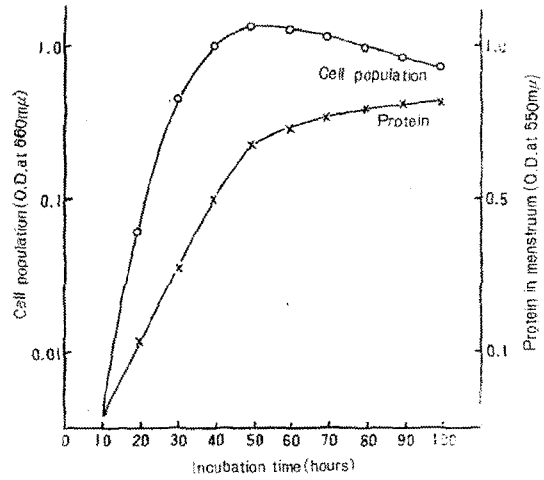


Fig. 2. Effect of incubation time on activity of the extracellular cellulase

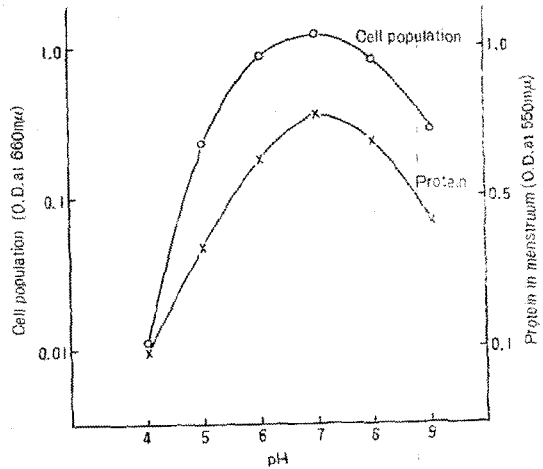


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1

다음 30°C에서 50시간 배양하여 균체중식과 배양액을 원심분리한 상정액 중의 단백질 함량을 측정할 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH 7부근에서 가장 많았다.

그리고 효소활성을 측정할 결과, pH 5~7의 범위에서 효소활성이 높았다(Fig. 4). 균체중식이 pH 6~8의 범위에서 좋았고, 효소활성이 pH 5~7에서 높은 것은 균체생육 pH와 효소활성 pH가 다르기 때문이라 생각된다.

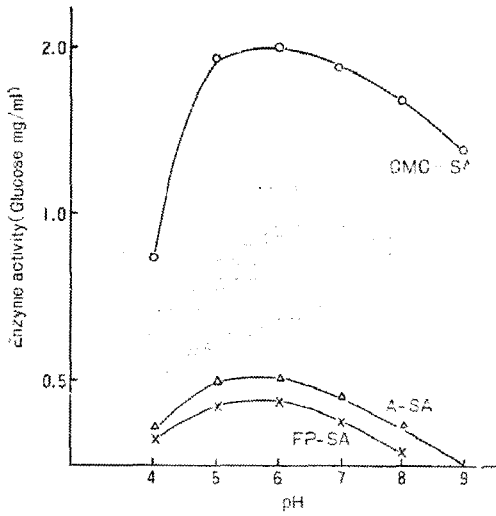


Fig 4. Effect of pH on the activity of the extra-cellular cellulase

2. 각종 섬유질의 자화성

여지분말, 톱밥, 폐지신문, 왕겨, 볏짚, 땅콩껍질, NaOH 처리한 볏짚등을 생육배지에서 4일간 진탕배양하여 중량법에 의하여 자화율을 측정할 결과, 여지분말이 47.1%, 알카리처리한 볏짚이 77%의 자화율을 보였으며 다른 시료는 30% 이하의 낮은 자화율을 보였다(Table 2).

여기서 여지분말과 알카리처리한 볏짚이 자화율이 높은 것은 여지분말은 lignin이 제거된 비교적 순수한 섬유소 성분으로 되어 있기 때문이며, 볏짚에 알카리를 처리함으로써 고분자 물질인 lignin이 완전히 제거되고 또한 섬유질이 팽창됨으로써

Table 2. Digestibility of various cellulosic materials by *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1

Substrate	Initial wt(g)	Residual wt(g)	Per Cent digestion
Cellulose Powder	1. 825	0. 959	47. 1
Saw dust	1. 865	1. 537	17. 6
Used newspaper	1. 847	1. 481	19. 8
Rice hull	1. 754	1. 347	23. 2
Rice straw	1. 796	1. 247	29. 5
Peanut hull	1. 824	1. 456	20. 2
Alkali-treated rice straw	1. 753	0. 353	77. 0

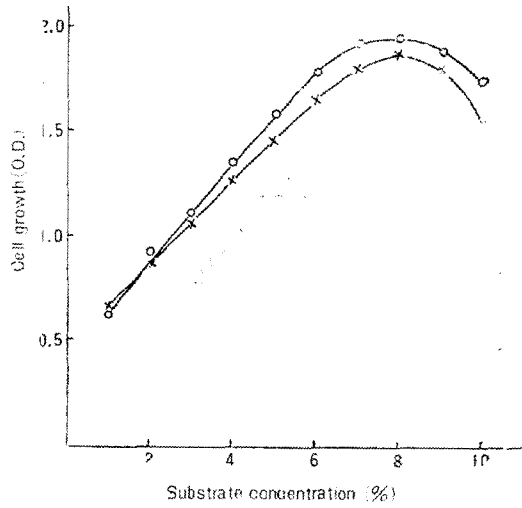


Fig 5. Effect of substrate concentration on the growth of *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1

o—o; Turbidity (O. D. at 660m μ)
x—x; Lowry method (O. D. at 550m μ)

자화율이 좋은 것 같다^{11~15)}.

최근에 섬유질 자화세균이 잘 자화하지 못하는 lignin을 기질로 하여 미생물을 배양, 균체를 생산하기 위한 연구^{16~17)}가 진행되고 있는데 앞으로 많은 연구자에 의하여 개척되어야 할 분야라고 생각된다.

3. 기질농도에 따른 균체증식

생육배지에 탄소원으로써 알카리 처리한 볏짚을 1~10%농도로 첨가하여 살균한 다음, 공시균을 접종하여 4일간 배양하고 균체 생육도를 Lowry 법과 탁도로써 측정할 결과는 Fig. 5와 같다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 기질 농도의 증가에 따라 6%까지는 균체 증식이 적절적으로 증가하였고 그 이상의 농도에서는 완만하게 증가하다가 9~10%의 농도에서는 감소하였다.

여기서 고농도에서는 균체 증식이 감소되는 것은 배양액에 대한 기질 농도가 높음으로써 진탕배양할 때 진탕이 잘 되지 않아 효소 작용이 제대로 되지 않았기 때문인 것 같다. 그리고 Lowry법과 탁도에 의한 측정은 비슷한 경향을 나타내었다.

4. 배양시간에 따른 균체증식과 자화율

알카리 처리한 볏짚을 4% 첨가한 생육배지에 공시균을 접종하여 12~120 시간 경시적으로 배양하고 균체 증식도와 균체량, 자화율을 측정할 결과

Table 3. Effect of incubation time on the growth of *Cellulomonas flavigena* GFB 24-1

Incubation time (hours)	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
O. D. (Lowry method (550m μ))	0.230	0.756	0.808	1.250	1.241	1.151	1.147	1.138	1.120	1.017
(Turbidity (660m μ))	0.148	0.408	0.778	1.272	1.270	1.264	1.236	1.232	1.222	0.826
Cell weight (mg/ml)	2.6	6.3	6.8	10.6	10.4	9.5	9.4	9.3	9.2	8.3
Digestibility (%)	8.9	20.1	41.2	69.3	74.5	76.2	77.3	77.5	77.6	77.6

는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보는 바와 같이 균체증식은 48시간 배양하였을 때 10.6mg/ml로써 가장 좋았고 자화율은 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 이것은 다른 연구자의 실험에서 얻은 8mg/ml보다 훨씬 균체증식이 높으며 자화율은 77%이상으로써 벚짚을 암모니아수로 처리한 기질을 사용한 결과 보다 월등히 자화율이 높았으며¹⁸⁾, Han 등의 연구와는 비슷한 자화율을 나타내었다.^(13,14,19)

요 약

비교적 효율적으로 이용되고 있지 않은 섬유성 물질의 이용성을 높이고 섬유소 자화세균에 의한 섬유소 단세포단백을 생산할 목적으로 전보에서 분리, 동정한 *Collulomonas flavigena* GFB 24-1의 몇 가지 균학적 성질을 통한 이용성을 검토한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 섬유질 자화세균 생육배지에서 배양한 결과 pH 7.0에서 50시간 배양하였을 때 균체증식이 가장 좋았고, 배양시 유리되는 단백질은 배양중 시간이 경과됨에 따라 증가하였다.

2. Cellulolytic activity는 pH 5~7에서 40~50시간, 배양하였을 때 가장 좋았다.

3. 톱밥, 벚짚, 왕겨, 땅콩껍질의 자화율은 30% 이하 였으며 여지분말은 47.1%, NaOH로 처리한 벚짚은 77%이었다.

4. 생육배지에서 배양시 기질의 농도의 증가에 따라 6%까지는 균체증식이 직선적으로 증가하였으며 8%까지는 완만하게 증가하다가 9~10%농도에서는 감소하였다.

5. NaOH 처리한 벚짚을 기질로 하여 진탕 flask에서 배양한 결과 48시간 배양하였을 때 균체증식이 10.6mg/ml로써 가장 좋았다.

참 고 문 헌

(1) Han, Y. W. and V. R. Srinivasan: *Appl.*

microbiol., **16** (8), 1140 (1968)

(2) Han, Y. W. and C. D. Callihan: *ibid.*, **27** (1), 159 (1974).

(3) Han, Y. W. C. E. Dunlap, and C. D. Callihan: *Food Technol.*, **25**, 130 (1971)

(4) Updegraff, D. M.: *Biotech. Bioeng.*, **XIII**, 77 (1971).

(5) Sung, N. K. and K. H. Shim: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **5** (1), 1 (1977).

(6) Sung, N. K. and J. K. Kim: *ibid.*, **4**(1), 1 (1976)

(7) Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)

(8) Huang, T. L., Y. W. Han and C. D. Callihan: *J. Ferment. Technol.* (Japan), **49**, 574 (1971)

(9) 京都大學農學部 食品工學教室編: 食品工學實驗書(養賢堂版, 日本東京) 下卷, 142 (1970)

(10) Matsuba, Y., N. Okamoto and T. Komaki: *J. Ferment. Technol.*, **41** (1), 47 (1963)

(11) Han, Y. W., J. S. Lee and A. W. Anderson: *J. Agric. Food Chem.* **23** (5), 928 (1975)

(12) Han, Y. W. and A. W. Anderson: *Economic Botany.*, **28** (3), 338 (1974)

(13) Han, Y. W. and A. W. Anderson: *Appl. microbiol.*, **30** (6), 930 (1975)

(14) Han, Y. W.: *ibid.*, **49**(4), 510 (1975)

(15) Merrill, A. M. and A. J. Baker: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **5**, 193 (1975)

(16) 原口隆英: *化學과生物*, **14**(10), 626 (1976)

(17) Muranaka, M., S. Kinoshita and Y. Yamada: *J. Ferment. Technol.*, **54** (9), 635 (1976)

(18) Bae, M., and B. H. Kim: *Korean J. Appl. microbiol. Bioeng.*, **2**(2), 79 (1974)

(19) Han, Y. W., J. W. Pence and A. W. Anderson: *Appl. microbiol.*, **29** (5), 708 (1975)