

Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究*¹

—(II) 反應條件의 效果—

閔 斗 植*²

Studies on the Hydrolysis of Holocellulose with *Trichoderma viride* Cellulase*¹

—(II) Effects of the Reaction Conditions—

Du Sik Min*²

Enzymatic hydrolysis of the substrate from *Alnus hirsuta* (Spach) Rupr (8-14years) was investigated using cellulase preparations of *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16374 and conducted on the optimum reaction conditions of the cellulase on saccharification.

The crude cellulase was produced by the submerged culture process and produced in the culture fluid was salted out quantitatively by the use of ammonium sulfate.

The method of delignification from wood(Saw dust) was treated by the peracetic acid (PA) method.

Reducing sugar was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method.

The results were summarized as follows;

1. The optimum pH of cellulase was 5.0 and the range of stability with respect to pH was generally from 4.0 to 6.0
2. The optimum temperature of cellulase was generally 40°C, but reducing sugar formation did not show significant differences at 5% levels in the reaction temperature from 40°C to 50°C.
3. The reducing sugar were increased with increase of cellulase concentration.
4. The reducing sugar were decreased with increase of substrate concentration.
5. Fructose was a very good inhibitor of the enzyme from *Trichoderma viride*, but glucose inhibition was generally weak.

Trichoderma viride SANK號 cellulase에 의한 木材 加水分解에 관한 研究로서 材料는 산오리나무材를 使用하였다. 그리고 糖生成을 위한 cellulase의 最適 反應條件을 調査하였다.

Trichoderma viride 粗酵素液은 振盪培養法에 依하여 生産하였고, 이것을 鹽析酵素液을 調製하여 使用하였다.

基質은 산오리나무材 톱밥을 過醋酸法에 依하여 脫리그닌 환것을 使用하였다. 還元糖 定量은 DNS 法에 依하였다.

結果는 다음과 같다.

1. 最適 pH는 5.0이며, pH 安定性的 範圍는 4.0~6.0으로 나타났다.
2. 反應溫度는 40°C가 最適이었으며, 溫度의 安定性은 40°C~50°C 範圍로 나타났다.
3. 酵素濃度는 높을수록 還元糖 生成率은 增加되었다.
4. 基質濃度는 높을수록 單位 基質에 對한 還元糖 生成率은 減少 되었다.
5. 糖類中 pructose가 가장 강한 阻害劑로 나타났으며, glucose의 阻害作用은 弱하게 나타났다.

*¹ Received for publication on August 14, 1978.

*² 忠北大學校 農科大學 College of Agr. Chung-Buk University

緒 論

Cellulase란 植物性이나 微生物性 纖維物質을 分解하는 酵素를 總稱하는 말이다.

그리고 1961年 International Union of Biochemistry의 酵素 委員會에서는 이 Cellulase를 “ β -1,4-glucan, 4-glucanohydrolase”라고 命名하였다.

纖維物質은 거의 全部가 植物界에서 由來되며 이들 纖維性物質의 分解는 微生物의 酵素作用에 起因한다는 事實이 1900年代初에에서 부터 알려져 왔으나 그 당시는 學界의 關心을 끌지 못하였다. 即 cellulase에 關한 研究는 Karrer(1925~1929)^{12,13,14,15,16}가 달팽이의 cellulase를 纖維素에 作用시켜 glucose를 生成하는 것을 發見함으로써 研究가 始作되었다. 後 1950年代에 이르러 이들 酵素의 利用이 據頭됨으로써 纖維素 分解酵素에 關한 研究가 活潑하게 되었다.

Trichoderma viride cellulase에 關한 初期(1960年以前) 研究로는 Reese(1950)에 依한 것이 主要한 部分을 占하며 특히 cellulose分解作用에 關하여 (1) C_1 - C_x 說에 出發한 Cellulase多成分의 發見^{20,30,31,32,33,39,41,42} (2) 各成分 (Reese는 C_x 라 稱함)의 CMCC Carboxy Methyl Cellulose)에 對한 水解樣式에는 “more”endowise=more random[endo- β (1 \rightarrow 4) glucanases]型和 “Less” endowise=Less random [exo- β (1 \rightarrow 4) glucanases]型이 있다는 發見^{25,33,45} (3) 各種 cellulase成分이 cellulose에 對한 分解相助效果 같은 것의 發見^{25,33}은 cellulase研究에 根本的인 問題를 提供한 結果가 되었다. 中期(1960年代)는 주로 *Trichoderma viride*起源의 cellulase標品을 原料로한 研究가 많았다. 即 研究者들은 각기 다른 精製法으로 얻은 cellulase標品에 關하여 한편으로는 多成分에 關한 것이 많지만, 3成分 程度에 對하여 그 性質을 調査하였다. 그 結果로 (1) *Trichoderma viride* Cellulase는 多成分系(multicellulase system)이며 그中에는 基質特異性이 있다는 것을 發見^{18,21,25,33} (2) 單一 蛋白質로 보이는 cellulase標品이지만 綿 cellulose 및 Avicel에 對하여 糖化力도 있고, CMC 및 cello-oligo糖에 對한 糖化力과 粘度低下力도 있다는 것이 發見^{21,22,25,33} (3) cellulase 成分間에는 cellulose에 對하여 可溶化와 糖化力에 相助效果가 있다는 것을 發見^{23,25,27,28,33,44,48} (4) cellulase 各成分에는 多少의 炭水化物(간혹 多糖類)로 結合되어 있고 exowise 水解作用을 나타내는 成分도 있다는 것이 發見^{21,25,29,33,34,49} 되었다.

最近(1970年代)의 研究로는 xylannose作用을 나타내

는 cellulase 成分이 發見^{25,46} 되었으며 특히 C_1 에 關한 研究가 活潑하였다. 即 Wood(1972)는 C_1 이라 稱하는 cellulase劃分을 分別하여 基質 特異性を 調査^{25,50} 하였다. 西澤(1972) Pettersson(1973)는 Avicel에 對한 糖化力이 높고, CMC에 對하여서는 糖化力이 낮은 cellulase 成分을 分劃 精製하여 그의 性質을 調査하고 특히 C_1 과 C_x 는 單一 蛋白質 같으나 amino酸의 組成이 틀린다는 것을 發見^{24,25,47} 하였다. 특히 Reese는 基質인 cellulose를 高溫加熱하여 粉末로 만드려 cellulase의 糖化力을 아주높게 增加시킬수 있다는 것을 發見²⁵ 하였다. 지금 各國에서는 cellulase의 食糧化 問題, 食品工業, 飼料, 釀造, 生藥, 醫藥等 擴範한 應用에 關하여 積極的인 研究가 進行되고 있다.

本 研究는 經濟的으로 利用價値가 낮은 산오리나무材의 合理的인 利用開發을 위하여, 산오리나무材를 Cellulase基質로 使用할 때 糖生成의 最適反應條件을 究明하는데 있다.

材料 및 方法

I. 材 料

1. 供試樹種

忠北大學校 構內에서 生育한 樹齡 8~14年生인 산오리나무(*Alnus hirsuta*(Spach) Rupr)를 10株 擇하여 0.3~0.5cm간격으로 環鋸로 切斷하여 톱밥을 만드려 이것을 脫리그린 하였다.

2. 供試菌株

現在까지 cellulose에 對한 糖化力이 가장 강한 것으로 알려진 *Trichoderma viride* pers. ex Fr. SANK 16374號菌을 使用 하였다.

II. 方 法

1. 鹽析 酵素液 調製¹⁰

밀기울 振盪(液內)培養法에 依하여 生成된 酵素抽出液을 取하여 硫酸飽和度 0.2(20%)~0.8(80%)에서 沈澱하는 것을 半透性膜에 넣어 30時間 透析한 酵素液을 使用 하였다.

2. 基質調製¹⁰

上記 산오리나무材 톱밥을 過醋酸法에 依하여 脫리그린 한것을 190°C에서 45分間 熱處理後 60mesh로 粉碎한 것을 酵素基質로 使用하였다.

3. 反應條件

(1) 酸度(pH)

Cellulase反應 最適 pH를 究明하기 위하여 0.1M醋酸緩衝液으로 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0으로 區分하여

100ml用 三角 flask에 50ml를 取하고, 基質 0.5g, 酵素液 0.5ml를 加하고 充分히 混合한 後 溫度 40°C에서 反應時間을 24時間, 48時間, 72時間, 96時間으로 區分하여 反應시켰다. 다음에 이것을 100°C에서 5分間 끓여 酵素反應을 停止시켰다. 그리고 遠心分離하여 上澄液을 取하고 이때 生成되어 있는 還元糖量을 DNS(3.5 Dinitrosalicylic acid)法^{3,10,20,33,35,36}에 依하여 定量하였다. 그 結果를 二元配置法(3反覆)에 依하여 分散分析하였다.

(2) 反應溫度

最適 反應溫度를 究明하기 爲하여 反應溫度를 30°C, 40°C, 50°C, 60°C로 區分하고 pH는 5.0으로하고 其他 條件은 上記 方法과 같게 하였다.

(3) 酵素 濃度

酵素濃度를 0.25ml(0.5%), 0.50ml(1.0%), 0.75ml(1.5%), 1.00ml(2.0%)로 區分하였으며 pH5.0으로 하고 其他 條件은 上記 方法과 같게 하였다.

(4) 基質 濃度

基質濃度를 0.25(0.5%), 0.50g(1.0%), 1.00g(2.0%), 1.50g(3.0%)로 區分하였으며 pH5.0으로 하고 其他 條件은 上記 方法과 같게 하였다.

(5) 糖類에 依한 沮害

糖類中 Glucose 0.1%, Lactose 0.1%, Maltose 0.1%, Fructose 0.1%로 區分 하였으며 pH5.0으로하고 其他 條件은 上記 方法과 같게 하였다.

結果 및 考察

1. pH效果

Cellulase를 純粹하게 分別 精製하였을 때는 cellulase complex의 種類에 따라 最適 pH는 差異가 있는데 一般的으로 天然 cellulase를 加水分解하는 最適 pH는 4.5 ~ 5.5範圍로 나타난다고 報告되고 있다^{4,5,11,25,26,33,37,40} <Fig. 1>에서 보는 바와같이 本 鹽析酵素液은 最適

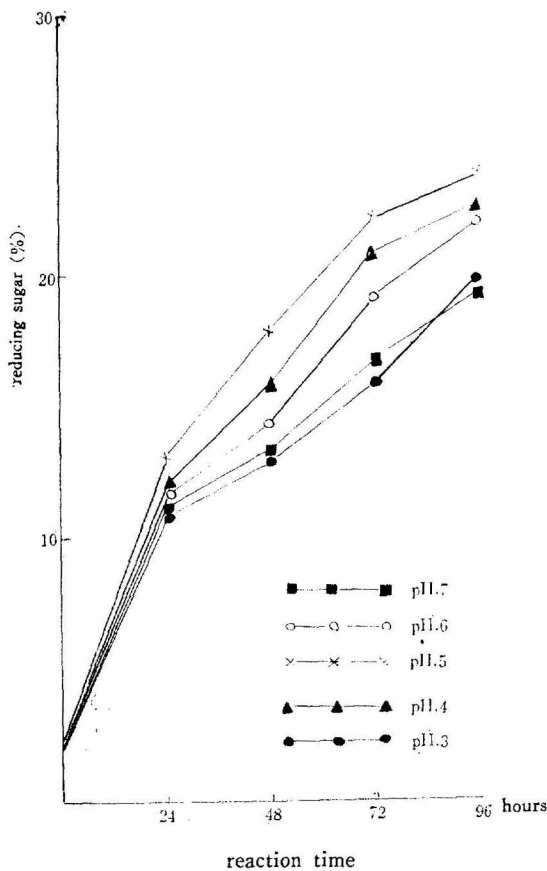


Fig.1. Effect of pH levels on saccharification. cellulase 0.5ml., substrate 0.5g., temperature 40°C.

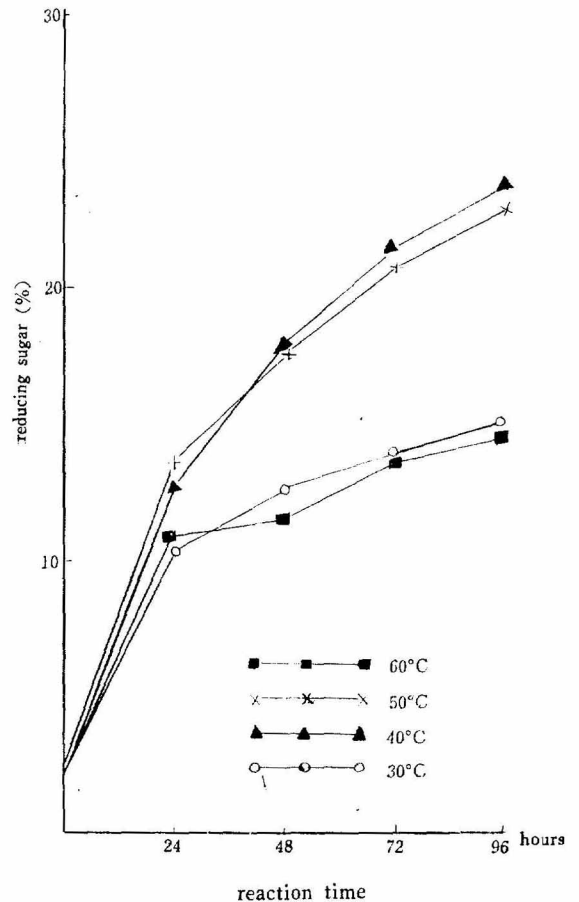


Fig.2. Effect of reaction temperature on saccharification. pH=5.0, cellulase 0.5ml., substrate 0.5g.

pH가 5.0으로 나타났으며 특히 pH 6.0 順으로 還元糖 <4.0<5.0 生成量이 많았다. 그리고 이들 間에는 有意差가 認定되지 않았다. 그러므로 pH 安定性은 4.0~6.0 範圍라고 하겠다.

2. 溫度 効果

最適 pH에서 最大의 還元糖 生成率을 나타내는 反應 溫度는 基質의 特異性에 따라 다를 뿐만 아니라 Cellulase를 生産하는 菌株에 따라 最適反應 溫度의 範圍가 다르다고 報告되고 있다. ^{2, 5, 17, 25, 26, 33, 37, 38, 43)}

<Fig. 2>에서 보는 바와 같이 本鹽析 Cellulase는 反應 溫度 40°C가 最高의 還元糖 生成率을 나타냈으며 또한 溫度 50°C와는 還元糖 生成率에 有意差가 認定되지 않았다. 그러므로 反應 溫度의 安定性은 40~50°C의 範圍라고 할 수 있다.

3. 酵素濃度의 效果

一般적으로 一定한 濃度의 基質에 酵素의 濃度를 높이면 還元糖生成率은 增加되는 경향이 있다고 報告되었다. ^{5, 25, 33, 38)}

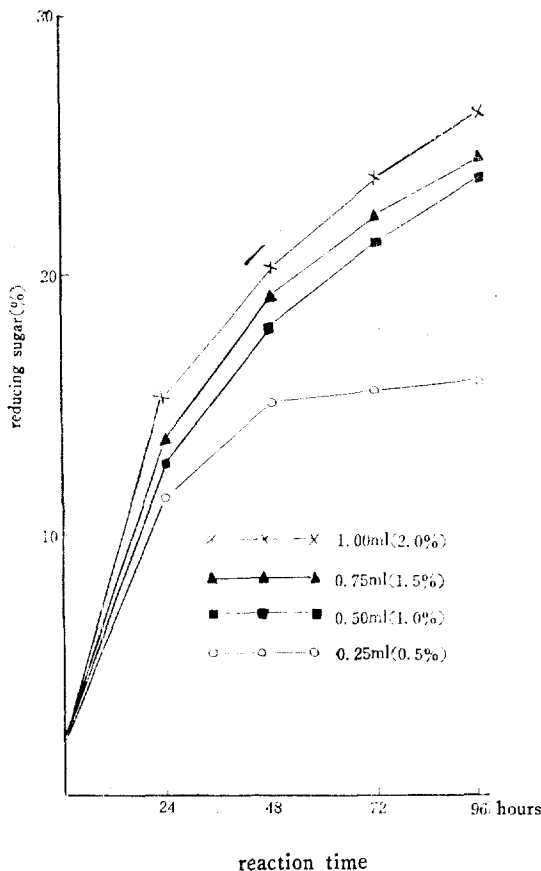


Fig.3. Effect of conc. of cellulase on saccharification pH·5.0. temperature 40°C substrate 0.5g.

<Fig. 3>에서 보는 바와같이 酵素濃度가 높을수록 還元糖生成率이 높았으며 또한 酵素濃度 0.25ml(0.5%)와 0.50ml(1.0%) 以上の 濃度間에는 有意差가 認定되었으나 0.50ml(1.0%), 0.75ml(1.5%), 1.00ml(2.0%)의 濃度間에는 有意差가 認定되지 않았다. 그리고 酵素濃度가 낮은 0.5%는 還元糖 生成率도 낮았으며 反應時間이 48時間이 經過되면서 부터는 曲線의 變化가 緩慢하게 나타났다. 이러한 現象은 一定한 濃度의 基質에는 그 基質量에 相應할 수 있는 酵素濃度가 必要하다는 것을 意味한다.

4. 基質濃度의 效果

一定한 酵素濃度에 基質의 濃度를 높이면 還元糖 生成率의 絕對値는 增加되었다. 그러나 單位基質量에 對한 還元糖 生成率은 減少되는 것을 <Fig. 4>에서 볼 수 있다. 그리고 基質의 濃度가 낮은 0.5%의 還元糖 生成率은 反應時間이 24時間을 經過하고서는 그 曲線이 緩慢하게 나타나고 있다. 이것은 基質濃度가 낮을수록 反應時間은 短時間을 必要로 한다고 볼 수 있는 것이

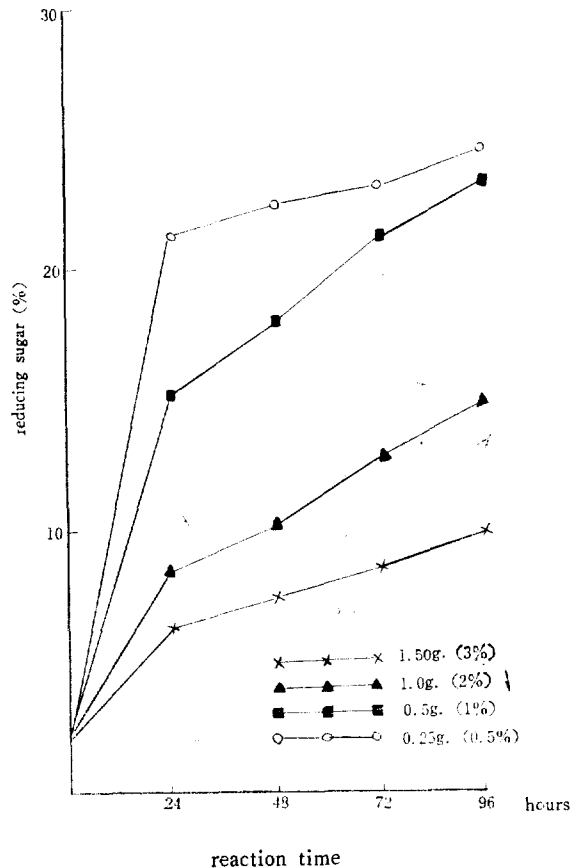


Fig.4. Effect of conc. of substrate on saccharification pH·5.0. temperaturue 40°C cellulase 0.5g.

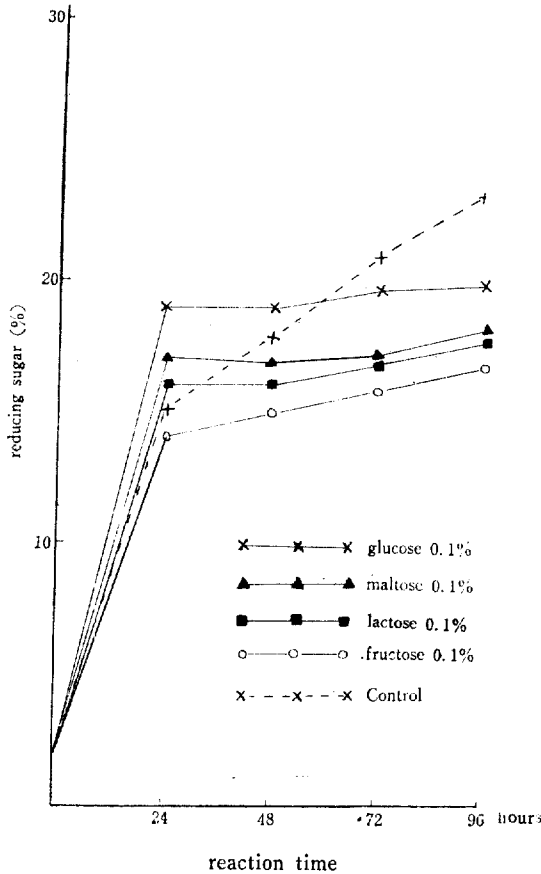


Fig.5. Inhibition of cellulase by Sugars. pH·5.0. temperature 40°C cellulase 0.5ml. substrate 0.5g.

다.

各基質의 濃度間에서는 有意差가 認定되었다.

5. 糖類의 阻害

Cellulase는 一般的으로 糖類에 對하여 多少 差異는 있으나 阻害作用을 나타내는 것으로 報告되고 있다. (6, 7, 25, 83)

<Fig. 5>에서 보는 바와 같이 還元糖 生成率은 glucose > maltose > lactose > fructose 順으로 나타났다. 그리고 glucose, maltose=lactose, fructose間에는 有意差가 認定 되었다. 即 Cellulase에 阻害를 強하게 作用하는 것은 Fructose(0.1%)이었으며, 中間이 maltose와 lactose이었고 glucose는 弱한 阻害作用을 나타냈다. 그리고 Fructose를 除外한 다른 糖類들은 反應時間 24 時間에서는 對照區보다 높은 還元糖 生成率을 보여주고 있다. 이러한 現象은 糖類가 反應時間을 어느程度 短縮시킨다는 것을 意味한다.

結 論

Trichoderma viride cellulase에 의한 還元糖 生成에 最適의 反應條件은 다음과 같다.

1. 最適 pH는 5.0이며 pH安定性的 範圍는 4.0~6.0 으로 나타났다.
2. 最適反應 溫度는 40°C이며 溫度의 安定性的 範圍는 40°C~50°C로 나타났다.
3. 酵素溫度는 높을수록 還元糖 生成率은 增加 되었으나 酵素濃度間에 1.0%, 1.5%, 2.00%는 還元糖 生成率에 有意差가 認定되지 않았다.
4. 基質濃度는 높을수록 還元糖 生成率의 絕對值는 높았으나 單位基質量에 對한 것은 減少되었다.
5. 糖類中 fructose가 가장 強한 阻害劑이었으며 Glucose의 阻害作用은 弱했다.

謝 辭 文

本 研究을 遂行하는데 始終 指導하여 주신 忠北大學 校 農科大學 鄭大成 教授, 全北大學校 總長 沈鍾燮 博士님께 衷心으로 感謝를 드리며 本 研究에 協助하여 주신 忠北大學校 農科大學 農化學科 金教昌 博士, 金 寄哲教授에게 深甚한 謝意를 表합니다.

引 用 獻 文

1. 赤堀 四郎. 1966. 酵素研究法(第1卷) 131-136. 朝倉書店.
2. 草井健一郎, 荻原允隆. 1968. 셀룰라제處理による 木材パルプ의 強度變化, 紙パ技協誌(J. Japan. Tappi) 22:245-252.
3. Coutts, A.D., R.E. Smith. 1976. Factors Influencing the Production of Cellulases by *Sporotrichum thermophile*, Applied and Environmental Microbiology. 31:819-825.
4. 張文雄, 宇佐美昭次, 武富昇. 1965. 셀룰라제에 關する研究(第1報). 醱酵協會誌. 23:375-377.
5. ————. 1965. 셀룰라제에 關する研究(第2報), 醱酵協會誌. 23:378-380.
6. ————. 1967. 셀룰라제에 關する研究(第5報). 醱酵協會誌. 25:349-352.
7. ————. 1968. 셀룰라제에 關する研究(第7報). 醱酵協會誌. 26:73-76.

8. ———. 1968. セルラーゼに 關する研究(第8報). 醱酵協會誌. 26:155-159.
9. ———. 1969. *Trichoderma* Cellulaseの 液内培養による 生産と利用. 醱酵工學. 47:447-455.
10. 鄭大成, 関斗植. 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 關한研究. 1. 基質處理의 效果. 韓國林學會誌. 38:16-20.
11. 石丸義夫, 外山信男. 1952. *Trichoderma koningi* に依る 纖維素分解(第1報). 醱酵工學. 30:409-414.
12. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1925. über Enzymatischen Abbau von Kunstseide und Nativer Cellulose, Helvetica Chim. Acta (Basel), 8: 797-810.
13. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1926. Weitere Beiträge zum Enzymatischen Abbau der Kunstseide und Nativer Cellulose, Helvetica Chim. Acta (Basel). 9:893-904.
14. ———. 1927. über den Enzymatischen Abbau von Viscoseseiden, Helvetica Chim. Acta(Basel), 10:430-440.
15. Karrer, P., Schubert, P., Wehrli, W. 1928. über das Verhalten Verschiedener Cellulosen gegen Schnecken-Cellulase, Helvetica Chim. Acta(Basel). 11:229-230.
16. Karrer, P., M.P. Orsi. 1929. über das Verhalten der Sog. Lilienfeld-Seide gegen Cellulase, Helvetica Chim. Acta(Basel). 12:989-990.
17. 北御門敬之, 外山信男, 1962. 濾紙崩壊による セルラーゼ 測定法. 醱酵工學. 40:85-88
18. 小嶋吉久, 山田雄次郎, 江澤和美, 五井仁. 1964. *Trichoderma*-Cellulaseに 關する 研究(第1報). 醱酵工學. 42:115-123.
19. 小卷利章. 1962. 酵素の 工業的精製. 醱酵協會誌. 20:325-330.
20. Levinson, H.S., G.R. Mandels, E.T. Reese. 1951. Products of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Its Derivatives, Arch. Biochem. Biophys, 31: 351-355.
21. Li, L.H., R.M. Flora, K.W. King. 1965. Individual Roles of Cellulase Components Derived from *Trichoderma Viride*, Arch. Biochem. Biophys. 111 :439-447.
22. 圓羽富造, 岡田岩太郎, 石川哲夫, 西澤一俊. 1964. Starch-Zone 電氣泳動ならびに Column Chromatographyによる *Trichoderma Viride* よりの 各種 Cellulase成分の 分離, 醱酵工學. 42:124-130.
23. ———. 1965. Fractionation and Some properties of Cellulase Componentoin Meicelase, a Cellulase Preparation from *Trichoderma viride*, 醱酵工學. 43:286-301.
24. Nisizawa, T.K., H. Suzuki. 1972. Catabolite Repression of Cellulase Formation in *Trichoderma viride*, J. Biochem. 71:999-1007.
25. 西澤一俊. 1974. セルラーゼ, 277pp. 南江堂.
26. 小川喜八郎, 外山信男. 1964. *Trichoderma viride* の Cellulolytic Complexについて, (第1報) 醱酵工學. 42:199-206.
27. ———. 1965. *Trichoderma viride*のCellulolytic Complexについて(第4報), 醱酵工學. 43:661-668.
28. ———. 1967. *Trichoderma viride*のCellulolytic Complexについて(第4報), 醱酵 學. 45:671-680.
29. 岡田巖太郎, 西澤一俊, 鈴木恕, 1968. Cellulose Components from *Trichoderma viride*, J. Biochem. (Tokyo), 63. 591-607.
30. Reese, E.T., R.G. Sin, H.S. Levinson. 1950. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis, J. Bacteriol. 59:485-497.
31. Reese, E.T., W. Gilligan. 1953. Separation of Components of Cellulolytic Systems by Paper Chromatography. Arch. Biochem. Biophys. 45:74-82.
32. ———. 1954. The Swelling Factor in Cellulose Hydrolysis, Text. Res. J., 24:663-669.
33. Reese, E.T. 1968. Cellulases and Their Applications, 470pp. American Chemical Society Pub.
34. Rautela, G.S., K.W. King. 1968. Significance of the Crystal Structure of Cellulose in the Production and Action of Cellulase, Arch. Biochem. Biophys. 123:589-601.
35. Sumner, J.B., 1921. Dinitrosalicylic acid; a Reagent for the Estimation of Sugar in Normal and Diabetic Urine, J. Biol. Chem., 47:5-6
36. ———. 1925. A more Specific Reagent for the Determination of Sugar in urine, J. Biol. Chem. 65:393-395.
37. 外山信男. 1953. *Trichoderma koningi*に依る 纖維素分解(第2報). 醱酵工學. 31:315-320.
38. ———. 1954. *Tichoderma koningi*に依る 纖

- 維分解(第6報). 醱酵工學. 32:300-307.
39. ————. 1956. *Trichoderma koningi*に依る纖維素分解(第6報). 醱酵工學. 34:274-281.
40. ————. 1956. *Trichoderma koningi*に依る纖維素分解(第7報). 醱酵工學. 34:282-285.
41. ————. 1957. *Trichoderma koningi*に依る纖維素分解(第8報). 醱酵工學. 35:356-362.
42. ————. 1958. *Trichoderma koningi*に依る纖維素分解(第10報). 醱酵工學. 36:348-354.
43. 外山信男, 松田義夫. 1958. *Trichoderma koningi*に依る纖維素分解(第10報). 醱酵工學. 36:375-380.
44. 外山信男, 小川喜八郎. 1966. *Trichoderma viride*の Cellulolytic Complexについて(第3報). 醱酵工學. 44:741-752.
45. 戸田智子, 鈴木恕, 西澤一俊. 1968. The Mode of Action of *Trichoderma* Cellulases toward Normal and Reduces Cello-origo Saccharide, 醱酵工學. 46:711-718.
46. ————. 1971. Some Enzyme Properties and the Substrate Specificities of *Trichoderma* Cellulases with Special Reference to Their Activity toward Xylan, 醱酵工學. 49:499-521.
47. 富田善井, 鈴木恕, 西澤一俊. 1974. Further Purification and Properties of "Avicelase" a Cellulase Component of Less random Type from *Trichoderma viride*. 醱酵工學. 52:233-246.
48. Umbreit, W.W. 1967. Advances in Applied Microbiology; Cellulose and Cellulolysis, 9:91-130, Academic Press, New York.
49. Wood, T.M. 1968, Cellulolytic Enzyme System of *Trichoderma koningi*, Biochem. J. 109:217-227.
50. Wood, T.M., S.I. McCrae, 1972. The Purification and Properties of the C₁ Component of *Trichoderma koningi* Cellulase, Biochem. J. 128:1183-1192.