

담배섬유소의 Cellulase 처리에 관한연구

조 시 형

한국인삼연초연구소 제품개발부

CELLULASE TREATMENT FOR LEAF TOBACCO CELLULOSE

Si Hyoung, Jo

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute

(Received for publication, April 20, 1985)

Abstract

A strain of *Trichoderma* sp. J-30 which strongly produces cellulase to reduce the content of cellulose in the stem of leaf tobacco was isolated from leaf tobacco. The *Trichoderma* sp. J-30 was identified as *Trichoderma viride*. The cellulase from this strain was purified with the physico-chemical methods and treated in the cutted stem of leaf tobacco. The results obtained were summarized as follows.

1. Optimal pH of the enzyme was at pH 5.0.
2. The enzyme showed a higher activity at 40°C and its thermal stability began to decrease at 60°C.
3. The enzyme activity was promoted by the metal ions such as Ca²⁺, Mg²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺.
4. When the cutted stem of leaf tobacco was applied with the 3% of the enzyme solution at 40°C for 3 days, 15 to 17% of cellulose contents decreased, 12 to 13% of total sugar increased and the filling power was increased by 10-13% in the sample.

서 론

농가에서 생산된 잎담배는 여러 가공 공정을 거쳐 권련(Cigarette)으로 제조되며 이들 공정가운데 제갈단계에서 생기게 되는 부산물 중에는 25~30%의 잎줄기(Stem)와 5% 정도의 잎부스러기(Scrap)가 있다.¹⁾ 이 잎줄기는 특히 15~20%의 섬유소를 함유하고 있어 이 물질이 연소할때 담배의 맛과 향기에 나쁜 영향을 미치게 되므로²⁾ 판상엽을 제조하거나¹⁾ 향료물질을 첨가하고³⁾ 또한 팽화(puffing)하여⁴⁾ 그 영향을 감소시켜 사용하고 있다. 본

연구는 잎줄기에 다량 함유되어 있는 섬유소를 감소시키기 위하여 보관중인 잎담배 중에서 강력하게 Cellulase를 생산하는 균을 분리하였고 이 균이 생산한 Cellulase를 잎줄기에 처리하여 그 효과를 측정하였다.

Cellulase를 생산하는 미생물로는 곰팡이와 세균등 매우 광범위하나 곰팡이에 속하는 *Trichoderma* sp.와 *Aspergillus* sp.가 우수하다고 보고되었다.⁵⁾ 이들중 특히 *Trichoderma Viride*는 Cellulase 생산력이 매우 높은 균주로서 Yasunasa⁶⁾와 Shigenori⁷⁾는 이것을 이용하여 대두의 종피를 분해시켜 단백질 분리율

을 높이는등 이 분야에 대한 수많은 연구결과가 보고되었다.⁸⁻¹⁷⁾

본 실험은 잎담배 시료 20 종을 채취하여 379 종의 균주를 분리하였고 이들중에서 Cellulase 생산력이 가장 강력한 1 균주를 분리하고 *Trichoderma Viride* J-30 으로 명명하였다. 본 균주로부터 생산된 Cellulase 를 잎줄기에 처리한 결과 15~17%의 섬유소가 감소되었고 12~13%의 전당(total sugar)이 증가하였으며 10~13%의 팽송성(filling power)이 증가되는 결과를 얻어 이에 보고하는바이다.

재료 및 방법

1. 사용균주

균주 분리용 시료의 내역은 Table 1 과 같다. 균분리는 잎담배시료 10 g을 취하여 멸균생리

식염수 90 ml을 가하고 1 시간 침출하여 그 현탁액을 10⁴ ~ 10⁷ 까지 희석한뒤 0.5 ml을 Table 2 와 같은 평판배지에 도포하여 30 C에서 3 ~ 4 일간 배양하여 용해환(lytic zone) 이 비교적 큰것을 1 차로 선별하였다. 최종선별은 2 차분리용배지(Medium D)를 500 ml 삼각 flask에 각각 20 g씩 넣고 1 차분리된 균주들을 1 백급이씩 접종하여 30 C에서 진탕배양(Rotary Shaker G-25, NBS Co., USA, 120 rpm) 한후 증류수 100ml를 넣고 실온에서 3 시간 추출하여 여과한후 여액의 Cellulase Activity를 Nelson 법¹⁸⁾ 으로 측정하여 활성이 가장 큰 1 균주를 최종 선별하였다. 선별된 균주 J-30 은 Chang^{19, 20)} 등의 방법에 의하여 형태학적으로 동정하였고 균의 보존용 배지는 Table 3 과 같은 배지를 사용하였다.

Table 1. Items of leaf tobacco samples

Varieties	Stalk Position	Grade	Site
Flue Cured	Heavy	5	Cheong Ju
	"	3	"
	"	1	"
	Light	1	"
	"	3	"
	"	5	"
	Heavy Light	B ₃ F X ₃ F	U.S.A. "
Burley	Heavy	5	Kwang Ju
	"	3	"
	"	1	"
	Light	1	"
	"	3	"
	"	5	"
	Heavy Light	C ₃ F X ₄ F	U.S.A. "
Hyang Cho	Heavy	3	Dae Gu
	Light	3	"
Basma		1/III	Greece
Izmir		B/G	Turkey

Table 2. Medium composition for primary & secondary screening.

Components	Primary Screening (%)			Secondary Screening
	Medium A for fungi	Medium B for actinomycete	Medium C for bacteria	Medium D
Wheat bran				20g
Carbon source*	0.1	0.2	0.5	
Peptone		1	0.5	
Yeast extract	0.05		0.05	
NaCl		0.1		
KH ₂ PO ₄		0.1		0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05%
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.001		
MnSO ₄ · 7H ₂ O		0.001		
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0.001		
ZnSO ₄ · 3H ₂ O		0.001		
NaNO ₃	0.01			
Agar	1.5	1.5	1.5	
H ₂ O				20ml
pH	5.0	7.0	5.0	5.0

* Carbon source: 1% Na-Carboxyl methyl cellulose & Micro-crystalline cellulose were used.

Table 3. Medium for strain preservation (potato dextrose agar*)

Components	grams/liter
Diced potato	300
Glucose	20
Agar	15

* Boil finely potatoes in 500 ml of water until thoroughly cooked: filter through cheesecloth, add water to filtrate make up to 1.0ℓ. The glucose was added prior to sterilization, the agar was dissolved in the filtrate by heating & autoclaving.

2. 효소의 생산 및 정제

효소의 생산은 밀기울배지(밀기울 20 g, 물 20 cc, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%)를 500 ml 삼각 플라스크에 넣고 121℃에서 15분간 살균한뒤 최종 선별된 균주 J-30을 1백금이씩 접종하여 1일 3~4회 흔들 어주며 3~4일간 정치배양한후 5배의 증류수를 가하여 추출하고 여지(Toyo, No.2)로 여과한뒤 여액을 조효소액(initial solution)으로 하였다.²¹⁾

효소의 활성도는 1% Na-CMC를 기질(4 ml)로 하여 효소액(1 ml)을 작용시켜 40℃의 water bath 상에서 15분간 반응시킨뒤 Nelson 법¹⁸⁾으로 환원당을 측정하여 glucose로 환산하였다. 효소의 정제는 상기 방법에서 얻어진 추출 효소액에 황산암모니움을 0.2 포화되게 교반하면서 첨가한후 5℃에서 2시간 방치한뒤 1차 원심분리한후 그 여액에 다시 0.6 포화되게 황

산암모니움을 첨가하여 원심분리하고 침전물을 소량의 증류수에 용해시킨다음 투석하여 투석효소용액에 acetone (-5℃)을 첨가하고 (90 V/V%) 원심분리한후 침전된 효소를 냉동건조하여 본 실험에 조정제된 효소시료로 사용하였으며 그 정제과정은 Fig.1 과 같다.

3. 담배주액의 Cellulase 처리

보통 사용하고 있는 세각주액을 수분이 20% 되게 가습한다음 1%의 효소액을 1,2,3,4,5, 6,7%(V/V)되도록 첨가하여 40℃에서 효소작용시켰고 처리품의 성분분석은 CORESTA Standard방법²²⁾에 의하여 측정 또는 분석하였다.

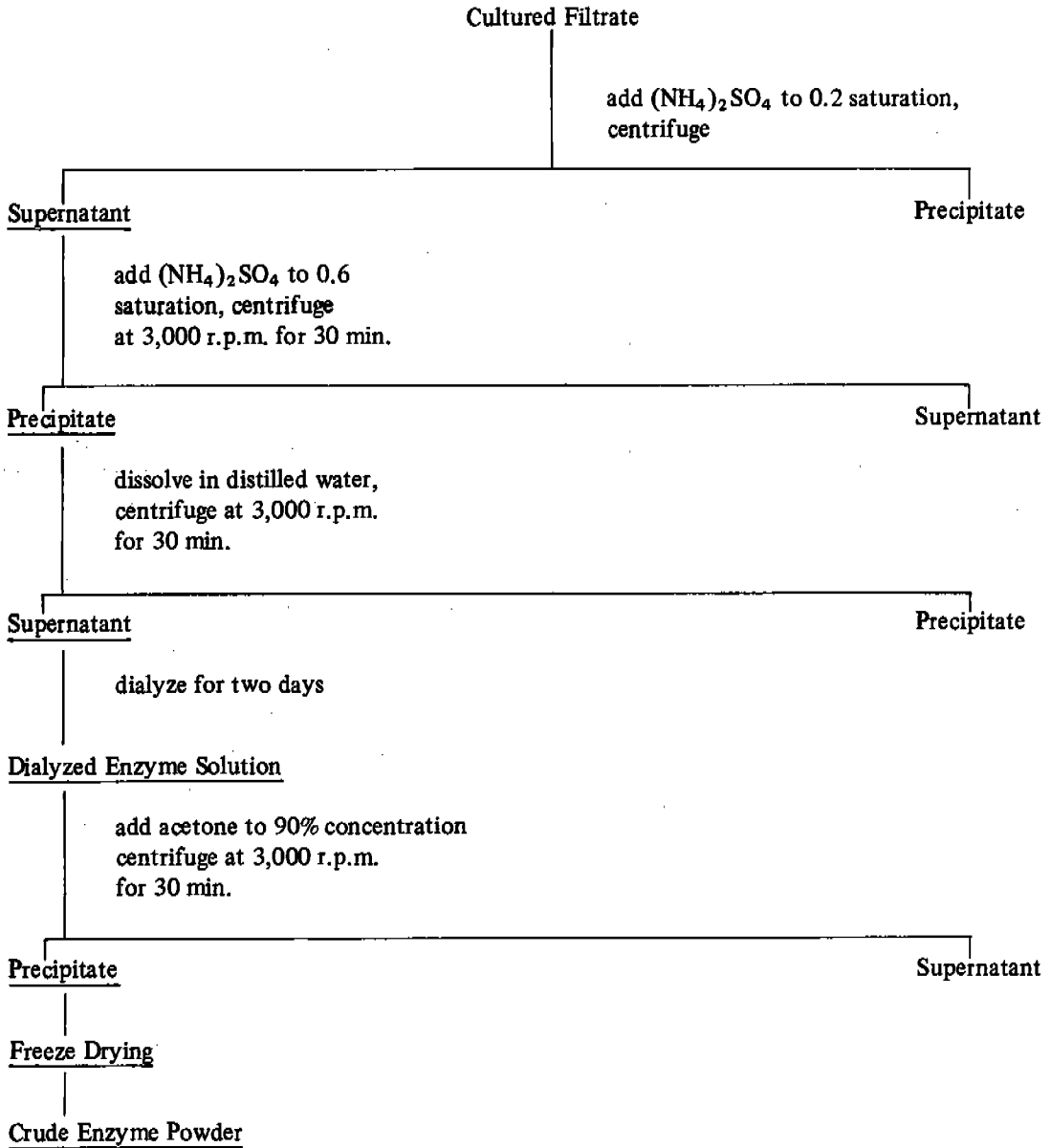


Fig. 1. Purification of cellulase from *Trichoderma viride* J-30.

결과 및 고찰

1. 균의 분리 및 등정

잎담배 시료로부터 균을 분리한 결과 효모가 285주, 곰팡이가 70주, 세균이 24주 등이었고 이들 곰팡이 중에서 Cellulose 분해력이 비교적 강한 균주는 5주였다. 이 5균주중 가장 높은 cellulase activity를 갖는 균주는 국내산 황색종 잎담배 박엽 5등(No. J-30)에서 분리된 것으로 형태상의 특징은 Table 4와 같다. 본 균주는 potato agar 평판배지에서 30°C로 배양하면 발아초기에는 단선, 모상의 백색 균사가 배지 전체에 36~40시간만에 퍼지며 50시간 후에는 청록색의 포자가 발생하였고 배지의 뒷면은 담황색을 나타내었다. 포자의 착생상태는 경자선단에 10~20개씩 집합되어 있고 포자 형태는 타원형이었다. 분생자병은 불규칙하게 분기되고 무색이었으며 분생포자는 점질 덩어리로 되어 있었다. 또한 이 균주의 발육적온은 27~30°C이었으며 발육최적 pH는 4.5~5.0이었다. 이상의 결과로 보아 분리 선별된 J-30은 Nomura¹⁹⁾, Chang²⁰⁾ 등의 보고와 일치하므로 *Trichoderma Viride* J-30으로 등정하였다.

2. 효소의 회수성

황산암모니움에 대해서는 조효소를 황산암모니움으로 20% 포화하여 침전물을 회수하고 다시 상등액에 단계적으로 20%씩 분별침전시켜

각 포화도에 따른 침전물의 효소활성을 측정하였고 효소의 회수방법으로는 유기용매를 많이 사용하고 있으며 효소의 종류에 따라 처리농도와 처리시간에 따라서 침전율과 회수율이 변화한다는 보고가 있다.²³⁾

본 실험에서는 acetone을 40%에서 90%까지 10%간격으로 가한후 5°C에서 2시간동안 방치한뒤 원심분리하여 얻어진 침전물의 효소활성도를 비교한결과 Fig.2,3과 같다. Fig.2에서 보는바와 같이 황산암모니움을 사용한 효소의

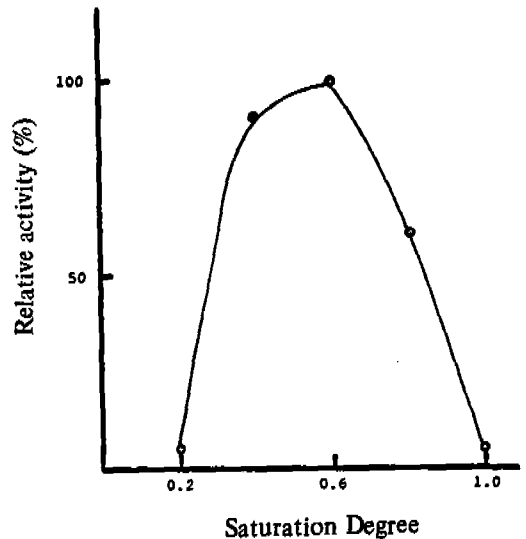


Fig. 2. Partial purification of cellulase by ammonium sulfate.

Table 4. Morphological characteristics of the *T. viride* genus.

Strain	<i>T. viride</i> ¹⁹⁾	<i>T. viride</i> ²⁰⁾	Isolated <i>T. viride</i>
Organ			
Mycelium (width)	3.0 - 3.5μm	1.5 - 6.0μm	2.0 - 3.0μm
Spore	3.0 - 3.5μm	2.0 - 3.0μm	2.0 - 3.0μm
Spore lump	7.0μm	-	6.0 - 8.0μm
Sterigmata	3.5μm	3.0 - 3.5μm	3.5μm
Sterigma	3.5 - 10.5μm	2.0 - 10.0μm	3.0 - 10.0μm

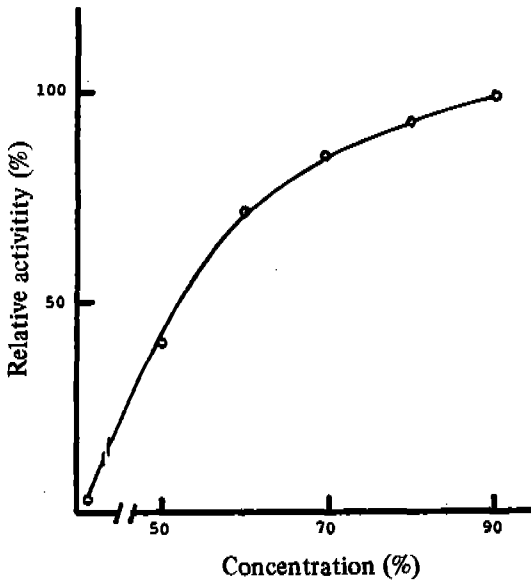


Fig. 3. Yield of enzyme treated with acetone.

최수성은 0.6 포화일때 가장 효과적 이었으며 acetone 을 사용하였을때는 Fig.3 에서 보는바와 같이 그 함량이 90 %일때가 가장 효과적이었다.

3. 조 정제효소의 특성

조 정제된 cellulase 는 용매제를 달리한 paper chromatogram 상에서 단일의 spot 로 나타났으며 chromatography 의 결과는 Table 5 와 같다.

Table 5. R_f value of purified cellulase.

Method	Solvent System	Cellulase (R_f value)
Paper chromatography	1.5% NaCl: 50% acetone	0.80
	butanol: acetic acid: water	0.81
	4: 1: 5	
	pyridine: water	0.69
	2: 1	

R_f : each solvent was ascended for 24 hours.

1) 최적 pH와 pH안정성

정제된 효소의 최적 pH를 조사하기 위하여 1% Na-CMC 0.5 ml과 0.2M 각 완충액 1 ml, 1% 효소액 0.5 ml를 혼합하여 40°C에서 30분간 반응시킨후 1ml를 취하여 CMC 당화력을 Nelson¹⁸⁾ 법에 의하여 유리 환원당을 정량하였고 안정성을 조사하기 위하여 효소액 0.5 ml에 0.2M의 각 pH완충액 0.5 ml를 가하여 30°C에서 24시간 방치한 다음 0.2M acetate buffer로 pH를 5.0으로 조절하여 동일한 용적으로 만든후 1% Na-CMC 0.5 ml를 가한다음 40°C에서 30분간 작용시켜 Nelson 법¹⁸⁾ 으로 CMC 당화력을 측정 한 결과 Fig.4,5 와 같다. 이 효소의 최적 pH는 5.0이었고 pH 4.5~5.5에서 pH에 대한 안정성을 나타냈다.

2) 최적작용온도와 열안정성

최적 작용온도를 조사하기 위하여 0.2M acetate buffer (pH 5.0) 1 ml와 효소액 0.5 ml, 1% Na-CMC 0.5 ml를 혼합하여 상이한 온도에서 (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C) 30분간 작용시켜 Nelson 법¹⁸⁾ 으로 환원당을 측정하였고 열에 대한 안정성은 0.2M acetate buffer (pH 5.0) 1 ml와 1% 효소액 0.5 ml 혼합액을 각 온도 (40, 50, 60, 70, 80°C)에서 15분간 방치한후 1% Na-CMC 0.5 ml를 가하여 40°C에서 30분간 작용시킨뒤 Nelson 법¹⁸⁾ 으로 환

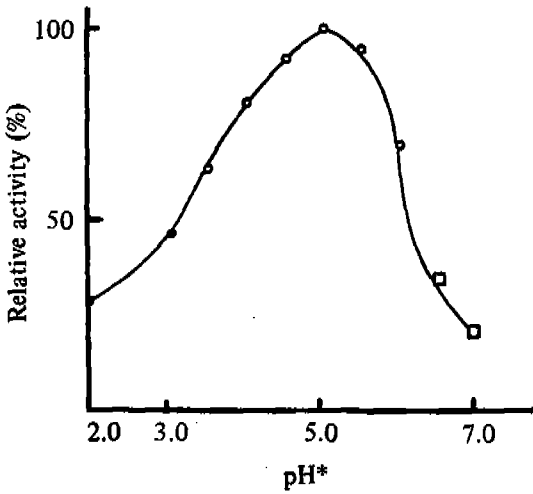


Fig. 4. Effects of pH on cellulase activity of *Trichoderma viride* J-30.

* pH 2,3 : 0.2M McIlvaine buffer. (●—●)
 pH 4,5,6: 0.2M acetate buffer. (○—○)
 pH 7 : 0.2M phosphate buffer. (□—□)

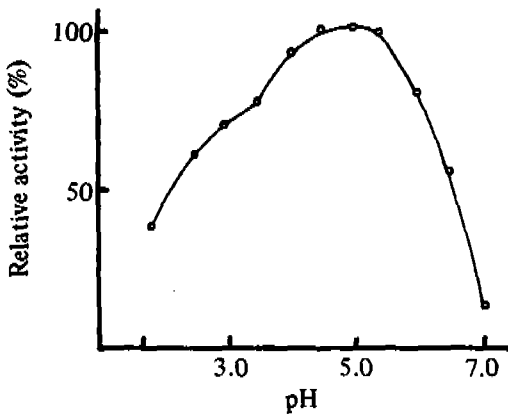


Fig. 5. pH stability of cellulase of *Trichoderma viride* J-30.

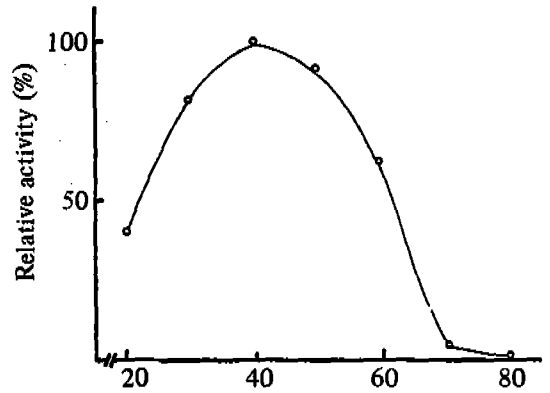


Fig. 6. Effects of temperature on cellulase activity of *Trichoderma viride* J-30.

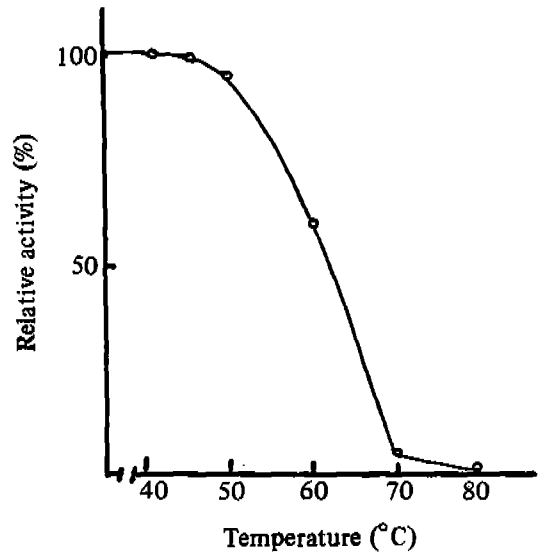


Fig. 7. Thermal stability of cellulase of *Trichoderma viride* J-30.

원당을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 6, 7과 같고 그림에서 보는 바와 같이 본 효소의 최적작용온도는 40°C 부근이었으며 열에 대한 안정성은 60°C를 넘으면 불활성화 되기 시작하고 80°C에서 15분이면 불활성화하여 사멸되기 시작하였다.

3. 금속 Ion의 영향

여러가지 금속 Ion이 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 등 8 종류의 금속염용액을 10^{-3}M 이 되도록 반응액에 가하고 전향의 방법으로 효소의 활성도를 측정한 결과 Table 6과 Fig. 8과 같았다. 이때

Table 6. Effect of metal ions on cellulase activity of *Trichoderma viride* J-30.

Metal salts	Relative activity (%)
CaCl ₂ · 2H ₂ O	118
MgSO ₄ · 7H ₂ O	129
AlCl ₃ · 6H ₂ O	101
CuSO ₄ · 5H ₂ O	98
ZnCl ₂	112
SnCl ₂ · 2H ₂ O	97
PbSO ₄	116
FeCl ₃ · 6H ₂ O	104
HgCl ₂	78
Control	100

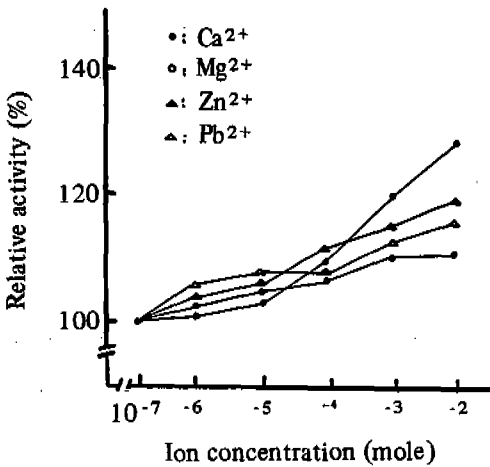


Fig. 8. Effects of Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, and Pb²⁺ ion on cellulase activity of *Trichoderma viride* J-30.

Ca²⁺, Mg²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ Ion 들은 효소의 활성을 촉진시켰으나 Hg Ion 은 다소 저해하였고 그외의 Ion 들은 큰 차이가 없었다.

4. 담배주액에 대한 Cellulase 처리

1) 주액의 일반성분 분석결과는 Table 7 에서 보논바와 같이 잎담배에 비하여 전당함량이 적고 조섬유함량이 많았다.

2) 주액에 대한 Cellulase 처리효과

주액에 효소의 농도별 처리와 작용일수별 성분변화는 Table 8, Fig.9 및 Fig.10 과 같으며 효소액을 3% (V/V) 되게 첨가하여 3 일간 작용시켰을때 섬유소는 15 ~ 17% 가 감소되었고 전당이 12 ~ 13% 증가하였으며 팽창성이 10 ~ 13% 증가하였는바, 이는 Reigi⁸⁾, Nobuo⁹⁾, Tosiki²⁴⁾, 등의 이론과 같이 Cellulase 가 Cellulose 를 분해하여 Glucose 와 Cell-abiose 등을 생성하고 세포벽을 용해하여 조직을 부드럽게 한다는 보고와 일치하였다.

이상의 실험은 cellulase 를 각초상태에 처리하였다. 효소의 작용은 각초보다 분말 상태가 더 효과적일 것이나 본 실험에서는 처리후의 활용성을 고려하였기 때문에 각초에 처리하였고 이로써 효과가 감소된것으로 사료된다. 이때 효소의 첨가량이 3% 이상에서는 효과가 대등하였고 또 작용일수가 3 일을 넘으면 미생물이 발생하였다.

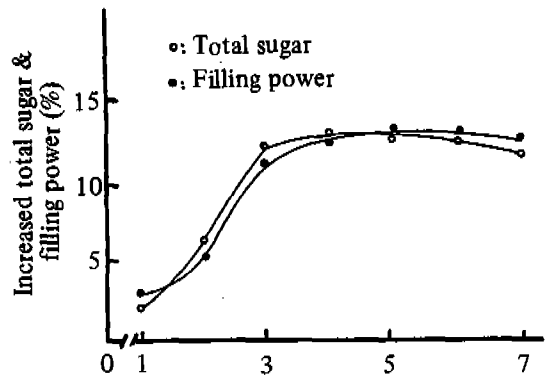


Fig. 9. Increase of total sugar & filling power with treatment of cellulase (40°C. 3% (v/v) enzyme sol'n were used).

Table 7. Composition of leaf tobacco & tobacco stem of Flue cured.

Samples	Stalk Position	Grade	Crude Fiber (%)	Total Sugar (%)	Filling power (cc/g)
Leaf tobacco	Heavy	3	13.3	17.8	3.2
	Light	3	9.9	16.2	3.5
Tobacco stem	Heavy	3	20.2	8.9	2.4
	Light	3	19.8	8.3	2.6

Table 8. Composition of tobacco stem of Flue Cured after treatment of cellulase.

Sample	Crude Fiber (%)	Total Sugar (%)	Filling power (cc/g)
Control	20.2	8.9	2.4
H ₃ * tobacco stem			
Treatment**	16.9	10.0	2.8
H ₃ tobacco stem			

* H : Stalk position

3 : Grade

** : Reaction condition : 3% (v/v) addition 3 days at 40°C.

결론

담배주액에 함유되어 있는 섬유소를 감소시키기 위하여 보관중인 잎담배에서 강력하게 Cellulase를 생산하는 *Trichoderma Viride* J-30을 분리 동정하였고 이 효소가 생산하는 Cellulase를 물리, 화학적방법으로 정제하여 주액에 처리하여 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 효소의 최적 pH는 5.0이었고, pH에 대한 안정성은 pH 4.5 ~ 5.5이었다.

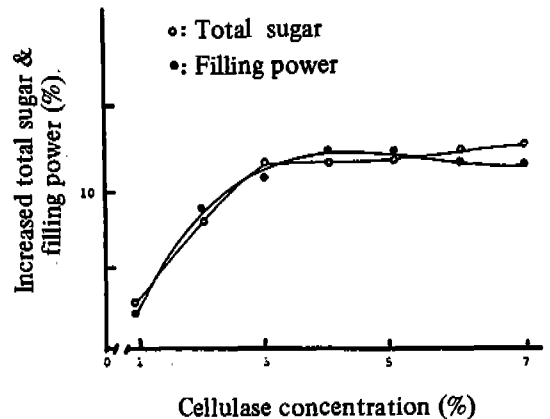


Fig. 10. Increase of total sugar and filling power with treatment of cellulase (40°C, 3 days incubation).

2. 효소의 최적작용온도는 40°C였고, 열에 대한 안정성은 60°C를 넘으면 불활성화되기 시작하였다.
3. 금속 Ion 중 Ca²⁺, Mg²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ 등은 효소의 활성을 촉진시켰다.
4. 잎줄기에 효소액을 3% (V/V) 되게 첨가하여 40°C에서 3일간 작용시켰을때 섬유소가 15~17% 감소하였고, 전당이 12~13% 증가하였으며, 팽창성이 10~13% 증가되었다.

REFERENCES

1. 한국연초연구소 : 자체업 무교재, 4-1 ~ 33 (1980)
2. 田中富吉 : タベコ, 保育社, 72 - 75 (1979)
3. Milton M. Sherman: All about tobacco, P.M. Sherman Corp. 10-60 (1974).
4. 한국인삼연초연구소 : 연구보고서, 183 - 196 (1981)
5. Mandels, M. & J. Weber: Adv., Chem. Ser., 95: 391-414 (1969).
6. Yasumasa, *et al.*: J. Ferment. Technol., 44 (11), 835-841 (1966).
7. Shigenori Nakayama, *et al.*: J. Ferment. Technol., 43 (9): 648-652 (1965).
8. Reiji Takahashi, *et al.*: J. Ferment, Technol., 43 (9), p. 842-846 (1966).
9. Nobuo Toyama, *et al.*: J. Ferment. Technol., 44 (11) 840-834 (1966).
10. Bae M.: Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 4 (3) 105-110 (1976).
11. Bae M.: Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 7(2), 91-95 (1979).
12. Kihashiro Ogawa, *et al.*: J. Ferment. Technol. 43 (9): 661-668 (1965).
13. 成洛發 : 한국농화학회지, 12 : 99-105 (1969)
14. Toyokiko Imai, *et al.*: J. Ferment. Technol., 44 (11): 854-857 (1969).
15. Iruo Igaue: J. Ferment. Technol., 43 (9), 669-682 (1965).
16. Nobuo Toyama: J. Ferment. Technol., 43 (9), 583-689 (1965).
17. Nobuo Toyama: J. Ferment, Technol., 45 (7), 663-670 (1967).
18. Nelson, N.: J. Biol. Chem. 153: 375 (1944).
19. Chang, W.S., *et al.*: *ibid.*, 24, 421 (1966).
20. Nobura, K., *et al.* L.: J. Ferment. Technol., 46 (8), 634 (1968).
21. Okada G., *et al.*: J. Biochem., 63, 591, (1968)
22. 한국연초연구소 : 담배 성분 분석법, 53-60 (1979)
23. 서정원 : 경대생기연보, 2, 57, (1967)
24. Tosiki Nisizawa, *et al.*: J. Ferment. Technol. 44 (9), 659-658 (1966).