

*Aspergillus saitoi*가 生産하는 纖維素 分解 酵素에 關한 研究

第 2 報 各種 培地條件이 Cellulase 生成에 미치는 영향에 관하여

李 順 愛 · 吳 錫 欣 · 尹 政 義

서울保健專門學校

(1971년 9월 11일 수리)

Studies on Cellulolytic Enzymes Produced by *Aspergillus saitoi*

II. Influence of Various Media Condition on Cellulase Production

by

Soon Ae Lee, Suk Hen Oh and Jung Eui Youn

Seoul Health Junior College, Seoul

(Received September 11, 1971)

Abstract

This experiment was conducted to study on the productive conditions of cellulase by *Aspergillus saitoi* in the shaking culture medium. The results were as follows:

1. The production of enzyme required higher concentration of corn steep liquor than that of dextrin.
2. The concentration of 1.0% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{SO}_4$ produced the enzyme excellently than 3.0%.
3. The cellulase was produced very slowly by adding $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, but the final concentration of the enzyme was higher than control. The production was suppressed by addition of CaCO_3 .
4. The addition of 1.0~2.0% substrate caused an increase or stimulation in cellulase production.

序 論

著者は 前報에서 *Aspergillus saitoi*가 生産하는 cellulase 分解酵素가 밀감果肉皮의 分解除去에 미치는 영향에 대해서 報告 하였다.⁽¹⁾

本實驗에서는 培地組成에 따른 cellulase 生成能을 보기 위하여 振盪培養에 의한 本菌의 培養條件을 실험하여 다음과 같은 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

實 驗

A. 供試菌株

韓國產 메주에서 分離, 同定한 *Aspergillus saitoi*를 供試菌株로 하였다.

B. 培地

다음 성분을 Table 1, 2, 3, 4 에서와 같은 비율로 함유하는 배지를 사용하였다.

- ① Corn steep liquor (CSL), dextrin
- ② CSL, dextrin $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaCO_3
- ③ CSL, dextrin, K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- ④ Basal medium, substrate (filter paper 粉末, CMC-Na 粉末)

※ Basal medium

Corn steep liquor	10%
dextrin	3%
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1%
K_2HPO_4	0.3%
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05%
FeSO_4	0.01%
KCl	0.05%

C. 培養方法

1. 前培養

Table 1, 2, 3, 4 와 같은 合成培地를 pH 4.5 로 조절하여 멸균된 시험관에 7 ml 씩 分注한 후 1.2kg/cm² 에서 高壓殺菌하여 供試菌株 1 白金耳量을 移植하여 28°C 에서 48 時間 培養 하였다.

2. 振盪培養

前培養液과 같이 pH 4.5 로 조절된 合成培地를 200 ml 의 멸균된 Erlenmeyer flask 에 50 ml 씩 分注하여 1.2kg/cm² 에서 30 分間 高壓殺菌한 후 前培養液을 接種移植하여 28°C 에서 振幅 8 cm 의 reciprocating shaker (200 strokes/min)로 振盪培養 하였다.

D. 酵素 生成能 測定

1. 酵素液의 調製

振盪培養한 培養液을 여과하여 그 여액을 「酵素液」로 하였다.

2. 酵素 生成의 測定⁽³⁾

a) Carboxymethyl cellulose (CMC-Na 특급) 1%액 5 ml 에 pH 5.0 acetate buffer solution 4 ml 를 加하여 40°C 의 恒溫槽에 40°C 가 될때까지 pre-heating 한다. 이 溶液에 酵素液 1 ml 를 加하여 正確히 1 時間 作用시킨 後 反應液 1 ml 를 取하여 3,5-dinitrosalicylic acid 를 利用해서 生成한 還元糖을 Arther H. Thomas Co. Spectronic 20 으로 波長 530 mμ 에서 比色定量하여 그 optical density 를 酵素生成能으로 表示 하였다.

b) 3,5-Dinitrosalicylic acid method^(4,5) 本法은 3.5 -dinitrosalicylic acid 가 alkali 性에서 糠類 還元氣와 反

應해서 黃褐色으로 反應되는 것을 利用한 것이다.

試藥 : 4.5% NaOH 溶液 300ml 에 1% dinitrosalicylic acid(DNS) 溶液 880 ml 및 Rochelle salt 255 g 을 添加한다. 달리 10% NaOH 溶液 22 ml 에 結晶 phenol 10 g 을 加하여 100 ml 가 될 때 까지 물을 添加한다. 이 溶液에 69 ml 에 NaHCO_3 6.9 g 을 加하여 溶解시켜 이것을 전부 위의 DNS 溶液에 넣어 Rochelle salt 가 충분히 溶解할 때 까지 混濁하여 준다. 2 일간 放置 後 여과하여 착색병에 保存한다.

定 量 法 : 25 ml 의 標線이 있는 乾燥된 Folin-Wu tube 에 반응액 1.0 ml 와 DNS 試藥 3.0 ml 를 加하여 混合 後 100°C 에서 5 分間 加熱한 後 冷水로 冷却하여 正確히 25 ml 가 될 때 까지 물을 加한다.

Blank test : DNS 試藥 3.0 ml 에 증류수를 加하여 全量을 25 ml 로 하여 上記와 같이 處理한다.

結果 및 考察

Cellulase 의 生成에 對해서 培地組成을 主로하여 corn steep liquor 와 dextrin 의 비율에 對해서 振盪培養으로 實驗하였으며 또한 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, filter paper 粉末, CMC-Na 粉末의 添加效果에 對해서 검토 하였다.

培地條件에 對한 Cellulase 生成能

1. Corn steep liquor, dextrin

窒素源으로 corn steep liquor 를 炭素源으로 dextrin 을 利用하여 各濃度別로 조사 하였으며 各 培養液에 對한 酵素生成은 Table 1 에 표시 하였다.

CSL 이 3% 인때에는 dextrin 의 濃도가 적은 쪽이 酵素生成이 높았다.

즉, 絲狀菌의 培養에 의한 菌體內 物質의 生産에 對해서 有機態 窒素를 多量으로 필요로 하지만,⁽²⁾cellulase 의 生成경우에는 더욱 顕저하며 질소원이 탄소원 보다 大量을 要한다.

2. CSL, dextrin, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, CaCO_3 의 添加

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 나 Ca^{++} 이 *Aspergillus sp.*에서 α -amylase 生成에 영향을 미치며 또한 安定化 한다는 것이 알려져 있으므로⁽⁶⁾ 이것이 *Asp. saitoi* 의 cellulase 生成에 미치는 영향을 검토 하였다.

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1% 添加한것이 3% 添加한 것보다 우수 하였으며 특히 CSL 과 dextrin 의 濃도가 높은 培地에서 는 約 2 倍의 酵素生成을 나타냈다.

또한 CaCO₃를 添加한것은 CSL 5%쪽이 2%쪽보다 낮았으며 일반적으로 添加하지 않은 것이 酵素 生成이 우수하였으며 CSL 5%, dextrin 8%, NH₄H₂PO₄ 1% 培地에 CaCO₃ 2% 添加한 것과 添加하지 않은것에 대해서 酵素 生成能을 비교한 結果 Table 2에 表示한 것과 같이 適合하지 않았다.

3. CSL, dextrin, K₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄의 添加

(NH₄)₂SO₄를 添加 하므로 *Rhizopus sp.*의 lipase 生成을 促進 시키므로⁽⁷⁾ *Asp. saitoi*에 의한 cellulase의 生成에 미치는 영향을 조사하였다.

CSL 5%, dextrin 10%, K₂HPO₄ 0.3%에 (NH₄)₂SO₄ 0.5%, 1.0%, 3.0%, 5.0%을 각각 培地에 添加해서 검토 하였으며 5日과 8日間 培養結果를 Table 3에 표시 하였다. 이 結果에 의하면 (NH₄)₂SO₄의 量은 증가됨에 따라 酵素 生成能도 증가하며 3.0%에서 8日間 배양한 것에서 最大量을 나타냈으며 5.0%에서는 低下 되는 것으로 보아 (NH₄)₂SO₄의 添加는 酵素 生成은 낮지만 生成量은 반대로 높은것으로 나타났다.

4. Basal medium, substrate (filter paper 粉末, CMC-Na 粉末) *Myriococcum albomyces*에 inducer 로 CMC-Na 粉末 添加에 의하여 cellulase 生成이 증대되므로 CSL 10%, dextrin 3%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.3%, FeSO₄ 0.01%, MgSO₄·7 H₂O 0.05%, KCl 0.05%의 basal medium에 inducer 로 本菌에

CMC-Na 粉末 (Kanto Chemical Co.), 濾紙粉末 (東洋濾紙 100~200 mesh)을 각각 1.0%, 2.0%, 4.0% 添加하여 7日, 12日間을 各各 培養한 結果는 Table 4와 같다.

이에 의하면 inducer 로 基質 1.0~2.0% 정도 添加한 것에서는 酵素의 生成이 높았고 4.0%에서는 현저하게 감소 되었다. 7日間 培養한것 에서는 12日間 培養한 것 보다는 酵素 生成이 對照區보다 많은것으로 보아 基質은 酵素의 生成을 增加 또는 促進시키는 것으로 思料된다.

Table 1. Cellulase production on various concentration of dextrin and corn steep liquor (CSL) (5 days culture)

CSL(%)	Dextrin(%)	Optical density
3.0	3.0	0.12
3.0	5.0	0.13
3.0	8.0	0.14
5.0	3.0	0.21
5.0	5.0	0.16
5.0	8.0	0.10
8.0	3.0	0.19
8.0	5.0	0.15
8.0	8.0	0.08

Table 2. Effect of CSL, dextrin, ammonium phosphate monobasic and calcium carbonate additions on the cellulase production (5 days culture)

CSL(%)	Dextrin(%)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (%)	CaCO ₃ (%)	Optical density
2.0	5.0	1.0	2.0	0.07
2.0	5.0	1.0	—	0.15
2.0	5.0	3.0	2.0	0.04
2.0	5.0	3.0	—	0.11
5.0	8.0	1.0	2.0	0.08
5.0	8.0	1.0	—	0.14
5.0	8.0	3.0	2.0	0.05
5.0	8.0	3.0	—	0.08

Table 3. Effect of CSL, dextrin, potassium phosphate dibasic and ammonium sulphate dibasic additions on the cellulase production (5 days culture)

CSL(%)	Dextrin(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Optical density
5.0	10.0	0.3	0.5	0.25
5.0	10.0	0.3	1.0	0.24
5.0	10.0	0.3	3.0	0.20
5.0	10.0	0.3	5.0	0.19

8 days culture

CSL(%)	Dextrin(%)	K ₂ HPO ₄ (%)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	Optical density
5.0	10.0	0.3	0.5	0.27
5.0	10.0	0.3	1.0	0.23
5.0	10.0	0.3	3.0	0.29
5.0	10.0	0.3	5.0	0.21

Table 4. Effect of basal medium, filter paper powder and CMC-Na powder additions on the cellulase production

7 days culture				12 days culture			
Filter paper (%)	Optical density	CMC-Na (%)	Optical density	Filter paper (%)	Optical density	CMC-Na (%)	Optical density
—	0.36	—	0.37	—	0.41	—	0.40
1.0	0.44	1.0	0.41	1.0	0.39	1.0	0.43
2.0	0.35	2.0	0.43	2.0	0.35	2.0	0.41
4.0	0.28	4.0	0.37	4.0	0.33	4.0	0.38

要 約

文 獻

Aspergillus saitoi가 생성하는 cellulase의 생성조건을 振盪培養法으로 實驗하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) Corn steep liquor는 dextrin에 비해서 大量을 必要로 하였다.
- 2) NH₄H₂PO₄ 1.0% 첨가가 3.0% 첨가보다 cellulase 生成이 우수하였다.
- 3) (NH₄)₂SO₄는 酵素生成은 낮고 生成量은 대조구보다 높았으며 CaCO₃의 첨가는 억제되었다.
- 4) 基質의 1.0~2.0% 添加는 酵素의 生成을 增加 또는 促進시킨다.

- (1) 李順愛, 吳錫欣, 尹政義: 한국식품과학회지, 3, 27 (1971).
- (2) 松村, 前島: セルラーゼ 研究會 第五回 シンポジウム 記録 (1965).
- (3) 外山信男: 日本特許公報, 39-2957 (1965).
- (4) Sumner, J. B.: J. Biol. Chem., 47, 5 (1921).
- (5) Sumner, J. B.: J. Biol. Chem., 65, 393 (1925).
- (6) 赤堀四郎(編): 酵素ハンドブック, 朝倉書店, 東京, p. 455 (1978).
- (7) 松村: 醱酵協會誌(日本), 20, 36 (1962).
- (8) 鄭東孝: 한국식품과학회지, 3, 1 (1971).

된장 중의 Tyramine 에 대하여 (Content of Tyramine in Soybean Mash)

된장에 관하여 많은 연구가 되어 있다. 그러나 근래 된장을 진공 포장하여 저장할 때는 흰 반점(白色鱗狀物質)이 생기는 바 이것은 tyrosine 의 용해도가 낮아 석출되는 것이라고 보고된 바 있다.^{1,2)} 이 흰 반점은 제품의 상품 가치를 저하시키므로 된장을 비닐포장할 때 상당히 꺼리는 물질이다.

된장중에 tyrosine 이 많으므로 발효과정중 일부는 갖가지로 분해될 것으로 생각하고 우선 tyramine 을 정량하여 그 실험의 일부를 보고한다.

재료와 방법

1. 된장 : 서울 시내 식품점과 가정에서 수집한 10점, 日本 福岡市 백화점에서 제조회사가 다른 비닐포장된 7점을 시료로 하였다.

2. Tyramine 의 정량 : 된장 20g 정도를 60°C 에서 진공 건조시키고 이를 분쇄하여 무수 알코올 50 ml 로 추출, 여과하여 이 용액을 東洋여지 No. 50 에 spot 하고 $n\text{-BuOH} : \text{Acetic acid} : \text{H}_2\text{O} = 4 : 1 : 5$ ³⁾의 혼합액으로 15~20시간 전개하였다.

Tyramine 의 정량은 渡邊씨의 amino 산 정량법을 이용하였다.⁴⁾ 즉 전개된 여지는 draft 에서 전개제의 냄새가 없어질 때 까지 충분히 풍진한 다음 0.2% ninhydrin acetone 용액으로 여지의 전면에서 분무하여 60°C 에서 3분간 예비 발색시켰다. 이렇게 하여 tyramine 의 위치를 확인하고 ($R_f = 0.63$) 그 희미한 spot 의 중심에 2% ninhydrin acetone 용액을 피펫으로 균일히 0.3 ml 정도 침투되게 한다. 곧 60°C 에서 다시 3분간 가열하여 acetone 이 완전히 증발되고 나면 pH 7.0, M/25 phosphate buffer 로 여지의 앞 뒤에다 충분히 분무하였다. 이를 다시 60°C 에서 40분간 가열한다. 발색된 tyramine 의 spot 의 주위 약 5 mm 정도의 여백을 남기고 여지를 끊어 그립프로 윤상(輪狀)으로 한다. 미리 준비한 증기탕에서 여지를 넣어서 90초간 완전히 발색시킨다.

발색이 끝난 여지의 spot 만을 거의 같은 면적으로 올려서 시험관에 넣고 pH 7.0, M/25 phosphate buffer 용액과 methanol 을 각각 2.5 ml 씩 가하여 30°C 에서 약

3시간 방치하여 색소를 완전히 용출시킨다. 이를 광전비색계로 흡광도 (570 m μ)를 측정하였다. 동시에 전개된 표준 tyramine 의 흡광도에서 표준곡선을 작성하여 이것에 따라 tyramine 을 정량하였다.

결과 및 고찰

1. Tyramine 의 표준곡선 : 전기한 실험에 따라 만든 표준곡선은 Fig. 1과 같다. Fig. 1과 같이 100 μg 까지는 거의 비례관계가 있으나 정량범위는 30~60 μg 으로 가능한 조절하였다.

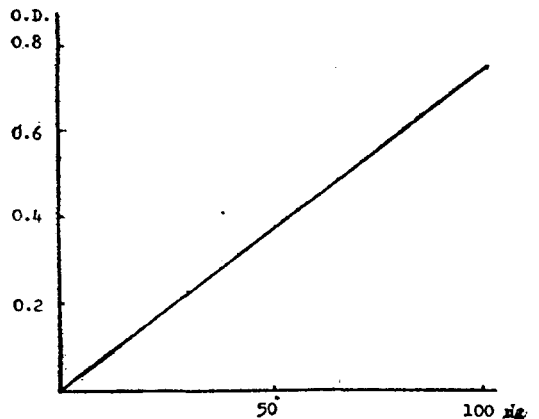


Fig. 1. Standard curve of tyramine

2. Tyramine 의 recovery test : 일정량의 tyramine 을 여지에 spot 하고 이를 전개하여 전기의 방법에 따라 정량한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Recovery of tyramine by paper chromatography

Authentic tyramine	Apparent tyramine	Yield(%)
0.5	0.55	110.0
1.5	15.05	103.3
40	39.0	97.5
60	58.0	96.5
80	77.5	96.8

Table 1과 같이 비교적 좋은 수율로 tyramine 이 정량 되었으나 tyramine 함량이 많을 때는 약간 수율이 떨어 졌다.

3. 각종 된장중의 tyramine 의 함량 : 비닐 포장된 日本된장(miso) 7점과 서울 시내에서 수집한 각종 된장의 tyramine 함량은 Fig. 2 와 같다.

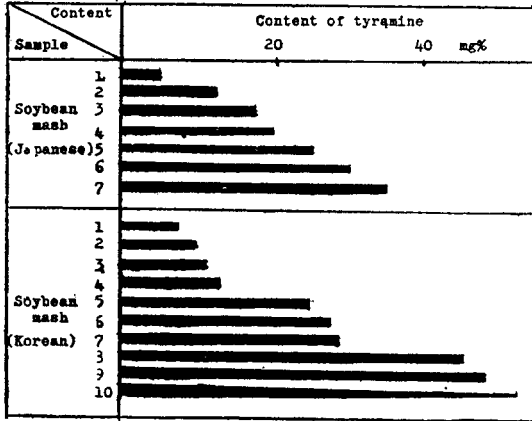


Fig. 2. Content of tyramine in soybean mash

Miso 와 된장에서 tyramine 함량의 차이는 있으나 상당량 함유되어 있다. 된장 중에 유리 tyrosine 이 존재하고 있는 사실로 부터 tyramine 이 함유됨은 의심치 않는다.

Tyrosine 에서 tyramine 의 생성은 두가지로 생각된다. 그 하나는 발효과정중 비교적 내염성의 *Streptococcus faecalis*,⁽⁵⁾ *Cl. aerofedidum*⁽⁷⁾과 같은 세균의 decarboxylase 에 의하여 생길 수도 있을 것 같고, 다른 하나는 제국 중 *Asp. oryzae* 로 생성된 L-tyrosine decarboxylase⁽¹¹⁾로 생성될 것 같다.

이런 추정에서 된장 중 tyramine 의 함량이 낮은 것은 된장의 성숙도가 낮았거나, 아니면 L-tyrosine decarboxylase activity 가 낮은 균을 사용하였거나, 혹은 진

기와 같은 세균의 오염이 적다는 것을 의미하는 것 같다.

이와 반대로 tyramine 이 많은 것은 성숙이 잘 된 된장으로 국균의 L-tyrosine decarboxylase activity 가 높은 균주를 사용하였거나, 세균의 오염을 의미하는 것 같다. 특히 진공 포장된 miso 보다 된장이 그 함량이 높은 것으로 보서는 세균오염의 지표로 삼을 수 있을 것 같다.

한편 tyramine 을 분해하는 효소인 amino acid oxidase⁽⁸⁻¹⁰⁾를 생성하는 균주인 *Asp. oryzae* 를 사용하면 생성된 tyramine 은 성숙기간 중에 소실될 것 같다.

앞으로는 된장 발효에서 tyramine 함량에 대한 더 상세한 연구가 필요할 것 같다.

문 헌

- 1) 海老根, 杉浦 : 味噌技術, No. 62, 1 (1958).
- 2) 海老根 : 味噌技術, No. 64, 4 (1958).
- 3) Bremner, J. M. and Kenten, R. H.: *Biochem. J.*, 49, 651 (1951).
- 4) 渡邊, 渡邊, 小出, 齊藤, 志村 : 日本農藝化學會誌, 34, 620 (1960).
- 5) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, 34, 846 (1940).
- 6) Hellen, M.R. EPPS: *Biochem. J.*, 38, 242 (1944).
- 7) Gale, E. F.: *Biochem. J.*, 35, 66 (1941).
- 8) Yamaç'a, H., Adachi, O. and Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 117 (1965).
- 9) Yamada, H., Adachi, O. and Ogata, K.; *Agr. Biol. Chem.*, 29, 649 (1965).
- 10) Yamada, H., Adachi, O. and Ogata, K.: *Agr. Biol. Chem.*, 29, 864 (1965).
- 11) 정동효 : 한국농화학회지, 14 (1971) 투고중.

鄭 東 孝 (건국대학교 발효공학과)
(1971년 8월 30일 수리)