

Aspergillus niger KK2를 이용한 Hemicellulase 생산

강성우, 박양순, 이진석*, 김승욱**

고려대학교 생명공학원, 한국에너지 기술연구소*, 고려대학교 화공생명공학과**

Hemicellulase Production by *Aspergillus niger* KK2

Seong-Woo Kang, Yang-Soon Park, Jin-Suk Lee*, Seung-Wook Kim**

Graduate School of Biotechnology, Korea University

Korea Institute of Energy Research*

Department of Chemical & Biological Engineering, Korea University**

1. 서론

식물 세포벽은 다음과 같은 3 가지의 주요한 중합체 (cellulose, hemicellulose, lignin)로 구성되어 있으며, 구성성분 중에서 cellulose가 가장 많이 존재하고 그 다음으로 xylan이 주 성분인 hemicellulose가 많이 존재하며 이들 두 성분이 전체 식물 바이오매스 (biomass)의 50% 이상을 차지한다. Cellulose와 xylan은 지구상에 존재하는 가장 풍부한 유기물질로 석유나 석탄처럼 고갈에 대하여 걱정할 필요가 없는 영원히 재생 가능한 자원이다. 그러므로 이들 다당류의 효율적인 당화과정 개발은 식량문제와 연료문제의 해결에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 오랫동안 많은 연구가 cellulose와 xylan의 당화에 초점이 맞춰져 왔는데, 현재에는 이들 효소의 용도가 다양하게 개발이 되어 여러 분야에서 상업화가 되었으며 또한 새로운 응용연구도 활발하게 진행이 되고 있다. Cellulase는 섬유산업, 제지산업, 세제산업, 사료산업등에서 많이 이용되고 있으며 이외에도 저칼로리 식품의 제조와 음식물 쓰레기의 발효 등의 다양한 용도에 적용이 되고 있다. 또한 xylanase는 제지산업, 식품산업, 사료산업 등에 많이 응용이 되고 있다 (1~3).

본 연구에서는 *Aspergillus niger* KK2를 이용하여 hemicellulase를 보다 경제적으로 생산하기 위한 배양배지를 최적화 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주

본 연구에서 사용된 균주는 *Aspergillus niger* KK2 (4)인 돌연변이 균주이다.

2.2 종균배양

Aspergillus niger KK2 포자현탁액을 2% malt extract에 접종하여 28°C 진탕배양기에서 200 rpm으로 2일간 배양한 것을 종균으로 사용하였다.

2.3 배지

기본배지는 2% ground rice straw, 1% wheat bran, 1% corn steep liquor (CSL), 0.05% industrial yeast extract (IYE), 0.5% KH₂PO₄, 0.05% CuSO₄ · 5H₂O, 0.01% CoSO₄ · 7H₂O로 구성되었다. 기본배지 pH는 멸균 전에 7.0으로 조정하였다.

2.4 효소생산

본배양은 기본배지에 종균을 10%로 접종하여 28°C 진탕배양기에서 200 rpm으로 배양하였다. 2.5 l 발효기 [한국발효기(주)]에서 효소생산은 기본배지 또는 최적화된 배지 1.8 l를 첨가한 후 종균을 5%로 접종하여 28°C, 200 rpm에서 통기량 1.0 vvm으로 하여 수행하였다.

2.5 분석

Xylanase와 β -xylosidase 활성은 IUPAC에서 제시한 방법으로 측정하였다. 환원당은 DNS 방법 (5)으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 삼각플라스크 배양에서 배지 최적화

기본배지에서 종균 접종량을 결정하기 위하여 5, 10, 15%로 접종하였다. 종균을 5%로 접종하였을 때 xylanase와 β -xylosidase의 활성이 각각 360 IU/ml, 11.8 IU/ml로 높았다 (Fig. 1). 벻짚의 농도를 변화시켜 배양했을 때 5% 벻짚에서 효소활성(xylanase: 442 IU/ml, β -xylosidase: 15.3 IU/ml)이 높았다. 하지만 5% 탄소원에서는 점도가 너무 커서 반응기에 적용하기에는 무리가 있어 탄소원은 3% 벻짚으로 결정하였고, 이때 xylanase와 β -xylosidase의 활성은 각각 418 IU/ml, 13.2 IU/ml이었다. 7% 탄소원에서는 점도 때문에 효소활성이 크게 낮아졌으며, 벻짚을 제외시켰을 때는 xylanase와 β -xylosidase 활성이 각각 123 IU/ml, 8.8 IU/ml로 나타났다 (Fig. 2). Corn steep liquor (CSL) 농도를 변화시켜 효소활성을 조사하였다. 5%와 7%의 CSL 농도에서 최대활성 (xylanase: 510 IU/ml, 489 IU/ml, β -xylosidase: 16.3 IU/ml, 15.1 IU/ml)을 보였으며, 이러한 활성은 CSL을 제외했을 때의 xylanase와 β -xylosidase 활성보다 각각 약 2배, 2.6~2.9배 높았다. 3% CSL에서는 xylanase활성이 CSL을 제외했을 때와 비슷하였지만 β -xylosidase는 5%와 7%에서의 최대활성과 비슷한 16 IU/ml을 보였다 (Fig. 3). Industrial yeast extract (IYE) 농도를 변화시켜 효소활성을 조사하였다. 0.05% IYE 농도에서 xylanase 활성이 510 IU/ml로 IYE를 제외했을 때의 활성 보다 약 25% 증가하였다. 그러나 β -xylosidase 활성은 15.7~16.3 IU/ml로 IYE의 농도에 관계없이 비슷하였다 (Fig. 4). 이상과 같은 실험의 결과로 최적화된 배지의 조성은 다음과 같다; 3% ground rice straw, 1% wheat bran, 5% corn steep liquor (CSL), 0.05% industrial yeast extract (IYE), 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3.2 2.5L 발효기 배양에서 xylanase 생산

Aspergillus niger KK2를 1.8 l의 기본배지와 최적화된 배지에서 배양하였다. 기본배지의 lag phase는 24시간으로 최적화된 배지에서의 36시간보다 짧았으나 최대 효소활성은 최적화된 배지가 약 84시간으로 기본배지보다 12시간 빨랐다. 최적화된 배지에서 최대 효소활성은 449 IU/ml로 기본배지에서 최대 효소활성 (349 IU/ml)보다 약 30% 증가하였다.

4. 감사의 말

본 연구를 일부 지원하여 주신 유변공정연구센터 (한국과학재단 ERC)에 감사드립니다.

5. 참고 문헌

1. N. Kulkarni, A. Shendye and M. Rao, *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 411-456 (1999)
2. M. Uma Maheswari and T. S. Chandra, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 257-263 (2000)
3. K. K. Y. Wong, S. L. Nelson and J. N. Saddler, *J. Biotechnol.*, **48**, 137-145 (1996)
4. S. W. Kang, E. H. Ko, J. S. Lee and S. W. Kim, *Biotechnol. Lett.*, **21**, 647-650 (1999)
5. G.L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426-428 (1959).

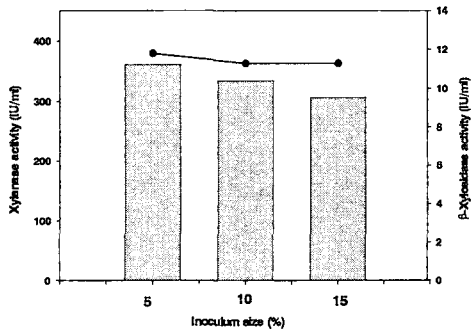


Figure 1. Effect of inoculum size on enzyme activity.

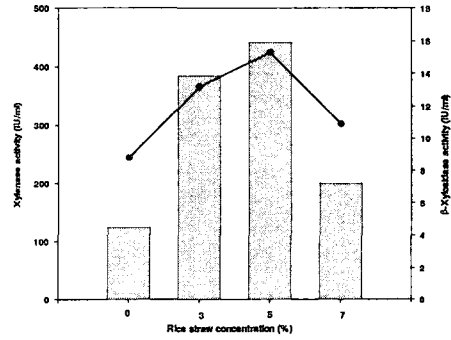


Figure 2. Effect of rice straw concentration on enzyme activity.

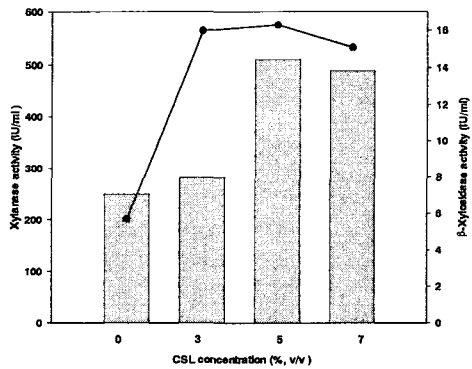


Figure 3. Effect of corn steep liquor on enzyme activity.

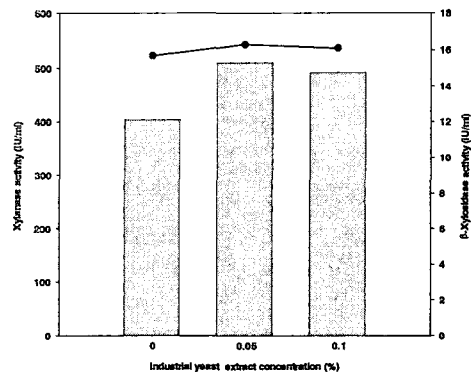


Figure 4. Effect of industrial yeast extract concentration on enzyme activity.

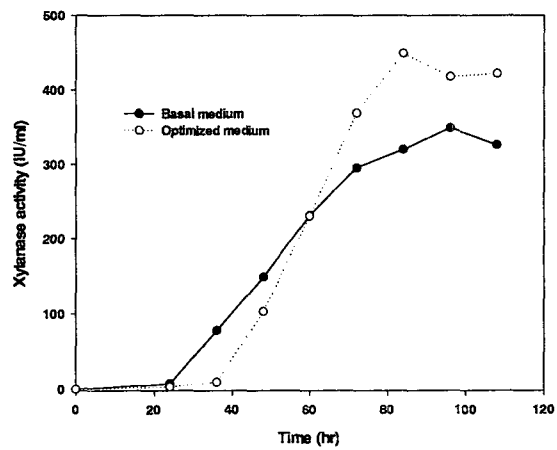


Figure 5. Time course of xylanase production by *A. niger* KK2 using basal and optimized medium in 2.5L bioreactor.