

Cellulase 및 hemicellulase의 고생산균주 FJ1의 효소생산 특성 연구

김경철 · 유승수 · 오영아 · 정선용 · 김성준

전남대학교 환경공학과

전화 (062) 530-0853 FAX (062) 530-1859

Abstract

The strain FJ1 isolated from a rotten wood showed high activity to hydrolysis of cellulosic materials. The strain produced largely enzymes related in hydrolysis of cellulose and hemicellulose, such as CMCCase, xylanase, β -glucosidase, and avicelase. The culture conditions(pH, temperature, inoculation concentration) and substrate specificity to various cellulosic materials were examined to elevate productivity of the enzymes. The enzyme activities of CMCCase and xylanase were 13.5U/ml and 24.3U/ml in agitation culture using Mandel's medium, respectively. The high activity of the enzymes was earned when mixed cellulosic materials of rice straw, sawdust, and pulp as substrates, indicating that the strain FJ1 could use crystalline substrates.

1. 서론

천연 biomass는 cellulose, hemicellulose, lignin을 주성분으로 하여 구성되는데 그 중에서 cellulose는 양적으로 가장 풍부하며 이용가능성이 높은 물질로서, 이의 재활용에 관하여 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다. Cellulose는 glucose가 β -1,4-glycosidic 결합으로 이루어진 결정성 고분자 중합체로서 일반적으로 glucose로 가수분해시켜 2차적으로 사용하고 있으며, 또한 hemicellulose도 다양한 다당류 균으로서 가수분해를 통해 이용되어지고 있다. 그러나, 식물조직을 이루는 lignin은 견고하고 쉽게 분해되지 않으므로 천연 biomass의 효율적인 이용을 위해서는 많은 연구가 이루어져야 한다.

섬유소 분해효소를 생산하는 미생물로서는 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Irpex*, *Humicola*, *Sporotrichum*속의 곰팡이와 세균으로는 *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Pseudomonas* 등이 있으며, 방사선균으로는 *Streptomyces*, *Thermomonospora*속 등의 많은 균주에 의한 섬유소 물질의 생물전환에 대하여 연구가 이루어져 왔다¹⁾²⁾.

섬유소 물질을 분해하기 위해 효소로는 크게 cellulose, hemicellulase, lignin을 분해할 수 있는 효소가 필요하며, Cellulose의 효소 당화에는 다음과 같은 3종의 효소가 관여하고 있다. ①cellulose chain을 무작위로 가수분해하여 cellobiose와 glucose를 생성하는 endo- β -1,4-glucanase(CMCCase), ②cellulose chain의 비환원성 말단에 작용하여 cellobiose를 생성하는 exo- β -1,4-glucanase(Avicelase), ③cellobiose를 분해하여 glucose를 생성하는 β -glucosidase(Cellobiase)에 이 외에도 식물세포막으로부터 cellulose를 분해하기 위해서는 cellulose에 결합된 물질(hemicellulose, lignin 등)을 분해 제거하여야 한다. 여기에 필요한 효소로 xylanase, lignin peroxidase 등의 다양한 기질구조를 산화할 수 있는 산화효소가 공동으로 작용되어야 한다. 이와 같이 섬유소물질의 가수분해 공정에는 다양한 효소균이 관여

하고 있으며, 섬유소물질을 효율적으로 가수분해시키기 위해서는 이러한 효소군이 항상 다량으로 분비하는 미생물을 선택하여 섬유소물질의 생물전환에 이용하여야 한다.

본 연구에서는 토양 및 부식토에서 섬유소물질을 분해할 수 있는 미생물을 분리하고, 효소생산성이 우수한 균주를 선별하여 효소생산에 관한 배양특성에 대해 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. Cellulose 분해미생물의 탐색 및 선별

Cellulose 분해효소를 생산하는 미생물의 탐색 및 선별을 목적으로 토양 및 부식토를 채취하여 균주로 사용하였고, 이에 관련된 환경 조건들은 30°C, 호기정치배양이었다. 섬유소물질의 분해능과 성장특성이 가장 좋은 균주 FJ1를 선택하였고, 4°C 냉장 보관(PDA, Merck Co.)하여 실험에 이용하였다.

2-2. 효소활성도 측정

CMCase와 xylanase에 대한 효소활성도 측정을 위하여 2%의 CMC(0.05 M Citrate buffer, pH 4.8)용액과 2%의 xylan(Oat spelts ; 0.05 M Citrate buffer, pH 4.8)용액 0.5ml와 효소액 0.5ml을 혼합한 반응물을 50°C, 30분간 반응시켜 DNS방법³⁾으로 환원당을 측정하였다. Avicelase 활성도 측정은 1%의 Avicel(Merck pH 101)(0.05 M Citrate buffer, pH 4.8) 1ml와 효소액 1ml을 혼합한 반응물을 50°C, 120분간 반응시켜 Somogyi-Nelson방법³⁾으로 환원당을 측정하였다. 효소활성도 측정에 사용된 표준물질로써는 glucose 및 xylose을 이용하였다. 효소 활성도는 표준반응조건에서 $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ 의 glucose 또는 xylose에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1unit로 정의하였다. β -glucosidase는 5mM PNP(p-nitrophenyl- β -D-glucoside) 1ml와 0.1M sodium acetate buffer(pH 4.8) 1.8ml, 효소액 0.2ml을 혼합한 반응물을 50°C, 30분간 반응시킨 후 0.4M glycine buffer(pH 10.8) 4ml를 넣어 반응을 종결시킨 다음, 이 때 생성되는 p-nitrophenol을 430nm에서 정량 하였다. 효소 활성도는 표준반응조건에서 $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ 의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한 효소량을 1unit로 정의하였다. 단백질 정량은 lowry등의 방법⁴⁾을 이용하였다.

2-3. 분리균주 FJ1의 배양 특성

분리균주의 환경변수 및 기질 특이성에 관한 실험은 탄소원으로 Avicel(Merck Co. PH101), Sodium carboxymethyl cellulose(CMC)을 이용하는 Mandel's medium¹⁾에서 수행하였고, 모든 실험에서의 배양조건은 30°C, 100rpm, 호기상태 배양을 기본으로 하여 각각의 환경변수 및 기질특이성을 달리 하여 조사하였다. 효소활성도를 분석을 위한 조효소액은 10,000rpm, 10분간 원심분리 하여 상등액을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 분리균주 FJ1의 환경변수에 관한 실험

분리균주 FJ1의 환경변수에 관한 실험은 균체 접종물 농도, pH, 온도의 변화에 따른 효소활성도 분석을 수행하였다. Fig. 1은 균체 접종물 농도에 따른 효소활성도를 살펴보았는데, 포자현탁액의 계수가 10^4 개/ml에서 CMCase 및 Xylanase의 값이 11.6, 15.9U/ml로서 가장 좋은 효소활성도를 나타내었다. 분리균주 FJ1의 초기 pH 및 온도의 변화에 따른 효소

활성도는 fig. 2와 fig. 3에 나타내었는데, 분리균주 FJ1의 효소생산을 위한 최적 pH 및 최적 온도는 각각 6~7, 25~30°C임을 알 수 있었다. 분리균주 FJ1는 pH 6에서 CMCase 및 xylanase의 활성도는 각각 15.5, 24.33U/ml이었고, 25~30°C에서 최대 효소생산성을 보이나 40°C의 이상의 온도에서는 균주의 성장 및 효소활성도를 나타내지 않는다.

3-2. 분리균주 FJ1의 기질특이성에 관한 실험

분리균주 FJ1의 기질특이성에 관한 실험은 상업용 섬유소 및 섬유소폐기물 물질, 상업용 당 첨가에 따른 효소활성도 분석을 수행하였다. Fig. 4는 상업용 섬유소 물질을 이용한 분리균주 FJ1의 효소생산성 유도에 관하여 살펴보았다. 분리균주 FJ1는 불용성, 미세결정성 물질인 Avicel 및 α -cellulose 물질에서 모든 효소활성도가 높게 유도됨을 보여주고 있으며, cellobiose를 이용시에는 β -glucosidase를 높게 유도할 수 있다. 분리균주 FJ1의 섬유소폐기물 및 상업용 당 첨가에 따른 효소생산성을 fig. 5와 fig. 6에서 보여주고 있다. Fig. 5에서 섬유소폐기물에 의한 효소 유도 특성은 톱밥, 벚짚, 펄프를 혼합하여 사용한 기질에서 유리함을 보여주고 있으며, fig. 6의 상업용 당 첨가에 따른 효소 유도 특성은 CSL(Corn steep liquor) 및 sucrose에서 높은 효소생산성을 보여 주고 있다.

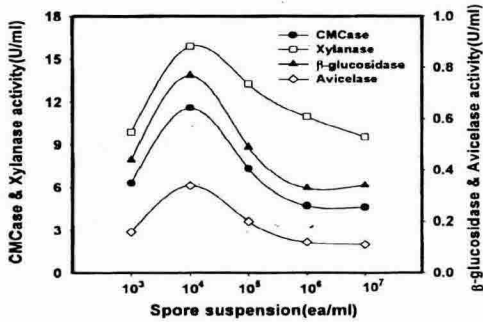


Fig. 1. Comparison of enzyme activities in various inoculation concentration of spores suspension(Cultivation condition : 30°C, 100rpm, Mandel's medium(pH 6.0), 5day, Aerobic culture).

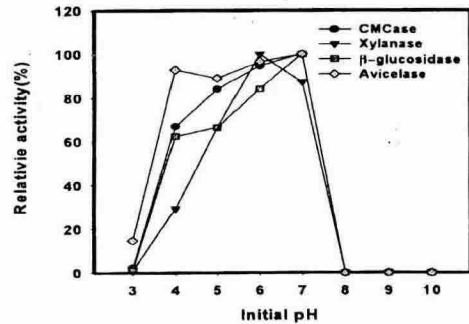


Fig. 2. Comparison of relative enzyme activity for initial pH variation of culture medium(Cultivation condition : 30°C, 100rpm, Mandel's medium, 5day, Inoculation 1%(10^6 ea/ml), Aerobic culture)

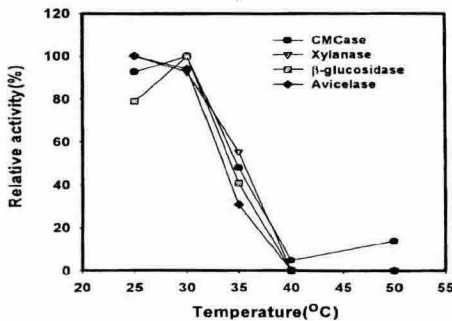


Fig. 3. Comparison of relative enzyme activity in the culture temperature variation(Cultivation condition : Mandel's medium(6.0), Static state, 7day, Inoculation 1%(10^6 ea/ml), Aerobic culture).

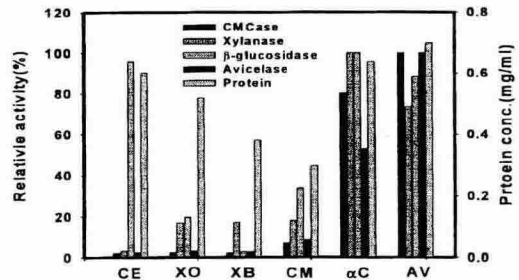


Fig. 4. The comparison of relative enzyme activity and protein concentration in the cultures using various commercial cellulosic materials(Cultivation condition : 30°C, 100rpm, Mandel's medium(pH 6.0), 5day, Inoculation 1%(10^6 ea/ml), Aerobic culture) (CE: Cellobiose, XO: Xylan(oat spelt), XB: Xylan (Birchwood), CM: CMC, α C: α -Cellulose, AV: Avicel).

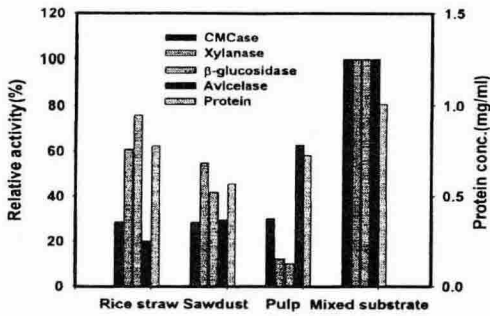


Fig. 5. The comparison of relative enzyme activity and protein concentration in the cultures using various cellulosic materials(Cultivation condition : 30°C, 100rpm, Mandel's medium(pH 6.0), 5day, Inoculation 1%(10⁶ea/ml), Aerobic culture).

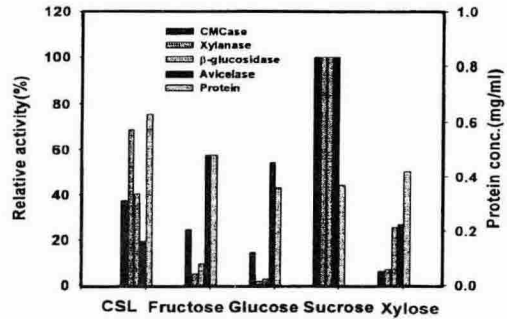


Fig. 6. The comparison of relative enzyme activity and protein concentration in the cultures using various commercial sugars (Cultivation condition : 30°C, 100rpm, Mandel's medium(pH 6.0), 5day, Inoculation 1%(10⁶ea/ml), Aerobic culture).

4. 요약

자연계로부터 분리된 FJ1의 환경변수 및 기질 특이성을 본 연구에서 살펴보았는데, 분리 균주 FJ1의 특성은 최적pH, 최적온도는 각각 6~7, 25~30°C이었다. 또한, 분리균주 FJ는 Avicel, 섬유소폐기물과 같은 결정성 섬유소물질의 분해에 유리함을 알 수 있었다. 본 연구에서는 cellulose의 분해에 관련된 효소를 분비하는 분리균주 FJ1의 환경변수 및 기질 특이성을 조사하였고, 이를 기본으로 하여 배양인자의 조절을 통한 최적의 효소생산 및 생산되어진 효소에 의한 섬유소 폐기물(벼짚, 폐지, 음식물 쓰레기 등)의 당화 특성을 검토하고 있다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(2000-2-30900-006-3)지원으로 수행되었음.

5. 참고문헌

1. Young-June S. et al., "Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulase"(1997), Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 25(4), 346-353
2. J. P. H. and van Wyk, "Hydrolysis of pretreated paper materials by different concentrations of cellulase from *Penicillium funiculosum*"(1999), Bioresource Technology, 69(3), 269-273
3. Willis A. Wood and Scott T. Kellogg, "Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose"(1988), ACADEMIC PRESS, INC., 160, 87-112
4. Lowry O. H. et al., "Protein measurement with the folin phenol reagent"(1951), J. Biol. Chem. 193, 265-275