Trichoderma sp. FJ1의 섬유소폐기물을 이용한 Cellulolytic enzymes의 고생산

유승수, 김경철, 오영아, 정선용, 김성준
전남대학교 공과대학 환경공학과
전화 (062) 530-1864, Fax (062) 530-0864

Abstract

A filamentous microorganism was isolated from completely rotten wood for the production of cellulolytic enzyme. The *Trichoderma* sp. FJ1 produced a large amount of cellulolytic enzymes, such as CMC, xylanase, β-glucosidase, and avicelase. For the production of the enzymes, when cellulolsic wastes were used as carbon sources of strain FJ1, rice straw showed higher enzyme activities than sawdust and pulp. The activities of CMC, xylanase, β-glucosidase, and avicelase were 2.95, 5.89, 0.45, and 0.12 U/ml in use of rice straw, respectively. To enhance production of the enzymes, the mixture substrate of rice straw and commercial cellulosic materials was investigated as carbon sources. The highest activities of CMCase, β-glucosidase, and avicelase were found in the mixture of rice straw and avicel, particularly rice straw:avicel (50:50), and the highest xylanase was obtained in the mixture ratio of 71:29. Bacto peptone addition of 0.1% showed enhanced production of the cellulolytic enzymes in which the activities of CMCase, xylanase, β-glucosidase, and avicelase were 19.23, 27.18, 1.28, and 0.53 U/ml, respectively. The production of the enzymes using rice straw was efficiently induced in present of avicel and pulp containing high content of cellulose. Consequently, the filamentous microorganism, strain FJ1 utilized various cellulosic wastes as carbon sources and cellulases productivities were excellent compared to those of others strains reported previously, suggesting that the strain FJ1 will be expected as a favorable candidate for biological saccharification of cellulosic wastes in further.

서 론

자연계에 다량으로 존재하는 biomass는 cellulose, hemicellulose, lignin을 주성분으로 구성되어지고, 이로부터 유용화학물질, 식량 및 에너지로의 재활용에 관하여 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다(1). 하지만 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 비수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부만 이용되어지고 있다. 섬유소를 이용하여 효소를 생산하는데 있어서의 가장 중요한 인자는 많은 양의 섬유소 분해효소를 효율적이고 낮은 비용으로 생산하는 것이다.

본 연구에서는 섬유소폐기물을 기질로 이용하는 효율적인 효소 생산 시스템을 구성하기 위하여, *T. reesei*보다 exocellobiohydrolase, endoglucanase의 활성이 뛰어난 *Trichoderma* sp. FJ1을 분리하여 이용하였다. 섬유소 분해효소의 생산에 있어서 중요한 배양인자인 탄소원 및 질소원의 영향과 섬유소 폐기물의 혼합기질을 유도물질로 사용하였을 경우 효소 생산에

미치는 영향에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 보관, 배양조건 및 효소활성도 분석

본 실험에 사용된 *Trichoderma* sp. FJ1은 썩은 나무로부터 분리하였다. 균주의 보관 및 이용은 YMEA 배지(yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, agar 15 g, distilled water 1.0 L)에서 3일간 30℃에서 성장시킨 후 냉장보관 하여 실험에 이용하였다. 효소 생산의 기본배지는 Mandel's medium에서 탄소원인 avicel, CMC를 제외하고 대신에 섬유소폐기물(볏짚, 톱밥, 펄프)을 사용하였다. CMCase와 xylanase, β-glucosidase, Avicelase의 효소활성도 측정은 배양액을 10,000×g, 10분간 원심분리하여 상등액을 Thomas 등(2)의 방법으로 측정하였다.

효소생산을 위한 섬유소 기질들의 영향

효소생산에 사용되어진 섬유소폐기물(볏짚, 톱밥, 펄프)은 Mandel's medium(3)을 기본배지로 사용하였다. 효소생산성은 탄소원인 CMC와 avicel 대신에 효소생산성 향상을 위해 섬유소폐기물(볏짚, 톱밥, 펄프)을 사용하여 효소생산성을 비교하였다. 질소원의 농도가 효소생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 bacto peptone의 농도를 변화시켜 배양하였다.

결과 및 고찰

효소 생산을 위한 섬유소 기질들의 영향

본 실험실에서 사용된 *Trichoderma* sp. FJ1은 *T. reesei*와 동등이상의 우위를 보여주며(Table 1), 특히 CMCase와 avicelase에 대해서는 높은 활성을 보여주고 있다. Fig. 1은 섬유소폐기물(볏짚, 톱밥, 펄프)을 각각 단독으로 사용했을 때의 효소활성도를 보여주고 있으며, 볏짚의 효소생산이 뛰어남을 보여준다. 효소생산성을 높이기 위해서 천연 섬유소 물질인 볏짚과 상업용 섬유소물질인 CMC, avicel, xylan을 혼합하여 사용하였다. 볏짚과 avicel을 혼합하였을 때 CMCase 및 avicelase는 볏짚 단독 사용시보다 각각 5.3배, 3.5배 이상의 높은 활성을 보여 주었다(Fig. 2). 탄소원의 혼합비율로 변화시켜 실험한 결과, 효소 생산에 관한 기질간의 최적혼합비율은 볏짚과 avicel의 50:50 비율에서 가장 높은 효소활성이 얻어졌고, 그때의 CMCase, β-glucosidase, avicelase활성은 16.89, 1.07. 0.57 U/ml이었다. Xylanase는 71:29에서 37.15 U/ml로 최대의 효소활성도를 나타내었다(Fig. 3). 유기 질소원이 섬유소

Table 1. Comparisons of strain FJ1 with *Trichoderma reesei* to the production characteristics of cellulolytic enzymes.

Strain	Cultivation time (day)	Cellulolytic enzyme activities (U/ml)			
		CMCase	Xylanase	Avicelase	β-glucosidase
FJ1[a)]	5	9.07	12.56	0.45	0.54
T. reesei[a)b)]	7	8.60	9.95	0.43	0.48
T. reesei	-	7.86	1.00	0.37	0.09
T. reesei	7	8.30	-	0.75	1.65

[a)]The cultivation of the strain were performed on Mandel's medium under same condition.
[b)]*T. reesei*(KCTC 6952) was devided from the Korean Collection for Type Culture.

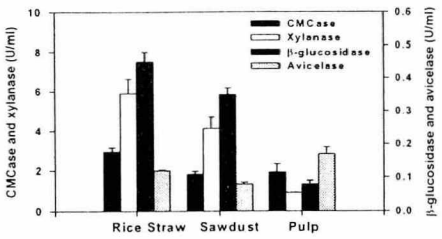

Fig. 1. Effects of various cellulosic wastes on the cellulases production in the liquid culture. The bars showed standard deviations.

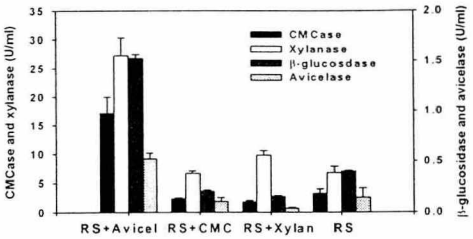

Fig. 2. Effects of the mixture substrates of rice straw and commercial cellulosic materials on the cellulases production in the liquid culture. The bars showed standard deviations and RS indicated rice straw.

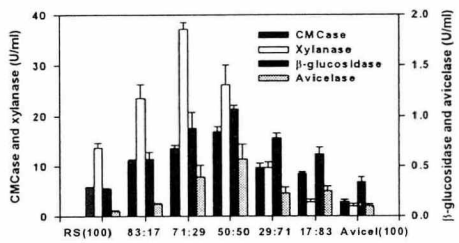

Fig. 3. Effects of composition ratio of rice straw and avicel on the cellulases production in the liquid culture. The bars showed standard deviations and RS indicated rice straw.

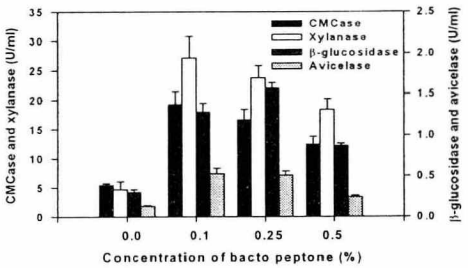

Fig. 4. Comparisons of the productivities of cellulolytic enzymes according to the bacto peptone concentration in the liquid cultures. The bars showed standard deviations.

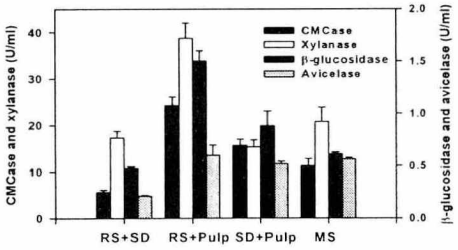

Fig. 5. Comparisons of the cellulases production according to the mixture conditions of cellulosic wastes in the liquid cultures. The bars showed standard deviations and RS indicated Rice straw, SD indicated Sawdust, and MS indicated Mixture substrate.

활성도는 1.4배의 높은 값을 얻었다.

분해효소 생산성에 미치는 영향을 알아보기 위해 bacto peptone의 농도를 변화시켜 효소의 생산성을 검토하였다(Fig. 4). 그 결과 0.1%농도에서 CMCase, xylanase, β-glucosidase, avicelase활성은 19.23, 27.18, 1.28, 0.53 U/ml이었다. 경제적으로 섬유소 분해효소를 생산하기 위해 섬유소물질들을 볏짚+톱밥, 볏짚+펄프, 톱밥+펄프, 혼합(볏짚+톱밥+펄프)의 조합으로 한 혼합농도 1%에서 효소생산성을 비교하였다(Fig. 5). 이때의 CMCase, xylanase, β-glucosidase, avicelase는 각각 24.3, 38.7, 1.5, 0.6 U/ml로써 볏짚+avicel의 혼합 기질보다 xylanase

요 약

Trichoderma sp. FJ1의 cellulase 생산을 위한 배지조성의 검토에서, 질소원으로서 0.1% bacto peptone을 사용하였을 때 생산성이 향상되었으며, 순수 상업용기질인 avicel과 섬유소 폐기물인 볏짚의 혼합배양에서 높은 효소생산성이 얻어졌다. 경제적인 효소생산성을 위한 기질로 섬유소 폐기물의 농도와 혼합비를 검토한 결과, 1%농도에서 볏짚과 펄프를 50:50으로 사용했을시 CMCase, xylanase, β-glucosidase, avicelase는 24.3, 38.7, 1.5, 0.6 U/ml가 얻어졌다. 이러한 효소생산성은 타 보고서의 결과보다 동등이상의 우위를 보여주고 있으며 섬유소 폐기물의 생물학적 당화기술에 크게 기여하리라 사료된다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Busto, M. D., and N. Ortega. "Location, kinetics and stability of cellulases induced in *Trichoderma reesei* culture"(1996), *Bioresource technol.* **57,** 187-192.
2. Thomas M. W. and K. M. Bhat, "Methods for measuring cellulase activities"(1988), *Method. Enzymol.* **160,** 87-112
3. Mandels, M. and J. Weber, "Cellulase Production by *Trichoderma reesei*"(1969), *J. Adv. Chem. Ser.* **95,** 391-414.