

## Enzymatic saccharification of cellulosic wastes by pectinase

Ji-Eun Lee, Sam-Gon Kim, Seong-Jun Kim

Dep. of Environmental Engineering Chonnam National University

Tel: +82-62-530-1864, FAX: +82-62-530-0864

### Abstract

The study was aimed to saccharify callulosic waste by pectinase produced from strain KL34 isolated from soil. The enzyme activity in the culture using 1%(w/v) fruit waste as carbon source reached to 3.8 U/ml. In the enzymatic hydrolysis of cellulosic waste, we obtained 9.5g/L reducing sugar in the condition of supernatant containing 5 U/ml enzyme and 10%(w/v) apple rind as substrate. Additionally, in enzymatic hydrolysis of food waste using pectinase from KL34, reducing sugar of 12.7g/L was obtained, indicating enhancement of 1.6 fold compared with that of only cellulase employment.

### 서론

Pectin질은 과일, 야채 등의 고등식물의 세포벽에 많이 존재하는 식물체의 콜로이드성 탄수화물 군으로서, 세포막 사이의 middle lamella층에 주로 존재하면서 세포막 사이의 내부를 메워주거나 세포와 세포 사이를 접착시켜주는 물질로 작용한다<sup>1)</sup>. 따라서 펙틴질은 식물 세포의 기계적 강도를 유지하거나 세포간의 결합력, 조직의 강도, 응집성 및 점조성을 유지하는데 결정적인 영향을 미친다. Pectinase는 펙틴질을 분해시키는 효소군의 총칭으로서 자연계에 존재하는 펙틴 분해 효소로는 pectin esterase(PE), pectin lyase(PL), pectate lyase(PAL), polygalacturonase(PG) 등이 있다<sup>2)</sup>. 펙틴분해 효소는 과즙이나 과일주의 생산공정에서 과즙의 청징화, 착즙률 및 여과 공정의 개선을 위해 널리 이용하고 있다<sup>3)</sup>. 현재 상업적으로 이용되는 펙틴분해 효소들은 *Aspergillus* 속에서 생산되는 효소가 많이 이용되고 있으며 [13], *Bacillus* 등의 bacteria에 의한 효소 생산은 최근에 보고되었다<sup>4)</sup>.

Pectinase를 이용하여 폐야채나 과일껍질 등을 효과적으로 가수 분해하여 환원당을 만들고, 이렇게 만들어진 환원당을 이용하여 다른 생물산업의 탄소원으로 이용하여 고부가가치의 물질을 생산한다면, 버려지는 식물성 Biomass의 자원화 및 환경오염을 줄이는 한 방법이 될 수 있을 것이다. 본 연구에서는 토양으로부터 pectinase 활성을 가지는 bacteria를 분리하여 분리균주의 효소생산 조건과 효

소를 이용한 cellulosic waste의 가수분해에 관한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Strain and medium

토양으로부터 분리된 pectinase 생산균주 strain KL34를 효소생산을 위해 사용하였고, NaCl 5g, tryptone 10g, yeast extract 5g, Polygalacturonic acid 5g이 함유된 배지를 효소생산을 위한 기본배지로 사용하였다. KL34는 기본배지 100ml가 들어있는 500ml 플라스크에서 25°C, 100rpm으로 3일간 배양하였다

### 2. Measurement of enzyme activity

Pectinase 효소 활성을 측정하기 위해, 배양액을 12,000rpm, 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다. 시험관에 효소액 100 $\mu$ l, 기질(0.25% polygalacturonic acid용액, pH 8.5) 200 $\mu$ l를 첨가하여 buffer(50mM Tris-HCl, pH 9.0)로 total volume을 1ml되게 하여 40°C에서 30분간 반응시킨 다음 DNS 시약 3ml를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응물을 끓는 물에서 5분간 가열 후 증류수 20ml 첨가하고 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 D-galacturonic acid를 이용하였으며, 효소 활성도는 위의 반응조건에서 1분 동안 1 $\mu$ mol의 환원당을 생산하는 효소의 양을 1unit로 정의하였다.

### 3. Production of pectinase using cellulosic wastes

상업용 기질을 이용한 효소생산은 경제적으로 불리하기 때문에, 폐야채와 과일 껍질 등의 섬유소폐기물을 이용한 효소 생산성을 검토하였다. 사용된 섬유소 폐기물은 폐야채와 과일껍질을 이용하였으며, 대조실험을 위해 Polygalacturonic acid를 이용하였다. 효소생산용 액체배지에 기질 1%(w/v)를 첨가하였고, 배양은 500ml baffled 플라스크에 100ml 배지(pH 8.5)를 넣고, 25°C, 100rpm, 3일간 배양하였다. 배양후 효소활성도를 측정하여 폐야채와 과일껍질의 효소생산성을 검토하였다.

### 4. Enzymatic hydrolysis of fruit waste by pectinase

분리균주 KL34를 polygalacturonic acid가 포함된 효소생산배지에서 배양하여 얻은 배양상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소학적 가수분해를 위해 건조된 과일 껍질과 폐야채를 기질로 사용하였으며, 반응조건은 효소액(pectinase 활성: 5.0U/ml) 50ml에 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 9.0) 50ml을 더하고, 각각의 기질을 10%(w/v) 농도로 첨가하여 40°C, 100rpm에서 48시간 반응시켰다. 생성된 환원당은 DNS 방법으로 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Production of pectinase using cellulosic wastes

폐야채와 과일껍질 등의 섬유소폐기물을 탄소원으로 이용한 효소 생산성을 검토한 결과 다양한 과일껍질가운데 사과 껍질을 기질로 사용했을 때 3.8U/ml의 효소를 얻을 수 있었다. 이에 비해 폐야채 경우에는 효소 생산이 거의 이루어지지 않았다. 과일이 숙성될수록 증가하는 에스테르화가 더 된 pectin질에서 효소 생산성이 더 높은 것으로 보아, 녹색 채소를 기질로 하여 효소를 생산하기는 어려울 것으로 판단 되었다. 또한 여러 가지 과일 껍질 가운데 다른 것에 비해 사과 껍질에서 가장 높은 효소 활성을 나타낸 것은 성숙한 과일껍질을 사용했기 때문으로 판단된다.

과일껍질의 종류와 농도에 따른 효소생산성을 비교한 결과, 과일껍질 기질 농도 1, 2, 3%(w/v)으로 변화시켰을 때, 사과 껍질의 농도 1%에서 효과적인 효소 생산을 하는 것으로 조사되었다.

### 2. Enzymatic hydrolysis of fruit waste by pectinase

폐야채와 과일껍질(건조상태)을 이용하여, 각각의 기질 10%(w/v)농도에서 48시간 가수분해시킨 결과, 분리균 KL34의 폐야채와 과일껍질(사과껍질)에 대한 당화율은 각각 1.5%와 7.1%였으며, 이때 생성된 환원당은 폐야채와 과일껍질(사과껍질)이 각각 2.03g/L, 9.15g/L였다. 폐야채에 비해 과일껍질(사과껍질)을 기질로 사용했을 때의 환원당이 약 4.5배 높았으며, 과일껍질 가운데서는 사과 껍질을 사용했을 때 당화율이 가장 좋은 것으로 나타났다.

Pectinase 활성 5U/ml을 나타내는 효소액과 기질 농도를 5~20%까지 변화시킨 사과껍질 건조기질을 이용하여 가수분해를 수행한 결과 4.5~16.6g/L의 환원당을 얻을 수 있었고, 당화율은 6.8~7.5%였다. 기질농도가 10%일 때 당화율은 7.5%로 가장 효과적이었으며, 이때 생성된 환원당은 10.0g/L였다. 그러나 사과 껍질 농도가 20%일 때 환원당은 16.6g/L로 환원당 값은 높지만, 당화율은 6.2%로 낮아져 10%이상의 기질농도에서는 당화율이 감소함을 알 수 있었다.

### 3. Utilization of pectinase produced from KL34

음식물 폐기물 100g(함수율 80%)에 KL34의 배양상등액 100ml를 혼합하여 효소 최적반응조건(40℃, pH 9.0)에서 당화실험을 수행한 결과 생산된 환원당은 1.7g/L였으며, 상업적으로 사용되는 cellulase(sigma. co. let.)만을 사용한 당화액에서는

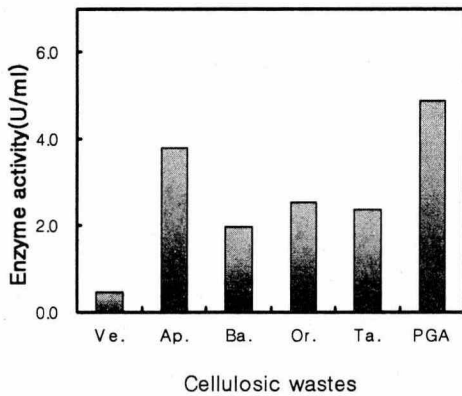
7.6g/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 그러나 KL34의 배양 상등액과 cellulase를 함께 사용한 당화액에서는 12.7g/L의 환원당을 얻어(당화율 63%), 복합기질로 구성되어 있는 음식물 쓰레기에 두가지 효소를 함께 사용함으로써 음식물 쓰레기의 당화율을 더욱 증가시킬 수 있었다.

### 요 약

토양에서 분리된 pectinase 생산균 strain KL34를 이용하여 폐섬유소의 효소학적 당화에 관한 연구를 수행하였다. 섬유소폐기물을 이용한 효소생산에서 폐야채보다는 과일껍질을 기질로 사용했을 때 높은 효소활성을 보여주었으며, 과일껍질 1.0%(w/v)를 기질로 사용했을 때 3.8U/ml의 pectinase활성을 얻을 수 있었다. 폐야채와 과일껍질을 기질로 사용하고, 5U/ml의 pectinase 활성을 가지는 배양 상등액을 사용하여 효소학적 당화를 수행한 결과 사과껍질 10%를 기질로 사용했을 때 7.1%의 당화율을 얻을 수 있었으며, 이때 생산된 환원당은 9.5g/L였다. 또한 생산된 효소액을 음식물 쓰레기의 당화에 적용하여 pectinase의 사용 가능성을 검토한 결과 KL34의 배양 상등액과 cellulase를 함께 사용한 당화액에서는 12.7g/L의 환원당을 얻어, cellulase만을 사용했을 때 보다 1.6배의 당화효율을 얻을 수 있었다.

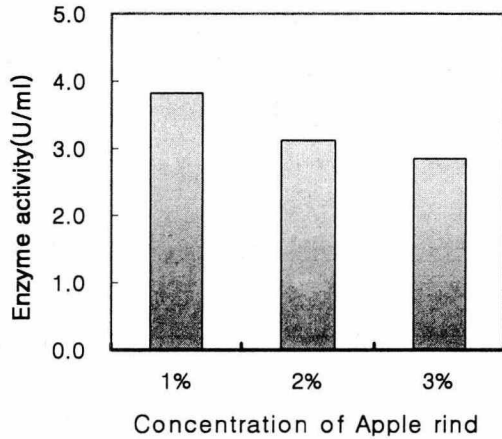
### References

1. Lucian Biffi Crotti, V. A. P. Jobor, et. al. (1999), "Studies of pectic enzymes produce by Talaromyces flavus in submerged and soild substrate cultures", *J. Basic Microbiology* **39**(4), 227-235.
2. G. S. N. Naidu, T. Panda (1998), "Production of pectolytic enzymes-a review", *Bioprocess Engineering* **19**, 355-361.
3. Jeon Beong-Sam, J. Y. Cha, J. Y. Song, G. D. Lee, B. K. Kim, Y. C. Lee (2000), "Isolation and characterization of pectinase producing Bacillus sp. BS-214", *Korean J. Life Science* **10**(1), 101-106.
4. Kim Jong-Chon, Hwa-young Kim and Yong-Jin Choi (1998), "Production and charaterization of acid-stable pectin lyase from Bacillus sp. PN33", *J. Microbiology and Biotechnology* **8**(4), 353-360.

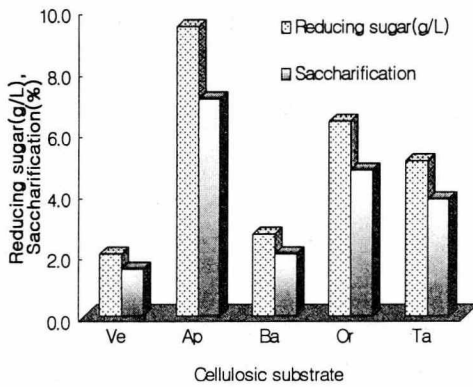


**Fig.1. Effect of cellulosic wastes on the pectinase production.**

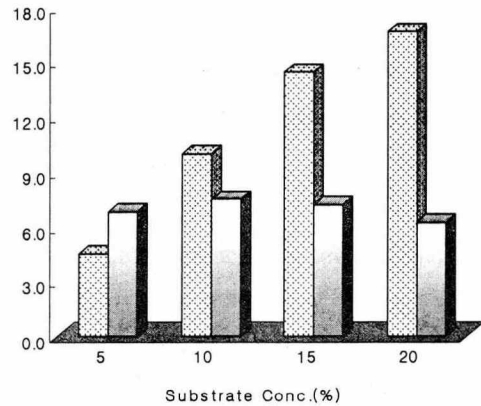
Ve : vegetable waste, Ap : Apple rind, Ba : Banana peel, Or : orange peel, Ta:Tangerine peel, PGA: Polygalacturonic acid



**Fig. 2. Effect of apple rind concentrations on the pectinase production.**



**Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials(10%, w/v) by pectinase from strain KL34.**



**Fig. 4. Enzymatic hydrolysis at various concentrations of apple rind by pectinase from strain KL34.**