

갈색부후균의 효소시스템을 이용한 목질계 바이오매스의 효소당화

윤 정준¹⁾, 차 창준²⁾, 김 영숙³⁾, 김 영균⁴⁾

Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass by enzyme system of brown-rot fungi

Jeong-Jun Yoon, Chang-Jun Cha, Yeong-Suk Kim, Young-Kyoon Kim

Key words : Brown-rot fungi, lignocellulosic biomass, cellulase, enzymatic saccharification

Abstract : Recently the production of ethanol from lignocellulosics has received much attention due to immense potential for conversion of renewable biomaterials into biofuels and chemicals. *Fomitopsis palustris* causes a typical brown-rot and is unusual in that it rapidly depolymerize the cellulose in wood without removing the surrounding lignin that normally prevents microbial attack. This study demonstrated that the brown rot basidiomycete *F. palustris* was able to degrade crystalline cellulose. This fungus could also produce the three major cellulases (BGL, EXG and EG) when the cells were grown on 2.0% Avicel. The fungus was able to degrade both the crystalline and amorphous forms of cellulose from woody biomasses. Moreover, we found that this fungus has the processive EG like CBH which are able to degrade the crystalline region of cellulose. To establish the cellulase system in relation with degradation of woody biomass, we performed that purification, characterization and molecular cloning of a BGL, EGs and GLA from *F. palustris* grown on Avicel.

subscrip

BGL : β -glucosidase
EG : endoglucanase
EXG : exoglucanase
HR-XRD : high resolution X-ray diffractometry
PDA : potato dextrose agar
PDB : potato dextrose broth
TLC : thin-layer chromatography

이용 바이오매스 중 약90%이상이 목질계 바이오매스이다. 따라서 이들을 활용할 수 있는 기술을 개발한다면 상당량의 바이오에탄올을 생산할 수 있다. 비록 목질계 바이오매스를 생물학적 처리 방법을 이용하여 에너지로 변환시키기에는 구조적으로 어려운 점이 있지만, 장기적인 관점에서 보면 가장 경제적이며 친환경적인 방법으로서 생물학적 변화 기술이라고 생각한다.

1. 서론

전 세계적으로 화석연료의 과다사용으로 인한 환경오염 및 온난화 문제를 해결하기 위하여 친환경적 신재생에너지의 개발이 시급한 실정이다. 다양한 신재생에너지 중에서 바이오매스로부터 생산되는 바이오에너지는 화석연료에 비해 환경오염물질의 배출이 적어 현대사회의 환경 친화적인 에너지로 주목받고 있으므로 이들의 활용을 증대할 필요성이 있다. 국내에서 활용 가능한 미

- 1) 건국대학교 생명공학과 BK21 응용생명공학사업단
E-mail : jjyoon@konkuk.ac.kr
Tel : (02)2049-6180 Fax : (02)444-6176
- 2) 중앙대학교 산업과학대학 생명공학과
E-mail : cjcha@cau.ac.kr
Tel : (02)910-4822 Fax : (02)910-4809
- 3) 국민대학교 삼림과학대학 임산공학과
E-mail : yskim@kookmin.ac.kr
Tel : (02)910-4822 Fax : (02)910-4809
- 4) 국민대학교 삼림과학대학 임산공학과
E-mail : ykkim@kookmin.ac.kr
Tel : (02)910-4825 Fax : (02)910-4809

목재부후균은 지구상에 다량으로 존재하는 목질계 바이오매스를 완전 분해할 수 있는 유일한 미생물로서 분해메카니즘에 관한 연구는 상당히 중요하다. 그 중에서도 갈색부후균은 목질의 섬유소를 분해초기에 빠른 속도로 분해하는 능력을 갖고 있으나, 백색부후균과는 대조적으로 리그닌을 거의 분해하지 않는다.¹⁾ 본 연구는 목질성분인 cellulose 및 hemicellulose를 선택적으로 분해하는 갈색부후균이 생산하는 효소시스템을 밝혀내고, 목질계 바이오매스의 효율적인 당화시스템의 개발을 목표로 한다.

2. 재료 및 실험방법

2.1 재료

본 연구에서 사용한 공시균으로는 *Fomitopsis palustris* FFPRI0507를 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 배양

1) 액체배양계
PDA plate에서 7일간 전배양한 *F. palustris*의 균사체를 PDB액체배지에 접종하여 27°C에서 6일간 진탕배양을 수행하였다. 본배양은 Yoon 등이 보고한 것과 동일한 방법으로 수행하였다.²⁾

2) 목편배양계

삼나무 목편(2 x 2 x 1 cm)에 공시균을 접종하여 27°C에서 12주간 정치배양을 수행하였다.

2.2.2 조효소액 추출 및 효소측정

1) 조효소액 추출

집중 후 14일 동안 배양액을 filter paper로 여과시킨 후, 여과액을 조효소액으로 사용하였다. 목편배양계의 경우에는 균사체를 제거한 후, 목편으로부터 균체 외 단백질을 추출하였다.

2) 효소측정 및 SDS-PAGE

조효소액의 SDS-PAGE분석 및 Cellulose 생분해 관련 효소의 활성 변화를 측정하였다.²⁾

2.2.3 XRD 분석

*F. palustris*에 의해 분해된 목편 및 Avicel의 결정화도 변화를 HR-XRD를 이용하여 측정하였고, 결정화도는 Segal법에 의해 구했다.³⁾

2.2.4 효소정제

효소정제를 위하여 10L Bio-reactor를 이용하여 위와 동일한 방법으로 배양하였다. BGL 및 EG의 정제는 ion-exchange column, gel filtration 및 hydrophobic column을 사용하여 FPLC 및 HPLC system을 이용하여 수행하였다.

2.2.5 아미노산 서열 분석

정제효소의 N-terminal 및 internal amino acid sequences는 한국기초과학연구소(서울분원)에 의뢰하여 분석하였다. 각각의 아미노산 서열의 BLAST검색은 NCBI 및 JGI의 genome database를 이용하여 동정하였다.

2.2.6 효소당화실험

조효소액 및 정제효소를 목질계 바이오매스 및 결정형 셀룰로오스(Avicel)에 반응시킨 후, 분해산물인 유리당의 분석 및 환원당량을 HPLC 및 TLC를 이용하여 측정하였다.

3. 결과

3.1 갈색부후균의 목질계 바이오매스 생분해 능력

갈색부후균 *F. palustris*의 목질계 바이오매스의 분해능력을 조사하기 위하여 침엽수재와 활엽수재의 목편배양을 수행하였다. 대조균으로는 백색부후균인 *Trametes versicolor*를 사용하였다. 그 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 또한 분해 목편의 셀룰로오스 결정화도의 변화를 조사하기 위하여 XRD를 이용하여 배양12주의 목편의 결정화도를 Control과 비교한 결과 상대결정화도가 48.9% 감소 9.1%이하로 큰 폭으로 감소하였음을 확인하였다.⁴⁾

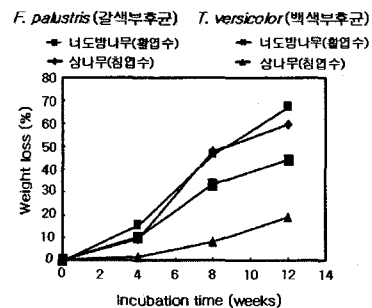


Fig. 1 Changes in weight loss of woody blocks decayed by *F. palustris* and *T. versicolor*

또한 본 균이 폐목질계 바이오매스를 분해하는 과정 중에 생산하는 3종류의 주요 cellulases (BGL, EG, EXG)의 효소활성을 측정하였다(Table 1). 특히, 흥미로운 점은 본 균과 같은 갈색부후균은 Avicel를 분해하는 효소가 결손되어 있기 때문에 결정형 셀룰로오스를 분해하지 못하다는 연구보고가 일반적이었다.⁵⁾ 그러나, Table 1에서도 제시하고 있듯이 cellulose의 결정영역 분해효소인 CBH의 효소활성을 여러 종류의 폐목질계 바이오매스 분해 과정 중에 생산된 균체 외 배양액으로부터 효소활성을 확인하였다. 본 연구

는 갈색부후균이 셀룰로오스의 결정영역을 분해하는 효소시스템을 갖고 있다는 점을 처음으로 밝혀냈다.

Table 1 Production of BGL, EG and EXG(CBH) from *F. palustris* growth on different carbon sources

Carbon source (2%, w/vol)	Enzyme activity			Protein concentration (mg/ml)
	EG* ($\Delta A_{230}/\text{min}$)	CBH (U)	BGL (U)	
Avicel	1.50 \pm 0.12	23.3 \pm 0.5	69.8 \pm 0.1	0.31
Corrugated cardboard	0.077 \pm 0.004	12.9 \pm 0.9	117 \pm 5.9	0.49
Cotton	2.46 \pm 0.22*	10.8 \pm 2.6	20.2 \pm 0.2	0.35
Glucose				
Waste paper	0.044 \pm 0.006	26 \pm 3.2	356 \pm 12.6	0.16

3.2 효소정제 및 동정

*F. palustris*가 생산하는 cellulase의 효소학적 특성 및 유전자cloning을 수행하기 위하여 효소정제를 수행하였다. 정제한 결과를 Fig. 2에 제시하였다. 본 실험에서 BGL, 3개의 EGs (EG47, EG43, EG35) 그리고 1개의 putative CBH를 정제하였고, 특히 셀룰로오스 배양계에 cellobiose의 첨가에 의해 유도되는 glucoamylase (GHF15)를 밝혀내어, 정제 및 cDNA cloning을 수행하여 그 결과를 보고하였다.⁶⁾ 정제효소의 아미노산 서열을 분석하여 Genome database에 BLAST검색을 수행하여 정제효소를 동정하였다. EG47의 부분 아미노산 서열은 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*의 EG1(Cel5)와 100%의 상동성을 갖고 있고, EG43을 Xyl10(GHF 10)과 높은 상동성을 시사했다.

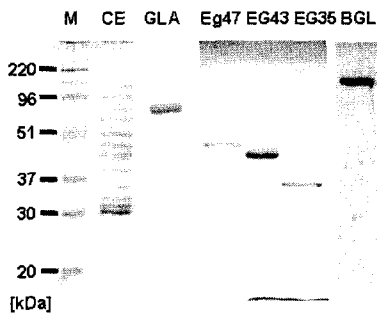


Fig. 2 SDS-PAGE of the purified extracellular cellulases and glucoamylase (GLA) from *F. palustris*.

3.4 목질계 바이오매스의 효소당화

먼저 *F. palustris*의 균체 외 조효소액을 활엽수인 현사시(*Populus x albaglandulosa*)와 침엽수인 리기다소나무(*Pinus rigida*) 목분에 반응시켜 당화수율 및 유리당의 분석을 수행하였다 (Table 2). 그 결과, glucose 이외에도 hemicellulose 구성당인 단당류가 검출되었다. 현사

시와 리기다소나무의 효소당화율은 각각 8.7%와 5.2%였다. 또한, 정제된 효소액을 Avicel에 반응시킨 후 가수분해 산물인 환원당량을 측정된 결과, 상당히 흥미로운 점을 발견하였다. 즉, Avicel의 가수분해할 수 있는 효소는 CBH만 존재하는 것이 아니라, Avicel을 가수분해하는 processive EG가 존재한다는 점을 밝혀냈다. Fig. 2에 제시한 결과에서 보여진 EG47과 EG35는 Avicel의 가수분해 산물로서 glucose 및 cellobiose를 생산하였다 (Fig. 3). 따라서 셀룰로오스의 결정영역을 분해하는 processive EGs임이 확인되었다. 그러나, EG35의 경우에는 아미노산 서열분석을 Genome database에 BLAST검색을 수행하였지만, 일치하는 단백질이 존재하지 않았다. 따라서, EG35가 어떤 성질을 갖고 있는 단백질인가를 밝혀내기 위하여 현재 cDNA cloning을 수행 중에 있다.

Table 2 Analysis of enzymatic saccharification of lignocellulosic biomasses by extracellular enzymes of *F. palustris*

Substrates	Amount (mg)					Total sugars (mg)	w/w (%)
	Ara	Gal	Glu	Man	Xyl		
<i>Populus x albaglandulosa</i>							
Control	0	0	0	0	0	0	0
Sample	0.6	1.4	39.9	11.4	34.1	87.2	8.7
<i>Pinus rigida</i>							
Control	0	0	0	0	0	0	0
Sample	1.8	2.4	21.0	20.4	6.5	52.1	5.2

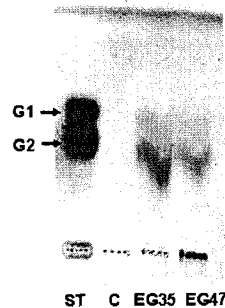


Fig. 3 TLC of the reaction products from enzymatic activity. ST: standard marker (G1: glucose, G2: cellobiose), C: control

4. 결론

갈색부후균은 목질성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 선택적이며 빠른 속도로 분해한다. 또한 갈색부후균은 셀룰로오스의 결정영역을 분해하지 못한다는 연구보고가 일반적이었으나, 본 연구에 의해 갈색부후균이 결정영역을 분해할 수 있다는 결과를 얻었다. 또한, 결정셀룰로오스 분해효소인 CBH 뿐만 아니라 processive EG를 생산한다는 점을 밝혀냈다. 갈색부후균의 효소당화시스템을 산업화에 적용하기 위해서는 생물공학적인

방법을 이용하여 효소의 개량 및 대량생산 기술의 확보가 절대적으로 필요하다. 현재 본 연구진은 목질계 바이오매스를 효율적으로 당화할 수 있는 기술을 바이오에너지산업에 적용시키기 위하여 cellulase의 screening system을 확립하여 고역가의 cellulases를 생산하기 위한 연구를 수행 중에 있다.

후 기

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 프로그램의 일환으로 수행되었습니다.

References

- [1] Eriksson, K.-E. L., Blanchette, R. A. & Ander, P., 1990, "Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Component," Springer-Verlag, Berlin.
- [2] Yoon, J. -J. & Kim, Y. -K., 2005, "Degradation of Crystalline Cellulose by the Brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*," J. of Microbiol., Vol. 43, pp. 487-492.
- [3] Segal, L., Creely, J. J., Martin, Jr., A. E. & Conrad, C. M., 1959, "An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-ray Diffractometer," Text. Res. J., pp. 786-794.
- [4] Yoon, J. J., Kim, Y. -S. and Kim, Y. -K., 2006, "The Cellulolytic System of the Brown-rot Fungus *Fomitopsis palustris*-Purification and Characterization of β -Glucosidase and Endo-glucanase-" pp. 249, JWRS.
- [5] Ishihara, M & Shimizu, K., 1984, "Purification and Properties of Two Extracellular Endo-cellulases from the Brown-rotting Fungus *Tyromyces palustris*," Mokkuzai Gakkaishi, Vol. 30, pp. 79-87.
- [6] Yoon, J. -J., Igarashi, K., Kajisa, T. and Samejima, M., 2006, "Purification, Identification and Molecular Cloning of Glycoside Hydrolase Family 15 Glucoamylase from the Brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*," FEMS Microbiol. Lett., Vol. 259, pp. 288-294.