

KMU001 조효소에 의한 목질계 바이오매스, 벼짚의 효소당화성에 관한 연구

*김 영숙¹⁾, 이 영민¹⁾, 차 창준²⁾, 윤 정준³⁾

Enzymatic saccharification of rice straw, a lignocellulosic biomass by the extracellular enzyme from *KMU001*

*Yeong-Suk Kim¹⁾, Young-Min Lee¹⁾, Chang-Jun Cha²⁾, Jeung-Jun Yoon³⁾

Key words : Saccharification(당화), Lignocellulosic biomass(목질계바이오매스), Rice-straw(벼짚), Enzyme(효소)

Abstract : This study shows that lignocellulosic biomass saccharification work has been carried out with rice-straw by the extracellular enzyme from *KMU001*, and the enzymes produced in 5%(w/v) wood biomass were characterized by protein and various enzyme activity measurements. Several cellulases such as *Endoglucanase(EG)*, *β -D-1,4-Glucosidase(BGL)*, *Cellobiohydrolase(CBH)*, and *β -D-1,4-Xylanase (BXL)* were detected. Saccharification of rice-straw by the enzyme yielded about 233mg/g of glucose after 48hrs.

1. 서론

기후변화협약 이행에 따른 대체에너지 사용확대 방안으로 미국, EU 등 선진국은 바이오에탄올 생산능력을 확장하여 2020~2030년까지 수송용 연료의 20~30%를 화석연료에서 바이오에탄올로 대체하겠다는 목표로 에탄올 보급 인프라 구축 및 생산 비용절감에 집중적인 노력을 기울이고 있다. 특히 가까운 일본은 2008~2013년에 휘발유 수요의 절반에 바이오 에탄올 3%혼입을 시도하고, 2030년에는 전 수송용 휘발유에 10% 에탄올 혼입을 목표로 에탄올 보급 인프라에 3500억엔 이상 투자를 계획하고 있다. 그러나 현재까지의 바이오에탄올 기술은 식량바이오매스인 옥수수나 사탕수수과 같은 전분계 곡물을 원료로 해왔고 생산 기술이 그런 원료에 적합하게 개발되어 왔다. 그러나 전분계 원료의 경우 식량바이오매스로도 활용되어 식량시장과의 마찰로 가격인상 등 많은 사회적 문제가 야기되고 있다. 이 같은 환경에서 차세대 바이오에탄올 원료로 목질계바이오매스에 주목하고 이들 원료를 이용한 에탄올 생산기술개발에 주력하고 있는 상황이다.

그러나 목질계 바이오매스의 경우, cellulose, hemicellulose, lignin을 주성분으로 매우 견고하게 결합되어 있어 에탄올 생산을 위해서는 우선 세포벽을 분해(전처리)하여 단당류로 만들고(당화), 이들 당류(옥탄당, 오탄당)를 발효시키는 과정이 필요하므로 전분계 에탄올에 비해 복잡한 생

산 공정과 비용이 소요되므로 상용화에 많은 어려움을 가지고 있다.

목질 바이오매스의 에너지 전환공정은 주로 산(acid) 및 유기용매 등을 이용한 직접당화를 시행하기도 하지만 이 경우 원료투입대비 에너지 전환과 기타 성분 회수율이 저조하거나 시설부식 등의 결점이 있고, 전처리 공정을 거치는 경우에는 소요에너지사용이 높아져 또 다른 환경오염의 원인이 되거나 비용 상승으로 이어지는 문제점이 있는 것이 사실이다. 따라서 환경적 문제를 최소화하면서 투입되는 바이오매스의 에너지 전환 및 부산물 활용율의 극대화 할 수 있는 에너지 전환기술이 요구된다고 할 수 있다. 본 연구에서는 목질계 바이오매스의 에탄올화 원료로 농림 폐기물인 벼짚과 목재를 대상으로 전처리법 당화에 cellulose 분해력이 큰 목재 부후균의 균체 외 효소를 적용하여 단당류 생산의 가능성을 시험하고 그 결과를 보고한다.

1) Department of Forest Products, College of Forest Science, Kookmin University, Jeongneungdong, Seongbuk-gu, Seoul, 136-702, Korea

2) Environment & Energy Division, Korea Institute of Industrial Technology, Cheonan, Chungnam 330-825, Korea.

3) Department of Biotechnology and BET Institute, College of Industrial Science, Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi-do 456-756, Korea

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

2.1.1 공시재료 준비

목질계바이오매스로서 벗짚을 이용하였고, 비교 목질바이오매스로 목재를 이용하였다. 공시벗짚은 전남 장성군의 농가에서 구입한 벗짚을 건조, 분쇄하여 시험에 이용하였다. 공시목재는 강원도 홍천군 일대에서 벌채된 국산 낙엽송 (*Larix leptolepsis*), 리기다소나무(*Pinus rigida*), 잣나무(*Pinus koraiensis*) 및 소나무(*Pinus densiflora*)를 대상으로 각 수종별로 심재와 변재로 구분하여 willy mill로 분쇄한 목분을 혼합하여 사용하였다. 공시바이오매스의 입자는 목재와 벗짚 공히 80-100mesh로 조정된 것을 이용하였다.

2.1.2 공시부후균 준비

1) 공시균

공시균은 목재부후균으로서 *AMU001* 을 사용하였다.

2) 배양

가. 전배양: PDA 배지에서 배양된 균사체를 PDB배지 100ml에 접종한 후, 28℃에서 진탕배양(100rpm)한 것을 본배양에 이용하였다.

나. 본배양: glucose 0.5%, peptone 0.8%, Yeast extract 0.2%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, Thiamin HCl 5ppm을 포함한 액체배지(pH5.0)을 사용하였다. 조제된 액체배지에 심재율이 높은 낙엽송은 모두 심재를, 변재율이 높은 리기다소나무는 모두 변재를 취하고, 다른 수종들은 심변재를 각각 1:1 혼합한 것을 5%(W/V)로 조정하였다. 전배양액 5ml을 첨가하고, 28℃에서 진탕배양(150rpm)하였다.

2.2 균체 외 효소단백질 추출

전술한 배양액을 filter paper(Adventec No. 2)로 여과시킨 후, Amicon Membrane 농축기를 사용하여 농축액을 얻고, 이를 분석용 추출물로 사용하였다.

2.3 효소활성측정 및 단백질 정량

1) β -glucosidase 측정

1.5 mL 튜브에 100 μL 1M sodium acetate buffer (pH5.0), 100 μL 10mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG, Sigma), 증류수 700 μL 와 100 μL 효소를 넣고 50℃에서 15분간 반응을 시켰다. 그 후에 100 μL 2 M Na_2CO_3 를 첨가시킨 후에 405 nm에서 β -glucosidase의 활성을 측정하였다. 효소활성단위는 일정 조건하에서 1분간 반응용액 1 mL당 p-nitrophenol 1 μmol 을 방출하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

2) *Endo- β -1,4-glucanase* 측정

Somogyi-Nelson법(Nelson, N., 1944, Somogy, M., 1952)에 따라서 5 μL 1M sodium-acetate, 5 μL 1%의 carboxymethyl cellulose(CMC), 35 μL 증류수에 5 μL 효소를 첨가시킨 후, 50℃에서 30분간 반응시켰다. 효소반응이 끝난 샘플에 구리 시약 50 μL 를 넣고 잘 혼합한 후 100℃에서 15분간 효소반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 샘플을 실온까지 냉각하였다. 50 μL Nelson 발색 시약을 첨가하여 청색으로 변색하는 것을 확인하고 1mL 증류수를 넣고 충분히 혼합하였다. 샘플을 실온에서 15분간 반응시킨 후에 660 nm흡광도를 측정한다. 다음, 검량선에 의거 효소활성을 구하였다.

3) *Cellobiohydrolase* 측정

1M CH_3COONa (pH=5) 100 μL , 10mM p-NPL (p-Nitrophenyl- β -actopyranoside) 100 μL , 효소 100 μL , 증류수 700 μL 를 혼합한 후 40℃에 30분간 반응 후 효소활성 저해제인 2M Na_2CO_3 100 μL 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 cellobiohydrolase 활성을 구했다.

4) β -1,4-xylosidase 측정

1M CH_3COONa (pH=5) 100 μL , 10mM p-NPX(p-Nitrophenyl- β -xylopyranoside) 100 μL , 효소 100 μL , 증류수 700 μL 를 혼합한 후 40℃에 15분간 반응 후 효소활성 저해제인 2M Na_2CO_3 100 μL 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 효소활성을 구하였다.

5) 단백질의 정량

배양액을 filter paper(Adventec No. 2)로 여과시킨 후, Amicon Membrane 농축기를 사용하여 농축액을 얻었다. 여기서 얻은 농축액을 분석용 추출물로 사용하였다.

단백질 정량은 Bradford 방법 (Bradford, M, 1967)에 따라 정량하였고, 다음 식에 의거하여 단백질 농도를 구하였다.

$$\text{Protein Concentration (mg/mL)} = A_{595} * 0.811 + 0.009$$

2.4 SDS-PAGE에 의한 효소패턴 분석

바이오매스별 배양에서 추출한 균체 외 효소군의 패턴 분석을 위해 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)를 12.5% 겔을 사용하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 실시하였다. 분자량 표준 단백질로 Myosin (220 kDa), β -galactosidase (115 kDa), bovine serum albumin (96kDa), ovalbumin (51kDa), carbonic anhydrase (37 kDa), soybean trypsin inhibitor (30 kDa)과 lysozyme (20 kDa)을 포함하고 있는 SDS Molecular Weight Standard Markers (Bio-Rad)를 사용하였다. 영동이 끝난 겔은 Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)으로 염색하였다. 염색된 겔을 탈색용액을 이용하여 탈색하였다.

2.5 조효소 정제 및 농축

균주에 의한 혼합목분의 생분해 과정에서 발생 가능한 균체생육 억제 물질들의 영향을 줄이기 위해 공시균주로부터 분리되는 조효소를 추출하여 당화시험에 사용하였다. 조효소 획득에 사용된 균주는 *KMU001*이었으며, 각 균주는 조효소 생산을 위해 각각 2주간 배양하였고 (glucose 0.5%, peptone 0.8%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3%, Thiamin HCl 5 ppm을 포함한 액체배지(pH5.0)), *KMU001*에 대해서는 3주간 배양하였다. 배양 후, 배양액을 거즈로 1차 걸러낸 후, filter paper(AdventecNo.2) 로 2차 여과시켰다. 그 후 효소농도를 높이기 위하여 Amicon Membrane 농축기를 사용하여 탈염·농축하여 최종 조효소 농축액을 얻었다. 그리고 효소당화에 사용하기 직전 멸균필터(0.45 μm)를 통해서 멸균을 실시하였다.

2.6 조효소의 효소활성 측정

조효소에 포함된 각종 Cellulase의 효소활성과 단백질 농도를 측정하였다. 효소활성과 단백질 농도분석은 2.3에서 서술된 방법에 준하여 실시하였다.

2.7 균주별 조효소에 의한 최적당화

조건 탐색

농축한 조효소액의 효소특성을 조사하기 위하여 효소에 대한 온도안정성과 pH안정성을 조사하였다. 먼저, 효소의 온도안정성을 조사하기 위하여 반응온도를 20 $^{\circ}\text{C}$ ~90 $^{\circ}\text{C}$ 사이에서 10 $^{\circ}\text{C}$ 간격으로 변화시켜 효소활성을 측정하였다. 또한, pH 안정성을 조사하기 위하여 반응액의 pH를 2.0~4.0(Citric Acid), 4.0~6.0 (Sodium Acetate), 6.0~8.0(Tris-HCl)사이에서 pH1.0 간격으로 변화시켜 효소활성을 측정하였다.

2.8 효소당화

2.7에서 얻어진 최적의 온도와 pH조건으로 당화적정시험을 실시하였다. 시료는 혼합목분(갯나무, 리기다소나무, 낙엽송, 소나무)과 볏짚이 사용되었으며 농도는 7.5%, 10%로 조정하여 당화시험을 실시하였다. 당화시간은 6, 12, 24, 48시간으로 하였으며, 당화조건별 당화성능을 측정하였다. 당화 샘플은 채취 후 100 $^{\circ}\text{C}$ 의 water bath에 넣어 10분간 끓여주어 반응을 정지시킨 후 당 분석에 이용하였다.

2.9 생성당 측정

효소당화가 완료된 액을 멸균필터(0.45 μm)로 여과한 후 HPLC 시스템에 주입하여 당 성분을 비교분석하였다. HPLC는 Waters 1525 및 RI detector 시스템을 사용하였고, 사용 컬럼은 Biorad제 HPX-87P컬럼을 사용하여 유속 1ml/min, 으로 하였으며, 용매는 DI water를 사용하였다. 컬럼 오븐 온도 50 $^{\circ}\text{C}$ 를 유지하였다. 시료의 주입량은 샘플당 10 μl

주입하였고, 측정하는 당은 Glucose, Arabinose, Galactose, Mannose, Xylose를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 *KMU001* 균체의 효소 패턴

목재분해균인 *KMU001*에서 분리된 균체의 효소에 구성되어 있는 효소단백질 패턴을 분석한 결과, Fig.1에 나타낸 바와 같이 다양한 종류의 효소단백질이 포함되어 있는 것으로 나타났다. Yoon et.al(2007)이 Avicel을 기질로 했을 때 갈색부후균에서 분리된 Endo-형과 Exo-형의 cellulose분해패턴을 동시에 나타내는 Processive Endoglucanase로 밝혀진 35kDa과 47kDa의 효소가 볏짚에서도 나타났다. 또한 갈색부후균인 *Gloeophyllum trabeum*이 분비하는 균체 외 효소로서 Cohen et.al(2005)에 의해 밝혀진 42kDa의 Processive Endoglucanase가 역시 본 연구의 볏짚에서도 나타났다. 또한 약 26kDa과 108.5kDa부근의 Exo-형의 glucanase와 138kDa의 Beta-glucosidase로 추정되는 효소단백질이 분리된 것으로 밝혀졌다.

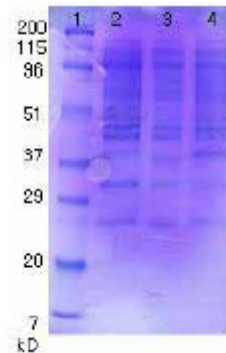


Fig. 1 SDS-PAGE of enzyme from *KMU001*, 1:standard, 2: rice straw 4W, 3: rice straw 8W, 4: rice straw 12W

3.2 *KMU001* 조효소의 주요 효소 활성

볶짚 바이오매스를 기질로 액체배양했을 때 공시부후균으로부터 분리된 조효소로부터 각종 cellulase의 효소활성을 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에 제시된 바와 같이, *KMU001* 조효소 내의 주요 cellulase활성은 Endo-glucanase와 β -glucosidase가 Cellbiohydrolase나 Xylanase에 비해 비교적 높은 것으로 나타났다.

Table 2 Specific activities of crude enzyme from *KMU001*

Fungus	specific activity(U/mg)				Protein concentration (mg/L)
	EG ¹⁾	CBH ²⁾	BGL ³⁾	BXL ⁴⁾	
<i>KMU001</i>	2.56	0.61	4.48	0.90	14.3

1)endo-β-1,4-glucanase, 2)cellobiohydrolase, 3)β-glucosidase, 4)β-1,4-xylosidase

3.3 *KMU001*의 최적 온도 및 pH

온도 및 pH변화에 따른 endo-β-1,4-glucanase(EG), cellobiohydrolase(CBH), β-glucosidase(BGL), β-1,4-xylosidase(BXL)의 활성도 변화를 측정하고 효소활성에 최적조건을 도출한 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에 나타낸 바와 같이 endo-β-1,4-glucanase(EG)와 cellobiohydrolase(CBH)는 60°C에서, β-glucosidase와 β-1,4-xylosidase(BXL)는 각각 70°C와 80°C에서 최대 활성을 보였다. 그러나 목질바이오매스 cellulose분해에 큰 역할을 할 것으로 기대되는 EG, CBH 및 BGL의 당화과정상 효소 안정성을 고려하여 최적온도를 55°C로 채택하였다. endo-β-1,4-glucanase는 pH4~6, cellobiohydrolase는 pH4~5에서, β-glucosidase은 pH4, β-1,4-xylosidase는 pH4~6의 범위에서 최대 활성을 나타냄으로서 최적 pH는 모든 효소들이 공통적으로 80%이상의 효소활성을 나타낸 약 pH4.5로 하였다.

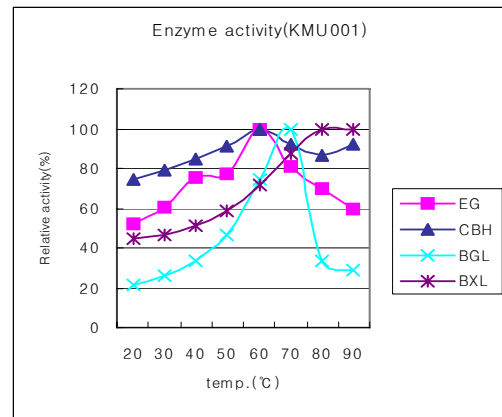


Fig. 2 Relation between enzyme activities of *KMU001* and temperature

3.4 *kmU001* 조효소에 의한 볏짚의 분해

조효소 *KMU001*을 볏짚기질에 적용하여 당화 시험을 실시한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 볏짚의 경우에는 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 *KMU001*에서는 10% 기질농도에서 7.5%보다 더 높은 당화량을 보였고, 48시간 당화시간에서 모든 당을 합한 총 당생성량이 투입된 볏짚중량을 기준으로 약 322mg/g을 나타내 혼합 목분에 비해 10배이상 높은 당화능을 보였고, glucose만으로도 약 233mg/g의 높은 생성량을 나타냈다. 또한 목질바이오매스의 경우 hemicellulose 유래 단당류는 초기 당화에서 대부분 분해되는 것으로 나타났고, glucose분해는 당화시간을 증가시킴에 따라 계속 당화량이 증가하는 것으로 나타나 당화시간을 더 연장하는 경우 더 높은 glucose 생성율을 기대할 수 있는 가능성이 있는 것으로 시사되었다. 타 목재분해균에 비해 비교적 높은 당화능을 나타내었다. *KMU001*로부터 얻은 이 같은 결과는 어떠한 전처리 없이 조효소만으로 볏짚은 직접 당화가 가능한 것을 의미하는 것으로 매우 중대한 결과로 고찰되었다.

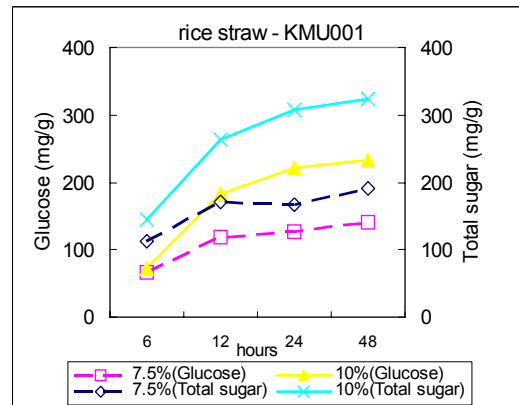


Fig. 3 Produced sugar from saccharification of rice-straw by the crude enzyme from *KMU001*

<참고문헌>

1. Yoon, J-J, C-J Cha, Y-S Kim, D-W, Son & Y-K Kim, 2007, J. Microbiol. Biotechnol. 17(5), 800-805
2. Cohen, R., M.R. Suzuki & K.E. Hemmel, 2005. Applied and Environmental Microbiology, May, 2412-2417