

# 목질분해효소에 의한 고지의 재활용 기술연구 (제1보)\*1

- 목질분해균으로부터 조효소의 단리 -

양재경<sup>2</sup> · 이증명<sup>3</sup> · 엄태진<sup>3</sup>

## Studies on the Recycling Technology of the Waste Paper with Wood Degradable Enzyme(I)\*1

- Separation of Crude Enzyme from Wood Degradable Fungi -

Jae-Kyung Yang<sup>2</sup> · Jung-Myoung Lee<sup>3</sup> and Tae-Jin Eom<sup>3</sup>

### ABSTRACT

The various culture conditions of *Trichoderma viride*(ATCC 3454) and *Phanerochaete chrysosporium*(ATCC 26921) with glucose-pepton medium, Mandels medium, YMG medium for wood degradable enzyme were examined.

Mycellium of the two species grew profusely on glucose-pepton medium. Maximum fungal growth was observed about 10days. But CMCase, FPase, laccase activity in the culture medium with glucose-pepton was not detected.

When grown in fermenter culture using Mandels medium, *Trichoderma viride* produced CMCase and FPase. Its CMCase activity was 0.15 IU/ml and FPase activity was 0.3 IU/ml within about 4-6days.

*Phanerochaete chrysosporium* grown in a YMG medium gave the best enzyme activity when they were grown under stationary culture with an atmosphere of 100% oxygen. Levels of laccase activity of 3.0 mU/L were achieved in stationary culture under 100% oxygen.

The enzyme condensation by ultrafiltration method caused a 2-fold(cellulase) and 6-fold(laccase) as compared to control activity.

\*1 본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 국내 박사후 연수 지원비에 의해 수행되었음.

\*2 경북대학교 농업과학기술연구소, Institute of Agriculture Science & Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea.

\*3 경북대학교 농과대학, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

## 1. 서론

국내의 고지회수율은 1994년에 50%를 초과 하였다<sup>1)</sup>. 현재 고지펄프의 용도는 일반신문용지에서 출발하여 인쇄용지, 필기용지등에 까지 확대시키려는 노력들이 행해지고 있지만, 이를 위해서는 고지 펄프 잉크의 완전제거, 점착물의 완전제거, 안정된 백색도, 고수율, 저비용등의 기술적 문제를 해결해야만 한다.

고지는 다른 공업원료와는 달리 한번 사용한 원료이므로 목재섬유 이외의 이물질이 많이 포함되어 있을뿐 아니라, 고지를 구성하고 있는 목재섬유는 시간에 따른 열화로 인하여 강도의 저하가 나타난다. 고지의 재활용을 최대로 하기 위해서는 고지를 구성하는 목재섬유의 물성을 향상시키는 것이 중요하다. 고지펄프의 물성저하 원인으로는 고지펄프를 구성하는 목재섬유 세포벽 내부의 형태적 변화, 화학적 조성변화, 셀룰로오스 결정구조변화등이 알려져 있다<sup>2)</sup>.

한편 고지 재활용 측면에서 개질에 의한 용도 확대는 목질자원의 효율적 이용과 산림환경의 보호라는 관점에서 매우 중요하다.

특히 고지는 천연펄프에 비해 값이 싸며, 최근 고지의 탈묵과 정선등 고지처리기술이 개선되어 고지 처리에 대한 관심과 설비투자가 증대되고 있다. 고지의 해리 및 탈묵설비에 대한 투자비도 목재펄프화 설비에 비해 적게 소요됨으로서 이에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다<sup>3)</sup>.

이와 더불어 고지원료의 재활용공정에 소요되는 기계적 에너지 및 약품의 투입량을 절감하려는 연구노력의 일환으로 자연계에 존재하는 미생물 또는 효소를 고지 재활용 공정에 적용시키려는 연구<sup>4,5)</sup>가 관심을 끌고 있다.

그러나 현재 펄프제지산업에서 자연계에 존재하는 미생물 또는 효소를 응용하는 대부분의 연구는 주로 화학펄프 및 기계펄프에 대한 연구<sup>6,7)</sup>로서 고지펄프에 관한연구는 일부에 지나지 않는다.

저자등<sup>4,5)</sup>은 목재부후균을 이용하여 신문고지 및 골판지 고지를 균체처리한 결과, 고지펄프의 백색

도 상승과 동시에 펄프의 인장강도 및 과열강도가 개선되었다고 보고한 바있으며, 또한 기존의 탈묵계 대신에 상업용 효소를 이용하여 한국산 신문고지와 미국산 신문고지를 탈묵시험한 결과, 효소탈묵펄프가 기존의 탈묵펄프보다 품질면에서 우수할뿐만 아니라 제조 경비측면에서도 유리하다고 하였다.

본 연구는 목재부후균, 특히 백색부후균은 hemicellulose등 탄수화물 분해효소뿐만 아니라 리그닌의 산화분해효소도 분비한다는 사실에 주목하여 대표적인 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*이 생산하는 효소에 의해 고지의 탈묵뿐만 아니라 고지중의 리그닌의 산화 및 개열반응에 의한 백색도 상승효과를 확인할 목적으로 *Phanerochaete chrysosporium*의 배양조건에 따른 조효소 분비특성과 조효소의 활성을 측정하여 *Trichoderma viride*의 그것과 비교하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시균주

목질분해균주로는 일본삼림총합연구소로부터 분양받아 계대배양중인 사상균에 속하는 *Trichoderma viride*, ATCC 3454(연부후균) 및 *Phanerochaete chrysosporium*, ATCC 26921(백색부후균)을 사용하였다.

### 2.2 사용배지

*Trichoderma viride* 및 *Phanerochaete chrysosporium*의 사면배양용 배지로는 FDA 배지<sup>8)</sup>를 사용하였고, *Trichoderma viride*의 액체배양용 배지로는 Glucose-Peptone 배지 및 Mandels 배지를 변형하여 사용하였으며, *Phanerochaete chrysosporium*의 액체배양용 배지로는 Glucose-Peptone 배지 및 YMG 배지를 변형하여 사용하였다. 또한 탄소원 및 질소원은 필요에 따라 변화 시켰다. 액체배지의 조성은 표 1.과 같다.

Table 1. The composition of medium for *Trichoderma viride* and *Phanerochaete chrysosporium*

Glucose-Peptone medium		Mandels medium		YMG medium	
Glucose	20.0g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.4g	Yeast extract	4.0g
Peptone	2.0g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0g	Malt extract	2.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5g	Urea	0.3g	Glucose	4.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3g	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.3g	α-cellulose	10.0g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.0mg	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.3g	Tween80	1.0ml
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.0mg	Fe <sup>2+</sup>	1.0mg	Benzyl alcohol	1.0g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0mg	Mn <sup>2+</sup>	0.5mg	Guaiacol	0.5g
Thiamine hydrochloride	3.0mg	Zn <sup>2+</sup>	0.8mg	Distilled water	1000ml
Distilled water	1000ml	Co <sup>2+</sup>	0.5mg		
		Tween 80	0.2ml		
		Polypeptone	1.0g		
		Avicell	10.0g		
		Distilled water	1000ml		

## 2.3 배양방법

공시균은 PDA배지를 사용하여 27-28℃에서 약 10일간 배양하여 접종원으로 사용하였다.

### 2.3.1 *Trichoderma viride*의 배양

플라스크 배양은 균사의 생육이 양호하다고 판단 되는 부분에서 직경 1cm disk를 접종원으로부터 채취하여 Glucose-Peptone 배지에 접종한 다음 28℃, 180rpm 조건에서 회전진탕배양 하였다.

Fermentor 배양은 균사체를 Mandels 배지에 접종한 후, 24시간 전배양(Pre-culture)하여 5 l 용 Jar fermentor(KF-5L, Korea Fermentor Co.)에 접종하여 28℃, 250rpm, 공기압 2 l/min. 조건으로 배양하였다. 이때 소포제로는 silicone oil을 사용하였다.

### 2.3.2 *Phanerochaete chrysosporium*의 배양

플라스크 배양은 균사의 생육이 양호하다고 판단 되는 부분에서 직경 1cm disk를 접종원으로부터

채취하여 Glucose-Peptone 배지에 접종한 다음 28℃, 180rpm 조건에서 회전진탕배양 하였다.

또한 YMG 배지를 사용하여 24시간 전배양한 후, 진탕효과를 파악하기위해 정치배양 및 진탕배양(180rpm)을 하였다. 그리고 정치배양에서는 산소투입효과를 검증하기위해 매일 5분동안 멸균된 산소를 투입하는 경우와 산소를 투입하지 않은 경우를 분리하여 배양하였다. 이때 배양온도는 3가지 배양조건 모두 28℃로 동일하게 하였다.

## 2.4 조효소의 단리, 군사생장량 및 기질소모량 측정

일정기간 배양된 배양액을 채취하여 미리 중량을 알고 있는 glass fiber filter(GF/A)로 여과한 후, 이 여과액을 조효소로 하였으며, 이때 여과잔사를 60℃ 감압건조기에서 48시간 건조시켜 glass fiber filter의 중량 변화로서 군사생장량을 측정하였다. 또한 조효소액은 여과분리전 즉시 pH를 측정하였으며, Somogyi-Nelson법<sup>10)</sup> 및 DNS법<sup>11)</sup>으로 조효소액중에 존재하는 glucose의 농도를 측

정하여 기질소모량으로 하였다.

## 2.5 효소활성측정

### 2.5.1 CMCase(Cx) 활성 측정

기질용액으로 0.05M citrate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 1% CMC 용액 0.5ml, 조효소 0.5ml를 혼합하여 50℃에서 30분간 반응시킨 다음, DNS 용액 3ml를 첨가하여 생성된 환원당을 550nm에서 정량하였다. 효소활성은 1분당 효소액 1ml가 1μmole의 glucose를 생성할때 1unit로 하였다.

### 2.5.2 Filter paper(FPase) 활성측정

Whatman No.1 filter paper 50mg에 0.05M citrate buffer(pH 5.0) 1ml와 배양 여과액 0.5ml를 첨가하여 50℃에서 1시간 반응시킨 다음, 생성 환원당량을 DNS법으로 측정하였다. 효소활성은 1분당 효소액 1ml가 1μmole의 glucose를 생성할때 1unit로 하였다.

### 2.5.3 Xylanase 활성 측정

기질용액으로 0.05M citrate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 0.5% xylan 용액 0.5ml, 조효소 0.5ml를 혼합하여 50℃에서 10분간 반응시킨 다음, DNS 용액 3ml를 첨가하여 생성된 환원당을 550nm에서 정량하였다. 효소활성은 1분당 효소액 1ml가 1μmole의 xylose를 생성할때 1unit로 하였다.

### 2.5.4 Laccase 활성 측정

10<sup>-3</sup>M guaiacol 수용액 0.5ml를 기질로 하여 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.0) 3ml 및 배양여과액 0.5ml를 혼합한 후, 20℃에서 5분간 반응시킨 다음 420nm에서 흡광도를 측정하였다.

이때 활성은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Laccase activity (mU/l)} = \frac{\Delta E \times 106}{\epsilon \times \Delta t \times 0.5}$$

여기에서

$\Delta E$ : Absorbance at 420nm

$\epsilon$ : 5570(molar absorbance coefficient of guaiacol)

$\Delta t$ : Reaction time(min.)

## 2.6 효소단백질 정량

조효소액중의 가용성 단백질 정량은 Hartree법<sup>12)</sup>으로 측정하였다.

## 2.7 조효소의 농축

단리된 조효소액에 황산암모늄을 90%까지 포화시킨 다음, 12시간 냉장고에 보관한 후, 10,000rpm, 30분 원심분리하였다. 침전물은 아세틸화된 cellulose 여과막을 사용하여 24시간 투석한 다음, 한외여과막으로 MWCO 10,000과 MWCO 3,000을 사용하여 농축하였다. 이때 CMCase, FPase, xylanase, laccase 활성은 가용성 단백질량을 기준으로 표시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 Glucose-peptone 배지를 사용한 *Trichoderma viride* 와 *Phanerochaete chrysosporium*의 플라스크배양 특성

*Trichoderma viride*와 *Phanerochaete chrysosporium*을 PDA배지에서 접종 시켜, 28℃에서 일주일간 생장시킨후, 균사의 생육이 양호하다고 판단되는 부분에서 1cm의 disk를 채취, glucose-pepton 액체배지를 사용하여 플라스크 진탕배양시킨 결과를 그림 1.에 나타냈다.

균체량은 배양기간 10일을 기점으로 계속적 증가를 나타내다가, 그 이후에는 감소하는 경향을 나타냈다. 배양후반기에 균체량이 감소하는 이유로는 기질의 부족으로 인한 균체의 자기분해 및 환경적

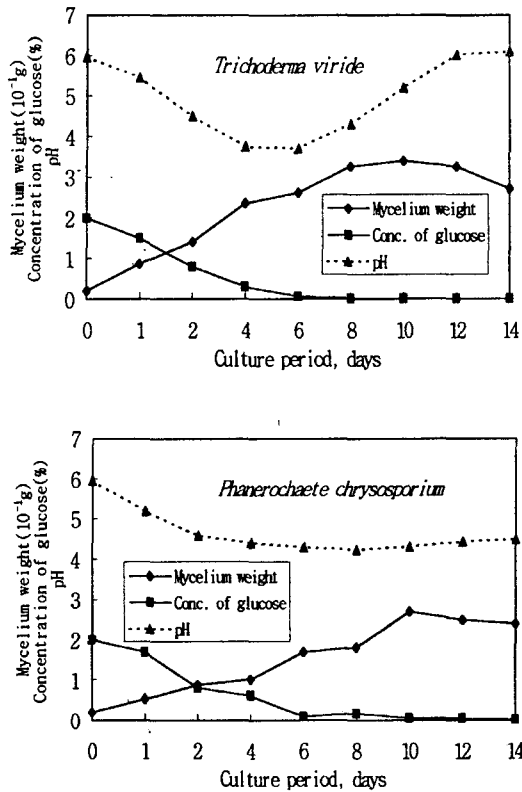


Fig. 1. Cultivation characteristics of *Trichoderma viride* and *Phanerochaete chrysosporium* on glucose-pepton medium in submerged flask culture.

응성 때문<sup>13)</sup>이라고 판단되었다.

배양액중의 기질소비량, 즉 glucose 소비량은 배양 2일까지는 급속히 증가하다가 6일 이후에는 대부분의 glucose가 소비된 것으로 나타났다. 6일 이후에는 균의 주영양원, 즉 탄소원이 완전히 흡수 소비된 것으로 판단된다.

배양액중의 pH 변화는 두가지 균에 있어서 다른 변화 형태를 나타냈다. *Trichoderma viride* 배양액중의 pH 변화는 6일 까지 계속적 감소를 나타내다가, 그 이후에는 증가하는 경향을 나타냈다. 특히 배양 말기 14일에는 최초의 pH에 접근하였다. *Trichoderma viride*의 플라스크배양 특성은 탄소원이 거의 소모되었을때, pH가 최저를 나타낸 것은 글루코오스가 산화적으로 분해되어 oxalic

acid등의 대사물이 배양액중에 축적되기 때문으로 추측된다.

*Phanerochaete chrysosporium*은 *Trichoderma viride*와 달리 배양초기에는 pH 감소를 나타내다가 8일 이후에는 pH변화가 없었다.

*Trichoderma viride*와 *Phanerochaete chrysosporium* glucose-pepton 배지상의배양액중에는 CMCCase, FPase, Laccase 활성이 배양전기간에 걸쳐서 나타내지않았다. 이것의 원인은 탄소원, 즉 기질로 glucose만을 사용하였기 때문에 cellulase등의 분해효소를 생성하지 않았기 때문으로 생각된다.

Glucose 단독의 탄소원은 균체의 성장만 촉진시키고, 효소유도에는 전혀 영향이 없다<sup>14)</sup>는 사실을 확인할 수 있었다.

일반적인 균의 성장특성은 액체배지중의 단당류가 완전히 소비되는 시점을 기준으로 효소활성이 나타나는 것으로 알려져 있지만<sup>15)</sup>, 본 연구의 경우는 glucose가 완전히 소비되었음에도 불구하고 효소활성을 보이지 않았다.

그러므로 *Trichoderma viride*와 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 CMCCase, FPase 활성을 유도하려면 탄소원으로서는 α-cellulose, cotton, avicell등과 같은 induce carbon source를 사용해야한다고 판단되었다.

### 3.2 *Trichoderma viride*로부터 CMCCase 및 FPase의 유도

균으로부터 효소활성을 유도하고자, induce carbon source로 Avicell을 사용하고, 또한 균의 대량배양을 위해 fermentor배양을 실시하였다.

균주를 PDA배지에서 접종 시킨다음, 28℃에서 일주일간 성장시킨후, 멸균수를 사용하여 균사체만을 분리하였다. 분리된 균사체는 Mandels 배지를 사용하여 전배양(pre-culture)한 후, fermentor에 투입하여 배양하였다.

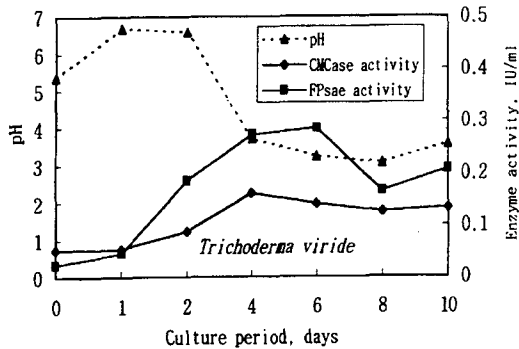


Fig. 2. Cellulase production and pH change by Mandels medium of *Trichoderma viride* in a 5 l fermentor.

그림 2에 *Trichoderma viride*의 fermentor 배양특성을 나타냈다.

배양액의 pH는 배양 8일까지 저하하다가 그 이후에는 일정하게 나타났다.

배양액에 존재하는 효소활성은 배양 4-6일 부근에서 최대로 나타났으며, 이때 FPase활성은 CMCase 활성보다 약 2배정도 높게 나타났다. 그 이후의 배양에서는 FPase활성은 급속히 감소하는 반면에 CMCase 활성은 거의 일정하게 나타났다.

본 실험에 사용된 탄소원인 Avicell은 cellulase 유도에 적합하다고 생각되었고, 배양액중의 cellulase계 효소를 효율적으로 얻기 위한 최적 배양일수는 4-6일 부근이 가장 유리하다고 판단되었다.

이러한 결과는 Schaffner등<sup>16)</sup>이 셀룰로오스를 induce carbon으로 사용하여 *Trichoderma reesei*로부터 효소를 유도한 결과, cellulase activity가 배양 4-5일에 최대를 나타냈다는 결과와 일치하고 있다.

### 3.3 Phanerochaete chrysosporium으로 부터 조효소의 유도

Kirk등<sup>17)</sup>에 의하면 *Trichoderma*가 분비하는 cellulase계 효소는 주로 endo- $\beta$ -glucanase 및  $\beta$ -glucosidase로 구성되어 있지만, *Phanerochaete*의 경우는 endo- $\beta$ -glucanase,

$\beta$ -glucosidase 이외에 exo-glucanase 및 ligninase도 분비한다고 알려져 있다. 이는 본 실험의 결과와 잘 일치되고 있으며, 특히 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*은 리그닌의 cinnamyl alcohol측쇄를 산화시켜 glycerol 구조로 전환시키는 효소를 분비한다고 알려져 있다.<sup>18)</sup>

桃原郁夫<sup>19)</sup>는 배양액중의 질소원 농도가 감소함

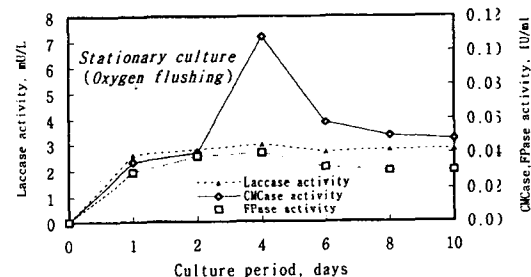
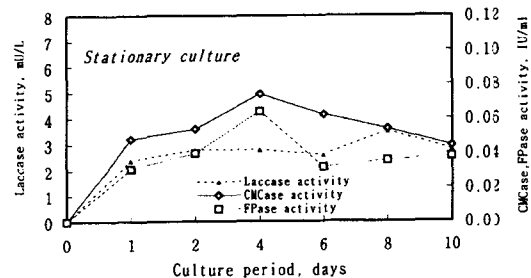
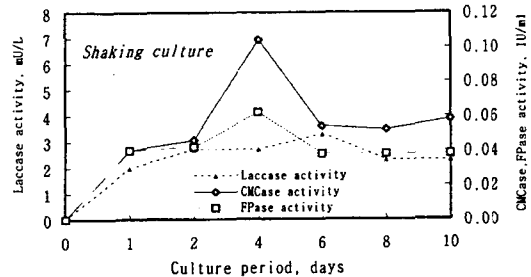


Fig. 3. Induction of laccase, CMCase and FPase by *Phanerochaete chrysosporium*.

으로서 리그닌 분해활성이 나타난다고 보고하였으며, 이때 발생하는 리그닌 분해활성은 배양조건에 따라 다르다고 하였다.

본 실험은 YMG 액체배지를 기본으로 하여 탄소

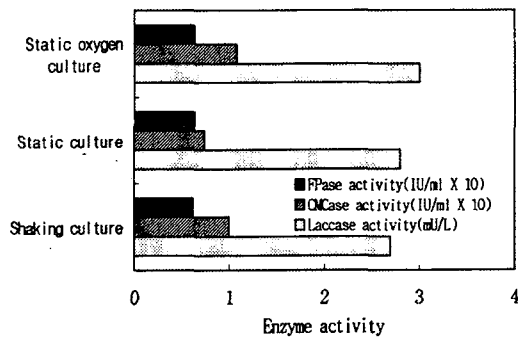


Fig. 4. Culture condition of *Phanerochaete chrysosporium* and enzyme production.

원으로 α-cellulose를 추가로 첨가하였고, 또한 laccase유도를 위해 benzyl alcohol, guaiacol을 첨가하여 *Phanerochaete chrysosporium*을 배양하였다.

*Phanerochaete chrysosporium*의 배양은 진탕배양과 정치배양으로 구분하여 실시하였으며, 또한 정치배양에서는 산소투입효과를 검증하기 위해 산소를 투입한 경우와 투입하지 않은 경우를 구분하여 배양하였다.

배양액중의 효소활성은 그림 3.과 4.에 표시하였다.

CMCase 및 FPase활성은 정치배양 및 진탕배양에서 배양 4일에 최대를 나타냈으며, 또한 CMCase 활성은 진탕배양에서 더 높게 나타났다.

이러한 결과로 볼 때, YMG 배지를 사용한 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 셀룰로오스 분해효소를 유도하기 위해서는 정치배양보다 진탕배양이 유리하다고 판단되었다.

Venkatadri등<sup>20)</sup>은 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 목질분해효소를 유도하기 위해 Tween 80의 첨가효과를 확인하는 연구를 통하여 진탕배양이 정치배양보다 유리하다고 하였으며, 이는 본 연구결과와 유사한 경향을 나타냈다.

정치배양에 있어서 산소투입에 대한 효소유도 효과는 산소를 투입하는 것이 유리하다고 판단되었다. 합성된 <sup>14</sup>C-lignin을 사용하여 *Phanerochaete chrysosporium*을 배양한 결

과, 충분한 산소의 공급이 리그닌 분해 활성을 촉진시킨다는 Kirk의 연구보고<sup>21)</sup>와 일치하고 있다.

본 실험에서 실시한 *Phanerochaete chrysosporium*의 3가지 배양방법을 검토해 볼 때, 배양 4일에서 각 효소의 활성이 거의 최대에 도달하였으며, 이때 효소유도를 위한 최적의 배양방법은 산소를 투입한 정치배양이 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

### 3. 4 *Trichoderma viride* 및 *Phanerochaete chrysosporium* 배양액으로부터 조효소의 농축

4일간 fermentor 배양한 *Trichoderma viride* 배양액 및 산소투입한 정치배양된 *Phanerochaete chrysosporium*을 황산암모늄으로 포화시키고, 투석한 다음 한외여과막을 사용하여 조효소를 단리, 농축하였다. 이때 농축된 조효소의 단백질 함량 및 각 효소활성을 표 2.에 나타냈다.

*Trichoderma viride*의 조효소액은 Molecular weight cut-off(MWCO) 10,000으로 여과했을 때 단백질 함량을 기준으로 약 7배 농축할 수 있었으며, 이때 효소활성은 약 1.5 - 2배 정도 상승되었다.

*Phanerochaete chrysosporium* 조효소액을 MWCO 10,000과 MWCO 3,000으로 각각 여과했을 때, 농축액중의 단백질 함량은 큰 차이를 나타내지 않았다. 농축후 CMCase, FPase 및 xylanase 활성은 약 2배 상승되었지만, laccase 활성은 6배 이상 상승되었다.

*Phanerochaete chrysosporium* 조효소 농축 있어서, 한외 여과막의 투과분자량 크기가 작을수록 xylanase 및 laccase 활성을 나타내는 효소 단백질 농축에 유리하다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 xylanase 및 laccase 효소단백질의 분자량은 cellulase계 효소단백질보다 작거나, 보다 구형에 가깝다<sup>22)</sup>는 사실을 추정할 수 있었다.

Table 2. Enzyme concentration by ammonium sulfate and ultrafiltration membrane

Wood rot fungus	Step	Protein yield(%)	Specific activity			
			CMCase (IU/mg · protein)	Fpase (IU/mg · protein)	Xylanase (IU/mg · protein)	Laccase (mU/g · protein)
<i>Trichoderma viride</i>	Crude enzyme	100.0	1.31	1.10	10.98	-
	MWCO 10,000	15.8	2.76	1.87	16.33	-
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Crude enzyme	100.0	0.04	0.03	0.08	0.74
	MWCO 10,000	8.1	0.10	0.07	0.13	4.22
	MWCO 3,000	8.3	0.10	0.07	0.18	5.90

*Trichoderma viride* 및 *Phanerochaete chrysosporium* 조효소액에 있어서, 단백질 농축 정도와 효소활성 상승비율의 차이는 효소단백질과 구조단백질이 효소단리 및 농축과정에서 분자량의 차이로 인한 황산암모늄의 흡착 및 한외여과막 투과정도가 다르기 때문이라고 추측해 볼수 있으며, 이에 대해서는 차후 계속된 연구가 필요하다고 판단된다.

#### 4. 결론

본 연구는 목질분해효소에 의한 고지의 탈묵 및 개질에 관한 연구를 목적으로 *Trichoderma viride*(ATCC 3454) 및 *Phanerochaete chrysosporium*(ATCC 26921)의 배양특성 및 목질분해효소의 분비특성을 파악함과 동시에 조효소를 최대 유도할 수 있는 최적의 배양조건을 얻고자 하였다.

그 결과를 요약하면 다음과 같다.

Glucose-pepton 액체배지를 사용한 진탕배양에서 *Trichoderma viride* 및 *Phanerochaete chrysosporium*의 배양액에서는 효소활성은 나타나지 않았으며, 균체량은 배양 10일에 최대를 나타냈다. 또한 탄소원으로 사용된 glucose는 배양 6일 이전에 거의 분해 소비되었다.

Mandels 액체배지를 사용한 fermentor배양에

서 *Trichoderma viride*는 배양 4-6일부근에서 CMCase 및 FPase 활성이 최대로 나타났다. 이때 CMCase 활성은 0.15 IU/ml, FPase 활성은 0.3 IU/ml였다.

YMG 액체배지를 사용한 *Phanerochaete chrysosporium*의 배양에서는 산소를 투입한 정처배양이 효소유도에 가장 효과적이었으며, 이때 laccase의 활성은 3.0 mU/L였다.

한외여과막을 사용하여 *Trichoderma viride* 배양액중의 효소활성을 약 1.5-2배까지 농축할 수 있었다. 또한 *Phanerochaete chrysosporium* 배양액중에 존재하는 laccase의 농도를 6배이상 농축할 수 있었다.

#### 인용문헌

1. 신동소, 고지리사이클링, pp. 16-17, 서울대학교 출판부(1995).
2. 古紙再生促進センター, 古紙再生處理にかかわる基礎的技術に関する調査報告書, pp.141-149, 古紙再生促進センター(1989).
3. 신동소, 고지리사이클링, pp. 71-72, 서울대학교 출판부(1995).
4. 엄태진, 양재경, 목재부후균에 의한 재생펄프의 표백 및 개질, 펄프종이기술 25(4): 53-59(1993).



5. 嚴泰振, 吳世均, 酵素による新聞古紙の再生, 紙  
バ技協誌 45(12): 81-86(1991).
6. 橋樸郁, 本田義, 田中理恵, 住本昌之, 機械パル  
プの微生物處理に関する研究 (第1報), 紙バ技  
協誌 43(12): 84-91(1989).
7. 橋樸郁, 小柳知章, 住本昌之, 機械パルプの微生  
物處理に関する研究 (第2報), 紙バ技協誌  
44(4): 71-79(1990).
8. M. G. Paice, L. Jurasek, C. Ho, R.  
Bourbonnais and F. Archibald, Direct  
biological bleaching of hardwood kraft  
pulp with the fungus *Coriolus versicolor*,  
*Tappi* 72(5): 217-221(1989).
9. Tseaa Shambe and Onah Ejembi,  
Production of amylase and cellulase,  
*Enzyme Microb. Technol.* 9(5): 308-  
312(1987).
10. IUPAC, Measure of cellulase activity,  
pp. 60-62, IUPAC(1981).
11. 福井作, 還元糖の定量法, pp. 19-20, 生物化  
學研究會(1969).
12. E. F. Hartree, Determination of  
protein, *Analytical Biochemistry* 48:  
422-427(1972).
13. 村尾澤夫, 井基夫, 阪本禮一郎, セルラゼ, pp.  
34-48, 講談社(1987).
14. R. M. Lafferty and E. Maier, *Enzyme  
technology*, pp. 55-64, Springer -  
verlag(1983).
15. 엄태진, *Trichoderma viride* 균체의 효소로  
부터 xylanase의 정제 및 xylan의 분해, 목재  
공학 19(2): 22-29(1991).
16. D. W. Schaffner and R. T. Toledo,  
Cellulase production by *Trichoderma  
reesei* with cultured on xylose-based  
media supplemented with sorbose,  
*Biotechnology and Bioengineering* 37:  
12-16(1991).
17. Karen Kleman-Leyer, Eduardo Agosin,  
Anthony H. Conner and T. Kent Kirk,  
Changes in molecular size distribution  
of cellulose during attack by white rot  
and brown rot fungi, *Applied and  
Environmental Microbiology* 58(4): 1266-  
1270(1992).
18. Fumikai Nakatsubo, T. Kent Kirk,  
Mikio Shimada and Takayoshi Higuchi,  
Metabolism of a phenylcoumaran  
substructure lignin model compound in  
ligninolytic culture of *Phanerochaete  
chrysosporium*, *Arch. Microbiol.* 128:  
416-420(1981).
19. 桃原郁夫, 白色腐朽菌を用いたパルプ漂白廢液  
の脱色, 修士學位論文, 東京大(1988).
20. R. Venkatadri and Robert L. Irvine,  
Effect of agitation on ligninase activity  
and ligninase production by  
*Phanerochaete chrysosporium*, *Applied  
and Environmental Microbiology* 56(9):  
2684-2691(1990).
21. T. K. Kirk, E. Schultz, W. J. Connors,  
L. F. Lorenz and J. G. Zeikus, Influence  
of culture parameters on lignin  
metabolism by *Phanerochaete  
chrysosporium*, *Arch. Microbiol.* 117:  
277-285(1978).
22. 日本木材學會, 木質バイオマスの利用技術,  
pp. 19-22, 文永堂(1991).