

Trichoderma reesei를 이용한 섬유소 분해 효소의 생산에 있어서 혼합탄소원의 영향

남주현 · 구윤모 · 윤현식*
인하대학교 공과대학 생물공학과

Effects of Mixed Carbon Sources on the Production of Cellulase by *Trichoderma reesei*

Joo-Heon Nam, Yoon-Mo Koo and Hyun-Shik Yun*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT: The feasibility of enzymatic hydrolysis of cellulosic materials is dependent on the cost of cellulase, which is strongly influenced by the selection of proper carbon source in the cellulase production medium. When solka floc was used as a carbon source for the production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C-30, a maximum of 53.2 U/ml of CMCase activity (4.8 U/ml of FPase activity) was obtained with a concentration of 1% of solka floc. The cellulase activity decreased to 50% in the presence of 0.5% of glucose in the medium. The production of cellulase was considerably enhanced when solka floc and wheat bran were used together as a carbon source. A medium which contained 1% of solka floc and 3% of wheat bran yielded highest cellulase activity: CMCase activity of 76 U/ml and FPase activity of 12.5 U/ml.

KEYWORDS: Cellulase, Mixed carbon sources, *Trichoderma reesei*

지구상에 도달하는 태양에너지의 약 0.1%는 녹색식물의 광합성에 의해 고정되어 매년 1000억 톤의 식물유기화합물이 생긴다. 이 유기화합물의 약 반은 섬유소이며 나머지 반은 lignin과 hemicellulose가 반씩 차지한다(Ryu와 Mandels, 1980). 섬유소는 지구상에서 가장 풍부한 탄소원이며 연료, 식품, 화학약품 생산에 쓰이는 포도당을 섬유소의 가수분해에 의해 생산하는데 관심이 집중되어 왔다(Wyman 등, 1986; Takagi, 1987). 섬유소는 화학적 또는 생물학적 방법에 의해 가수분해될 수 있는데 화학적 방법인 산에 의한 가수분해공정은 효소를 이용한 생물학적 방법에 의한 가수분해공정에 비해 높은 온도가 요구되며 원하지 않는 부산물이 많이 생기는 단점이 있다. 섬유성 물질을 분해하는 효소는 곰팡이, 세균 및 방선균 등의 미생물로부터 얻어진다. 상업적으로 가장 효과적인 섬유소 분해효소는 *Trichoderma* sp.로부터 얻어진 효소

이며 이외에도 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes*를 이용한 효소생산에도 많은 관심이 모아지고 있다(Drauz와 Waldmann, 1995). 섬유소 분해효소를 생산하는 미생물 중에서 부식된 가죽에서 분리된 *T. reesei*에 대해 가장 많은 연구가 진행되어 왔으며, 섬유소 분해효소의 생산을 위한 배지와 배양조건의 최적화, 고수율 변이주의 개발에 대하여 연구가 집중되어 왔다(Ryu와 Mandels, 1980; Andreotti 등, 1981; Morikawa 등, 1985). 배양조건, 배양액의 회수방법, 유도물질의 농도와 형태, 조효소의 농도 및 사용기질 등이 상이하어 효소생성능과 섬유소분해능을 서로 비교하는데 문제가 있으나, *T. reesei*로부터 생산되는 섬유소 분해효소는 섬유소의 단당류와 소당류로의 전환에 있어서 가장 효과적인 효소로 알려져 있다(Mandels, 1982; Montenecourt와 Eveleigh, 1977).

미생물이 생산하는 섬유소 분해효소는 endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase 및 β -1,4-glucosidase로 구성되어 있는 복합효소이며 등전점이

*Corresponding author

비슷한 isoenzyme으로 존재하며, 특히 각 구성효소의 기질에 대한 특이성이 약간씩 상이하기 때문에 각각을 순수하게 분리하기는 상당히 어렵다 (Ghosh와 Ghosh, 1992). 일반적으로 섬유소 분해효소는 β -1,4결합을 가진 당류의 존재 하에서 유도되는 유도 효소이며 포도당과 같이 미생물이 쉽게 이용할 수 있는 기질에 대해 이화 대사산물 억제(catabolite repression)를 받고 있으며, 섬유소의 최종분해 산물인 포도당의 농도가 증가함에 따라 효소생합성이 억제되는 feedback저해 조절하에 있다.

Trichoderma sp.로부터 생산된 섬유소 분해효소는 silage공정의 속도를 증가시키는 효과가 있으며 세제 중에 첨가된 섬유소 분해효소는 직물의 색을 밝게 하며 토양입자의 제거에 효과가 있다. 그 외에 작물의 소화능을 증가시키기 위한 섬유성 물질의 전처리, 농업 및 공업폐기물의 당화 처리반응에도 이용된다(Drauz와 Waldmann, 1995). 섬유소를 효과적으로 이용하기 위해서는 많은 양의 섬유소 분해효소를 생산하여 가수분해 공정의 단가를 낮추는 것이 필요하다. 섬유소 분해효소의 생산을 유도하는데 있어서 효과적인 섬유소원의 선택은 낮은 비용으로 섬유소 분해효소를 생산하는데 있어서 가장 중요한 인자중의 하나이다. 상업적으로 이용 가능한 정제된 섬유소는 효소 생산성은 좋지만 가격이 비싼 반면 자연에서 쉽게 구할 수 있는 목질섬유소는 저가이나 가수분해의 효율이 떨어지는 단점이 있다.

본 연구에서는 *Trichoderma reesei* Rut C-30을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어서 중요한 탄소원의 영향 특히, 혼합 탄소원을 유도물질로 사용하였을 경우 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향에 대하여 플라스크 배양실험을 통하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

섬유소 분해효소의 생산을 위해 사용된 균주는 *Trichoderma reesei* Rut C-30(ATCC 26922)이다. 균주는 2% potato dextrose agar(Difco Lab.) 배지에 접종한 후 30°C에서 5일간 배양하여 4°C에

보관하여 사용하였다. 균주의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산에 사용된 배지의 조성은 섬유소 분해효소 생산의 유도를 위한 탄소원, 10 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 11.5 g/l; proteose peptone, 1.5 g/l; yeast extract, 0.2 g/l; KH_2PO_4 , 4.0 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/l; Tween-80, 1.0 g/l이다. 섬유소 분해효소 생산배지의 탄소원으로 carboxymethyl cellulose(Sigma Chemical Co.), sigmacell(Sigma Chemical Co.), lactose(Merck Co.), avicel(Fluka Co.), solka floc(Fiber sales and Development Co.), wheat bran(동아제분), straw를 사용하였다. Straw(60~80 mesh)는 2%(w/v) 수산화나트륨용액에서 24시간동안 처리 한 후 세척, 건조하여 탄소원으로 사용하였다. *Trichoderma reesei* Rut C-30은 사면배지 배양관에 증류수를 부어 포자 현탁액을 만든 후, 5 ml씩 250 ml 플라스크에 준비된 배지 100 ml에 접종하여, 온도 28°C, 초기 pH 5.5, 교반속도 200 rpm으로 10일간 배양하였다.

섬유소 분해효소 활성 측정 방법

CMCase 활성은 endo- β -1,4-glucanase의 농도를 나타낸다. 0.1 M sodium acetate 완충액(pH 5.0)에 녹여서 만든 1% CMC용액 0.5 ml에 filtering을 거친 배양액 0.5 ml를 가하였다. 50°C에서 10분간 반응시킨 후, DNS(dinitrosalicylic acid) 반응액 3 ml를 가하고 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 증류수 2 ml를 넣고 냉각시킨 후 분광광도계(Shimazu UV-1601)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 환원당의 양에 의해 효소의 활성을 측정하였다(Wood와 Bhat, 1988).

FPase 활성은 exo- β -1,4-glucanase의 농도를 나타낸다. 0.1 M sodium acetate 완충액(pH 5.0) 1 ml에 Whatman paper No. 1(지름 0.7 mm)을 0.5 mg을 넣은 후, filtering을 거친 0.5 ml의 배양액을 가하여 50°C에서 1시간동안 반응시켰다. DNS 반응액 3 ml를 가하고 끓는 물에서 5분간 가열한 후 증류수 2 ml를 넣고 냉각시킨 후, 분광광도계를 사용하여 생성된 환원당의 양에 의해 효소의 활성을 측정하였다(Wood와 Bhat, 1988).

β -Glucosidase 활성은 0.1 M sodium acetate

완충액(pH 5.0)으로 만든 1.25% cellobiose용액 1 ml에 filtering을 거친 배양액 0.5 ml를 가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후, glucose oxidase-peroxidase assay에 의해 15분 동안 생성되는 포도당의 양으로부터 효소의 활성을 측정하였다(Wood와 Bhat, 1988).

섬유소 분해효소의 활성은 1분 동안에 1 μmol 의 포도당을 생성하는 효소의 양을 1 Unit으로 정의하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 최적농도 결정

본 실험에서는 *Trichoderma reesei* Rut C-30을 이용한 섬유소 분해효소 생산에 있어서 가장 효과적인 탄소원인 solka floc을 유도물질로 사용하였다(Hendy 등, 1984; Nam, 1998). 배지 내의 solka floc의 최적농도를 결정하기 위하여 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0%(w/v)로 배지에 첨가한 후 *Trichoderma reesei* Rut C-30을 배양하였다. 섬유소 분해효소의 활성 측정을 위해 CMCase 활성, FPase 활성, β -glucosidase 활성을 측정하였으나 수행된 모든 실험에서 β -glucosidase 활성은 거의 측정이 되지 않을 정도로 낮았다. Solka floc의 농도가 1%일 때 CMCase와 FPase 활성이 모두 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 1과 Fig. 2).

Solka floc의 농도가 3%일 경우 CMCase활성과 FPase활성은 solka floc의 농도가 1% 일때의 활성의 각각 25%(12.5 U/ml)와 10%(0.4 U/ml)이었다. Solka floc의 농도가 1% 보다 높을 경우 배지의 낮은 pH가 섬유소 분해효소의 활성에 상당히 큰 영향을 주는 것으로 사료된다(Table 1). *T. viride* QM 9414의 경우 pH 2.5에서 처음 4시간동안 생산된 섬유소 분해효소의 활성의 30%를 잃고 24시간 후에는 70%를 잃는다고 보고되었다(Su, 1976).

포도당의 농도에 따른 영향

섬유소가 섬유소 분해효소에 의해 분해되는 과정에서 최종산물로 생산되는 포도당은 그 농도가 높을 경우 섬유소 분해효소의 생산을 억제하는 저해작용을 한다. 그러나 포도당이 배지에 탄소원으로

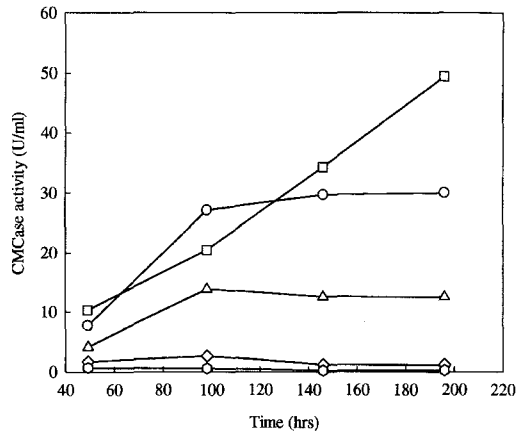


Fig. 1. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on various concentrations of solka floc (CMCase activity).

○— solka floc 0.5%, □— solka floc 1%,
△— solka floc 3%, ◇— solka floc 5%,
○— solka floc 7%

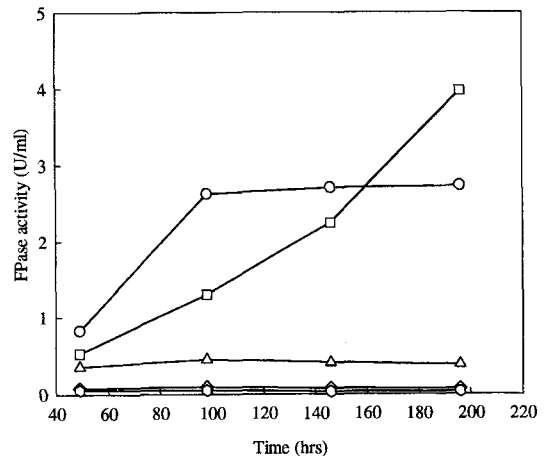


Fig. 2. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on various concentrations of solka floc (FPase activity).

○— solka floc 0.5%, □— solka floc 1%,
△— solka floc 3%, ◇— solka floc 5%,
○— solka floc 7%

첨가될 경우 쉽게 소비되어 균체의 증식이 빠르게 일어나므로 배지내 초기 포도당의 농도를 적절히 조절하는 것이 중요하다. Solka floc 1% 배지에 포도당을 0.05, 0.1, 0.5, 1.0%로 배지내에 첨가하여 배양하였을 때 섬유소 분해효소의 활성을 측정할 결과 배지내 포도당의 농도가 0.5% 이상일 경우 포

Table 1. Variations of final pH of culture broth obtained from the cultivation of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various concentrations of solka floc

Solka floc concentration (%)	Final pH
0.5	4.8
1.0	2.9
3.0	2.5
5.0	2.3
7.0	2.3

도당을 배지 중에 첨가하지 않았을 때와 비교하여 CMCase 활성과 FPase 활성이 모두 50% 이상 감소하였다(Fig. 3과 Fig. 4). *Trichoderma reesei* Rut C-30은 다른 *Trichoderma* sp.에 비하여 이화 대사산물에 대한 억제작용을 덜 받는 균주로 보고 되어 있으나(Persson 등, 1991) 배지내 포도당의 농도가 0.5% 이상일 때에는 포도당에 의해 섬유소 분해효소의 생산이 상당히 저해됨을 알 수 있었다.

혼합탄소원의 영향

섬유소 가수분해반응의 정도와 그 속도는 섬유소원의 구조적 특징에 의하여 영향을 받는다. 섬유소는 결정부위와 비결정부위로 나누어지며 이 중 결정부위는 비결정 부위보다 분해가 더 어렵다(Ryu와 Mandels, 1980). 본 실험에서는 *Trichoderma reesei* Rut C-30 배양시 세포가 분해하여 이용하기

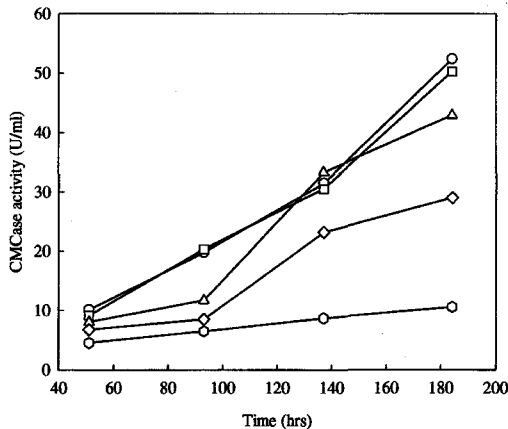


Fig. 3. Effect of glucose concentration on the production of cellulase (CMCase activity).
 -○- glucose 0%, -□- glucose 0.05%, -△- glucose 0.1%, -◇- glucose 0.5%, -○- glucose 1%

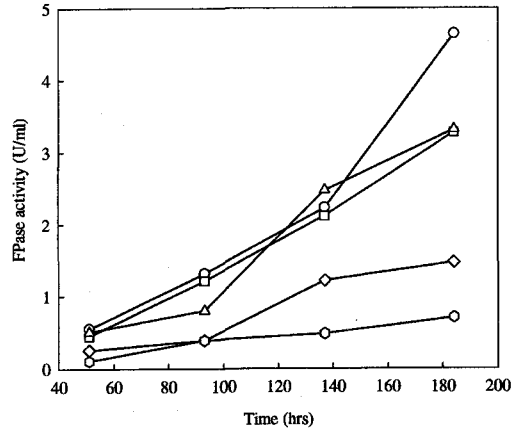


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the production of cellulase (FPase activity).
 -○- glucose 0%, -□- glucose 0.05%, -△- glucose 0.1%, -◇- glucose 0.5%, -○- glucose 1%

어려운 탄소원인 결정성 섬유소를 많이 포함하는 solka floc, avicel, sigmacell과 비교적 빠르게 소비되는 목질섬유소인 straw, wheat bran을 함께 배양하였다. 혼합비율을 각각 1%씩 1:1(중량비)로 하여 실험한 결과 solka floc과 wheat bran을 혼합하여 탄소원으로 사용한 경우에 가장 높은 섬유소 분해효소 활성을 나타내었다(Fig. 5와 Fig. 6).

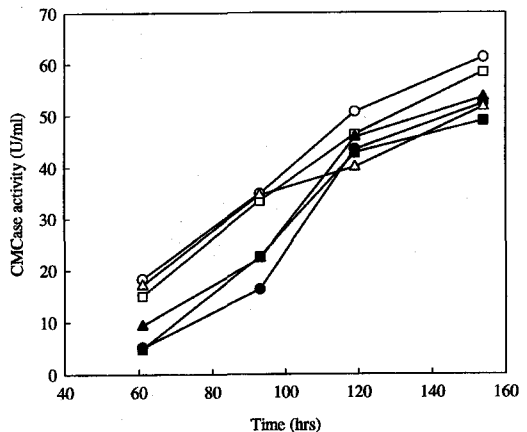


Fig. 5. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on various carbon source combinations (CMCase activity).
 -○- solka floc+wheat bran, -●- solka floc+straw, -□- avicel+wheat bran, -■- avicel+straw, -△- sigmacell+wheat bran, -▲- sigmacell+straw

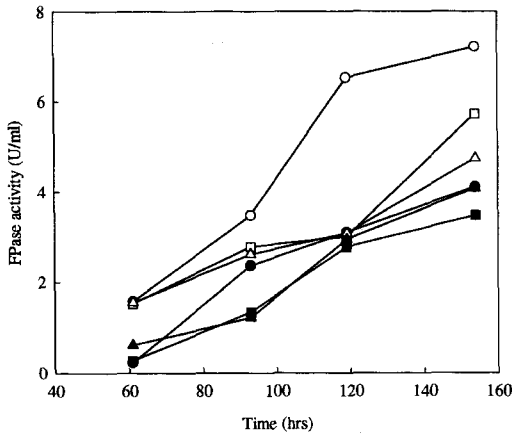


Fig. 6. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on various carbon source combinations (FPase activity).
 -○- solka floc+wheat bran, -●- solka floc+straw, -□- avicel+wheat bran, -■- avicel+straw, -△- sigmacell+wheat bran, -▲- sigmacell+straw

CMCase 활성과 FPase 활성은 61 U/ml과 7.2 U/ml로 solka floc이나 wheat bran을 각각 탄소원으로 사용하였을 때 보다 더 높은 활성을 보였다 (Table 2). 특히 FPase 활성의 경우 solka floc만을 탄소원으로 사용했을 때와 비교하여 50%가 증가하였다. 목질섬유소를 섬유소 분해효소 생산에 있어서 유도물질로 사용할 경우 pH가 효소 생산에 미치는 영향이 avicel이나 solka floc에 비해 작은 것으로 알려져 있다(Knapp와 Legg 1986).

Table 2에 나타난 바와 같이 wheat bran이나 straw를 탄소원으로 사용할 경우 pH가 초기 pH

Table 2. Cellulase activities and final pH of culture broth obtained from the cultivation of *Trichoderma reesei* Rut C-30 on various carbon sources

Carbon source	CMCase activity (U/ml)	FPase activity (U/ml)	final pH
CMC	3.0	0.3	6.5
lactose	21.0	2.5	3.0
sigmacell	55.1	3.6	2.9
solka floc	53.2	4.8	2.9
avicel	51.3	4.7	2.9
wheat bran	17.0	1.3	6.4
straw	15.9	1.3	6.3

5.5보다 약간 증가하는데(pH 6.3~6.4) 이는 정제된 섬유소만을 탄소원으로 이용하여 섬유소 분해효소를 생산하는 경우 일어나는 pH 변화에 의한 영향을 감소시키는 효과가 있으며, 일반적으로 전처리된 목질섬유소의 섬유소 함유량은 약 50%(Persson 등, 1991)로 정제된 섬유소와 비교할 경우 같은 양의 기질에 포함된 섬유소의 양이 훨씬 적어 섬유소의 농도가 증가함에 따라 일어나는 glucose나 cellobiose와 같은 분해생산물에 의한 저해작용을 감소시키는 효과도 있어서 정제된 섬유소와 목질섬유소의 혼합 탄소원을 이용한 경우 더 높은 값의 효소 활성을 얻을 수 있었다고 사료된다.

탄소원의 혼합비율의 영향

Wheat bran은 그 자체가 함유하는 starch와 단백질에 의해 일부 영향을 받아 wheat bran만으로는 섬유소 분해효소 생산성이 다른 정제된 섬유소에 비해 높지 않다(Toyama, 1976; Chahal, 1991). 섬유소 분해효소 생산시 유도물질로 사용된 정제된 섬유소인 solka floc의 농도가 3% 이상일 경우 오히려 섬유소 분해효소 생산에 저해가 됨을 앞 실험(Fig. 1과 Fig. 2)에서 알 수 있었다. *Trichoderma reesei* Rut C-30에 의한 섬유소 분해효

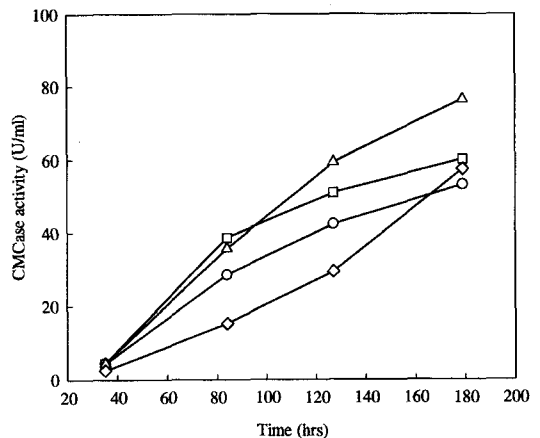


Fig. 7. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on solka floc and various concentrations of wheat bran (CMCase activity).
 -○- solka floc 1%+wheat bran 0.5%, -□- solka floc 1%+wheat bran 1%, -△- solka floc 1%+wheat bran 3%, -◇- solka floc 1%+wheat bran 5%

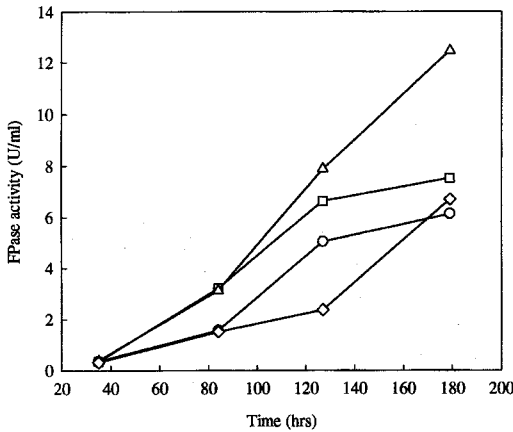


Fig. 8. Cellulase production of *T. reesei* Rut C-30 on solka floc and various concentrations of wheat bran (FPase activity).

—○— solka floc 1%+wheat bran 0.5%, —□— solka floc 1%+wheat bran 1%, —△— solka floc 1%+wheat bran 3%, —◇— solka floc 1%+wheat bran 5%

소 생산배지에 포함된 solka floc의 농도는 1%로 고정시킨 후 wheat bran의 농도를 0.5, 1.0, 3.0, 5.0%로 변화시켜 섬유소 분해효소 생산을 위한 최적 혼합비율을 얻기 위하여 실험을 수행하였으며 그 결과 solka floc 1%에 wheat bran 3%를 혼합하여 탄소원으로 사용하였을 때 CMCCase 활성은 76 U/ml, FPase 활성은 12.5 U/ml로 가장 높은 값을 나타내었다(Fig. 7과 Fig. 8).

적 요

섬유소를 분해하여 이용하기 위해서는 섬유소 분해효소를 대량으로 생산하는 것이 중요하며 이를 위해서는 적절한 탄소원을 이용하여 섬유소 분해효소의 대량생산을 유도하는 것이 중요하다. 본 실험에서는 *Trichoderma reesei* Rut C-30을 섬유소 분해효소의 생산 균주로 solka floc을 탄소원으로 사용하여 섬유소 분해효소의 활성을 증가시키기 위한 배지내 최적 농도가 1%이고 포도당이 0.5% 이상 배지에 첨가 될 경우 섬유소 분해효소의 생산이 저해됨을 알 수 있었다. 정제된 섬유소인 solka floc이 목질섬유소인 wheat bran과 함께 탄소원으로 사용되었을 때 각각 섬유소 분해효소 생산의

유도 물질로 이용했을 때보다 더 높은 CMCCase 활성과 FPase 활성을 보였다. Solka floc 1%와 wheat bran 3%을 탄소원으로 사용한 배지의 CMCCase 활성이 76 U/ml, FPase 활성이 12.5 U/ml로 가장 높은 값을 나타내었다.

감사의 글

본 연구를 수행할 수 있도록 지원해 주신 통상산업부 청정기술 개발 사업과 인하대학교에 감사드립니다.

참고문헌

- Andreotti, R. E., Medeiros, J. E., Roche, C. and Mendels, M. 1981. Effects of strain and substrate on production of cellulase by *Trichoderma reesei* mutants. Pp 373-388. In: Ghose, T. K. Ed. Bioconversion and biochemical engineering. vol. 1. IIT. New Delhi. India.
- Chahal, D. S., 1991. Production of *Trichoderma reesei* cellulase system with high hydrolytic potential by solid-state fermentation. Pp 111-122. In: Leatham, G. F. and Himmel, M. E. Eds. Enzymes in biomass conversion. ACS symposium series. no. 460. American Chemical Society. Washington.
- Drauz, K. and Waldmann, H. 1995. Pp 325. In: Enzyme catalysis in organic synthesis. VCH. New York.
- Ghosh, B. K. and Ghosh, A. 1992. Degradation of cellulose by fungal cellulase. Pp 97. In: Winkelmann, G. Ed. Microbial degradation of natural products. VCH. New York.
- Hendy, N. A., Wilke, C. R. and Blanch, H. W. 1984. Enhanced cellulase production in fed-batch culture of *Trichoderma reesei* C30. *Enzyme Microb. Technol.* 6: 73-77.
- Knapp, J. S. and Legg, M. 1986. The effect of different cellulosic growth substrates and pH on the production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 319-329.
- Mandels, M., Andreotti, R. and Roche, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Pp 21-33. In: Gaden, E. L., Mandels, M., Reesei, E. T., and Spano, L. Eds. Biotechnology and bioengineering symposium. no. 6. Wiley. New

- York.
- Mandels, M. 1982. Cellulases. Pp 35-78. In: Tsao, G. Ed. Annual reports on fermentation processes. vol. 5. no. 2. Academic Press. New York.
- Montenecourt, B. S. and Eveleigh, D. E. 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl. Environ. Microbiol.* **334**: 777-782.
- Nam, J. H. 1998. Media optimization for the production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C-30. M. S. Thesis. Inha University. Incheon. Korea.
- Persson, I., Tjerneld, F. and Hahn-Hagerdal, B. 1991. Fungal cellulolytic enzyme production. *Proc. Biochem.* **26**: 65-74.
- Ryu, D. D. Y. and Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 91-102.
- Su, T. 1976. Comments on the papers presented at the cellulase production session. Pp 83-89. In: Gaden, E. L., Mandels, M., Reesei, E. T. and Spano, L. Eds. Biotechnology and bioengineering symposium. no. 6. Wiley. New York.
- Takagi, M. 1987. Pretreatment of lignocellulosic materials with hydrogen peroxide in the presence of manganese compounds. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 165-170.
- Toyama, N. 1976. Feasibility of sugar production from agricultural and urban cellulosic wastes with *Trichoderma viride* cellulase. Pp 207-19. In: Gaden, E. L., Mandels, M., Reesei, E. T. and Spano, L. Eds. Biotechnology and bioengineering symposium. no. 6. Wiley. New York.
- Wood, T. M. and Bhat, K. M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. Pp 87-112. In: Wood, W. A. and Kellogg, S. T. Eds. Methods in enzymology. vol. 160. Academic Press. London.
- Wyman, C. E., Spindler, D. D., Grohman, K. and Lastick, S. M. 1986. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brethanomyces clausenii*. *Biotechnol. Bioeng.* **17**: 221-228.