

섬유소 분해 효소의 고생산을 위한 복합균주 개발

오 영 아 · 김 경 철 · 유 승 수 · *김 성 준
전남대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2002. 6. 25., 게재승인 : 2002. 8. 19.)

Development of a Microbial Consortium with High Cellulolytic Enzyme Production

Young-A Oh, Kyoung-Cheol Kim, Seung-Soo Yoo, and Seong-Jun Kim†
Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju
500-757, Korea
(Received : 2002. 6. 25., Accepted : 2002. 8. 19.)

A filamentous fungus, strain FB01 showing high β -glucosidase activity was isolated from a compost. This fungus was cocultured with *Trichoderma viride* to enhance the productivity of β -glucosidase by changing inoculation time of the fungus. The microbial consortium showed higher cellulolytic enzyme production than *T. viride* alone. The maximal enzyme production was obtained when the microbial consortium was cultured at 30°C and pH 6.0 for 10 days with the activities of CMCase, β -glucosidase, and avicelase of 2.0, 0.8, and 0.2 U/mL, respectively. These enzyme activities were 2, 4, and 2 times as high as those of CMCase, β -glucosidase, avicelase from *T. viride*, respectively, indicating that a synergistic interaction appeared between *T. viride* and strain FB01. The serial subcultures with pH control increased β -glucosidase production about 3.2 times. Enzyme production using ricestraw as a carbon source showed that the activities of CMCase, β -glucosidase, and avicelase were 3.69, 0.76, 0.17 U/mL, respectively, and β -glucosidase activity was 1.5 times higher than that of *T. viride*.

Key Words : CMCase, β -glucosidase, avicelase, microbial consortium, fungus

서 론

섬유소 물질의 주성분은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이다. 그 중에서 셀룰로오스는 가장 풍부하며 이용 가능성이 높은 물질이나, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 연소되거나 폐기물로 취급되어 낭비되며 환경오염 현상까지도 유발한다(1). 이와 같이 풍부한 자원중의 하나인 셀룰로오스는 효소를 이용한 가수분해를 통해 glucose로 전환되어 식량 및 에너지 자원으로 이용되고 있으며, 이에 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다. 효소학적 가수분해는 *Trichoderma reesei*(2,3), *Trichoderma viride*(4,5), *Aspergillus niger*(6,7) 등이 분비하는 cellulase에 의해 이루어지며, 또한 endoglucanase, exocellobiohydrolase 및 β -glucosidase 등의 다양한 효소군이 동시에 존재할 때 이들의 상승작용에 의하여 효율적으로 전환된다(8). 지금까지 발표된 보고에 의하면 가수분해 효율을

높이기 위해서 두 가지 접근이 시도되어지고 있다. 균주들이 생산한 효소를 효율적으로 조합하여 이용하는 방안(9)과 각각의 균주들의 혼합배양을 통한 가수분해 효소들의 균형적인 효소 생산을 들 수 있다(10). *T. viride*가 생산하는 cellulase는 효과적으로 셀룰로오스를 분해하지만, β -glucosidase의 활성이 낮기 때문에 가수분해시 inhibitor로 작용하는 cellobiose를 glucose로 전환하는 능력이 부족하다. 따라서 가수분해 효율을 향상시키기 위한 방법으로 β -glucosidase의 활성이 우수한 *A. niger*의 cellulase를 첨가하여 사용하기도 한다(6,11). 또한 Marcel(10) 등의 연구에서는 *T. reesei*와 *A. niger*를 이용한 고체배양에서 두 균주의 상호작용에 의한 효소생산을 검토하였는데, 혼합 배양하였을 경우 더 효율적임을 보여주고 있다. 이는 셀룰로오스를 효율적으로 가수분해시키기 위해서는 다양한 효소군이 항상 다량으로 분비되고 저해 없는 일련의 가수분해 반응을 할 수 있도록 미생물군을 조정 개발하여 효소를 생산하는 방법이다.

본 연구에서는 endoglucanase와 exocellobiohydrolase의 활성이 높은 분양균주 *T. viride*와 β -glucosidase의 활성이 높은 분리균주에 대한 배양특성을 조사하고, 최적의 효소생산을 위한 두 균주의 복합균주 개발을 통해 β -glucosidase의 고생산에 초점을 두었다. 또한 개발된 복합균주의 계대 배양을 통

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864
E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

한 균주의 안정성 및 섬유소폐기물을 이용한 효소생산성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 분양균주로서 *Trichoderma viride* (KCTC 6047; Korean Collection for Type Culture)와 분리균주 FB01을 사용하였다. Cellulose 분해 및 가수분해 효소활성이 우수한 균주를 자연계에서 선별하여 배양특성을 조사한 결과 FB01이 선택되었다. FB01은 전라남도 장성 일대의 토양 및 부식토에서 샘플을 채취하여 탄소원으로서는 볏짚을 이용한 배지에서 분리한 사상균이다. 보존 및 포자생산용 배지로는 Potato Dextrose Agar (PDA; Merck, Germany)를 사용하였으며, 효소생산의 기본배지는 Mandel's medium (12)을 이용하였다. 접종원으로서 포자현탁액을 사용하였으며, 포자현탁액은 PDA 배지에 30°C, 4~5일간 배양한 균사체를 백금으로 끊어 수집하여 멸균수에 현탁 한 후 cotton wool plug로 여과시켜 조제하였다.

균체의 정량

배양액 중 균체의 농도는 배양액 100 mL을 원심분리 (10,000×g, 30 min)하여 얻어진 침전 고형물을 2번 수세한 후 증류수 100 mL 첨가하여 현탁시켜 초음파 처리 (60 watt, 10 min)를 통해 세포벽을 파쇄하여 세포내의 단백질 농도를 측정하였다. 이 단백질 농도는 표준곡선의 환산식 $y = 6.0643x - 0.6776$ ($R^2=0.9887$)에 의하여 균체 농도로 전환되었다. 단백질 농도는 Lowry method (13)에 의해 측정되었다.

효소활성 측정

CMCase에 대한 효소활성도 측정은 2%의 CMC용액 0.5 mL에 배양상등액 0.5 mL을 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS방법으로 측정하였다(14). Avicelase 활성도 측정은 1%의 avicel (PH 101; Merck, Germany)용액 1 mL에 배양상등액 1 mL을 혼합하여 50°C에서 120분간 반응시켜 Somogyi-Nelson방법(15)으로 생성된 환원당을 측정하였다. 효소활성도 측정에 사용된 표준물질로서 glucose와 cellobiose를 이용하였다. 효소 활성도는 표준반응조건에서 $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ 의 glucose와 cellobiose에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다. β -glucosidase는 5 mM PNPG (*p*-nitrophenyl- β -D-glucoside)용액 1 mL에 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.8) 1.8 mL, 배양상등액 0.2 mL을 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후, 0.4 M glycine buffer (pH 10.8) 4 mL를 넣어 반응을 종결시킨 다음, 이 때 생성되는 *p*-nitrophenol을 430 nm에서 정량 하였다(14). β -glucosidase 1 unit는 위의 반응조건에서 $1 \mu\text{mol min}^{-1}$ 의 *p*-nitrophenol을 생성하는데 필요한 효소량으로 정의하였다.

복합균주의 개발

분리균주 FB01과 *T. viride*를 복합시켰을 때 효소생산에 저해작용이 없이 상리공생할 수 있는 조건을 검토하여 복합균주 개발에 관한 실험을 수행하였다. 사상균 FB01의 성장과

효소생산을 위한 최적 배양조건은 pH 6.0, 30°C이었고, 성장 속도는 PDA 배지내에서 4일간 배양시 petri dish에서의 균체의 성장반경이 7 cm 정도였다. 그리고 *T. viride*의 최적조건은 pH 5.0, 30°C이었고, 5일간 배양에서의 성장반경이 7 cm이었다. 그래서 두 균주의 balance를 유지하기 위해 FB01의 접종 시기를 검토하였으며, 이에 관련된 실험은 아래와 같다. 효소 생산용 액체배지는 Mandel's medium을 기본배지로 사용하였으며, 배지 100 mL을 500 mL baffled flask에 넣어 멸균 (121°C, 15분)하고, 총 7개의 flask에 *T. viride*의 포자현탁액 1% (w/w)를 각각 접종하여 배양 (30°C, 100 rpm)한 후, FB01 포자현탁액 1% (w/w)의 접종시기를 하루씩 늦추어 접종하였다. 접종시기에 따른 효소생산은 총 7일간 배양된 배양액을 원심분리 (10,000×g, 10분, 4°C)한 후, 상등액의 효소활성도를 측정하여 비교하였다. 또한 복합균주의 효소생산에 관한 온도 및 pH에 대한 영향을 조사하였고, 추후 실험을 위해 개발되어진 복합균주는 80% glycerol을 첨가하여 -70°C deep freezer에 보관되었다.

복합균주의 계대배양

개발되어진 복합균주가 안정하게 상리공생하면서 지속적으로 효소를 생산하는지 알아보기 위해 4번의 연속적인 계대배양을 수행하였다. 1차 계대배양에서는 Mandel's medium (pH 6.0)에서 7일간 배양하였으며, 2차 계대배양에서는 pH 3~10까지 달리하여 실험하였다. 3차 계대배양은 2차 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 pH 3~6까지 이루어졌으며, 4차 배양은 3차 실험에서 얻은 결과를 토대로 하여 pH 4.5에서 10일간 배양시켰다. 각 단계에서 최대의 효소활성이 얻어진 복합균주는 다음 계대배양의 접종원으로 사용되었으며, -70°C에서 보존되었다.

섬유소폐기물을 이용한 효소생산

효소생산에 사용되어진 볏짚, 톱밥, 펄프는 증류수로 세척하여 80°C에서 24시간 건조한 후 30 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 위의 섬유소 폐기물을 이용한 섬유소 분해효소 생산은 Mandel's medium에서 탄소원으로 이용되는 CMC와 avicel 대신에 각각의 기질을 1%로 하여 사용하였다. 위의 복합균주 개발 실험에서 얻어진 결과를 바탕으로 *T. viride*를 2일간 배양 한 후 FB01을 접종하였고, 30°C, 100 rpm에서 8일간 배양하여 상등액의 효소활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

사상균 FB01의 배양 특성

복합균주 개발을 위한 균주의 분리는 토양 및 부식토를 채취하여 사용하였고, 분리균주 중 FB01은 분리한 여러 균주 중 다른 균주에 비해 β -glucosidase의 활성이 뛰어났다. Mandel's medium에서의 FB01의 CMCase, β -glucosidase, avicelase 활성도는 각각 1.23, 0.45, 0.07 U/mL이었고, *T. viride*보다 β -glucosidase의 활성도(16)는 2배정도 높았으며, β -glucosidase의 활성이 우수한 *A. niger*와 비교시에는 1.5배정도 높았다. 사상균 FB01의 최적 pH와 온도는 각각 pH 6.0, 30°C이었고, 이는 *T. viride*의 pH 5.0, 30°C와 비슷하므로 혼합배양

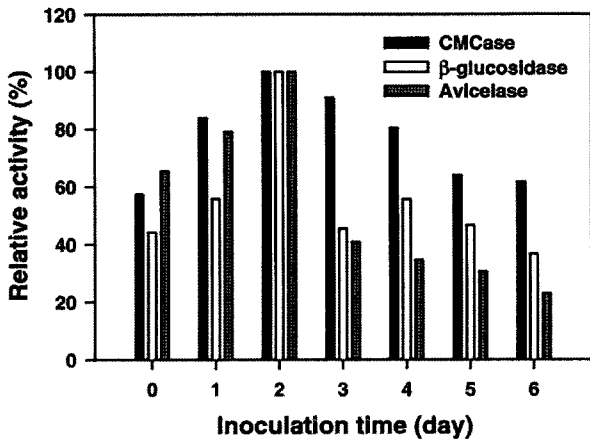


Figure 1. Effect of inoculation time of FB01 on the production of cellulolytic enzymes in the co-cultivation with *Trichoderma viride*.

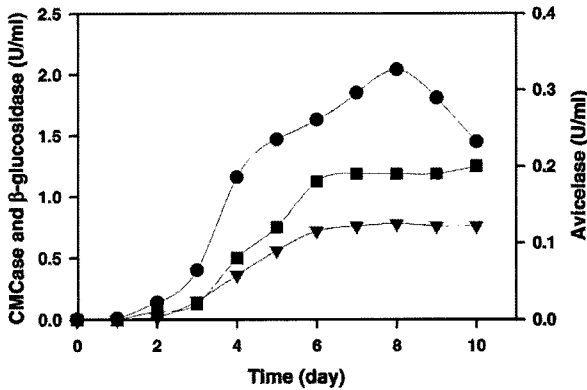


Figure 2. Time courses of CMCase, β -glucosidase, and avicelase activities in the liquid culture of *T. viride*+FB01 in Mandel's medium. Symbols; CMCase(●), β -glucosidase(▼), avicelase(■)

이 가능할 것으로 예상하였다.

복합균주의 개발과 특성

위의 실험에서의 β -glucosidase의 우수한 생산자인 FB01과 *T. viride*를 혼합시켜 회분배양 하였을 때, 서로의 성장속도에 차이가 있었기 때문에 두 균주의 생장균형을 유지하기 위해 접종시기를 조절할 필요가 있었다. *T. viride*을 기준배양으로 하여 FB01의 접종시기를 달리 하였을 때 *T. viride*을 단독으로 2일간 배양한 후 FB01의 포자현탁액을 접종했을 때 최대의 활성을 보였다(Figure 1). 따라서 이후의 복합균주에 관한 회분배양 실험은 *T. viride*를 2일동안 배양 한 후 FB01을 접종하였다. 회분배양에서 복합균주의 섬유소 분해 효소생산의 시간적 변화(Figure 2)를 살펴보면 정상기로 생각되는 배양 6일 후에 효소활성들이 안정적으로 얻어졌으며, CMCase의 최고 활성은 배양 8일째에 얻어졌다. 8일째 복합균주의 CMCase, β -glucosidase, avicelase의 활성도는 각각 2.04, 0.78, 0.20 U/mL이었다. 이때의 *T. viride*의 CMCase, β -glucosidase, avicelase의 활성도가 각각 1.02, 0.2, 0.11 U/mL이었다. 복합균주의 β -glucosidase 활성이 약 4배정도 높게 측정되었으며, CMCase, avicelase에서도 2배정도 높았다.

복합균주는 초기 pH 6.0에서 가장 효소활성이 탁월하였으

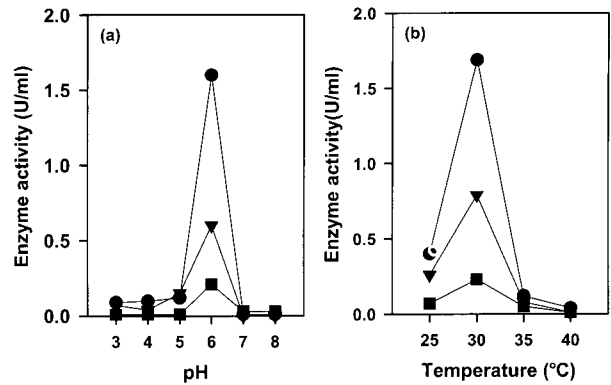


Figure 3. Effects of initial pH of medium(a) and growth temperature(b) on the enzyme production by *T. viride*+FB01. Symbols; CMCase(●), β -glucosidase(▼), avicelase(■)

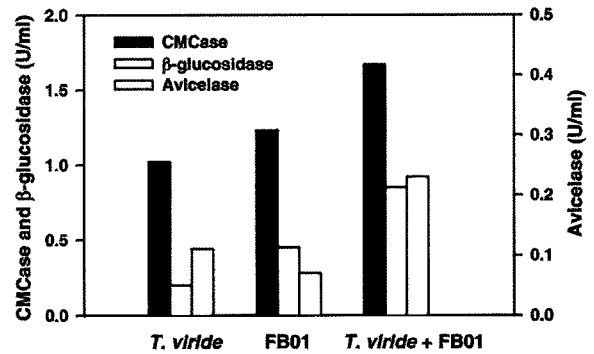


Figure 4. Comparisons of the cellulolytic enzymes production by *Trichoderma viride*, FB01 and *T. viride*+FB01 in Mandel's medium.

며, pH 7~8에서는 효소가 생산되지 않았다 (Figure 3(a)). 그리고 배양 후의 pH는 pH 6의 경우 6.8이었고, pH 7~8의 경우는 8~8.5이었다. 또한 30°C에서 가장 큰 활성을 보였으며 25°C와 40°C이상에서는 성장은 하나 효소생산은 하지 않았다 (Figure 3(b)). 복합균주의 효소 생산을 위한 활동범위는 좁은 것으로 나타나, pH와 온도의 조절이 중요한 인자임을 알 수 있었다. Figure 4는 *T. viride*, FB01과 복합균주를 각각 최적 배양조건을 적용하여 30°C에서 7일간 배양했을 때의 최대 활성을 비교한 것이다. 단일 균주인 FB01과 *T. viride*보다 복합균주를 사용한 배양에서 각각의 효소활성이 높게 나타났다. 단일 균주와 복합균주를 Mandel's medium에서 성장시켜 SEM을 측정된 결과 FB01 (Figure 5(a))은 구형의 pellet 형태의였으며, *T. viride* (Figure 5(b))는 기다란 균사체 형태로 증식하였다. 복합균주 (Figure 5(c))는 FB01과 *T. viride*가 길항적 성장저해를 보이지 않고 공존하면서 성장하였으며, 이로 인해 단일 균주에 비해 균체의 총 농도가 높아 기질과 반응할 수 있는 기회가 커짐으로서 효과적으로 기질을 이용하며 효소활성을 높일 수 있음을 짐작 할 수 있었다(Figure 6).

Figure 7은 FB01, *T. viride*와 복합균주를 Mandel's medium에서 CMC, avicel, CMC : avicel(1:1)을 1%(w/v)로 하여 실험한 결과이다. FB01은 avicel에 비해 CMC가 효소생산에 유리하였으며, CMC만을 탄소원으로 한 경우 보다 avicel과 CMC를 혼합할 경우 효소생산에 효과적이었다. *T. viride*는 각 기질에 대한 효소 생산이 별다른 차이를 보이지 않았다(Figure 7).



Figure 5. Comparison of scanning electron micrograph of FB01(a), *T. viride*(b), and FB01+*T. viride*(c) in Mandel's medium.

개발한 복합균주는 Mandel's medium내의 수용성인 CMC를 우선기질로 이용하여 균체의 활발한 증식을 위해 사용되었으며 CMC가 고갈되면서 불용성인 avicel을 2차 대사를 위한 기질로 사용함으로써 효소생산이 촉진되었으리라 사료된다. 복합균주의 큰 균체 및 밀도에 의해 단일 균주의 *T. viride*보다 avicel을 효소유도체로서 효과적으로 작용하여 CMCcase, avicelase의 활성이 높게 나타났으며, 균주 FB01 또한 탄소원으로 CMC를 1차적으로 이용한 후 β -glucosidase의 유도 활성이 높게 나타났다. Duff등은 사상균을 혼합배양 할 경우 기질 이용성, 생산성, 변화하는 환경 조건에서의 적응력이 좋으며, 불필요한 미생물에 의한 오염에 대해 저항력 또한 높다고 보고한바 있다(17). 본 실험에서도 사상균 *T. viride*와 FB01을

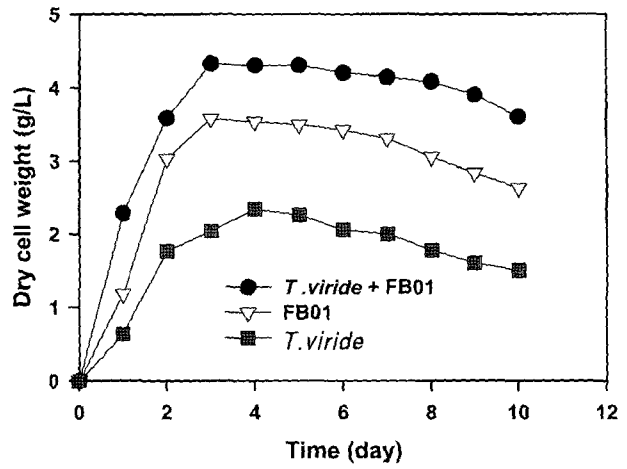


Figure 6. Comparison of batch growth in the liquid culture with Mandel's medium by *T. viride*+FB01, FB01, and *T. viride*.

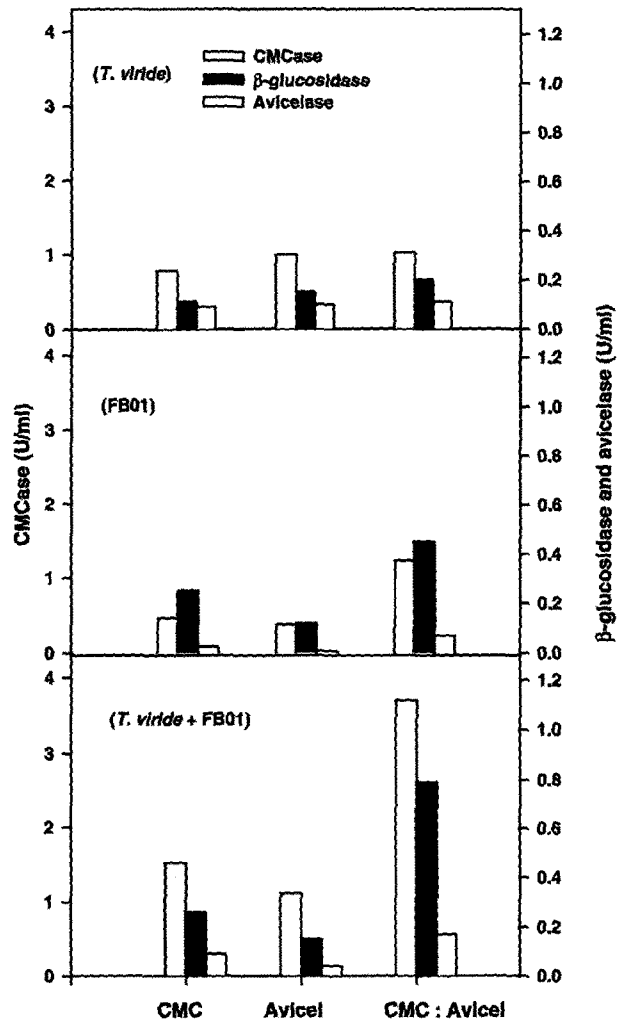


Figure 7. Effects of composition of CMC and avicel on the cellulases production of *T. viride*, FB01, and *T. viride*+FB01 in Mandel's medium.

이용한 혼합배양에서 단일 균주 일 때에 비해 복합균주로서의 두 균주가 효과적으로 기질을 이용하여 효소생산에 있어서 시너지 효과로 나타났다.

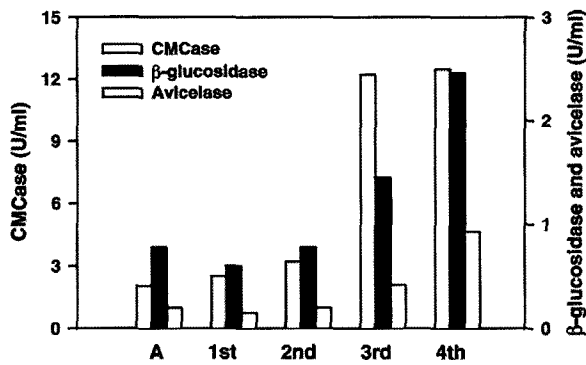


Figure 8. Changes of the cellulolytic enzymes in the serial subcultures of the microbial consortium varying initial pH. Legend A indicates a point of time of development of microbial consortium. (1st; pH 6.0, 30°C, 7 days. 2nd; pH 5.0, 30°C, 7 days. 3rd; pH 4.5, 30°C, 7 days. 4th; pH 4.5, 30°C, 8 days.)

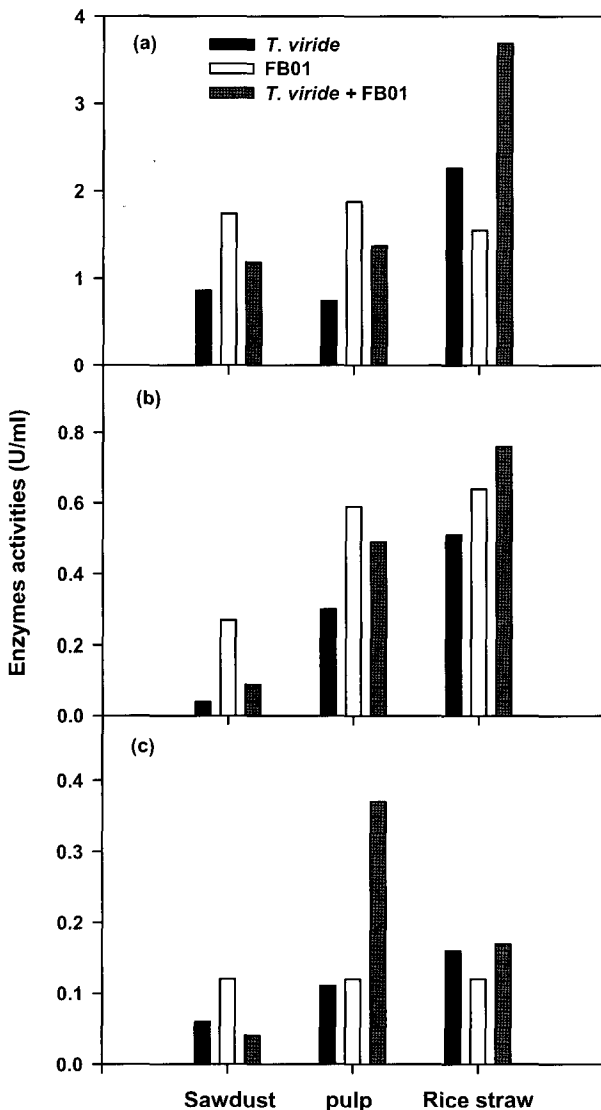


Figure 9. Comparisons of the production of cellulolytic enzymes, such as CMCase(a), β -glucosidase(b), and avicelase(c) in the culture of *Trichoderma viride*, FB01 and *T. viride*+FB01 using various cellulosic wastes.

복합균주의 계대배양에 의한 활성 유지

개발된 복합균주가 안정하게 상리공생하면서 지속적으로 효소를 생산하는지 알아보기 위해 배지내의 초기 pH를 변화시켜 4번의 연속적인 계대배양을 수행하였다. 1차 계대배양은 복합균주의 최적 pH 6.0에서 수행하였는데, 복합균주 개발 당시에 비해 CMCase의 활성이 미미하게 증가하였을 뿐 β -glucosidase와 avicelase는 감소하였다. 개발된 복합균주를 이용한 효소 생산은 그에 알맞은 최적의 pH가 존재 할 것으로 예상하여, 각각 다른 pH로 조절하여 2차 계대배양을 수행하였다. 2차 계대배양에서는 pH 3~10까지 달리하여 실험한 결과, pH 5.0에서 CMCase 활성도가 1차 보다 1.5배정도 증가하였다. 효소 생산에 있어서의 pH 영향을 재확인하기 위해 3차 계대배양은 위의 얻어진 결과를 바탕으로 pH 3-6까지 수행하였다. 3차 계대배양에서는 pH 4.5에서 2차 계대배양에 비해 β -glucosidase와 avicelase가 각각 2배정도 증가되었으며, CMCase의 경우는 복합균주 개발당시의 효소활성보다 총 4배 이상의 증가를 보였다 (Figure 8). 마지막으로 4차 계대배양에서는 pH 4.5에서 10일간 배양한 결과 배양 8일째에 최대의 활성을 보였으며, 3차 계대배양 비해 β -glucosidase의 활성이 1.7배 증가했으며, 개발 초기의 복합균주와 비교해 볼 때 총 3.2배가 증가되었다. 또한 CMCase의 활성도는 복합균주 개발 초기에 비해 총 6배가 증가되었으며, avicelase는 약 5배의 증가를 보였다. 그리고 초기 pH를 4.5로 하여 8차까지의 계대배양 결과 5차 계대배양에서는 최대 활성에 비해 25%의 활성이 감소하였으며, 6~8차 계대배양에서 감소는 미미하나 최대 활성에 비해 30% 정도의 감소를 보였다 (data not shown). 8차까지의 계대배양 결과 4차 계대배양에서 최대의 활성을 나타냈으며, 4차 계대배양액을 -70°C에서 보관하여 효소생산 배양의 접종원으로 사용하였다. 연속적인 계대배양에서도 복합균주의 효소 활성을 높이 유지하기 위해 보다 정확한 pH 조절과 복합균주의 균형성장을 위한 기질 특이성을 파악할 필요가 있다고 사료된다. 위와 같은 결과로부터 개발된 복합균주는 두 균주가 상리공생 하면서 안정하게 효소를 생산하기 위해서는 초기 pH가 중요한 배양 조절 인자인 것이 밝혀졌다.

섬유소 폐기물을 이용한 효소생산

섬유소폐기물을 이용한 섬유소 분해효소 생산은 Mandel's medium의 탄소원인 CMC와 avicel 대신에 벼짚, 톱밥, 펄프를 각각 1%(w/v)로 사용하였다. 톱밥을 탄소원으로 이용한 효소 생산에서는 FB01이 다른 균주에 비해 탁월하였다. 펄프를 이용한 CMCase와 β -glucosidase의 생산에서는 FB01이 유리하였으며, avicelase의 생산에는 복합균주가 우수하였다. 이는 FB01이 상대적으로 미약한 avicelase의 활성을 가지는데, 복합균주로 존재하는 *T. viride*에 의한 상승 효과에 의해 avicelase의 활성이 높아졌음을 짐작할 수 있었는데, 이는 Marcel 등의 연구결과와 일치하였다(10). 마지막으로 벼짚에서는 단일균주에 비해 복합균주가 모든 효소 생산에 대해 우수했으며, 특히 *T. viride*에 비해 CMCase와 β -glucosidase는 약 1.5배의 효소생산을 나타내었다(Figure 9). 위의 섬유소 폐기물 중 복합균주의 효소생산에 있어서 벼짚이 가장 탁월하다고 생각되어 벼짚의 농도를 1~5%(w/v)까지 달리한 결과 최적 농도는

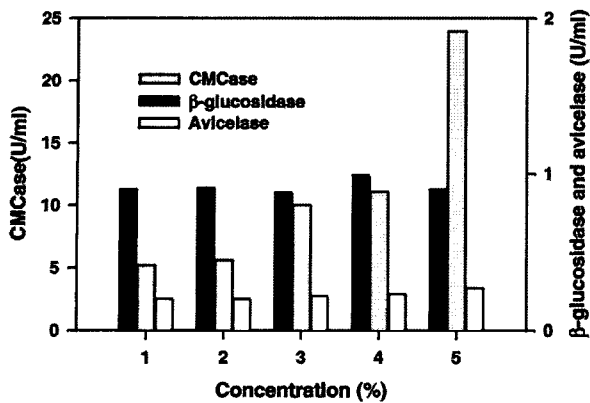


Figure 10. Comparisons of the production of cellulolytic enzymes according to carbon sources concentration.

5%(w/v)였다(Figure 10). 탄소원의 종류에 따른 효소생산에 관한 영향을 살펴보았는데, 섬유소원이 갖는 기질의 구조적 특징에 의하여 크게 영향을 받음을 알 수 있었다. 위의 결과를 종합해 볼 때 특정 효소를 생산하고자 할 때에는 상업용 기질이 아닌 섬유소폐기물을 이용함으로써(16,18), 비용 절감 측면에서 유리함을 보여주고 있었다. CMCase 및 β -glucosidase 생산에는 단일균주 보다는 복합균주를 이용하여 탄소원으로 볏짚을 사용하고, avicelase의 생산에는 pulp를 이용해서 효소 생산을 하면 효과적이라 할 수 있을 것이다. *T. viride*와 분리균주 FB01을 이용한 복합균주 개발은 두 균주의 상호 보완적인 작용으로 인해 단일 균주시 보다 효소활성이 뛰어난 것을 알 수 있었으며, 또한 개발되어진 복합균주와 섬유소폐기물들을 적절하게 이용한다면 효소 생산에 유리할 것이다. 이는 효소생산에 있어서 상업용 기질이 아닌 주위에서 손쉽게 구할 수 있는 섬유소 폐기물의 대체로 인해 경제적인 면을 더욱 부각시킬 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구의 목적은 기존의 단일 균주보다 두 종의 서로 다른 균주를 복합시켰을 때 두 균주간의 상호 보완적인 면을 이용하여 효소생산을 극대화하기 위함이며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

실험에서 사용된 *T. viride*와 FB01는 최적 pH와 온도가 비슷하여 혼합배양이 가능하였으며, 이들의 복합균주를 개발하는데 성공하였다. 즉 두 균주는 희분배양 하였을 때, 서로의 성장속도에 차이가 있었기 때문에 두 균주의 성장균형을 유지하기 위해 접종시기를 조절할 필요가 있었다. 접종시기를 변화시킴으로서 두 균주간의 상호작용으로 인해 단일 균주일 때보다 CMCase, β -glucosidase 및 avicelase의 활성이 우수했으며 또한 계대배양을 통한 두 균주의 활성유지에 관한 실험에서는 pH 조절을 통해 β -glucosidase 활성이 최고 3.2배까지 증가함을 알 수 있었다. 따라서 배양액내에서 초기 pH의 영향은 생산된 cellulase complex의 다양한 구성요소의 상대적 농도를 결정하는 실질적인 요인으로 판명된다. pH 4.5에서의 enzyme activity는 12.5 U/mL CMCase, 2.46 U/mL β -glucosidase, 0.93 U/mL avicelase였으며 개발당시의 복합균주

활성인, 2.04 U/ml CMCase, 0.78U/ml β -glucosidase, 0.2 U/ml avicelase과 비교할 때 각각 6, 3.2, 4.7배의 높은 활성을 보였다.

복합균주의 탄소원으로 볏짚을 이용했을 때 복합균주에 의한 효소생산이 단일 균주인 *T. viride*나 FB01보다 훨씬 높게 나타났으며, 이때의 볏짚의 최적 농도는 5%(w/v)였다. 이러한 배양조건에서 복합균주를 장기적으로 계대배양하면서 효소의 생산성 향상과 복합균주의 안정성을 관찰할 필요가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- Busto, M. D., N. Ortega, and M. Prrez-Mateos (1996), Location, kinetics and stability of cellulase induced in *Trichoderma reesei* cultures, *Biores. Technol.* **57**, 187- 192.
- Reetta, H., P. Elke, S. Pirkko, and L. Susan (1996), Production of endo-1,4- β -glucanase and xylanase with nylon-web immobilized and free *Trichoderma reesei*, *Enzyme Microb. Tech.* **18**, 495-501.
- Naticidad, O., D. B. Maria, and P. M. Manuel (2001), Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases, *Int. Biodeter. Biodegr.* **47**, 7-14.
- Brown, H. L. and Alan B. (1999), Assessment of the biocontrol potential of a *Trichoderma viride* isolate, *Int. Biodeter. Biodegr.* **44**, 219-223.
- Kono, H., R. Markus, M. F. Waelchli, and T. Erata (1999), Transglycosylation of cellobiose by partially purified *Trichoderma viride* cellulase, *Carbohydr. Res.* **319**, 29-37.
- Abdel, N., A. Mohamed, and D. Y. Kwon (1992), The production of xylanase and β -xylosidase by *Aspergillus niger* NRC 107, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 543-550.
- Kang, S. W., S. W. Kim, and K. Kim (1994), Production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* KKS, *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**, 9-55.
- Kim, D. S. and C. H. Kim (1992), Production and characterization of crystalline cellulose-degrading cellulase components from a thermophilic and moderately alkaphilic Bacterium, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 7-13.
- Wyk, J. P. H., M. A. Mogale, and T. A. Seseng (2000), Saccharification of used paper with different cellulases, *Biotechnol. Lett.* **22**, 491-494.
- Marcel, G. C., P. Leticia, M. Patricia, and P. T. Robert (1999), Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane baggages, *Biores. Technol.* **68**, 173-178.
- Moon, I. S., S. K. Park, and K. Y. Lee (1993), Production of β -glucosidase from *Aspergillus niger*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 409-414.
- Mandels, M. and D. Sternberg (1976), Recent advances in cellulase technology, *J. Ferment. Technol.* **54**, 267-286.
- Daniel, M. B., D. R. Michael, and J. E. Stuart (1996), Protein methods, pp68-71, *Wiley-Liss*, New York.
- Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring activity, *Method Enzymol.* **160**, 87-112.

15. Somogyi, A. M. (1952), A new reagent for determination of sugar, *J. Biol. Chem.* **195**, 19-24.
16. Sharma, A., S. K. Khare, and M. N. Gupta (2001), Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase, *Biores. Technol.* **78**, 281-284.
17. Duff, S. J. B, G. C. David, and M. O. Fuller. (1985), Evaluation of the hydrolytic potential of a crude cellulase from mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis*, *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 305-308.
18. Cho, N. C., K. H. Kim, S. B. Chun, and K. C. Chun (1990), Effect of cellobiose octaacetate, avicel, and KC-flock on production of avicelase from *Penicillium verruculosum*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 383-389.