Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 31, No. 1, 42-45 (2003)

Trichoderma sp. SO-571에 의한 Cellulase 생산 및 섬유가공 처리에 관한 연구

오성훈 · 김무성[1] · 소 성[1] · 서형주[2,*]
안산공업대학, 식품생물공학과, [1]태평양화학, [2]고려대학교 병설 보건대학 식품영양과

Studies on the Production of Cellulase by *Trichoderma* sp. SO-571 and the Enzyme Treatment for Cellulosic Fabrics. Oh, Sung-Hoon, Moo-Sung Kim[1], Sung So[1], and Hyung-Joo Suh[2,*]. *Department of Food and Biotechnology, Ansan College of Technology, 170 Choji-dong, Ansan, Gyonggi-do 425-792, Korea, [1]Biotech. Division, Pacific Corporation, Singil-dong, Ansan, Gyonggi-do 425-120, Korea, [2]Department of Food and Nutrition, College of Health Sciences, Korea University, 1 Jeongneung-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-703, Korea* - A *Trichoderma* sp. SO-571 producing cellulase was isolated from soil, and a pilot-scale cultivation and separation of cellulase were conducted. The cellulase activity was about 14.5 unit/ml after 112 hr of cultivation in a 30 l fermenter containing 3.0% cellulose, 4.0% soybean powder, 3.0% wheat bran, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% urea, 1.0% CSL, 0.5% KH_2PO_4, and 0.2% Tween 80. The cellulase was purified over 4.6 folds in three steps with 47.86% yield. The optimum pH of cellulase was pH 5.0 and optimum temperature was 60°C. To investigate the effect of the cellulase-treated cellulosic fabric, the weight loss was compared. The weight loss of denim treated with cellulase from *Trichoderma* sp. SO-571 was 2.9% and that with Celluclast 1.5L was 2.2%. In tencel treatement with enzyme, cellulase showed 0.7% higer weight loss than that with Celluclast 1.5L.

Key words: Cellulase, *Trichoderma* sp., denim, tencel

Cellulase는 재생자원인 농 · 임산 폐자원의 당화, 과일음료와 맥주의 청징, 사료의 가공 및 폐지의 재생등에 이용되는 산업용 효소이다[2, 7]. 최근들어 cellulase는 면직물 제품의 보습성과 촉감의 유지를 위한 처리제로서 뿐만 아니라 indigo로 염색된 청바지의 탈색가공 효소로 사용량이 급격히 증대되면서 전체 효소시장에서 차지하는 비율이 약 15%에 달하고 있다[14].

Cellulase는 여러 세균과 곰팡이류에서 생산되고 있으며, 특히 soft rot fungus의 일종인 *Trichoderma* 속에서 생산되는 cellulase의 경우 활성이 높은 것으로 보고되고 있다[6]. Cellulase는 cellulose chain을 무작위적으로 분해하여 cellobiose와 glucose를 생성하는 endo-β-1,4-glucanase(CMCase)와 cellulose chain의 비환원말단에 작용하여 cellobiose를 생성하는 exo-β-1,4-glucanase(Avicelase) 및 cellobiose를 분해하여 glucose를 생성하는 β-glucosidase(cellobiase)로 구성되어 있는 multi-enzyme이다[6, 15].

Cellulase는 섬유소로 구성된 의복표면으로부터 섬유를 제거하여 물리적 처리에 의한 마모효과와 비슷한 화학적 마모효과를 나타낸다. 면직물에 cellulase 처리를 하면 cellulose 분해에 의해 표면 섬유가 제거되면서 감량이 일어나 직물 표면이 평활해지고 촉감이 부드러워지므로 직물의 외관과 태를 변화시키는데 사용된다. 또한 cellulase 처리시 염색된 섬유가 표면에서 제거될 때 색 제거효과가 나타나므로 indigo로 염색된 데님(denim)에 응용되어 여러 가지 독특한 외관을 창출하는 세탁가공에 사용된다[2, 10].

본 연구에서는 토양으로부터 분리 동정한 균주 *Trichoderma* sp. SO-571이 생산하는 cellulase를 상업적으로 활용하고자 대량 배양하여 얻은 조효소를 한외여과기 등을 사용하여 정제하였으며, 정제된 효소의 직물 가공 이용성 여부를 확인하고자 청바지 제조시 사용되는 청천에 대한 가공후의 변화를 측정하였다.

재료 및 방법

Cellulase 생산균주 및 배지

Cellulase 생산균주는 토양으로부터 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)와 trypan blue(80 mg/l)를 첨가한 한천배지에서 CMC 분해환이 큰 균을 분리 동정하였다. Cellulase 생산을 위한 배지로 3.0% cellulose, 4.0% 탈지대두, 3.0% 밀기울, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% urea, 1.0% corn steep liquor(CSL), 0.5% KH2PO4, 0.2% Tween 80을 사용하였다. 30 l 발효조에 20 l 배양액을 넣고 121°C, 1.5 기압에서 살균한 후, 30°C에서 300 rpm, 통기량 1 vvm으로 조정한 후 배양하였다.

Cellulase의 산업적 규모 정제

효소의 상업화를 위해 Lee 등[11]이 제시한 ultrafiltration

*Corresponding author
Tel. 82-2-940-2853, Fax. 82-2-941-7825
E-mail: suh1960@unitel.co.kr

을 이용하여 산업적 규모의 정제를 실시하였다. Cellulase 생산용 배지를 이용하여 얻은 배양액 20 l에 perlite(400 g), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$(300 g), Na_2HPO_4(300 g)를 각각 첨가한 후 pH를 5.5로 조정 후 30°C에서 60분간 처리 후 filter press를 통과하여 여액을 얻었다. 이 여액은 UF 5/4040(Prochem Tech Internation Inc., New York, USA) 장치를 이용하여 분자량 15 kDa 이상만을 회수하여 효소액으로 사용하였다.

Cellulase 효소 활성

CMC(Sigma Chemical Co., U.S.A)를 사용하여 Yu 등의 방법[16]에 따라 CMCase 활성을 측정하였으며, 효소에 의해 분해되어 나오는 환원당의 양은 dinitrosalicylic acid (DNS) method[3]로 측정하였으며, 이때 효소의 활성은 1분 동안 1 μmol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다[5].

Cellulase에 의한 섬유가공 처리

청천(denim)과 텐셀(tencel, 20×20 cm)에 대한 cellulase 처리효과는 Kang과 Ryu의 방법[9]에 의해 측정하였다. 활성도가 평가된 효소와 1 g/l의 계면활성제로 이루어진 반응액의 온도를 60°C로, pH 5.0인 acetate 완충용액을 사용하여 magnetic stirrer로 교반하면서 섬유를 효소 처리하였다. 처리한 섬유는 증류수로 충분히 수세하고 자연건조하여 효소처리전과 후의 무게를 측정하여 중량 손실율을 계산하였다.

결과 및 고찰

30 l 발효조에서의 cellulase 생산

0.5% carboxymethyl cellulose(CMC)와 trypan blue(80 mg/l)를 첨가한 한천배지를 이용하여 분리한 균주는 MEA (malt extracat agar) 배지에서 5일(28°C) 배양시 집락은 배지표면에 낮고 넓게 흰색 균사체를 형성하였다. 이때 분생자는 주로 margin 부근이 밝고 흐릿한 청록색으로 생성되었으며, 배양이 진행됨에 따라 짙고 어두운 녹색으로 균사체에 불균일하게 분포하였다. 집락의 배면은 옅은 갈색을 나타냈다. 생육온도는 25-30°C에서 최대 였으며, 5°C와 37°C에서는 생육하지 못하였다. 형태적 관찰에 의하면 균사는 격벽이 있고, 무색 투명하였다. 분생자병은 분절분지가 많이 되어 있으며 곤봉형을 이루고 크기는 4-5×1.0-2.5 μm 정도였으며 분생자병의 끝에 몇 개의 분생자가 덩어리로 점착된 형으로 발생하였다. 분생자는 벽이 매끄러운 모양이었고, 색상은 짙은 녹색이었으며 크기는 1.5 μm 정도 였다. 이상의 특성을 근거로 분리균주는 *Trichoderma* sp.로 동정하였으며[13], 분리균주를 도정하여 *Trichoderma* sp. SO-571로 명명하였다.

토양에서 분리한 균주 *Trichoderma* sp. SO-571의 cellulase를 생산하기 위해 생산용 배지에서 배양시간에 따른 변화를 측정하였다(Fig. 1). 균체량은 배양 62시간에 가장 높은 양을 보였으며, 62시간 이후에는 서서히 균체량이 감소되는 경향을 보였다. 또한 cellulase 활성은 배양시간이 증가할수록 증가하는 경향을 보였으며, 대수기 말기에서 효소의 활성이 나타나기 시작하여 시간이 지남에 따라 효소의 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 112시간 배양시 14,500 unit/ml의 효소 활성을 보였다. Yu 등 [16]도 *Trichoderma reesei* Rut C30 배양시 배양시간이 증가할수록 cellulase의 활성이 증가하는 경향을 보고하였으며, 균체량 역시 48시간 배양시 가장 많은 양을 보였고, 균체량과 cellulase 생산량 비교시 정지기에서 가장 높은 cellulase 활성을 보고하였으며, Nam 등 [12]도 탄소원에 따른 cellulase 생산변화를 측정한 결과 배양시간이 증가할수록 cellulase 활성이 증가하는 것을 보고한 바 있다.

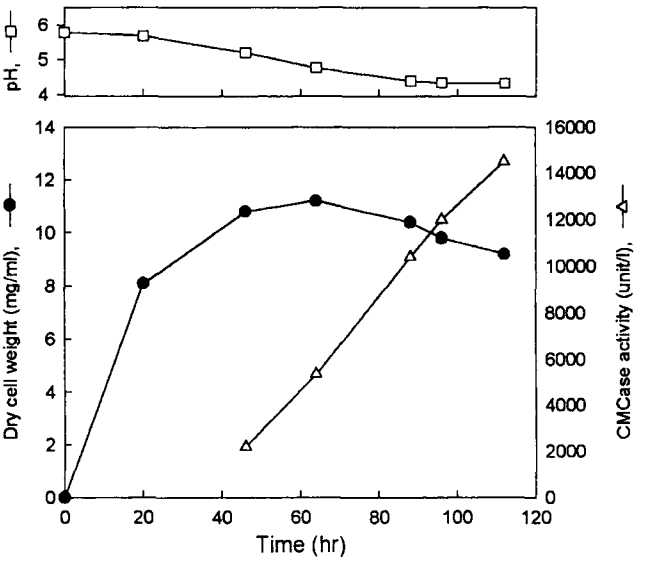

Fig. 1. Cell growth and cellulase activity of *Trichoderma* sp. SO-571 at 30 fermenter. Culture media were composed with 3.0% cellulose, 4.0% soybean powder, 3.0% wheat bran, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% urea, 1.0% CSL, 0.5% KH_2PO_4, and 0.2% Tween 80. Fermentation was carried out at 30°C, pH 5.0 with 300 rpm and 1 vvm.

Cellulase 정제

Cellulase를 산업적으로 생산하기 위해서는 기존의 정제방법과는 달리 대량 정제과정을 거쳐야 한다. Ultrafiltration을 이용하여 대량정제를 하기 위해서는 여과과정을 거쳐야 하며, 여과 효율을 높일 수 있는 여과 보조제를 사용하여야 한다. 여과보조제는 여과과정중의 여과층 생성, 세포의 filter cloth의 흡착 등을 방지할 수 있어 여과 효율을 높일 수 있다. Perlite는 값이 싸고, 불활성이며, pH 9까지는 안정한 물질로 여과 보조제로 널리 사용되는 물질이다[1]. Cellulase의 여과에도 역시 perlite를 여과 보조제로 사용하였으며, 여과 후 ultrafiltration 시 여과 효율이 상승하였다. Ultrafiltration을

Table 1. Commercial separation of cellulase from *Trichoderma* sp. SO-571.

Separation step	Volume (l)	Protein (mg)	Activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	20	88,597	290,000	3.3	1.0	100
Gel treatement with $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and Na_2HPO_4	19	64,675	226,200	3.5	1.1	78.0
Filtration with filter press	18	25,801	175,500	6.8	2.1	60.5
Concentration with ultrafiltration	5.1	9,030	138,645	15.3	4.6	47.8

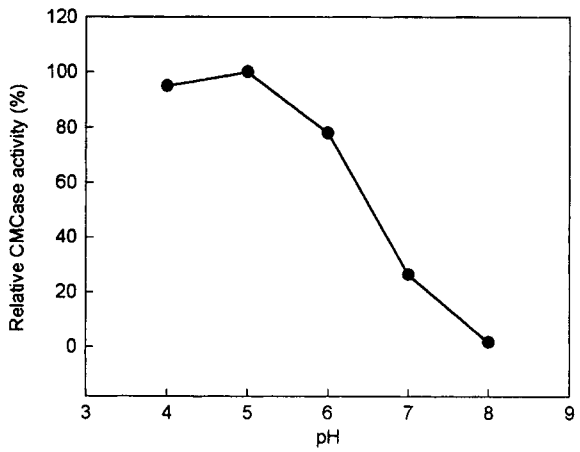

Fig. 2. Optimum pH of cellulase from *Trichoderma* sp. SO-571. The acetate buffer (pH 4-5.5) and phosphate buffer (pH 6-8) were used.

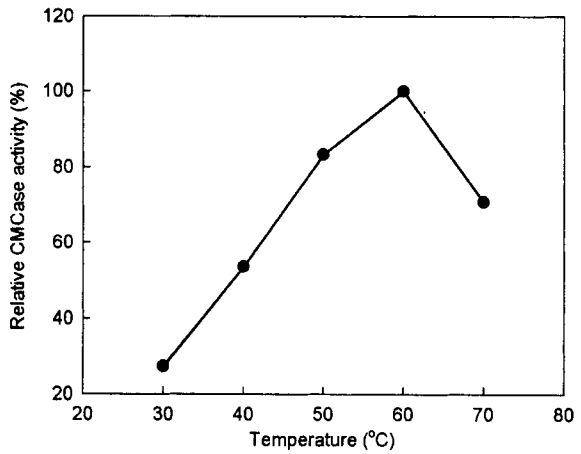

Fig. 3. Optimum temperature of cellulase from *Trichoderma* sp SO-571.

이용하여 cellulase를 부분 정제한 결과(Table 1), 47.8%의 수율과 4.6배의 정제도를 나타냈다.

Cellulase 반응 특성

Cellulase를 섬유가공 처리에 사용하기 위한 최적 반응 pH 및 온도를 측정 하였다. 반응 pH에 대한 영향을 측정한 결과(Fig. 2), pH 5에서 가장 높은 활성을 보였으며, pH가 중성으로 증가할수록 효소의 활성이 급격히 감소하여 pH 7과 8에서는 26.4%와 1.7%의 상대 활성을 보였다. 그러나 pH 4에서는 95%의 상대활성을 보여 산성 cellulase 임을 확인하였다. Huh와 Lee [8]의 *Trichoderma viride*가 생산하는 cellulase의 최적 반응 pH는 pH 4.8-5.2이었으며, pH 3에서의 상대활성이 30%였다고 보고하였다.

최적 pH 5.0에서 반응온도에 대한 영향을 측정한 결과(Fig. 3), 60°C에서 최대의 활성을 보였으며, 50°C와 70°C일 때 83.3%와 70.8%의 상대활성을 보였다. Huh와 Lee [8]의 *Trichoderma viride*에서 생산되는 cellulase의 최적온도는 55°C였으며, Novo사의 상업용 효소 Celluclast 1.5 L과 Cellusoft L[14]역시 최적 반응조건이 pH 5.0과 50°C로 *Trichoderma* sp. SO-571이 생산하는 cellulase의 반응특성과 큰 차이를 보이지 않았다.

섬유에 대한 cellulase 처리 효과

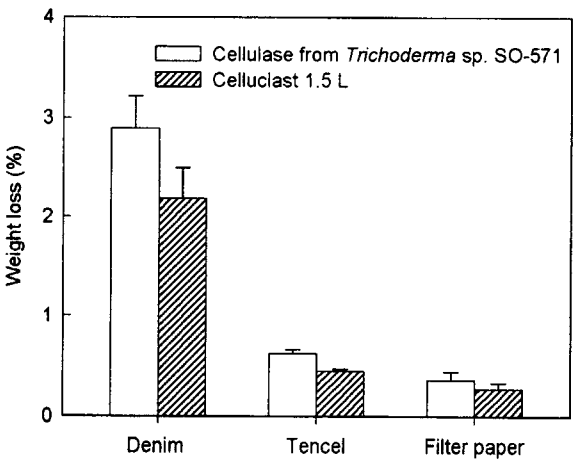

Fig. 4. The weight loss of cellulosic fabric treated with the cellulase from *Trichoderma* sp. SO-571 and Celluclast 1.5 L.

섬유가공 처리에 대한 cellulase 효과를 측정하고자 청바지 제조에 사용되는 청천과 정제된 섬유소로 만들어진 텐셀을 대상으로 감량율을 측정한 결과(Fig. 4), CMCase의 활성으로 100 unit에 해당되는 양을 첨가 후 청천에 대한 감량율은 분리균주가 생산한 cellulase는 2.9%의 감량율을 보였고, 산업적으로 널리 쓰이는 Celluclast 1.5 L은 2.2%의 감량율을 보여 유의적 차이는 없었다. 반면 텐셀에 대한 처리 효과를 측정한 결과, 분리균주의 cellulase는 0.62%, Celluclast 1.5 L은 0.45% 감량율 보여 Celluclast 1.5 L이 섬유에 대한

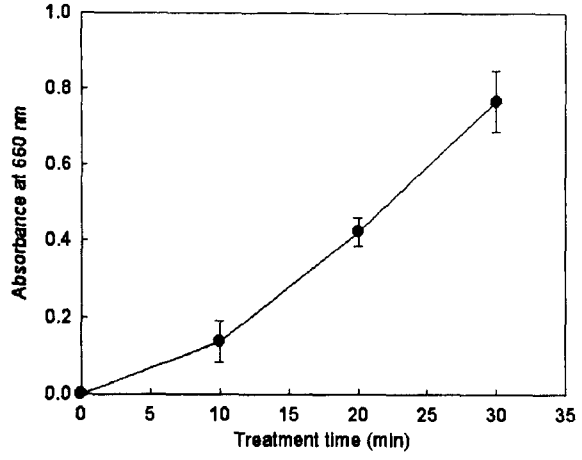

Fig. 5. The absorbance of washing water after denim treated with the cellulase from *Trichoderma* sp. SO-571.

손상율이 다소 낮은 결과를 보였다. 또한 여과지에 대한 감량율을 측정한 결과, 분리균주의 cellulase는 0.36%, Celluclast 1.5 L은 0.27% 감량율을 보여 유의적 차이는 없었다.

또한 청천 처리시 반응시간에 따른 청천의 탈색정도를 측정하고자 세탁 가공처리한 물의 청색정도를 660 nm에서 측정한 결과(Fig. 5), 세탁시간이 증가할수록 흡광도가 증가하였으며, 이는 분리균주의 cellulase에 의해 청바지 염색에 사용된 염료 indigo가 탈색되어 나타나는 결과이다.

이상의 결과에 따라 토양에서 분리한 균주 *Trichoderma* sp. SO-571이 생산하는 cellulase는 기존의 산업용 효소인 Celluclast 1.5 L과 비교시 직물의 처리가공에 적합한 효소임을 알수있으며, 텐셀보다는 청바지 가공에 더 적합한 것으로 생각된다.

요 약

토양에서 분리한 균주 *Trichoderma* sp. SO-571의 cellulase를 생산하기 위해 3.0% cellulose, 4.0% 탈지대두, 3.0% 밀기울, 0.5% $(NH_4)_2SO_4$, 0.2% urea, 1.0% CSL, 0.5% KH_2PO_4, 0.2% Tween 80을 사용하여 생산한 결과, 균체량은 배양 62시간에 가장 높은 양을 보였으며, cellulase 활성은 배양시간이 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. Ultrafiltration을 이용하여 cellulase를 정제한 결과, 47.8%의 수율과 4.6배의 정제도를 보였다. Cellulase를 섬유가공 처리에 사용하기 위한 최적 반응 pH 및 온도는 pH 5, 60°C에서 최대의 활성을 보였다. 섬유가공 처리에 대한 cellulase 효과를 측정하고자 청천과 텐셀을 대상으로 감량율을 측정한 결과, 청천에 대한 감량율은 분리균주가 생산한 cellulase는 2.9%, Celluclast 1.5 L은 2.2%의 감량율을 보였다. 텐셀 처리시 분리균주의 cellulase는 0.62%, Celluclast 1.5 L은 0.45% 감량율을 보였다. 또한 반응시간에 따른 천청에 탈색정도를 측정하고자 세탁 가공처리한 물의 청색정도를 660 nm에서 측정한 결과, 세탁시간이 증가할수록 흡광도가 증가하였다.

REFERENCES

1. Akers, R. J. and A. S. Ward. 1977. Liquid filtration theory and filtration pretreatment. pp. 169-250. *In* Orr C, ed. *Chemical processing and engineering.* Marcel Dekker, New York.
2. Beguin, P. and J. P. Aubert. 1994. The biological degradation of cellulase. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 25-58.
3. Chaplin, M. F. 1987. Monosaccharides, pp. 1-13. *In* M. F. Chaplin and J. F. Kenne (eds.), *Carbohydrate Analysis-A Practical Approach,* IRL Press. Washington DC.
4. Effers, J. N. and Q. W. Denim. 1994. New opportunity for denim garment manufactures. *Am. Dye Stuff Rep.* **83**: 15-18.
5. Ghose, T. K. 1987. Measurement of celluase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**: 257-268.
6. Ghose, T. K. and V. S. Bisaria. 1979. Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 131-146.
7. Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanase. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
8. Huh, T. R. and S. Y. Lee. 1981. Cellulase of *Trichoderma viride. Kor. Biochem. J.* **1**: 55-71.
9. Kang, J.Y. and H. S. Ryu. 1990. A study on softening finish of cotton fabric using cellulase. *J. Kor. Soc. Cloth. Text.* **14**: 262-273.
10. Klahorst, S., A. Kumar, and M. M. Mullins. 1994. Optimizing the use of cellulase enzymes. *Text. Chem. Color.* **26**: 13-18.
11. Lee, H., H. J. Suh, H. J. Yu, S. So and S. H. Oh. 2002. Commercial production and separation of catalase produced by *Micrococcus* sp. *J. Food Sci. Nutr.* **7**: 28-32.
12. Nam, J. H., Y. M. Koo, and H. S. Yun. 1998. Effects of mixed carbon sources on the production of cellulase by *Trichoderma reesei. Kor. J. Mycol.* **26**: 239-245.
13. Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma. Mycol. Rap.* **116**: 1-54.
14. Shin, H. W. and H. S. Ryu. 1997. The washing finish of blue jeans. *J. Kor. Soc. Cloth. Text.* **21**: 471-481.
15. Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 1-81.
16. Yu, X. B, H. S. Yun, and Y. M. Koo. 1998. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* Rut C30 in a batch fermenter. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 575-580.

(Received Sep. 10, 2002/Accepted Feb. 6, 2003)