

# 미생물 효소를 이용한 고효율 효소 탈묵제의 개발(제1보)

-Cellulase와 Xylanase를 생산하는 Bacteria의 분리 및 선발-

박성철<sup>†</sup> · 강진하 · 이양수

(2002년 6월 10일 접수; 2003년 2월 5일 채택)

## Development of High Efficient Enzymatic Deinking Agent by Microorganism( I )

- Isolation and Screening of Bacteria Producing Cellulase and Xylanase -

Seong-Cheol Park,<sup>†</sup> Jin-Ha Kang, and Yang-Soo Lee

(Received on June 10, 2002; Accepted on February 5, 2003)

### ABSTRACT

This study was carried out to select the useful bacteria which secret extracellular enzymes for enzymatic deinking agent of old newspaper. CMCase, FPase and xylanase activities of the bacteria liquid culture were measured at optimal growth conditions. Clear zone test was checked on the solid culture. The results of this study were as follow:

Eight strains of 28 bacteria isolated from a paper mill soil ground were shown strong CMCase and xylanase activity with the clear zone test. The optimal pH and temperature for culture growth were 6~8 and 26~34°C, respectively and optimal culture period were less than 60 hours. Based on CMCase, FPase and xylanase activity, strain No. 18, 21, 22 and 28 which were relatively higher than the other strains, were selected for further enzymatic deinking research.

**Keywords :** *Enzymatic deinking agent, wastepaper, enzyme, cellulase, CMCase, FPase, xylanase*

### 1. 서론

경제 및 문화의 발전과 생활수준의 향상, 그리고 인구의 증가로 인하여 지류소비도 꾸준히 증가하고 국내

의 제지산업도 국가 경제발전에 따라 성장을 거듭하고 있다. 그러나 펄프 자급률은 45.8%에 불과하고 목재 자원의 부족으로 해마다 막대한 외화를 지불하면서 펄프와 고지를 수입하고 있다.

• 전북대학교 농과대학 산림과학부(Division of Forest Science, College of Agriculture, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

† 주저자 (Corresponding author) : E-mail : jihu2002@orgio.net

이에 따라, 자원의 효율적 이용과 폐기물 감량화 추세에 부응하여 매립, 소각 등으로 야기되는 오염원을 최소화하고자, 고지를 탈목하여 이용하는 것이 더욱 중요시 되고 있다. 최근에는 펄프·제지 산업에 생물공학분야가 도입되어 그 비중이 점차 확대되면서 효소 탈목, biopulping, slim control, biobleaching, 지력증강제용 효소변성전분 등에 많은 관심이 집중되고 있다.<sup>1,2,3)</sup> 특히 효소탈목은 화학약품을 사용하는 기존 탈목방법에 비해 에너지 비용절감, 종이의 물성개선, 환경오염 유발물질의 생성감소 등의 부가적인 장점이 보고 되고 있다.<sup>4,5,6)</sup> 효소탈목 과정에는 cellulase, lipase, hemicellulase, ligninase 등의 목재 구성성분 분해효소들이 관여할 것으로 생각되고 있으나, 아직 명확한 탈목 mechanism은 규명되어 있지 못하다.<sup>7)</sup>

따라서, 본 보에서의 연구는 탈목에 관여하는 목재의 탄수화물 분해효소를 얻기 위하여 자연계에서 새로운 균주를 수집하고, 이들의 생육조건 및 효소활성을 측정하여 탈목에 필요한 효소의 역가가 높은 미생물을 선발코저 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시료채취 및 균주분리

전주시 인근의 제지공장 내 토양에서 시료를 채취하였고, 멸균 증류수 10 ml에 약 1 g의 토양시료를 첨가하여 현탁시킨 후 정지하여 상정액만을 사용하였다.

상정액을 100배, 1,000배, 10,000배 희석하여 2종의 배지에 각각 도말하였고 30℃에서 24시간 배양하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같고 멸균 후 cyclo-

**Table 1. Compositions of Isolating medium**

Yeast extract-Dextrose-CaCO <sub>3</sub>		King's medium B	
Yeast extract	10 g	Bactopeptone	20.0 g
Calcium carbonate (USP light powder)	20 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2.5 g
Agar	15 g	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6.0 g
Distilled water	900 ml	Glycerol	15.0 ml
+		Agar	15.0 g
Dextrose	20 g	Distilled water	1000 ml
Distilled water	100 ml		

heximide 100 ~ 200 mg/l 을 첨가하였다.

배지에 나타난 단일 colony를 각각의 petridish와 사면배지에 옮기고, 30℃ 에서 5일간 배양 후 4℃ 냉장고에 보관하였다.

### 2.2 균주의 Clear zone 측정

CMC와 xylan을 분해하는 효소의 분비를 확인하기 위하여 균주를 다음과 같은 조성의 배지에 접종하고, 30℃에서 5일간 배양한 후, Congo red(0.02%)법을 이용하여 염색 후 균주의 성장직경과 분해직경을 측정하였다.

- CMC 10 g/l , Xylan 10 g/l , Yeast extract 5 g/l , Bactopeptone 5 g/l , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l , Agar 15 g/l , pH 7.0

### 2.3 균주의 생육조건 구명

균주의 최적 생육조건을 검토하기 위하여 전배양은 30℃, 24hr., 200rpm 조건으로 하였으며, 본배양은 전배양액 1%에 접종하여 pH, 온도, 배양기간을 변화시켜가면서 배양하였다. 배양액의 혼탁도는 600nm에서 측정하였으며, 최대혼탁도를 나타낸 조건을 최적 생육조건으로 하였다. 전배양 및 본배양에 사용된 배지의 조성은 다음과 같다.

- CMC 10g/l , Bactopeptone 10g/l , Yeast extract 5g/l

#### 2.3.1 pH

배지의 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11로 조절하여 30℃, 24 hr., 200 rpm 조건으로 배양하여 최적 pH를 구명하였다.

#### 2.3.2 온도

배지를 구명된 적정 pH로 조절하고 배양온도를 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36℃로 변화시켜가면서 24 hr., 200 rpm 조건으로 배양하여 최적 온도를 구명하였다.

### 2.3.3 배양기간

구명된 최적의 pH 및 배양온도의 조건에서 200rpm으로 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 36, 48, 60, 72, 84hr. 배양하여 최적 배양기간을 구명하였다.

## 2.4 조효소액의 조제

균주를 각각의 pH, 온도, 배양기간이 구명된 최적 생육조건으로 다음과 같은 배지 조성에서 배양하였으며, 배양액을 4000rpm으로 30min. 동안 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

- CMC 10 g/l , Xylan 10 g/l , Yeast extract 5 g/l , Bactopeptone 5 g/l ,  $K_2HPO_4$  1 g/l

## 2.5 효소활성 측정

### 2.5.1 CMCase 활성 측정

기질 용액으로 1% CMC 0.25 ml와 0.1 M 인산완충 용액(pH 7.0) 0.5 ml를 효소액 0.25 ml와 혼합하여 50°C 에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰고 생성된 환원당을 DNS법에 의하여 540 nm에서 흡광도로 측정하였다.

효소단위는 1분동안 1  $\mu$ mol의 glucose에 해당하는

환원당이 생성되는 속도의 효소량을 1 IU로 하였다.

### 2.5.2 Filter paper 분해활성(FPase) 측정

Whatman No.1 50 mg(1×6 cm)을 기질로 하고 0.1M 인산완충용액(pH 7.0) 1.5 ml를 효소액 0.5 ml와 혼합하여 50°C에서 60분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 환원당 정량 및 효소단위는 CMCase에서와 동일하게 행하였다.

### 2.5.3 Xylanase 활성 측정

기질 용액으로 0.5% Xylan 0.5ml와 0.1M 인산완충용액(pH7.0) 0.25ml를 효소액 0.25ml와 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰고 환원당의 측정은 CMCase에서와 동일하게 행하였다.

효소단위는 1분동안 1  $\mu$ mol의 xylose에 해당하는 환원당이 생성되는 속도의 효소량을 1IU로 하였다.

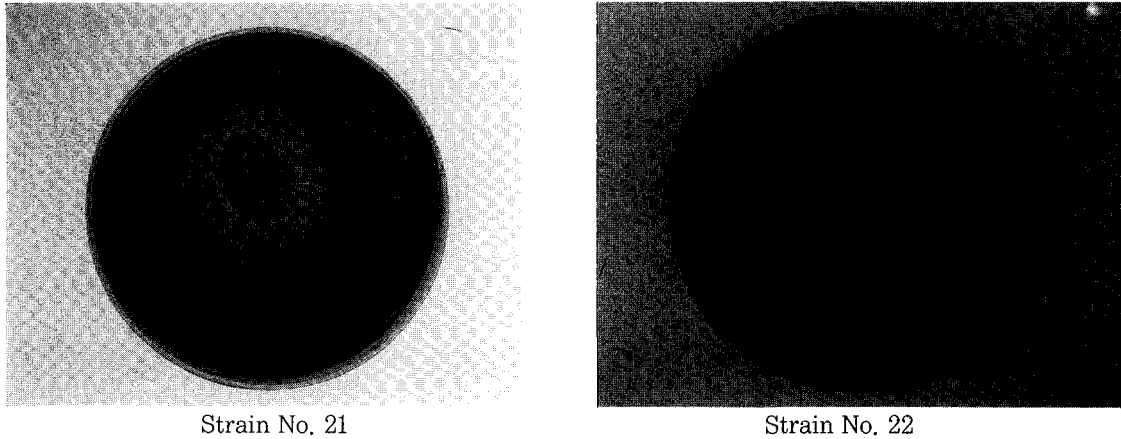
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 Clear zone

Petridish에 균주들을 접종하고 30°C에서 5일간 배양한 균주들의 직경 및 분해직경을 측정한 결과는

Table 2. Diameters of colonies and clear zones

Strain NO.	Diameter of colony (mm)	Diameter of clear zone (mm)	Strain NO	Diameter of strain (mm)	Diameter of clear zone (mm)
1	15.5	0	15	15.5	40.5
2	21.0	37.5	16	49.0	0
3	8.5	0	17	14.0	0
4	8.5	0	18	24.5	48.0
5	8.0	0	19	15.5	0
6	14.5	0	20	10.0	0
7	14.5	0	21	21.5	43.5
8	10.0	0	22	28.0	48.0
9	7.5	0	23	17.0	0
10	16.5	24.5	24	17.0	0
11	13.0	0	25	17.0	0
12	33.5	0	26	17.0	0
13	17.5	0	27	22.0	0
14	18.0	34.5	28	36.0	47.5



**Fig. 1. Bacteria producing cellulase and xylanase show the clear zones with degrading CMC and xylan**

Table 2와 같았는데, 그 예는 Fig. 1과 같다.

CMC와 Xylan을 분해하는 효소를 생산할 수 있는 균주를 확인하기 위하여 이들을 함유한 배지에 각 균주를 30℃에서 5일간 배양한 결과 전반적으로 균주의 성장은 양호하였으나 Clear zone을 형성하는 균주는 8종으로 이들 균주가 CMCase와 Xylanase 활성이 높을 것으로 사료된다.

### 3.2 적정 생육조건외의 구명

각 균주의 적정 생육조건들을 혼탁도를 이용하여 pH, 온도, 배양시간을 검토한 결과는 다음과 같다.

#### 3.2.1 pH

pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11로 조절된 배지에 전 배양된 각 균주의 동일량을 접종하고 30℃에서 24 hr. 배양하여 혼탁도를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

적정 생육 pH 6.0을 적정 생육조건으로 하는 것은 No. 16, 22으로 2종이었고, pH가 7.0인 것으로는 No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 14, 18, 19, 21, 25, 27로써 15종이었으며, pH 8.0을 적정 생육조건으로 하는 것은 No. 7, 8, 9, 13, 15, 17, 20, 23, 24, 26, 28로 11종이었다. 이는 토양에서 분리한 *Bacillus stearothermophilus*와 *Cellulomonas* sp. YE-5의 생장이 중성에서 가장 높을 결과와 유사하였다.<sup>8,9)</sup> 이상의 결과를 검토하여 볼 때 균주의 적정 생육조건이

전반적으로 중성영역임을 확인 할 수 있었다.

#### 3.2.2 온도

구명된 최적조건외의 pH로 조절된 배지에 전배양된 각 균주를 동일량 접종하고 배양온도를 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36℃로 변화시켜 24 hr. 배양하여 혼탁도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

적정 생육온도를 26℃로 하는 것은 No. 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12로 10종이었고 28℃는 No. 18, 22로 2종이었으며 30℃는 No. 3, 11, 13, 15, 16, 17, 23, 24, 25, 26으로 10종, 32℃는 No. 21, 28 2종 뿐이었고 34℃는 No. 14, 19, 20, 27로 4종이었다. 상기의 결과를 검토하여 볼 때 분리된 균주는 중온성 균주이었다.

#### 3.2.3 배양기간

구명된 최적조건외의 pH로 조절된 배지에 전배양된 각 균주를 동일량 접종하고 배양온도도 각 균주에 최적의 온도로 하고 배양시간을 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 36, 48, 60, 72, 84 hr.로 연장시켜가면서 배양시간에 대해 검토한 결과는 Fig. 4와 같다.

균주가 성장 정지기에 이르는 때를 최적 배양기간으로 하였고, 각각 균주의 최적 배양기간이 12 hr.의 경우는 No. 24, 26이었고 15 hr.의 경우는 No. 23, 18 hr.의 경우는 No. 13이었다. 24 hr.의 경우는 No. 2, 6, 8, 12, 15, 17, 22, 25, 27, 28이었으며 36 hr.의

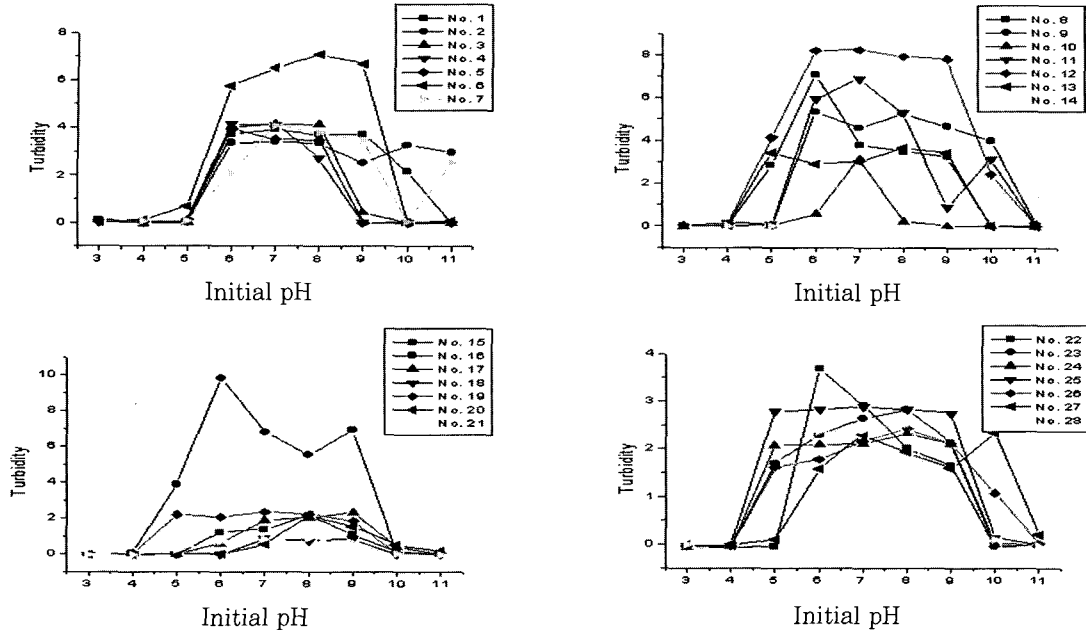


Fig. 2. Effects of pH on the growth of isolated bacteria

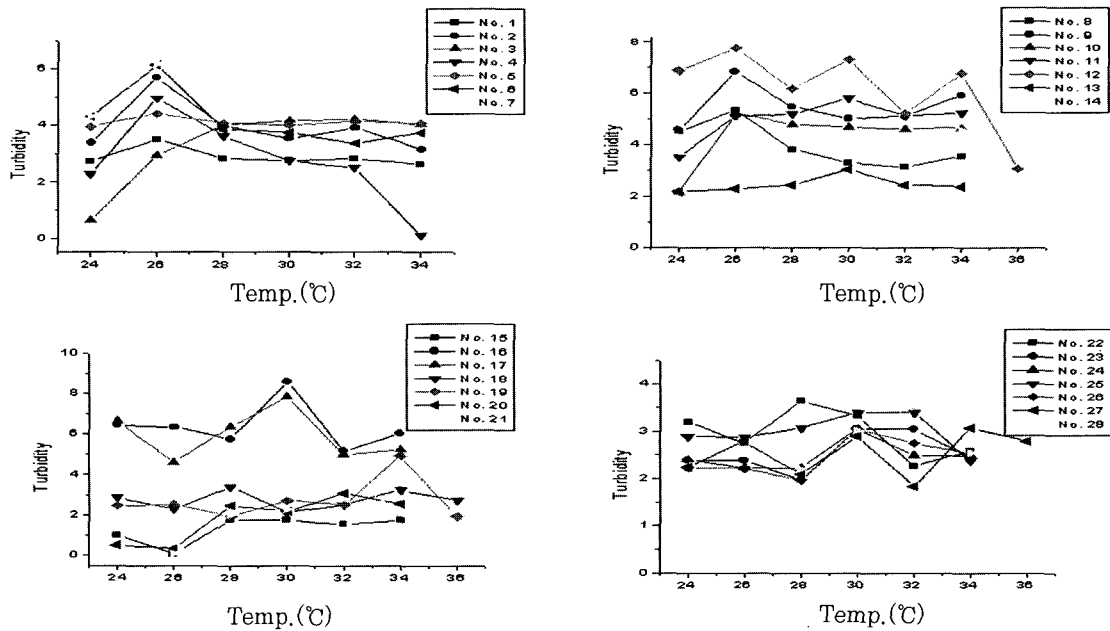


Fig. 3. Effects of temperature on the growth of isolated bacteria

경우는 1, 5, 9, 11, 14, 16, 18, 19, 21이었다. 또한 48 hr.의 경우는 No. 3, 7, 20이었고 60 hr.의 경우

는 No. 4, 10이었다. 이상의 결과들을 검토해 볼 때 대부분 60 hr. 이전에 정지기에 도달하여 단시간에 성

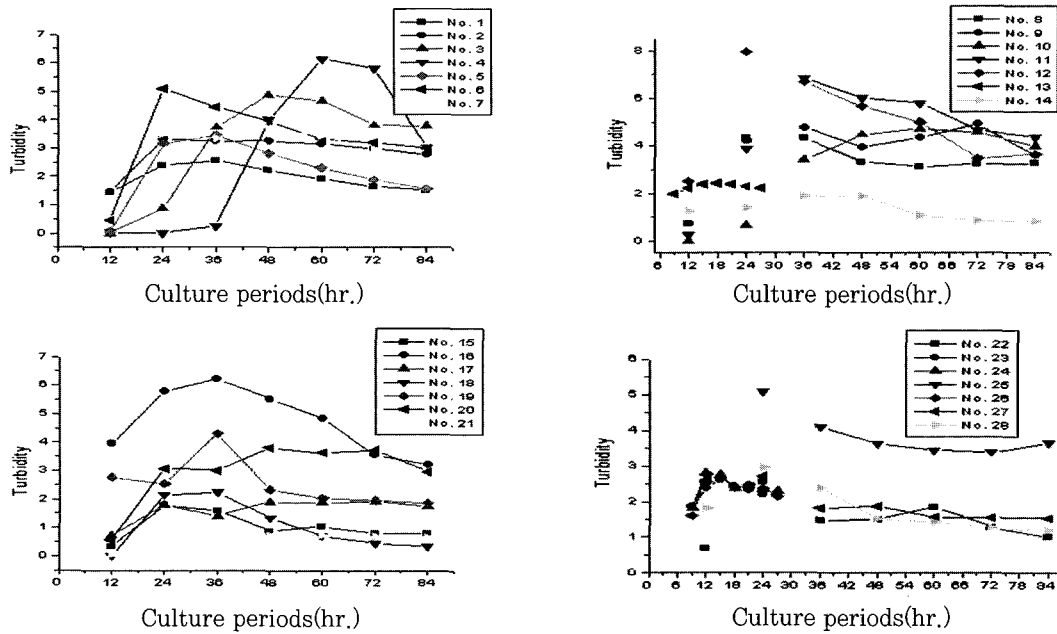


Fig. 4. Effects of culture periods on the growth of isolated bacteria

Table 3. Enzyme activities of bacteria at optimal condition

unit: IU/ml

Strain No.	Enzymes			Strain No.	Enzymes		
	CMCase	FPase	Xylanase		CMCase	FPase	Xylanase
1	0.26	0.13	0.42	15	ND	0.13	0.35
2	0.28	0.14	0.43	16	0.29	0.13	0.36
3	ND	ND	ND	17	0.29	0.21	0.74
4	ND	0.13	ND	18	0.43	0.20	0.84
5	ND	ND	0.34	19	ND	ND	0.40
6	0.26	0.14	0.58	20	0.29	0.13	0.35
7	0.26	ND	ND	21	0.54	0.17	0.72
8	0.26	0.13	0.36	22	0.34	0.17	1.60
9	0.26	0.13	0.35	23	0.26	0.13	0.37
10	0.39	0.22	0.60	24	ND	0.13	ND
11	0.27	ND	0.39	25	0.27	ND	0.37
12	ND	0.13	0.37	26	ND	ND	0.37
13	0.29	ND	ND	27	ND	0.13	ND
14	ND	0.13	0.36	28	0.99	0.22	2.08

ND : not detected

장하는 것으로 나타났다.

활성이 전반적으로 우수한 균주인 No. 18, 21, 22, 28의 4종을 선발하였다.

### 3.3 효소활성

각 균주의 배지를 최적조건의 pH로 조절하고, 배양 온도와 시간을 구명된 최적의 조건으로 하고 배양하였을 때 효소활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

효소활성 측정 결과 CMCase 활성의 경우 No. 28, 21, 18, 10의 순으로 높았고, FPase 활성은 28, 17, 10, 18 순이었으며, xylanase 활성은 28, 22, 18, 21 순이었다. 전술한 Clear zone 측정 결과와 효소활성을 비교하여 볼 때 부분적으로는 일치하였으나 상관관계는 적었는데, 하 등<sup>10)</sup>의 연구에서도 Clear zone과 효소활성의 상관관계가 없었음을 보고한 바 있다. 이상의 결과를 검토하여 볼 때 세 가지 효소를 고르게 다량 분비하는 균주는 No. 18, 21, 22, 28의 4 종이었다.

## 4. 결론

본 보의 연구는 자연계에서 탈묵에 유용한 박테리아를 선발하기 위하여 제지공장 내 토양에서 균주를 분리하고 그 최적 생육조건을 구명하며, 균주가 분비하는 효소의 활성을 측정하였는데, 그 결과로부터 얻은 결론은 다음과 같다.

- 1) 토양에서 분리한 균주는 총 28 종이었는데, Clear zone 측정 시 CMC와 xylan를 분해하는 균주는 8 종이었다.
- 2) pH에 대한 적정 생육조건은 pH 6.0은 2종, pH가 7.0은 15종, pH 8.0은 11종으로 균주들의 적정 pH는 전반적으로 중성영역이었다.
- 3) 온도에 대한 적정 생육조건은 26℃의 경우가 10종, 28℃는 2종, 30℃는 10종, 32℃는 2종, 34℃는 4종으로서 중온성 균주에 속했다.
- 4) 배양기간에 대한 적정 생육조건은 12 hr.은 2종, 15 hr.과 18 hr.은 각 1종, 24 hr.은 10종, 36 hr.은 9종이었다. 또한 48hr.은 3종, 60 hr.은 2종으로서 60 hr. 이전에 정지기에 도달하여 단 시간에 성장하는 경향이였다.
- 5) 상기의 적정 생육조건에서 효소활성을 측정된 결과를 검토하여 CMCase, FPase 및 xylanase의

## 인용문헌

1. Hassan K Sreenath, Vina W. Yanf, Harold H. Burdsall, Jr., and Thomas W. Jeffrees, Toner Removal by Alkaline-Active Cellulase from Desert Basidimycetes, *Enzymes for Pulp and Paper Processing*, p. 267-279 (1996).
2. Tae-Jin Eom, Application of Enzymes in Pulp and Paper Industry, *Proc. Internat'l Conf. For. Sci.*, p. 120-127 (1999).
3. 손광희, 복해성, 오세균, 고지 탈묵용 Cellulase 및 Xylanase 생산, *산업미생물학회지*, 20(5):527-533 (1992).
4. H. Pala, M. Mota and F. M. Gama, Modification of secondary pulp fibre fractions by enzymatic treatment, *8th ICBPPI*, p. 260-262 (2001).
5. Thomas Jeffries, John H. Klungness, Preliminary results of enzyme-enhanced versus conventional deinking of xerographic printed paper, *Recycling Symposium*, p. 183-188 (1993).
6. U. Viesturs, M. Leite, M. Eisimonte, T. Eremeeva, A. Treimanis, Biological deinking technology for the recycling of office waste papers, *Bioresource Technology*, 67: 255-265 (1999).
7. Anne L. Morkbak and Wolfgang Zimmermann, Deinking of soy bean oil based ink printed paper with lipases, *7th ICBPPI, C*: 187-188 (1998).
8. 송현숙, 최용진, *Bacillus stearothermophilus*에 의한 Xylanase 생산, *산업미생물학회지*, 17(4):289-294 (1989).
9. 최동철, 허남윤, 유주현, 오두환, *Cellulomonas* sp. YE-5가 생산하는 Cellulase의 정제, *산업미생물학회지*, 18(4):376-382 (1990).
10. 하재석, 이영남, 임재윤, Exo-xylanase 생산균의 분리 및 동정, *산업미생물학회지*, 20(1):14-19 (1992).