Journal of Korea TAPPI
Vol. 35. No. 3, 2003
Printed in Korea

호알카리성 목질분해 효소를 이용한 폐지재생(제1보)

-목질분해 효소의 단리 및 특성-

강석현 · 이중명 · 박성배 · 엄태진†

(2003년 2월 8일 접수; 2003년 6월 20일 채택)

Recycling of Waste Paper with Alkaline Cellulolytic Enzymes(I)

- Preparation and characteristics of cullulolytic enzymes-

Suk-Hyun Kang, Jung-Myoung Lee*, Soung-Bae Park and Tae-jin Eom†

(Received on February 8, 2003; Accepted on June 20, 2003)

ABSTRACT

Alkaline cellulolytic enzymes are prepared from Coprinus cinereus 2249. Recovery method of enzyme protein from cultured medium and effect factors on enzyme activity of protein were investigated.

The results could summarized as follows,

① Amount of enzyme protein from cultured medium was highest in incubation with shaking and addition of skim milk.

② Protein from cultured medium was alkaline enzymatic protein which shows the highest activity at pH 9.0.

③ The most effective recovery method of enzyme protein was the precipitation of protein by addition of cultured medium of protein in ethanol.

④ The enzyme activity was enhanced by tween-80 and decreased with $Al_2(SO_4)_3$, H_2O_2 et al, and was little changed with metal ions except Hg^{++}.

Keyword : *Recycling, Enzyme, Activity.*

1. 서론

펄프, 제지 및 목재 산업에서 친환경적인 공정으로의 변화를 위한 가장 효과적인 방법은 생물공학기술의 적용이라고 할 수 있다.

펄프, 제지 산업관련 생명공학기술은 biopulping,

· 경북대학교 임산공학과(Wood Sci. and Tech. Kyungbook Nat'l Univ. Daegu 702-701, Korea)
· Department of Paper Sience, North Carolina State University, USA.
· 본 논문은 과학재단 특정기초연구(과제번호 1999-1-31700-002-2)의 지원에 의해 수행되었음.
†주저자 (Corresponding author): E-Mail; tjeom@knu.ac.kr

biobleaching, biodeinking, bioboard making 등을 들 수 있으며 관련 분야의 상당한 진보가 예상되고 있다.

생물공학적 이용기술 중 미생물 이용에 관련된 연구도 적극적으로 이루어지고 있으나 효소공학적 기술을 이용한 연구사례가 많고 일부 실용화되고 있다. 예를 들면 Jackson 등[1]의 여수도 개선, morgan 등[2]의 fiber의 강도증가, Eom(1991)[3], Zeyer(1994)[4], Jeffries 등[5]에 의한 효소탈묵 등이 효소를 이용한 대표적 연구 및 응용 사례라고 할 수 있다.

그러나 이상의 연구에서 사용된 효소는 일반적인 산성 cellulase계 효소들로서 반응 최적 pH가 5.0~7.0로서 약산성인 점이 현장 적용상 문제점으로 지적되고 있다. 이는 제지공정이 공통적으로 pH 9.0~10.0의 alkali영역에서 운영되고 있기 때문에 환경 친화형 제지공정 개선을 목적으로 하기 위해서는 제지공정에 도입되는 용수의 pH를 바꾸어 주거나 중성상태에서 폐지를 해섬해야 하는데 pH 조절을 위한 추가비용과 많은 동력비가 소요된다.

한편, 지금까지 자연계에서 분리된 호알카리성 cellulase는 대부분이 Bacillus 속의 세균으로부터 유래된 것이다. 그러나 Bacillus 속으로부터 유래되는 cellulase의 경우 일반적으로 알려져 있는 endo-β-1,4-glucanase(CMCase, EC 3.2.1.4), exo-β-1,4-glucanase (Cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91)와 β-glucosidase (Cellobiase EC 3.2.1.21)의 3가지 components로 구성되어 있는 진균류에 비해 endo-β-1,4-glucanase(EC 3.2.1.4) components의 점유율이 지나치게 높아 진균류 유래의 cellulase보다 산업적 실효성이 미약한 것으로 알려져 있다.[6]

이러한 문제점을 해결하기 위한 방안으로서 균류(Fungus)가 분비하는 호알카리성 cellulase의 연구보고가 소개되기 시작하고 있다. Lion[7]과 Sharyo 등[8]의 알카리성 lipase를 이용한 soy lipid-based offset ink의 제거에 관한 연구결과를 시작으로, Sreenath 등[9] 은 목질 분해 균주에서 호알카리성 cellulase를 단리하여 pH 7.0에서 가장 높은 활성도를 나타내었지만 pH 8.5에서도 활성을 나타내었으며, 균의 생육 시 계면활성제에 대한 효과는 없었지만, 탈묵시험 결과 계면활성제 존재 하에서 pH 8.5일 때 대조구(Humicola 유래의 중성 cellulase)보다 잔존 잉크 양이 적어 우수한 탈묵효과를 보인다고 보고하였다. 저자 등[10,11]은 먹물버섯이 pH 9.0~10.0의 배지 중에 성장할 때 알칼리성 목질 분해 효소를 분비한다는 결과와 이 효소를 이용하여 폐지에 처리하였을 때 우수한 탈묵효과를 보인다는 것을 보고 하였다.

본 연구에서는 먹물버섯으로부터 alkaline cellulohytic enzyme의 분비를 촉진시키고 분비된 효소의 단리, 회수효율 및 최적 보관조건을 모색하여 그 결과를 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시 균주

본 실험에 사용한 균주는 Coprinus cinereus 2249이며 Potato dextrose agar(PDA) 배지에 보존하면서 2주마다 동일배지에 계대배양 하였다.

2.2 배양 및 조효소 단리

균주의 배양은 Table 1과 같은 조성의 배지를 사용하였다.

삼각플라스크(3ℓ)에 Table 1과 같은 조성의 배지 2ℓ를 넣고 멸균시킨 후 PDA배지 상에서 균사를 만연시킨 균을 소정량 분취하여 무균 상태에서 배지 중에 주입한 후 25 ℃와 35 ℃의 배양기 중에서 정치 배양하였다. 진탕배양의 경우는 진탕기 중에 25 ℃와 30 ℃, 50 rpm의 속도로 진탕하였다.

발효기배양인 경우 4ℓ의 Fermenter(한국발효기, Air : 0.2 atm, 20 rpm, Korea)를 이용하여 5일간 발효시킨 후 배양액을 원심분리하여 침전물을 제거한 후 소정농도의 황산암모늄 용액 중에 투입하여 단백질을 침전시키고 또 ethanol(시약 1급 95%)에 발효액을 주입하거나, 발효액에 ethanol을 주입하여 침전된 효소단백질을 회수하여 Amicon ultrafilter(YM10, U.S.A)로 농축하였다.

Table 1. Compositions of mediums

Medium-I	*Medium-II*
CMC 0.5%	CMC 0.5%
Wheat Bran 2%	Wheat Bran 2%
Peptone 0.5%	Peptone 0.5%
KH2PO4 0.5%	KH2PO4 0.5%
Yeast extract 0.05%	Yeast extract 0.05%
Tween 80 0.01%	Tween 80 0.01%
	Skim milk 0.5%

2.3 효소활성 측정

본 실험에 사용된 완충용액은 pH 5.0의 경우 100 mM $NaCH_3CO_2$-CH_3COOH, pH 6.0~8.0는 50 mM의 KH_2PO_4-NaOH, pH 9.0~1.00은 100 mM Glycine-NaOH 용액이다. CMCase 활성은 1% CMC 용액 0.5 ml와 같은 단백질 농도로 조절된 효소액 0.5 ml를 혼합하여 50℃에서 30분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하였다. FPase는 No.1 filter paper 50 mg (1 × 6 cm)를 1.5 ml 완충용액에 반응시켜 DNS로 정량하였다.

2.4 단백질 정량

효소단백질은 Bovine Serum Albumin(Sigma Ltd.)을 표준단백질로 하여 개량 Lowry법[12]에 의하여 정량하였다.

2.5 pH, 온도 및 chemicals

pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0의 1% CMC를 효소액 0.5 ml와 함께 30분간 50℃에서 반응시켜 DNS법으로 환원당을 측정하였다.

30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃의 조건에서 1% CMC(pH 9.0)와 효소액 0.5 ml를 30분간 반응시켜 DNS법으로 환원당을 측정하였다.

제지공정 중에 사용되는 주요 화학약품과의 호환성을 점검하기 위하여 $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$, H_2O_2, Sodium chlorite, Sodium sulfate, Ca^{++}, Zn^{++}, Co^{++}, Mn^{++}, Mg^{++} 및 Hg^{++}가 혼합된 1% CMC 용액에 0.5 ml의 효소액을 혼합한 후 반응시켜 DNS법으로 환원당을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 배양 조건별 효소활성

3.1.1 온도, 정치 및 진탕배양의 영향조사

Figs. 1과 2는 호알카리성 cellulase의 유도 조건을 모색하기 위해 25℃ 및 30℃에서 정치 및 진탕배양하여 얻어진 조효소액을 pH 9.0에서의 CMCase 활성을 측정한 결과이다.

Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 Medium-Ⅰ의 경우에는 배양일수에 따라 정치배양 보다는 진탕배양의 활성도가 높은 것을 알 수 있고, 또한 온도는 30℃보다 25℃에서 배양할 때 높은 활성도를 나타내었다. 그러나 Medium-Ⅱ의 경우에는 배양일수에 따라 정치배양보다는 진탕배양의 경우가 높은 활성도를 나타내고, 더불어 25℃보다 30℃일 때 높은 활성도를 나타내었다. 또한 Medium-Ⅰ과 Ⅱ 모두 배양기간 5일 동안 가장 높은 활성도를 나타내었다.

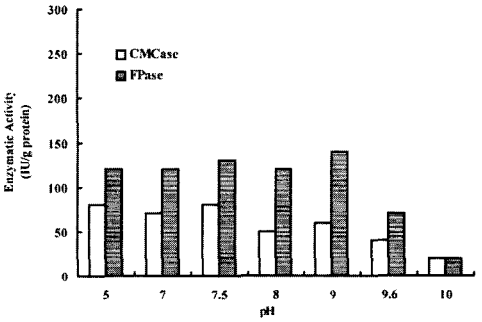

Fig. 1. CMCase Activity at pH9 with Medium Ⅰ.

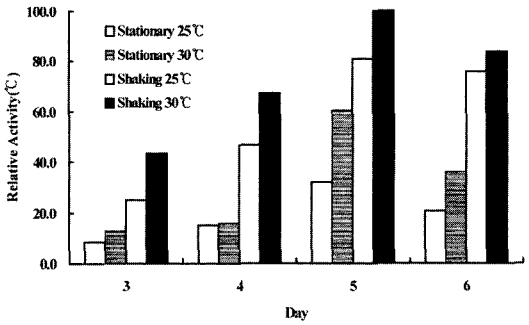

Fig. 2. CMCase Activity at pH9 with Medium Ⅱ.

Figs. 3 및 4는 Medium-Ⅰ과 Ⅱ의 진탕배양 및 정치배양의 경우 얻어진 조효소액의 활성을 상호 비교한 것이다. Fig. 3과 4에서 보는 바와 같이 정치배양 및 진탕배양의 모든 경우에 있어서 온도가 25℃보다 30℃에서 높은 CMCase 활성을 나타내었다. 또 Medium-Ⅰ과 Ⅱ중 정치 및 진탕 모두 Medium-Ⅱ에서 5일 동안 배양하는 것이 높은 효소활성을 보이고 있으며 이는 Medium-Ⅱ에 첨가된 skim milk가 먹물버섯의 배양

및 효소생산에도 매우 효과적임을 나타내는 결과이다. 또 정치보다는 진탕 배양이 보다 높은 효소활성을 보이고 있다는 결과는 먹물버섯이 비교적 산소요구량이 높은 호기성 균주임을 시사하고 있다.

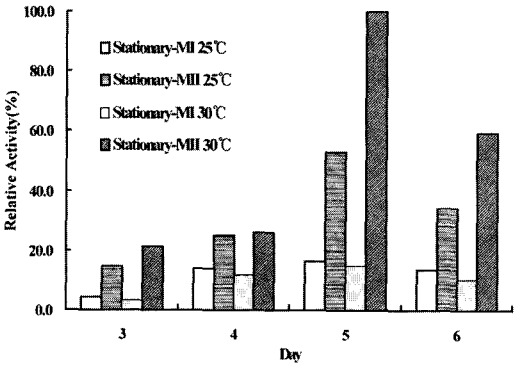

Fig. 3. Comparisons of CMCase Activity of Medium Ⅰ and Ⅱ.

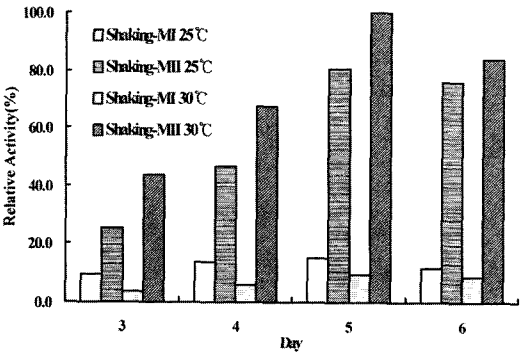

Fig. 4. Comparisons of CMCase Activity of Medium Ⅰ and Ⅱ.

3.1.2 배양액의 pH 변화

Figs. 5와 6은 Medium-I과 II의 배양 기간에 따른 정치 및 진탕배양의 pH 변화를 나타낸 것이다. Fig. 5와 6에서 보는 바와 같이 정치 배양 및 진탕 배양에서의 배양 기간에 따른 pH 변화는 거의 비슷한 양상을 보이지만, Medium-I에서는 정치배양의 경우에서는 배양시작부터 6일간 계속 떨어지는 반면 진탕배양의 경우 배양시작부터 3일까지는 떨어지지만 4일째부터 pH가 다시 상승하는 양상을 나타내었으며 전술했듯이 Medium-I에서 가장 활성이 높은 25℃에서 진탕 배

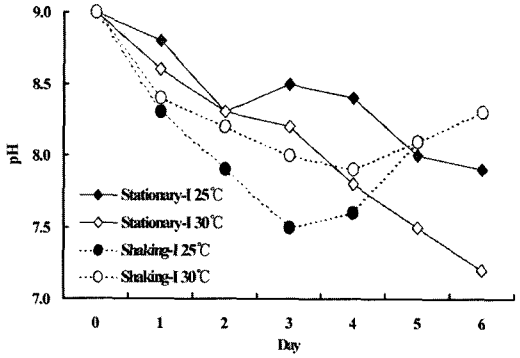

Fig. 5. Changes of pH in Medium Ⅰ.

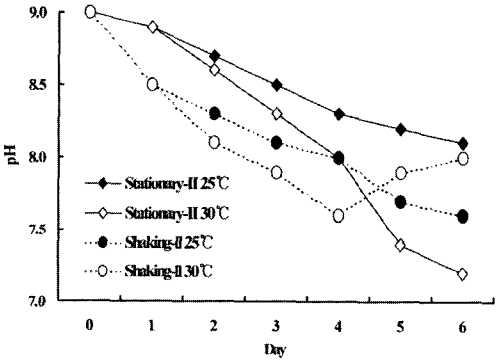

Fig. 6. Changes of pH in Medium Ⅱ.

양액의 pH가 급속하게 감소됐다가 증가하는 경향을 보였다. 이와 같은 현상은 Medium-Ⅱ를 사용한 실험결과에서도 관찰되었다. 배양시간에 따른 pH의 저하는 CMC 등 탄소원의 분해와 함께 oxalic acid와 같은 유기산이 생성되기 때문이며 그 후 pH의 상승은 peptide가 분해 되어 암모니아가 생성되기 때문으로 추정된다.

3.1.3 조효소액의 활성과 pH

Fig. 7은 Medium-II의 배지조건으로 30℃, 5일 동안 배양한 배양액의 다양한 pH 영역에서 CMCase 및 FPase의 활성을 나타내었다. CMCase 및 FPase 활성 모두 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 전반적으로 pH 7.0에서 pH 9.6까지 약 50%의 상대활성도를 유지하였지만, pH 10.0에서는 급격히 활성도가 떨어지는 것을 알 수 있다. 이는 먹물버섯이 분비하는 알칼리성 목질분해효소의 경우 pH 10.0부근에서부터 단백질의 active domain 혹은 bonding domain의 변성이 시작되기 때문으로 추측된다.

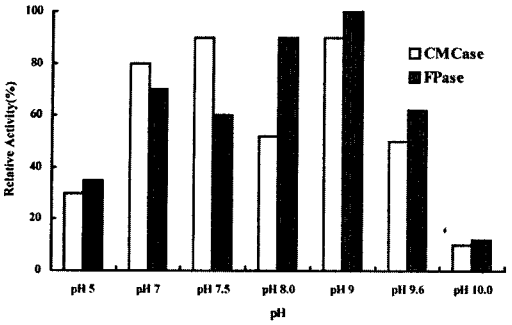

Fig. 7. Enzyme Activity in pH range 5.0~10.0 with Medium Ⅰ.

3.2 배양기 배양 및 단백질 회수

Fig. 8은 fermenter에 의해 일정기간 배양한 조효소액을 30~100%의 황산암모늄 용액 중에 침전시켜 회수한 조효소의 총 단백질 양과 또한 배양액에 alcohol을 투입시켜 침전시킨 단백질과 alcohol에 배양액을 투입시켜 침전시킨 단백질 양을 측정한 값이다.

먼저 30~50%로 침전시킨 조효소액의 단백질 양보다는 80% 혹은 100%로 침전시켰을 때 2배 정도의 단백질이 침전하는 것을 알 수 있었다. 또한 배양액에 유기용제를 침전시켰을 때보다 유기용제에 배양액을 투입하는 것이 보다 효과적으로 단백질을 얻을 수 있었다. 또한 황산암모늄으로 80~100%로 침전시켰을 때 얻어지는 단백질 양과 유기용제에 배양액을 침전시켰을 때 얻어지는 단백질양이 비슷하였다. 이에 보다 효과적으로 단백질을 얻기 위해 각각 침전시킨 조효소 단백질의 각 pH별 효소활성을 조사하였다.

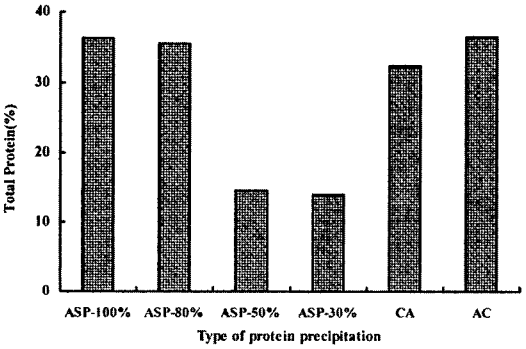

Fig. 8. Total protein content of Ammonium sulfate precipitation and ethanol precipitation.
ASP: Ammonium sulfate preciptation, CA: Cuture-in ethanol, AC: Ethanol-in culture.

Figs. 9~14는 fermenter의 배양 조건으로 배양된 액을 다양한 방법으로 침전하여 얻어진 조효소의 각 pH별 CMCase 및 FPase를 측정하여 각 침전 방법에 의한 효율성 평가 및 효소 활성을 나타내었다. 황산암모늄 100%로 침전시킨 효소액(Fig. 9)의 FPase 활성은 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 가지는 반면에 CMCase의 경우는 pH 7.5에서 가장 높은 활성을 가지는 특성을 보였다.

또한 80%로 침전시킨 효소액의 경우(Fig. 10)도 100% 침전시킨 효소액과 동일한 효소활성을 나타내었지만, 100% 황산암모늄보다는 효소활성도가 약 60%정도 증가함을 알 수 있다.

50% 황산암모늄의 경우(Fig. 11)는 80%의 경우보다 pH 9.0에서 약간 증가하는 경향을 나타내었지만, 균이 생산한 단백질의 회수 효율이 80% 황산암모늄의 경우 보다 약 20 point % 가 떨어지는 단점을 가지는 것을 알 수 있었다.

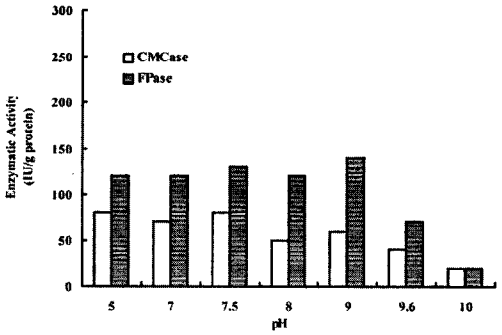

Fig. 9. Enzyme Activity of 100% Ammonium sulfate precipitated protein.

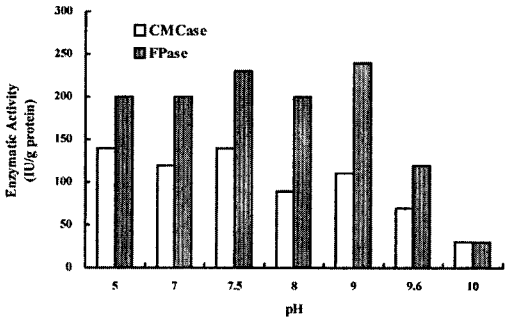

Fig. 10. Enzyme Activity of 80% Ammonium sulfate precipitated protein.

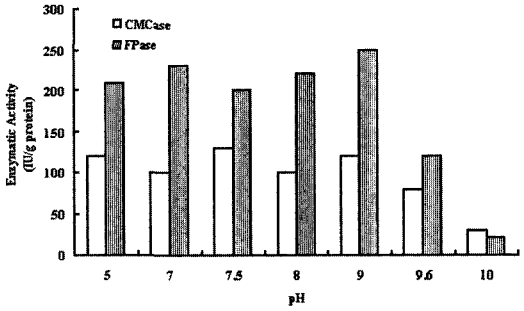

Fig. 11. Enzyme Activity of 50% Ammonium sulfate precipitated protein.

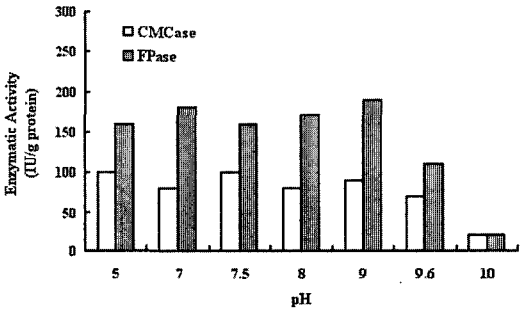

Fig. 12. Enzyme Activity of 30% Ammonium sulfate precipitated protein.

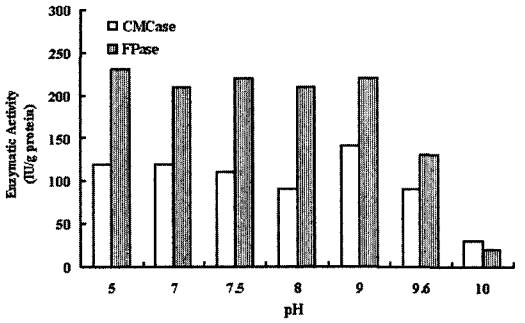

Fig. 13. Enzyme Activity of precipitated protein from ethanol in culture.

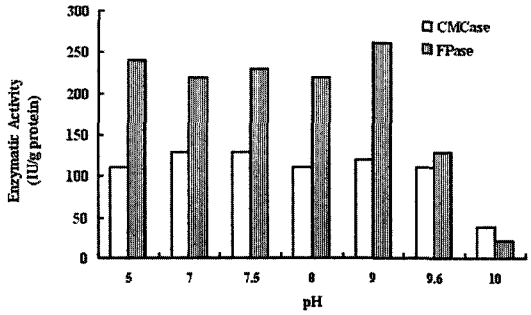

Fig. 14. Enzyme Activity of protein from culture liquid in ethanol.

Fig. 12는 30% 황산암모늄의 결과로서 단백질의 생산효율과 효소활성이 고농도 황산암모늄 용액에 의한 조건과 비교해 봤을 때 비효율적이라는 사실은 나타내고 있다.

Fig. 13은 배양액에 alcohol을 투입하여 단백질을 침전시켜 회수한 조효소액의 각 pH별 효소활성을 나타낸 것이고 Fig. 14는 이와는 반대로 alcohol에 배양액을 투입하여 얻어진 조효소액의 각 pH별 효소활성을 나타낸 것이다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 FPase 활성의 경우 황산암모늄과 달리 pH 5.0에서 가장 높은 활성도를 가지는 것을 물론이고 pH 7.0, 9.0에서도 높은 활성도를 나타내지만 Fig. 8.0에서 나타낸 총 단백질양을 보면 수율이 다소 떨어지는 것을 알 수 있다.

그러나 Fig. 14에 나타난 경우는 FPase 활성은 pH 9.0에서 가장 높았으며, 활성도 또한 다른 조건과 비교해서 가장 높은 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 8에서 나타난 총 단백질양의 수율도 80~100%의 황산암모늄 것과 비슷한 것을 알 수 있었다. 결론적으로 ethanol 용액 중에 배양액을 투입하여 단백질을 침전 회수하는 방법이 가장 효율적으로 호알칼리성 목질분해효소를 회수할 수 있는 조건이라 생각된다.

3.3 조효소의 pH 및 열안정성

단리된 조효소를 pH 3.0~10.0의 영역에서 실온 하에 24시간 방치 후 pH 안정성을 조사하였으며, 이 조효소를 각 온도에서 1시간 방치 후 열안전성도 평가하였다.

조효소의 안정성을 조사한 결과 CMCase 및 FPase 모두 pH 5.0~9.6의 범위에서 안정한 것으로 나타났다(Fig. 15). 또한 각 온도에서 1시간 방치 후 온도 안정성을 조사한 결과를 Fig. 16에 나타내었다. Fig.에서 보는 바와 같이 CMCase 및 FPase 모두 30~55℃까지는 안정하였으나, 55℃ 이상의 온도에서 점차 실활되기 시작하여 60℃에서는 CMCase 및 FPase의 잔존 활성이 40% 내외로 저하되었다.

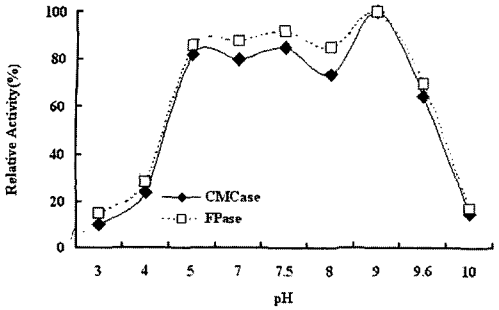

Fig. 15. pH stability of enzyme.

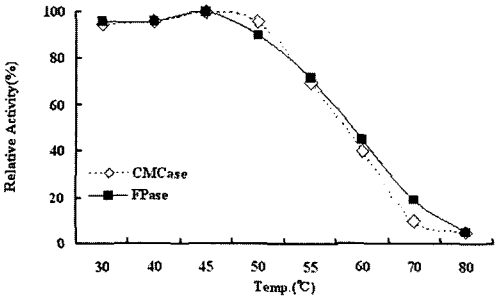

Fig. 16. Temperaure stability of enzyme.

3.4 제지용 약품과의 호환성

고지재생 공정에 사용되는 탈묵제 및 표백제 등의 제지용 첨가제가 효소활성에 미치는 영향을 조사하였으며 그 결과를 Table 2에 요약하였다.

계면활성제 종류는 활성을 증가시키는 경향을 보였으며, Aluminium sulfate, sodium chlorite, hydrogen peroxide, sodium sulfate 등은 효소활성을 저해하였다. 또한 금속이온 중 2가 금속이온인 경우에는 다소 효소활성이 증가되었지만, Hg^{2+}에 의해서는 효소활성이 크게 저해되었다.

4. 결론

먹물버섯으로부터 알칼리성 목질 분해 효소의 분비를 촉진시키고 배양액으로 효과적인 효소 단백질 회수 방법을 모색하였다. 아울러 효소단백질의 활성에 영향을 미치는 인자를 검토하였으며 그 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

① 배지 중에 skim milk를 첨가하고 진탕 배양 하였을 경우 효소 생성량이 가장 높았다.

Table 2. Effect of chemical additives and metal ion on enzyme activity

Additives	Concentration	Relative Activity(%) at pH 9.0	
		CMCase	FPase
None	-	100	100
Tween 80	0.1%	110	110
$Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H^2O$	1.0%	86.3	87.4
H2O2	1.0%	87.2	88.9
Sodium chlorite	1.0%	92.0	93.2
Sodium sulfate	1.0%	95.5	96.0
Ca^{++}	1mM	102	100
Zn^{++}	1mM	103	104
Co^{++}	1mM	100	100
Mn^{++}	1mM	106	107
Mg^{++}	1mM	110	109
Hg^{++}	1mM	30	28

② 회수 단백질은 pH 9.0에서 가장 높은 효소 활성을 보이는 알칼리성 효소 단백질이다.

③ 단백질 양이나 효소 활성면에서 ethanol 용액에 배양액를 주입하여 효소 단백질을 회수하는 방법이 가장 효과적이다.

④ 계면활성제는 효소 활성을 촉진하였으며 $Al_2(SO_4)_3$, H_2O_2 등은 효소활성을 저하시키고 Hg++를 제외한 금속이온은 크게 영향을 주지 않았다.

인용문헌

1. Jackson, L. S., Heitmann, J. A., Joyce. T. W, Tappi journal Vol.76(3), 147~154(1993).
2. Morgan, B, R, Pulp and paper, 9, 119~121(1996).
3. Eom, T. J, Kim, T. J., Ow, S-K., Tappi pulping conf., 1023, Tappi press, Atlanta, (1991).
4. Zeyer, C., Joyce, T.W., Heitmann, J.A., Rucker, J.W, Tappi journal Vol.77(10), 169~177(1994).
5. Jeffries, T.W., Klungness, J.H., Sykes, M,S., Rutledge-cropsey, K.R, Tappi Journal Vol.77(4), 173~179(1994).
6. Bisaria, V. S., Ghose, T. K, Enzyme and microb. Technol., 3, 90~104(1981).
7. Lion, Japanese Pat. JP 2080684(1990).
8. Sharyo, M., Sakaguchi, H., Kokai, T. K., Japanese Pat. JP021609 84(1990).
9. Sreenath H. K., Yang, V. W., Burdsall, H. H. Jr.,

Jeffries, T. W. Enzymes for pulp and paper processing, ACS Symposium series 655, American Chemical Society ; 267~279(1996).
10. Lee J. M., T. J. Eom, Jounal of KTAPPI, 31(3), 68~76(1999).
11. Lee J. M., T. J. Eom, Jounal of KTAPPI, 31(3), 12~17(1999).
12. Hartree E. F. Analytical biochemistry, 48, 422~427(1972).