Journal of Korea TAPPI
Vol.36.No.3, 2004
Printed in Korea

고효율 효소를 분비하는 균주의 선발 및 신문고지의 효소탈묵 특성(제2보)

- Cellulase와 Xylanase를 생산하는 Fungi의 분리 및 선발 -

박성철† · 강진하 · 이양수

(2004년 4월 17일 접수: 2004년 7월 30일 채택)

Screening of Microorganisms Secreted High Efficient Enzymes and Properties of Enzymatic Deinking for Old Newsprint(Ⅱ)

- Isolation and screening of fungi producing cellulase and xylanase -

Seong-Cheol Park,† Jin-Ha Kang and Yang-Soo Lee

(Received on April 17, 2004: Accepted on July 30, 2004)

ABSTRACT

The useful fungi which secret extracellular enzymes was selected for deinking agent of old newsprint. Five fungal strains were isolated from a paper mill soil ground. The CMCase, FPase and xylanase activities of fungi on the liquid culture were investigated at optimal growth conditions. The results of this study were as follow:
The optimal pH and temperature for culture growth were 4~8 and 27~35℃, respectively. For screening of extracellular enzymes at optimal culture conditions the optimal culture period were less than 6-7 days. *Fusarium pallidoroseum* and *Aspergillus niger* which shows relatively higher CMCase, FPase and xylanase activities than the other species were selected for further enzymatic deinking research.

Keywords : *enzymatic deinking agent, wastepaper, enzyme, Fusarium pallidoroseum, Aspergillus niger, cellulase, CMCase, FPase, xylanase*

• 전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부 (Division of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)
† 주저자 (Corresponding author) : E-mail ; jihu2002@orgio.net

1. 서 론

경제 및 문화의 발전과 생활수준의 향상, 그리고 인구의 증가로 인하여 지류소비도 꾸준히 증가하여 국내 종이 소비량도 크게 증가되고 있고 국내의 제지산업도 국가 경제발전에 따라 성장을 거듭하고 있다. 그러나 지류 생산량은 세계 10권에 있는데 반해 펄프의 생산량은 28위에 머물고 있어 해마다 막대한 외화를 지불하면서 펄프와 고지를 수입하고 있다.[1)]

이에 따라, 자원의 효율적 이용으로 인한 에너지 절감과 폐기물 감량화 추세에 부응하여 매립, 소각 등으로 야기되는 오염원을 최소화하고자, 고지 탈묵에 대한 관심이 더욱 대두되고 있다. 그러나 기존의 화학약품에 의한 공정의 제반문제 즉, 비약적 반응성 증가 기대 불가, 환경오염유발 등의 문제 등으로 인하여 보다 환경친화적 공정개선이 요구되어 최근에는 펄프·제지 산업에 생물공학분야가 도입되어 그 비중이 점차 확대되었다. 특히 효소탈묵은 세척법이나 부상법과 같은 재래식 탈묵방법에 비해 에너지 비용절감, 종이의 물성개선, 환경오염 유발 물질의 생성감소 등의 부가적인 장점이 보고 되고 있다.[2-3)]

최근의 효소 탈묵에 대한 연구로 손 등[4)]의 *Tricoderma reesei* ATCC 28217 균주에서 단리한 cellulase와 xylanase를 이용하여 탈묵하였다. Sreenath 등[5)]도 목재부후균을 광범위하게 수집하여 호알칼리성 cellulase를 생산하는 균주를 선발, 배양조건 및 효소특성을 구명한 후 토너잉크 제거를 위해 계면활성제와 함께 사용한 바 있다. 또한 Lee 등[6)]도 *Coprinus cinereus* 2249에서 단리한 cellulase를 이용한 탈묵과 Eisimonte 등[7)]의 cellulase와 xylanase를 이용한 탈묵 결과를 보고한 바 있다.

이에 따라, 본보에서의 연구는 탈묵에 관여하는 목재의 탄수화물 분해효소를 얻기 위하여 자연계에서 새로운 fungi를 수집하고, 이들의 생육조건 및 효소활성을 측정하여 탈묵에 필요한 효소의 역가가 높은 미생물을 선발코자 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 정치하여 상징액만을 사용하였다.

상징액을 10^2배, 10^3, 10^4로 희석하여 2종의 배지에 각각 도말하였고, 25℃에서 1~2일 동안 배양하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같고 멸균 후 streptomycin 100~200 mg/ℓ 을 첨가하였다.

Table 1. Compositions of medium for fungal isolation

Peptone sucrose agar(g/ℓ)	Potato dextrose agar(g/ℓ)
Sodium glutamate 1.0 Peptone 10.0 Sucrose 10.0 Agar 16.0	Potato dextrose 24.0 Agar 15.0

배지에 나타난 단일 colony를 각각의 petridish와 사면배지에 옮기고, 25℃에서 5일간 배양 후 4℃ 냉장고에 보관하였다.

2.2 균주의 생육조건 구명

균주의 최적 생육조건을 검토하기 위하여 2% yeast extract에 접종한 후 25℃, 24시간, 120 rpm 조건으로 전배양은 하였으며, 본배양은 전배양액을 1%로 접종하여 pH, 온도, 배양기간을 변화시켜가면서 배양하였다. 최적 생육조건은 배양액의 균체량을 Glass Microfibre Filter(Whatman, GF/A 4.7 ㎝)를 사용하여 건조균체량을 측정하여 최대 건조균체량을 나타낸 조건을 최적 생육조건으로 하였고, 본배양에 사용된 배지의 조성은 Table 2와 같다.

2.3 pH, 온도 및 배양기간

배지의 pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11로 조절하여 25℃, 5일, 120 rpm 조건으로 배양한 후 균체량을 측정하여 최적 pH를 구명하였고, 배양온도는 배지를 구명된 적정 pH로 조절하고 배양온도를 21, 23,

Table 2. Composition of medium for fungal growth

glucose	5 g/ℓ
peptone	10 g/ℓ
yeast extract	1 g/ℓ
$KH_2PO_4 \cdot 12H_2O$	200 mg/ℓ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g/ℓ
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	20 mg/ℓ
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg/ℓ
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg/ℓ
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10 mg/ℓ
urea	20 g/ℓ
tween-80	1 g/ℓ

25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39℃로 변화시켜가면서 5일, 120 rpm 조건으로 배양하여 역시 균체량에 따라 최적 온도를 구명하였으며, 구명된 최적의 pH 및 배양온도의 조건에서 120 rpm으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10일간 배양하여 최적 배양기간을 구명하였다.

2.4 조효소액의 조제

균주를 최적 생육조건에서 배양시킨 후 배양액을 원심분리(8000 rpm, 20 min.)하여 상징액을 조효소액으로 사용하였고 사용된 배지의 조성은 Table 3과 같다.

Table 3. Composition of medium for enzyme activities

CMC	10 g/ℓ
xylan	10 g/ℓ
peptone	2 g/ℓ
KH_2PO_4	2. 5g/ℓ
K_2HPO_4	0.3 g/ℓ
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10 mg/ℓ
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1 mg/ℓ
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1 mg/ℓ

2.5 효소활성 측정

2.5.1 CMCase 활성 측정

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

효소단위는 1분동안 1 μ 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 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0) 1.5 mℓ에 효소액 0.5 mℓ와 혼합하여 50℃에서 60분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 환원당 정량 및 효소단위는 CMCase에서와 동일하게 행하였다.

2.5.3 Xylanase 활성 측정

기질 용액으로 0.5% xylan 0.5 mℓ와 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0) 0.25 mℓ에 효소액 0.25 mℓ와 혼합하여 50℃에서 30분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰고 환원당의 측정은 CMCase에서와 동일하게 행하였다.

효소단위는 1분동안 1 μ mol의 xylose에 해당하는 환원당이 생성되는 속도의 효소량을 1 IU로 하였다.

2.6 균주의 선발 및 동정

최적 생육조건에서 효소활성을 측정하여 세 종류의 효소를 고르게 분비하는 균주을 선발하였다. 또한 선발된 균주는 영국의 CABI Bioscience에 동정을 의뢰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 적정 생육조건의 구명

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

3.2.1. pH

pH를 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11로 조절한 배지에 전배양된 각 균주의 동일량을 접종하고 25℃에서

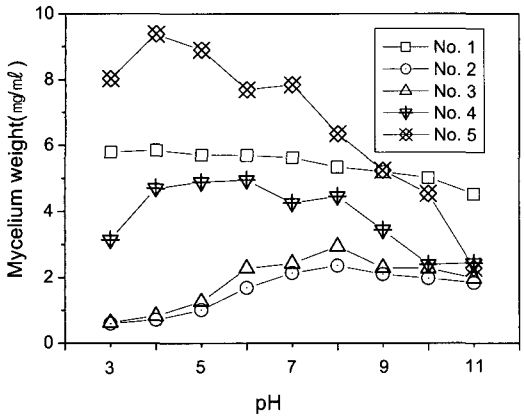

Fig. 1. Effects of pH on the mycelium weight of isolated fungi.

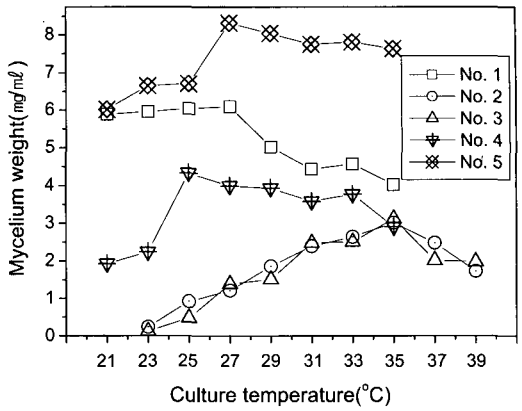

Fig. 2. Effects of temperature on the mycelium weight of isolated fungi.

5일 동안 배양하여 건조 균체량을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

pH에 대한 최적 생육조건으로 pH 4.0을 적정 생육 조건으로 하는 것은 No. 1, 5이었다. No. 1은 pH 전영역에서 건조 균체량의 차이가 적었고 다른 균주들보다 건조 균체량이 가장 높았고, No. 5는 산성에서보다 알칼리영역에서 성장이 크게 둔화되었다. pH가 6.0인 것으로는 No. 4이었으며, pH 8.0을 적정 생육조건으로 하는 것은 No. 2, 3이었다. 특히 No. 2, 3은 다른 균주에 비해 낮은 건조 균체량을 나타내었다. 이상의 결과를 검토하여 볼 때 균주의 적정 생육조건은 산성과 중성영역이었음을 확인할 수 있었다.

3.2.2. 온도

구명된 최적조건의 pH로 조절된 배지에 각 균주의 전배양액을 동일량 접종하고 배양온도를 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39℃로 변화시켜가면서 5일, 120 rpm 조건으로 배양하여 건조 균체량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

건조 균체량으로 비교할 경우 적정 생육온도를 25℃로 하는 것은 No. 4이었고 27℃는 No. 1, 5이었으며, 35℃는 No. 2, 3이었다. No. 1은 27℃ 이하까지는 비교적 안정한 생육을 하였으나 그 이상에서는 생육이 둔화되었고, No. 2, 3은 35℃까지 점진적으로 생육이 양호하였으며 다른 균주에 비해 최적 생육온도가 높았다. No. 4는 25℃이상에서 점차 생육이 저해되었고, No. 5는 27℃ 이후의 생육이 완만하게 둔화되었다. 상기의 결과를 검토하여 볼 경우 분리된 균주는 중온성 균주이었다.

3.2.3. 배양기간

구명된 최적조건의 pH로 조절된 배지에 각 균주의 전배양액을 동일량 접종하고 배양온도 역시 각 균주에 최적인 온도로 하여 배양기간을 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10일로 연장시켜가면서 배양시간에 대해 건조 균체량을 측정한 결과는 Fig. 3과 같다.

균주가 성장 정지기에 이르는 때를 최적 배양기

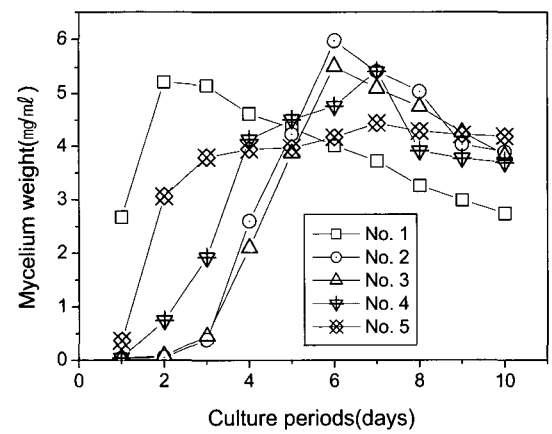

Fig. 3. Effects of culture periods on the mycelium weight of isolated fungi.

간으로 하였고, 균주의 최적 배양기간이 2일인 경우는 No. 1으로 다른 균주에 비해 가장 빠른 정지기를 나타내었고, 6일은 No. 2, 3 이었으며 7일은 No. 4, 5 이었다.

3.3 효소활성 측정 및 균주의 선발

각 균주의 배지를 최적조건의 pH로 조절하고, 배양온도와 기간을 구명된 최적의 조건으로 하고 배양하였을 경우 효소활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Enzyme activities of fungi at optimal condition

unit: IU/mℓ

Enzymes / Fungi	CMCase	FPase	Xylanase
No. 1	0.91	0.52	2.95
No. 2	0.28	0.17	2.46
No. 3	0.26	0.15	2.39
No. 4	0.23	0.14	0.30
No. 5	1.31	0.32	4.14

효소활성 측정 결과 CMCase 활성의 경우 No. 5, 1, 2, 3, 4의 순으로 높았고, FPase 활성은 No. 1, 5, 2, 3, 4 순이었으며, xylanase 활성은 No. 5, 1, 2, 3, 4의 순이었다. 이상의 결과를 검토하여 볼 때 세 종류의 효소를 고르게 다량 분비하는 No. 1, 5 균주를 선발하였다.

3.4 균주의 동정

선발된 No. 1, 5 균주의 생장상태 및 포자의 형태는 Fig. 4과 같고, 영국의 CABI Bioscience에 동정을 의뢰한 결과는 각각 *Fusarium pallidoroseum* 과 *Aspergillus niger* 이었다.

4. 결 론

본 보의 연구는 자연계에서 탈묵에 유용한 fungi를 선발하기 위하여 제지공장 내 토양에서 5 종의 균주를 분리하고 그 최적 생육조건을 구명하며, 균주가 분비하는 효소의 활성을 측정하였다. 분리된 균주의 적정 생육 pH는 전반적으로 산성과 중성영역으로 pH 4.0은 2종, pH 6.0은 1종, pH 8.0은 2종이었다. 온도에 대한 적정 생육조건은 25℃의 경우가 1종, 27℃는 2종, 35℃는 2종으로써 중온성 균주에 속했고, 배양기간에 대한 적정 생육조건은 2일은 1종이었고, 6일과 7일은 각각 2종이었다. 상기의 적정 생육조건에서 효소활성을 측정한 결과를 검토하여 CMCase, FPase 및 xylanase의 활성이 전반적으로 우수한 균주인 No. 1, 5로 2종을 선발하였고, 선발된 No. 1, 5 균주를 동정한 결과 각각 *Fusarium pallidoroseum, Aspergillus niger* 이었다.

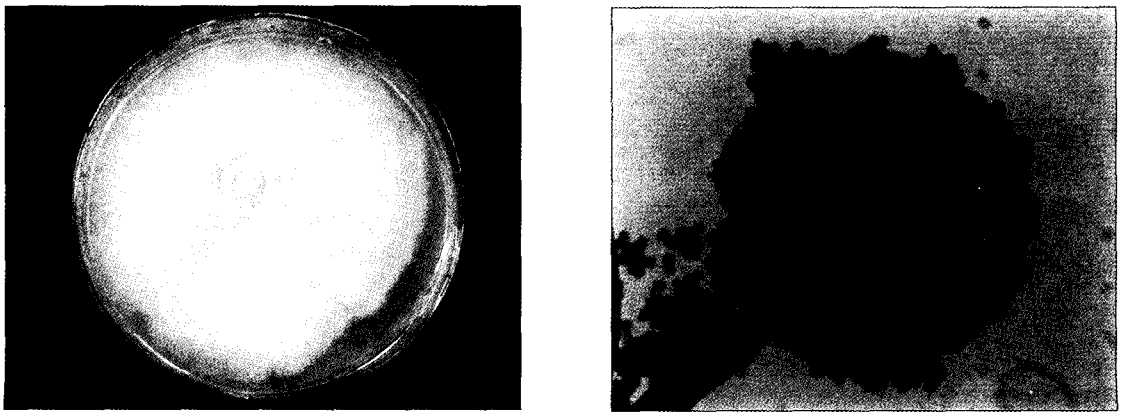

Fig. 4. Colony of *Fusarium pallidoroseum* on PDA medium(left) and conidial head of *Aspergillus niger* showing mass of globose and pigmented conidia(right).

인용문헌

1. 한국제지공업연합회, 아시아를 중심으로 확대되고 있는 세계 종이 · 판지 생산과 소비, 제지계, (337): 12-20 (2000).
2. Pala H., M. Mota and F. M. Gama, Modification of secondary pulp fibre fractions by enzymatic treatment, 8th ICBPPI, p. 260-262 (2001).
3. Jeffries T., John H. Klungness, Preliminary results of enzyme-enhanced versus conventional deinking of xerographic printed paper, Recycling Symposium, p. 183-188 (1993).
4. 손광희, 복해성, 오세균, 고지 탈묵용 Cellulase 및 Xylanase 생산, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 20(5):527-533 (1992).
5. Sreenath K Hassan, 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).
6. Lee Jung-Myoung and Tae-Jin Eom, Enzymatic Deinking of Old Newsprint with Alkalophilic Enzymes from *Coprinus cinereus* 2249, J. Korea TAPPI 31(5):12-17(1999).
7. Viesturs U., M. Leite, M. Eisimonte, T. Eremeeva, A. Treimanis, Biological deinking technology for the recycling of office waste papers, Bioresource Technology, 67: 255-265 (1999).