

# 고효율 효소를 분비하는 균주의 선발 및 신문고지의 효소탈묵 특성(제4보)

—고지 탈묵용 Fungal Cellulase와 Xylanase의 생산—

박성철<sup>†</sup> · 강진하 · 이양수  
(2004년 12월 27일 접수: 2005년 1월 26일 채택)

## Screening of Microorganisms Secreted High Efficient Enzymes and Properties of Enzymatic Deinking for Old Newsprint(IV) —Culture conditions of fungal extracellular enzyme production for biological deinking system—

Seong-Cheol Park<sup>†</sup>, Jin-Ha Kang and Yang-Soo Lee  
(Received on December 27, 2004: Accepted on January 26, 2005)

### ABSTRACT

This study was focused on the optimum culture condition in CMCase, FPase and xylanase activities of two fungal strains that secrete extracellular enzymes for using enzymatic deinking agent to old newsprint. The results of this study were as follows. When *Fusarium pallidoroseum* was grown on the medium, containing of rice bran+xylan 2.0%, peptone 0.6%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.075% and  $\text{MnSO}_4$  0.06% with pH 9.0, at 29°C for 6 days, the quantitative degree of extracellular enzyme production was the highest. Optimum culture condition for *Aspergillus niger* was pH 5.0, 27°C incubating temperature and 7 days incubation period on liquid medium, containing of CMC+xylan 2.5%, yeast extract 0.4%,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0.05% and  $\text{CaCl}_2+\text{FeSO}_4$  0.08%. *Aspergillus niger* was fairly higher FPase and xylanase activities than *Trichoderma reesei* ATCC 28217.

**Keywords** : enzymatic deinking agent, cellulase, *Fusarium pallidoroseum*,  
*Aspergillus niger*

• 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. 서론

고지의 탈묵은 자원의 효율적 이용으로 인한 에너지 절감과 폐기물의 감량화, 매립 및 소각 등으로 야기되는 오염원을 최소화 할 수 있다. 최근에는 펄프·제지 산업에 생물공학분야가 도입되고 탈묵에 환경친화적 공정개선이 요구되면서 그 비중이 점차 확대되었다. 특히 미생물 효소를 이용한 효소탈묵은 세척법이나 부상법과 같은 재래식 탈묵방법에 비해 여수도 및 종이의 강도를 개선시키는 섬유질의 물성개선, 환경오염 유발물질의 생성감소 등의 부가적인 장점이 보고 되고 있다.<sup>1,2)</sup>

이러한 효소탈묵을 위해서는 먼저 탈묵에 유용한 효소를 분비하는 미생물의 선발에서 시작하여 이들 미생물로부터 다량의 효소를 얻을 수 있는 배양조건 및 배양기술을 개발하여야 한다. 한편 이와 관련된 연구로는 cellulase 생산성 향상을 위해 *Trichoderma* QM6a<sup>3)</sup>로부터 돌연변이에 의해 cellulase 생산성이 2~4배 높은 균주로 개량한 연구, 손 등<sup>4)</sup>의 *Trichoderma reesei* ATCC 28217 균주에서 탈묵을 목적으로 cellulase와 xylanase를 생산하기 위한 배양조건으로 탄소원으로 신문고지, 질소원으로 면실박 등을 첨가한 경우가 가장 효과적이었다는 보고, 또한 Chandra 등<sup>5)</sup>과 강 등<sup>6)</sup>도 각각 *Aspergillus fischeri* Fxn1과 *A. niger* KKS 균주를 이용해 xylanase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 구명하는데 주력하기도 하였다.

이에 따라, 본보에서는 전보<sup>7)</sup>에서 CMCase, FPase, xylanase 활성이 우수하여 선발된 2종의 fungi를 이용하여 효소생산을 위한 최적 배양조건을 검토하기 위해 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시균주 및 배지

전보<sup>7)</sup>에서 cellulase와 xylanase 생산력이 우수하여 선발된 *Fusarium pallidroseum*과 *Aspergillus niger*를 공시균주로 사용하였고, 배지의 조성은 다음과 같이하였다.

-. CMC 10 g/l, xylan 10 g/l, peptone 2

g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 mg/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1 mg/l

### 2.2 pH

배지의 pH를 4.0~13.0으로 조절하여 각각 25°C, 5일 동안 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소생산의 최적 pH를 구명하였다.

### 2.3 온도

최대활성의 pH로 배지를 조절하고 온도를 21~35°C로 변화시킨 조건으로 5일 동안 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소생산의 최적 배양온도를 구명하였다.

### 2.4 탄소, 질소 및 인

최적 탄소원, 질소원, 인원 및 그 첨가량은 전보<sup>8)</sup>와 동일하게 수행하였다.

### 2.5 금속염

최적의 탄소원, 질소원, 인을 첨가한 배지에 금속염을 무첨가, CaCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>를 각각 0.05 %씩 첨가하고 pH 및 온도를 조절하여 5일 동안 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소생산을 위한 최적 금속염을 구명하였다.

선발된 금속염의 첨가량을 0.02~0.12 % 첨가하고 pH 및 온도를 조절하여 5일 동안 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소생산에 있어서 금속염의 적정첨가량을 구명하였다.

### 2.6 배양기간

구명된 최적의 pH, 온도, 배지에서 배양기간을 1~10일로 연장시켜가면서 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 적정 배양기간을 구명하였다. 또한 균주의 효소활성을 정도를 확인하고자 *Trichoderma reesei* ATCC28217의 효소와 활성을 비교하였다.

### 2.7 조효소액 조제 및 효소활성 측정

균주 배양액을 4000 rpm으로 30분 동안 원심분

리하여 상징액을 조효소액으로 사용하였고, 효소활성은 전보<sup>7)</sup>와 동일하게 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 pH

배지의 pH를 4.0~13.0으로 조절하여 각각 25°C, 5일의 조건으로 배양한 후 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

배지의 초기 pH를 4.0~13.0으로 변화시켜 배양 후 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*의 경우 pH 8.0~10.0에서 높은 활성을 나타내었고, *Aspergillus niger*는

pH 4.0~9.0까지 큰 차이는 없었다. 이들 결과들로 *F. pallidoroseum*과 *A. niger*에서 가장 높은 활성을 나타내는 pH는 각각 9.0, 5.0이었다.

#### 3.2 온도

최대활성의 pH로 배지를 조절하고 온도를 21~35°C로 변화시켜 5일 동안 배양한 후 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

배양온도를 21~35°C까지 변화시켜 배양한 후 CMCCase, FPase, xylanase의 활성을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*은 29°C에서 최대 활성을 나타내었고 이후에는 크게 감소하는 경향을 나타내었다. *Aspergillus niger*는 온도 변화에 큰 차

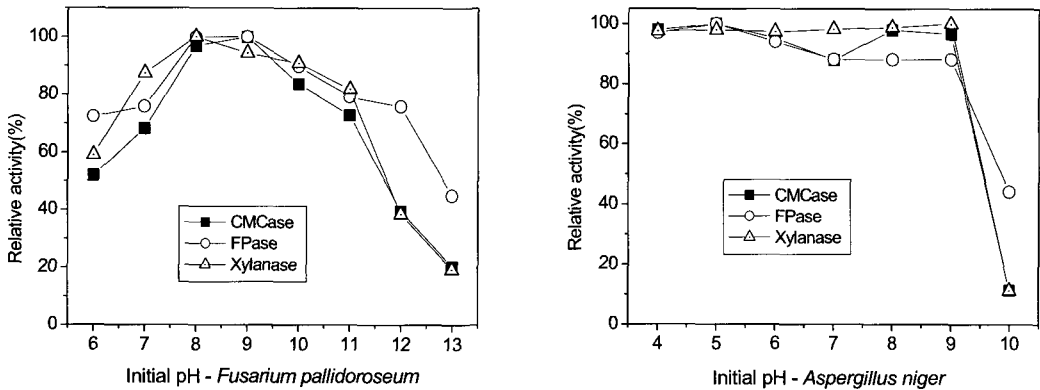


Fig. 1. Effect of initial pH on fungal enzyme production.

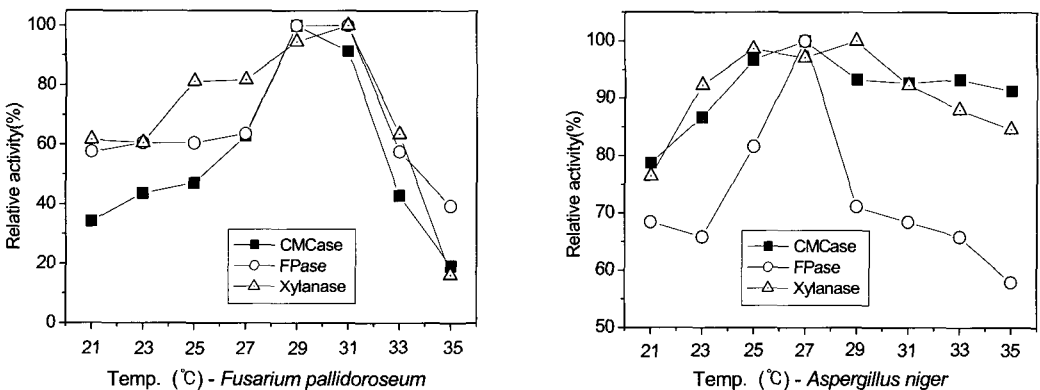


Fig. 2. Effect of temperature on fungal enzyme production.

이는 없었으나 27°C에서 최대 활성을 나타내어 *F. pallidoroseum*과 *A. niger*의 최적 배양온도는 각각 29, 27°C이었다. 이는 정 등<sup>9)</sup>이 *Fusarium* 속의 cellulase 생산 최적 온도가 30°C인 보고와 거의 일치하였다.

### 3.3 탄소원

무첨가, rice bran, avicel, xylan, CMC, rice bran+avicel, rice bran+CMC, rice bran+xylan, avicel+xylan, CMC+xylan을 배지의 유일한 탄소원으로 1%를 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

각종 탄소원 1.0%를 함유한 기본배지를 이용, 탄소원의 종류에 따른 CMCase, FPase, xylanase의 활성을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*은 rice bran+CMC에서 최대 활성을 나타내었고, *Aspergillus niger*는 CMC+xylan에서 최대 활성을 나타내었다. 두 균주 모두 단일 탄소원 보다 복합 탄소원에서 더욱 높은 활성을 나타내었다.

### 3.4 탄소원 첨가량

각각의 최적 탄소원을 0.5~4.0%로 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

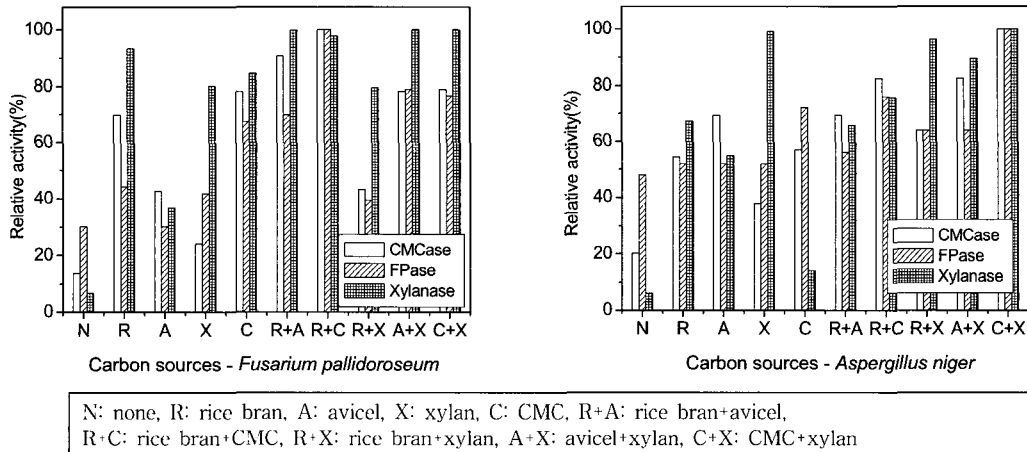


Fig. 3. Effect of different carbon sources on fungal enzyme production.

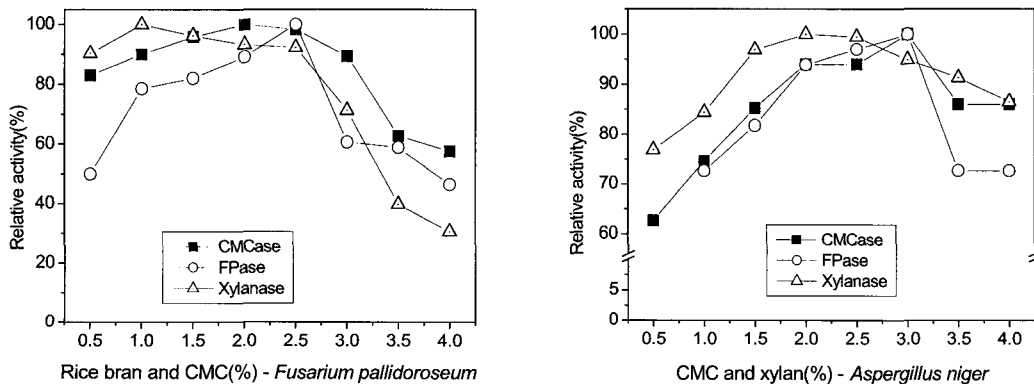


Fig. 4. Effect of various carbon concentrations on fungal enzyme production.

최적 탄소원의 첨가량이 CMCase, FPase, xylanase 활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*은 CMCase, FPase, xylanase에 있어서 rice bran+CMC의 최적 첨가량은 각각 2.0, 2.5, 1.0% 이었고, 이들을 종합하여 볼 때 2.0%가 최적 첨가량이었다. *Aspergillus niger*의 경우에는는 효소활성에 있어서 CMC+xylan 최적 첨가량은 각각 3.0, 3.0, 2.0%이었으며, 3.0%에서도 xylanase 활성이 상당히 높아 최종적으로 첨가량은 CMC+xylan 3.0% 이었다.

### 3.5 질소원

최적 탄소원의 적정량을 첨가한 배지에 질소원

으로 무첨가, peptone, yeast extract, urea, ammonium acetate, ammonium sulfate, yeast extract+peptone를 각각 0.5%씩 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

각종 질소원이 효소활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*의 CMCase, FPase, xylanase 활성에 있어서 최적 질소원은 각각 peptone, peptone, ammonium sulfate이었고, *Aspergillus niger*의 CMCase, FPase, xylanase 활성에 최적 질소원으로는 각각 peptone+yeast extract, ammonium acetate, ammonium sulfate이었으나, 세 효소 모두 높은 활성을 나타낸 질소원

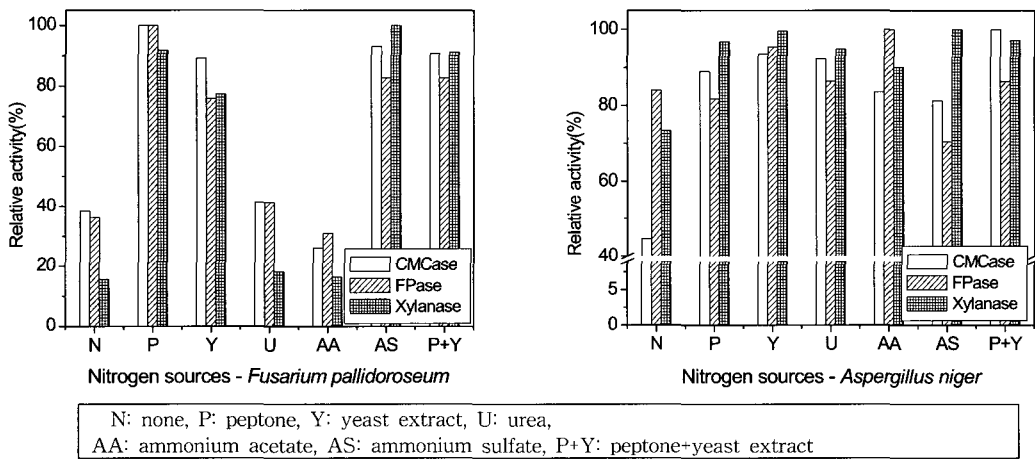


Fig. 5. Effect of different nitrogen sources on fungal enzyme production.

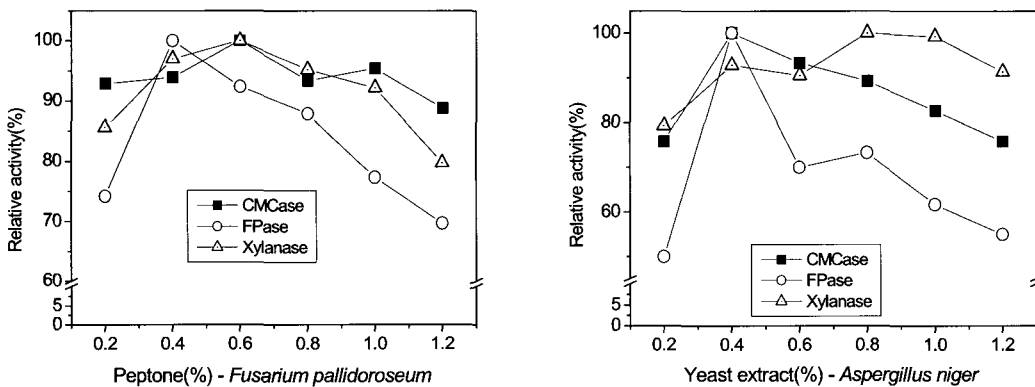


Fig. 6. Effect of various nitrogen concentrations on fungal enzyme production.

은 yeast extract이었다. 정 등<sup>10)</sup>도 *Fusarium* 속 균주로부터 cellulase 생산에 있어서 최적 질소원은 peptone 이었다는 결과와 일치하여 상기의 결과로 *F. pallidoroseum*과 *A. niger*의 최적 질소원은 각각 peptone과 yeast extract이었다.

### 3.6 질소원 첨가량

각각의 최적 질소원을 0.2~1.2%까지 0.2%씩 증가시켜 가면서 질소원을 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과 Fig. 6과 같다.

각각의 최적 질소원의 첨가량에 따른 효소활성을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*의 CMCase, FPase, xylanase 활성에 있어서 peptone의 최적 첨가량은 각각 0.6, 0.4, 0.6%이었

고, *Aspergillus niger*의 경우 CMCase, FPase, xylanase 활성에 있어서 yeast extract의 최적첨가량은 각각 0.4, 0.4, 0.8%이었다. 상기 결과를 종합해 볼 때 *F. pallidoroseum*과 *A. niger*의 질소원 최적 첨가량은 각각 0.6, 0.4% 이었다.

### 3.7 인원

각각의 최적 탄소원과 질소원을 첨가하고 인원으로 무첨가,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 를 각각 0.1%씩 첨가하고 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 7과 같다.

각종 인원이 효소활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroseum*과 *Aspergillus niger*의 효소 활성에 있어서 최적 인원은 각각  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 이었다.

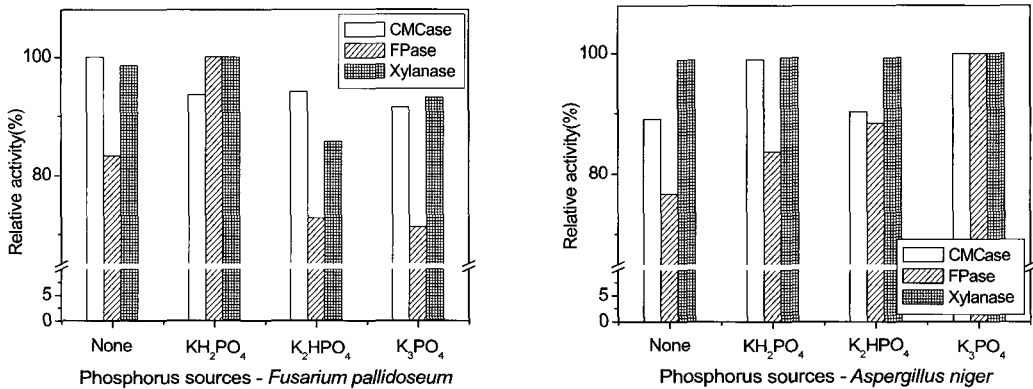


Fig. 7. Effect of different phosphorus sources on fungal enzyme production.

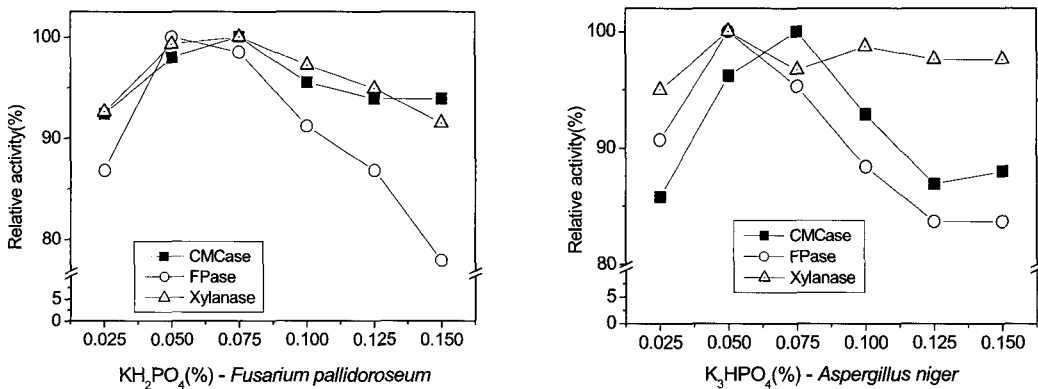


Fig. 8. Effect of various phosphorus concentrations on fungal enzyme production.

### 3.8 인원 첨가량

각각의 최적 인원을 0.025~0.15% 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정 한 결과는 Fig. 8과 같다.

각각의 최적 인원의 첨가량에 따른 효소활성을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroeseum*과 *Aspergillus niger*의 CMCase, FPase, xylanase 활성이 전체적으로 우수하게 나타난 첨가량은 각각  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.075%,  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0.05% 이었다.

### 3.9 금속염

최적의 탄소원, 질소원, 인을 첨가한 배지에 금속염을 무첨가,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ 를 각각 0.05%씩 첨가하

여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정 한 결과는 Fig. 9와 같다.

각종 금속염이 효소활성에 미치는 영향을 살펴본 결과 *Fusarium pallidoroeseum*의 경우 세 효소 모두  $\text{MnSO}_4$ 이 가장 우수한 결과를 나타내었고, *Aspergillus niger*는  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ 의 경우가 우수하였다. 이상의 결과로 *F. pallidoroeseum*과 *A. niger*의 최적 금속염은 각각  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2 + \text{FeSO}_4$  으로 하였다.

### 3.10 금속염 첨가량

각각의 최적 금속염의 첨가량을 0.02~0.12% 첨가하여 배양한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정 한 결과는 Fig. 10과 같다.

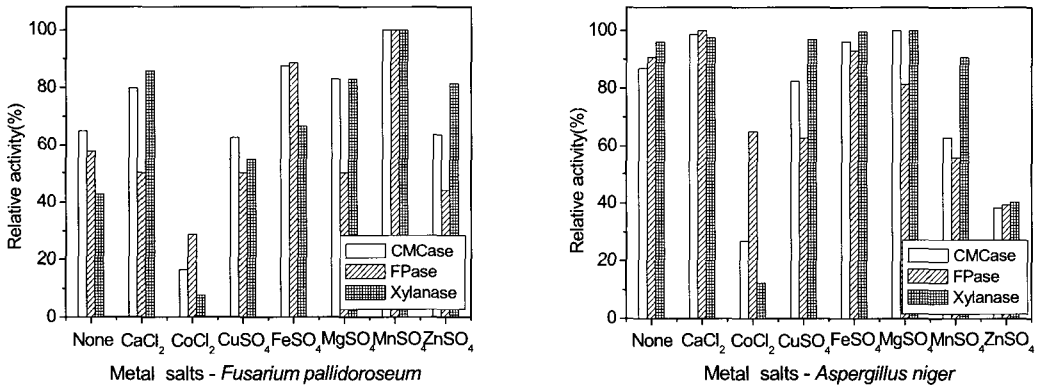


Fig. 9. Effect of different metal salts on fungal enzyme production.

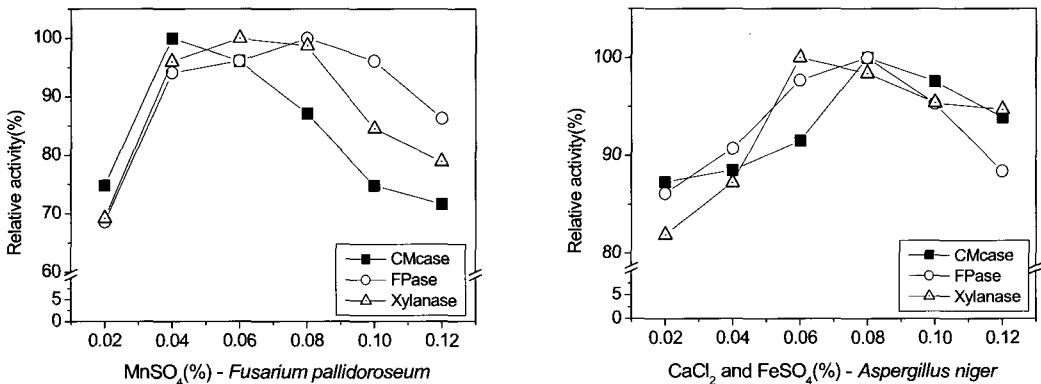


Fig. 10. Effect of various metal salt concentrations on fungal enzyme production.

각각의 최적의 금속염 첨가량에 따른 효소활성을 살펴본 결과는 *Fusarium pallidosorum*은 0.06%에서 세 효소가 고르게 분비되었고, *Aspergillus niger*는 0.08%에서 우수한 결과를 나타내었다. 따라서 *F. pallidosorum*과 *A. niger*의 금속염 최적 첨가량은 각각  $MnSO_4$  0.06%,  $CaCl_2+FeSO_4$  0.08% 이었다.

### 3.11 배양기간

구명된 최적의 pH, 온도, 배지조성에서 1~10일로 배양시간을 연장시켜가면서 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정한 결과는 Fig. 11과 같다.

각각의 구명된 최적의 배양조건에서 효소활성과 배양시간의 관계 및 pH를 검토한 결과 *Fusarium pallidosorum*의 경우 배양 6일에 효소활성은 최대를 나타내어 CMCase, FPase, xylanase는 각각 1.16, 0.30, 4.02 IU/ml 이었고, pH는 지속적으로 상승하였다. *Aspergillus niger*는 배양 7일에서 최대 효소활성으로 CMCase, FPase, xylanase는 각각 1.47, 0.71, 4.90 IU/ml 이었고, pH는 점차 감소하는 경향이였다. 상기의 결과로 효소활성을 고려하면 최적 배양기간에 있어서 *F. pallidosorum*과 *A. niger*는 각각 6, 7일 이었다. 한편 cellulase의 생산력이 우수하여 고지 탈묵에 이용되기도 하는 *Trichoderma reesei*와의 효소활성을 상기의 두 균주와 비교하면 *F. pallidosorum*은 전체적으로 *T. reesei* 보다 낮은 효소활성을 나타내었는데, 특

히 FPase가 약 50%의 활성만이 있었다. 그러나 *A. niger*의 경우 CMCase는 거의 비슷하였고, FPase와 xylanase는 오히려 *T. reesei* 보다 높은 결과를 나타내어 탈묵에 적용할 경우 긍정적인 작용을 할 것으로 기대된다.

## 4. 결론

본 연구는 자연계에서 분리하여 CMCase, FPase, xylanase의 활성이 우수한 2종의 fungi를 이용하여 효소생산을 위한 최적 배양조건을 검토하기 위해 수행되었고, 그 결과로부터 얻은 결론은 *Fusarium pallidosorum*의 최적 배양조건은 rice bran+CMC 2.0%, peptone 0.6%,  $KH_2PO_4$  0.075%,  $MnSO_4$  0.06%, pH 9.0, 29°C, 6일이었고 *Aspergillus niger*의 최적 배양조건은 CMC+xylan 2.5%, yeast extract 0.4%,  $K_3PO_4$  0.05%,  $CaCl_2+FeSO_4$  0.08%, pH 5.0, 27°C, 7일이였다. 또한 효소 활성 측면에서 *F. pallidosorum*는 *Trichoderma reesei* 보다 다소 낮았으나, *A. niger*는 비교적 높은 효소활성을 나타내었다.

## 인용문헌

1. Pala H., M. Mota and F. M. Gama. Modification of secondary pulp fibre fractions by enzymatic treatment. 8th ICBPPI, p. 260-262 (2001).

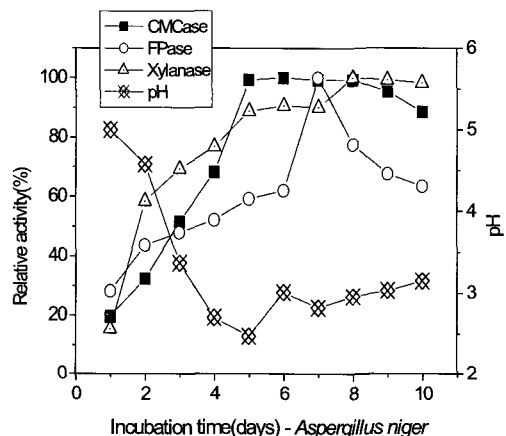
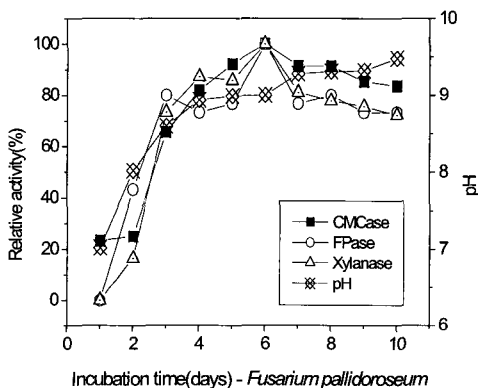


Fig. 11. Time course of fungal enzyme production and pH.



2. Thomas Jeffries, John H. Klungness. Preliminary results of enzyme-enhanced versus conventional deinking of xerographic printed paper. Recycling Symposium, p. 183-188 (1993).
3. Mendels Mary, James Weber and Richard Parizek. Enhanced Cellulase Production by a Mutant of *Trichoderma viride*. Applied Microbiology, 21(1): 152-154 (1971).
4. 손광희, 복해성, 오세균. 고지 탈묵용 Cellulase 및 Xylanase 생산. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 20(5):527-533 (1992).
5. Chandra K. Ray and Chandra T. S. A Cellulase-free Xylanase from Alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. Biotechnology letters, 17(3): 150-152 (1995).
6. Kang Seong-Woo, Kim Seung-wook and Kim Keun. Production of Cellulase and Xylanase by *Aspergillus niger* KKS. J. of Microbiology and Biotechnology, 4(1): 19-55 (1994).
7. 박성철, 강진하, 이양수. 미생물 효소를 이용한 고효율 효소 탈묵제의 개발(제2보). J. of KTappi, 36(3): 9-14 (2004).
8. 박성철, 강진하, 이양수. 미생물 효소를 이용한 고효율 효소 탈묵제의 개발(제3보). J. of KTappi, 37(1): (2005).
9. 정세훈, 박관화. *Fusarium moniliforme*이 생산하는 식물세포벽 분해효소의 정제와 특성. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18(2):154-158 (1990).