

흡착법에 의한 *Fomitopsis pinicola* 유래 cellulase의 고정화와 그에 따른 효소특성 변화*¹

신 금*² · 김 태 종*² · 김 영 균*² · 김 영 숙*^{2†}

Immobilization of Cellulases from *Fomitopsis pinicola* and Their Changes of Enzymatic Characteristics*¹

Keum Shin*² · Tae-Jong Kim*² · Young-Kyoon Kim*² · Yeong-Suk Kim*^{2†}

요 약

Fomitopsis pinicola KMJ812에 의해 생산된 조효소액은 섬유소 분해효소 복합체로서 매우 활성이 높으며 특히 β -glucosidase의 활성이 높아 포도당 전환수율이 높다. 본 연구에서는 *F. pinicola* KMJ812 생산 cellulase를 고정화에 따른 효소특성의 변화와 고정화 효소의 재사용에 따른 효소의 불활성 정도를 관찰하였다. 담체는 고정화 수율이 cellulase활성 61.7%와 β -glucosidase활성 64.4%로 우수한 Duolite A568로 선정하였다. 고정화 효소의 최적반응온도는 cellulase와 β -glucosidase 활성의 경우 모두 55°C로서 수용성효소보다 높았으며, 최적 pH는 cellulase활성은 4.0이었고, β -glucosidase활성은 4.5로 cellulase활성의 경우에서만 수용성효소와 비교하여 약간 염기성으로 변화하였다. 본 고정화 효소는 50°C에서 72시간 후에 98%의 활성을 유지하고 있었으며, 50°C에서 8회 사용 후에 50%정도의 잔존활성을 나타내었다.

ABSTRACT

Cellulase from *Fomitopsis pinicola* KMJ812 is an efficient cellulose degradation enzyme complex, especially with a high β -glucosidase activity. In this study, the change in enzymatic characteristics by immobilization and the reduction of immobilized enzyme activity by repeated usages were evaluated using cellulases from *F. pinicola* KMJ812. Among tested four resins, Duolite A568 resin had the best enzyme activity yield with 61.7% cellulase activity and 64.4% β -glucosidase activity during the cellulase immobilization. The best reaction temperature was 55°C

*¹ 접수 2010년 3월 22일, 채택 2010년 4월 14일

*² 국민대학교 삼림과학대학 임산생명공학과. Department of Forest Products and Biotechnology, College of Forest Science, Kookmin University, 861-1, Jeongneung-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-702, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 김영숙(e-mail: yskim@kookmin.ac.kr)

for both cellulase and β -glucosidase activities which were higher than the unimmobilized soluble cellulases. The best reaction pH was 4.0 for cellulase activity which was a little more basic than a soluble form and 4.5 for β -glucosidase activity. The immobilized cellulase activity was remained 98% of the beginning activity after 72 h incubation at 50°C and 50% of the beginning activity after eight times usage at 50°C.

Keywords: immobilization, Duolite A568, cellulase, β -glucosidase

1. 서 론

화석자원이 고갈되어감에 따라 대체에너지 개발에 많은 관심이 모아지고 있다(Aristidou and Penttila, 2000; Zaldivar *et al.*, 2001). 재생산 가능한 자원으로 cellulose material은 지구상에서 가장 풍부하며 매년 상당한 양이 축적되어지고 있다. 이를 발효시켜서 생산되는 에탄올은 연소적 특성이 석유와 비슷하며, 동시에 지구온난화문제를 야기시키는 이산화탄소의 축적을 줄일 수 있기에 석유의 대체에너지로 각광 받고 있다(Claassen *et al.*, 1999; Chengzhou *et al.*, 2004; Lin and Tanaka, 2006). Cellulose material의 효소당화에 이용되는 cellulase는 작용기 작에 따라 endo- β -1,4-glucanase (EG, EC 3.2.1.4), exo- β -1,4-glucanase (CBH, EC 3.2.1.91) 및 β -glucosidase (BGL, EC 3.2.1.21)로 3가지로 분류되며 이들은 복합체로써 상보적인 작용에 의해 cellulose를 포도당으로 전환한다(Bayer *et al.*, 1998; Dincer and Telefoncu, 2007). 그러나 현재 알려져 있는 대부분의 섬유소 분해 효소 복합체의 경우 β -glucosidase의 활성이 약하여 생성 환원당의 40~60%가 cellobiose로 축적된다(Duff and Murray, 1996). 특히 cellobiose는 EG와 CBH의 효소작용을 강력하게 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 cellulose의 효소적 당화과정 중에 당 전환율을 최대화 하기 위해서는 cellobiose나 다른 짧은 사슬형의 β -1,4-oligoglucosides를 glucose로 전환시키는 β -glucosidase의 추가적인 첨가가 필요하다(Duff and Murray, 1996; Tu *et al.*, 2006).

일반적으로 cellulase들은 식품산업(Tenkanen *et al.*, 2003), 직물의 표면가공(Andreaus *et al.*, 2000),

펄프 제지산업(Viikari *et al.*, 1998) 등의 여러 공업 분야에서 널리 사용되고 있다(Macario *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2007). 효소분리 후 재사용에 따른 효소반응공정의 경제성 향상을 위해 cellulase를 고정화하기 위한 여러 가지 방법들 - 가용성 담체에 의한 고정화(Kajiuchi and Park, 1992), polymeric matrix에 의한 고정화(Karube *et al.*, 1977), 불용성 담체에 의한 고정화(Woodward *et al.*, 1984; Chim-Anage *et al.*, 1986) - 이 보고되었다.

본 실험에 사용한 효소인 *Formiopsis pinicola* KMJ812로부터 생산한 cellulase 조효소액은 보고된 바와 같이 매우 높은 활성의 섬유소 분해효소 복합체로서(Joo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2008), 특히 기존의 낮은 β -glucosidase 활성 문제점을 극복할 수 있도록 β -glucosidase의 활성이 매우 높았다(Joo *et al.*, 2009). 이와 같은 고효율 섬유소 분해효소 복합체의 경제성 증진을 위해 흡착법에 의하여 고정화 실험을 수행하였고 그에 따른 효소의 특성변화를 관찰하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 한국농업미생물자원센터에서 분양받은 *Formiopsis pinicola* KMJ812 (KACC number: 43358)를 사용하였다. 이것을 potato dextrose agar (PDA) 배지(Sigma사, St. Louis, MO, USA)에 접종하여 28°C에서 4일간 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

이미 보고된 바와 같이 *F. pinicola* KMJ812로부터

생산한 조효소액의 cellulases 역가는 endo- β -1,4-glucanase (EG, EC 3.2.1.4)의 활성이 944 U/mg (Yoon *et al.*, 2008), β -glucosidase (BGL, EC 3.2.1.21)의 활성이 1420 U/mg (Joo *et al.*, 2009), exo- β -1,4-glucanase (CBH, EC 3.2.1.91)의 활성이 26 U/mg (Lee *et al.*, 2008)를 갖고 있다.

2.2. 조효소액 제조

Potato dextrose broth (PDB) 배지(Sigma사) 100 ml에 *F. pinicola* KMJ812를 접종한 후 28°C에서 4일간 배양하여 전배양액으로 사용하였다. 5 l 용 배양조에 균체증식용 배지(배지조성은 아래에 기술) 4 l을 넣고 전배양액 100 ml을 접종한 후 28°C에서 17일간 진탕 배양하였다. 4°C에서 12,000 × g으로 원심분리하여 얻은 상등액을 35% 농도의 ammonium sulfate 염석에 의해 분획하였고, 10 kD ultrafiltration membrane을 이용하여 0.02 M sodium acetate buffer (pH 5)로 투석한 후 농축하였다. 균체증식에 사용한 배양액의 조성은 peptone 8 g/l, yeast extract 2 g/l, K₂HPO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 3 g/l, 티아민 0.005 g/l, 그리고 탄소원으로 벳짚을 20 g/l로 사용하였다.

2.3. 효소 고정화와 담체 선정

고정화용 담체로는 Duolite A568 (Rohm and Haas 사, Philadelphia, PA, USA), Duolite A7 (Sigma사), Amberlite XAD 7HP (Sigma사), Amberlite XAD 761 (Sigma사)을 사용하였다. 담체를 선택하기 위하여 Duolite A568, Duolite A7, Amberlite XAD 7HP, Amberlite XAD 761을 증류수로 3회 세척한 후 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5)로 평형화하였다. 평형화된 담체 1 g (dry weight)에 대하여 pH 5의 효소액 70 mg (23 U/mg cellulase와 50 U/mg β -glucosidase의 효소역가), 10 ml 0.02 M sodium acetate buffer (pH 5)을 넣어 효소와 담체가 잘 섞이도록 상온에서 30분 동안 200 rpm으로 흔들여 준 후 4°C에서 24시간 두어 담체를 활성화시켰다. 담체는 여과를 통해 모은 후, 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5)로 3회

세척하였다. 비 흡착효소는 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5)로 세척하여 고정화 수율을 얻었다 (Demirel *et al.*, 2004; Gargouri *et al.*, 2004).

2.4. 효소활성

β -glucosidase의 효소활성은 1% (v/w) cellobiose (Sigma사) 0.5 ml과 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5) 0.4 ml에 적당한 양의 수용성 효소 또는 고정화 효소를 각각 첨가하여 50°C에서 30분 간 반응시킨 후, 100°C에서 10분 동안 끓여 반응을 정지시키고 생성된 glucose를 측정하여 결정하였다. 효소반응에 의해 생성된 glucose는 glucose oxidase/oxidase 방법(Morin and Prox, 1973)에 의하여 측정하였고, 효소활성은 효소가 분당 1 μ mole의 glucose를 생성한 것을 1 unit (1 U)로 하였다.

Cellulase의 효소활성은 0.05 M sodium acetate buffer (pH 5)에 녹인 1% (v/w) carboxy methylcellulose (CMC) 50 μ l에 적당한 양의 수용성 효소 또는 고정화 효소를 첨가하여 50°C에서 30분 동안 반응시켰으며, 효소반응에 의해 생성된 환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)법에 의해 측정하였다 (Miller, 1959). 효소활성은 분 당 1 μ mole의 glucose를 생성한 것을 1 unit (1 U)로 하였다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 이용하여 Bradford방법으로 정량하였다 (Bradford 1976).

2.5. 고정화 효소의 cellulase 활성에 대한 pH와 온도의 영향

최적 pH 및 pH안정성은 0.02 M citrate buffer (pH 2.5~5 범위), 0.02 M sodium acetate buffer (pH 4~6 범위), 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 6~8 범위), 0.02 M Tris buffer (pH 8~10 범위)를 사용하여 조사하였고, pH안정성은 기질을 첨가하지 않은 상태에서 효소를 50°C에서 24시간 동안 처리 후 남은 활성을 측정하였다. 반응은 cellulase의 경우에는 1% CMC로 β -glucosidase의 경우 2% cellobiose를 각각 넣고 82 mg (82 U cellulase; 203 U β -glucosidase)의 고정화 효소로 50°C에서 30분 동안

Table 1. The protein amounts and enzyme activities during the immobilization process

Resin	Enzyme added			Immobilized enzyme					Unbound enzyme			Yield (%)	
	Cellulase activity ^a	BGL activity ^a	Protein ^b	Cellulase activity ^a	BGL activity ^a	Protein ^b	Cellulase specific activity ^c	BGL specific activity ^c	Cellulase activity ^a	BGL activity ^a	Protein ^b	Cellulase	BGL
Duolite A568	1611	3535	69.9	994	2277	60.4	164	376	368	658	185	61.7	64.3
Duolite A7	1611	3535	69.9	801	1332	49.6	16.1	268	731	1866	31.3	49.7	37.6
Amberlite XAD 7HP	1611	3535	69.9	745	1583	47.6	15.6	33.2	756	1355	32.3	46.2	44.7
Amberlite XAD 761	1611	3535	69.9	963	1979	59.7	16.1	33.1	476	1311	25.8	59.7	55.9

BGL, β -glucosidase (EC 3.2.1.21)
^a enzyme activity (U/g-resin)

^b protein amount (mg/g-resin)
^c specific enzyme activity (U/mg-protein)

행하였고, 수용성효소는 51 μ l (82 U cellulase와 203 U β -glucosidase의 효소역가)로 50°C에서 30분 동안 행하였다.

최적온도 및 온도안정성은 30°C에서 70°C의 범위에서 고정화 효소와 수용성효소를 비교 조사하였다.

2.6. 고정화 효소의 반복사용에 따른 효소 활성 저하

고정화 효소의 재사용성을 검토하기 위하여 반복적인 가수분해 반응을 실시하였다. 고정화 효소 82 mg (82 U cellulase와 203 U β -glucosidase의 효소역가)와 1% CMC용액 또는 2% cellobiose를 넣은 후 50°C에서 30분 간 반응하였다. 반응 후 시료를 분리한 후 완충액으로 1회 세척 후 다시 1% CMC용액 또는 2% cellobiose를 넣고 반복실험을 계속하였다. 반응의 횟수가 증가됨에 따라 계속 효소의 활성이 낮아지기 때문에 각 반응의 활성도는 최고 활성에 대한 퍼센트 활성으로 나타냈고, 이 상대활성이 50%까지 줄어드는 효소반응 횟수를 반감기로 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 담체의 선택

흡착법으로 효소를 고정화하는데 적합하다고 여겨

지는 담체 4종을 선정하여 흡착율과 효소활성을 조사하였다(Table 1과 Fig. 1). 이때 효소의 화학적 변형을 피하고 활성을 최대한 유지하기 위하여 흡착법을 선정하였으며, 흡착법에 의한 효소 고정화는 operational stability가 낮은 것이 단점이나, entrapment 방법에서 발생하는 고정화 후 낮은 효소활성의 문제가 적은 이점이 있으므로(Abel-Naby, 1993), entrapment 방법은 배제하였다. 효소의 비활성화를 방지하기 위하여 모든 과정은 4°C에서 이루어졌다. 가장 높은 고정화 수율을 갖는 담체로는 Duolite A568로 cellulase와 β -glucosidase의 활성이 각각 61.7%와 64.4%를 나타내었고, Amberite XAD 761은 59.7%와 55.9%, Duolite A7이 49.7%와 37.6%, Amberite XAD 7HP이 46.2%와 44.7%의 순으로 고정화 수율을 나타냈다. 또한 고정화된 효소의 cellulase와 β -glucosidase의 활성을 살펴보면 Duolite A568의 경우 각각 994 U/g와 2277 U/g로 상대적으로 매우 높음을 알 수 있었고, 다음으로 Amberite XAD 761이 963 U/g와 1979 U/g로 나타냈다. 이는 endoglucanase를 고정화하기 위하여 acryl amide를 이용하여 53.4%의 고정화율을 얻은 Saleem등의 방법보다 높은 고정화 수율이며(Saleem *et al.*, 2005), transglucosidase를 고정화하기 위하여 DEAE-sephadex를 이용하여 33.1%의 고정화율을 얻은 Ahn 등의 방법보다 높았다(Ahn *et al.*, 1997). Duolite A568은 여러 종류의 효소를 고정화하는 데에 사용되

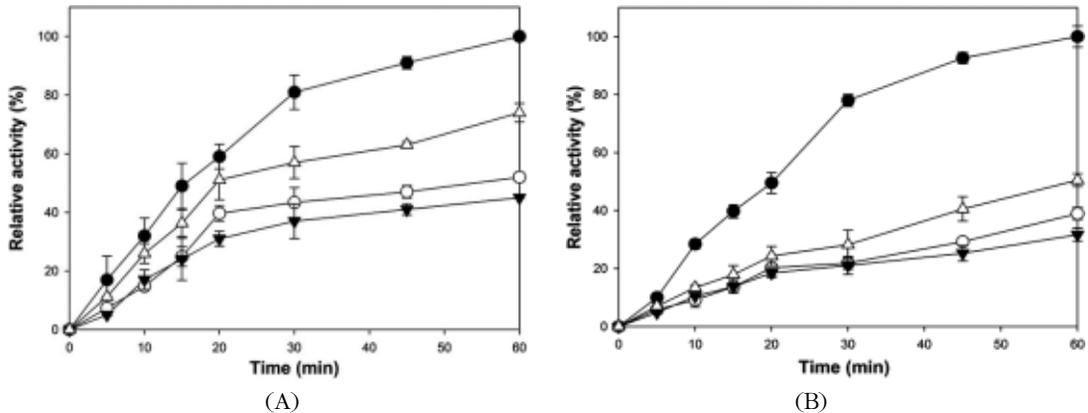


Fig. 1. Glucose production from carboxymethylcellulose (CMC) (A) and cellobiose (B) by immobilized enzymes. ●, Duolite A568; ▲, Amberlite 7HP; △, Amberlite 761; ○, Duolite A7. The amount of immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase).

어져 왔으며(de Fuentes *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2009; Ozdural *et al.*, 2001), 최근에는 기질과의 분리를 보다 쉽게 하기 위하여 magnetite등을 이용하여 고정화된 효소를 자석에 의하여 쉽게 분리하는 연구가 진행되어지고 있다(Demirel *et al.*, 2004). 본 연구에서는 cellulase를 고정화시키는데 적당한 담체를 Duolite A568 1 g (dry weight)으로 정하였고, 이때 사용한 효소액의 활성은 cellulase와 β -glucosidase의 활성이 각각 23 U/mg과 51 U/mg이었으며, 고정화 후 Duolite A568 1 g에 흡착된 단백질은 60.4 mg (994 U cellulase와 2277 U β -glucosidase의 효소역가)이었다. Duolite A568은 음이온 흡착법(anionic)에 의해 효소를 고정화하고 다른 3가지 고정화 매체는 단순 흡착법(adsorption)에 의해 효소를 고정화한다. 본 실험결과는 음이온 흡착법이 단순 흡착법보다 *Fomitopsis pinicola* KMJ812에서 생산된 cellulase 효소복합체에 적합함을 제안한다.

3.2. 온도 및 pH의 영향

고정화 후에 효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 검토하였다(Fig. 2). Cellulase와 β -glucosidase 모두 Fig. 2(A), (B)와 같이 고정화 효소의 최적온도는 55°C인 반면에 수용성효소의 최적온도는 50°C이었다.

이러한 현상의 이유는 효소가 비활성화 되는 높은 온도에서 담체가 효소를 보호하는 효과를 가지기 때문이다(Fuentes *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2009; Ozdural *et al.*, 2001). 또한 효소의 고정화에 따른 pH 영향을 검토하기 위하여 pH 2.5에서 pH 10까지 범위에서 검토하였다(Fig. 3). Cellulase 활성의 경우 Fig. 3(A)에서 보는 바와 같이 수용성효소의 최적 pH는 3이었고, pH가 높아질수록 활성이 급격히 떨어졌다. 그러나 고정화된 cellulase는 최적 pH는 4.0 이었고, 고정화된 cellulase의 활성의 감소는 알카리 쪽의 pH에서 수용성효소의 활성 감소보다 낮았다. 이는 효소가 polyanionic micro-environment에 있음으로 해서 생긴 결과와 같았다(Kajiuchi and Park, 1992). 이는 반응용액과 고정화 효소가 반응하는 과정에서 담체와의 정전기적 상호작용에 의해 H⁺와 OH⁻의 농도가 균일하게 나뉘어지지 않기 때문에 결과적으로 pH에 의한 활성이 이동하게 된다는 결과와 같았다(Martino *et al.*, 1996). 최적 pH의 이와 같은 변화가 PVC, sepharose, chitin, agarose, celite를 담체로 이용하여 *C. rugosa* lipase를 고정화했을 때에도 일어났음이 문헌에 보고되고 있다(Shaw *et al.*, 1991; Fadiloglu and Soylemez, 1998). Busto 등에 의해서도 고정화된 endoglucanase의 최적 pH가 자유 endoglucanase의 최적 pH보다 알카리쪽으로 이동한

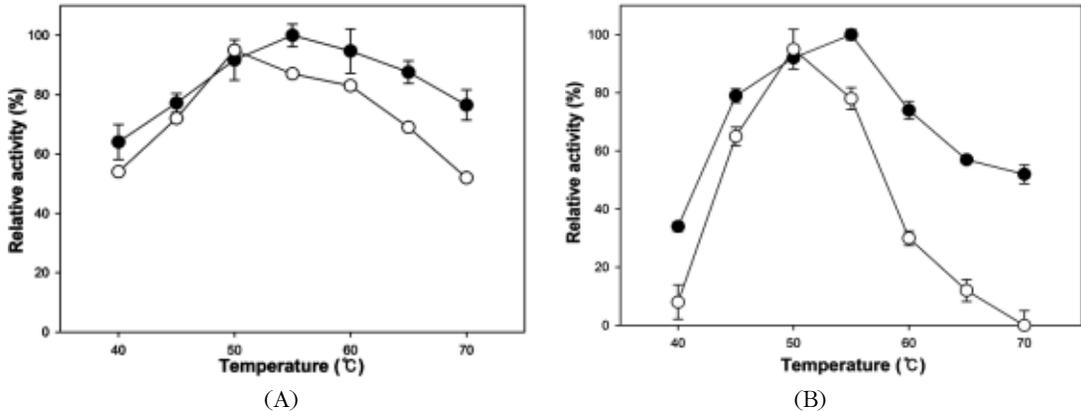


Fig. 2. Effect of temperature on activities of cellulase (A) and β -glucosidase (B) in both free or immobilized forms. The open circle (○) represented the free enzyme and the closed circle (●) represented the immobilized enzyme. The relative activities were calculated by comparing with the maximum activity value. The amount of free and immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase) and 51 μ l (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase).

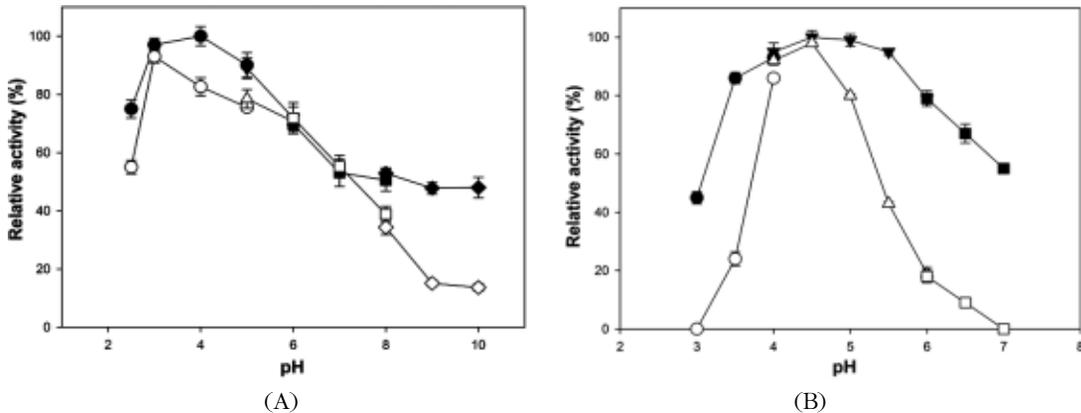


Fig. 3. Effect of pH on the activities of cellulase (A) and β -glucosidase (B) in both free or immobilized forms. The buffer systems were 0.1 M citrate buffer for pH 2.5~5.0 range (○, ●), 0.1 M sodium acetate buffer for pH 5.0~6.0 range (△, ▲), 0.1 M sodium phosphate buffer for pH 6.0~8.0 range (□, ■), and 0.1 M tris buffer for pH 8.0~10.0 range (◇, ◆). The open symbols represented the free enzyme and the closed symbols represented the immobilized enzyme. The amount of free and immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase) and 51 μ l (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase).

결과와 같았다(Busto *et al.*, 1998). β -glucosidase의 경우 Fig. 3(B)에서 보는 바와 같이 수용성효소의

최적 pH는 4.5이었고, pH가 높아질수록 활성이 급격히 떨어졌다. 그러나 고정화된 cellulase는 최적

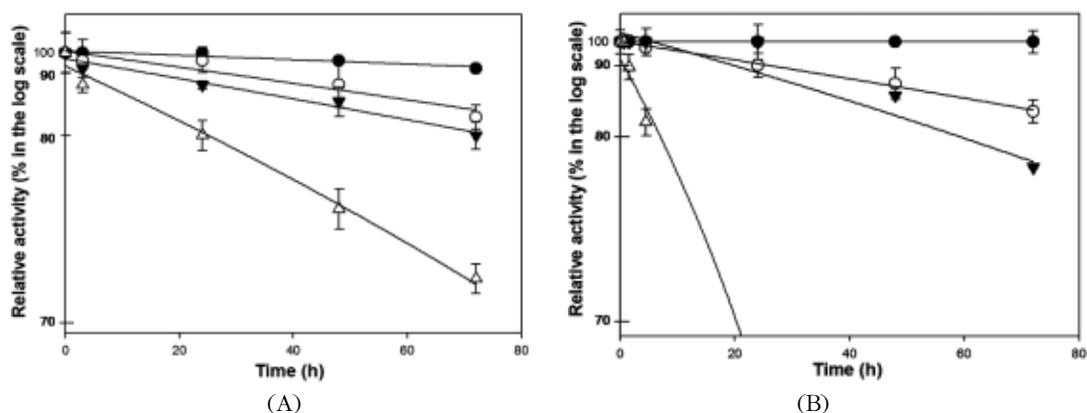


Fig. 4. Thermostability of immobilized enzyme (A) and free enzyme (B) ●, 50°C; ○, 55°C; ▲, 60°C; △, 70°C. The amount of free and immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase) and 51 μ l (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase).

pH는 4.5로 수용성효소의 최적과 같았으나 pH가 높아질수록 활성이 완만히 떨어졌다. 고정화된 cellulase의 활성의 감소는 알카리 쪽의 pH에서 수용성효소의 활성 감소보다 낮았다.

3.3. 열안정성 및 pH안정성

효소의 고정화가 열 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 온도 30~70°C에서 시간에 따른 효소활성의 변화를 조사하였다(Fig. 4). 고정화 효소의 활성을 72시간 후 조사한 결과 70°C에서도 75% 이상의 잔존활성을 보여 주었다(Fig. 4(A)). 이는 수용성 효소의 경우 70°C에서 24시간에 55% 이상의 잔존활성(Fig. 4(B))과 비교하여 고정화 효소가 수용성 효소에 비해 열안정성이 높게 나타났음을 알 수 있었다. 이는 alumina nanoparticles을 이용하여 고정화시킨 pepsin에서도 관찰되었고(Li *et al.*, 2003), 다른 여러 가지 담체에 여러 가지 효소를 고정화시킬 때에도 관찰되었다(Arica *et al.*, 1995; Akgol *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2000).

고정화 효소의 pH 안정성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 24시간 동안 pH 3~10의 범위에 노출시킨 후 잔존하는 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 5). 수용성효소와 고정화 효소 모두 최적 pH는 3이었으나

pH 안정성은 모두 pH 5에서 가장 안정한 것으로 나타났다. 또한 고정화 효소는 중성이나 알카리성 부근에서도 급격히 활성이 떨어지는 수용성효소에 비해 매우 높은 효소활성을 유지하고 있었다.

3.4. 고정화 효소의 반복사용에 따른 효소 활성 저하

고정화 효소의 반복사용실험을 통해 사용 횟수에 따른 효소의 활성 감소를 측정하였다(Fig. 6). 고정화된 cellulase와 β -glucosidase 모두 8회까지 가수분해율이 50% 이상이었다. 이는 Li 등의 liposome을 이용하여 고정화시킨 cellulase의 6회 사용 시 얻은 활성이 약 65%로 이와 비슷하였으며(Li *et al.*, 2007), 1-ethyl-3-methylimidazolium diethyl phosphate (EMIM-DEP)을 지지체로서 5회 재사용 시 42.8%의 활성을 나타낸 것보다 높은 활성을 나타내었고(Paetrice and Palligarnai, 2010), Eudragit L-100을 이용하여 만든 고정화된 cellulase 효소복합체 경우에도 5회 재사용후 60%의 활성을 나타낸 것보다 높은 활성을 나타내었다(Zhang *et al.*, 2010). Gold nano 입자에 고정화한 endoglucanase도 5회 재사용하였을 때 초기활성의 43%만을 나타내었다(Phadtare *et al.*, 2004).

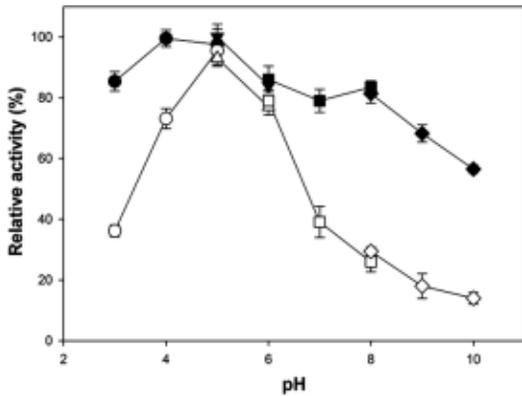


Fig. 5. pH stability of free and immobilized cellulase. The buffer systems were 0.1 M citrate buffer for pH 2.5~5.0 range (○, ●), 0.1 M sodium acetate buffer for pH 5.0~6.0 range (△, ▲), 0.1 M sodium phosphate buffer for pH 6.0~8.0 range (□, ■), and 0.1 M tris buffer for pH 8.0~10.0 range (◇, ◆). The open symbols represented the free enzyme and the closed symbols represented the immobilized enzyme. The amount of free and immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase) and 51 μ l (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase).

4. 결 론

Formiptosis pinicola KMJ812로부터 생산한 조효소의 cellulase는 이미 보고(Joo *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2008; Yoon *et al.*, 2008)된 바와 같이 매우 높은 활성의 섬유소 분해효소 복합체로서 특히 기존의 낮은 β -glucosidase 활성 문제를 극복하는 높은 β -glucosidase의 활성을 나타냈기에(Joo *et al.*, 2009) cellulosic material의 효소 당화시 문제점을 해결할 수 있다고 판단되어 *F. pinicola* KMJ812 유래의 cellulase 효소복합체를 고정화하였으며, 이때 β -glucosidase의 고정화율도 함께 비교하였다. 고정화 담체는 cellulase 61.7%와 β -glucosidase 64.3%의 높은 고정화 수율을 갖는 Duolite A568로 선정하였다. 고정화

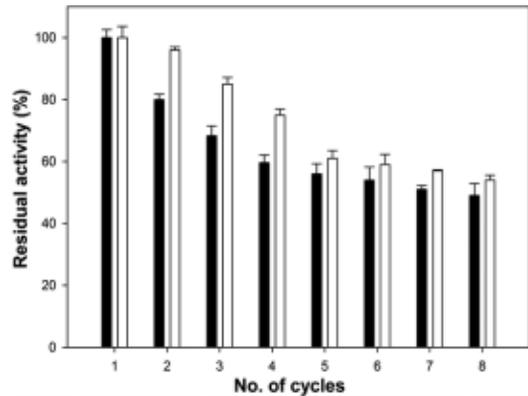


Fig. 6. The enzyme activity change of cellulase (black bars) and β -glucosidase (white bars) in Duolite A 568. The reusability of cellulase in Duolite A568 was studied by carrying out the hydrolysis of carboxymethyl cellulose or cellobiose at 50°C for 30 min. Each value represents the mean of triplicate measurements and varied from the mean by not more than 15%. The amount of free and immobilized enzymes was added to 82 mg (5.7 mg total protein equivalent to 82 U cellulase and 203 U β -glucosidase).

효소의 최적반응온도는 cellulase활성과 β -glucosidase 활성의 경우 모두 55°C로서 고정화 후 수용성효소보다 높았으며, 최적 반응 pH는 cellulase활성이 4.0이었고, β -glucosidase활성은 4.5로, cellulase활성의 경우에만 수용성효소와 비교하여 약간 염기성으로 변화하였다. 본 고정화 효소는 50°C에서 72시간 후에 98%의 활성이 유지되었으며, 50°C에서 8회 사용 후에 50%의 잔존활성을 나타내었다.

사 사

본 연구는 산림청 '산림과학기술개발사업(과제번호: S210709 L010110)'의 지원에 의해 수행되었다.

참 고 문 헌

1. Abdel-Naby, M. A. 1993. Immobilization of *Aspergillus niger* NRC 107 xylanase and β -xylosidase, and properties of the immobilized enzymes Applied Biochemistry and Biotechnology 38: 69~81.
2. Ahn, J. W., K. W. Park, and J. H. Seo. 1997. Immobilization of transglucosidase from *Aspergillus niger*. Korean Journal of Food Science and Technology 29: 320~325.
3. Akgol, S., Y. Yalcinkaya, G. Bayramoglu, A. Denizil, and M. Y. Arica. 2002. Reversible immobilization of urease onto procion brown MX-5BR-Ni (II) attached polyamide hollow-fiber membrane. Process Biochemistry 38: 675~683.
4. Andraus, J., R. Campos, G. Gubitz, and A. Cavaco-Paulo. 2000. Influence of cellulases on indigo backstaining. Textile Research Journal 70: 628~632.
5. Arica, M. Y., V. Hasirci, and N. G. Alaeddinoglu. 1995. Covalent immobilization of α -amylase onto pHEMA microspheres. Biomaterials 16: 761~768.
6. Aristidou, A. and M. Penttila. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. Current Opinion in Biotechnology 11: 187~198.
7. Bayer, E. A., H. Chanzy, R. Lamed, and Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. Current Opinion in Structural Biology 8: 548~557.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248~254.
9. Busto, M. D., N. Ortega, and M. Perezmateos. 1998. Characterization of microbial endo- β -glucanase immobilized in alginate beads. Acta Biotechnologica 18: 189~200.
10. Chengzhou, L. I., S. Kana, M. Tomohiro, Y. Makoto, F. Kimitoshi, and N. Katsumi. 2004. Enzymatic hydrolysis of waste paper in an external loop airlift bubble column with continuous ultrasonic irradiation. Journal of Chemical Engineering of Japan 37: 1041~1049.
11. Chim-Anage, P., Y. Kashiwagi, Y. Magae, T. Ohta, and T. Sasaki. 1986. Properties of cellulase immobilized on agarose gel with spacer. Biotechnology and Bioengineering 28: 1876~1878.
12. Choi, D. Y., Y. M. Lee, Y. K. Kim, J. J. Yoon, and Y. S. Kim. 2007. Enzyme activities and cellulose degradation of domestic softwoods in shaking culture of *Fomitopsis palustris* Mokhae Konghak 35(6): 91~99.
13. Claassen, P. A. M., J. B. van Lier, A. M. Lopez Contreras, E. W. J. van Niel, L. Sijtsma, A. J. M. Stams, S. S. de Vries, and R. A. Weusthuisvan. 1999. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. Applied Microbiology and Biotechnology 52: 741~755.
14. de Fuentes, I. E., C. A. Viseras, D. Ubiali, M. Terreni, and A. R. Alcantara. 2001. Different phyllosilicates as supports for lipase immobilization. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 11: 657~663.
15. Demirel, D., A. R. Ozdural, and M. Mutlu. 2004. Preparation and characterization of magnetic duolite-polystyrene composite particles for enzyme immobilization. Journal of Food Engineering 62: 203~208.
16. Dincer, A. and A. Telefoncu. 2007. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 45: 10~14.
17. Duff, S. J. B. and W. D. Murray. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology 55: 1~33.
18. Fadiloglu, S. and Z. Soylemez. 1998. Olive oil hydrolysis by celite immobilized *Candida rugosa* lipase. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 3411~3414.
19. Gargouri, M., I. Smaali, T. Maugard, M. D. Legoy, and N. Marzouki. 2004. Fungus β -glycosidases: immobilization and use in alkyl- β -glycoside synthesis. Journal of Molecular Catalysis B 29: 89~94.
20. Joo, A. R., M. Jeya, K. M. Lee, W. I. Sim, J. S. Kim, I. W. Kim, Y. S. Kim, D. K. Oh, P. Gunasekaran, and J. K. Lee. 2009. Purification and character-

- ization of a β -1,4-glucosidase from a newly isolated strain of *Fomitopsis pinicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83: 285~294.
21. Kajiuchi, T. and J. W. Park. 1992. Characteristics of cellulase modified with a copolymer of polyethylene glycol derivative and maleic acid anhydride. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 25: 202~206.
 22. Karube, I., S. Tanaka, T. Shirai, and S. Suzuki. 1977. Hydrolysis of cellulose in a cellulase-bead fluidized bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 19: 1183~1191.
 23. Kim, H. J., S. G. Wi, and H. J. Bae. 2007. Biobleaching of softwood kraft pulp using recombinant xylanase and cellulase. *mokchae konghak* 35(6): 166~174.
 24. Lee, J. W., H. Y. Kim, B. W. Koo, D. H. Choi, M. Kwon, and I. G. Choi. 2008. Enzymatic saccharification of biologically pretreated *Pinus densiflora* using enzymes from brown rot fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106: 162~167.
 25. Li, C., M. Yoshimoto, K. Fukunaga, and K. Nakao. 2007. Characterization and immobilization of liposome-bound cellulase for hydrolysis of insoluble cellulose. *Bioresource Technology* 98: 1366~1372.
 26. Li, J., J. Wang, V. G. Gavalas, D. A. Atwood, and L. G. Bachas. 2003. Alumina-pepsin hybrid nanoparticles with orientation specific enzyme coupling. *Nano Letters* 3: 55~58.
 27. Lim, B. C., H. J. Kim, and D. K. Oh. 2009. A stable immobilized D-psicose-3-epimerase for the production of D-psicose in the presence of borate. *Process Biochemistry* 44: 822~828.
 28. Lin, Y. and S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 627~642.
 29. Macario, A., A. Katovic, G. Giordano, L. Forni, F. Caloni, A. Filippini, and L. Setti. 2005. Immobilization of lipase on microporous and mesoporous materials: studies of the support surfaces. *Studies in Surface Science and Catalysis* 155: 381~394.
 30. Martino, A., P. G. Pifferi, and G. Spagna. 1996. Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan. *Process Biochemistry* 31: 287~293.
 31. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Biochemistry* 31: 426~428.
 32. Morin, L. G. and J. Prox. 1973. Single glucose oxidase-peroxidase reagent for two-minute determination of serum glucose. *Clinical Chemistry* 19: 959~962.
 33. Ozdural, A. R., D. Tanyolac, Z. Demircan, I. H. Boyaci, M. Mutlu, and C. Webb. 2001. A new method for determination of apparent kinetics parameters in recirculating packed-bed immobilized enzyme reactors. *Chemical Engineering Science* 56: 3483~3490.
 34. Phadtare, S., S. Vyas, D. V. Palaskar, A. Lachke, P. G. Shukla, S. Sivaram, and M. Sastry. 2004. Enhancing the reusability of endoglucanase - gold nanoparticle bioconjugates by tethering to polyurethane microspheres. *Biotechnology Progress* 20: 1840~1846.
 35. Saleem, M., M. H. Rashid, A. Jabbar, R. Perveen, A. M. Khalid, and M. I. Rajoka. 2005. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachniotus citrinus*. *Process Biochemistry* 40: 849~855.
 36. Shaw, J. F., R. C. Chang, F. F. Wang, and Y. J. Wang. 1991. Lipolytic activity of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnology and Bioengineering* 35: 132~137.
 37. Takahashi, H., B. Li, T. Saaki, C. Miyazaki, T. Kajino, and S. Inagaki. 2000. Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depends on the pore size and surface characteristic of mesoporous silica. *Chemistry of Materials* 12: 3301~3305.
 38. Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi. 2001. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of stream-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 28: 835~844.
 39. Tenkanen, M., M. L. Niku-Paavola, M. Linder, and L. Viikari. 2003. Cellulases in food processing. In *Handbook of Food Enzymology* pp. 771~789.
 40. Tu, M., X. Zhang, A. Kurabi, N. Gilkes, W. Mabee, and J. Saddler. 2006. Immobilization of β -gluco-

- sidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology Letters* 28: 151~156.
41. Viikari, L., J. Pere, A. Suurnakki, T. Qksanen, and J. Buchert. 1998. Use of cellulases in pulp and paper applications. *Special Publication-Royal Society of Chemistry* 219: 245~254.
 42. Woodward, J., S. K. Hillman, and B. K. Vaughen. 1984. An immobilization method for the recovery of cellulase used in cellulose conversion to ethanol. *Energy Biomass Wastes* 8: 1091~1111.
 43. Yoon, J. J., C. J. Cha, Y. S. Kim, and W. Kim. 2008. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnology Letters* 30: 1373~1378.
 44. Zaldivar, J., J. Nielsen, and L. Olsson. 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 17~34.
 45. Zhang, Y., J. Xu, Z. Yuan, H. Xu, and Q. Yu. 2010. Artificial neutral network-genetic algorithm based optimization for the immobilization of cellulase on the smart polymer Eudragit L-100. *Bioresource Technology* 101: 3153~3158.