

# 고지탈목용 Bacterial Cellulase와 Xylanase의 배양특성

박성철<sup>1)</sup> · 강진하<sup>2)</sup> · 이양수<sup>2)</sup>

1) 전북대학교 농업과학기술연구소, 2) 전북대학교 농업생명과학대학 산림과학부

## 1. 서 론

급속한 산업의 발전과 더불어 지구환경의 파괴가 극심해짐에 따라 저공해성 생화학 적 기술에 커다란 기대를 가지고 있다. 생화학적 기술은 미생물에 의해 생성되는 효소를 이용하는 기술로 이는 미생물의 성장 작용에 필요한 에너지의 전환매체로 이용되는 고분자 화합물로서 소량에 의해서도 화학반응 속도를 촉진시킬 수 있으며 선택된 기질에만 선택적으로 반응하며, 반응 후 화학적 공해 없이 생성물과 효소를 분리 회수할 수 있는 이점을 지니고 있다.

최근에는 펄프제조 및 제지분야에도 효소 사용에 대한 관심이 증가하고 있고 특히 고지원료의 재활용 공정에 소요되는 기계적 에너지 및 약품의 투입량을 절감하려는 연구노력의 일환으로 자연계에 존재하는 미생물 또는 효소를 이용한 생화학적 기술에 대한 연구가 관심을 끌고 있다.

이러한 효소탈목을 위해서는 먼저 탈목에 유용한 효소를 분비하는 미생물의 선발에서 시작하여 이 미생물로부터 다량의 효소를 얻을 수 있는 배양조건 및 배양기술을 개발하여야 한다. 한편 이와 관련된 최근의 연구로는 손 등<sup>4)</sup>의 *Tricoderma reesei* ATCC 28217 균주에서 단리한 cellulase와 xylanase를 이용한 탈목, Sreenath 등<sup>3)</sup>의 탈목용 미생물의 선발 및 적용, Lee 등<sup>1)</sup>의 *Coprinus cinereus* 2249에서 단리한 cellulase를 이용한 탈목, Marques 등<sup>2)</sup>의 cellulase와 xylanase를 이용한 탈목 결과를 보고 한 바 있다.

이에 따라, 본 연구에서는 자연계에서 분리·선발된 탈목에 관여하는 목재의 탄수화물 분해효소를 분비하는 균주를 이용하여 효소활성에 미치는 배양 특성을 검토하고자 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시균주 및 배지

자연계에서 분리·선발된 cellulase와 xylanase 생산력이 우수한 4종(No.18, 21, 22, 28)의 bacteria를 공시균주로 사용하였고, 기본배지로 CMC 10, xylan 10, yeast extract 5, peptone 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g/l 를 사용하였다.

### 2.2 조효소액 조제 및 효소활성 측정

균주의 배양액을 4000 rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하였고, 조효소액은 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하였다.

### 2.3 균주의 동정

공시균주로 사용된 균주는 영국의 CABI Bioscience에 동정을 의뢰하였다.

### 2.4 배양특성 조사

#### ○ pH

배지의 pH를 4.0 ~ 10.0으로 조절하여 각각 30 ℃, 48 시간의 조건으로 배양하고 효소활성을 측정하여 적정 pH를 구명하였다.

#### ○ 온도

최대활성의 pH로 배지를 조절하고 온도를 26 ~ 38 ℃로 변화시킨 조건으로 배양한 후 효소활성을 측정하여 적정배양온도를 구명하였다.

#### ○ 탄소원

기본배지에 무첨가, rice bran, avicel, xylan, CMC, rice bran+avicel, rice bran+CMC, rice bran+xylan, avicel+xylan, CMC+xylan을 배지의 유일한 탄소원으로 1.0 %를 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 최적의 탄소원을 선발하였다.

구명된 최적의 탄소원을 0.5 ~ 4.0 %로 각각 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 적정첨가량을 구명하였다.

#### ○ 질소원

최적 탄소원의 적정량을 첨가한 기본배지에 질소원으로 무첨가, peptone, yeast

extract, urea, ammonium acetate, ammonium sulfate, yeast extract+peptone를 각각 0.5 % 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 최적의 질소원을 구명하였다.

최적의 질소원을 0.2 ~ 2.0 %로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 최적의 질소원의 적정첨가량을 구명한다.

#### ○. 인원

최적의 탄소원과 질소원을 첨가한 기본배지에 인원으로 무첨가,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ 를 각각 0.1 % 첨가하고 배양한 후 효소활성을 측정하여 최적 인원을 구명하였다.

최적의 인원을 0.025 ~ 0.15 %로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 인의 적정첨가량을 구명한다.

#### ○. 금속염

최적의 탄소원, 질소원, 인을 첨가한 배지에 금속염을 무첨가,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ 를 각각 0.05 % 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 최적 금속이온을 구명하였다.

구명된 금속염의 첨가량을 0.005 ~ 0.12 %로 각각 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정하여 금속이온의 적정첨가량을 구명한다.

#### ○. 배양기간

구명된 최적의 pH, 온도, 배지에 12 ~ 84 시간으로 배양시간을 변화시켜가면서 효소활성을 측정하여 적정 배양기간을 구명하였다.

### 2.5 대조군과 비교

대조군으로는 *Thermomonospora fusca*를 사용하였다. *Thermomonospora fusca*의 배지조성(%) 및 배양조건은 다음과 같이 하였다.

CMC 1,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.25, Yeast extract 0.05,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.27,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.53, NaCl 0.02,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{CaCl}_2$  0.005, 55°C, pH 7.2, 72hr., 200rpm.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 균주의 동정

공시균주의 동정을 의뢰한 결과 No. 18, 21, 22, 28 균주는 각각 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II로 동정되었다.

## 3.2 배양특성

### 3.2.1 pH 및 온도

배지의 pH를 4.0 ~ 10.0으로 조절하여 배양한 후 효소활성을 측정한 결과, 각 균주는 전반적으로 중성 및 알칼리 영역에서 높은 활성을 나타내었다. *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II의 최적 pH는 각각 8.0, 8.0, 9.0, 8.0이었고, 특히 No. 28 균주는 pH 5.0 ~ 9.0까지 거의 비슷한 효소활성을 나타내었다.

또한 구명된 최적 pH로 배지를 조절하고 온도를 26 ~ 38 °C로 변화시켜 배양한 후 효소활성을 측정한 결과, 각 균주에 있어서 효소에 따라 약간의 차이는 있었으나 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II는 28 °C, *B. subtilis* II는 34 °C가 최적 배양온도 이었다.

### 3.2.2 탄소원

각각의 탄소원 1.0 %를 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정한 결과 대부분 혼합 탄소원에서 높은 효소활성을 나타내었다. *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II는 각각 rice bran+xylan, CMC+xylan, CMC+xylan에서 최대활성을 나타내었고, No. 28 균주는 xylan에서 최대활성을 나타내어 최적의 탄소원 이었다.

탄소의 첨가량을 검토하기 위하여 각각 구명된 최적의 탄소원을 0.5 ~ 4.0 %로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정한 결과, *Bacillus pumilus* I는 rice bran+xylan의 첨가량 3.0 %에서 CMCase와 FPase 활성이 최대를 나타내었고, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II는 세 효소를 종합 볼 때 avicel+xylan 3.5 %가 적정 첨가량이었다. *B. subtilis* II는 xylan 2.0 %에서 세 효소 모두 최대활성을 나타내었다.

### 3.2.3 질소원

최적 탄소원의 적정량을 첨가한 배지에 각종 질소원을 0.5 %씩 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정한 결과, 세 효소를 종합하여 볼 때 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II는 각각 peptone, urea, urea, yeast extract가 최적인

질소원 이었다.

구명된 각각의 최적 질소원을 0.2 ~ 2.0 %로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 측정한 결과, *Bacillus pumilus* I는 peptone 0.8 %까지 CMCase와 FPase의 활성이 꾸준히 증가하였고, *B. subtilis* I는 세 효소 모두 urea 0.4 %에서 최대활성을 나타내었다. *B. pumilus* II는 urea 1.6 %까지 CMCase와 FPase 활성이 지속적으로 증가하였고 xylanase는 완만한 감소 추세에 있어 적정 첨가량은 1.6 % 이었다. *B. subtilis* II는 yeast extract를 첨가할 경우 CMCase와 xylanase의 활성이 0.6 %에서 가장 높은 활성을 나타내었고, FPase는 첨가량이 증가할수록 약간씩 감소하는 경향으로 적정첨가량은 0.6 % 이었다.

### 3.2.4 인원

각 균주에 최적 탄소원과 질소원을 첨가하고 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 효소활성을 측정한 결과, *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II의 최적 인원은 각각  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  이었다.

또한 각 균주의 최적 인원을 0.025 ~ 0.15 %로 첨가하여 배양한 후 효소활성을 검토한 결과, *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. subtilis* II는 최적 인원의 첨가량 0.100 %에서 세 효소가 최대 활성을 나타내었고, *B. pumilus* II는 세 효소를 고려하여 볼 때  $\text{K}_3\text{PO}_4$  0.125 %가 적정 첨가량이었다.

### 3.2.5 금속염

구명된 최적의 탄소원, 질소원, 인을 첨가한 배지에 금속염을 무첨가,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ 를 각각 0.05 %씩 첨가하여 배양한 후 효소활성을 검토하였다. 그 결과 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I는 세 효소의 활성을 고려해 보았을 때  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하였을 경우 가장 우수한 효소활성을 나타내었고, *B. pumilus* II는 xylanase의 경우에서  $\text{FeSO}_4$ 를 첨가하였을 경우가 가장 우수한 활성을 나타내었으나, 전체적으로 무첨가 보다 효소활성이 낮았다. *B. subtilis* II는  $\text{ZnSO}_4$ 에서 세 효소 모두 최대 활성을 나타내어 최적의 금속염이었다.

각 균주에 최적의 금속염을 0.005 ~ 0.12 %로 첨가하여 배양 후 효소활성을 검토하

었는데, *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I는 각각  $\text{CaCl}_2$  0.06, 0.015 % 이후 효소활성의 증가가 둔화되었고, *B. subtilis* II는 세 효소의 활성을 고려하여  $\text{ZnSO}_4$  0.1 %가 적정첨가량이었다.

### 3.2.6 배양기간

구명된 최적의 pH, 온도, 배지에서 12 ~ 84 시간으로 배양시간을 변화시켜가면서 효소활성에 대한 변화를 검토하였다. 효소활성을 고려하여 볼 때 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II의 적정 배양시간은 각각 72, 36, 60, 36 시간이었다.

### 3.3 대조군과 비교

각 균주를 최적 조건에서 배양 후 *Thermomonospora fusca*와 효소활성을 비교·검토한 결과, 균주 상호간에 차이는 있었으나 CMCcase의 경우는 대조군이 높았고 FPase와 xylanase는 대체적으로 분리·선발된 균주가 우수하였다.

## 4. 결 론

본 연구는 자연계에서 분리·선발된 균주에서 탈목에 효과가 있는 목재의 탄수화물 분해효소를 얻기 위하여 효소활성에 요구되는 배양조건을 검토하여 얻은 결론은 다음과 같다.

분리·선발된 bacteria No. 18, 21, 22, 28는 동정결과 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II이었다. 효소활성에 대한 최적의 배양조건으로 *Bacillus pumilus* I은 pH 8.0, 28°C, 2.0% rice bran + xylan, 0.8% peptone, 0.100%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.06%  $\text{CaCl}_2$ , 72시간이었고, *B. subtilis* I은 pH 9.0, 28°C, 3.5% avicel + xylan, 0.4% urea, 0.100%  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , 0.015%  $\text{CaCl}_2$ , 36시간이었다. *B. pumilus* II는 pH 9.0, 28°C, 3.5% avicel + xylan, 1.6% urea, 0.125%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 60시간이었고, *B. subtilis* II는 pH 8.0, 34°C, 2.0% xylan, 0.6% yeast extract, 0.100%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.04%  $\text{ZnSO}_4$ , 36시간을 최적 배양조건으로 하였다. 또한 효소활성 측면에서 대조군인

*Thermomonospora fusca*와 유사하였다.

## 5. 인 용 문 헌

1. Lee Jung-Myoung and Eom Tae-Jin. 1999. Enzymatic Deinking of Old Newsprint with Alkalophilic Enzymes from *Coprinus cinereus* 2249. J. KTappi, 31(5) : 12 ~ 17.
2. Marques S., Pala H., Mota M., Amaral-Collaco M. T., Gama F. M. and Girio F. M. 2001. Screening New Enzymes For Enzymatic Deinking. 8th ICBPPI, : 277 ~ 279.
3. Sreenath K Hassan, Vina W. Yanf, Harold H., Burdsall Jr. and Jeffrees W. Thomas. 1996. Toner Removal by Alkaline-Active Cellulase from Desert Basidimycetes. American Chemical Society, : 267 ~ 279.
4. 손광희, 복해성, 오세균. 1992. 고지 탈묵용 Cellulase 및 Xylanase 생산. 산업미생물 학회지, 20(5) : 527 ~ 533.