

목질계 연료용알콜제조공정개발을 위한 β -Glucosidase 생산

■ 目 次 ■

1. 서 론
2. 재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 요 약

보해연구소, 순천대학교

이 원고는 상공자원부의 대체에너지 기술개발사업연구비에 의해 수행된 연구 결과를 요약 소개하는 것임.

1. 서 론

광합성 작용에 의해 매년 지구상에 가장 풍부하게 생산되고 있는 섬유성 Biomass인 Cellulose를 Oligosaccharide 또는 단당류도 분해시켜 대체 에너지 등의 유용물질로의 산업적 생산을 가능하게 하는데, 가장 큰 난점은 당화경비 및 당화액 중에 발효성 당의 함량이 문제로 지적되고 있다. 미생물 효소를 이용하는 생물학적 가수분해법(1, 2)은 물리화학적 방법(3-5)에 비하여 상온상압에서 가수분해가 가능하고 효소의 특이성으로 부산물이 생성되지 않은 장점 때문에 많은 연구가 되고 있으나 효소의 생산단가가 전공정의 40~60% 이상을 차지하는 문제점이 있다(6, 7). 효소적 당화의 경비 절감방법은 자연계로부터 강력한 효소생성의 균주를 탐색한 후, 여러 가지 방법으로 대사조절기구를 해제하여 대량의 효소를 생산하는 균주로 육종하여야 하며, 특히 Cellobiose 및 Cellooligosaccharide를 Glucose로 빠르게 전환시키려면 β -glucosidase 활성이 강한 Cellulase system이 필요하게 된

다(8). 지금까지 Cellulase를 생산하는 곰팡이로는 *Trichoderma*속이 가장 널리 알려져 있으나, 이는 섬유소 당화효소 중의 하나인 $\text{exo-}\beta$ -1, 4-glucanase(C_1)의 활성을 억제하는 Cellobiose를 분해시키는 β -glucosidase를 많이 분비하지 않는 것으로 알려져 있다(8, 9). 본 연구자들은 유기용매상의 섬유소 분해효소 반응을 이용하여 폐신문지로부터 발효성 당을 효율적으로 얻기 위하여, 우선 자연계로부터 유기용매에 비교적 안정한 β -glucosidase를 우수하게 생산하는 균주로서 *Aspergillus niger*를 분리·동정한 바 있으며(10), 본 연구에서는 β -glucosidase의 생산조건을 구한 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

사용균주

공시균주는 순천대학교 공업기술연구소에 보관중인 *Aspergillus niger* FN-416(10)을 사용하였다.

배 지

보존 및 포자형성용 배지는 각각 Potato Dextrose Agar(PDA) 및 Malt Extract Agar (MEA) 배지를 사용하였으며, 효소생성의 기본배지(6)는 KH_2PO_4 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g, Urea 0.3g, CaCl_2 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, Bacto peptone 1.0g, CMC 10.0g, Trace solution 1.0ml($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5%, $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.14%, CoCl_2 0.2%), Tween 80 2.0g, DW 1.0 l 조제하여 사용하였다.

포자 현탁액 조제

MEA 배지에서 30°C, 3일간 배양한 미성숙 포자에 0.005%(w/v) tween 80을 함유하는 0.8%(w/v) saline 용액 10ml를 첨가하여 도말봉으로 포자를 수확한 다음, vortex로 강하게 진탕하여 포자사슬을 파쇄하였다. 포자외의 잔해물을 제거하기 위하여 Cotton wool plug로 여과시키고 포자수를 1×10^7 conidia/ml 조절하여 4°C에 보관하면서 제조 후 1주일 이내에 사용하였다.

균주배양

효소 생산용 액체배지 10ml를 L-type 시험관에 넣어 살균(121°C, 10min)하고, 포자현탁액 0.5ml을 무균상 내에서 접종하여 30°C에서 6일 동안 진탕배양(120rpm, stroke 5.4cm)한 다음, 배양액을 원심분리(6000rpm, 10min)한 후 그 상정액을 조효소액으로 하여 효소활성도를 측정하였다.

효소 활성 측정

효소 활성 측정은 Kohchi법(11)에 따라 소형시험관 10ml에 효소액 1ml와 0.05M-sodium phosphate buffer(pH 5.5)로 용해한 4mM p-nitrophenyl- β -D-glucoside(PNPG) 1ml를 혼합한 다음, 37°C에서 20분간 반응시키고, 0.5M Na_2CO_3 2ml를 가하여 반응을 정지시켜 4°C로 냉각하였다.

원심분리하여 상정액을 400nm에서 흡광도를 측정하여 유리된 p-nitrophenol을 표준곡선에서 정량하였으며, 효소활성단위는 $\mu\text{M-PNP/ml} \cdot \text{min}$ 으로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

탄소원의 영향

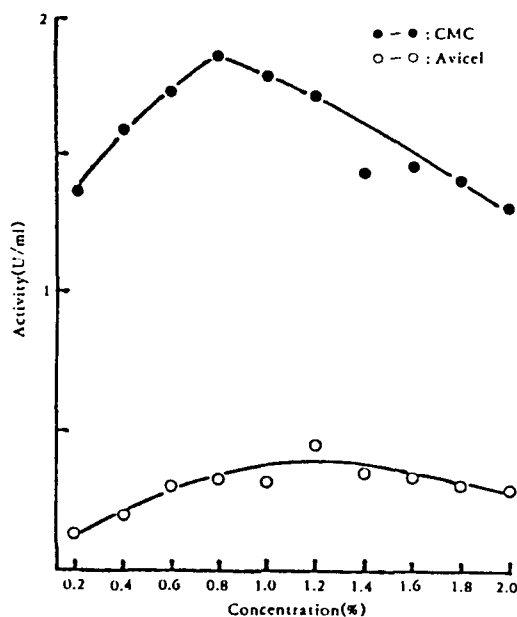
공시균주의 β -glucosidase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사한 결과(Table 1), 단당류에서는 Salicin, Glucose, Fructose가 약간 양호하였는데, 나머지 단당류들은 Catabolite 억제를 많이 시켰다. 이당류에서는 Lactose, Maltose가 약간 양호하였으며, 나머지는 단당류와 마찬가지로 억제를 받았다. 다당류에서는 CMC, Avicel이 양호하였으며, α -cellulose, Filter paper는 이용하지 못하였는데, 특히 CMC와 avicel은 β -glucosidase 생산에서 대조구에 비하여 5.7, 2.3배 영향을 주었다.

β -glucosidase 생산에 양호한 CMC와 Avicel의 최적 농도를 알아본 결과[Fig. 1], CMC는 0.8%, Avicel은 1.2%에서 양호하였으며 CMC가 Avicel보다 약 4배 정도 효소생산에 좋았으나 각각의 농도간에 현격한 차이를 나타내지는 않았다. 이와 같은 결과는 *Aspergillus aculeatus*는 Xylan에만 효소활성이 약간 증진되었으며 Avicel등과 같은 비용해성 Cellulose에는 거의 효과가 없었고(12), *Eupenicillium javanicum*는 2.9% 결정성 Cellulose(13), *Pellicularia filamentosa*는 1% Cellulose(14), *Penicillium purpurogenum* P-26은 0.6% Cellobiose-octaacetate 및 0.4% Avicel 농도(15)가 효과적이라는 보고와는 차이를 나타내었다. 그러나 *Thermoascus aurantiacus* A-131은 CMC, Avicel, Xylan 등이 효과적이라고 하였는데(16), 본 실험의 경우와 약간의 차이는 있지만 대체로 비슷하였다.

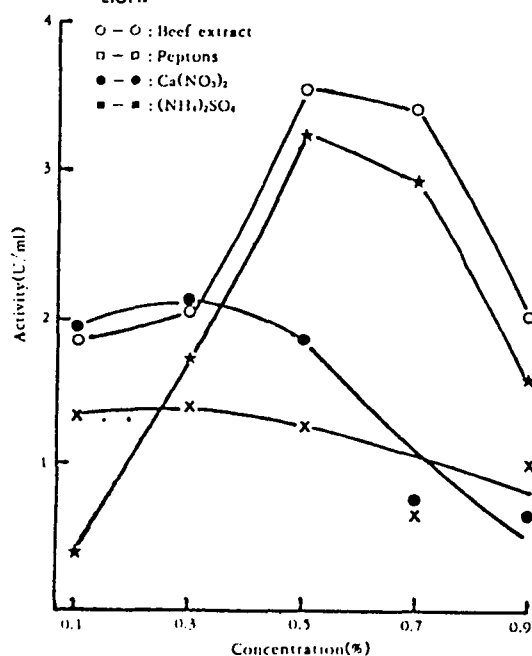
(Table 1) Effect of carbon sources on β -glucosidase production

Carbon sources(1.0%, w/v)	Activity(U/ml)
None	0.38
Xylose	0.38
Arabinose	0.16
Sorbose	0.40
Glucose	0.52
Fructose	0.47
Mannose	0.34
Galactose	0.28
Inositol	0.11
Mannitol	0.33
Sorbitol	0.28
Salicin	0.78
Sucrose	0.28
Maltose	0.50
Cellobiose	0.32
Melibiose	0.24
Lactose	0.52
CMC	2.15
α -Cellulose	0.19
Xylan	0.10
Starch	0.02
Avicel	0.89
Filter paper	0.22

Strain was cultured at 30°C for 6 days with shaking. Each carbon sources(1%) was added to basal medium instead of CMC.



[Fig 1] Effect of concentration of carbon sources on β -glucosidase production.



[Fig 2] Effect of concentration of nitrogen sources on β -glucosidase production.

질소원의 영향

β -glucosidase 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사한 결과(Table 2), 무기태 질소원에서는 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 양호하였고, 유기태 질소원에서는 Beef extract, Peptone, Tryptone, Yeast extract 순으로 양호하였는데 전체적으로는 유기태 질소원이 효소생산에 적합하였다. 효소생산에 우수한 질소원인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Beef extract, Peptone의 최적 농도를 조사한 결과 [Fig. 2], 효소생산에 0.5% Beef extract가 가장 우수하였으며, 다음으로 0.5% Peptone, 0.3% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 순이었다.

(Table 2) Effect of nitrogen sources on β -glucosidase production.

Nitrogen sources(0.5%, w/v)	Activity(U/ml)
None	0.18
NH_4Cl	0.30
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.50
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.30
$(\text{NH}_4)_2\text{HOP}_4$	0.58
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.23
$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{H}_4$	0.14
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2.51
NH_4NO_3	0.70
NaNO_3	0.32
KNO_3	0.68
Casein	0.77
Yeast ext.	1.85
Peptone	2.82
Beef ext.	3.20
Malt ext.	0.76
Tryptone	2.08
Asparagine	0.42
Skim milk	0.22

Strain was cultured at 30°C for 6 days with shaking. Each nitrogen sources(0.5%) was added to basal medium containing 0.8% CMC instead of peptone, ammonium sulfate and urea.

이상의 결과는 다른 보고자의 경우, *P. purpurogenum* P-26은 0.42% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 0.1% Peptone이 양호하였고(15), *A. aculeatus*는 Sodium glutamate가 가장 효과적이라는 보고(12)와는 질소원의 종류 및 농도에서 약간 차이가 있었다.

무기염류의 영향

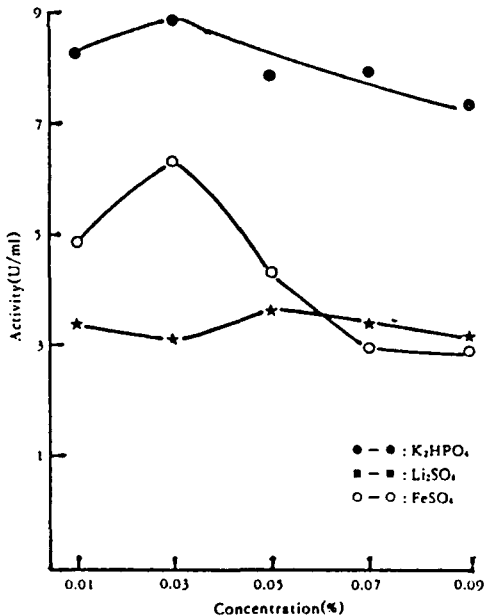
β -glucosidase 생산에 미치는 무기염류의 영향을 조사한 결과(Table 3), K_2HPO_4 가 가장 우수하였고, 대조구에 비하여 2배 정도 효과적이었으며, 다음으로는 Li_2SO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 순이었다.

(Table 3) Effect of inorganic salts on β -glucosidase production.

Inorganic salts(0.05%, w/v)	Activity(U/ml)
None	2.83
AgNO_3	1.59
BaCO_3	3.36
CaCO_3	2.88
CaCl_2	2.60
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.70
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.57
FeSO_4	3.79
HgCl_2	1.01
$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$	3.21
K_2HPO_4	6.10
Li_2SO_4	4.41
LiCl	3.35
$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3.68
MnCl_2	3.04
MnSO_4	3.31
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.33
ZnSO_4	2.97

Strain was cultured at 30°C for 6 days with shaking. Each inorganic salts(0.05%) was added to basal medium containing 0.8% CMC, 0.5% beef extract and 0.3% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ instead of KH_2PO_4 , MgSO_4 and CaCl_2

HgCl₂, AgNO₃, CoCl₂는 효소생산에 대하여 40~65% 정도 억제를 하였다. 또한 동일한 금속 원소일 경우에는 Cl⁻을 함유한 무기염류가 대체로 효소생산에 불리하였다. β -glucosidase 생산에 우수한 무기염류인 K₂HPO₄, Li₂SO₄, Fe₂SO₄이 최적 농도를 조사한 결과[Fig. 3], 0.03% K₂HPO₄가 가장 우수하였으며, 다음으로 0.03% FeSO₄, 0.5% Li₂SO₄순이었다. 이는 *A. aculeatus*의 효소생산 경우에는 대부분의 무기염류에 대하여 효소 활성 증진에 별로 효과가 없다고 한 결과(12)와는 상이하였다.



[Fig. 3] Effect of concentration time on β -glucosidase production.

배양시간의 영향

β -glucosidase 생산의 경시적인 변화를 조사한 결과[Fig. 4], 3일 이후부터 효소를 생산·분비하여 5일까지 급격한 증가를 보였으며, 그 이후부터는 약간씩 증가는 되었으나 큰 변화는 보이지 않았다.

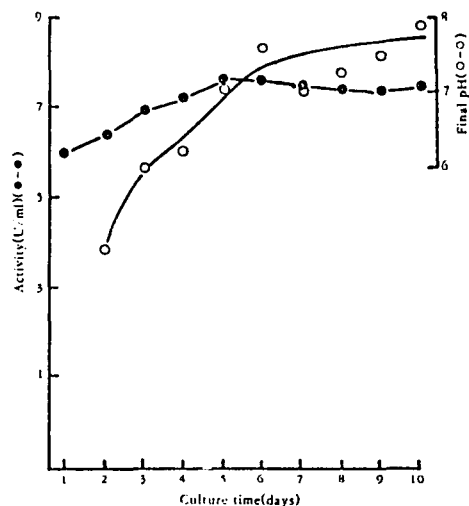
초기 pH의 영향

배양 초기 pH가 β -glucosidase 생산에 미치는 영향을 조사한 결과[Fig. 5], pH 4.0~4.5에서 효과적이었으며, 효소생성의 기본 배지조건(6)에서 보다 약 4.5배 효소생산의 증가를 나타내었다. 이는 *E. Javanicum*(13), *T. aurantiacus* A-131(16) 및 *T. viride*(19)의 최적 pH인 3.5~4.5와 비슷한 경향이었으나, *A. aculeatus*(12) 및 *P. filamentosa*(14)의 5.5~7인 경우보다 약간 산성측이었다.

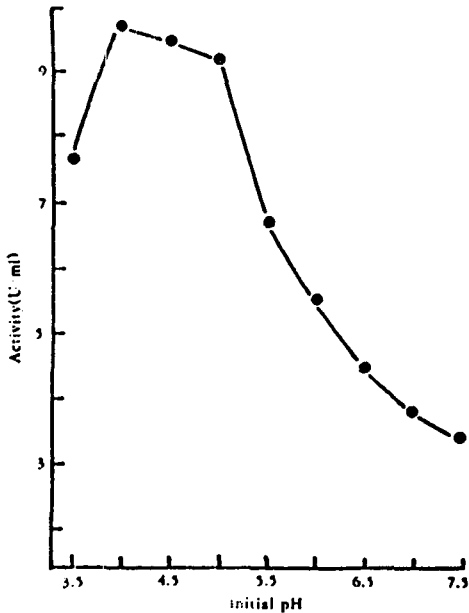
온도의 영향

공시균주의 β -glucosidase 생성에 미치는 최적 온도를 조사한 결과[Fig. 6], 가장 적당한 배양온도는 30°C였으며, 40°C 이상 20°C 이하에서는 효소생성이 억제되었다. 이는 *A. aculeatus*(10)의 30°C와는 동일하였으나, *T. aurantiacus* A-131(16) 및 *T. viride*(17)에 의한 효소 생성의 최적 온도인 23~30°C, 28°C보다는 약간 높은 경향이였다.

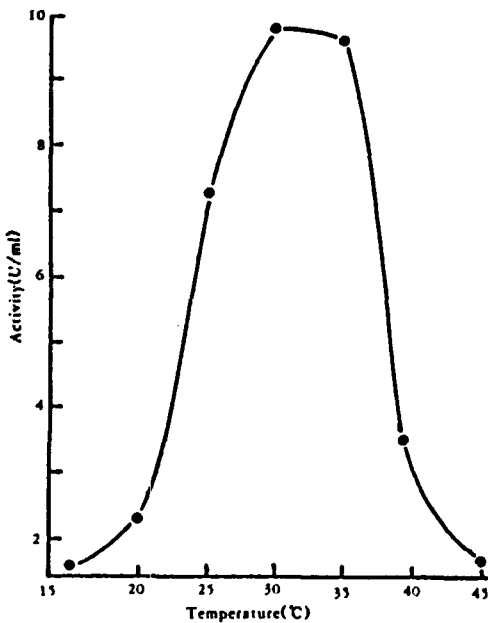
이상의 최적 효소 생산조건에서 배양액 중의 효소활성은 8.5~9.8unit/ml였다.



[Fig. 4] Effect of culture time on β -glucosidase production.



[Fig 5] Effect of initial pH and temperature on β -glucosidase production.



[Fig. 6] Effect of initial pH and temperature on β -glucosidase production.

4. 요약

*Aspergillus niger*에 의한 β -glucosidase의 최적 생산조건으로는 0.8% CMC, 0.5% Beef extract, 0.3% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 0.03% K_2HPO_4 , 0.03% FeSO_4 , 0.05% Li_2SO_4 , 0.2% tween 80, Trace solution 1ml, 초기 pH 4.0, 배양온도 30°C , 배양 기간 5~6일이었고, 그 배양액 중의 최종 효소 활성은 8.5~9.8unit/ml였다.

〈참고문헌〉

1. I. V. Gorbacheva and N. A. Rodionove (1977), *Biochem. Biophys. Acta.*, **484**, 79.
2. A. Chosh(1981), *Arch. Microbiol.*, **140**, 126.
3. M. Pibber and J. C. Toha(1982), *J. Ferment. Technol.*, **60**, 247.
4. H. T. Rehm and G. Reed(1983), *Biotechnology*, Vol. 3-Biomass, P. 293, Deerfield Beach, Florida, Basel.
5. J. Weigel(1982), *Experientia*, **38**, 151.
6. M. Mandels and D. Sternberg(1976), *J. Ferment. Technol.*, **54**, 267.
7. S. B. Virendra and T. K. Ghose(1981), *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90.
8. S. K. Garg and S. Neclakanten(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 109.
9. S. M. Trivedi and J. D. Desai(1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**, 211.
10. 박석규, 문일식, 최옥자, 성낙계(1993), *산업미생물학회지*, **21**, 440.
11. C. Kohchi and A. Tohe(1986), *Mol. Gen. Genet.*, **203**, 89.

12. S. Murao, J. Kanamoto and M. Arai(1979), *J. Ferment. Technol.*, **57**, 151.
13. M. Tanaka, M. Taniguchi, T. Morinaga, R. Matsuno and T. Kamikubo(1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 149.
14. M. Taniguchi, M. Tanaks, R. Matsuno and T. Kamikubo(1980), *J. Ferment. Technol.*, **58**, 143.
15. S. Takao, Y. Kamagata and H. Sasaki (1985), *J. Ferment. Technol.* **63**, 127.
16. M. Kawamori, K. Takayama and S. Takasawa(1987), *Agric. Biol. Chem.* **51**, 647.
17. 송은경, 허태린, 이세영(1982), 한국생화학회지, **15**, 228.

信人者, 人未必盡誠, 己則獨誠矣. 疑人者, 人未必皆詐, 己則先詐矣.

남을 믿는 것은, 남들이 모두 진실하기 때문이 아니라 자기가 홀로 진실하기 때문이요, 남을 의심하는 것은, 남들이 모두 속이기 때문이 아니라 자기가 먼저 속이기 때문이다.

— 榮根譚중에서 —