

Microbial Cellulases and Xylanases in Biotechnology

정경화 · 박종철

(주)도드람사료

Why study cellulases and xylanases?

자연계에서 cellulase와 xylanase의 기본적인 기능은 식물 세포벽의 주요 구성물질인 cellulose와 xylan의 β -1,4-glycosidic linkage를 절단하여 구성 당으로 분해함으로써 생물체가 에너지원과 탄소원으로 이용할 수 있도록 한다. 따라서 cellulase와 xylanase는 광합성에 의해 고정된 carbon의 recycling에 주요한 역할을 수행한다. 그런데 자연계에 존재하는 fixed carbon의 최대 저장고인 식물 세포벽은 다음과 같은 3가지의 주요한 polymer로 구성되어 있다; cellulose(불용성 β -1,4-glucan fiber), hemicellulose(glucan, mannan, xylan을 포함하는 noncellulosic polysaccharides), and lignin(a complex polyphenolic structure). 이러한 구조로 인하여 식물의 세포벽을 lignocellulose라고도 부르는데, 구성성분 중에서 cellulose가 가장 많이 존재하고 그 다음으로 xylan이 주성분인 hemicellulose가 많이 존재하며 이들 두 성분이 전체 plant biomass의 50% 이상을 차지한다(8, 13, 15).

장기보관 중인 먼 피복에서 강도 저하를 야기시키는 곰팡이를 분리하면서부터 시작된 cellulase와 xylanase에 대한 연구는 오랫동안 cellulose와 xylan의 saccharification을 위한 효소 생산 균주의 발효연구 뿐만 아니라 cellulase와 xylanase 유전자의 cloning과 이들 효소의 생화학적 연구에 많이 치중되어 왔다. 그 결과, cellulase 유전자만 해도 현재까지 150가지 이상의 유전자가 cloning이 되는 등 많은 cellulase와 xylanase 유전자가 cloning되어 그 일차구조가 밝혀져 있으며(2, 8, 13), 현재는 유전자 산물의 여러 domain에 대한 기능분석 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 많은 생화학적 연구를 통하여 이들 효소의 작용특성 뿐만 아니라 3차원적 구조, catalytic sites와 작용기작까지도 밝혀져 있다(6, 8, 15, 16). Cellulase와 xylanase는 이와 같은 기초 학문 측면의 연구가 많이 수행되어져 왔고 이러한 결과들을 토대로 현재에는 이들 효소 또는 domain 그리고 효소 생산균의 상업적 이용 가능성에 많은 관심을 가지고 응용연구가 활발히 진행되고 있으며 일부는 산업화되었다.

광합성에 의해 연간 약 4×10^9 톤의 cellulose가 생성되는 등 cellulose와 xylan은 지구상에 존재하는 가장 풍부한 유기물질일 뿐만 아니라 식물은 해마다 자라기 때문에 석유나 석

탄처럼 고갈에 대하여 걱정할 필요가 없는 영원히 재생 가능한 자원이다. 게다가 이들 자원이 농산 폐기물 범람으로 인하여 환경오염원으로 대두되고 있는 실정이다. 매년 수확되는 4천만톤 이상의 미곡 및 발작물 등에서 파생되는 부산물은 주로 벚짳, 왕겨, 미강박의 형태로 발생하는데, 현재는 주로 퇴비 및 저급 사료로 이용되거나 또는 전혀 이용되지 못하여 소각하거나 폐기물로 자연계에 방치되고 있다. 그러므로 이들 다당류의 효율적인 당화과정 개발은 식량문제와 연료문제의 해결에 큰 도움이 될 수 있을 것으로 여겨진다. 이러한 cellulose와 xylan 자원의 무한한 이용 가능성 때문에 많은 연구진들에 의해 *Trichoderma*속을 비롯한 여러 곰팡이와 *Clostridium*속을 비롯한 여러 세균이 생산하는 cellulase와 xylanase에 대한 연구가 많이 이루어져왔다. 그러나 미생물 유래의 cellulase와 xylanase를 이용한 plant biomass의 효소적 가수분해는 화학적인 방법에 비해서 여러 가지 장점을 가지고 있을 뿐만 아니라 일부 미생물에서는 높은 수준으로 효소 생산도 가능하지만 여러 가지 이유로 인해서 경제성 확보가 문제가 되어 현재는 연구에 큰 진전이 없는 상태이다.

위와 같이 오랫동안 많은 연구가 cellulose와 xylan의 당화에 초점이 맞춰져 왔었는데, 현재에는 이들 효소의 용도가 다양하게 개발이 되어 여러 분야에서 상업화가 되었으며 또한 새로운 응용연구도 활발하게 진행이 되고 있다. Cellulase는 섬유산업, 제지산업, 세제산업, 사료산업 등에서 많이 이용이 되고 있으며 이외에도 저칼로리 식품의 제조, 음식물 쓰레기의 발효, industrial slime의 제거 등의 다양한 용도에 적용이 되고 있다(6, 15). 또한 xylanase는 제지산업, 식품산업, 사료산업 등에 많이 응용이 되고 있다(2, 8, 13). 특히 최근에는 cellulase와 xylanase의 domain 기능분석 연구 결과를 토대로 cellulose-binding domain(CBD)과 thermostabilizing domain 등의 상업화를 위한 연구가 시도되고 있다. 실제로 1998년에 미국에서 다른 단백질들을 CBD에 접합시킨 fusion protein을 이용하여 drug delivery, diagnostic kits, affinity separation 등의 여러 응용분야에 대한 특허가 등록된 바가 있다(5). 이와 같이 높은 상업적 이용 가능성 때문에 많은 연구진들이 cellulase와 xylanase에 관련된 연구를 수행하고 있으며 앞으로도 이들 효소는 더 많은 분야에서 확대·적용될 것으로 기대된다.

Microbial cellulase and xylanase systems

Cellulose는 glucose unit가 β -1,4 결합으로 연결된 homopolymer로서 cellulose를 complete digestion하기 위해서는 3 가지 type의 enzyme이 필요하다; endo- β -1,4-glucanase(EC 3.2.1.4; endoglucanase, CMCase), exo- β -1,4-glucanase(EC 3.2.1.91; exoglucanase, cellobiohydrolase), and β -glucosidase (EC 3.2.1.21). Endoglucanase는 internal β -1,4-glycosidic bond를 무작위적으로 절단하고 exoglucanase는 non-reducing sugar end에서 glucose 이당체인 cellobiose 단위로 절단해 나간다. 세포외로 분비되는 endoglucanase와 exoglucanase의 synergistic action을 통해서 glucose 또는 cellobiose로 분해가 되고, cellobiose는 세포 내로 유입된 후에 intracellular enzyme인 β -glucosidase에 의해서 glucose로 최종 분해가 된다(1, 15). 그러므로 cellulose의 부분 가수분해를 위해서는 endoglucanase가 중요시되고, saccharification을 위해서는 endoglucanase, exoglucanase와 더불어 β -glucosidase의 역할이 중요시된다.

Xylan은 β -1,4-glycosidic linkage로 연결된 xylose backbone에 acetate 또는 arabinose, glucuronic acid가 branch를 이루는 heteropolymer이다. Esparto grass와 tobacco에서 분리된 xylan은 side chain이 없이 xylosyl unit만으로 구성된 가장 단순한 구조를 가지고 있지만 대부분의 xylan은 side chain이 branch되어 있다. Wood에선 acetylated xylan 형태의 hardwood와 arabinoxylan 형태의 softwood가 주종을 이루고 있으며, 일반적으로 grass의 xylan은 arabinoxylan 형태를 가지고 있다. 이러한 side chain의 종류와 branch 정도는 xylan의 solubility, physical conformation, 효소 반응성 등에 영향을 미친다(8, 13). 일반적으로 xylan을 완전 가수분해하기 위해서는 5가지 종류의 효소가 필요하다; Endo- β -1,4-xylanase(EC 3.2.1.8; endoxylanase), β -xylosidase(EC 3.2.1.37), α -arabinofuranosidase(EC 3.2.1.55), α -glucuronidase (EC 3.2.1.-), and acetyl xylan esterase(EC 3.1.1.6). 세포외로 분비되는 endoxylanase는 xylan backbone의 internal glycosidic bond를 절단하여 xylose와 xylo-oligosaccharides를 생성하고 β -xylosidase에 의해서 xylobiose가 최종적으로 xylose로 분해되게 된다. 그러나 xylose backbone에 branch되어 있는 side chain들이 xylanase가 기질에 작용하는데 입체적인 장애로 작용하기 때문에 xylan을 완전히 가수분해시키기 위해서는 xylanase와 debranching enzymes의 synergistic action이 요구된다. 즉, arabinose side chain을 절단하는 arabinofuranosidase, glucuronic acid를 제거하는 α -glucuronidase, acetyl group을 제거하는 acetyl xylan esterase의 활성이 같이 요구되는 것이다(2, 8). 이와 같이 xylan의 구조는 cellulose에 비해 훨씬 복잡하다. 따라서 완전 가수분해에 요구되는 효소들도 더 많이

생물산업

필요하지만 구조자체가 cellulose보다 compact하지 않기 때문에 작용 효소가 쉽게 접근하여 가수분해 작용을 잘 할 수 있게 된다. 그런데 일반적으로 cellulase, xylanase라고 일컫는 경우에는 통상적으로 endoglucanase와 endoxylanase를 의미하는 경우가 대부분이다.

Cellulase를 생산하는 미생물은 대부분 xylanase도 같이 생산한다. 그리고 대부분의 미생물에서는 기질특이성, 반응특성 등이 다른 다수의 cellulase와 xylanase를 생산한다. 이들 효소들은 세포 외부로 분비되어 각기 따로 기질에 결합하여 효소 반응을 하는 것이 일반적이나 일부 미생물에서는 여러 효소들이 aggregation된 multienzyme complex를 형성하여 효과적인 polymer 분해를 수행하기도 한다. 특히 *Clostridium*속 세균에서 발견되는 multienzyme complex를 “cellulosome”이라고 부르는데, 이 cellulosome은 다수의 cellulase와 xylanase 및 scaffolding protein과 같은 noncatalytic polypeptide 등을 포함하여 약 14~26개의 polypeptides로 구성되어 있다(13, 15). Cellulosome은 cell surface에 부착되어 있고 crystalline cellulose를 아주 효율적으로 분해한다. 그리고 최근에는 cellulosome과 유사한 구조를 가진 multienzyme complex (“xylanosome”이라고 부름)가 *Butyrivibrio fibrisolvens*로부터 발견이 되기도 하였다(10).

Cellulase와 xylanase는 single subunit로 구성이 되어 있다. 그리고 fungal enzyme의 경우 대부분 glycosylation되어 있으며 *Clostridium*속 세균을 비롯한 일부 세균 유래의 효소에서 glycosylation이 관찰된다. 이러한 glycosylation은 극한 환경에 대해 안정성을 부여하거나 세포외 환경에 존재하는 protease에 의한 분해를 방지하는 것으로 여겨진다. 실제로 post-modification 기능이 없는 *E. coli*로 외래 유전자를 cloning하였을 때, 모균과는 다르게 *E. coli*에서는 재조합 유전자 산물이 proteolytic cleavage가 일어나는 것을 종종 경험하게 된다. 그리고 alkaliphilic thermophilic *Bacillus* sp.로부터 분리되어 *E. coli*에서 발현된 xylanase가 모균에서 생산된 xylanase에 비해서 열 안정성이 저하되고 xylan 기질에 대해서 낮은 결합 능력을 갖는 것이 관찰되기도 하였다(4). 또한 fungal enzyme은 중온과 산성 pH에서 최대반응 활성을 보이는 것이 대다수인데 반하여 bacterial enzyme의 반응특성은 다양하여 중성이나 알칼리성 또는 내열성 효소들이 많이 발견된다. 그러므로 세균의 효소 생산성이 곰팡이에 비해 낮기는 하지만 상업적 용도에 적합한 성격을 지닌 효소를 개발하기 위해서 세균성 효소를 탐색하는 것이 일반적이다.

Domain organization of cellulases and xylanases

1980년대 초반에 cellulase 유전자가 처음 보고된 이래로 현

까까지 150가지 이상의 cellulase 유전자와 70가지 이상의 xylanase 유전자가 밝혀져 있다(13, 15). 그런데 효소의 기본 구조를 알면 그 효소의 기능을 이해하는데 있어서 매우 유용하겠지만 실제로 효소의 3차원적 구조에 관한 정보는 매우 제한적일 수밖에 없다. 그러므로 이렇게 많은 유전자 산물의 분석을 위해 인위적으로 구조적·기능적 측면에서 이들 유전자 산물을 grouping할 필요가 생겼다. 그래서 이들 유전자 산물의 amino acid sequence homology와 hydrophobic cluster analysis 방법에 의해 지금까지 밝혀져 있는 효소 유전자들을 12개의 군(Family A~L)으로 분류하였다(13, 15). 이와 같은 분류는 각 효소들의 효소적 성질을 이해하는데 뿐만 아니라 효소 유전자 또는 organism의 진화적 관계를 규명하는 데에도 중요한 근거가 되고 있다.

대부분의 cellulase와 xylanase는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 짧은 linker sequence로 연결된 catalytic domain과 cellulose-binding domain(CBD)을 가지고 있으며, CBD 이외의 다른 noncatalytic domain을 지니고 있는 효소가 많다. 하나의 효소는 하나의 catalytic domain이 존재하는 것이 일반적이다. 그러나 예외적으로 *Caldocellum saccharolyticum* cellulase의 경우처럼 하나의 polypeptide 내에 endoglucanase 활성을 보이는 catalytic domain과 exoglucanase 활성을 보이는 catalytic

domain을 가지고 있는 bifunctional enzyme이 발견되기도 한다(12). 일반적으로 catalytic domain은 compact하게 folding이 되어 있어서 protease-resistant하다.

이러한 catalytic domain은 hydroxy amino acids(serine, threonine 등)나 proline 등으로 구성된 짧은 linker sequence에 의해 CBD와 연결되어져 있다. Linker sequence는 flexible한 구조를 가지고 있으며 linker 내에 glycosylation이 되어 있는 경우가 많다. 그러므로 post-modification 기능이 없는 *E. coli*나 *B. subtilis*에서 생성된 재조합 효소는 linker sequence 내에서 proteolytic cleavage가 일어나 catalytic domain과 CBD가 분리되는 경우를 자주 접하게 된다.

한편 CBD는 불용성 기질에 대해서 매우 높은 결합력을 가지고 있는데, 이 CBD로 인하여 plant cell wall 표면에 다수의 가수분해효소가 축적이 되어 synergistic action을 하는 것으로 여겨지고 또한 CBD가 rigid한 구조를 가지고 있는 불용성 기질에 flexibility를 부여하여 가수분해가 쉽게 일어날 수 있도록 도와주는 것이 아닌가 하고 추측하고 있다(11). 실제로 catalytic domain과 CBD를 지니고 있는 intact enzyme과 CBD가 결여된 truncated enzyme을 정제하여 반응특성을 비교해 보았더니 반응온도나 pH, soluble substrate에 대한 kinetics 등에서는 아무런 변화가 없었으나, intact enzyme과는 달리 truncated enzyme은 insoluble substrate에 대한 결합력이 현저하게 떨어지면서 활성을 거의 나타내지 않았다(8, 11). 그런데 cellulose matrix가 가격이 저렴하면서도 안전하다는 점과 CBD가 가지고 있는 cellulose에 대한 강한 결합력 때문에 CBD는 오랫동안 많은 연구진들의 주목을 받아왔고 최근에는 foreign protein을 CBD에 접합시킨 fusion protein을 이용하여 drug delivery, diagnostic kits, affinity purification, immobilization 등의 여러 응용분야에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다.

Thermoanaerobacterium saccharolyticum(9)과 *Clostridium thermocellum*(7)등의 일부 bacterial xylanase에서 catalytic domain에 인접한 thermostabilizing domain이 발견되어지고 있는데, 이들 thermostabilizing domain이 결여된 truncated enzyme은 catalytic activity에는 별 영향이 없으나 intact enzyme에 비하여 반응 최적온도가 5~10°C 정도가 낮아지고 열 안정성도 감소하였다. 이러한 thermostabilizing domain 내에는 cysteine residue가 없고 대신에 상당수의 aliphatic residues가 존재하여 protein folding을 더욱 compact하게 함으로써 열안정성을 부여하는 것으로 추측하고 있다(8, 9). 최근에는 열 안정성이 낮은 단백질에 이 thermostabilizing domain을 fusion시킨 chimeric protein을 제조하여 열 안정성을 증가시키고자 하는 연구도 진행되고 있다.

또한 cellulose-binding domain과 thermostabilizing domain 이외에도 아직 그 기능이 밝혀지지 않은 여러 가지의

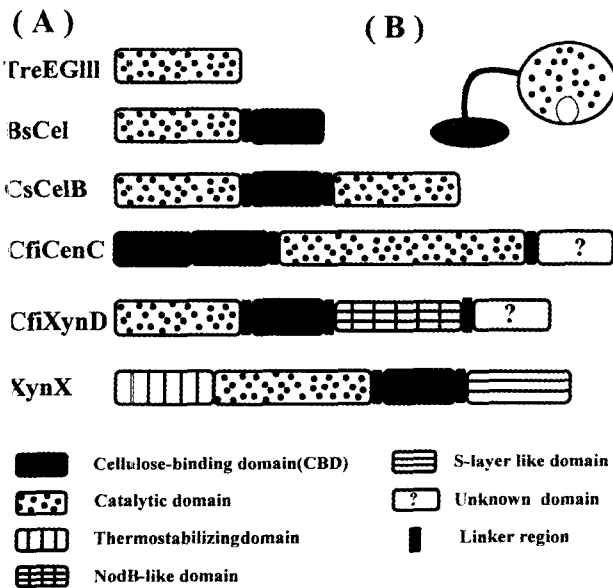


Fig. 1. (A) Schematic representation of single and multi-domain cellulases and xylanases showing the diversity of structural and functional organization. (B) Schematic representation of the domain arrangements found in BsCel. Symbols: TreEGIII, *Trichoderma reesei* endoglucanase III; BsCel, *Bacillus subtilis* BSE616 endoglucanase; CsCelB, *Caldocellum saccharolyticum* bifunctional cellulase(12); CfiCenD, *Cellulomonas fimi* endoglucanase D; CfiXynD, *Cellulomonas fimi* xylanase D; XynX, *Clostridium thermocellum* xylanase X(7).

noncatalytic domain(cell-associated S-layer-like domain, NodB-homologue domain 등)들이 발견되어지고 있는데, 이들 domain들에 대한 기능분석 연구도 활발하게 이루어지고 있다.

Cellulase와 xylanase는 구조나 기능면에서 유사한 점이 매우 많을 뿐만 아니라 효소합성의 경우에도 서로 공조되는 경향이 많다. 또한 xylanase의 catalytic domain이 cellulase의 catalytic domain과 높은 homology를 보여 xylanase 중에서 cellulase 활성을 보이는 경우가 많으며 두 효소간에 catalytic mechanism도 유사한 것으로 알려져 있다. 그러므로 cellulase와 xylanase는 domain shuffling에 의해 다양한 catalytic domain과 substrate-binding domain 등이 생겨나면서 서로 진화되어 온 것으로 여겨지고 있다.

Regulation of cellulase and xylanase synthesis

산업적 응용에 필요한 효소생산 균주를 개발하기 위해서 microbial cellulase와 xylanase의 생합성 조절에 관한 연구가 많이 이루어져 왔으나 분자수준에서는 아직 그 조절 기작이 명확하게 밝혀지지 않는 상태이다. 그러나 일반적으로 이들 효소의 생합성은 cellulose나 xylan보다 쉽게 대사될 수 있는 분자량이 작은 탄소원의 존재에 의해 억제(repression)되거나 효소 반응산물 또는 그 유도체에 의해 유도(induction)되는 2가지 조절기작에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있다(8). Cellulase와 xylanase의 생합성 조절기작은 서로 유사하므로 xylanase의 생합성 조절기작만을 간략히 서술하면 다음과 같다(Fig. 2). Xylan은 아주 큰 분자량을 가진 중합체이므로 세포 내로 유입되지 못한다. 그러므로 세포 외부에 이미 아주 적은 양으로 존재하고 있는 constitutive endoxylanase에 의해서 xylan이 작은 분자량을 가진 xylobiose와 xylo-oligosaccharides로 분해가 되고 이들이 세포 내로 유입되어 xylanase 합성을 induction

하게 된다. 그리고 β -xylosidase는 xylobiose를 xylose로 분해하기도 하지만 transglycosylation 반응에 의해서 유도체를 만들어내는데 이들이 세포 내로 유입되어 부가적인 inducer로서의 역할을 하게 된다. 그 결과 세포 내에서 대량 합성된 xylanase는 세포 외부로 분비가 되어 xylan을 효율적으로 가수분해하게 된다. 그러나 최종 분해산물인 xylose가 많아지면 end-product inhibition을 받아서 xylanase 생합성이 중지된다. 그리고 glucose에 의한 catabolite repression은 xylanase 생합성 경우에서도 적용되는 일반적인 현상이다.

몇몇 미생물의 경우에 cellulase와 xylanase의 생합성이 독립적으로 조절된다는 보고가 있기는 하지만 대부분의 미생물의 경우에는 두 효소의 생합성 과정이 공조되어 있다. 하나의 inducer에 의하여 두 효소 모두가 대량 합성이 되기도 하고, 특정부위의 mutation이 cellulase 유전자와 xylanase 유전자의 발현을 모두 상실시키거나 두 효소 유전자의 발현이 동시에 증가되는 pleiotropy effect를 보이기도 한다. 이는 두 효소의 생합성 과정이 어떤 식으로든 연결되어 있다는 것을 의미한다.

Industrial uses of microbial cellulases

섬유산업(Textile industry)에서의 응용

섬유산업에서 청바지 염색에 사용된 indigo를 탈색시키기 위한 stone washing 공정과 면직물의 고품질화를 실현하기 위한 polishing 공정이 cellulase를 이용한 효소적 공정으로 대체되고 있다. 종래의 경석을 이용한 청바지 탈색작업 공정보다 cellulase를 이용한 Bio-stone washing 공정은 작업효율을 높여줄 뿐만 아니라 indigo의 균일한 탈색을 통해서 자연스러운 색상의 실현이 가능해진다. 또한 직물에 있는 보푸라기를 제거하는 연마 공정도 cellulase를 이용한 Bio-polishing 공정으로 대체함으로써 인체의 명확도, 색상의 선명도, 표면 촉감, 구김 저항도, 유연도 등의 품질 향상을 가져올 수 있다. 특히 최종 면직제품에 cellulase를 처리하여 면직류의 윤택도와 촉감 등을 향상시킬 수가 있다. 이러한 섬유가공용 효소로서의 cellulase는 전체 cellulase 시장의 많은 부분을 차지하고 있으며, 섬유가공용 효소가 세계 전체 산업용 효소시장 중 약 15%를 차지하는 등 섬유가공용 효소는 급격한 시장 증가를 보여왔고 앞으로도 지속적인 성장을 할 것으로 예측되고 있다.

세제산업(Detergent industry)에서의 응용

가정용 세제에 protease와 lipase가 사용이 되어져 왔었는데 최근에 alkaline cellulase가 세제용 효소로 개발이 되어 가정용 세제에 첨가가 되고 있다. Cellulase는 dust를 제거하는 즉, 세정면에서 효과적인 것으로 알려져 있다. 그리고 면직물의 보푸라기를 제거함으로써 표면 촉감을 좋게 하고 색상을 선명하게 해준다. 세제용 cellulase의 개발로 일본에서의 전체 효소시

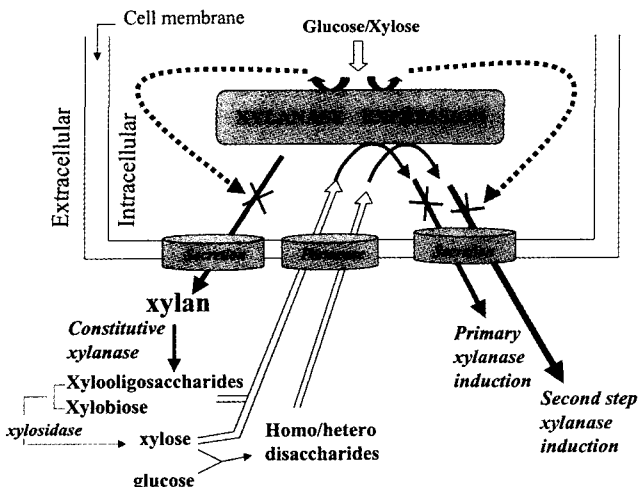


Fig. 2. Hypothetical model for regulation of xylanase biosynthesis(Based on(8)).

강이 급격하게 증가된 바와 같이 세제용 cellulase의 시장은 앞으로 많이 커질 것으로 예상되고 있다. 그런데 cellulase를 면직물에 처리하게 되면 염료의 back-staining과 면직물 강도 저하의 단점이 생길 수 있기 때문에 섬유가공용 cellulase와 마찬가지로 세제용 cellulase도 용도에 적합한 효소 개발 또는 효소 조성과 섬유처리 방법에 관한 연구가 많이 이루어져 특허화되고 있다.

제지산업(Paper-recycling industry)에서의 응용

종이 사용량이 급증함에 따라 배출되는 폐지의 재활용에 있어서 잉크를 비롯한 이물질의 제거를 위한 deinking 과정에 화학적 처리의 대체방법으로 cellulase가 이용되고 있다. 종래의 deinking은 주로 계면활성제와 NaOH를 사용하고 있으며 보조약품으로 발포제, 규산소다, chelating agents, solvents 등이 사용되고 있는데, 알칼리 약품과 무기약품의 사용으로 deinking 과정은 pH 10 이상의 강알칼리 조건에서 처리되므로 폐섬유의 구성성분중 lignin의 황변화를 유도하여 표백약품 사용량을 증가시키는 원인이 된다. 그리고 계면활성제와 같은 유기약품들이 강알칼리 상태에서 pulp를 해리시키고 잉크 입자를 제거하기 때문에 화학적 처리에 의한 deinking은 심각한 수질오염 문제를 일으킨다. 게다가 재생횟수를 증가시키면 종이의 강도가 저하되는 현상이 발생하기도 한다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위해서 cellulase를 이용한 deinking 공정을 개발하여 환경오염을 줄이면서 고품질의 재생지를 생산하고자 하는 시도가 이루어지고 있다.

Cellulose ethanol 생산

Ethanol은 gasoline에 비해 옥탄가가 높아서 연소가 더 잘될 뿐만 아니라 greenhouse-effect에 거의 영향을 주지 않는 등 운송연료로서 많은 장점을 가지고 있다. 이러한 운송연료로서의 ethanol은 가장 풍부한 자원 중의 하나인 cellulose로부터 생산이 가능하다. 그러나, 현재 cellulosic biomass로부터 생산된 ethanol은 gasoline과는 가격경쟁이 되지 않는다. 그래서 cellulose ethanol의 높은 잠재력에도 불구하고 연구의 진전이 많이 이루어지지 않고 있다. Cellulose ethanol의 생산에 있어서 생물공정 단계가 가격 상승의 많은 부분을 차지하고 있는데 cellulase 생산, 섬유소의 가수분해, 가수분해 산물을 이용한 미생물의 성장과 알콜발효라는 3단계 공정이 단 1개의 bioreactor에서 이루어지게 되는 direct microbial conversion (DMC) 방법을 사용하게 되면 cellulose ethanol의 가격을 많이 낮출 수 있을 것으로 기대하고 있다. DMC 방법으로 고농도의 ethanol을 생산하기 위해서는 cellulase 생성능력과 알콜발효 능력 모두가 우수한 미생물의 확보가 필수적인데, 이를 위해서 섬유소 분해 능력이 뛰어난 *Clostridium*속 세균의 ethanol selectivity의 문제점을 해결하는 접근방식과 ethanol 생산 능력이 뛰어난 효모 또는 *Zymomonas*속 세균에 cellulase

유전자를 도입하여 섬유소 당화의 문제점을 해결하는 접근방법이 시도되고 있다(3).

Industrial uses of microbial xylanases

제지산업(Paper and pulp industry)에서의 응용

Xylanase가 상업적으로 이용되고 있는 가장 큰 분야로서 제지원료의 표백공정에 사용되는 유독성 chlorine을 xylanase로 대체하여 환경오염 물질의 발생을 감소시키고 있다. 식물 세포벽에서 xylan은 lignin과 cellulose의 interface에 존재한다. 즉, xylan을 매개로 lignin이 cellulose와 결합되어 있는데, 이 lignin이 노란색을 나타내므로 미색의 종이를 만들어내기 위해서는 lignin을 제거하기 위한 표백공정이 필요하다. 그런데 chlorine을 사용하는 제지원료의 표백공정에서 독성이 높은 chlorinated compounds가 다량 방출되는데 최근들어 이러한 화학물질을 사용하는 표백공정에 xylanase를 사용한 bio-bleaching이 이용되고 있다. Xylanase는 수용성 xylan과 함께 cellulose에 결합된 불용성 xylan도 분해할 수 있으므로 xylanase가 pulp에 잔존하는 xylan과 이와 결합된 lignin을 제거하는데 이용되고 있다. 이러한 용도로 사용되어지는 xylanase는 cellulase 활성이 없는 cellulase-free xylanase가 요구되고 있다. 게다가 제지원료의 표백공정이 고온과 알칼리 조건에서 이루어지고 있기 때문에 bio-bleaching 공정에 cellulase-free xylanase를 적용하기 위해서는 내열성과 내알칼리성이 요구되어지고 있다.

사료산업(Feed industry)에서의 응용

소 같은 반추동물의 경우에는 반추위에 cellulase와 xylanase 등의 효소를 분비하는 미생물이 존재하기 때문에 문제가 되지 않지만 돼지나 닭 같은 단위동물은 이러한 식물 세포벽을 분해할 수 있는 효소를 가지고 있지 않아서 세포벽 내에 들어있는 곡물의 전분이나 단백질 이용 효율이 매우 떨어지게 된다. 특히 밀과 호밀의 세포벽에 다량 함유되어 있는 수용성 xylan은 소화관 내에서 수분을 빨아들여 끈적끈적한 상태가 만들어지면서 소화효소가 영양소로 접근하는 것을 방해하고, 소화관내 소화물의 흐름을 늦게 하여 사료섭취가 줄어들게 되고, 미생물이 소화물에 부착하여 이상발효를 일으키게 된다. 또한 가축이 자주 물을 마시게되어 분변 중 수분함량이 높아져 결국 연변과 하리의 원인이 되기도 한다. 이러한 이유로 사료적 가치가 매우 높음에도 불구하고 다량 사용이 어려웠던 밀 원료에 xylanase를 첨가함으로써 소화관내 점도를 낮추어주고 곡물중의 영양소 이용성을 증진시켜 사료의 효율을 증진시킬 수 있게 된다.

식품산업(Food industry)에서의 응용

장내 유용 미생물인 비피더스균의 선택적 증식에 매우 효과

적인 xylo-oligosaccharides를 기능성 식품으로 개발하려는 연구가 시도되고 있는데, 최근에 일본에서는 xylanase를 이용하여 기존의 올리고당보다 장내균총 개선 효과가 압도적으로 뛰어난 새로운 대체 감미료인 xylo-oligosaccharides의 개발에 성공하여 기능성 식품소재로서 이용을 하고 있다. *Bifidus* stimulator로서의 xylo-oligosaccharides을 개발하기 위해서는 효소 반응생성물로서 xylose(X1)는 거의 만들어내지 않고 xylobiose(X2), xylotriose(X3), xylotetraose(X4) 등의 xylo-oligosaccharides를 목적하는 비율로 특이적으로 생성시킬 수 있는 xylanase의 개발이 필요하다. Xylanase는 이외에도 과일 주스의 청징 등 여러 용도로 식품산업에서 응용이 되고 있다. 한편 xylan의 최종 분해 산물인 xylose를 xylose reductase 효소반응으로 xylitol을 제조하여 대체 감미료, 치석 방지제 등의 분야에 이용하고 있다.

Future prospects

Cellulase와 xylanase의 용도가 다양하게 개발되어 현재 섬유산업과 제지산업을 비롯한 여러 분야에서 상업화되고 있으며 또한 새로운 용도 개발을 위한 연구가 진행 중에 있다. 그러나 현재 경제성이 맞지 않아서 상업화되지 않고 있기는 하지만 장기적인 관점에서는 무한 자원인 plant biomass를 이용하여 인간을 위한 edible sugars를 생산하거나 또는 fermentable sugars의 생산을 통한 liquid fuel로의 변환 등이 시장성 측면 뿐만 아니라 환경문제, 식량문제, 연료문제의 해결 측면에서도 중요한 선결과제라고 생각된다. 이를 위해서는 효소 고생산 균주의 개발, enzyme recovery, downstream processing 등의 연구분야에서 진전이 있어야 될 것으로 여겨지는데, 경제성에 영향을 미치는 효소 생산성과 수율에 관계된 process parameters 결정에 관한 최근 몇 년 사이의 연구 진전의 경우처럼 앞으로 여러 연구결과가 축적이 되면 biomass의 이용도 가능할 것으로 기대해 본다.

그리고 cellulase와 xylanase가 섬유산업, 제지산업, 세제산업, 식품산업, 사료산업 등 여러 분야에서 수요가 계속적으로 증가할 것으로 예측되므로 유용 효소자원을 확보하기 위한 기술개발이 활발히 이루어지고 있고 한편으로는 새로운 기능과 용도를 갖는 효소 또는 domain의 탐색 및 응용기술 분야에도 많은 진전이 있을 것으로 예상된다. 특히, protein engineering이나 PCR technique을 이용한 domain shuffling 등을 통해서 기존 용도에 더욱 적합한 새로운 효소 또는 새로운 개념의 new enzyme 개발이 이어질 것으로 전망된다.

참고문헌

1. Beguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 219-248.
2. Coughlan, M. P. and G. P. Hazlewood. 1993. β -1,4-D-Xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **17**: 259-289.
3. Demain, A. L., T. R. Klapatch, K. H. Jung, and L. R. Lynd. 1996. Recombinant DNA technology in development of an economical conversion of waste to liquid fuel. *Ann. New York Acad. Sci.* **782**: 402-412.
4. Dey, D., J. Hinge, A. Shendye, and M. Rao. 1992. Purification and properties of extracellular endoxylanases from an alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can. J. Microbiol.* **38**: 436-442.
5. Doi, R. H. 1998. Cellulose binding domain proteins. U.S. Patent 5,837,814.
6. Gilbert, H. J., and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 187-194.
7. Kim, H., K. H. Jung, and M. Y. Pack. 2000. Molecular characterization of xynX, a gene encoding a multidomain xylanase with a thermostabilizing domain from *Clostridium thermocellum*. Submitted for publication in *Appl. Microbiol. Biotechnol.*
8. Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 411-456.
9. Lee, Y. E., S. E. Lowe, B. Henrissat, and J. G. Zikus. 1993. Characterization of the active site and thermostability regions of endoxylanases from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* B6A-RI. *J. Bacteriol.* **175**: 5880-5888.
10. Lin, L.-L. and J. A. Thomson. 1991. An analysis of the extracellular xylanases and cellulases of *Butyrivibrio fibrisolvens* H17c. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**: 197-204.
11. Linder, M. and T. T. Teeri. 1997. The roles and function of cellulose-binding domains. *J. Biotechnol.* **57**: 15-28.
12. Saul, D. J., L. C. Williams, R. A. Grayling, L. W. Chamley, D. R. Love, and P. L. Bergquist. 1990. celB, a gene coding for bifunctional cellulase from the extreme thermophile "*Caldocellum saccharolyticum*". *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3117-3124.
13. Sunna, A. and G. Antranikian. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* **17**: 39-67.
14. Thomson, J. 1993. Molecular biology of xylan degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 65-82.
15. Tomme, P., R. A. J. Warren, and N. R. Gilkes. 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Adv. Microb. Physiol.* **37**: 1-81.
16. Torronen, A. and J. Rouvinen. 1997. Structural and functional properties of low molecular weight endo-1,4- β -xylanases. *J. Biotechnol.* **57**: 137-149.
17. Viikari, L., A. Kantelinen, J. Sundquist, and M. Linko. 1994. Xylanases in bleaching: from an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**: 335-350.