

사상균 FM04에 의한 Amylase 생산 및 음식물 쓰레기의 효소학적 가수분해

¹김 경 철 · ¹배 영 수 · ²김 시 옥 · † ¹김 성 준
¹전남대학교 공과대학 환경공학과, ²조선대학교 공과대학 환경공학과
(접수 : 2003. 6. 10. 게재승인 : 2003. 10. 26.)

Production of Amylase by a Filamentous Fungus, Strain FM04, and Enzymatic Hydrolysis of Food Waste

Kyoung-Cheol Kim¹, Young-Soo Bae¹, Si-Wouk Kim², and Seong-Jun Kim^{1†}

¹Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

²Department of Environmental Engineering, Chosun University, Dong-Gu, Gwangju 501-759, Korea

(Received : 2003. 6. 10. Accepted : 2003. 10. 26.)

A filamentous fungus, strain FM04 producing amylase was isolated from rotten yam peels and potatoes. The favorable conditions of cultivation factors such as, temperature, pH, and agitation speed of strain FM04 were 28~30°C, 5.0~6.0, and 100 rpm, respectively. Starch was the best carbon source in the amylase production. Therefore, food wastes containing lots of starch were employed as the carbon source of the cultivation for the economical amylase production. 5.2 U/ml of amylase was obtained in the cultivation using 1% (w/v) of food wastes. The amylase showed the highest activity at enzyme reaction conditions of 60°C and pH 4.5 and showed 90% of residual activity after the reaction at 50°C for 2 days. In the enzymatic hydrolysis reaction using 20% (w/v) of food wastes and 2.5 U/ml of amylase, 72.6 g/l of reducing sugar was obtained at the reaction condition of 50°C, pH 4.5 for 2 days.

Key Words : Fungus, amylase, enzymatic hydrolysis, food wastes

서 론

현재 우리나라에서 발생하는 음식물쓰레기는 매립, 소각 및 재활용을 통하여 처리되어지고 있는데, 이 중 대부분이 재활용되어지지 못하고 매립 또는 소각되어지고 있다. 또한 음식물쓰레기의 재활용을 살펴보면 사료화, 퇴비화 및 메탄화 등으로 이용되어지고 있는데, 처리비용이 많이 들고, 처리방법의 복잡성, 가축사료의 유해성 논란, 악취 및 침출수와 같은 2차 환경오염 발생 등의 많은 문제점을 안고 있다. 음식물쓰레기는 대부분 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 아밀로오스, 펙틴 등의 섬유소물질로 구성되어져 있으며, 이러한 섬유소물질은 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제, 아밀라아제 등의 섬유소분해효소에 의해 단당류 및 이당류로 가수분해되어진다(1). 음식물쓰레기내의 많은 부분을 차지하는 전분의 가수분해는

exo-type과 endo-type의 amylase에 의해 분해된다. Exo-type의 아밀라아제는 전분을 비환원성 말단으로부터 가수분해하여 글루코오스를 생성하는 glucoamylase, 말토오스 단위를 생성하는 β -amylase 등이 있으며, Endo-type의 분해양식을 갖는 것으로는 전분의 α -1,4-glycosidic bond만을 가수분해하는 α -amylase 등이 있다. 이렇게 전환되어진 단당류 및 이당류는 대부분의 미생물이 가장 이용하기 좋은 탄소원 및 에너지원으로 이용되어질 수 있으며, 발효 및 생물산업을 통해 박테리얼 셀룰로오스, 젯산, 에탄올 등으로 전환되어질 수 있을 것이다. 이제는 새로운 개념의 음식물쓰레기 처리 및 고부가 자원회수를 위하여 생물전환기술을 적극적으로 도입하여, 음식물쓰레기 처리의 관점에서는 zero-emission을 달성하고 동시에 유용한 물질들을 회수하는 고부가 자원화 기술이 필요하다.

본 연구실에서는 음식물쓰레기의 처리와 동시에 유용한 물질을 회수하기 위하여, Kim 등(2)의 섬유소분해효소 생산균 주 분리에 관한 연구, Yoo 등(3)의 섬유소폐기물을 이용한 경제적인 섬유소분해효소 생산에 관한 연구를 수행하였다. 또한 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해를 통해 박테리얼 셀룰로오스 (Bacterial cellulose) 생산 배양의 탄소원 및 에너지

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864

E-mail : seongjun@jnu.ac.kr

원으로 이용을 위한 연구를 수행하였다(4). 이러한 일련의 음식물쓰레기의 고부가 자원화 시스템은 당화수율을 높이는 단계가 가장 중요하다. 당화수율을 높이기 위해서는 음식물쓰레기중의 다량으로 함유된 전분을 효율적으로 가수분해해야 된다. 그래서 전분 가수분해 효소인 아밀라아제를 경제적으로 생산하고 가수분해 효율을 높일 필요가 있다. 본 연구에서는 아밀라아제의 생산에 초점을 맞추어 균주를 분리하여 그 특성을 명확히 하고, 저 비용으로 생산된 효소를 이용하여 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해를 수행하여, 음식물쓰레기의 고부가 자원화의 상용화 가능성을 살펴보았다.

재료 및 방법

균주 분리 및 배양

Amylase 생산균주를 분리하기 위하여 광주소재 각화동 농수산물 도매센터에서 썩은 고구마 및 감자를 수집하여 균주 분리원으로 사용하였다. 균주 분리 및 선별을 위한 MSS 배지의 조성은 soluble starch 20 g, peptone 1 g, urea 0.3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2.0 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.0 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4 mg, CoCl_2 2.0 mg, distilled water 1 L, pH 5.2 이다. 수집되어진 시료 50 g에 200 ml의 멸균수를 넣어 현탁시키고, 20~30분간 정치시킨 현탁액을 단계별로 희석하고 적당량을 분리배지에 도달한다. 위의 배지를 30°C에 배양시키고, 시간 경과에 따른 균주 성장 및 형태를 관찰하면서, 성장이 빠른 균주를 선택하여 2차, 3차 계대배양을 통해 균주 활성 유지 및 순수분리를 수행한다. 분리균주들은 PDA (potato dextrose agar; dried potatoes 300.0 g, glucose 20.0 g, agar 15.0 g, distilled water 1 L) 배지에 30°C, 3일간 성장시킨 후 4°C에서 보관한다. Amylase 생산균주를 선별하기 위해 PDA 배지에 균주를 도말하여 3일 후의 균체 크기를 측정하여 균체 성장속도를 살펴보고, MSS 배지에 접종하여 30°C, 100 rpm, 5일간 배양 후 효소활성도를 분석하였다.

사상균 FM04의 포자현탁액은 PDA 배지에 3일 성장시킨 균주에 멸균수 10 ml을 넣고 백급이를 이용하여 잘 긁은 후, 4번 짚은 거즈에 통과시켜 여과를 통해 균사체를 제거하고 포자현탁액을 조제하였다. 효소생산에 관한 실험은 MSS 배지를 기본배지로 사용하였고, 500 ml baffled flask에 100 ml의 배지를 넣고, 121°C, 15분간 멸균한 후, 포자현탁액 2%(v/v)를 접종하여 30°C, 100 rpm에서 5일간 배양하였다. 배양시간에 따라 배양액 일정량을 분취하여 효소활성도, 균체량 및 pH 변화를 측정하였다. 효소활성 분석을 위한 효소액은 위의 배양액을 10,000 rpm, 10분간 원심분리 하여 상등액을 이용하였다.

효소활성도, 균체량 및 전분량 측정

Amylase 효소 활성을 측정하기 위해, 시험관에 buffer (50 mM citric acid, pH 5.0)로 적당히 희석되어진 시료(효소) 0.2 ml에 2% 전분용액을 0.8 ml 가하여 50°C, 30분간 반응시킨 다음, DNS 시약 3 ml을 넣어 반응을 종결시켰다. 반응물은 끓는 물에서 5분간 가열하여 증류수를 20 ml를 첨가한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. FPase 활성은 적당히 희

석되어진 시료(효소) 1.0 ml에 Whatman No. 1 filter paper의 50 mg (1×6 cm)을 넣고 50°C에서 1시간 반응시킨다. 생성된 환원당의 농도를 DNS법으로 정량 하였다. Xylanase 효소활성도 측정은 2% (w/v)의 xylan용액 0.5 ml에 buffer로 적당히 희석한 시료(효소) 0.5 ml을 혼합하여 반응물을 50°C, 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS방법으로 측정하였다. Amylase와 FPase의 표준물질은 glucose을 이용하였고, xylanase의 표준물질은 xylose을 이용하였다. 위에서 살펴본 효소활성도는 표준반응조건에서 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ 의 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

배양액 내의 전분을 정량하기 위해 iodine 시약 10 ml에 배양상등액 0.2 ml을 넣는다. 반응물의 청색의 흡광도를 680 nm에서 측정하여 미리 작성되어진 검량선 [$\text{Starch (g/L)} = 13.72 \times \text{ABS} - 0.7162$; R^2 0.9923]을 통하여 배지내의 전분량을 정량한다. Iodine 시약은 I (1.2 g)과 KI (5.0 g)을 증류수 100 ml에 녹이고 이 용액 1 ml, 1 N HCl 10 ml 및 증류수 300 ml을 넣어 조제한다.

균체량 정량은 배양액을 여과지에 흡인여과 및 수세하여 80°C에서 10시간 건조 시킨 후 실리카겔 데시케이터에서 2시간 방냉 후 균체량을 정량하였다.

효소생산에 관한 배양 조건의 검토

Amylase 생산의 배양조건으로 온도, 교반속도 및 초기 pH 영향 등을 살펴보기 위하여, MSS 배지 100 ml를 500 ml baffled flask에 분주하고, 온도의 변화를 25~35°C, 교반속도 0~150rpm, 초기 pH 3~7로 변화시켜 30°C, 100 rpm, 5일 동안 교반배양 하였다. 배양후의 활성도를 분석하여 amylase 생산의 최적 온도, 교반속도 및 최적 pH를 결정하였다. 또한 일정시간 간격에 따라 효소활성도, pH, 균체량 및 전분량을 분석하여 배양시간에 따른 효소생산성을 살펴보았다.

효소생산에 관한 탄소원 및 질소원 검토

Amylase 생산균주 FM04의 상업용 당 및 섬유소물질을 이용한 효소의 생산 특성을 살펴보기 위하여 사용되어진 상업용 당 기질은 glucose, maltose, cellobiose, fructose, sucrose이고, 섬유소물질로는 Avicel, CMC, α -cellulase, xylan, pectin, starch을 이용하였다. 효소생산조건은 MSS 배지에 각각의 기질을 1% (w/v) 농도로 첨가하여 교반배양 하였고, 배양후의 효소활성도, pH 및 균체량을 정량하였다. 또한 cellulase 및 amylase를 동시에 생산할 수 있는 최적의 기질 조건을 찾고자, α -cellulose와 starch 비율에 따른 효소생산성을 검토하였다.

효소생산의 최적 유기질소원을 살펴보기 위하여, peptone, malt extract, meat extract, yeast extract를 이용하였다. 효소생산조건은 MSS 배지에 각각의 유기질소원을 0.1% (w/v) 농도로 첨가하여 교반배양 하였고, 배양후의 효소활성도를 정량하여 유기질소원에 따른 효소생산성을 비교하였다.

섬유소폐기물을 이용한 효소 생산성

섬유소폐기물을 이용하여 효소생산을 하기 위해, 음식물쓰레기(전남대학교 구내식당, 주정박(보해공장, 전남순천), 콩비지(자연과 사람들, 전남 담양) 및 쌀겨(도정공장, 광주)를 이

용하였다. 섬유소폐기물은 분쇄기로 분쇄한 후, 건조기에서 80℃, 2일 동안 건조하였다. 건조된 섬유소폐기물은 재차 분쇄하여 30 mesh 체에 통과시켜 실험에 사용하였다.

효소생산은 MSS 배지에 soluble starch 대신에 위의 기질들을 1% (w/v) 첨가하여 배양하였고, 배양후의 효소활성도를 정량하여 섬유소폐기물에 따른 효소생산성을 검토하였다. 또한 경제적인 효소 생산을 위해 섬유소폐기물만을 단독 및 조합 사용을 통해 효소생산성을 살펴보았다. 음식물쓰레기와 쌀겨를 MSS 배지 첨가 없이 1, 2, 3% (w/v) 농도로 첨가하였고, 섬유소폐기물의 조합에 따른 생산성을 비교하기 위해 음식물쓰레기, 쌀겨 및 콩비지를 각각 2, 3% (w/v)의 기질농도로 조합하여 사용하였다.

Amylase의 효소학적 특성

Amylase의 최적 pH는 pH 4.0~6.0까지 각각 조제된 완충용액에 적당히 희석되어진 시료(효소) 0.2 ml와 전분용액(각각 pH 완충용액으로 2% 농도로 조제) 0.8 ml를 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시켜, 생성되는 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 pH에 변화에 따른 효소활성도를 비교하였다. pH 4.0~6.0의 완충용액은 50mM citrate acid-NaOH를 사용하였다.

효소활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해 50 mM citric acid(pH 4.5)완충용액에 적당히 희석되어진 시료(효소) 0.2 ml와 2% 전분용액 (50 mM citric acid, pH 4.5) 0.8 ml를 첨가한 반응물을 30~70℃의 각 온도에서 30분간 반응시킨 후, 생성되는 환원당을 DNS 방법으로 정량하여 온도에 따른 효소활성도를 비교하였다.

각 pH에서 효소의 안정성을 조사하기 위해 각각의 완충용액에 적당히 희석되어진 시료(효소) 1 ml를 4℃에서 24시간 정치한 후, amylase 활성도 분석 방법에 따라 잔존 효소활성을 측정하였다.

효소의 열안정성을 조사하기 위해 50 mM citric acid 완충용액 (pH 4.5)에 적당히 희석시킨 시료(효소) 1 ml를 30~70℃ 온도 범위에서 2일간 정치시키면서 일정 시간간격으로, amylase 활성도 분석 방법에 따라 효소용액의 잔존 효소활성을 측정하였다.

음식물쓰레기의 효소학적 가수분해

분리균주 FM04가 생산한 섬유소가수분해 효소에 의한 효소학적 가수분해를 수행하기 위해서, 효소액은 최적배지 조건 (MSS 배지 및 음식물쓰레기를 이용한 수정된 MSS 배지)에서 생산되어진 배양상등액을 이용하였다. 효소학적 가수분해에 이용되어진 기질은 Avicel, pectin, CMC, xylan, starch 및 음식물쓰레기 (건조상태)를 대상으로 하였으며, 반응조건은 효소액 (amylase; 5.0 U/ml) 50 ml에 50 mM citric acid 완충용액 (pH 4.5) 50 ml를 더하고, 각각의 기질을 10% (w/v) 농도로 첨가하여 50℃, 100 rpm으로 48시간 반응시켰다. 생성된 환원당은 DNS 방법으로 정량하였다.

음식물쓰레기 농도 및 효소농도에 따른 음식물쓰레기의 가수분해율을 살펴보기 위하여 음식물쓰레기 농도 5~20% 및 amylase 농도 1.0~5.0 U/ml로 각각 변화시켜 실험을 수행하였다.

결과 및 고찰

사상균 FM04의 분리 및 배양 특성

Amylase 생산균주를 분리하기 위하여 썩은 고구마 및 감자를 이용하여 총 5종의 곰팡이를 분리하였다. 최적의 amylase 생산균주를 선별하기 위해 성장형태, 유기산 생성 유무, 성장속도 및 MSS 배지에서 성장시켜 효소활성도를 분석하였다. FM04의 균주는 PDA 배지 상에서 녹색과 흰색을 띄며 성장하였으며 집락의 배면의 색깔은 녹색을 나타내었고, 균체의 성장속도는 30℃, 3일 동안에 9 cm의 배양접시를 다 덮을 만큼 신속히 성장하였다. 균체의 SEM을 통한 형태학적 관찰을 살펴보았는데(Fig. 1), 격벽이 존재하며, 균사체의 직경은 3~5 μm 이었다. FM04의 amylase 활성도는 MSS 배지에서 30℃, 5일 배양 후에 3.02 U/ml이었으며, 배양후의 pH는 3.2이었다. 성장속도가 타 분리균주에 비해 빠르고, 효소활성이 가장 높은 FM04의 균주를 최종적으로 선별하였다. 유기산 생성 유무 관찰을 위해 PDA + bromocresol purple (50 mg/L) 고체 배지에 도말하여 30℃에서 배양하였다. 시간 경과에 따라 균체 성장과 더불어 균주의 콜로니 주위가 노란색으로 바뀜을 확인하였고, 이 결과로 FM04는 유기산을 생성하는 균주로 판단할 수 있었다. 박 등(5)의 연구에서도 bromocresol purple이 함유된 PDA배지에서 색 변화를 관찰한 결과, amylase의 활성이 우수한 *Aspergillus niger*에서 산생성 능력이 있음을 보고하였다.

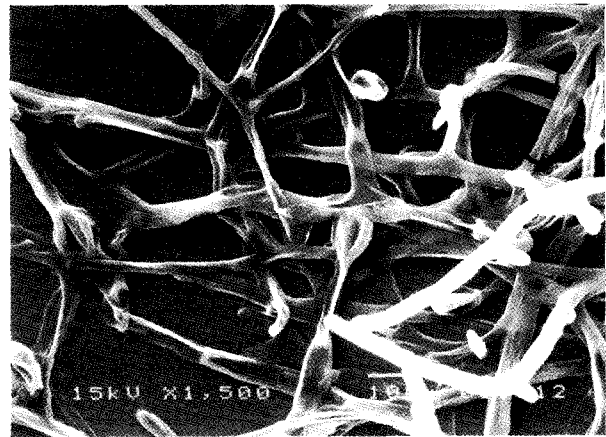


Figure 1. Morphology of a filamentous fungus, FM04 observed by SEM.

FM04의 amylase 생산의 최적온도를 살펴보기 위해 25~35℃에서의 5일간 배양한 결과 Table 1에서 보여주는 바와 같이 28℃임을 알 수 있었고, 35℃에서는 균주의 성장은 있지만 효소생산에는 불리한 영향을 보였다. FM04의 효소생산의 최적의 교반조건은 100 rpm이었고, 정치배양 (0 rpm) 및 50 rpm에서는 낮은 전단력으로 막을 형성하면서 성장하였으나 효소활성은 미미하였다. 150 rpm에서는 균주의 성장은 타 교반속도 보다 빠르지만, 전단력에 의해 효소 생산이 저해됨을 살펴볼 수 있었다. 효소생산에 관한 최적 pH를 살펴보기 위해 MSS 배지에 2 N NaOH/HCl을 이용하여 pH를 3~7까지 변화시켰다. 배양 5일 이후의 효소활성도 및 pH를 측정된 결과, 효소생산의 최적 pH는 6.0임을 알 수 있었다. 또한 배양

후의 pH의 감소는 유기산 생성에 의존함을 추론할 수 있었다. 배양온도, 교반조건 및 pH에 관한 FM04의 특성은 증온성 사상균의 *Aspergillus sp.*와 비슷한 특징을 보여주었다(6-7).

Table 1. Effects of temperature, agitation speed, and pH on the production of amylase in strain FM04

	Conditions	Amylase activity (U/ml)
Temperature (°C)	25	1.50
	28	2.18
	30	1.16
	35	0.93
Agitation speed (RPM)	0	0.49
	50	0.81
	100	2.02
	150	0.87
Initial pH	3	0.26
	4	0.79
	5	1.04
	6	1.90
	7	0.36

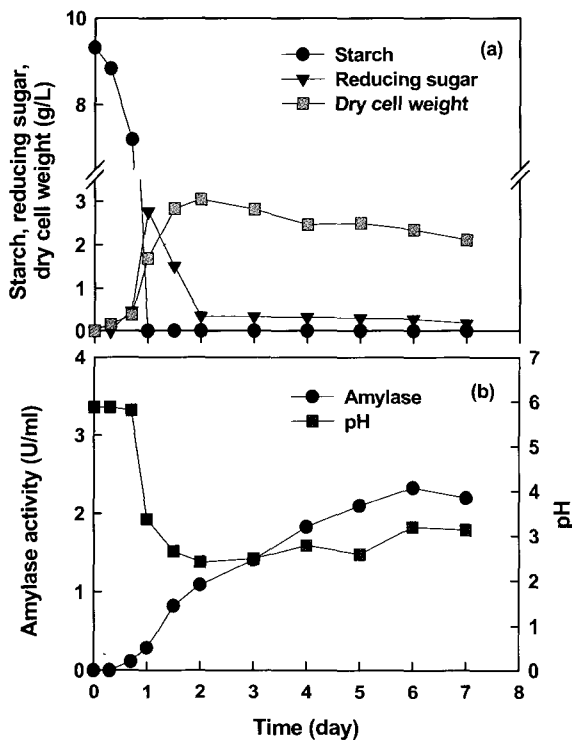


Figure 2. Time courses of amylase activity (b), residual starch concentration, dry cell weight, and pH (a) in the liquid culture of strain FM04.

FM04을 이용하여 시간에 대한 효소생산성을 살펴보면, 배양이 진행됨에 따라 효소활성은 서서히 증가하여 배양 6일째 2.33 U/ml로서 최대 효소 활성을 나타내었다(Fig. 2). 탄소원으로 이용되어지는 전분의 양은 초기 8시간까지 그대로 유지되어지나, 16시간째 급격히 감소하여 배양 1일만에 모든 전

분이 소비되었다. 소비되어진 전분은 배양액 내의 환원당, 균체농도 및 산생성 물질 (pH 감소) 등으로 전환되어짐을 알 수 있었다. 환원당의 농도는 2.8 g/L로서 1일째 최대가 되었으며, 배양 2일째에는 생성된 환원당은 거의 모두 소모되었다. 균체의 성장은 배양 16시간까지는 커다란 변화를 보이지 않았지만, 그 이후부터 배양 36시간까지 최대 성장을 보였으며, 최대 균체 농도는 배양 2일째 3.1 g/L이었다. pH의 변화는 균체 성장과 더불어 급격히 감소되어져 배양 2일째 pH 3.0 이었다. FM04의 균체의 증식, 기질 소비 및 효소 생산성을 종합적으로 살펴보면, 균체의 성장에 따라 배양액내의 전분은 환원당으로 전환되어지고, 생성되어진 환원당을 이용하여 급격한 균체 성장 및 pH 감소가 이루어진다. 효소활성은 전분이 전부 소비되어지는 배양 1일째부터 서서히 증가하였다. *Bacillus* 등의 세균에서는 효소생산이 균의 성장속도와 일치하는 증식연관형의 산물로 얻어지고(8-9), *Aspergillus sp.* 및 *Rhizopus sp.*와 같은 균류에서는 최대의 균체성장 이후에 2차 대사산물로서 효소가 생산된다(7,10). 사상균FM04의 amylase 생산특성도 타 균류와 유사함을 보여주었다.

효소생산에 있어서의 탄소원 및 질소원의 영향

Amylase 생산균주 FM04의 상업용 당 및 섬유소 물질을 이용한 섬유소분해효소의 생산 특성을 살펴보았다. 가장 좋은 효소생산성을 보이는 당기질은 Fig. 3에서 cellobiose 또는 maltose와 같은 이당류에서 얻어졌다. 균체의 성장은 fructose에서 가장 높았으며, sucrose는 균체의 성장 및 효소생산에 불리하였다. *A. niger*의 경우 같은 균주는 glucose을 이용한 배양에서 amylase 효소생산성이 높게 얻어진다고 보고되어졌으나(11), FM04는 전분이 함유된 배지에서 높게 나타났다. 그 이유는 FM04의 amylase의 유도특성이 성장관련 산물이 아닌 2차 대사산물로써, 전분의 경우 균체의 성장과 유지대사가 적절하게 균형을 이룬 것으로 판단된다.

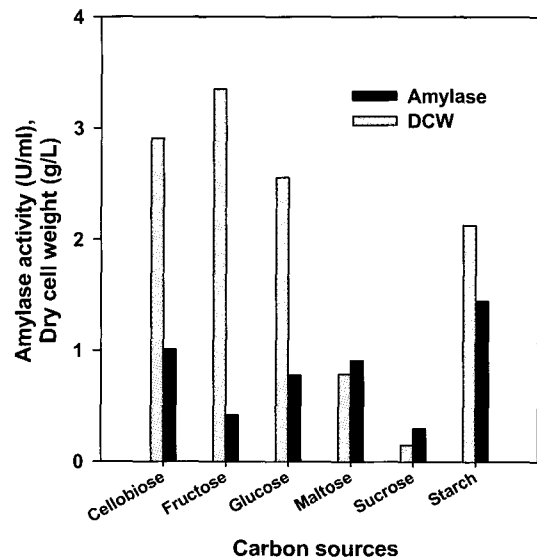


Figure 3. Effect of commercial sugars on the amylase production.

FM04는 효소생산에 이용되는 기질에 따라 다양한 효소를 유도하는 것으로 예상되어, 다양한 섬유소 물질을 이용한 cellulase, amylase, xylanase 등의 효소생산성을 살펴보았다. 사용된 기질은 Avicel, CMC, α -Cellulase, xylan, pectin을 이용하였다. Fig. 4와 같이 결정성 셀룰로오스 물질인 α -cellulose에서는 cellulase의 활성 (FPase; 0.15 U/ml)이 높았으며, starch에서는 amylase가 3.1 U/ml로서 높게 생산됨을 확인할 수 있었다. 또한 xylan에서는 5.9 U/ml의 xylanase 효소활성을 보여주었다. 위의 물질 중에서 가장 효소 생산성이 높은 전분을 중심으로 농도 변화에 따른 효소생산성을 살펴보기 위해 0.5~2.0% (w/v)을 MSS 배지에 첨가하여 30°C, 100rpm으로 배양하였다. 배양후의 효소 활성을 조사한 결과 1%의 전분기질농도에서 가장 높은 활성을 보여주고 있다. 기질농도가 증가함에 따라 환원당 농도가 높아지고 있으나(Fig. 5), Agger 등(12)의 연구 결과와 같이 높은 환원당의 영향으로 효소유도의 탄소억제로 작용됨을 알 수 있었다.

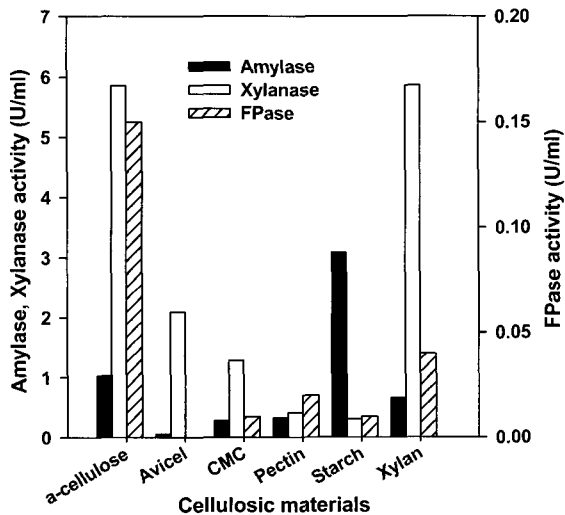


Figure 4. Effect of cellulosic materials on the amylase production.

위의 실험결과에서 FM04는 α -cellulose을 이용한 효소생산에서는 FPase의 생산성이 우수하였고, starch 이용에서는 amylase 생산성이 높았다. 이 두 기질을 이용하여 cellulase 및 amylase의 효소를 동시에 생산할 수 있는 기질 조건을 찾고자, α -cellulose와 starch 기질 비율을 각각 달리하여 30°C, 100rpm으로 배양하였고, 결과를 Fig. 6에 보여주고 있다. 각각의 기질 0.5%에서 가장 좋은 FPase의 효소생산을 나타내었으나, amylase 생산에서는 전분을 단독 기질로 이용함이 더 유리함을 알 수 있었다. 전분의 기질농도가 증가함에 따라 배양액내의 환원당 농도는 증가하였고(data not shown), 이는 FPase 및 amylase 생산에 불리한 영향을 주는 것으로 나타났다.

FM04의 효소생산에서 유기질소원의 영향을 살펴보기 위하여 peptone, malt extract, meat extract, yeast extract을 MSS 배지에 0.1% 첨가하였다. 모든 유기질소원에서 좋은 균체 성장 및 효소활성을 나타내었다. 유기질소원인 peptone의 농도

를 0.0~0.5% (w/v)까지 달리하여, peptone의 농도 변화가 효소생산에 미치는 영향을 살펴본 결과, 0.1%에서 효소생산성이 높았다(data not shown).

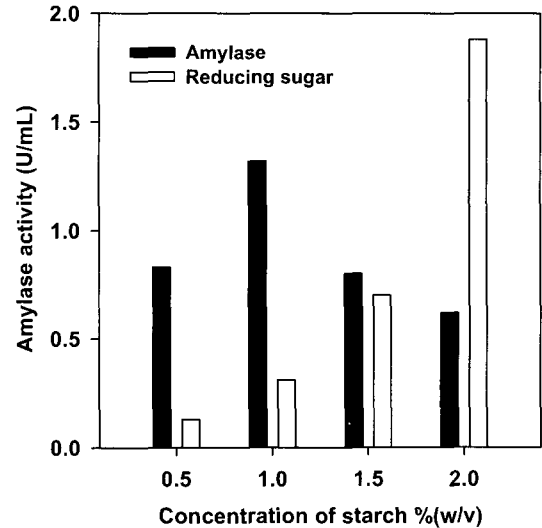


Figure 5. Effect of starch concentrations on the amylase production.

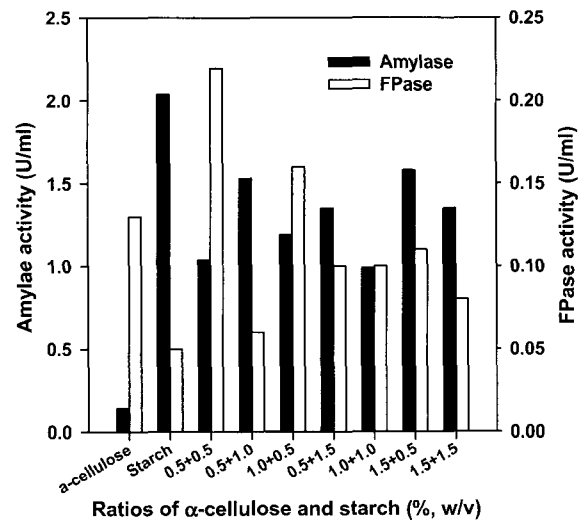


Figure 6. Effect of mixed ratio of two different substrates on the amylase production.

섬유소폐기물을 이용한 효소생산성 검토

산업용 기질을 이용한 효소생산은 경제적으로 불리하기 때문에, 섬유소폐기물을 탄소원으로 이용한 효소 생산성을 검토하였다. 효소생산성을 살펴본 결과 음식물쓰레기에서 4.7 U/ml로서 가장 높은 효소 활성을 보여주고 있는데(Fig. 7), 이는 음식물쓰레기에는 다양한 영양소들이 적절하게 존재하고 있으며, 또한 타 섬유소폐기물보다 전분함유량이 높기 때문인 것으로 추측할 수 있었다. 섬유소폐기물을 이용한 효소생산성 실험에서 음식물쓰레기가 효소생산에 적합한 물질로

선택되었고, 음식물쓰레기 농도에 따른 효소생산성을 살펴본 결과 음식물쓰레기 1%의 농도에서 5.2 U/ml로서 높은 효소활성을 보여주고 있다(Fig. 7). 높은 기질 농도에서는 음식물쓰레기에 함유된 각종 염류 등이 효소 유도작용을 저해하였다고 생각할 수 있다.

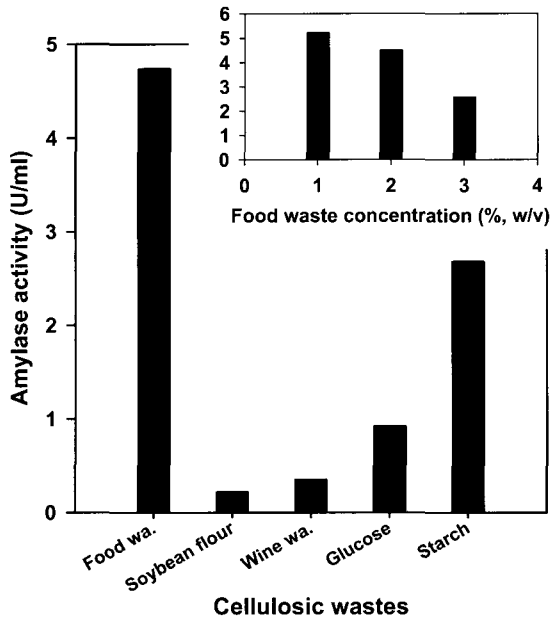


Figure 7. Effect of cellulosic wastes and food waste concentration on the amylase production.

Table 2. Effect of mixed substrates using food waste, rice bran, and soybean flour on amylase production

Exp. No.	Cellulosic wastes (% w/v)			Total substrate conc. (% w/v)	Amylase activity (U/ml)
	Food waste	Rice bran	Soybean flour		
1	1			1	0.9
2	2			2	0.9
3	3			3	1.6
4		1		1	0.9
5		2		2	2.2
6		3		3	3.2
7	0.67	0.67	0.67	2	1.6
8	1	1		2	2.2
9	1		1	2	1.3
10		1	1	2	0.7
11	1	1	1	3	2.9
12	1.5	1.5		3	2.4
13	1.5		1.5	3	4.6
14		1.5	1.5	3	0.5

효소생산성 향상 및 경제적인 효소 생산을 위해 섬유소폐기물의 단독 및 조합 사용을 통해 효소생산성을 살펴보았다. 본 실험에서는 MSS 배지 첨가 없이 섬유소폐기물만을 이용하였다. 음식물쓰레기를 단독으로 이용한 실험에서는 낮은 효소활성을 보여주었지만, 쌀겨만을 3% (w/v)을 이용한 실험에서는 3.2 U/ml로서 상대적으로 높은 활성을 보여주었다

(Table 2). 또한 음식물쓰레기와 콩비지를 각각 1.5% (w/v)로 조합한 실험에서 4.6 U/ml의 amylase 효소활성을 보여주었다.

종합적으로 살펴보면, FM04는 다양한 섬유소폐기물을 이용하여 amylase를 비롯한 cellulase 및 hemicellulase 등을 생산할 수 있었으며, 이는 음식물쓰레기 내의 섬유소 성분 (amylose, cellulose, hemicellulose 등)들을 효율적으로 가수분해 할 것으로 사료된다.

Amylase의 효소학적 특성

효소학적 가수분해에서 중요한 변수인 온도 및 pH의 영향에 대해 살펴보았다. 이들은 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해에 중요 운전 인자로서 이용되어질 수 있을 것이다 (13,14).

효소활성에 대한 최적 pH를 조사한 결과 최적 pH는 4.5이었으며, 효소활성에 대한 최적 온도는 60°C에서 얻어졌다 (data not shown). 각 pH에서 24시간 정치 후의 효소 안정성을 살펴본 결과, pH 3.0-6.0 범위 내에서 80%이상의 효소안정성을 나타내었다(data not shown). Amylase의 열 안정성은 50°C에서 2일 동안 90%의 활성을 유지하였고, 60°C에서는 4시간후의 효소 활성은 58%로 감소하였고, 70°C에서는 4시간 만에 모든 활성을 완전히 상실하였다(Fig. 8). Nielsen 등(15)의 보고에 의하면 여러 효소군이 동시에 존재시 열에 대한 효소구조의 변성이 적거나, 저항성이 높아졌다고 추론하였다.

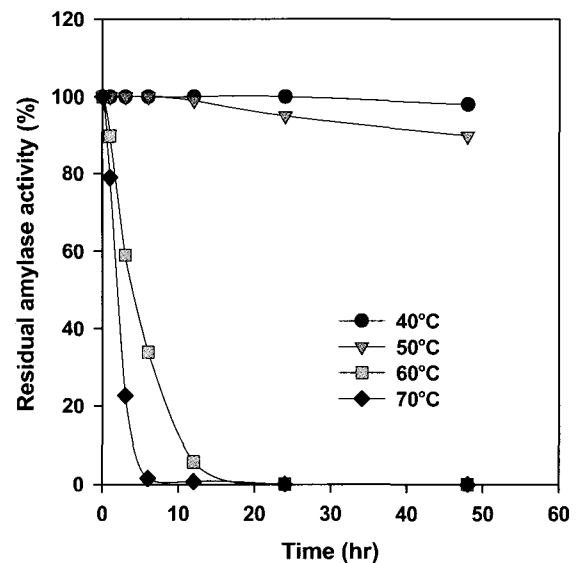


Figure 8. Thermal stability of amylase from strain FM04.

섬유소분해효소를 이용한 효소학적 가수분해

효소학적 가수분해에서 가장 중요한 변수들은 앞에서 살펴본 온도 및 pH 이외에도, 반응시간, 효소농도, 기질농도, 다양한 효소군에 의한 상승작용, 기질 및 효소간의 흡착, 생성물에 의한 효소활성 억제 등이 있다(16). 본 실험에서는 음식물쓰레기의 효율적인 가수분해 반응조건을 찾고자 반응시간에 따른 효소 및 기질농도를 검토하였고, 당화율의 결정은

아래의 식을 이용하였다(17).

$$\text{Saccharification}(\%) = \frac{\text{reducing sugars formed}(\text{g}) \times 0.89}{\text{carbohydrates}(\text{g})} \times 100$$

가수분해 기질로서 Avicel, pectin, CMC, xylan, starch 및 음식물쓰레기 (건조상태)를 이용하였다. 각각의 기질 10% (w/v)농도에서 48시간 가수분해 결과를 Fig. 9에 보여주고 있으며, FM04가 생산하는 cellulase, xylanase, amylase 등의 효소작용에 의해 CMC, xylan, starch등을 가수분해하여 환원당을 생성할 수 있었으나 비용해성/결정성 cellulose인 Avicel 및 pectin은 거의 가수분해하지 못했다. 음식물쓰레기에서 전분보다 더 높은 42.2 g/l의 환원당이 얻어졌는데, 이는 음식물쓰레기내에 cellulose, hemicellulose 및 amylose 등이 다량 함유하고 있기 때문이라고 생각할 수 있을 것이다. 즉 전분의 가수분해에서는 amylase의 작용에 의해서만 환원당으로 전환되어지는데 반해 음식물쓰레기는 cellulose, hemicellulose 및 amylose에 FM04가 생산하는 다양한 섬유소분해효소가 상승적으로 작용하여 환원당으로 전환되기 때문일 것이다.

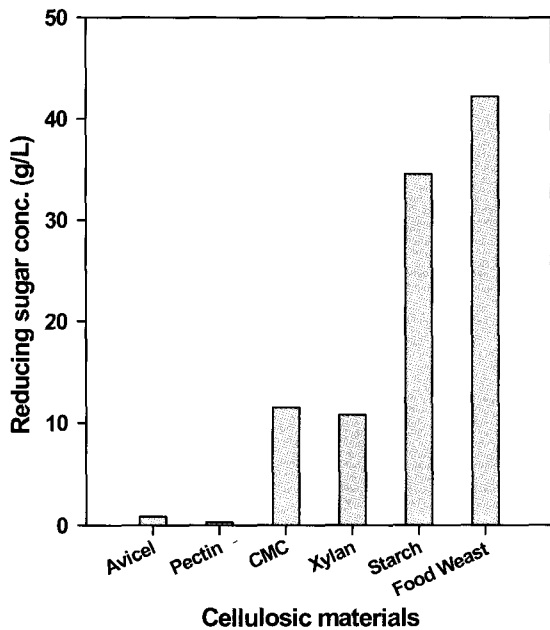


Figure 9. Enzymatic hydrolysis of cellulosic materials (10%,w/v) by amylase from strain FM04.

위의 실험에서 가장 좋은 가수분해율을 보인 음식물쓰레기의 농도에 따른 가수분해 결과를 Fig. 10에 나타내었다. Amylase 2.5 U/ml을 이용하여 음식물쓰레기 농도를 5~20% 까지 달리하여 가수분해를 수행한 결과 21.8~72.6 g/L의 환원당을 얻을 수 있었고, 이때의 당화율은 39~32%이었다. 음식물쓰레기 농도 20%에서 가장 높은 72.6 g/L의 환원당을 생성하였지만, 당화율은 5% 농도에서 가장 좋은 38%의 높은 당화율을 보였다. 효소농도가 증가할수록 당화율은 향상되지만(data not shown), 경제적인 효소학적 가수분해를 수행하기

위해서는 효소농도 및 기질농도에 관하여 최적화되어야 할 것이다.

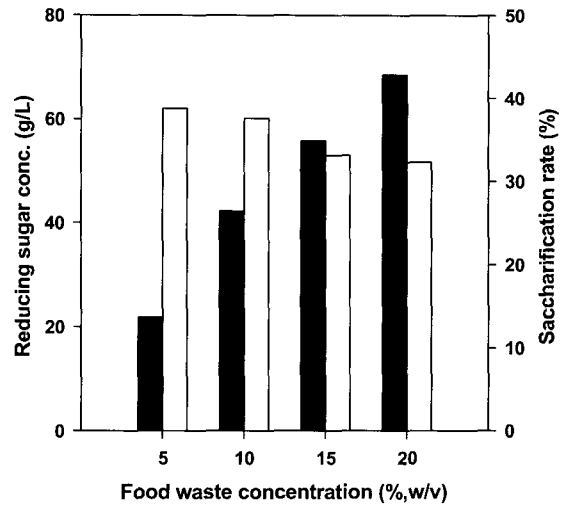


Figure 10. Enzymatic hydrolysis at various concentrations of food waste by amylase from strain FM04.

지금까지 분리균주 FM04을 이용한 경제적인 섬유소분해효소 생산 및 음식물쓰레기의 자원화를 위한 효소학적 가수분해를 살펴보았다. 섬유소폐기물만을 이용한 배양에서도 음식물쓰레기 당화에 필요한 다양한 섬유소분해효소를 생산할 수 있었으며, 특히 amylase의 생산성이 높음을 알 수 있었다. 배양 효소액을 이용한 음식물쓰레기를 효소학적 가수분해한 결과, 음식물쓰레기 20% (w/v)를 50℃, 48시간 반응하여 72.6 g/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 건조시킨 음식물쓰레기를 대상으로 가수분해 특성을 살펴보았지만, 습윤상태 음식물쓰레기를 이용시에 높은 환원당 및 당화율이 얻어짐을 확인할 수 있었다. 또한 배양상등액 대신 배양액 자체를 이용하여도 당화에 큰 영향을 미치지 않았으며, 이러한 결과들은 실용화 공정의 단순화시킬 수 있을 것이다. 이러한 당화 공정은 발효산업에 유용하게 사용될 수 있는 환원당을 얻을 수 있었으며, 음식물쓰레기의 자원회수 및 처리를 위한 차세대 환경 기술로 적용가치가 높을 것이다.

요 약

본 연구에서는 썩은 고구마 및 감자로부터 amylase 생산균주인 사상균 FM04를 분리하였으며, 분리균주의 섬유소분해효소 생산에 관한 배양의 환경변수 및 기질특성을 조사하였다. 최적의 효소생산을 위한 온도, pH, 교반조건은 각각 28~30℃, 5.0~6.0, 100rpm이었다. FM04는 Amylase 생산을 위해 탄소원으로 starch를 잘 이용하였다. 경제적인 효소생산을 위해 전분이 많이 함유된 음식물쓰레기를 이용하였고, 1% (w/v)의 기질농도에서 5.2 U/ml의 amylase 효소활성을 얻을 수 있었다. Amylase 활성의 최적온도 및 pH는 각각 60℃와 4.5이었으며, 열안정성은 50℃에서 2일 동안 90%의 활성이

유지되었다. 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해에서는 2.5 U/ml의 amylase 배양상등액에 음식물쓰레기 20% (w/v)의 첨가한 반응물을 50℃, 48시간의 반응한 결과 72.6 g/L의 환원당을 얻을 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R01-2000-00350) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Sun, Y. and J. Cheng (2002), Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
2. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, and S. J. Kim (2003), Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1-8.
3. Yoo, S. S., K. C. Kim, Y. A. Oh, S. Y. Chung, and S. J. Kim (2002), The high production of cellulolytic enzymes using cellulosic wastes by a fungus, strain FJ1, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 172-176.
4. Son, C. J., S. Y. Chung, J. E. Lee, and S. J. Kim (2002), Isolation and cultivation characteristics of *Acetobacter xylinum* KJ-1 producing bacterial cellulose in shaking cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 722-728.
5. Park, J. W., K. H. Lee, and C. Y. Lee (1995), Identification of filamentous molds isolated from Korean traditional nuruk and their amyolytic activities, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 737-746.
6. Jin, B., H. J. van Leeuwen, B. Patel, and Q. Yu (1998), Utilisation of starch processing wastewater for production of microbial biomass protein and fungal α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Bioresource Technol.* **66**, 201-206.
7. Uguru, G. C., J. A. Akinyanju, and A. Sani (1997), The use of yam peel for growth of locally isolated *Aspergillus niger* and amylase production, *Enzyme Microb. Technol.* **21**, 48-51.
8. Kim, C. K., J. S. Kim, and W. S. Cha (1996), Effects of concentration of inhibitor on the production of α -amylase and growth of *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **11**, 125-131.
9. Haq, I., H. Ashraf, J. Iqbal, and M. A. Qadeer (2003), Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium, *Bioresource Technol.* **87**, 57-61.
10. Jin, B., H. J. van Leeuwen, B. Patel, H. W. Doelle, and Q. Yu (1999), Production of fungal protein and glucoamylase by *Rhizopus oligosporus* from starch processing wastewater, *Process Biochem.* **34**, 59-65.
11. Carlsen, M. and J. Nielsen (2001), Influence of carbon source on α -amylase production by *Aspergillus oryzae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 346-349.
12. Agger, T., J. B. Petersen, S. M. O'Connor, R. L. Murphy, J. M. Kelly, and J. Nielsen (2002), Physiological characterisation of recombinant *Aspergillus nidulans* strains with different creA genotypes expressing *A. oryzae* α -amylase, *J. Biotechnol.* **92**, 279-285.
13. Hamilton, L. M., C. T. Kelly, and W. M. Fogarty (1999), Production and properties of the raw starch-digesting α -amylase of *Bacillus* sp. IMD 435, *Process Biochem.* **35**, 27-31.
14. Chung, M. J., W. N. Hou, J. H. Jeong, and H. Taniguchi (1990), Studies on the development and the characteristics of the powerful raw starch digesting enzyme, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 251-259.
15. Nielsen, J. E. and T. V. Borchert (2000), Protein engineering of bacterial α -amylases, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1543**, 253-274.
16. Ozbek, B. and S. Yuceer (2001), α -Amylase inactivation during wheat starch hydrolysis process, *Process Biochem.* **37**, 87-95.
17. Ortega, N., M. D. Busto, and M. Perez-Mateos (2001), Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **47**, 7-14.