

# 침엽수 혼합목분에서 배양조건을 달리한 *Fomitopsis palustris*의 균체외효소 활성 변화

이영민<sup>1</sup> · 최두열<sup>1</sup> · 김현정<sup>1</sup> · 윤정준<sup>2</sup> · 김영숙<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국민대학교 삼림과학대학 임산공학과, <sup>2</sup>한국생산기술연구원 환경에너지본부 신재생에너지팀

## Effect of Various Culture Conditions on the Activity of Extracellular Enzymes from *Fomitopsis palustris*, Brown Rot Fungi

Young-Min Lee<sup>1</sup>, Doo-yul Choi<sup>1</sup>, Hyun-Jung Kim<sup>1</sup>, Jeoung-Jun Yoon<sup>2</sup>, and Yeong-Suk Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Forest Products, Kookmin University, Seoul, Korea

<sup>2</sup>Division of Environment and Energy, Korea Institute of Industrial Technology Seoul, Korea

**ABSTRACT** : Extracellular enzyme activities of *Fomitopsis palustris* were determined by the particle sizes, culture periods and concentrations of wood particle substrate which was mixture of 4 domestic coniferous woods, such as *Pinus densiflora*, *Larix leptolepis*, *Pinus koraiensis*, and *Pinus rigida*. The results showed that the culture conditions had an effect on the secretion of most of the extracellular enzymes from *Fomitopsis palustris* in the mixed wood particle substrate. The optimal culture conditions for enzyme activities were 80~100 mesh in wood particle size, 7.5% in concentrations of wood substrate, and 4~8 weeks in culture period.

**Keywords** : Wood biomass, *Fomitopsis palustris*, extracellular enzyme, Enzyme activity, Culture conditions

### 서 론

기후변화협약 이행으로 인한 온실가스배출 저감 및 고유가로 인한 대체에너지 요구가 커지는 상황에서 미국, EU 일본과 같은 선진국에서는 향후 5~20년내에 자동차연료의 5~30%를 바이오연료로 대체하고자하는 에너지정책이 실행되어 기술개발에 대한 R&D투자 등 적극적인 노력을 경주하고 있다(Energy efficiency and Renewable Energy, 2008; Rockvill, 2005; Aden et al., 2002; Wyman, 1999; Fujisankei Business I. 2007; [http://racer.kemco.or.kr/newsletter/20070521/he\\_focus\\_01.htm](http://racer.kemco.or.kr/newsletter/20070521/he_focus_01.htm)). 특히 전량 수입에 의존하고 있는 국내 현실에서는 수송용 대체에너지개발이 시급한 상황이다(산업자원부, 2007).

수송용 바이오연료로 미국등지에서 상용화된 바이오에탄올의 경우 원료로 옥수수과 같은 곡물을 이용하기 때문에 그로 인한 곡물 가격상등과 사회적 영향성 등의 부작용이 발생하여 제2세대 바이오에탄올 원료로 목질바이오매스가 주목 받는 상황으로 전환되었다(Energy efficiency and Renewable Energy, 2008, 산업자원부, 2007). 그러나 목질바이오매스로 전환된 에탄올의 경우 옥수수유래 에탄올에 비해 고비용으로 상용화에 어려움이 많아 현재는 목질바이오매스를 강한 산성용액에 처리하여 glucose를 생산해 내는 기술이 실증 생산에 도입되고 있어 설비부식 및 환경오염 등의 부작용을 야기하는 문제점을 지니고 있어 이를 극복할 연구가 다수 이루어져 왔다(Oh et al., 2002; Schell et al., 2003; Ikeda et al., 2007).

\* Corresponding author: (E-mail) yskim@kookmin.ac.kr

※ 본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21 사업(20050401034819)의 일환으로 수행된 것임.

목질계 에탄올 생산에서 강산사용의 이 같은 문제점을 해결하기 위해 미국 DOE가 시도해온 기술이 목질바이오매스의 전처리에 희석산을 사용하고, 당화에 고효율의 효소를 이용하는 방법(NREL, 2008; Fred et al., 2003; Genecor International, Inc. 2003; <http://www1.eere.energy.gov/biomass>, 2007; Aden et al., 2002)인데 여기서 사용되는 효소가 목질계 에탄올 생산기술의 핵심요소라 할 수 있다.

상용화된 효소들은 *Trichoderma reesei* 또는 *Phanerochaete chrysosporium*(Eriksson and Pettersson, 1975; Claeysens et al., 1989; Eriksson et al., 1990; Miettinen-Oinonen, 2004)으로 목재분해균에서 유래한 효소들인데 국내에서도 이같은 효소의 국산화가 바이오에탄올 산업과 함께 시급한 과제라고 할 수 있다. 국내에서 Avicel과 같은 cellulose를 기질로 한 효소 연구(Song et al., 2008; Yoon et al., 2008; 윤 등, 2006, 2007; Kim, 1995)는 다수 있으나, 천연의 목재를 기질로 한 목재분해균의 효소활성에 대한 연구는 미미한 상황이다.

저자들은 국내에서 분포가 많아 이용가능성이 가장 높은 소나무, 낙엽송, 리기다소나무, 잣나무 등 국내산 침엽수 기질로 대상으로 목재분해력이 높은 *Fomitopsis palustris*가 분비하는 균체외효소에서 나타나는 효소패턴과 셀룰로오스 분해성에 대해 연구한 결과 침엽수기질에 나타난 효소패턴은 수종 및 심변재 간에 차이를 크게 보이지 않았으나 효소활성에서는 다소간의 차이가 있음을 보고한 바 있다(Kim et al., 2006). 국내산 효소개발을 위해서는 셀룰로오스 분해능이 우수하면서 효소활성이 좋은 유전인자 탐색이 이루어져야 하는데 이를 위해서는 최대 효소활성을 나타내는 최적배양조건 도출이 중요한 과정이라고 할 수 있다.

본 연구에서는 혼합목분을 기질로 했을 때 균주로부터 생산되는 균체외효소의 활성과 배양조건의 관계를 구명하여 미이용 균주 및 효소 탐색의 배양조건으로 활용하고자 하였다. 즉, 목질 바이오매스를 효율적으로 분해하는 최적 배양조건을 확립하기 위하여 다양한 수종의 목질바이오매스를 간편하게 혼합 처리하여 목분의 적정입도, 배양기간, 기질 첨가농도별 균주의 효소활성을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

목질 바이오매스를 효율적으로 분해하는 균주 선발 등에

사용될 최적 배양조건을 확립하기 위하여 다양한 수종의 목질바이오매스를 간편하게 혼합 처리하여 목분의 적정입도, 배양기간, 기질 첨가농도별 균주의 효소활성을 측정하였다. 공시수종은 국내에서 사용가능성이 높은 침엽수 4개 수종(소나무, 낙엽송, 잣나무, 리기다소나무)을 사용하였고, 심재와 변재를 1:1로 혼합하였다. 그러나 심재율이 높은 낙엽송은 변재대신에 심재를, 변재율이 현저히 많은 리기다소나무는 심재대신에 변재를 대체하여 혼합하였다. 목분의 적정입도를 결정하기 위하여 목분의 입도를 40~60, 60~80 및 80~100 mesh로 조정하였다. 공시균으로 갈색부후균인 *Fomitopsis palustris*를 사용하였다.

### 공시균 배양 및 본배양

공시균은 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 배양된 균사체를 PDB(Potato Dextrose Broth)배지 100 ml에 접종한 후, 28°C에서 5일간 진탕배양(115 rpm)하는 방법으로 전배양을 실시하고, 이들을 본배양에 이용하였다. 본배양에는 glucose 0.5%, peptone 0.8%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3%, Thiamin HCl 5 ppm을 포함한 액체배지(pH 5.0)를 사용하였다. 조제된 액체배지에 전배양액 5 ml를 첨가하고, 적정기질농도를 구명하기위해 목분 혼입율을 5%, 7.5%, 10%(w/v)로 조정하여 본배양을 실시하였다. 이 때 목분의 입도를 40~60, 60~80 및 80~100 mesh로 조정하였고, 배양기간별 효소활성의 차이를 보기위해 배양기간을 4, 8, 12주로 나누어 28°C에서 진탕배양(150 rpm)하였다.

### 효소활성 및 단백질 정량

#### *β*-glucosidase 측정

1.5 mL 튜브에 100 μL 1 M sodium acetate buffer(pH 5.0), 100 μL 10 mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNPG, Sigma), 증류수 700 μL와 100 μL 효소를 넣고 50°C에서 15분간 반응을 시켰다. 그 후에 100 μL 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>를 첨가시킨 후에 405 nm에서 β-glucosidase의 활성을 측정하였다. 효소활성단위는 일정 조건하에서 1분간 반응용액 1 mL당 p-nitrophenol 1 μmol을 방출하는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

#### *Endo-β*-1,4-glucanase 측정

Somogyi-Nelson법(Nelson, 1944; Somogy, 1952)에 따

라서 5  $\mu$ L 1 M sodium-acetate, 5  $\mu$ L 1%의 carboxymethyl cellulose(CMC)나 1% xylan, 35  $\mu$ L 증류수에 5  $\mu$ L 효소를 첨가시킨 후, 50°C에서 30분간 반응시켰다. 효소반응이 끝난 샘플에 구리 시약 50  $\mu$ L를 넣고 잘 혼합한 후 100°C에서 15분간 효소반응을 정지시켰다. 반응이 정지된 샘플을 실온까지 냉각하였다. 50  $\mu$ L Nelson 발색 시약을 첨가하여 청색으로 변색하는 것을 확인하고 1 mL 증류수를 넣고 충분히 혼합하였다. 샘플을 실온에서 15분간 반응시킨 후에 660 nm 흡광도를 측정한다. 검량선에 의거 효소활성을 구하였다.

### Cellobiohydrolase 측정

1 M CH<sub>3</sub>COONa(pH=5) 100  $\mu$ L, 10 mM p-NPL(p-*nitrophenyl- $\beta$ -lactopyranoside*) 100  $\mu$ L, 효소 100  $\mu$ L, 증류수 700  $\mu$ L를 혼합한 후 40°C에 30분간 반응 후 효소활성 저해제인 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100  $\mu$ L 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 cellobiohydrolase 활성을 구했다.

### $\beta$ -1,4-xylosidase 측정

1 M CH<sub>3</sub>COONa(pH=5) 100  $\mu$ L, 10 mM p-NPX(p-*nitrophenyl- $\beta$ -xylopyranoside*) 100  $\mu$ L, 효소 100  $\mu$ L, 증류수 700  $\mu$ L를 혼합한 후 40°C에 30분간 반응 후 효소활성 저해제인 2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100  $\mu$ L 투입한 후 UV-Vis spectroscopy를 이용 405 nm에서 흡광도를 측정한다. 다음 효소활성을 구하였다.

### 단백질의 정량

배양액을 filter paper(Adventec No. 2)로 여과시킨 후, Amicon Membrane 농축기를 사용하여 농축액을 얻었다. 여기서 얻은 농축액을 분석용 추출물로 사용하였다.

단백질 정량은 Bradford 방법(Bradford, M, 1967)에 따라 정량하였고, 다음 식에 의거하여 단백질 농도를 구하였다.

$$\text{Protein Concentration(mg/mL)} = A_{595} \times 0.811 + 0.009$$

## 결과 및 고찰

최 등(2007)의 보고에서 국내 주요 침엽수종의 기질에서 나타난 각 수종의 효소패턴이 매우 유사한 결과로부터

*Fomitopsis palustris* 균주에 대해 각 수종별 목재바이오매스의 혼합가능성이 시사된 바 있어 국내 주요 수종(낙엽송, 소나무, 잣나무, 리기다소나무)과 수종별 심, 변재의 혼합효과 및 최적 배양조건을 탐색한 결과, Fig. 1~4에 나타난 바와 같은 결과를 얻었다. 혼합목분을 기질로 했을 때 공시균주인 *Fomitopsis palustris*의 경우, Fig. 1~4에 나타난 바와 같이 Endoglucanase(EG), Cellobiohydrolase(CBH),  $\beta$ -glucosidase(BGL), and  $\beta$ -1,4-xylosidase 등의 효소가 분비되지만 이들의 효소활성은 목분의 입도와 배양기간, 기질농도를 달리 했을 때 현저한 차이가 나는 것으로 밝혀졌다. 목분의 입도가 40~60 mesh 및 60~80 mesh 기질의 경우 기질의 농도가 5%에서 7.5%와 10%에 비해 효소 활성이 높게 나타났으며, 80~100 mesh에서는 7.5%에서 보다 활성이 큰 결과를 보여 목분 입도와 기질농도 상호 관련성이 있는 것을 알 수 있었다. 그리고, Endoglucanase(EG), Cellobiohydrolase(CBH),  $\beta$ -glucosidase(BGL), 및  $\beta$ -1,4-xylosidase의 효소활성은 모두 40~60 mesh 나 60~80 mesh에 비해 80~100 mesh의 기질에서 효소활성이 큰 결과를 보여 목분 입도가 작아질수록 비교적 높은 활성을 나타내었다. 일반적으로 셀룰로오스의 결정화도를 낮추거나 입자의 크기를 감소시키면 기질의 표면적이 넓어지고 셀룰로오스 체인을 짧게 끊어 주어 효소분해력이 상승하고, 입자크기가 325~400 mesh, 정도로 미세하게 했을 때 리그닌 성분에 의한 저해 효과가 있는 것으로 알려져 있다(황 등, 1998). 본 연구결과와 경우 입자가 작아짐에 따라 셀룰로오스의 결정영역이 파괴되고 표면적이 증가되면서 효소접근성이 좋아지는 결과로 효소활성이 다소 크게 나타난 것으로 고찰되었다. 또한 본 연구에서 사용한 목분은 Willey mill에 의해 분쇄되었으나 ball milling에 의해 분쇄한 것과 유사한 결과를 보여주었다.

한편, 국내산 주요 유용수종인 소나무, 낙엽송, 잣나무, 리기다소나무와 같은 공시수종과 수종별 심·변재부위를 모두 혼합한 기질에서의 대부분의 효소활성이 Fig. 1~4에서 볼 수 있는 바와 같이, 김 등(2007)이 보고한 단독수종의 목재 기질보다 낮은 결과를 보였다. 여러 수종에 함유된 리그닌, 추출물 등이 기질에 혼합되어 나타남으로서 이들 성분이 효소활성의 inhibitor로 작용한 것으로 해석하였다. 특히 Endoglucanase(EG)의 활성이 목분 입도와 목분 투입 농도에 관계없이 활성이 매우 낮고 활성이 가장 크게 억제되는 결과를 보여 주어서 이에 대한 원인구명이 필요하고, 목재 분해균의 효소탐색을 위한 배양의 경우에는 추출물과 약간

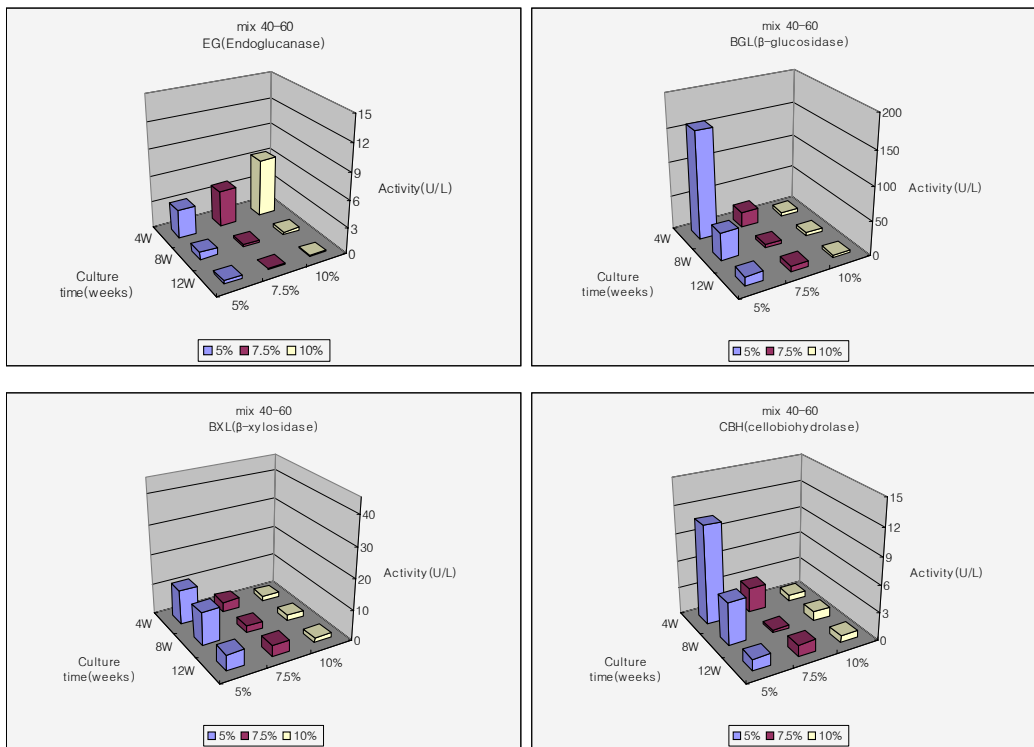


Fig. 1. Enzyme activities in 40-60 mesh wood biomass substrates (Incubation time: 4, 8, 12 weeks)

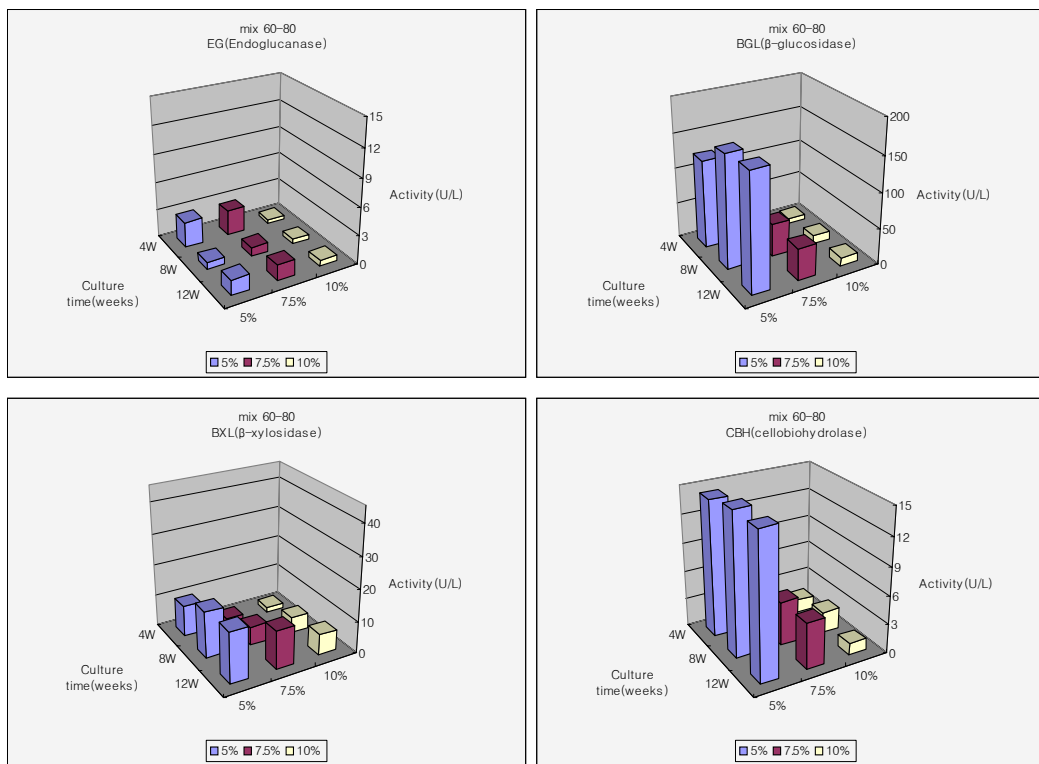


Fig. 2. Enzyme activities in 60-80 mesh wood biomass substrates (Incubation time: 4, 8, 12 weeks)

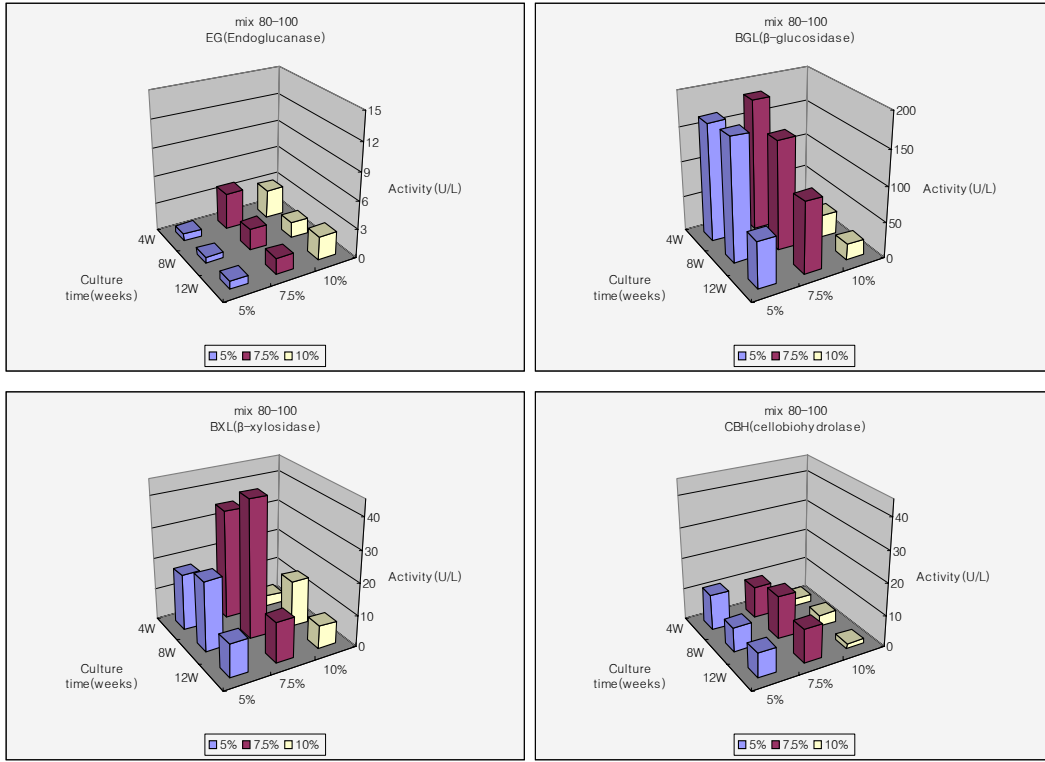


Fig. 3. Enzyme activities in 80~100 mesh wood biomass substrates (Incubation time: 4, 8, 12 weeks)

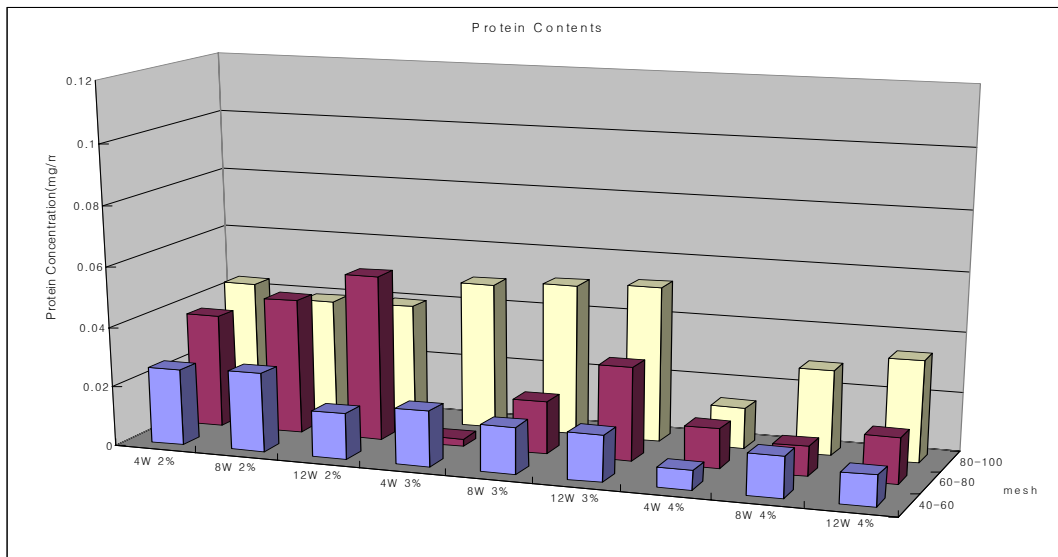


Fig. 4. Protein concentrations in wood biomass substrate (Culture periods: 4, 8, 12 weeks)

의 리그닌을 제거한 목분의 사용이 바람직할 수도 있을 것으로 고찰되었다. 한편 다른 조건에 비해 비교적 큰 효소활성을 나타낸 80~100 mesh 기질과 기질투입농도 7.5%를 기준으로 했을 때 배양기간별 효소활성은 4~8주 배양조건

에서 12주에 비해 현저하게 높은 활성을 나타내 8주이상 경과하면 오히려 기질의 분해물질 농도가 높아지면서 효소활성은 오히려 억제되는 결과를 보여, 효소탐색의 적정배양기간이 4~8주가 적정하다는 결과를 얻었다.

## 결 론

목질 바이오매스(wood biomass)를 효율적으로 분해하는 최적 배양조건(optimum culture conditions)을 확립하기 위하여 국내산 4수종(소나무, 낙엽송, 잣나무, 리기다소나무)의 목질바이오매스를 혼합하여 목분(wood particle)의 적정 입도(particle size), 배양기간(culture period), 기질첨가농도별(concentration of wood particle substrate) 균주(wood-decaying fungi)의 균체외효소 활성(extracellular enzyme activity)을 측정하였다. 연구 결과, 혼합목분을 기질로 했을 때 *Fomitopsis palustris*가 분비하는 Endoglucanase(EG), Cellobiohydrolase(CBH),  $\beta$ -glucosidase(BGL), and  $\beta$ -1,4-xylosidase 등의 효소분비를 유도하는 최적 조건은 목분 입도는 80~100 mesh, 목분 투입농도는 7.5%가 적정한 것으로 밝혀졌다. 또한 최적의 목분입도 및 투입농도 조건에서 배양기간은 4~8주로 적절한 것으로 밝혀졌다.

## 요 약

목질 바이오매스(wood biomass)를 효율적으로 분해하는 최적 배양조건을 확립하기 위하여 국내 침엽수 4수종(소나무, 낙엽송, 잣나무, 리기다소나무)의 목질바이오매스를 혼합하여 목분의 적정입도, 배양기간, 기질첨가농도별 균주의 균체외효소 활성을 측정하였다. 연구 결과, 혼합목분을 기질로 했을 때 *Fomitopsis palustris*가 분비하는 균체외효소 활성은 효소 종류에 따라 기질농도, 목분입도, 및 배양기간 등의 배양조건에 따라 다른 효소활성 값을 나타냈다. 침엽수 혼합목분을 기질로 했을 때 대부분의 cellulase 분비를 유도하는 최적 조건은 목분 입도, 80~100 mesh, 기질 농도는 7.5%가 적정한 것으로 밝혀졌다. 또한 최적의 목분입도 및 투입농도 조건에서 배양기간은 4~8주로 적절한 것으로 구명되었다.

## 인 용 문 헌

산업자원부. 2007a. 신·재생에너지 RD&D 전략2030 [수송용 바이오에너지].  
 윤정준, 차창준, 김영숙, 김영균. 2006. 갈색부후균의 효소시스템을 이용한 목질계 바이오매스의 효소당화. 한국신·재생에너지학회 추계학술대회논문집, pp. 529-532.  
 윤정준, 이영민, 최두열, 김영균, 김영숙. 2007. 벗질분해과정중에 생산하는 *Fomitopsis palustris* 균체의 Xylanase의 분리정제 및

효소특성, 목재공학 35(6): 159-165.  
 최두열, 이영민, 김영균, 윤정준, 김영숙. 2007. 국내산 침엽수 목분의 진탕배양에서 나타난 *Fomitopsis palustris*의 효소 활성 및 셀룰로오스 분해, 목재공학 35(6): 91-99.  
 황병호, 구자운, 김윤수, 김영숙, 문성필, 문창국, 백기현, 안원영, 이병근, 이종윤, 이현중, 조남석. 1998. 목질 바이오매스, 선진문화사.  
 Aden, A., M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechura, K. Neeves, J. Sheehan, B. Wallace, L. Montague, A. Slayton, and J. Lukas. 2002. Lignocellulosic Biomass to Ethanol process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Prehydrolysis for Corn Stover, National Renewable Energy Laboratory.  
 Claeysens, M. H. van Tilbeurgh, P. Tomme, T. M. wood, and I. McCrae. 1989. Fungal cellulase systems. Comparison of the specificities of the cellobiohydrolases isolated from *Penicillium pinophilum* and *Trichoderma reesei*. Biochem. J. 261: 819-826.  
 Eriksson, K. E., R. A. Blanchette, and P. Ander. 1990. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. Springer Berlin Heidelberg, New York.  
 Eriksson, K. E., and B. Pettersson. 1975. Extracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose I. Separation, purification and physico-chemical characterization for five *endo-1-4- $\beta$ -glucanases*. Eur. J. Biochem. 51: 193-206.  
 Fred, A. K., J. E. Hamilton, and Q. A. Nguyen. 2003. Microbial pretreatment of biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology. 105-108: 27-41.  
 Energy efficiency and Renewable Energy, 2008. Ethanol Myths: Under the Microscope, U.S. Dept. of Energy.  
 FujiSankei Business I. 2007/2/12  
 Genecor International Inc. 2003. (NREL)/DOE Subcontract with Genecor for "Cellulose cost reduction for bioethanol", [http://racer.kemco.or.kr/newsletter/20070521/he\\_focus\\_01.htm](http://racer.kemco.or.kr/newsletter/20070521/he_focus_01.htm)  
<http://www1.eere.energy.gov/biomass>, 2007-07-05  
 Ikeda, T., T. Sugimoto, M. Nojiri and K. Magara. 2007. Alkali pretreatment for the bioethanol fuel production from lignocellulosics. Proceedings of The 2007 International Symposium on Bioenergy from Lignocellulosics, Seoul, Korea.  
 Kim, C. H. 1995. Characterization and substrate specificity of an *endo- $\beta$ -1,4-D-glucanase I* (*Avicelase I*) from an extracellular multi-enzyme complex of *Bacillus circulans*. Appl. Envir. Microbiol. 61: 959-965.  
 Kim, Y. K., J. J. Yoon, C. J. Cha, Y. K. Kim and Y. S. Kim. 2005. Degradation of the lignocellulosic biomass by brown-rot fungus *Fomitopsis palustris*. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies, 1012pp.  
 Kim, Y. S., Y. K. Kim, D. Y. Choi, Y. K. Kim and J. J. Yoon. 2006. Characterization of the major cellulases from *Fomitopsis palustris*, a brown-rot fungus in woody lignocellulosic biomass substrates. Abstract of the 56th Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, 119pp.  
 Miettinen-Oinonen, Arja, 2004. *Trichoderma reesei* strains for production of cellulases for the textile industry, Espoo 2004, VTT Publication 550, ISBN 951-38-6416-2, Julkaisija-Utgivare-Publisher. NREL, 2008. Research advances- Cellulosic Ethanol, <http://www.nrel.gov>

- Oh, K. K., Y. S. Kim, H. H. Yoon, and B. S. Tae. 2002. Pretreatment of lignocellulosic biomass using combination of ammonia recycled percolation and Dilute-acid process, *J. Ind. Eng. Chem.* 8: 64-70.
- Schell, D. J., J. Farmer, M. Newman, and J. D. Mcmillan. 2003. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105-108: 69-85.
- Song, B. C., K. Y. Kim, J. J. Yoon, S. H. Sim, K. S. Lee, Y. S. Kim, Y. K. Kim and C. J. Cha. 2008. Functional analysis of a gene encoding *Endoglucanase* that belongs to *Glycosyl Hydrolase* family 12 from the brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris*, *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 404-409.
- Wyman, E. C. 1999. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and commercial challenges, *annu. Rev. Energy Environ.* 1999. 24: 189-226.
- Yoon, J. J., K. Y. Kim and C. J. Cha. 2008. Purification and characterization of thermostable  $\beta$ -glucosidase from the brown-rot Basidiomycete *Fomitopsis palustris* grown on microcrystalline cellulose. *The Journal of Microbiology* 46(1): 51-55.