

## $\beta$ -glucosidase의 고생산을 위한 복합균주 개발

오영아, 김경철, 유승수, 정선용, 김성준

전남대학교 공과대학 환경공학과

전화 (062) 530-0853, FAX (062) 530-0864

### Abstract

This study was targeted to develop a microbial consortium having high cellulase production. A filamentous fungus, strain FB01, isolated from a compost showed high  $\beta$ -glucosidase activity especially. The strain FB01 was co-cultured with *Trichoderma viride* to enhance the productivity of  $\beta$ -glucosidase, changing inoculation time of one strain(FB01). The microbial consortium prepared showed the higher cellulytic enzyme production than *T. viride* well-known. The maximal enzyme production was obtained when the microbial consortium was cultured at 30°C and pH 6.0 for 10days and the activities of CMCase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase were 2.0, 0.8, and 0.2 U/mL, respectively. These enzyme activities were 2, 4, and 2 times as high as those of CMCase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase from *T. viride*, respectively, indicating that a synergistic interaction appeared between *T. viride* and strain FB01. The serial subcultures by pH control increased  $\beta$ -glucosidase production about 3.2 times.

Also, enzyme production using rice-straw as a carbon source showed that the activities of CMCase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase were 3.69, 0.76, 0.17 U/mL, respectively, and  $\beta$ -glucosidase activity was 1.5 times higher than that of *T. viride*. Consequently, microbial consortium showed the considerably enhanced production of the cellulolytic enzymes, such as CMCase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase compared those of *T. viride*, and a favorable stability for the enzyme production even in the serial subcultures.

### 서 론

섬유소 물질은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌을 주성분으로 구성되는데 그 중에서 셀룰로오스는 양적으로 가장 풍부하며 이용 가능성이 높은 물질이나, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 산화되거나 폐기물로 취급되어 자원이 낭비되며 환경오염 현상까지도 유발한다(1). 이와 같이 풍부한 자원중의 하나인 셀룰로오스는 효소학적 가수분해를 통해 glucose로 전환시켜 식량 및 에너지 자원으로 이용되고 있으며, 이에 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 endoglucanase와 exocellobiohydrolase의 활성이 높은 분양균주 *T. viride*와  $\beta$ -glucosidase의 높은 활성을 보여주는 분리균주에 대한 배양특성을 조사하고, 최적의 효소생산을 위한 두 균주의 복합균주 개발과 이용을 통해  $\beta$ -glucosidase의 고생산에 초점을 두었다. 또한 개발된 복합균주의 안정성 및 섬유소폐기물을 이용한 효소생산성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, 배양조건 및 효소활성도 분석

본 실험에 사용된 균주는 분양균주로서 *Trichoderma viride* (KCTC 6047; Korean Collection for Type Culture)와 분리균주 FB01을 사용하였다. Cellulose 분해 및 가수분해 효소활성이 우수한 균주를 자연계에서 선별하여 배양특성을 조사한 결과 FB01이 선택되었다. FB01은 전라남도 장성 일대의 토양 및 부식토에서 샘플을 채취하여 탄소원으로서는 볏짚을 이용한 배지에서 분리한 사상균이다.

CMCase,  $\beta$ -glucosidase 및 avicelase의 효소활성도 측정은 배양액을 10,000×g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 Thomas 등(2)의 방법에 따라 분석하였다.

### 복합균주의 개발

효소생산용 액체배지는 Mandel's medium을 기본배지로 사용하였으며, 100 ml을 500 ml baffled flask에 넣어 멸균(121°C, 15분)하고, 총 7개의 flask에 *T. viride*의 포자현탁액 1%를 각각 접종하여 배양(30°C, 100rpm)한 후, FB01 포자현탁액(1%)의 접종시기를 하루씩 늦추어 접종하였다. 접종시기에 따른 효소생산은 총 7일간 배양된 배양액을 원심분리(10000×g, 10분, 4°C)한 후, 상등액의 효소활성도를 측정하여 비교하였다. 또한 복합균주의 효소생산에 관한 온도 및 pH에 대한 영향을 조사하였고, 추후 실험을 위해 개발되어진 복합균주는 80% glycerol을 첨가하여 -70°C deep freezer에 보관되었다.

## 결과 및 고찰

### 복합균주 개발

실험에서의  $\beta$ -glucosidase의 우수한 생산자인 FB01과 *T. viride*를 혼합시켜 회분배양 하였을 때, 서로의 성장속도에 차이가 있었기 때문에 두 균주의 성장균형을 유지하기 위해 접종시기를 조절할 필요가 있었다. *T. viride*를 기준배양으로 하여 FB01의 접종시기를 달리 하였을 때 *T. viride*를 단독으로 2일간 배양한 후 FB01의 포자현탁액을 접종했을 때 최대의 활성을 보였다(Fig. 1). 접종 1일째에도 큰 영향을 끼치지 않았으나 2일째에 가장 큰 활성을 보였으므로, 이후의 복합균주에 관한 회분배양 실험은 *T. viride*를 2일동안 배양 한 후 FB01을 접종하였다.

### 복합균주의 계대배양에 의한 활성 유지

개발된 복합균주가 안정하게 상리공생하면서 지속적으로 효소를 생산하는지 알아보기 위해 4번의 연속적인 계대배양을 수행하였다. 1차 계대배양은 복합균주의 최적 pH 6.0에서 수행하였는데, 복합균주 개발 당시에 비해 CMCase의 활성이 미비하게 증가하였을 뿐  $\beta$ -glucosidase와 avicelase는 감소하였다. 2차 계대배양에서는 pH 3~10까지 달리하여 실험한 결과, pH 5.0에서 CMCase 활성도가 1차 보다 1.5배정도 증가하였다. 3차 계대배양은 위의 얻어진 결과를 바탕으로 pH 3-6까지 수행하였다. 3차 계대배양에서는 pH 4.5에서 2차 계대배양에 비해  $\beta$ -glucosidase와 avicelase가 각각 2배정도 증가되었으며, CMCase의 경우는 복합균주 개발당시의 효소활성보다 총 4배 이상의 증가를 보였다(Fig. 2). 마지막으로 4차 계대배양에서는 pH 4.5에서 10일간 배양한 결과 배양 8일째에 최대의 활성을 보였으며, 3차

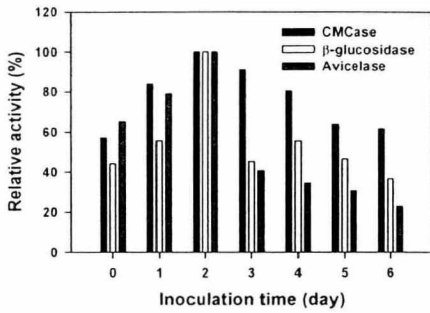


Fig. 1. Effects of inoculation time of FB01 on the production of cellulolytic enzymes in the co-cultivation with *Trichoderma viride*.

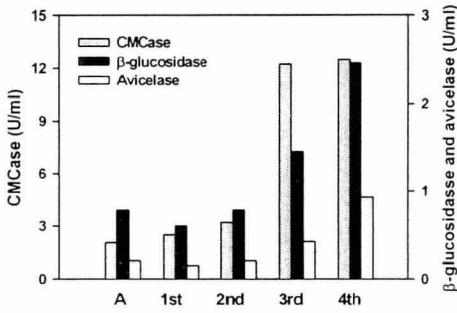


Fig. 2. Changes of the cellulolytic enzymes in the serial subcultures of the microbial consortium varying initial pH. Legend A indicated a point of time of development of microbial consortium. (1st; pH 6.0, 30°C, 7 days. 2nd; pH 5.0, 30°C, 7 days. 3rd; pH 4.5, 30°C, 7 days. 4th; pH 4.5, 30°C, 8 days.)

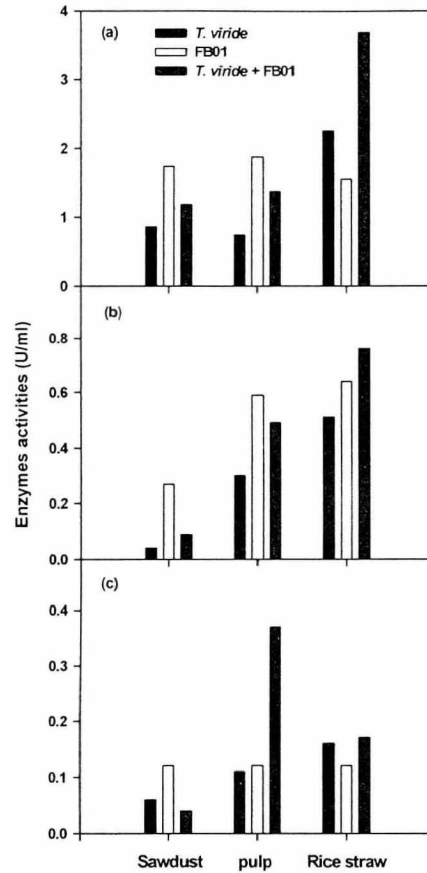


Fig. 3. Comparisons of the production of cellulolytic enzymes, such as CMCCase(a),  $\beta$ -glucosidase(b), and avicelase(c) in the culture of *Trichoderma viride*, FB01 and *T. viride*+FB01 using various cellulosic wastes.

계배양·비해  $\beta$ -glucosidase의 활성이 1.7배 증가했으며, 개발 초기의 복합균주와 비교해 볼 때 총 3.2배가 증가되었다. 또한 CMCCase의 활성도는 복합균주 개발 초기에 비해 총 6배가 증가되었으며, avicelase는 약 5배의 증가를 보였다. 위와 같은 실험결과를 종합해 볼 때, 개발된 복합균주는 두 균주가 상리공생 하면서 안정하게 효소를 생산하기 위해서는 일련의 계배양을 통한 pH 조절이 중요하였고, 최적 pH 배양에서는 효소의 활성이 월등하게 증가되었다. 이러한 변수들은 두 균주의 상호작용을 통해 평형을 유지시키기 위한 중요한 인자임을 알 수 있었다.

#### 섬유소 폐기물을 이용한 효소생산

섬유소 폐기물을 이용한 섬유소 분해효소 생산은 Mandel's medium의 탄소원인 CMC와

avicel 대신에 볏짚, 톱밥, 펄프를 각각 1%로 사용하였다. 톱밥을 탄소원으로 이용한 효소생산에서는 FB01이 다른 균주에 비해 탁월하였다(Fig.3). Pulp를 이용한 CMCase와  $\beta$ -glucosidase의 생산에서는 FB01이 유리하였으며, avicelase의 생산에는 복합균주가 우수하였다. 이는 FB01이 상대적으로 미약한 avicelase의 활성을 가지는데, 복합균주로 존재하는 *T. viride*에 의한 상승 효과에 의해 avicelase의 활성이 높아졌음을 짐작할 수 있다. 마지막으로 볏짚에서는 단일균주에 비해 복합균주가 모든 효소 생산에 대해 우수했으며, 특히 *T. viride*에 비해 CMCase와  $\beta$ -glucosidase는 약 1.5배의 효소생산을 나타내었다

## 요 약

본 연구의 목적은 기존의 단일 균주보다 두 종의 서로 다른 균주를 복합시켰을 때 두 균주간의 상호 보완적인 면을 이용하여 효소생산을 극대화하기 위함이며, 다음과 같은 결론을 얻었다. 실험에서 사용된 *T. viride*와 FB01는 최적 pH와 온도가 비슷하여 혼합배양이 가능하였으며, 이들의 복합균주를 개발하는데 성공하였다. 두 균주간의 상호작용으로 인해 단일 균주일 때보다 CMCase,  $\beta$ -glucosidase 및 avicelase의 활성이 우수했으며 또한 계대배양 및 pH 조절을 통해  $\beta$ -glucosidase의 활성이 최고 3.2배까지 증가함을 알 수 있었다.

탄소원으로 섬유소 폐기물중 특히 볏짚을 이용했을 때 복합균주에 의한 효소생산이 효과적이었으므로 앞으로 이 조건에서 복합균주를 장기적으로 계대배양하면서 효소의 생산성 향상과 복합균주의 안정성을 관찰할 필요가 있다고 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원으로 수행되었음.

## 참고문헌

1. Busto, M. D., Ortega, N., and Prrez-Mateos, M., "Location, kinetics and stability of cellulase induced in *Trichoderma reesei* cultures"(1996), *Bioresource Technol.*, **57**, 187~192.
2. Thomas, M. W. and Bhat, K. M., "Methods for measuring activity"(1988), *Method. Enzymol.*, **160**, 87-112.