

# 고효율 효소를 분비하는 균주의 선발 및 신문고지의 효소탈묵 특성(제6보)

—*Fusarium pallidoroseum*과 *Aspergillus niger*에서 단리한  
Cellulase와 Xylanase의 특성—

박성철<sup>†</sup> · 이양수 · 정인수<sup>\*1</sup>

(2005년 9월 17일 접수: 2005년 11월 15일 채택)

## Screening of Microorganisms Secreted High Efficient Enzymes and Properties of Enzymatic Deinking for Old Newsprint(VI)

—Characteristics of Cellulase and Xylanase from *Fusarium  
pallidoroseum* and *Aspergillus niger*—

Seong-Cheol Park<sup>†</sup>, Yang-Soo Lee and In-Soo Jeong<sup>\*1</sup>

(Received on September 17, 2005: Accepted on November 15, 2005)

### ABSTRACT

This study was carried out to investigate the characteristics of extracellular cellulase and xylanase from *Fusarium pallidoroseum* and *Aspergillus niger*, such as enzyme activity and stability by various pH, temperature and metal ions, for application into enzymatic deinking system.

The optimal temperature and pH for enzyme activity and stability of *Fusarium pallidoroseum* and *Aspergillus niger* were 50°C, pH 5.0 and 60°C, pH 9.0, respectively. Certain metal ions, calcium and cobalt, brought to elevate cellulase and xylanase activity from *F. pallidoroseum* and *A. niger*. With these results we suggest that enzymatic deinking system should be proceed at 50~60°C under their optimal pH condition.

• 전북대학교 농업과학기술연구소 (Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea)

\*1 익산대학 목조건축인테리어과 (Department of Wooden Building Construction and Interior Design, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea)

† 주저자 (Corresponding author) : E-mail ; jihu2002@orgio.net

*Keywords* : enzymatic deinking system, enzyme activity, cellulase, xylanase

## 1. 서론

고지의 탈묵은 자원의 효율적 이용으로 인한 에너지 절감과 폐기물 감량화, 매립 및 소각 등으로 야기되는 오염원을 최소화 할 수 있다. 그러나 고지 탈묵에 환경친화적 공정개선이 요구되면서 최근에는 생물공학분야가 도입되어 그 비중이 점차 확대되었다. 특히 미생물 효소를 이용한 효소탈묵은 세척법이나 부상법과 같은 재래식 탈묵방법에 비해 여수도 및 종이의 강도를 개선시키는 섬유의 물성 개선, 환경오염 유발물질의 생성감소 등의 부가적인 장점이 보고 되고 있다.<sup>1,2)</sup> 이러한 효소탈묵을 위해서는 먼저 탈묵에 유용한 효소가 각종 펄프에 안정, 반응 최적 pH가 중성 혹은 알칼리성, pH 및 열에 대한 안정성, 효소 활성에 미치는 인자가 적은 효소를 분비하는 미생물의 선발에서 시작하여 이 미생물로부터 다량의 효소를 얻을 수 있는 배양조건 및 배양기술을 개발하여야 한다. 한편 최근에 커다란 관심을 끌고 있는 내열 및 내알칼리성 cellulase 및 xylanase는 발효공업, 식품공업 또는 화학공업에서의 안정성으로 인하여 산업에 실질적인 이용이 용이하기 때문이다.<sup>3)</sup> 그러나 지금까지 자연계에서 분리된 호알칼리성 cellulase는 대부분 박테리아에 속하는 *Bacillus* sp.이다. Fungi의 cellulase는 endo- $\beta$ -1,4-glucanase (CMCase, EC 3.2.1.4), exo- $\beta$ -1,4-glucanase (Cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase (Cellobiase, EC 3.2.1.21)로 구성되어 있고 박테리아 cellulase는 endo- $\beta$ -1,4-glucanase의 1가지 구성성분만을 가

지고 있어 fungi의 cellulase가 산업적 실효성이 있는 것으로 알려져 있다.

이러한 효소는 fungi에서 cellulase를 얻기 위한 노력으로 홍 등<sup>4)</sup>은 퇴비, 부패한 목재, 토양 등에서 균주를 수집하여 CMC, filter paper, avicel을 분해하는 균주로 *Trichoderma koningi*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Streptomyces* sp.를 분리하였고, 이들 균주의 최적 효소 활성온도와 pH는 각각 40~50°C, 5.4~6.0이었고, *A. niger*는 약간 낮은 pH 4.8이었다. Chandra 등도 *Aspergillus fischeri* Fxn1을 이용하여 pH 9.0, wheat bran에서 높은 활성의 xylanase를 얻었는데, 이 효소의 최적 반응조건은 pH 6.0~7.0, 60°C이었고, 50°C에서 상당한 안정성이 있다고 보고하였다.<sup>5)</sup> 또한 Lee 등은 *Coprinus cinereus* 2249에서 단리한 효소는 50°C, pH 9.0에서 가장 높은 활성을 얻어 알칼리 조건에서 탈묵을 시도한 바 있다.<sup>5)</sup>

따라서, 본 보에서의 연구는 탈묵을 하기에 앞서 목재 탄수화물분해 효소를 분비하는 균주로부터 효소의 최적 활성 pH, 온도 및 금속이온 등 효소의 반응성과 안정성에 대한 검토를 하기 위해 수행되었다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시균주 및 배지

전보<sup>6)</sup>에서 cellulase와 xylanase 생산력이 우수하여 선발된 *Fusarium pallidoroseum*,

Table 1. Culture conditions for fungal enzyme production

Species	Culture condition
<i>Fusarium pallidoroseum</i>	rice bran+xylan 2.0%, peptone 0.6%, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.075%, MnSO <sub>4</sub> 0.06%, 6days, pH 9.0, 29°C
<i>Aspergillus niger</i>	CMC+xylan 2.5%, yeast extract 0.4%, K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.05%, CaCl <sub>2</sub> +FeSO <sub>4</sub> 0.08%, 7days pH 5.0, 27°C

*Aspergillus niger*를 공시균주로 사용하였고, 효소생산을 위한 배지의 조성은 다음과 같다.

## 2.2 조효소액 조제 및 효소활성 측정

균주 배양액을 4000 rpm으로 30 min. 동안 원심 분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하였고, 효소 활성은 전보<sup>6)</sup>와 동일하게 측정하였다.

## 2.3 효소활성의 안정성

### 2.3.1 온도의 영향

효소의 활성 최적온도를 검토하기 위하여 30~70°C에서 효소의 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 최적 활성온도를 구명하였다.

### 2.3.2 열 안정성

효소의 열 안정성을 검토하기 위하여 40~70°C에서 1~4시간 정치시킨 후 잔존하는 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 열 안정성을 측정하였다.

### 2.3.3 pH의 영향

효소의 최적 활성 pH를 검토하기 위하여 pH 3.0~10.0(pH 3.0~5.0 0.1M Citrate-Phosphate buffer, pH 6.0~8.0 0.1M Phosphate buffer, pH 9.0~10.0 0.1M Glycine-Sodium Hydroxide buffer)에서 효소의 CMCCase, FPase, xylanase 활

성을 측정하여 최적 활성 pH를 구명하였다.

### 2.3.4 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 효소를 buffer 용액과 함께 최적 활성온도에서 1시간 동안 정치한 후 잔존하는 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 pH 안정성을 측정하였다.

### 2.3.5 금속이온의 영향

효소에 대한 금속이온의 영향을 검토하기 위하여 구명된 최적 pH에 금속이온으로 Ca, Co, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Zn를 이용하여 5mM 금속이온을 buffer용액과 함께 조효소액에 첨가하여 최적 반응온도에서 1시간 정치한 후 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 금속이온이 효소에 미치는 영향을 조사하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 온도의 영향

각 균주에서 단리한 효소의 활성 최적온도를 검토하기 위하여 30~70°C에서 CMCCase, FPase 및 xylanase 활성을 측정하여 최적 활성온도를 구명한 결과는 Fig. 1과 같다.

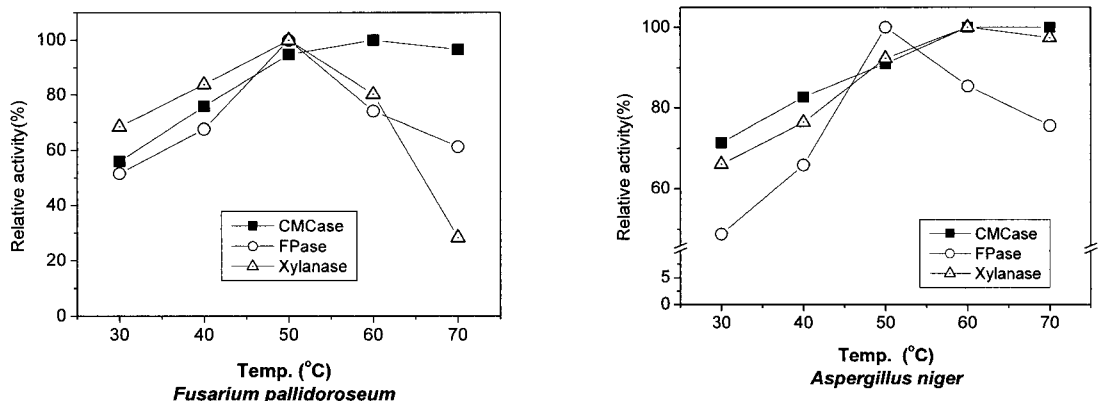


Fig. 1. Effect of temperature on fungal enzyme activities.

각 효소의 온도 변화에 대한 활성을 측정된 결과 *Fusarium pallidoroseum*의 CMCase는 50~70°C에서 높은 활성을 나타내었고, 최적 온도는 60°C이었다. FPase와 xylanase는 50°C에서 최대 활성을 나타내어 세 효소를 종합하여 살펴보면 *F. pallidoroseum* 효소의 최적 활성 온도는 50°C이었으나, 정 등<sup>7)</sup>은 *Fusarium sp.*의 cellulase의 최적 활성 온도가 30°C라 보고하여 본 연구 결과와는 차이가 있었다.

*Aspergillus niger*의 CMCase와 xylanase는 모두 60°C에서 최대 활성을 나타내었고, FPase는 50°C에서 최대 활성을 나타내었으나 이후 급격히 감소하여 이들 효소를 고려하여 보면 *A. niger* 효소의 최적 활성 온도는 60°C이었다. 이 결과는 고<sup>8)</sup>가 *A. niger*에서 생산한 cellulase의 최적 활성 온도는 60°C라는 보고와 일치한다.

### 3.2 열 안정성

효소의 열 안정성을 검토하기 위하여 40~70°C에서 1~4시간 정치시킨 후 잔존하는 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

*Fusarium pallidoroseum* 효소의 열 안정성 측정 결과 CMCase는 40~50°C에서 거의 90%에 가까운 잔존 효소활성을 가지고 있었고, 60°C에서도 2시간까지는 78.4%의 잔존 활성을 나타내어 이 시간까지는 비교적 안정하여 전체적으로 높은 안정성

을 가지고 있는 것으로 나타났다. FPase의 경우 40°C에서 3시간 처리 후 80% 이상의 높은 잔존 활성을 나타내었고, 50°C에서는 1시간 처리에 77.4%의 잔존 활성으로 이후에는 서서히 감소하였으며, 60°C에서는 1시간 처리에 50% 정도의 효소가 실활되어 4시간 처리에서는 완전히 실활되었다. Xylanase는 40°C에서 거의 모든 효소의 활성이 유지되었고, 50°C 2시간 처리에는 88.7%의 잔존활성을 나타내었다. 그러나 60°C에서는 1시간 처리에 거의 50%의 효소가 실활되어 결국 2시간 이후에는 10% 이하의 낮은 잔존활성을 나타냄으로써 xylanase는 열에 대한 안정성이 다른 효소에 비해 크게 떨어졌다.

*Aspergillus niger* 효소의 열 안정성을 검토한 결과 CMCase의 경우 50~60°C에서는 1~4시간 처리에도 잔존 효소 활성의 80% 이상을 유지하였으나 70°C에서는 1시간 처리에도 50% 이상, 이후에는 완전히 실활되어 60°C까지는 열에 대해 안정하였으나 이상의 온도에서는 안정성이 없었다. FPase에 있어서도 CMCase와 거의 비슷한 경향으로 50~60°C에서는 열에 상당히 안정한 결과로 4시간의 열처리에도 80%에 가까운 잔존 활성을 나타내었으나, 70°C에서는 2시간 처리 후 50%의 효소가 실활되었고 이후에는 완전히 실활되었다. Xylanase는 CMCase와 FPase 보다도 열에 약해 50°C에서는 90% 이상의 잔존 활성을 계속해서 유지하였으나, 60~70°C에서는 잔존 활성이 크게 저

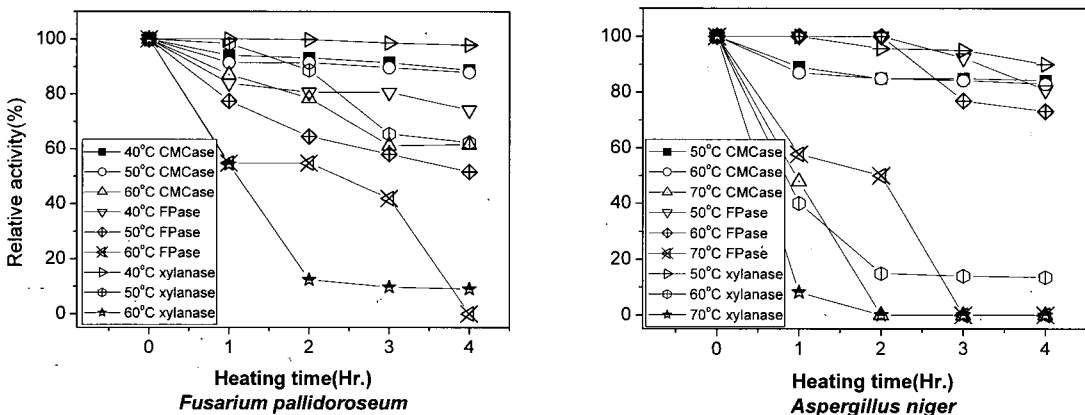


Fig. 2. Effect of temperature on the stability of fungal enzyme activities.

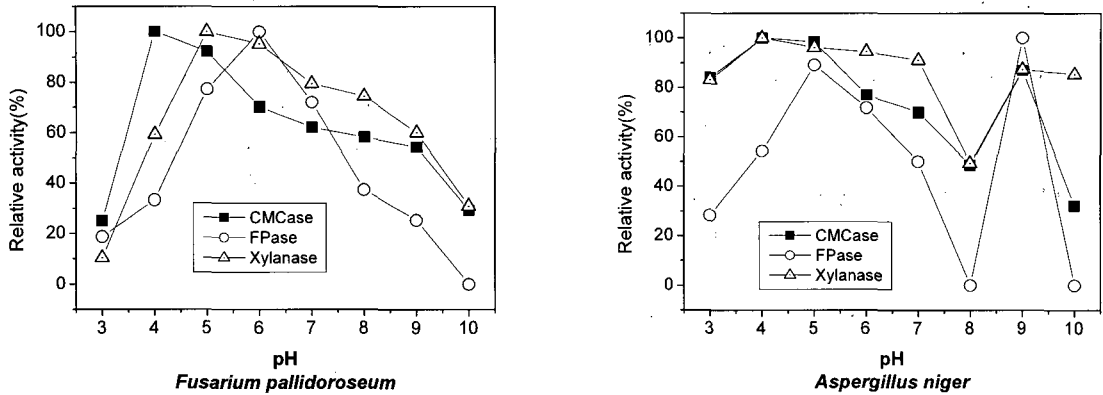


Fig. 3. Effect of pH on fungal enzyme activities.

하되어 거의 안정성이 없었다. 이는 최 등<sup>9)</sup>의 결과인 *A. niger*의 xylanase는 40°C에서 6시간 처리 후 잔존 활성이 80% 이었다는 보고와 비교할만하였다.

### 3.3 pH의 영향

효소의 최적 활성 pH를 검토하기 위하여 pH 4.0~10.0 및 각 균주의 최적 활성 온도에서 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 반응 최적 pH를 구명한 결과는 Fig. 3과 같다.

각 효소의 pH에 따른 활성을 측정한 결과 *Fusarium pallidoroseum*의 CMCase 최적 활성 pH는 4.0 이었고 이후 서서히 감소하였다. FPase는 pH 6.0에서 최고 활성을 나타낸 후 pH 10.0에서

는 효소 활성이 전혀 없었으며 xylanase는 전체적으로 CMCase와 유사한 경향으로 pH 5.0에서 최적이었다. 이들 세 효소를 종합하여 보면 *F. pallidoroseum*은 pH 5.0에서 최적 활성을 나타내어 정 등<sup>7)</sup>도 *Fusarium* sp.의 cellulase 활성의 최적 pH를 4.5로 유사한 결과를 보고하였다.

*Aspergillus niger*는 CMCase와 FPase는 pH 4.0에서 최적 활성을 나타내었고 이후 계속 감소하였으나 pH 9.0에서 다시 효소 활성이 상승하는 경향이었다. Xylanase도 pH 5.0에서 높은 활성을 나타내었지만 pH 9.0에서 최대 활성을 나타내었는데, 이는 엄<sup>10)</sup>의 연구에서 먹물버섯이 분비하는 cellulase가 산성 및 알칼리성이라 보고한 결과와 유사한 경우라 사료된다.

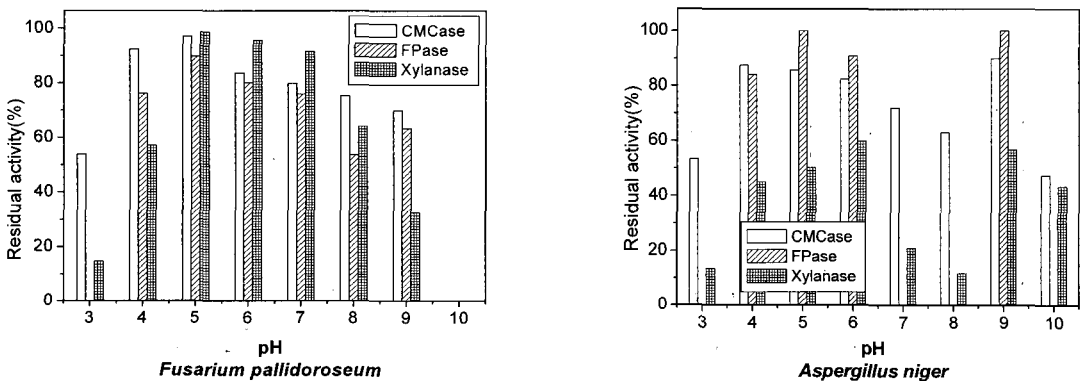


Fig. 4. Effect of pH on the stability of fungal enzyme activities.

### 3.4 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 효소를 buffer 용액과 함께 각각의 최적 활성온도에서 1시간 정치한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정된 결과는 Fig. 4와 같다.

pH 안정성의 결과로 *Fusarium pallidoroseum*의 CMCase와 FPase는 pH 4.0~7.0의 범위에서 잔존 활성이 각각 80, 75% 이상을 유지하여 상당히 안정하였고, xylanase의 경우에는 pH 5.0~7.0에서 90% 이상의 잔존 활성을 나타내었으나 이 범위 외의 pH에서는 효소활성이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 정 등<sup>7)</sup>이 *Fusarium sp.* cellulase가 pH 4.0~8.0의 범위에서 안정하였다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다.

*Aspergillus niger*의 pH 안정성은 CMCase와 FPase의 경우 pH 4.0~6.0에서 비교적 안정한 상태를 유지하여 잔존 활성 80% 이상을 나타내었으나 xylanase는 모든 pH에서 60% 이하의 낮은 잔존 활성을 나타내었는데 이는 상기에서 설명한 것과 같이 xylanase가 열에 대한 안정성의 부족으로 인한 것으로 사료된다.

### 3.4 금속이온의 영향

효소의 금속이온에 대한 영향을 검토하기 위하여 다양한 금속이온 5mM을 효소액에 첨가하고 최적 반응온도에서 1시간 정치한 후 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다.

*Fusarium pallidoroseum*의 효소는 금속이온의 영향으로 CMCase의 경우 Ca, Co, Cu, Mg, Zn에서 무첨가보다 활성이 상승되었고, FPase는 Ca, Mg에서 효소 활성이 증가되었다. Xylanase는 Cu에서만 금속이온의 효과가 나타났는데, 전체적으로는 Cu에서 가장 큰 효과를 볼 수 있었고 Hg는 활성을 크게 저해하는 것으로 나타났다.

*Aspergillus niger*는 CMCase와 FPase의 활성에 금속이온으로 각각 Co, Cu, Mg와 Cu, Fe의 첨가로 효소 활성이 약간 상승되었고 xylanase는 Ca, Co, Cu, Mg, Mn, Zn에서 효소 활성이 상승하였으며, Co에서 상대활성 151.5%의 가장 높은 효과가 있었다. 또한 Hg는 *F. pallidoroseum*와 같은 결과로 효소를 크게 저하시켰다. 그러나 이<sup>12)</sup>의 결과에서는 Cu, Hg, Pb, Mn 등이 cellulase의 활성을 억제한다고 하여 본 결과와는 부분적으로 큰 차이를 나타내었다.

## 4. 결론

본 보에서의 연구는 신문고지의 탈묵에 앞서 cellulase와 xylanase를 분비하는 *Fusarium pallidoroseum*과 *Aspergillus niger*에서 효소의 활성에 미치는 영향과 안정성을 검토하기 위해 수행되었고 얻은 결론은 다음과 같다.

*Fusarium pallidoroseum*과 *Aspergillus niger*는 50, 60°C에서 각각 최적 활성 온도 및 열에

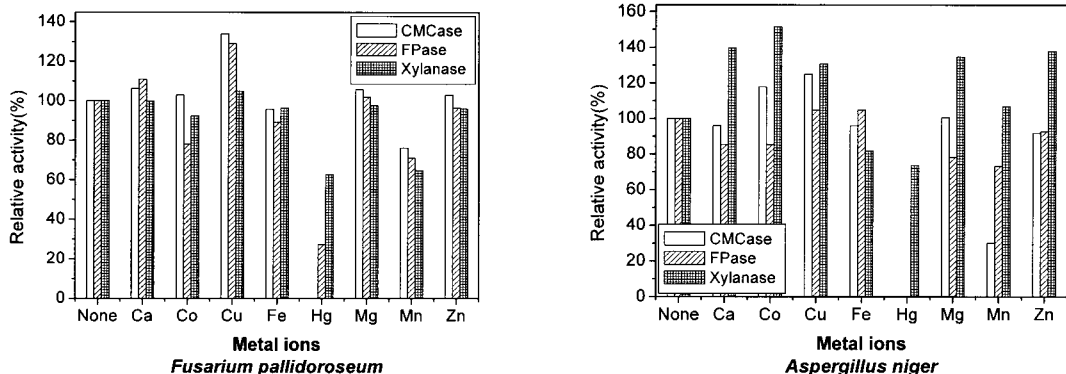


Fig. 5. Effect of metal ions on fungal enzyme activities.

대한 안정성이 있었고, 최적 활성 pH 및 pH에 대한 안정성은 각각 5.0과 4.0~7.0 및 9.0과 4.0~6.0에서 최적 활성과 안정성을 나타내었다. 금속이온으로는 균주와 효소에 따라 차이는 있었으나 *F pallidroseum*과 *A. niger*는 각각 Cu와 Co 이온이 효소 활성을 향상시키는 작용을 하였다. 따라서 향후 이들 효소를 이용한 탈묵은 50°C 내외에서 효소의 특성에 따라 pH를 조절하여 수행하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

## 인용문헌

1. H. Pala, M. Mota and F. M. Gama. Modification of secondary pulp fibre fractions by enzymatic treatment. 8th ICBPPI, p. 260-262 (2001).
2. Thomas Jeffries, John H. Klungness. Preliminary results of enzyme-enhanced versus conventional deinking of xerographic printed paper. Recycling Symposium, p. 183-188 (1993).
3. Chandra K. Ray and Chandra T. S. A Cellulase-free Xylanase From Alkali-tolerant *Aspergillus fischeri* Fxn1. Biotechnology letters, 17(3): 309-314 (1995).
4. 홍순우, 하영철, 이인복, 이세영, 섬유소 분해균의 분리 및 그의 생리학적 특성, 미생물학회지, 14(1): 14-24 (1976).
5. Lee Jung-Myoung and Eom Tae-Jin. Enzymatic Deinking of Old Newsprint with Alkalophilic Enzymes from *Coprinus cinereus* 2249. J. KTappi, 31(5): 12-17 (1999).
6. Park, S. C., Kang, J. H., and Lee, Y. S., Screening of Microorganisms Secreted High Efficient Enzymes and Properties of Enzymatic Deinking for Old Newsprint(II), J. Korea TAPPI 36(3): 9-14 (2004).
7. 정세훈, 박관화, *Fusarium moniliforme*이 생산하는 식물세포벽 분해효소의 정제와 특성, 산업미생물학회지, 18(2): 154-158 (1990).
8. 고정삼. *Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride*에 의한 Cellulase 생산성 및 그 효소특성에 관한 연구. 석사학위논문, 서울대학교 대학원 (1976).
9. 최양도, 이희중, 한문희, *Aspergillus niger*의 Hemicellulase계 효소에 관한 연구, 산업미생물학회지, 11(3): 23-32 (1983).
10. 엄태진. 먹물버섯이 분비하는 목질섬유소 분해효소에 의한 고지의 재활용. 한국과학재단 연구보고서 (1998).
11. Park, S. C., Lee, Y. S., and Jeong, I. S. Screening of Microorganisms Secreted High Efficient Enzymes and Properties of Enzymatic Deinking for Old Newsprint(V). J. Korea Tappi, 37(3): 9-16 (2005).
12. 이영하. 섬유소 분해균의 분리 및 섬유소 분해효소의 성질에 관한 연구. 석사학위논문. 서울대학교 대학원.