

고효율 효소를 분비하는 균주의 선발 및 신문고지의 효소탈묵 특성(제5보)

– *Bacillus* sp.에서 단리한 Cellulase와 Xylanase의 특성 –

박성철[†] · 이양수 · 정인수^{*1}

(2005년 4월 6일 접수: 2005년 8월 10일 채택)

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

– Characteristics of Cellulase and Xylanase from *Bacillus* sp. –

Seong-Cheol Park[†], Yang-Soo Lee and In-Soo Jeong^{*1}

(Received on April 6, 2005; Accepted on August 10, 2005)

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the characteristics of extracellular cellulase and xylanase from 4 selected different species, such as enzyme activity and stability by pH, temperature and metal ions, for application into enzymatic deinking system.

The optimal temperature and pH for enzyme activity of *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II and *B. subtilis* II were mainly 40~60°C and pH 6.0~7.0, respectively. Certain metal ions, calcium and cobalt, elevated enzyme activity, even though there were different results of enzyme activities based on various metal ions in 4 different species. With these results we suggest that enzymatic deinking system should be proceed at 50°C with neutral pH condition.

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

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

*1 익산대학교 목재공학과 (Department of Wood Science and Technology, Iksan National College, Iksan 570-752, Korea)

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

1. 서론

최근 인터넷이라는 새로운 정보매체의 발달과 함께 종이의 역할은 점차 디지털로 그 위치가 대체될 것이라는 예상이 지배적이었으나 종이 자체가 갖는 휴대의 편리성, 저렴한 가격, 눈에 느끼는 적은 피로감 등의 많은 장점과 정보통신의 발달이 정보의 양을 증가시켜 오히려 종이의 소비를 증가시키고 있다. 국내의 제지산업도 꾸준히 성장해 왔으나 목재자원의 수급은 갈수록 불안정해지고 펄프와 고지를 수입하는데 막대한 외화를 지불하고 있는 실정이다.¹⁾

이에 따라, 자원의 효율적 이용과 폐기물 감량화 추세에 부응하여 매립, 소각 등으로 야기되는 오염원을 최소화하고자, 고지를 탈묵하여 이용하는 것이 더욱 중요시 되고 있고 한발 더 나아가 효소를 이용한 탈묵방법이 개발되었다. 현재 펄프·제지산업에서 가장 절실히 요구되고 있는 효소의 특성은 각종 펄프에 안정, 반응 최적 pH가 중성 혹은 알칼리성, pH 및 열에 대한 안정성, 효소 활성에 영향을 미치는 인자의 최소화이다.

이러한 특성의 효소를 요구함에 따라 유용 cellulase 및 xylanase를 얻기 위해 자연계로부터 균주의 수집은 꾸준히 이루어지고 있고, 특히 호열성 또는 호알칼리성 cellulase를 생산하는 균주를 산업에 이용하기 위해 배양조건 개선이나 돌연변이에 의한 연구가 계속 추진되고 있다. 강 등²⁾은 호알칼리성 cellulase의 생산을 목적으로 석회암 지대 토양에서 *Cephalosporium* sp. RYM-202을 분리하여 이 균주에서 정제한 효소의 최적 활성 pH는 중성이상이며 또한 세제조성물로 사용되고 있는 계면활성제 등에도 안정함을 입증하였고, Kim 등³⁾도 토양에서 *Bacillus* sp. K-12를 분리하여 효소특성을 검토한 결과 60°C, pH 8.5에서 6시간 만에 filter paper를 완전히 분해하였고 CMC와 avicel은 각각 95, 90%를 glucose로 가수분해하는 호열 및 호알칼리성 bacteria에 관해 보고를 한 바 있다.

따라서, 본 보에서의 연구는 선발된 균주로부터 분리된 목재 탄수화물 분해 효소에 대하여 최적 활성pH, 온도 및 금속이온 등 효소의 반응성과 안정성에 대한 검토를 하기 위해 수행되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시균주 및 배지

전보⁴⁾에서 cellulase와 xylanase 생산력이 우수하여 선발된 *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II를 공시균주로 사용하였고, 효소생산을 위한 배지의 조성은 다음과 같다.

Table 1. Culture conditions for bacterial enzyme production

Species	Culture condition
<i>Bacillus pumilus</i> I	pH 8.0, 28°C, rice bran+xylan 2.0%, peptone 0.8%, K ₂ HPO ₄ 0.1%, CaCl ₂ 0.06%, 72hr.
<i>B. subtilis</i> I	pH 9.0, 28°C, avicel+xylan 3.5%, urea 0.4%, K ₃ PO ₄ 0.1%, CaCl ₂ 0.015%, 36hr.
<i>B. pumilus</i> II	pH 9.0, 28°C, avicel+xylan 3.5%, urea 1.6%, K ₂ HPO ₄ 0.125%, 60hr.
<i>B. subtilis</i> II	pH 8.0, 34°C, xylan 2.0%, yeast extract 0.6%, K ₂ HPO ₄ 0.1%, ZnSO ₄ 0.04%, 36hr.

2.2 조효소액 조제 및 효소활성 측정

균주 배양액을 4000 rpm으로 30 min. 동안 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였고, 효소 활성은 전보⁴⁾와 동일하게 측정하였다.

2.3 효소활성의 안정성

2.3.1 온도의 영향

효소액을 30~70°C에서 효소액의 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 최적 활성온도를 구명하였다.

2.3.2 열 안정성

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

2.3.3 pH의 영향

pH 3.0~10.0 (pH 3.0~5.0 : 0.1 M Citrate-

Phosphate buffer, pH 6.0~8.0 : 0.1 M Phosphate buffer, pH 9.0~10.0 : 0.1 M Glycine-Sodium hydroxide buffer)에서 효소액의 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 최적 활성pH를 구명하였다.

2.3.4 pH 안정성

효소액을 buffer 용액과 함께 최적 활성온도에서 1시간 동안 정치한 후 잔존하는 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 pH 안정성을 측정하였다.

2.3.5 금속이온의 영향

5 mM Ca, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Zn의 금속

이온을 함유한 최적 활성pH의 buffer에 효소액을 첨가하여 최적 활성온도에서 1시간 정치한 후 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 금속이온이 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 온도의 영향

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

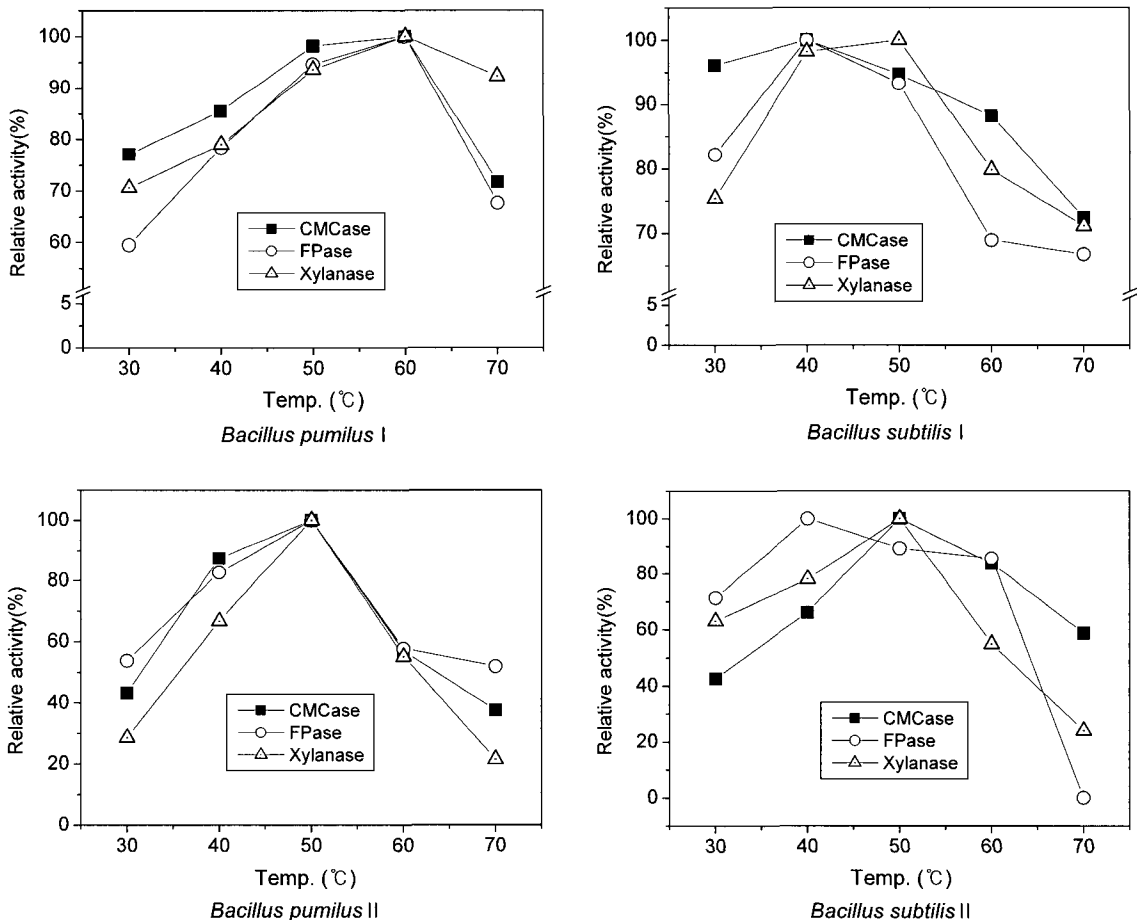


Fig. 1. Effect of temperature on bacterial enzyme activities.

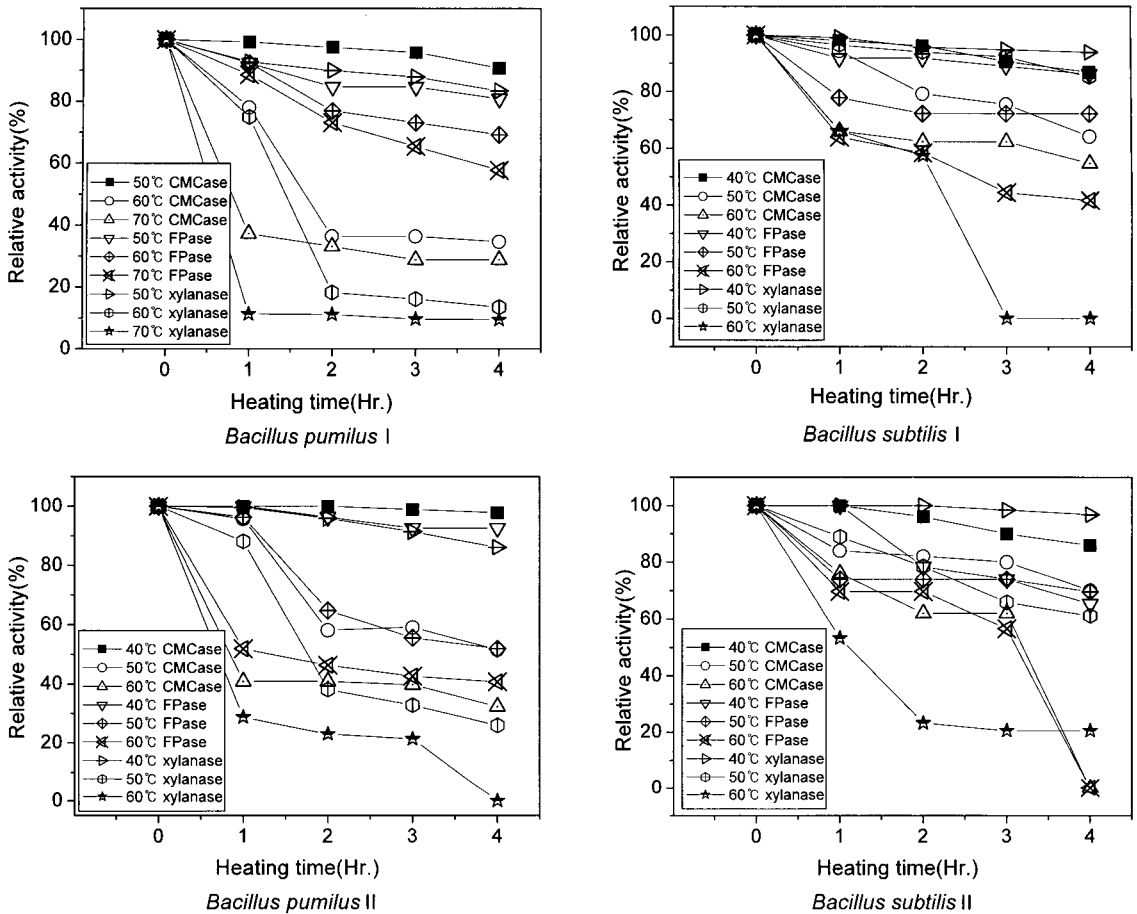


Fig. 2. Effect of temperature on the stability of bacterial enzyme activities.

Bacillus pumilus I 은 30~60°C까지 온도가 상승함에 따라 CMCCase, FPase, xylanase 활성이 지속적으로 증가하여 비교적 높은 온도인 60°C에서 최대활성을 나타내었고, *B. subtilis I* 40°C, *B. pumilus II* 50°C, *B. subtilis II*는 50°C에서 최대활성을 나타내었다. 그러나 Johnvesly 등⁵⁾은 *Bacillus* sp.에서 내열성 xylanase의 최적 활성온도가 70°C 이었고, Kim 등⁶⁾은 *Bacillus* sp. K-12에서 CMCCase와 FPase의 최적 활성온도가 65°C 이었다고 보고하여 본 연구결과와는 다소 차이가 있었다.

3.2 열 안정성

각각의 효소를 열에 대한 안정성을 검토하기 위하여 40~70°C에서 1~4시간 정치시킨 후 잔존하

는 CMCCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 Fig. 2와 같다.

Bacillus pumilus I 의 CMCCase는 60°C에서 1시간까지는 78.0%의 잔존활성을 유지하여 비교적 안정하였고, FPase와 xylanase는 50°C에서 4시간까지는 안정하였으나 이후 온도에서는 효소가 급격히 실활되는 것으로 나타났다. *B. subtilis I* 의 CMCCase 경우 50°C 2시간, FPase와 xylanase는 40~50°C 4시간에서 열에 대한 안정성을 보였다. 또한 *B. pumilus II*는 세 효소 모두 50°C, 1시간까지는 안정하였으나 이후에는 효소가 급격히 실활되었다. *B. subtilis II*의 CMCCase는 40~50°C 4시간까지 각각 86, 70% 이상의 잔존 활성을 유지하였으나 60°C 4시간에서는 효소가 완전히 실활되었고,

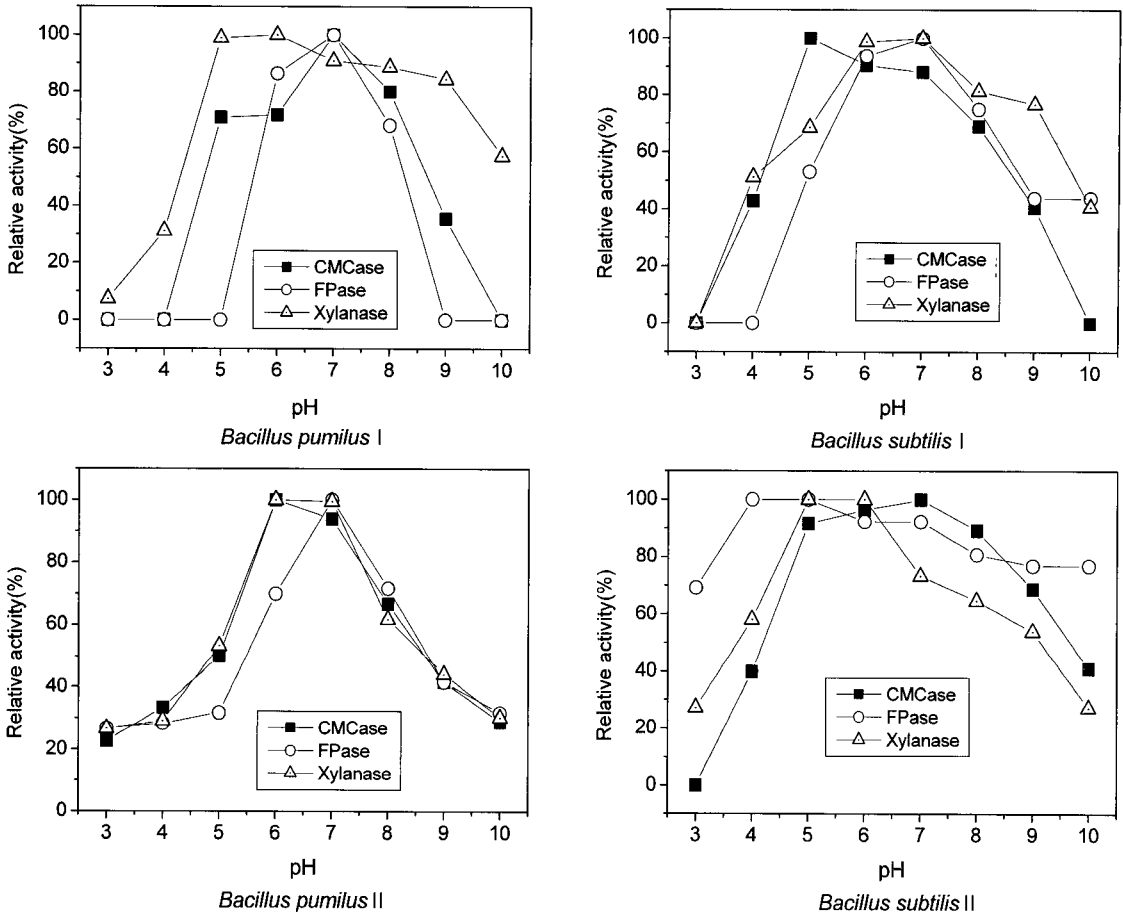


Fig. 3. Effect of pH on bacterial enzyme activities.

FPase는 60°C 2시간, xylanase는 50°C 4시간까지 비교적 열에 대한 안정성을 가지고 있었다.

그러나 김 등⁷⁾의 *Bacillus* sp.의 xylanase가 65°C에서 거의 10시간 동안 안정하였다는 결과 및 박 등⁸⁾의 *Bacillus* sp.의 xylanase가 80°C에서 30분 동안 50% 이상의 잔존활성을 나타낸 결과들과 비교한다면 본 연구에서 사용된 효소는 내열성을 지니고 있다고 할 수는 없었다.

3.3 pH의 영향

효소의 최적 활성 pH를 검토하기 위하여 최적 활성온도에서 pH 4.0~10.0의 CMCase, FPase, xylanase 활성을 측정하여 효소의 최적 활성 pH를 구명한 결과는 Fig. 3과 같다.

*Bacillus pumilus I*의 CMCase는 pH 5.0~8.0, FPase는 pH 6.0~8.0, xylanase는 pH 5.0~9.0에서 비교적 높은 활성을 나타내었고 CMCase와 FPase는 비교적 좁은 범위의 pH에서만 활성을 나타내어 이들 결과를 종합하여 볼 때 최적 활성 pH는 7.0이었다. *B. subtilis I*, *B. pumilus II*, *B. subtilis II*의 최적 활성 pH는 각각 7.0, 7.0, 6.0으로 효소마다 약간의 차이는 있었으나 전반적으로 중성 영역이었다.

3.4 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 효소액을 각각의 최적 활성온도에서 buffer 용액과 함께 1시간 정치한 후 잔존하는 CMCase, FPase, xylanase

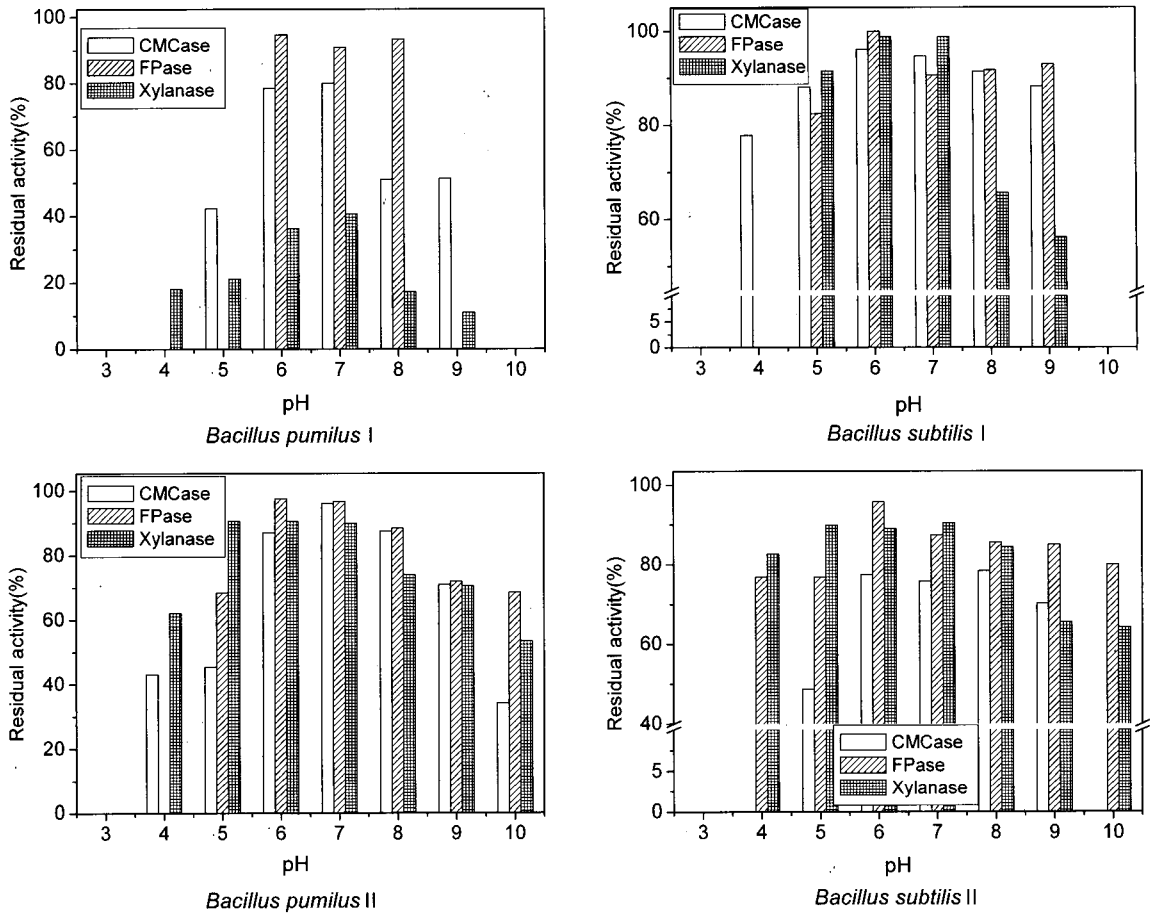


Fig. 4. Effect of pH on the stability of bacterial enzyme activities.

활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

Bacillus pumilus I 은 CMCase와 FPase의 경우 열과 pH에 노출시키지 않은 효소에 비교하여 pH 6.0~8.0 범위에서 각각 73.9, 90.9% 이상의 잔존 효소 활성을 나타내어 비교적 안정하였으나, xylanase는 전체적으로 40% 이하의 잔존 활성을 나타내었다. 이는 xylanase가 상기에서 기술하였던 바와 같이 열 안정성의 부족과 pH에 의한 실활의 결과인 것으로 사료된다. *B. subtilis I* 은 세 효소 모두 pH 5.0~9.0에서 비교적 안정하였고, *B. pumilus II* 와 *B. subtilis II* 는 pH 6.0~9.0에서 비교적 높은 잔존 활성을 나타내었다. 이 결과로 볼 때 이들 효소는 중성영역의 pH에서 안정성이 있다고 할 수 있다.

3.5 금속이온의 영향

효소의 금속이온에 대한 영향을 검토하기 위하여 최적 활성pH의 buffer 용액에 5 mM의 다양한 금속이온을 효소액에 첨가하고 최적 활성온도에서 1시간 정치한 후 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

Bacillus pumilus I 은 금속이온을 첨가함에 따라 CMCase는 활성이 억제되었고, FPase와 xylanase는 각각 Ca, Co, Fe, Mg, Zn와 Cu, Fe에서 효소활성이 상승되는 결과를 나타내었다. *B. subtilis I* 의 CMCase의 경우에는 Cu에서 127.6%로 가장 높은 상승효과가 있었고, FPase는 전체적으로 금속이온의 첨가가 효소 활성에 부정적인 역할을 하였으며 xylanase는 Co에서만 약간의

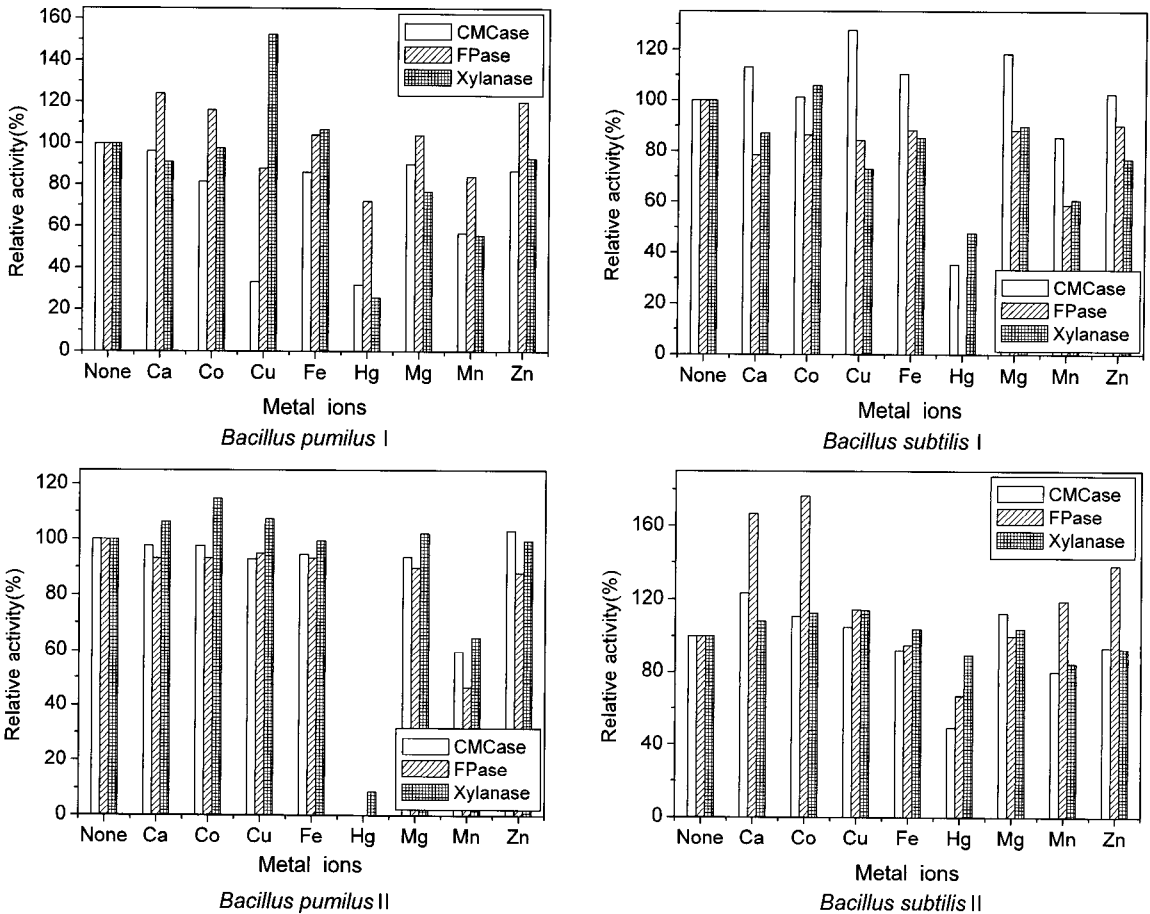


Fig. 5. Effect of metal ions on bacterial enzyme activities.

상승효과를 기대할 수 있었다. 또한 *B. pumilus* II는 CMCase와 xylanase에서 각각 Zn과 Co에서 가장 좋은 효과가 있었으나 FPase는 *B. subtilis* I과 마찬가지로 금속이온의 첨가 효과는 없었다. *B. subtilis* II의 경우는 CMCase, FPase, xylanase의 활성이 각각 Ca, Co, Cu에서 가장 좋은 효과를 나타내었다. 상기의 결과는 균주 및 효소마다 차이는 있지만 안 등⁹⁾의 *Bacillus* sp.의 xylanase에서 Co와 Cu에서 현저하게 효소 활성이 증가되었고, 배 등¹⁰⁾의 *Bacillus* sp.의 효소는 Mn과 Co에서 효소 활성이 증가되고 Hg에서 완전히 실패 되었다는 결과와 상당히 유사하였다.

4. 결론

4종의 박테리아가 분비하는 cellulase와 xylanase의 온도, pH 및 금속이온에 대한 활성과 안정성을 검토한 결과, *Bacillus pumilus* I, *B. subtilis* I, *B. pumilus* II, *B. subtilis* II 효소의 최적 활성 온도 및 pH는 각각 60, 40, 50, 50°C, pH 7.0, 7.0, 7.0, 6.0이었고, 50°C, pH 중성에서 비교적 안정하였다. 또한 금속이온으로는 균주와 효소마다 차이는 있으나 전체적으로 Ca와 Co가 효소 활성을 향상시키는 작용을 하였다. 따라서 향후 이들 효소를 이용한 탈묵은 50°C 내외, 중성영역의 pH에서 수행하는 것이 적절할 것으로 사료된다.

인용문헌

1. 한국제지공업연합회, 펄프·제지 및 목재이용과 지구온난화, 제지계 354: 17-22 (2002).
2. 강명규, 박희문, 이영하, 김윤석, 김여경, 호알칼리성 *Cephalosporium* sp. RYM-202가 생산하는 carboxymethyl cellulase의 부분정제 및 특성, 미생물학회지 21(4): 301-309 (1993).
3. Kim, D. S., and Kim, C. H., Production and Characterization of Crystalline Cellulose-Degrading Cellulase Components from a Thermophilic and Moderately Alkalophilic Bacterium, J. of Microbiology and Biotechnology 2(1): 7-13 (1992).
4. 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).
5. Johnvesly B., Virupakshi S., Patil G., Ramalingam N. and Naik G. R., Cellulase-free Thermostable Alkaline Xylanase from Thermopholic and Alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99, J. Microbiol. Biotechnol. 12(1): 153-156 (2002).
6. Kim, S. H., Cho, S. G., and Choi, Y. J., Purification and Characterization of Carboxymethyl Cellulase from *Bacillus stearothermophilus* No. 236, J. of Microbiology and Biotechnology 7(5): 305-309. (1997).
7. 김대준, 신한재, 민본홍, 윤기홍, 내열성 Cellulase-free Xylanase를 생산하는 고온성 *Bacillus* sp.의 분리 및 효소 특성, 산업미생물학회지 23(3): 304-310 (1995).
8. 박영서, 강미영, 장학길, 박귀근, 강종백, 이정기, 오탈광, Xylanase를 생산하는 내열성 *Bacillus* 속 균주의 분리와 효소생산 조건, 산업미생물학회지 27(5): 370-377 (1999).
9. 안준배, 박헌국, 이제호, Xylanase 생산성 *Bacillus* sp. GS의 분리 및 동정, 식품영양학회지 7(1): 8-15 (1994).
10. 배성호, 최용진, *Bacillus stearothermophilus* 가 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성, 산업미생물학회지 19(6): 592-597 (1991).