

과 메밀폐기물을 대상으로 분해능력을 검토하였고 3년차에는 쓰레기매립장의 폐기물과 감귤 및 당근 착즙액 중의 리그닌 분해 능력을 검토하였다.

실험에 사용된 사철느타리 균주는 패트리디쉬 PDA 배지에 접종하여 27°C에서 5~7일간 배양한 후 표면에 형성된 conidia만을 순수하게 분리하여 사용하였다. 접종방법은 분리한 conidia를 eppendorf tube를 사용해서 homogenizer를 이용하여 0.2g씩 취해 50g의 액체배지에 접종하였다.

lignin 분해정도를 측정하기 위해 농산부산물을 열풍 건조 후 기본 배지에 배지 전체 부피에 대해 폐기물을 1, 5, 7, 10% 첨가하여 배양하였다. 균사체 배양액과 상기 폐기물이 들어있는 flask를 진탕 배양기에서 200rpm, 27°C 에서 10일간 배양하면서 균사체의 변화량과 리그닌의 분해량을 측정하였다. 리그닌 분해량 측정은 flask 액체배지를 감압여과하여 폐기물과 균사체를 걸러내고, 걸러낸 균사체와 폐기물을 24시간동안 열풍건조시켰다. 건조시킨 균사체와 폐기물의 무게(A)를 측정하고, 72% 농황산을 각각 1, 5, 7, 10%를 섞어 상온(20°C)에서 4시간 동안 가수분해하였다. 여기에 농황산 혹은 증류수를 넣어 황산농도 3%로 희석시키고 상온에서 1시간동안 냉각시켰다. 냉각을 마친 가수분해액을 감압여과하여 갈색의 불용성 리그닌을 분리해 내고, 24시간동안 완전히 열풍건조시켜 무게(B)를 측정하였다. 이렇게 얻어진 값을 이용 증가한 균사체의 양과 분해된 불용성 리그닌의 양을 계산했다. 또, 균사체를 넣지 않은 각 폐기물별 리그닌의 함량을 동일한 방법으로 리그닌의 양을 측정하여 표준량(x)을 정하였고, 다음 식을 이용해 리그닌의 양을 계산하였다.

$$\begin{aligned} \text{증가된 균사체의 양}(X) &= \text{균사체와 폐기물의 건물중}(A) - \text{황산으로 가수분해시킨} \\ &\hspace{15em} \text{균사체와 폐기물의 건물중}(B) \\ \text{분해된 리그닌의 양}(L) &= \text{각 폐기물의 리그닌 함량}(x) - B \end{aligned}$$

또한 균체의 비 생육속도와 lignin의 분해속도는 다음의 식으로 구하였다.

$$\begin{aligned} \mu(\text{비 생육속도}) &= \frac{1}{X} \frac{d \ln X}{dt} \\ qs(\text{최대 리그닌 소비속도}) &= \frac{1}{X} \frac{ds}{dt} \end{aligned}$$

나. 사철느타리 버섯 균사체로부터 분리한 리그닌 분해효소의 리그닌 분해 능력

본 연구는 사철느타리 버섯 균사체로부터 분리한 리그닌 분해효소의 리그닌 분해 능력을 검토하기 위해 몇단계의 검토과정을 수행하였는데 단계별 수행방법을 기술하면 다음과 같다.

1) 사철느타리 버섯 균사체로부터 리그닌 분해효소의 분리를 위한 최적배양조건 구명

사철느타리 버섯 균사체로부터 리그닌 분해효소를 추출하기 위한 효율적인 방법을 구명하기 위해 균사체 액체배양시 pH, 온도, 탄소원을 다르게 하여 lignin 분해효소의 생산성 변화 등 최적배양 조건을 검토하였다.

2) 효소액의 조제

위 실험을 통해 구명한 최적조건을 이용 배양한 사철느타리 버섯 균사체를 원심분리를 통해 상등액을 0.2 μ m의 필터로 여과하고 이 여과액을 효소액으로 하였다.

3) 효소의 분리 및 정제

효소를 분리하기 위하여 CM-sepharose 이온교환수지를 pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0의 5mM sodium phosphate 완충용액으로 5회 세척하여 pH를 조절한 후 효소액을 50ml씩 가하여 혼합, 정치하여 상등액의 효소활성을 측정하고 결과 pH 6.8에서 가장 높은 흡착율을 보였다. 효소액으로부터 대상 효소를 분리하기 위하여 먼저 CM-sepharose 이온교환수지에 2배량의 0.2N NaOH를 가하여 반응시킨 후 과량의 증류수로 세척한 후 다시 2배량의 0.2N HCl를 가하여 반응시킨 후 과량의 증류수로 세척하였다. 10mM Na-K phosphate buffer를 사용하여 pH를 조절하여 활성화된 CM-sepharose를 1ml씩 시험관에 담아 활성화시키고 20mM 인산 완충용액(pH 6.0)으로 pH를 조절한 후 이온교환수지 250ml에 효소액 350ml를 가하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 교반하면서 동일한 인산완충용액 1l를 부가하였다. 그 후 정치하여 이온교환수지를 가라앉히고 상등액을 제거하였다. 활성을 나타내는 획분을 모아 다시 아세톤으로 침전시킨 후 20mM glycine-NaOH 완충용액 (pH 9.8)에 용해 후 동결건조하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

정제는 CM-sepharose 이온 교환수지를 사용하여 분리된 효소를 정제하기 위하여 gel filtration chromatography를 수행하였다. Toyopearl HW-55(fine, Toyo Soda, Tokyo, Jen)를 0.2 μ m 필터로 여과한 3차 증류수에 현탁시킨 후 정치하여 3회 decantation한 후 직경 1.5cm, 길이 40cm의 컬럼에 충전하고 4 $^{\circ}$ C에서 20mM glycine-NaOH 완충용액(pH 8.9) 1l로 세척한 후 CM-sepharose column chromatography에서 회수한 효소를 완충용액에 녹여 column에 loading한 후 동일한 완충용액으로 용출하였다. 각 획분당 5ml를 용출하여 280nm에서 흡광도를 측정하였으며 활성을 나타내는 획분을 동결건조하였다.

4) lignin 분해 정제효소의 특성 구명

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 배지의 pH 4-8로 변화시켜 정제효소액 50 μ l을 혼합한 다음 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치한 뒤 lignin을 1.0g/l로 첨가하고 25 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고, 효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해서 10 $^{\circ}$ C에서 80 $^{\circ}$ C까지 변화시키면서 30분간 반응시켰으며, 또한 본 효소의 열 안정성을 조사하기 위하여 40, 50, 60, 70, 80 $^{\circ}$ C에서 10~60분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

또한, 기질농도와 효소활성과의 관계를 검토하기 위하여 미리 조제된 lignin 시료를 $1.0 \times 10^{-5} \sim 2.0 \times 10^{-4}$ M까지 기질의 농도를 달리 하였을 때 효소활성 변화를 측정하고 결과를 바탕으로 Lineweaver-Burk plotting하여 Km값을 구하였다. 또한 정제효소의 활성도를 얻기 위해 Lineweaver-Burk 식을 사용해 기질 친화도 등을 확인하였다.

$$(1/V) = K_M/(V_{max}S) + 1/V_{max}$$

여기서 V는 효소의 반응속도 (g/day/l), V_{max} 는 최대 효소반응속도 (g/day/l), S는 기질인 lignin 농도 (g/l), K_M 는 기질 친화도 (g/l)이다.

5) 정제 효소의 활용도 실험

본 실험에서 분리한 효소의 실용성을 검토하기 위해 lignin이 많이 함유된 춘천 폐기물 처리소의 목질폐기물을 이용하였다. 고체 상태의 건조 폐기물 1kg당 정제효소 5g을 첨가하고 수분을 10%로 조절한 후 일반 교반기를 이용 실온에서 50-100 rpm 으로 7일간 교반하였다. 이후 분해된 폐기물의 무게와 lignin 분해 정도를 측정했다. 또한 본 효소의 식품 첨가제로 이용 가능성을 검토하기 위해 시판 밀감과 당근을 착즙 후 500 μ m로 1차 여과한 액을 시료로 했다. 이 착즙액 1kg 당 분말 효소를 2g씩 첨가해 25 $^{\circ}$ C에서 100rpm으로 교반하여 lignin 분해 정도 및 탁도 변화를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 사철느타리 버섯 균사체의 리그닌 분해 능력

폐기물의 첨가농도별 느타리 균사체의 성장량 및 리그닌 분해량을 조사한 결과는 <그림 1, 2>와 같았다. 복합폐기물을 5% 첨가하여 6일간 배양하였을 경우 사철느타리 균사체 성장속도가 9g/l/day로 가장 높았으며, 리그닌 분해속도도 균사체 성장속도와 비례하였다.

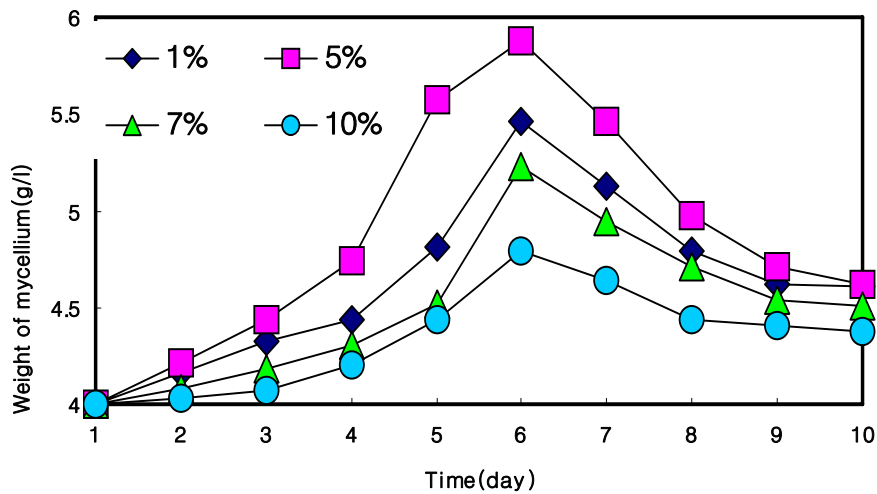


그림 1. 복합폐기물의 농도에 따른 사철느타리 균사체 성장량

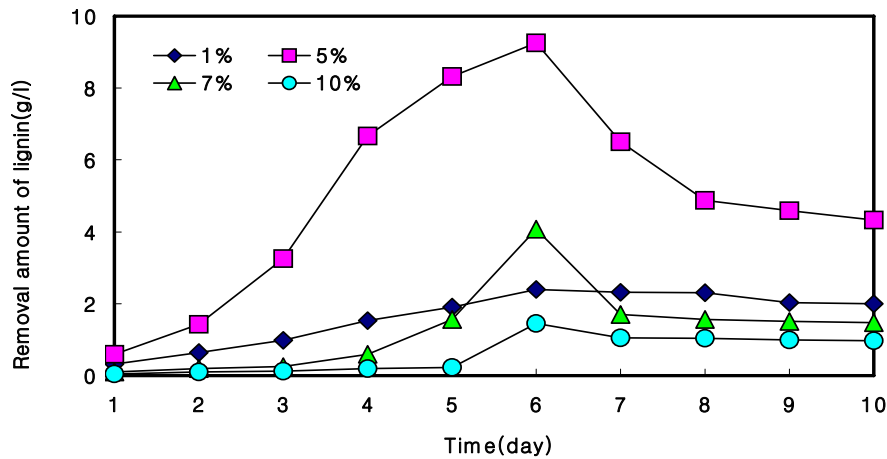


그림 2. 복합폐기물 첨가농도에 따른 리그닌 분해량

한편, 농산폐기물별 첨가농도에 따른 사철느타리 균사체의 생육속도를 비교한 결과는 <표 1, 2>와 같았다. 농산폐기물의 첨가농도가 높을수록 사철느타리의 균사체 성장 속도는 낮아 지는 경향이였으며 리그닌 분해속도도 같은 경향이였다. 한편, 폐기물 종류간에는 단일 폐기물보다는 복합폐기물에서 균사체 생육 및 리그닌 분해속도가 높았다

표 1. 농산폐기물별 첨가농도에 따른 사철느타리 균사체의 생육속도 비교 (ℓ/day)

폐기물첨가 농도(%)	인진쑈박	솔잎	메밀폐기물	Chinese matrimony vine	복합폐기물 ¹⁾
1	0.103	0.079	0.122	0.141	0.166
5	0.120	0.141	0.174	0.113	0.207
7	0.053	0.06	0.063	0.038	0.066
10	0.033	0.054	0.053	0.011	0.054

표 2. 사철느타리 균사체 배양에 의한 농산폐기물내 리그닌의 분해속도 (g/g day)

구 분	인진쑈박	솔잎	메밀폐기물	Chinese matrimony vine	복합폐기물
1%	0.093	0.105	0.110	0.108	0.103
5%	0.108	0.117	0.176	0.218	0.319
7%	0.037	0.038	0.053	0.110	0.127
10%	0.036	0.040	0.042	0.072	0.100

한편, 인진쑈박과 메밀폐기물만을 공시하여 균사체 성장량과 리그닌 분해속도를 정밀 검정한 결과도 <표 3, 4>와같이 폐기물 첨가농도 5% > 1% > 7% > 10% 순으로 균사체의 증가량이 컸다.

표 3. 인진숙박의 혼합농도별 균사체 생육 및 리그닌 소비속도 비교

폐기물 혼합 농도	리그닌의 양(g)		균사체 비 생육속도 (ℓ /day)	리그닌 소비속도 (g/day)
	초기량	잔류량		
1%	0.29	0.26	0.1413	0.14
5%	1.11	0.94	0.1127	0.12
7%	2.38	2.25	0.0383	0.07
10%	3.12	3.11	0.0107	0.01

표 4. 메밀폐기물 혼합농도별 균사체 생육 및 리그닌 소비속도 비교

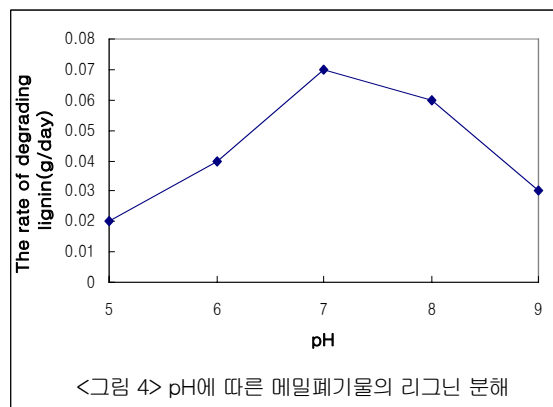
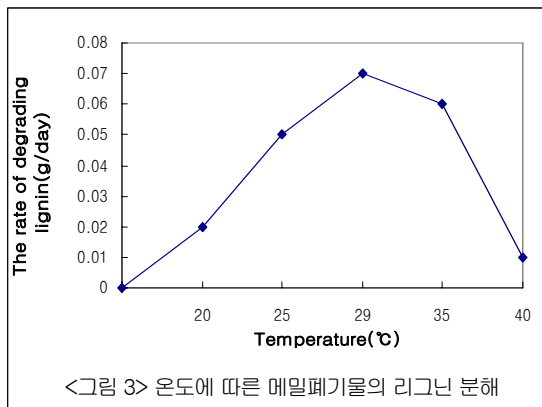
폐기물 혼합 농도	리그닌 양(g)		균사체 비 생육속도(1/day)	리그닌 소비속도 (g/day)
	초기량	잔류량		
1%	0.26	0.22	0.1655	0.16
5%	0.93	0.83	0.2065	0.34
7%	2.21	2.18	0.0663	0.19
10%	3.05	3.04	0.0537	0.2

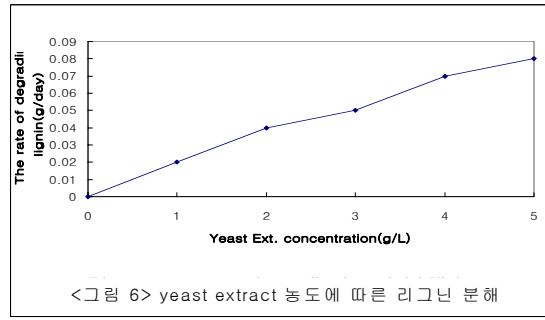
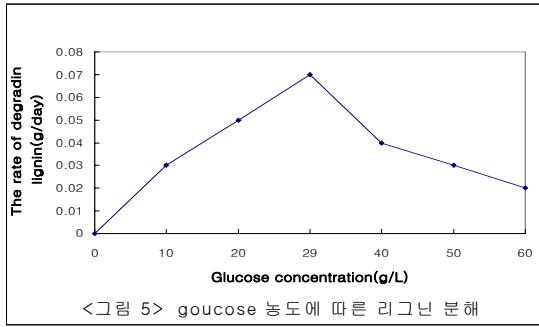
나. 사철느타리 버섯 균사체로부터 분리한 리그닌 분해효소의 리그닌 분해 능력

사철느타리 버섯 균사체로부터 분리한 리그닌 분해효소의 리그닌 분해 능력은 액체배양 후 원심 분리한 효소인 조효소와 정제과정을 거친 정제효소로 나누어 검토하였다.

1) 조효소액의 리그닌 분해 능력

조효소의 리그닌 분해능력인 최대 활성을 나타내는 조건 및 효소 특성을 확인하기 위해 온도, pH, glucose, yeast extract 첨가량의 영향을 검토한 결과는 <그림 3, 4, 5, 6>과 같았다. 온도는 29-30℃, pH는 7 부근의 중성, 그리고 배지조성 중 가장 중요한 탄소원인 glucose 농도는 30g/ℓ에서 최대치를 나타내었으며, 배지의 주요 미량원소 및 질소원인 yeast extract는 glucose와는 달리 yeast extracts의 농도가 증가할수록 lignin 분해 속도도 지속적으로 증가하는 현상을 보여 배지의 조성 중 단백질원 공급이 limiting step으로 작용할 가능성이 높은 것으로 나타났다.





2) 정제효소의 리그닌 분해 능력

리그닌 분해효소의 정제를 위한 CM-Sephrose Column Chromatography 결과는 <그림 7>와 같았다.

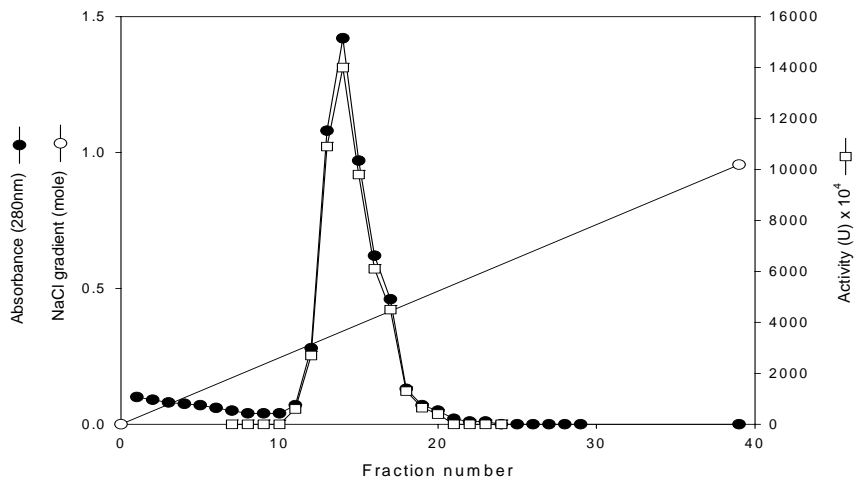


그림 7. 리그닌 분해효소의 순수 정제를 위한 CM-sepharose column chromatography

이 효소액으로 정제한 효소의 활성 검정결과는 <그림 8>과 같았다.

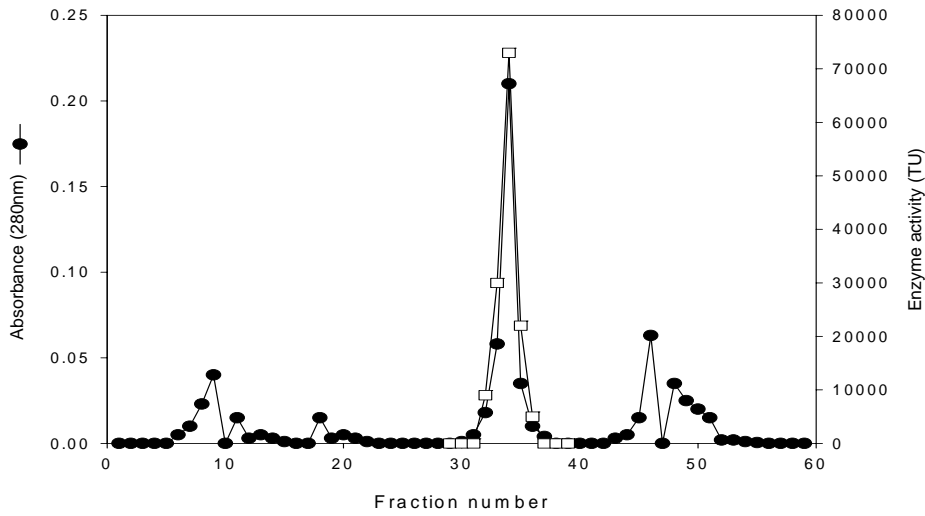


그림 8. CM-sepharose active fraction Gel filtration column chromatography

균사체 생육 및 효소생산에 관한 동력학적 실험을 한 결과는 <그림 9>과 같았다. 균사체의 생육은 접종 8시간까지 증가하여 정지기에 들어갔으며 그 이후에는 약간 감소하였다. 배지 pH는 최초 8.0 에서부터 점차 감소하여 pH 7.4 정도까지 감소하였으며 효소의 생산은 균체의 생육과 비례하는 양상을 보였다. 또한 실험방법의 배양조건을 바탕으로 5% 접종량으로 배양 8시간에서 최대활성을 얻었으며 이때의 배양액의 효소활성은 기본배지를 사용하였을 때보다 2배 이상의 효소 생산성의 증대를 보였다. 이로써 사철느타리버섯 균사체의 배양 상등액으로부터 효과적으로 다량의 효소를 얻을 수 있었다.

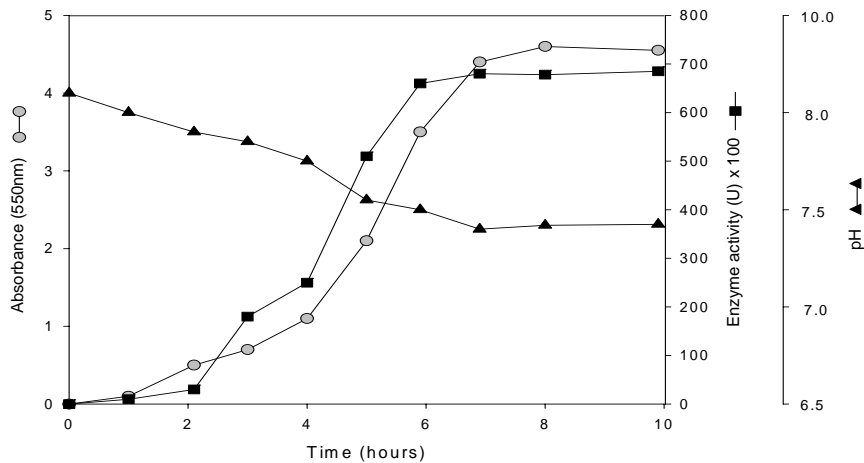


그림 9. 균사체 생육 및 효소생산에 관한 동력학

3) 정제효소의 안정성

본 효소의 pH 안정성을 pH 3~13 범위에서 조사한 결과는 <그림 10>과 같았다. pH

6.0 이하에서는 pH 감소에 따라 잔존활성이 급격히 감소하기 시작하여 pH 5.0 에서는 63%만 잔존활성을 나타내어 불안정하였으며 pH 7.5 ~ 10 범위에서는 안정성을 나타내었고 pH 11 이상에서는 불안정하여 활성이 저하되었다.

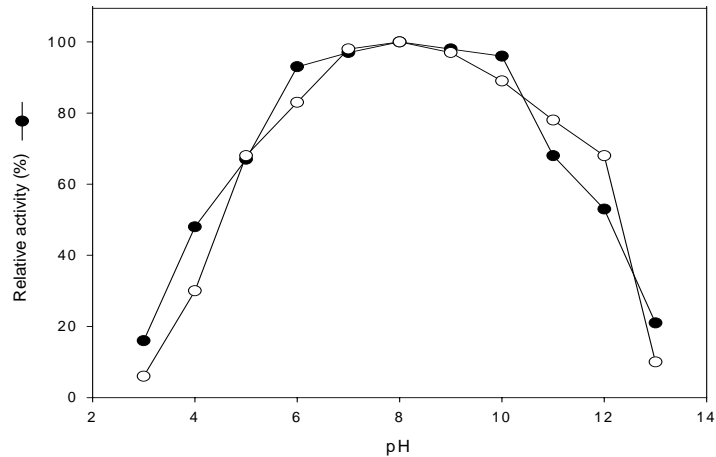


그림 10. pH가 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향

<그림 11>는 온도가 효소 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양온도별 효소의 활성을 측정하여 나타내었다. 이 효소는 25 ~ 27°C에서 최대의 활성을 나타내었으며 30°C에서는 80%, 50°C에서는 75% 정도의 활성을 나타냈으나 그 이하와 그 이상의 온도에서는 활성이 현저하게 저하되었다.

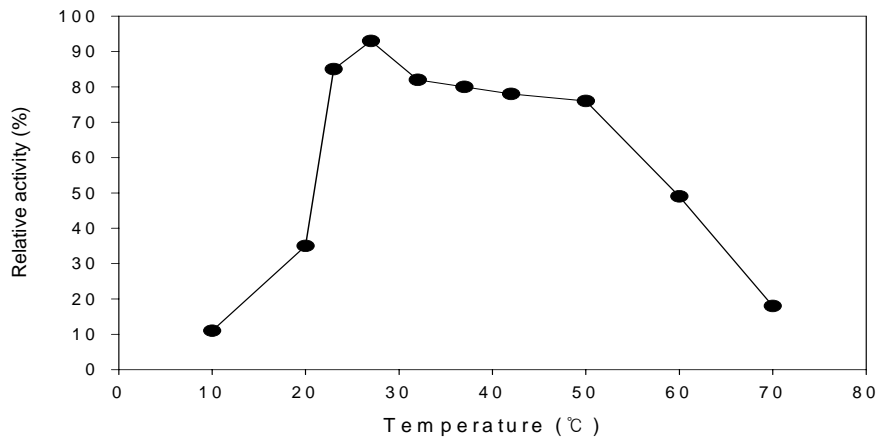


그림 11. 온도가 효소활성에 미치는 효과

4) 기질 농도에 따른 효소활성

또한 기질의 농도가 효소 활성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 lignin 농도를 달리하였을 때 효소활성 변화를 측정하여 후 Lineweaver- Burk plotting한 결과 <그림 12>과 같이 Km값으로 $4.8 \times 10^{-5} M$ 을 얻었다. 이 결과는 본 효소의 lignin에 대한 기질 친화력이 상대적으로 높은 것으로 생각되어진다.

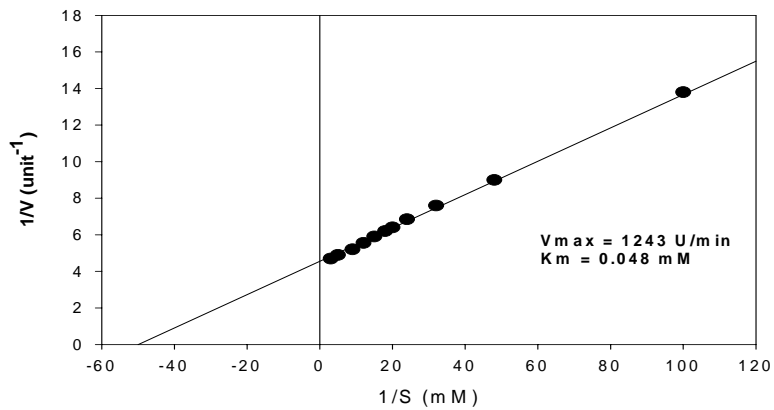


그림 12. 효소 동역학의 Lineweaver-Burk plot

다. 리그닌 분해효소의 실용성 검토

본 효소의 폐기물처리장의 목질폐기물 중에 함유된 리그닌의 분해능력을 검정한 결과는 <그림 13>와 같이 분해능력이 인정되었다.

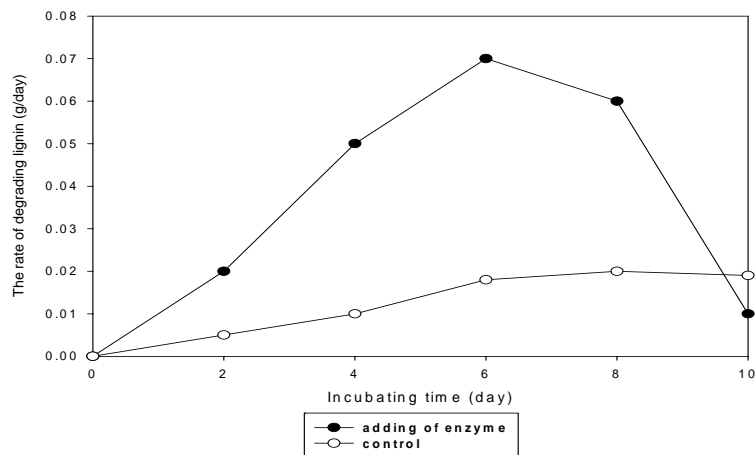


그림 13. 정제효소 투여시 폐기물 중 리그닌 분해

<그림 14, 15, 16>은 효소의 식품 첨가제로서의 가능성을 검토하기 위한 것으로 감귤 및 당근 착즙액에 본 효소를 처리한 결과 무처리에 비해 리그닌의 분해가 급격히 증가하였고 감귤 착즙액의 투명도 개선되었다. 이로써 본 효소가 쥬스 제조시 리그닌 분해를 통한 액상 천연 쥬스의 제품성 향상에 이용될 수 있을 것으로 판단되었다.

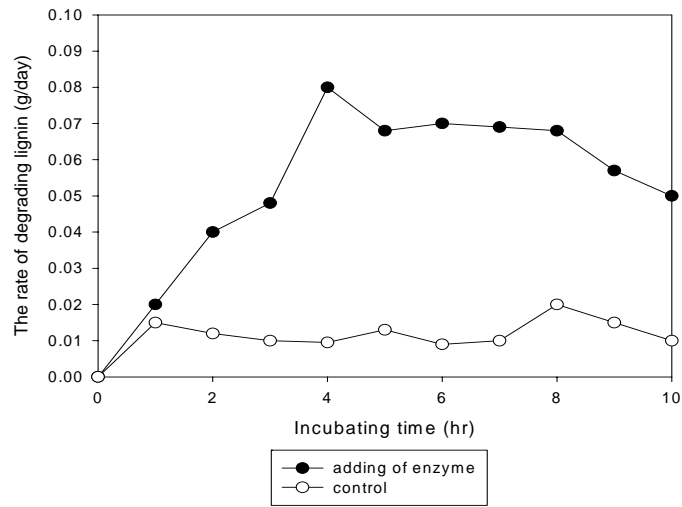


그림 14. 정제효소 투여시 감귤착즙액 중 리그닌 분해

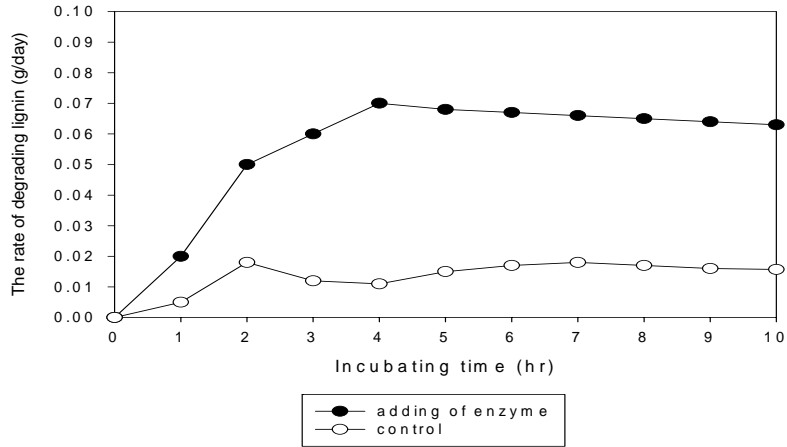


그림 15. 정제효소 투여시 당근착즙액 중 리그닌 분해

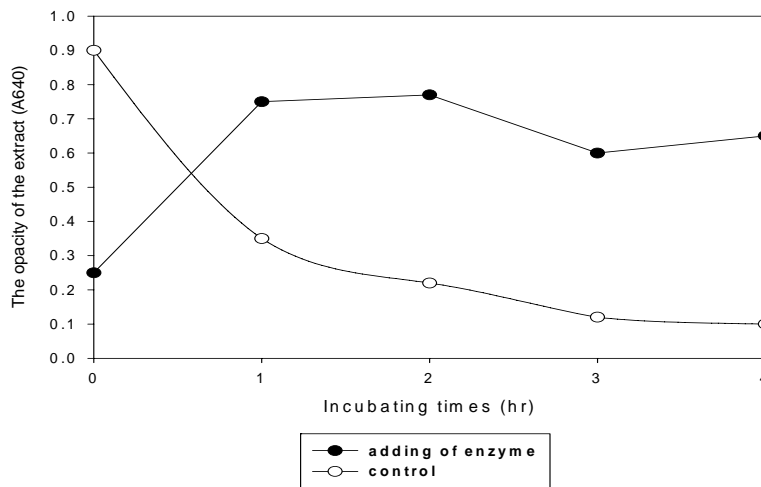


그림 16. 정제효소 투여시 감귤 착즙액의 투명도 변화

4. 적 요

본 연구는 리그닌 분해능이 우수한 백색부후균의 일종인 사철느타리버섯을 이용한 폐기물 및 식품 중 리그닌의 효율적인 분해기술을 개발하기 위해 실시하였는 바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 가. 복합폐기물(인진숙등 5종) 등을 농도별로 첨가하여, 사철느타리 액체배양시 폐기물 농도는 5> 1> 7> 10%의 순으로 균사체량과 리그닌 분해량도 많았다. 리그닌 분해효소는 균사체 생육과 함께 체외 생산되는 효소임을 알 수 있었다.
- 나. 사철느타리 액체배양에 의해 생산된 균사체로부터 원심분리에 의해 추출한 조효소의 농산 폐기물 분해를 위한 최대 활성조건은 온도 29-30℃, pH 7 및 글루코스 농도 30g/l였고 yeast extract의 농도가 증가할수록 리그닌 분해 속도도 지속적으로 증가하는 현상을 보여 배지의 조성 중 단백질원 공급이 limiting step으로 작용할 가능성이 높은 것으로 나타났다.
- 다. 조효소를 정제한 효소의 리그닌 분해 능력은 pH 7.5~10, 온도 25~27℃에서 활성이 높았다. 리그닌에 대한 효소 활성도를 평가한 결과, 기질인 리그닌에 대해 4.8×10^{-5} M로 상당히 낮은 K_M 수치로 계산되어 이 효소는 리그닌에 대한 친화도가 상당히 높아 그 활용 가능성이 높을 것으로 판단되었다.
- 라. 쓰레기 매립장의 폐기물을 대상으로 정제효소의 실용성을 검토한 결과, 무처리에 비하여 최고 5배 가량 빠른 분해 속도를 보였고, 과즙 음료 제조시의 첨가제로의 활용성을 검토한 결과, 제주산 밀감과 당근 착즙액 중 리그닌의 분해속도가 무처리에 비하여 최고 7~8배 증가하였고, 과즙음료의 탁도 개선에도 효과가 있는 것으로 나타나 금후 이 효소의 산업화에 대한 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

5. 인용문헌

- 김규중. 1995. 목재부후균의 리그닌 분해효소 생성조절. 한국과학재단.
- Glenn, J. K., M. A. Morgan, M. B. Mayfield, M. Kuwahara and M. H. Gold. 1983. An extracellular H_2O_2 -requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. commun.
- Kelley, R. I., K. Ramasamy and C. A. Reddy. 1986. Characterization of glucose oxidase-negative mutants of a lignin degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbial.
- Kersten, P. J. and T. K. Kirk. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase in extracellular H_2O_2 production by *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacterial.
- Kirk, T. K. and R. I. Farrell. 1987. Enzymatic "combustion" : the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbial.
- Paszczynski, A., V. B. Huynh and R. Crawford. 1986. Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Biochem. Biophys.
- Tien, M. and T. K. Kirk. 1983. lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. Science.