

제 3 차년도
최종보고서

섬유작물가공 초생력화 생물공정개발

Development of A Biological Plant Fiber
Processing System for Labor Saving

전남대학교 농과대학

농림부행정자료실



0005746

농 립 부

“ 가 ”
 .

1997. 9. 30.

∴
∴
∴
∴

I.

『 가 』

II.

, 가 가
 가 . 가 25
 가 .
 가 , 가
 , UR 가
 가 . , 가
 .
 2-3 가 .

III.

3	1	-
(1996)		- 가
		-
		-
		-
		-
	2	-
		-
		- 2 ()
		- , pH,
		- ,
	()	-
		-
		-
		- cutin
		-
		- 가
	가	-
		-
		-
		-
	3	-
	가	- 가 ,
		-
		-
		-
		-
		- 가
		-
		-
		- 3

IV.

-

1. (, ,)
- (, ,)
-
-

2. 130
- ATCC
-
-

3. pectinase cutinase
- .

4. .
- .
-

5. 가 () 液肥
- .

6. 가 가 가
pectinase cutinase
- .
- ()

-

1. 가 , 가 가 .
 가 가 1(D) X 1(W) X 3(L)m .
 가 30 가
 가 1-2 가 . 가
 가 가 .
 가 가 .

2. 가 가 가
 가 가 가 가
 가 가 가
 가 가 가
 ()

3. 가 가 가 . 가
 가 가 가 가
 .
 .

4. 가 가 .

Summary

Development of a biological plant fiber processing system utilizing several microorganisms and their hydrolases have been tried for the purpose of saving labors and attaining high quality fibers from hemp rames and chinese jute.

Local lines of hemp and ramie were collected and investigated for the characters such as stem length, stem thickness, fiber length and fiber yield. For the 19 lines of hemp, days to flowers, sex ratio and fiber yield in relation to sowing date were checked and several processing lines were selected on the basis of fresh and dry crude fiber yields and the suckers were planted outdoor as well as under tunnel to secure the establishment. In order to acquire the microorganism strains that have excellent property to refine the plant fiber, 2600 samples of bacteria and fungi were collected throughout the contry. A preliminary screening based on their ability to degrade pectin or gum result in 1.3×10^6 selected colonies from which 1,250 colonies were selected. Out of these 65 strains. 12 strains that result in high yield of good quality fibers from hemp and rames. Practical application of these strains for processing hemp and ramie fibers has been confirmed. The effective enzymes selected by those microorganisms were purified and their monoclonal antibodies were constructed.

A farm house model for biological plant fiber processing system has been designed and a farmers field trial on chinese jute cultivation was carried out.

1. Clarification of Cultural characteristics of fiber crops such as hemp, ramie and jute.

Survey of the area growing hemp and ramie in Kangwon, Kyoungbuk and Chonnam provinces.

- Collection of local_linesof each fiber crops and their characterization mainly on fiber yield
 - Test of the response to microorganismes treated for fiber isolation by growing season and harvest time
2. Screening and identification of excellent microbial strain for fiber isolation
 - A total of 1,300,000 microbial collection have been screened for the purpose .
 - A few selected strain were proved to be far superior to ATCC strain from comparative characterization. Commercial application of the selected microbial strain was confirmed from bioassays with fiber crops.
 3. The selected strains were enzymatically characterized and the enzymes selectively digest cortical tissues were purified. pectinase and cutinase were purified and amino acid sequence of their enzymes were elucidated
 4. Simplification of the biological plant fiber processing system and proof its practical use. The possibility of fiber isolation without complex facilities was confirmed.
 - The structures for growing fiber crops and collecting microorganisms were set up on the spots and operated in collaboration with farmers.
 5. From the biological fibers, after isolating fibers the by products such as the inner stems and waste could be used as fillers and fertilizer, respectively, since any chemical compound was not added during the process.
 6. The microbial collection for their nature easily mutated and often consist of strains that secrete enzymes digesting cellulose. The pectinase and cutinase from the cellulase-producing strains were purified to acquire the genes for their enzymes.

The genes for pectinase and cutinase which are necessary for fiber isolation were isolated from the selected microbial strains and transformed to Escherichia Coli. Therefore the Transformed E.coli as well as the selected wild strain can be used simultaneously for commercial fiber processing.

It has been confirmed that the newly developed biological processing system can save labors and give high yield or good quality fibers so that it can be applicable to the processing of plant fibers such as hemp.

Contents

Chapter 1. Introduction -----	1
1. A goal of reserch -----	1
2. A background of reserch -----	8
Chapter 2. Techniques of Breeding and cultivation -----	10
1. Remarks -----	10
2. Results of experinents -----	11
Chapter 3. Screen of microorganism -----	18
1. Remarks -----	18
2. Results of experinents -----	20
3. Results and discussions -----	23
Chapter 4. Biological plant fiber processing system -----	34
1. Remarks -----	34
2. Results of experinents -----	36
3. Results and discussions -----	41
A supplement -----	57

1	-----	1
1 :	-----	1
2 :	가 -----	8
2 :	-----	10
1 :	-----	10
1 :	-----	11
3 :	-----	18
1 :	-----	18
2 :	-----	20
3 :	-----	23
4 :	-----	34
1 :	-----	34
2 :	-----	36
3 :	-----	41
	-----	57

1

1 :

1.

가.

1. 2

2

가

1 3

21

가

2.

가

-

:

,

,

가

3.

가

가

가

가가

가

가

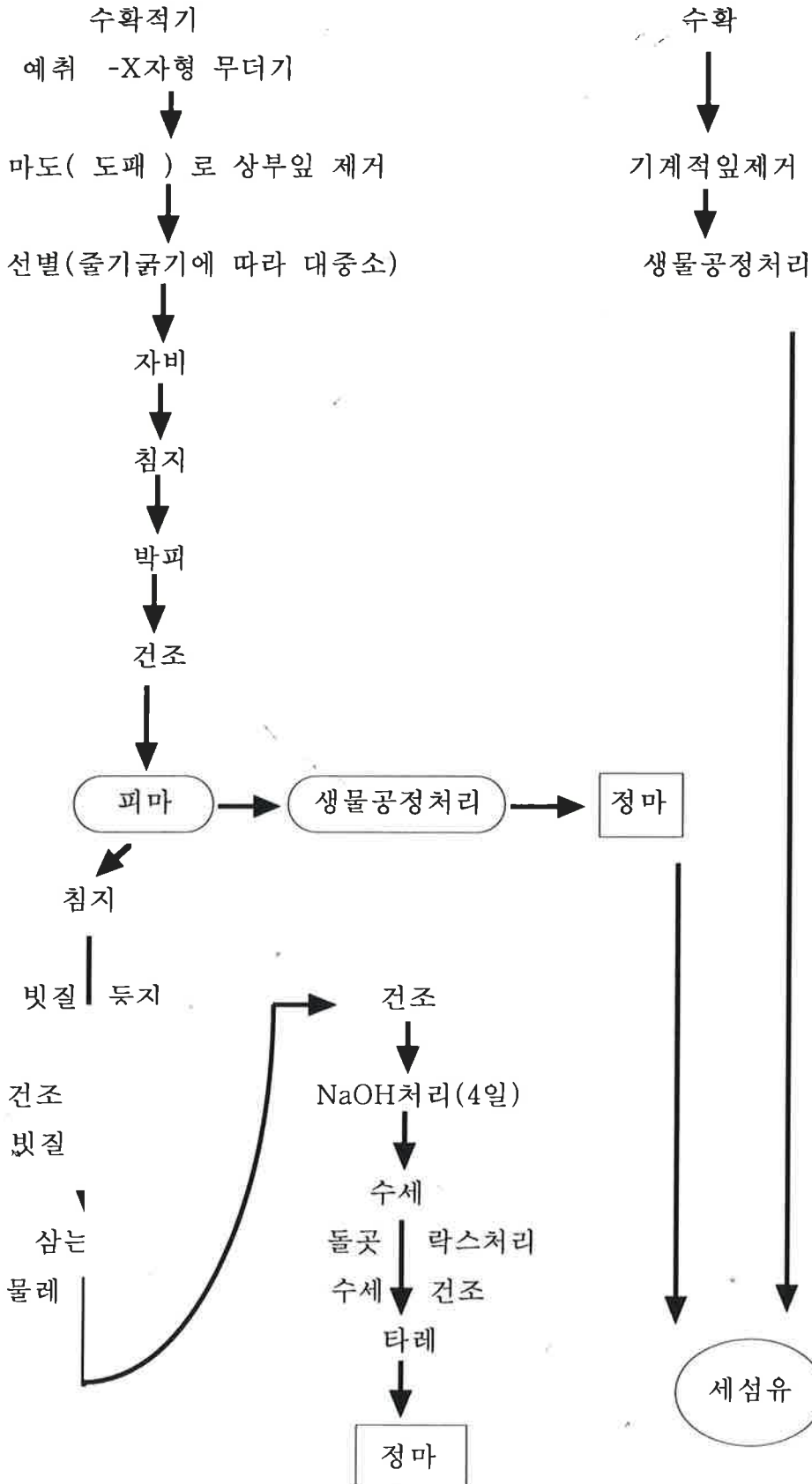
.

가

가

○ 전통적 대마 가공

○ 개발 내용과목표



. .

1. 2 .

가 가 2 가 가 .

2. 가 .

가 가 100% 가 .

3. , .

가 가 10 .

(1)	180,000 - 1,000,000	30,000 - 50,000
(1)	250,000 - 900,000	40,000 - 60,000

94

가 .

가 .

93	8400	24,000

4. 가 .
가 가 가
가 가 가

5. 가 가
가 가 3
가 가

가 , .

가 가 가
가 가 .
6. 가
가
1000ha 가 90ha

7. 가

가 가 가 가 가

1. 가 , 가 . 가 . 가 . 가 . 가 . 가 .

	140,000 ()	520,000 ()

가 ()

	가					
	201,900Kg	40,740Kg	242,640Kg	13,470	12,080	25,550
(%)	83.2	16.8	100	52.7	47.3	100

83.2%

가

2. 가 .

가

	, , 가
	, ,
	- , ,
,	
	(가)

3. ,

가

가 .

4.

non quota

가 100% 가가 .

5.

가 가

가 .

6.

- 3 . 가 가 kg 가 1.5
 가 가
 가 가 .

7.

가 .

Ewinia subsp.

Bacillus

가

가

가가

8.

1 1

50 가

가 1 1

1 가 가

가

가 (40)

	1967	1989	1992
(ha)	6,000	147.3	150
(M/T)	7,337	230	256.5

* 30%

9.

가 .

10.

가 가 . 가

11.

.- THC

2 : 가

: 가 , 가

; -

25

: , ()

:

5

:

(1)	3	1	
	5	-	
	7	-	
	3	3	

: -

- 1)
- 2) 가가
- 3)
- 4) 2

-

:

1	- , , , (pectin, gum)
2	- - 가
3	- 7 가 (cutin) - 가

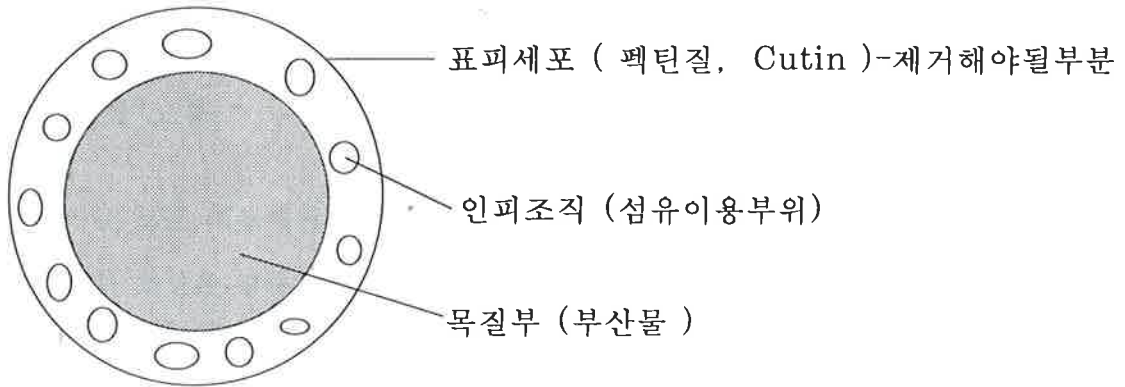
제 2 장 : 육종, 재배기술개발 분야

제 1 절 서설

현재까지 재배되는 섬유 작물은 전통적인 가공 방법을 전제로 한 재배의 수준에 머무르고 있다고 할수 있다. 본 연구에서 대상으로 하는 대마, 모시, 청마는 우리나라의 대표적인 섬유 작물이다. 단지 청마의 경우 우리나라에서 재배면적이 많지 않다.

그러나 모시와 대마는 아직도 재배면적이 상당히 많으며 가공 품이 전술한바와 같이 가격이 상승되고 있는 실정이다. 따라서 초생력화 방법의 개발을 위해서는 이러한 개발될 방법을 적용했을때의 우량섬유 생산을 위해서 이에 대한 재배적인 연구가 필수적으로 동반되어야 한다. 이 3 작목은 다같이 섬유구성에 있어서 인피조직을 이용하는 동질성을 가지고 있다. 즉 표피층, 인피층, 목질부의 3부로 이루어져 있으며 우리가 섬유로 이용할때는 표피와 인피층의 주 성분인 펙틴과 gum 및 cutin층의 불순물질을 제거하고 나머지 인피세포층을 섬유로서 이용한다.

식물섬유 즉 대마의 섬유구조는 대체로 다음그림과 같이 구성이 되어있음



3

이러한 섬유의 조직의 구조를 가지고 있는 대마의 파종과 수확시기별 섬유의 성장과 섬유로 이용가능한 시기 및 생물공정에서 반응성 정도를 조사하였다. 그결과는 대체로 일반적으로 수확적기라고 하는 시기보다 1주일 이상 앞당겨 수확도 가능함을 확인하였다.

2

1.

1.

2.

가. : , , ()

. (.) : 3 . 10 , 20 , 30

. : 30x5cm

. (kg/10a) : N-P205-K20- = 10-6-5-800

. : 1000

3

3.

가. 8 5 7 20 .

. 가 .

. 가

. 가 .

. 3 20

7 15 .

< 1.>

Region of collected		Stem		Yield Kg/n ²	Land of cul t.	Sex ratio(%)			()
Rig.	Vir.	Length	Di an.						
	Chungsun I	265	1. 88	3. 8	U	58	42	++++	8. 2.
	Chungsun II	287	1. 9	3. 5	U	65	35	+++	8. 3.
	Chungsun III	291	2. 1	3. 7	U	56	44	++++	8. 4.
	Chungsun IV	274	1. 85	4. 1	U	61	39	++++	8. 4.
	Chungsun V	267	1. 96	3. 9	U	66	34	+++	8. 3
	Sanchuk I	245	1. 75	2. 8	U	67	33	++++	8. 3.
	Sanchuk I	267	1. 64	3. 6	U	58	42	+++	8. 4.
	Sanchuk I	278	1. 88	3. 2	U	55	45	+++	8. 2.
	Sanchuk I	256	2. 1	3. 1	U	49	51	++++	8. 5
	Sanchuk I	253	1. 8	3. 3	U	56	44	+++	8. 3
	Andong I	288	1. 6	3. 6	L	57	43	+++	8. 7
	Andong II	302	1. 9	3. 1	L	55	45	+++	8. 6
	Andong III	289	1. 95	3. 7	U	50	50	++++	6. 5
	Andong IV	312	1. 87	3. 4	L	63	47	++++	8. 5
	Andong V	316	2. 0	4. 1	L	56	44	++++	8. 4
	Whasoon	304	2. 7	4. 1	U	48	52	+++	8. 7
	Bosung I	298	2. 5	3. 5	U	52	48	+++	8. 6
	Bosung II	299	2. 6	3. 3	U	53	47	+++	8. 5
	Bosung III	305	2. 55	3. 8	U	49	51	+++	8. 6
	Koheung I	320	2. 8	3. 6	U	61	39	+++	8. 1
	Koheung II	305	2. 2	3. 7	U	64	36	+++	8. 9.

3 10 .

U= , L= , ++++ = 48

+++ 72 .

. 3 90%
 3 25 3 10 -15 ,
 6 25 7 30 8
 72 .
 가 가 .
 가 10
 5% . 10
 12 . 가 .
 2 가 3 가
 2 가 , 3 10 20 가
 2 가 가 가 가 가
 가 가 가 가 가 가
 2 가
 2
 3 가 가 가 가
 가 가 가 가 가
 가 . cutin 가 가 가 cutin

< 2 >

Ri gion of Collet	Stem length	Stem colour	Pectinase effect		cutinase*	
			1st Harvest	2nd Harvest	1st Harvest	
1	()	141	DG	++++	+++	78
2	()	143	DG	+++	+++	82
3	()	148	IG	+++	+++	78
4	()	171	G	++	++	72
5	()	165	G	+++	++	78
6	()	140	G	+++	++	86
7	()	147	G	++++	+++	72
8	()	143	G	++++	+++	68
9	()	153	G	++++	+++	72
10	()	170	GL	++++	++++	78
11	()	153	G	++++	++++	72
12	()	165	G	++++	++++	68
13	()	157	G	++++	+++	78
14	()	143	G	++++	+++	68
15	()	138	G	++++	++++	68
16	()	142	IG	++++	++++	82
17	()	157	IG	++++	+++	68
18	()	149	IG	++++	+++	72
19	()	165	DG	+++	+++	78
20	()	153	DG	+++	+++	78
21	()	147	DG	+++	+++	86
22	()	155	DG	+++	+++	82
23	()	134	DG	+++	+++	78
24	()	156	G	+++	+++	68
25	()	137	G	+++	+++	72
26	()	140	G	+++	+++	81
27	()	139	G	+++	+++	72
				+++	+++	
				++++	+++	

* - cutinase recombinant E coli

** cuticle

()	(kg/g)	(cm)	(mm)	(%)	(kg/10a)					
3. 10	1. 5	278	10. 5	5. 8	165	100	100	92		
		279	11. 0	6. 1	178			99		
		281	9. 5	6. 3	179			100		
		279	10. 3	6. 0	174					
	3. 0	271	10. 2	5. 8	168				98	
		268	10. 5	5. 6	171				100	
		265	9. 6	5. 4	167			100	94	
		268	10. 1	5. 6	169					
	4. 5	251	9. 8	5. 1	165					96
		234	9. 4	5. 6	171					100
		228	10. 2	4. 9	169				99	
		238	9. 8	5. 2	168			100		
3. 20	1. 5	311	10. 8	6. 4	178	100	100	98		
		308	11. 2	5. 8	181			100		
		289	12. 2	6. 2	172			95		
		303	11. 4	6. 1	177					
	3. 0	271	10. 1	5. 1	168				98	
		288	10. 5	6. 2	172				100	
		272	9. 9	5. 3	167			100	97	
		277	10. 2	5. 5	169					
	4. 5	271	9. 8	4. 9	164					99
		254	8. 9	4. 8	161					97
		261	10. 0	5. 4	166			100	100	
		262	9. 6	5. 0	164					
3. 30	1. 5	258	10. 1	5. 1	161	100	100		100	
		261	10. 5	4. 9	158				98	
		244	9. 4	4. 8	149			94		
		254	10. 0	4. 9	156					
	3. 0	254	9. 6	4. 2	151				100	
		239	9. 5	4. 1	141				93	
		227	9. 4	4. 5	138			100	91	
		240	9. 5	4. 3	143					
	4. 5	225	9. 2	4. 4	129					100
		210	8. 9	4. 2	120					93
		207	9. 1	4. 0	109			100	85	
		214	9. 1	4. 2	119					

3

가

가

가

가

가

가

가

3

3

1.5kg

4.5 kg

3

20

가

가

가

o a

4

3가

3 20

3 30

가

6 25

10

가

가

3

7

3

가

가

가

가

2-3

가

가

가

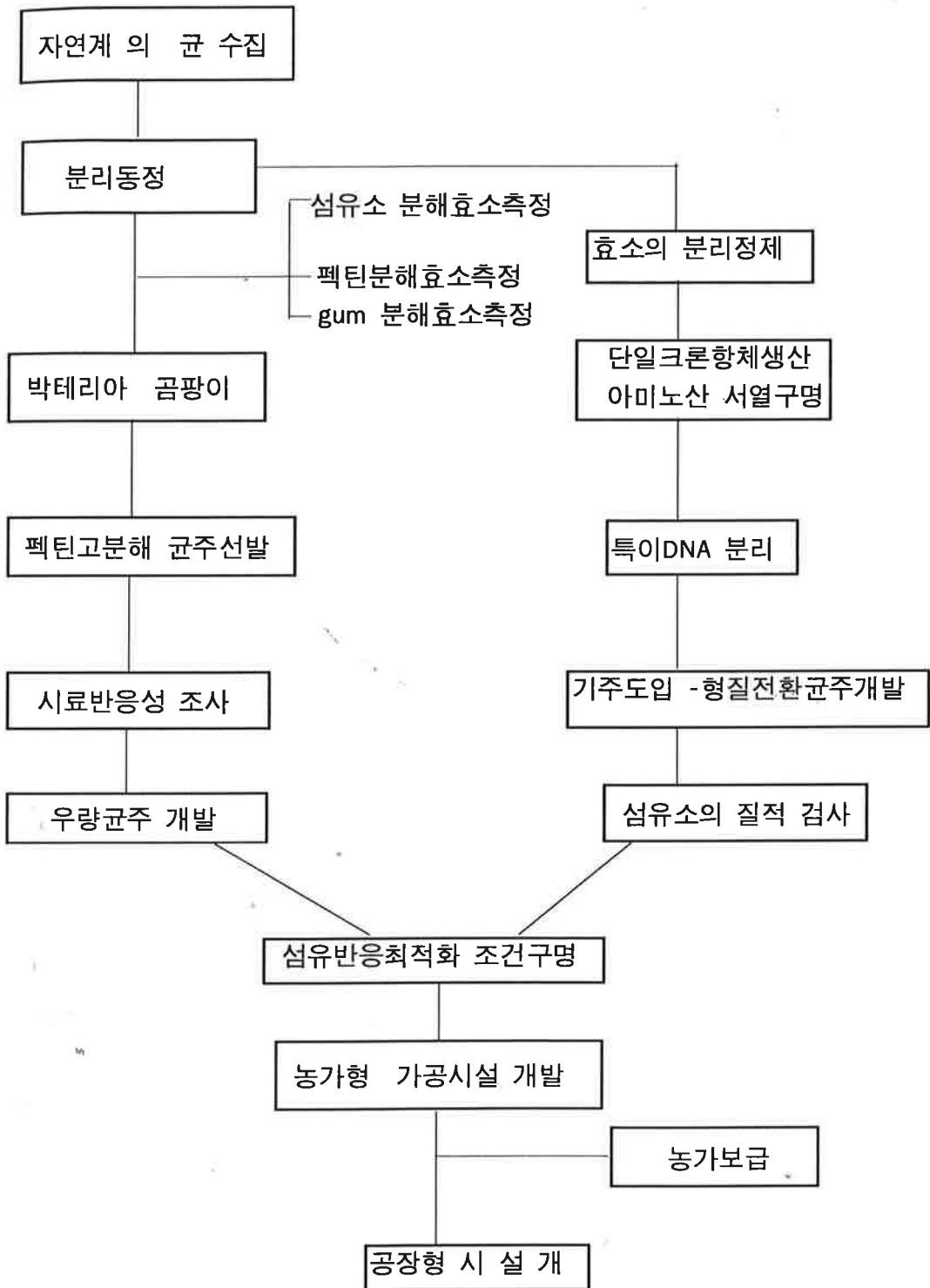
가

가

가

()	(kg/g)	(cn)	(mm)	(%)	(kg/10a)			
3. 10	6. 25	288	10. 9	5. 0	165	100	100	95
		290	10. 0	5. 6	173			100
		289	9. 6	5. 3	172			99
		289	10. 1	5. 3	170			99
	7. 5	291	10. 2	5. 6	170			99
		298	10. 5	5. 4	171			100
		295	10. 6	5. 8	167			96
		295	10. 4	5. 6	169			100
	7. 15	301	10. 8	5. 8	165			92
		294	10. 4	5. 7	178			99
		288	10. 2	5. 9	179			100
		294	10. 6	5. 8	174			100
3. 20	6. 25	276	10. 6	6. 0	164	100	100	96
		278	11. 0	6. 0	171			100
		289	10. 2	6. 3	165			96
		279	10. 6	6. 1	165			100
	7. 5	271	10. 1	6. 1	172			100
		288	10. 5	6. 2	168			98
		272	10. 9	6. 3	167			97
		277	10. 5	6. 2	169			100
	7. 15	271	10. 8	5. 9	170			98
		284	10. 9	6. 8	172			99
		291	10. 0	6. 4	174			100
		282	10. 6	6. 4	172			100
3. 30	6. 25	248	10. 1	4. 7	161	100	100	96
		271	10. 5	5. 1	158			95
		264	9. 4	5. 2	167			100
		261	10. 0	5. 0	162			100
	7. 5	251	9. 4	4. 5	163			97
		242	9. 6	4. 1	161			96
		221	9. 2	4. 2	168			100
		238	9. 4	4. 3	164			100
	7. 15	225	9. 0	4. 0	169			100
		210	8. 8	4. 6	160			95
		207	10. 1	4. 0	160			95
		214	9. 3	4. 2	163			100

개발 전략의 도식



2

1.

pectin gum

가 가가

2.

- 가. :

ATCC KTCC

- . :

- (1) 3
- (2) 5
- (3)

가 0.85% saline 50ml 가 4C 5g
 pectin 48 30C plate 100
 ATCC KTCC
 cellulose 가
 uase pectinase cellulase cell

Nutrient agar plate

agar 2% glass rod spreading beaf ex-
 tract 3g, peptone 5g

Nutrient pectin media

pectin 0.5%-2% 가 .

M9/ pectin media

Mininal salt M/9 pectin 0.5% 가 pH

CVP media (crystal violet bulner pectate media)

Erwinia sp

gran-negative, gran-positive

No-

vobicin .

crystal violet

가 .

Pectin media

polygalacturonase

30C 48

plate가 0.5cm hole
ruthenium red

clear zone .

PDA media (potato-dextrose agar)

fungi .

Citrate / pectin media

Sinon 동 citrate media (Difco) 1%pectin 가 .

blue color indicator가 .

-

plate

bronthynol blue 0.08% 가 a-
crystal violet, ruthenium red

Ikali blue .

(1).

200µg/100µl (0.9% saline + Freund 동 complete adjuvant,

FCA) 8 Balb/c 10 2, -3 3 50ug 가

. 8 RIA ELISA 가 .

(2).

Koehler & Milsten

Balb/c (1.5 * 10⁸) myeloma (1.5 * 10⁷)
 50% polyethylene glycol (Gibco, MW 4000, 37 °C) 1ml
 hybridoma 10% FCS-RPMI 1640 2 PEG

(3).

hybridoma cell 20%FCS-RPMI 1640-HAT 가
 96 well plate 1*10⁵/well/myeloma 가 . 2 HAT
 가 HT10% FCS RPMI1640
 . 2 hybridoma well plate 1/3 2
 4well plate 2 가 가 6
 well 25cm² flask .
 MEM- Na- gentamycin, peni-
 cillin, streptomycin .

(4). Hybridoma

가 . 가 IgG(anti mouse IgG
 antibody) capture antibody (cAp) antinouse IgG-alkaline phosphatase
 .
 가

(5). (Ascitic fluid)

가 hybridoma 0.5
 pristane 1 Balb/c mouse 1*10⁷
 1 가 protin A-Sepharose 4B column
 chromatography . -70°C

(6). Double immunodiffusion

가 antinouse IgG, IgA, IgM IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3
 Ouchterlony class subclass .

(7). -alkaline phosphatase(AP)

COOH carbodiimide .
 (10umol) 0.2ml (1:1, DMF : H₂O) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)
 carbodiimide. HCl(EDC, 15umol) 가 pH6.4 1 25°C
 . 0.1ml alkaline phosphatase(1ng protein) 가 90
 1°C 5 . (TBS; 50mM tris, 1mM MgCl₂, pH 7.5)
 3 30% glycerol -30°C .

(8). hybrida

medium 가 . 10% DMSO가 cryogenic

3.

1)

< 5 >

		1, 2	3	
I.	,	125	87	가
II.		83	28	가
III.	, ,	328	125	,
		536	240	

가 . 3 cutin

1 2 pectin .

70

가

< 6 >

(3)	,	1, 2
(1)	,	
()	,	

2)

cuticle

21

.

< 7 >

21

No.	Descrip.	1%pectin activity	Colour	Growth speed	Enzyne activity		
					PGA	EPG	PL(dia,)
1	2-001	++	w	+			17
2	3-1671	++	y	+			17
3	24-007	++++	w	+			20
4	25-125	++	w	++	20	18	
5	28-883	+++	w	++	18	16	
6	H63	++++	y	+			20
7	H64	++++	y	+			20
8	G65	++++	y	+			20
9	I-129	+++	I	+			16
10	XI-249	++	y	+			11
11	II-250	++	y	+			14
12	II-267	++++	y	++			16
13	294	++	w	+			15
14	373-23	+++	w	+++		12	10
15	422-123	++++	w	+++	20	16	
16	423-287	++++	w	+	20	16	
17	622-11	++	w	+			18
18	B8	++	y	+++			18
19	B21	+++	y	++			19
20	B130	++	I	++			23
21	C64	++++	I	+			16

: ++ 80% , +++=95% , ++++ 100%

: + , ++, , +++, .

: w, , y , , I, .

No.	Descrip.	Type	Vari,	Requir. of Nutrient	Optimal		
					pH	Temp.	Media
1	2-001	b(bacte.)	Bacillus	P(pectin)	7.2	25	n(nin.)
2	3-1671	b		p	7	25	m
3	24-007	b	Bacillus	.	6.5	25	b(broth)
4	25-125	y(yeast)	Pseudo.	p	4.5	30	pda
5	28-883	b		p	5	35	m
6	H63	b		b	6.5	30	np
7	H64	b		p	7.5	25	m
8	G65	b	Bacillus	p	5	25	b
9	I-129	b			8.5	30	b
10	XI-249	b			7	30	b
11	II-250	b			9	25	m
12	II-267	b			6	30	m
13	294	b	Bacillus		6.5	25	m
14	373-23	b		p	7	25	m
15	422-123	b	Pseudo		6	25	m
16	423-287	b			4	30	m
17	622-11	b			7	25	b
18	B8	f (fungi)	Aspergi.	p	5.5	25	pda
19	B21	f			6.2	30	pda
20	B130	f			5	30	pda
21	C64	f			8	25	pda

가

marker

가

($\mu\text{mol}/\text{ng}/\text{min}$)

No.	Descrip.	Cellulase	proteina se	Cutinase	Pectinase	
					lyase	esterase
1	2-001	n	n		17.5	3.2
2	3-1671	n	n		7.8	12.4
3	24-007	n	n		6.5	7.8
4	25-125	n	n	23.8	24.9	1.2
5	28-883	0.085	n		22.3	0.6
6	H63	n	0.023	15.7	8.7	8.7
7	H64	n	0.10		9.8	0.2
8	G65	n	n		8.8	12.4
9	I-129	n	n		7.5	15.6
10	XI-249	n	n		6.5	7.8
11	II-250	0,04	n		5.5	11.2
12	II-267	n	n		9.8	24.5
13	294	n	n		12.5	19.2
14	373-23	n	n		21.3	22.7
15	422-123	n	n		6.6	13.2
16	423-287	n	0.05		7.2	34.7
17	622-11	n	n	4.8	5.9	2.5
18	B8	n	n	17.5	13.5	2.3
19	B21	n	n	23.4	21.1	1.7
20	B130	0,06	n	356.5	2.9	6.3
21	C64	n	n	18.5	3.1	7.2

가

cutinase pectinase

< 10 >

가

No.	Descrip.				
1	2-001	++++		++++	++++
2	3-1671	+++		+++	+++
3	24-007	++++		++++	+++
4	25-125	++++	++	++++	++++
5	28-883	+++		++++	+++
6	H63	+++		+++	++++
7	H64	++++	++	++	+++
8	G65	+++		++++	+++
9	I-129	+++		+++	++++
10	XI-249	+++		++++	++++
11	II-250	++	+++	++++	+++
12	II-267	++++		+++	++
13	294	+++		+++	+++
14	373-23	+++		++++	++
15	422-123	++++		+++	+++
16	423-287	++++		+++	+++
17	622-11	+++	++++	++++	++++
18	B8	+++		++	++++
19	B21	++++	+++	++	+++
20	B130	+++		+++	++
21	C64	++++		+++	+++

3

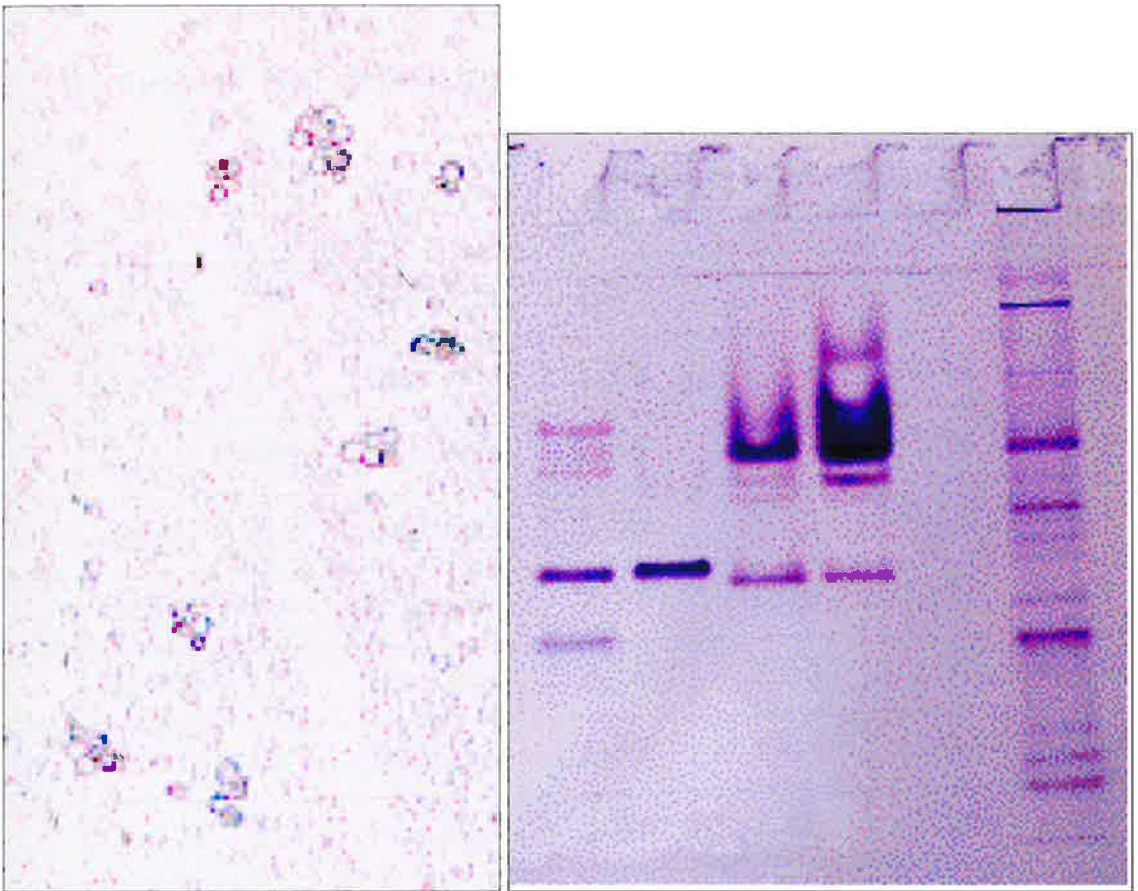
가

5

3) 고 활성의 Yeast 균주의 분리

일반적으로 세균성 또는 곰팡이를 이용하여 펙틴을 분해하는 경우 이 것이 병원성을 가지고 있을 때는 다른 농작물에 잘못 취급하여 병을 유발 시킬 가능성이 존재하고 있다. 물론 본연구에서 주로 작물과 관련이 적은 곳으로 부터 균을 수집하고 채소류와 주요 화곡류에 감염여부를 거쳐서 선별하였다. 그러나 Yeast는 병원성을 가진 것이 식물에는 없기 때문에 yeast를 사용하면 유리하다.

따라서 본연구에선 수백종의 yeast 를 조사하여 1종의 특이성 높고 pectin 을 잘 분해하는 균주를 작성하였다. 이스트는 배지가 간단하고 분비되는 효소의 종류가 적기 때문에 실용적으로 매우 편리하다. 이 이스트로 부터 분리된 효소 단백질과 이스트의 모양은 아래그림과 같다.



< 그림 2> 분리한 이스트의 모양과 이로부터 분리정제한 펙틴분해 효소의 전기영동상, 단일 밴드가 보여주는 것과 같이 완전한 효소단백의 정제상태를 보여주고 있다.

4) Cutin

cuticle
pectin

가
c

cutinase

cutinase
nitrophenylbutyrate nitrophenyl
polycaprate (PCL)

nitrophenylbutyrate esterase

clear zone cutin
clear zone

< 11> Cutinase

NO.	Descrip.	Microorganism	Substrate of Cutinase			
			NPB	NPC	PCL	
1	Cu- A - 18	Bacteria	1.2	1.23	0.89	+++
2	Cu- C - 711	Bacteria	1.75	2.11	1.21	+++
3	Cu- C - 628	Bacteria	2.34	3.21	1.34	++++
4	Cu- C - 912	Bacteria	1.56	2.12	1.53	++++
5	Cu- B - 6	Fungus	2.12	1.78	0.79	+++
6	Cu- B - 713	Bacteria	2.18	2.54	1.73	+++
7	Cu- D - 15	Bacteria	1.67	2.0	1.34	+++
8	Cu- H - 234	Fungus	2.22	2.45	1.59	++++
9	Cu- H - 312	Bacteria	1.88	1.65	0.42	+++
10	Cu- I - 25	Fungus	1.51	1.22	0.86	+++

NPB; nitrophenylbutyrate, NPC; nitrophenyl caprate, PCL; polycaprate

5)

21 cutinase 10

가

No.		basic medium	adding compound	No.		basic medium	adding compound
1	2-001	b	AA	17	622-11		
2	3-1671	b	HE	18	B8	f	
3	24-007	b	sugar	19	B21	f	sugar
4	25-125	y	AA	20	B130	f	
5	28-883	b	AA	21	C64	f	
6	H63	b					
7	H64	b	sugar	1	Cu-A-18	b	AA
8	G65	b		2	Cu-C-711	b	
9	I-129	b	AA	3	Cu-C-628	b	HR
10	XI-249	b	HR	4	Cu-C-912	b	AA
11	II-250	b		5	Cu-B-6	f	
12	II-267	b	sugar	6	Cu-B-713	b	
13	294	b	HR	7	Cu-D-15	b	sugar
14	373-23	b	AA	8	Cu-H-234	f	
15	422-123	b		9	Cu-H-312	b	HR
16	423-287	b		10	Cu-I-25	f	

AA ; amino acid , b; bacteria, f; fungus , HE ; hemp extracts

6) 단일클론 항체 생산

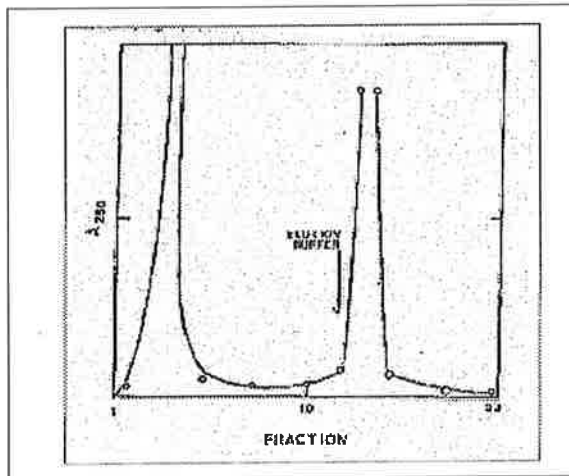
분리된 균주와 효소 단백질을 항원으로 하여 항체를 생산하였다. 단일클론 항체를 생산하는 세포주는 아래의 표와 같이 1차로 IgG를 분비 하는 하이브리도마를 선발하고 특히 항원과 결합하는 항체를 선발하였다.

〈 표 12 〉 항체선발 내용

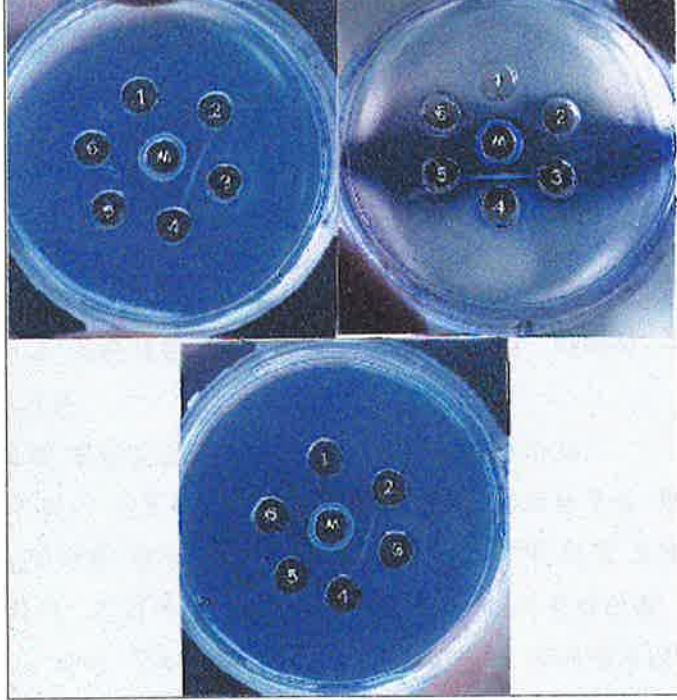
항원	하이브리도마		비고
	IgG secretion	IgG secretion	
I (펙틴분해균주5종)	457	112	액체질소 용기에 전 량보관사 용
II (펙틴분해균주5종)	376	78	
III (쿠틴분해균주5종)	543	123	
IV (펙틴분해효소 2종)	197	101	
V 쿠틴분해효소 2종)	252	165	

단일클론항체의 대량생산과 정제

상기에서 작성된 hybridoma 를 2회에 걸쳐서 limiting dilution 한이후에 대량증식 시켜 5000,000cell 을 생쥐의 복강에 주사하여 복수암을 유발시켜 복수를 채취했다. 이 복수를 40% ammonium sulfate 로 침전시켜 투석후 protein A-Sepharose 4B column chromatography 하여 항체단백질인 IgG만을 아래의 그림과 같이 순수분리 정제하였다.



〈그림3〉 Purification of IgG by protein A-Sepharose 4B chromatography and immunopure buffer system.



<그림 4> 항체의 immunodiffusion에 위한 항체의 특이성 검정
(M:항원 , 1 ~ 6 :단일크론항체)

7) 생물공정 처리 폐액의 재활용효과

생물공정에 의해서 대마를 가공하고 나면 처리 용액만큼의 폐액이 발생한다. 물론 이 폐액은 미생물과 효소그리고 펙틴 또는 쿠틴의 분해물로 이루어져 있다. 그래서 이 반응용액은 계속 그대로 사용하여도 문제가 없다. 그러나 계속사용하면 즉 3회이상을 사용하면 pH가 달라져서 미생물의 성장과 효소의 반응이 지연될수가 있다. 따라서 2-3회 사용하면 용액을 교체해야 한다. 실험실에서는 증류수로 반응을 시켰으나, 수도물—우물물(pH 5.5 이상) 이면 생물공정상 문제가 없다.

생물공정에 의해서 처리되고 남은 반응용액은 화학적 방법이 아니기 때문에 화학약품은 전혀 없다. 따라서 직접공해를 유발시킬수 있는 요인은 없다. 그러나 COD와 BOD가 높을수 있다. 왜냐하면 미생물이 발효를하면서 용액중의 산소호흡을 하기때문에 생물학적 산소요구도를 높여놓는다. 따라서 이용액을 그대로 방류하는것은 바람직하지 않다. 따라서 이용액을 액비로 사용가능성을 탐색하였다.

< 표 13 > 반응용액의 수박 유묘에 처리효과

묘 목	생체중 (g/fr.w.)			
	처리원액	10배희석	100배희석	1000배희석
7일	97	107	112	105
14	96	104	108	103

7일 14일 유묘에 3일간 동안처리하고 3일 후에 생체중의 증가율을 표시하였다. 원액의처리는 리적 장애를 받았다.

제 4 장 : 생물공정 기술연구 분야

제 1 절 서설

1. 연구접근 방법

현재사용되는 기존의 가공방법의 노동력과 2차가공단계에서 사용되는 가성소다등의 오염 발생등 문제점을 가지고 있는것은 이미 잘알려진 사실이다. 따라서 본연구에서의 섬유작물 가공에 있어서 전제조건은

가. 초생력화 방법일것 — 무인화 자동화 가능하고

나. 섬유의 질이 양호하고 — 고부가가치 의 의료용구등 제조가능

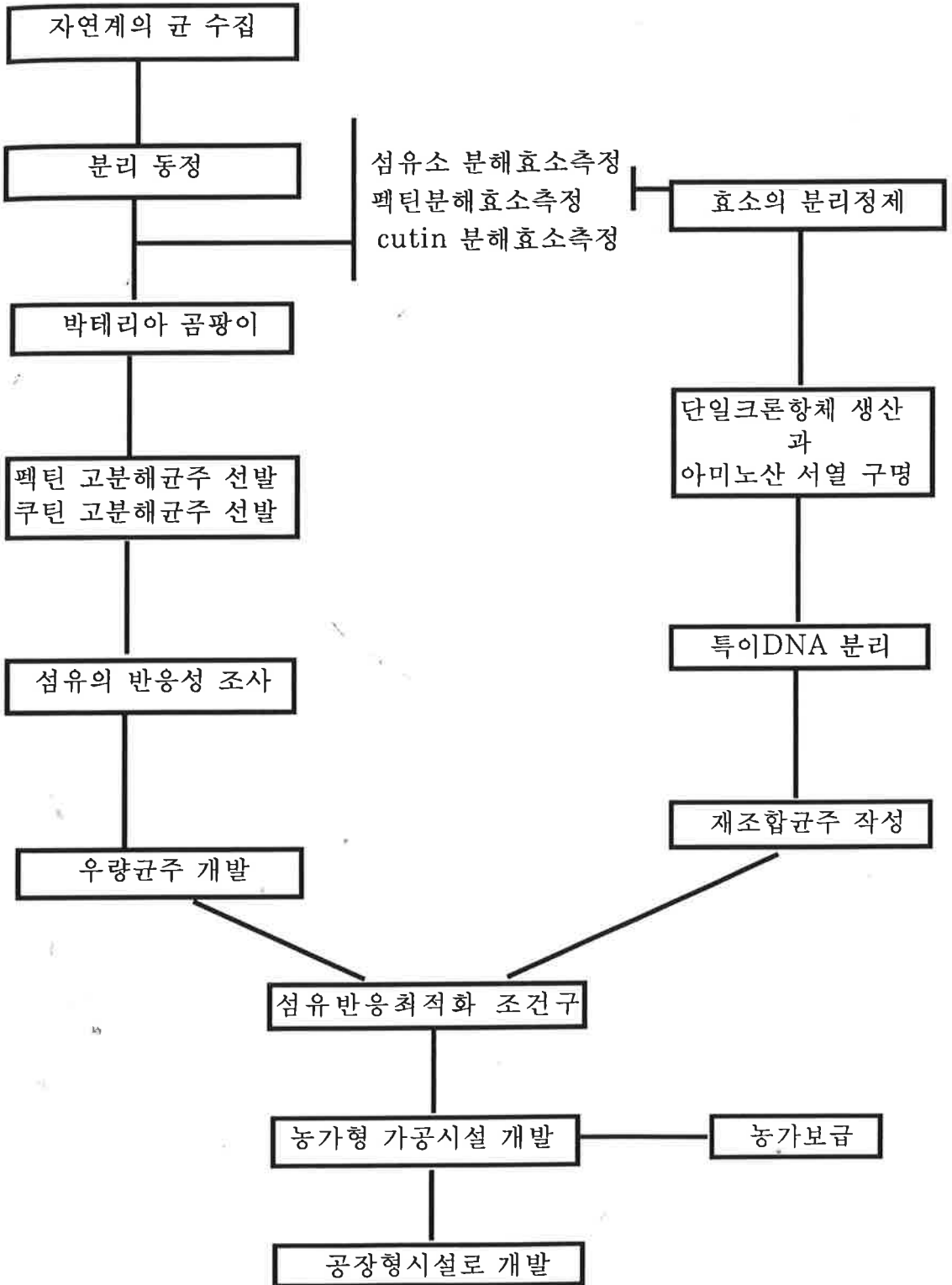
다. 2차 오염원의 발생이 없어야함 — 생물공정에 의한 오염 전무.

라고 할수있다. 따라서 기계에 의한 가공 또는 화학적 가공방법을 생각할수 있으나 이들의 방법은 투자비용의 과다, 2차오염원의 발생, 농가형의 부적합등의 문제를 야기시킬수 있기 때문에 생력화의 가능성이 가장 높고 농촌에서 이용이 용이하며 공장형으로 의 이용 가능성이 높은 방법으로는 생물공학적인 방법이 가장 현실성이 있는 방법이라고 할수 있다. 한편 생물공정에 의한 섬유의 강도안정성과 농민의 중간정도 가공의 요청에 따라서 펙탄과 쿠틴의 선택적 분해가 가능한 방법에 모색되어야 한다. 본 연구에서는 생물공학적인 방법으로 대마를 농가형이든 공장형이든 가능하도록 기술을 개발코자 한다.

2. 연구전략

대마, 모시, 청마에서 섬유로 이용되는 부위는 인피조직 으로서 나머지 부위 즉 표피 조직 과 내부 수관부(목질부)는 제거되어야한다. 따라서 표피조직의 쿠틴과 인피조직사이를 연결하는 물질은 주로 펙틴과 gum으로 알려져 있다. 따라서 이들물질을 선택적으로 제거하는 효소를 분비하는 균주를 만들고 이균주를 이용하여 효과적으로 가공할수있는 공정을 개발해야한다. 또한 일반적으로 세균은 필요로 하나의 효소만을 분비하는 것이 아닌만큼 이에대한 대비도 필요하다. 즉 펙틴을 분비하면서 섬유소 분해효소를 분비하면 섬유가 분해되는 결과를 가져오기 때문에 섬유소는 분해하지 않으면서 불용성분만을 분해하는 것이 필요하다. 그러나 일반적으로 세균들은 섬유소 분해효소를 가지고 있는것으로 알려져 있다. 따라서 이에 대한 변이주를 개발하는것도 필요하고 효소단백을 분리정제하여 이 유전자를 구명하고 적당한 기주에 도입시켜 특이효소만을 생산하여 이용하거나 이 기주 자체를 직접 활용하면 섬유소의 손상없이 소기의 목적을 달성 할수 있을것으로 기대된다. 다만 본연구에서 섬유소 분해효소를 최소화한 변이주를 개발이용코자한다, 도식으로 표시하면 다음과 같다.

개발 전략의 도식



제 2 절 연구 결과

1. 연구 목표

우량균주를 수집 선발하여 섬유작물 인피조직 외부에 연결 형성된 pectin과 cutin을 효과적으로 분해하는 특이 효소를 다량분비하는 우량균주의 선발을 목표로 한다. 우량균주의 선발은 그 자체가 부가가치일뿐만 아니라 재조합 균주를 작성하는 모체가 되기 때문에 본 연구과제의 중심을 이루는 연구 분야이다. 이 균주들은 야생형이기 때문에 그대로 사용할 수도 있다. 그러나 야생형은 그대로 사용하기는 문제가 있다. 2년차에 병원성에 관한 검정은 거쳤다. 그밖에도 실험목적에 불필요한 효소를 동시에 생산한다. 즉 섬유소 분해효소나 단백질 분해효소등이 이에속한다. 그래서 야생형의 균주도 그대로 사용하고 더 이상적인 균주의 창제를 위해서는 섬유가공에 필요로하는 재조합 균주를 창제하는 것이 효율적이고 경제적이다. 따라서 본연구에서는 생물공정에 적합한 균주를 창제하기 위한 재조합 균주의 작성을 위하여 우선 효소단백질을 정제하고 아미노산 서열을 결정하며 이를 바탕으로한 유전자 크로닝과 형질전환세포를 작성하기 위한 연구를 중심으로 수행한다.

2. 재료 및 방법

가. 효소의 분리정제

< 새로운 미생물 단백질 의 분리 와 정제 기술 >

일반적으로 미생물에서 분비되는 단백질들이 당단백질이어서 활성에 문제가 되거나 분리(단리) 하기가 쉽지 않다. 왜냐하면 다른 단백질들과 결합하여 정제되기 때문에 같은 피크내에서도 전기영동을 하여 보면 여러개의 밴드가 나타난다.

본 연구에서 개발한 균주에서 분비되는 펙틴분해효소 단백질은 비변성 전기 영동에서 120,000MW 과 110,000정도 되는 것이 있고, 다른 하나는 동정되지 않고 있다. SDS - gel에서 30,000과 27,000정도인것으로 관찰되고 있다. cutinase의 경우 22000에서 28000까지의 밴드로 나타났다.

본 연구에서는 전술한 몇가지 컬럼을 이용한 정제에서 순수하게 단일밴드로 정제되지 않을때는 recycling HPLC를 수행하였다. 즉 단일 HPLC (single head pump) 펌프를 분취용컬럼과 (prep. column 20 X 600 mm, gel filtration ,JAI=GS520) 연결하여 시료를 recycle 시켜서 분리 정제를 하였다

50% ammonium sulfate 가

0.2M phosphate buffer

FPLC

Ion exchange chromatography

column : Mono Q, Pharnacia (5mm x 50mm)
 buffer : Tris 20mM, pH 6.5
 gradient : 0 0.4M KCL
 flow rate : 1ml/min
 pressure : 200 psi

Reverse phase chromatography

column : phenyl - 5PW (75mm x 80mm)
 buffer : Tris 20mM, pH 6.5
 gradient : 1 0 M ammonium sulfate
 flow rate : 1ml / min
 pressure : 200psi

(1) RNA

40nl	prtoplasting buffer 40nl
lysozyne (100ng/nl) 160μℓ 가	15
protoplast	60μℓ DEPC 가
lysis buffer 2nl	NaCl 250μℓ
37 5	2 가
가 . 10	1nl TE buffer C
-20 RNA	
sCl cushion RNA	RT-PCR

Protoplasting buffer: 15mM Tris-HCl, pH 8.0

0.45M Sucrose

8mM EDTA

Lysis buffer : 30mM Tris-HCl, pH 7.4

100mM NaCl

5mM EDTA

1% SDS

(2) RT-PCR

cDNA Perkin Elmer RT-PCR kit . 1st-strand DNA Master mix
 random primer 2.5 μM 1μg total RNA 가 30 20 p
 riner extention 42 30 DNA 95 1
 0 denature 5 .
 2nd strand DNA upstream downstream primer가 0.15uM 가
 Master mix denature 95 1 , annealing 65 2
 , extention 75 5 35 cycle 1% agarose gel
 cDNA cloning .

(3) chromosomal DNA

brain heart infusion cutin 40nl 2
 X CTAB buffer 20nl 가 55 10 chloroform/isoanyla
 lcohol (24:1) 2 0.1 10% CTAB PPT buffer
 DNA .
 pellet 5nl STE 2.5 가 -20 .
 DNA 1nl TE buffer RNA Sau 3A1
 genonic DNA cloning .

Protoplasting buffer: 15nM Tris-HCl, pH 8.0

0.45M Sucrose

8nM EDTA

Lysis buffer : 30nM Tris-HCl, pH 7.4

100nM NaCl

5nM EDTA

1% SDS

(4) Genomic DNA cloning

5μg Chromosomal DNA Sau3A1 partial 1-3Kb
 . plasmid vector pUC19 BanH1 CIP DNA lig
 ation DH5 0.025% polycarprolactone ampicilline
 (50ng/L) 가 LB . colony clear zone

(5) Competant cell

E. coli strain DH5	single colony	3ml	LB	1	50m
1 LB	1ml	OD600=0.5가			
			CM1 buffer(10nM Na · OAc, pH8.0, 50nM MnCl2, 5nM Na		
Cl)	20		CM2 buffer(10nM Na · OAc, p		
H5.6, 5nM MnCl2, 70nM CaCl2, 5% glycerol)			100μℓ		ligation
mixture 1μℓ	40		42	2	heat shock
0.9ml	가	1	PCl	ampicilline	가

(1) Pectinase

- nitro phenyl galacturonic acid
- pectinase (polygalacturonase)
- Collner Sonogyi-Nelson

copper reagent ;

12g sodium potassium tartrate, 24g anhydrous sodium carbonate
in 250ml D.W.

4g cupric sulfate pentahydrate in 100ml D.W.

16g sodium anhydrogen carbonate, 180g sodium sulfate
anhydrous in 500ml D.W. total add to 1l.

arsenomolybdate reagent:

25% ammonium molybdate in 450ml D.W.

96% sulfuric acid 21ml

3g disodium hydrogenarsenate heptahydrate

substrate solution :

20ml 0.6M sodium chloride

75mM sodium acetate. pH 5.3

7.5mM EDTA

0.3% polygalacturonic acid

pectin nutrient broth 30C

1ml eppendorf tube 12000rpm 5 0.5
 nl tube 0.5nl 가 30C 1
 copper reagent 0.5nl 가 10 100C 1nl ar-
 senomolubdate reagent 가 30 galacturonic acid 500nm

(2) cellulase

pectinase CMC filter
 paper

(3) cutinase

cutinase artificial substrate PNB(-nitrophenyl butyrate)
 PNPC(-nitrophenyl caproate) 5mM sub-
 strate 10μl, 50mM Na · phosphate buffer(pH8.0) 70μl, 20μl ep-
 endorf tube 30 1 405nm

(4) PCL cutinase

polycaprolactone 0.5g 2nl acetone 3nl 가
 100μl 50mM sodium phosphate buffer(pH8.0) 400μl 500μl
 30 1 600nm

1.

1

2

3

240

5

10

membrane filter blot

N-terminal

15

DNA

oligonucleotide

primer

probe

DNA

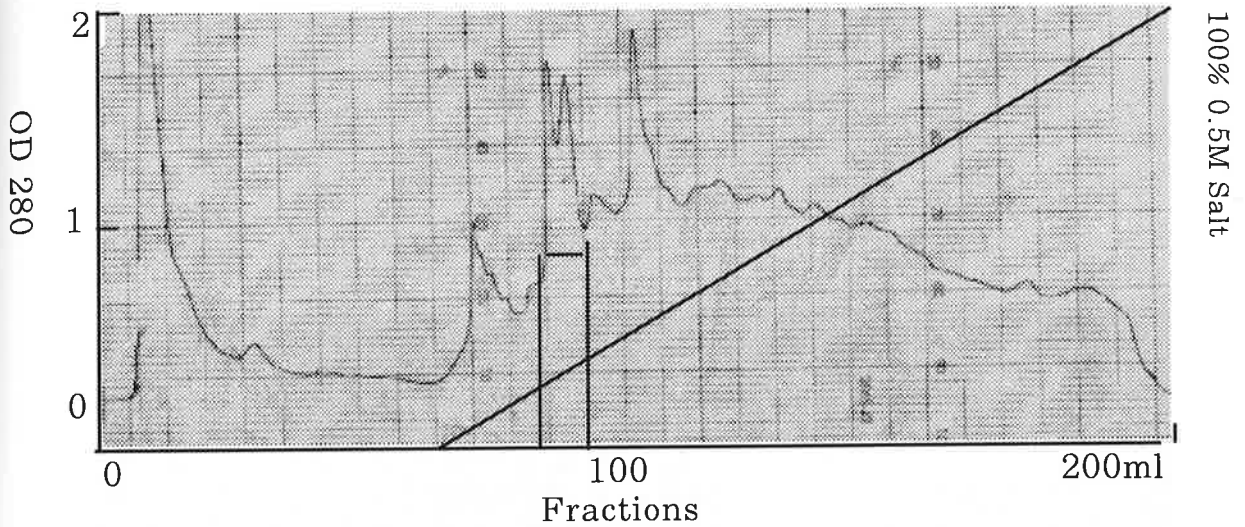
1, 2	(pectinase)	2600
	1	100 /plate × 5 = 1,300,000 colony
	2	1250 (800)
	3	
3	cutinase	240
	1, 2, 3	10

DEAE

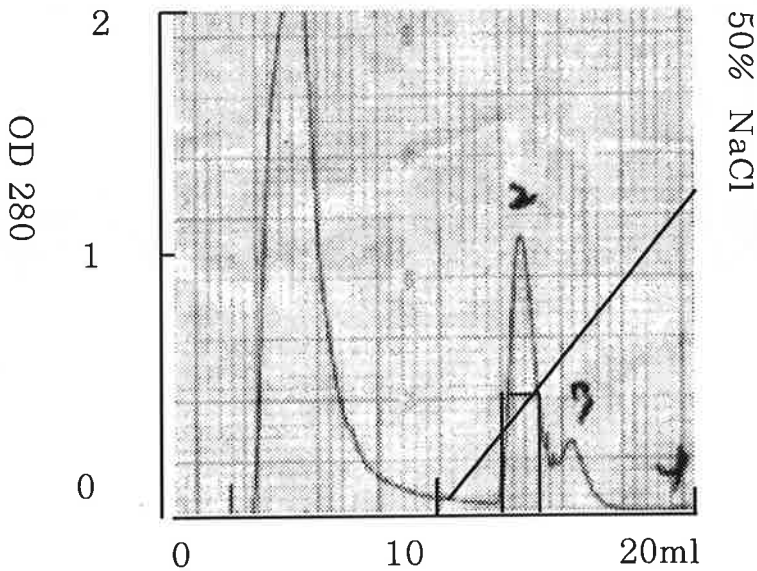
가

()

배지로부터 황산암모늄 침전물을 DEAE 와 소수성크로마토그리피를 수행하여 단백질을 정제하는 과정에서의 정제되어가는 과정을 볼수있는 크로마토그램 (하단 그림)

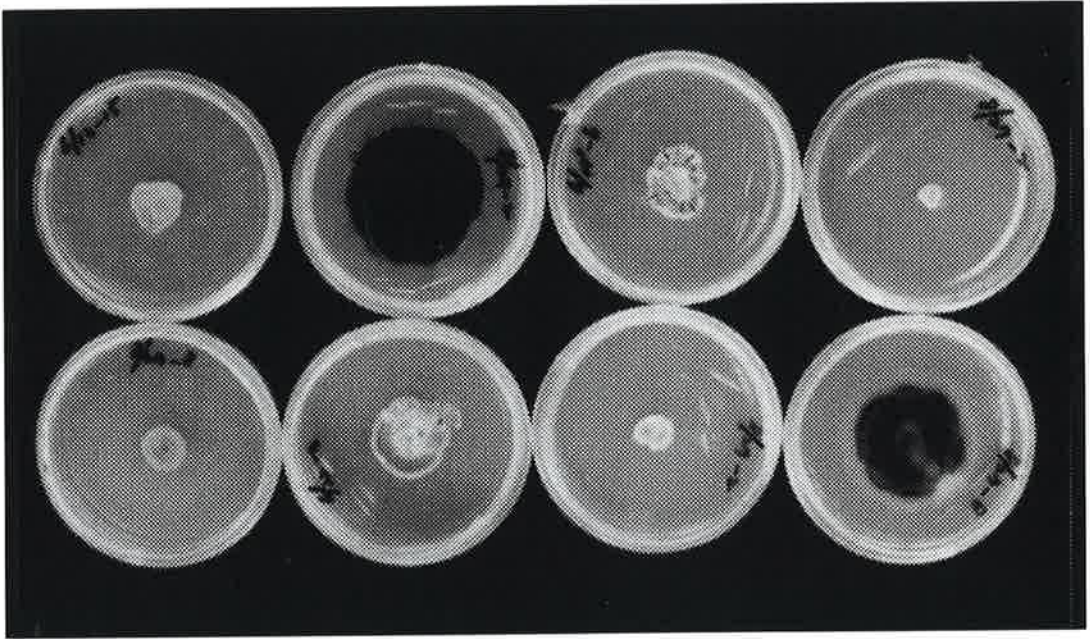


< 그림 1 > 효소단백의 정제를 위한 DEAE chromatograph



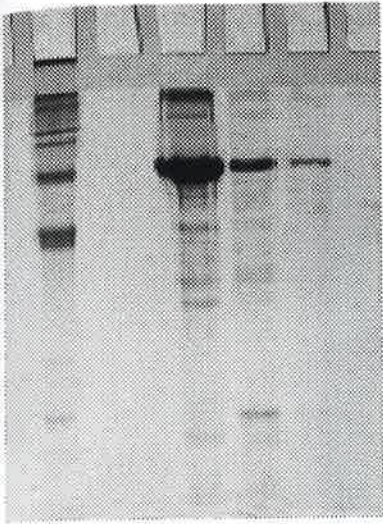
< 그림 2 > 상기DEAE의 컬럼에서 효소활성이 나타난부위를 다시 Mono S로 정제한 상태

전술한 cutinase를 분비하는 균주는 박테리아와 곰팡이를 분리 동정하였다. 그가운데서 곰팡이의 종류와 특이적으로 분비되는 쿠틴의 분해양상을 볼수가 있었다.

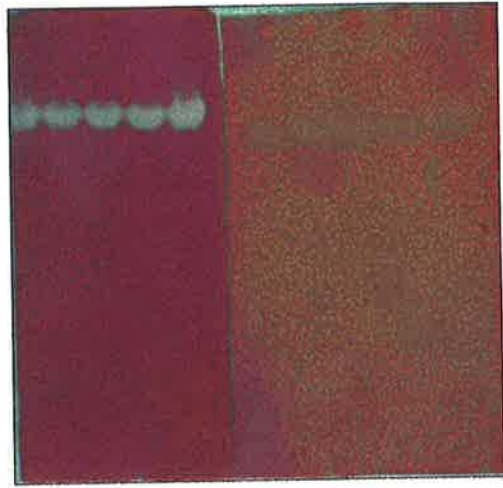


< 그림3> 곰팡이 선발과정에서 선발된 곰팡이류
Cutinase 분비 균주의 선발과정

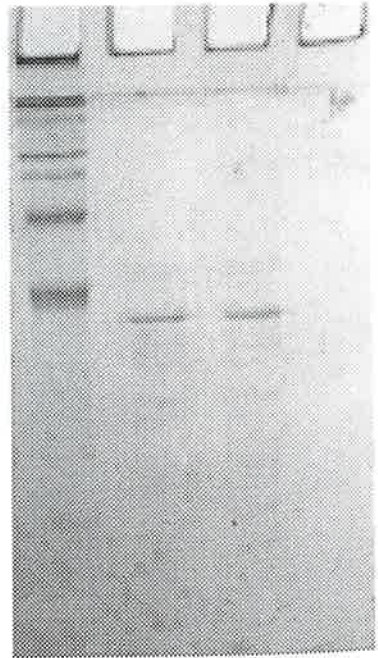
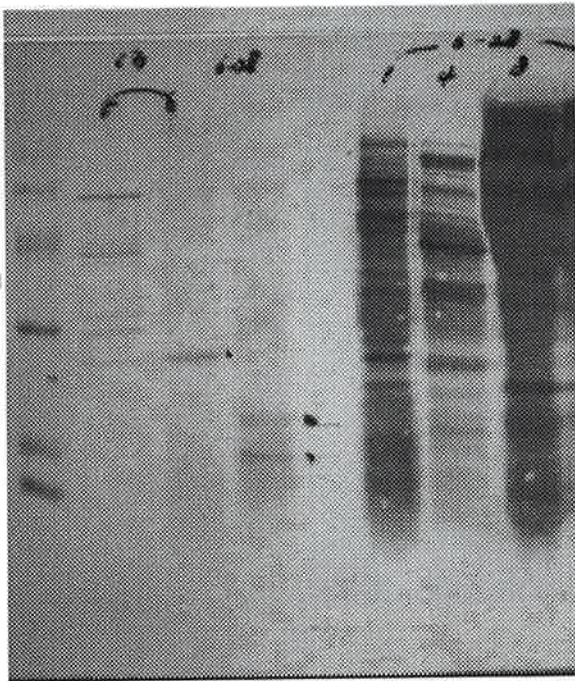
Pectinase 전기영동상



pectinase, native gel
electrophoresis



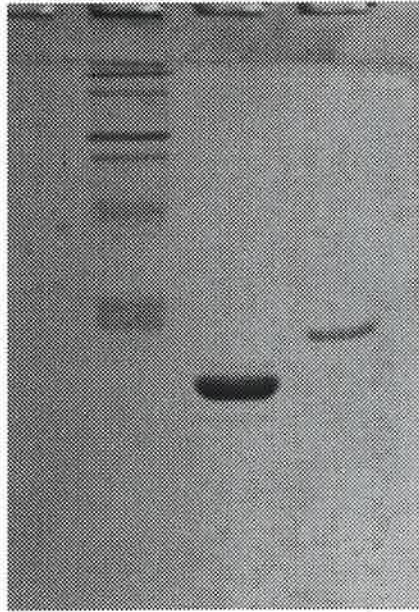
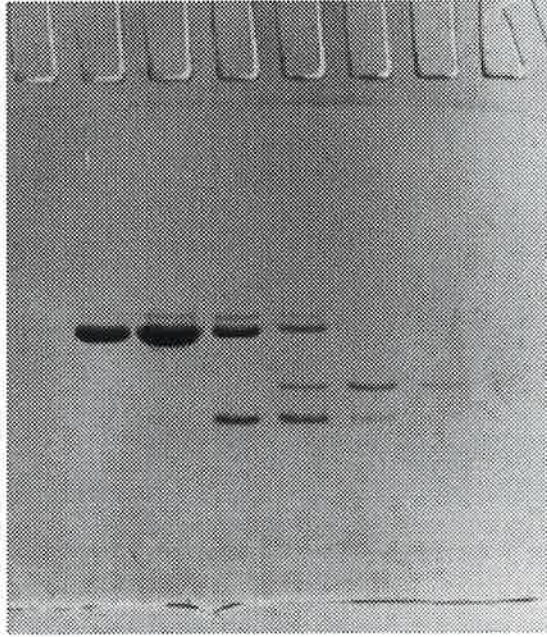
〈 그림 4 〉 펙틴 분해균주로부터의 효소 정제과정에서 native 전기영동과 이를 blot하여 확인한 패턴 분리정제된 단백질의 활성을 확인함



〈 그림 5 〉 곰팡이로부터 펙틴 분해효소의 정제되는 전기영동 패턴

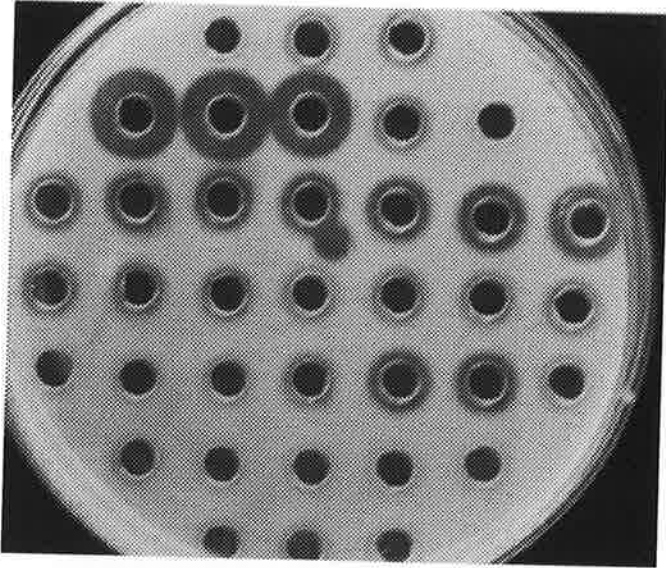
Cutinase 전기영동 사진

cutinase의 활성을 확인한 균주로 부터 재료및 방법에서과 같이 단백질을 순수 정제하였다. 아래의 전기영도에서는 정제되는 과정에서의 변화와 단일밴드로 정제 되었다 분자량은 약 30000이었다.

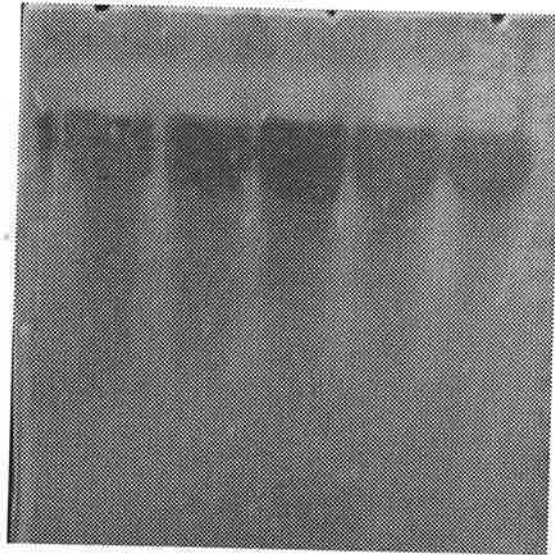


<그림 6> Cutinase 의 전기영동상, Mono Q 에서 분획(상) 과 정제된 단백질(하)패턴

cutinase 의 활성 검정을 위한 polycaprolacton 을 이용한 균주의 선발 방법과 선발된 균주로부터 분리한 효소를 비변성 전기 영동에 의한 blot 방법에 의한 확인그리고 다시 SDS전기 영도에 의한 단일 밴드를 확인 하는 과정을 거쳐서 균주를 선발하였다. 이후 이 균주는 활용할수 있도록 배지조것등이 규명되었고 이 단백질은 아미노산 서열을 구명하여 유전자 크로닝 과정을 거쳐서 재조합 균주 까지 작성되는 과정을 거쳤다.



PCL plate에서 cutinase의 활성확인

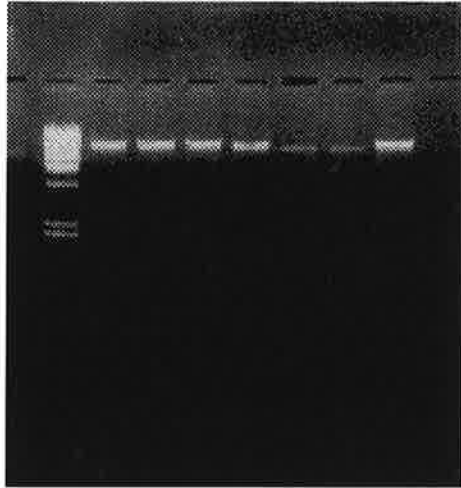


Blot에 의한 활성의 확인

< 그림 7 > 균주의 성장과정에서 상층액을 plate의 well 에 가하여 활성의 정도를 확인하고 native 전기영동에 의해서 위치를 확인함.

2. 재조합 균주작성을 위한 유전자 크로닝

DNA분리 및 절단



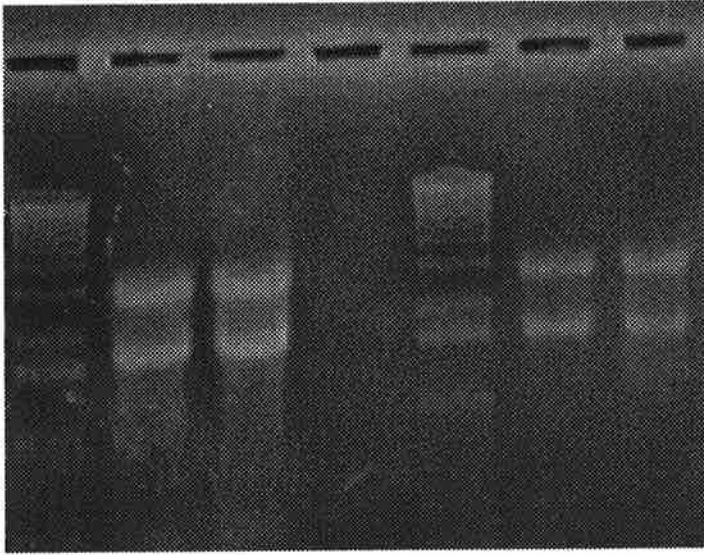
Genomic DNA



제한효소에 의한절단된 DNA

< 그림 8 > 균주로부터 분리한 DNA(상)와 제한효소에 한 DNA절편 (하)

RT-PCR을 위한 전기영동

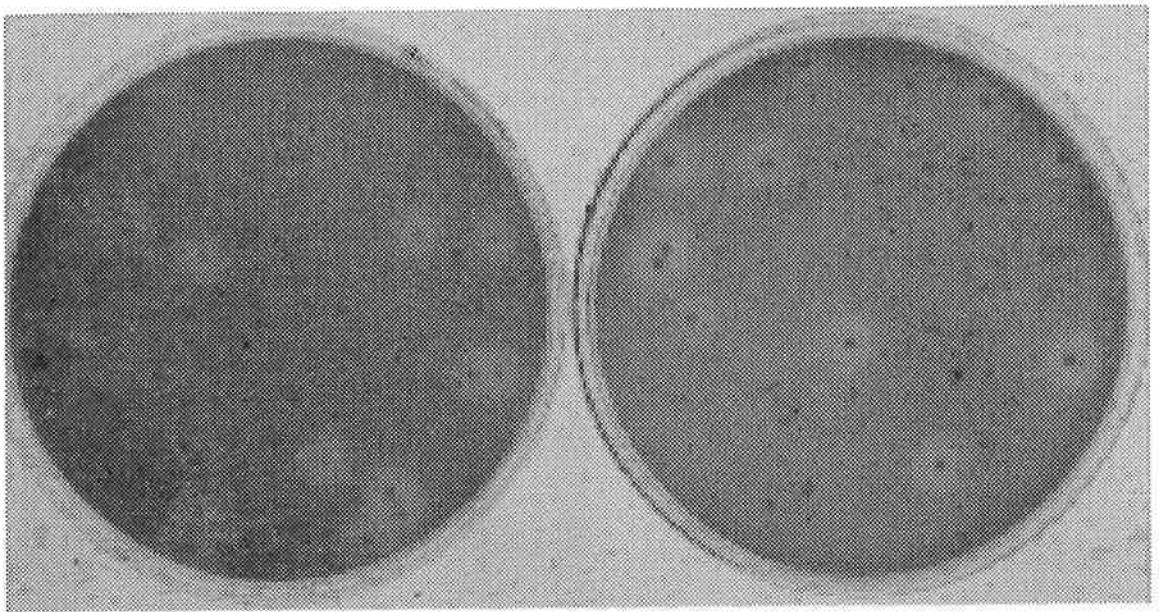


Total RNA



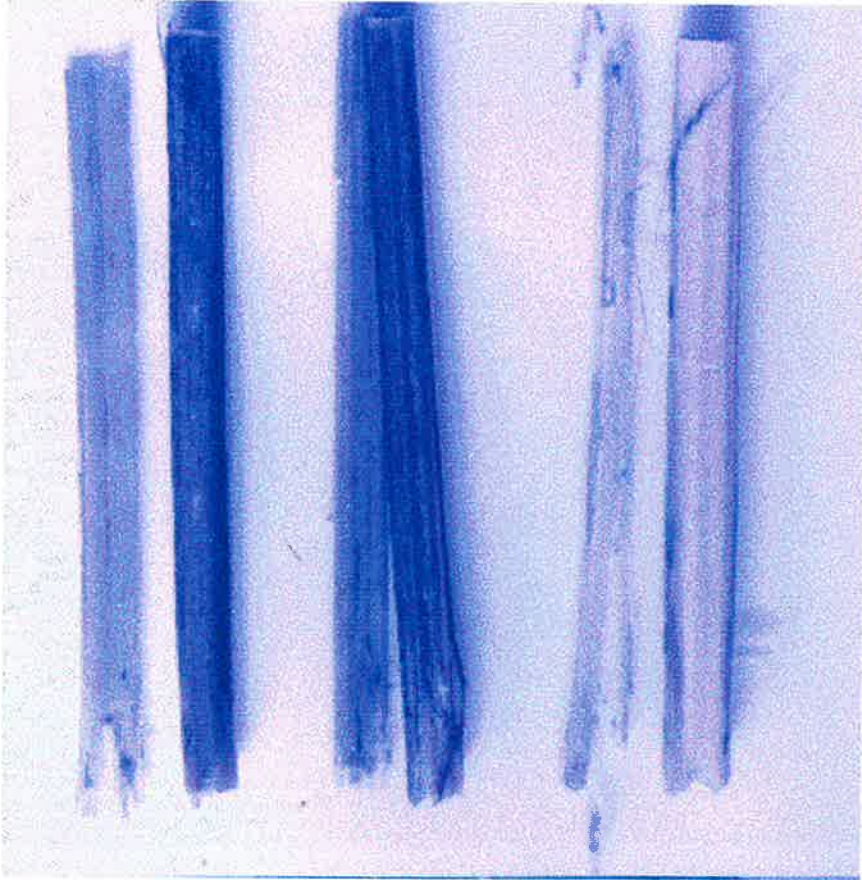
cDNA

〈그림 9〉 RT-PCR을 수행하기 위하여 분리한 RNA(상)과 작성된 cDNA



< 그림 10 > 형질전환된 균주의 선발. 배지중에는 대마로 부터 추출한 펙틴(좌) 와 쿠틴(우)이 함유되어있어서 특이 효소를 분비함으로써 clear zone 이 형성되어있다.

3. 우량균주와 재조합 균주에 의한 섬유의 가공성



I

II

III

< 그림 11 > Cutinase 분비 균주에 의한 대마표피 cuticle 층의 제거효과
1 : 재조합 균주의 처리, II : 수집균주의 처리효과
III : Cutinase분비 균주와 pectinase분비 균주의
동시처리효과

상기그림에서와 같이 cutinase 균주만을 처리했을 경우 표피세포만 제거되고 엽록소부분 (검게보이는 부분)은 그대로 남아있고 pectinase와 동시에 처리했을때 완전히 제거되어 하얗게 보이고 있다. 이것은 이용의 목적에 따라서 선택적으로 처리하여 원하는 부위만을 얻을수 있음을 증명하는것이다.



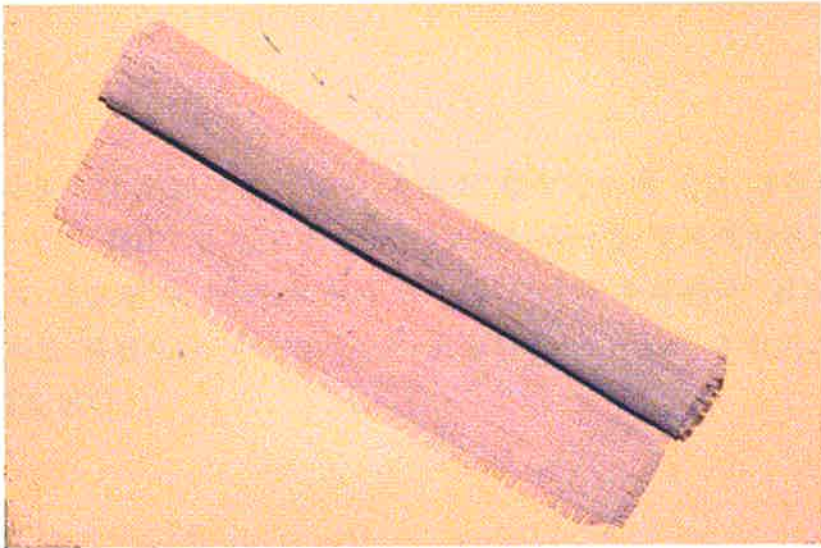
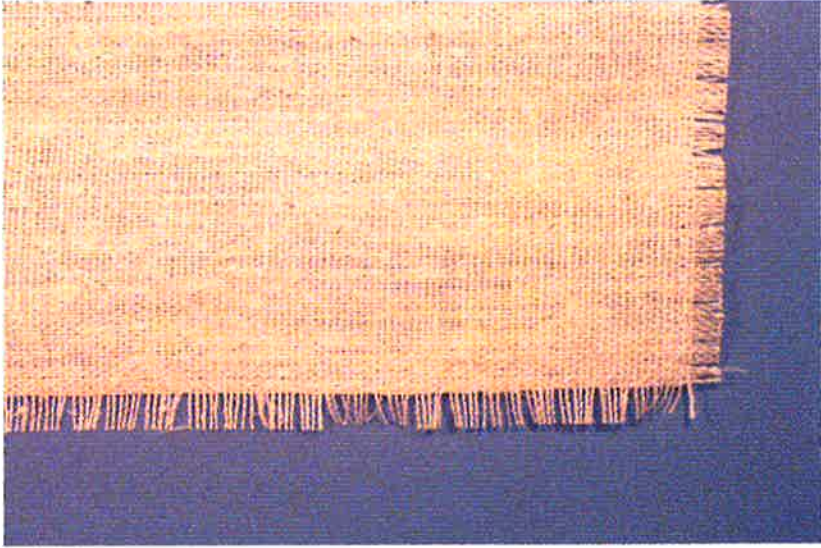
1 2 3 4 5 6

<그림 12> 우량균주와 재조합 균주에 의해서 가공된 섬유

1, 3 : 쿠틴과 펙틴이 완전히 제거된 섬유

2,4,5 : 펙틴이 남아있는 상태의 섬유

6 : 린넨가공된 섬유- 상적가공에 의해서 실 뽑기 직전상태



〈그림 13〉 생물공정에 의해서 생산된 섬유로 짠 시험생산된 삼베

< 가 5 > 가 9 .
가 .

1.

가
가 .

2.

25-30 가 . 3Kw
magnetic relay .

3. pH

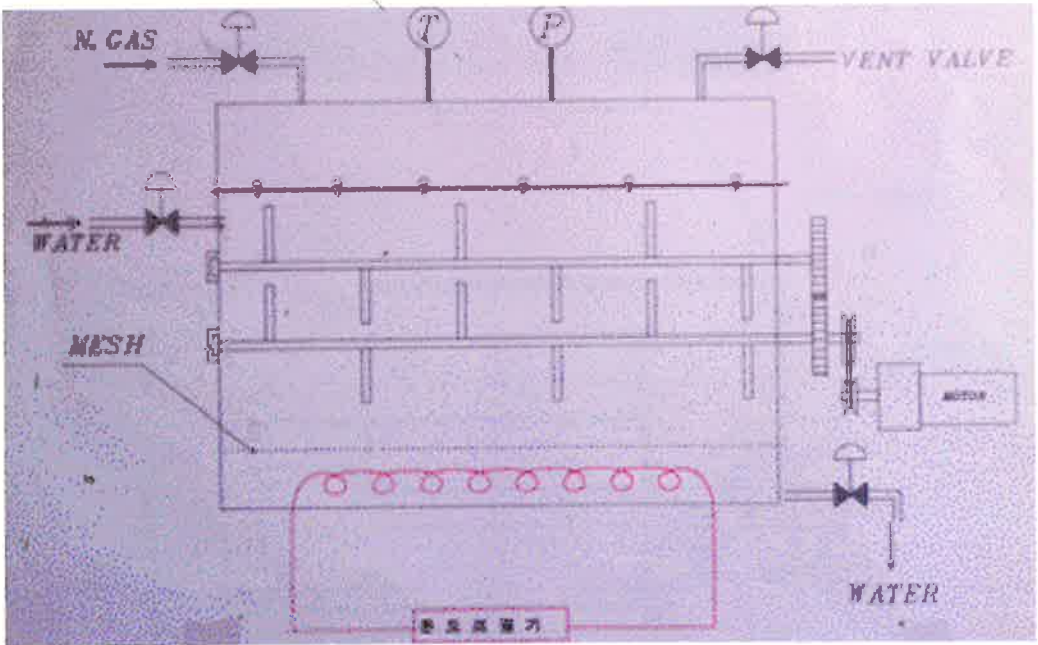
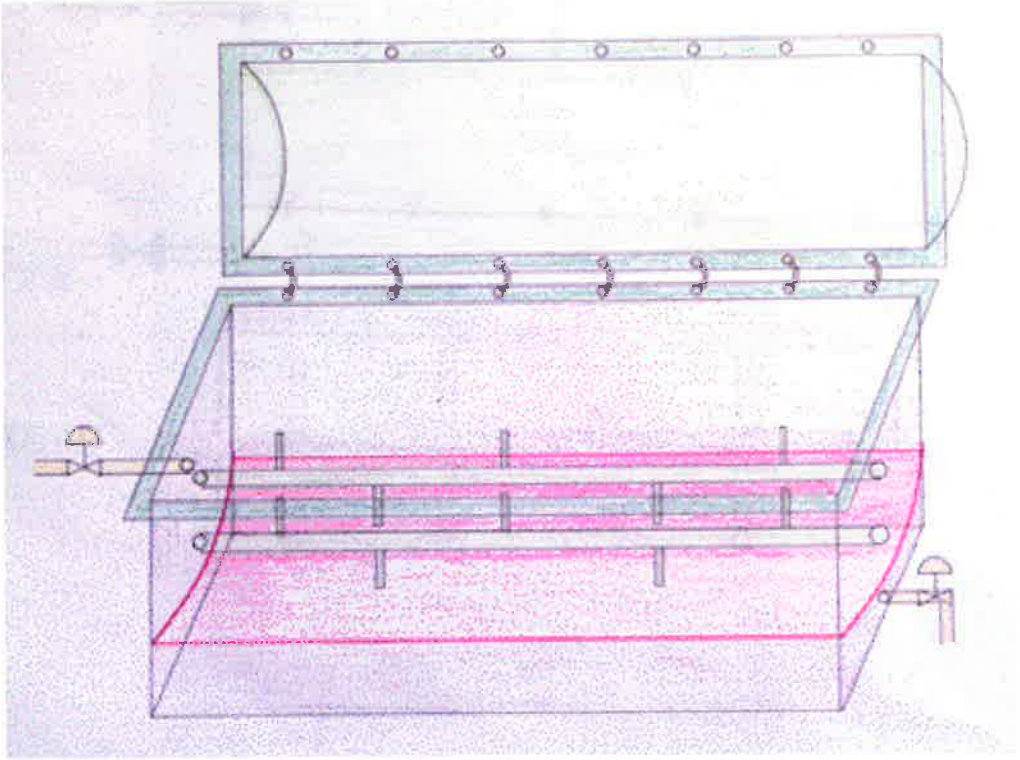
, , controler . 가 5
가 .

4.

가 가 .
가 가 .
가 .
sus
가 .

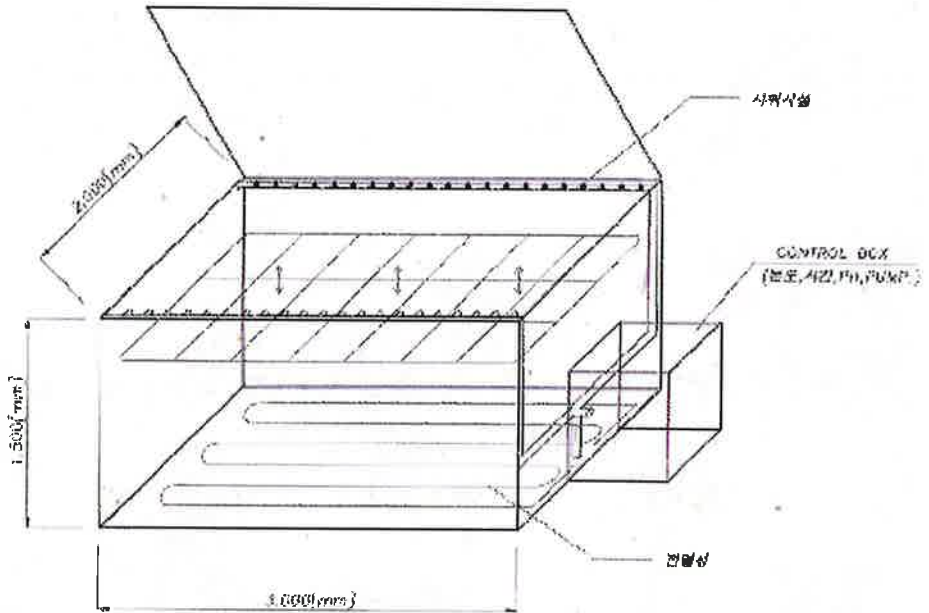
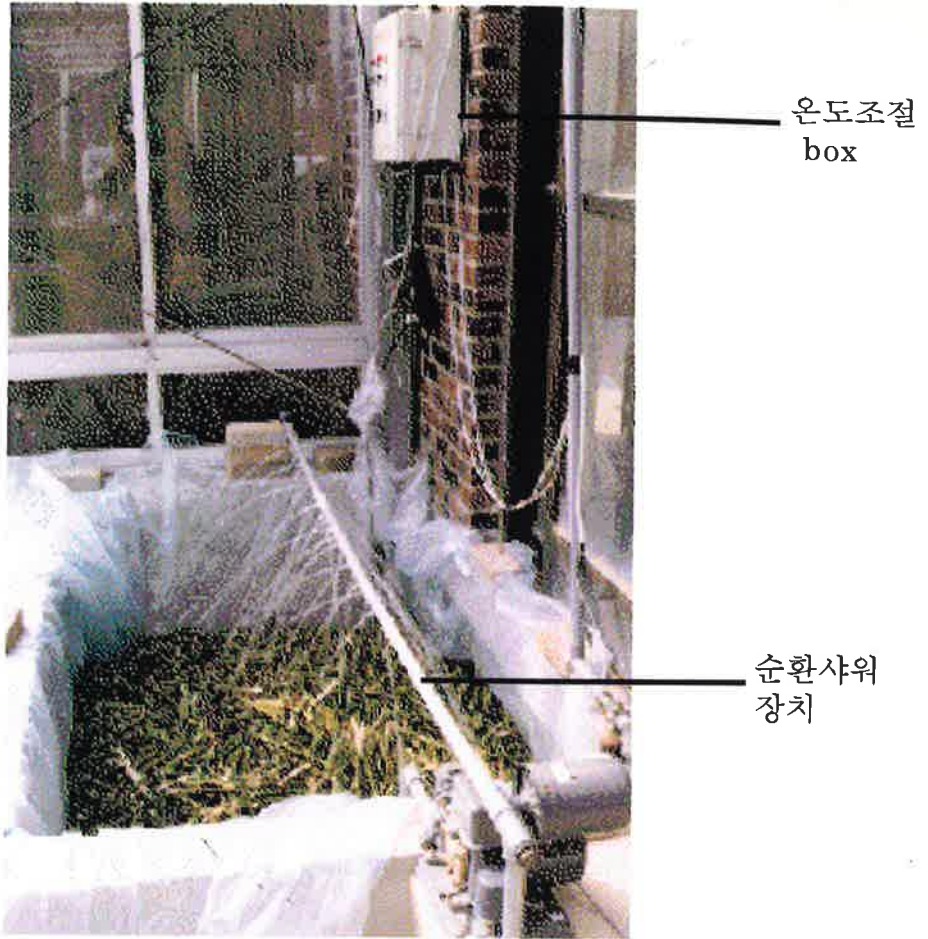
I	-	가
II	가 (2 , 가)	1m 2-3
III 가	25 , 가 30 가 가 3	가 가
IV		가
V	가	,
VI	3-4	.
VII ,	48-72	

가



<그림 14> 표준화위한 가공탱크(농가용 간치처리 장치로 고안함)

개량된간이시설 설계도면과 실제 가공 현장의 간이 설치에 의한 가공 모습



<그림 15> 농가형의 간이 설치현장과 개량된 간이 처리 장치의 도면

pectinase cutinase

.

10

()

	() 가		
	() Development of A Biological Plant Fiber Processing system for Labor Saving		
			()
			()
		90,000	1996. 12. 1. 1997. 11. 30.
(90,000)		90,000	(7)
			10
			(3)

○

, 가 가 가

. 가 가

. 가 25 가

. 가 가

, 가 가 .

UR 가 , 가

가

2-3 가 .

○

1. (, ,)
(, ,)

2.

130
ATCC
pectinase
cutinase

3.

4.

液肥

5.

가 가
pectinase cutinase

- ○

1.

가 가 가 가 가 가 가 가
1(D) X 1(W) X 3(L)n 가 30
가 가 가 가 가 가
가 1-2 가 가 가 가
가 가 가 가

2.

가 가 가 가 가 가 가 가 가 가
가 가 가 가 가 가 가 가 가
가 가 가 가 가 가 가 가 가
가 가 가 가 가 가 가 가 가
가 가 가 가 가 가 가 가 가
가 가 가 가 가 가 가 가 가

3.

가

4.