

Cellulolytic Enzymes Production Cultivation Using Air Circulation Bioreactor

Jin-Ho Seo, Hyo-Jung Song, Seong-Jun Kim

Department of Environmental Engineering, College of Engineering,

Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

TEL: +82-62-530-1864, FAX +82-62-530-0864

Abstract

The cellulolytic enzymes, such as FPase and amylase, production by *Trichoderma inhamatum* KSJ1 using 10L air circulation bioreactor were tried. Physical properties of the employed bioreactor, mixing time, $k_L a$ were examined in airflow conditions of enzyme production cultures. Mixing time of distilled water at 0.6, 1.2, 1.8 vvm were 25, 21, 9 sec, respectively, and mandel's medium using rice straw and pulp as carbon sources were 31, 25, 15 sec. Mixing time decreased when airflow rate increased. $k_L a$ of distilled water at 0.6, 1.2, 1.8 vvm were measured -22.52, -29.31, -39.62, respectively, and the mandel's medium were -47.8, -18.5, -21.4. The $k_L a$ values was increased linearly as the air-flow rates increased. However the values in mandel's medium showed different results, especially at 0.6 vvm. Amylase and FPase activity at the 1.2 vvm was 3.39U/mL, 0.72U/mL in 5 days cultivation. and the activities at 0.6 vvm were 2.01U/mL, 0.39U/mL, respectively. The enzyme productivity at 1.2 vvm was higher than at 0.6 vvm, indicating that high oxygen tension is requested for the efficient enzyme production culture of *T. inhamatum* KSJ1.

서 론

자연계에 존재하는 섬유소 물질의 주성분은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이다. 그 중에서 셀룰로오스는 가장 풍부하며 유용한 화학물의 생산, 식량 및 에너지로의 재활용 등 이용 가능성이 높은 물질이나 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 크며, 비수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부만 이용되어지고 있으며, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 산화되거나 폐기물로

취급되어 버려져 자원이 낭비되고 있으며 공해현상까지 유발시키고 있다⁽¹⁾. 이러한 섬유소폐기물을 효율적으로 이용하기 위해서는 많은 양의 섬유소 분해효소를 생산하여 가수분해 공정의 단가를 낮추어야 하며 효율적이고 낮은 비용으로 생산할 수 있어야 한다. 우리의 선행연구에서 엑소글루카나제, 엔도글루칸아제의 활성이 뛰어난 *Trichoderma inhamatum* KSJ1을 분리하여, 효소생산특성을 파악하고, 경제성의 배지구성으로 최적화하였다. 본 연구에서는 섬유소폐기물을 기질로 이용하는 효율적인 효소 생산 시스템을 구축하기 위하여 산삼배양에 사용하는 10L 공기순환형 반응기를 도입하여, 혼합시간, 총괄산소이동계수 등을 조사하였으며, 다양한 통기조건에서의 섬유소 분해효소의 생산특성에 대해서 검토하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

다른 효소생산을 위한 균주는 김 등이 분리한 *Trichoderma. inhamatum* KSJ1을 사용하였다⁽²⁾. 균주의 보관은 YMEA배지(Yeast extract 4g, Malt extract 10g, Glucose 4g, Agar 15g, distilled water 1 L)에서 3일간 30°C에서 성장시킨후 냉장(4°C) 보관하여 실험에 이용하였다. 효소생산의 기본배지는 탄소원으로서는 벧짚과 폐지를 2%을 이용하였고, 질소원으로 peptone 0.1%를 이용한 멘델배지를 사용하였다⁽³⁾. 효소생산은 조제된 배지5L을 10L 공기순환형 배양기에 넣은 후, YMEB배지에서 3일 성장시킨 균주 접종물 2%접종하여 각각 30°C, 0.6vvm과 1.2vvm에서 5일간 배양하였다.

사용된 공기순환형배양기(total volume 10L, working volume 5L)는 Fig. 1에 도시하였다. 반응기의 재질은 강화유리이며 거치대에 설치하여 autoclave가 가능하게 제작되었다.

2. 혼합시간 측정

혼합시간은 distilled water에서는 4N H₂SO₄ 2mL을 벧짚·폐지 기본멘델배지에서는 35% HCl 4mL을 추적자로 사용하며 0.6, 1.2, 1.8 vvm에 따라 pH 변동치를 시간별로 측정한다. 혼합시간은 최종안정 pH의 95%에 도달했을 때의 시간으로 결정된다.

3. 산소전달계수측정 ($k_L a$)

$k_L a$ 의 측정은 10L 공기순환형반응기에 5L의 증류수와 5L의 벧짚, 폐지를 탄소원으로 하는 기본멘델배지를 넣고 대기압에서 static gassing-out method로 각각의 vvm

에 따라 수행하였다. 질소가스로 산소를 치환한 후 30°C에서 DO electrode(Hamilton Oxyferm 120 PN 237100)을 넣어서 용존산소농도의 변화량을 기록하였다. 용존산소농도의 변화는 다음의 식으로 나타내어진다.

$$dC/dt = k_L a (C^* - C)$$

C^* : 포화용존산소농도

C : 일시용존산소농도

적분하면,

$$\ln(1-C^*/C) = -k_L a t,$$

$k_L a$ 는 the least squares method에 의해 계산되며 기울기는 t 와 $\ln(1-C^*/C)$ 과의 관계에서 얻어진다.

4. 효소활성도 측정

Amylase의 효소활성도를 측정하기 위하여 1%의 soluble starch(0.05M Citrate buffer, pH4.8)용액 0.8mL과 배양액을 10,000×g, 10분간 원심분리한 배양상등액 0.2mL을 혼합한 반응물을 50°C, 30min 반응시켜 생성된 환원당을 DNS방법^(4,5)으로 측정하였다. FPase에 대한 효소활성도 측정은 filter paper(Watman no. 1)의 가수분해능력으로 나타내었는데, 이는 filter paper를 50mM 구연산 완충용액 (pH 4.8)으로 희석되어진 배양상등액 1.0mL과 혼합하여, 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하여 계산하였다. 효소활성도는 표준반응조건에서 1·min⁻¹의 글루코오스에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1U로 정의하였다.

결과 및 고찰

혼합시간은 증류수에서는 0.6, 1.2, 1.8vvm에 따라 각각 25, 21, 9sec로 측정되었고, 벗짚·폐지 기본배지에서는 31, 25, 15sec으로 증류수에서보다는 많은 시간이 소요되었다. 이는 깨끗한 물에서의 추적자의 확산이 더 빠르다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2, 3).

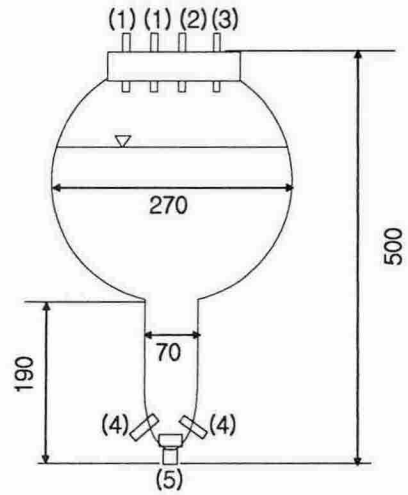


Fig. 1. Schematic representation of 10-L airlift reactor used. (unit; mm) (1) gas outlet; (2) DO sensor; (3) pH sensor; (4) sampling nozzle; (5) air inlet

$k_L a$ 는 Fig. 4, 5에서 보는 바와 같이 증류수에서는 0.6, 1.2, 1.8vvm에 따라 각각 -22.52, -29.31, -39.62로 공기주입량에 비례하게 측정되었고, 볏짚·폐지 기본배지에서는 -47.8, -18.5, -21.4로 측정되었다. 볏짚·폐지 기본배지에서의 0.6vvm에서는 증류수에서보다 높은 -47.8이라는 $k_L a$ 값이 나와서 이상히 여겨 3회에 걸쳐 실험을 수행한 결과 동일한 값을 얻었다. 여기에는 0.6 vvm에서의 공기량과 $k_L a$ 에 관한 어떤 상호관계가 있을 것 이라고 사료되지만 심화된 실험은 수행하지 않았다.

사상균 KSJ1의 통기속도에 따른 pH와 섬유소 분해효소 생산성에 대한 영향은 Fig. 6와 Fig. 7.에서 나타내었다. 기질이 동일한 조건이었을 때 1.2vvm에서의 pH가 낮았으며 이에 상응하게 효소활성이 높게 나타났다. 0.6vvm에서는 pH의 변화가 거의 없는 5.0~6.0사이를 가리켰으며 1.2vvm에서는 pH가 2.5일째 3.88까지 내려갔으며 이때 섬유소분해효소의 활성은 Amylase와 FPase에서 모두 급격한 기울기로 상승하여 3.5일째 각각 2.95(U/mL)과 0.65(U/mL)을 가리켰다. 이는 사상균 KSJ1의 섬유소 분해효소의 배양은 낮은 pH로 최적화되었음을 짐작할 수 있다. 또한 배양종료시의 효소 활성은 Amylase와 FPase에서 각각 3.39(U/mL)과 0.72(U/mL)까지 측정되었다.

0.6vvm과 1.2vvm에서의 섬유소분해효소의 활성도를 비교해봤을 때, 10L 공기순환형 반응기의 배양종료시점은 3.5 ~ 4.0일째까지로 정하는 게 경제적이라고 사료된다. 4일 이후의 효소활성농도는 증가하지만 이는 배지 내 수분의 증발로 인한 효소의 농축효과로 보여지며 동력비용 등을 고려했을 때 조금이라도 배양시간을 단축하는 것이 경제적이기 때문이다.

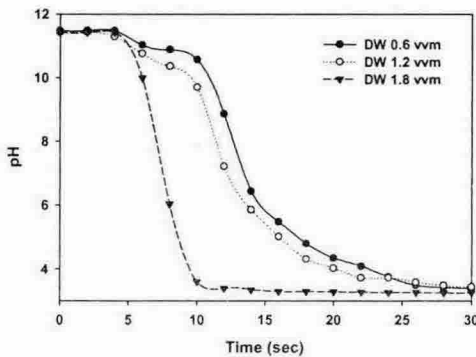


Fig. 2. Mixing Time of Distilled Water

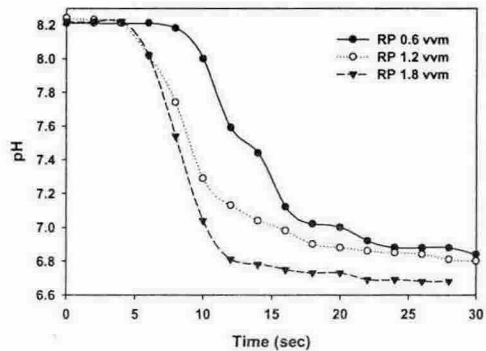


Fig. 3. Mixing Time of Mendel's medium containing Rice Straw & Pulp. RP indicates Rice straw & Pulp

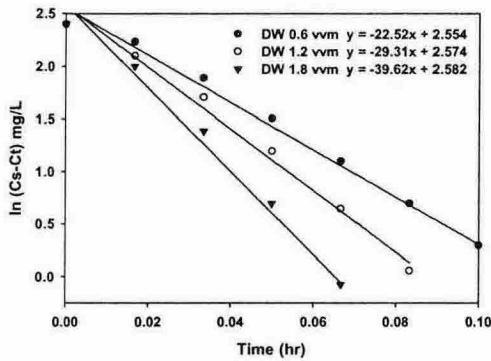


Fig. 4. $k_L a$ of Distilled Water

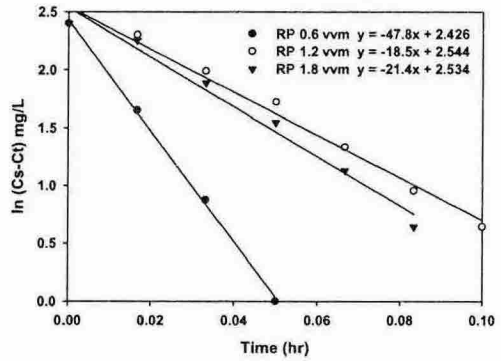


Fig. 5. $k_L a$ of Mendel's medium containing Rice Straw & Pulp.

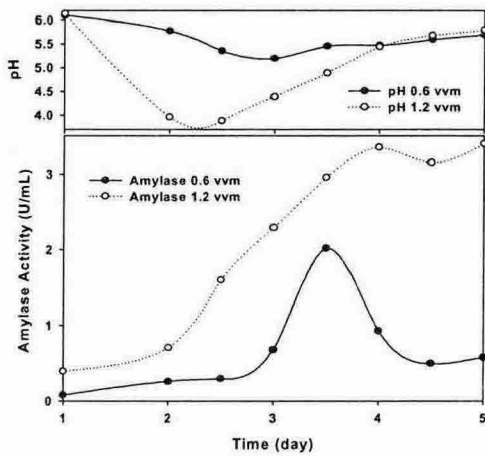


Fig. 6. pH & Amylase Activity (U/mL)

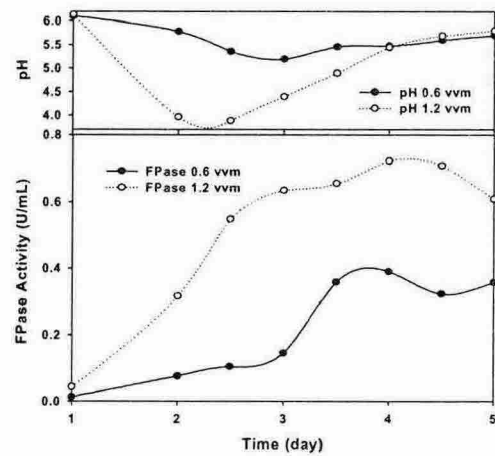


Fig. 7. pH & FPase Activity (U/mL)

감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었음

References

1. Busto, M. D., N. Ortega, and M. Prrez-Mateos (1996), Location, kinetics and stability of cellulase induced in *Trichoderma reesei* culture, *Biores. Technol.* 57, 187-192.

2. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, and S. J. Kim. 2003. Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase largely. *J. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
3. Mandel M and Sternberg D, "Recent advances in cellulase technology," *Ferment Tchnol.*, **54**:267-286(1976).
4. Willis A. Wood and Scott T. Kellogg, "Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose"(1988), ACADEMIC PRESS, INC., **160**, 87-112
5. Thomas M. W. and K. M. Bhat, "Methods for measuring cellulase activities"(1988), *Method. Enzynol.* **160**, 87-112.