

Nitrogen Source Investigation for Economical Production of Cellulolytic Enzymes

Hongxian Li, Gi-Wan Kim, Young-Bok Lee, Seong-Jun Kim

Dept. of Environmental Engineering, Chonnam National University

TEL: +82-62-530-0853 FAX: +82-62-530-1864

Abstract

Trichoderma inhamatum KSJ1, a filamentous fungus, isolated from rotten wood showed high ability to hydrolysis of cellulosic materials. Enzyme productivity by strain KSJ1 was high in the cultivation using carbon sources such as cellulosic materials and lignocellulosic wastes as rice straw and paper waste. In previous study peptone was one of optimum organic nitrogen sources in producing cellulases for saccharification of food wastes. However, it was too expensive using peptone as organic nitrogen source, so, in this study, soybean and yeast were applicated to substitute peptone. Yeast showed producing high enzyme activity, so it was estimated that yeast is available in producing cellulase using *Trichoderma inhamatum* KSJ1 at industrial production.

1. 서론

자연계에 다량으로 존재하는 biomass는 cellulose, hemicellulose, lignin을 주성분으로 구성되어지고, 이로부터 유용화학물질, 식량 및 에너지로의 재활용에 관하여 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다[1, 3]. 음식물류 폐기물은 2003년 말 전국에서 11,398톤/일이 발생·배출되고 있다. 음식물쓰레기 중에 포함된 전분, cellulose, 및 hemicellulose가 다량으로 함유되어 있어 이들을 단당류로 가수분해시켜 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있다. 복합고분자물질로 구성된 음식물쓰레기의 당화에는 다양한 섬유소 가수분해효소들이 필요하다. 다행히도 선행 연구에서 다양한 섬유소 가수분해효소들을 폐섬유소 배지에서 효과적으로 생산하는 균주를 확보하여 저비용 당화효소생산기술의 기초를 확보한 상태이다. 섬유소 분해효소를 대량 생산함에 있어서 탄소원으로 볏짚과 폐지를 사용하는 효소생산 기술은 확보하고 있지만, 배지원 중의

유기질소원인 펩톤은 효소생산배양에서 여전히 높은 비용을 발생시키고 있어 산업적인 생산방법으로 적합하지 못하다. 따라서 본 연구에서는 쉽게 이용할 수 있는 콩비지나 주정공장에서 나오는 효모를 효소생산배양의 질소원으로 대체하여 *T. inhamatum* FJ1에 의한 섬유소분해효소의 생산비용을 대폭 절감하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 사용균주

효소생산 배양에는 Kim 등이 분리 및 특성 파악한 *Trichoderma inhamatum* KSJ1을 사용하였다[2].

2-2 효소활성도 측정

효소액은 KSJ1을 YMEA(yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, agar 10 g, distilled water 1.0 L)배지에 3일간 전배양한 후, 멘델배지에서 5일간 본 배양한 배양액을 원심분리(12,000 rpm, 10min)하여 상등액을 효소액으로 사용하였다. Filter paper 활성은 FPA(filter paper activity)로 나타내었는데, 이는 50mg (1 × 6)의 filter paper (Watman No.1)를 배양상등액 1.0ml와 혼합하여 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 측정하였다[6]. Amylase 활성은 1% 가용성 전분 0.8ml을 배양상등액 0.2ml와 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 측정하였다. 효소활성도는 표준 반응 조건에서 1 μ mol/min의 글루코오스를 생성하는데 필요한 효소량을 1unit로 정의하였다.

2-3 섬유소폐기물을 이용한 효소생산

선행 연구결과에 의하여, 섬유소분해효소 생산의 최적 배지구성으로 탄소원으로 1% 볏짚과 1% 폐지, 유기질소원의 최적 농도로 0.1% 펩톤을 실험에 사용하였다. 높은 원가의 펩톤 대신 콩비지, 효모를 사용하여 질소원으로 대체하기 위하여 최적 기질 농도를 검토하였다. 콩의 농도를 0.1% 펩톤의 질소함량의 1배, 5배, 10배 즉 0.242 g, 1.21 g, 2.42 g 을 첨가 [원소분석에 의하면 펩톤의 질소함량(15.4%)은 콩의 질소함량(6.34%)의 2.42배] 하였으며, 효모의 농도도 0.1% 펩톤의 질소함량의 1배, 5배, 10배 즉 0.243 g, 1.215 g, 2.43 g을 첨가 [원소분석에 의하면 효모의 질소함량(6.36%)은 펩톤의 2.43배] 하였다. 실험에 사용된 콩과 효모는 막자사발에서 분쇄한 후 80°C에서 24 시간 건조하여 사용하였다. 또한 콩과 효모 각각 5 g을 6 N H₂SO₄에 용해시킨 후

(1.5 atm, 121°C, 30 min)에서 가수분해 시킨 후 10N NaOH용액으로 pH 6.0으로 조절하였다. 0.1% 펩톤의 질소함량의 1배, 5배, 10배를 취하여 질소원으로 대체하였다. 효소생산배지는 탄소원, 질소원을 제외한 멘델배지를 기본배지로 사용하였으며, 멘델 배지의 조성은 1L당 avicel 50.g, CMC 5.0g, peptone 1.0g, urea 0.3g, (NH₄)₂SO₄ 1.4g, KH₂PO₄ 2.0g, MgSO₄·7H₂O 0.3g, CaCl₂ 0.3g, trace element 1.0 ml, pH 6.0 이다.

3. 결과 및 고찰

(1) 배양배지인 멘델배지에서 무기, 유기질소원을 막자사발에서 분쇄한 콩 혹은 효모로 대체하였을 때, 효모 0.1%에서 amylase의 활성이 1.33 U/ml로써 가장 높았다.

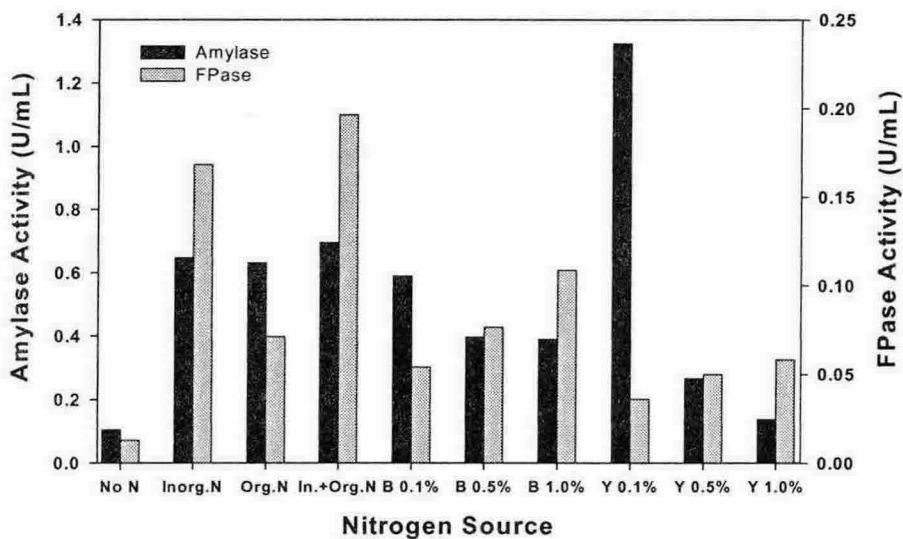


Fig 1. Comparison of amylase and FPase activities in the cultivation substituting inorganic and organic nitrogen sources in mandel's medium with soy bean or yeast. Growth condition (30°C, 100 rpm, 5 days), N: Nitrogen, Org.N: Organic Nitrogen, Inorg.N: Inorganic Nitrogen, B: Soybean, Y: Yeast

(2) 배양배지인 멘델배지에서 무기, 유기질소원을 6N 황산으로 가수분해한 콩 혹은 효모로 대체하였을 때, 효모 1.0%에서 FPase의 활성이 1.09 U/ml, amylase의 활성이 2.27 U/ml로써 가장 높았다.

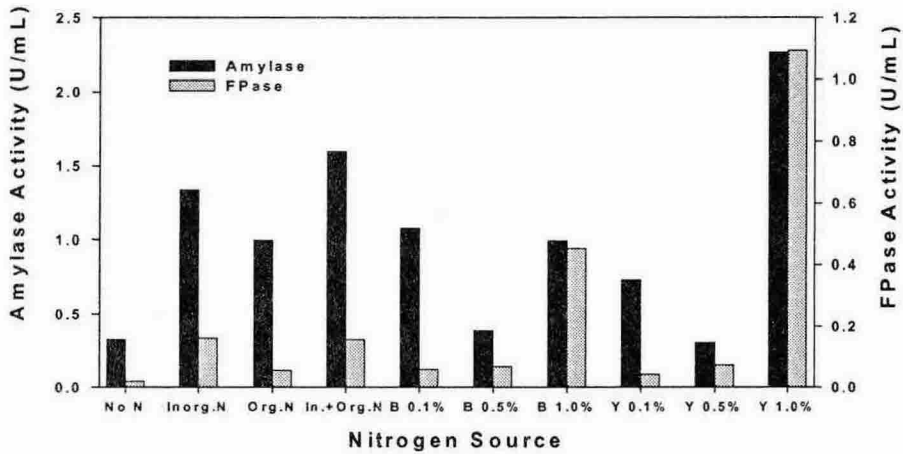


Fig 2. Comparison of amylase and FPase activities in the cultivation using nitrogen sources(soy bean, yeast) hydrolysed with 6 N H₂SO₄ in mandel's medium without nitrogen source. Growth condition (30°C, 100 rpm, 5 days), N: Nitrogen, Org.N: Organic Nitrogen, Inorg.N: Inorganic Nitrogen, B: Soybean, Y: Yeast

(3) 배양배지인 멘델배지에서 유기질소원(펩톤)을 막자사발에서 분쇄한 콩 혹은 효모로 대체하였을 때, 효모 1.0%과 콩 1.0%에서 amylase의 활성은 각각 1.93 U/ml, 1.71 U/ml로써 매우 높았다.

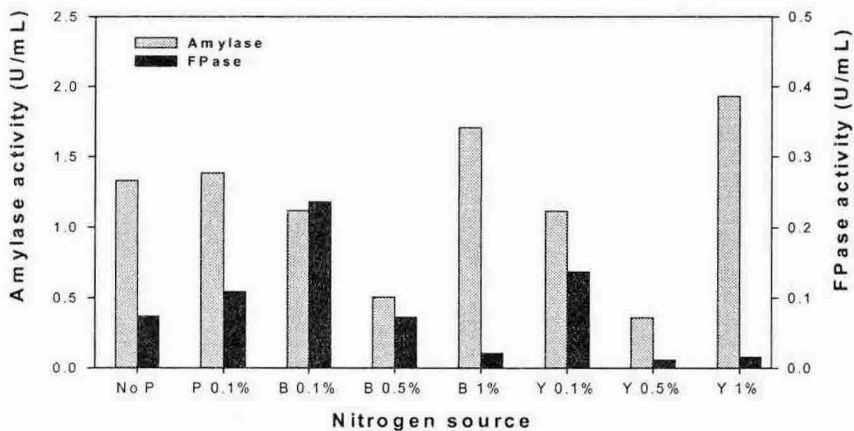


Fig 3. Comparison of amylase and FPase activities by addition of soy bean or yeast in mandel's medium without organic nitrogen source. Growth condition (30°C, 100 rpm, 5 days), P: Peptone, B: Soybean, Y: Yeast

(4) 배양배지인 멘델배지에서 유기질소원을 6N 황산으로 가수분해한 콩 혹은 효모로 대체하였을 때, FPase의 활성은 효모 1.0%에서 0.82 U/ml, amylase의 활성은 효모 0.5%에서 2.30 U/ml, 효모 0.1%에서 1.70 U/ml, 효모 1.0%에서 1.73%로써 매우 높았다.

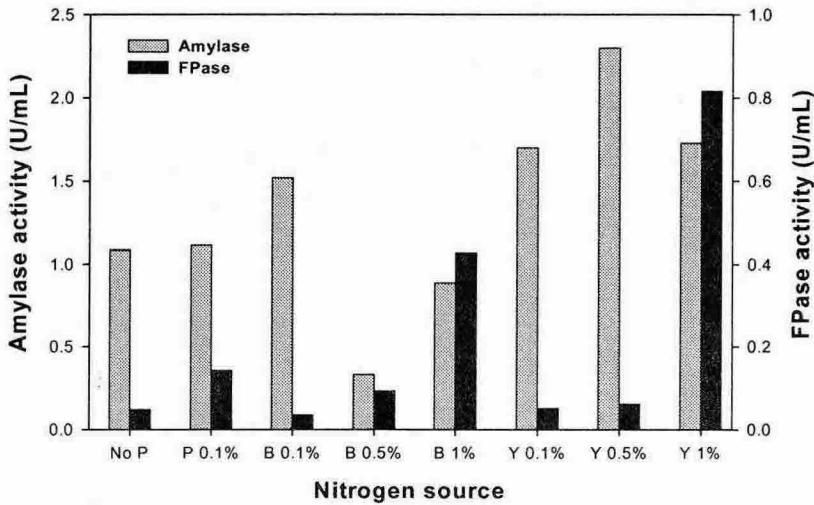


Fig 4. Comparison of amylase and FPase activities in the culture using nitrogen sources(soy bean or yeast) hydrolysed with 6N H₂SO₄ in mandel's medium without organic nitrogen source. Growth condition (30°C, 100 rpm, 5 days), P: Peptone, B: Soybean, Y: Yeast

4. 요약

높은 원가인 펩톤을 다른 질소원으로 대체하기 위하여 콩 혹은 효모의 질소원 대체가능성을 검토한 결과 효모의 농도를 0.5%의 펩톤과 동등한 양의 질소원으로 하였을 때 amylase의 생산성이 2.30 U/ml로써 가장 높았다. 때문에 높은 원가의 펩톤을 효모로 대체하는 것이 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 환경부의 차세대핵심환경기술개발사업(Eco-technopia 21 project)으로 지원받은 과제입니다.

5. 참고문헌

1. Bhat, M. K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* 15: 583-620.
2. Kim K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, Y. W. Lee, S. Y. Chung, and S. J. Kim. 2002. Optimization for the production of cellulolytic enzymes of a fungus, strain FJ1 by response surface methodology. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 17: 195-202
3. Krishna S. H., and K. C. Sekhar Rao. 2000. Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-414, *Bioprocess Eng.* 22: 467-470
4. Lowery, O. H., N. J. Rosebrough, A. I. Farr, and R. J. 1951. Randall Protein measurment with the folin phenol reagent. 193: 265-275
5. Ryu, D. D. Y. and M. Mandels. 1980. Cellulases: biosynthesis and application. *Enzyme Microb. Technol.* 2: 91-102
6. Vlasenko, E. Y., H. Ding, J. M. Labavitch, and S. P. Shoemaker. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technol.* 59: 109-119