

Trichoderma harzianum FJ1의 고체상태배양에 의한 섬유소분해효소의 생산

유승수 · 김경철 · 김성준*
전남대학교 공과대학 환경공학과

Production of Cellulolytic Enzymes by *Trichoderma harzianum* FJ1 in Solid State Fermentation. Yoo, Seung-Soo, Kyoung-Cheol Kim, and Seong-Jun Kim. Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea – The cellulases production in solid state fermentation (SSF) of *Trichoderma harzianum* FJ1 with high cellulases productivity using cellulosic wastes was investigated. Physical and chemical conditions of the fermentation, such as moisture content, initial pH, and composition of mixed substrate (wine waste, rice straw, and soybean flour) on FPase (Filter paper activity) production were examined. The enzyme production was optimized in the conditions of moisture content of 70%, pH 5.0, 30°C, and 1:1:1 composition of mixed substrate containing wine waste, rice straw, and soybean flour. The highest activities of FPA, CMCase, Xylanase, β -glucosidase, and Avicelase in the optimized culture conditions were 15.2, 69.1, 83.9, 29.2, and 4.2 unit/g-SDW in 5 day cultivation, respectively. Economical and efficient production of cellulolytic enzymes by *T. harzianum* FJ1 using cellulosic wastes in solid state fermentation will contribute to the biological saccharification of cellulosic wastes with enormous potential resource value in future.

Key words: *Trichoderma harzianum* FJ1, solid state fermentation, cellulolytic enzymes, cellulosic wastes

자연계에 다량으로 존재하는 biomass는 cellulose, hemicellulose, lignin을 주성분으로 구성되며, 이로부터 유용 화학물질, 식량 및 에너지로의 재활용에 관하여 전 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다[2, 5]. 그러나, biomass는 화학적 및 생물학적 가수분해에 매우 저항성이 큰 불수용성의 견고한 구조를 지닌 화합물이기 때문에 극히 일부만 이용되어지고 있으며, 아직도 막대한 양이 적절히 이용되지 못한 채 산화되거나 폐기물로 취급되어 자원이 낭비되고 공해 현상까지도 유발한다. 이러한 biomass를 효율적으로 이용하기 위해서는 많은 양의 섬유소분해효소를 저비용으로 생산하여 가수분해 공정의 단가를 낮추는 것이 필요하다.

본 실험실에서는 섬유소분해효소를 경제적으로 생산하기 위하여 Kim 등이 분리 및 특성파악을 수행한 *Trichoderma harzianum* FJ1을 이용하여 액상배양 연구를 수행하였다[4]. 상업용 기질을 이용한 효소생산의 최적배양 조건에서 CMCase, xylanase, β -glucosidase 및 Avicelase의 활성은 각각 34.2, 57.4, 2.97, 2.01 unit/ml이었고[3], 섬유소폐기물을 이용한 최적배양 조건에서는 각각 24.3, 38.7, 1.5, 0.6 unit/ml의 활성을 나타내었다[16]. 위의 액체상태배양에서 높은 효소활성을 얻을 수 있지만, 질소원과 trace element 첨

가 및 배양시의 동력비를 감안한다면 그리 경제적인 효소생산이라고 할 수 없을 것이다.

보다 경제적인 효소생산방법으로 고체상태배양을 들 수 있는데, 이는 효소 추출과정에서의 고농도의 효소액의 생산이 가능하며, 미생물의 자연 서식지와 거의 근접한 조건아래에서 성장하기 때문에 액체상태배양에서 효소를 생산하지 못하거나 아주 낮은 양을 생산하는 것보다 더 많은 효소나 대사산물을 생산할 수 있다[6, 8]. 또한 배양장치의 간단함과 저렴한 운전비용을 고려해 볼 때 액체상태배양보다 경제적인 이점을 살릴 수 있다[8]. 따라서 본 연구에서는 고체상태배양에서 주정박, 볏짚과 같이 쉽게 이용할 수 있는 섬유소 폐기물만을 기질로 이용하여 *T. harzianum* FJ1에 의한 섬유소분해효소의 경제적인 생산을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 포자현탁액 제조

본 실험에 사용된 균주는 제주도 일원에서 완전분해에 가까운 나무로부터 샘플을 채취하여 분리한 균주로서 형태학적 관찰 및 ITS sequencing을 분석한 결과 *T. harzianum*으로 동정되었다[4]. 균주의 보관 및 사용은 YMEA 배지 (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, agar 15 g, distilled water 1 L)에서 5일간 30°C에서 성장시킨 후 냉장보관 하여 실험에 이용하였다. 균주 접종은 포자현탁액

*Corresponding author
Tel: 82-62-530-1864, Fax: 82-62-530-0864
E-mail: seongjun@chonnam.ac.kr

을 사용하였으며, 포자현탁액을 조제하기 위해 YMEA배지 (petri-dish, 90 mm)에서 5일 배양된 *T. harzianum* FJ1의 Petridish 균체 2매분을 백금으로 긁어 시험관에 넣은 후 멸균증류수 10 ml를 첨가하였다. 이 시험관을 vortex mixer로 흔들어 포자를 현탁시킨 후, 4번 접은 거즈에 균사체를 걸러낸 여과액을 접종액으로 사용하였다. 접종액의 포자농도는 10^6 개/ml이었다.

균체의 정량

세포 농도를 정량하기 위해, 배양물 2 g에 증류수 100 ml을 첨가시켜 원심분리에 의해 2번 수세하여 배양물내의 protein을 제거하였고, 침전물은 100 ml의 증류수로 현탁시켰다. 현탁액 5 ml를 초음파 균체파쇄기로 5분간 세포벽을 파쇄한 후 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액의 protein 농도를 측정하였다. 이때의 균체 정량은 균체 농도와 protein 농도의 검량선을 이용하였다. 검량선을 작성하기 위하여 YMEA 액체배지에 균체를 5일 배양시킨 후, 위의 방법으로 배양액에 함유된 protein을 제거하고, 침전물은 정확히 칭량하여 2개로 분획하였다. 한 개의 분획물은 위의 방법에 의해 상등액을 Lowery 방법[7]에 의해 protein을 측정하였다. 다른 하나는 80°C에서 24시간 건조시킨 후 건조무게를 칭량한다. 이를 토대로 균체농도의 검량선을 작성하였다.

효소액 추출 및 효소활성도 측정

효소액 추출은 배양된 기질 1 g 당 50 mM citric acid buffer(pH 5.0)를 10 ml 첨가하여 30°C, 100 rpm으로 1시간 추출시킨 후, 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액을 효소액으로 하였다.

섬유소분해효소 활성은 FPA(filter paper activity)로 나타내었는데, 이는 50 mg(1×6 cm)의 filter paper(Whatman No. 1)를 위의 buffer로 적당히 희석되어진 효소액 1.0 ml에 첨가하여 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS 법으로 측정하였다[13]. 1 unit는 1분 동안 1 μ mol의 환원당을 생성하는 효소량을 나타내며, 효소의 농도는 1 g의 SDW(substrate dry weight)당 unit로 표기하였다. CMCase, xylanase, β -glucosidase 및 Avicelase의 활성 측정은 Yoo 등의 방법을 이용하여 정량하였다[16].

섬유소폐기물물 이용한 효소생산

섬유소분해효소 생산을 위한 고체상태배양에 사용된 섬유소폐기물은 주정박, 벚짚(전남 장성), 톱밥(참나무), 박스용지, 콩비지, 음식물쓰레기(전남대학교 구내식당)를 사용하였다. 준비된 기질들은 80°C에서 24시간 건조시킨 후 30 mesh로 분쇄하여 멸균(121°C, 15 min)후 실험에 사용하였다. 주정박은 주정발효 이전의 성상이 현미(40%)와 절간고구마(60%)로서, 전남 순천 소재 보해공장(주)에서 주류 제조시 발효물로서 이용되고 남은 잔류물이며, 콩비지는 전남 담양

소재 (주)자연과 사람들에서 두유제품 제조에 이용되고 남은 잔류물이다.

섬유소폐기물들의 효소생산성을 검토하기 위해 100 ml 삼각플라스크에 각각의 기질을 2 g씩 첨가하였고, 기질 이외의 다른 영양물질은 전혀 첨가하지 않았다. 배지의 함수율 및 pH는 50 mM citric acid buffer(pH 5.0)와 포자현탁액을 사용하여 70% (w/w) 및 pH 5.0으로 조절하였다. 효소생산은 대기 중 상대습도를 90~95% 이상 유지하여 30°C의 항온실에서 5일간 호기상태 배양을 하였다. 효소생산성을 높이기 위해, 효소생산성이 좋은 주정박 및 벚짚을 기준으로 각각의 섬유소폐기물을 각각 1 g씩 혼합하여 기질 조합의 영향을 조사하였다. 효소생산이 높았던 주정박과 벚짚의 기질 혼합비를 살펴보기 위해 각각의 기질혼합비를 달리하여 효소생산성을 조사하였다. 그리고 효소생산성을 더 높이고자 주정박과 벚짚에 질소원과 같은 부족한 영양물질을 추가하기 위해 음식물쓰레기와 콩비지를 혼합하여 배양하였다.

효소생산에서 배지의 최적 함수율을 결정하기 위해 60~80%(w/w)로 변화를 주었고, 또한 배지의 pH 영향을 살펴보기 위해 50 mM citric acid buffer 및 50 mM phosphate buffer를 사용하여 pH를 3~7로 변화시켰다. 경제적인 효소 생산을 위해 배지내의 함수율과 pH 조절을 위한 buffer를 증류수로 대체하여 효소생산성을 비교하였다. 고체상태배양에 적합한 최적 온도조사를 수행하기 위해 온도를 25~37°C로 변화를 주었으며, 접종물 농도의 영향을 살펴보기 위해 포자현탁액을 건조기질 g당 각각 0.15~1.6 ml의 변화를 주었다.

효소생산시 교반의 영향을 검토하기 위해 500 ml의 삼각플라스크를 이용하여 축방향 원심형 교반장치를 구성하였다. 플라스크는 수평방향에서 오른쪽으로 5° 기울어졌으며, 기질과 균체는 플라스크의 벽면을 따라 교반 되어진다. 플라스크의 교반속도를 25 rpm으로 하여 정치배양과 동일조건에서 배양하였다.

결과 및 고찰

탄소원으로서 섬유소폐기물의 이용

섬유소분해효소는 배지내의 사용되는 탄소원에 따라 효소유도 및 생산 특성이 다르다는 것은 잘 알려져 있다[10]. 탄소원으로서 섬유소폐기물을 이용하여 5일 동안 고체상태배양 후 균체의 성장과 섬유소분해효소의 생산 특성을 살펴보았다. 최적 배양조건에서 *T. harzianum* FJ1의 효소생산의 시간 변화에 따른 균체 성장 및 효소생산성을 Fig. 1에 보였다. 균체의 성장은 2일까지 급속한 성장을 보여주었으며, 그 이후에는 점점 감소하였다. 이와 반대로 기질의 소비율은 균체가 성장하는 동안 급격한 감소를 보였지만, 3일 이후에는 기질농도의 감소는 미미하였다. 한편 섬유소분해효소는 균체의 성장이 정지된 후 2일부터 생산되어 5일째에 최대에

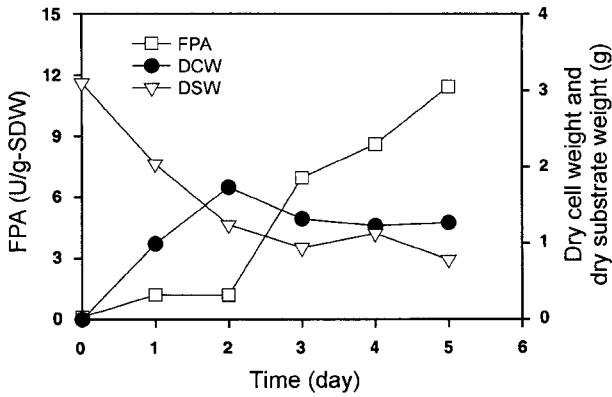


Fig. 1. Time course profiles of enzyme production, dry cell weight, and dry substrate weight of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g + soybean flour of 1 g).

이러한 전형적인 2차 대사산물의 형태를 보여 주었다. 한편 액체상태배양에서와 마찬가지로 5일 이후에는 효소활성이 감소하였다(data not shown).

Fig. 2는 다양한 섬유소폐기물을 이용한 섬유소분해효소 생산을 보여주고 있다. 주정박을 사용한 배양에서는 *T. harzianum* FJ1의 성장이 활발하여 흰 균사체가 기질을 모두 덮었으며, 1.05 FPA로 가장 높은 효소생산을 보였다. 이는 균체의 성장이 효소생산과 밀접한 관련이 있었고, 주정박이 고체상태배양에 적합한 기질임을 알 수 있었다.

효소생산성을 높이기 위해 주정박과 다른 섬유소폐기물을 혼합하여 기질 조합의 영향을 살펴보았다(Fig. 3). 이는 각각의 기질을 단독으로 사용할 경우 기질에 함유된 성분이 균주의 성장과 효소생산에 효과적으로 작용하지 않을 수 있으므로 기질혼합을 통하여 상호보완 하기 위해서이다. 그 결과 주정박과 볏짚을 혼합하여 배양했을 때 섬유소분해효소의 생산이 주정박을 단독으로 사용했을 때 보다 약 13배 이

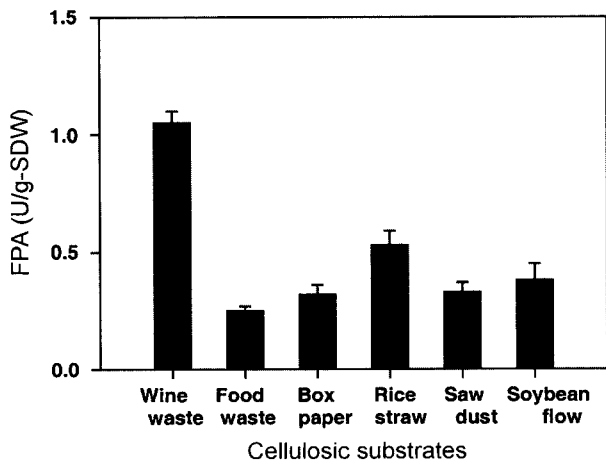


Fig. 2. Effect of cellulosic substrates on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation. The bar showed standard deviation from triplicate cultures.

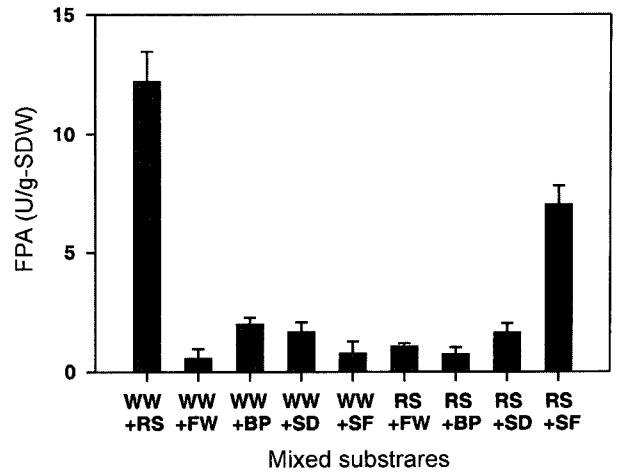


Fig. 3. Effect of mixed substrates on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation. The bar showed standard deviation from triplicate cultures. Legends: WW (wine waste), RS (rice straw), FW (food waste), BP (box paper), SD (sawdust), SF (soybean flour).

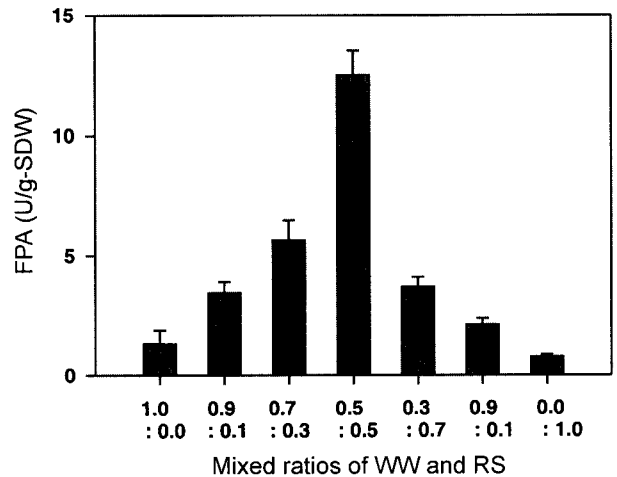


Fig. 4. Effect of mixture ratios of substrate on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation. The bar means standard deviation from triplicate cultures.

상의 효소생산을 나타내었고, 최적의 혼합비율은 1:1임을 Fig 4에서도 보여주고 있으며, 이때의 효소활성 값은 13.98 FPA 이었다. 이는 Luiza 등이 *Aspergillus niger* 38 균주를 이용하여 wheat straw와 wheat bran을 9:1로 혼합했을 때 9.30 FPA를 얻은 결과보다 높았다[6]. 주정박과 볏짚의 혼합배양 시 높은 효소생산성을 보여주었는데, 이는 볏짚내에 포함되어 어진 용해성 환원당(30~50 mg/g-볏짚)이 균체성장에 유리하게 작용되어져 효소 유도를 원활히 할 수 있었던 것으로 사료된다. 용해성 환원당 함량은 적지만 초기 균체 성장의 탄소원으로 이용되어지고, 환원당이 고갈되면 비용해성 섬유소 고분자인 cellulose 및 hemicellulose에 의해 섬유소분해소의 1단계 유도가 촉진된다. 분비된 섬유소분해효소들에 의

해 벚짚 중의 cellulose, hemicellulose가 가수분해 되어 환원당이 생성된다. 이들은 다시 균체 성장의 탄소원으로 이용되고, 다음 단계의 섬유소분해효소 분비를 촉진시키는 형태로서 벚짚이 효소생산에 관여하는 것으로 사료된다. Vlasenk 등의 보고에 의하면 벚짚내의 탄수화물 함량은 66%이며, 이 중에서 cellulose 37.2%, hemicellulose 26.1% 및 환원당 21.3%의 비율로 존재한다[14]. Yu 등의 보고에 의하면 섬유소가 분해효소에 의하여 가수분해되는 과정에서 최종산물로 생성되는 당 농도가 높을수록 섬유소분해효소의 유도작용을 억제하지만, 당이 배지에 탄소원으로 일정량 첨가될 경우 균체의 증식이 빠르게 일어나 효소생산성을 향상시킨다고 제시하고 있다[15]. 효소생산성의 향상에 관한 또 다른 가능성은 다양한 물질로 이루어진 기질내에서 본 균주가 활발하게 성장하면서 효소를 원활히 유도한 것으로 사료된다. 주정박 구성은 현미와 절간고구마로 이루어져 있으며, 이는 starch가 다량 함유된 물질이고, 벚짚은 cellulose 및 hemicellulose로 이루어져 있다. Ryu 등의 액체상태배양의 연구에서 비결정성의 용해성 기질(CMC)은 균체가 성장하는 탄소원으로 작용하고, 결정성의 비용해성 기질(Avicel)은 2차 대사기에 생성되는 섬유소분해효소의 분비를 촉진시키는 유도제로 작용하는 것과 유사한 결과를 보여주는 것이라고 사료된다[10]. *T. harzianum* FJ1의 이전 액체상태배양 연구에서도 비용해성인 Avicel과 용해성인 CMC의 혼합배양에서 높은 효소 활성이 얻어졌다[4]. 섬유소폐기물인 벚짚과 펄프를 이용한 Yoo 등의 연구와도 비슷한 경향을 보이고 있다[15]. 본 연구의 고체배양에서도 벚짚의 초기 환원당은 용해성 기질로 작용하고 비용해성인 주정박 및 벚짚의 고분자 섬유소 물질은 결정성 기질로서 효소유도를 촉진시켰다고 사료된다. 또한 Yu 등이 제시한 바와 같이 Avicel과 wheat bran을 이용한 효소생산의 연구에서도 wheat bran은 용해성 기질로 사용되었으며, 단일 기질에서 부족한 영양물질, 전분, protein, lignocellulosic 물질의 부가를 통해 미생물 성장과 효소 유도 유도를 촉진시켰다고 하였다[15].

고체상태배양인자들의 검토

고체상태배양에서 배지내 함수율은 효소를 생산하는데 있어 가장 큰 변수 중 하나로서 균체와 기질간의 물리·화학적 반응에 깊은 영향을 미친다[11]. 수분은 미생물의 성장과 물질대사에 필수적이지만, 고형기질 중의 함수율이 높게 되면 산소와 같은 성장관련 물질의 전달 속도가 제한을 받게 된다[8]. 함수율 변화에 따른 효소생산성을 살펴보았는데, 60, 70 및 75%의 범위에서는 균체 성장 및 효소생산에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(Table 1). 반면 배지내 함수율이 80% 이상일 때는 균체의 성장이 원활히 이루어지지 않았고, 이로 인해 효소생산에 저해를 주는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Liuza 등의 연구와 비슷한 결과를 나타내었고[6], Sun 등의 연구에서는 함수율이 증가할수

Table 1. Effect of initial moisture contents in solid medium on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g).

Moisture content (% w/w)	FPA (U/g-SDW)
60	13.25
70	12.70
75	12.10
80	3.26

록 기질사이의 다공성이 감소하여 미생물의 성장을 저해한다고 설명하고 있다[11].

초기 pH가 효소생산에 미치는 영향을 검토하였다. 고체상태배양에서는 pH의 조절이 배양 중에는 어렵기 때문에 일반적으로 배양초기에 buffer를 사용하여 배지의 pH 및 함수율을 조절한다[9]. Table 2는 buffer를 이용한 각각의 초기 pH에서의 효소생산성을 비교하였는데, 초기 pH 5.0에서 가장 안정적인 효소생산을 보여주는 것을 확인할 수 있었다.

효소생산의 배양온도를 검토한 결과, 25~30°C의 범위까지 대체로 안정적으로 효소를 생산하였다(Table 3). 배양온도 35°C 이상에서는 균체의 성장 및 효소생산이 원활히 이루어지지 않았는데, 이는 Liuza 등의 온도에 관한 연구 결과와 같은 경향을 보여주고 있다[6].

접종물의 농도에 따른 효소생산성을 검토하였는데, 건조기질 g 당 포자현탁액 0.35~0.5 ml로 주입하여 배양하였을 때 효소생산에는 큰 영향을 보이지 않았지만, 0.5 ml 이상 접종하였을 경우에는 효소생산이 낮아짐을 보여주었다(Table 4). 효소생산에 관한 온도, pH 및 접종농도와 같은 환경변수를 살펴보면 *T. harzianum* FJ1의 액체상태배양에서의 특성과 비슷한 경향을 보여주었다[4].

Table 2. Effect of initial pHs on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g).

Initial pH	FPA (U/g-SDW)
3.0	8.07
4.0	8.59
5.0	10.46
6.0	6.05
7.0	5.72

Table 3. Effect of culture temperatures on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g).

Temperature (°C)	FPA (U/g-SDW)
25	9.47
27	9.51
30	12.29
35	2.52
37	2.58

Table 4. Effect of inoculum concentrations on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g).

Inoculum (g/ml)	FPA (U/g-SDW)
0.3	9.34
0.7	11.87
1.0	12.38
2.0	8.71
3.2	8.91

Table 5. Effect of agitation on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation (wine waste of 1 g + rice straw of 1 g).

Wine waste + Rice straw	FPA(U/g-SDW)
Agitate Fermentation	1.63
Static Fermentation	12.38

교반배양시 효소생산성은 정치배양에서 보다 낮은 효소생산을 보였다(Table 5). 이는 교반배양시 전단력에 의해 균사체의 원활한 성장이 안되어 효소 유도에 불리하였다는 관점과 교반작용에 의해 고형기질들이 단단하게 굳어져 내부 공간이 치밀해짐으로서 산소와 같은 기질들의 물질전달이 원활히 이루어지지 않았다고 고찰할 수 있다. 경제적인 효소생산 측면에서 살펴보면, Maurice 등의 효소생산의 배양법 비교에서 교반시 소비되는 동력비 등을 고려해 볼 때 고체상태배양에서 정치배양이 보다 경제적인 배양공정임을 증명하였으며[8], *T. harzianum* FJ1을 이용한 고체상태배양의 정치배양에서의 높은 효소 생산성은 경제적인 효소생산 측면에서 유리함을 보여 주는 결과라고 얘기할 수 있을 것이다.

효소생산에서 초기 pH와 함수율을 동시에 조절하기 위해 50 mM citric acid buffer(pH 5.0)를 사용하였는데, 배양공정에서 최적의 운전비용을 고려해 본다면 buffer의 사용 또한 운전비의 증가를 야기하는 원인이 된다. 따라서 자연상태와 거의 유사한 환경조건에서의 효소생산성 검토 및 buffer 사용 여부를 결정하였다. 그 결과 buffer 이용시에는 11.4 FPA이었고, 증류수 이용시에는 10.3 FPA이었다. 거의 유사한 생산성을 보여 효소의 대량 생산공정에서 buffer의 사용으로 인한 운전비용을 감소시킬 수 있으리라 사료된다.

섬유소분해효소의 최적생산

섬유소분해효소 생산을 향상시키기 위해 주정박과 볏짚에 질소원과 같은 부족한 영양물질을 추가하기 위해 음식물쓰레기와 콩비지를 첨가하여 배양하였다. 음식물쓰레기내의 여러 가지 성분이 효소생산에 유리한 영향을 미칠 것으로 사료되어 실험을 수행한 결과, 주정박, 볏짚과 음식물쓰레기의 혼합비율 1:1:0.5 이상에서는 오히려 효소생산에 저해를 주었다(Fig. 5). 이는 음식물쓰레기내에 포함된 염분량이 음식물쓰레기의 혼합비가 증가할수록 같이 증가하여 효소생산에

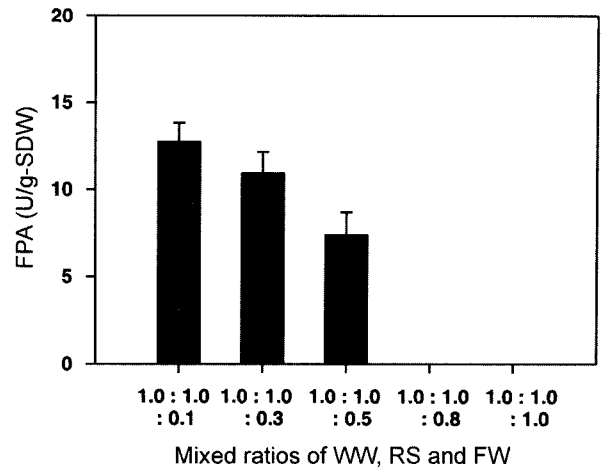


Fig. 5. Effect of mixture substrate ratios on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation. The bar means standard deviation from triplicate cultures. Legends: WW (wine waste), RS (rice straw), FW (food waste).

저해를 주는 것으로 사료된다. Abd-Alla 등의 연구에서 NaCl(%)의 농도에 따른 cellulase의 생산성을 조사하였는데, 0.5%의 농도까지는 높은 효소활성을 보여주고 있으나 1.0%의 농도에서는 낮은 효소활성을 나타내는 것으로 살펴볼 수 있었으며, NaCl에 의해 균체의 개체수 감소나 효소 protein의 salting-out의 결과로 고찰하였다[1].

콩비지를 주정박과 볏짚에 혼합하여 배양한 결과, 콩비지의 혼합비율이 높아질수록 효소생산도 높아지는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). 이 결과는 주정박과 볏짚만으로 배양했을 때 효소생산에 필요한 질소원과 같은 영양물질이 부족하였다고 사료할 수 있었고, 콩비지는 균체의 성장에 도움을 주어 효소생산성을 높일 수 있음을 보여주었다. 주정박과 볏짚과 콩비지가 1:1:1의 비율로 혼합되었을 때, FPA,

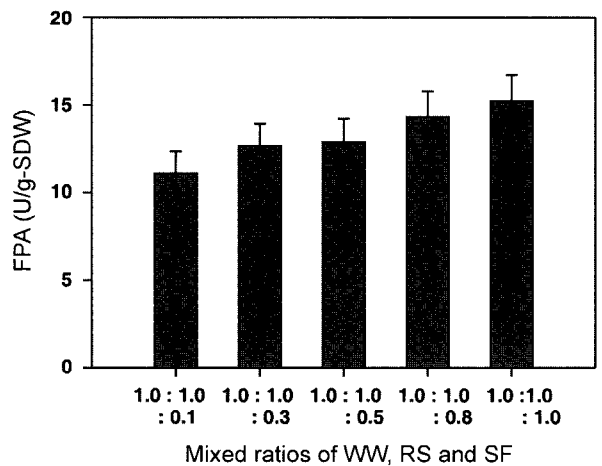


Fig. 6. Effect of mixture substrate ratios on the cellulase production of *T. harzianum* FJ1 in solid state fermentation. The bar means standard deviation from triplicate cultures. Legends: WW (wine waste), RS (rice straw), SF (food waste).

CMCase, Xylanase, β -glucosidase 및 Avicelase는 각각 15.22, 69.1, 83.9, 29.2 및 4.2로서 최대 효소활성을 보였다. 이는 Marcel 등의 최적배양조건에서의 14.8 FPA의 값과 유사함을 보여준다[9].

결론적으로, 경제적인 섬유소분해효소 생산을 위해 *T. harzianum* FJ1을 이용한 고체상태배양법을 검토하였는데, 상업용 기질의 첨가 없이 섬유소폐기물만을 이용하여 효소학적 당화에 필요한 섬유소분해소를 생산할 수 있었다. 섬유소폐기물만을 이용해 효소생산이 가능했던 것은 고체상태배양의 장점인 자연상태의 균주 서식환경에서 효소 생산법이라는 관점으로 해석할 수 있을 것이다. 본 균주는 썩은 나무에서 분리되어진 사상균으로서, 기질제한상태 및 폭 넓은 환경변수(온도, pH, 함수율)의 조건에서 효소 유도 능력이 뛰어나기에, 섬유소폐기물만을 이용하여도 충분히 효소생산이 가능했으리라 사료된다.

고체·액체상태배양에서의 각각의 효소활성 및 생산성에 관한 비교는 어렵지만, 고체 상태배양에서는 효소학적 당화 공정에 필요한 효소농도를 임의로 조제 가능하다는 장점을 가진다. 불용성의 견고한 섬유소물질의 가수분해에는 Sun 등의 에탄올 생산을 위한 섬유소물질의 가수분해에서 기질 g 당 10 FPU의 cellulase 첨가되어야 한다고 제시하였다[12]. *T. harzianum* FJ1의 고체·액체상태배양에서 얻어진 효소액을 이용하여 폐지의 효소학적 당화를 수행한 결과, 액체상태배양에서 일정하게 얻어지는 효소농도(FPase, 0.5~0.7 unit/ml)에서는 최대 당화율이 30% 정도 달성할 수 있었지만, 고체상태배양에서 임의로 조제된 효소농도(FPase, 1.0 unit/ml 이상)에서는 최대 당화율 50% 이상까지 수행할 수 있었다 (data not shown).

마지막으로 본 균주는 고체상태의 정치배양으로 효소생산성을 충분히 얻을 수 있었으며, 이는 배양공정의 경제적인 측면에서 장치구성 및 교반을 위한 동력비용에서의 장점을 가질 수 있을 것이다. 본 연구에서의 효소생산성은 타 보고서의 결과보다 동등이상의 우위를 보여주고 있었으며, 경제적으로 섬유소분해효소를 생산할 수 있었다. 이는 생물학적 당화에서의 효소생산 비용을 감소시키는데 도움을 줄 것이며, 섬유소폐기물의 생물학적 당화기술에 크게 기여하리라 사료된다.

요 약

고체상태배양에서 섬유소분해효소의 고 생산을 위해 기질로서 다양한 섬유소폐기물을 검토한 결과, 주정박과 볏짚을 1:1의 혼합기질로 사용하였을 때 13.98 FPA를 얻었다. 효소 생산을 높이기 위해 주정박과 볏짚의 혼합기질에 질소원으로 콩비지를 1:1로 혼합하였을 때 15.22 FPA의 효소활성을 얻을 수 있었다. 이때의 최적의 함수율, pH, 온도는 각각 70%, 5.0, 30°C이었다. 최적배양조건에서 배양 5일째

FPA, CMCase, Xylanase, β -glucosidase 및 Avicelase의 효소활성은 각각 15.22, 69.1, 83.9, 29.2 및 4.2 unit/g-SDW 이었다. *T. harzianum* FJ1의 섬유소폐기물을 이용한 고체상태배양의 경제적인 효소생산은 섬유소폐기물의 생물학적 당화기술에 크게 기여할 것이다.

감사의 말

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며(KRF-2002-003-D00100), 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Abd-Alla, M. H. and S. A. Omar. 1998. Wheat straw and cellulolytic fungi application increases nodulation, nodule efficiency and growth of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) grown in saline soil. *Biol. Fertil. Soils* **26**: 58-65.
2. Bhat, M. K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnol. Adv.* **15**: 583-620.
3. 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.
4. 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).
5. 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.
6. Luiza, J. 2000. Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production. *Ind. Crop. Prod.* **11**: 1-5.
7. Lowery, O. H., N. J. Rosebrough, A. I. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
8. Maurice, R. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* **1**: 1-15.
9. Marcel, G. G., P. Leticia, M. Patricia, and T. P. Robert. 1999. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse. *Biore-source technol.* **68**: 173-178.
10. Ryu, D. D. Y. and M. Mandels. 1980. Cellulases: biosynthesis and application. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 91-102.
11. Sun, T., B. Liu, Z. Li, and D. Liu. 1999. Effect of air pressure amplitude on cellulase productivity by *Trichoderma viride* SL-1 in periodic pressure solid state fermenter. *Process Biochem.* **24**: 25-29.
12. Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* **83**: 1-11.
13. Thomas, M. W. and K. M. Bhat. 1988. Methods for measur-

- ing cellulase activities. *Method. Enzymol.* **160**: 87-112.
14. Vlasenko, E. Y., H. Ding, J. M. Labavitch, and S. P. Shoemaker. 1997. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw. *Bioresource Technol.* **59**: 109-119.
15. Yu, X. B., H. S. Yun, and Y. M. Koo. 1998. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* RUT C30 in wheat bran-containing media. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 208-213.
16. Yoo, S. S., K. C. Kim, Y. A. Oh, S. Y. Chung, and S. J. Kim. 2002. The high production of cellulolytic enzymes using cellulosic wastes by a fungus, strain FJ1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 172-176.

(Received Feb. 27, 2003/Accepted Aug. 21, 2003)