

Trichoderma harzianum SJG-99721의 체외 분비 chitinase 생산에 미치는 생물 반응기에서의 반응 최적화 연구

이 호 용

상지대학교 생명과학과

Optimization of Environmental Parameters for Extracellular Chitinase Production by *Trichoderma harzianum* SJG-99721 in Bioreactor

Ho Yong Lee

Department of Biological Science, Sang Ji University, Wonju 220-702, Korea

Abstract - A self-directing optimization procedure was applied to determine the best environmental factors in operating the bioreactor. The self-directing optimization process was employed to determine the best conditional combination of multi-parameters, pH, temperature, aeration rate and mixing rate for maximal production of chitinase by *Trichoderma harzianum* SJG-99721 in batch mode fermentation. Among these factors, the parameters of pH and aeration rate were found to be particularly important on mycellial growth and chitinase activity. pH 4.89, an aeration rate of 3.22 l per minute and an agitation rate of 225 rpm was found to be the best combination. By the optimization, chitinase activity was dramatically increased from an initial value of 4.221 U under basic conditions to a final value of 16.825 U.

Key words : Chitinase activity, Self-directing optimization, *Trichoderma harzianum*

서 론

*Trichoderma*속의 대부분은 주변의 토양과 유기물에서 광범위한 분포를 나타내고 있어 손쉽게 분리할 수 있으며 많은 기질에서 아주 빠른 속도로 증식하는 특징이 있다. 특히 다양한 종류의 효소를 생산하여 여러 가지 병원성 균주에 대한 폭넓은 항균능력을 나타내고 있어 (Samuels 1996) 이러한 능력은 생물학적 제어제로서 *Trichoderma*의 사용 가능성을 제시하게 되었으며 한국의 토착종으로 본 실험실에서 분리한 *Trichoderma har-*

zianum SJG-99721 역시 높은 항균 능력을 나타낸 바 있다(이와 민 2002).

Chitinase와 β -N-acetylglucosaminidase는 chitin을 N-acetyl-D-glucosamine으로 분해시키는 효소이다 (Reynolds *et al.* 1996). 이러한 chitinase의 역할은 곰팡이들로 하여금 세포벽 형성을 불가능 하게 하여 많은 식물 병원성 곰팡이들에 대한 효과적인 생물 농약으로 사용 가능하게 한다(Elad *et al.* 1982; Kitamoto *et al.* 1988).

*T. harzianum*의 곰팡이 병원균에 대한 생물학적 제어 효과는 이제 상업적으로 매우 중요하게 인식되고 있다. 특히 화학합성 농약의 여러 가지 문제점으로 인해 앞으로 그 효율성이 더욱 증대될 것으로 판단된다. 그럼에도 불구하고 *T. harzianum*의 chitinase 대량 생산에 대한

* Corresponding author: Ho Yong Lee, Tel. 033-730-0432, Fax. 033-730-0403, E-mail. hylee@sangji.ac.kr

최적화 연구는 거의 이루어지고 있지 않다.

모든 발효 과정은 pH, 폭기율과 교반 속도에 의해 영향을 받는다. 그러나 이들 환경 요인을 최적화하는 과정은 한 가지 변수를 고정시키며 나머지 변수를 하나씩 측정해나가는 매우 어려운 무작위 과정에 의해 이루어진다. 이러한 복잡함을 극복하는 방법으로 처음 제시된 것이 바로 Hendrix(1980)에 의한 self-directing optimization(자율 조절 최적화) 기술이다.

본 연구에서는 Hendrix의 자율 조절 최적화 기술을 응용하여 *Trichoderma harzianum*을 이용한 세포의 분비 chitinase의 대량 생산을 시도하였으며 이 시료를 이용하여 실험한 결과 많은 식물 병원성 미생물에 대한 생물학적 조절이 가능한지 확인하여 보았다.

재료 및 방법

1. 실험 균주의 관리와 배양

실험균주로는 본 연구실에서 분리 배양하여 보존하고 있던 *Trichoderma harzianum* SJG99721을 사용하였으며 배양 방법은 이와 민(2002)의 방법에 따랐다. 보존은 PDA 사면 배지를 이용하여 4°C에서 실시하며 2달에 한 번씩 계대하였다. 본 실험을 실행하기 위해서는 PDB배지를 사용하여 활성화 한 후 실험에 사용하였다.

2. Colloidal chitin과 chitinase activity의 측정

Colloidal chitin의 제조는 Hsu의 방법을 변형하였다(Hsu and Lockwood, 1975). Crab shell chitin을 염산 원액에 200 g L⁻¹의 농도로 첨가한 다음 2~3시간동안 교반하면서 녹인 후 6 N NaOH 용액으로 hood안에서 pH 7.0으로 적정하였다. 그 후 증류수로 5~6회 씻어내서 염을 제거함으로써 colloidal chitin 용액을 제조하였으며 고온(80°C) 건조시킨 후 분말로 사용하였다.

*Trichoderma harzianum*의 chitinase 생산을 가장 높게 하는 배지로는 Kapat *et al.* (1996)의 논문에 의해 조성하였다(Table 1).

Chitinase의 활성은 Yanai *et al.* (1992)의 방법에 의하여 측정하였다. 0.5% colloidal chitin 250 µl, 0.2 M sodium acetate buffer (pH 4) 250 µl와 enzyme solution 500 µl를 포함하는 반응 혼합물을 40°C에서 2시간 동안 방치하였다. 이 혼합물을 원심분리(4°C 12,000 rpm 5 min)후 500 µl의 상등액을 취한 다음, 0.8 M boric acid 100 µl를 첨가하고 다시 1 M KOH 100 µl를 첨가하여 pH를 10.2로 맞추었다. 이 시험관을 3분 동안 중탕 반응한 다음 DMAB

Table 1. Composition of medium for producing chitinase

Component	Concentration (g L ⁻¹)
Colloidal chitin	12.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.2
NaH ₂ PO ₄	6.9
KH ₂ PO ₄	2.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.3
Tween 80	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.005
MnSO ₄	0.0016
ZnSO ₄	0.0014
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.002

용액을(p-dimethylamino benzaldehyde 1 g을 1% HCl을 포함하는 Acetic acid 100 ml속에 녹여서 제조) 3 ml 첨가하여 상온에서 20 min 동안 방치하여 발색시켜서, 585 nm에서 측정하였다. Chitinase 1unit는 40°C, 2시간 동안 0.01 µmole ml⁻¹의 N-acetyl-glucosamine을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

3. 발효조건 및 운전 방법

발효는 8 l Bioreactor (Eyela, MBF-800MC, Japan)에 5 l가 되도록 배지를 조절하여 실시하였다. 발효조에는 교반속도와 폭기율 등 모든 실험 조건을 조절할 수 있도록 부속 장치를 설치하여 사용하였다. pH는 2 M NaOH와 2 M HCl을 이용하여 조절하였다. 각 단계별 실험은 제어 변수를 적정화 한 후 배양 시간은 6일간을 실시하였다.

4. 제어 변수의 자율 조절 최적화 기술

기존의 최적화 기술이 각 변수의 연속적인 결과를 얻은 후 각각의 변수를 종합하여 최종 최적화 변수를 찾아내는 것과는 달리 self-directing 최적화 기술은 동시에 몇 가지 변수를 동시에 적용시키며 최종 최적화 변수를 찾아내는 기술이다(Felse and Panda 1999; Hendrix 1980). 본 연구에서는 온도, 폭기율, 교반 속도의 세가지 변수와 pH, 폭기율, 교반 속도의 세가지 변수를 사용하여 온도와 pH 간의 우선성을 측정하였으며 아울러 이들 변수에 따른 최적 폭기율과 교반 속도를 서로 비교하여 보았다.

온도와 폭기율 및 교반량과의 관계를 살펴보기 위하여 pH는 5.0으로 조절하였으며 온도는 25°C와 30°C, 폭기량은 분당 1 l 및 2 l 교반 속도는 150 rpm, 300 rpm으로 적용하였다.

pH와 폭기율 및 교반량과의 관계를 확인하기 위해서는 온도는 32°C로 pH는 5.0과 6.0의 두 변수로 기타는

앞의 방법과 같이 적용하였다.

결과 및 고찰

1. 온도와 폭기율 및 교반량과의 관계

자율 조절 최적화 과정을 수행하기 위해서는 3가지 변수에 대해 4가지 조건으로 실험한 후 그 결과 중 1가지를 제외시키고 평균값을 구해 새로운 조건을 찾아 나가는 과정을 계속하게 된다. 이를 위해 온도 변수로 25°C와 30°C의 온도, 폭기율로 분당 1l 및 2l의 공기주입량, 교반 속도는 150, 300 rpm로 각각 적용 시켜 1번째 자료를 얻은 결과는 Table 2와 같다. 이 결과에 의해 1번째 data (Run No. 1)를 제외하였고 이에 따라 5번째 조건을 계산하여 내었으며 같은 방법에 의해 6번째, 7번째, 8번째 조건을 계산하여 낸 결과는 Table 3과 같다. 그 결과 온도는 32°C, 폭기율은 2.34 L, 교반율은 350 rpm에서 최적조건을 보여 11.324 U의 chitinase를 생산하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 같은 방법을 사용한 Felse와 Panda의 논문(1999)에서 나타난 최적 조건이 폭기율

Table 2. Basal data for calculating self-directing optimization

Run No.	Temperature (°C)	Aeration rate (l min ⁻¹)	Agitation rate (rpm)	Maximum activity (U)
1	25	1	150	6.221
2	25	2	150	6.727
3	30	1	300	8.778
4	30	2	300	9.875

Table 3. Maximum activity of chitinase at various combinations of environmental factors with temperature as governed by the self-directing optimization technique

Run No.	Temperature (°C)	Aeration rate (l min ⁻¹)	Agitation rate (rpm)	Maximum activity (U)
1	25	1	150	4.221
2	25	2	150	4.727
3	30	1	300	6.778
4	30	2	300	8.875
Mean	28.33	1.67	250.00	6.79
2×M	56.66	3.34	500	
2M-R1	31.66	2.34	350	
5	32	2.34	350	11.324
6	36.33	1.56	483	5.245
7	25.00	2.00	150	7.278
8	21.67	2.67	50	4.278

Table 4. Maximum activity of chitinase at various combinations of environmental factors with pH as governed by the self-directing optimization technique

Run No.	Temperature (°C)	Aeration rate (l min ⁻¹)	Agitation rate (rpm)	Maximum activity (U)
1	5.6	1	160	5.221
2	5.6	2	160	5.741
3	4.0	1	305	4.329
4	4.0	2	305	6.484
5	6.13	2.33	112	5.483
6	4.89	3.22	225	16.825
7	3.53	2.48	348	6.662
8	3.39	2.80	473	5.443

1.5l, 교반율 224 rpm이라 밝힌 것과 많은 차이를 나타내었고 최적 조건을 찾아가는 과정도 maximum activity가 agitation rate에 의해 크게 좌우되지 않는 등 차이점을 나타내었다. 이러한 차이는 균주의 차이에서 발생될 수 있어 정확한 원인을 밝힐 수는 없었다. 또한 최대 11.324 U의 chitinase 생산량은 4.221 U를 보인 처음 조건과 비교하여 볼 때 2.68배 그 생산량을 증가시킨 조건을 찾아낸 것이다. 본 연구의 목적은 어떻게 하면 빠른 시간 안에 최적 조건을 찾아낼 수 있는가에 있었다. 그러한 점에서 기존의 방법이 각 parameter들에 대해 최소한 7~8개 구간을 설정하여 한 가지씩 최적화를 이루어 간다면 본 방법은 동시에 3가지 parameter들에 대해 8회 정도의 실험을 통하여 최대 생산량을 이루어 낸다는 점에서 매우 활용 가치가 높은 기술이라고 사료되었다.

2. pH와 폭기율 및 교반량과의 관계

온도를 이용한 최적화의 결과와 비교하기 위하여 같은 방법으로 pH를 5.6과 4.0의 두가지 조건으로 적용하여 실험하여 보았다. 단지 온도는 앞의 실험 결과를 이용하여 32°C로 정하였으며 그 실험 결과는 Table 4와 같다. 즉 pH는 4.9, 폭기율은 3.22 l, 교반율은 225 rpm에서 chitinase 생산에 대한 최적의 값 16.825 U를 나타냈는데 이러한 결과는 앞서 온도를 이용한 최적조건에서의 생산량에 비해 48.6%나 증가한 것으로 나타났다. 또한 온도 25°C, pH 5, 폭기율 1l, 교반율 150 rpm에서 나타난 chitinase 생산량 4.221 U에 비교하면 3.99배 증가한 효과를 나타내고 있다.

이상의 결과로 보아 자율 조절 최적화 과정이 완벽하지는 않다 하더라도 3가지 변수에 대한 최적 값을 찾아내기 위해 단지 5~6회의 실험을 통하여 최대치에 유사한 효소생산 값에 도달할 수 있었으며 이러한 점에서 매

우 효율적인 방법으로 그 가치를 인정받을 수 있으리라 판단되었다.

적 요

Phytopathogenic fungi들에 대해 매우 공격적인 *Trichoderma harzianum*은 다른 곰팡이들의 세포벽 주 성분인 chitin을 분해하는 extracellular chitinase를 분비하기 때문에 매우 효율적인 biocontrol agent로 사용할 수 있다. *Trichoderma harzianum*의 생물학적 제어 기능을 이용하기 위하여 extracellular chitinase의 생산성을 높일 수 있는 batch 모드에서의 적정 환경을 찾는 일은 매우 복잡하다. 이러한 문제를 해결할 수 있는 방법이 바로 self-directing optimization이다. 이 방법을 이용하여 실험한 결과 6~7 차례의 실험만으로 최적의 온도 혹은 pH 및 폭기율과 교반양을 구할 수 있었다. 그 결과 온도 32°C, pH 4.9, 폭기율 3.22 l, 교반율 225 rpm에서 chitinase의 최대 생산량 16.825 U를 나타내었다. 이는 온도 25°C, pH 5, 폭기율 1 l, 교반율 150 rpm에서 나타난 chitinase 생산량 4.221 U에 비교하면 3.99배 증가한 효과를 나타내고 있다. 이로서 self-directing optimization 방법을 통한 최적화 기술이 효소 생산 기술에 있어 그 최적화 과정을 단축시키고 최종 과정에 도달하는 새로운 기술로 적용할 수 있음을 알 수 있었다.

사 사

본 논문은 2002년도 상지대학교 학술연구비의 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

이호용, 민봉희. 2002. 길항작용을 나타내는 *Trichoderma*

harzianum SJG-99721의 분리 및 형태학적 특징. 환경생물. 20:130-135.

Elad Y, I Chet and Y Henis. 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Can. J Microbiol. 28:719-725.

False PA and T Panda. 1999. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. Process Biochem. 34:563-566

Handix C. 1980. Through the response surface with test tube and pipe wrench. Chemtechology 10:488-497.

Hsu SC and JL Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomy-cetes in water and soil. Appl. Microbiol. 29:422-426.

Kapat A, SK Rakshit and T Panda. 1996. Optimization of carbon and nitrogen sources in medium and environmental conditions for enhanced production of chitinase by *Trichoderma harzianum*. Bioprocess Eng. 15:13-20.

Kapat A, SK Rakshit and T Panda. 1997. Parameter optimization of chitin by *Trichoderma harzianum* chitinase under assay conditions. Bioprocess Eng. 16:269-272.

Kitamoto Y, N Mori, M Yamamoto, T Ohiwa and Y Ichiwaka. 1988. A simple method for protoplast formation and generation from various fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:445-450.

Reynolds SE and RE Samuels. 1996. Physiology and biochemistry of insect moulding fluid, Adv. Insect Physiol. 26:157-232.

Samuels GJ. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100:923-935.

Yanai K, N Takada, N Kosima, H Horiuchi, A Ohta and M Takagi. 1992. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequence of the encoding genes. J. Bacteriol. 174:7398-7406.

Manuscript Received: November 29, 2003

Revision Accepted: December 24, 2003

Responsible Editorial Member: Young Gyu Chai
(Hanyang Univ.)