

Trichoderma inhamatum KSJ1의 반연속배양 방식에 따른 섬유소분해효소의 생산성 비교

리홍선 · 김성준*

전남대학교 건설지구환경공학부

Comparison of cellulolytic enzyme productivities in various semicontinuous culture modes of *Trichoderma inhamatum* KSJ1

Hongxian Li and Seong-Jun Kim*

Dept. of Civil, Earth and Environmental Engineering, Chonnam National University.

Abstract For continuous culture of cellulolytic enzymes production to saccharify food wastes, refill concentration of Mandel's medium for continuous culture was 0.5%, and refill intervals were determined to 12 hours by analysis of COD and total nitrogen concentration after 4-days batch culture in flask level. As a result, amylase and FPase productivities were 3.5 and 1.0 U/L · hr, respectively. In 10 L bioreactor, the batch culture mode was compared with fed-batch, fill-and-draw for continuous production of cellulolytic enzyme. Enzyme productivities were most high at batch culture and followed by fed-batch culture. Amylase and FPase activities were 42.3 and 5.6 U/L · hr at batch culture, and 23.0, 2.8 U/L · hr at fed-batch culture, respectively. As a result, in continuous cultivation of cellulolytic enzymes by *T. inhamatum* KSJ1, the mode of fed-batch was most effective in 10 L bioreactor.

Keywords: Cellulolytic enzyme, productivity, semicontinuous culture, fed-batch, fill and draw, *Trichoderma inhamatum* KSJ1

서 론

음식폐기물은 cellulose, hemicellulose, starch 및 pectin 등의 고분자 섬유소를 함유하고 있으며, 이들은 물리·화학적, 생물학적 당화에 의해 glucose와 xylose로 전환된다. 여기에서 효소학적 당화는 미생물계 섬유소분해효소를 이용하여 섬유소를 가수분해시켜 환원당으로 전환하는 생촉매 반응이다. 이에 관련된 효소들은 cellulases, amylases¹⁾, xylanases²⁾³⁾, pectinases⁴⁾ 등이 있으며, 이들 효소군의 복합적인 상승 작용에 의해 음식폐기물은 가수분해되어 환원당으로 전환된다⁵⁾⁶⁾. 그리하여 본 연구에서는 음식물

쓰레기를 당화시키는 효소인 섬유소분해효소의 생산성을 제고하고자 효소의 연속배양 기술을 개발하고자 하였으며, 배양방식에 따른 효소생산성을 비교하여 최적의 섬유소분해효소 배양방법을 찾고자 한다.

섬유소분해효소는 제 2차 대사산물로써, 탄소원과 질소원이 고갈된 상태에서 그 활성이 최대치를 나타낸다. 때문에 섬유소분해효소의 연속배양은 질소원이 결핍한 조건을 유지시키면서 지속적인 배양을 하는 것이 중요하다. 또한, 질소원의 결핍은 cellulase induction을 촉진시킨다⁷⁾.

*T. reesei*와 같은 대부분의 사상균은 탄수화물을 기질로 하는 배지에서 성장할 때, pH가 급격히 감소하는 경향을 보인다⁸⁾⁹⁾. 사상균에서는 탄소원이 거의 소비가 된 후, pH가 급격히 증가한 것을 관찰할 수 있다. 때문에 batch 배양으로 cellulase를 생산할 때, 가장 효과적으로 효소를 생산하는 시기는 사상균이 배지로부터 탄소원을

*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1864, Fax: +82-62-530-0864

e-mail: seongjun@chonnam.ac.kr

거의 소비되기 바로 전, 혹은 바로 후이다. 때문에 cellulase의 연속배양에서는 pH를 조절인자 (control parameter)로 하기도 하며, 또한 최대의 cellulase 생산 시기인 pH의 변화 시점을 새로운 배지 주입시간의 signal로 하기도 한다.

본 연구에서는 섬유소분해효소의 활성이 최고로 나타날 때 배양액의 COD와 T-N농도를 측정하여 탄소원과 질소원의 고갈된 시점을 찾았으며, 이 시점에서의 COD와 T-N농도를 기준으로 하여 연속배양시 주입하는 새로운 배지의 탄소원과 질소원의 농도를 결정하였다.

재료 및 방법

섬유소분해효소의 생산배양

플라스크 배양

섬유소분해효소 생산균 *Trichoderma inhamatum* KSJ1¹⁰⁾을 YMEB (yeast extract 4 g, malt extract 10 g, glucose 4 g, distilled water 1.0 L) 배지에 30°C, 120 rpm에서 2일간 전배양한 후, 5%의 전배양액을 Mandel's 배지¹¹⁾에 접종하여 30°C, 120 rpm에서 4일간 배양하였다. Mandel's 배지의 조성은 rice straw 1.0 g, paper waste 1.0 g, peptone 1.0 g, urea 0.3 g, CaCl₂ 0.3 g, KH₂PO₄ 2.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, FeSO₄·7H₂O 5.0 mg, MnSO₄·H₂O 1.6 mg, ZnSO₄·7H₂O 1.4 mg, CoCl₂ 2.0 mg, distilled water 1.0 L 이었으며, pH 6.0 이었다.

10 L 생물반응기

실험에 사용된 생물반응기 (10 L, BioG, Hanil R&D Co., Korea)는 다양한 환경 변수 (pH, 온도, 교반속도, 용존산소 등)의 조절 및 제어가 가능하다. 실험에 사용된 배지 (5 L)는 볏짚+폐지 2% (w/v)와 펩톤 0.1% (w/v)을 탄소원 및 질소원으로 한 Mandel's 배지를 이용하였다. 배양 조건은 교반속도 200 rpm, 30°C, 초기 pH 6.0, 공기량 0.6 vvm으로 하였다.

효소활성의 측정

멘델배지에서 배양한 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상등액을 효소액으로 사용하였다. Filter paper 활성은 FPA (filter paper activity)로 나타내었는데, 이는 50 mg (1 × 6cm)의 filter paper (Watman No.1)를 배양상등액 1.0 mL와 혼합하여 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법¹²⁾으로 측정하였다. Amylase 활성은 1% 가용성 전분 0.8 mL을 배양상등액 0.2 mL와 혼합하여 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 측정하였다. 효소활성도는 표준 반응 조건에

서 1 μmol/min의 글루코오스를 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

COD와 T-N 농도 측정

COD와 T-N농도는 standard methods에 의해 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 주입농도의 결정

섬유소분해효소는 탄소원이 거의 고갈된 상태에서 효소 활성이 최대의 값을 나타낸다. 섬유소분해효소는 2차 대사 산물로써 플라스크 배양에서는 배양 4일째 탄소원의 농도가 최저로 나타나며, 이때 효소활성이 가장 높게 나타난다.

연속배양시 주입하는 탄소원과 질소원의 농도를 결정하고자, 먼저 멘델배지 조성 중 탄소원의 농도를 1) 1% 볏짚 + 1% 폐지, 2) 0.8% 볏짚 + 0.8% 폐지, 3) 0.5% 볏짚 + 0.5% 폐지, 3) 0.2% 볏짚 + 0.2% 폐지, 4) 0.1% 볏짚 + 0.1% 폐지로 변화시켜 T-N, COD 농도를 측정하였다(Fig. 1).

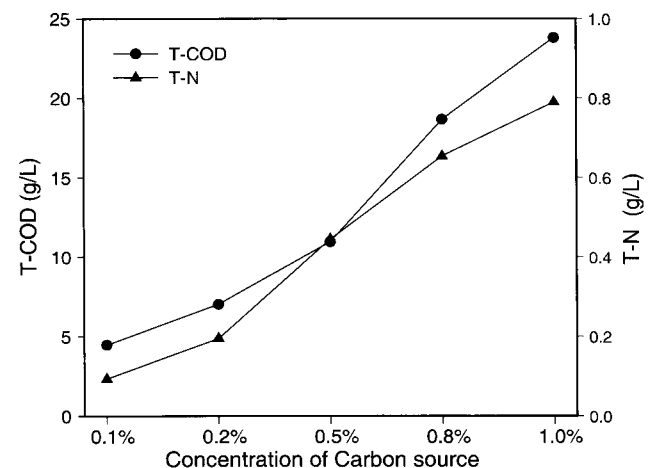


Fig. 1. 탄소원 (볏짚, 폐지)의 농도에 따른 멘델배지의 T-N 및 COD 농도.

그리고 *T. inhamatum* KSJ1을 100 mL의 멘델배지에 접종한 후 30°C, 120 rpm에서 4일간 배양한 후 amylase, FPase 활성 및 잔존 T-N, COD 농도를 측정하였다. 그리하여 4일 배양 후의 T-N, COD 농도를 측정하여, 연속배양 중 주입하는 탄소원의 농도를 결정하였다. 배양 4일 후 배양액의 COD 농도는 10.54 g/L, T-N 농도는 0.283 mg/L 이었으며, 이것은 0.5% (탄소원 농도 기준)의 멘델배지의 COD, T-N 농도와 유사한 값을 보여, 연속배양시 refill하는 멘델배지의 농도는 0.5%가 적당한 것으로 사료되었다(Fig. 1).

Flask level에서 fill-and-draw 방식의 섬유소분해 효소생산

위의 실험결과로부터 refill하는 새로운 멘델배지의 탄소원 농도가 0.5%로 결정되었다. 그리하여 새로 refill하는 탄소원 농도를 0.5%로 하여 flask level에서 fill-and-draw 방법으로 섬유소분해효소 연속배양을 하였다. KSJ1을 멘델배지에 4일간 배양한 후, 12시간 단위로 10 mL의 배양액을 빼고, 10 mL의 새로운 배지를 주입하여 연속배양하였다. 그 결과, amylase 활성은 300시간까지 1.0 U/mL 내외로 유지되었으며, FPase 활성은 156시간까지 0.40 U/mL 이상으로 유지되었다가 활성이 점차 감소하는 경향을 보였고 300시간째 0.24 U/mL로 감소하였다(Fig. 2). 그리고 COD 농도는 약 10.0 g/L 내외, T-N 농도는 약 0.5 g/L 내외로 유지되었다(Fig. 2). 그리하여 배양 300시간 까지 연속적으로 효소를 생산할 수 있었다.

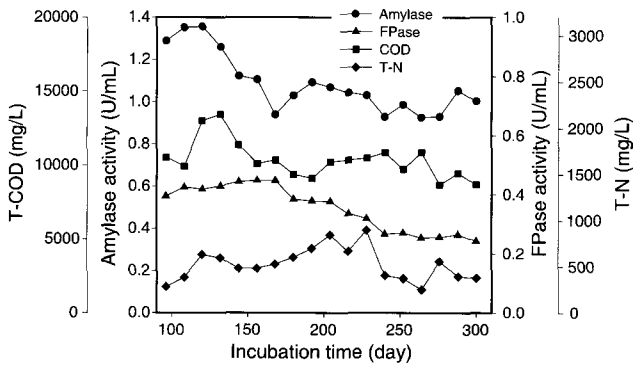


Fig. 2. Flask level에서 fill-and-draw 방식의 섬유소분해효소배양에서 COD, T-N 농도 및 amylase, FPase 활성변화.

10 L 규모에서 fill-and-draw 방식의 섬유소분해효소생산

Flask level에서 refill하는 새로운 배지의 탄소원 농도

를 0.5%로 하고, refill하는 주기를 12시간으로 하였을 때, 300시간동안 fill-and-draw 방법으로 섬유소분해효소를 연속배양 할 수 있었다. 그리하여 10 L 배양기에서도 배지의 농도와 주입간격을 똑같이 하여 확대배양 하였다. 5 L의 멘델배지를 섬유소분해효소 생산배지로 하여 4일 batch 배양 후 (4 L 잔류), 5일 까지 fed-batch 배양하여 working volume을 5 L로 하였다. 12시간 단위로 한번에 500 mL씩 주입하였다. Refill하는 멘델배지의 탄소원 농도는 0.5% 이었으며, 새로운 10 L 생물반응기에 배지를 멸균하여 일정한 시간간격으로 수동으로 주입하였다. 배양 5일 후 fill-and-draw 방법을 이용하여 12시간 단위로 500 mL의 섬유소분해 효소를 빼고, 500 mL의 새로운 배지를 주입하여 연속배양 하였으며 배양액의 pH는 2 N HCl와 2 N NaOH를 이용하여 4.5~5.5 사이로 조절하였다.

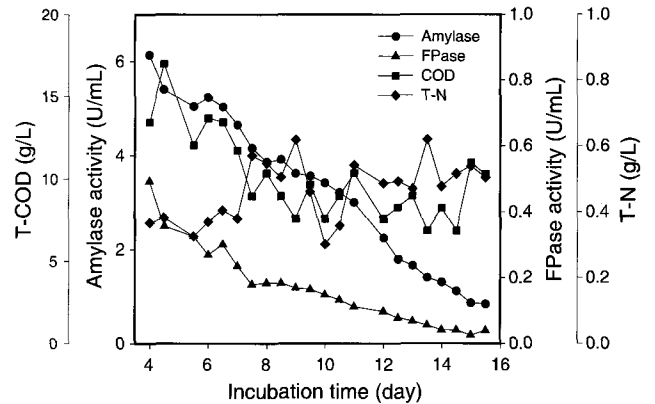


Fig. 3. 10 L 반응기에서 fill-and-draw 방법을 이용한 섬유소분해효소 생산배양에서 COD, T-N 농도 및 amylase, FPase 활성변화.

배양 5일 후 부터 amylase, FPase 활성 모두 일정한 수준으로 유지되지 않고 점차 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3). 그 원인은 flask 배양과 10 L 생물반응기에서의 효소생산 조건이 다르기 때문인 것으로 사료된다. 그리하여 flask level에서의 연

Table 1. 배양방식에 따른 섬유소분해효소의 생산성 비교

Incubation level	Incubation mode	Incubation time (day)	Enzyme production volume	Enzyme activity		Enzyme production amount		Enzyme productivity	
				Amylase (U/mL)	FPase (U/mL)	Amylase (U)	FPase (U)	Amylase (U/L · hr)	FPase (U/L · hr)
Flask	Batch	5.0	100 mL	1.23	0.35	123	35	10.25	2.92
	Fill-and-draw	12.5	270 mL	1.08±0.14	0.35±0.08	283	84	3.49	1.04
10 L	Batch	3.5	3.5 L 0.7 L (Foam)	3.64 3.12	0.48 0.42	14,924	1,974	42.30	5.60
	Fill-and-draw	15.5	15.5 L 0.9 L (Foam)	- 5.54	- 0.59	- 44,462	- 2,559	- 7.29	- 0.42
	Fed Batch	6.0	6.5 L	3.34±0.16	0.37±0.05	24,870	2,975	23.03	2.76
			1.0 L (Foam)	3.16	0.57				

속배양 조건은 10 L 배양에 적용되지 못할 것으로 사료된다.

10 L 규모에서 fed-batch 방식의 섬유소분해효소생산

10 L 생물반응기에서 fill-and-draw 방식을 이용한 효소 배양에서 섬유소분해효소의 활성이 점차 감소하여 fed-batch 방식으로 연속배양하여 그 가능성을 검토하였다. 5 L의 멘델배지를 섬유소분해효소 생산배지로 하여 3일 batch 배양 후, fed-batch 배양하여 12시간 단위로 500 mL씩 주입하였다. Refill하는 배지는 0.5%의 멘델배지 (pH 4.5)로 하였고, 5 L의 배지를 멸균하여 사용하였다. 그 결과, 6일까지 지속적인 효소활성을 보였다(Fig. 4). Amylase 활성은 3.2~3.7 U/mL, FPase 활성은 0.33~0.42 U/mL로 유지되었으며, COD 농도는 10 g/L, T-N 농도는 0.42~0.48 g/L로 유지하였다. 그 결과, amylase, FPase 생산성은 각각 23.03, 2.76 U/L·hr 이었다.

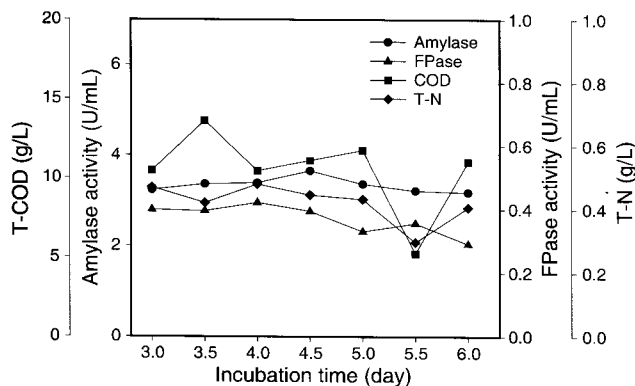


Fig. 8. 10 L 반응기에서 fed-batch 방식을 이용한 섬유소분해 효소생산배양에서 COD, T-N 농도 및 amylase, FPase 활성변화.

배양방식에 따른 섬유소분해효소의 생산성 비교

Flask level과 10 L 생물반응기에서의 배양방법에 따른 amylase, FPase의 생산성을 비교한 결과, 10 L 규모에서 batch 방식으로 배양할 때의 효소생산성은 amylase 42.30 U/L·hr, FPase 5.60 U/L·hr로 가장 높은 생산성을 나타내었다. 그다음은 fed-batch 방식이었으며, 이때 amylase, FPase의 생산성은 각각 23.03, 2.76 U/L·hr 이었다.

요약

본 연구에서는 음식물쓰레기를 당화시키기 위해 섬유소분해효소를 효율적으로 배양하고자 먼저 refill하는 멘델 배지의 농도를 0.5%로, 새로운 배지의 주입시간을 12시간으로 결정하였다. Flask 레벨에서는 fill-and-draw 방법으로 12시간 단위로 연속배양한 결과, amylase 활성은 300시간

까지 1.0 U/mL 내외로 유지되었으며, FPase 활성은 156시간까지 0.40 U/mL 이상으로 유지되었다. 이때의 효소생산성은 amylase 3.49 U/L·hr, FPase 1.02 U/L·hr 이었다. 10 L에서는 batch, fed-batch, fill-and-draw 방법으로 효소를 생산한 결과 batch에서 가장 높은 효소생산성을 나타내었으며, 그다음은 fed-batch 이었다. Batch에서의 효소생산성은 amylase 42.30 U/L·hr, FPase 5.60 U/L·hr, fed-batch에서는 각각 23.03, 2.76 U/L·hr 이었다. 그리하여 *T. inhamatum* KSJ1을 이용한 섬유소분해효소의 연속배양에서 10 L 생물반응기에서 fed-batch 방법이 가장 효율적이었다.

감사의 글

이 논문은 post-BK 사업지원 및 2007년도 과학기술부의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구이며(No. R01-2007-000-20348-0), 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 3월 12일, 게재승인 : 2008년 12월 8일

REFERENCES

- Bhat, M. K. and S. Bhat (1997), Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnol. Adv.* **15**(3-4), 583-620.
- Gerber, P. J., J. A. Heitmann, and T. W. Joyce (1997), Purification and characterization of xylanases from *Trichoderma*, *Bioresource Technol.* **61**(2), 127-140.
- Kulkarni, N., A. Shendye, and M. Rao (1999), Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiol. Rev.* **23**(4), 411-456.
- Kashyap, D. R., P. K. Vohra, S. Chopra, and R. Tewari (2001), Applications of pectinases in the commercial sector: a review, *Bioresource Technol.* **77**(3), 215-227.
- Lee, K. J. (1976), Enzymatic hydrolysis of cellulose, *Kor. J. Pharmacog.* **7**, 85-93.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002), Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresource Technol.* **83**(1), 1-11.
- Sun, T., B. H. Liu, and Z. H. Li (1997), Enhanced cellulase production in fed-batch solid state fermentation of *Trichoderma viride* SL-1, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 429-432.
- Bailey, M. J. and L. Viikari (1993), Production of xylanases by *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus oryzae* on xylan-based media, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 80-84.
- Bailey M. J, S. Askolin, N. Horhammer, M. Tenkanen,

- M. Linder, M. Penttila, and T. Nakari-setala. (2002), Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*, *Appl Microbiol Biotechnol.* **58**, 721-727.
10. Kim, K. C., S. W. Kim, M. J. Kim, and S. J. Kim (2005), Saccharification of food wastes using cellulolytic and amylolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* FJ1 and its kinetics, *Biotech. Bioprocess. Eng.* **10**, 52-59.
11. Mandels, M. and E. T. Reese (1960), Induction of cellulase in fungi by cellobiose, *J. Bacteriol.* **79**, 816-826.
12. Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring cellulase activities, *Methods Enzymol.* **160**, 87-112.