

식료폐설물에 의한 세균섬유소생산에서 응답곡면방법을 리용한 배양성분조성최적화

한경애, 리철호

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《생물공학, 화학을 발전시키는것은 인민들의 먹고 입는 문제를 비롯하여 인민생활을 높이는데서 매우 중요한 의의를 가집니다.》(《김정일선집》 증보판 제15권 487페이지)

세균섬유소는 식물성섬유소에 비하여 독특한 나노구조와 높은 결정도, 화학결합과 생체적합성, 높은 기계적세기와 보수성, 무독성 등 좋은 물성을 가진것으로 하여 생물의학분야, 화장품, 식료품, 팔프, 광학과 전자기공업 등을 비롯한 넓은 분야에서 전망성있는 재료로 인정되고있다.[2]

하지만 세균섬유소생산에 리용되는 배양성분들의 원가가 높은 반면에 생산량이 높지 못함으로 하여 생산 및 리용분야에서 많은 제한성을 가지고있다.[3, 4]

우리는 세균섬유소생산에 드는 원가를 줄이기 위하여 쌀씻은물과 두부순물을 리용하여 세균섬유소를 생산하였으며 응답곡면방법에 의한 최적화모의를 진행하여 최적배양성분조성을 결정하였다.

재료와 방법

1) 재료

대조구로 표준배지(D-글루코즈(20g/L), 효모추출물(5g/L), 펩톤(5g/L), 2수소린산나트륨(2.7g/L), 레몬산(1.15g/L))[1]을 리용하였다.

또한 시험구로는 에타놀과 초산, 류산암모니움 등 여러가지 무기 및 유기시약을 넣은 배지를 리용하였다.

쌀씻은물은 쌀 100g을 물 200mL에 씻어낸 용액을 리용하였으며 두부순물은 공장에서 두부를 찌 때 나오는 물을 리용하였다.

세균섬유소생성균으로는 *Acetobacter xylinum*10을 리용하였다.

2) 방법

실험에 리용된 쌀씻은물과 두부순물은 낮은 온도(-10°C)에서 립시 보관하였다가 1일 내로 리용하였으며 사탕과 무기염은 고압멸균(120°C , 0.2MPa에서 30min)전에 첨가하고 에타놀과 초산은 멸균후에 첨가하였다.

세균섬유소막정제 및 생성량측정은 다음과 같은 방법으로 진행하였다.

생성된 세균섬유소막을 건져서 물로 세척하고 80°C 에서 2% 가성소다용액으로 20min 처리하였다. 다음 막을 증류수로 세척하고 0.5% 초산용액으로 중화한 후 증류수로 다시 세척하였다. 정제된 막을 건조기(70°C)에서 2~3h 건조시켜 그 질량을 측정하였다.

표 1에서는 2차응답곡면모형화를 위한 배양성분들의 농도구배와 해당한 준위값들을 보여준다.

표 1. 2차응답곡면모형화를 위한 변수값들과 준위값

배양성분	준위값				
	-2	-1	0	1	2
섞음률(두부:쌀)	0:1	1:3	1:1	3:1	1:0
사탕/%	0	0.5	1	1.5	2
초산/%	0	0.5	1	1.5	2
에타놀/%	0	0.75	1.5	2.25	3.0
무기염/%	0	0.13	0.26	0.39	0.50

세균섬유소생성의 최적배양성분함량을 결정하기 위하여 두부순물과 쌀씻은물을 각각 0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0의 비율로 섞어 리용하였다.

다음 사탕 0~2%, 초산 0~2%, 에타놀 0~3%, 무기염(류안) 0~0.5%의 범위에서 표 1에서와 같이 실험계획을 작성하였다. 위의 변수값들에 해당하여 이름을 각각 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_5 로 정하였으며 매개 변수들을 5가지 준위로 나누어 각각 -2, -1, 0, 1, 2로 표기하였다.

해당한 수값들에 대한 통계적처리를 응답곡면방법에 기초한 2차응답곡면을 얻는 방법으로 진행하였다.[5]

결과 및 분석

1) 2차응답곡면모형화를 통한 2차응답곡면방정식 유도

배지조성성분들의 농도구배에 따르는 준위값들과 세균섬유소생성량을 리용하여 2차응답곡면모형화를 진행하였을 때 얻어지는 세균섬유소예측생성량은 표 2와 같다.

표 2. 2차응답곡면모형화를 위한 세균섬유소생성량과 예측량

No.	섞음률(X_1)	사탕(X_2)	초산(X_3)	에타놀(X_4)	무기염(X_5)	생성량(Y) /(mg·100mL ⁻¹)	예측량(P) /(mg·100mL ⁻¹)
1	-2	0	-2	-2	0	310.5	318.8
2	-1	-2	-2	0	1	316.3	315.0
3	0	-1	-1	-1	-1	425.2	429.4
4	1	-2	0	-2	-1	362.1	364.3
5	2	0	-2	0	0	421.5	418.5
6	1	-1	-2	-1	2	368.2	365.1
7	1	0	2	2	-1	313.8	315.4
8	1	1	-2	2	1	451.5	450.5
9	1	2	-1	1	0	516.4	513.9
10	2	1	0	0	-2	445.9	442.2
11	-2	0	1	-2	1	318.1	317.3
12	0	2	2	-1	1	378.7	379.4
13	1	0	0	-1	2	480.7	480.2

No.	섞음률(X_1)	사탕(X_2)	초산(X_3)	에타놀(X_4)	무기염(X_5)	생성량(Y) /(mg·100mL ⁻¹)	예측량(P) /(mg·100mL ⁻¹)
14	2	2	0	0	-2	450.2	449.5
15	0	-1	0	1	-2	399.4	398.3
16	0	-1	1	1	-1	380.5	378.6
17	2	-2	2	-2	0	215.6	214.2
18	-1	2	-2	0	-1	420.6	421.8
19	1	1	0	0	2	505.3	506.5
20	1	-2	1	-2	1	337.1	336.2

표 1에서 보는바와 같이 임의의 변수값들에 해당하는 세균섬유소생성량을 통하여 매 변수값들이 세균섬유소생성에 미치는 영향을 보여주는 2차원방정식을 얻을수 있다.

2차응답곡면모형화를 통하여 얻은 2차방정식은 다음과 같다.

$$Y=479.076 + 5+8.354 \cdot 2X_1+27.121 \cdot 9X_2-35.044 \cdot 2X_3+18.936 \cdot 5X_4+9.593 \cdot 3X_5-16.453 \cdot 1X_1^2-7.823 \cdot 3X_2^2-22.233 \cdot 1X_3^2-4.542 \cdot 9X_4^2-5.781 \cdot 0X_5^2+12.746 \cdot 5X_1X_2+5.039 \cdot 9X_1X_3-31.438 \cdot 1X_1X_4+7.311 \cdot 7X_1X_5+3.677 \cdot 1X_2X_3+4.550 \cdot 3X_2X_4-3.854 \cdot 4X_2X_5+3.447 \cdot 1X_3X_4-2.950 \cdot 0X_3X_5-0.811 \cdot 4X_4X_5+E \quad (Y: \text{세균섬유소예측생성량}, E: \text{오차값})$$

이 방정식을 리용하여 배양성분들이 세균섬유소생성에 미치는 호상작용을 보여주는 2차원응답곡면을 얻을수 있다.

2) 세균섬유소생성에 미치는 배양성분들의 영향과 호상작용

2차응답곡면모형화를 통하여 얻은 2차방정식을 리용하여 우리는 서로 다른 배양성분들이 세균섬유소생성에 미치는 영향과 그것들사이의 호상작용을 3차원그라프로 볼수 있다.(그림 1)

두부순물과 쌀씻은물의 섞음률과 사탕농도의 영향 그림 1의 ㄱ)에서 보는바와 같이 두부순물과 쌀씻은물의 섞음률이 4:1이고 사탕첨가량이 2%일 때 세균섬유소생성량이 519.34mg/mL로서 가장 높았다. 또한 두부순물의 함량이 80%(두부순물:쌀씻은물=4:1)에 이르기 전에는 세균섬유소생성량이 증가하다가 80%이상에서는 감소하였다. 대용배지에서 세균섬유소생성량이 표준배지(세균섬유소생성량은 450mg/mL)에 비해볼 때 더 많은것은 두부순물과 쌀씻은물속에 세균섬유소생성에 유리한 작용을 하는 여러가지 무기염과 비타민 B₁, B₂과 같은 물질들이 들어있기때문이라고 생각된다.

두부순물이나 쌀씻은물에 일정한 영양성분이 있다고 해도 세균섬유소생성에 요구되는 표준배지의 배양성분함량과 비교해볼 때는 큰 차이가 있다. 특히 세균섬유소는 생합성이 포도당대사로부터 진행되므로 탄소원에 대한 요구성이 매우 높은것으로 하여 우리는 대용배지에 사탕을 첨가하였다.

두부순물과 쌀씻은물의 섞음률과 초산농도의 영향 초산은 균의 대사과정에서 섬유소생합성에 참가하는 매우 중요한 물질이다. 그림 1의 ㄴ)에서 보는바와 같이 초산은 낮은 농도단계에서 세균섬유소생성량을 거의 2배이상이나 증가시켰으나 농도가 0.7%이상에서는 반대로 세균섬유소생성을 억제하였다. 또한 두부순물:쌀씻은물의 비가 2:3까지는 세균섬유소생성을 증가하는 방향에서 호상작용을 하였지만 두부순물의 농도가 높아짐에 따라 반대효과가 나타났다.

두부순물과 쌀씻은물의 섞임률과 에타놀농도의 영향 세균섬유소생성에서 에타놀은 초산으로 산화되어 TCA순환을 거쳐 ATP를 생성함으로써 사탕이 세균섬유소생합성에 참가하도록 한다. 그림 1의 ㄷ)에서 보는바와 같이 에타놀의 농도가 1.35%보다 낮은 단계에서는 세균섬유소생성량을 거의 1.3배 증가시켰지만 1.35%이상에서는 세균섬유소생성량증가가 크게 나타나지 않았다.

두부순물과 쌀씻은물의 섞임률과 류산암모니움농도의 영향 무기염은 균체증식과 세균섬유소생성에서 필수적인 인자이다. 특히 세균섬유소생합성과정에서 질소원에 대한 요구성이 매우 높으므로 배지에 류산암모니움을 첨가하였다. 그림 1의 ㄴ)에서 보는바와 같이 류산암모니움의 농도가 0.39%에서 세균섬유소생성량이 가장 높았으며 그보다 높은 농도에서는 약간 감소하였다. 또한 두부순물과 쌀씻은물의 섞임률이 3:2까지는 세균섬유소생성량을 증가시키는 방향에서 호상작용을 하였지만 두부순물의 섞임률이 그보다 높으면 반대효과가 나타났다.

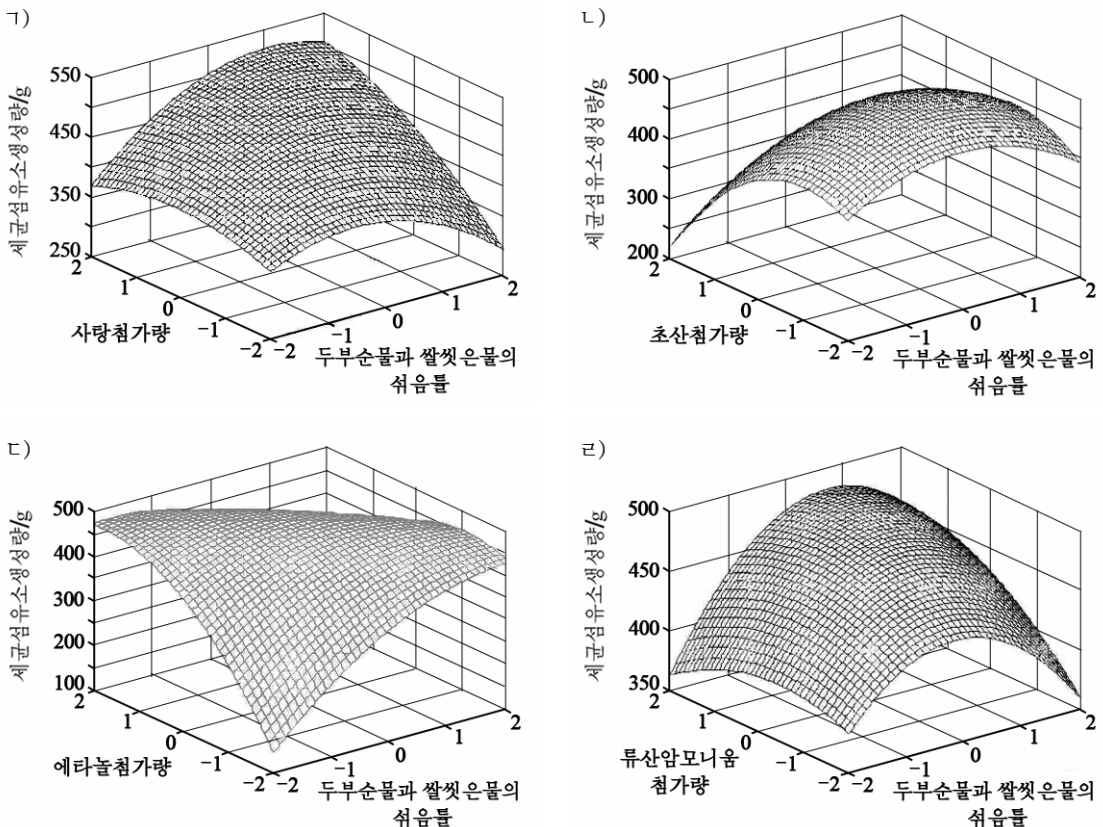


그림 1. 세균섬유소생성에 미치는 두부순물과 쌀씻은물의 섞임률과 기타 배양성분들의 호상관계를 보여주는 응답곡면

3) 2차응답곡면모형화를 리용한 최적배양조건모의 및 측정량통계분석

위의 실험들에서 우리는 2차응답곡면모형화를 통하여 개별적인 배양성분들이 세균섬유소생성에 미치는 영향과 세균섬유소생성에서 두부순물과 쌀씻은물의 섞임률과의 호상작용을 보았다. 이 수값자료들을 통하여 우리는 최적배양성분함량과 최대세균섬유소생성량을 예측하고 통계프로그램인 ANOVA-test를 리용하여 수값자료의 유의성을 밝혔다.

2차응답곡면모형화에 의하여 결정한 최적배양성분함량과 세균섬유소생성량은 표 3과 같다. 이때 예측되는 세균섬유소생성량은 $(531.27 \pm 5.04) \text{mg}/100\text{mL}$ 이지만 실제 실험을 통하여 얻어낸 실험값은 $528.6 \text{mg}/100\text{mL}$ 으로서 예측값과 거의 일치하였다.

표 3. 2차응답곡면모형화에 의하여 결정한 최적배양성분함량과 세균섬유소생성량

지표	섞음률	사탕	초산	에타놀	류산암모니움
준위값	0.61	2.0	-0.56	-0.20	0.76
배양성분함량	6.53:3.47	2.0%	0.72%	1.35%	0.345%
예측값/ $(\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1})$	531.27 ± 5.04				
실험값/ $(\text{mg} \cdot 100\text{mL}^{-1})$	528.6				

우리는 2차응답곡면모형화에 의한 결과값들의 유의성을 평가하기 위하여 실험값과 예측값의 유의성을 ANOVA-test를 통하여 평가하였다.(그림 2)

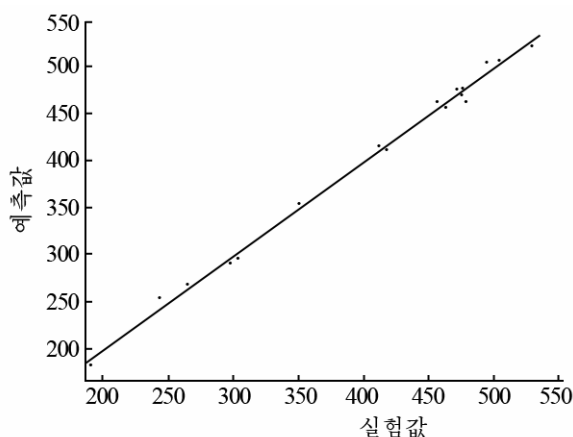


그림 2. 세균섬유소생성량에 대한 실험값과 예측값분산도

ANOVA-test를 통하여 얻은 R^2 값은 0.997 23이며 이것은 실험에서 얻은 결과값의 99.723%가 유의한 값이라는것을 보여준다.

맺 는 말

최적배양조건에서 두부순물과 쌀씻은 물의 섞음률은 6.53:3.47이며 이때 세균섬유소생성량은 $528 \text{mg}/100\text{mL}$ 로서 표준배지에 비하여 약 1.17배 높다. 이것은 표준배지에 비해볼 때 같은 량의 세균섬유소생성에 드는 생산원가를 거의 90%이상 절약하는것으로 된다.

대용배지를 리용한 세균섬유소생산에서 배지에 첨가되는 배양성분들의 농도는 각각 사탕 2.0%, 초산 0.72%, 에타놀 1.35%, 류산암모니움 0.345%이다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성 종합대학학보(자연과학), 45, 10, 103, 주체88(1999).
- [2] F. S. Andrea et al.; Front. Microbiol., 8, 1, 2017.
- [3] M. J. Tabaii et al.; Applied Food Biotechnology, 3, 1, 35, 2016.
- [4] S. M. Mohammad et al.; Advances in Biological Research, 8, 6, 307, 2014.
- [5] Rani et al.; J. Microbiol. Biotechnol., 21, 7, 739, 2011.

주체108(2019)년 10월 5일 원고접수

The Optimization of Culture Medium Composition in the Bacterial Cellulose Production from Food Industrial Waste Using Response Surface Methodology

Han Kyong Ae, Ri Chol Ho

At the optimal condition, the ratio of WSCB(Water Strained off Coagulating Bean curd) to RW(Rice Washings) was 6.53:3.47 and the yield of BC was 528mg/100mL, which was 1.17 times higher than in the standard culture medium. Moreover, the cost of BC production was reduced by 90% as compared with the standard culture medium.

At the optimal condition, the concentrations of culture medium additives were sugar(2%), acetic acid(0.72%), ethyl alcohol(1.35%), and ammonium sulfate(0.345%) respectively.

Keywords: BC(bacterial cellulose), RSM(response surface methodology), level, ANOVA—test