

## 반응표면 분석에 의한 *Trichoderma* sp. FJ1의 cellulolytic enzymes 생산의 최적화

김경철, 유승수, 오영아, 이용운, 정선용, 김성준  
전남대학교 공과대학 환경공학과  
전화 (062) 530-0853, FAX (062) 530-0864

### Abstract

The production conditions of cellulolytic enzymes by *Trichoderma* sp. FJ1, were optimized using response surface analysis. The culture factors which largely affected to the production of enzymes such as cultivation time, carbon source concentration, nitrogen source concentration, and composition ratio of carbon sources were employed. Optimized conditions of the factors above to each cellulolytic enzyme production was as follow: CMCase production was obtained in the conditions of cultivation time of 5.4 days, 3.5% of carbon source concentration, 0.6% of nitrogen source concentration, and 52:48 (avicel:CMC) of composition ratio of carbon sources, respectively, xylanase appeared in the conditions of 5.3 day, 3.5%, 0.8%, and 54:46, respectively, and  $\beta$ -glucosidase were 7.0 day, 5.0%, 1.0%, and 83:17, respectively, and avicelase were 6.5 day, 4.0%, 0.9%, and 64:36, respectively. The activities of CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, and avicelase predicted by the response surface methodology were 33.5, 52.6, 2.88, and 1.84 U/ml, respectively, and  $\beta$ -glucosidase was enhanced up to 74% compared to that obtained in the experimental conditions.

### 서 론

섬유소는 자연계의 가장 풍부한 탄소원이나 그 대부분이 효율적으로 이용되지 못하고 있는 실정으로서 지구가 직면하고 있는 자원난을 극복하기 위해서, 이들을 glucose나 xylose로 전환시켜 식량 혹은 에너지원으로 이용하는 방법이 전 세계적인 관심거리가 되어 왔으며 이의 재활용에 관하여 활발한 연구가 진행되고 있다(1). 현재까지 연구된 바에 의하면 섬유소 분해효소를 이용한 섬유소 물질의 가수분해 공정에서 glucose 생산 총비용의 60%가 효소 생산에 소요되며, 이것은 섬유소 물질을 이용한 glucose의 상업적 생산에 큰 장애가 되고 있다. 따라서 경제적으로 효소를 생산하는 것이 섬유소 자원 이용의 중요한 관건이 되어 진다고 할 수 있다.

본 연구에서는 섬유소 분해효소 생산을 생물공학적 측면으로 확장시키기 위한 첫 단계로 효소의 생산성을 최대화시키기 위해 균주와 기질간의 유도작용에 초점을 맞추었으며, 중요한 운전 변수인 탄소원 및 질소원의 농도와 혼합탄소원의 비율 그리고 유도시간의 상호 영향을 검토하고, 반응표면분석법(Response Surface Methodology)을 도입하여 효소의 생산 조건을 최적화하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주, 배양조건 및 효소활성도 분석

본 실험에 사용된 *Trichoderma* sp. FJ1은 썩은 나무로부터 분리하였고, 뛰어난 cellulase 생산능력을 보여주고 있다. 균주의 보관 및 이용은 YMEA 배지(Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g, Agar 15 g, distilled water 1 L)에서 3일간 30°C에서 성장시킨 후 냉장(4°C) 보관하여 실험에 이용하였다. 효소 생산의 기본배지는 Mandel's medium을 이용하였고, 탄소원 농도의 영향에 대해서는 avicel과 CMC의 혼합기질을 사용하였으며, 질소원 농도 변화는 복합 유기질소원인 bacto peptone의 양을 변화시켰다. 혼합탄소원의 비율 변화는 전체 탄소원 농도를 일정하게 하면서 avicel과 CMC의 구성 비율을 변화시켰다. 효소 생산을 위한 배양은 Table 1와 2의 배양조건에 따라 조제된 배지 50 ml을 500 ml 플라스크에 넣은 후, 포자현탁액을 2% 접종하여 30°C, 100rpm으로 교반배양 하였다. CMCase, Xylanase,  $\beta$ -glucosidase 및 Avicelase의 효소활성도 측정은 배양액을 10,000×g, 10분간 원심분리 하여 상등액을 Thomas 등(2)의 방법에 따라 분석하였다.

### 실험계획 및 통계분석

중요 배양인자인 배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원의 비율 등의 독립변수 변화가 효소 생산성에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 분석하였다(3). 각각의 실험인자 변화에 따른 효소생산성의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 다항식을 사용하였다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

$Y$  : Response variable                       $\beta_0$  : Intercept

$\beta_i, \beta_j$  : Regression coefficients       $X_i, X_j$  : Independent variables

실험결과는 SAS(Statistical analysis system)를 이용하여 통계적으로 분석하여 독립변수(배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원 비율)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향을 검토하고 섬유소 분해 효소 생산을 위한 최적 배양조건을 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 반응표면 분석

본 실험에 이용한 중심합성계획은 Table 1과 같이 표준화된 값을 사용하여, 전체 39개의 실험조건에서의 각각의 섬유소 분해효소 생산성에 관한 결과를 Table 2에 나타내었다. 섬유소 분해효소 생산의 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면방정식 계수 및 상관계수를 결정하였으며, 섬유소 분해 효소들의 상관계수 값들은 0.79-0.85이었다. 이는 독립변수인 배양시간, 탄소원 및 질소원 농도, 그리고 혼합탄소원 비율 변화에 따른 효소 생산에 관해 잘 설명되고 있음을 알 수 있었다. 또한 3차원 반응표면 그래프로 분석한 결과 Figure 1에서 보여주는 것처럼 섬유소 분해 효소 생산에 대한 각각의 변수의 영향을 살펴 볼 수 있었다.

### 최적조건에서의 효소 생산성 검증

실험조건인 배양시간, 탄소원의 농도, 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원 비율 변화에 대한 섬유소 분해 효소 생산의 반응표면을 분석한 결과 최대치를 주는 stationary point가 존재하였고, 이 점에서 결정된 최적조건을 Table 3에 나타내었다. 분석 결과를 검증하기 위해 최적조건 결정값의 실험 조건에서 배양하여 효소활성도를 분석하여, 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 모든 효소의 생산에 관련된 실험값은 예측값보다 약간 높게 나타났으나, 이는 표준편차 내에 허용된 값이었다. Table 2에서 보여주는 실험번호 22의 기존 실험조건에서 각각의 CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, 그리고 avicelase의 값은 각각 29.8, 48.7, 1.7, 1.5 U/ml을 보여주고 있는데, 최적조건으로 배양한 결과 34.2, 57.4, 2.97, 2.01 U/ml의 값들은 기존 실험조건보다 14-74%까지 향상됨을 보여주고 있다.

### 요 약

*Trichoderma* sp. FJ1의 섬유소 분해효소 생산조건을 최적화하기 위해 반응표면 분석법을 이용하였다. 반응표면 분석을 위한 실험 계획법은 중심합성법 계획법을 이용하였으며, 주요 배양인자로서 탄소원의 농도, 질소원의 농도, 혼합탄소원 비율, 그리고 배양시간에 대해 조사하였다. CMCase의 경우에는 탄소원의 농도 3.5%, 질소원 농도 0.6%, 혼합탄소원인 avicel 및 CMC의 비율 52:48, 그리고 배양시간 5.4일에 33.5 U/ml로 최적화되었고, xylanase의 생산은 3.5%, 0.8%, 54:46의 배양조건에서 5.3일에 52.6 U/ml이었고,  $\beta$ -glucosidase의 생산은 5.0%, 1.0%, 83:17의 배양조건에서 7일에 2.88 U/ml이었고, avicelase의 생산은 4.0%, 0.9%, 64:36의 배양조건에서 6.5일에 1.84 U/ml로 최적화되었다. 이 중에서  $\beta$ -glucosidase의 생산성은 기존 실험조건보다 74% 정도로 가장 높은 효율 향상을 보여주었다. 실제로 최적 예측조건에서 실증실험을 수행한 결과 본 모델의 타당성이 입증되었다. 본 연구에서 얻은 섬유소 분해 효소 생산 조건 최적화에 관련된 자료들은 산업적으로 효소를 생산하고자 할 때 설계에 유용하게 사용될 것이다.

### 감사의 글

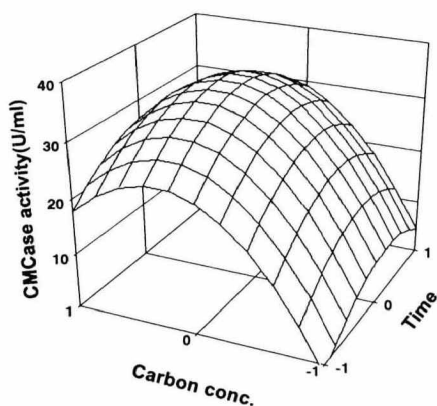
본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2000-00350) 지원으로 수행되었음.

### 참고문헌

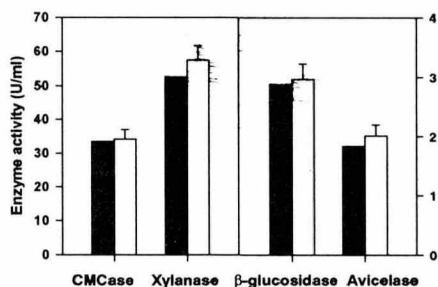
1. Bhat M. K. and S. Bhat, "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications"(1997), *Biotechnol. Adv.* **15**, 583-620
2. Thomas M. W. and K. M. Bhat, "Methods for measuring cellulase activities"(1988), *Method. Enzymol.* **160**, 87-112
3. Yoon S. J., B. D. Ye, S. H. Park, and E. Y. Lee, "Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis"(2000), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397

**Table 1.** Standardization in three levels of each factor in various culture conditions.

Factors	Sym bols	Culture conditions			Standardized levels		
Time(day)	X <sub>1</sub>	3	5	7	-1.00	0.00	1.00
Carbon conc.(%)	X <sub>2</sub>	1.0	2.5	5.0	-1.00	-0.25	1.00
Nitrogen conc.(%)	X <sub>3</sub>	0.1	0.5	1.0	-1.00	-0.11	1.00
Avicel/CMC ratio	X <sub>4</sub>	17: 83	50: 50	83: 17	-1.00	0.00	1.00



**Figure 1.** 3-D response surface in second scanning to the production of CMCCase according to the variation of cultivation time and carbon source concentration. The values of X<sub>3</sub> and X<sub>4</sub> were fixed as 0.16 and -0.06 as shown in Table 3.



**Figure 2.** Comparisons between activities predicted (■) by analysis of response surface and activities (□) experimentally verified in the optimal condition of each cellulolytic enzyme. The bars showed standard deviations.

**Table 2.** Experimental results and standardized values of each factor in various culture conditions.

Run No.	Experimental conditions				Experimental results			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	Cmc	Xyl	β gl	Avi
1	-1	-1	-1	0	1.4	3.1	0.3	0.1
2	-1	-1	-0.11	0	0.6	1.8	0.1	0.0
3	-1	-1	1	0	0.5	2.8	0.1	0.0
4	-1	-0.25	-1	-1	0.5	3.3	0.1	0.4
5	-1	-0.25	-1	0	13.5	19.2	0.7	0.4
6	-1	-0.25	-1	0	14.3	18.3	0.3	0.5
7	-1	-0.25	-1	0	13.7	19.6	0.7	0.4
8	-1	-0.25	-1	1	3.6	8.4	0.4	0.0
9	-1	-0.25	-0.11	0	13.1	20.7	0.4	0.5
10	-1	-0.25	1	0	9.9	16.4	0.4	0.2
11	-1	1	-1	0	6.3	1.5	0.6	0.2
12	-1	1	-0.11	-1	3.0	12.5	2.0	0.6
13	-1	1	1	1	0.4	1.9	0.1	0.1
14	0	-1	-1	0	8.3	13.5	0.5	0.2
15	0	-1	-0.11	0	5.2	14.9	0.3	0.0
16	0	-1	1	0	2.5	23.4	0.0	0.4
17	0	-0.25	-1	-1	7.4	8.0	0.8	0.8
18	0	-0.25	-1	0	26.2	34.6	1.2	0.9
19	0	-0.25	-1	0	26.0	35.7	0.7	1.0
20	0	-0.25	-1	0	26.8	34.8	1.2	1.0
21	0	-0.25	-1	1	3.6	8.8	0.5	0.5
22	0	-0.25	-0.11	0	29.8	48.7	1.7	1.5
23	0	-0.25	1	0	26.3	46.8	1.4	1.3
24	0	1	-1	0	13.5	27.3	1.1	1.4
25	0	1	-0.11	-1	11.3	23.6	2.0	1.4
26	0	1	1	1	1.2	6.2	0.1	0.3
27	1	-1	-1	0	7.5	12.2	0.3	0.2
28	1	-1	-0.11	0	2.4	8.4	0.2	0.3
29	1	-1	1	0	0.9	0.8	0.0	0.1
30	1	-0.25	-1	-1	8.7	9.3	1.0	0.6
31	1	-0.25	-1	0	15.7	26.8	1.0	1.3
32	1	-0.25	-1	0	16.2	25.4	1.2	1.5
33	1	-0.25	-1	0	15.9	27.2	1.3	1.4
34	1	-0.25	-1	1	5.8	9.7	0.6	0.3
35	1	-0.25	-0.11	0	30.1	49.8	2.3	1.6
36	1	-0.25	1	0	17.2	38.9	1.7	1.8
37	1	1	-1	0	10.6	2.7	0.7	0.5
38	1	1	-0.11	-1	8.9	13.3	2.3	1.5
39	1	1	1	1	0.3	0.6	0.0	0.1

Cmc(CMCCase), Xyl(Xylanase), β gl(β glucosidase), Avi(Avicelase)

**Table 3.** Predicted optimum conditions by analysis of response surface.

Factor	CMCCase	Xylanase	β-glucosidase	Avicelase
X <sub>1</sub>	5.4	5.3	7.0	6.5
X <sub>2</sub>	3.5	3.5	5.0	4.0
X <sub>3</sub>	0.6	0.8	1.0	0.9
X <sub>4</sub>	52:48	54:46	83:17	64:36
Predicted values	33.5	52.6	2.88	1.84