

반응표면분석을 이용한 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해 조건의 최적화

김경철, 김성희, 천화영, 김성준
전남대학교 공과대학 환경공학과
전화 (062) 530-0853, FAX (062) 530-0864

Abstract

The major factors related in enzymatic hydrolysis of food waste using cellulolytic enzymes of *Trichoderma harzianum* FJ1 were optimized by response surface analysis. The factors largely affecting to the reducing sugar concentration and enzymatic saccharification rate of food waste such as substrate concentration (X_1 , %), enzyme concentration (X_2 , U/ml), and reaction time (X_3 , hr) were employed. A quadratic polynomial expressing the reducing sugar (RS) concentration relating with the above factors was as follows : $RS (g/l) = -17.80 + 5.04X_1 + 51.37X_2 + 1.21X_3 - 0.11X_1^2 - 38.86X_2^2 - 0.03X_3^2 + 1.64X_1X_2 + 0.04X_1X_3 - 0.70X_2X_3$ ($R^2=0.9939$). The maximum value of the reducing sugar concentration and saccharification rate were obtained in the conditions of substrate concentration of 18.2%, enzyme concentration of 0.78 U/ml, and reaction time of 19 hr, respectively. The predicated reducing sugar concentration and saccharification rate by the response surface methodology were 95.13 g/l and 47.27%, respectively.

서론

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). 현재 까지 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. 또한 섬유소의 효소학적 가수분해 반응은 복합효소로 이루어진 cellulases 및 xylanase에 의해 이루어지고 있으며, 섬유소 물질의 구조적 특성, 섬유소-효소계의 상관성, 가수분해 산물의 저해효과, 섬유소 분

해효소의 불활성화 등이 당화율에 영향을 미친다. 따라서 경제적인 효소 생산 및 생산된 효소의 효율적 이용이 중요한 관건이 되어진다고 할 수 있다.

본 연구에서는 생물공학적인 측면으로 확장시키기 위한 첫 단계로 섬유소분해효소를 효율적으로 이용하기 위해 섬유소의 가수분해 반응에서 기질 및 효소농도, 반응시간의 최적화에 초점을 맞추었다.

재료 및 방법

사용균주, 배양조건 및 효소활성도 분석

본 실험에 사용된 *Trichoderma harzianum* FJ1은 썩은 나무로부터 분리하였고, 뛰어난 cellulase 생산능력을 보여주고 있다(2). 균주의 보관은 YMEA 배지(Yeast extract 4 g, Malt extract 10 g, Glucose 4 g, Agar 15 g, distilled water 1 L)에서 3일간 30℃에서 성장시킨 후 냉장(4℃) 보관하여 실험에 이용하였다. 효소 생산의 기본배지는 탄소원으로 벧짚과 폐지를 2%를 이용하였고, 질소원으로 peptone 0.1%를 이용하였다. 효소생산은 조제된 배지 5L을 10L jar fermentor (Hanil Co., Korea)에 넣은 후, Mandels medium에서 3일 성장시킨 균주 접종물 2% 접종하여 30℃, 0.6 vvm, 200 rpm으로 5일간 교반배양 하였다. FPass의 효소활성도 측정은 배양액을 10,000×g, 10분간 원심분리하여 상등액을 Thomas 등(3)의 방법에 따라 분석하였다.

효소학적 가수분해

음식물쓰레기의 효소학적 가수분해의 최적화에 관련된 실험을 수행하기 위해서, *Trichoderma harzianum* FJ1의 효소액은 위의 실험조건에서 생산되어진 배양상등액을 한외여과기(PM10)를 이용하여 농축 후 사용하였다. 효소학적 가수분해에 이용되어진 기질은 음식물쓰레기(전남대학교 구내식당, 습윤상태)를 이용하였으며, 반응조건은 효소액(FPase 농도: 4.0 U/ml)에 50 mM citric acid 완충용액(pH 5.0)을 일정량 더하고, 각각의 기질을 %(w/v) 농도로 첨가하여 50℃, 100rpm으로 반응시켰다. 생성된 환원당은 DNS 방법으로 정량하였다.

실험계획 및 통계분석

중요 배양인자인 기질 및 효소농도, 그리고 반응시간의 독립변수 변화가 효소학적 가수분해에 미치는 영향을 반응표면분석법을 이용하여 분석하였다(4). 각각의 실험인자 변화에 따른 환원당 농도 및 당화율의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 아래와 같은 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

β_0 : Intercept

β_i, β_j : Regression coefficients X_i, X_j : Independent variables

실험결과는 Design-Expert(Stat-Easy Inc., U.S.A)프로그램을 이용하여 통계적으로 분석하여 독립변수(기질농도, 효소농도, 반응시간)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건들에 대한 상호영향을 검토하고 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해를 위한 최적조건을 살펴보았다.

결과 및 고찰

반응표면 분석

본 실험에 이용한 수정된 Box-Behnken은 Table 1과 같이 표준화된 값을 사용하였으며, 각각의 27개의 실험조건에서 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해에 관한 결과를 Table 2에 나타내었다. 환원당 농도 및 당화율에 관한 실험자료는 반응표면분석을 통해 2차 다항식의 계수 및 상관계수를 결정하였으며, 환원당 농도 및 당화율에 관한 상관계수는 각각 0.9586 및 0.9939이었다. 이는 독립변수인 기질농도, 효소농도 및 반응시간에 따른 환원당 농도 및 당화율에 관해 잘 설명하고 있다. 또한 3차원 반응표면 그래프로 분석한 결과 Figure 1에서 보여주는 것처럼 반응시간 12시간에의 기질 및 효소농도에 대한 환원당의 농도를 살펴 볼 수 있었다.

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

Factors	Symbols	Culture conditions			Standardized levels		
Substrate conc. (%)	X_1	5	10	20	-1.00	-0.33	1.00
Enzyme conc. (U/ml)	X_2	0.2	0.4	0.8	-1.00	-0.33	1.00
Time(day)	X_3	6	12	24	-1.00	-0.33	1.00

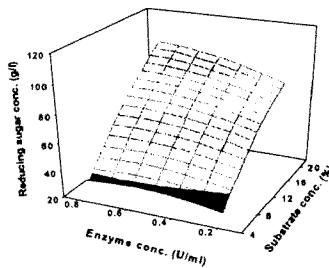


Figure 1. 3-D response surface to the concentration of reducing sugar according to the variation of substrate concentration and enzyme concentration. The values of X_3 was fixed as 12hr.

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

Exp. No.	X ₁	X ₂	X ₃	Result	
				RS (g/l)	SR (%)
1	-1.00	-1.00	-1.00	23.26	41.40
2	-1.00	-1.00	-0.33	28.76	51.19
3	-1.00	-1.00	1.00	28.49	50.72
4	-1.00	-0.33	-1.00	27.51	48.97
5	-1.00	-0.33	-0.33	30.79	54.81
6	-1.00	-0.33	1.00	30.33	53.99
7	-1.00	1.00	-1.00	29.06	51.72
8	-1.00	1.00	-0.33	31.50	56.07
9	-1.00	1.00	1.00	31.59	56.23
10	-0.33	-1.00	-1.00	41.14	36.61
11	-0.33	-1.00	-0.33	46.38	41.27
12	-0.33	-1.00	1.00	50.73	45.15
13	-0.33	-0.33	-1.00	51.50	45.84
14	-0.33	-0.33	-0.33	53.72	47.81
15	-0.33	-0.33	1.00	53.80	47.88
16	-0.33	1.00	-1.00	58.84	52.36
17	-0.33	1.00	-0.33	61.67	54.89
18	-0.33	1.00	1.00	61.63	54.85
19	1.00	-1.00	-1.00	63.80	28.39
20	1.00	-1.00	-0.33	73.37	32.65
21	1.00	-1.00	1.00	87.09	38.76
22	1.00	-0.33	-1.00	80.67	35.90
23	1.00	-0.33	-0.33	87.27	38.83
24	1.00	-0.33	1.00	94.68	42.13
25	1.00	1.00	-1.00	90.71	40.37
26	1.00	1.00	-0.33	97.36	43.33
27	1.00	1.00	1.00	98.47	43.82

최적조건에서의 효소 생산성 검증

실험변수인 기질농도, 효소농도 및 반응시간 변화에 대한 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해의 반응표면을 분석하여 환원당 농도 및 당화율에 관한 각각의 변수의 최적값을 Table 3에 나타내었다. Table 3의 조건 1은 모든 실험변수의 값을 최소로 하여 가장 높은 환원당 농도를 얻을 수 있는 최적조건이며, 위의 결과의 검증실험으로서 최적조건에서 얻어진 환원당의 농도를 Figure 2에 나타내었다. 반응표면분석에 의한 예측값과 실증 실험값의 차이는 표준편차 이내의 값을 나타내었고, 이는 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해에 이용되어진 반응표면분석 모델의 타당성을 입증하였다. 본 연구에서 얻어진 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해 조건의 최적화에 관련된 자료들은 산업적으로 음식물쓰레기의 이용하여 환원당을 얻고자 할 때 유용하게 사용될 것이다.

Table 3. Optimum conditions predicted by response surface analysis

Optimal condition		X ₁ (%)	X ₂ (U/ml)	X ₃ (hr)	RS (g/l)	SR (%)
No. 1	Condition	Min	Min	Min	Max	None
	Result	11.7	0.25	6.0	50.02	38.05
No. 2	Condition	Range	Range	Range	None	Max
	Result	5.1	0.70	19.3	34.10	58.09
No. 3	Condition	Min	Min	Min	Max	Max
	Result	9.7	0.39	9.2	51.14	47.03
No. 4	Condition	Range	Range	Range	Max	Max
	Result	18.2	0.78	19.0	95.13	47.27
No. 5	Condition	Max	Max	Max	Max	Max
	Result	20.0	0.80	24.0	101.65	44.50

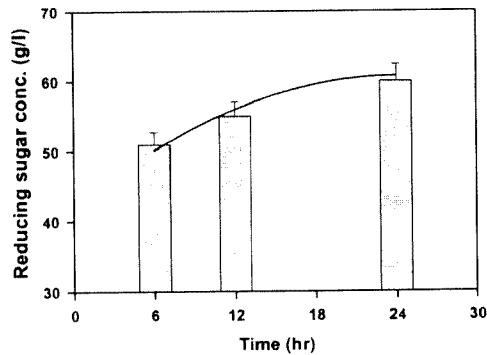


Figure 2. Comparisons between reducing sugar (—) predicted by analysis of response surface and reducing sugar (■) experimentally verified in the optimal conditions. The bars showd standard deviations.

요 약

Trichoderma harzianum FJ1의 섬유소분해효소를 이용하여 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해 조건을 최적화하기 위해 반응표면분석법을 이용하였다. 반응표면분석을 위한 실험계획은 수정된 Box-Behnken을 이용하였으며, 주요 반응인자로는 기질 및 효소 농도, 반응시간에 대해 조사하였다. 반응표면분석 결과 환원당 (RS) 농도에 관련된 방정식은 다음과 같이 얻었다; $RS (g/l) = -17.80 + 5.04X_1 + 51.37X_2 + 1.21X_3 - 0.11X_1^2 - 38.86X_2^2 - 0.03X_3^2 + 1.64X_1X_2 + 0.04X_1X_3 - 0.70X_2X_3$ ($R^2=0.9939$). 환원당 농도 및 당 화율을 최대로 얻기 위한 최적 조건은 18.2%의 기질농도, 0.78 U/ml의 효소농도 및

19hr의 반응시간을 얻었으며, 이때의 환원당 농도 및 당화율을 각각 95.13 g/l 및 47.27%이었다.

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. Kim K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, and S. J. Kim, "Isolation and Characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 Producing Cellulases and Xylanase Largely"(2003), *J. Microbiol. biotechnol.*, **13**, 1-8
3. Thomas M. W. and K. M. Bhat, "Methods for measuring cellulase activities"(1988), *Method. Enzynol.* **160**, 87-112
4. 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