

## *Neurospora crassa*를 이용한 Tyrosinase 생산의 최적화

채희정 · 유영제\*

서울대학교 공과대학 화학공학과

### Optimization of Tyrosinase Production using *Neurospora crassa*

Chae, Hee-Jeong and Young-Je Yoo\*

Department of Chemical Engineering, College of Engineering,  
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

**Abstract** — *Neurospora crassa* (KCTC 6079) produces tyrosinase (EC 1.14.18.1) during sexual differentiation under derepressed conditions in the presence of inducers such as amino acid analogues, antimetabolites or protein synthesis inhibitors. The selection of inducer concentration and induction time as well as inducer type are critical for the optimization of the enzyme production. The best inducer was found to be cycloheximide. Since cycloheximide was toxic to the cells, an optimal inducer concentration and an optimal induction time were determined to maximize the enzyme production from batch cultures. Mathematical models for the cell growth and the enzyme production were proposed and used for process optimization. By optimizing the induction conditions, maximum tyrosinase productivity was increased significantly.

Tyrosinase (polyphenol oxidase, EC 1.14.18.1)는 페놀과 같은 방향족화합물의 수산화반응(hydroxylation) 및 카테콜의 탈수소화반응(dehydrogenation)을 촉매할 수 있는 효소이다(1). 전자의 촉매활성을 cresolase activity라고 하며 후자의 촉매활성을 catecholase activity라 한다. Tyrosinase에 의하여 전환되는 기질은 4번 탄소에 치환기를 가진 phenol, catechol 종류로서 L-tyrosine, p-cresol, p-coumaric acid, p-hydroxybenzoic acid, 4-formylphenol, p-chlorophenol 등이다.

Tyrosinase는 동식물세포, 박테리아, 곰팡이 등에서 많이 발견되며(2) 생체내에서 tyrosine 같은 페놀계의 아미노산 지질을 이용하여 L-DOPA 같은 중간산물 또는 흑갈색의 melanin 색소를 형성하는 반응을 촉매한다(3). Tyrosinase는 고혈압과 파킨슨씨병의 치료제인 L-DOPA의 생산(4, 5), 방향족화합물의 수산화기치환 반응에 의한 유기합성(6), 또는 페놀류 폐수의

처리(7) 등에 이용가치가 있는 중요한 효소로서 최근 많은 관심이 집중되고 있다.

Tyrosinase를 많이 생산하는 미생물에는 *Streptomyces*속의 박테리아(8, 9), *Agaricus bisporus*(10, 11) 같은 곰팡이 등이 있으며 현재 산업적으로는 *Agaricus bisporus*를 사용하고 있다. 곰팡이의 일종인 *Neurospora crassa*도 tyrosinase를 대량생산할 수 있는 균주로서 분화과정(sexual differentiation)의 결과로 이 효소를 생산하는 것으로 알려져 있다(12). 야생형 균주에는 tyrosinase가 특별한 유도과정이 필요없이 생산되지만 변이종인 경우에는 D-tyrosine, L-ethionine, DL-fluorophenylalanine 등과 같은 아미노산 유사체나 항생제를 배양액에 투여하여야 효소의 생합성이 가능하다(13, 14). 항생제로는 cycloheximide나 actinomycin D 같이 주로 진핵세포의 성장 및 단백질 생합성을 저해하는 물질이 많이 사용된다(13, 15, 16). 투여되는 항생제의 농도가 높아질수록 항생제에 의한 유도효과는 높아지지만 균체의 성장 및 균체내 단백질의 생합성을 크게 저해하는 농도에 이르면 오히려 tyrosinase의 생합성량은 줄어든다. 이

**Key words:** Tyrosinase, *Neurospora crassa*, cycloheximide, enzyme induction, optimization.

\*Corresponding author

같이 항생물질이 세포에 매우 toxic하기 때문에 적정 농도에서 투여되어야 효소의 생합성량을 최대화시킬 수 있다. 이와 같은 효소생산 시스템에서는 유도물질의 적절한 선택은 물론 유도물질의 농도 및 유도시간 선택이 효소생산성에 매우 큰 영향을 미친다. Park 등(17)은 재조합 *E. coli*를 이용한 단백질의 생산에 있어서 유도시간이 공정생산성에 미치는 영향에 대하여 고찰한 바 있으나 유도물질 농도의 영향은 고려하지 않았다. 지금까지 유도물질에 의한 효소생합성 시스템에 관한 연구들은 경험적으로 얻은 적정 유도물질 농도와 적정 투입시간에 유도물질을 투입하여 유도작용의 기작이나 여러 환경인자들의 영향을 밝혀왔을 뿐, 유도조건의 변화가 효소 생산공정의 생산성에 미치는 영향을 정량적으로 다루어 효소생산성을 높이는데 이용한 예는 거의 없다.

본 연구에서는 tyrosinase를 생합성하는 미생물 균주로서 *Neurospora crassa* 변이주를 이용하였다. Tyrosinase를 생산하는데 적합한 유도물질을 찾고 유도시간 및 유도물질의 농도의 영향을 모두 고려한 수학적 모델을 제안하였으며 이를 토대로 효소의 생합성을 최대화시키는 유도조건을 찾았다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

Tyrosinase를 생산하는 균주로서 *Neurospora crassa*(KCTC 6079)를 이용하였으며 고체배지(16)에서 냉장보관하였다.

### 배지조성

플라스크배양 및 회분식 발효조배양에 사용한 합성배지는 Vogel's medium N이며 그 조성은 Table 1(18)과 같다.

### 배양방법 및 장치

플라스크 배양은 500 ml 삼각플라스크에서 배양액을 200 ml로 하고 고체배양에서 얻은 포자를 접종하여 배양하였다. 진탕배양기의 배양온도는 25°C로, 교반속도는 150 rpm으로 하였다. 5l 발효조(한국발효기)에서는 배양액량을 2.5l로 하고, 플라스크 배양 조건에서 3일간 전배양(seed culture)한 배양액 200 ml를 발효조에 접종하였다. 교반속도는 500 rpm, 통

Table 1. Growth media composition (18)

Sodium citrate·2H <sub>2</sub> O	2.5	g/l
Potassium phosphate monobasic	5	g/l
Ammonium nitrate	2	g/l
Magnesium sulfate·7H <sub>2</sub> O	0.2	g/l
Calcium chloride	0.1	g/l
Sucrose	20	g/l
Biotin solution*	0.1	ml/l
Trace elements**	0.1	ml/l

\* 5 mg of biotin in 100 ml of 50%(v/v) ethanol solution

\*\* Trace elements (per 100 ml water)

Citric acid·H <sub>2</sub> O	5	g
Zinc sulfate·7H <sub>2</sub> O	5	g
Ferrous ammonium sulfate·6H <sub>2</sub> O	1	g
Copper(II) sulfate·5H <sub>2</sub> O	0.25	g
Manganese sulfate	0.066	g
Boric acid	0.05	g
Sodium molybdate·2H <sub>2</sub> O	0.05	g

기속도는 1 vvm으로 하였으며 pH는 제어하지 않았다. 균사가 발효조 벽에 붙어 자라는 것을 막기 위하여 발효조에서 baffle을 제거하고 발효조 유리 내벽을 silanization하였다(19). 발효조 배양을 오래하면 silanization의 효과가 떨어지므로 5회 발효할 때마다 1회씩 silanization을 반복하였다.

### 분석방법

균체의 성장을 관찰하기 위하여 건조중량을 측정하였다. 당(sucrose)의 정량은 DNS법(20)을 사용하였다. 균체 내에 존재하는 tyrosinase를 정량하기 위하여 균체를 초음파분쇄기(Sonics & Materials Inc., VC300)로 분쇄한(40% 출력에서 15분간) 다음 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 분석에 사용하였다. 효소가 갖는 catecholase activity로 효소의 활성을 측정하였으며 사용한 방법은 dopachrome method(13, 21)이었다. Sodium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.0)에 L-DOPA(1 mg/ml)를 녹인 기질용액을 30°C 항온조에 담그고 5분 이상 공기를 불어 넣어 산소를 포화시켰다. 기질용액 2 ml에 효소액 0.5 ml를 가하고 신속하게 섞은 다음 분광광도계로 dopachrome의 생성속도를 475 nm에서 측정하였다. 1분 동안 1 μmol의 L-DOPA를 dopachrome(흡광계수=3660 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)으로 전환시킬 수 있는 효소의 양을 1 unit으로 정

의하였다.

## 결과 및 고찰

### 효소 생합성의 유도

균체의 배양은 성장기와 생산기의 두 단계로 구분되는데 *Neurospora tyrosinase*는 특정한 유도물질이 배지내에 투여되거나 배지 중의 특정성분이 고갈되어야 생합성되는 유도효소이므로 성장기에서 생산기로 넘어갈 때 적절한 유도작용이 필요하다. 따라서 첫번째 단계에서는 균체를 충분히 성장시키고, 두번째 단계에서 원하는 효소를 다량으로 생산하기 위한 조건을 만들어 주는 것이 매우 중요하다. *Neurospora crassa*를 이용하여 *tyrosinase*를 생산하는데 효과가 있다고 알려진 여러가지 유도방법들 중 본 연구에서 사용한 변이주에 유효한 유도방법을 찾기 위한 유도 실험을 하였다.

플라스크 배양을 한지 48 hr째에 여러 가지 방법에 의해서 효소의 생합성을 유도시켰으며 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 기질 고갈이나 아미노산 유사체에 의해서는 균체의 성장이 크게 방해받지 않은 대신 효소 생합성량은 매우 작았다. L-tryptophan과 DL-tyrosine에 의해서 효소생합성이 조금 유도되었는데 이는 사용한 유도물질들이 *tyrosinase*의 기질인 L-ty-

**Table 2. Effects of various inducers on the cell growth and the enzyme biosynthesis in flask culture**

Induction method <sup>1</sup>		Maximum cell mass (g/l)	Maximum enzyme activity <sup>2</sup> (unit/l)
inducer	inducer conc.(g/l)		
Transfer to carbon-free medium		5.0	2.79
Transfer to sodium phosphate buffer <sup>3</sup>		3.3	2.8
Transfer to sulfate-free medium		4.2	0.0
L-tryptophan	1.0	5.1	4.47
DL-tryptophan	0.4	5.2	0.0
DL-tyrosine	1.25	5.0	8.7
L-tyrosine	0.25	4.8	1.8
p-fluorophenylalanine	0.2	4.7	0.0
cycloheximide	0.0003	3.7	135

<sup>1</sup>Induction was performed after 2 days of culture.

<sup>2</sup>Maximum enzyme activity was obtained after 8 days.

<sup>3</sup>0.02 M, pH 6.0

rosine과 유사한 형태를 갖기 때문인 것으로 생각된다. 시험한 여러 방법들 중 cycloheximide가 가장 좋은 유도물질임을 알 수 있었다. Horowitz 등(13)은 *tyrosinase*의 생합성을 억제하는 억제단백질(repressor protein)의 존재와 유도물질에 의한 이 억제단백질의 생합성 저해로 유도기작을 설명한 바 있다. 억제단백질은 불안정하여 균체에 의해 지속적으로 생합성됨과 동시에 다시 아미노산으로 분해되어 정상상태의 농도를 유지하는데, 항생제에 의해 단백질의 생합성이 저해되면 억제단백질의 생합성도 억제된다. 이 때 균체의 성장속도가 감소할지라도 균체의 성장은 계속된다. 따라서 단위세포당 세포내 억제단백질의 양의 비는 감소하게 되어 정상상태가 깨진다. 즉 억제단백질의 양이 *tyrosinase*의 생합성을 저해하는데 필요한 농도 이하로 줄어들면 *tyrosinase*의 구조유전자(structural gene)를 발현시킬 것이다.

*Neurospora crassa*를 회분배양하였을 경우 균체는 기질 소모속도에 비례하여 지속적으로 성장하다가 정체기에 들어갔으며 발효 후반기에 자가분해(cell lysis)가 크게 일어났다. 회분배양을 통해 유도물질로서 cycloheximide를 대수 성장기 중간에 1 mg/l의 농도로 투여한 결과 균체는 전형적인 지수성장을 하다가 성장이 크게 저하되었다. 균체의 성장형태(morphology)는 가늘고 긴 균사체(filamentous hyphae)이었다. 균체 내의 효소활성은 유도 후 일정시간 동안 관측되지 않았다가 일정 생산지연기(production lag)를 지닌 후 지속적으로 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었다.

### 유도물질의 최적 농도

유도물질로 쓰이는 cycloheximide는 진핵생물에 있어서 단백질의 생합성을 저해하는 물질로 균체의 성장속도를 크게 둔화시킨다. *Tyrosinase*를 생산하기 위해서는 일정 농도 이상의 유도물질이 배양액에 투여되어야 한다. 그러나 고농도 투여시에는 균체의 성장을 크게 저해하므로 효소생산량을 감소시킬 것이다. 따라서 효소의 생산을 최대화하기 위한 유도물질의 최적 농도가 존재한다. Cycloheximide의 농도를 변화시키며 효소생산에 최적인 유도물질 농도를 찾기 위한 실험을 실시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 cycloheximide의 농도가 증가함에 따라 균체의 성장은 크게 저하되었다. 효소의 생산은 0.5 mg/l의

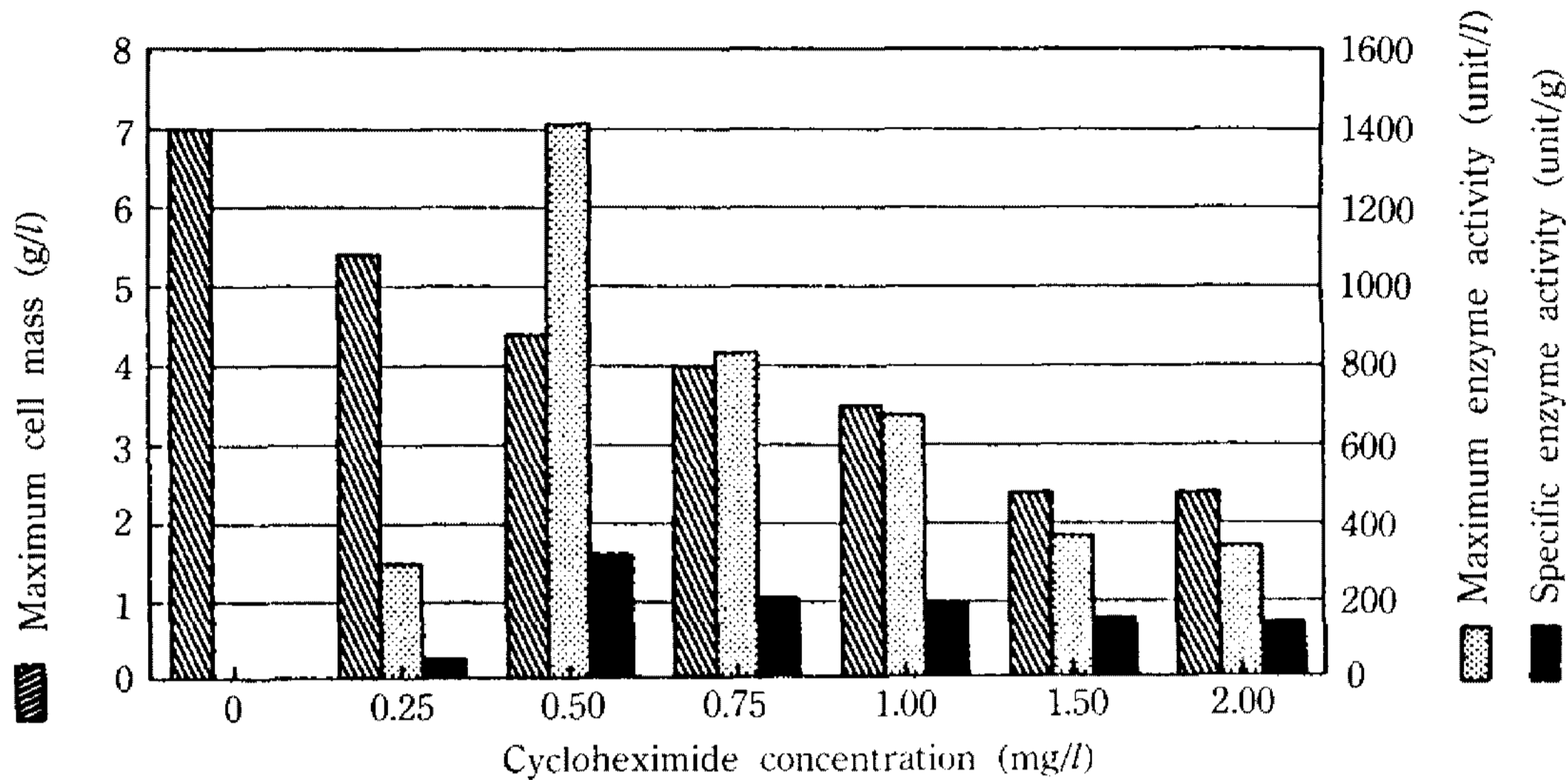


Fig. 1. Effects of cycloheximide concentration on the cell growth and the enzyme biosynthesis in flask culture (induction time=48 hr).

유도물질 농도에서 최대값을 보인 반면 그 이하이거나 그 이상인 경우나 모두 효소의 생산량이 크게 줄어드는 경향을 보였다. 이로써 플라스크배양에서 48 hr 배양 후 유도를 시켰을 때 효소생산을 최대화할 수 있는 cycloheximide의 최적농도는 0.5 mg/l인 것을 알 수 있었다. 유도물질은 균체의 성장을 저해하여 분화를 일으킴으로써 효소를 생산하게 하는데, Horowitz 등(13)은 tyrosinase에 특이성을 갖는 일종의 억제단백질이 존재한다고 가정하고, 이 억제단백질에 의해 효소의 생산이 조절받는 repression-induction 모델을 제안한 바 있다. 항생제 유도물질이 이 억제단백질의 생성을 저해한다면 유도물질의 농도가 증가함에 따라 억제단백질의 생성량이 감소하여 효소의 생합성이 유도되지만, 유도물질의 농도가 지나치게 높으면 억제단백질 뿐만 아니라 균체의 성장과 유지에 필요한 여러 단백질은 물론 tyrosinase 단백질의 생합성도 저해하게 된다. 따라서 유도물질 농도에 따라 단위 세포당 효소의 생합성능력이 달라질 것이다.

유도시간을 24 hr으로 하고 유도물질의 농도를 0.5, 0.7, 1.0 mg/l로 변화시키며 회분배양했을 때 균체량 대 효소생산속도의 비를 도시한 결과 Fig. 2와 같은 직선적인 관계를 얻었다. 그래프의 기울기로부터 효소비생산속도(specific enzyme production rate,  $\epsilon = (dE/dt)/X$ )를 구할 수 있었다. 효소 비생산속도는 유도물질의 농도가 0.7 mg/l일 때 21.68 unit/g·hr로 가장 큰 값을 보였으며 0.5, 1.0 mg/l의 경우 각각 14.87, 7.18 unit/g·hr이었다.

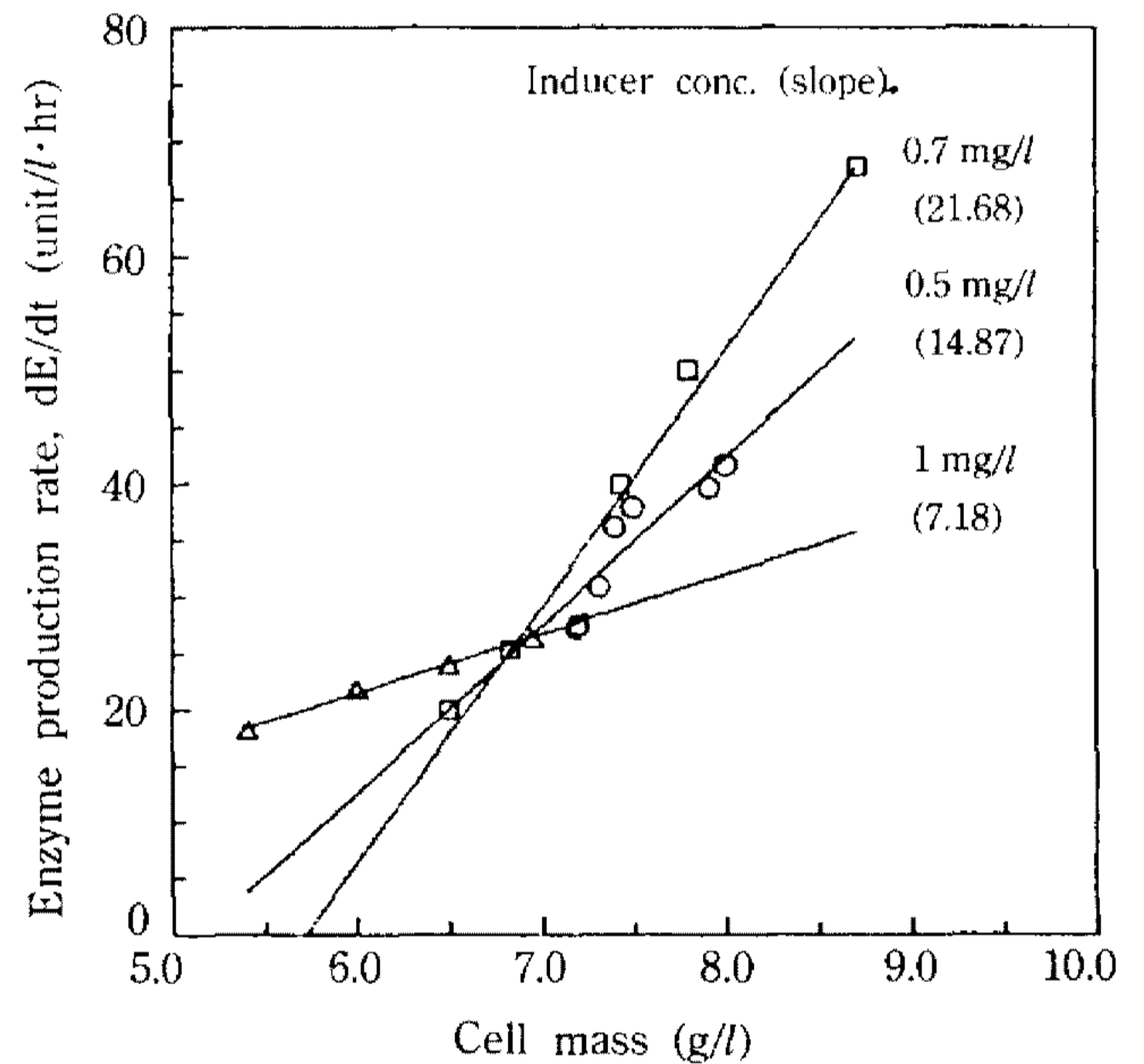


Fig. 2. Effects of cycloheximide concentration on the specific enzyme production rate in 5l fermenter (induction time=24 hr).

최적 유도시간

유도시간 및 유도물질의 농도를 일정하게(48 hr, 0.3 mg/l)하고 제한기질인 sucrose의 초기농도를 각각 10, 20, 40 g/l로 하였을 때 효소 생합성량을 비교하여 Table 3에 나타내었다. 유도시간이 같을지라도 초기 기질농도가 다르기 때문에 각각의 플라스크내 균체의 생리적인 상태는 서로 다를 것이다. 미생물 공정의 생리적 상태를 대표하는 공정변수로서 잔류기질의 농도 및 균체의 농도를 들 수 있는데 생합성되는 효소의 양은 이들 공정변수를 포함한 여러 환경인자들의

함수라고 할 수 있다. 초기 탄소원 농도가 10 g/l인 플라스크에서는 48 hr째에 이미 탄소원도 고갈되고 균체의 성장도 크게 제한을 받아 균체의 생리적 활성이 크게 저하되었으므로 효소생산량이 매우 작게 나타난 것으로 해석된다. 초기 탄소원 농도가 20 g/l인 경우, 48 hr에 유도시켰는데 이 유도시간은 균체가 정체기에 들어가기 직전의 시기이며 이 때 균체의 생리적 활성이 비교적 높을 것이고 균체가 분화과정에 들어가기 직전의 상태이며 효소의 생합성을 유도시키기에 가장 적합한 시간일 것이다. 이러한 이유 때문에 효소의 활성이 가장 높게 나온 것으로 판단된다. 초기 탄소원 농도를 40 g/l의 고농도로 사용했을 경우 48 hr째에 균체의 잔류기질농도는 22 g/l로서 균체는 지수성장기의 중간에 있으며 이 시기는 분화과정에 들어가지 못한 시간이며 균체가 효소를 생합성하기에 최적의 시간은 아닐 것이다. 그래서 초기 탄소원 농도를 20 g/l로 한 경우 보다 잔류기질농도가 큼에도 불구하고 효소생산은 오히려 낮게 나타난 것으로 볼

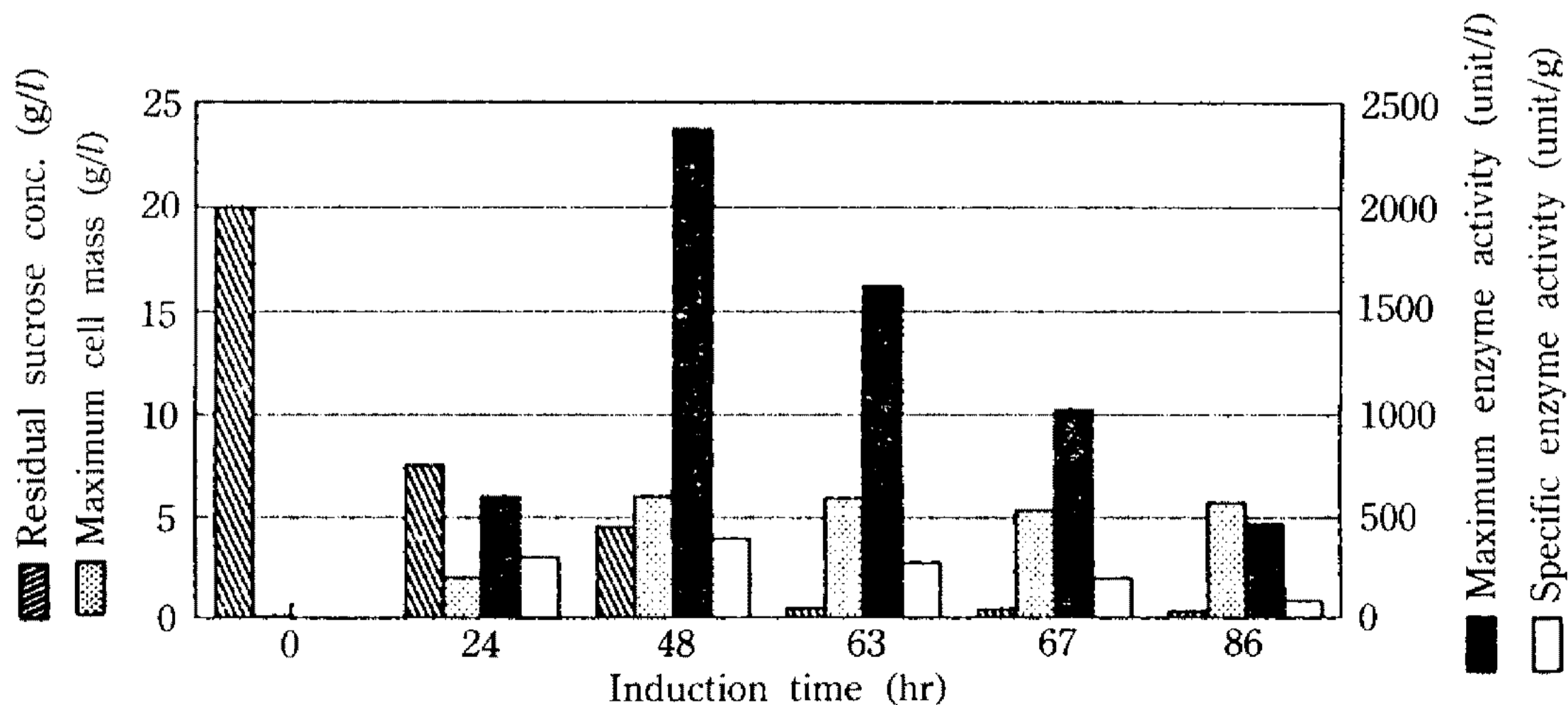
수 있다.

플라스크배양을 통해 유도물질 농도를 일정하게 하고 유도시간을 달리하며 효소의 생합성을 유도시키 비교하였다(Fig. 3). 접종시에 유도물질을 투입한 플라스크에서는 뚜렷한 기질소모 및 균체성장이 관측되지 않았으며 효소의 생합성량도 거의 없었다. 이 때 균체의 성장 morphology는 pellet형이었다. 균체가 지수성장기에 있는 24 hr째에 유도시킨 플라스크에서의 최대 효소활성은 600 unit/l로 48 hr째 투입한 플라스크에서 얻은 최고값인 2363 unit/l보다 현저히 작은 값을 보였다. 또한 유도시간에 따라 최대 균체량은 크게 영향을 받지 않았지만 효소의 생합성량은 유도시간이 지연됨에 따라 크게 감소하는 경향을 보였다. 유도물질의 농도가 같을지라도 이와 같이 균체의 생리조건에 따라 효소의 생합성 양상이 크게 달라짐을 알 수 있었다. 균체의 생리적 상태는 균체량, 잔류기질의 양, 균체의 성장과 tyrosinase 생산에 관여하는 효소의 활성 등으로 표현될 수 있으며 이는 배양조건이 같으면 배양시간의 함수일 것이다. 다른 조건이 같다면 접종 때부터 유도물질 투입시까지 경과한 시간이 균체의 생리조건을 결정할 것이며 그 생리상태에 따라서 균체의 효소 생합성 능력도 결정될 것이다. 앞서 결정한 적정한 농도로 유도물질을 투여했다 할지라도 최적 유도시간에 투여하지 않는다면 효소의 생합성을 극대화시킬 수 없을 것이다. 그러므로 tyrosinase의 생산에는 유도물질의 농도는 물론 그 유도시간도 매우 중요한 영향을 미치는 운전변수이다. 따라서 이 두 운전변수를 동시에 최적화하여야 효소의 생합성을 최대화시킬 수 있다.

**Table 3. Effect of initial sucrose concentration on the cell growth and the enzyme biosynthesis**

Initial sucrose concentration (g/l)	Residual sucrose concentration (g/l)	Maximum cell mass (g/l)	Maximum enzyme activity (unit/l)	Maximum specific activity (unit/g)
10	0.13	3.7	258.3	60
20	4.5	5.9	2373	368
30	22.0	8.1	1435	172

Inducer was added at 48 hr of culture and the inducer concentration was 0.3 mg/l.



**Fig. 3. Effects of induction time on the enzyme production (cycloheximide concentration=0.3 mg/l).**

균체의 성장 및 효소생산에 관한 모델링

효소의 생산성을 극대화시키기 위한 최적의 유도 조건을 찾기 위하여 균체 내에서 tyrosinase의 생산과 관계하는 일련의 생물반응을 수학적 모델로 표현하였다. 세포의 성장은 일반적으로 많이 쓰는 균체성장 모델식인 Monod식(22)을 변형하였는데 유도물질의 존재에 의한 성장저해를 고려하였다(식 (1)). 즉 제한기질인 탄소원의 농도가 높은 배양초기에는 매우 빠른 지수성장을 하며, 기질농도가 감소함에 따라 균체성장도 감소할 것이다. 그러나 유도물질이 투입된 후엔 기질의 농도만이 제한인자가 되는 것이 아니라 유도물질의 농도 역시 균체 성장을 저해하는 인자로 작용할 것이기 때문에 유도물질에 의한 저해항( $K_I/(K_I+I)$ )을 고려하였다. 기질이 고갈되면( $S=0$ ) 균체가 분화과정에 들어가며 따라서 균체는 성장을 멈추고( $\mu=0$ ) 자가분해되어 균체량이 감소한다. 일반적으로 균체 사멸기(death phase)를 모델링하는데는 Monod식을 확장하여 비사멸속도(specific death rate,  $K_d$ )를 포함시키는 방법(23)을 많이 쓰는데 본 연구에서도 1차적 자가분해항을 고려하였다.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - K_d) X$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \frac{K_I}{K_I + I} \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_S} \mu X \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = 0 \quad (t < T_S + T_L) \quad (3-1)$$

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \frac{I}{K_1 + I + I^2/K_2} X - K_e E \quad (t > T_S + T_L) \quad (3-2)$$

$$\alpha' = \frac{1}{X} \frac{dE}{dt} = \alpha \cdot f(I) = \alpha \frac{I}{K_1 + I + I^2/K_2} \quad (4)$$

기질의 소모속도는 균체의 성장속도에 비례하므로 (식 (2)) 비례상수로 수율상수(yield coefficient,  $Y_S$ )를 사용하였다. 비성장속도식에 유도물질에 의한 저해현상을 고려하였기 때문에 식 (2)은 유도 후 균체 성장속도가 감소함과 동시에 기질소모속도도 감소하

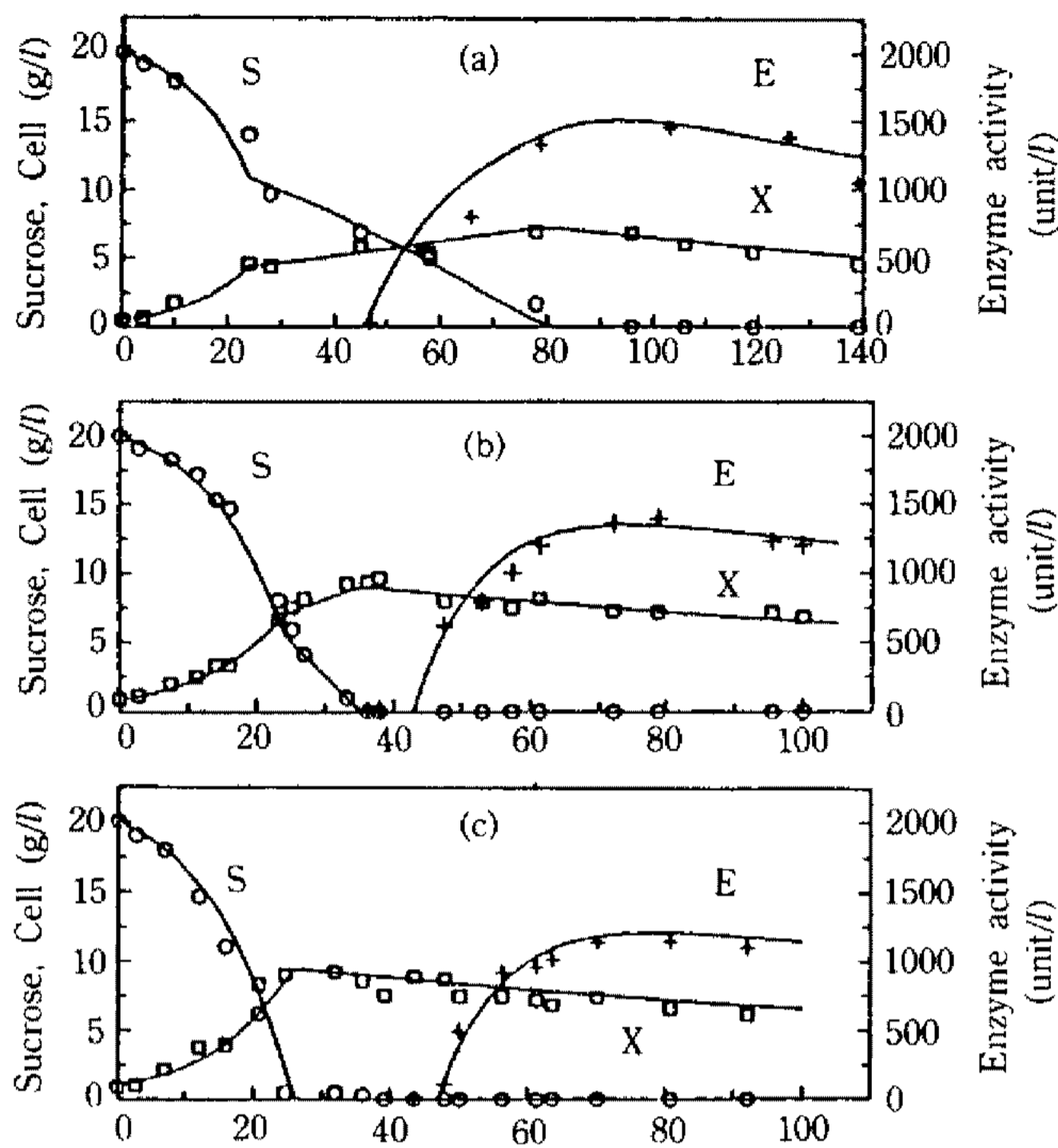
Table 4. Estimated parameter values in the model

Parameter	Parameter values	Remark
$\mu_{MAX}$	0.095 (hr <sup>-1</sup> )	Experimental
$K_S$	0.30 (g/l)	Experimental
$K_I$	0.00025 (g/l)	Estimated
$K_d$	0.005 (hr <sup>-1</sup> )	Estimated
$Y_S$	0.45 (g/g)	Experimental
$\alpha$	22.0 (unit/g·hr)	Estimated
$K_1$	0.0007 (g/l)	Estimated
$K_2$	0.0007 (g/l)	Estimated
$K_e$	0.10 (hr <sup>-1</sup> )	Estimated
$T_L$	20 (hr)	Experimental

는 경향을 나타낼 것이다.

효소는 유도작용에 의해서 생산되기 때문에 효소 생산 속도식은 효소생산이 없는 유도 전(식 (3-1))과 유도 후(식 (3-2))의 2단계로 구분하여 모델링하였다. 효소의 생산속도식으로는 일반적으로 많이 쓰는 Leudeking-Piret식을 사용하였는데, 균체는 지수성장기에서 효소를 생산하지 않고 정체기에서 효소를 생산하기 때문에 균체의 성장속도와 연관된 항(growth associated term)은 무시될 수 있다. 따라서 균체농도에 비례하여 생산속도가 결정될 것이다. 효소는 생산과 동시에 1차적으로 비활성화된다고 가정하였다. 또한 유도시킨 후( $t > T_S$ ) 일정한 생산지연기를 지난 다음 효소가 생합성되기 시작하므로 시간정수(time constant,  $T_L$ )를 포함시켰다. 이 시간정수( $T_L$ )는 유도물질에 의해 유도되어 효소단백질이 생합성되기까지 균체 내에서 거치는 일련의 과정에 소요되는 시간이다. 효소의 비생산속도는 Fig. 2에서 본 바와 같이 유도물질농도의 함수였으므로, 저농도 영역에서는 비례하되 고농도 영역에서 다시 감소하는 실험적 경향을 모사할 수 있도록 식 (4)와 같은 일반적인 저해모델 식으로 표현하였다.

모델식은 10개의 매개변수를 갖는데  $\mu_{max}$ ,  $K_S$ ,  $Y_S$ ,  $T_L$ 은 실험결과로부터 구하였으며 나머지 매개변수들은 비선형 회귀분석법을 사용하여 구하였다. 여러 회분실험을 통하여 생산지연시간( $T_L$ )을 관측한 결과 18~23 hr이었는데 이 범위에서 최대 효소생산성에 대한 민감도(parameter sensitivity)가 비교적 낮아 (최고 1.9%) 회분반응 모사에서는 20 hr으로 고정하였다. 추정된 매개변수 값을 Table 4에 나타내었다.



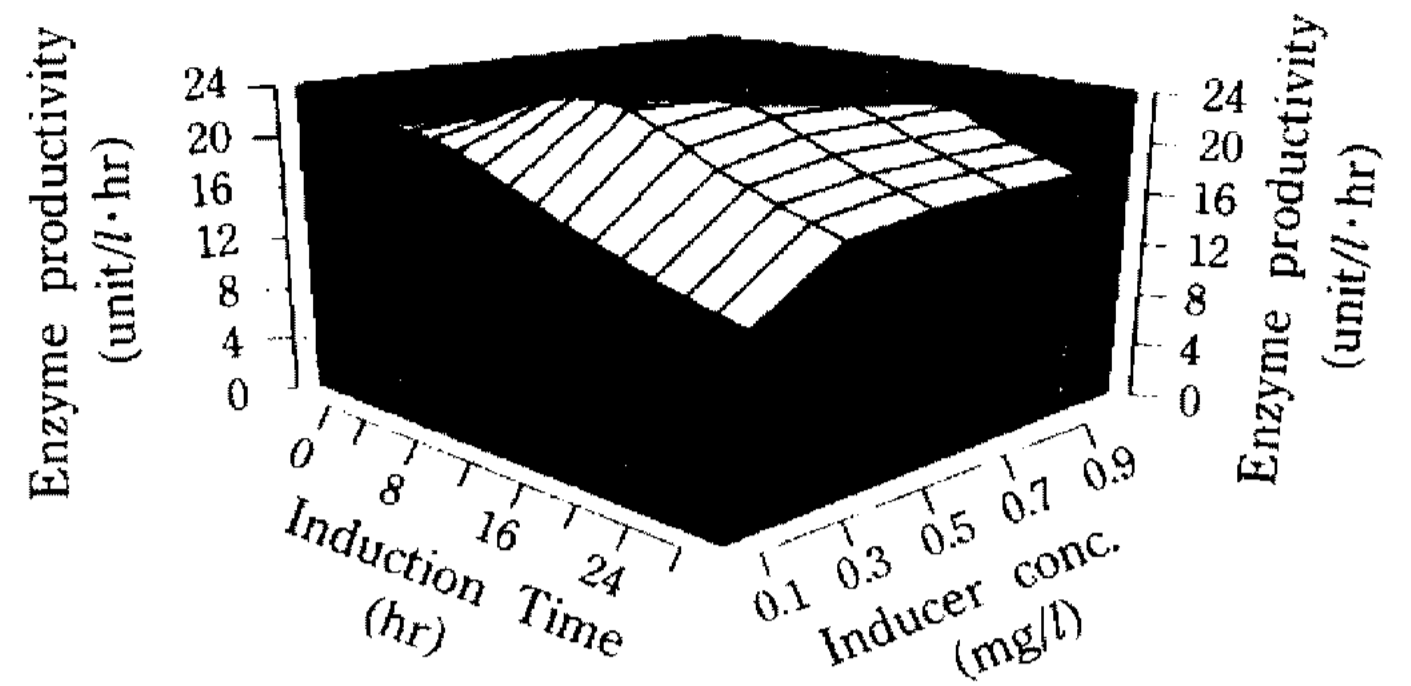
**Fig. 4. Comparison of simulation profiles with experimental data for the batch fermentation.**

The inducer concentration and induction time were (a) 1 mg/l and 24 hr (b) 0.5 mg/l and 24 hr (c) 0.5 mg/l and 32 hr. Dots indicate experimental data and solid lines represent simulation results.

○—○: cell mass (X), □—□: sucrose concentration (S), +—+: tyrosinase activity (E).

유도물질의 농도 및 유도시간을 변화시키며 식 (1)~(3)의 상미분방정식을 Runge-Kutta법에 의해 수치모사하였으며 모사결과와 실험결과를 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4(a)는 cycloheximide의 농도가 1 mg/l이며 유도시간은 24 hr일 때의 결과로서 전반적으로 모사치와 실험치가 잘 일치하며 유도물질 투입에 의한 기질소모 및 세포성장의 저해현상을 잘 따르고 있음을 보여준다. 유도시간을 고정시키고(24 hr) 유도물질 농도를 0.5 mg/l로 낮춘 Fig. 4(b)의 결과와 유도물질 농도를 고정하고(0.5 mg/l) 유도시간을 32 hr로 낮추어 유도시킨 Fig. 4(c)의 결과에서도 실험치와 모사치가 잘 일치하였다.

유도물질의 농도가 0.5 mg/l로 일정하며 유도시간이 서로 다른 Fig. 4(b)와 4(c)의 결과를 비교하면 32 hr에서 유도시킨 회분배양(Fig. 4(c))에서 24 hr에서 유도시킨 회분배양(Fig. 4(b))보다 최고 효소활성이 15% 정도 낮은 값을 보이고 있다. 32 hr째에 유도시킨 후자의 회분배양에서는 유도시간 전에 이미



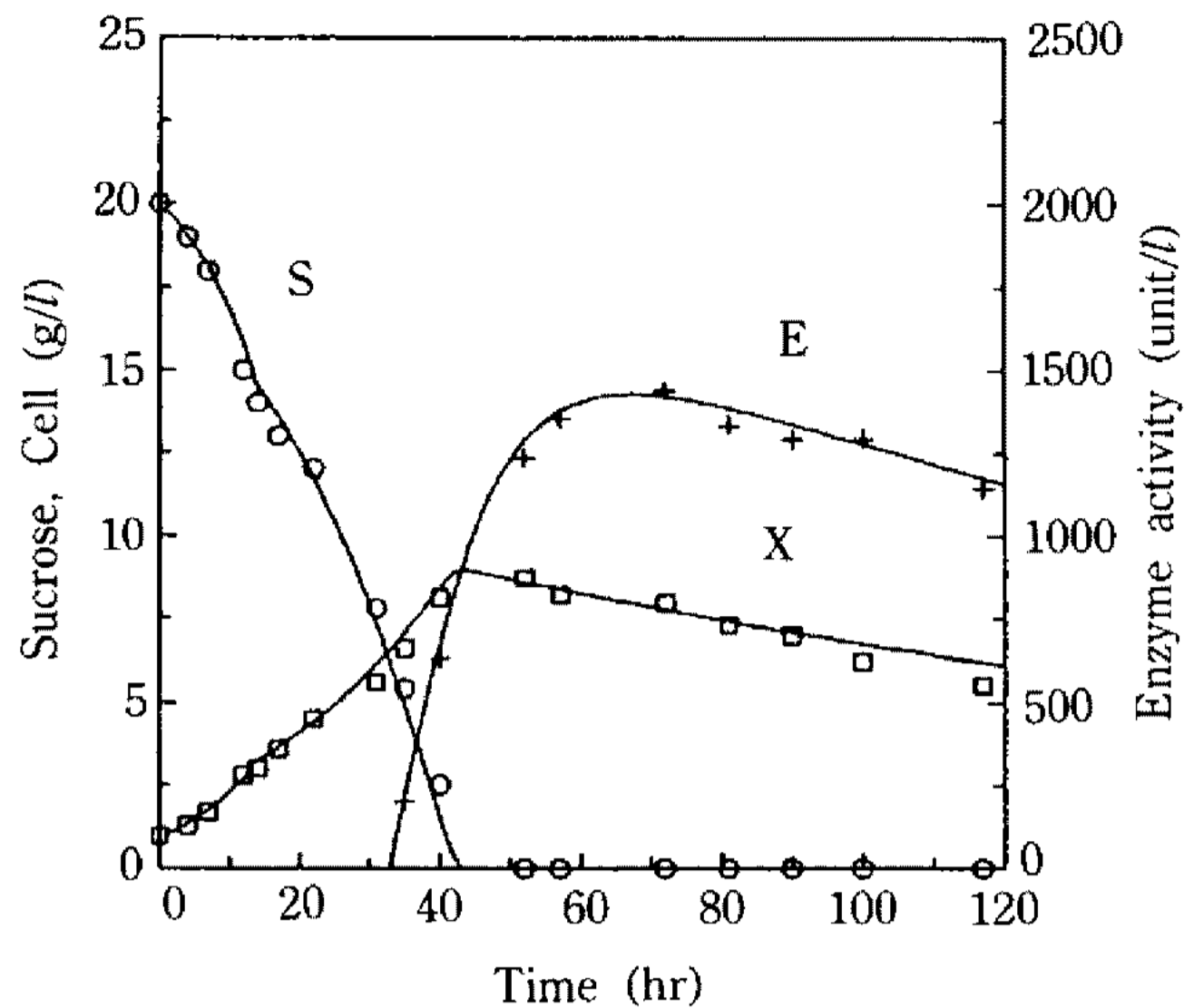
**Fig. 5. Effects of induction time and inducer concentration on the enzyme productivity.**

기질이 고갈되고 균체는 정체기에 들어가서 분화되는 과정에 있다. Tyrosinase를 생산하는 미생물반응의 활성이 매우 저하된 상태라 할 수 있는 정체기에 효소의 생합성을 유도하였기 때문에 낮은 효소활성을 보인 것으로 생각된다.

### 효소생산 최적화

본 연구에서 제안한 모델식을 토대로 효소생산을 최대화시킬 수 있는 최적 유도조건을 결정하기 위하여 유도물질 농도 및 유도시간을 변화시킨 여러 유도조건에서의 회분배양을 수치모사하였다. Fig. 5는 각각의 회분배양에서 도달할 수 있는 최고 효소생산성(maximum enzyme productivity)을 서로 다른 유도조건에 대하여 도시한 결과이다. 수치모사시 사용한 초기접종농도는 0.9 g/l였으며, 초기 탄소원 농도는 20 g/l이었다. 유도물질의 농도가 낮을수록 일찍 유도시키는 것이 높은 생산성을 얻는데 유리하였으며, 유도물질의 농도가 높을수록 늦게 유도시키는 것이 효소생산성을 높일 수 있다. 20 hr 이상의 유도시간에서는 유도시간이 늦어질수록 효소의 생산성은 낮아졌다. 효소의 생합성을 늦게 유도시킬 경우(20 hr 이상에서) 유도물질 농도가 매우 낮은 0.1 mg/l인 경우를 제외하고는 효소생산성에 미치는 농도의 영향이 무시할 만하였다. 이러한 현상으로부터 균체의 성장이 거의 완료된 늦은 시간에 유도시킬 경우 균체의 농도에 비해 유도물질 농도가 효소생합성속도에 대하여 덜 지배적인 인자임을 알 수 있다.

수치모사결과 효소생산을 최대화시키기 위한 최적 유도조건은 0.3 mg/l, 14 hr였으며 이러한 유도조건에서 얻을 수 있는 최대 효소생산성은 23.78 unit/l·hr로서 생산성이 가장 높은 52 hr째에 수확하는 것이 가장 유리한 것으로 나타났다. 이렇게 최적화된 유



**Fig. 6. Enzyme production using the optimized induction conditions.**

The inducer concentration was 0.3 mg/l and the induction time was 14 hr. Dots indicate experimental data and solid lines represent simulation results.

○—○ : cell mass (X), □—□ : sucrose concentration (S), +—+ : tyrosinase activity (E).

도조건에서 실제로 효소의 생합성을 유도시킨 결과 모사결과와 일치하는 실험결과를 얻었으며(Fig. 6), Fig. 4(a)~(c)의 실험결과보다 최고 87%까지 효소 생산성을 향상시킬 수 있었다(Fig. 6).

## 요 약

*Neurospora crassa*는 성장이 끝나고 분화되는 과정에서 tyrosinase를 생산하며 아미노산류의 기질 유사체, 반대사물질, 단백질 생합성 저해제 등에 의해 효소생산이 유도된다. 미생물 균체를 배양시키며 여러 가지 유도물질을 사용하여 효소의 생합성을 유도시킨 결과 가장 적합한 유도물질은 cycloheximide였다. 이는 균체의 성장을 크게 저해하는 항생제의 일종이므로 효소 생합성을 최대화시키기 위한 최적의 농도가 존재하였으며, 유도물질의 농도가 일정한 경우에 효소 생산에 최적의 유도시간이 존재하였다. 유도물질에 의한 균체의 성장저해, 기질소모, 유도물질 농도 및 시간에 따른 효소생산 kinetics를 고려하여 수학적 모델링을 하였고 이를 효소생산조건 최적화에 이용하였다. 유도조건을 최적화함으로써 최대 효소생산성을 크게 향상시킬 수 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행된 연구결과의 일부로서 이에 대하여 감사드립니다.

## 사용 기호

E	: enzyme activity (unit/l)
I	: inducer concentration (g/l)
$K_d$	: specific cell death rate ( $\text{hr}^{-1}$ )
$K_e$	: enzyme deactivation constant ( $\text{hr}^{-1}$ )
$K_f$	: growth inhibition constant (g/l)
$K_s$	: growth saturation constant (g/l)
$K_1, K_2$	: production inhibition constant (g/l)
S	: limiting substrate concentration (g/l)
$T_L$	: production lag time (hr)
$T_S$	: induction time (hr)
t	: cultivation time (hr)
X	: cell concentration (g/l)
$Y_S$	: cellular yield coefficient (g/g)
$\alpha$	: maximum specific production rate (unit/g·hr)
$\alpha'$	: specific production rate (unit/g·hr)
$\epsilon$	: specific enzyme production rate (unit/g·hr)
$\mu$	: specific growth rate ( $\text{hr}^{-1}$ )
$\mu_{max}$	: maximum specific growth rate ( $\text{hr}^{-1}$ )

## 참고문헌

- Whitaker, J.R.: *Principles of Enzymology for the Food Science*, Marcel Dekker, Inc., New York (1972)
- Nelson, J.M. and C.R. Dawson: *Advances in Enzymology and Related Subjects of Biochemistry*, (F.F. Nord and C.H. Werkman eds.) Interscience Publishers, Inc., New York, Vol. 29, 99 (1944)
- Mason, H.S.: *Pigment Cell Biology*, Academic Press, New York (1959)
- Calne, D.B. and M. Sandler: *Nature*, **226**, 21 (1970)
- Wykes, J.R., P. Dunnill and M.D. Lilly: *Nature New Biol.*, **230**, 187 (1971)
- Kazandjian R.Z. and A.M. Klivanov: *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5448 (1985)
- Atlow, S.C., L. Bonadonna-Aparo and A.M. Klivanov: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 599 (1984)
- Lerch, K. and L. Ettlinger: *Eur. J. Biochem.*, **31**, 427 (1972)



9. Lerch, K.: *Metal Ions in Biological Systems*, (H. Siegel ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, Vol. 6, 143 (1981)
10. Bouchilloux, S., P. McMahon and H.S. Mason: *J. Biol. Chem.*, **238**, 1699 (1963)
11. Duckworth, H.W. and J.E. Coleman: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1613 (1970)
12. Hirsch, H.M.: *Physiol. Plantarum*, **7**, 72 (1954)
13. Horowitz, N.H., H.M. Feldman and M.L. Pall: *J. Biol. Chem.*, **245**, 2784 (1970)
14. Horowitz, N.H., M. Fling, H.L. Macleod and N. Sueoka: *J. Mol. Biol.*, **2**, 96 (1960)
15. Rajan, J.S. and P.D. Virkar: *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 770 (1987)
16. Horowitz, N.H., M. Fling and G. Horn: *Methods in Enzymology*, (H. Taylor and C.W. Tabor, eds.) Academic Press, New York, Vol. 17A, 615 (1970)
17. Park, T.H., J.-H. Seo and H.C. Lim: *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1167 (1989)
18. Davis, R.H. and F.J. De Serres: *Methods in Enzymology*, (S.P. Colowick and N.O. Kaplan eds.) Academic Press, New York, Vol. 17A, 79 (1970)
19. Cooper, T.G.: *The Tools of Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 189 (1977)
20. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
21. Kim, J.H. and Y.J. Yoo: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 191 (1990)
22. Monod, J: *Annu. Rev. Microbiol.* **3**, 371 (1949)
23. Chiu, S.Y., L.T. Fan, I.C. Kao and L.E. Erickson: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 179 (1972)

(Received April 4, 1991)