

## 반응표면 분석에 의한 사상균 Strain FJ1의 Cellulolytic Enzymes 생산조건의 최적화

김 경 철 · 유 승 수 · 오 영 아 · 이 용 운 · 정 선 용 · \*김 성 준  
전남대학교 공과대학 환경공학과  
(접수 : 2002. 3. 4., 게재승인 : 2002. 4. 5.)

## Optimization for the Production Factors of Cellulolytic Enzymes of a Fungus, Strain FJ1 by Response Surface Methodology

Kyung-Cheol Kim, Seung-Soo Yoo, Young-A Oh, Yong-Woon Lee, Seon-Yong Chung, and Seong-Jun Kim\*  
Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University,  
Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2002. 3. 4., Accepted : 2002. 4. 5.)

The production conditions of cellulolytic enzymes by a fungus, strain FJ1, were optimized using response surface analysis. The culture factors which largely affected 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 corresponding to each cellulolytic enzyme production were as following: CMCase production was obtained in the conditions of cultivation time of 5.4 days, carbon source concentration of 3.5%, nitrogen source concentration of 0.6%, and composition ratio of carbon sources of 52:48 (avicel:CMC), xylanase appeared in the conditions of 5.3 days, 3.5%, 0.8%, and 54:46, respectively, and  $\beta$ -glucosidase were 7.0 days, 5.0%, 1.0%, and 83:17, respectively, and avicelase were 6.5 days, 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 activity was enhanced up to 74% when compared to that obtained in the experimental conditions.

**Key Words** : fungus, response surface methodology, CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase, optimization, saccharification

### 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(1,2). 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 되어진다고 할 수 있다.

섬유소 분해효소는 glucose가  $\beta$ -1,4-linkage로 결합된 고분자 화합물인 식물성 cellulose를 분해하여 당을 생성하는 효소이며, cellulose, lactose, sucrose 등의  $\beta$ -linkage를 갖는 탄소원에 의해 유도된다. 특히 fungi가 생산하는 효소는 inducer가 효과적으로 작용되었을 때 효소 활성도가 1,000배 정도 증가하며, 또한 대사 산물인 glucose에 의해 억제를 받아 미량의 glucose 존재 하에서도 균주가 효소를 생성하지 않게 되므로 가장 효과적인 생산을 얻기 위해서는 탄소원의 조성 과 기질 농도를 최적으로 제한하여야 한다(3). 또한 탄소원과 함께 amino acids, peptides, vitamins, trace elements and/or mineral salts를 갖춘 복합 유기질소원을 첨가시켜 배양하였을 경우에는 무기질소원 이용시보다 더 높은 효소 생산성을 보여주고 있는데, 이는 미생물의 성장 영양물로 제공되어져 지

\*Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864  
E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

**Table 1.** Comparisons of the cellulolytic enzyme activities of strain FJ1 and *Trichoderma reesei*

	Cultivation time (day)	Cellulolytic enzyme activities (U/mL)				Reference
		CMCase	Xylanase	Avicelase	$\beta$ -glucosidase	
FJ1 <sup>a)</sup>	5	9.07	12.56	0.45	0.54	
<i>T. reesei</i> <sup>a)b)</sup>	7	8.60	9.95	0.43	0.48	
<i>T. reesei</i>		7.86	1.00	0.37	0.09	(3)
<i>T. reesei</i>	7	8.30		0.70	1.60	(15)

<sup>a)</sup>The cultivation of the strain were performed on Mandel's medium under the same conditions with the reference strain below.

<sup>b)</sup>*T. reesei*(KCTC 6952) was supplied from the Korean Collection for Type Culture.

속적인 좋은 성장을 보여 효소생산성을 향상시키기도 한다 (4).

본 연구에서는 섬유소 분해효소 생산을 생물공학적인 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 및 배양조건

썩은 나무로부터 분리된 사상균 FJ1은 뛰어난 cellulase 생산능력을 보여주고 있으며, 우수한 cellulase 생산자로 잘 알려진 *T. reesei*와 비교한 결과를 Table 1에 나타내었다. 사상균 FJ1은 *T. reesei*에 비해 성장속도가 빠르며 cellulase 생산성은 우수하였다. 또한 효소생산에 유리한 균주로 판단되어, 현재 동정실험을 진행 중에 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 (5), 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 구성비율을 변화시켰다. 효소 생산을 위한 배양은 Table 2와 3의 배양조건에 따라 조제된 배지 50 mL을 500 mL 플라스크에 넣은 후, 포자현탁액을 2% 접종하여 30°C, 100 rpm으로 교반배양 하였다. 이 때 사용된 균주 접종물은 포자현탁액을 만들어 사용하였고, 효소활성도를 측정하기 위한 조효소액은 배양액을 10,000×g, 10분간 원심분리 하여 상등액을 이용하였다.

### 효소활성도 측정

CMCase와 xylanase에 대한 효소활성도 측정은 2%의 CMC 용액과 xylan(Oat spelts)용액 0.5 mL와 효소액 0.5 mL을 혼합하여 50°C, 30분간 반응시킨 후 DNS방법으로 환원당을 측정하였다(6,7). Avicelase 활성도 측정은 1%의 avicel(Merck, Germany)용액 1 mL와 효소액 1 mL을 혼합하여 50°C, 120분

간 반응시켜 Somogyi-Nelson방법으로 환원당을 측정하였다 (6,8). 효소활성도 측정에 사용된 표준물질은 glucose, xylose와 cellobiose를 이용하였고, 활성도는 표준반응조건에서 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$ 의 glucose, xylose와 cellobiose에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.  $\beta$ -glucosidase는 5 mM PNPG(p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside)용액 1 mL와 0.1 M sodium acetate buffer(pH 4.8) 1.8 mL, 효소액 0.2 mL을 혼합한 반응물을 50°C, 30분간 반응시킨 후, 0.4 M glycine buffer(pH 10.8) 4 mL를 넣어 반응을 종결시킨 다음, 이 때 생성되는 p-nitrophenol을 430 nm에서 정량하였다(6). 활성도는 표준반응조건에서 1  $\mu\text{mol min}^{-1}$ 의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다.

### 실험계획 및 통계분석

중요 배양인자인 배양시간, 탄소원 및 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원의 비율 등의 독립변수 변화가 효소 생산성에 미치는 영향을 반응표면 분석법을 이용하여 분석하였다(9-11). 반응 표면 분석의 중요한 목적은 각각의 독립 변수에 대해 종속변수인 섬유소 분해효소 생산성과의 상관관계를 구해 어떠한 영향을 주는지 모니터링하고 가장 높은 효소 생산성을 줄 수 있는 최적조건을 결정하기 위함이다. 각각의 실험인자 변화에 따른 효소생산성의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 다항식을 사용하였다.

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

$Y$  : 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.

최적배양조건 결정값은 위 방정식의 Y값이 최대가 되는 지점을 3차원 그래프를 이용하여 구하였다. 3차원 그래프는 얻어진 각 계수( $\beta$ )를 대입하여  $X_1, X_2, X_3, X_4$ 의 변수를 변화시켜 Y가 최대가 되도록 point를 찾아낸다. 이를 구체적으로 설명하면 구해진 각 계수( $\beta$ )를 2차 다항식에 대입하고

**Table 2.** Standardization in three levels of each factor in various culture conditions

Factors	Symbols	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>	83:17	50:50	17:83	-1.00	0.00	1.00

**Table 3.** Experimental results and standardized values of each factor in various culture conditions

Run No.	Experimental conditions				Experimental results (U/mL)			
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	CMCase	Xylanase	$\beta$ -glucosidase	Avicelase
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

Table 2에서 표준화한 값으로부터 우선 X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>를 고정하고 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>를 스캔해서 Y가 최대가 되는 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>를 구하고, 그 다음 구해진 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>의 최적화된 값을 고정해서 X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>를 스캔하여 Y가 최대가 되는 X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>를 정한다. 여기에서 결정된 X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>의 조건에서 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>의 최적조건을 구하였고, 다시 최적화된 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>을 고정시켜 X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub>를 결정하였다.

## 결과 및 고찰

### 반응표면 분석

본 실험에 이용한 중심합성계획은 Table 2에 보는 바와 같이 표준화된 값을 사용하여, 전체 39개의 실험조건에서의 각각의 섬유소 분해효소 생산성에 관한 결과를 Table 3에 나타내었다. 표준화된 값은 측정 단위가 다른 변수들과 동등한 비교가 가능하도록 해주며, 다중공선성을 제거하고자 사용하

**Table 4.** Coefficients of regression equations for response surface methodology

Coefficient	Parameters estimated							
	CMCase		Xylanase		$\beta$ -glucosidase		Avicelase	
	Estimate	Pr>  t	Estimate	Pr>  t	Estimate	Pr>  t	Estimate	Pr>  t
$\beta_0$ (Intercept)	32.63	<.0001	48.56	<.0001	1.55	<.0001	1.46	<.0001
$\beta_1$ ( $X_1$ )	2.76	0.024	4.04	0.024	0.24	0.001	0.32	0.000
$\beta_2$ ( $X_2$ )	8.95	0.010	10.90	0.010	0.66	0.002	0.54	0.009
$\beta_3$ ( $X_3$ )	1.19	0.602	5.68	0.602	0.16	0.232	0.13	0.326
$\beta_4$ ( $X_4$ )	-0.85	0.956	-1.24	0.956	-0.29	0.746	-0.17	0.850
$\beta_{12}$ ( $X_1X_2$ )	-0.16	0.919	-1.78	0.919	-0.02	0.849	0.02	0.872
$\beta_{13}$ ( $X_1X_3$ )	0.21	0.877	0.72	0.877	0.05	0.506	0.03	0.724
$\beta_{14}$ ( $X_1X_4$ )	-1.55	0.440	-1.05	0.440	-0.16	0.161	-0.12	0.326
$\beta_{23}$ ( $X_2X_3$ )	2.91	0.461	5.74	0.461	0.33	0.154	0.13	0.595
$\beta_{24}$ ( $X_2X_4$ )	-1.42	0.945	-7.47	0.945	-0.79	0.501	-0.43	0.725
$\beta_{34}$ ( $X_3X_4$ )	-0.02	0.999	-1.12	0.999	-0.10	0.925	0.08	0.945
$\beta_{11}$ ( $X_1^2$ )	-6.34	0.002	-11.54	0.002	-0.17	0.121	-0.25	0.031
$\beta_{22}$ ( $X_2^2$ )	-15.26	<.0001	-21.32	<.0001	-0.62	0.001	-0.70	0.001
$\beta_{33}$ ( $X_3^2$ )	-6.72	0.019	-6.68	0.019	-0.19	0.229	-0.12	0.451
$\beta_{44}$ ( $X_4^2$ )	-14.72	<.0001	-19.86	<.0001	-0.46	0.010	-0.52	0.006
R-square	0.8272		0.8471		0.8547		0.7969	
Prob>F	<.0001		<.0001		<.0001		<.0001	

$X_1$ =time,  $X_2$ =carbon conc.  $X_3$ =nitrogen conc.  $X_4$ =avicel/CMC ratio

**Table 5.** Correlation coefficients(R) between production of cellulolytic enzymes and factors used in optimization

	Cultivation conditions			
	Cultivation time	Carbon conc.	Nitrogen conc.	Avicel/CMC ratio
CMCase	0.215	-0.008	-0.178	-0.112
Xylanase	0.220	-0.0737	-0.009	-0.109
$\beta$ -glucosidase	0.306	0.342	-0.133	-0.456
Avicelase	0.442	0.238	-0.094	-0.339

**Table 6.** Predicted optimum conditions by analysis of response surface

Factor	CMCase		Xylanase		$\beta$ -glucosidase		Avicelase	
	SL	CC	SL	CC	SL	CC	SL	CC
$X_1$ (day)	0.22	5.4	0.17	5.3	1.00	7.0	0.76	6.5
$X_2$ (%)	0.31	3.5	0.34	3.5	1.00	5.0	0.57	4.0
$X_3$ (%)	0.16	0.6	0.59	0.8	1.00	1.0	0.79	0.9
$X_4$ (avicel:CMC)	-0.06	52:48	-0.12	54:46	-1.00	83:17	-0.43	64:36
Predicted values	33.5		52.6		2.88		1.84	

SL: Standardized level, CC: Cultivation condition

였다(10). 섬유소 분해효소 생산의 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면방정식 계수 및 상관계수를 결정하였으며, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 섬유소 분해 효소들의 상관계수 값들은 0.79-0.85이었고, 또한 유의성 검증, 적합결여 및 잔차분석 등을 해석한 결과 모든 실험자료들이 95% 이상의 신뢰도를 보여 주었다. 이는 독립변수인 배양시간, 탄소원 및 질소원 농도, 그리고 혼합탄소원 비율 변화에 따른 효소 생산에 관해 잘 설명되고 있음을 알 수 있었다. 사상균 FJ1을 이용한 효소 생산에서 가장 큰 영향을 주는 독립 변수를 결정하기 위하여 상관성을 살펴보았는데, 배양시간이 가장 높은 상관성을 보여 주고 있으며(Table 5), 각각의 섬유소 분해 효소에 따라 탄소원 및 질소원 농도, 혼합탄소원 비율은 약간의 차이를 보이고 있음을 알 수 있었다. 또한 3차원 반응표면 그래프로 분석한 결과 Figure 1-4에서 보여 주는 것처럼 섬유소 분해 효소 생산에 대한 각각의 변수의 영향을 살펴

볼 수 있었다.

#### 최적조건 결정

능선분석(ride analysis)를 수행하여 반응변수의 값이 증가하는 방향으로 좌표를 이동시켜 각각의 변수들의 반응표면을 살펴보고(10), 이때 사용되어진 능선분석은 본 실험에 포함된 영역 내에서만 실시하였다. 사상균 FJ1의 효소 생산 조건을 최적화하기 위한 배양시간에 대한 탄소원 농도의 반응표면은 모든 변수들을 center run에서 + 방향으로 이동시켜야 하는 것으로 나타났다. 위와 같은 방법으로 질소원 농도, 혼합탄소원 비율의 영향을 살펴보았다. CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, 그리고 avicelase를 생산하기 위한 사상균 FJ1의 배양시간은 각각 5.4, 5.3, 7.0, 그리고 6.5일에서 최적화되었다(Table 6). 탄소원 농도에 대한 최적 결정값을 살펴보면 CMCase 및 xylanase의 생산을 위한 결정값은 3.5%로 비슷하

나,  $\beta$ -glucosidase와 avicelase의 결정값들은 5.0%, 4.0%로 상이함을 나타내고 있다. 혼합탄소원의 비율에서 CMCase와 xylanase의 결정값은 52:48, 54:46으로서 비슷하나,  $\beta$ -glucosidase와 avicelase의 결정값들은 혼합탄소원 비율 중 avicel이 더 많은 비중을 차지하였다. 이는 섬유소 분해 효소 생산에 있어서 탄소원의 농도와 혼합탄소원의 비율에 의해서 각각의 효소 유도 특성이 다름에 기인할 수 있을 것이다(12,13). 또한 질소원의 농도에 관한 최적 결정값은 0.6-1.0%를 보여 주고 있다. 특히적으로  $\beta$ -glucosidase의 생산 조건에 관한 최적화된 결정값은 5.0%의 탄소원의 농도, 1.0%의 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원 avicel과 CMC의 비율 83:17에서 배양 시간 7일째 최대의 효소 활성도를 보여 주고 있다.

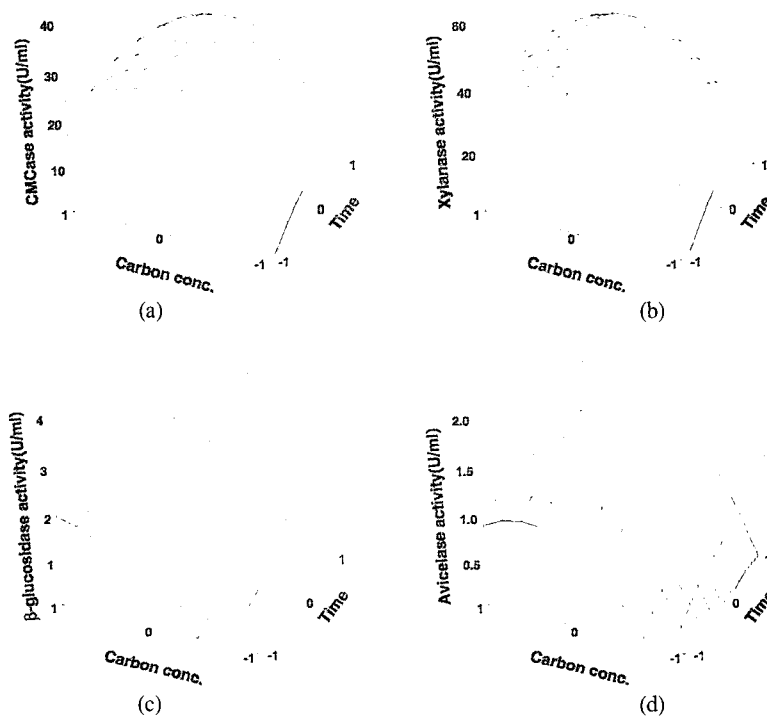
3차원 반응표면도를 살펴보면, Figure 1은 배양시간과 탄소원의 농도에 관한 각각의 섬유소 분해 효소 활성도를 나타내었는데, 탄소원의 영향이 더 크게 작용함을 보여 주고 있다. 즉 탄소원 농도의 변화에 따른 CMCase, xylanase, avicelase의 반응표면은 점차 증가하다가 감소하는 형태를 보이지만,  $\beta$ -glucosidase는 두 변수가 증가하는 방향으로 반응표면을 보이고 있다. Figure 2에서는 배양시간과 질소원의 농도에 관한 효소 활성도를 보여주고 있는데, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase는 질소원의 농도가 증가하는 방향으로 반응표면을 보이고 있으며, CMCase는 점차 증가하다가 감소하는 반응표면을 보이고 있다. Figure 3은 탄소원 농도와 질소원의 농도에 따른 효소의 활성도를 살펴보았는데, 최적의 결정값은 탄소원 농도의 3.5-4.0% 범위와 질소원의 농도 0.6-0.9%의 범위에서 각각의 효소 생산의 최적임을 알 수 있었다. 배양조

건 및 기질조건에 따라 효소 유도 특성이 달라지는데, avicelase, CMCase와 같은 exocellobiohydrolase 및 endoglucanase의 생산조건은 비슷한 반응표면을 갖는데 반해,  $\beta$ -glucosidase의 생산에서는 실험계획의 최대값 방향으로 치우치는 반응표면을 보이고 있었다. Figure 4는 탄소원 농도와 혼합탄소원인 avicel과 CMC의 비율에 관한 각각의 효소 활성도를 보여 주고 있는데, 기질간의 최적비율이 존재하였고, 전체 탄소원 농도에서 avicel 기질 비율이 높은 방향으로 최적의 효소생산을 보이고 있다. 또한  $\beta$ -glucosidase 생산에서 사상균 FJ1은 avicel이 CMC 기질보다 효소 유도에 많은 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 이는 Halliwell 등(14)의 연구에서 미세결정성 형태인 cellulose을 이용한 효소 생산과 유사함을 보였다.

위의 결과를 종합적으로 살펴보면, CMCase, xylanase, avicelase는 사상균 FJ1의 탄소원 및 질소원의 실험적 최적조건에서 결정된 중앙값부터 표준화된 범위내에 최적 반응표면을 가지고 있었으나,  $\beta$ -glucosidase는 표준화된 범위 밖의 값을 가졌다. 이는 사상균 FJ1이 생산하는 복합적인 효소 시스템에서 CMCase, xylanase, avicelase의 생산에 비중을 둔 최적화 조건이라 볼 수 있다. 만약  $\beta$ -glucosidase의 생산성을 높이하고자 한다면, 탄소원 및 질소원의 고 농도의 범위내에서 최적화 실험을 실시해야 하며, 또한 배양시간도 증가시켜 최적화 실험을 수행할 필요가 있다고 사료된다.

**최적조건에서의 효소 생산성 검증**

실험조건인 배양시간, 탄소원의 농도, 질소원의 농도, 그리고 혼합탄소원 비율 변화에 대한 섬유소 분해 효소 생산의



**Figure 1.** 3-D response surface in second scanning to the production of cellulolytic enzymes, such as CMCase(a), xylanase(b),  $\beta$ -glucosidase(c), and avicelase(d) according to the variation of cultivation time and carbon source concentration. The valves of  $X_3$  and  $X_4$  were fixed as 0.16 and -0.06(a), 0.59 and -0.12(b), 1.00 and -1.00(c), and 0.79 and -0.43(d), respectively, as shown in Table 6.

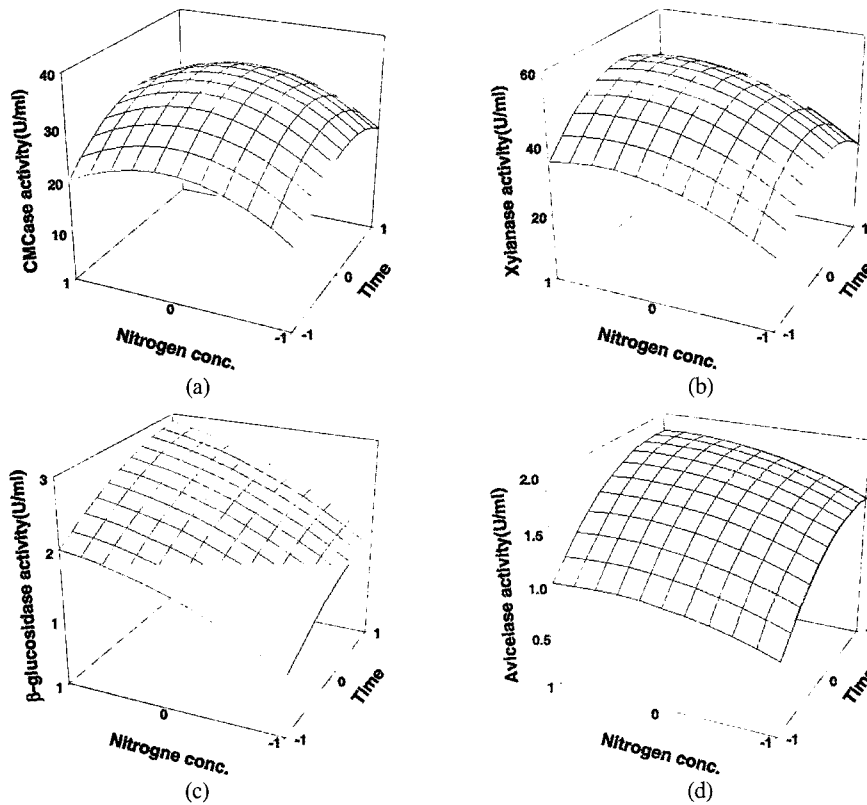


Figure 2. 3-D response surface in second scanning to the production of cellulolytic enzymes, such as CMCCase(a), xylanase(b),  $\beta$ -glucosidase(c), and avicelase(d) according to the variation of cultivation time and nitrogen source concentration. The valves of  $X_2$  and  $X_4$  were fixed as 0.31 and -0.06(a), 0.34 and -0.12(b), 1.00 and -1.00(c), and 0.57 and -0.43(d), respectively, as shown in Table 6.

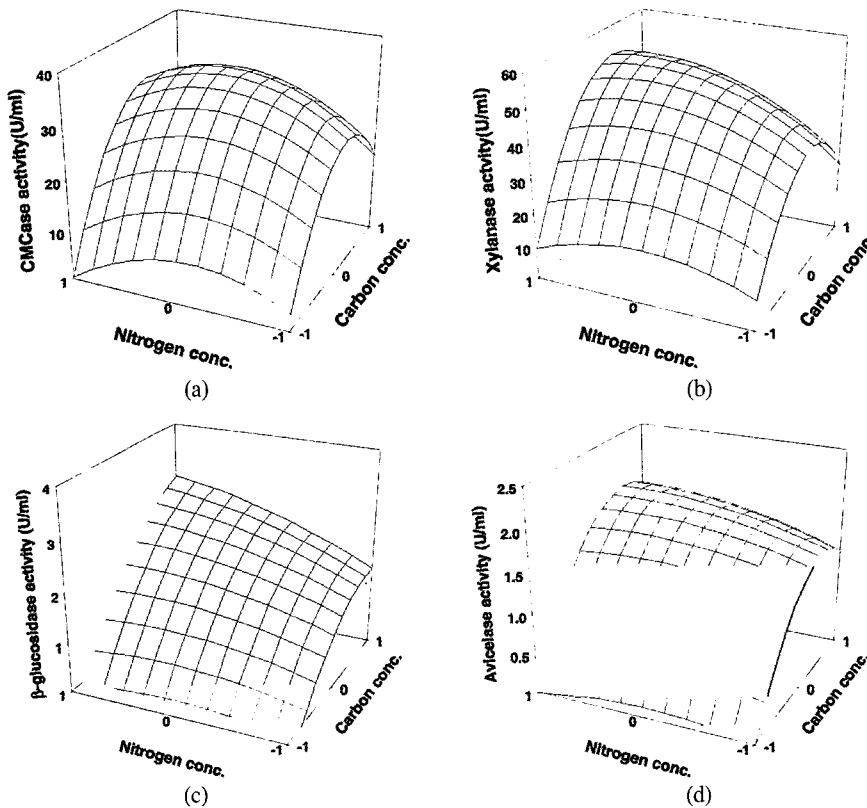


Figure 3. 3-D response surface in second scanning to the production of cellulolytic enzymes, such as CMCCase(a), xylanase(b),  $\beta$ -glucosidase(c), and avicelase(d) according to the variation of carbon source concentration and nitrogen source concentration. The valves of  $X_1$  and  $X_4$  were fixed as 0.22 and -0.06(a), 0.17 and -0.12(b), 1.00 and -1.00(c), and 0.76 and -0.43(d), respectively, as shown in Table 6.

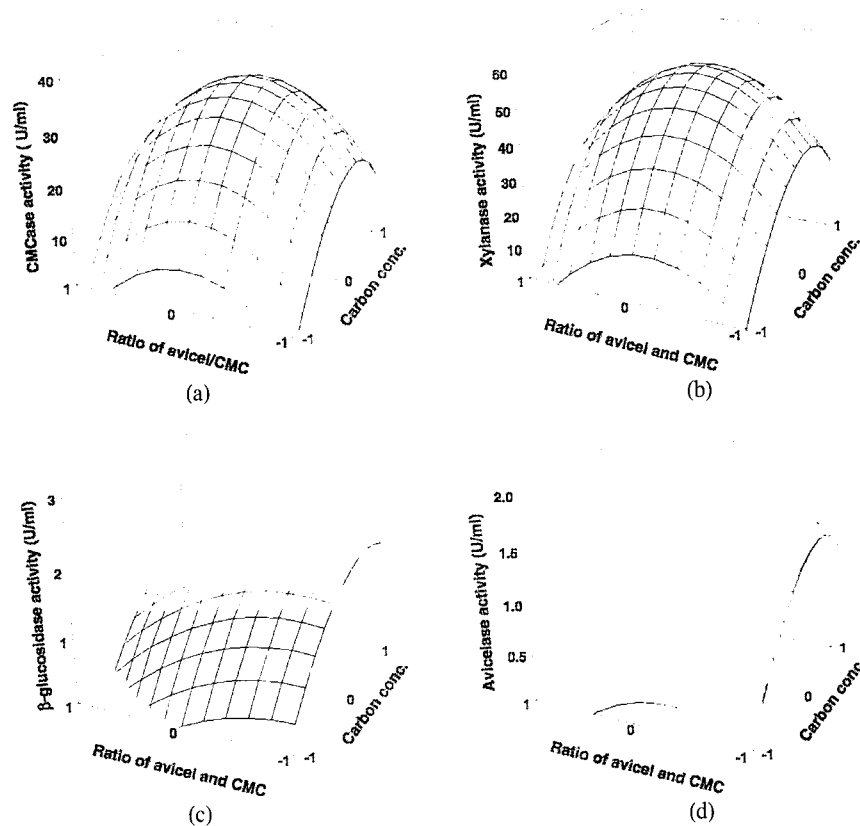


Figure 4. 3-D response surface in second scanning to the production of cellulolytic enzymes, such as CMCase(a), xylanase(b),  $\beta$ -glucosidase(c), and avicelase(d) according to the variation of carbon source concentration and ratio of avicel and CMC. The values of  $X_1$  and  $X_3$  were fixed as 0.22 and 0.16(a), 0.17 and 0.59(b), 1.00 and 1.00(c), and 0.76 and 0.79(d), respectively, as shown in Table 6.

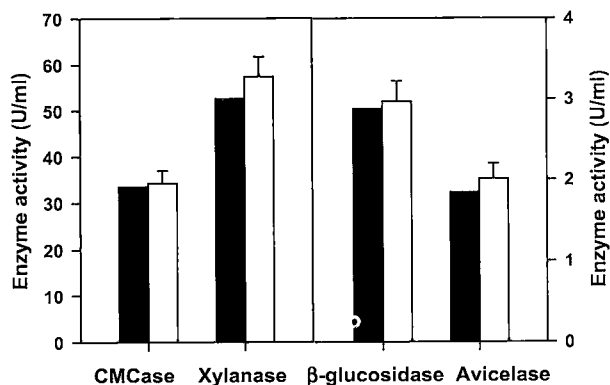


Figure 5. Comparisons between activities(■) predicted by analysis of response surface and activities(□) experimentally verified in the optimal condition of each cellulolytic enzyme. The bars showed standard deviations.

반응표면을 분석한 결과 최대치를 주는 stationary point가 존재하였고, 이 점에서 결정된 최적조건을 Table 6에 나타내었다. 분석 결과를 검증하기 위해 최적조건 결정값의 실험 조건에서 배양하여 효소활성도를 분석하여, 그 결과를 Figure 5에 나타내었다. 모든 효소의 생산에 관련된 실험값은 예측값보다 약간 높게 나타났으나, 이는 표준편차 내에 허용된 값이었다. 사상균 FJ1의 탄소원 및 질소원의 실험적 최적조건의 실험을 통한 효소생산의 중앙값으로 채택된 실험변호

22(Table 3)에서는 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 각 변수들의 중앙값을 이용한 실험조건보다 CMCase, xylanase,  $\beta$ -glucosidase, avicelase는 각각 14.7%, 17.9%, 74.7%, 34%까지 향상됨을 보여 주고 있다. 본 연구에서 적용한 예측모델이 사상균 FJ1의 효소 생산과 관련된 주요인자들의 상관성을 잘 설명해 주고 있었으며, 본 모델의 타당성을 입증할 수 있었다.

### 요 약

사상균 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 중앙값의 실험조건보다 74% 정도로 가장 높은 효율 향상을 보여 주었다. 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 유용하게 사용될 것이다.

### 감사의 글

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

### REFERENCES

- Bhat M. K. and S. Bhat (1997), Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications, *Biotechnol. Adv.* **15**, 583-620.
- Thomas M. W. and J. N. Saddle (1988), Increasing the availability of cellulose in biomass materials, *Method Enzymol.* **160**, 3-11.
- Setälä T. N. and M. Penttilä (1995), Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose-containing media, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3650-3655.
- Svetlana V., R. M. Mark, and F. O. David (1997), Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30, *J. Biotechnol.* **54**, 83-94.
- Mandels M. and E. T. Reese (1960), Induction of cellulase in fungi by cellobiose, *J. Bacteriol.* **79**, 816-826.
- Thomas M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring cellulase activities, *Method Enzymol.* **160**, 87-112.
- Miller G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Somogyi M. (1952), Notes in sugar determination, *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
- Yoon S. J., B. D. Ye, S. H. Park, and E. Y. Lee (2000), Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397.
- Kim S. K., S. J. Oh, and S. J. Lee (1994), Optimizing conditions for the growth and bacteriocin production of *Lactococcus* sp. HY 449 using response surface methodology, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 522-530.
- Oh K. K., S. W. Kim, Y. S. Jeong, and S. I. Hong (1996), Optimization of operation conditions for the hydrolysis of cellulose by response surface methodology, *Hwahak Konghak* **34**, 418-423.
- Marcel G. C., P. Leticia, M. Patricia, and P. T. Robert (1999), Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse, *Bioresource Technol.* **68**, 173-178.
- Mes-Hartree M., C. M. Hogan, and J. N. Saddler (1988), Influence of growth substrate on production of cellulase enzymes by *Trichoderma harzianum* E58, *Biotechnol. Bioeng.* **31**, 725-729.
- Halliwel G., T. M. Phillips, and N. Halliwel (1995), Microcrystalline forms of cellulose as substrates for strains of *Clostridium thermocellum* and cellulase formation, *Process Biochem.* **30**, 243-250.
- Son U. J., O. K. Sul, D. K. Chung, I. S. Han, Y. J. Choi, and C. S. Jeong (1997), Isolation and characterization of *Trichoderma* sp. C-4 producing cellulase, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 346-353.