

효소에 의한 섬유소 가수분해에서 억제제의 영향에 관한 연구

이형근 · 홍석인

고려대학교 공과대학 화학공학과
(1986년 1월 21일 접수, 1986년 12월 15일 채택)

Effect of Inhibitor on Enzymatic Hydrolysis of Cellulose

Hyoungh Keun Lee and Suk In Hong

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Korea University, Seoul 136; Korea
(Received 21 January 1986; accepted 15 December 1986)

요 약

Trichoderma reesei QM 9414를 배양하여 효소를 생산하였으며, 이 효소를 이용한 섬유소 가수분해 반응에서 여러 억제제가 반응속도에 미치는 영향에 관하여 연구하였다. 반응초기에 cellobiose, 글루코오스, xylose, sucrose 등의 억제제를 첨가한 가수분해 반응에서 이들의 농도가 증가함에 따라 환원당의 수율은 낮아지고, 반응용액내에 존재하는 가용성 효소의 양은 증가하였으며, 에탄올의 경우에는 감소하는 경향을 보였다. 또한 글루코오스와 에탄올은 반응중에 효소의 F.P activity 및 CMC activity를 감소시켰으며, CMC activity 보다 F.P activity의 감소폭이 컸다.

효소 가수분해 반응에서 각 억제제의 효소에 대한 억제 정도를 정량적으로 비교하기 위하여, 경쟁적 억제 반응 모델을 도입하였다. 실험결과 각 억제제는 Foster-Niemann plot을 만족하였으며, 이 도식을 이용하여 각 억제제에 대한 억제상수 값을 구하였다.

Abstract—The effect of several inhibitors on the reaction rate in the enzymatic hydrolysis of cellulolytic substrate (solka floc BW 200) was studied. The enzyme used was produced from *Trichoderma reesei* QM 9414, and the inhibitors used were cellobiose, glucose, ethanol, xylose and sucrose, respectively. In general, the decreasing effect for the reducing sugar production was observed as the amount of the inhibitors were increased, and the increasing effect of the soluble protein was also observed, except ethanol. The measurements of both the filter paper activity and CMC activity were carried out for the case of glucose and ethanol, respectively. The activities were decreased to about 66% and about 70% from the initial activities. Analysis of the data using Foster-Niemann plot indicated that the inhibition was of the competitive type. The inhibition constant values of each inhibitor were calculated from the plot.

1. 서 론

효소를 이용한 섬유소 가수분해 공정이 산업화되지 못하고 있는 큰 요인중의 하나는 효소의 생산비가 높은

것과 가수분해 공정에서 반응이 진행됨에 따라 분해속도가 급격히 떨어지는데 있다[1, 2]. 이때 반응속도가 낮아지는 중요한 이유중의 하나는 반응중에 생성된 생성물이 효소와 결합하여 효소의 작용을 억제하기 때문

이라고 알려졌다[3, 4].

앞서 언급한 효소 가수분해 반응의 생성물중 글루코오스와 cellobiose의 억제작용이 특히 큰 것으로 알려져 있으며, 이를 줄이기 위하여 분리막을 사용하거나 동시 당화발효(simultaneous saccharification/fermentation: SSF) 공정을 통하여 생성된 글루코오스를 에탄올로 전환시키는 연구가 보고되었다[5, 6].

본 연구에서는 섬유소 가수분해 반응에서 생성물에 의한 억제효과를 정량적으로 비교하기 위해 반응초기에 억제제(inhibitor)를 첨가하였다. 이때 억제제로 선정된 물질은 다음과 같다.

1) 섬유소를 효소 가수분해 하였을 때 주생성물인 cellobiose 및 글루코오스

2) 섬유소에 소량 함유되어 있는 hemicellulose로부터 생성되는 xylose

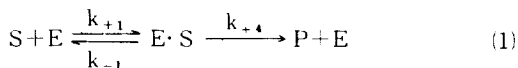
3) SSF 공정에서 섬유소로부터 효소에 의해 중간생성물인 글루코오스로부터 생성되는 에탄올

4) Cellobiose와 같은 이당류이며 비환원당인 sucrose

또한 환원당의 생성량과 반응용액(bulk phase)내에 존재하는 효소의 양 및 역가의 변화를 측정 한 후, Foster-Niemann plot를 이용하여 각 억제제에 대한 억제상수(inhibition constant) 값을 구하고자 하였다.

2. 이 론

본 실험에서는 효소(E)는 기질(S)에 신속하게 흡착되어 E·S 복합체를 형성하고, 이것은 비가역적으로 반응이 진행되어 생성물(P)를 생성한다고 가정하였다. 이때 생성물(주로 cellobiose와 글루코오스의 혼합물이며 미량의 xylose가 포함됨)은 가역적으로 효소와 결합하여 비활성 복합체인 E·P를 형성하며 반응초기에 가해진 억제제(I)가 역시 효소와 결합하여 E·I를 형성한다고 가정하면, 다음과 같이 쓸 수 있다.



윗 식에서는 억제제가 효소 가수분해 반응에서 경쟁적 억제 반응을 한다고 가정하였으며, 사용된 기질의 구조적 다양성은 고려하지 않았다. 또한 기질농도 50

g/l까지는 기질에 의한 억제반응(substrate inhibition)은 무시할 수 있다[2, 7]고 가정하였으며, 반응이 진행되는 동안 기질이 점차 분해되기 어려운 상태로 변화되므로, 이러한 단점을 보완하기 위해 반응시간을 기질의 변형형태가 적은 8 시간 까지로 하였다. 윗 식으로 부터 반응속도식은

$$\text{rate } V = \frac{d(P)}{dt} = k_{+2} [E \cdot S] \quad (4)$$

$$\frac{d[E \cdot S]}{dt} = k_{+1} [S] [E] - (k_{-1} + k_{+2}) [E \cdot S] \quad (5)$$

$$\frac{d[E \cdot P]}{dt} = k_{+3} [P] [E] - k_{-3} [E \cdot P] \quad (6)$$

$$\frac{d[E \cdot I]}{dt} = k_{+4} [I] [E] - k_{-4} [E \cdot I] \quad (7)$$

이 되며, 정상상태라고 가정하면 식(5), (6), (7)로부터

$$[E] = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{-1}} \cdot \frac{[E \cdot S]}{[S]} = K_m \frac{[E \cdot S]}{[S]} \quad (8)$$

$$[E \cdot P] = \frac{k_{+3}}{k_{-3}} [P] [E] = \frac{1}{K_3} [E] [P] \quad (9)$$

$$[E \cdot I] = \frac{k_{+4}}{k_{-4}} [I] [E] = \frac{1}{K_4} [I] [E] \quad (10)$$

와 같이 쓸 수 있으며, 여기서 K_m 은 Michaelis-Menten constant이다. 식(4)를 효소보존의 법칙을 적용하고 정리하면

$$\begin{aligned} \text{rate } V = \frac{d(P)}{dt} &= \frac{k_{+2} [E]_0 [S]}{[S] + K_m \left\{ 1 + \frac{[P]}{K_3} + \frac{[I]}{K_4} \right\}} \\ &= \frac{V_m [S]}{[S] + K_m \left\{ 1 + \frac{[P]}{K_3} + \frac{[I]}{K_4} \right\}} \quad (11) \end{aligned}$$

이 된다. 식(11)에서 기질의 농도(S) 값을 직접 구할 수 없으므로, 측정된 환원당의 양인 (P)로부터 다음과 같은 식을 이용하여 간접적으로 구할 수 있다[11].

$$[S] = [S]_0 - 0.9 [P] \quad (12)$$

이 식을 식(11)에 대입하고 적분하면

$$\begin{aligned} \int_0^P \frac{\{[S]_0 - 0.9 [P]\} + K_m \left\{ 1 + \frac{[P]}{K_3} + \frac{[I]}{K_4} \right\}}{[S]_0 - 0.9 [P]} dp \\ = \int_0^t V_m dt \quad (13) \end{aligned}$$

이 되며, 정리하면 다음의 식(14)를 얻을 수 있다.

$$\frac{P}{t} = \frac{V_m K_s}{K_s - 1.11 K_m} + \frac{K_m \{K_s K_4 + 1.11 [S]_0 + K_s [I]\}}{1.11 K_m - K_s} \cdot \frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - 0.9 [P]} \quad (14)$$

식 (14)를 $\frac{1}{t} \ln \frac{[S]_0}{[S]_0 - 0.9 [P]}$ 와 $\frac{[P]}{t}$ 에 대하여 도식하여 절편인 $\frac{V_m K_s}{K_s - 1.11 K_m}$ 로 부터 inhibition constant K_s 값을 구할 수 있다.

3. 실험장치 및 방법

3-1. 효소액 생산균주

U.S. army natick laboratory에서 개발된 *trichoderma reesei* QM9414를 potato dextrose agar 사면배지에 접종하여, 29°C에서 3-4일 배양시킨 후 4°C에서 보관하여 사용하였다.

3-2. 효소액의 제조

교반속도, 온도, 용존산소, 산 알칼리 소비량 및 pH 등이 자동 조절되고 기록되는 12L의 미생물 배양기(B. Brown co. West Germany)를 사용하였다. 이때 교반속도는 350 rpm이었으며, 온도는 29°C로 일정하게 유지되고 소포제(silicon, TSA 732, Toshiba)를 사용하여 생기는 거품을 제거하였다. pH는 5.4-5.8로 유지되었으며 공기는 5.0 ± 0.5 L/min로 공급되었다. 6-7일간 배양시킨 후 배양액을 원심분리기(6500 rpm)로 15분간 분리한 후 상등액을 저온 냉장고에 보관하여 가수분해 효소용액으로 사용하였다.

3-3. 섬유소의 가수분해

본 실험에 사용한 장치는 Fig. 1에서 보는 바와 같은 회분식 반응기를 사용하였다. 기질은 sulfite pulp를 200 mesh로 ball milling한 solka floc BW 200을 이용하였으며, sodium citrate 완충용액(pH 4.8)에 현탁시키고 미생물 성장방지제인 sodium azide(Sigma co.)를 소량 첨가한 후 50°C로 30분간 예열시켰다. 이 현탁액 100 ml에 효소용액 100 ml를 가한 후 가수분해를 시작하였으며, 한 시간마다 5 ml씩 시료를 채취하여 원심분리한 후, CMC, cotton, filterpaper activity, 환원당(reducing sugar)의 양 및 가용성 단백질(soluble protein)의 양을 측정하였다.

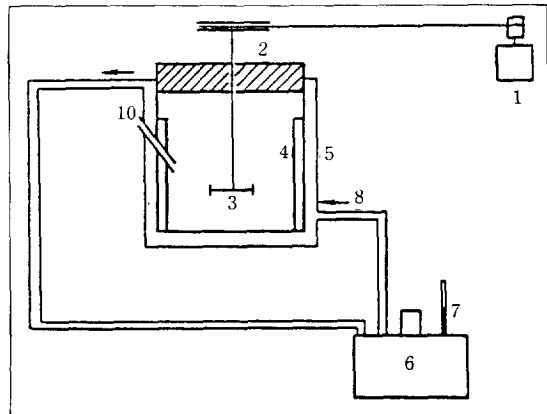


Fig. 1. Reactor for saccharification of cellulose.

- | | |
|-------------------------|---------------------|
| 1. D C Motor | 6. Circulation pump |
| 2. Rubber stopper | 7. Thermometer |
| 3. Impeller | 8. Water in |
| 4. Baffle | 9. Water out |
| 5. Water jacket reactor | 10. Sampling tap |

3-4. 효소의 활성도

CMC, cotton, filterpaper activity 및 환원당의 양 측정에는 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법으로 하였으며, 효소액 1 ml당 생성된 환원당의 양을 활성도(activity)로 정하였고, 이때 표준물질로는 글루코오스를 사용하였다[8]. 가용성 단백질의 양은 Lowry 방법에 의하여 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다[9].

4. 실험결과 및 고찰

4-1. 억제제의 농도변화에 따른 환원당 생성량 변화

반응초기에 셀룰로오스의 농도를 50 g/l로 일정하게 고정시키고, 억제제의 농도를 5g/l-30g/l(0.5-3.0 %)으로 변화시키면서 반응에서 생성된 환원당의 양을 측정하였다. 이때 원래 효소용액 속에 들어있던 환원당의 양과 억제제로 환원당을 첨가한 경우에는 첨가된 환원당의 양을 뺀 양이 실제 가수분해 반응에서 생성된 양이 된다.

Fig. 2에서와 같이 억제제인 cellobiose를 첨가하면 첨가하지 않은 것에 비해 환원당의 양은 감소되었으며, 첨가농도가 높아짐에 따라 억제제의 정도는 증가하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 cellobiose가 억제제의 정도가 가장 강력하였는데, 이것은 가수분해가 진행됨에 따라 생성물에서 cellobiose에 대한 글루코오스의 비가

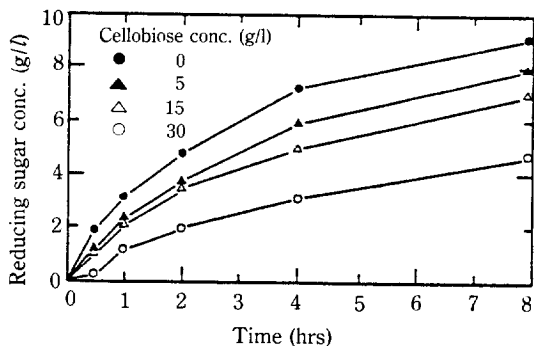


Fig. 2. Effect of the addition of cellobiose at the onset of hydrolysis on the hydrolysis of cellulose.

증가하게 되고, 글루코오스는 cellobiase(β -glucosidase)를 억제하게 되어, 결과적으로 cellobiose는 효소전체를 억제하게 됨으로 인한 것으로 판단된다. 또한 에탄올은 cellobiohydrolase와 endoglucanase의 활성을 억제하여 섬유소가 글루코오스로 분해되는 것을 저해하게 되나[10], 그 정도는 글루코오스나 cellobiose에 비해 작게 나타났다.

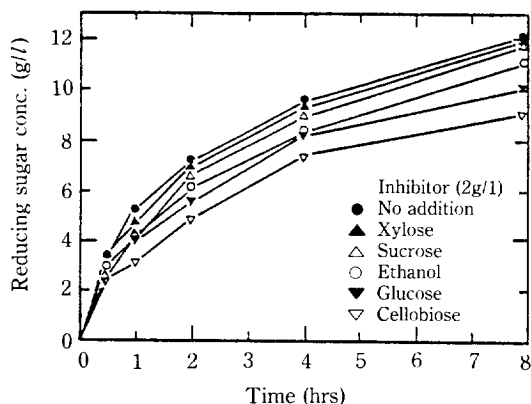


Fig. 3. Effect of the addition of cellobiose, glucose, ethanol, xylose, sucrose at the onset of hydrolysis on the hydrolysis of cellulose.

4-2. 억제제의 농도변화에 따른 가용성 단백질의 변화

Fig. 4와 같이 기질과 효소농도가 일정하게 억제제의 농도가 증가함에 따라 반응용액 내에 존재하는 가용성 단백질의 농도가 증가하였다. 이것은 억제제와 기질이 효소에 대해 경쟁적으로 반응하여 E·I 복합체를 형성하였고, 따라서 억제제의 농도증가에 따라 가용성 효소의

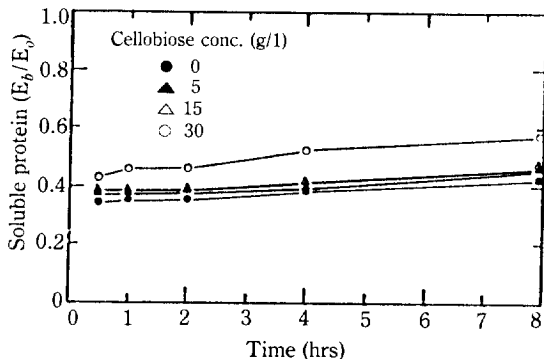


Fig. 4. Effect of the addition of cellobiose on the soluble protein during hydrolysis of cellulose.

농도도 증가한 것으로 생각된다. 에탄올의 경우는 Fig. 5와 같이 억제제의 농도증가에 따라 오히려 가용성 단백질의 농도는 감소하였는데, 이것은 에탄올이 효소와 복합체를 형성하는 것이 아니라 Pemberton 등[10]이 주장한 바와 같이 용액내의 유전상수(dielectric constant)가 감소되어서 일어난 것으로 판단된다. 억제제의 정도가 가장 큰 cellobiose가 글루코오스나 xylose에 비해 가용성 단백질의 농도가 컸는데 이는 cellobiose가 효소에 대한 상대친화도(relative affinity)가 다른 억제제에 비해 크기 때문인 것으로 생각된다(Fig. 6).

4-3. 억제제의 농도변화에 따른 F.P 및 CMC activity의 변화

기질과 효소농도가 일정할 때 반응초기에 글루코오스나 에탄올의 농도를 1g/l-10g/l까지 변화시키면서, 4

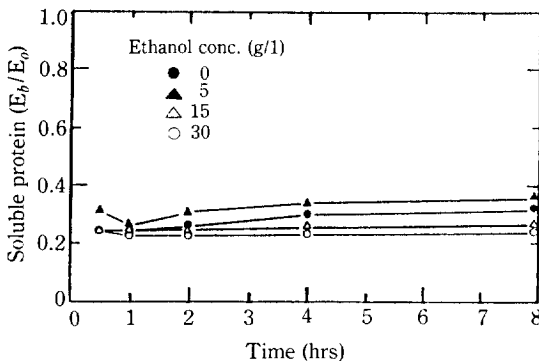


Fig. 5. Effect of the addition of ethanol on the soluble protein during hydrolysis of cellulose.

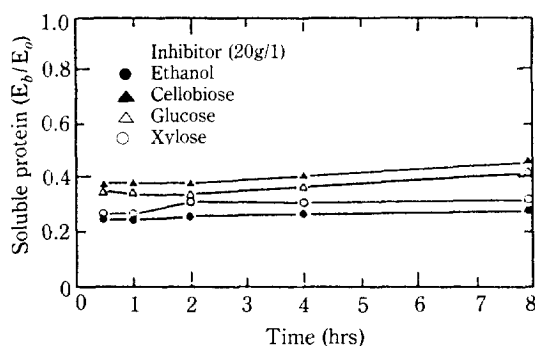


Fig. 6. Effect of the addition of cellobiose, glucose, xylose, ethanol on the soluble protein during hydrolysis of cellulose.

시간 후 이들의 농도변화에 따른 활성도를 측정하였다. 활성도를 측정할 때 초기에 첨가한 글루코오스나 에탄올을 및 반응해서 생성된 환원당에 의한 억제효과를 제거하기 위해 샘플 2mL에 아세톤 6mL를 첨가하여 침전시킨 후, 원심분리기를 이용하여 상등액을 제거하고 얻어진 효소 pellet를 0.05M citrate 완충용액에 용해시킨 후 활성도를 측정하였다[12]. Fig. 7-8에서와 같이 억제제의 농도가 증가함에 따라 각각 활성도는 감소했으며 F.P activity는 초기 글루코오스의 농도가 10g/l 일 때 원래의 66%로 감소했고 에탄올의 경우는 70%로 줄어들었다. 또한 억제제의 농도가 같을 경우 CMC activity보다 F.P activity의 감소폭이 큰 것으로 나타났다.

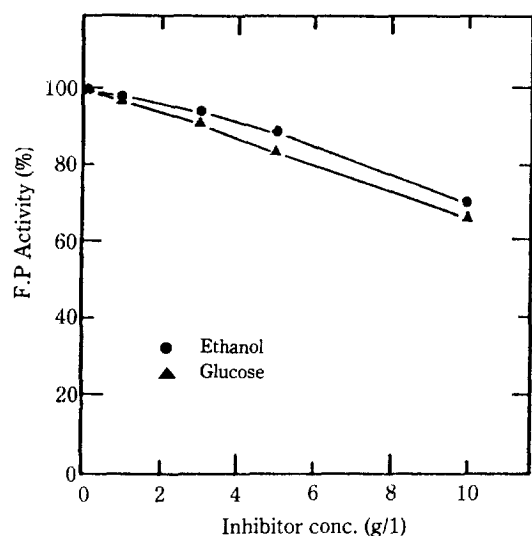


Fig. 7. Effect of glucose, ethanol on the F.P activity during hydrolysis of cellulose.

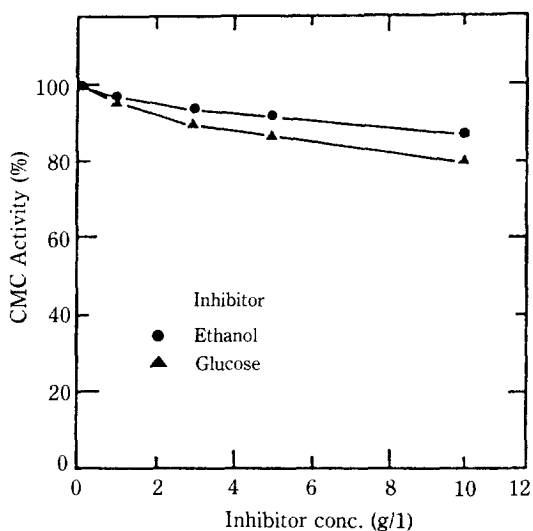


Fig. 8. Effect of glucose, ethanol on the CMC activity during hydrolysis of cellulose.

4-4. V_m, K_m 및 K_s 값의 결정

V_m과 K_m 값을 구하기 위해 기질의 농도를 10 g/l ~ 50 g/l까지 변화시키면서 반응초기(t=30 min)에 전환된 환원당의 양을 측정하여, Fig. 9에서와 같이 Lineweaver-Burk Plot을 이용하여 구하였다.

$$\frac{1}{V_m} = 0.065 \quad \therefore V_m = 15.39 \text{ (g/hr} \cdot \text{l)}$$

$$\frac{K_m}{V_m} = 4.06 \quad \therefore K_m = 62.50 \text{ (g/l)}$$

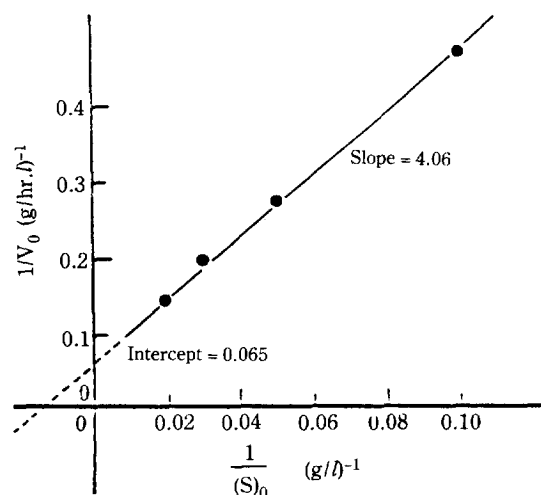


Fig. 9. Inverse of initial rates vs. inverse of substrate concentration for hydrolysis of cellulose.

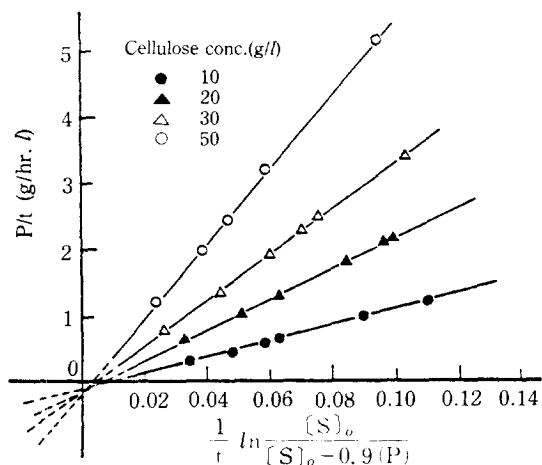


Fig. 10. Foster-Niemann plot for cellobiose addition hydrolysis of cellulose.

억제상수 값을 구하기 위해 셀룰로오스의 농도를 10 g/l-50 g/l까지 변화시키면서 억제제의 첨가량을 20 g/l로 한 후 시간에 따라 생성된 환원당의 양을 측정하고 Fig. 10에 도시하여 식[14]의 절편으로부터 K_3 값 및 기울기로 부터 K_4 값을 구하였다. Fig. 10에서 셀룰로오스 각 농도에 대해 Foster-Niemann plot를 만족시키므로 억제제인 cellobiose가 효소 가수분해에서 경쟁적 억제반응을 함을 보여주고 있으며 다른 억제제의 경우에도 Foster-Niemann plot를 만족시켰으며, 위와 같은 방법에 의해 K_3 값을 구하여 그 값을 Table 1에 실었다.

Table 1. The calculated K_3 values for each inhibitors.

Inhibitor	K_3 value (g/l)	Inhibitor	K_3 value(g/l)
Cellobiose	0.67	Xylose	1.41
Glucose	0.93	Sucrose	1.20
Ethanol	1.11		

5. 결 론

1. 여러 억제제를 첨가한 가수분해 반응에서 이들의 농도가 증가함에 따라 억제의 정도가 커졌으며 cellobiose가 가장 강력하였다.

2. 억제제로서 cellobiose, 글루코오스, xylose를 첨가했을 경우 이들의 농도가 증가함에 따라 반응용액 내에 존재하는 가용성 효소의 양이 증가했으며 에탄올

의 경우는 감소하였다.

3. 글루코오스, 에탄올을 첨가했을 때 F.P activity는 초기 글루코오스의 농도가 10 g/l일 때 원래의 66%로 감소했고 에탄올의 경우는 70%로 줄어들었다.

NOMENCLATURE

- E : Enzyme
- [E] : Free enzyme concentration (g/l)
- [E]_T : Total enzyme concentration (g/l)
- E·I : Enzyme inhibitor complex
- E·P : Enzyme product complex
- E·S : Enzyme substrate complex
- I : Inhibitor
- [I] : Inhibitor concentration (g/l)
- K_3 : Inhibition constant (g/l)
- K_m : Michaelis-Menten constant (g/l)
- P : Product
- [P] : Product concentration (g/l)
- S : Substrate
- [S] : Substrate concentration (g/l)
- [S]₀ : Initial substrate concentration
- t : Time
- V_m : Maximum reaction velocity (g/hr. l)
- V_0 : Initial reaction velocity (g/hr. l)

REFERENCES

- Ryu, D.D.Y. and Mandels, M.: *Enzyme Microb. Tech.*, **2**, 91 (1980).
- Mangat, M. and Howell, J.A.: *AIChE Symp. Series*, **74**, 77 (1978).
- Fan, L.T. and Lee, Y.H.: *Biotech. Bioeng.*, **25**, 939 (1983).
- Katz, M. and Reese, E.: *Appl. Microbiol.*, **16**, 419 (1968).
- Ghose, T.K. and Pathak, A.N.: *Process Biochemistry*, May 24 (1973).
- Fan, L.T., Gharpuray, M.M. and Lee, Y.H.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **11**, 29 (1981).
- Howell, J.A. and Mangat, M.: *Biotech. Bioeng.*, **20**, 847 (1978).
- Miller, G.L.: *Analytical Chemistry*, **31**, 426 (1959).
- Lowry, P.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: *J. Bio. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- Pemberton, M.S., Brown, R.D. and Emert, G.H.: *The Can. J. Chem. Eng.*, **58**, 723 (1980).
- Lee, Y.H. and Fan, L.T.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 2383 (1982).
- Mandels, M.: *Laboratory Procedures in Growth, Enzyme Measurement and Related Analytical Procedures*, New Delhi, India (1978).