

벼짚 셀룰로오스의 효소가수분해에 의한 글루코오스의 생성 — 고농도 기질의 가수분해를 중심으로 —

김우식·유인상·이병철*·송동윤**

연세대학교 공과대학 화학공학과

*홍익공업전문대학 공업화학과

(1987년 5월 30일 접수, 1987년 9월 29일 채택)

Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw Cellulose to Glucose — In the Range of High Substrate Concentration —

Woo-Sik Kim, In-Sang Yoo, Byoung-Chul Lee* and Dong-Yoon Song**

Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Yonsei University

*Dept. of Chemical Technology, Hong Ik Technical Jr. College

(Received 30 May 1987; accepted 29 September 1987)

요 약

본 연구는 벼짚에 포함되어 있는 셀룰로오스의 효소가수분해시 반응 제특성과 반응속도식 고찰에 관한 것으로서 주로 고농도 기질을 대상으로 한 가수분해반응을 연구하였다. 고농도 기질 (5-20 w/v%)의 가수분해반응에서 몰속단계는 효소와 셀룰로오스의 물리적 흡착단계이고, 반응속도식은 생성물 저해가 있는 변형된 Michaelis-Menten식으로 나타낼 수 있었다.

속도 상수는 $ES_{max}=2.02 \text{ unit/mg cellulose}$, $K_E=0.0132 (\text{unit/ml})^{-1}$, $k_2=0.1628 \text{ mg cellulose/unit}\cdot\text{h}$ 그리고 $k_3=0.1251 \text{ ml/mg cellulose}$ 였다.

0.8% p-TSA 용액으로 2시간 전처리시킨 분쇄 벼짚 200 mg/ml를 30 unit/ml의 셀룰라아제로서 30 시간 반응시켰을 때, 98%의 글루코오스 전환율을 얻었다.

Abstract—This study was investigated on the kinetics and characteristics of enzymatic hydrolysis of rice straw cellulose, especially at high substrate concentration for the purpose of effective use of the rice straw.

In the range of high substrate concentration (5-20w/v%) the rate limiting step of the hydrolysis reaction is physical adsorption step and reaction mechanism was shown as modified Michaelis-Menten equation (product inhibition reaction). The value of kinetic parameters were $ES_{max}=2.02 \text{ unit/mg cellulose}$, $K_E=0.0132 (\text{unit/ml})^{-1}$, $k_2=0.1628 \text{ mg cellulose/unit}\cdot\text{h}$ and $k_3=0.1251 \text{ ml/mg cellulose}$, respectively.

Meanwhile, when 200 mg/ml of milled rice straw (which is pretreated with 0.8% p-TSA for two hours) under 30 unit/ml of cellulase was hydrolyzed for 30 hours, about 98% conversion of glucose was obtained.

1. 서 론

천연 biomass의 주성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로

오스, 리그닌 중에서 셀룰로오스는 양적으로 가장 풍부하고, 이용가능성이 높은 물질로서, 이의 재활용에 관하여 1970년대부터 미국 등지에서 활발하게 연구되고

**현주소 : 대림엔지니어링주식회사

있다[1, 2, 3]. 셀룰로오스는 결정성 고분자 물질로서 일반적으로 가수분해시켜 단당(글루코오스)으로 만들어 2차적으로 사용한다[4, 5].

셀룰로오스의 가수분해 방법은 크게 산가수분해와 효소가수분해법이 있는 바, 최근에는 산가수분해의 단점을 보완할 수 있는 효소가수분해법이 많이 연구되고 있으며[6, 7, 8], 주로 셀룰로오스의 농도가 저농도인 경우를 주대상으로 연구되어 왔다[9, 10, 11]. 그러나 본 연구에서는 적절한 전처리를 거친[16] 고농도의 기질 범위 [5-20(w/v)%]의 벚짚 셀룰로오스를 사용하여 효소가수분해에 관하여 연구하였는 바, 가수분해시의 반응속도식을 흡착단계를 도입하여 해석하였고[12, 13], 실험결과를 모델식과 비교하였다.

2. 이 론

고농도 기질의 효소가수분해시 효소가 고상의 셀룰로오스에 순간적으로 흡착되어 착화물(ES)를 형성하고, 비가역적으로 반응하여 생성물 P를 생성하게 되며 생성물은 또한 가역적으로 효소와 반응하여 비활성 착화물 X를 형성하므로 이때의 반응경로는 다음과 같이 설정할 수 있다[12].



식 (1)의 (ES) 형성단계는 벚짚과 효소의 물리흡착과 뒤따라 일어나는 화학흡착을 함께 내포하고 있으며, 물리흡착이 순간적으로 진행되고, 평형은 Langmuir 흡착 model로 표시하면

$$\frac{ES}{ES_{max}} = \frac{K_E \cdot (E)}{1 + K_E \cdot (E)} \quad (4)$$

와 같다. 이때 ES, ES_{max} 는 각각 단위기질 질량당 흡착량과, 포화흡착량이며, (E)는 free enzyme량, $K_E = \frac{k_1}{k_{-1}}$, $K_3 = \frac{k_3}{k_{-3}}$ 이다. 기질의 농도가 효소의 농도보다 훨씬 크다면, 정상상태로 가정할 수 있으며 이 경우,

$$\frac{d(X)}{dt} = 0, (E)_o = (E) + (ES) + X \quad (5)$$

이 되고, 반응속도식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$v = \frac{d(P)}{dt} = k_2 \cdot (ES) \\ = \frac{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o \cdot (S)}{1 + K_E \cdot (P) + K_E \cdot (E)_o + K_E \cdot (S) [ES_{max} - ES]} \quad (6)$$

여기서 괄호는 액상의 단위부피를 기준으로 한 농도이다.

$ES_{max} \gg ES$ 라고 한다면 식 (6)은

$$\frac{1}{v} = \frac{1 + K_E \cdot (E)_o + K_3 \cdot (P)}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \cdot \frac{1}{(S)} + \frac{1}{k_2 \cdot (E)_o} \quad (7)$$

이 되고 (S) = (S)_o - P일 때 식 (7)을 적분하면

$$t = \frac{1 + K_E \cdot (E)_o + K_3 \cdot (S)_o}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \cdot \ln \frac{(S)_o}{(S)_o - (P)} \\ + \frac{ES_{max} \cdot K_E - K_3}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} (P) \quad (8)$$

이 된다.

(P)_o = 0으로 하고 식 (8)을 선형화시키면

$$\frac{t}{(P)} = \frac{1 + K_E \cdot (E)_o + K_3 \cdot (S)_o}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \left\{ \frac{1}{(P)} \ln \frac{(S)_o}{(S)_o - (P)} \right\} \\ + \frac{ES_{max} \cdot K_E - K_3}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \quad (9)$$

또는

$$\frac{1}{\bar{v}} = \frac{1 + K_E \cdot (E)_o + K_3 \cdot (S)_o}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \cdot \frac{1}{(\bar{S})} \\ + \frac{ES_{max} \cdot K_E - K_3}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \quad (10)$$

이 된다. 식 (10)에 의해 초기 기질농도 (S)_o를 변화시키면서 주어진 (E)_o에서 1/(\bar{S})대 1/\bar{v}을 도시하면 같은 절편을 갖는 직선을 얻을 수 있고 기울기는 (S)_o의 함수가 된다. 식 (8)에서 kinetic parameter를 산출하기 위한 방법으로 초기 속도 자료를 이용하면 (P) = 0일 때

$$\frac{1}{v_o} = \frac{1 + K_E \cdot (E)_o}{k_2 \cdot ES_{max} \cdot K_E \cdot (E)_o} \cdot \frac{1}{(S)_o} + \frac{1}{k_2 \cdot (E)_o} \quad (11)$$

이 된다. 주어진 (E)_o에서 1/(S)_o대 1/v_o을 도시하여 선형관계를 만족하면 속도상수 k₂는 절편으로부터 직접 구할 수 있다. 그리고 상수 K_E과 ES_{max}는 흡착에 의한 실험결과로부터 구하며, K₃값은 식 (10)에 의해 절편으로부터 계산된 값을 취한다.

3. 실험

3-1. 실험재료

본 실험에 사용한 기질은 화학적 전처리법[16]을 이용하여 전처리시킨 볏짚(cellulose : 48.2%)으로서 필요에 따라 milling시킨 후 메쉬별로 사용하였다. 또한 효소로는 셀룰라아제(Sigma-C0901)를 사용하였다.

3-2. 흡착실험

흡착실험은 50°C의 물중탕 진탕기에서 5-30 unit/m/ 효소용액(acetate buffer solution) 20 m/와 5-20 (w/v)%로 전처리시킨 볏짚을 각각 혼합하여 1시간동안 진탕한 후, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리시켜 상등액중의 효소량을 Lowry protein법으로 측정하여[14] 흡착된 효소량과 미흡착된 효소량을 정량하였다.

3-3. 가수분해 실험

가수분해 실험은 회분식으로 진행하였으며, 기질로 사용한 볏짚은 milling시킨 후 100 mesh sieve로 걸러낸 작은 입자의 볏짚으로서 5-20 (w/v)%로 변화시키고, 효소의 농도를 5-30 unit/m/까지 변화시켜 실험하였다. 반응온도 및 pH는 예비실험으로 부터의 최적조건인 50°C와 pH 4.4로 고정하였다.

3-4. 분석방법

당 측정에는 DNS법을 사용하여[15], 575 nm에서 정량하였고, cellobiose, glucose, xylose는 HPLC(waters Co.)로 측정하였다. HPLC의 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC.

항 목	조 건
Column packing material	Carbohydrate column
Solvent	Acetonitrile-Water (75:25)
Temperature	25°C
Flow Rate	2.0ml/min
Detector	RI × 4 - × 2

4. 실험결과 및 고찰

4-1. 흡착실험

효소에 의한 볏짚의 가수분해시 효소가 볏짚 셀룰로

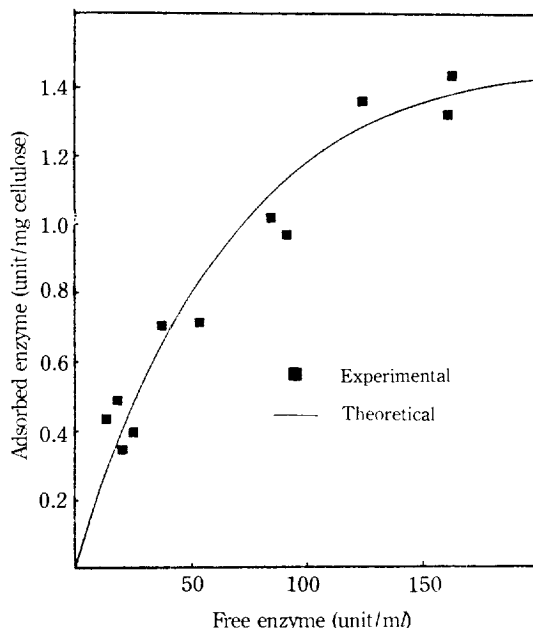


Fig. 1. Adsorption isotherm for milled rice straw, at 50°C and pH 4.4.

$$ES = \frac{2.02E}{75.75 + E}$$

$$ES_{max} = 2.02 \text{ (unit/mg cellulose)},$$

$$K_E = 0.0132 \text{ (unit/m)}^{-1}.$$

오스 표면에 흡-탈착하면서 평형을 이루는데 이러한 흡착은 Langmuir형의 흡착식을 따르며, 이 결과는 Fig. 1과 같다. 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 본 실험의 효소농도범위(5-30 unit/m/)에서 실험결과를 Langmuir 흡착과 비교적 잘 일치하였다.

Fig. 2는 매개변수 ES_{max} 와 K_E 를 구하기 위한 그림이며, 기울기로 부터, $ES_{max} = 2.02 \text{ unit/mg cellulose}$ 였고, 절편으로 부터 $K_E = 0.0132 \text{ (unit/m)}^{-1}$ 임을 알 수 있었다.

4-2. 가수분해 실험

식 (11)로 부터 매개변수값을 구하기 위하여 효소 농도를 5-20 unit/m/로 하고 볏짚량을 5-20 (w/v)%로 변화시키면서 실험하였는 바, 이 결과를 Fig. 3에 수록하였다. 실험값들과 이론식을 비교하면 전반적으로 효소의 초기농도가 증가할수록 실험값이 이론값보다 작게 나타나는데, 이는 반응메카니즘에 의한 선형속도식의 유도과정에서 최대 흡착량이 실제 흡착량보다 훨씬 크다는 가정을 바탕으로 출발하므로써 기인하는 것으로 사료된다. 또한 실험한 결과값들을 초기속도법으로 해

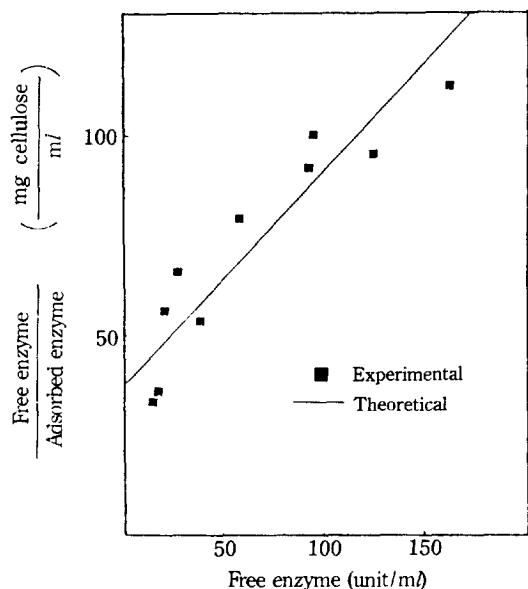


Fig. 2. Reciprocal plot of adsorption isotherm.

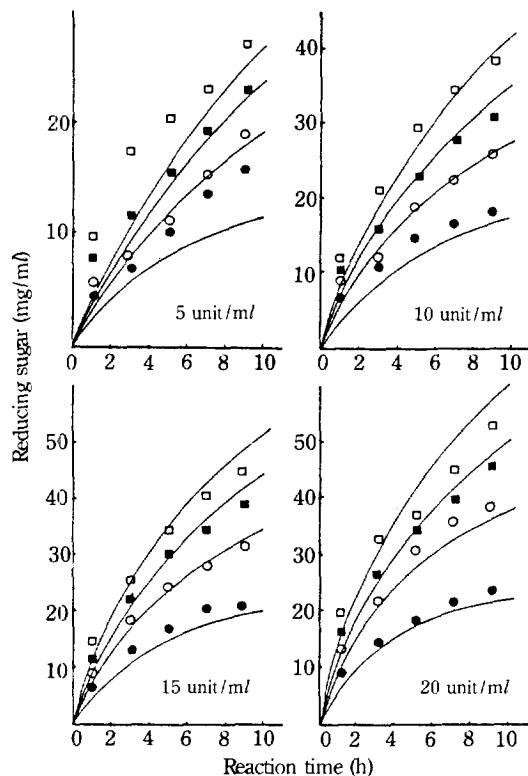


Fig. 3. Comparison of experimental data and theoretical curves at (E) of 5, 10, 15 and 20 (unit/ml). Substrate: 5% (\bullet), 10% (\circ), 15% (\blacksquare) and 20% (\square), — theoretical.

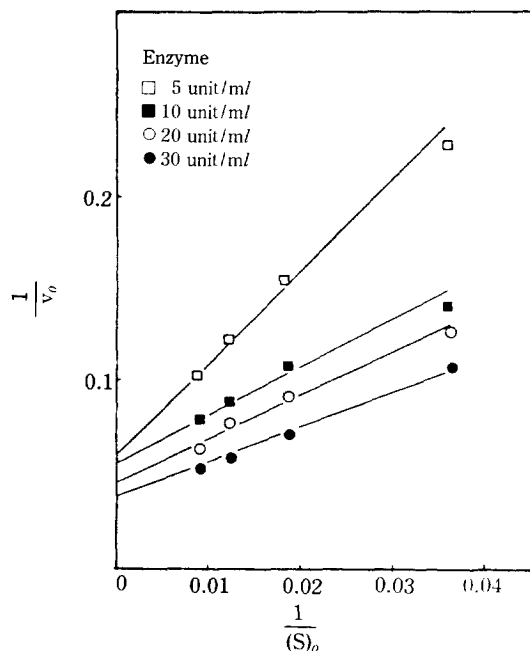


Fig. 4. The Lineweaver-Burk plot for $(E)_0 = 5$ (\square), 10 (\blacksquare), 15 (\circ) and 20 (\bullet) unit/ml.

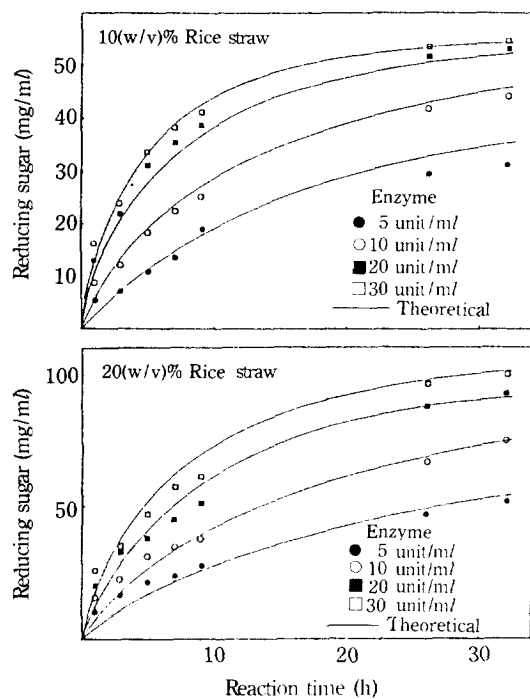
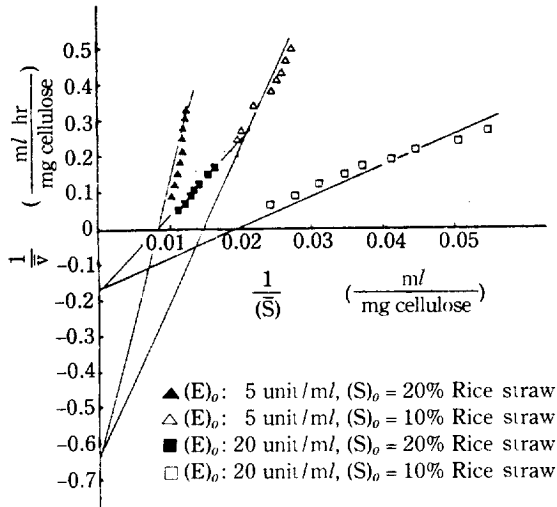


Fig. 5. Comparison of experimental data and theoretical curves at 10, and 20(w/v)% rice straw.


 Fig. 6. Plot of $1/\bar{v}$ VS. $1/(\bar{S})$.

석하여 Fig. 4에 나타내었는 바, 그림의 절편으로 부터 매개변수 k_2 는 $0.1628 \text{ mg cellulose/unit} \cdot \text{h}$ 였다.

Fig. 5는 초기 기질의 농도를 10, 20(w/v)%로 고정시키고, 효소의 양을 5, 10, 20, 30(unit/ml)으로 변화시키면서 실험한 결과인 바, 전반적으로 이론값과 비교적 잘 맞음을 알 수 있다.

반응시간이 1시간정도 부분에서 실험값이 이론값보다 약간 높게 나타난 것은 앞서 언급한 바대로 속도식의 유도과정에서 최대 흡착량이 실제 흡착량보다 훨씬 크다는 가정에 기인하는 것으로 사료된다.

식 (10)에 나타난 매개변수 K_3 값을 결정하기 위하여 Fig. 5의 결과를 재 표시하여 셀룰로오스에 대한 평균 생성속도값(\bar{v})을 Fig. 6에 나타내었다. 그림의 기울기와 절편값으로부터 K_3 는 $0.1251 \text{ ml/mg cellulose}$ 이었다.

5. 결 론

효소가수분해에 의한 고농도 기질의 볏짚으로 부터 글루코오스 생성 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고농도 [5-20(w/v)%] 볏짚의 가수분해시 반응을속단계는 효소의 물리적 흡착단계이며, 이 때 흡착형태는 Langmuir형 단분자층 흡착과 일치하였으며, $ES_{max}=2.02 \text{ unit/mg cellulose}$, $K_E=0.0132 \text{ (unit/mg)}$ 이었다.

2. 고농도 볏짚의 가수분해반응은 생성물이 비활성

착화물을 형성하는 modified Michaelis-Menten식으로 나타낼 수 있었으며, $k_2=0.1628 \text{ mg cellulose/unit} \cdot \text{h}$, $K_3=0.1251 \text{ ml/mg cellulose}$ 이었다.

3. 전처리시킨 볏짚 200 mg/ml (cellulose: 96 mg/ml)에 cellulase (30 unit/ml)를 사용하여 30시간 가수분해시켰을 때, 95 mg/ml (전화율 95%)의 글루코오스를 생성하였다.

NOMENCLATURE

- (E) : free enzyme in liquid phase, unit/ml
- (E)₀ : initial enzyme concentration, unit/ml
- ES : enzyme-substrate complex
- ES_{max} : maximum adsorbed enzyme, unit/mg cellulose
- K_m : Michaelis-Menten constant, g/l
- K_E : equilibrium constant (k_1/k_{-1}), (unit/ml)
- K₃ : equilibrium constant (k_3/k_{-3}), ml/mg cellulose
- k₂ : reaction rate constant, mg cellulose/unit·h
- (P) : product concentration in liquid phase, mg/ml
- (S)₀ : initial substrate concentration, mg cellulose/ml
- (\bar{S}) : average substrate concentration, mg cellulose/ml
- t : reaction time, h
- v₀ : initial reaction rate, mg/ml·h
- \bar{v} : average reaction rate, mg/ml·h
- v : reaction rate, mg/ml·h
- X : product-enzyme inactive complex

REFERENCES

1. Ghose, T.K. and Kostick, J.A.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **12**, 921 (1970).
2. Alfred, L.A.: *AIChE Symposium Series*, **72**, 115 (1978).
3. Charles, R.W. and Gautam, M.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **5**, 253 (1975).
4. Robert, K.A., Erickson, R.J. and Medeiros, J.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **6**, 177 (1976).
5. Millett, M.A., Baker, A.J. and Satter, L.D.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **6**, 125 (1976).
6. Saeman, J.F.: *Industrial and Engineering Chemistry, Jan.*, 43 (1945).
7. Raphael, K. and Donald, F.O.: *Industrial and Engineering Chemistry, Mar.*, 314 (1942).
8. Grethlein, H.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **20**, 503 (1978).
9. Halliwell, G. and Griffin, M.: *Biochem. J.*, **135**, 587 (1973).

10. Okazaki, M. and Moo Young, M.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **20**, 637 (1975).
11. Howell, J.A. and Stuck, J.D.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **17**, 873 (1975).
12. Huang, A.A.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **17**, 1421 (1975).
13. Stephen, W., Wilke, C.R. and Harvey Blanch, H.W.: *Biotechnol. and Bioeng.*, **26**, 221 (1984).
14. Lowry, O.H., Rosenberg, N.H., Farr, H.L. and Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
15. Miller, G.L.: *Analytical Chemistry*, **31**, 426 (1959).
16. 김우식, 성준용, 유인상: *화학공학*, **25**, 4(1987).