

고정화 효소에 의한 섬유소 가수분해

오경근 · 김승욱* · 홍석인

고려대학교 화학공학과

*수원대학교 유전공학과

(1992년 2월 27일 접수, 1992년 6월 9일 채택)

Cellulose Hydrolysis by Immobilized Enzyme

Kyung-Keun Oh, Seung-Wook Kim* and Suk-In Hong

Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon P.O. Box 77, Suwon 445-743, Korea

(Received 27 February 1992; accepted 9 June 1992)

요 약

Trichoderma reesei QM 9414로부터 생산된 셀룰라아제를 Ca-alginate로 고정화하여 안정도를 높임으로써 셀룰로오스를 가수분해하는데 장기간 사용할 수 있도록 하였다. 고정화 효소의 역가는 Na-alginate와 CaCl_2 용액의 농도가 각각 3%(w/v), 0.4 M일 때 가장 좋은 결과를 보여준다. 고정화 젤 비드의 강도는 Na-alginate의 농도가 증가함에 따라 증가하였고 CaCl_2 용액의 농도에는 무관하였다. 고정화 효소는 효소용액을 사용했을 때보다 약 3배 정도의 높은 역가를 나타내었다. 또한 β -Glucosidase를 고정화하여 첨가했을 때 원래의 가수분해 반응보다 환원당 및 포도당의 생산성을 3배 이상 증가시켰다.

Abstract—The immobilization of cellulase was studied to stabilize the enzyme and thus increase the efficiency of the hydrolysis of cellulose. The cellulase induced from the fungus *Trichoderma reesei* QM 9414, was immobilized on Ca-alginate bead. The experiments were performed in order to find the optimum conditions for immobilization and understand the properties of immobilized enzyme systems. Experimental results showed that optimal concentrations of Na-alginate and CaCl_2 providing the highest activity of immobilized enzyme systems, were 3%(w/v) and 0.4 M, respectively. The gel strength of the immobilized bead was increased in proportion to the concentration of Na-alginate but independent of the concentration of CaCl_2 . The activity of the immobilized enzyme system was enhanced three folds compared to free enzyme system. Also, the productivities of reducing sugar and glucose were increased three folds by the addition of immobilized β -glucosidase in comparison with free β -glucosidase system.

1. 서 론

세계의 부존자원이 고갈되어감에 따라 대체에너지 개발에 많은 관심을 갖게 되었다. 특히 바이오매스는 무한한 태양에너지에 의하여 매년 막대한 양이 생산공

급되고 있어 이를 이용하여 생산되는 바이오에너지는 대체에너지로서 매우 적절하다고 할 수 있다. 현재 이러한 재생산성 에너지원인 섬유소의 회수와 전환에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다[1-5]. 대체연료인 알코올의 생산에 중요한 기질로 이용되는 포도당은 섬유소를 산에

의해 처리하거나 또는 효소에 의해 가수분해함으로써 얻을 수 있다. 섬유소 가수분해효소는 곰팡이나 박테리아가 섬유소에서 성장하여 분비되는 유도효소로서, 이 효소를 생산하는 균주들 중 가장 널리 알려진 것은 *Trichoderma reesei* 변이주들이다. 이 변이주들이 생산하는 효소의 장점으로서의 일반적으로 활성이 높고 억제제에 대해 저항력이 있으며, 또한 높은 온도에서 장기간 반응하여도 안정하다는 점이다[6, 7]. 그러나 *T. reesei* 변이주로부터 생산되는 효소복합체로서 *exo-glucanase*와 *endo-glucanase*는 높은 활성을 보이나 *β -glucosidase*는 아주 낮은 활성을 보인다. 이같은 이유로서는 효소복합체의 최대 생산에 가장 적합한 배지의 조건 때문이다. 완충용액에 의해 배지의 pH가 5.0으로 조절되어 있을 때 *β -glucosidase*의 활성은 상당히 증가하지만 *exo-glucanase*와 *endo-glucanase*가 매우 안정하고 높은 활성을 나타내는 pH 3.0에서 pH 4.0사이에서 *β -glucosidase*는 90% 이상의 활성을 잃게 된다[8]. 따라서 *β -glucosidase*의 결핍으로 cellobiose는 축적되고 결과적으로 cellobiose에 의한 생성물 억제반응의 영향이 가장 심각함을 알 수 있다.

일반적으로 효소고정화의 가장 큰 장점은 효소의 비활성화에 관한 안정성의 증가로 알려져 있는데 현재 다양한 방법에 의해 많은 시도가 이루어지고 있다[9, 10]. 그러나 섬유소 가수분해효소의 고정화에 대한 연구가 다른 효소의 고정화에 대한 연구보다 뒤떨어지고 있는 것은 섬유소가 불용성이므로 반응물의 확산속도가 크게 제한을 받는다는 점과 효소자체가 단일효소가 아니라 효소복합체라는 커다란 문제점을 갖고 있기 때문이다. 그럼에도 불구하고 최근에 효과적인 방법을 개발하고자 상당한 연구가 진척되고 있다[11-13]. 본 실험에서는 Na-alginate를 이용하여 섬유소 가수분해효소를 고정화하여 효소의 안정성을 증가시켰다. 또한 고정화효소의 특성을 파악한 후, 실제로 이를 *β -glucosidase*에 적용하여 섬유소 가수분해반응에 첨가하였다. 따라서 cellobiose에 의한 섬유소 가수분해효소의 억제반응을 감소시킴으로써 포도당의 생산을 증가시키는데 대하여 연구하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용효소 및 분석방법

본 실험에서 사용한 섬유소 가수분해효소는 *Trichoderma reesei* QM 9414로부터 생산되었다. 12 L 발효조 (B. Brown Co., West Germany)에 기질로서 Solka floc BW 200을 포함한 Mandels배지 10 L를 넣고 멸균시킨 후 inoculum을 330 ml 첨가한 후 6-7일 동안 배양하여

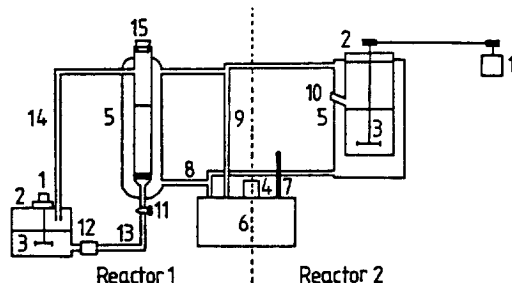


Fig. 1. Experimental set-up used for evaluation of the immobilized enzyme.

- | | |
|-------------------|----------------------|
| 1. D.C. motor | 9. Water out |
| 2. Rubber stopper | 10. Sampling tap |
| 3. Impeller | 11. Sampling cock |
| 4. Thermostat | 12. Peristaltic pump |
| 5. Water jacket | 13. Reactant in |
| 6. Water bath | 14. Product out |
| 7. Thermometer | 15. Cover |
| 8. Water in | |

그 상등액을 가수분해효소용액으로 사용하였다. 반응기의 온도 29°C 및 교반속도 400 rpm에서 pH는 3.0 이하로 떨어지지 않도록 유지하였다. 효소반응에 의해 생성된 환원당은 DNS방법[14]에 의해 측정하였고, 포도당은 효소적 방법[15]에 의해 측정하였다.

2-2. 실험장치

실험장치는 Fig. 1에서와 같이 반응기 1과 반응기 2로 나누어 설명할 수 있다. 반응기 1은 생성물의 분리를 용이하게 하고, 연속반응을 가능하도록 고안된 장치로 내경 20 mm, 외경이 40 mm, 높이가 150 mm로 유리로 제작되었다. 시료의 분리가 용이하도록 콕크가 연결되어 있으며 일정한 온도를 유지하도록 물 자켓이 장치되어 있다. 반응기 2는 회분식 반응기로서 반응기의 크기는 내경 80 mm, 외경 100 mm, 높이가 150 mm이며 물 자켓에 의해 일정한 온도가 유지된다. 임펠러 날개는 6개이며, 지름은 20 mm이고 터빈형으로 되어 있으며 350 rpm으로 일정하게 조절하였다.

2-3. 효소의 고정화

Na-alginate용액 50 ml에 효소용액 10 ml(CMCase 55.5 IU)를 넣고 교반시켜 혼합한 후 이 혼합액을 CaCl_2 용액 500 ml에 교반시키면서 주사기를 이용하여 떨어뜨려 구형의 겔을 만들고 고정화 효소가 형성된 후 겔의 강도를 높여주기 위해 0.3 M KCl 용액에 4°C에서 2시간 동안 침지시켰다. 효소의 비활성화를 방지하기 위하여 모든 과정이 4°C에서 이루어졌고, 고정화율은 약 20%를

나타내었다.

2-4. 효소 활성도의 측정

효소용액 2 ml에 해당하는 고정화 효소를 Fig. 1의 반응기 1에 넣고 0.5%(w/v) CMC 용액 4 ml를 넣은 다음 50°C에서 30분간 반응시킨 후 콕크를 이용해 생성물을 분리하는 방식으로 10회 이상 반복실험을 한 후 각 시료의 환원당을 측정하여 활성도를 측정하였다.

2-5. 고정화 효소의 견고성 측정

Rheometer(Sun Kagaku Co. Ltd., Type M-1107)을 이용하여 Ca-alginate겔의 견고성을 측정하였다. 구형의 겔을 평판위에 올려놓고 adaptor(직경 25.6 mm)를 설치한 후 압착시켜 압축력을 측정하여 Kg 중으로 표시하였다. 실험조건은 Max. force 4 Kg 중, chart speed 120 mm/min, table speed 0.72 mm/s이었고 clearance는 0으로 측정하였다.

2-6. 고정화 효소의 반감기 측정

반응기 1에 구형의 고정화 효소를 넣은 후 0.5%(w/v) CMC 용액 4 ml를 넣고 50°C에서 30분간 반응하였다. 반응후 시료를 분리한 후 0.3 M KCl 용액으로 1회 세척한 후 다시 0.5%(w/v) CMC 용액을 넣고 반복실험을 계속하였다. 반응의 횟수가 증가됨에 따라 계속 효소의 활성이 낮아지기 때문에 각 반응의 활성도는 최고 활성에 대한 퍼센트 활성으로 나타냈고 이 활성이 50%까지 되는 반응 횟수를 반감기로 정하였다.

2-7. 고정화 효소의 비교 활성도 측정

시험관을 사용해 고정화 전후의 효소의 활성을 측정하여 고정화율을 측정하였다. 고정화율은 원래의 효소 활성에 대한 고정화 효소의 활성비를 퍼센트로 나타내었다. 또한 비교 활성도를 측정하기 위해 효소용액인 경우에는 회분식 반응기에서 반응을 시켰고 고정화 효소의 경우에는 효소의 장점을 최대한 살리기 위해 반응기 1에서 연동펌프를 사용해 30 ml/min으로 기질을 계속적으로 재순환시킴에 의해 당화반응을 시키면서 일정한 시간마다 각각 시료를 채취해 시료의 환원당의 양으로 활성도를 측정하였다. 당화반응은 50°C, pH 4.8에서 각각 이루어졌다.

2-8. 고정화 β -glucosidase를 이용한 당화공정

CMC를 기질로 이용하여 가수분해시킬 경우 기질을 0.05 M citrate buffer(pH 4.8) 용액에 넣어 100 ml 현탁액을 만든 후 미생물의 성장을 방지하기 위해 0.005%(w/v)의 sodium azide, 그리고 겔의 견고성을 유지하기

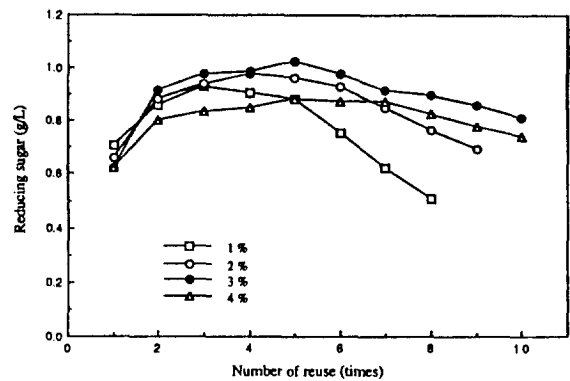


Fig. 2. Effect of Na-alginate concentration on the activity of immobilized enzyme; Reaction time is 30 min for each run.

위해 0.005%(w/v) CaCl_2 를 넣은 다음 50°C에서 30분간 반응기에서 예열시켰다. 효소용액도 100 ml를 50°C에서 30분간 예열시킨 후 반응기에 넣고 임펠러가 돌아가기 시작할 때를 시작시간으로 보고 반응시켰다. 시료는 정해진 시간에 3 ml씩 주사기로 채취한 후 원심분리기에서 2500 rpm으로 20분간 분리하여 분석하였다. 또한 고정화 효소를 이용한 경우 반응기 1에는 10 ml의 효소용액을, 반응기 2에는 그에 해당하는 고정화 효소를 첨가하여 실험하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3-1. 효소활성도에 미치는 Na-alginate 농도의 영향

CaCl_2 의 농도를 0.4 M로 고정시키고 Na-alginate의 농도를 1%(w/v)에서 4%(w/v)까지 변화시키며 고정화된 섬유소 가수분해효소의 활성을 측정하였다. Fig. 2에서 보여주듯이 Na-alginate의 농도가 3%(w/v)일 때 활성이 가장 좋았고, 4%(w/v)일 때에는 활성이 다소 낮은 편이었지만 반응의 횟수가 늘어남에 따라 효소의 활성이 감소되는 경향은 다른 농도에 비해 완만한 경사를 보였다. Na-alginate 농도를 3%(w/v)까지 증가시킬 때 효소활성의 감소하는 경향이 낮아지는 것으로 볼 때 Na-alginate 농도가 증가할수록 효소의 유출이 적어지는 것으로 생각된다. 그러나 4%(w/v)의 Na-alginate의 경우 활성이 다소 떨어지는 것은 Na-alginate의 농도가 증가함에 따라 기공의 크기가 작아져 기질의 겔 내부로의 확산속도를 크게 제한하는 것으로 추측된다. 이러한 결과로 볼 때 Na-alginate의 최적농도는 3%(w/v)임을 알 수 있었다.

3-2. 효소활성도에 미치는 CaCl_2 농도의 영향

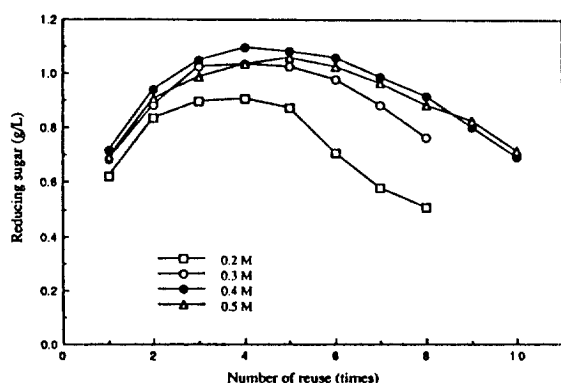


Fig. 3. Effect of CaCl_2 concentration on the activity of immobilized enzyme; Reaction time is 30 min for each run.

Hicks와 Updike[17]에 따르면 가교제의 농도가 높을수록 고정화 효소의 활성이 증가된다고 보고하였고 Charmbach 등[18]은 담체와 가교제의 상대비가 겔의 기공의 크기를 결정한다고 했다. 또한 Miron 등[19]은 가교제의 높은 농도가 trapping efficiency를 감소시킨다고 보고했다. 따라서 CaCl_2 의 최적농도를 찾기 위해 Na-alginate의 농도를 3%(w/v)로 고정시키고 CaCl_2 의 농도를 0.2 M에서 0.5 M까지 변화시키며 CaCl_2 의 농도가 효소의 활성에 미치는 영향에 대해 관찰하였다. Fig. 3에 나타난 것처럼 CaCl_2 의 농도가 0.4 M일 때 효소의 활성이 가장 좋았다. CaCl_2 의 농도의 영향은 Na-alginate의 경우와 마찬가지로 기공의 크기에 영향을 끼쳐 CaCl_2 의 농도를 0.4 M까지 증가시킬 때 효소활성의 감소하는 경향이 낮아진다. 0.2 M과 0.3 M CaCl_2 의 경우는 반복반응을 10번도 못해 효소의 유출이 심했고 0.5 M CaCl_2 의 경우와 0.4 M의 경우에 효소가 유출되는 정도는 거의 비슷하였지만 0.4 M일 때 활성이 다소 높았던 것으로 보아 CaCl_2 의 최적농도는 0.4 M임을 알 수 있었다.

3-3. 고정화 효소의 견고성

고정화 효소를 이용하여 목적하는 생산물을 연속 생산하는 경우 고정화 효소를 장시간 사용함에 따라 높은 겔의 강도가 요구된다. 겔의 강도를 증가시키기 위해 glutaraldehyde 및 hexamethylenediamine에 의한 경화 방법 그리고 여러 종류의 금속성 이온에 의한 방법 등이 보고되고 있다[20]. 본 실험에서는 겔의 견고성을 높이는 데 매우 효과적으로 보고되고 있는 0.3 M KCl 용액을 이용하여 겔의 견고성을 증가시켰고 Na-alginate 농도 및 CaCl_2 의 농도에 따라 견고성에 미치는 영향에 대해 조사하였다. Fig. 4에 나타난 것처럼 겔의 견고성은 Na-alginate 농도가 증가할수록 현저히 증가하였고, 겔

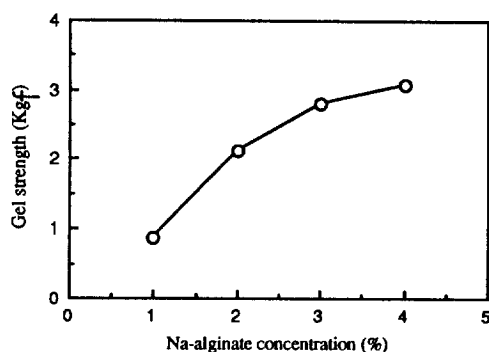


Fig. 4. Effect of Na-alginate concentration on the gel strength of immobilized gel bead.

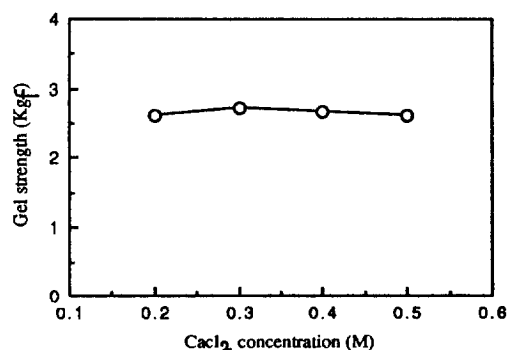


Fig. 5. Effect of CaCl_2 concentration on the gel strength of immobilized gel bead.

의 견고성은 주어진 실험범위 내에서 담체의 농도에 비례함을 알 수 있었다. 그러나 Fig. 5에서 보는 것처럼 CaCl_2 의 농도는 주어진 실험범위 내에서 겔의 견고성에 거의 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다. 이 결과는 실제로 효소를 고정화하였을 때 CaCl_2 의 농도에 따른 영향(Fig. 3)과는 상반된 결과를 보여준다. 이는 고정된 Na-alginate 농도에 치환되는 Ca 이온의 농도가 한정되어 있기 때문에 0.2 M 이상의 CaCl_2 용액으로 처리하여도 기계적 강도는 비슷하게 나타나고, 또한 효소를 고정화시켰을 때 CaCl_2 의 농도에 따른 활성의 변화는 잔존해 있는 Ca 이온이 효소의 활성에 영향을 끼친다고 생각된다.

3-4. 고정화 효소의 반감기

앞의 실험에서 얻은 Na-alginate의 최적농도 3%(w/v)와 CaCl_2 의 최적농도 0.4 M을 이용하여 고정화 효소를 준비하였고 실험방법에 언급한 방법으로 반복실험하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 18-19회 정도까지의 재사용이 가능한 것으로 판단되고 처음 1-2회 때보다 4-

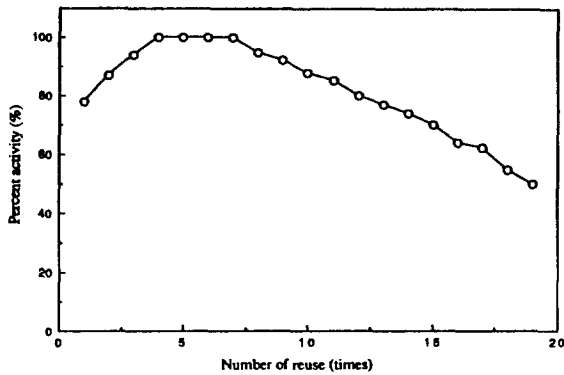


Fig. 6. The half-life of immobilized enzyme in Ca-alginate gel bead.

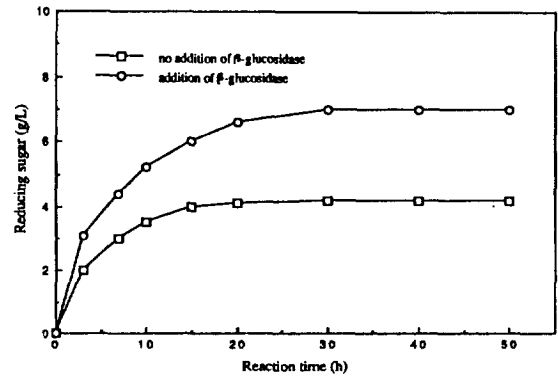


Fig. 8. Effect of the addition of β -glucosidase on the hydrolysis of cellulose (in reducing sugar).

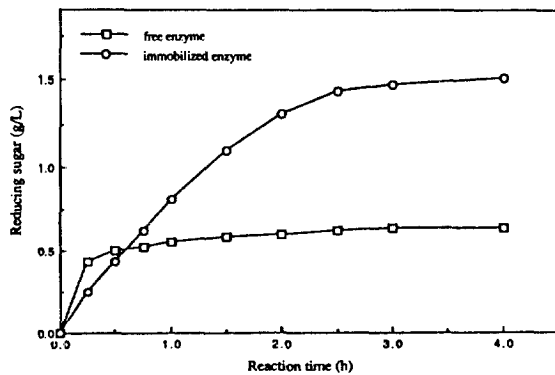


Fig. 7. The activities of immobilized and free enzyme.

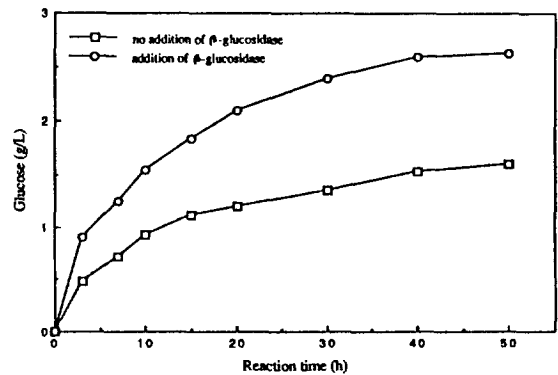


Fig. 9. Effect of the addition of β -glucosidase on the hydrolysis of cellulose (in glucose).

7회 때의 반응에서 최고의 활성을 나타냈는데 이같은 현상은 젤이 반응하는 동안 팽윤되어 기질의 확산이 잘 되었던 것으로 생각된다. 또한 7회 이후 고정화 효소의 활성이 감소하는 현상은 반복사용에 의한 효소의 유출과 비활성화에 기인된 것으로 판단된다.

3-5. 고정화 효소의 비교 활성도

효소의 고정화 전후의 활성을 각각 비교한 결과 동량의 효소용액에 대해 고정화 효소는 20% 정도의 낮은 고정화율을 보였다. 또한 고정화를 시킴으로써 얻어지는 잇점을 최대로 살리기 위하여 고정화 효소를 반응기 1에 고정시키고 기질을 재순환시켜 고정화 효소의 비교 활성도를 측정하였다. Fig. 7을 보면 고정화 효소는 효소 용액보다 3배 가량 더 높은 생산성을 나타냈다. 이같은 이유는 고정화 방법을 이용함으로써 교반 및 전단응력 등에 의한 효소의 비활성화를 막을 수 있고 또한 생성물이 반응기로부터 계속 분리됨으로써 생성물에 의한 억제반응을 감소시킬 수 있는데 기인한 것으로 생각된다.

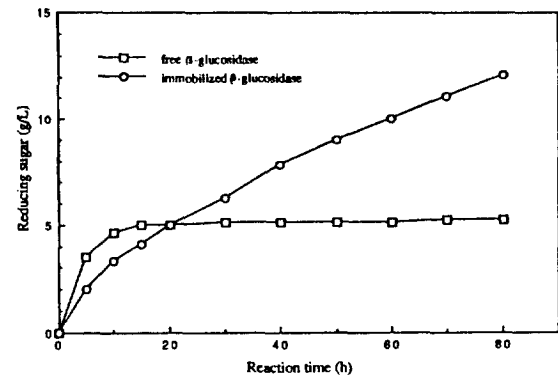


Fig. 10. Effect of the immobilization of β -glucosidase on the hydrolysis of cellulose (in reducing sugar).

3-6. 고정화 β-glucosidase에 의한 당화과정

앞의 실험들에서 고정화 효소의 최적조건과 특성들을 파악하고 그러한 조건들을 이용해 β -glucosidase에 적용하여 실제 가수분해 반응에 응용하였다. 먼저 β -glu-

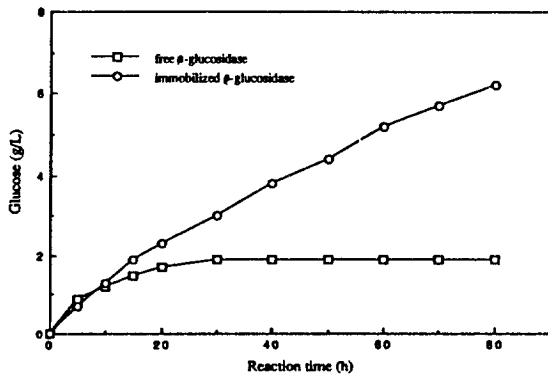


Fig. 11. Effect of the immobilization of β -glucosidase on the hydrolysis of cellulose(in glucose).

cosidase(0.01 U/ml)를 working volume의 10%인 10 ml를 첨가함으로써 환원당과 포도당의 증가량을 측정하였다. Fig. 8에서 나타난 것처럼 환원당의 양이 4.1 g/L에서 7.0 g/L로 증가하였다. 이렇게 환원당이 증가한 것은 축적되어 있는 이당류인 cellobiose를 신속하게 포도당으로 전환시킴에 의해 생성물 억제반응을 감소시킨 결과이다. 한편 포도당의 양은 1.6 g/L에서 2.6 g/L로 증가함을 보여준다(Fig. 9). 또한 10 ml의 β -glucosidase를 고정화시킴으로써 비고정화 상태와 고정화 상태에서의 생산성을 비교하였다. Fig. 10과 11에 각각 나타난 바와 같이 환원당의 양은 5.0 g/L에서 12.1 g/L으로, 포도당의 양은 1.8 g/L에서 6.2 g/L로 현격히 증가됨을 알 수 있었다. 이러한 현상 역시 고정화에 의해 β -glucosidase의 안정성이 증가되는 것으로 생각된다.

4. 결 론

(1) 겔을 형성하는 담체(Na-alginate)의 최적농도는 3%(w/v)이고, 가교제(CaCl_2)의 최적농도는 0.4 M이었다.

(2) 효소의 고정화율은 비교적 낮았지만 반감기는 20 회 정도이고 고정화 효소의 생산성은 효소용액보다 3배 이상 증가하였다.

(3) 고정화 β -glucosidase의 첨가는 원래의 가수분해 반응과 비교할 때 환원당과 포도당의 생산성을 약 3배 정도 증가시켰다.

참고문헌

1. Sternberg, D. and Dorval, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 181(1979).
2. Mandels, M., Medeiros, J. E., Andreotti, R. E. and Bissett, F. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2009(1981).
3. Ladisch, M. R., Lin, K. W., Volch, M. and Tsao, G. T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 82(1983).
4. Ladisch, M. R. and Tsao, G. T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 66(1986).
5. Parisi, F.: *Adv. Biochem. Eng.*, **38**, 53(1989).
6. Mandels, M.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **5**, 81(1975).
7. Montecourt, B. S. and Eveleigh, D.: *Proc. 2nd Bioconv. Symp.*, Troy, N. Y., p. 613(1978).
8. Mandels, M. and Reese, E. T.: *J. Bacteriol.*, **79**, 816 (1959).
9. Messing, R. A.: "Comprehensive Biotechnology" Vol. 2, Ch. 12, p. 203, M. Moo-young(Ed), Pergamon Press Ltd.(1985).
10. Pifferi, P. G., Tramontini, M. and Malacarne, A.: *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1258(1989).
11. Fujikawa, S., Yokota, T. and Koga, K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 440(1988).
12. Roy, S. K., Raha, S. K., Dey, S. K. and Chakrabarty, S. L.: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **11**, 431(1989).
13. Jeong, E.-J., Lee, S.-H. and Lee, Y.-H.: "Korean J. Biotechnol. Bioeng.", **5**, 141(1990).
14. Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959).
15. Bergmeyer, H. U.: "Method of Enzymatic Analysis.", Vol. 1, p. 457, 2nd Ed, Academic Press, NY (1974).
16. Lowry, P. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
17. Hicks, G. P. and Updike, S. J.: *Anal. Chem.*, **38**, 726 (1966).
18. Chrambach, A. and Rodbard, D.: *Science*, **172**, 440 (1971).
19. Miron, T. and Degani, Y.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **212**, 362(1970).
20. Tosa, T., Sato, T., Mori, T. and Chibata, I.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1697(1979).