

Lignocellulose의 당화와 고정화 효모에 의한 에탄올발효

조항신 · 김승욱* · 홍석인

고려대학교 화학공학과

*수원대학교 유전공학과

(1992년 3월 25일 접수, 1992년 9월 4일 채택)

Saccharification of Lignocellulose and Ethanol Fermentation by Immobilized Yeast

Hang-Shin Cho, Seung-Wook Kim* and Suk-In Hong

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

*Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon 445-743, Korea

(Received 25 March 1992; accepted 4 September 1992)

요 약

Solka floc BW 200과 폐지와 같은 섬유소원을 *Trichoderma* 기원의 셀룰라아제와 고정화 효모를 이용해 에탄올로 전환시키고자 하였다. 본 연구의 목적은 동시당화와 발효공정을 통해 생성물 억제를 줄이고 유동층 반응기를 사용하여 고정화 효모의 생화학적 물질대사를 조절하여 에탄올의 생산성을 높이하고자 하였다. 효모를 당화 시작후 30시간에 접종했을 때, 당화와 동시 발효반응 1시간 후 포도당의 농도가 일시적으로 증가하였다가 에탄올 발효가 활발히 일어나 포도당의 양이 급격히 감소하였다. 또한 당화 공정 중 포도당 및 에탄올을 첨가했을 때 당화반응이 저해됨을 알 수 있었다. 유동층 반응기에서 회분식 첨가 배양과 반회분식 배양을 사용하여 회분식 배양보다 에탄올의 생성량을 높일 수 있었다.

Abstract—The conversion of cellulose and lignocellulose such as Solka floc BW 200 and waste paper into ethanol using *Trichoderma reesei* cellulase and immobilized yeast was investigated. The object of this study is to decrease the product inhibition by performing simultaneous saccharification and fermentation (SSF), and is to control the biochemical metabolism of immobilized yeast by using fluidized-bed reactor, thus producing high productivity of ethanol. When the yeast was inoculated after 30 hours of the saccharification process, glucose concentration was increased temporarily after 1 hour of SSF and decreased rapidly by ethanol fermentation. And it was found that the saccharification was inhibited by the addition of glucose or ethanol. Fed-batch or semi-batch fermentation in the fluidized-bed reactor was more favorable than batch fermentation for ethanol production.

1. 서 론

섬유소 물질은 지구상에서 가장 풍부하며 유용한 에너지 자원이고 또한 재생할 수 있는 물질이다. 현재 이를

이용하여 식량원, 화학물질의 원료, 대체에너지원으로 사용하려는 연구가 활발히 진행 중이다[1]. 섬유질 바이오매스는 cellulose, hemicellulose와 lignin으로 구성되어 있는데, 이들은 산이나 효소 촉매반응에 의해 가

용성 생산물로 가수분해된다. 그러나 천연상태의 섬유소는 cellulose와 hemicellulose가 lignin과 밀접하게 결합되어 있어 셀룰라아제가 접촉하기 어려우므로 분해가 어렵다[2]. 따라서 셀룰라아제에 의한 분해를 효과적으로 하기 위하여 섬유소 전처리 방법[3, 4]으로 섬유소 표면적을 증가시키거나, 결정도를 감소시키거나, lignin을 제거한다. 이렇게 섬유소는 당화와 발효과정을 거쳐서 대체에너지원인 에탄올로 전환된다.

당화 과정은 산이나 효소를 이용하여 cellulose나 hemicellulose를 당으로 전환시키는 과정으로써, 상온 상압에서 반응하는 효소의 가수분해가 고온 고압을 요하는 산의 가수분해보다 유리하다. 이렇게 생산된 당을 이용하여, 주로 효모에 의해 에탄올이 생산된다. 현재 산업적으로 음료용 에탄올 생산공정은 이미 많이 확립된 상태이나 대체에너지로서의 에탄올은 경제적인 가격으로 대량생산되어야 한다는 점에서 새로운 에탄올 생산공정의 개발이 필수적이다. 특히 세계적으로 섬유소 자원을 이용하여 대체에너지원인 에탄올을 생산하는 연구가 활발히 진행 중에 있다. Blotkamp[5]는 종래의 섬유소 당화와 발효공정을 동시 당화와 발효공정으로 실험함으로써 높은 수율의 에탄올이 얻어졌다고 보고하였다. 한편 Bisaria와 Ghose[6]는 섬유소를 에탄올로 전환시키는 과정에서 축적되는 포도당 및 에탄올 억제현상을 동시당화와 발효공정, 에탄올 제거공정을 통해 감소시킴으로써 에탄올 수율을 증가시켰다. 이외에도 여러 연구자들이 동시 당화와 발효 공정으로 다양한 종류의 섬유소에서 에탄올로의 전환율과 수율을 증가시키기 위해 많은 연구를 하고 있다[7-10].

본 실험에서는 섬유소원으로 종이공장 폐수 속의 폐지 성분을 셀룰라아제와 고정화 효모를 이용해 에탄올로 전환시켰다. 또한 동시당화와 발효공정을 통해 생성물 억제를 줄이고 유동층 반응기를 사용함으로써 고정화 효모의 물질대사 조절을 용이하게 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용균주 및 배지

섬유소 가수분해 효소의 생산균주인 *Trichoderma reesei* QM9414를 Potato dextrose agar 사면 배지에 접종하여 29°C에서 배양하였고, 에탄올 생산 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216은 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% dextrose에 1.5% agar를 첨가한 사면 배지에 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다. 각 균주는 4°C에서 보관하였고 매달 한 번씩 계대 배양하였다.

2-2. 효소 생산 및 기질

섬유소 가수분해 효소는 *Trichoderma reesei* QM 9414로부터 생산되었다. 12L 생물반응기(B. Brown Co., West Germany)에 기질로서 Solka floc BW 200을 포함한 Mandels 배지 10L를 넣고 멸균시킨 후 inoculum 330 ml를 첨가한 후 6-7일 동안 배양시켜 그 상등액을 가수분해 효소용액으로 사용하였다. 반응기의 온도는 29°C, 교반 속도는 400 rpm, pH는 3.0 이하로 떨어지지 않도록 유지되었다. 당화를 위한 포도당 생산 기질로서는 Solka Floc BW 200과 제지회사 폐수를 여과하여 고형성분을 얻고 이를 증류수로 세척한 후 0.05 M lactic acid 완충용액(pH 4.5)과 함께 섞은 폐지를 사용하였다.

2-3. 효모의 고정화

2%(w/v) Na-alginate 용액에 일정량의 효모를 넣고 잘 섞은 후 이 혼합액을 CaCl₂ 용액 500 ml에 교반시키면서 피펫을 이용하여 떨어뜨려 직경 3-3.5 mm인 구형의 겔모양의 고정화 효모를 만들고 겔의 강도를 높이기 위해 5%의 포도당이 포함된 0.05 M CaCl₂ 용액에서 24시간 동안 침전시킨 후 사용하였다.

2-4. 분석방법

시료 중에 생성된 환원당은 DNS 방법[11]에 의해 측정하였고, 포도당은 효소적 방법인 peroxidase-glucose oxidase o-parainisidine 방법[12]에 의해 측정하였다. 생산된 에탄올의 양은 n-butanol을 internal standard로 하여 Chromosorb W Column과 FID를 이용하여 가스크로마토그래피로 측정하였다. 생존 세포의 농도는 유리 세포의 경우 배양용액 0.1 ml를 취하거나, 또는 0.1 ml에 해당하는 고정화 세포를 0.05 M citrate 완충용액(pH 4.5)에 녹인 후, 10⁶-10⁸배까지 묽혀 이 용액 0.1 ml를 효모 사면배지에 펼쳐 30°C에서 48시간동안 배양한 후 균체 수를 세어서 이를 생존효모의 수로 정하였다.

2-5. 당화와 에탄올발효 방법

Solka floc과 폐지 각 5g(건조중량)을 pH 4.5, 50°C로 유지하여 섬유소 가수분해 효소로 당화시켰다. 그리고 Solka floc과 폐지의 당화 시작 후 적절한 시간 후에 효모를 접종하였다. 반응기에서의 실험은 pyrex 유리로 제작된 유동층 반응기(높이 30 cm, 내경 5.6 cm)에 고정화 효모를 넣고, 당화액 100 ml를 주입하여 30°C, pH 4.5에서 에탄올 발효 반응을 혐기성 조건으로 실험하였다(Fig. 1). 균주의 혐기성 조건을 만족하기 위해 질소가스를 20 ml/min로 반응기 내에 주입하였다.

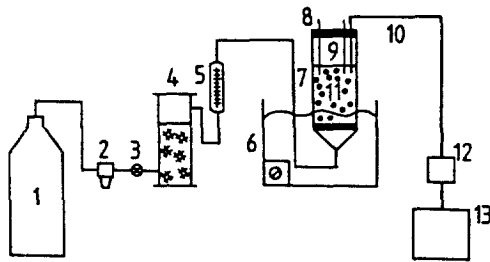


Fig. 1. Diagram of fluidized-bed reactor system for ethanol fermentation.

- | | |
|------------------------------|-------------------------------|
| 1. N ₂ gas or air | 8. Thermometer |
| 2. Air filter | 9. pH meter |
| 3. Air control valve | 10. Feeding and sampling port |
| 4. Humidifier | 11. Immobilized cell |
| 5. Air flow meter | 12. Peristaltic pump |
| 6. Water bath | 13. Reservoir |
| 7. Reactor | |

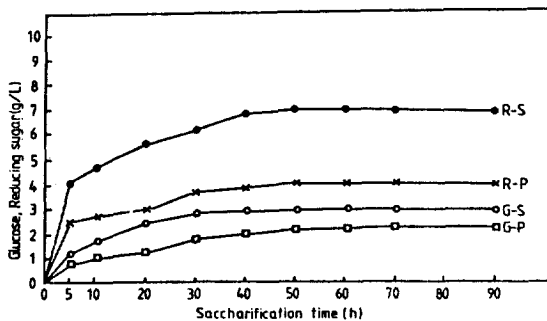


Fig. 2. Saccharification of Solka floc and waste paper.

- : R-S: Reducing sugar from Solka floc
- ×: R-P: Reducing sugar from waste paper
- : G-S: Glucose from Solka floc
- : G-P: Glucose from waste paper

2-6. 회분식 첨가 배양

30°C, pH 4.5에서 회분식 발효 중인 고정화 효모의 포도당 소비량과 균체수를 살펴본 후, 포도당 첨가시기를 결정하였다. 이 시기를 반응 후 8시간으로 정하고 이 때에 포도당이 첨가된 Solka floc 당화액(총 포도당 50 g/L 함유), 포도당이 첨가된 폐지 당화액(총 포도당 50 g/L 함유)을 각각 20 ml씩 유동층 반응기에 주입하여 고정화 효모의 균체수 증가와 에탄올 생산량 증가를 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. Solka floc과 폐지 성분의 당화

pH 4.5, 50°C에서 0.33 IU 셀룰라아제를 사용하여 So-

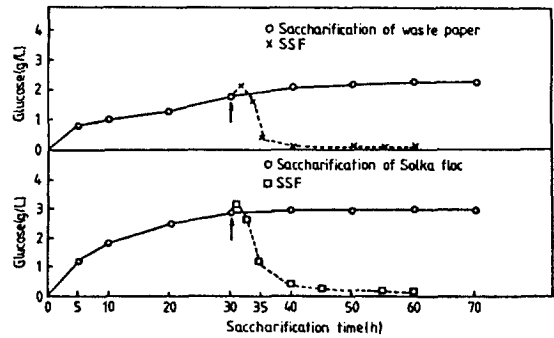


Fig. 3. Comparison of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with simple saccharification (○; Inoculation time of yeast).

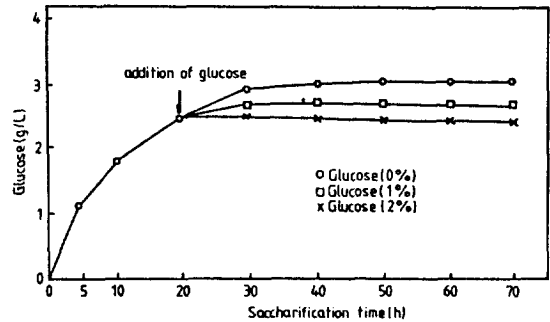


Fig. 4. Effect of the addition of glucose on the saccharification of Solka floc.

lka floc 5 g(건량기준)과 폐지 성분 5 g(건량기준)을 당화시켰다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 50시간 후에는 환원당 및 포도당의 생성이 정지되었다. 이와 같은 현상은 계속적인 당화에 의한 생성물의 축적으로 이들 생성물에 의한 억제에 기인한 것으로 판단된다. 생성된 환원당의 양은 Solka floc의 경우 7.1 g/L였으며, 폐지의 경우는 4.1 g/L였다. 이와 같이 폐지를 기질로 한 경우가 환원당 및 포도당의 생성량이 적은 것은 폐지에 함유된 리그닌 때문에 셀룰라아제가 섬유소를 당화하는데 쉽지 않은 것으로 판단된다.

3-2. 당화와 동시 에탄올발효

포도당을 이용하여 에탄올발효를 하는 효모 균주를 당화 시작 후 30시간에 접종하였다. Fig. 3에서 당화와 동시 발효반응 1시간 후, 포도당의 농도가 Solka floc의 경우 3.05 g/L, 폐지의 경우 2 g/L 생성되었다. 이 양은 단순한 당화공정과 비교할 때 각각 0.15 g/L(5% 증가)와 0.2 g/L(10% 증가)의 포도당의 농도가 증가하였다. 이것은 포도당의 생성속도가 증가하기 때문일 수도 있고, 또는 효모를 접종했을 때 집중액 자체에 포함된 당의

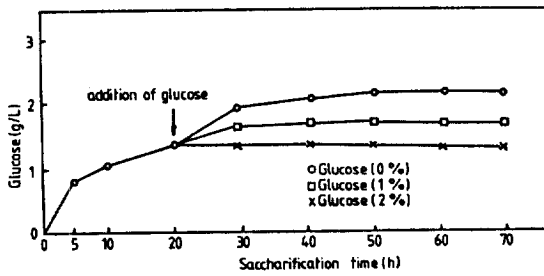


Fig. 5. Effect of the addition of glucose on the saccharification of waste paper.

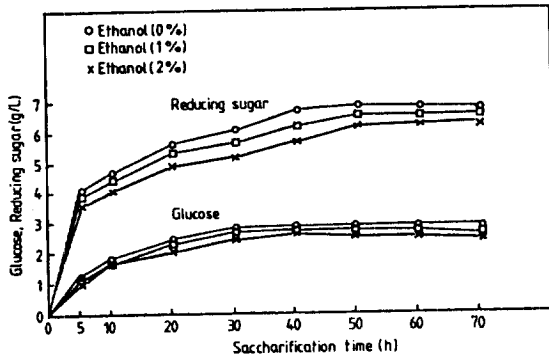


Fig. 6. Effect of the addition of ethanol on the saccharification of Solka floc.

농도 때문일 것으로 추측된다. 또한 효모를 접종한 1시간 이후부터 에탄올발효가 활발히 일어나 포도당의 양이 급격히 감소하는 것을 보여준다.

3-3. 당화 공정 중 포도당 첨가가 셀룰라아제의 활성에 미치는 영향

Fig. 4와 5에서 보는 바와 같이 기질이 Solka floc 및 폐지의 두 경우, 포도당을 첨가하지 않은 두 경우에 비하여 1% 및 2%로 첨가량이 증가되면 당화반응이 저하됐다. 따라서 포도당이 첨가되면 오히려 셀룰라아제의 활성이 저하되는 것을 알 수 있다.

3-4. 당화 공정 중 에탄올 첨가가 셀룰라아제의 활성에 미치는 영향

Fig. 6과 7에서 보는 바와 같이 당화 공정에 에탄올을 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우에 비하여 환원당 및 포도당 생산량이 감소하였다. 특히 에탄올을 1%, 2%로 증가시켜 첨가할수록 감소폭이 커졌으며, 환원당의 경우가 포도당보다 감소폭이 더 큰 것으로 미루어, 에탄올은 C_1 , C_x 및 β -glucosidase의 활성을 모두 저하시킨다고 판단할 수 있다. 그러나 이러한 작용은 동량의

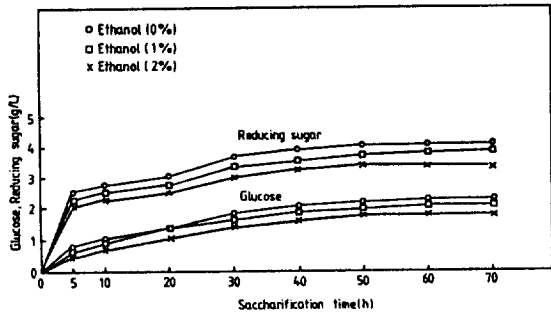


Fig. 7. Effect of the addition of ethanol on the saccharification of waste paper.

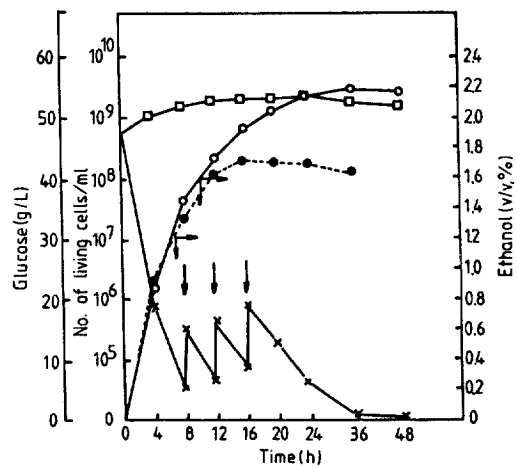


Fig. 8. Fed-batch culture with glucose and saccharifying solution of solka floc at 30°C and pH 4.5 (↓; Feeding glucose and saccharifying solution of solka floc 50 g/L, 20 ml).

○; Ethanol production in fed-batch culture, ●; Ethanol production in batch culture, □; No. of living cells, ×; Glucose.

포도당이나 cellobiose의 저해보다 훨씬 적은 것으로 알려져 있고, 또한 동시당화와 발효공정에 있어서 포도당의 농도를 최소로 유지함으로써 오염의 가능성을 줄일 수 있다[13].

3-5. Solka floc과 폐지를 기질로 한 당화액의 회분식 첨가 배양

Fig. 8과 9는 포도당이 첨가된 Solka floc 및 폐지를 기질로 한 당화액(포도당, 50 g/L)으로 회분식 첨가 배양한 결과를 보여준다. 36시간 후의 에탄올의 생산량을 보면 각각 2.18%(v/v)와 2.12%(v/v)로 나타났다. 이 값들은 같은 농도의 순수한 포도당을 배지로 사용하여

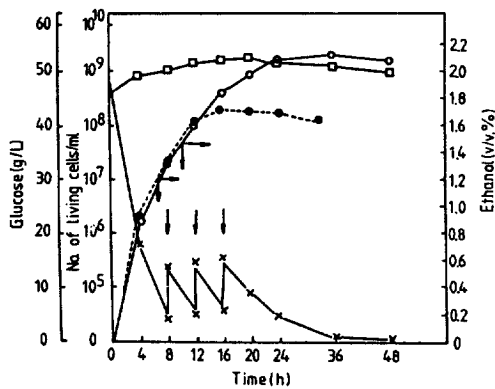


Fig. 9. Fed-batch culture with glucose and saccharifying solution of waste paper at 30°C and pH 4.5 (↓; Feeding glucose and saccharifying solution of waste paper 50 g/L, 20 ml). ○; Ethanol production in fed-batch culture, ●; Ethanol production in batch culture, □; No. of living cells, ×; Glucose.

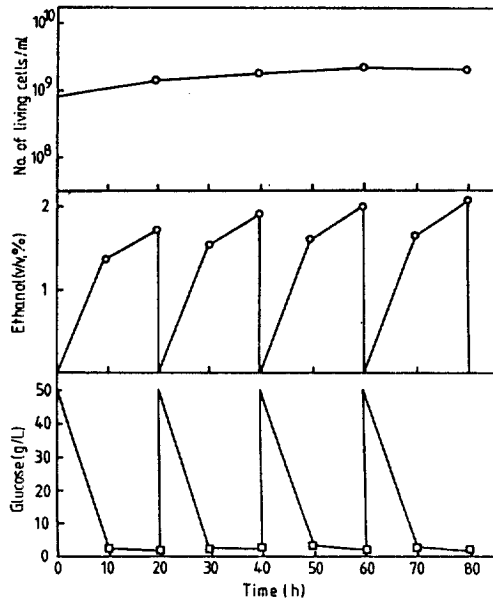


Fig. 10. Results of semi-batch fermentation using glucose and saccharifying solution of waste paper at 30°C and pH 4.5.

회분식 배양에서 얻은 1.7%(v/v)에 비하여 약 25%가 증가함을 보여준다. 따라서 회분식 첨가 배양이 회분식 배양에 비해 좋은 결과를 얻었고, Solka floc 및 폐지를 기질로 한 당화액을 이용하여 에탄올을 생산할 수 있음을 알 수 있다.

3-6. 반 회분식 배양

20시간 발효 후 발효액을 제거하고 같은 고정화 효모를 재사용하여 에탄올 발효를 행하였다. 같은 방법으로 4회 재사용하여 반 회분식 에탄올발효를 행하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 생존 균수 및 각 회분배양 당 에탄올생성량의 증가를 관찰할 수 있다. 배지로서 포도당을 포함하는 폐지 당화액을 사용했을 때, 80시간 후 2.2%(v/v)의 에탄올이 생성되었는데, 이는 전환율 67.3%로서 회분식 배양에서의 전환율 54.3%와 비교할 때 약 13%가 증가함을 보여준다.

4. 결 론

제지공장 폐수 중의 불용성 공해물질인 폐지성분을 셀룰라아제와 고정화 효모를 이용한 당화와 발효공정으로 에탄올로 전환시킬 수 있었고 회분식 첨가 배양과 반 회분식 배양을 사용함으로써 회분식 배양보다 에탄올의 생성량을 높일 수 있었다.

참고문헌

1. Ladisch, M. R., Lin, K. W., Voloch, M. and Tsao, G. T.: *Enzyme Microb. Technol.*, **5**, 82(1983).
2. Fan, L. T., Lee, Y. H. and Beardmore, D. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 177(1980).
3. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1471(1974).
4. Bailey, M. J. and Nevalainen, K. M. H.: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 153(1981).
5. Blotkamp, P. J.: *Biochemical Research*, 85(1978).
6. Bisaria, V. S. and Ghose, T. K.: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 90(1981).
7. Sasaki, T., Tanaka, T., Narbu, N., Sato, Y. and Kainum, K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1031(1979).
8. Ooshima, H., Ishitani, Y. and Harano, Y.: *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 389(1985).
9. Punnapayak, H. and Emert, G. H.: *Biotechnol. Lett.*, **8**, 63(1986).
10. Hueng, S. Y. and Chen, J. C.: *J. Ferment. Technol.*, **66**, 509(1988).
11. Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959).
12. Bergmeyer, H. U.: "Method of Enzymatic Analysis", Vol. 1, p. 457, 2nd Ed(1984).
13. Kosaric, N., Wiczorek, A., Cosentino, G. P., Magee, R. J. and Prenosil, J. E.: "Biotechnology", Vol. 3, Ch. 3a, Ethanol Fermentation, edited by Dellweg, H., Verlag-Chemie, Weinheim(1983).