혼합효소를 사용한 섬유소-가수분해반응의 최적조건

손민일, 김태옥
명지대학교 화학공학과

Optimum Conditions of Cellulose-Hydrolysis Reaction with Mixed Enzymes

Min-Il Son, Tae-Ok Kim
Dept. of Chemical Engineering, Myong Ji University, Yong In 449-728

서 론

지구상에서 생성되고, 소멸하여 침적 등이 되어 있는 biomass, 즉 생물유기체의 양은 대단히 많으나 충분한 평가를 내리지 못하고 있으며 특히 이들은 매년 생산되고 있을 뿐만 아니라 지구상에서 가장 풍부한 자원중의 하나라고 할 수 있다. 그중에서도 원목으로부터 생산되는 biomass인 cellulose, hemicellulose, lignin 등을 가수분해하여 당(糖)이나 알코올을 생산하기 위한 연구는 오랫동안 연구되어 왔으나 경제성이 낮아서 실용화되어 있지 않은 실정이다[1-3]. 더욱이 최근에는 화석연료의 고갈에 따른 새로운 대체에너지원으로서 섬유소 등이 중요한 자원으로 부각되고 있는 실정이며 특히 종이, 펄프공장 등에서 발생되는 폐섬유는 환경문제를 일으키므로 이를 이용한 당화공정의 개발은 환경문제와 대체에너지원의 측면에서 상당히 시급하다고 판단된다. 그러나 혼합효소를 사용하여 섬유소의 효소-가수분해반응의 최적조건과 반응속도론, 그리고 반응기의 성능해석을 체계적으로 해석한 연구는 보고된 바 없다.

따라서 본 연구는 공기리프트(airlift) 생물반응기에서 효소-가수분해반응에 의해 폐섬유소로부터 글루코오스(glucose)를 생산하기 위한 연구의 일환으로 순수섬유소(α-Cellulose)의 효소-가수분해반응의 최적온도와 pH, 그리고 글루코오스의 생성을 최대화시키기 위한 주효소인 셀루라아제(cellulase)와 보조효소인 β-glucosidase의 최적 활성비를 규명하고자 하였다.

실 험

1. 실험재료

섬유소로는 순수한 셀루로오스(α-Cellulose : SIGMA C-8002)를 사용하였고 효소는 Penicillium funiculosum에서 추출한 셀루라아제(Cellulase : SIGMA C-0901)와 Almond에서 추출한 β-Glucosidase(SIGMA G-0395)를 각각 사용하였다.

2. 실험방법

(1) 효소의 최적 pH의 측정

0.1M acetate buffer solution을 각각 pH 3.6, 4.0, 4.2, 4.4, 4.6, 4.8, 5.0, 5.6로 제조한 후 0.0075g/ℓ 셀루라아제와 4.5g/ℓ 셀로바이오스(cellobiose)를 각각 2 mℓ씩 취해 37 ℃에서 5분간 반응시킨 후 0.2M Na_2CO_3용액 2 mℓ를 넣어 반응을 정지시켜 생성된 글루코오스 농도를 Dye-Oxidation법[4]을 사용하여 각 pH에서 효소의 활성(activity)을 산출하였다. 또한 동시에 1.5g/ℓ의 p-Nitrophnyl α-D-Glucopyranoside(SIGMA N-1377, PNPG)을 기질로 사용하여 효소(셀루라아제의 경우에는 0.025g/ℓ, β-glucosidase의 경우에는 0.0025 g/ℓ)와 반응시킨 후 UV를 이용하여 흡광도를 측정하고 p-Nitrophnol의 검량곡선(reference curve)을 이용하여 활성을 산출하여 최적 pH를 결정하였다.

(2) 최적 온도범위의 측정

효소는 특정 온도범위까지는 활성이 증가하나 그 이상의 온도에서는 단백질로 이루어진 효소의 분해와 불활성의 증가로 오히려 활성이 떨어질 뿐만 아니라 시간에 따라 불활성되므로 실제조업에서는 일정기간이 지나면 불활성된 만큼의 효소를 보충해 주어야만 한다. 따라서 최적 pH에서 실험온도를 각각 30, 37, 50, 60, 70℃로 변화시키면서 PNPG를 사용하여 약 2주정도의 기간동안 온도변화에 대한 효소의 안정성과 시간에 따른 효소의 활성을 측정하여 최적 온도범위를 결정하였다.

(3) 혼합효소의 최적 활성비

셀루라아제와 β-glucosidase효소의 최적 pH는 각 효소의 특성에 따라 다르기 때문에 셀루라아제의 최적 pH와 β-glucosidase의 최적 pH의 사이에서 혼합 활성비(cellulase : β-glucosidase)를 각각 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 1:12로 변화시키면서 최적 온도하에서 10g/ℓ의 셀루로오스와 반응시켜 생성된 글루코오스와 셀로바이오스의 농도를 Dye-Oxidation법과 DNS법[5]에 의해 UV를 이용하여 정량한 후 글루코오스의 생성양을 비교하여 혼합효소의 최적 pH와 효소의 최적 혼합비를 결정하였다.

결과 및 고찰

반응온도 37℃에서 pH변화에 따라 산출된 셀루라아제의 활성변화는 Table 1에서와 같이 pH가 4.2부근에서 최대의 활성을 나타내었고, β-glucosidase에 대

Table 1. Cellulase activity with pH.

pH	Glucose con. $\times 10^2$(mg/ml)	Conversion(%)	Reaction rate $\times 10^6$ (mmol/ml·min)	Activity (U/mg)
3.6	5.92752	2.503	32.9307	8.78
4.0	6.15824	2.600	34.2124	9.12
4.2	6.20310	2.619	34.4617	9.19
4.4	6.19028	2.614	34.3904	9.17
4.6	6.10697	2.579	33.9276	9.05
4.8	5.96598	2.519	33.1443	8.83
5.0	5.65836	2.389	31.4353	8.38
5.6	4.70345	1.986	26.1303	6.97

Table 2. β-glucosidase activity with pH.

pH	Glucose con. $\times 10^2$(mg/ml)	Conversion(%)	Reaction rate $\times 10^6$ (mmol/ml·min)	Activity (U/mg)
3.0	1.8743	1.13	3.75	3.00
4.6	3.4215	2.06	6.84	5.47
5.0	4.3125	2.60	8.63	6.90
5.2	5.2572	3.17	10.51	8.41
5.4	4.7419	2.86	9.48	7.58
5.6	4.4259	2.67	8.85	7.08
7.0	3.0002	1.81	6.00	4.80
8.0	0.6025	0.36	1.21	0.97

한 활성의 결과는 Table 2에서와 같이 pH가 5.3부근에서 최대의 활성을 유지함을 알 수 있었다. 따라서 혼합효소(cellulase + β-glucosidase)의 경우에 pH의 변화와 혼합효소의 활성비의 변화에 대하여 생성된 글루코오스의 생성량의 결과는 Fig. 1에서와 같이 최적 pH는 4.2이었다. 이것은 글루코오스의 생성이 셀로바이오스를 분해하는 β- glucosidase의 영향보다 셀루로오스를 분해하는 셀루라아제의 영향이 커서 Table 1과 같이 셀루라아제의 최적 pH에 근접하는 것으로 보인다. 또한 혼합효소의 최적 활성비는 Fig. 2에서와 같이 셀루라아제 : β-glucosidase (C/B)의 비가 10:4임을 알 수 있으며 이 결과는 Fig. 1의 결과 및 효소의 혼합비에 따라 섬유소의 가수분해반응속도가 영향을 받는다는 Okazaki 등[6]과 Suga 등[7]의 실험결과와 일치된다.

혼합효소의 경우에 최적 pH 4.2에서 온도와 반응시간의 변화에 따른 활성은 Fig 3과 같다. 그림에서와 같이 50℃의 경우, 효소의 활성이 초기에는 가장 우수하였으나 시간이 지날수록 온도에 대한 안정성이 감소하였고 또한 60℃에서는 온도의 안정성이 50℃에서보다 낮으며 시간에 지남에 따라 급격한 활성의 감소와 매우 낮은 활성을 나타내었다. 30℃와 37℃에서는 장시간동안 안정성을 유지하였으나 30℃에서는 37℃에서보다 낮은 활성을 나타내어 혼합효소의 경우에는 35-45℃범위에서 장시간동안 높은 활성을 유지함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 셀루라아제와 β-glucosidase를 각각 단일효소로 사용한 경우에서도 거의 유사한 경향을 나타내었다.

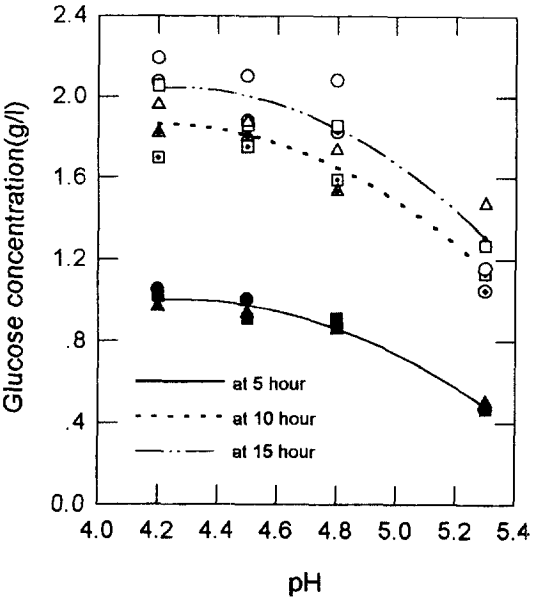

Fig. 1. Glucose Concentrations with pH : C/B=10/4(○), 10/8(△), 10/14(□).

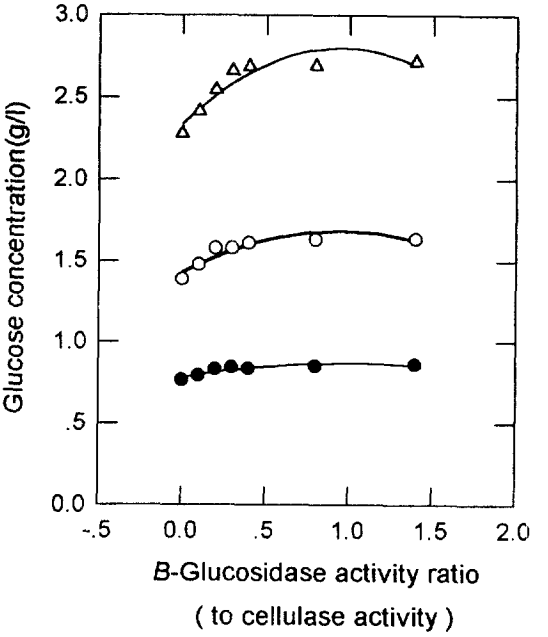

Fig. 2. Glucose Concentrations with β-Glucosidase activity to cellulase at pH 4.2 : 5(○), 10(△), 15 hour(□).

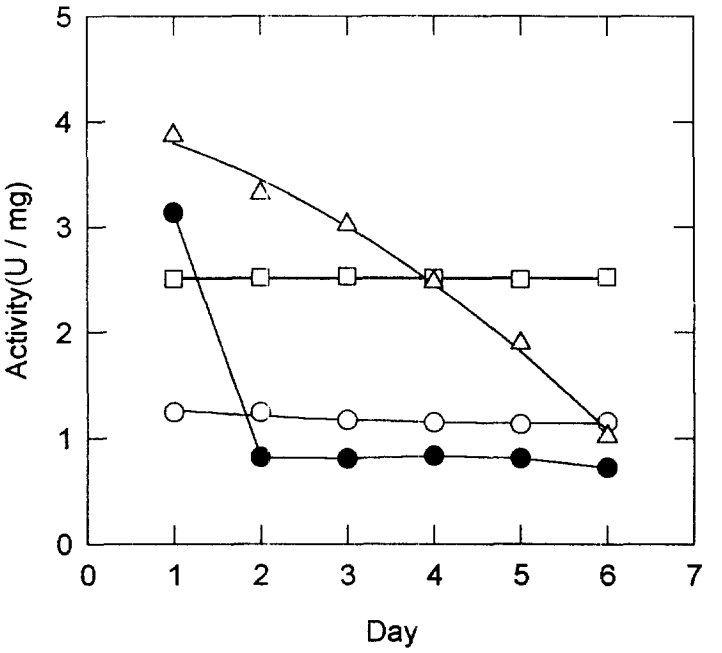

Fig. 3. Mixed enzyme activities with time and reaction temperature : 30(○), 37(□), 50(△), 60℃(●).

참고문헌

[1] David, N.S.H. and Nobuo, S. : "Wood and Cellulosic Chemistry", Marcel Dekker, Inc., New York and Basel(1991)
[2] Asim, E. : "β-Glucosidases : Biochemistry and Molecular Biology", *ACS Symposium Series 533*, American Chemical Society, Washington DC(1993)
[3] Oh, K.D. and Kim, C. : ***World Congress III of Chemical Engineering***, Tokyo, **10a-202**, 832(1982)
[4] Harris, D.A. and Bashford, C.L. : "Spectrophotometry and Spectrofluorimetry", IRL Press(1987)
[5] Miller, G.L. : ***Anal. Chem.***, **31**, 426(1959)
[6] Okazaki, M. and Moo-Young, M. : ***Biotech. Bioeng.***, **20**, 637(1978)
[7] Suga, K. and Moo-Young, M. : ***Biotech. Bioeng.***, **17**, 185(1975)