

한외여과막을 이용한 효소재순환 시스템에서의 효소역가감소

김 준 석 · *정 용 섭 · †홍 석 인

고려대학교 공과대학 화학공학과, *전북대학교 농과대학 식품공학과

Enzyme Deactivation During Enzyme Recycling with Ultrafiltration Hollow Fibers

Jun-Seok Kim, Yong-Seob Jeong*, and Suk-In Hong†

Dept. of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University,
Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

ABSTRACT

The enzyme deactivation in a membrane recycling system for the simultaneous saccharification and fermentation(SSF) was studied under various temperature and pressure. The optimum molecular weight cut off(MWCO) of the ultrafiltration membrane for recycling cellulase and β -glucosidase was 50,000. When the cellulase was recycled continuously through the membrane system, it was not deactivated. But the activity of β -glucosidase was decreased with an increase in operating temperature and transmembrane pressure. After 720 minutes at 42°C and 24.8 psig, the activity of β -glucosidase was reduced by 35% of the initial activity. Such tendencies could be well explained by the results of highly induced shear at the fiber surface of membrane when temperature and transmembrane pressure became higher.

서 론

목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 양이 풍부하고 가격이 저렴하여 이상적인 대체에너지 생산원료로서 활용 가능성이 점차 높아지고 있다. 따라서 목질계 바이오매스로 부터 에탄올을 생산하기 위한 공정의 개발연구가 계속 진행되고 있다(1, 2). 이러한 섬유소물질을 기질로 하여 에탄올을 생산하기 위한 공정중의 하나인 동시당화발효공정(SSF: Simultaneous Saccharification and Fermenta-

tion)은 당화 공정과 발효공정을 동시에 수행함으로써, 기존의 분리당화 발효공정(SHF: Separate Hydrolysis Fermentation)에 비해 하나의 반응기만을 필요로 하기 때문에 설치비용이 감소된다(3-6). 그리고 당화효소의 억제제인 글루코오스가 당화효소에 의해서 생성되자마자 발효균주에 의해 소모되므로, 전체공정에 필요한 비용의 25%를 차지하는 당화효소의 투입량을 감소시킬 수 있다. 또한 이러한 SSF공정에 효소와 균체를 막분리 시스템을 이용하여 재순환시키는 시스템(Membrane Recycling System)을 적용시킬 경우, 당화공정에서는 효소역가도를 더욱 감소시키며 효소를 재사용 할 수 있고,

† Corresponding Author

발효공정에서는 균체 재순환으로 인해 반응기내의 균체농도를 증가시킬 수 있어 생산성을 극대화 하는 동시에 생산물인 에탄올을 분리, 농축할 수 있다(7-10).

목질계 효소 당화공정을 위하여 주로 사용되는 효소는 endoglucanase, exoglucanase와 cellobiase가 섞여 있는 복합효소인 cellulase와 당화효율을 높이기 위한 β -glucosidase가 사용되어지고 있다(11-13). 일반적으로 에탄올 발효균주의 최적 성장온도는 30~35°C 인데 반해 cellulase의 최적 반응온도는 45~50°C 정도로써, 동시당화발효공정을 위한 최적온도의 선별이 중요하며 최근까지 연구된 결과 동시당화발효공정의 최적온도는 37~40°C로 알려져 왔다(14-15).

본 연구에서는 목질계 당화공정에서 사용되어지는 cellulase와 β -glucosidase를 재사용하기 위해 적절한 MWCO(Molecular Weight Cut Off)를 지닌 중공사막모듈을 적용한 막분리 시스템을 이용하여 효소를 반응조로 재순환 시키면서 MWCO에 따른 투과실험을 통해 막특성을 파악 하였다. 또한 전체 동시당화발효공정에 적용한 온도조건하에서 압력에 따른 효소역가변화 여부 및 분리도와 투과플럭스를 측정하여 막분리 시스템을 위한 최적운전조건을 제시하였다.

재료 및 방법

효소

효소는 *Trichoderma reesei* 변이균주에 의해 생산된 상업용 cellulase인 Celluclast 1.5L(Novo Nordisk Co., Denmark)와 β -glucosidase를 강화한 Novozym 188 (Novo Nordisk Co., Denmark)를 사용하였다. Cellulase의 filter paper activity는 Whatman No.1 filter paper를 50mg(1x6cm)이 되도록 잘라서 효소 0.5mL와 citrate buffer 1.0mL를 넣어 50°C에서 1시간동안 반응시켜 생성된 환원당의 농도를 DNS방법(16)에 의해 분석하였으며, Celluclast 1.5L의 activity는 80 IU/mL이었다. β -glucosidase역가는 15.0mM cellobiose (1.2836g/250mL citrate buffer)를 기질로 하여 β -glucosidase 1.0mL를 넣어 50°C에서 30분간 반응시킨 다음 생성된 포도당의 농도를 측정하여 분석(16, 17)하였으며, Novozym 188의 activity는 150 CBU/mL이었다.

사용된 효소에 대한 단백질의 농도는 Folin-

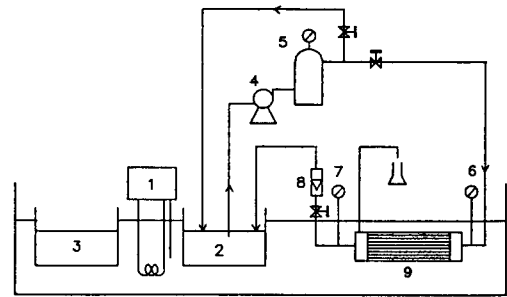


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental cross flow membrane unit.

1. thermoregulator 2, 3. reservoir 4. pump
5. damper 6, 7. pressure gauge 8. flowmeter
9. hollow fiber module(UF).

Ciocalteu 착화합물 시약을 이용하여 발색법에 의한 흡광도를 측정하는 Lowry법을 이용하여 분석하였다(18).

막분리시스템

효소재순환을 위한 본실험의 시스템은 Fig. 1과 같다. 사용된 펌프는 정량펌프(Weco Co. Korea)이며, 사용된 막은 재질이 polysulfone이고 MWCO이 30,000인 Superane, SKC-103(Sunkyong Industries, Korea)과 MWCO이 50,000인 Micro-sampler(Microgon Co., U.S.A)으로 중공사형 한외여과막이었다. MWCO이 30,000과 50,000인 막의 유효 막면적은 1,000cm²와 680cm²이었다. 완충용액(Sodium citrate buffer, pH4.8, 23°C)에 일정하게 희석시켜, 30 IU/mL와 50 CBU/mL로 유지시킨 효소를 일정온도와 압력조건하에서 damper를 거쳐 막모듈을 통과시켜 다시 저장조로 재순환시켰으며, 이때의 막모듈로 공급되는 효소용액의 속도는 400mL/min으로 유지시켰다. 막의 기공을 투과한 용액(permeated solution)과 막모듈에 의해 재순환된 효소용액(recycled solution)을 720분 동안 일정시간격으로 일정량을 취하여 효소역가 및 단백질의 농도를 측정하였다. 효소역가분석은 완충용액에 희석시킨 효소용액을 재순환용 저장조(Fig. 1의 2)와 재순환시키지 않고 각 온도조건에서 유지시킨 저장조(Fig. 1의 3)의 효소용액을 기준으로 하여 % activity 단위로 측정하였다.

온도는 동시당화발효의 선정대상인 30, 37 및 42°C에서 각각 수행하였으며, 투과압력은 막모듈 최대

Table 1. Relative activity(%) of enzymes and protein concentrations in permeated and retentated solutions for two different membranes

enzyme		membrane	MWCO 30000		MWCO 50000	
			0min	720min	0min	720min
cellulase	relative activity (%)		100	97.5	100	98.0
	protein concentration in recycled solution (g/l)		1.40	1.25	1.35	1.20
	average flux (mL/cm ² min)		0.385	0.378	0.483	0.475
	separation coefficient		0.961	0.968	0.940	0.944
β-glucosidase	relative activity (%)		100	62.5	100	67.7
	protein concentration in recycled solution (g/l)		1.20	0.944	1.20	0.90
	average flux (mL/cm ² min)		0.340	0.331	0.449	0.440
	separation coefficient		0.975	0.977	0.950	0.951

허용 압력을 고려하여 14.2, 21.3 및 28.4 psig에서 각각 수행하였다.

각 온도와 투과압력에 따른 효소역가변화를 측정하였으며, 투과 플럭스(Permeation Flux)와 배제계수(Separation Coefficient)를 측정하여 각 조건에서의 MWCO 30,000과 50,000인 한외여과막의 막 특성을 파악하였다. 각 실험후에는 초기 PWP (Pure Water Permeability)로 회복될때까지 back-flushing과 세척을 수행하였다.

$$Permeation\ Flux = V/At$$

V는 여과부피이며, A는 사용된 막의 표면적, t는 여과부피의 측정시간이다.

$$Separation\ Coefficient = \frac{C_f - C_p}{C_f}$$

C_p는 permeate에서 효소의 농도를 의미하며, C_f는 초기 효소농도를 뜻한다.

결과 및 고찰

효소재순환을 위한 막모듈 선정

당화공정을 기준으로 막모듈을 이용한 재순환 공정에서 최적의 막분리 시스템은 막모듈에 의한 효소의 역가감소를 최소화시키면서 높은 투과플럭스를 유지하고 효소에 대한 배제계수가 1이어야 한다. 보편적으로 투과 플럭스와 배제계수 모두를 최대로 유지시킬 수 없으므로, 적절한 압력과 온도를 선정하여 최적의 공정조건을 도출시켜야 한다.

Cellulase와 β-glucosidase, 두 효소의 평균분자량

을 고려하여 선정된 MWCO가 30,000과 50,000인 막모듈을 막분리 시스템에 적용시켜 막통과시 효소역가 감소여부, 투과플럭스 및 효소에 대한 배제계수를 측정하여 보았다. 최근까지 동시당화발효공정의 최적온도인 37℃와 막모듈 최대허용압력인 28.4 psig 조건하에서의 실험결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서와 같이 MWCO가 30,000과 50,000인 막을 비교할 경우 cellulase와 β-glucosidase에 대해서 MWCO 30,000인 막이 보다 높은 배제계수를 나타낸다. 그러나, MWCO 50,000인 막이 상대적으로 높은 투과 플럭스를 유지할 수 있으며, 특히 β-glucosidase에 대한 효소역가 감소정도가 낮음을 알 수 있다. 또한 목질계 바이오매스를 기질로 사용할 경우의 기질의 높은 분자량 및 장기간 조업시 예견되는 막의 오염을 고려할 때, 막분리 효소 재순환공정을 위한 최적막 조건은 MWCO이 50,000인 막모듈이 적합함을 알 수 있었다.

공정조건에 따른 효소역가 감소

Cellulase

선정된 MWCO이 50,000인 막모듈을 사용하여, 초기투입한 효소역가를 100%로 하여 온도 30, 37 및 42℃, 압력 14.2, 21.3 및 28.4 psig 조건하에서 720분간 막분리재순환 시스템을 이용하여 일정한 간격으로 측정된 결과, 막모듈을 통과하여 재순환된 cellulase의 역가는 95% 이상을 유지하였다.

또한 효소에 대한 배제도는 초기 0.940에서 실험 종료시 0.944로 계속 높은 값을 유지하였으며, 막의 막힘현상은 관찰되지 않았다.

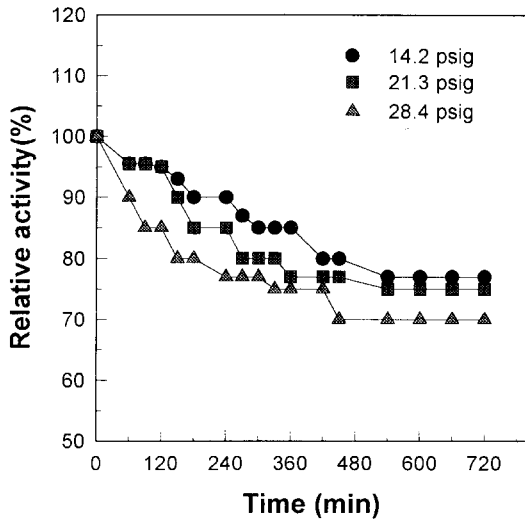


Fig. 2. Relative activity of β -glucosidase in the recycled solution through a MWCO 50,000 membrane at 30°C.

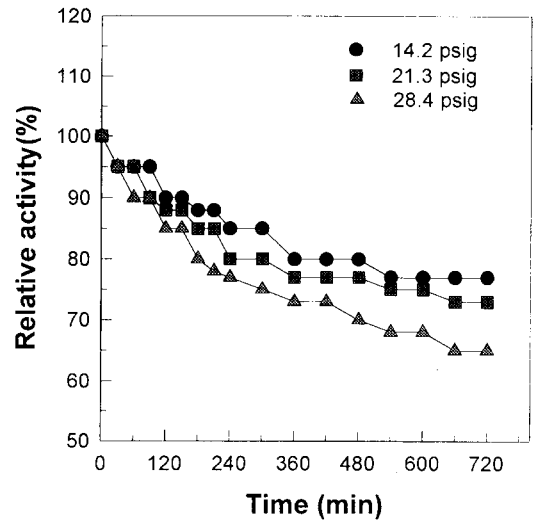


Fig. 4. Relative activity of β -glucosidase in the recycled solution through a MWCO 50,000 membrane at 42°C.

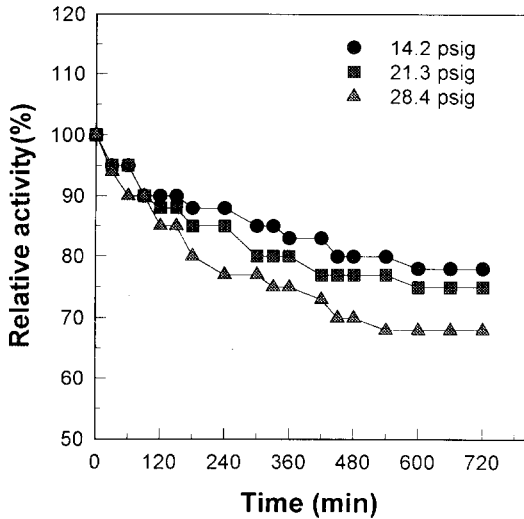


Fig. 3. Relative activity of β -glucosidase in the recycled solution through a MWCO 50,000 membrane at 37°C.

β -glucosidase

선정된 MWCO이 50,000인 막모듈을 사용하여 일정하게 유지된 온도 30, 37 및 42°C 각각에 대해서 압력을 14.2, 21.3 및 28.4 psig으로 변화시키면서 각 조건에서의 초기시간으로부터 720분간 재순환시키면서 일정시간 간격으로 저장조 내의 β -glucosi-

dase 용액을 취하여 효소역가 변화를 측정하였다.

온도가 30°C일때, 각각의 압력조건하에서의 재순환 효소의 역가변화를 Fig. 2에 나타내었다. 압력이 증가할수록 효소역가는 압력 28.4 psig에서 최대 30%까지 감소함을 확인 할 수 있었다. 온도가 37°C일때, 같은 실험을 수행한 결과 압력이 증가할수록 효소역가는 감소하며 초기조건을 기준으로 최대 32%까지 감소하였다(Fig. 3). 또한 내열성 효모를 사용할 경우 적용될 온도인 42°C에서는 최대 35%까지 효소역가가 감소하였다(Fig. 4) 이것으로 온도, 압력변화에 따른 효소역가 변화가 없었던 cellulase에 비해 β -glucosidase의 경우 온도와 압력이 증가할수록 효소의 역가가 감소함을 알 수 있었다. 이러한 효소역가의 감소현상은 Jones와 Lee(19)가 언급했던 전단(shear)의 영향에 의한 결과로 해석될 수 있으며, 특히 압력이 증가함에 따른 투과플럭스의 증가가 막모듈의 사(fiber)내부표면의 단백질 뭉침(aggregation)증가를 유발시켜 전단을 크게 유도시킨 것으로 해석할 수 있겠다(20). 이러한 결과는 막분리 재순환공정을 적용한 전체동시당화발효공정에 있어서 역가감소만큼의 효소를 재투입시켜야할 필요성과 투과압력을 최소로 유지시키면서 효소를 재순환시킬수록 효소역가의 감소를 최소화 시킬 수 있음을 보여주었다.

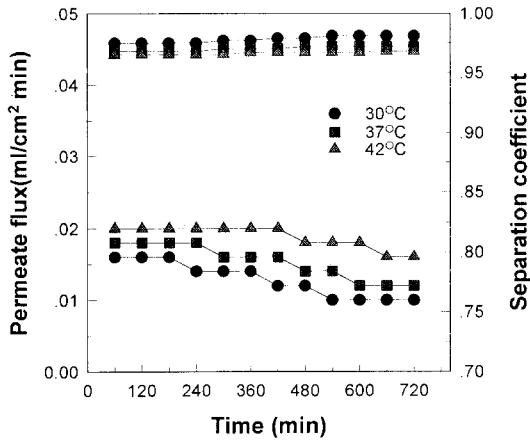


Fig. 5. Permeate flux and separation coefficient of a β -glucosidase solution through a MWCO 50,000 membrane at 14.2 psig.

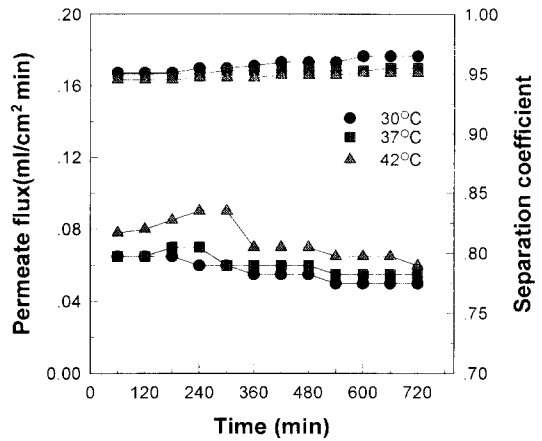


Fig. 7. Permeate flux and separation coefficient of a β -glucosidase solution through a MWCO 50,000 membrane at 28.4 psig.

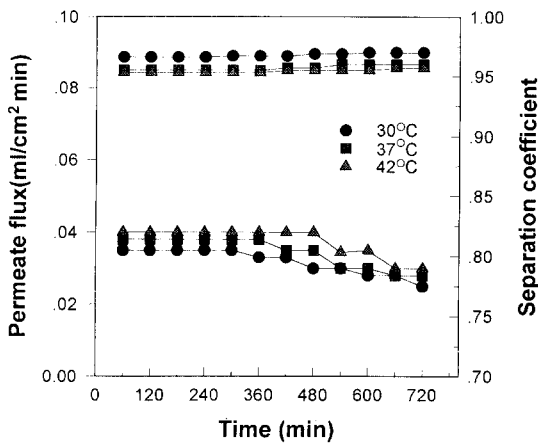


Fig. 6. Permeate flux and separation coefficient of a β -glucosidase solution through a MWCO 50,000 membrane at 21.3 psig.

투과플럭스와 배제계수

효소 재순환을 위해 선정된 막모듈은 효소에 대하여 높은 배제계수(separation coefficient)을 유지하면서 효소를 재순환 시켜야 하며, 당화공정시 생성 당을 연속적으로 분리하기 위해 높은 투과플럭스(permeate flux)을 유지하여야 한다.

압력이 14.2 psig일때, 각각의 온도조건에 따른 투과플럭스와 배제계수를 초기 시간으로부터 720분간 β -glucosidase를 재순환시키면서 일정시간 간격으로

효소용액을 취하여 효소역가를 측정하여 Fig. 5에 나타 내었다. 배제계수는 각 온도조건에서 평균 0.97정도를 유지하면서 효소를 분리하여 재순환 시킬 수 있었으며, 투과플럭스 역시 미세하게 감소하나 전반적으로 온도를 30, 37, 42°C로 증가시킬수록, 투과도는 증가하고 배제계수는 감소함을 확인하였다.

압력이 21.3 psig일때, 14.2 psig 조건에서 보다 다소 낮은 배제계수를 나타냈으나, 투과플럭스는 높 이 유지되었다(Fig. 6). 압력이 28.4 psig일때, 효소를 재순환시킨 결과 14.2, 21.3 psig조건에서와 같은 경향을 보였다(Fig. 7). 결과적으로, 각 압력 및 온도의 변화를 통하여, 온도 및 압력이 증가할수록 투과플럭스는 증가하고 배제도는 감소함을 확인할 수 있었다. 이것은 적절한 투과플럭스를 유지시킬수 있는 범위에서 투과압력을 최소화 시킴으로써, 배제계수를 증가 시키는것이 막분리 효소재순환 시스템에 유리하다고 판단된다.

결 론

동시당화발효공정에서의 효소비용절감을 위한 막 분리 재순환시스템을 이용한 효소 재순환 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 목질계 바이오매스의 당화효소인 cellulase와 β -glucosidase를 막분리시스템에 적용시킬경우 재순환을 위한 막의 MWCO는 50,000이 최적임을 알았다.
2. 실험된 온도와 투과압력조건에서 효소를 재순

환한 결과 온도와 투과압력이 증가 할수록 투과플럭스는 증가하나, 배제계수는 감소함을 확인하였다.

3. 선정된 한외여과막을 이용하여 효소를 재순환시켰을때 cellulase의 역가변화는 없었으나, β -glucosidase의 경우 초기조건을 기준으로 효소역가가 최대 35%까지 감소함을 확인하였고 이것은 막분리 재순환 시스템의 온도와 투과압력이 증가할수록 전단(shear)이 증가되어, 결과적으로 효소역가감소의 경향이 증가함을 알 수 있었다.

요 약

동시당화발효공정에 적용된 막분리 효소재순환 시스템을 이용하여 온도 및 압력 조건에 따른 효소역가감소현상에 대해서 고찰하였다. 목질계바이오매스를 기질로한 효소당화공정을 고려하여 사용된 효소인 cellulase와 β -glucosidase을 막분리 재순환 시킬 수 있는 최적의 막은 MWCO가 50,000인 한외여과막이라 판단되었다. cellulase의 경우 한외여과막을 이용하여 연속적으로 재순환 시켰을때, 효소역가의 감소를 확인할 수 없었다. 그러나 β -glucosidase는 온도와 압력이 증가할수록 초기상태를 기준으로 온도 42°C, 투과압력 28.4 psig에서 최대 35%까지 감소함을 확인하였다. 이것은 온도와 압력이 증가할수록 투과플럭스가 증가하고, 이에따른 막모듈의 사(fiber) 내부표면에서 전단(shear)이 증가된 결과로 설명할 수 있다.

감 사

본 연구는 에너지자원기술개발지원센터의 지원(1995)에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

1. C. E. Wyman(1994), *Biores. Technol.*, **50**, 3.
2. D. Ballerini, J. P. Desmarquest, and J. Pourpuie(1994), *Biores. Technol.*, **50**, 17.
3. M. Takagi, S. Abe, S. Suzuki, and G. H. Emert(1977), *Bioconversion Symposium*, **2**, 551.
4. D. D. Spindler, C. E. Wyman, K. Grohmann, and G. P. Philippidis(1992), *Biotechnol. Lett.*, **14**, 403.
5. T. K. Ghose, P. K. Roychoudhury, and P. Ghosh(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 377.
6. J. D. Wright(1988), *Chem. Eng. Prog.*, Aug., 62.
7. L. P. Ramos, C. Breuil, and J. N. Saddler(1993), *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 19.
8. M. Cheryan and M. A. Mehaia(1985), "Reverse Osmosis and Ultrafiltration", American Chemical Society, Washington D.C. 321.
9. M. Cheryan and M. A. Mehaia(1986), "Membrane Separations in Biotechnology", Marcel Dekker, New York, NY.
10. R. K. Warren, D. G. Macdonald, and G. A. Hill(1994), *Biores. Technol.*, **47**, 121.
11. C. Breuil, C. M. Chan, M. Gibbert, and J. N. Saddler(1992), *Biores. Technol.*, **39**, 139.
12. B. C. Stockton, D. J. Mitchell, K. Grohmann, and M. E. Himmel(1991), *Enzyme. Microb. Technol.*, **13**(1), 57.
13. R. Sutcliffe and J. N. Saddler(1986), *Biotech. Bioeng. Symp.*, **17**, 749.
14. D. J. Blotkamp, M. Takagi, M. S. Pemberton, and G. H. Emert(1978), The American Institute of Chemical Engineer, Series No.74, 85.
15. D. D. Spindler, E. W. Charles, and G. Karel(1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28**, 773.
16. T. K. Ghose(1987), *Pure & Appl. Chem.*, **59**(2), 257.
17. M. Holtzapple, M. Cognata, Y. Shu, and C. Hendrickson(1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 275.
18. O. H. Lowry, R. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randale(1951), *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
19. E. O. Jones and J. M. Lee(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 35.
20. K. J. Kim, V. Chen, and A. G. Fane(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 260.