

공중합 고분자를 이용한 수식셀룰라아제의 당화 특성 및 반응속도에 관한 연구

전 영 호 · 신 호 철 · 박 진 원

연세대학교 화학공학과

Saccharification Characteristics and Kinetic Analysis of Modified Cellulase with a Copolymer

Young-Ho Jhon, Ho-Chul Shin, and Jin-Won Park[†]

Dept. of Chemical Engineering Yonsei Univ., Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

Cellulase was modified with synthetic copolymers of polyoxyethylene derivative and maleic acid anhydride. The saccharification characteristics and enzymatic reaction kinetic mechanism of modified and native cellulases were observed. In modification reaction of cellulase, degree of modification(DM) increased, as mass ratio of copolymers to enzyme increased. Maximum DM was 55% at mass ratio of 4 and remained activity was 75%. In saccharification experiment modified enzyme had maintained higher stability than native enzyme over all the reaction and the final conversion yield of modified enzyme was greater than that of native enzyme. Numerical simulation based on the reaction mechanism considering enzymatic deactivation was performed. Modified enzyme had kept higher free enzyme concentration over all the reaction than that of native enzyme. Comparing calculation values with experimental data, calculation values were in accordance with experimental data.

서 론

지구상 가장 풍부한 물질 중의 하나인 셀룰로오스의 당화 공정은 폐셀룰로오스계 물질의 자원화와 화석연료의 대체물질개발 측면에서 최근 주목받고 있다.

산당화공정은 부식, 공해 등의 문제점과 불필요한 부산물의 생성 등과 같은 문제점이 있는 반면, 효소 당화 공정은 온화한 조건의 온도, 압력에서 반응이 진행될 수 있으며, 높은 활성의 효소가 개발되면서 그에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나, 실

제로 섬유질의 바이오매스인 셀룰로오스의 효소가수 분해공정은 효소기질 반응에 의한 당 생성속도가 느린 점과 효소-기질과의 흡착에 의한 효소 실활이 급속히 진행된다는 점 등과 같은 반응공학적인 문제와 아직까지 가수분해효소의 생산가격이 비싼 경제적인 문제가 있다(1-4).

따라서 효소의 성능을 향상시키기 위해 셀룰라아제를 특정 공중합고분자와 중합시킨 수식셀룰라아제(modified cellulase)에 관한 연구가 있다(5). 수식셀룰라아제의 초기의 활성도는 미수식셀룰라아제보다 조금 감소하나, 내pH성, 내열성 등은 향상된다고 보고하였다.

[†] Corresponding Author

또한 셀룰로오스의 효소당화공정에 대한 반응속도 관련 연구를 보면, Suga(6)와 Lee(7)는 기질의 효소가수분해과정에서 셀룰라아제의 각 구성효소들의 복합적인 활동으로 기질의 중합도를 떨어뜨린다는 이론적 모델링을 하였으며, Petterson(8)과 Ryu(9)는 기질의 다중성을, Howell(10)과 Dwivedi(1)는 셀룰로오스 표면에서 일어나는 효소의 deactivation을 고려한 반응식을 보고하였다.

본 연구는 셀룰라아제의 안정성과 반응성을 향상시키기 위하여 polyoxyethylene 유도체와 무수말레인산(maleic acid anhydride) 공중합고분자를 이용한 셀룰라아제의 수식 반응을 행하였다. 수식셀룰라아제의 당화반응의 특성을 고찰하고, 효소-기질의 강한 흡착에 의한 실활을 고려한 수식셀룰라아제 반응속도식을 가정하여 실험값과 비교 검토하였다.

재료 및 방법

효소 및 수식 반응

본 실험에 사용한 효소는 일본 Yakult사의 상품명 onozuka cellulase 3S를 사용하였고, 수식을 위한 공중합체는 일본 유지(주)에서 제조한 polyoxyethylene(POE) 유도체와 maleic acid anhydride(MAA)의 공중합체로서, 화학적 구조는 Fig. 1(a)과 같다. 단백질의 아미노기와 MAA와의 수식 반응을 말레일화 반응이라고 하며, Fig. 1(b)에 나타내었다. pH 8.0~8.2, 0°C에서 효과적으로 반응이 일어나며, 반응이 진행됨에 따라 H⁺가 생성되어 pH가 감소하므로 염기에 대한 pH조절이 필요하다.

본 실험에서는 효소 농도 40g/L에, 적당한 중량 비율의 공중합고분자를 첨가하여 미수식효소를 수식 반응시켰다. 수식조건은 말레일화 반응조건과 동일한 0°C, pH 8.0~8.2에서 이루어졌다. 수식 반응액의 pH 측정값이 불변인 시점을 수식 반응 종결시점으로 하였다.

공중합 고분자와 원효소를 각기 다른 질량비로 변화시켜 수식반응을 행하였으며, 각각의 수식효소의 미반응 아미노기 농도는 trinitrobenzene sulfonic acid(TNBS)법으로 측정하였다(11). 미반응 아미노기로부터 수식셀룰라아제의 수식률(degree of modification, DM)을 구할 수 있으며, 그 정의는 식(1)과 같다.

$$DM = 1 - \frac{\text{수식효소의 미수식 } NH_2 \text{ 기 수}}{\text{미수식효소의 총 } NH_2 \text{ 기 수}} \quad (1)$$

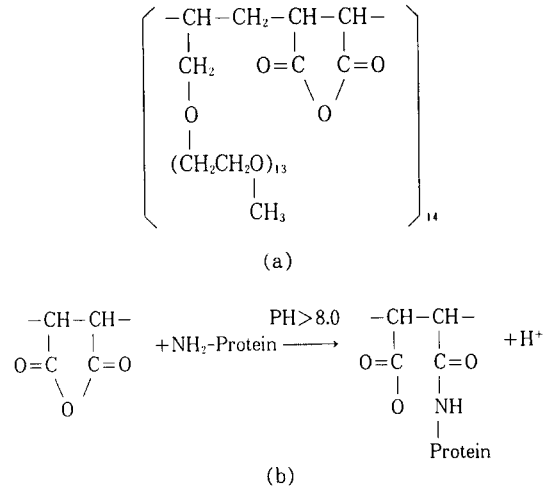


Fig. 1. Structure of the copolymer modifier (a) and reaction of cellulase modification with maleic acid anhydride (b).

수식셀룰라아제의 활성도의 단위(activity unit)는 FPase 활성도로 나타내었다. 표준 당화기질로서는 여과지 FP-5C(Toyo Roshi Ltd. Japan)를 사용하였으며 50°C, pH 5.0에서 1분동안에 1μmol의 생성환원당을 생산하는 효소량을 1 unit로 정의하였으며, 환원당농도 측정은 dinitro salicylic acid 발색(DNS)법을 사용하였다(12).

당화반응

당화반응에 사용된 기질은 건식 폐사무용지로서 0.4M 아세트산 완충용액과 섞어 mixer로 3분간 분쇄한 후, 적당한 농도의 기질과 효소를 첨가하여 당화반응에 사용하였다. 당화반응장치는 회분식이며, Water shaker를 사용하였으며, 반응조건은 200 rpm, 50°C, pH 5.0으로 하였다. Sample은 2시간 간격으로 250mL 반응액 중 약 2mL를 추출해, 원심분리하여 상등액을 취하였다.

속도론적 해석

효소의 실활을 고려한 반응에 있어서 반응 도중 효소는 비활성의 기질에 강력하게 흡착된 후 겉보기 실활을 하거나 반응도중에 높은 반응온도와 같은 외부요인에 의해 변성되어 실활된다.

본 실험에서의 가정은 다음과 같다.

- ① 기질은 균일한 성질을 가지는 단일물질이다.
- ② 효소와 기질, 생성물은 중간활성체(ES, EP)를

형성한다.

- ③ 중간활성체는 pseudo steady state hypothesis (PSSH)가 적용된다.
- ④ 일부 중간활성체는 외부요인(온도, pH 등)에 의해 자체적으로 실패된다(D₁).
- ⑤ 일부 효소와 기질은 강한 흡착에 의해 deactivation 복합체(D₂)를 형성한다.
- ⑥ EP와 ES의 농도는 초기기질농도([S₀])에 비해 무시할 만하다.
([S₀]-[EP]-[ES]≈[S₀])

위의 가정으로부터 다음과 같은 반응식이 얻어진다.



식 (2)~식 (6)으로부터 생성물속도식을 유도하면 다음과 같다.

$$r_p = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0] - [P]K_5}{K_1 + [S] + [P]\frac{K_1}{K_3}} [S] \tag{7}$$

여기서, $K_1 = \frac{k_{-1} + k_2 + k_4}{k_1}$, $K_5 = \frac{k_4 + K_1 k_5}{k_2}$,

$$K_3 = \frac{k_{-3}}{k_3}$$

식 (7)에서 초기조건 [S]=[S₀], [P]=0을 대입하여 역수를 취한 1/[S₀]와 1/r_{p,0}의 관계를 식(8)에 나타내었다.

$$\frac{1}{r_{p,0}} = \frac{K_1}{k_2[E_0]} \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{k_2[E_0]} \tag{8}$$

반응식으로부터 생성물농도와 시간, 효소농도와 시간의 상관관계식을 식 (9), (10)에 각각 나타내었다.

$$\frac{A}{K_5} \ln \frac{[E_0]}{[E_0] - [P]K_5} + \frac{B}{1+K_5} \ln \frac{[S_0]}{[S_0] - [P](1+K_5)} = k_2 t \tag{9}$$

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} - \ln \frac{[E]\beta + [S_0] - [E_0]\beta}{[S_0]} = -k_2 t \left(-\frac{k_2 K_5}{A' K_1} \right) \tag{10}$$

여기서 $A = \frac{[E_0]K - \sigma K_5}{(1+K_5)[E_0] - [S_0]K_5}$

$$B = \frac{\sigma(1+K_5) - [S_0]K}{(1+K_5)[E_0] - [S_0]K_5}$$

$$A' = \frac{1}{[S_0] - [E_0]\beta} \quad K = 1 + K_5 - \frac{K_1}{K_3}$$

$$\alpha = K_1 + [S_0], \quad \beta = 1 + \frac{1}{K_5}$$

K₁, k₂, K₃, K₅의 값을 알면, 식 (9), (10)으로부터 반응시간에 따른 효소 및 생성물의 농도를 계산할 수 있다. 식 (8)에서 1/r_{p,0}를 1/[S₀]에 대해서 lineweaver-burk plot한 후, 기울기와 절편으로부터 k₂, K₁을 구할 수 있다. 또한, K₃, K₅는 nonlinear simplex algorithm(13)에 의해 계산치와 실험치의 차이의 최소자승법으로부터 구하며, 초기 예측값(initial guess value)인 K₃는 생성물 방해 모델에서 구한 값으로 하고(14), K₅는 0.1로 하였다.

결과 및 고찰

수식셀룰라아제의 수식률 및 활성도

셀룰라아제의 공중합고분자 수식반응에 의한 수식셀룰라아제의 활성유지정도를 고찰하기 위하여 수식

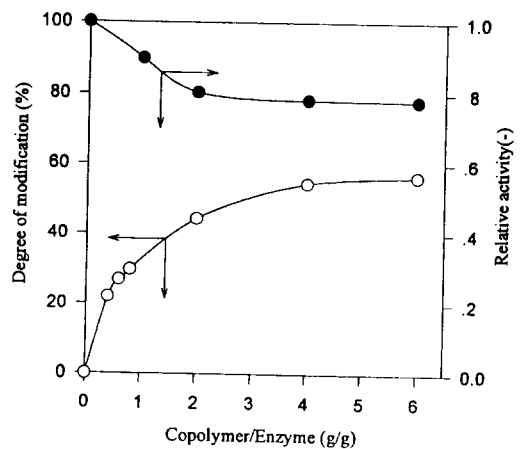


Fig. 2. Degree of modification and relative activity achieved vs. weight ratio of copolymer modifier to cellulase. Control value : cellulase 1g/L.

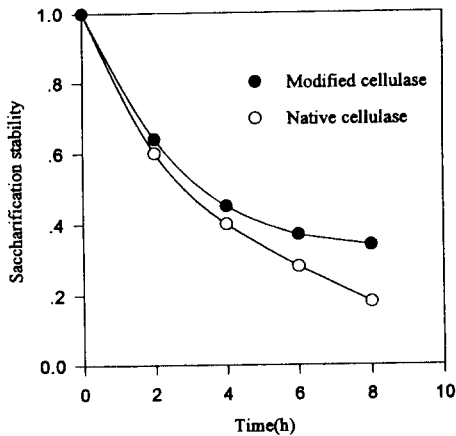


Fig. 3. Relationship between stability of saccharification and time. Control values: cellulase, 1g/L; substrate, 10g/L; 200rpm; temperature, 55°C; pH, 5.0.

셀룰라아제의 수식물에 대한 활성도의 변화를 실험하였다. 셀룰라아제 수식반응에 있어서 효소량에 대한 수식제 고분자의 질량비에 대한 상대 활성과 수식물의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 상대활성도는 미수식셀룰라아제 활성에 대한 수식셀룰라아제의 활성의 비로 정의하였다. 질량비가 증가함에 따라 상대 활성도는 완만히 감소하였으며, 수식물은 증가하였다. 질량비 4 부근에서 최대수식물(약 55%)을 가졌으며, 이 때 효소활성은 75% 이상을 유지하였다. 효소에 대한 고분자 수식제의 수식반응에서 효소의 구조적인 형태에 의하여 외부에 있는 NH₂기와 반응을 끝낸 포화상태라고 사료된다. 따라서 공중합 고분자에 의한 셀룰라아제의 수식반응은 현저한 효소실활을 일으키지 않고 수식셀룰라아제를 제조할 수 있었다. 본 실험에서는 최대 수식비인 질량비 4로 수식한 수식 효소를 사용하였다.

당화반응 안정성

당화반응 안정성(stability)은 (특정 반응시간의 환원당 생성속도)/(초기 환원당 생성속도)로 정의되며, 효소의 활성도가 반응이 진행됨에 따라, 어느 정도 유지되는지를 표시하는 척도이다. 따라서 당화반응 안정성이 클수록 효소의 환원당 생성량속도의 감소율은 완만하며, 최종 당전환율도 높게 된다. 당화반응 안정성의 시간 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 수식 및 미수식효소의 당화반응속도의 안정성은 반

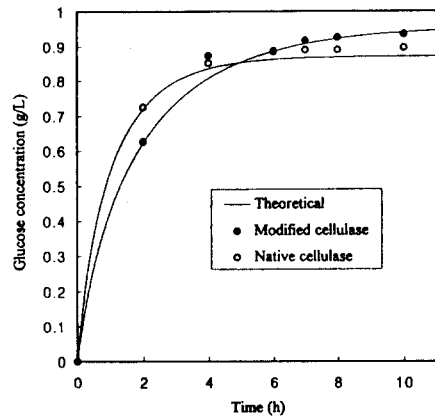


Fig. 4. The concentration of produced glucose vs. reaction time Control value : substrate, 1g/L; cellulase, DM, 55%; 200rpm; temperature, 55°C; pH, 5.0.

응시간에 따라 급격히 감소한다. 그러나 수식효소의 반응속도 안정성이 미수식효소보다 높게 유지됨을 알 수 있다. 효소반응이 진행됨에 따라 생성물 농도 증가에 따른 효소활동의 저해, 효소와 기질의 강한 흡착에 따른 효소활동의 저해에 의하여 당화반응 속도가 감소하는 것으로 사료된다. 수식셀룰라아제는 POE수식고분자에 의해 고분자화되고, POE수식고분자의 친수성환경에 의해 기질과의 강한 흡착을 이완하여 표면 개질이 발생함으로 미수식셀룰라아제보다 높은 반응속도안정성을 나타낸 것으로 사료된다.

당화반응 실험치와 계산치와의 비교

당화반응의 실험치와 이를 기초로 하여 상수값들로부터 구한 생성당농도의 모사그래프의 비교를 통하여 실험조건이 알맞게 가정되었는가를 확인한다. 반응시간에 따른 생성 환원당의 농도를 Fig. 4에 나타내었다. 반응초기에는 수식셀룰라아제의 낮은 초기활성에 의하여 미수식효소의 환원당 생성량이 높았으나, 5시간 후 수식효소의 당생성량이 미수식효소의 경우보다 높았다. 평형을 이룬 10시간 후 수식효소의 환원당농도가 약 8% 더 높았다. 수식효소와 미수식효소의 이론적인 생성환원당을 계산하기 위하여 당화반응 속도론적 해석에 필요한 반응상수값들을 Table 1에 나타내었다.

k_2, K , 상수값을 구하기 위한 반응조건은 $[E_0] = 1g/L, [S_0] = 1, 5, 10, 15g/L$ 이다. 당화반응시간을 20분간격으로 60분까지 실험한 결과 시간에 따

Table 1. Evaluation of Kinetic Parameters.

		K_1	K_2	K_3	K_4
Enzyme	Initial guess value			0.598	0.1
	Calculated value	35.863	4.039	1.027	0.148
Modified Enzyme	Initial guess value			0.613	0.1
	Calculated value	18.841	1.473	0.710	0.043

Control value : calculated value K_1, k_2 ; $[E_0]=1\text{g/L}$, $[S_0]=1, 5, 10, 15\text{g/L}$, initial guess value K_3 ; $[E_0]=3\text{g/L}$, $[S_0]=20\text{g/L}$, initial guess value K_5 ; 0.1.

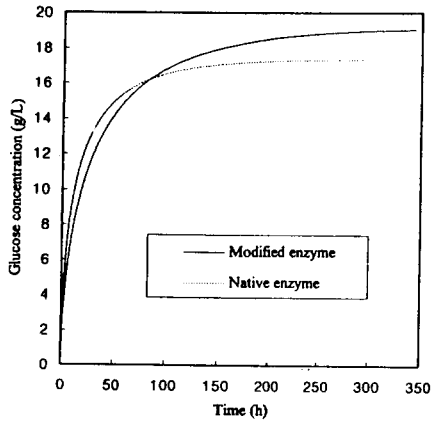


Fig. 5. The calculated concentration of produced glucose vs. time Control value : substrate, 20g/L ; cellulase, 5g/L, DM, 55%.

른 당생성능도는 직선적으로 증가하였다. 60분에서의 수식효소와 미수식효소의 당생성속도는 기질 1, 5, 10, 15g/L에 대하여 각각 0.0743, 0.309, 0.511, 0.653g/(L·hr)과 0.109, 0.492, 0.881, 1.19g/(L·hr)였다. $1/[r_p]$ 와 $1/[S_0]$ 의 lineweaver-burk plot에 의한 k_2, K_1 값을 구할 수 있었다. 또한 K_3 의 초기 예측값(initial guess value)의 반응조건은 $[S_0] = 20\text{g/L}$, $[E_0] = 3\text{g/L}$ 일 때 매 2시간당 당화반응 농도로부터 $1/[P]$ 를 $1/([P] \cdot \ln([S_0] - [P])/[S_0])$ 에 대해 그린 후 직선의 기울기와 절편으로부터 생성물 방해모델의 K_1 의 값을 얻어 이 값을 K_3 로 사용하였다. 또한 K_5 의 초기예측값은 임의로 0.1로 해주었다. K_5, K_3 는 최소자승법을 이용한 nonlinear simplex algorithm에 의해 초기값을 설정해 주고난

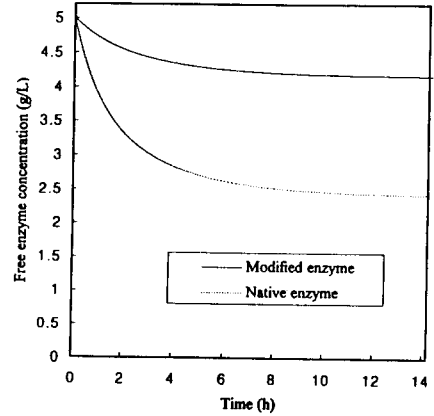


Fig. 6. The calculated concentration of free enzyme vs. time Control value : substrate, 20g/L ; cellulase, 5g/L, DM, 55%.

후반복계산을 통해 구하였다.

일부 효소는 기질과의 강한 흡착과 외부요인에 의해 자체적으로 실활하는 가설에 나타내는 식 (5), (6)의 반응상수 k_4, k_5 는 K_1 과 K_3 에 포함되어 있다. k_4, k_5 가 증가할수록 K_1 과 K_3 가 증가함은 식 (7)로부터 고찰할 수 있다. 실험을 통해서 구한 수식셀룰라아제의 K_1, K_3 값이 미수식셀룰라아제보다 작음으로부터, 수식셀룰라아제의 경우 반응상수 k_4, k_5 가 감소함을 유추할 수 있다. 이는 POE고분자 수식셀룰라아제를 이용함으로써 기질과의 강한 흡착에 의한 실활을 완회시킬 수 있고 외부요인에 대해서도 자체적으로 실활하는 중간활성체의 비율이 줄어들 것이라고 사료된다. 이로써 실험을 통해서 구한 상수값들로부터 반응시간에 따른 효소 및 생성당의 농도를 모사할 수 있다.

환원당 생성 및 유리효소량 모사

위에서 구한 상수값들로부터 반응시간에 따른 생성환원당 농도 및 유리효소농도를 식 (9)와 식 (10)을 사용하여 모사하여 Fig. 5와 Fig. 6에 각각 나타내었다. 환원당생성 모사에 있어서 수식효소의 당생성량이 반응초기에는 미수식셀룰라아제의 경우보다 낮았지만 약 80시간 후 미수식효소의 당생성량이 증가하였으며 최종 당전환율이 수식효소 95.5%, 미수식효소 87.5%로 약 8%의 차이를 보였다(Fig. 5). 강한 흡착에 의한 효소의 활동성저하를 고찰하기 위하여 당화활동상태에 있다고 사료되는 유리효소농도 모사를 행하였다(Fig. 6). 유리효소(free

enzyme)량은 시간에 따라 감소하였으나, 전 시간에 걸쳐 수식효소의 유리효소량이 미수식효소의 경우보다 더 많았다. 또한, 최종 정상상태 활동효소 농도가 수식효소의 경우 약 4.2g/L로 약 16%의 감소를 보인 반면에, 미수식효소의 경우 2.4g/L로 약 50%의 효소가 기질에의 강한 흡착상태를 보였다. 효소의 기질과의 강한 흡착에 의한 유리효소량의 감소는 당화반응속도에 영향을 미치며 궁극적으로 높은 유리효소량을 나타내는 수식셀룰라아제가 높은 당전화율을 나타내는 것으로 기대된다.

요 약

셀룰라아제, polyoxyethylene 유도체와 maleic acid anhydride의 공중합고분자로 중합한 수식셀룰라아제를 제조하고, 당화 특성과 효소 반응 속도론 등을 검토하였다. 수식 반응에서, 공중합고분자-효소 질량비가 증가함에 따라 수식효소는 증가하며, 질량비 4 이상에서는 수식효소가 일정하였다. 이 때 최대수식효소는 55%이며 최대수식효소의 수식셀룰라아제는 75%의 높은 효소활성을 나타내었다. 수식효소와 미수식효소의 당화 실험에서, 수식효소가 전 반응시간에 걸쳐 미수식효소보다 높은 당화반응안정성을 유지하였으며, 그로 인해 최종 전화율은 수식효소가 더 큰 값을 가졌다. 기질에의 강한 흡착으로 인한 효소 deactivation을 고려한 반응식을 적용한 결과, 생성환원당농도의 실험값과 계산치는 잘 일치하였다. 그로부터 반응속도상수를 구하고 생성환원당농도와 유리효소농도의 모사그래프를 구할 수 있었으며, 반응시간에 따른 유리효소의 농도를 수치모사한 결과, 미수식효소에 비해 수식효소의 유리효소 농도가 더 높았고 그로 인해 더 높은 당전화율을 나타내었다.

감 사

본 연구는 1995년 교육부의 학술연구조성비 생물화학공학분야 과제의 일부로서 수행되었으며 교육부의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. P. Dwivedi and T. K. Ghose(1979), *J. of Ferment. Tech.*, **57**(1), 15.
2. G. Beldman(1987), *Biotech. Bioeng.*, **30**, 251.
3. C. R. Wilke and R. D. Yarg(1987), *Biotech. Bioeng.*, **29**, 163.
4. M. D. Kim and D. W. Zabriskie(1987), *Biotech. Bioeng.*, **29**, 1086.
5. T. Kajiuchi and Jin-Won Park(1991), *J. of Chem. Eng.*, **25**(2), 202.
6. K. Suga, G. Van Dedem, and Moo-young M. (1975), *Biotech. Bioeng.*, **17**, 433.
7. S. B. Lee, C. M. Watteeuw, and A. E. Humphrey(1978), *Biotech. Bioeng.*, **20**, 141.
8. N. Petterson and E. W. Rose(1979), *Biotech. Bioeng.*, **21**, 997.
9. D. D. Y. Ryu(1982), *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1047.
10. J. A. Howell and M. Mangat(1978), *Biotech. Bioeng.*, **20**, 847.
11. A. F. S. F. Habeeb(1966), *Anal. Biochem.*, **14**, 328.
12. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
13. D. C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, 2nd ed., 674, Freeman.
14. I. H. Segel(1975), *Enzyme Kinetics*, Chap. 3, 100, Wiley, New York.