

Cellulose Hydrolysis by Cellulase

Cellulosic Bioethanol

리그노셀룰로오스로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법은 셀룰루로스법과 가스합성법이 있는데, 셀룰루로스법은 전처리된 리그노셀룰로오스 재료를 발효 정제한 후 하이드로시스를 통해 처리하는 방법이다. 이에 반해 가스화를 통한 방법은 리그노셀룰로오스 재료를 가스화된 카본모노사이드와 하이드로젠으로 분해전환한 뒤 이 가스를 발효 혹은 화학적 촉매를 통해 에탄올로 만드는 방법이다.

그런데 문제가 되는 것은 리그노셀룰로오스의 경우 미생물발효에 사용될 당 모노머를 추출해내는 공정이 매우 많은 처리를 요구한다는 단점을 가지고 있다. 이에 따라 손쉽게 바이오 에너지로 전환하는 방법으로 가스액화공정이 일찍부터 개발되었는데, 그 중에서도 가장 잘 알려진 것은 Fisher-Tropsch 공정이라고 할 수 있다. 피터-트롭스 공정에서는 일산화탄소와 수소가 혼합된 혼합가스를 만들어낸 뒤, 이를 다시 액상의 하이드로카본 연료로 전환하는 과정을 거치게 된다.

Lignocellulose

리그노셀룰루스의 세포는 cellulose, hemicellulose, 그리고 lignin로 구성되어 있으며, 식물세포벽은 다양한 기능을 수행하는 다양한 구성부분들의 복잡하고 역동적인 혼합물이다. 그리고 식물세포의 대부분은 폴리사카라이드(셀룰루스와 헤미셀룰루스)의 형태를 취하며, 그 나머지는 phenylpropane 빌딩블록인 리그닌이 차지하며, 이들 구성성분이 차지하는 중량비율은 셀룰루스가 40-60%, 헤미셀룰루스가 20-40%, 리그닌은 10-25%를 구성한다. 셀룰루스는 길다란 베타글루코스 모노머가 미세섬유다발로 뭉쳐져 있으며 헤미셀룰루스는 xyloglucan이나 xylan으로 구성되어 있고, 수소를 통해 셀룰루스 섬유다발과 연결되어 있다. 리그닌은 p-coumaryl, coniferyl, 그리고 synapyl alcohols가 식물종마다 상이한 비율로 구성되어 있는 페놀계 모노머이다.

Hydrolysis

(1) 가수분해 공정

가수분해(Hydrolysis) 공정은 셀룰루스 분자체인을 분해하여 당으로 전환하는 공정을 지칭하는데 산(acid)을 사용한 방법과 효소를 사용한 방법으로 나뉜다. 화학적 방법은 19세기에 개발되었는데 산을 통해 셀룰루스를 분해하는 것이다. 증류애시드는 높은 온도와 압력하에서 작용하게 되는데 농축된 산을 사용할 경우 대기압 수준에서 비교적 낮은 온도에서도 처리가 가능하다.

그러나 앞서 언급했듯이 하이드로시스 공정을 통해 분해된 분해물은 물과 접촉하여 당분자로 전환되게 되는데 이후 중성화 과정을 거친 다음 효모를 활용한 발효 공정을 거쳐 에탄올로 전환되게 된다. 증류산을 사용한 하이드로시스공정의 경우 이 공정이 갖는 혹독한 조건으로 인해 독성을 가진 분해물이 만들어지게 되어 발효공정을 어렵게 만든다.

Chemical Hydrolysis

(2) 화학적 가수분해법

산을 이용한 가수분해 과정은 0.7%의 황산을 섞어 190도에서 반응시켜 일차적으로 당과 Pentose를 추출한 뒤, 2차에서는 0.4%의 황산을 섞어 210도의 조건에서 반응시켜 좀 더 본격적으로 당을 추출해내게 된다. 이러한 공정을 거치게 될 경우 Mannose 89%, Galactose 82%, Glucose 50%를 얻을 수 있게 된다).

이와는 달리 농축된 황산을 사용할 경우에는 섞어 40도 정도의 조건에서 반응시켜 90% 이상의 글루코스를 추출해 낼 수 있으나 2-6시간 이상의 반응시간이 필요하다. 그러나 이러한 공정의 문제점은 Hexose와 Pentose의 분해를 통해 만들어지는 발효저해물의 존재이다. 발효저해물로는 당으로부터 만들어지는 HMF(Hydroxyfurfural)와 xylose로부터 만들어지는 furfural, 그리고 황산이 있다. 이러한 문제를 해결하는 방법은 분리추출해서 제거하는 방법과 정제 후 고부가 부산물로 결합생산물을 만들어 내는 것이다.

Enzyme Hydrolysis

(3) 효소 가수분해법

효소를 통한 하이드로시스공정은 셀룰라제 효소를 사용하여 셀룰로스체인을 글루코제로 전환시키는 방법을 사용한다. 이러한 반응은 소나 양과 같은 반추동물의 위장 내에서 체온 정도의 온도 하에서 반응이 일어나게 되는데, 반응공정의 각 단계마다 다양한 효소들을 사용하게 된다. 이때 작용하는 주요 효소들로는 endoglucanase, exoglucanase, 베타-glucosidase 등이 있으며 이들 효소작용제들이 시너지 현상을 일으키며 가수분해를 통한 당화가 이루어진다.

Cellulase

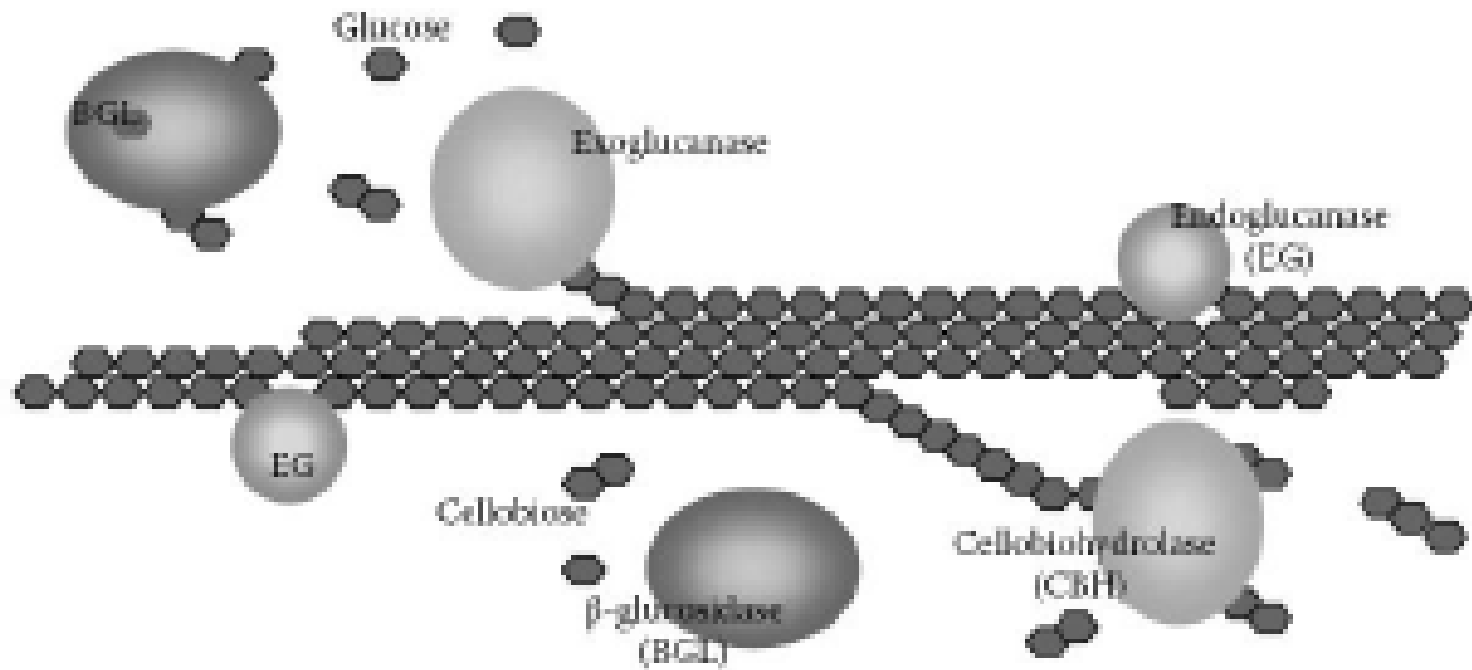
셀룰라제 효소는 오래전부터 생산되어 왔는데, 특히 1980년대 이후 눈부신 기술 발전이 이루어졌다. 그 결과 1972~1984년 사이에만 매 2년마다 그 생산량이 2배씩 늘어왔으며 생산단가는 1980년대 동안 약 10배 이상 절감되었다. 하지만 전분의 당화에 사용되는 Amylase에 비하면 5배 이상의 높은 가격을 형성하고 있으며 효소 비용이 에탄올 생산 총비용 중 30% 이상을 차지하고 있다.

Genencore, Iogen, Novozyme, Rhom 등 많은 기업들이 효소를 사용한 셀룰루우스 생산기술의 발전을 위해 노력해 왔는데, 그 핵심은 효소생산 미생물의 대사설계를 최적화하는 방법이 사용되고 있다. 이와 관련된 대표적인 사례를 본다면, 캐나다의 회사인 Iogen Corporation은 특별하게 설계된 엔자임을 공급하고 있다. 이 효소는 *Trichoderma reesei*으로부터 만들어지는데, 최근 들어서 이들 변종인 Rut-C30, RL-P37 and MCG-80로부터 셀룰라제 효소가 개발되고 있다. 또 다른 효소 전문 회사인 Dyadic International, Inc. (AMEX: DIL) 역시 균주류의 유전자 조작을 통해 cellulase, xylanase, hemicellulase를 생산하고 있다. 이와 유사한 회사로 Diversa가 바이오에탄올 생산에 전적으로 전념하기 위해 만든 Verenum Corporation (NASDAQ: VRNM)는 효소생산과 동시에 바이오에탄올 시범공장을 건설, 운영 중에 있다.

Endoglucanase (EG), Cellodextrinase, Cellobiohydrolas (CBH), beta-Glucosidae(BG)

Endoglucanase: 선형의 셀룰루스 체인을 분쇄하고 작용점에 대한 반응을 통해 거대분자 셀룰루스의 폴리머라이제이션 정도를 낮추는 작용, Cellodextrinase: 셀룰루스 폴리머의 연결말단을 공격해서 글루코세를 릴리즈하는 작용, Cellobiohydrolase: 셀룰루스 폴리머의 연결말단을 공격하여 polyglucan 체인과 Disaccharide Cellobiose를 방출, 베타 Glucosidase: 수용secellodextrin셀룰젠수분해와 cellobiose를 글루코세로 전환시키는 작용 등이 그것이다. 이외에도 리그닌을 확장하거나 부풀어 오르게 하거나 (swollen, expansin) 혹은 리그닌을 산화(Peroxidase, Lacase)함으로써 가수분해를 촉진시켜주는 역할을 수행하기도 한다.

Cellulase structure



현재 균주류에서 추출한 효소가 주로 이용되고 있으며 *Trichoderma reesei*이 주로 연구개발되고 있는데, 이 균주로부터 추출한 효소는 2가지 종류의 CBH (CBH1, CBH2), 8개의 EG (EG1-EG8), 7개의 베타-글루코시다제로 구성되어 있다. 특히 셀룰라제 효소의 효율을 높이기 위한 전략으로는 CBH-EG-BG간의 적절한 비율을 맞추는 것이 중요하다. 특히 CBH-EG는 서로가 시너지 효과를 일으키며 동시작용을 하는 반면에 BG는 방해물의 제거와 관련된 역할을 하게 된다. 특히 BG의 효율을 높이는 것이 중요한데 노보자임사의 *Cullucast*에 *Aspergillus oryzae* BG를 접합시키는 방식으로 그렇지 않은 경우에 비해 절반의 효소로 동일한 수율을 달성할 수 있음이 밝혀졌다.

Hemicellulase

Pentose, hexose를 통합해서 헤미셀룰루스라고 부르는데 헤미셀룰루스를 분해할 수 있는 효소는 해양 박테리아, 효모와 균주, 포유류의 박테리아나 protozoa, algae, 나무분해 곤충 등이 있다. 대부분의 헤미셀룰루스 분해미생물은 그 유전자내에 아주 다양한 헤미셀룰루스 분해효소를 포함하고 있는데, 그 한 사례로 *Bacillus subtilis*의 경우는 최소 16개의 효소를 가지고 있다. 아래의 표는 주요 헤미셀룰루라제와 작용지점, 그리고 관련된 생산물을 요약한 내용이다.

Major hemicellulase (Next slide)

위의 표에서 볼 수 있듯이 헤미셀룰루스 효소 중 endoxylanase는 xylan을 분해하고 xylosidase는 xylan oligosaccharide를 xylose로 분해하며, glucuronidase, arabinofuranosidase, acetylsterase에 의한 주변연결망의 제거작용 등이 포함된다.

Major Hemicellulases, Their Enzymic Sites of Action and Their Products

Hemicellulase	EC number	Site(s) of action	Released products
Xylanases:			
Endo- β -1,4-xylanase	3.2.1.8	Internal β -1,4-linkages in xylans, L-arabino-D-xylans etc.	Xylose, xylobiose, xylan oligomers, xylan-arabinan oligomers, etc.
Exo- β -1,4-xylosidase	3.2.1.37	External β -1,4-linkages in xylan oligomers, etc.	Xylose
Arabinanases:			
Endoarabinanase	3.2.1.59	Internal α -1,5- and/or α -1,3-linkages in arabinans	Arabinose
α -L-arabinofuranosidase	3.2.1.55	Side chain α -1,2- and/or α -1,3-linkages in xyloarabinans and external α -1,5 linkages in arabinans	Arabinose, xylan oligomers
Mannanases:			
Endo- β -1,4-mannanase	3.2.1.78	Internal β -1,4-linkages in mannans, galactomannans, and glucomannans	Mannose, mannan oligomers, etc.
Exo- β -1,4-mannosidase	3.2.1.25	External β -1,4-linkages in mannan oligomers	Mannose
Galactanases:			
Endo- β -1,4-galactanase	3.2.1.89	Internal β -1,4-linkages in galactans and arabinogalactans	Galactose, galactan oligomers, etc.
α -galactosidase	3.2.1.25	Side chain α -1,6-linkages in galactomannan oligomers	Galactose, mannan oligomers
Other:			
β -glucosidase	3.2.1.21	External β -1,4-linkages in glucomannan oligomers	Glucose, mannan oligomers
α -glucuronidase	3.2.1.139	Side chain 4-O-methyl- α -1,2-linkages in glucuronoxylans	Galactose, mannan oligomers
Esterases:			
Acetyl esterase	3.2.1.6	2- or 3-O acetyl groups on mannan and xylose	Acetic acid, mannose, xylose
Arylesterase	3.2.1.2	3-O-furanyl/coumaryl- α -L-arabinofuranose side chains	Ferulic, coumaric acids, arabinoxylans

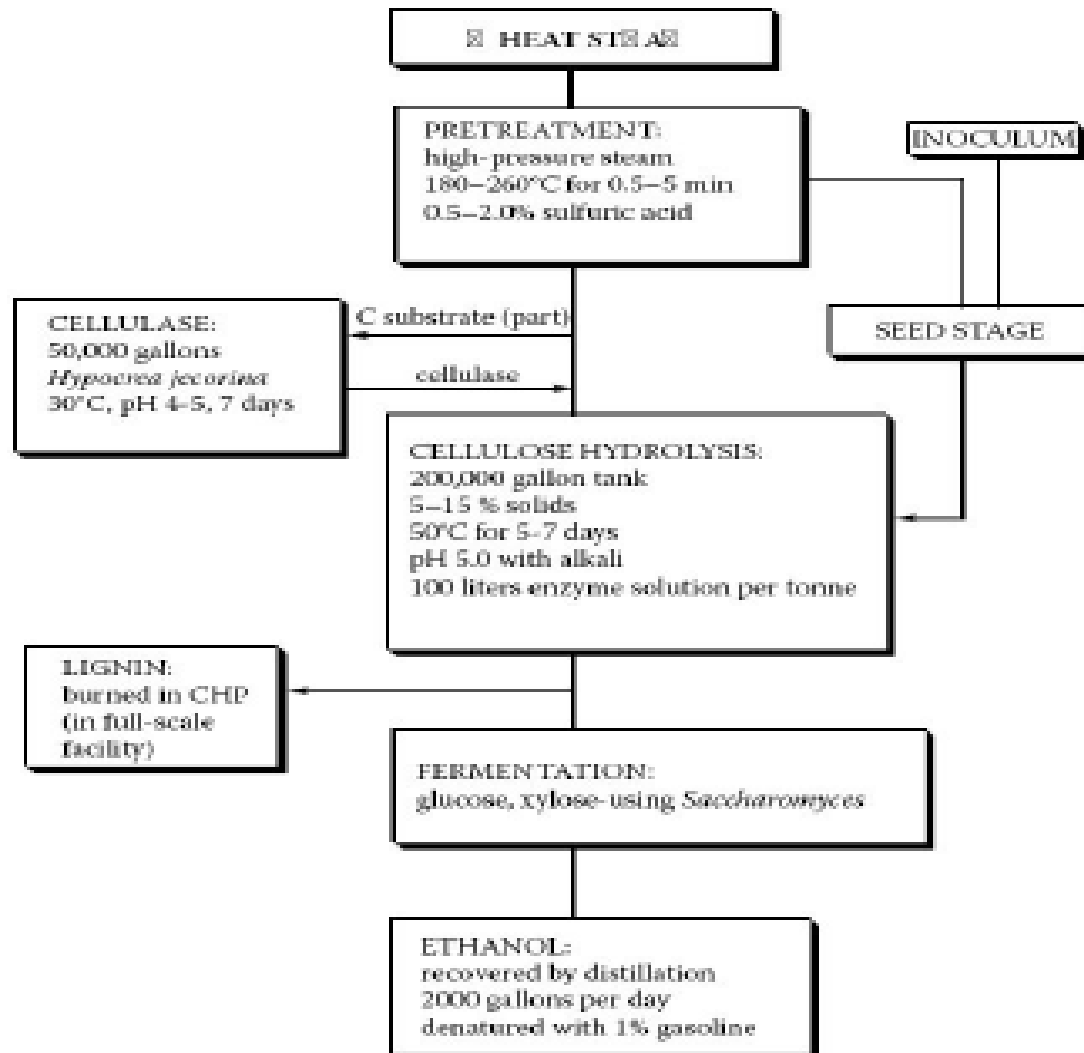
셀룰루스와는 달리 헤미셀룰루스는 이질다당류로 (heteropolysaccharide)서 다양한 carbohydrate 모노머로 구성되어 있다. 헤미셀룰루스는 모노머를 연결하는 화학적 접합체의 종류가 제한적이나 그 구조가 다양해서 엄청난 다양성을 가지고 있다. 가장 흔한 헤미셀룰루스는 Xylan인데, 이외에도 아주 다양한 구성물을 포함하고 있어서 헤미셀룰루스의 분해를 위해서는 다양한 효소들의 종합적 작용을 필요로 한다.

헤미셀룰루스 효소제는 Endo-, Exo-, Side chain 균열 효소, acetyl esterase와 리그닌의 글루코스 본드를 분해하는 esterase 등과 같은 보조효소로 구분될 수 있고, 식료품, 사료, 종이, 펄프 등 다양한 제품을 만들기 위한 중간재물 선택적으로 추출, 성분을 강화하기 위한 목적으로 사용되어 왔다.

Lignin

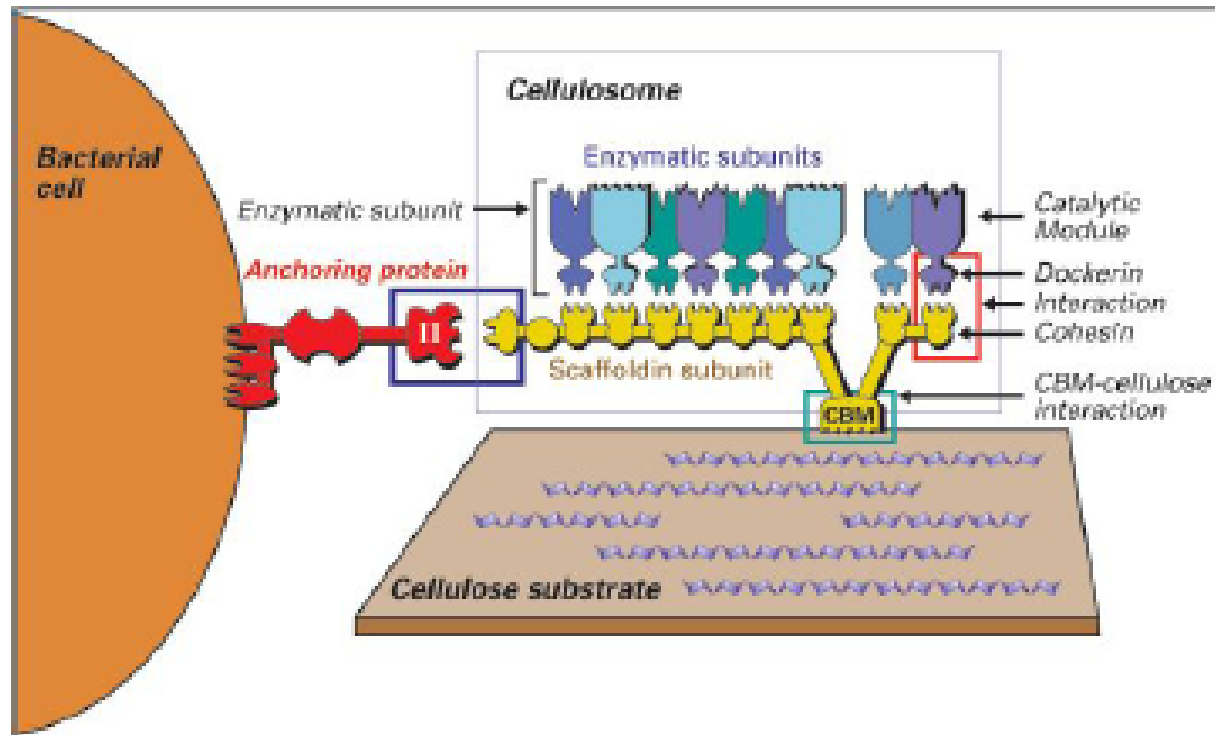
셀룰라제는 대부분 리그닌에 의해 흡수되는데, 이러한 이유로 셀룰루스 분해효능이 시간이 지남에 따라 떨어지게 된다. 특히 증기처리를 통한 전처리가 이루어질 경우 셀룰라제가 리그닌에 접촉되는 정도가 대단히 높아지는데, 이러한 방해 작용의 생산성 감소효과에 비해 리그닌의 제거와 관련된 효소에 대한 연구는 상대적으로 적은 것이 사실이다. Laccase는 탄소와 탄소, 탄소와 에테르간의 연결에 균열을 일으켜서 셀룰라제의 셀룰루스 접촉을 확장시킨다. 또한 Peroxidase 역시 리그닌 분해효과가 탁월하다.

Iogen cellulase process



Cellulosome

셀룰로솜이란 extracellular supramolecular machine으로서 크리스탈라인 셀룰루스와 폴리사카라이드를 분해할 수 있는 몇몇 혐기성 미생물의 합성체이다. 각각의 셀룰로솜은 몇 가지 다른 상보적 carbohydrate 활성효소를 포함하게 되는데, 셀룰라제, 헤미셀룰라제, 카보하이드레이트 esterase등이 단백질 구조체에 의해 단일하게 구조화된 것이다(88).



셀룰라제 복합체인 셀룰루좀은 에너지원이 부족하지 않은 열악한 상황에서 최소한의 바이오매스 에너지원으로 최대한의 대사에너지를 만들어 내야 하는 혐기성 세균의 특이적 환경 적응 현상으로 생성된 것으로 생존에 직접적으로 관련된 미생물의 성장, 대사 및 발달에 매우 중요한 효소이다. 이는 또한 세균이 가지고 있는 고도로 발달한 조절원리 (regulatory mechanism)로 가장 필요한 시기에 가장 효과적인 셀룰라제와 헤미셀룰라제 효소 소단위체 (enzyme subunits)를 조합해 목표하는 섬유소 탄소 에너지를 공격하는 매우 중요한 미생물의 성장 전략 중의 하나이다. 하지만 셀룰루좀 머신을 개발하는 것은 아주 많은 부분이 미지의 영역으로 남아있기에 (개별 효소의 성능은 물론이고 혼합된 효소들 간의 시너지 작용 여부, 그리고 효소의 재투입이 없는 자체재생산 역량 등등과 관련해서) 앞으로도 집중적인 연구개발이 필요한 부분이기도 하며 기회가 그만큼 많은 영역이기도 하다.

Enzyme Immobilization

최근 들어 나노기술의 고유한 특성인 부피대 표면적의 장점과 나노입자의 확산력을 활용하려는 시도가 광범위하게 진행되고 있는데, 특히 diatom이나 해양 sponge와 같은 사례에서 볼 수 있듯이 단백질을 이용한 단단한 구조체 형성 프로세스를 모사한 펩타이드-실리카 다공체 기술이 인기를 모으고 있다. 가장 최근의 연구개발 동향과 관련해서는 주로 biomimetic mineralization 기술을 응용하여 생물학적 템플릿 혹은 화학적 템플릿을 이용해서 비유기산화물을 만드는 방법으로 이루어진다. 그런데 효소는 그 본질상 수용성을 가진다. 그런데 만약 효소의 수용성을 제거할 수 있다면 부산물과의 혼합, 분리정제의 어려움, 약한 안정성과 같은 문제를 쉽게 해결할 수 있을 것이다. 이러한 이유로 어떤 단백질 원료를 쓰느냐에 따라 친수성, 소수성이 나타날 수 있고, 이러한 특성으로 인해 효소작용의 효율이 변화하게 된다. 또한 대개의 효소고정기술이나 인트랩먼트 기술의 경우 효소 구조의 변형을 가져와서 궁극적으로 수율에 영향을 미치게 된다. 대개의 경우 효소고정기술은 covalent binding에 의거해서 기술개발이 이루어져 왔다.