

## 동시당화발효공정에서의 효소 재순환을 위한 최적막 운전조건 확립

김준석, 정용섭\*, 홍석인

고려대학교 화학공학과, 전북대학교 식품공학과\*

### Membrane Operational Strategies for Enzyme Recycling in the Simultaneous Saccharification and Fermentation Process

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

Dept. of Chemical Engineering, Korea University  
Dept. of Food Science and Technology, Chonbuk National University\*

#### 서론

목질계 바이오매스의 주성분인 셀룰로스로부터 에탄올 생산공정에서 당화와 발효공정을 2단계로 분리하여 수행하는 분리당화발효방법 ( SHF ; Separate Hydrolysis Fermentation)의 문제점인 생성당에 의한 효소억제작용은 셀룰로스 당화공정에서의 많은 양의 효소가 필요하게 되어 전체공정의 생산단가를 높이는데 적지 않은 역할을 한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 기질로부터 당화와 발효를 동시에 한 반응조내에서 수행하는 동시당화발효방법( SSF ; Simultaneous Saccharification Fermentation)이 도입되었으며, 발효공정을 극대화하기 위해 사용된 효소와 균체를 재순환시키는 막분리시스템의 적용이 고려되고 있다. 이러한 막분리공정은 일차적으로 사용된 효소를 반응조로 재순환시킴으로써, 효소의 재사용 및 생산된 에탄올로부터 균체에 대한 억제작용을 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

본 실험에서는 당화에 필요한 효소(cellulase,  $\beta$ -glucosidase)를 순환시키기 위하여 막분리시스템을 이용하였으며, 막종류에 따른 투과도, 효소분리정도 및 효소역가 감소여부를 측정하여 SSF 공정에 적용될 최적막 및 최적 운전조건을 도출하고자 하였다.

#### 실험

##### 1. 효소 및 분석

효소는 *Trichoderma viride*의 배양액을 농축한 산업용 효소인 Celluclast 1.5L(Novo Co., Denmark)과  $\beta$ -glucosidase를 강화한 효소인 Novozym 188(Novo Co., Denmark)을 사용하였다. Lowry법으로 분석한 soluble protein 함량은 각각 5.6, 4.5 mg/ml이었다.

효소활성법 측정에 의한 Celluclast의 filter paper activity는 185 IU/ml이었으며 Novozym 188의 효소 활동도는 280 CBU/ml이었다. Soluble protein은 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법으로 측정하였다.

2. 막분리 장치

효소 재순환을 위한 본 실험의 시스템은 Fig.1과 같다. 사용된 펌프는 정량펌프(Weco Co., 한국)이다. 막의 기공크기는 MWCO가 50,000인 미국 Microgon사 제품과 MWCO가 30,000인 주식회사 선정인더스트리 제품으로 증공사막 모듈을 사용하였다. 완충용액을 기준으로 희석시킨 효소용액을 재순환용 저장조와 재순환시키지 않고 온도에 따른 효소역가 측정용 저장조에 같은 농도로 유지시켜 실험중 계속 교반시켰으며, 사용된 막모듈과 온도가 일정하게 유지된 항온조에서 실험을 수행하였다. 제작된 막분리 장치를 사용하여 온도, 압력 및 효소농도를 변화시키면서, 초기시간으로부터 일정시간 30분간격으로 재순환된 효소용액과 순환시키지않은 용액을 각각 일정량씩 취하여 효소역가 감소여부를 측정하였다. 각 실험후에는 초기 PWP(pure water permeability)로 회복될 때까지 back flushing 및 cleaning 작업을 행하였다. 투과플럭스와 배제계수는 다음과 같이 각각 계산하였다.

$$\text{Permeation Flux} = V / A t$$

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

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

C<sub>p</sub>는 permeate에서 효소의 농도를 의미하며, C<sub>f</sub>는 초기 효소농도를 뜻한다.

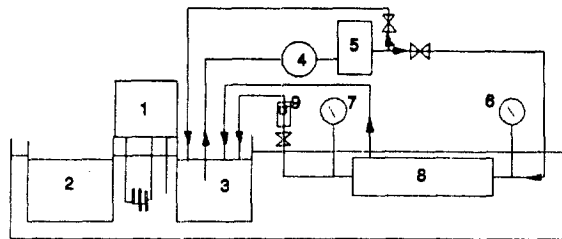


Fig.1 Schmatic diagram of the experimental cross flow filtration unit.

- 1.thermoregulator 2.3.reservoir 4.pump 5.damper
- 6.7.pressure gauge 8.hollow fiber membrane 9.flowmeter

실험결과 및 토론

1. Cellulase

MWCO 50,000인 막모듈을 사용하였을 경우 초기 투입한 효소역가와 항온조에 유지시킨 기준용액에서의 효소역가를 100% 하여 온도, 압력 및 효소농도를 변화하여 효소역가 감소여부를 측정하여 보았다.

온도 30℃, 압력 2.0Kg/cm<sup>2</sup>, 효소 회석배율 400배의 조건하에서 270분간 실험한 결과를 Fig.2에 나타냈다. 270분 동안 막모듈을 통과하여 재순환된 효소의 역가감소는 측정할 수 없었다. 또한 막을 투과하여 나오는 용액의 투과플럭스는 0.483ml/cm<sup>2</sup>min에서 0.475 ml/cm<sup>2</sup>min 이고, 효소역가는 전체기준 7%정도로 측정되었다. 단백질의 경우 초기 투입량 1.25g/L에서 재순환후 저장조에서의 농도는 1.15g/L이었으며 막을 투과하여 나온 평균 단백질의 농도는 0.078g/L이었으며 배제계수 (separation coefficient)는 초기 0.940에서 실험종료시 0.944였다. MWCO 30,000인 막에서는 MWCO 50,000과 같은 조건과 방법을 사용하여 수행했다. 실험한 결과 50,000에서와 같이 효소역가 감소는 측정할 수 없었다. 투과되어 나온 효소역가는 전체의 3%였으며, 막을 투과하는 용액의 투과플럭스는 0.385ml/cm<sup>2</sup>min에서 0.378ml/cm<sup>2</sup>min였다. 단백질의 경우도 초기 1.40g/L 투입후 270분후 재순환된 저장조에서 1.25g/L, 막을 투과한 평균농도는 0.045g/L로 배제계수는 0.961에서 0.968로 측정되었다.

2. β-glucosidase

MWCO 50,000의 경우, 초기투입 효소역가와 항온조에 유지시킨 기준용액의 효소역가를 100%로 하였을때, 온도 30℃, 압력 2.0kg/cm<sup>2</sup>, 효소 회석배율 400배의 조건하에서 실험한 결과 540분후에 재순환된 저장조에서의 효소역가는 32.3% 정도 감소하였다. 막을 투과하는 효소용액의 투과플럭스는 초기 0.449ml/cm<sup>2</sup>min에서 0.444ml/cm<sup>2</sup>min이었고, 효소역가는 전체기준의 6.5%로 측정되었으며 Fig.3에 나타냈다. 단백질농도는 초기 1.13g/L에서 재순환된 저장조에서 0.90g/L이고, 투과된 효소용액에서는 평균 0.055g/L로 배제계수는 0.950에서 0.951이었다.

MWCO 30,000의 경우, 재순환된 효소역가는 37.5%정도 감소하였으며, 막을 통과하는 용액의 투과플럭스는 초기 0.340ml/cm<sup>2</sup>min 에서 0.331 ml/cm<sup>2</sup>min이었다. 단백질의 경우 초기 1.15g/L에서 재순환후 저장조에서 0.944g/L, 투과된 효소용액에서는 평균 0.024g/L로, 배제계수는 0.975에서 0.977이었다.

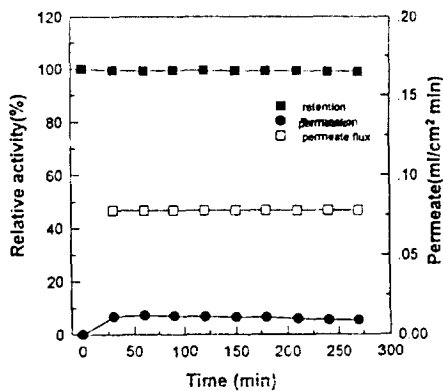


Fig.2 Relative activity on the permeation and retention of enzyme (cellulase) solution through the MWCO 50,000 membrane.

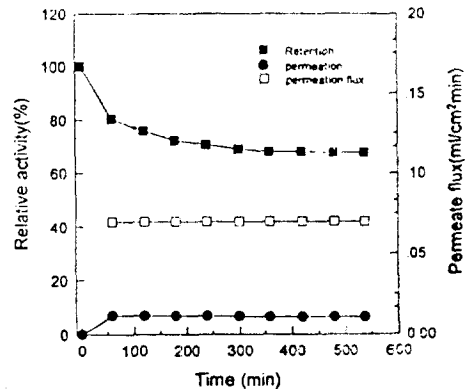


Fig.3 Relative activity on the permeation and retention of enzyme (β-glucosidase) solution through the MWCO 50,000 membrane.

## 3. 막조건 선정

본 실험에서는 cellulase와  $\beta$ -glucosidase에 대해 유효한 MWCO 범위를 갖는 막모듈을 적용시켜 막 통과시의 효소역가 감소여부, 투과플럭스 및 효소에 대한 배제계수를 측정하여 보았다. MWCO 50,000과 30,000 모듈에서 cellulase의 경우 효소의 역가감소는 측정할 수 없었으며, 두가지 막이 효소에 대해 높은 배제율을 나타냈다. 이 결과로부터 cellulase 효소에 대한 막 적용시 전단(shear)에 의한 효소역가 감소는 무시할 수 있음을 확인하였다.  $\beta$ -glucosidase의 경우 두가지 막에서 각각 초기 기준효소에 비해 약 33 및 38% 효소역가가 감소함을 알 수 있었으며,  $\beta$ -glucosidase가 cellulose에 비해 상대적으로 전단에 약함을 알 수 있었다. 그러나 두 막 모두 효소에 대한 높은 배제계수를 유지하였다. 상기 결과로 당화 공정에서의 막모듈을 이용한 효소 재순환시  $\beta$ -glucosidase에 대하여 효소역가 감소량 만큼 효소를 다시 보충해야할 필요성을 확인하였다.

결과적으로 MWCO 50,000과 30,000을 비교할 경우, 두가지 효소에 대하여 MWCO 50,000 막이 MWCO 30,000보다 효소에대한 배제율이 약간 낮기는 하나 상대적으로 높은 투과 플럭스를 유지할 수 있으며, 본격적인 당화공정 수행시 기질의 높은 분자량 및 장시간 조업시 예견되는 막의 오염등을 고려할때, 막모듈을 이용한 효소 재순환공정의 최적 막은 MWCO가 50,000인 막이 적절하다고 판단되었다..

## 참고문헌

1. Spindler D. D., Wyman C. E., Grohmann K., and Philippidis G. P. ; *Biotechnol. Lett.*, 14, 403(1992).
2. Ghose T. K., Roychoudhury P. K., and Ghosh P. ; *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 377(1984).
3. Wright J. D. ; *Chem. Eng. Prog.*, Aug., 62(1988).
4. Ramos L. P., Breuil C., and Saddler J. N. ; *Enzyme Microb. Technol.*, 15, 19(1993).
5. Cheryan M. and Mehaia M. A. ; *Reverse Osmosis and Ultrafiltration.*, 231, American Chemical Society, Washington D.C.(1985)
6. Cheryan M. and Mehaia M. A. ; *Membrane Separations in Biotechnology.*, 255, Marcel Dekker, New York (1986).
7. Warren R. K., Macdonald D. G., and Hill G. A. ; *Bioresource Technol.* 47, 121(1994).
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. , and Randale R. J. ; *J. Biol. Chem.*,193, 265(1951).
9. Tanaka T., Kamimura R., Itoh K., Nakanishi K., and Matsuno R. ; *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 617(1993).
10. Anantraksakul P. and Noonhorm A. ; *Agricultural and Food Processing Wastes*, American Society of Agricultural Engineers, St. Joseph, Michigan.(1990).