

동시당화발효공정을 위한 섬유소 가수분해의 동력학적 모사

오경근, 정용섭*, 홍석인

고려대학교 화학공학과, 전북대학교 식품공학과*

Kinetic Modeling of the Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose

Kyeong-Keun Oh, Yong-Seob Jeong*, Suk-In Hong

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

섬유소계 바이오매스로부터 연료용 에탄올로의 전환을 위한 기술개발에 대해 많은 관심이 기울여지고 있다. 이중 동시당화발효(SSF; Simultaneous Saccharification and fermentation) 공정은 당화와 발효공정이 한 장치에서 이루어지고 반응기 내에 에탄올이 존재하므로 장치비 절감 및 오염문제를 감소시킬 수 있다. 또한 효소에 의해 섬유소가 당화될 때 생성물인 셀로바이오스나 포도당을 미생물에 의해 생성되는 즉시 에탄올로 전환시키게 되므로 당화속도를 저해하는 생성물 당에 의한 효소억제작용을 크게 감소시킬 수 있어 동력학 또는 경제적으로 에탄올을 생산할 수 있는 유용한 공정이 될 수 있다. 그러나 이러한 동시당화발효가 효과적으로 수행되기 위해서는 미생물 발효기질인 셀로바이오스나 포도당의 높은 농도가 요구되므로 고농도 당화반응 연구가 선행되어야 한다. 고농도 당화공정에서 가장 중요한 역할을 하는 것은 역시 cellulase 와 β -glucosidase 두 효소의 역할이다.

본 연구에서는 에탄올 생산 수율에 최대 관건이 되는 당 생산성을 최대화시키기 위한 일환으로 고농도 당화공정에서 셀로바이오스나 포도당의 효소에 대한 억제효과를 관찰하고 공정조건 개선 및 공정설계 등에 이용될 수 있도록 고농도 당화공정의 동력학적 이론을 규명하고자 하였다.

이론

섬유소의 가수분해 속도 r_1 은 섬유소에 흡착한 셀룰라아제양에 의존한다.

$$r_1 = k_1^*(E_1^*) \quad (1)$$

흡착된 셀룰라아제의 양 (E_1^*)를 구하기 위하여 Langmuir 흡착등온식을 도입하면 흡착속도는 흡착되지 않은 부위와 효소농도에 비례한다

$$\left(\frac{dn_E}{dt}\right)_{ads} = k_{ads}(a_1 - a)(E_1)$$

탈착속도는 흡착된 부위에 비례

$$\left(\frac{dn_E}{dt}\right)_{des} = k_{des} \alpha$$

셀룰라아제의 흡착과 탈착속도가 평형이라고 가정하면

$$k_{ads}(\alpha_i - \alpha)(E_1) = k_{des}\alpha$$

따라서 식 (1)은

$$r_1 = \frac{k_1 \alpha_i (E_1)_i}{\alpha_i [(E_1)_i + K_e] + (\alpha_i - \alpha)} \quad (2)$$

효소 농도가 높을 때에는, 즉 기질의 표면이 효소로 포화 되었을 때에는

$$\alpha \rightarrow \alpha_i$$

$$r_1 = \frac{k_1 \alpha_i (E_1)_i}{[K_e + (E_1)_i]} \quad (3)$$

또한, 셀룰라아제와 β -glucosidase는 리그닌에 흡착된다. 이러한 흡착은 두 효소의 효과적인 농도(effective concentration)를 감소시킨다. 따라서 $(E_1)^*$ 과 (E_2) 의 농도는 리그닌에 대한 흡착효과를 고려해주어야 한다. 또한 동시당화발효 수행 중에 섬유소 당화 속도가 감소하는 원인으로서는 기질의 결정성 증가, 유용 표면적 감소, 그리고 효소의 억제효과/불활성화 등의 요인이 있다. 섬유소 구조가 당화속도에 미치는 영향을 고려하기 위해 기질의 반응성 계수 ϕ 가 도입된다. ϕ 는 시간함수이며($\phi_0=1$), 기질의 종류, 그리고 전처리 조건 등에 따라 다르다. 따라서 ϕ , 그리고 셀로바이오스(B)와 포도당(G)의 비경쟁적 억제효과를 고려하고 에탄올(E)에 의한 억제반응을 고려하면 섬유소의 셀로바이오스로의 당화속도 r_1 은 다음과 같이 표현될 수 있다.

$$r_1 = \frac{k_1 \alpha_i \phi (E_1)_i}{[K_e + (E_1)_i] \left\{ 1 + \left[\frac{(B)}{K_{1B}} \right] + \left[\frac{(G)}{K_{1G}} \right] \right\}} \frac{K_{1E}}{K_{1E} + (E)} [1 - K_{1L}(L)] \quad (4)$$

β -glucosidase는 수용액 상태에 존재한다. β -glucosidase는 기질에 의해 억제된다고 보고되었으며, 생산물인 포도당에 의해 경쟁적으로 억제된다고 보고되어 있다. 따라서 셀로바이오스의 당화 속도는 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$r_2 = \frac{k_2 (E_2)(E)}{K_m \left\{ 1 + \left[\frac{(G)}{K_{1G}} \right] + (B) \left[1 + \left[\frac{(B)}{K_{1B}} \right] \right] \right\}} \frac{K_{2E}}{K_{2E} + (E)} [1 - K_{2L}(L)] \quad (5)$$

실험

1. 매개변수 결정

식 (4), (5)는 매개변수들의 값에 근거하여 효소의 동력학적 행동을 묘사한다. 각각의 실험을 통하여 수집된 동력학적 자료들을 비선형 회귀분석하여 매개변

수들을 결정하였다. 본 실험에서는 Marquardt-Levenberg 알고리즘을 이용한 best-fitting 방법으로 매개변수를 결정하였다.

2. 초기반응속도 결정

셀룰라아제에 대한 억제효과를 관찰하기 위하여 셀로바이오스와 포도당을 일정 농도별로 첨가하여 섬유소의 가수분해를 수행하였다. 초기 1시간 동안 15분 간격으로 시료를 채취하여 환원당 농도를 측정하고, 그 결과를 선형 회귀분석하여 얻은 기울기 값을 초기반응속도로 하였다. β -glucosidase에 대한 억제효과는 셀로바이오스를 기질로한 반응액에 일정량의 포도당을 첨가하여 당화반응을 수행하였으며, 초기 4분간 1분 간격으로 생성된 포도당 농도를 측정하여 시간에 따라 선형 회귀분석하여 얻어진 기울기 값을 초기반응속도로 하였다.

3. 섬유소 가수분해반응 모사

섬유소가 가수분해되어 당이 생성되는 과정의 물질수지식에 매개변수 값들을 대입하여 얻은 미분방정식을 Runge-Kutta 방법을 이용, 수치해석하여 섬유소, 셀로바이오스 그리고 포도당의 시간에 따른 농도변화를 예측하여 실험값과 비교하였다.

결과 및 토론

셀로바이오스와 포도당의 농도를 0~80g/L 까지 변경시키면서 환원당 및 포도당의 생성속도를 비교한 결과 셀로바이오스를 5g/L 첨가시 셀룰라아제 역가는 70% 감소한 것으로 나타났으며, 포도당의 농도가 2g/L 일때 셀룰라아제 역가는 80%를 유지한 반면 β -glucosidase 역가는 25%만을 유지하였다. 또한 포도당의 농도가 20g/L 일때는 β -glucosidase는 거의 비활성화 된 것으로 나타나 포도당의 β -glucosidase에 대한 억제효과가 매우 심각한 것으로 나타났다. Fig 1은 섬유소 가수분해 반응을 모사하여 속도표현식 적용성을 입증한 결과이며 기질의 특성 및 효소와 기질간의 상호작용에 대한 이해를 증진시키고, 모델 매개변수에 대한 보정단계를 거친다면 공정 설계, 공정 최적화, 그리고 규모확대등에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

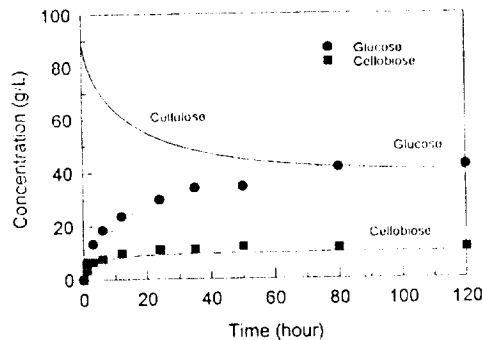


Fig. 1 Model simulations and experimental data of cellulose hydrolysis at optimum conditions.

사용기호

- k_1^* : specific rate of hydrolysis (h^{-1})
- k_1 : k_1^*/α_s
- (E_1^*) : concentration of adsorbed cellulase (g/L)
- (E_1) : free cellulase concentration (g/L)
- $(E_1)_t$: total cellulase concentration (g/L)
- k_{ads}, k_{des} : specific rates of cellulase adsorption on
and desorption from the surface of cellulose
- K_e : k_{des}/k_{ads} (g/L)
- α_t : total surface area of the substrate (m^2/L)
- α : surface area of the substrate occupied by cellulase (m^2/L)
- α_s : surface area occupied per unit mass of cellulase (m^2/g)
- K_2 : specific rate of cellobiose(B) hydrolysis (h^{-1})
- K_m : Michaelis constant of β -glucosidase(E_2) (g/L)
- K_{1B}, K_{1G}, K_{1E} : inhibition constants of cellulase (g/L)
- K_{2B}, K_{2G}, K_{2E} : inhibition constants of β -glucosidase (g/L)

참고문헌

1. Holtzapple M. T., Caram H. S., and Humphery A. E.: Biotechnol. Bioeng., **26**, 775(1984)
2. Holtzapple M. T., Cognata M., Y. Shu, Hendrickson C.: Biotechnol. Bioeng., **36**, 275(1990)
3. Wald S., Wilke C. R., and Blanch H. W.: Biotechnol. Bioeng., **26**, 221(1984)
4. George P. P., Diane D. S., and Charles E. W.: Appl. Biochem. Biotechnol., **34**, 543(1992)
5. George P. P., Tammy K. S., and Charles E. W.: Biotechnol. Bioeng., **41**, 846(1993)
6. Bernd V., and Walter S.: Biotechnol. Bioeng., **42**, 469(1993)
7. Marquardt, D. W.: J. Soc. Indust. Appl. Math. **11**, 431(1968)
8. Howell J. A.: Biotechnol. Bioeng., **20**, 847(1978)
9. Caminal G., Lopez-Santin J., and Sola C.: Biotechnol. Bioeng., **27**, 1282(1985)