

리그노셀룰로스계 폐기물을 이용한 섬유소가수분해효소 생산

강 석우, 이 진석*, 김 승욱**

고려대학교 생명공학원, 한국에너지 기술연구소*, 고려대학교 화학공학과**

Production of Cellulase from Lignocellulosic Waste

Seong-Woo Kang, Jin-Suk Lee*, Seung-Wook Kim**

Graduate School of Biotechnology, Korea University

Korea Institute of Energy Research*

Department of Chemical Engineering, Korea University**

1. 서론

바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 공정은 원료 물질의 재생성 및 생산 연료의 환경 친화성 등 많은 장점을 갖고 있다. 다양한 바이오매스 중 특히 리그노셀룰로스계 물질은 자원의 풍부성과 경제적인 가격 때문에 유망한 원료로 꼽힌다. 이런 점 때문에 리그노셀룰로스계 폐기물 (lignocellulosic waste)로부터 에탄올을 생산하여 대체 연료로 활용하고자 하는 많은 시도가 있었다. 그러나 리그노셀룰로스계 물질을 원료로 생산된 에탄올은 휘발유에 비해 생산 단가가 너무 높아 실용화에 장애가 되고 있다. 이러한 에탄올 생산 공정 비용의 가장 큰 부분은 cellulase의 생산비로서 전체 비용의 약 60%에 해당한다 (1). 따라서 cellulase를 경제적으로 생산할 수 있는 기술과 균주 개발을 위해 많은 연구가 수행되었다 (2-6).

본 연구에서는 cellulase를 보다 경제적으로 생산하기 위해 다양한 리그노셀룰로스계 폐기물 기질에 대해 cellulase 생산성을 검토, 비교하였으며 가능성이 높은 기질에 대해 대량 생산 실험을 수행하여 산업화 방안을 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 균주

본 연구에서 사용된 균주는 *Trichoderma reesei* Rut C-30이다.

2.2 기질

폐 신문지는 약 1×2cm 크기로 자른 후 0.1~0.4% NaOH 용액에 넣고 90°C의 온도에서 12시간 동안 처리한 후 증류수로 충분히 세척하고 실온에서 건조한 후 Wiley mill로 분쇄하여 기질로 사용하였다. 1×2cm의 폐 신문지 및 1×3cm 크기의 참나무 칩을 한국에너지 기술 연구소에 설치된 증기 폭쇄 장치 (용량 5L)를 사용하여 215°C에서 3분간 처리한 후 폭쇄하여 실온에서 건조한 것을 사용하였다. 또한 0.2% 황산 용액에 12시간 동안 침적한 참나무 칩을 동일한 조건에서 폭쇄하여 기질로 사용하였다. 당화 잔사는 앞에서 준비한 폭쇄재 10%의 용액에 상업 효소인 Cellusoft와 Novozym 188을 각각 20 IU/g 폭쇄재와 30 IU/g 폭쇄재의 농도로 첨가 후 50°C에서 96시간 당화한 후 원심 분리하여 얻어진 침전물을 실온에서 건조하여 기질로 사용하였다.

2.3 Cellulase 생산 발효

균주가 배양된 PDA 평판 배지에 멸균수를 첨가하여 포자를 회수하였다. Vogel 배지에 10^6 /ml의 포자농도로 접종하여 30°C 진탕 배양기에서 2일 간 배양액을 접종 균체로 사용하였다. 플라스크에서의 발효 실험은 250ml 플라스크에 여러 가지 탄소원을 1.0% 첨가한 Vogel 배지 100ml을 넣고 균체 접종액을 5.0ml 첨가하여 진탕 배양기에서 30°C, 150rpm으로 배양하였으며, 초기 pH는 5.0으로 조절하였다. 대량 생산 실험은 30 l 발효기 [한국발효기(주)]에 탄소원 1.0%를 첨가한 Vogel 배지 20 l를 첨가한 후 균체 접종액 1.0 l를 넣고 30°C, 100rpm에서 통기량 0.5vvm으로 하여 cellulase 생산 발효 실험을 수행하였다.

2.4 분석

FPase, CMCase, β -glucosidase 활성은 IUPAC에서 제시한 방법으로 측정하였다 (7). 환원당은 DNS 방법 (8)으로, 단백질 함량은 Lowry 방법 (9)으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 삼각플라스크 배양에서 cellulase 생산

NaOH로 전 처리한 폐 신문지를 기질로 사용한 결과 전처리를 하지 않은 경우에 비해 FPase와 CMCase의 생산성 모두 높았다. 특히 0.2% NaOH로 전 처리한 경우 배양 9일째 FPase의 활성은 0.25 IU/ml로 전처리하지 않은 경우의 0.15 IU/ml에 비해 90% 높은 것으로 나타났다. NaOH 농도를 0.4%로 높이면 전처리 효과가 현저하게 감소하여 FPase의 활성은 0.16 IU/ml로 전처리를 하지 않은 경우와 차이가 없었다 (Fig. 1). 이와 같이 NaOH 전처리에서 농도가 0.2%에서 0.4%로 증가함에 따라 FPase의 활성이 감소한 이유는 분명하지 않다. CMCase 활성을 조사한 결과 0.2% NaOH로 전처리시 가장 높은 4.6 IU/ml이었으며 농도가 0.4%로 높아지면 전처리를 하지 않은 경우에 비해 약 15% 높아 FPase의 경우와 다른 결과를 나타냈다. Cellulase 생산을 위한 폐 신문지의 기질 사용시 전처리 NaOH 농도는 0.2%가 적합한 것으로 밝혀졌다. 폐 신문지의 cellulase 생산 기질로서 활용하는 방안을 모색하기 위해 다른 전처리 기술의 적용 가능성을 조사하였다. 단순 폭쇄한 경우와 0.3% 황산으로 전처리한 후 폭쇄한 경우 모두 FPase와 CMCase 활성이 각각 0.2 IU/ml, 2 IU/ml 이하로 극히 낮았다 [Fig. 2 (a)].

폭쇄나 산, 알칼리 용액으로 전처리한 폐 신문지가 cellulase 생산 기질로서 활용성이 낮아 목질계 바이오매스를 생산 기질로 활용하는 가능성에 대해 조사하였다. 참나무 칩을 폭쇄한 폭쇄재를 기질로 한 경우 최대 FPase 활성은 약 0.84 IU/ml로 효소 당화후 남은 잔사를 기질로 한 경우에 비해 약 20% 높았다. 그러나 cellulase 생산성은 당화 잔사를 기질로 한 경우 0.18 IU/ml-day로 폭쇄재의 0.12 IU/ml-day에 비해 오히려 50% 높았다 [Fig. 2 (b)]. 이와 같이 당화 잔사를 기질로 하였을 때 cellulase 생산성이 높았던 이유는 당화 과정에서 생성된 여러 가지 당 물질이 cellulase 생성 촉진 효과를 가졌기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 당화 잔사를 기질로 사용시 cellulase의 최대 활성이 폭쇄재에 비해 낮은 이유는 가용 탄소원이 적었기 때문으로 풀이된다. 동일한 전처리 조건에서 만들어진 폐 신문지와 폭쇄재에서 FPase 및 CMCase 활성을 비교한 결과 폭쇄재를 기질로 한 경우 cellulase 생산성은 폐 신문지에 비해 약 4배 가량 높았다.

3.2 30L 발효기 배양에서 cellulase 생산

참나무 폭쇄재 및 폭쇄재를 당화하고 남은 잔사와 1.0% lactose를 기질로 한 cellulase 생산 실험을 30 l 발효기에서 비교하였다. 폭쇄재를 기질로 이용했을 때 lag phase는 lactose에 비해 다소 긴 24시간이었으며 FPase 최대 활성은 배양 72시간 후 약 0.75 IU/ml이었다. CMCCase와 β -glucosidase 생산도 비슷한 유형을 나타냈으며 최대 값은 각각 7.2 IU/ml, 0.03 IU/ml이었다. 폭쇄재 당화 잔사를 기질로 이용한 경우 플라스크 배양에서와 비슷한 결과를 나타냈다. 즉 FPase 최대 활성은 약 0.63 IU/ml로 폭쇄재에서 보다 약 15% 낮았으나, lag phase는 약 18시간으로 짧았다. 또한 CMCCase 최대 활성은 7.4 IU/ml로 폭쇄재에 비해 오히려 5% 가량 높았다 (Fig. 3 and 4). 이는 당화 잔사에 CMCCase 생산을 촉진하는 전구체가 포함되어 있음을 의미한다.

4. 감사의 말

본 논문은 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며, 깊은 감사를 드립니다 (Bio 1998-020-E00033).

5. 참고 문헌

1. R. Torget, M. Himmel and J.D. Wright, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **17**, 89 (1988).
2. A.L. Allen and C.D. Roche, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 650-656 (1989).
3. I. Persson, F. Tjerneld and B.H. Hagerdahl, *Process Biochem.*, **26**, 65-74 (1991).
4. S.W. Kang, S.W. Kim and J.S. Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **53**, 101-106 (1996).
5. S.W. Kim, S.W. Kang and J.S. Lee, *Bioresource Technol.*, **59**, 63-67 (1997).
6. L.K. Ju and O. A. Afolabi, *Biotechnol. Prog.*, **15**, 91-97 (1999).
7. T.K. Ghose, *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 257 (1987).
8. G.L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
9. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough and A.L. Farr, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

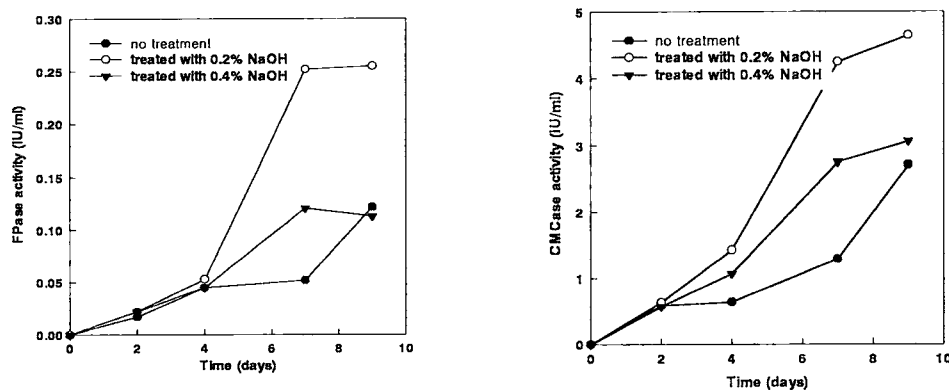
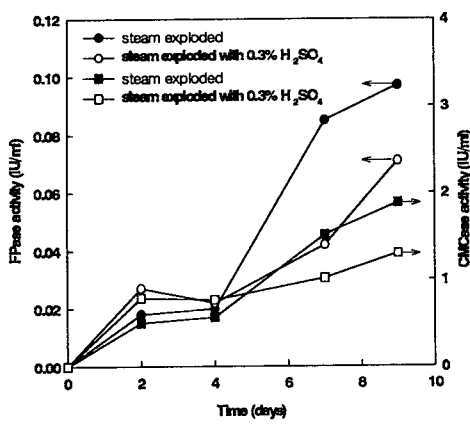
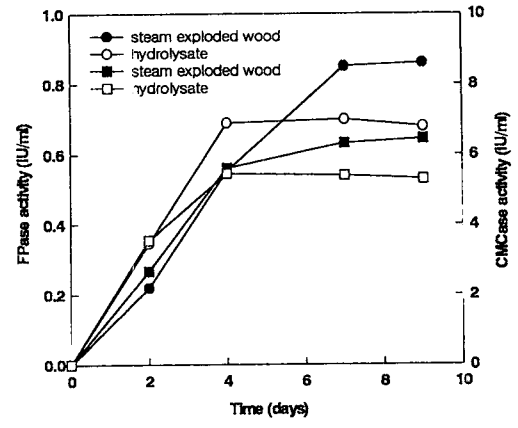


Fig. 1. Effect of NaOH pretreatment of newspaper on the production of cellulase (FPase and CMCCase) at 1.0% substrate concentration in the shake-flask culture.



(a) newspaper



(b) wood

Fig. 2. Cellulase production (FPase and CMCCase) at 1.0% substrate concentration in the shake-flask culture.

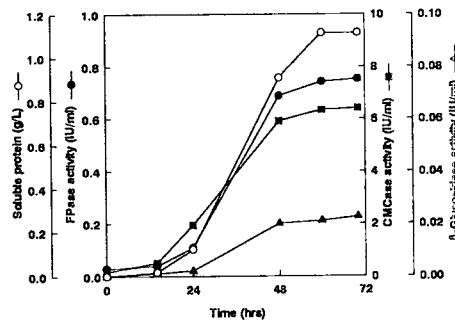
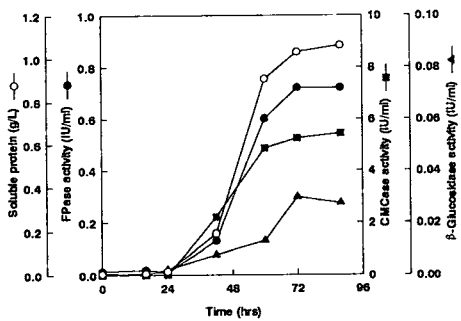
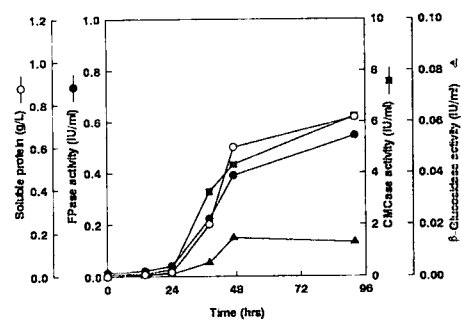


Fig. 3. Cellulase production by using 1.0% lactose in a 30 l fermentor.



(a) steam exploded wood chip



(b) wood hydrolysate

Fig. 3. Cellulase production at 1.0% substrate concentration in a 30 l fermentor.