

반응표면분석법을 이용한 유기용매 전처리된 백합나무 (*Liriodendron tulipifera*)의 최적 효소 당화 조건 탐색

Investigation on optimal conditions for enzymatic hydrolysis of organosolv pretreated *Liriodendron tulipifera* using response surface methodology

곽기섭^{1*}, 김호용¹, 정한섭¹, 김혜연¹, 여환명^{1, 2}, 최인규^{1, 2}

(¹서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, ²서울대학교 농업생명과학연구원)

1. 서론

화석 연료를 대체할 신재생에너지의 한 종류인 바이오에너지를 생산하기 위한 자원으로써 목질계 바이오매스는 그 양이 풍부하고 이용 가능성이 매우 높다. 특히 매우 높은 홀로셀룰로오스 (75~80%)를 함유하고 있기 때문에 이를 글루코오스, 자일로오스 등의 단당류로 당화시켜 발효 과정을 거침으로써 바이오에탄올과 같은 유용한 에너지 자원을 생산할 수 있다. 목질계 바이오매스를 이용 가능한 단당류로 전환하기 위해서는 산 또는 효소 당화를 실시해야 한다. 효소 당화의 경우, 산 당화에 비해서 좀 더 온화한 조건에서 실시가능하며 발효저해물질을 발생시키지 않는다는 장점을 가지고 있다. 그러나 높은 수율의 단당류를 획득하기 위해서는 당화 시간이 오래 걸리고 효소 사용량이 증가하는 등 경제적인 측면에서 매우 비효율적이다. 따라서 이를 해결하기 위하여 효율적인 효소 당화를 실시하기 위한 전처리가 필요하며, 전처리에 의해 바이오매스의 다양한 물리화학적 특성이 변하게 되고, 결과적으로 효소에 대한 접근성이 향상되어 효소 당화 수율이 증가한다고 보고되었다.

또한 전처리 바이오매스의 효소 당화 수율에 영향을 미치는 인자로서 효소 사용량 및 종류, 기질 농도, 반응 시간, 온도, pH 등을 들 수 있으며, 이러한 인자들이 개별적 또는 상호적으로 작용하여 효소 당화에 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 효소 당화의 최적 조건을 탐색하기 위하여 반응표면분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하여 효소 당화 중요 인자들 간의 상호 작용을 명확히 확인하고, 실험 인자와 결과에 대한 관계를 통계적으로 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료 및 유기용매 전처리

20년생 백합나무 (*Liriodendron tulipifera*)를 공시재료로 사용하여 유기용매 전처리를 실시하였다. 백합나무를 40 mesh의 크기로 분쇄하여 사용하였으며, 시료와 용매를 1:10의 비율로 하여 50%(v/v)에탄올과 1%(w/w)의 황산 촉매로 500 ml 반응기에서 전처리를 실시하였다. 전처리 목표 온도는 133°C로 설정하였으며, 반응기를 40분 동안 가열시켜 목표 온도에 도달시킨 후, 10분 동안 반응시켰다. 반응기를 상온으로 냉각시켜, 여과 및 세척한 후 전처리 바이오매스를 획득하였다.

2.2. 반응표면분석법 비교

효소 사용량, 기질 농도, 가수분해 시간을 효소 당화 인자로 선택하여 전처리 바이오매스의 효소 당화를 실시하였다. 최적 효소 당화 조건을 탐색하기 위하여 통계적 분석방법인 반응표면분석법을 이용하였다. 그 중에서 Central Composite Design (CCD)과 Box-Behnken Design (BBD)을 사용하였으며, 세 가지 효소 당화 인자를 독립변수로 선정하여 Table 1을 기준으로 실험을 설계하였다.

Table 1. Three variables of CCD and BBD

Variables	Coded symbol	Actual values of coded levels		
		-1	0	1
Enzyme loading (EGU/g substrate)	X ₁	150	300	450
Substrate concentration (g/100 ml)	X ₂	3.0	6.0	9.0
Hydrolysis time (h)	X ₃	24	48	72

사용된 효소는 cellulase의 경우, Novozyme사의 NS 50013을 사용하였으며, β -glucosidase는 Novozyme사의 NS 50010을 사용하였다. 버퍼는 50 mM sodium acetate를 사용하였으며, pH 5.0, 50°C에서 효소 당화를 실시하였다. 해당 당화 시간에 맞추어 샘플을 채취하였으며, HPLC (HP 1100 series, Aminex-87H column (300 mm×7.8 mm, BioRad), RI detector)를 이용하여 글루코오스를 정량하였다. 글루코오스 수율은 전처리 바이오매스에 함유되어 있는 글루코오스 함량을 기준으로 다음의 식으로 계산하였다.

$$\text{글루코오스 수율 (\%)} = \frac{\text{효소 당화에 의해 생성된 글루코오스 (g)}}{\text{전처리 바이오매스에 함유된 글루코오스 (g)}} \times 100$$

CCD, BBD에 의해 실시한 실험 결과로부터 다항식 회귀 모델을 추정하였으며, ANOVA 분석에 의하여 각각의 항에 대한 계수를 선정하였고, 유의성 및 적합성을 검정하였다. 반응표면분석법에 의한 실험 설계 및 통계 분석을 위해 Stat-Ease사의 Design-Expert 8.0.4를 이용하였다.

2.3. 당화 수율 향상을 위한 최적 당화 조건 탐색

최적 당화 조건을 탐색하기 위하여 당화 온도와 pH를 독립변수로 추가하여 실험설계를 하였다. 공시재료 선정, 유기용매 전처리, 효소 당화 (당화 시간은 72시간으로 고정), 분석 방법 등은 앞에서 언급했던 것과 동일하게 실시하였다. 반응표면분석법 중 Box-Behnken Design (BBD)을 사용하여 Table 2를 기준으로 실험을 설계하였으며, 최대 글루코오스 수율을 획득할 수 있는 효소 당화 조건을 탐색하였다.

Table 2. Four variables of BBD for optimization of enzymatic hydrolysis

Variables	Coded symbol	Actual values of coded levels		
		-1	0	1
Enzyme loading (EGU/g Substrate)	X ₁	100	200	300
Substrate concentration (g/100 ml)	X ₂	2.0	4.0	6.0
pH	X ₃	4.0	5.0	6.0
Temperature (°C)	X ₄	40	50	60

2.4. Xylanase 첨가에 의한 글루코오스 수율 향상

Cellulase 사용량을 감소시키고 글루코오스 수율을 향상시키는 방법으로 xylanase를 첨가하는 방법을 적용하였다. 유기용매 전처리, 분석 방법 등은 앞에서 언급했던 것과 동일하게 실시하였으며, 효소 당화의 경우, Novozyme사의 xylanase인 NS 50030을 이용하였다. 효소 당화 조건은 Table 3과 같이 설정하였으며, pH (5.3)와 온도 조건 (45°C)은 앞에서 획득한 최적 조건으로 설정하였다.

Table 3. Conditions of Xylanase addition for enzymatic hydrolysis

Variables	Values			
Enzyme loading (EGU/g Substrate)	100		200	
Xylanase loading (Ratio * cellulase loading)	0.00	0.15	0.30	0.45
Substrate concentration (g/100 ml)	4.0			

3. 결과 및 고찰

3.1. 반응표면분석법 비교

CCD에 의한 효소 사용량, 기질 농도, 당화 시간 등의 독립변수의 설정으로부터 획득한 글루코오스 수율에 대한 독립변수 각각의 일차, 이차, 상호관계 계수의 유의성을 살펴본 결과, X₁, X₃는 99% 이상의 유의성을 보였으며, X₂, X₁², X₃² 등은 87~93% 정도의 유의성을 보였다. 이로부터 글루코오스 수율에 대한 회귀 모델식을 다음과 같이 구하였다.

$$Y = 22.66956 + 0.14809X_1 - 0.92927X_2 + 0.87568X_3 - 0.00016X_1^2 - 0.00518X_3^2$$

위의 회귀 모델은 99% 이상의 유의성을 보였으나, R^2 (0.8619)과 Adjusted R^2 (0.7928)값이 너무 낮아서 상관관계가 낮았기 때문에 CCD에 의한 반응표면분석법을 적용하기는 어려웠다.

BBD에 의한 효소 사용량, 기질 농도, 당화 시간 등의 독립변수의 설정으로부터 획득한 글루코오스 수율에 대한 독립변수 각각의 일차, 이차, 상호관계 계수의 유의성을 살펴본 결과, X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_3 , X_1^2 , X_3^2 에서 모두 99% 이상의 높은 유의성을 보였다. 이로부터 구한 글루코오스 수율에 대한 회귀 모델식은 다음과 같다.

$$Y = 17.64475 + 0.15035X_1 - 0.88404X_2 + 1.27325X_3 - 0.00058X_1X_3 - 0.00014X_1^2 - 0.00773X_3^2$$

CCD로부터 구한 회귀모델과 마찬가지로 BBD로부터 구한 회귀 모델은 99% 이상의 유의성을 보였으며, CCD와는 달리 R^2 (0.9962)과 Adjusted R^2 (0.9936)값이 0.99 이상으로써 높은 상관관계를 확인할 수 있었기 때문에 BBD를 적용하여 최적 효소 당화 조건을 탐색하기로 하였다.

BBD로부터 구한 회귀 모델을 적용하여 세 가지 독립변수 중 한 가지 인자를 센터 값에 고정시키고 나머지 두 가지 인자의 상관관계를 확인한 결과, 효소 사용량이 높을수록, 기질 농도가 낮을수록, 당화 시간이 길어질수록 글루코오스 수율이 향상되었다.

3.2. 당화 수율 향상을 위한 최적 당화 조건 탐색

최적 효소 당화 조건을 보다 정확히 확인하기 위하여 효소 사용량, 기질 농도 이외에 추가적으로 당화 온도 및 pH를 독립변수로 채택하였으며, BBD를 사용하여 실험을 설계하였다. 글루코오스 수율에 대한 독립변수 각각의 일차, 이차, 상호관계 계수의 유의성을 살펴본 결과, X_1 , X_3 , X_4 , X_3^2 , X_4^2 에서 모두 99% 이상의 높은 유의성을 보였으며, X_1X_3 , X_1X_4 등은 88~92% 정도의 유의성을 보였다. 이로부터 구한 글루코오스 수율에 대한 회귀 모델식은 다음과 같으며, 99% 이상의 유의성을 보여주었다.

$$Y = -599.19 + 0.07X_1 + 125.62X_3 + 15.15X_4 - 0.05X_1X_3 + 0.01X_1X_4 - 10.83X_3^2 - 0.18X_4^2$$

이상의 회귀 모델을 적용하여 각각의 독립변수 변화에 대한 글루코오스 수율을 3차원 그래프로 나타내었다 (Figure 1). 네 가지 독립변수 중 두 가지 인자를 센터 값에 고정시켜 나머지 두 가지 인자의 상관관계를 확인하였으며, 효소 사용량 200 EGU/g substrate, 기질 농도 4 g/100 ml, pH 5.3, 온도 44.9°C에서 86.2%의 글루코오스 수율을 획득하였다.

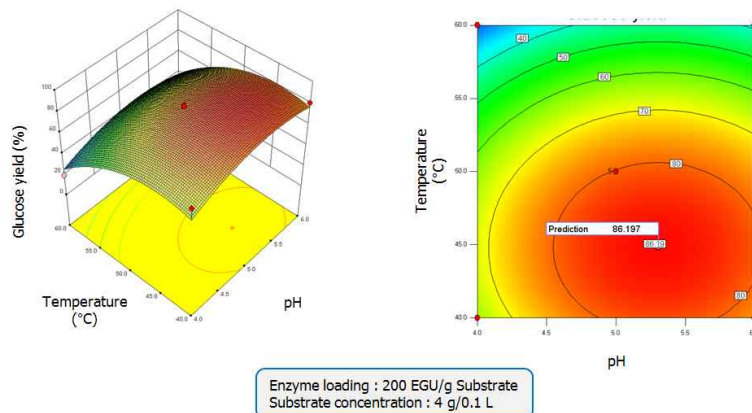


Figure 1. 3D surface plot for maximum glucose yield.

글루코오스 수율은 효소 사용량, 기질 농도, pH, 온도 등에 매우 민감하며, 최대 글루코오스 수율을 얻기 위해서는 최적 pH 및 온도 조건에서 효소 사용량을 높여야 한다. 그러나 효소 사용량이 증가할수록 동시에 비용 증가도 이루어지기 때문에 적절한 최대 글루코오스 수율 내에서 효소 사용량을 최소화하는 방안을 고려해야 한다. 따라서 본 연구에서는 최대 글루코오스 수율을 각각 85, 90%로 설정하여 최소 효소 사용량을 측정하였다 (Table 4). 그 결과, 85% 이상의 글루코오스 수율을 획득하기 위해서는 178.8 EGU/g substrate 이상의 효소 (cellulase 기준)가 필요했으며, 90% 이상일 경우, 258.1 EGU/g substrate 이상이 필요하였다. 이 때, 다른 당화 인자의 조건은 pH 5.3, 온도 45.0°C, 당화 시간 72시간으로 측정되었다.

Table 4. Maximum glucose yield depending on conditions of four variables

Variables	Values		
Enzyme loading (EGU/g Substrate)	100	200	300
Substrate concentration (g/100 ml)	4		
pH	5.6	5.3	5.1
Temperature (°C)	43.2	44.9	46.5
Maximum glucose yield (%)	< 81.5	< 86.2	< 93.2

3.3. Xylanase 첨가에 의한 글루코오스 수율 향상

앞에서 85% 또는 90% 이상의 글루코오스 수율을 획득하기 위한 최소 효소 (cellulase) 사용량 및 기타 당화 조건을 확인하였다. 본 장에서는 xylanase를 첨가하여 cellulase 사용량을 감소시키고 글루코오스 수율을 향상시키는 방법을 고려하였다.

Xylanase 첨가로 인하여 Figure 2와 같이 글루코오스 수율이 전체적으로 향상되었다. Cellulase 사용량 100, 200 EGU/g substrate에서 모두 0.15배의 xylanase를 첨가하였을 때, 글루코오스 수율이 급격하게 향상되었고, xylanase 사용량이 0.3, 0.45배로 증가하면서 글루코오스 수율이 향상되었으나 큰 폭으로 증가하지는 않았다. 상대적으로 적은 양의 cellulase를 사용하였을 때, xylanase 첨가에 의한 글루코오스 수율이 효과적으로 증가하였으며, 100 EGU/g substrate에 0.15배의 xylanase 첨가 시, 9.02%의 글루코오스 수율이 향상되었고, 200 EGU/g substrate의 경우, 4.22%의 글루코오스 수율이 향상되었다.

따라서 기존의 cellulase, β -glucosidase 등의 효소에 소량의 xylanase를 첨가함으로써 글루코오스 수율을 효과적으로 향상시킬 수 있었으며, cellulase 사용량을 감소하고 xylanase를 첨가함으로써 목표한 글루코오스 수율을 달성함과 동시에 가장 많은 양이 필요한 cellulase 사용량을 감소시켜 효소 비용 절감도 이룰 수 있을 것이다.

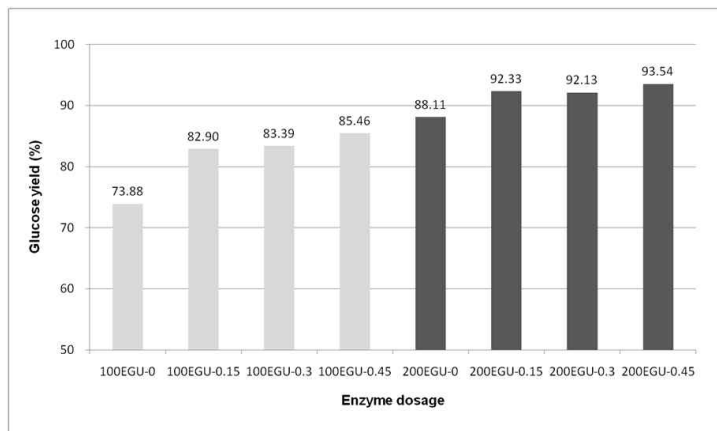


Figure 2. Glucose yield depending on xylanase addition.