

Biomass의 고효율 효소당화에 적합한 Attrition Coupled Bioreactor 개발에 관한 연구; Horizontal Paddle Type Bioreactor를 활용한 섬유소 당화

이용현·박진서

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Development and Evaluation of the Attrition Coupled Bioreactors for Enzymatic Hydrolysis of Biomass; Horizontal Paddle Type Bioreactor for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose

Yong Hyun Lee and Jin Seo Park

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences

Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

ABSTRACT

To develop an attrition coupled enzyme reactor with high efficiency-low energy consumption for saccharification of insoluble biomass, a 5L horizontal paddle type bioreactor was constructed and its performance was evaluated. The optimal condition for saccharification of 50g α -cellulose/L was found to be 200rpm with 500g of 3mm glass bead. Especially, the horizontal paddle type bioreactor was very effective for saccharification of high concentration of insoluble cellulose, in which around 72% of α -cellulose was saccharified for 75g α -cellulose/L, and even up to 70% for 100g of α -cellulose/L after 24hours. Under the optimal condition, the power consumption was measured to be around 1.7watt-h/g. Horizontal paddle type bioreactor seems to have an appropriated structural feature for industrial scale operation and to be an effective and energy saving attrition coupled enzyme reactor.

서론

섬유질 바이오매스를 기질로 대체에너지를 생산하는데 있어 해결해야할 가장 큰 난점은 섬유소를 고효율로 당화시키는데 있다. 섬유소 효소당화를 용이하게 하기위해 각종 전처리 공정에 대한 연구가 많이 행해져 왔다(1-5). 최근 섬유질 biomass의 효소당화시 현탁액에 고품 분쇄마찰매체를 첨가하여 젖은 상태에서 교반함으로써 섬유소 당화를 현저히 상승시키는 분쇄마찰매체 함유반응계가 연구되고 있으며(6-10), 이 반응계는 전처리와 당화를 동시에 수행하는 섬유소 효소당화법이라 할 수 있으며, 그 효율성때문에 산업적으로 활용될 가능성이 크다고 판단되며 이를 목표로한 기술적 가능성과 경제성을 평가할 필요가 있다. 본인등은 전보(11,12)에서 impeller로 분쇄마찰매체를 교반하는 impeller형 효소반응기와 통자체를 회전시켜 교반하는 tumbling drum형

bioreactor를 설계, 제작하여 그 효용성, 조작조건, 그리고 동력소모량등을 검토한 바 있다.

본 연구의 목적은 상기 2종의 bioreactor를 개선시킨 수평형 회전축에 부착된 paddle에 의해 반응조 내부의 섬유소-분쇄마찰매체-효소의 혼합액을 교반 마찰시켜 섬유질 biomass의 효소당화를 촉진시키는 horizontal paddle type bioreactor(HPTB)를 설계 제작하여 그 효용성과 당화조건 및 당화율을 검토하고 회전에 소요되는 에너지등을 분석 검토함에 있다. 이를 통해 공업적 규모의 활용을 위한 기술적 가능성과, 경제적 타당성의 평가를 위한 기초자료를 확보코져 한다.

재료 및 방법

실험재료

사용효소는 *Trichoderma reesei*의 배양액을 농축한 산업용효소인 Celluclast(Novo Co.)였다(11). 사용기질은

α -cellulose(Sigma Co.)로서 순도는 99.5%였고 평균 입자크기는 100-200 mesh 였다. 분쇄마찰매체로는 직경이 3,6 mm 인 유리구(glass bead)를 사용하였으며, 비중은 2.56이었다.

Horizontal paddle type bioreactor의 구성

제작된 horizontal paddle type bioreactor는 원통형 반응조, 온도조절장치, torque 측정장치를 내장한 회전축, 그리고 각종 controller로 구성되어 있다. 반응조는 stainless steel로 제작된 5L 용량의 원통형 vessel로서 각종 paddle을 교환 부착할 수 있도록 하였으며, 반응조 내부에는 수평회전축에 부착된 paddle의 회전운동에 의하여 교반되도록 하였다. 또한 반응조와 수평회전축 접착부위에서의 반응조 내부액의 유출을 막기 위해 mechanical seal을 사용하였다. 반응조 내부구조를 도식화하여 Fig. 1에 나타내었다.

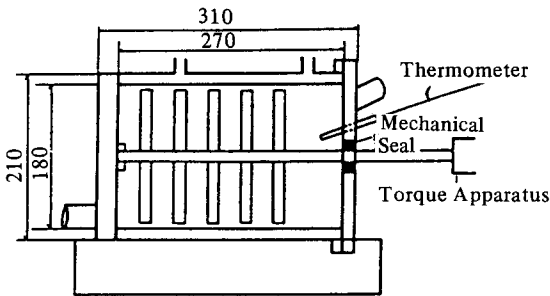


Fig. 1. The shape and dimension of horizontal paddle type bioreactor (dimension; mm).

반응조내의 온도측정은 반응조내에 함입된 thermometer에 의해 측정하였으며, 반응조 외부에 water jacket을 부착하여 반응조내 온도를 55°C로 일정하게 유지하였다. Controller는 교반속도 조절 및 계측기, torque 계측기, temperature controller, voltage and ampere meter로 구성되어 있다. Paddle의 교반속도는 최대 340 rpm으로, 온도는 90°C까지 조절 가능하며, 회전축의 회전에는 1/2HP의 정밀 DC motor를 사용하였다.

Bioreactor의 조작에 소모되는 동력측정

Horizontal paddle type bioreactor에서 각 실험조건의 변동에 따른 동력소모량은 전압을 100 V로 일정하게 유지한 후 일정한 회전속도하에서 소모되는 전류량을 측정하여 motor의 고유동력소모치인 Orpm에서의 전류값을 감하여 얻었다.

Horizontal paddle type bioreactor에서의 당화

Bioreactor에서의 섬유소의 효소가수분해는 α -cellulose 50g/L, 증류수 0.67L, 0.2M Na-citrate buffer(pH 4.8) 0.25L를 혼합하여 55°C로 조절한 후 여기에 효소액 0.03L를 첨가하여 일정 교반속도하에서 당화시켰다. 최적조건을 조사하기 위해서 교반속도, 분쇄마찰매체 종류 및 첨가량, 기질농도를 변화시켰다.

분석방법

Soluble protein은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 법(13)으로, 생성환원당은 표준물질로 glucose를 사용하여 DNS 법(14)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

Horizontal paddle type bioreactor의 효용성

분쇄마찰매체 함유반응계에서 섬유소의 당화 촉진은 섬유소분해효소와 분쇄마찰매체의 상호작용에 의한 섬유소의 fragmentation현상의 유발과 이에 따른 가용표면적의 재생에 있다(11). 이와같은 가용표면적의 재생은 효소가 작용할 수 있는 부위를 증가시켜 효소반응을 크게 증가시키게 된다. 분쇄마찰매체에 의한 당화촉진효과를 극대화하기 위해서는 반응조내의 마찰매체의 운동패턴을 조절하여 주는것이 필요하다.

제작한 horizontal paddle type bioreactor의 효용성을 검토코저 분쇄마찰매체를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군을 대비하면서 실험한 결과는 Fig. 2와 같다.

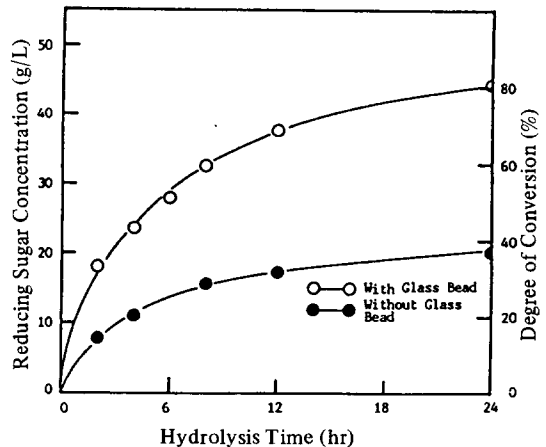


Fig. 2. Hydrolysis of cellulose with and without glass bead; 5%(w/v) slurry concentration, 500g glass bead/L, 200rpm, 55°C.

분쇄마찰매체인 유리구를 첨가하지 않은 군은 6시간 후 14g/L, 24시간 후 20g/L, 첨가한 군은 29g/L, 44g/L로서 전자에 비해 당화율이 2배이상 증가하였다. 이는 통상의 섬유소 효소가수분해에 의해서는 얻기 어려운 높은 당수율이며 또한 전보(11,12)에 보고한 바 있는 vertical impeller로 매체를 교반하는 agitated bead type bioreactor 나 반응조인 drum 자체를 회전시키는 tumbling drum type bioreactor에서 얻은 결과에 비하여 향상된 수준임을 알 수 있다. Horizontal paddle type bioreactor는 전보(11,12)에서 기술한 두 종류의 bioreactor에 비해 분쇄마찰매체가 반응조내 전체에 분포됨으로 인해 교반에 소요되는 동력을 절감시킬 뿐만 아니라, 공업적 규모의 scale-up 시 안정성이 높은 효율적인 반응 장치라 사료된다.

200 rpm에서도 이에 근접한 결과를 보이고 있다. 이보다 낮은 교반강도에서는 교반매체의 분쇄마찰효과가 낮고 또 섬유소현탁액의 혼합이 효과적으로 이루어지지 않음으로 인해 당화율이 감소한다고 사료된다. 300 rpm 이상의 교반강도에서는 기계장치상의 제한때문에 실험할 수 없었으나, 더 이상의 당화율증가는 없을 것으로 유추된다. 이와 같은 높은 교반강도하에서는 섬유소현탁액의 효과적인 혼합은 가능하나 분쇄마찰매체가 섬유소현탁액 중에 부유하게되어 유리구와 유리구, 그리고 유리구와 섬유소간의 효과적인 분쇄마찰작용이 발생하지 않을 것으로 판단된다.

Horizontal paddle type bioreactor가 agitated bead type bioreactor에 비교하여 낮은 교반강도에서도 훌륭한 당화촉진효과를 나타내는 것으로 보아, 내용량으로의 scale-up 시 반응조내의 단위면적에 분포된 분쇄마찰매체당 접촉 반응량을 적절히하여 줌으로써 용액전체가 동시에 분쇄마찰효과를 받을 수 있도록 장치를 설계함이 필요하다라고 사료된다. 본 연구에서는 교반속도 증가는 사용되는 동력을 증가시킴으로 최고의 당수율을 보이는 300 rpm 대신 거의 비슷한 당화율을 나타내는 200 rpm을 최적 교반강도로 결정하였다.

2. 분쇄마찰매체 첨가량 및 종류의 영향

Horizontal paddle type bioreactor를 이용한 섬유소 효소당화에서 분쇄마찰매체 첨가량에 의한 영향을 조사하기 위하여 섬유소와 유리구의 비를 1:6(300g/L), 1:8(400g/L), 1:10(500g/L), 1:12(600g/L), 1:14(800g/L)로 변화시키면서 당화시켰으며 그 결과는 Fig. 4와 같다.

섬유소와 유리구의 무게 혼합비가 1:12인 600g/L를 반응조에 첨가했을때 가장 높은 당화율을 보이고 있으나, 무게 혼합비가 다소낮은 1:10에서도 거의 비슷한 당화율을 보이고 있어 소모동력을 고려할 때 주목할만하다. 유리구 첨가량이 증가할수록 동력소모는 비례하여 증가함으로 500g/L가 가장 적당한 첨가량으로 판단된다. 또한 전보(11,12)에 기술한 바 있는 2종의 bioreactor와는 달리 유리구의 첨가량을 어느 수준으로 증가하여도 당화율의 급속한 감소현상은 관찰되지 않았다. 이는 본 bioreactor에서는 과다한 양의 유리구를 첨가하더라도 원활한 분쇄마찰 운동양상을 유지할 수 있는 데 있다고 판단된다.

본 실험에 사용된 분쇄마찰매체로서 직경 3mm인 유리구외에 이보다 직경이 큰 6mm 유리구를 동일한 실험 조건에서 500g/L 첨가하여 실험하였으며, 그 결과는 Fig. 5와 같다.

직경 6mm인 유리구가 3mm인 유리구 사용에 비해

Horizontal paddle type bioreactor의 최적조작조건외 검토

1. 최적교반강도의 조사

Horizontal paddle type bioreactor의 최적교반속도를 조사하기 위하여 55°C로 고정된 bioreactor에서 교반속도를 100, 200, 300 rpm으로 변화시키면서 당화시켰으며, 이때 기질농도는 50g/L, 유리구 첨가량은 500g/L였다. 가수분해시간에 대한 환원당농도 및 수율을 경시적으로 비교하여 Fig. 3에 나타내었다.

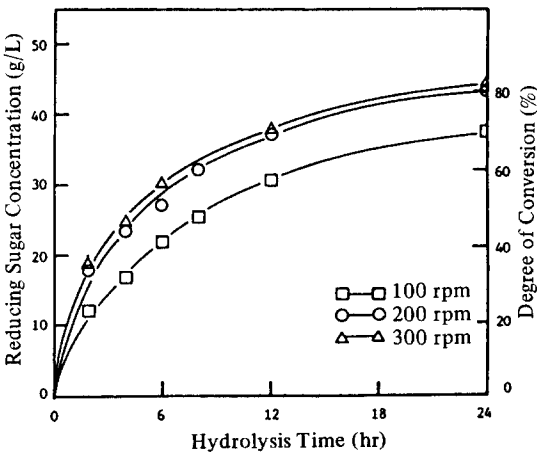


Fig. 3. Effect of agitation intensity on enzymatic hydrolysis of cellulose in a horizontal paddle type bioreactor; 5% (w/v) slurry concentration, 500g glass bead/L, 55°C.

교반강도가 증가할수록 당화율이 증가함을 알 수 있으며, 300 rpm에서 가장높은 당화율을 나타내고 있으나,

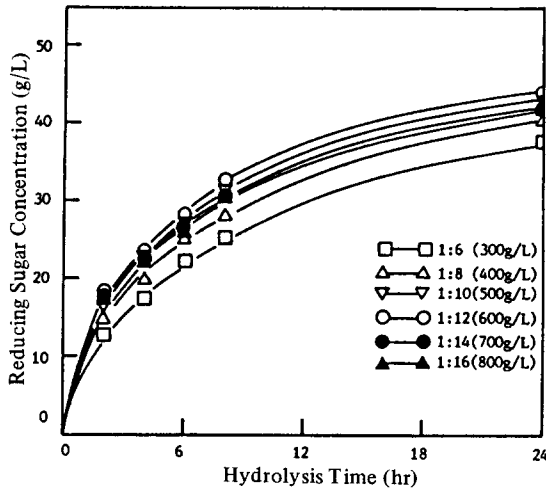


Fig. 4. Effect of the amount of glass bead charged on enzymatic hydrolysis of cellulose in a horizontal paddle type bioreactor; 5% (w/v) slurry concentration, 200rpm, 55°C.

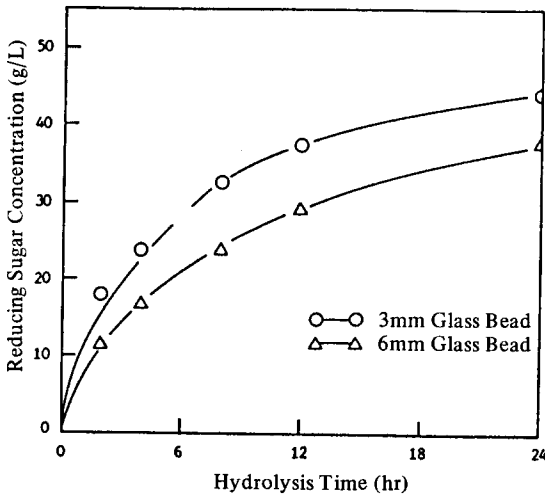


Fig. 5. Effect of different milling media of the same volume on enzymatic hydrolysis of α -cellulose in a horizontal paddle type bioreactor; 5% (w/v) slurry concentration, 200rpm, 55°C.

당화율이 다소 감소함을 볼 수 있는데, 이는 유리구 직경증가에 따라 단위 분쇄마찰매체당 접촉용액량이 감소되어 분쇄마찰효과가 감소하는데 있는 것으로 보여진다.

전보(11,12)의 결과로 유추컨데 이보다 직경이 큰 유리구를 사용하더라도 당화율의 증가는 기대되지 않는다.

3. 기질농도의 영향

단시간에 고농도의 당화액을 확보함은 당농축 에너지의 절감, 반응조 용량의 축소가능 등 많은 장점이 있어 섬유소를 고농도에서 효율적으로 당화시킬 수 있는 bioreactor의 개발은 무엇보다 중요하다 하겠다. Horizontal paddle type bioreactor의 고농도기질에 대한 효율성을 검토코져 기질농도 50g/L를 기준으로 섬유소를 75g/L, 100g/L의 고농도로 첨가시켜 당화하였으며, 그 결과를 비교하여 Fig. 6에 나타내었다. 이때 분쇄마찰매체인 유리구 첨가량은 500g/L로 일정하게 유지하였으며, 효소량만 기질증가비만큼 증가시켰다.

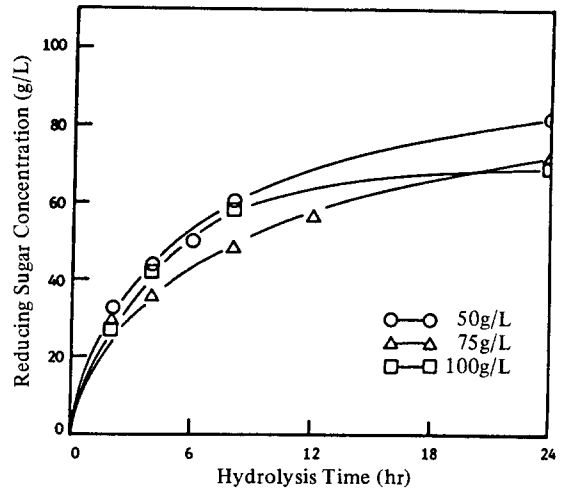


Fig. 6. Effect of substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose in a horizontal paddle type bioreactor; 500g glass bead/L, 200rpm, 55°C.

일반적으로 분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 실험에서는 75g/L과 같이 고농도로 기질을 첨가할 경우 섬유소의 높은 흡수성때문에 대부분의 유동성 수분이 섬유소내부에 흡수되어 cellulose network를 형성함으로써 유동성의 감소를 일으켜 섬유소 당화저해현상을 일으킨다. 그러나 분쇄마찰매체를 이용한 horizontal paddle type bioreactor에서는 당화저해 현상이 거의 일어나지 않고, 24시간 이후 75g/L, 100g/L의 고농도기질에 있어 72%, 70%의 높은 당수율을 나타내었다. 이는 효소와 분쇄마찰매체의 상호보완작용에 의한 섬유소 입자의 분

배 및 network의 파괴를 일으켜 고농도의 기질에서도 훌륭한 당화효과를 나타낸 것으로 사료되며, 본 장치는 고농도기질의 당화에 적합한 형태의 bioreactor로 평가된다.

4. Horizontal paddle type bioreactor의 동력소모 및 경제성예측

섬유소의 고효율당화를 목적으로 제작된 horizontal paddle type bioreactor의 경제성 및 산업적 활용가능성을 검토하기위해서는 교반시 소요되는 power당 당생성량의 증가를 일반적인 효소당화법의 경우와 전보(11,12)에 기술한 두 종류의 bioreactor와 비교함이 필요하다.

Table 1은 지금까지 실험한 여러 실험조건하에서 섬

유질 biomass첨가량의 반이 당화되는데 소요되는 시간, 부하되는 initial power, 섬유소의 반을 당화시키는데 소요된 동력, 그리고 포도당 1g 생성시 소모되는 에너지를 각각 표시하였다. 최적당화조건에서의 power 소모량은 9 watt / L이며, 포도당 1g 생성시 소모되는 에너지는 1.7 watt·h / g이었다.

교반속도 및 분쇄매체첨가량이 증가함에 따라 소모되는 power량이 증가함을 볼 수 있으나, 고농도 기질을 사용할 경우 오히려 power량이 감소함을 볼 수 있어 주목할 만하며 이는 현탁액의 공회전에 기인한다. 그러나 power소모량에 의한 비교보다는 에너지 소모량의 검토가 경제성을 검토하는데 더욱 적합하다. 최적당화조건에 비해 낮은 교반속도에서도 당생성량에 대한 에너지

Table 1. The Comparison of Energy Consumption Required for Half Saccharification and 1g Reducing Sugar Production.

	Power (watt/L)	T _{1/2} * (hr)	EC (watt·h/L)	ECG (watt·h/g)
Agitation Speed				
100rpm	5	8.2	41	1.49
300rpm	16	4.4	70.4	2.56
Amount of Glass Bead				
300g/L	7	10	70	2.55
400g/L	8	7	56	2.03
600g/L	11	5	55	2.0
700g/L	13	6.2	80.6	2.93
800g/L	15	6.2	93	3.38
Different Milling Media				
6mm Glass Bead	16	10	160	5.82
Cellulose Conc.				
75g/L	10	6	60	1.54
100g/L	9	5.4	48.6	0.88
Bioreactor Type				
ABTB	4.33	10	43.3	2.62
TDTB	11.12	4	44.48	1.63
Standard**	9	5.2	46.8	1.7

* T_{1/2} ; Half Saccharification Time (hr)

EC ; Energy Consumption Required for Half Saccharification

ECG ; Energy Consumption Required for 1g Reducing Sugar Production

ABTB ; Agitated Bead Type Bioreactor

TDTB ; Tumbling Drum Type Bioreactor

**Standard hydrolysis condition; 5% (w/v) slurry concentration, 200rpm, 500g glass bead/L, 55°C.

소모가 적음으로 scale-up 시 이보다 더 적은 동력소모로도 우수한 당화효과를 기대할 수 있다. 당화율이 높았던 고농도기질에서도 최적당화조건보다 낮은 동력소모를 보이고있어 고농도기질의 사용가능성을 크게 해주고 있다. 본 reactor system 의 최적당화조건에서의 동력소모량은 전보(11,12)의 결과인 agitated bead type bioreactor 와 경우 2.62 wath/g 그리고 tumbling drum type bioreactor 의 경우인 1.63 wath/g 와 비교할때 이들 값의 중간 값을 취하였다. 그러나 tumbling drum type bioatritor 와는 동력소모가 큰 차이가 없을 뿐만아니라, 고농도기질에서 높은 당화율을 얻을 수 있었고, 또 scale-up 이 용이할 것으로 예상되어 가장 효율적인 장치로 판단된다.

요 약

불용성 기질인 섬유소의 고효율 효소당화에 적합한 저 에너지 소모형 분쇄마찰매체 함유 효소반응기의 개발을 목표로 수평형 회전축에 부착된 paddle 에 의해 반응조 내부의 섬유소-분쇄마찰매체-효소의 혼합액을 교반 마찰시키는 horizontal paddle type bioreactor 를 제작하여 효용성과 당화조건을 검토하였다. 여러 실험조건하에서 당생성효율과 분쇄마찰매체의 교반시 소모되는 에너지를 다른 두 형태의 bioreactor 와 비교 분석함으로써 공업적 활용을 위한 기술적, 경제적 타당성을 비교 평가하였다. 표준당화조건은 3 mm 의 분쇄마찰매체를 500 g/L 첨가하여 200 rpm 에서 교반할 때였으며, 특히 HPTB 는 고농도 기질의 당화에 적합한 bioreactor 로 판단된다. 표준당화조건에서 분쇄마찰매체의 교반시 소모되는 동력은 1.7 wath/g 였으며, 고농도기질을 이용할 경우 더욱 낮은 동력소모로 당을 생산할 수 있었다. 뿐만아니라 scale up 이 용이할 것으로 예상되는 등 섬유소의 고농도 당화에 적합한 고효율 분쇄마찰매체 함유 효소반응기로 판단된다.

감 사

본 연구는 한국과학재단 86-88 목적기초연구비의 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. L. T. Fan, Y. H. Lee and M. M. Gharpuray(1982), *Advances in Biochemical Engineering*, **23**, 157.
2. Y. H. Lee, C. W. Robinson and M. Moo-Young(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 572.
3. G. H. Robertson, E. M. Zaragosa and A. E. Pavlath(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1159.
4. L. Vallander and K. -E Eriksson(1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 650.
5. A. G. Hashimoto(1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1857.
6. R. G. Kelsey and F. Shafizadeh(1980), *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1025.
7. M. G. Nielson, R. G. Kelsey and F. Shafizadeh(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 293.
8. S. K. Ryu and J. M. Lee(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 53.
9. Y. H. Lee(1985), *J. Natural Sciences of Kyungpook National University*, **3**, 115.
10. K. D. Oh and C. Kim(1987), *Korean J. of Chem. Eng.*, **4(2)**, 105.
11. 이용현, 박진서, 윤대모(1989), *한국생물공학회지*, **4(2)**, 78.
12. 이용현, 조구형, 박진서(1989), *한국생물공학회지*, **4(2)**, 87.
13. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
14. Sigma Corporation(1989), Sigma Diagnostic Glucose Procedure No. 510, Sigma Catalogue.

(Received September 24, 1989)