

Hydrolysis of Cellulose by Immobilized Cellulase in a Packed Bed Reactor

Byung Chul Kang* and Jong Baek Lee

Department of Chemical Engineering, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Received September 9, 2013 / Revised November 4, 2013 / Accepted November 22, 2013

Immobilized cellulase on weak ion exchange resin showed a typical Langmuir adsorption isotherm. Immobilized cellulase had better stability with respect to pH and temperature than free cellulase. Kinetics of thermal inactivation on free and immobilized cellulase followed first order rate, and immobilized cellulase had a longer half-life than free cellulase. The initial rate method was used to characterize the kinetic parameters of free and immobilized enzyme. The Michaelis-Menten constant K_m was higher for the immobilized enzyme than it was for the free enzyme. The effect of the recirculation rate on cellulose degradation was studied in a recycling packed-bed reactor. In a continuous packed-bed reactor, the increasing flow rate of cellulose decreased the conversion efficiency of cellulose at different input lactose concentrations. Continuous operation for five days was conducted to investigate the stability of long term operation. The retained activity of the immobilized enzymes was 48% after seven days of operation.

Key words : Packed-bed reactor, immobilized cellulase, cellulose degradation, Duolite A568

서 론

바이오매스를 당(sugar)으로 전환한 후 발효 혹은 화학적 변환에 의해 에탄올과 같은 액체 연료나 화학물질을 생산하는 것에 대한 많은 연구가 진행되고 있다[17]. 바이오매스에 포함된 셀룰로스를 물질의 주 성분은 헤미셀룰로스(hemicellulose), 셀룰로스 그리고 리그닌(lignin)으로 구성된다. 이 중 셀룰로스는 변환에 의해 포도당으로 전환되지만 헤미셀룰로스는 pentose로 전환되어 발효에 의해 에탄올로 전환하는 것이 어렵다[24].

셀룰로스가 포도당으로 전환하는 공정은 산 분해 혹은 효소 분해에 의해 진행되는데 산 분해는 고온에서 운전되고 부식의 문제가 있으며 또한 에탄올 생산성이 낮은 단점이 있다. 이런 단점을 극복하기 위해 효소 가수 분해 공정을 사용한다[2, 13]. Cellulase는 셀룰로스를 당으로 분해하는 효소로서 3가지 구성 성분을 가진 복합 효소이다. 첫째 성분은 셀룰로스를 무작위로 가수 분해하는 endoglucanase이고, 둘째 성분은 비환원 말단에서 이당류 단위로 가수 분해하여 cellobiose를 생산하는 exoglucanase이고 마지막으로 이당류인 cellubiose를 포도당으로 분해하는 β -glucosidase로 구성되어 있다[4].

Cellulase는 전분을 가수 분해하는 효소인 amylase에 비해

활성이 매우 낮기 때문에 바이오매스를 활용하여 재생 에너지를 생산하는 연구에 걸림돌이 되고 있다[8]. 이런 문제점을 해결하기 위한 일환으로 효소 고정화에 대한 연구가 진행되고 있다[19, 25, 28]. 고정화 효소를 사용하면 안정성이 높고 재사용이 가능하기 때문에 전체 공정의 비용을 줄일 수 있다. 고정화 방법으로는 가두기(entrapment)에 의한 방법[5, 27], 담체로 키토산과 PVA를 사용하는 방법[6, 14, 18], 가교에 의한 공유 결합 방법[9], 실리카 겔과 같은 무기물이나 polyacrylamide와 같이 고분자에 의한 고정화 방법[22, 29] 등이 있다. 효소 고정화의 단점인 기질의 물질전달에 의한 확산 저항을 감소시키기 위한 연구도 진행되었다[1, 26]. 고정화 효소 반응기로는 충전층 반응기, 유동층 반응기, 그리고 막 반응기 등이 사용되었다[10, 12].

셀룰로스의 효소 가수분해에 대한 수학적 모델은 대량 생산 공정 개발에 필수적이다. 셀룰로스의 가수 분해의 속도를 연구하기 위해 용해성 셀룰로스인 CMC (carboxy-methyl cellulose)와 WSCA (water-soluble cellulose acetate)를 기질로 사용한다[7]. 셀룰로스의 가수 분해 속도식을 결정하기 위해 초기 속도법과 적분 속도 방정식을 사용한다[15, 21]. 셀룰로스의 분해에서 생성되는 포도당과 cellubiose는 효소반응의 저해물질로 작용하는 것이 알려져 있다[13]. 저해작용이 있는 효소 속도 반응식은 용해성 기질을 사용할 때 Michaelis-Menten 속도식을 변형하여 사용한다[23].

본 연구의 목적은 cellulase 고정화를 통한 효소의 안정성을 증가시키고 셀룰로스의 가수 분해 능력을 향상시키는 것이다. 이것을 위해 본 연구에 사용된 약 염기성 음이온 교환수지 담체는 식품용으로 적절하고 연속조업에서 안정성을 보인 Duolite A568을 사용하였고 이것에 대한 효소의 흡착 특성을

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1702, Fax : +82-51-890-1694

E-mail : bckang@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

조사하였다[10]. 자유 효소와 고정화 효소에 의한 cellulase의 분해 특성을 비교하고 Michaelis-Menten 속도식에 기초한 가수분해에 대한 수학적 모델을 제시하였다. 충전층 반응기에서 운전 조건에 따른 가수분해 능력과 안정성을 평가하였다.

재료 및 방법

효소 및 시약

*Trichoderma reesei*에서 유래된 효소 cellulase는 Sigma Chemical (St. Louis, U.S.A.)에서 구입하였다. 고정화 담체로는 약 염기성 음이온 교환수지인 Duolite A568 (Rohm and Hass, Germany)를 사용하였다. 이 담체는 비교적 균일한 미세기공을 가지며 평균 입자크기는 375 μm 이고 매트릭스는 phenol formaldehyde 이다. 효소 반응에 대한 기질로는 셀룰로스에서 glucopyranose에서 수산화기를 carboxy methyl기로 치환하여 용해될 수 있는 유도체 CMC (carboxy-methyl cellulose)를 사용하였다. 다른 모든 시약들도 1급 이상을 사용하였다.

담체에 대한 효소 흡착 특성

담체에 고정화되는 효소의 흡착 특성을 관찰하기 위해 효소의 농도를 변화시키면서 약 염기성 음이온 교환수지에 고정화되는 효소의 양을 측정하였다. 대표적인 흡착 등온식은 Langmuir와 Freundlich이 있는데 식은 각각 다음과 같이 표시된다[3].

$$\text{Langmuir isotherm: } Y = \frac{Y_{\max}C}{\theta + C}$$

$$\text{Freundlich isotherm: } Y = kC^{1/n}$$

여기서 Y는 담체에 고정화된 효소의 농도이고 C는 용액에 있는 효소의 농도이고 Y_{\max} , θ , k 그리고 n은 흡착 등온선의 특성을 나타내는 상수이다. 고정화 담체에 효소의 농도를 달리하면서 효소용액 20 ml를 투입하였고 고정화 효소의 양과 용액 속에 남아있는 효소의 양을 측정하여 흡착 등온선의 비교는 엑셀의 해 찾기 기능을 사용하여 비선형회귀 방법으로 결정하였다.

효소 고정화

효소 고정화는 담체 약 염기성 음이온 교환수지를 사용하여 충전층 반응기에서 넣고 흡착에 의한 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 우선 충전층 반응기는 원통형 유리관을 사용하였고 지름은 8 mm 그리고 높이는 75 mm로서 부피는 4.0 ml였다. 담체 0.5 g을 충전층 반응기에 넣고 증류수 500 ml를 연동펌프(peristaltic pump)로 1시간 동안 10 ml min^{-1} 의 유량으로 재순환(recirculation)시키면서 담체를 세척하였다. 그 다음에 sodium acetate 완충용액(100 mM, pH 4.6)을 사용하여 마찬

가지 방법으로 1시간 동안 세척을 실시하였다. sodium acetate 완충용액에 적절히 희석된 효소 용액 20 ml를 연동펌프로 10 ml min^{-1} 의 유량으로 12시간 동안 재순환시키면서 효소 고정화를 실시하였다. 담체에 흡착되지 않은 효소를 제거하기 위해 인산완충용액 20 ml로 2회에 걸쳐 연동펌프로 1시간 동안 재순환으로 세척을 실시하였다. 담체에 흡착된 효소의 양은 초기에 투입된 효소의 양과 세척에 의해 상등액(supernatant)으로 빠진 효소의 양의 차이에 의해 결정하였다. 효소의 양은 단백질 측정에 의해 결정되었고 Lowry 방법을 사용하였다 [16].

효소의 활성 측정

효소의 활성 측정은 기질인 CMC의 분해로 생성된 포도당을 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 시약과 반응시켜 540 nm에서 spectrophotometer에서 흡광도로 결정하였다[20]. Michaelis-Menten 속도식에서 속도 상수를 결정하는 방법은 다음과 같다. 기질인 CMC의 농도를 달리하면서 초기 속도를 측정하고 이것을 Lineweaver-Burk plot을 통해 기울기와 절편을 선형회귀에 의해 엑셀에서 초기값을 결정하고 이것을 기준으로 하여 최종 값은 Excel의 Solver 기능을 사용하여 비선형회귀 방법으로 결정하였다.

pH와 온도에 따른 자유 효소와 고정화 효소의 활성을 비교하였다. pH는 3.5에서 6.5까지 변화시켰고 온도는 20°C에서 70°C까지 변화시키면서 자유 효소와 고정화 효소의 활성을 비교하였다. 열 안정성 평가는 60°C에서 자유 효소와 고정화 효소의 활성을 시간에 따른 측정을 실시하였고 이것을 로그 그래프를 이용하여 1차식의 효소 활성 감소를 보이는지 평가하였다.

충진층 반응기 운전

연속 운전에서는 기질의 농도와 유량을 달리하면서 정상상태에 도달한 후 포도당 농도를 측정하였다. 기질인 셀룰로스의 농도를 변화시켰고 각 기질 농도에 대해서 공급되는 유량은 0.5에서 6 ml min^{-1} 로 변화시켰다. 또한 장기 운전에 의한 안정성을 평가하기 위해 기질농도를 일정하게 하고 유량을 1.0 ml min^{-1} 로 5일 동안 연속운전을 실시하였고 이것에 대한 안정성을 평가하였다.

결과 및 고찰

효소의 담체에 대한 흡착 특성

효소의 농도를 0.2 mg ml^{-1} 에서 2.0 mg ml^{-1} 의 범위에서 변화시키면서 담체에 고정화되는 효소의 양을 측정하였다(Fig. 1). 흡착된 효소의 양은 초기 효소농도에서 상등액(supernatant)에 남아있는 효소의 양 사이의 차이에 의해 결정되었다. 효소의 농도가 증가할수록 흡착되는 효소의 양이 완만한 포화

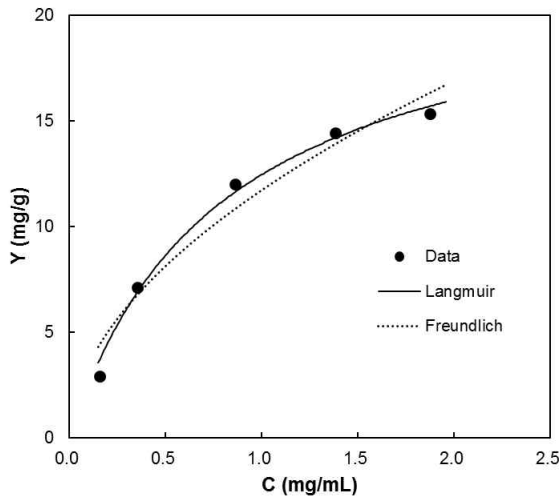


Fig. 1. Comparison of adsorption isotherm of cellulase on Duolite A568. C and Y indicates the cellulase concentration in solution and adsorbed cellulase in support, respectively.

곡선을 보이면서 증가함을 알 수 있다. 실험에서 구한 흡착 결과를 Langmuir와 Freundlich 흡착 등온식을 사용하여 비교하여 보았다. 비선형회귀에 의한 최적의 매개변수 값을 결정하였는데 Freundlich 등온식의 k와 n 값은 각각 11.7과 0.52로 결정되었고 Langmuir 등온식의 Y_{max} 와 θ 값은 각각 22.3과 0.79였다. Langmuir 등온식이 실험 결과를 Freundlich 보다 잘 나타내고 있음을 보여 주었다. Cellulase에 대한 고정화 흡착 특성을 나타낸 문헌은 없지만 효소 amylase의 담체에 흡착 특성을 연구한 결과에 의하면 Langmuir 흡착 등온식이 Freundlich 흡착 등온식 보다 흡착 특성을 잘 나타냄을 보여주었다[3].

고정화 cellulase의 특성

자유 효소와 고정화 효소의 활성을 pH에 대한 함수로서 조사하였다(Fig. 2). 자유 효소와 고정화 효소의 활성은 pH 4.6에서 최적을 나타내었다. 고정화에 의해 최적 pH가 변하지 않았다. 고정화 효소의 활성은 그림에서 알 수 있듯이 모든 조사된 pH 범위에서 자유 효소의 활성보다 높음을 알 수 있다. 이것은 고정화에 의해 효소의 안정성이 증가되었기 때문이다. 효소 활성에 대한 온도의 영향을 조사하였다(Fig. 3). 모든 온도 범위에서 고정화 효소의 활성이 자유 효소에 비해 높게 나타났다. 그리고 고정화 효소의 활성이 45°C에서 최적을 보였는데 이것은 자유 효소보다 5°C 높게 나타났다. 고정화 효소는 자유 효소에 비해 온도에 대한 안정성이 높아 높은 온도에서 운전할 수 있는 유리한 점이 있다는 것을 보여 준다. Duolite 담체에 고정화된 cellulase의 경우에는 pH보다 온도에 대한 안정성이 넓고 높기 나타났다. 이것은 일반적으로 고정화 효소의 경우 담체 내부에 효소가 고정화됨으로 인해 열에 의한 효소의 구조적인 변형이 어렵기 때문이다[11].

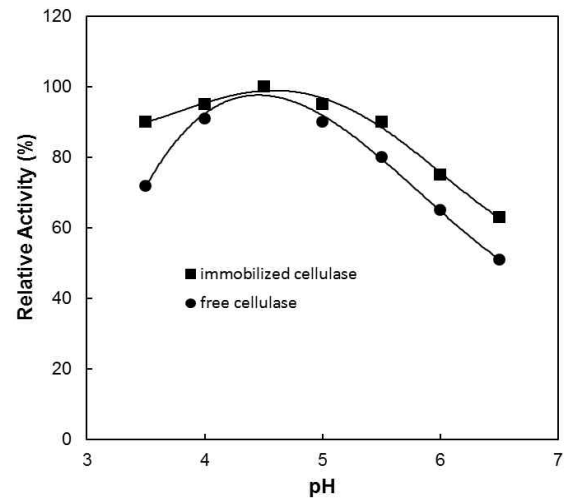


Fig. 2. Effect of pH on activity of free and immobilized cellulase. Relative activity was determined using enzyme activity under different pH divided by maximum enzyme activity achieved.

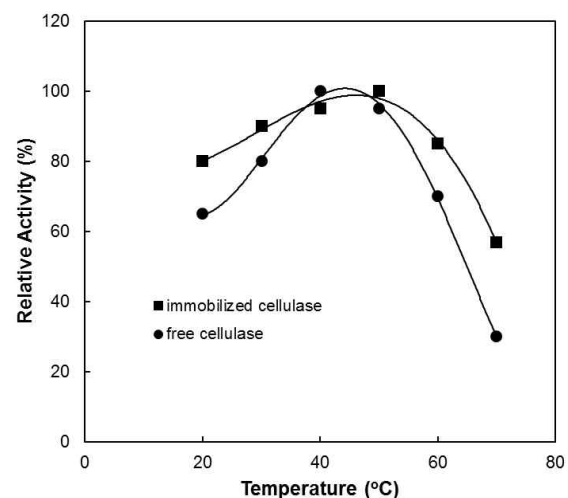


Fig. 3. Effect of temperature on activity of free and immobilized cellulase. Relative activity was determined using similar relation given in Fig. 2.

고정화 효소의 반응 속도

자유 효소와 고정화 효소의 셀룰로스 가수 분해에 대한 반응 속도를 조사하였다. 기질로는 용해성 셀룰로스인 CMC를 사용하였다. CMC는 셀룰로스에서 glucopyranose에서 수산화기를 carboxymethyl기로 치환한 셀룰로스의 용해성을 부여한 유도체이다. 자유 효소와 고정화 효소의 가수분해는 Michaelis-Menten 식을 잘 따르고 속도 상수인 K_m 과 V_m 은 Lineweaver-Burk plot에서 절편과 기울기에서 구하고 이것을 초기값으로 하여 비선형 회귀로 최적의 상수를 결정하였다(Fig. 4). 고정화 cellulase의 Michaelis 상수인 K_m 값은 30.1 mg ml⁻¹로 자유 효소의 값인 20.9 mg ml⁻¹에 비해 약 1.5배 정도 높음을 알 수 있다. 이것은 일반적으로 고정화 효소의 경우

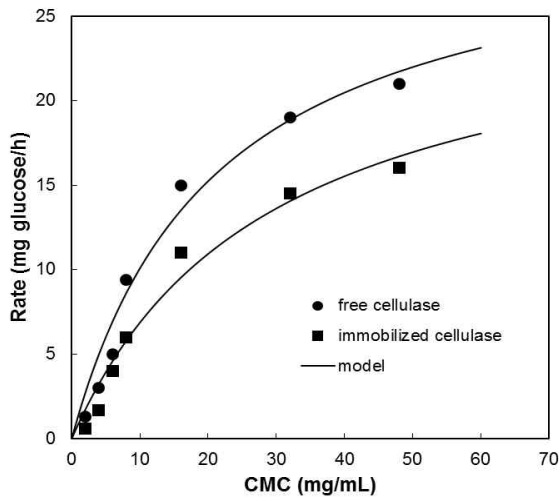


Fig. 4. Comparison of free and immobilized cellulase kinetics using initial rate method to evaluate Michaelis-Menten constants. Model line was obtained using least square of error minimized by Excel Solver.

기질에 대한 친화도가 자유 효소에 비해 감소하기 때문이다. 문헌에 제시된 결과와 비슷한 값을 보여 주고 있다. 최대 속도인 V_m 은 자유 효소나 고정화 효소 비슷하게 나타났다.

열 안정성

열에 대한 안정성을 평가하기 위해 60°C에서 시간에 따른 효소의 활성을 측정하였다(Fig. 5). 효소의 열에 대해서 활성을 잃는 속도식은 1차식을 따른다고 알려져 있다. 효소 활성을 로그 스케일로 나타내었는데 선형적으로 감소하는 하는 것을 알 수 있고 이것으로부터 열에 대한 효소 활성 감소는 1차식과 부합한다는 것을 알 수 있다. 고정화 효소가 자유 효소에 비해

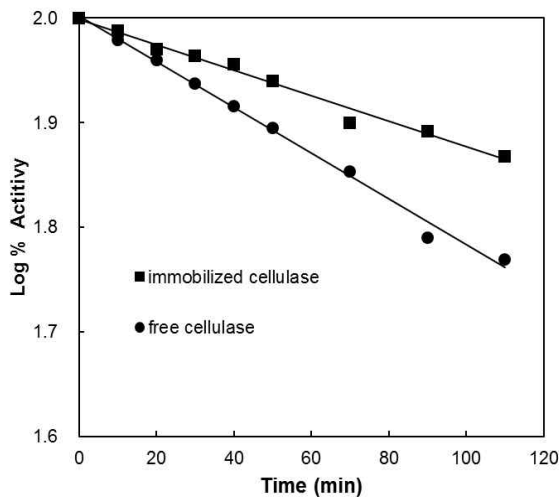


Fig. 5. Kinetics of thermal deactivation of free and immobilized cellulase at 60°C. At start of experiment, relative activity of both free and immobilized cellulase was set to 100%.

높은 완만한 기울기에서 알 수 있듯이 열 안정성이 우수함을 알 수 있다. 반감기는 고정화 효소의 경우 250 min이었고 자유 효소는 143 min으로 계산되었다. 고정화 효소의 열 안정성이 우수한 것은 효소가 담체에 고정화되면서 구조적 안정성을 유지하기 때문으로 문헌들이 보고하고 있다.

충진층 반응기 운전

충진층 반응기에서 기질인 셀룰로스를 재순환시키면서 포도당의 생산을 계속적으로 측정하였다(Fig. 6). 투입되는 기질의 농도를 달리하면서 셀룰로스의 가수분해를 조사하였는데 기질의 농도를 증가시킬수록 포도당의 생산은 증가하였다. 기질을 재순환시키지 않는 연속 운전을 충진층 반응기에서 실시하였다. 투입되는 유량과 기질인 셀룰로스의 농도 변화에 따른 포도당 생산량을 측정하였다(Fig. 7). 유량이 증가할수록 포도당의 생산은 감소함을 알 수 있다. 이것은 기질과 효소의 접촉시간이 단축되기 때문에 포도당의 생산은 감소하지만 생산성을 증가시키기 위해서는 투입 유량을 높여야 한다. 이 결과는 문헌과 잘 일치하며 포도당 생산을 늘리기 위해서는 단일 반응기보다는 다단 반응기가 유리하다고 판단된다. 담체에 고정화한 효소의 유당 분해에 대한 운전 결과를 수학적 모델링에 의해 충진층 반응기에서 투입되는 유량이 증가할수록 기질의 전환율은 감소하였고 이것은 실험 결과와 잘 일치함을 알 수 있다[10].

고정화 효소의 운전 안정성을 평가하기 위해 장시간 연속 운전을 실시하여 효소의 활성 변화를 측정하였다(Fig. 8). 시간이 경과하면서 효소의 활성이 감소함을 알 수 있다. 고정화 cellulase의 활성이 반으로 감소하는 반감기는 운전 7일 후에 도달하였다. 기존 문헌들은 회분식 반응을 반복하면서 반복 회분식 반응에 따른 효소 활성을 측정하여 반감기를 결정하였

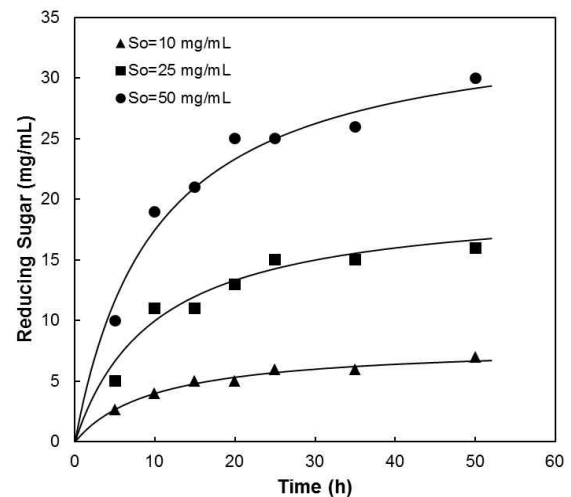


Fig. 6. Hydrolysis of CMC by immobilized cellulase in a recycling packed bed reactor under various initial CMC concentrations in reservoir.

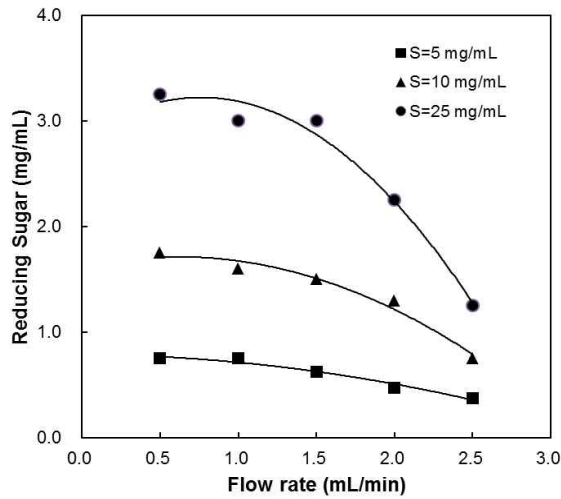


Fig. 7. Hydrolysis of CMC by immobilized cellulase in a continuous packed bed reactor. Reducing sugar concentration was obtained under steady state condition.

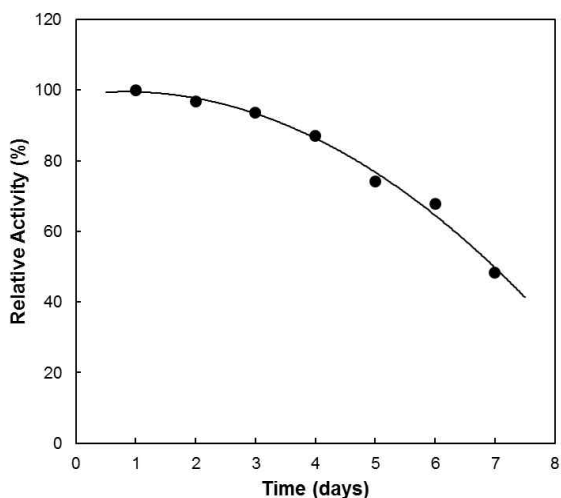


Fig. 8. Continuous operation of immobilized cellulase in a packed bed reactor using fixed CMC concentration of 5 mg/ml and fixed flow rate of 1 ml/min.

다. 대부분 10회 반복 이내에서 반감기에 도달하였는데 반복 회분식에서 고정화 효소를 10회 이내로 재활용할 수 있음을 보여준다. 이에 비해 연속식 운전은 계속적으로 생산이 가능하기 때문에 생산성과 안정성 면에서 모두 우수함을 알 수 있다.

References

- Al-Muftah, A. E. and Abu-Reesh, I. M. 2005. Effects of internal mass transfer and product inhibition on a simulated immobilized enzyme-catalyzed reactor for lactose hydrolysis. *Biochem Eng J* **23**, 139-153.
- Bahcegul, E., Tatli, E., Haykir, N. I., Apaydin, S. and Bakir, U. 2011. Selecting the right blood glucose monitor for the determination of glucose during the enzymatic hydrolysis of corncob pretreated with different methods. *Bioresour Technol* **102**, 9646-9652.
- Bautista, L. F., Martinez, M. and Aracil, J. 1999. Adsorption equilibrium of α -amylase in aqueous solutions. *AIChE J* **45**, 761-768.
- Bayer, E. A., Chanzy, H., Lamed, R. and Shoham, Y. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 548-557.
- Busto, M. D., Ortega, N. and Perez-Mateos, M. 2004. Characterization of microbial endo- β -glucanase immobilized in alginate beads. *Acta Biotechnol* **18**, 189-200.
- Dinçer, A. and Telefoncu, A. 2007. Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *J Mol Catal B: Enzym* **45**, 10-14.
- Gan, Q., Allen, S. J. and Taylor, G. 2003. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview, an experimental study and mathematical modeling. *Process Biochem* **38**, 1003-1018.
- Imai, M., Ikari, K. and Suzuki, I. 2004. High-performance hydrolysis of cellulose using mixed cellulase species and ultrasonication pretreatment. *Biochem Eng J* **17**, 79-83.
- Jones, P. O. and Vasudevan, P. T. 2010. Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase. *Biotechnol Lett* **32**, 103-106.
- Kang, B. C. 2010. Hydrolysis of egg yolk protein in a packed bed reactor by immobilized enzyme. *J Life Sci* **20**, 1656-1661.
- Kang, B. C. 2011. Characteristics of lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase on chitosan bead. *J Life Sci* **21**, 127-133.
- Karube, I., Tanaka, S., Shirai, T. and Suzuki, S. 1977. Hydrolysis of cellulose in a cellulase-bead fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng* **19**, 1183-1191.
- Levine, S. E., Fox, J. M., Blanch, H. W. and Clark, D. S. 2010. A mechanistic model of the enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol Bioeng* **107**, 37-51.
- Liao, H., Chen, D., Yuan, L., Zheng, M., Zhu, Y. and Liu, X. 2010. Immobilized cellulase by polyvinyl alcohol/Fe₂O₃ magnetic nanoparticle to degrade microcrystalline cellulose. *Carbohydr Polym* **82**, 600-604.
- Lortie, R. 1994. Evaluation of the performance of immobilized enzyme reactors with Michaelis-Menten kinetics. *J Chem Tech Biotechnol* **60**, 189-193.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lupoi, J. S. and Smith, E. A. 2011. Evaluation of nanoparticle-immobilized cellulase for improved ethanol yield in simultaneous saccharification and fermentation reactions. *Biotechnol Bioeng* **108**, 2835-2843.
- Mao, X., Guo, G., Huang, J., Du, Z., Huang, Z., Ma, L., Li, P. and Gu, L. 2006. A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulose immobilization. *J Chem Tech Biotech* **81**, 189-195.
- Mateoa, C., Palomoa, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. and Fernandez-Lafuente, V. 2007. Improvement of en-

- zyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* **40**, 1451-1463.
20. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Biochem* **31**, 426-428.
 21. Özdural, A. R., Tanyolac, D., Boyaci, I. H., Mutlu, M. and Webb, C. 2003. Determination of apparent kinetic parameters for competitive product inhibition in packed-bed immobilized enzyme reactors. *Biochem Eng J* **14**, 27-36.
 22. Paljevac, M., Primožič, M., Habulin, M., Novak, Z. and Knez, Ž. 2007. Hydrolysis of carboxymethyl cellulose catalyzed by cellulase immobilized on silica gels at low and high pressures. *J Supercrit Fluids* **43**, 74-80.
 23. Peri, S., Karra, S., Lee, Y. Y. and Karim, M. N. 2007. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol Prog* **23**, 626-637.
 24. Philippidis, G. P., Smith, T. K. and Wyman, C. E. 1993. Study of the enzymatic hydrolysis of cellulose for production of fuel ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation process. *Biotechnol Bioeng* **41**, 846-853.
 25. Saville, B. A., Khavkine, M., Seetharam, G., Marandi, B. and Zuo, Y. L. 2004. Characterization and performance of immobilized amylase and cellulase. *Appl Biochem Biotechnol* **113**, 251-259.
 26. Tébéka, I. R., Silva, A. G. and Petri, D. F. 2009. Hydrolytic activity of free and immobilized cellulase. *Langmuir* **25**, 1582-1587.
 27. Ungurean, M., Paul, C. and Peter, F. 2012. Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. *Bioprocess Biosyst Eng* **35**, 1-12.
 28. Woodward, J. 1989. Immobilized cellulase for cellulose utilization. *J Biotechnol* **11**, 299-311.
 29. Yuan, X. Y., Shen, N. X., Sheng, J. and Wei, X. 1999. Immobilization of cellulase using acrylamide grafted acrylonitrile copolymer membranes. *J Membr Sci* **155**, 101-106.

초록 : 충전층 반응기에서 고정화 cellulase에 의한 셀룰로스 가수 분해

강병철* · 이종백

(동의대학교 화학공학과)

약 염기성 이온교환 수지에 cellulase를 고정화하였고 고정화 cellulase는 흡착 특성이 Langmuir 흡착 등온선을 잘 따랐다. pH와 온도에 대한 효소 활성은 고정화 효소가 우수한 특성을 보였다. 열에 대한 효소 활성은 1차식으로 감소하였고 고정화 효소가 자유 효소에 비해 열 안정성이 우수하였다. 초기 속도법을 통해서 자유 효소와 고정화 효소의 Michaelis-Menten 속도 상수를 결정하였고 속도상수 K_m 은 고정화 효소가 큰 값을 나타내었다. 충전층 반응기에서 셀룰로스의 전환 공정을 재순환에 의해 측정하였다. 투입되는 셀룰로스의 유량 변화에 대한 셀룰로스의 변환을 연속 공정에서 조사하였다. 장기 운전의 성능을 평가하기 위해 7일 통한 연속공정을 실시하였고 고정화 효소는 48%의 활성을 유지하였다.