

## 키토산 비드에 고정화된 셀룰라아제의 특성

이상현, 하용일, 김보영, 김범수\*

# Properties of Cellulase Immobilized on Chitosan Beads

Sang Heon Lee, Yongil Ha, Bo Young Kim, and Beom Soo Kim\*

접수: 2014년 5월 8일 / 게재승인: 2014년 6월 2일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Recently, there is a growing interest in efficient biomass pretreatment and saccharification processes to produce biofuels and biochemicals from renewable non-food biomass resources. In this study, glucose was produced from cellulose by immobilizing cellulase enzyme on chitosan beads which was reported to have high pH and temperature stability. The immobilized amounts of cellulase on chitosan beads linearly increased with increasing the concentrations of cellulase solution. The glucose production increased to 7.2 g/L from 1% carboxymethyl cellulose (CMC) substrate when immobilized at 20% cellulase solution. The maximum specific activity was 0.37 unit/mg protein when immobilized at 8% cellulase solution. At pH 7 and 37°C, the optimum reaction composition was 0.5 g beads/L from 1% CMC substrate. At this condition, the conversion to glucose completed at ca. 20 min.

**Keywords:** Cellulase, Immobilization, Chitosan beads

### 1. INTRODUCTION

최근 재생 가능한 비식용 바이오매스 자원으로부터 바이오 연료 및 바이오케미칼 생산을 위하여 효율적인 바이오매스의 전처리 및 당화공정에 대한 관심이 증가하고 있다 [1-3]. 바이오에탄올은 자동차 수송연료 (가솔린 대용 또는 가솔린과 혼합)로 사용되는 것 이외에도 각종 석유화학 공정에서

부타디엔 원료, 세정제 등으로 사용될 수 있다. 현재 바이오에탄올의 원료는 크게 당질계 (사탕수수, 사탕무 등), 전분질계 (옥수수, 감자, 고구마 등), 목질계 (간벌재, 폐목재, 볏짚 등) 등으로 나눌 수 있다 [4]. 당질계의 경우 원료를 비교적 간단한 전처리 과정 후 이어지는 발효공정을 통해 곧바로 바이오에탄올로 전환이 가능하며 비교적 저렴하게 수송용 에탄올을 제조할 수 있으나, 이 경우 브라질과 같이 국토의 면적이 충분히 사탕수수 재배면적이 넓은 경우에만 적용할 수 있어 당질계를 이용한 수송용 바이오에탄올 생산기술은 국내 실정에 맞지 않다. 옥수수, 고구마 등과 같은 전분질계 바이오매스는 효소당화에 의해 용이하게 발효 가능한 포도당으로 전환이 가능하고 이후 과정은 당질계 에탄올 생산 방법과 동일하다. 현재 상용화된 바이오 에탄올 생산기술은 모두 식량자원인 당질계 및 전분질계 바이오매스를 원료로 사용함으로 인해 인류의 식량수급 상황과 매우 밀접한 연관관계가 존재한다. 장기적으로 볼 때, 이러한 문제를 극복하기 위해 보다 값싸고 원료 수급에 문제가 적은 제2세대 바이오매스라고 불리는 목질계 바이오매스를 원료로 사용하는 기술이 전세계적으로 개발 중에 있다.

효소는 대부분 단백질로 구성되어 열과 강산, 강알칼리, 유기용매에 약하고 활성이 불안정하다. 효소 반응에 있어서 짧은 시간 내에 활성이 소실된 효소는 반응 종료 후 생성물과 효소의 분리가 어렵고, 효소의 재사용이 불가능하다. 이러한 특징을 가진 효소는 생산단가가 높고 반응공정에 있어서 많은 어려움을 가져다 준다. 이와 같은 문제점을 해결하는 방법 중 효소의 고정화가 매우 유용한 방법으로 인정되어 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [5-10]. 고정화 효소를 이용한 반응공정에는 화학촉매가 존재하지 않아 환경오염문제를 야기하지 않고, 친환경 공정을 개발할 수 있는 이점이 있다. 효소를 이용한 에탄올 생산은 오랜 기간 연구되어 왔으

충북대학교 공과대학 화학공학과  
Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea  
Tel: +82-43-261-2372, Fax: +82-43-269-2370  
e-mail: bskim@chungbuk.ac.kr

며, 현재는 대량 생산 공정에 직접 적용이 가능한 기술 수준까지 도달하였다. 효소학적인 방법에 의한 바이오에탄올의 생산은 친환경적인 공정이라는 장점이 있지만 효소의 가격이 비싸기 때문에 생산 공정의 비용을 줄여야 하는 필요성을 갖고 있다. 이에 제안될 수 있는 방법이 효소의 고정화이다. 효소의 고정화는 담체를 이용하여 물리적인 흡착법과 화학적인 방법에 의해 수행되며 반응액으로부터 분리가 용이하며 재사용이 가능하여 공정 내 비용을 줄이기 위한 적합한 방법으로 제안되고 있다.

본 연구에서는 높은 pH와 온도 안정성을 갖는 것으로 보고된 키토산 비드에 셀룰라아제 효소를 고정화하여 셀룰로오스로부터 포도당을 생산하고자 하였다. Maleic anhydride로 변형시킨 폴리비닐알콜을 키토산 비드에 코팅하는 방법 [11]으로 고정화 지지체를 만든 후 셀룰라아제 효소를 고정화시켰을 때, 셀룰라아제 효소 용액의 농도에 따른 효소의 고정화량과, 각 농도에서 고정화된 효소의 비활성도에 대해 조사하였다. 또한 최대 셀룰라아제 비활성도를 나타낸 조건에서 셀룰로오스로부터 포도당으로의 전환을 수행하였다.

## 2. MATERIALS AND METHOD

### 2.1. 재료

셀룰라아제는 20% (w/v) Viscozyme으로 Novozyme에서 구입하였다. 키토산 (75% 이상 탈아세틸화, 용해도: 10 g/L of 1 M acetic acid), 폴리비닐알콜 (PVA, 평균 분자량 31,000~50,000), sodium tripolyphosphate (TPP), sodium carboxymethyl cellulose (CMC, 평균 분자량: 90,000, extent of labeling: 0.7 carboxymethyl groups per anhydroglucose unit)는 Sigma-Aldrich 사에서 각각 구입하였다. Maleic anhydride는 Fluka 사에서 구입하였으며, 가교제로 쓰인 epichlorohydrin (ECH)은 TCI 사에서 구입하였다.

### 2.2. 키토산 비드의 제조

2% (v/v) 아세트산 용액 100 mL에 키토산 2 g을 용해시킨 키토산 용액 및 TPP 10 g을 증류수 500 mL에 용해시킨 후 1 N HCl을 이용하여 pH 값을 8.2로 맞춘 용액을 준비하였다. 그 후, TPP 용액을 약하게 교반시키면서 뷰렛을 이용하여 키토산 용액을 한 방울씩 떨어뜨렸다. 키토산 용액을 TPP 용액에 떨어뜨리자마자 구 형태의 키토산 비드가 형성되었다. 4시간 동안 경화시킨 후에, sieve를 이용해 키토산 비드를 TPP 용액으로부터 여과하였다. 30 g의 비드를 75 mL의 NaOH 용액 (pH 10)이 들어 있는 플라스크에 넣은 후, 가교제로 ECH (0.04 M)를 첨가하여 50°C에서 6시간 동안 교반시켜 가교 키토산 비드를 제조하였다. 그 후, 반응하지 않은 ECH를 제거하기 위해 비드를 증류수로 세척하였다.

Maleic anhydride를 이용한 PVA의 변형을 위해 12 g의 PVA를 120 mL의 증류수에 용해시켜 PVA 용액을 만들었다. PVA 용액이 든 비커에 magnetic bar를 넣고, pH 전극을 장치한 후

ice bath에서 온도를 4°C로 유지하였다. 4°C로 유지되며 교반되고 있는 PVA 용액에 maleic anhydride 6 g을 천천히 첨가하였고, 1 N NaOH를 이용하여 pH 값을 9.0으로 유지하였다. 최종 혼합 용액의 부피는 약 300 mL이었다.

가교 키토산 비드를 변형된 PVA 용액에 넣고 40°C 항온조에서 1시간 동안 교반시켰다. 그 후, 비드를 sieve로 여과하여 60 mL의 NaOH 용액 (pH 10)이 들어 있는 플라스크에 넣고, ECH (0.15 M)를 첨가하여 40°C에서 2시간 동안 교반시켰다. 그 후, 증류수로 세척하여 가교 키토산 비드를 변형된 PVA로 코팅하였다.

### 2.3. 키토산 비드에 효소 고정화

셀룰라아제 효소 용액과 변형된 PVA가 코팅된 가교 키토산 비드를 2 mL : 1 g의 비로 혼합하여 4°C orbital shaker에서 150 rpm으로 3시간 동안 고정화시켰다. 효소가 고정화된 비드는 sieve로 여과하여 분리한 뒤 비드에 흡착되지 않은 효소를 제거하기 위해 증류수로 세척하여 사용하였다. Fig. 1은 효소가 고정화되기 전과 후의 키토산 비드를 비교한 사진이다. 효소가 고정화된 키토산 비드의 평균지름은 약 3 mm로 관찰되었다.

### 2.4. 셀룰라아제 효소 용액의 농도에 따른 고정화된 효소의 양 측정

20% (w/v) 셀룰라아제 효소 용액을 증류수로 희석하여 10 mL의 농도가 각각 1, 2, 4, 8, 10, 20% (w/v)가 되도록 준비한 후, 각각의 샘플 (0.1 mL)을 채취하였다. 각각의 효소 용액에 변형된 PVA가 코팅된 가교 키토산 비드를 5 g씩 넣어 4°C orbital shaker에서 150 rpm으로 3시간 동안 shaking하여 고정화시킨 후, sieve로 효소가 고정화된 비드를 여과하여 분리하였다. 고정화 후의 남은 효소 용액 샘플 (0.1 mL)을 각각의 농도별로 채취하였다. 고정화된 효소의 양은 고정화하기 전에 채취한 샘플과, 고정화한 후에 채취한 샘플의 단백질 농도차이를 이용해 계산하였다. 단백질 농도는 UV-spectrophotometer (Shimadzu UVmini-1240)를 이용해 562 nm에서 BCA 방법으로 측정하였다.



Fig. 1. Photographs of prepared chitosan beads (a) before and (b) after cellulase immobilization (average diameter = ca. 3 mm).

**2.5. 셀룰라아제 효소 용액의 농도에 따른 비드의 활성도 측정 및 포도당 생산**

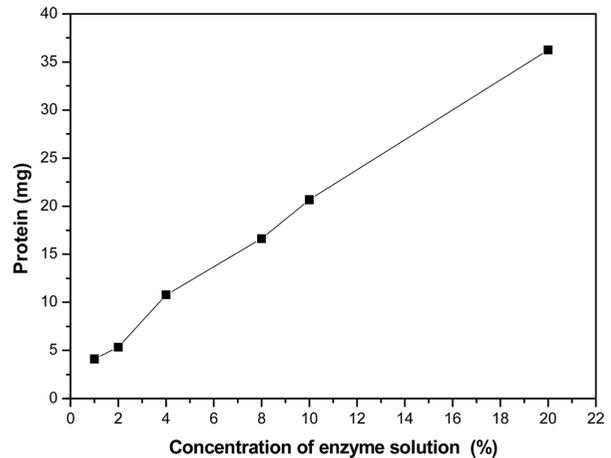
농도가 1, 2, 4, 8, 10, 20% (w/v)인 셀룰라아제 용액에서 고정화한 각각의 비드 1g씩을 1% (w/v) CMC 1 mL에 각각 넣어 50°C에서 5분간 반응시켜 생성된 포도당의 농도를 측정하였다. 포도당 농도는 UV-spectrophotometer를 이용해 500 nm에서 포도당 측정용 시액 (아산셋트, 아산제약주식회사)으로 측정하였다. 효소의 활성단위 1 unit은 50°C에서 1분 동안 기질로부터 1 μmol의 환원당을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다. 셀룰라아제 비활성도가 최대인 조건에서의 포도당 생산은 pH 7, 37°C에서 1% (w/v) CMC 20 mL에 비드를 5~20 g 넣은 후 반응을 수행하였다.

**3. RESULTS AND DISCUSSION**

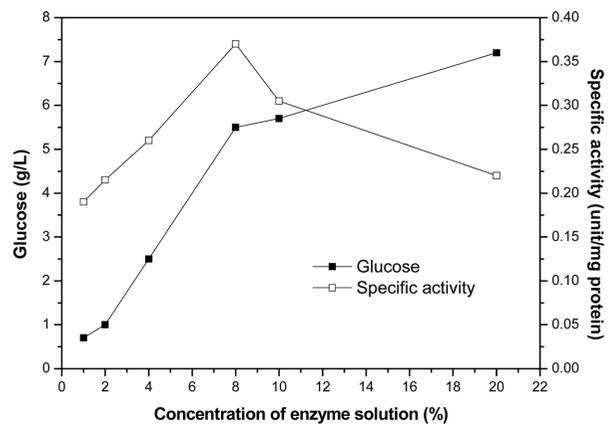
효소의 고정화 방법은 효소를 물리적으로 가두는 포획법과 지지물질의 표면에 흡착과 공유결합에 의하여 부착하는 결합법으로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 포획법을 이용할 경우 거대분자인 셀룰로오스가 셀룰라아제 효소와 접촉하기 위해 확산제한이 일어날 수 있으므로 이를 극복하기 위하여 키토산 비드 표면에 셀룰라아제를 고정화시키는 Dincer와 Telefonce [11]의 방법을 이용하였다.

키토산은 β-(1-4)-linked 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose와 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose의 중합체로 새우와 같은 갑각류의 표면에 존재하는 키틴의 탈아세틸화에 의해서 얻어진다 [12]. 키토산은 유용한 형태 (필름, 섬유질, 비드, 분말, 용액 등)로의 변환 능력과 독특한 화학적, 생물학적 특성으로 인해 효소 고정화에 이용되어 왔다 [13]. PVA는 비용이 저렴한 합성 고분자로서 미생물에 무독성이어서 세포와 효소 고정화에 사용될 수 있다 [14]. TPP는 무독성의 polyanion으로, 정전기적 힘으로 키토산과 상호작용하여 이온결합을 생성한다. TPP는 빠른 겔화 능력 때문에 구형의 키토산 비드 형성에 사용될 수 있다 [15]. 또한 ECH는 염기 촉매가 교제로 사용되었다. 가교제로서 ECH를 사용할 경우, 키토산의 양이온 아민 그룹을 제거하지 않고 키토산 막의 습윤강도를 상당히 강화시키는 장점이 있다 [16]. 본 연구에서 키토산은 비드의 형태를 만드는데 사용되었고, 셀룰라아제는 malic anhydride로 변형시킨 PVA 막으로 코팅된 키토산 비드에 고정화되었다. 변형된 PVA를 사용함으로써 고정화된 셀룰라아제의 3차구조를 보존하여 pH 및 온도 안정성을 향상시키고, 최적 pH가 4.0에서 7.0으로 이동됨이 보고되었다 [11]. 따라서 본 연구에서는 변화된 효소의 최적 pH인 7.0에서 실험을 진행하였다. 효소 고정화시 가교제인 ECH를 첨가하면 비드 표면의 히드록시기와 효소의 아미노기 사이에 가교결합이 일어나 공유결합으로 효소를 고정화시킬 수 있으나, 본 연구에서는 고정화시 ECH를 첨가하지 않았으므로 효소는 흡착에 의해 고정화되었다.

Fig. 2는 셀룰라아제 용액의 농도에 따라 비드에 고정화된



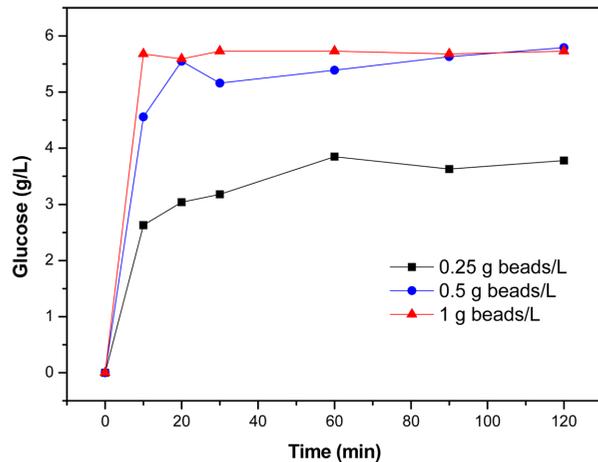
**Fig. 2.** Effect of the concentration of cellulase solution (2 mL) on immobilized amount of cellulase on chitosan beads (1 g).



**Fig. 3.** Effect of the concentration of cellulase solution (2 mL) on glucose production and the specific cellulase activity of the immobilized beads (1 g) from 1% CMC substrate (1 mL) at pH 7 and 50°C.

셀룰라아제의 양을 측정된 결과이다. 비드에 효소를 고정화하기 전과 후의 셀룰라아제 용액의 단백질 농도 차이를 BCA 방법으로 측정하여 계산한 결과, 효소 용액의 농도가 20%까지 증가함에 따라 일정한 비드의 양에 고정화되는 단백질이 양이 거의 선형적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 고정화된 셀룰라아제의 양은 비드 1g당 4 mg (1% 셀룰라아제 용액)에서 36 mg (20% 셀룰라아제 용액)까지 증가하였다.

Fig. 3은 각각의 셀룰라아제 용액의 농도에서 고정화시킨 비드로 생성된 포도당의 농도 및 이를 바탕으로 각 셀룰라아제 용액의 농도에서 고정화시킨 비드가 나타내는 효소의 비활성도를 계산한 값이다. 셀룰라아제 용액의 농도가 증가할수록 8%까지는 포도당의 생성량이 급격히 증가하다가 그 이후로는 천천히 증가하는 것으로 관찰되었다. 최대 포도당 생성량은 20% 셀룰라아제 용액에서 고정시킨 경우 7.2 g/L였다. 본 연구에서 기질로 사용한 1%의 CMC는 extent of labeling이



**Fig. 4.** Glucose production with different concentrations of beads immobilized at 8% cellulase solution from 1% CMC substrate at pH 7 and 37°C.

0.7 carboxymethyl groups per anhydroglucose unit으로 모노머 환산 0.0459 mol/L에 해당하며, 최대 생성된 포도당 7.2 g/L는 0.04 mol/L에 해당하므로 가수분해 전환율은 87.2%로 계산된다. 가수분해 전환율이 100%에 도달하지 못한 이유는 고정화에 사용된 20%의 효소용액 농도 또는 5분의 가수분해 시간이 100% 전환에 부족하기 때문으로 생각된다. 효소의 비활성도를 계산한 결과 8%의 셀룰라아제 용액에서 고정화시킨 비드가 효소의 비활성도 값이 0.37 unit/mg protein으로 가장 높으므로 가장 효율적인 효소 고정화 농도임을 알 수 있었다. 고정화 효소의 최대 비활성도가 존재하는 이유는 효소 용액의 농도가 증가함에 따라 기질과 결합하는 효소가 점점 포화상태에 이르게 되면서 어느 농도 이상에서는 고정화된 효소의 증가량만큼 포도당이 비례해서 생성되지 않기 때문으로 생각된다. 본 연구를 통해 생산한 포도당을 효모의 탄소원으로 이용하여 바이오 에탄올 생산에 적용하고자 온도 조건은 37°C로 설정하였다.

가장 효율적인 효소 고정화 농도인 8% 셀룰라아제 용액에서 고정화시킨 비드의 농도에 따라 일정한 기질의 양에서 생성된 포도당의 농도를 관찰한 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 1% CMC 기질에서 0.25 g/L의 비드를 사용한 경우 생성된 포도당의 최대 농도는 60분 경과 후 3.8 g/L였으며, 그 이후로는 거의 일정하게 유지되었다. 0.5 g/L와 1 g/L의 비드의 경우에는 약 20분 경과 후 포도당 생성 농도는 5~6 g/L사이로 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 pH 7, 37°C에서 1%의 CMC 기질로부터 비드의 최적 농도는 0.5 g/L로 볼 수 있으며, 약 20분 반응시켰을 때 효소가 고정화된 비드는 가수분해 반응을 완료하는 것으로 생각된다.

이상과 같이 키토산을 기반으로 한 비드를 제조하고 셀룰라아제를 비드 표면에 고정화할 때의 최적 셀룰라아제 용액 농도 및 셀룰로오스로부터 포도당 생산을 위한 최적 반응 조성을 구하였다. 본 결과는 셀룰로오스 기반 바이오연료 및 바

이오케미칼 생산을 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

#### 4. CONCLUSION

최근 재생 가능한 비식용 바이오매스 자원으로부터 바이오 연료 및 바이오케미칼 생산을 위하여 효율적인 바이오매스의 전처리 및 당화공정에 대한 관심이 증가하고 있다. 본 연구에서는 높은 pH와 온도 안정성을 갖는 것으로 보고된 키토산 비드에 셀룰라아제 효소를 고정화하여 셀룰로오스로부터 포도당을 생산하고자 하였다. 셀룰라아제 용액의 농도가 증가함에 따라 키토산 비드에 고정화되는 셀룰라아제의 양은 선형적으로 증가하였다. 포도당의 생성량은 20%의 셀룰라아제 용액에서 고정화시켰을 때 1% carboxymethyl cellulose (CMC) 기질로부터 7.2 g/L까지 증가하였다. 효소의 최대 비활성도 값은 8%의 셀룰라아제 용액에서 고정화시켰을 때의 0.37 unit/mg protein이었다. pH 7, 37°C에서 최적 반응 조성은 1% CMC 기질로부터 0.5 g beads/L였으며, 포도당으로의 전환은 약 20분에 완료되었다.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 2013학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

#### REFERENCES

- Limayem, A., and S. C. Ricke (2012) Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog. Energ. Combust.* 38: 449-467.
- Ra, C. H., H. J. Lee, M. K. Shin, and S. K. Kim (2013) Bioethanol production from seaweed *Gelidium amansii* for separated hydrolysis and fermentation (SHF). *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 28: 282-286.
- Kim, T. U. and E. K. Kim (2009) *Bioin Issues & Specials* Vol. 10, <http://www.bioin.or.kr/board.do?num=195852&cmd=view&bid=feature>.
- Kim, G. S., M. G. Sin, Y. J. Kim, J. J. Yun, and S. H. Kim (2009) *Bioin Special WebZine* Vol. 11, <http://www.bioin.or.kr/board.do?num=188526&cmd=view&bid=report>.
- Santos, A. M. P., M. G. Oliveira, and F. Maugeri (2007) Modelling thermal stability and activity of free and immobilized enzymes as a novel tool for enzyme reactor design. *Bioresour. Technol.* 98: 3142-3148.
- Park, J. W. (2013) Carbon dioxide sequestration of enzyme covalently immobilized on porous membrane. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 28: 225-229.
- Ahn, H. K., B. C. Kim, S. H. Jun, M. S. Chang, D. Lopez-Ferrer, R. D. Smith, M. B. Gu, S. W. Lee, B. S. Kim, and J. Kim (2010) Robust trypsin coating on electrospun polymer nanofibers in rigor-

- ous conditions and its uses for protein digestion. *Biotechnol. Bioeng.* 107: 921-927.
8. Chang, R. H. Y., J. Jang, and K. C. W. Wu (2011) Cellulase immobilized mesoporous silica nanocatalysts for efficient cellulose-to-glucose conversion. *Green Chem.* 13: 2844-2850.
  9. Zang, L., J. Qiu, X. Wu, W. Zhang, E. Sakai, and Y. Wei (2014) Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53: 3448-3454.
  10. Khoshnevisan, K., A. K. Bordbar, D. Zare, D. Davoodi, M. Noruzi, M. Barkhi, and M. Tabatabaei (2011) Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability. *Chem. Eng. J.* 171: 669-673.
  11. Dincer, A. and A. Telefoncu (2007) Improving the stability of cellulase by immobilization on modified polyvinyl alcohol coated chitosan beads. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 45: 10-14.
  12. Sung, I. K., J. Y. Song, and B. S. Kim (2011) Preparation of chitosan/poly-glutamic acid nanoparticles and their application to removal of heavy metals. *Korean Chem. Eng. Res.* 49: 475-479.
  13. Mao, X., G. Guo, J. Huang, Z. Du, Z. Huang, L. Ma, P. Li, and L. Gu (2006) A novel method to prepare chitosan powder and its application in cellulase immobilization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 189-195.
  14. Dave, R. and D. Madamwar (2006) Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. *Process Biochem.* 41: 951-955.
  15. Mi, F. L., S. S. Shyu, S. T. Lee, and T. B. Wong (1999) Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistant properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.* 37: 1551-1564.
  16. Zeng, X. and E. Ruckenstein (1998) Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. *J. Membr. Sci.* 148: 195-205.