

Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究*¹

—(I) 基質 處理의 效果—

鄭大成*² · 閔斗植*²

Studies on the Hydrolysis of Holocellulose with *Trichoderma viride* Cellulase*¹

—(1) Effects of the treated substrate—

Tae-Seong Cheong*², Du-Sik Min*²

In this study, enzymatic hydrolysis of the holocellulose from *Alnus hirsuta* (Spach) Rupr. (8-14 yr's) was investigated using crude cellulase preparations of *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16374. And conducted on the optimum condition of the treated substrate for saccharification.

A strain of *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16374 was found to be highly efficient for the cellulase productivity, especially in the submerged culture process.

The culture medium used in this experiment was prepared from an extract of wheat bran consisting also of KH_2PO_4 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, NaNO_3 3, and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/1. Cellulose powder (Toyo filter paper, 60 mesh) was found to be an important factor for inducing the cellulase formation. And the cellulase produced in the culture fluid was salted out quantitatively by the use of ammonium sulfate (Fig. 1)

Reducing sugar was determined by the Dinitrosalicylic acid (DNS) method, using reagents prepared according to the method of Sumner (1925). The results obtained were summarized as follows;

1. The method of delignification were treated by the Peracetic acid (PA) method, according to the method of Toyama (1970). The yield of holocellulose were decreased in accordance with increasing concentration of Peracetic acid solution; delignification of *Alnus hirsuta* Rupr. with 20% Peracetic acid was satisfied for 48 hours and 40%~60% peracetic acid was satisfied for 24 hrs;
2. The substrate (holocellulose) was changed easily into fine powder with enzymatic hydrolysis and cellulase exhibits optimum activity on the reducing sugar formation from substrate at the range of 60-100 mesh.
3. The reducing sugar formation increased in accordance with increasing dry temperature on holocellulose substrate was found to be $190 \pm 5^\circ\text{C}$.
4. The optimal heat treated time of holocellulose substrate was found to be 45 min. for the reducing sugar formation showed the best products. The reducing sugar formation did not show statistically significant differences at 5% levels by heat treated time for 45 min. and 60 min.

Trichoderma viride 16374號 Cellulase에 의한 木材加水分解에 관한 研究로서 材料는 산오리나무 材를使用하였다. 酵素生産은 液體 振盪培養法에 依하였다. 即 밀기울 抽出液에 Pulp粉末(Toyo濾紙 60 mesh) 10, KH_2PO_4 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3, NaNO_3 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/1을 加하였다. 이와 같이 하여 振盪培養한 後 培養液을 取하여 硫酸飽和度에 依한 鹽析粗酵素液을 만들었다. 還元糖定量은 DNS 法에 依하였다.

*¹ Received for publication on May 24, 1978

*² 忠北大學校 農科大學 College of Agr. Chung-Buk University

(1) 脫리그닌은 外山(1970)의 過醋酸法에 依하였다. 여기서 過醋酸의 濃도가 높을수록 短期間에 Pulp收率은 減少하였다. 卽 20% 過醋酸液으로 處理한 試料은 48時間에, 40% 및 6% 過醋酸液으로 處理한 試料은 24時間이던 充分한 脫리그닌이 되었다.

(2) 基質은 微細할수록 酵素에 依한 加水分解가 容易하였으며 還元糖生成에 適合한 基質의 크기는 60-100mesh로 나타났다.

(3) 基質의 乾燥溫度는 높을수록 還元糖生成量이 增加하였으며, 여기서는 乾燥溫度가 190±5°C에서 가장 많은 糖生成이 나타났다.

(4) 基質의 熱處理時間이 가장 적당한 것은 45分으로 나타났다. 그리고 45分과 60分間 熱處理한 基質의 還元糖 生成量에는 有意差가 認定되지 않았다.

緒 論

現在 美國에서 人口增加에 따라 일어나는 世界的 食糧飢饉에 다음 3構想으로 對處하고 있다. 그 하나는 石油에서 蛋白質의 生産이고 둘째는 海藻類의 利用이다. 그리고 셋째는 農, 林產物을 基質로하는 Cellulase에 依한 活用に 두고 있다. 그러나 石油에서 蛋白質의 生産은 最近 石油cost의 高騰 및 資源의 有限性을 지닌 缺點 때문에 再生資源인 農, 林產物에 關心을 더욱 많이 갖게 되었다. 그 理由는 植物의 構造炭水化合物인 셀룰로오스는 植物의 細胞膜의 主成分을 이루고 光合成 產物中의 하나로 地上에서 第1豐富한 炭水化合物로 그 量은 約 1,000億 ton.으로 推算하고 있다. 또한 植物의 生育條件만 좋으면 셀룰로오스는 光合成을 거쳐 繼續으로 生産할 수 있으며 그 外로 多量의 여타 農, 林產物 廢棄物도 셀룰로오스源으로 利用될 수 있기 때문이다.

셀룰로오스는 一種의 炭水化合物이고 이것을 加水分解하여 포도당을 얻을 수 있는 量은 理論值가 111%가 된다는 事實은 이미 오래전부터 알려졌으나 實際로 酸加水分解에 依하면 理論值의 30%에 불과하여 經濟性이 적다. 그러므로 셀룰로오스의 用途는 主가 製紙用이고 糖化基質로서의 用途는 아직 實驗的 範疇을 넘지 못하고 있다. 지금은 酸보다 酵素에 依한 木材糖化法이 經濟的 價値가 높게 認定되고 있으나 이것 역시 糖化率이 不振한데 그 理由는 셀룰로오스가 Cellulase의 作用을 받기 어려운 構造的 特徵을 갖고 있기 때문이다.

셀룰로오스는 結晶性 領域과 無定形領域으로 되어 있는데 그 比率는 셀룰로오스의 出處에 따라 다르나 結晶性 領域이 셀룰로오스는 全體에 대하여 30~70%이다.

셀룰로오스를 糖化基質로 使用하는데는 이 結晶性 領域을 무엇보다도 無定形領域으로 轉化시켜 줌으로서

酵素에 依한 포도당 生成이 용이하게 되는 것이라 보고 있다. 이러한 셀룰로오스의 無定形領域을 위하여 Resse(1965)는 木材 셀룰로오스를 高溫으로 處理하여 基質로 使用하니 容易하게 加水分解되어 高率의 포도당을 얻을 수 있다고 하였다. 그리고 最近 美國의 Natick研究所에서 酵素源으로서 *Trichoderma viride* 酵素를 利用하여 셀룰로오스의 經濟的인 糖化可能性을 크게 示唆하고 있다. 8.11.12.17

이와 같이 糖化力이 優秀한 酵素(Cellulase)가 얻어졌고 또한 反應條件에 관한 知識도 進歩되었으나 實質的인 셀룰로스糖化에는 아직 解決할 問題가 많다.

本 研究目的은 지금까지 世界的으로 가장 많이 研究되고 活性이 강한 것으로 알려진 *Trichoderma viride* Cellulase를 生産하여 이의 糖化基質로 經濟的 價値가 낮은 潤葉樹材를 利用하여 糖質生産에 原料가 될 수 있도록 開發하는데 있으며 우선 산오리나무 木材 홀로 셀룰로오스 基質의 處理 條件이 還元糖 生成에 미치는 效果에 關하여 調査하였다.

本 研究을 遂行함에 있어 始終 指導하여 주신 全北大學校 總長 沈鍾燮 博士님께 深甚한 謝意를 드린다.

材料 및 方法

I. 材料

1. 供試料

忠北大學校 構內에서 生育하고 있는 樹齡이 8~14年 生인 산오리나무(*Alnus hirsuta* (Spach) Rupr)를 10本 擇하여 0.3~0.5cm간격으로 環鋸로 切斷하여 톱밥을 만드려 이것을 脫리그닌 用 試料로 使用하였다.

2. 供試菌株

韓國 種菌協會에서 分讓받은 *Trichoderma viride* pers, ex, Fr. SANK 16374號 菌을 使用하였다.

II. 方 法

1. 液體 振盪培養

밀기울 100g에 0.1M 醋酸緩衝液 pH 5.0를 1.5l 加하여 1.5kg/cm²에서 20分間 加壓 蒸餾한 後 gauze로 濾過하여 濾液 1l를 만드러 여기에 pulp粉末(Toyo濾紙 6 mesh) 10g, KH₂PO₄ 10g, (NH₄)₂SO₄ 3g NaSO₄ 3g Mg SO₄·7H₂O 0.5g를 加하여 500ml用 三角 flask에 50ml 식 넣고 1.5kg/cm²에서 30分間 滅菌시킨 後 上記 菌株를 接種하여 30°C에서 5日間 振盪培養하였다.

2. 粗酵素^{1),5),9)}

振盪培養한 것을 그대로 10分間 遠心分離(12,000 prm)를 하고 그 上澄液을 取하였다. 이 粗酵素液을 <Fig1>과 같은 方法으로 酵素液을 分離한 것을 半透性 膜에 넣고 0.1M 醋酸 緩衝液 pH5.0의 水中에서 30時間(2~5°C) 沈澱하여 硫酸을 除去한 酵素液을 使用하였다.

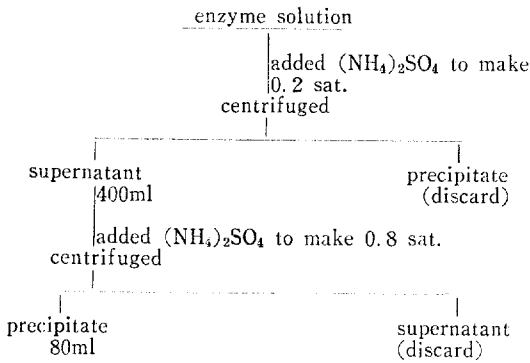


Fig. 1. Preparation of enzyme

3. 木材의 脫 리그닌 및 基質調製

① 脫 리그닌

外山(1970)法에 依하여 製造한 過醋酸液의 濃度를 20%, 40%, 60%로 區分하여 500ml用 beaker에 200 ml를 取하고 산오리나무 톱밥 乾絶重量 5g를 加하고 常溫(17~22°C)에서 24時間 48時間 72時間 96時間 120時間으로 區分하여 反應(脫리그닌)시킨후 Holocellulose 量을 定量하였다. 그리고 그 結果를 二元配置法(三反應)에 依하여 分散分析하였다.

② 基質用 試料

20% 過醋酸液으로 處理한 것은 48時間에 40%와 60% 過醋酸液으로 處理한 것은 24時間에 脫 리그닌한 것을 基質로 使用하였다.

4. 基質의 處理와 反應條件

① 基質의 크기

基質 粒子는 190°C에서 30分間 熱處理한 基質은 20 mesh, 40 mesh, 60 mesh, 80 mesh, 100 mesh로 粉碎하여 100ml用 三角 flask에 0.5g식 넣고 粗酵素液 0.5ml를 加하여 0.1M 醋酸 緩衝液 pH5.0를 全量 50ml가

되도록 加하였다, 다음에 40°C에서 0分, 24時間, 48時間, 72時間, 96時間으로 區分反應시킨 後에 100°C에서 5分間 加熱하여 酵素反應을 中止시킨 다음 遠心分離하고 上澄液을 取하여 還元糖 定量用 試料로 使用하였다. 그리고 그 結果를 二元配置法에 依하여 分散分析하였다.

② 基質의 熱處理 溫度

60mesh用 基質의 熱處理時間은 30分으로 하고 溫度를 100°C, 130°C, 160°C, 190°C로 區分하여 處理試料를 짓고 酵素反應條件은 上法과 같은 方法으로 處理하였다.

③ 基質의 熱處理 時間

60mesh用 基質의 熱處理 溫度는 190°C로 하고 熱處理 時間을 15分, 30分, 45分, 60分으로 區分하여 熱處理한 基質로 使用하고 其他 酵素 反應條件은 上法과 같은 方法으로 處理하였다.

5. 還元糖 定量法^{6,10,15,16)}

25ml의 標試이 있는 試驗管에 3.5 Dinitrosalicylic acid (DNS)를 3.0ml 넣고 이곳에 糖化反應液인 各 Sample 1 ml를 加하여 잘 混合한 後 正確히 100°C에서 5分間 加熱하여 發色시킨 다음 冷却하였다. 여기에 蒸溜水를 加하여 正確히 25ml로 稀釋하였다. Blank test는 DNS試藥 3.0ml에 蒸溜水 1ml를 加하여 上法과 같이 處理하였다.

糖標準液의 調製는 D-(+)-glucose를 使用하여 蒸溜水로 250µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml의 3種으로 調製하여 使用하였다.

以上の 測定試料와 標準糖液을 波長 50mµ에서 ATAGO 36形으로 測定하여 試料 1g에서 生成되는 還元糖量을 計算하였다.

結果 및 考察

1. 脫 리그닌

脫 리그닌 方法은 亞硫酸法, 曹達法, 硫酸鹽法 등이 있는데 이 方法은 高溫高壓을 必要로 하여야 하는 缺點이 있고 過鹽素酸法 亞鹽素酸法 등은 常溫常壓下에서 이루어 지지만 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스가 分解되고 着色이 생기며 부식성도 強하여 取扱하기가 나쁘다.^{3,7)} 이러한 決點을 없애는 方法으로 H. Haas, W. Schock(1955)는 過醋酸(peracetic acid)에 依한 홀로 셀룰로오스 定量法을 發表하였고 그後 外山(1970)는 過醋酸法을 다시 改良하여 發表하였다. 本 試驗에서는 過醋酸法에 依한 脫 리그닌을 實施하고 여기서 얻어진 홀로 셀룰로오스를 糖化基質로 使用하였다.

<Table 1.> The yield of Holocellulose made from the wood of *Alnus hirsuta* Rupr. treated with Peracetic acid solution(PA)

Reaction	Concentration of Peracetic acid solution			
Time	20%	40%	60%	Average
24 hr	74.3	67.2	62.5	68%
48 "	70.9	62.8	56.4	63
72 "	68.2	57.5	52.6	60
96 "	60.4	57.3	52.6	56
120 "	60.3	51.8	49.5	55
Average	67	59	54	

Table. 2. Analysis variance for the Table I.

Factor	df	S.S	M.S	F	P
Reaction time(A)	4	689.6	172.4	11.65**	P>0.01
ConontrationPA(B)	2	803.6	401.8	27.15**	P>0.01
A×B	8	5.7	0.71	0.05	P<0.05
Error	15	222.0	14.8		

산오리나무의 Holocellulose 함유량은 72.8%로 되어 있다. Table I.에서 보는바와 같이 과醋酸濃度 20%는 48시간 反應시키면 Holocellulose量이 70.9%에 달하고 40%의 과醋酸液은 反應時間 24시간이면 67.2%, 60%의 과醋酸液은 24시간의 反應이면 62.5%에 달하게 되며 각 과醋酸液 濃度間에는 有意差가 認定되었다. 그리고 산오리나무材의 脫 리그닌은 20% 과醋酸液에서는 48시간, 40 및 60% 과醋酸液에서는 24시간이면 脫 리그닌이 充分하다고 본다.

또한 脫 리그닌 材料를 水洗할 때 無水醋酸은 醋酸으로 變하고 過酸化水素는 分解되어 廢液處理는 容易하게 되었다.

2. 基質粒子가 還元糖 生成에 미치는 效果

셀룰로오스가 可及의 無定形(非結晶性) 領域 部分이 많게 하는 方法의 하나는 셀룰로오스를 微粒子로 만드는 것이다. 即 셀룰로오스 粒子가 微細할수록 Cellulase C₁ (Component of the Cellulase Complex)에 의한 加水分解領域이 많아지게 되는 것으로 보고 있다.^{2,4,8,12,13,14)}

<Fig 2>에서 보는 바와 같이 基質粒子가 微細할수록 還元糖生成量은 많아 더욱 粒子가 微細한 基質이 還元糖生成에 좋은 結果를 갖어 온다는 事實을 立證하고

있다. 그러나 基質粒子가 60mesh, 80mesh, 100 mesh에 있어서는 이들 還元糖 生成量에 有意差가 認定될 程度로 나타나지 않았다.

또한 基質粒子에 關係없이 反應時間이 長할수록 이들 還元糖 生成量은 增加하고 있다. 即 셀룰로오스와 같은 炭水化物인 澱粉은 酵素(amylose)에 의한 糖化가 40~180분이면 反應時間이 充分하나 셀룰로오스를 基質로 한 Cellulase에 의한 糖化反應時間은 96時間(4日) 이상을 要하여야 한다는 것을 알 수 있다.

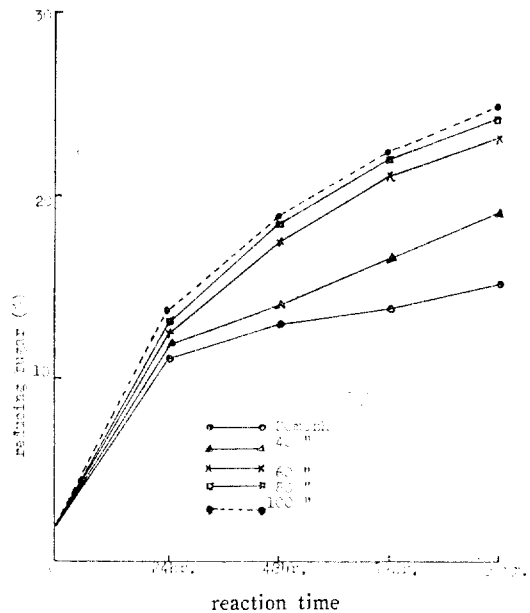


Fig. 2. Effect of holocellulose powder on saccharifying activity.

reaction PH 5.0, Tv cellulase 0.5ml
reaction temp. 40°C, holocellulose 0.5g

3. 基質의 乾燥溫度가 還元糖生成에 미치는 效果

基質을 高溫으로 處理한다는 것은 酸化作用을 促進시키는 方法이 된다고 할 수 있다. Ibid(1964)는 전나무 셀룰로오스를 200°C에서 粉碎한 53μ 以下の 粒子를 가진 基質은 冷水에서도 可溶된다고 發表하였다. 또한 이러한 現象은 基質이 酸化에 依하여 結晶性 領域이 無定形領域으로 轉化되는 것을 뜻하는 것이다. 그리고 酸素가 있는 窒素中에서 基質을 加熱粉碎한 것은 空氣中에서 加熱하여 粉碎한 基質보다 糖化率이 1.5~2倍 낮아졌으므로 셀룰로오스의 酸化의 熱處理는 含糖 糖化性을 增大시킨다고 할 수 있다.^{12,13,14)}

한편 西澤(1974)는 基質을 熱處理하니 200°C 以上

에서는 도리어 糖化性は 낮아지고 170~200°C 가량이 糖化量이 좋다고 하였으며 加熱溫度가 너무 높으면 셀룰로오스 分子가 加水分解를 하는데 도리어 阻障을 준다고 하였다. (12, 14)

<Fig. 3>에서 보는 바와 같이 基質의 乾燥溫度가 높은 것일수록 還元糖 生成量은 增加하였으며 190±5°C 에 것이 가장 높은 糖生成率을 나타냈다. 即 이러한 現象은 西澤의 發素와 비슷한 結果를 보여주고 있다. 그리고 基質, 乾燥溫度 130°C, 160°C, 190°±5C間에는 有意差가 認定되었으나 100°C와 130°C間에서는 有意差가 없었다.

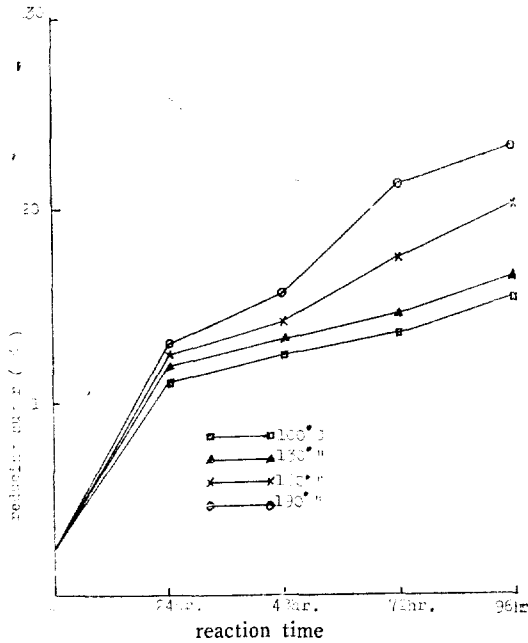


Fig. 3. Effect of dry temperature on holocellulose powder.

reaction PH 5.0, Tv cellulase 0.5ml
reaction temp. 40°C, holocellulose powder 60 mesh, dry temp. time 30min.

4. 基質의 熱處理 時間이 還元糖 生成에 미치는 效果

Kupnova(1964)는 전나무 셀룰로오스를 200°C에서 40分間 熱處理한 것이 還元糖 生成量이 가장 높았으며 210°C에서는 30分間 220°C에서는 25分間 230°C에서는 15分間 熱處理한 것이 糖 生成量이 높았다고 發表하였다. 即 熱處理溫度가 높을수록 熱處理 時間은 短縮되는 것이 좋은 糖生成을 보여 주고 있다. 그러나 이들 중 가장 많은 糖 生成量을 나타낸 基質은 200°C에서 40分間 熱處理한 것이었다. (12)

<Fig 4>에서 보는 바와 같이 基質을 190°C에서 45分間 熱處理하여 粉碎한 것이 가장 높은 糖生成量을 보여 주고 60分間 熱處理한 것이 도리어 45分間 熱處理한 것보다 糖生成量이 多少 낮았으나 이들 間에는 有意差가 認定되지 않았다.

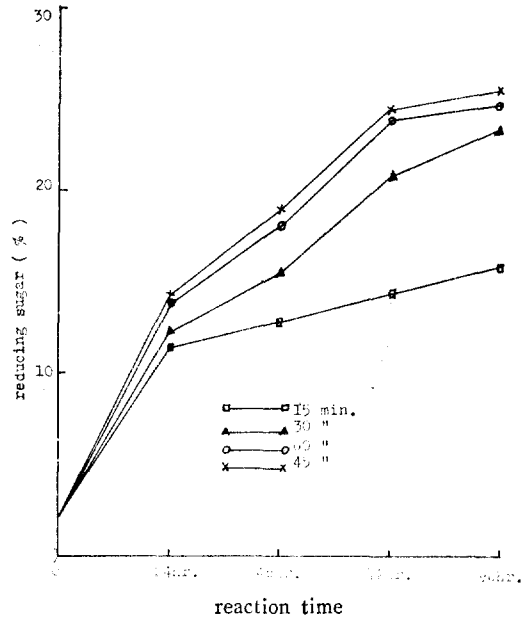


Fig. 4. Effect of heat treated time on substrate.
reaction PH 5.0, Tv cellulase 0.5ml
reaction temp. 40°C, holocellulose powder 60 mesh, holocellulose 0.5g.

結 論

Trichoderma viride Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究로서 基質은 산오리나무材의 홀로셀룰로오스를 使用하였으며 홀로셀룰로오스의 處理 條件이 還元糖 生成量에 미치는 效果를 調査한 것이다. 그 結果는 다음과 같다.

1. 脫 리그닌은 過醋酸法에 依하였으며 過醋酸 濃度가 높을수록 脫 리그닌은 短時間에 이루어졌다. 即 20% 過醋酸液에서는 48時間 40% 및 60%의 過醋酸液에서는 24時間이면 充分한 脫 리그닌이 되었다.

2. 基質粒子는 微細할수록 還元糖 生成量은 增加되었으나 基質粒子 60 mesh, 80 mesh, 100 mesh間에는 有意差가 認定되지 않았다.

3. 基質의 乾燥 溫度는 190±5°C에서 處理한 것이 還元糖 生成量이 가장 높았으며 190°C 및 160°C에서 乾燥한 基質間에 還元糖 生成量은 有意差가 認定되었

으나 100°C와 130°C에서는 有意差가 없었다.

4. 基質의 熱處理時間은 190°C에서 45分間 處理한 後 粉碎한 것이 60分間 處理한 것보다 還元糖 生成量이 많았으나 이들 間에는 有意差가 認定되지 않았다.

引 用 文 獻

1. 赤堀四郎. 1966. 酵素研究法(第1卷) 朝倉書店 131~136.
2. Blum R., W. H. Stahl. 1957. Enzymic Degradation of Cellulose Fibers. Text. Res.J. 22: 178~192.
3. Britt. K. W. 1970. Pulp and paper Technology, von nostrand Reinhold Co.135~248.
4. 張文雄, 宇佐美昭次. 1968. 셀룰라제에 關する 研究(第7報). 醸協 26: 73~76.
5. —————. 1969. Trichoderma Cellulase의 液內 培養による 生産と利用. 醸工. 47: 447~455.
6. 福井作藏. 1969. 還元糖의 定量法. 東京大學出版會 19-20.
7. 芝本武夫. 1974. 林産製造, 實教社. 47-94. 110-136.
8. 金中晩. 1977. 醱酵酒精生産의 第3基質로서의 Cellulase에 對한 小考. 酒工 7: 18~25.
9. 小卷利章. 1962. 酵素의 工業的 精製, 醸協 20: 325~330.
10. 松葉豐, 若松靖弘. 岡本昇. 小卷利章, 1963. 셀룰라제 活性度測定法について, 醸工 41, 47~51.
11. 中野準三. 1977. 우드케미칼스의 現狀および 將來, 化學と生物 15: 366~367.
12. 西澤一俊. 1974. 셀룰라제, 南江堂 pp. 277.
13. 小川喜八郎, 外山信男. 1965. Trichoderma Viride Cellulolytic Complexについて, 醸工 43: 661~668.
14. Reese. E. T., R. G. H. Siu. Levinson. 1950. The Biological Degradation of Soluble Cellulose Derivatives and its Relationship to the Mechanism of Cellulose Hydrolysis., J. Bacteriol. 59: 485~497.
15. Summer. J. B. 1921. Dinitrosalicylic acid., J. Biol. Chem 47: 5~9.
16. —————. 1925. A more Specific Reagent for the Determination of sugar in urine. J. Biol Chem. 65: 393~395.
17. 外山信男. 1969. 世界における 셀룰라제의 應用, 化學と生物 7: 630~635.