

표고栽培廢材의 糖化에 關한 研究*1

閔 斗 植*2

Studies on the Hydrolysis of the Waste wood of Cortinellus edodes with *Trichoderma viride* Cellulase.*1

Du Sik Min.*2

In this study, enzymatic hydrolysis of the substrate of the waste wood of Cortinellus edodes was investigated using crude cellulase preparation of *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16374.

The crude cellulase was produced by the submerged culture process and produced in the culture fluid was salted out quantitatively by the use of ammonium sulfate. Reducing sugar was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method.

1. The chemical composition of the waste wood was crude protein 2.26%, c. fat 2.57%, c. fibre 44.60%, c. ash 5.58% and lignin 13.62%. In amino acid composition, no cystine and methionine was showed, but trace amount of Vitamin A, B₁, and B₂, niacine and chloride were detected. (Table 1)

2. As heat treatment of the substrate was found to produce the highest reducing sugar yield being reacted for 48hr. with T.v cellulase, the substrate was heated to 190±5°C. for 45 min. either before or immediately after milling.

3. The substrate heated and ball milled at 190±5°C. for 45 min. the reducing sugar yield reached to 11.5%.

4. The substrate without any treatment was found to produce the highest reducing sugar yield being reacted 72hr. with T. v cellulase, the reducing sugar yield reached to 10.1%.

5. The rate of reducing sugar per each treated substrate was decreased by the order of the substrated, heated and then ball milled at 190±5°C. for 45 min. (11.5%) > without any treatment (10.1) > ball milled and heated at 190±5°C. for 45 min. (6.9%).

6. Saccharification of waste wood has been shown to be possible by heat treated and milling the substrate in contact with cellulase. And it is likely to be recommended that the waste wood may be valuable for raw materials of saccharification.

Trichoderma viride SANK 16374號 Cellulase에 의한 표고栽培廢材의 糖化에 關한 研究로서 酵素生産은 液體振盪 培養法에 依하였다. 이와같이 하여 生産된 粗酵素液을 取하여 硫安飽和度에 依한 鹽析酵素液을 供試用 酵素液으로 使用하였다. 그리고 還元糖 定量은 DNS法에 依하였다.

1. 표고栽培廢材의 一般의 組成은 粗蛋白質이 2.26%, 粗脂肪이 2.57%, 粗纖維가 44.6%, 灰分이 5.58%, 리그닌이 13.62%, 可溶無窒素物이 23.21%였다. 그리고 아미노酸의 組成成分과 비타민의 成分은(Table 1)과 같다.

2. 표고栽培廢材를 190±5°C에서 45分間 熱處理한 基質은 Cellulase에 依한 反應이 48時間이면 還元糖 生成量이 最大値에 達하였다.

*1 Received for Publication on September 10, 1979.

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

3. 표고栽培廢材를 $190 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 45分間 熱處理한 後 粉碎하여 使用한 基質은 還元糖 生成量이 11.5%이었다.

4. 熱處理하지 않은 표고栽培廢材의 基質은 cellulase 反應時間이 72時間에 還元糖 生成物이 最大值에 達하였으며 그 量은 10.1%였다.

5. 各處理別 還元糖 生成量은 廢材를 熱處理後 粉碎한 基質(11.5%) > 熱處理하지 않은 基質(10.1%) > 粉碎後 熱處理한 基質(6.9%) 順으로 나타났다.

6. 표고栽培廢材의 糖化는 基質을 熱處理後 粉碎함으로써 더욱 可能하였다. 그리고 糖生成量이 增大될 수 있어 糖質原料로 可能할 것으로 본다.

緒 論

化學藥品으로 處理하여 木材에서 만드는 pulp를 化學 pulp, 機械的인 힘을 加하여 만드는 pulp를 機械 pulp라고 하듯이 微生物 및 微生物이 生産하는 酵素의 힘으로 pulp를 얻는 것은 生物 pulp(biological pulp)라 한다.

生物 pulp의 生産은 環境公害의 問題解決, Energy의 節減 및 資源節約等 現社會의 要請에 부응되는 經濟的인 pulp製造法의 하나로 關心이 되고 있는 것이다

木材는 成熟組織인 細胞를 相互膠着하고 있는 것은 主가 리그닌의 役割이다. 따라서 木材組織을 解離하여 pulp를 얻는 것은 리그닌을 分解除去 하는 것이 先決問題라 볼 수 있는 것이다. 即 生物 pulp를 얻는다는 것은 微生物을 써서 木材의 리그닌 分解作用을 갖게 하여 解離이 될 수 있게 하면 되는 것이다. 이러한 作用을 하는 微生物은 主가 木材腐朽菌인데, 여기에 屬하는 腐朽菌에는 白色腐朽菌, 褐色腐朽菌 및 軟腐朽菌이 있다.

이들 腐朽菌中 軟腐朽菌은 木材에 對한 分解力이 弱하므로 生物的 pulp化에의 利用은 期待할 수 없다. 그리고 白色腐朽菌은 主가 리그닌과 炭水化물을, 褐色腐朽菌은 主로 炭水化물을 分解함으로 生物的 pulp化에 利用될 수 있는 것은 白色腐朽菌이다. 이들 腐朽菌은 木材組織에 浸入(接種) 直後에는 炭水化물을 分解利用 하지만 어느程度 成長하던 褐色腐朽菌은 炭水化물에 攻撃을 本格的으로 開始하고 白色腐朽菌은 리그닌에 攻撃을 하게 되는데 이때 白色腐朽菌에서는 리그닌 分解酵素(lignolytic enzyme)를 強力하게 生産하지만 셀룰로오스 分解酵素(cellulase)의 生産은 弱하고, 헤미셀룰로오스 分解酵素(hemicellulase)는 적당히 生産하고 있으므로 白色腐朽菌에 의한 木材 리그닌分解, 除去는 더욱 有利한 것이다.

표고菌(*Cartinells edodes* (Berk) ITD et IMAI)은 白色腐朽菌의 一種이므로 표고栽培廢材는 原木에 比

하여 리그닌의 含有量이 많이 減小되고 反面 셀룰로오스가 많이 單離되고 아울러 표고菌絲에 의하여 蛋白質 및 비타민 등이 增加될 可能性이 있어 표고栽培廢材의 飼料化에 關한 研究 結果를 發表한 바 있다.⁽²⁾

本試驗에서는 표고栽培廢材를 脫리그닌할 必要 없이 直接 cellulase의 基質로 使用하여 還元糖生成 可能性을 調査함으로써 糖質原料의 開發에 目的을 두었다.

材料 및 方法

I. 材 料

1. 樹 種

참나무類 표고栽培廢材 200本(種菌 接種後 10년이 經過한 것), 忠北 永同郡 上村面 勿閑里(金泳煥 所有)

2. 菌 株

Trichoderma viride Pers. ex. Fr. SANK 16374.

II. 方 法

1. 基質의 組成成分 調査

표고栽培廢材의 一般的 合成成分은 AOAC方法에 依하여 分析하였고, 아미노酸 成分은 自動아미노酸 分析計로 分析하고 비타민類는 Kist에 依賴하여 調査하였다.

2. 基質調製

표고栽培廢材 200本을 飼料用 粉碎機로 粉碎(5~10 mesh)한 것 1kg을 採取하여 各試驗區에 따라 無處理 基質(60mesh), $195 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 45分間 熱處理後 粉碎한 基質(60mesh), 60mesh로 일단 粉碎한 後 45分間 $190 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 熱處理한 基質로 區分하여 使用하였다.

對照區로는 상수리나무(*Quercus acutissima* Carruthers)톱밥을 過醋酸法^(1,3)에 依하여 脫리그닌한 것을 60mesh로 粉碎하여 對照區의 基質로 使用하였다.

3. 鹽析酵素液의 調製

菌株를 接種하여 鬚기을 振盪培養(液內培養法)⁽⁴⁻⁶⁾한 後 그 培養液을 10分間 遠心分離하여 上澄液을 取하였다. 다음에 硫安飽和度 0.2(20%)로 하여 이때 생긴 沈澱物을 10分間遠心分離하여 除去하고 上澄液을 取

하였다. 다시 이 上澄液을 硫安飽和度 0.8(80%)를 하여 10分間遠心分離한 後 沈澱物을 모아서 半透性膜에 넣고 0.1M 醋酸緩衝液(pH 5.0)에서 30時間(3~4°C) 透析한 것을 試驗用 酵素液으로 使用하였다.

4. 基質의 處理

(1) 對照區

상수리나무 15~20年生의 표고原木에서 톱밥을 만들어 Toyoma(1970)의 過醋酸法^(1,2)에 의하여 脫리그닌 하였다. 即 톱밥 50g에 40% 過醋酸液 250ml을 加하여 24時間 常溫(20~25°C)에서 脫리그닌 한 것을 乾燥한 後 60mesh로 粉碎한 것을 對照區의 基質로 하였다.

(2) 基質의 處理

基質의 前處理 條件이 還元糖 生成에 미치는 效果를 究明하기 위하여 다음과 같이 處理하였다.

① 絶乾한 基質: 표고栽培廢材의 粉末을 絶乾(100±5°C)하여 60mesh로 粉碎한 다음 基質로 使用하였다.

② 高溫處理後 粉碎한 基質: 표고栽培廢材의 粉末(5~10mesh)을 190±5°C에서 45分間 熱處理한 後 即時 60mesh로 粉碎한 것을 基質로 使用하였다.

③ 粉碎後 高溫處理한 基質: 표고栽培廢材를 60mesh로 粉碎한 後 190±5°C에서 45分間 熱處理한 것을 基質로 使用하였다.

5. 反應條件

各處理別 基質 0.58을 100ml用 三角플라스크에 넣고 0.1M 醋酸 緩衝液(pH 5.0) 50ml를 加하여 잘 混合한 後 이것에 鹽析酵素液 0.5ml를 加하였다. 이때 反應溫度는 40°C로 하고 反應時間은 0分, 24時間, 48時間, 72時間, 96時間으로 區分하였다. 이와같이 하여 生成된 還元糖液을 5分間 끓여 反應을 中止시킨 다음 遠心分離하여 上澄液을 가지고 DNS法⁽¹⁻⁴⁾에 의하여 還元糖量을 定量하였다.

結果 및 考察

1. 組成分 含量

표고栽培廢材의 一般組成分, 아미노酸 分析結果, 비타민의 含量은(Table1)에서 보는바와 같다. 一般組成分에 있어 灰分量이 5.58%나 되는데 이것은 生材의 灰分含有量(0.3~0.6%)에 比하여 월등히 많으며 리그닌 含量은 13.62%로 一般木材에 比하여 약 8%가량 減少된 것을 알 수 있고, 粗蛋白質 含有量도 2.26%에 達하고 있다. 그리고 아미노酸의 組成分은 16가지 成分이 있으나 Cystine과 Methionine 成分은 전혀 存在하지 않는다. 또한 비타민의 含量은 極히 微量으로서 痕跡 程度에 不過하다.

Table 1. Composition of waste wood (Cartinellus edodes)

Chemical(%)		Amino acid		Vitamin	
moiture	8.16	threonine	0.0594	V.A	5IU/g
c. protein	2.26	serine	0.0591	V.B ₁	0.1μg/g
c. fat	2.57	glutamic acid	0.1339	V.B ₂	0.05μg/g
c. fibre	44.60	proline	0.0960	niacine	5μg/g
c. ash	5.58	glycine	0.0740	choline chloride	0.3μg/g
lignin	13.62	alanine	0.0761		
NFE	23.21	valine	0.0744		
		iso-leucine	0.0530		
		leucine	0.0954		
		tyrosine	0.0246		
		phenylalanine	0.0564		
		lysine	0.0480		
		histidine	0.0270		
		ammonia	0.0361		
		arginine	0.0521		
		aspartic acid	0.1161		
		cystine	—		
		methionine	—		

2. 絶乾한 基質의 還元糖 生成量

100±5°C에서 絶乾한 基質의 還元糖 生成量은(Fig. 1)의 ㉠曲線과 같이 反應時間이 길어질수록 糖生成量

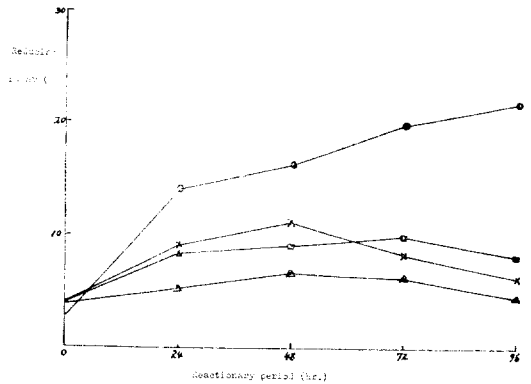


Fig. 1. Effect of heat treatment on the susceptibility of waste wood to enzymatic hydrolysis.

- ㉠ Oak cellulose for control.
- ㉡ (A) Waste wood without any treatment.
- ㉢ (B) Waste wood heated and ball milled at 190±5°C. for 45 min.
- ㉣ (C) Waste wood ball milled and heated at 190±5°C. for 45 min.

Reactionary condition;
 reaction pH. 5.0, Tv cellulase 0.5ml,
 reaction temp. 40°C. waste wood powder (60 mesh) 0.5g

도 增大하여 反應時間 72時間에서는 10.1%로 最大値를 보여주고 있다. 이는 표고栽培廢材의 粗纖維 含有量이 44.6%이므로 22.6%에 해당된다. 그러나 反應時間이 96時間을 經過하면 糖生成量이 8.3%로 減少하였다. 이것은 cellulase가 표고栽培廢材의 셀룰로오스는 反應時間 72時間이던 充分히 還元糖으로 加水分解 될 수 있다는 것을 意味한다.

3. 高溫處理後 粉碎한 基質의 還元糖生成量

표고栽培廢材를 $190 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 45分間 熱處理後 60 mesh로 粉碎하여 使用한 基質의 還元糖 生成量은 (Fig. 1)의 曲線⑥와 같이 反應時間이 48時間일 때 11.5%의 最大 還元糖 生成物을 보여주고 있는데 이는 표고栽培廢材의 粗纖維 含有量이 44.6%이므로 25.8% 糖生成量에 該當한다고 볼 수 있다.

Reese(5)는 一般의으로 基質을 加熱하여 粉碎하는 것이 糖化性은 增大 된다고 하였다.

本 試驗에 있어서도 糖生成量이 가장 增大된 것을 보면 표고栽培廢材도 加熱處理 함으로서 Reese가 發表한 것과 비슷한 結果를 나타낸다고 볼 수 있다.

또한 熱處理後 粉碎하여 使用한 基質에서 生成되는 還元糖量이 最大値를 보여주고 있는데, 이것은 對照區의 還元糖最大量보다 2.2%나 높은 糖生成이 되었으므로 표고菌이 보다 強力한 리그닌分解菌으로서 開發되고 cellulase의 보다 強力한 活性을 갖인 精製에 힘쓴다면 基質을 熱處理함으로서 糖生成量이 增大될 수 있어 표고栽培廢材는 糖質原料로서 開發할 여지가 있다고 본다.

4. 粉碎後 高溫處理한 基質의 還元糖 生成量

표고栽培廢材를 60mesh로 粉碎하여 $190 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 45分間 熱處理하여 使用한 基質의 還元糖 生成量은 (Fig. 1)의 曲線⑦와 같이 反應時間이 48時間까지 漸增하여 6.9%로 最大値를 보여주고 있으나 다른 處理區에 비해 糖生成量이 가장 적은 量을 보여주고 있다. 이와같은 理由를 Reese는 高溫處理를 함으로서 셀룰로오스는 分子가 加水를 하기 어려운 상태로 되는데 起因한다고 보고 있는 것이다. 이와같은 현상은 셀룰로오스에서만 나타나는 것이 아니고 표고栽培廢材를 使用한 基質에서도 비슷한 結果를 보여주고 있는 것을 알 수 있다.

또한 基質을 高溫處理하면 最大 還元糖 生成量에 達하는 反應時間은 48時間이던 充分하나 糖生成量에 큰 差異를 나타내고 있다. 即 高溫處理後 粉碎한 基質은

還元糖 生成物이 最大 11.5%인데 比하여 粉碎後 高溫處理한 基質에서는 불과 6.9%로 4.6%나 낮은 糖生成量을 보여주고 있어 같은 熱處理를 하는데 있어서도 粉碎後 高溫處理하는 것이 不利함을 나타내고 있다.

結 論

1. 표고栽培廢材의 一般組成분은 粗蛋白質이 2.26%, 粗脂肪이 2.57%, 粗纖維가 44.6%, 灰분이 5.58%, 리그닌은 13.62%였으며, 아미노酸 成分과 비타민의 含量은 (Table 1)에서 보는바와 같다.

2. 표고栽培廢材를 熱處理한 基質은 cellulase 反應이 48時間이던 還元糖 生成量이 最大値에 達하였다.

3. 표고栽培廢材를 熱處理後 粉碎하여 使用한 基質은 還元糖 生成量이 11.5%였으며 그 量은 표고栽培廢材의 粗纖維 含有量에 對하여 25.8%에 該當되는 量이 된다.

4. 絶乾한 基質은 cellulase反應이 72時間에서 還元糖 生成量이 最大値에 達하였으며 그 量은 표고栽培廢材의 粗纖維量에 對하여 22.6%에 該當된다.

5. 各處理別 還元糖 生成量은 廢材를 熱處理後 粉碎하여 使用한 基質이 11.5% > 絶乾한 것이 10.1% >, 粉碎後 熱處理한 것이 6.9% 順으로 나타났다.

6. 표고菌으로서 보다 強力한 리그닌 分解菌이 開發되고 *Trichoderma viride* Cellulase의 強力한 活性을 갖인 精製에 힘쓴다면 基質을 熱處理 함으로서 糖生産量이 增大될 수 있어 표고栽培廢材의 糖質原料 開發은 有望하다.

引 用 文 獻

1. 闊斗植, 1978. Cellulase에 依한 木材糖化에 關한 研究(I) 基質 處理의 效果, 韓國林學會誌, 38:13-18.
2. _____, 1978, 표고栽培廢材의 飼料化에 關한 研究, 木材工業, 6:8-14. 韓國木材工學會.
3. _____, 1978. Cellulase에 依한 木材糖化에 關한 研究(II), 反應條件의 效果, 韓國林學會誌, 39:57-63.
4. _____, 1979. 묽은 黃酸 및 Cellulase에 依한 木材糖化에 關한 研究, 韓國林學會誌, 41:1-6.
5. Reese, E.T. 1969. Cellulase and their application, 415-446. American Chem. Society Pub.