

Cellulase 에 의한 木材糖化에 관한 研究

— (Ⅲ) 最適 處理條件과 酵素處理 殘渣의 再基質化 效果 —

閔 斗 植*²

Studies on the Hydrolysis of Holocellulose with *Trichoderma viride* Cellulase. (Ⅲ). Effects of the Optimum Treated Conditions and Reactivation of Residue of Digested Substrates.

Du Sik Min *²

In this study, enzymatic saccharification of substrates from *Alnus hirsuta* Rupr (8—14 years), *Quercus acutissima* Carruthers, *Betula platyphylla* var. *japonica* Nera, *Populus euramericana* Guiner and *Platanus orientalis* L. were investigated using crude cellulase preparations of *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. SANK 16374, and conducted on the optimum treated conditions of the cellulase saccharification and reactivation of residue of digested substrates.

The *Trichoderma viride* cellulase was produced by the submerged culture process and produced in the culture fluid was salted out quantitatively by the use of ammonium sulfate.

The method of delignification from wood (5 species) was treated by the peracetic acid (PA) method.

The reducing sugar was determined by the dinitrosalicylic acid (DNS) method.

1. The results of tests carried out for 96 hr. (Figure 1), show conclusively the initial substrates from 5 species (S_1) which has been rendered highly reactive form and the mean rate of reducing sugar was 28.3 %.

2. The results of tests carried out for 96 hr., the reactivation of residue of digested substrates (improvement in the quality of the substrate through preheating in air at 190°C. for 45 min. followed by milling was (60 mesh size) at the same substrate level, increased concentrations of cellulase at the same substrate level, and increased concentrations of cellulase increases the rate of hydrolysis considerably.

3. Figure 1. shows conclusively that the residue of digested substrates (S_1 dried at 60°C) which has been rendered extremely resistant to cellulase action can be reactivated into a highly reactive form (S_2), almost comparable to that of the initial substrates (S_3).

And the reducing sugar formation did not show statistically significant differences at 5% levels by initial substrates and the residue of digested substrates (preheating in air at 190°C. for 45 min. followed by milling was (60 mesh size)

이 研究는 *Trichoderma viride* Cellulase 에 의한 木材加水分解에 관한 것으로서 供試材料는 산오리나무, 상수리나무, 자작나무, 이태리포푸라, 버즘나무材를 使用하였다. 그리고 還元糖 生成을 위한 Cellulose 反應의 最適 處理條件과 酵素處理 殘渣를 再加熱과 再粉砕한 基質의 糖生成量을 比較하였다.

*1 Received for publication on Nov. 10, 1980

*2 忠北大学校農科大学 College of Agr chungbuk National University, Cheong Ju, Korea.

Trichoderma viride 粗酵素液은 振盪培養法에 의하여 生産하였고 이것을 塩析酵素液을 調製하여 使用하였다.

基質은 산오리나무, 상수리나무, 자작나무, 이태리포푸라, 버즘나무材의 톱밥을 過醋酸法에 의하여 脫리그닌 한 것과 다시 이들의 酵素處理殘渣를 再加熱함과 再粉碎한 것을 使用하였다.

還元糖 定量은 DNS法에 依하였다.

1. *Trichoderma viride* Cellulase를 사용하여 最適條件에서 糖化處理하면 反應時間 96時間에서 平均 28.3%의 還元糖을 生成하였다.

2. 酵素處理殘渣를 水洗한 後 60°C에서 乾燥하여 190°C에서 45分間 再熱處理하여 60mesh로 再粉碎한 基質은 同一 基質에서 酵素濃度가 높아질수록 還元糖 生成量도 增加하였다.

3. 酵素處理殘渣를 60°C에서 乾燥하여 基質로 使用한 것의 還元糖 生成量은 大端히 低調하였으나(Fig1의 S_1 曲線) 最初의 基質과 酵素處理殘渣를 再加熱과 再粉碎하여 使用한 基質에서 生成된 還元糖量은 비슷하였으며 또한 이들間(最初의 基質(S_3)과 酵素處理殘渣를 再處理한 基質(S_2))에는 還元糖生成量에 有意差가 認定되지 않았다.

緒 論

Trichoderma viride Cellulase의 最適 還元糖 生成條件을 究明하기 위하여 基質處理의 效果 (韓林誌 第38号, 1978) 및 酵素反應條件의 效果 (韓林誌 第39号, 1978)를 究明한 結果에서 다음과 같은 最適 還元糖 生成 條件을 얻었다. I. 基質處理의 最適效果로는 (1) 過醋酸法 (外山 1970)에 依한 脫리그닌은 過醋酸液의 濃度가 높을수록 短時間에 脫리그닌이 되었는데 60%의 過醋酸液에서는 24時間 處理로 充分하였다 (2) 基質의 粒子는 微細할 수록 Cellulase에 依한 加水分解가 잘되었으며 60~100mesh의 基質의 粒子가 좋았다. (3) 基質의 熱處理 溫度는 높을수록 還元糖 生成量이 增加하였으며 熱處理 溫度가 190°C에서 가장 많은 糖生成을 나타냈다. (4) 基質의 熱處理 時間은 45分이 最大의 還元糖 生成量을 나타냈다. II 酵素反應條件의 最適效果로는 (1) 0.1M醋酸緩衝液에서 PH. 5.0가 最適이었다. (2) 反應溫度는 40°C가 最適이었다. (3) 酵素濃度는 높을수록 還元糖 生成량이 많았다. (4) 基質의 濃度는 낮을수록 單位基質에 對한 還元糖 生成量은 增加하였다. (5) 糖類인 fructose, lacose, maltose 및 glucose는 酵素活成에 阻害作用을 나타냈다.

이研究는 以上과 같은 諸最適 處理條件下에서 潤葉樹 5樹種의 Holocellulose를 基質로 하고 *Trichoderma viride* Cellulase를 作用하였을때 生成된 還元糖量과 酵素處理 殘渣의 再加熱과 再粉碎로서 다시 基質로 使用하였을 때의 還元糖量을 究明하는데 있다.

材料 및 方法

I. 材料

1. 供試 樹種

忠北大學校 構內에서 生育한 樹種 8~14年生인 산오리나무 (*Alnus hirsuta* (Spach) Rupr), 상수리나무 (*Quereus acutissima* Carruthers), 자작나무 (*Betula platyphylla* var. *japonica* Nara), 이태리포푸라 (*Populus euramericana* Guiner), 버즘나무 (*Platanus orientalis* L.)를 各樹種마다 10株를 採하여 0.3 - 0.5cm간격으로 環鋸로 切斷하여 톱밥을 만들어 이것을 脫리그닌 하였다

2. 供試 菌株

現在까지 Cellulose에 依한 糖化力이 가장 강한 것으로 紹介된 *Trichoderma viride* Pers, ex. Fr. S-ANK 16374号菌을 利用하였다.

II. 方法

1. 塩析 酵素液 調製 (1955)

밀기울 振盪(液內) 培養法에 依하여 生成된 酵素 抽出液을 取하여 硫酸飽和度 0.2 (20%)~0.8 (80%)에서 沈澱하는 것을 半透性膜에 넣어 30時間 透析한 酵素液을 使用하였다.

2. 基質調製^(1,2)

上記 供試樹種에서 얻은 톱밥을 60%의 過醋酸液으로 常溫(17℃)에서 24時間 處理하여 脫리그린 한 것을 190℃에서 45分間 熱處理하여 60mesh로 粉碎한 것을 酵素基質로 使用하였다. 그리고 酵素處理 殘渣의 再使用 基質은 供試樹種別로 酵素處理後 殘渣를 모디어 물로 充分히 洗滌한후 60℃에 乾燥하여 이것을 190℃에서 45分間 熱處理하여 60mesh로 다시 粉碎한 것을 使用하였으며 比較區의 基質은 酵素處理後殘渣를 물로 充分히 洗滌한 후 60℃로 乾燥한 것을 使用 하였다.

3. 反應條件

(1) 酸度(PH)^(1,3)

0.1M醋酸緩衝液, PH, 5.0인 것을 100ml用 三角 flask에 50ml 取하고 여기에 基質과 酵素液을 加하였다.

(2) 反應溫度^(1,3)

反應溫度는 40℃로 하였다.

(3) 基質濃度^(1,3)

基質濃度는 0.25g/50ml로 하였다.

(4) 酵素濃度^(1,3)

酵素濃度는 0.5%, 1.0%, 2.0%로 区分하여 處理하였다.

(5) 反應時間^(1,3)

反應時間은 96時間으로 固定하였다.

이상과 같은 諸條件에서 酵素反應을 시킨것을 100℃에서 5分間 끓여 酵素反應을 停止시켰다. 그리고 遠心分離하여 上澄液을 取하고 이때 生成되어있는 還元糖量을 DNS(3.5 Dinitrosalicylic acid)法(1, 2)에 依하여 定量한 結果를 三元配置法으로 分散分析하였다.

結果 및 考察

各樹種의 Holo-cellulose를 基質로한 還元糖 生成量의 結果는 Table 1과 같으며 이에 對한 分散分析結果는 Table 2와 같다.

Table 1. Effect of the substrates from 5 species on the production of reducing sugars.

Cellulase concent. (%)	Substrate	Reducing sugar produced(%)						
		A	B	C	D	E	Control	Mean
0.5(Y)	Initial substrate (T)	19.8	18.7	19.6	19.2	19.3		19.3
	Residue of digested (T)	18.5	18.4	19.1	18.3	19.0	1.1	18.7
1.0(Y)	Initial substrate (T)	24.6	25.4	25.3	24.3	24.2		24.8
	Residue of digested (T)	23.9	24.1	24.8	24.0	23.7	1.6	24.4
2.0(Y)	Initial substrate (T)	28.4	28.6	28.7	27.4	28.6		28.3
	Residue of digested (T)	27.8	28.1	28.4	26.9	28.3	1.9	27.9

A : *Alnus hirsuta* Rupr

B : *Quercus acutissima* Carruthers

C : *Betula platyphylla* var. *japonca* NARA

D : *Populus euramericana* Guiner

E : *Platanus orientalis* L.

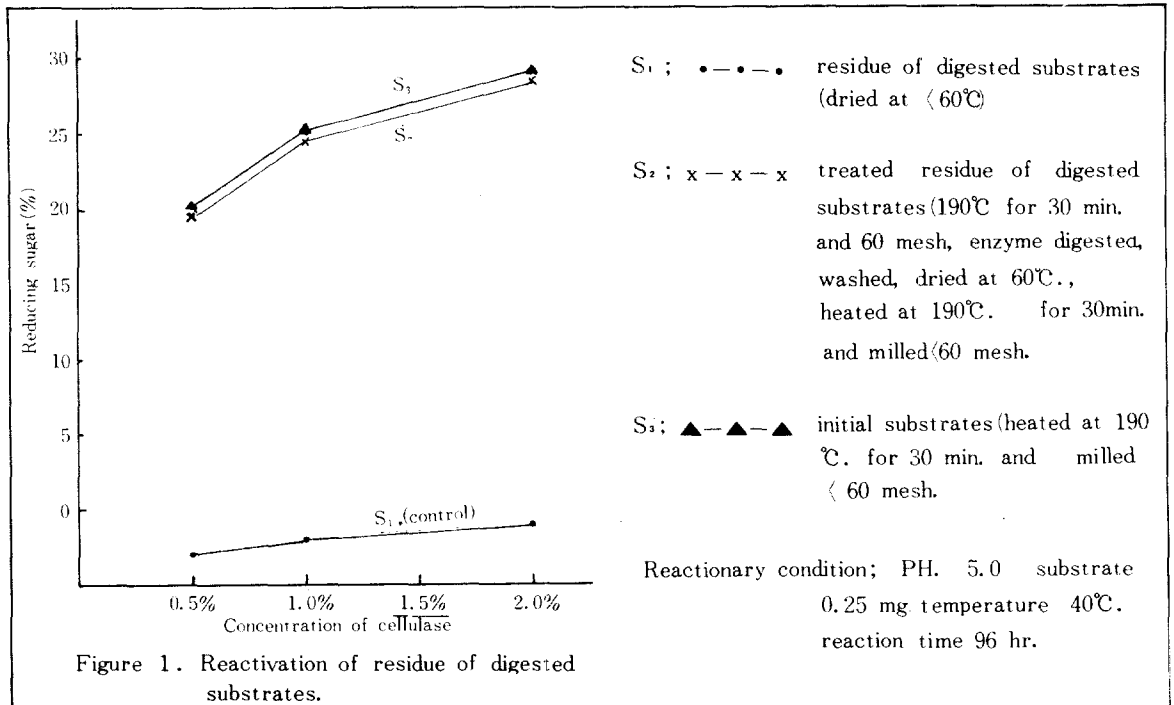
Table 2. Analysis variance of the Table 1.

Factor	SS	d. f	MS	F	P
V (Species)	0.80	4	0.20	0.146	P < 0.05
Y (Cellulase)	195.47	2	97.74	71.343 **	P < 0.01
T (Substrate)	1.64	1	1.64	1.197	P < 0.05
V × Y	3.03	8	0.15	1.37	
V × Y	0.27	4	0.76		
T × Y	1.23	2	0.14		
V × Y × T	2.53	8	0.32		
Total	204.97	29			

** : Significant at 1% Level

Table 1 및 2 에서 보는 바와같이 各樹種에서 生成된 還元糖量은 같은 酵素濃度에서는 有意差가 없이 거의 均一하였다. 더욱이 酵素處理 殘渣의 再加熱과 再粉碎後 基質로 再使用한 것의 還元糖 生成量은 最初로 使用한 基質에서 生成된 還元糖과 비슷한 値를 나타내며 이들間(最初의 基質, 즉 Figure 1 의 S₁ 曲線

線과 酵素處理 殘渣의 基質, 즉 S₂ 曲線)에는 有意差가 認定되지 않았다. 그러나 酵素處理 殘渣를 60°C 에서 乾燥하여 다시 基質로 使用한 것의 還元糖 生成量 (S₁)을 大端히 微微하였으나 酵素濃度가 最高인 2.0 %에서 불과 1.9%에 달하였다.



이상과 같은 現象은, 基質은 190°C에서 45分間 熱處理하고 다시 粉碎함으로서 Michallis와 Menten (1973)가 提案한 酵素-基質-Complex說에 立脚한 데서 나타나는 反應이라 본다. 즉 酵素의 表面에 獨特한 立体構造가 있고 이 特定한 곳에 이것과 立体構造가 같은 基質의 分子가 190°C라는 高温의 熱處理와 다시 細粉 함으로서 再生되어 酵素反應이 容易하게 될 수 있도록 結合되기 때문이다 본다. 또한 酵素處理殘渣를 60°C에서 乾燥하여 基質로 다시 使用한 것은 還元糖 生成量이 거의 없는것을 보면(Figure 1, S₁의 曲線) 最初의 基質로 使用되었을때 酵素處理로 酵素의 立体構造에 맞는 基質의 表面構造가 이미 糖으로 轉化되어 지므로서 그다음 부터는 基質에 特別한 處理를 하지 않는이상 還元糖 生成은 어렵다는것을 보여주고 있는 것이다.

Figure 1의 S₂와 S₃의 曲線을 보면, 最初의 基質(S₁)과 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎한 基質(S₂)의 還元糖 生成量은 酵素의 濃도가 높아 질수록 還元糖 生成量은 增加한 것은 사실이나 그增加량이 酵素의 濃도가 높아질수록 最初의 基質과 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎한 基質에서 生成되는 糖量은 서로 近接하고 있는 것이다. 그러므로 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎로 最初의 基質과 같은 效果를 얻는 基質로 使用될 수 있다고 본다.

Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究(1, 2)에서 보는 바와같이 이때의 生成된 最大 還元糖量은 酵素反應時間 96時間에서 24~26%를 보여주고 있으나 最適의 諸反應 條件에서 酵素反應을 하여 얻은 還元糖量은 Table 1에서와 같이 最初의 基質에서는 28.3%였으며, 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎한 基質에서는 27.8%로 약 2-4% 向上된 糖收量을 갖었다. 이와같은 現象은 基質處理와 酵素反應條件을 보다 最適의 條件으로 誘導할 것 같으면 酵素-基質-Complex說에 立脚한 酵素와 基質이 서로 맞는 立体構造가 向上되는 반면 酵素의 蛋白質의 立体構造는 일정한 곳에 荷電 또는 反應성이 큰 原子團이 基質과 結合하기에 알맞게 配列을 하고 있어 基質과 Ion 結合을 하거나 副原子가 結合을 하는 active center의 領域이 增加되는 것으로 본다.

結 論

Trichoderma viride cellulase에 의한 最大 還元糖 生成을 위하여 潤葉樹 5樹種의 Holocellulose를 基質로 하고 酵素反應의 最適條件에서 Cellulase를 作用하여 이때 生成된 還元糖量과, 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎한 基質의 還元糖 生成량을 調査하였다.

1. *Trichoderma viride* cellulase를 使用하여 最適의 反應條件에서 糖化處理하면 反應時間 96時間에서 平均 28.3%의 還元糖을 生成하였다.
2. 酵素處理 殘渣를 水洗한 후 60°C에서 乾燥하여 190°C에서 45分間 再加熱하고 60mesh로 再粉碎한 基質은 같은 基質에서 酵素 濃도가 높아질수록 還元糖 生成량도 增加하였다.
3. 酵素處理 殘渣를 60°C에서 乾燥하여 基質로 使用한 것의 還元糖 生成量은 大端히 低調하였다. 그러나 最初의 基質과 酵素處理殘渣의 再加熱과 再粉碎한 基質에서 生成된 還元糖量은 비슷하였으며 또한 이들間에는 還元糖 生成量에 有意差가 認定되지 않았다.

引用 文 獻

1. 閔斗植, 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究(I) 基質處理의 效果, 韓國林學會誌, 33: 13~18.
2. ———, 1978. 표고栽培廢材의 飼料化에 관한 研究, 木材工業 6: 8~14. 韓國木材工學會.
3. ———, 1978. Cellulase에 의한 木材糖化의 閔한 研究(II) 反應條件의 效果, 韓國林學會誌, 39: 57~63.
4. ———, 1979. 묶은 黃酸 및 Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究, 韓國林學會誌, 41: 1~6.
5. ———, 1979. 표고栽培廢材의 糖化에 관한 研究. 韓國林學會誌, 43: 31~34.