

代替燃料 生産을 위한 木質材料의 加水分解에 관한 研究(Ⅱ)*¹

—脫리그닌처리가 爆碎處理材의 酵素的 糖化에 미치는 影響—

趙 南 奭*²

Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for the Alternative Fuels(II)*¹

—The Effect of Delignification Treatment on the Enzymatic
Hydrolysis of Steam-Exploded Woods —

Nam Seok Cho*²

SUMMARY

As polysaccharides in lignocellulosic materials are encrusted with aromatic lignin molecules and have high crystallinity, these require pretreatment to improve their digestability by cellulolytic enzymes. Though a number of pretreatment methods have been proposed, the steam explosion process is evaluated as a promising method. This study was performed to investigate the effect of delignification treatment by alkali, methanol and the others on the enzymatic hydrolysis.

Delignification treatment resulted in great increase rate in enzymatic hydrolysis. Concerning to the effect of delignification reagents on the enzymatic hydrolysis, methanol treatment was more effective than alkali in the case of oak wood. In pine wood, the delignification did not showed any significant enhancement of hydrolysis rate. Complete delignification by Alkali-Oxygen. Alkali treatment showed high saccharification rate of 99.5%.

Keywords : lignocellulosic material, steam explosion, enzymatic hydrolysis, delignification, saccharification

1. 緒 論

오늘날 세계 에너지 소비의 주종을 이루고 있는 석유, 석탄, 천연가스 등 化石燃料 資源은 재생성이 없기 때문에 새로운 代替資源의 개발이 절실히 요청되고 있다. 그리고 植物의 光合成

작용을 이용하는 木質系 바이오메스 資源은 그 蓄積量이 많고, 광합성 효율이 높을 뿐 만 아니라 再生産 가능한 無限의 資源이므로 今後의 유용한 對替에너지 資源으로서 가장 적당한 것으로 評價되고 있으며, 따라서 이들을 이용하여 편리한 형태의 燃料를 얻고자 하는 많은 研究가

*1. 接受 1990年 8月 18日, Received August 18, 1990.

本 研究는 1987년도 韓國科學財團의 研究費(目的基礎 研究) 支援으로 遂行되었음.

*2. 忠北大學校 農科大學 College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

진행되고 있다.

前報¹⁾에서는 爆碎처리 기술을 응용하여 木材 자원의 효과적인 前處理特性을 究明하였고, 爆碎처리 조건이 酵素의 加水分解에 미치는 影響을 검토하였는바, 酵素의 糖化率이 대체적으로 높지 않았다.

加水分解 氣質로서 목재중에 함유되어 있는 cellulose와 hemicellulose 등의 탄수화물은 lignin에 의해 둘러싸여 있거나 혹은 긴밀하게 결합되어 있기 때문에 이들을 효과적으로 이용하기 위해서는 이러한 lignin을 제거하여 이들과 酵素와의 反應性を 높여야 한다. 이와 같이 多糖類 및 木質재료의 효소 반응성을 높일 목적으로 여러가지의 전처리 방법이 제안되어 왔으며, 그 가운데 化學的으로 脫리그닌 하는 방법^{2,13)}과 木材 腐朽菌의 리그닌 分解力을 이용한 微生物的 脫리그닌 방법^{14,15)} 등이 報告되고 있다.

本 研究는 爆碎한 木質 시료를 각종 시약으로 脫리그닌함으로써 이러한 처리가 酵素의 糖化에 미치는 영향을 파악하고자 실시하였다.

2. 材料 및 方法

2.1 供試 材料 및 試料 調製

闊葉樹材로서 신갈나무(*Quercus Mongolica*)를, 針葉樹材로서 소나무(*Pinus densiflora*)를 慶北大學校 靑松연습원에서 벌채하였으며, 목재칩은 대구시 소재 경북제재소에서 펄프용 칩피를 이용, 조제하였고 음건후 폭쇄시료로서 공시하였다.

2.2 爆碎 處理

前報¹⁾와 동일하게 처리하였다.

2.3 脫리그닌 處理

2.3.1 칩의 알칼리 처리

爆碎 처리 시료를 1% NaOH를 사용하여 100℃에서 1hr 처리하고 뜨거운 물로 충분히 씻고, 1% 초산 용액으로 中和시킨 다음, 다시 뜨

거운 물로 충분히 세척하였다.

2.3.2 메틸알콜 처리

爆碎시료를 메틸알콜을 사용하여 속시렛 抽出裝置로 6시간 추출하였다.

2.3.3 酸素-알칼리 처리

爆碎처리한 시료를 Fig. 1의 Scheme에 따라 제 1단 처리(알칼리 처리, 약품: 0.3% 가성 소오다, 液比=1:10, 반응온도 및 시간: 70℃, 2hr) 및 제 2단 처리(酸素-알칼리 처리, 酸素初氣壓: 10kg/cm², 반응온도 및 시간: 120℃, 1hr, 알칼리 負荷: 0.6%)하여 리그닌 함량 0.03%의 시료를 조제하였다.

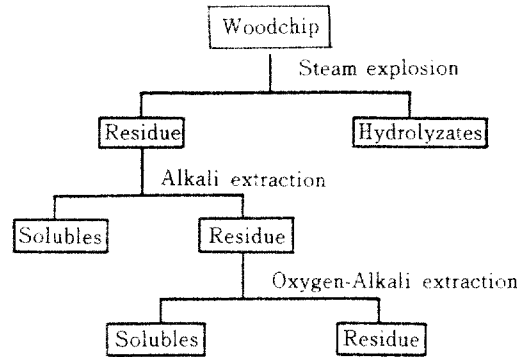


Fig. 1. Three stage fractionation.

2.3.4 酵素의 加水分解

酵素는 *Aspergillus niger* 로부터 유래된 미국 Miles사의 cellulase를 사용하였으며, 試料 1g에 대하여 0.32%의 셀룰레이스 효소용액을 30ml의 L형 삼각 후라스크에 넣고 40℃에서 산도 4.5의 sodium acetate 완충 용액을 가하여 소정시간 동안 효소분해를 행하였으며, 그 후 糖化 glass filter 1G4를 사용, 여과하고, 이를 105℃의 전기 항온 건조기에서 恒량이 될때까지 乾燥, 秤量하여 다음식에 의거하여 加水分解率을 구하였다.

$$\text{加水分解率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{잔사의 중량}(g)}{\text{시료의 중량}(g)}\right) \times 100$$

3. 結果 및 考察

3.1 알칼리에 의한 脫리그닌

爆碎처리시료를 그대로 가수분해한 결과, 전보¹⁾에 보고한 바와 같이 19.8-37.1%의 매우 저조한 효소분해율을 나타내었는 바, 이들의 효소적 가수분해율을 향상시키기 위하여 전처리를 실시하였다. 1% NaOH처리과정에서 폭쇄시료가 가지고 있던 약 1/2의 리그닌(23.4%의 리그닌이 14.9%로 감소) 용출되었다. Table 1은 이들 알칼리 탈리그닌 시료의 酸素의 加水分解의 결과를 나타낸 것이다.

알칼리 脫리그닌 처리한 신갈나무의 경우 Table 1에서 보는 바와같이 未處理 시료의 결과¹⁾에 비해 20kg/cm²의 경우 15.4-33.7%, 25kg/cm²의 경우 22.4~35.3%, 30kg/cm²에서 24.8~26.5%, 35kg/cm²에서 18.2-21.7%의 높은 加水分解增加率을 기록하였다. 또한 未處理에서와는 달리 가수분해 시간이 증가하더라도 분해율이 그다지 중요하지 않았다. 그러나 실질적인 가수분해율은 매우 낮아서 예를 들면 30-6 이상의 처리조건에서의 가수분해율은 30-3 이하의 처리조건에 비하여 약 1/2 정도로서 매우 낮았다.

Fig. 2는 알칼리로 탈리그닌한 신갈나무의 Table 1. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded oak wood delignified with 1%-NaOH

Explosion Condition*	Hydrolysis Time, hr.				
	4	8	16	24	48
20-6	33.6	35.3	40.6	43.2	44.8
20-9	31.5	36.6	41.1	42.5	47.6
25-3	34.1	40.0	40.8	43.9	45.8
25-6	34.7	40.3	44.5	46.1	50.2
25-9	31.1	40.1	43.5	45.6	47.8
30-3	28.1	29.6	34.3	38.8	40.6
30-6	17.6	19.6	20.5	26.7	27.5
30-9	17.1	20.5	21.6	24.3	25.9
35-3	21.5	24.6	28.3	31.4	32.0
35-6	17.0	17.1	20.6	23.5	26.7
35-9	16.9	20.8	21.1	23.5	24.4

*For example.

20-6 : Steam pressure 20kg/cm²
Steaming time 6 min.

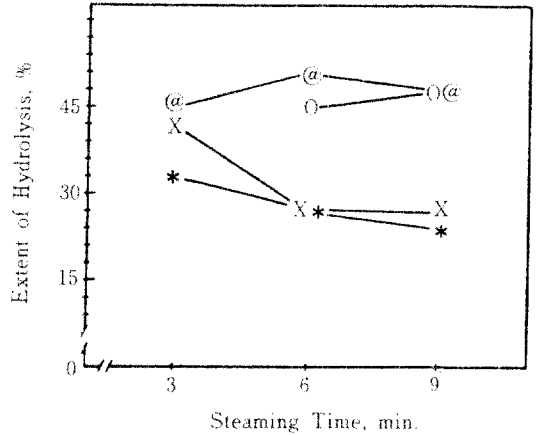


Fig. 2. Effect of steaming time on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded oak wood delignified with 1% -NaOH.

O 20kg/cm², @ 25kg/cm²
X 30kg/cm², * 35kg/cm²

酵素分解에 미치는 蒸氣처리시간의 영향을 나타낸것으로서 탈리그닌 처리를 하지 않은 爆碎처리시료에서와 같이 20 및 25kg/cm²의 처리조건이 높은 加水分解率을 나타냈으며, 증기처리시간이 증가하더라도 분해율은 그다지 증가되지 않고 거의 동일한 값을 보여주었다. 그러나 30kg/cm²의 경우 3분처리는 비교적 높은 분해율을 보여주었으나 6 및 9분으로 처리시간이 증가되면 35kg/cm²의 경우처럼 낮은 加水分解率을 나타냈다.

상기한 瀾葉樹의 결과와 비교해 보았을 때 소나무는 알칼리를 사용하여 탈리그닌을 하더라도 Table 2에서 보는 바와 같이 그다지 酵素分解率의 증가에 기여하지 못하였는바, 최소 3.5%(40kg/cm², 6분)에서 최고 65.3%(35kg/cm², 9분)의 증가율을 기록하였다. 그리고 이와같은 결과의 표현이 수치상으로는 매우 현저한 효과를 보이는 것 같으나 실제로는 각각 14.1%, 9.2%의 매우 낮은 加水分解率로서 알칼리에 의한 탈리그닌이 효소분해율의 증가효과를 주지 못하였다. 또한 처리시간의 延長이 특히 아무런 효소분해율의 증가효과를 주지 못하였다.

Table 2. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded pine wood delignified with 1% -NaOH.

Explosion Condition*	Hydrolysis Time, hr.				
	4	8	16	24	48
25-6	11.0	16.4	17.6	17.1	18.1
25-9	16.0	17.7	17.8	18.9	20.9
30-3	22.0	22.8	23.5	23.8	26.9
30-6	14.7	14.7	15.6	16.6	18.0
30-9	8.2	8.9	11.5	12.0	14.8
35-3	13.2	13.0	14.1	14.1	18.9
35-6	10.1	11.5	13.9	14.3	14.8
35-9	9.2	9.2	8.7	9.3	11.5
40-3	12.8	11.8	11.7	12.1	12.7
40-6	12.9	13.4	13.5	13.9	14.1
40-9	9.2	9.3	13.6	13.2	10.5

*For example.

25-6 : Steam pressure 25kg/cm²
 Treating time 6 min.

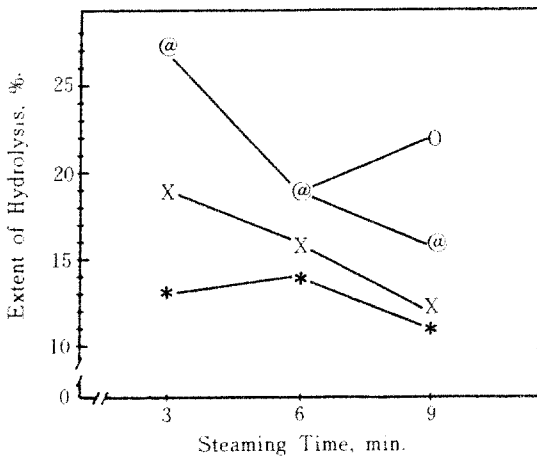


Fig. 3. Effect of steaming time on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded pine wood delignified with 1% -NaOH.

O 25kg/cm², @ 30kg/cm²
 X 35kg/cm², * 40kg/cm²

Fig. 3은 알칼리로 탈리그닌한 시료의 酵素分解에 미치는 蒸氣처리시간의 영향을 나타낸

것으로서 3분 처리가 30, 35kg/cm²의 경우 좋았으며, 압력이 낮은 25kg/cm²의 경우는 9분의 장시간 처리가 좋은 결과를 주었다. 그리고 신갈나무의 경우는 20 및 25kg/cm²의 낮은 蒸氣壓力이 좋은 가수분해율을 기록하였고, 소나무재의 경우는 30kg/cm²의 보다 높은 압력이 오히려 좋은 가수분해를 기록하여 재질이 부드러운 침엽수재가 재질이 딱딱한 활엽수재보다 훨씬 심한 爆碎조건이 요구됨을 알 수 있었다. 이와 같은 침·활엽수재에 따른 가수분해율의 차이는 목재종의 hemicellulose의 함량 및 그 중의 아세틸기의 함량차에 기인하는 것으로 생각된다.

Fig. 4은 蒸氣壓力의 효과를 나타낸 것으로서 무처리에서와 같이 신갈나무의 경우 25kg/cm²이 最高의 加水分解率을 보여주었고, 소나무의 경우 25 및 30kg/cm²의 조건이 거의 동일한 낮은 분해율을 결과하였다.

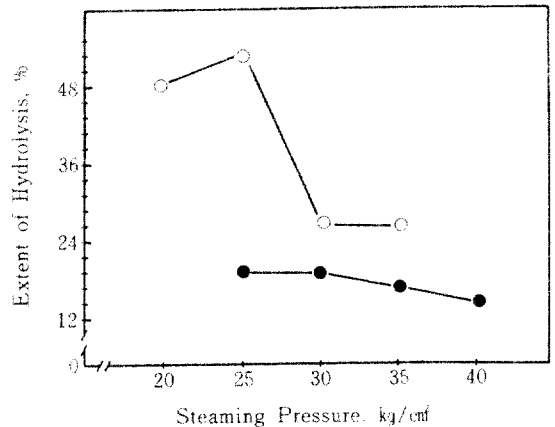


Fig. 4. Effect of steaming pressure on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded woods delignified with 1% -NaOH.

○ Oak wood ● Pine wood

3.2 Methanol에 의한 靛리그닌

탈리그닌용 試藥으로서 methanol을 사용한 결과 리그닌의 제거도 일어났으며 시료의 건조과정에서 물을 媒體로 하였을 경우 일어나는 水素結合을 상대적으로 줄일 수 있다는 측면에서

Table 3. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded oak wood delignified with methanol.

Explosion Condition*	Hydrolysis Time, hr.				
	4	8	16	24	48
20-6	36.1	40.2	45.2	45.7	47.5
20-9	34.6	36.8	40.2	41.6	49.5
25-3	38.1	41.2	43.4	36.9	48.1
25-6	35.8	38.8	44.7	49.0	53.1
25-9	34.4	41.2	44.2	48.2	50.2
30-3	29.2	32.3	35.9	41.8	45.7
30-6	17.5	16.3	19.9	25.8	27.1
30-9	18.6	22.1	24.0	26.0	24.9
35-3	26.1	28.6	30.3	31.1	32.0
35-6	18.8	19.1	19.5	21.2	26.6
35-9	16.1	23.1	25.4	28.8	29.2

*For example,

20-6 : Steam pressure 20kg /cm²
Steaming time 6 min.

검토되었다.

메타놀에 의한 전처리시, 신갈나무의 경우 Table 3에서 보는 바와 같이 알칼리에 의한 탈리그닌 시료의 결과와 동일한 경향을 보여 주었고, 탈리그닌 처리를 하지 아니한 것과 비교하여 가수분해 시간에 따른 分解率의 變異幅도 훨씬 감소되었다. 가수분해의 증가를 자세히 살펴보면 20kg/cm²의 경우 27.3-42.7%, 30kg/cm²에서 20.7-33.3%, 35kg/cm²에서 12.9-47.2%로 알칼리 탈리그닌 시료보다도 훨씬 우수하였다.

Fig. 5는 methanol로 탈리그닌한 신갈나무의 효소분해에 미치는 증기처리시간의 효과를 나타낸 것으로서 Fig. 2의 알칼리처리의 경우와 동일한 경향을 보여주었다.

소나무에 있어서 Table 4에서 보는 바와 같이 加水分解率이 매우 낮았으며, 알칼리에서의 결과와 같이 methanol에 의한 탈리그닌이 효소가 가수분해율을 그다지 향상시키지 못하였다.

Methanol 처리시료의 加水分解에 미치는 蒸氣처리 시간의 효과를 보면 Fig. 6에서 보는 바

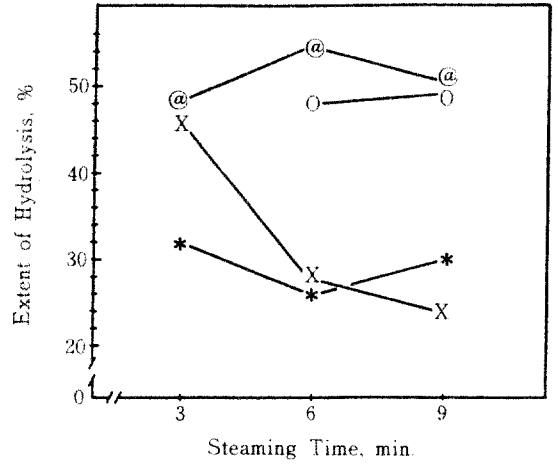


Fig. 5. Effect of steaming time on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded oak wood (for 6 min) delignified with methanol.

O 20kg/cm², @ 25kg/cm²
X 30kg/cm², * 35kg/cm²

Table 4. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded pine wood delignified with methanol.

Explosion Condition*	Hydrolysis Time, hr.				
	4	8	16	24	48
25-6	11.1	16.4	18.6	18.3	19.1
25-9	16.7	18.1	17.7	18.8	22.1
30-3	22.9	22.8	24.2	24.4	27.3
30-6	14.7	15.5	15.6	16.4	19.2
30-9	8.8	9.0	11.5	13.2	15.8
35-3	14.1	13.4	14.2	13.4	19.0
35-6	10.2	12.1	13.2	15.7	15.7
35-9	10.2	10.2	9.0	10.1	12.2
40-3	13-6	12.6	12.8	12.6	12.8
40-6	13.9	14.1	13.1	13.8	14.1
40-9	9.2	10.2	14.3	14.1	11.3

*For example,

25-6 : Steam pressure 25kg /cm²
Treating time 6 min.

와 같이 30kg/cm²에서 3분 처리가 가장 우수하였

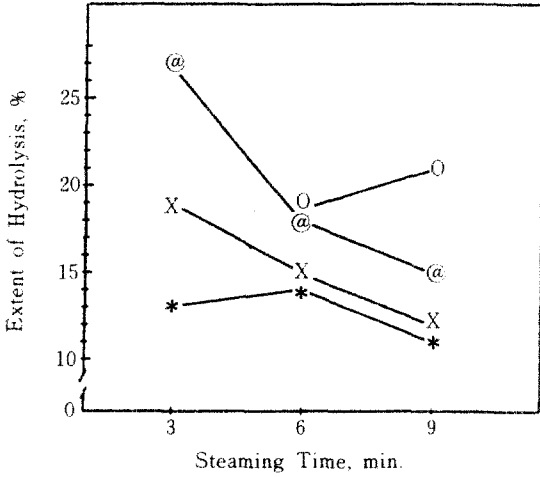


Fig. 6. Effect of steaming time on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded pine wood (for 6 min.) delignified with methanol.

O 25 kg/cm², @ 30 kg/cm²
 X 35 kg/cm², * 40 kg/cm²

고, 증기처리 시간이 길어질 수록 酵素分解率은 감소 되었다. 가장 감소율이 큰 것이 30 kg/cm²의 증기압력이었으며 40 kg/cm²의 경우는 증기처리 시간과 관계없이 매우 저조한 가수분해율을 보

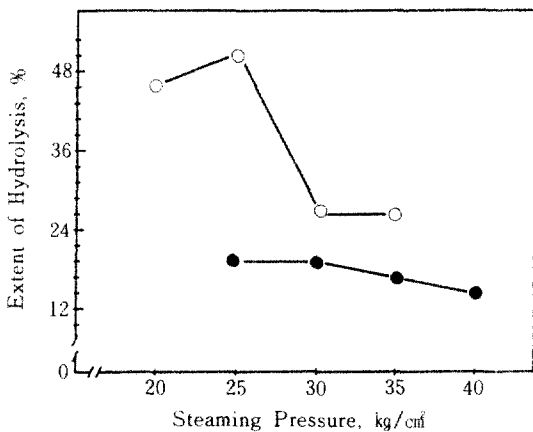


Fig. 7. Effect of steaming pressure on enzymatic hydrolysis (for 48 hr.) of steam-exploded woods (for 6 min.) delignified with methanol.

O Oak wood ● Pine wood

여주었다.

Fig. 7은 蒸氣壓力과 加水分解率의 관계를 나타낸 것으로서 무처리, 알칼리 처리한 시료와 동일한 경향을 보여 주었는데, 신갈나무의 경우 25 kg/cm²이 가장 우수하였고 소나무에 있어서는 25, 30 kg/cm²이 우수하였다.

3.3 酸素-알칼리에 의한 脫리그닌

Fig. 8은 oxygen-alkali 탈리그닌시 알칼리 charge가 脫리그닌反應에 미치는 효과를 나타낸 것으로서 리그닌의 溶出과 알칼리량이 밀접하게 관계하고 있음을 나타낸다. 그리고 이때 고려되어야 할 주요사항은 알칼리량뿐만 아니라 산소와 기질의 접촉이 매우 중요한 인자로서 작용하는바, 산소는 물에 잘 용해되지 않을 뿐 아니라 탈리그닌시 반응온도가 120°C나 되므로 약액속에는 거의 산소가 없는 상태로 되므로 효과적으로 酵素와 試料의 접촉을 피하기 위해서는 상당히 높은 固形分 농도에서 충분히 攪拌을 행하여야 한다. 본 실험에서의 반응은 回轉하는

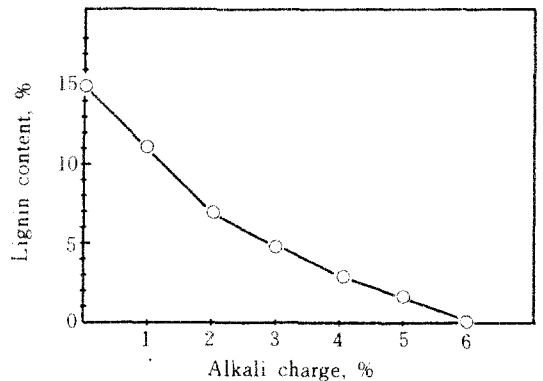


Fig. 8. Effect of alkali charge on oxygen-alkali delignification of steam-exploded oak wood.

대형 autoclave 내에 스테인레스 스틸재 반응관을 넣고 회전시키면서 행하였으며, 최종적으로 Klason 리그닌 함량 0.03%의 맑은 크림상의 시료를 41.7%의 收率로서 얻었다.

筆者 등의 연구⁶⁾에서 보는 바와같이 自己加水分解 처리의 경우, 시료의 酵素 糖化率은

180°C 처리시 71.6%-83.5%을, 195°C에서는 90.3-96.3%의 높은 당화율을 결과하였다. 가수분해 온도가 210°C로 높아지면 당화율은 약 94%를 기록하였다. 이와같은 결과는 자기 가수분해처리 만으로도 목재의 조직이弛緩되었고, 특히 셀룰로오스 부분의 結晶領域이 파괴되어 효소적 당화반응이 순조롭게 일어나는 것으로 생각된다. 그런데 시료중에 리그닌이 소량이라도 존재하면 효소와의 吸着現狀에 의하여 효소의 損失을 초래하고 효소의 活性을 저하시키는 고로 가능한한 리그닌을 제거할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 알칼리 및 산소-알칼리에 의한 2단계 탈리그닌 처리를 행하여 최종적으로 리그닌함량 0.03%의 크림상 색깔의 시료를 41.7%의 수율로 얻었으며 효소적 당화를 실시한 결과는 Fig. 9와 같다.

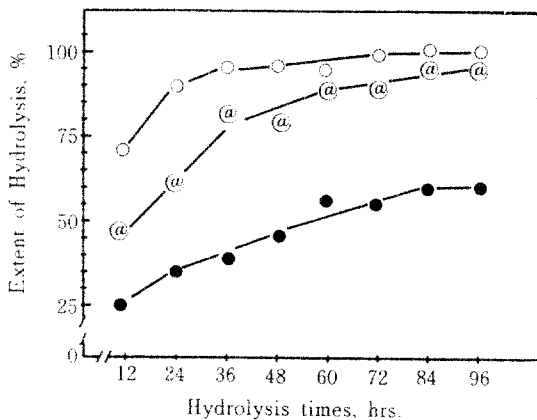


Fig. 9. Effect of steam explosion on enzymatic hydrolysis.

- : Delignified steam-exploded oak wood
- @ : Steam-exploded oak wood (25-6)
- : Whatman No. 2 filter paper (20-60 meshes)

이 그림에서 보는 바와 같이 脫리그닌된 爆碎 처리재의 酵素的 糖化처리의 결과로서 탈리그닌하므로서 99.5%의 높은 糖化率을 결과하였다. 폭쇄 처리만 한 시료 및 20-60 meshes로 粉碎한 濾過紙의 경우 각각 96.3%, 61.5%의 당

화율을 결과하였다. 여기에서도 리그닌이 거의 없는 여과지의 경우, 효소분해율이 매우 낮는데 비하여, 리그닌이 그대로 포함되어 있는 폭쇄 처리재의 효소 분해율이 이처럼 높다는 사실은 리그닌 그자체보다도 전처리 과정에서 셀룰로오스 基質의 表面 혹은 内部에 어떠한 변화가 일어났는가 하는 것이 중요한 因子임을 알 수 있다.

4. 結 論

木質系 바이오매스는 多糖類가 리그닌으로 둘러 싸여 있으며, 이들 多糖類의 結晶性이 매우 크기 때문에 이들을 酵素的으로 加水分解하여 이용하기 위해서는 전처리를 필요로 하는바, 제안된 많은 전처리법 가운데 爆碎處理法(Steam explosion process)이 유망한 처리방법으로 알려지고 있다.

本 研究에서는 우리나라에서 최대의 蓄積量을 보유하고 있는 瀾葉樹材로서 신갈나무와 針葉樹材로서 소나무를 원료로 하여 爆碎處理法에 의한 酵素的 糖化를 검토하는 것과 관련하여 폭쇄처리재의 脫리그닌처리가 효소적 당화에 어떠한 영향을 미치는가를 알기 위하여 실시하였으며, 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 알칼리에 의한 脫리그닌으로 신갈나무의 경우 최저 15.0%에서 최고 35.3%의 加水分解率 증가를 결과하였으며, 25kg/cm², 6분 처리가 가장 우수한 결과를 보여 주었다. 소나무의 경우는 가수분해율 증가율이 최소 3.5%에서 최고 65.3%였으며, 가장 우수한 결과 35kg/cm², 3분 처리였다.

2. 메틸알콜에 의한 脫리그닌 효과에 있어서는 신갈나무의 경우 최소 12.9%에서 최고 42.7%의 加水分解 增加率을 보여주었고, 전체적으로 알칼리 처리보다도 우수한 가수분해 증가 효과를 결과하였다. 소나무에 있어서는 그다지 효과가 없었다.

3. 알칼리 및 酵素-알칼리에 의한 2단계처리

로 脫리그닌 함으로서 99.5%의 높은 당화율을 결과하였다. 自己加水分解 처리만으로도 195°C의 경우 90.3-96.3%의 당화율 결과와 비교하였을 때 대단한 증가는 아니었으며, 완전 탈리그닌의 목적은 酵素 回收와 관련하여 중요하다.

參 考 文 獻

1. Cho, Nam-Seok, and J. Y. Lee. 1989. The effect of steam explosion on its enzymatic hydrolysis. *J. Korea For. Energy.* 9(1): 1-9
2. Millett, M. A. et al. 1970. *J. Anim. Sci.* 31: 781-785
3. Pew, J. C. 1957. Properties of powdered wood and isolation of lignin by cellulytic enzymes. *Tappi.* 40: 553
4. Ghose, T. K., and J. A. Kostick. 1969. *Advan. Chem. Ser.* 95: 415
5. Garves, K., and H. H. Dietrichs. 1975. *Holzforchung* 29: 39-43
6. Kaneko, H. et al. 1980. Degradation of lignin with ozone. *Mokuzai gakkaiishi.* 26(11): 752-758
7. Kaneko, H. et al. 1981. Reactions of biphenyl and alpha-carbinol type model compounds with ozone. *Mokuzai Gakkaiishi.* 27(9): 678-683
8. Singh, R. P. 1982. Ozone replaces chlorine in the first bleaching stage. *Tappi.* 65(2): 45-52
9. April, G. C. 1982. Prehydrolysis achieves higher organosolv delignification. *Tappi.* 65(2): 41-44
10. Kleinert, T. N. 1974. Organosolv pulping with aqueous alcohol. *Tappi.* 57(8): 99-103
11. Kleinert, T. N. 1975. Ethanol-water delignification of wood. Rate constants and activation energy. *Tappi.* 58(8): 170-173
12. Nakano, J., C. Takatsuka, and H. Daima. 1976. Studies on the alkali-methanol cooking. *Japan Tappi.* 30: 650-655
13. Dehaas, G. G., and C. J. Lang. 1974. Delignification with ketones and ammonia. *Tappi.* 57(5): 127-130
14. Hartley, R. D. et al. 1974. *J. Sci. Food Agri.* 25: 433-436
15. Kirk, T. K., and T. L. Highley. 1973. *Phytopathology.* 63: 1338
16. Kirk, T. K., and W. E. Moor. 1972. *Wood Timber.* 4: 72-77