

代替燃料 生産을 위한 木質材料의 加水分解에 관한 研究(Ⅲ)^{*1}

—爆碎처리재의 酵素分解時 Cellulase 酵素의 定量的 回收에 관하여—

趙南奭^{*2}·林昌淑^{*3}·李在成^{*4}·朴 申^{*4}

Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for the Alternative Fuels(Ⅲ)^{*1}

—Quantitative Recycling of Cellulase Enzyme in the Enzymatic
Hydrolysis of Steam-Exploded Woods—

Nam Seok Cho^{*2}·Chang Suk Lim^{*3}·Jae Sung Lee^{*4}·Shin Park^{*4}

SUMMARY

Steam-exploded woods were delignified by two-stage with a 0.3% NaOH extraction and oxygen-alkali bleaching and were subjected to the enzymatic hydrolysis with cellulase enzyme. Also, an improved almost quantitative recycle process of cellulase enzyme was discussed.

In enzyme recovery by affinity method, The first recycling showed relatively high hydrolysis rate of 96.4%. Even at the third recycle, hydrolysis rate was 87.0 percents. In the case of cellulase recovery by ultrafiltration method, first 2 recycling treatments resulted in very high hydrolysis rates, 96.8% and 95.0%, respectively. Even the third recycling showed about 93.6%. Steam-explosion treatment of oak wood followed by 2-stage delignification with alkali and oxygen-alkali produced a excellent substrate for the enzymatic hydrolysis that allowed almost quantitative recycle of cellulase.

Keywords: steam-explosion, enzymatic saccharification, cellulase, recycle of cellulase, ultrafiltration, affinity.

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

本 研究은 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

*3. 林業研究院 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

*4. 嶺南大學校 農畜產大學 College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea

1. 緒 論

木材에 소량의 물을 가하고, 고온(180°C—260°C)에서 단시간(1—15분)처리하는 自己加水分解法¹⁶⁻¹⁹은 著者 등이 행한 一連의 研究⁴⁻⁷⁾에서 밝혀진 바와 같이 목재 주성분을 효율적으로 분리시키며, 셀룰로오스의 효소에 의한 가수분해율을 용이하게 하여 한번의 처리로서 성분의 분획과 전처리 효과를 동시에 달성할 수 있음을 알았다.

한편 cellulose를 酵素에 의해 糖化하여 食品 및 에너지 源으로 이용하려는 연구 또한 많이 이루어지고 있는바^{13, 14, 20, 21)} 이들 cellulose 資源을 효소적으로 가수분해 시키기 위해서 소요되는 費用이 신문용지의 경우 전체비용의 60%를 차지하고 있으며, 목재를 원료로 하는 경우는 自己加水分解 등과 같은 전처리에 많은 비용이 들기 때문에 실제 비용은 이를 훨씬 上廻한다^{13, 23)}. 그리고 효소의 생산비가 매우 비싸기 때문에, 어떤 경우는 목질재료의 전처리 비용보다 효소의 생산비가 월등히 높다는 연구¹³⁾도 있다. 그러므로 값비싼 효소를 회수하여 재이용 한다는 사실은 매우 중요한 문제이며, 효소적 가수분해 工程의 經濟性을 提高시킨다는 측면에서도 그 기술개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 효소의 회수와 관련하여 부닥치는 하나의 문제점은 cellulase가 가수분해의 과정에서 cellulose와의 親和性은 말할것도 없지만, 基質속의 lignin 성분과도 강한 結合을 하여 회수가 불가능하다는 것이다^{11, 15)}.

오늘날 까지 가수분해 반응액에 잔존하고 있는 cellulose 효소를 회수하는 방법으로서, 限外濾過膜을 사용하는 방법¹⁷⁾, 새로운 基質에 吸着시켜 회수하는 방법^{1, 2, 3, 9)} 등이 시도되어 왔으나, 반응시 가하였던 活性의 약 35% 밖에 회수되지 못하였다. 本 研究는 酵素分解에 사용한 cellulase를 回收하여 再利用하려는 목적에서 酵素의 基質 吸着性을 이용하여 사용한 효소를 최고로 회수하고자 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 淸송연습림에서 벌채하였으며, 목재칩은 대구시소재 경북제재소에서 펄프 제조용 칩퍼를 이용, 조제하였고 陰乾 후 爆碎시료로서 供試하였다.

2.2 爆碎 처리

前報²²⁾와 동일하게 처리하였다.

2.3 爆碎 시료의 完全 脫리그린

2.3.1 第 1段 처리 : NaOH 처리

藥品 : 0.3% 가성소오다

液比 : 1 : 10

反應 온도 및 시간 : 70°C, 2hr.

2.3.2 第 2段 처리 : 酸素—알칼리 처리

酸素 初期壓 : 10kg/cm²

反應 온도 및 시간 : 120°C, 1hr.

알칼리 負荷 : 10%

2.4 酵素의 加水分解

酵素는 *Aspergillus niger*로 부터 유래된 미국 Miles사의 cellulase를 사용하였으며, 소정의 시료와 일정 농도의 효소를 30ml의 L형 삼각 후라스크에 넣고 40°C에서 산도 4.5의 sodium acetate 완충 용액을 가하여 소정시간 동안 효소 분해를 행하였으며, 그 후 糖化 殘渣를 glass filter 1G4를 사용, 여과하고, 이를 105°C의 전기 항온 건조기에서 恒量이 될때까지 건조, 평량하여 다음식에 의거하여 가수분해율을 구하였다.

$$\text{加水分解率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{殘渣의 重量}(g)}{\text{試料의 重量}(g)}\right) \times 100$$

2.5 酵素 活性의 측정

pH 4.5의 0.1M sodium acetate 완충용액을

사용하여 40°C에서 다음과 같은 방법¹⁰⁾으로 측정하였다.

2.5.1 Endo-β-1,4-glucanase(CMCase) : carboxymethyl cellulose (CMC) 1% 수용액 0.5ml에 緩衝용액 0.4ml을 가하고, 5분간 豫熱한 다음, 0.012%의 효소 용액 0.1ml를 가해 10분간 振湯, 반응시켜 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson 법으로 정량하였다.

2.5.2 Cellobiohydrolase (Avicelase) : avicel 200mg을 基質로 하여 효소농도 0.00436%가 되도록 전 용액량을 11ml로 하여 1시간 반응시켜, 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson 법으로 定量하였다.

2.6 酵素의 回收 및 再使用

2.6.1 限外 濾過에 의한 방법

爆碎처리한 시료를 알칼리, 酸素-알칼리로 완전 탈리그닌시킨 다음, 이 시료 1.17g을 粗 酵素 0.375g을 포함하는 pH 4.5의 acetate 완충용액 50ml에 넣고, 45°C의 진탕항온기에서 30시간 加水分解를 행하였다. 가수분해 용액과 효소를 포함하는 부분을 glass filter 1G2를 사용하여 불용잔사와 여별하고, 잔사를 상기와 동일한 acetate 완충용액 및 증류수로 세척한 다음, 두용액을 합치고, 완충용액을 가하여 500ml로 되게 한다.

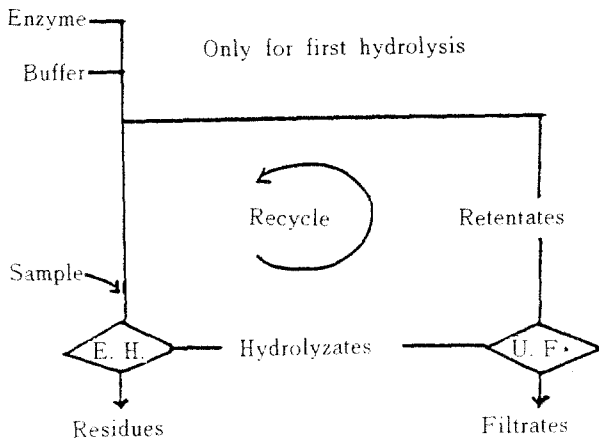


Fig.1. Recycle of enzyme by ultrafiltration.

E.H.: Enzymatic hydrolysis
U.F.: Ultrafiltration

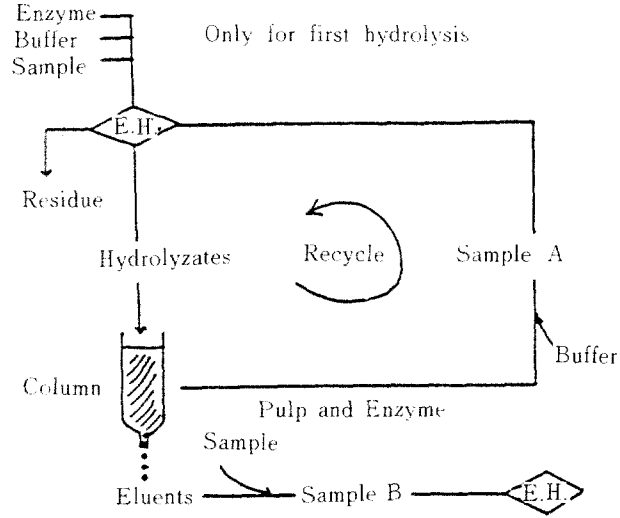


Fig.2. Recycle of enzyme by its affinity to cellulose.

E.H.: Enzymatic hydrolysis

이 여과액을 Fig.1에서 보는 바와 같이 限外 濾過(membrane: Amicon 5 PM 10. cut-off level, 10,000)하여 얻은 50ml의 효소액을 새로운 효소를 넣지 않은채 다음의 가수분해를 실시하였다.

2.6.2 親和크로마토 그래피에 의한 方法

최초의 효소적 가수분해는 전술한 限外濾過법과 동일하게 수행하며, 최초의 가수분해후 glass filter를 사용하여 잔사와 濾別한 가수분해액을 포함하는 효소용액을 한외여과 장치에 넣지 아니하고, Fig.2에서 보는 바와 같이 1.17g의 새로운 효소를 채운 칼럼을 통과 시킨다. 그리고 칼럼으로부터 시료를 꺼내 새로운 효소를 가하지 않은 50ml의 acetate 완충용액을 가하여 동일한 조건에서 가수분해를 행하였다(sample A). 2번째 시료에 가수분해액을 넣고 흘러나오는 溜出液의 酵素 活性을 조사하기 위하여 유출액 50ml에 시료 1.17g을 넣고 동일한 조건에서 가수분해 하였다(sample B).

2.7 温水抽出物の 定量

爆碎 시료 2g에 증류수 100ml를 가하고 3시간 温水추출하고, 1G3 유리濾過器로 여과, 건

조하여 重量감소율을 구하여 温水抽出物로 하였다.

3. 結果 및 考察

3.1 酸素-알칼리에 의한 脫리그닌

爆碎처리한 신갈나무 시료를 제 1단 처리(알칼리 처리, 약품: 0.3% 가성소오다, 液比=1:10, 반응 온도 및 시간: 70°C, 2hr) 및 제 2단 처리(산소-알칼리 처리, 酸素 初期壓: 10kg/cm², 반응 온도 및 시간: 120°C, 1hr, 알칼리 부하: 6.0%) 하여 리그닌 함량 0.03%의 시료를 조제하였다.

Fig.3은 oxygen-alkali 脫리그닌시 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 알칼리량뿐 만 아니라 산소와 基質의 접촉이 매우 중요한 인자로서 작용하는 바, 酸素는 물에 잘 용해되지 않을뿐 만 아니라 탈리그닌시 반응온도가 120°C나 되므로 藥液속에는 거의 산소가 없는 상태로 되므로 효과적으로 산소와 시료의 접촉을 피하기 위해서는 상당히 높은 固形分 농도에서 충분히 攪拌을 행하여야 한다. 본 실험에서의 반응은 회전하는 대형 autoclave 내에 스테인레스 스틸제

반응관을 넣고 회전시키면서 행하였으며, 최종적으로 Klason 리그닌 함량 0.03%의 밝은 크림상의 시료를 41.7% 목재칩기준의 수율로서 얻었다.

筆者 등의 研究⁵⁾에서 보는 바와같이 自己加水分解 처리의 경우, 시료의 효소 당화율은 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 自己加水分解처리 만으로도 목재의 조직이 이완되었고, 특히 셀룰로오스 부분의 結晶領域이 파괴되어 효소적 당화반응이 순조롭게 일어나는 것으로 생각된다.

그러나 셀룰로오스의 효소분해에 있어서 효소가 基質에 대한 親和性 내지 吸着으로 인하여 효소의 회수 및 活性이 크게 低下되고 있는바, 셀룰로오스와 결합된 효소의 경우에는 큰 문제가 되지 아니하지만 리그닌이 소량이라도 존재하면 효소의 損失을 초래하고 효소의 활성을 저하시키는 고로 가능한한 리그닌을 제거할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 알칼리 및 산소-알칼리에 의한 2단계 탈리그닌 처리를 행하였다.

3.2 酵素의 回收 및 再使用

한편 cellulose를 효소에 의해 당화하여 食品 및 에너지源으로 이용하려는 연구 또한 많이 이루어지고 있는바, 이들 cellulose 資源을 효소적으로 가수분해시키기 위해서 소요되는 비용이 신문용지의 경우 전체비용의 60%를 차지하고 있으며, 목재를 원료로 하는 경우는 자기 가수분해 등과 같은 전처리에 많은 비용이 들기 때문에 실제 비용은 이를 훨씬 상회한다. 그리고 효소의 생산비가 매우 비싸기 때문에, 어떤 경우는 목질재료의 전처리 비용보다 효소의 생산비가 월등히 높다는 연구도 있다. 그러므로 값비싼 효소를 回收하여 再利用 한다는 사실은 매우 중요한 문제이며, 효소적 가수분해 工程의 경제성을 提高시킨다는 측면에서도 그 기술개

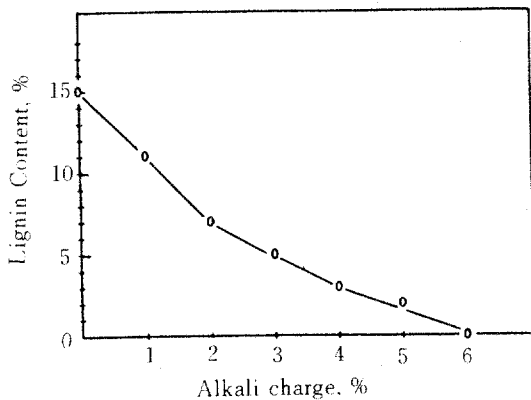


Fig.3. Effect of alkali charge on oxygen-alkali delignification of steam-exploded oak wood.

발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 효소의 회수와 관련하여 부딪치는 하나의 문제점은 cellulase가 가수분해의 과정에서 cellulose와의 親和性은 말할 것도 없지만, 基質속의 lignin 성분과도 강한 結合을 하여 회수가 불가능하다는 것이다.

3.2.1 限外 濾過에 의한 方法

가수분해 糖液의 限外濾過는 실온에서 실시하였으며, 稀釋과 濾過를 3회 반복하였다. Fig.4는 회수된 효소의 가수분해 결과를 나타내는 것으로서 1차 회수의 경우 96.8%의 높은 가수분해율을 기록하였고, 2차 회수에 있어서도 95.0%, 3차 회수의 경우 93.6%의 비교적 높은 加水分解率을 보여주었다.

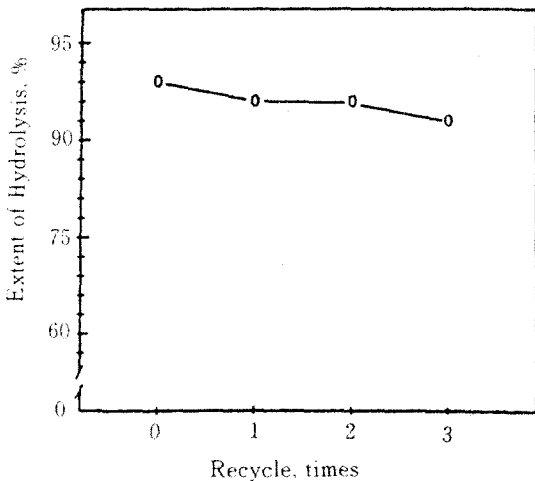


Fig.4. Enzymatic hydrolysis of delignified steam-exploded oak wood using cellulase enzyme recovered by ultrafiltration method.

3.2.2 親和크로마토 그래피에 의한 方法

Fig.5에서 보는 바와같이 제 1차 회수 효소의 가수분해율은 96.4%로서 매우 높았으며, 2차 회수의 경우 또한 94.8%의 가수분해율을 결과하였고, 제 3차에 있어서도 87.0%로써 효소의 활성이 아직 상당히 높게 나타났으며, 限外濾過에 의한 효소의 활성에 비해서는 다소간 감소를 결과하였다. 이와같은 효소활성의 逸失은 효소

적 가수분해 조건에서의 효소의 불안정성에서 기인되었다기 보다는 오히려 효소의 불완전한 회수가 주 원인인 것으로 생각된다. 이러한 討論의 근거로서는 Sample B의 시료를 사용하여 상기와 동일한 조건에서 측정된 효소적 가수분해율이 18.8%로서 상당량 셀룰레이스가 남아 있다는 것을 알 수 있었다.

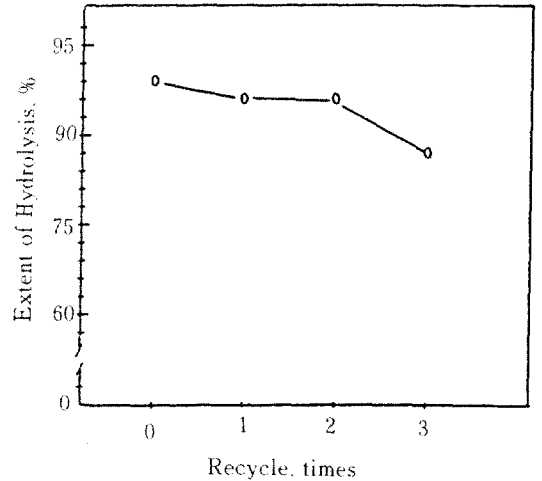


Fig.5. Enzymatic hydrolysis of delignified steam-exploded oak wood using cellulase enzyme recovered by affinity method.

3.2.2 回收에 의한 酵素의 活性 變化

탈리그닌된 목쇄처리 시료를 전술한 바와같이 親和크로마토 그래피에 의한 방법으로 회수하여 재 사용할 경우, 효소의 활성이 어떻게 변화하는가를 알기 위하여 효소활성 가운데 Endo-β-1,4-glucanase (CMCase) 및 Cellobiohydrolase (Avicelase)의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

표에서 보는 바와 같이 셀룰로오스 分解酵素의 활성은 회수가 반복되더라도 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 효소분해시 셀룰라제의 活性은 分解溫度, 振湯 및 基質에서 효소 吸着 등의 원인으로 저하하는 것이 일반적인 사실로 인정되고 있으나, 본 실험에서 이와같이 활성변화가 거의 없는 것은 목쇄처리를 받은 시료의 셀룰

Table 1. Enzyme activity of cellulases after recycling.

Activity	Carboxy methyl cellulase μ mole Glc/mg. min.				Avicelase μ mole Glc/mg. h			
	0	1	2	3	0	1	2	3
Recycle time								
Cellulase Onozuka	4.21	4.14	4.11	4.10	14.3	14.3	14.1	14.0
Cellulosin	6.40	6.40	6.30	6.26	3.00	3.06	2.98	2.90
Mixture	5.29	5.26	5.27	5.23	13.3	13.2	12.9	12.7

로오스가 고도로 효소분해되기 적절한 상태로 되어 졌거나, 시료중의 리그닌이 완전히 제거되어 리그닌에 의한 효소의 흡착 및 活性 감소가 일어나지 아니하였다는 사실과, 리그닌이 거의 없는 시료이었기 때문에 fresh enzyme을 첨가할 당시 충분한 양(예를 들면, 0.32 g cellulase in 50ml 완충용액/1 g 기질)을 가하였기 때문인 것등으로 생각된다.

3.3 酵素 加水分解率과 温水 抽出物

목재를 高温, 高壓에서 단시간 처리후 급격히 大氣壓下로 방출시켜 전처리 하는 爆碎法은 처리과정에서 대부분의 hemicellulose가 水溶性이 되고, 리그닌은 희박한 알칼리에 의해 추출 가능한 상태로 되며, 이러한 고온처리가 목재로부터 醋酸과 같은 有機酸을 생성시켜 목재중의 성분들이 가벼우나마 가수분해를 받게 된다. 폭쇄처리제의 温水 추출물과 酵素糖化率과의 관계를 검토하였는 바, Fig.6에서 보는 바와같이 신갈나무, 소나무 2 수종 공히 온수추출물과 효소당화율간에 직선적인 比例관계를 보여 주었다. 따라서 簡易 評價法으로서 온수추출물 함량이 효소당화율의 간단한 尺度로서 사용가능 할 것으로 생각되며, 다만 樹種에 따라 추출물 및 효소당화율도 크게 달라질 것이며, 신갈나무의 경우가 소나무재에 비하여 직선의 경사가 훨씬

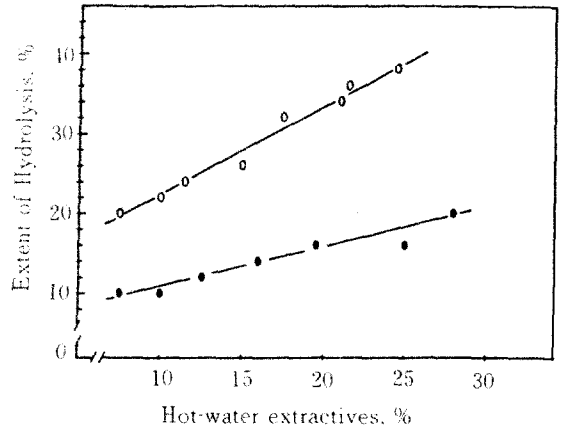


Fig.6. Relationship between enzymatic hydrolysis and hot-water extractives. ○ Oak wood(*Quercus mongolica*) ● (*Pinus densiflora*)

급했다.

4. 結 論

木質系 바이오매스 資源을 酵素的으로 加水分解함에 있어서, 일어나는 주요한 문제가운데 하나는 cellulase가 효소적 당화 과정에서 基質과의 강한 親和性으로 인하여 효소의 活性이 低下되고, 基質 성분과의 吸着으로 인하여 효소를 회수하는 과정에서 회수를 방해하기도 하고, 때로는 효소의 回收率을 떨어트리게 된다.

本 研究에서는 효소분해에 사용한 cellulase 효소를 회수하고자 알칼리 및 알칼리-산소 제거의 完全하게 脫리그닌 시킨 爆碎처리 시료를 사용하여, 限外濾過法 및 親和 크로마토 그래피法을 적용하여 효소분해를 및 효소의 回收율을 검토하였는바 그 결과를 要約하면 다음과 같다.

(1) 限外濾過法 및 親和 크로마토 그래피法 모두 높은 효소분해율을 기록하였는데, 前者의 경우 제 1회 및 제 2회 회수한 경우 각각 96.8%, 95.0%의 높은 가수분해율을 보여주었고, 後者의 방법에 의해서도 95% 전후의 높은 가수분해율을 기록하였다. 그리고 효소를 3회까지

재 이용하더라도 前者의 경우 93.6%, 後者の 경우 87.0%의 가수분해율을 나타냈다.

(2) 회수효소의 活性변화를 알기위한 Carboxymethyl cellulase 활성 및 Cellobiohydrolase의 활성을 측정한 결과, 회수를 反復하더라도 活性低下가 거의 인정되지 아니하였다. 따라서 完全 脫리그닌 시킨 爆碎처리 시료를 사용한 효소적 당화에 있어서, 親和 크로마토 그래피법에 의하여 효소의 회수를 거의 定量的으로 달성할 수 있었다.

(3) 爆碎처리재의 温水 抽出物과의 酵素당화율과의 관계를 검토하였는바, 신갈나무, 소나무 2수종 공히 温水抽出物과 酵素당화율간에 직선적인 比例관계를 보여 주었으며, 따라서 온수 추출물 함량이 효소당화율의 簡易 評價法으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

參 考 文 獻

- Blotknap, P.J. and G.H. Emert. 1980. U.S. Patent 4,220,721 [Chemical Abst. 93.236977]. (Sept. 2, 1980)
- Castanon, M. and C.R. Wilke. 1980. Biotechnol. Bioeng. 22: 1037-1053
- Castanon, M. and C.R. Wilke. 1981. Biotechnol. Bioeng. 23: 1365-1372
- Cho, N.S. 1989. On the enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed mixed hardwoods. J. Resource Development, Yeungnam Univ., 8(1): 73-78
- Cho, N.S. 1989. Autohydrolysis and enzymatic Saccharification (I), J. Korea Tappi 21(3): 24-34
- Cho, N.S. 1989. Autohydrolysis and enzymatic Saccharification (II), J. Korea Tappi 21(4): 21-30
- Cho, N.S., Y. Matsumoto, and H-m. Chang. 1988. An improved enzymatic hydrolysis of mixed hardwood polysaccharides. Kasan Theses Collection p.323-328
- 趙南奭, 李鍾潤. 1989. 代替燃料생산을 위한 木質材料의 加水分解에 관한 研究(제1보)-爆碎처리가 酵素的 加水分解에 미치는 影響-, 林産 에너지 9(1): 1-9
- Fujishima, S., F. Yaku and T. Koshijima. 1986. Recovery and reutilization of cellulases used for the hydrolysis of woods (III). Mokuzaigakkaishi 32: 119-124
- Fujishima, S., F. Yaku and T. Koshijima. 1987. Recovery and reutilization of cellulases used for the hydrolysis of woods (IV). Mokuzaigakkaishi 33(6): 530-533
- Jiang, J., H-m Chang, S.S. Bhattecharjee and D.L.W. Kwoh. 1986. Characterization of residual lignin in semibleached kraft pulp. Proceedings of the 1986 Tappi R & D Conference, Raleigh, NC, Sept. 1986
- Muraki E., F. Yaku, R. Tanaka and T. Koshijima. 1982. Enzymatic degradation of finely divided wood meal. II. Mokuzaigakkaishi 28: 122-128
- Shimizu, K. 1981. Development of Fuels & Chemicals from Biomass, Fuji Techno-system 275
- Shimuzu, K., K. Sudo, S. Nagasawa and M. Ishihara. 1983. Enzymatic suceptibility of autohydrolyzed woods. Mokuzaigakkaishi 29: 428-437
- Sinitsyn, A.P., H.R. Bungay and L.S. Clesceli. 1983. Biotechnology and Bioengineering vol. XXV, p. 1393
- Tanahashi, M. 1983. Explosion wood process for saccharification and ruminant feed preparation. Biomass & Biotechnol. 4: 1-9
- Tanahashi, M. & T. Higuchi. 1983. Characterization of explosion wood (I), Wood Research 69: 36-51
- Tanahashi, M. & T. Higuchi. 1985. Steam explosion process for wood and its development, Japan Tappi 39(1): 118-127

19. Tanahashi, M., K. Tamabuchi, T. Goto, T. Aoki, M. Karina and T. Higuchi. 1988. Characterization of steam-exploded wood (II), Wood Research 75 : 1-12
20. Tanaka, R., E. Muraki, F. Yaku and T. Koshijima. 1980. Enzymatic degradation of finely divided wood meal, I. Cellulose Chem. Technol. 14 : 859-868
21. Toyama, N. and K. Ogawa. 1975. Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser. 5 : 225-244
22. Toyama, N., K. Ogawa and H. Toyama. 1978. Symposium on Biosynthesis and Biodegradation of Cell Wall Component, ACS/CST Chemical Congress, Honolulu, Hawaii (April, 1978)
23. Wilke, C.R., R. Yang & U. Stocker. 1976. Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser. 6 : 155-175