

Cellulase에 의한 폭쇄재의 가수분해에 있어서 탄수화물조성 및 효소흡착량 변화*1

양재경*2 · 김철환*2

Changes of Carbohydrate Composition and Enzyme Adsorption on the Hydrolysis of Steam Exploded Wood by Cellulase*1

Jae-Kyung Yang*2 · Chul-Hwan Kim*2

요약

신갈나무와 이태리포플러 칩을 25 kg/cm^2 의 압력에서 6분간 폭쇄처리하였다. 폭쇄재는 수산화나트륨(NaOH), 차아염소산나트륨(NaClO), 아염소산나트륨(NaClO₂)을 사용한 단독 또는 다단의 공정으로 화학처리 하였다. 폭쇄재의 다단처리는 시료중의 리그닌 제거에 상당한 효과를 나타냈다. 대조구인 폭쇄재 기질의 효소 가수분해율은 25%였지만, 다단 화학약품 처리된 폭쇄재는 약 80%에 근접하는 가수분해율을 나타냈다. 효소에 의한 분해율은 수종간에 차이가났다. 폭쇄재의 다단 화학약품 처리는 효소 가수분해액에 있어서 글루코오스 함유 비율을 증가시켰다. Cellulase의 흡착은 기질의 리그닌 함량과 비례하여 증가하였지만, 반면에 기질의 결정화도, 공극면적 및 비표면적은 효소흡착에 큰 영향을 미치지 않았다. 본 연구에서 제시된 전처리 당화공정에 따르면, 100 kg의 활엽수재로부터 약 37~40 kg의 글루코오스 생산이 가능하리라 생각된다.

ABSTRACT

Two species(*Quercus mongolica*, *Populus euramericana*) of hardwood chips were subjected to steam explosion 25 kg/cm^2 , for 6 min. The exploded woods were treated by the single or multi-stage chemical process with sodium hydroxide, sodium hypochlorite and sodium chlorite. The multi-stage treatment of exploded wood can be successfully removed lignin. Enzymatic hydrolysis rate of substrate varied from 25% for exploded wood to about 80% for the multi-chemical treated exploded wood. The enzymatic

* 1 접수 2001년 4월 30일, 채택 2001년 9월 4일

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-99-003-G00062).

* 2 경상대학교 농과대학 College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea.

susceptibility was different among wood species. The multi chemical treatment of the exploded wood resulted in the high rate of glucose in the enzymatic hydrolyzate. Cellulase adsorption increased at high lignin content of substrates, while crystallinity, pore area and specific surface area of substrates did not affected enzyme adsorption. According to the proposed pretreatment and saccharification process in this study, it can be acquired about 37~40 kg of glucose from 100 kg of hardwood.

Keywords: steam explosion, glucose, hydrolysis, cellulase, adsorption, pretreatment, saccharification

1. 서 론

목재로부터 연료용 알코올을 생산하기 위한 공정은 목재의 주성분인 셀룰로오스를 당류로 가수분해하는 당화공정과 생성된 당류를 에탄올로 전환시키는 발효공정으로 구성된다. 자연계에서 생육하는 미생물이 분비하는 효소를 이용한 효소가수분해는 상온, 상압의 조건에서 반응이 가능하며, 장치가 간단하여 설비비가 적게 들고, 생성된 당의 변질을 최소화할 수 있으며, 환경 친화력이 높은 장점이 있는 반면에, 당화에 장시간이 요구되며, 산업화하기에는 효소의 가격이 고가이고, 효소의 활성이 낮은 것이 그 문제점으로 남아 있다(村尾 등, 1987).

특히, 목재에 결정화된 상태로 존재하는 셀룰로오스 및 탄수화물 보호하고 있는 리그닌 등으로 인해 가수분해 효율은 상당히 저조하다. 그리고 목재의 효소가수분해율은 목재기질의 물리, 화학적 특성에 따라 매우 큰 영향을 받으며, 화학적 조성, 탄수화물 조성, 결정화도, 공극 용적, 표면적, 입자크기 및 분포, 효소 흡착능 등에 따라 가수분해 효율이 다르게 나타난다고 알려져 있다(Lisbeth *et al.*, 1999). 그 이외에도 효소의 회수 및 재이용, 전처리법, 순수 글루코오스의 제조 등이 아직 문제점으로 남아 있다.

최근에는 고가의 효소 비용과 관련하여 셀룰로오스계 기질과 효소간의 흡착 및 재회수에 관련된 연구가 활발히 진행되고 있다. Vallander 등(1985)은 화학적으로 전처리 한 밀짚을 효소가수분해 한 다음, 가수분해물을 제거하고 기질을 재투입하여 가수분해했을 때, 당화율이 74%, 효소회수율이 70%였다고 보고하였으며, Dekker(1988)는 전처리한 목재 기질 중의 효소가수분해 저해물을 ethyl acetate로 추출하

여 저해효과 입증한 바 있다. Jackson 등(1996)은 섬유에 흡착된 효소는 저농도의 알칼리와 계면활성제 혼합액으로 세척하면 분리할 수 있고, 효소는 세척조건에 따라 완벽하게 재이용 가능하다고 하였다. Bernardez 등(1993)은 활엽수 목분, Avicel, 리그닌에 대한 효소흡착은 Langmuir식으로 설명 가능하며, Langmuir 친화상수는 리그닌이 가장 높다고 하였다.

Mooney 등(1998)은 리그닌 함량과 초기 공극 함량을 달리하는 침엽수 펄프를 사용하여 cellulase 흡착과 기질 분해율을 검토한 결과, 리그닌이 섬유의 팽윤과 효소의 accessibility에 관련된 중요 인자이지만, 섬유가 충분히 팽윤이 되어 있는 경우에는 효소 흡착에 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다. 또한 섬유의 팽윤처리는 리그닌 제거와 상관없이 진행할 수 있지만, 팽윤처리만으로는 가수분해율이나 기질의 공극도를 상승시키기는 어렵다고 하였다. 그러나 리그닌 제거는 공극 집단 및 효소가수분해율을 명백히 증가시킨다고 보고하였다. 이와 더불어 효소가수분해 효율을 증가시키기 위한 목재 기질의 전처리에 관해서도 많은 연구가 시도되고 있는데, 이에 관해서는 수증기만을 이용하는 폭쇄 전처리법이 비교적 우수하다고 알려져 있다(이 등, 1992; 이 등, 1993). 현재까지 목재로부터 당류를 생산하는데 있어서, 전처리 효과, 기질 및 생산된 당류의 탄수화물 조성 변화 및 기질에 따른 효소흡착정도를 종합적으로 연구한 사례는 거의 미미한 실정이다.

따라서 본 연구는 목재의 전처리법으로 우수하다고 평가되고 있는 폭쇄법 및 화학약품으로 전처리된 목재를 기질로 하여 효소가수분해를 실시하였을 때, 기질 및 생산된 당액의 탄수화물 조성 변화 및 효소 흡착량 분석, 검토와 동시에 최종적으로 목재로부터

당류를 생산할 수 있는 최적의 전처리, 당화공정을 도출하고자 시도되었다.

2. 재료 및 방법

2.1 폭 쇄

경북대학교 부속연습원에서 벌채한 신갈나무 (*Quercus mongolica*)와 산림청 임업연구원으로부터 제공받은 이태리포플러(*Populus euramericana*) 칩 (2×2×0.2 cm)을 경북대학교 목재화학연구실에서 보유하고 있는 폭쇄장치를 이용하여 25 kg/cm²의 수증기 압력에서 6분간 처리하였다. 처리 후 시료는 실온에서 기건시켰다.

2.2 폭쇄재의 약품처리

폭쇄처리된 시료는 단독약품처리와 다단약품처리로 구분하여 실시하였다. 단독약품처리는 기건 시료 5 g에 냉수 250 mL(실온, 48시간), 1% NaOH 용액 250 mL(실온, 2시간), 1.5% NaClO 용액 100 mL (50℃, 0.5시간), 1% NaClO₂ 용액 250 mL(실온, 2시간)을 각각 투입하여 일정시간동안 각기 다른 온도에서 처리하였다. 다단약품처리는 2가지 방법으로 실시하였는데, 1% NaOH 용액 및 1.5% NaClO 용액에 의한 다단처리와 1% NaOH 용액 및 1% NaClO₂ 용액에 의한 다단처리로 구분하여 실시하였다. 이때, 처리온도 및 시간은 각각 약품의 단독처리와 동일한 조건으로 실시하였다. 최종적으로 약품처리된 시료는 증류수로 충분히 세척하여 기건시켰다.

2.3 전처리한 시료의 효소가수분해

효소가수분해는 시료 2 g을 100 mL 삼각플라스크에 넣고, 0.05 M sodium-citrate buffer(pH 4.8) 36.8 mL와 효소액 1.2 mL를 첨가하여 50℃ 진탕수조에서 72시간 가수분해 후 반응잔사를 glass filter (1G4)로 여과 후, 그 잔사를 0.05 M Na-citrate

buffer(pH 4.8)와 증류수로 충분히 세척하였다. 이때 가수분해에 사용된 cellulase는 *Trichoderma reesei*의 배양액을 농축한 산업효소인 Celluclast (Novo Co.)를 사용하였으며, 이 효소의 soluble protein 함량은 82 mg/mL였으며 filter paper activity는 402 IU/mL, carboxymethyl cellulase activity는 837 IU/mL였고, specific filter paper activity는 1.33 IU/mg였다.

당화율은 가수분해후 잔사를 기건시킨 다음 전건 중량을 구하여, 가수분해전 시료의 전건중량에 대한 비율로써 산출하였다.

2.4 효소 흡착량 측정

시료 2 g을 72시간 동안 효소가수분해한 다음, glass filter(1G4)로 흡입 여과하여 그 잔사를 40℃의 진공 감압건조기에서 향량에 이를 때까지 건조하였다. 그 다음, 원소분석기(Carlo-Erba Co., EA-1106R)를 사용하여 시료중 질소(N) 함량(%)을 측정하여 단백질함량을 계산함으로써, 효소흡착량을 측정하였다.

이때 질소 및 단백질의 함량은 사용 시료의 전건무게를 기준으로 하였으며, 단백질 함량 계산방법은 다음과 같다.

$$\text{단백질함량 (\%)} = \text{질소함량 (\%)} \times 6.25$$

2.5 탄수화물의 조성 분석

탄수화물 조성은 시료를 alditol-acetate 유도체 (Bochardt *et al.*, 1970; Vidal *et al.*, 1984)로 조제한 다음, gas chromatograph(GC)로 분석 하였으며, 분석 조건은 다음과 같다.

GC: Shimadzu Co., GC-14A.

컬럼: 0.4 cm×190 cm.

충진제: 3% ECNSS-M on Gaschrom Q, 100~200 mesh.

검출기: Flame Ionization Detector(FID).

컬럼 온도: 190℃.

주입구 온도: 220℃.

검출기 온도: 250℃.
 운반 기체: 질소, 30 mL/min.
 내부표준: 1% inositol 용액.

2.6 상대결정화도 측정

상대결정화도는 Segal법(1959)에 의거하여 계산하였으며, X선회절장치(Enraf Nonius, RA/FR571)의 분석조건은 35 KV, 25 mA로서 반사법에 의해 회절 실험하였으며, 회절각의 범위는 $2\theta = 5^\circ - 35^\circ$, Divergence slit = 1.0 mm, Scattering slit = 1.0 mm, Receiving slit = 0.6 mm, Scan speed = $1^\circ/\text{min.}$, Step angle = 0.01° 였다.

2.7 공극면적의 측정 및 SEM 관찰

시료의 공극면적은 고압 수은 Porosimeter (Poresizer 9320, Micrometrics co.)를 사용하여 측정하였으며, 분석조건은 penetrometer constant: $21.63 \mu\text{L/pF}$, maximum head pressure: 4.45 psi, penetrometer volume: 5.85 mL, advancing contact angle: 130.0 deg.였다. SEM 관찰은 시편을 금으로 코팅 한 다음, SEM(Philips XL-30S)으로 관찰하였으며, 이때 가속전압은 10~15 kV로 하였다.

2.8 비표면적의 측정

Toluidine blue 및 Borax 혼합용액(1:1)으로 시료를 염색한 다음, 전건 중량을 알고있는 여과지(No. 4)에 부착하여 충분히 건조한 후 시료의 전건 중량을 측정하였다. 또한 시료의 표면적 측정을 위해 스캐너(Epson expression 1600)를 사용하여 시료의 이미지를 흑백영상으로 전환한 다음, 이를 화상분석프로그램(KS400, ver. 3.0, Carl Zeiss, Germany)에 입력하여 시료의 표면적을 구하여 비표면적을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 약품처리한 폭쇄재의 탄수화물 조성

목재를 에탄올로 전환시키는 공정에 있어서 기질의 탄수화물 함량 및 조성은 대단히 중요하다. 특히 목재 기질 중에 에탄올로 전환시킬 수 있는 글루코오스의 함량은 공정의 효율 및 경제성을 좌우하는 중요 지표가 되고 있다. 목재의 효율적 전환을 위해서 시도되는 전처리방법 중 폭쇄 전처리는 강한 수증기 압력과 높은 온도에 의한 목재 세포의 물리적 파괴 및 화학적 조성분의 변화를 유도할 수 있다. Boussaid 등(1999)은 SO_2 가스를 사용한 폭쇄 방법으로 전나무를 전처리하여, 헤미셀룰로오스의 약 87%를 냉수로 추출, 분리한 바 있으며, 또한 분리된 헤미셀룰로오스의 약 80% 이상은 단당류의 형태라고 보고한 바 있다. 이러한 연구 결과는 폭쇄법이 목재중의 헤미셀룰로오스를 제거 혹은 분리할 수 있는 우수한 전처리법이라는 사실을 예측할 수 있다.

Table 1은 신갈나무와 이태리포플러 폭쇄재를 각종의 약품으로 단독 혹은 다단처리 했을 때 시료의 화학적 조성을 나타낸 결과로, 이때 대조구로 무처리 폭쇄재(25 kg/cm^2 , 6 min.)를 사용하였다. 약품처리하는 모든 처리 조건에서 탄수화물 및 리그닌 일부를 유출(분해)시키는 경향을 나타냈으며, 처리방법에 따라 탈리그닌 효과는 다르게 나타났다. 냉수처리에 의한 탈리그닌 효과는 다른 처리에 비해 상당히 저조하였다. 또한 Boussaid 등(1999)이 전나무 폭쇄재를 냉수로 추출했을 때, 대부분의 헤미셀룰로오스를 분리(제거)할 수 있다는 연구결과와 일치하지 않았다. 이것은 폭쇄 처리조건 및 SO_2 가스 사용 유무의 차이 때문인 것으로 추측해 볼 수 있다.

한편, 다단약품 처리 후, 시료의 수율은 처리 전 폭쇄재 중량을 기준으로 약 50%에 근접하는 경향을 나타냈다. 이때 처리 후, 시료 중에 잔존하는 리그닌 함량은 약 4% 이하로서 최초 활엽수재 원목에 존재하는 리그닌 함량(약 24~25%)에 비해 상당히 낮게 나타났다.

실제로 활엽수재 칩을 폭쇄처리하면 약 95%의 수

을(25 kg/cm², 6분)로 폭쇄재가 얻어진다. 이러한 수율은 수종 및 폭쇄처리조건에 따라 다르게 나타난다. 최초로 사용된 활엽수 원목의 화학적 조성은 리그닌 약 24~27%, 추출물 및 회분 함량 2~3%, 탄수화물 72~74%이지만, 폭쇄처리를 하게 되면 탄수화물, 특히 헤미셀룰로오스의 함량이 감소됨으로서 탄수화물의 전체 함량이 감소되는 경향이 나타난다. 이러한 사실은 목재를 폭쇄처리했을 때, 목재 중에 존재하는 헤미셀룰로오스로부터 유래되는 xylose의 함량이 감소된다(이 등, 1990)는 연구결과와 일치하는데, 이에 대한 원인은 폭쇄 처리 동안 고온 및 고압에 의해서 활엽수재 헤미셀룰로오스의 주체인 glucuronoxylan이 가수분해되고, 이것이 탈수소화가 진행됨과 동시에 축합반응을 일으켜 휘발성 물질(furfural, 2-furaldehyde)로 전환되었기 때문(Fengel *et al.*, 1983)으로 추측된다.

Winkle 등(1995)도 포플러를 폭쇄처리, 알칼리처리, 과산화처리 등의 다단처리방법을 사용하여 글루코오스 함량이 90%인 셀룰로오스를 조제할 수 있는데, 본 실험에서 시도된 다단처리방법, 즉 NaOH, NaClO₂ 복합처리한 시료 중의 리그닌 함량(1~2%)을 고려해 보더라도(이 등, 1992) 시료 중의 글루코오스 함량은 거의 순수 셀룰로오스와 비교할 만한 수

준이다. 결과적으로 다단 약품처리에 의해서 일부분의 헤미셀룰로오스와 90% 이상의 리그닌을 제거할 수 있었다. 이러한 결과로서 90% 이상의 글루코오스 함량을 지닌 셀룰로오스를 조제할 수 있었지만, 수율을 개선할 수 있는 새로운 방법의 모색이 절실히 필요하다고 생각된다.

3.2 약품처리된 폭쇄재 기질의 가수분해율 변화

Shimizu 등(1998)이 제안한 목재 성분의 총합적 이용방법은 수증기 폭쇄처리 후, 알칼리, 물, 다이옥산을 사용한 헤미셀룰로오스 및 리그닌의 분리와 최종적으로 존재하는 잔사인 셀룰로오스계 물질의 효소가수분해로 구성되며, 여기에 분리성분의 기술적 변환이용 기술이 추가됨으로서 생산물질의 고부가가치가 실현될 수 있다고 하였다. 이 시스템에 의하면, 자작나무의 최종 잔사인 셀룰로오스계 물질의 효소분해율은 폭쇄처리 조건 및 약품처리 방법에 따라 각기 다르지만, 약 100%에 근접, 도달하고 있다.

각종 약품처리된 폭쇄재 기질을 cellulase계 효소로 가수분해했을 때, 최종적인 효소가수분해율을

Table 1. Chemical composition of chemical treated wood with steam explosion.

Species	Chemical treatment	Sugar composition(%)**						Lignin (%)**	Yield (%)**
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.		
<i>Quercus mongolica</i>	Non-treated*	0.3	7.6	0.9	T	57.7	T	33.5	100.0
	H ₂ O	0.3	4.4	0.6	T	46.3	T	32.9	84.5
	NaOH	0.2	3.2	1.6	T	46.6	T	7.6	59.2
	NaClO	0.1	3.9	0.6	T	55.7	T	5.3	65.6
	NaClO ₂	0.1	3.8	0.6	T	51.5	T	0.3	56.3
	NaOH + NaClO	0.1	1.9	0.8	T	44.1	T	3.4	50.3
	NaOH + NaClO ₂	0.2	3.4	0.5	T	49.9	T	1.5	55.5
<i>Populus euramericana</i>	Non-treated*	0.3	5.0	1.5	T	56.8	T	36.4	100.0
	H ₂ O	0.2	2.2	1.0	T	50.3	T	34.6	88.3
	NaOH	T	1.7	1.0	T	47.2	T	7.8	57.7
	NaClO	0.1	2.0	1.0	T	49.0	T	10.6	62.7
	NaClO ₂	T	2.0	1.0	T	50.7	T	1.7	55.4
	NaOH + NaClO	T	1.5	1.1	T	47.0	T	3.2	52.8
	NaOH + NaClO ₂	T	2.0	1.0	T	50.3	T	1.7	55.0

Note; *: Steam exploded wood (25 kg/cm², 6 min.)

** : Based on the non-treated exploded wood. T: Trace, below 0.1%

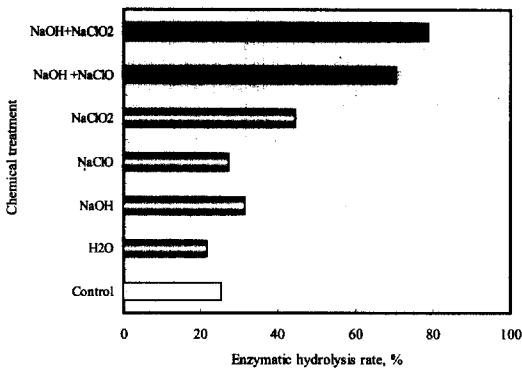


Fig. 1. The effects of chemical pretreatment on the enzymatic hydrolysis of the exploded oak wood.

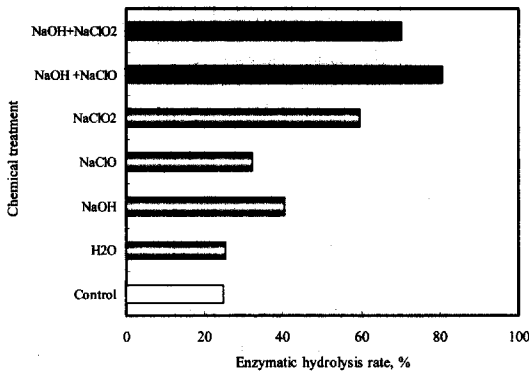


Fig. 2. The effects of chemical pretreatment on the enzymatic hydrolysis of the exploded poplar wood.

Fig. 1과 2에 나타냈다.

단독약품처리에 의한 가수분해율 상승은 대조구에 비해 최대 약 2배 이상을 초과할 수 있었으며, 다단 처리는 기질의 약 80%까지 효소분해를 가능하게 하였다. 단독처리방법에 있어서는 NaClO₂ 용액에 의한 실은처리가 효소가수분해에 있어서 가장 효과적이었으며, 알칼리와 염소계 약품을 다단으로 사용하는 처리방법도 효소가수분해율 증가를 촉진시켰다고 판단된다. 다단 약품처리의 가수분해율 상승 효과는 알칼리에 의한 기질의 팽윤과 염소계 약품에 의한 리그닌의 제거로 인한 기질과 효소사이의 접촉면적 확대 때문이라고 생각된다. Lisbeth 등(1999)은 8%의 낮은

효소가수분해율을 나타내는 포플라 목분을 산에 의한 고온 전처리함으로써 가수분해율을 78%까지 도달시켰는데, 이때 가수분해 기간은 5일이 소요되었다. 이러한 연구결과와 비교해볼 때, 3일 동안의 효소가수분해만으로 약 80%의 전환율을 획득한 것은 의미있는 연구결과라고 생각된다.

3.3 효소가수분해에 의해 생산된 가수분해액 및 잔사의 탄수화물조성

약품처리한 폭쇄재 기질에 효소를 투입하여 가수분해했을 때, 최종적으로 획득할 수 있는 가수분해액의 탄수화물조성과 가수분해되지 않은 잔사의 탄수화물 조성을 Table 2와 Table 3에 각각 나타냈다. 이때 Table 2의 수율은 효소가수분해 후, 불용 잔사를 기준으로 하여 계산된 값이다.

Table 2에서 보는 바와 같이 효소 가수분해액 중의 글루코오스함량은 무처리 폭쇄재, 단독 약품처리재, 다단 약품 처리재로 갈수록 증가되는 경향을 나타냈는데, 이것은 최초로 투입되는 기질중에 존재하는 글루코오스 함량 비율에 의존한다는 사실을 추측할 수 있다. 즉, 기질중의 셀룰로오스 함량이 높아질수록 생산된 가수분해액은 높은 비율의 글루코오스를 함유할 수 있다는 것이다.

가수분해액 당조성(Table 2)와 최초 기질의 당조성(Table 1)을 비교해 볼 때, 가수분해액 중에는 글루코오스 이외에 헤미셀룰로오스로부터 유래된 단당류가 일부 존재하고 있었다. 이러한 사실은 본 연구에서 사용된 셀룰로오스 분해 효소인 cellulase가 *Trichoderma reesei*로부터 생산되었고, 이 효소는 산업용 효소로, 셀룰로오스이외에 헤미셀룰로오스 분해활성을 나타내는 효소가 일부 존재하여 이들이 목재 헤미셀룰로오스를 동시에 분해하였기 때문으로 추측된다. 이와 관련하여 Nunes 등(1996)은 유칼리 목재를 무기산과 폭쇄법으로 다단 처리한 다음, 효소가수분해 했을 때, 생산된 가수분해액 중의 pentose와 hexose의 비율은 기질에 대한 효소투입량에 의존했으며, 효소투입량과 hexose 생산비율은 일정수준까지 거의 비례적으로 상승한다는 연구결과를 보고

Table 2. Sugar composition of enzymatic hydrolyzate of chemical treated exploded wood.

Species	Chemical treatment	Sugar composition(%)**						Yield (%)**
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.	
<i>Quercus mongolica</i>	Non-treated*	0.2	2.8	0.9	T	21.4	T	25.3
	NaOH	T	1.5	0.5	T	16.6	T	18.6
	NaOH + NaClO	T	1.6	0.8	T	33.0	T	35.4
	NaOH + NaClO ₂	0.1	2.2	0.5	T	40.8	T	43.6
<i>Populus euramericana</i>	Non-treated**	0.1	1.6	1.5	T	21.5	T	24.7
	NaOH	T	0.8	0.8	T	21.7	T	23.3
	NaOH + NaClO	T	1.2	1.2	T	40.2	T	42.6
	NaOH + NaClO ₂	T	1.3	1.1	T	36.2	T	38.6

Note; * : Acquired solution from hydrolysis of steam exploded wood (25 kg/cm², 6 min.)

** : Yield was calculated from hydrolysis residue and based on the non-treated exploded wood.

T: Trace, below 0.1%

Table 3. Sugar composition of residue after enzymatic hydrolysis of chemical treated exploded wood.

Species	Chemical treatment	Sugar composition(%)**						Lignin (%)**	Yield (%)**
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.		
<i>Quercus mongolica</i>	Non-treated*	0.1	4.8	T	T	36.3	T	33.5	74.7
	NaOH	0.2	1.7	1.1	T	30.0	T	7.6	40.6
	NaOH + NaClO	T	0.4	T	T	11.1	T	3.4	14.9
	NaOH + NaClO ₂	T	1.1	T	T	9.3	T	1.5	11.9
<i>Populus euramericana</i>	Non-treated**	0.2	3.4	T	T	35.3	T	36.4	75.3
	NaOH	T	0.9	0.3	T	25.4	T	7.8	34.4
	NaOH + NaClO	T	0.3	T	T	6.7	T	3.2	10.2
	NaOH + NaClO ₂	T	0.6	T	T	14.1	T	1.7	16.4

Note; * : Acquired residue from hydrolysis of steam exploded wood (25 kg/cm², 6 min.)

** : Based on the non-treated exploded wood. T: Trace, below 0.1%

한 바 있다. 이것은 목재의 효소가수분해 초기에는 pentose계 당류가 hexose계 당류와 거의 비슷한 수준으로 분해되지만, 가수분해가 진행 될수록 목재 기질의 대부분을 구성하는 셀룰로오스가 지속적으로 분해되고, 이들로부터 글루코오스가 생산되었기 때문으로 생각된다. 그러나 이러한 결과는 기질의 화학적 조성, 사용효소의 종류, 효소의 정제순도 및 가수분해 조건에 따라서 충분히 달라질 수 있다고 생각된다. 가수분해액의 당조성(Table 2)과 불용잔사의 당조성(Table 3)을 비교해보면, 불용잔사 중에도 분해되지 않은 상당량의 탄수화물이 존재하고 있다는 사실을 알 수 있었다. 알칼리 단독으로 처리된 시료는

다단처리에 비해 잔존 리그닌 함량에서는 큰 차이가 없지만, 잔존 글루코오스 함량이 높다는 사실만으로 상당량의 셀룰로오스가 가수분해되지 않았다는 사실을 추측할 수 있다.

결과적으로 약품 처리 단계가 많아질수록, 기질중의 셀룰로오스 함량은 거의 비슷하더라도 이들로부터 생산된 가수분해액은 많은 양의 글루코오스를 함유하고 있었다. 이것은 다단의 약품처리 효과때문으로 생각되지만, 이에 관해서는 향후 지속적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한, 앞으로 목재 가수분해액의 글루코오스 함량, 알칼리 발효 효율, 화학적 약품처리 등 최적의 처리 조건에 관하여 경제적인 측면에서

검토되어야 할 것으로 생각된다.

3.4 기질의 물리적, 화학적 특성이 효소 흡착에 미치는 영향

셀룰로오스계 자원으로부터 알코올을 생산하기 위한 공정에 있어서, 효소가수분해 비용은 대단히 많은 부분을 차지하고 있다. 이 경비의 대부분은 기질의 완벽한 가수분해를 위해서 일차적으로 투입되는 고농도 효소 및 장기간의 반응시간에 소요되는 경비로 알려져 있다. 특히 효소와 기질 농도 및 최종 산물의 저해가 효소가수분해 효율에 영향을 미치지만, 이와 더불어 기질과 cellulase 간의 흡착현상은 효소가수분해를 저해 뿐만 아니라, 효소의 리사이클링과 관련하여 효소의 투입경비에 큰 비중을 차지하고 있다 (Gregg *et al.*, 1996). 이러한 측면에서 기질의 물리, 화학적 특성과 효소흡착과의 상호관계를 파악하는 것은 대단히 중요한 과제이다.

Table 4는 약품으로 단독 혹은 다단 처리된 폭쇄재 기질을 효소가수분해한 다음, 그 잔사에 존재하는 효소 단백질 흡착량과 가수분해전 기질의 리그닌 함량, 상대 결정화도, 공극면적, 비표면적을 나타낸 결과로, 기질에 흡착된 효소 단백질 함량은 약품처리가 다단으로 진행됨에 따라서 감소되는 경향을 나타냈다. 특히 다단 약품처리한 기질의 효소흡착량은 대

조구에 비해 50% 이하로 낮게 나타났다.

효소 흡착량은 기질의 리그닌 함량과 비례적으로 증가되는 경향을 나타냈으며, 또한 상대결정화도가 높아질수록 효소 흡착량이 감소되는 경향을 보였다. 그리고 효소흡착량은 기질의 공극면적 및 비표면적에 대해 큰 영향을 받지 않았다. 이는 기질의 결정화도, 공극 용적, 표면적, 입자크기 및 분포는 효소가수분해 효율을 좌우하는 인자(Lisbeth *et al.*, 1999)는 될 수 있지만, 기질의 효소 흡착량에 직접적으로 관여하지 않는다는 사실을 추측할 수 있었다.

또한 Fig. 3의 SEM 사진에서 보는 바와 같이 약품처리가 다단으로 진행될수록, 섬유 표면은 평활하게 나타나며, 이 평활한 표면은 효소의 물리적 흡착량을 감소시킬 수 있다고 생각되지만, 효소흡착량에 직접적인 영향을 미쳤다고는 생각하지 않는다.

기질의 섬유와 효소간의 흡착과 관련하여 Gerber 등(1999)은 높은 이온 농도에서 침엽수 섬유는 활엽수 섬유보다 효소 흡착량이 높게 나타날 수 있는데, 이러한 차이는 섬유의 전하 차에서 기인한다고 설명하였으며, 특히 반응계 내에 있어서 이온 및 pH 변화는 섬유의 표면전하에 영향을 줌으로서, 효소 흡착 반응을 유도할 수 있는 원인을 제공한다고 보고한 바 있다. 또한 Bernardez 등(1993)의 연구결과에 따르면, 효소흡착은 Langmuir식으로 설명 가능하며, Langmuir 친화상수는 리그닌이 가장 높다고 하였으며, 이에 대한 원인은 리그닌과 효소사이의 전하차

Table 4. The characteristics of exploded wood substrates and enzyme adsorption.

Substrates	Characteristics of substrates*				Adsorbed Protein, %**	
	Lignin, %	Relative crystallinity, %	Total pore area, m ² /g	Specific surface area, μm ² /mg		
<i>Quercus mongolica</i>	Non-treated***	335	525	555	0.70	251
	NaOH	7.6	61.1	0.94	0.66	241
	NaOH + NaClO	3.4	63.1	1.54	0.68	0.46
	NaOH + NaClO ₂	1.5	64.5	0.53	0.67	0
<i>Populus euramericana</i>	Non-treated***	36.4	55.2	1.03	0.78	267
	NaOH	7.8	60.0	1.08	0.66	257
	NaOH + NaClO	3.2	71.6	0.91	0.79	1.29
	NaOH + NaClO ₂	1.7	62.9	0.37	0.78	0.29

Note; * : Based on the substrate before enzymatic hydrolysis.

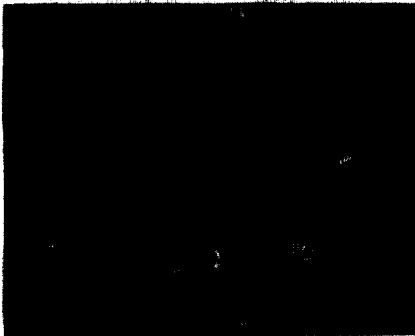
** : Based on the residual substance after enzymatic hydrolysis. *** : Steam exploded wood.



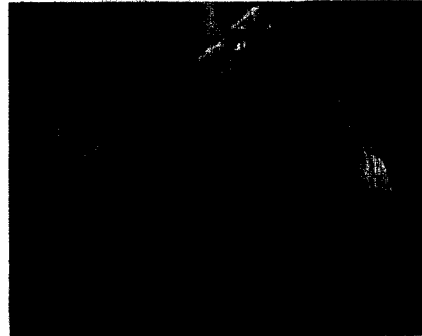
Exploded oak wood



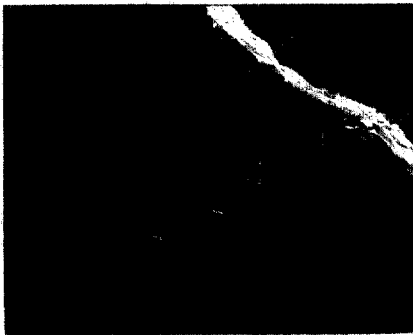
Exploded poplar wood



NaOH Treatment



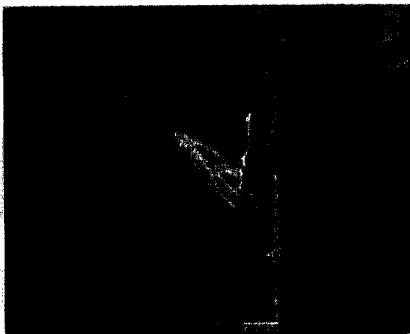
NaOH Treatment



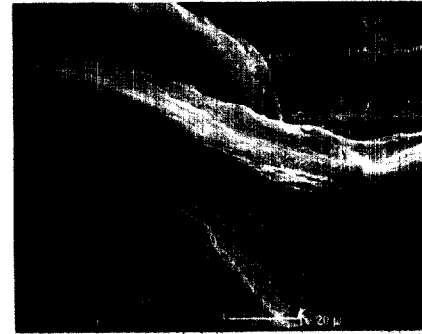
NaOH \Rightarrow NaClO Treatment



NaOH \Rightarrow NaClO Treatment



NaOH \Rightarrow NaClO₂ Treatment



NaOH \Rightarrow NaClO₂ Treatment

Fig. 3. Surface of chemical treated exploded wood by scanning electron microscopy.

때문이라고 추측, 설명 있는데, 본 연구의 효소흡착량 변화 원인도 리그닌과 효소의 친화력 때문인 것으로 추측되며, 이에 관해서는 깊이 있는 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

본 실험 결과 기질에 흡착된 효소는 증류수 세척만으로 기질로부터 분리할 수 있었다. 이러한 사실은 세척 후 기질을 원소 분석하여 질소 성분이 전혀 검출되지 않음으로서 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Jackson 등(1996)이 재생펄프를 cellulase와 xylanase로 효소가수분해한 후, 저농도 알칼리가 혼합액을 이용하여 효소 재회수할 수 있었다는 연구보고와 거의 일치하고 있다.

3.5 목재의 당화 공정 도출

목질계 자원으로부터 당을 획득하기 위해서는 전처리, 주성분의 분리 및 가수분해 방법의 선택이 경제적인 측면에서 고려되어야 한다. 특히 목질계 자원의 당화를 위해서 cellulase를 사용하는 bioprocess

는 친 환경 공정이라는 점에서 주목을 받고 있다.

Fig. 4는 본 연구결과를 기초로 하여, 목재로부터 당을 생산할 수 있는 공정 제안 모식도로, 활엽수 전건 칩 100 kg을 기준으로 하여 물질수지를 나타낸 것이다.

단독 약품처리 공정을 이용할 경우, 신갈은 최대 24 kg, 이태리포플러는 32 kg의 당을 획득할 수 있지만, 다단처리 공정을 이용하면 단독 약품 공정에 비해서 당의 획득량을 약 8~18 kg 증가시킬 수 있다. 또한 알칼리와 염소계 약품을 다단으로 처리하는 공정에서는 알칼리 처리로 헤미셀룰로오스와 리그닌을 분리, 회수 할 수 있는 장점을 가지고 있으며, 약 70% 이상의 글루코오스를 함유하는 당(Table 2 참조)을 생산할 수 있다. 당을 생산하기 위한 경비 측면만을 고려할 때는 염소계 약품 단독 처리가 유리할 수가 있지만, 목재 셀룰로오스 이외의 다른 주성분 즉, 헤미셀룰로오스나 리그닌은 염소화로 인하여 분리 및 이용이 불가능한 측면이 있다. 그러므로 목재의 총합이용을 위해서는 폭쇄처리, 다단 약품처리가

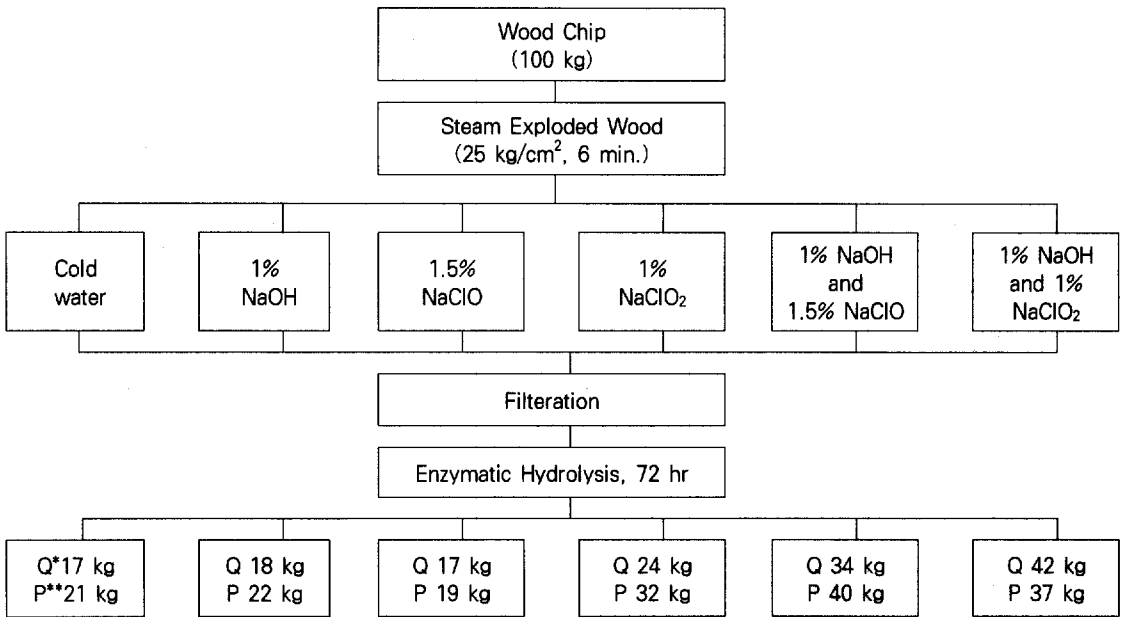


Fig. 4. Pretreatment and sugar production from oak and poplar wood.

Note; *: Sugar from *Quercus monglica*, **: Sugar from *Populus euramericana*, Kg: Based on the oven dry weight.

유리하다고 생각된다.

활엽수재로부터 당 생산을 위한 최적공정은 신갈나무와 이태리포플러에서 각기 다르게 나타났다. 신갈나무를 위한 최적 공정은 25 kg/cm²의 압력에서 6분간 폭쇄 처리, 알칼리 및 아염소산나트륨처리 다단처리, 효소가수분해(72시간)으로 구성되지만, 이태리포플러는 25 kg/cm²의 압력에서 6분간 폭쇄 처리, 알칼리 및 차아염소산나트륨처리 다단처리, 효소가수분해(72시간) 공정이 당을 획득하는데 유리하였다.

Shimizu 등(1998)이 제안한 목재의 총합이용 공정 에 의하면 활엽수 칩 100 ton을 180~230℃의 조건에서 폭쇄처리하고, 물을 이용하여 헤미셀룰로오스를 추출, 분리한 다음, 유기용제와 알칼리를 이용하여 리그닌을 분리하였다. 그 다음으로 90% 다이옥산을 사용하여 셀룰로오스를 분리한 다음, 이를 효소로 당화했을 때, 약 39.4 ton의 글루코오스가 획득 가능하며, 발효 후에는 96% 에탄올 18 ton을 생산 할 수 있다고 보고하였다. 본 연구에서 제시한 공정은 이들이 제시한 공정보다 최종 글루코오스 생산 수율이 약 1~3 ton 낮게 나타났다.

4. 결 론

목재로부터 알콜발효의 원료인 당류를 생산할 수 있는 최적 공정 도출의 기초자료를 확보하고자 국내산 신갈나무(*Quercus mongolica*)와 이태리포플러(*Populus euramericana*)를 폭쇄 및 여러 가지 조건의 약품 전처리하고, 효소가수분해 하는 동안 이들로 부터 생산된 당의 탄수화물 조성, 효소의 흡착량 및 흡착에 관련된 영향인자를 검토한 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1. 폭쇄처리된 목재를 다단 약품처리함으로써 90% 이상의 글루코오스 함량을 가지는 셀룰로오스를 조제할 수 있었다.
2. 단독 약품처리는 대조구에 비해 약 2배 이상의 가수분해를 증가를 유도할 수 있었으며, 다단 약품처리 기질은 약 80%에 접근하는 효소가수분해율을 나타냈다.
3. 폭쇄재의 약품 처리 단계가 증가할수록 기질로

부터 생산된 가수분해액의 글루코오스 함량은 증가하였다.

4. 효소가수분해에 있어서 기질에 흡착된 효소단백질 함량은 기질의 리그닌 함량과 비례적인 관계를 나타냈으며, 기질의 공극면적 및 비표면적에 대해서는 큰 영향을 받지 않았다.

5. 당 생산을 위한 최적공정은 신갈나무와 이태리포플러에서 각기 다르게 나타났는데, 신갈나무를 위한 최적 공정은 25 kg/cm²의 압력에서 6분간 폭쇄 처리, 알칼리 및 아염소산나트륨처리 다단처리, 효소가수분해(72시간)으로 구성되지만, 이태리포플러는 25 kg/cm²의 압력에서 6분간 폭쇄 처리, 알칼리 및 차아염소산나트륨처리 다단처리, 효소가수분해(72시간) 공정이 당을 획득하는데 유리하였다.

6. 본 연구에서 제안된 공정에 따르면, 100 kg의 신갈나무 및 이태리포플러로부터 각각 42 kg, 40 kg의 당이 생산 가능하다.

사 사

본 연구의 수행에 있어 많은 도움을 주신 경상대학교 농업생명과학연구원 에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Bernardez T. D., Lyford K., Hogsett D. A. and Lynd L. R. 1993. Adsorption of *Clostridium thermocellum* cellulases onto pretreated mixed hardwood, Avicel and lignin. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(7): 899-907.
2. Bocharadt, L. G. and Piper, C. V. 1970. A Gas chromatographic method for carbohydrates as alditol-acetate. *Tappi*, 53(2): 257-260.
3. Boussaid Abdel, Jamie Robinson, Yi-jin Cai and David J. Gregg. 1999. Fermentability of the hemicellulose-derived sugars from steam-exploded softwood. *Biotechnology and bioengineering*, 64(3): 284-289.
4. Dekker, R. F. H. 1988. Inhibitors of *Trichoderma reesei* beta-glucosidase activity derived from

- autohydrolysis-exploded *Eucalyptus regnans*. Appl. Microbial. Biotechnol. 29(6): 593-598.
5. Fengel, D, and Wegener, G. 1983. Wood. Walter de Gruyter. Berlin. pp. 274-276.
 6. Gerber P. J. , J. A. Heitmann, T. W. Joyce, J. Buchert and M. Siika-aho. 1999. Adsorption of hemicelluloses onto bleached kraft fibers. Journal of biotechnology. 67: 67-75.
 7. Gregg David J. and John N. Saddler. 1996. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. Biotechnology and bioengineering. 51(4): 375-383.
 8. Jackson L. S., Joyce T. W., Heitmann J. A. and Giesbrecht F. G. 1996. Enzyme activity recovery from secondary fiber treated with cellulase and xylanase. Journal of Biotechnology. 45(1): 33-44.
 9. Lisbeth Meunier-Goddik, Michelle Bothwell, Kunruedee Sangseethong, Kuakoon Piyachomkwan, Yun-Chin Chung, Khamphet Thammasouk, Djuhartini Tanjo and Michael H. Penner. 1999. Physicochemical properties of pretreated poplar feedstocks during simultaneous saccharification and fermentation. Enzyme and Microbial Technology. 24: 667-674.
 10. Mooney Caitriona A., Shawn D. Mansfield, Maria G. Touhy and John N. Saddler. 1998. The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. Bioresource Technology. 64: 113-119.
 11. Nunes A. P. and J. Pourquie. 1996. Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood. Bioresource technology. 57: 107-110.
 12. Segal, L., J. J. Creely, A. E. Martin. Jr., and C. M. Conrad. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. Text. Res. J.: 786-794.
 13. Shimizu K., K. Sudo, H. Ono, M. Ishihara, T. Fujii and S. Hishiyama. 1998. Integrated process for total utilization of wood components by steam-explosion pretreatment. Biomass & bioenergy. 14(3): 195-203.
 14. Vallander, L. and Eriksson, K. E. 1985. Enzymic saccharification of pretreated wheat straw. Biotechnol. Bioeng. 27(5): 650-659
 15. Vidal, T. and Colom Pastor, J. F. 1984. Determination of carbohydrates by gas chromatography. Tappi. 70(9): 132
 16. Winkle Van, S. C. and Glasser, W. G. 1995. Chemical cellulose from steam-exploded wood by peracetic acid treatment. Journal of pulp and paper science. 21(2): 37-43.
 17. 이종윤, 장준복, 양재경, 엄찬호, 임부국. 1993. 목쇄처리에 의한 Biomass 자원의 전처리 및 당화 신공정의 개발 (VI). 펄프·종이기술. 25(1): 85-92.
 18. 이종윤, 장준복, 양재경. 1990. 목쇄처리에 의한 biomass 자원의 전처리 및 당화 신공정의 개발(I). 펄프종이기술. 22(3): 56-63.
 19. 이종윤, 장준복, 양재경. 1992. 목쇄법을 이용한 목질계 Biomass의 종합적 이용(I)-소나무와 신갈나무 목쇄재의 탈리그닌처리-. 한국목재공학회지. 20(3): 11-20.
 20. 村尾澤夫, 荒井基夫, 阪本禮一郎. 1987. セルラセ. 講談社. 東京. pp. 20-21.