

오존 처리에 의한 목재 세포벽의 미세구조변화와 효소가수분해

김강재 · 엄태진[†]

(2010년 9월 6일 접수: 2010년 9월 24일 채택)

Enzymatic hydrolysis and micro-structure of ozone treated wood meal

Kang-Jae Kim, Tae-Jin Eom[†]

(Received September 6, 2010; Accepted September 24, 2010)

ABSTRACT

Pine (*Pinus densiflora*) and aspen (*Populus euramericana*) wood meals were treated with ozone at various time schedule in acidic condition. The lignin contents and surface area of the ozone treated wood meals were determined and the enzymatic hydrolysis rate of ozonated wood meals was evaluated. The feasibility of enzymatic hydrolysis of the ozone treated wood meal was obviously influenced with the degree of delignification. After ozone treatment of wood meal for 10min, total pore volume were slightly increased in the surface of wood meal. When wood meals were treated with ozone longer than 10min, few change in the pore volume was observed. However, the area of over 50 Å of pore size is increased with ozonation time. As a conclusion, the rate of enzymatic hydrolysis of wood is more effective with the pore size distribution than the total pore volume.

Keywords : ozone treatment of wood, enzymatic hydrolysis, micro-structure

1. 서론

목재 중의 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 등의 탄수화물은 리그닌에 의해 둘러싸여 있거나 결합되어 있기 때문에 다당류 효소와의 반응성을 높이기 위해서는 리그

닌을 제거하는 과정이 필요하다. 탈리그닌화 과정은 목재의 다당류를 효소로 분리, 이용하는데 있어서 가장 중요한 단계로 인식된다. 물리·화학적으로 탈리그닌하는

• 경북대학교 농업생명과학대학 임산공학과(Dept. of Wood Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

[†] 교신저자(Corresponding Author): E-mail: tjeom@knu.ac.kr

방법과 목재 부후균을 이용한 미생물적 방법 등이 있다. 구체적으로, Coughlan은 기계적인 방법만으로 목질 자원을 파괴시켜 미생물 가수분해 또는 유기용매 처리를 병행하는 탈리그닌 과정이 효율적이라고 보고하였다. 1) 수증기 폭쇄처리법은 섬유판 제조용으로 개발된 masonite gun의 이용을 시초로 1975년 캐나다에서 목재의 사료화를 위한 장치로 고안되면서 목재의 효소 당화 및 사료화를 위한 전처리법으로 연구 되었다.²⁾

최근 발표된 목질계 바이오매스의 당화를 위한 전처리 방법에 관한 총설에서는 목질 다당류의 효율적 당화를 위한 전처리의 필요성과 그 방법들에 대하여 상세히 소개하고 있다.²⁻⁵⁾ 목질계 바이오매스의 전처리는 주로 탈리그닌화, 헤미셀룰로오스 제거, 결정화도 감소 및 미세공극의 증가 등을 목적을 하고 있으며, 효과적인 전처리는 당화수율을 향상시킬 수 있어야 하고, 탄수화물의 분해 및 손실을 최소화하며, 당화 및 발효에 영향을 주는 저해 물질과 같은 부산물의 형성을 억제하는 등의 조건을 반드시 충족시켜야 하는 것으로 되어 있다.

목재의 효소 당화를 위한 전처리 방법의 하나로 오존처리법에 관해서도 연구되었다. 오존은 강력한 산화제로서 펄프의 표백에 널리 사용되고 있으며 리그닌의 분해 능력이 우수한 기체상의 화합물이다. Nadezhda 등³⁾은 침엽수의 오존 탈리그닌은 목분의 함수율에 영향을 많이 받는다고 보고하였고 Hayashi 등⁴⁾은 활엽수의 경우는 오존처리에 의해 효소 당화가 촉진되지만 침엽수는 그에 미치지 않는다고 보고하였다.

목질섬유소의 효소 당화인 경우 셀룰로오스는 endo- β -glucanase, exo- β -glucanase와 셀로비오스인 β -glucosidase가 서로 동시에 작용하여 glucose로 분해되며 이때 당화효율에 영향을 미치는 주요 인자는 기질의 특성에 대응하는 enzyme system의 적합성이 라고 보고되어 있다.⁶⁻⁹⁾

Fan¹⁰⁾은 셀룰로오스의 효소가수분해에 가장 크게 영향을 미치는 요소는 셀룰로오스의 구조적 특징이며 셀룰로오스의 팽윤정도, 결정화도, 리그닌과 같은 결합물질의 양, 중합도, fiber의 표면적 등이 있다고 하였다. 또한 Grethlein¹¹⁾은 기질의 공극분포가 효소당화에 미치는 영향에 대하여 보고하였다.

본 연구에서는 강력한 산화력을 가진 오존 처리에 의해 목질세포벽중의 리그닌의 분해와 미세공극 변화

가 세포벽 다당류의 효소가수분해에 미치는 영향에 관하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2. 1. 공시재료

소나무(*Pinus densiflora*)와 이태리포플러(*Populus euramericana*)의 목편을 Willy mill로 분쇄한 후 40-80 mesh의 목분을 ethanol- benzene(2:1) 혼합 용제로 탈지한 후 시료로 하였다.

2. 2. 오존처리

40-60 mesh를 통과한 목분(전건 중량 대비 10 g)을 삼구플라스크에 넣고 60% 초산 수용액 200 ml에 침지한 후 교반을 하면서 0℃에서 300 ml/min의 속도로 오존 발생기(Model No. 2000, Jelight Co., USA)로부터 생성된 오존 가스(3.0% 오존/ 산소)를 주입하였다. 오존 처리된 목분은 증류수로 충분히 세척하여 대기 중에 건조 시킨 후 함수율을 측정하였다. 소나무(pine)와 이태리포플러(aspen) 목분의 오존처리 시간은 모두 0, 10, 30, 60, 120 min 이었다.

2. 3. 비표면적 및 기공도 분석

Surface Area & Pore Analyzer (BET, Model Quantachrome, Nova 2000)를 사용하여 비표면적 및 기공도 분석하였다. BET의 측정범위는 비표면적이 0.01~2,000 m²/g 이상, 다공직경 범위는 3.5~2,000 Å/Font이다.

2. 4. 탈리그닌율

Klason 리그닌과 UV 리그닌은 각각 TAPPI T236 om-06, TAPPI T222 om-06에 의거하여 정량 분석을 실시하였고 두 리그닌의 합을 총 리그닌 함량으로 계산하였다.

2. 5. 효소 가수분해

전건중량 2 g에 해당하는 오존처리 시료를 삼각플라스크에 넣고 0.05M phosphate buffer 38.8 ml와 효소액 1.2 ml(Cellulast, Novo. Co)를 혼합한 용액 40 ml를 첨가하였다. Shaking incubator에서 50℃, 48시간 가

수분해반응 시킨 후 반응 잔사를 glass filter(1G4)로 여과시켜 buffer와 증류수로 세정하였다. 효소가수분해율은 가수분해 후 잔사의 전건중량을 구하여, 가수분해 전 시료의 전건중량에 대한 비율로 나타내었다.

2. 6. FE-SEM 측정

오존처리 목분 표면의 미세변화를 관찰하기 위하여 목분 시료를 백금으로 코팅한 후 전계 방사형 주사전자현미경(FE-SEM, S-4300, Hitachi, Japan)로 10,000배율로 촬영하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. 비표면적과 기공도

Bes 등²⁾은 오존처리에 의해 셀룰로오스 중의 수가용성 물질의 함량이 증가함으로 효소가수분해가 촉진된다고 보고하였다. 또한, Burns 등¹⁴⁾, Converse 등¹⁵⁾ 및 Sinistyn 등¹⁶⁾은 전처리에 의한 세포벽의 비표면적 증가가 효소가수분해를 위하여 더욱 중요한 요소라고 보고하였다.

리그닌의 제거가 섬유 내에 작은 공극들의 생성에

상당한 영향을 미친다. 목재는 다공성 재료로써 다양한 형상을 가진 공극을 가지고 있다. 특히 목재의 세포벽 및 내강에 존재하는 공극의 크기는 약 10~수백 Å에 이르고 있다고 알려져 있는데, 이 공극들은 여러 가지 약품 및 효소의 침투 등 목재의 화학적 반응에 있어서 대단히 중요한 요소가 되고 있다.¹⁷⁻¹⁸⁾

Table 1과 2에 오존처리에 따른 소나무와 이태리포플러 목분의 비표면적, 전공극량과 공극 분포 및 효소가수분해율의 변화를 측정한 결과를 나타내었다. 소나무와 이태리포플러 목분 모두 오존 처리 시간에 따른 비표면적의 변화는 거의 없었으나 오존 처리 10분 만에 전공극량이 급속히 증가하고 그 이후에는 처리시간에 그다지 변화가 없음을 알 수 있다. 전공극량의 증가는 오존이 세포벽 중의 리그닌을 선택적으로 공격하여 제거시키기 때문으로 볼 수 있다. 그러나 오존 처리 시간에 따라 전공극량의 변화는 미미하지만 효소가수분해율은 지속적으로 증가하고 있다. 이와 같은 결과는 목재 세포벽의 전공극량이나 비표면적이 효소가수분해율과 직선적인 관계를 갖는다고 보기 어렵다는 것을 시사하고 있다. Fig. 1은 오존처리 소나무와 이태리포플러 목분의 전공극량과 리그닌 함량의 상관관계를 나타낸 것이다. 오존처리 소나무의 잔존 리그닌 함량이

Table 1. Surface properties of ozonated pine wood meals

	Ozonation time (min)				
	0	10	30	60	120
Rate (%)	14.1	26.2	36.5	48.6	60.4
SSA (m ² /g)	2.05	2.45	3.55	4.54	3.96
TPV (ml/g)	3.75	18.62	21.42	22.53	11.4
APR (Å)	132.5	120.0	160.8	95.8	133.6

Rate : rate of enzymatic hydrolysis, SSA : specific Surface Area,
TPV : total pore volume, APR : average pore radius

Table 2. Surface properties of ozonated aspen wood meals

	Ozonation time (min)				
	0	10	30	60	120
Rate (%)	18.3	30.1	42.4	68.5	84.2
SSA (m ² /g)	2.38	2.83	4.54	3.82	4.34
TPV (ml/g)	33.46	59.74	71.44	70.89	72.13
APR (Å)	151.5	146.2	180.6	60.8	120.9

Rate : rate of enzymatic hydrolysis, SSA : specific Surface Area,
TPV : total pore volume, APR : average pore radius

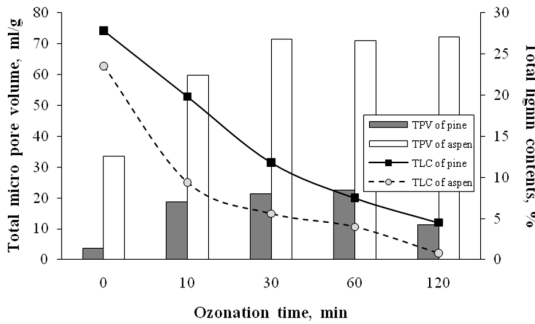


Fig. 1. Total micro pore volume and lignin contents of ozonated pine and aspen wood meals.

TPV : total pore volume, TLC : total lignin contents

이테리포플러의 것보다 더 높은 것을 알 수 있다. 이는 조직적인 면에서 소나무가 이테리포플러에 비해 세포벽 층으로 오존의 확산 침투가 어렵기 때문에 리그닌의 제거가 상대적으로 어렵고 따라서 탈리그닌에 의해 생성되는 공극의 양도 적은 것으로 추정 할 수 있다. 그러나 탈리그닌율이 효소가수분해율과 비례적인 관계를 보이는 것은 효소가수분해는 전공극량보다는 세포벽 층의 리그닌의 함량에 더욱 의존하는 것으로 생각할 수 있다.

Fig. 2와 3은 오존처리 시간에 따른 소나무와 이테리포플러 목분의 pore size별 volume을 측정 한 것이다. 오존 처리한 소나무와 이테리포플러 목분의 경우 아주 미세한 20 Å 이하의 공극은 오존 처리 시간에 따라 비례적으로 증가하고 있으며 20-50 Å의 공극은 소나무와 이테리포플러 목분 모두 오존 처리 시간에 따라 큰

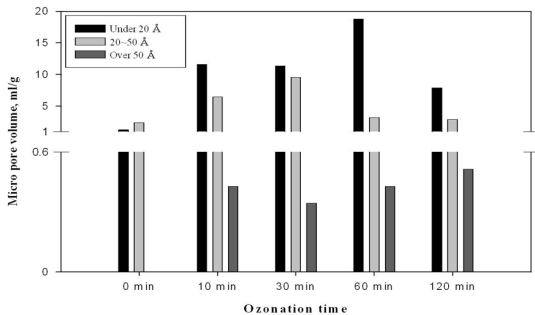


Fig. 2. Micro pore size distribution of ozonated pine wood meal.

변화를 보이지 않았다. 하지만 특이하게도 오존 처리 시간이 길어짐에 따라 오존 처리 전에는 무시되었던 50 Å 이상의 상대적으로 큰 공극들이 처리시간이 경과함에 따라 증가되는 것을 알 수 있었다. 이로서 오존처리 후 처음 10분 동안 오존의 공격을 받기 쉬운 위치에 분포하는 세포벽 사이의 리그닌이 분해·제거되어 그 제거된 공극만큼의 volume이 증가되고 그 이후에는 세포벽 중에 잔존하는 리그닌이나 lumen에 존재하는 소량의 리그닌이 제거되기 때문에 전체적으로 전공극률은 큰 차이를 보이지 않는 것으로 생각된다. 이러한 결과로부터 목재 세포벽내의 리그닌 오존 분해에 있어서도 불균질성이 존재하는 것으로 추정할 수 있다.

셀룰로오스의 분해에 관련된 효소 단백질을 구형으로 볼 때 평균 직경이 50 Å 전·후라고 한다. 이는 목재 세포벽의 미세공극이 50 Å 이상은 되어야 셀룰로오스 분해효소가 용이하게 공격할 수 있다는 것을 의미한다.^{13,17)} 소나무와 이테리포플러 목분 모두 오존 처리를 함에 따라 기존에는 거의 존재하지 않던 50 Å 이상의 공극이 상당히 많이 생성됨으로서 효소의 침투가 용이해지고 잔존 리그닌의 감소와 미세공극의 증가에 따라 효소가수분해율이 증가하는 것으로 추정 할 수 있다.

또한, 이상의 결과는 50 Å 이상의 비표면적이 증가함에 따라 효소가수분해율도 비례하여 증가한다는 Hans 등¹²⁾의 연구와 일치하고 있다. 짧은 오존 처리로 50 Å 이상의 공극이 급속히 증가하고 이후 서서히 20 Å 이하의 공극이 계속 증가하고 잔존리그닌이 감소함에 따라 목분의 친수성이 증가하여 효소가수분해가 촉진됨으로 오존 처리는 목재 당화를 위한 우수한 전처리법이 될 수 있을 것으로 판단된다.

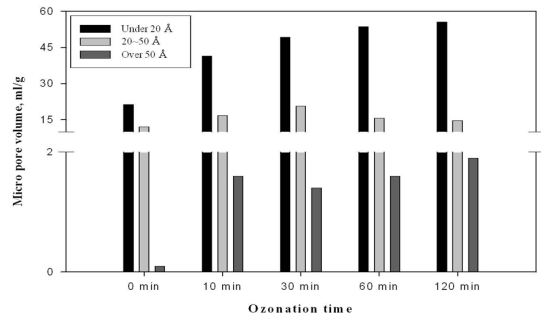


Fig. 3. Micro pore size distribution of ozonated aspen wood meal.

3. 2. 효소 가수분해율

셀룰로오스는 불균질한 다공성 물질이므로, 가수분해율은 cellulase 복합체의 접근이 용이한 glycoside 결합수에 따라 달라진다. 일반적으로 오존 처리함으로써 cellulase 반응이 용이한 부분이 증가된다. 효소 접근 가능성을 측정하는 직접적인 방법은 고체 기질에 대해 cellulase 흡착을 측정하는 것이다. 셀룰로오스의 단백질 흡착 능력은 오존 처리 후 6배 정도 증가한다고 보고되었다.¹¹⁾

Fig. 4는 소나무와 이태리포플러의 오존 처리에 의한 효소 가수분해율을 나타낸 것이다. 전반적으로 소나무의 가수분해율이 이태리포플러의 가수분해율보다 낮게 나타났다. 이는 소나무가 리그닌 함량이 높으므로 섬유 팽창률이 적고 이에 따라 효소가 흡착할 수 있는 면적이 작기 때문으로 생각된다. 즉, 침엽수의 가수분해율이 낮은 것은 적은 공극 부피, 낮은 흡착력, 낮은 섬유 포화점 때문인 것으로 추정할 수 있다.

이미 보고된 연구 결과와 같이 오존처리에 의해 리그닌이 분해·제거되고 미세공극이 커짐으로써 오존처

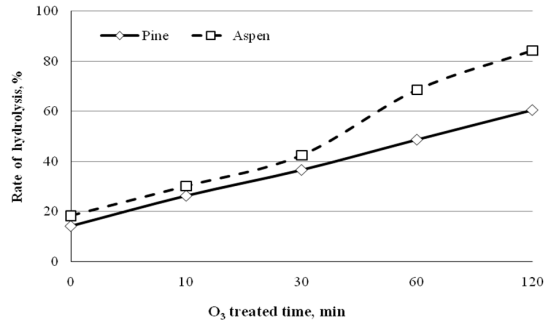


Fig. 4. The rate of enzymatic hydrolysis of ozonated wood meals of pine and aspen.

리 시간에 비례하여 효소 가수분해율이 증가하였다.¹⁷⁻¹⁹⁾

3. 3. 오존처리 목분의 표면 관찰

Fig. 5와 6은 오존처리 소나무와 이태리포플러 목분의 표면을 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 사진이다. 10,000배율로 관찰한 결과 오존 처리 시간이 경과함에 따라 소나무와 이태리포플러의 표면에 요철이 발

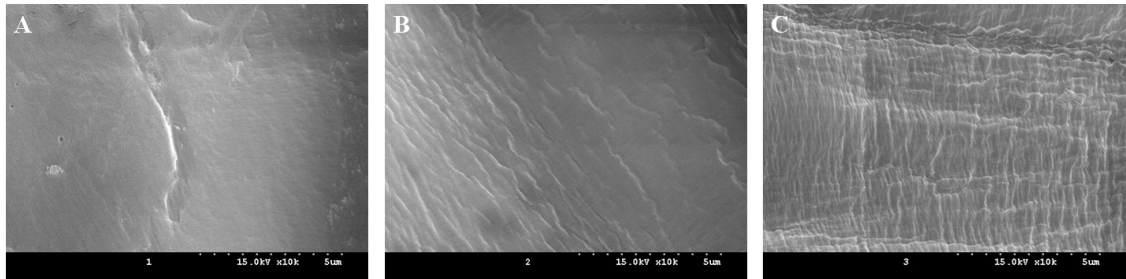


Fig. 5. SEM of ozonated pine wood meal(×10,000).

A : wood meal of O3 10 min, B : wood meal of O3 30 min, C : wood meal of O3 120 min

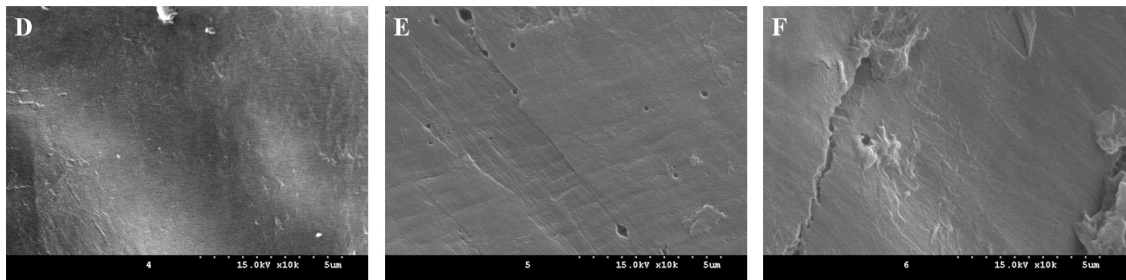


Fig. 6. SEM of ozonated aspen wood meal(×10,000).

D : wood meal of O3 0 min, E : wood meal of O3 10 min, F : wood meal of O3 60 min

생한 것을 볼 수 있었다. 특히, 소나무 목분의 경우에 더욱 현저하게 나타났는데 이것은 소나무가 이태리포플러보다 리그닌 함량이 많고 이에 따라 표면에 분포하는 리그닌의 함량이 상대적으로 많기 때문에 더 많은 요철이 생긴 것으로 보인다.

4. 결론

본 연구에서는 오존 처리에 의하여 리그닌을 제거함에 따라 소나무 및 이태리포플러 목분의 미세구조와 효소가수분해율의 변화를 비교·분석하였다. 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 목분의 효소가수분해율은 오존 처리 시간이 길어짐에 따라 증가하였다.
2. 짧은 오존 처리로 50 Å 이상의 유효 공극이 증가하고 서서히 미세한 공극이 증가하였다.
3. 소나무는 이태리포플러에 비하여 잔존리그닌의 함량이 높고 생성되는 공극의 전체량도 낮기 때문에 효소가수분해율도 낮게 나타났다.
4. 오존 처리에 의해 목재 세포벽의 표면에 요철이 발생하였으며 소나무의 경우 이러한 현상이 더욱 뚜렷하게 나타났다.

인용문헌

1. M.P. Coughlan, Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview, *Bioresource Technology*, 39(2), 107-115 (1991).
2. R.S. Bes, G. Gas, J. Molinier, P. Vidal, J. Mathieu, J.C. Mora, Enhancement of poplar cellulose susceptibility to cellulase enzyme hydrolysis by ozonation, *Science & Engineering*, 11(2), 217-226(1989).
3. A. M. Nadezhda, A.A. Stanislav, G.B. Natal'ya, V.L. Valery, Delignification of softwood by ozonation, *Pure Appl. Chem.*, 81(11), 2081-2091(2009).
4. Noriko Hayashi, Kazumasa Shimizu, Shuji Hosoya, Pretreatment of ozone for increasing the enzymatic susceptibility of autohydrolyzed softwoods, *Mokuzai Gakkaishi*, 35(6), 521-529 (1989).
5. H. Kaneko, S. Hosoya, J. Nakano, Delignification of lignin with ozone(in Japanese), *Mokuzai Gakkaishi*, 26, 752-758(1980).
6. Rarid Talebnia, Dimitar Karakashev, Irimi Angelidaki, Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment hydrolysis and fermentation, *Bioresource Technology*, 101, 4744- 4753(2010).
7. M.J. Taherzadeh, K. Karimi, Acid- based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: A review, *BioResources*, 2, 472-499 (2007).
8. P. Buffiere, D. Liosel, N. Bernet, J.P. Delgenes, Towards new indicators for the prediction of solid waste anaerobic digestion properties, *Water Sci. Technol.*, 53, 233-241(2006).
9. Mohammad J. Taherzadeh, Keikhosro Karimi, Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review, *Int. J. Molecular Sciences*, 9, 1621-1651(2008).
10. L.T. Fan, Y.H. Lee, D.R. Beardmore, The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymic hydrolysis, *Biotechnol. & Bioeng.*, 23(2), 419-24(1981).(6)
11. Hans E. Grethlein, The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates, *Biotechnology February*(1985).
12. David N. Thompson, Hsin-Chih Chen, Hans E. Grethlein, Comparison of pretreatment methods on the basis of available surface area, *Bioresource Technology*, 39, 155-163(1992).
13. C.A. Mooney, S.D. Mansfield, M.G. Touhy, J.N. Saddler, The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods, *Bioresource Technology*, 64(2), 113-119(1998).
14. D.S. Burns, H. Ooshima, A.O. Converse, Surface area of pretreated lignocellulosics as a function of the extent of enzymatic hydrolysis, *Applied Biochem. & Biotechnol.*, 20, 79-94(1989).
15. A.O. Converse, H. Ooshima, D.S. Burns, Kinetics of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials based on surface area of cellulose accessible to enzyme and enzyme adsorption on lignin and cellulose, *Applied Biochem. & Biotechnol.*, 24, 67-73(1990).
16. A.P. Sinityn, A.V. Gsakov, E.Yu. Vlasenko, Effect of structural and physico-chemical features of cellulosic substrates on the efficiency of enzymic hydrolysis, *Applied Biochem. & Biotechnol.*, 30(1), 43-59

- (1991).
17. Sannigrahi Poulomi, Miller Stephen J., Ragauskas Arthur J., Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine, Carbohydrate research, 345 (7), 965-70(2010).(3)
 18. L.E. Peters, L.P. Walker, D.B. Wilson, D. C. Irwin, The impact of initial particle size on the fragmentation of cellulose by cellulases of *Thermomonospora fusca*, Bioresource Technology, 35(3), 313-319 (1991).(12)
 19. C.A. Mooney, S.D. Mansfield, R.P. Beatson, J.N. Saddler, The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates, Enzyme and Microbial Technology, 25(8-9), 644-650(1999).