

纖維素의 糖化

李 啓 準

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

Enzymatic Hydrolysis of Cellulose

Kye JOON LEE

Applied Microbiology Laboratory, Korean Institute of Science & Technology, Seoul, Korea.

Since cellulose is the only organic material that is annually replenishable in very large quantities, we must explore ways to utilize it as a source of energy, food and chemicals. For the utilization of this resource, it is first enzymatic hydrolyzed to glucose, then the glucose can be used as a food, converted single cell protein by microorganism, fermented to clean burning fuel and other chemicals. Cellulolytic enzyme, cellulase, consists of two or three major components, C₁-cellulase, C_x-cellulase and β -glucosidase. C_x-cellulase are fairly common but C₁-cellulase are quite rare. *Trichoderma viride* is the best source of active cellulase, especially C₁-enzyme. Saccharification rate of cellulose is greatly influenced by the degree of crystallinity and extent of lignification. But by the pretreatment the substrate with cellulose swelling agent, delignifying reagent and physical treatment, the degree of saccharification is enhanced. Thus, glucose syrups of 2 to 10% concentration are realized from milled newspaper. The enzymatic hydrolysis of such energy rich material, such as cellulose, to glucose is technically feasible and practically achievable on a very large scale.

서 론

섬유소(cellulose)자원은 인류에게 가장 풍부한 자원으로서 오래전부터 연료, 건축, 공예, 화학약품 및 식품등 여러가지 목적으로 이용되어 왔다. 섬유소의 연간 생산량은 최소한 1조톤이상으로 추정되는데 이는 전세계 40억 인구 1인에 1일 약 70kg정도 분배해 줄 수 있는 양이다^{1,2)}.

이러한 엄청난 자원은 태양에너지로서 광합성에 의하여 생산되는데 사람이 직접 또는 간접적으로 이용하는 것은 극히 일부에 지나지 않으며 대부분은 그대로 폐기되어 여러가지 경로로서 자연에 귀환되어진다.

이용되지 않고 폐기 또는 축적되어 자연으로 돌아가거나 또는 이용되고 있더라도 그리 효율적이 못되는 것을 섬유소 폐자원이라 칭한다.

섬유소폐자원은 입산물, 농산물, 과일, 채소등의 가공처리과정에서 발생되며 도시고형폐기물중에도 40~60%를 점유하고 있어 이들의 처리문제는 도시행정의

중요한 과제이기도 하다.

1900년이전에 인류가 주로 사용한 에너지자원은 목재, 수력, 풍력, 석탄등이었으며 급세기에 들어서서는 석유로서 충당되었는데, 석탄, 석유등의 매장량에 한계점이 예견되고 있어 새로운 에너지자원의 개발이 요청되고 있다. 또한 세계적으로, 급속한 인구증가 추세에 따르지 못하는 식량증산의 문제는 매우 심각한 과제로 대두되어 그 해결책의 일환으로서 비식량자원 및 폐자원의 식량화방안이 다각적으로 활발히 검토되고 있다³⁾.

이와같은 관점에서 가장 풍부히 생산되고 또 매년 재현되고 있는 막대한 섬유소 자원을 에너지원으로, 식량원으로 또는 각종 화학약품의 원료물질로서 이용할 수 있는 방법을 강구하여야 될 것이다.

섬유소를 이와같은 목적으로 이용할 수 있는 방법은 Fig. 1과 같다. 이 방법에 가장 중요한 과정인 섬유소로부터 포도당의 생산 즉 "섬유소의 당화"에 관하여 기술하고자 한다. 현재까지 알려진 바로서는 Fig. 1과

같은 효소학적인 당화이다.

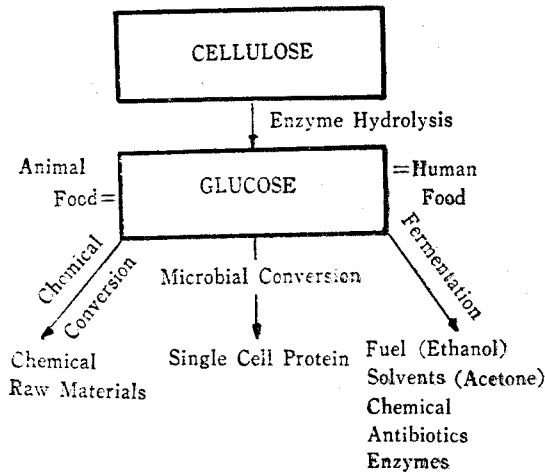


Fig. 1. Enzymatic hydrolysis of cellulose and the product utilization.

섬유소분해효소

作用 機轉 : 섬유소분해효소(cellulase)는 단일물질은 아니며 최소한 3종이상의 물질로 구성되어 있음이 chromatography나 electrophoretic 방법으로 확인되었다⁴⁻⁶⁾. 따라서 cellulase에 의하여 기질인 cellulose가 분해되는 과정도 3종이상의 효소가 연속적으로 작용하는것으로 알려졌다⁷⁾.

Cellulase는 β -(1→4) glucan을 분해하는 β -(1→4) glucan 4-glucohydrolase 또는 β -(1→4)-glucanase (E.C. 3214)로 정의하는바⁸⁾ cellulose chain에서 β -D-glucose를 생산하는 효소를 말하고 있으나 천연섬유소는 상호간의 결합으로 fibril을 형성하고 fibril은 다시 fiber로 결합되어 있어 결정성의 단단한 조직을 이루고 있는데 β -(1→4)glucanase의 작용만으로는 분해가 쉽지 않다.

Mandels와 Reese등은 천연결정성 cellulose에 최초로 작용하는 C_1 -cellulase와 C_1 -cellulase의 작용으로 linear cellulose가 된 뒤에 이어서 작용하는 C_x -cellulase (β -(1→4)glucanase)와 최후에 glucose까지 분해하는 cellobiase의 최소한 3종의 효소가 연속적으로 작용한다고 밝혔다⁹⁾.

1) C_1 -cellulase: 천연 cellulose의 결정성부분에 최초로 작용하여 cellulose분자상호간의 결합력을 파괴내지는 약화시켜 C_x -cellulase의 작용을 수월하게 한다고 보고되었다¹⁰⁾. C_1 -cellulase가 순수하게 분리되었지만 그 작용기전은 아직 확실치 않고 *Tricoderma*에서 얻은 C_1 -cellulase에는 avicel이나, 인산으로 팽윤시킨 cellu-

lose에 작용해서 Cellobiose를 서서히 생산해내는 exo- β -(1→4) cellobiohydrolase (CBH)가 존재하여 이것을 C_1 -cellulase로 보는 견해도 있다¹¹⁻¹³⁾.

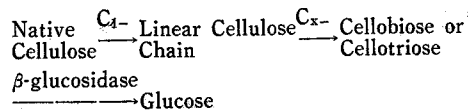
2) C_x -cellulase: endo- β -(1→4) glucanase를 흔히 C_x -cellulase라고 부른다. 이효소는 cellulase연구의 초기에 많이 다루어 졌는데 C_1 -cellulase 작용의 연속으로 결정성 cellulose를 분해할 수 있다. C_1 -cellulase가 없는 상태에서는 ① carboxy methyl기나 hydroxy methyl기로 치환된 cellulose, ② 강산, 강알칼리 및 ball mill처리등으로 결정성이 파괴된 cellulose의 β -(1→4)glucosidic linkage에 random하게 작용하여 cellobiose나 cellotriase를 주로 생성시킨다¹⁴⁾.

C_x -cellulase 내에는 exo- β -(1→4)glucanase가 존재하는데 이 효소는 cellulose chain의 비환원성부의 끝부터 glucose를 차례로 분해해낸다¹⁴⁾.

일반적으로 섬유소를 분해할 수 있는 미생물은 C_1 -cellulase와 C_x -cellulase을 동시에 생산하는데 C_x -cellulase가 C_1 -cellulase보다 많이 생성된다.

3) β -glucosidase (cellobiase): β -(1→4)-glucanase의 작용에 의해서 생성된 cellobiose, 또는 short chain oligosaccharides를 glucose까지 분해시키는 효소인데 cellobiose나 cellotriase는 신속히 분해하나 중합도(D.P)가 많아질수록 그 능력은 저하된다¹⁵⁾.

Cellulase의 작용기전을 종합적으로 도시하면 다음과 같다.



力價測定方法 : cellulase의 역가를 측정하는 때에는 몇가지 고려하여야 할 문제점이 있다. 즉 기질인 cellulose가 수용성이 아니므로 효소가 기질에 흡착되어 접촉하는데 시간이 필요할뿐 아니라 반응후 생산된 반응물이 용출되어 나오는데 또한 시간이 필요하기 때문이다. 기질의 경도(硬度) 및 결정성이 증가할수록 반응시간이 길어야 하며, C_1 , C_x -cellulase가 공존할 때와 C_x -cellulase만이 존재할 때의 차이가 크게 나타난다. 때문에 cellulase의 활성을 측정함에 있어서는 기질과 반응조건의 선택이 가장 중요하다. cellulase는 그 작용기질에 따라 C_1 -cellulase, C_x -cellulase로 구별하였으므로 이들 각각의 역가를 측정하는 방법과 이들을 동시에 측정할 수 있는 방법은 다음과 같다.

1) C_x -cellulase의 활성측정 : C_x -cellulase (endo- β -(1→4) glucanase)의 활성은 치환도가 0.5인 carboxy-

methyl cellulose (CMC)를 기질로해서 효소의 반응 최적 pH와 최적온도에서 단위시간에 반응시킨 뒤 생성된 환원당을 β -D-glucose를 기준으로 하여 측정한다. 이효소는 단지 cellulose chain의 β -(1 \rightarrow 4)-glucosidic linkage만을 분해하는데 기질농도 12%까지만 적선적으로 비례하므로 기질농도를 그 이하로 하여야 한다. 반응속도가 매우 빠르며 C₁-cellulase에 의하여 영향을 받지 않기 때문에 순수한 효소나 복합 또는 조효소중의 C_x-cellulase를 측정하는데 가장 적당한 방법이다¹⁶⁾. 일반적으로 pH 4.8 buffer 1ml와 희석한 조효소액 0.5ml 및 1% CMC액 0.5ml를 50°C에서 1시간 반응시킨 뒤 생성된 환원당의 양을 측정하여 μ mol. of glucose/min./1ml of crude enzyme soln.을 1 unit로 표시한다.

2) C₁-cellulase활성측정 : C₁-cellulase 측정방법의 개발에는 몇가지 문제점을 고려하여야 한다. 왜냐하면 C₁-cellulase는 전술한대로 결정성 cellulose를 분해해서 C_x-cellulase의 기질화시키는 작용으로 보기 때문에 그 상태를 측정할 적당한 방법이 없다. 결국 C_x-cellulose의 작용에 의하여 생산된 환원당의 양을 측정할 수 밖에 없다. 따라서 조효소액중의 C₁-cellulase의 역가를 측정하려면 C_x-cellulase가 얼마간 존재한다고 생각하고 탈지면을 기질로해서 반응시킨 뒤 생성된 환원당의 양을 측정한다¹⁶⁾.

실제 미생물에 의하여서는 C_x-cellulase의 생성량이 C₁-cellulose 생성량보다 많으므로 이 방법에 큰 무리가 없다. 보통 pH 4.8, 50°C에서 24시간 반응시킨다¹⁷⁾. 순수하게 정제된 C₁-cellulase의 활성은 인산으로 팽윤시킨 cellulase나 avicel을 기질로 하여 순수하게 얻은 C₁-cellulase를 작용시켜 생성된 cellobiose의 양으로서 측정하는데 이것은 *T. viride*와 기타 균주로부터 순수하게 분리된 C₁-cellulase에 존재하는 exo- β -(1 \rightarrow 4) cellobiohydrolase의 작용에 기인한다^{11~13)}. 이방법은 순수하게 분리된 C₁-Cellulase에만 적용된다.

3) Total cellulase 활성측정 : 여과지를 기질로 사용하여 cellulase의 활성을 측정할 수 있는데 이 방법으로 측정할 때는 측정시간이 짧으면서도 cellulase의 total activity를 측정할 수 있는 이점이 있으므로 새로운 균주나 변이주를 screening 하는데, 발효중의 역가를 측정하는데 많이 이용된다^{16~18)}.

반응시간이 경과됨에 따라 기질의 작용면적이 감소되고 최종산물의 저해작용때문에 반응속도가 느려진다. 반응액중의 환원당이 2mg/ml이상 생성되면 오차가 심하므로 반응액을 적당히 희석하여야 한다. 이때 반응후 생성된 환원당의 양을 측정하여 μ mol of glu-

cose/min/ml of crude enzyme로 표시한다. 한편 일정한 조건하에서 반응시켜 기질로 사용된 여과지의 기계적인 결합이 완전히 붕괴되는데 소요되는 시간을 측정하여 분으로 나타내기도 하며, 효소의 농도 1%일때 붕괴되는데 요하는 시간이 X(min)이면 30,000/X로 나타내기도 한다¹⁹⁾. 이밖에 CMC액화중을 측정하는 방법¹⁶⁾과 cellulase 평판배지에 항생물질 정량용 stainless steel cup을 세우고 조효소액을 주입한 뒤 일정시간 반응시켜 생성된 반응원의 직경을 측정하는 방법¹⁹⁾, 일정한 기질에 일정시간 작용시켜 분해시킨 뒤 나머지 양을 측정하는 방법²⁰⁾ 등이 있으나 상호간 얼마간의 차이점이 있다.

Cellulase의 역가를 국제적으로 통일되게 나타내는 방법이 요망되고 있다.

微生物에 의한 cellulase의 生産 : ① cellulase생산 균주 및 균주선별의 기준; 상당수의 세균 및 곰팡이가 cellulose를 자가소화하여 성장하는데 대부분은 균체량의 증가와 CO₂ gas나 CH₄ gas를 생산하고 cellulase를 생산하는 균주는 곰팡이중 수종에 지나지 않는다. cellulase를 생산하는 곰팡이로서는 *Trichoderma viride*, *T. koningii*^{10~13,16,17,21~24)} *Cryosporium lignorum*, *C. pruinosa*^{10,24)} *Penicillium funiculosum*, *P. iriensis*,²⁵⁾ *Fusarium solani*¹³⁾ 등이 비교적 cellulase를 강력히 생산하는 것으로 보고되었다. 이밖에도 *Aspergillus niger*¹⁴⁾ *Irpex locteus*,²⁶⁾ *Chaetomium globosum*^{27~28)} *C. thermophilum*, *Myrothecium verrucaria*^{29~31)} 등의 균이 보고되어 있었으나 실질적으로 공업화할 수 있는 것으로는 *Trichoderma*속, *Penicillium*속, *Aspergillus*속의 몇몇 곰팡이가 사용되고 있는 실정이다. cellulase를 생산하여 사용하는 목적에 따라 균주선택의 기준이 각각 다르다. 즉 cellulase를 생산하는 미생물은 보통 C₁-cellulase와 C_x-cellulase (endo β -(1 \rightarrow 4)glucanase)를 동시에 생성하기 때문에 결정성이 많은 천연섬유소를 분해하고자 할 때에는 C₁-cellulase의 활성이 높은 균주를 선택하는 것이 타당하다.

가령 *Pestalotiopsis westergijkii*(pw) 균주는 C_x-cellulase를 강력히 생산하나 C₁-cellulase의 역가는 매우 낮다. 이러한 균주는 C_x-cellulase가 필요할 경우에 사용될 수 있기는 하나 천연 cellulose의 분해에는 아주 적당치 않다.

Tansey³¹⁾ 등은 *Chaetomium thermophilum* QM9381, *Sporotrichum thermophilum* QM9382. 및 *Thermoascus aurantiacus* QM9383등 thermophile한 섬유소분해곰팡이를 사용하였는데 이들 균주는 cellulose에서 잘 자라

고 신속히 분해(decomposition)시키기는 하나 cellulase의 생성량은 매우 낮았다.

General Electric Company의 Bellamy등이³²⁾ 사용한 thermophile한 *Thermoactinomyces*는 C₁-cellulase가 결핍되어 있고 전체적으로 cellulase의 역가가 낮으나 천연 cellulose에서 잘 자라고 아주 신속히 기질을 분해한다. 이러한 균주는 섬유질을 기질로해서 single cell protein을 생산하는 목적이나 퇴비화과정에서는 적합하겠으나 cellulase를 생산하여 섬유소를 당화하는 목적에는 적합하지 않다. 따라서 cellulose의 당화목적으로 cellulase를 생산하고자 할 때에는 cellulase의 역가가 강력하여야 하는데 특히 C₁-cellulase의 역가가 강력한 것을 선택하는 것이 중요하다.

현재까지 C₁-cellulase를 가장 강력히 나타내는 균주는 미국 Natick연구소 M. Mandels와 E.T. Reese등이 얻은 *Trichoderma viride*이다⁴⁾. 그러나 자연에서 분리된 정상균주로서는 C₁-cellulase의 생성에 한도가 있다. 따라서 변이제로서 처리하여 C₁-cellulase 및 기타 cellulase의 역가가 증진된 변이주를 유도하고 배양조건등을 최적화하여 cellulase의 활성을 증진시키는 연구가 현재 활발히 진행되고 있고 또 상당한 진전을 보고 있다.

② Cellulase생산균주 및 생산조건의 개선 : 분자생물학의 발전과 함께 유전 및 변이의 원인이 규명되어져 변이를 효율적으로 유도할 수 있는 변이제와 그 방법

이 확립되었고 또 유전학적인 방법으로 새로운 변이주를 끊임없이 얻고 있다. 또한 변이주를 screening하는 방법이 점차 손쉽고 막대한 양을 신속히 처리할 수 있도록 발전됨에 따라 보다 강력한 생산성을 갖는 변이주의 선택이 쉽게 되었다.

그러나 cellulase의 경우에는 생산성이 증가된 균주를 자연에서 분리하든, 변이주를 유도하든간에 효율적으로 screening하는 방법이 아직 개발되어 있지 않다. 따라서 아직까지도 통상의 방법 즉 균주의 분리 배양 분석의 제 방법을 거쳐서 선발하고 있다.

Mandels등은 자연에서 분리하여 얻은 C₁-cellulase를 생성하는 균주 *Trichoderma viride* QM6a를 모균으로 하여 이 균주의 포자를 증류수에 현탁시켜 각종변이제를 처리하여 99%이상 사멸시키고 남은 포자중에서 C₁-cellulase의 역가가 현저히 증가된 변이주 QM9123, QM9414를 얻는데 성공하였다^{33,34)}.

Cellulase의 활성이 증가된 균주는 배양액중에 많은 양의 단백질을 분비하고 있는데 이들이 얻은 모균 및 변이주의 cellulase활성을 다른 균주와 비교한 것은 Table I과 같다³⁰⁾. 현재까지 QM9123 및 9414가 C₁-cellulase를 가장 강력히 생산하는 균주로서 인정되고 있다.

비록 C₁-cellulase를 강력히 생산하는 균주를 개발하였다 하더라도 배양여건이 확립되지 않으면 cellulase를 효과적으로 생산할 수 없다. 왜냐하면 곰팡이에서 생

Table I. Production of Cellulase by *Mesophilic Cellulolytic Fungi*^a

Q M	Strain	Dry weight (mg/ml) ^b	Soluble protein (mg/ml) ^c	Total protein (mg/ml) ^d	Cellulase					
					C _x (u/ml)		FP (u/ml)		Cotton (mg/ml)	
					F	H	F	H	F	H
6a	<i>Trichoderma viride</i>	2.4	0.7	1.0	8	10	0.3	0.3	1.9	1.6
9123	<i>Trichoderma viride</i>	1.6	1.5	1.5	22	29	0.9	0.9	3.4	3.5
9414	<i>Trichoderma viride</i>	1.1	1.5	1.6	32	32	1.0	1.1	3.0	2.9
9316	<i>Trichoderma viride</i>	9.0	0	0.1	0	0	0	0	0.1	0.1
B814	<i>Streptomyces</i> sp.	2.5	0.5	0.5	2	0	0.1	0	0.3	0.1
9624	<i>Penicillium iriensis</i>	1.8	0.5	1.0	14	17	0.5	0.5	1.1	1.3
9145	<i>Chrysosporium lignorum</i>	5.0	0.1	0.5	0	3	0	0.2	0.2	0.4
381	<i>Pestalotiopsis westerdijkii</i>	3.7	0.1	0.8	4	4	0.2	0.2	0.4	0.3
806	<i>Sporotrichum dimorphosporum</i>	0.8	0.8	1.0	21	22	0.2	0.3	0.3	0.5
826	<i>Chrysosporium pruinatum</i>	2.4	0.6	0.8	4	3	0.2	0.3	0.5	0.6

^aCultures grown 14 days on 1% cellulose pulp, 0.1% proteose peptone, 0.2% Tween 80, 0.01% yeast extract.

^bDry weight includes residual cellulose.

^cSoluble protein, F cellulase measured on culture filtrate.

^dTotal protein, H cellulase measured on homogenate of whole culture.

산되는 cellulase는 구성효소가 아니고 inducer에 의해서 유도되는 유도효사이므로 배양에 사용되는 탄소원에 크게 영향을 받기 때문이다^{35,36}). 균주 *T. viride* QM9123이나 QM9414는 cellulose, lactose, cellobiose 등에서 자라 cellulase를 생성하는데 glucose나 glycerol에서는 cellulase의 생성이 저해된다^{35,36}). Sophorose는 매우 낮은 농도에서도 cellulase의 induction에 강력히 영향을 주어 cellulase의 생산이 증가하나 실용화하기에는 sophorose가 희귀하여 사용할 수 없다³⁶).

일반적으로 순수한 cellulose나 혹은 천연 cellulose를 처리한 것들이 사용되고 있는데 이에 따라 C₁ 및 C_x-cellulase의 생성비율에 얼마간 차이가 있다.

배양양식에 따라 cellulase의 생성에 차이가 있어 *T. viride*를 koji배양할 때는 액체배양할 때보다 활성이 떨어져서 특히 C₁-cellulase의 활성이 더 저하되는데 이것은 C₁-cellulase가 koji에서 충분히 추출되지 않아^{16,37}) C₁-cellulase의 활성은 더욱 떨어진다. 아세트산으로 처리하여 침전시킨 것보다 배양여과액내에서의 활성이 더 강하며, 제외효소이기 때문에 균체를 파괴하여도 cellulase의 활성은 증가하지 않는다.

현재까지의 연구를 토대로 pilot plant scale에서 cellulase생산조건의 최적화를 검토하여야 하며 한편으로는 보다 더 강력한 cellulase를 생산하는 균주 또는 변이주를 취득하여야 할 것이다. 즉 ① Glucose에 의해서 저해되지 않고 inducer가 없어도 생산할 수 있는 구성효소(constitute cellulase)로서 cellulase를 생산하는 균주 ② cellulase의 활성이 증진되어 처리하지 않은 기질을 직접 분해할 수 있는 cellulase를 생산하는 균주 ③ 고온에서 안정성 및 활성이 증진된 cellulase를 내는 균주의 개발이 필요하다고 Natick의 E.T. Reese³⁸)는 주장하고 있다.

기질로서의 섬유소

物理化學的인 性質 : Cellulose의 화학구조는 40년전 Haworth⁴⁰) 등에 의해서 Fig. 2와 같이 밝혀진 이래 cellulose의 전체적인 구조에 관한 연구가 많아 이에 대한 중설이 많은 사람들에 의하여 발표되었다⁴¹). Cellulose는 Fig. 2에서 도시된대로 anhydroglucose가 β-(1→4) glucosidic linkage로 축쇄로 연결되지 않고 직선으로만 연결된 polymer이다. 분자내의 직경이 10Å 미만의 cellulose분자는 분자간 수소결합으로 직경이 약 100Å의 microfibril을 형성하는데 이 fibril의 크기는 일정치 않고, 직선상의 fibril은 측면으로 hydrogen bond를 형성하여 평행성의 결정상태의 fiber가 되는데 그 결정도

가 직선상의 방향을 유지하는 부분을 crystalline region 이라고 하며 다소 그 정도가 낮은 부분을 paracrystalline region이라고 한다^{42,43}). Cellulose의 D.P.는 30~14,000 정도로 일정치 않으므로 cellulose의 분자량 측정은 곤란하다. 그러나 편이상 20°C에서 17.5% NaOH에 녹지 않는 것을 α-cellulose라 하고(D.P.가 200이상) 용해된 것을 중화하였을 때 침전으로 떨어지는 부분을 β-cellulose (D.P. 15~200), 그 이하의 것을 γ-cellulose라고 한다⁴⁴).

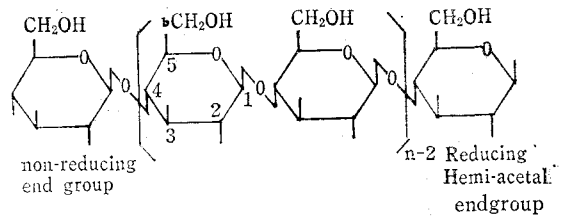


Fig. 2. Cellulose-Haworth Formula

목화섬유질은 90% 이상이 cellulose인데 비해 목재는 45%정도가 cellulose이다. 이들의 조직을 현미경으로 확대해 보면 cotton fiber는 가는 실모양의 fiber로 되어 있으나 목재의 경우는 응집된 3차원적인 구조를 형성하고 있어 cellulose이 다른 물질이 있는음을 알 수 있다. 즉 cotton fiber는 결정성이 높은 cellulose로서 구성되어 있으며 목재에는 lignin, hemicellulose가 cellulose와 혼존되어 있다. lignin과 hemicellulose는 heteropolymer로서 서로 엉켜 matrix를 형성하여 cellulose의 amorphous region에서 cellulose와 다시 뒤엉켜서 cross-linkage가 형성되는데 이 중에서 lignin은 식물조직을 견고히하고 기계적강도를 증진시킨다^{45,46}). Hemicellulose는 주로 xylose, galactose, mannose, arabinose 및 glucuronic acid가 1→3, 1→6, 및 1→4 glycosidic bond로 된 heteropolymer인데 cellulose보다는 짧아 D.P.가 200을 넘지 않는다. glucoman이나 xylan에는 acetylgroup이 많아서 이것이 다른 polymer 즉 lignin, 및 cellulose와 ester결합하여 cross-linkage를 형성한다⁴⁷). Lignin은 coniferyl alcohol, pyrocatechol, vanillin, 및 syringyl unit가 3차원적으로 복잡하게 결합된 물질로서 Freudenberg가 구조식을 발표한 바 있으나 아직 확실하지 않다⁴⁸). 식물조직은 견고하고 쉽게 분해되지 않으므로 lignin의 함량이 많은 천연 cellulose일수록 쉽게 분해되지 않는다⁴⁶).

또한 목재에는 wax, fats, essential oil, tannin, resin 등의 물질이 함유되어 그 정도와 종류에 따라 목재 특유의 형상과 성질을 나타낸다^{48,49}).

纖維素의 基質化 : Cellulose 구성단위인 glucose의 2, 3, 6위치에 hydroxyl기가 있기는 하나 cellulose는 intermolecule의 수소결합으로 단단히 결합되어 결정성으로 되어 있는데다가 물에 불용성이므로 화학적으로나 생물 화학적으로 쉽게 분해되지 않는다. cellulose의 분해에 영향을 주는 요소로서는 ① cellulose내의 수분량 ② cellulose의 결정성 정도 ③ cellulose의 D.P.정도 ④ lignin 등 cellulose에 포함된 물질의 영향 ⑤ cellulose chain에 치환된 치환도 등이다. 보다 강력히 cellulase를 생산하는 방법의 개발과 아울러 생산된 cellulase의 기질에 대한 감수성을 증진시키는 것은 섬유소의 당화에 있어 매우 중요하다. 따라서 효소는 감수성에 영향을 주는 요소를 개선하면 같은 활성의 효소로서 처리하여도 당화율이 증진된다.

섬유소는 물리화학적으로 안정한 물질이기는 하나 강 전해질의 용액에 쉽게 침투되어 팽윤되는 성질이 있다. 섬유소를 팽윤시킬 수 있는 것을 cellulose swelling agents라고 하는데 Table II와 같다⁵⁰⁾.

이 중에서 NaOH, cuprammonium hydroxide, H₂SO₄, copper ethylenediamine등의 효과는 매우 좋아서 공업적으로 사용할 수 있는 전망이 있다⁵⁰⁾.

Table II. Cellulose-Swelling Agent

- 1) 9% NaOH+CS₂
- 2) Calcium thiocyanide
- 3) Cuprammonium Hydroxide
- 4) NaOH
- 5) Ruthenium red
- 6) Copper ethylene diamine
- 7) H₃PO₄
- 8) 85% formic acid+ZnCl₂
- 9) Iron tartarate
- 10) NH₃
- 11) Sodium zincate
- 12) Cadoxen
- 13) H₂SO₄

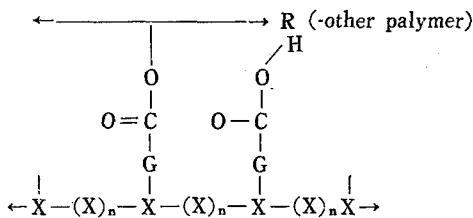


Fig. 3. Schematic structure of a hard wood xylan chain with a free carboxyl group and an esterified carboxyl group functioning as a cross-link between the xylan chain and other polymeric unit.

Fig. 3에서 도시한대로 cellulose내의 polymer는 me-

thyl glucuronic acid의 carboxyl group에 의해서 다른 polymer와 cross-linkage되어 있는데 희 NaOH용액 또는 liquid NH₃로서 처리하면 이 ester결합에 saponification 또는 ammcolysis가 일어나서 polymer간의 cross-linkage가 끊어지고 결과적으로 cellulose의 결정성이 파괴되며 팽윤된다^{51,52,53)}.

따라서 효소 및 섬유소 분해제의 침투가 용이하게 된다⁵⁴⁾. NaOH의 사용량에 따라서 처리효과도 증진되기는 하나 대체로 5~6%의 NaOH로 처리하면 만족할 만한 결과에 도달하는데⁵⁵⁾ NaOH의 필요량은 천연섬유소내의 acetyl radical이나 carboxyl group의 존재정도에 따라 좌우된다⁵⁶⁾. 알카리 처리한 섬유소는 효소에 의해서 쉽게 분해되는데 Feist⁵⁵⁾ 등은 NaOH 0.5% 수용액 10 배량으로 2시간 처리하여 초식동물인 양에게 급여시현한 결과 소화율 41%에서 52%으로 증가되었는데 이러한 연구결과를 토대로 저질의 건조, 고간류 등을 소석회 NaOH등으로 처리하여 초식동물에게 급여한다. Ammonia처리에 따른 cellulose가 팽윤되는 이유는 ammcolysis인데 NaOH보다는 작용속도가 느리고 약하다. 그러나 섬유소 당화가 아닌 사료로서 이용하고자 할때는 장시간 처리함으로써 NH₃가 질소원으로 사용될 수 있는 이점이 있다⁵⁶⁾. lignin의 함량이 증가하면 효소의 감수성 및 소화율이 심각하게 저하되는데 이것은 lignin이 효소에 저해제로서 작용하는 것이 아니고 단지 cellulose내에 효소의 침투가 어렵기 때문이다⁵⁷⁾.

천연 섬유소를 NaClO₂로서 처리하면 조직내의 lignin이 용해되어 나오는데 lignin이 용탈된 cellulose를 hollo-cellulose=(total carbohydrate portion of ligno-cellulose)라고 한다⁵⁸⁾. NaClO₂의 처리가 가장 강력한 lignin 용탈제이기는 하나 값싼 자원을 개발한다는 목적에서는 경제적으로 난점이 있다. 기타 SO₂로서 lignin을 용탈하기도 하며⁵⁹⁾ steaming처리하여 소화율을 증진시킬 수 있다⁶⁰⁾.

Cellulose의 결정성 및 D.P.정도를 파괴시키기 위해서는 ball mill등으로 분말화하고⁶¹⁾ γ-ray조사,⁶²⁾ 고온 또는 저온처리 및 압력을 가하여 처리하기도 한다.

이상 섬유소의 소화율 또는 효소의 감수성을 증진시키는 방법의 몇가지를 열거하였는데, 가장 중요한 것은 경제적인 면에서 항상 고려하여야 한다.

섬유소의 당화

섬유소의 분해는 다음 4가지로서 구별된다⁶³⁾. ① hydrolytic degradation ② oxidative degradation ③ mic-

robiological degradation ④ mechanical degradation으로 ① hydrolytic degradation은 cellulose의 β -(1 \rightarrow 4) glucosidic linkage가 H⁺에 의하여 쉽게 분해되면서 H₂O가 부가되어 왼쪽 glucose의 제1탄소에 hemiacetal의 reducing group이 형성되는 반응이다. 이 가수분해에 의해서 cellulose의 D.P.가 줄어들며 환원력이 증가되어 점차 β -D-glucose가 생성된다⁶⁴⁾.

② hydroxy기를 갖는 다른 화합물과 마찬가지로 cellulose의 -OH기는 산소분압의 근(root)에 비례하여 autooxidation되어 free radical이 증가되고 이에 따라 cellulose의 방향성 즉 결정성이 떨어져 팽윤된다. 이러한 반응은 알카리처리로 팽윤된 cellulose에서 신속히 일어나는데 Co⁺⁺, benzenediazonium hydroxide에 의해서 더욱 촉진되고 Ag, naphthaquinone에 의해서는 저해된다⁶⁵⁾. 이 반응의 결과로 cellulose의 D.P.가 줄어들고 carbonyl, carboxyl group이 증가된다⁶⁵⁾.

③ cellulose는 절단 분해 분말과정에서 기계적인 힘과 결정성이 파괴되어 D.P.가 줄어들며 무정형의 cellulose가 된다⁶¹⁾.

④ microbiological degradation은 cellulose가 미생물에 직접 분해되는 것으로 섬유소를 분해할 수 있는 (cellulolytic microorganisms)미생물은 cellulose를 직접 기질로 하여 성장하면서 cellulose에 의하여 유도된 효소 즉 cellulase을 생성한다. 이 cellulase를 분리 추출하여 가장 경제적이고 효과적인 방법으로 처리한 cellulose를 분해하면 전술된 작용기전으로 β -D-glucose가 생성된다. 산으로 분해할때나 효소로서 분해할때나 β -D-glucose가 생성되지만 효소로서 분해하는 것에 많은 장점이 있다. 즉 산으로 분해할 경우는 ① 산에 의해 부식되지 않는 용기를 설치하는데 많은 경비가 소요되고 ② 결정성 섬유소는 산에 매우 저항성이 강하므로 산의 농도나 반응온도를 증가시켜야 하는데 이러한 상태에서는 생성된 당의 분해가 불가피하다. ③ 사용한 cellulose로부터 증량비로 50% 정도의 낮은 효율로 glucose가 생성된다. ④ 산에 의해서 분해된 기타 물질이 혼입되어 이들의 분리 정제가 어렵다.

그러나 효소로서 분해할 경우는 ① 효소 cellulase가 기질인 cellulose에 선택적으로 작용하여 분해시키므로 이물질 혼입의 염려가 없고 ② 반응온도가 50°C 정도이므로 생성된 당의 변화가 없으며 ③ 분해된 기질에서 111%의 고수율로 glucose가 생성되며 비교적 순수하고 일정한 농도로 생성된다. 이러한 이점을 충분히 고려하여 인류에게 가장 충분히 공급되고 있는, 섬유소자원을 현재 사용하고 있는 상태보다 더 효율도가

Table III. Hydrolysis of Cellulose by *Trichoderma viride* Cellulase

Substrate	% Saccharification			
	1hr	4hr	24hr	48hr
PURE CELLULOSE				
Cotton-Fibrous	1	2	6	10
Cotton-Pot Milled	14	26	49	55
Cellulose Pulp SW40	5	13	26	37
Milled Pulp Sweco 270	23	44	74	92
WASTE CELLULOSE				
Bagasse	1	3	6	6
Bagasse-Pot Milled	14	29	42	48
Corrugated Fibreboard Mighty Mac	11	27	43	55
Corrugated Fibreboard Pot Milled	17	38	66	78
Black Clawson Fibers	5	11	32	36
Black Clawson Pot Milled	13	28	53	56
Bureau of Mines Cellulose	7	16	25	30
Bureau Mines Pot Milled	13	31	43	57
NEWSPAPER TREATED				
Pot Mill	18	49	65	70
Sweco Mill	16	32	48	56
Granulator-Comminutor	6	14	24	26
Treated 2% NaOH	8	14	28	35
Viscose	15	30	44	51
Cuprammonium	18	35	52	58

증진된 상태에서 이용하고자 하는 연구의 하나로서 섬유소를 섬유소 분해효소로서 분해 당화시켜 glucose를 얻고자 하는 연구가 활발히 진행중에 있다^{4,18,33,37)}. 이 중에서 cellulase의 생산균주중 C₁-cellulase를 강력히 생산하는 균주 *T. viride* QM6a QM9123 QM9414를 분리 개선한 U.S. Army Natick연구소가 가장 활발히 이 연

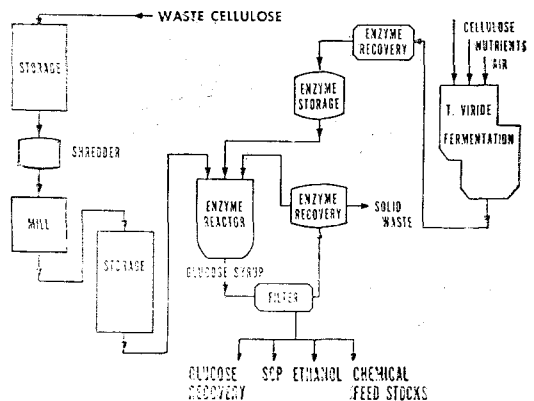


Fig. 4. Enzymatic Conversion of Waste Cellulose

구를 추진중에 있다^{67,73)}. 이들은 *T. viride* QM9123 QM9414로 생산한 cellulase로 순수한 cellulose, 섬유소 폐자원 및 여러가지로 처리한 폐신문지등을 당화시킨 결과 당농도 4.6%의 당화액을 얻어 기질대비 최고 92%의 당화율을 얻었다(Table 3). 또한 기질처리 및 당화조건의 경제적인 방법을 모색하여 준시작공장(pre-pilotplant)의 가동과 함께 1980년대에는 대형공장의 설립이 가능할 것이라고 결론지었으며 현재 가동중인 공장의 flow sheet를 Fig. 4와 같이 제시하였다.

그리하여 막대한 섬유소자원을 energy, 식량, 사료 및 각종 화공약품으로 값싸게 전환시켜 energy원의 고갈이 예견되고 식량문제가 심각해질 것이 확실시 되는 장래에 크게 기여할것이라고 하였다¹¹⁾.

결 론

막대한 양으로 계속 생산되고 있으나 효율적으로 쓰여지지 않는 섬유소 폐자원을 사료, 식량 및 에너지원으로 사용할 수 있는 방법을 개발하는 것이 필요하다. 현재까지 알려진 바로는 섬유소분해효소로서 분해시켜 포도당을 얻는 즉 섬유소의 효소학적당화가 가장 바람직한 방법이라 할 수 있다.

섬유소분해소는 C₁-Cellulase, C_x-Cellulase가 혼존하는 복합효소로서 미생물로서 대량생산이 가능하다. 섬유소의 당화에 가장 중요한 것은 천연섬유소를 효과적으로 분해하는 C₁-Cellulase라 할수 있는데 *Trichoderma viride* C₁-Cellulase생산균주로 가장 우수하다.

천연섬유소내의 lignin함유량 및 섬유소의 결정성 정도가 높으면 분해율이 매우 낮은데 lignin 제거제나 섬유소 팽윤제로서 처리하던가, 분쇄 분말등 물리적인 방법으로서 lignin을 제거하고 결정성을 파괴하던 분해율은 크게 증진된다.

폐신문지 등을 NaOH로 처리하고 ball mill로서 분쇄한뒤 Cellulase로 분해시켜 반응액중에 gluose 함량 2~10%의 당액을 얻었는데 공업화과정에서 문제시되는 것은 아직까지 경제적인 면에서 비싸기 때문이다.

좀더 경제적인 방법으로 섬유소 폐자원을 처리할 수 있고 좀더 강력한 효소를 생산하는 균주가 개발되면 풍부한 섬유소자원으로부터 값싸게 식량, 에너지 자원을 얻을 수 있으며 그 시기는 향후 5년 이내에 성취될 것으로 예측되고 있다.

<1976. 3. 1 접수>

문 헌

1. SPANO, L.A., MEMORIS, J. and MANDELS, M.: U. S.

Army Natick Laboratory Report, (1975).
 2. LOOMIS, R.S., WILLIAMS, W.A. and HALL, A.E.: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **22**, 431 (1971).
 3. REESE, E.T., MANDELS, M. and WEISS, A.H.: *Adv. in Biochem. Engin.*, Vol. 2 p.181 Springer-Verlag, New York, (1972).
 4. REESE, E.T.: Enzymatic hydrolysis of cellulose, *Appl. Microbiol.*, **39** (1956).
 5. JERMYN, M.A.: Fungal cellulase, *Austral. J. Sci.* **5**, 433 (1952b).
 6. WHITAKER, D.R.: Purification of *M. verrucaria* cellulase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **43**, 253 (1953).
 7. WOOD, T.M.: *Biochem. J.*, **10**, 716 (1968).
 8. Report of the Comission on Enzymes of Internat. Union of Biochem. Oxford pergamon press, (1961).
 9. REESE, E.T., SIU, B.G.H. and LEVINSON, H.S.: *J. Bacteriol.* **59**, 485 (1950).
 10. MANDELS, M. and REESE, E.T.: *Development of Industrial Microbiology*, (1964).
 11. BERGHEM, L. and PETTERSON, L.G.: *Eur. J. Biochem.*, **7**, 21 (1973).
 12. ERIKSON, K.E. and PETTERSON, B.: *Proc. Int. Bacterior. Symp.* **2**, 116 (1971).
 13. WOOD, T.M.: *Ferment. Tech.*, p.711 (1972).
 14. LI, L.H., FLORA, R.M. and KING, K.W.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 439 (1965).
 15. BUCHT, B. and ERIKSSON, K.E.: *ibid*, **129**, 416 (1969).
 16. MANDELS, M. and WEBER, J.: *Advances in Chem. Ser.* **95**, 391 (1969).
 17. SELBY, K. and MAITLAND, C.C.: *Biochem. J.*, **104**, 716 (1971).
 18. GRIFFIN, H.L.: *Anal. Biochem.*, **56**, 621 (1973).
 19. KITAMIKATO, T. and TOYAMA, N.: *J. Ferment. Tech.*, **40**, 85 (1962).
 20. GASCOIGNE, J.A. and GASCOIGNE, M.M.: *Biological degradation of cellulose*, London, p.264 (1960).
 21. Mandels, M., HONTÉ, L. and NYSTROM, J.: *Biotech. Bioeng.*, **16**, 1471 (1974).
 22. HALLIWELL, G. and RIAZ, M.: *Arch. Microbiol.*, **78**, 295 (1971).
 23. TOYAMA, N. and OGAWA, K.: *Ferment, Tech.*, p.743 (1972).

24. WOOD, T.K. and McCRAE, S.: *Biochem. J.*, **128**, 1183 (1972).
25. SELBY, K.: *Proc. Int. Biodeterior. Symp.*, **1**, 62 (1968).
26. NISIZAWA, K., MORIMOTO, I. and HASHIMOTO, Y.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 152 (1962).
27. 渡邊 敬: 日醸酵誌, **46**, 299 (1968).
28. *Idem: ibid*, **45**, 303 (1968)
29. HULME, H.A. and STRANKS, D.W.: *Nature*, **226**, 469 (1970).
30. *Idem: J. Gen. Microbiol.*, **69**, 145 (1971).
31. TANSEY, M.R.: *Mycologia*, **63**, 537 (1971).
32. BELLAMY, W. D.: *Biotechnol. Bioengineering*, **16**, 869 (1974).
33. MANDELS, M., WEBER, J. and PARIEZK, R.: *Appl. Microbiol.*, **21**, 152 (1971).
34. MANDELS, M., HONTZ, L. and BRANDT, D.: *Proc. Army Sci. Conf.*, **3**, 16 (1972).
35. MANDELS, M., PARRISH, F. and REESE, E.T.: *J. Bact.*, **83**, 400 (1962).
36. NISIZAWA, T., SUZUKI, H. and MISIZAWA, K.: *J. Biochem.*, **71**, 999 (1972).
37. MANDEL, M., KOSTICK, J. and PARIZEK, R.: *J. Polym. Sci.*, **36**, 445 (1971).
38. REESE, E.T.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, No. 5, p.77 (1975).
39. *Idem: Ibid*, p.92 (1975).
40. The Chem. of cellulose and wood, page 41, (1966).
41. MULETHALER, K.: *Annu. Rev. plant physiol.*, **18**, 1 (1967).
42. ROWLAND, S.P. and ROBERTTS, E.J.: *J. Polym. Sci. A-1* 2447 (1972).
43. MANLEY, R. ST. J.: *Nature*, **204**, 1155 (1964).
44. COWLING, E.B.: *Biotech Bioengin., sym.* Vol. 5, p.163 (1975).
45. FREUDENBERG, K.: *Science*, **148**, 595 (1965).
46. SARKANEN, K.V. and LUDWIG, C.H.: *Lignins*, willey-Inter. (1971).
47. TIMELL, T.E.: *Wood Science and Tech.*, **1**, 45 (1967).
48. HILLIS, W.E.: *Wood Extractive*, A.P. New York (1962).
49. COWLING, E.B.: *Can. J. Bot.*, **44**, 1539 (1966).
50. WARWICKER, J.O., Jeffries, R., Colbran, R.L. and Robinson, R.W.: Shirle Inst. pamphet No. 93 (1966).
51. FEIST, W.C., and TARKOW, H.: *Forest Prod.*, **17**, 65 (1967).
52. FLORY, P.J.: Principles of Polymer Chemistry, p.519 (1953).
53. *ibid.*, p.585.
54. MILLETT, M., BAKER, A.J., and FEIST, W.E.: *J. Animal Sci.*, **31**, 781 (1970).
55. FEIST, W.C., BAKER, A.J. and TARKOW, H.: *ibid*, **30**, 832 (1970).
56. TARKOW, H. and FEIST, W.C.: *Cellulase and Their Application Chem. Ser.* **95**, 197 (1970).
57. BAKER, A.J, MOHAUPT, A.A. and SPINO, D.F.: *J. Amimal Sci.*, **37**, 179 (1973).
58. GREEN, J.W.: *Methods in Carbohydrate Chemistry* Vol. **111**, p. 12. Academic process N.Y. (1963).
59. STRANKS, D.W.: *Forest. Prod. J.*, **11**, 288 (1961).
60. MOORE, W.E., EFFEAND, M.J. and MILLETT, M.A.: *J. Agr, Food, Chem.*, **20**, 1173 (1972).
61. DEHORITY, B.A. and JOHNSON, R.R.: *J. Dairy Sci*, **44**, 2242 (1961).
62. SAEMAN, J.F., MILLETT, M.A. and LAWTON, E.J.: *Ind. Eng. Chem.* **44**, 2848 (1952).
63. MCBURNEY, L.F.: High polymor, Vol. **5**, p.99 Interscience publishers N.Y. (1954).
64. DAVIDSON, G.F.: *J. Textile Inst.*, **34**, 87 (1943).
65. ENTWISTLE, E., Cole, H. and Wooding, N.S. *Textile Res. J.*, **19**, 609 (1949).
66. GREY, W.D.: *World Protein Resources* A.C.S. Publication p.261 (1966).
67. HOTTEL, H.C. and HOWARD, J.B.: New Energy Technology MIT press p.4. (1971).
68. KATZ, M. and REESE, E.T.: Production of Glucose by Enzymatic Hydrolysis of Cellulose, *Appl. Microbiol.*, **16**, 419 (1968).
69. GHOSE, T.K.: *Advances in Chem. Ser.*, **95**, 415 (1969).
70. GHOSE, T.K.: *Biotech. Bioeng.*, **11**, 239 (1969).
71. *Idem: ibid*, **12**, 921 (1970).
72. *Idem: U.S. Patent* 3,642,580 (1972).
73. MANDELS, M. and KOSTICK, J.: *ibid*, **3**, 764, 475 (1973).
74. MANDELS, M.: Microbial Sources of Cellulase, *Biotech. Bioengin. Symposium*, **5**, 81. (1975).