목재공학17(3) : 45~51(原著)
Mogjae Gonghak. 17(3) : 45~51. 1989

목질 재료의 자기가수분해 및 효소당화에 관한 연구 (Ⅲ)*1
—Cellulase 효소의 회수 및 재사용—

조 남 석*2

Autohydrolysis and Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Materials(III) *1
-Recycling and Reutilization of Cellulase Enzyme-

Nam Seok Cho*2

SUMMARY

A major problem in the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates is the very strong bonding of cellulase to lignin and even cellulose in the hydrolysis residues. This phenomenon inhibits recycle of the cellulase which is a major expense of the enzymatic hydrolysis process.

In this paper, autohydrolyzed wood was delignified by two-stage with a 0.3% Na OH extraction and oxygen-alkali bleaching and was subjected to enzymatic hydrolysis with cellulase. 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 97.4%. Even at the third recycle, hydrolysis rate was 86.7 percents. In the case of cellulase recovery by ultrafiltration method, first 2 recycling treatments resulted very high hydrolysis rate(97.0-97.7%). Even the third recycling showed about 94.2%. Authoydrolysis of oak wood followed by 2-stage delignification with alkali and oxygen-alkali produced a substrate for enzymatic hydrolysis that allowed almost quantitative recycle of cellulase.

Keywords : Autohydrolysis, Enzymatic saccharification, Cellulase, Recycle of cellulase, Ultrafiltration, Affinity.

1. 서 론

목재에 소량의 물을 가하고, 고온(180℃—260℃)에서 단시간(1—15분)처리하는 자기가수분해법(1—4)은 저자등이 행한 일련의 연구(5—8)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 효소에 의해 당화하여 식품 및 에너지원으로 이용하려는 연구 또한 많이 이

*1. 接受 1989年 5月 2日, Received May 2, 1989.
본 연구는 1986년도 한국 과학재단의 학술 연구비 지원으로 수행되었음.

*2. 영남대학교 농축산대학 College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea.

루어 지고 있는바(9-12), 이들 cellulose 자원을 효소적으로 가수분해 시키기 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(13-14), 그리고 효소의 생산비가 매우 비싸기 때문에, 어떤 경우는 목질재료의 전처리 비용보다 효소의 생산비가 월등히 높다는 연구(14)도 있다. 그러므로 값비싼 효소를 회수하여 재이용 한다는 사실은 매우 중요한 문제이며, 효소적 가수분해 공정의 경제성을 제고시킨다는 측면에서도 그 기술개발이 시급히 요청되고 있는 실정이다. 효소의 회수와 관련하여 부닥치는 하나의 문제점은 cellulase가 가수분해의 과정에서 cellulose와의 친화성은 말할것도 없지만, 기질속의 lignin성분과도 강한 결합을 하여 회수가 불가능하다는 것이다(15-16),

오늘날 까지 가수분해 반응액에 잔존하고 있는 cellulase효소를 회수하는 방법으로서, 한외여과막을 사용하는 방법(17) , 새로운 기질에 흡착시켜 회수하는 방법(18-21)등이 시도되어 왔으나, 반응시 가하였던 활성의 약 35%밖에 회수하지 못하였다. 본 연구는 효소분해에 사용한 cellulase 를 회수하여 재이용하려는 목적에서 효소의 기질 흡착성을 이용하여 사용한 효소를 최고로 회수하고저 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시수종

공시수종인 신갈나무(*Quercus mongolica*) 는 서울대학교 연습림(백운산)에서 벌채한 38년생의 건전재였다.

2.2 시료조제

2.2.1 공시 목분의 조제

공시수종을 박피 및 건조하고 톱밥을 조제한 후, 분쇄기로서 40-60mesh의 목분을 조제하였다.

2.2.2. 자기가수분해 처리

자기가수분해는 스텐레스 스틸제 45㎖ 용량의 SS Parr reaction autoclave를 사용하여 195℃에서 20분간 처리하였다.

2.4.2. 자기가수분해 시료의 완전 탈리그닌

자기가수분해한 시료를 Fig. 1의 Scheme에 따라 제 1단 처리(알칼리 처리, 약품 : 0.3% 가성소오다, 액비=1 : 10, 반응 온도 및 시간 : 70℃, 2hr)및 제 2단 처리(산소-알카리 처리, 산소 초기압 : 10㎏/㎠, 반응 온도 및 시간 : 120℃, 1hr, 알칼리 부하 : 10%)처리하여 리그닌 함량 0.03%의 시료를 조제하였다.

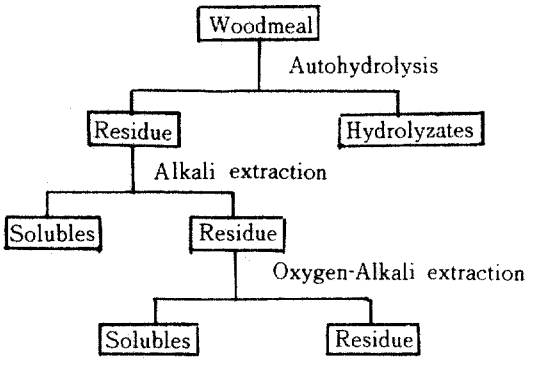


Fig. 1. Three stage fractionation.

2.6.1 효 소

Trichoderima viride 및 *Aspergillus niger*로 부터 유래된 cellulase를 사용

2.6.2. 효소분해

소정의 시료와 일정 농도의 효소를 30㎖의 L형 삼각 후라스크에 넣고 40℃에서 산도 4.5의 sodium acetate 완충용액을 가하여 소정시간 동안 효소분해를 행하였으며, 그 후 당화 잔사를 glass filter 1G4를 사용, 여과하고, 이를 105℃의 전기 항온 건조기에서 항량이 될때까지 건조, 평량하여 다음식에 의거하여 가수 분해율을

구하였다.

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

2.6.3 환원당의 측정

시료 1 g과 일정 농도의 효소를 70mℓ용량의 삼각 후라스크 혹은 L형 후라스크에 넣고 40℃에서 pH 4.5의 sodium acetate의 완충용액을 가하여 효소분해를 행하였으며, 생성되는 환원당을 Somogyi-Nelson법(22)으로 측정하였다.

2.6.4 효소 활성의 측정

pH 4.5의 0.1M sodium acetate 완충용액을 사용하여 40℃에서 다음과 같은 방법(23)으로 측정하였다.

(1) Endo-β-1,4-glucanase(CMCase) : carboxymethyl cellulose(CMC)1% 수용액 0.5mℓ에 완충용액 0.4mℓ를 가하고, 5분간 예열한 다음, 0.012%의 효소용액 0.1mℓ를 가해 10분간 진탕, 반응시켜 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson법으로 정량하였다.

(2) Cellobiohydrolase(Avicelase) : avicel 200mg을 기질로하여 효소농도 0.00436%가 되도록 전용액량을 11mℓ로하여 1시간 반응시켜, 생성되는 포도당을 Somogyi-Nelson 법으로 정량하였다.

2.7 효소의 회수 및 재사용

2.7.1. 한외여과에 의한 방법

자기가수분해후 알카리, 산소—알카리로 완전 탈리그닌한 시료 1.17 g을 조효소 0.375 g을 포함하는 pH 4.5의 acetate완충용액 50mℓ에 넣고, 45℃의 진탕항온기에서 30시간 가수분해를 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.

이 여과액을 Fig. 2에서 보는 바와 같이 한외여과(membrane:Amicon 5 PM 10, cut-off level, 10,000)하여 얻은 50mℓ의 효소액을 새로운 효소를 넣지 않은채 다음의 가스분해를 실시하였다.

2.7.2 친화크로마토 그래피에 의한 방법

최초의 효소적 가스분해는 전술한 한외여과법과 동일하게 수행하며, 최초의 가수분해후 glass filter를 사용하여 잔사와 여별한 가수분해액을

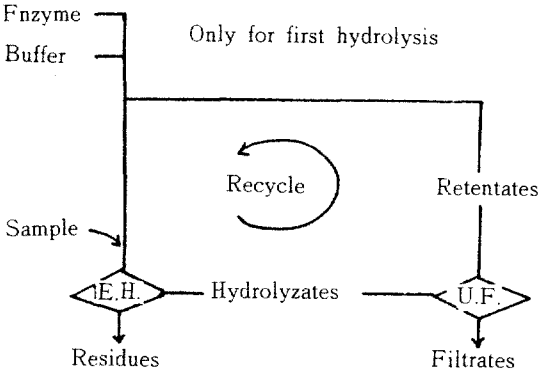
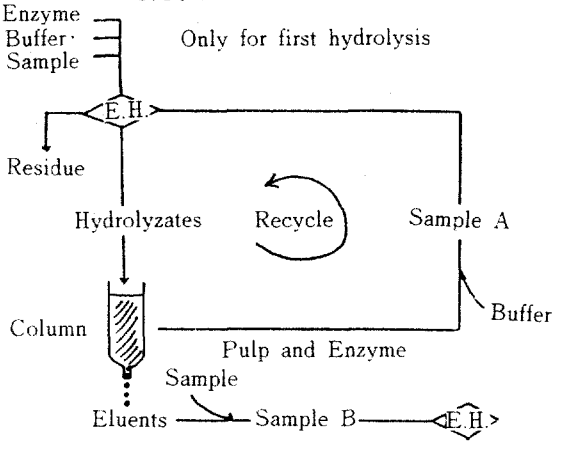


Fig. 2. Recycle of enzyme by ultrafiltration.
E. H. : Enzymatic Hydrolysis
U. F. : Ultrafiltration



E. H :Enzymatic hydrolysis

Fig. 3. Recycle of enzyme by its affinity to cellulose.

포함하는 효소용액을 한외 여과 장치에 넣지 아니하고, Fig. 3에서 보는 바와 같이 1.17 g의 시료를 채운 칼럼을 통과 시킨다. 그리고 칼럼으로 부터 시료를 꺼내 새로운 효소를 가하지 않은 50mℓ의 acetate 완충용액을 가하여 동일한 조건에서 가수분해를 행하였다. (sample A). 2번

재 시료에 가수분해액을 넣고 흘러나오는 유출액의 효소 활성을 조사하기 위하여 유출액 50mℓ에 시료 1.17 g을 넣고 동일한 조건에서 가수분해 하였다. (SampleB)

3. 결과 및 고찰

3.1 완전 탈리그닌 처리시료의 효소분해 특성

전보(2-5)에서 보는 바와같이 자기가수 분해처리의 경우, 시료의 효소당화율은 180℃ 처리시 71.6%-83.5%을, 195℃에서는 90.3-96.3%의 높은 당화율을 결과하였다. 가수분해 온도가 210℃로 높아지면 당화율은 약 94%를 기록하였다. 이와같은 결과는 자기가수 분해처리만으로도 목재의 조직이 이완되었고, 특히 셀룰로오스 부분의 결정영역이 파괴되어 효소적 당화반응이 순조롭게 일어나는 것으로 생각된다.

그러나 셀룰로오스의 효소분해에 있어서 효소가 기질에 대한 친화성 내지 흡착으로 인하여 효소의 회수 및 활성이 크게 저하되고 있는바, 셀룰로오스와 결합된 효소의 경우에는 큰 문제가 되지 아니하지만 리그닌이 소량이라도 존재하면 효소의 손실을 초래하고 효소의 활성을 저하시키는 고로 가능한한 리그닌을 제거할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 Fig. 1에서 보는 바와같이 알카리 및 산소-알카리에 의한 2단계

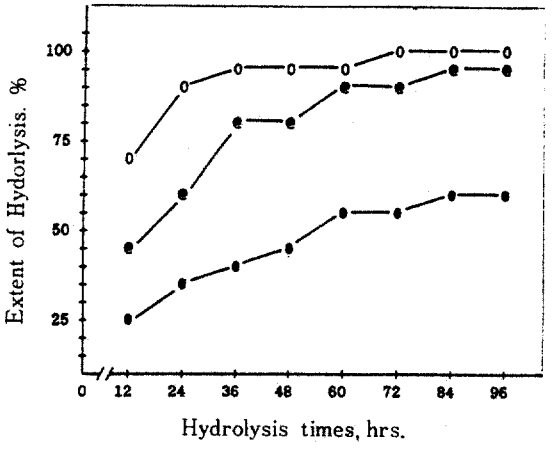


Fig. 4. Effect of autohydrolysis on enzymatic hydrolysis.
○:Delignified autohydrolyzed wood
@:Autohydrolyzed wood
●:Whatman No.2 filter paper(20-60 meshes)

탈리그닌 처리를 행하여 효소적 당화를 실시하였다.

Fig. 4는 탈리그닌된 자기가수분해 처리재의 효소적 당화처리의 결과로서 탈리그닌 하므로서 99.5%의 높은 당화율을 결과하였다. 가수분해 처리만 한 시료 및 20-60 meshes로 분쇄한 여과지의 경우 각각 96.3%, 61.5%의 당화율을 결과하였다. 여기에서도 리그닌이 거의 없는 여과지의 경우, 효소분해율이 매우 낮은데 비하여 리그닌이 그대로 포함되어 있는 자기가수분해 처리재의 효소분해율이 이처럼 높다는 사실은 리그닌 그 자체보다도 전처리 과정에서 셀룰로오스기질의 표면 혹은 내부에 어떠한 변화가 일어났는가 하는것이 중요한 인자임을 알수 있다.

3.2 효소의 회수

3.2.1 한외여과에 의한 방법

산소-알카리 처리에 의해 완전 탈리그닌된 자기가수분해 목분을 0.375 g의 셀룰레이스를 포함하는 산도 4.5의 Acetate buffer 50mℓ에 넣고 45℃의 진탕 항온기중에서 30시간 가수분해를 행하였다. 가수 분해된 당액은 glass filter를 사용하여 여별하였으며, 잔사는 상기와 동일한 Acetate buffer 용액 및 증류수로 세척하여 여액과 세척액을 합치고, 증류수를 가하여 500mℓ로 하였다.

이와같이 준비한 희석한 여액은 한외여과기(membrane:Amicon 5 PM 10, Cut off level : 10,000)를 사용하여 여과하여 당을 분리하고, 잔사인 효소용액 50mℓ를 Acetate buffer용액으로 250mℓ가 되도록 희석하고 다시 50mℓ가 되도록 농축하여 Fig. 2에서와 같이 새로운 셀룰레이스

의 첨가없이 다음단계의 효소분해에 사용하였다.

가수분해 당액의 한외여과는 실온에서 실시하였으며, 희석과 여과를 3회 반복하였다. Fig. 5는 회수된 효소의 가수분해 결과를 나타내는 것으로서 1차 회수의 경우 97.7%의 높은 가수분해율을 기록하였고, 2차 회수에 있어서도 97.0%, 3차 회수의 경우 94.2%의 비교적 높은 가수분해율을 보여주었다.

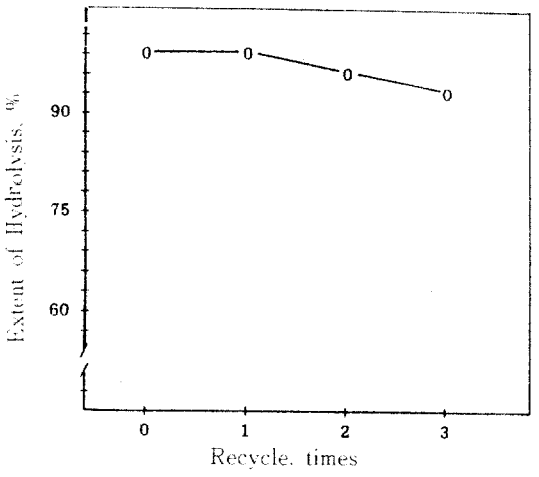


Fig. 5. Enzymatic hydrolysis of delignified autohydrolyzed wood using cellulase enzyme recovered by ultrafiltration method.

3.2.2 친화크로마토 그래피에 의한 방법

최초의 효소적 가수분해는 전기한 방법과 동일하게 실시하며, 1차 효소처리후 가수분해물(당액)을 포함하는 효소요액을 glass filter를 사용하여 잔사로부터 분리하고, 효소를 분리하기 위하여 전기와 같이 한외여과기를 사용하는 대신에 Fig. 3에서 보는 바와 같이 가수분해하여야 할 시료가 충진된 칼럼을 통과시켰다. 이 시료를 Acetate buffer 10ml로 세척하고, 칼럼으로부터 꺼내어 신선한 효소를 가하지 않은채, 50mℓ를 가하여 효소분해를 행하였다.(Sample A).

한편, 칼럼을 통과한 유출액중에 잔존하는 효소활성을 측정하기 위하여 전기와 동일한 양의 시료를 사용, 유출액으로 가수분해를 행하였다(Sample B). Fig. 6에서 보는바와 같이 제1차 회수 효소의 가수분해율은 97.4%로서 매우 높았으며, 2차 회수의 경우 또한 94.2%의 가수분해율을 결과하였고, 제 3차에 있어서도 86.7%로써 효소의 활성이 아직 상당히 높게 나타났으며, 한외여과에 의한 효소의 활성에 비해서는 급격한 감소를 결과하였다. 이와같은 효소활성의 일실은 효소적 가수분해 조건에서의 효소의 불안정성에서 기인되었다기 보다는 오히려 효소의 불완전한 회수가 주원인인 것으로 생각된다. 이러한 토론의 근거로서는 Sample B의 시료를 사용하여 상기와 동일한 조건에서 측정된 효소

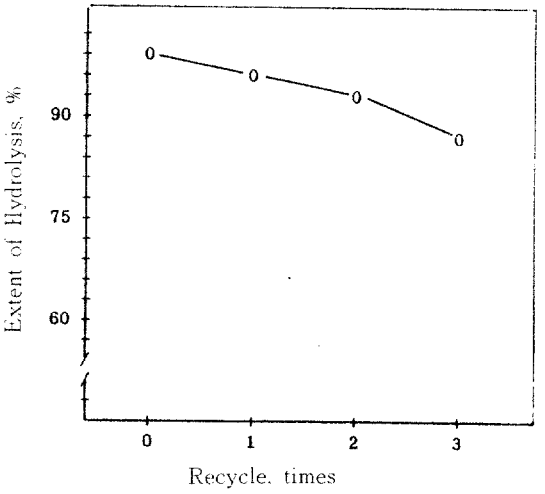


Fig. 6. Enzymatic hydrolysis of delignified autohydrolyzed wood using cellulase enzyme recovered by affinity method.

적 가수분해율이 19.0%로서 상당량 셀룰레이스가 남아있다는 것을 알 수 있었다.

3.2.3 회수에 의한 효소의 활성 변화

탈리그닌된 가수분해 처리 시료를 전술한 바와 같이 친화크로마토 그래피에 의한 방법으로 회수하여 재 사용할 경우, 효소의 활성이 어떻게 변화하는가를 알기 위하여 효소활성 가운데 Endo-β-1,4-glucanase(Cx[(MCase] 및 Cellobiohydrolase(Avicelase) 의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 1과 같다.

표에서 보는 바와 같이 셀룰로오스 분해효소의 활성은 회수가 반복되더라도, 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 효소분해시 셀룰라제의 활성은 분해 온도, 진탕 및 기질에의 효소 흡착 등의 원인으로 저하하는 것이 일반적인 사실로 인정되고 있으나, 본 실험에서 이와같이 활성변화가 거의 없는 것은 자기 가수분해를 받은 시료의 셀룰로오스가 고도로 효소분해되기 적절한 상태로 되어 졌거나, 시료중의 리그닌이 완전히 제거되어 리그닌에 의한 효소의 흡착 및 활성 감소가 일어나지 아니하였다는 사실과, 리그닌이 거의 없는 시료이었기 때문에 fresh enzyme을 첨가할 당시 충분한 량(예를들면, 0.32 g cellulase in 50㎖ 완충용액/1 g 기질)을 가하였기 때문인 것등으로 생각된다.

여 효소분해율 및 효소의 회수율을 비교한 결과 두 방법 모두 높은 효소분해율을 기록하였고, 효소를 3회까지 재이용 하더라도 전자의 경우 94.2% 후자의 경우 86.7%의 가수분해율을 나타냈다. 그리고 회수효소의 활성에 있어서도 회수를 반복하더라도 활성저하가 거의 인정되지 아니하였다. 따라서 완전 탈리그닌 시킨 자기 가수분해 처리 시료를 사용한 효소적 당화에 있어서, 친화 크로마토그래프법에 의하여 효소의 회수를 거의 정량적으로 달성할 수 있었다.

Table 1. Enzyme activity of cellulases after recycling.

Activity	Carboxy methyl cellulose μ mole Glc/mg. min.				Avicel μ mole Glc/mg. h			
Recycle time	0	1	2	3	0	1	2	3
Cellulase Onozuka	4.10	4.11	4.09	4.09	14.3	14.3	14.6	14.0
Cellulosin	6.42	6.40	6.33	6.36	3.02	3.0	2.94	2.90
Mixture	5.30	5.26	5.27	5.25	13.5	13.1	12.8	12.9

4. 결 론

목질계 셀룰로오스 자원의 효소분해시, 일어나는 주요한 문제가운데 하나는 cellulase가 효소적 당화 과정에서 기질속의 lignin 및 cellulose와 강하게 결합을 형성하여, 효소를 회수하는 과정에서 회수를 방해하기도 하고, 때로는 효소의 회수율을 떨어트리고, 효소 자체의 활성을 저하시키기도 한다.

본 연구에서는 cellulase효소의 회수와 관련하여, 알카리 및 알카리-산소로 거의 완전하게 탈리그닌 시킨 자기 가수분해 시료를 사용하여, 한외여과법 및 친화 크로마토그래피법을 적용하

참 고 문 헌

1. Tanahashi, M.& T. 1983. Higuchi, Characterization of explosion wood(I). Wood Research 69:36-51
2. Tanahashi, M. 1983. Biomass & Biotechnol. 4:1-9
3. Tanahashi, M. & T. Higuchi, 1985. Steam explosion process for wood and its development, Japan Tappi 39(1):118-127
4. 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.
5. Cho, N. S. 1989. On the enzymatic hydrolysis of autohydrolyzed mixed hardwoods, J. Resource Development, Yeung-

nam Unvi., 8(1):73-78

6. Cho, N.S. 1989. Autohydrolysis and enzymatic Saccharification(I). J. Korea Tappi(in press)
7. Cho, N.S. 1989. Autohudrolysis and enzymatic Saccharification(II). J. Korea Tappi(in press)
8. Cho, N.S., Y. Matsumoto, and H-m. Chang. 1988. An improved enzymatic hydrolysis of mixed hardwood polysaccharides. Kasan Theses Collection p. 323-328
9. Toyama, N. and K. Ogawa. 1975. Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser. 5:225-244
10. Shimizu, K., K. Sudo, S. Nagasawa and M. Ishihara. 1983 Mokuzaigakkaishi 29: 428-437
11. Tanaka, R., E. Muraki, F. Yaku and T. Koshijima. 1980. Cellulose Chem. Technol. 14:859-868
12. Muraki E., F. Yaku, R. Tanaka and T. Koshijima. 1982. Mokuzai gakkaishi 28:122-128
13. Wilke, C.R., R. Yang & U. Stocker. 1976. Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser. 6:155-175
14. Shimizu, K. 1981. Development of Fuels & Chemicals from Biomass. Fuji Technosystem 275
15. Sinitsyn, A.P., H.R. Bungay & L.S. Clesceli. 1983. Biotechnology and Bioengineering vol. XXV. p. 1393
16. Jiang, J., H-m. Chang, S.S. Bhattercharjee and D.L.W. Kwoh. 1986. Proceedings of the 1986 Tappi R & D Conference, Raleigh, NC, Sept.
17. Toyama, N., K. Ogawa and H. Toyama. 1978 Syposium on Biosymthesis and Biodegradation of Cell Wall Component. ACS/CST Chemical Congress, Honolulu, Hawaii
18. Blotknap, P.J. and G.H. Emert. 1980. U.S. Patent 4,220,721 [Chemical Abst. 93.236977]
19. Castanon, M. and C. R. Wilke. 1980. Biotechnol. Bioeng. 22:1037-1053
20. ..... 1981. Ibid. 23:1365-1372
21. Fujishima, S.,F. Yaku and T. Koshijima. 1986. Recovery and reutilization of cellulases used for the hydrolysis of woods(III). Mokuzaigakkaishi 32:119-124
22. Somogyi, J., J. 1952. Biol. Chem. 195:19
23. Fujishima, S., F. Yaku & T. Koshijima. 1987. Recovery and reutilization of cellulases used for the hudrolysis of woods(IV). Mokuzaigakkaishi 33(6):530-533