

섬유소의 가수분해에 대한 기술 개발 모색(1)

박주정·박성화·강성주·김진환·박돈희
전남대학교 공과대학 화학공학과

A Technique for Increasing Cellulose Hydrolysis

Ju-Jung Park, Sung-Hwa Park, Sung-Ju Kang, Jin-Hwan Kim and Don-Hee Park
Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Kwangju
500-757, Korea

ABSTRACT

A novel pretreatment of rice straw has been developed to increase the reactivity of cellulose, in particular to increase the rate and extent of cellulose enzymatic hydrolysis. This technique is called ammonia-freeze-explosion method and relies on treatment of the lignocellulosic material with a volatile liquid under pressure followed by pressure release to evaporate the liquid and reduce the temperature by Brue E. Dale of Texas A & M University. Volatile liquids which also chemically explosion and swell lignocellulosic materials are particularly effective when used in this technique. Above four times of conversion of cellulose to glucose has been achieved by enzymatic hydrolysis of rice straw with this method.

서 론

풍부한 자원의 하나인 Biomass를 이용하여 연료나 화학공품을 얻어내는데 최근 수년동안 전세계적으로 연구를 집중시켜 오고 있다. 이것은 70년대에 두번의 오일과동을 겪고, 미래의 자원확보 방안을 검토함으로써 Biomass의 가치에 대한 인식이 높아지게 되었다.

Biomass를 유용한 물질로 전환시키기 위해서는 간단하게 3단계의 공정이 필요하다. 그중 제1단계는 Biomass가 함유한 섬유소를 가수분해하여 포도당을 얻는 공정이다. 제2단계는 얻어진 포도당을 발효시켜 알코올을 얻는 것이다. 마지막으로 3단계는 생성된 알코올을 불순물과 분리하여 고순도 알코올을 만드는 공정이다. 여기서 각 단계의 공정을 살펴볼때 2단계, 3단계의 방법이 경제적으로 만족되는 공정이라 하더라도 제1단계의 효율과 경제성이 없으면 전반적으로 가치가 크게 낮아진다.

본 연구에서는 그러한 점들을 감안하여 국내에서 생산해서 폐기되는 700만톤(1)의 벚짚을 이용하여 자원화시키는 데 있다. 벚짚을 자원화시키기 위해서는 벚짚속의 섬유소를 가수분해시켜 포도당을 만드는 방법을 개선하

여 당화효율을 극대화시켜야 한다. Biomass 속에 있는 섬유소를 가수분해시키기 위한 전처리방법(2)은 재래적으로 물리적인 방법인 분쇄, 압출, 팽창, 열분해처리 등과 화학적전처리 방법인 산, 염기, 기체처리, 용매추출 처리등, 그리고 복합적으로 처리하는 방법들이 연구되어 오고 있다. 그러나 팔목할만한 방법은 아직도 얻어내지 못하고 있다. 본 연구에서는 액체암모니아를 고압으로 생물반응기에 주입시켜 벚짚과 반응시킨후 그것을 원료(Lignocellulosic materials)로 하여 효소적 가수분해하는 방법을 도입하였다. 재래의 방법보다 당화율을 개선시키는 방법이다.

재료 및 방법

효소

사용효소는 *Trichoderma viride*의 배양액을 농축한 산업용효소인 Cellulase의 Sigma 제품의 세종류(① C-0898, 100units, Lot 72F-4005 ② C-0898, 100units, Lot 96F 4028 ③ C-2274, 10,000 units, Lot 54F 0130)와 BDH 제품(Prod-39074, 0.02 EU per mg)이었다. β -Glucosidase는 Sigma 제품(G-0395, 500units, Lot

29F-4000)을 사용하였다.

기질

본 실험에서 사용한 원료(Lignocellulosic material)는 충남 천원군 성거와 전남 화순군 사평에서 채취한 볏짚을 사용하였다. 채취된 볏짚은 절단기를 사용하여 2-3 cm 정도의 크기로 절단하고, 건조기에서 하룻동안 두었다가 불밀로 분쇄하여 120 mesh 통과된 것을 원료로 삼았다. 본 실험의 기질은 Fig. 1의 실험장치에서 암모니아-냉동-파열법(Ammonia-Freeze-Explosion Technique: AFEX)으로 전처리하여 얻은 물질로 실험을 하였다.

액체 암모니아

액체암모니아는 시중에서 공급되고 있는 150 lb 봄베의 Anhydrous ammonia를 사용하였으며 순도는 99.5% 이상이다.

실험 장치

실험장치의 개략도는 Fig. 1과 같다. 본 실험에서 사용한 장치는 일본 Taiatsu glass 사가 제작한 고압 반응기이다. 이 반응기는 온도와 압력 그리고 교반기의 회전 속도를 임의로 조절할 수 있으며 섬유소 가수분해반응에 매우 적합한 장치이다.

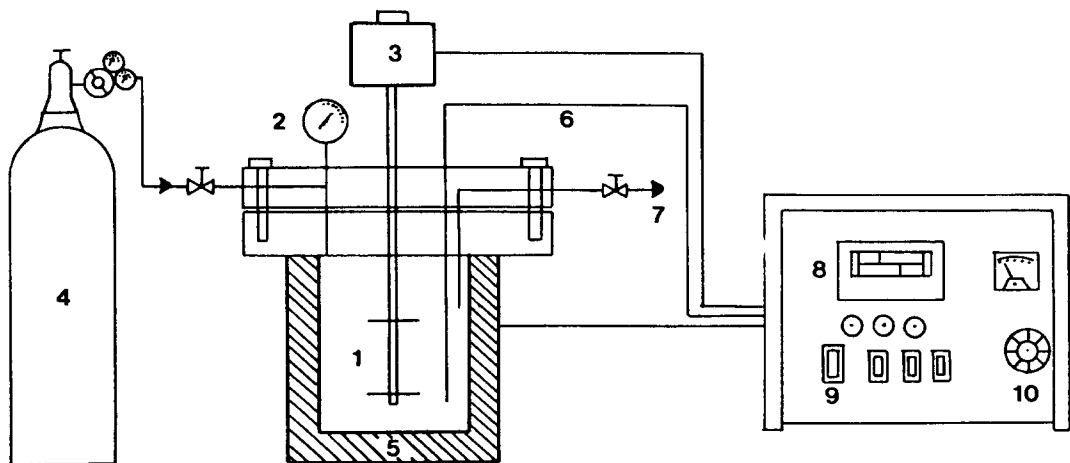
실험 방법

볏짚 120 mesh 통과 400 g을 고압반응기(1)에 넣고,

교반(200 rpm)을 시키면서 온도를 45°C로 고정시킨후 액체암모니아 봄베(4)의 밸브를 열어 액체 암모니아가 섬유소와 접촉하여 15-30분정도 반응시킨후 액체암모니아 주입을 막고 배기선(Vent)(7)을 열어 액체 암모니아가 암모니아 기체로 분출되어 나가도록 한다. 이때 액체 암모니아가 기체 암모니아로 되기 위하여 기화열이 필요하므로 반응온도 45°C에서 약 영하 20°C로 떨어진다. 전처리의 시간이 경과된후 섬유질고체에서 암모니아 냄새가 완전히 사라진후 시료병으로 옮겨 필요할때 사용한다. 본 실험에서 행한 전처리 공정을 암모니아-냉동-파열법(AFEX)이라 부르며 미국의 Dr. Bruce E. Dale (3)의 연구에서 착안하였음을 밝힌다. Dale 교수는 암모니아-냉동-파열법(AFEX)을 사용하여 전초의 일종인 Alfalfa를 전처리하여 당화실험을 하였다.

당화실험

AFEX 법으로 전처리된 시료를 100 mg 취하여 0.1 M Citric buffer 용액 2 mL에 혼합(S), 그리고 미리 0.1 M Citric buffer 용액 50 ml에 필요한 양의 효소를 희석시켜 놓은 혼합액(E)의 4 ml을 S 용액에 재혼합하여 37°C로 고정시킨 200 rpm의 진탕배양조(Blue M, No. 2813189, USA)에서 효소가수분해 반응 실험을 하였다. 정해진 시간에 따라 배양조의 시료를 취하여 분석용 시료를 삼았다.



- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| 1. High pressure reactor | 6. Thermometer |
| 2. Pressure indicator | 7. Vent line |
| 3. Agitator | 8. Temperature controller |
| 4. NH ₃ gas | 9. Power switch |
| 5. Heater jacket | 10. Rpm controller |

Fig. 1. Apparatus diagram of cellulose hydrolysis experiment.

분석 방법

섬유질 시료의 결정도를 찾기 위하여 X-선 회절 굴절기(Ridaka X-ray Diffractometer, 30KV, Ni-filter, Japan)를 사용하였다. 또한 표면구조 분석은 전자 현미경(JEOL, JSM-35C Scanning Electron Microscope, Japan) 사진을 찍어 보았다. 벚짚의 성분분석은 Tappi 법(4)(T12 os-75, T15 os-58, T203 os-74, T222 os-74)으로 하였다. 효소분해로 생성된 환원당은 G. L. Miller (5)의 Dinitrosalicylicacid (DNSA) 법으로 정량하였고 효소 역가 측정은 M. Mendels (6)의 여과지 활성도법(Filter paper activity)으로 하였다. 이때 사용한 여과지는 Whatmann No.1 이다. 분석실험에서 사용한 분광광도계(UV-160, P/M 204-04550 Shimadzu, Japan)이었으며 환원당의 흡광도는 550 nm 파장에서 읽었다.

결과 및 고찰

원료 분석 결과

본 실험에서 사용한 벚짚(Lignocellulosic material)의 조성은 Table 1 과 같다. Table 1의 섬유소 함량은 40.69%으로서 E. Cowling (7)와 Linko. M (8)이 발표한 32.1%보다 많으며 국내 김우식, 유인상(9) 박사가 발표한 48.2%보다는 적은 결과를 얻었다. 또한 Cowling 과 Linko 의 연구결과에 의하면 목재와 비목재원료의 섬유질구성비에서 Hemicellulose 와 리그닌이 많기 때문에 포도당으로 전환되는율이 적어지는 결과를 가져온다. 본 실험에서 사용한 벚짚의 품질은 다른 Biomass 재질보다도 포도당으로 가수분해시키는데 좋은 원료로 사료된다.

AFEX 처리와 비처리의 비교

본 실험에서 AFEX 법으로 처리된 원료를 결정도와 표면현상을 관찰하기 위한 X-ray 회절 분석결과와 전자현미경으로 찍은 사진은 Fig. 2와 Fig. 3b와 같다. Fig. 2에서 A 곡선은 Sigma의 상품화된 Avicel 섬유소로서 120 mesh 통과된 것이다. B 곡선과 C 곡선은 AFEX 처리되지 않은 것과 처리된 것인데 서로간에 미소한 강도의 차이를 보여주고 있어 본 벚짚에서의 결정도는 포도당으로 전환되는데 큰 영향이 없다고 본다. Fig. 3a와 Fig. 3b는 전자현미경으로 찍은 사진으로 500배

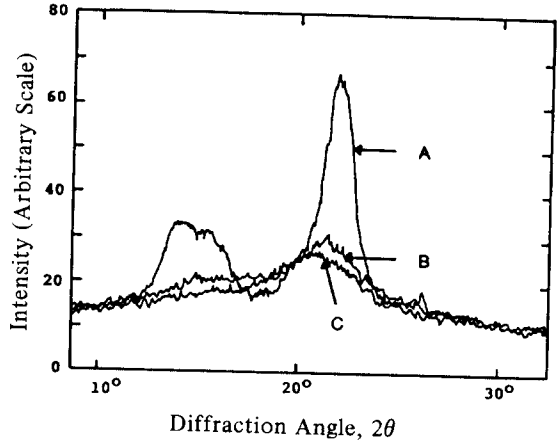


Fig. 2. X-ray diffractograms of lignocellulosic material. A: Avicel cellulose, B: Rice straw material, C: AFEX treated rice straw material

확대하여 본 사진인데 Avicel의 섬유소(Fig. 3a 상)는 사람의 골과 같이 보여지며 나머지 사진들은 엷비슷하게 보여지나 처리된 것과 처리되지 않은 것을 관찰할때 처리된 사진에서 입자들이 파편처럼 파열된 것과 같이 보여지고 있다. 이것이 효소가 섬유소와 반응하여 가수분해되는데 큰 영향을 미치게 되는것으로 보여지고 있다.

효소 가수분해 결과

섬유소를 분해하기 위하여 Cellulase 와 β-glucosidase를 사용하였고, 실험에 사용한 시약들의 활성도는 Table 2에 나타냈다. Table 2에서 A는 Cellulase의 여과지 활성도가 0.48로 B보다 낮았다. 섬유소의 분해속도를 증가시키기 위하여 Cellulase 양을 시료중에 2mg/ml에서 3mg/ml로 늘렸으며 또한 복합적으로 β-glucosidase 양도 1mg/ml에서 1.5mg/ml로 첨가하였다.

상기 실험조건에서 얻은 결과들은 Fig. 4~7이다. Fig. 4는 Cellulase 2mg/ml이고 영국의 BDH 제품을 사용하였으며 AFEX 전처리된 벚짚과 상품화된 순수 섬유소 Avicel이다. 섬유소 분해속도와 환원당 생성량을 비교하면 약 2배 정도 전처리된 것이 상승되고 있

Table 1. Analysis of rice straw.

Component	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Ash	Moisture
Percent of wet weight	40.69	24.31	13.0	12.5	9.5

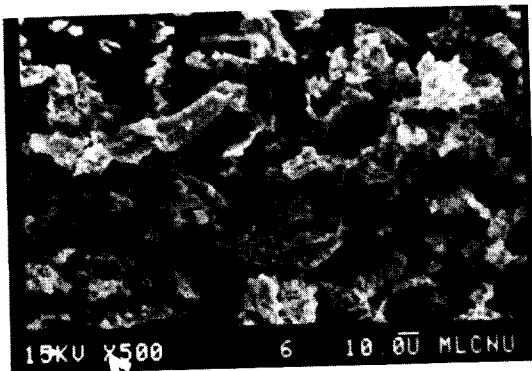
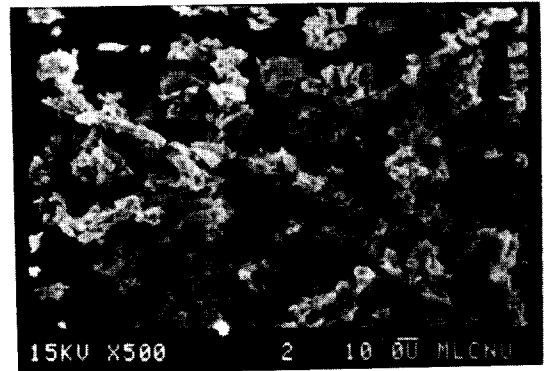
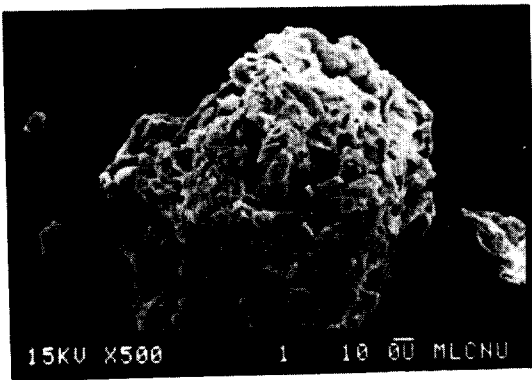


Fig. 3a. Electron microscope photos of ligno-cellulosic material. Above: Avicel-cellulose, Below: Untreated rice straw

Fig. 3b. Electron microscope photos of ligno-cellulosic material. (AFEX-treated rice straw)

음을 알 수 있다. Fig. 4의 결과로 두 재료를 평가하면 Fig. 2의 결정도에 따른 결과라고 예측할 수 있으나 Fig. 5의 그림을 살펴보면 전처리하지 않은 볏짚을 같은 조건에서 실험한 결과인데 Avicel의 당화량과 큰 차이

를 보이지 않고 있어 본 실험에서 사용한 볏짚에서의 결정도가 당화율에 미치는 영향은 거의 없다고 볼 수 있다. 또한 사진은 Fig. 3의 표면 비교에서도 결정에 따른 특별한 구조가 보이지 않고 있다.

Table 2. Filter paper activities of experimental enzymatic condition.

Enzyme Condition (mg/mL)	A	B	B+C	B+C	D+C
	2	2	2+1	3+1.5	2+1
Activity (IU/mL)	0.48	0.67	0.90	1.12	3.3

- A : Sigma(Lot 72F 4005, No. C-0898)
- B : Sigma(Lot 96F 4028, No. C-0898)
- C : Sigma(Lot 29F 4000, No. G-0395)
- D : Sigma(Lot 54F 0130, No. C-2274)

Lee와 Fan(10)의 이론으로 보면 Amorphous cellulose가 포도당으로 전환되는 2개의 경로를 설명하고 있는데 하나는 Amorphous cellulose가 Cellobiose를 거쳐 포도당으로 가는 것이고 이때 경로마다 작용되는 효소는 Endo- β -glucanase(EC 3.2.1.4)와 β -glucosidase(EC 3.2.1.31)이다. 또 다른 하나의 경로는 Amorphous cellulose가 Exo- β -1,4-glucan glucohydrolase 효소에 의하여 직접 포도당으로 분해되는 경로이다. 이 경로들을 관찰하기 위하여 실험결과를 비교한 그림이 Fig. 6~7이다. Fig. 7은 Cellulose와 β -glucosidase의 양을 증가시켜 가면서 실험한 결과로서 Lee와 Fan이 설명한 경로를 그대로 따르고 있음을 알 수 있으며 전환된 환원당(6.2g/l)의 양도 처리되지 않는 값(1.44g/l)보다 대략 3배의 당화 효과를 보이고 있음을 알 수 있다. 또한 본 실험에서 사용한 원료속의 섬유소 양이 약 6.78g/l

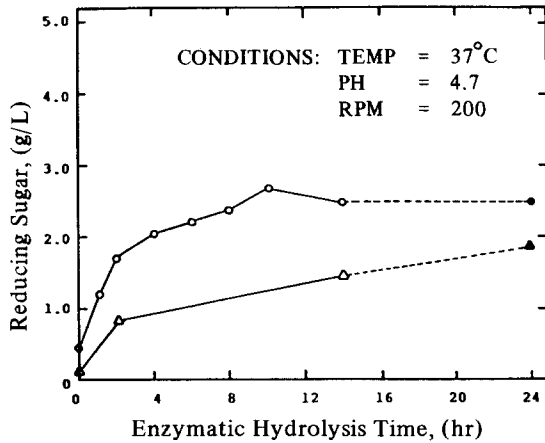


Fig. 4. Reducing sugar yields with various substrate condition in enzymatic hydrolysis reaction. ○: Treated rice straw, △: Avicel

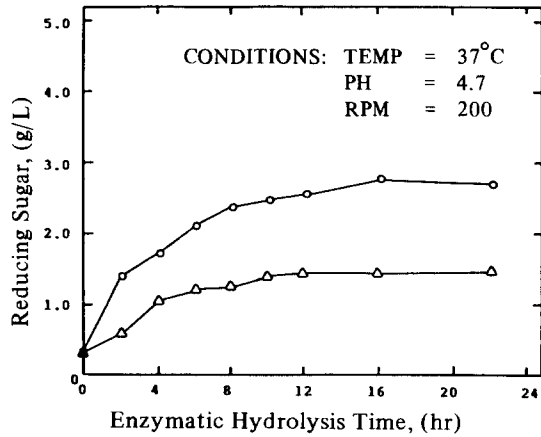


Fig. 6. Effects of AFEX treated (○) and untreated rice straw (△) in enzymatic hydrolysis reaction.

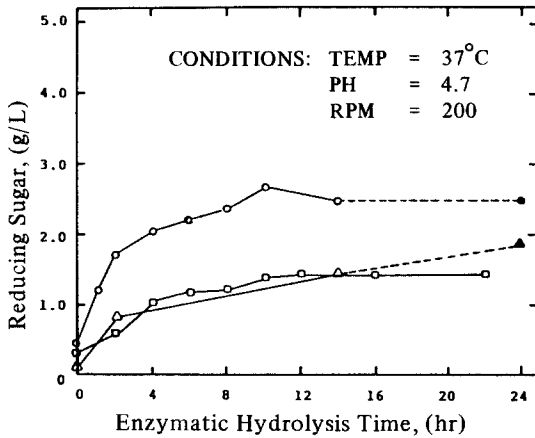


Fig. 5. Reducing sugar yields with various substrate condition in enzymatic hydrolysis reaction. ○: Treated rice straw, △: Avicel, □: Untreated rice straw.

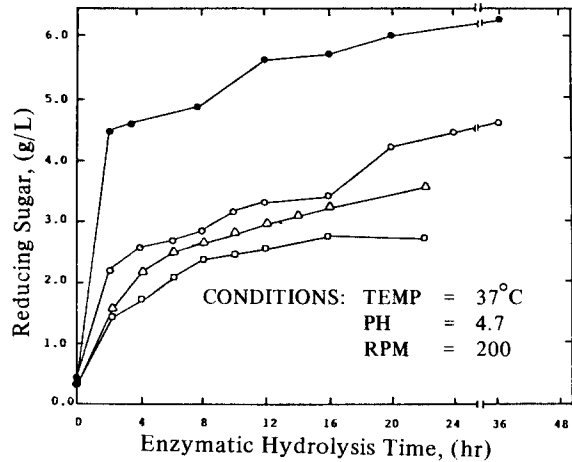


Fig. 7. Reducing sugar yields with various enzyme amount in hydrolysis reaction.: Enzyme activity 1.12 IU/mL, Enzyme activity 0.91IU/mL, Enzyme activity 0.67IU/ml, Enzyme activity 3.31IU/mL.

이고 10,000 unit의 효소로 가수분해 하였을 경우 36시간에서 6.20 g/l이므로 70%의 당화율을 얻을 수 있었고, 10,000 unit의 효소를 사용하였을때 6.20 g/l로 약 91.4%의 당화율을 얻었다. Dale (11)과 Kim (12)의 결과와 비교하여 보면 당화율의 약간의 차이가 있는데 Dale과 Kim이 사용한 효소의 역가를 보면 86 IU/g-dry fiber와 30 unit/ml으로 큰 차이가 있어 역가가 높은 효소를 사용하면 대단히 좋은 효율을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

요 약

본 연구에서는 매년 700여만톤 생산되는 볏짚을 자원화 하기 위하여 암모니아-냉동-과열법(AFEX)을 사용하였다. AFEX으로 전처리된 볏짚은 처리되지 않은 것보다 대략 4배 이상의 가수분해율을 얻을 수 있었다. 또한 어떠한 전처리 방법보다도 처리하는 과정이 쉽고 당화율도 90%로 이상이며, 경제성이 높다.

감 사

본 연구는 1988년도 전남대학교 학술조성 연구비의 지원으로 수행되어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 농림통계 연보(1988), 농림수산통계연보 p 102, 농림 수산부.
2. 박정극(1989), 생물화공, **3** (1), p 30, 한국화학공학회 생물화공부문위원회.
3. Bruce E. Dale and Maria J. Moreira(1982), *Biotech. & Bioeng. Symp.*, **12**, 31-43.
4. Tappi Standard(1978), T204 os-76, T204 os-74, T203 os-74.
5. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
6. M. Mendels, L. Hontz and J. nystrom(1974), *J. Biotech. & Bioeng.*, **16**, 1471.
7. E. B. Cowling(1977), *Biotech. & Bioeng. Symp.*, **5**, 163-181.
8. M. Linko(1977), *Adv. Biochem. Eng.*, **5**, 25-48.
9. 김우식, 유인상(1988), 화학공학, **26** (1), p 41.
10. Y. H. Lee and L. T. Fan(1980), *Adv. Biochem. Eng.*, **17**, p101.
11. Bruce E. Dale and Maria J. Moreira(1982), *Biotech. & Bioeng.*, **12**, 39.
12. W. S. Kim and I. S. Yoo(1988), *Hwahak Konghak*, **20**(1), 39.

(Received November 10, 1989)