

NaOH 전처리된 현사시나무의 효소가수분해 특성¹

박영기² · 오정수²

Characteristics of Enzymatic Hydrolysis of Sodium Hydroxide pretreated Suwon Poplar¹

Youngki Park² · Jung-Soo Oh²

요 약

글루코스 생산을 위한 효과적인 방법을 개발하기 위해서 cellulase에 의한 현사시 나무의 효소가수분해를 실시하였다. 목재의 효소가수분해는 미생물이 생산한 효소를 사용하여 글루코스를 생산하는 반응이다. 이렇게 얻어진 글루코스는 발효에 의해 쉽게 에탄올로 변환시킬 수 있다. 에탄올은 아세톤이나 부탄올, 시트릭산 그리고 락틴산을 제조하는 원료물질이나 석유자원을 대체할 수 있는 대체에너지 자원이다.

셀룰로오스의 효소가수분해 기작은 endo-cellulase, exo-cellulase 그리고 β -D-glucosidase라는 세 개의 서로 다른 형태의 효소가 연속적인 반응에 의해 일어난다고 설명되어지고 있다.

본 실험의 목적은 다양한 농도의 수산화나트륨으로 현사시나무를 전처리 하여 이러한 전처리가 셀룰로오스의 결정화도와 리그닌함량에 미치는 영향과 가수분해율과의 관계를 조사하였다.

ABSTRACT

An effective method for production of glucose was developed using enzymatic hydrolysis of Suwon poplar by the cellulase. Enzymatic hydrolysis of wood is the reaction to produce glucose from wood using enzyme which derives from microorganism. Glucose can be transferred easily to ethanol by fermentation. Ethanol is the starting material for producing acetone, butanol, citric acid and lactic acid.

The mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose are reasonably explained in terms of the sequential action of three different types of enzymes, endo-cellulase, exo-cellulase, and β -glucosidase.

1. 접수 2001년 11월 28일 Received on November 28, 2001

2. 동국대학교 생명자원과학대학 산림자원학과 Department of Forest Resources, Dongguk University, Seoul, 100-715. Korea

The goal of this work was to investigate the cellulose hydrolysis pretreated polar with various concentration NaOH, the crystallinity of cellulose, lignin contents and the degree of hydrolysis.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, alkali pretreatment crystallinity, lignin contents

서론

Cellulase는 식물 바이오매스의 구조물질이며 지구상에서 가장 풍부한 유기 물질인 셀룰로오스의 가수분해 반응에서 촉매 역할을 한다. 셀룰로오스의 완전한 가수분해는 당을 생산하고 이것은 발효에 의해 에탄올을 생산하므로 이러한 바이오매스는 재생 가능한 에너지 자원으로서의 잠재력을 가지고 있다. 또한 리그노 셀룰로오스로부터 에탄올을 생산하는 기술은 자동차의 연료로 사용될 수 있다는 잠재력 때문에 많은 관심을 가져왔다¹⁾.

효소가수분해란 미생물이 분비하는 효소를 이용하여 목재 내에 존재하는 부분 중에서 특히 cellulose를 분해하여 글루코스를 얻는 반응으로 효소가수분해에 관한 기작은 Reese⁶⁾에 의해 제일 먼저 제안되었는데, 이것은 C₁-C_x 가설이라고도 한다. 이 가설에 의하면 먼저 C₁ 효소가 결정영역을 공격한 후 C_x 효소가 비결정영역을 공격한다는 것인데, 이 가설은 그 후 Wood 등⁹⁾에 의해서 수정되어 C_x-C₁ 가설로 발전하였다. 이 가설에 의하면 먼저 C_x 효소 즉, Endo-cellulase가 먼저 무작위로 cellulose의 비결정영역을 공격한 후 C₁ 효소 즉, Exo-cellulase가 말단기를 공격하여 cellobiose 단위를 형성시키고 이러한 단계적인 가수분해가 반복하여 일어난 다음 cellulose 묶음은 조각이 나고 이러한 cellobiose나 cello-oligosaccharides들은 β-glucosidase에 의해서 글루코스로 가수분해된다는 것이다.

이렇게 하여 얻어진 글루코스는 우선 발효하여 에탄올로 사용할 수 있으며 혹은 아세트산, 부탄올, 시트릭산, 혹은 락틱산 같은 다양한 화

학약품을 합성할 수 있는 시작물질로 사용될 수 있다. Cellulase에 의한 셀룰로오스의 효소가수분해는 불균일한 공정으로 이것은 결정화도나 비표면적 그리고 중합도와 같은 셀룰로오스의 구조적 특징에 의해 영향을 받으므로 목재와 같이 cellulose에 hemicellulose와 lignin이 복합된 물질인 ligno-cellulose 물질이 충분히 효소가수분해 되기 위해서는 기질이 효소의 접근에 용이하게 되거나 혹은 저해물질이 없어야 한다. 그리하여 효소가수분해의 효율을 증가시키기 위해서는 전처리가 필요하다²⁾. 전자에서 말한 효소의 접근이 용이하게 하기 위해서는 물리적 전처리가 필요하며, 후자에서 말한 저해물질의 제거는 화학적 전처리가 필요한데 이러한 전처리 방법 중에서 물리적인 방법에는 폭쇄처리³⁾, 분쇄⁴⁾ 등이 있으며 화학적 전처리로서는 탈리그닌법, 알칼리 전처리 등의 방법이 있다. Ericksson 등에 의하면 cellulose에 H₂O₂/Fe₂-만으로는 β-glucosidase의 행동을 증가시키지는 못했지만 oxalic acid를 첨가하였을 경우는 가수분해가 증가했다는 보고가 있었다¹⁾.

이 중 알칼리 처리는 NaOH나 KOH를 이용하여 목재를 탈리그닌화 시키거나 효소의 접근을 쉽게 하기 위해서 팽윤시키는 방법으로, 이 방법에는 다음과 같은 인자들이 있다. 즉, 알칼리 용액의 농도, 반응 시간, 반응 온도 등이 있는데 이 중 각각의 반응에 대한 최적의 조건을 조사하는 것도 중요한 일이다.

본 연구에서는 알칼리의 전처리가 목재의 가수분해에 어떠한 영향을 미치며, 각각 다른 농도의 알칼리 중 최적의 농도를 결정하였으며, 그 후 알칼리 처리가 목재의 미세구조와 결정에 미친 영향을 알아보기 위해서 주사전자현미

경 관찰과 X선 회절에 의한 결정화도를 측정하였다. 또한 효소가수분해 처리가 목재에 미치는 영향을 결정화도와 글루코스 생산을 중심으로 관찰하였다.

재료 및 방법

2.1 재료

2.1.1 공시재료

공시목은 경기도 남양주시에 위치한 동국대학교 운길산연습림에서 채취한 현사시나무 (*Populus alba × glandulosa* L.)를 사용하였다. 이 목재는 chipper를 사용하여 chip 상태로 제조한 후 다시 Willey type mill을 사용하여 목분으로 제조한 후 40-60mesh의 목분을 선별하여 사용하였다.

2.1.2 효소

사용한 효소는 Boehringer Mannheim사에서 제조한 *Trichoderma reesei*의 배양액을 농축한 효소인 Cellulase를 공시 효소로 사용하였다.

2.2 실험방법

2.2.1 알칼리 처리

시료 2.5g을 둥근 플라스크에 넣은 후 증류수 250ml와 각각의 농도에 맞게 NaOH 2.5g(1%), 7.5g(3%), 12.5g(5%), 17.5g(7%), 25.0g(10%), 50.0g(20%)을 첨가한 후 80℃의 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 후 글래스 필터(1G3)로 여과하여 식 (1)에 의해서 수율을 계산하였다. 반응온도에 따른 수율의 변화를 조사하기 위해 각각 실온, 50, 80, 100, 130도의 온도에서 반응시켜 위와 동일한 방법으로 수율을 계산하였다.

$$Yield(\%) = \frac{W_1}{W_0} \times 100 \text{-----} (1)$$

W_0 : The Weight of untreated sample(g)

W_1 : The residual Weight of treated sample(g)

2.2.2 효소처리

Cellulase 효소 분말을 1:10으로 희석한 효소액 2ml와 기질 2g, 그리고 0.05M Na-Citrate buffer(pH 4.8)을 혼합한 후 온도 48℃의 incubator에서 72시간 동안 교반하면서 배양하였다.

2.2.3 결정화도의 측정

결정화도란 섬유가 결정영역과 비결정영역으로 이루어졌으므로 이러한 섬유의 결정영역량을 결정화도라 한다. 즉 cellulose 섬유의 X선 회절의 강도 분포곡선은 결정영역량에 근거한 피크, I_{cr} 및 비결정영역의 산란에 의한 피크, I_a의 중복으로 되기 때문에 양자의 강도를 분리하여 높이의 비를 취하면 결정화도가 계산된다. Segal의 식⁵⁾에 의해서 결정화도는 다음의 식 (2)에 의해서 구하였다.

$$CrI(\%) = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100 \text{-----} (2)$$

Diffraction의 조건은 다음과 같다.

Tube anode : Cu

Generator tension : 30KV

Generator current : 20mA

2.2.4 주사전자현미경(SEM)의 관찰

각각의 목분과 알칼리 전처리 그리고 효소 처리된 잔사를 목적에 따라 실내 건조, 알콜에 의한 탈수, 그리고 탄소와 금의 이중 증착을 실시하였다.

결과 및 고찰

3.1 알칼리 처리가 목재에 미치는 영향

3.1.1 NaOH 농도와 온도에 따른 기질의 수율과 리그닌의 함량

각각 다른 농도의 NaOH에 따라서 전처리된

목재의 수율은 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 NaOH의 농도가 5%가 될 때까지는 수율의 감소가 급속하게 줄어들다가 그 후 거의 변화가 일어나지 않았다. 따라서 적은 양의 NaOH로 인하여 리그닌의 양이나 탄수화물의 분해가 일어난 가능성이 높은 것으로 사료된다.

Table 1. Yield of alkali treated Suwon Poplar wood millwood mill which is treated at various concentration of NaOH.

species	% of NaOH	yield (%)
Suwon	1	84.45
	3	78.65
	5	74.37
Poplar	7	71.42
	10	70.47
	20	69.63

Fig. 1은 각각의 NaOH 농도에 따라서 변화된 리그닌의 함량을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 알칼리의 농도가 높을수록 리그닌의 함량은 이에 반비례하여 감소하는 경향을 알 수 있었다. Lincoln C. 등은 NaOH와 peracetic acid로 포플라 목재를 전처리 한 경우 리그닌의 함량이 감소한다고 보고한 바 있다³⁾.

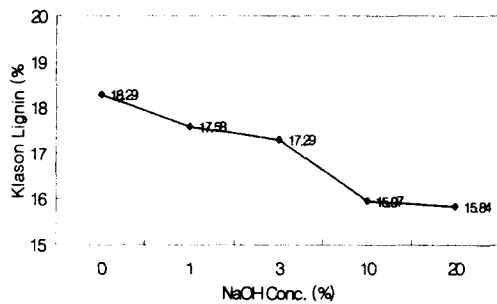


Fig. 1. Relationship between the concentration of NaOH and the lignin contents of Suwon Poplar wood mill.

Fig. 2는 5% NaOH처리한 현사시 목분을 각각의 반응온도에 따라 처리한 후 이에 따른 수율을 계산하였다. 온도가 올라감에 따라 수율은 감소하는 경향을 보여주었는데, 이는 심한 온도조건하에 반응이 일어나서 리그닌이 분해된 것으로 사료된다.

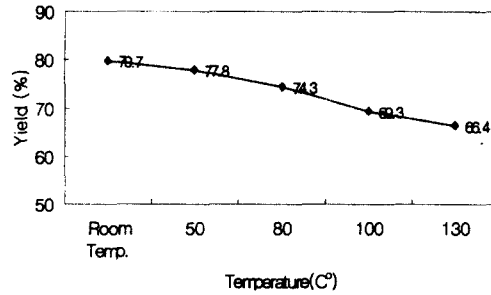


Fig. 2. Yield of 5% NaOH treated Suwon Poplar wood mill at different temperature.

3.1.2 NaOH 전처리가 기질의 결정화도에 미치는 영향

전처리를 하지 않은 목재와 10% NaOH 처리한 목재, 그리고 아염소산나트륨 처리를 한 목재의 결정화도를 조사한 결과는 아래의 Table 2와 같았다.

Fig. 3, 4 및 5에서는 X-ray diffractometer를 이용하여 얻은 diffractogram을 나타내었다. 각각의 그림에서 보는 바와 같이 회절각 18.5°와 22.5°에서의 높이에 대한 상대값을 계산하여 결정화도를 구하였고, 그 결과는 Table 2와 같다. 표에서 보는 바와 같이 전처리하지 않은 목재보다는 10% NaOH 처리한 목재의 결정화도가 높았고 아염소산나트륨에 의해 처리된 목재의 결정화도가 가장 높았다. 결정화도란 결정영역의 비율을 나타내므로 결정화도가 크다는 것은 결정영역의 부분이 많다는 것이다. 그러므로 무처리보다는 10% NaOH가 그 보다는 아염소산나트륨 처리제의 결정영역이 더 많았다. 이는 알칼리 전처리로 인하여 비결정영역이 분해되고 결정영역은 영향을 덜 받아 상대

적으로 결정영역의 부분이 증가한 것으로 여겨진다.

Table 2. Effect of crystallinity on NaOH treated and NaClO₂ treated wood mill.

species	treatment	crystallinity (%)
Polpar	untreated	55
	10% NaOH	61.02
	NaClO ₂	72.29

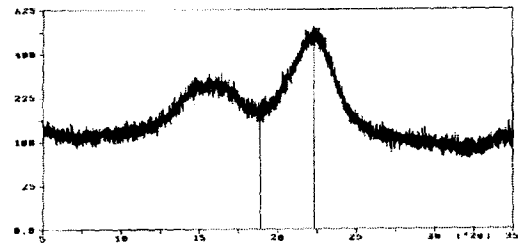


Fig. 5. Diffractogram of NaClO₂ treated wood mill of Suwon poplar.

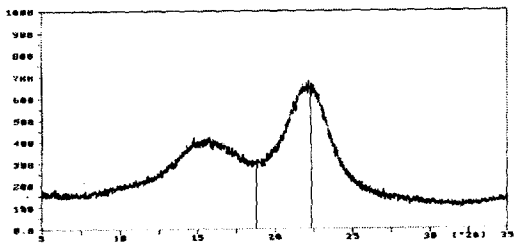


Fig. 3. Diffractogram of untreated wood mill of Suwon poplar.

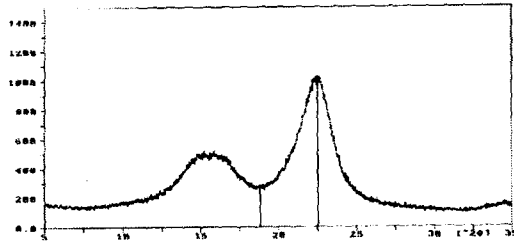


Fig. 4. Diffractogram of 10% NaOH treated wood mill of Suwon poplar at 80°C.

3.1.3 NaOH 전처리 및 탈리그닌 처리된 기질의 미세구조 관찰

Fig. 6에서는 무처리된 목재의 주사전자현미경 사진이다. Fig. 7, 8은 각각 NaOH 처리 및 NaClO₂ 처리한 목재의 주사전자현미경 사진이다. 그림에서 보듯이 무처리재보다는 알칼리 처리한 목재의 표면이 더 많이 노출되고 분해된 것을 관찰할 수 있다. 즉, 이러한 이유로 하여 알칼리 처리로 인한 수율이 감소하였다고 사료된다.



Fig. 6. Scanning electron micrograph(SEM) of untreated wood mill of Suwon poplar.

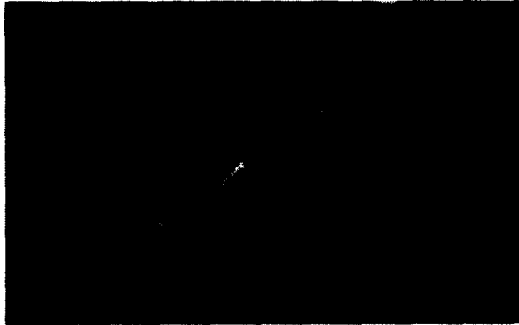


Fig. 7. Scanning electron micrograph(SEM) of 10% NaOH treated wood mill of Suwon poplar.



Fig. 8. Scanning electron micrograph(SEM) of NaClO₂ treated wood mill of Suwon poplar.

3.2 효소가수분해가 알칼리 처리된 목재에 미치는 영향

3.2.1 효소가수분해율

Table 3은 각각의 NaOH 농도로 처리한 현사시 목분의 가수분해율을 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 무처리재의 목분이 10.9%의 가수분해율을 보인 반면 1%, 3%, 그리고 5%의 NaOH로 처리한 목분의 가수분해율은 21.9%에서 22.9%로 알칼리 처리에 의해 약 11%의 증가를 가져왔다. 이로 인해 알칼리 전처리에 의해 가수분해율의 효과를 보았다. 이는 박 등¹¹⁾이 현사시 나무를 폭쇄처리한 후 아염소산나트

륨으로 전처리하여 효소가수분해한 결과 32.7%에서 89.8%의 가수분해율을 보여본것에 비하면 낮은 효과이지만 NaOH처리가 위의 전처리보다는 온화한 조건이라는 것을 감안한다면 비교적 효과적이라 할 수 있다.

Table 3. The Enzymatic hydrolysis of Suwon Poplar wood mill pretreated with NaOH.

species	treatment	Degree of Enzymatic hydrolysis(%)
	untreated	10.9
Suwon	1% NaOH	21.9
Polpar	3% NaOH	22.8
	5% NaOH	22.9

3.2.2 기질의 결정화도 변화

Table 4는 NaOH 전처리와 아염소산나트륨 전처리된 목재의 효소가수분해 전과 후의 결정화도 변화를 나타낸 것이다. Table 3에서 보는 바와 같이 전처리, 10% NaOH 및 아염소산나트륨 처리한 목재 모두는 효소가수분해한 후에 결정화도가 증가하였는데 이는 효소가수분해되는 동안에 효소가 비결정영역을 먼저 공격하여 비결정영역의 양은 줄고 상대적으로 결정영역의 양이 증가한 것으로 여겨진다. Wood의 가설에서도 C_x 효소가 먼저 무작위로 cellulose의 비결정영역을 공격한 후 C₁ 효소 즉 Exo-cellulase가 말단기를 공격하여 cellobiose 단위를 형성하고 이러한 단계적인 가수분해가 반복적으로 일어난 다음 cellulose 묶음은 조각이 나고 이러한 cellobiose나 cello- oligo-saccharides는 β-glucosidase에 의해서 글루코스로 가수분해된다 하였으며, 실험에서의 결정화도 증가는 이러한 가설과도 일치하는 결과이다.

3.2.3 미세구조의 변화

Fig. 9, Fig. 10 및 Fig. 11에서는 각각 무처리, NaOH 처리 및 NaClO₂로 처리된 목재를

Table 4. Effect of crystallinity on NaOH treated and NaClO₂ treated wood mill before and after enzymatic hydrolysis.

species	treatment	crystallinity(%) before enzymatic hydrolysis	crystallinity(%) after enzymatic hydrolysis
Polpar	untreated	55.00	65.26
	10% NaOH	61.02	66.13
	NaClO ₂	72.29	72.83

효소가수분해한 후 효소의 처리가 목재의 미세 구조에 어떠한 영향을 미치는가 알아보기 위하여 주사전자현미경 관찰을 하였다. 그림에서 보는 바와 같이 미처리재 목재의 현미경 사진 Fig. 6과 비교하면 효소 처리로 인하여 목재의 구조가 많이 분해된 것을 관찰할 수 있다.



Fig. 9. Scanning electron micrograph(SEM) of untreated wood mill of Suwon poplar after enzymatic hydrolysis.



Fig. 10. Scanning electron micrograph(SEM) of NaOH treated wood mill of Suwon poplar after enzymatic hydrolysis.



Fig. 11. Scanning electron micrograph(SEM) of NaClO₂ treated wood mill of Suwon poplar after enzymatic hydrolysis.

결 론

본 연구에서는 알칼리의 전처리가 목재에 미치는 영향과 아울러 효소가수분해에 어떠한 영향을 미치는지, 그 후 알칼리 처리가 혹은 이러한 전처리 기질에 대한 효소의 반응이 목재의 미세구조와 결정에 미치는 영향을 알아보기 위해 주사전자현미경 관찰과 X선 회절에 의한 결정화도를 측정된 결과는 다음과 같다.

1. 1%-5% NaOH 처리가 가장 많은 수율 감소를 보여주었으며, 10%와 20%의 NaOH에서는 현저한 차이를 보여주지는 않았다.

2. NaOH에 의한 탈리그닌 효과는 5% NaOH가 가장 좋았다.

3. 결정영역은 무처리보다는 NaClO_2 가 높았으며 NaOH 처리한 목재의 결정화도가 가장 높았다.

4. 효소처리에 의해서는 결정화도가 증가하였는데, 무처리재의 결정화도 차이가 55%에서 65.26%로 가장 높았으며, NaClO_2 그리고 NaOH 순이었다.

5. 주사전자현미경 관찰에 의한 결과 알칼리 전처리와 아염소산나트륨 결과 처리전의 목분에 비해 세포벽의 분해를 관찰하였고 아울러 효소가수분해로 인한 분해도 관찰할 수 있었다.

Advances in Solar Energy. 7 : 373-448
 8. Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E. and Conrag, C. M. 1959. Textile Research J. 29 : 786
 9. Wood T. M and S. I. McCrae. 1979. Synerism between enzymes involves in the solubilization of native cellulose. Adv. Chem. Ser. 181 : 181
 10. 박영기, 오정수. 1993. 폭쇄처리된 목질계 Biomass의 효소가수분해 (I) - 리그닌의 함량과 섬유소 결정화도가 효소가수분해에 미치는 영향-. 한국목재공학회지 21(3) : 53-60

참고문헌

1. Erickson K-E. Wood TM. 1985. Biodegradation of cellulose. Academic Press, Orlando, Florida
 2. Fan, L. T, Grauray, M. M. and Lee Y. H. 1987. Cellulose hydrolysis. Springer-Verlag : 6
 3. Lincoln C. Teixeira, James C. Linden. 1999. Applied Biochemistry and Biotechnology. 77-79 : 19-34
 4. Massumura Yoshitot, SudoKen-ichi. 1977. Enzymatic hydrolysis of Wood II. Mokuzai Gakkaishi. 23(11) : 562-570
 5. Mistuhiko Tanahashi. 1989. Degradation mechanism of wood component by steam explosion : 21-24
 6. Reese, E. T., R. G. H. Sin et al. 1950. The biological degradation of cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. of Bacterial. 59 : 485
 7. Schell, D. J., McMillan, J. D., Philippidis, G. P., Hinman, N. D. and Riley, C. 1992.