



ORIGINAL PAPER

원저

## 황산염 환원 조건에서 리그노셀룰로오스의 분해 및 리그닌과 셀룰로오스의 상호작용

고재중, 김석구<sup>†</sup>, 清水芳久\*

한국건설기술연구원 첨단환경연구소, 교토대학 유역권총합환경질 연구센터\*

(2007년 12월 6일 접수, 2007년 12월 21일 채택)

## Lignocellulose Biodegradation and Interaction between Cellulose and Lignin under Sulfate Reducing Conditions

Jae-Jung Ko, Seog-Ku Kim<sup>†</sup>, Yoshihisa Shimizu\*

Advanced Environment Technology Research Division, Korea Institute of Construction Technology, Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University\*

### ABSTRACT

In this study, the biodegradation test on lignocellulose under sulfate reducing conditions was carried out. In particular, the interaction between cellulose and lignin was investigated with various g-cellulose/g-lignin (C/L) ratios: 42.15, 4.59, 2.51, 1.14 and 0.7. It was shown that the rate of cellulose degradation decreased in proportion to the lignin content. Assuming first order degradation kinetics, the consequences of competitive inhibition were graphically shown for different C/L ratios. The relation between cellulose reduction rate and C/L ratio was expressed by logarithm function with a determination coefficient of 0.97. Lignocellulose reduction rate was also described as a logarithm function of C/L ratio showing a inhibition effect by lignin. In the mean time, the rate of lignin decomposition was higher at C/L ratio of 2.51 and 1.14 compared with C/L ratios of 4.59 and 0.7, indicating that excessive extra carbon source is not appropriate for lignin biodegradation.

Keywords : cellulose, C/L ratio, lignin, lignocellulose, sulfate reducing conditions

### 초 록

황산염 환원조건에서의 리그노셀룰로오스의 분해에 대하여 고찰하였다. 특히, 리그닌에 대한 셀룰로오스의 비(C/L 비)를 각각 42.15, 4.59, 2.51, 1.14, 0.7로 하여 리그닌과 셀룰로오스의 상호작용에 대하여 고찰하였다. 셀룰로오스의 분해율은 1차 반응식에 의해 계산되어져, C/L 비가 감소할수록 반응상수는 감소하

\*Corresponding author (sgkim@kict.re.kr)

여 셀룰로오스의 분해에 대한 리그닌의 저해작용을 보여 주었다. 1차 반응식에 의한 반응상수와 리그닌의 함량의 증가에 대한 셀룰로오스의 분해율은 0.97의  $R^2$  값을 가지며 로그함수에 의해 표현할 수 있었다. 리그노셀룰로오스의 분해율 또한 C/L 비와 로그함수의 관계를 가지며 리그닌의 함량이 많을수록 감소하였다. 리그닌의 분해율은 C/L 비가 2.51 및 1.14인 조건에서 4.59 및 0.7의 조건보다 높게 나타나, 공동기질로서의 과도한 탄소원은 리그닌분해에 장애가 됨을 보여 주었다.

핵심용어 : 셀룰로오스, C/L비, 리그닌, 리그노셀룰로오스, 황산염 환원 조건

## 1. 서론

리그노셀룰로오스는 식물체에 존재하는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 3 성분을 포함하는 것으로 건조 목재의 89-98%를 차지한다<sup>1),2)</sup>. 이들은 지구상에 존재하는 가장 풍부한 탄소원으로 자연상태에서는 목재나 풀로서 존재하여, 인위적으로는 농업부산물, 산림벌채목, 종이를 포함한 일반폐기물의 형태로 나타난다. 목질계 바이오매스로도 불리어지는 리그노셀룰로오스는 석유자원의 고갈과 지구온난화의 가속화 속에서 대체연료로 알려진 바이오에탄올의 차세대 원료로서 최근 주목되어지고 있다. 셀룰로오스는 리그노셀룰로오스의 3 성분중 가장 많은 비율을 차지하는 것으로 글루코오스가 수소결합 및 Van der Waals 힘에 의해 규칙적으로 결합된 고분자화합물로서 목재성분의 40-45%를 차지한다<sup>1),2)</sup>. 셀룰로오스의 미생물에 의한 분해는 분자상 산소가 존재하지 않는 혐기성 상태에서 5-10%가 이루어져 이산화탄소와 메탄으로 무기화되어지는데 이는 지구상의 탄소순환, 일반폐기물의 조기 안정화, 펄프폐수의 처리 및 셀룰로오스계 바이오에탄올의 생산등에서 주목되어진다<sup>3)</sup>. 일반적으로 셀룰로오스는 자연상태에서 헤미셀룰로오스 및 리그닌과 화학적으로 결합되어져 존재하여, 특히 리그닌의 존재는 셀룰로오스의 미생물에 의한 분해를 저해한다.

리그닌은 페놀계 방향족 물질이 불규칙으로 연결된 불용성 고분자로 자연상태에 존재하는 최대의 난분해성 물질로 나무나 식물의 분해에 대한 방어막 역할을 수행한다. 생물학적 셀룰로오스의 분해

에 대한 리그닌의 저해 작용은 물리적 작용과 화학적 작용으로 구분 된다<sup>4),5)</sup>. 물리적 저해작용은 리그닌의 존재가 가수분해효소의 셀룰로오스의 표면에 대한 흡착을 가로막으면서 활성도를 저하시키는 것이며, 화학적 저해작용은 리그닌과 셀룰로오스가 공유결합 형태로 연결되어 있어 분해되기 어려운 현상을 의미한다. 셀룰로오스의 생물학적 분해의 첫 번째 기작은 주로 가수분해 효소의 표면흡착에서 시작되기 때문에 대부분의 리그닌에 의한 저해작용은 물리적 현상에 의한 것으로 보고되어지고 있다<sup>4)</sup>.

황산염은 혐기성 상태에서 유용한 전자 수용체이며, 황산염환원 조건은 메탄생성조건에서 보다 높은 유기물에 대한 전자친화력을 갖기 때문에 난분해성 물질의 혐기성 분해 등에 유용하다. 특히 혐기성 조건에서 리그노셀룰로오스와 같은 고분자의 생물학적 분해에 황산염환원박테리아(SRB, Sulfate Reducing Bacteria)의 활성이 높음으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. 본 연구는 혐기성 황산염 환원조건에서 난분해성 고분자 물질로 알려져 있는 리그노셀룰로오스의 분해능에 대하여 고찰하였다. 특히, 리그닌 함량이 셀룰로오스의 분해에 미치는 저해작용을 반응식을 통해 예측할 수 있도록 하였다. 또한, 리그닌 분해에 필요한 공동기질로서의 셀룰로오스의 함량변화에 따른 리그닌의 분해율에 대하여 고찰하였다.

## 2. 실험방법

본 연구는 120 mL 혐기성 회분식 실험용 바이

알을 이용하였으며 유일탄소원으로 사용된 Avicel 셀룰로오스 및 Hydrolytic 리그닌은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 미생물 식중은 3년 이상 톱밥과 신문지를 넣어 황산염 환원상태에서 운전되어진 침출수 순환형 모형매립지의 침출수를 이용하였다<sup>7)</sup>. 실험조건은 초기 Avicel 셀룰로오스를 4 g/L로 일정하게 한 후 리그닌의 농도를 달리하여 셀룰로오스와 리그닌의 비율 (w/w)이 42.15, 4.59, 2.51, 1.14, 0.7이 되도록 하였으며 각각의 조건에 대하여 시료 3개씩 준비하였다. 회분식 실험을 위한 모든 조작은 혐기성 상태에서 진행되었다. 분석항목은 셀룰로오스의 농도는 phenol-sulfuric acid 방법을 이용하여 총탄수화물의 양을 글루코오스로 환산하였으며, 리그닌은 72%황산 불용성 리그닌의 개념을 갖는 Klason 리그닌 방법을 이용하였다. 총고형물의 농도는 채취한 시료를 전처리 없이 동결건조 하여 무게를 측정하였으며, 650°C에서 2시간 가열하여 남은 재(ash)의 무게는 배제하였다. 황산염은 이온크로마토그래피를 이용하였으며, 황산염 환원균에 의한 황산염의 환원에 의해 생성되어지는 황화수소는 흡광도 490 nm에서 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 셀룰로오스의 분해

[Fig. 1]은 각각의 실험조건에서의 셀룰로오스 농도의 감소 및 황화수소의 생성에 대하여 나타내었다. 셀룰로오스와 리그닌의 비 (C/L 비)가 2.51 이상인 조건에서는 지체기 없이 셀룰로오스의 분해가 진행되었으나 1.14의 조건에서는 96시간, 0.7의 조건에서는 316시간의 지체기를 보여 주었다. 미생물대사에 필요한 기질로서의 셀룰로오스의 가장 큰 특징은 불용해성이다. 특히 혐기성 분해의 경우 세포외효소가 셀룰로오스에 흡착되면서 분해가 시작되며 세포외효소가 셀룰로오스에 흡착된 형태는 Cellulosome이라 불려진다<sup>5),8)</sup>. 리그닌 함량이 많은 조건에서 지체기를 보인 것은 난분해성 리그닌이 셀룰로오스에의 흡착에 필요한 비표면적을 감소시켰기 때문으로 사료된다.

분해속도는 다음과 같은 일차반응식으로 표현할 수 있었으며 각각의 반응상수와 계산결과는 Fig.1에 나타내었다.

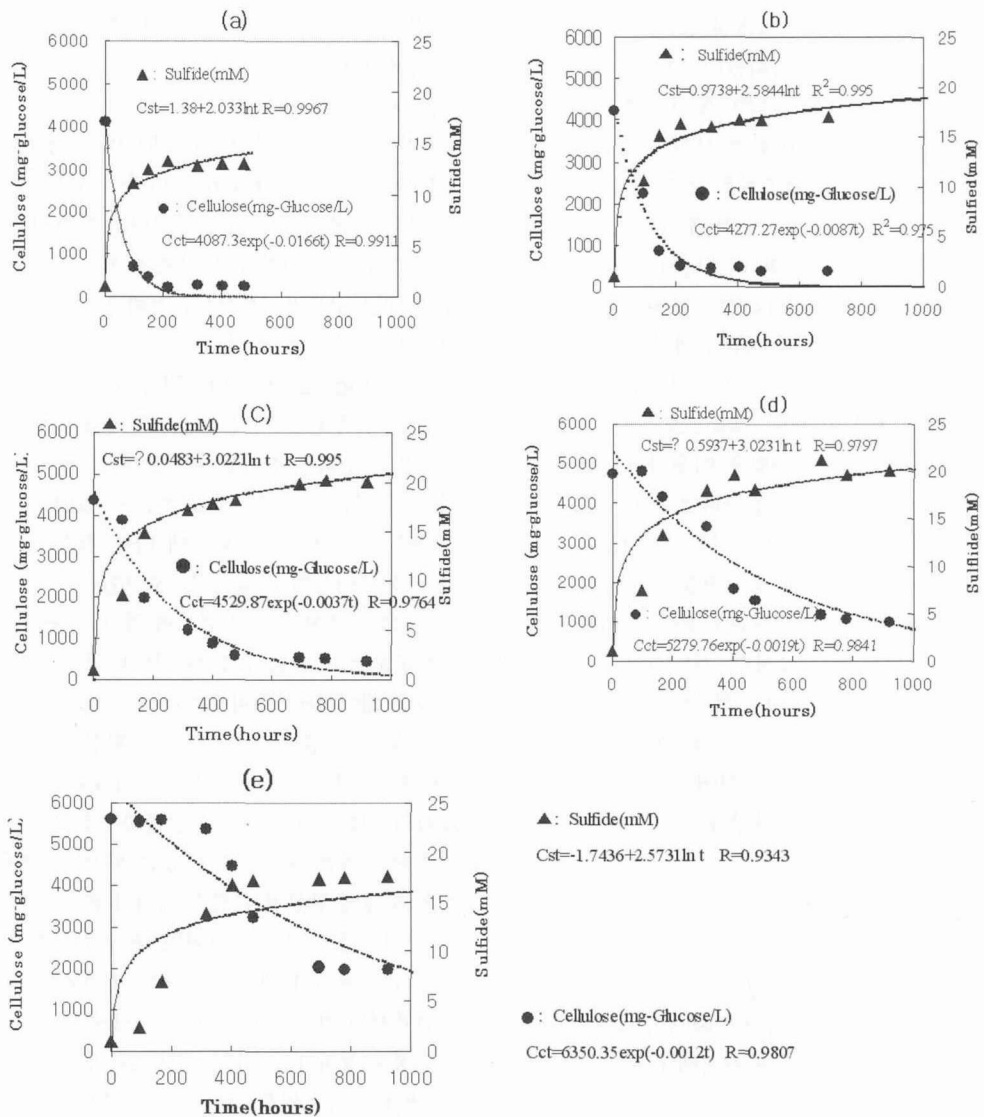
$$C_{ct} = C_{co} \exp(-At) \dots\dots\dots (1)$$

여기서  $C_{ct}$ 는 경과된 시간에서의 셀룰로오스의 농도를,  $C_{co}$ 는 초기농도를 의미하여  $A$ 는 반응상수 ( $h^{-1}$ )이다. 반응상수  $A$ 는 리그닌의 함량이 증가하면서 감소하는 경향을 보였으며 셀룰로오스의 분해에 대한 고분자 리그닌의 저해를 보여주었는데, 서로 다른 C/L 비와 셀룰로오스 분해율과의 상관관계를 [Fig. 2]에 나타내었다. 리그닌의 함량이 많을수록, 즉 C/L 비가 작을수록 셀룰로오스의 분해능은 감소되는 결과를 보였으며 그 관계는 0.97의  $R^2$ 를 갖는 로그함수로 표현할 수 있었다.

한편, 리그닌의 함량변화에 따른 황화수소의 증가는 0.97이상의  $R^2$ 를 갖는 로그함수,  $C_{st} = C_{so} + B \ln(t)$ 로 표현할 수 있었으며 결과는 [Fig. 1]에 셀룰로오스의 변화와 함께 나타내었다. 셀룰로오스의 분해에 따라 황화수소가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 셀룰로오스 분해에 황산염 환원 박테리아가 깊이 관여하는 것으로 사료된다. 그러나, 각각의 다른 C/L 비에 대한 황화수소의 증가율이 일정한 관계를 보여주지 않았는데, 이는 셀룰로오스의 분해에 황산염 환원 박테리아 뿐만 아니라 다른 미생물 활동과의 복합적인 대사에 의해 셀룰로오스가 분해되기 때문인 것으로 판단된다. 혐기성 조건에서의 셀룰로오스 분해는 크게 3 단계의 대사과정을 통해 이루어지는 것으로 보고되고 있다. 첫 번째는 세포외효소에 의해 셀룰로오스가 저분자화되어 cellobiose, glucose 같은 환원당을 생성하며, 두 번째는 이러한 환원당이 유기산과 같은 중간대사를 거쳐 최종적으로 이산화탄소등으로 무기화되어진다<sup>3)</sup>.

#### 3.2 리그닌의 분해

[Fig. 3]은 서로 다른 C/L 비에서의 리그닌 농도의 변화를 나타내었다. 오랜 연구결과에 의하면 혐기성 조건에서 고분자 리그닌은 분해되지 않으며, 수용성 저분자 리그닌만이 분해되는 것으로 보고되고 있다<sup>9),10),11)</sup>. 그러나, 최근에 24%의 리그닌을

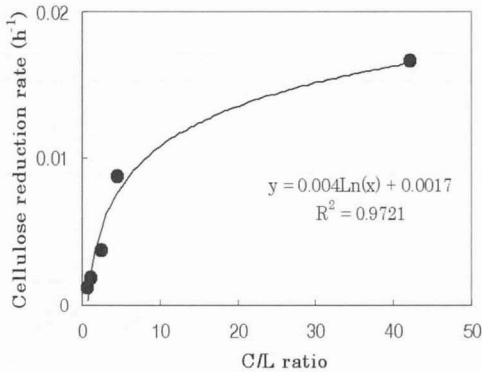


[Fig. 1] Rates of cellulose biodegradation and sulfide production.

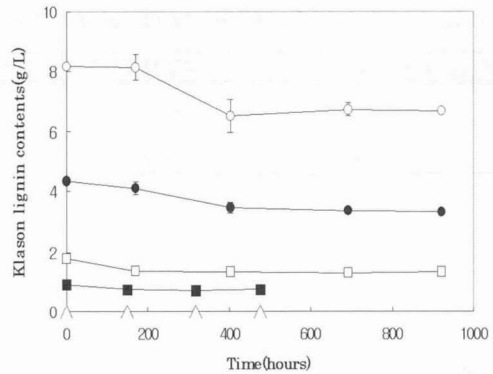
(a) C/L ratio of 42.15 w (cellulose)/w (Klason lignin),  
 (b) 4.59, (c) 2.51, (d) 1.14 and (e) 0.7

포함하는 신문지가 황산염환원조건에서 고분자 리그닌이 저분자되어 생성되는 리그닌의 기본 구성요소인 페놀계 산화물을 다수 검출함으로써 낮은 분해율이나 고분자 리그닌이 분해된다고 보고되었다<sup>6)</sup>. 본 연구에서 리그닌의 분해율은 C/L 비가 1.14,

2.51인 조건에서 24%, 4.59와 0.7의 조건에서는 16%, 18%의 분해율을 나타내었다. 리그닌은 미생물 대사에서 직접적인 탄소원으로 사용되지 않아 글루코오스와 같은 분해되기 쉬운 공동기질을 필요로 한다<sup>1),12)</sup>. 본 연구결과를 토대로 볼 때 리그닌



[Fig. 2] The results of the kinetic analysis on the relation between the rate of cellulose reduction and the C/L ratio (Reduction rate is A in equation of  $C^{ct} = C^{co} \exp(-At)$ ).



[Fig. 3] Variation in the Klason lignin contents at different C/L ratios under sulfate reducing conditions.

( $\Delta$ ): C/L ratio of 42.15 w (cellulose)/w (Klason lignin), ( $\blacksquare$ ): 4.59, ( $\square$ ): 2.51, ( $\bullet$ ): 1.14 and ( $\circ$ ): 0.7)

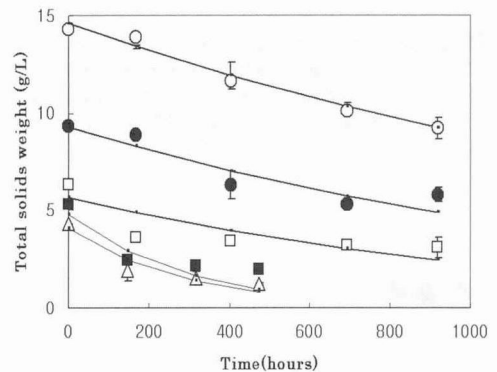
분해를 위한 공동기질로서 과도한 탄소원은 오히려 리그닌 분해에 장애가 되는 것으로 나타났다. 리그닌 분해를 위한 최적의 공동기질 및 적정량에 대하여는 아직도 논란이 되고 있는 부분이다.

### 3.3 리그노셀룰로오스의 분해

본 연구에서 사용된 탄소원은 셀룰로오스와 리그닌으로 불용성 고분자 화합물로서 총고형물의 농도는 헤미셀룰로오스를 제외한 리그노셀룰로오스의 농도로 표현될 수 있다. 총고형물 농도 변화 결과를 [Fig. 4]에 나타내었다. 총고형물 농도 변화도 다음과 같은 일차 반응식으로 계산되었다.

$$C_{tt} = C_{t0} \exp(-Dt) \dots\dots\dots (2)$$

여기서  $C_{t0}$ 와  $C_{tt}$ 는 각각 최초의 시간 및 경과시간별 측정시간에서의 총고형물농도(g/L)이며 D는 반응상수( $h^{-1}$ )이다. 서로 다른 C/L 비의 실험조건에서의 반응상수의 계산결과를 [Table 1]에 요약하였다. 리그닌의 함량이 증가할수록, 즉 C/L 비가 감소할수록 총고형물농도의 분해율은 감소하였는데, 그 속도는 셀룰로오스에 비해 낮은 것으로 나타났다. 이는 총고형물농도에는 셀룰로오스에 비해 분해되기 어려운 난분해성 물질인 리그닌을 포



[Fig. 4] Estimated data and plotted results of the total weight during vial batch experiments.

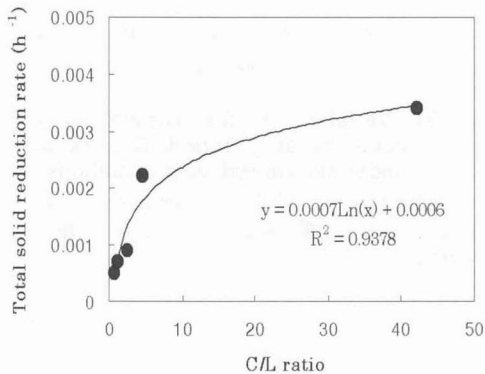
( $\Delta$ ): C/L ratio of 42.15 w (cellulose)/w (Klason lignin), ( $\blacksquare$ ): 4.59, ( $\square$ ): 2.51, ( $\bullet$ ): 1.14 and ( $\circ$ ): 0.7)

함하고 있기 때문이다.

서로 다른 C/L 비와 리그노셀룰로오스의 분해율의 관계는 0.94의  $R^2$ 를 갖는 로그함수에 의해 예측될 수 있었다. [Fig. 5]는 서로 다른 C/L 비와 리그노셀룰로오스 분해율과의 상관관계를 나타낸 것이다.

[Table 1] Kinetic Coefficients Obtained Using Equation (2)

C/L ratio(w/w)	42.15	4.59	2.51	1.14	0.7
$C_{it}$ (g/L)	4.087	4.082	5.674	9.296	14.576
D ( $h^{-1}$ )	0.0034	0.0022	0.0009	0.0007	0.0005
R square	0.978	0.957	0.985	0.993	0.999



[Fig. 5] The results of the kinetic analysis on the relation between the rate of total solids weight reduction and the C/L ratio (Reduction rate is D in equation of  $C_{it} = C_{i0} \exp(-Dt)$ ).

#### 4. 결론

황산염 환원조건에서 리그노셀룰로오스의 분해에 대하여 리그닌에 대한 셀룰로오스의 비(C/L 비)를 각각 42.15, 4.59, 2.51, 1.14, 0.7의 비율로 하여 고찰하였다. 셀룰로오스는 1차 반응에 의해 분해되는 것으로 나타났으며, 리그닌의 함량이 증가할수록 셀룰로오스의 분해율은 감소하였다. 반응상수와 리그닌의 함량의 증가에 대한 셀룰로오스의 분해는 0.97의  $R^2$  값을 가지며 로그함수에 의해 예측되어져, 리그닌이 셀룰로오스의 분해에 저해작용을 일으키는 것으로 나타났다. 리그닌의 분해율은 C/L 비가 2.51 및 1.14인 조건에서 24%, 4.59 및 0.7의 조건에서는 각각 16%와 18%로서 리그닌 분해를 위한 공동기질로서의 과

도한 셀룰로오스는 오히려 리그닌의 분해에 장애가 됨을 보여주었다. 리그닌의 함량이 증가할수록, 즉 C/L 비가 감소할수록 리그노셀룰로오스의 분해율은 감소하였는데, 그 속도는 셀룰로오스에 비해 낮은 것으로 나타났다. 서로 다른 C/L 비와 리그노셀룰로오스의 분해율의 관계는 0.94의  $R^2$ 를 갖는 로그함수에 의해 표현할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Eriksson K.E.L., Blanchette R.A. and Ander P., Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components, Springer-Verlag, Berlin, pp. 89~180, (1990).
2. Colberg P.J., Anaerobic microbial degradation of cellulose, lignin, oligolignols, and monoaromatic lignin derivatives, In: Alexander J.B.Z.(ed) Biology of anaerobic microorganisms, Wiley-Interscience, New York, pp. 333~372, (1988).
3. Leschine S.B., Cellulose degradation in anaerobic environments, Annu. Rev. Microbiol., 49, pp. 399~426, (1995).
4. Dimitris P. K. and Robert K. H., The effect of lignin and sugars to the anaerobic decomposition of solid wastes, Waste Management, 23, pp. 419~423, (2003).
5. Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H. and Pretorius I.S., Microbial cellulose

- utilization: Fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66, pp. 506~577, (2002).
6. Pareek S., Degradation of lignocellulose under anaerobic conditions: The effect of sulfate reducing bacteria, Ph. D thesis, Kyoto University, (2000).
  7. Kim S.G., Matsui S., Pareek S. and Shimizu Y., Biodegradation of recalcitrant organic matters under sulfate reducing and methanogenic conditions in the municipal solid waste landfill:
  8. Continuous experiments, J. of the Japan society of waste management experts, 9, pp. 79~86, (1998).
  9. Desvaux M., The cellulosome of *Clostridium cellulolyticum*, *Enzyme Microbial Technology*, 37, pp. 373~385, (2005).
  10. Micales, J.A. and Skog K.E., The decomposition of forest products in landfills, *Int. Biodeter. Biodegrad.*, 1 (39), pp. 145~158, (1997).
  11. Tuomela M., Vikman M., Hataka A. and Itävaara M., Biodegradation of lignin in a compost environment: a review, 72, pp. 169~183, (2000).
  12. de Boer W., Folman L.B., Summerbell R.C. and Boddy L., Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(4), pp. 795~811, (2005).
  13. Couto S.R. and Rättö M., Effect of vetratryl alcohol and manganese (iv) Oxide on lignolytic activity in semi solid cultures of *phanerochaete chrysosporium*, *Biodegradation*, 9, pp. 143~150, (1998). 