

Cellulase에 의한 Plant Cellulose의 분해 및 알코올발효

金東洵* · Ortwin Bobleter · Günther Bonn

오스트리아 인스부르크대학교 방사화학연구소
(1985년 12월 30일 접수, 1986년 5월 15일 채택)

Degradation of Plant Cellulose by Cellulase and Alcohol Fermentation

Dong Won Kim*, Ortwin Bobleter and Günther Bonn

Institute of Radiochemistry, University of Innsbruck, Innrain 52a
A-6020 Innsbruck, Tirol, Austria

(Received 30 December 1985; accepted 15 May 1986)

요 약

여러종류의 plant cellulose의 효소에 의한 가수분해에 대하여 논의하였다. *Trichoderma viride*로부터 얻은 cellulase에 의한 이들 물질의 가수분해는, 0.15M, pH 5.0, 아세트산 완충용액에서 50℃로 이루어졌으며, 가수분해의 조건은 100mg plant cellulose에 대하여, 25mg의 셀룰라아제 및 반응시간에 있어서 72시간이었다. 실험을 통하여 얻은 글루코오스의 최대 수율은, 반응시간 72시간에서, % saccharification으로써 옥수수대에 대하여 37.4%였다. 그리고 효모를 사용하여, 이들 글루코오스를 알코올발효시켜 이론치의 95-98%의 에틸알코올을 얻었다.

Abstract—This paper deals with the enzymatic hydrolysis of different kinds of plant celluloses. The enzymatic hydrolysis of these materials by a complete cellulase from *Trichoderma viride* were carried out in the 0.15M acetate buffer solution at pH 5.0, 50°C, and hydrolysis conditions were 25mg cellulase, from *Trichoderma viride* for 100mg plant cellulose and 72 hours.

The maximum yield of glucose from these experiments was 37.4% in per cent saccharification for the indian corn stem without pretreatment for 72 hours. This enzymatic hydrolyzed solution of indian corn stem was concentrated by means of reversed osmosis until 100mg/ml glucose concentrations. And this glucose solution was fermented into ethanol, using the strain *Saccharomyces carlsbergensis* w34, giving yields of 95-98% of the theoretical value.

1. 서 론

나무나, 풀 혹은 보리짚 따위의 셀룰로오스를 포함하고 있는 바이오매스 물질을 분해하여, 그것으

로부터 새로운 대체에너지를 얻으려는 연구는 많은 사람들에게 의하여 수행되고 있다.

Bobleter와 그의 공동연구자들은 [1~5] hydro-thermolysis로 셀룰로오스를 분해하여 글루코오스

* 현주소 : 충북대학교 자연과학대학 화학과

를 얻고, 그것을 알코올로 만드는 연구를 하고 있다. 그들은 순수한 물만을 사용하여, 높은 압력하에서 265°C의 높은 온도로서, 셀룰로오스를 분해하여 52% 이상의 글루코오스를 얻는데 성공하였다. Eriksson등은[6~8] micro fungi를 사용하여 나무나 셀룰로오스를 분해시키는 연구를 하고 있으며, Bellamy[9], Spicer[10]등은 [11, 12] 폐 셀룰로오스로부터 단세포 단백질을 얻는 연구를 하고 있다. 그들은 또한 micro fungi를 사용하여, 전분이나 수크로오스, 혹은 락토오스로부터 단백질을 얻거나, 또는 폐 셀룰로오스의 효소에 의한 가수분해를 통하여 미생물단백질을 얻는 연구를 하고 있다. Ghose등은[13] 셀룰로오스 물질을 효소에 의하여 가수분해하고, 그의 메카니즘과 분해생성물에 대한 연구를 하고 있다. 그리고 Mandels등은 [14, 15] 나무나 종이들을 셀룰라아제를 사용하여 가수분해시켜 환원당을 얻는 연구를 하고 있다. 그리고 브라질에서는 옥수수대로부터 알코올을 만들어 자동차의 연료로 사용하고 있는 것이다. 이와같은 모든 연구들은 바이오매스를 이용하여 대체에너지원이나 대체식량원을 얻는 것이라고 생각할 수 있다.

그러나 이와같은 이들이 아직은 실제적으로 성공하고 있는 것은 아니다. 그러므로 본 연구의 목적은 셀룰라아제를 사용하여 셀룰로오스를 포함하고 있는 여러 식물이나, 혹은 쉼들을 가수분해하고, 이에 의하여 생성되는 글루코오스를, 다시 효모를 사용하여 알코올 발효시켜서, 에틸알코올을 얻는데 있다.

2. 실 험

2-1. 기기 및 시약

가수분해에 의하여 생성되는 글루코오스의 정량 분석에는, ALTEX, Model 110A, Waters Associates, HPLC를 사용하였고, 가수분해실험에는 Sorvall OTD-65, (Du Pont Instrument), Ultra Centrifuge; Heraeus Christ GMBH의 Centrifuge 및 Gerhardt SW20, 진탕수조를 사용하였다.

시약은 모두 Merck 제 분석용으로써, CH_3COOH , CH_3COONa , CH_3CN , $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, *Trichoderma viride*, cellulase를 실험에 사용하였다. 이 cellulase는 상업용 제품으로서, A. B. M. Chemicals Ltd. Stockport,

England였다. 글루코오스의 정량분석에 사용한 H-PLC의 column은, HPX-87H, amino column 300 × 7.8mm I. D., (Bio-Rad Labs., Richmond, CA, U. S. A)로서, ion exclusion micro-guard cartridges가 부착된 것이었다.

2-2. 효소 Activity 측정

효소역가 측정은 기질로서 여과지를 이용하였다 [15]. 여과지 (TOYO No. 1) 100mg에 효소 25mg을 가한 다음, pH 4.8인 0.2M 아세트산 완충용액 8 ml를 넣고, 50°C에서 1시간동안 반응시킨후, 생성된 환원당을 DNS 방법으로 측정하였다. 효소역가는 셀룰라아제 1mg에 대하여 생성되는 환원당의 mg수로 표시하였다. 가수분해에 사용된 *Trichoderma viride* cellulase의 activity는 0.11이었다.

2-3. 식물셀룰로오스의 가수분해

옥수수대 및, 여러종류의 풀과 쉼들을 길이 1cm, 폭 2~3mm로 잘라 상온하의 공기중에서 일주일동안 건조시켰다. 그리고 이렇게 건조시킨, 각각의 기질 100mg에 대하여 *Trichoderma viride* cellulase 25mg을 각각 칭량하여 25ml들이 이중마개를 한 폴리에틸렌병에 넣었다. 그리고 8 ml의 0.15M CH_3COONa , pH=5.0 완충용액을 가하였다. 마개를 막고, 진탕수조에 넣은 다음, 온도를 50°C로 유지하고, 72시간동안 천천히 흔들며 주면서 반응시켰다. 반응 종료 1분전에 6 ml의 증류수를 가하여, 전체 반응용액의 부피를 14ml로 하였다. 72시간이 되면 반응용기를 꺼내어, 즉시 냉장고에 보관하였다. 반응도중, 하루에 두번씩 폴리에틸렌 용기를 꺼내어, 5초동안 손으로 강력히 흔들어 주었다. 일정한 양의 반응용액을 취하여 원심분리하고, 그 상등액을 취하여 HPLC로 글루코오스의 양을 정량분석 하였다.

Heraeus Christ GMBH Centrifuge를 사용하여, 상온에서 3000rpm/min으로 10분간 용액을 원심분리하였다.

2-4. 글루코오스의 정량분석

ALTEX, Model 110A, (Waters Associates), H-PLC를 글루코오스의 정량분석에 사용하였다.

HPX-87H amino column를 사용하였고, 이동상으

로서, 77% acetonitrile+23% water를, flow rate는 2.0ml/min로 했다.

% saccharification은 다음식에 의해 계산하였다 [16]. 여기서 각 기질의 무게는 absolute dry mass로 환산하여 % saccharification 값을 얻는데 사용하였다. absolute dry mass는 실험 2-3의 방법으로 건조시킨 각각의 기질을, 105°C 하에서 24시간 동안 건조시킨 다음 칭량한 기질의 무게이다.

% Saccharification

$$= \frac{\text{Glucose mg/ml}}{\text{Substrate mg/ml}} \times 0.9 \times 100 \% \quad (1)$$

여기서 인자 0.9는 glucan monomer, $C_6H_{10}O_5$ 의 glucose, $C_6H_{12}O_6$ 에 대한 무게비를 표시한다.

2-5. Alcohol 발효

Merck제 글루코오스 100g을 300g의 2회 증류수에 녹인 다음, 이용액을 Fermentor, (Bioengineering System, Ch-8636Wald) 한편 100g의 *Saccharomyces Carlsbergensis* W34 Strain 200g 2회 증류수에 희석한 다음, 그것을 Fermentor에 넣고, 마지막으로 2회 증류수 500g을 다시 넣었다. 그리고 25°C의 온도에서 rpm 80으로 알코올 발효시켰다. 알코올 발효는, 질소 분위기에서 수행되었다. 일정한 시간마다, 일정한 양의 발효용액을 채취하여, 냉장고에 보관하였다. 식물 셀룰로오스의 가수분해 생성물의 알코올 발효는, Bobleter [17]와 Bonn [18]의 방법에 따라 수행하였고, 글루코오스의 함량은 표준 글루코오스의 양과 같은, 100g glucose/glucose/1000g water로 하였다.

알코올의 정량분석은, μ -Spherogel Carbohydrate, Beckmann으로 하였으며, flow rate는 0.6ml/min, column 온도는 85°C로 하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1에는 여러종류의 풀과 밀짚 등에 대한 가수분해 결과가 그려져 있다. 이 중에는 옥수수대가 가장 가수분해가 잘되었고, 클로우버, 풀, 밀짚 및 보리짚의 순서로 가수분해가 감소되었다. 72시간 가수분해한 후의 옥수수대의 % saccharification은 37.4%였다. 식물바이오매스에 대한 화학적인, 혹은 물리적인 전처리를 하지 않고 이 정도의 전환율

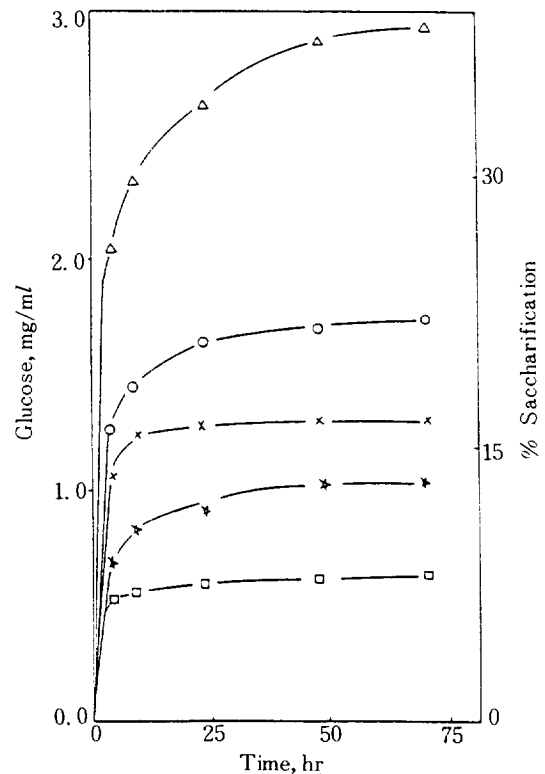


Fig. 1. Hydrolysis of various grasses and straws by a complete cellulase from *Trichoderma viride*.

Hydrolysis conditions; Plant cellulose; 100mg, Cellulase; 25mg, Buffer solution; 0.15M, $CH_3COONa-CH_3COOH$, pH=5.0, Reaction temperature; 50°C, ○; Clover, □; Barley straw, △; Indian corn stem, ☆; Wheat straw, ×; Grass.

을 얻는다는 것은 매우 귀중한 것이다 [15]. 여러종류의 목화 및 솜의 가수분해결과가 Fig. 2에 그려져 있다. Fig. 2에서 볼 수 있는 것처럼, 면화와 순수한 솜을 72시간 동안 가수분해하였을 때의 % saccharification은 각각 24.8% 및 22.7%이다. 그리고 48시간 동안 가수분해하였을 때의 값은 각각 21.1% 및 19.4%이다. 면화나 솜은, 다른 천연식물셀룰로오스에 비하여 가수분해 정도가 낮은 이유는, 이들 셀룰로오스가 높은 결정성의 구조를 갖고 있어, 큰 분자량을 갖는 효소성분들이 결정성속으로 스며들어서, 흡착되기가 어렵기 때문이다 [16]. 솜 찌꺼기와 이탈리아 포플라의 포를 사용하여 가수분해한 결과는, 면화와 순수한 솜에 비하면 매우 나

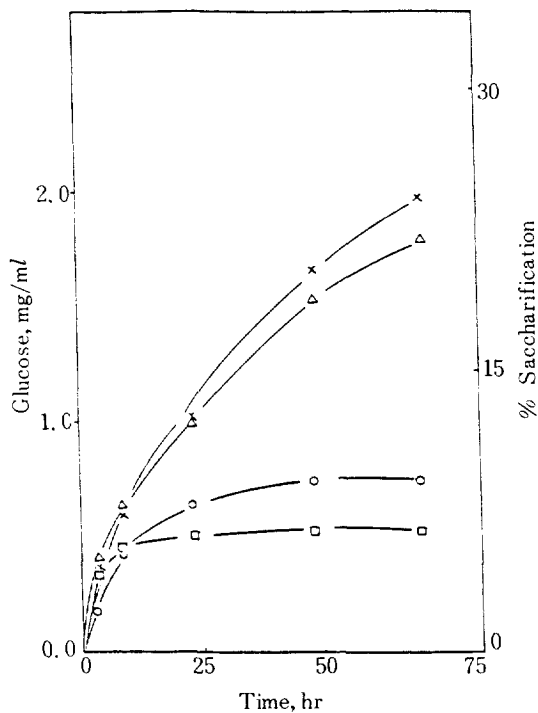


Fig. 2. Hydrolysis of various cottons by a complete cellulase from *Trichoderma viride*.

Hydrolysis conditions are as Fig. 1, ○; Cotton waste, fibrous, □; Italian poplar bract, fibrous, △; Pure cotton, white, fibrous, ×; Raw cotton, fibrous.

쁘다. 그리고 이것들은 24시간 지나면, 거의 가수분해되지 않음을 Fig. 1을 통하여 볼 수 있다. 그러나 면화와 순수한 솜은 시간이 경과함에 따라 가수분해도 증가하고 있음을 알게 된다.

글루코오스 표준용액과, 셀룰라아제를 사용하여 옥수수대를 가수분해하여 생성한 글루코오스 수용액의 알코올발효 결과가 Fig. 3에 그려져 있다. 셀룰라아제에 의한 옥수수대의 가수분해생성물 중의 글루코오스는, Reverse Osmosis방법에 의하여 [17, 18], 글루코오스의 함량이 10%가 될때까지 농축하였다. 즉 글루코오스의 농도가 100mg/ml가 되도록 하였다.

그런 다음 이 글루코오스 용액을 발효시켰다. 알코올 수율산출의 방법 및 이론은 Bonn [18] 등의 방법에 따라하였다. Fig. 3을 통하여 볼 수 있는 것처럼, 글루코오스 표준용액은, 알코올 발효가 시작됨에 따라 글루코오스의 농도가 급격히 감소한다.

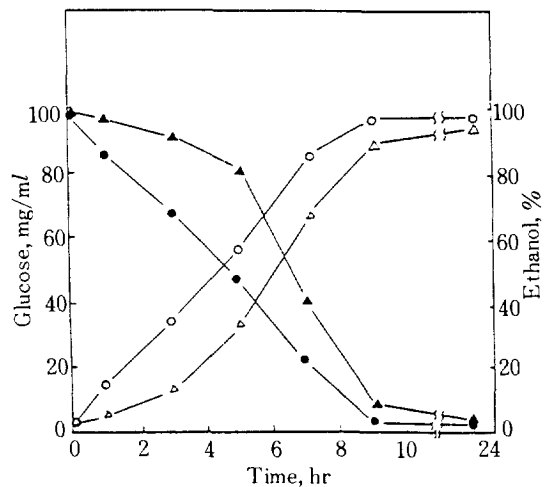


Fig. 3. Fermentation of standard glucose and enzymatic hydrolysis solution of the Indian corn stem.

Temperature; 25°C, rpm; 80, ●; Standard glucose solution; 0.1g glucose/1g water, ○; Ethanol yield for the standard glucose solution, ▲; Enzymatic hydrolysis solution of the Indian corn stem; 0.1g glucose/1ml solution, 10 times extracted, △; Ethanol yield for the enzymatic hydrolysis solution of the Indian corn stem.

그리고 이와같은 글루코오스의 감소는 발효후 9시간이 지남에 따라 거의 일정하게 된다. 24시간 후의 글루코오스의 잔류량은 농도로서, 3.58mg/ml가 된다. 그러나 옥수수대의 분해생성물인 글루코오스는 서서히 농도가 감소하고 있다. 모든 경우에 있어서, 24시간 동안에 글루코오스 분해물의 대부분이 에틸알코올로 전환됨을 볼 수 있다. 분해생성물을 Osmosis하더라도, furfural과 hydroxymethylfurfural의 양이 inhibition limit를 넘고 있는 때문이라 여겨진다 [18, 19].

본 실험을 통하여, 글루코오스 표준용액과 옥수수대의 분해생성물인 글루코오스 용액의 알코올 발효에 의한 에틸알코올의 수율은, 각각 98%와 95%이었다. 매우 높은 수율이라 여겨진다. 옥수수대의 경우, 그 분해생성물의 알코올 발효에 있어서, 글루코오스의 양의, 5시간까지는 거의 서서히 감소하고 있는데, 이것은 분해생성물의 농도와 점도가 커서, 온도방해가 일어나기 때문에 나타나는 현상으로 여겨진다 [18].

감 사

본 연구는, 오스트리아 정부의 저개발도상국학자에게 주는 연구비로 이루어졌으며, 이에 대하여 오스트리아 정부에 감사한다.

REFERENCES

1. Bobleter, O. and Pape, G. : *Austrian Pat.*, **263**, 661 (1968).
2. Bobleter, O., Binder, H., Concin, R. and Burtscher, E. : "Energy from Biomass", Applied Science Pub., London, 1981, p. 554.
3. Bobleter, O., Bonn, G. and Concin, R. : "Alternative Energy Sources", 111. Vol. 3, Hemispheres Pub., Washington, D.C., 1983, p. 323.
4. Bobleter, O. and Bonn, G. : *Carbohydr. Res.*, **124**, 185 (1983).
5. Bonn, G., Concin, R. and Bobleter, O. : *Wood Sic. Technol.*, **17**, 195 (1983).
6. Eriksson, K-E. : *Pure and Appl. Chem.*, **53**, 33 (1981).
7. Wilcox, W.W.; *Bot. Rev.*, **26**, 1 (1970)
8. Ander, P. and Eriksson, K-E. : *Prog. Ind. Microbiol.*, **14**, 1 (1978).
9. Bellamy, W.D. : *Biotechnol. Bioengng.*, **16**, 869 (1974).
10. Spicer, A. : *Tropical Sci.*, **13**, 239 (1971).
11. Gregory, K.F., Reade, A.E., Khor, G.L., Alexander, J.C., Lumsden, J.H. and Losos, G. : *Food Technol.*, March, 1976, p. 30.
12. Hatakka, A. and Anttonen, E. : *Proceedings of the 2nd Int. Meeting on Biophysics and Biotechnology in Finland.*, 1976, p. 99.
13. Ghose, T.K. and Bisaria, V.S. : *Biotechnol. Bioengng.*, **11**, 131 (1979).
14. Mandels, M., Kostick, J. and Parizek, R. : *J. Polym. Sic.*, Part C. No. **36**, 445 (1971).
15. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J. : *Biotechnol. Bioengng.*, **16**, 1471 (1974).
16. Mandels, M. and Sternberg, D. : *J. Ferm. Technol. Japan*, **54**, 267 (1976).
17. Bobleter, O., Bonn, G. and Concin, R. : *Alternative Energy Sources III*, Hemisphere Publ. corp., WA, USA, Vol-3, 1983, p. 323.
18. Boon, G., Pfeifer, P., Schwald, W. and Bobleter, O. : 6th Miami International Conference on Alternative Energy Sources, 12-14, Dec. Miami Beach, Florida, 1983.
19. Bonn, G., Pecina, R., Burtscher, E. and Bobleter, O. : *J. Chromatg.*, Notes, **22**, 17 (1984).