

혼합효소에 의한 셀룰로오스의 가수분해

金東洄 · 梁在昊 · 鄭榮奎

충북대학교 자연과학대학 화학과
(1986년 3월 11일 접수, 1986년 5월 15일 채택)

Hydrolysis of Cellulose by Enzyme Mixture

Dong Won Kim, Jae Ho Yang and Young Guy Jung

Department of Chemistry, College of Natural Sciences,
Chungbuk National University, Cheongju 310, Korea

(Received 11 March 1986; accepted 15 May 1986)

요 약

Trichoderma viride cellulase의 약한 β -glucosidase의 활성을 보충해주기 위해 *Trichoderma viride* cellulase와 *Aspergillus niger* cellulase를 혼합하여 여러종류의 셀룰로오스를 가수분해하였다.

혼합효소는 완전한 cellulase로 알려진 *Trichoderma viride* cellulase보다 효과적으로 셀룰로오스를 분해하였다.

미세결정성 셀룰로오스와 결정성 셀룰로오스를 혼합효소로 48시간 가수분해하였을 때 당화율이 각각 53 및 85%로 *Trichoderma viride* cellulase에 의한 당화율보다 1.32 및 1.15배 증가하였다.

Abstract—To enhance the activity of β -glucosidase in enzyme system from *Trichoderma viride*, the cellulase from *Trichoderma viride* and *Aspergillus niger* were mixed and various celluloses were hydrolyzed by using the mixed cellulase.

The mixed enzyme had an effect on hydrolysis of the cellulosic materials more than cellulase from *Trichoderma viride*. The saccharification percentages of microcrystalline and noncrystalline cellulose after 48 hr hydrolysis were 53 and 85% respectively.

These saccharification values were 1.32 and 1.15 times as high as those of cellulase from *Trichoderma viride*.

1. 서 론

셀룰로오스는 우리 주변에서 가장 풍부한 탄소원으로 매년 4.4×10^{14} lbs라는 막대한 양이 식물의 광합성에 의하여 합성되지만 이중 극히 일부만 유

용하게 이용되고 있다[1].

현재 세계적인 에너지 문제때문에 풍부한 자원 중의 하나인 셀룰로오스를 글루코오스로 전환시켜 단세포 세포질(SCP), 에탄올, 부탄올 등 여러가지 발효생산물의 기본 기질로 이용하여 식량, 에너

지 및 환경공해 문제 해결을 위한 많은 연구가 진행되고 있다[2]. 셀룰로오스를 분해할 수 있는 균들은 여러종류가 있으며 사상균에서 많이 알려져 있는데 특히 *Trichoderma* 속에 관한 연구가 많이 되었다[3]. 지금까지 발표된 보고에 의하면 *Trichoderma viride*에서 나온 cellulase가 가장 효과적인 것으로 천연 셀룰로오스를 잘 분해시킨다. 그러나 Stenberg에 의하면 *Trichoderma viride* cellulase는 exoglucanase와 endoglucanase의 활성도는 높지만, β -glucosidase의 활성도가 낮기 때문에 효소적 가수분해에 있어 가장 큰 inhibitor로 작용하는 cellubiose를 글루코오스로 전환하는 능력이 부족하다. 그러므로 당화율이 낮아지고, 순수한 글루코오스만을 얻으려할 때는 cellubiose가 불순물이 된다고 하였다.

반면에, *Aspergillus niger*로부터 나온 cellulase는 exoglucanase와 endoglucanase의 활성도는 낮지만 β -glucosidase의 활성도는 매우 높다고 하였다[4, 5]. 셀룰로오스를 효과적 방법으로 가수분해하여 글루코오스를 얻으려면 보다 완전한 cellulase를 생산할 수 있는 새로운 변이종의 개발이 시급하지만 아직 요원하기 때문에 *Trichoderma viride*로부터 나온 cellulase의 응용은 중요하다.

Seely는 *Trichoderma viride* cellulase에 이어 *Aspergillus niger* cellulase의 처리, 즉 "Two Step Enzyme Processing"으로 가수분해수율을 높이고, 환원당으로 95% 이상의 D-glucose를 얻었다[5].

본 연구의 목적은, *Trichoderma viride* cellulase와 *Trichoderma viride* cellulase에 부족한 β -glucosidase를 *Aspergillus niger* cellulase로 보충할 수 있도록 이들 두 cellulase를 혼합한 cellulase로 여러 종류의 표준셀룰로오스 및 천연셀룰로오스를 가수분해하고자 한다. 가수분해에 있어 최적 pH, 온도 및 반응시간 그리고 천연셀룰로오스의 전처리 효과를 알아보고, 혼합한 cellulase의 가수분해 특성을 연구하려고 한다.

2. 실험

2-1. 기기 및 시약

실험에 사용한 여러 종류의 표준셀룰로오스는 Sigma 회사의 α -cellulose, microcrystalline cellulose

및 noncrystalline cellulose로 모두 TLC용이었고, *Trichoderma viride* cellulase는 BDH, *Aspergillus niger* cellulase는 Sigma 회사 제품이었다. 혼합 cellulase는 *Trichoderma viride* cellulase와 *Aspergillus niger* cellulase를 10:1 (W/W)로 균일하게 섞어서 사용하였다. 본 내용에서 이것을 T-A mixed cellulase로 약칭하기로 한다. 환원당 정량분석에는 Spectrophotometer(Shimadzu Co)를 이용하였다.

2-2. 효소 Activity 측정

효소 역가측정은 기질로서 여과지를 이용하였다[6]. 여과지(Whatman No. 1) 50mg에 대하여 효소 10mg과 pH 4.8의 0.2M sodium acetate 완충용액 5ml를 넣은 뒤 50℃에서 1시간 반응시킨 후, 생성된 환원당을 DNS 방법으로 측정하여, 효소 1mg당 생성된 환원당을 activity (환원당 mg/mg)로 하였다. 가수분해에 사용된 T-A mixed cellulase, *Trichoderma viride* cellulase와 *Aspergillus niger* cellulase의 activity는 각각 0.77, 0.76 및 0.2이었다.

2-3. 전처리

Plant biomass의 리그닌 및 불순물 제거는 다음과 같은 방법으로 전처리 하였다[6, 7]. 벼짚, 보리짚 및 옥수수대는 1cm의 크기로 자른후, 1% NaOH 용액과 시료가 10:1 (W/W) 되도록 하여, 80℃에서 3시간 동안 처리하였다. 소나무와 포플러는 톱밥으로 만든 후, 1% NaOH 용액에 시료가 7:1 (W/W) 되도록하고, 3시간 처리후 이어서 20% peracetic acid 용액에서 1시간 동안 교반하면서 끓였다. 전처리한 기질의 알칼리성분을 제거하기 위해 pH가 중성이 될때까지 증류수로 씻어낸 후, 80℃ Oven에서 24시간 건조시켰다. 건조시킨 시료는 40-60 mesh로 분쇄한 후 기질로 사용하였다.

2-4. 셀룰로오스 및 천연셀룰로오스의 가수분해

여러종류의 표준셀룰로오스, 40-60 mesh의 plant biomass 및 가로와 세로의 길이를 1cm의 크기로 자른 종이류를 60℃에서 1시간 진공건조시킨 후 기질로 사용하였다. 80ml의 이중마개를 한 폴리에틸렌 용기에 기질 500mg에 대하여 120mg의 cellulase를 칭량하여 넣었다.

여기에 15ml 의 0.2M sodium acetate pH=4.8 완충용액을 가하고, 50℃의 water bath shaker에서 120 r. p. m으로 흔들어 주면서 반응시켰다. 환원당 정량은 반응물을 적절히 묽힌후 3,500 r. p. m에서 20분간 원심분리후 상등액을 취하여 DNS 법으로 생성된 환원당을 정량하였다[8]. 그리고 saccharification은 다음식에 의하여 계산하였다[3].

• Saccharification =

$$\frac{\text{Reducing Sugar mg/ml} \times 0.9}{\text{Substrate mg/ml}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

셀룰로오스 가수분해 효소는 최소한 3종류 이상의 복합체로 구성되어 있고 이들 복합된 효소의 협동 작용으로 가수분해가 이루어지기 때문에 최적 가수분해 반응의 pH와 온도가 각 효소성분에 따라 다르다[9]. 그러나 협동작용에 의하여 셀룰로오스가 글루코오스로 분해되기 때문에 환원당 전환능력

으로부터 최적 반응 pH와 온도조건을 찾을 수 있다. *T. viride* cellulase와 *A. niger* cellulase로 α-셀룰로오스를 가수분해 시킬때의 최적 pH를 알아보기 위하여 반응온도 50℃에서 0.2M sodium acetate 완충용액으로 pH를 3.6-5.6까지 0.2 간격으로 변화시켜 반응시켰으며, 최대활성을 Relative activity 100으로 하여 Fig. 1에 나타내었다. 두 cellulase 모두 pH 4.6-5.2사이에서 가수분해능이 높았으며 pH 4.8에서 최고 활성을 나타내었다. 온도에 의한 영향은 최적반응 pH인 4.8로 고정한 후 30℃-70℃까지의 각 온도에서 반응시켰으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 50℃에서 최대 활성을 나타내며, 55℃ 이상의 온도에서는 가수분해능이 50% 이상 떨어지는데 이것은 효소의 열적 안정성이 감소되었기 때문이라 생각된다.

가수분해 시간과 생성된 환원당과의 관계는 Fig. 3과 같다. 8시간까지의 가수분해는 빠르게 진행되었고, 24시간 이내에 70% 이상 가수분해 생성물을 얻을 수 있었다. 48시간후 생성되는 환원당은

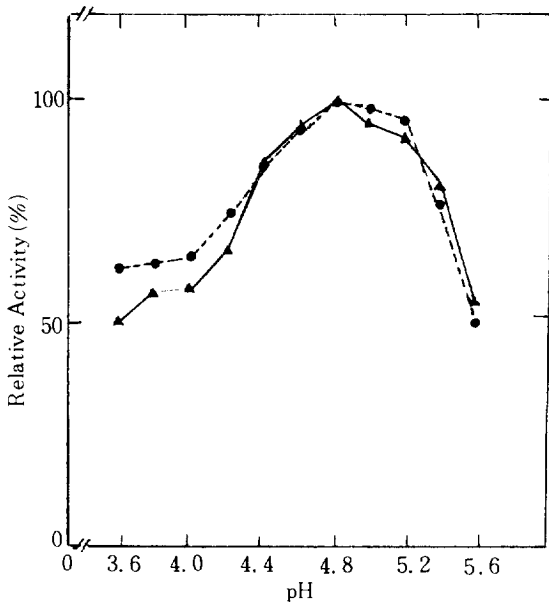


Fig. 1. Effect of pH on hydrolysis of α-cellulose by *Trichoderma viride* cellulase and *Aspergillus niger* cellulase.

●---● *Trichoderma viride* cellulase, ▲---▲ *Aspergillus niger* cellulase.

Reaction temperature : 50℃, Reaction time : 48hrs.

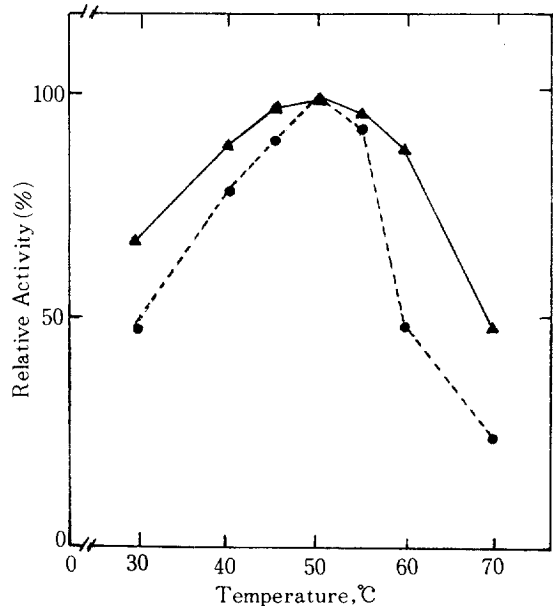


Fig. 2. Effect of temperature on hydrolysis of α-cellulase by *Trichoderma viride* cellulase and *Aspergillus niger* cellulase.

●---● *Trichoderma viride* cellulase, ▲---▲ *Aspergillus niger* cellulase.

Reaction temperature: 50℃, Reaction time : 48hrs.

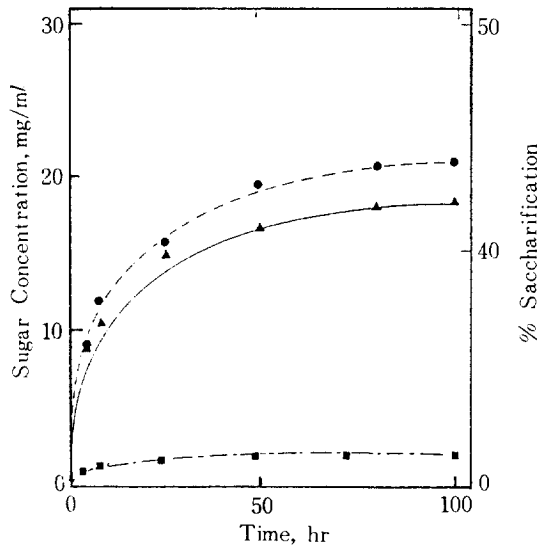


Fig. 3. Effect of hydrolysis time on saccharification of α -cellulose by *Trichoderma viride* cellulase, *Aspergillus niger* cellulase and *Trichoderma viride-Aspergillus niger* mixed cellulase.

●---● *Trichoderma viride-Aspergillus niger* mixed cellulase, ▲---▲ *Trichoderma viride* cellulase, ■---■ *Aspergillus niger* cellulase.

Buffer solution: 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 4.8, Reaction time: 48hrs.

매우 조금씩 증가되었다. T-A mixed cellulase에 있어서는 48 시간에서 당화율이 48.6%이며, 100 시간 후에는 59.4%로 약간 증가함을 볼 수 있다.

이상의 결과로부터 셀룰로오스를 가수분해 하기 위한 최적조건은 셀룰로오스 500mg에 대하여 120mg의 cellulase를 사용하였을 때, 가수분해 시간은 48 시간, 온도는 50°C 그리고 완충용액은 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH=4.8임을 알 수 있다. 이와같은 조건으로 여러 종류의 표준셀룰로오스 및 천연셀룰로오스를 가수분해한 결과를 Fig. 4, 7에 나타내었다. 여러종류의 표준셀룰로오스를 *T. viride* cellulase, *A. niger* cellulase 및 T-A mixed cellulase로 가수분해 한 결과는 Fig. 4와 같다. 세 종류 cellulase 모두 비결정성 셀룰로오스를 가장 잘 가수분해 시켰으며, cotton fibrous에 대해 가수분해 정도가 매우 낮았다. 셀룰로오스가 높은 결정성이면 큰 분자량을 가진 효소분자가 결정성속으로

스며들어 흡착되기가 어렵기 때문에 가수분해가 억제된다[3, 10]. 그러나 *T. viride* cellulase와 T-A mixed cellulase를 사용하여 가수분해하였을 때, 미세결정성 셀룰로오스는 α -셀룰로오스보다 24 시간 이후에 가수분해 속도가 증가하기 시작하였다. 이것은 *T. viride* cellulase가 결정성 셀룰로오스에 대하여 가수분해 활성이 높은 점도 있지만, 높은 결

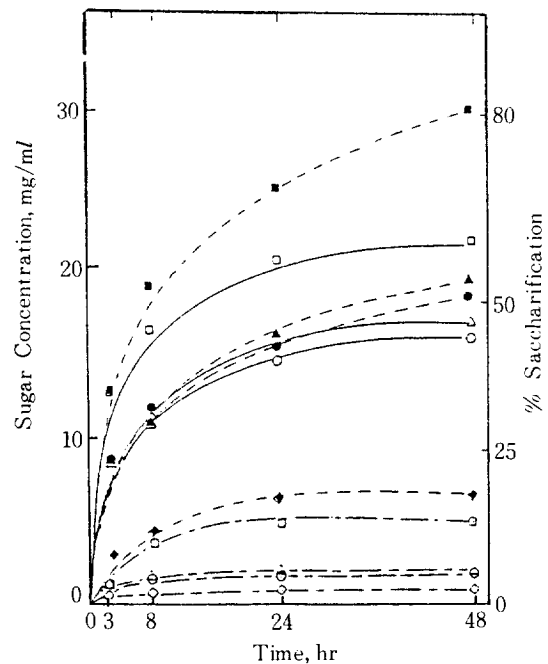


Fig. 4. Hydrolysis of pure celluloses by *Trichoderma viride* cellulase, *Aspergillus niger* cellulase and *Trichoderma viride-Aspergillus niger* mixed cellulase.

●---● α -Cellulose (T-A mixed cellulase),
▲---▲ Avicel (T-A mixed cellulase),
■---■ Noncrystalline cellulose (T-A mixed cellulase),
◆---◆ Cotton fibrous (T-A mixed cellulase),
○---○ α -Cellulose (*T. viride* cellulase),
△---△ Avicel (*T. viride* cellulase),
□---□ Noncrystalline cellulose (*T. viride* cellulase),
◇---◇ Cotton fibrous (*T. viride* cellulase),
○---○ α -Cellulose (*A. niger* cellulase),
△---△ Avicel (*A. niger* cellulase),
□---□ Noncrystalline cellulose (*A. niger* cellulase),
◇---◇ Cotton fibrous (*A. niger* cellulase).
Buffer solution; 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 4.8, Reaction temperature; 50°C, Reaction time; 48 hrs.

정성의 셀룰로오즈도 화학적 또는 물리적 전처리를 통하여 효소가 흡착할 수 있는 반응표면적을 증가시켰을 때 당화율이 증가할 수 있음을 나타내고 있다. 48 시간 가수분해 후 *T-A* mixed cellulase와 *T. viride* cellulase는 *A. niger* cellulase 보다 당화율이 4 배이상 높게 나타내었다. *A. niger* cellulase의 당화율은 비결정성 셀룰로오즈에 대하여 13%이고 α -셀룰로오즈와 미세결정성 셀룰로오즈에 대하여 각각 6% 이었다. *T. viride* cellulase의 가수분해 속도에 비하여 *T-A* mixed cellulase의 비결정성 셀룰로오즈 가수분해 속도는 3 시간 이후에 급격하게 증가되기 시작하여, 48 시간이 지난 후 당화율이 81%로 완전한 cellulase로 알려진 *T. viride* cellulase 보다 20% 높게 나타내었다.

α -셀룰로오즈와 미세결정성 셀룰로오즈는 24 시간 이후에 증가되기 시작하여 48 시간 후에는 당화율 값이 각각 49%와 53%로 *T. viride* cellulase 보다 5%와 7% 높게 증가되었다. 이와같이 *T-A* mixed cellulase의 경우에 일정시간이 지나면서 가수분해 속도가 증가되는 현상은 *A. niger* cellulase로부터 공급받은 활성이 높은 β -glucosidase가 가수분해 생성물인 cellubiose를 글루코오스로 빠른 시간내에 전환시켜 cellubiose가 주는 exoglucanase와 endoglucanase에 대한 강한 Inhibition을 감소시키기 때문이다. 셀룰로오즈의 가수분해는 높은 exoglucanase와 endoglucanase의 활성에만 의존하지 않고, 높은 활성의 β -glucosidase가 함께 공존하였을 때 이들 효소 성분들에 의한 협동작용이 원활히 이루어져 가수분해 속도가 증가된다(4, 5, 7). 벚짚, 보리짚 및 옥수수대에 대한 가수분해 결과는 Fig. 5에 나타내었다. *T. viride* cellulase를 사용하여 전처리 하지 않은 벚짚, 보리짚 그리고 옥수수대를 48 시간 가수분해 하였을 때 당화율은 각각 28.2%, 31.5% 및 33.6% 이었다.

전처리를 한 경우 같은 반응조건에서 당화율이 각각 78.6%, 52.9% 및 39.6%로 전처리를 하지 않은 것에 비하여 당화율이 2.8배, 1.7배 및 1.2배의 증가를 나타내고 있다. 이러한 결과는 천연셀룰로오즈를 가수분해 할 경우 물리적 또는 화학적 전처리의 중요성과 필요성을 보여주고 있다. 셀룰로오즈가 리그닌과 같은 불순물과 혼재되어 있으면, 효소의 glycosidic bonds에의 접근을 제한하기 때문

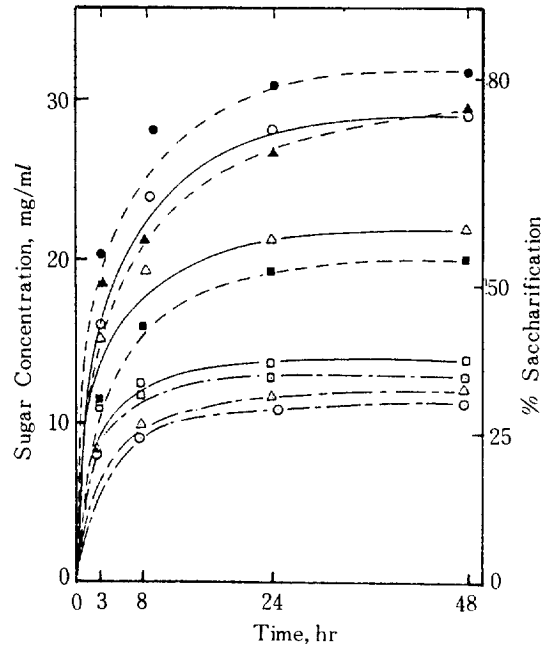


Fig. 5. Hydrolysis of cellulosic materials by *Trichoderma viride* cellulase, *Aspergillus niger* cellulase and *Trichoderma viride-Aspergillus niger* mixed cellulase.

●---● Rice straw pretreatment (*T-A* mixed cellulase), ○---○ Rice straw pretreatment (*T. viride* cellulase), ○---○ Rice straw control (*T. viride* cellulase), ▲---▲ Barley straw pretreatment (*T-A* mixed cellulase), △---△ Barley straw pretreatment (*T. viride* cellulase), △---△ Barley straw control (*T. viride* cellulase), ■---■ Corn stem pretreatment (*T-A* mixed cellulase), □---□ Corn stem pretreatment (*T. viride* cellulase), □---□ Corn stem control (*T. viride* cellulase). Buffer solution; 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH=4.8, Reaction temperature; 50 °C, Reaction time; 48 hrs.

에 효소에 의한 전환이 억제된다(11, 12). *T-A* mixed cellulase를 사용하여 전처리한 벚짚, 보리짚 그리고 옥수수대를 48 시간 가수분해 하였을 때 당화율이 각각 85%, 77.7%, 54%으로 전처리한 기질을 *T. viride* cellulase로 가수분해 한것보다 당화율이 6.4%, 18.8% 및 14.4% 증가하였다. 소나무와 포플러에 대한 가수분해 결과는 Fig. 6에 나타내었다. *T. viride* cellulase을 사용하여, 전처리하지 않은 소나무 및 포플러를 48 시간 가수분해 하였

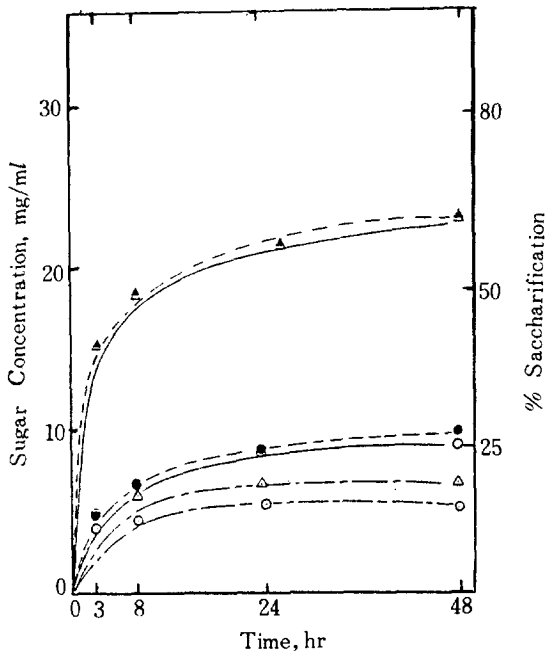


Fig. 6. Hydrolysis of cellulose materials by *Trichoderma viride* and *Trichoderma viride* - *Aspergillus niger* mixed cellulase.

▲---▲ Pine, pinus rigada Mill pretreatment (*T-A* mixed cellulase), △-△ Pine, pinus rigada Mill pretreatment (*T. viride* cellulase), △---△ Pine, pinus rigada Mill control (*T. viride* cellulase), ●---● Poplar, populus monilifera Ait pretreatment (*T-A* mixed cellulase), ○-○ Poplar, populus monilifera Ait pretreatment (*T. viride* cellulase), ○---○ Poplar, populus monilifera Ait control (*T. viride* cellulase)
Buffer solution; 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH=4.8, Reaction temperature; 50°C, Reaction time; 4 Zhrs.

을 때 당화율은 13% 및 14.9%이었다. 그러나 전처리를 한 경우 각각 23.4% 및 59.4%로, 소나무는 1.8배 그리고 포플러는 4배 높게 전처리효과를 나타냈다. *T-A* mixed cellulase를 사용하였을 때는 당화율이 약간 더 증가했으나 보리짚이나 벼짚에 비하면 당화율이 매우 낮은 편이었다. Nobuo Toyama에 따르면 1% NaOH와 peracetic acid에 의한 목재류의 불순물 및 리그닌 제거 방법은 좋지 않지만, 벼짚, 보리짚 및 옥수수대등에 대하여는 효과적이라 하였다[6]. Fig. 7에 여러종류의 종이에 대한 가수분해 결과를 나타내었다.

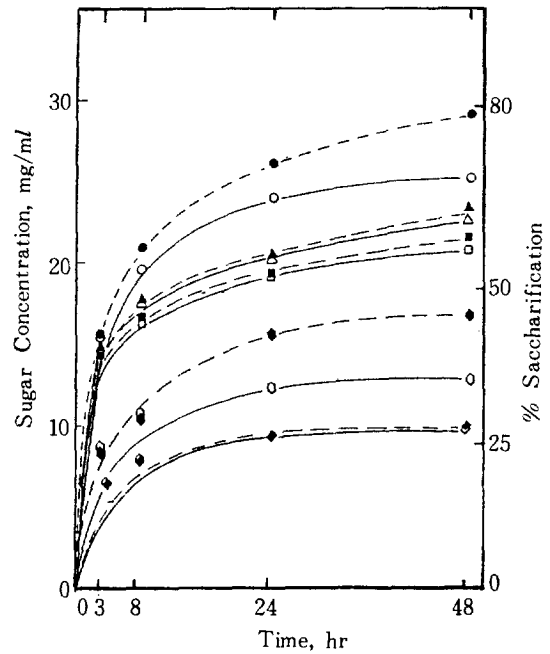


Fig. 7. Hydrolysis of various papers by *Trichoderma viride* and *Trichoderma viride* - *Aspergillus niger* mixed cellulase.

●---● Toilet paper, white, Monalisa (*T-A* mixed cellulase), ○-○ Toilet paper, white, Monalisa (*T. viride* cellulase), ▲---▲ Copying paper, white, A-4 (*T-A* mixed cellulase), △-△ Copying paper, white, A-4 (*T. viride* cellulase), ■---■ Note book paper, white, Mookook (*T-A* mixed cellulase), □-□ Note book paper, white, Mookook (*T. viride* cellulase), ●---● Filter paper, whatman No.1 (*T-A* mixed cellulase), ○-○ Filter paper, whatman No.1 (*T. viride* cellulase), ◆---◆ Newspaper (*T-A* mixed cellulase), ◇-◇ Newspaper (*T. viride* cellulase).

Buffer solution; 0.2M $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$, pH=4.8, Reaction temperature; 50°C, Reaction time; 48hrs.

T. viride cellulase와 *T-A* mixed cellulase에 의한 화장지, 복사용지, 공책종이, 여과지 및 신문지의 가수분해에 의하여 생성된 환원당의 양이 같은 순서대로 감소되고 있음을 볼 수 있다. *T-A* mixed cellulase로 48시간 가수분해 하였을 때 당화율은 화장지, 복사용지, 공책종이, 여과지 및 신문지에 대하여 80%, 63%, 57.8%, 45% 및 27%로 *T. viride* cellulase로 가수분해 하였을 때보다 당화율

이 각각 11%, 2%, 2.9%, 11% 및 0.2%씩 증가 하였다.

화장지, 복사지, 공책종이 및 여과지 순으로 가수분해가 감소하는 경향은 일정기질 무게에 대한 반응 표면적의 감소순서와 같은 경향성을 갖는다. 반응표면적은 종이의 앞면과 뒷면의 면적합으로 계산하였다. 기질무게 500mg에 대하여 화장지, 복사지, 공책종이 및 여과지의 반응표면적은 각각 260, 142, 100 및 84cm²이었다. 셀룰로오스의 효소적 가수분해시 반응표면적이 클수록 가수분해 속도가 증가함을 나타내고 있다. 신문지는 반응표면적이 172cm²이지만 불순물을 포함하고 있기 때문에 효소의 접근이 억제되어 가수분해가 잘 되지 않는 것이라 생각된다.

REFERENCES

1. Humprey, A.E.: *Biotechnol. Symp. No. 5*, 53 (1975).
2. Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J.: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1471 (1974).
3. Mandels, M. and Sternberg, D.: *J. Ferm. Technol., Japan*, **54**, 267 (1976).
4. Herr, D., Luck, G. and Dellweg, H.: *J. Ferm. Technol.*, **54**, 267 (1976).
5. Herr, D.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1601 (1980).
6. Toyama, N. and Ogawa, K.: *Biotechnol. Bioeng., Symp. No. 5*, 225 (1975).
7. Ghose, T.K. and Bisaria, B.S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 131 (1979).
8. Summer, J.B. and Somers, G.F.: *Laboratory Experiments in Biological Chemistry*, Academic, New York, p. 34 (1944).
9. Ghose, T.K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 239 (1969).
10. Cowling, E.: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5* (1975).
11. Mandels, M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 147 (1974).
12. Grethlein, H.E., Allen, D.C. and Converse A.O.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 26 (1984).