

## 목질계 바이오매스의 전처리 및 효소당화 연구

이진석\* · 이준표 · 조재경 · 이영우 · 홍종준 · 박순철

한국에너지기술연구소 바이오매스팀  
(1993년 5월 6일 접수, 1993년 9월 28일 채택)

### Optimization of Pretreatment Conditions for Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass

Jin Suk Lee, Jun Pyo Lee, Jae Kyung Cho, Young Woo Lee,  
Jong Jun Hong and Soon Chul Park

*Solar Thermal Research Dept., KIER*  
(Received 6 May 1993; accepted 28 September 1993)

#### 요 약

리그노셀룰로오스계 바이오매스의 대규모 효소 당화공정을 개발하기 위해 여러 가지 운전변수의 영향에 대해 검토했다. 증기폭쇄와 NaOH에 의한 탈리그닌 공정을 전처리공정으로 택하였다. 셀룰로오스와 당화수율 및 당화속도 등을 고려할 때 최적 전처리 조건은 증기폭쇄압과 폭쇄시간은 각각 25 kg/cm<sup>2</sup>, 6분이었고 탈리그닌 공정의 NaOH농도는 0.2%이었다. 당화가 진행됨에 따라 cellobiose에 의한 당화 억제효과가 두드러졌으며  $\beta$ -glucosidase를 소량 첨가함에 의해 당화속도와 수율을 크게 증가시킬 수 있었다. 5%(w/v) 폭쇄재의 효소당화에서 셀룰라아제만을 투입할 경우 50%의 당화수율을 얻는데 필요한 최소 효소량은 45 IU/g 기질인데 비해  $\beta$ -glucosidase를 소량 첨가할 경우 최소 셀룰라아제 필요량은 15 IU/g 기질로 감소하였으며 당화수율은 60%로 증가하였다. 0.1%(v/v) 계면활성제(Tween 20)의 첨가로 당화수율을 10% 증가시킬 수 있었다.

**Abstract**—For the development of large-scale enzymatic hydrolysis of lignocellulosics, the influence of various parameters has been studied. Steam explosion and delignification by NaOH have been adopted as a pretreatment process. Optimum pretreatment condition based on both cellulose yield and saccharification rate and yield were determined to be 6 min for steam explosion at 25 kg/cm<sup>2</sup> and 0.2% NaOH for delignification. With the addition of  $\beta$ -glucosidase, the rate and extent of hydrolysis were increased significantly. Optimum enzyme loading was determined to be 15 IU/g substrate with supplementation of  $\beta$ -glucosidase. The addition of surfactant(0.1%) increased the hydrolysis yield by 10%.

#### 1. 서 론

목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 풍부한 양, 재생 특성, 저렴한 원료비 등의 장점을 가져 에탄올생산 원료로서의 활용가능성이 높아지고 있다. 따라서 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 생물학적

방법으로 에탄올을 대량생산하는 공정의 개발연구가 활발히 진행되고 있다[1-4]. 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등의 주성분이 견고하게 결합되어 있어 바이오매스로부터 높은 수율로 에탄올을 생산하기 위해서는 이 3성분을 따로 구분하여 전환처리하여야 한다. 전기 3성분을 효율적으로 분리하기 위해

다양한 전처리공정이 개발되었다[5].

증기폭쇄법은 다른 전처리 공정과는 달리 원료를 미 분쇄할 필요가 없어 높은 에너지 효율성을 가지므로 특히 널리 사용되고 있다[6-10]. 증기폭쇄공정에서는 공급 수증기의 포화압(폭쇄압력), 폭쇄기내 체류시간(폭쇄시간)에 따라 폭쇄재의 수율 및 분리효율이 달라지며 당화공정에도 영향을 미친다. Heitz 등[11]은 폭쇄조건을 severity index라는 실험변수를 도입하여 정량화하여 폭쇄조건에 따른 폭쇄공정의 분리효율 및 폭쇄재의 수율변화를 측정하였다. 폭쇄시료를 물과 NaOH로 세척하면 헤미셀룰로오스와 리그닌을 각각 분리회수할 수 있다. 잔류 셀룰로오스는 효소에 의해 당으로 전환된다.

전처리 공정을 거친 폭쇄재에는 미세척 헤미셀룰로오스와 리그닌 등이 상당량 포함되어 있어 순수 셀룰로오스를 기질로하여 당화한 결과에 비해 낮은 당화속도와 수율을 갖는다. 그러나 현재까지의 대부분 연구는 시약급 셀룰로오스를 기질로 하여 수행되었으며 폭쇄시료를 기질로한 연구는 비교적 적다.

현재 한국에너지기술연구소에서는 대체에너지 연구사업의 일환으로 우리 나라에서 부존량이 가장 많은 참나무계 바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 시험용 공장(20t 연료알콜 생산규모/일)을 설계, 건설중이다. 이와 병행하여 위 공정의 운전 조건을 최적화하기 위해 기초연구를 수행하고 있다. 본 고에서는 증기폭쇄시간, 탈리그닌 공정에서 사용된 NaOH농도 등 전처리 공정의 조건이 효소 가수분해에 미치는 영향을 검토하고 시료물성의 효과도 규명하여 효율적인 전처리 조건을 찾고자 하였다. 또한 당화 공정에서의 효소 투입량 및 효소 성분비, 계면활성제의 첨가에 따른 당화 속도 및 수율의 변화를 분석하므로써 최적 당화조건을 도출하고자 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2-1. 바이오매스 시료

건조된 참나무 칩(참나무와 신갈나무의 1:1 혼합물)을 증기폭쇄장치(경북대 임산공학과)에서 최적 폭쇄압인 25 kg/cm<sup>2</sup>에서 3, 6, 9분간 폭쇄한 후 실험조건에 따른 적절한 농도의 NaOH용액으로 탈리그닌, 건조하여 4℃에서 보관하며 효소당화 시료로 사용하였다.

### 2-2. 효소

효소는 *T. reesei*의 배양액을 농축한 산업용 효소인 Celluclast 1.5 L(Novo Co., Denmark)과  $\beta$ -glucosidase를 강화한 효소인 Novozym 188(Novo Co., Denmark)을 사용하였다. 효소활성법[11] 측정에 의한 Cel-

Table 1. Overall yields of explosion runs of oak wood (wt%)

Explosion time, min	NaOH concentration, %		
	0	0.2	1.0
3	77	60	56
6	76	56	52
9	73	50	47

lucast의 filter paper activity는 74 IU/ml이었으며 Novozym 188의 효소 활성도는 250 CBU/ml이었다. 또한 Celluclast와 Novozym 188중의 잔류 환원당 농도는 22.2 g/l와 8.7 g/l이었다.

### 2-3. 효소당화

효소당화는 250 ml 플라스크에서 전처리한 폭쇄재, 효소와 pH 4.8로 조절된 citrate 완충용액을 실험조건에 따라 슬러리 100 ml로 만들어 250 ml 플라스크에 넣고 50℃로 유지된 공기 진탕 배양기에서 실험하였다. 반응도중 일정시간 간격으로 2 ml씩 시료를 채취하여 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리시킨 뒤 상등액만 취하여 당분석을 하였다. 생성 환원당은 DNS방법[12]으로 측정하였고 포도당은 포도당 측정용시약(영동제약)을 사용하여 정량하였다[13]. 리그닌 분석은 한국공업규격(KSM 7045)[14]에 준하여 정량하였다.

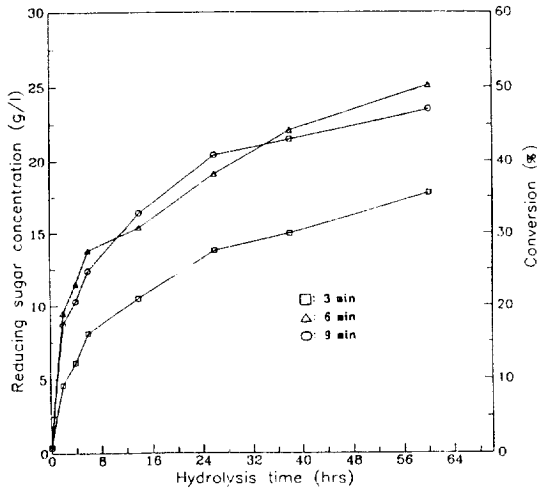
## 3. 실험결과 및 고찰

### 3-1. 전처리 조건에 따른 폭쇄재의 수율 및 리그닌 함량

폭쇄시간과 탈리그닌 과정에 사용된 NaOH농도 등의 전처리 조건에 따른 폭쇄재의 수율과 리그닌 함량을 결정하기 위해 25 kg/cm<sup>2</sup>의 증기압에서 3, 6, 9분간 폭쇄 처리후 냉동건조를 마친 폭쇄재 50 g을 2l의 냉수, 0.1% (즉 NaOH와 폭쇄재의 무게비 0.04), 0.2%(NaOH와 폭쇄재의 무게비 0.08), 1% NaOH 용액(NaOH와 폭쇄재의 무게비는 0.4)으로 각각 탈리그닌한 후 건조하여 폭쇄재 수율을 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 동일한 농도의 NaOH로 탈리그닌을 하는 조건에서는 폭쇄시간이 길어질수록 폭쇄재의 수율은 낮았다. 동일 폭쇄시간을 거친 폭쇄재에서는 탈리그닌에 사용된 NaOH 농도가 높아짐에 따라 수율은 낮아졌다. 전처리 조건에 따른 폭쇄재내 리그닌함량을 분석한 결과를 Table 2에 나타냈다. 폭쇄재는 NaOH용액으로 탈리그닌시 냉수 추출에 비해 리그닌 함량이 현저히 낮았다. 그러나 NaOH 농도가 0.2%에서 1%로 증가하는데 따른 리그닌 함량의 감소는 미미했다. 따라서 탈리그닌 공정에서의 최적

Table 2. Lignin content in pretreated oak wood(wt%)

NaOH concentration, %	0	0.1	0.2	1.0
Explosion time, min				
3	28.7	25.6	17.3	16.9
6	29.7	24.6	11.7	8.9
9	39.6	16.9	8.6	8.4

Fig. 1. Enzymatic hydrolysis of 0.2% NaOH delignified wood at various steam explosion time at 25 kg/cm<sup>2</sup>.

NaOH량은 폭쇄재의 수율, NaOH 비용, 탈리그닌 후 처리 공정 등을 고려할 때 폭쇄재량의 8%로 결정했으며 이 값은 다른 연구팀의 실험결과와도 비슷하다[15, 16]. 따라서 최적 전처리 조건은 폭쇄시간 6분, 0.2% NaOH로 결정하였다.

### 3-2. 폭쇄처리시간이 효소당화에 미치는 영향

3, 6, 9분간 폭쇄한 시료를 0.2% NaOH로 탈리그닌 후 효소농도 45 IU/g 기질의 조건에서 효소당화한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 3분 폭쇄한 시료는 6, 9분 폭쇄한 시료에 비해 당화속도 및 수율이 현저히 낮아 60시간 당화시 전환율은 36%에 불과했다. 6분, 9분 폭쇄시료는 60시간 당화시 각각 47, 50%의 전환율을 나타냈다. 이와 같이 3분 폭쇄한 시료에서의 낮은 전환율은 리그닌 함량이 17.3%로서 타시료에 비해 월등히 높은 것으로 미루어(Table 2 참고) 리그닌에 의한 당화반응 억제 효과에 기인하는 것으로 해석되며 효율적인 당화를 하기 위해서는 리그닌 함량을 일정량 이하로 유지해야 함을 보여준다.

### 3-3. NaOH 농도에 따른 효소당화

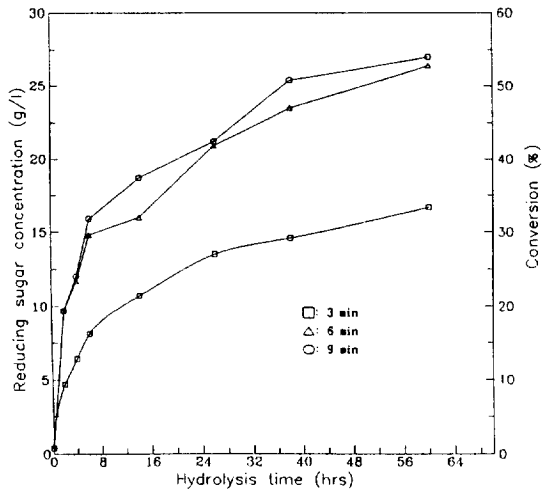
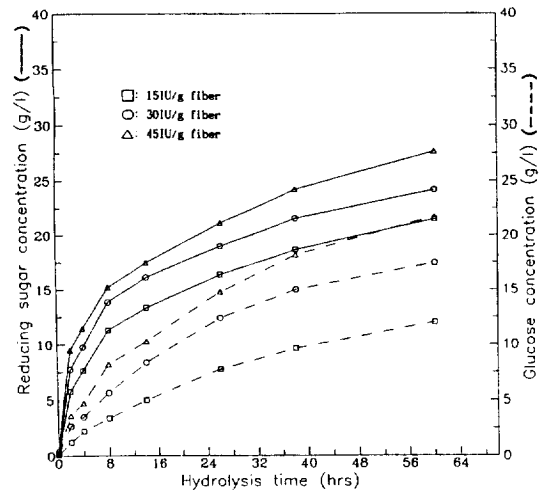
Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of 1% NaOH delignified wood at various steam explosion time at 25 kg/cm<sup>2</sup>.

Fig. 3. Effect of the addition of fresh enzyme on the enzymatic hydrolysis of steam exploded for 6 min and 0.2% NaOH delignified wood.

3분 폭쇄한 시료가 타시료에 비해 현저히 낮은 당화 수율을 보임에 따라 6분 폭쇄한 시료에 대해 0.2%, 1% NaOH로 탈리그닌 후 효소농도 45 IU/g 기질의 조건에서 효소당화한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 1% NaOH로 탈리그닌한 시료의 60시간 당화후 전환율은 53%로서 0.2% NaOH로 탈리그닌한 시료의 당화 수율에 비해 3% 높았다. 그러나 탈리그닌 공정에서의 폭쇄재 수율(Table 1 참고)을 함께 고려한다면 0.2% NaOH처리시 당화수율(공급 원료량 기준)이 높거나 비슷하다. 그러므로 탈

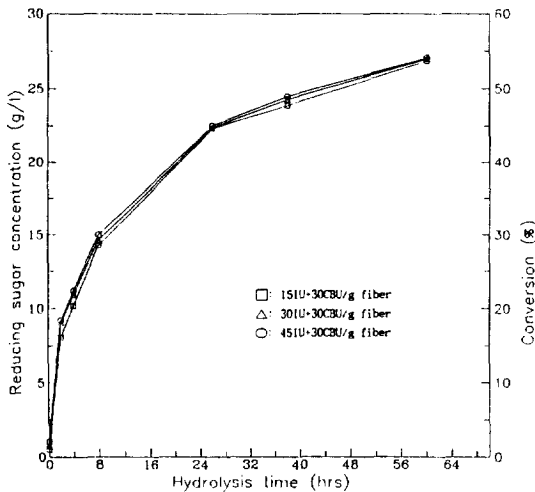


Fig. 4. Enzymatic hydrolysis of steam exploded and NaOH delignified oak wood with the supplementation of Novozym 188.

리그닌 공정에서의 NaOH비용과 후처리 공정(예를들면 pH 조절 등) 등을 고려한다면 0.2% NaOH로 탈리그닌하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

### 3-4. 효소농도의 당화속도 및 전환율에 미치는 영향

앞에서 최적 전처리 조건으로 나타난 6분 폭쇄, 0.2% NaOH로 탈리그닌한 시료 5 g[5%(w/v)]에 cellulclast를 각각 1, 2, 3 ml(15, 30, 45 IU/g 기질)를 첨가하여 60 시간 당화한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 당화속도 및 전환율은 투입효소량에 비례증가하여 45 IU/g 기질의 조건에서 당화 수율은 50%로 가장 높았다. 이와 같이 낮은 전환율은 효소량이 부족해서라기 보다는 생성된 cellobiose에 의한 효소억제효과 때문인 것으로 생각된다. 이와 같은 가정은 생성 환원당중 포도당 분율은 약 70%로서 상당량의 cellobiose가 존재한다는 것(HPLC로 잔여당의 대부분이 cellobiose임을 확인)과 첨가 cellulclast량을 증가시켜도 수율은 거의 증가하지 않았다는 사실로도 뒷받침된다[6].

### 3-5. $\beta$ -glucosidase의 첨가에 따른 당화속도 및 전환율의 변화

$\beta$ -Glucosidase 강화효소인 Novozym 188을 첨가함으로써 생성된 셀로바이오스를 포도당으로 전환시켜 효소억제효과를 줄이는 방안을 검토하였다. 6분 폭쇄, 0.2% NaOH에서 탈리그닌한 폭쇄재 5 g[5%(w/v)]을 기질로 Celluclast 1, 2, 3 ml(15, 30, 45 IU/g 기질)와 Novozym 188 0.6 ml(30 CBU/g 기질)를 첨가하여 당화

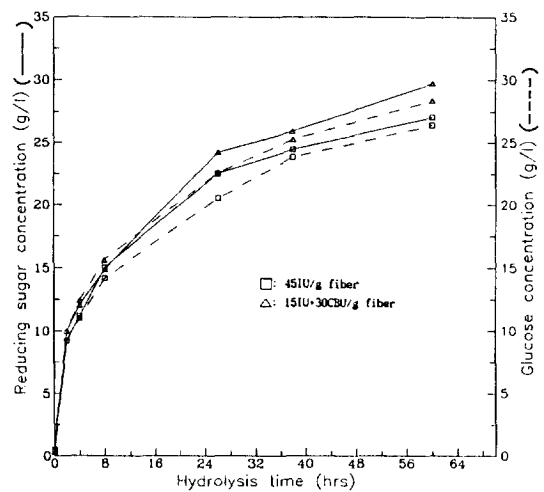


Fig. 5. Enzymatic hydrolysis profiles of 5%(w/v) steam exploded and NaOH extracted oak wood when Celluclast was added(45 IU/g fiber) and Celluclast with the supplementation of Novozym 188 was added(15 IU + 30 CBU/g fiber).

실험한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 60시간 당화시 모든 경우에서 환원당 농도와 전환율은 27.5 g/l와 55%내외로서 Celluclast첨가량에 따른 차이는 거의 없었다. Novozym 188 첨가로 cellobiose의 효소반응 억제효과의 감소에 의한 효소 활용효율의 증가는 Fig. 5에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 Celluclast 1 ml에 Novozym 188 0.6 ml를 보충하여 60시간 당화하였을 때 전환율은 60%로서 3 ml의 Celluclast만 넣고 당화한 경우의 전환율에 비해 5%가량 높았다. 따라서 소량의  $\beta$ -glucosidase의 보충이 효율적인 당화수행에 필요조건임을 알 수 있다. 그러므로 효소의 농도 뿐만 아니라 효소의 성분비(즉 Celluclast/Novozym 188)도 중요한 변수임이 밝혀짐에 따라 본 연구실에서는 효소의 상대비에 따른 효소당화속도의 변화에 대한 연구를 수행하고 있다.

### 3-6. 계면활성제 첨가의 당화속도 및 전환율에 대한 영향

계면활성제의 첨가에 따른 효소당화반응의 속도 및 수율변화를 조사하기 위해 0.1%의 Tween 20, Tween 80을 첨가한 7g의 폭쇄재 시료와 계면활성제가 첨가되지 않은 시료에 Celluclast 1.2 ml와 0.6 ml의 Novozym 188을 첨가후(즉 g 폭쇄재당 효소농도는 12 IU + 30 CBU) 비교 당화 실험을 수행하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 계면활성제 첨가시 전환율은 약 10% 향상

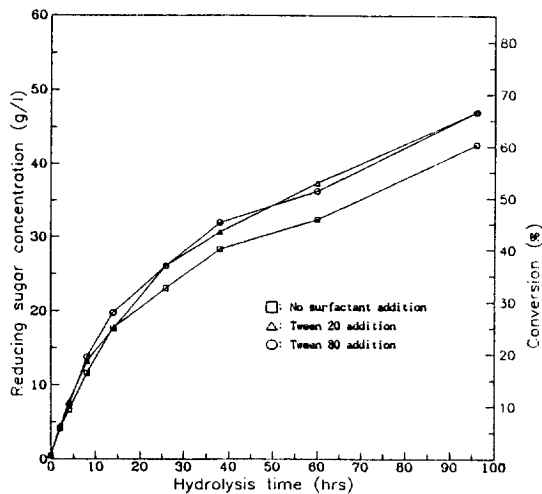


Fig. 6. Reducing sugar production profiles from the enzymatic hydrolysis of 7%(w/v) pretreated wood with the supplementation of Novozym 188 and the addition of surfactants[0.1%(v/v)].

되었다. 이와 같은 계면활성제 첨가에 의한 효소 활용 효율의 증가는 순수 셀룰로오스를 기질로한 다른 당화 실험에서도 보고되었으며 첨가 계면활성제에 의해 흡착 효소의 탈착이 용이해져 활용효율이 그만큼 증가할 수 있었던 것으로 풀이되고 있다[17-19]. 그러나 계면활성제의 종류에 따른 전환율의 차이는 거의 없었다. 그러므로 점도가 비교적 낮아 보다 다루기 쉬운 Tween 20을 사용 계면활성제로 택하였다.

#### 4. 결 론

우리 나라의 대표수종인 참나무계 바이오매스로부터 에탄올 대량 생산공정의 개발을 위한 기초연구를 수행하여 전처리와 효소당화에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 일정한 폭쇄압력(25 kg/cm<sup>2</sup>)의 조건에서 폭쇄시간이 길어질수록 폭쇄재 수율은 낮아졌으나 당화수율은 증가하였다. 폭쇄시간 3분에서 처리시 폭쇄재 수율은 높았으나 당화율이 저조하였고 폭쇄시간 6, 9분에서는 폭쇄재 수율과 당화수율이 비슷하였다. 탈리그닌 공정에서는 NaOH사용시 냉수추출에 비해 리그닌 제거효율이 높았다. NaOH농도가 0.2%에서 1%로 증가함에 따른 리그닌 함량의 감소효과는 미미했다. 따라서 탈리그닌후 처리공정과 당화공정을 고려할 때 0.2% NaOH가 폭쇄재의 탈리그닌에 적합한 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 최적 전처리 조건으로 6분, 0.2%

NaOH추출로 결정했다.

(2) 폭쇄재의 효소당화시 당화속도와 전환율은 투입 효소량에 비례증가하였다. 15 IU/g 기질의 효소당화공정에서는 당화수율은 40%이었고 45 IU/g 기질에서는 50%로서 낮은 전환율을 나타냈다. Celluclast만 투입할 때는 셀로바이오스에 의한 효소반응 억제효과가 두드러졌으며 그 결과 효소활용효율이 매우 낮았다. 효소 활용효율을 높이기 위해서는  $\beta$ -glucosidase의 보충이 필요하였으며 적합한 효소량은 g 폭쇄재당 Celluclast 15 IU이었다.

(3) 계면활성제를 첨가하므로서 효소당화속도 및 전환율을 10% 상승시킬 수 있었으며 그 결과 최고 당화수율에 도달하는데 필요한 효소량을 20% 가량 줄일 수 있었다.

#### 감 사

증기폭쇄장치를 사용할 수 있도록 허락하여 주신 경북대학교 임산공학과와 이종운 교수님과 Celluclast와 Novozym 188을 공급하여 주신 동국대학교 화공과의 박정극 교수님과 Novo사(Korea)에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Bioenergy Intl. Ltd.: "Internal Circula: Bioenergy, a Quadrex Company", Gainesville, FL32606-1657, USA.
- Oxyfuel News, June 15, Printed in USA(1992).
- Ballerini, D., Nativel, F., Rebeller, M., Renault, P. and et Vandecasteele, J. P.: *Biofutur(in French)*, Juin, 47(1992).
- Ado, Y., Murata, Y., Michiki, H., Miyakawa, H., Ishibashi, H., Ogoshi, T. and Furuichi, M.: 에너지이용기술 특강, 한국과학기술원, 2.05-2.07(1990).
- Wright, J. D.: *Chem. Eng. Prog.*, Aug., 62(1988).
- 이용현, 이종운, 박정극: "바이오매스자원의 전처리 당화신공정의 개발", 동력자원부 대체에너지 연구개발보고서 901C203302FG(1992).
- Saddler, J. N., Brownell, H. H., Clermont, L. P. and Levitin, N.: *Biotech. Bioeng.*, 24, 1389(1982).
- Grethlein, H. E.: *Bio/Technol.*, 3, 155(1985).
- Grous, W. R., Converse, A. O. and Grethlein, H. E.: *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 274(1986).
- Holtzapple, M. T., Humprey, A. E. and Taylor, J. D.: *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 207(1989).
- Commission on Biotechnology: IUPAC, New Dehli (1984).

12. Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959).
13. 영동제약: 포도당 측정용시약 사용설명서.
14. 한국공업표준협회: KSM 7045(1977).
15. Ado, Y., Murata, Y., Michiki, H., Miyakawa, H., Ishibashi, H., Ogoshi, T. and Furuichi, M.: "에너지 이용기술 특강", 한국과학기술원, Feb., 93(1990).
16. Millet, M. A., Baker, A. J. and Satter, L. D.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **5**, 193(1975).
17. Castanon, M. and Wilke, C. R.: *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1365(1981).
18. Ooshima, H., Sakata, M. and Harano, Y.: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1727(1986).
19. Park, J. W., Takahata, Y., Kajiuchi, T. and Akehata, T.: *Biotech. Bioeng.*, **39**, 117(1992).