

산업용 셀룰라제에 의한 목질계 바이오매스의 당화 특성 연구

이진석[†] · 윤석민* · 이준표 · 조재경 · 김미선 · 박순철

한국에너지기술연구소 바이오매스팀

*산업과학기술연구소 환경연구센터

(1995년 3월 24일 접수, 1995년 5월 19일 채택)

Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass by Commercial Cellulases

Jin Suk Lee[†], Seok Min Yoon*, Jun Pyo Lee, Jae Kyung Cho, Mi Sun Kim and Soon Chul Park

Biomass Team, KIER

**Environmental Research Center, RIST*

(Received 24 March 1995; accepted 19 May 1995)

요 약

성분이 다른 산업용 셀룰라제 효소의 목질계 바이오매스에 대한 당화특성을 조사하였다. 셀룰라제 제조 회사에 따라 효소의 구성 성분별 효소 활성이 달랐으며 그 결과 기질과 사용 효소에 따라 현저하게 다른 당화능을 보였다. 산업용 셀룰라제 효소 모두 비교적 낮은 β -glucosidase 활성을 가졌으며 그 결과 리그닌이 포함된 기질에서는 β -glucosidase 활성 억제의 효과가 두드러졌다. CMCase는 펄프와 폭채재의 당화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 CMCase 활성이 높을수록 목질계 바이오매스의 효율적인 당화를 기대할 수 있다. FPase 활성 측정은 효소의 리그닌, 헤미셀룰로스 등이 포함된 목질계 바이오매스 기질에 대한 당화능을 적절하게 표현할 수 없는 것으로 나타났다.

Abstract—Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by various commercial enzymes has been studied. The commercial cellulases used in this study showed different CMCase and β -glucosidase activities but have similar FPase activities. CMCase was found to play a key role for the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass which contains inert material such as hemicellulose and lignin. The β -glucosidase inhibition by lignin was the most remarkable for Celluclast which has the lowest β -glucosidase activity. FPase activity could not represent the capability to hydrolyze the lignocellulosic biomass.

1. 서 론

목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 풍부한 양, 재생 특성, 저렴한 원료비 등의 장점을 가져 에탄올 생산원료로서의 활용가능성이 높아지고 있다. 따라서 리그노셀룰로스계 바이오매스로부터 에탄올을 대량 생산하는 공정의 개발 연구가 활발히 진행되고 있다 [1-4]. 목질계 바이오매스의 주성분인 셀룰로스, 헤미

셀룰로스, 리그닌을 효율적으로 분리하기 위해 다양한 전처리 공정이 많은 연구그룹에 의해 개발되었다. 그리고 그 중 증기폭쇄법은 다른 전처리 공정과 달리 원료물질의 미분쇄과정이 필요없고 그 결과 높은 에너지 효율성을 가져 널리 사용되고 있다[5-7].

목재 칩을 폭쇄하면 물에 쉽게 용해되는 헤미셀룰로스는 세척에 의해 쉽게 분리되고 리그닌과 셀룰로스의 혼합물을 얻게 된다. 과거에는 회석 가성소다 용액을

사용하여 리그닌을 제거한 후 효소 당화를 하였으나 이 경우 탈리그닌 과정에서 발생하는 폐액의 처리가 문제된다. 최근에는 탈리그닌 과정없이 직접 효소 당화한 후 당화액과 리그닌이 포함된 잔류 물질을 분리하여 잔류물질은 건조시켜 보일러 연료로 사용하고 있다[8].

셀룰라제에 의한 셀룰로스 당화 메카니즘에 대해 많은 연구가 진행되었으나 아직 확실하게 밝혀진 것은 없다. 다만 셀룰라제는 endoglucanase(CMCase), exoglucanase와 cellobiase가 섞여 있는 혼합효소로서 셀룰로스의 당화과정에서 복합적으로 작용한다는 것이다[9, 10]. 그러므로 셀룰라제의 효소 성분비에 따라 셀룰로스의 당화 효율은 크게 달라질 수 있다. 예로서 *Trichoderma reesei*에 의해 생산된 셀룰라제는 β -glucosidase 함량이 낮아 당화효율을 높이기 위해 β -glucosidase 강화효소를 첨가하기도 한다[11]. 특히 리그닌은 β -glucosidase에 대한 활성 억제 효과를 가져[12] 탈리그닌 과정을 거치지 않은 폭쇄재의 당화과정에서는 리그닌에 의한 β -glucosidase 억제효과가 높을 것으로 판단된다.

몇몇 효소 전문 생산 회사들은 리그노셀룰로스계 기질에 대해 보다 당화 효율이 높은 셀룰라제 생산 균주를 개발하기 위해 노력을 경주하고 있다. 특히 덴마크의 Novo, 프랑스의 IFP, 미국의 Genencor는 이 분야의 선두 주자들이다. 이들은 *T. reesei*를 모 균주로 각자의 knowhow로 변이시킨 균주를 사용하여 생산한 셀룰라제를 Celluclast, Safizym, Cytolase(또는 Multifect Cellulase)라는 상표로 판매하고 있다.

본 연구에서는 먼저 각 산업용 셀룰라제의 특성을 분석, 비교하였다. 또한 산업용 효소를 사용하여 리그닌이 없는 기질인 펄프와 탈리그닌 과정을 거치지 않은 폭쇄재를 당화하므로써 셀룰라제의 효소 성분과 폭쇄재 중에 함유된 리그닌이 리그노셀룰로스계 기질의 효소 당화에 미치는 영향을 규명하였다. 실험결과를 토대로 리그노셀룰로스계 기질의 당화에 적합한 셀룰라제의 필요 조건에 대한 기본 정보를 제시하였다.

2. 실험재료 및 방법

2-1. 바이오매스 시료

건조된 참나무 칩(참나무와 신갈나무의 1:1 혼합물)을 한국에너지기술연구소에 설치된 증기폭쇄장치를 사용하여 25 kg/cm²에서 6분간 폭쇄한 후 폭쇄재 50 g(건조 무게 기준)에 2 L의 물로 2번 세척한 후 냉동 진공건조하여 당화 시료로 사용하였다. 리그닌이 없는 기질로는 제지공장서 얻은 활엽수 펄프(bleached kraft pulp)를 Wiley mill(Thomas Inc., USA)로 분쇄하여 사용하였다.

2-2. 효소

효소는 *T. reesei*의 배양액을 농축한 산업용 효소인 Celluclast(Novo Co., Denmark), Safizym(IFP Co., France), Cytolase(Genencor Co., USA)와 β -glucosidase를 강화한 효소인 Novozym 188(Novo Co., Denmark)을 사용하였다.

2-3. 효소 당화

효소당화는 기질, 효소와 pH 4.8로 조절된 citrate 완충용액을 실험조건에 따라 슬러리 100 ml을 만들어 250 ml 플라스크에 넣고 50℃로 유지된 공기 진탕 배양기에서 교반 속도를 150 rpm으로 하여 당화실험하였다. 반응도중 일정 시간 간격으로 1 ml씩 시료를 채취하여 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리시킨 뒤 상등액만 취하여 당분석을 하였다.

2-4. 분석

FPase, CMCase, β -glucosidase 등 효소의 활성은 IU-PAC에서 제시한 방법을 사용하여 측정하였다[12]. 환원당은 DNS방법으로 측정하였고[13] 포도당은 포도당 측정용 시약을 사용하여 정량하였다[14]. 셀로바이오스는 HPLC(Spectra Physics 8800 pump, RI detector)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 Aminex 87P(Biorad Inc., CA)를 이용하였고 용매는 H₂O, 유량은 0.6 ml/min, 컬럼온도는 85℃로 유지하였다. 효소 용액 중 단백질 함량은 Lowry 방법에 의해 결정하였다[15].

3. 실험결과 및 고찰

3-1. 산업용 효소의 특성

산업용 셀룰라제 생산회사들은 각각 고유의 변이균주를 사용하여 셀룰라제를 생산하므로 셀룰라제는 다소 다른 특성을 가질 것으로 판단된다. 본 연구에서는 셀룰로스의 당화에 중요한 역할을 하는 CMCase와 filter paper 효소의 활성을 측정하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 β -glucosidase 강화효소인 Novozym을 제외한 각 회사의 산업용 셀룰라제는 거의 비슷한 filter paper 효소 활성을 가졌다.

그러나 CMCase와 β -glucosidase의 경우 산업용 효소에 따라 차이가 있어 CMCase는 Cytolase가 740 IU/ml로 Celluclast와 Safizym에 비해 약 13% 높은 것으로 나타났다. β -Glucosidase의 활성은 Safizym이 가장 높은 16.5 IU/ml이었으며 Cytolase와 Celluclast는 각각 9.5와 5.6 IU/ml이었다. 셀룰라제의 활성 측정에 대한 문제점이 제기된 바 있지만 이와 같은 측정치는 문헌에 보고된 Celluclast의 78 IU/ml과 Novozym의 780 IU/ml과 거의

Table 1. Specific activities of commercial cellulase preparations

Source Components	Celluclast	Safizym	Cytolase	Novozym 188
Protein(mg/ml)	33.1	39.3	40.7	53.5
FPase(IU/ml)	77	77	76	-
CMCase(IU/ml)	655.3	666.2	740.1	23.1
β -glucosidase(IU/ml)	5.4	16.5	9.5	805.0

Table 2. Specific activities of commercial cellulases loaded for the enzymatic hydrolysis of pulp and steam exploded wood

Source Components	Celluclast	Safizym	Cytolase	Celluclast*	Safizym*	Cytolase*
FPase	30	30	30	30	30	30
CMCase	262	266	296	264	268	298
β -glucosidase	2	7	4	66	71	68

*: 0.4 ml Novozym supplemented

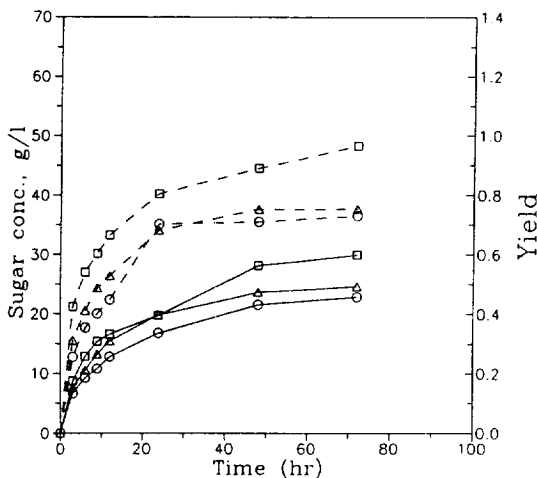


Fig. 1. Effects of commercial cellulases on the hydrolysis of 50 g/l pulp: (—) glucose, (---) reducing sugar; (○) Celluclast; (△) Safizym; (□) Cytolase.

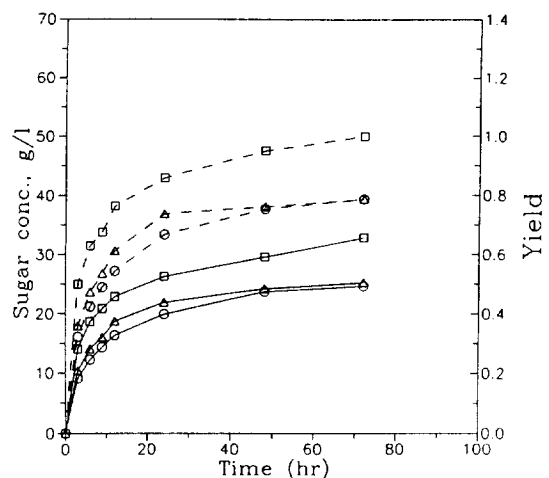


Fig. 2. Effects of β -glucosidase content of cellulase mixtures on the hydrolysis of 50 g/l pulp: (—) glucose, (---) reducing sugar; (○) Celluclast; (△) Safizym; (□) Cytolase.

비슷하다[16].

3-2. 펄프의 효소당화

완충용액 92 ml에 펄프 시료 5 g과 효소 용액 2 ml를 첨가하여 효소 투입량이 filter paper 활성기준으로 30 IU/g 기질이 되도록 조절한 후(Table 2 참고) 당화한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. Cytolase를 첨가한 경우 당화속도와 수율이 가장 높았으며 72시간 당화후 포도당과 환원당의 농도는 29.9 g/l과 48.28 g/l로 전환수율은 0.57과 0.91이었다. 펄프 중 셀룰로스 함량이 약 80%인 점을 고려하면 실질 포도당 전환 수율은 0.71이다. 반면

Safizym과 Celluclast의 첨가 당화에서는 포도당 농도가 각각 24.56 g/l과 22.78 g/l로 Safizym을 첨가한 당화에서 약 10% 높았다. 이와 같이 FPase 활성을 동일하게 조절하였음에도 불구하고 첨가 효소에 따라 당화속도와 생성 포도당 농도가 크게 다른 이유는 효소의 CMCase활성이 달랐기 때문으로 풀이된다. 즉 순수한 셀룰로스인 filter paper를 기질로 사용하는 FPase활성 측정의 경우와 달리 펄프는 헤미셀룰로스를 다량 포함하고 있어(본 연구에 사용한 제지 펄프의 경우 헤미셀룰로스 함량은 약 20%) 효소로 당화를 시작하면 당화

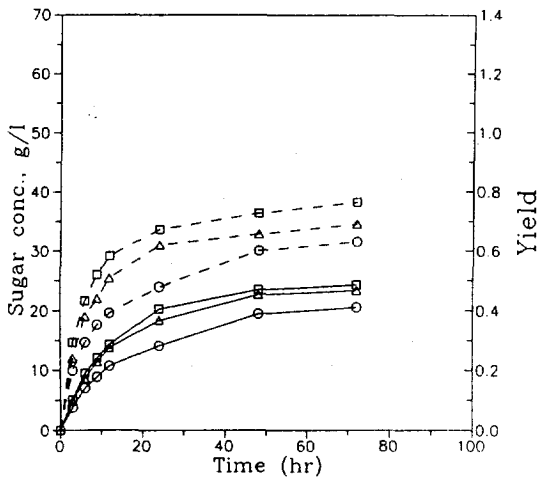


Fig. 3. Effects of commercial cellulases on the hydrolysis of 83 g/l steam exploded oak wood: (—) glucose, (---), reducing sugar; (○) Celluclast; (△) Safizym, (□) Cytolase.

초기에 작용하는 CMCase가 기질을 분해함에 따라 셀룰로스 구조 내에 갇혀 있던 헤미셀룰로스의 분리가 일어나고 exo-glucanase, cellobiohydrolase 등과 같은 다른 셀룰라제 구성 효소가 접촉할 수 있는 기질 표면적이 증가하였을 것으로 판단된다. 따라서 CMCase 활성이 가장 높은 Cytolase에 의한 당화에서 헤미셀룰로스의 분리 및 셀룰라제가 접촉 가능한 표면적이 가장 크게 증가하였기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같은 설명은 α -cellulose를 기질로 하여 당화한 실험에서는 생성 당농도가 거의 비슷하였다는 사실로도 뒷받침 된다 (미공개 실험 data). Table 2에 나타낸 바와 같이 Cytolase 첨가의 당화는 CMCase 활성이 296 IU/g으로 Safizym과 Celluclast의 CMCase 활성에 비해 약 14%가량 높았다.

효소의 상호 작용을 보다 잘 이해하기 위해 앞에 수행한 실험을 β -glucosidase 강화 효소인 Novozym을 0.4 ml 첨가한 후 반복 실험하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 Fig. 1과 당화 패턴은 동일하였고 β -glucosidase 첨가로 환원당과 포도당 농도는 거의 동일한 분율로 증가하였다. Cytolase에 의한 당화에 β -glucosidase를 보충 첨가한 경우 증가율이 가장 높은 16%이었으며 Celluclast와 Safizym에 의한 당화에서는 증가율이 각각 13%와 8%로 β -glucosidase 활성이 가장 높은 Safizym이 β -glucosidase의 보충 첨가에 따른 상승 효과가 가장 낮은 것으로 나타났다. Novozym을 보충 첨가한 Cytolase에 의한 당화에서는 당화 시작 72시간후 환원당과

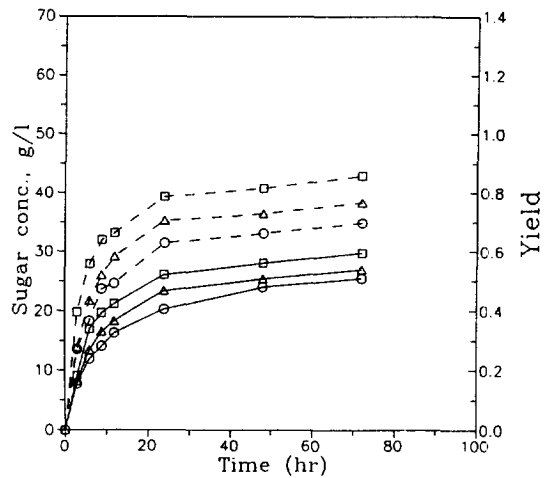


Fig. 4. Effects of β -glucosidase content of cellulase mixtures on the hydrolysis of 83 g/l steam exploded oak wood: (—), glucose, (---), reducing sugar; (○) Celluclast, (△) Safizym, (□), Cytolase.

포도당 농도가 49.7 g/l와 32.8 g/l로 셀룰로스 기준 포도당 전환 수율은 0.82였다. CMCase 활성이 가장 높은 Cytolase에 의한 효소당화에서 β -glucosidase의 첨가에 따른 상승 효과가 가장 높았다는 점은 CMCase와 β -glucosidase가 상호 공조(synergism) 가능성을 보여준다. 또한 Cytolase만을 첨가하여 당화한 경우의 당 농도가 Novozym을 첨가한 Celluclast와 Safizym에 의한 당화 당 농도보다 15% 높다는 것은 주목할 점이다. 이와 같은 실험결과를 리그노셀룰로스에 바이오매스의 효소당화에서 CMCase의 역할이 중요하다는 점을 보여준다.

3-3. 폭쇄재의 효소 당화

산업용 셀룰라제의 폭쇄재에 대한 당화능을 조사하기 위해 완충용액 90 ml에 폭쇄재 8.3 g과 효소 2.2 ml를 첨가하여 당화한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. Cytolase에 의한 폭쇄재 당화에서 72시간 경과후 환원당과 포도당 농도는 38.3 g/l와 24.7 g/l로 가장 높았다. 펄프의 당화에서의 전체적인 경향은 비슷하였으나 펄프의 당화 실험결과와 비교하면 주목할 만한 점이 있다. Cytolase와 Celluclast에 의한 펄프 당화에서 최종 포도당 생성 농도는 Safizym에 의한 당화 포도당 농도의 120%와 93%였으나 폭쇄재의 당화에서는 포도당 분율이 104%와 86%로 공통적으로 줄어들었다. 이런 결과는 β -glucosidase 활성이 보다 낮은 Celluclast와 Cytolase에 의한 폭쇄재 당화에서 리그닌에 의한 β -glucosidase 활성 억제 효과가 두드러지게 나타났기 때문으로 풀이된다.

폭쇄재 당화에서 β -glucosidase의 보충 효과를 조사하기 위해 Novozym을 0.4 ml 첨가하여 당화한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. β -Glucosidase를 첨가함에 따른 상승효과는 Cytolase와 Celluclast에 의한 당화에서 두드러졌다. Novozym을 첨가한 경우 Cytolase와 Celluclast 당화에서 최종 생성 포도당 농도는 29.5 g/l와 25.2 g/l로 Novozym을 첨가하지 않은 경우에 비해 각각 20%와 23% 증가하였다. 그러나 Safizym 당화에서는 포도당 농도가 26.7 g/l로 Novozym을 첨가하지 않은 경우에 비해 12% 높아졌다. 그러므로 β -glucosidase 활성이 가장 낮은 Celluclast에 의한 폭쇄재 당화에서 Novozym의 첨가에 따른 상승효과가 가장 높은 것으로 나타났다.

4. 결 론

본 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 주요 산업용 셀룰라제 효소를 분석한 결과 FPase 활성은 비슷하였으나 CMCase와 β -glucosidase의 활성은 제품별로 뚜렷한 차이가 있었다. 검토 효소 중 Cytolase가 당화 대상 바이오매스인 펄프와 폭쇄재 모두에 대해 가장 높은 전환율을 보였다.

(2) 동일한 FPase 활성 조건에서 펄프와 폭쇄재를 당화하였을 때 시약급 셀룰로스의 당화에서와는 달리 검토 효소별로 각각 다른 생성 당농도를 나타냈다. 가장 높은 당화능을 보인 Cytolase는 β -glucosidase 활성이 비교 효소인 Safizym의 60% 이하임을 고려할 때 헤미셀룰로스와 리그닌 등이 포함된 일반 리그노셀룰로스계 물질의 당화에 적합한 효소의 필요 조건은 셀룰라제 중 CMCase 활성이 특히 높아야 한다는 것이다. 본 연구 결과로부터 당화능이 우수한 셀룰라제를 생산하기 위해서는 CMCase 활성이 극대화되도록 셀룰라제 생산 균주의 배양조건을 조절하는 것과 CMCase 활성이 높은 변이 균주의 개발이 필요한 것으로 나타났다.

(3) 폭쇄재의 당화에서는 리그닌에 의한 β -glucosidase 활성 억제효과가 두드러져 β -glucosidase의 보충 첨가가 필요한 것으로 나타났다.

(4) 현재 셀룰라제의 활성을 표시하기 위해 사용하는 FPase 활성은 셀룰라제 효소에 의해 분해되지 않는 헤미셀룰로스와 리그닌 등을 포함하는 목질계 바이오매스에 대한 효소 당화능을 정확하게 표시할 수 없는 것으로 밝혀졌다.

감 사

본 연구는 통상산업부 대체에너지 연구사업으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다. 또한 본 연구에 사용된 효소를 공급하여준 IFP Inc.의 Dr. Ballerini, Environmental Biotechnology Inc.의 Dr. Munnecke 그리고 Auburn 대학의 Dr. Y. Y. Lee에게 감사드립니다.

참고문헌

- Wyman, C. E.: *Biores. Technol.*, **50**, 3(1994).
- Ballerini, D., Desmarquest, J. P. and Pourquie, J.: *Biores. Technol.*, **50**, 17(1994).
- 박순철, 이진석, 김미선, 홍종준, 조재경, 이준표: 통상산업부 대체에너지개발연구보고서(1994).
- Ado, Y., Murata, Y., Michiki, H., Miyakawa, H., Ishibashi, H., Ogoshi, T. and Furuichi, M.: 에너지이용기술특강, 한국과학기술원, Feb. 5th-7th(1990).
- Clark, T. A. and Mackie, K. L.: *J. Wood Chem. Technol.*, **7**(3), 373(1987).
- Brownell, H. H., Yu, E. K. C. and Saddler, J. N.: *Biotech. Bioeng.*, **28**, 792(1986).
- Goyal, A., Ghosh, B. and Eveleigh, D.: *Biores. Technol.*, **36**, 37(1991).
- Persson, I., Tjerneld, F. and Hagerdal, H.: *Biores. Technol.*, **36**, 65(1991).
- Breuil, C., Chan, C. M., Gibbert, M. and Saddler, J. N.: *Biores. Technol.*, **39**, 139(1992).
- Stockton, B. C., Mitchell, D. J., Groghmann, K. and Himmel, M. E.: *Enz. Microb. Technol.*, **13**(1), 57(1991).
- Sutcliffe, R. and Saddler, J. N.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **17**, 749(1986).
- Ghose, T. K.: *Pure & Appl. Chem.*, **59**(2), 257(1987).
- Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426(1959).
- 영동제약: 포도당 측정용 시약 사용 설명서.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
- Duff, S. J. B., Moritz, J. W. and Casavant, T. E.: *Biotech. Bioeng.*, **45**, 239(1995).