

Hydrolysis of Pulp Sludge for Lactic Acid Fermentation using Enzyme System

이상목, Lin Jianqiang*, 구윤모

인하대학교 공과대학 생물공학과

State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, China*

전화 (032) 872-2679, FAX (032) 875-0827

Abstract

Enzymatic hydrolysis of cellulose was studied with emphasis on the effect of cellulase loading and pulp sludge concentration on glucose yield. Enzyme loading appeared to have a significant effect on glucose yield. Chemical pretreatment had no effect on enzymatic hydrolysis of pulp sludge. High glucose yield was obtained from enzymatic hydrolysis, especially at sludge concentrations lower than twenty percent. The optimum concentrations of crude cellulase and β -glucosidase were 5 U/mL and 8 U/mL, respectively, considering the amount of enzymes used and glucose produced.

Key words : cellulase, β -glucosidase, enzymatic hydrolysis, pulp sludge

서 론

인류가 직면한 가장 큰 문제는 자원의 고갈과 환경오염문제라고 할 수 있다. 펄프 및 제지산업에서 효소의 이용은 이미 오래전부터 활발한 연구가 진행되고 있다 [1]. 제지 sludge를 이용하여 ethanol, succinic acid, acetic acid, lactic acid 등의 유용물질을 생산하는 연구가 진행되고 있다 [2]. 이 중 lactic acid는 식품, 피혁, 의약, 유기화합물의 1차적 원료로 이용될 뿐만 아니라, 다양한 물리, 화학적 성질을 지닌 생분해성 고분자의 단량체로써 그 활용도가 크게 증가하고 있다. 폐지의 재사용에 사용되는 효소는 cellulase, hemicellulase, xylanase, lipase, peroxidase 등이 보고되고 있다. 제지 sludge로부터 lactic acid를 생산하기 위해서는 cellulose를 효소 당화하여 glucose로 전환하고 이를 이용하여 lactic acid를 생산하는 공정이 요구된다. 펄프 sludge의 성분은 ash와 cellulose가 대부분으로 당화를 위해서는 cellulose를 가수분해할 수 있는 cellulase와 β -glucosidase가 필요하다.

Cellulase는 일반적으로, cellulose chain을 무작위적으로 가수분해하여 cellobiose

와 glucose를 생성하는 endo- β -1,4-glucanase (CMCase), cellulose chain의 비환원성 말단기에 작용하여 cellobiose를 생성하는 exo- β -1,4-glucanase (cellobiohydrolase), 그리고 cellobiose를 분해하여 glucose를 생성하는 β -glucosidase로 분류하고 있다 [3]. Cellulase와 β -glucosidase의 비율 조합으로 인한 당화시, 이들 효소들에 의한 synergy 효과가 보고되고 있다 [4].

본 실험은 lactic acid 생산을 위한 전 단계의 당화공정으로서 *T. reesei*에서 생산된 crude cellulase와 상업용 β -glucosidase인 Novozym 188 (Novo Nordisk Co.)을 이용하여 당화에 적용하였다.

실험 재료 및 방법

본 실험에서는 당화를 위한 효소의 synergism과 최적 효소량을 구하기 위한 실험을 하였다. Sludge를 30분간 autoclave한 후, *T. reesei*에서 생산된 crude cellulase와 Novozyme 188을 첨가하였다. 반응에 이용된 sludge는 100 mL flask에 20-30 mL 운전부피로 실행하였으며, water bath를 이용하여 50°C, sodium acetate buffer (pH 4.8) 용액에 제지 sludge를 첨가하여 반응하였다. 또한, 오염을 방지하기 위해 항생제 oxymycin을 12.25 mg/mL로 첨가하였다 [5]. 사용된 제지 sludge는 삼화제지(주)에서 협조를 얻어서 사용하였다. 분석 방법은 carboxymethyl cellulose (CMC)ase activity와 β -glucosidase activity를 측정하였으며, International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)에 따라 시행하였다. 효소 활성의 1 unit은 glucose 1 μ mol이 1분 동안 생성되는 양으로 정의된다. Glucose의 분석은 glucose analyzer (YSI 2700, Yellow Springs Instrument Co., Inc., USA)를 이용하였다. 전처리 방법으로는 presoaking 과정으로 황산과 가성소다를 첨가하여 2시간동안 60°C에서 반응한 후 사용하였고, 계면활성제의 영향을 확인하기 위하여 Tween-80을 이용하였다 [5,6].

결과 및 고찰

전처리에 의한 당화공정의 비교

제지 sludge 성분으로는 ash (Si, Al, Ca), lignin, cellulose 등으로 구성되어 있다. 효소가 cellulose를 분해하는 과정에서 ash, lignin 성분 등이 저해작용을 한다고 보고되고 있다. 그래서, 전처리의 한 과정으로 cellulose 분해 수율을 높이기 위해 일반적인 전처리 과정인 산과 염기를 이용하여 실험하였다. 산과 염기를 첨가하는 경우 cellulose fiber가 풀어지는 현상과 lignin 등의 감소로 인해, 효소에 의한 cellulose 가수분해가 보다 더 용이하다는 사실에 주목하여 실험을 하였다. 그러나, 이미 sludge는 다른 원목 또는 원질과는 다르게 fiber 형태로 있으므로 전처리의 효과가 나타나

지 않았다. 오히려, 원심분리 과정 중에 유실되는 작은 fiber들에 의해서 더 낮은 당 생산을 보였다 (Fig. 1).

그리고, 효소와 cellulose의 흡착을 용이하게 하기 위해 계면활성제인 Tween-80을 첨가하여 실험하였다 (Fig. 2). 계면활성제의 첨가 실험도 효소 양의 많음으로 인해 큰 효과를 보이지 않고 있으며, 결과적으로 효소의 양을 조절함으로써 보다 효율적인 당 생산이 가능할 것으로 기대된다.

당화공정을 위한 효소의 최적조합

제지 sludge의 당화를 위해서는 crude cellulase와 β -glucosidase의 효소 비율을 조정하여 당화공정에 최적의 조건을 찾을 필요성이 있다. 이를 위해 넓은 범위의 효소비율을 설정하여 실험하였다. 제지 sludge 5% sludge (W/V)에서 실험을 실행한 결과 β -glucosidase와 crude cellulase의 비율에 따라 cellulose가 가수분해되는 비율에 큰 차이를 보였다 (Fig. 3). 또한, cellulose의 가수분해는 crude cellulase보다 β -glucosidase에 의해 영향을 많이 받았다. 이는 crude cellulase가 생성된 cellobiose에 의해 저해작용을 받는 것으로 보였다. 그리고, β -glucosidase의 반응에 의해 10시간이면 반응이 거의 끝나는 것을 보이고 있으며 효소의 경제성을 고려할 때 최종 가수분해결과는 CMCase activity가 5 U/mL, β -glucosidase가 8 U/mL에서 최적으로 나타났다.

최종적으로, sludge의 content가 5%일 경우에는 cellulose 당 당생산은 15 g/L, 당 생산 수율이 90% 이상을 보이고 있으며, 10%인 경우는 25 g/L의 당생산과 83%의 당생산 수율을 보이고 있다. 이는 당이 생산되면서 효소에 대한 저해반응을 일으키기 때문인 것으로 판단되며, 또한 제지 sludge 농도에 따른 mass transfer 문제로 보인다.

참고 문헌

1. Kertes, A. S. and King, C. J., "Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids"(1986), *Biotech Bioeng.*, **28**, 269-282.
2. Schmidt, S. and Padukone, N., "Production of Lactic Acid from Wastepaper as a Cellulosic feedback"(1997), *J. Industrial Microbiology and Biotech.*, **18**, 10-14.
3. Fan, L. T., Gharpuray, M. M. and Lee, Y. H., "Cellulose Hydrolysis"(1987), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 21-52.
4. Medve, J., Karlsson, J., Lee, D. and Tjerneld F., "Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose by Cellobiohydrolase I and Endoglucanase II from *Trichoderma reesei* : Adsorption, Sugar Production Pattern and Synergism of the Enzymes"(1998), *Biotech. Bioeng.*, **5**, 621-634.
5. Schell, D. J., Ruth, M. F. and Tucker, M. P., "Modeling the Enzymatic Hydrolysis of

Dilute-Acid Pretreated Douglas Fir"(1999), *Applied Biochem. Biotech.*, 77-79, 67-81.
 6. Helle, S. S., Duff, S. J. B. and Cooper, D. G., "Effect of Surfactant on Cellulose Hydrolysis"(1993), *Biotech. Bioeng.*, 42, 611-617.

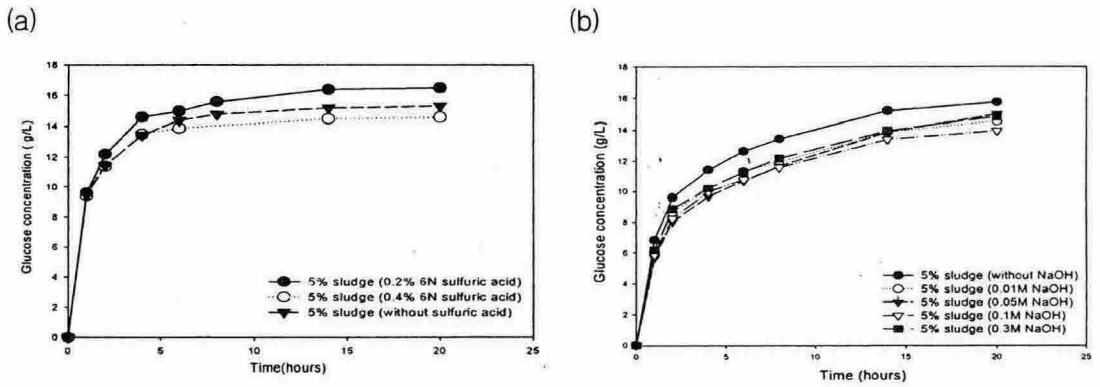


Fig. 1. The effects of pretreatment using acid (a) and base (b) on cellulose hydrolysis.

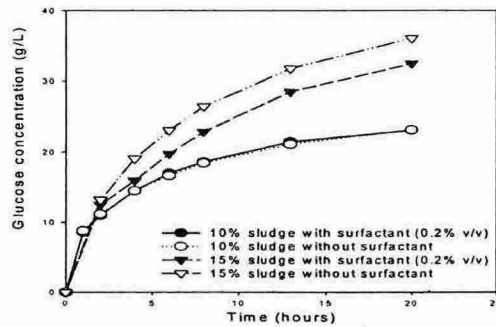


Fig. 2. The effects of surfactant on cellulose hydrolysis.

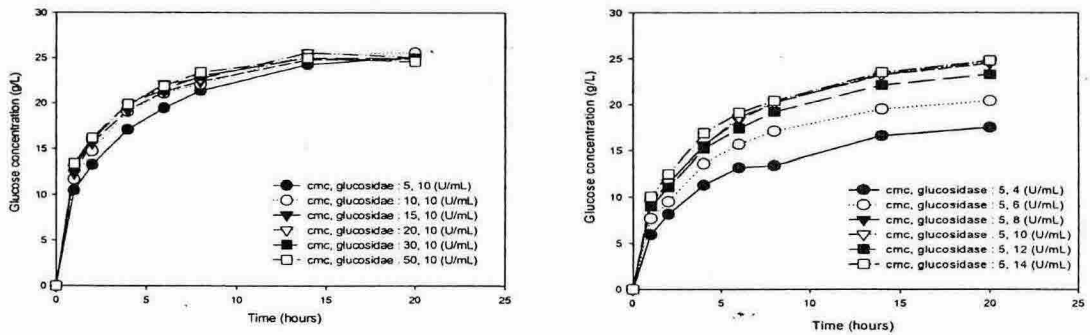


Fig. 3. The effects of relative concentration ratio of crude cellulase and β -glucosidase on cellulose hydrolysis.