

리그노셀룰로스계 폐기물을 이용한 Cellulase의 생산

강성우¹ · 이진석² · 김승욱*

¹고려대학교 생명공학원, ²한국에너지기술연구원, *고려대학교 화공생명공학과

Production of Cellulase from Lignocellulosic Waste. Kang, Seong-Woo¹, Jin-Suk Lee², and Seung-Wook Kim*. ¹Graduate School of Biotechnology, Korea University, ²Korea Institute of Energy Research, Daejeon, Korea, *Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, 1, Anam-dong, Sungbuk-ku, 136-701, Korea - Lignocellulosic wastes available in abundance can be excellent substrates for the production of cellulase. Different types of substrates and various pretreatments were used to improve the production of cellulase. The steam-exploded wood chip gave the highest activities of FPase (0.84 IU/mL) and CMCase (6.5 IU/mL) in the shake-flask culture. In 30 L bioreactor the steam-exploded wood chip and residue after saccharification gave the FPase activity (0.72 IU/mL) and the CMCase activity (6.3 IU/mL), respectively, similar those obtained in lactose.

Key words: Cellulase, Lignocellulosic waste, Pretreatment, *Trichoderma reesei* Rut C-30

바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 공정은 원료 물질의 재생성 및 생산 연료의 환경 친화성 등 많은 장점을 갖고 있다. 다양한 바이오매스 중 특히 리그노셀룰로스계 물질은 자원의 풍부성과 경제적인 가격 때문에 유망한 원료로 꼽힌다. 이런 점 때문에 리그노셀룰로스계 폐기물(lignocellulosic waste)로부터 에탄올을 생산하여 대체 연료로 활용하고자 하는 많은 시도가 있었다. 그러나 리그노셀룰로스계 물질을 원료로 하여 생산된 에탄올은 휘발유에 비해 생산 단가가 너무 높아 실용화에 장애가 되고 있다. 이러한 에탄올 생산 공정 비용의 가장 큰 부분은 cellulase의 생산 비로서 전체 비용의 약 60%에 해당한다[1]. 따라서 cellulase를 보다 경제적으로 생산할 수 있는 기술의 개발을 위해 많은 연구가 수행되었다.

일부 연구는 우수 균주의 분리와 개량을 통해 cellulase 생산성이 보다 우수한 균주를 확보하는 분야에 대해 수행되었으며 괄목할 만한 성과를 거두었다[2-5]. Cellulase 생산 균주로는 *Trichoderma reesei*가 대표적인 균주로 집중 연구되고 있다[6]. 현재까지 *T. reesei* QM 6a로부터 개선되어 온 변이 균주는 1980년 미국 Rutgers 대학의 Montenecourt 교수에 의해 Rut C-30으로 개량되었으며 이후 일부 효소 생산 기업에서 보다 개량된 균주를 확보하고 있는 것으로 알려져 있으나 기업 비밀로 상세한 내용은 알려져 있지 않다. *T. reesei*의 낮은 β -glucosidase 활성 문제를 극복하기 위해 다른 종의 균주를 이용한 cellulase 생산 연구도 일부 연구되었다[5].

Cellulase 생산을 위한 발효 공정의 개선 또는 최적화를 통해 경제성을 높이려는 연구도 일부 진행되었다[7-11]. Cellulase의 생산비용을 낮추기 위해 볏짚, 옥수수 대, 폐 종이 및 펄프 폐액 등 다양한 농, 임산 폐기물을 원료로 하여 cellulase를 생산하는 방안에도 검토되었다[10-12]. 리그노셀룰로스계 바이오매스를 기질로 생산된 cellulase가 순수한 셀룰로스(cellulose)를 기질로 생산된 cellulase에 비해 목질계 바이오매스를 당화하는데 높은 활성을 갖는 것으로 보고되었다[13].

본 연구에서는 cellulase를 보다 경제적으로 생산하기 위해 다양한 리그노셀룰로스계 폐기물 기질에 대해 cellulase 생산성을 검토, 비교하였으며 가능성이 높은 기질에 대해 대량 생산 실험을 수행하여 산업화 방안을 검토하였다.

재료 및 방법

미생물

본 연구에 사용된 균주 *Trichoderma reesei* Rut C-30 (ATCC 56765)은 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 분양 받았으며, PDA(potato dextrose agar)배지에 계대배양하여 사용하였다.

기질

폐 신문지는 약 1×2 cm 크기로 자른 후 0.1~0.4% NaOH 용액에 넣고 90°C의 온도에서 12시간 동안 처리한 후 증류수로 충분히 세척하고 실온에서 건조한 후 wiley mill(Thomas Scientific Inc., USA)로 분쇄하여 기질로 사용하였다. 1×2 cm의 폐 신문지 및 1×3 cm 크기의 참나무 칩(참나무와 신갈나무 1:1 혼합)을 한국에너지기술연구

*Corresponding author
Tel. 02-3290-3300, Fax. 02-926-6102
E-mail: swkim@prosys.korea.ac.kr

원에서 자체 제작한 증기 폭쇄 장치(용량 5 L)를 사용하여 215°C에서 3분간 처리한 후 폭쇄하여 실온에서 건조한 것을 사용하였다. 또한 0.2% 황산 용액에 12시간 동안 침적한 참나무 칩을 동일 조건에서 폭쇄하여 기질로 사용하였다. 당화 잔사는 앞에서 준비한 폭쇄재 10%의 용액에 상업 효소인 Cellusoft(Novo-Nordisk, Denmark)와 Novozym 188(Novo-Nordisk, Denmark)을 각각 20 IU/g 폭쇄재와 30 IU/g 폭쇄재의 농도로 첨가 후 50°C에서 96시간 당화한 후 원심 분리하여 얻어진 침전물을 실온에서 건조하여 기질로 사용하였다.

Cellulase 생산 발효

Rut C-30 균주를 PDA 평판 배지에 30°C에서 일주일 정도 배양하여 포자가 충분히 형성되면 멸균수를 첨가하여 포자를 회수하여 사용하였다. 250 mL 또는 1.0 L 삼각플라스크에 100 mL 또는 500 mL의 변형된 Vogel 배지를 넣고 포자의 농도가 1×10^6 /mL이 되도록 접종한 후 30°C로 유지된 진탕 배양기에서 2일 간 배양하여 cellulase 생산을 위한 발효의 접종 균체로 사용하였다. 변형된 Vogel 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다.

플라스크에서의 cellulase 생산 발효 실험은 250 mL 삼각 플라스크에 여러 가지 탄소원 (전처리된 폐 신문지, 폭

쇄재, 당화 잔사 등)을 1.0%로 첨가된 변형된 Vogel 배지 100 mL을 넣고 균체 접종액을 5.0 mL 첨가하여 30°C의 진탕 배양기에서 150 rpm으로 교반하며 일정시간 간격으로 시료를 취하여 cellulase 활성을 분석하였다. 배지의 초기 pH는 5.0으로 조절하였다.

Cellulase의 대량 생산 실험은 30 L 발효기[한국발효기(주), 인천]에 탄소원(lactose, 참나무 폭쇄재 및 당화 잔사) 1.0%가 첨가된 변형된 Vogel 배지 20 L를 첨가한 후 접종 균체 용액 1.0 L(포자 수 1×10^8 /mL)를 넣고 30°C, 교반 속도 100 rpm에서 통기량 0.5 vvm으로 하여 cellulase 생산 발효 실험을 수행하였다.

분석

FPase 활성은 희석된 효소용액과 Whatman No. 1 filter paper strip (50 mg)을 담고있는 50 mM citrate buffer(pH 4.8)를 혼합하여 50°C에서 60분간 반응시킨 후 유리된 환원당을 DNS 방법[14]으로 측정하였다. CMCase 활성은 희석된 효소용액을 50 mM citrate buffer(pH 4.8)로 제조된 1.0% CMC(carboxymethylcellulose, Sigma C-4888) 기질 용액과 50°C에서 30분간 반응시킨 후 유리된 환원당을 DNS 방법으로 측정하였다. β -Glucosidase 활성은 희석된 효소용액을 동일한 완충용액으로 제조된 1.0 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(Sigma N-7006) 기질용액과 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시킨 후 유리된 p-nitrophenol을 1.0 M Na₂SO₄용액을 이용하여 비색법으로 측정하였다. 효소활성 단위는 1 분간에 1 μ mol의 glucose 또는 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한 효소량으로 나타내었다.

결과 및 고찰

삼각플라스크 배양에서 cellulase 생산

다양한 조건에서 전처리한 폐 신문을 기질로 cellulase 생산 실험한 결과를 Fig. 1에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 NaOH로 전 처리한 경우 전처리를 전혀 하지 않은 경우에 비해 FPase와 CMCCase의 생산성 모두 높았다. 특히 0.2% NaOH로 전처리한 폐지를 기질로 cellulase를 생산한 경우 발효 시작 9일째 FPase의 활성은 각각 0.25 IU/mL로서 전처리하지 않은 경우의 0.15 IU/mL에 비해 90% 높은 것으로 나타났다. 전처리에 사용된 NaOH 농도를 0.4%로 높이면 전처리 효과가 현저하게 감소하여 FPase의 활성은 0.16 IU/mL로 전처리를 하지 않은 경우와 차이가 없는 것으로 나타났다. 이와 같이 전처리에 사용된 NaOH의 농도가 0.2%에서 0.4%로 증가함에 따라 FPase의 활성이 감소한 이유는 분명하지 않다. 다른 중요 cellulase 구성 효소인 CMCCase 활성은 FPase의 경우와 비슷한 경향을 나타냈다. 즉 0.2% NaOH로 전처리시 가장 높은 4.6 IU/mL의 값을 가졌으며 NaOH 농도가 0.4%로 높아지면

Table 1. Composition of modified Vogel's medium

Ingredient	Composition (/L)
Vogel salt ^a	20 mL
Vitamine solution ^b	1 mL
Vogel trace minerals ^c	1 mL
Peptone	1 g
Cellulose	10 g
Tween 80	2 mL
<hr/>	
^a Vogel salt	
Trisodium citrate 2H ₂ O	125 g
KH ₂ PO ₄	250 g
NH ₄ NO ₃	100 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	10 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	5 g
<hr/>	
^b Vitamine solution	
Biotin	5 mg
Inositol	2 g
Pyridoxine HCl	200 mg
Thiamine HCl	200 mg
Ca-pantothenate	200 mg
<hr/>	
^c Vogel minerals	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5 g
MnSO ₄ · 7H ₂ O	1.4 g
ZnCl ₂	1.7 g
CoCl ₂	2 g

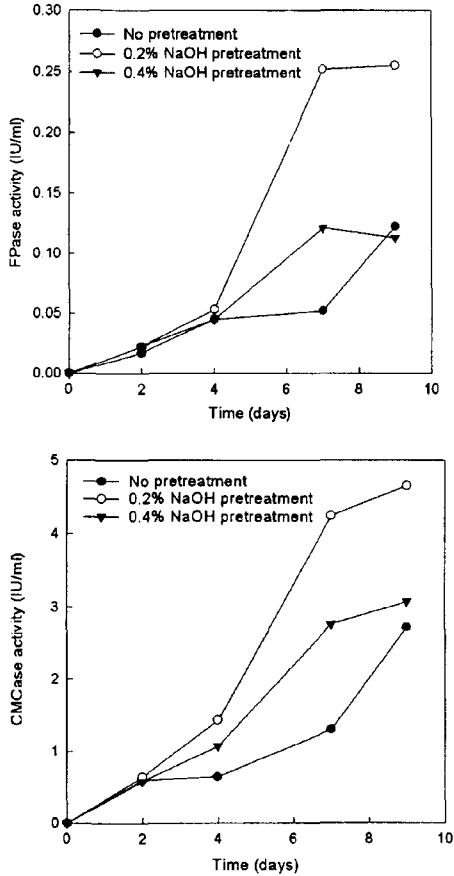


Fig. 1. Effect of NaOH pretreatment of newspaper on the production of cellulase at 1.0%(w/v) substrate concentration in the shake-flask culture.

FPase의 경우와 마찬가지로 CMCCase 활성은 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 0.4% NaOH 처리시 CMCCase 활성은 전처리를 하지 않은 폐 신문지를 기질로 활용하였을 경우에 비해 약 15% 높아 FPase의 경우와 다른 결과를 나타냈다.

Cellulase 생산을 위한 폐 신문지의 기질 사용시 전처리 NaOH 농도는 0.2%가 적합한 것으로 밝혀졌다. 그러나 폐 신문지를 원료로 cellulase를 생산한 경우 FPase활성은 최대 0.25 IU/mL로서 문헌에 보고된 벚짚 등 농임산 폐기물을 기질로 한 경우의 FPase 활성에 비해 현저하게 낮아 폐 신문지는 NaOH 전처리를 하여도 cellulase 생산 기질로서 활용 가치가 낮은 것으로 나타났다[12,15,16]

폐 신문지의 cellulase 생산 기질로서 활용하는 방안을 모색하기 위해 다른 전처리 기술의 적용 가능성을 조사하였다. 바이오매스를 고압 증기로 압축 후 급 팽창시켜 파쇄하는 증기 폭쇄는 목질계 바이오매스를 전처리하는 효과적인 방법으로 널리 사용되고 있다[17]. 또한 폭쇄 공정은 물은 황산으로 침지 후 폭쇄하면 파쇄 효과가 더욱 높아지는 것으로 보고되어 있다[18]. 따라서 단순 폭쇄에 의한 전처

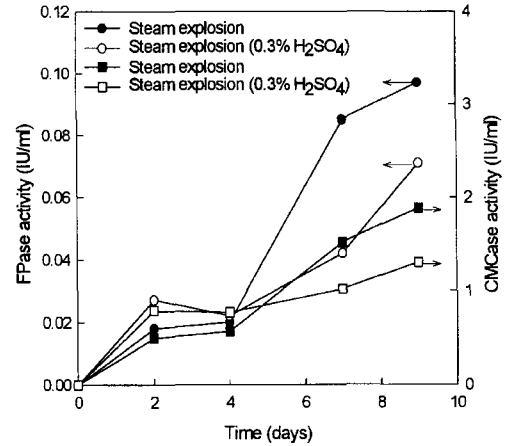


Fig. 2. Effect of steam explosion with and without H₂SO₄ catalysis of newspaper on the production of cellulase (FPase and CMCCase) at 1.0%(w/v) substrate concentration in the shake-flask culture.

리와 0.3% 황산 용액에 담근 후 폭쇄하는 조건에서 폐 신문지를 전처리하여 효소 생산의 기질로 실험하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 단순 폭쇄한 경우와 황산으로 전처리한 후 폭쇄한 경우 모두 FPase와 CMCCase 활성이 각각 0.2 IU/mL, 2.0 IU/mL 이하로 극히 낮은 것으로 나타났다. 폭쇄나 산, 알칼리 용액으로 전처리한 폐 신문지는 cellulase 생산 기질로서 활용 가치가 낮은 것으로 판단된다.

폐 신문지가 cellulase 생산 기질로 활용성이 낮은 것으로 밝혀짐에 따라 목질계 바이오매스를 cellulase 생산 기질로 활용하는 가능성에 대해 조사하였다. 앞서서도 기술한 바와 같이 폭쇄재를 기질로 생산된 cellulase는 셀룰로스를 기질로 하여 생산된 cellulase에 비해 목질계 바이오매스의 당화 효율이 높다는 장점이 있다. 기질의 활용성을 높이기 위해 참나무 칩을 폭쇄한 폭쇄재를 기질로 한 경우와 cellulase 생산 공정의 경제성을 보다 높이기 위한 방안으로 효소 당화 후 남은 잔사를 기질로 하는 방안에 대해 검토하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 폭쇄재를 기질로 한 경우 최대 FPase 활성은 약 0.84 IU/mL로 당화 잔사를 기질로 한 경우에 비해 약 20% 높았다. 그러나 cellulase 생산성은 당화 잔사를 기질로 한 경우 0.18 IU/mL · day로 폭쇄재를 기질로 하였을 때 생산성인 0.12 IU/mL · day에 비해 오히려 50% 높은 것으로 나타났다. 이와 같이 당화 잔사를 기질로 하였을 때 cellulase 생산성이 높았던 이유는 당화 과정에서 생성된 여러 가지 당 물질이 cellulase 생성 촉진 효과를 가졌기 때문인 것으로 판단된다. 이와 같은 당화시 생성된 당에 의한 cellulase 생산 촉진 효과는 다른 문헌에서도 보고된 바 있다. Chen과 Wayman 등[19]은 폐지를 부분 당화하여 cellulase 생산 기질로 활용할 경우 1.8 IU/mL의 높은 FPase 활성을 얻을 수 있음을 보고하였으며 이는 당화 과정에서 생성된 올리고당에 의한 촉진 효

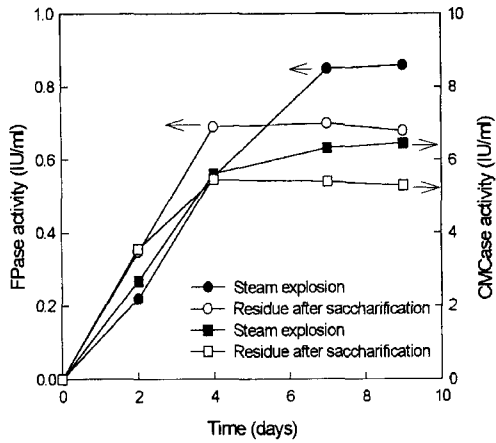


Fig. 3. Production of cellulase (FPase and CMCCase) by using steam-explored wood chip and residue after saccharification at 1.0%(w/v) substrate concentration in the shake-flask culture.

과 때문인 것으로 보고하였다. CMCCase의 경우에도 유사한 경향을 나타냈다. 당화 잔사를 기질로 사용시 cellulase의 최대 활성이 폭쇄재에 비해 낮은 이유는 가용 탄소원이 적었기 때문으로 풀이된다.

Fig. 4에는 동일한 전처리 조건에서 만들어진 폐 신문지와 폭쇄재를 기질로 하였을 때 FPase 및 CMCCase 활성을 비교한 결과를 요약하였다. 폭쇄재를 기질로 한 경우 cellulase 생산성은 폐 신문지에 비해 약 4배 가량 높은 것으로 나타났다.

30 L 발효기 배양에서 cellulase 생산

플라스크 배양 실험에서 cellulase 생산 기질로 적합한 것으로 나타난 참나무 폭쇄재 및 폭쇄재를 당화하고 남은 잔사를 탄소원으로 30 L 발효기에서 cellulase 생산 실험을 수행하였으며 1.0% lactose를 기질로 한 실험 결과와 비교하였다.

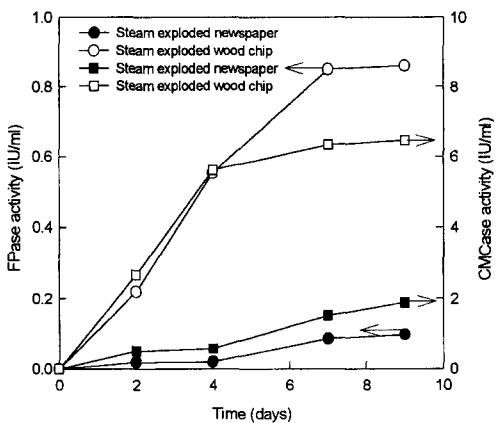


Fig. 4. Production of cellulase (FPase and CMCCase) by using newspaper and wood chip pretreated with the identical steam explosion method in the shake-flask culture.

기질별로 FPase, CMCCase와 β -glucosidase의 생산되는 경향에 대한 정보를 요약하기 위해 Fig. 5에 나타냈다. Lactose와 당화 잔사는 폭쇄재에 비해 lag phase가 18시간으로 비교적 짧았으며 폭쇄재는 24시간의 lag phase를 갖는 것으로 나타났다. 그러나 최대 FPase 활성은 lactose와 폭쇄재에서 각각 0.75 IU/mL, 0.72 IU/mL로서 당화 잔사의 최대 활성인 0.58 IU/mL에 비해 30% 높았다. 이는 lactose와 당화 잔사가 폭쇄재에 비해 비교적 소화하기 쉬운 당이 많이 포함되어 있어 lag phase가 짧았던 것으로 판단되며 당화 잔사에서 최대 활성이 낮은 이유는 가용 기질의 절대량이 부족하였기 때문인 것으로 생각된다.

발효 실험에 따른 CMCCase 생산은 FPase와 비슷한 유형을 나타냈으며 특이한 점은 당화 잔사에서 최대 CMCCase

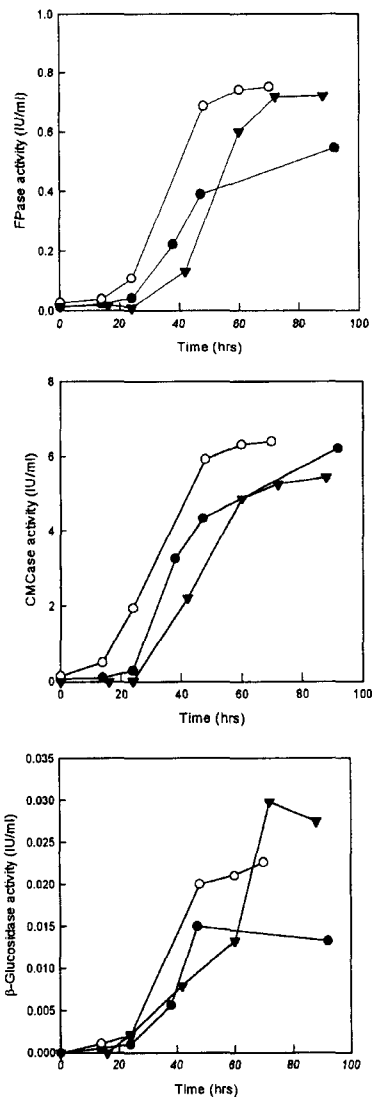


Fig. 5. Cellulase production by using various 1.0%(w/v) substrates in a 30 L fermentor. ○: Lactose, ●: Residue after saccharification, ▼: Steam exploded wood chip

활성이 6.3 IU/mL로 목쇄재를 기질로 하였을 때 보다 15% 높았다는 점이다. 이는 당화 잔사에 FPase 보다는 CMCase 생산에 적합한 기질 성분이 더 많이 포함되어 있었기 때문인 것으로 추측된다.

한편 *T. reesei*의 배양에서 가장 적게 생산되어 당화발효에서 문제가 되고 있는 β -glucosidase 생산에 있어서는 최대 활성이 0.03 IU/mL로서 문헌에 보고된 벗짚 등 농업산 폐기물을 기질로 한 경우보다 현저하게 낮았다[15,20].

결과적으로 목쇄재와 당화 잔사를 이용하여 cellulase를 값싸게 생산할 수 있는 가능성을 보였다.

요 약

본 연구에서는 cellulase를 보다 경제적으로 생산하기 위해 다양한 리그노셀룰로스계 폐기물 기질에 대해 cellulase 생산을 검토, 비교하였으며 가능성이 높은 기질에 대해 대량 생산 실험을 수행하였다.

폐 신문지는 0.2% NaOH를 사용하여 전처리한 경우 FPase와 CMCase의 최대활성이 각각 0.25 IU/mL, 4.6 IU/mL로 좋았으나, 목쇄재 및 당화잔사 등 다른 기질의 최대활성인 0.6~0.8 IU/mL, 5.5~6.5 IU/mL에 비해 매우 낮았다.

30 L 발효기를 이용한 cellulase 생산 실험에서 FPase 최대활성은 lactose와 목쇄재에서 각각 0.75 IU/mL, 0.72 IU/mL로서 당화 잔사의 최대 활성인 0.58 IU/mL에 비해 30% 높았으나 CMCase는 당화 잔사에서 최대활성이 6.3 IU/mL로 목쇄재를 기질로 하였을 때 보다 15% 높았다.

감사의 말

본 논문은 학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었으며, 깊은 감사를 드립니다 (Bio 1998-020-E00033).

REFERENCES

1. Torget, R., M. Himmel, J. D. Wright, and K. Grohmann. 1988. Initial design of a dilute sulfuric acid pretreatment process for aspen wood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **17**: 89-104.
2. Montencourt, B. S. and D. E. Eveleigh. 1979. Selective screening methods for the isolation of high yielding cellulase mutants of *T. reesei*. *Adv. Chem. Ser.* **181**: 289-301.
3. Allen, A. L. and C. D. Roche. 1989. Effects of strain and fermentation conditions on production of cellulase by *T. reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 650-656.
4. Janbon, G., A. Arnaud, and P. Galzy. 1994. Selection and study of a *Candida molischiana* mutant derepressed for β -glucosidase production. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 207-212.
5. Kang, S. W., S. W. Kim, and K. Kim. 1994. Production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* KKS. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 49-55.
6. Esterbauer, H., W. Steiner, I. Labudova, A. Hermann, and M. Hayn. 1991. Production of *Trichoderma* cellulase in laboratory and pilot scale. *Biores. Technol.* **36**: 51-65.
7. Persson, I, F. Tjerneld, and B. H. Hagerdahl. 1991. Fungal cellulolytic enzyme production: a review. *Process Biochem.* **26**: 65-74.
8. Webb, C., H. Fukuda, and B. Atkinson. 1986. The production of cellulase in a spouted bed fermentor using cells immobilized in biomass support particles. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 41-50.
9. Kang, S. W., S. W. Kim, and J. S. Lee. 1995. Production of cellulase and xylanase in a bubble column using immobilized *Aspergillus niger* KKS. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **53**: 101-106.
10. Ju, L. K. and O. A. Afolabi. 1999. Wastepaper hydrolysate as soluble inducing substrate for cellulase production in continuous culture of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Prog.* **15**: 91-97.
11. Kim S. W., S. W. Kang, and J. S. Lee. 1997. Cellulase and xylanase production by *Aspergillus niger* KKS in various bioreactors. *Biores. Technol.* **59**: 63-67.
12. Hayward, T. K., J. Hamilton, D. Templeton, E. Jennings, M. Ruth, A. Tholudur, J. McMillan, M. Tucker, and A. Mohagheghi. 1999. Enzyme production, growth, and adaptation of *T. reesei* QM9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30 conditioned yellow poplar sawdust hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77-79**: 293-309.
13. Vinzant, T. B., W. S. Adney, S. R. Decker, J. O. Baker, and M. E. Himmel. 1998. Presented at 20th Symposium on Biotechnology for fuels and Chemicals Denver USA 3-7 May.
14. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
15. Doppelbauer, R., H. Esterbauer, W. Steiner, R. M. Lafferty, and H. Steinmuller. 1987. The use of lignocellulosic wastes for production of cellulase by *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **26**: 485-494.
16. Szengyel, Z., G. Zacchi, and K. Reczey. 1997. Cellulase production based on hemicellulose hydrolysate from steam-pretreated willow. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**: 351-362.
17. Heitz, M., E. C. Menard, P. G. Koeberle, J. Gagne, E. Chor-net, R. P. Overend, J. D. Taylor, and E. Yu. 1991. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. *Biores. Technol.* **35**: 23-32.
18. Ramos, L. P., C. Breuil, and J. N. Saddler. 1992. Comparison of steam pretreatment of Eucalyptus, Aspen and Spruce wood chip and their enzymatic hydrolysis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **34/35**: 37-48.
19. Chen, S. and M. Wayman. 1991. Cellulase production induced by carbon source derived from waste newspaper. *Process Biochem.* **26**: 93-100.
20. Reczey, K., A. Brumbauer, M. Boll, Z. Szengyel, and G. Zacchi. 1998. Use of hemicellulose hydrolysate for β -glucosidase fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**: 225-235.

(Received Aug. 30, 2001/Accepted Dec. 10, 2001)