

암모니아수 침지처리가 백합나무(*Liriodendron tulipifera* L.)의 화학적 조성 변화와 효소 당화에 미치는 영향

신수정*¹ · 유주현*² · 조남석 · 최인규*³ · 김문성 · 박종문[†]

(2009년 2월 10일 접수:2009년 3월 5일 채택)

Effects of Aqueous Ammonia Soaking to Chemical Compositional Changes and Enzymatic Saccharification of Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera* L.)

Soo-Jeong Shin *¹, Ju-Hyun Yu *², Nam-Seok Cho, In-Gyu Choi *³, Mun-Sung Kim, and Jong-Moon Park [†]

(Received February 10, 2009; Accepted March 5, 2009)

ABSTRACT

Effects of aqueous ammonia soaking treatments to yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) were investigated to focus on chemical compositional changes and enzymatic hydrolysis characteristics changes by this treatment. Treatment temperature and time were main variables. At 3 different levels of aqueous ammonia soaking temperature and time (145°C -1 h, 90°C -16 h and 45°C - 6 days), lower temperature and longer soaking time led to more xylan removal based on carbohydrate compositional analysis. However, at higher temperature treatment led to more enzymatic saccharification of cellulose to glucose by commercial cellulose mixtures (Celluclast 1.5L and Novozym 342 from Novozyme, Denmark). Cellulose hydrolysis was gradually increased with increasing enzymatic hydrolysis time but xylan hydrolysis was leveled out at early stage (less than 10 h) of enzymatic hydrolysis.

Keywords : *aqueous ammonia soaking, xylan, lignin, NMR, glucose, xylose, yellow poplar (Liriodendron tulipifera L.), enzymatic saccharification*

• 충북대학교 농업생명환경대학 목재·종이과학전공(Chungbuk National University, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Wood and Paper Science, Cheongju, Chungbuk, South Korea)

*1 충북대학교 농업과학기술연구소(Chungbuk National University, Agricultural Science & Technology Institute, Cheongju, Chungbuk, South Korea)

*2 한국화학연구원 산업바이오화학연구센터(Korea Research Institute of Chemical Technology, Chemical Biotechnology Research Center, Daejeon, South Korea)

*3 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부(Dept. of Forest Sciences, College of Agriculture and Life Science, Seoul National University, Silimdong Gwanakgu, Seoul, South Korea)

† 교신저자 (Corresponding Author): E-mail: jmpark@cbu.ac.kr

1. 서론

화석 연료 자원의 고갈과 지구 온난화 현상이 가속화됨에 따라 화석연료를 대체할 수 있는 신재생 에너지 자원의 연구와 개발에 대한 관심이 최고수위에 달하고 있다. 식물 바이오매스 자원은 지속적인 재생산이 가능할 뿐만 아니라 농림가의 소득을 제고할 수 있는 유력한 방안으로 인식되면서 바이오에너지와 바이오리파이너리 산업의 주요한 자원으로 여겨지고 있다. 열매 부분에 포함되어 있는 전분이나 지방, 단백질질을 제외하고 식물 바이오매스 자원은 대부분 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌으로 구성되어 있다. 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 효과적으로 가수분해하면 포도당(glucose)과 목당(xylose) 등 주요 단당류를 생산할 수 있으므로 곡물전분을 사용하지 않고도 단당류를 기반으로 하는 바이오리파이너리 산업의 원료 물질을 지속적으로 공급할 수 있다.

목질계 자원을 당화하는 공정에서 가장 큰 장애 요인은 당화 효율이 낮다는 점이며, 그 원인으로는 크게 두 가지를 들 수 있다. 첫째로 효소당화의 경우 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스에 치밀하게 결합되어 있는 리그닌이 당화효소의 접근을 저해하거나, 헤미셀룰로오스 중 자이란이 효소의 셀룰로오스에 대한 접근성을 제한한다. 둘째로 산으로 가수분해하여 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스로부터 단당류를 제조하고자 할 경우 반응이 단당류 생성에서 멈추지 않고 산촉매 작용에 의하여 furfural이나 5-hydromethylfurfural을 거쳐 더 작은 단위로 분해반응이 계속 진행되기 때문이다.

그러나 적절한 전처리 기술을 도입하면 효소 당화의 효율을 현저하게 증가시킬 수 있다. 따라서 다양한 물리적, 화학적 전처리 기술과 그 효과에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔는데,^{1,2)} 그 중의 하나가 암모니아 처리이며, 반응조건에 따라 암모니아 폭쇄법과 암모니아 수용액 침지법이 있다. 암모니아 폭쇄법은 무수액체 암모니아를 60 내지 100°C, 250 내지 300 psi 에서 5분간 노출시킨 다음 순식간에 압력을 제거하여 폭쇄시키는 공정이다.³⁾ 암모니아 폭쇄 처리로 리그닌의 용해도가 증가하고, 헤미셀룰로오스가 가수분해되며, 셀룰로오스의 결정성이 파괴되면 노출된 표면적이 증가함으로써 효소에 의한 셀룰로오스와 헤

미셀룰로오스의 가수분해가 촉진된다. 암모니아 침지법은 다양한 온도에서 바이오매스를 암모니아수에 담가서 가용성 리그닌과 자이란을 녹여내어 제거하는 공정이다.⁴⁾ 이렇게 리그닌과 자이란의 제거로 셀룰로오스가 노출되고 효소의 접근이 용이해짐으로써 당화 공정의 효율이 크게 증가할 수 있다.

국내에서는 폭쇄 처리 공정을 전처리 공정으로도 입하여 당화 효율을 향상시키는 대체연료 생산을 위한 연구들이 진행되어 왔다.^{5,6)} 폭쇄 처리 공정은 첨가물의 사용에 따라 침엽수나 활엽수의 목질 바이오매스 자원을 모두 처리할 수 있는 공정이다. 암모니아 침지 처리 공정은 일반적으로 초분류의 셀룰로오스를 당화시키기 적합한 구조로 만들어 주는 전처리 공정이지만^{3,4)} 활엽수나 침엽수의 전처리 공정에는 적합하지 않다. 본 연구에서는 화학적 조성이 유사한 초분류와 활엽수에 대한 암모니아 침지 처리의 다른 반응성을 구명하는 것을 목표로 하고 있다. 일차적으로 백합나무의 암모니아 침지 조건에 따른 전처리 효과를 검증하고자 하였다.

본 연구에서는 온도와 시간을 달리하여 백합나무분말을 암모니아 수용액에 침지한 후 효소 당화하여 위의 두 가지 변수가 목질계 바이오매스 전처리물의 조성 변화와 당수율에 미치는 영향을 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 백합나무 목분 제조

충북대학교(충북 청주시) 구내에 식재된 20년생 백합나무를 잘라서 그늘에서 2개월간 건조하였다. 수피를 제거하고 칩을 제조한 다음 커팅밀로 분쇄하였다. 목분은 체로 쳐서 40 내지 60 mesh 부분만을 공시재료로 사용하였다.

2.2 암모니아수 침지

온도가 암모니아 수용액 침지처리 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시약용 암모니아수(30%, w/w)를 같은 양의 증류수로 희석하여 15%의 암모니아수를 조제하였다. 목분 2.5g을 반응기에 달아 넣고 암모니아수 45 mL를 첨가한 다음 밀봉하였다. 이것을 각각 45°C 항온기에서 6일, 90°C 항온기에서 16 시

간 및 140°C oil bath에서 1시간 동안 열처리한 후 여과 세척하여 암모니아수 처리에 의해 용출된 성분을 제거하였다. 여과 후 남은 고형분을 상온 대기 중에서 건조시킨 후 조성을 분석하였다.

2.3 공시재료와 전처리물의 조성 분석

국제적으로 통용되고 있는 미국 NREL의 laboratory analysis procedure에 따라 백합나무 분말을 아세톤과 비등수로 각각 추출하여 유기용매 추출물(organic solvent extractive)과 열수 추출물(hot water extractive)을 측정하였고, 추출 후의 고형분으로 Klason lignin을 정량하여 공시재료의 리그닌과 다당류 함량을 산출하였다. 암모니아 침지처리 후 얻은 시료의 Klason lignin을 정량한 후 전체적인 질량 수치를 계산함으로써 암모니아수 침지 처리에 의한 리그닌과 다당류의 용출 정도를 추정하였다.

2.4 백합나무 분말과 암모니아 침지처리 후 고형분 잔사의 탄수화물 조성 분석

백합나무 분말에 진한 황산(72%, w/w)을 가한 다음 20°C에서 2시간 동안 1차 산 가수분해하였다. 가수분해물에 중수(D₂O)를 가해 희석하고, 121°C에서 1시간 동안 2차 가수분해하였다. 가수분해물을 여과하고 여액을 ¹H-NMR로 분석한 후 anomeric hydrogen 피크를 적분하여 탄수화물의 조성을 산출하였다.⁷⁾

2.5 효소당화와 당용액의 탄수화물 조성 분석

암모니아 수용액 침지처리 후 여과하여 얻은 전처리물 잔사를 250 mL의 삼각플라스크에 넣고 170 mL의 0.05 M sodium acetate buffer 수용액을 가한 후 121°C에서 20분간 멸균하였다. 상온에서 식힌 후 교반반응기에 넣고 45°C를 유지하였다. 온도가 평형에 도달한 후 Cellulast 1.5L(Novozyme, 공업용, 덴마크) 0.8 mL와 Novozym 342(Novozyme, 덴마크) 0.2 mL를 각각 첨가한 다음 진탕하여 가수분해하였다. 진탕 개시 2, 4, 10, 24 및 48시간 후에 시료 1 mL를 채취한 다음 즉시 냉장 보관하였다.

당용액 200 µL를 900 µL의 acetonitrile수용액 (5:5, v/v)으로 희석한 다음 원심분리하고 HPLC를 이용하여 당장액의 당농도를 분석하였다. ELSD (evaporative

light scattering detector, Alltech model ELSD 2000; Tube temp. 80°C, gas flow 2.0 L/min, gain 4)를 장착한 Waters HPLC(Waters pump 1525, Waters 717 Autosampler)에 apHera™ NH₂ column (4.6 mm i.d. × 250 mm, SUPELCO)을 연결하고 acetonitrile/증류수 혼합액(80:20, v/v)을 1.2 mL/min으로 흘려주었다. 이러한 조건에서 xylose는 7.9분에서, glucose는 12.0분에서 용출되었다.

3. 결과 및 고찰

백합나무의 건조 분말에는 유기용매 추출물이나 끓는 물 추출물과 같은 가용성 성분(non-structural components 혹은 extractives)의 함량이 16.5%이었으며, 리그닌 함량은 17.5%로 나타났다. 따라서 탄수화물의 함량은 66% 정도로 추정되었다 (Table 1).

암모니아 침지 처리 후 아세톤 추출물의 90% 이상, 끓는 물 추출물의 48.6 내지 62.3%가 용출되었으며, 전체적으로 볼 때 백합나무 목질 바이오매스의 17.7 내지 19.4%가 용출되었다. 끓는 물 추출물의 용출 정도는 140°C 처리에서 48.6%이었지만 90°C나 45°C에서는 64.2%와 62.9%로 비슷하였다 (Table 2).

리그닌과 다당류 등의 구조적 성분(structural components)은 암모니아수 침지처리에 의한 용출 정도가 낮았다. 리그닌의 경우 13.7 내지 21.7%가 용출되었으며, 저온에서 장시간 처리했을 때 리그닌 용출 효과가 높은 것으로 나타났다. 다당류의 용출 정도는 5.8 내지 9.4% 정도여서 암모니아 침지 처리는 구조적 성분 중에서 리그닌을 더 잘 용해 제거하는 것으로 보인다.

암모니아 수용액 침지 처리 후 남은 고형분 중 탄수화물의 조성은 산 가수분해 후 NMR 스펙트럼의 anomeric hydrogen 피크 영역 (Fig. 1)을 적분하여 분

Table 1. Chemical compositions of yellow poplar

Components	Contents (%)
Acetone soluble (A)	2.5
Hot-water soluble(H)	14.0
Lignin (L)	17.5
Carbohydrates (100-A-H-L)	66.0

Table 2. Chemical compositional changes by aqueous ammonia treatment to yellow poplar

	Chemical composition (%)				
	Residual (%)	Acetone solubles	Hot-water solubles	Lignin	Carbohydrates
140°C-1 h	82.3	0.2	7.2	15.1	59.8
90°C-16 h	81.9	0.2	5.2	14.4	62.2
45°C-6 days	81.6	0.2	5.0	13.7	59.8
No treatment	100	2.5	14.0	17.5	66.0

Table 3. Carbohydrate compositional changes by aqueous ammonia treatment to yellow poplar

	NMR peak areas		Relative composition of carbohydrates (%)		Composition of carbohydrates (%)	
	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose
140°C-1 h	1.6153	0.6691	61.7	38.3	36.9	22.9
90°C-16 h	1.6044	0.5811	64.8	35.2	40.3	21.9
45°C-6 days	1.6000	0.4782	69.0	31.0	41.3	18.5
No treatment	1.6053	0.6006	64.1	35.9	42.3	23.7

석하였다. 이때 산 가수분해에서 xylose의 빠른 분해 속도로 인하여 일부가 furfuraldehyde를 거쳐 산 축합 반응이 일어나기 때문에 보정이 필요하므로⁷⁾ 이를 고려하여 탄수화물 조성을 분석하였다.

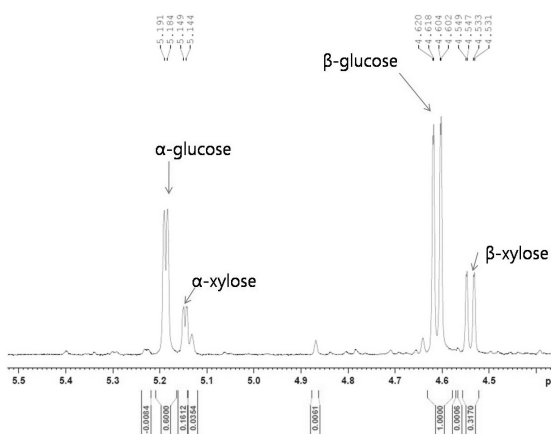
NMR 분석 결과 암모니아 침지 처리에 의하여 백합나무의 당 조성이 변한 것으로 나타났다. 저온에서 긴 시간 처리한 경우에는 자이란이 주로 용해된 반면 고온에서 단시간 처리했을 때는 자이란보다 셀룰로

오스의 용해가 현저하였다 (Table 3). 고온(140°C)에서 1시간 동안 침지 처리한 경우 자이란은 3.4%가 용출 되었지만 셀룰로오스는 12.8%가 용출되었다. 그러나 45°C에서 6일간 침지 처리한 경우에는 자이란이 21.9%나 용출된 반면 셀룰로오스는 단지 2.4% 용출되는데 그쳤다.

효소당화에서 Celluclast 1.5L 효소는 셀룰로오스와 자이란을 분해 할 수 있는 효소 복합체이다. 셀룰로오스 분해 과정에서 생겨나는 cellobiose를 포도당으로 분해하는 β -glucosidase의 활성을 보충하기 위하여 Novozym 342 효소를 추가하였다. 고온에서 단시간 동안 암모니아수를 처리하였을 때 다당류 중 자이란보다 셀룰로오스가 더 많이 용출되었는데, 셀룰로오스의 효소 당화 실험에서도 전처리 온도가 높아짐에 따라 당화율이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 따라서 고온의 암모니아수 처리에서 제거된 셀룰로오스가 셀룰라아제의 작용을 용이하게 하는 것으로 추정된다.

효소당화에 의한 xylose의 전환율은 140°C 처리 시료에서 높았지만 90°C나 45°C 처리 시료에서는 비슷한 경향을 나타냈다 (Fig. 3). 저온처리에 의한 자이란 제거가 자이란의 효소 당화에 미치는 영향보다는 고온에서 제거된 셀룰로오스가 자이란의 당화에 더 크

y2

**Fig. 1. NMR spectrum of yellow poplar (45°C, 6 days aqueous ammonia soaked).**

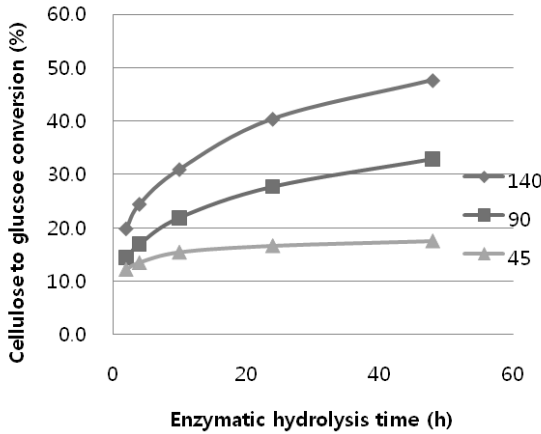


Fig. 2. Enzymatic saccharification of ammonia soaked yellow poplar with different treatment temperature and time. (140°C-1 h, 90°C-16 h, and 45°C-6 days).

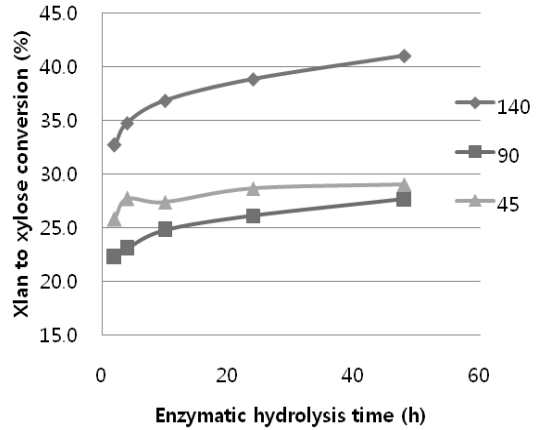


Fig. 3. Enzymatic saccharification of xylan to xylose from ammonia soaked yellow poplar with different treatment temperature and time. (140°C-1h, 90°C-16h, and 45°C-6 days).

게 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 자이란의 당화에는 자이란 분해 효소뿐만 아니라 자이란 측쇄의 4-O-methylglucuronic acid와의 에테르 결합 절단도 필요하기 때문에 효소 복합체에 이런 기능의 효소를 첨가하거나 uronic acid결합이 전처리 조건에서 끊어지는 것이 자이란의 당화를 위해서 필요하다. 이 부분에 대한 보다 자세한 연구가 필요하다.

4. 결론

암모니아 침지 처리에 의해 백합나무 분말로부터 유기용매 추출물이나 끓는물 추출물의 상당부분이 용출되었으며, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌 등 구조적 성분(structural components)의 용출율은 가용성 성분(non-structural components)에 비하여 크지는 않았다. 리그닌이 암모니아 침지에 의해 다당류보다 더 잘 제거되었으며, 다당류 성분의 변화 면에서 보면 저온 장시간 침지에서는 자이란의 용출이 뚜렷하였고 고온 단시간 처리에서는 셀룰로오스의 용출이 더 크게 나타났다.

고온에서 단시간 동안의 암모니아 침지 처리에 의한 셀룰로오스의 제거 효과가 백합나무의 효소 당화에서 셀룰로오스의 포도당 전환이나 자이란의 xylose 전환에 더 효과적이었다. 또한 45°C, 6일 처리 시료의 셀룰로오스 당화율이 20% 이하인데 비하여 145°C 1

시간 처리 시료의 셀룰로오스 당화율은 50%에 근접하였으며, 자이란의 효소당화에서도 비슷한 경향을 보였다.

사사

이 논문은 학술진흥재단 2007년도 지역대학 우수 과학자 지원 사업 (F00023)에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

- Hemdriks, A.T.W.M and Zeeman, G., Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* 100:10-18 (2008).
- Sun, Y. and Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* 83:1-11(2002).
- Teymouri, F., Laureano Perez, L., Alizadeh, H. and Dale, B.E, Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover, *Bioresour. Technol.* 96: 2014-2018 (2005).
- Kim, T. H. and Lee, Y.Y., Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 137-140: 81-92

- (2007).
5. 조남석, 민두식, 대체연료 생산을 위한 목질재료의 가수분해 연구 제5보. 붉은황산 폭쇄처리재의 가수분해에 관하여, 펄프 · 종이기술 22(4): 35-60 (1990).
 6. 이종윤, 장준복, 폭쇄처리에 의한 biomass 자원의 전처리 당화 신공정 개발(2) 산 및 알칼리에 의한 신갈나무와 이태리포플러 폭쇄재의 탈리그닌, 펄프 · 종이기술 22(4): 26-34 (1990).
 7. Shin, S. J. and Cho, N. S., Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and ^1H NMR spectroscopy, Cellulose 15:255-260 (2008).