

# 구멍갈파래의 알칼리 과산화수소 전처리 및 효소 가수분해 특성

윤병태<sup>†</sup> · 김영운 · 정근우 · 김진석

한국화학연구원 그린화학연구본부  
(2011년 2월 17일 접수, 2011년 4월 1일 채택)

## Enzymatic Hydrolysis of Pre-treated *Ulva pertusa* with Alkaline Peroxide

Byung-Tae Yoon<sup>†</sup>, Young-Wun Kim, Keun-Wo Chung, and Jin-Seog Kim

Green Chemistry Division, Chemical Biotechnology Research Center, KRICT, Daejeon 305-600, Korea

(Received February 17, 2011; Accepted April 1, 2011)

해조류는 잠재력이 있는 풍부한 발효기질이다. 해조류의 효소가수분해를 상업용 셀룰라아제 및 비스코자임과 함께 알칼리 과산화수소 전처리에 의해서 검토하였다. 본 연구에서 사용된 해조류는 구멍갈파래이며, 전처리 평가는 효소 가수분해 후 얻어진 글루코오스의 수율로 나타내었다. 알칼리 과산화수소는 과산화수소 1 wt%에 수산화나트륨을 1~1.75 wt% 범위로 혼합하였다. 60 °C에서 3 h 동안 전처리한 결과 5 wt% 과산화수소를 사용했을 때에 가장 높은 글루코오스 전환율을 보였다. 알칼리 과산화수소로 전처리한 후 필요한 효소의 양은 전처리하지 않은 구멍갈파래에 비하여 상당히 절감되었으며, 아울러 효소 가수분해동안 얻어진 글루코오스의 양은 증가되었다.

Algae is an abundant and potential fermentation substrate. The enzymatic hydrolysis of algae was investigated by pre-treating an alkaline hydrogen peroxide with commercial cellulase and viscozyme. Algae used in this study was the *Ulva pertusa*. The evaluated response was the yield of released glucose after the enzymatic hydrolysis. Alkaline hydrogen peroxide containing mixtures of 1 wt% hydrogen peroxide and 1~1.75 wt% sodium hydroxide was also used. The results show that the highest glucose conversion was obtained for *Ulva pertusa* using 5 wt% hydrogen peroxide at 60 °C for 3 h. The required amount of enzymes after the pre-treatment with alkaline hydrogen peroxide were reduced by far compared to that of untreated *Ulva pertusa*. Also, the amount of glucose that is released during the enzymatic hydrolysis was increased.

**Keywords:** algae, enzyme, pretreatment, hydrogen peroxide, sodium hydroxide

## 1. 서 론

석유자원의 고갈과 환경적인 측면에서 바이오매스(biomass)를 원료로 하는 정밀화학 제품의 개발 필요성이 점점 증가하고 있다. 최근에는 기존 석유화학 산업으로부터 지속적 녹색성장이 가능한 신 재생에너지로의 전환이 이루어지고 있고, 그런에너지 및 바이오산업의 비중이 확대될 것으로 예상되며 온실가스 저감 및 석유자원 고갈에 따른 석유산업 대체 바이오 산업공정의 개발은 전 세계가 앞 다투어 개발하고 있다. 최근에는 사탕수수 즙, 옥수수 전분 등의 바이오매스로부터 생성되는 당화합물을 이용한 바이오에너지(bio-energy) 생산에 많은 관심이 집중되고 있으나, 이러한 제 1세대 바이오매스 원료들은 식품 및 가축사료와의 경쟁, 재배 면적의 포화 등 많은 문제에 봉착해 있는 실정이다[1]. 이를 극복하기 위하여, 목본 및 초본류의 재생 가능한 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 바이오매스를 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있다[2]. 또한, 구조적으로 결정구조로 되어 있는 셀룰로오스를 헤미셀룰로오스와 난분해성 물질인 리그닌이 둘러싸고 있기 때문에 물리, 화학적 방법을 이용한 전처리(pretreatment) 공정이 매우

어려운 실정이다[3]. 바이오매스로부터 정밀화학 제품을 개발하기 위해서는 글루코오스와 같은 당화합물을 고효율 및 고농도로 제조하는 것이 무엇보다 중요하다[4]. 이를 극복하기 위한 대안으로 최근에는 리그닌 함량이 낮고 조직이 치밀하지 않아 당화가 용이하며, 생산량도 매우 방대하여 그 잠재력이 우수한 해조류를 이용하여 전처리 및 당화하는 연구를 진행하고 있다[1]. 물리, 화학적 전처리 공정에서 화학적 방법에 의한 전처리는 주로 알칼리 약품을 사용하는데, 알칼리는 헤미셀룰로오스 및 다른 성분과 가교결합(crosslinking)을 하는 분자간의 에스터(ester) 결합을 비누화(saponification)시키고[5], 특히 산(acid)전처리보다 당(sugar)분해가 적어 목질계 바이오매스보다 농업 부산물에 더 효과적이다[6]. 또한, 알칼리에 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 병행하면 시너지 효과가 있고[7-9], 발효를 억제시키는 furfural과 HMF(5-hydroxymethylfurfural)와 같은 성분이 검출되지 않는다[10]. 물리, 화학적 전처리 후 이루어지는 당화는 셀룰로오스 성분이 효소의 작용에 의해 글루코오스로 전환되는 과정이며, 셀룰라아제(cellulase)가 셀룰로오스의 반응표면에 흡착하여 셀룰로오스를 셀로바이오스(cellobiose)로 바꾸는 과정과 이렇게 생성된 셀로바이오스가  $\beta$ -글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase)의 효소반응에 의해 글루코오스로 전환되는 과정으로 이루어지며[11] 물리, 화학적 전처리 방법에 따라 상당히 큰 영향을

† 교신저자 (e-mail: btyoun@krikt.re.kr)

받는다[2,12,13]. 즉, 고효율, 고농도로 글루코오스 당화합물을 생산하기 위해서는 물리, 화학적 전처리 방법을 최적화하는 것이 무엇보다 중요하다. 본 논문에서는 해조류 바이오매스로 구멍갈파래(*Ulva pertusa*)를 사용하여 알칼리 과산화수소 전처리 과정이 효소가수분해 특성에 미치는 영향을 고찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 해조류 원료는 전남완도에서 수집한 구멍갈파래이며 월리밀(Willy mill)로 분쇄하여 20~80 mesh 크기로 균일화시켜 시료로 사용하였다. 알칼리전처리 시 사용한 약품은 덕산화학(사)의 sodium hydroxide (NaOH), OCI (사)의 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), 삼전화학(사)의 acetic acid ( $CH_3COOH$ )를 사용하였고, 효소가수분해 시 사용한 약품으로는 Acros 사의 sodium azide ( $NaN_3$ ), Sigma Aldrich의 sodium citrate와 citric acid를 사용하였으며, 효소는 Cellulast 1.5 L (Novozyme 사), Viscozyme L (Novozyme 사)을 사용하였다.

### 2.2. 실험방법

#### 2.2.1. 전처리

효소에 의한 구멍갈파래의 가수분해 효율을 증가시키기 위하여 화학적으로 전처리를 실시하였다.

원료에 고형분 대비 알칼리 과산화수소용액(전처리용액)을 5 wt% (과산화수소 농도 기준) 첨가한 후, 중류수로 고형분 농도 40 g/L으로 조정하였다. 이어서 shaking apparatus (SI-600R)에서 온도 40~70 °C, 150 rpm으로 3 h 동안 처리하고, 여과 및 세척과 함께 농도 1%의 acetic acid로 pH 6으로 조정한 다음 60 °C에서 건조하였다.

#### 2.2.2. 효소 가수분해

전처리하여 건조한 원료를 구연산과 구연산나트륨으로 조제한 0.1 M 완충용액(pH 4.8)을 사용하여 고형분 농도 20 g/L으로 만들어서 1%  $NaN_3$  1.67 mL를 첨가하고 120 °C에서 15 min 동안 멸균처리를 하였다. 이어서 원료 g당 Cellulast 1.5 L을 15 Filter Paper Unit (FPU), Viscozyme L을 30 Cellobiose Unit (CBU) 투입하여 shaking apparatus에서 50 °C, 150 rpm으로 10 h 동안 효소가수분해를 실시하였다.

#### 2.2.3. 분석

원료의 화학적 조성분석은 한국식품연구원에 의뢰하여 식품공전(2009) 상압가열건조법에 의한 수분분석, 식품공전(2009) 에테르추출법에 의한 지방분석, Kjeldahl법에 의한 단백질분석, 식품공전(2009) 회분시험법으로 회분분석을 하였고, 총량에서 이를 4가지 성분을 제외한 성분을 탄수화물로 계산하였다.

효소 가수분해하여 얻은 글루코오스 함량 분석은 biochemistry analyzer (YSI 2537 buffer, YSI 2365 glucose membrane kit)를 이용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 원료의 화학적 조성

원료에 대하여 화학적 조성 분석을 한 결과 탄수화물이 52.3%, 단백질이 18.7%, 회분이 19.7%로 구성되어 있는 것으로 나타났다.

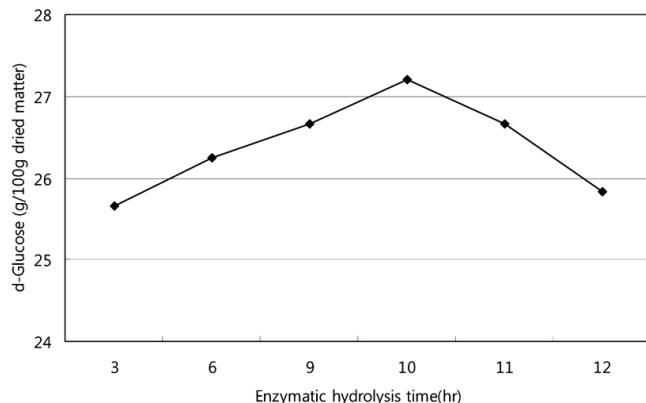


Figure 1. Effect of hydrolysis time on d-glucose yield with un-pretreated raw material (50 °C).

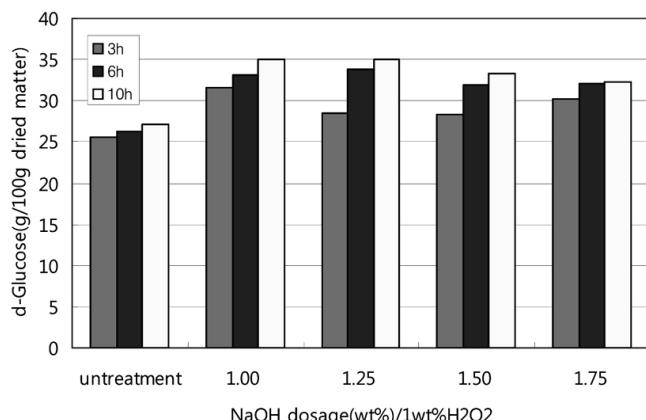


Figure 2. Effect of sodium hydroxide loading in alkaline peroxide pre-treatment stage (60 °C, 3 h) on d-glucose yield of *Ulva pertusa* after enzymatic hydrolysis (50 °C, 10 h).

### 3.2. 알칼리/과산화수소 전처리에 따른 효소 가수분해 효율

2.2.1항에서 언급한 전처리 방법처럼 전처리용액으로 1 wt%  $H_2O_2$ 에 NaOH의 혼합비율에 따라 전처리하고 2.2.2항처럼 효소가수분해를 실시하여 혼합비율에 따른 효소 가수분해 효율을 살펴보았다.

효소가수분해는 Figure 1처럼 전처리를 하지 않은 원료에 대한 효소 가수분해 시의 결과에 의거 10 h 동안 실시한 후 글루코오스 생산량을 비교 검토하였다.

그 결과 Figure 2처럼 1 wt%  $H_2O_2$ 에 대하여 NaOH의 최적 혼합 비율은 1.0 wt%로 나타났다.

일반적으로  $H_2O_2$ 에 의한 처리활성은 NaOH의 첨가에 의하여 발생되는 peroxide anion ( $OOH^-$ )에 기인한다. 따라서 처리하고자 하는 biomass 원료에 따라 과산화수소에 NaOH의 최적 혼합비율이 변화할 수 있는 것으로 생각된다[14].

이 결과에 따라 원료에 대하여  $H_2O_2 : NaOH = 1 : 1$  비율로 혼합한 전처리용액의 투입량(과산화수소 농도 기준)을 1~7 wt% 범위에서 전처리를 하고 효소 가수분해를 함으로써 전처리용액 투입량의 차이에 따른 글루코오스의 발생량을 알아보았다. 그 결과 Figure 3처럼 5 wt% [alkaline peroxide (AP-5)] 투입 했을 때가 35.1 (g/100 g dried matter)로 가장 높았으며, 이 결과는 Figure 4와 같이 과산화수소를 혼합하지 않고 NaOH 만으로 5 wt% 처리했을 경우[sodium hydroxide (SH-5)] 보

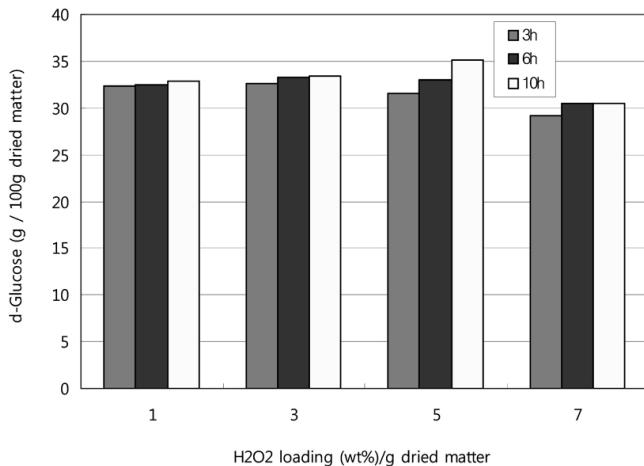


Figure 3. Effect of alkaline peroxide loading in pre-treatment stage (60 °C, 3 h) on d-glucose yield after enzymatic hydrolysis (50 °C, 10 h).

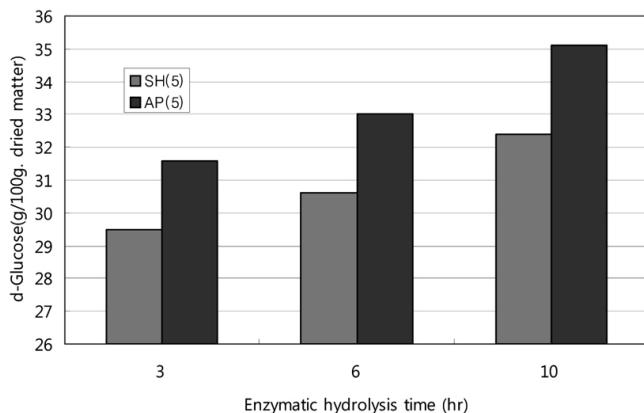


Figure 4. Comparison of glucose yield between alkaline peroxide and alkali pre-treatment (60 °C, 3 h) after enzymatic hydrolysis (50 °C, 10 h).

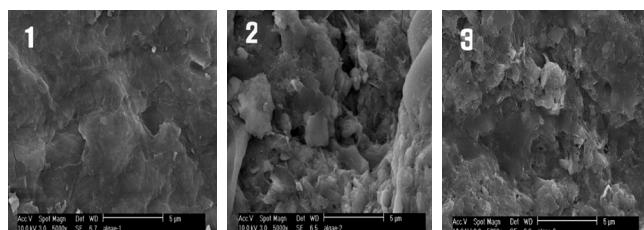


Figure 5. Scanning electron microscopy (5000×) showing the effect of pre-treatment conditions in *Ulva pertusa*. (1) Image of untreated *Ulva pertusa*, (2) *Ulva pertusa* pre-treated with mixed solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NaOH), and (3) *Ulva pertusa* pre-treated with NaOH.

다도 높은 글루코오스의 발생량을 보였다. Lee[15] 등에 의하면 구멍 갈파래를 1% 황산으로 123 °C에서 1 h 동안 용매추출하고 셀룰라야제로 50 °C에서 72 h 동안 가수분해하여 16.56 (g/100 g dried matter)의 글루코오스를 얻었다고 하였다.

Figures 3, 4와 같은 결과는 SEM (scanning electron microscopy) 사진을 통하여 알 수가 있다. Figure 5에서 사진 (1)처럼 처리하지 않은 원료의 세포벽의 구조는 치밀하고 매끄러운 결정상태의 모습이고, NaOH로 처리하면 사진 (3)처럼 일부 구조가 파괴된 상태이며, 알칼리

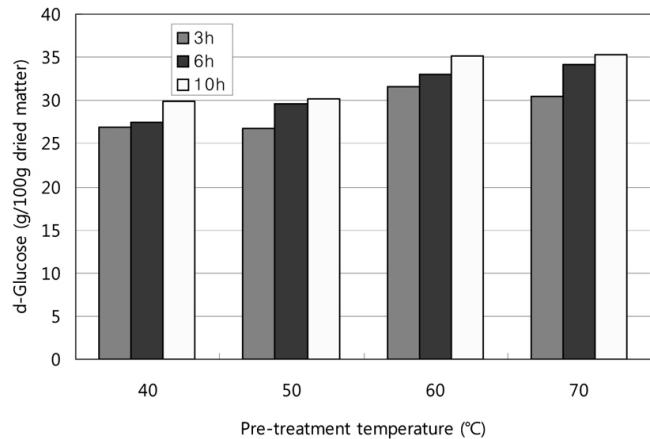


Figure 6. Effect of the temperature of alkaline peroxide pre-treatment (3 h) on d-glucose yield after enzymatic hydrolysis (50 °C, 10 h).

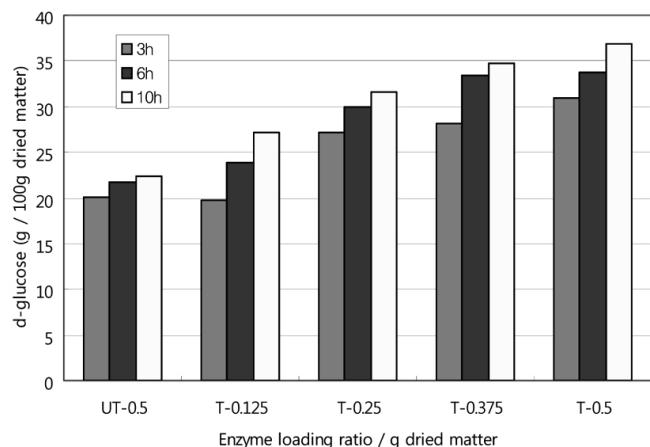


Figure 7. Effects of enzyme addition on d-glucose of algae (*Ulva pertusa*) after alkaline peroxide pre-treatment (60 °C, 3 h) and enzymatic hydrolysis (50 °C, 10 h): Enzymes addition reduction according to alkaline peroxide pre-treatment ; Enzymes dosage per g dry matter. Loading 0.5 × = Cellulast 1.5 L 15 FPU, Viscozyme L 30 CBU. Loadings 0.375×, 0.25×, 0.125× represent 0.75, 0.5, and 0.25 times of loading 0.5×, respectively.

과산화수소로 처리하면 사진 (2)처럼 pore가 생길 정도로 심하게 파괴된 현상을 볼 수가 있다.

이러한 현상은 NaOH가 결정상태인 셀룰로오스를 팽윤시키면서 표면적이 늘어나는 무정형상태로 만들고, 또한 세포벽 구조로부터 저분자량의 탄수화물이 제거되어 pore가 발생된 것으로 생각되며[10, 16], 여기에 과산화수소를 사용하면서 그 효과는 보다 높아[7-9] 효소가수분해 시 효소의 침투가 한층 더 쉽게 형성되어 글루코오스 발생량이 보다 높은 것으로 생각된다.

Figure 6은 원료에 대하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : NaOH = 1 : 1 비율로 혼합한 전처리용액을 5wt% 투입하고 40~70 °C 범위에서 처리온도 차이에 따른 효소 가수분해 후의 글루코오스 발생량을 나타낸 결과이다. 온도 60, 70 °C에서 처리했을 때가 유사하게 가장 높은 글루코오스가 발생됨에 따라 온도 60 °C가 효소가수분해 적정온도로서 생각된다.

지금까지 효소가수분해 단계에서 사용한 효소는 2.2.2항에서 언급한 바와 같이 원료 g당 15 FPU cellulase와 30 CBU viscozyme의 복합효소를 사용하였다.

다음은 전처리에 따른 효소의 절감효과를 평가하기 위하여 복합효소의 첨가 비율에 따른 글루코오스 생산량을 비교 검토하였다. 그 결과 Figure 7처럼 전처리를 하고 원료 g당 15 FPU (0.2 mL) cellulase와 30 CBU (0.3 mL) viscozyme의 복합효소 0.5 mL를 사용하면 [treated (T-0.5)] 전처리하지 않고 복합효소 0.5 mL 사용한 것 [untreated (UT-0.5)] 보다 효소가수분해 효율이 65% 정도 상승되었다. 또한 전처리를 하면 효소 사용량이 cellulase 0.05 mL, viscozyme 0.075 mL의 복합효소 0.125 mL [treated (T-0.125)] 사용으로 75% 정도 절감시켜도 전처리를 하지 않고 복합효소 0.5 mL 사용한 것 [untreated (UT-0.5)]에 비하여 효소 가수분해 효율이 21.5% 상승되는 효과를 보였다.

원료에 함유하고 있는 탄수화합물(52.3%)을 감안하면 T-0.5의 10 h 후 글루코오스 전환율은 65%정도이다.

#### 4. 결 론

구멍갈파래로부터 글루코오스를 얻기 위하여 알칼리 과산화수소로 전처리를 하고 이에 따른 효소 가수분해 특성을 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 구멍갈파래의 전처리는 알칼리로 처리하는 것보다 과산화수소와 혼합하여 처리하는 것이 보다 효과적이며 혼합비율은 1 : 1 이 적합하고, 이 혼합비율로 제조한 용액을 원료 g당 5wt%로 적용하면 효소 가수분해에서 글루코오스의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났다.

2) 알칼리 과산화수소로 전처리하면 처리하지 않은 경우에 비해서 효소 가수분해 시 효소 사용량이 75% 절감되며 글루코오스 생산량도 21.5% 상승되는 효과를 보였다.

3) 알칼리 과산화수소로 구멍갈파래를 전처리하고 효소 가수분해를 하면 글루코오스 전환율이 65%정도로 나타났다.

#### 참 고 문 헌

- D. Pimentel and T. W. Patzek, *Netherlands Springer*, **358** (2008).
- A. T. W. M. Hendriks and G. Zeeman, *Bioresource Tech.*, **100**, 10 (2009).
- N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch, *Bioresource Tech.*, **96**, 673 (2005).
- M. K. Lee, S. Y. Hwang, S. Y. Choi, H. S. Lee, and J. H. Lee, *News & Information for Chemical Engineers*, **28**, 506 (2010).
- Y. H. P. Zhang and L. R. Lynd, *Biotechnol Bioeng*, **88**, 797 (2004).
- R. Kumar and C. E. Wyman, *Biotechnol. Prog.*, **25**, 302 (2009a).
- H. Chen, Y. Han, and J. Xu, *Process Biochemistry*, **43**, 1462 (2008).
- J. X. Sun, X. F. Sun, R. C. Sun, and Y. Q. Su, *Carbohydr Polym*, **56**, 195 (2004).
- J. R. Monte, M. Brienz, and A. M. F. Milagres, *Appl. Energy*, **88**, 403 (2011).
- M. J. Taherzadeh and K. Karimi, Pretreatment of lignocellulose wastes to improve ethanol and biogas production; a review, *Int. J. Mol. Sci.*, **9**, 1621 (2008).
- K. E. L. Eriksson, R. A. Blanchette, and P. Ander, Microbial and Enzymatic Degradation of wood and wood components, 102 (1990).
- Y. Teramoto and S. H. Lee, *Bioresour. Technol.*, **99**, 8856 (2008).
- M. Chen, J. Zhao, and L. Xia, *Biomass and Bioenergy*, **33**, 1381 (2009).
- K. J. Hipolit, Chemical Processing Aids in Papermaking Guide, 196 (1992).
- H. Y. Lee and K. H. Chung, Korea Patent, 10-2008-0056322 (2008).
- R. Marton and S. Granzow, *Tappi J.*, **65**, 103 (1982).