

발효 당용액 생산자원으로서 담수조류 그물말의 유용성

김슬기, 황현진, 김재덕, 고은혜, 최정섭, 김진석*

Usefulness of Freshwater Alga Water-net (*Hydrodictyon reticulatum*) as Resources for Production of Fermentable Sugars

Seul Ki Kim, Hyun Jin Hwang, Jae Deog Kim, Eun Hye Ko
Jung Sup Choi and Jin-Seog Kim*

ABSTRACT To investigate the usefulness of freshwater alga Water-net (*Hydrodictyon reticulatum*, HR) as resources for production of fermentable sugars, the easiness of enzymatic saccharification was evaluated at first. When 6 plant materials (HR, *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*, Corn stover) were enzymatically hydrolyzed with 2% solid loading at the same condition, HR showed the highest ratio of saccharification based on glucose production. No milled HR was also completely saccharified at the amounts of optimal enzyme mixture. Glucose yield was not changed though the citrate buffer strength for saccharification was decreased from 0.1 M to 0.1 mM. Only about 10% yield reduction was observed compared to that of 120°C treatment when HR was enzymatically hydrolyzed at room temperature. The saccharification was normally occurred at 37°C and pH 6.5 which is general growth condition of fermentable microorganisms, suggesting that HR have a biomass characteristics applicable for the simultaneous saccharification and fermentation. The saccharification was occurred by more than 70~80% of one of the best condition although the supplied enzyme amounts was reduced to 1/10 volume. And the glucose yield by enzymatic hydrolysis was not decreased by 10% HR solid loading and began to decrease at more than 15% solid contents. Above these results show that HR is an interesting algal biomass which is relatively easy to be saccharified by hydrolyzing enzymes. In addition, HR is a filamentous alga and very easy to be collected. Therefore, HR seems to be an useful and valuable resources in the economical production of fermentable sugars for manufacture of bio-chemical products.

Key words: algal biomass; fermentable sugars; *Hydrodictyon reticulatum*; enzymatic hydrolysis; saccharification.

한국화학연구원 바이오화학연구센터, 305-600 대전광역시 유성구 가정로 141 유성우체국 사서함 107(Research Center for Biobased Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong 305-600, Korea).

* 연락저자(Corresponding author) : Phone) +82-42-860-7026, Fax) +82-42-861-4913, E-mail) jskim@kriect.re.kr

(Received April 16, 2012; Examined May 13, 2012; Accepted June 1, 2012)

서 언

석유자원의 고갈, 에너지 수요 증가, 지구온난화와 CO₂ 배출 문제, 환경규제 강화 등 여러 문제에 직면한 상황에서 미래 환경과 자원고갈을 슬기롭게 대비하기 위해서는 필수적으로 식물자원 바이오매스의 효율적 활용기술 개발이 필요하다. 이에 적합한 식물자원은 다음의 몇 가지 요인으로 첫째, 식량 및 사료 확보와의 충돌이 최소화 될 것 둘째, 생산시 이산화탄소 저감 또는 환경오염 경감 능력이 상대적으로 우수할 것 셋째, 생산성이 뛰어나거나 생산물의 산업적 가치가 높아 경제성이 높을 것 등이 필수적으로 구비되어야 할 것이다. 무엇보다 성장속도가 빨라 바이오매스 확보가 원활한 것이 우선적으로 고려되어야 하는 바, 그동안 잡초 또는 위해식물로서 여겨져 왔던 초본계 다년생 식물인 억새, 스위치그래스, 갈대, 코드그래스, 코끼리풀, 부들, 돼지감자 등이 활용연구의 후보자원이 되어 세계적으로 많은 연구가 이루어지고 있다. 상기 요인에 적합한 다른 식물로는 조류(algae)를 들 수 있다. 특히 조류 중에는 특정 성분이 고함량 존재하는 종들이 많고 리그닌이 거의 없기 때문에 리그노셀룰로오스계 바이오매스(리그닌 15~30% 함유)보다 값싼 공정개발이 가능하고 폐이산화탄소 또는 각종 폐수를 활용하여 재배할 수도 있다(Brennan과 Owende 2010; Mata 등 2010). 따라서 이러한 긍정적 기능들을 최대한 얻고자 미세조류 또는 해양 거대조류를 활용하여 바이오연료 또는 바이오화학소재 생산을 위한 많은 연구(Adams 등 2009; Choi 등 2010; Ge 등 2011; Harun 등 2010; Isa 등 2009; John 등 2011; Kang 등 2009; Kim 등 2009; Lee 등 2009; Lee 등 2011; Mata 등 2010; Nguyen 등 2012; Scott 등 2010; Ueno 등 1998)가 진행되고 있다.

산업화 진입을 보다 신속히 추진하기 위해서 해결해야 할 가장 큰 도전중의 하나는 생산비용의 절감으로서 무엇보다 목표로 하는 유용성분이 높게 함유된 바이오매스를 활용하되 특히 미세조류의 경우는 수집이 용이하여야 하고 보다 온화한 조건에서 당화될 수 있어야 한다. 아울러 목표로 하는 바이오화학제품의 생산공정도 친환경적이어야 할 것이다.

본 연구자들은 이러한 조건에 부합될 수 있다고 판단되는 조류종으로서 그물말을 발견하였다. 그물말

(*Hydrodictyon reticulatum*, HR)은 그물말과(Hydrodictyaceae)에 속하는 녹조류 중의 하나로서 담수조건에서 성장하는 사상조류의 일종이다. 이는 논, 하천, 저수지, 호소, 습지, 정원호수 등의 일부 지역에서 대발생되는 사례가 보고된 바 있고(Hall과 Payne 1997; Hawes와 Smith 1993; Wells 1999), 위해 조류종으로 인식되어 방제법이 제안되기도 하였다(Fitzgerald 1966). 그러나 한편으로서는 이를 활용하는 연구도 진행되었는바, 그 연구사례를 취합해 보면 첫째 담수조건에 버를 재배하면서 HR이 수면에 잘 자라도록 하면 광투입 및 수온 저하를 통해 수중잡초의 번식을 억제한다고 하여 논 잡초 발생의 생태적 제어 수단으로 제안된 바 있다(Fanyan 등 2008). 둘째 수질정화용 식물로서의 가능성이 검토되어 특히 질소, 인의 제거(Wang 등 1999), 중금속 제거(Aparicio Alonso 등 2006; Rai와 Chandra 1989; Singh 등 2007; Starý 등 1987)의 가능성이 연구 보고되었다. 셋째 HR 메탄올 추출물의 항균활성 조사에서 antibacterial activity보다 antifungal activity가 좋았다는 연구결과가 있으며(Ghazala 등 2004), 넷째 기타 유기질 비료, 사료(Appler 1985), 메탄 제조(Legros 등 1985; Nyns 1981) 등의 원료로서 이용가치가 있다.

그러나 그물말 조류로부터 당(sugar) 기반의 바이오화학물질을 생산하고자 하는 연구는 전혀 진행되지 못했다. 금후 당용액을 생산함에 있어서 지향해야 할 목표는 저에너지 투입/저비용 생산과 친환경적 공정개발이다. 특히 친환경적 공정개발을 위해서는 가능한 한 산 및 알칼리 사용을 줄이고 효소 또는 물리적 수단을 이용하여 당용액을 제조하는 것이 바람직하다. 따라서 본 연구에서는 발효용 당용액 생산자원으로서 담수녹조류인 그물말의 활용 가능성을 검토하고자 일차적으로 그물말의 효소당화 용이성에 관한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험재료

HR은 대전시 유성구 소재 갑천에서 수집하여 실내 배양한 것을, *Spirulina pratensis*, *Chlorella vulgaris*와 *Scenedesmus* sp.는 한국생명공학연구원 생물자원은행에서 분양받아 실내 배양한 것을, *Cladophora aegagropila*(Moss ball)는 시중에서 구입한 것을, 옥수수대

(corn stover)는 농가에서 재배한 것을 구하여, 45°C 건조기에서 2~4일 말린 후 믹서기로 분말화하여 플라 스틱 봉지에 담고 4°C에 보관하면서 실험재료로 사용 하였다. 미세조류 실내배양의 경우는 잘 알려진 기본 배지(Allen's medium)에 25°C 항온, 12시간 광주기, 50~130 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 의 조건에 7~15일 배양하여 사용하였다.

당화효소

사용된 당화효소는 Cellulase (Celluclast® 1.5L 또는 Celluclast Conc. BG, Novozymes사 제품, E1으로 표시), β -glucosidase (Sigma C6105, 311 U mL⁻¹, E2로 표시), α -amylase (Sigma A8220, 800 FAU g⁻¹, E3로 표시), Amyloglucosidase (Sigma A7095, 311 U mL⁻¹, E4로 표시)를 사용하였다. Celluclast Conc. BG의 경우는 1g의 효소파우더를 5mL 1M citrate buffer(pH 4.8)에 녹여 64 FPU mL⁻¹의 효소활성을 가진 것을 사용하였다.

그물말 바이오매스의 당화에 미치는 여러 가지 처리 효과

당화 기본과정

건조시료 0.5g을 125mL 삼각 플라스크에 넣고 0.1M citrate buffer(pH 4.8) 23.9mL와 1% NaN₃의 1.1mL를 가한 다음, 120°C에서 20분 멸균하였다. 무균상에서 E1+E2+E3+E4 효소용액을 0.2+0.04+0.2+0.2mL g⁻¹ dried matter(DM) 수준으로 가한 후 50°C, 150rpm에 2일 동안 배양하면서 가수분해시키고, 당화가 끝난 시료는 원심분리를 통해 잔사를 제거시킨 다음 상등액을 취하여 glucose 함량을 측정하였다.

당화에 미치는 여러 가지 처리효과 조사

효소조합 및 처리농도별 당화 : E1+E2, E1+E2+E3+E4, E3+E4 혼합처리에 따른 당화율 차이를 검토하였다. 즉, E1을 0.2mL g⁻¹ DM으로 고정시키고 이에 E2를 0.02~0.4mL g⁻¹ DM로 혼합시켜 처리하거나, E1+E2를 0.2+0.04mL g⁻¹ DM로 고정시키고 이에 starch 분해와 관련된 E3, E4를 각각 0.2mL g⁻¹ DM로 혼합시켜 처리했을 때 당화율의 증가정도를 측정하였다. 한편 효소처리농도의 경우 4가지, 즉, E1+E2가 각각 0.02+0.004mL (V1), 0.04+0.008 mL (V2), 0.1+0.02 mL (V3), 0.2+0.04 mL g⁻¹ DM (V4) 되도록 설정하여

48시간 가수분해시켰다.

당화 buffer strength : 0.0~100mM 범위의 citrate buffer(pH 4.8)에서 buffer strength에 따른 당화차이를 실험하였다.

당화전 온도처리 효과 : 당화하기 전 온도 전처리가 당화에 미치는 효과를 알아보기 위해 55°C와 120°C에서 각각 5, 20, 60분간 전처리한 다음, 당화정도를 비교해 보았다.

당화온도 및 당화반응액의 pH 차이에 따른 당화정도 비교 : 당화온도를 40°C와 50°C로 하거나 당화반응액의 pH를 각각 4.8과 6.5로 설정하여 각각 당화정도를 비교해 보았다.

생체시료와 건조시료간의 당화정도 비교 : 야외에서 수집한 HR을 대상으로 물기만 제거된 상태의 생체 시료와 이를 45°C에서 convection oven에 1일 동안 건조시킨 것을 믹서기로 분쇄하여 두 시료간의 당화정도를 비교해 보았다.

조직 분쇄여부에 따른 당화정도 : HR 시료의 분쇄 여부에 따른 당화정도에 차이가 있는지를 알아보기로 HR시료를 분쇄한 것과 분쇄하지 않은 것 간의 당화정도를 비교하였다.

고형분 함량에 따른 당화 : 당화용액내의 고형분 함량(biomass solid loading 정도)에 따른 당화율 차이를 알아보기로 1차 실험의 경우 glucose 함량이 약 45% 짜리의 시료를 대상으로 solid loading 2~10% 조건에서, 2차 실험의 경우 glucose 함량이 35%짜리의 시료를 대상으로 solid loading 10~25% 조건에서 당화정도를 실험하였다. 이 때 사용된 당화 효소량은 E1+E2+E3+E4를 0.2+0.04+0.2+0.2mL g⁻¹ DM 수준으로 사용하였으며, 투입한 solid loading양에 비례하여 효소량을 가감하였다.

몇 가지 바이오매스 간 효소당화 용이성 상대비교

본 실험을 위해서는 HR, *Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*, Corn stover 등 총 6가지 바이오매스가 공시되었다. 효소당화 용이성의 상대비교는 산 가수분해 대비 효소당화에 의해 얻어진 glucose 수득율로 평가하였다. 산가수분해는 바이오매스내 당모노머 함량조사를 위해 변형된 NREL 방법(2010)을 실시하였다. 즉, 0.1g의 건조분말시료를 취한 다음 72% sulphuric acid 1.5mL를 넣고, 60°C bath에 1시간 두었

다가(1차 가수분해), 이후 증류수 23.5mL를 가하여 마개를 한 후, 위 아래로 흔들어 혼합시킨 후 121°C에서 1시간 가수분해하였다(2차 가수분해). 이어서 가수분해물을 탄산칼슘으로 중화, 원심분리 후 얻어진 상등액을 가지고 glucose 함량을 측정하였다. 한편 공시 바이오매스들의 효소당화는 위에서 기술한 HR 당화 기본과정에서와 동일한 조건으로 수행되었다.

Glucose 함량 조사

가수분해물의 원심분리 상등액을 취하여 HPLC (Waters사, ELSD detector) 또는 Biochemistry analyzer (YSI 2700 SELECT™, YSI Life Sciences, USA)를 통해 glucose 함량을 정량하였다.

HPLC를 이용한 glucose 분석의 경우 RI Detector가 장착된 HPLC(Waters사 410)를 사용하였고 pump는 HP Agilent사의 1100, column oven은 Futecs사의 AT-4000을 사용하였다. 컬럼은 Asahipak NH2P-50 4E(4.6mm × 250mm)를 사용하였고 검출기와 컬럼은 모두 30°C를 유지하여 분석하였다. 이동상은 acetonitrile : water 혼합액(75 : 25, v/v)로 flow rate는 1ml min⁻¹으로 하였다. 샘플은 수용액 상태이므로 전처리없이 20 µL를 주입하여 분석하였다. 각 당은 표준 당용액의 정량곡선을 만들어 retention time과 peak area를 사용하여 정량 분석하였다.

Biochemistry analyzer를 이용한 glucose 분석의 경우, 제조사에서 제시된 assay kit와 방법에 따라 분석하였다.

결 과

효소조합 및 처리농도별 HR 당화

효소당화 정도는 당화효소의 종류 및 조합, 처리 농도에 따라 많이 달라질 수 있다. 본 실험은 HR시료의 당화 최적화를 위한 효소조합을 탐색하고자 수행하였다. 사전실험에서 E1의 경우 0.2mL g⁻¹ DM 처리가 가장 좋았기 때문에 E1을 0.2mL g⁻¹ DM으로 고정시키고 이에 E2를 0.02~0.4mL g⁻¹ DM로 혼합시켜 처리했을 때, E1 단독처리에 비해 E2의 추가는 당화율을 증가시켰으며 0.02mL g⁻¹ DM 추가로도 충분하였다. 한편 E1+E2을 0.2+0.04mL g⁻¹ DM로 고정시키고 이에 전분분해와 관련된 E3, E4를 각각 0.2mL g⁻¹ DM로 혼합시켜 처리했을 때 당화율의 증가 여부를 알아보았다. 그 결과 E1+E2 혼합처리에 비해 E3+E4의 추가는 당화속도를 아주 미약하게 증가시키는 경향이었으나 당화정도를 현저히 높이지는 않았다. 따라서 당화율과 효소비용 측면을 종합적으로 고려해 볼 때 HR의 당화에는 E1+E2의 혼합만으로도 충분할 것으로 판단되었다(표 1).

한편 E1+E2 효소조합의 처리농도를 달리하여 glucose 수득율을 보았을 때, 효소량을 최적 조합농도(V4)의 1/2(V3), 1/5(V2), 1/10(V1) 농도로 감소시킴에 따라 glucose 최종 생성량은 낮아지는 경향이거나 1/10 저농도(V1)로 처리해도 공시된 HR 시료중에 따라 약간씩 다르지만 최적처리의 70~80% 정도는 glucose가 생성되었다(그림 1). 최적조건 처리(V4)에서 시료 종류에 따라 생성된 glucose량이 달랐던 것은 시료내 탄

Table 1. Effect of various enzyme combinations on the saccharification of HR-d2 and HR-d9.

Samples	Enzymes (mL/g DM) ¹⁾				Glucose contents (g/100g DM)	
	E1	E2	E3	E4	24 hr	48 hr
HR-d2	0.2	0.04	-	-	42.54±1.0	43.48±1.1
	0.2	0.04	0.2	0.2	44.59±1.8	43.61±4.2
HR-d9	0.2	0.04	-	-	40.23±1.0	42.50±1.2
	0.2	0.04	0.2	0.2	39.03±1.5	41.22±1.1
	-	-	0.2	0.2	28.13±0.4	29.38±0.5

¹⁾E1 : cellulase, E2 : β-glucosidase, E3 : α-amylase, E4 : amyloglucosidase.

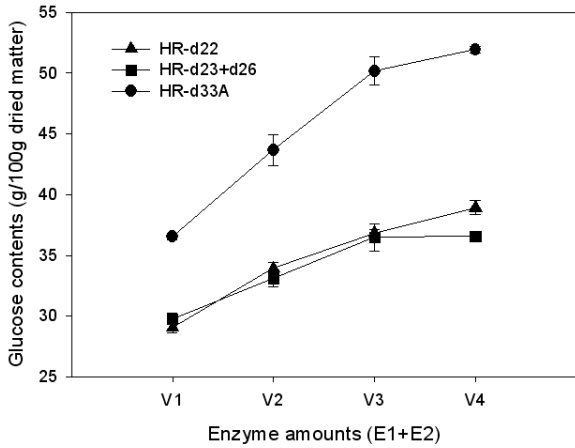


Fig. 1. Effect of enzyme amounts on the saccharification of several HR biomass.

V1 : E1+E2=0.02+0.004mL/g DM, V2 : 0.04+0.008mL/g DM, V3 : 0.1+0.02mL/g DM, V4 : 0.2+0.04mL/g DM.

수화물 함량이 다른 재배환경으로 인해 처음부터 차이가 있었기 때문이다.

당화 buffer strength

효소당화시 적정 pH는 효소의 활력과 관계가 있어 매우 중요하며 buffer strength 역시 당화중의 pH 변동과 관련이 있어 당화시 중요하게 고려되어야 한다. 그러나 buffer strength가 높으면 고농도 당농축액을 조제할 때 염도가 높아져 발효에 부정적으로 작용할 수 있다. 따라서 당화율에 영향을 미치지 않는 범위에서 buffer strength가 낮으면 낮을수록 바람직한데 본 연구에서는 이를 알아보기 위하여 실험하였다.

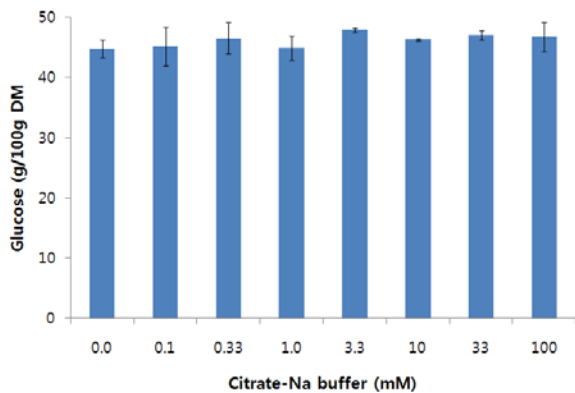


Fig. 2. Effect of sodium citrate buffer strength on the saccharification of HR sample.

그 결과, 그림 2에서 보는 바와 같이 HR 고형분 함량을 2%로 하여 시험하였을 때 0.0~100mM 범위의 citrate buffer(pH 4.8) strength간에 효소당화로 인한 glucose 생성량에 있어서는 차이가 없었다. 즉 HR 시료의 경우 0.1mM 또는 증류수만을 가지고서도 당화가 충분히 이루어지기 때문에 필요한 경우 본 효소조합 및 농도조건을 활용함으로써 고품질의 당화액을 조제할 수 있을 것으로 생각되었다. 그러나 고농도 고형분 함량에서도 같은 경향이 나타나는지에 대해서는 추가 검토가 필요하다.

당화전 온도처리 효과

사전실험에서 HR 고형분 함량을 2%로 하고 25~120℃ 온도범위 조건에서 20분 전처리를 할 경우, 120℃ 처리에 비해 그 이하의 온도처리에서는 glucose 생성량이 약간 낮은 경향을 보였으나 그 정도는 10% 내외였다(데이터 제시 생략). 한편 처리온도를 55℃와 120℃로 고정하고 처리 시간을 달리하여 실험한 결과에 있어서는 처리시간 간에 유의성이 관찰되지 않았다(그림 3). 따라서 HR은 필요에 따라 실온조건에서도 당화를 진행시킬 수 있는 재료임이 알 수 있었으며, 일반적으로 당화 도중의 오염을 막기 위해서 멸균과정을 거치는데 이러한 처리로도 HR 최적당화는 쉽게 이루어지는 것으로 인정되었다.

당화온도 및 당화 반응액 pH의 차이에 따른 당화 정도

당화온도를 40℃와 50℃로 하여 HR의 당화율을 비교한 결과, 두 온도간의 당화정도 차이는 없이 100g

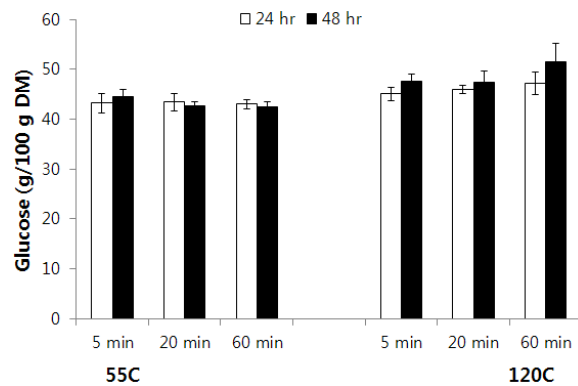


Fig. 3. Effect of pre-treatment temperature on the saccharification of HR.

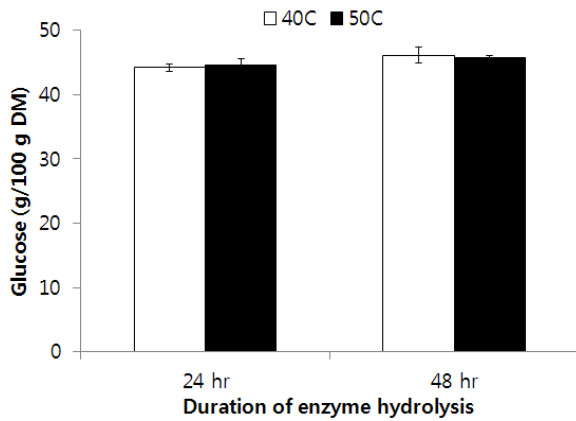


Fig. 4. Effect of saccharification temperature on the production of glucose from HR.

DM당 45g 내외의 glucose가 생산되었다(그림 4). 그리고 당화를 위한 반응액의 pH가 6.5일 때에도 pH 4.8일 때와 동일한 glucose 생성율을 나타내었다(표 2). 이는 발효미생물의 일반적인 생육온도인 37°C 내외에서나, pH가 중성에 가까운 6.5에서도 당화가 잘 이루어 질 수 있음을 의미하며 HR 바이오매스를 이용하여 동시 당화/발효 공정의 개발이 가능함을 나타내 준다. 전처리 및 당화과정을 별도로 하지 않고 발효공정과 통합시켜 진행하면 생산비가 매우 절약된다. 따라서 HR은 바이오화학제품 원료물질 생산에 있어서 경제성 확보에 매우 유리한 특성을 가진다고 볼 수 있겠다.

생체시료와 건조시료간의 당화정도 비교

일반적으로 당화는 건조된 시료를 가지고 원하는 시간에 수행하는 것이 편리 하겠지만 때에 따라서는 건조과정없이 수집된 생체시료 자체를 직접 당화시킬 필요도 있을 것이다. 특히 경제성 측면에서는 건조과정을 두지 않는 것이 더 유리할 수 있기 때문에 HR 생체시료 자체로도 당화가 잘 이루어지는지를 실험하

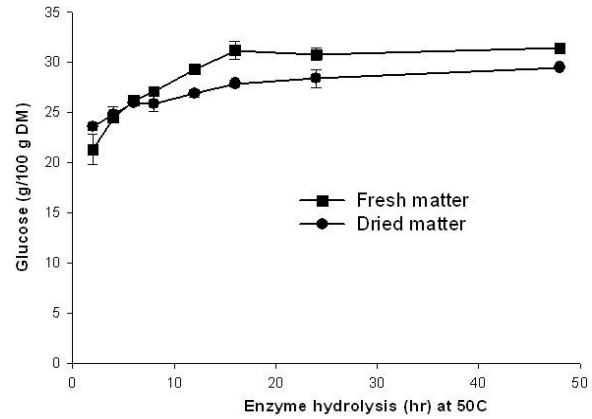


Fig. 5. Difference of enzymatic hydrolysis degree between fresh matter and dried matter of HR samples.

였다. 본 실험에서는 전 실험과는 달리 야외에서 확보한 HR 시료를 사용하였다. 그 결과, 그림 5에서와 같이 당화 개시 후 2시간째에는 생체시료보다 건조시료에서 glucose 함량이 보다 높게 나타났는데 이는 건조조직에서 효소용액의 침투가 보다 신속하였기 때문으로 추정된다. 그러나 4시간 이후부터는 건조시료보다 생체시료에서 glucose 생성량이 높았으며 16시간째에는 두 시료 모두 당화가 거의 완료되는 경향을 보였다(그림 5). 이러한 결과를 볼 때, HR 시료는 생체 조건에서도 당화를 충분히 진행시킬 수 있기 때문에 보다 폭넓은 당화공정기술을 개발할 수 있을 것으로 판단되었다.

조직 분쇄여부에 따른 당화정도

일반적으로 곱게 분쇄된 바이오매스일수록 당화효율이 높다고 알려져 있다. 이는 가수분해 촉매제가 분해대상 고분자물질로의 접근이 용이하기 때문이다. 그런데 조직분쇄의 경우도 바이오매스 종에 따라 에너지가 많이 소요되기 때문에 경제적 당화를 위해서는 분

Table 2. Effect of reaction buffer pH for saccharification on the production of glucose from HR biomass.

Samples	Temperature of Enzyme hydrolysis	pH of citrate buffer	Glucose contents	
			Glucose (g/L)	Glucose (g/100g DM)
HR-d3	50°C	4.8	10.01±0.11	45.27±0.6
	50°C	6.5	9.05±0.23	45.84±1.1

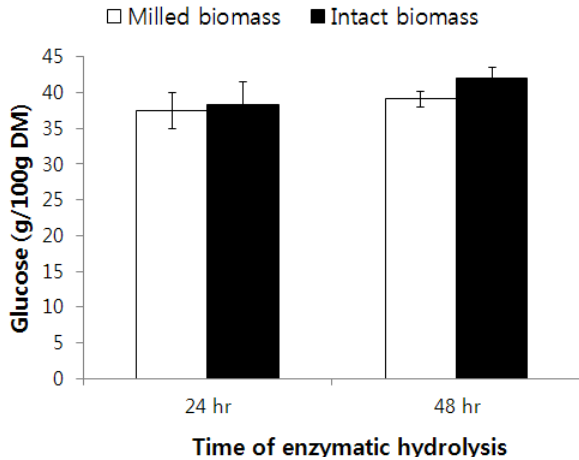


Fig. 6. Effect of biomass milling on the saccharification of HR-d6.

쇄과정이 생략될수록 유리하다. 본 실험은 HR 시료의 분쇄여부에 따른 당화정도에 차이가 있는지를 알아보고자 실험하였다. 그 결과, HR시료를 분쇄한 것과 분쇄하지 않은 것 간에 glucose 생성량 차이가 인정되지 않았다(그림 6). 이는 HR을 수확한 다음 조직을 분쇄하지 않고 그대로 당화시킬 수 있음을 의미하므로 당용액을 경제적으로 생산하는데 있어서 우수한 특징을 가진다고 보여진다.

고형분 함량에 따른 당화율

효소당화율은 용액내 고형분의 종류 및 함량에 의존하여 많은 차이를 나타낸다. 본 실험은 HR solid

loading 량에 따른 glucose 생성 패턴을 파악하고자 실시하였다.

그 결과 본 실험에서 사용한 효소량을 가지고서는 HR 건조시료의 고형분 함량이 10% 될 때까지는 직선적으로 glucose 생성량이 증가되었다(그림 7). 그러나 15% 이상의 solid loading에서는 건조시료 투입량에 따른 glucose 생성량이 비례적으로 증가되지는 않았고 당화율도 점점 낮아지는 경향을 보였다(그림 8). 따라서 보다 효율적으로 당용액을 얻기 위해서는 10~15%(w/v)의 solid loading 조건에 의해서 이루어질 수 있을 것으로 판단되었다.

바이오매스 종류간 효소당화 용이성 상대비교

이상의 실험결과로 볼 때, HR은 별도의 전처리 과정이 없이도 당화가 잘되는 미세조류임을 나타낸다. 이를 더욱 확인해 보기 위하여 다른 몇 가지 종류의 바이오매스를 대상으로 HR과 동일한 조건에서 효소당화를 실시, 상대 비교해 보았다. 일반적으로 당화율은 가수분해에 의한 바이오매스내 당 모노머의 회수율로 평가되며 이때 보다 온화한 조건에서 높은 당화율을 보일 때 당화가 용이한 재료라고 평가된다. 그러나 본 연구에서는 당화조건을 고정시키고 당해 조건에서 목표하는 당 모노머가 얼마나 많이 생성되는지를 기준으로 재료 간 상대 비교하였으며 그 결과는 표 3에서와 같았다.

HR의 효소당화율은 95~100% 정도이었다. 그러나 공시된 다른 바이오매스의 경우 *Spirulina*, *Chlorella*,

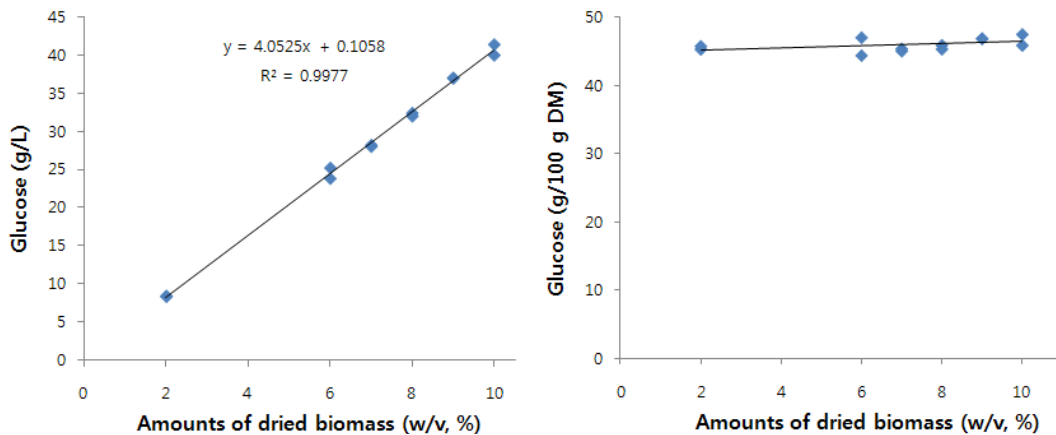


Fig. 7. Effect of HR biomass on saccharification various solid loading (2~10%, w/v).

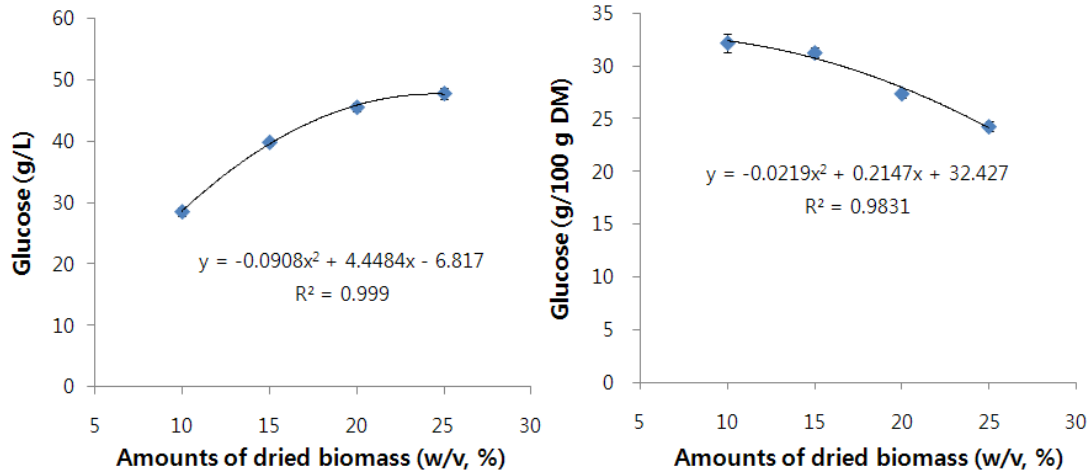


Fig. 8. Effect of HR biomass on saccharification various solid loading (10~25%, w/v).

Scenedesmus SM1은 산가수분해 대비 효소당화율이 80% 내외, *Scenedesmus* SM2는 42.0%, 사상 담수조류인 *Cladophora*는 30.3%, 초본성 식물인 옥수수대 분말은 49.1%에 불과하였다. 이들의 결과는 본 연구의 HR이 다른 바이오매스들에 비해 효소당화가 매우 용이함을 보여준다.

고찰

일반적으로 셀룰로오스계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스의 활용방법을 볼 것 같으면 먼저 생체 구조를 파괴한 다음 고분자화되어 있는 탄수화물을 분리, 가수분해시켜 단당류로 만들고 이들 당을 분리정

Table 3. Comparison of relative efficiency in enzymatic hydrolysis of several biomass based on glucose production.

Samples		Glucose contents (g/100g DM)		Efficiency, B/A (%)
		Acid hydrolysis (A)	Enzymatic hydrolysis (B)	
<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	HR-d23+d26	33.94±0.94	35.38±0.26	110.1%
	HR-d8	32.56±3.53	36.64±1.3	112.5%
	HR-d13	35.88±2.81	40.80±2.52	113.7%
	HR-R2+R3	40.25±1.44	42.64±3.20	105.9%
	HR-d9	44.60±5.42	44.12±2.6	98.9%
	HR-d31	46.38±1.09	44.12±0.61	95.1%
<i>Spirulina pratensis</i>		4.51±0.2	3.60±0.40	79.8%
<i>Chlorella vulgaris</i>		3.83±0.40	3.08±0.0	80.4%
<i>Scenedesmus</i> sp.	SM1	12.31±0.15	9.79±0.2	79.5%
	SM2	17.13±1.36	7.19±0.2	42.0%
<i>Cladophora aegagropila</i>		30.0±7.1	9.1±0.84	30.3%
<i>Zea mays</i> (Corn stover)		25.69±1.71	12.62±0.2	49.1%

제하여 발효를 위한 영양원으로 공급하거나 화학적 전환의 기질로 사용해서 바이오화합소재(연료, 바이오플라스틱, 기타 바이오화합제품)의 제조에 활용된다. 그런데 이들 공정과정 중에서 산업화 진입을 위해 극복해야 할 가장 큰 과정중의 하나는 전처리/당화의 용이성이다. 일반적으로 당화에 영향을 미치는 요인으로서 크게 두 가지, 바이오매스 자체의 내적요인과 당화 환경이라는 외적요인에 의해 지배받는 것으로 알려지고 있다. 즉, 바이오매스의 물리화학적 성질로서 조직 구성의 치밀도가 높고 분말화 정도가 낮거나, 가수분해 촉매제의 진입 또는 반응을 막는 화학물질(예, 리그닌)의 혼합정도가 높으면 당화가 어렵다. 그리고 가수분해제의 종류, 온도, 반응시간, 반응액의 산도 및 경도 등에 따라 당화가 좌우된다. 따라서 치밀한 식물 조직을 분해시킬 수 있는 전처리 공정(pre-treatment process)과 전처리물로부터 단당류를 생산하기 위한 화학적 혹은 생화학적 당화공정(hydrolysis or saccharification process)이 필수적이다.

바이오매스의 전처리 및 당화를 위해 많은 기술들이 연구되어 왔으며(Alvira 등 2010; Harun과 Danquah 2011; Hendriks와 Zeeman 2009) 초기에는 비용이 가장 저렴하다고 알려진 약산 가수분해 기술이 주로 이용되었으나 이론 수율이 60% 내외로 높지 않으며, 공정 중에 당의 추가적인 가수분해로 furfural 혹은 hydroxymethylfurfural(HMF) 등의 알데히드 생성이 불가피하다는 특징을 가지고 있다. 반면에 셀룰로오스 가수분해효소를 주성분으로 하는 당 가수분해효소 복합체에 의한 생화학적 당화 기술은 비약적인 발전을 거듭하여 최근에는 가장 경제적이면서 효율적인 기술로써 인식되어가고 있다(Alvira 등 2010; Harun과 Danquah 2011).

조류 바이오매스(algal biomass)는 크게 미세조류와 거대조류, 또는 녹조류/홍조류/갈조류 등으로 구별되는데 종류에 따라서 생체구조와 구성성분이 상당히 달라 당화의 용이성은 조류 종 및 생육 환경 조건 등에 따라 다르다. 조류의 경우 리그노셀룰로오스계 식물에 비해 손쉽게 당화가 이루어지는 것으로 알려져 있지만 원활한 당화를 위해 대부분 전처리를 실시하였는바, 지금까지 보고된 주요 연구사례들로서는 약산처리(김 등 2009; Ge 등 2011; Nguyen 등 2009; Zhou 등 2011; Kim 등 2011), 과산화수소 처리(Yoon 등 2011), NaClO₂

처리(Wi 등 2009), 고압 액화법(Kang 등 2009; Zhou 등 2010), 방사선처리(Lee 등 2011), 산성 이온성 액체 이용(Kim 등 2010), 초음파 처리(Choi 등 2012), 초임계 처리(Jeon과 Ro 등 2011), 열수처리(Okuda 등 2008) 등이 개발되었다. 이들을 검토해 볼 때, 상대적으로 거대조류는 아주 온화한 전처리로도 당화에 충분한 것 같지만(Adams 등 2009; Isa 등 2009) 대부분의 미세조류는 세포벽이 두껍기 때문에 보다 강한 전처리가 필요한 것으로 여겨졌다(Lee 등 2009). 예를 들면, 미세조류인 *Scenedesmus*의 경우도 초음파와 같은 전처리를 비교적 강하게 해야 유용물질 수득율이 높다(Choi 등 2012). 본 연구에 있어서도 응집제 처리를 통해 수거한 *Scenedesmus* SM1에 비해 응집제를 사용하지 않았던 *Scenedesmus* SM2의 경우 산가수분해 대비 효소당화율이 상대적으로 낮은 특성을 보였다(표 2). 더구나 같은 사상녹조류인 *Cladophora*의 경우는 30% 정도로서 아주 낮은 효소당화율을 나타내었다. 이에 비해 본 연구의 미세조류 HR은 매우 당화가 용이한 특성을 보였다. HR의 경우는 상대적으로 당함량이 낮은 바이오매스에서는 산가수분해 대비 효소당화율이 100% 이상 높고 당함량이 높은 시료는 효소당화율이 95~100% 정도이었다. 당함량이 낮은 재료에서 효소당화율이 100% 이상 높은 이유는 가수분해되어야 할 탄수화물량에 비하여 산농도가 상대적으로 높기 때문에 일부 내용물이 산으로 인해 더 반응이 진전되어 당 이외의 산물(예, HMF)로 전환되었기 때문이라고 추정된다. 또한 HR을 분말화하지 않아도 최적조건의 효소처리량에서 당화가 모두 이루어지며(그림 6), 당화용액의 buffer strength가 매우 낮아도 당수득율에 큰 지장이 없었다(그림 2). 한편 고온의 전처리없이 실온상태에서 바로 당화시켜도 120°C 처리에 비해 10% 미만의 당화율 감소만 보였다. 효소당화시의 적용온도 범위도 넓어 발효균주의 일반적인 생장적온인 37°C에서도 당화가 정상적으로 잘 일어나 당화/발효를 동시에 진행시킬 수 있는 바이오매스로의 특징을 보였다. 실질적으로 이를 이용하여 본 저자들은 젓산 생산기술을 보고하였다(Nguyen 등 2012). 또한 효소당화시의 적용 산도(pH) 범위도 넓었고(표 2), 최적조건의 효소량보다 1/10정도의 효소량만으로도 최적조건의 70~80% 이상 해당하는 당수득율을 나타내었다(표 1, 그림 1). 그리고 당용액을 경제적으로 생산하기 위해서

는 고형분 함량이 높은 조건에서 당수득율이 높아야 하는데 본 실험조건에서 HR의 경우는 고형분 함량 10%까지 당수득율이 떨어지지 않았고 15% 이상되어야 감소하였는 바(그림 8, 그림 9), 이는 고농도의 당용액을 생산하는데 있어서 유리한 장점을 가진다고 볼 수 있다.

이상의 제반 실험결과를 종합해 볼 때, 본 연구의 담수조류 HR은 흥미롭게도 여러 처리 조건변화에서도 당화가 손쉽게 잘 일어나는 특징을 보였다. 그 원인을 검토해 볼 때, 효소능력이 외부환경변화에 의해 가감될 수 있을 정도보다 본 연구의 실제 효소 처리량이 과도하게 높았기 때문으로 가정될 수 있을 것이다. 그런데 본 실험조건은 최적화 연구를 통해 결정된 효소량이었고, 다른 종류의 바이오매스를 가지고서 상대 비교했을 때에도 HR의 당화율이 가장 높았기 때문에 단순히 효소 처리량에 원인을 들 수는 없을 것 같다. 본 저자들은 HR의 생체구조 특징에 보다 근본적인 원인이 있을 것으로 추정하고 있으며 이에 대해서는 차후에 분석될 것이다.

사용되고 있는 바이오매스 종류와 특성에 따라 다르지만 예를 들어 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산의 경우, 전체 생산공정비 중에서 전처리 및 당화가 차지하는 비율은 30% 이상인 것으로 알려지고 있다(Wyman 2007). 따라서 이러한 공정이 손쉽게 이루어지는 종을 사용하는 것은 생산비 절감 전략에 있어서 가장 바람직한 선택이다. 이러한 측면에서 볼 때, 그물말은 당화가 매우 쉽게 이루어질 뿐만 아니라 수집하기가 매우 용이한 사상조류(filamentous algae)이기 때문에 다른 종류의 조류 바이오매스에 비해 바이오화학제품 생산을 위한 원료로서 향후 이용가치가 매우 높다고 하겠다.

요 약

본 연구에서는 담수녹조류인 그물말(*Hydrodictyon reticulatum*, HR)을 산업바이오 자원으로서 활용하는 방안을 강구하고자 일차적으로 효소당화의 용이성을 검토하였다. HR에 대하여 효소당화를 2% 고형분 함량에서 동일조건으로 수행했을 때, 다른 종류의 바이오매스(*Spirulina*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cladophora*,

Corn stover)보다 glucose 수득율이 가장 높았다. HR을 분말화하지 않아도 최적조건의 효소처리량에서 당화가 모두 이루어지며, HR 당화용액의 citrate buffer strength가 0.1mM까지 낮아도 당수득율에 큰 지장이 없었다. 또한 HR을 고온의 전처리없이 실온상태에서 바로 당화시켜도 120°C 처리에 비해 10% 미만의 당화를 감소만 나타내었다. 발효균주의 일반적인 생장적인 37°C 또는 pH 6.5에서도 당화가 정상적으로 잘 일어나 당화/발효를 동시에 진행시킬 수 있는 바이오매스로의 특징을 보였다. 효소량을 기준량의 1/10정도 줄여도 최적조건의 70~80%에 해당하는 glucose 수득율을 나타내었다. 그리고 본 실험조건에서 HR의 고형분 함량 10%까지 당수득율이 떨어지지 않았고 15% 이상되어야 감소하기 시작하여 고농도 당용액 생산에도 좋은 특성을 나타내었다. 이들의 제반 결과는 HR이 당화가 매우 쉽게 일어나는 특징을 가진 조류 바이오매임을 나타내준다. 이러한 장점뿐만 아니라 수집하기가 매우 용이한 사상조류(filamentous algae)이기 때문에 다른 종류의 조류 바이오매스에 비해 바이오화학제품 생산을 위한 원료로서 향후 이용가치가 매우 높을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국화학연구원 기관고유중점사업과 환경부 EI사업(과제번호 405-112-034)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Adams, J. M., J. A. Gallagher, and I. S. Donnison. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* 21:569-574.
- Alvira, P., E. Tomás-Pejó, M. Ballesteros, and M. J. Negro. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. *Bioresource Tech.* 101:4851-4861.

- Aparicio Alonso, P. J., M. A. Quinones Gomez, and F. G. Witt Sousa. 2006. Purification of surface waters using filamentous algae to absorb and recycle nutrients and/or heavy metals and generate biomass. Spain patent NO. ES 2251286.
- Appler, H. N. 1985. Evaluation of *Hydrodictyon reticulatum* as protein source in feeds for *Oreochromis (Tilapia) niloticus* and *Tilapia zillii*. J. Fish Biol. 27(3):327-334.
- Choi J. A., J. H. Hwang, B. A. Dempsey, R. A. I. Abou-Shanab, B. Min, H. Song, D. S. Lee, J. R. Kim, Y. Cho, S. Hon, and B.-H. Jeon. 2011. Enhancement of fermentative bioenergy (ethanol/hydrogen) production using ultrasonication of *Scenedesmus obliquus* YSW15 cultivated in swine wastewater effluent. Energy & Environmental Sci. 4:3513-3520.
- Choi, S. P., M. T. Nguyen, and S. J. Sim. 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. Bioresource Tech. 101:5330-5336.
- Fanyan, G. G., A. G. Ladatko, V. D. Agarkov, and V. G. Vlasov. 2008. Method of weed control in paddy fallow field of rice crop rotation. Patent No. RU 2330402.
- Fitzgerald, G. P. 1966. Use of potassium permanganate for control of problem algae. J. Amer. Water Works Assoc. 58(5):609-614.
- Ge, L. P. Wang, and H. Mou. 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. Renewable Energy 36(1): 84-89.
- Ghazala, B., M. Shameel, M. I. Choudhary, S. Shahzad, and S. M. Leghari. 2004. Phycochemistry and bioactivity of two microalgae (Volvocophyta) from Sindh. Inter. J. Biol. Biotech. 1(3):343-350.
- Hall, J. and G. Payne. 1997. Factors controlling the growth of field populations of *Hydrodictyon reticulatum* in New Zealand. J. Appl. Phycol. 9(3): 229-236.
- Harun, R. and M. K. Danquah. 2011. Enzymatic hydrolysis of microalgal biomass for bioethanol production. Chemical Engin. J. 168(3):1079-1084.
- Harun, R., M. Singh, G. M. Forde, and M. K. Danquah. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renew. Sustain. Energy Rev. 14:1037-1047.
- Hawes, I. and R. Smith. 1993. Influence of environmental factors on the growth in culture of a New Zealand strain of the fast-spreading alga *Hydrodictyon reticulatum* (water-net). J. Appl. Phycol. 5(4):437-445.
- Hendriks, A. T. W. M. and G. Zeeman. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Tech. 100:10-18.
- Isa, A., Y. Mishima, O. Takimura, and T. Minowa. 2009. Preliminary study on ethanol production by using macro green algae. J. Japan Inst. Energy 88:912-917.
- Jeon, B. S. and M. G. Ro. 2011. Production process of monosaccharide and amino acid from seaweed by sub- and supercritical water hydrolysis. Patent No. KR 1057290.
- John, R. P., G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri, and A. Pandey. 2011. Micro and macroalgal biomass : A renewable source for bioethanol. Bioresource Tech. 102:186-193.
- Kang, D. H., H. Y. Lee, J. G. Han, H. S. Park, H. S. Lee, and R. S. Kang. 2009. Liquefied extract of marine algae for producing bio-ethanol under high pressure and method for producing the same. Patent No. KR 0908425.
- Kim, G. S., M. K. Shin, Y. J. Kim, H. J. Ryu, J. J. Yoon, S. G. Lee, and C. Kim. 2010. Method of producing hydrolysate from sea algae using acidic ionic liquid catalysts. Publication Patent No. KR 10-2010-0024665.
- Kim, G. S., M. K. Shin, Y. J. Kim, K. K. Oh, J. S. Kim, H. J. Ryu, and K. H. Kim. 2009. Method of producing biofuel using sea algae. Publication Patent No. KR 10-2009-0025221.
- Kim, N. J., H. Li, K. Jung, H. N. Chang, and P. C.

- Lee. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. Biore-source Tech. 102:7466-7469.
- Lee J. Y., C. Yoo, S. Y. Jun, C. Y. Ahn, and H. M. Oh. 2010. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. Biore-source Tech. 101(1):S75-S77.
- Lee, J. U., J. I. Choi, J. H. Kim, Y. H. Yoon, B. S. Song, and M. U. Pyun. 2011. Preparation method of biofuel from sea algae using irradiation. Patent No. KR 1083608.
- Lee, S. M., B. J. Yu, Y. M. Kim, S. J. Choi, J. M. Ha, and J. H. Lee. 2009. Production of bio-ethanol agar using *Saccharomyces cerevisiae*. J. Korean Ind. Eng. Chem. 20(3):290-295.
- Legros, A., E. Dujardin, F. Collard, H. Naveau, E. J. Nyns, and C. Sironval. 1985. An integrated system : mass algae culture in polluted luke-warm water for production of methane, high-value products and animal feed. Belg. Comm. Eur. Communities (EUR 10024, Energy Biomass) : 369-373.
- Mata, T. M., A. A. Martins, and N. S. Caetano. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications : A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 14(1):217-232.
- Nguyen, C. M., J. S. Kim, H. J. Hwang, M. S. Park, G. J. Choi, Y. H. Choi, K. S. Jang, and J. C. Kim. 2012. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulatum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli. Bioresource Tech. 110:552-559.
- Nguyen, M. T., S. P. Choi, J. Lee, and S. J. Sim. 2009. Hydrothermal acid pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. J. Microbiol. Biotechnol. 19:161-166.
- NREL. 2010. Chemical analysis and testing standard procedure, no. 001-014, National Renewable Energy Labs., Golden, CO.
http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
- Nyns, E. J. 1981. Methane production by anaerobic digestion of algae. Belg. Comm. Eur. Communities (EUR 7160):183-194.
- Okuda, K., K. Oka, A. Onda, K. Kajiyoshi, M. Hiraoka, and K. Yanagisawa. 2008. Hydrothermal fractional pretreatment of sea algae and its enhanced enzymatic hydrolysis. J. Chem. Tech. Biotech. 83(6): 836-841.
- Rai, U. N. and P. Chandra. 1989. Removal of heavy metals from polluted waters by *Hydrodictyon reticulatum* (Linn.) Lagerheim. Sci. Total Environ. 87-88:509-515.
- Scott, S. A., M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J. Lea-Smith, and A. G. Smith. 2010. Biodiesel from algae : challenges and prospects. Current Opinion in Biotech. 21(3):277-286.
- Singh, A., S. K. Mehta, and J. P. Gaur. 2007. Removal of heavy metals from aqueous solution by common freshwater filamentous algae. World J. Microbiol. Biotech. 23(8):1115-1120.
- Starý, J., A. Zeman, and K. Kratzer. 1987. The uptake of ammonium, nitrite and nitrate ions by *Hydrodictyon reticulatum*. Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 15(2):193-198.
- Ueno, Y., N. Kurano, and S. Miyachi. 1998. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. J. Ferment. Bioeng. 86(1):38-43.
- Wang, Z. H., Q. Q. Lin, S. Qi, Y. Z. Qi, and Y. M. Luo. 1999. Studies on the ability of *Hydrodictyon reticulatum* to remove nitrogen and phosphorus under different environmental condition. Zhongguo Huanjing Kexue 19(3):257-261.
- Wells, R. D. S. 1999. The rise and fall of water-net (*Hydrodictyon reticulatum*) in New Zealand. J. of Aquat. Plant Manage. 37:49-54.
- Wi, S. G., H. J. Kim, S. A. Mahadevan, D. J. Yang, and H. J. Bae. 2009. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. Bioresource Tech. 100:6658-6660.
- Wyman, C. E. 2007. What is (and is not) vital to

- advancing cellulosic ethanol. Trends Biotechnol. 25(4):153-157.
- Yoon, B. T., Y. W. Kim, K. W. Chung, and J. S. Kim. 2011. Enzymatic hydrolysis of pre-treated *Ulva pertusa* with alkaline peroxide. Appl. Chem. Eng. 22(3):336-339.
- Zhou, D., L. Zhang, S. Zhang, H. Fu, and J. Chen. 2010. Hydrothermal Liquefaction of macroalgae *Enteromorpha prolifera* to bio-oil. Energy Fuels 24:4054-4061.
- Zhou, N., Y. Zhang, X. Wu, X. Gong, and Q. Wang, 2011. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and MgCl₂, Bioresource Tech. 102(21):10158-10161.