

창자파래로부터 환원당 생산을 위한 효소가수분해의 최적 반응조건

김아람¹, 김동현^{1,2}, 정귀택^{1*}

Optimum Reaction Condition of Enzymatic Hydrolysis for Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis*

A-Ram Kim¹, Dong-Hyun Kim^{1,2}, and Gwi-Taek Jeong^{1*}

Received: 21 November 2014 / Accepted: 26 March 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, the production of total reducing sugar from macro green-algae *Enteromorpha intestinalis* by enzymatic hydrolysis was investigated. As a result of enzymatic hydrolysis using 13 kind commercial enzymes, the highest yield of 8.75% was obtained from Viscozyme L, which is multi-enzyme complex such as cellulase, arabanase, beta-glucanase, hemicellulase and xylanase. As a control, only 0.33% and 0.27% yield were obtained from 1% sulfuric acid and 0.05 M citrate buffer (pH 4.8), respectively. In the case of enzyme mixture, the mixture of Viscozyme[®] L and Cellic[®] CTec2 (1:1) was presented the highest yield of 10.67%. Finally, the 14.99% yield was obtained at 36 hr under the condition of 10% biomass and 30% enzyme mixture.

Keywords: *Enteromorpha intestinalis*, Enzymatic hydrolysis, Reducing sugar

1. INTRODUCTION

해조류는 바다에 서식하는 조류로 미세조류와 거대조류로 나뉜다. 육상 식물에 비하여 단위면적당 생산성이 높고, 종(species), 수확 장소 및 시기에 따라 탄수화물 및 지질의 함량

이나 구성이 다양하다고 알려져 있다 [3,9,15,17,19].

본 연구에 사용한 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*)는 녹조식물문 갈파래목 (Ulvales) 갈파래과 (Ulvaaceae)에 속하는 해조류로서, 우리나라를 포함한 전세계의 해안의 바위에 부착 서식한다 [9]. 파래는 다양한 영양소를 함유하고 있어 오래전부터 식품으로 이용되고 있다 [5,9,15]. 파래 중 창자파래에 대한 다양한 항산화 활성, angiotensin-1 전환효소 저해활성, 저분자 peptide의 기능성, 항돌연변이 및 암성장 억제 등과 같은 연구가 보고되었다 [3,6,11-13].

최근 재생에너지의 개발과 이용에 대한 많은 관심으로 인하여 재생가능한 자원으로부터 열화학적 또는 생물학적 공정을 통하여 다양한 바이오연료와 화학제품을 생산하고자 하는 연구가 진행되고 있다 [4,18]. 최근에는 육지의 바이오매스 자원뿐만 아니라, 해양자원에서 얻고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다 [2,4,7,18].

해조류 바이오매스로부터 바이오연료와 화학제품을 생산하기 위해서 물리적, 화학적 그리고 생물학적인 방법을 사용하여 당 (sugar)을 얻은 후 열화학적 또는 생물학적 공정을 통하여 생산하고자 하는 연구가 수행되고 있다 [2,4,18]. 대표적인 방법으로는 고온고압의 열수를 이용하는 방법 [14, 19], 산 또는 알칼리와 열수 처리를 병행하는 방법 [8,14]이 대표적이며, 효소나 이온성 액체를 이용하는 방법 [1,8,17], 마이크로웨이브나 초음파를 이용하는 방법 [10] 등이 있다 [9].

본 연구에서는 해양 거대 녹조류인 창자파래로부터 상용 효소를 사용하여 환원당을 생산하기 위하여 가수분해에 미치는 인자들의 영향을 조사하였다. 실험에 적용한 인자들로는 효소 종류, 기질농도, 효소농도, 반응시간에 대하여 최적 반응 조건을 조사하였다.

¹부경대학교 생물공학과

¹Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863

e-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

²(주)바이오포트코리아

²Bio Port Korea Inc., Busan 619-912, Korea

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 실험재료

실험에 사용한 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*, 전남 진도, 2012년 수확)는 60°C에서 2일간 건조한 후 분쇄 (200 μ m 이하)하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 효소는 Novozyme 사 (Denmark)의 AMG 300L, Cellic® CTec2, Celluclast 1.5 L, Citrozym Ultra L, Mannaway 4.0 T, Novoprime B 959, Pectinex 5XL, Pectinex Ultra SP-L, Termamyl 120L, Ultraflo Max, Viscoferm, Viscoflow MG, Viscozyme L을 사용하였다. Table 1에 실험에 사용한 효소의 특성을 나타내었다. 황산, citric acid, sodium hydroxide 등의 시약은 특급시약을 사용하였다.

2.2. 가수분해

효소를 사용한 파래의 가수분해에 미치는 인자들의 영향을 알아보기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다. 실험에 따라 100 mL 크기의 반응용기에 설정한 양의 파래 분말과 효소를 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) 40 mL와 혼합하였다. 미생물의 오염을 방지하기 위해 sodium azide를 효소반응 전체 부피의 0.02%가 되도록 첨가하였다. 반응은 shaking incubator를 사용하여 45°C에서 200 rpm의 속도로 24시간 동안 반응을 진행하면서, 일정 시간마다 시료를 취하여 원심분리 (15,000 rpm, 10분)한 후 얻은 상등액을 이용하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다.

2.2.1. 효소 종류의 영향

효소 종류에 따라 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 13종의 효소를 이용하여 단일 효소와 복합효소 반응을 실시하였다. 1% sulfuric acid와 0.05 M citrate buffer (pH

4.8)을 대조구로 사용하였다. 100 mL 플라스크에 파래 분말 2 g과 citrate buffer 40 mL를 첨가한 후 효소를 바이오매스 중량의 20%가 되도록 첨가하여 반응을 진행하였다. 시료는 반응 24 시간에 취하여 효소별 가수분해율을 측정하였다.

2.2.2. 기질 농도의 영향

기질 농도가 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질의 농도를 0.5, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5%로 설정하여 첨가하고 앞의 실험에서 선정된 효소 복합물 (Viscozyme L과 Cellic C-Tec 2, 1:1)을 기질 중량의 20%가 되도록 첨가하여 반응을 진행하였다. 시료는 반응 6시간에 취하여 기질 농도별 가수분해율을 측정하였다.

2.2.3. 효소 농도의 영향

효소 농도가 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞의 실험에서 선정된 10%의 기질 농도에 효소 복합물 (Viscozyme L과 Cellic C-Tec 2, 1:1)을 기질 중량의 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50%로 설정하여 첨가하고 반응을 진행하였다. 시료는 반응 6시간에 취하여 기질 농도별 가수분해율을 측정하였다.

2.3. 분석방법

시료 중의 환원당은 DNS법으로 580 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 표준시료로는 glucose를 사용하였다 [16]. 가수분해율 (yield)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{가수분해율 (yield, \%)} = (\text{반응 후 시료의 환원당 농도}) / (\text{반응 전 기질의 농도}) \times 100$$

2-3회 반복실험을 통하여 얻은 결과는 평균±표준편차로 나타내었다.

Table 1. Properties of enzymes in experiments

Enzymes	Properties
Novoprime B 959	Cellulase
Viscozyme L	Multi-enzyme complex (cellulase, arabanase, beta-glucanase, hemicellulase and xylanase)
Termamyl 120L	Alpha amylase
AMG 300L	Glucoamylase
Viscoferm	Beta-glucanase (endo-1,3(4)-), cellulase, xylanase (endo-1,4-)
Ultraflo Max	Xylanae (endo-1,4-), beta-glucanase (endo-1,3(4)-)
Viscoflow MG	Beta-glucanase (endo-1,3(4)-), cellulase, alpha-amylase, xylanase
Mannaway 4.0 T	Mannanase
Pectinex Ultra SP-L	Pectinase, hemicellulase
Pectinex 5XL	Pectinase, arabanase
Citrozym Ultra L	Pectinase (polygalacturonase)
Celluclast 1.5 L	Cellulase
Cellic® CTec2	Cellulase, xylanase

3. RESULTS AND DISCUSSION

창자파래로부터 상용효소를 사용하여 환원당을 생산하기 위하여 가수분해에 미치는 인자들의 영향을 조사하였다. 실험에 적용한 인자들로는 효소의 종류, 기질농도, 효소농도, 반응시간을 대상으로 하였다.

3.1. 효소 종류의 영향

효소 종류에 따라 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 13종의 상용효소를 이용하여 단일 효소와 복합효소로 구성하여 효소반응하여 얻은 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 1% sulfuric acid와 0.05 M citrate buffer (pH 4.8)을 대조구로 사용하여 실험한 결과, 각각 0.33%와 0.27%의 낮은 수율을 보였다. 이는 파래의 가수분해에 있어서 효소를 이용한 가수분해가 필요하다는 것을 의미한 것이다. 단일 효소로서 cellulase로 주로 구성된 효소들 중 Viscozyme L 8.75%, Viscoferm 8.05%, Ultraflo Max 7.62%, Viscoflow MG 7.05%, Cellic® CTec2 6.57%, Novoprime B 959 6.52%, Celluclast 1.5 L 6.51%

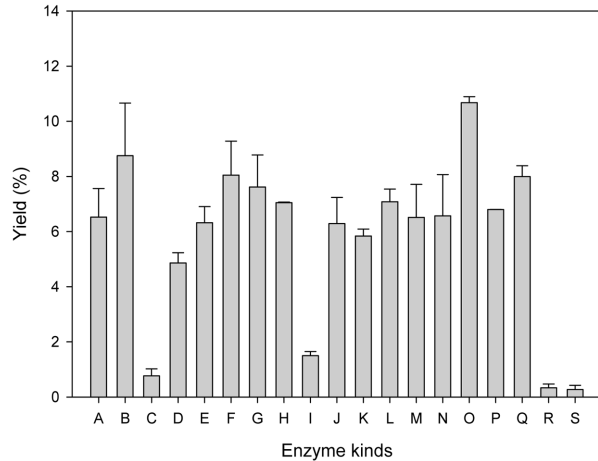


Fig. 1. Effect of enzyme kind on the hydrolysis of *E. intestinalis*. A (Novoprime B 959), B (Viscozyme L), C (Termamyl 120L), D (AMG 300L), E (Termamyl 120L+AMG 300L), F (Viscoferm), G (Ultraflo Max), H (Viscoflow MG), I (Mannaway 4.0 T), J (Pectinex Ultra SP-L), K (Pectinex 5XL), L (Citrozym Ultra L), M (Celluclast 1.5 L), N (Cellic[®] CTec2), O (Viscozyme L+Cellic[®] CTec2), P (Viscozyme L+Termamyl 120), Q (Viscozyme L+Termamyl 120+Cellic[®] CTec2), R (1% H₂SO₄), S (Citrate buffer).

의 수율을 나타내었다. Pectin을 분해하는 Pectinase (polygalacturonase 등)가 주로 함유되어 있는 Pectinex Ultra SP-L은 6.29%, Pectinex 5XL은 5.84%, Citrozym Ultra L은 7.08%의 수율을 나타내었다. α-amylase인 Termamyl 120L을 사용한 경우에는 0.77%의 낮은 수율을 보인 반면에, β-glucoamylase인 AMG 300L를 처리한 경우에는 4.86%의 수율을 나타내었다. 이 두 α-amylase와 β-glucoamylase를 혼합하여 효소반응을 수행한 경우 (Termamyl 120L + AMG 300L)에서는 6.32%의 수율을 나타내었다. 이는 파래 중 함유되어 있는 starch 성분이 α-amylase와 β-glucoamylase에 의해서 glucose 단위로 분해된 결과로 판단된다. Mannanase로 구성된 Mannaway 4.0 T는 1.50%의 수율을 나타내었다.

Cellulose와 starch를 분해할 수 있도록 2-3종의 효소를 혼합하여 실험한 결과, Viscozyme L과 Termamyl 120L 그리고 Cellic[®] CTec2를 혼합한 경우에는 8.00%의 수율을 보였다. 또한 Viscozyme L과 Termamyl 120L을 혼합한 경우에 있어서는 6.80%의 수율을 나타내었다. Viscozyme L과 Cellic[®] CTec2를 혼합한 경우에서 가장 높은 10.67%의 수율을 얻었다. 가장 높은 수율을 나타낸 Viscozyme L과 Cellic[®] CTec2를 혼합한 효소액 (1:1)을 사용하여 다음 실험을 수행하였다.

3.2. 기질 농도의 영향

기질 농도가 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질의 농도를 0.5%에서 12.5%로 조절하여 효소가수분해 반응을 진행하여 비교하였다 (Fig. 2). 10% 까지는 biomass 농도가 증가할수록 수율이 증가하였으며, 10% 이상에서는 큰 변화를 나타내지 않았다. 10%의 biomass 농도에서는

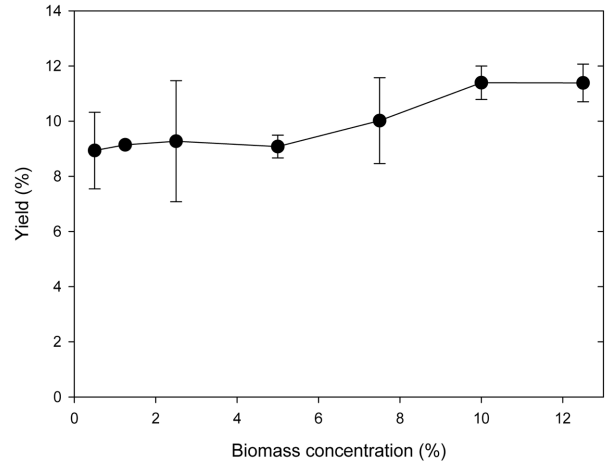


Fig. 2. Effect of biomass concentration on the hydrolysis of *E. intestinalis*.

11.39%의 최대 수율을 나타내었다. 기질농도 10% 이상에서는 수율이 증가하지 않는 이유로는 기질의 농도가 증가함에 따라 기질과 효소의 혼합이 상대적으로 원활하지 않아서 발생하는 것으로 판단된다. 이와 비교할만한 연구로는 송 등 [17]이 갈조류 톳 (*Hizikia fusiforme*)을 상용 효소를 사용하여 1-5%의 기질 농도에서 효소 가수분해 결과, 2.5%의 기질 농도에서 가장 높았다고 보고하였다. 추후 실험은 biomass의 농도를 10%로 하여 수행하였다.

3.3. 효소 농도의 영향

효소 농도가 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞의 실험에서 선정된 10%의 기질 농도에 효소 복합물 (Viscozyme L과 Cellic[®] CTec2 혼합, 1:1)을 사용된 기질량의 0%에서 50%까지 첨가하여 가수분해 수율을 조사하였다 (Fig. 3). 기질농도의 30% 까지는 효소량이 증가함에 따라 수율이 증가하였으나, 그 보다 높은 농도에서는 수율이 감소하였다. 30% 효소첨가량에서의 수율은 11.83%로 가장 높게 나타났다. 다음 실험은 30%의 효소량 조건에서 수행하였다. 이와 비교할만한 연구로는 송 등 [17]이 갈조류 톳 (*H. fusiforme*)을 상용 효소를 사용하여 효소 농도에 따른 영향을 조사한 결과, 2.5% 기질농도에서 30%의 효소를 첨가한 경우에 22.8%로 가장 높은 수율을 보고하였다.

3.4. 반응시간의 영향

효소 반응시간이 파래 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 앞의 실험에서 선정된 10%의 기질 농도에 효소 복합물 (Viscozyme L과 Cellic[®] CTec2 혼합, 1:1)을 사용된 기질량의 30%가 되게 첨가하여 반응시간에 따른 효소가수분해 수율을 조사하였다 (Fig. 4). 반응 6시간에 11.83%에서 반응 36시간에 14.99%로 증가하다가 48시간에 14.15%로 소폭 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 비교할만한 연구로는 송 등 [17]이 갈조류 톳 (*H. fusiforme*)을 상용 효소를 사용하여 반

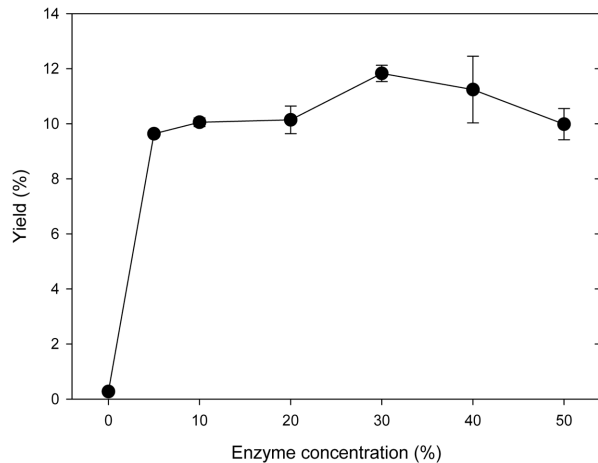


Fig. 3. Effect of enzyme amount on the hydrolysis of *E. intestinalis*.

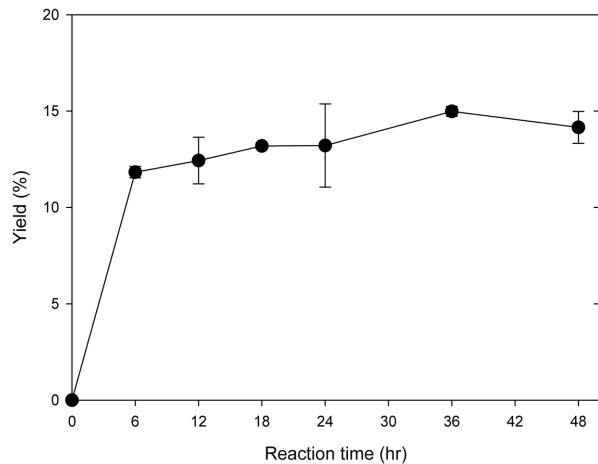


Fig. 4. Effect of reaction time on the enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis*.

응시간의 영향을 조사한 결과, 1-5%의 기질 농도에서 효소 가수분해 결과 24시간 이후에는 가수분해 정도가 일정하게 유지되었다고 보고하였다.

4. CONCLUSION

본 연구는 해양 바이오매스 자원의 하나인 해조류 중 녹조류인 창자파래를 대상으로 환원당을 생산하기 위하여 13종의 상용 효소를 사용하여 반응에 필요한 인자들의 영향을 조사하였다. Cellulase를 포함하는 복합효소인 Viscozyme L에서 8.75%의 가장 높은 수율을 보였다. 파래에 포함되어 있는 cellulose와 starch 등의 탄수화물을 분해할 수 있도록 2-3종의 효소를 혼합하여 실험한 결과, Viscozyme L과 Cellic CTec2를 1:1로 혼합한 결과 10.67%의 높은 수율을 얻었다. 효소반

응의 최적 반응조건을 탐색한 결과, 10%의 기질 농도에 효소 복합물 (Viscozyme L과 Cellic CTec2 혼합, 1:1)을 사용된 기질량의 30%가 되게 첨가하여 반응 36 시간에 14.99%의 수율을 얻었다. 위의 결과로부터 해양자원인 창자파래를 이용하여 바이오연료 또는 화학물질을 생산하는데 필요한 당을 생산하기 위한 기초자료로 사용되리라 판단된다.

Acknowledgements

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2012R1A1A2006718).

REFERENCES

- Choi, D., H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, and H. Cho (2009) Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 12-15.
- Demibras, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energy Combust. Sci.* 33: 1-18.
- Han, Y. B. (2010) Edible Seaweed II - Components and biological activity. pp. 262-269. Korea University Pres, Korea.
- Hayes, D. J., S. Fitzpatrick, M. H. B. Hayes, and J. R. H. Ross (2006) *The biofine process - Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks*, pp. 139-164. In Kamm, B., Gruber, P. R. and M. Kamm (eds.), *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Doopedia, *Enteromorpha intestinalis*, <http://www.doopedia.co.kr> (2015)
- Jeong, G. T. and D. H. Park (2014) Effect of pretreatment method on lipid extraction from *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* 29: 22-28.
- Jeong, G. T. (2014) Production of total reducing sugar and levulinic acid from brown macro-algae *Sargassum fulvellum*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 42: 177-183.
- Kim, C. (2010) *Saccharification of Gelidium amansii by acid hydrolysis to generate mixed sugars*. M.S. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Kim, D. H. and G. T. Jeong (2014) Antimicrobial and antioxidant activities of extracts of marine greenalgae *Enteromorpha intestinalis*. *KSBB J.* 29: 92-97.
- Kim, J. K. (2010) *Pretreatment and enzymatic hydrolysis of Ulva pertusa Kjellman*. M.S. Thesis. Inha University, Incheon, Korea.
- Kim, S. A., J. Kim, M. K. Woo, C. S. Kwak, and M. S. Lee (2005) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 451-459.
- Kwak, C. S., S. A. Kim, and M. S. Lee (2005) The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1143-

- 1150.
13. Lee, H. O., D. S. Kim, J. R. Do, and Y. S. Ko (1999) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 427-431.
 14. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
 15. Lee, Y. P. (2008) Seaweed in Jeju, Academic Press.
 16. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
 17. Song, B. B., S. K. Kim, and G. T. Jeong (2011) Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J.* 26: 347-351.
 18. The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL) Top value added chemicals from biomass, volume I - Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. <http://www.osti.gov/bridge> (2004).
 19. Yeon, J. H., H. B. Seo, S. H. Oh, W. S. Choi, D. H. Kang, H. Y. Lee, and K. H. Jung (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB J.* 25: 283-288.