

창자파래로부터 citrate buffer를 이용한 전처리와 효소가수분해를 통한 환원당 생산

김동현 · 김아람 · 박돈희* · 정귀택†

부경대학교 생물공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
*전남대학교 생물공학과
61186 광주광역시 북구 용봉로 77

(2015년 2월 5일 접수, 2015년 5월 11일 수정본 접수, 2015년 5월 19일 채택)

Production of Total Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis* Using Citrate Buffer Pretreatment and Subsequent Enzymatic Hydrolysis

Dong-Hyun Kim, A-Ram Kim, Don-Hee Park* and Gwi-Taek Jeong†

Department of Biotechnology, Pukyong National University, 45, Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea

*Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, Korea

(Received 5 February 2015; Received in revised form 11 May 2015; accepted 19 May 2015)

요 약

본 연구에서는 창자파래(*Enteromorpha intestinalis*)로부터 citrate buffer를 사용하여 전처리 조건(고액비, 반응온도, buffer의 pH와 농도)에 따른 전처리 반응과 효소가수분해를 통한 가수분해 수율을 조사하였다. 0.25 M, pH 3.5의 citrate buffer를 이용하여 140 °C에서 60분간 전처리를 수행한 결과, 5.40%의 가수분해 수율을 얻었다. 최종적으로 전처리 반응 후 24시간의 효소 가수분해를 통하여 18.68%의 가수분해 수율을 얻었다. 이 결과는 대조구에 비하여 약 1.81배 증가한 결과이다.

Abstract – In this study, the effects of citrate buffer pretreatment conditions (solid-to-liquid ratio, reaction temperature, pH and concentration of buffer) on enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis* for total reducing sugar (TRS) production were investigated. As a results of the citrate buffer pretreatment, a 5.40% hydrolysis yield was obtained under conditions including 1:10 solid-to-liquid ratio, 0.25 M citrate buffer (pH 3.5) at 140 °C for 60 min. The maximum hydrolysis yield of 18.68% was obtained to enzymatic hydrolysis after pretreatment. This result is 1.81 times higher than that of control.

Key words: *Enteromorpha intestinalis*, Citrate buffer pretreatment, Enzymatic hydrolysis, Total reducing sugar

1. 서 론

전 세계적인 화석연료 사용으로 인한 지구온난화와 환경문제가 발생하고 있으며, 이를 극복하고자 온실가스 감축, 탄소저장제 등의 정책들이 시행되고 있다. 이와 관련하여 재생에너지가 주목 받고 있다. 재생에너지 중 바이오에너지는 화석연료를 대체할 수 있는 에너지 및 자원으로 사용 가능하다. 그러나 1세대 식량작물을 원료로 한 바이오에너지의 생산은 곡물가격의 급등 및 육상작물을 재배하기 위해 많은 양의 물의 소요 등의 사회적 문제를 야기하고 있다. 2세대

목질계 바이오매스자원은 상용화에 다가가고 있으나, 전처리 문제, 효소당화에 수반되는 문제들로 인하여 경제성의 문제를 안고 있다. 이러한 1,2세대 바이오매스의 한계를 극복할 수 있는 차세대 자원으로 해조류가 주목받고 있으며, 해조류를 이용한 바이오연료 생산 연구가 활발히 진행되고 있다[1-6]. 2세대 바이오매스 자원인 섬유소계 자원은 구성성분 중 리그닌이 전처리 및 효소당화에 영향을 미치나, 해조류에는 리그닌 성분이 존재하지 않아 당화가 용이한 점이 있다[3,6-8].

해조류는 바다에 사는 조류(algae)로 통틀어 말하며, 미세조류(microalgae)와 거대조류(macroalgae)로 분류한다. 거대조류는 녹조류, 홍조류, 갈조류로 분류되며, 종과 수확장소 및 시기에 따라 구성 성분(탄수화물, 지질, 단백질 등)과 그 함량이 다양하다고 알려져 있다[4,7,8]. 창자파래(*Enteromorpha intestinalis*)는 녹조 거대조류로 glucose, xylose, galactose, glucuronic acid, 그리고 rhamnose 등으로

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

구성된 탄수화물을 포함하고 있다[8-10].

해조류로부터 바이오연료나 화학물질 생산에 필요한 발효가능한 당을 얻기 위해서는 당화가 용이하도록 구조적인 변형을 위한 전처리 방법과 이에 이어지는 당화공정의 최적화가 필요하다. 전처리 방법과 당화 공정에는 다양한 물리(열, 폭쇄), 화학(산, 알칼리, 산화제 등) 및 생물학적(효소, 미생물) 처리 방법이 적용되고 있다[3-9,13]. 기존의 산 촉매를 사용한 전처리 공정은 전처리 후 남아 있는 산 촉매를 중화하여야 하며, 중화로 인해 생성된 염이 향후 생물학적 당화공정과 발효공정에 영향을 미치게 된다[6,8]. 본 연구에서는 효소 당화에 buffer로 주로 사용되는 citrate buffer를 이용하여 전처리를 수행하여 전처리 후 중화과정 없이 효소당화를 수행함으로써 중화 과정에서 생성되는 염의 영향을 최소화하고자 하였다.

본 연구에서는 창자과래(*E. intestinalis*)로부터 citrate buffer를 사용하여 전처리 조건(고액비, 반응온도, buffer의 pH와 농도)에 따른 전처리 반응과 효소가수분해를 수행하여 환원당의 생산 수율을 조사하여 바이오연료 및 화학물질 생산의 원료로서의 가능성을 탐색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험에 사용한 창자과래(*E. intestinalis*)는 2010년에 전남 완도에서 수확한 것을 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 그 구성 성분은 31.6% crude protein, 1.3% crude lipid, 24.3% crude ash 그리고 42.8% total carbohydrate이다[6]. 실험에 사용한 효소로는 cellulase, amylase, xylanase 등으로 구성된 복합효소인 Viscozyme L (Novozyme 사, 덴마크)과 cellulase로 구성된 Cellic CTec II (Novozyme 사, 덴마크), 그리고 β -glucosidase인 Cellic HTec II (Novozyme 사, 덴마크)을 사용하였다. Citric acid와 sodium hydroxide (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan) 등은 특급시약을 사용하였다. 실험에 사용한 citrate buffer는 citric acid와 sodium hydroxide를 이용하여 buffer의 농도와 pH에 조절하여 제조하여 사용하였다.

2-2. 바이오매스 전처리

전처리에 따른 효소가수분해 수율을 조사하기 위하여 다음과 같은 방법을 이용하였다. 고액비 1:10의 경우에서는 과래 분말 2 g에 전처리용 촉매로 citrate buffer 20 mL를 첨가하여 상온에서 10분간 균일하게 침지 교반한 후, oven을 사용하여 설정한 온도로 가열하여 전처리하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다. 전처리 후 반응액은 효소가수분해를 위한 시료로 사용하였다.

2-2-1. 고액비의 영향

전처리에 미치는 고액비의 영향을 조사하기 위하여 바이오매스와 citrate buffer (pH 4.8, 0.05 M)의 비를 1:6, 1:8, 1:10, 1:15, 1:20으로 설정하여 120 °C에서 60분 동안 반응하여 생성된 환원당의 양을 측정하여 비교하였다. 전처리 후 반응액은 효소가수분해를 위한 시료로 사용하였다.

2-2-2. Citrate buffer pH의 영향

전처리에 미치는 citrate buffer의 pH가 미치는 영향을 조사하기 위하여 citrate buffer (0.05 M)의 pH를 3.5, 4.0, 4.5, 4.5, 4.8, 5, 5.5,

6.0로 설정하여 120, 130, 140 °C에서 60분 동안 반응하여 생성된 환원당의 양을 측정하여 비교하였다.

2-2-3. Citrate buffer 농도의 영향

전처리에 미치는 citrate buffer 농도의 영향을 조사하기 위하여 citrate buffer (pH 3.5)의 농도를 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 M로 설정하여 140 °C에서 60분 동안 반응하여 생성된 환원당의 양을 측정하여 비교하였다.

2-3. 효소 가수분해

효소가수분해는 일정 농도와 pH를 가지는 citrate buffer와 함께 120-140 °C에서 60분 동안 전처리된 시료를 대상으로 하여 효소가수분해를 수행하였다. 전처리된 시료는 일정량의 citric acid와 sodium hydroxide를 첨가하여 40 mL의 citrate buffer (pH 4.8, 0.05 M) 용액이 되도록 조절한 후, 가수분해용 효소(총 용량기준 1%)를 첨가하여 shaking incubator에서 50 °C에서 180 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 반응을 수행하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다. 가수분해에 사용한 효소로는 김 등[11]의 연구결과에서 높은 가수분해율을 나타낸 효소혼합물인 Viscozyme L (cellulase, amylase, xylanase 등으로 구성된 복합효소)과 Cellic CTec II (cellulase로 구성), 그리고 Cellic HTec II (β -glucosidase)를 1:1:0.1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

2-4. 분석방법

생성된 환원당의 양은 DNS법을 통해 분석하였다[12]. 일정한 농도로 희석된 시료 100 μ L에 증류수 900 μ L와 DNS시약 3 mL를 혼합하여 끓는 물에서 5분간 반응시킨 후 차가운 물에서 5분간 냉각시킨 후 분광광도계를 이용하여 580 nm에서 측정하였다. 표준시료로는 glucose를 사용하였다. 본 연구에서 나타낸 가수분해 수율은 전처리 또는 효소가수분해에 의해 생성된 환원당의 양을 초기 바이오매스 중량으로 나눈 값으로 정의하였다[11].

3. 결과 및 고찰

3-1. 창자과래에 대한 효소가수분해

Fig. 1은 1:10의 고액비 조건에서 pH 3.5~6.0의 citrate buffer (0.05 M)를 사용하여 과래(기질)를 상온에서 1시간 침지시킨 후 50 °C에서 24시간 동안 효소가수분해를 수행한 결과를 나타낸 것이다. pH 3.5~6.0의 buffer를 사용한 모든 경우에서 상온에서 1시간 동안 침지 후에는 환원당이 생성되지 않았다(data not shown). 전체적으로 효소가수분해 24시간 이후에 바이오매스 중량 기준 10% 내외의 가수분해 수율을 나타내었다. 특히, pH 3.5의 citrate buffer 조건에서는 10.32%의 가수분해 수율을 나타내었다.

3-2. 전처리 조건에 따른 효소가수 분해

창자과래를 대상으로 citrate buffer를 이용한 전처리 방법이 효소가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 전처리 조건으로 고액비, 전처리 온도, citrate buffer의 pH와 농도에 대한 영향을 조사하였다.

3-2-1. 고액비의 영향

고액비가 효소가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 1:6-1:20의 고액비 조건에서 citrate buffer (pH 4.8, 0.05 M)를 사용하여

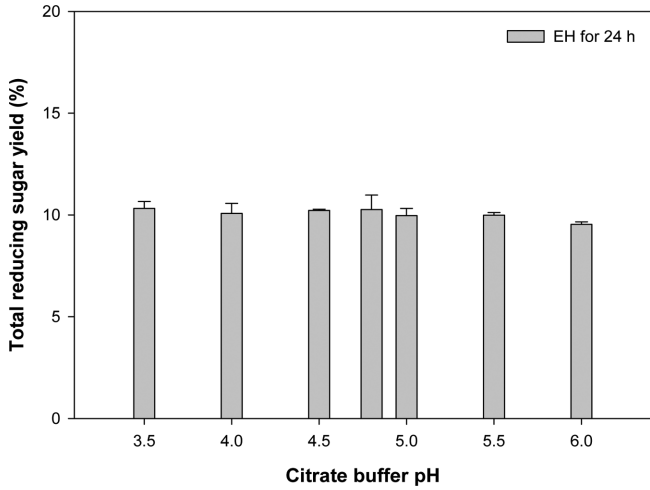


Fig. 1. Effect of pH of citrate buffer on enzymatic hydrolysis of non-pretreated *E. intestinalis* EH (Enzymatic hydrolysis).

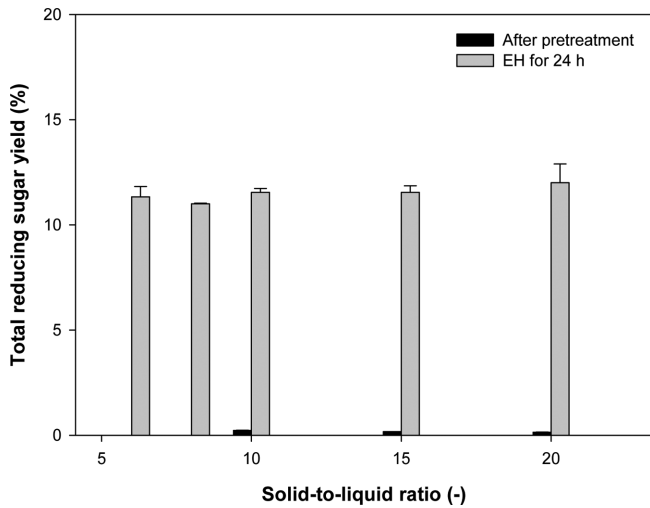
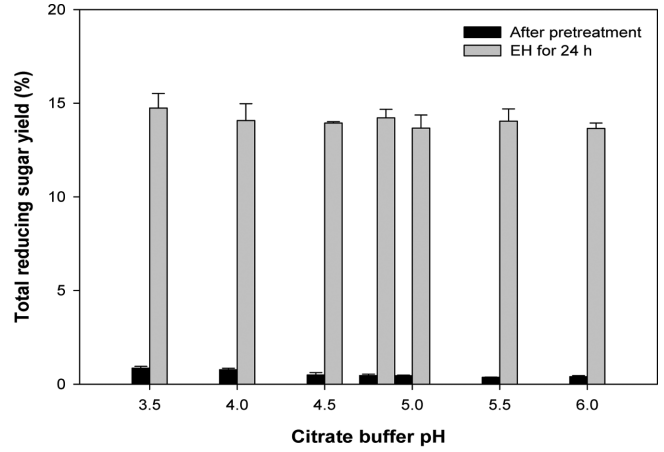


Fig. 2. Effect of solid-to-liquid ratio on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis*. EH (Enzymatic hydrolysis).

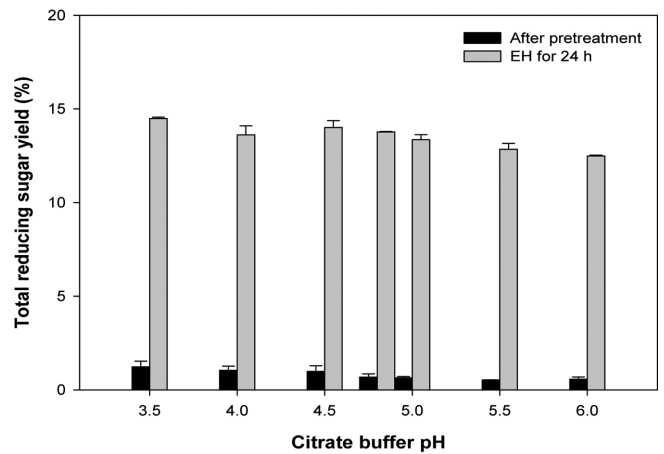
120 °C에서 60분 동안 전처리한 시료를 24시간 동안 효소 가수분해하여 얻은 가수분해 수율을 비교한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 1:6과 1:8의 고액비 조건에서는 전처리한 후 시료가 높은 밀도를 나타내어 시료채취가 불가능하였다. 1:10, 1:15, 1:20의 고액비로 전처리한 경우에는 각각 0.23, 0.17, 0.14%의 가수분해 수율을 나타내었다. 또한 효소 가수분해 반응 24시간 후에는 각각 11.55, 11.55, 12.01%의 가수분해 수율을 얻었다. 또한 Jang 등 [7]은 다시마의 동시 당화발효에 관한 연구에서 높은 점도로 인한 슬러리의 조작의 어려움으로 바이오매스의 양을 10%로 제한하였으며, Meinita 등 [14]은 *Kappaphycus alvarezii*의 산 가수분해에서 최적 바이오매스의 양을 10%로 보고 하였다. 1:10의 고액비 조건 이후 더 높은 고액비에서 비슷한 가수분해 수율이 유지되거나 크게 증가하지 않는 결과를 고려하여 고액비를 1:10으로 선정하여 다음 실험에 적용하였다.

3-2-2. 반응온도와 citrate buffer pH의 영향

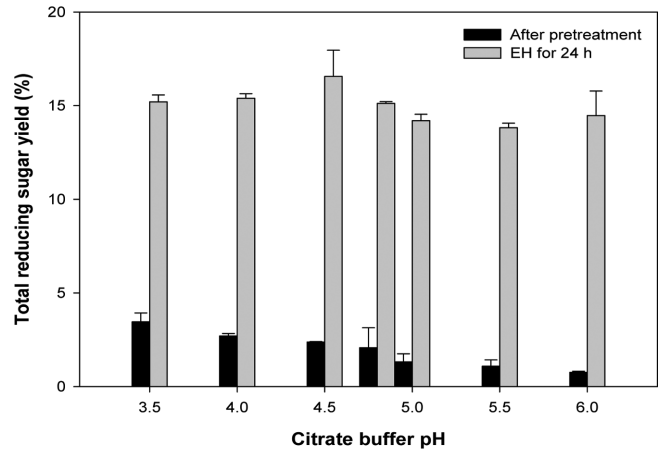
Citrate buffer의 pH와 전처리 온도가 파래의 효소 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 pH 3.5~6.0의 citrate buffer (0.05 M)를



(A)



(B)



(C)

Fig. 3. Effect of pretreatment temperature and buffer pH on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis*. (A) 120 °C, (B) 130 °C, (C) 140 °C, EH (Enzymatic hydrolysis).

사용하여 120 °C, 130 °C, 140 °C의 전처리 온도에서 60분간 전처리한 시료를 24시간 동안 효소 가수분해하여 얻은 가수분해 수율을 비교한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전처리 후 환원당의 생산은 전반적으로 buffer의 pH가 낮고, 반응온도가 높아질수록 많은 양의 환원

당이 생성되는 경향을 나타내었다. Citrate buffer의 pH 3.5, 140 °C에서 60분간의 전처리 조건에서 3.14 g/L으로 가장 높은 환원당이 생성되었다. 이는 바이오매스 중량 기준으로 3.46%의 가수분해 수율을 나타내었다. 또한 전처리 반응온도의 영향은 130 °C 이후에서는 상대적으로 140 °C에서 전처리된 조건에서 가수분해 수율이 크게 증가하였다. 140 °C의 반응온도에서 pH를 3.5~6로 조절할 경우, pH 4.5에서 효소 가수분해 후 7.81 g/L의 가장 많은 양의 환원당이 생성되었고, 이는 바이오매스 중량 기준으로 16.56%의 가수분해 수율을 나타내었다. 이러한 결과는 낮은 pH와 높은 반응온도 조건에서 긴 반응시간 동안 시료를 구성하고 있는 고분자들의 결합이 전처리 과정에서 분해되고, 이로 인하여 효소와 반응할 수 있는 기질의 증가한 결과라고 판단된다[2,4,8,14]. 또한 효소가수분해 반응에서는 전처리 후 잔존하는 기질의 양에 비례하여 환원당의 생성이 나타난 것으로 판단된다.

3-2-3. Citrate buffer 농도의 영향

Citrate buffer 농도가 파래의 전처리에 미치는 영향을 알아보기 위하여 citrate buffer (pH 3.5)의 농도를 0-0.5 M로 조절하여 140 °C에서 60분간 전처리하여 얻은 시료를 대상으로 효소 가수분해하여 얻은 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 전처리와 효소 가수분해로 인해 생성된 환원당의 양은 buffer 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 1:6~1:20의 고액비 조건에서 citrate buffer (pH 3.5, 0~0.5 M)를 사용하여 140 °C에서 60분 동안 전처리한 시료는 전체 부피가 40 mL가 되도록 일정량의 citric acid와 sodium hydroxide를 첨가하여 0.05 M citrate buffer (pH 4.8)가 되도록 조절한 후, 가수분해용 효소(총 용량기준 1%)를 첨가하여 shaking incubator에서 50 °C에서 180 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 반응을 수행하였다. 효소 가수분해 결과, 0.1 M 이상의 buffer 농도 조건에서는 효소 가수분해에 의한 가수분해 수율이 크게 변하지 않았다. 0.25 M의 buffer 농도에서 전처리와 효소 가수분해에 의해 각각 4.91 g/L, 8.81 g/L의 환원당이 생성되었고, 이는 바이오매스 중량기준으로 각각 5.40%, 18.68%의 가수분해 수율을 나타내었다. 이는 열처리 하지 않은 창자파래의 효소 가수분해 결과인 10.32%의 가수분해 수율에 비하여 8.36% 증가한 것이다.

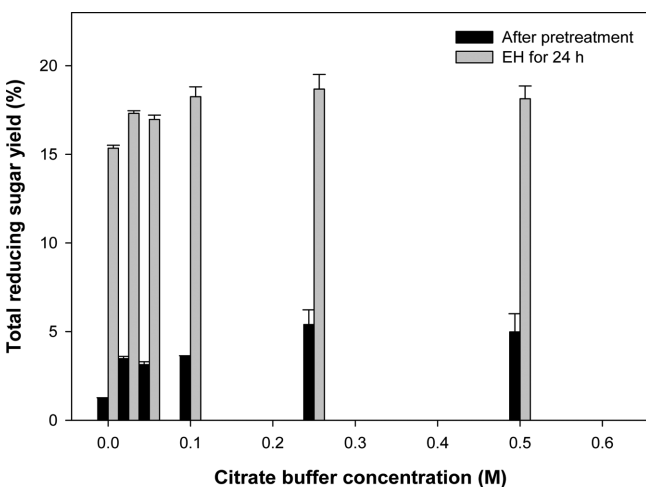


Fig. 4. Effect of citrate buffer concentration on pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis of *E. intestinalis* EH (Enzymatic hydrolysis).

4. 결 론

본 연구에서는 창자파래(*E. intestinalis*)로부터 환원당을 생산하기 위하여 citrate buffer를 이용한 전처리와 효소 가수분해를 수행하였다. 0.25 M, pH 3.5의 citrate buffer를 이용하여 140 °C에서 60분간 전처리를 수행한 결과, 5.40%의 가수분해 수율을 얻었다. 또한 전처리 후 24시간 동안의 효소 가수분해를 통하여 18.68%의 가수분해 수율을 얻었다. 이는 대조구에 비하여 약 1.81배 증가한 결과이다. 위의 연구결과로부터 창자파래로부터 바이오연료나 화학물질 생산에 필요한 당(sugar)을 생산하는데 citrate buffer의 이용 가능성과 전처리 조건 및 효소 가수분해 수율을 확인하였다.

감 사

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

1. Ayeni, A. O., Omoleye, J. A., Mudliar, S., Hymore, F. K. and Pandey, R. A., "Utilization of Lignocellulosic Waste for Ethanol Production: Enzymatic Digestibility and Fermentation of Pretreated Shea Tree Sawdust," *Korean J. Chem. Eng.*, **31**, 1180-1186(2014).
2. Jeong, G. T., "Production of Levulinic Acid from Chitosan by Acidic-hydrothermal Reaction," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 355-359(2014).
3. Ra, C. H., Lee, H. J., Shin, M. K. and Kim, S. K., "Bioethanol Production from Seaweed *Gelidium amansii* for Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)," *KSBB J.*, **28**(5), 282-286(2013).
4. Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Sugars and Levulinic Acid from Marine Biomass *Gelidium amansi*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **161**, 41-52(2010).
5. Jang, S. S., Shirai, Y., Uchida, M. and Wakisaka, M., "Production of Mono Sugar from Acid Hydrolysis of Seaweed," *African J. Biotechnol.*, **11**(8), 1953-1963(2012).
6. Cho, Y. K., Kim, M. J. and Kim, S. K., "Ethanol Production Form Seaweed, *Enteromorpha intestinalis*, by Seperate Hydrolysis and Fermentation (SHF) and Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) with *Saccharomyces cerevisiae*," *KSBB J.*, **28**(6), 366-371(2013).
7. Jang, J. S., Cho, Y., Jeong, G. T. and Kim, S. K., "Optimization of Saccharification and Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) from Seaweed, *Saccharina japonica*," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **35**, 11-18(2012).
8. Kim, D. H., Lee, S. B. and Jeong, G. T., "Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis* by Hydrothermal and Enzymatic Hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, **161**, 348-353(2014).
9. Feng, D., Liu, H., Li, F., Jiang, P. and Qin, S., "Optimization of Dilute Acid Hydrolysis of *Enteromorpha*," *Chin J. Oceanol. Limnol.*, **6**, 1243-1248(2011).
10. Sanchez-Machado, D. I., Lopez-Cervantes, J., Paseiro-Losada P. and Lopez-Hernandez, J., "Fatty Acid, Total Lipid, Protein and Ash Contents of Processed Edible Seaweeds," *Food Chem.*, **85**, 439-444(2004).

11. Kim, A. R., Kim, D. H. and Jeong, G. T., "Optimum Reaction Condition of Enzymatic Hydrolysis for Production of Reducing Sugar from *Enteromorpha intestinalis*," *KSBB J.*, **30**(2015). <http://dx.doi.org/10.7841/ksbbj.2015.30.2.1>
12. Miller, G. L., "Using Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, **31**, 426-428(1959).
13. Park, D. H. and Jeong, G. T., "Production of Reducing Sugar from Macroalgae *Saccharina japonica* Using Ionic Liquid Catalyst," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**, 106-110(2013).
14. Meinita, M. D. N., Hong, Y. K. and Jeong, G. T., "Comparison of Sulfuric and Hydrochloric Acids as Catalysts in Hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii)," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **35**, 123-128(2012).