

구멍갈파래의 고압 균질 전처리 공정을 통한 바이오에탄올 생산용 당화수율 증진

최운용¹, 이춘근¹, 안주희¹, 서용창², 이상은³, 정경환³, 강도형⁴, 조정섭⁵, 최근표⁶, 이현용^{1,2*}

Enhancement of Saccharification Yield of *Ulva pertusa* Kjellman by High Pressure Homogenization Process for Bioethanol Production

Woon Yong Choi¹, Choon Geun Lee¹, Ju Hee Ahn¹, Yong chang Seo², Sang Eun Lee³, Kyung Hwan Jung³, Do Hyung Kang⁴, Jeong Sub Cho⁵, Geun Pyo Choi⁶, and Hyeon Yong Lee^{1,2*}

접수: 2011년 8월 3일 / 게재승인: 2011년 9월 20일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study was investigated to improve the saccharification yield of *Ulva pertusa* Kjellman by the high pressure homogenization process. It was found that the high pressure homogenization pretreatment effectively destructed the cell wall structures only by using water. The high pressure homogenization process was operated under various conditions such as 10000, 20000 or 30000 psi with different recycling numbers. The optimal condition was determined as 30000 psi

and 2 pass of recycling numbers and the sugar conversion yields were 16.02 (% w/w) of glucose and 14.70 (%w/w) of xylose, respectively. In the case of enzymatic treating the hydrolyzates with 5 FPU/glucan of cellulase and 100 units/mL of amyloglucosidase, 65.8% of carbohydrates was converted into glucose. Using the hydrolysates of *Ulva pertusa* Kjellman, 48.7% of ethanol was obtained in the culture *S.cerevisiae*. These results showed that the high pressure homogenization process could efficiently hydrolyze the marine resource by using only water for bioethanol production.

¹강원대학교 생물소재공학전공

¹Department of Biomaterial Engineering, Kangwon Natl. Univ., Chuncheon 200-701, Korea

²강원대학교 의료, 융복합 인재양성센터

²Medical & Bio-Material Research Center and Department of Biomaterials Engineering College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
Tel: +82-33-256-4819, Fax: +82-33-250-6560
e-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

³충주대학교 바이오산업학과

³Department of Biotechnology, Chungju National University, Chungbuk 368-701, Korea

⁴한국해양연구원

⁴Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan P.O. Box 29, Seoul 426-744, Korea

⁵두산에코비즈넷

⁵DooSan EcoBizNet, Chucheon 200-161, Korea

⁶강원도립대학교 식품가공제과제빵과

⁶Department of Food Processing and Bakery, Gangwon Provincial College, Gangwon 210-804, Korea

Keywords: *Ulva pertusa* kjellmann, high pressure homogenization process, sugar yields, HMF, bioethanol production

1. 서론

신 재생에너지 연구 분야 중 가장 활발히 연구가 되어 있으며, 인류가 현재 소비하고 있는 화석 연료 중 가장 많이 사용하는 연료인 가솔린을 대체할 수 있는 바이오 에탄올은 최근 들어 여러 단계로 발전을 거듭하고 있다 [1-2]. 특히, 최근 바이오 에탄올 연구에서는 해양 자원을 이용하여 연료를 생산 하려는 연구가 활발히 진행 중이며, 그중 녹조류인 구멍 갈파래 (*Ulva pertusa kjellman*)는 우리나라 제주도 연안에서 주로 자생되어지고 있는 녹조류이며, 녹조 현상을 가장 많이 일으키는 주요 요인이다. 때문에 구멍갈파래는 환경 문제를 야기할 뿐만 아니라 수거하여 폐기시키기 까지 많은

자원이 소비되고 있는 실정이다. 이러한 구멍 갈파래는 조류의 특성상 빠른 성장과 생산 지역이 바다이기 때문에 광범위한 생산 영역을 가진다. 이러한 구멍갈파래는 여러 연구를 통해 그 구조 당의 종류와 구성성분의 함량이 연구가 되어 있으며, 특히 녹조류이기 때문에 광합성으로 생산되는 전분 (Starch)의 함유량이 높고 세포벽이 주로 Cellulose로 구성되어 있기 때문에 최근 문제시 되고 있는 식량자원과의 경쟁없이 바이오 에탄올 생산에 이용될 수 있다. 또한 경제적으로 친 환경적이기 때문에 큰 이점이 있을 것으로 기대된다 [3-9].

바이오 에탄올 생산을 위한 전처리 중 세계적으로 가장 기본이 되는 전처리 방법은 황산 전처리 방법으로, 이는 비교적 높은 수율의 단당류 전환 수율을 얻을 수 있다 [10]. 하지만 황산 전처리는 발효저해 물질인 5-hydroxy methylfurfural (HMF)의 생산으로 인한 발효 공정에서의 효율이 떨어지는 단점이 있으며 화학적인 전처리로 인한 중화 공정은 환경적인 문제 및 비경제적인 문제를 가지고 있기 때문에 황산처리로 인한 바이오 에탄올 생산은 산업적으로 이용하지 못하는 실정이다 [11]. 또한, 해조류를 이용한 바이오 에탄올을 생산하기 위한 전처리 공정은 기존 에탄올 전처리 기법인 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 세균효소에 의하지 않고서는 분해되기 어려워 이용이 에탄올 당화물질 생산에 제한적이다 [12]. 특히, 해조류 중 구멍갈파래는 내부에 Starch 형태로 당을 저장하고 있기 때문에 Starch를 용출하기 위해서는 필수적으로 구멍갈파래 Cell wall을 파괴하여야 한다. 이러한 구멍갈파래의 특유의 문제점을 해결해야만 고농도의 당을 얻을 수 있다.

따라서 위의 문제 해결을 위해 환경적으로 문제가 없는 물을 이용한 전처리 공정이 필요하다. 하지만 물을 이용한 전처리 공정은 바이오매스로부터 단당류로 당화시키는 효율이 높지 않아 화학적 전처리를 이용 하였을 때 보다 당 전환 수율이 낮아지며, 고온, 고압의 전처리 공정을 적용하여도 전처리 시간이 길어지고 그에 따른 경제적 효과도 낮아지기 때문에 물을 이용한 전혀 새로운 전처리 공정을 개발하여야 한다 [13]. 이러한 물을 사용하여 전처리 할 경우의 문제점을 해결하기 위해 높은 압력을 이용하여 물질을 고속으로 이동시킬 때 발생하는 힘인 전단력을 전처리 공정에 적용하여 해조류를 당화시킬 경우, 해조류의 세포벽의 분쇄로 인해 세포 내부에 존재하는 다당류의 분쇄가 가능할 것으로 사료된다. 특히, 구멍갈파래는 내부에 존재하는 Starch의 크기는 구멍갈파래 생육 조건에 따라 달라지지만 1~4 μm 크기로 많은 차이가 나지 않는 것으로 기존에 연구되어 졌으며, 이러한 특성상 구멍갈파래를 1 μm 이하의 크기로 분쇄를 할 경우 Starch 및 다당 사슬을 끊어 glucose 등의 단당류 형태로 가수분해가 될 것으로 사료된다 [21]. 특히, 상기의 전처리 공정은 추가 적인 2차 공정을 적용시키지 않아도 높은 당화 수율을 보일 것으로 예상된다. 따라서 이런 원리를 이용하여 해조류의 세포벽이 파괴되고 물의 출입이 용이하여 시료의 당화성분 추출이 단시간에 가능하며, 불순물이 없으며 추출효율을 증진시킬 수 있을 것으로 사료된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

제주도에서 2009년도에 수확한 구멍갈파래를 강제 순환 건조기에서 40°C로 48시간 건조한 후 불밀도 20 mesh 이하의 미세한 분말상태로 분해한 구멍갈파래를 사용하였다.

2.2. 방법

2.2.1. 고압균질 공정을 이용한 구멍갈파래 전처리

전처리에 사용된 기계는 고압 균질 공정기계 (High Pressure Processor; MN400BF; PiCOMAX, Korea)를 사용하여 구멍갈파래를 분쇄 하였으며, 전처리 모식도는 Fig. 1에 제시하였다. 고압균질 전처리 공정에의 방법은, 건조 분말 형태의 구멍갈파래를 1 L 증류수에 10% 첨가한 후 액상의 구멍갈파래를 고속 분쇄기에 20,000 rpm으로 15분 동안 파쇄하여 작게는 70 μm 이하의 크기로 구멍갈파래를 분쇄 한 후, 고압 균질기에 70 μm 크기의 관을 통과시켜 10000~30000 psi 이상의 압력을 가하여 관을 통과시킬 때 좁은 틈사이고 넣어 지게 됨으로써 생기는 전단력 (shear stress)를 이용하여 구멍갈파래 입자 크기가 나노 크기로 분쇄되도록 하였다.

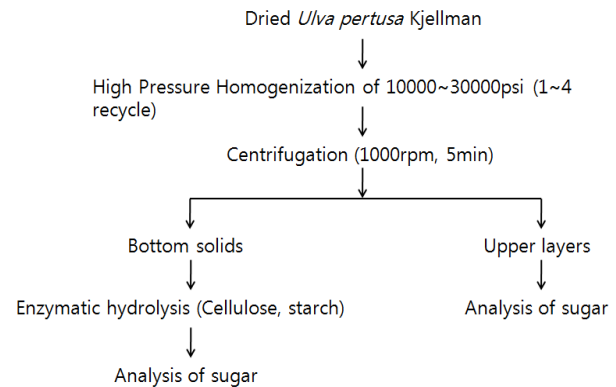
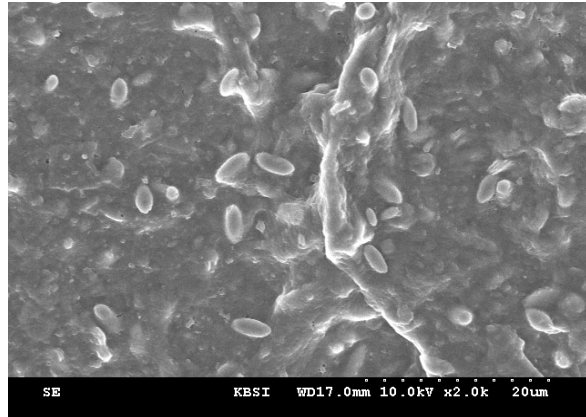


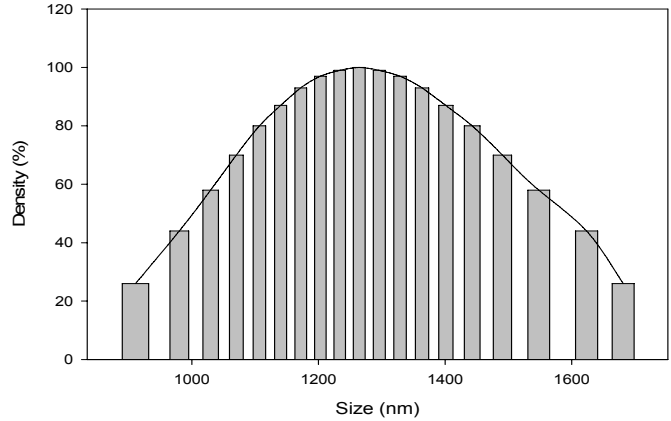
Fig. 1. Procedure for the pretreatment of green alga, *U. pertusa* kjellmann by high pressure homogenization process.

2.3. Scanning Electron Microscope (SEM) 및 Dynamic Light Scattering (DLS)을 통한 구멍갈파래의 입자크기와 표면 관찰

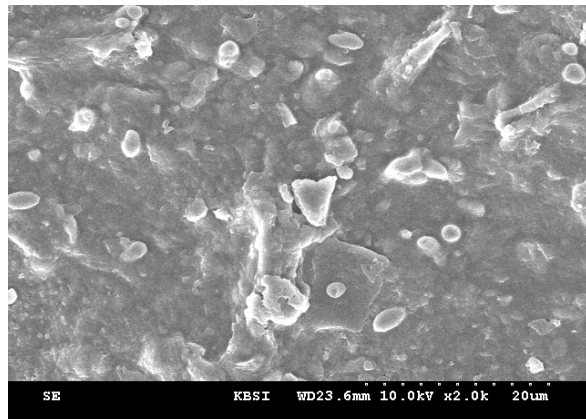
고압 균질 전처리 공정을 통한 구멍갈파래의 전처리 전, 후의 입자 크기와 균일성, 크기별 분포 측정을 위해 Dynamic Light Scattering (DLS, Brookhaven Instrument Co)을 이용하였다. DLS 측정을 위해 전처리 된 구멍갈파래를 10배 희석하여 DLS 측정용 큐벳에 2 mL을 첨가하여 측정하였다. 측정 조건은 25°C 온도에서 30초 간격으로 3회 측정하여 총 1분 30초 동안 DLS를 측정 하였다. 또한, 고압균질 전처리 공정을 적용을 한 구멍갈파래 입자의 형태학적 관찰을 위해 저진공주사현미경 (Low Vacuum-Scanning Electron \times 400)으로 관찰하였다. Scanning Electron Microscope (SEM)은 금, 백금 등을 이용해 입자를 3~4 mm 정도 얇게 증착하는 전처리 과정을 거친 후, 고압균질 공정을 통해 제조한 구멍갈파래의 입자 형태를 관찰 하였다.



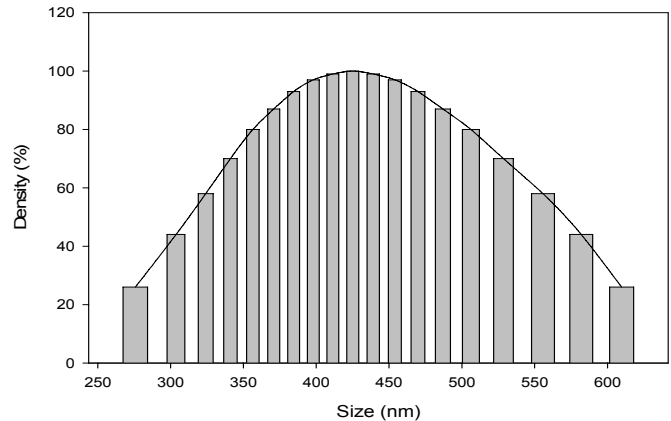
(a) Control sample (without pretreatment) - SEM images.



(b) Control sample (without pretreatment) - DLS images.



(c) High pressure homogenization process - SEM images.



(d) High pressure homogenization process - DLS images.

Fig. 2. SEM images and size distribution of nanoparticles of *U. pertusa* kjellmann using dynamic light scattering(DLS) from high pressure homogenization process : (a) Control sample (without pretreatment) - SEM images, (b) Control sample (without pretreatment) - DLS images, (c) High pressure homogenization process - SEM images, (d) High pressure homogenization process - DLS images.

2.4. 가수 분해 잔유물의 2차 효소처리

전처리를 통해 가수분해된 구멍갈파래에서 당화액을 제외한 잔여물인 세포벽과 전분으로 구성되어진 cellulose와 starch를 분해하기 위해 cellulase와 amyloglucosidase를 사용하였다. Cellulose를 분해하기 위해 Cellulase를 이용하여 2차 효소처리를 하였으며, starch의 구조인 α 사슬과 β 사슬을 모두 분해 할 수 있기 때문에 amyloglucosidase 사용하였다. 2차 효소 처리를 위해 40°C에서 24시간 건조시킨 후 건조 중량을 측정하고 sodium acetate buffer (pH 4.8) 100 mL에 1, 3, 5 FPU/g 역가를 가진 cellulase (Cellubrix L; Novozyme, USA)를 각각 처리하였다. 또한, 세포벽 파괴로 인해 용출된 구멍갈파래의 저장 당 성분인 starch를 분해하기 위해 amyloglucosidase (Sigma-Aldrich) 효소 100, 200, 400 units/mL를 각각 처리하였다. 효소 당화는 55°C에서 150 rpm으로 48시간 반응 시킨 후 생성된 당화물을 HPLC (Dionex, USA)에 RI Detector가 부착된 기기를 이용해 굴절률을 분석하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Bio-Rad사의 Aminex HPX-87P Column 300 × 7.8 mm를 사용하였으며 분석 조건은 70°C에서 100% 증류수를 이용하여 전개 하였으며, flow rate는 0.6 mL/min으로 30분 동안 분석을 하였다 [14].

2.5. 전처리 부산물 내 HMF 농도 측정

고압균질 전처리 공정을 통해 얻어진 당화물 내에 있는 발효저해물질의 측정을 위해 발효저해 물질 중 대표적인 저해물질인 5-hydroxy methylfurfural (HMF, sigma USA)를 기준 물질로 하여 HPLC를 이용하여 분석 하였다. 전처리를 통해 얻어진 가수분해물을 0.2 μ m의 필터로 여과한 후 분석하였으며, 분석 조건은 5 mM 황산을 이동상으로 하여 65°C에서 0.5 mL/min의 유속으로 Aminex HPX-87H 칼럼 (Bio-Rad, USA)을 이용하여 HMF 기준 농도와 비교해 RI detector로 분석 하였다 [15-16].

2.6. 구멍갈파래 가수분해물의 에탄올 발효

가수분해물의 에탄올 발효를 위하여 1 L flask에서 발효실험을 시행하였다. 발효종균으로 YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) 배지에서 24시간 동안 배양된 *S. cerevisiae* (ATCC, 24858)을 사용하였으며, 기본 YPD 배지에서 glucose를 대신하여 가수분해물을 첨가하여 발효 하였다. 배지의 pH조성은 인산 완충용액과 NaOH powder를 이용하여 5.5로 유지 하였으며, 총 배양부피의 10%의 양만큼 종균을 접종하여 shaking incubator에서 30°C, 150 rpm의

조건으로 배양 하였다. 발효된 에탄올의 함량 측정을 위해 GC (HP-5890 II, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. 오븐온도를 150°C, injector와 FID 온도는 250°C로 조절하였으며, N₂를 carrier gas로 이용하여 50 mL/min 속도로 분석하였다. GC분석에 사용된 컬럼은 INNOWax column (30 m × 0.32 mm, Agilent 19091N-113)을 사용하였다 [9].

2.6. 통계

모든 data는 평균 ± 표준편차 (Mean ± standard deviation)로 나타내었으며 SPSS program (ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용해 t-test로 검정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 고압균질 공정을 이용한 구멍갈파래 전처리

구멍갈파래의 고압 균질 전처리 공정을 통해 바이오 에탄올 생산용 당화수율 증진 실험을 하기 위해 고압균질 전처리 조건 별로 실험을 진행 하였으며, 공정 모식도는 Fig. 1에 나타내었다. 처음 건조 분말 형태의 구멍갈파래 100 g을 증류수 1 L를 혼합하여 액상의 시료로 만든 후, 고속 분쇄기에 액상의 시료를 20000 rpm의 속도로 15분간 분쇄하여 구멍갈파래 시료의 크기를 고압균질기에 통과 시킬수 있는 크기인 70 µm 이하의 크기로 분쇄한다. 분쇄된 구멍갈파래를 고압균질기 전처리를 실행함에 있어 초기 10000 psi의 압력에서 전처리 공정 횟수를 1회 하였을 경우의 구멍갈파래 입자의 크기와 표면을 확인하여 고압균질 전처리 공정이 실제로 구멍갈파래에 직접적으로 영향을 끼쳤는지에 대해 SEM images와 Distribution of nanoparticle using dynamic light scattering (DLS) 측정을 통해 입증하였다. Fig. 2는 SEM images와 DLS 측정 결과를 나타낸 것으로 전처리 전 구멍갈파래의 표면 모습은 (a)의 SEM image를 통해하여 관찰 하였으며, 고압균질 전처리 후의 구멍갈파래 표면 모습은 (c)와 같다. 또한, (b)와 (d)의 고압균질 전처리 전, 후의 구멍갈파래의 입자크기를 측정한 결과, 고압균질 전처리 공정을 통해 가수분해를 할 경우 구멍갈파래가 작은 크기로 균질화되어 있는 상태인 것을 확인하였다. 따라서 고압균질 전처리 공정을 통해서 구멍갈파래의 물리적인 전처리가 가능함에 따라 상기의 전처리 조건인 10000 psi의 조건에서 1~4회 까지 전처리하였을 경우의 glucose와 xylose의 전환 수율을 측정 한 결과를 측정하였다. Fig. 3은 상기의 조건에서 당 전환 수율을 측정한 결과이며, 가장 높은 당 전환 수율은 4회 전처리 하였을 경우이며, 전처리 수율은 구멍갈파래로의 구성성분인 Total carbohydrate 38.4 (% w/w)에서 cellulose 6.7 (% w/w), hemicellulose 16.8 (% w/w)를 바탕으로 계산 하였으며, 약 glucose 7.90 (% w/w), xylose 10.15 (% w/w)의 전환 수율을 얻을 수 있었다. 얻어진 당 전환 수율 중 glucose 전환 수율은 바이오 에탄올 생산에서 가장 많이 사용되어지고 있는 옥수수대의 황산 전처리 수율인 4.30 (% w/w) 보다 약 3.6 (% w/w) 높은 전환 수율을 보인다 [9]. 따라서 고압균질 전처리 공정은 해조류인 구멍갈파래를 이용하였을

경우에 바이오 에탄올 생산에 적용 할 수 있는 가능성을 확인하였다 [10].

구멍갈파래로부터 고압균질 전처리 공정을 적용하여 당화수율을 증진 시키기 위해 압력을 30000 psi 압력까지 증가시켜 당화수율 정도를 측정한 결과를 Table 1에 나타내었다. 고압균질 전처리 공정을 조건별로 측정 한 결과 전체적으로 고압균질 전처리시 압력을 증가 시킬수록 당화 수율이 증진 되는 것을 확인 하였으며, 10000 psi의 경우 4회 전처리를 하였을 경우 가장 높은 전처리 당화 수율을 얻었다. 또한, 20000 psi의 경우 2회 전처리 하였을 경우가 가장 높은 전환 수율인 것을 확인 하였으며, 당화 수율은 glucose 10.39 (% w/w), xylose 12.70 (% w/w)의 전환 수율을 얻었다. 그리고 Table 1의 결과에서 알 수 있듯이 가장 효과적인 전처리 공정 방법은 30000 psi의 압력이 가장 당 전환 수율이 높았다. 그 중 2회 전처리한 경우의 당화수율이 가장 높았으며, glucose와 xylose의 전환 수율은 각각 16.02 (% w/w), 14.70 (% w/w)의 전환 수율을 얻었다. 특히, 고압균질 전처리 시에는 압력이 높아질수록 당 전환 수율이 높아지지만, 전처리 횟수가 증가할수록 당화 수율이 높아지는 경향을 보이지 않는다. 따라서 고압균질 전처리 시에는 2번 이상 전처리를 하여 바이오에탄올 생산용 당을 생산하는 것은 비효율적인 것으로 사료된다.

Table 1. Result of estimation sugar concentrations in the hydrolysates of *U. pertusa* kjellmann after high pressure homogenization process with different pressure and recycling numbers

NO.	Pressure (psi)	Pass	glucose (% w/w)	xylose (% w/w)
1	10000	1	7.49 ± 1.11	9.27 ± 1.33
2		2	7.61 ± 0.23	9.10 ± 0.84
3		3	7.61 ± 0.46	9.94 ± 0.21
4		4	7.90 ± 0.43	10.15 ± 1.41
5	20000	1	9.90 ± 0.83	12.99 ± 0.21
6		2	10.39 ± 1.03	12.70 ± 1.33
7		3	9.98 ± 0.91	12.29 ± 0.65
8		4	10.30 ± 0.87	13.87 ± 0.19
9	30000	1	15.08 ± 0.51	14.14 ± 1.07
10		2	16.02 ± 0.10	14.70 ± 0.31
11		3	15.60 ± 0.34	14.29 ± 0.55
12		4	15.91 ± 0.76	14.87 ± 0.12

특히, 전처리시 glucose의 전환 수율보다 xylose의 전환 수율이 더 높은 것을 확인 할 수 있었는데, 이는 고압균질 전처리의 특성상 구멍갈파래 세포벽에 직접적인 가수분해 에너지가 가해져서 세포벽이 파괴되어 세포벽을 이루는 주요성분인 cellulose와 Hemicellulose가 분해되기 때문이며, cellulose의 구성성분은 6.7 (% w/w)이며, Hemicellulose의 구성성분은 16.8 (% w/w)이기 때문에 상대적으로 xylose의 수율이 더 높게 측정된 것으로 사료된다. 전환 수율이 증가하는 이유는 세포벽이 깨지면서 starch가 용출되어져 starch의 일부분에 가수분해가 작용하여 glucose의 전환 수율은 상대적으로 상승하는 결과가 얻어진 것으로 사료된다 [21]. 특히, 일반적인 산이나 알칼리를 이용한 화학적인 전처리

공정과 비교 하였을 경우와 비교 하였을 경우, 10000 psi에서 30000 psi까지 압력이 상승 할수록 당화 수율 증가폭은 약 1~2 (% , w/w)로써 낮은 수치로 상승하나, 가수분해 용매를 물만을 이용한 물리적인 전처리 공정을 이용하였기 때문에 당화수율은 비교적 높은 것으로 사료된다 [9].

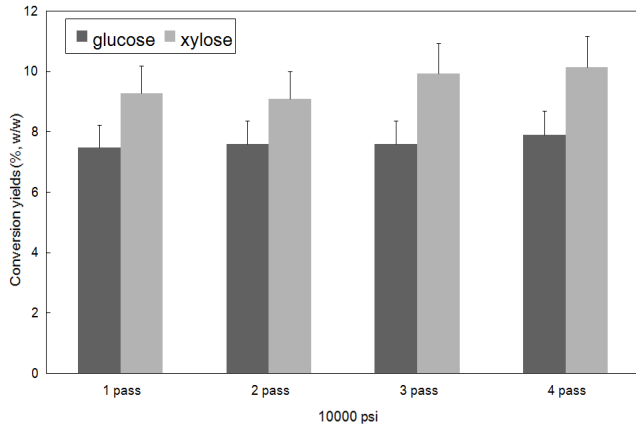


Fig. 3. Estimation of conversion yields of glucose and xylose in the hydrolysate after the pretreatment by high pressure homogenization process.

3.2. 전처리 가수분해물의 효소당화 공정

고압 균질 전처리 공정을 적용시킨 구멍갈파래 가수분해물의 잔유물의 cellulase와 amyloglucosidase를 통한 효소 당화 공정의 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 전처리 조건은 최적합 조건인 30000 psi의 압력에서 2번 전처리한 구멍갈파래의 잔유물을 이용하여 효소의 역가별로 시간에 따른 효소 당화도를 평가 하였다. 구멍갈파래의 경우 약 6.7%의 cellulase로부터 전처리 공정에서 전환 된 16.02 (% , w/w)의 glucose를 제외한 나머지인 5.62%에서 약 91% (% , w/w) 전환된 5.11 g/L의 glucose가 생성 되었다. Cellulase를 이용한 구멍갈파래 당화물의 효소당화 경향은 20시간 까지 증가하다가 그 이후 부터는 효소당화력의 한계점에 도달한 것으로 사료 된다. 또한, 구멍갈파래로부터 용출된 starch를 분해하기 위해 amyloglucosidase를 사용하여 가수분해 했을 경우 총 10%의 starch 함유량에서 약 56.8%의 효소당화 수율을 보였으며, 12시간 동안 효소처리를 하였을 경우 한계점에 도달 하였으며, 그 이후 부터는 효소당화력이 증가하지 않은 것을 확인하였다. 이처럼 cellulase와 amyloglucosidase 효소에 따라 효소당화 시점이 최고점에 도달하는 시간이 다르며,

amyloglucosidase를 이용하여 용출된 starch를 분해할 경우 starch가 다른 다당류의 구조에서 확실히 용출되어 12시간 더 빠르게 분해 된 것으로 생각되며, 효소당화 수율이 56.8%로 거의 절반 수준 밖에 분해되지 않은 이유는 고압균질 전처리를 통해 구멍갈파래 내부에 저장된 starch가 전부 용출되지 않은 것으로 사료된다. 반면 cellulase를 통해 효소당화를 할 경우 91%로 거의 모든 cellulase가 분해 되었으며 cellulase 세포벽의 주요 성분으로 구멍갈파래 외부에 주로 분포되어 있기 때문에 효소 당화 시간은 비교적 오래 걸리지만, 전환 수율은 매우 높게 얻어진 것을 확인하였다.

특히, 기존에 구멍갈파래를 이용한 고압액화 공정을 이용한 전처리시 15FPU에서 90%의 효소 당화 수율을 보이는 반면, 고압 균질 전처리 공정은 저역가인 1FPU부터 5FPU까지 cellulase를 투입 하였을 때, 90% 이상의 glucose의 전환 수율을 나타낸 것으로 보이며, 구멍갈파래 세포벽을 이루는 구조인 cellulose의 파괴로 인해 starch의 용출량이 증가하여 100 unit/mL의 양으로도 효소 가수분해력이 높아진 것을 확인하였다 [9]. 이는 저역가의 효소에서 가수분해도가 뛰어난 공정으로 사료되며, 고압 균질 전처리 공정으로 인해 높은 전단력에 의해 가수분해도가 증가하며, 다당류의 분자간격을 벌리고 결정화도를 감소시켜 cellulase와 반응할 수 있는 면적이 늘어나 높은 수율을 나타낸 것으로 사료된다.

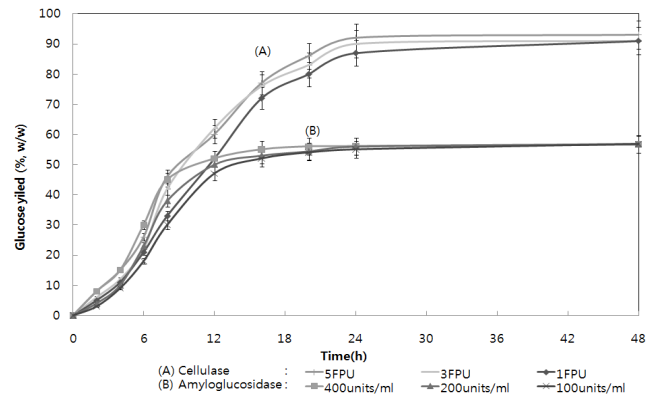


Fig. 4. Comparison of hydrolysis kinetics of pretreatment hydrolysate by two different enzymes: (A) Cellulase, (B) Amyloglucosidase. Error bars represent 95% confidence intervals.

고압 균질 전처리 공정은 Table 2에서와 구멍갈파래로부터 바이오 에탄올 생산을 위한 전처리시 고압액화 공정과 비교 하였을 때 발효에서 가장 중요한 당인 glucose의 전환수율이

Table 2. Comparison of conversion yields of glucose and xylose after pretreatment and enzymatic hydrolysis according to different pretreatment processes

Methods	Sample	Pretreatment yield (% , w/w)		Enzymatic process yield (% , w/w)		Total yield (% , w/w)	
		Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose
High pressure homogenization process ¹⁾	<i>U. pertusa</i>	16.0	14.7	65.8	1.9	72.2	15.1
High Temperature Liquefaction Process ²⁾	<i>U. pertusa</i>	11.2	20.2	31.6	4.1	36.0	23.4

¹⁾ The *U. pertusa* for high pressure homogenization process conditions such as 30000 psi of pressure and 2pass.

²⁾ The *U. pertusa* for high temperature liquefaction process conditions such as 195°C for 15min.

약 5% 이상 증진된 결과를 얻었으며, 전처리 및 2차 효소 당화 공정까지 비교한 결과 약 2배가량 증진된 결과를 얻었다. 또한, 바이오 에탄올 생산에서 가장 많이 연구된 황산 전처리 조건 중 0.49% 황산과 160°C 조건에서 20분 동안 전처리한 실험과 비교 하였을 때 약 5% 정도 더 높은 수율을 얻었다. 또한, 산 또는 알칼리 전처리와 다른 오직 물만을 사용한 전처리 공정 중 Steam gun test와 Microwave pretreatment를 비교 하였으며 본 연구에서의 고압 균질 전처리 공정은 약 9.2 (% w/w)의 glucose 전환 수율을 보인 반면, Steam gun test와 Microwave pretreatment pretreatment는 각각 3.1 (% w/w), 8.9 (% w/w)의 glucose 전환 수율을 보였다. 이는 본 연구의 고압 균질 공정이 약 4~5 (% w/w) 정도 높은 glucose 전환 수율을 확인 하였다 [17-20]. 상기의 전처리는 모두 100°C 이상의 고온이 필요한 조건이기 때문에 glucose 전환 수율과 에너지 투입량 등 고압균질 전처리 공정은 경제성 측면에서 매우 효과 적인 공정으로 사료된다.

3.3. 구멍갈파래 가수분해물 내 발효저해물질 농도 측정

구멍갈파래 전처리물에서 발효 저해물질인 HMF의 생성 여부를 확인 하였다. 고온 가수분해 시 생성되는 대표 효소 활성 저해 및 발효 저해물질인 HMF를 지표물질로 하여 농도를 측정해 보았다. 그 결과를 Table 3에 나타내었으며, 구멍갈파래를 이용한 황산처리 공정의 HMF의 생성량은 각각 350, 450 mg/L으로 매우 높은 수치를 나타내는 반면, 고압 균질 전처리 조건은 30000 psi에서 2번 전처리 하였을 경우이며, 이때의 HMF의 농도는 160.9 ppm 이었다 [9]. 또한, 일반적인 cellulosic 바이오매스 처리시 현사시 목분을 415°C 초임계 전처리조건에서 생성된 1070 ppm 보다 현저히 낮은 수치로서 다른 전처리 공정에 비해 활성을 크게 저해하지 않을 것으로 사료된다 [16].

따라서 본 연구에 사용된 전처리 공정의 HMF 생성량은 다른 전처리 공정보다 그 수치가 적기 때문에 효소적응성 및 에탄올 발효에 활성저해가 적을 것으로 사료된다.

Table 3. Comparison of HMF concentrations in the hydrolysates after High Pressure Homogenization and acid treatment process

Method	HMF (mg/L)
High Pressure Homogenization Process*	160.9 ± 4.15
H ₂ SO ₄ acid pretreatment**	350
H ₂ SO ₄ acid pretreatment***	450

* Conditions of 30000 psi and 2 pass. Each value is presented as the mean ± S.E. of three independent experiments.

** Conditions of 2% H₂SO₄ acid pretreatment under 195°C and 15min reaction time.

*** Conditions of 4% H₂SO₄ acid pretreatment under 195°C and 15min reaction time.

3.4. 구멍갈파래 가수분해물의 에탄올 발효 공정

고압균질 전처리 공정의 낮은 HMF이 에탄올 발효에 미치는 영향을 알아보기 위해 구멍갈파래의 고압 균질 전처리 공정 및 효소처리 공정에 의해 얻어진 가수 분해물인 12.06 g/L의 glucose를 에탄올 발효실험을 하였으며, 그 결과를 Fig. 5

에 나타내었다. glucose에서 배양초기 5시간 동안은 glucose를 급격히 소모하였으며, 5시간 이후 부터로는 효모 이차 대사 산물인 바이오에탄올이 급격히 생성되었다. 20시간 이후에 배지에 남아있는 glucose를 거의 소모 하였으며, 바이오 에탄올의 농도는 5.43g/L의 에탄올이 생성 되었다. 구멍갈파래의 glucose로부터 에탄올의 생성 수율은 약 46.0%로 나타났다. 상기의 결과로 보아, 고압 균질 전처리 공정을 적용시켜 생성되는 HMF가 낮은 농도로 포함되어 있기 때문에 바이오매스의 전처리 과정에서 발생하는 가장 큰 문제점 중 하나인 발효저해 부산물의 내성을 가지는 에탄올 효모균주 개발을 거치지 않고, 기존에 사용 되어진 에탄올 발효 균주를 이용 하여도 높은 수준의 에탄올 생산이 가능함에 따라 에탄올 생산 공정에의 경제성, 효율성, 안정성 면에서 충분한 효과가 있을 것으로 사료된다.

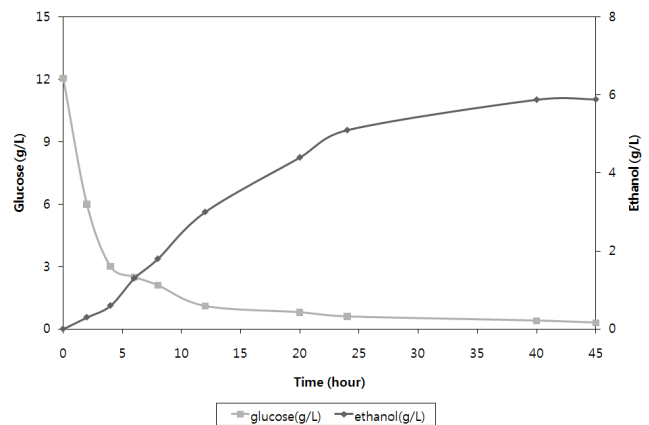


Fig. 5. Kinetics of glucose consumption and ethanol production during the fermentation of the hydrolysates.

4. 결론

고압 균질 전처리 공정을 통해 에탄올 생산을 위한 당화액 증진을 연구한 결과 구멍갈파래로부터 얻을 수 있는 최대 이론 수치인 glucose 6.7 g/L와 xylose 16.8 g/L에서부터 각각 glucose 16.02 (% w/w), xylose 14.70 (% w/w)의 전환 수율을 얻었다. 특히, 에탄올 발효에서 가장 중요한 C₆ 당인 glucose의 당화수율 결과 고압균질 전처리 공정의 경우 기존에 연구되어진 고압 액화 공정을 이용한 glucose의 전처리 수율인 11.2 (% w/w) 보다 약 5% 정도 높아진 고농도의 glucose를 얻었다. 또한, 고압균질 전처리 잔유물의 효소 처리 공정에서 가장 낮은 효소의 양으로 전처리하였을 경우 구멍갈파래의 cellulase와 amyloglucosidase 효소의 glucose 전환 수율은 각각 91.0 (% w/w)와 56.8% (% w/w)로 나타났으며, 본 공정을 통해 얻어진 발효저해물질인 HMF 값은 160.9 ppm의 수치로써 매우 낮은 양이 생성됨을 확인 하였다. 이러한 낮은 HMF 생산량은 에탄올 발효를 통해 그 효능을 입증 하였으며, 그 결과 약 48.7%의 높은 에탄올 수율을 나타내었다.

상기의 결과인 효율적인 효소당화 공정이 나타나는 것을

확인하고자 SEM images와 Distribution of nanoparticle using dynamic light scattering 분석을 통해 구멍갈과래 내부에 존재하는 저장당인 starch의 크기인 1~4 μm 보다 작은 1 μm 이하인 200~600 nm 크기로 분쇄된 것을 확인하였으며, 그 결과 starch를 이루고있는 결합이 파괴되어 전처리 후 잔유물의 표면적이 크게 증가함에 따라 효소당화과정에서 효소와 기질간 접촉 면적이 증가하여 빠른 시간 내에 다량의 glucose가 생성됨을 입증하였다.

감사

본 연구는 한국해양연구원 (과제번호: PE98592)의 지원으로 수행 되었기에 심심한 사의를 표합니다.

References

1. Wright, L. (2006) Worldwide commercial development of bioenergy with a focus on energy crop-based project. *Biomass Bioenerg.* 30: 706-714.
2. Saulnier, L., C. Marot, E. Chanliaud, and J. F. Thibault (1995) Cell wall polysaccharide interaction in maize bran. *Carbohydr. Polym.* 26: 279-287.
3. Kloareg, B. and R. S. Quatrano (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysical function of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 26: 259-315.
4. Davis, T. A., B. Volesky, and A. Mucci (2003) A Review of the Bio-chemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Res.* 37: 4311-4330.
5. Yu, Q. and P. Kaewsarn (1999) A model for pH dependent equilibrium of heavy metal biosorption. *Korean J. Chem. Eng.* 16: 753-757.
6. Lee, M. G., J. H. Lim, and S. K. Kam (2002) Biosorption characteristics in the mixed heavy metal solution by biosorbents of marine brown algae. *Korean J. Chem. Eng.* 19: 277-284.
7. Munoz, R. and B. Guieysse (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminant: A Review. *Water Res.* 40: 2799-2815.
8. Sugano, Y., H. Kodama, I. Terada, Y. Yamajakiand, and M. Noma (1994) Purification and characterization of a novel enzyme, α -neogargarooligosaccharide hydrolase, from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *J. Bacteriol.* 176: 6812-6818.
9. Han, J. G., S. H. Oh, M. H. Jeong, H. B. Seo, K. H. Jeong, and H. Y. Lee (2010) Enhancement of saccharification yield of *Ulva pertusa kjellman* for ethanol production through high temperature liquefaction process. *KSBB Journal.* 25: 245-362.
10. Lishi, Y., Z. Hongman, C. Jingwen, L. Zengxiang, J. Qiang, J. Honghua, and H. He (2008) Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery. *Bioresour. Technol.* 100: 1803-1808.
11. Koo, S. Y., K. H. Cha, and D. U. Lee (2007) Effects of high hydrostatic pressure of foods and biological system. *Food Sci. Ind.* 40: 23-30.
12. Zhang, S., J. Zhu, and C. Wang (2004) Novel high pressure extraction technology. *Inter. J. Pharma.* 278: 471-474.
13. Gray, K. A., L. Zhao, and M. Emphage (2006) Bioethanol. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 1-6.
14. Linde, M., M. Galbe, and G. Zacchi (2008) Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process stream from a dry-mill ethanol plant. *Bioresour. Technol.* 99: 6505-6511.
15. Mosier, N., R. Hendrickson, M. Ho, M. Sedlak, and M. R. Ladisch (2005) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 1986-1993.
16. Choi, J. W., H. J. Lim, K. S. Han, H. Y. Kang, and D. H. Choi (2005) Characterization of degradation features and degradative product of poplar wood (*populus alba* \times *glandulosa*) by flow type-supercritical water treatment. *J. Kor. For. En.* 24: 39-46.
17. Nathan, M., W. Charles, D. Bruce, E. Richard, Y. Y. Lee, H. Mark, and L. Michael (2005) Features of promising thechnologies for pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96: 673-686.
18. Chaogang, L. and C. E. Wyman (2005) Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresour. Technol.* 96: 1978-1985.
19. Lishi, Y., Z. Hongman, C. Jingwen, L. Zengxiang, J. Qiang, J. Honghua, and H. He (2008) Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery. *Bioresour. Technol.* 100: 1803-1808.
20. Nikolic, S., L. Mojovic, M. Rakin, D. Pejin, and D. Savic (2008) A microwave assisted liquefaction as a pretreatment for the bioethanol production by the simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quart.* 14: 231-234.
21. Kong, J. A., Y. S. Han, and T. Han (2002) Rhythmic phenomena in the green alga *Ulva pertusa kjellman*. *Algae.* 17: 259-265.