Weed Turf. Sci. 2(2):176~183, 2013
DOI:dx.doi.org/10.5660/WTS.2013.2.2.176
Print ISSN 2287-7924, Online ISSN 2288-3312

Weed & Turfgrass Science
The Korean Society of Weed Science and The Turfgrass Society of Korea

Research Article | Open Access

담수조류 그물말로부터 당 용액의 효율적 제조를 위한 가수분해 방법

김지현 · 김슬기 · 고은혜 · 김진철 · 김진석*
한국화학연구원 바이오화학연구센터

Hydrolysis Methods for the Efficient Manufacture of Sugar Solutions from the Freshwater Alga Water-net (*Hydrodictyon reticulatum*)

Ji-Hyun Kim, Sul Ki Kim, Eun Hye Ko, Jin-Cheol Kim and Jin-Seog Kim*
Research Center for Biobased Chemistry, Korea Research Institute of Chemical Technology, P.O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea
(Received on April 2, 2013; Revised on April 15, 2013; Accepted on April 25, 2013)

ABSTRACT. To explore hydrolysis methods for the efficient manufacture of sugar solutions from the freshwater alga Water-net (*Hydrodictyon reticulatum*, HR), acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, and combined hydrolysis (acid followed by enzymatic hydrolysis) were investigated. In the one-step acid hydrolysis, the reaction of 8% solids content using 2% sulfuric acid at 120°C for 1 hour was desirable. In this case, glucose 27.44 g 100 g DM^{-1} could be obtained from the HR-d13 samples. In the two-step acid hydrolysis, the primary hydrolysis (HR powder : 72% sulfuric acid = 1 g : 1.5 mL) was carried out for 1 hour at 60°C, and then the secondary hydrolysis was done for 1 hour at 120°C after addition of distilled water 23.5 mL. In this case, glucose 35.11 g/100 g DM could be obtained from the HR-d13 samples. In the combined hydrolysis, 25% solids content using 2% hydrochloric acid were reacted for 1 hour at 120°C, and then citrate buffer and hydrolysis enzyme complexes (E1 1.0 mL+E2 0.2 mL g^{-1} dried matter) were added and reacted for 1 – 2 days at 50°C. In this case, glucose 33.5 g 100 g DM^{-1} could be obtained from the HR-d23+26 samples. In conclusion, combined hydrolysis was likely to be more useful saccharification method of HR biomass at a practical level, considering the glucose productivity, generation of fermentation-inhibiting substances (hydroxyl methyl furfural, furfural), and limited use of strong acid.

***Key words*:** Acid hydrolysis, Freshwater algae, *Hydrodictyon reticulatum*, Saccarification

서 론

석유자원의 고갈, 에너지 수요 증가, 지구온난화와 CO_2 배출, 환경규제 강화 등 여러 문제에 직면한 상황에서 미래 환경과 자원고갈에 슬기롭게 대비하기 위해서는 필수적으로 식물자원 바이오매스의 효율적 활용기술 개발이 필요한 바, 이에 적합한 식물자원중의 하나는 제3세대 바이오매스로 알려진 조류(algae)이다(Kim et al 2012). 왜냐하면 algae는 대부분 비식용자원으로서 담수 또는 해수 등 다양한 환경에서 생장이 가능하고 생장속도가 빠르며, 이산화탄소 고함유 폐가스나 각종 폐수를 활용하여 대량생산할 수도 있기 때문이다(Brennan and Owende, 2010; Mata et al., 2010). 특히 조류 중에는 특정 성분이 고함량 존재하는 종들이 많고, 리그닌이 거의 없기 때문에 리그노셀룰로오스계 바이오매스(리그닌 15~30% 함유)보다 값싼 공정개발이 가능하다. 그리하여 최근 미세조류 또는 해양 거대조류를 활용하여 바이오연료 또는 바이오화학소재 생산을 위한 많은 연구(Adams et al., 2009; Choi et al., 2010; Ge et al., 2011; Harun et al., 2010; Isa et al., 2009; John et al., 2011; Lee et al., 2009; Mata et al., 2010; Nguyen et al., 2012; Scott et al., 2010; Ueno et al., 1998)가 추진되고 있으며, 성분 활용이라는 측면에서 고려해 볼 때 크게 두 그룹의 연구내용이 진행되고 있다. 하나는 지질 고생산 조류종을 가지고 비이오디젤 또는 기능성 소재(DHA, astaxanthin 등) 등을 생산하는 연구이며, 다른 하나는 탄

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

수화물 고생산 조류종을 가지고 발효당을 얻어 바이오알콜, 유기산, 기타 바이오화학소재를 생산하는 내용이다.

탄수화물 기반 바이오매스 활용에 있어서 가장 중요한 기술 중의 하나는 고품질의 발효당을 얻기 위한 전처리/당화(가수분해) 기술로서 바이오매스 내의 고분자 탄수화물을 (cellulose, hemicellulose, starch 등) 저분자의 당(glucose, mannose, galactose 등)으로 전환시키는데 있어서 단당류로의 전환율을 높이고, 생산공정이 친환경적이며, 생산된 발효당의 품질이 우수하고(발효억제물질 함유량이 낮을 것), 아울러 보다 낮은 비용의 공정기술을 확보하는 것이 필요하다(Alvira et al., 2010; Daroch et al., 2013). Algae는 리그닌이 거의 없기 때문에 리그노셀룰로오스계 바이오매스에 비하여 전반적으로 전처리/당화조건이 보다 용이하다고 알려지고 있지만(Daroch et al., 2013) 발효당을 고효율로 얻기 위해서는 바이오매스의 물리화학적 특성에 따라 이에 부합된 최적의 전처리/당화조건이 각각 확립되어야 한다.

현재 바이오화학산업용 바이오매스의 원료로서 산업화되는 것은 주로 농산물(옥수수, 밀 등의 곡물) 또는 농산물 부산물이다. 그러나 앞으로는 적어도 바이오화학산업용으로 사용될 바이오매스의 경우는 농산물과 경합되지 않는 바이오매스로 대체하는 것이 바람직하며, 또한 생산된 바이오화학제품의 가격 경쟁력을 갖추기 위해서는 바이오매스 활용에 있어서도 저에너지/저비용 공정 기술이 확립되어야 할 것이다. 그물말(*Hydrodictyon reticulum*, HR)은 담수녹조류 중의 하나로서 생장이 빠르고 수확하기가 용이한 사상조류의 일종이며, 탄수화물 축적이 높고 당화하기 용이한 특성을 가진다고 보고되었다(Kim et al., 2012). HR을 바이오화학산업제품의 범용 원료소재로서 사용하기 위해서는 당화용액을 제조하여 이를 기반 화학물질(platform chemicals)의 생산기질로 이용하는 방법이 가장 바람직한데, 이를 위해서는 경제성 확보가 우선이므로 가장 낮은 비용으로 당화시킬 수 있는 기술이 확립되어야 할 것이다. 본 연구에서는 당용액의 실용적 생산에 있어서 가장 비용이 낮게 소요된다고 알려진 산가수분해(acid hydrolysis)를 중심으로, HR 당화공정을 확립하기 위한 최적 가수분해조건을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

담수 녹조류 중의 하나인 그물말(*Hydrodictyon reticulatum,* HR)은 대전시 유성구 소재 갑천에서 수집하여 실내에서 배양한 것을 45ºC 건조기에서 2~4일 말린 후 믹서기로 분말화하여 비닐플라스틱 봉지에 담고 4ºC에 보관하면서 실험재료로 사용하였다. 미세조류 실내배양에는 기본 조류배양배지(Allen's medium)에 25ºC 항온, 12시간 광주기, 50~130 μmol $m^{-2}s^{-1}$의 광도에서 7~15일 배양하여 사용하였다(Kim et al., 2012).

당화효소

당화효소는 cellulase(Celluclast 1.5 L 또는 Celluclast Conc. BG, Novozymes사 제품, E1으로 표시)와 β-glucosidase (Sigma C6105, 311 U/mL, E2로 표시)를 사용하였다. Celluclast Conc. BG의 경우는 1 g의 효소파우더를 5 mL의 1M citrate buffer (pH 4.8)에 녹여서 64 FPU mL^{-1}의 효소활성을 가진 용액으로 만들어 사용하였다.

One-step acid hydrolysis

산 농도, 반응온도 및 시간에 따른 당화율

건조된 HR 분말 1 g을 28 mL 유리 시험관에 담고, 0~10% 황산 12.5 mL를 주입한 다음 잘 섞어주었다. 이를 알루미늄 pressure vessel에 넣고, 120~150ºC에서 1시간 동안 산가수분해 반응을 시켰다. 그 후 $CaCO_3$로 반응액을 중화시키고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상징액을 취한 다음, 얻어진 가수분해물에 대해 glucose, 환원당, hydroxyl methyl furfural(HMF) 및 furfural 분석을 실시하였다.

고형분 함량에 따른 당화율

건조된 HR 분말(0.25, 0.5, 0.75, 1 g)을 28 mL 유리 시험관에 담고 2% 황산 12.5 mL를 주입한 다음 잘 섞어주었다. 이를 알루미늄 pressure vessel에 넣고, 120ºC에서 1시간 동안 산가수분해 반응을 시켰다. 그 후 $CaCO_3$로 반응액을 중화시키고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상징액을 취한 다음, 얻어진 가수분해물에 대해 glucose, 환원당, HMF 및 furfural 분석을 실시하였다.

Two-step acid hydrolysis

1차 가수분해시의 고형분 함량/산용액 부피 차이에 따른 당화

건조된 HR 분말(0.1 g, 1.0 g)을 28 mL 유리 시험관에 담고, 72% 황산을 1.0 mL 또는 1.5 mL를 주입하여 10분마다 저어주면서 25ºC 수조에서 1시간 동안 반응시켰다(1차 산가수분해). 그 후 1차 산가수분해물에 증류수 23.5~24 mL를 가하고 1분 동안 잘 섞어준 다음 알루미늄 pressure vessel에 시험관을 넣고, 120ºC에서 1시간 동안 2차 가수분해를 실시하였다. 가수분해 종료 후 $CaCO_3$로 반응액을 중화시키고, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상징액을 취한 다음, 얻어진 가수분해물에 대해 glucose, 환원당, HMF

및 furfural 분석을 실시하였다.

1차 가수분해시의 반응온도 차이에 따른 당화

건조된 HR 분말 1.0 g을 28 mL 유리 시험관에 담고, 72% 황산을 1.5 mL를 주입하여 10분 마다 저어주면서 수조에서 여러 온도별로(30~80°C) 1시간 동안 1차 가수분해를 실시하였다. 그 후 1차 산가수분해물에 증류수 23.5 mL를 넣은 다음 120°C에서 1시간 동안 2차 산가수분해를 실시하였고, 나머지 실험 과정은 1차 가수분해에서 기술한 바와 같다.

산+효소 복합가수분해(Combined hydrolysis)

건조된 HR 분말 5 g에 2% HCl 20 mL를 넣고 섞어준 다음 위에서와 같이 120°C에서 1시간 동안 산가수분해를 하였다. 얻어진 산가수분해물을 10 N NaOH로 pH 4.8~5.0까지 중화시켜 125 mL 삼각플라스크에 옮겼다. 그 후 1% NaN_3가 포함된 0.1 M citrate buffer를 여러 부피(3.8, 4.88, 10.8, 11.88, 22.8, 23.88 mL)로 주입하여 잘 혼합한 다음 당화효소 E1+E2 (0.12~1.2 mL)를 가하였다. 조제된 반응용액을 Shaking incubator에 넣고, 150 rpm, 50°C에서 24시간 동안 효소가수분해를 실시하였다. 반응 종료 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻어진 상징액에 대하여 glucose, 환원당, HMF 및 furfural 분석을 실시하였다.

분석 방법

Glucose 정량

D-glucose의 정량은 YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Incorporated, Ohio, USA)를 가지고 제시된 assay kit를 이용하여 분석하였다.

환원당 정량

환원당 정량은 3,5-dinitrosalicylic acid를 포함한 DNS reagent를 시료와 혼합하여 100°C 수조에서 5분 30초 동안 반응시킨 후 spectrophotometer에서 540 nm의 흡광도를 측정하였다(Matrai et al., 2000; Nguyen et al., 2012). 환원당의 표준곡선은 D-glucose를 농도별로 희석하여 시료와 동일하게 DNS reagent와 반응 시킨 후 흡광도를 측정하여 작성하였다.

HMF 및 furfural 분석

HPLC(Waters사)를 사용하여 280 nm에서 HMF 또는 furfural을 정량하였다. Column은 Comosil 5C18-MS-II (4×150 mm)을 사용하였고, 이동상은 0분 water : methanol (98 : 2, v/v), 10분 water : methanol (75 : 25, v/v), 15분 water : methanol (40 : 60, v/v), 20분 water : methanol (0 : 100, v/v), 30분 water : methanol (0 : 100, v/v)로 설정하여 수행하였고, flow rate는 0.6 mL min^{-1} 이었다. 분석시료(가수분해물)는 membrane filter (40 μm)로 여과한 후 주입하였고, 표준물질을 메탄올로 용해한 다음 검량선을 작성하여 정량에 이용하였다.

결과 및 고찰

One-step acid hydrolysis

담수조류인 HR의 가수분해를 보다 저비용으로 수행할 수 있는 방안으로서 산당화 조건을 검토하였다. 바이오매스의 산당화를 실시할 때 보다 경제성을 확보하려면 저농도 고형분 함량보다는 고농도 고형분 함량에서의 당화조건을 확립하는 것이 바람직하다. 먼저 고형분 함량 8% 수준에서 one-step acid hydrolysis를 실시하였다. 이때 당화시 얻어지는 단당류가 많이 생성될수록 좋고, 아울러 대표적인 발효억제물질로 알려져 있는 HMF와 furfural이 산가수분해동안 각각 6탄당 및 5탄당으로부터 자연 생성되는데(Qian et al., 2005), 이들 성분의 생성을 최소화시키기 위해서는 산처리 농도, 반응시간, 반응온도 등의 최적화가 필요하다. 이를 위해 여러 산 농도에서 반응온도 및 시간차이에 따른 당 수득율 및 발효억제물질 생성정도를 비교한 결과, 2% 이상의 황산을 이용하여 120°C에서 1시간동안 가수분해 시킬 경우 다른 산처리 조건에서보다 glucose 생성량이 높았다(Table 1). 그렇지만 본 실험의 산가수분해 조건에서 가장 높게 생성된 glucose 함량은 27.4 g 100 g DM^{-1}수준으로서, 사전 실험에서 8% 고형분함량에서 효소가수분해를 통해서 얻었던 glucose 생성량(37.4 g 100 g DM^{-1})의 73%에 불과한 수치이다. 그리고 150°C에서 산가수분해를 할 경우에는 2% 황산까지 glucose 생성

Table 1. Effect of various conditions on the saccharification of *H. reticulatum* in one-step acid hydrolysis method.

Sulfuric acid (%)	Glucose (g 100 g DM^{-1})		
	120°C, 1hr	150°C, 0.5hr	150°C, 1.0hr
0	0.00±0.00	0.00±0.00	0.03±0.04
1	5.13±0.00	23.00±0.18	22.56±0.35
2	26.31±0.18	25.44±0.18	23.31±0.09
3	-	23.88±0.00	20.53±0.22
4	26.63±0.09	20.31±0.18	16.97±0.04
5	27.19±0.27	16.59±0.22	11.72±0.04
6	26.84±0.22	18.94±0.18	16.78±0.22
7	27.41±0.04	16.22±0.13	13.94±0.09
8	27.34±0.04	22.97±0.04	9.28±0.04
10	27.41±0.66	-	-

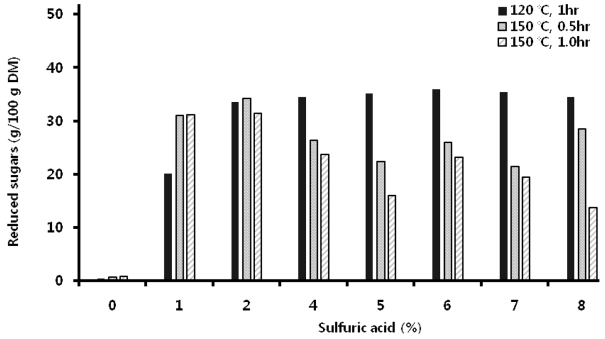

Fig. 1. Effect of various sulfuric acid concentrations on the generation of reduced sugars from *H. reticulatum* by one-step acid hydrolysis method.

량이 증가하다가 그 이상의 산농도에서는 산농도가 증가할수록 glucose 생성량이 점차 감소되는 경향을 보였는데, 그 정도는 0.5시간 처리보다 1시간 처리에서 더 뚜렷하였다(Table 1). 이는 강산조건으로 인해 당이 타 성분으로 전환되기 때문으로 판단되었다. 이러한 결과는 환원당의 생성에서도 유사한 경향이었다(Fig. 1). 한편 단당류의 가수분해 산물이면서 발효억제물질로서 알려진 HMF+furfural 함량을 조사한 결과를 보면 예상한 바와 같이 120°C 처리조건에서보다 150°C 처리조건에서 그 함량이 높은 경향이었다. 즉, 120°C 1시간 반응의 경우 5%까지 황산농도가 증가함에 따라 HMF 또는 furfural도 증가하였지만 5% 이상의 황산농도에서는 별다른 차이가 없었다. 한편 150°C 처리의 경우는 2%까지 황산농도가 증가함에 따라 HMF 또는 furfural도 증가하였지만, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다(Fig. 2). 이들 실험결과로부터 2%의 황산 용액으로 120°C에서 1시간동안 가수분해시킬 때 상대적으로 당수율도 우수하고, HMF+furfural 생성량도 낮은 것으로 판단되었다(Table 1, Fig. 2).

다음으로는 one-step acid hydrolysis에 있어서 적정 HR

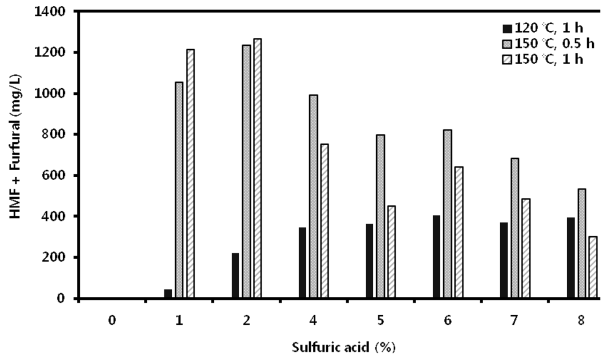

Fig. 2. Effect of various sulfuric acid concentrations on the generation of HMF and furfural from *H. reticulatum* by one-step acid hydrolysis method.

Table 2. Effect of various solid contents on the saccharification of *H. reticulatum* in one-step acid hydrolysis method.

Powder of HR-d13 (w/v)	Glucose (g 100 g DM^{-1})	Reduced sugars (g 100g DM^{-1})	HMF (mg L^{-1})	Furfural (mg L^{-1})
2%	27.00±0.74	49.74±0.60	62.5±3.5	8.5±0.7
4%	27.44±0.16	44.42±2.00	120.0±7.1	13.0±0.0
6%	26.40±0.98	40.68±1.88	183.0±4.2	18.5±0.7
8%	26.30±2.02	35.17±0.75	261.0±2.8	27.5±0.7

고형분 함량을 알아보기 위해 위 실험에서 확립한 2% 황산, 120°C 1시간 가수분해 조건에서 HR 고형분 함량별 당화정도의 차이를 조사하였다. 그 결과, 2~4% 고형분에서 glucose 생성량이 27 g 100 g DM^{-1} 내외였으나 그 이상의 고형분에서는 glucose 생성량이 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 그 차이는 미약하였다(Table 2). 그러나 HMF+furfural 생성량은 고형분의 농도가 높아짐에 따라 뚜렷하게 증가하였다.

따라서 최소한의 발효억제물질 생성과 최대한의 당수득율, 공정비용 절감 등을 고려하여 HR의 one-step acid hydrolysis는 120°C에서 4% 고형분을 2%의 황산 용액에서 1시간동안 반응시키는 것이 적절한 것으로 판단되었다. 그런데 이러한 one-step acid hydrolysis에서 생성되는 glucose 함량도 사전실험의 효소당화시 보다는 낮은 수준이므로 보다 개선된 방법의 탐색이 요구되었다.

Two-step acid hydrolysis

보다 개선된 산가수분해를 위해 two-step acid hydrolysis를 실시하였다. 이는 1차, 2차 산 가수분해를 통해 당화하는 과정으로서 1차 산 가수분해는 고농도 산용액에서(72% 황산) 신속히 조직을 swelling 및 softening 시키고, 2차 가수분해에서 고분자를 보다 효율적으로 단당화시키고자 하는 방법이다(NREL, 2010).

본 실험에서는 먼저 적정 HR 고형분 함량을 알아보고자 실험하였다. 기본 실험조건은 72% 황산 1 mL를 30°C에서 1시간 동안 1차 처리한 후, 증류수 24 mL를 추가하여 120°C에서 1시간 동안 2차 산가수분해 반응을 실시하였다. 그 결과, 고형분 함량이 증가될수록 glucose 생성량은 감소하는 경향이었다(Table 3). 2차 산가수분해 당시의 고형분 함량을 기준으로 검토하여 보았을 때, 0.4% 고형분 함량에서 glucose 생성량이 35.88 g 100 g DM^{-1} 이었고, 4% 고형분 함량에서의 glucose 생성량은 29.3 g 100 g DM^{-1} 이었으며 4% 고형분 함량의 one-step acid hydrolysis 결과와 비교해 볼 때 약간 증가된 생산성을 나타내었다.

한편 1차 산 가수분해시의 산용액(72% 황산) 부피를 1 mL

Table 3. Saccharification efficiency according to solid contents of *H. reticulatum* in two-step acid hydrolysis method.

Dried matter of HR-d13 in second-step (w/v)	Glucose (g 100 g DM^{-1})	HMF (mg L^{-1})	Furfural (mg L^{-1})
0.4%	35.88±2.81	17.0±4.2	0.0±0.0
1.0%	32.70±1.25	59.5±0.7	12.0±1.4
2.0%	31.00±0.87	86.0±31.1	15.0±8.9
3.0%	30.08±1.33	148.0±21.2	25.0±2.8
4.0%	29.29±0.58	222.5±34.7	38.5±10.6

에서 1.5 mL로 증가시킨 후 당화율을 검토해 보았다. HR 4% 고형분 함량 조건에서 위의 실험조건과 동일하게 two-step hydrolysis를 실시한 결과, 1차 가수분해 산용액 부피를 1.5 mL로 하였을 때 glucose 생성량이 31.50 g 100 g DM^{-1}로서 1.0 mL 처리에서의 glucose 생성량(30.33 g 100 g DM^{-1}) 보다 증가하였다. 그런데 HMF 및 furfural 생성은 1.5 mL 첨가구에서 2배 이상 낮았다(Table 4).

지금까지의 실험을 통해서 확립한 조건(4% 고형분 함량, 1차 가수분해시 72% 황산 1.5 mL를 30°C에서 1시간 동안 반응한 후, 2차 산 가수분해시 증류수를 넣은 후 120°C에서 1시간 동안 반응)에서 1차 가수분해시의 온도를 30°C에서 80°C까지 달리하여 당화실험을 실시하였다. 그 결과, glucose 생성량의 경우 60°C까지 온도가 증가할수록 증가하다가 60°C 이상부터는 점차 감소하는 경향이었다(Table 5). 그리고 60°C에서의 glucose 생성량은 효소당화시킨 것과 유사하였다. 아울러 HMF 및 furfural 생성량도 60°C에서 가장 낮은 것으로 나타났다. 결과적으로, HR-d13의 4% 고형분 함량조건에서 HR 건조중 : 72% 황산을 1 g : 1.5 mL로 하여 1시간 동안 1차 가수분해시킨 다음, 증류수 23.5 mL를 가한 후 120°C에서 1시간 가수분해하면 가장 바람직한 당화 결과를 보여주는 것으로 확인되었다. HR-d13 시료는 고형분 함량 2%와 8% 조건에서 효소당화시킬 경우 glucose 생성량이 각각 40.8, 37.47 g 100 g DM^{-1} 이었다. 결국 산가수분해만을 통해서 효소당화의 90-95%까지 glucose를 수득할 수 있기 때문에 1차 가수분해 시 강산을 사용한다는 점이 단점이 있기는 하지만, 본 공정은 보다 빠른 시간 내에 HR로부터 저비용으로 당화액을 조제할 수 있는 방법이 될 것으로 판단되었다.

산+효소 복합가수분해

산가수분해만을 실시할 경우 저비용 당화액 조제에는 바람직할지라도 환경 위해물질 배출, 장비 부식, 고농도 당화의 한계 등 여러 단점이 지적되고 있다(Mosier et al. 2005). 이러한 단점을 최소화시키면서 보다 고농도 고형분에서 당화시킬 수 있는 방법을 확립하고자 본 연구에서는 산가수분해와 효소가수분해를 조합하여 실시하였다. 예비실험 결과, 초기 산가수분해시 고농도 고형분을 사용하고자 할 때는 황산보다 염산을 사용하는 것이 glucose의 생산에 유리하였고 HR-d23+26 건조분말 5 g에 2% 염산 20 mL 사용하여 120°C에서 1시간 반응하는 것이 바람직하였다. 따라서 이들 산가수분해 조건을 고정시키고 이후 효소가수분해시의 buffer 추가량 및 효소 첨가량의 최적조건을 파악하기 위한 실험 결과, glucose 생산량은 첨가된

Table 4. Saccharification efficiency of *H. reticulatum* according to acid volumes in two-step acid hydrolysis method.

Dried matter of HR-d13 in second-step (w/v)	Acid volumes in first-step	Glucose (g 100 g DM^{-1})	Reduced sugars (g 100 g DM^{-1})	HMF (mg L^{-1})	Furfural (mg L^{-1})
0.4%	1.0 mL	34.63±0.25	59.12±3.00	15.38±3.56	2.55±0.17
4%		30.33±0.19	50.74±5.52	314.45±35.29	59.37±18.13
4%	1.5 mL	31.50±0.67	49.98±0.13	108.15±9.39	25.57±4.19

Table 5. Saccharification efficiency of *H. reticulatum* according to the reaction temperatures at first-step of two-step acid hydrolysis method.

Dried matter of HR-d13 in second-step (w/v)	Reaction temp at first-step	Glucose (g 100g DM^{-1})	Reduced sugars (g 100g DM^{-1})	HMF (mg L^{-1})	Furfural (mg L^{-1})
4%	30 °C	29.97±0.49	47.13±0.11	119.75±47.02	26.00±14.14
	40 °C	32.33±0.56	48.06±1.51	118.00±16.97	24.75±6.01
	50 °C	32.51±1.40	46.76±0.57	104.25±9.55	17.50±0.00
	60 °C	35.11±0.51	49.64±0.43	100.00±0.71	16.00±0.00
	70 °C	29.61±1.02	45.08±0.92	128.75±13.08	18.50±4.24
	80 °C	28.23±1.30	43.41±1.40	118.00±14.85	18.75±6.72

Table 6. Saccharification efficiency of *H. reticulatum* (HR-d23+26) by combined hydrolysis method.

Buffer[1)] (mL g DM^{-1})	Enzymes (mL g DM^{-1})		Glucose	Reduced sugar	HMF	Furfural
	E1	E2	(g 100 g DM^{-1})		(mg L^{-1})	
3.8	1	0.2	30.0±0.61	28.8±0.03	370±120	50±0
4.88	0.1	0.02	23.4±0.39	26.2±0.09	320±110	50±10
10.8	1	0.2	32.0±1.14	31.9±1.72	350±110	40±10
11.88	0.1	0.02	24.9±0.28	30.5±0.07	530±70	70±20
22.8	1	0.2	33.5±1.14	40.9±0.78	340±70	50±0
23.88	0.1	0.02	27.7±0.37	36.1±0.68	150±20	20±0

[1)]After 5 g dried matter of HR was pre-treated in 20 mL 2% HCl, different volumes of buffer were added for enzymatic hydrolysis.

buffer양이 많아질수록 증가되었고, E1+E2 효소의 고농도(1+0.2 mL g DM^{-1}) 처리시가 저농도(0.1+0.02 mL g DM^{-1}) 처리시보다 glucose 생성율이 약 25% 증가되었다(Table 6). 이는 반응액의 점도와 관련이 있을 것으로 추정된다. 결국 1차 산가수분해물에 buffer 22.8 mL를 추가하고 E1 + E2 효소를 각각 1+0.2 mL g DM^{-1} 첨가하여 효소가수분해를 실시했을 때 glucose 생성량이 33.5 g 100 g DM^{-1} 으로서 가장 우수한 결과를 보였다(Table 6). 이는 초기 고형분 함량이 25%인 조건에서 산가수분해를 실시하고, 이어서 4.0% 고형분 함량이 되도록 buffer와 효소를 첨가한 다음 효소가수분해를 실시하는 과정으로서, 궁극적으로 고농도 고형분 함량에서 산 또는 효소 단독으로 가수분해를 수행하는 것보다 우수한 당화 결과를 보여 주었다. 이러한 판단의 근거는 본 실험에 사용되었던 HR-d23+26시료의 경우, 예비실험에서 10% 고형분 함량의 효소가수분해만을 통해 33.8 g 100 g DM^{-1} 의 glucose 생성량을, two-step acid hydrolysis에서는 0.4% 고형분 함량에서 33.5 g 100 g DM^{-1} 을 나타내었었기 때문이다.

이상의 결과로부터, HR의 당화를 위해서는 효소가수분해와(Kim et al. 2012) 더불어 two-step acid hydrolysis와 산+효소 복합가수분해(combined hydrolysis)가 우수한 것으로 나타났다. 즉, two-step acid hydrolysis에서는 효소가수분해의 94% 수준에 달하는 glucose를 얻을 수 있었고, combined hydrolysis를 통해서는 고농도 고형분 함량(25%)에서 가수분해를 시작하여 비슷한 량의 glucose를 생산 할 수 있었다. 일반적으로 산가수분해의 경우는 지금까지 보고된 기술 중에서 상대적으로 가장 값싼 공정으로 인정받고 있으나 장비 부식, 산용액 배출, 발효억제물질 HMF 또는 fufural의 용이한 발생 등이 단점으로 지적되고 있다. 효소가수분해의 경우는 높은 효소 생산 비용과 낮은 반응속도로 인해 공정 비용이 상대적으로 높아지는 단점이 있으나, 반응에 투입되는 에너지가 낮고, 효소 조합에 따라 전체적인 당화율을 조절할 수 있으며, 발효억제물질인 HMF+fufural 생성이 거의 없고, 친환경적인 공정이라는 장점을 가지고 있다. 산+효소 복합가수분해는 산 또는 효소가수분해 보다 공정단계가 한 단계 추가되지만 이들의 장단점을 적당히 조절하면 당화효율을 높이면서 고품질의 당용액을 생산할 수 있는 조건확립이 가능하다(Wingren et al., 2005). 따라서 실용적 차원에서 HR을 당화시키고자 할 경우에는 상기 방법들의 장단점을 고려하여 주변 상황에 맞는 당화조건을 선택, 운용하는 것이 바람직할 것이다.

그 동안 미세조류(microalgae) 및 거대조류(macroalgae)의 당화에 관한 연구는 몇몇 조건에서 시도되어 왔다(Daroch et al., 2013). 먼저 미세조류에서 산가수분해를 이용한 방법으로 *Chlorella* (0.2 g)을 2% HCl+2.5% $MgCl_2$에 넣고, 180°C에서 10분 동안 반응시켰을 때 83.47%의 당화율을 얻었고 (Zhou et al., 2011), *Scenedesmus obliquus* (5 g)을 2 N H_2SO_4에 넣고 120°C에서 30분 동안 반응시킬 경우 89.9%의 당화율을 얻을 수 있었다 (Miranda et al., 2012). 알카리 가수분해방법으로서 미세조류 *Chlorococcum infusionum* (5 g)을 0.75% NaOH에 넣고, 120°C에서 30분 동안 반응시킬 경우 약 35%가 당화되었다 (Harun et al., 2011). α-amylase를 이용하여 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii* (5 g)을 90°C에서 30분 동안 반응시킬 경우 dextrin 25.21 g L^{-1}이 얻어졌다 (Choi et al., 2010). 한편 거대조류의 경우, *U. pertusa*를 5~20% H_2SO_4를 사용하여 one-step acid hydrolysis시킬 경우 3% 고형분 함량에서 ramnose 38%+glucose 16%가 얻어졌고, 91.46%의 당화율을 나타내었다(Jang et al., 2012). 같은 실험에서 *G. amansii*를 사용할 경우에는 3% 고형분 함량에서 galactose 49%+glucose 13%가 얻어졌고, 80.71%의 당화율을 나타내었다. *G. amansii* (1 g)를 3% H_2SO_4를 사용하여 tow-step acid hydrolysis시킬 cellulose 기준으로 68.58%의 전환율을 얻었다(Jeong et al., 2011). 한편 *Ulva pertusa*의 4% 고형분 함량을 5% 알칼리 과산화수소 용액에서 60°C 3 시간 동안 전처리 한 후, cellulose+viscozyme으로 효소가수분해시킬 글루코오스 전환율이 65% 정도로

나타났다 (Yoon et al., 2011). 이상에서 보는 바와 같이 기존의 연구되었던 여러 조건과 본 연구의 HR 가수분해 조건을 종합적으로 비교해보았을 때, HR은 특별한 전처리 없이 보다 완화된 조건에서 당화가 용이하게 이루어짐을 확인할 수 있었다(Kim et al. 2012). 이는 HR이 보다 친환경적으로, 또한 저비용으로 당용액을 제조할 수 있음을 의미하므로 향후 당용액을 이용한 바이오화학제품 제조 시 보다 경쟁력 있는 공정이 개발될 수 있으리라고 여겨진다.

요 약

담수조류인 그물말 (*Hydrodictyon reticulatum*, HR)의 실용적 당화조건 확립을 위해 산 가수분해 방법으로서 one-step acid hydrolysis과 two-step acid hydrolysis, 그리고 산 가수분해 후 효소가수분해를 병행하는 combined hydrolysis를 검토하였다. One-step acid hydrolysis의 경우, 120°C에서 HR 4% 고형분을 2% 황산 용액에 넣어 1시간 동안 반응시킬 경우가 적정하였다. Two-step acid hydrolysis의 적정 조건은 1차 가수분해시 HR 건조중: 72% 황산을 1 g : 1.5 mL로 하여 60°C에서 1시간 반응시킨 다음, 증류수 23.5 mL를 첨가하고 120°C에서 1시간 가수분해시키는 것이었다. Combined hydrolysis의 경우, 2% 염산에 25%의 HR 고형분을 넣고 120°C에서 1시간 반응시킨 후, citrate buffer로 4% 고형분 함량이 되도록 희석하고 E1+E2 효소를 각각 1+0.2 mL g DM^{-1} 수준으로 첨가하여 50°C에서 1~2일 동안 반응시키는 것이 바람직하였다. Glucose 생성량, 발효억제물질(HMF, furfural) 생성량, 강산 사용제한 등을 종합적으로 감안할 때, combined hydolysis가 보다 유용할 것으로 판단되었다.

주요어: 산가수분해, 담수조류, 그물말, 당화

Acknowledgments

This study was financially supported by the “Eco-innovation Program of KEITI (Project No. 405-112-034)” and “KRICT own project”.

References

Adams, J.M., Gallagher, J.A. and Donnison, I.S. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. J. Appl. Phycol. 21:569-574.

Alvira, P., Tomás-Pejó, E., Ballesteros M., and Negro, M.J.. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. Bioresour. Technol. 101:4851-4861.

Brennan, J. and Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew. Sustain. Energy Rev. 14: 557-577.

Choi, S.P., Nguyen, M.T. and Sim, S.J. 2010. Enzymatic pretreatment of *Chlamydomonas reinhardtii* biomass for ethanol production. Bioresour. Technol. 101:5330-5336.

Daroch, M., Geng, S. and Wang, G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. Applied Energy 102:1371-1381.

Ge, L., Wang, P. and Mou, H. 2011. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. Renewable Energy 36:84-89.

Harun, R., Singh, M., Forde, G.M. and Danquah, M.K. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. Renew. Sustain. Energy Rev. 14:1037-1047.

Harun, R., Jason, W.S.Y., Cherrington, T. and Danquah, M.K. 2011. Exploring alkaline pre-treatment of microalgal biomass for bioethanol production, Appl. Energy 88:3464-3467.

Isa, A., Mishima, Y., Takimura, O. and Minowa, T. 2009. Preliminary study on ethanol production by using macro green algae. J. Japan Inst. Energy 88:912-917.(In Japanese)

Jang, S.S., Shirai, Y., Uchida, M. and Wakisaka, M. 2012. Production of mono sugar from acid hydrolysis of seaweed. Afri. J. Biotechnol. 11:1953-1963.

Jeong, T.S., Kim, Y.S. and Oh, K.K. 2011. Two-stage acid saccharification of fractionated *Gelidium amansii* minimizing the sugar decomposition. Biotechnol. Bioeng. 102,:10529-10534.

John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. Bioresour. Technol. 102:186-193.

Kim, S.K,. Hwang, H.J., Kim, J.D., Ko, E.H., Choi, J.S. et al. 2012. Usefulness of freshwater alga water-net (*Hydrodictyon reticulatum*) as resources for production of fermentable sugars. Korean J. Weed Sci. 32: 85-97.(In Korean)

Lee, S.M., Yu, B.J., Kim, Y.M., Choi, S.J., Ha, J.M. et al. 2009. Production of bio-ethanol agar using *Saccharomyces cerevisiae*. J. Korean Ind. Eng. Chem. 20:290-295. (In Korean)

Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. Renew. Sustain. Energy Rev. 14:217-232.

Matrai, T., Mayer, S., Kokai, S. and Salamon, I. 2000. Invertase

production of common storage moulds in food and feed grains as a possibility for rapid detection of *Aspergillus flavus* group and *Aspergillus fumigatus*. Int. J. Food Microbiol. 61:187-191.

Miranda, J.R., Passarinho, P.C. and Gouveia, L. 2012. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. Bioresour. Technol. 104:342-348.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., et al. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 96: 673-686.

Nguyen, C.M., Kim, J.S., Hwang, H.J., Park, M.S., Choi, G.J., et al. 2012. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, Makgeolli. Bioresour. Technol. 110:552-559.

NREL. 2010. Chemical analysis and testing standard procedure, No. 001-014, National Renewable Energy Labs., Golden, CO. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures. (Accessed on March 5, 2013)

Qian, X., Nimlos, M.R., Johnson, D.K. and Himmel, M.E. 2005. Acidic sugar degradation pathways. App. Biochem. Biotechnol. 124:989-997.

Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I., Howe, C.J., et al. 2010. Biodiesel from algae: challenges and prospects. Current Opinion in Biotech. 21:277-286.

Ueno, Y., Kurano, N. and Miyachi. S. 1998. Ethanol production by dark fermentation in the marine green alga, *Chlorococcum littorale*. J. Ferment. Bioeng. 86:38-43.

Wingren, A., Galbe, M., Roslander, C., Rudol, A. and Zacchi, G. 2005. Effect of reduction in yeast and enzyme concentrations in a simultaneous saccharification and fermentation-based bioethanol process: technical and economic evaluation. Appl. Biochem. Biotechnol. 121:485-499.

Yoon, B.T., Kim, Y.W., Chung, K.W. and Kim, J.S. 2011. Enzymatic hydrolysis of pre-treated *Ulva pertusa* with alkaline peroxide. Appl. Chem. Eng. 22:336-343. (In Korean)

Zhou, N., Zhang, Y., Wu, X., Gong, X. and Wang, Q. 2011. Hydrolysis of *Chlorella* biomass for fermentable sugars in the presence of HCl and $MgCl_2$. Bioresour. Technol. 102:10158-10161.