

만니톨의 효소 가수분해 반응 조건 최적화

박은영¹, 김용진^{2*}, 정승미², 이동훈¹

Optimization for Enzymatic Hydrolysis of Mannitol

Eun-Young Park¹, Yong-Jin Kim^{2*}, Seung-Mi Jeong², and Dong-Hoon Lee¹

접수: 2012년 11월 23일 / 게재승인: 2013년 1월 16일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: This study aimed to investigate the enzymatic hydrolysis of mannitol using Viscozyme[®] L, Celluclast[®] 1.5 L, Saczyme[®], Novozym[®], Fungamyl[®] 800 L, Driselase[®] Basidiomycetes sp., and Alginate Lyase, and to optimize of reaction conditions for production of reducing sugar. Response surface methodology (RSM) based on central composite rotatable design was used to study effects of the independent variables such as enzyme (1-9% v/w), reaction time (10-30 h), pH (3.0-7.0) and reaction temperature (30-70°C) on production of reducing sugar from mannitol. The coefficient of determination (R^2) of Y_1 (yield of reducing sugar by Viscozyme[®] L) and Y_3 (yield of reducing sugar by Saczyme[®]) for the dependent variable regression equation was analyzed as 0.985 and 0.814. And the p -value of Y_1 and Y_3 showing 0.000 and 0.001 within 1% ($p < 0.01$), respectively, was very significant. The optimum conditions for production of reducing sugar with Viscozyme[®] L were 9.0 % (v/w) amount of enzyme, 30.0 hours of reaction time, pH 4.5 and 30.0°C of reaction temperature, and those with Saczyme[®] were 9.0% (v/w) of amount of enzyme dosage, 30.0 h of reaction time, pH 7.0 and 30.0°C of reaction temperature, consequently, the predicted reducing sugar yields were 22.5 and 27.9 mg/g-mannitol, respectively.

Keywords: Enzymatic Hydrolysis, Response Surface Methodology (RSM), Optimization, Mannitol

1. 서론

우리나라는 온실가스 배출량 기준으로 세계 9위로 교토의정서에 의한 2차 온실가스 감축의무 이행 기간이 시작되는 2013년부터 온실가스 저감 의무를 지게 될 것이 확실시되기 때문에 [1], 온실가스 저감을 위한 바이오에너지 등과 같은 대체에너지 개발이 불가피한 상황이다. 특히 해조류 바이오에너지 산업은 온실가스 감축 효과가 크고, 부지제약이 없어 차세대 대체에너지 산업으로의 발전가능성이 높다고 판단되며 [2], 따라서 육상계 바이오매스의 한계를 극복할 수 있는 차세대 바이오매스로서 재조명 받기 시작했다 [3]. 해조류에 대한 수요가 증가하고 있고, 기후변화 대응책으로 가치가 있음에도 불구하고 해조류의 가치 및 기능은 평가 절하되어 있고 [4], 해조류로부터 알코올을 생산하기 위한 발효성 당류의 생산과 관련된 연구는 아직까지 많이 이루어지지 못하고 있는 실정이다 [5].

해조류의 구성성분을 보면 일반적으로 탄수화물의 함량이 높으며, 특히 갈조류는 건조중량 기준으로 36~60%의 탄수화물을 함유하고 있다 [6]. 갈조류의 탄수화물은 세포벽의 주 구성성분으로 존재하거나 저장 탄수화물 형태로 존재하는데, 세포벽에 존재하는 탄수화물은 알긴산 (alginate)과 후코이단 (fucoidan)으로 주로 구성되어 있으며 셀룰로오스 섬유 (cellulose fiber) 등이 소량 존재한다. 그리고 갈조류의 저장 탄수화물은 크게 두 종류로 만니톨 (mannitol)과 라미나란 (laminaran)으로 구성되어 있다 [5]. 만니톨은 만노스 (mannose)에 해당하는 당 알코올이고 [7], 해조류의 종류, 계절 및 성

¹서울시립대학교 에너지환경시스템공학과

¹Department of Energy and Environmental System Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

²목포해양대학교 환경·생명공학과

²Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Mokpo National Maritime University, Mokpo 530-729, Korea
Tel: +82-61-240-7315, Fax: +82-61-240-7301
e-mail: yjkim@mmu.ac.kr

장 조건에 따라 함유량에 차이가 있지만 건조중량의 약 6.81~15.04% 존재한다 [8,9]. 만니톨은 탈수소효소 (mannitol dehydrogenase)에 의해 과당 (fructose)으로 산화되어 NADH가 생성되기 때문에 발효과정에서 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)가 쉽게 이용할 수 없다. NAD⁺를 재생하기 위해서, 산소 (활성 전자전달체: active electron transport chain) 또는 수소전달효소 (transhydrogenase)가 필요하다. 박테리움 (*Zymobacter palmae*)과 산소 및 수소전달효소가 존재한다면, 만니톨은 에탄올 생성을 위한 탄소원으로 이용 가능하며 [10], 저장 당은 낮은 pH와 높은 온도에서 가공 해조류에서 쉽게 추출할 수 있다고 보고하고 있다 [11].

이에 본 연구는 바이오에탄올 생산용 기질로 실제 갈조류를 이용하고자 할 때, 다양한 탄수화물로 구성된 갈조류에 직접 효소 가수분해를 실시하기에 앞서, 시판시약인 D-mannitol을 이용하여 시판 중인 효소 중에서 탄수화물 분해효소인 Viscozyme[®] L, Celluclast[®] 1.5 L, Saczyme[®], Novozym[®],

Fungamyl[®] 800 L, Driselase[®] Basidiomycetes sp., 그리고 Alginate Lyase 등 7종을 선정하여 가수분해를 실시하였다. 만니톨은 mannitol 1-dehydrogenase (MADH)에 의해 만노스가 되고, 만노스는 hexokinase에 의해 만노스-6-인산으로 되고, 만노스-6-인산은 mannose-6-P isomerase에 의해 과당-6-인산으로 전환된다 [12]. 그러나 본 연구에 사용하고자는 효소들은 만니톨에 절대적 특이성으로 작용하지 않고, 우선적으로 작용하는 기질과 다른 기질에도 약간 작용하는 상대적 특이성을 갖는 가수분해효소들과 제거효소로서 이 중에서 만니톨 가수분해 효소의 최적 가수분해 조건을 조사하였다. 만니톨을 각각의 효소로 가수분해 하여 알코올로의 전환을 위한 환원당 생산을 최대화시키기 위해 독립변수 4가지 (효소 주입량, 반응시간, pH, 반응온도)와 종속변수로 환원당 수율을 선정하고, 반응표면분석법 (Response Surface Methodology: RSM)을 적용하여 효소 가수분해 반응조건을 최적화 하였고, 이 조건은 향후 실제 갈조류를 대상으로 하

Table 1. The characteristic of enzymes

	Viscozyme [®] L	Celluclast [®] 1.5 L	Saczyme [®]	Novozym [®]	Fungamyl [®] 800 L	Driselase [®] Basidiomycetes sp.	Alginate Lyase
Origin	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Basidiomycetes</i>	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
Optimal pH	3.3-5.5	4.5-6.0	3.5-4.5	3.0-5.0	4.5-6.0	4.5	4.5-7.5
Optimal temp. (°C)	25-55	50-60	60-70	15-60	50-65	37	20-50
Characteristics	Complex carbohydrases (β-glucanase, xylanase, cellulase, hemicellulase)	Cellulase	Gluco-amylase	Pectin lyase	Alpha-amylase	glycanase mixture	Alginate Lyase
Activity	100 FBG ^a /g	700 EGU ^b /g	750 AGU ^c /g	10,000 PECTU ^d /mL	800 FAU ^e /g	100 U ^f /g	25,000-30,000 U ^g /g
Remarks	Breakdown of cell walls from plant tissue, cereal and vegetable materials	Breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose polymer	Degrade gelatinized starch and dextrins into fermentable sugars	Break down the cell wall of fruits and thus providing excellent performance in fruit processing	Rapidly hydrolyses the interior (α-1,4 glucosidic) linkages of gelatinous starch, amylose, and amylopectin solutions yielding soluble dextrins with small quantities of glucose and maltose which is more showing "endo" type.	Hydrolyses cellulose (to glucose) and all the major matrix polysaccharides.	Breakdown of alginate or alginic acid to smaller molecule

^a and ^b: the units of complex carbohydrases and endo-glucanase activity that the amount of enzyme liberates 1 μmol of glucose for 1 min from β-glucan and cellulose, respectively.

^c: 1 AGU (Amyloglucosidase Unit) is the amount of enzyme which hydrolyzes 1 μmol of maltose per minute under specified conditions.

^d: 1 PECTU (Pectinase Unit) is the amount of pectin (in mg) which is hydrolyzed from 1 g of enzyme preparation for 10 min at 30°C, to hydrolytic degree 30%.

^e: 1 FAU (Fungal-α-amylase Unit) is the amount of enzyme which dextrinizes 5.26 g starch dry substance per hour at 37°C and pH 4.7.

^f: 1 unit will liberate 1 μmol of glucose from cellulose in 1 h at pH 5.0 at 37°C.

^g: 1 unit is defined as an amount of enzyme which increases the absorbance of 1 mL substrate 1 at 235 nm per minutes in specified conditions.

는 연구에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용한 만니톨은 D-Mannitol로 SIGMA-ALDRICH, USA에서 구입하였으며, 7종류의 시판효소의 특징은 Table 1과 같다.

2.2. 실험방법

만니톨을 대상으로 7종의 시판효소를 이용한 효소 가수분해 실험은 반응표면분석법 적용을 위하여 효소 주입량, 반응시간, pH 및 반응온도 네 가지를 독립변수로 설정하여 실시하였다. 만니톨의 효소 가수분해 실험절차를 Fig. 1에 나타내었다.

만니톨 1 g과 증류수 30 mL를 삼각플라스크에 넣고 0.1 N HCl 또는 0.1 N NaOH으로 pH 3~7까지 조정한 후, 멸균 (121°C, 15분)하여 클린벤치 (clean bench)에서 방냉 시키고, 7종의 효소를 각각 기질무게의 1~9% (v/w)로 주입하여 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 반응온도 30~70°C, 반응시간 10~30시간 100 rpm조건으로 가수분해한 후 4,500 rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상징액만 취하여 0.45 μm의 여과지로 여과 후 여액을 희석하여 DNS방법으로 환원당을 측정하였다.

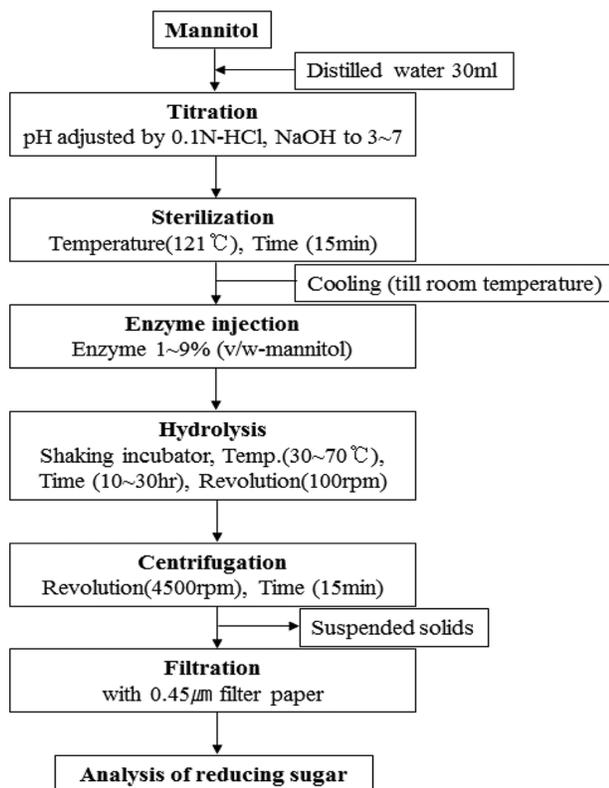


Fig. 1. Experimental procedure for enzyme hydrolysis of mannitol.

Table 2. Independent variables and their levels used for a central composite rotatable design for optimization of enzyme hydrolysis

Independent variable	Symbol	Coded factor levels				
		-2	-1	0	1	2
Dosage ^a (%)	X_1	1	3	5	7	9
Time (h)	X_2	10	15	20	25	30
pH	X_3	3	4	5	6	7
Temp. ^b (°C)	X_4	30	40	50	60	70

^a: Amount of enzyme, ^b: Temperature.

2.3. 실험계획

만니톨을 효소 가수분해하여 생성되는 환원당의 생성모델을 만들기 위한 반응표면분석을 위하여 5수준-4인자의 중심합성회전설계법 (central composite rotatable design: CCRD)를 적용하였다. 4개의 독립변수는 효소 주입량, 반응시간, pH 및 반응온도이고, 16개의 요인 실험점, 8개의 축점, 7개의 중앙점이 포함되는 31개의 실험을 계획하였다. 다음 변환식 (1)에 의해 독립변수들은 암호화되었다.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (i = 1, 2, 3, 4) \quad (1)$$

x_i 는 독립변수의 암호화 값, X_i 는 실험변수, X_0 는 실험범위의 중앙값 및 X 는 변수 X_i 의 단계변화값이다 [13,14]. 따라서 독립변수 (X_i)는 효소 주입량 (X_1 , 1~9%, v/w), 반응시간 (X_2 , 10~30 h), pH (X_3 , 3~7) 및 반응온도 (X_4 , 30~70°C)이고 이들 변수들간의 상호작용을 관찰하고 환원당의 생산성을 최대화시키고자 하였다. 효소 가수분해의 최적화를 위해 중심합성회전설계법을 이용한 독립변수와 부호화 한 실험계획을 Table 2에 나타내었다.

2.4. 통계분석

중심합성회전설계법에 의한 실험 결과는 Minitab software 16 version (Minitab Inc. USA)의 반응표면분석법을 적용하여 분석하였다. 4개의 독립변수의 영향을 받는 종속변수 Y (환원당 농도)는 다음 (2)식과 같은 회귀식으로 나타내었다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

Y 는 종속변수 (환원당), β_0 는 절편, β_i 는 1차 모델 계수, x_i 는 i 번째 독립변수, β_{ii} 는 변수 i 를 위한 정방형의 계수이고 β_{ij} 는 i 변수 j 사이를 상호 작용하는 직선 모델 계수이다 [13-16].

2.5. 분석방법

환원당은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)와 rochelle 염으로 발색하여 흡광도를 측정하는 DNS방법으로 분석하였다. 시료를 원심분리한 후 증류수로 희석시킨 후, 희석액 1 mL에 DNS시약 3 mL를 첨가하여 90에서 5분간 반응시킨 후, 증류수 20 mL를 넣어 희석하여 550 nm에서 흡광도 (UV-Vis Spectrophotometer-1650, Shimadzu, Japan)를 측정하여 정량

하였다 [17,18].

3. 결과 및 고찰

본 연구는 만니톨을 효소 가수분해하여 환원당 생산성을 최대화하기 위해 반응표면분석법을 적용하여 실험 방법의 최적화를 시도하였다. 환원당을 종속변수로 설정하여 Table 3에 그 실험결과를 나타내었다.

만니톨을 7종의 효소로 가수분해 하였으나, 그 중 Novozym[®]과 Fungamyl[®] 800 L를 이용하였을 때 만니톨 당화액 중의 총당은 (Novozym[®]: 평균 0.0203 g/g-mannitol, Fungamyl[®] 800 L: 평균 0.0090 g/g-mannitol) 다른 5종의 총당 (Viscozyme[®]

L: 평균 0.0229 g/g-mannitol, Celluclast[®] 1.5L: 평균 0.0144 g/g-mannitol, Saczyme[®]: 평균 0.0200 g/g-mannitol, Driselase[®] Basidiomycetes sp.: 평균 0.0245 g/g-mannitol, Alginate Lyase: 평균 0.0236 g/g-mannitol)과 비교했을 때, 최대 2.6배 낮았으며, Fungamyl[®] 800 L을 제외하고 거의 비슷한 수준인 것으로 나타났으나, 당화액 중에 환원당이 분석되지 않았다 이는 Novozym[®]과 Fungamyl[®] 800 L이 각각 Pectin lyase, Alpha-amylase 효소로써 기질특이성에서 기인한 것으로 판단된다 [19,20]. 따라서 환원당이 검출되지 않았던 Novozym[®]과 Fungamyl[®] 800 L 효소를 이용한 결과는 사용하기에 어려움이 있어 제외시켰다.

각각의 효소로 만니톨을 가수분해하여 당화액의 환원당 농도를 측정하였으며, 생산된 환원당 농도를 첨가된 만니톨

Table 3. Central composite rotatable design (CCRD) and reducing sugar^a

Run	Independent variables ^b				Dependent variables				
	Dosage ^c (%)	Time (h)	pH	Temp. (°C)	Reducing sugar (mg/g-mannitol)				
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	(Y ₁) ^d	(Y ₂) ^d	(Y ₃) ^d	(Y ₄) ^d	(Y ₅) ^d
1	1 (3)	-1 (15)	-1 (4)	-1 (40)	5.15	0.65	8.34	0.68	0.66
2	1 (7)	-1 (15)	-1 (4)	-1 (40)	16.33	0.78	10.50	0.66	0.68
3	-1 (3)	1 (25)	-1 (4)	-1 (40)	4.63	0.66	3.99	0.67	0.55
4	1 (7)	1 (25)	-1 (4)	-1 (40)	15.76	0.74	13.19	0.67	0.67
5	-1 (3)	-1 (15)	1 (6)	-1 (40)	5.86	0.80	3.89	0.28	0.28
6	1 (7)	-1 (15)	1 (6)	-1 (40)	14.90	0.80	11.33	0.68	0.55
7	-1 (3)	1 (25)	1 (6)	-1 (40)	4.31	0.75	6.03	0.67	0.66
8	1 (7)	1 (25)	1 (6)	-1 (40)	15.61	0.80	12.30	0.72	0.68
9	-1 (3)	-1 (15)	-1 (4)	1 (60)	4.70	0.73	8.56	0.25	0.25
10	1 (7)	-1 (15)	-1 (4)	1 (60)	13.21	0.74	9.47	0.72	0.57
11	-1 (3)	1 (25)	-1 (4)	1 (60)	5.09	0.79	6.95	0.71	0.67
12	1 (7)	1 (25)	-1 (4)	1 (60)	14.65	0.77	9.63	0.69	0.67
13	-1 (3)	-1 (15)	1 (6)	1 (60)	5.42	0.81	3.92	0.67	0.65
14	1 (7)	-1 (15)	1 (6)	1 (60)	14.85	0.76	9.77	0.67	0.67
15	-1 (3)	1 (25)	1 (6)	1 (60)	3.75	0.75	6.08	0.66	0.48
16	1 (7)	1 (25)	1 (6)	1 (60)	14.89	0.83	10.06	0.68	0.67
17	-2 (1)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	1.30	0.76	1.04	0.67	0.67
18	2 (9)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	19.35	0.71	11.81	0.67	0.71
19	0 (5)	-2 (10)	0 (5)	0 (50)	10.32	0.85	4.17	0.67	0.68
20	0 (5)	2 (30)	0 (5)	0 (50)	9.47	0.83	6.10	0.67	0.68
21	0 (5)	0 (20)	-2 (3)	0 (50)	7.11	0.86	8.44	0.66	0.67
22	0 (5)	0 (20)	2 (7)	0 (50)	10.08	0.90	5.17	0.67	0.70
23	0 (5)	0 (20)	0 (5)	-2 (30)	11.01	0.75	7.67	0.69	0.67
24	0 (5)	0 (20)	0 (5)	2 (70)	9.53	0.73	5.39	0.68	0.70
25	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	10.45	0.86	5.24	0.67	0.68
26	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	9.73	0.82	4.95	0.67	0.68
27	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	9.86	0.86	4.62	0.67	0.67
28	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	10.94	0.81	6.13	0.67	0.69
29	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	10.23	0.86	5.97	0.69	0.71
30	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	10.00	0.90	5.42	0.68	0.69
31	0 (5)	0 (20)	0 (5)	0 (50)	10.10	0.86	7.95	0.67	0.69

^aNon-randomized, ^bCoded symbols and levels of independent variables are referred to Table 2.

^cAmount of enzyme.

^dYields of Reducing sugar(mg-RS/g-mannitol) {reducing sugar(g)/solvent(L)×solvent(L)/mannitol(g) × 1000}

Y₁: Hydrolysis by Viscozyme, Y₂: Hydrolysis by Celluclast, Y₃: Hydrolysis by Saczyme, Y₄: Hydrolysis by Driselase, Y₅: Hydrolysis by Alginate Lyase.

Table 4. Quadratic polynomial equation for reducing sugar formation

Dependent variables	Quadratic polynomial model	R ²	P-value
Y ₁	Y ₁ = 10.19 + 4.89X ₁ - 0.14X ₂ + 0.25X ₃ - 0.37X ₄ + 0.063X ₁ ² - 0.044X ₂ ² - 0.37X ₃ ² + 0.049X ₄ ² + 0.31X ₁ X ₂ + 0.033X ₁ X ₃ - 0.25X ₁ X ₄ - 0.20X ₂ X ₃ + 0.13X ₂ X ₄ + 0.15X ₃ X ₄	0.985	0.000
Y ₃	Y ₃ = 5.76 + 2.50X ₁ + 0.26X ₂ - 0.58X ₃ - 0.40X ₄ + 0.53X ₁ ² + 0.20X ₂ ² + 0.62X ₃ ² + 0.55X ₄ ² + 0.36X ₁ X ₂ + 0.54X ₁ X ₃ - 0.73X ₁ X ₄ + 0.54X ₂ X ₃ - 0.029X ₂ X ₄ - 0.14X ₃ X ₄	0.814	0.001

Y_n: Yields of Reducing sugar, Y₁: Hydrolysis by Viscozyme, Y₃: Hydrolysis by Saczyme.

양 (g)으로 나누어 만니톨 1 g당 환원당 생산량을 나타내었다.

3.1. 효소 가수분해

만니톨이 환원당이 되기 위해서는 만당이성화효소 (mannose isomerase)가 발현되어 aldose (D-glucose, D-fructose 등)로 전환되어야 한다. 만당이성화효소의 기질로 D-fructose, D-mannose 및 D-lyxose이 사용되나 [21], 실험에 사용한 효소들은 만니톨에 절대적 특이성으로 작용하지 않고, 우선적으로 작용하는 기질과 다른 기질에도 약간 작용하는 상대적 특이성으로 작용하여 전반적으로 만니톨 가수분해 수율이 낮은 것으로 보인다. Table 3에 5종의 각 효소로 가수분해 한 결과를 제시하였다. 가장 높은 수율을 보인 경우는 Viscozyme® L로, 그 때의 반응조건은 효소주입량 9%, 반응시간 20시간, pH 5 및 반응온도 50°C이었으며, 그 수율은 19.35 mg/g-mannitol이었다. 그리고 가장 낮은 수율을 보인 경우는 Driselase® Basidiomycetes sp.로 효소주입량 3%, 반응시간 15시간, pH 4 및 반응온도 60°C의 조건이었으며, 그때의 수율은 0.25 mg/g-mannitol이었다. 또한 모든 실험조건에서도 Viscozyme® L로 가수분해 했을 때 환원당 수율이 가장 높았다. 이는 Viscozyme® L이 복합 탄수화물을 분해효소로써 mannitol에 대한 기질 특이성으로 인해 가수분해 반응을 촉진시킨 결과로 판단된다 [19].

Table 4에는 환원당 생성에 대한 2차 다항식 모델을, Table 5에는 분산 분석한 결과를 나타내었다. Y₁ (Viscozyme® L에 의한 환원당 수율)과 Y₃ (Saczyme에 의한 환원당 수율)의 결정계수 (R²)는 각각 0.985, 0.814로 분석되었다. 일반적으로 R²값이 최소 0.80일 때 적합한 실험설계를 하였다고 할 수 있다 [22]. Y₁과 Y₃의 P값은 각각 0.000과 0.001로 모두 1%이내에서 매우 유의한 것으로 나타났다 (p < 0.01). 따라서 개발된 모델들은 실험 설계한 독립변수와 환원당 수율과의 관계를 81.4~98.5% 나타내는 설명력이 높은 모형으로, 현재의 모형으로 최적해를 구할 경우 재현성 확인이 용이할 것으로 예상된다.

한편 Y₂ (Celluclast® 1.5 L에 의한 환원당 수율), Y₄ (Driselase® Basidiomycetes sp.에 의한 환원당 수율), 및 Y₅ (Alginate lyase에 의한 환원당 수율)의 결정계수 (R²)는 각각 0.753, 0.406 및 0.352으로 나타났으며, 모델이 선택된 범위 내에 유의하지 않은 실험 인자로 인해 회귀모형이 설명력이 낮은 모형이 된 것으로 판단된다. 이러한 이유로 회귀모형의 오차가 순수오차보다 훨씬 커졌고 적합성 결여 검정결과 회귀모형이 적합하지 않아 데이터를 기재하지 않았다.

Jeong *et al.*의 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*)를 대상으로 황산 촉매와 반응표면방법을 이용해 가수분해하여 당, HMF (Hydroxymethylfurfural) 및 레블린산 (levulinic acid)의 최적화 조건을 연구한 결과에서도 HMF가 생성된 경우, 모델의 결정계수 (R²)가 0.501로 낮아 선택된 범위 내의 실험 인자들이 실제 관계를 설명하기에는 부적합하다고 보고하였다 [16].

Table 5는 분산 분석한 결과로, Y₁은 1차항의 효소 주입량 (X₁), 반응온도 (X₄), 2차항의 pH (X₃ × X₃), Y₃은 1차항의 효소 주입량 (X₁)에서 유의하였으며 (p < 0.05), 적합성 결여 (lack-of-fit)에 대한 Y₁과 Y₃의 P값은 각각 0.038 및 0.080으로 나타났다. P값이 0.05보다 크면 이 모델이 적합하다는 것을 의미하므로 [23], Y₃의 모델은 적합하나 Y₁의 모델은 교호작용이 반응에 유의하지 않은 영향을 주었다고 판단된다. 한편 Y₁의 반응모델식의 R²이 0.985로 통계적 유의성이 5% 이내로 인정되었으므로 Y₁의 모델은 Viscozyme® L을 이용한 만니톨의 가수분해 자료로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

3.2. Viscozyme® L를 이용한 만니톨의 가수분해

만니톨을 Viscozyme® L로 가수분해 시 효소 주입량, 반응시간, pH, 반응온도가 환원당 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해 Minitab을 사용하여 반응표면도로 나타내었다 (Fig. 2).

Fig. 2(a)에서 pH 5 및 반응온도 50°C일 때, 효소 주입량이 증가함에 따라 환원당 수율은 직선적으로 증가하였으나, 반응시간이 짧은 범위보다 반응시간이 긴 범위에서 환원당 수율 증가의 기울기가 증가하였다. 또한 효소 주입량이 많은 범위에서 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 증가하는 경향이 나타났으나, 효소 주입량이 적은 범위에서는 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. Fig. 2(b)에서 반응시간 20시간 및 반응온도 50°C일 때, 효소 주입량이 증가함에 따라 환원당 수율이 직선적으로 증가하였으며, 효소 주입량이 많은 범위에서 pH가 증가할수록 환원당 수율이 증가하는 경향이 나타났으나 증가의 폭이 작아 미세한 영향을 주는 것으로 사료된다. Fig. 2(c)에서 반응시간 20시간 및 pH 5일 때, 반응온도가 높은 범위보다 반응온도가 낮은 범위에서 효소 주입량이 증가함에 따라 환원당 수율 증가의 기울기가 더 컸으며, 효소 주입량이 적은 범위에서 반응온도가 높아질수록 환원당 수율의 변화가 거의 없었으며, 효소 주입량이 많은 범위에서 반응온도가 높아질수록 환원당 수율이 감소하는 경향을 보였다. Fig. 2(d)에서 효소 주입량 5% 및 반응온도 50°C일 때, 반응시간이 짧은 조건에서 pH 6을 중심으로 환원당 수율이 다시 감소하는 경향을

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) of the regression parameters for the response surface model

	Variables	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean squares	F-value	P-value
Y ₁	Model	14	587.704	41.979	77.12	0.000
	X ₁	1	574.102	574.102	1054.63	0.000
	X ₂	1	0.489	0.489	0.90	0.358
	X ₃	1	1.517	1.517	2.79	0.115
	X ₄	1	3.335	3.335	6.13	0.025
	X ₁ × X ₁	1	0.266	0.114	0.21	0.653
	X ₂ × X ₂	1	0.005	0.055	0.10	0.754
	X ₃ × X ₃	1	4.054	3.896	7.16	0.017
	X ₄ × X ₄	1	0.070	0.070	0.13	0.725
	X ₁ × X ₂	1	1.548	1.548	2.84	0.111
	X ₁ × X ₃	1	0.017	0.017	0.03	0.861
	X ₁ × X ₄	1	1.002	1.002	1.84	0.194
	X ₂ × X ₃	1	0.643	0.643	1.18	0.293
	X ₂ × X ₄	1	0.283	0.283	0.52	0.481
	X ₃ × X ₄	1	0.374	0.374	0.69	0.419
	Residual error	16	8.710	0.544	-	-
	Lack-of-fit	10	7.703	0.770	4.59	0.038
Pure error	6	1.007	0.168	-	-	
Total	30	596.413	-	-	-	
Y ₃	Model	14	206.844	14.775	4.99	0.001
	X ₁	1	150.172	150.172	50.69	0.000
	X ₂	1	1.660	1.660	0.56	0.465
	X ₃	1	7.955	7.955	2.68	0.121
	X ₄	1	3.898	3.898	1.32	0.268
	X ₁ × X ₁	1	4.827	7.908	2.67	0.122
	X ₂ × X ₂	1	0.240	1.186	0.40	0.536
	X ₃ × X ₃	1	9.132	11.019	3.72	0.072
	X ₄ × X ₄	1	8.749	8.749	2.95	0.105
	X ₁ × X ₂	1	2.080	2.080	0.70	0.414
	X ₁ × X ₃	1	4.609	4.609	1.56	0.230
	X ₁ × X ₄	1	8.495	8.495	2.87	0.110
	X ₂ × X ₃	1	4.684	4.684	1.58	0.227
	X ₂ × X ₄	1	0.013	0.013	0.00	0.948
	X ₃ × X ₄	1	0.330	0.330	0.11	0.743
	Residual error	16	47.403	2.963	-	-
	Lack-of-fit	10	40.072	4.007	3.28	0.080
Pure error	6	7.331	1.222	-	-	
Total	30	254.247	-	-	-	

Y_n: Yields of Reducing sugar, Y₁: Hydrolysis by Viscozyme, Y₃: Hydrolysis by Saczyme.

보였으며, 반응시간이 긴 조건에서 pH 5를 중심으로 환원당 수율이 감소하는 경향을 보였다. 낮은 pH 범위 (3.0~5.0)에서는 반응시간이 증가함에 따라 환원당 수율이 완만하게 증가하였으나, 높은 pH 범위 (6.0~7.0)에서는 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. Fig. 2(e)에서 효소 주입량 5% 및 pH 5일 때, 반응온도가 낮은 범위에서 반응시간이 증가함에 따라 환원당 수율이 감소하였으나, 반응온도가 높은 범위에서는 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 다소 증가하는 경향이 나타났다. 반응시간이 긴 범위보다 반응시간이 짧은 범위에서 반응온도가 증가할수

록 환원당 수율 증가의 기울기가 증가하였다. 짧은 반응시간과 낮은 반응온도에서 환원당 수율이 높게 나타났다. Fig. 2(f)에서 효소 주입량 5% 및 반응시간 20시간일 때, 일정한 반응온도 조건에서 pH 5를 중심으로 환원당 수율이 다시 감소하는 경향이 있었으며, 이때 낮은 pH 범위보다 높은 pH 범위에서 환원당 수율이 더 높았다. 낮은 pH 범위에서 반응온도가 증가할수록 환원당 수율은 감소하였으나, 높은 pH 범위에서 반응온도가 증가할수록 환원당 수율 감소의 기울기가 작아 미세한 영향을 주는 것으로 판단된다.

위와 같이 만니톨을 Viscozyme® L으로 가수분해한 결과를

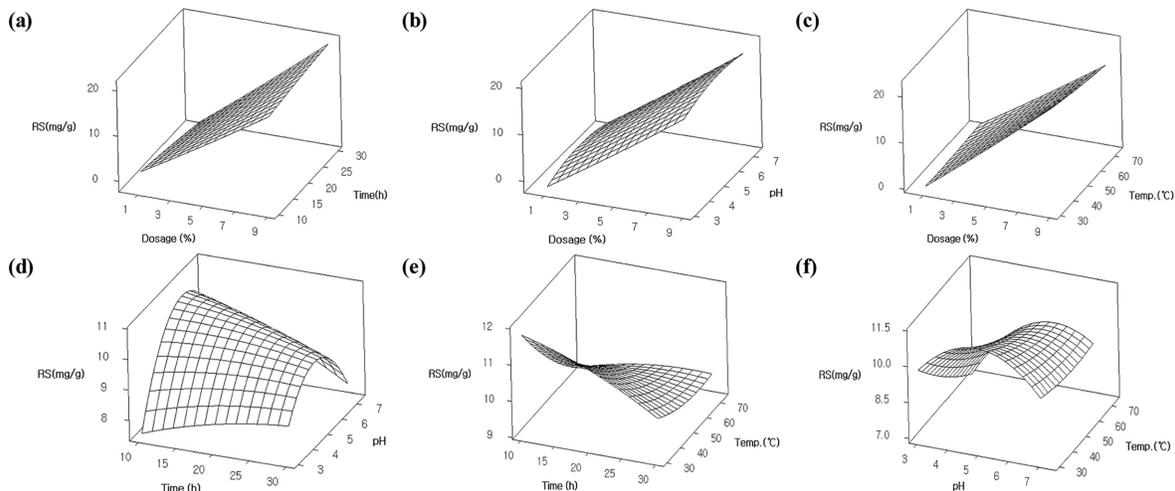


Fig. 2. Response surface plot of each factor on reducing sugar yield for hydrolysis by Viscozyme.

반응표면분석법으로 해석한 결과, 효소 주입량과 반응온도가 Viscozyme® L를 이용한 만니톨의 가수분해에 유의한 영향을 끼친 것으로 보였다. 또한 최적의 공정 조건은 효소 주입량 9.0%, 반응시간 30.0시간, pH 4.5 및 반응온도 30.0°C이었으며, 예측된 최대 환원당 수율은 22.5 mg/g-mannitol이었으며 이때의 만족도는 1.00이었다.

3.3. Saczyme®를 이용한 만니톨의 가수분해

Fig. 3에 만니톨을 Saczyme®로 가수분해 한 결과를 Minitab을 사용하여 반응표면도로 나타내었다. Fig. 3(a)에서 pH 5 및 반응온도 50°C일 때, 효소 주입량이 증가할수록 환원당 수율은 완만하게 증가하였고 반응시간이 짧은 범위보다 반응시간이 긴 범위에서 환원당 수율 증가의 기울기가 증가하였다. 효소 주입량이 적은 범위에서 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 감소하는 경향을 보였으나 효소 주입량이 많은 범위에서는 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 증가하는 경향을 보였다. Fig. 3(b)에서 반응시간 20시간 및 반응

온도 50°C일 때, 효소 주입량이 증가함에 따라 환원당 수율이 증가하였으며, 낮은 pH 범위보다 높은 pH 범위에서 효소 주입량이 증가할수록 환원당 수율 증가 기울기가 크게 나타났다. 많은 효소 주입량과 높은 pH 범위에서 환원당 수율이 높게 나타났다. Fig. 3(c)에서 반응시간 20시간 및 pH 5일 때, 반응온도가 높은 범위보다 반응온도가 낮은 범위에서 효소 주입량이 증가할수록 환원당 수율 증가의 기울기가 크게 나타났다. 효소 주입량이 적은 범위에서 반응온도가 증가할수록 환원당 수율이 증가하는 경향을 보였으나, 효소 주입량이 많은 범위에서는 반응온도가 증가할수록 환원당 수율이 감소하는 경향을 보였다. 많은 효소주입량과 낮은 반응온도에서 환원당 수율이 높게 나타났다. Fig. 3(d)에서 효소 주입량 5% 및 반응온도 50°C일 때, 낮은 pH 범위에서 반응시간이 증가함에 따라 환원당 수율이 감소하는 경향이 있었으나, 높은 pH 범위에서 반응시간이 증가함에 따라 환원당 수율이 증가하는 경향을 나타내었다. 반응시간이 짧은 범위에서 pH가 증가할수록 환원당 수율이 감소하였으나, 반응시간이 긴 범

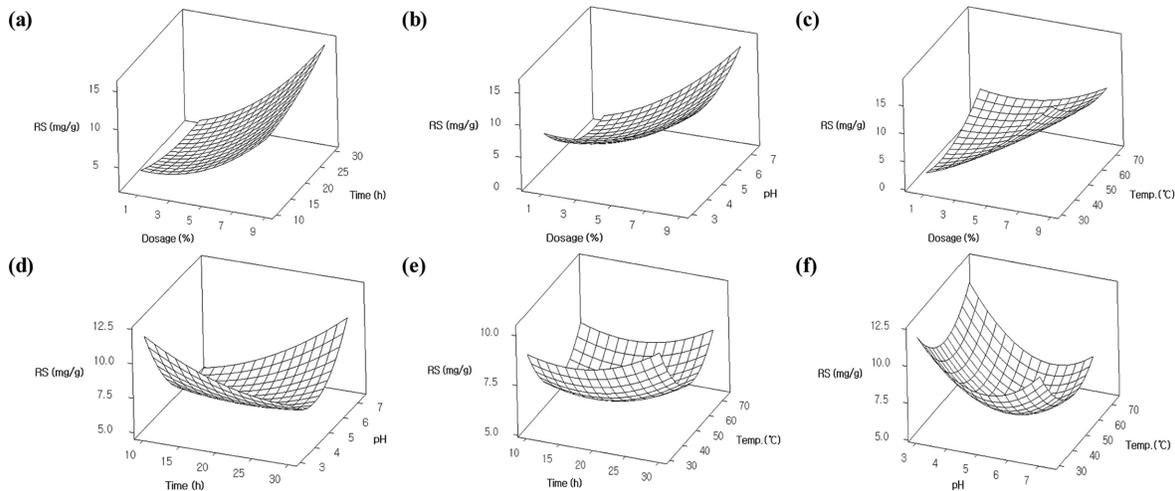


Fig. 3. Response surface plot of each factor on reducing sugar yield for hydrolysis by Saczyme.

위에서는 pH 5를 중심으로 환원당 수율이 다시 증가하는 경향을 보였다. Fig. 3(e)에서 효소 주입량 5% 및 pH 5일 때, 반응시간이 증가할수록 환원당 수율이 완만히 증가하였고, 반응온도가 높은 범위보다 반응온도가 낮은 범위에서 환원당 수율이 더 높게 나타났다. 반응시간이 짧은 범위와 긴 범위에서 반응온도가 50°C를 중심으로 환원당 수율이 다 증가하는 경향을 보였고, 이때 긴 반응시간과 낮은 반응온도에서 환원당 수율이 높게 나타났다. Fig. 3(f)에서 효소 주입량 5% 및 반응시간 20시간일 때, 낮은 pH 범위에서 환원당 수율이 감소하는 경향을 보였으나, 높은 pH 범위에서는 환원당 수율이 증가하는 경향을 보였다. 일정한 반응온도에서 높은 pH 범위보다 낮은 pH 범위에서 환원당 수율이 더 높게 나타났다.

위와 같이 만니톨을 Saczyme®로 가수분해한 결과를 반응 표면분석법으로 해석한 결과, 효소 주입량이 Saczyme®을 이용한 만니톨의 가수분해에 유의한 영향을 끼친 것으로 보였다. 또한 최적의 공정 조건은 효소 주입량 9.0%, 반응시간 30.0시간, pH 7.0 및 반응온도 30.0°C이었으며, 예측된 최대 환원당 수율은 27.9 mg/g-mannitol이었고 이때의 만족도는 1.00으로 조사되었다.

4. 결론

본 연구에서는 갈조류 탄수화물 중 만니톨을 대상으로, Viscozyme® L, Celluclast® 1.5 L, Saczyme®, Novozym®, Fungamyl® 800 L, Driselase® Basidiomycetes sp., 그리고 Alginate Lyase 등 7종의 시판효소를 사용하여 효소 가수분해를 실시하였다. 만니톨을 각각의 효소로 환원당 생산을 최대화시키기 위한 반응 조건 설정을 위하여 독립변수로 효소 주입량, 반응시간, pH, 반응온도를, 종속변수로 환원당 수율을 선정하여 반응표면분석법 (Response Surface Methodology: RSM)을 적용하였다.

환원당 생성에 대한 2차 다항식 모델 중, Celluclast® 1.5 L, Novozym®, Fungamyl® 800 L, Driselase® Basidiomycetes sp., 그리고 Alginate Lyase에 의한 모델은 회귀모형의 오차가 순수오차보다 훨씬 커졌고 적합성 결여 검정결과 회귀모형이 적합하지 않았다. 그러나 Viscozyme® L에 의한 환원당 수율 (Y_1) 및 Saczyme에 의한 환원당 수율 (Y_3)의 결정계수 (R^2)는 각각 0.985 및 0.814로 분석되었고, Y_1 및 Y_3 의 P값은 각각 0.000, 및 0.001로 모두 1%이내에서 매우 유의한 것으로 나타났다 ($p < 0.01$). 따라서 개발된 모델들은 설명력이 높은 모형이라고 할 수 있다.

만니톨을 상술한 2종의 효소로 가수분해하여 반응표면분석법을 적용하여 구한 수율과 반응조건은 다음과 같다. Y_1 은 효소 주입량 9.0%, 반응시간 30.0시간, pH 4.5 및 반응온도 30.0에서 22.5 mg/g-mannitol이 생산되었고, Y_3 는 효소 주입량 9.0%, 반응시간 30.0시간, pH 7.0 및 반응온도 30.0°C에서 27.9 mg/g-mannitol이 생산되었다. 따라서 만니톨의 효소 가

수분해 효소로 Saczyme®를 사용하는 것이 다소 유리할 것으로 판단되며, 효소 주입량, 반응시간, pH 및 반응온도가 효소 가수분해 반응에 유의한 영향을 보였음을 확인하였다.

감사

이 논문은 2011년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구 사업으로 지원받은 과제입니다 (No. 2011-0009041).

REFERENCES

- Hong, H. P. and C. M. Ma (2009) Policy research: The present condition of the bioenergy industry and direction of policy using the seaweed. *The institute for national security strategy*. 160: 29-64.
- Kim, H. H., Y. S. Go, Y. M. Im, and C. H. Lee (2009) CEO Information: The next generation bio-industry 5 kind choice which Korea will have to pay attention to. *Samsung economic research institute*. 731: 1-21.
- Lee, S. Y., J. W. Ahn, H. J. Hwang, and S. B. Lee (2011) Seaweed biomass resources in Korea. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*. 26: 267-276.
- Ryu, J. G., J. H. Cho, and D. Y. Kim (2009) Strategies to industrialize the algae bio-business and policy direction. *Korea maritime institute*. 13: 1-196.
- Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (2009) The seaweed massive raising for biomass and bio energy production technology development roadmap (feasibility study) research. *Ministry for Food Agriculture*.
- Park, E. Y., S. M. Jeong, Y. J. Kim, and D. H. Lee (2012) Review on hydrolysis methods of the macroalgae for production of bioethanol. *Korea Society of Waste Management*. 29: 323-333.
- Horn, S. J. (2000) *Bioenergy from brown seaweeds*. Ph. D. Thesis. Norwegian University of Science and Technology NTNU, Trondheim, Norway.
- Obluchinskaya, E. D. (2008) Comparative chemical composition of the barents sea brown algae. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 44: 305-309.
- Klindukh, M. P., E. D. Obluchinskaya, and A. G. G. Matishov (2011) Seasonal changes in the mannitol and proline contents of the brown alga *Fucus vesiculosus* L. on the murman coast of the barents sea. *Doklady Biological Sciences*. 441: 373-376.
- Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Østgaard (2000) Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 24: 51-57.
- Percival, E. and R. H. McDowell (1967) *Chemistry and Enzymology of Marine algal Polysaccharides*, pp. 1-219. Academic Press, London and New York.
- Iwamoto, K and Y. Shiraiwa (2005) Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Marine Biotechnology*. 7: 407-415.
- Xiao, G. and Y. Huiyuan (2008) Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface meth-

- odology. *Food chemistry*. 106: 345-351.
14. Jing, L., G. Xiao, Z. Daqi, and S. Jun (2008) Optimization of the enzymatic pretreatment in oat bran protein extraction by particle swarm optimization algorithms for response surface modeling. *LWT-Food science and technology*. 41: 1913-1918.
 15. Park, S. H. and J. U. Kim (2011) *The Modern Experimental Design Utilizing Minitab.*, pp. 421-464. Minyoungsa, Korea.
 16. Jeong, G. T. and D. H. Park (2010) Production of sugar and levulinic acid from Marine biomass *Gelidium amansii*. *Applies Biochemistry and Biotechnology*. 161: 41-52.
 17. Jeong, S. M. (2011) *Ethanol Fermentation of Hexose and Pentose from Food Wastes by Saccharomyces coreanus and Pichia stipitis*. Ph.D. Thesis. The University of Seoul, Korea.
 18. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31: 426-428.
 19. Novozymes Homepage. <http://www.novozymes.com>. (2012).
 20. SIGMA-ALDRICH Homepage. <http://www.sigmaaldrich.com>. (2012).
 21. Lee, D. S. (2000) *Carbohydrate Enzymatic Reactions*. pp. 80-83. Hanrimwon. Korea.
 22. Graf, E. and I. S. Saguy (1990) *Food Product Development from Concept to Marketplace*. pp. 211-230. In: A. M. Joglekar, and A. T. May. *Product Excellence Through Experimental Design*. An aspen Publication, USA.
 23. Lee, S. B. (2008) *The Example-centered Experimental Design*. pp. 101-286. Eretec, Korea.