

## 구멍갈파래의 효소 가수분해 증진을 위한 마이크로파 이용 열수 전처리

김정민 · 하성호\*<sup>†</sup>

인하대학교 생물공학과  
22212 인천 남구 인하로 100  
\*한남대학교 화공신소재공학과  
34054 대전 유성구 유성대로 1646

(2015년 4월 8일 접수, 2015년 4월 21일 수정본 접수, 2015년 4월 22일 채택)

## Hydrothermal Pretreatment of *Ulva pertusa* Kjellman Using Microwave Irradiation for Enhanced Enzymatic Hydrolysis

Jungmin Kim and Sung Ho Ha\*<sup>†</sup>

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea

\*Department of Advanced Materials & Chemical Engineering, Hannam University, Daejeon 34054, Korea

(Received 8 April 2015; Received in revised form 21 April 2015; accepted 22 April 2015)

### 요 약

녹조류는 cellulose가 세포벽의 주요 구성성분이며 그 양이 다른 해조류에 비해 월등하고, 세포벽에 lignin이 없어 lignin 제거공정을 거치지 않고 cellulase를 사용하여 쉽게 당화시킬 수 있을 뿐만 아니라 저장산물인 전분도 당 성분으로 사용할 수 있다. 이에 바이오에너지 생산을 위한 좋은 바이오매스가 될 것으로 기대되는 녹조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)를 사용하여 마이크로웨이브 장치를 통한 열수 전처리 효과가 cellulase를 사용한 가수분해 효율에 미치는 영향을 알아보았다. 열수의 온도에 따른 전처리 효과를 확인하기 위해 100~150 °C에서 전처리를 수행하였으며, 140~150 °C에서 가장 높은 전처리 효과를 얻었다. 또한 전처리 최적조건인 마이크로웨이브 장치의 출력 50 W와 온도 150 °C에서 열수 전처리한 구멍갈파래에 포함되어 있는 탄수화물의 효소적 가수분해 효율을 높이기 위해 cellulase 외에  $\alpha$ -amylase와  $\beta$ -glucosidase를 함께 사용하여, 효소 혼합의 효과를 확인하였다. 전처리한 구멍갈파래 시료에 cellulase와  $\alpha$ -amylase 그리고  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 Novozyme 188을 사용하여 가수분해하였을 경우 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료와 비교하면 초기 가수분해속도가 6배 이상 월등히 높았고, 3시간 만에 구멍갈파래에 포함되어 있는 탄수화물의 96 wt%에 해당할 정도의 환원당이 생성되었으며, 이 양은 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료를 24시간동안 효소적 가수분해해야 얻을 수 있는 환원당의 양으로 열수 전처리한 효과가 월등함을 보여주었을 뿐만 아니라 대부분의 탄수화물이 전환되는 최대 당화 효율을 얻을 수 있음을 보여준다.

**Abstract** – The green algae have cellulose as a main structural component of their cell wall and the cellulose content in green algae is much higher than other marine algae such as brown algae and red algae. Furthermore, green algae do not contain lignin in their cell wall and store starch as food in their plastids. Thus, it was investigated that the effect of hydrothermal pretreatment process utilizing microwave irradiation for *Ulva pertusa* Kjellman, a division of green algae, which is expected to be utilized for bioenergy production, on the enzymatic hydrolysis. The hydrothermal temperature have an effect on the pretreatment of *Ulva pertusa* Kjellman, but the effect of power of microwave irradiation is negligible. The rate of enzymatic hydrolysis was increased as the hydrothermal temperature increased until 140 °C. The enzymatic hydrolysis of pretreated *Ulva pertusa* Kjellman under the optimum pretreatment conditions (50 W of microwave irradiation power and 150 °C of hydrothermal temperature) with cellulase,  $\alpha$ -amylase, and Novozyme 188 having  $\beta$ -glucosidase activity resulted in the saccharification of 96 wt% of total carbohydrate in *Ulva pertusa* Kjellman during 3 hrs, while it took 24 hrs for the enzymatic hydrolysis of untreated *Ulva pertusa* Kjellman. It confirmed that the hydrothermal pretreatment was effective on *Ulva pertusa* Kjellman for the enzymatic hydrolysis.

Key words: Green algae, *Ulva pertusa* Kjellman, Hydrothermal pretreatment, Enzymatic hydrolysis, Cellulose, Cellulase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\alpha$ -Amylase

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: shha@hannam.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.

## 1. 서 론

현재 우리가 사용하고 있는 에너지는 대부분 화석연료로부터 얻어진다. 화석연료는 인류사회의 급속한 발전을 초래하면서 삶을 풍요롭게 한 원동력으로 그 사용량과 가격이 지속적으로 상승하고 있다. 그러나 화석연료의 매장량은 한정되어 있어 이러한 사용량의 증가는 자원 고갈문제뿐만 아니라 온실화 가스인 이산화탄소, 프레온가스, 아산화질소 등의 증가를 유발하여, 인간의 삶을 위협하는 지구온난화와 이상기후 현상을 야기하는 주범으로 인식되고 있다. 그래서 화석연료를 대체하면서 자연과 공존하며 안정적으로 발전하고자 하는 지속성장의 개념이 화두가 되고 있다[1]. 현재 전 세계적으로 지속성장을 가능하게 하는 재생에너지 개발에 많은 연구가 진행되고 있는데 그 중 바이오매스로부터 에너지를 얻는 바이오에너지가 각광을 받고 있다[2,3].

바이오에너지 생산을 위한 바이오매스 자원들은 크게 1세대인 곡물계, 2세대인 목질계, 3세대인 해조류로 나눌 수 있다. 곡물계는 사탕수수, 옥수수, 감자 등과 같은 당-전분질계 바이오매스를 말하며 현재 브라질 등에서 성공적으로 이용되고 있다. 하지만 식량자원이기 때문에 곡물가 상승을 일으킬 수 있으며, 이로 인해 원료 수준의 불안정 문제 및 식량자원의 연료화라는 윤리적인 문제 등 여러 문제에 봉착해 있는 실정이다. 이를 극복하기 위해 비식용작물인 목본 및 초본류에 포함되어 있는 lignocellulose를 활용하는 목질계 바이오매스에 대한 연구가 진행되고 있다[4,5]. 그러나 결정성 구조인 cellulose를 hemicellulose와 난분해성인 lignin이 감싸고 있어 까다로운 전처리 공정뿐만 아니라 공정상 수반 되는 lignin 제거 공정 비용 때문에 경제성 확보가 어렵고 경작지 확보를 위한 천연림 파괴 문제가 있다. 그래서 최근 들어 이산화탄소 고정 능력이 뛰어나고 기후에 따른 생산성 저하가 적으며 비식용작물이면서 에너지 생산효율이 좋은 해조류가 바이오에너지 생산을 위한 3세대 바이오매스로 주목 받고 있다[6,7].

해조류는 크게 거대조류(macroalgae), 미세조류(microalgae)로 나뉘며, 거대조류는 크게 홍조류(red algae), 갈조류(brown algae), 녹조류(green algae)로 분류된다. 이들은 얇은 바다의 서식지에서 성장하며 성장이 빠르고 단위면적당 생산성이 우수하다. 이러한 해조류는 종과 수확장소 및 시기에 따라 탄수화물의 함량이 다양하며, 당의 구성도 다양하다고 알려져 있다. 홍조류는 주로 agar, cellulose, xylan, mannan, carrageenan 등의 다당류로, 갈조류는 cellulose, alginate, fucoidan, laminaran 등의 다당류로, 녹조류는 cellulose, pectin, mannan, xylane 등의 다당류로 구성되어 있다[8-10]. 이처럼 해조류에는 다양한 다당류들이 존재하여 바이오에너지 생산에 적합한 해조류의 육종 및 개량, 바이오매스 합성에 영향을 주는 요소들에 대한 최적화 등에 대한 개발이 필요할 뿐만 아니라 해조류로부터 다당류를 효율적으로 추출할 수 있는 방법과 효과적인 다당류의 저분자화 방법에 대한 최적화 연구가 진행되어야 효율적인 해조류 이용 바이오에너지 생산공정의 개발이 앞당겨질 수 있을 것이다.

녹조류의 탄수화물은 종류와 수확시기에 따라 25~50% 함유되어 있는데, 탄수화물 함량에서 cellulose가 차지하는 비율이 높을 뿐만 아니라 cellulose는 세포벽 골격을 이루고 있는 주된 성분이다. 육상식물처럼 엽록소 a와 b를 통해 광합성을 하고 carotene, xanthophylls 등의 광합성 색소의 함량이 고등 식물과 같은 비율로 있으며 광합성으로 전분을 생산해 저장하는 등 육상 식물과 유사한 점이 많은

것이 특징이다[8-10]. 녹조류의 탄수화물 양은 홍조류나 갈조류에 비해 적지만, cellulose가 세포벽의 주요구성 성분이기 때문에 그 양은 다른 해조류에 비해 월등히 많으며, 이는 목질계 바이오매스와 견주어도 손색이 없다. 또한 lignin이 없어 lignin 제거공정을 거치지 않고 cellulase를 사용하여 쉽게 당화시킬 수 있을 뿐만 아니라 저장산물인 전분도 당 성분으로 사용할 수 있다.

D-glucose 분자가  $\beta$ -1,4-glycosidic 결합으로 연결되어 있는 선형 다당류 사슬인 cellulose는 고분자 사슬 사이에 수 많은 수소결합과 van der Waal's 힘이 형성되어 결정화도가 매우 높아 효소적 가수분해가 힘들다. 그렇기 때문에 전처리가 효소적 가수분해의 효율을 높이기 위한 중요한 역할을 하고 된다. 지난 수년간 steam explosion, liquid hot water, dilute acid, ammonia fibre/freeze explosion(AFEX) 등과 같은 바이오매스 전처리 방법이 연구되어 왔으나[11], 이러한 전처리 방법은 고온 고압의 환경과 다량의 산을 사용하는 문제점이 있다. 바이오매스 전처리의 주된 목적은 lignin이나 hemicellulose의 제거 또는 구조의 변경과 cellulose의 결정성 감소, 그리고 효소가 작용할 수 있는 표면적의 증가이다[12,13]. 열수(hydrothermal) 전처리 방법은 물이 열수 조건에서는 산의 추가 없이도 산으로서 작용하는 성질을 이용한 방법이기 때문에 산의 사용량을 줄일 수 있어 lignin이 없는 해조류에 적합한 전처리 방법이 될 수 있다[14-17].

마이크로파의 가열 효과를 응용한 기술은 최근들어 유기합성 및 폴리머 가공공정에서 유용한 도구로 응용되고 있으나, 바이오매스의 전처리에 응용된 예는 거의 없다[18,19]. 마이크로파를 이용하면 종래의 전통적인 가열 방법에 비해 가열 시간이 대폭 짧아져 소요 시간이 대폭 단축되고 제품 구조 및 물성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 따라서, 해조류인 구멍갈파래의 전처리를 위한 에너지 공급 매체로 마이크로파를 적용하여 가열상의 열적 효과 및 전자기파 유도에 의한 비가열적 효과를 알아보는 연구의 시도가 필요하다.

이에 본 연구에서는 이산화탄소 고정 능력이 뛰어나 차세대 바이오에너지 생산을 위한 바이오매스로 주목 받고 있는 해조류 중 cellulose가 세포벽의 주요 구성성분이며 그 양이 다른 해조류에 비해 월등하고, 세포벽에 lignin이 없어 lignin 제거공정을 거치지 않고 cellulase를 사용하여 쉽게 당화시킬 수 있는 장점과 저장산물인 전분도 당 성분으로 사용할 수 있어 목질계 바이오매스에 비해 바이오에너지 생산을 위한 좋은 바이오매스가 될 것으로 기대되는 녹조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)를 사용하여 마이크로웨이브 장치를 통한 열수 전처리 효과가 cellulase를 사용한 가수분해 효율에 미치는 영향을 알아보고, 나아가 구멍갈파래에 포함되어 있는 탄수화물의 효소적 가수분해 효율을 높이기 위해 cellulase 외에  $\alpha$ -amylase와  $\beta$ -glucosidase를 함께 사용한 효소 혼합 용액의 효과를 확인하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 실험재료

본 연구에 사용된 해조류는 강원도 강릉시 안인진에서 채집한 녹조류인 구멍갈파래(*Ulva pertusa* Kjellman)이며, 채집된 구멍갈파래는 4-5회 수세하여 표면에 붙어있는 이물질들을 제거한 후 40 °C 건조기에 넣어 건조한 후 분쇄하여 보관하였다. 시료로 사용 직전에 100 °C 건조기에 넣어 잔류 수분을 제거한 상태에서 시료를 정량한 후 사용하였다.

Cellulose의 가수분해 반응을 위한 효소로 *Trichoderma reesei* cellulase(Sigma Aldrich, USA)를, 부족한  $\beta$ -glucosidase 활성을 채워주기 위해 Novozyme 188(Novozymes, Denmark)을 사용하였다. 전분의 가수분해 반응을 위한 효소로  $\alpha$ -amylase(Junsei, Japan)를 사용하였다.

실험에 사용된 시약인 D-glucose, phenol, acetic acid, 3,5-dinitrosalicylic acid, sulfuric acid는 Sigma Aldrich(USA)의 제품을 사용하였다. Sodium hydroxide, sodium potassium tartrate, sodium dithionite는 Samchun(Korea)의 제품을 사용하였고, sodium acetate trihydrate는 Shinyo Pure Chemicals(Japan)의 제품을 사용하였다. 그 외 모든 시약은 분석시약 급의 제품을 사용하였다.

## 2-2. 실험방법

### 2-2-1. 시료의 전처리

효소에 의한 구멍갈파래의 가수분해 효율을 증진시키기 위해 마이크로웨이브 장치(CEM Discover, USA)를 사용하여 구멍갈파래의 전처리를 실시하였다. 구멍갈파래 50 mg을 5 mL의 acetate buffer (0.05M, pH 5)에 넣은 후 충분히 수화되도록 실온에서 30분 동안 방치시킨 후, 마이크로웨이브 장치에서 50~100 W의 출력과 90~150 °C의 온도에서 전처리하였다.

### 2-2-2. 효소 가수분해

전처리된 구멍갈파래 시료 50 mg을 5 mL의 acetate buffer (0.05 M, pH 5)에 넣은 후 1 mg의 *Trichoderma reesei* cellulase, 1 mg의  $\alpha$ -amylase, 10  $\mu$ L의 Novozyme 188을 따로 독립적으로 혹은 같이 넣은 후, reaction block (Variomag, Germany)에서 50 °C의 반응온도와 400 rpm으로 교반하면서 3~24 시간 동안 효소 가수분해한 후 환원당의 양을 측정하였다.

### 2-2-3. 분석

탄수화물의 총량은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다[20]. 시험관에 0.8 mL의 D.W.와 시료를 넣은 후, 3.2 mL의 80% sulfuric acid를 첨가하여 재빨리 교반 해주었다. 1분 동안 반응시킨 후, 50  $\mu$ L의 90% phenol을 첨가하였다. 30분 후 분광광도계를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정한 후 분석하였다.

환원당의 함량은 DNS 법으로 측정하였다[21]. 시료 1 mL이 든 시험관에 3 mL의 DNS 시약(dinitrosalicylic acid 0.5 g, NaOH 8 g, rochelle salt 150 g을 500 mL로 정용)을 넣고 100 °C에서 5분간 반응시킨 후 얼음물에서 급속 냉각시킨 후, 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한 후 분석하였다. 표준시료로는 D-glucose를 사용하였다.

마이크로웨이브 장치로 구멍갈파래를 전처리 하기 전과 후의 형태 변화는 scanning electron microscope(S-4300, Hitachi, Japan)를 사용하여 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3-1. 구멍갈파래의 탄수화물 총량

구멍갈파래 (*Ulva pertusa* Kjellman)에 포함되어 있는 탄수화물의 양을 phenol-sulfuric acid 법을 사용하여 측정한 결과 탄수화물이 39.6 wt%를 차지하고 있는 것을 나타냈다. 단백질, 지질, 회분 등이

나머지를 구성하고 있는 것으로 알려져 있다[8-10]. 해조류의 탄수화물은 종류와 수확시기에 따라 다르지만, 일반적으로 해조류의 탄수화물의 총 함량이 김과 우뚝가사리 등이 대표종인 홍조류는 30~60 wt%, 미역, 다시마, 톳, 모자반이 대표종인 갈조류는 30~50 wt%, 구멍갈파래, 파래, 청각 등이 대표종인 녹조류는 25~50 wt%이다[8-10]. 그리고 구멍갈파래에 포함되어 있는 탄수화물 비율이 목질계 바이오매스에 비해서는 낮지만, 목질계 바이오매스에는 lignin 및 hemicellulose가 포함되어 있다는 것을 감안한다면, 구멍갈파래가 바이오에너지를 생산하기 위한 바이오매스로 사용하기에 적합하다는 것을 보여준다.

### 3-2. 전처리 온도의 영향

열수(hydrothermal) 조건에서 물은 산의 추가 없이도 산으로서 작용하기 때문에 산의 사용량을 줄일 수 있어 리그닌이 없는 해조류에 적합한 전처리 방법이 될 수 있다. 이를 위해 마이크로웨이브 장치의 출력은 50 W로 고정하고, 100~150 °C의 온도에서 전처리한 구멍갈파래 시료 50 mg에 1 mg의 *T. reesei* cellulase를 사용하여 3시간 동안 가수분해하여 열수의 온도에 따른 전처리 효과를 비교하였다. Fig. 1에 보인 바와 같이 전처리 하지 않은 시료에 비해 마이크로웨이브 장치를 통한 열수 전처리 과정을 거친 시료에서 더 많은 환원당이 생성되었으며, 전처리 온도가 100 °C에서부터 높아짐에 따라 구멍갈파래로부터 생성되는 환원당의 양도 증가해 140 °C와 150 °C에서 비슷한 양의 환원당이 생성되는 것을 알 수 있다. 이 결과는 마이크로웨이브 장치를 통한 열수 전처리 시 140~150 °C의 온도에서 전처리 효율이 가장 좋다는 것을 보여주는 것으로, 보다 안정적인 전처리를 위해 150 °C에서 전처리 하는 것이 좋다고 판단되어 이후의 실험에서는 150 °C에서 구멍갈파래를 전처리하였다.

열수 전처리한 구멍갈파래 시료가 그렇지 않은 시료에 비해 *T. reesei* cellulase를 사용한 가수분해 반응을 통해 생성된 환원당의 양이 증가한다는 결과가 구멍갈파래의 형태에서의 변화와 관련이 있는지를 확인하기 위해 마이크로웨이브 장치로 150 °C에서 열수 전처리하기 전과 후의 구멍갈파래 시료를 SEM(scanning electron microscope)을

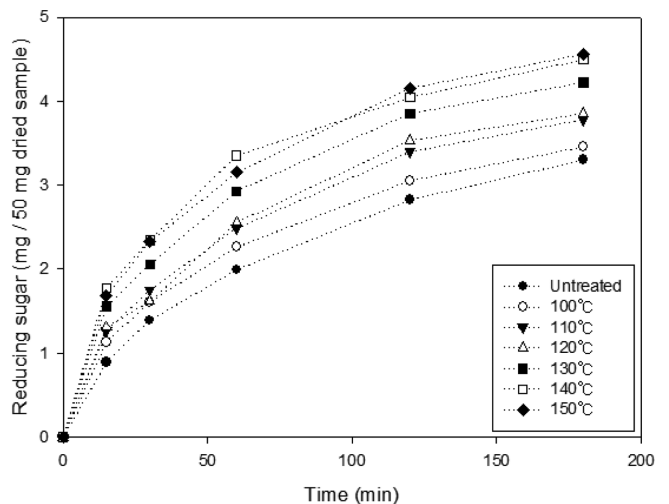


Fig. 1. Effect of hydrothermal pretreatment temperature on hydrolysis of *Ulva pertusa* Kjellman by *T. reesei* cellulase. Reaction conditions: 50 mg *Ulva pertusa* Kjellman, 5 mL acetate buffer (0.05 M, pH 5), 1 mg *T. reesei* cellulase.

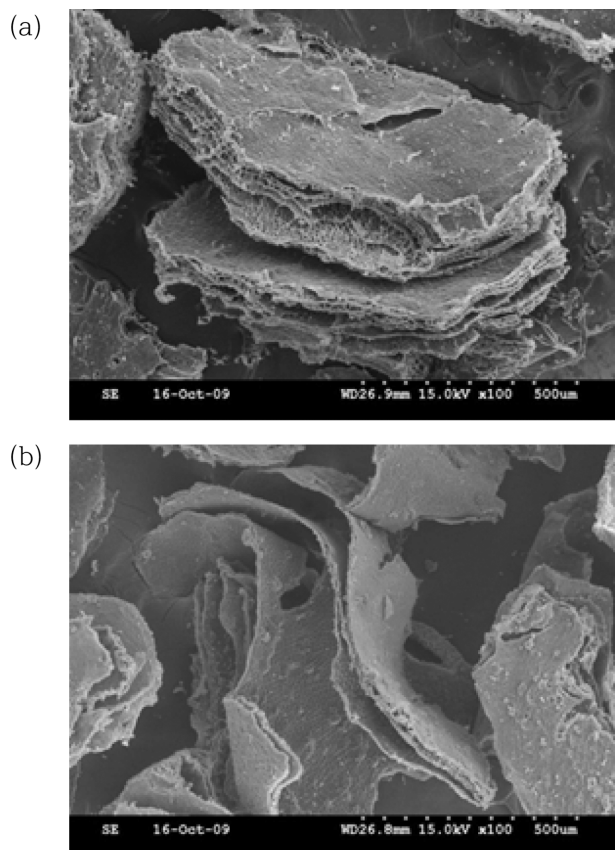


Fig. 2. SEM images of *Ulva pertusa* Kjellman (a) before hydrothermal pretreatment and (b) after hydrothermal pretreatment using microwave irradiation equipment at 150 °C and 50 W.

사용하여 그 차이를 비교 관찰하였다(Fig. 2). 전처리 전의 시료(Fig. 2(a))는 겹겹이 층을 이루고 있는 구조를 가지는 반면 전처리 후의 시료(Fig. 2(b))는 겹겹이 쌓인 구조가 하나씩 날장으로 분리된 모습을 보여준다. 전처리 후 나타나는 이러한 형태 변화로 인해 효소가 작용할 수 있는 구멍갈파래의 표면적이 비약적으로 증가되어 전처리 하지 않은 시료에 비해 효소 가수분해 반응을 통해 얻어지는 환원당의 양이 보다 높은 것으로 판단된다.

### 3-3. 전처리를 위한 장치 출력의 영향

열수 전처리를 위한 가열장치로 사용한 마이크로웨이브 장치는 2.45 GHz의 마이크로파를 사용하여 에너지를 공급하는데, 장치의 출력에 따라 투입되는 에너지의 양이 달라지게 된다. 따라서 장치의 출력이 구멍갈파래의 전처리에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 50 W와 100 W의 마이크로웨이브 장치의 각 출력 조건에서 90 °C와 150 °C에서 전처리하였다. 그러나 Fig. 3에 보인 바와 같이 마이크로웨이브 장치의 출력과는 상관없이 150 °C에서만 전처리 효과가 나타났다. 전처리 온도가 90 °C일 때에는 마이크로웨이브 장치의 출력이 50 W이든 100 W이든 상관없이 비슷한 양의 환원당이 전처리한 구멍갈파래 시료로부터 *T. reesei* cellulase 가수분해를 통해 생성되었고, 이 양은 전처리 하지 않은 시료를 효소 가수분해로부터 얻어지는 환원당의 양과 비슷한 양이었다. 이 결과로부터 마이크로웨이브 장치의 출력이 전처리에 미치는 영향은 거의 없을 뿐만 아니라 마이크로파에 의한 효과도 미미한 것으로 판단되며, 장

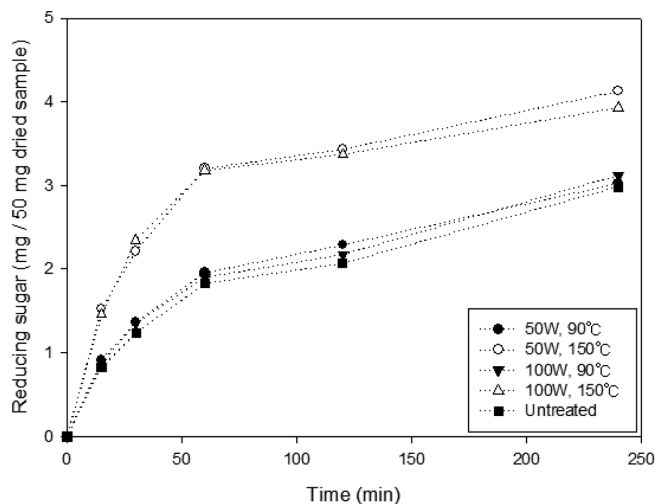


Fig. 3. Effect of the power of microwave irradiation and hydrothermal temperature on hydrolysis of *Ulva pertusa* Kjellman by *T. reesei* cellulase. Reaction conditions: 50 mg *Ulva pertusa* Kjellman, 5 mL acetate buffer (0.05 M, pH 5), 1 mg *T. reesei* cellulase.

치의 출력보다는 온도에 의해 더 많은 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 또한 90 °C에서 전처리를 하면 그 효과는 거의 없는 것으로 확인되었다.

### 3-4. $\alpha$ -amylase의 전처리 시료 당화 효과

녹조류가 광합성의 산물로 저장하는 전분 역시 포도당으로 구성되어 있으므로, 바이오에너지를 생산하기 위한 중요한 성분으로 사용될 수 있다. 따라서 열수 전처리한 구멍갈파래로부터 더 많은 환원당을 생성하기 위해서는 저장물질인 전분을 당화시키는 추가공정이 필요하므로,  $\alpha$ -amylase를 추가로 첨가했을 때의 그 당화 효과를 관찰하였다. Fig. 4에 보인 바와 같이 열수 전처리한 구멍갈파래 50 mg에 1 mg의 *T. reesei* cellulase와 1 mg의  $\alpha$ -amylase를 사용하여 가수분해를 통해 생성된 환원당의 양은 1 mg의 *T. reesei* cellulase만을 사용

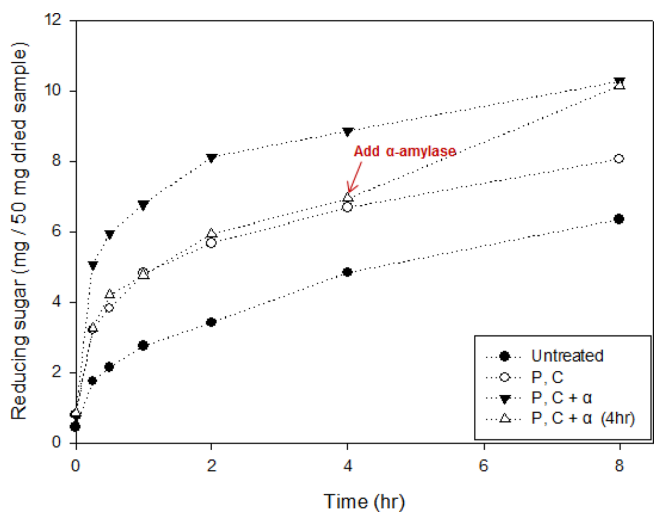


Fig. 4. Effect of  $\alpha$ -amylase on hydrolysis of hydrothermally pretreated *Ulva pertusa* (P: hydrothermally pretreated *Ulva pertusa* Kjellman, C: *T. reesei* cellulase,  $\alpha$ :  $\alpha$ -amylase). Reaction conditions: 50 mg *Ulva pertusa* Kjellman, 5 mL acetate buffer (0.05 M, pH 5), 1 mg *T. reesei* cellulase, 1 mg  $\alpha$ -amylase.

하였을 경우와 비교해 2 mg이 더 많이 얻을 수 있었으며, 이는 구멍갈파래 50 mg에 포함된 탄수화물의 10 wt%에 해당하는 양이다.  $\alpha$ -amylase의 투입 시기를 결정하기 위해 *T. reesei* cellulase가 세포벽을 구성하는 cellulose를 분해하여 세포벽 내부에 있는 전분이 외부로 방출되었다고 판단이 되는 시간인 *T. reesei* cellulase를 사용한 가수분해 반응 시작 후 4시간 이후에  $\alpha$ -amylase를 넣어주었다.  $\alpha$ -Amylase 투입 전에는 *T. reesei* cellulase 만을 통해 생성된 6.9 mg의 환원당 양이,  $\alpha$ -amylase 투입 후 추가적으로 가수분해가 일어나  $\alpha$ -amylase 투입 후 4시간 동안 더 반응을 진행하면  $\alpha$ -amylase를 투입하지 않은 경우와 비교해 2.0 mg의 환원당을 더 얻을 수 있었다. 이 결과는  $\alpha$ -amylase에 의해 전분이 추가적으로 가수분해 되었다는 것을 의미한다. 또한, Fig. 4는  $\alpha$ -amylase를 *T. reesei* cellulase와 처음부터 넣어 주어도 동일한 양의 환원당이 생성되는 것을 보여주므로, 열수 전처리한  $\alpha$ -amylase는 처음부터 cellulase와 혼합하여 넣어 사용하여도 동일한 효과를 보인다는 것을 알 수 있다.

### 3-5. 최대 당화 효과를 위한 최적 조건

이상의 결과를 바탕으로 전처리 최적조건인 마이크로웨이브 장치의 출력 50 W, 온도 150 °C에서 열수 전처리한 시료로부터 최대의 당화 효율을 얻기 위해 열수 전처리한 구멍갈파래 50 mg에 1 mg의 *T. reesei* cellulase, 1 mg의  $\alpha$ -amylase 그리고  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 Novozyme 188을 10  $\mu$ L 사용하여 가수분해하였다. Fig. 5은 열수 전처리한 구멍갈파래 시료에 *T. reesei* cellulase와 Novozyme 188을 넣어준 경우 *T. reesei* cellulase와  $\alpha$ -amylase를 넣어준 경우에 비해 초기 가수분해속도뿐만 아니라 생성된 환원당의 양도 상당히 증가한다는 것을 보여준다. 열수 전처리한 구멍갈파래 시료에 *T. reesei* cellulase와  $\alpha$ -amylase를 넣어준 경우 24 시간 동안 가수분해 반응을 수행하더라도 15.7 mg의 환원당을 생성하는 반면 *T. reesei* cellulase와 Novozyme 188을 넣어준 경우 반응시간이 증가함에 따라 생성되는 환원당의 양이 급격히 증가하다 9시간 후면 거의 가수분해반응이 종결되어 19 mg 이상 생성됨을 보여준다. 그 양은 구멍

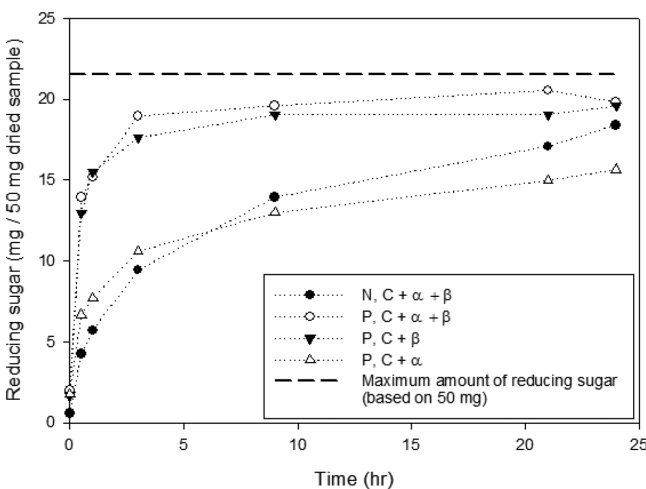


Fig. 5. Effect of enzyme cocktail on hydrolysis of hydrothermally pretreated *Ulva pertusa* (N: untreated *Ulva pertusa* Kjellman, P: hydrothermally pretreated *Ulva pertusa* Kjellman, C: *T. reesei* cellulase,  $\alpha$ :  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ : Novozyme 188). Reaction conditions: 50 mg *Ulva pertusa* Kjellman, 5 mL acetate buffer (0.05M, pH 5), 1 mg *T. reesei* cellulase, 1 mg  $\alpha$ -amylase, 10  $\mu$ L Novozyme 188.

갈파래의 탄수화물 비율을 고려하면 구멍갈파래 50 mg 중에 포함되어 있는 탄수화물의 양의 96 wt%에 해당할 정도로 높은 양이다. 이러한 결과는 열수 전처리한 구멍갈파래로부터 높은 당화 효율 얻기 위해서는  $\beta$ -glucosidase의 사용이 중요하다는 것을 의미한다. 열수 전처리한 구멍갈파래 시료에 *T. reesei* cellulase, Novozyme 188,  $\alpha$ -amylase를 모두 넣어준 경우 *T. reesei* cellulase와 Novozyme 188을 넣어준 경우에 비해 환원당 생성량은 약간 상회하는 효과를 볼 수 있으며, 그 양은 3.4 절에서  $\alpha$ -amylase를 넣어주었을 때 추가로 생성된 환원당 양인 2 mg 정도이다. 이를 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료에 *T. reesei* cellulase, Novozyme 188,  $\alpha$ -amylase를 모두 넣어준 경우와 비교하면 초기 가수분해속도가 6배 이상 월등히 높으며, 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료를 24시간동안 가수분해해야 얻을 수 있는 환원당의 양을 3시간 만에 생성할 수 있을 정도로 구멍갈파래를 열수 전처리한 효과가 월등함을 보여준다.

## 4. 결 론

이산화탄소 고정 능력이 뛰어나고 세포벽에 lignin이 없어 lignin 제거공정을 거치지 않고 cellulase를 사용하여 쉽게 당화시킬 수 있을 뿐만 아니라 저장산물인 전분도 당 성분으로 사용할 수 있는 구멍갈파래를 마이크로웨이브 장치를 이용한 열수 전처리 방법을 통해 재생 가능한 바이오에너지를 생산하기 위한 바이오매스로 사용하였다. 열수의 온도에 따른 전처리 효과를 확인하기 위해 100~150 °C에서 전처리를 수행하였고, 150 °C에서 가장 높은 전처리 효과를 얻었다. SEM 분석을 통해 열수 전처리 후 구멍갈파래 시료가 효소가 작용할 수 있는 표면적이 증가하여 전처리 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 전처리 최적조건인 마이크로웨이브 장치의 출력 50 W, 온도 150 °C에서 열수 전처리한 구멍갈파래 시료에 cellulase와  $\alpha$ -amylase 그리고  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 Novozyme 188을 사용하여 가수분해하였을 경우 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료와 비교하면 초기 가수분해속도가 6배 이상 월등히 높았고, 3 시간 만에 구멍갈파래에 포함되어 있는 탄수화물의 96 wt%에 해당할 정도의 환원당이 생성되었으며, 이는 전처리하지 않은 구멍갈파래 시료를 24시간동안 효소적 가수분해해야 얻을 수 있는 환원당의 양으로 열수 전처리한 효과가 월등함을 보여주었다. 이상의 결과는 열수 전처리 방법이 구멍갈파래로부터 바이오에너지 생산을 위한 친환경적이고 효과적인 전처리 공정으로의 가능성을 보여준다.

## 감 사

이 논문은 2014년도 한남대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구가 수행되었습니다.

## References

1. McLaren, J. S., "Crop Biotechnology Provides an Opportunity to Develop a Sustainable Future," *Trends Biotechnol.*, **23**(7), 339-342(2005).
2. Faaij, A. P. C., "Developments in International Bioenergy Markets and Trade," *Biomass and Bioenergy*, **32**, 657-659(2008).
3. Lee, S. U., Jung, K., Park, G. W., Seo, C., Hong, Y. K., Hong, W. H. and Chang, H. N., "Bioprocessing Aspects of Fuels and Chemicals

- from Biomass," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**(7), 831-850(2012).
4. Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman, G., "Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass," *Bioresource Technol.*, **100**(1), 10-18(2009).
  5. 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**(7), 1180-1186(2014).
  6. Park, J.-I., Woo, H.-C. and Lee, J.-H., "Production of Bio-energy from Marine Algae: Status and Perspectives," *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**(5), 833-844(2008)
  7. Xiao, M., Shin, H. J. and Dong, Q., "Advances in Cultivation and Processing Techniques for Microalgal Biodiesel: A Review," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**(12), 2119-2126(2013).
  8. Kloareg, B., and Quatrano, R. S., "Structure of the Cell Walls of Marine Algae and Ecophysiological Functions of the Matrix Polysaccharides," *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **26**, 259-315(1988).
  9. Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W. and Jeon, Y. J., "Antioxidant Activities of Enzymatic Extracts from Brown Seaweeds," *Bioresour. Technol.*, **96**, 1613-1623(2005).
  10. Ito, K. and Hori, K., "Seaweed: Chemical Composition and Potential Food Uses," *Food Rev. Int.*, **5**, 101-144(1989).
  11. Liu, C. G. and Wyman, C. E., "Partial Flow of Compressed-Hot Water Through Corn Stover to Enhance Hemicellulose Sugar Recovery and Enzymatic Digestibility of Cellulose," *Bioresource Technol.*, **96**, 1978-1985(2005).
  12. Mosier, N., Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M. R., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresource Technol.*, **96**, 673-686(2005).
  13. Cayetano, R. D., Kim, T. H. and Um, B.-H., "Bioconversion Strategy in Conversion of Lignocellulosic Biomass upon Various Pretreatment Methods using Sulfuric Acid and Aqueous Ammonia," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**(1), 45-51(2014).
  14. Bonn, G., Concin, R. and Bobleter, O., "Hydrothermolysis: A New Process for the Utilization of Biomass," *Wood Sci. Technol.*, **17**, 195-202(1983).
  15. Sunphorka, S., Prapaiwatcharapan, K., Hinchiranan, N., Kangvansaichol, K., and Kuchonthara, P., "Biocrude Oil Production and Nutrient Recovery from Algae by two-step Hydrothermal Liquefaction Using a Semi-Continuous Reactor," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(1), 79-87(2015).
  16. Kim, J. K., Um, B. H. and Kim, T. H., "Bioethanol Production from Micro-algae, *Schizocytrium* sp., Using Hydrothermal Treatment and Biological Conversion," *Korean J. Chem. Eng.*, **29**(2), 209-214(2012).
  17. Martin, C. and Thomsen, A. B., "Wet Oxidation Pretreatment of Lignocellulosic Residues of Sugarcane, Rice, Cassava and Peanuts for Ethanol Production," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **82**, 174-181(2007).
  18. Kappe, C. O., Dallinger, D. and Murphree, S. S., *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim(2009).
  19. Ha, S. H., Mai, N. L., An, G. and Koo, Y. -M., "Microwave-assisted pretreatment of cellulose in ionic liquid for accelerated enzymatic hydrolysis," *Bioresource Technol.*, **102**, 1214-1219(2011).
  20. Kimberley, A. C. C. Taylor, "A Modification of the Phenol/Sulfuric Acid Assay for Total Carbohydrates Giving More Comparable Absorbances," *Applied Biochem. and Biotechnol.*, **53**, 207-214(1995).
  21. Miller, G. L., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar," *Anal. Chem.*, **31**, 426-428(1958).