

해조류 톳 (*Hizikia fusiforme*)의 효소 가수분해

송부복, 김성구, 정귀택*

Enzymatic Hydrolysis of Marine Algae *Hizikia fusiforme*

Bu-Bok Song, Sung-Koo Kim, and Gwi-Taek Jeong*

접수: 2011년 7월 9일 / 게재승인: 2011년 8월 10일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, we investigated the effect of reaction factors on enzymatic hydrolysis of *Hizikia fusiforme*, which is brown algae in marine biomass resource, using commercial enzymes. The composition of *H. fusiforme* is 38.9% of reducing sugar, 4.8% of moisture, 17.8% of ash, and 38.5% of others. In the condition of 1-5% substrate, the increase of substrate concentration enhanced the increase of reducing sugar formation; however, the hydrolysis yield did not increase after 24 h. After reaction of 75 h, conversion yield of reducing sugar were obtained to 16.45%, 17.99%, and 14.55% at 1, 2.5, and 5% substrate, respectively. As a result of effect of enzyme amount, the formation of reducing sugar did not show considerable change at 1% substrate. However, in the condition of 2.5% substrate, the great change of reducing sugar formation was observed by the increase of enzyme amount. The conversion yields of reducing sugar were obtained to 18.77% and 22.83% at 1% and 2.5% substrate with 30% enzyme, respectively. As a result of heat treatment of biomass, the high yield was obtained in 2.5% substrate and the yields were increased to 0.06-7.2% by the heat treatment. This result will provide the basic information for production process of biofuels and chemicals from marine biomass *H. fusiforme*.

Keywords: *Hizikia fusiforme*, enzymatic hydrolysis, reducing sugar, heat treatment

1. 서론

대체에너지가 화석연료의 고갈과 지구온난화의 대응책으로 주목 받고 있다. 특히 바이오에너지는 기존의 화석연료와는 다르게 이산화탄소를 선순환시킬 수 있는 지속가능한 에너지 원으로써 인식되고 있다. 그러나 옥수수나 콩과 같은 식량 작물을 이용한 바이오에너지의 생산은 곡물가격의 급등 등의 또 다른 사회적 문제를 야기하고 있다. 이에 비식용자원 인 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에너지의 생산과 관련된 기술개발에 많은 노력을 하고 있다. 최근 국내에서는 해조류를 이용하여 바이오에너지를 생산하고자 하는 연구가 많이 수행되고 있다 [1-4].

바이오에너지 생산에 있어서 해조류는 육상 식량자원과의 경쟁을 피할 수 있으며, 성장속도가 육상식물에 비하여 빠르고 CO₂ 흡수율이 우수하여 에너지 고갈과 환경 문제 해결에 중요한 자원으로 인식되고 있다. 특히 해조류 중 갈조류는 성장이 빠르고 단위면적당 생산성이 우수하다고 알려져 있다 [1,2,5]. 갈조류에는 미역, 다시마, 모자반, 톳 등이 있다. 갈조류는 종류와 수확시기에 따라 건조중량의 약 30-67%의 탄수화물을 함유하고 있고, 주로 alginate, laminaran, 그리고 mannitol 등으로 구성되어 있다. Alginate는 갈조류의 세포벽을 이루는 구조성 다당류이며, β-D-mannuronate와 C5 epimer 구조인 α-L-gluronate로 구성되어 있다. 이들은 α-1,4 또는 β-1,4 결합으로 형성되어 있다. 이 두 성분은 각각 homopolymer (polygluronate와 polymannuronate) 형태나, 결합된 heteropolymer 형태로 존재한다. Laminaran은 *Laminaria*속의 저장성 다당류로 주로 β-1,3 결합으로 구성된 glucan이며, 일부는 β-1,6 결합을 하며, D-glucose 외에 D-mannitol (2-5%)로 구성되어 있다 [2,6].

톳은 우리나라의 중부 이남에 분포하고, 특히 제주도와 서남해안에서 많이 생산되는 갈조류이다. 부착기는 포부근이고

부경대학교 생물공학과
Department of Biotechnology, Pukyong National University,
Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863
e-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

직립하는 줄기는 원주상이며 방추형 또는 방망이 모양의 작은 가지가 호생한다. 잎은 다육질의 주걱모양으로 가장자리에 톱니가 있고, 봄과 초여름에 무성하게 자란다 [7].

일반적으로 해조류의 유용성분을 추출할 때에는 열수 추출이나 산, 알칼리 또는 효소처리 등에 의하여 추출하는 방법을 사용되고 있다 [1,5,6,8,9,10]. 이 중 [6]은 톳을 산처리하여 4.0g/L의 환원당을, 그리고 열처리에서는 0.99 g/L의 환원당을 얻었다. 김 [8]은 우뚝가사리를 기질로 하여 140-150°C, 15분, 1% 황산에서 33.7%의 최대 단당수율을 얻었으며, 또한 이온성 액체인 [Choline]H₂SO₄를 촉매로 사용하여 최대의 갈락토스 수율을 보고하였고, 연 [1] 등은 모자반을 고압액화추출기로 가수분해하여 얻은 가수분해물을 이용하여 에탄올을 생산하였다. 해조류 가수분해에 효소를 사용한 경우로는 김 [9]은 세포벽이 주로 cellulose로 구성된 구멍갈파래를 대상으로 마이크로웨이브를 조사하여 전처리하고 효소 (α -amylase, cellulase, β -glucosidase)를 첨가하여 반응한 결과 83.7%가 가수분해됨을 보고하였다. 또한 최 [10] 등은 미역과 다시마 혼합물을 대상으로 ascobic acid와 liquozyme을 이용하여 가수분해하여 27.2 g/L의 당을 얻었다.

본 연구에서는 갈조류인 톳 (*Hizikia fusiforme*)을 상용 효소를 사용하여 가수분해하여 환원당을 생산하는데 미치는 인자들의 영향을 조사하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

실험에 사용한 해조류로는 톳 (*Hizikia fusiforme*, 국내산) 분말 (355 μ m (45 mesh)이하)을 사용하였다. 효소가수분해 반응에 사용한 효소로는 Viscozyme L (100 FBG/g, Novozymes A/S, Denmark)은 arabinase, cellulase, beta-glucanase, hemicellulase, xylanase로 구성된 복합효소이며, β -glucosidase인 Novozyme 188 (430 CBU/mL, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였다.

2.2. 효소 가수분해

거대해조류 중 갈조류인 톳의 효소 가수분해 연구를 수행하기 위하여 톳 분말을 citrate buffer (pH 4.5, 0.05 M)에 녹여 실험을 수행하였다. 기질 시료로는 톳 분말 용액과 톳 분말 용액을 121°C에서 1시간 동안 열처리한 시료를 사용하였다. 기질량은 1%, 2.5%, 5%로 설정하였다. 가수분해에 사용한 효소로는 cellulase 등 복합효소로 구성되어 있는 Viscozyme L에 β -glucosidase인 Novozyme 188을 Viscozyme L 첨가량의 10%가 되게 첨가하였다. 적용한 효소량 (Viscozyme L 기준)은 기질량의 10, 20, 30% (w/w)가 되게 첨가하여 효소 가수분해 반응을 수행하였다. 효소 반응은 250 mL 플라스크를 사용하여 100 mL 용량으로 실시하였다. 효소 반응 중 미생물의 오염을 방지하기 위하여 0.2%의 sodium azide를 첨가하여 교반배양기를 이용하여 50°C, 150 rpm으로 3일 동안 효소 가수분해를 실시하면서 일정시간 마다 시료를 채취하여 생성된 환원당의 양을 측정하였다.

2.3. 분석방법

본 연구에서는 해조류에 포함되어 있는 당, ash, 수분의 함량을 조사하기 위하여 NREL chemical analysis and testing standard procedure [11]의 바이오매스 분석 실험과정을 변형하여 당 성분의 분석을 실시하였다. 환원당의 조성은 황산을 이용하여 바이오매스를 2단계로 가수분해하여 생성된 환원당 함량을 측정하였고, 유리된 환원당의 분석은 DNS법을 이용하였다. Ash 함량은 건조된 바이오매스를 575°C의 고온로에서 4시간 동안 회화 후 잔류한 ash의 중량으로 계산하였다. 수분함량은 시료를 105°C의 건조기에서 12시간 동안 건조한 후 수분이 제거된 건조시료의 중량으로부터 수분함량 (%)을 계산하였다. 기타 성분은 단백질, 지질, 핵산, 기타 당/당알콜류 (환원당으로 분석되지 않는 것)들의 총합으로 나타내었다. 효소 가수분해 중 생성된 시료 중의 환원당은 DNS법을 사용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 원료 해조류의 성분 분석

거대 갈조류인 톳의 구성성분을 분석한 결과를 Table 1에 나타내었다. 톳은 38.9%의 환원당, 4.8% 수분, 17.8% ash, 그리고 38.5%의 기타 물질로 구성되어 있었다. 실험에 사용한 톳과 같은 갈조류인 모자반과 미역에 대하여 성분 분석한 결과, 모자반이 39.4%, 미역이 44.7%의 환원당을 함유하고 있었다.

Table 1. Composition of marine biomass

| Biomass | Reducing sugar (%) | Moisture (%) | Ash (%) | Others* |
|---------------------------------------|--------------------|--------------|---------|---------|
| 톳 (<i>Hizikia fusiforme</i>) | 38.9 | 4.8 | 17.8 | 38.5 |
| 모자반 (<i>Sargassum fulvellum</i>) | 39.4 | 8.5 | 16.7 | 35.4 |
| 미역 (<i>Undaria pinnatifida</i>) | 44.7 | 11.3 | 11.2 | 32.8 |

*Others: protein, lipid, sugar alcohol, etc.

3.2. 톳에 대한 효소 가수분해

Fig. 1은 기질량의 20%에 해당하는 효소를 1.5%의 기질 농도에 첨가하여 톳의 효소 가수분해 정도를 나타낸 것이다. 기질농도가 증가할수록 많은 양의 환원당이 생성되는 경향을 나타내었다. 전체적으로 반응 24시간 이후에는 가수분해 정도가 크게 증가하지 않는 경향을 나타냈다. 5%의 기질 농도에서는 24시간에 2.72 g/L, 75시간에는 2.83 g/L의 환원당이 생성되었다. 2.5%의 기질 농도에서는 24시간과 75시간에 각각 1.63 g/L와 1.75 g/L의 환원당이 생성되었다. 1%의 기질 농도에서는 24시간과 75시간에 각각 0.61 g/L와 0.64 g/L의 환원당이 생성되었다. 이는 기질 전체의 환원당 함량 (38.9%)을 기준으로 효소 가수분해로 생성된 환원당의 수율을 계산한 결과, 반응 75시간을 기준으로 비교하면

1%의 기질을 첨가한 경우에는 16.45%, 2.5%의 기질 농도에서는 17.99%, 5%의 기질 농도에서는 14.55%의 수율을 나타내었다. 이로써 톳의 가수분해에 사용되는 기질의 농도는 2.5%에서 가장 높은 값을 나타내었다.

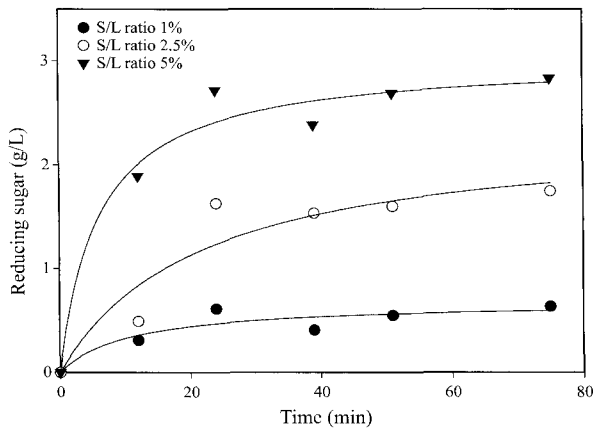


Fig. 1. Effect of substrate concentration on hydrolysis of *Hizikia fusiformis* in 20% enzyme preparation.

Fig. 2에 효소 농도 (10-30%)에 따른 톳의 효소 가수분해 중 반응 24시간에 얻은 환원당 농도를 비교한 결과를 나타내었다. 1%의 기질농도에서는 효소 농도 증가에 따른 큰 변화를 보이지 않았지만, 2.5%의 기질에서는 효소량이 증가하면 급격히 증가하였다. 1%의 기질에서 기질량을 기준으로 하여 효소 농도가 10, 20, 30%가 되게 첨가한 경우, 각각 0.43, 0.61, 0.73 g/L의 환원당이 생성되었다. 또한 기질 농도 2.5%의 조건에서 효소 농도를 10, 20, 30%로 조절한 경우, 각각 1.36, 1.63, 2.22 g/L의 환원당이 생성되었다. 이는 기질 전체의 환원당 함량 (38.9%)을 기준으로 효소 가수분해로 생성된 환원당의 수율을 계산한 결과, 1%의 기질을 첨가한 경우에는 효소 농도 (10-30%)에 따라 각각 11.05%, 15.68%, 18.77%의 수율을 나타내었다. 또한 2.5%의 기질 농도에서는 13.98%, 16.76%, 22.83%의 수율을 나타내었다. 이로써 톳의 가수분해에 사용되는 효소의 농도는 기질 1%와 2.5% 농도에서 30%의 효소 첨가의 경우에 각각 18.77%와 22.83%로 가장 높은 수율을 나타내었다. 이 등 [2]은 20 g/L의 모자반, 톳, 그리고 다시마 용액에 *Pseudoalteromonas* sp. AL-1로부터 얻은 조효소액을 이용하여 효소 가수분해를 수행한 결과, 모자반과 톳에서는 12시간 이후에는 환원당의 생성 변화가 거의 없었다고 보고하였다. 또한 톳을 기질로 사용한 경우 12시간에 0.916 g/L의 환원당이 생성됨을 보고하였다. 또한 이 등 [6]은 20 g/L의 모자반, 톳, 그리고 다시마 용액에 120°C에서 30분 동안 고압 멸균 열처리를 한 결과, 톳에서는 최대 0.99 g/L의 환원당 (약 4.95% 수율)을 확인하였고, 모자반과 다시마에서는 톳에 비해 1/3 정도의 환원당을 확인하였다. 또한 0.1 N HCl을 첨가한 전처리에서도 열처리와 동일하게 톳에서 환원당의 생성량이 4.00 g/L로 가장 높게 나타났다. 정 등 [5]은 5%의 우뭇가사리를 대상으로 황산촉매를 사용하여 당 (galactose, glucose)를 생산하는 연구에서 반응온도 108.2°C, 촉매농도 3.0%, 반응시간

45분에서 12.12 g/L의 galactose를, 그리고 반응온도 139.4°C, 촉매농도 3.0%, 반응시간 15분에서 2.92 g/L의 glucose가 생성되었다고 보고하였다.

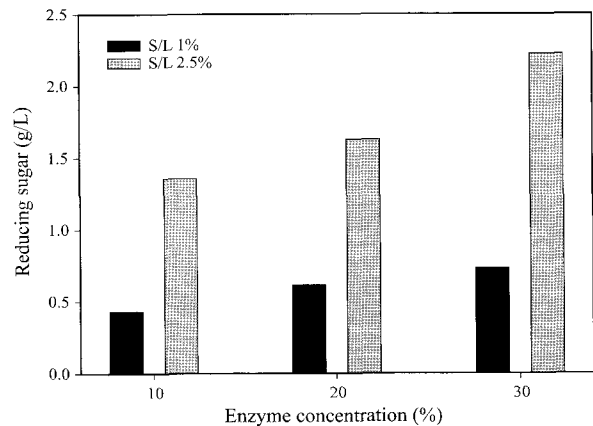


Fig. 2. Effect of the amount of enzyme preparation on hydrolysis of *Hizikia fusiformis* at 24 h.

3.3. 열처리한 톳에 대한 효소 가수분해

Fig. 3은 기질량의 20%에 해당하는 효소를 첨가하여 기질 농도 (1-5%)에 따른 열처리한 톳 분말의 효소 가수분해 정도를 나타낸 것이다. 기질 농도가 증가할수록 환원당 생성량이 증가 하였으나, 5% 기질농도에서는 상대적으로 2.5%에 비해 환원당 생성/기질량의 비가 낮게 나타났다. 반응 75시간에 1%의 기질 농도에서는 0.59 g/L의 환원당이, 2.5%의 기질 농도에서는 2.46 g/L의 환원당이 생성되었다. 5%의 기질 농도에서는 2.46 g/L의 환원당이 생성되었다. 이는 기질 전체의 환원당 함량 (38.9%)을 기준으로 효소 가수분해로 생성된 환원당의 수율을 계산한 결과, 반응 75시간을 기준으로 비교하면 1%의 기질을 첨가한 경우에는 15.17%, 2.5%의 기질 농도에서는 25.65%, 5%의 기질 농도에서는 12.65%의 수율을 나타내었다. 이로써 톳의 가수분해에 사용되는 기질의 농도는 2.5%에서 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 열처리 하지 않은 톳의 2.5% 기질농도에서 얻은 17.99%의 수율에 비하여 7.6% 증가한 것이다. 이는 톳의 열처리에 의하여 세포벽의 구조가 느슨해져 효소가 깊숙이 도달하여 반응이 가능해진 결과로 판단된다 [9].

Fig. 4는 효소 농도에 따른 열처리 한 톳의 효소 가수분해 중 반응 24시간에 얻은 환원당 농도를 비교한 것이다. 기질 농도가 1%인 경우에 효소량이 증가할수록 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 기질 농도가 2.5% 일 때는 오히려 30% 효소량에서 20% 효소를 첨가한 경우보다 낮은 결과를 보여, 기질 농도가 2.5%인 경우에서 1%인 경우에 비하여 높은 환원당 생성을 나타내었다. 기질 농도 1%의 조건에서 기질 농도에 기준하여 효소 농도가 10, 20, 30%를 첨가한 경우, 각각 0.48, 0.67, 0.92 g/L의 환원당이 생성되었다. 또한 기질 농도 2.5%의 조건에서 효소 농도를 10, 20, 30%로 첨가한 경우, 각각 1.46, 2.33, 2.18 g/L의 환원당이 생성되었다. 이는 기질 전체의 환원당 함량 (38.9%)을 기준으로 효소 가수분해로 생성된 환원당의 수율을 계산한 결과, 반

응 24시간을 기준으로 비교하면 1%의 기질을 첨가한 경우에서는 효소 농도 (10-30%)에 따라 각각 12.34, 17.22, 23.65%의 환원당 전환수율을 나타내었다. 또한 2.5%의 기질 농도에서는 15.01, 23.96, 22.42%의 수율을 나타내어 열처리 한 톳의 가수분해에 사용되는 효소의 농도는 기질 1%에서는 30%의 효소 첨가의 경우에 각각 23.65%의 수율을 나타내었으며, 2.5%의 기질 농도에서는 20%의 효소농도에서 가장 높은 수율을 나타내었다. 열처리 하지 않은 톳의 효소 가수분해 결과와 비교하면 열처리에 의해 1%의 기질에서는 4.88% 만큼 증가하였으나, 2.5% 기질농도에서는 10%와 30% 효소농도에서는 약간의 증가를 보였으나, 20% 효소량에서는 큰 변화를 나타내었다.

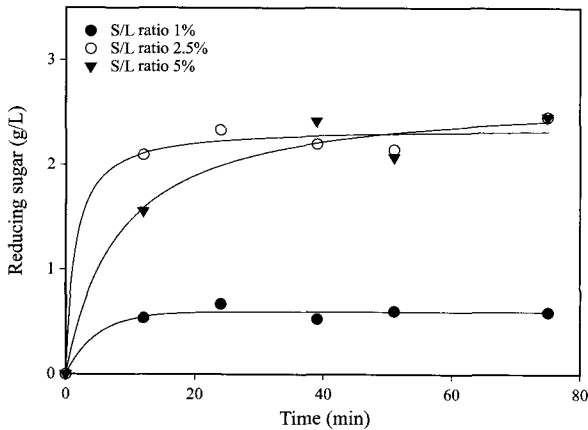


Fig. 3. Effect of substrate concentration on hydrolysis of heat-treated *Hizikia fusiformis* in 20% enzyme preparation.

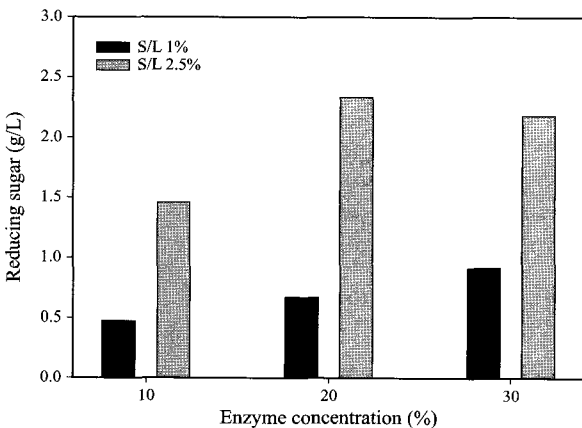


Fig. 4. Effect of the amount of enzyme preparation on hydrolysis of heat-treated *Hizikia fusiformis* at 24 h.

3.4. 열처리 전·후의 효소 가수분해능 비교

Fig 5는 기질량을 기준으로 20%의 효소를 첨가한 경우 121°C에서 1시간 동안 열처리한 톳 시료와 열처리 하지 않은 시료를 24시간 동안 가수분해하여 얻은 결과를 비교한 것이다. 2.5%의 기질 농도에서 121°C에서 1시간 동안 처리한 경우에서 높은 환원당 생성이 확인되었다. 열처리를 하지 않은 기질의 경우에는 기질 농도가 1, 2.5, 5%로 증가함에 따라서 생성된 환원당의 농도가 0.61, 1.63, 2.72 g/L로 증가하였

다. 또한 열처리를 한 기질의 경우에는 기질 농도가 1, 2.5, 5%로 증가함에 따라서 생성된 환원당의 농도가 0.67, 2.33, 2.73 g/L로 증가하였다. 이는 열처리를 하지 않은 기질의 경우에는 기질 농도가 1, 2.5, 5%로 증가함에 따라서 환원당의 생성 수율이 15.68, 16.76, 13.98%로 나타났다. 또한 열처리를 한 기질의 경우에는 기질 농도가 1, 2.5, 5%로 증가함에 따라서 환원당의 생성 수율이 17.22, 23.96, 14.04%로 나타났다. 이는 열처리를 한 경우나 그렇지 않은 경우에 있어서 2.5%의 기질 농도에서 가장 높은 환원당 생성 수율을 나타내는 것이다. 그러나 각각의 기질 농도에서 열처리 여부에 따른 환원당 수율을 비교하면 열처리를 한 기질을 사용한 경우에 있어서 0.06-7.2% 정도의 수율이 증가하였다.

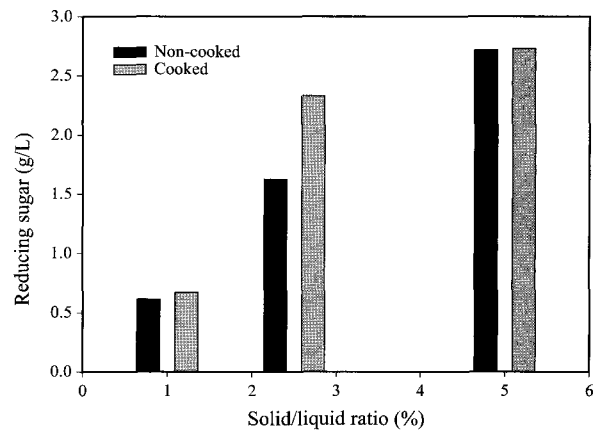


Fig. 5. Effect of solid/liquid ratio on hydrolysis of heat-treated and non-treated *Hizikia fusiformis* with 20% enzyme preparation at 24 h.

4. 결론

본 연구에서는 해양바이오매스 자원인 갈조류 톳 (*Hizikia fusiforme*)을 상용 효소를 사용하여 가수분해하여 환원당으로 전환하는데 미치는 인자들의 영향을 조사하였다. 실험에 사용한 톳은 38.9%의 환원당, 4.8% 수분, 17.8% ash, 그리고 38.5%의 기타 물질로 구성되어 있었다. 1.5%의 기질 농도에서 효소 가수분해 결과 기질농도가 증가할수록 많은 양의 환원당이 생성되었으나, 반응 24시간 이후에는 가수분해 정도가 일정하게 유지되었다. 반응 75시간을 기준으로 환원당의 생성 수율을 비교하면, 1%의 기질에서 16.45%, 2.5%의 기질에서 17.99%, 5%의 기질에서 14.55%를 나타내어 2.5%의 기질 농도에서 가장 높았다. 효소 농도에 따른 영향을 조사한 결과, 기질농도 1%에서는 효소량의 증가에 따른 큰 변화를 보이지 않았지만, 2.5%의 기질에서는 효소량이 증가하면 환원당 생성이 급격히 증가하였다. 효소의 농도는 기질 1%와 2.5% 농도에서 30%의 효소를 첨가한 경우에 각각 18.77%와 22.83%로 높은 수율을 나타내었다. 열처리 전·후의 효소 가수분해능을 비교한 결과, 열처리를 한 경우나 그렇지 않은 경우에 있어서 2.5%의 기질 농도에서 가장 높은 환원당 전환율을 나타내었고, 열처리에 따라 0.06-7.2% 정도의 수율이 증가하였다. 이러한 결과는 해양

바이오매스인 톳으로 부터 미생물을 통한 바이오연료와 화학 물질의 생산공정에 기초적인 정보를 제공할 것으로 판단된다.

감사

이 논문은 2009학년도 부경대학교의 지원을 받아 수행된 연구임 (PKS-2009-013).

References

1. Yeon, J. H., H. B. Seo, S. H. Oh, W. S. Choi, D. H. Kang, H. Y. Lee, and K. H. Jung (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB Journal* 25: 283-288.
2. Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *KSBB Journal* 24: 483-488.
3. Kang, K. Y., S. Y. Park, K. H. Bang, H. Park, G. T. Jeong, and D. H. Park (2010) Study on enzymatic hydrolysis of rapeseed straw. *Journal of Research Institute for Catalysis* 31: 77-85.
4. Lee, S. J., S. Go, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2011) Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 561-566.
5. Jeong, G. T. and D. H. Park (2010) Production of sugars and levulinic acid from marine biomass *Gelidium amansii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161: 41-52.
6. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
7. Korean Society of Food Science and Technology (2004) *Dictionary of Food Science and Technology*. Gwang Il Munhwasa, Korea.
8. Kim, C. (2010) *Saccharification of Gelidium amansii by acid hydrolysis to generate mixed sugars*. M.S. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
9. Kim, J. K. (2010) *Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Ulva pertusa Kjellman*. M.S. Thesis. Inha University, Incheon, Korea.
10. Choi, D., H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, and H. Cho (2009) Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *Journal of Industrial and engineering Chemistry* 15: 12-15.
11. Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker (2008) "Determination of structural carbohydrates and lignin" in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42618.