

## 해조류 파래로부터 지질 추출에 미치는 전처리 방법의 영향

정귀택\*, 박돈희<sup>1,2</sup>

# Effect of Pretreatment Method on Lipid Extraction from *Enteromorpha intestinalis*

Gwi-Taek Jeong\* and Don-Hee Park<sup>1,2</sup>

접수: 2013년 11월 21일 / 게재승인: 2013년 12월 30일  
© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, we investigate the effect of pretreatment method on lipid extraction from *Enteromorpha intestinalis* using physical, thermo-chemical, and enzymatic process such as ultrasonication, high temperature treatment, freezing, microwave irradiation, osmotic shock, pH shock, homogenizing, and enzymatic treatment. In pretreatment with separated lipid extraction, the high extraction yield was obtained by high temperature treatment (121°C for 5 min) with 0.1 N HCl, which is 1.4 times higher than that of control. In pretreatment with direct lipid extraction, the high extraction yields were obtained by 0.1 N HCl pretreatment, microwave irradiation (700 W, 1 min with twice), and 10% NaCl pretreatment, which is 1.45 times higher than that of control. In the result of enzymatic pretreatment with 17 kinds of enzymes, Cellic CTec II showed the high extraction yield of 5.3%, and which is 1.9 times higher than that of control. Moreover, the extraction yield was increased by the increase of enzyme amounts. In 10% enzyme amount, about 5.8% yield was obtained.

**Keywords:** Pretreatment method, Lipid extraction, *Enteromorpha intestinalis*

### 1. 서론

해조류는 바다에 서식하는 미세조류 (식물성 플랑크톤)과 거대조류 (녹조류, 갈조류, 홍조류, 남조류)로 성장이 육상의 식물에 비하여 빠르고 단위면적당 생산성이 높다고 알려져 있다. 이러한 해조류는 탄수화물 및 지질의 함량이 종 (species)이나 수확 장소 및 시기에 따라 다양할 뿐만 아니라, 그 구성도 다양하다고 알려져 있다 [1-5]. 거대조류로부터 생산되는 2,400종 이상의 천연물질이 의약품 및 식품산업에 중요하게 사용되고 있다고 보고되고 있다 [6]. 또한 고농도의 다가불포화지방산 (polyunsaturated fatty acid), 탄수화물, 비타민, 무기염류 등을 함유하는 해조류는 식품이나 동물 사료에 첨가제로 사용되고 있다 [6-8]. 최근에는 바이오에너지의 원료물질로서 적용가능성이 지속적으로 확대 연구되고 있다 [1-5].

녹조식물문 갈파래목 (Ulvales) 갈파래과 (Ulvaaceae)에 속하는 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*)는 전 세계에 분포하는 해조류로서, 우리나라의 전 연안 해안의 바위에 부착하여 서식하고 있다. 창자파래는 길이 수 cm에서 수 m, 직경 1~5 cm 정도의 녹색의 얇은 막으로 된 대롱모양을 보인다. 상부는 확대하여 다소 부풀거나 쪼글쪼글하게 꼬여지며, 불규칙하게 잘록하게 생겨 창자모양을 나타내며, 외가닥으로 가지를 내지 않는다. 세포는 직경이 10~16  $\mu\text{m}$ 이며, 불규칙하게 배열되어 있고, 높이는 12~30  $\mu\text{m}$ 이다. 동속에는 납작파래 (*E. compressa*), 가시파래 (*E. prolifera*), 잎파래 (*E. linza*) 등이

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

<sup>1</sup>전남대학교 생물공학과  
<sup>2</sup>Department of Biotechnology and Bioengineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>2</sup>전남대학교 바이오에너지 및 바이오소재 협동과정  
<sup>3</sup>Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy and Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

있다 [9,10]. 파래는 섬유소, 단백질, 지방, 철분, 칼슘, 비타민 등을 많이 함유하고 있고, 우리나라에서 예로부터 고급 식품으로 이용되어 왔다 [7,8,10]. 창자파래의 생리활성 성분에 대한 연구에는 phenol 성분과 항산화 효과, 항산화 물질, nitrate 제거 활성, angiotensin-1 전환효소 저해활성, 저분자 peptide의 기능성, 항돌연변이 활성 및 암 성장 억제 등에 대한 연구가 보고되었다 [9,11-15]. 또한 식품으로서의 영양성 등에 관한 연구가 수행되었다 [7-9].

일반적으로 해조류에서 유용성분의 분리에는 온수나 산, 알칼리 또는 효소를 이용한 방법이 사용되고 있다 [16]. 종전에 사용되고 있는 방법으로는 갈조류인 톳 (*Hizikia fusiforme*)을 열처리 [17]와 산 처리 [17]하였고, 홍조류인 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*)를 촉매로 황산 [2,18]과 이온성 액체 ([Choline]HSO<sub>4</sub>)[18]를 사용하였다. 갈조류 다시마 (*Saccharina japonica*)에 이온성 촉매를 적용하였다 [5]. 효소를 사용한 경우에는 미역 (*Undaria pinnatifida*)과 다시마 (*S. japonica*) 혼합물을 대상으로 ascorbic acid와 liquozyme을 [19], 그리고 톳 (*H. fusiforme*)에 Viscozyme L을 적용한 경우 [16]가 보고되었다. 또한 고압액화추출기를 이용하여 모자반 (*Sargassum sagamianum*) 처리한 경우 [20]와 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)를 마이크로웨이브를 조사하여 전처리 [21] 한 연구 결과가 보고되었다. 목질계 자원으로부터 바이오매스의 가수분해를 증진하기 위하여 전처리를 수행함으로써 추후에 계속되는 반응의 수율을 증가시키고 있다. 목질계 자원의 전처리 방법으로는 수열 (hydrothermal) 처리, 묽은 산 (dilute acid), 암모니아 폭쇄 (ammonia fiber expansion), 암모니아수 침지 (soaking in aqueous ammonia), 증기폭쇄 (steam explosions), 알칼리 (alkaline), 무기염 (inorganic salts) 처리 등 다양한 방법이 적용되고 있다 [22].

본 연구에서는 창자파래로부터 지질을 추출하기 위하여 여러 가지 전처리 방법을 적용하여 적절한 전처리 방법을 선정하고자 하였다. 파래로부터 지질을 추출하기 위하여 물리적, 화학적, 효소적인 전처리 방법을 적용하여 전처리 방법을 선정하고자 하였다. 적용한 전처리 방법으로는 초음파 조사, 고온 열처리, 동결, 마이크로파 조사, 삼투압 조절, pH 충격, 균질화, 효소처리의 방법을 적용하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

실험에 사용한 창자파래 (*Enteromorpha intestinalis*)는 전남 진도에서 2012년에 수확한 것을 건조한 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 효소로는 Viscoferm, viscozyme L, Ultraflo Max, Celluclast 1.5L, Cellic CTec II, Pectinex 5X L, Pectinex Ultra SP-L, Novozyme 188, Citrozym Ultra L, Cellic HTec II, AMG 300L, Termamyl 120L, Mannaway 4.0T, Protamex, Viscoflow MG는 Novozyme 사 (덴마크)의 것을, 그리고  $\alpha$ -amylase와 amyloglucosidase는 Sigma-Aldrich 사 (미

국)의 것을 사용하였다. Hydrochloric acid, sodium hydroxide, chloroform, methanol, citric acid 등의 분석용과 추출용매는 특급시약을 사용하였다.

## 2.2. 전처리 방법의 선정

### 2.2.1. Pretreatment with separated lipid extraction

전처리 방법에 따른 지질 추출 수율을 조사하기 위해 파래 시료 5 g에 50 mL의 증류수를 첨가하여 shaking incubator에서 400 rpm의 속도로 상온에서 30분간 침지 교반한 후, 아래의 전처리 방법에 따라 전처리하였다. 전처리 후 반응액을 50 mL tube에 넣어 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 분리한 후 잔류물을 얻었다. 얻은 잔류물을 60°C에서 24시간 동안 건조한 후 분쇄하여 지질 추출용 시료로 사용하였다. 사용한 전처리 방법은 다음과 같다. (1-1) 초음파 파쇄기 (550 Sonic Dismembrator, 20 kHz, Fisher Scientific, USA)를 이용하여 초음파를 5초 조사/2.5초 정지의 과정으로 5분 동안 조사하였다. (1-2) 초음파 세척기(40 KHz, 200 W, Daihan-Sci, Korea)를 이용하여 50°C에서 200 W로 30분 동안 초음파를 조사하였다. (1-3) 초음파 세척기를 이용하여 50°C에서 200 W로 10분 동안 초음파를 조사하였다. (2-1) 증류수에 현탁한 시료를 증기멸균기를 사용하여 121°C에서 5분 동안 열처리하였다. (2-2) 0.1M HCl 용액에 현탁한 시료를 증기멸균기를 사용하여 121°C에서 5분 동안 열처리하였다. (2-3) 0.1 M NaOH 용액에 현탁한 시료를 증기멸균기를 사용하여 121°C에서 5분 동안 열처리하였다. (3) 시료를 -20°C에서 동결 후 해동하여 전처리하였다. (4-1) 전자레인지(KR-G20M W, 2,450 MHz, 대우일렉트로룩스)를 이용하여 700 W에서 1분 동안 마이크로파를 조사하여 전처리하였다. (4-2) 전자레인지를 이용하여 500 W에서 2분 동안 마이크로파를 조사하여 전처리하였다. (5) 삼투압의 효과를 확인하기 위하여 10% NaCl 용액에 시료를 48시간 동안 처리하였다. (6-1) pH의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.1 N HCl 용액 (pH 1.32)에 현탁하여 20°C에서 30분간 처리하였다. (6-2) pH의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.1 N NaOH 용액 (pH 12.27)에 현탁하여 20°C에서 30분간 처리하였다.

### 2.2.2. Pretreatment with direct lipid extraction

전처리 방법에 따른 지질 추출 수율을 조사하기 위해 건조 파래 시료 1 g에 100 mL의 증류수를 첨가하여 30분간 침지 교반 (400 rpm)한 후 아래와 같이 전처리 방법별로 전처리하여 반응액에 100 mL의 추출용매 (chloroform-methanol = 2:1)를 첨가하고 응축기를 장착하여 60°C에서 1시간 동안 교반하면서 추출한 후 여과지를 이용하여 고형물을 여과 분리하였다. 여과액은 분액여두를 이용하여 유기층 (하층)과 수층 (상층)으로 분리한 후 하층의 지질이 함유된 유기층만을 건조하여 중량을 측정하였다. 이 잔류량으로부터 추출률을 계산하였다. 전처리 방법은 다음과 같다.

Ultrasonication (초음파 파쇄기를 이용하여 초음파를 5초 조사/2.5초 정지의 과정으로 5분 동안 조사하였다.); Osmotic

shock (삼투압 조절의 효과를 확인하기 위하여 4°C에서 10% NaCl 용액에 시료를 48시간 동안 처리하였다.); Ultrasonic bath (초음파 세척기를 이용하여 50°C에서 200 W로 30분 동안 초음파를 조사하였다.); Microwave treatment A (전자레인지를 이용하여 500 W에서 2분 동안 마이크로파를 조사하여 전처리를 수행하였다.); Microwave treatment B (전자레인을 이용하여 700 W에서 1분씩 2회 마이크로파를 조사하였다.); Heat treatment (증류수에 현탁한 시료를 증기멸균기를 사용하여 121°C에서 5분 동안 열처리하였다.); pH shock (0.1 N HCl) (pH의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.1 N HCl 용액(pH 1.32)에 현탁하여 20°C에서 30분간 처리하였다.); pH shock (0.1 N NaOH) (pH의 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.1 N NaOH 용액(pH 12.27)에 현탁하여 20°C에서 30분간 처리하였다.); Homogenizing (Homogenizer(WiseTis® HG-15A, Daihan-Sci, Korea)를 이용하여 20% power로 5분 동안 균일화하였다.); Deep freezing (시료를 -20°C에서 동결 후 해동하였다.).

### 2.2.3. 효소 전처리

#### 2.2.3.2. 효소의 선정

효소 전처리에 따른 지질 추출 수율을 조사하기 위해 건조 파래 시료 5 g에 50 mL의 sodium citrate buffer (pH 4.8)를 첨가하여 shaking incubator에서 400 rpm의 속도로 상온에서 30분간 침지 교반한 후, 전처리용 효소 (바이오매스 중량기준 5%)를 250  $\mu$ L 또는 250 mg 첨가하여 shaking incubator에서 45°C에서 170 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 전처리를 수행하였다. 효소별로 전처리한 반응액을 50 mL tube에 넣고 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액을 제거하고, 잔류물을 60°C에서 24시간 동안 건조한 후 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어 지질 추출용 시료로 사용하였다. 전처리에 사용한 효소는 다음과 같다. Viscoferm (E1), viscozyme L (E2), Ultraflo Max (E3), Celluclast 1.5L (E4), Cellic CTec II (E5), Pectinex 5X L (E6), Pectinex Ultra SP-L (E7), Novozyme 188 (E8), Citrozym Ultra L (E9), Cellic HTec II (E10), AMG 300L (E11), Termamyl 120L (E12), Mannaway 4.0T (E13), Protamex (E14), Viscoflow MG (E15),  $\alpha$ -amylase (E16), amyloglucosidase (E17), 1% sulfuric acid (E18), Control A (citrate buffer), Control B (distilled water).

#### 2.2.3.2. 효소량의 영향

효소 전처리에 선정된 효소를 대상으로 효소 첨가량이 미치는 영향을 알아보기 위해, 건조 파래 시료 5 g에 50 mL의 sodium citrate buffer (pH 4.8)를 첨가하여 shaking incubator에서 상온에서 400 rpm의 속도로 30분간 침지 교반한 후, 전처리용 효소 Cellic CTec II를 바이오매스 중량을 기준으로 1~10% (50~500  $\mu$ L)를 첨가하여 shaking incubator에서 45°C, 170 rpm의 조건으로 교반하면서 24시간 반응하여 전처리하였다. 조건별로 전처리한 반응액을 50 mL tube에 넣고 4,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, 잔류물은

60°C에서 24시간 동안 건조한 후 분말로 분쇄하여 지질 추출용 시료로 사용하였다.

### 2.3. 분석방법

전처리된 시료로부터 지질의 추출은 다음과 같이 수행하였다. 전처리한 분말 시료 500 mg에 10 mL의 추출용매 (chloroform-methanol = 2:1)를 첨가하여 45°C에서 500 rpm으로 2시간 동안 교반하면서 추출한 후 추출액을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 취하여 건조 후 잔류량을 측정하였다. 이 잔류량으로부터 추출률을 계산하였다.

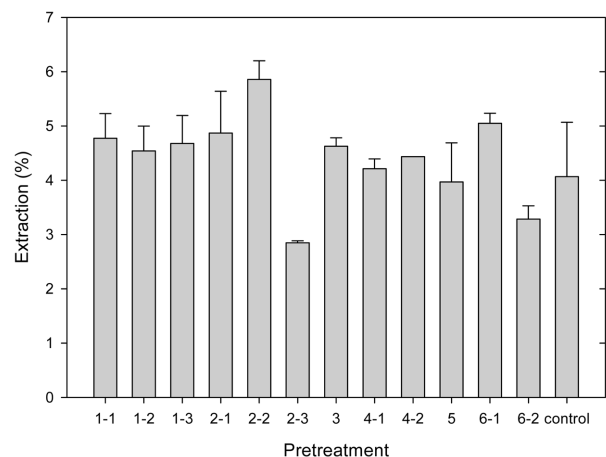
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 파래로부터 지질 추출을 위한 전처리 방법의 선정

파래로부터 지질을 추출하기 위하여 물리적, 화학적, 효소적인 전처리 방법을 적용하여 전처리 방법을 선정하고자 하였다. 적용한 전처리 방법으로는 초음파 조사, 고온 열처리, 동결, 마이크로파 조사, 삼투압 조절, pH 충격, 균질화, 효소처리의 방법을 적용하였다.

#### 3.1.1. Pretreatment with separated lipid extraction

파래로부터 지질을 추출하기 위하여 12가지의 전처리 방법을 적용한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 초음파를 조사하여 전처리한 경우 (1-1, 1-2, 1-3)에서는 4.5~4.8% 정도의 수율을 나타내었다. 초음파 파쇄기를 사용한 경우 (1-1)에서는 4.77%의 수율을, 초음파 세척기를 사용한 경우 (1-2, 1-3)에서는



**Fig. 1.** Effect of pretreatment with separated lipid extraction of *E. intestinalis*. Control, 1-1 (ultrasonication, 5 s/2.5 s/5 min), 1-2 (ultrasonic bath, 50°C, 200 W, 30 min), 1-3 (ultrasonic bath, 50°C, 200 W, 10 min), 2-1 (heat treatment, 121°C, 5 min), 2-2 (heat treatment, 121°C, 5 min, 0.1 M HCl), 2-3 (heat treatment, 121°C, 5 min, 0.1 M NaOH), 3 (deep freezing, -20°C), 4-1 (microwave treatment, 700 W, 1 min), 4-2 (microwave treatment, 500 W, 2 min), 5 (osmotic shock, 10% NaCl, 48 hr), 6-1 (pH shock, 0.1 N HCl, 20°C, 30 min), 6-2 (pH shock, 0.1 N NaOH, 20°C, 30 min).

4.54%와 4.68%의 수율을 보였다. 초음파 조사의 경우에 있어서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 초음파 조사의 조건 (초음파 세기, 시간, 용량)에 따라 차이가 있을 수 있다고 판단된다. Lee 등 [23]은 미세조류인 *Botryococcus* sp.를 대상으로 초음파 조사 (10 kHz, 5분)하여 세포파쇄 후 지질을 추출한 결과, microwave oven (28.6%)와 bead-beating (28.1%)에 비하여 낮은 수율 (8.8%)을 보고하였다. 또한 *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp.를 대상으로 한 경우에서도 상대적으로 낮은 수율을 보고하였다.

열처리에 의한 전처리 영향을 알아보기 위해 시료를 증류수 (2-1), 0.1 M HCl 용액 (2-2), 0.1 M NaOH 용액 (2-3)에 현탁하여 121°C에서 5분 동안 열처리를 수행한 결과, 증류수, 0.1 M HCl 용액, 0.1 M NaOH 용액의 경우 각각 4.87%, 5.86%, 2.85%의 지질 추출수율을 얻어 0.1 M HCl 용액을 이용한 경우에서 가장 높은 값을 나타내었다. 이는 열과 산이 파래의 전처리에 많은 영향을 미친 것으로 판단된다. Lee 등 [23]은 미세조류인 *Botryococcus* sp.를 대상으로 한 전처리에서 열처리 (autoclaving, 125°C, 1.5 MPa, 5분) 조건에서 bead-beating과 microwave 처리에 비하여 2배 정도 낮은 수율을 보고하였다.

시료를 -20°C에서 동결 후 해동하여 전처리 (3)한 경우에는 4.63%의 수율을 보였다. 마이크로웨이브 조사를 통한 전처리 (4-1, 4-2)에서는 700 W에서 1분 동안 조사한 경우에는 4.21%를, 500 W에서 2분 동안 조사한 경우에는 4.43%의 수율을 얻었다. 실험 중 마이크로웨이브 조사에 의한 고열 발생 (100°C 이상)이 확인되었으며, 용액의 증발이 관찰되었다. 마이크로웨이브 조사의 조건 (세기, 시간, 용량)에 따라 차이가 있을 수 있다고 판단된다. Lee 등 [23]은 미세조류인 *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp.를 대상으로 초음파조사 (10 kHz, 5분)하여 세포파쇄 후 지질을 추출한 결과, 종에 따라 차이는 있지만, autoclaving, bead-beating, sonication, osmotic shock 처리에 비하여 높은 수율을 보고하였다. 이러한 microwave 처리 방법은 단순하고 쉬운 효율적인 방법으로 상대적으로 대규모화에도 장점이 있다고 알려져 있다 [A]. Suganya 등 [B]은 *Enteromorpha compressa*의 지질을 대상으로 바이오디젤 생산연구를 수행하는 과정에서 지질의 추출을 위한 전처리 과정으로 microwave 처리 (24 kHz, 50°C, 5분)한 후, soxhlet extraction (1% diethyl ether+10% methylene chloride in n-hexane, 6시간)하여 11.14%의 추출수율을 보고하였다.

삼투압을 이용한 전처리 (10% NaCl 용액에 시료를 48시간 동안 처리)한 경우 (5)에서는 3.97%의 수율을 나타내었다. Lee 등 [23]은 미세조류인 *Botryococcus* sp., *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus* sp.를 대상으로 osmotic shock 처리한 결과, autoclaving과 sonication과 비슷한 추출수율을 보고하였다.

pH에 의한 전처리 영향을 알아보기 위해 시료를 0.1 M HCl 용액 (6-1), 0.1 M NaOH 용액 (6-2)에 현탁하여 20°C에서 30분간 처리하였다. 0.1 M HCl 용액을 사용한 경우에는 5.05%, 0.1 M NaOH 용액의 경우에는 3.28%를 나타내었

다. 알칼리성 조건에서 (2-3, 6-2)에서는 산성 조건보다 지질 추출수율이 낮았다. 전처리를 하지 않은 시료에서는 약 4.07% 정도의 지질추출 수율을 나타내었다. 전체 전처리 조건 중 시료를 0.1 N HCl에 침지 후 121°C에서 5분간 처리한 방법에서 가장 높은 수율을 나타내었다. 이는 대조구에 비하여 약 1.4배의 수율이 증가한 것이다.

### 3.1.2. Pretreatment with direct lipid extraction

파래로부터 지질을 추출하기 위하여 11가지의 전처리 방법 별로 전처리하고 반응액에 추출용매 (chloroform-methanol=2:1)를 바로 첨가하여 지질을 추출한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 초음파 파쇄기를 이용하여 초음파를 5초 조사/2.5초 정지의 과정으로 5분 동안 조사 (ultrasonication)한 경우에는 5.27%의 지질 추출수율을 나타내었다. 삼투압 조절에 의한 전처리 효과를 확인하기 위하여 4°C에서 10% NaCl 용액에 시료를 48시간 동안 전처리 (osmotic shock)한 경우에는 5.55%의 수율을 나타내었다. 초음파 세척기를 이용하여 50°C에서 200 W로 30분 동안 초음파를 조사 (ultrasonic bath)한 경우에는 4.5%의 수율을 나타내었다. 전자레인지를 이용하여 500 W에서 2분간 (microwave treatment A)과 700 W에서 1분씩 2회 (microwave treatment B) 마이크로파를 조사하여 전처리를 수행한 결과 각각 5.28%와 5.48%의 수율을 나타내었다. 증류수에 현탁한 시료를 121°C에서 5분 동안 열처리 (heat treatment)를 수행한 경우에는 4.3%의 수율을 얻었다. pH가 전처리에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시료를 0.1 N HCl 용액 (pH 1.32) (pH shock-acid)과 0.1 N NaOH 용액 (pH 12.27) (pH shock-alkali)에 현탁하여 20°C에서 30분간

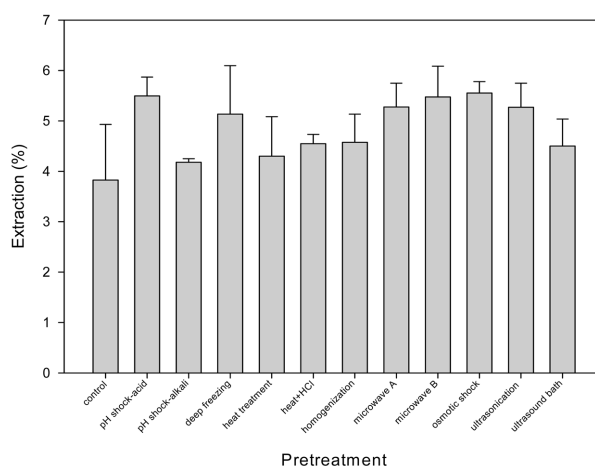


Fig. 2. Effect of pretreatment with direct lipid extraction of *E. intestinalis*. Control, Ultrasonication (10 kHz, 5 s/2.5 s, 5 min), Osmotic shock (10% NaCl, 4°C, 48 hr), Ultrasonic bath (200 W, 50°C, 30 min), Microwave A (microwave irradiation, 500 W for 2 min), Microwave B (microwave irradiation, 700 W for 1 min\*2 times), Heat treatment (121°C, 5 min), pH shock-acid (0.1 N HCl, pH 1.32, 20°C, 30 min), pH shock-alkali (0.1 N NaOH, pH 12.27, 20°C, 30 min), Homogenization (20% power, 5 min), Deep freezing (-20°C for 2 day).

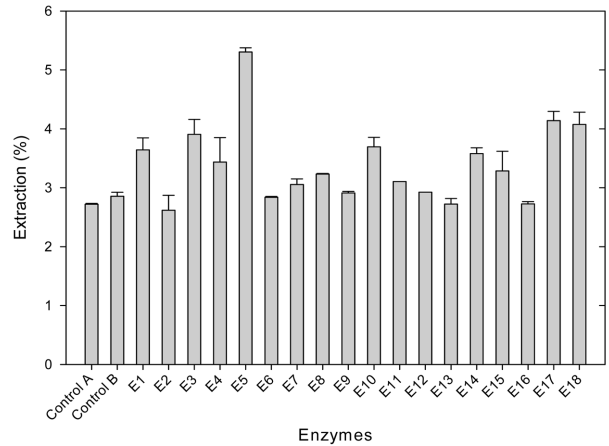
전처리한 결과, 각각 5.5%와 4.18%의 수율을 얻었다. Homogenizer를 이용하여 20% power로 5분 동안 시료를 균일화하여 전처리 (homogenization)한 결과 4.58%의 수율을 얻었다. 시료를 -20°C에서 동결 후 해동하여 전처리 (deep freezing)를 수행한 결과 5.13%의 수율을 얻었다. 전처리를 하지 않은 시료에서는 약 3.83% 정도의 지질추출 수율을 나타내었다. Prabakaran과 Ravindran [25]에 의하면 *Chlorella sp.*, *Nostoc sp.*, *Tolypothrix sp.*를 대상으로 sonication, osmotic shock, microwave, autoclave, bead beating을 이용한 세포파쇄 후 지질을 추출한 결과, 종마다 상이하지만, *Chlorella sp.*, *Nostoc sp.*에서는 sonication을 한 후 지질 추출한 경우에 있어서 대부분의 종에서 높은 함량을 얻었다고 보고하였다. 또한 *Tolypothrix sp.*에서는 microwave에서 sonication보다 조금 높은 함량을 얻었다고 보고하였다. Gonzalez-Fernandez 등 [26]은 *Scenedesmus sp.*를 대상으로 메탄발효를 위한 가용물질을 얻기 위하여 ultrasound와 thermal pretreatment를 수행한 결과, 128.9 MJ/Kg의 ultrasound energy를 조사하여 대조구보다 3.1배 높은 가용성 물질 (COD<sub>sol</sub>)을 추출하였으며, 70~80°C의 열처리에서는 이보다 낮은 1.9~2.3배의 COD<sub>sol</sub>을 얻었다고 보고하였다.

전체 전처리 조건 중 시료를 0.1 N HCl에 전처리한 경우 (pH shock-acid)와 700 W에서 1분씩 2회 마이크로파를 조사하여 전처리 (microwave B) 한 경우, 그리고 10% NaCl로 처리한 경우 (osmotic shock)에서 높은 수율을 나타내었다. 이들은 대조구에 비하여 약 1.45배 높은 수율을 나타낸 것이다.

### 3.1.3. 효소 전처리

#### 3.1.3.1. 전처리 효소 선정

상용 효소 17종을 바이오매스 중량 기준으로 5%가 되게 첨가하여 shaking incubator에서 45°C에서 170 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 전처리하여 얻은 고형물을 건조·분쇄한 시료로부터 지질을 추출하여 전처리 영향을 비교하였다 (Fig. 3). Control A (buffer)와 Control B (distilled water)은 각각 2.72%와 2.86%를 나타내어 효소 전처리를 위한 buffer의 영향은 미미한 것으로 나타났다. 1% sulfuric acid (E18)를 이용하여 전처리한 경우에는 4.07%의 수율을 나타내었다. Viscozyme L (E2), Mannaway 4.0T (E13),  $\alpha$ -amylase (E16), Pectinex 5X L (E6), Citrozym Ultra L (E9), Termamyl 120L (E12)의 경우에는 2.3~2.9%의 낮은 수율을 나타내었다. Pectinex Ultra SP-L (E7), AMG 300L (E11), Novozyme 188 (E8), Viscoflow MG (E15), Celluclast 1.5L (E4), Protamex (E14), Viscoferm (E1), Cellic HTec II (E10), Ultraflo Max (E3), amyloglucosidase (E17)의 경우에는 3.1~4.1% 수율을 나타내었다. 대부분의 효소들이 pectinase, amylase, cellulase, protease로 구성되어 있었다. Cellic CTec II (E5)은 5.3%의 수율을 나타내어 가장 높은 수율을 얻었다. Cellic CTec II은 cellulase로 구성된 상용효소이다. 효소가 파래의 섬유소를 분해하여 지질의 추출에 도움을 준 것으로 판단된다. 이는 대조구에 비하여서는 1.9배 증가한 것이다. 또한 1% sulfuric acid를 처리한 것과

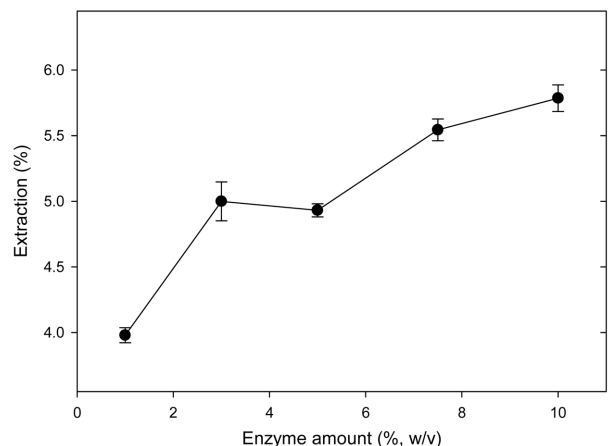


**Fig. 3.** Effect of enzymatic pretreatment on lipid extraction of *E. intestinalis*. Control A (buffer), Control B (distilled water), Viscoferm (E1), Viscozyme L (E2), Ultraflo Max (E3), Celluclast 1.5L (E4), Cellic CTec II (E5), Pectinex 5X L (E6), Pectinex Ultra SP-L (E7), Novozyme 188 (E8), Citrozym Ultra L (E9), Cellic HTec II (E10), AMG 300L (E11), Termamyl 120L (E12), Mannaway 4.0T (E13), Protamex (E14), Viscoflow MG (E15),  $\alpha$ -amylase (E16), amyloglucosidase (E17), 1% sulfuric acid (E18).

비교해도 1.3배 높은 결과이다. 효소를 사용한 연구로는 마이크로웨이브 조사를 통하여 구멍갈파래를 전처리한 후  $\alpha$ -amylase, cellulase,  $\beta$ -glucosidase와 효소 반응한 결과 [21], 갈조류인 톱을 효소 가수분해한 결과 [16], 다시마와 미역 혼합물에 ascorbic acid로 전처리하고 liquozyme으로 가수분해하여 당을 얻은 결과 [19]로 주로 당을 추출하기 위한 연구 결과들이 보고되었다.

#### 3.1.3.2. 전처리 효소량의 영향

파래 전처리에 적용가능한 효소로 선정된 Cellic CTec II를 이용하여 효소량이 전처리에 미치는 영향을 알아보기 위하여 효소를 바이오매스 중량 기준으로 1~10%가 되게 첨가하여



**Fig. 4.** Effect of enzyme amount on enzymatic pretreatment of lipid extraction.

45°C에서 170 pm으로 교반하면서 24시간 동안 전처리를 수행한 후 얻은 고형물을 건조·분쇄한 시료로부터 지질을 추출하여 전처리에 미치는 효소량의 영향을 조사하였다 (Fig. 4). 전처리에 사용한 효소의 양이 증가할수록 추출수율도 증가함을 나타내었다. 10%의 농도로 처리한 경우에 약 5.8%의 수율을 나타내었다. 이는 보다 많은 섬유소 및 세포벽 구조가 파괴되어 지질이 용이하게 추출되는 것으로 판단된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 창자파래로부터 지질을 추출하기 위하여 초음파 조사, 고온 열처리, 동결, 마이크로파 조사, 삼투압 조절, pH 충격, 균질화, 효소처리 방법의 물리적, 화학적, 효소적인 전처리 방법을 대상으로 전처리 효과를 조사하였다. 전처리를 수행한 후 건조 분쇄된 고형물로부터 지질을 추출한 결과, 시료를 0.1 N HCl에 침지 후 121°C에서 5분간 처리한 방법에서 대조구에 비하여 약 1.4배 높은 수율을 나타내었다. 또한, 전처리 후 반응액에 추출용매를 바로 첨가하여 지질을 추출 (direct extraction)한 결과에서는 시료를 0.1 N HCl에 전처리한 경우와 700 W에서 1분씩 2회 마이크로파를 조사하여 전처리한 경우, 그리고 10% NaCl로 처리한 경우에서 대조구에 비하여 약 1.45배 높은 수율을 나타내었다. 효소를 사용하여 전처리한 결과, cellulase로 주로 구성된 상용효소인 Cellic CTec II가 가장 높은 5.3%의 수율을 나타내어, 대조구에 비하여 1.9배 증가한 결과를 나타내었다. 또한 전처리에 사용한 효소의 양이 증가할수록 추출수율도 증가하여 10%의 농도에서 약 5.8%의 수율을 나타내었다. 이러한 결과로부터 해조류 파래로부터 지질성분을 분리하는데 있어 적절한 전처리 과정을 거침으로써 추출수율을 증대할 수 있고, 추출된 지질성분은 향후 지질성분의 기능성 및 에너지 자원으로서의 연구에 기초자료가 될 것이다.

#### 감사

이 논문은 2012년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임 (2012R1A1A2006718).

#### REFERENCES

- Jeong, G. T. and D. H. Park (2011) Production of levulinic acid from marine algae *Codium fragile* using acid-hydrolysis and response surface methodology. *KSBB J.* 26: 341-346.
- Jeong, G. T. and D. H. Park (2010) Production of sugars and levulinic acid from marine biomass *Gelidium amansii*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161: 41-52.
- Jang, J. S., Y. Cho, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2012) Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35: 11-18.
- Meinita, M. D. N., Y. K. Hong, and G. T. Jeong (2012) Comparison of sulfuric and hydrochloric acids as catalysts in hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *Bioprocess Biosyst. Eng.* 35: 123-128.
- Park, D. H. and G. T. Jeong (2013) Production of reducing sugar from macroalgae *Saccharina japonica* using ionic liquid catalyst. *Korean Chem. Eng. Res.* 51: 106-110.
- Kumari, P., C. R. K. Reddy, and B. Jha (2011) Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal. Biochem.* 415: 134-144.
- Chandini, S. K., P. Ganesan, P. V. Suresh, and N. Bhaskar (2008) Seaweeds as source of nutritionally beneficial compounds - A review. *J. Food Sci. Technol.* 45: 1-13.
- Kumari, P., M. Kumar, V. Gupta, C. R. K. Reddy, and B. Jha (2010) Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem.* 120: 749-757.
- Han, Y. B. (2010) Edible Seaweed II - Components and biological activity. pp. 262-269. Korea University Pres, Korea.
- Lee, Y. P. (2008) *Seaweed in Jeju*, Academic Press.
- Kwak, C. S., S. A. Kim, and M. S. Lee (2005) The correlation of antioxidative effects of 5 Korean common edible seaweeds and total polyphenol content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 1143-1150.
- Kim, S. A., J. Kim, M. K. Woo, C. S. Kwak, and M. S. Lee (2005) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34: 451-459.
- Park, J. H., K. C. Kang, S. B. Baek, Y. H. Lee, and K. S. Rhee (1991) Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J. Food Sci. Technol.* 23: 256-261.
- Lee, H. O., D. S. Kim, J. R. Do, and Y. S. Ko (1999) Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 427-431.
- Choi, J. S., J. H. Lee, and J. H. Jung (1997) The screening of nitrite scavenging effect of marine, algae and active principles of *Ecklonia Stolonifera*. *J. Korean Fish. Soc.* 30: 909-915.
- Song, B. B., S. K. Kim, and G. T. Jeong (2011) Enzymatic hydrolysis of marine algae *Hizikia fusiforme*. *KSBB J.* 26: 347-351.
- 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.
- Kim, C. (2010) Saccharification of *Gelidium amansii* by acid hydrolysis to generate mixed sugars. M.S. Thesis. Kyung Hee University, Seoul, Korea.
- Choi, D., H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, and H. Cho (2009) Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *J. Ind. Eng. Chem.* 15: 12-15.
- 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 J.* 25: 283-288.
- Kim, J. K. (2010) Pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Ulva pertusa* Kjellman. M.S. Thesis. Inha University, Incheon, Korea.
- Kang, K. Y., D. H. Park, and G. T. Jeong (2013) Effects of inorganic salts on pretreatment of *Miscanthus* straw. *Biores. Technol.*

- 132: 160-165.
23. Lee, J. Y., C. Yoo, S. Y. Jun, C. Y. Ahn, and H. M. Oh (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Biores. Technol.* 101: S75-S77.
24. Suganya, T., N. N. Gandhi, and S. Renganthan (2013) Production of algal biodiesel from marine macroalgae *Enteromorpha compressa* by two step process: Optimization and kinetic study. *Biores. Technol.* 128: 392-400.
25. Prabakaran, P. and A. D. Ravindran (2011) A comparative study on effective cell disruption methods for lipid extraction from microalgae. *Lett. Appl. Microbiol.* 53: 150-154
26. Gonzalez-Fernandez, C., B. Sialve, N. Bernet, and J. P. Steyer (2012) Comparison of ultrasound and thermal pretreatment of *Scenedesmus* biomass on methane production. *Biores. Technol.* 110: 610-616.