[UCI]I804:24011-200000241463

2011 년 2 월

석사학위논문

효소처리를 이용한 해조류의 셀룰로오스 계열 당화공정 개발

조선대학교 대학원
화 학 공 학 과
김 현

효소처리를 이용한 해조류의 셀룰로오스 계열 당화공정 개발

Development of seaweed saccharification process using magnetically recyclable enzymes

2011 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원
화 학 공 학 과
김 현

효소처리를 이용한 해조류의 셀룰로오스 계열 당화공정 개발

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함.

2011 년 2 월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 현

김 현의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 조 병 욱 (인)
위 원 조선대학교 교수 김 정 규 (인)
위 원 조선대학교 교수 이 중 헌 (인)

2011 년 2 월

조선대학교 대학원

목 차

Abstract V
제 1 장 서론 1
제 2 장 실험재료 및 방법 5
제 1 절 해조류 당화 공정 5
1-1 재료 5
1-2 기기 5
1-2 가수분해 6
1-3 탄수화물 분석 6
1-4 당 분석 6
1-5 액체 크로마토그래프 분석 7
제 2 절 효소 특성 분석 11
2-1 Enzyme 고정화 11
2-2 효소 고정화 특성 12
제 3 장 결과 및 고찰 17
제 1 절 해조류 당화 공정 17
1-1 탄수화물 분석 17
1-2 당 분석 19
1-3 액체 크로마토그래프 분석 21

제 2 절 효소 고정화 23
2-1 효소 고정화 23
2-2 pH 변화에 따른 안정성 25
2-3 온도 변화에 따른 안정성 27
2-4 고정화 효소의 온도에 대한 안정성 29
2-5 고정화 효소의 재사용 31
2-6 자연효소와 고정화 효소 처리로부터 다시마 당화 33
제 4 장 결론 34
참 고 문 헌 38
감사의 글 41

List of figure

Figure 1 . D-glucose production from cellulose of seaweeds.....4
Figure 2 . Standard curve for determination carbohydrate concentration by UV/vis spectrophotometer. 8
Figure 3 . Standard curve for determination of reducing sugar concentration by UV/vis spectrophotometer. 9
Figure 4 . Standard curve for determination of simple sugar concentration by HPLC system. . 10
Figure 5 . Standard curve for determination of protein concentration. 15
Figure 6 . SEM image of poly nanofiber..... 16
Figure 7 . Carbohydrate concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii*) by enzyme treatment at 1hour. 18
Figure 8 . Reducing sugar concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii* by enzyme treatment at 1hour..... 20

Figure 9 . Glucose concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii)* by enzyme treatments at 1 hour. 22
Figure 10 . Loading capacity of immobilized celluclast 24
Figure 11 . Effect of pH on the activity of free and immobilized..... 26
Figure 12 . Effect of temperature on the activity of free and immobilized..... 28
Figure 13 . Storage stability of free and immobilized celluclast at 55℃ and pH 4.0 30
Figure 14 . Effect of recycle on celluclast activity. 32
Figure 15 . Seaweeds of Saccharification process.34

Abstract

Development of seaweed saccharification process using magnetically recyclable enzymes

Kim Hyun
Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, PhD.
Department of Chemical Engineering.
Graduate School of Chosun University.

In this paper, the monosaccarification process from various seaweeds was developed. Sea alagae consist mainly of 40 ~ 70 % polysaccharides, 10 ~ 20 % proteins, and residual low molecular weight compounds such fatty acid, free amino acid and amine. This process just used immobilized enzymes to produce the simple sugars from the seaweeds. The magnetically separable polyaniline nanofiber was used as a carrier of the enzymes. The immobilized enzymes were developed for the recycle of enzyme and enhanced enzyme stability. The residual activity of immobilized enzyme was over 50 % after 15 days incubation at 55° C. Glucose was produced from various polysaccharides, *Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens* and *Gelidium amansii* with magnetically separable

immobilized enzyme. Simple sugar production rate with the seaweeds were 20 mg / 1 g and showed high decomposition rate due to high mass transfer. After 10 times recycle, the residual activity of immobilized enzyme was over 70 %.

제 1 장 서론

현재 우리가 사용하고 있는 에너지는 대부분 화석연료로부터 얻어진다. 그러나 화석연료는 매장량이 한정되어 있으며 대기오염과 지구 온난화를 비롯한 갖가지 환경 문제를 유발하는 등 많은 문제점을 안고 있기 때문에 지속 성장 (sustainable development) 을 가능하게 하는 에너지이며, 바이오 매스로부터 에너지를 얻는 바이오 에너지가 각광 받고 있다. 바이오 매스란 광합성에 의해 생성되는 식물체, 균체와 이를 먹이로 살아가는 동물체를 총칭하는 재생 가능한 에너지원으로 화학적, 생물학적인 전환을 통해 천연 화학 산업의 원료로 활용 되어 지고 있다. 이러한 바이오 매스로부터 생산되는 모든 에너지를 바이오 에너지라고 하며 현재 전 세계적으로 가장 많이 이용되고 있다. 바이오 에너지는 매년 재생산되기 때문에 자원 고갈의 염려가 없고, 생성된 에너지의 형태가 매우 다양하다. 또한 이산화탄소의 증가가 없기 때문에 지구 온난화의 문제를 발생하지 않는다. 바이오 연료의 생산은 크게 1 세대 옥수수, 감자 등의 곡물계, 2 세대 나무, 식물 등의 목질계, 3 세대 다시마, 미역 등의 해조류로 나누어진다. 1 세대인 곡물계는 식량자원이기 때문에 원료 확보가 문제가 되며, 2 세대인 목질계는 리그닌의 제거 공정비용 때문에 경제성 확보가 어렵고 산림의 파괴 문제가 있다. 그래서 현재 다양하고 생산성이 좋으며 에너지 생산 효율이 좋은 3 세대 해조류가 바이오 매스로 주목받고 있다. 사계절이고 삼면이 바다로 둘러싸인 우리나라는 햇빛과 물만 있으면 양식이 가능하고 민물보다 해수에서 성장속도가 더 우월하며 환경에 따라 종류가 다양한 해조류를 바이오 매스로

사용하기에 적합하다. 또한 여러 가지 바이오 매스원 중에서 지구 온난화의 주범으로 꼽히고 있는 이산화탄소 흡수 능력이 매우 뛰어난 것으로 밝혀졌다.

해조류는 녹조류 (green algae), 홍조류 (ged algae), 갈조류 (brwon algae) 로 나누어진다. 녹조류에는 청각, 파래, 매생이 등이 있으며 셀룰로오스, 만노오즈, 자일랜이 대표적인 성분이고 육상식물처럼 광합성을 하여 카로테인 등의 광합성 색소가 함유되어 있다. 홍조류에는 우뭇가사리, 꼬시래기 등이 있으며 카라기닌, 셀룰로오즈, agar 등이 다당류로 세포벽이 구성되어있다. 우뭇가사리는 agarose 와 agaro-fection 이 혼합되어 있어 응고성의 특징이 있기 때문에 배지에 사용되어지고 있다. 녹조류보다 깊은 물속에 서식하는 갈조류는 다시마, 톳, 미역 등이 있으며 알긴산, 후코이단이 대표적인 성분이다. 요오드와 탄산칼륨의 주 원료로서 사용되며, 아이스크림의 점성을 증가시키는 주원료로 사용되고 있다. 해조류의 산업적인 응용은 갈조류의 경우에는 갈조류에서 추출한 알긴산을 사용하여, 섬유, 식품, 제지 및 의약산업에 사용되고 있다. 알긴산은 흡수성이 우수하여 현탁제, 안정제, 유화제, 농후제, 겔화제 등으로 다양한 용도로 쓰이고 있으며 홍조류의 경우에는 홍조류로부터 추출한 아가와 카라기닌이 널리 이용되고 있다. 아가의 경우에는 미생물의 배지로 많이 사용되고 있으며 순도가 높은 아가로스는 전기영동용 시약으로 사용되고 있음 화장용품의 첨가물로 많이 사용되고 있다. 카라기닌도 다른 다당류와 같이 분산제, 유화제 등의 안정제로 그 활용성이 높다. 해조류 중 갈조류의 대표 식물인 미역으로부터 유래되는 단당류는 혈당 저하 등에 활용되고 있다고 보고되었다.

일반적으로 다당류를 분해하는 효소는 재사용이 불가능하며 안정성이 떨어지기 때문에 경제적, 산업적으로 활용하는데 문제점이 많다. 효소의 활용성을 높이기 위한 일환으로 효소의 고정화 및 안정화 기술이 많이 개발되어 왔으나 효소를 고정화 하는 경우에는 alginate 등의 polysaccharide 의 문제로 적용하기 어려웠다. 최근에는 나노

공학이 발달함에 따라 효소를 자석으로 분리가 가능한 나노 물질을 개발 중에 있으며, 여러 가지 방법으로 효소를 고정화 함으로서 효소의 지속적인 재활용이 가능해졌다.

본 연구는 고온에서 효소의 활성도를 유지할 수 있으며, 회수가 가능한 고정화 담체를 개발하여 효소를 고정화시킴으로서 이로부터 해조류 다시마, 매생이, 우뭇가사리로부터 바이오 매스인 단당류를 확보하여 바이오 에너지를 경제적으로 생산할 수 있는 가능성을 보이기 위한 내용으로 최종 생산물인 에탄올 생산에 혁신적인 공정이 될 것으로 전망된다.

.

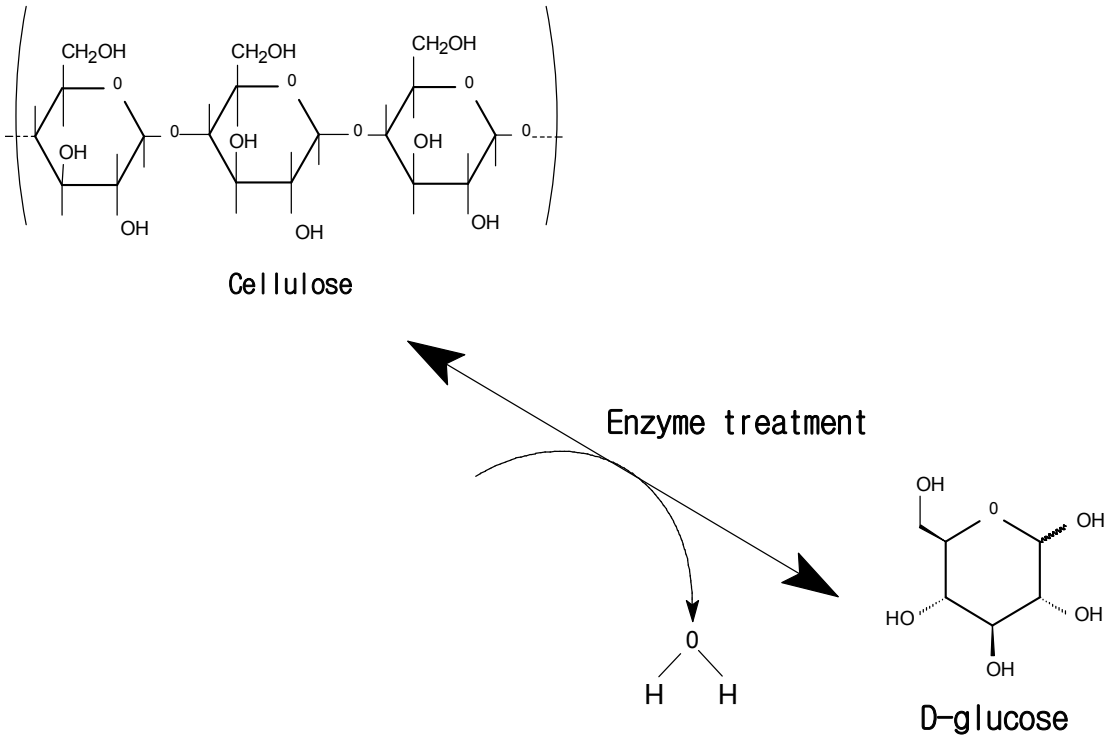


Figure 1 . D-glucose production from cellulose of seaweeds.

제 2 장 실험재료 및 방법

본 연구에서는 제 1 절에서 효소처리로부터 해조류 당화공정에 대한 내용과 제 2 절에서 효소 활성도를 유지하기 위한 효소 고정화에 대한 내용을 구분하여 정리하였다.

제 1 절 해조류 당화 공정

1-1 재료

당화하기 위한 해조류로는 다시마 (*Laminaria japonoica*), 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*) 와 효소로는 celluclast ® BG (novozymes , CC100133), lysing enzyme (from *Trichoderma harzianum* , sigma), viscozyme ® L(sigma), beta-glucosidase (from almonds, biochemika), pectinase (novozymne 사), flavourzyme (novozymne 사), alcalase (novozymne 사) 를 사용하였다.

1-2 기기

탄수화물 분석, 당 분석하기 위해 분광광도계 (amersham biosciences) 를 사용하였으며, 단당류의 농도를 측정하기 위해 액체크로마토그래프 (shimadzu) 를 사용하였다.

1-2 가수분해

반응온도가 55 ℃ 로 유지된 250 ml flask 반응기에서 50 mM sodium acetate buffer pH 4.0 을 사용 용매로 하는 효소 반응계를 구성하고 효소 농도를 20 mg/ml 로 하여 1 g 의 해조류를 당화하였다. 0 ~ 24 시간의 가수분해 된 시료 2 ml 을 채취하여 100 ℃에서 효소 불활성화 시킨 후 분석을 하였다.

1-3 탄수화물 분석

시료 안에 들어있는 탄수화물의 총량은 phenol-sulfuric acid 법으로 측정하였다. 시험관에 0.8 ml 의 물과 시료를 넣고, 3.2 ml 의 80 % 황산을 넣어준 후 재빨리 교반해주었다. 1 분 동안 방치 후 온도를 실온까지 떨어뜨리고 90 % 의 페놀 50 μL 를 첨가하였다. 30 분 후 490 nm 에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

1-4 당 분석

환원당 측정은 DNS (3 , 5 - dinitrosalicylic acid) 법을 사용하였다. DNS 법은 3 , 5 -dinitrosalicylic acid 를 3 - amino - 5 - nitrosalicylic acid 로 환원시킬 수 있는 환원당을 형성하는데 3 - amino - 5 - nitrosalicylic acid 의 흡광도를 측정함으로써 환원당을 정량 한다. 당의 환원력은 당 종류에 따라 차이가 있고 반응 조건에 따라서 다르므로 상대적인 양 만을 측정할 수 있다. 분석은 시료 1 mL 이 든 시험관에 3 mL 의 DNS 시약을 넣고 100 ℃ 에서 물 중탕으로 10 분간 방치한 후 상온으로 냉각시킨 후 유리되는 환원당을 540 nm 에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

1-5 액체 크로마토그래프 분석

반응물의 단당류 분석은 shimadzu 사 액체 크로마토그래프를 사용하였으며, 컬럼은 Sugar SH - 1011 (shodex) 을 연결하여 사용하였다. 이동상은 100 % 의 5 mM H_2SO_4 를 제조하여 사용하여 유속 0.6 ml/min 으로 운전하였다. 이 때 검출기는 RID- 10 A (shimadzu) 를 사용하였다. 단당류의 농도를 측정하기 위한 표준 시약으로는 D(+)-글루코오스 (98 %, junsei) 이다.

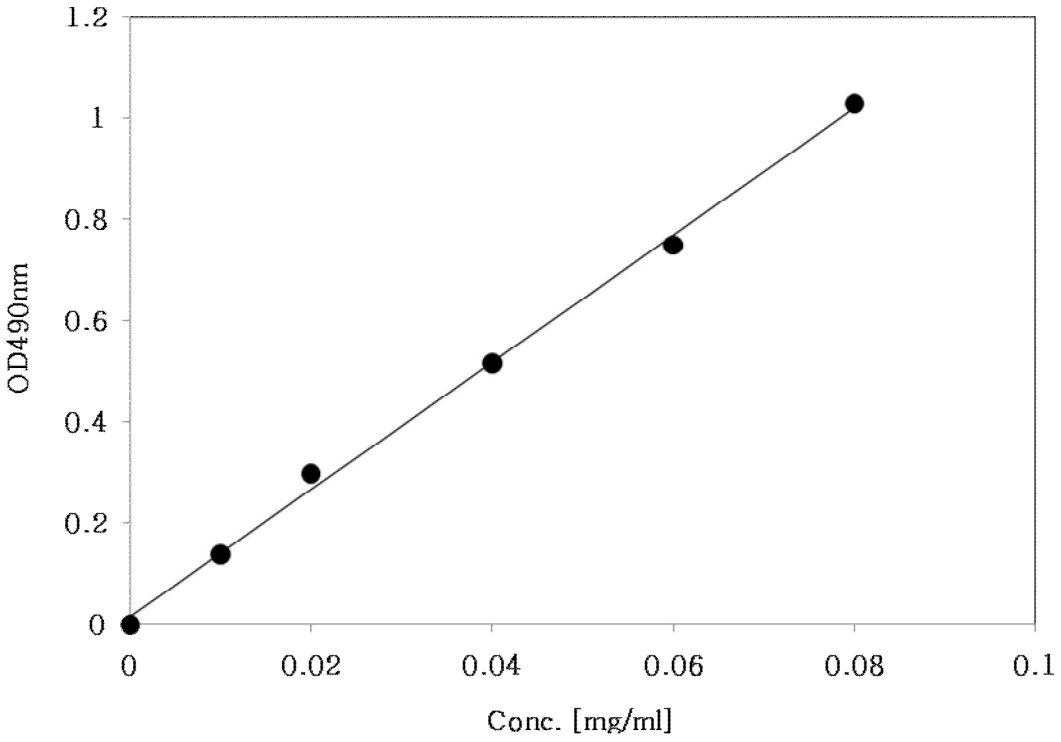


Figure 2 . Standard curve for determination carbohydrate concentration by UV/vis spectrophotometer.

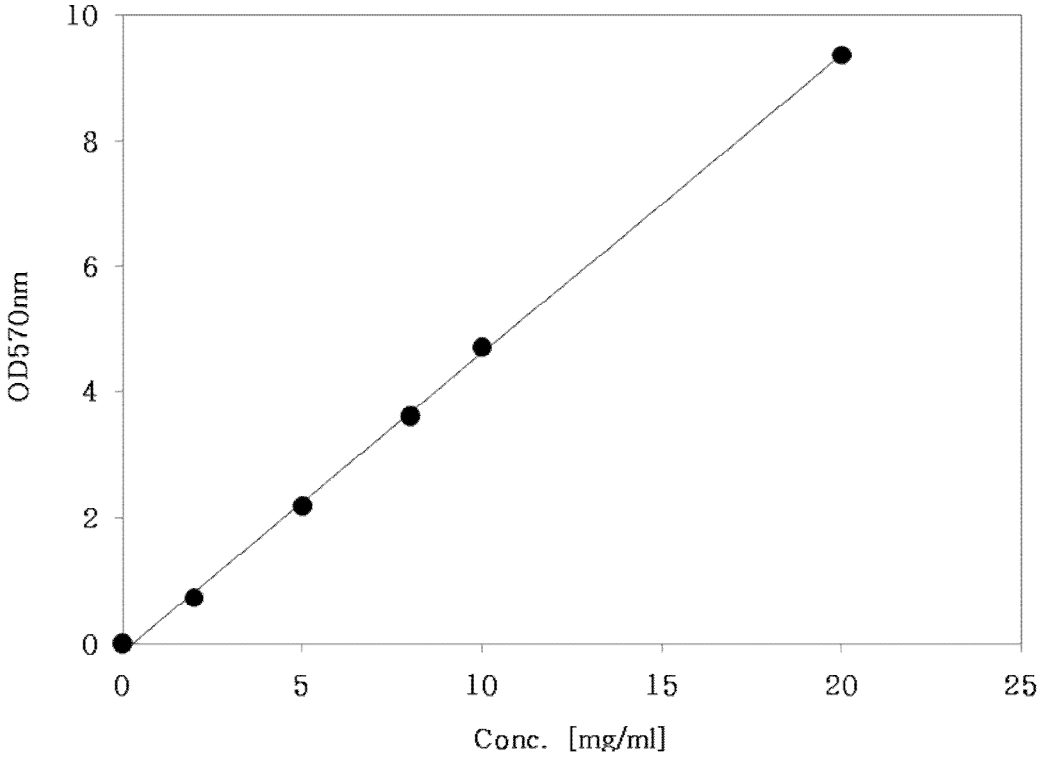


Figure 3 . Standard curve for determination of reducing sugar concentration by UV/vis spectrophotometer.

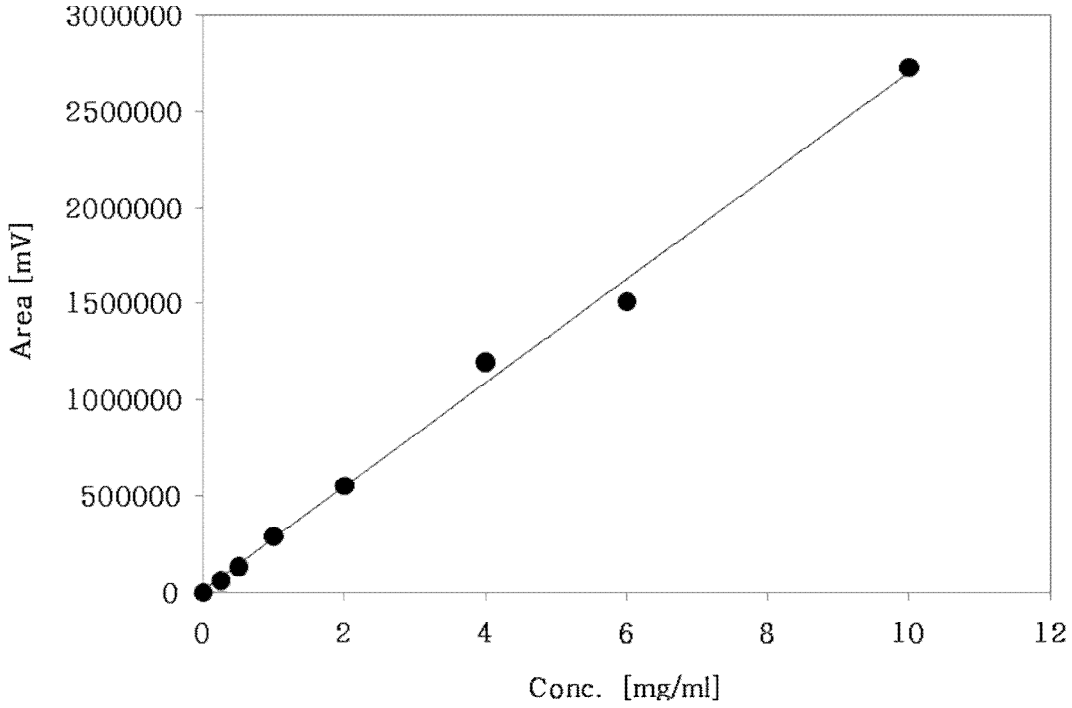


Figure 4 . Standard curve for determination of simple sugar concentration by HPLC system.

제 2 절 효소 특성 분석

2-1 Enzyme 고정화

2-1-1 PANI 제조

Polyaniline nanofiber 를 제조하기 위해서 1M HCl 에 녹인 aniline 과 oxidant 를 250 rpm 에서 격렬하게 혼합한다. 고분자 중합 반응에 의해 nanofiber 가 만들어지면 nanofiber 내에 있는 HCl 용액을 제거하기 위해 3 차 증류수를 사용하여 12000 rpm 에서 6 번 이상 씻어낸다. 제조된 polyaniline nanofiber 는 냉장 보관하였다.

2-1-2 PAMP 제조

자석으로 분리가 가능한 polyaniline nanofiber 의 제조를 위해서 시약상에서 구입한 iron oxide 나노 입자를 고분자 중합 시 첨가하여 반응을 시켜 polyaniline 중합 시 nanoparticle 등이 끼워 들어가는 형태 또는 nanoparticle 표면에 polyaniline 이 coating 되는 형태의 자석에 의해 분리가 가능한 나노 입자 또는 nanofiber 의 제조가 가능하였다. 이렇게 제조된 nanofiber 는 자석으로 분리하여 증류수로 6 번 이상 씻어낸다. 제조된 polyaniline nanofiber 는 냉장 보관하였다.

2-1-3 Polyethyleneimine-Magnetite 제조

Lev Bromberg 외의 polyethyleneimine-Magnetite 제조법을 수정하여 polyethyleneimine-magnetite 을 제조하였다. 증류수에 30 mmol 의 $FeCl_2 * 6 H_2O$ (Ⅱ) 과 15 mmol 의 $FeCl_2 * 4 H_2O$ 를 넣어 80 ℃에서 섞어주는 동시에 질소 공급해준다. pH 6.0 으로 조절하여 4 w/w [%] PEI 를 넣고, 80 ℃에서 10 분 동안 반응시킨 후 30 % 암모니아수를 넣어서 1 시간 동안 혼합한다. 제조된 polyethyleneimine-magnetite 는 magnetic nanoparticle 안에 PEI 가 끼워 들어간 형태로 SEM 사진을 첨부하였다.

2-1-4 PANI 와 PAMP, PEI-M 지지체에 효소 고정화

각 각의 5 ml vial 에 2 mg 의 PANI, PAMP, PEI-M 을 넣는다. Celluclast 를 20 mg/ml 되게 50 mM sodium acetate phosphate buffer pH 4.0 에 용해한 다음 이 효소 용액 1 ml 을 취하여 각 각의 2 mg 의 PANI , PAMP , PEI-M 이 들어 있는 5 ml vial 에 첨가하여 실온에서 200 rpm 으로 30 분간 반응시킨다. 2 시간 후 상등액을 버리고 50 mM sodium acetate phosphate buffer 로 200 rpm 에서 5 분 동안 세척한 후 더 이상의 효소가 떨어져 나오지 않을 때까지 세척과정을 5~10 회 반복한다.

2-2 효소 고정화 특성

2-2-1 효소 고정화

Celluclast 를 50 mM sodium acetate phosphate buffer pH 4.0 에 용해시켜 20 mg/ml 가 되도록 효소용액을 만들어서 PANI , PAMP , PEI-M 지지체에 각 각 고정화 하여 효소활성을 측정한다.

2-2-2 pH 변화에 따른 안정성

고정화 효소 celluclast 의 pH 에 따른 영향을 조사하기 위해서 기질로써 1 g 의 다시마와 반응시켰으며, pH 의 조절은 50mM sodium acetate phosphate buffer 를 이용하여 pH 2.0 ~ 6.0 까지 바꿔가면서 측정하였다.

2-2-3 온도 변화에 따른 안정성

고정화 효소 celluclast 의 온도의 영향 조사를 위해 pH 를 효소의 최적 pH 4.0 으로 고정하고 Thermo mixer (FINEPCR, micromixer Mxi4t) 를 이용하여 온도를 25 ℃ ~ 65 ℃ 로 바꿔가면서 측정하였다.

2-2-5 고정화 효소의 온도에 대한 안정성 측정

50 mM sodium acetate phosphate buffer pH 4.0 을 용매로 한 PANI, PAMP, PEI-M 에 고정화 된 celluclast 용액을 55 ℃에서 200 rpm 으로 shaking 상태에서 보관하면서 각각 효소의 활성을 측정하여 안정성을 조사하였다.

2-2-6 효소의 재사용

고정화 담체 PAMP 와 PEI-M 은 자석에 의하여 회수가 용이하며, PANI 는 원심분리에 의하여 회수가 용이하다. 앞서 언급된 고정화 효소에 의한 해조류 당화에 사용된 PAMP 과 PEI-M 을 강력한 자석을 사용하여 반응용액으로부터 회수한 후 재사용하였으며, PANI 는 원심분리를 이용하여 회수 한 후 재사용하였다. 회수된 PAMP 과 PEI-M, PANI 을 이용하여 55 ℃ 로 유지된 반응기에서 다시마 당화

실험을 수행하였다. 1 회 반응시간은 12 시간이었으며, 재회수해서 사용한 횟수는 총 10 회이다.

2-2-7 자연효소와 고정화 효소에 의한 해조류 당화

각 각의 250 ml flask 반응기에 PANI (133 ul/ 2 mg) , PAMP (133 ul/ 2 mg) 과 PEI-M (2 mg) 에 고정화 되어진 효소 celluclast 와 자연효소 celluclast 의 농도를 20 mg/ml 로 하여 넣은 후 50 mM sodium acetate buffer pH 4.0 을 사용 용매로 하는 효소 반응계를 구성하고, 1 g 의 해조류 다시마를 당화하였다. 0 ~ 24 시간에 시료 2 ml 을 채취하여 100 ℃에서 효소 불활성화 시킨 후 DNS 법을 사용하여 환원당 농도를 비교 분석하였다.

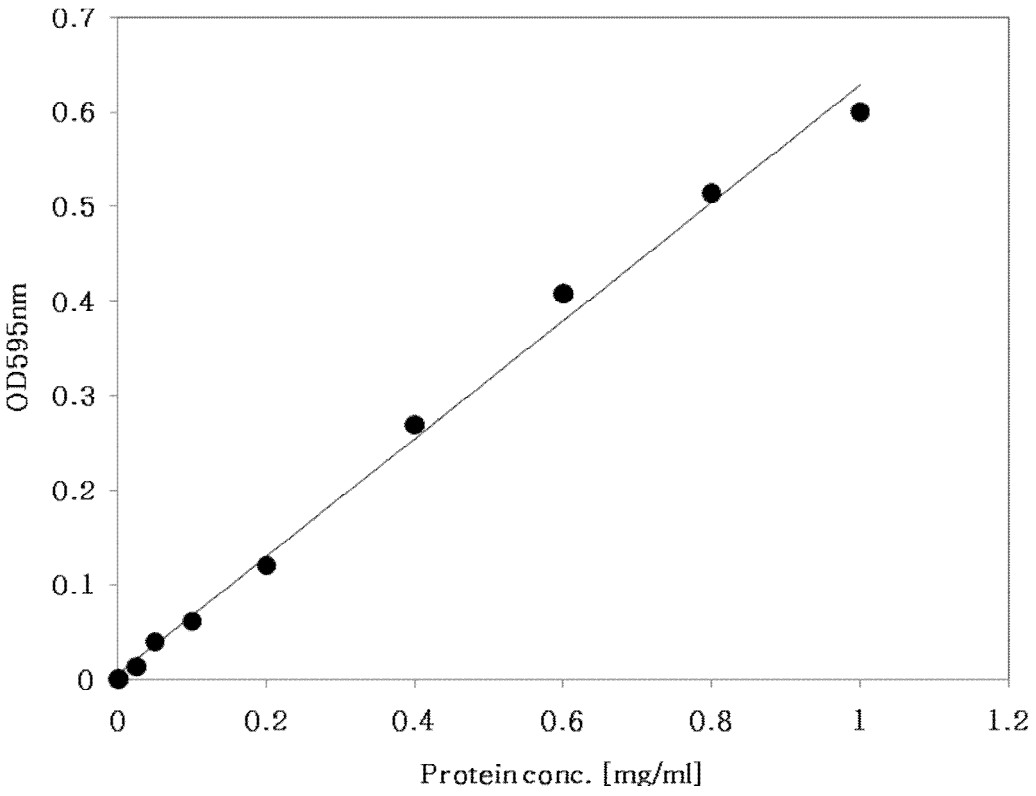
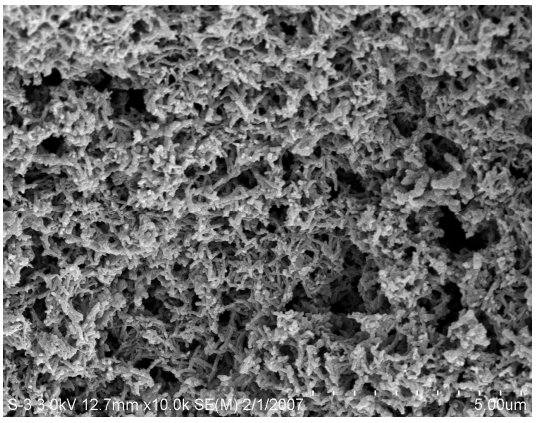
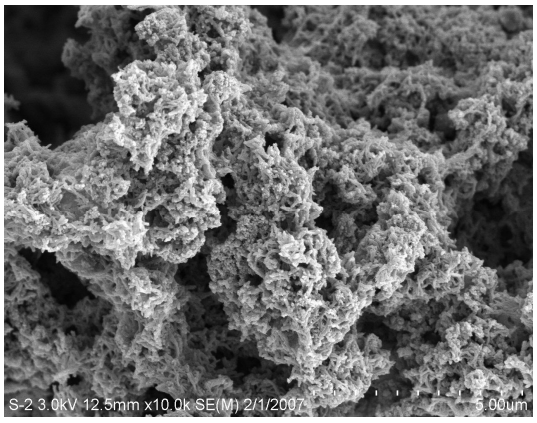


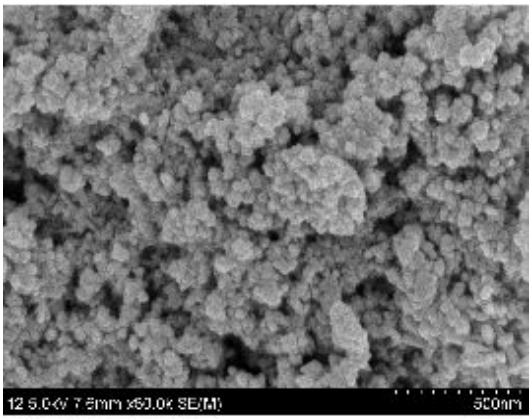
Figure 5 . Standard curve for determination of protein concentration.



(a)



(b)



(c)

Figure 6 . SEM image of poly nanofiber.

(a) Polyaniline nanofiber.
(b) Polyaniline magnetic particle.
(c) Polyethyleneimine magnetite.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 해조류 당화 공정

1-1 탄수화물 분석

효소 처리 시 해조류 다시마 (*Laminaria japonica*), 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*) 의 총 탄수화물의 변화를 분석하기 위한 내용으로 phenol-sulfuric acid 법을 사용하여 총 탄수화물의 함량 변화를 측정하였다.

Figure 7 . 에서 보는 바와 같이 효소 celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 로 24 시간 동안 처리한 결과 1 시간 대의 시료에서 최대 탄수화물 함량을 나타내었으며, 다른 효소에 비해 celluclast 로 처리 시 비교적 높은 함량을 나타냄을 확인하였다. 또한 효소 처리 시 다시마, 매생이, 우뭇가사리 중 다시마에서 총 탄수화물의 함량이 약 35 mg/g 으로 가장 높음을 알 수 있었다.

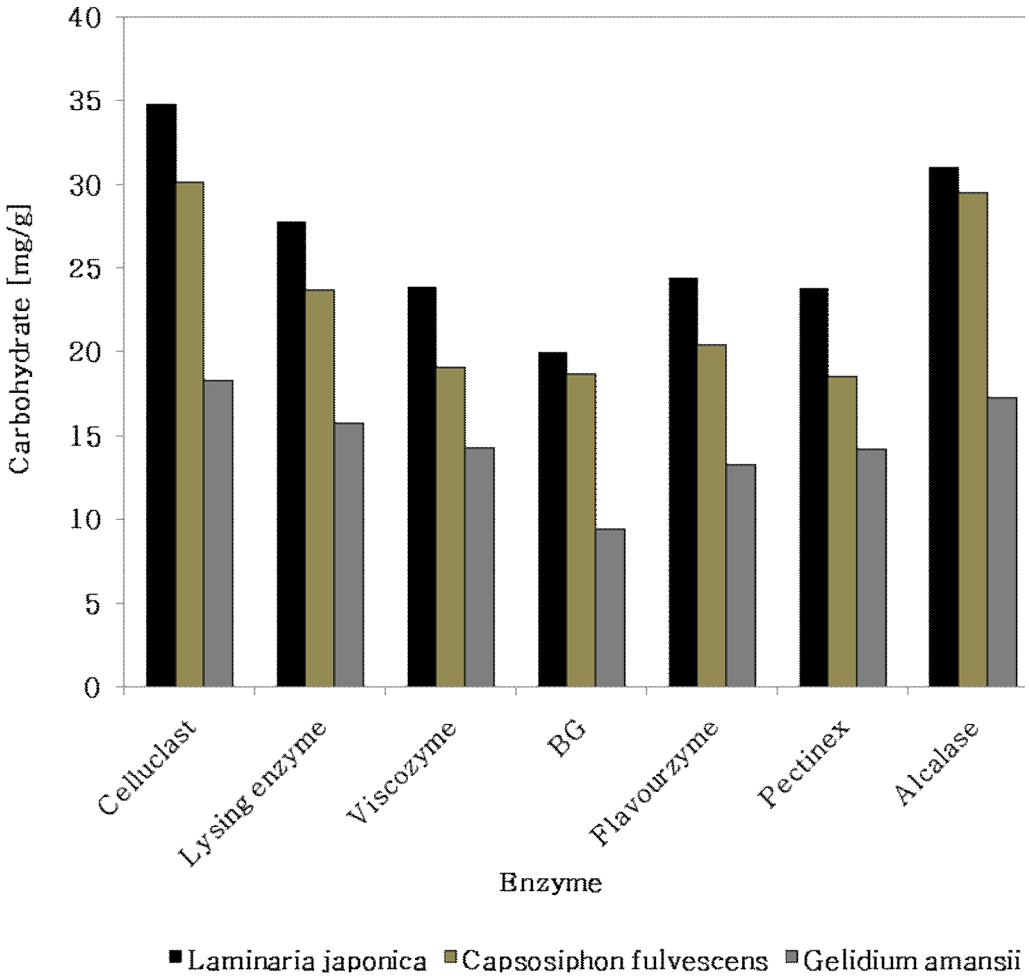


Figure 7 . Carbohydrate concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii*) by enzyme treatment at 1hour.

1-2 당 분석

Figure 8 . 은 효소 celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 으로 해조류 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 처리하여 환원당을 측정한 그래프이다. 효소 당화 액 내 환원당의 농도는 DNS 법을 사용하여 분석하였다.

Celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 로 24 시간 동안 처리한 결과 1 시간 대의 시료에서 다른 효소에 비해 celluclast 로 처리 시 비교적 높은 환원당 함량을 나타냄을 확인하였다. 또한 효소 처리 시 다시마, 매생이, 우뭇가사리 중 다시마에서 총 탄수화물의 함량이 약 25 mg/g 으로 가장 높았으며, 우뭇가사리의 경우 효소 처리 시 크게 영향을 받지 않음을 확인 할 수 있었다.

또한 celluclast 가 다른 효소에 비해 당화 능력이 뛰어난 것은 celluclast 는 cellulase 만을 함유하고 있기 때문에 해조류 당화한 결과 높은 수율을 나타냄을 알 수 있었다.

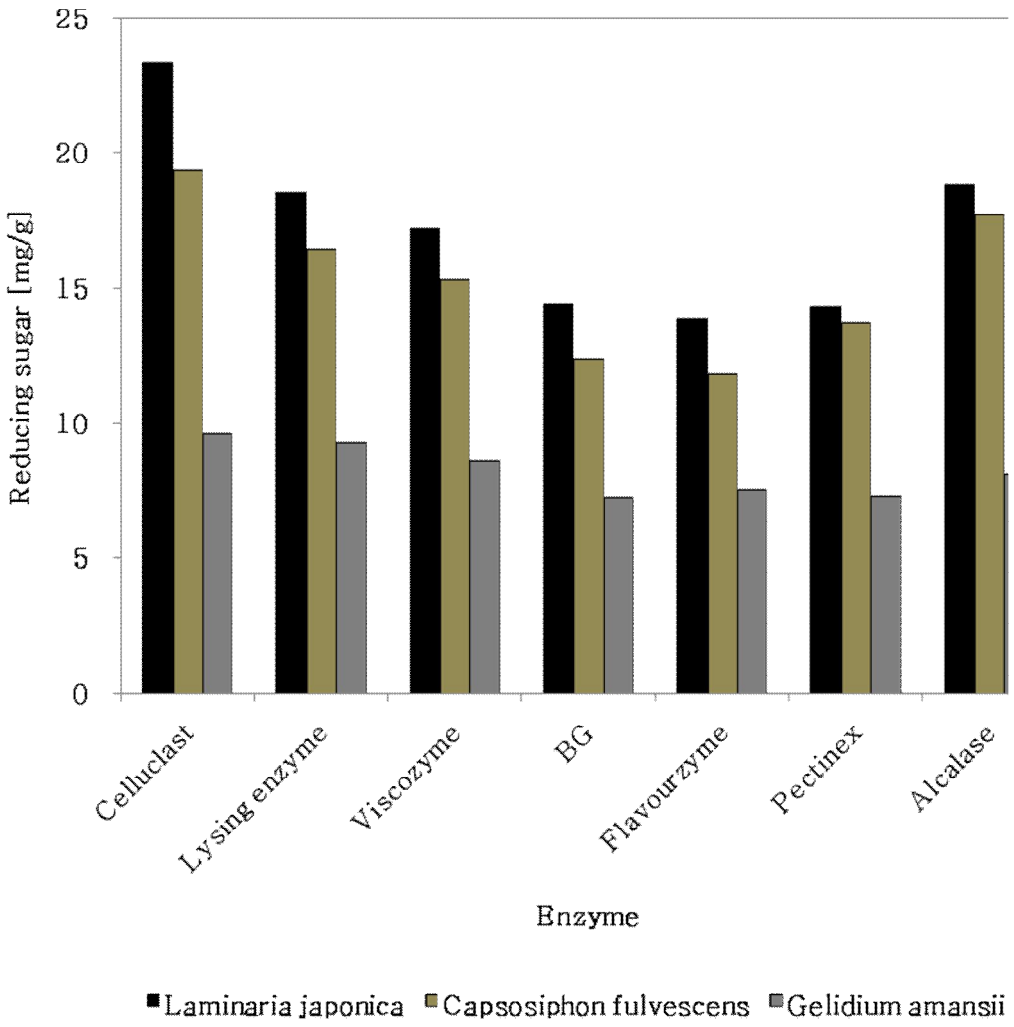


Figure 8 . Reducing sugar concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii* by enzyme treatment at 1hour.

1-3 액체 크로마토그래프 분석

효소 당화 액 내 단당류의 농도는 액체 크로마토그래프 (High Performance Liquid Chromatography) 로 분석하였다. 아래 Figure 9 . 는 해조류 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 효소 celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 의 주입에 따른 단당류의 생산량을 나타낸 그래프이다. 1 시간 동안 각 각의 효소 처리 별로 확인한 결과 celluclast 로 처리하였을 시 다른 효소로 처리하였을 때에 비해 높은 단당류의 생산량을 나타내었으며, beta-glucosidase 로 처리하였을 때 보다 약 10 mg/g 높은 단당류의 함량을 나타내었다.

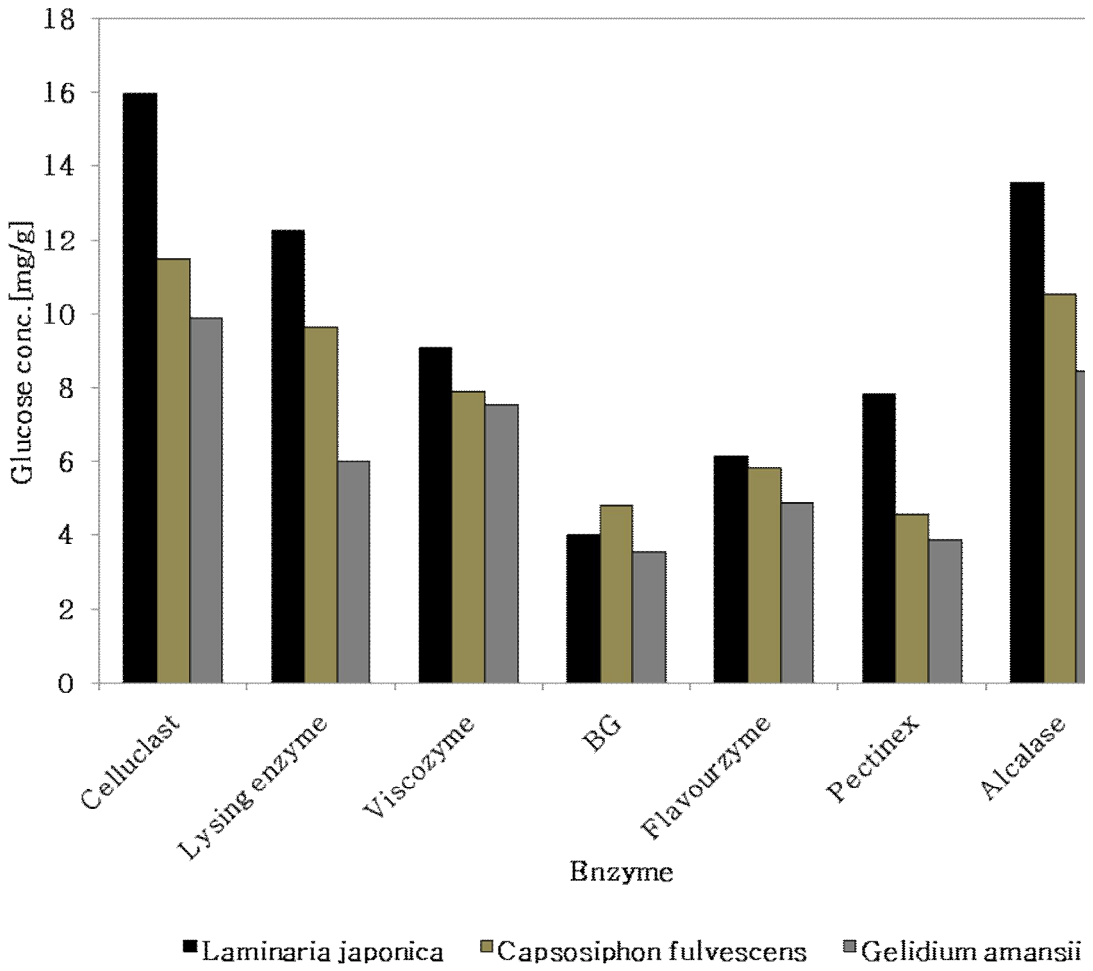


Figure 9 . Glucose concentration of seaweeds (*Laminaria japonica, Capsosiphon fulvescens, Gelidium amansii)* by enzyme treatments at 1 hour.

제 2 절 효소 고정화

2-1 효소 고정화

Figure 10 . 에서 보는 바와 같이 PANI , PAMP , PEI-M 에 고정화된 각 각의 농도가 다른 효소는 celluclast 의 경우 20 mg/ml 의 농도로 고정화 되었을 때 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 그러므로 최대 고정화를 위한 효소의 농도는 각각 20 mg/ml 이라고 할 수 있다.

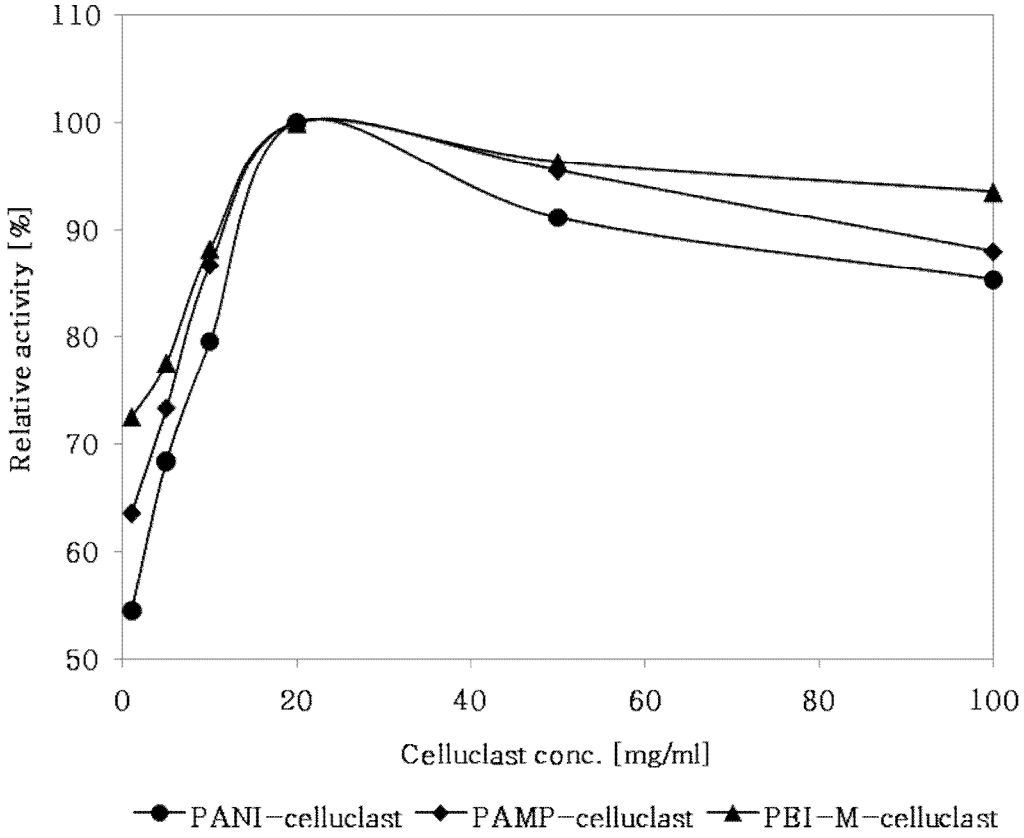


Figure 10 . Loading capacity of immobilized celluclast

2-2 pH 변화에 따른 안정성

고정화 담체 PANI, PAMP, PEI-M 에 고정화된 celluclast 와 자연효소 celluclast 으로부터 기질 다시마의 처리에 의한 pH 영향을 다음 Figure 11 . 에 나타내었다. pH 별 완충액에 있어서의 활성 비교를 pH 2.0 ~ 6.0 까지 범위 내에서 반응을 진행시킨 후, pH 변화에 따른 활성 변화를 관찰하였다. 고정화 효소 celluclast 와 자연 효소 celluclast 의 경우 pH 4.0 에서 상대적으로 높은 활성도를 나타내었다. 또한 고정화 효소가 자연효소에 비해 pH 별 다른 조건에서 상대적으로 안정함을 확인하였다.

고정화 효소의 활성이 pH 에 따라 자연효소와 차이가 많이 나는 이유는 대부분의 담체가 띄고 있는 전하가 반응용액의 pH 와 고정화 효소가 있는 미세 환경의 pH 가 서로 다르기 때문이다.

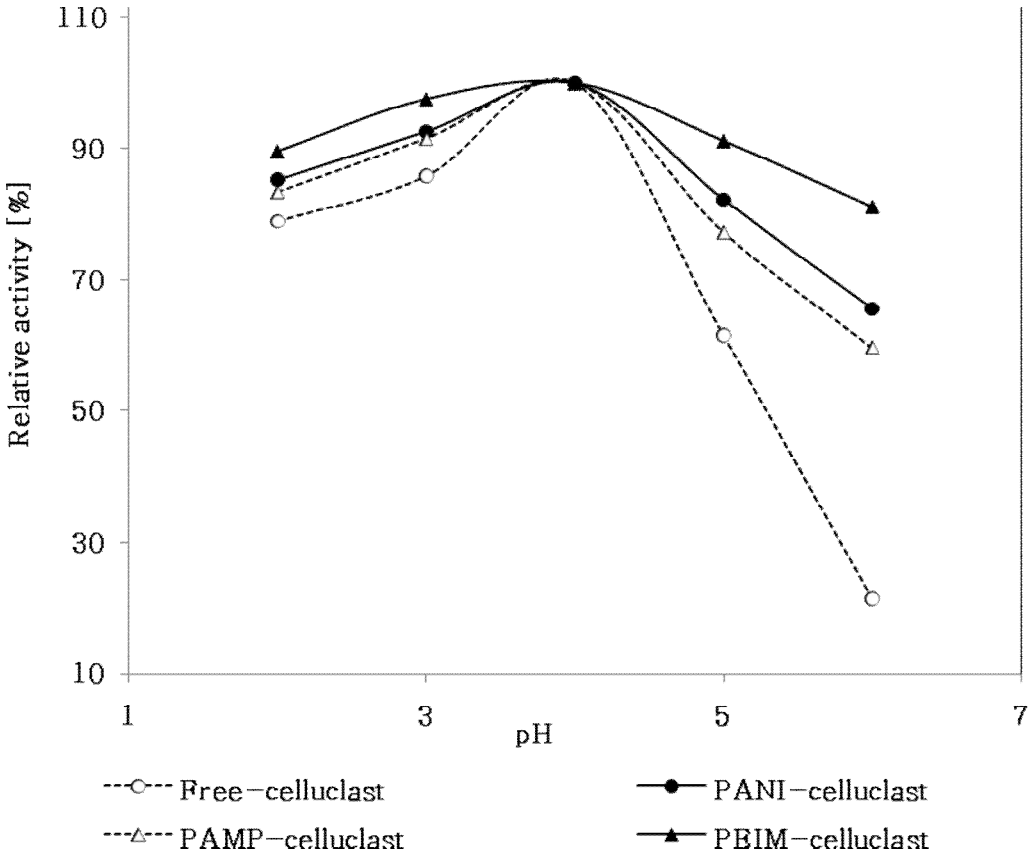


Figure 11 . Effect of pH on the activity of free and immobilized celluclast at 55℃

2-3 온도 변화에 따른 안정성

고정화 담체 PANI, PAMP, PEI-M 에 고정화된 celluclast 와 자연효소 celluclast 으로부터 기질 다시마의 처리에 의한 최적 온도를 측정한 결과를 다음 Figure 12 . 에 나타내었다. 온도 별 조건에 있어서의 활성 비교를 25 ℃ ~ 65 ℃ 까지의 범위 내에서 반응을 진행시킨 후, 온도 변화에 따른 활성 변화를 관찰하였다. 고정화 효소 celluclast 와 자연 효소 celluclast 의 경우 55 ℃ 에서 상대적으로 높은 활성도를 나타내었다. 또한 고정화 효소가 자연효소에 비해 온도 별 다른 조건에서 상대적으로 안정하였으며, 고정화 효소는 자연효소에 비해 저온과 고온에서 활성도를 유지하는 능력이 뛰어남을 확인하였다.

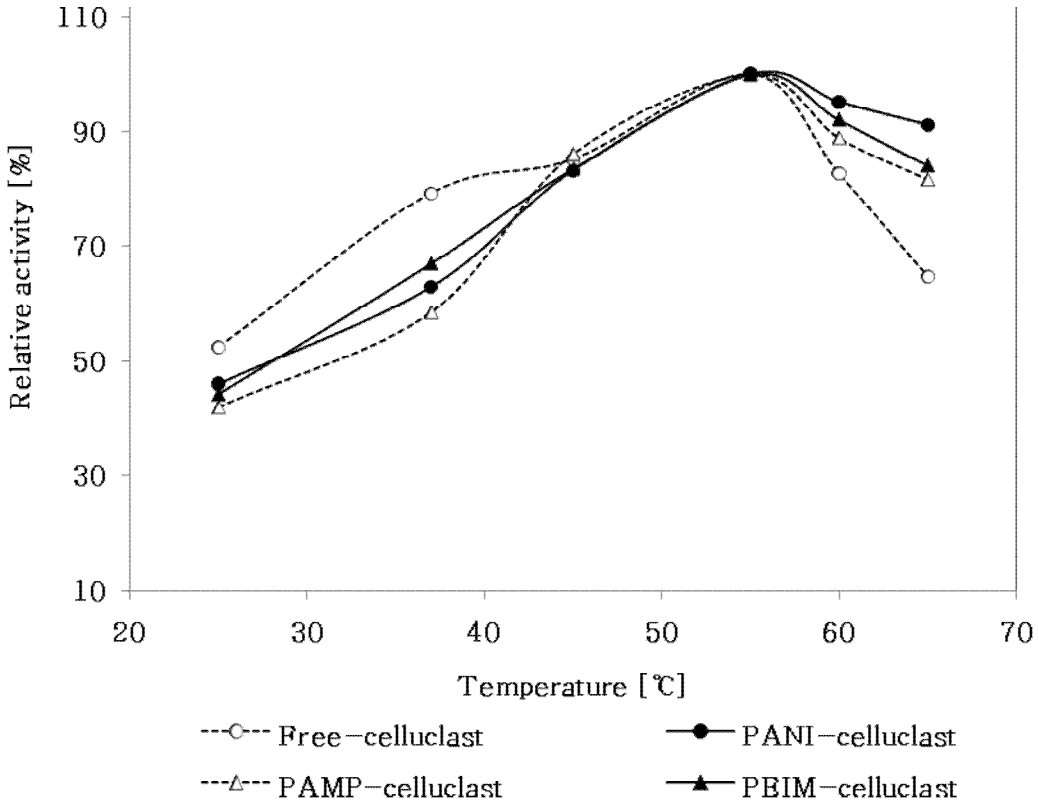


Figure 12 . Effect of temperature on the activity of free and immobilized celluclast.

2-4 고정화 효소의 온도에 대한 안정성

자연효소 celluclast 및 고정화 담체 PANI, PAMP, PEI-M 에 고정화 된 효소 celluclast 의 기질 해조류 다시마에 대한 온도 영향을 다음 Figure 18 . 에 나타내었다. 온도에 의한 활성변화 측정은 50mM sodium acetate buffer pH 4.0 , 55 ℃ 의 반응 용매 조건에서 각 각 15 일 동안 저장하였을 때, 저장기간에 따른 잔존 효소활성의 변화를 측정하여 장기저장에 따른 효소활성을 관찰하였다. 55 ℃ 에서 1 일 동안 저장한 자연 효소의 잔존 효소 활성도는 약 80 % 이었으며, 4 일 동안 잔존 효소 활성도는 약 37 % , 16 일 동안 10 % 이하로 낮아졌다. 이에 비해 고정화 된 효소는 동일한 조건 55 ℃ 에서 4 일 동안 잔존 효소 활성도는 70 % 이상을 유지하였고, 15 일 동안 저장한 경우 잔존 효소 활성도는 50 % 이상 이였다. 또한 고정화 담체인 PANI , PAMP 에 고정화 되어있는 효소보다 PEI-M 에 고정화 되어 있는 효소가 상대적으로 더 높은 활성도를 유지하였다. 이것은 다공성면이 더 뛰어난 담체 PEI-M 의 효소 고정화에 의해서 열 안정성이 증가되었음을 말해 주고 있다. 고정화로 인해 최적온도가 향상된다는 보고는 여러 논문에서도 보고된 바가 있다. 본 연구에서도 고정화 효소의 장점 중의 하나인 여러 특성 중 특히 열에 대한 안정성이 높아졌음을 확인하였다.

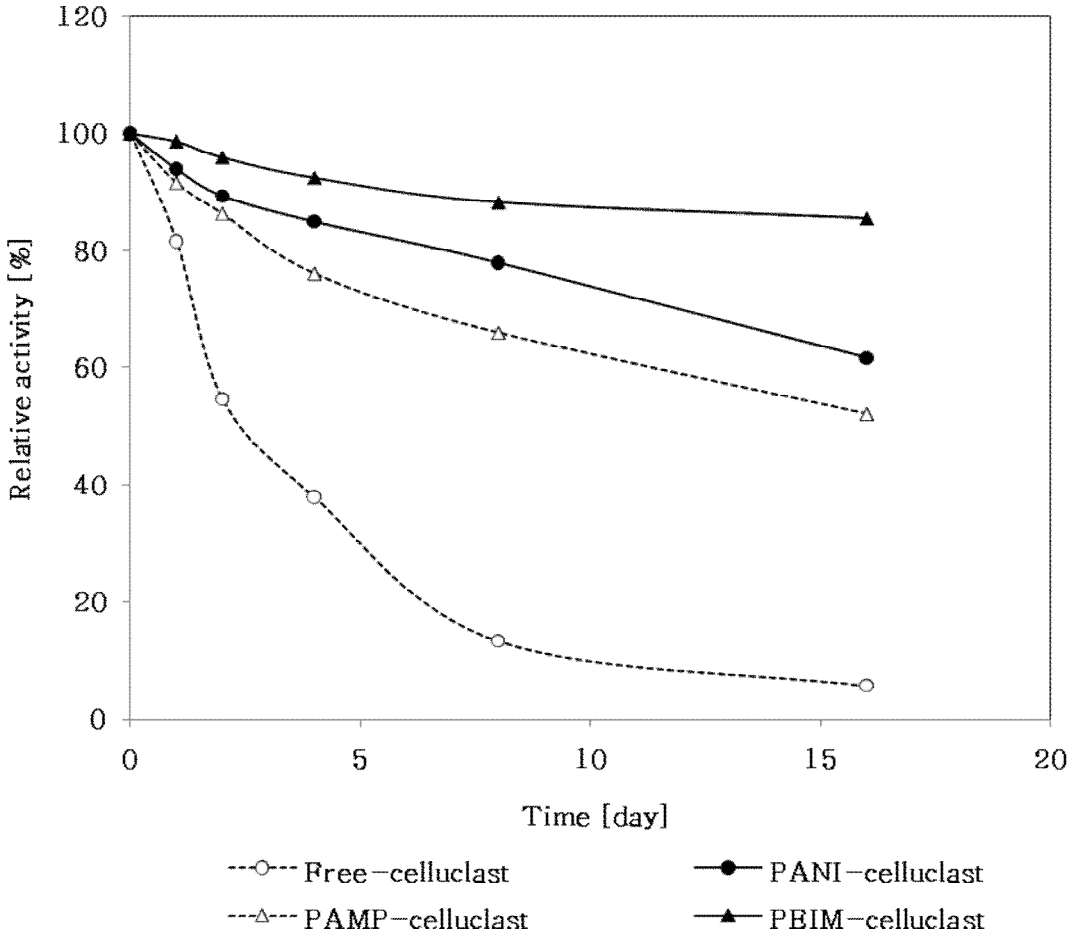


Figure 13 . Storage stability of free and immobilized celluclast at 55℃ and pH 4.0

2-5 고정화 효소의 재사용

자석과 원심분리기로부터 회수가 가능한 고정화 지지체인 PANI, PAMP, PEI-M 에 효소를 고정화 시킨 후에 이를 사용하여 celluclast 를 합성하는 실험을 반복하여 고정화 효소의 재사용 가능성을 실험하였다. 이러한 일련의 실험은 효소의 재활용을 통하여 효소의 사용량을 감소 시키고 효소의 재사용을 통하여 경제적인 효과를 얻기 위한 과정이었다. Figure 14 . 에서 보는 바와 같이 본 연구를 통하여 고정화 효소를 사용하고 이를 자석으로 회수한 후에 다시 사용하는 반복되는 과정을 통하여 사용한 결과 10 번 반복해서 사용한 경우 회수되는 효소의 양이 PANI 에 고정화 되어 있는 celluclast 는 초기 효소활성도의 80 % , PAMP 에 고정화 되어 있는 celluclast 는 초기 효소 활성도의 73 % , PEI-M 에 고정화 되어 있는 celluclast 는 초기 효소 활성도의 90 % 의 회수율을 나타내었다. 회수율의 감소는 고정화 효소가 탈착되어 총괄적인 효소의 활성도 감소로 나타난 것으로 판단된다.

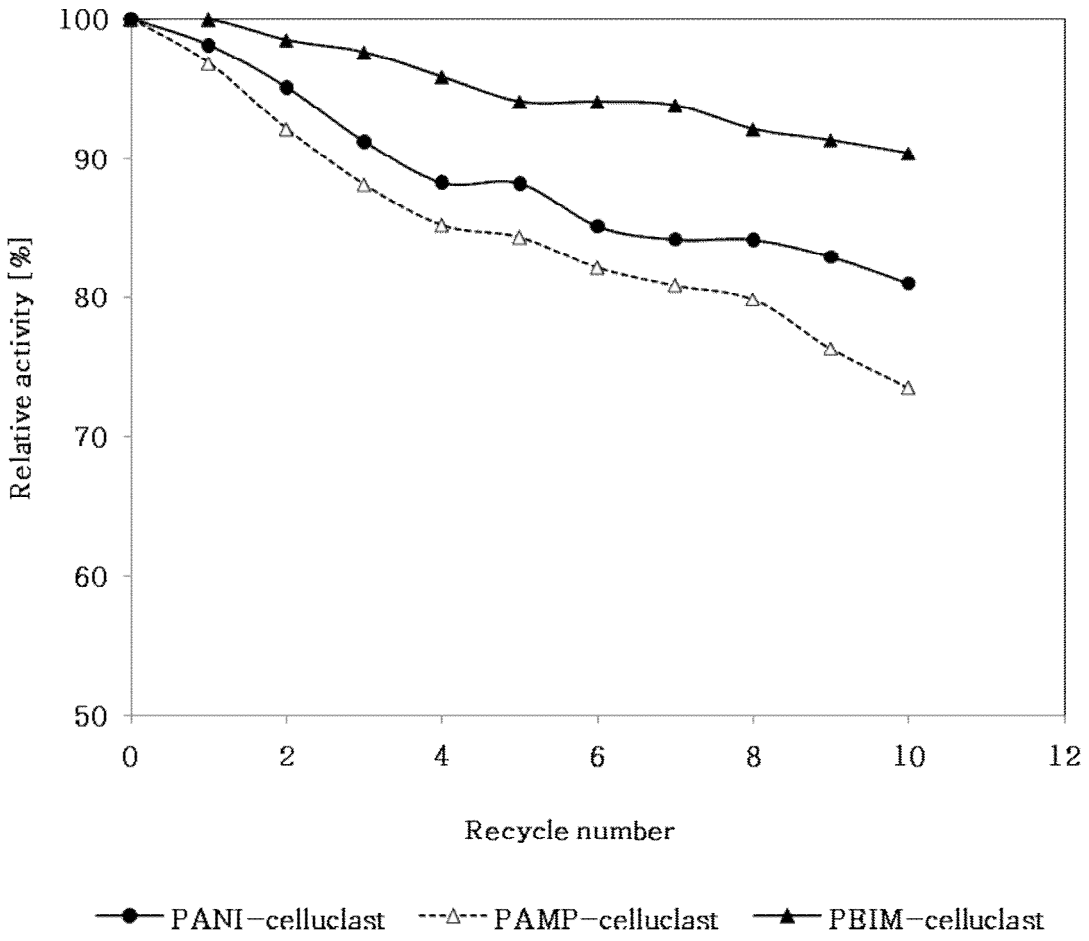


Figure 14 . Effect of recycle on celluclast activity.

2-6 자연효소와 고정화 효소 처리로부터 다시마 당화

자연효소 celluclast 와 고정화 담체 PANI 와 PAMP, PEI-M 에 고정화 된 celluclast 로부터 해조류 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 12시간 처리하여 당화공정을 진행하였으며, 얻은 당화 액으로부터 환원당을 측정하여 자연 효소와 고정화 효소의 당화 능력을 비교 분석하였다. 다음 Figure 15 . 는 제 1 절의 동일한 당화 조건으로 반응을 진행한 결과 다시마, 매생이, 우뭇가사리 중 다시마에서 환원당 생산량이 높았으며 자연효소가 다시마에서 약 20 mg/g 의 환원당을 생산한 것에 비해 고정화 효소는 약 55 mg/g ~ 80 mg/g 의 환원당을 생산하였다. 또한 앞에서 분석한 결과와 마찬가지로 고정화 담체인 PEI-M 은 다른 담체 PANI 와 PAMP 보다 고온과 반응시간에 안정한 것을 확인하였다.

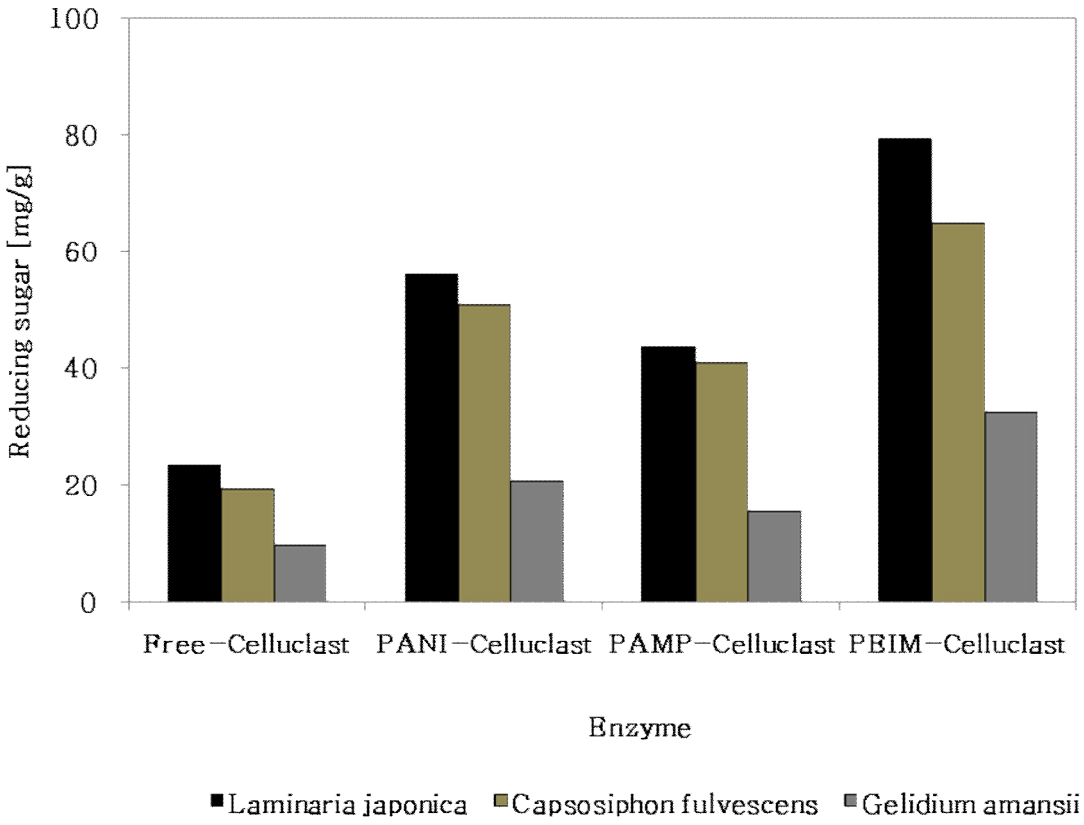


Figure 15 . Seaweeds of Saccharification process.
[Seaweeds of reducing sugars concentration [mg/g] from free and immobilized celluclast.]

제 4 장 결론

본 연구의 목적은 바이오 매스로부터 재생 가능한 바이오 연료를 생산하는데 있어서 원료로부터 효과적으로 보다 많은 당을 얻기 위한 공정 개발에 있다. 즉 바이오 매스를 자연 효소와 고정화 효소를 이용하여 당화 시 높은 수율의 당을 얻을 수 있도록 새로운 담체를 개발하며, 고정화 된 효소를 재사용하여 경제적인 효소 당화공정을 제시하였다.

제 1 절에서 각 각의 효소로부터 기질인 해조류 다시마 (*Laminaria japonica*), 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*) 를 처리함으로서 얻어지는 당화 공정에 대한 내용을 정리하였으며, 제 2 절은 효소 고정화 부분으로 효소의 반응 온도와 반응 공정 시간으로부터 활성도를 유지하기 위한 내용을 정리하하였다. 사용된 효소는 celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 이며, 효소 고정화 시 사용된 고정화 담체는 PANI (polyaniline nanofiber), PAMP (polyaniline magnetic particle), PEI-M (polyethyleneimine magnetite)이다.

제 1 절에서 효소 celluclast, lysing enzyme, viscozyme, beta-glucosidase, pectinase, flavourzyme, alcalase 로부터 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 처리하여 phenol-sulfuric acid 법으로부터 탄수화물 분석한 결과 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 celluclast 로 처리하였을 때 가장 높은 함량을 나타내었으며, 특히 다시마를 celluclast 로 처리하였을 때 매생이, 우뭇가사리보다 높은 탄수화물 함량을 나타내었다. 또한 DNS 법으로부터 환원당 함량을 분석한 결과 마찬가지로 celluclast 로 처리하였을 때가 다른 효소로 처리하였을 때보다 높았으며, 다시마가 매생이, 우뭇가사리보다 높은 환원당을 나타내었다. 액체 크로마토그래피를 사용하여 단당류를 분석한 결과 다시마를 celluclast 로 처리하였을 때 매생이, 우뭇가사리를 다른 효소로 처리하였을 때보다 단당류 생성이 높음을 확인하였다.

이로부터 갈조류인 다시마를 녹조류 매생이, 홍조류 우뭇가사리 보다 바이오 자원으로 이용하였을 시 수율이 높은 바이오 매스 자원을 획득 할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 효소 celluclast 가 다른 효소보다 당화 능력이 뛰어나며, cellulase 만을 함유하고 있는 효소이기 때문에 실직적으로 사용을 하였을 때 얻고자 하는 물질을 대량으로 생산하는 데 도움을 줄 수 있음을 확인하였다.

제 2 절에서 고정화 담체인 PANI, PAMP, PEI-M 에 glutaraldehyde 를 이용하여 효소 celluclast 를 고정화 시켜 기질 다시마와 다양한 조건에서 반응시켜서 활성도를 측정하였다. PANI, PAMP, PEI-M 에 고정화 된 celluclast 의 최적 고정화 양은 20 mg/ml 이며, pH 변화에 대하여 측정한 결과 pH 4.0 에서 안정된 활성도를 나타내었으며, 자연효소에 비해 상대적으로 pH 변화에서 영향을 적게 받는 것을 확인하였다, 온도 변화에 대하여 측정한 결과 55 ℃ 에서 가장 안정하였으며, 고정화 효소가 자연 효소보다 고온에서 활성도를 유지하는 능력이 우수하였다. celluclast , 를 회수하여 10 번 재사용 하였을 때 PANI 의 경우 초기 활성도의 73 %, PAMP 의 경우 초기 활성도의 80 %, PEI-M 의 경우 초기 활성도의 90 % 이상이 유지되었다. 앞서 확인한 바와 같이 고온 반응에서 활성도 유지 능력이 뛰어난 고정화 담체에 celluclast 를 고정화한 효소와 자연효소 celluclast 의 처리로부터 해조류 다시마, 매생이, 우뭇가사리를 당화하여 DNS 법으로부터 환원당 함량을 비교 분석한 결과 자연효소가 다시마에서 23 mg/g, 매생이 19 mg/g, 우뭇가사리에서 9 mg/g 의 환원당을 생성하는 반면, PANI 에 고정화된 효소는 다시마에서 55 mg/g, 매생이에서 50 mg/g, 우뭇가사리에서 20 mg/g, PAMP 에 고정화된 효소는 다시마에서 43 mg/g, 매생이에서 41 mg/g, 우뭇가사리에서 15 mg/g, PEI-M 에 고정화된 효소는 다시마에서 79 mg/g, 매생이에서 64 mg/g, 우뭇가사리에서 32 mg/g 의 환원당을 생성하였다.

즉 고온 반응에 의한 문제점인 효소 활성도, 반응 공정 시간을 해결한 것으로서 효소 고정화 기술은 효소 처리 기술을 개발 시키는데 도움이 될 것으로 판단된다. 본 연구에서 개발한 고정화 담체에 효소를 고정화 하여 바이오 자원으로부터 바이오 매스를 얻는 당화 공정의 기술을 개발하였으며, 이는 효소 처리로부터의 당화 공정 기술을 경제적, 상업적으로 발전시킬 수 있는 가능성을 제시한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. J. B. Na, J. S. Kim, The optimum condition of SSF to ethanol production from starch biomass. *Korean.chem.Eng. Res.* 2008. Vol. 46:858-862.
2. J. I. Park, H. C. Woo, J. H. Lee, Production of bio-energy from marine algae: Status and perspectives. *Korean. chem. Eng. Res.* 2008. Vol. 46: 833-844.
3. A. Z. Sulaiman, The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Sci.* 2008. Vol. 99: 4078-4085.
4. P. F. Carlos, M. P. Antonio, B. B. Adela, B. B. Pilar, P. C. Hugo, G. H. Ida, Speeding up enzymatic hydrolysis procedures for the multi-element determination in edible seaweed. *Sci.* 2005. Vol. 548: 183-191.
5. K. K. Oh, S. W. Kim, S. I. Hong, Cellulose hydrolysis by immobilized enzyme. *Journal of the Korean of chemical engineers* . 1992. Vol. 30: 467-472.
6. W. K. Kang, J. S. Jeung, H. S. Kim, B. C. Kim, J.S. Yun, H. S. Park, The deceloment of expression process leading to ethanol production with highly active cellulose modified by directed evolution. *J. Biotechnol. Bioeng.* 2007. Vol. 22: 16-21.

7. K. J. Jung, C. H. Jung, J. H. Pyeun, Y. J. Choi, Changes of food components in Mesangi (Capsosiphon fulvecense), Gashiparae (Enteromorpha prolifera), and cheonggak (Codium fragile) depending on harvest times. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2005. Vol. 34(5): 687-693.
8. S. J. Kim, I. B. Ju, C. H. Lee, D. K. Suh, Y. W. Suh, Hydrolysis of cellulose pretreated by ionic liquids over solid acid catalysts. *Theories and Application of Chem. Eng.* 2007. Vol. 13. No. 2
9. S. M. Lee, J. H. Kim H. Y. Cho, H. Joo, J. H. Lee, Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem*. 2009. Vol. 20: 517-521.
10. J. J. Lee, B. H. Lee, Degradation properties and production of fuels of cellulose. *Trans. of the Korean hydrogen and new energy society*. 2004. Vol. 15: 333-340.
11. W. S. Kim, I. S. Yoo, B. C. Lee, D. Y. Song, Enzymatic hydrolysis of rice straw cellulose to glucose. *Journal of the Korean institute of chemical engineers*. 1988. Vol. 26: 39-44.
12. Y. Zheng, Z. Pan, R. Zhang, D. Wang, Enzymatic saccharification of dilution acid pretreated saline crops for fermantable sugar production. *Sci*. 2009. Vol. 86: 2459-2465.
13. Y. Sun, J. Cheng, Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2002. Vol. 83: 1-11.

14. D. B. Choi, H. S. Sim, Y. L. Piao, W. Ying, H. Cho, Sugar production from raw seaweed using the enzyme method. *Sci.* 2009. Vol. 15: 12-15.
15. Y. Numanoglu, S. Sungur, beta-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* cell disruption and enzyme immobilization using a cellulose gelain carrier system. *Process biochemistry.* 2004. Vol. 39: 703-709
16. R. Yanez, J. L. Alonso, J. C. Parajo, Production of hemicellulosic sugars and glucose from residual corrugated carboard. *Sci.* 2004. Vol. 39: 1543-1551.
17. L. Bromberg, S. Raduyk, T. Alan Hatton, Functional magnetic nanoparticles for biodefense and biological threat monitoring and surveillance. *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81: 5637-5645.
18. B. H. Hur, H. S. Seo, S. M. Kim, Y. J. Kim , J. H. Cho, S. I. Roh, Simultaneous analysis of sugars by HPLC. *Korean J Vet Serv.* 2000. Vol. 23: 137-142.
19. S. Fransis, L. Varshney, K. Tirumalesh, Studies on radiation systhesis of polyethyleneimin/acrylanude hydrogels. *Sci.* 2005. Vol. 75: 747-754.
20. F. Y. Cheng, C. H. Su, Y. S. Yang, C. S. Yeh, C. Y. Tsai, C. L. Wu, M. T. Wu, D. B. Shieh, Characterization of aqueous dispersion of Fe3O4 nano-particle and their biomass applications. *Sci.* 2004. Vol. 26: 729-738.
21. S. Wei, W. Zhu, Y. Zhang, J. Xu, Preparation and characterization of hyperbranched aromatic polyamide/Fe3O4 magnetic nanocomposite. *Sci.* 2006. Vol. 66: 1272-1277.

감사의 글

앙드레 말로의 ‘오랫동안 꿈을 그리는 사람은 마침내 그 꿈을 닮아간다.’라는 명언은 저의 삶의 지표이며 꿈을 달성하는데 위로가 되는 글귀입니다. 3 년 전 가슴 속에 꿈을 가득 담고 실험실에 들어왔을 때 TV 에서만 보던 실험 기기와 새로운 사람들과의 만남에 설레었던 기분을 지금도 기억하고 있습니다. 대학원에 입학하여 배움의 길로 들어섰을 때 한 층 더 성숙한 지식인이 되고자 다짐했었던 때가 엊그제 같은데 벌써 마무리 되어가는 날이 왔습니다. 사회에 첫 발을 내딛게 돼서도 발전하는 ‘김 현’ 이 될 수 있도록 노력하겠습니다.

실험실 들어와서 대학원 과정을 마무리하기까지 바쁘신 가운데 재미있는 농담과 때론 엄격한 충고로 저의 생활을 바로 잡아주시고, 꼼꼼하고 세심한 지도로 튼튼한 배움의 기둥을 지어주신 이중헌 교수님이 계셨기에 꿈을 잃지 않고 석사 과정을 마무리하게 되어 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 대학교에 입학하여 지금까지 따뜻한 격려와 지도를 아낌없이 베풀어 주신 김선일 교수님, 김정규 교수님, 신현재 교수님, 이재욱 교수님, 조병욱 교수님, 차월석 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

대학원 재학 중에 입사하여 모든 것이 낯선 저에게 따뜻한 배려, 따끔한 충고를 전해주신 태극제약 ㈜ 장성공장 제이에스 제약㈜ 직원 분들께 감사를 드립니다. 석사 학위 논문으로 인한 죄송스러운 마음과 감사한 마음을 보답 하기 위해 더 큰 사람이 되어 회사의 발전에 기여할 수 있도록 최선을 다하겠습니다.

지금은 북경 청와대에 계시지만 학부 실험 수업 때 처음 만나서 학위 과정 동안 친 언니처럼 때론 엄격한 훈장처럼 진심으로 챙겨주신 김 려화 박사님께 깊은 감사를 드립니다. 느즈막하게 알게 되었지만 6 개월 동안 완도 조선대학교

해양생물연구교육센터에서 함께 지내고 나를 울리기도 많이 울리고, 많이도 웃게 하신 김현우 선배님. 지금껏 저만 알고 저를 위해 살아온 저의 모습이 당근과 채찍으로 반성하게끔 해주셨기 때문에 이렇게 변화 되었습니다. 시간이 지나도 반가울 것 같이 미운 정 든 선배님께 진심으로 감사 드리며, 앞으로 박사 과정 동안 좋은 일만 펼쳐지길 기도하겠습니다. ^^

대학교 입학하면서부터 지금까지 어려운 일, 기쁜 일, 슬픈 일 함께 해오고 심적, 육체적으로 의지할 수 있고, 티격태격하지만 서로 옆에 없으면 그리운 나의 베스트 프렌드 안영덕! 철없는 어린 아이가 엄마에게 아이스크림 사주라고 때 쓸 때 내 자식이기 때문에 사주는 마음으로, 보잘것없고 칠칠치 못한 나를 새심 하게 배려해준 나의 친구 류지순! 내 곁에 너희들이 있어서 정말 행복하고 든든하다. ^^ 우리 배운 만큼 더 열심히 살아보자! 우리 실험실의 왕 언니가 된 김보람, 박새로미. 특유의 개그와 아름다운 목소리로 언니에게 배꼽 잡을 웃음을 주었단다. 열심히 공부하고 연구해서 너희의 대학원 생활에 좋은 일만 가득하길 기도할게. 그리고 우리 실험실 귀여운 막내들, 김민성, 나혜영, 김아라. 따끔하게 혼내면 깊이 반성하고, 툭 툭 장난치면 웃으면서 이해 해준 너희 덕분에 우리 실험실의 분위기가 활기찼단다. 4 학년이 되는 너희들의 앞 길에 밝고 행복한 일들만 펼쳐지길 바랄께. ^^

몇 백 년 친구 사이인 것처럼 편안한 학사 동기 김 진영, 김 현정, 신지은. 같은 과이지만 다른 전공으로 대학원 졸업하게 된 대학원 동기 이 승우, 정 지은. 우리들의 가방 끈이 이렇게 길어진 만큼 인생 한번 폼 나고 활기차게 살아보자! ^^

마지막으로 힘들게 낳아주시고 내리 사랑으로 애지중지 키워주신 부모님과 언니만 믿고 따라준 나의 동생. 차려주신 아침 밥을 먹지 않고 학교 가는 날에도, 피곤해서 짜증 섞인 말투로 대꾸하는 날에도 항상 저의 어깨를 다독여 주신 부모님과 나의 문제점들에 대한 해결 방안을 전해주고 충고 해준 동생 덕분에 무사히 석사과정 마칠

수 있었습니다. 나를 믿고 힘이 되어준 가족의 응원과 사랑에 다시 한 번 고개 숙여 감사 드리며, 오늘 내일 하루하루 변화하는 자랑스러운 큰 딸이 되도록 노력하겠습니다. 사랑합니당. ♥

지금보다 더 든든하고 멋진 『큰 딸, 언니, 제자, 선배, 후배, 공학인』 이 되도록 노력하겠습니다. ^^

2011 년 2 월

김 현

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20097068	과 정	석사
성 명	한글: 김 현 한문: 金 玄 영문: Kim Hyun				
주 소	광주광역시 북구 중흥3동 261-17 번지				
연락처	E-MAIL : dyqqp86@hanmail.net				
논문제목	한글: 효소처리를 이용한 해조류의 셀룰로오스 계열 당화공정 개발 영어: Development of seaweed saccharification process using magnetically recyclable enzymes.				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의 (●) 반대 ( )

2011 년 2 월

저작자: 김 현 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하