

산 농도 및 염 농도가 다시마 에탄올 발효에 미치는 영향

이성목 · 이재화[†]

신라대학교 의생명과학대 생명공학과
(2009년 11월 12일 접수, 2010년 2월 5일 채택)

Influence of Acid and Salt Content on the Ethanol Production from *Laminaria japonica*

Sung-Mok Lee and Jae-Hwa Lee[†]

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea
(Received November 12, 2009; Accepted February 5, 2010)

본 연구는 갈조류인 다시마를 이용한 생물학적 바이오 에탄올 생산 과정에서 산 및 염 농도가 미치는 영향과 다시마에 포함된 다당류 성분 중 에탄올로 전환 가능한 유용 기질에 대해 연구하였다. 다시마를 이용한 에탄올 발효에는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 이용하였으며, 고압멸균기를 이용한 열 처리 다시마에서 최대 2.09 g/L의 에탄올 생산을 확인할 수 있었다. 산 전처리 과정을 통해 1.0 N HCl에서 최대 3.95 g/L의 환원당이 생성되었으나 에탄올 생산은 오히려 산 처리를 하지 않은 배지에서 더욱 높게 나타났다. 산 처리시 생성되는 염의 영향을 확인 결과 염 농도의 증가에 따라 에탄올 발효가 저해되는 것을 확인할 수 있다. 갈조류 주요 구성 다당류를 이용한 발효에서 mannitol만이 열처리에서 최대 3.09 g/L까지 에탄올로 전환 가능한 것으로 확인되었으며, laminaran의 경우 0.1 N HCl을 처리하였을 때 0.15 g/L의 소량의 에탄올 생산이 확인되었으며, 산 처리에서 세포 성장이 다른 기질에 비해 크게 증가하는 것으로 나타났다.

In the study, the effect of acid and salt concentrations during the production of bio-ethanol from various brown-algae raw materials was investigated. Especially, the possibility of the conversion of various polysaccharides contained in *Laminaria japonica* was studied. Bio-ethanol was produced by *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129 strains in *Laminaria japonica*. The maximum bio-ethanol production of 2.09 g/L using heat-treatment of *Laminaria japonica* was achieved. The optimum concentration for reducing sugar conversion by *Laminaria japonica* was found to be 3.95 g/L at the HCl concentration of 0.1 N. But bio-ethanol production was higher than the case without the non-acid pretreatment. Among the various polysaccharides, only mannitol produced maximum 3.09 g/L bio-ethanol. In case of laminaran, the ethanol was produced only at 0.15 g/L only in 0.1 N HCl pretreatment medium and cell growth was higher than other pretreatment.

Keywords: bio-ethanol, pretreatment, *Laminaria japonica*, *Saccharomyces cerevisiae*

1. 서 론

산업혁명 이후 화석연료의 사용량은 급속도로 증가하여 현재 전세계 에너지 사용량의 약 86%에 달하고 있으며, 이로 인해 이산화탄소의 농도는 빙하기 시대에 180 ppm이었던 것이 최근 370 ppm까지 급격히 증가했다[1]. 2007년 유엔 정부간 기후 변화 위원회(IPCC; Intergovernmental Panel on Climate Change)에서 발표한 제4차 평가보고서에 따르면, 21세기 말까지 온실가스 증가에 따른 지구온난화로 인하여 연 평균기온이 현재보다 1.1~6.4 °C 정도 오를 것으로 예상했으며, 해수면은 최대 0.59 m 상승할 것으로 전망했다. 또한 기온이 1.5~2.5 °C만 올라가도 생물 종의 20~30%가 멸종할 것으로 예측하고 있다. 온난화로 인한 지구 연 평균 기온은 지난 100년 간 약 0.74 °C 증가하였으며, 이러한 온난화 속도는 온실가스의 누적으로 인해 더욱 가속화될 것으로 예상되고 있다. 또한 화석연료는 급격한 산업화로

인한 그 요구량이 갈수록 증가하고 있으나 매장량은 이미 한계에 도달한 상태이다. 따라서 이러한 범지구적 온난화 현상과 화석연료의 고갈을 막기 위해 재생 가능한 바이오 연료에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이 중 바이오 에탄올은 액체연료인 휘발유를 대체할 수 있는 유력한 대체 연료로서 세계적으로 그 생산량이 급증하고 있다[2,3]. 바이오 에탄올은 현재 미국과 브라질을 중심으로 옥수수와 사탕수수를 이용하여 생산되고 있으나[4-7], 식량자원과의 경쟁과 이에 따른 가격상승으로 인해 폐 목재 및 농업 부산물 등의 고분자 다당류를 이용한 새로운 바이오 매스의 개발에 전 세계의 이목이 집중되어 있다. 이러한 바이오 매스의 개발은 앞서 말한 전분질계나 목질계에서 해양 유래의 바이오 매스로까지 확대되고 있으며, 이에 따라 해조류를 바이오 매스로 이용한 바이오 에탄올 생산이 유력한 대안으로 떠오르고 있다. 해조류 바이오 매스 중 갈조류는 성장이 빠르고 단위 면적당 생산성이 매우 높으며, 홍조류나 녹조류에 비해 그 생산량이 많다는 장점을 가지고 있어 새로운 바이오 매스의 개발에 유리할 것으로 생각된다[1].

[†] 교신저자 (e-mail: jhalee@silla.ac.kr)

갈조류는 건조중량의 약 30~67%의 탄수화물을 함유하고 있다[8, 9]. 이러한 탄수화물의 주요 구성 성분으로는 alginate와 laminaran, 그리고 당 알코올인 mannitol이 있으며[9,10], 이들의 성분 비율은 채취 시기 및 종에 따라 달라진다[11].

Alginate는 갈조류의 세포벽을 이루는 구조성 다당류로 β -D-mannuronate와 α -L-guluronate로 이루어져 있고, 이 두 성분은 각각 homopolymer 형태로 결합된 polymannuronate (M) 또는 polyguluronate (G) 형태로 존재하거나, 두 성분이 혼합된 heteropolymer (MG) 형태로 존재한다[12-14]. Alginate는 M와 G의 구성비율에 따라 젤 형성의 특성이 달라지는데 G의 함량이 많으면 젤의 강도가 높고 M 함량이 높을수록 유연성이 높은 젤이 형성되며[15], 금속이온과의 결합 및 성분 구성에 따라 가용성 및 난용성, 그리고 알칼리가용성, 산·알칼리 가용성으로 나뉜다[3,10,16].

또 다른 고분자 다당류인 laminaran은 갈조류 중에서도 특히 *Laminaria* 속의 저장성 다당류로 줄기 등의 생장이 왕성한 부분에서는 그 함량이 낮으나 성숙기에는 건조 중량의 약 20%를 차지하기도 한다[1]. 계절에 따른 성분 함량의 변화는 alginate와는 반대로 8~10월에 함량이 가장 많다. 주로 β -1, 3 결합으로 구성된 glucan으로 되어 있으며, 약간의 β -1, 6 결합 분자가 있으며 D-glucose 이외에 미량(2~5%)의 D-mannitol을 함유하고 있다[17,18].

이러한 갈조류의 alginate와 laminaran 같은 고분자 다당류들은 효소[19-21] 또는 물리화학적[22-25] 가수분해를 통해 다당류로 전환할 수 있다. 효소적 가수분해는 반응 조건이 온화하고 목적으로 하는 중합도의 올리고당 생산에 유리하다는 장점을 가지고 있다. 반면 물리화학적 가수분해는 효소에 비해 처리 시간이 짧고 간단하다는 장점이 있으나 산 처리 및 열처리에 의해 생기는 독성 부산물의 작용과 중화과정에서 생성되는 염에 의해 발효에 영향을 받을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 산 처리가 다시마 에탄올 발효에 미치는 영향과 중화과정에서 생성되는 염 농도가 미치는 영향에 대해 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 이용하여 확인하고자 한다.

2. 실험

2.1. 균주 및 배지

에탄올 발효균주로는 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 이용하였으며, 균주의 보관은 20% glycerol로 하여, -70 °C에서 보관하였다. Stock한 균주는 YPD배지(glucose 20.0 g/L, peptone 20.0 g/L, yeast extract 10.0 g/L)를 사용하여 30 °C, 150 rpm에서 진탕 배양시킨 후 사용하였다. 에탄올 발효에 사용한 다시마는 부산 부전시장에서 시판되는 것을 구입하여 이용하였으며, ball mill을 이용하여 분쇄하였다. 에탄올 발효를 위한 다시마 배지는 오직 다시마만을 20 g/L로 농도로 첨가하여 사용하였다. 알코올 발효는 300 mL flask에서 working volume을 100 mL로 하여 전 배양한 효모 3 mL를 접종하여 30 °C, 150 rpm에서 진탕 배양하였으며, pH는 배양 전 과정에서 인위적으로 조절하지 않았다.

2.2. 산 농도 및 염 농도에 따른 다시마 에탄올 발효

산 전처리에 의한 환원당 생성 및 에탄올 발효 영향을 확인하기 위해 HCl과 H₂SO₄를 이용하여 0.01 N에서 1.5 N까지 다양한 농도로 처리하였다. 각 농도별 산 용액 80 mL에 다시마를 각각 2 g씩 첨가하여 고압멸균기로 120 °C에서 30 min 동안 처리하였다. 멸균 후 배지는 NaOH를 이용하여 중화하였으며, 최종 배양 부피는 100 mL로 조절하

여 에탄올 발효 배지로 이용하였다. 산 처리과정에서 생기는 염의 발효저해를 확인하기 위해 HCl과 H₂SO₄의 중화과정에서 생기는 NaCl과 Na₂SO₄를 이용하여 산 처리 농도와 동일한 농도로 처리하였다. 즉 증류수 80 mL에 다시마를 각각 2 g씩 첨가하여 고압멸균기로 120 °C에서 30 min 동안 처리한 후 NaCl과 Na₂SO₄를 각각 0.01 N에서 1.5 N까지 다양한 농도로 배지에 첨가하여 에탄올 발효에 이용하였다. 모든 에탄올 발효는 shaking incubator를 이용하여 30 °C, 150 rpm에서 배양하였다.

전처리에 따른 환원당 생성량 및 배양기간 동안의 환원당 변화는 DNS 법을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 500 μ L에 DNS용액 2 mL을 가한 후 10 min간 가열한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 표준 검량선은 maltose를 이용하여 생성된 환원당을 정량하였다.

2.3. 기질에 따른 성장 및 에탄올 발효

에탄올 발효를 위해 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129의 다시마 구성 당 성분의 대사 가능성을 확인하기 위해 다시마의 주요 당 성분인 alginate, laminaran 및 mannitol을 각각 이용하여 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129의 성장과 에탄올 생산능을 확인하였다. 각각의 성분에 대한 기질 대사를 확인하기 위해 질소원으로 peptone 0.5 g/L를 이용하였으며, 탄소원으로 각각의 배지에 alginate, laminaran 및 mannitol을 10 g/L로 첨가해 주었으며, 대조군으로 peptone 만을 첨가한 배지를 이용하였다. 산 및 열처리에 대한 가수분해에 따른 기질 이용가능성을 확인하기 위해 열처리는 고압멸균기로 120 °C에서 30 min 동안 처리하였으며, 산 처리는 HCl과 H₂SO₄를 각각 0.1 N 농도로 처리하여 열처리와 동일한 조건으로 반응시켰다.

2.4. 에탄올 함량 측정

생성된 에탄올의 정량을 위해 발효된 시료를 14000 rpm에서 5 min 동안 원심분리 후 상층액을 gas chromatography (GC)를 이용하여 분석하였다. GC는 HP 5890 series II를 사용하였고, 칼럼은 HP-FFAP (Cross-Linked PEG-TPA 30 m/0.25 mm/0.25 μ L)를 사용하였다. 이동상은 N₂를 0.6 mL/min로 사용하였으며, injection temperature 150 °C, detector temperature 200 °C, 승온 조건은 45 °C (2 min)/(1 °C/min)/50 °C (1 min)/(20 °C/min)/90 °C (1 min)/(30 °C/min)/150 °C (1 min)이었다. 분리비는 70 : 1로 했으며 내부 표준물질로 1%의 isopropanol을 이용하였다.

2.5. Plate Assay에 의한 Alginate 가수분해

Saccharomyces cerevisiae KCCM1129의 alginate 가수분해 활성을 확인하기 위해 plate assay법[26]을 이용하였다. 즉, alginate 0.8 g/L, peptone 0.5 g/L, agar 1.5 g/L를 포함한 고체배지에 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 도말하여 24 h 동안 30 °C 항온배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지에 10% cetylpyridinium chloride를 처리하고, 10 min 동안 반응 후 증류수로 배지에 첨가한 cetylpyridinium chloride를 제거하고 clear zone 생성 여부에 따른 alginate 가수분해 활성을 확인하였다.

2.6. 전처리 Laminaran의 Glucose 전환

전처리 과정에서 laminaran의 glucose 전환을 확인하기 위해 Gel Permeation Chromatograph (GPC)를 이용하여 당 성분을 분석하였다. GPC는 Agilent Technologies의 1100 series GPC system을 이용하였으

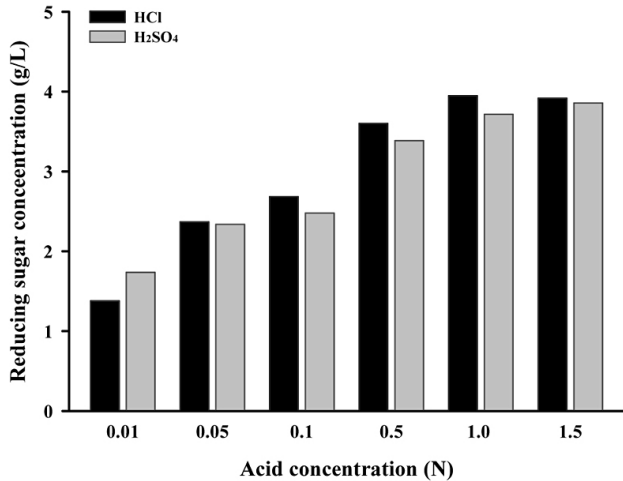


Figure 1. Hydrolysis of *Laminaria japonica* treated with various acid concentration.

며, 측정에는 refractive index (RI) 검출기를 이용하였고, column은 Bio-Rad의 Aminex HPX-87H 300 mm × 7.8 mm을 이용하였다. 이동상은 d-H₂O를 사용하였으며, 유속은 0.6 mL/min로 조절하였고, column 온도는 40 °C로 유지하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 산 전처리에 따른 환원당 생성

산 전처리에 따른 환원당 생성을 확인하기 위해 HCl과 H₂SO₄를 이용하여 0.01 N 에서 1.5 N까지 다양한 농도로 처리하였다. 열처리 결과 산을 첨가하지 않은 다시마에서는 0.30 g/L의 환원당 생성이 확인되었으며, 산 첨가의 경우 HCl과 H₂SO₄ 모두 1.0 N 농도까지는 환원당 생성량이 급격히 증가하는 것으로 확인되었다(Figure 1). 산 종류에 따른 가수분해는 H₂SO₄보다는 HCl에서 좀 더 높게 나타났으며, 1.0 N HCl에서 최대 3.95 g/L의 환원당이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 1.0 N 이상의 농도로 처리시에는 오히려 환원당의 생산이 일부 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 산 및 열처리로 인한 최대 환원당 생성은 수율은 19.75%인 것으로 확인되었다. 그러나 일반적으로 다당류가 갈조류 전체 건조중량의 약 30~67%를 차지하는 것을 볼 때 상당히 낮은 수율이며, 이러한 낮은 수율은 처리되지 않고 남은 고형분과 DNS로 측정되지 않는 mannitol 같은 비환원당에 의한 것으로 생각된다.

3.2. 산 가수분해물을 이용한 에탄올 생산

산 가수분해에 따른 에탄올 발효를 비교하기 위해 각각의 산 가수분해물을 증화하여 이를 배지로 사용하였다. 증화 후 첨가한 다시마의 농도를 동일하게 하기 위해 멸균수를 첨가하여 모든 배양 부피는 100 mL로 동일하게 조절하여 주었다. 에탄올 발효 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 이용하였으며, 전 배양된 균주를 3 mL 접종하여 120 °C, 150 rpm에서 48 h 동안 배양하였다. 발효에 따른 에탄올 생산은 산 처리를 하지 않고 열처리만 한 배지에서 2.08 g/L로 가장 높게 나타났다. 산 처리에 대한 에탄올 생산은 HCl의 경우 0.01 N에서 에탄올 생산량 1.23 g/L로 급격히 감소하였고 이후 증가하여 0.1 N에서 1.65 g/L까지 증가하였다(Figure 2(a)). 에탄올 생산량의 감소는 산 첨가와 열처리에 따른 발효저해 물질의 생산 때문인 것

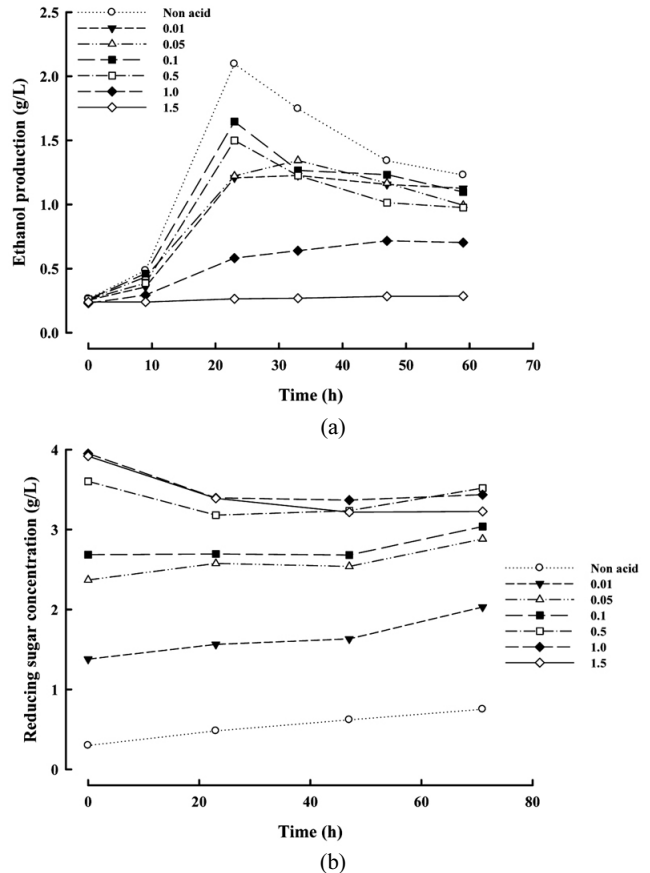


Figure 2. Ethanol production and reducing sugar content from *Laminaria japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* in various hydrochloric acid pretreatment; (a) Inhibition of bio-ethanol production during fermentation, (b) Progressive change in reducing sugar content in the culture medium during fermentation.

으로 생각되며, 0.1 N 이후의 급격한 에탄올 생산량의 감소는 고농도의 염에 의한 것으로 생각된다. H₂SO₄를 이용한 에탄올 발효에서는 0.01 N에서 1.25 g/L로 에탄올 생산량이 급격히 감소하였고 0.05~1.0 g/L까지 약 1.39 g/L 크게 변화가 없었다(Figure 3(a)). 그러나 1.5 N에서는 HCl과 같이 에탄올 생산이 급격히 감소하는 경향을 보였다. 전체적으로 HCl에 의한 산 가수분해의 경우 산 농도에 따라 에탄올 생산량이 급격히 변화하는 것으로 나타났다. 반면 H₂SO₄를 이용한 실험에서는 산 농도의 변화에 따른 에탄올 생산은 급격한 변화가 없는 것으로 나타났다.

3.3. 염 농도에 따른 에탄올 생산 저해

염 농도에 따른 에탄올 생산 저해를 확인하기 위해 다시마 2 g을 300 mL 삼각플라스크에 넣고 증류수를 80 mL 첨가하여 고압멸균기에서 120 °C, 30 min 동안 처리하고 실온에서 냉각하였다. 처리된 다시마 용액은 증화 과정에서 생산되는 염 농도의 영향을 확인하기 위해 산 전처리와 동일한 노르말 농도의 NaCl과 Na₂SO₄를 첨가해 주었다. 에탄올 발효 조건은 산 처리 가수분해물을 이용한 발효와 동일한 조건으로 전 배양된 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129 균주를 이용하였으며, 균주를 3 mL 접종하고 120 °C, 150 rpm에서 48 h 동안 배양하였다. 염 농도에 따른 에탄올 생산 저해는 염을 첨가하지 않은 대조군에서 에탄올 생산이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 이후

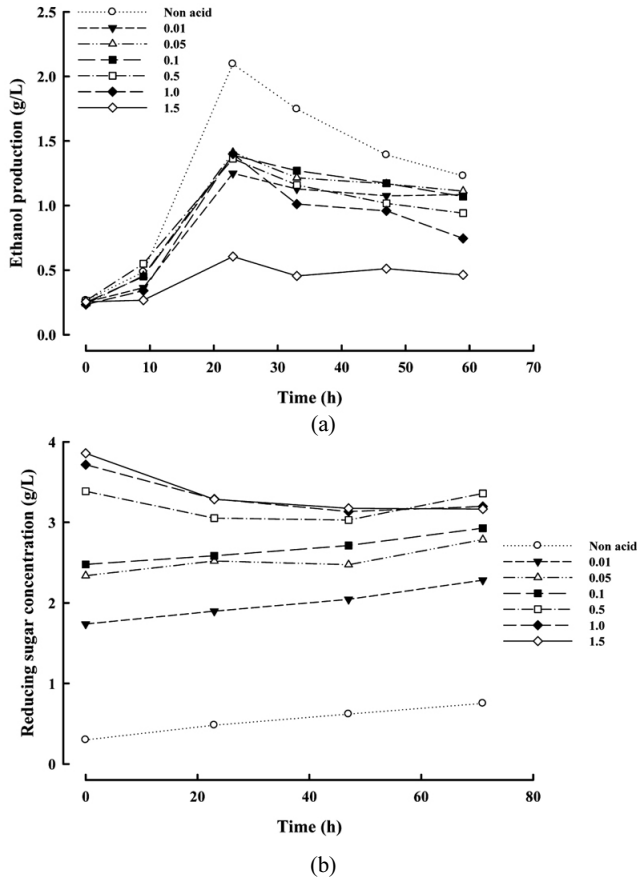


Figure 3. Ethanol production and reducing sugar content from *Laminaria japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* in various sulphuric acid pretreatment; (a) Inhibition of bio-ethanol production during fermentation, (b) Progressive change in reducing sugar content in the culture medium during fermentation.

첨가한 염의 농도 증가에 따라 에탄올 생산량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 대부분의 에탄올 발효는 24 h에서 끝이 났으며, NaCl을 첨가한 경우 1.0 N에서부터 에탄올 생산이 확인되지 않았다(Figure 4(a)). 또한 Na₂SO₄를 첨가한 경우 1.5 N까지 에탄올 생산이 소량 확인되었으나, 0.5 N 이후 에탄올 생산이 급격히 감소하는 것으로 확인되었다(Figure 5(a)).

에탄올 생산에 미치는 산 및 염 농도의 영향은 산의 경우 첨가 농도에 따라 0.1 N까지는 증가하다가 감소하는 경향을 나타냈고, 반면 염 첨가의 경우 에탄올 생산이 저 농도에서부터 서서히 감소하는 것으로 나타났다(Figure 6(a), (b)). 또한 저 농도에서는 염 첨가 시료에서 에탄올 생산이 높았으나 고 농도로 갈수록 산 처리 시료에서의 에탄올 생산이 증가하는 경향을 나타냈다. 이러한 영향은 고 농도 산 처리에서의 가수분해로 인해 염 농도에 의한 에탄올 발효저해를 일부 회복한 것으로 보인다.

3.4. 배양 중 배지 내의 환원당 변화

다시마를 이용한 에탄올 발효 기간 동안 배지 내의 환원당 변화를 확인하기 위해 DNS법을 이용하였다. 다시마에 존재하는 alginate, laminaran는 가수분해에 의해 분해되면 환원당을 생산하므로 DNS를 통해 측정이 가능하다. 그러나 mannitol의 경우 비 환원당으로 DNS법으로는 측정되지 않는다. 따라서 DNS측정을 통해 배지 내에 존재하

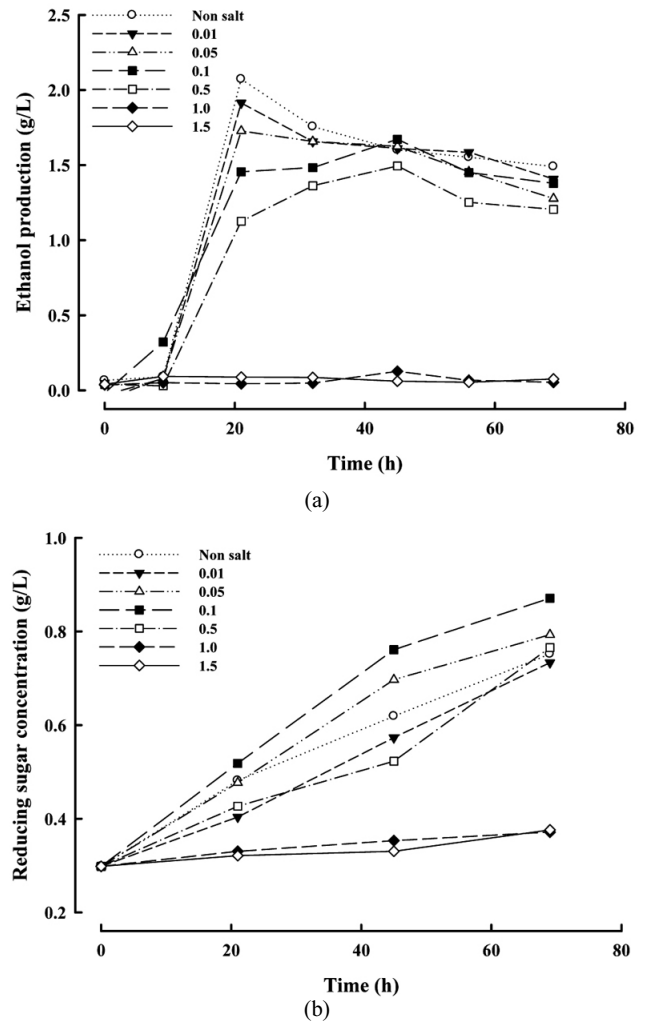
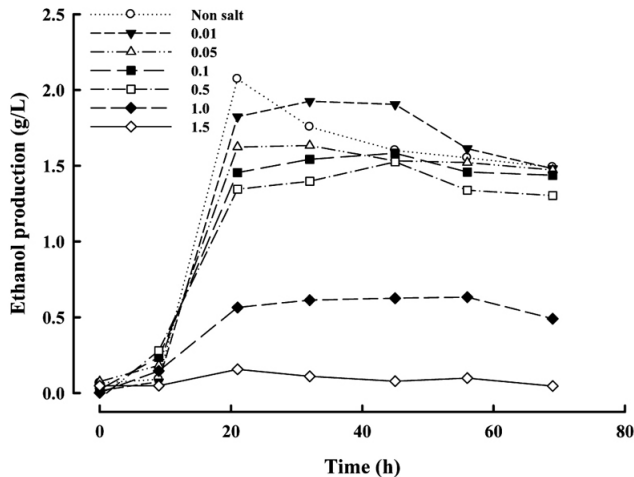
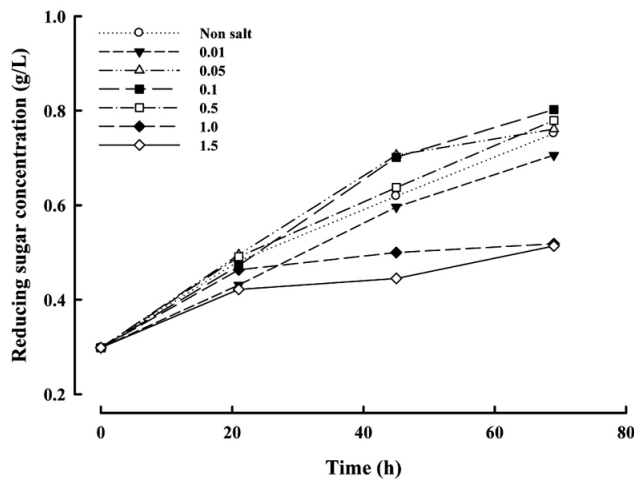


Figure 4. Ethanol production and reducing sugar content from *Laminaria japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* in various sodium chloride pretreatment; (a) Inhibition of bio-ethanol production during fermentation, (b) Progressive change in reducing sugar content in the culture medium during fermentation.

는 다당류의 가수분해 및 소모를 확인할 수 있다. DNS를 이용한 환원당 측정 결과 전처리를 통한 배지 내의 환원당 생성량은 산 농도의 증가에 따른 증가하는 경향을 보였다(Figure 1). 배양기간 중 환원당의 변화는 HCl과 H₂SO₄ 모두 0.5 N 이상의 농도에서는 배양 기간에 따라 배지 내의 환원당이 감소하는 것으로 확인 되었다. 그러나 그 이하의 산 농도를 처리한 배지에서는 오히려 환원당의 생산량이 증가하는 것으로 나타났다(Figure 2(b), 3(b)). 이러한 경향은 염을 첨가한 배지에서도 나타났다. 염 첨가의 경우 모든 배지에서 열 처리 후 초기 환원당은 0.30 g/L로 확인되었고, 모든 배지에서 환원당이 증가하였으며 0.1 N Na₂SO₄에서 0.87 g/L까지 증가하는 것으로 확인되었다(Figure 4(b), Figure 5(b)). 이러한 환원당의 변화는 고농도의 산 처리 산물에서 환원당이 감소하는 것으로 보아 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129가 일부 가수분해 과정에서 생성되는 환원당을 기질로 이용 가능한 것으로 보이나 대부분 이용하지 못하고 잔류하는 것으로 확인된다. 또한 환원당이 증가하는 것으로 보아 발효과정에서 다당류인 alginate와 laminaran이 가수분해된 것으로 보인다.



(a)



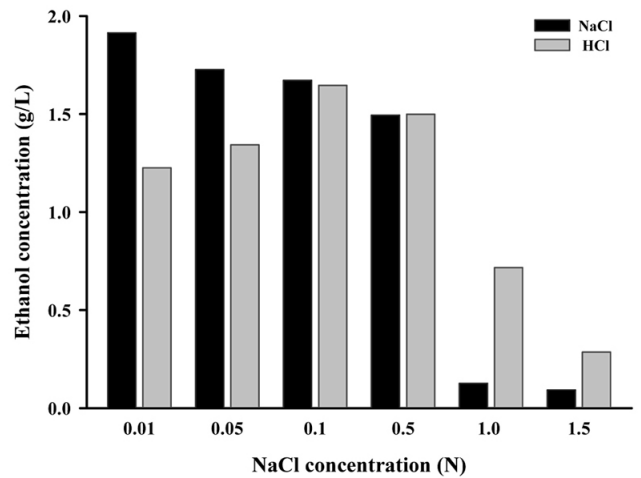
(b)

Figure 5. Ethanol production and reducing sugar content from *Laminaria japonica* of *Saccharomyces cerevisiae* in various sodium sulfate pretreatment; (a) Inhibition of bio-ethanol production during fermentation, (b) Progressive change in reducing sugar content in the culture medium during fermentation.

3.5. Plate Assay를 통한 Alginate 분해 활성 확인

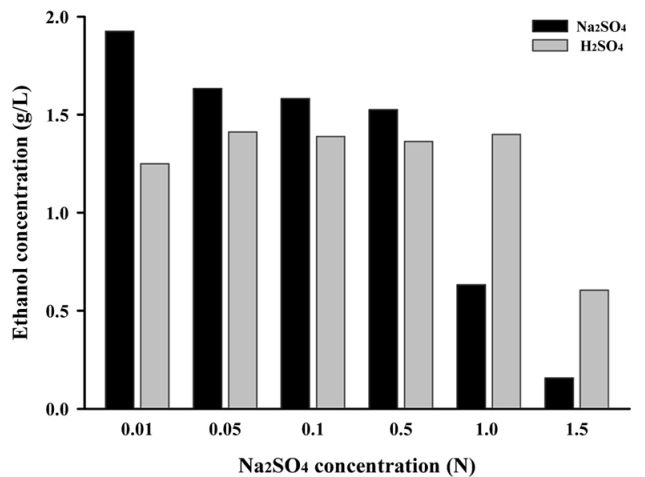
Alginate에 대한 가수분해 여부를 확인하기 위해 plate assay를 이용하였다. 활성 측정에 사용한 고체 배지는 alginate를 0.8 g/L 포함한 복합배지를 이용하였으며, 배지에 에탄올 발효 균주로 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 항온배양기를 이용하여 30 °C에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지에 10% cetylpyridinium chloride를 처리하여 10 min 간 반응한 후 alginate에 대한 가수분해 여부를 확인하였다. Cetylpyridinium chloride처리 후 배지는 시간이 지날수록 흰색으로 뿌옇게 변하기 시작했다. 10 min 경과 후 배지는 완전한 흰색으로 변하였으며, 증류수로 10% cetylpyridinium chloride를 세척한 결과 배양한 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129는 배지에서 완전히 떨어져 나왔다. 균주가 자란 자리는 투명한 clear zone이 생성되었으며(Figure 7), 따라서 alginate에 대한 가수분해 활성이 있는 것으로 확인 되었으며, 다시마를 이용한 에탄올 발효 과정 동안의 비정상적인 환원당의 증가는 alginate의 가수분해에 의한 것으로 보인다.

Ethanol production(NaCl & HCl)



(a)

Ethanol production(Na2SO4 & H2SO4)



(b)

Figure 6. Inhibition of bio-ethanol production from acid and salt concentration; (a) Effect of NaCl and HCl concentration, (b) Effect of Na₂SO₄ and H₂SO₄ concentration.

3.6. 기질에 따른 세포성장 및 에탄올 발효

다시마의 주요 다당류 기질인 alginate, laminaran, 그리고 mannitol을 이용한 에탄올 발효 결과, 에탄올로 전환 가능한 당 성분은 mannitol이 유일한 것으로 확인되었다(Figure 8). Mannitol을 이용한 배지에서 전처리 조건으로 열처리를 이용하였을 때 에탄올 생산은 최대 3.09 g/L로 확인되었다(Figure 8(a)). 세포의 성장은 대조군으로 이용한 peptone 배지와 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 세포의 성장에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. Laminaran의 경우 산처리에서 세포의 성장이 다른 배지에서 보다 훨씬 크게 나타났으며, 0.1 N HCl에서 최대 2.94 g/L의 성장을 보였다(Figure 8(b)). 세포의 성장은 전체적으로 열처리 산물을 이용했을 때 가장 높게 나타났으며, 산 처리시에는 오히려 성장이 감소하는 것으로 확인되었다. 이는 산처리로 인해 생성되는 독성 부산물과 중화 과정에서 생기는 염에 의한 세포 성장 저해로 보인다. 또한 에탄올 생산도 산 처리시 열처리보다 오히려 생산율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 기질에 따른 에

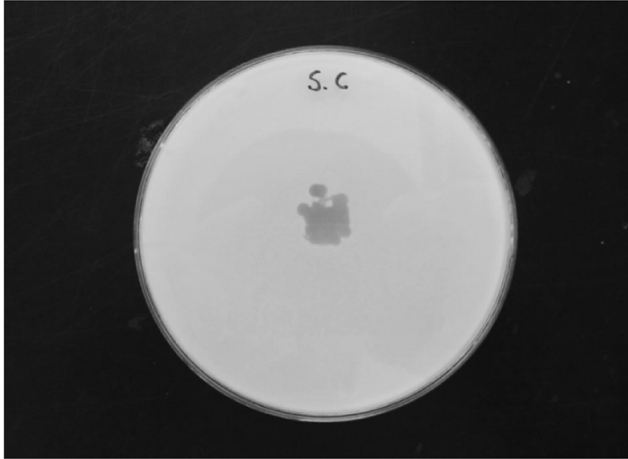


Figure 7. Plate assay of alginate lyase activation from *Saccharomyces cerevisiae*.

탄올 발효에서 laminaran은 특이하게 세포의 성장에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었고, 또한 0.1 N HCl을 이용한 laminaran의 전처리 산물에서는 0.15 g/L의 소량의 에탄올 생산이 확인할 수 있었다. Laminaran의 에탄올 전환을 확인하기 위해 HPLC를 이용하여 전처리

에 따른 laminaran의 변화에 대해 확인하였다(Figure 9). 실험 결과 산 처리과정에서 일부 laminaran이 glucose로 전환되는 것으로 확인 되었 으며, laminaran 10 g/L를 0.1 N HCl로 전처리시 최대 2.50 g/L의 glucose가 생성되는 것으로 확인되었다(Figure 9(b)). 반면 동일한 농도의 H₂SO₄를 처리한 것에서는 0.84 g/L로 HCl에 비해 glucose로의 전환율이 33.6% 정도에 불과한 것으로 확인되었다(Figure 9(c)). 따라서 0.1 N HCl을 처리한 laminaran에서의 에탄올 생산은 산 가수분해 과정에서 생성된 glucose에 의한 것으로 보인다. 따라서 발효균주인 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129가 laminaran을 성장 기질로는 직접적으로 이용 가능하나 에탄올 발효를 위해서는 전처리 과정을 통해 가수분해 과정에서 생산된 glucose만을 에탄올 생산의 기질로도 이용하는 것으로 확인된다.

4. 결 론

본 연구는 갈조류인 다시마를 이용한 바이오 에탄올 발효에서 산 및 염의 농도가 미치는 영향 및 구성 다당류의 기질로서 이용가능성에 대해 실험하였으며, 또한 다시마를 이루는 고분자인 다당류인 alginate와 laminaran, 그리고 단 당류인 mannitol을 이용하여, 발효과정에서 각 탄소원이 미치는 영향에 대해 확인하였다.

다시마를 구성하고 있는 고분자 다당류들은 산 처리에 의해 가수분

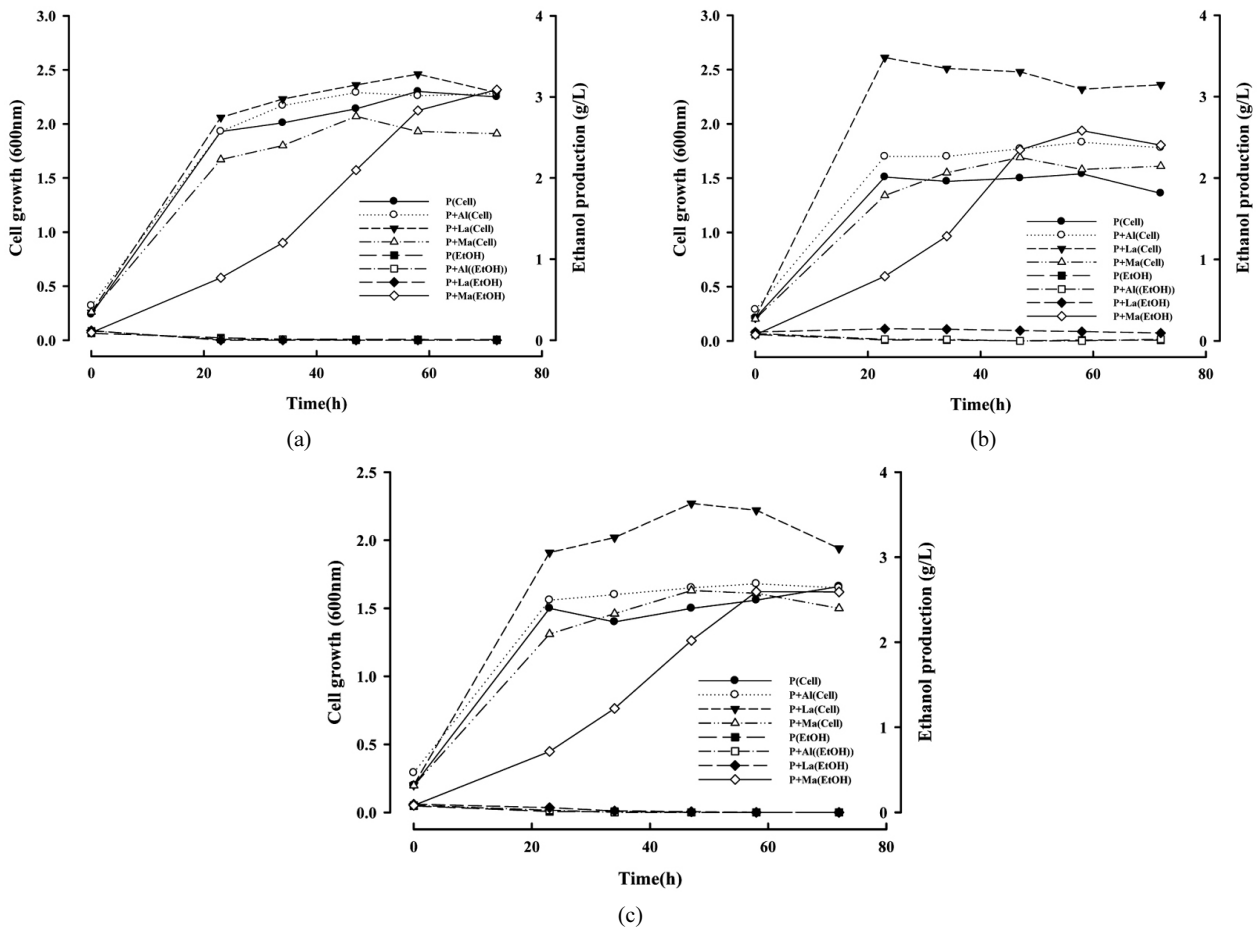


Figure 8. Cell growth and ethanol production from various substrate in culture medium; (a) Heat pretreatment: 120 °C, 30 min with autoclave, (b) 0.1 N HCl pretreatment: added 0.1 N HCl at 120 °C for 30 min with autoclave, (c) 0.1 N H₂SO₄ pretreatment: added 0.1 N H₂SO₄ at 120 °C for 30 min with autoclave. P = peptone, Al = alginate, La = Laminaran, Ma = mannitol, Cell = Cell growth, EtOH = Ethanol production.

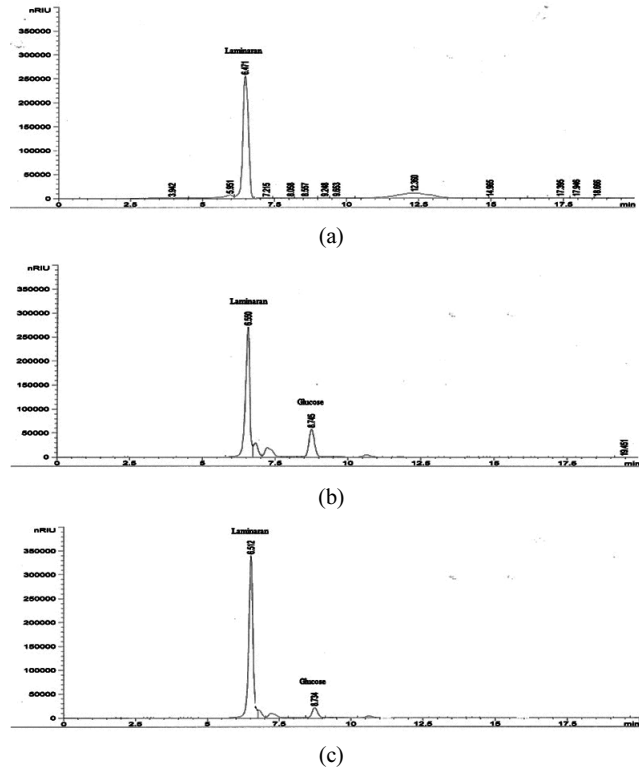


Figure 9. Change of acid pretreatment on the laminaran; (a) Heat pretreatment: 120 °C, 30 min with autoclave, (b) 0.1 N HCl pretreatment: added 0.1 N HCl at 120 °C for 30 min with autoclave, (c) 0.1 N H₂SO₄ pretreatment: added 0.1 N H₂SO₄ at 120 °C for 30 min with autoclave.

Table 1. Effect of Pretreatment Used Various Substrate, on the Cell Growth and Ethanol Production

Pretreatment	Substrate	Cell growth (O.D. ₆₀₀)	Dry cell weight (g/L)	Ethanol (g/L)	Ethanol yield
Heat	Control	2.30	2.59	—	—
	Alginate	2.29	2.58	—	—
	Laminaran	2.46	2.77	—	—
	Mannitol	2.07	2.33	3.09	15.45
HCl	Control	1.54	1.73	—	—
	Alginate	1.83	2.06	—	—
	Laminaran	2.61	2.94	0.15	0.75
	Mannitol	1.69	1.90	2.58	12.90
H ₂ SO ₄	Control	1.66	1.87	—	—
	Alginate	1.68	1.89	—	—
	Laminaran	2.27	2.55	—	—
	Mannitol	1.63	1.83	2.59	12.95

해되어 환원당 생성량을 높이는 것으로 확인되었다. 산 처리에 의한 환원당의 생성은 1.0 N HCl에서 최대 3.95 g/L까지 증가하는 것으로 확인되었다. 그러나 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129를 이용한 바이오 에탄올 생산에서 환원당의 함량이 가장 낮은 산 처리를 하지 않은 배지에서 에탄올 함량이 2.09 g/L로 가장 높게 나타났다. 이는

기질에 따른 에탄올 발효를 확인한 결과 가수분해에 의해 환원당을 생성하는 alginate와 laminaran이 에탄올로 전환되지 않기 때문인 것으로 확인되었다. 반면 DNS에 의해 정량이 불가능한 비환원당인 mannitol만이 생물학적 발효 과정을 통해 에탄올로 전환 가능한 것으로 확인되었다. 따라서 환원당의 증가는 에탄올 발효에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 그러나 laminaran의 경우 열처리에서는 에탄올 생산에 거의 영향을 미치지 않으나 0.1 N HCl을 이용한 산 가수분해에서 0.15 g/L의 소량에 에탄올 생산이 확인되었으며, 산 처리한 HCl과 H₂SO₄ 모두에서 세포의 성장을 각각 2.94와 2.55 g/L로 급격히 증가시키는 것으로 확인되었다. 따라서 laminaran 또한 적절한 전처리 공정의 확립을 통해 에탄올 발효 기질로 이용이 가능할 것으로 생각된다. 또한 배양기간 동안 배지 내의 환원당 함량이 증가하는 경향을 보였는데 이는 plate assay를 통한 확인 결과 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM1129 자체적으로 alginate에 대한 가수분해 활성을 가지고 있어 배양 과정에서 이를 분해했기 때문으로 보인다.

참고 문헌

1. J.-I. Park, H.-C. Woo, and J.-H. Lee, *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**, 833 (2008).
2. M. Balat and H. Balat, *Applied Energy*, **86**, 2273 (2009).
3. N. E. Tolbert, Regulation of atmospheric CO₂ and O₂ by photosynthetic Carbon Metabolism, ed. J. Preiss, **8**, Oxford University Press, Oxford (1994).
4. J.-R. Do, Y.-J. Nam, J.-H. Park, and J.-H. Jo, *J. Kor. Fish. Soc.*, **30**, 428 (1997).
5. A. Hirano, R. Ueda, S. Hirayama, and Y. Ogushi, *Energy.*, **22**, 137 (1997).
6. B. C. Saha and M. A. Cotta, *Enzyme Microb. Technol.*, **41**, 528 (2007).
7. B. Hahn-Hagerdal, M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi, *Trends Biotechnol.*, **24**, 549 (2006).
8. J.-H. Kim, D.-S. Byun, J. S. Godber, J.-S. Choi, W.-C. Choi, and H.-R. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 553 (2004).
9. H.-I. Kang, M.-S. Ko, H.-J. Kim, S.-W. Kim, and T.-J. Bae, *J. Kor. Fish. Soc.*, **29**, 716 (1996).
10. G. Michel, P. Nyval-Collen, T. Barbeyron, M. Czjzek, and W. Helbert, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 23 (2007).
11. S. A. Lee, J. U. Kim, J. G. Jung, I. H. Kim, S. H. Lee, S. J. Kim, and J. H. Lee, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 389 (2006).
12. Y. Sugano, I. Terada, M. Arita, M. Noma, and T. Matsumoto, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1549 (1993).
13. B. Hu, Q. Gong, Y. Wang, Y. Ma, J. Li, and W. Yu, *Anaerobe.*, **12**, 260 (2006).
14. D. S. Joo, S. Y. Cho, and E. H. Lee, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 378 (1998).
15. C. Y. Lii, C. H. Chen, A. I. Yeh, and V. M. F. Lai, *Food Hydrocolloids.*, **13**, 477 (1999).
16. D. S. Joo, O. S. Kim, S. Y. Cho, and C. H. Lee, *J. Kor. Fish. Soc.*, **36**, 6 (2003).
17. D. S. Joo, H. M. Song, J. S. Lee, S. Y. Cho, and E. H. Lee, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**, 320 (1998).
18. A. Karlsson and S. K. Singh, *Carbohydr. Polym.*, **38**, 7 (1999).
19. J.-Y. Kong, New Informations of Oligosaccharides, 359, Yelim media, Seoul (2007).
20. M.-K. Jang, O. H. Lee, K. H. Yoo, D.-G. Lee, and S. H. Lee, *J.*

- life. Sci.*, **17**, 1601 (2007).
21. J.-Y. Kong, S.-K. Bae, S.-H. Hwang, S.-D. Ha, H.-T. Kim, S.-K. Kim, and B.-J. Kim, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 37 (1996).
 22. H.-M. Chen, L. Zheng, and X.-J. Yan, *Food Technol. Biotechnol.*, **43**, 29 (2005).
 23. S. J. Horn, I. M. Aasen, and K. Østgaard, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 249 (2000).
 24. S.-L. Kim, W.-J. Kim, S.-Y. Lee, and S. M. Byun, *J. Kor. Agricultural Chemical Society.*, **27**, 139 (1984).
 25. S.-K. Paik, H.-S. Yun, K.-H. Sa, I.-S. Kim, I.-K. Rhee, H.-D. Park, C.-B. Yu, and I. Jin, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 63 (2003).
 26. P. Gacesa and F. S. Wusteman, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2265 (1990).