

해조류 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*)의 분리당화발효를 이용한 바이오에탄올의 생산

라채훈, 이현준, 신명교¹, 김성구*

Bioethanol Production from Seaweed *Gelidium amansii* for Separated Hydrolysis and Fermentation (SHF)

Chae Hun Ra, Hyeon Jun Lee, Myung Kyo Shin¹, and Sung-Koo Kim*

접수: 2013년 6월 24일 / 게재승인: 2013년 9월 25일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: The seaweed, *Gelidium amansii*, was fermented to produce bioethanol. Optimal pretreatment condition was determined as 94 mM H₂SO₄ and 8% (w/v) seaweed slurry at 121°C for 60 min. The mono sugars of 40.4 g/L with 67% of conversion from total carbohydrate of 60.6 g/L with 80 g dw/L *G. amansii* slurry were obtained by thermal acid hydrolysis pretreatment and enzymatic saccharification. *G. amansii* hydrolysate was used as the substrate for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150 and *Candida tropicalis* KCTC 7212 using 5L fermentor. The ethanol productions by *K. marxianus* KCTC 7150 and *C. tropicalis* KCTC 7212 were 17.8 g/L with Y_{EtOH} of 0.48 at 120 h and 19.3 g/L with Y_{EtOH} of 0.50 at 120 h, respectively.

Keywords: Seaweed, *Gelidium amansii*, Pretreatment, Ethanol fermentation, SHF

1. 서론

최근 해조류 바이오매스는 육상계 바이오매스의 한계를 극복할 수 있는 차세대 바이오매스로서 새롭게 조명받기 시작하였으며, 바이오연료로서의 활용에 초점을 맞추어 해조류의 생태, 바이오매스의 생산과정과 바이오연료 생산, 경제성 평가 등 다방면으로 새로운 재생 가능한 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다 [1,2]. 해조류를 이용한 바이오에너지의 생산은 삼면이 바다인 우리나라에 적합하며, 해조류가 성장하는 동안 이산화탄소를 소모하는 닫힌 탄소순환 (closed carbon circulation)으로 이산화탄소 배출량 감소 등 생태계의 안정화에 기여한다.

해조류는 바다에 사는 조류를 통틀어 말하며, 부유생활을 하는 미세조류 (식물플랑크톤)와 고착생활을 하는 대형 조류로 구분된다. 대형조류에는 녹조류, 갈조류, 홍조류로 구성되어 있으며, 탄수화물을 구성하는 당 및 함량은 종류에 따라 다양하지만 20~60%의 탄수화물을 함유하고 있다 [3]. 그 중 홍조류인 모로코산 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*)는 성장이 빠르며, 갈조류나 녹조류에 비해 탄수화물 함량이 76%로 가장 높다는 장점이 있다. 홍조류를 이용한 에탄올 발효를 위해서는 전처리 과정이 필요하며, 다양한 물리적, 화학적, 생물학적 처리로 당화효율을 증가시킬 수 있다. 화학적 전처리 방법인 황산의 사용은 바이오 매스의 구조를 가수분해에 용이하게 전환시키고 신속하게 가수분해를 시킬 수 있어 당을 효율적으로 분해 가능하다는 장점이 있다 [4-6]. 그러나 산 촉매 열가수분해 전처리 방법은 오탄당의 탈수반응에서 furfural을 생성시키며, 육탄당의 탈수 반응에서 5-hydroxymethylfurfural

부경대학교 생물공학과
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5868, Fax: +82-51-629-5863
e-mail: skkim@pknu.ac.kr

¹바이올시스템즈
¹Biolsystems Co. Ltd., Gwang-Ri 430, Doyang-eub, Goheung-gun, Jeonnam 548-901, Korea.

(HMF)를 생성시킨다 [7]. 이러한 저해물질들은 미생물의 효소적·생물학적 활성, 단백질과 RNA 생합성을 저해시킨다 [8].

본 연구에서는 홍조류인 우뭇가사리 (*Gelidium amansii*)를 황산과 상용효소를 사용하여 가수분해를 실시하며, 효모 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150와 *Candida tropicalis* KCTC 7212를 분리당화발효 (SHF)공정을 이용하여 바이오에탄올 발효를 수행하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에서는 에탄올 발효를 위한 기질로 모로코산 우뭇가사리를 사용하였으며, 바이올시스템즈 회사에서 모로코산 우뭇가사리를 공급받아 자연건조 후 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 355 μm (45 mesh) 이하의 분말을 사용하였다. 우뭇가사리의 구성성분 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하였으며, AOAC 방법에 의해 분석을 실시하였다 [9,10].

2.2. 우뭇가사리 산 촉매 열가수분해

산 촉매 열가수분해 최적조건을 설정하기 위해 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 하여 우뭇가사리 농도 범위를 7~9%로 설정하였다. 황산의 농도 범위는 56~132 mM로 설정하고 열처리 시간은 121°C에서 45~75분간 처리하였다. 열처리 후 시료를 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 분리된 상층액에서 glucose, galactose, HMF를 측정하였다. 산 촉매 열가수분해의 처리효율 (E_p , %)은 다음 식 (1)로 나타낼 수 있다.

$$E_p (\%) = \frac{\Delta S_{gal}}{TC} \times 100 \quad (1)$$

여기서 ΔS_{gal} 는 산 촉매 열가수분해시 생성되는 galactose의 농도 (g/L)이며, TC는 우뭇가사리의 총 탄수화물 (total carbohydrate) 함량 (g/L)이다.

2.3. 효소 가수분해

홍조류인 우뭇가사리의 효소 가수분해를 수행하기 위하여 기질 시료를 산 촉매 열가수분해를 실시한 시료를 사용하였다. 가수분해에 사용한 최종 효소 농도는 1.2 FBG/mL Viscozyme L (beta-glucanase, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)와 8.4 EGU/mL Celluclast 1.5 L (endo-glucanase, Novozymes)를 사용하였다. 효소 반응은 pH 5.0, 45°C, 200 rpm으로 2일 동안 효소 가수분해를 실시하였으며, 시료를 채취하여 생성된 단당의 양을 측정하였다. 효소 가수분해 효율 (E_s , %)은 다음 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$E_s (\%) = \frac{\Delta S_{glc}}{C} \times 100 \quad (2)$$

여기서 ΔS_{glc} 는 효소 가수분해시 생성되는 glucose의 농도

(g/L)이며, C는 우뭇가사리의 섬유 (fiber) 함량 (g/L)이다.

2.4. 효모 균주 및 배양

에탄올 발효 균주는 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150와 *Candida tropicalis* KCTC 7212를 사용하였다. Seed culture는 YPG broth (yeast extract 10.0 g/L, peptone 20.0 g/L, galactose 50.0 g/L)를 500 mL flask에서 working volume 250 mL로 하여 48시간 동안 배양하였다. 에탄올 발효는 5L 발효기 (KF-5, KFC, Incheon, Korea)에서 working volume 2.5 L로 하여 단계적으로 산 촉매 열가수분해와 효소 가수분해를 수행하였다. 최종 균 농도가 0.27~0.30 g dcw/L로 접종한 후 30°C, 200 rpm으로 120시간 동안 배양을 하면서 일정시간마다 시료를 채취하여 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., Santa Clara, USA)를 이용하여 생성된 에탄올 농도를 분석하였다.

에탄올 수율 (Y_{EtOH} , g/g)은 다음 식 (3)로 나타낼 수 있다.

$$Y_{EtOH} (\text{g/g}) = \frac{[EtOH]_{max}}{[Sugar]_{ini}} \quad (3)$$

여기서 $[EtOH]_{max}$ 는 에탄올 발효로 인해 생성되는 최종 에탄올의 농도 (g/L)이며, $[Sugar]_{ini}$ 는 에탄올 발효 초기 단당 (galactose + glucose)의 농도 (g/L)이다. 최대 이론적 에탄올 수율 (Y_{EtOH} , g/g)은 0.51이다.

2.5. 분석방법

단당 (Glucose, galactose), 저해물질 (HMF), 에탄올 측정은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., Santa Clara, USA)와 RID (refractive index detector)를 이용하였다. 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column (300.0×7.8 mm)를 사용하여 온도 65°C, 이동상 5 mM 황산, 유속 0.6 mL/min로 하여 각 시료를 40분간 분석하였다 [11].

3. 결과 및 고찰

3.1. 우뭇가사리의 성분 분석

거대 홍조류인 우뭇가사리의 구성성분을 AOAC방법으로 분석한 결과 58.4% 탄수화물, 17.4% 섬유, 18.7% 단백질, 0.7% 지방, 4.8% ash 등으로 Table 1과 같이 구성되어 있었다. 실험에 사용한 모로코산 우뭇가사리와 같은 홍조류인 제주산 우뭇가사리와 꼬시래기에 대하여 성분 분석한 결과, 제주산 우뭇가사리가 62.8%, 꼬시래기가 66.9%의 탄수화물을 함유하고 있었다. 셀룰로오스를 포함한 총 탄수화물은 모로코산 우뭇가사리가 가장 높은 것으로 나타나 실험에 적합한 바이오매스라고 판단되었다.

3.2. 우뭇가사리의 산 촉매 열가수분해

우뭇가사리를 이용한 발효당을 생산하기 위해 산 촉매 열가수분해의 최적 전처리 조건을 확립하였다. Fig. 1은 7~9%의 우뭇가사리 슬러리, 56~132 mM의 황산, 그리고 121°C에서

Table 1. Composition of red seaweeds

Red seaweed	Carbohydrate (%)	Fiber (%)	Protein (%)	Lipid (%)	Ash and etc
<i>Gelidium amansii</i> (Morocco)	58.4	17.4	18.7	0.7	4.8
<i>Gelidium amansii</i> (Korea, Jeju)	62.8	11.6	18.1	0.2	7.3
<i>Gracilaria verrucosa</i> (Korea, wando)	66.9	7.7	9.5	0.7	15.2

45~75분간 열처리 시간에 대한 최적 조건을 나타내었다.

Fig. 1(a)는 다양한 슬러리 농도에 따른 산 촉매 열가수분해 결과이며, 슬러리 농도가 증가할수록 가수분해되는 galactose와 HMF의 농도도 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 산

촉매 열가수분해시 슬러리 농도가 8%에서 9%로 증가하였을 때 전처리 효율 (E_p)은 40.2%에서 37.8%로 감소하였다. 따라서 최적 슬러리 농도는 8%로 설정하였다. Fig. 1(b)는 8%의 최적 슬러리 농도에서 산 농도를 달리하여 산 촉매 열가수분해를 실시한 결과이며, 황산 농도가 94 mM에서 132 mM로 증가할수록 전처리 효율 (E_p)은 47.8%에서 47.4%로 큰 차이는 없었다. 따라서 최적 산 농도는 94 mM로 설정하였다. Fig. 1(c)는 8%의 슬러리 농도와 94 mM 황산 농도에서 열처리 시간을 달리하여 산 촉매 열가수분해를 실시한 결과이며, 열처리 시간이 60분에서 75분으로 증가할수록 HMF 농도만 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 전처리 효율 (E_p)은 48.0%에서 47.8%로 큰 차이는 없었다. 따라서 최적 열처리 시간은 60분으로 설정하였다.

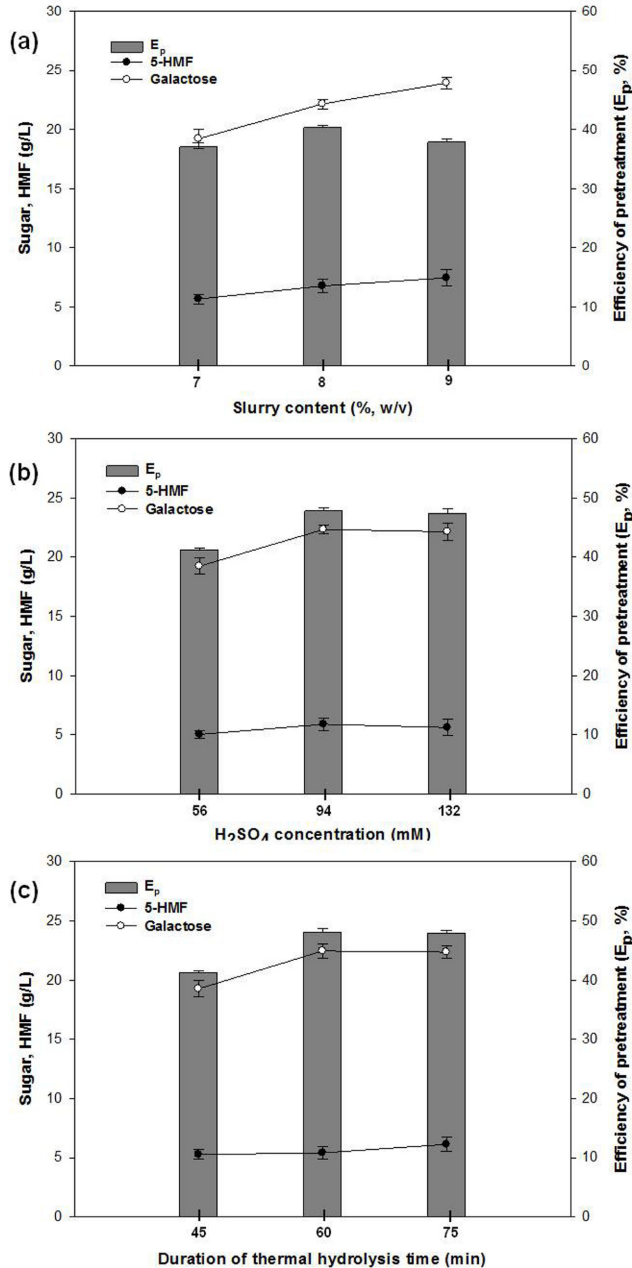


Fig. 1. Effect of thermal acid hydrolysis using various seaweed contents, acid concentrations, and thermal hydrolysis durations on the efficiency of pretreatments: (a) *G. amansii* slurry content, (b) H₂SO₄ concentration and (c) thermal hydrolysis time.

3.3. 효소 가수분해

산 촉매 열가수분해를 최적 전처리 조건으로 실시한 후 5 N NaOH를 이용하여 pH를 5.0으로 중화한 뒤 효소 가수분해를 실시하였다. Fig. 2는 단일 효소와 복합 효소를 이용하여 가수분해를 실시하였으며, 시간에 따른 glucose 농도를 분석하였다. 효소 가수분해에 사용한 단일 효소는 최종 농도는 1.2 FBG/mL Viscozyme L (beta-glucanase, Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)와 8.4 EGU/mL Celluclast 1.5L (endo-glucanase, Novozymes)를 사용하였다. 대조구에서 나타난 2.2 g/L의 glucose는 산 촉매 열가수분해를 실시하였을 때 생성되었다. 단일 효소인 Viscozyme L과 Celluclast 1.5L의 가수분해효율 (E_p)은 각

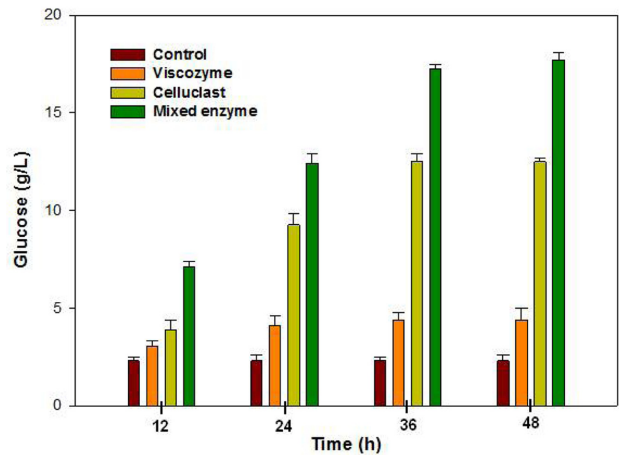


Fig. 2. Effect of single and mixed enzyme treatments on glucose release of *G. amansii* hydrolysate from 8% (w/v) slurry after thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 40°C for 48 h. The initial glucose was 2.2 g/L after thermal acid hydrolysis pretreatment. Celluclast 1.5L with 8.4 EGU/mL and Viscozyme L with 1.2 FBG/mL were used to 80 g/L of seaweed slurry.

각 15.8%에 해당되는 2.2 g/L와 74%에 해당되는 10.3 g/L를 나타내었다. 혼합 효소의 가수분해효율 (E_s)은 100%에 해당되는 13.9 g/L 이상을 나타내었으며, 단일 효소보다는 혼합 효소를 이용한 가수분해가 당화효율을 높이는 시너지 효과가 있음을 확인하였다.

3.4. 효모를 이용한 에탄올 발효

에탄올 발효는 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150와 *Candida tropicalis* KCTC 7212를 5L fermentor를 이용하여 분리당화발효를 실시하였다. *K. marxianus* KCTC 7150와 *C. tropicalis* KCTC 7212는 glucose, xylose, mannose, galactose 등을 이용할 수 있으며 [12], 이러한 glucose와 galactose의 혼합당에 대하여 에탄올 발효를 실시하였다. Fig. 3(a)는 *K. marxianus* KCTC 7150를 30°C, 200 rpm으로 132시간 동안 발효한 결과이며, 40시간에 glucose와 HMF가 모두 감소하였고 이후 galactose가 점점 감소하였다. 발효 120시간에 17.8 g/L의 에탄올이 생산되었으며, Yuan et al. [13]에서 *K. marxianus*를 이용한 에탄올 수율 (Y_{EtOH})인 0.46과 비교하였을 때 에탄올 수율 (Y_{EtOH})은 0.48로 높은 수율을 나타내었다. Fig. 3(b)는 *C. tropicalis* KCTC 7212를 30°C, 200 rpm으로 132시간 동안 발효한 결과이며, 40시간에 glucose와 HMF가 모두 감소하였고 이후 galactose가 점점 감소하였다. 발효 120시간에 19.3 g/L의 에탄올이 생산되었으며, 에탄올 수율 (Y_{EtOH})은 0.50로 나타났다. 이는 에탄올의 이론적 최대 수율 ($Y_{EtOH, g/g}$)이 0.51임

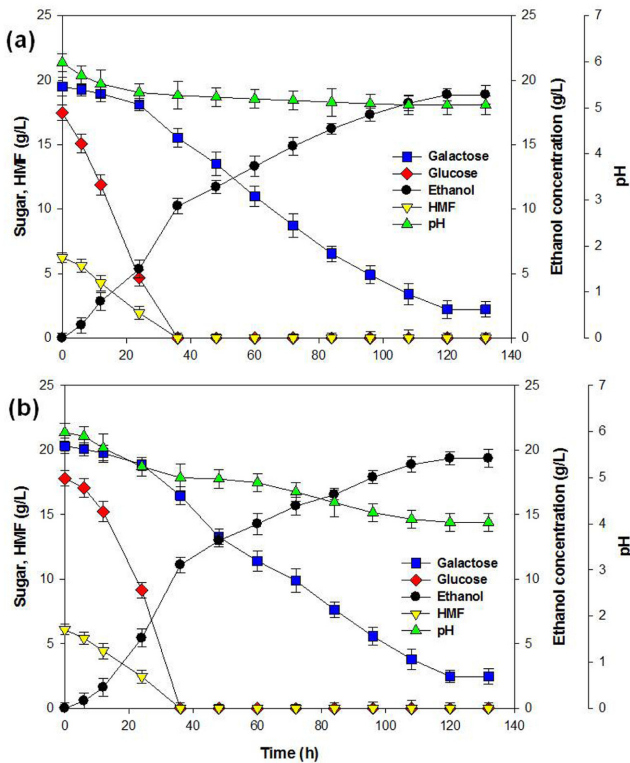


Fig. 3. Ethanol production from *G. amansii* by separate hydrolysis and fermentation (SHF) with (a) *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150, (b) *Candida tropicalis* KCTC 7212.

을 감안할 때, *C. tropicalis* KCTC 7212의 에탄올 전환수율이 매우 높음을 알 수 있었다. Fig. 4는 *K. marxianus* KCTC 7150를 이용한 에탄올 발효에서 단당 (Glucose, galactose), 저해물질 (HMF), 에탄올을 측정된 HPLC 분석결과이며, 발효 0시간에 측정된 단당과 HMF가 120시간 이후에는 모두 감소하였고, 17.8 g/L의 에탄올이 생산되었다.

4. 결론

해조류 중 홍조류인 우뚝가사리를 이용하여 산 촉매 열 가수분해, 효소당화, 에탄올 발효에 대해 연구를 진행하였다. 산 촉매 열 가수분해와 효소 당화 전처리를 이용하여 80 g dw/L의 우뚝가사리에서 총 탄수화물 60.6 g/L로부터 당화 효율 (E_s) 67%의 40.4 g/L의 단당을 생성하였다. 에탄올 발효는 *K. marxianus* KCTC 7150와 *C. tropicalis* KCTC 7212를 사용하여 각각 132시간에 에탄올 수율 $Y_{EtOH} = 0.48$ 의 17.8 g/L의 에탄올과 $Y_{EtOH} = 0.50$ 의 19.3 g/L의 에탄올을 생산하였다.

이러한 연구결과는 해양 바이오매스인 해조류로부터 바이오연료 생산과정에 있어 기초적인 정보를 제공할 것이다.

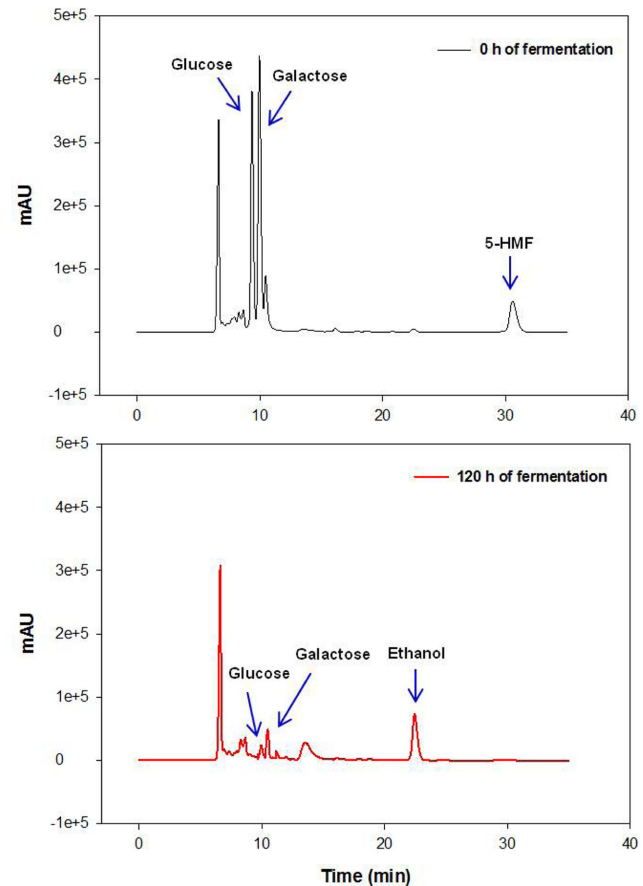


Fig. 4. HPLC profile of HMF and ethanol during bioethanol fermentation using *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150.

감사

본 연구는 부경대학교 산학협력선도대학 (LINC+)육성사업 단 캠프스톤 디자인 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Roesijadi, G., S. B. Jones, L. J. Snowden-Swan, and Y. Zhu (2010) *Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis*, PNNL 19944. Pacific Northwest National Laboratory, Washington, USA.
- Østgaard, K., M. Indergaard, S. Markussen, S. H. Knutsen, and A. Jensen (1993) Carbohydrate degradation and methane production during fermentation of *Laminaria saccharina* (Laminariales, Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.* 5: 333-342.
- 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 Journal* 26: 341-346.
- Kim, M. J. and S. K. Kim (2012) Ethanol production by separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharina japonica*. *KSBB Journal* 27: 86-90.
- Adams, J. M., J. A. Gallagher, and I. S. Donnison (2009) Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* 21: 569-574.
- Agbor, V. B., N. Cicek, R. Sparling, A. Berlin, and D. B. Levin (2011) Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Advan.* 29: 675-685.
- Boopathy, R., H. Bokang, and L. Daniels (1993) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by enteric bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 11: 147-150.
- Modig, T., G. Liden, and M. J. Taherzadeh (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* 363: 769-776.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995) In: Cunniff, P. (Ed), Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th edition. *Association of Official Analytical Chemists*, Arlington, VA.
- Sanchez-Machado, D. I., J. Lopez-Cervantes, P. Paseiro-Losada, and J. Lopez-Hernandez (2004) Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439-444.
- Cho, Y. K., H. J. Kim, and S. K. Kim (2013) Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst Eng.* 36: 713-719.
- Rouhollah, H., N. Iraj, E. Giti, and A. Sorah (2007) Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their co-cultures. *Afr. J. Biotechnol.* 6(9): 1110-1114.
- Yuan, W. J., X. Q. Zhao, X. M. Ge, and F. W. Bai (2008) Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* 105: 2076-2083.