



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

홍조류 (*Eucheuma denticulatum*)를
이용한 바이오에탄올 생산

2018년 8월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

김 상 원

공학석사 학위논문

홍조류 (*Eucheuma denticulatum*)를
이용한 바이오에탄올 생산

지도교수 김 성 구

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2018년 8월

부경대학교 대학원

생 물 공 학 과

김 상 원

김상원의 공학석사 학위논문을 인준함.



위 원 장 공학박사 정 귀 택 (인)

위 원 공학박사 김 중 균 (인)

위 원 공학박사 김 성 구 (인)

목차

List of Figures and Table	II
Abstract	V

제목: 홍조류 (*Eucheuma denticulatum*)를 이용한 바이오에탄올 생산

1. 서론	2
2. 재료 및 방법	8
2.1. 실험재료	8
2.2. 초고온 열가수분해와 효소당화	8
2.3. 효모를 이용한 에탄올 발효	11
2.4. 분석방법 및 통계처리	12
3. 결과 및 고찰	13
3.1. <i>E. denticulatum</i> 의 초고온 열가수분해	13
3.2. <i>E. denticulatum</i> 의 효소가수분해	20
3.3. 효모를 이용한 에탄올 발효	23
4. 결론	26
참고문헌	27

List of Figures and Table

Fig. 1. Comparison with bioenergy resources of materials derived from biological sources

Fig. 2. Ethanol production from various biomass. There are four steps for production of ethanol from seaweed: pretreatment, enzymatic saccharification, fermentation, and distillation.

Fig. 3. Image of the setup of hyper thermal acid hydrolysis pretreatment on instruments

Fig. 4. Effect of hyper thermal acid hydrolysis using various acids on the efficiency of pretreatments. Hyper thermal acid hydrolysis was carried out with 14% (w/v) slurry content, 360 mM various acids, at 160°C for 10 min. The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows: $E_p(\%) = \Delta S_{rs}/TC \times 100$. Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

Fig. 5. Effect of hyper thermal acid hydrolysis using various H_3PO_4 acids concentration on the efficiency of pretreatments. Hyper thermal acid hydrolysis was carried out with 14% (w/v) slurry content, various H_3PO_4 acids concentration, at 160°C for 10 min.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs}/TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

Fig. 6. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the reaction temperature treatment.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs} / TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

Fig. 7. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the thermal acid hydrolysis time.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs} / TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

Fig. 8. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the slurry content.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs} / TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

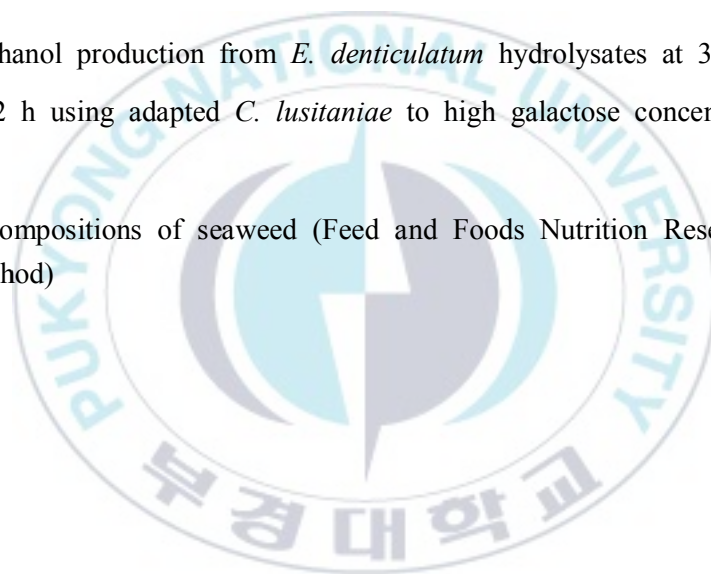
Fig. 9. Effect of single and mixed enzyme type treatments on reducing sugar release of *E. denticulatum* hydrolysate from 12% (w/v) slurry after hyper thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 45°C for 48 h. The initial reducing sugar was 38.5 g/l after hyper thermal acid hydrolysis pretreatment.

Fig. 10. Effect of enzyme dosage on reducing sugar release of *E. denticulatum* hydrolysate from 12% (w/v) slurry after hyper thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 45°C for 48 h. The initial reducing sugar was 38.5 g/l after hyper thermal acid hydrolysis pretreatment.

Fig. 11. Ethanol production from *E. denticulatum* hydrolysates at 30°C, 200 rpm, for 72 h using non-adapted (wild type) *C. lusitaniae*.

Fig. 12. Ethanol production from *E. denticulatum* hydrolysates at 30°C, 200 rpm, for 72 h using adapted *C. lusitaniae* to high galactose concentration.

Table 1. Compositions of seaweed (Feed and Foods Nutrition Research Center, AOAC method)



Bioethanol production from the red seaweed *Eucheuma
denticulatum*

Sang Won Kim

Department of Biotechnology, the Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

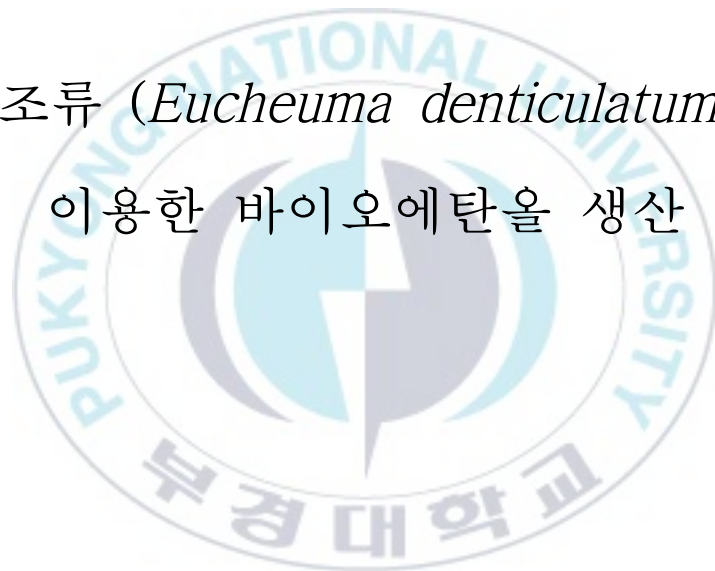
Use of marine macroalgae (seaweed) as an energy feedstock for production of biodiesel, bioethanol, biogas, and biohydrogen has been investigated. Seaweed has a faster growth rate, lower land usage, higher CO₂ absorption and uptake rate, no need for fertilizers and no competition for food or freshwater resources compared to lignocellulosic biomass. The red seaweed *Eucheuma denticulatum* has a high content of easily degradable carbohydrates, making it a potential substrate for the production of bioethanol. The carbohydrates in red seaweed comprise a neutral polymer (agarose) and a sulfate polysaccharide (agaropectin). Therefore, galactose and glucose are obtained by agarose and agaropectin hydrolysis.

Various pretreatment techniques have been introduced to enhance the overall hydrolysis yield, and can be categorized into physical, chemical, biological, enzymatic or a combination. Dilute

acid hydrolysis is commonly used to prepare seaweed hydrolysates for enzymatic saccharification and fermentation for economic reasons.

In this study, hyper thermal acid hydrolysis pretreatment of *Eucheuma denticulatum* was carried out with 12% (w/v) seaweed slurry content, 90 mM of H_3PO_4 at 150°C for 10 min. To improve the efficiency of the ethanol fermentation of mixed monosaccharides, the use of *Candida lusitanae* with adaptive evolution was evaluated for the ethanol fermentation. The levels of ethanol production by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) with non-adapted and adapted *C. lusitanae* were 10.1 g/l with ethanol yield (Y_{EtOH}) of 0.23 and 18.1 g/l with ethanol yield (Y_{EtOH}) of 0.45 at 72 h, respectively. Adaptive evolution was employed in this study to improve the efficiency of ethanol fermentation. Development of the SHF process could enhance the overall ethanol fermentation yields of seaweed, *E. denticulatum*.

홍조류 (*Eucheuma denticulatum*)를
이용한 바이오에탄올 생산



1. 서론

인구의 증가와 산업혁명을 통한 산업화에 따라 인류는 지난 100여년 동안 화석연료를 사용하였으며, 에너지 고갈과 기후변화에 따른 기상이변 및 지구온난화와 같은 환경문제에 직면해 있다. 이에 따라 전 세계적으로 기존의 석유기반의 연료 및 화학물질 산업에서, 지속 가능한 생물자원인 바이오매스 기반의 바이오 산업(Bio-refinery)으로 연구 및 기술개발을 지속적으로 높이고 있다[1,2].

Fig. 1에서 나타난 바와 같이 바이오에너지 생산을 위한 생물자원인 바이오매스는 1, 2, 3세대로 구분이 가능하며, 1세대 바이오매스는 당류, 곡물과 식물류이다. 탄수화물 함량이 높은 옥수수, 사탕수수 등은 당화와 발효를 거쳐 바이오에탄올로 전환할 수 있으며, 지방 함량이 높은 유채유, 팜유, 대두유 등은 전이에스테르화반응을 통해 바이오디젤로 전환할 수 있다. 그러나 1세대 바이오매스는 원료이자 식량인 곡물자원의 가격 상승과 윤리적인 문제, 지구온난화로 인한 기상 이변, 도시화에 의한 경작지 감소로 인해 바이오에너지 가격의 경쟁력 확보가 어렵게 되었다[3]. 2세대 바이오매스는 폐목재와 식물 줄기 등의 목질계 바이오매스로 전처리, 당화 및 발효를 거쳐 바이오에탄올을 생산하는데 주로 이용 되는데, 목질계 바이오매스를 구성하는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 중 셀룰로오스만이 당화 및 발효 공정을 통해 바이오에탄올로 전환될 수 있다. 따라서 불규칙적이고 복잡한 구조를 가지는 리그닌과 헤미셀룰로오스에 대한 전처리 기술개발은 미국 에너지부가 지난 30년간 많은 연구비를 투자해 왔지만 아직까지도 기술장벽을 넘지 못하고 있다[4]. 따라서 3세대 바이오매스인 해조류는 육상계 바이오매스의 한계를 극복할 수 있는 차세대 바이오매스로서 새롭게 조명받기 시작하였으며, 바이오연료로서의 활용에 초점을 맞추어 해조

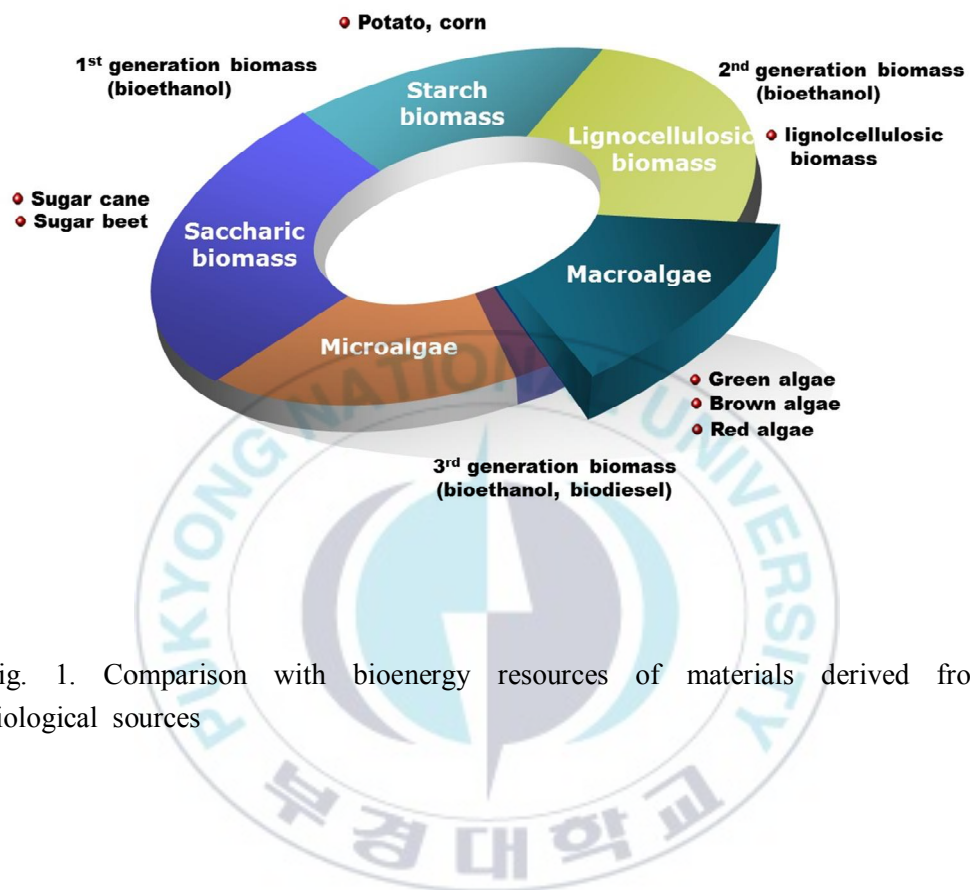


Fig. 1. Comparison with bioenergy resources of materials derived from biological sources

류의 생태, 바이오매스의 생산과정과 바이오연료 생산, 경제성 평가 등 다
방면으로 새로운 재생 가능한 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다
[5]. 해조류를 이용한 바이오에너지의 생산은 삼면이 바다인 우리나라에 적
합하며, 해조류가 성장하는 동안 이산화탄소를 소모하는 닫힌 탄소순환
(closed carbon circulation)으로 이산화탄소 방출량 감소 등 생태계의 안정
화에 기여한다.

해조류는 바다에 사는 조류를 통틀어 말하며, 부유생활을 하는 미세조류
(식물플랑크톤)와 고착생활을 하는 대형 조류로 구분된다. 대형조류에는 녹
조류, 갈조류, 홍조류로 구성되어 있으며, Table 1에서 나타난 바와 같이
탄수화물을 구성하는 당 및 함량은 종류에 따라 다양하지만 20-60%의 탄
수화물을 함유하고 있다[6]. 녹조류는 파래와 청각 등이 대표 종으로서
48-55%의 총 탄수화물 함량을 가지며, cellulose, pectin, mannan 및 xylan
등의 다당류를 포함하고 있다. 홍조류는 김과 우뚝가사리가 대표종으로서
53- 70%의 총 탄수화물 함량과 agarose, carrageenan 및 porphyran 등의
다당류가 포함되어 있다. 갈조류는 미역, 다시마, 톳, 모자반 등이 대표종
으로서 45-60%의 총 탄수화물 함량과 alginate, fucoidan, laminaran 및
mannitol 등의 다당류 및 단당류를 포함하고 있다(Table 1). 따라서 제1세
대 바이오매스인 식량자원[7]과 제2세대 바이오매스인 리그노셀룰로스[8]
등을 대체할 수 있는 해조류 바이오매스는 가장 적합한 제3세대 바이오매
스로 알려져 있다.

제 3세대 바이오매스 중 홍조류인 *Eucheuma denticulatum* 은 필리핀, 중
국, 인도네시아, 말레이시아, 그리고 탄자니아 등에서 상업적으로 생산하고
있으며, cellulose와 galactans (agar와 carrageenan)으로 구성되어 있다 [9].
Galactans는 대부분 galactose와 3,6-anhydrogalactose로 구성되어 있는데
그 비율은 56%와 44%로 알려져 있으며[10], 본 학위논문 연구에서는

Table 1. Compositions of seaweed (Feed and Foods Nutrition Research Center, AOAC method)

Species	Seaweed	Composition (%)				
		Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Carbohydrate	Main carbohydrate
Red seaweed	<i>Eucheuma denticulatum</i>	4.5	4.6	21.5	69.4	Cellulose, Xylan, Mannan, Agar, Carrageenan
	<i>Hypnea charoides</i>	18.4	1.5	22.8	57.3	
	<i>Carpopeltis cornea</i>	23.4	0.4	15.6	60.7	
Brown seaweed	<i>Saccharina Japonica</i>	10.6	1.6	21.8	66.0	Cellulose, Alginate, Fucoidan, Laminaran, Mannitol
	<i>Undaria pinnatifida</i>	23.8	3.5	29.5	43.2	
	<i>Hijikia fusiforme</i>	9.8	1.2	41.5	47.5	
Green seaweed	<i>Enteromorpha Intestinalis</i>	31.6	1.8	29.2	37.4	Cellulose, Mannose, Xylan, Starch
	<i>Caulerpa lentillifera</i>	21.7	1.2	41.6	35.5	
	<i>Capsosiphon Fulvescens</i>	30.4	0.6	32.9	36.1	

Eucheuma denticulatum 을 바이오매스로 선택하여 바이오에탄올 발효를 수행하였다.

Fig. 2에서 나타낸 바와 같이 해조류를 이용한 바이오에탄올 생산 방법은 초고온 열가수분해, 효소 당화, 효모를 이용한 에탄올 발효, 증류 등으로 구분할 수 있다. 또한 바이오 에탄올 생산 공정에 따라 효소당화와 에탄올 발효가 통합된 동시 당화 발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)와 효소당화와 에탄올 발효가 분리된 분리 당화 발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)로 구분할 수 있다. 본 학위논문 연구에서는 황산, 인산, 염산, 질산으로 초고온 열가수분해를 수행한 뒤, 상업적 효소를 이용하여 효소 당화를 실시하였다. 전처리와 효소당화가 끝난 후에 효과적인 에탄올 생산을 위해 *Candida lusitanae*를 이용하여 에탄올 발효 및 생산 효율을 비교하였다.

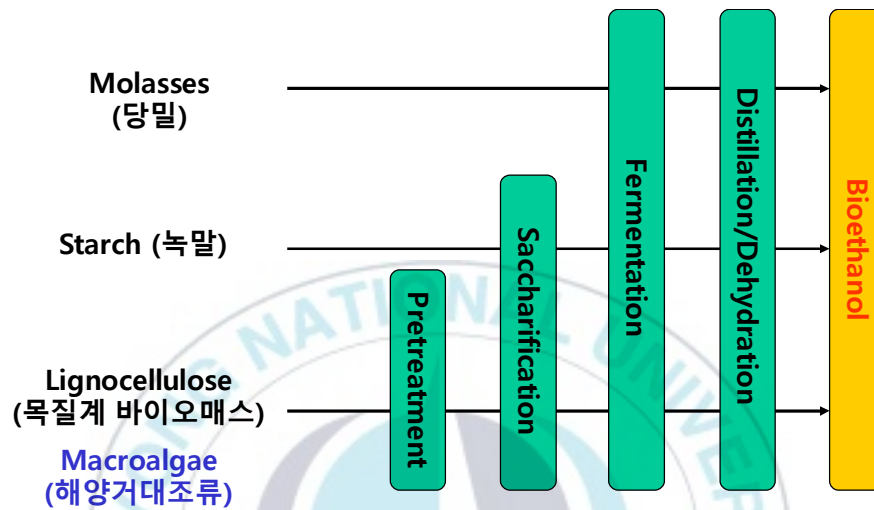


Fig. 2. Ethanol production from various biomass. There are four steps for production of ethanol from seaweed: pretreatment, enzymatic saccharification, fermentation, and distillation.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 실험에서는 에탄올 발효를 위한 기질로 인도네시아산 *E. denticulatum*를 사용하였으며, 바이올시스템즈 회사 (고흥군, 전남)에서 공급받아 자연 건조 후 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 355 μm 이하의 분말을 사용하였다. *E. denticulatum*의 구성성분 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하였으며, AOAC 방법에 의해 분석을 실시하였다[11].

2.2. *E. denticulatum*의 초고온 열가수분해와 효소당화

본 연구는 황산, 인산, 염산, 질산에 따른 전처리 효율을 비교하여 전처리에 적합한 산과 농도를 적용하기 위해 단계적으로 전처리 조건을 최적화하였다. 14% (w/v)의 *E. denticulatum* 슬러리에 360 mM의 황산, 인산, 염산, 질산을 각각 첨가하여 160°C 에서 10분간 열처리를 하였다. 초고온 열가수분해 전처리에 적합한 산과 농도의 조건을 바탕으로 8~20% (w/v) 슬러리, 120 ~ 180°C의 온도, 5~20분간 열처리 시간에 대해 전처리 조건들을 확립하였다. 전처리 방법은 50 mL stainless steel batch reactor안에 샘플 40 mL의 양으로 전처리를 수행하였으며 (Fig.3), 오일 수조에 열을 가한 후 PID 온도 조절기 (TC200P, Misung Scientific, Seoul, Korea)를 이용하여 전처리 온도를 120~200°C로 조절하였다. 50 mL stainless steel batch reactor 안에서 전처리 후 즉시 차가운 흐르는 물에 식혀서 샘플을 분석하였다.



Fig. 3. Image of the setup of hyper thermal acid hydrolysis pretreatment on instruments

효소당화를 위해 전처리 후 5N NaOH를 이용하여 pH 5.0로 중화하였다. 최적 효소당화를 위한 효소의 선정은 Viscozyme L(β -glucanase, 121 U/mL; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), Celluclast 1.5L (endo-glucanase 854 U/mL; Novozymes), Spirizyme fuel (Gluco-amylase, 862 U/mL; Novozymes), Cellic CTec 2 (cellulase, 150 U/mL; Novozymes)를 희석하여 단일 효소 혹은 1대 1 비율로 혼합 효소를 첨가하여 45℃ 에서 48 시간 동안 반응시켰다. 또한 선정된 효소의 활성 농도에 따른 환원당 생성량을 분석하여 선정된 효소의 최적 활성 농도를 확인하였다. 초고온 열가수분해 전처리 효율 (E_p ,%)과 효소 당화의 전처리 효율 (E_s ,%)은 다음 식 (1)과 (2)로 나타낼 수 있다.

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

여기서 ΔS_{rs} 는 초고온 열가수분해시 생성되는 환원당(reducing sugar)의 농도 (g/l)이며, TC는 *E. denticulatum* 의 총 탄수화물 함량 (g/l)이다.

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

여기서 ΔS_{rs} 는 효소당화에서 생성되는 환원당의 농도 (g/l)이며, C는 *E. denticulatum* 의 cellulose 함량 (g/l)이다.

2.3. 효모를 이용한 바이오 에탄올 발효

바이오에탄올 발효에 사용된 *C. lusitaniae*의 종배양 배지는 100ml 플라스크 안에 50 ml working volume 으로 YPG broth (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, galactose 20.0 g/l)를 사용하였다. 고농도 당 순치 효모는 종배양 배지 YPG broth에서 5ml의 균을 취하여 250 ml 플라스크 안에 100 ml working volume의 YPHG (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, high galactose 120.0 g/l)에 접종하여 36 시간 동안 배양하였다. YPHG broth에서 원심분리기를 이용하여 배지를 제거하고, 순치된 효모를 최종 균 농도가 0.35 g dcw/l로 접종한 후 30℃, 200 rpm으로 3 일 동안 배양을 하면서 일정 시간마다 시료를 분석하였다. 여러 단당이 혼합되어 있는 *E. denticulatum* 가수분해산물에서 고농도 당 순치를 한 효모는 당 흡수율과 에탄올 생산이 증가한다고 보고되고 있으며[12], 효과적인 바이오 에탄올 생산비교를 위해 고농도 당에 순치하지 않은 대조군과 순치를 한 *C. lusitaniae* 를 사용하였다.

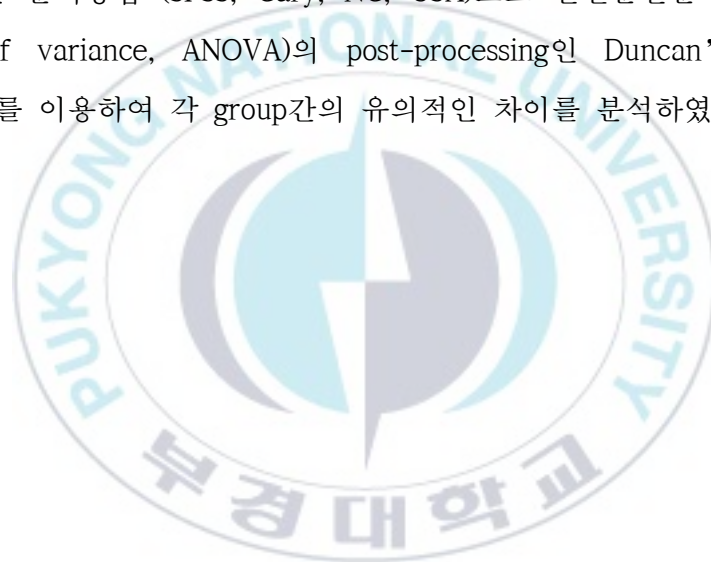
다양한 단당 및 에탄올 함량 분석을 위해 시료를 14,240 x g 에서 10분 동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent. Inc., USA) 를 이용하여 분석하였다. 에탄올 수율 (Y_{EtOH} , g/g)은 식 (3)로 나타낼 수 있다.

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

여기서 $[EtOH]_{max}$ 는 에탄올 발효로 인해 생성되는 최종 에탄올의 농도 (g/l)이며, $[Sugar]_{ini}$ 는 에탄올 발효 초기 단당 환원당의 농도 (g/l)이다. 최대 이론적 에탄올 수율은 0.51이다.

2.4. 분석방법

E. denticulatum 가수분해산물 내 환원당은 DNS측정 방법으로 575 nm에서 흡광도를 측정하였다 [13]. 저해물질 (5-hydroxymethylfurfural, HMF)과 에탄올의 농도 측정은 HPLC와 RID 분석기를 이용하였다. 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column (300.0 × 7.8 mm)를 사용하여 온도 65℃, 이동상 5 mM 황산, 유속 0.6 ml/min로 하여 각 시료를 35분간 분석하였다 [12]. 통계학적인 분석방법 (SPSS, Cary, NC, USA)으로 일원분산분석 (one way analysis of variance, ANOVA)의 post-processing인 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 group간의 유의적인 차이를 분석하였다 ($p < 0.05$).



3. 결과 및 고찰

3.1. *E. denticulatum* 의 초고온 열가수분해

거대 홍조류인 *E. denticulatum*의 구성성분을 AOAC방법으로 분석한 결과 64.7% 탄수화물, 4.7% 섬유, 4.5% 단백질, 4.6% 지방, 21.5% ash 등으로 구성되어 있었다. 이 결과를 통해 홍조류 *E. denticulatum* 에서 사용할 수 있는 총 탄수화물 함량은 섬유를 포함한 69.4%이며, 이는 바이오에탄올 생산에 적합한 바이오매스라고 판단되어 실험에 사용하였다.

해조류의 발효 가능한 당당을 최대 생산하기 위해 초고온 열가수분해와 효소당화의 최적 조건을 확립하였다. 일반적으로 초고온 열가수분해 전 처리에서 희석한 산의 사용은 바이오매스의 구조를 가수분해에 의해 용이하게 당당류로 전환시키고 신속하게 가수분해를 시킬 수 있다[14]. Fig. 4에서 나타난 바와 같이 12% (w/v)의 *E. denticulatum* 슬러리, 150°C, 10 분 동안 360 mM의 황산, 인산, 염산, 질산에 따른 초고온 열가수분해를 수행하였다. Fig. 4는 홍조류인 *E. denticulatum*에 황산, 인산, 염산, 질산으로 초고온 열가수분해를 하고 환원당 농도와 효율을 나타낸 그래프이다. 초고온 열가수분해 전 처리의 효율은 황산, 인산, 염산, 질산에서 각각 39.6%, 46.7%, 42.3%, 43.0%의 효율을 나타내었다. 따라서 최적 산 종류를 인산으로 설정하였다. Fig. 5는 12% (w/v)의 *E. denticulatum* 슬러리, 150°C, 10 분 동안 인산 농도를 달리하여 초고온 열가수분해를 실시한 결과이며, 인산 농도가 90 mM에서 180 mM로 증가할수록 전 처리와 당화 효율은 47.4%에서 46.6%로 큰 차이는 없었다. 따라서 최적 산 농도는 90 mM로 설정하였다.

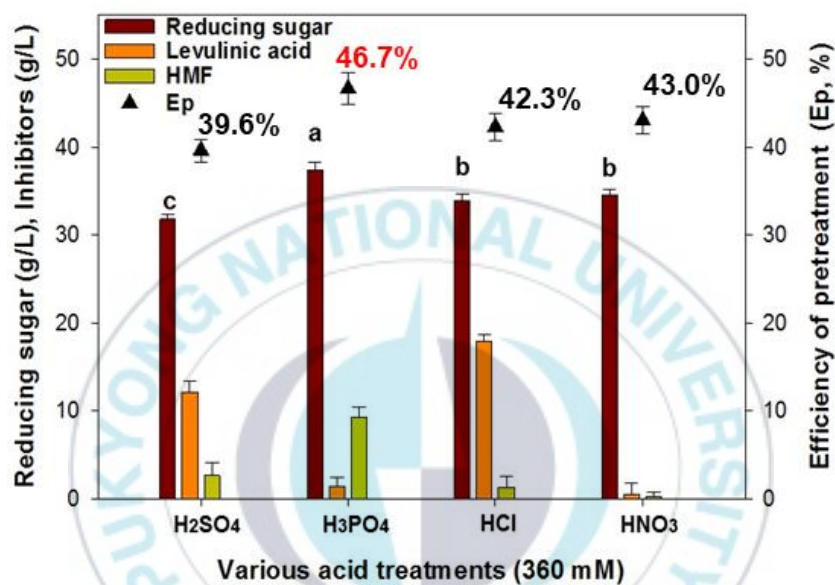


Fig. 4. Effect of hyper thermal acid hydrolysis using various acids on the efficiency of pretreatments. Hyper thermal acid hydrolysis was carried out with 14% (w/v) slurry content, 360 mM various acids, at 160°C for 10 min. The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows: $E_p(\%) = \Delta S_{rs}/TC \times 100$. Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

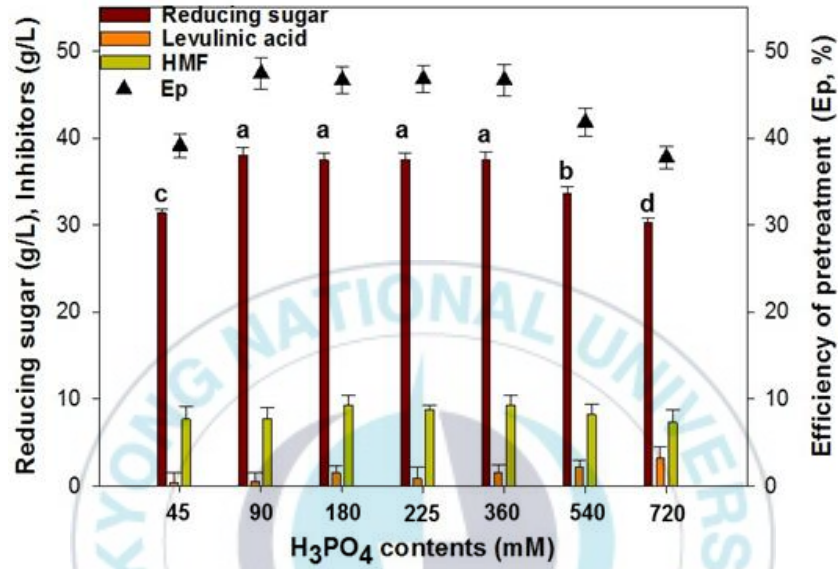


Fig. 5. Effect of hyper thermal acid hydrolysis using various H₃PO₄ acids concentration on the efficiency of pretreatments. Hyper thermal acid hydrolysis was carried out with 14% (w/v) slurry content, various H₃PO₄ acids concentration, at 160°C for 10 min.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \frac{\Delta S_{rs}}{TC} \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

최적 산 농도 90 mM의 인산을 이용하여 120 ~ 180℃의 온도 (Fig. 6), 5~20 분의 열처리 시간 (Fig. 7), 8%~20% (w/v)의 *E. denticulatum* 슬러리 (Fig. 8)에 따른 초고온 열가수분해를 수행하였다. Fig. 6은 다양한 온도에 따른 초고온 열가수분해의 결과이며, 온도가 120 ~ 150℃ 까지 증가할수록 가수분해되는 환원당과 HMF의 농도가 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 열처리 온도가 150 ~ 180℃로 증가하였을 때 전처리 효율은 47.4%에서 41.2%로 감소하였다. 이는 Qi et al.[15]에서 보고된 바와 같이 높은 온도에서는 당 생성 효율이 감소하며 저해물질의 농도가 증가한다는 내용과 일치하였다. 따라서 생성된 당과 저해물질의 농도를 고려하여 150℃를 최적 열처리 온도로 선택하였다. Fig. 7은 90 mM의 인산 농도, 150℃의 열처리 온도, 12%의 슬러리 농도에서 열처리 시간을 달리하여 초고온 열가수분해를 실시한 결과이며, 열처리 시간이 10분에서 20분으로 증가할수록 levulinic acid 농도만 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 전처리 효율은 47.4%에서 44.1%로 큰 차이가 없었다. 따라서 최적 열처리 시간은 10분으로 설정하였다. Fig. 8은 다양한 슬러리 농도에 따른 초고온 열가수분해결과이며, 슬러리 농도가 증가할수록 가수분해되는 환원당과 HMF의 농도도 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 슬러리 농도가 12%에서 20%로 증가할 때 전처리 효율은 47.4%에서 45.4%로 큰 차이가 없었다. 따라서 최적 슬러리 농도는 12%로 설정하였다.

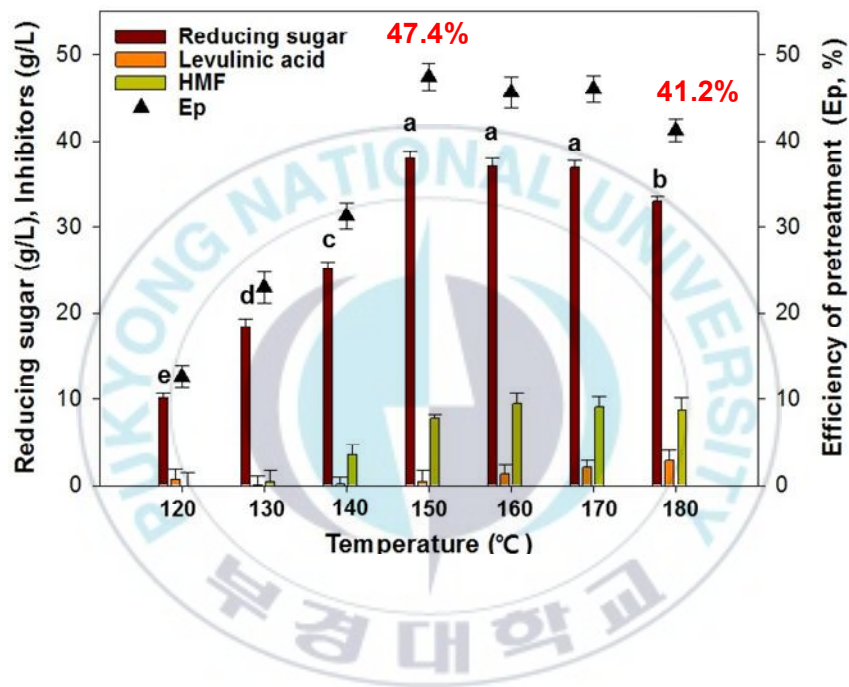


Fig. 6. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the reaction temperature treatment.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs} / TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

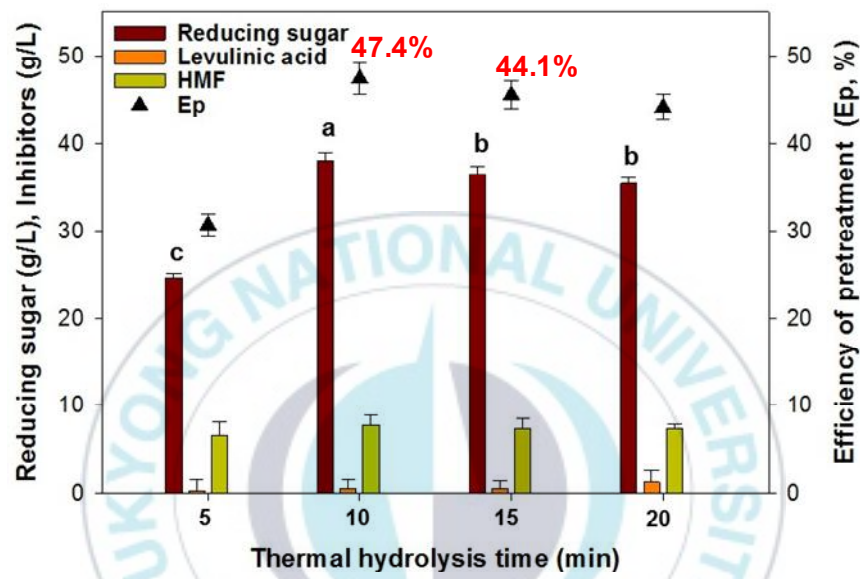


Fig. 7. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the thermal acid hydrolysis time.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \Delta S_{rs} / TC \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$, Duncan's test).

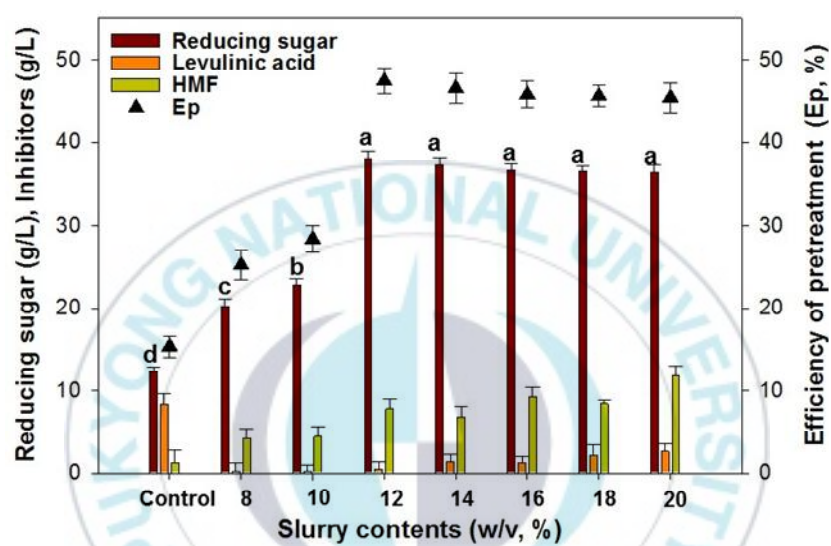


Fig. 8. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis conditions by changing the slurry content.

The efficiency of pretreatment E_p (%) is defined as follows:

$$E_p(\%) = \frac{\Delta S_{rs}}{TC} \times 100.$$

Different letters indicate significant differences of reducing sugar ($P < 0.05$,

Duncan's test).

3.2. *E. denticulatum* 의 효소가수분해

홍조류 *E. denticulatum*로부터 초고온 열가수분해를 이용하여 최적 전처리를 실시한 후 pH를 5.0으로 5N NaOH를 이용하여 중화한 뒤 효소당화를 진행하였다. 단일 효소와 혼합 효소를 이용하여 최적 효소 종류 (Fig. 9)와 효소 유효농도 (Fig. 10)에 대해 실험을 진행하였다. Fig. 9에서 단일 효소와 혼합 효소를 사용한 결과 단일 효소보다는 ViscozymeL 과 Cellic CTec 2의 혼합효소에서 6.0 g/l로 가장 높은 환원당을 생성하였다. 이는 Ahn et al. [16]이 보고한 바와 같이 단일효소보다는 혼합 효소를 이용한 가수분해가 당화효율을 높이는 시너지 효과가 있음을 확인하였다. 또한 효소의 반응시간은 12~24 시간 안에 대부분의 효소 반응이 완료되는 것을 알 수 있었다. Fig. 10에서 대조구에서 나타난 38.5 g/l의 환원당은 초고온 열가수분해를 실시하였을 때 생성된 당의 농도이다. 이후 ViscozymeL 과 Cellic CTec 2의 혼합 효소 활성 농도를 확인한 결과, 효소활성 농도가 16 U/ml 이상 증가할수록 당화되는 환원당의 양은 큰 차이가 없었다. 16 U/ml 이상부터 혼합 효소의 당화효율은 100%에 해당되는 6.0 g/l 이상을 나타내었다. 따라서 효소당화 조건을 ViscozymeL 과 Cellic CTec 2의 혼합 효소를 16 U/ml로 12 시간 동안 당화하는 조건을 선택하였다. 12% (w/v) *E. denticulatum*로부터 획득 가능한 환원당은 총 44.5 g/l이며, 전처리와 효소당화 실험을 통해 생성된 단당 44.5 g/l 을 총 탄수화물 양 69.4%에 기준했을 때 53.4%의 당화 전환율을 나타내었다.

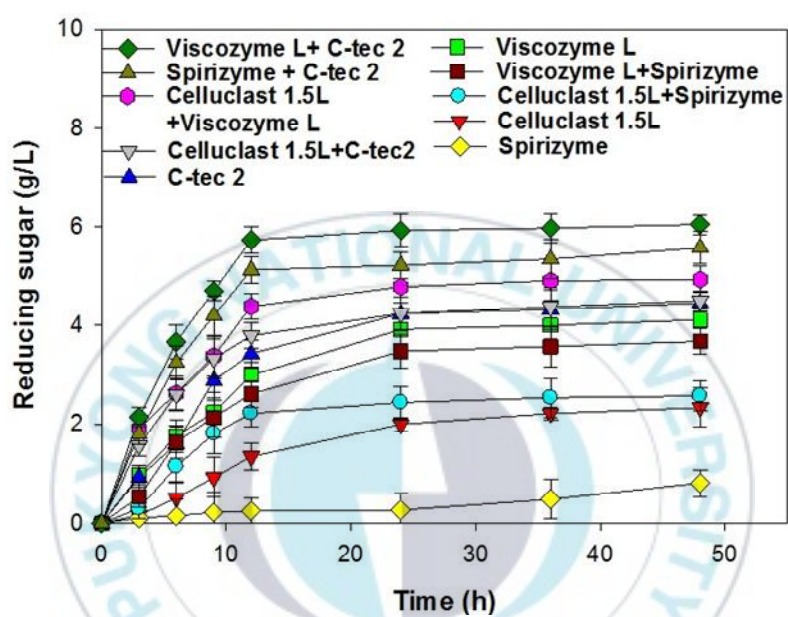


Fig. 9. Effect of single and mixed enzyme type treatments on reducing sugar release of *E. denticulatum* hydrolysate from 12% (w/v) slurry after hyper thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 45°C for 48 h. The initial reducing sugar was 38.5 g/l after hyper thermal acid hydrolysis pretreatment.

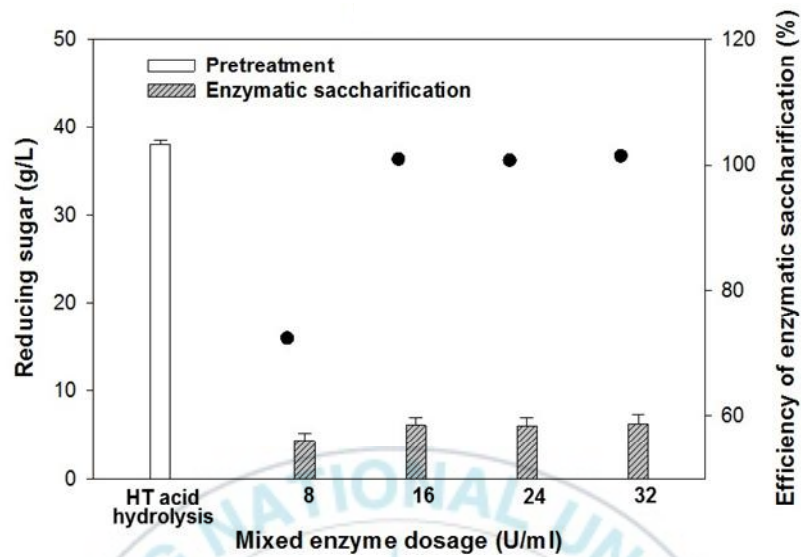


Fig. 10. Effect of enzyme dosage on reducing sugar release of *E. denticulatum* hydrolysate from 12% (w/v) slurry after hyper thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 45°C for 48 h. The initial reducing sugar was 38.5 g/l after hyper thermal acid hydrolysis pretreatment.

3.3. 효모를 이용한 에탄올 발효

에탄올 발효는 12% (w/v) *E. denticulatum* 가수분해산물과 *C. lusitaniae* 균주를 이용하여 250 ml 플라스크 안에 100 ml working volume으로 분리당화 발효를 실시하였다. Fig. 11은 비순치 *C. lusitaniae* 를 30℃, 200 rpm으로 72 시간 동안 발효한 결과이며, 36시간에 저해물질인 HMF은 모두 감소하였다. 또한 48 시간부터 균 성장에 따라 흡수되던 환원당이 점점 감소되는 것을 알 수 있었다. 분리당화발효로 72 시간에 10.1 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 에탄올 수율은 0.23로 낮은 수율을 나타내었다.

Fig. 12는 고농도 galactose에 순치를 한 *C. lusitaniae* 를 30℃, 200 rpm으로 72 시간 동안 발효한 결과이며, 72 시간에 4.4 g/l의 환원당을 남겨놓고 모두 소비되었으며, 저해물질인 HMF도 모두 감소하였다. 분리당화발효로 72 시간에 18.1 g/l의 에탄올이 생산되었으며, 에탄올 수율은 0.45로 나타났다.

Lee 와 Lee [17]는 갈조류로부터 *S. cerevisiae*를 이용하여 2.7 g/l의 바이오에탄올을 생산하였으며, Tan과Lee [18]는 macroalgae cellulosic residue (MCR)로부터 동시당화발효를 통해 14.1 g/l의 바이오에탄올을 생산한 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구에서 해조류를 이용한 분리당화발효는 바이오에탄올 생산에 있어서 기존에 알려진 바이오에탄올 생산 수율보다 높게 나타난 것으로 판단된다.

**Non-adapted (wild type) yeast
(10.1 g/L EtOH, $Y_{\text{EtOH}} = 0.23$)**

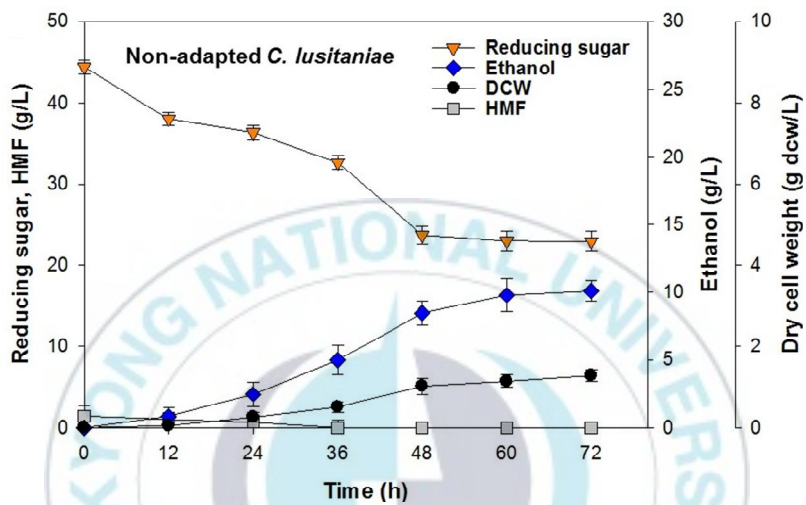


Fig. 11. Ethanol production from *E. denticulatum* hydrolysates at 30°C, 200 rpm, for 72 h using non-adapted (wild type) *C. lusitanae*

**Adapted yeast to galactose
(18.1 g/L EtOH, $Y_{\text{EtOH}} = 0.45$)**

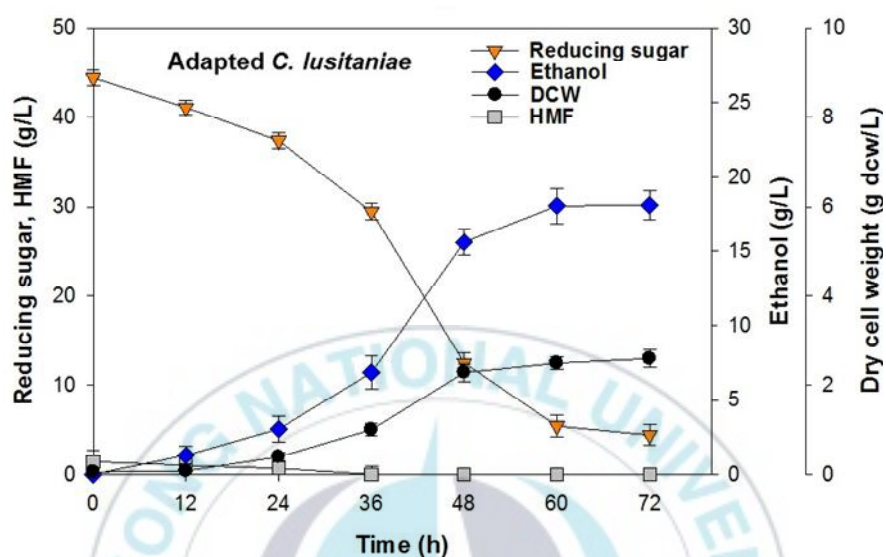


Fig. 12. Ethanol production from *E. denticulatum* hydrolysates at 30°C, 200 rpm, for 72 h using adapted *C. lusitanae* to high galactose concentration.

4. 결론

해조류 중 홍조류인 *E. denticulatum*로부터 분리당화발효를 위한 초고온 열가수분해, 효소당화 및 에탄올 발효 수율 향상을 검토하고, 기존의 혼합당의 흡수 효율을 높이기 위해 고농도 당 순치를 수행하였다. 초고온 열가수분해는 90 mM의 인산을 이용하여 12% (w/v)의 *E. denticulatum* 슬러리, 10 분 동안 150° C의 온도에서 열가수분해를 수행하였다. 또한 비순치 효모와 고농도 갈락토오스에 순치한 효모를 이용한 분리당화발효를 실시한 결과 발효 72 시간에 10.1 g/l의 에탄올 수율 0.23 과 18.1 g/l의 에탄올 수율 0.45을 나타내었다. 이러한 연구결과는 해양 바이오매스인 해조류로부터 바이오연료의 효율적인 생산방법을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Lee, S. M., Choi, I. S., Kim, S. K. and Lee, J. H. 2009. Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *KSBB Journal*. **24**, 483-488.
2. Park, J. I., Woo, H. C. and Lee, J. H. 2008. Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives. *Korean Chem. Eng. Res.* **46**, 833-844.
3. Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin, A. and Levin, D. B. 2011. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Advan.* **29**, 675-685.
4. Sung, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour. Technol.* **83**, 1-11.
5. Luning, K. and Pang, S. J. 2003. Mass cultivation of seaweeds: Current aspects and Approaches. *J. Appl. Phycol.* **15**, 115-119.
6. Chandini, S. K., Ganesan, p., Suresh, P. V. and Bhaskar, N. 2008. Seaweeds as source of nutritionally beneficial compounds-A review. *J. Food Sci. Technol.* **45**, 1-13.
7. Dias MOS, Esinas AV, Nebra SA, Filho RM, Rossel CEV, Maciel MRW. 2009. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. *Chem. Eng. Res.* **87**:1206-1216.

8. Chiaramonti D, Prussi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, Cherchi F. 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production. *Biomass. Bioenergy* **46**:25-35.
9. Tong HK, Lee KH, Wong HA. 2007. Study of the water extractable components of the red seaweed *Eucheuma spinosum*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **14**:265-275.
10. Lin L, Tako M, Hongo F. 2000. Isolation and characterization of I-carrageenan from *Eucheuma serra* (Togekirinsai). *J. Appl. Glycosci.* **47**: 303-310.
11. Sanchez-Machado DI, Lopez-Cervantes J, Paseiro-Losada P, Lopez-Hernandez J. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* **85**:439-444.
12. Cho HY, Ra CH, Kim SK. 2014. Ethanol production from the seaweed, *Gelidium amansii* using specific sugar acclimated yeasts. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 264-269.
13. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**:426-428.
14. Nguyen TH, Ra CH, Park MR, Jeong GT, Kim SK. 2016. Bioethanol production from seaweed *Undaria pinnatipida* using various yeasts by Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF). *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**:529-534.

15. Qi L, Mui YF, Lo SW, Lui MY, Akien GR, Horváth IT. 2014. Catalytic conversion of fructose, glucose, and sucrose to 5-(hydroxymethyl)furfural and levulinic and formic acids in γ -valerolactone as a green solvent. *ACS Catal.* **4**:1470–1477.
16. Ahn DJ, Kim SK, Yun HS. 2012. Optimization of pretreatment and saccharification for the production of bioethanol from water hyacinth by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**:35-41.
17. Lee SM, Lee JH. 2012. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**: 16-18.
18. Tan IS, Lee KT. 2015. Solid acid catalysts pretreatment and enzymatic hydrolysis of macroalgae cellulosic residue for the production of bioethanol. *Carbohydr. Polym.* **124**: 311-321.