

모자반 가수분해물을 이용한 바이오 에탄올 생산

연지현 · 서현범 · 오성호¹ · 최원석² · 강도형³ · 이현용¹ · 정경환*

충주대학교 바이오산업학과, ¹강원대학교 생물소재공학전공, ²충주대학교 식품공학과, ³한국해양연구원

Bioethanol Production from Hydrolysate of Seaweed *Sargassum sagamianum*

Ji-Hyeon Yeon, Hyeon-Beom Seo, Sung-Ho Oh¹, Won-Seok Choi²,
Do Hyung Kang³, Hyeon-Yong Lee¹, and Kyung-Hwan Jung*

Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

¹Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Food Science and Technology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea

³Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan, Gyeonggi-do 426-744, Korea

Abstract We investigated the feasibility of bioethanol production from hydrolysate of brown seaweed *Sargassum sagamianum*. Prior to bioethanol production using yeasts, six yeast strains were compared and the best ones in terms of the ethanol production levels were selected. *Pichia stipitis* ATCC 7126, *Pichia stipitis* ATCC 58784, and *Pichia stipitis* ATCC 58376 were superior to others in terms of ethanol production. These yeast strains were used for producing bioethanol by the shaking bottle culture and the fermentor culture. Out of approximately 30 g/L reducing sugar, about 3~6 g/L and 4~7 g/L bioethanol were produced in the bottle culture and the fermentor one, respectively. Furthermore, it was observed that around 12~28 g-bioethanol was produced from 1 kilogram of *Sargassum sagamianum*. Compared with those previously published, these data were almost three to eight times higher in value.

Keywords: *Sargassum sagamianum*, brown seaweed, bioethanol production, *Pichia stipitis*, surface aeration

서 론

모자반 (*Sargassum sagamianum*)은 우리나라의 동남해안과 일본 해안에 분포하는 갈조류 (brown seaweed)의 한 종류로서 우리나라에서는 모자반속의 많은 종류가 식용으로 이용되기도 하며 alginate의 원료와 비료로 사용되어져 왔다. 또한 연안 어류가 먹이를 얻거나 산란하기 적합한 환경을 제공하여 어족자원 확보에 매우 중요한 구실을 하기도 한다 [1].

Brown seaweed의 추출물 중의 주된 carbohydrate 성분으로 alginate가 알려져 왔으며 [2,3], 이것을 이용한 bioethanol 생산이 renewable energy 생산의 한 방편으로 관심을 끌고

있다 [4]. Brown seaweed에서의 alginate 함량은 30~50% [2] 혹은 19.2% [3]로 보고되고 있으며, *Sargassum* sp.의 또 다른 carbohydrate 성분으로 sulfated heteropolysaccharide도 알려져 있다 [5-11]. 이 sulfated heteropolysaccharide의 구성성분으로 fucose, xylose, galactose, glucose, uronate, glucuronic acid, arabinose, mannose, rhamnose 등의 단당류가 보고되고 있다. 이때 fucose는 약 20% 정도의 함량을 보이며 나머지 단당류들은 brown seaweed의 종류에 따라 많은 조성의 편차를 보이고 있다.

Seaweed를 이용한 bioethanol 생산에 관한 연구는 국내 외적으로 아직까지 활발한 연구가 이루어지지 못하고 있으며 몇 편의 제한된 연구 결과만이 보고되고 있다 [12-14]. 이러한 연구 결과에서도 seaweed의 가수분해물로부터 bioethanol이 생산되는지에 대한 검증과 적절한 균주를 screening하는데 그치고 있고, 효모가 bioethanol 생산에 사용하는 다양하고 복잡한 단당류의 구성성분이 어떠한 경로

*Corresponding author

Tel: +82-43-820-5246, Fax: +82-43-820-5272

e-mail: khjung@cjnu.ac.kr

로 bioethanol로 전환되는지에 대한 구체적인 연구결과는 없다.

본 연구에서는 특징적으로 모자반의 전처리 가수분해물을 고압액화 추출기를 이용하여 만든 후, 이 가수분해물을 이용하여 bioethanol을 생산하는 연구를 수행하였다. 이에 앞서서 6탄당과 5탄당을 이용하는 효모 중에서 가장 적절한 효모를 선별하는 연구를 bottle culture를 통하여 수행하였고, 5탄당의 bioethanol로의 전환 수율을 증가시키기 위하여 발효조에서 bioethanol을 생산하는 실험을 실시할 경우에는 surface aeration을 통하여 미량의 공기를 주입하였다. 본 연구는 모자반의 가수분해물로부터 bioethanol을 생산하는 기반연구 결과를 얻는데 목적이 있다고 할 수 있으며, 그 결과를 이미 보고된 연구결과와 비교 분석하였다.

실험방법

효모균주

본 연구에서는 6가지 종류의 효모를 사용하여 bioethanol 생산 연구를 수행하였다 (Table 1).

Table 1. Yeast strains used in this study

Yeasts	Abbreviations
<i>Pachysolen tannophilus</i> ATCC 32691	32691
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20336	20336
<i>Candida shehatae</i> ATCC 58779	58779
<i>Pichia stipitis</i> ATCC 58376	58376
<i>Pichia stipitis</i> ATCC 58784	58784
<i>Pichia stipitis</i> CBS 7126	7126

Bottle culture를 이용한 효모선별

Bottle culture를 위한 seed culture는 250 mL 삼각플라스크에 50 mL YPD 배지 (yeast extract, 10 g/L; peptone, 20 g/L; glucose; 20 g/L)를 만들어 shaking incubator에서 30°C, 150 rpm의 조건으로 배양하였고, 효모선별을 위한 배양은 250 mL media bottle (Schott Duran)에 50 mL 배지를 만들어서 30°C, 150 rpm에서 배양을 진행하였으며, 배양 초기에는 Silistopper (Silicone plug)로 마개를 대신하였다. 사용한 배지조성은 glucose 5 g/L, xylose 20 g/L, yeast extract 10 g/L 였으며, 배양 부피의 2% (v/v)에 해당하는 seed culture를 접종하여 배양을 시작하였다. 배지중의 glucose가 모두 소모될 시점에 80 rpm으로 shaking incubator의 회전수를 줄이고, media bottle을 screw cap으로 완전히 닫아서 공기의 공급을 제한하면서 배양을 계속 진행하였다.

고압액화 추출기를 이용한 모자반 가수분해

고압액화 추출기 (Ilshin, Korea)를 이용하여 1 L의 반응기에 한국해양연구원에서 제공한 10 g의 모자반과 증류수

75 mL의 혼합하였다. 이때 이미 보고된 연구 방법을 사용하여 처리하였으며, 모자반 가수분해반응 시 190°C, 15분에서 최대 가수분해 수율을 나타내었다 [15].

모자반 가수분해물을 이용한 bioethanol 생산

모자반 가수분해물을 약 3배 정도 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 농축한 후 bioethanol 생산을 위한 원료로 사용하였다. Bottle culture나 fermenter culture 시 3배 농축된 모자반 가수분해물에 yeast extract 10 g/L와 peptone 20 g/L를 녹여서 제조하였다. Bottle culture는 위에서 설명한 방법과 동일하게 수행하였고, fermenter culture는 2.5 L 발효조 (Kobitech, Republic of Korea)를 이용하여 수행하였다. 이때 배양 부피는 800 mL이었으며 배양온도는 30°C로 조절하였고 pH는 5.0으로 암모니아수와 10% 인산 용액으로 조절하였다. Agitation speed는 200 rpm으로 조절하였고 미량의 공기를 주입하기 위하여 배양조 상판위에 관을 삽입하여 배양액 표면으로 공기를 주입하는 surface aeration 방법을 택하였다. 이때 공기주입속도는 100 mL/min 였다.

분석방법

Cell growth는 spectrophotometer (Spectronic, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였고, 배지내의 잔여 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 측정하였다 [16]. 배양액 중의 에탄올 함량은 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였고, 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L=6 ft, ID=1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, FID (flame ionization detector)를 이용하여 검출하였다. Injector와 FID 온도는 250°C, 오븐온도는 150°C로 조절하였고, carrier gas로는 헬륨을 사용하여 40 mL/min으로 흘려주었다. 정량분석을 위하여 내부표준물질로 *n*-butanol을 사용하여 분석하였다 [17,18]. 그리고 배지 중의 glucose와 xylose는 thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였다. 이때 Partisil® K5F (20 × 10 cm, Whatman)를 TLC plate로 사용하였고, mobile phase로는 acetonitrile 용액 (acetonitrile : water = 85 : 15, v/v) 사용하였고, sample loading volume은 1.0 µL 였으며, 발색은 ethanol에 0.5% α -naphthol과 5% H₂SO₄을 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

Bottle culture를 이용한 효모균주선별

본 연구에 가장 적절한 효모균주를 선별하기 위하여 국내에서 수급 가능한 6가지 6탄당 및 5탄당 이용 효모균주를

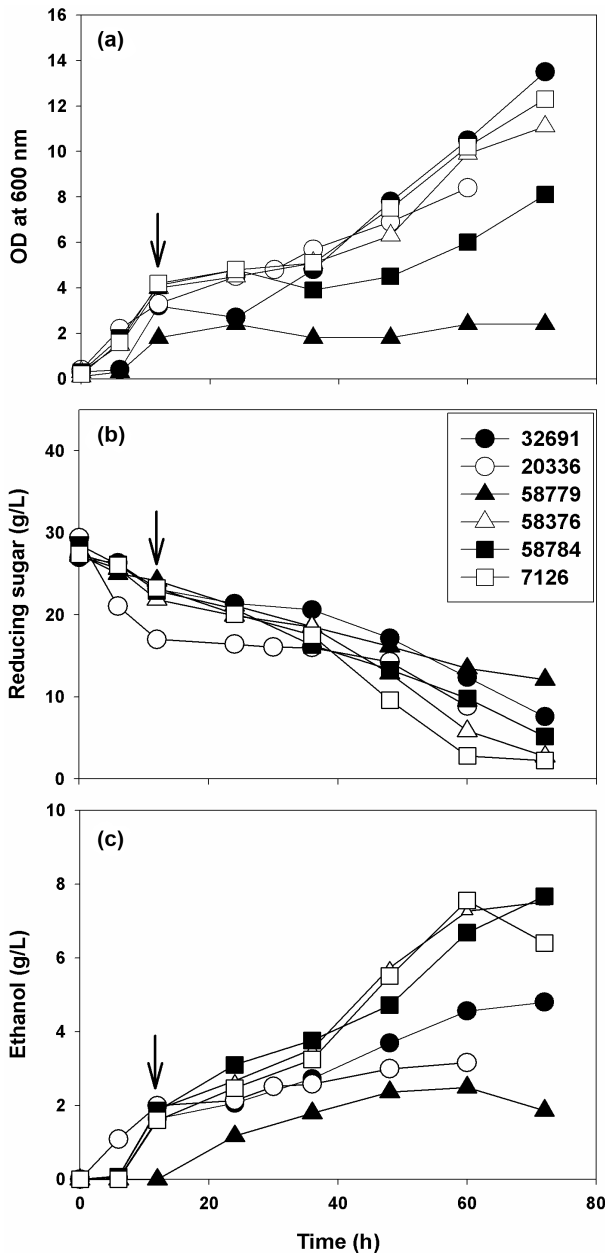


Fig. 1. Bottle cultures for the selection of yeast strain, in which xylose and glucose were used as carbon sources. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar, and (c) ethanol production. Yeast strains used in this study are described in panel (b). Arrow indicates the time at which the screw cap was completely closed.

가지고 연구하였다 (Table 1). 배지는 glucose와 xylose가 함유된 배지를 사용하였으며 Fig. 1과 같이 세포 성장과 총 환원당 소비 그리고 에탄올 생산양상을 관찰하였다. Fig. 1(a)에서의 세포성장 결과와는 다르게 Fig. 1(c)에서와 같이 약 25 g/L의 총 환원당으로부터 7126, 58784, 58376 균주에서 약 6 ~8 g/L의 ethanol이 생성되는 것을 확인하였다. 반면에 다른 3가지 효모균주는 약 5 g/L이하의 ethanol

생산을 보였다. 이때 glucose와 xylose의 소비양상은 Fig. 2에 표시하였으며, 7126, 58784, 58376에서 상대적으로 xylose가 배양 후반부에 완전히 소비되는 것을 확인하였다. 이 실험에서 모자반 가수분해물을 이용한 bioethanol 생산의 최적 효모선별을 glucose와 xylose가 들어간 배지를 이용하여 수행하였는데, 이는 아직 모자반 가수분해물의 단당류에 대한 확인이 완료되지 않았기 때문이다. 대표적인 6탄당과 5탄당을 넣은 배지가 모자반 가수분해물로부터 가장 효율적으로 bioethanol을 생산하는 효모 선별에 정확한 결과를 제공하지는 못한다 할지라도 가장 최선의 접근법이라고 생각되어져서 7126, 58784, 58376 균주를 가지고 아래의 모자반 가수분해물에서의 bioethanol 생산 연구를 수행하였다. 또한 연료용 bioethanol 생산 할 때, 고농도의 ethanol이 증류공정의 비용을 낮출 수 있기 때문에 효모 균주의 bioethanol 생산능력보다는 최종 bioethanol 농도가 가장 높은 균주를 다음 연구를 위한 선별 기준으로 삼았다.

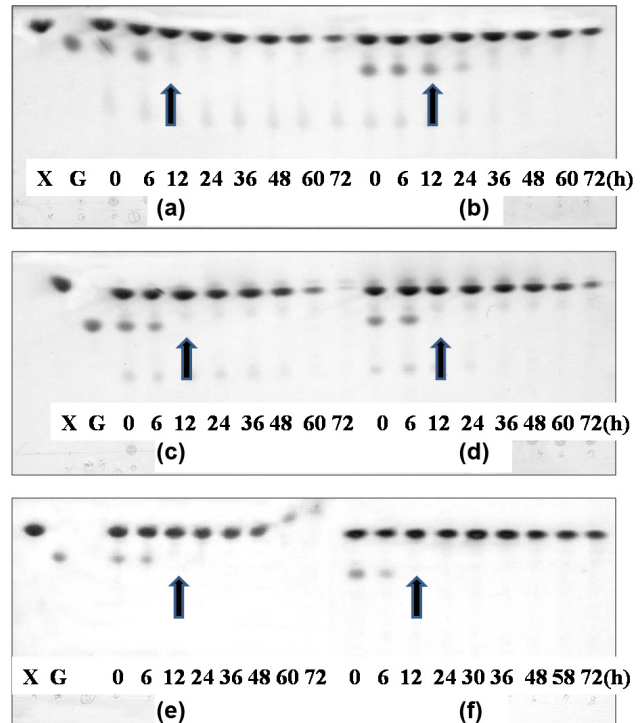


Fig. 2. TLC of the culture supernatant from Fig. 1. (a) 32167, (b) 58779, (c) 58376, (d) 58784, (e) 7126, and (f) 20336. X and G indicate xylose and glucose, respectively, as standard. Arrow indicates the time at which the screw cap was completely closed.

Bottle culture와 fermenter culture를 이용한 모자반 가수분해물에서 bioethanol 생산

위 연구에 선별된 3가지 효모를 가지고 모자반 가수분해물에서 bioethanol이 잘 생산되는지를 먼저 bottle culture을 이용하여 확인하였다. Fig. 3과 같이 세포성장, 환원당 소비,

ethanol 생산을 조사하였는데, Fig. 1에서와 같이 세포성장양상과는 다르게 약 30 g/L의 환원당으로부터 최대 약 3~6 g/L 사이의 bioethanol이 생산되었다 (Fig. 3(c)). 또한 fermenter culture를 이용한 모자반 가수분해물로부터 bioethanol 생산에 관련된 연구결과 Fig. 4와 같이 세포성장, 환원당 소비, bioethanol 생산을 조사할 수 있었다. 이때도 마찬가지로 세포성장과 관계없이 약 30 g/L의 환원당으로부터 최대 약 4~7 g/L의 bioethanol이 생산되었다 (Fig. 4(c)).

Bottle culture와 fermenter culture의 결과를 비교분석한 결과 3가지 균주의 bioethanol 생산에 있어서 확실한 비교우위를 판단할 수 없었다. 이는 3가지 균주 사이의 bioethanol 생산 능력의 차이가 없음을 보여주는 결과이기도 하고, 모자반 가수분해물의 제조 시 일관성 있는 가수분해물의 제조가 불가능하였기 때문에 나타나는 결과이기도 하다. 즉, 공급되는 모자반 자체의 비균일성으로부터 기인되는 것으로 생각되어진다. 또한 이러한 현상이 bottle culture와 fermenter culture의 세포성장에 있어서 3가지 균주 사이의 차이와 초기 환원당 함량에 있어서의 차이 등을 초래 하는 것으로 보여진다. 그러나 Fig. 3와 Fig. 4의 결과에서 분명히 모자반의 가수분해물에서 bioethanol이 생산되어질 수 있다는 것을 확인하였고, 6탄당과 5탄당 이용 효모인 *Pichia stipitis* 중에서 3가지 효모가 가장 좋은 bioethanol 생산량을 보일 수 있음을 확인하였다. 한편 bottle culture와 fermenter culture에서 환원당이 DNS 방법으로 측정되었는데, 측정에 영향을 주는 미확인 물질과 배지의 어두운 색 등으로 인하여 환원당이 완전히 소비되지 않은 것처럼 관찰되었다 (Fig. 3(c) and Fig. 4(c)).

Table 2. Ethanol yields (g-ethanol/g-reducing sugar) of Fig. 3 and 4

Culture Methods	Yeasts			<i>Pichia angophorae</i> ^a
	7126	58376	58784	
Bottle culture	0.139	0.253	0.335	-
Fermentor culture	0.297	0.357	0.353	0.18~0.43

^aReference number is [14].

Table 3. Ehanol yields (g-ethanol/kg) of Fig. 3 and 4

Culture Methods	Yeasts			<i>Pichia angophorae</i> ^a
	7126	58376	58784	
Bottle culture	12.51	19.61	22.2	-
Fermentor culture	23.84	27.67	28.34	3.6~8.6

^aReference number is [14].

Fig. 3과 Fig. 4의 결과를 종합하여 다른 연구자의 결과와 비교하기 위하여 Table 2과 같이 최대 bioethanol 생산 시점에서 총 환원당 소비량에 대한 bioethanol 생산량인 bioethanol yield를 비교하였다. 또한 Table 3에서는 최대 bioethanol 생산 시점에서 모자반 1 kg을 이용한 bioethanol 생산량을 bioethanol yield로서 비교분석하였다. 이때 유일

하게 국제학술지에 보고된 seaweed를 이용한 bioethanol 생산에 관한 연구논문 결과를 비교하였다. Horn *et al.* [14]의 연구결과와 비교하여 볼 때 환원당에 대한 bioethanol 수율은 bottle culture와 fermenter culture에서 매우 유사한 0.139~0.357 이었고 (Table 2), 1 kg의 seaweed를 기준으로 한 bioethanol 생산수율을 비교했을 때는 본 연구결과가 상대적으로 약 3~8배 정도의 bioethanol이 생산수율이 높은 약 12~28 g/kg인 것을 확인하였다 (Table 3).

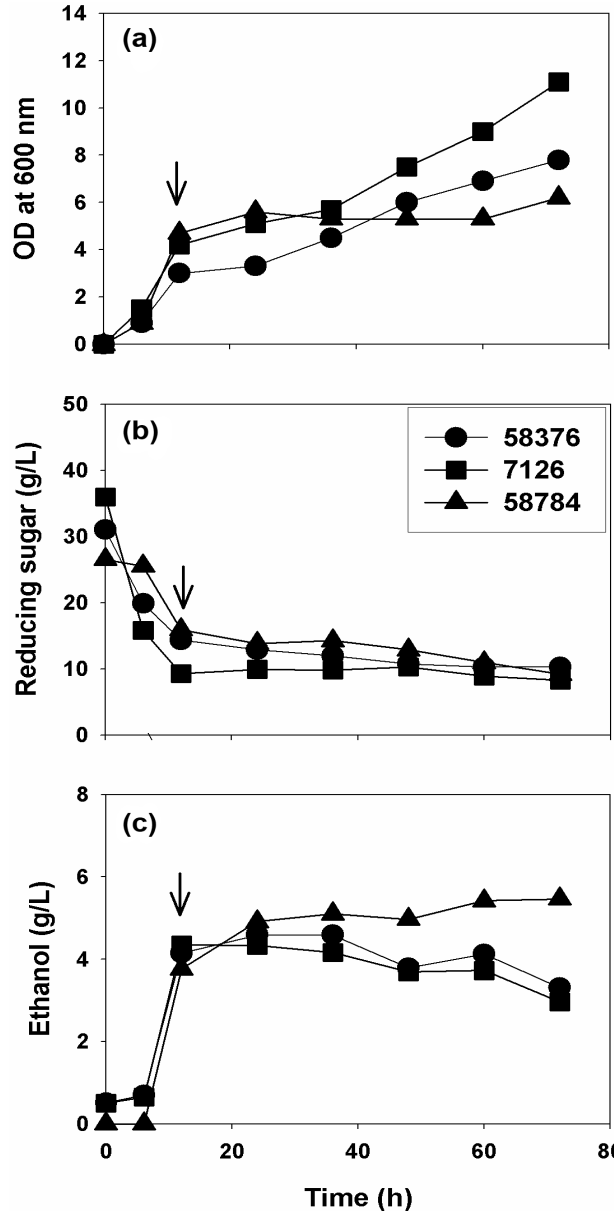


Fig. 3. Bottle cultures of 58376, 7126, and 58784, in which the hydrolysate of *Sargassum sagamianum* was used as carbon source. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar, and (c) ethanol production. Yeast strains used in this study are described in panel (b). Arrow indicates the time at which the screw cap was completely closed.

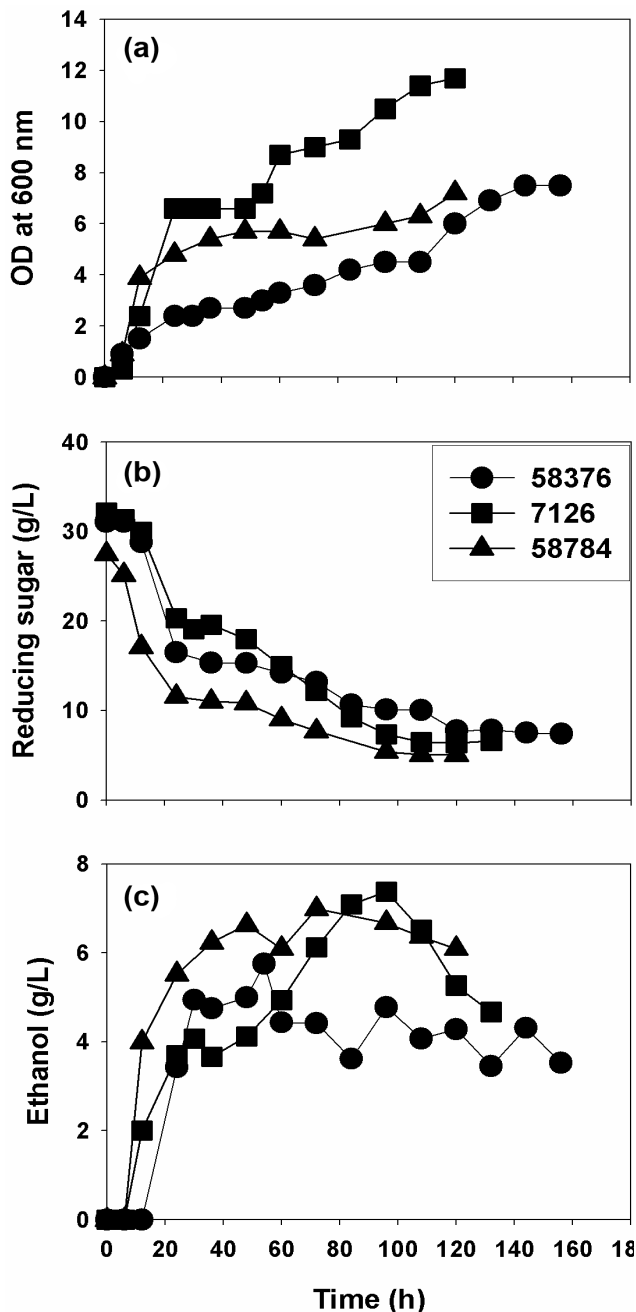


Fig. 4. Fermentor cultures of 58376, 7126, and 58784, in which the hydrolysate of *Sargassum sagamianum* was used as carbon source. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar, and (c) ethanol production. Yeast strains used in this study are described in panel (b).

본 연구결과가 모자반 가수분해물을 이용한 bioethanol 생산에 관련된 연구로서 몇 가지 제한된 환경 속에서 이루어지기는 하였으나 seaweed인 모자반 가수분해물로 부터 bioethanol을 생산할 수 있다는 가능성을 확인할 수 있었다. 한편 이러한 결과는 모자반 가수분해물 안에 alginate 뿐만아니라 다양하고 복잡한 carbohydrate 성분이 존재하

며 [5-11], 이것이 가수분해물 속에 존재하여 bioethanol을 생산하기 위한 carbon source로 사용되었을 것으로 추론되어진다. 앞으로 모자반 가수분해물 안의 다양한 환원당 성분에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각되어지며, 본 연구에서는 5탄당의 ethanol로의 conversion시 산소로 인하여 그 수율이 떨어질 것을 생각하여, bottle culture와 fermenter culture에서 공기 공급을 제한하였다. 특히 fermenter culture에서는 surface aeration을 통하여 제한된 공기를 주입하였다. 이것이 어떠한 효과를 주었는지에 대한 추가 연구도 필요 하리라 생각된다.

감 사

This work was supported by Korea Ocean Research & Development Institute (Project No. PP00740), Republic of Korea. The author thanks Ms. Hye-Ji Kim, Ms. Ga-Young Shin, Ms. Ji-Eun Lee for their technical assistance.

접수 : 2010년 4월 27일, 게재승인 : 2010년 6월 19일

REFERENCES

1. Sargassaceae. <http://www.encyber.com>.
2. Jensen, A. (1993) Present and future needs for algae and algal products. *Hydrobiologia* 260-261: 15-23.
3. Zubia, M., C. Payri, and E. Deslandes (2008) Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *J. Appl. Phycol.* 20: 1033-1043.
4. Aquatic biomass: Sustainable bio-energy from algae? <http://www.oeko.de>.
5. Abdel-Fattah, A. F., M. M. -E. Hussein, and H. M. Salem (1973) Sargassan: A sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*. *Phytochemistry*. 12: 1995-1998.
6. Sinha, S., A. Astani, T. Ghosh, P. Schmitzler, and B. Ray (2010) Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity. *Phytochemistry*. 71: 235-242.
7. Hiroe, M. and N. Kazutosi (1982) Sugar constituents of sulfated polysaccharides from the fronds of *Sargassum ringgoldianum*. *B. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48: 981-989.
8. Zhou, J., N. Hu, Y. I. Wu, Y. Pan, and C. R. Sun (2008) Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant properties of acidic polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 9: 721-727.

9. Zhu, W., L. C. M. Chiu, V. E. C. Ooi, P. K. S. Chan, and P. O. Ang Jr. (2006) Antiviral property and mechanisms of a sulphated polysaccharide from the brown alga *Sargassum patens* against *Herpes simplex* virus type 1. *Phytochemistry* 13: 695-701.
10. Dias, P. F., J. M. Siqueira Jr., M. Maraschin, A. G. Ferreira, A. G. Ferreira, A. R. Gagliardi, and R. M. Ribeiro-do-Valle (2008) A Polysaccharide isolated from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum* exerts antivasculogenic effects evidenced by modified morphogenesis. *Microvasc. Res.* 75: 34-44.
11. Duarte, M. E. R., M. A. Cardoso, M. D. Nosedá, and A. S. Cerezo (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res.* 333: 281-293.
12. Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee (2009) Production of Bioethanol from brown algae by enzyme hydrolysis. *KSBB J.* 24: 483-488.
13. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, H. Joo, and J. H. Lee (2009) Production of bioethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
14. Horn, S. J., I. M. Aasen, and K. Østgaard (2000) Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 249-254.
15. Mosier, N., R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak, and M. R. Ladisch (2008) Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96: 1986-1993.
16. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986) *Carbohydrate analysis; A practical approach*, p. 3. IRL press, Oxford, UK.
17. Lee, S. -E., H. -B. Seo, M. C. Kwon, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Operational strategy for increasing ethanol production in repeated fed-batch ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. *KSBB J.* 25: 187-192.
18. Lee, S. -E., J. -H. Yeon, Y. C. Seo, D. H. Kang, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Optimal strategy for ethanol production in repeated fed-batch operation using flocculent *Sacchromyces cerevisiae*. *KSBB J.* 25: 179-186.