

# 산가수분해법과 반응표면분석법을 이용한 해조류 청각으로부터 레블린산의 생산

정귀택<sup>1\*</sup>, 박돈희<sup>2,3,4</sup>

## Production of Levulinic Acid from Marine Algae *Codium fragile* Using Acid-Hydrolysis and Response Surface Methodology

Gwi-Taek Jeong<sup>1\*</sup> and Don-Hee Park<sup>2,3,4</sup>

접수: 2011년 7월 9일 / 게재승인: 2011년 8월 16일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** This work is focused on the possibility of marine biomass *Codium fragile* as renewable resources for production of levulinic acid. In an effort to optimize the reaction conditions of levulinic acid production from *Codium fragile*, response surface methodology was applied. A total of 18 individual experiments were designed to investigate the effect of reaction temperature, catalyst amount, and reaction time. As a result, 4.26 g/L levulinic acid from *Codium fragile* was produced in the condition of 160.7°C of reaction temperature, 3.9% of sulfuric acid, and 39.1 min of reaction time. This result will provide the useful information for chemical production from marine resource.

**Keywords:** *Codium fragile*, levulinic acid, acid-hydrolysis,

marine algae, response surface methodology

### 1. 서론

최근 고갈되어 가는 화석 연료로부터 얻어왔던 연료 및 화학 산업용 소재를 목질계 또는 해조류 바이오매스와 같은 재생 가능한 자원으로부터 확보하고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다 [1-5]. 재생 가능한 바이오매스 자원은 그 기본 단위가 오탄당이나 육탄당으로 구성된 탄수화물로 구성되어 있으며, 이로부터 화학, 생물학적인 방법을 도입하여 효과적으로 원하는 연료 및 화합물로 바꾸는 연구가 진행되고 있다 [1,3,6].

육상의 옥수수과 콩과 같은 식용작물에서 바이오 연료의 개발은 식량가격 폭등과 경작지 제한 등의 문제점이 있으나, 해조류를 이용한 바이오에너지의 생산은 원료생산을 위한 양식장소가 바다이기 때문에 매우 광범위하고, 해조류가 성장하는 동안 이산화탄소와 부영양화의 원인인 영양염을 흡수하는 등 생태계의 안정화에 기여한다. 또한 바이오에너지 생산수율에서 육상작물은 30~35%, 목재 20~25%, 해조류 45% 이상으로 해조류가 많은 장점을 가지고 있다. 해조류는 바다에 사는 조류를 통틀어 일컫는다. 부유생활을 하는 식물플랑크톤 (미세조류)과 고착생활을 하는 대형 조류로 구분된다. 거대 조류로는 녹조식물, 갈조식물, 홍조식물과 남조식물 중 바다에 사는 종류가 포함된다. 해조류의 구성성분 중 탄수화물의 함량은 종류에 따라 다양하지만, 25-60%의 탄수화물을 함유하고 있으며, 그 탄수화물을 구성하는 당의 조성도 다양하다 [5-10].

청각 속은 청각목 청각과에 속하는 녹조식물의 분류군이

<sup>1</sup>부경대학교 생물공학과  
<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea  
Tel: +82-51-629-5869, Fax: +82-51-629-5863  
e-mail: gtjeong@pknu.ac.kr

<sup>2</sup>전남대학교 생명과학기술학부  
<sup>2</sup>School of Biological Sciences and Technology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>3</sup>전남대학교 바이오에너지 및 바이오소재 협동과정  
<sup>3</sup>Interdisciplinary Program of Graduate School for Bioenergy and Biomaterials, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

<sup>4</sup>전남대학교 촉매연구소  
<sup>4</sup>Research Institute for Catalysis, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

다. 몸 색깔은 짙은 녹색을 띤다. 사슴뿔의 모양으로 옆으로 가지가 뻗듯이 자라나는 특성이 있다. 청각 속은 난해산으로서 아열대 및 열대에 널리 분포하고 세계적으로 약 80여 종이 보고되었고, 한국에는 10여종이 보고되어 있다. 그 중에서도 대표적인 청각 (*Codium fragile* (Suringar) Hariot)은 한국과 중국, 일본은 물론 필리핀, 하와이 또는 아프리카 등지에서도 식용으로 널리 이용되고 있다 [11]. 동양의학에서 청각은 오충 (enterpibiosis), 수증 (dropsy), 배뇨통 (dysuria)의 치료에 사용되어 왔다 [12]. 청각유래 수용성 다당류들은 항응고제 (anticoagulant agents) [13,14], 혈소판 응집 (platelet aggregation) [13], 면역자극 효과 (immunostimulating effect) [12], 항바이러스성 효과 (antiviral effect) [15] 등의 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 해조류 바이오매스인 청각을 이용한 바이오에너지 (바이오연료, 화학물질)의 생산에 관한 연구는 전무하다.

청각의 성분 중 탄수화물의 구성에 대한 여러 연구가 수행되었다. 조 등 [16]은 청각의 성분 분석에서 수확한 시기 별로 함량의 변화가 다르고, 24.9-45.8%의 함량을 보고하였다. Ciancia 등 [13]은 *Codium fargile*과 *C. vermilara*의 수용성 탄수화물에서 sulfated arabinan과 galactan 또는 sulfated arabinogalactan, 그리고  $\alpha$  (1 → 4)-D-glucan,  $\beta$  (1 → 4)-D-mannan을 분리하였고, 기타 구성 당으로는 glucose, xylose, rhamnose, fructose를 확인하였다. 또한 Love와 Percival [17]은 *C. fragile*의 수용성 추출물에서 pyranose form에서 3-linked galactose와 arabinose로 구성되어 있고, C-4 또는 C-6가 sulfate화 되어 있고, 반면에 arabinopyranose units은 C-2 또는 C-3이 sulfate화 되어 있다고 보고하였다. Estevez 등 [18]은 *C. fragile*의 세포벽 구성성분을 분석한 결과 31%의 선형 (1 → 4)- $\beta$ -D-mannans과 9%의 pyruvated arabinogalactan sulfate 등으로 구성되어 있다고 보고 하였다.

미국 에너지성은 미국 국립연구소 (NREL, EERE, PNNL)들과 함께 생물학적 공정과 화학공정을 이용하여 당류를 기반으로 석유자원을 대체하기 위해 필요한 12가지의 기본 구성 화합물 (Top Value Added Chemicals from Biomass) 중 하나로 levulinic acid를 제시하였다 [19]. 화학중간체인 levulinic acid는 현재 석유로부터 분리되는 많은 화학 물질을 합성하는데 사용될 수 있는 다목적으로 쓰이는 바이오매스에서 추출된 기본 화학물질이다. 플라스틱 합성이나 정밀화학에서 사용되고 있는 화학연료로부터 얻는 중간체들은 levulinic acid와 그 유도체들로 대체할 수 있다. 게다가 화학 처리를 하여 levulinic acid에서 얻은 액체 연료는 발효 공정을 통해 얻은 에탄올을 대체할 수 있는 잠재적인 대안을 평가되고 있다. 그러나 높은 생산가로 인해 levulinic acid의 산업적 사용에 제한을 받고 있다 [1,3,8].

바이오매스 중의 탄수화물은 주로 육탄당이나 오탄당으로 구성되어 있다. 육탄당인 glucose, galactose, mannose, fructose는 산가수분해에 의해 5-hydroxymethylfurfural이나 levulinic acid로 전환될 수 있고, 오탄당인 arabinose와 xylose는 furfural로 쉽게 전환될 수 있다 [1,8,20]. 본 연구에서 사용하고자 하는 청각은 그 탄수화물의 구성이 주로 mannose나 galactose로 구성되어 이로부터 HMF나 levulinic

acid와 같은 화학물질을 생산하는데 원료로 사용 가능하다 [17].

반응표면설계법 (Response Surface Analysis, RSA)는 1951년 Box와 Wilson의 논문에서 최초로 제시되었으며, 수학과 통계학적 기법을 사용하여 반응 값에 대한 최적조건을 찾는 방법으로, 기존 화학공학, 산업공학 등에서 공정 최적화를 위해 일부 사용되었으나 최근에는 생물공정에 적용되어 좋은 평가를 받고 있다. 이 실험계획법을 이용하면 불연속적으로 얻을 수밖에 없는 실험 자료들을 연속적으로 분석하여 객관적이며 신뢰도가 높은 분석 결과를 최단시간 내에 얻을 수 있다. 또한 반응표면분석에서 얻어진 여러 가지 독립 변수들이 생산공정에 미치는 영향을 종합적인 분석이 가능하다는 장점이 있다 [8,21].

본 연구에서는 해양 바이오매스인 청각 (*Codium fragile*)을 이용하여 화학중간체로 사용되는 levulinic acid를 생산하는데 있어 잠재적인 자원으로 사용될 수 있는지 평가하기 위하여 산가수분해 방법과 반응표면분석법을 적용하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

실험재료로 사용한 청각 (*Codium fragile*, 국내산)은 증류수를 사용하여 세척하여 이물질을 제거한 다음 60°C에서 1시간 건조하였다. 건조된 청각 시료는 분쇄하여 체 (20~40 mesh)로 분획하여 밀폐용기에 밀봉저장하면서 실험에 사용하였다. Sulfuric acid (99.8%, Duksan Pure Chemical Co. Ltd. Korea), calcium carbonate (Sigma-Aldrich Co., USA)는 시약급의 제품을, levulinic acid (Acros Organics, USA)는 표준 분석용 시약을 사용하였다.

### 2.2. 실험방법

산가수분해법을 이용하여 청각으로부터 levulinic acid로의 전환 실험은 통계실험법 중에 한가지인 반응표면분석법을 적용하여 세 가지 반응인자 (반응온도, 반응시간, 촉매농도)를 대상으로 실험하였다. 각각의 전환 실험은 회분식 스테인리스 스틸 재질의 반응기를 사용하여 수행하였다. 20-40 mesh 크기의 청각 분말 1.5 g을 30 mL의 황산 수용액에 5분간 담지하여 충분히 흡수시킨 후 실험을 시작하였다. 반응물은 오일 중탕 안에서 80~180°C의 조건으로 미리 설정된 반응시간 (5-55분) 동안 반응시킨 후 반응이 끝나면 반응을 중지시키기 위해 즉시 수돗물을 사용하여 실온으로 빠르게 냉각시켰다. 반응온도는 반응기와 오일중탕에서 PID 온도 컨트롤러를 이용하여 조절하였다. 그리고 반응기 내의 반응물의 반응도를 높이기 위하여 자석교반기를 사용하여 약 200 rpm으로 교반하면서 반응을 수행하였다. 반응의 시작은 반응기 내의 온도가 설정한 반응온도 (166-233°C)에 도달하는 시점으로 하였으며, 대략 5분 정도가 필요하였다. 실험 후 생산물에 증류수를 첨가하여 전체 용액량이 50 mL가 되도록 조절하였다. 고체 잔류물은 15,000 rpm 속도로 20분간 원심분리하여 제거하였다. 상등액은 calcium carbonate를 이용하여 pH를 7로 조절한 다음 15,000 rpm, 20분간 원

심분리하여 생성된 CaSO<sub>4</sub>를 제거한 후 상등액을 levulinic acid 분석에 사용하였다.

**2.3. 실험계획**

해조류 청각으로부터 화학중간체인 levulinic acid 생산을 위한 모델을 만들기 위하여 반응표면분석법 (Response Surface Methodology; RSM)에 의한 실험 계획을 최적화하기 위하여 5-수준-3-인자의 중심합성회전설계법 (central composite rotatable design; CCRD)을 적용하였다. 반응인자로써 반응온도, 반응시간, 촉매농도를 적용하였다. 이 방법은 실험 범위의 내부에 관한 정보를 제공하기 위해서 8개의 요인적인 점, 6개의 축의 점, 4개의 중앙 점이 포함된 18가지의 실험을 계획하였다. Levulinic acid의 생산과 관련 인자들의 상관관계를 평가하기 위하여 실험한 변수들의 범위는 반응온도 (166~233°C), 반응시간 (5~55분), 촉매농도 (0.48~5.52 wt%)이다. Table 1과 3에 암호화되거나 암호화되지 않은 독립 인자 (X<sub>i</sub>), 수준, 그리고 실험계획을 나타내었다.

**Table 1.** Factors and their levels in the central composite design

Variable	Symbol	Coded factor levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Reaction temperature (°C)	X <sub>1</sub>	166.4	180	200	220	233.6
Reaction time (min)	X <sub>2</sub>	4.77	15	30	45	55.23
Catalyst amount (wt %)	X <sub>3</sub>	0.48	1.5	3	4.5	5.52

**2.4. 통계분석**

실험계획에 의해 디자인된 실험조건으로부터 얻은 결과 (Table 2)는 Design-Expert 7 software (Stat-Ease, Inc. USA) 중의 반응표면분석법을 사용하여 분석하였다. 2차 계수는 어떠한 인자의 소거 없이 회귀분석을 통하여 분석하였다. 실험결과는 다양한 회귀분석을 통한 인자들에 의해 맞추었고, 맞춤 모델의 질은 측정계수 (R<sup>2</sup>)와 변이분석 (ANOVA)을 통하여 평가하였다. 정방형의 반응표면분석은 다음의 식 (1)과 같은 방정식에 맞추었다.

$$Y = \beta_{k0} + \sum_{i=1}^3 \beta_{ki}X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{kii}X_i^2 + \sum_{i+1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{kij}X_iX_j \quad (1)$$

Y는 반응 인자 (농도), X<sub>i</sub>는 i번째 독립 인자, β<sub>0</sub>는 절편, β<sub>i</sub>는 일차 모델 계수, β<sub>ii</sub>는 인자 i를 위한 정방형의 계수이고 β<sub>ij</sub>는 인자 i와 j 사이를 상호 작용을 위한 직선 모델 계수이다 [8,21].

**2.5. 분석 방법**

해조류에 포함되어 있는 당, ash, 수분의 함량을 조사하기 위하여 NREL chemical analysis and testing standard procedure [22]의 바이오매스 분석 실험과정을 변형하여 각 성분의 분석을 실시하였다. 환원당의 조성은 sulfuric acid를 이용하여 바이오매스를 가수분해하여 생성된 환원당을 DNS 법을 이용하여 분석하였다. 먼저, 1차 가수분해를 시작하기 위해 300 mg (±10 mg)의 바이오매스 시료를 72 wt% 황산

3 mL에 넣어 약 60분 동안 30°C 수욕조에서 잘 섞어 주었다. Pre-hydrolysis 단계를 완료한 다음 pre-hydrolysis된 반응물에 84 g의 증류수를 첨가한 다음 2차 가수분해를 하기 위해 121°C에서 60분 동안 가열하였다. 2차 가수분해 단계를 완료한 다음 반응기의 온도를 즉시 수돗물을 이용하여 실온으로 낮추었다. 가수분해 상등액의 pH는 calcium carbonate를 이용하여 7로 조절하였고, 당 조성을 분석하기 위해 13,500 rpm, 10분 동안 원심분리하여 상등액을 분석용 시료로 사용하였다. 환원당은 DNS법으로 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 580 nm에서 측정하였다. Ash 함량은 건조된 바이오매스를 575°C의 고온로에서 4시간 동안 회화 후 잔류한 ash의 중량으로 계산하였다. 수분 함량은 시료를 105°C의 건조기에서 12시간 동안 건조한 후 건조 시료의 중량으로부터 계산하였다. 기타 성분은 단백질, 지질, 핵산, 기타 당/당알콜류 (환원당으로 분석되지 않는 것)들의 총합으로 나타내었다. Levulinic acid의 농도는 GC (YL 6100 GC, 영린기기, 한국)를 사용하여 분석하였다. 컬럼은 HP-INNOWAX (Supelco, USA)으로, 운반기체로는 헬륨을 3 mL/min의 유속으로 사용하였다. 오븐의 온도조건은 90°C에서 1분, 이후 15°C/분의 속도로 240°C 까지 승온시켜 분석하였다. 분리된 물질의 검출은 FID 검출기를 이용하여 측정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 원료 해조류의 성분 분석**

해조류에 포함되어 있는 당, ash, 수분의 함량을 조사하기 위하여 각 성분의 분석을 실시하여 특성을 조사하였다 (Table 2). 실험에 사용한 청각 (*Codium fragile*)은 57.1%의 환원당, 9.2%의 수분, 12.0%의 ash, 그리고 21.8%의 기타 성분으로 구성되어 있었다. 이와 유사한 녹조류 중 파래 (*Ulva lactuca*)는 33.0%의 환원당을 함유하였으며, 홍조류인 코토니 (*Kappaphycus alvarezii*)는 55.7%, 김 (*Porphyra tenera*)은 34.4%의 환원당을 함유하고 있었다.

**Table 2.** Composition of marine biomass

Biomass	Reducing sugar (%)	Moisture (%)	Ash (%)	Others* (%)
청각 ( <i>Codium fragile</i> , Korea)	57.1	9.2	12.0	21.8
파래 ( <i>Ulva lactuca</i> , Korea)	33.0	2.7	13.6	50.6
코토니 ( <i>Kappaphycus alvarezii</i> , Philippines)	55.7	5.4	22.6	16.3
김 ( <i>Porphyra tenera</i> , Korea)	34.4	8.3	9.2	48.1

\*Others: protein, lipid, sugar alcohols, etc.

청각의 성분은 수확한 장소 및 시기에 따라 그 함량이 다르다고 알려져 있다 [16]. Ciancia 등 [13]은 *C. fragile*과 *C. vermilara*에서 arabinan, galactan, arabinogalactan, glucan,

mannan으로 구성된 다당 성분을 분리하였으며, 기타 구성당으로는 glucose, xylose, rhamnose, fructose를 확인하였다. Love와 Percival [17]은 *Codium* species의 수용성 다당 추출물의 주요 구성 성분으로 L-arabinose와 D-galactose를 보고하였으며, Lee 등 [23]은 *C. adhaerens*, *C. fragile*, *C. latum*에서 arabinose가 주요 구성당이라고 보고하였다. 또한 Matsubara 등 [24]와 Bilan 등 [25]은 각각 *C. cylindricum*과 *C. yezoense*로부터 galactose가 주요 당임을 확인하였다. Estevez 등 [18]은 *C. fragile*의 세포벽 구성성분 중 31%가 선형 (1 → 4)-β-D-mannans으로, 9%가 pyruvated arabinogalactan sulfate로 구성되어 있다고 보고 하였다. Love 등 [26]은 뜨거운 알칼리 용액으로 처리하여 얻은 추출액 중 mannann이 *Codium* 속의 해조류의 세포벽의 fibrillar moiety의 주요 구성성분이라고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 청각은 arabinose, galactose, mannose가 주요 구성당이고, 그 외에 glucose, xylose, rhamnose, fructose가 소량으로 구성되어 있다고 판단된다 [13,17,18,23-26]. 본 연구에서는 정확히 정량된 당의 구성 비율은 제시하지 않았지만, 문헌상 조사된 단당 중 육탄당들이 본 연구의 산물인 levulinic acid로 전환될 수 있으리라 판단된다.

**3.2. 통계적 실험방법에 의한 levulinic acid의 생산**

본 연구에서는 해양 바이오매스 자원인 청각 (*C. fragile*)에 산촉매를 사용하여 levulinic acid로 전환시키고자 반응표면 분석법을 적용하여 반응변수를 최적화하고자 하였다. Table 3에 실험 매개변수 조건과 실험설계를 기본으로 18개의 실험 조건을 설정하여 실험을 수행하여 얻은 결과를 나타내었다. 실험결과, 166.4°C, 3.0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30.0분의 조건에서 가장 많은 4.11 g/L의 levulinic acid가 생성되었다 (Run 4). 또한 200°C, 0.5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30.0분의 조건 (Run 5)에서는 1.32 g/L로 가장 낮은 농도를 나타내었다.

**Table 3.** Central composite rotatable second-order design, experimental and estimated data for 5-level-3-factor response surface analysis

Std	Run	Reaction temperature (°C), X <sub>1</sub>	Reaction time (min), X <sub>2</sub>	Catalyst amount (wt %), X <sub>3</sub>	Levulinic acid (g/L)
9	4	166.4	30.0	3.0	4.11
1	6	180.0	15.0	1.5	2.64
3	8	180.0	45.0	1.5	2.64
7	10	180.0	45.0	4.5	3.50
5	13	180.0	15.0	4.5	3.56
14	1	200.0	30.0	5.5	3.93
11	3	200.0	4.8	3.0	3.37
13	5	200.0	30.0	0.5	1.32
12	11	200.0	55.2	3.0	3.32
18	14	200.0	30.0	3.0	3.32
17	15	200.0	30.0	3.0	3.59
16	16	200.0	30.0	3.0	3.69
15	18	200.0	30.0	3.0	3.62
4	2	220.0	45.0	1.5	3.64
8	7	220.0	45.0	4.5	3.28
6	9	220.0	15.0	4.5	3.92
2	17	220.0	15.0	1.5	3.37
10	12	233.6	30.0	3.0	3.71

**Table 4.** ANOVA results for the response surface quadratic model for levulinic acid formation

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob. > F <sup>a,b</sup>
Model	5.374	9	0.597	3.142	0.0608
X <sub>1</sub>	0.106	1	0.106	0.557	0.4767
X <sub>2</sub>	0.020	1	0.020	0.103	0.7561
X <sub>3</sub>	2.964	1	2.964	15.596	0.0042
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	0.013	1	0.013	0.067	0.8018
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.320	1	0.320	1.686	0.2303
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	0.114	1	0.114	0.602	0.4603
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	0.229	1	0.229	1.204	0.3044
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.052	1	0.052	0.275	0.6139
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	1.287	1	1.287	6.774	0.0315
Residual	1.520	8	0.190		
Lack of Fit	1.442	5	0.288	11.114	0.0376
Pure Error	0.078	3	0.026		
Cor. Total	6.895	17			

<sup>a</sup> Prob. > F is level of significance.

<sup>b</sup> Values of "Prob. > F" less than 0.05 indicate model terms are significant.

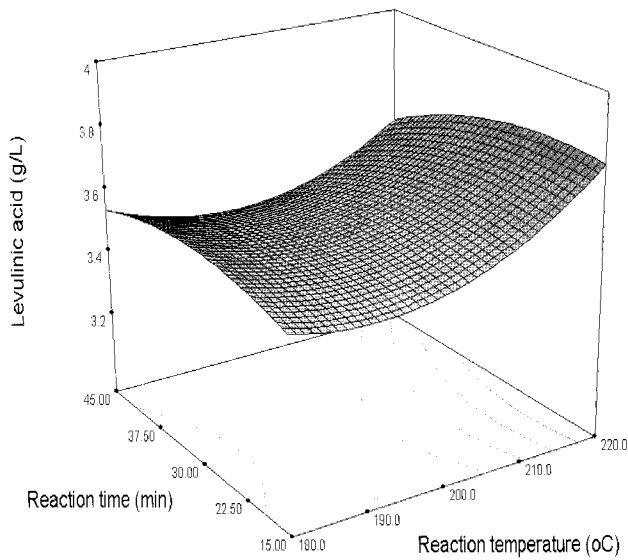
청각으로부터 화학중간체 levulinic acid 생산을 위한 최종 모델 추정식 (암호화된 값을 기초로 함)은 다음과 같았다.

$$Y = 3.552 + 0.088 X_1 - 0.038 X_2 + 0.466 X_3 - 0.040 X_1 X_2 - 0.200 X_1 X_3 - 0.120 X_2 X_3 + 0.135 X_1^2 - 0.064 X_2^2 - 0.319 X_3^2$$

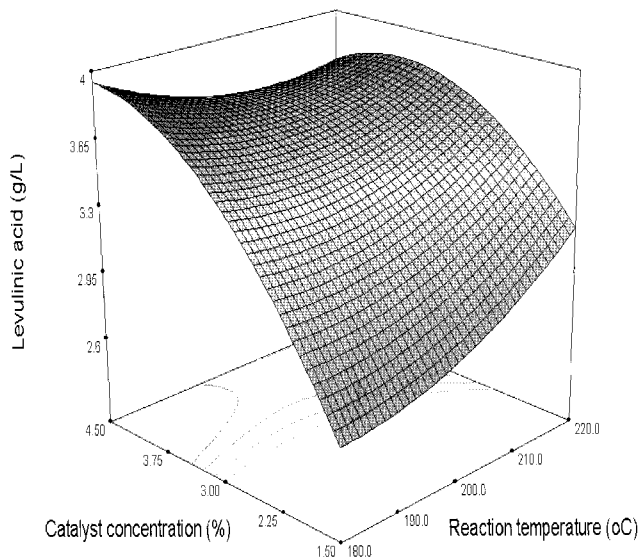
Y는 생산물 (levulinic acid, g/L)이다. X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>는 각각 반응인자로써 반응온도 (°C), 반응시간 (min), 촉매농도 (wt %)이다.

Fig. 1에 촉매 농도가 3.0% (w/v)일 때, 반응온도, 반응시간, 그리고 이러한 인자들의 상호작용이 levulinic acid 생성에 미치는 영향을 나타내었다. Levulinic acid의 생성이 일정한 반응시간 조건에서 반응온도가 증가하는 동안에 선형적으로 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 반응온도가 높고 반응시간이 짧을 때에 levulinic acid의 생성은 높았다. 이러한 결과는 청각의 당 성분 중 galactose, mannose, glucose와 같은 육탄당의 탈수반응으로부터 levulinic acid가 형성되기 때문에 야기된 것으로 판단된다 [1,8,20].

Fig. 2는 일정한 반응시간 30분에 levulinic acid의 생성에 미치는 반응온도, 촉매농도 등의 상호관계의 영향을 나타내었다. 낮은 반응온도에서는 levulinic acid의 생성이 주어진 촉매농도가 증가함에 따라 증가함을 보였다. 반응온도가 증가할수록 높은 농도의 촉매농도 조건에서는 levulinic acid의 생성이 감소되었다. 특히 촉매농도 3.75%까지는 반응온도가 높은 경우 levulinic acid의 생성량이 많고 촉매농도가 3.75% 이상인 경우에는 반응온도가 낮을수록 levulinic acid의 생성량을 많은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Fig. 1에서 설명한 것처럼 청각의 당이 탈수반응이 일으키는 과정에서 지나치게 분해됨으로써 humic acid로 전환되기 때문으로 판단된다 [1,20].

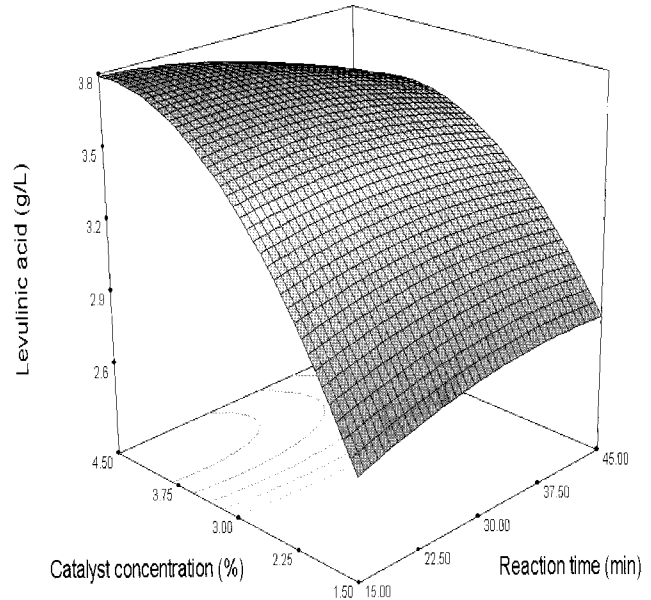


**Fig. 1.** Contour plots representing the effect of reaction temperature, reaction time, and the reciprocal interaction of these factors on the formation of levulinic acid at a constant catalyst concentration of 3.0% (w/v).



**Fig. 2.** Contour plots representing the effect of reaction temperature, catalyst amount, and the reciprocal interaction of these factors on the formation of levulinic acid at a constant reaction time of 30 min.

Fig. 3에서는 반응시간과 촉매농도 간의 상호 작용이 반응 온도 200°C에서 levulinic acid를 형성하는데 미치는 영향을 나타내었다. 반응시간 (15-45분)의 조건에서 촉매농도가 증가함에 따라 levulinic acid의 생성은 선형적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 각각의 촉매농도 (1.5-4.5%) 조건에 따른 반응시간의 증가는 levulinic acid의 생성이 감소하는 경향으로 나타났다. 높은 촉매농도와 긴 반응시간에서는 levulinic acid의 생성이 낮아졌다. 이는 과도한 촉매와 긴 반응시간에 의해 청각 중의 당이 HMF를 거쳐 levulinic acid로 전환된 후 반응이 더욱 진행되어 humic acid로 전환된 결과로 판단된다 [1,20].



**Fig. 3.** Contour plots representing the effect of reaction time, catalyst concentration and the reciprocal interaction of these factors on the formation of levulinic acid at a constant reaction temperature of 200°C.

반응표면분석법을 적용하여 실험한 범위 내에서 해양 바이오매스인 청각으로부터 levulinic acid의 생성을 위한 최적화 연구를 수행한 결과, 반응온도 160.7°C, 반응시간 39.1분, 촉매농도 3.9%의 조건에서 4.26 g/L의 levulinic acid가 생성되는 것으로 예측되었다. 우뭇가사리를 대상으로 황산촉매를 사용하여 levulinic acid를 생산하는 연구 [8]에서 반응온도 160°C, 촉매농도 3.0%, 반응시간 43.1분에서 9.74 g/L의 levulinic acid를 생산하였다고 보고하였다. 이는 청각을 사용한 본 연구 결과와 비교하면 높은 농도의 levulinic acid를 생산한 결과이다. 이러한 결과는 녹조류인 청각의 구성당 조성은 주로 arabinose, galactose, mannose로 구성 [13,17,18,23-26]되어 있는 반면, 홍조류인 우뭇가사리는 주요 구성당이 galactose와 1,3-anhydro-L-galactose로 구성되어 있으며, 이중 1,3-anhydro-L-galactose가 galactose 보다 쉽게 분해되어 5-HMF로 전환되고, 이 5-HMF가 levulinic acid로 전환된 결과로 판단된다 [8].

#### 4. 결론

본 연구의 결과는 해양 바이오매스 자원인 청각에 산촉매를 사용하여 여러 화학물질의 시작원료로 사용가능한 levulinic acid의 생산을 위해 실험계획법 중 반응표면분석법을 적용하여 반응조건을 최적화 하였다. 청각으로부터 levulinic acid의 생성을 위하여 산가수분해법과 반응표면분석법을 적용한 연구 결과, levulinic acid는 반응온도 160.7°C, 반응시간 39.1분, 그리고 촉매농도 3.9%에서 4.26 g/L가 생성되었다. 이러한 연구 결과는 해양 바이오매스인 해조류로부터 바이오연료와 화학물질들의 생산과정에 있어 기초적인 정보를 제공할 것이다.

## 감사

이 논문은 2009학년도 부경대학교의 지원을 받아 수행된 연구임 (PKS-2009-013).

## References

- Hayes, D. J., S. Fitzpatrick, M. H. B. Hayes, and J. R. H. Ross (2006) The biofine process - Production of levulinic acid, furfural, and formic acid from lignocellulosic feedstocks. pp. 139-164. In: B. Kamm, P. R. Gruber, M. Kamm (eds.). *Biorefineries - Industrial Processes and Products*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Faaij, A. P. C. (2008) Developments in international bioenergy markets and trade. *Biomass and Bioenergy* 32: 657-659.
- Demibras, A. (2007) Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy Combustion Science* 33: 1-18.
- Jeong, G. T., J. H. Park, S. H. Park, and D. H. Park (2009) Performance of pilot-scale biodiesel production system. *KSBB Journal* 24: 89-95.
- Lee, S. J., S. Go, G. T. Jeong, and S. K. Kim (2011) Oil production from five marine microalgae for the production of biodiesel. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16: 561-566.
- Han, J. G., S. H. Oh, W. Y. Choi, K. J. Woong, H. B. Seo, K. H. Jeong, D. H. Kang, and H. Y. Lee (2010) Enhancement of saccharification yield of *Ulva pertusa kjellman* for ethanol production through high temperature liquefaction process. *KSBB Journal* 25: 357-362.
- Lee, S. B., S. J. Cho, S. Y. Lee, K. H. Paek, J. A. Kim, and J. H. Chang (2009) Present status and prospects of marine chemical bioindustries. *KSBB Journal* 24: 495-507.
- Jeong, G. T. and D. H. Park (2010) Production of sugars and levulinic acid from marine biomass *Gelidium amansii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161: 41-52.
- Yeon, J. H., H. B. Seo, S. H. Oh, W. S. Choi, D. H. Kang, H. Y. Lee, and K. H. Jung (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB Journal* 25: 283-288.
- Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *KSBB Journal* 24: 483-488.
- Park, C. S. and C. H. Sohn (1992) Effects of light and temperature on morphogenesis of *Codium fragile* (Suringer) Harit in laboratory culture. *The Korean Journal of Phycology* 7: 213-223.
- Lee, J. B., Y. Ohta, K. Hayashi, and T. Hayashi (2010) Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydrate Research* 345: 1452-1454.
- Ciancia, M., I. Quintana, M. I. Vizcargüénaga, L. Kasulin, A. de Dios, J. M. Estevez, and A. S. Cerezo (2007) Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *International Journal of Biological Macromolecules* 41: 641-649.
- Rogers, D. J., K. M. Jurd, G. Blunden, S. Paoletti, and F. Zanetti (1990) Anticoagulant activity of a proteoglycan in extracts of *Codium fragile* ssp. atlanticum. *Journal of Applied Phycology* 2: 357-361.
- Ohta, Y., J. B. Lee, K. Hayashi, and T. Hayashi (2009) Isolation of sulfated galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32: 892-898.
- Cho, D. M., D. S. Kim, D. S. Lee, H. R. Kim, and J. H. Pyeun (1995) Trace components and functional saccharides in seaweed - Changes in proximate composition and trace elements according to the harvest season and places. *Bull. Korean Fish. Soc.* 28: 49-59.
- Love J. and E. Percival (1964) The polysaccharides of the green seaweed *Codium fragile*. Part II. The water-soluble sulphated polysaccharides. *J. Chem. Soc.* 3338-3345.
- Estevez, J. M., P. V. Fernández, L. Kasulin, P. Dupree, and M. Ciancia (2009) Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*. *Glycobiology* 19: 212-228.
- The Pacific Northwest National Laboratory (PNNL) and the National Renewable Energy Laboratory (NREL), Top value added chemicals from biomass, volume I - Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. [\(http://www.osti.gov/bridge\)](http://www.osti.gov/bridge).(2004).
- Cha, J. Y. and M. A. Hanna (2002) Levulinic acid production based on extrusion and pressurized batch reaction. *Industrial Crops and Products* 16: 109-118.
- Jeong, G. T., H. S. Yang, S. H. Park, and D. H. Park (2007) Optimization of biodiesel production from rapeseed oil using response surface methodology. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22: 222-227.
- Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker (2008) "Determination of structural carbohydrates and lignin" in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP), Technical Report NREL/TP-510-42618.
- Lee, I. B., K. Hayashi, M. Maeda, and T. Hayashi (2004) Antiherpetic activity of sulfated polysaccharide from green algae. *Planta Med.* 70: 813-817.
- Matsubara K., Y. Matsuura, A. Bacic, M. Liao, K. Hori, and K. Miyazawa (2001) Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green algae, *Codium cylindricum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28: 395-399.
- Bilan, M. I., E. V. Vinogradova, A. S. Shashkov, and A. I. Usov (2006) Isolation and preliminary characterization of a highly pyruvylated galactan from *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Bot. Mar.* 49: 259-262.
- Love, J., and E. Percival (1964) The polysaccharides of the green seaweed *Codium fragile*, Part III. A  $\beta$ -1,4 linked mannan. *J. Chem. Soc.* 3345-3350.