

반응표면분석법을 이용한 갈조류, 미역의 전처리 인자 영향 파악 및 젖산 생산성 검토

민창하*** · 이두근* · 엄병환** · 윤정준*,†

*한국생산기술연구원 지능형정정소재그룹
31056 충청남도 천안시 서북구 입장면 양대기로길 89
**국립한경대학교 화학공학과
17579 경기도 안성시 중앙로 327

(2018년 5월 9일 접수, 2018년 5월 30일 수정본 접수, 2018년 6월 4일 채택)

Validation of Factors Effect on Pretreatment of Brown Algae, *Undaria*, Using Response Surface Methodology and Prospect of Lactic Acid Production

Chang Ha Min***, Doo-Geun Lee*, Byung Hwan Um** and Jeong-Jun Yoon*,†

*Intelligent Sustainable Materials R&D Group, Korea Institute of Industrial Technology, 89, Yangdaegiro-gil, Ipjang-myeon,
Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, 31056, Korea

**Department of Chemical Engineering and Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University,
327, Jungang-ro, Anseong-si, Gyeonggi-do, 17579, Korea

(Received 9 May 2018; Received in revised form 30 May 2018; accepted 4 June 2018)

요 약

원유 가격의 상승과 지구온난화로 인하여 재생 가능한 바이오매스를 이용하여 산업적으로 중요한 화합물을 생산하는 연구가 주목받고 있다. 특히, 3세대 바이오매스인 해조류는 비식량 자원, 높은 생산 수율, 온실가스 저감 등 장점을 가지고 있기에 연구 되어야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 고체분석 방법을 이용하여 4종의 해조류 중에 미역이 가장 많은 당류를 함유하는 것을 확인하였다. 미역의 효과적인 전처리를 위해 반응표면분석법을 이용하였으며 이를 통해 고체의 부하 및 촉매의 농도 증가가 총 당의 추출률과 관계 있음을 확인하였다. 4종의 락토바실러스 균주에서 미역의 전처리물을 이용하여 젖산 생산 수행하였으며 *L. alimentarius*와 *L. brevis*가 해조류 이용한 젖산생산에 적합한 균주임을 확인하였다.

Abstract – Owing to rising oil prices and anthropogenic global warming, focused attempts are being made toward production of industrially important compounds by using renewable biomass. In this context, algal biomass as third-generation biomass is important because it doesn't compatible with food resource, has high yield, and helps abate greenhouse gases. Here, we investigate whether *Undaria* has the highest sugar content, which would make it the most suitable biomass for lactic acid production among the four algal biomasses tested. For effective pretreatment of *Undaria*, the response surface methodology was used. The amount of solid loaded and catalyst concentration were related to the extraction rate of total sugar. Lactic acid was produced by pretreatment of *Undaria* by using four *Lactobacilli*, and *L. alimentarius* and *L. brevis* were found to be suitable for lactic acid production.

Key words: Macroalgae, Lactic acid, Pretreatment, Lactobacillus, Response surface methodology

1. 서 론

세계적으로 원유 가격의 상승과 지구온난화에 따른 문제들이 대두되는 상황에서 환경 친화적이고 재생 가능한 바이오매스의 이용

이 주목 받고 있다. 특히, 3세대 바이오매스인 해조류(Algae)는 1세대 바이오매스(곡물류)에 비해 경작지 잠식으로 인한 식량생산 감소 및 식량 수급 불균형 문제를 야기하지 않으며, 2세대 바이오매스와 비교하여 빠른 성장성 및 단위면적 당 생산 수율이 높다[1]. 또한 성장에 필요한 탄소배출이 낮아 기후변화의 원인이 되는 온실가스(Green gas)의 감축에도 효과가 있는 장점이 있다[2]. 또한 해조류 바이오매스는 일반적으로 섬유질과 다양한 당류를 포함하고 있어 화합물 생산에 유리하다. 과거 해조류는 주로 식량, 비료, 하이

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jjyoon@kitech.re.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

드로콜로이드(hydrocolloid)의 원료로만 이용되어 왔지만 현재는 바이오연료(Biofuel) 및 화합물의 합성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다[3]. 연구에서 사용한 미역(*Undaria.sp*)은 한국의 남해에서 양식한 미역으로, 연간 약 300만 톤의 해조류 생산 중 26%를 차지한다[4]. 이는 에너지 및 화합물의 합성에 있어 해조류의 지속적인 생산 및 공급의 가능성을 시사하고 있다. 본 연구에서는 화합물 및 에너지 합성의 대체자원으로서 미역의 이용 가능성에 대하여 조사하였다.

젖산(Lactic acid)은 일반적으로 식품 보존제, 산미제 등의 식품 첨가제로 사용될 뿐만 아니라 화장품, 섬유, 제약 등 산업적으로 광범위하게 이용되는 중요한 유기산(Organic acid)이다. 특히 최근 들어 유가상승과 석유 유래 플라스틱의 부패하지 않는 특성으로 인해 유발되는 환경오염문제 때문에 환경친화적인 대체 고분자 물질에 대한 관심이 증가되어 생분해성 플라스틱의 일종인 폴리젖산(Polylactic acid)의 원료로 사용되는 젖산에 대한 수요가 크게 증가하는 추세이다[5]. 세계적으로 젖산시장의 규모는 연간 5%의 성장을 하고 있으며, 폴리젖산의 수요가 점진적으로 증가하고 있음을 감안할 때 향후 수 년 이내에 젖산의 수요는 더욱 증가할 것으로 예상된다. 젖산은 하이드록시기와 카르복실기를 가지고 있어 반응성이 큰 유기산으로서, 폴리젖산 뿐만 아니라 폴리프로필렌 글리콜(Polypropylene glycol), 아크릴산(Acrylic acid) 등의 화합물을 생산하는 중요한 원료 물질로도 사용된다[6]. 이와 같이 젖산은 산업적으로 유용성이 매우 큰 물질이며, 젖산을 생산하는 방법으로는 전통적인 화학합성법과 생물학적 생합성방법이 있다. 전자의 경우 D형과 L형 젖산이 50 : 50으로 혼합된 라세믹 혼합물 형태로 생성되어 조성비의 조절이 불가능하다. 폴리젖산은 L형 젖산과 D형 젖산의 혼합으로 생겨나는데 물성이 D형과 L형 젖산의 비율에 따라서 결정된다. 그래서 조성비의 조절이 불가능한 화학합성 젖산은 폴리젖산의 생산에 적합하지 않아 D형 또는 L형의 젖산을 선택적으로 생산할 수 있는 생물적 합성방법을 이용한다[7].

Lactobacillus 균주는 주산물로 젖산을 생산하는 미생물이며 유해균의 생장을 억제하는 효과가 높기 때문에 발효식품과 유산균 제재, 의약품으로 널리 사용되고 있다. 특히, *Lactobacillus* 균주는 6탄당 사용 대사 경로인 엠텐-마이어로프 경로(Embden-Meyerhof pathway) 뿐만 아니라 5탄당 사용 경로인 포스포-케톨레이즈 경로(Phospho-ketolase-pathway)를 가지고 있어 다양한 당류로 구성된 해조류 이용 대해 강점을 가지며 젖산 생산이 우수해 본 연구의 목적에 적합하다[8].

본 연구에서는 *Lactobacillus* 균주에서 주 탄소원으로써 해조류 전처리물을 이용하여 젖산을 생산하였다. 고체분석을 이용하여 4종의 해조류 중 가장 당함유량이 높은 젖산 생산에 적합한 해조류를 선정하였다. 해조류의 효과적인 전처리를 위해 반응표면분석법을 이용하여 최적 조건을 조사하였으며 4종의 *Lactobacillus* 균주를

통해 해조류 전처리물과 혼합당에서 젖산생산을 하여 젖산생산의 기질로의 가능성을 확인하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2-1. 해조류의 고체분석

해조류의 당 함량 분석은 National Renewable Energy Laboratory (NREL)의 탄화수소 분석방법을 참고하여 진행하였다[9]. 해조류는 미역(*Undaria sp.*, 완도, 한국) 우뚝가사리(*Gelidium sp.*, 제주, 한국), 김(*Porphyra sp.*, 완도, 한국), 파래(*Ulva sp.*, 제주, 한국) 등 4종류의 해조류를 분석하였다. 해조류는 각각 20 mesh 이하로 분쇄하였으며, 분쇄한 해조류는 각각 50 °C에서 하루 동안 건조한 후 0.3 g (오차 범위 ± 0.001 g)을 정밀저울에 재어 사용하였다. 준비된 해조류와 72% (wt/wt) 황산용액 3 ml를 시험관에 넣고 30 °C에서 60 분 동안 항온수조에서 반응하였으며, 15 분 간격을 두고 유리막대로 저어주었다. 반응이 끝난 해조류를 황산용액의 농도가 4% (wt/wt)가 되도록 증류수를 첨가한 후 밀폐된 비중병에서 121 °C, 60 분 동안 반응 후 종이필터를 이용하여 고상과 액상을 분리하였다. 액상은 0.45 μ m의 실린지 필터를 이용하여 거른 후 이동상 0.005 M의 황산용액, 컬럼 온도 60 °C, 유속 0.6 mL/min에서 50 분 동안 HPX87-H Column 300 \times 7.8 mm(BIO-RAD, 미국) 및 RID detector가 장착된 HPLC (Agilent 1200, Agilent, 미국)을 사용하여 분석하였다.

2-2. 반응표면분석법을 이용한 산 전처리 최적화

미역의 산 전처리를 통한 당류의 회수를 최적화 하기 위하여 반응표면분석법(Response surface methodology, RSM)을 사용하였다. 반응표면분석을 위한 실험 설계는 중심합성설계법(central composition design, CCD)을 적용하였다. 실험 인자는 촉매의 농도(Catalyst concentration) 0.25~1.25% (wt/wt), 반응시간(Reaction time) 15~75분, 고체의 비율(Slurry) 2.5~12.5%, 반응온도(Reaction temperature) 120~200 °C로 총 4가지 인자를 변수로 설정하여 실험을 진행하였다(Table 1). 반응표면분석을 위한 실험 계획은 Design Expert Software Version 11(Stat-Ease, 미국)의 반응표면분석법에 Table 1에서 설정한 인자를 적용하여 실험계획을 하였다(Table 2). 랜덤화 된 각 실험은 독립적으로 이루어 졌으며, 2회 반복하여 평균을 내었다.

실험 재료로 사용한 미역은 세척 후 건조된 것을 이용하였으며, 분쇄한 후 체(10-40 mesh)에 걸러 밀봉용기에 저장한 후 분획하여 사용하였다. 시료는 상대습도(Relative humidity) 30% 온도 25 °C의 환경에 저장하여 수분함량(Moisture content : MC) 5% 미만이 되도록 유지하였다. 시료의 수분 함량은 수분함량 측정기(MA-150, Sartorius AG, 독일)를 이용하여 반응 직전에 측정하였다. 반응에 이용한 산 촉매는 96% (wt/wt) 황산을 이용하였으며, 촉매의 농도 0.25~1.25% (wt/wt)가 되도록 증류수에 당량의 황산을 첨가하였다.

Table 1. Experiment variables of levels and coded value

Variables	Symbol	Coded value levels				
		-2	-1	0	1	2
Catalyst concentration (wt%)	A	0.25	0.5	0.75	1	1.25
Slurry (wt%)	B	2.5	2	7.5	10	12.5
Reaction temperature (°C)	C	120	140	160	180	200
Reaction time (min)	D	15	30	45	60	75

Table 2. Independent variables and responses of 4-factor 5-level central composite design

Std	Run	Independent variables				Response	
		Catalyst concentration (wt%), A	Slurry (wt%), B	Reaction temperature (°C), C	Reaction time (min), D	Total sugar (g/L)	Sugar recovery (%)
1	8	0.5	5	140	30	1.71	32.68
2	22	1	5	140	30	1.31	24.93
3	16	0.5	10	140	30	1.77	16.91
4	27	1	10	140	30	1.24	11.88
5	26	0.5	5	180	30	1.28	24.38
6	28	1	5	180	30	2.11	40.35
7	13	0.5	10	180	30	2.10	20.01
8	4	1	10	180	30	2.62	25.03
9	17	0.5	5	140	60	1.16	22.19
10	9	1	5	140	60	1.16	22.10
11	25	0.5	10	140	60	0.74	7.05
12	19	1	10	140	60	0.18	1.74
13	7	0.5	5	180	60	0.72	13.80
14	30	1	5	180	60	1.79	34.10
15	6	0.5	10	180	60	1.11	10.63
16	12	1	10	180	60	1.63	15.53
17	5	0.25	7.5	160	45	1.66	21.17
18	15	1.25	7.5	160	45	2.43	30.88
19	20	0.75	2.5	160	45	0.52	19.68
20	18	0.75	12.5	160	45	3.00	22.88
21	1	0.75	7.5	120	45	0.17	2.19
22	21	0.75	7.5	200	45	0.37	4.67
23	29	0.75	7.5	160	15	0.16	2.06
24	14	0.75	7.5	160	75	2.53	32.18
25	23	0.75	7.5	160	45	1.64	20.83
26	11	0.75	7.5	160	45	1.59	20.18
27	2	0.75	7.5	160	45	1.75	22.22
28	3	0.75	7.5	160	45	1.73	21.95
29	24	0.75	7.5	160	45	1.66	21.09
30	10	0.75	7.5	160	45	1.73	21.97

30 ml 스테인리스 반응기에 제조한 용액을 20 ml를 넣고, 실험 계획에 따라서 용액의 질량에 대하여 미역을 2.5~12.5% 첨가하였다. 준비된 반응기는 120~200 °C로 온도를 설정하여 PID 온도제어센서가 장착된 오일배스(Oil bath)에서 1시간 안정화 후 실험계획에 따라 30~75분 동안 반응을 진행하였다. 반응액상의 총 당 함량을 측정하기 위하여 액상과 고상을 종이 필터를 이용하여 분리한 후 72% (wt/wt) 황산을 전처리 용액의 황산 농도가 4% (wt/wt) 되도록 첨가하였다. 황산이 첨가된 전처리 용액은 고압멸균기에 121 °C 60분 동안 반응하였다. 반응물은 0.45 µm의 실린지 필터를 이용하여 거른 후 이동상 0.005 M의 황산용액, 컬럼 온도 60 °C, 유속 0.6 mL/min에서 50분 동안 HPX-87H Column 300 × 7.8 mm (BIO-RAD, 미국), RI detector가 장착된 HPLC (Agilent 1200, Agilent, 미국)을 사용하여 분석하였다.

반응표면분석은 4가지 인자에 대하여 반응 후 추출된 총 당 함량 (Total sugar concentration), 당 회수율 (Sugar recovery)을 출력하였다. 모델의 정확성을 높이기 위하여 다양한 회귀분석을 통해 각 인자가 모델에 미치는 영향을 고려하여 소거하였다. 모델의 정확성은 분산 분석 (Analysis of variance, ANOVA)을 통하여 평가하였다 (Table 3). 각각의 독립변수들이 추출 당의 농도와 당 회수율에 미치는 영향은 아래에 나타낸 이차 다항 방정식의 일반형으로 표현하

였다(1). Y는 모델의 출력 값인 추출 당의 농도와 당 회수율, x_i , x_j 는 암호화된 인자, β_0 는 출력 Y의 상관계수, β_i 는 변수에 대한 선형 상관계수, β_{ij} 는 두 변수에 대한 교호작용을 가지는 상관계수, β_{ii} 는 변수에 대한 이차 상관계수를 의미한다.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{ij=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{ii=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \quad (1)$$

2-3. 산 전처리 배양액의 제조

산 전처리 최적화에 사용된 미역을 시료로 사용하였으며, 증류수에 황산의 농도가 1% (wt/wt)가 되도록 당량을 첨가하여 용액을 제조하였다. 2 L 유리병에 제조한 1 L의 용액을 첨가하고, 용액에 대하여 미역을 5% (wt/wt)로 첨가하고 고압멸균기에 121 °C 60분 동안 반응하였다. 중화한 배양액을 농축하기 위하여 회전농축증발기를 이용하여 항온조의 온도 60 °C, 감압 펌프의 압력을 50 MPa로 설정하고 농축하였다. 농축한 미역의 전처리물은 10N NaOH를 이용하여 pH 6으로 중화하였다.

2-4. 미생물

본 연구에 사용된 균주는 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 구입하였으며 *L. alimentarius* KCTC 3593, *L. brevis* KCTC

3102, *L. plantarum* KCTC 3108, *L. fermentum* KCTC 5049를 사용하였다. 균주는 25% 글리세롤(Glycerol) 용액에서 -80 °C에서 보관되었다. 보관된 균주는 30 °C 혹은 37 °C MRS Agar 플레이트에서 전 배양(Pre-cultivation)되었다.

2-5. 배양배지

본 연구에서 전 배양과 본 배양을 위해 *Lactobacilli* MRS medium (MRS)을 사용하였다. MRS 배지의 조성은 10 g/L의 펩톤(Peptide) 10 g/L의 육류 추출물(Meat extract), 5 g/L의 효모 추출물(Yeast extract), 20 g/L의 글루코스(Glucose), 2 g/L의 인산일수소칼륨(di-Potassium hydrogen phosphate), 1 g/L의 Tween® 80, 2 g/L의 시트르산수소암모늄(di-Ammonium hydrogen citrate), 5 g/L의 아세트산 나트륨(Sodium acetate), 0.2 g/L의 황산 마그네슘(Magnesium sulfate), 0.04 g/L의 황산 망간(Manganese sulfate) 이다. 액체배지는 121 °C에서 15분 동안 고압 멸균되었다. 배양(Cultivation)은 20 ml의 MRS 배지가 함유된 50 ml의 플라스크(Flask)에서 수행하였다. 균주를 10% (v/v)로 접종한 플라스크는 30 °C 혹은 37 °C, 200 rpm에서 배양되었다[10].

3. 결과 및 고찰

3-1. 해조류의 고체분석

Lactobacillus 균주가 이용할 수 있는 해조류의 당 조성을 파악하기 위하여 고체 분석을 진행하였으며 결과는 Table 3에 나타내었다. 적조류에 속하는 우뚝가사리와 김은 총 당 함량이 각각 32.12, 35.98%로, 6탄당인 글루코스와 갈락토스의 비중은 0.01~0.02%로 매우 적은 함량을 가졌다. 5탄당인 아라비노스는 우뚝가사리, 김 각각 21.80, 35.16%로 조사 되었으며, 플럭토스는 각각 10.29, 0.79%를 함유하였다. 녹조류인 파래는 4가지 해조류 중 가장 당 함량이 높게 나타났으며, 59.37%의 당류 중 29.40%는 아라비노스, 29.94%는 플럭토스로 조사되었다. 하지만 적조류와 마찬가지로 0.01~0.02%의 낮은 글루코스 및 갈락토스 함량을 보였다. 갈조류에 속하는 미역은 총 10.47%의 당 함량 중 플럭토스 4.80%로 가장 큰 비중을 차지하였으며, 글루코스 3.59%, 갈락토스 1.09%로 다른 해조류에 비하여 상대적으로 높은 글루코스 및 갈락토스 함량을 가졌다. *Lactobacillus* 균주를 포함한 대부분의 미생물은 생장에 있어 글루코스를 이용한다. 갈락토스, 플럭토스 및 기타 5탄당을 이용하는 경

Table 3. Sugar composition of macro-algae

Biomass	Glucose (%) ^a	Galactose (%) ^a	Arabinose (%) ^a	Fructose (%) ^a	Total sugar (%) ^b
Undaria	34.29	10.41	9.46	45.85	10.47
Gelidium	0.03	0.06	67.87	32.03	32.12
Porphyra	0.05	0.03	97.72	2.19	35.98
Ulva	0.03	0.02	49.52	50.43	59.37

^aRatio of sugar in total sugar (Sugar/Total sugar*100)

^bPercentage of total sugar in biomass

Table 4. ANOVA for reduced quadratic model of extracted total sugar

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-value	p-value
Model	7.06	6	1.18	3.10	0.0225
A	0.3679	1	0.3679	0.9687	0.3353
B	1.09	1	1.09	2.88	0.1033
C	0.8340	1	0.8340	2.20	0.1519
D	0.0353	1	0.0353	0.0930	0.7632
AC	1.23	1	1.23	3.24	0.0852
C ²	3.50	1	3.50	9.23	0.0059
Residual	8.73	23	0.3798		
Lack of Fit	8.72	18	0.4842	122.37	< 0.0001
Pure Error	0.0198	5	0.0040		
Cor Total	15.80	29			

Table 5. ANOVA for reduced quadratic model of sugar recovery

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-value	p-value
Model	1360.42	6	226.74	3.80	0.0089
A	93.70	1	93.70	1.57	0.2229
B	411.30	1	411.30	6.89	0.0151
C	101.24	1	101.24	1.70	0.2057
D	3.23	1	3.23	0.0541	0.8181
AC	258.82	1	258.82	4.34	0.0486
C ²	492.13	1	492.13	8.24	0.0086
Residual	1373.09	23	59.70		
Lack of Fit	1369.89	18	76.10	118.84	< 0.0001
Pure Error	3.20	5	0.6404		
Cor Total	2733.51	29			

있다[11]. 본 실험에서 재료로 사용된 미역은 기타 해조류보다 글루코스 함량이 가장 높기에 젓산 생산의 기질로 선정되었다.

3-2. 반응표면분석법(RSM)을 이용한 산 전처리 최적화

ANOVA (Analysis of Variance)의 결과는 설계 모델의 적합성을 보여준다. Table 4, Table 5는 각각 추출된 당 농도 및 당 회수율의 ANOVA 결과로, 모델의 p-value는 각각 0.0225, 0.0089로 0.05보다 낮은 값을 가져 모델이 적합함을 보여주었다. 모델을 설계함에 있어 주효과 인자는 소거하지 않았고, 인자의 교호작용 효과 및 이차항은 모델의 정확성을 위하여 소거하였다. 실험 설계에 있어 주효과라 고려된 인자 중 반응 시간은 p-value가 0.8181로 매우 높게 나타나, 설계된 모델에 대하여 다른 인자에 비해 상대적으로 중요도가 떨어지는 것을 확인하였다. 반응표면분석을 이용한 모델식은 Table 4에서 암호화된 인자들로 구성되었고, 아래와 같이 설계되었다[2,3].

$$\text{Total sugar concentration (g/L)} = 1.73 + 0.1238A + 0.2134B + 0.1864C - 0.0384D + 0.2771AC - 0.3488C^2 \quad (2)$$

$$\text{Sugar recovery (\%)} = -153.987 - 120.799A - 1.655B + 2.806C - 0.024D + 0.8041AC - 0.0103C^2 \quad (3)$$

Fig. 1은 RSM의 출력인 추출된 총 당 농도와 당의 회수율에 대한 잔차를 보여준다. 외부 스튜던트화 잔차(externally studentized residuals)는 정규확률 대각선에 대하여 일정한 근사 값을 보인다. 이는 설계된 실험의 모델이 충분히 정규확률분포를 따른다는 것을 의미한다[12].

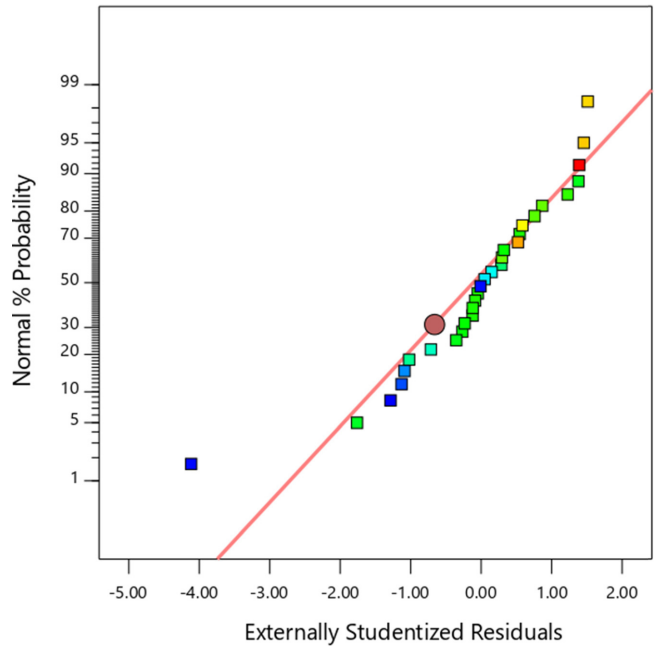


Fig. 1. Normal plot of residual for responses.

Fig. 2와 Fig. 3은 각각 총 당 농도 및 당 회수율에 대하여 각 인자가 미치는 영향을 보여준다. Fig. 2(a)는 총 당 농도에 대하여 반응 고체의 비율 및 촉매 농도의 영향을 나타냈다. 총 추출된 당의 농도는 고체의 함량 및 촉매의 농도가 증가함에 따라 증가하는 추세를 보

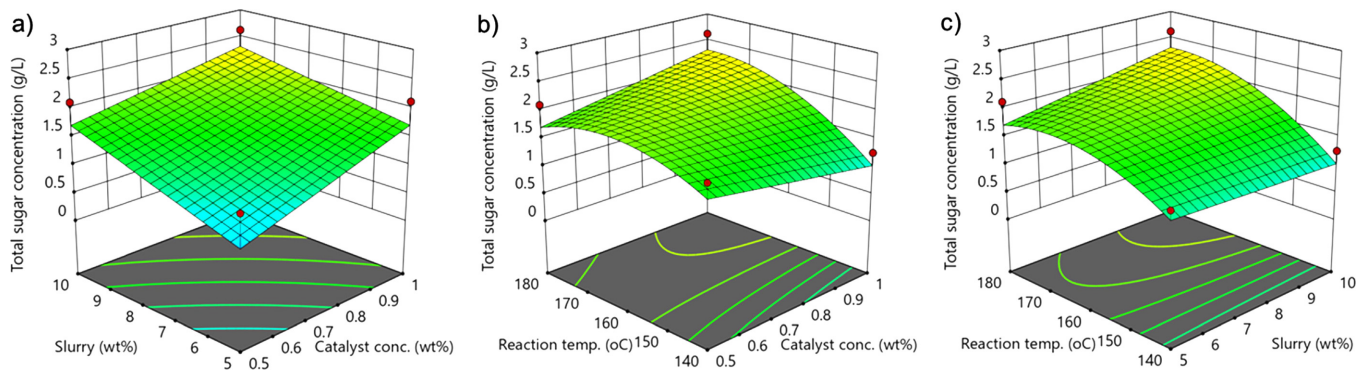


Fig. 2. 3D-plot, factors effect on total sugar concentration (g/L) : (a) slurry (%) and catalyst concentration (%), (b) reaction temperature (°C) and catalyst concentration (%), (c) reaction temperature (°C) and slurry (%).

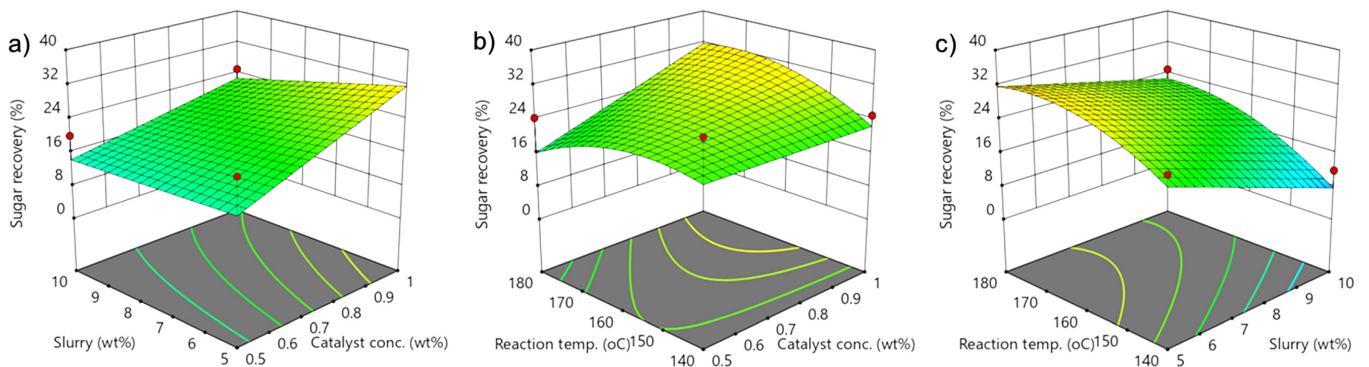


Fig. 3. 3D-plot, factors effect on sugar recovery (%) : (a) slurry (%) and catalyst concentration (%), (b) reaction temperature (°C) and catalyst concentration (%), (c) reaction temperature (°C) and slurry (%).

선형적인 증가관계를 보였다. Fig. 3(a)에서 당 회수율은 총 당 농도에 미치는 영향과 마찬가지로, 촉매의 농도 및 고체의 부하가 증가함에 따라 증가하지만, 촉매농도와 고체 부하의 관계를 보면, 고체 부하가 낮을수록 당 회수율이 더 높은 결과를 나타냈다. 이는 반응기 내 높은 고체 함량이 촉매와 해조류가 반응함에 있어 반응 선택도를 낮춰, 저해요소로 작용함을 보여준다[13,14].

Fig. 2(b)는 추출된 총 당 농도에 대하여 반응온도 및 촉매 농도의 영향을 나타냈다. 총 당 농도는 반응 온도가 낮을 경우에는 촉매의 영향의 거의 없거나, 촉매의 농도가 높을수록 더 낮은 결과를 보여 준다. 하지만 반응온도가 증가함에 따라 촉매의 효과가 커지며, 이에 따라 총 당의 농도가 높아짐을 알 수 있다. Fig. 3(b)의 당 회수율도 마찬가지로, 낮은 반응온도에서 촉매 농도의 증가 효과는 미미하지만, 반응 온도가 높아질수록 촉매의 농도에 따라서 회수율 또한 높아지는 경향을 보였다. 반면에, 촉매 농도가 낮을 경우 반응온도 170~180 °C에서 추출당 농도 및 회수율 모두 감소하는 경향을 보인다. 이는 본 연구에서는 다루지 않았지만, 글루코스 및 기타 당류들이 Formic acid 및 5-HMF, Furfural 등으로 과분해가 이루어지기 때문이다[15,16].

Fig. 2(c)는 반응온도와 고체의 비율이 당 추출에 미치는 영향을 보여준다. 총 추출 당 농도는 고체 부하에 관계 없이 온도에 따라 증가하는 양상을 보인다. 하지만 Fig. 3(c)에서 높은 당 회수율을 가짐에도 불구하고 낮은 고체 부하에서는 낮은 추출 농도를 보이는데, 이는 추출 될 수 있는 절대적인 양이 작기 때문이다. 앞서 서술한 바와 같이 고체의 부하가 낮을수록 당 회수율이 증가하며, 반응온도가 증가함에 따라 회수율이 증가하는 양상을 보였다[17].

3-3. *Lactobacillus* 균주의 미역 전처리물에서의 젖산 생산

본 연구는 해조류 전처리물을 젖산 생산의 기질로 이용하기 위하여, 6탄당 사용 경로인 Embden-Meyerhof pathway (EMP-P) 뿐만 아니라 5탄당 사용 경로인 Phospho-ketolase-pathway (PK-P)를 이용하는 비균질적 발효특성을 가진 젖산 생산 균주를 선별하여 실험을 진행하였다[18].

Fig. 4는 미역 전처리물의 배양액과 같은 글루코스 및 기타 혼합

당을 조성의 복합배지에서 *Lactobacillus* 균주를 배양한 결과이다. 농축된 전처리물의 총 당 농도는 약 6 g/L로, 세부적으로 3.2 g/L의 글루코스, 1.8 g/L의 갈락토스, 0.6 g/L의 아라비노스로 구성되었으며, 성장 저해요소인 Formic acid, 5-HMF 및 Furfural은 각각 약 0.05 g/L 함유되었다. 낮은 농도의 저해요소는 *Lactobacillus* 균주의 생장에 영향이 없다 보고 되어 있어 혼합배지에 첨가하지 않았다[19]. *L. alimentarius* 및 *L. brevis*는 배양 시작 후 8시간 이내에 모든 당원을 소모하였으며, 각각 4.56, 4.77 g/L의 젖산을 생산하였다. 당원에서 젖산으로의 물 질량 수율은 각각 1.46, 1.55으로 이론적 전환률에 대하여 73, 77%를 보였다. *L. plantarum*은 배양 시작 14시간 후에 모든 당원을 소모하였고 최종적으로 2.50 g/L의 젖산을 생산하였다. 이 때 젖산으로의 물 질량 수율은 0.78이며, 이론적 전환률에 대하여 38.5%를 생산하였다(Table 6). 본 연구에서 다루어 지지 않았지만, *L. plantarum*은 당을 젖산으로의 생산 이외에 아세트산(Acetic acid) 및 에탄올(Ethanol)을 합성하는데 이용했다고 고려된다[20]. *L. fermentum*은 혼합당 기반의 복합배지에서 젖산을 생산하지 않았다. 젖산은 1차 대사산물이기 때문에 *L. fermentum*의 생장이 이루어지지 않았다 할 수 있다[21].

Fig. 5는 미역 전처리물을 탄소원으로 이용하여 *Lactobacillus* 균주를 배양한 결과이다. *L. alimentarius* 및 *L. brevis*는 각각 3.70, 3.40 g/L의 젖산을 생산하였다. 당원에서 젖산으로의 물 질량 수율은 각각 1.37, 1.25으로 이론적 전환수율에 대하여 68.5, 62.5%로 혼합배지에서 보다 낮은 수율을 보였다. 또한 젖산의 생산성 또한 상대적으로 낮게 나타나는 것이 확인되었다(Table 6). *L. plantarum*은 혼합 탄소원 환경에서는 젖산을 생산하였지만, 전처리물을 탄소원으로 이용할 시에는 젖산을 생산하지 못했다. 이는, 위에 서술한 바와 같이 전처리물에서 *L. plantarum*의 생장이 이루어지지 않았음을 의미한다. *L. fermentum*은 혼합배지 환경에서 생장을 못했음에도 불구하고 전처리물에서는 낮지만 젖산을 생산하는 결과를 보였다. *L. fermentum*의 생장에 있어 전처리물의 영향은 추가적인 연구가 필요하다. 실험 결과에서 관찰되는 낮은 생산성과 수율은 가혹한 환경의 전처리 과정에서, 균의 생장에 있어 저해 요인으로 작용하는 5-HMF 및 Furfural과 같은 물질이 발생하기 때문이다. 또한 농축과

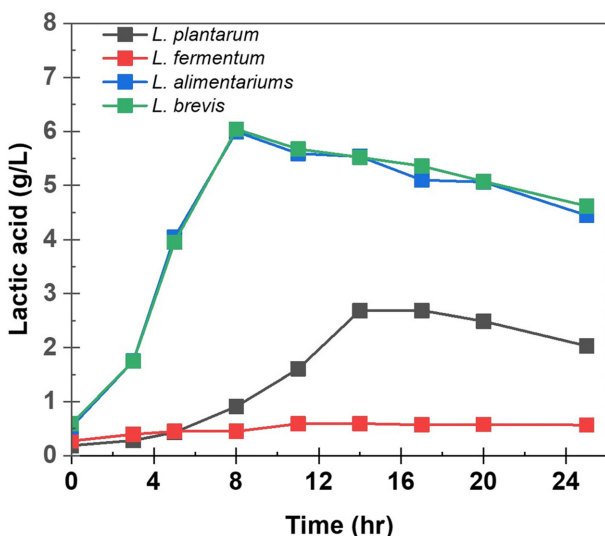


Fig. 4. Lactic acid production of *Lactobacillus* strain in complex sugar media.

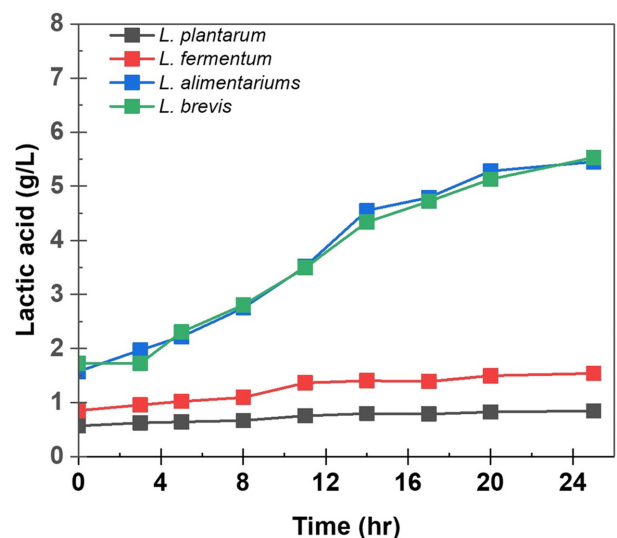


Fig. 5. Lactic acid production of *Lactobacillus* strain in *Undaria* hydrolysate.

Table 6. Comparison of different culture condition and inoculum in lactic acid production

Culture condition	Inoculum	Initial sugar (g/L)	Sugar consumption (g/L)	Yield (mol/mol)	Productivity (g/L/h)
Complex media	<i>L.alimentarius</i>	6.17	6.14	1.47	0.81
	<i>L.brevis</i>	6.08	6.04	1.55	0.79
	<i>L.plantarum</i>	6.34	6.34	0.78	0.19
	<i>L.fermentum</i>	6.34	1.06	0.09	0.09
<i>Undaria</i> hydrolysate	<i>L.alimentarius</i>	5.34	3.15	1.37	0.66
	<i>L.brevis</i>	5.25	3.23	1.29	0.57
	<i>L.plantarum</i>	5.98	0.38	0.07	0.08
	<i>L.fermentum</i>	5.37	1.39	0.24	0.20

정 및 중화과정에서 사용된 높은 농도의 염은 미생물의 생장에 삼투 저해를 일으켜 생장을 방해하기 때문에 생산성 감소 요인이 될 수 있다[22].

4. 결 론

본 연구에서는 지속적으로 이용 가능한 자원인 미역을 이용하여 젖산을 생산하기 위해, 반응표면분석을 통하여 미역의 전처리 조건에 미치는 영향에 대하여 고찰하였고, 전처리물에서 여러 젖산 생산균의 생산성을 검토하였다.

미역으로부터의 당 추출은 촉매의 농도, 반응온도, 반응시간 및 고체의 부하의 영향을 파악하였다. 고체의 부하 및 촉매의 농도 증가는 선형적인 증가관계를 보였다. 또한 반응온도가 증가함에 따라 촉매의 효과가 커지며, 이에 따라 총 당의 추출율의 증가가 확인되었다. 하지만 반응기 내의 너무 높은 고체 부하는 투입된 재료에 대하여 당 회수율을 떨어뜨리는 것으로 확인되었다. 또한 30에서 60 분 이내의 반응 시간은 당의 추출에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

미역 전처리 물로부터의 젖산 생산은 비균질적 발효특성을 가진 젖산 생산 균주인 *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. alimentarius* 및 *L. brevis*의 생산성 대하여 조사하였다. *Lactobacillus* sp.의 전처리 물과 혼합배지 조성에서의 배양결과 *L. alimentarius* 및 *L. brevis*는 다른 균주와 비교하여 상대적으로 높은 젖산 생산성을 보여주었고, 이론적 수율에 대하여 각각 혼합배지에서 73, 77%, 전처리물에서 68.5, 62.5%로 조사되었다.

바이오 기반의 젖산은 L-젖산 혹은 D-젖산의 선택도가 높아 바이오폴리머인 폴리하이드록시알카네이트(Polyhydroxyalkanoate, PHA) 및 평판 디스플레이 산업에서의 점착제로 쓰이는 아크릴산(Acrylic acid) 등의 합성 화학 산업에 있어서 수요가 높은 바이오 기반 물질로의 전환에 용이하게 이용 될 수 있기 때문에, 미역과 같이 지속 가능한 자원을 이용한 바이오 기반의 젖산의 생산에 관한 연구는 산업적으로 큰 의의가 있다.

감 사

본 논문은 한국생산기술연구원 기관주요사업 “2018년 이산화탄소/오탄당 유래 산업소재 생산기술개발 (KITECH EO-18-0003)”의 지원으로 수행한 연구입니다.

References

1. Kifayat Ullah, Mushtaq Ahmad, Sofia, Vinod Kumar Sharma,

- Pengmei Lu, Adam Harvey, Muhammad Zafar, Shazia Sultana, C. N. Anyanwu., Algal biomass as a global source of transport fuels: Overview and development perspectives, *PNSC International.*, **24**, 329-339(2014).
2. Cho, J.-H. and Lee, H.-S., A Preliminary Study for Environmentally-friendly Application of Biofuel using Marine Biomass, KEI Working paper (korea environment institute) (2011).
3. John J. Milledge, Birthe V. Nielsen, David Bailey., High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology.*, **15**, 67-88(2016).
4. Ali A. El Gamal, Biological importance of marine algae, *SPJ.*, **18**, Issue 1, 1-25(2010).
5. Intan, S. M. A. Tawakkal, Marlene J. Cran, Joseph Miltz, and Stephen W. Bigger, A Review of Poly(Lactic Acid)-Based Materials for Antimicrobial Packaging, *JFS.*, Vol. 79(2014).
6. Berłowska, J., Binczarski, M., Dudkiewicz, M., Kalinowska, H., Witonska, I. A. and Stanishevsky, A. V., “Recent Advancements in Lactic Acid Production - A Review,” *RSC Advances.*, **5**, 2299 (2015).
7. Saara Inkinen, Minna Hakkarainen, Ann-Christine Albertsson, and Anders Sodergar., From Lactic Acid to Poly(lactic acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors, *Bio-macromolecules.*, **12**, 523-532(2011).
8. Parvaneh Jafare, and Maryam Tajabadi, Ebrahimi, *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application, *AJMR.*, **5**(24), 4033-4042(2011).
9. Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D. and Crocker, D., “Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass,” *LAP.*, 1617(2008).
10. Hujanen, M., Linko, S., Linko, Y.-Y. and Leisola, M., “Optimisation of Media and Cultivation Conditions for L(+)(S)-lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei* NRRL B-441,” *AMB.*, **56**, 126-130(2001).
11. Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K., “Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits,” *JB.*, **156**(4), 286-301(2011).
12. Tedesco, S., Marrero Barroso, T. and Olabi, A. G., “Optimization of Mechanical Pre-treatment of Laminariaceae spp. Biomass-derived Biogas,” *RE.*, **42**, 527-534(2014).
13. Jang, S.-S., “Yoshihito Shirai, Motoharu Uchida and Minato Wakisaka, Production of Mono Sugar from Acid Hydrolysis of Seaweed,” *AJB.*, **11**(8), 1953-1963(2012).
14. Kim, J. S., “Production of Levulinic Acid from *Gelidium amansii* Using Two Step Acid Hydrolysis,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**(4), 438-442(2013).

15. Jönsson, L. J. and Martín, C., "Pretreatment of Lignocellulose: Formation of Inhibitory by-products and Strategies for Minimizing Their Effects," *BITE.*, **199**, 103-112(2016).
16. Kim, S. B., Lee, J. H., Yang, X., Lee, J. and Kim, S. W., "Furfural Production from Hydrolysate of Barley Straw After Dilute Sulfuric Acid Pretreatment," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(11), 2280-2284(2015).
17. Jeong, G.-T. and Park, D.-H., "Production of Levulinic Acid from Marine Algae *Codium fragile* Using Acid-Hydrolysis and Response Surface Methodology," *KBB.*, 341-346(2011).
18. Edwin, C. van der Pol, Evelien Vaessen, Ruud A. Weusthuis, Gerrit Eggink., Identifying inhibitory effects of lignocellulosic by-products on growth of lactic acid producing micro-organisms using a rapid small-scale screening method," *Bioresource Technology.*, 297-304(2016).
19. Axelsson, L., Ahmé, S., Lactic Acid Bacteria. in: Applied Microbial Systematics, (Eds.) F.G. Priest, M. Goodfellow, Springer Netherlands. Dordrecht, 367-388(2000).
20. Gänzle, M. G., "Lactic Metabolism Revisited: Metabolism of Lactic Acid Bacteria in Food Fermentations and Food Spoilage," *COFS.*, **2**, 106-117(2015).
21. Smetanková, J., Hladíková, Z., Valach, F., Zimanová, M., Kohajdová, Z., Greif, G. and Greifová, M., "Influence of Aerobic and Anaerobic Conditions on the Growth and Metabolism of Selected Strains of *Lactobacillus plantarum*," *Acta Chimica Slovaca.*, **5**, 204(2015).
22. Cai, Y., Ohmomo, S., Ogawa, M., Kumai, S., "Effect of NaCl-tolerant Lactic Acid Bacteria and NaCl on the Fermentation Characteristics and Aerobic Stability of Silage," *JAM.*, **83**(3), 307-313(1997).