

혐기성 발효에 의한 다시마 추출물로부터 휘발성 유기산 제조: 휘발성 유기산 생산성에 대한 환경적 영향인자 평가

최재형, 송민경[†], 전병수[‡], 이철우[§], 우희철*

부경대학교 화학공학과
608-739 부산광역시 남구 신선로 365

[†]부경대학교 청정생산기술연구소
608-739 부산광역시 남구 신선로 365

[‡]부경대학교 식품공학과
608-737 부산광역시 남구 용소로 45

[§]한밭대학교 화학공학과
305-719 대전광역시 유성구 동서대로 125

(2012년 12월 18일 접수; 2013년 3월 19일 수정본 접수; 2013년 3월 28일 채택)

Volatile Fatty Acid Production from *Saccharina japonica* Extracts by Anaerobic Fermentation: Evaluation of Various Environmental Parameters for VFAs Productivity

Jae Hyung Choi, Min Kyung Song[†], Byung Soo Chun[‡], Chul Woo Lee[§], and Hee Chul Woo*

Department of Chemical Engineering, Pukyong National University
365 Sinseon-ro, Nam-gu, Busan 608-739, Korea

[†]The Institute of Cleaner Production Technology, Pukyong National University
365 Sinseon-ro, Nam-gu, Busan 608-739, Korea

[‡]Department of Food Science and Technology, Pukyong National University
45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 608-737, Korea

[§]Department of Chemical Engineering, Hanbat National University
125 Donseo-daero, Yuseong-gu, Daejeon 305-719, Korea

(Received for review December 18, 2013; Revision received March 19, 2013; Accepted March 28, 2013)

요 약

본 연구에서는 거대 갈조류 대표종인 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 물리화학적 전처리 방법, 미생물 접종비율, 다시마 추출물의 농도 및 pH 조건에 따른 휘발성 유기산(volatile fatty acids, VFAs) 생산 가능성 확인과 생산 효율을 평가하고자 하였다. 물리화학적 전처리 방법에 따른 휘발성 유기산의 최대 농도는 황산, 아임계수, 지질 추출 후 아임계수 전처리 순으로 나타났다. 황산 전처리 방법에서 미생물 접종비율(유효용적(WV)/미생물 부피(M) = 10~30), pH (6.0~7.0) 및 다시마 추출물의 농도(18.0~72.0 g/L)의 혐기성 발효 조건에 따른 휘발성 유기산 생성 농도에 미치는 영향을 확인한 결과, 발효 온도 35 °C, 미생물 접종비율 15, pH 7.0, 발효시간 372시간에서 다시마 추출물의 농도가 18.0, 36.0, 54.0, 72.0 g/L일 때, 휘발성 유기산의 최대 농도가 각각 9.8, 13.9, 18.6, 22.3 g/L로 확인되었다. 생산된 휘발성 유기산의 조성은 pH가 높을수록 아세트산과 프로피온산의 생산 비율이 높았으며, pH가 낮을수록 부티르산의 비율이 높게 확인되었다. 생산된 저농도의 휘발성 유기산은 농축 및 분리공정과 연계하여 향후 기초화학 원료와 바이오연료 등으로 사용될 수 있으므로, 기존 화석연료의 대체에너지 생산에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

주제어 : 다시마, 혐기성 발효, 휘발성 유기산, 물리화학적 전처리 추출물

Abstract : Volatile fatty acids (VFAs) production from marine brown algae, *Saccharina japonica*, was investigated in anaerobic dark fermentation. In order to evaluate the VFAs productivity, various experimental parameters (i.e., physicochemical pre-treatment, microorganism inoculation ratio, substrate concentration, and pH) were evaluated. According to the physicochemical pre-treatment

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail: woohc@pknu.ac.kr

doi:10.7464/ksct.2013.19.2.148

methods, the maximum concentrations of VFAs were obtained in the order of sulfuric acid, subcritical water and subcritical water with lipid-extraction. Also, we investigated the operating parameters such as microorganism inoculation ratio (MV/M = 10 to 30), the substrate concentration (18.0 to 72.0 g/L) and pH (6.0 to 7.0) in sulfuric acid pre-treatment method. When the substrate concentrations were 18.0, 36.0, 54.0 and 72.0 g/L at 35 °C, microorganism inoculation ratio 15, pH 7.0 for 372 hours, the maximum concentrations of VFAs were respectively 9.8, 13.9, 18.6 and 22.3 g/L. The change in VFAs concentrations was detected that acetic- and propionic acids increased according to increasing pH, while the butyric acid increased with decreasing pH. The VFAs obtained from concentration and separation process may be used as basic chemistry materials and bio-fuel, and they will expect to produce alternative energy of fossil fuel.

Keywords : *Saccharina japonica*, Anaerobic dark fermentation, Volatile fatty acids, Physicochemical pre-treatment extracts

1. 서론

최근 석유자원 고갈로 인해 석유화학 산업에서 지속적으로 녹색성장이 가능한 신재생에너지 산업으로의 전환이 이루어지고 있으며, 무분별한 화석연료의 사용으로 지구의 온실가스가 증가함에 따라 기후변화협약이 1992년에 채택되어 온실가스 감축을 위해 국가적으로 노력하고 있다. 국내의 경우에는 2020년부터 온실가스 의무 감축 대상 국가에 포함됨에 따라 정책적으로 2012년부터 신재생에너지 의무할당제(renewable portfolio standards, RPS)가 시행되었고, 2015년부터 온실가스 배출권 거래제(emission trading system)가 시행될 계획이다. 이러한 신재생에너지 시장 활성화 정책에 맞추어 국내 실정에 적합한 지속가능한 바이오에너지 생산기술 개발이 필요하다.

다양한 바이오매스 자원 중 해조류(거대조류)는 전 세계 해양에서 불과 0.2%만을 점유하고 있음에도 불구하고, 온대 및 열대산림에 비하여 약 2.7배 이상의 뛰어난 이산화탄소 흡수량을 나타내고 있다[1,2]. 특히, 거대조류는 넓은 바다를 이용하기 때문에 식량작물과 경쟁할 필요도 없으며, 해수 중의 부영양물질

제거 등의 장점이 있어 탁월한 친환경적 바이오매스이다[3,4].

거대조류를 이용한 바이오에너지 생산 연구는 기초 요소기술 개발단계[5]로, 최근 거대조류에 속하는 갈조류의 대표종인 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 생물학적 전환방법을 통해 바이오에탄올(bio-ethanol)[6-8], 휘발성 유기산(volatile fatty acids, VFAs)[9-11], 바이오메탄(bio-methane)[12,13], 바이오수소(bio-hydrogen)[14]를 생산하는 연구가 진행되고 있다. 혐기성 발효(anaerobic fermentation)에 의해 생산된 휘발성 유기산은 주로 아세트산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid), 부티르산(butyric acid) 등으로 구성되며(탄소수 C2~C6), 이를 농축/분리하여 수소 첨가 반응으로 혼합알코올로 전환시키거나, 바이오메탄 생산 및 기초화학 원료로 이용될 수 있다[15-18].

다시마(*S. japonica*)는 국내에서 가장 많이 생산되는 거대 갈조류로, 알지네이트(alginate), 마니톨(mannitol), 라미나린(laminarin)과 같은 다양한 탄수화물을 포함하고 있다. 특히, 알지네이트는 다시마 다당류의 약 40% 이상을 차지하는 세포벽의 주요 구성물질로[8], 혐기성 발효를 통해 쉽게 전환되지 않

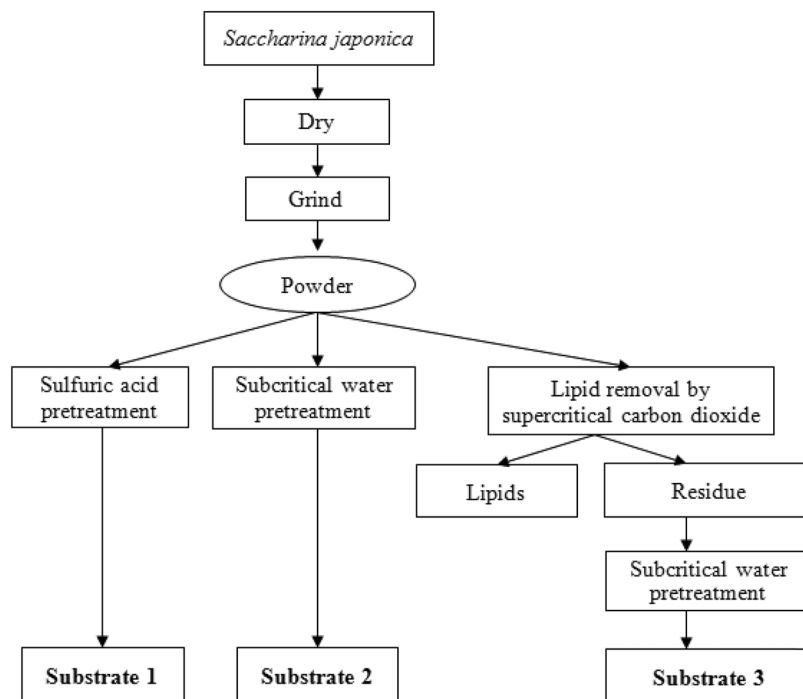


Figure 1. Preparation of various pre-treatment substrates for VFAs production.

는 난발효성 당으로 알려져 있다. 따라서, 다시마를 특별한 전처리 과정 없이 혐기성 발효할 경우 높은 휘발성 유기산 생산 수율을 기대하기 어려우며, 기질의 특성상 고형물 함량이 높아 연속식 공정 운전 적용이 힘들다[9-11].

따라서 본 연구에서는 다시마로부터 휘발성 유기산 생산 수율을 높이기 위해 황산, 아임계수, 지질 추출 후 아임계수의 물리화학적 전처리 방법, 미생물 접종비율 변화, 다시마 추출물의 농도 및 pH 조건에 따른 휘발성 유기산 생산 효율을 평가하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 다시마 원료 및 물리화학적 전처리

본 연구에 사용된 기질은 완도산 양식 다시마(*S. japonica*)이며, 자연 건조시킨 후 분쇄장치로 분쇄하여 지름이 5~10 mm 범위의 크기로 분쇄하였다. 휘발성 유기산을 제조하기 위해 혐기성 발효에 사용된 기질은 Figure 1에 나타낸 바와 같이 황산, 아임계수, 지질 추출 후 아임계수로 전처리를 하여 혐기성 발효를 위한 다시마 추출물의 액상 기질을 준비하였다. 추출물 여과액의 농도는 식 (1)로 계산하였으며, 다시마 추출물 농도는 희석 및 농축하여 원하는 농도로 만들어 사용하였다.

$$\text{Extract concentration (g/L)} = \frac{W_{BE} - W_{AE}}{V_{TS}} \quad (1)$$

W_{BE} : *S. japonica* dry weight before extraction (g)

W_{AE} : *S. japonica* dry weight after extraction (g)

V_{TS} : Total solvent volume (L)

2.1.1. 황산 전처리

황산 전처리 기질 준비를 위해 25 g의 다시마 분말에 3 wt% 황산 수용액 225 mL를 넣고, 500 mL 용량의 회분식 오토클레이브 반응기에서 반응온도 120 °C에서 250분 동안 반응시켰다. 전처리된 다시마는 여과하여 탄산칼슘(CaCO₃)으로 중화한 후 여과액을 수득하였다.

2.1.2. 아임계수 전처리

아임계수 전처리 기질 준비를 위해 15 g의 다시마 분말을 250 mL 용량의 회분식 오토클레이브 반응기에 증류수 150 mL와 함께 넣고, 압력 250 bar 조건에서 반응온도 300 °C에 도달 후 1분 동안 반응시켰다. 아임계수 전처리된 다시마에서 여과 후 여과액을 수득하였다.

2.1.3. 지질 추출 후 아임계수 전처리

지질 추출 후 아임계수 전처리 기질 준비를 위해 초임계 이산화탄소에 의해 우선 지질을 추출한 후에, 아임계수 전처리를 실시하였다. 250 g의 다시마 분말을 500 mL 용량의 연속식 오토클레이브 추출장치에서 순도 99.999%의 이산화탄소 용매를 사용하여 반응온도 45 °C, 압력 200 bar 조건으로 1시간 동안 지질을 추출하였다. 이후, 250 mL 용량의 회분식 오토클레이브 반응기에 지질이 추출된 다시마 분말 15 g과 증류

수 150 mL를 넣고 압력 250 bar 조건에서 반응온도 300 °C에 도달 후 1분 동안 반응시켰다. 전처리된 다시마는 여과 후, 최종적으로 여과액을 수득하였다.

2.2. 미생물 접종

혐기성 발효에 사용된 미생물은 하수처리장의 혐기성 소화조 슬러지(부산환경공단 수영사업소)를 사용하였으며, 영양분으로는 NH₄HCO₃ 2.00000 g/L, KH₂PO₄ 1.00000 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.01000 g/L, NaCl 0.00100 g/L, Na₂MoO₄·2H₂O 0.00100 g/L, CaCl₂·2H₂O 0.00100 g/L, MnSO₄·7H₂O 0.00150 g/L, FeCl₂ 0.00278 g/L을 사용하였다[19].

2.3. 혐기성 발효 공정 운전

다시마로부터 휘발성 유기산을 생산하기 위해 Figure 2의 도면과 같이 칼럼 생물반응기(column fermentor)를 제작하였다. 생물반응기 내부에는 원하는 농도의 기질과 상기 조성을 가진 영양분을 주입한 후, 발효장치 내의 산소가스를 제거하기 위하여 질소가스를 10분간 주입하였다. 배양기간 중 발효 산물에 의하여 변화하는 pH를 조절하기 위해, pH가 낮아질 때는 3 M NH₄HCO₃ 용액을 주입하고, pH가 높아질 때는 3 M H₂PO₄ 용액을 주입함으로써 원하는 pH로 일정하게 유지하였고, 항온장치를 이용하여 발효장치 내의 발효 온도를 원하는 온도로 일정하게 유지하였다. 발효장치의 내용물을 혼합하기 위해 질소가스를 하부에서 주입하여 하루에 두 번 혼합하였으며, 메탄생성균에 의하여 휘발성 유기산이 소비되지 않도록 메탄생성 억제제(요오드포름, CHI₃) 20 g/L 농도로 에탄올에 녹여 사용하였다. 반응기에서 발생하는 총 바이오가스를 측정하기 위하여 수상치환 형태의 가스포집기를 설치하였다.

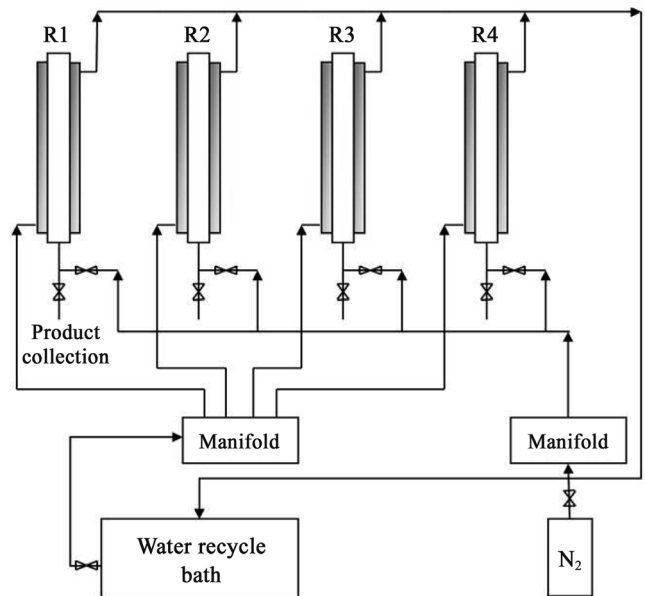


Figure 2. Schematic diagram of bubble column fermenter system for VFAs production.

2.4. 분석방법

휘발성 유기산은 모세관 칼럼(capillary column, Agilent Technologies, Inc. model HP-FFAP, 50 m × 0.32 mm × 0.50 μm) 이 장착된 기체크로마토그래프(gas chromatograph, Shimadzu 17A)를 사용하여 정량하였다. 검출기로는 불꽃이온화 검출기(flame ionization detector, FID)를 사용하였다. 혐기성 발효 중 발생하는 가스는 열전도도 검출기(thermal conductivity detector, TCD)를 장착한 기체크로마토그래프(Shimadzu 9A)를 이용하여 측정하였다. 메탄측정을 위한 기체크로마토그래프의 조건은 주입부 온도 200 °C, 검출기 온도 250 °C이며, 칼럼 유량은 30 mL/min로 유지하였다.

전처리 추출물의 환원당 함량은 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)를 사용하여 분석하였다. 환원당 분리 이온 교환 Shim-pack ISA-07 분석 칼럼(4.0 mm × 250 mm)과 Shim-pack ISA guard 칼럼(4.0 mm × 50.0 mm)을 사용하였다. 주입량은 10 μL 주입하며 post-column 방법을 이용하여 환원당을 유도체화한 후 형광검출기(Ex = 320, Em = 430)를 사용하여 분석하였다. 반응시약으로 1% arginine과 3% boric acid를 함유하는 용액을 사용하였다. 환원당 표준물질을 탈 이온화 증류수에 용해시켜 0.5~20 μL/mL 범위의 표준용액을 조제하여 고성능액체크로마토그래피(Shimadzu Co.) 분석을 실시하고 피크 면적으로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 물리화학적 전처리 방법에 따른 휘발성 유기산 생산

다시마로부터 황산 및 아임계수, 지질 추출 후 아임계수 전처리된 추출물을 대상으로 혐기성 발효를 통해 전처리 방법에 따른 휘발성 유기산 생성 효율 및 특성을 비교하였다. Figure 3

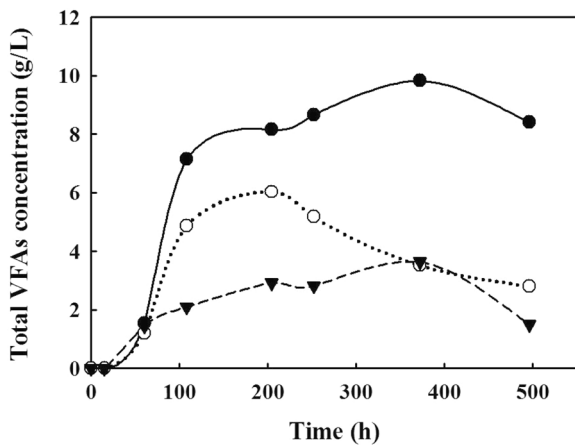


Figure 3. Effect of different physico-chemical pre-treatment on total VFAs production. Symbols represent the pre-treatment methods of 3 wt% sulfuric acid solution (●), subcritical water (○) and subcritical water with lipid-extraction (▼). Culture conditions: pH = 7.0, temperature = 35 °C, initial substrate concentration = 18.0 g/L, working volume to microorganism (WV/M) ratio = 15.

에서 총 휘발성 유기산 생성(total VFAs)은 황산, 아임계수, 지질 추출 후 아임계수 처리순으로 나타났으며, 황산을 처리한 경우, 372시간 동안 최대 9.8 g/L의 총 휘발성 유기산이 생성되었다. 아임계수 및 지질 추출 후 아임계수 전처리한 결과, 총 휘발성 유기산은 각각 최대 6.0 g/L와 3.6 g/L가 생성되었다. 한편, 물리화학적 전처리 추출물에 함유된 주요 환원당(저분자 탄수화물) 함량을 측정한 결과(Table 1), 황산 전처리 추출물의 총 환원당 함량은 1349.7 ppm이며, 주요 환원당 성분

Table 1. Profiles of reducing sugars contents during anaerobic fermentation: *S. japonica* was pre-treated with (a) 3 wt% sulfuric acid solution, (b) subcritical water and (c) subcritical water with lipid-extraction

Pre-treatment methods	Reducing sugars	Time (h)				
		0	108	204	300	396
3 wt% sulfuric acid solution	Sucrose	36.51	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cellobiose	0.39	0.38	0.37	0.62	0.40
	Maltose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Lactose	0.00	0.98	0.89	0.45	0.95
	Rhamnose	6.22	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ribose	7.29	0.26	0.36	0.18	0.89
	Mannose	42.16	3.74	3.82	5.14	5.37
	Arabinose	1172.12	6.64	6.66	5.06	0.75
	Galactose	44.30	0.00	0.00	0.00	0.00
	Xylose	24.42	0.47	0.62	0.61	0.41
	Glucose	16.33	6.41	11.03	9.47	8.74
Subcritical water	Sucrose	99.90	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cellobiose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Maltose	22.17	13.26	11.26	11.18	13.50
	Lactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Rhamnose	0.00	6.97	6.41	5.19	0.08
	Ribose	0.00	0.56	2.41	1.60	1.18
	Mannose	1.34	12.66	20.82	15.03	0.42
	Arabinose	0.00	2.91	3.03	3.16	0.91
	Galactose	13.41	0.00	0.00	0.00	0.00
	Xylose	0.00	13.44	26.37	24.01	0.98
	Glucose	0.00	0.00	0.00	0.00	5.09
Subcritical water with lipid-extraction	Sucrose	97.20	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cellobiose	0.00	1.51	1.13	0.97	2.57
	Maltose	21.45	17.68	21.88	19.26	17.14
	Lactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Rhamnose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Ribose	0.00	1.07	1.39	0.99	0.91
	Mannose	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00
	Arabinose	0.00	3.41	4.49	9.66	0.97
	Galactose	3.28	0.00	0.00	0.00	0.00
	Xylose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Glucose	0.00	2.76	4.01	5.98	5.00

은 아라비노스(arabinose)와 갈락토오스(galactose), 만노오스(mannose), 수크로오스(sucrose), 자일로오스(xylose), 글루코오스(glucose)로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한, 아임계수 전처리 추출물의 총 환원당 함량은 136.8 ppm으로 수크로오스, 말토오스(maltose), 갈락토오스, 만노오스가 확인되었다. 지질 추출 후 아임계수 전처리 추출물의 총 환원당 함량은 122.2 ppm이며, 주요 환원당 성분으로 수크로오스, 말토오스, 갈락토오스, 만노오스를 확인하였다. 이와 같이 물리화학적 전처리에 의해 생성된 환원당 성분은 혐기성 발효에 의해 100 시간 안에 쉽게 휘발성 유기산으로 전환됨을 알 수 있었다. 특히, 황산 전처리 추출물 속에 함유된 환원당 성분의 농도가 상대적으로 아임계수 전처리 추출물 속에 함유된 환원당 성분의 농도보다 높았으며, 아임계수 전처리는 고온 및 고압 조건에서 과잉반응의 가수분해, 열분해, 부분산화 반응 등으로 인해 혐기성 발효가 가능한 유기물 함량이 낮음을 알 수 있었다. 전처리 추출물의 모든 유기물 성분을 분석하기 어려우나, 환원당 성분의 농도 정량을 통해 혐기성 발효에 따른 전처리 추출물의 휘발성 유기산 전환 효율을 확인할 수 있었다.

Figure 4는 물리화학적 전처리 방법으로부터 생성된 휘발성 유기산 조성을 비교한 결과이다. 혐기성 발효 372시간을 기준으로 황산 전처리를 통해 생성된 휘발성 유기산의 조성을 살펴보면 아세트산(acetic acid) 51.8%, 프로피온산(propionic acid) 20.4%, 발레르산(valeric acid) 11.6%, 부티르산(butyric acid) 11.1%, 헥사노익산(hexanoic acid) 5.0% 순서로 확인되었으며, 아임계수 전처리를 통해 생성된 휘발성 유기산 조성은 아세트산 39.6%, 프로피온산 27.2%, 부티르산 13.9%, 발레르산 10.7%, 헥사노익산 8.5% 비율로 나타났다. 지질 추출 후 아임계수 전처리 경우, 휘발성 유기산 조성은 아세트산 51.5%, 프로피온산 16.2%, 발레르산 11.1%, 헥사노익산 11.6%, 부티르산 9.6% 비율의 순서로 생성되었다. 모든 전처리 방법에서 아세트산과 프로피온산 비율이 상대적으로 높게 나타났다. 향후, 수소 첨가 반응을 통해 혼합 알코올 생산 시 다시마 유래 주요 혼합 알코올로 에탄올 및 프로판올, 부탄올 등의 생산이 가능할 것으로 사료되어진다.

3.2. 미생물 접종비율에 대한 영향

세 가지의 전처리 다시마 추출물로부터 최대의 휘발성 유기산 생산을 위한 미생물 접종비율을 확인하기 위해 생물반응기 내 미생물(microorganism, M) 당 유효용적(working volume, WV)의 부피비율(WV/M) 변화(WV/M = 10, 15, 30)에 따른 총 휘발성 유기산 생산 농도를 확인하였다(Table 2). 황산 전처리 방법에서는 372시간에서 WV/M 비율이 감소할수록 휘발성 유기산 생성 농도가 증가하는 것으로 확인하였다. 아임계수 및 지질 추출 후 아임계수 전처리 방법에서는 204시간까지 WV/M 비율 감소할수록 휘발성 유기산 농도가 최대로 빨리 도달함을 알 수 있었으며, 204시간 이후 휘발성 유기산 농도가 감소하여 농도 차이가 크게 나지 않았음을 확인하였다. 한편, WV/M 비율이 15 미만의 조건에서는 휘발성 유기산 생산 이후 반응액과 미생물(고형물)을 분리하는 데 과도한 공정비용

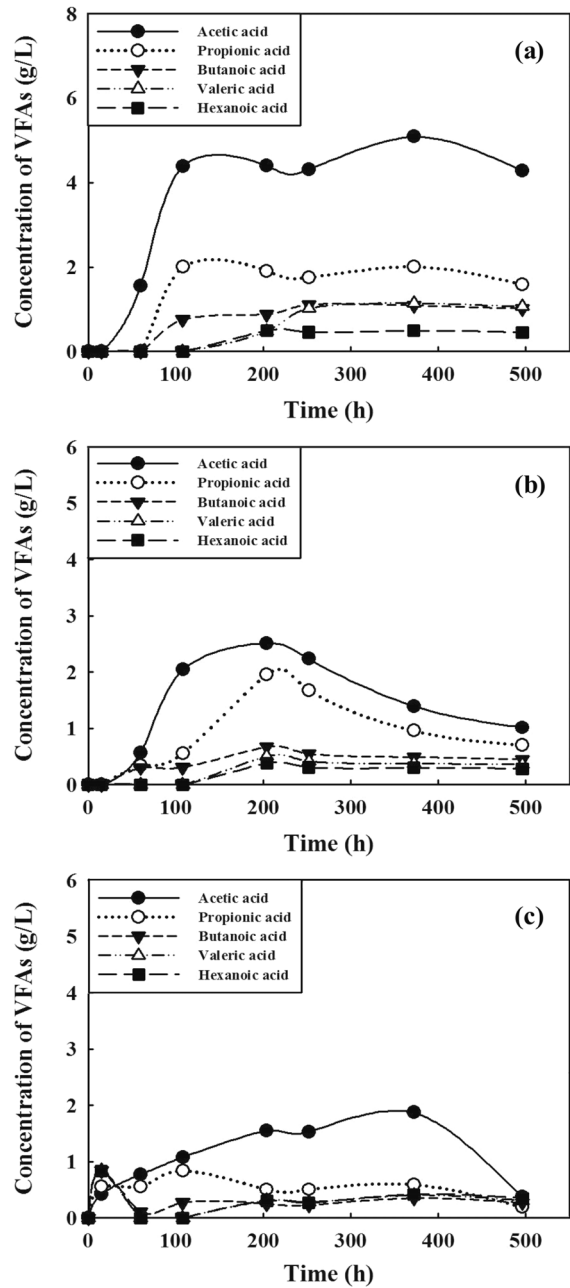


Figure 4. Individual VFAs profiles according to the pre-treatment using (a) 3 wt% sulfuric acid solution, (b) subcritical water and (c) subcritical water with lipid-extraction.

이 투입될 수 있으므로, 최적의 공정운전을 위해 휘발성 유기산 생산성에 대한 WV/M 비율을 적절히 고려하여야 한다.

3.3. 다시마 추출물의 농도에 대한 영향

황산 전처리된 다시마 추출물의 기질 농도에 따른 휘발성 유기산 생성 농도를 평가하였다. 혐기성 발효공정 운전 시 온도, pH, 미생물 접종비율은 모두 동일하게 적용하고, 전처리된 다시마 추출물 농도를 18.0, 36.0, 54.0, 72.0 g/L로 변화시켰다. 그 결과, 전처리된 다시마 추출물의 농도가 높을수록 총 휘발성 유기산의 생성 농도가 증가하였으며, 추출물 농도

Table 2. Effect of microbial inoculum ratio on total VFAs production at pH 7.0, 35 °C, 18.0 g/L initial substrate concentration. The carbon source of *S. japonica* was pre-treated with 3 wt% sulfuric acid solution, subcritical water and subcritical water with lipid-extraction

Pre-treatment methods	Microbial inoculum ratio	Time (h)						
		15	60	108	204	252	372	496
3 wt% sulfuric acid solution	MV/M=30	0.0	1.3	6.5	7.9	8.2	8.8	8.4
	MV/M=15	0.0	1.6	7.1	8.1	8.7	9.8	8.4
	MV/M=10	0.0	1.8	7.4	8.1	8.8	11.0	10.1
Subcritical water	MV/M=30	0.0	0.8	3.3	4.8	4.7	3.5	3.0
	MV/M=15	0.0	1.2	4.9	6.0	5.2	3.5	2.8
	MV/M=10	0.0	1.2	5.2	5.2	4.6	4.0	3.5
Subcritical water with lipid-extraction	MV/M=30	0.0	1.0	1.7	2.9	3.1	3.1	2.0
	MV/M=15	0.0	1.4	2.1	2.9	2.8	3.6	1.5
	MV/M=10	0.0	1.5	2.6	3.1	2.8	3.3	2.6

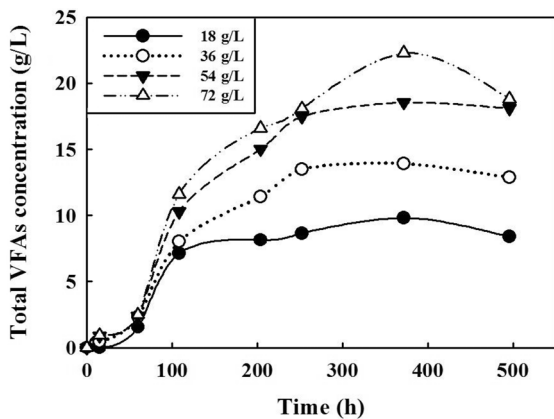


Figure 5. Effect of initial substrate concentration on sulfuric acid (3 wt%) pre-treatment for total VFAs production. Culture conditions: pH = 7.0, temperature = 35 °C, initial substrate concentration = 18.0 g/L, working volume to microorganism (WV/M) ratio = 15.

가 18.0, 36.0, 54.0, 72.0 g/L일 때 372시간에서 휘발성 유기산의 최대 농도는 각각 9.8, 13.9, 18.6, 22.3 g/L로 확인되었다 (Figure 5). 한편, 추출물 농도가 72.0 g/L인 경우를 제외하고 252시간 이후 휘발성 유기산의 농도가 더 이상 크게 증가하지 않았으며, 추출물 농도가 72.0 g/L인 경우는 372시간에서 휘발성 유기산 농도가 최대값을 보인 후 감소하는 경향을 보였다. 추출물 농도가 54.0, 72.0 g/L인 경우 372시간 부근을 제외하고는 비슷한 휘발성 유기산 생성 농도를 보였으며, 이와 같은 현상은, 고농도의 기질(다시마 추출물의 농도 54 g/L)이 최대 미생물 성장계수 구간을 벗어나 기질 포화농도 구간에 있음을 의미한다[20].

3.4. pH에 대한 영향

황산 전처리 추출물로부터 혐기성 발효 pH에 따른 휘발성

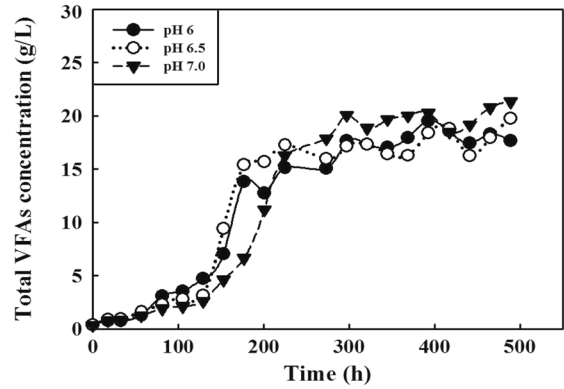


Figure 6. Effect of pH on sulfuric acid (3 wt%) pre-treatment for total VFAs production. Culture conditions: pH = 7.0, temperature = 35 °C, initial substrate concentration = 54.0 g/L, working volume to microorganism (WV/M) ratio = 15.

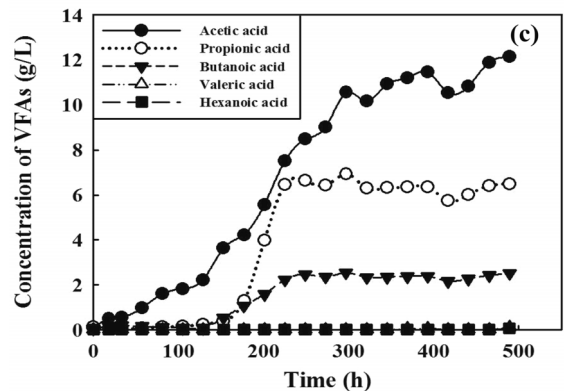
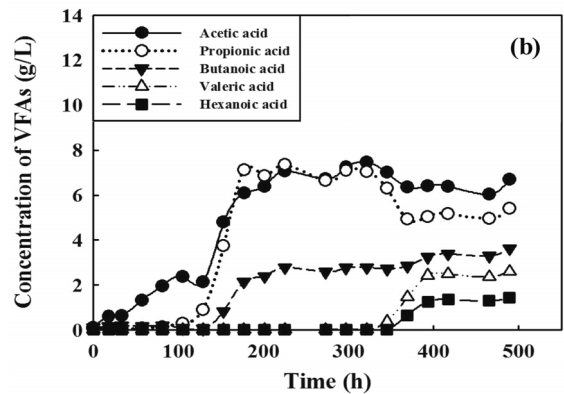
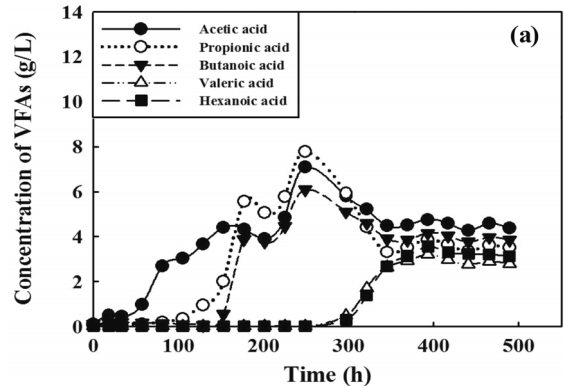


Figure 7. Individual VFAs profiles on range of (a) pH 6.0, (b) pH 6.5 and (c) pH 7.0.

유기산의 생산에 대한 영향을 확인하기 위해, 혐기성 발효공정 운전 시 온도, 다시마 추출물 농도, 미생물 접종비율은 모두 동일하게 적용하고, pH를 6.0, 6.5, 7.0으로 변화시켰다. 그 결과, pH 조건에 상관없이 혐기성 발효 시간에 따라 총 휘발성 유기산의 생성 농도가 증가하였다(Figure 6). 휘발성 유기산의 조성은 pH 6.0인 경우 249시간에서 아세트산과 프로피온산, 부티르산이 각각 7.1, 7.7, 6.0 g/L의 농도로 유사하게 생산되었다. 한편, pH 6.5인 경우 상대적으로 아세트산과 프로피온산의 생산 비율이 높았으며, pH 7인 경우 아세트산의 생산 비율이 상대적으로 높았다(Figure 7). 이를 통해, 아세트산과 프로피온산은 휘발성 유기산 생성 미생물의 최적 pH 조건으로 알려진 pH 6.5~7.0 범위에서 주요 생산물로 확인되었으며, 부티르산의 경우 상대적으로 낮은 pH에서 생성됨을 알 수 있었다[21].

4. 결론

거대 갈조류 대표종인 다시마 바이오매스로부터 혐기성 발효에 의한 휘발성 유기산 생산효율을 평가하기 위해 다양한 물리화학적 전처리 방법, 미생물 접종비율 변화, 다시마 추출물의 농도 및 pH 조건을 적용하였다. 세 가지의 황산, 아임계수, 지질 추출 후 아임계수 전처리를 하여 액상의 추출물 기질을 준비하고, 이를 혐기성 발효한 결과 황산 전처리 방법에서 가장 높은 농도의 휘발성 유기산을 생산하였다. 또한, 이 전처리 조건에서 미생물 접종비율(유효용적(WV)/미생물 부피(M)) = 10~30, 다시마 추출물의 농도(18~72 g/L) 및 pH(6.0~7.0)가 휘발성 유기산 생산을 위한 중요한 인자임을 파악하였고, 발효 온도 35 °C, 372시간 동안 미생물 접종비율 15, pH 7.0인 조건에서 다시마 추출물의 농도가 18.0, 36.0, 54.0, 72.0 g/L일 때, 각각 최대 9.8, 13.9, 18.6, 22.3 g/L의 휘발성 유기산을 생산하였다. 생산된 휘발성 유기산의 조성은 pH가 높을수록 아세트산과 프로피온산의 생산 비율이 높았으며, pH가 낮을수록 부티르산의 비율이 높게 확인되었다. 본 연구 결과를 바탕으로 황산 전처리 추출물이 휘발성 유기산 생산에 효과적이며, 미생물 접종비율이 15, 다시마의 농도가 54.0 g/L일 때, 휘발성 유기산 생산에 효율적인 조건으로 판단된다. 본 연구에 이어서 생산된 저농도의 휘발성 유기산을 농축 및 분리공정과 연계하여 향후 기초화학 원료 및 바이오연료 생산을 위한 연구가 추가적으로 수행되어 대체에너지 생산에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사

본 연구는 한국수산자원관리공단의 지원연구에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Klass, D. L., "Biomass for Renewable Energy and Fuels," *Encyclopedia of Energy*, **1**, 193-212 (2004).
- Fourqurean, J. W., Duarte, C. M., Kennedy, H., Marba, N.,

- Holmer, M., Mateo, M. A., Apostolaki, E. T., Kendrick, G. A., Doete, K.-J., Mcglathery, K. J., and Serrano, O., "Seagrass Ecosystems as a Globally Significant Carbon Stock," *Nature Geosci.*, **5**, 505-509 (2012).
- Park, J. I., Woo, H. C., and Lee, J. H., "Production of Bioenergy from Marine Algae: Status and Perspectives," *Korean Chem. Eng. Res.*, **46**(5), 833-844 (2008).
- Roesijadi, G., Jones, S. B., Snowden-Swan, L. J., and Zhu, Y., "Macroalgae as a Biomass Feedstock: a Preliminary Analysis," US DOE, PNNL-19944, 2010.
- <http://www.abrc.re.kr>
- Wargacki, A. J., Leonard, E., Win, M. N., Regitsky, D. D., Santos, C. N. S., Kim, P. B., Cooper, S. R., Raisner, R. M., Herman, A., Sivitz, A. B., Lakshmanaswamy, A., Kashiya, Y., Baker, D. and Yoshikuni, Y., "An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae," *Science*, **20**, 308-313 (2012).
- Lee, J. Y., Li, P., Lee, J., Ryu, H. J., and Oh, K. K., "Ethanol Production from *Saccharina japonica* Using an Optimized Extremely Low Acid Pretreatment Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation," *Bioresour. Technol.*, **127**, 119-125 (2013).
- Lee, S.-M., and Lee, J.-H., "Organic Acid and Enzyme Pretreatment of *Laminaria japonica* for Bio-ethanol Production," *Appl. Chem. Eng.*, **23**(2), 164-168 (2012).
- Pham, T. N., Nam, W. J., Jeon, Y. J., and Yoon, H. H., "Volatile Fatty Acids Production from Marine Macroalgae by Anaerobic Fermentation," *Bioresour. Technol.*, **124**, 500-503 (2012).
- Chang, H. N., and Kim, N. J., "Method for Producing Bio-Chemicals Derived from Algal Biomass," Korea Patent No. 10-1039432 (2011).
- Woo, H. C., Chang, H. N., Jeon, Y. J., Suh, D. J., Chun, B. S., Oh, K. K., Kim, K. H., Kim, D. W., and Choi, J. H., "Method for Preparing Volatile Fatty Acids from the Pre-treated Extracts of Marine Biomass Residue," US Patent No. 13/807, 587 (2012).
- Kim, J., Lee, Y., Jung, S., Lee, J., and Cho, M. H., "Production of Methane from Anaerobic Fermentation of Marine Macroalgae," *Clean Tech.*, **16**(1), 51-58 (2010).
- Lee, S.-M., Kim, G. H., and Lee, J.-H., "Bio-gas Production by Co-fermentation from the Brown Algae, *Laminaria japonica*," *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**(4), 1512-1514 (2012).
- Shi, X., Jung, K.-W., Kim, D.-H., Ahn, Y.-T., and Shin, H.-S., "Direct Fermentation of *Laminaria japonica* for Biohydrogen Production by Anaerobic Mixed Cultures," *Int. J. Hydrogen Energy*, **36**, 5857-5864 (2011).
- Wall, J. D., Harwood, C. S., and Demain, A., Bioenergy, AMS Press, Washington DC, 2008, pp. 347-360.
- Chan, W. N., and Holtzapple, M. T., "Conversion of Municipal Solid Wastes to Carboxylic Acids by Thermophilic Ferment-

- tation,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **111**(2), 93-112 (2003).
17. Fu, Z., Holtzapple, and M. T., “Consolidated Bioprocessing of Sugarcane Bagasse and Chicken Manure to Ammonium Carboxylates by a Mixed Culture of Marine Microorganisms,” *Bioresour. Technol.*, **101**, 2825-2836 (2010).
 18. Holtzapple, M. T., and Granda, C. B., “Carboxylate Platform: the MixAlco Process Part 1: Comparison of Three Biomass Conversion Platforms,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **156**, 95-106 (2009).
 19. Mehta, K. I., and Callihan, C. D., “Production of Protein and Fatty Acids in the Anaerobic Fermentation of Molasses by *E. ruminantium*,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **61**(11), 1728-1734 (1984).
 20. Macarthur, R. H., and Wilson, E. O., *The Theory of Island Biogeography*, Princeton University Press, Princeton, NJ, 1967.
 21. Horiuchi, J. I., Shimizu, T., Tada, K., Kanno, T., and Kobayashi, M., “Selective Production of Organic Acids in Anaerobic Acid Reactor by pH Control,” *Bioresour. Technol.*, **82**(3), 209-213 (2002).