

Clostridium 종을 이용한 미역으로부터 아세톤, 부탄올, 에탄올 (ABE) 생산

권정은¹, 곽승희¹, 김진아¹, 류지아², 박상언², 백윤서³, 허아정³, 김성구^{1*}

¹부경대학교 생물공학과

²양산제일고등학교

³예문여자고등학교

Received: May 25, 2017 / Revised: September 19, 2017 / Accepted: September 19, 2017

Acetone, Butanol, Ethanol Production from *Undaria pinnatifida* Using *Clostridium* sp.

Jeong Eun Kwon¹, Seung Hee Gwak¹, Jin A Kim¹, Ji A Ryu², Sang Eon Park², Yoon Seo Baek³, A Jeong Heo³, and Sung-Koo Kim^{1*}

¹Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Yangsanjeil High School, Yangsan 50593, Republic of Korea

³Yeamoon Girls' High School, Busan 48570, Republic of Korea

The conversion of marine biomass to renewable energy has been considered an alternative to fossil fuels. Butanol, in particular, can be used directly as a fuel. In this experiment, the brown alga *Undaria pinnatifida* was selected as a biomass for biobutanol production. Hyper thermal (HT) acid hydrolysis was used as an acid hydrolysis method to produce monosaccharides. The optimal pretreatment conditions for *U. pinnatifida* were determined as slurry with 10% (w/v) *U. pinnatifida* content and 270 mM H₂SO₄, and heating at 160°C for 7.5 min. Enzymatic saccharification was carried out with Celluclast 1.5 L, Viscozyme L, and Ultraflo Max. The optimal saccharification condition was 12 U/ml Viscozyme L. Fermentations were carried out for the production of acetone, butanol, and ethanol by *Clostridium acetobutylicum* KCTC 1724, *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785, and *Clostridium tyrobutyricum* KCTC 5387. The fermentations were carried out using a pH-control. The optimal ABE fermentation condition determined using *C. acetobutylicum* KCTC 1724 adapted to 160 g/l mannitol. An ABE concentration of 9.05 g/l (0.99 g/l acetone, 5.62 g/l butanol, 2.44 g/l ethanol) was obtained by the consumption of 24.14 g/l monosaccharide with Y_{ABE} of 0.37 in pH 5.0.

Keywords: *Undaria pinnatifida*, hyper thermal acid hydrolysis, biobutanol, *Clostridium* sp., pH-control

서 론

최근 화석연료의 고갈로 인한 불안정한 유류 가격과 이산화탄소에 의한 환경 문제로 인해 신재생 자원으로 만든 바이오연료의 개발이 각광받고 있다. 전통적으로 옥수수, 밀 그리고 사탕수수를 사용하여 바이오연료를 만들어왔지만 원료의 높은 가격과 식용작물이라는 점에서 적합하지 못한 바이오매스였다. 따라서 대체 원료로서 짚과 나무 등 농업 폐기물이 고려되었지만 lignocellulosic biomass의 특징인 리그닌

을 쉽게 분해하지 못한다는 단점을 아직도 해결하지 못하고 있는 실정이다[1].

해조류는 바이오에탄올, 바이오부탄올, 바이오디젤, 바이오가스 및 바이오수소 등 바이오연료 생산을 위한 가장 유망한 신재생 자원 중 하나이다. 해조류는 적은 경작지 사용, 빠른 성장률이라는 장점을 가지고 있다. 또한 높은 탄수화물 함량과 lignocellulosic biomass보다 훨씬 쉽게 단당으로 전환된다[2, 3]. 해조류는 광합성을 통한 대기중의 이산화탄소의 감소와 산소의 증가로 환경 문제도 해결할 수 있다[4]. 그 중 갈조류는 한국에서 대량 생산되고 있는 바이오매스이며 본 연구에 사용된 미역의 탄수화물 구성은 alginate, laminaran, fucoidan 그리고 mannitol로 구성되어 있다[2]. 이러한 다당류의 분해를 위해 초고온 열산 가수분해(hyper

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5868, Fax: +82-51-629-5863

E-mail: skkim@pknu.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

thermal acid hydrolysis)와 효소 당화(enzymatic saccharification)를 진행하였다.

열산 가수분해 방식으로 전처리를 진행하면 5-hydroxymethylfurfural (HMF), levulinic acid 그리고 formic acid와 같은 저해물질이 생성된다. 이러한 저해물질들은 균의 생장을 저해하고 생산성을 감소시킨다. 이를 보완하기 위하여 온도를 높임으로써 열처리 시간을 감소시키는 초고온 전처리 방식을 이용하였다[3].

부탄올은 높은 에너지 함량, 낮은 증기압과 부식성을 가졌고 가솔린과 비슷한 특성을 지니고 있는 액체 연료이다[5]. 부탄올은 *Clostridium*종을 사용한 혐기 조건에서 생산되며, 먼저 acetic acid와 butyric acid가 생성되고 난 이후 아세톤과 부탄올, 에탄올이 생성된다[6]. *Clostridium*종은 5탄당과 6탄당과 같은 다양한 당을 이용해 아세톤, 부탄올, 에탄올을 생산한다[7, 8]. 따라서 본 연구에서는 해조류인 미역에서 초고온 열산 가수분해와 효소 당화를 거쳐 당을 얻은 후, *Clostridium*종 세 가지를 사용하여 아세톤, 부탄올, 에탄올의 생산을 최대화하는 연구를 진행하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 균주

본 실험에서는 부탄올 생성을 위해 갈조류인 미역(*U. pinnatifida*)를 사용하였다. 미역은 자연건조 후 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 355 μm (45 mesh) 이하의 분말을 사용하였다. 구성성분 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하여 AOAC 방법에 의해 분석을 실시하였다[9]. 배지는 PGY 배지(3 g/l peptone, 20 g/l glucose, 1 g/l yeast extract 그리고 cysteine 0.15 g/l)를 사용하였고 N_2 incubator에서 120 rpm, 37°C로 24시간동안 배양한 *Clostridium acetobutylicum* KCTC 1724, *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785와 *Clostridium tyrobutyricum* KCTC 5387을 사용하였다.

초고온 열산 가수분해와 효소당화

해조류의 농도 범위는 6–14% (w/v)로 하였고, 황산의 농도 범위는 90–450 mM로 설정, 열처리 시간은 160°C에서 2.5–10분간 처리하였다. 온도는 140–200°C까지 진행하여 초고온 열산 가수분해를 수행하였다. 초고온 열산 가수분해의 효율(Ep, %)은 식 (1)로 나타낼 수 있다.

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

여기서 ΔS_{mono} 는 가수분해시 생성되는 단당의 농도(g/l)이며, TC는 *U. pinnatifida*의 총 탄수화물 함량(g/l)이다[3].

효소당화를 위해 전처리 후 10 N NaOH를 이용하여 pH

5.0로 중화하였다. 효소당화는 Viscozyme L (121 β -glucanase unit/ml; Novozymes, Denmark)과 Celluclast 1.5 L (854 endo-glucanase unit/ml; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark), Ultraflo Max (700 endo-glucanase unit/ml; Novozymes, Denmark)를 16 U/ml로 희석하여 단일 혹은 혼합하여 50°C에서 48 시간 동안 반응시켰다. 또한 세 가지 효소 중 최적이라 판단되는 효소를 선택하여 효소의 최적 농도를 4, 8, 12, 16 U/ml로 처리하여 확인하였다. Cellulase와 β -glucosidase의 효소활성은 Mandels 등[10] 및 Kubicek [11]의 방법에 의해 분석을 실시하였다.

아세톤, 부탄올, 에탄올 발효

미역 가수분해 산물을 사용하여 120 ml serum bottle에 working volume 70 ml로 하여 N_2 incubator에서 120 rpm, 37°C로 8일 동안 발효를 진행하였다. 종배양 배지는 120 ml serum bottle에 working volume 70 ml로 PGY medium (3 g/l peptone, 20 g/l glucose, 1 g/l yeast extract 그리고 cysteine 0.15 g/l)을 사용하여 24시간 동안 *C. acetobutylicum* KCTC 1724, *C. beijerinckii* KCTC 1785, *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 균을 배양한다. 고농도의 당에서 순치한 균은 당 흡수율을 증가시켜 아세톤, 부탄올, 에탄올의 생산을 증가시킨다고 보고되어 있다[12]. 따라서 1차 종 배양된 *C. acetobutylicum* KCTC 1724, *C. beijerinckii* KCTC 1785, *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 균을 고농도의 mannitol을 첨가한 PMY medium (3 g/l peptone, 60 g/l mannitol, 1 g/l yeast extract 그리고 cysteine 0.15 g/l)에 24시간 동안 2차 종배양을 한다. 2차 종배양된 *C. acetobutylicum* KCTC 1724, *C. beijerinckii* KCTC 1785, *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 균을 발효영양분을 첨가한 미역 가수분해 산물에 7 ml를 접종하여 발효를 진행하였다. 발효 첨가 영양분으로 YPC (84 g/l yeast extract, 140 g/l peptone, cysteine 4.2 g/l) 2.4 ml, 140 g/l ammonium acetate 1 ml, 140 g/l MgSO_4 0.5 ml, 140 g/l KH_2PO_4 0.5 ml, 140 g/l K_2HPO_4 0.5 ml를 미역 가수분해 산물에 첨가하였다. 발효 도중 pH를 일정하게 유지하기 위해 HCl과 NaOH를 첨가하였다.

다양한 단당 및 아세톤, 부탄올, 에탄올 함량 분석을 위해 시료를 14,240 \times g에서 20분동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, USA)와 gas chromatography (YL 6100, YoungLin, Korea)를 이용하여 분석하였다. 아세톤, 부탄올, 에탄올 수율(Y_{ABE} , g/g)은 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$Y_{\text{ABE}} (\text{g/g}) = \frac{[\text{ABE}]}{[\text{monosaccharide}]} \quad (2)$$

여기서 [ABE]는 발효로 생산되는 아세톤, 부탄올, 에탄올의

최대 농도(g/l)이며, [monosaccharide]는 발효 초기 단당 (glucose + mannitol)의 농도(g/l)이다.

분석방법

단당인 glucose와 mannitol, 저해물질인 5-hydroxymethyl-furfural (HMF), levulinic acid 그리고 formic acid의 양 측정은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, USA)와 RID (refractive index detector)를 이용하였다. 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column (300.0 × 7.8 mm)를 사용하여 온도 65°C, 이동상 5 mM 황산, 유속 0.6 ml/min로 하여 각 시료를 35분간 분석하였다[2]. 아세트, 부탄올, 에탄올, acetic acid, butyric acid는 gas chromatography (YL 6100, YoungLin, Korea)와 FID (flame ionization detector)를 이용하였다. 컬럼은 silica capillary column HP-INNOWAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 분석하였다[10]. 통계학적인 분석방법 (SPSS, USA)으로 일원분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)의 post-processing인 Duncan's multiple range test를 이용하여 각 group간의 유의적인 차이를 분석하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

미역의 성분 분석

미역의 구성성분을 AOAC 방법으로 분석한 결과 48.5% 탄수화물, 3.5% 섬유유, 18.2% 단백질, 1.8% 지방, 28.0% 회분으로 구성되어 있다.

초고온 열산 가수분해

미역에서 아세트, 부탄올, 에탄올 발효를 위한 단당을 생산하기 위해 one factor at a time 방법으로 초고온 열산 가수분해를 수행하였다. Fig. 1은 6~14%의 미역분말, 90~450 mM의 황산, 2.5분에서 10분까지의 열처리 시간, 그리고 140~200°C까지의 온도에 대한 결과를 나타냈다.

Fig. 1A는 다양한 미역분말 농도에 따른 초고온 열산 가수분해 결과이며, 온도는 160°C, 황산 농도는 180 mM, 열처리 시간은 10분으로 고정하여 실험을 진행하였다. 슬러리 농도가 증가할수록 가수분해되는 단당과 저해물질의 농도도 증가하는 경향을 나타냈다. 하지만 10%에서 초고온 열산 가수분해 효율(Ep)이 32.8%로 가장 높게 나타났으며 농도가

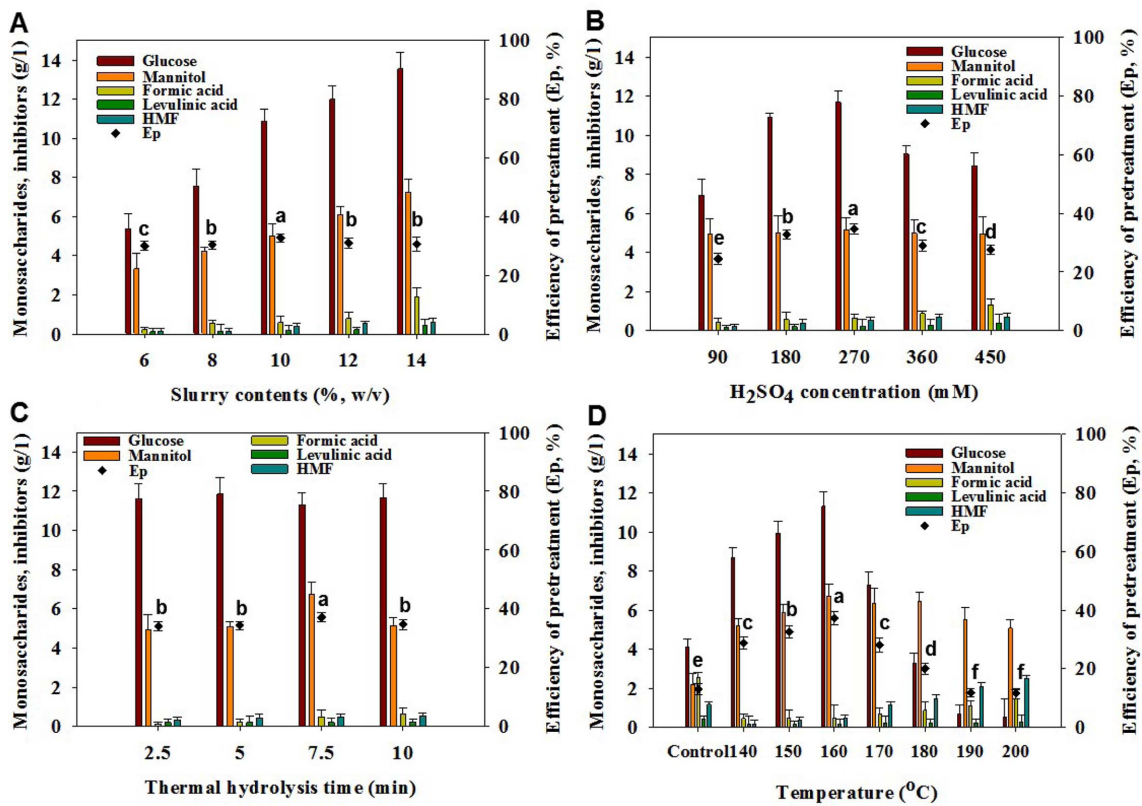


Fig. 1. Effect of optimal conditions of HT acid hydrolysis on the degradation of inhibitory compounds and monosaccharides : (A) slurry contents, (B) H₂SO₄ concentration, (C) thermal hydrolysis time, (D) reaction temperature. Control group of thermal acid hydrolysis was carried out with 10% (w/v) slurry content, 270 mM H₂SO₄, at 121 °C for 60 min.

높아질수록 효율이 떨어짐을 확인하였다.

Fig. 1B는 슬러리 농도 10%, 온도는 160°C, 열처리 시간은 10분으로 고정하고 황산 농도를 90–450 mM로 처리한 결과이다. Mannitol의 양은 모든 황산 농도에서 비슷한 수치를 나타냈으나 황산 농도가 270 mM일 때, 가장 많은 glucose 양이 생성됨을 확인하였다. 그에 따른 초고온 열산 가수분해 효율(Ep)도 34.7%로 가장 높음을 확인할 수 있다.

Fig. 1C는 슬러리 농도 10%, 황산 농도 270 mM, 온도는 160°C로 고정한 후 열처리 시간을 다르게 하여 수행한 결과이다. Glucose의 농도는 모두 비슷하게 나타났지만 7.5분에서 mannitol의 농도가 가장 높게 나타났고 그에 따른 초고온 열산 가수분해 효율(Ep)도 37.2%로 가장 높게 나타났다.

Fig. 1D는 슬러리 농도 10%, 황산 농도 270 mM, 열처리 시간 7.5분으로 고정된 후 온도를 140–200°C로 수행하였다. 160°C를 기점으로 온도가 높아질수록 저해물질이 증가하고 당이 감소하는 것을 확인하였다. 초고온 열산 가수분해 효율(Ep)도 160°C에서 37.2%로 가장 높으며 그 전후로는 감소하였다. 비교를 위해 control로 열산 가수분해인 121°C에서 60분동안 반응시켰다, control은 초고온 열산 가수분해에 비해 생성되는 당은 적고, 저해물질은 많이 생성됨을 확인하였다. 따라서 이번 연구에서는 온도를 올림으로써 열처리 시간을 줄일 수 있고 그에 따라 저해물질의 농도가 낮게 나타나며 그에 비해 생성되는 당의 농도는 초고온 열산 가수분해가 더 많음을 확인하였다.

효소 당화

초고온 전처리를 최적 조건으로 실시한 후 10 N NaOH를 이용하여 pH 5.0으로 중화한 뒤 효소 당화를 실시하였다. 효소는 Viscozyme L과 Celluclast 1.5 L, Ultraflo Max를 16 unit/ml로 희석해서 사용하였다. Fig. 2A는 단일 효소와

복합 효소를 사용하여 가수 분해를 실시하였으며 50°C에서 72시간 동안 당화를 진행한 결과, 48시간 이후는 당이 증가하지 않음을 확인하여 48시간의 효소 당화 효과를 나타냈다. 그 결과, Viscozyme L (β -glucanase, Novozymes)을 단일로 사용했을 때, 23.9 g/l로 가장 높은 수치를 나타냈다. 이는 다른 두 효소인 Celluclast 1.5 L (endo-glucanase, Novozymes)와 Ultraflo Max (endo-glucanase, Novozymes)의 효과가 Viscozyme L (β -glucanase, Novozymes)보다 떨어짐을 알 수 있다. 이후, Fig. 2B와 같이 효소의 유닛을 4, 8, 12, 16 unit/ml로 각각 다르게 하여 pH 5.0에서 50°C로 48시간동안 효소 당화를 진행한 결과, 12 unit/ml에서 25.1 g/l로 16 unit/ml보다 더 많은 당을 얻었다. 최종적으로 효소 당화의 최적 조건으로는 12 unit/ml의 Viscozyme L을 사용하는 것으로 확립하였다.

Clostridium sp.를 이용한 아세톤, 부탄올, 에탄올 발효

발효는 10% (w/v) 미역 가수분해 산물과 wild type의 *Clostridium acetobutylicum* KCTC 1724과 *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785, *Clostridium tyrobutyricum* KCTC 5387 균주를 이용하여 working volume 70 ml로 120 rpm, 37°C로 8일 동안 수행하였다. 세 균주 모두 OD₆₀₀ = 1.0일 때 건조 균체량은 0.70 g dew/l로 나타났다. Table 1은 순치하지 않은 (wild type) 세 균주의 발효를 진행할 때, pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 각각 고정하여 발효하였고, 초기 glucose농도는 17.57 g/l, mannitol 농도는 6.57 g/l이다. 세 균주의 최적 pH에 대한 발효 결과 최적 pH가 세 균 모두 다르게 나타났다(data not shown). *C. acetobutylicum* KCTC 1724는 pH 5.0에서 가장 많은 아세톤, 부탄올, 에탄올(ABE)이 생성되었고, *C. beijerinckii* KCTC 1785는 pH 5.5, *C. tyrobutyricum* KCTC 5387은 pH 6.0으로 나타났다. 균체수

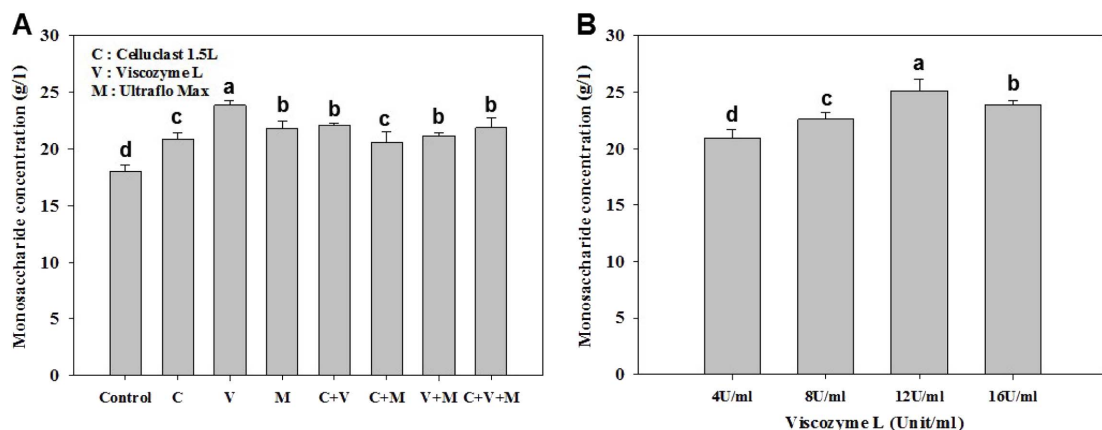


Fig. 2. Effects of single and mixed enzyme of Celluclast 1.5L, Viscozyme L, Ultraflo Max treatments (A) and dosage of Viscozyme L (B) on monosaccharide concentration of *U. pinnatifida* hydrolysate at 10% (w/v) slurry after HT acid hydrolysis at pH 5.0, 45 °C for 48 h. The initial monosaccharide was 18 g/l after HT acid hydrolysis.

도 다르게 나타났는데 단당의 소비에 있어서는 glucose는 모두 소비하지만 mannitol의 경우 *C. acetobutylicum* KCTC 1724은 2.1 g/l 정도의 소량만 소비하였고 *C. beijerinckii* KCTC 1785는 아예 소비하지 못하였다. 그에 비해 *C. tyrobutyricum* KCTC 5387은 모두 소비하는 것을 알 수 있었다. 단당의 소비에 따라 균체수도 *C. tyrobutyricum* KCTC 5387이 3.42로 가장 많았고 이어 *C. acetobutylicum* KCTC 1724이 2.72, *C. beijerinckii* KCTC 1785가 1.98로 가장 작았다. 생산된 아세톤, 부탄올, 에탄올(ABE)의 경우 *C. tyrobutyricum* KCTC 5387가 당을 모두 소비하고 균체수도 가장 많지만 ABE가 1.82 g/l로 가장 낮은 값을 나타냈다. 반면 *C. acetobutylicum* KCTC 1724은 mannitol을 거의 섭취하지 못해 균체수가 상대적으로 작았지만 ABE는 5.72 g/l로 가장 높은 값을 나타냈다. 이는 아세톤, 부탄올, 에탄올과 같은 solvent products와 acetic acid, butyric acid와 같은 acid products의 생산이 pH 5.1을 기점으로 pH가 높으면 acid products가 생산되고 pH가 낮으면 solvent products가 생산된다는 보고와 일치되는 것을 알 수 있었다[13]. 따라서 본 연구에서는 pH 5.0에서 가장 많은 ABE를 생성한 *C.*

acetobutylicum KCTC 1724을 선택하여 ABE 발효를 진행하였다.

순치 하지 않은 wild type *C. acetobutylicum* KCTC 1724의 발효 과정을 확인하기 위해 시간별로 진행되는 단당 (glucose, mannitol)과 균체수(OD₆₀₀), pH, solvent products, 그리고 acid products를 Fig. 3에 나타냈다. Fig. 3A에 나타난 바와 같이 단당은 glucose가 4일만에 모두 소비되었고 mannitol의 경우에는 거의 소비되지 않음을 확인하였다. 그에 따른 OD₆₀₀ 값도 3일차에 2.72로 더 이상 증가하지 않았다. pH는 5.0으로 유지하기 위해 NaOH와 HCl을 사용하였다. 그에 따라 생성된 결과로 Fig. 3B에 나타난 바와 같이 solvent products는 아세톤이 1.21 g/l, 부탄올이 3.17 g/l, 에탄올이 1.34 g/l였고, acid products의 경우 acetic acid는 0.04 g/l로 매우 소량이 생성되었고 butyric acid도 0.32 g/l로 적은 양이 생성되었다. 아세톤, 부탄올, 에탄올의 수율을 계산했을 때, Y_{ABE} 값이 0.24로 나타났다.

Fig. 4는 mannitol을 모두 소비하지 못하는 단점을 해결하기 위해 고농도의 mannitol 60 g/l를 첨가한 배지(PMY)에서 순치를 한 *C. acetobutylicum* KCTC 1724을 이용하여 발

Table 1. Summary of acetone, butanol, ethanol production by non-adapted *C. acetobutylicum* KCTC 1724, *C. beijerinckii* KCTC 1785 and *C. tyrobutyricum* KCTC 5387 using *U. pinnatifida* hydrolysate.

Factor	Control	<i>C. acetobutylicum</i>	<i>C. beijerinckii</i>	<i>C. tyrobutyricum</i>
pH	5.0–7.0	5.0	5.5	6.0
OD ₆₀₀	0.25	2.72 ± 0.31	1.98 ± 0.15	3.42 ± 0.23
Glucose (g/l)	17.57	0	0	0
Mannitol (g/l)	6.57	4.47 ± 0.78	6.57 ± 0.63	0
Acetone (g/l)	0	1.21 ± 0.29	0.68 ± 0.06	0.54 ± 0.11
Butanol (g/l)	0	3.17 ± 0.42	0.37 ± 0.05	0.18 ± 0.06
Ethanol (g/l)	0	1.34 ± 0.32	1.52 ± 0.48	1.10 ± 0.21
Acetic acid (g/l)	0	0.04 ± 0.06	0.76 ± 0.12	1.19 ± 0.17
Butyric acid (g/l)	0	0.32 ± 0.08	1.21 ± 0.52	9.08 ± 0.32

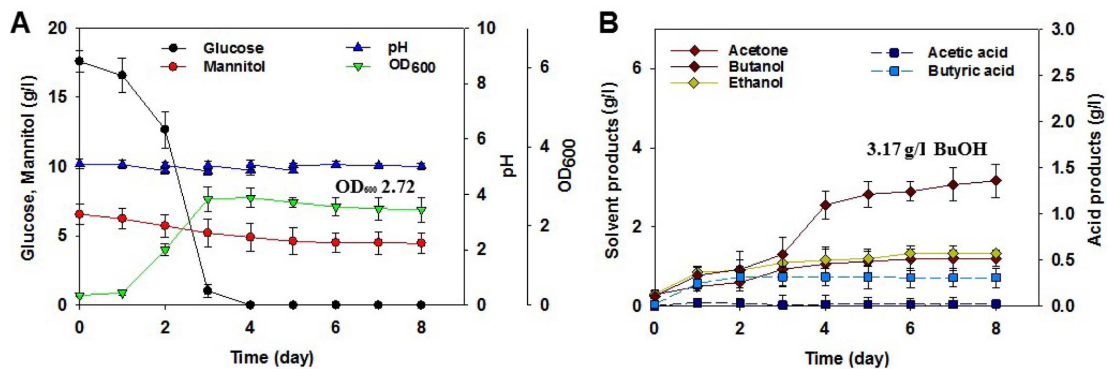


Fig. 3. Acetone, butanol, ethanol production by non-adapted *C. acetobutylicum* KCTC 1724 with 10% (w/v) *U. pinnatifida* hydrolysates at 37 °C, 120 rpm for 8 days with pH controlled fermentation.

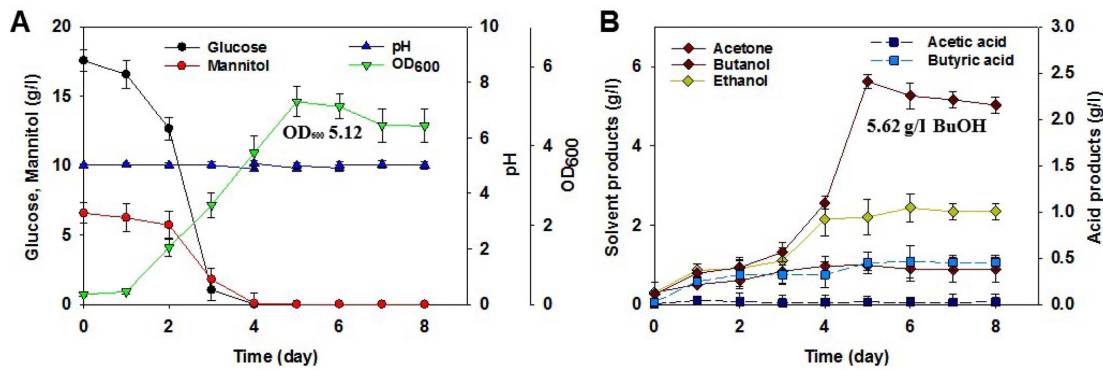


Fig. 4. Acetone, butanol, ethanol production by adapted *C. acetobutylicum* KCTC 1724 with 10% (w/v) *U. pinnatifida* hydrolysates at 37 °C, 120 rpm for 8 days with pH controlled fermentation.

효를 진행한 결과이다. Glucose, mannitol 모두 4일차에 소비되는 것을 확인하였고 그에 따라 OD₆₀₀ 값도 5일차에 5.12를 나타내며 순치하지 않은 균을 사용했을 때보다 약 1.9배 증가하였다. pH는 5.0으로 유지하여 생성물의 양을 확인하였다. 그 결과, acetic acid는 0.04 g/l로 변함이 없었으며, butyric acid는 0.46 g/l, 아세톤은 0.99 g/l로 순치하지 않은 균을 사용했을 때와 크게 다르지 않았다. 하지만 부탄올은 5.62 g/l, 에탄올은 2.44 g/l로 순치를 하지 않았을 때보다 각각 2.45 g/l, 1.10 g/l가 증가한 것을 알 수 있었다. 수율을 계산했을 때, Y_{ABE} 값이 0.37로 0.13만큼 증가하였다.

요 약

본 연구에서는 미역을 이용하여 초고온 열산 가수분해, 효소 당화, 발효과정을 거쳐 아세톤, 부탄올, 에탄올을 생성하는 실험에 대해 진행하였다. 초고온 열산 가수분해에서의 최적 조건은 10%의 slurry, 270 mM의 황산, 160°C에서의 7.5분이었다. 초고온 열산 가수분해는 열처리 시간을 줄이고 적은 농도의 황산을 사용해도 더 많은 당과 적은 저해물질을 생성해 낸다는 장점이 있다. 효소 당화에서는 Viscozyme L (β-glucanase, Novozymes)을 12 unit/ml로 처리하는 것이 25.1 g/l로 가장 많은 단당을 생성했다. 발효에서는 *C. acetobutylicum* KCTC 1724이 비교적 낮은 pH 5.0에서 많은 아세톤, 부탄올, 에탄올을 생성하는 장점이 있었지만 mannitol을 모두 소비하지 못하는 단점이 있어 고농도의 mannitol 배지에 순치한 *C. acetobutylicum* KCTC 1724을 사용하여 발효를 진행하였다. 그 결과, 아세톤, 부탄올, 에탄올이 각각 0.99 g/l, 5.62 g/l, 2.44 g/l로 순치하지 않은 *C. acetobutylicum* KCTC 1724를 이용해 발효했을 때 보다 부탄올은 2.45 g/l, 에탄올은 1.10 g/l 증가했으며 수율(Y_{ABE})은 0.24에서 0.37로 증가했다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) and Center for Women In Science, Engineering and Technology(WISET) grant funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning of Korea(MSIP) under the team research program for female engineering students (WISET-2016-116-001).

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea, funded by the Ministry of Education (2016R1D1A1A09918683).

References

- Jang JS, Cho YK, Jeong GT, Kim SK. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**: 11-18.
- Cho YK, Kim HJ, Kim SK. 2013. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**: 713-719.
- Ra CH, Nguyen TH, Jeong GT, Kim SK. 2016. Evaluation of hyper thermal acid hydrolysis of *Kappaphycus alvarezii* for enhanced bioethanol production. *Bioresour. Technol.* **209**: 66-72.
- Roesijadi G, Jones SB, Snowden-Swan LJ, Zhu Y. 2010. Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis, PNNL 19944. Pacific Northwest National Laboratory, Washington, USA.
- Li J, Chen X, Qi B, Luo J, Zhang Y, Su Y, et al. 2014. Efficient production of acetone-butanol-ethanol (ABE) from cassava by a fermentation-pervaporation coupled process. *Bioresour. Technol.* **169**: 251-257.
- Yu M, Zhang Y, Tang IC, Yang ST. 2011. Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metab. Eng.* **13**: 373-382.
- Hetty VDW, Sperber BL, Houweling-Tan B, Bakker RR, Brandenburg W, López-Contreras AM. 2013. Production of acetone,

- butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*. *Bioresour. Technol.* **128**: 431-437.
8. Jiang W, Wen Z, Wu M, Li H, Yang J, Lin J, *et al.* 2014. The effect of pH control on acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 with xylose and D-glucose and D-xylose mixture. *Chin. J. Chem. Eng.* **22**: 937-942.
 9. 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.
 10. Mandels M, Andreotti R, Roche C. 2009. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioene. Symp.* **6**: 21-23.
 11. Kubicek CP. 1982. β -Glucosidase excretion by *Trichoderma pseudokoningii*: correlation with cell wall bound β -1.3-glucanase activities. *Arch. Microbiol.* **132**: 349-354.
 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. Grupe H, Gottschalk G. 1992. Physiological events in *Clostridium acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3896-3902.