

Ferric chloride를 이용한 *Eucheuma spinosum*으로부터 플랫폼 케미컬의 생산

정귀택[†] · 김성구

부경대학교 생물공학과
48513 부산광역시 남구 용소로 45
(2020년 2월 13일 접수, 2020년 3월 9일 수정본 접수, 2020년 3월 16일 채택)

Conversion of Red-macroalgae *Eucheuma spinosum* to Platform Chemicals Under Ferric Chloride-catalyzed Hydrothermal Reaction

Gwi-Taek Jeong[†] and Sung-Koo Kim

Department of Biotechnology, Pukyong National University, 45, Yongso-ro, Nam-gu, Busan, 48513, Korea
(Received 13 February 2020; Received in revised form 9 March 2020; accepted 16 March 2020)

요 약

홍조류인 *Eucheuma spinosum*은 카라기난을 주된 다당으로 함유하고 있으며 Indonesia, Malaysia, Philippines, China, Tanzania 등지에서 상업적으로 생산되고 있다. 본 연구에서는 *E. spinosum*을 대상으로 FeCl₃-촉매 수열반응을 통하여 당과 화학중간체(5-HMF, levulinic acid, formic acid)로 전환하고자 하였다. 통계적 실험법(3-수준-3-인자의 Box-Behnken design)을 적용하여 반응인자(반응온도, 촉매농도, 반응시간)의 최적화와 영향을 평가하였다. 최적화 결과, 5-HMF의 농도는 160 °C, 0.4 M FeCl₃, 10 min에서 2.96 g/L가 생성되었다. Levulinic acid와 formic acid의 최적 조건은 200 °C, 0.6 M FeCl₃, 30 min으로 결정되었고, 농도는 각각 4.26 g/L와 3.77 g/L이었다.

Abstract – *Eucheuma spinosum*, red macro-algae, contains carrageenan as the major polysaccharide and is commercially produced in Indonesia, Malaysia, Philippines, China and Tanzania. In this study, *E. spinosum* was converted to sugar and platform chemicals (5-HMF, levulinic acid, formic acid) via FeCl₃-catalytic hydrothermal reaction. In addition, statistical methodology (3-level 3-factor Box-Behnken design) was applied to optimize and evaluate the effects of reaction factors (reaction temperature, catalyst concentration and reaction time). As a result of optimization, the concentration of 5-HMF was obtained to be 2.96 g/L at 160 °C, 0.4 M FeCl₃ and 10 min. Optimal conditions of levulinic and formic acids were determined at 200 °C, 0.6 M FeCl₃ and 30 min, and the concentrations were obtained to be 4.26 g/L and 3.77 g/L, respectively.

Key words: *Eucheuma spinosum*, Platform chemicals, Ferric chloride, Hydrothermal reaction

1. 서 론

석유와 석탄과 같은 화석자원에서부터 많은 화학 원료를 생산하여 사용했으나, 화석자원의 고갈과 환경오염, 기후변화의 우려로 화석자원을 대체할 자원에 대한 탐색이 진행되고 있다[1,2]. 화석자원에서부터 생산되는 화학 원료를 대체하기 위해 재생 가능한 자원 유래의 탄수화물(carbohydrate), 지질(lipid), 리그닌(lignin) 등을 생물 공정 또는 열화학 공정을 이용하여 확보하고자 하고 있다[1-6]. 최근에는 해양자원의 거대 해조류를 이용한 바이오에너지 및 화학 원료

생산과 관련된 연구가 진행 중에 있다[7-12].

홍조류인 *Eucheuma spinosum*은 Indonesia, Malaysia, Philippines, China, Tanzania, Kiribati 등지에서 상업적으로 생산되고 있다[13]. *Eucheuma* 종에 함유된 주된 다당(polysaccharides)은 카라기난(carrageenan)으로 알려져 있다. 카라기난은 선형의 다당으로 galactose residue와 3,6-anhydrogalactose residue로 구성된 galactan으로 알려져 있다[13,14]. 본 연구에서는 *E. spinosum*에 함유되어 있는 다당 성분을 화학중간체 생산의 자원으로서의 가능성을 연구하고자 하였다. 또한, 본 연구에 촉매로 사용한 ferric chloride (FeCl₃)는 다양한 분야에 사용되는 루이스 산(Lewis acid)으로 낮은 가격, 무독성, 그리고 풍부하다는 특성 때문에 다양한 바이오매스의 전처리나 전환 반응에 사용되고 있으나 해조류에 대한 연구는 미미하다[15,16].

미국 에너지성에서는 향후 화석자원에서부터 생산되어왔던 다양한 종류의 화학물질과 중간체들을 대체하기 위하여 당(sugar)으로

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gtjeong@pknu.ac.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.

부터 생물학적 공정과 화학 공정을 통하여 12가지의 기본 구성화합물을 얻을 수 있다고 발표하였다[17]. Levulinic acid (LA)는 기본 구성화합물 중 하나이며, 그 유도체들은 화학자원 유래의 화학중간체들(디젤 연료 첨가제, 살충제, 고분자 단량체 등)을 대체 가능하다고 알려져 있다[2,7,8,18,19]. 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF)는 액체 연료나 고분자 빌딩블록(polymer building blocks)으로 사용될 수 있는 다양한 화학물질(2,5-bis(hydroxymethyl)tetrahydrofuran, 2,5-dihydroxymethylfuran, 2,5-dimethylfuran, 5-furandicarboxylic acid 등)의 전구체로 사용될 수 있다[3,4]. Formic acid (FA)는 가장 단순한 카복실산이며, 탄화수소의 액상 산화 과정을 통한 아세트산 생산 과정에서 부산물로 주로 생성되었다[2,20,21]. 그러나 바이오매스 자원으로부터 열화학 반응 과정 중에 당으로부터 LA와 같이 FA가 생성되고 있다[2,10,11]. 이러한 FA는 석회질 제거, 유기 에스테르 조제, 사일레이지 및 동물 사료 보존, 가죽 및 태닝, 직물, 포름염, 약품 및 식품 화학물질, 고무 화학물질, 촉매, 가스제 등 다양한 산업 분야에 적용되고 있다[2,20,21]. 또한, FA가 연료전지의 친환경적인 수소 저장매체로서 주목받고 있다[22].

본 연구에서는 홍조류인 *E. spinosum*을 대상으로 수열전환반응을 통하여 바이오연료로 전환 가능한 화학중간체(platform chemicals)로 전환하는데 사용 가능한 잠재력을 평가하기 위하여 FeCl_3 촉매와 반응표면분석법을 적용하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 실험재료

실험재료로 사용한 *E. spinosum*은 인도네시아에서 생산된 것으로 자연 건조 후 분쇄 후 체를 이용하여 200 μm 이하의 입자만을 선별하여 실험에 사용하였다. FeCl_3 는 Duksan Pure Chemicals 사(Korea)의 것을, 5-HMF, FA 그리고 LA는 Sigma-Aldrich 사의 것을 사용하였다. 기타 시약은 시약 급을 사용하였다.

2-2. 실험방법

*E. spinosum*을 FeCl_3 촉매하에서 수열 반응을 이용한 화학중간체(platform chemicals)의 생산을 위해 다음과 같이 진행하였다. 각 실험은 회분식 반응기(스테인리스 스틸, 50 mL)를 사용하였으며, 반응기에 5%의 바이오매스와 촉매 용액을 넣어 10분간 혼합하여 균일한 반응물이 되도록 한 후 반응을 시작하였으며, 초기 반응액의 부피는 25 mL가 되도록 하여 실험을 수행하였다. 반응 조건은 반응 온도, 촉매농도, 반응시간을 변수로 하여 실험계획법에 의해 디자인된 조건으로 실험을 수행하였다. 반응기 내부의 온도가 설정 온도에 도달하는 시점(약 5 min 정도)을 0 min으로 실험을 시작하였다. 반응기 온도는 기름 증탕을 이용하여 설정된 온도를 PID 온도 컨트롤러를 이용하여 조절하여 일정 반응시간 동안 진행하였다. 반응기 내의 반응물은 마그네틱 바를 이용하여 약 500 rpm으로 혼합하였다. 반응이 종료되면 반응기를 냉각수를 이용하여 빠르게 냉각시킨 후 시료를 취하여 17,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리한 후 상등액을 실린지 필터(0.2 μm)로 여과하여 HPLC 분석에 사용하였다[11,12].

2-3. 실험계획 및 통계분석

반응표면분석법을 적용한 실험계획을 디자인하기 위하여 Design-Expert 9 software (Stat-Ease, Inc., USA)를 이용하여 3-수준-3-인자의

Box-Behnken design을 적용하였다. 3가지의 반응인자(반응온도(160~200 °C), 촉매농도(0.2~0.6 M), 반응시간(10~50 min))를 대상으로 실험계획을 디자인하여 실험하였다. 실험 결과(Table 1)는 상관관계 및 회귀분석을 통하여 model을 예측하였다. 모델식의 정확도는 결정계수(R^2)와 변이분석(ANOVA)을 이용하여 평가하였다[11,12].

2-4. Severity factor

반응온도와 반응시간의 함수[$\text{SF} = \log [t \exp(T - T_{ref})/14.75]$]로 반응의 가혹도(severity factor, SF)를 나타내었다. t 는 반응시간(min), $T(t)$ 는 반응온도(°C), T_{ref} 는 기준 반응온도(100 °C), 그리고 14.75는 임의상수 값이다[18,23-25].

2-5. 분석 방법

시료 중의 5-HMF, FA, LA의 농도는 HPLC 시스템(Agilent 1100, USA)을 사용하였다. 굴절을 검출기, Aminex 87H 칼럼(Bio-rad사, USA)과 칼럼 온도 65 °C, 5 mM sulfuric acid를 이동상으로 0.6 mL/min의 유속으로 분석하였다[11,12].

3. 결과 및 고찰

3-1. *E. spinosum*으로부터 당과 화학중간체(platform chemicals) 생산

본 연구에서는 홍조류인 *E. spinosum*을 대상으로 FeCl_3 를 촉매로 사용하여 당과 화학중간체(platform chemicals)로 전환하고자 하였다. FeCl_3 촉매 전환반응의 최적화를 위해 실험계획법(반응표면분석법)을 적용하였다. Table 1에 실험계획법으로 디자인한 실험조건과 결과를 나타내었다.

Table 1에 의하면, 160 °C, 0.4 M FeCl_3 , 10 min의 실험조건(Run 3)에서 가장 높은 5.18 g/L의 당이 생성되었다. LA는 다수의 실험조건(Run 11, 13, 16)에서 가장 높은 4.3 g/L 내외의 LA가 생성되었다. FA는 200 °C, 0.6M FeCl_3 , 30 min의 실험조건(Run 1)에서 가장 높은 3.77 g/L의 FA가 생성되었다. 5-HMF는 160 °C, 0.4 M FeCl_3 , 10 min의 실험조건(Run 3)에서 가장 높은 농도 3.01 g/L가 생성되었다.

5-HMF 생성 모델의 다중 회귀분석(ANOVA) 결과를 Table 3에 나타내었다. 모델 식은 모델의 F -value가 542.76으로 모델이 중요하다고 판단되었다. 세 개의 1차식의 계수(A, B, C)와 세 개의 cross-product 계수(AB, AC, BC) 그리고 세 개의 2차식의 계수(A^2 , B^2 , C^2)가 중요한 인자(p -values < 0.05)로 확인되었다.

Table 4에 LA의 모델식과 관련된 ANOVA 결과를 나타내었다. 모델 식의 F -value가 24.62로 모델 식이 적절하였다. 모델 식은 세 개의 1차식의 계수(A, B, C)와 두 개의 cross-product 계수(AB, AC)가 중요한 인자였다.

Table 5에 FA의 모델식 ANOVA 결과를 나타내었다. 모델 식의 F -value가 40.87로 모델 식이 적절하였다. 모델 식은 세 개의 1차식의 계수(A, B, C)와 한 개의 cross-product 계수(AB)가 중요한 인자로 나타났다.

반응변수(반응온도, 촉매량, 반응시간)에 대해 ANOVA 분석(Table 3-5)과 다중 회귀분석을 통하여 얻은 모델 추정 식을 Table 2에 나타내었다. 5-HMF, LA, FA의 모델식은 quadratic 또는 2FI

Table 1. Experimental design and data for 3-level-3-factor response surface analysis in Box-Behnken design

Reaction temp. (°C), A	Reaction time (min), B	Catalyst conc. (M), C	Products (g/L)			
			Monomeric sugar (g/L)	LA	FA	5-HMF
200	30	0.6	3.42	4.26	3.77	0.01
180	10	0.6	2.49	4.19	3.14	0.41
160	10	0.4	5.18	2.59	2.08	3.01
160	50	0.4	1.28	4.01	2.87	0.61
180	30	0.4	1.94	4.08	3.00	0.26
160	30	0.2	2.59	2.94	2.13	2.73
180	50	0.2	1.91	3.92	3.03	0.28
180	30	0.4	2.33	3.99	3.08	0.27
180	30	0.4	2.48	3.71	3.07	0.29
180	10	0.2	1.98	3.14	2.71	2.14
200	50	0.4	3.10	4.34	3.62	0.01
180	30	0.4	2.69	4.00	3.16	0.23
200	30	0.2	2.41	4.31	3.37	0.06
200	10	0.4	4.11	4.15	3.66	0.10
160	30	0.6	1.94	4.13	2.90	0.66
180	50	0.6	1.89	4.34	3.10	0.04

Table 2. Final model equation for monomeric sugar, 5-HMF, LA and FA responses resulting from experimental design

Response (g/L)	Final equation in terms of actual factors	Model	R ² (Adj R ²)
5-HMF	$= 62.473 - 0.506A - 0.365B - 31.873C + 0.001AB + 0.126AC + 0.093BC + 0.001A^2 + 0.001B^2 + 4.769C^2$	Quadratic	0.999 (0.997)
LA	$= - 11.250 + 0.075A + 0.169B + 16.798C - 0.001AB - 0.078AC - 0.039BC$	2FI	0.943 (0.904)
FA	$= - 7.295 + 0.053A + 0.108B + 5.896C - 0.001AB - 0.023AC - 0.022BC$	2FI	0.965 (0.941)
Monomeric sugar	$= 80.037 - 0.793A - 0.388B - 5.936C + 0.002AB + 0.104AC - 0.033BC + 0.002A^2 + 0.001B^2 - 13.973C^2$	Quadratic	0.814 (0.536)

A (Reaction temperature, °C), *B* (Reaction time, min), *C* (Catalyst concentration, M) are the actual values of the independent factors.

Table 3. ANOVA results for the response surface quadratic model for 5-HMF formation

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Prob. > F ^{a,b}
Model	14.736	9	1.637	542.756	4.93E-08
A-Temperature	5.857	1	5.857	1941.538	9.15E-09
B-Time	2.793	1	2.793	925.809	8.36E-08
C-Catalyst conc.	2.093	1	2.093	693.681	1.98E-07
AB	1.327	1	1.327	440.035	7.65E-07
AC	1.019	1	1.019	337.874	1.67E-06
BC	0.552	1	0.552	182.824	1.01E-05
A ²	0.675	1	0.675	223.711	5.62E-06
B ²	0.275	1	0.275	91.080	7.56E-05
C ²	0.146	1	0.146	48.255	0.000441
Residual	0.018	6	0.003		
Lack of Fit	0.017	3	0.006	10.419	0.04282
Pure Error	0.002	3	0.001		
Cor Total	14.754	15			

Table 4. ANOVA results for the response surface 2FI model for LA formation

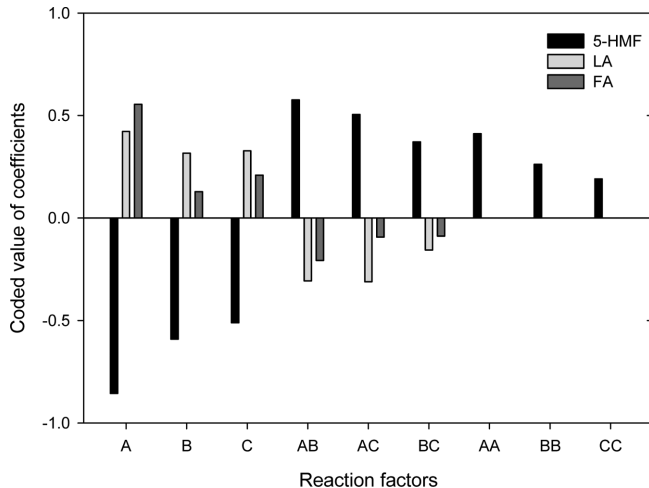
Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Prob. > F ^{a,b}
Model	3.943	6	0.657	24.624	4.23E-05
A-Temperature	1.426	1	1.426	53.442	4.51E-05
B-Time	0.800	1	0.800	29.965	0.000393
C-Catalyst conc.	0.857	1	0.857	32.121	0.000307
AB	0.376	1	0.376	14.077	0.004542
AC	0.387	1	0.387	14.487	0.004178
BC	0.097	1	0.097	3.653	0.088289
Residual	0.240	9	0.027		
Lack of Fit	0.162	6	0.027	1.042	0.530009
Pure Error	0.078	3	0.026		
Cor Total	4.183	15			

Table 5. ANOVA results for the response surface 2FI model for FA formation

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-value	Prob. > F ^{a,b}
Model	3.179	6	0.530	40.872	4.98E-06
A-Temperature	2.460	1	2.460	189.803	2.36E-07
B-Time	0.132	1	0.132	10.153	0.01107
C-Catalyst conc.	0.349	1	0.349	26.940	0.000571
AB	0.172	1	0.172	13.238	0.005414
AC	0.035	1	0.035	2.671	0.136621
BC	0.031	1	0.031	2.425	0.153855
Residual	0.117	9	0.013		
Lack of Fit	0.105	6	0.018	4.504	0.122191
Pure Error	0.012	3	0.004		
Cor Total	3.296	15			

Table 6. Comparisons of 5-HMF, FA and LA production

Species	Reaction conditions	Product/concentration	References
<i>G. verrucosa</i>	140°C, 7.5 liquid/solid ratio, 15% Amberlyst 15, 150 min	10.7 g/L 5-HMF, 2.5 g/L LA	[7]
<i>G. verrucosa</i>	180°C, 10% biomass amount, 0.5M MSA, 20 min	22.02% LA	[8]
<i>K. alvarezii</i>	178.2°C, 62.5 g/L biomass amount, 2.87% H ₂ SO ₄ , 39.3 min	18.7% LA	[9]
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	175°C, 3.7% H ₂ SO ₄ , 35 min	4.0% LA	[10]
<i>Sargassum fulvellum</i>	189.5°C, 2.93% H ₂ SO ₄ , 48.8 min	2.65 g/L LA	[20]
<i>Gelidium amansii</i>	160.0°C, 3.0% H ₂ SO ₄ , 43.1 min	9.74 g/L LA	[5]
<i>Codium fragile</i>	160.7°C, 3.9% H ₂ SO ₄ , 39.1 min	4.26 g/L LA	[6]
Corn stalk	180°C, 0.5 mol/L FeCl ₃ , 40 min	16.14 g/L LA	[21]
<i>E. spinosum</i>	160°C, 0.4M FeCl ₃ , 10 min	2.96 g/L 5-HMF	This work
	200°C, 0.6M FeCl ₃ , 30 min	4.26 g/L LA	
	200°C, 0.6M FeCl ₃ , 30 min	3.77 g/L FA	

**Fig. 1. Effect of explanatory factors on 5-HMF, LA, and FA formation. A (Reaction temperature), B (Catalyst concentration), C (Reaction time).**

모델의 R² 값이 0.94 이상(Adj. R² 값은 0.90 이상)의 높은 값을 나타내어 모델식이 적절히 예측하리라 판단된다. 단당(monomeric sugar)의 모델식은 상대적으로 낮은 R² 값을 나타내었다.

Fig. 1은 반응인자가 모델식에 미치는 영향을 비교한 것이다. 5-HMF 모델에서는 반응온도(A), 반응시간(B), 촉매농도(C)가 부정적인 영향을 주었고, 나머지 AB, AC, BC, A², B², C²은 긍정적인 영향을 주었다. LA 모델에서는 A, B, C가 긍정적인 영향을, 나머지 AB, AC, BC는 부정적인 영향을 나타내었다. FA 모델에서는 LA 모델과 유사하게 반응 인자들이 영향을 나타내었다. 이는 LA와

FA가 5-HMF의 과분해 반응을 통해 생성되는 기작에 의한 것으로 판단된다.

Fig. 2는 *E. spinosum*으로부터 당과 화학중간체의 생성에 미치는 반응 인자들의 영향을 나타내었다. 5-HMF 생성에는 세 반응 인자들의 크기가 커질수록 5-HMF가 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2(A)). LA 생성은 세 반응인자의 크기가 커질수록 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2(B)). FA의 경우에서도 세 반응 인자의 크기가 증가할수록 선형적으로 증가하였으며, 특히 반응온도(A)의 영향이 크게 나타났다. 단당의 경우에는 반응온도의 증가에 따라 감소하다가 이후 증가하는 경향을, 반응시간이 증가할수록 감소하는 경향을, 그리고 촉매농도의 증가에 따라 증가하다 감소하는 경향을 보였다.

Fig. 3은 *E. spinosum*으로부터 5-HMF의 생성에 반응인자가 미치는 상호작용을 나타내었다. Fig. 3(A)에 0.4M의 FeCl₃ 촉매농도 하에서 5-HMF 생성에 미치는 반응온도와 반응시간의 상호작용을 나타내었다. 낮은 반응온도 조건에서 반응시간이 증가할수록 5-HMF 생성이 감소하였다. 높은 온도에서는 반응시간에 의한 영향이 없었다. 이는 높은 반응온도에서는 짧은 시간에 당이 5-HMF로 전환된 후 과분해 반응으로 인해 5-HMF가 분해되었기 때문으로 판단된다[10,11,18]. Fig. 3(B)는 30 min 반응시간에서 5-HMF의 생성에 반응온도와 촉매농도가 미치는 상호관계를 나타낸 것이다. 낮은 반응온도에서는 촉매농도가 증가할수록 5-HMF의 생성이 감소하였다. 높은 반응온도에서는 촉매농도에 상관없이 낮게 나타났다. Fig. 3(C)는 180 °C에서 5-HMF 생성에 미치는 반응시간과 촉매농도의 상호관계를 나타낸 것이다. 촉매농도와 반응시간의 증가에 따라 5-HMF의 생성은 감소하였다. 5-HMF의 생성에는 낮은 반응온도와 촉매농도, 그리고 짧은 반응시간에서 증가하였다. 종합적

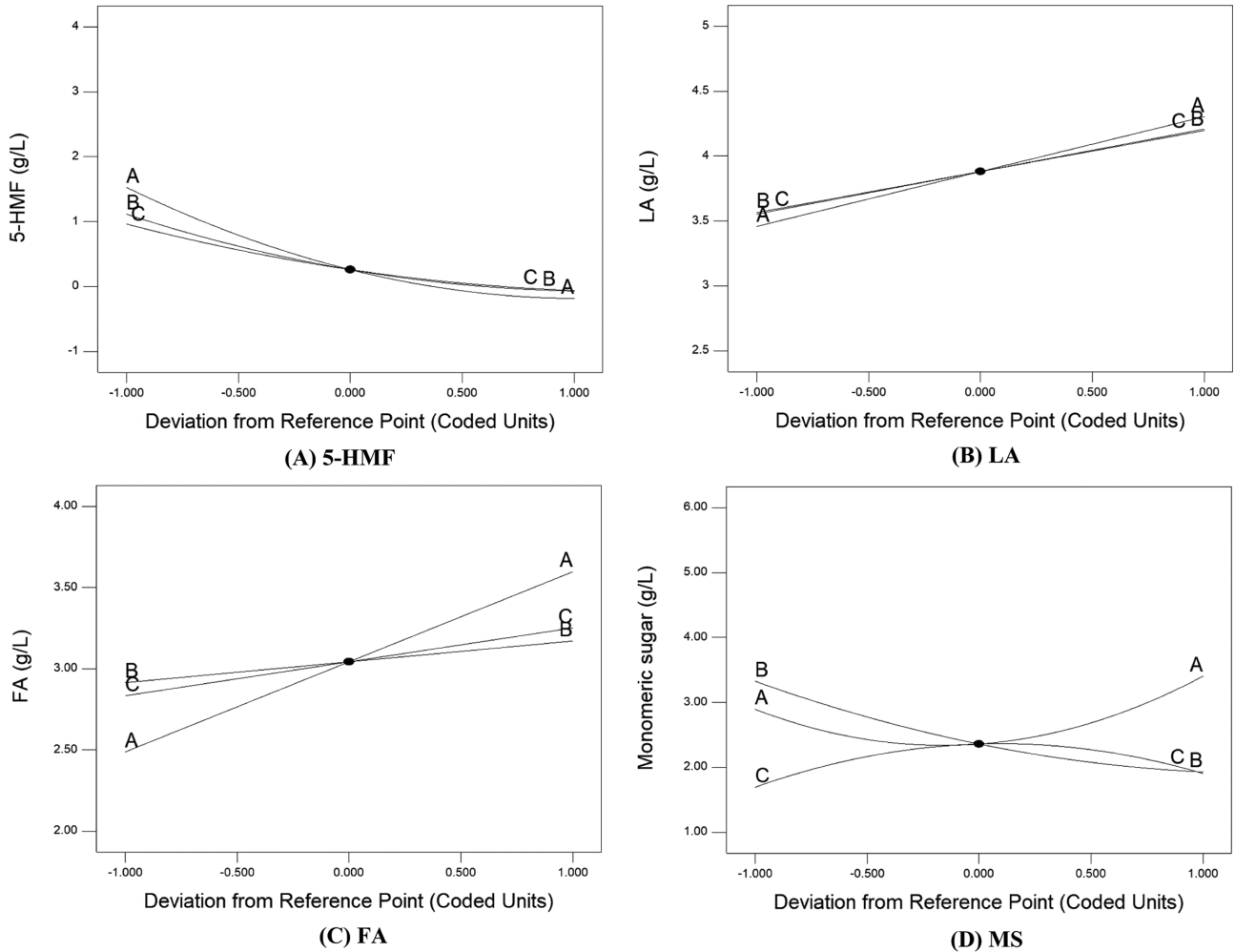


Fig. 2. Perturbation plot for comparing the effects of reaction temperature, catalyst concentration and reaction time on the formation of 5-HMF (A), LA (B), FA (C) and monomeric sugar (D) from *E. spinosum* under constant reaction condition.

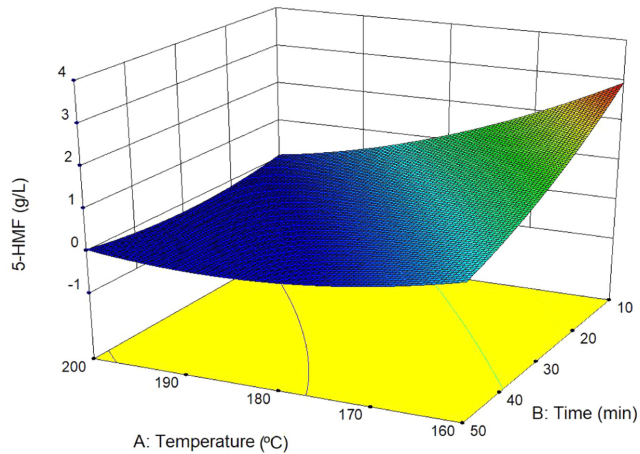
으로 5-HMF의 생성은 반응온도, 촉매농도가 낮을수록, 그리고 반응시간이 짧을수록 높게 나타났다.

Fig. 4는 LA의 생성에 반응인자가 미치는 상호작용에 의한 영향을 나타낸 것이다. 0.4 M의 촉매하에서 LA의 생성에 반응온도와 반응시간이 미치는 상호관계를 나타낸 결과(Fig. 4(A)), 짧은 반응시간 조건에서는 반응온도가 증가할수록 LA의 생성이 증가하였으나, 긴 반응시간에서는 온도가 증가하더라도 큰 증가를 보이지 않았다. Fig. 4(B)는 30 min의 반응시간 조건에서 반응온도와 촉매농도의 상호관계를 나타내었다. 낮은 촉매농도 조건에서는 반응온도 증가에 따라 LA 생성이 증가하였으며, 높은 촉매 농도에서는 큰 영향을 보이지 않았다. 또한, 낮은 반응온도에서는 촉매농도가 증가할수록 생성률이 증가하였으나, 높은 온도에서는 촉매농도에 큰 영향을 보이지 않았다. 180 °C 조건에서 LA의 생성에 반응시간과 촉매농도가 미치는 영향을 나타낸 결과(Fig. 4(C)), 촉매농도가 증가할수록, 그리고 반응시간이 증가할수록 LA의 생성이 증가하는 경향을 나타내었다. 총괄적으로 LA의 생성은 반응온도가 높을수록, 촉매농도가 높을수록 높게 나타났다.

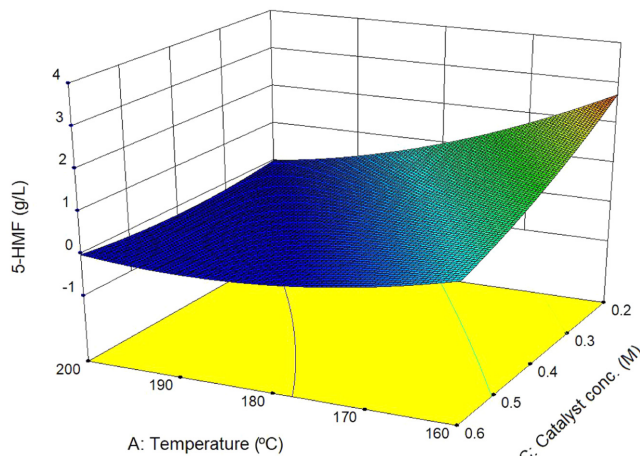
Fig. 5는 FA의 생성에 미치는 반응인자의 상호작용에 의한 영향을 나타낸 것이다. 0.4 M의 촉매하에서 FA의 생성에 반응온도와 반응시간의 상호작용을 나타낸 결과(Fig. 5(A)), LA의 경우와 유사하게

짧은 반응시간에서는 반응온도의 증가에 따라 FA의 생성이 증가하였으나, 긴 반응시간에서는 온도가 증가하는 정도가 낮았다. 또한, 고온의 조건에서는 반응이 진행됨에 따라 FA의 생성이 줄어들었다. 이는 고온의 가혹한 조건에서 FA가 이산화탄소와 수소로 과분해된 것으로 판단된다[2,18]. 30 min의 반응시간 조건에서 반응온도와 촉매농도의 상호영향을 나타낸 결과(Fig. 5(B)), 반응온도 증가에 따라 FA 생성이 증가하였으며, 촉매농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. 가장 높은 FA 생성은 높은 온도와 높은 촉매농도 조건에서 나타났다. 180 °C 조건에서 FA의 생성에 미치는 반응시간과 촉매농도의 영향을 나타낸 결과(Fig. 5(C)), 높은 촉매농도와 짧은 반응시간에서 높은 FA 생성이 이루어졌다. 총괄적으로 FA의 생성은 LA의 경우와 유사하게 반응온도가 높을수록, 촉매농도가 높을수록 높게 나타났다.

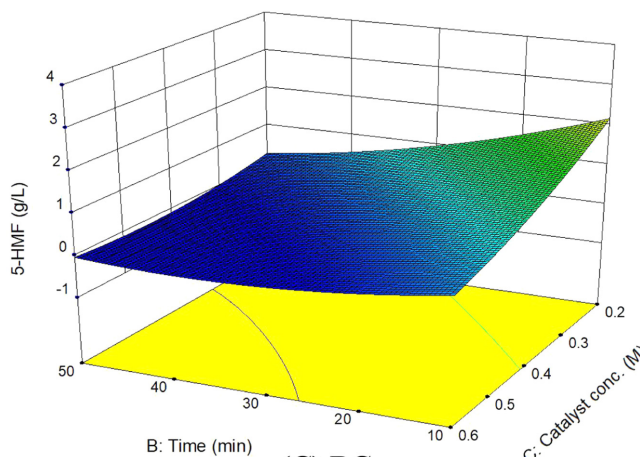
FeCl₃ 촉매하에서 *E. spinosum*으로부터 5-HMF, LA, FA의 생성을 위해 반응표면분석법을 적용하여 반응변수의 최적화를 수행하여 최적의 반응조건을 얻었다. 5-HMF의 최적 생성 조건은 160 °C, 0.4 M FeCl₃, 그리고 10 min에서 3.01 g/L의 생성이 예측되었다. LA는 200 °C, 0.6M FeCl₃, 30 min의 조건에서 4.32 g/L의 생성이 예측되었다. 또한, FA도 200 °C, 0.6M FeCl₃, 30 min의 조건에서 3.71 g/L의 생성이 예측되었다. 모델식을 통한 최적화 조건에서 얻은 결과를



(A) AB



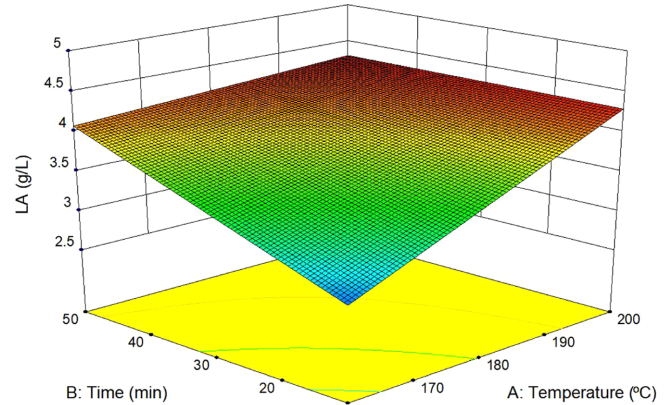
(B) AC



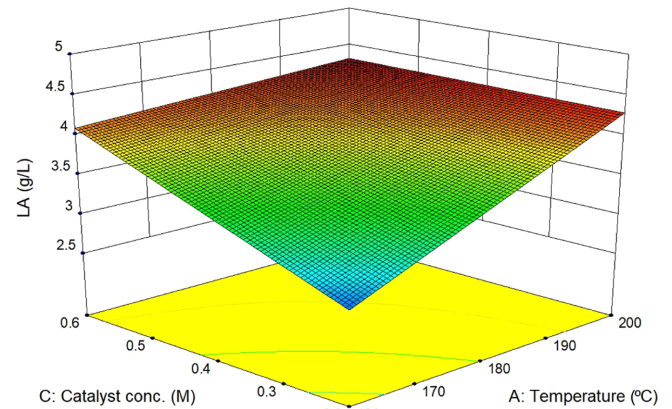
(C) BC

Fig. 3. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and the reciprocal interaction of these factors on the production of 5-HMF from *E. spinosum* at a constant reaction condition. (A) At a constant 30 min; (B) At a constant 0.4 M FeCl_3 ; (C) At a constant 180 °C.

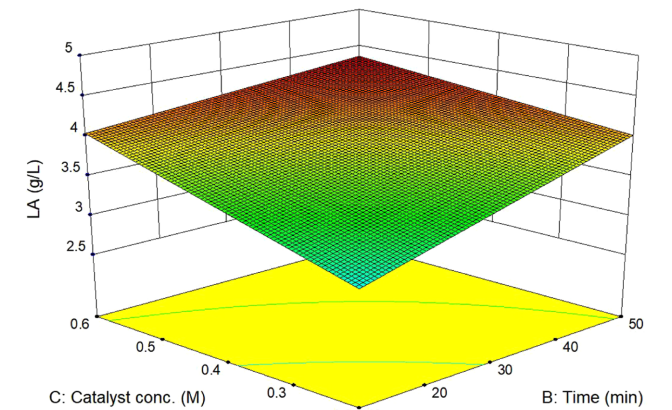
검증하기 위하여 각각의 최적 조건에서의 5-HMF, LA 그리고 FA의 생성을 비교한 결과, 각각 5-HMF가 2.96 ± 0.221 g/L, LA는 4.26 ± 0.06 g/L, FA는 3.77 ± 0.04 g/L가 생성되었으며, 예측된 값과 95% 이상의 만족도를 나타내었다.



(A) AB



(B) AC



(C) BC

Fig. 4. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and the reciprocal interaction of these factors on the production of LA from *E. spinosum* at a constant reaction condition. (A) At a constant 30 min; (B) At a constant 0.4 M FeCl_3 ; (C) At a constant 180 °C.

다양한 해조류로부터 화학중간체(platform chemicals)로의 전환과 관련된 여러 연구결과를 Table 3에 비교하였다[7-12,26]. 홍조류인 *G. verrucosa*에 산성 고체촉매(Amberlyst 15)를 촉매로 수열 반응하여 7.5 liquid/solid 비, 15% 고체촉매, 140 °C, 150 min의 조건에서 10.7 g/L의 5-HMF와 2.5 g/L의 LA의 생성을 보고하였다[9]. Park 등[10]에 의하면 MSA 촉매 하의 수열 반응(180 °C, 10% 바이오매스량, 0.5 M MSA, 20 min)에서 *G. verrucosa*로부터 22.02% 수율의

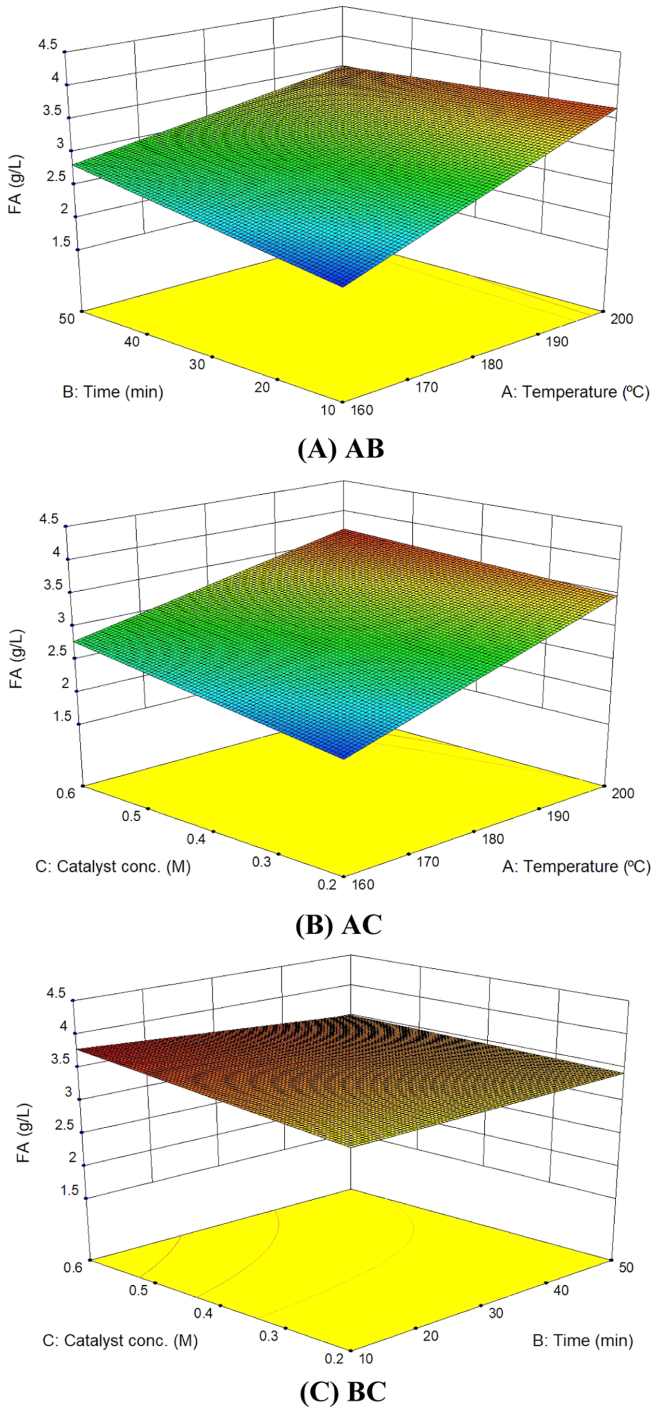


Fig. 5. Response surface plot representing the effect of reaction temperature, catalyst concentration, reaction time, and the reciprocal interaction of these factors on the production of FA from *E. spinosum* at a constant reaction condition. (A) At a constant 30 min; (B) At a constant 0.4M FeCl₃; (C) At a constant 180 °C.

LA를 생성하였다고 보고하였다. 또한, Lee 등[11]은 홍조류인 *K. alvarezii*를 황산을 촉매로 사용하여 가수분해(178.2 °C, 62.5 g/L 바이오매스, 2.87% H₂SO₄, 39.3 min)하여 18.7% 수율의 LA 생성을 보고하였다. 또한, 홍조류인 *Gelidium amansii*로부터는 9.74 g/L의 LA가 보고되었다[7]. 그러나 Kim 등[12]은 녹조류인 *Enteromorpha*

*intestinalis*의 열수 가수분해(175 °C, 3.7% H₂SO₄, 35 min)에서 단지 4.0%의 LA 수율이 보고하였다. 또 다른 녹조류인 *Codium fragile* 으로부터는 4.26 g/L의 LA가 생성되었다고 보고되고 있다[8]. 갈조류인 *Sargassum fulvellum*을 대상으로 열수 가수분해(189.5 °C, 2.93% H₂SO₄, 48.8 min) 반응의 결과 2.65 g/L의 LA를 보고하였다[26].

FeCl₃를 촉매로 이용하여 해조류로부터 열화학적인 방법으로 chemicals로 전환한 연구결과는 아직 보고되지 않았으나, 목질계 자원을 대상으로 연구된 결과는 다음과 같았다. Zheng 등[16]은 기질로 corn stalk을 사용하여 FeCl₃를 촉매로 사용하여 LA를 생산하는 연구에서 180 °C, 0.5 mol/L FeCl₃, 40 min의 조건에서 최대 16.14 g/L의 LA를 얻었고, FeCl₃가 corn stalk로부터 glucan hydrolysis와 LA 생산에 효율적인 촉매로 판단하였다. 기존의 연구결과와 비교하면, 해조류로부터 산성 촉매를 이용한 화학중간체로의 전환한 다수의 연구결과가 있으나, FeCl₃를 촉매로 해조류에 적용한 연구는 미미한 것으로 판단되어 직접적인 비교에는 어려움이 있었다. 본 연구에서 *E. spinosum*과 FeCl₃를 촉매로 사용한 경우는 해조류를 대상으로 산 촉매를 사용한 경우에 비해 낮은 전환수준인 것으로 판단된다. 또한, 목질계 자원인 corn stalk를 이용한 연구[16]에서는 FeCl₃ 촉매에 의해 glucan이 가수분해되고 LA로 전환되는 결과를 나타내어 다양한 종류의 해조류를 대상으로 한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

3-2. Severity factor의 영향

Fig. 6은 severity factor가 화학중간체의 생성에 미치는 관계를 나타낸 것이다. 5-HMF (Exponential decay model, $f=y_0+a \times \exp(-b \times x)$, $y_0=-0.446$, $a=160.256$, $b=1.372$, $R^2=0.849$)의 경우에는 severity factor가 증가할수록 급격히 감소하는 경향을 보였다. LA (Sigmoidal model, $f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$, $a=4.299$, $b=0.454$, $x_0=2.559$, $R^2=0.794$)와 FA (Sigmoidal model, $f=a/(1+\exp(-(x-x_0)/b))$, $a=3.997$, $b=0.898$, $x_0=2.660$, $R^2=0.852$)의 경우는 severity factor가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 어느 이상의 가속한 severity factor의 조건에서는 *E. spinosum*으로부터 생성된 5-HMF가 LA와 FA로 과분해되었기 때문이라고 판단된다[10,11,18].

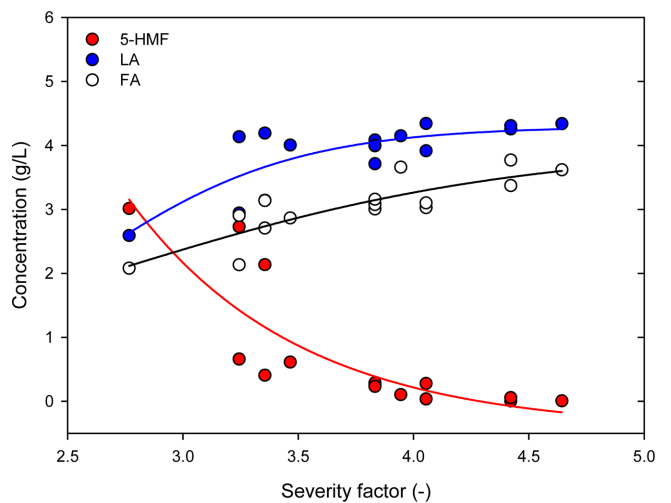


Fig. 6. Effect of severity factor on the formation of 5-HMF, levulinic and formic acids by FeCl₃-catalyzed hydrothermal reaction of *E. spinosum*.

4. 결 론

본 연구에서는 홍조류인 *E. spinosum*을 대상으로 수열전환반응을 통하여 화학중간체(platform chemicals)로 전환하기 위하여 FeCl₃ 촉매와 반응표면분석법을 적용하였다. 화학중간체 생성에 영향을 주는 반응 인자들의 상호작용을 확인한 결과, 실험범위 내에서 5-HMF는 반응온도와 촉매농도가 낮을수록, 그리고 반응시간이 짧을수록 높게 나타났다. LA와 FA는 반응온도와 촉매농도가 높을수록 높게 나타났다. 반응표면분석법을 통한 최적화 결과, 5-HMF는 160 °C, 0.4M FeCl₃, 10 min에서 2.96 g/L가 생성되었다. LA와 FA는 200 °C, 0.6M FeCl₃, 30 min의 조건에서 각각 4.26 g/L와 3.77 g/L가 생성되었다. 위의 결과는 거대 해조류인 *E. spinosum*을 화학중간체로 전환할 수 있는 바이오매스 자원으로서의 가능성을 확인하였다.

감 사

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2019 Year).

References

- Demibras, A., "Progress and Recent Trends in Biofuels," *Prog. Energ. Combust. Sci.*, **33**, 1-18(2007).
- Kamm, B., Gruber, P. R. and Kamm, M., *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim(2006).
- Putten, R. J., Waal, J. C., Jong, E., Rasrendra, C. B., Heeres, H. J. and Vries, J. G., "Hydroxymethylfurfural, a Versatile Platform Chemical Made from Renewable Resources," *Chem. Rev.*, **113**(3), 1499-1497(2013).
- Chheda, J. N., Roman-Leshkov, Y. and Dumesic, J. A., "Production of 5-hydroxymethylfurfural and Furfural by Dehydration of Biomass-derived Mono- and Polysaccharides," *Green Chem.*, **9**, 342-350(2007).
- Kim, Y. W. and Shin, H. J., "Introduction of Alkali Soaking and Microwave Drying Processes to Improve Agar Quality of *Gracilaria verrucosa*," *Korean J. Chem. Eng.*, **34**(12), 3163-3169(2017).
- Siripong, P., Doungpom, P., Yoo, H. Y. and Kim, S. W., "Improvement of Sugar Recovery from *Sida acuta* (Thailand Weed) by NaOH Pretreatment and Application to Bioethanol Production," *Korean J. Chem. Eng.*, **35**(12), 2413-2420(2018).
- Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Sugars and Levulinic Acid from Marine Biomass *Gelidium amansii*," *Appl. Biochem. Biotech.*, **161**, 41-52(2010).
- Jeong, G. T. and Park, D. H., "Production of Levulinic Acid from Marine Algae *Codium fragile* Using Acid-hydrolysis and Response Surface Methodology," *KSBB Journal*, **26**, 341-346(2011).
- Jeong, G. T., Kim, S. K. and Park, D. H., "Application of Solid-acid Catalyst and Marine Macro-algae *Gracilaria verrucosa* to Production of Fermentable Sugars," *Bioresour. Technol.*, **181**, 1-6(2015).
- Park, M. R., Kim, S. K. and Jeong, G. T., "Optimization of the Levulinic Acid Production from the Red Macroalga, *Gracilaria verrucosa* Using Methanesulfonic Acid," *Algal Res.*, **31**, 116-121(2018).
- Lee, S. B., Kim, S. K., Hong, Y. K. and Jeong, G. T., "Optimization of the Production of Platform Chemicals and Sugars from the Red Macroalga, *Kappaphycus alvarezii*," *Algal Res.*, **13**, 303-310(2016).
- Kim, D. H., Lee, S. B., Kim, S. K., Park, D. H. and Jeong, G. T., "Optimization and Evaluation of Sugars and Chemicals Production from Green Macro-algae *Enteromorpha intestinalis*," *Bioenerg. Res.*, **9**, 1155-1166(2016).
- Ra, C. H., Jung, J. H., Sunwoo, I. Y., Kang, C. H., Jeong, G. T. and Kim, S. K., "Detoxification of *Eucheuma spinosum* Hydrolysates with Activated Carbon for Ethanol Production by the Salt-tolerant Yeast *Candida tropicalis*," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 856-862(2015).
- Kim, M. J., Kim, J. S., Ra, C. H. and Kim, S. K., "Bioethanol Production from *Eucheuma spinosum* Using Various Yeasts," *KSBB Journal*, **28**(5), 315-318(2013).
- Zhang, H., Ye, G., Wei, Y., Li, X., Zhang, A. and Xie, J., "Enhanced Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse with Ferric Chloride Pretreatment and Surfactant," *Bioresour. Technol.*, **229**, 96-103(2017).
- Zheng, X., Zhi, Z., Gu, X., Li, X., Zhang, R. and Lu, X., "Kinetic Study of Levulinic Acid Production from Corn Stalk at Mild Temperature Using FeCl₃ as Catalyst," *Fuel*, **187**, 261-267(2017).
- 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>(2004).
- Kim, H. S. and Jeong, G. T., "Valorization of Galactose Into Levulinic Acid via Acid Catalysis," *Korean J. Chem. Eng.*, **35**, 2232-2240(2018).
- Kim, H. S., Park, M. R., Kim, S. K. and Jeong, G. T., "Valorization of Chitosan into Levulinic Acid by Hydrothermal Catalytic Conversion with Methanesulfonic Acid," *Korean J. Chem. Eng.*, **35**, 1290-1296(2018).
- Chemical Economics Handbook, 2016. Formic acid. <https://www.ihs.com/products/formic-acid-chemical-economics-handbook.html>. (Accessed 07 Feb. 2020).
- Zhou, D., Hou, Q., Liu, W. and Ren, X., "Rapid Determination of Formic and Acetic Acids in Biomass Hydrolysate by Headspace Gas Chromatography," *J. Ind. Eng. Chem.*, **47**, 281-287(2017).
- Joó, F., "Breakthroughs in Hydrogen Storage-Formic Acid as a Sustainable Storage Material for Hydrogen," *ChemSusChem*, **1**(10), 805-808(2008).
- Banerji, A., Balakrishnan, M. and Kishore, V. V. N., "Low Severity Dilute-acid Hydrolysis of Sweet Sorghum Bagasse," *Appl. Energy*, **104**, 197-206(2013).
- Estrada-Martínez, R., Favela-Torres, E., Soto-Cruz, N. O., Escalona-Buendía, H. B. and Saucedo-Castañeda, G., "A Mild Thermal Pre-treatment of the Organic Fraction of Municipal Wastes Allows High Ethanol Production by Direct Solid-state Fermentation," *Biotechnol. Bioproc. E.*, **24**(2), 401-412(2019).
- Park, M. R., Kim, S. K. and Jeong, G. T., "Biosugar Production from *Gracilaria verrucosa* with Sulfamic Acid Pretreatment and Subsequent Enzymatic Hydrolysis," *Biotechnol. Bioproc. E.*, **23**(3), 302-310(2018).
- Jeong, G. T., "Production of Total Reducing Sugar and Levulinic Acid from Brown Macro-algae *Sargassum fulvellum*," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**(2), 177-183(2014).