Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 26: 317-322 (2011)

연구논문

해조류 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)의 친환경적 이용을 위한 바이오에탄올의 생산

김종덕[2]*, 윤양호, 신태선, 김민용, 변헌수, 오석진[1], 서효진

Bioethanol Production from Seaweed *Ulva pertusa* for Environmental Application

Jong Deog KIM[2]*, Yang Ho YOON, Tai Sun SHIN, Min Yong KIM, Hyun Soo BYUN, Seok Jin OH[1], and Hyo Jin SEO

접수: 2011년 7월 7일 / 게재승인: 2011년 8월 17일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: *Ulva pertusa* is one of the worst pollutant like a waste vinyl after agriculture and caused bad smell at seashore in Jejudo and south area of korean peninsular. For favorable environmental utilization of *Ulva pertusa*, it could be applied for ethanol production with its acid hydrolysate. The components of hydrolysate included fermentable sugar of glucose, xylose, mannose, galactose, and higher amounts of unfermentable rhamnose. Fermentable sugars were converted to ethanol with *S. cerevisiae,* also xylose to ethanol with *P. stipitis,* their maximun ethanol production at optimum conditions were 462 μg/mL and 475 μg/mL, respectively. While, rhamnose cannot be changed to ethanol with *S. cerevisiae* or *P. stipitis,* alone. Combination of *S. cerevisiae* and *P. stipitis* can convert rhamnose to ethanol, because *P.stipitis* degradaded rhamnose to pyruvate, and then *S. cerevisiae* convert to ethanol, at optimum conditions, ethanol reached to 782 μg/mL (30.24%) that is higher than that of 2 strain alone from 500 mg of dried *Ulva pertusa* contained 2586.45 μg/mL of reduced sugars. *Ulva pertusa* can be utilized for renewal energy insted of environmenatal enemy.

Keywords: *Ulva pertusa*, Seashore waste, H_2SO_4, Rhamnose, *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, Combined strain, Ethanol

전남대학교 해양미래자원개발사업단
Marine Future Resources Development Agency, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea

[1]부경대학교 해양학과
[1]Department of Oceanography, Pukyong National University

[2]전남대학교 항비만·건강연구소
[2]Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea
Tel: +82-61-659-3305, Fax: +82-61-659-3305
e-mail: pasteur@chonnam.ac.kr

1. 서론

화석연료의 고갈, 이로 인한 지구의 온난화, 대기오염, 기후변화 등은 현실로 다가와 자연의 질서를 바로잡게 다그치고 있다.

지구온난화를 규제·방지하기 위해 설립된 국제기구인 유엔 기후변화협약 (United Nations Framework Convention on Climate Change: UNFCCC)은 강도 높은 지구 온실가스 감축을 추진하고 있으며, 2005년 발효된 교토의정서에 의하여 선진국들은 2008년부터 2012년까지 1990년 수준 보다 평균 5.2% 온실가스를 감축할 예정이며, 2013년 이후 포스트교토 체제를 대비한 국제적인 강력한 온실가스 규제는 강화될 전망이다. 즉, 화석연료 사용을 줄여 온실가스를 감축하고 탄소흡수원을 확보하면서도 경제를 발전시킬 수 있는 대안을 모색 중이다.

녹색성장의 핵심은 화석연료를 대체할 수 있는 대체에너지를 개발하는 것이라 할 수 있다. 따라서 새로운 신재생에너지원으로 각광을 받고 있는 것이 바이오에너지이다. 바이오에너지원으로는 곡물, 목질계, 부산물 및 해조류 등이 있다.

Table 1. Composition of reducing sugar treated with different H_2SO_4 concentration from *Ulva pertusa*

(unit: μg/mL)

samples	1	2	3	4	5	6	7
	H-0	H-2	H-10	H-20	H-36	H-50	H-72
Sucrose	3.61	32.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Cellobiose	0.00	5.44	35.25	6.40	12.29	9.02	7.99
Maltose	2.66	37.51	3.88	0.00	0.00	2.01	1.87
Lactose	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Rhamnose	1.07	203.74	963.49	1229.09	1585.43	1787.77	16.42
Ribose	1.21	15.47	49.82	46.07	60.24	0.00	0.00
Mannose	0.00	4.45	88.24	94.61	102.69	104.26	94.80
Arabinose	0.00	4.29	2.30	0.00	0.14	0.41	15.77
Galactose	1.30	7.24	28.23	33.23	39.80	38.54	0.00
Xylose	0.00	56.14	161.78	160.45	192.09	209.25	171.16
Glucose	1.74	36.42	287.62	327.90	397.44	435.19	852.97
Sum	11.60	403.11	1620.62	1897.75	2390.12	2586.45	1160.98
Weight after reaction (500 mg)	0.180	0.138	0.135	0.154	0.128	0.146	0.091

* H-0,2,10,36,50 and 73 : H_2SO_4 concentration (%).

그러나 곡물을 이용한 에너지 생산은 식량문제와 우리나라의 토지 이용의 한계로 인하여 크게 제약받고 있다. 최근 미국을 비롯한 선진국에서 곡물 바이오에너지 생산을 늘림으로써 2007년 곡물가격 급등이라는 유래 없는 사태를 초래한 바 있다. 이에 대하여 FAO를 비롯한 국제기구에서 곡물 에너지화에 대하여 인류식량차원에서 공식반대하고 있음을 감안할 때 장기적으로 바람직하지 않은 것 같다. 그 외에 목질계와 부산물의 경우도 원료를 지속적으로 생산할 수 있는 것이 아니기 때문에 발전가능성은 그리 크지 않은 것으로 보인다. 이에, 미래 차세대 에너지자원으로 부상하고 있는 것이 바로 해조류이다.

해조류는 우리나라를 비롯한 동양권에서 식용하는 식품으로, 해조의 세계 생산량은 연간 대략 4백만 톤이다. 이 생산량의 80% 이상이 아시아의 태평양 지역에서 생산되며, 이중 상당부분은 중국, 일본, 한국에서 생산하여 소비하고 있다. 녹조식물문의 갈파래과 해초인 구멍갈파래는 일년생 해초로서 우리나라의 어디서나 볼 수 있고, 일본을 비롯한 거의 전 세계적으로 널리 분포하며, 함유 성분 중에는 단백질, 아미노산, 비타민 등이 많아 영양가가 높을 뿐만 아니라 특유의 향기가 있고, 다양한 영양분으로 인하여 건강보조식품, 생리활성물질의 공급원등으로서도 각광을 받고 있어 해조의 이용도는 늘어날 것으로 전망된다.

농사가 끝난 후 방치되는 폐비닐처럼 쌓여서 썩어가면서 환경오염의 주범으로 골칫거리가 되고 있으며, 연안 어업에도 막대한 지장을 초래하고 있다.

한편, 해조류인 구멍갈파래 (*Ulva pertusa*)는 제주 바닷가를 점령하는 여름철 불청객이다. 한 해 2천 ton 이상이 생겨나는데 특히 여름철에는 해안을 온통 뒤덮어 해수욕장 등 해안 경관을 망칠뿐더러 악취마저 심하게 풍겨 눈살을 찌푸리게 한다. 도내에선 제주시 구좌읍 종달리, 서귀포시 성산읍 신양리, 휘닉스아일랜드 등 연안에 대량 번식한 구멍갈파래가 다행히 최근에는 제주해양수산자원연구소가 구멍갈파래를 이용하여 전복의 사료로 개발하였다고 하니 구멍갈파래의 처리에 한시름 놓은 것 같기도 하다. 하지만, 이렇게 많이 생겨나는 구멍갈파래의 다른 방향으로도 이용 가능 할 수 있다면 더욱 그 응용도를 높일 수 있으며, 그 처리에도 한가지 방향이 될 수 있을 것이다. 본 연구자는 제주연안 뿐만 아니라 많은 지방에서 처리에 문제가 많은 구멍갈파래를 이용하여 새로운 바이오매스로써 활용하여 바이오에탄올 생산하여 에너지 대체부분에 도움이 되고자 한다. 특히 해조류의 바이오매스로서의 중요성은 목질계의 바이오매스보다 분해하기가 쉽고, 리그닌을 제거하는 작업이 필요 없으며, 조직이 유연하고, 굳이 산림을 훼손하지 않아도 되는 다양한 장점을 가지고 있다.

Fig. 1. *Ulva pertusa* contaminated seashore like waste vinyl in Jejudo.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료 처리

구멍갈파래는 제주도 서귀포 휘닉스아일랜드 근처에서 채집하였으며 건조 후 분쇄하여 사용하였다. 시료 500 mg을 정량하여 0, 2, 5, 10, 20, 36, 50 및 72%의 H_2SO_4를 각각

Table 2. Production yields and maximum products with yeasts from H_2SO_4 hydrogenate of *U. peritus*

Concentration of acid (%)	*S. cerevisiae* (S.c)		*P. stipitis* (P.s)		*S. cerevisiae* and *P. stipitis*	
	% EtOH yield	Maximum EtOH (μg/mL)	% EtOH yield	Maximum EtOH (μg/mL)	% EtOH yield	Maximum EtOH (μg/mL)
0	57.9	0.9	44.9	0.4	42.4	0.8
2	81.3	20	84.5	40	74.5	85
10	89.6	185	84.9	195	79.2	430
20	86.7	202	84.1	210	81.1	525
36	84.8	234	80.3	242	85.3	694
50	84.6	250	80.2	264	86.6	782
72	95.4	462	90.8	475	52.0	275

5 mL 첨가하여, 30℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 증류수 14 mL를 첨가하고, 105℃에서 2시간 가수분해 시킨 후 10,000xg에서 10분간 원심분리하고 NaOH로 중화시켜 시료로 사용하였다.

2.2. 구멍갈파래의 구성 당 분석

HPLC의 구성은 Shimadzu LC-20AD pump, CTO-20AC oven, Sil-20AC auto-sampler, RF-10Axl fluorescence detector, CBM-20A system controller, CRB-6A reaction box LC Workstation software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 이용하였다. 환원당 분리는 ion exchange Shim-pack ISA-07 (4.0×250 mm) 분석 column과 Shim-pack ISA guard column (4.0×50.0 mm)을 사용하였다. 이동상은 A용액으로 potassium borate (pH 8)과 B용액으로 potassium borate (pH 9)를 사용하였는데 B용매를 0분에서 0%으로 시작하여 30분에 50%으로 증가시키고 50분에 100%으로 증가하여 15분간 100%으로 유지하다가 65분 이후에 0%으로 감소하여 총 90분의 분석 시간으로 하였다. injection volumn은 20 μL주입하며 post-column 방법을 이용하여 1% arginine과 3% boric acid 혼합용액을 반응시약으로 하여 150℃ reaction box에서 환원당을 유도체화 한 후 형광 검출기 (Ex = 320, Em = 430)를 사용하여 분석하였다. 환원당 표준물질을 탈 이온화 증류수에 용해시켜 0.1-400 ppm 범위의 표준용액을 조제하여 분석하였고 peak area로부터 검량선을 작성하여 정량하였다.

2.3. 에탄올의 생산

에탄올의 생산은 구멍 갈파래의 가수분해 조건에 따라 시료 200 mL을 500 mL 플라스크에 넣은 것 3종류로 준비하고, 여기에 전 배양한 효모 (A600 = 0.2) 즉, *S. cerevisiae* (Sc), *P. stipitis* (Ps) [1,2] 및 이 두 종류의 효모를 혼합한 것 ((Sc) + (Ps))을 각각 10 mL을 접종하였고, 혼합균주는 *S. cerevisiae* (S.c) 및 *P. stipitis* (P.s)를 각각 5 mL씩 접종한 후 혐기적 조건에서 발효시켰으며, 5시간 간격으로 sampling하여 분석하였다.

2.4. 에탄올의 정량

다양한 농도 (0.125, 0.25, 0.5, 1, 5%)의 alcohol을 liquid cells에 넣고 퓨리에 변환 적외선 분광광도계 스펙트럼 (Vertex 70, BRUKER, German)으로 4,000~500 cm^{-1} 범위를 16번 scans 하여 농도를 검량 후 동일 방법으로 시료 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 구멍갈파래의 구성 당 분석

H_2SO_4의 농도가 증가할수록 환원당의 합은 증가되는 것으로 보아 가수분해에 의하여 구성당이 환원당으로 증가되는 것으로 보인다. Man, Gal, Xyl, Glc 및 Rhm등의 환원당 등은 산의 농도가 50%까지 증가할수록 그 량이 증가되는 것으로 타나났으며, 72%로 H_2SO_4의 농도가 증가 될 때는 다른 성분은 감소됨을 보였으나, Glc만 증가하는 경향을 보였다.

3.2. 에탄올의 생산

가수분해 시 사용한 H_2SO_4의 농도에 따라 제조된 시료를 기질로 하여 *S. cerevisiae*, *P. stipitis*, 그리고 *S. cerevisiae* 및 *P. stipitis*의 혼합균주를 사용하여 발효시켰을 때 균주의 성장과 생산된 alcohol의 profile을 Fig. 1에 나타내었다.

에탄올의 생산수율 (%)은 효모의 종류에 따라 식 (1), 식 (2) 및 식 (3)으로 구하였고 [3], 최대생산량 (%)은 그래프로부터 구하였다.

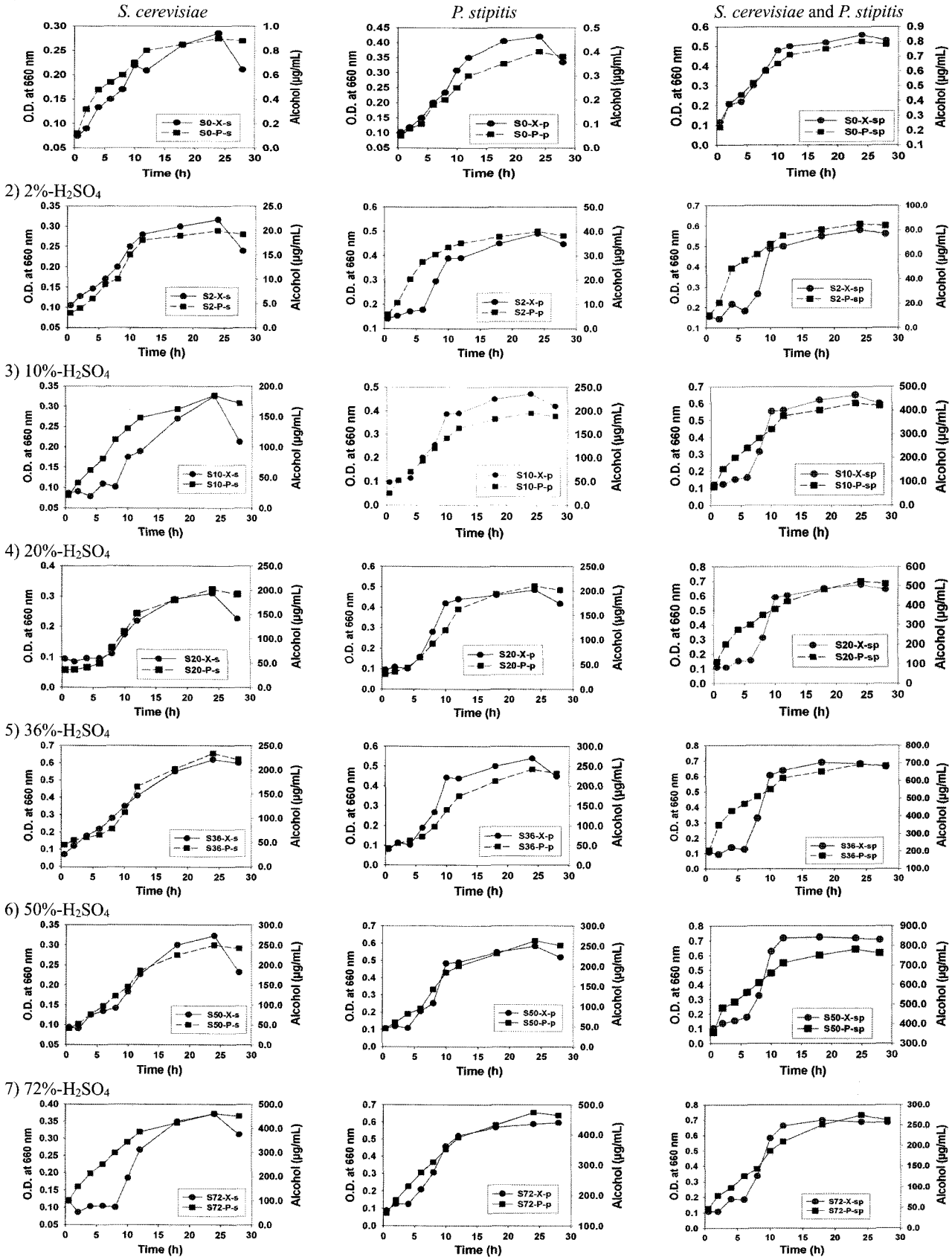
$$\%\ \text{Total ethanol yield from } S.\ cerevisiae = \frac{ethanol produced(g)\ after\ 30\,hr\ fermentation}{(the\ amount\ of\ Glc. + Gal. + Man) * 0.511} \quad (1)$$

$$\%\ \text{Total ethanol yield from } P.\ stipitis = \frac{ethanol produced(g)\ after\ 30\,hr\ fermentation}{(the\ amount\ of\ Glc. + Xyl.) * 0.511} \quad (2)$$

$$\%\ \text{Total ethanol yield from } S.\ cerevisiae\ and\ P.\ stipitis = \frac{ethanol produced(g)\ after\ 30\,hr\ fermentation}{(the\ amount\ of\ Glc. + Gal. + Xyl.) * 0.511 + Rhm * 0.31} \quad (3)$$

전반적으로 가수분해를 위한 H_2SO_4의 농도가 높아질수록 에탄올의 생산율이 높아지는 것을 볼 수 있었으며, 이것은 환원당의 량이 증가되는 것과 관련이 있는 것으로 판단된다 (Table 4).

*S. cerevisiae*를 사용하여 발효 시킨 것을 *P. stipitis*를 이용하여 발효시킨 것과 비교해보면 그다지 많은 차이를 보이지 않았다. 이것은 구멍갈파래의 구성성분 중에 Glc를 많이 함유하고 있고, *P. stipitis*도 Glc를 잘 이용할 수 있는 것에 기인되는 것으로 사료된다 [2]. Glc, Gal 및 Man이 *S. cerevisiae*



X: biomass, P: product (alcohol), s: *S. cerevisiae* (Sc), p: *P. stipitis* (Ps), sp: Sc + Ps

Fig. 2. Alcohol production from sulfuric acid hydrolysate of *U. pertusa* with *S. cerevisiae*, *P. stipitis* and their half-mixed strains.

에 의하여 ethanol로 전환되는 pathway 및 관여 효소를 볼 수 있다 [4]. 구멍갈파래에서 이 3가지 종류의 hexose를 함유하고 있어 알콜 발효에 이용할 수 있으며 bioalcohol의 원료가 될 수 있을 것으로 본다.

Xylose는 천연물에 많이 존재하는 성분으로써 이로부터 에탄올의 생산에 많은 연구를 하고 있고 [1,5], *Pachysolen tannophilus* [6], *Candida tropicalis* [7,8], *Brettanomyces naardenensis* [1], *Candida shehatae* [9], *Candida tenuis* [10,11], *Pa. tannophilus* [12], *Pichia segobiensis* [1,13] 등의 균주에 의하여 에탄올 생산이 수행되어 왔다. 발효에 많이 사용되고 있는 *S. cerevisiae*는 그 자체로서는 알콜생산을 할 수 없으나 최근에는 재조합 *S. cerevisiae* [14,15]에 의하여 에탄올을 바로 생산하는 공정이 개발되고 있다. 그리고 *P. stipitis*의 wild type 및 고정화에 의해서도 공업적 알콜 생산이 시도되고 있고 [16], xylose는 구멍갈파래의 구성성분이기도하여 이 균주로부터 알콜 생산을 시도하였다. *P. stipitis* [4]는 에서 볼 수 있듯이 xylose reductase [17] 및 xylitol dehydrogenase [18]를 가지고 있어, pentose phosphate pathway를 통하여 에탄올 생산을 할 수 있다.

또한, 구멍갈파래의 구성성분 중에는 deoxyhexose인 rhamnose가 있는데 이는 원래 털갈매나무 (*Rhamnus croceus*)에서 처음 분리되었으며, pectin 및 hemicellulose의 부분으로 rhamnogalacturonan으로서 자연에 풍부하게 존재한다. 구멍갈파래의 가수분해 정도에 따라 아주 많이 생성되는 것을 볼 수 있는데, 이것은 기능성 물질로서도 사용이 가능하기도 하지만 에탄올의 생산에는 큰 도움이 되지 않는 물질이기도 하다. *S. cerevisiae*는 rhamnose를 대사 시킬 수 있는 효소를 가지고 있지 않아 기질로 사용하지 못하며 [19], rhamnose는 막을 통과하는 속도가 glucose에 비교하여 10,000배 느려 이용하기에 더욱 어렵다 [20-22]. 그러나 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*를 동시에 사용하므로써 에탄올을 생산할 수 있다. Rhamnose는 *Debaryomyces polymorphus*나 *Pichia stipitis*가 함유하고 있는 rhamnose dehydrogenase (EC 1.1.1.17) [23,24]에 의하여 L-rhamnono-1,4-lacton를 형성하고, 이것은 rhamnono-1,4-lactonase (EC 3.1.1.65) [25,26]에 의하여 L-rhamnonate가 생산되며, 다시 L-rhamnonate dehydratase (EC 4.2.1.9)에 의하여 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate가 형성되고, 이것은 aldolase [25]에 의하여 pyruvate 및 L-lactaldehyde를 형성한다 [4]. 이 때 형성된 pyruvate는 *P. stipitis*와 함께 투여한 *S. cerevisiae*에 의하여 에탄올을 생산 가능하다. 따라서, 천연에 많이 존재하는 rhamnose는 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis*를 동시에 사용하면 rhamnose의 알콜 전환을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

또한, *S. cerevisiae*가 *P. stipitis* 보다 생산 수율이 높았는데, 이것은 *S. cerevisiae*가 hexose를 잘 이용하기 때문으로 사료되며 [27], 같은 당 종류에 대해서도 *S. cerevisiae*의 *Ys/x* (0.1 g/g)가 *P. stipitis*의 것 (0.03 g/g)보다 큰 것에 기인된다고 사료된다 [2]. 그리고 혼합 균주에서 생산율이 높게 나타났는데 이는 각 균주 별로 affinity가 높은 기질들이 따로 존재하는 것에 기인되는 것으로 사료된다 [27]. 따라서 해변가에서 환경적으로 피해를 입히고 있는 구멍갈파래를 친환경적인 에너지원으로서의 사용 가능성이 높음을 확인할 수 있었다.

4. 결론

해변, 바닷가에 악취를 풍기며 오염의 원인이 되는 해조류인 구멍갈파래를 긍정적으로 이용하기 위하여 바이오에탄올을 생산하고자 하였다. 구멍갈파래는 H_2SO_4를 이용하여 농도별로 가수분해 시켰을 때, glucose, galactose, mannose등의 hexose와 xylose, 그리고 많은 량의 rahmnose를 함유하고 있었으며, 이로부터 에탄올 생산을 위하여 *S. cerevisiae* 및 *P. stipitis*, 그리고 이들의 혼합 균주를 사용하여 발효시켰다. 천연에 많이 존재하고 있으나 에탄올로의 전환이 어려운 rhamnose를 혼합균주를 사용하여 발효시킬 수 있었던 것은 다양한 biomass로부터 에너지 생산에 긍정적인 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다. 500 mg의 건조시킨 구멍갈파래로부터 2586.46 μg/mL의 환원당을 추출할 수 있었고, 이로부터 782 μg/mL을 생산하여 30.24%의 수율을 보여 환경의 적이라는 이미지로부터 바이오에너지 자원으로서의 가능성을 보였다.

감사

이 연구는 전남대학교 특성화 사업단 (해양미래자원개발사업단)의 연구결과이며 이에 감사합니다.

References

1. Toivola, A., D. Yarrow, E. V. Bosch, J. P. Dijken, and A. A. Scheffersi (1984) Alcoholic fermentation of D-Xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1221-1223.
2. Laplace, J. M., J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro (1991) Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis, Candida shehatae, Saccharomyces cerevisiae and Zymomonas mobilis:* oxygen requirement as a key factor. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 36: 158-162.
3. Park, J. Y., R. Shiroma, M. Imran, Y. Zhang, M. Ike, Y. A. Sanoh, A. Ida, M. Kondo, and K. Tokuyasu (2010) A novel lime pretreatment for subsequent bioethanol production from rice straw. Calcium capturing by carbonation (CaCCO) process. *Bioresource Technology* 101: 6805-6811.
4. Antonius J. A. van Maris, A. Derek, E. Bellissimi, J. Brink, M. Kuyper, M. A. H. Luttik, H. W. Wisselink, W. A. Scheffers, J. P. van Dijken, and J. T. Pron (2006) Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by Saccharomyces cerevisiae: current status. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 391-418.
5. Delgenes, J. P., R. Moletta, and J. M. Navarro (1996) Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis,* and *Candida shehatae. Enzyme and Microbial Technology* 19: 220-225.
6. Slininger, P. J., R. J. Bothast, J. E. Vancauwenberge, and C. P.

Kurtzman (1982) Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 371-384.
7. Gong, C. S., L. F. Chen, M. C. Flickinger, L. C. Chiang, and G. T. Tsao (1981) Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 430-436.
8. Gong, C. S., L. D. McCracken, and G. T. Tsao (1981) Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermentating yeast mutant, Candida sp Xf217. *Biotechnol. Lett.* 3: 245-250.
9. Preez, J. C., B. van Driessel, and B. A. Prior (1989) D-Xylose fermentation by Candida shehatae and Pichia stipitis at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.* 2: 131-136.
10. Michael, V., R. Kratzer, B. Nidetzky, and L. Brecker (2011) *Candida tenuis* xylose reductase catalysed reduction of acetophenones: the effect of ring-substituents on catalytic efficiency. Organic & Biomolecular Chemistry, www.rsc.org/obc
11. Regina, K. and B. Nidetzky (2007) Identification of *Candida tenuis* xylose reductase as highly selective biocatalyst for the synthesis of aromatic a-hydroxy esters and improvement of its efficiency by protein engineering. *Chem. Commun.* 22: 1047-1049.
12. Savitree, L., T. Sumpradit, V. Kitpreechavanich, M. Tuntirungkij, T. Seki, and T. Yoshida (2000) Effect of Acetic Acid on Growth and Ethanol Fermentation of Xylose Fermenting Yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 34 : 64-73.
13. Masahiko, T., K. Kubota, N. Matsushita, and K. Togashi (2010) Discovery of mycangia and the associated xylose-fermenting yeasts in stag beetles (Coleoptera: Lucanidae). *Naturwissenschaften* 97: 311-317.
14. Toivari, M. H., A. Aristidou, L. Ruohonen, and M. Penttila (2001) Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen availability. *Metabolic Engineering* 3: 236-249.
15. Bao, X., D. Gao, Y. Qu, Z. Wang, M. Walfridssion, and B. H. Hagerbal (1997) Effect on product formation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing different levels of xylose metabolic genes. *Chin. J. Biotechnol.* 13: 225-231.
16. Linko, Y. Y., H. Kautola, S. Uotila, and P. Linko (1986) Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast. *Biotechnol. Lett.* 8: 47-52.
17. Almeida, R. M., T. Modig, A. Rerl, G. Lid, and M. F. Gorwa-Grauslund (2008) *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels* 1: 12-18.
18. Metzger, M. H. and C. P. Hollenberg (1995) Amino acid substitutions in the yeast *Pichia slipitis* xylitol dehydrogenase coenzyme-binding domain affect the coenzyme specificity. *Eur. J. Biochem.* 228: 50-54.
19. Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow (1990) Yeasts; Characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge, UK. ISBN 0-521-35056-5.
20. Heredia, C. F., A. Sols, and G. DelaFuente (1968) Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* 5: 321-329.
21. Bakker, B. M., C. Bro, P. Kotter, M. A. Luttik, J. P. Dijken, and J. T. Pronk (2000) The mitochondrial alcohol dehydrogenase *Adh3p* is involved in a redox shuttle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182: 4730-4737.
22. Bakker, B. M., K. M. Overkamp, A. J. Maris, P. Kotter, M. A. Luttik, J. P. Dijken, and J. T. Pronk (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 15-37.
23. Twerdochlib, A. L., F. O. Pedrosa, S. Funayama, and L. U. Rigo (1994) L-rhamnose metabolism in *Pichia stipitis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Can. J. Microbiol.* 40: 896-902.
24. Koivistoinen, O. M., S. Hilditch, S. P. Voutilainen, H. Boer, M. Penttilä, and P. Richard (2008) Identification in the yeast Pichia stipitis of the first L-rhamnose-1-dehydrogenase gene. *FEBS J.* 275: 2482-2488.
25. Seiya, W., S. Piyanart, and K. Makino (2008) Metabolic fate of L-lactaldehyde derived from an alternative L-rhamnose pathway. *FEBS J.* 275: 5139-5149.
26. Seiya, W., M. Saimura, and K. Makino (2008) Eukaryotic and Bacterial Gene Clusters Related to an Alternative Pathway of Nonphosphorylated L-Rhamnose Metabolism. *J. Biological Chem.* 283: 20372-20382.
27. Michelle, M. C., J. Boonstra, J. Arie, and C. T. Verrips (1996) Kinetic analysis of hexose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in continuous culture. *Biochimica et Biophysics Acta* 1277: 209-216.