

*Eucheuma spinosum*으로부터 다양한 효모를 이용한 바이오에탄올 생산

김민지, 김정수, 라채훈, 김성구*

Bioethanol Production from *Eucheuma spinosum* using Various Yeasts

Min-Ji Kim, Jung-Soo Kim, Chae Hun Ra, and Sung-Koo Kim*

접수: 2013년 7월 5일 / 게재승인: 2013년 9월 23일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Ethanol fermentations were performed using separate hydrolysis and fermentation (SHF) processes with monosaccharides from pretreated seaweed, *Eucheuma spinosum* as the biomass. The pretreatment was carried out with 11% (w/v) seaweed slurry and 150 mM H₂SO₄ at 121°C for 40 min. Enzyme hydrolysis after H₂SO₄ pretreatment was performed with Celluclast 1.5 L at 45°C for 24 h. Five % active charcoal were added to hydrolysate to removed 5-hydroxy methylfurfural. Ethanol fermentation with 11% (w/v) seaweed hydrolysate was performed for 72~96 h using *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis*. Ethanol concentration was reached to 18 g/L by *K. marxianus*, 16 g/L by *P. stipitis*, 15 g/L by *S. cerevisiae* and 10 g/L by *C. tropicalis*, respectively. The ethanol yield from total monosugar was obtained 0.50 and ethanol productivity was obtained 0.38 g/L/h by *K. marxianus*.

Keywords: Seaweed, *Eucheuma spinosum*, Ethanol fermentation, *Kluyveromyces marxianus*

1. 서론

현재 전 세계는 화석연료의 사용으로 인해 지구온난화와 자원 고갈 문제에 직면해 있다 [1]. 이러한 상황에서 바이오에

너지는 급등하는 유가로 인한 경제문제와 화석연료의 사용으로부터 발생하는 환경문제를 줄일 수 있는 대안으로 대두되고 있다 [2]. 특히, 바이오 에탄올은 화석연료와 혼합하거나 대체하여 사용할 수 있으며, 이산화탄소의 닫힌 순환구조(closed circulation system)로 친환경적이며 지속 가능한 에너지 생산이 가능하다 [3,4]. 바이오 에탄올을 생산하기 위해 곡류, 목재 등 다양한 바이오 매스가 사용되고 있는데, 곡류는 단가가 비싸고 식량이라는 도덕적 측면에서 문제가 되고 있고, 목재는 아직도 리그닌에 의한 셀룰로스의 분해 저해 및 바이오 매스 확보에 문제가 있다. 제 3세대 바이오 매스로서 해조류는 생육과 성장이 매우 우수하고 연안해역을 이용하여 가용 재배면적이 넓고 비료 등의 자원을 투입할 필요가 없어 가장 적합한 바이오 매스이다 [1]. 그 중 홍조류인 *Eucheuma spinosum*은 인도네시아에서 생산되며 agar와 carrageenan으로 구성되어 있다 [5]. Agar는 홍조류의 세포벽을 구성하는 점질성 복합다당류로서 galactose의 중합체이며 agarose (70%)와 agaropectin (30%)로 구성되어 있다 [6]. Agarose는 단당류인 D-galactose와 3,6-anhydrogalactose가 β-1,4-glycosidic bond로 연결된 agarobiose가 α-1,3-glycosidic bond로 연결된 중성다당류이다 [7]. Carrageenan는 linear polysaccharide로서 galactose residue가 연결된 galactan이다. 또한 galactose unit에 연결된 3,6-anhydrogalactose와 sulphate ester 그룹이 존재하기 때문에 산처리나 열처리를 하면 구조적 변형이 일어난다 [8]. *E. spinosum*의 galactose와 3,6-anhydrogalactose의 비율은 56.2%의 galactose와 43.8%의 3,6-anhydrogalactose로 구성되어 있다 [9]. 전처리 시 황산이나 염산을 사용하여 고온에서 열처리를 통하여 당 결합을 분해한다. 산을 이용하는 전처리 과정에서 당 결합을 분해하는 반응 중에서 5-hydroxymethylfurfural (HMF)와 같은 미생물 저해 물질이 생성

부경대학교 수산과학대학 생물공학과
Department of Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea
Tel: +82-51-629-5868, Fax: +82-51-629-5863
e-mail: skkim@pknu.ac.kr

되어 에탄올 발효 공정에서 문제가 되고 있다 [10].

본 실험에서는 *E. spinosum*을 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다. 먼저 전처리는 황산을 처리하여 열산가수분해를 진행하였으며, 효소 Celluclast 1.5L (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)을 이용하여 효소당화를 하였다. 또한 전처리 시 생성된 발효저해물질 HMF를 제거하기 위해 활성탄을 처리하였다. 전처리, 효소당화와 활성탄 처리가 끝난 후 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150, *Pichia stipitis* KCTC 7728, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 1126, *Candida tropicalis* KCTC 7212 를 사용하여 에탄올 생산 효율 비교를 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 실험에서는 에탄올 발효를 위하여 인도네시아에서 생산된 *Eucheuma spinosum*을 바이오매스로 사용하였다. *E. spinosum*은 자연 건조한 뒤 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 200 μm 이하의 분말을 사용하였다.

2.2. 산 촉매 열 가수분해 및 효소당화

산 촉매 열 가수분해 전처리로 11% (w/v) 슬러리에 150 mM 황산을 첨가하여 121°C에서 40분간 열처리를 하였다. 효소당화를 위해 전처리 후 10 N NaOH를 이용하여 pH 4.5로 중화하였다. 효소당화는 1% (v/v) Celluclast 1.5L (8.4 EGU/mL, Novozyme)을 첨가하여 45°C에서 24시간 동안 반응하였다.

2.3. 활성탄을 이용한 발효물질 제거

효소당화가 끝난 후 10 N NaOH를 이용하여 pH를 5.5로 중화하여 발효저해물질인 HMF를 제거하기 위해 5% (w/v)의 활성탄을 첨가하고 에탄올 발효를 진행하였다.

2.4. 발효균주

에탄올 발효 효모는 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150, *Pichia stipitis* KCTC 7728, *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 1126, *Candida tropicalis* KCTC 7212 4종의 효모를 사용하였다. 효모 종배양 배지는 YPG broth (yeast extract 10.0 g/L, peptone 20.0 g/L, galactose 20.0 g/L)를 사용하였다. 균 접종 후 30°C에서 160 rpm으로 18시간 배양하였다.

2.5. 분리당화발효 (SHF)

열산 처리 후 효소당화를 실시하고 발효저해물질인 HMF를 제거하기 위해 활성탄을 사용하였다. 앞서 제조한 가수분해

물 11% (w/v)에 효모 4종을 10% (v/v)로 접종 후 30°C, 190 rpm으로 최대 96시간 배양하였으며, 에탄올 함량 분석을 위해 시료를 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)를 이용하여 분석하였다.

2.6. 분석방법

발효하기 전 효모 균체량의 측정은 UV-Vis spectrophotometer (Ultrospec™ 6300 pro UV/Visible Spectrophotometer, Amersham Biosciences Inc, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 에탄올, HMF 및 유기산 측정은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)를 이용하였다. HPLC의 검출기는 Agilent G1362A refractive index detector (RID)를 사용하였으며 column은 Biorad Aminex HPX-87H column (300×7.8 mm)을 사용하였다. Column의 온도는 65°C로 하였고 이동상은 5 mM 황산을 사용하였으며, 유속 0.6 mL/min로 하여 각 시료를 35분간 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. *E. spinosum*의 구성성분

홍조류 *E. spinosum*의 구성성분은 탄수화물 64.6%, 섬유 4.7%, 단백질 4.4%, 지방 0.1%, 회분 등 25.9%이었다 (Table 1). 녹조류나 갈조류의 경우 총 탄수화물이 39.1%와 59.9%이었으며, *E. spinosum*의 총 탄수화물은 69.2%로 파래와 다시마 보다 20-30% 높은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 다른 갈조류나 녹조류보다 탄수화물이 많이 포함된 홍조류 *E. spinosum*을 바이오에탄올 생산에 사용하였다.

3.2. 효모 4종을 이용한 에탄올 발효

홍조류 *E. spinosum*을 이용하여 열산가수분해를 통한 전처리와 효소당화를 실시하고, 활성탄을 첨가하여 HMF를 제거한 뒤 에탄올 발효를 진행하였다. 활성탄을 이용하여 HMF를 제거한 결과 전처리 후 생성된 5.7 g/L의 HMF가 0.3 g/L로 감소하였다. 에탄올 발효를 시작하기 전 전처리와 효소당화 후 생성된 당은 25 g/L의 갈락토오스와 11 g/L의 글루코오스가 생성되었다. 총 탄수화물에 51%의 당화율을 나타내었다. *K. marxianus*를 이용한 에탄올 생산은 Fig. 1에 나타난 바와 같이 갈락토오스를 동시에 사용하여 48시간의 발효로 18 g/L의 에탄올을 생산하였다. 그러나 *P. stipitis*와 *S. cerevisiae*를 이용한 에탄올 생산은 Figs. 2, 3에 나타난 바와 같이 *K. marxianus*보다 48시간이 더 걸려 96시간에 각각 16 g/L와 15 g/L

Table 1. Compositions of *Eucheuma spinosum*

Composition	Carbohydrate	Fiber	Protein	Lipid	Ash & Etc
<i>Eucheuma spinosum</i> (유큐마)	64.7 %	4.7%	4.5%	0.2%	25.9%
<i>Entromorpha intestinalis</i> (파래)	39.1%	-	35.1%	2.5%	23.3%
<i>Saccharina japonica</i> (다시마)	54.2%	5.7%	10.1%	1.8%	28.2%

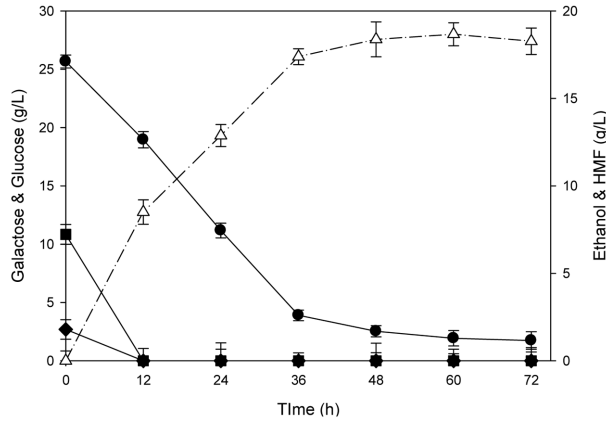


Fig. 1. Ethanol fermentation of *E. spinosum* by SHF after active charcoal treatment with *K. marxianus*; ●: galactose, ■: glucose, △: ethanol, ◆: 5-HMF.

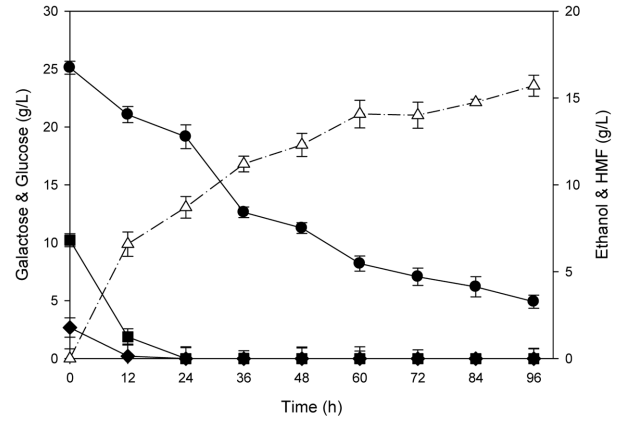


Fig. 3. Ethanol fermentation of *E. spinosum* by SHF after active charcoal treatment with *S. cerevisiae*; ●: galactose, ■: glucose, △: ethanol, ◆: 5-HMF.

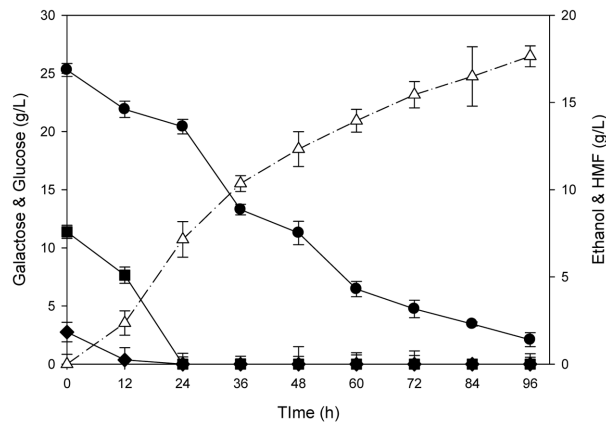


Fig. 2. Ethanol fermentation of *E. spinosum* by SHF after active charcoal treatment with *P. stipitis*; ●: galactose, ■: glucose, △: ethanol, ◆: 5-HMF.

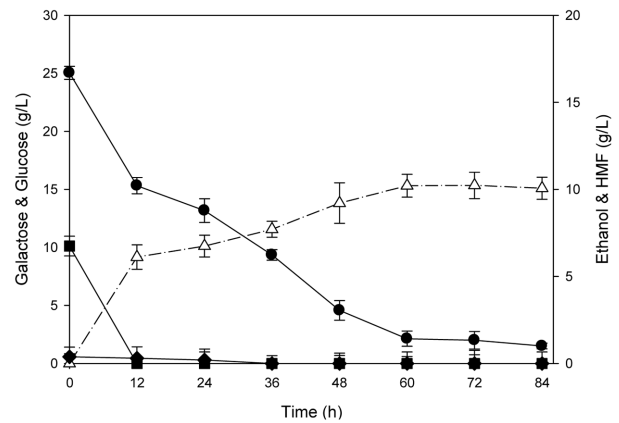


Fig. 4. Ethanol fermentation of *E. spinosum* by SHF after active charcoal treatment with *C. tropicalis*; ●: galactose, ■: glucose, △: ethanol, ◆: 5-HMF.

의 에탄올을 생산하였다. Fig. 4의 *C. tropicalis*를 이용한 에탄올 생산은 35 g/L의 당당으로부터 60시간 만에 10 g/L의 에탄올을 생산하였다. *C. tropicalis*는 *K. marxianus*, *P. stipitis*와 *S. cerevisiae*보다 5-8 g/L 적은 농도의 에탄올을 생산하였다. 효모 4종으로부터 Table 2에 나타난 바와 같이 생산된 에탄올의 에탄올 생산 수율 (Y_{EtOH})은 *K. marxianus*는 0.5, *P. stipitis*는 0.44, *S. cerevisiae*는 0.42 였고 *C. tropicalis*는 0.28으로 나타났다. 또한 에탄올 생산 수율 (Y_{EtOH})을 비교하였을 때 *K. marxianus*가 *P. stipitis*와 *S. cerevisiae*보다 높았으며, *C. tropicalis* 보다는 0.22 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 *K. marxianus*

의 시간당 에탄올 생산량 (P_{EtOH})은 0.38 g/L/h로 *P. stipitis*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*의 각 에탄올 생산량 (P_{EtOH})인 0.17 g/L/h, 0.16 g/L/h, 0.17 g/L/h보다 2배 높은 것을 확인할 수 있었다 (Table 2). 해조류의 경우 염이 에탄올 생산에 저해제로 작용할 수 있기 때문에 염 농도가 중요하다. 염 농도가 cell growth나 에탄올 생산 수율에 영향을 끼쳐 감소시킬 수가 있다 [11]. *K. marxianus*가 다른 yeast 3종보다 에탄올 생산 속도와 생산량이 높은 이유는 22% (w/v)의 높은 삼투압을 내는 염 농도와 에탄올 (10% v/v)에 대한 저항성이 높다 [12]. 또한 다른 효모 3종보다 *K. marxianus*는 5탄당인 xylose 등 다양한 기

Table 2. Ethanol yields from total monosugars from thermal acid hydrolysis and enzyme hydrolysis and ethanol productivities *E. spinosum* using various yeasts

Yeast	<i>K. marxianus</i>	<i>P. stipitis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. tropicalis</i>
Ethanol yield (Y_{EtOH}) ¹	0.50	0.44	0.42	0.28
Ethanol productivity (g/L/h) ²	0.38	0.17	0.16	0.17

¹Yield of ethanol (Y_{EtOH} , g/g) = [EtOH]_{max}/[Sugar]_{after saccharification}

²Productivity of ethanol (P_{EtOH} , g/L/h) = g ethanol/L/h

질을 사용할 수 있다 [13]. 그러므로 본 연구 결과, 다른 효모보다 *K. marxianus*가 *E. spinosum*으로부터 에탄올 생산에 적합하였고, 최근 연구 결과 산업적으로도 에탄올 생산에 *S. cerevisiae*보다 *K. marxianus*가 적합하다고 보고되었다 [14].

4. 결론

본 연구에서는 *E. spinosum*을 이용한 효모 4종 *K. marxianus*, *P. stipitis*, *S. cerevisiae*와 *C. tropicalis*로부터 바이오에탄올 생산에 관한 연구를 수행하였다. 바이오에탄올 생산을 위해 11% (w/v) *E. spinosum* seaweed slurry와 150 mM의 H_2SO_4 를 이용하여 121°C에서 40분간 열산처리와 Celluclast 1.5L를 이용하여 효소당화하였다. 전처리 시 생성된 HMF를 제거하기 위해 활성탄 5% (w/v)을 이용하여 HMF를 제거한 뒤 바이오에탄올 생산을 하였다. 에탄올 발효를 한 결과 *K. marxianus*가 18 g/L의 에탄올을 생산하였으며 *P. stipites*, *S. cerevisiae*, *C. tropicalis*는 각각 16 g/L, 15 g/L, 10 g/L의 에탄올을 생산하였다. *K. marxianus*의 에탄올 생산 수율 (Y_{EtOH})은 0.50로 다른 효모보다 높은 것을 확인할 수 있었으며, 시간당 에탄올 생산량 (P_{EtOH})도 0.38 g/L/h로 가장 높았다. 이 결과로서 *K. marxianus*가 *E. spinosum*으로부터 바이오에탄올 생산에 적합한 것으로 판단된다.

감사

본 연구는 2차년도 산학협력선도대학육성 (LINC+) 사업에 의하여 지원되었습니다.

REFERENCES

- Lee, S. M., I. S. Choi, S. K. Kim, and J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *KSBB*. 24: 483-488.
- Yazdani, S. S. and R. Gonzalez (2007) Anaerobic fermentation of glycerol: A path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotech.* 18: 213-219
- Cazetta, M. L., M. A. P. C. Celligoi, J. B. Buzato, and I. S. Scarmino (2007) Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresour. Technol.* 98: 2824-2828.
- Won, K. (2010) *Optimization of dilute acid pretreatment of barley straw for bioethanol production*, M.S. Thesis. Dankuk University, Yongin, Korea.
- Do, J. H. (1997) Extraction and purification of agar from *Gelidium amansii*. *Kor J Fish Aquatic Sci.* 30: 423-427.
- Meinita, M. D. N., J. Y. Kang, G.T. Jeong, H. M. Koo, S. M. Park, and Y. K. Hong (2012) Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *J. Appl. Phycol.* 24: 857-862.
- Duckworth, M. and W. Yaphe (1971) Structure of ahar. I. Fraction of a complex mixture of polysaccharides. *Carbo. Res.* 16: 198-197.
- Seok, J. H., H. G. Park, S. H. Lee, S. W. Nam, S. J. Jeon, J. H. Kim, and Y. H. Kim (2010) High-level secretory expression of recombinant β -agarase from *Zobellia galactanivorans* in *Pichia pastoris*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 40-45.
- Tan, I. S., M. K. Lam, and K. T. Lee (2013) Hydrolysis of macroalgae using heterogeneous catalyst for bioethanol production. *Carbohydrate. Polymers.* 94: 561-566.
- Kim, Y. N., Y. K. Jeong, M. C. Kim, S. B. Kim, Y. K. Chang, W. J. Chi, S. K. Hong, and C. J. Kim (2012) Isolation and identification of agarose-degrading bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. GNUM 08122. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 40: 1-9
- Cho, Y. K., H. J. Kim, and S. K. Kim (2013) Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 36: 713-719.
- Amaya-Delgado, L., E. J. Herrera-López, J. Arrizon, M. Arellano-Plaza, A. Gschaedler (2013) Performance evaluation of *Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* in industrial tequila fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 875-881.
- Fonseca, G. G., E. Heinzle, C. Wittmann, and A. K. Gombert (2008) The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 339-354.
- Pang, Z. W., J. J. Liang, X. J. Qin, J.R. Wang, J. X. Feng, and R. B. Huang (2010) Multiple induced mutagenesis for improvement of ethanol production by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnol. Lett.* 32: 1847-1851.