

홍조류(*Kappaphycus alvarezii*)의 동시 당화 발효를 이용한 바이오에탄올의 생산

라채훈, 김성구*
부경대학교 생물공학과

Received: March 8, 2016 / Revised: March 29, 2016 / Accepted: April 1, 2016

Bioethanol Production from Seaweed *Kappaphycus alvarezii* by Simultaneous Saccharification and Fermentation

Chae Hun Ra and Sung-Koo Kim*

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

Thermal acid hydrolysis pretreatment of *Kappaphycus alvarezii* was carried out with 12% (w/v) seaweed slurry and 180 mM H₂SO₄ at 140°C for 5 min. Utility of the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* KCTC7150 was evaluated with respect to cell growth and ethanol fermentation at 40°C was close to optimal for enzymatic hydrolysis. This could lead to the integration of both the saccharification and fermentation processes. The levels of ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with non-adapted and adapted *K. marxianus* KCTC7150 were 9.1 g/l with an ethanol yield (Y_{EtOH}) of 0.24 and 10.2 g/l with an ethanol yield (Y_{EtOH}) of 0.27 at 156 h, respectively. The two-phase SSF process was employed in this study to improve the efficiency of ethanol fermentation. Adapted *K. marxianus* KCTC7150 using the two-phase SSF process produced 13.5 g/l with an ethanol yield (Y_{EtOH}) of 0.35 at 96 h. Development of the two-phase SSF process could enhance the overall ethanol fermentation yields of the seaweed *K. alvarezii*.

Keywords: Red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, ethanol fermentation, SSF

서 론

해조류를 이용한 신재생에너지 연구는 화석연료의 한계를 극복할 수 있는 차세대 바이오매스로서 새롭게 조명받고 있으며, 해조류는 햇빛과 대기 중의 이산화탄소를 이용하여 광합성을 하고, 산소를 생산하기 때문에 탄소배출에 따른 기후변화문제 해결에 기여할 수 있다[9]. 그 중 홍조류인 *Kappaphycus alvarezii*는 필리핀, 중국, 인도네시아, 말레이시아, 탄자니아, 그리고 키리바시 등에서 상업적으로 생산하고 있으며, cellulose와 galactans (agar와 carrageenan)으로 구성되어 있다[2]. Galactans는 대부분 galactose와 3,6-anhydrogalactose로 구성되어 있는데 그 비율은 56%와 44%로 알려져 있다[7]. Cellulose는 해조류 골격을 만드는 다

당류(skeletal polysaccharide)로 알려져 있으며, 해조류 종류에 따라 결정형(crystalline form)으로 1–20% 내외로 존재한다[4].

홍조류를 이용한 에탄올 발효를 위해서는 전처리 과정이 필요하며, 일반적으로 화학적 전처리 방법인 황산의 사용은 바이오 매스의 구조를 가수분해에 의해 용이하게 단당류로 전환시키고 신속하게 가수분해를 시킬 수 있어 당을 효율적으로 분해 가능하다는 장점이 있다[3].

해조류를 이용한 바이오에탄올 생산 방법은 분리 당화 발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)와 동시 당화 발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)로 구분할 수 있다. 동시 당화 발효(SSF)는 효소 당화와 에탄올 발효가 통합된 공정이며, 분리 당화 발효(SHF)에 비해 공정시간과 비용을 줄일 수 있다[1]. 그러나 동시 당화 발효(SSF)는 효소 당화를 위한 최적 활성온도(약 45°C)와 에탄올 생산을 위한 효모의 최적 배양온도(약 30–37°C)가 다르기 때문에 효소 당화와 에탄올 발효를 같이 진행하였을 때 에탄올 발효 효율이 떨어지는 단점이 있다.

*Corresponding author

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

E-mail: sskim@pknu.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

본 연구에서는 홍조류 *K. alvarezii*를 황산으로 전처리 한 뒤 이어서 상용효소와 열내성 효모 *Kluyveromyces marxianus* KCTC 7150를 첨가하여 fiber의 cellulose를 분해하며 동시에 발효하는 동시 당화 발효(SSF) 공정을 적용하여 바이오 에탄올 발효를 수행하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서는 에탄올 발효를 위한 기질로 인도네시아산 *K. alvarezii*를 사용하였으며, 바이올시스템즈 회사(고흥군, 전남)에서 공급받아 자연건조 후 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 355 μm (45 mesh) 이하의 분말을 사용하였다. *K. alvarezii*의 구성성분 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하였으며, AOAC 방법에 의해 분석을 실시하였다[11].

*K. alvarezii*의 산 촉매 열가수분해와 효소 당화

산 촉매 열가수분해 전처리로 12% (w/v) 슬러리에 180 mM 황산을 첨가하여 140°C에서 5분간 열처리를 하였다. 효소 당화를 위해 전처리 후 5 N NaOH를 이용하여 pH 5.0로 중화하였다. 효소 당화는 Viscozyme L (121 β -glucanase unit U/ml; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)과 Celluclast 1.5 L (854 endo-glucanase unit U/ml; Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)를 16 U/ml로 희석하여 1대 1 비율로 첨가하여 40°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 또한 온도별로 30, 35, 40, 그리고 45°C로 달리하여 효소의 당화온도를 확인하였다. 효소 당화의 처리효율(E_s , %)은 식 (1)로 나타낼 수 있다.

$$E_s (\%) = \frac{\Delta S_{glc}}{C} \times 100 \quad (1)$$

여기서 ΔS_{glc} 는 효소 가수분해시 생성되는 glucose의 농도(g/l)이며, C는 *K. alvarezii*의 셀룰로오스(cellulose) 함량(g/l)이다.

동시 당화 발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

배양 온도에 따른 *K. marxianus* KCTC7150의 균 성장(DCW, g/l)은 YPD medium (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, glucose 20.0 g/l)을 이용하여 각각 온도별로 30°C, 35°C, 40°C, 45°C에서 150 rpm, 24시간 동안 분석을 실시하였다. 동시 당화 발효(SSF)에 사용된 *K. marxianus* KCTC7150의 종배양 배지는 100 ml 플라스크 안에 50 ml working volume으로 YPG broth (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, galactose 20.0 g/l)를 사용하였다. 고농도 당 순치를 한 효모는 당 흡수율과 에탄올 생산이 증가한다고 보고되고 있으며[2], 여러 단당이 혼합되어 있는 *K. alvarezii* 가수분

해산물에서 고농도 당 순치를 한 *K. marxianus* KCTC 7150를 사용하였다. 고농도 당 순치 효모는 종배양 배지 YPG broth에서 5 ml의 균을 취하여 100 ml 플라스크 안에 50 ml working volume의 YPHG (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, high galactose 120.0 g/l)에 접종하여 36시간 동안 배양하였다. YPHG broth에서 원심분리기를 이용하여 배지를 제거하고, 순치된 효모(0.35 g dcw/l)를 *K. alvarezii* 가수분해산물에 접종하였다. 동시 당화 발효는 250 ml 플라스크 안에 100 ml working volume으로 산촉매 열가수분해 처리 후 적절한 온도에서 효소 당화와 에탄올 발효를 동시에 실시하였다. 또한 동시 당화 발효(SSF)의 에탄올 생산 효율을 높이기 위해 30시간 동안은 효소 반응 온도를 40°C로 유지하다가 효소 당화가 끝나면 배양 온도를 30°C로 낮추어 에탄올 발효를 수행하였다.

다양한 단당 및 에탄올 함량 분석을 위해 시료를 12,000 rpm에서 10분동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)를 이용하여 분석하였다. 에탄올 수율(Y_{EtOH} , g/g)은 식 (2)로 나타낼 수 있다.

$$Y_{EtOH} (g/g) = \frac{[EtOH]_{max}}{[Sugar]_{ini}} \quad (2)$$

여기서 $[EtOH]_{max}$ 는 에탄올 발효로 인해 생성되는 최종 에탄올의 농도(g/l)이며, $[Sugar]_{ini}$ 는 에탄올 발효 초기 단당(galactose + glucose)의 농도(g/l)이다. 최대 이론적 에탄올 수율(Y_{EtOH} , g/g)은 0.51이다.

분석방법

단당으로 glucose 및 galactose, 저해물질로서 5-hydroxymethylfurfural (HMF), 에탄올의 양 측정은 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)와 RID (refractive index detector)를 이용하였다. 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column (300.0 \times 7.8 mm)를 사용하여 온도 65°C, 이동상 5 mM 황산, 유속 0.6 ml/min로 하여 각 시료를 40분간 분석하였다[8].

결과 및 고찰

*K. alvarezii*의 성분 분석

거대 홍조류인 *K. alvarezii*의 구성성분을 AOAC 방법으로 분석한 결과 65.8% 탄수화물, 6.0% 섬유, 4.6% 단백질, 0.8% 지방, 22.8% ash 등으로 구성되어 있었다.

Lin 등[5]에 따르면 galactose와 3,6-anhydro-galactose (AHG)의 중량비는 0.56:0.44로 보고되고 있다. *K. alvarezii*에서 최대 갈락토오스 함량은 (0.658 g agar/g *K. alvarezii*) \times (0.56 g galactose unit/g agar) \times (180 g galactose/162 g

galactose unit)로 계산할 수 있으며, 계산 결과 0.41 g/g으로 나타낼 수 있다. 또한 글루코오스 함량은 $(0.06 \text{ g cellulose/g } K. \text{ alvarezii}) \times (180 \text{ g glucose/162g glucose unit of cellulose})$ 로 계산할 수 있으며, 계산 결과 0.07 g/g으로 나타낼 수 있다. 따라서 *K. alvarezii*에서 발효 가능한 당당의 함량은 $0.41 + 0.07 = 0.48 \text{ g/g}$ 으로 나타낼 수 있다. 이 결과를 통해 *K. alvarezii*는 탄수화물 함량이 높아 에탄올 생산에 적합한 바이오 매스라고 판단되어 실험에 사용하였다.

*K. alvarezii*를 이용한 효소 당화 및 균 성장 온도

홍조류 *K. alvarezii*을 이용하여 산 촉매 열가수분해를 통한 전처리 실험을 실시하고, 동시 당화 발효(SSF)를 위해 효소 당화와 균 성장 온도를 확인하였다. 산 촉매 열가수분해를 실시한 후 5 N NaOH를 이용하여 pH를 5.0으로 중화한 뒤 효

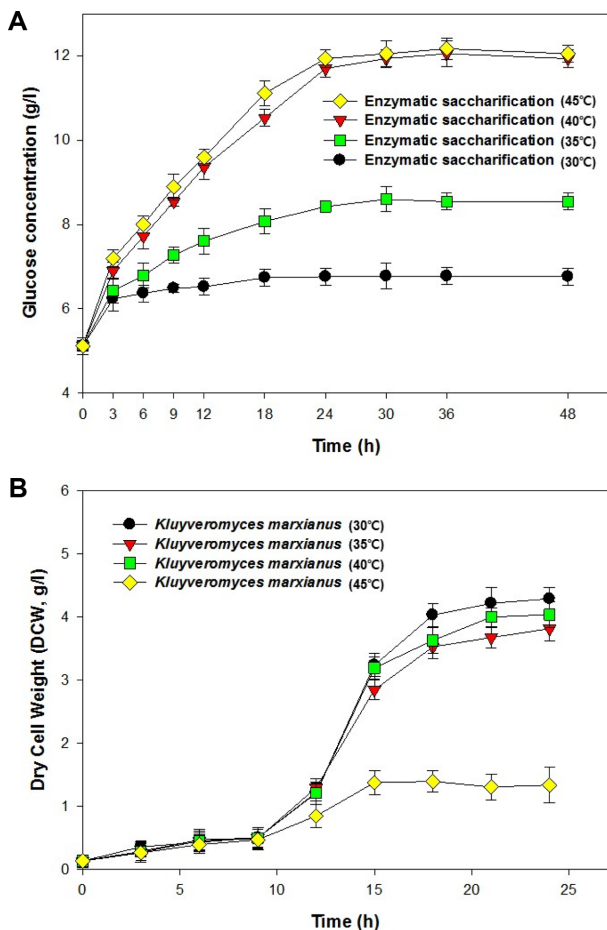


Fig. 1. Effect of temperatures on (A) enzymatic saccharification to produce glucose and (B) cell growth on different temperature conditions after thermal acid hydrolysis. The initial glucose concentration was 5.1 g/l after thermal acid hydrolysis. Enzyme mixtures were prepared at a 1:1 ratio of Celluclast 1.5 L and Viscozyme L with 16 U/ml of equal activities.

소 당화를 실시하였다. Fig. 1A는 16 U/ml의 복합 효소를 이용하여 30–45°C 온도별로 가수분해를 48시간 동안 실시하였으며, 효소 반응 온도에 따른 glucose 농도를 분석하였다. 효소 당화 초기에 나타난 5.1 g/l의 glucose는 12% (w/v) *K. alvarezii*를 산 촉매 열가수분해 실시하였을 때 생성되었다. 효소 반응 온도에 따른 복합 효소의 가수분해효율(E_s)은 온도 30°C, 35°C, 40°C, 45°C에서 각각 19.1%, 40.5%, 83.3%, 84.5%로 나타났으며, 45°C에서 당화효율이 가장 높음을 알 수 있었다. 그러나 40°C와 45°C에서 생성되는 glucose 농도가 비슷한 값을 가지기 때문에 동시 당화 발효(SSF)에 적용하는 효소 당화 온도는 40°C를 선택하여 실험을 진행하였다.

Fig. 1B는 *K. marxianus* KCTC7150를 이용하여 30–45°C 온도별로 균 성장을 YPD medium에서 150 rpm, 24시간 동안 실시하였으며, 배양 온도에 따른 균 성장(DCW, g/l)을 분석하였다. 배양 온도에 따른 *K. marxianus* KCTC7150의 균 성장(DCW, g/l)은 온도 30°C, 35°C, 40°C, 45°C에서 각각 4.3 g/l, 4.0 g/l, 3.8 g/l, 1.3 g/l로 나타났으며, 30°C에서 균 성장이 가장 높음을 알 수 있었다. 배양 온도 45°C에서는 균 성장이 억제되는 경향이 나타났으며, 이는 Lertwattanasakul 등 [6]에서 보고된 바와 같이 높은 온도에서는 효모의 대사활성도가 감소하여 균 성장이 떨어진다는 내용과 일치하였다. 따라서 효소 당화와 균 성장 온도를 고려하였을 때 동시 당화 발효(SSF)에 적용하는 균 배양 온도는 40°C를 선택하여 실험을 진행하였다. 12% (w/v) *K. alvarezii*를 이용하여 전처리와 효소 당화를 각각 시행한 후 생성된 당은 26.2 g/l의 갈락토오스와 12.1 g/l의 글루코오스가 생성되었다(data not shown). 12% (w/v) *K. alvarezii*로부터 획득 가능한 당당은 갈락토오스와 글루코오스를 포함하여 총 57.6 g/l이며, 전처리와 효소 당화 실험을 통해 생성된 당당 38.3 g/l을 기준했을 때 66.7%의 당화 전환율을 나타내었다.

효모를 이용한 에탄올 발효

에탄올 발효는 12% (w/v) *K. alvarezii* 가수분해산물과 *K. marxianus* KCTC 7150 균주를 이용하여 250 ml 플라스크 안에 100 ml working volume으로 에탄올 발효를 실시하였다. *K. marxianus* KCTC 7150는 glucose, xylose, mannose, galactose 등을 이용할 수 있으며[10], 이러한 glucose와 galactose의 혼합당에 대하여 동시 당화 발효(SSF)를 수행하였다. Fig. 2A는 비순치(wild type) *K. marxianus* KCTC 7150를 40°C, 200 rpm으로 156시간 동안 발효한 결과이며, 48시간에 glucose가 완전히 소비되었고 저해물질인 HMF도 모두 감소하였다. 또한 30시간 이후 galactose가 소비되기 시작하였다. 동시 당화 발효(SSF)로 156시간에 9.1 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 에탄올 수율(Y_{EtOH})은 0.24로 낮은 수율을 나타내었다. Fig. 2B는 고농도 갈락토오스에 순치를 한

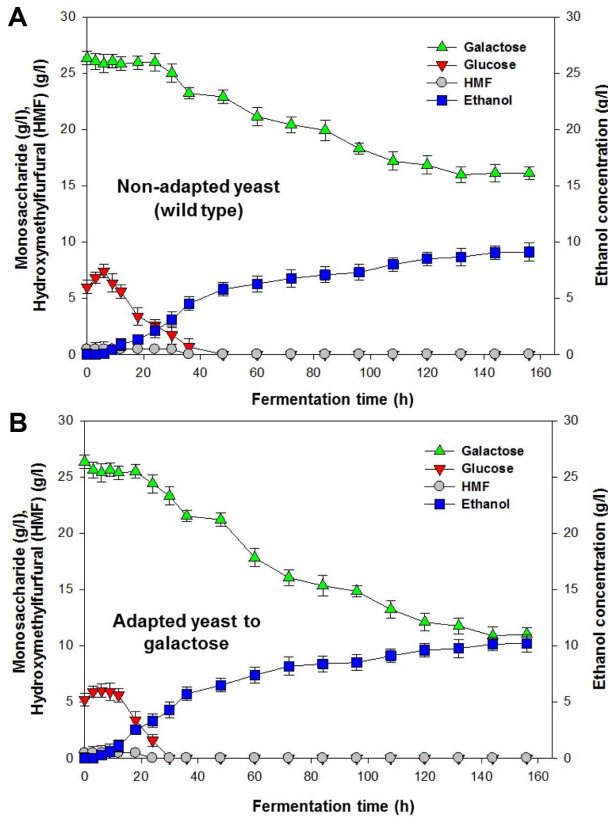


Fig. 2. Ethanol production from SSF with 12% (w/v) *K. alvarezii* hydrolysates at 40°C, 200 rpm for 156 h using (A) non-adapted (wild type) *K. marxianus* KCTC7150 and (B) adapted *K. marxianus* KCTC7150 to a high galactose concentration.

K. marxianus KCTC 7150를 40°C, 200 rpm으로 156시간 동안 발효한 결과이며, 30시간에 glucose가 모두 소비되었으며, 저해물질인 HMF도 모두 감소하였다. 또한 24시간 이후 galactose가 흡수되기 시작하였다. 발효 156시간에 10.2 g/l의 에탄올이 생산되었으며, 에탄올 수율(Y_{EtOH})은 0.27로 나타났다. Yuan 등[13]에서 분리 당화 발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)를 이용한 *K. marxianus*의 에탄올 수율(Y_{EtOH})인 0.46과 비교하였을 때, 동시 당화 발효(SSF)를 이용한 *K. marxianus* KCTC 7150의 에탄올 전환수율이 낮음을 알 수 있었다. 따라서 에탄올 생산 효율을 높이기 위해 2단계 동시 당화 발효(SSF)를 수행하였다.

동시 당화 발효(SSF)의 2단계 배양과정은 첫 번째 단계인 효소 당화 온도를 40°C로 유지하다가 효소 당화가 끝나기 시점에 두 번째 단계인 배양 온도를 30°C로 낮추어 에탄올 발효를 수행하였다. Fig. 3은 고농도 갈락토오스에 순치를 한 *K. marxianus* KCTC 7150를 이용하여 2단계 동시 당화 발효(SSF)를 수행한 결과이다. 첫 번째 단계에서 30시간 동안 효소 당화를 40°C로 실시하면서 글루코오스가 생성되었고,

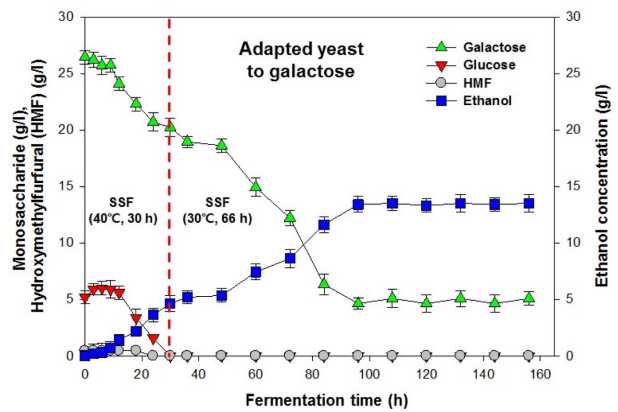


Fig. 3. Evaluation of ethanol fermentation by two phase SSF process with adapted *K. marxianus* KCTC7150 using thermal acid hydrolyzed 12% (w/v) *K. alvarezii* hydrolysates for 96 h. Vertical line indicates the temperature shifting point from 40°C to 30°C.

Table 1. Summary of adapted *K. marxianus* KCTC7150 to high concentration of galactose for ethanol production using a two phase SSF process with 12% (w/v) *K. alvarezii* hydrolysates.

Growth factor	General SSF process	Two phase SSF process	
	One phase	First phase	Second phase
Temperature (°C)	40	40	30
Fermentation time (h)	156	30	66
Ethanol concentration (g/l)	10.2	-	13.5
Ethanol yield (Y_{EtOH})	0.27	-	0.35

동시에 글루코오스가 사용되면서 에탄올도 같이 생산되는 것을 알 수 있었다. Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 효소 당화는 30시간에 당화가 모두 끝나며, 그 이후부터는 글루코오스 생성량이 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 Fig. 3의 동시 당화 발효(SSF)에서 30시간이 후부터는 배양온도를 30°C로 낮추는 2단계 에탄올 발효를 진행하였다. 그 결과 발효 96시간에 13.5 g/l의 에탄올이 생산되었으며, 에탄올 수율(Y_{EtOH})은 0.35로 나타났다. 이러한 결과는 2단계 동시 당화 발효가 기존의 동시 당화 발효(SSF)에 비해 에탄올 생산 수율이 0.27에서 0.35로 증가하였으며, 에탄올 발효 시간도 156시간에서 96시간으로 감소하였다. Lee와 Lee [5]는 갈조류로부터 *S. cerevisiae*를 이용하여 2.7 g/l의 바이오에탄올을 생산하였으며, Tan과 Lee [12]는 macroalgae cellulosic residue (MCR)로부터 동시 당화 발효(SSF)를 통해 14.1 g/l의 바이오에탄올을 생산한 것으로 보고하였다. 따라서 해조류를 이용한 2단계 동시 당화 발효(SSF)는 바이오에탄올 생산에 있어서 기존에 알려진 바이오에탄올 생산 수율보다 높

거나 비슷한 것으로 판단된다. 일반적인 동시 당화 발효(SSF, Fig. 2B)와 2단계 동시 당화 발효(SSF, Fig. 3)의 본 연구 결과에 관한 비교를 Table 1에 나타내었다.

요약

해조류 중 홍조류인 *K. alvarezii*로부터 동시 당화 발효(SSF)를 위한 효소 당화 및 균 배양 온도를 검토하고, 기존의 동시 당화 발효(SSF)를 개선하기 위해 2단계 동시 당화 발효(SSF)를 수행하였다. 효소 당화와 균 성장 온도를 고려하였을 때 동시 당화 발효(SSF)에 적용하는 배양 온도는 40°C를 선택하여 실험을 진행하였다. 비순치 효모(wild type)와 고농도 갈락토오스에 순치한 효모(adapted yeast to galactose)를 이용한 동시 당화 발효(SSF)를 실시한 결과 발효 156시간에 9.1 g/l의 에탄올 수율(Y_{EtOH}) 0.24와 10.2 g/l의 에탄올 수율(Y_{EtOH}) 0.27을 나타내었다. 이러한 기존의 동시 당화 발효(SSF)를 개선한 2단계 동시 당화 발효(SSF)는 에탄올 생산 수율이 0.27에서 0.35로 27.5% 증가하였으며, 에탄올 발효 시간도 156시간에서 96시간으로 61.5% 감소하였다. 이러한 연구결과는 해양 바이오매스인 해조류로부터 바이오연료 생산과정에 있어 기초적인 정보를 제공할 것이다.

Acknowledgments

This work was supported by a Research Grant of Pukyong National University (2015 year).

References

1. Alfani A, Gallifuoco FF, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. 2000. Comparison of SHF and SSF process for bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 184–192.
2. 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.
3. Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH. 2013. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresour. Technol.* **132**: 109–114.
4. Koyama M, Sugiyama J, Itoh T. 1997. Systematic survey on crystalline features of algal celluloses. *Cellulose.* **4**: 147–160.
5. Lee SM, Lee JH. 2012. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**: 16–18.
6. Lertwattanasakul N, Kosaka T, Hosoyama A, Suzuki Y, Rodrusamee N, Matsutani M, et al. 2015. Genetic basis of the highly efficient yeast *Kluyveromyces marxianus*: complete genome sequence and transcriptome analyses. *Biotechnol. Biofuels.* **8**: 47–59.
7. Lin L, Tako M, Hongo F. 2000. Isolation and characterization of l-carrageenan from *Euclima serra* (Togekirinsai). *J. Appl. Glycosci.* **47**: 303–310.
8. Ra CH, Jeong GT, Shin MK, Kim SK. 2013. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresour. Technol.* **140**: 421–425.
9. 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.
10. Rouhollah H, Iraj N, Giti E, Sorah A. 2007. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Saccharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *Afr. J. Biotechnol.* **6**: 1110–1114.
11. 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.
12. Tan IS, Lee KT. 2015. Solid acid catalysts pretreatment and enzymatic hydrolysis of macroalgae cellulosic residue for the production of bioethanol. *Carbohydr. Polym.* **124**: 311–321.
13. Yuan WJ, Zhao XQ, Ge XM, Bai FW. 2008. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 2076–2083.