Galactose에 순치한 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)로부터 바이오에탄올 생산

양지원, 박유림, 정귀택, 김성구*
부경대학교 생물공학과

Received: September 9, 2020 / Revised: November 20, 2020 / Accepted: November 24, 2020

Bioethanol Production from *Gracilaria verrucosa* Using *Saccharomyces cerevisiae* with Adaptive Evolution

Ji Won Yang, Yu Rim Park, Gwi-Taek Jeong, and Sung-Koo Kim*

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

The seaweed, *Gracilaria verrucosa* (red seaweed) was fermented to produce bioethanol. Optimal thermal acid hydrolysis conditions were determined as 200 mM H₂SO₄ and 10% (w/v) seaweed slurry at 130 °C for 60 min yielding 47.5% of pretreatment efficiency (E_p). After the thermal acid hydrolysis, enzymatic saccharification was carried out with 16 U/ml Viscozyme L, Cellic CTec2 or mixture of Viscozyme L and Cellic CTec2 to *G. verrucosa* hydrolysates. Enzymatic saccharifications with Viscozyme, Cellic CTec2 or mixture of those yielded 7.3 g/l glucose with efficiency of saccharification, $E_s = 34.9\%$, 11.6 g/l glucose with $E_s = 64.4\%$ and the mixture of those 9.6 g/l glucose with $E_s = 56.6\%$, respectively. Therefore, based on the E_s value, Cellic CTec2 was selected for the optimal enzyme for enzymatic saccharification of *G. verrucosa* hydrolysate. The ethanol productions with non-adapted *S. cerevisiae* CEN-PK2 (wild type) and *S. cerevisiae* CEN-PK2 with adaptive evolution to galactose produced 8.5 g/l ethanol with $Y_{EtOH} = 0.19$ and 21.5 g/l ethanol with $Y_{EtOH} = 0.50$ at 144 h, respectively. From these results, the ethanol production by *S. cerevisiae* with adaptive evolution showed high concentration of ethanol production using *G. verrucosa* as a substrate.

Keywords: Bioethanol, red seaweed, *Gracilaria verrucosa*, ethanol fermentation

서론

현재 화석연료의 고갈과 이산화탄소(CO₂) 축적에 따른 지구온난화 등의 환경 문제로 인해 화석연료를 대체할 수 있는 새로운 재생 가능한 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다[1]. 바이오 에탄올은 화석연료와 혼합하거나 대체하여 사용할 수 있어서 이산화탄소의 순환으로 친환경적이고 지속 가능한 에너지 생산이 가능하다[2, 3]. 대체에너지인 바이오 에탄올 생산에 사용할 수 있는 자원 중 해양생물자원인 해조류 바이오매스는 육상계 바이오매스의 한계를 극복할 수 있는 차세대 바이오매스로서 새롭게 조명받기 시작하였다[4]. 해조류는 광합성을 통한 대기중의 이산화탄소를 흡수하므로 지구온난화 등의 환경문제를 해결할 수 있으며

[5], 육상계 바이오매스 자원에 비해 면적대비 생산수율이 높고, 성장이 빠르고, 높은 이산화탄소 흡수율 및 식량자원과 경쟁하지 않는 장점이 있어 경쟁력이 있는 것으로 평가되고 있다. 따라서 제1세대 바이오매스인 식량자원[6]과 제2세대 바이오매스인 리그노셀룰로스[7] 등을 대체할 수 있는 해조류 바이오매스는 가장 적합한 제3세대 바이오매스로 알려져 있다.

제3세대 바이오매스 중 홍조류인 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*)는 갈조류나 녹조류에 비해 탄수화물 함량이 높다는 장점이 있다. 홍조류를 이용한 에탄올 발효를 위해 선행되어야 할 것은 홍조류로부터 당당을 얻어내는 작업이다. 열산가수분해법은 단시간 내에 바이오매스로부터 효율적으로 당당을 분리해낸다는 장점이 있다[8–10]. 그러나 열산가수분해 전처리(thermal acid hydrolysis pretreatment) 방법은 dehydration 반응에서 5-hydroxymethylfurfural (HMF)를 생성시킨다[11]. 이러한 저해물질들은 미생물의 효소적, 생물학적 활성, 단백질과 RNA 합성을 저해시키기 때문에 이

*Corresponding author

Tel: +82-51-629-5868, Fax: +82-51-629-5863
E-mail: skkim@pknu.ac.kr

를 제거하였다.

본 연구에서는 홍조류 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 열산가수분해를 수행한 뒤, 상업적 효소를 이용하여 효소당화를 실시하며, 야생(wild type)과 적응진화(adaptive evolution)된 *Saccharomyces cerevisiae* CEN-PK2를 이용하여 바이오 에탄올 발효 및 생산효율을 비교하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에서는 에탄올 발효를 위한 바이오매스로 완도산 꼬시래기(*G. verrucosa*)를 사용하였으며, 자연 건조 후 분쇄기로 갈아 입자의 크기가 150-mesh인 분말을 사용하였다. 꼬시래기의 구성성분은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하였으며, AOAC 방법에 의해 분석을 실시하였다[12].

열산가수분해(Thermal acid hydrolysis)

꼬시래기(*G. verrucosa*) 열산가수분해 최적조건을 설정하기 위하여 먼저 산의 종류에 따른 전처리 효율을 비교하여 단계적으로 전처리 조건을 최적화하였다. 꼬시래기(*G. verrucosa*) 슬러리 10% (w/v)에 200 mM의 황산(H_2SO_4), 질산(HNO_3) 또는 염산(HCl)을 각각 첨가하여 121°C에서 60분간 열처리를 하였다. 열산가수분해 전처리에 적합한 산 조건을 바탕으로 산 농도 100–500 mM, 온도 100–140°C, 슬러리 농도 6–14% (w/v), 15–120분 동안 시간에 따라 열처리 후 시료를 원심분리하여 분리된 상층액에서 glucose, galactose, formic acid, levulinic acid, HMF를 측정하여 최적의 조건을 확립하였다. 열산가수분해의 전처리효율(E_p , %)은 식 (1)에 나타내었다.

$$E_p (\%) = \frac{\Delta S_{glu+gal}}{TC} \quad (1)$$

여기서 $\Delta S_{glu+gal}$ 는 열산가수분해시 생성되는 glucose와 galactose의 농도(g/l)이며, TC는 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 총 탄수화물(total carbohydrate) 함량(g/l)이다.

꼬시래기 열산가수분해물의 효소당화

효소당화를 위해 전처리 후 10 N NaOH를 이용하여 pH 5.0로 중화하였다. 최적 효소당화를 위한 효소는 Viscozyme L (121 β -glucanase U/ml; Novozymes, Denmark)과 Cellic CTec2 (cellulase, 120 FPU/ml; Novozyme)를 각각 16 U/ml의 단일효소 및 1대 1비율로 혼합한 효소를 첨가하여 50°C에서 72시간동안 반응시켰다. 효소당화를 실시한 후 시료를 채취하여 생성된 단당의 양을 측정하였다. 효소당화 효율(E_s , %)은 식 (2)에 나타내었다.

$$E_s (\%) = \frac{\Delta S_{glu}}{C} \times 100 \quad (2)$$

여기서 ΔS_{glu} 는 효소당화시 생성되는 glucose의 농도(g/l)이며, C는 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 섬유(fiber) 함량(g/l)이다.

꼬시래기 열산가수분해물의 HMF 제거

꼬시래기의 가수분해물로부터 HMF를 제거하기 위해 활성탄(activated carbon, Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Korea)을 이용하였다. 먼저, 100 ml의 가수분해물에 0–6% 농도의 활성탄을 넣고 50°C, 150 rpm에서 2분동안 흡착시켰다. 활성탄의 흡착 표면적은 1400–1600 m²/g이다. 흡착 후 원심분리기(1390 $\times$ g, 10 min)로 활성탄을 제거하였고, 분리된 상층액의 당당량과 HMF잔여량을 분석하였다.

효모를 이용한 바이오 에탄올 발효

홍조류 꼬시래기(*G. verrucosa*)를 이용하여 열산가수분해와 효소당화를 실시하였고, HMF가 제거된 꼬시래기(*G. verrucosa*) 가수분해산물을 이용하여 에탄올 발효를 진행하였다. 고농도에서 당 순치를 한 효모는 당 흡수율과 에탄올 생산이 증가한다고 보고되어 있으며[13], 효과적인 바이오 에탄올 생산비교를 위해 고농도 당에 순치(adaptive evolution)를 한 *S. cerevisiae* CEN-PK2와 순치하지 않은 wild type *S. cerevisiae* CEN-PK2를 접종용 발효 효모로 사용하였다. 배지는 100 ml flask에서 working volume 30 ml로 121°C에서 15분간 멸균한 YPD broth (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, dextrose 20.0 g/l)를 사용하였다. 효모 접종 후 30°C에서 150 rpm으로 24시간 배양하였다.

고농도 당 순치 효모(adaptive evolutioned *S. cerevisiae* CEN-PK2)는 YPD broth에서 효모를 분리하여 250 ml flask 안에 100 ml working volume의 YPHG (yeast extract 10.0 g/l, peptone 20.0 g/l, high galactose 120.0 g/l)에 접종하여 24시간 동안 배양하였다. YPHG broth에서 원심분리기를 이용하여 배지를 제거하고, 순치된 효모를 최종 효모 농도가 1.0 g DCW/l로 접종한 후 30°C, 150 rpm으로 6일동안 배양하면서 일정 시간마다 시료를 분석하였다.

다양한 단당 및 에탄올 함량 분석을 위하여 시료를 20분 동안 원심분리 후 상층액을 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)를 이용하여 분석하였다. 에탄올 수율계수(Ethanol Yield Coefficient, Y_{EtOH} , g/g)는 식 (3)으로 나타낼 수 있다.

$$Y_{EtOH} (g/g) = \frac{[EtOH]_{max}}{[Sugar]_{ini}} \quad (3)$$

여기서 $[EtOH]_{max}$ 는 에탄올 발효를 통해 생성되는 최종 에탄올의 농도(g/l)이며, $[Sugar]_{ini}$ 는 에탄올 발효 초기 단당 환

원당의 농도(g/l)이다. 최대 이론적 에탄올 수율계수 Y_{EtOH} = 0.51이다.

분석방법

단당 glucose, galactose, 저해 물질인 HMF와 에탄올 농도의 측정을 위해 HPLC (Agilent 1100 Series, Agilent, Inc.)를 이용하여 분리하였고, RID (refractive index detector)를 이용하여 농도를 측정하였다. 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column (300.0 × 7.8 mm)를 사용하여 온도 65℃, 이동상 5 mM 황산, 유속 0.6 ml/min로 하여 각 시료를 35분간 분석하였다[14].

열산가수분해의 통계적처리는 SPSS software package (ver. 23.0; SPSS Inc., USA)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

꼬시래기(*G. verrucosa*)의 성분 분석

홍조류인 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 구성성분을 AOAC 방법으로 분석한 결과 66.9% 탄수화물, 10.6% 섬유, 9.5% 단백질, 0.6% 지방, 12.4% ash 등으로 Table 1에 나타내었다. 이 결과를 통해 꼬시래기(*G. verrucosa*)에서 사용할 수 있는 총 탄수화물 함량은 섬유를 포함한 77.5%이며, 이는 활용해야 할 단당을 얻을 수 있어 에탄올 생산에 적합한 바이오매스라고 판단되었다.

열산가수분해(thermal acid hydrolysis)를 통한 전처리 최적화

꼬시래기(*G. verrucosa*)를 이용하여 에탄올을 생산하기 위해 열산가수분해 전처리를 실시하였다. 일반적으로 열산가수분해 전처리에서 121℃의 온도와 강산의 사용으로 바이오매스를 가수분해에 의해 용이하게 당당류로 전환시키고 신속하게 가수분해를 시킬 수 있다[15].

Fig. 1은 10% (w/v)의 꼬시래기(*G. verrucosa*) 슬러리를 121℃에서 60분간 200 mM 질산(HNO_3), 황산(H_2SO_4) 및 염산(HCl)을 이용한 열산가수분해를 수행하고 단당 농도와 효율을 나타낸 그래프이다. 열산가수분해 전처리의 효율(E_p)은 질산, 황산 및 염산에서 각각 36.3%, 44.3%, 43.3%를 나타내었다. 황산(H_2SO_4)과 염산(HCl)의 효율이 44.3%, 43.3%로 크게 차이를 보이지는 않았으나 최적의 산 종류를 결정

Fig. 1. Effect of thermal acid hydrolysis and efficiency of pre-treatments. Various acids (H_2SO_4 , HNO_3 and HCl) were used with 10% (w/v) *G. verrucosa* slurry content, 200 mM at 121 °C for 60 min. Values labeled with different letters (A, B, C, D for glucose; a, b, c, d, e for galactose) differ significantly based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

하기 위해 황산(H_2SO_4)과 염산(HCl) 두 가지를 선정하여 전처리 실험을 진행하였다.

Fig. 2(A)는 10% (w/v)의 꼬시래기(*G. verrucosa*) 슬러리를 121℃, 60분 동안 100 mM에서 500 mM 황산(H_2SO_4)의 농도에 따라, Fig. 2(B)는 100 mM에서 500 mM 염산(HCl)의 농도에 따라 조건을 달리하여 열산가수분해를 실시한 결과이다. 황산(H_2SO_4)의 농도가 200 mM일 때 E_p 값이 45.1%로 가장 높았으며, 염산(HCl)은 농도가 300 mM일 때 E_p 값이 45%로 가장 높았다. 그러므로, 황산(H_2SO_4) 200 mM 농도에서 꼬시래기(*G. verrucosa*)에서 분해되어 나오는 glucose와 galactose 양이 최적화되었으며, 이후에는 200 mM 황산(H_2SO_4)를 사용하였다.

Fig. 3은 200 mM의 황산(H_2SO_4)을 이용하여 (A) 100–140℃의 온도, (B) 15–120분의 열처리 시간, (C) 6–14% (w/v)의 꼬시래기(*G. verrucosa*) 슬러리 농도에 따른 열산가수분해를 수행하였다. Fig. 3(A)는 다양한 온도에 따른 열산가수분해의 결과이며, 온도가 130℃까지 증가할수록 가수분해를 통한 당이 증가하는 경향을 나타내었다. 전처리 효율은 130℃에서 46%로 가장 높았으며, 따라서 130℃를 최적 열처리 온도로 선정하였다. Fig. 3(B)는 200 mM의 황산(H_2SO_4) 농도, 130℃의 열처리 온도, 10% (w/v) 슬러리 농도에서 열처리 시간을 증가시켜 열산가수분해를 실시한 결과이며, 열처리 60분에서 120분으로 시간이 증가함에 따라 Levulinic acid

Table 1. Composition of *Gracilaria verrucosa*.

Species	Seaweed	Composition (%)				
		Carbohydrate	Fiber	Protein	Lipid	Ash
Red Seaweed	<i>Gracilaria verrucosa</i>	66.9	10.6	9.5	0.6	12.4

Fig. 2. Effect of thermal acid hydrolysis and efficiency of pre-treatments. (A) sulfuric acid (H₂SO₄) concentrations, (B) hydrochloric acid (HCl) concentrations on the efficiency of pretreatment carried out with 10% (w/v) slurry content, at 121 °C for 60 min. Values labeled with different letters (A, B, C, D for glucose; a, b, c, d, e for galactose) differ significantly based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

농도만 증가하였으며, 열산가수분해 효율(E_p , %)은 46.3%에서 44.7%로 점점 감소하였다. 따라서, 최적 열처리 시간은 60분으로 설정하였다. Fig. 3(C)는 다양한 슬러리 농도에 따른 열산가수분해 결과이며, 슬러리 농도가 증가할수록 가수분해되는 galactose와 HMF의 농도도 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 사용한 슬러리 농도가 10%에서 12%로 증가하였을 때 전처리 효율(E_p , %)은 47.5%에서 44.7%로 오히려 감소하였다. 따라서 최적 슬러리 농도(w/v, %)는 10%로 설정하였다. 최종적으로 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 최적조건으로 판단되는 전처리 조건은 황산(H₂SO₄) 농도 200 mM, 가수분해 온도 130°C, 처리 시간 60분, 슬러리 농도 10% (w/v)로 설정하였다.

효소당화

꼬시래기(*G. verrucosa*)로부터 열산가수분해를 이용하여

Fig. 3. Evaluation of thermal acid hydrolysis conditions by changing the treatment parameters. (A) reaction temperature, (B) thermal acid hydrolysis time and (C) slurry content. Values labeled with different letters (A, B, C, D for glucose; a, b, c, d, e for galactose) differ significantly based on one-way ANOVA and Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

최적 전처리를 실시한 후 10 N NaOH를 이용하여 pH 5.0으로 중화한 뒤 효소당화를 진행하였다. 효소는 16 U/ml Viscozyme L (121 β-glucanase U/ml; Novozymes, Bagsvaerd,

Fig. 4. Saccharification of single and mixed enzyme treatments on glucose release of *G. verrucosa* hydrolysate from 10% (w/v) slurry after thermal acid hydrolysis at pH 5.0, 50 °C for 72 h.

Denmark), 16 U/ml Cellic CTec2 (cellulase, 120 FPU/ml; Novozyme, Denmark), 및 16 U/ml Viscozyme L과 16 U/ml Cellic CTec2를 1대 1 비율로 혼합한 것을 사용하였다.

Fig. 4에서는 효소당화(Enzymatic saccharification)의 최적화 조건을 구하였다. 단일 효소와 혼합 효소를 이용하여 50°C에서 72시간동안 당화를 진행한 결과로 72시간에서 단일 효소 Viscozyme L과 Cellic CTec2의 효소당화 효율(E_s , %)은 각각 34.9%에 해당되는 7.3 g/l glucose와 64.4%에 해당되는 11.6 g/l glucose를 나타내었다. 혼합 효소의 효소당화 효율(E_s , %)은 56.6%에 해당되는 9.6 g/l glucose로 나타났다. 따라서 효소당화 조건을 Cellic CTec2 16 U/ml로 72시간동안 당화하였을 때 효소당화 효율이 가장 높은 것을 확인하였고, 이 조건을 효소당화 조건으로 선택하였다.

꼬시래기 열산가수분해물 HMF 제거

Formic acid와 Levulinic acid는 각각 10 g/l과 40 g/l 이상을 포함하고 있을 때 효모의 세포 성장에 있어서 저해제 역할을 한다[16]. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF)는 에탄올 생산을 억제하는 역할[17]을 함으로 본 연구에서는 HMF흡착을 위한 최적의 활성탄소 농도를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 1–6% 활성탄으로 2분동안 흡착시킨 후 HMF 제거 효과 및 단당의 양을 나타내었다. 활성탄의 농도가 증가할수록 HMF가 제거되어, 존재하는 HMF는 감소하는 것을 알 수 있다. 4% (w/v) 활성탄을 2분동안 흡착시켰을 때 단당량에는 변화없이 모든 HMF가 제거되는 것을 확인할 수 있었으며 이 농도를 최적의 HMF 제거방법으로 정하였다.

Fig. 5. Effect of activated carbon treatment with the adsorption time of 2 min on HMF removal and monosaccharide concentration at 150 rpm, 50 °C.

효모를 이용한 에탄올 발효

에탄올 발효는 10% (w/v) 꼬시래기(*G. verrucosa*) 가수분해 산물로부터 wild type *S. cerevisiae* CEN-PK2와 고농도 galactose에 순치한(adaptive evolution) *S. cerevisiae* CEN-PK2를 이용하여 당 소비와 에탄올수율계수(Y_{EtOH} , g/g)를 통해 비교 분석하였다.

Fig. 6(A)는 wild type *S. cerevisiae* CEN-PK2를 30°C, 150 rpm으로 144시간 동안 발효한 결과이다. 열산가수분해 후 당화를 통해 얻은 단당 glucose와 galactose의 총 당량은 44.3 g/l이며, 이 중 glucose는 11.3 g/l, galactose는 33 g/l이다. 24시간내에 glucose는 완전히 소모된 반면, galactose의 경우 단지 5 g/l의 소모가 있었다. 이때의 galactose 최종 잔존량은 28 g/l이며, galactose의 대사는 glucose의 대사에 비해 거의 이루어지지 않았다고 볼 수 있다.

이후 galactose는 감소하는 경향을 보였으나 발효 144시간동안 대부분을 소비하지는 못하였다. 발효 144시간에 8.5 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.19를 나타내었다.

Fig. 6(B)는 고농도 galactose에 순치(adaptive evolution)를 한 *S. cerevisiae* CEN-PK2를 30°C, 150 rpm으로 144시간동안 발효한 결과이며, 24시간만에 glucose를 완전히 ethanol로 발효하였고, 또한 galactose를 발효하여 에탄올을 생산하였다. 시간이 지남에 따라 galactose는 점점 감소하는 경향을 보였으며, 발효 144시간이 되었을 때 2.0 g/l를 남겨두고 모두 발효하였다. 고농도 galactose에 순치를 한 *S. cerevisiae* CEN-PK2로 144시간동안 발효하였을 때 21.5 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 최종 에탄올수율계수(Y_{EtOH})는 0.50을 얻을 수 있었다.

Ra *et al.* [18]의 논문에서는 동일한 해조류인 꼬시래기(*G. verrucosa*)를 이용하여 전처리 최적조건 270 mM 황산(H_2SO_4), 슬러리 농도 12%, 온도 121°C에서 60분간 열산가수분해 후 효소당화를 진행하였으며, 슬러리 농도 12%로부터 총 50.4 g/l의 당을 얻었다. 이와 비교하여 본 연구에서는 전처리 최적조건 200 mM 황산(H_2SO_4), 슬러리 농도 10%, 온도 130°C에서 60분간 열산가수분해 후 효소당화를 진행하여 슬러리 농도 10%로부터 총 44.3 g/l의 당을 얻었다. 또한 Ra *et al.* [18]에 따르면, 효모 *Candida lusitanae* ATCC 42720을 이용해 발효하여 wild type *C. lusitanae*로부터 총 당량 50.4 g/l으로부터 15.1 g/l의 에탄올을 생산하였고, 이때 에탄올수율계수, $Y_{EtOH} = 0.29$ 이다. 120 g/l 고농도 galactose에 적응진화(adaptive evolution)한 *C. lusitanae* ATCC 42729를 이용하여 발효를 하였을 때 22.0 g/l의 바이오에탄올을 생산하였으며, $Y_{EtOH} = 0.43$ 이었다. 본 연구에서는 동일한 바이오매스인 꼬시래기(*G. verrucosa*)를 효모 *S. cerevisiae* CEN-PK2를 이용한 발효를 통해 wild type *S. cerevisiae* CEN-PK2로부터 총 당량 44.3 g/l로부터 8.5 g/l의 에탄올을 생산하여 $Y_{EtOH} = 0.19$ 의 값을 얻었고, 120 g/l

고농도 galactose에 순치된(adaptive evolution) *S. cerevisiae* CEN-PK2를 이용하였을 때 21.5 g/l의 에탄올을 생산하여 $Y_{EtOH} = 0.50$ 의 값을 얻었다. 본 실험에 사용한 효모 *S. cerevisiae* CEN-PK2와 *C. lusitanae* ATCC 4272의 에탄올 발효에 대해서 비교해 보았을 때, 야생형 균주를 사용한 경우에는 *C. lusitanae*의 에탄올 생산량이 높았으나 적응진화한 경우에는 *S. cerevisiae*의 에탄올 생산량이 높았다. *S. cerevisiae*가 *C. lusitanae*보다 적응진화로 인한 에탄올생산수율 개선이 뚜렷하게 이루어졌다.

요 약

해조류 중 홍조류인 꼬시래기(*G. verrucosa*)로부터 효모를 이용한 발효를 위해 열산가수분해, 효소당화 및 에탄올 발효 수율 향상을 검토하고, 기존의 혼합당의 흡수효율을 높이기 위해 고농도 당 순치를 수행하였다. 열산가수분해는 200 mM 황산(H_2SO_4)을 이용하여 10% (w/v)의 꼬시래기(*G. verrucosa*)의 슬러리, 130°C의 온도에서 60분 동안 열산가수분해를 수행하였다. 또한 wild type 효모와 고농도 galactose에 순치(adaptive evolution)된 효모를 이용한 발효를 실시한 결과, wild type 효모의 경우 발효 144시간에 8.5 g/l 에탄올 발효로 에탄올수율계수 $Y_{EtOH} = 0.19$ 와 galactose에 순치된 효모의 경우 21.5 g/l 에탄올 발효로 에탄올수율계수 $Y_{EtOH} = 0.50$ 을 나타내었다. 이러한 연구결과는 해양 바이오매스인 해조류로부터 바이오 연료의 효율적인 생산방법을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

Acknowledgments

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

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Sabourin-Provost G, Hallenbeck PC. 2009. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. *Bioresour. Technol.* **100**: 3513-3517.
2. Yazdani SS, Gonzalez R. 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**: 213-219.
3. Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production.

Fig. 6. Bioethanol production from *G. verrucosa* using thermal acid hydrolysis, enzymatic saccharification and fermentation using (A) wild type *S. cerevisiae* CEN-PK2, (B) *S. cerevisiae* CEN-PK2 with adaptive evolution.

- Bioresour. Technol.* **98**: 2824-2828.
4. Bothast RJ, Schlicher MA. 2005. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 19-25.
 5. Daroch M, Geng S, Wang G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy* **102**: 1371-1381.
 6. Dias MOS, Esinas AV, Nebra SA, Filho RM, Rossel CEV, Maciel MRW. 2009. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse. *Chem. Eng. Res. Des.* **87**: 1206-1216.
 7. Chiaramonti D, Prissi M, Ferrero S, Oriani L, Ottonello P, Torre P, *et al.* 2012. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production. *Biomass Bioenergy* **46**: 25-35.
 8. Kim MJ, Kim SK. 2012. Ethanol production by separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharina japonica*. *KSBB J.* **27**: 86-90.
 9. Adamas JM, Gallagher JA, Donnison LS. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissimi* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.* **21**: 569.
 10. Agbor VB, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin DB. 2011. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* **29**: 675-685.
 11. Morimoto S, Murakami M. 1993. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *J. Ind. Microbiol.* **11**: 147-150.
 12. 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.
 13. Cho Y, Ra CH, Kim SK. 2014. Ethanol production from the seaweed *Gelidium amansii*, using specific sugar acclimated yeasts. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 264-269.
 14. Cho Y, Kim H, Kim SK. 2013. Bioethanol production from brown seaweed, *Undaria pinnatifida*, using NaCl acclimated yeast. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**: 713-719.
 15. Qi L, Mui YF, Lo SW, Lui MY, Akien GR, Horvath IT. 2014. Catalytic conversion of fructose, glucose and sucrose to 5-(hydroxymethyl) furfural and levulinic and formic acids in γ -valerolactone as a green solvent. *ACS. Catal.* **4**: 1470-1477.
 16. Guo Z, Olsson L. 2014. Physiological response of *Saccharomyces cerevisiae* to weak acids present in lignocellulosic hydrolysate. *FEMS Yeast. Res.* **14**: 1234-1248.
 17. Linihan P, Orozco A, O'Neill E, Ahmad MNM, Rooney DW, Walker GM. 2010. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chem. Eng. J.* **156**: 395-403.
 18. Ra CH, Choi JG, Kang CH, Sunwoo IY, Jeong GT, Kim SK. 2015. Thermal acid hydrolysis pretreatment, enzymatic saccharification and ethanol fermentation from red seaweed, *Gracilaria verrucosa*. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **41**: 9-15.