

## 괘쟁이모자반의 동시당화발효를 통한 Lactic Acid의 생산

장주은<sup>†</sup>, 주예빈<sup>†</sup>, 이유경, 설정만, 김수린\*

# Production of Lactic Acid by Simultaneous Saccharification and Fermentation of *Sargassum horneri*

Jueun Jang<sup>†</sup>, Yebin Ju<sup>†</sup>, You-Kyung Lee, Jeongman Seol, and Soo Rin Kim\*

Received: 21 January 2021 / Revised: 4 March 2021 / Accepted: 30 March 2021

© 2021 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** *Sargassum horneri* is inedible and invasive species of brown macroalgae that expands and drifts in Spring and Summer, causing damages to the ecosystem of the south coast of Korea, especially Jeju island. Korean government is preventively collecting large amounts of *S. horneri* biomass before reaching to the coast, but there is no other way to dispose or utilize the biomass but landfill and incineration. In the present study, *S. horneri* biomass was tested as a raw material for biological production of lactic acid, a type of commodity chemicals for polymer synthesis. Using commercial cellulases and lactic acid-producing engineered yeast, simultaneous saccharification and fermentation (SSF) conditions were optimized and lactic acid production was demonstrated. Finally, lactic acid was produced at a yield of 0.24 g lactic acid/g dried biomass and at a productivity of 0.73 g lactic acid/L-h, suggesting an industrial potential to biologically utilize *S. horneri* coastal waste.

**Keywords:** brown macroalgae, cellulase, yeast, lactic acid

### 1. INTRODUCTION

갈조류의 일종인 괘쟁이모자반 (*Sargassum horneri*)은 한국, 일본 및 중국 연안에 분포하는 종으로, 동해와 일본 해역 쪽으로 해류를 타고 이동하는 부유성 모자반의 주요 구성 종으

로 알려져 있다 [1]. 그러나 2015년부터 현재까지 괘쟁이모자반이 중국으로부터 해류를 타고 우리나라 서해안과 제주도 연안으로 넘어와 대규모의 유조가 일어나고 있으며, 이에 악취와 해충을 발생시키고 선박의 스크류 감김에 따른 해상 안전에 관한 사고와 양식장 시설에 피해를 일으켰다 [1]. 연간 수거되는 약 5,000톤의 괘쟁이모자반은 식용이 불가하여 해양 폐기물로 버려지고 있으며, 괘쟁이모자반을 바이오매스로 재활용하는 연구는 아직 미비한 실정이다 [2,3].

Lactic acid는 식품 첨가물, 화장품 산업, 화학산업 등 다양한 분야에서 응용되고 있다 [4,5]. 현재 lactic acid는 화학적인 방법, 생물학적인 방법으로 합성이 가능하며, 생물학적 합성을 통해서 보다 순도 높은 lactic acid를 생산할 수 있다고 알려져 있다 [6]. 게다가 lactic acid는 친환경 소재 플라스틱의 주 원료로 사용될 수 있기 때문에 최근까지 미생물을 이용한 lactic acid의 생산에 관한 연구가 많이 진행되고 있다 [7]. Lactic acid는 일반적으로 유산균에 의해서 생산될 수 있으나 기존 연구에서 유산균의 낮은 산내성으로 인해 lactic acid 생산 수율이 건중량 기준 0.19(g lactic acid/g dried biomass)으로 저조하였기 때문에 [6,8,9], 유산균 유래 lactate dehydrogenase (LDH) 유전자를 발현하는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 이용한 lactic acid 생산 연구가 진행되고 있다 [4,6].

괘쟁이모자반의 구성성분에는 mannitol, laminarin, alginates, cellulose, fucoidan 등을 포함한 탄수화물 함량이 가장 높은 것으로 알려져 있으며, 3세대 해양 바이오매스로서 리그노셀룰로직 작물에 비하여 리그닌의 함량이 적어 가수분해가 수월하다는 장점을 가진다 [10]. 기존 연구에서는 이러한 괘쟁이모자반을 물리화학적으로 전처리하고 효소적으로 당화 후 효모로 발효할 수 있는 가능성이 제시되었으나 그 활용은 바이오에탄올 생산에만 국한되어 있었다 [2,3]. 본 연구에서는 전처리된 괘쟁이모자반의 바이오에탄올 외 lactic acid와

<sup>†</sup>These two authors contributed equally.

<sup>1</sup>경북대학교 식품공학부

<sup>1</sup>School of Food Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

Tel: +82-53-950-7769, Fax: +82-53-950-7762

E-mail: soorinkim@knu.ac.kr

같은 화학소재의 생산 가능성을 확인하고자 하였다. 생물전환을 통한 lactic acid 생산은 고비용 문제를 겪고 있어, 해양폐기물인 팽생이모자반 기질을 공급함으로써 해당 문제를 개선함과 동시에 전처리된 팽생이모자반의 동시당화발효를 진행하여 보다 효율적인 산물 생산 전략을 제시해 보고자 한다 [9]. 구체적으로는 동시당화발효에서의 효소 농도, 바이오매스 함량, 발효 부피 등의 조건들을 다르게 하여 lactic acid의 생산성과 수율을 비교하였다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. 실험재료 및 전처리

본 실험에서는 제주도 연안의 팽생이모자반을 수집하여 사용하였다 (Table 1). 팽생이모자반의 염분 제거를 위해 증류수로 4-5번 행군 뒤 70°C에서 24시간 건조하고 grinder로 180-245 µm로 분말화 하여 50 mL tube에 담아 4 ± 2°C 냉장 보관 하였다. 분말화 한 팽생이모자반 4 g (20% solid loading) 과 4%의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mL을 100 mL Serum bottle에 넣고 밀봉하여 autoclave (BF-60AC, BioFree, Korea)를 이용하여 95°C, 4 시간동안 전처리 과정을 진행하였다. 전처리 후 calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>) 5 g과 증류수를 넣어 전체 부피를 20 mL로 맞추고 pH를 5.5~6.0으로 중화시켜 주었다. Solid loading에 따른 lactic acid 생산량을 비교하기 위해 6 g (30% solid loading)의 팽생이모자반을 위와 동일한 방법으로 전처리와 중화하여 가수분해물을 준비하였다. Scale-up 발효를 위해서는 2 L bottle을 이용하여 전체 부피를 1 L로 맞추어 위와 같이 전처리를 실시하였다.

### 2.2. 동시당화발효

동시당화발효에 사용된 균주는 glucose와 xylose를 대사하여 lactic acid를 생산하도록 *Rhizopus oryzae* 유래의 lactate dehydrogenase (LDH) 유전자를 도입한 SR8 LDH 균주를 사용하였다 [11]. SR8 LDH 균주는 buffered YPD 배지 (10 g/L

yeast extract, 20 g/L peptone, 20 g/L glucose, 50 mM potassium hydrogen phthalate)에 접종하여 30°C, 250 rpm에서 24시간 동안 전배양되었다. 전처리 후 calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>)로 중화시킨 팽생이모자반에 SR8 LDH의 초기세포농도를 0.5 OD (optical density at 600 nm) 또는 10 OD로 맞추어 멸균된 증류수로 세척하여 접종하고, 당화효소 (Table 2)를 첨가하여 동시당화발효를 진행하였다. 모든 발효는 shaking incubator (Ist-3075, Jeiotech, Daegu, Korea)에 30°C, 80 rpm, pH 5.5에서 혐기적으로 진행되었다.

### 2.3. 성분분석

팽생이모자반의 일반성분 분석은 기존의 연구 방법을 따라 수행되었다 [12]. 요약하면, 수분, 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유 함량을 Association of Official Analytical Chemists (AOAC)의 표준 방법에 따라 3반복으로 측정하였으며, 가용 무질소물 (N-free extract) 함량은 총 중량에서 측정된 값들을 빼서 계산하였다.

팽생이모자반 가수분해물의 glucose, lactic acid, ethanol 농도는 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies 1260 Series)를 이용하여 정량 분석하였다. Column은 Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex Inc. Torrance, CA)을 사용하였고, 이동상은 0.005 N의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 이용하여 50°C에서 0.6 mL/min 속도로 분석하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. 팽생이모자반의 일반성분분석

팽생이모자반의 일반성분분석을 수행하여 Table 1에 요약하였다. 팽생이모자반에 대한 일반성분은 기존에 보고되지 않았기 때문에, 비교를 위해 갈조류 중 부유성 성질을 가지고 팽생이모자반과 매우 유사한 구조적 형태를 띠는 노도솜 (*Ascophyllum nodosum*)과 일반성분을 비교하였다. 유사한 수분함량 조건에서, 팽생이모자반의 조섬유 (fiber, 대부분

**Table 1.** Proximate analysis of *Sargassum horneri* used in this study

	Moisture	Ash	Protein	Fat	Fiber	N-free extract	Reference
<i>Sargassum horneri</i>	14.2 ± 0.1	21.5 ± 0.1	8.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	9.6 ± 0.8	45.5	This study
<i>Ascophyllum nodosum</i>	13.5	18.6	5.2	3.0	-	59.7 <sup>1)</sup>	[13]
<i>Sargassum cinereum</i>	12.6 ± 0.2	22.3 ± 0.5	8.4 ± 0.1	0.4	5.4 ± 0.02	51.3 ± 0.7	[14]

<sup>1)</sup>44.7 % carbohydrate, 1.4% phenolic, and 13.62% others

**Table 2.** Commercial cellulase enzymes used in this study

Enzymes <sup>1)</sup>	Composition	Price	Activity	1x
Cellic® CTec2	Cellulase, hemicellulase, β-glucosidase	120,000 won/50 ml	1000 BHU/g <sup>2)</sup>	250 ppm, v/v
Celluclast 1.5 L FG	Cellulase	195,100 won/50 ml	700 EGU/g <sup>3)</sup>	

<sup>1)</sup>All enzymes are from Novozymes, Bagsværd, Denmark.

<sup>2)</sup>Biomass Hydrolysis Unit.

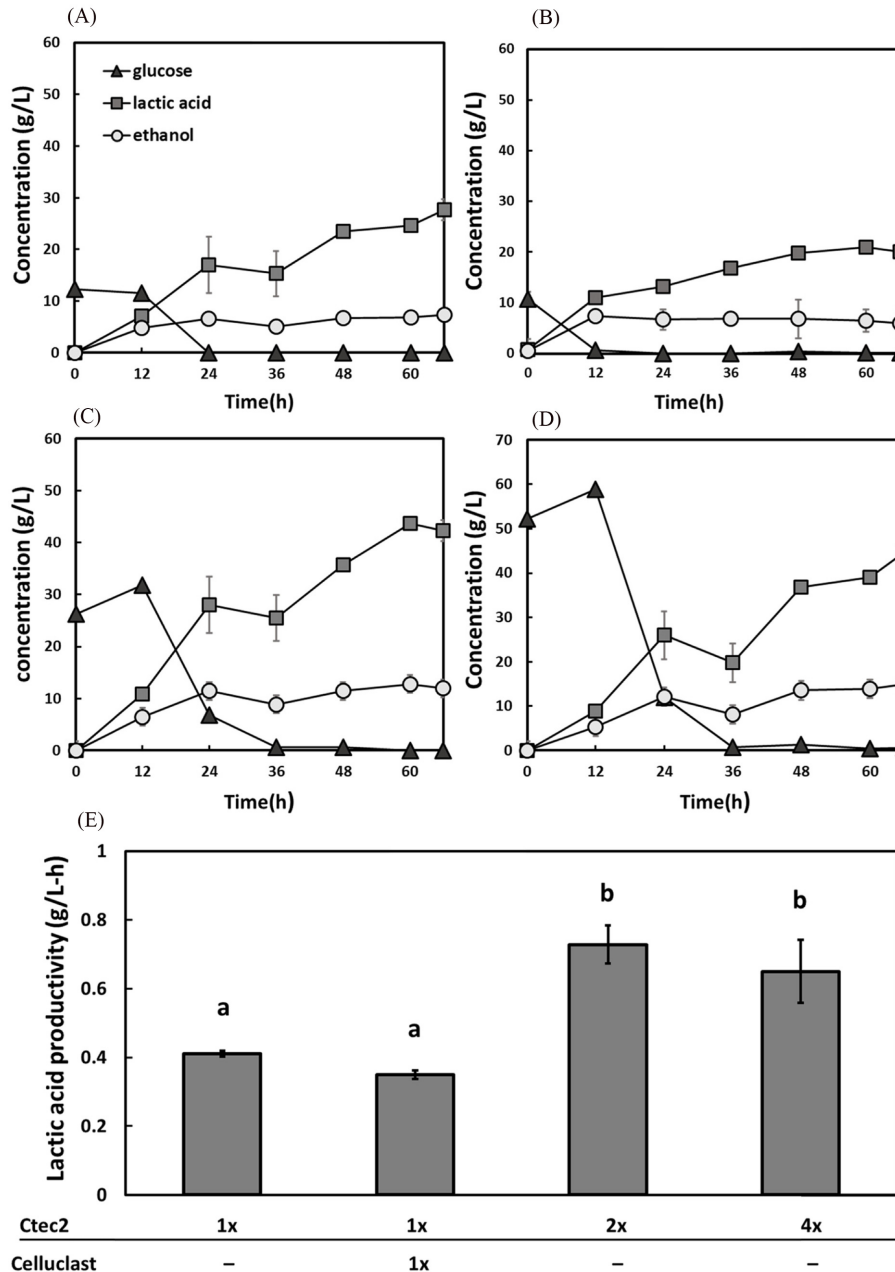
<sup>3)</sup>Endo-Glucanase Unit.

cellulose) 함량이 9.6%이고 가용 무질소물 (N-free extract, 대부분 탄수화물) 함량이 45.5%로 총 탄수화물 함량이 최대 55.1%로 분석되었으며, 이는 59.7%의 노도솜과 유사하였다 [13]. 또한 유전적으로 유사한 모자반 속의 *Sarggasum cinereum*의 탄수화물 함량은 최대 56.8%으로 팽생이모자반과 유사하였다 [14]. 이러한 결과는 일반적인 갈조류의 탄수화물 함량인 40-60%에 포함되는 값이나, 탄수화물의 조성은 갈조류의 종류 및 환경적 요인에 의해 달라질 수 있을 것이며, 이에 따라 발효가능한 탄수화물의 양도 달라질 것으로 예상해 볼

수 있다. 따라서 추후 연구에서는 팽생이모자반 탄수화물의 구체적인 탄수화물 조성비에 대한 분석이 요구된다.

### 3.2. 당화효소에 따른 lactic acid 생산 비교

팽생이모자반의 당화효소로는 상업적으로 이용가능한 Celluclast와 Ctec2 (Table 2)을 사용하였다. cellulase만으로 이루어진 Celluclast와 달리 Ctec2는 cellulase,  $\beta$ -glucosidase 및 일부 hemicellulase가 복합적으로 혼합되어 있는 효소로 [15], 팽생이모자반의 구조적인 특징이 잘 알려져 있지 않은 상황



**Fig. 1.** Optimization of cellulase enzymes for simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *S. horneri* for lactic acid production. Two types of cellulase enzymes (Ctec2 and Celluclast) were used as described in Table 2. (a) 1x Ctec2 (250 ppm, v/v), (b) 1x Ctec2 and 1x Celluclast, (c) 2x Ctec2, (d) 4x Ctec2 (0.1%, v/v), and (e) comparison of lactic acid productivity. Fermentation was performed at pH 6.0, 30°C, and 80 rpm for 60 h. Different letters (a, b) represent a significant difference ( $p < 0.05$ ).

에서 어떤 효소로 당화하는 것이 SR8 LDH균주를 이용한 lactic acid 생산에 유리할지를 비교해 보고자 하였다. 전처리된 팽생이모자반의 동시당화발효 (SSF)를 위해 효소와 균주를 동시에 넣어 발효를 진행하였고, 그 결과는 Fig. 1에 요약되었다.

Ctec2 (250 ppm, 1x)를 단독처리 하였을 때 발효 60시간 후 생산된 lactic acid는 27.7 g/L이었다 (Fig. 1(a)). Ctec2 1x에 Celluclast 1x를 추가했을 때, lactic acid 생산량은 20.1 g/L으로 유의적 차이가 없었으나 (Fig. 1(b)), Ctec2를 두 배(2x)로 처리했을 때, lactic acid 생산량이 43.7 g/L으로 증가하였다 (Fig. 1(c)). 반면 Ctec2를 그 이상(4x) 첨가하는 것은 초기 당화 속도를 향상시키는 것으로 확인되었지만, lactic acid 생산량을 증가시키지는 못했다 (Fig. 1(d)). 발효 60시간 동안의 lactic acid 생산성을 비교하면 (Fig. 1(e)), Ctec2를 500 ppm (2x) 처리했을 때, 가장 높은 생산성 (0.73 g/L-h)을 보였다. 해당 조건에서의 lactic acid 생산 수율은 팽생이모자반 건중량 기준 0.24 (g lactic acid/g dried biomass)이고, 팽생이모자반의 식이섬유 함량을 40%로 고려했을 때 [16], lactic acid의 수율은 이론수율 대비 60%로 계산될 수 있다.

위의 결과로부터, 팽생이모자반의 효과적인 당화를 위해서는 lignocellulose biomass와의 구조적인 차이가 고려되어야 함을 알 수 있다. 팽생이모자반은 갈조류의 일종으로 lignocellulose biomass의 glucan, hemicellulose, lignin 대신 glucan, alginate, mannitol을 주요 구성성분으로 한다 [17]. 단, 갈조류의 glucan은 cellulose ( $\beta$ -1,4 glycosidic bonds)와 laminarin ( $\beta$ -1,3/ $\beta$ -1,6 glycosidic bonds)으로 구성되며, 이러한 차이는 효소의 당화효율에 영향을 미칠 수 있다. 기존 연구에서 사용했던 celluclast 대신 [2], Ctec2의 첨가량에 비례해서만 lactic acid 생산량이 증가한 것은, cellulase 보다는  $\beta$ -glucosidase가 팽생이모자반의 당화에 제약이 되고 있음을 시사한다. 단, Ctec2를 최대(4x)로 첨가했을 때 lactic acid 생산성이 증가하

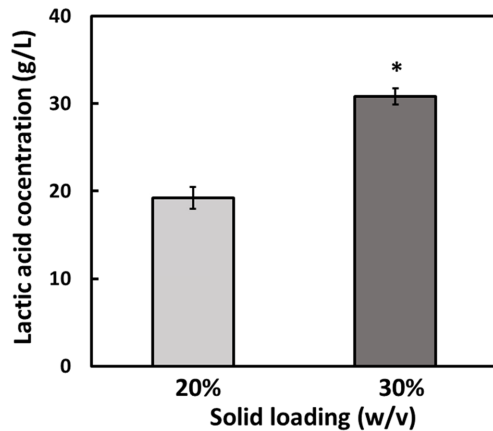


Fig. 2. Effect of solid loading on lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *S. horneri*. Fermentation was performed at pH 5.5, 30°C, and 80 rpm for 60 h with 250 ppm Celluclast and 250 ppm Ctec2. The asterisk represents a significant difference ( $p < 0.05$ ).

지 않은 것은 최대 fermentable sugar의 함량 및 yeast의 최대 생산량 (lactic acid tolerance)으로 인한 제약일 수 있으므로, 추후에는 동시당화발효가 아니라 효소 당화만을 분리하여 최적화하는 연구가 필요하다.

### 3.3. 바이오매스 첨가량에 따른 lactic acid 생산 비교

다음으로 팽생이모자반 첨가량 (biomass loading)을 증가시켜 전처리 및 동시당화발효에서의 lactic acid 생산량을 비교하였다. 건중량 기준 팽생이모자반 중량을 20% (w/v)에서 30%로 증가시켰을 때, lactic acid 생산량이 19.2 g/L에서 30.8 g/L로 유의적으로 증가하였다 (Fig. 2). 그러나 이러한 결과는 교반이 유리한 조건 (10% working volume)에서 shaking incubator를 이용해 80 rpm으로 교반 되었을 때의 결과이므로, 이러한 공정이 산업적으로 scale-up 된다면 에너지 효율 및 생산성을 모두 고려하여 최적 biomass loading 양은 이보다 낮게 설정될 수 있다.

### 3.4. 팽생이모자반의 Scale-up 발효를 통한 lactic acid 생산 확인

위와 같은 팽생이모자반의 생물전환 공정의 scale-up 가능성을 확인하기 위해, 0.5 L (25% working volume) 규모로 100 g 팽생이모자반 (20% dried biomass loading)의 전처리 및 동시당화발효를 진행하였다 (Fig. 3). 배양시간 72시간 동안 최대 48.3 g/L의 lactic acid를 생산하였고, 이는 lactic acid 수율이 0.24 (g lactic acid/g dried biomass)로 계산되어 20 mL 소규모 발효 결과와 동일하였다. 그러나 lactic acid 생산성은 0.67 g/L-h로 약 8% 정도 감소하였다. 이러한 생산성 저하는 배양규모가 20 mL에서 0.5 L로 25배 증가되었고, working volume이 10%에서 25%로 2.5배 증가함에 따라 교반이 원활하게 되

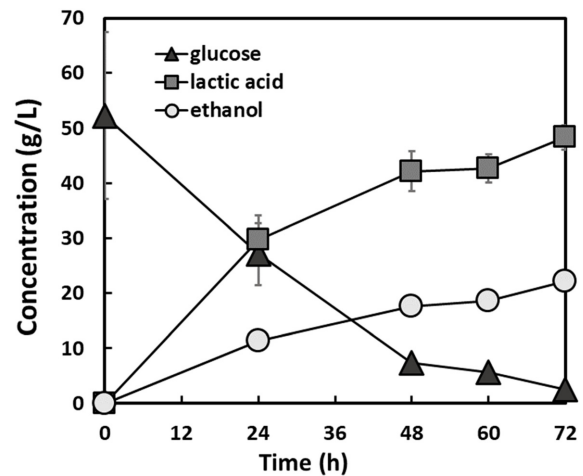


Fig. 3. Scale-up fermentation data of SR8 LDH strain using 2 L bottle. Fermentation was performed at pH 5.5, 30°C and 80 rpm using 0.1% Ctec2 for 72 h. In the 2 L bottle fermentation, 48.3 g/L of lactic acid is produced. Glucose ( $\blacktriangle$ ), lactic acid ( $\blacksquare$ ), and ethanol ( $\circ$ ).

지 않았기 때문일 수 있다. 향후에는 bioreactor를 이용하여 높은 working volume에서도 교반 효율을 향상시켜 연구해 볼 필요가 있으며, 또한 생산성을 극대화하기 위한 측면에서는 초기 세포 접종량을 늘이는 전략이 효과적일 수 있다.

#### 4. CONCLUSION

본 연구에서는 해양폐기물로 버려지는 팽생이모자반을 재 활용하기 위한 하나의 대책으로서 다양한 분야에서 응용 가치가 높은 유용산물인 lactic acid로의 생물전환 조건을 최적화하는 연구를 수행하였다. 이를 위해서 glucose와 xylose를 발효하여 lactic acid를 생산하도록 유전자를 조작한 SR8 LDH균주를 사용하여 효소 농도 및 바이오매스 함량, 배양 부피 등의 조건에 따른 lactic acid 생산을 비교 분석하였다. 먼저 효소처리 조건에서는  $\beta$ -glucosidase가 포함된 cellulase cocktail이 팽생이모자반의 동시당화발효에 적합했다. 한편, 바이오매스 함량 (solid loading)을 20%에서 30%로 증가시켰을 때 lactic acid 생산량이 증가하였다. 그러나 working volume을 증가시킨 경우 20% biomass loading에서도 lactic acid 생산성이 저하되었다. 향후 연구에서는 bioreactor를 이용한 조건에서 팽생이모자반의 당화 조건, 균주 발효 특성, 초기 균주 접종량 등을 고려한 lactic acid 생산 공정의 최적화하고, 미생물 플랫폼 개발을 통해 해조류의 탄수화물에 다량 존재하는 mannitol, alginate와 같은 non-fermentable sugar의 활용을 향상시키고자 한다. 또한 미생물 발효 종료 및 lactic acid 추출이 완료된 후 생성되는 팽생이모자반 여분의 폐기 비용을 최소화하기 위하여, 바이오매스 연소를 통한 biochar 생산, 갈조류의 지방 성분을 이용한 biooil 생산 연구를 통해 팽생이모자반을 100% 활용하기 위한 전략의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgements

이 논문은 2018년 정부재원 (미래창조과학부 여대학(원)생공학연구팀제 사업)으로 한국연구재단과 한국여성과학기술인지원센터의 지원을 받아 연구되었습니다.

#### REFERENCES

- Hwang, E. K., S. J. Lee, D. S. Ha, and C. S. Park (2016) *Sargassum* golden tides in the Shinan-gun and Jeju Island, Korea. *Korean J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 689-693.
- Jeong, D., D. Jeong, S. Jeong, and Y. Kim (2017) Production of bioethanol via *Sargassum horneri* fermentation. *J. Korean Soc. Environ. Eng.* 17: 19-24.
- Kim, M.-J. and S.-K. Kim (2012) Ethanol production by separate hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharina japonica*. *KSBB J.* 27: 86-90.
- Lee, J. W., J. H. In, J.-B. Park, J. Shin, J. H. Park, B. H. Sung, et al. (2017) Co-expression of two heterologous lactate dehydrogenases genes in *Kluyveromyces marxianus* for L-lactic acid production. *J. Biotechnol.* 241: 81-86.
- Upadhyaya, B. P., L. C. DeVeaux, and L. P. Christopher (2014) Metabolic engineering as a tool for enhanced lactic acid production. *Trends Biotechnol.* 32: 637-644.
- Ishida, N., S. Saitoh, K. Tokuhiro, E. Nagamori, T. Matsuyama, K. Kitamoto, et al. (2005) Efficient production of L-lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1964-1970.
- Mussatto, S. I., E. M. Machado, S. Martins, and J. A. Teixeira (2011) Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food. Bioproc. Tech.* 4: 661.
- Ishida, N., T. Suzuki, K. Tokuhiro, E. Nagamori, T. Onishi, S. Saitoh, et al. (2006) D-Lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.* 101: 172-177.
- Lin, H.-T. V., M.-Y. Huang, T.-Y. Kao, W.-J. Lu, H.-J. Lin, and C.-L. Pan (2020) Production of lactic acid from seaweed hydrolysates via lactic acid bacteria fermentation. *Fermentation.* 6: 37.
- Yeon, J.-H., H.-B. Seo, S.-H. Oh, W.-S. Choi, D.-H. Kang, H.-Y. Lee, et al. (2010) Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB J.* 25: 283-288.
- Jang, B.-K., D. Jeong, J. Seol, Y.-K. Lee, and S. R. Kim (2020) Xylose facilitates lactic acid yield of engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *KSBB J.* 35: 129 - 134.
- Jeong, D., N. Min, Y. Kim, S. R. Kim, and O. Kwon (2020) The effects of feed materials on the nutrient composition of *Protactia brevitaris* larvae. *Entomol. Res.* 50: 23-27.
- Yuan, Y. and D. J. Macquarrie (2015) Microwave assisted acid hydrolysis of brown seaweed *Ascophyllum nodosum* for bioethanol production and characterization of alga residue. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3: 1359-1365.
- Kadimpati, K. K., S. Thadikamala, K. Devarapalli, L. Banoth, and K. B. Uppuluri (2021) Characterization and hydrolysis optimization of *Sargassum cinereum* for the fermentative production of 3G bioethanol. *Biomass Conversion and Biorefinery.* 1-11.
- Zhou, L., L. da Costa Sousa, B. E. Dale, J.-X. Feng, and V. Balan (2018) The effect of alkali-soluble lignin on purified core cellulase and hemicellulase activities during hydrolysis of extractive ammonia-pretreated lignocellulosic biomass. *Royal Soc. open sci.* 5: 171529.
- Murakami, K., Y. Yamaguchi, Y. Sugawa-Katayama, and M. Katayama (2016) Effect of water depth on seasonal variation in the chemical composition of *Akamoku*, *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh. *Natural Resources.* 7: 147.
- Enquist-Newman, M., A. M. E. Faust, D. D. Bravo, C. N. S. Santos, R. M. Raisner, A. Hanel, et al. (2014) Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature.* 505: 239-243.