

바이오 기반 경제를 위한 해조류 유래 바이오 연료 생산

Biofuel production from macroalgae toward bio-based economy

임현규¹, 곽동훈², 정규열^{1,2*}

Hyun Gyu Lim¹, Donghun Kwak², Gyoo Yeol Jung^{1,2*}

¹포항공과대학교 대학원 화학공학과, 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 790-784, 대한민국

²포항공과대학교 대학원 시스템생명공학부, 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 790-784, 대한민국

¹Department of Chemical Engineering, POSTECH, Pohang 790-784, Republic of Korea

²School of Interdisciplinary Bioscience and Bioengineering, POSTECH, Pohang 790-784, Republic of Korea

(2014년 7월 2일 접수, 2014년 7월 8일 채택)

Abstract Macroalgae has been strongly touted as an alternative biomass for biofuel production due to its higher photosynthetic efficiency, carbon fixation rate, and growth rate compared to conventional cellulosic plants. However, its unique carbohydrate composition and structure limits the utilization efficiency by conventional microorganisms, resulting in reduced growth rates and lower productivity. Nevertheless, recent studies have shown that it is possible to enable microorganisms to utilize various sugars from seaweeds and to produce some energy chemicals such as methane, ethanol, etc. This paper introduces the basic information on macroalgae and the overall conversion process from harvest to production of biofuels. Especially, we will review the successful efforts on microbial engineering through metabolic engineering and synthetic biology to utilize carbon sources from red and brown seaweed.

Keywords : Macroalgae, Seaweed, Biofuel, Metabolic engineering, Synthetic biology

서 론

석유 고갈과 온실 가스 발생 등 각종 환경문제의 대두로 인하여 그 동안 석유로부터 생산되고 있던 연료 및 많은 화합물들을 미생물을 이용하여 바이오매스로부터 효과적으로 전환하고자 하는 노력이 지속되고 있다 [1-4]. 기존의 석유산업을 궁극적으로 대체하기 위해선 이러한 바이오 공정의 경제성과 바이오매스의 확보의 안정성이 필수적이다. 현재 바이오 공정의 탄소원은 현재 대부분 녹말작물로부터 얻어지고 있지만 토지사용의 한계 및 비료 사용, 식량

자원 사용이라는 도덕적 이유 등의 문제점으로 인하여 석유를 대체하기 위한 탄소원으로는 한계가 있다 [5-7]. 녹말자원 이외에 현재 많은 연구가 벼짚, 식물 줄기, 폐목재 등 식량자원으로 쓰이지 않는 육상식물(lignocellulose)을 활용하는 방안이 집중되어 있다 [8, 9]. 육상식물 자원을 사용할 경우 셀룰로오스(cellulose) 및 헤미셀룰로오스(hemicellulose)를 분해하여 탄소원을 얻을 수 있어, 미생물 발효에 사용할 수 있다. 하지만, 육상식물은 리그닌(lignin) 성분으로 인해 구조가 단단하며, 전처리 과정에서 발생하는 발효저해물질 등을 제거하기 위한 추가공정의 필

* Corresponding author

Phone: +82-54-279-2391 Fax: +82-54-279-5528

E-mail: gyjung@postech.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

요 등, 전처리 및 당화공정에 비용이 높아 경제성 확보가 어렵다는 단점이 있다 [10-13].

최근, 육상식물과 달리 바다의 식물인 해조류가 차세대 탄소원으로 주목을 받고 있다 [5, 14, 15]. 해조류는 주로 우리나라를 포함하여 일본 등 일부 아시아 국가에서만 식용으로만 소비될 뿐, 전 세계적으로는 ‘바다의 잡초’로 인식하고 있다 [16]. 해조류도 마찬가지로 광합성을 하는 생물체이기 때문에, 육상식물이 가지고 있는 장점은 모두 가지고 있다. 추가적으로, 해조류를 탄소원으로 이용할 경우 장점들이 더 있는데, 먼저, 광합성 효율이 육상식물보다 높기 때문에 성장속도가 빠르고, 이산화탄소 고정 효과도 기존보다 1.5배에서 2배 정도 높다고 알려져 있다 [17, 18]. 또한, 구조적 강성유지를 위한 리그닌이 없어 간단한 당화공정만으로도 발효당을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 무엇보다도, 해조류의 경우 광합성을 위한 태양빛과 바닷물만 있으면 자랄 수 있기 때문에 바이오매스 재배를 위한 토지 사용 및 비료 공급 등 추가로 발생하는 비용이 적다 [19-21]. 이와 같은 이유로 해조류는 화석연료를 대체하기 위한 미래 탄소원으로서 매우 적합하다고 생각된다.

해조류는 광합성을 하는 해양 진핵생물로 대표되는데, 미세조류와 달리 여러 세포로 구성되며 육상식물과 흡사한 성질을 가지고 있다 [19]. 해조류는 광합성이 일어나는 색소의 종류에 따라 크게 홍조류(Rhodophyta), 갈조류(Phaeophyta), 녹조류(Chlorophyta)로 나뉘며, 각 종류별로 포함하고 있는 탄수화물의 성분이 제각각 다르다 [19]. 일반적인 육상식물의 경우, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 구성되는 반면 해조류는 특이적인 다당류를 함유하고 있는데, 홍조류는 주로 카라기난(Carrageenan), 한천(Agar), 셀룰로오스로 구성되어 있으며, 갈조류는 라미나린(Laminarin), 알긴산(Alginic acid), 만니톨(Mannitol), 그리고 녹조류는 일부 녹말과 셀룰로오스를 함유하고 있다 [19].

해조류는 여러 가지 복합 당 성분으로 구성되어 있기 때문에, 효과적인 전처리 공정 및 당화과정을 통해 탄소원을 확보하고, 해당 탄소원을 바이오 화합물로 전환할 수 있는 미생물을 개발하는 것이 필요하다 (Figure 1). 특히, 높은 생산성을 유지하기 위하여 여러 탄소원이 함께 존재할 때 나타나는 CCR(carbon catabolite repression) 현상을 극복하여, 여러 탄소원을 동시대사 하는 것이 중요하다 [22,

23]. 또한, 바이오매스의 종류와 수확 시기에 따른 조성 변화, 발효조건, 생산하고자 하는 화합물의 종류 등에 따라서 미생물의 성장 속도 및 환원력(reducing equivalent)의 요구량이 각각 다르게 되는데 각각의 경우에 대사 및 생합성 회로의 최적화하여 높은 생산량을 보이는 것이 필수적이다 [24-27]. 본 총설에서는 해조류 중 널리 연구된 홍조류와 갈조류를 중심으로, 미생물을 통해 바이오 연료로 전환하고자 한 최근 연구를 소개하고, 앞으로의 연구 방향에 대하여 논의하고자 한다.

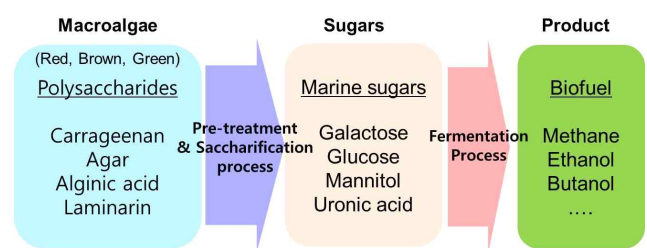


Figure 1. Overall process for bioconversion of macroalgae to products (especially, biofuel). Polysaccharides in red, brown, green seaweed are hydrolyzed during pre-treatment and saccharification process. The sugars are then metabolized and converted into biofuels by microorganisms(e.g., *E. coli* and *S. cerevisiae*).

해조류의 생산

FAO(Food and Agriculture Organization, UN) 조사에 따르면 전세계적으로 해조류는 식용 및 공업용 목적으로 약 1500만톤이 생산(90%이상이 양식에 의한 생산)되고 있으며, 생산량은 해마다 늘어나고 있다. 현재 생산되고 있는 해조류의 대부분은 식량자원 및 식품 첨가물의 목적이며, 한국을 포함한 아시아 국가, 프랑스, 영국 및 칠레에서 생산 및 재배되고 있다 [19, 28]. 구체적인 종류로는 갈조류인 다시마(*Laminaria japonica*), 미역(*Undaria pinnatifida*)이 가장 많고, 김(*Porphyra tenera*) 및 우뚝가사리(*Gelidium amansii*), 꼬시래기(*Gracilaria verrucosa*) 등의 홍조류, 그리고 파래(*Enteromorpha prolifera*)와 같은 녹조류 순으로 생산되고 있다 [17, 19]. 현재까지는 소비가 한정되어 있기 때문에 생산량이 적은 편이지만, 양식기술 개발로 대량 재배가 가능해진다 면 충분한 생산량을 확보할 수 있을 것으로 생각된다 [19]. 더욱이, 우리나라의 경우 양식기술은 세계

최고수준으로 확보하고 있으며, 지리적으로도 삼면이 바다로 둘러싸여 있으며 난류와 한류가 교차하는 지점에 있기 때문에 해류 자원이 풍부하여 해조류 양식에 적합하다 [17].

전처리 공정을 통한 당화과정

생산된 해조류를 통해 미생물의 발효공정을 위해 선 옥수수나 사탕수수를 활용하는 것과 비슷한 과정으로, 주로 산 및 효소를 이용한 가수분해반응을 통해 당화과정을 거친다. 먼저, 해조류에 포함된 모래, 돌, 염분을 제거하는 작업을 거친 후, 건조시켜 분쇄한다 [29]. 이 때, 건조과정은 보관을 용이하게 하여 장기간 보관할 수 있게 만들며, 분쇄과정을 통해 부피당 표면적을 넓혀 당화 공정에서의 효율을 높인다.

해조류의 전처리가 끝나면, 미생물을 통해 발효가 가능한 탄소원을 확보하기 위하여 당화과정을 거친다. 당화과정은 주로 해조류 중에서 탄수화물의 비율이 높은 홍조류에 대하여 많은 연구가 진행되었는데, 주로 묽은 산(dilute acid)이나 효소를 이용하여 가수분해를 일으킨다 [30]. 묽은 산을 이용한 당화공정에서 가장 큰 변수로 작용하는 것은 산의 농도와 반응 온도인데, 농도와 온도를 증가시킬수록 글루코스나 갈락토스 등의 탄소원이 많이 생성되게 되지만, 반응이 더욱 진행되어 탄소원의 분해가 일어나 HMF(hydroxymethylfurfural), 레블린산(levulinic acid), 포름산(formic acid) 등이 생성된다 [31]. 따라서, 해당 반응 조건을 당화효율은 높으면서 부산물의 발생은 적도록 최적화하는 것이 필요하다. 최근, 산 촉매로 가장 널리 쓰이는 황산, 염산, 인산, 질산을 사용하여 홍조류 중에서 가장 대표적인 우뚝가사리를 분해하는 공정을 최적화한 연구가 진행되었다 [32]. 각기 다른 산을 이용하여 농도 및 온도를 변화시켜가며 최적화 시킨 결과, 황산을 사용하여 160.7 °C도, 2 % (w/v), 40분의 반응 시 발효당의 수율이 가장 높았고, 비교적 낮은 부산물을 얻을 수 있었다 [31]. 추가적으로, 연속 반응공정을 개발하여 기존의 회분식 반응기를 사용하였을 때 부산물의 생성량을 30 % 내로 줄인 결과도 보고되었다 [32].

한편, 갈조류의 경우 만니톨은 수용성 성분이기 때문에 분쇄 후 물에 녹이면 자연스럽게 용출되어, 추가적인 당화공정이 필요 없다. 하지만, 주요 구성

성분인 알긴산의 경우 일반적인 미생물은 대사가 불가능할 뿐 더러, 현재 초보적인 수준이라 정립된 당화공정이 존재하지 않는다. 다만, 알긴산을 유일 탄소원으로 대사할 수 있는 여러 해양 미생물들이 보고되었는데, 해당 미생물들이 가지고 있는 알긴산 분해효소(Alginate lyase)를 이용하여 추후 당화공정을 개발할 수 있을 것으로 보인다 [33-36].

홍조류를 통한 바이오 연료 생산

홍조류는 주로 한천, 셀룰로오스 등으로 구성되어 있는데, 산 분해 및 효소당화 과정을 거쳐 갈락토스(Galactose)와 포도당(Glucose)를 탄소원으로 얻을 수 있다 (Figure 2).

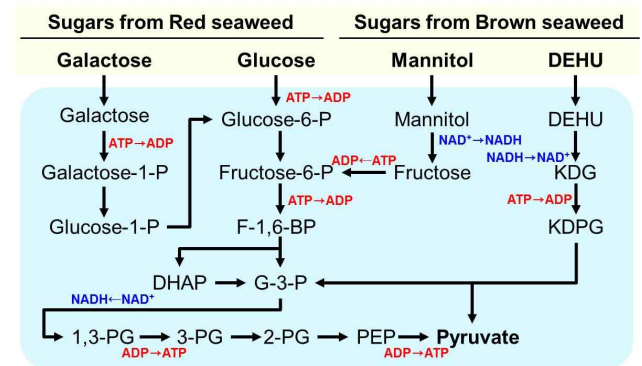


Figure 2. Metabolic pathway of various sugars from macroalgae. Galactose can be converted into Glucose-6-phosphate by several enzymatic reactions (Leloir pathway). UDP-Glucose and UDP-Galactose are also related in galactose metabolism, however, both were not shown in this figure. Mannitol is converted into Fructose-6-phosphate, but not in *S.cerevisiae*. DEHU generates Glycerol-3-phosphate and pyruvate. Symbol: G-3-P, Glycerol-3-phosphate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; 1,3-PG, 1,3-bisphosphoglycerate; 3-PG, 3-phosphoglycerate; 2-PG, 2-phosphoglycerate; PEP, Phosphoenolpyruvate; DEHU, 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose urinate; KDG, 2-keto-3-deoxygluconate; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate

이 때 얻어지는 갈락토스는 포도당의 이성질체로, 대부분의 미생물들은 대사가 가능하지만, “Leloir 회로”를 통하여 포도당-6-인산으로 전환되어 해당과정(glycolysis)에 참여하기 때문에 포도당에 비하여 미생물의 성장속도가 떨어지게 된다 [25, 37]. 실제로, 대장균의 경우 M9 최소 배지(minimal medium)에서 포도당 대비 약 39% 느린 성장속도를 보인다 [25].

홍조류의 탄소원을 이용하기 위하여 산 분해 및 효소 분해 과정을 거쳐 생성된 탄소원을 혐기 발효를 통하여 메탄이나 아세트산과 같은 기본적인 화합물을 생산하고자 하는 시도가 보고되었다 [38-40]. 일례로, 우뭇가사리를 산 분해 한 뒤, 용매생성(solventogenic) 미생물인 *Clostridium tetanomorphum* ATCC49273, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824, *Clostridium aurantibutyricum* NCIMB10659, and *Clostridium beijerinckii* NCIMB8052을 이용하여 발효를 시켰고, 각 미생물의 갈락토스 대사량 및 아세트산(acetate), 부틸산(butyrate), 에탄올(ethanol), 아세트산(acetone) 등의 화합물이 생산성을 확인하였다. 그 결과, *C. acetobutylicum* ATCC824 균주가 갈락토스 대사능도 가장 높았으며, 부틸산, 부탄올 등의 생산량이 가장 많았다 [41].

기존의 용매생성 미생물을 활용하는 것을 넘어, 역대사공학기술(inverse metabolic engineering)을 통해 갈락토스를 빠른 속도로 대사하기 위한 연구도 발표되었다. 먼저, *Saccharomyces cerevisiae*의 염색체를 2-5kb의 절편으로 만들어 플라스미드에 클로닝한 후, 갈락토스 배지에서 계대배양을 진행하여 성장속도가 빠르게 나타나는 균주를 확보하였다. 이후 해당 균주에 포함된 플라스미드를 확인하여 갈락토스 대사에 효과적인 유전자를 확인하였다. 확보된 유전자는 SEC53(phosphomannomutase), SNR84(small nuclear RNA), 말단부분이 소실된 TUP1(일반적인 조절단백질)이었으며, 해당 유전자를 과 발현 시켰을 경우 갈락토스 대사능 및 에탄올의 생산량이 약 2.5배 증가한 결과를 나타내었다 [42].

또한, 기존의 유전자 발현조절 네트워크를 재설계함으로써 갈락토스의 대사율이 높아진 결과가 보고되었다. *S. cerevisiae*의 갈락토스 대사회로를 조절하는 음성조절 단백질인 GAL6, GAL80, MIG1을 유전자체에서 삭제한 결과 약 41%의 탄소 대사능이 증가하였으며(4.25 mmol gal/g CDW/h), 에탄올 최대 생산성 또한 6.48 mmol EtOH/g CDW/h 로 239 % 증가된 결과를 나타내었다. [43]

하지만, 갈락토스 대사량을 증가시키는 것만으로는 충분하지 않은데, 홍조류의 당화과정 후에는 갈락토스뿐만 아니라 포도당도 함께 존재하기 때문이다 [44]. 포도당은 미생물이 선호하는 탄소원으로서, 다른 탄소원과 함께 있을 경우 먼저 선택적으로 대

사가 이루어진다 [22]. 이러한 조절 기작을 통해 미생물은 탄소원을 선택적으로 소비할 수 있게 되지만, 바이오 공정에서는 대사되는 탄소원이 변하는 과정에서 지연기(lag phase)가 생기게 되고 결과적으로 생산성이 떨어지는 단점이 있다 [45, 46].

앞서 언급한 탄소 대사 기작을 극복하기 위해서, 포도당이 분해되기 전인 이합체 형태의 셀로바이오스(cellobiose)를 이용하여 동시대사가 가능하도록 한 연구가 소개되었다. 대장균의 경우, 진화적으로 발현이 되지 않는 오페론(cryptic operon)을 가지고 있는데, 이들 중 *asc* 오페론과 *chb* 오페론을 강한 발현량을 가지는 항시성 프로모터(constitutive promoter)를 사용하여 전사과정이 일어날 수 있게 하였다. 그 결과, 야생형 균주의 경우 셀로바이오스의 대사가 불가능하지만, 강한 발현을 가지도록 조작한 후에는 셀로바이오스의 대사가 가능하였다 [47]. *S. cerevisiae*의 경우에는 *Neurospora crassa* 미생물로부터 셀로덱스트린(cellodextrin) 수송단백질과 세포질 내에서 글루코시데이스(glucosidase)를 발현하여 셀로바이오스를 대사하도록 할 수 있었다 [46]. 이 두 가지 연구는 모두 세포질 내에 존재하는 글루코스는 CCR 기작에 영향을 거의 미치지 않는다는 점을 이용한 것이며 [46], 결과적으로 비선택당과 포도당의 동시대사가 가능하였다. *S. cerevisiae*의 경우, 해당 대사회로를 에탄올 생산에 적용시켰을 때 세포 성장은 64% 증가하였으며, 에탄올의 생산성 및 생산량은 29% 증가하는 결과를 확인하였다 [46].

최근, 대장균의 유전자 발현을 정량적으로 조절하고, 탄소원 대사회로의 재설계를 통하여 갈락토스와 포도당을 동시대사를 가능케 한 연구가 보고되었다. 갈락토스 대사 경로가 포도당에 비해 복잡하고, 효율성도 떨어지지만 해당 연구팀은 *galR* 유전자의 삭제 및 대사회로 상의 유전자(*galP*, *pgm*, *galE*, *galT*, *galK*, *galM*)의 지속발현 프로모터로의 교체 및 mRNA의 5'UTR(5'-untranslated region)을 최적화해 주었다 [48]. 그 결과, 갈락토스를 유일 탄소원으로 하는 배지에서 대장균의 갈락토스의 대사능은 약 53% 증가되었고, 성장속도 또한 약 45% 증가됨을 확인할 수 있었다 [25]. 또한, 합성 서열 도입으로 인해 해당 효소들이 CCR과 같은 발현 조절 기작을 따르지 않고 새롭게 디자인됨에 따라, 포도당과 갈락토스가 동시대사가 가능함을 보여주었다 [25].

갈락토스를 이용하여 에탄올 이외에도 산업적으로 널리 사용은 되지만, 독성으로 인해 고농도의 생산이 어려웠던 (2R, 3R)-부탄디올(butanediol)을 생산하고자 하는 연구가 진행되었다 [49]. 피루브산탈카르복시효소(pyruvate decarboxylase)의 비활성화, MTH1(포도당 감지와 관련된 전사인자)의 과발현 및 진화과정(adaptive evolution)의 결과 포도당과 갈락토스를 동시에 대사가 가능하면서도, 부탄디올을 생산하였다 [49]. 연구에서 사용된 균주는 이론적 수율의 약 70%정도를 달성하였으며, 유가배양(fed batch) 결과 300시간에 걸쳐 100g/L 까지 생산할 수 있었다 [49].

끝으로, 홍조류의 한천(agar)이 분해되면 갈락토스 이외에도 3,6-무수갈락토스(3,6 anhydrous galactose)가 생산되는데 [50], 갈락토스와 달리 앞서 언급된 미생물은 이 물질을 대사하지 못한다. 현재로서 3,6-무수갈락토스 자체의 상품성 및 경제성이 있지만 [51], 추후 바이오 연료 생산을 위하여 대량 생산될 때에는 모든 탄소원들이 효과적으로 원하는 바이오 화합물로 전환될 수 있어야 한다. 따라서 3,6-무수갈락토스 또한 효과적으로 대사할 수 있는 균주의 개발이 필요할 것으로 보인다.

갈조류를 통한 바이오 연료 생산

갈조류의 주성분은 라미나린, 알긴산과 만니톨이 있으며 [19], 라미나린의 경우 다당류로서 분해되면 일부 포도당을 얻을 수 있다. 알긴산의 경우 만뉴론산(Mannuronic acid)과 글루론산(guluronic acid)의 β -1,4 결합된 고분자 형태를 가지는 물질로 종류에 따라 만뉴론산만으로 구성되어 있는 부분과 글루론산만으로 구성되어진 부분, 그리고 두 가지가 혼합되어 있는 부분이 있다 [34]. 알긴산은 주로 안정화제(stabilizer)나 증점제(viscosifier), 식품 첨가물(food additives)로 사용되어 왔는데 [34], 알긴산은 사람 등 포유류 뿐만 아니라, 일반적인 미생물들도 대사하지 못한다. 다만, 알긴산이 포함되어있는 다시마를 먹이로 사는 전복 속 내장에 존재하는 *Sphingomonas* sp. A1 등 일부 미생물이 알긴산을 분해한다고 알려져 있다 [36, 52].

갈조류를 통해 바이오 연료를 생산하기 위해 먼저 당화공정을 진행한 뒤, 산업용으로 많이 쓰이는 균

주를 활용하여 에탄올을 생산하고자 하는 연구가 진행되었다 [44, 53-55]. 염산과 황산 분해 및 셀룰레이스(cellulose) 및 클루카네이스(glucanase) 등 효소분해를 거쳐 *Zymomonas mobilis*로부터 에탄올 생산 효소들이 도입된 *E. coli* KO11 균주를 이용하여 에탄올 생산성을 평가하였다. 그 결과 약 0.4 g ethanol/g sugar의 생산량을 보였으나, 갈조류 구성 성분 중 만니톨과 글루코스만 대사하고 알긴산은 전혀 대사하지 못했기 때문에 추가 개량의 필요성을 보였다 [44].

산업용으로 쓰이는 균주를 직접적으로 사용한 경우 외에도, 실제로 알긴산을 분해하여 탄소원으로 사용할 수 있는 *Sphingomonas* sp. A1을 이용한 에탄올 생산도 보고되었다 [56]. *Sphingomonas*는 알긴산 대사가능 미생물 중에서도 특별한 편에 속하는데, 알긴산 고분자를 세포 내로 들여올 수 있는 슈퍼채널을 보유하고 있다 [57]. 즉, 거대한 분자를 세포 내로 끌어들여 세포질에 있는 알긴산 분해효소로 당화시켜 대사를 하게 된다. 해당 연구팀은 이 미생물에 *Z. mobilis* 유래의 에탄올 생합성 유전자(*pdc*, *adhB*)를 추가적으로 도입하였고, 여러 경쟁 회로의 효소들을 유전체 상에서 삭제한 결과 3일에 걸쳐 13.0g/L의 에탄올을 생산하였다 [56].

최근, 대장균과 같은 산업용 미생물을 개량하여 알긴산을 대사할 수 있도록 연구된 결과가 보고되었다. BAL(Bio Architecture Lab) 그룹에서는, 가장 대표적인 미생물인 *E. coli*를 이용하여 알긴산 대사회로를 구축하여 도입하는데 성공 했다 [52, 58]. 알긴산을 올리고머(oligomer)로 분해할 수 있는 Aly 효소를 *Pseudoalteromonas* sp. SM0524 균주에서 도입하였고, 이를 세포 밖으로 분비시키기 위하여 세포표면발현(cell surface display) 방법으로 알려진 *E. coli* 자체의 Ag43과 융합 단백질을 만들었다. 추가로 절단 서열을 더하여 세포 표면에서 배지로 분비 되도록 하였다. 분비된 효소로 생성된 알긴산 올리고머는 *Vibrio splendidus* 12B01의 유전체를 포스미드 라이브러리(fosmid library)로 제작하여 확보된 수송단백질을 통해 세포 내로 도입되었고, 이후 추가적인 효소들에 의하여 단량체(4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose urinate, DEHU)로 분해되어 대사되었다 (Figure 2). 최종적으로 에탄올 생산 회로를 도입한 결과 갈조류의 일종인 *Saccharina japonica*로부터 알긴산과 만니톨을 대사하여 약 4.7 % v/v의 에탄올 생산량을 보였다 [52].

또한, 더욱 최근 연구결과는 *S. cerevisiae*를 개량하여 알긴산을 대사할 수 있는 연구가 진행되었다 [58]. 기존의 연구에서는 알긴산을 올리고머 형태로 세포 내로 수송하여 대사하였지만, *Asteromyces cricatus* 미생물로부터 DEHU를 세포 내로 수송할 수 있는 단백질(DHT1)을 동정 및 발현시켰다. 또한, DEHU가 세포 내로 들어온 이후에 해당과정에 참여하게 되는 효소들이 명확하지 않았으나, *V. splendidus* 유래의 DehR 효소를 도입함으로써 대사회로를 구축할 수 있었다. 추가적으로, *S. cerevisiae*의 경우 만니톨의 대사 경로가 *E.coli*의 셀로바이오스의 경우처럼 발현 되지 않는 유전자(cryptic gene)로 되어 있어 대사가 불가능하지만 [59], M2DH(mannitol-2-dehydrogenase) 효소와 수송단백질을 발현시켜 만니톨을 대사할 수 있도록 하였다. 최종적으로, 효소 당화공정을 통해 DEHU로 분해된 배지에서 *S. cerevisiae*를 배양하여 에탄올을 생산하였다. 그 결과 약 4.6 % v/v의 에탄올 생산과 이론적 수율의 83%을 얻을 수 있었다 [58].

Table 1. Total amounts of generated ATP and NADH from each sugars during glycolysis.

	Product	ATP	NADH
Galactose	2 PYR	2	2
Glucose	2 PYR	2	2
Mannitol	F-6-P	2	3
DEHU	G-3-P + PYR	1	0

갈조류의 대사과정에서 추가적으로 언급해야 할 점은, 알긴산의 단량체인 DEHU를 대사하게 되면 해당과정에서의 환원력(reducing equivalent)의 생성량이 포도당(1분자당 2개의 NADH생산)에 비하여 부족한 상태(DEHU의 경우 NADH 생성량 없음)인데, 이에 비하여 만니톨은 대사과정에서 포도당과 비교하여 추가적인 환원력(1분자당 3개의 NADH)을 생성한다 (Table 1). 환원력의 균형은 세포 성장과 원하는 화합물(특히, 바이오 연료)의 생산에 직접적으로 영향을 미치기 때문에 매우 중요하다 [60]. 따라서 두 가지 탄소원을 동시에 대사하게 될 때 상보적으

로 작용하여 효과적으로 환원력의 균형을 달성하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다 [52, 58].

결론

본 총설에서는, 미래의 탄소원으로 주목 받는 해조류를 미생물 공정을 통하여 바이오 연료로 전환하고자 한 최근 연구에 대하여 소개하였다. 대사공학 및 합성생물학을 통하여 해조류에 포함된 탄소원을 대사하기 위한 노력들이 성공적이었으며, 앞으로의 발전 가능성이 높을 것으로 생각된다. 현재까지는 주로 탄소원을 대사하기 위한 대사회로 개발에 집중되어 있기 때문에, 바이오 연료로서는 에탄올에 한정되어 있는 편이다. 하지만, 개발된 플랫폼 미생물에 바이오 연료를 포함한 각종 화합물 생합성 회로를 도입한다면 휘발유와 성질이 비슷한 차세대연료(advanced fuel), 석유 유래 화합물, 바이오 플라스틱 등의 생산도 가능할 것이라 예상된다. 한편, 궁극적으로 화석연료를 대체하여 해조류를 통하여 바이오 연료 및 화합물을 생산하고자 할 때, 해조류 바이오매스의 확보에 관한 기술개발 또한 선행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 해양바이오산업신소재연구단의 지원으로 수행되었다.

References

1. Zhang, F, Rodriguez, S, Keasling, JD. 2011. Metabolic engineering of microbial pathways for advanced biofuels production. *Metab. Eng.*, **22**, 775-783.
2. Choi, YJ, Lee, SY. 2013. Microbial production of short-chain alkanes. *Nature*, **502**, 571-574.
3. Rathnasingh, C, Raj, SM, Jo, J-E, Park, S. 2009. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. *Biotechnol. Bioeng.*, **104**, 729-739.
4. Du, J, Shao, Z, Zhao, H. 2011. Engineering microbial factories for synthesis of value-added products. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **38**, 873-890.

5. Wei, N, Quarterman, J, Jin, Y-S. 2013. Marine macroalgae: an untapped resource for producing fuels and chemicals. *Trends Biotechnol.*, **31**, 70-77.
6. Tenenbaum, DJ. 2008. Food vs. Fuel: Diversion of Crops Could Cause More Hunger. *Environ. Health Perspect.*, **116**, A254-A257.
7. G. Cassman, K, Liska, AJ. 2007. Food and fuel for all: realistic or foolish? *Biofuel. Bioprod. Bior.*, **1**, 18-23.
8. Kondo, A, Ishii, J, Hara, KY, Hasunuma, T, Matsuda, F. 2013. Development of microbial cell factories for bio-refinery through synthetic bioengineering. *J. Biotechnol.*, **163**, 204-216.
9. Olson, DG, McBride, JE, Joe Shaw, A, Lynd, LR. 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **23**, 396-405.
10. Singhvi, MS, Chaudhari, S, Gokhale, DV. 2014. Lignocellulose processing: a current challenge. *RSC Advances*, **4**, 8271-8277.
11. Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Bio Technol. Biofuels*, **6**, 13.
12. Frei, M. 2013. Lignin: Characterization of a Multifaceted Crop Component. *Sci. World. J.*, **2013**, 25.
13. Himmel, ME, Ding, S-Y, Johnson, DK, Adney, WS, Nimlos, MR, Brady, JW, Foust, TD. 2007. Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production. *Science*, **315**, 804-807.
14. Mata, TM, Martins, AA, Caetano, NS. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **14**, 217-232.
15. John, RP, Anisha, GS, Nampoothiri, KM, Pandey, A. 2011. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. *Bioresour. Technol.*, **102**, 186-193.
16. FAO. Yearbook of Fishery statistics - aquaculture production, 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
17. Ryu, JG, Cho, JH, Kim, DY. 2009. Strategies to Industrialize the Algae Bio-business and Policy Direction. Korea Maritime Institute, Korea
18. Gao, K, McKinley, K. 1994. Use of macroalgae for marine biomass production and CO2 remediation: a review. *J. Appl. Phycol.*, **6**, 45-60.
19. Roesijadi G, SBJ, LJ Snowden-Swan, Y Zhu. 2010. Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis. *Pacific Northwest National Laboratory, PNNL-19944*.
20. Hughes, AD, Kelly, MS, Black, KD, Stanley, MS. 2012. Biogas from Macroalgae: is it time to revisit the idea? *Biotechnol. Biofuels*, **5**, 86.
21. Daroch, M, Geng, S, Wang, G. 2013. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Appl. Energy*, **102**, 1371-1381.
22. Gorke, B, Stulke, J. 2008. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat. Rev. Micro.*, **6**, 613-624.
23. Vinuselvi, P, Kim, MK, Lee, SK, Ghim, CM. 2012. Rewiring carbon catabolite repression for microbial cell factory. *BMB Rep.*, **45**, 59-70.
24. Lim, JH, Seo, SW, Kim, SY, Jung, GY. 2013. Model-driven rebalancing of the intracellular redox state for optimization of a heterologous n-butanol pathway in *Escherichia coli*. *Metab. Eng.*, **20**, 56-62.
25. Lim, HG, Seo, SW, Jung, GY. 2013. Engineered *Escherichia coli* for simultaneous utilization of galactose and glucose. *Bioresour. Technol.*, **135**, 564-567.
26. Adams, JMM, Toop, TA, Donnison, IS, Gallagher, JA. 2011. Seasonal variation in *Laminaria digitata* and its impact on biochemical conversion routes to biofuels. *Bioresour. Technol.*, **102**, 9976-9984.
27. S. Kaehler, RK. 1996. Summer and winter comparisons in the nutritional value of marine macroalgae from Hong Kong. *Bot. Mar.*, **39**, 11-17.
28. Lindsey Zemke-White, W, Ohno, M. 1999. World seaweed utilisation: An end-of-century summary. *J. Appl. Phycol.*, **11**, 369-376.
29. Tom Bruton, HL, Yannick Lerat, Michele Stanley, Michael Bo Rasmussen. 2009. A Review of the Potential of Marine Algae as a Source of Biofuel in Ireland. Sustainable Energy Ireland, Ireland

30. Talebnia, F, Karakashev, D, Angelidaki, I. 2010. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, **101**, 4744-4753.
31. Jeong, TS, Choi, CH, Lee, JY, Oh, KK. 2012. Behaviors of glucose decomposition during acid-catalyzed hydrothermal hydrolysis of pretreated *Gelidium amansii*. *Bioresour. Technol.*, **116**, 435-440.
32. Park, J-H, Hong, J-Y, Jang, HC, Oh, SG, Kim, S-H, Yoon, J-J, Kim, YJ. 2012. Use of *Gelidium amansii* as a promising resource for bioethanol: A practical approach for continuous dilute-acid hydrolysis and fermentation. *Bioresour. Technol.*, **108**, 83-88.
33. Park, H, Kam, N, Lee, E, Kim, H. 2012. Cloning and Characterization of a Novel Oligoalginate Lyase from a Newly Isolated Bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. *Mar. Biotechnol.*, **14**, 189-202.
34. Wong, TY, Preston, LA, Schiller, NL. 2000. ALGINATE LYASE: Review of Major Sources and Enzyme Characteristics, Structure-Function Analysis, Biological Roles, and Applications. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 289-340.
35. Jang, J-S, Cho, Y, Jeong, G-T, Kim, S-K. 2012. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioprocess Biosyst Eng*, **35**, 11-18.
36. Martin, M, Portetelle, D, Michel, G, Vandenberg, M. 2014. Microorganisms living on macroalgae: diversity, interactions, and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 2917-2935.
37. Holden, HM, Rayment, I, Thoden, JB. 2003. Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *J. Biol. Chem.*, **278**, 43885-43888.
38. Vivekanand, V, Eijssink, VH, Horn, S. 2012. Biogas production from the brown seaweed *Saccharina latissima*: the optimal pretreatment and codigestion with wheat straw. *J. Appl. Phycol.*, **24**, 1295-1301.
39. Park, J-H, Yoon, J-J, Park, H-D, Lim, DJ, Kim, S-H. 2012. Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue. *Bioresour. Technol.*, **113**, 78-82.
40. Meinita, M, Kang, J-Y, Jeong, G-T, Koo, H, Park, S, Hong, Y-K. 2012. Bioethanol production from the acid hydrolysate of the carrageenophyte *Kappaphycus alvarezii* (cottonii). *J. Appl. Phycol.*, **24**, 857-862.
41. Kim, Y, Kim, D, Kim, T, Shin, MK, Kim, YJ, Yoon, JJ, Chang, IS. 2013. Use of red algae, Ceylon moss (*Gelidium amansii*), hydrolyzate for clostridial fermentation. *Biomass Bioenerg*, **56**, 38-42.
42. Lee, KS, Hong, ME, Jung, SC, Ha, SJ, Yu, BJ, Koo, HM, Park, SM, Seo, JH, Kweon, DH, Park, JC, Jin, YS. 2011. Improved Galactose Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* Through Inverse Metabolic Engineering. *Biotechnol. Bioeng.*, **108**, 621-631.
43. Ostergaard, S, Olsson, L, Johnston, M, Nielsen, J. 2000. Increasing galactose consumption by *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering of the GAL gene regulatory network. *Nat. Biotech.*, **18**, 1283-1286.
44. Kim, N-J, Li, H, Jung, K, Chang, HN, Lee, PC. 2011. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour. Technol.*, **102**, 7466-7469.
45. Kim, SR, Ha, S-J, Wei, N, Oh, EJ, Jin, Y-S. 2012. Simultaneous co-fermentation of mixed sugars: a promising strategy for producing cellulosic ethanol. *Trends Biotechnol.*, **30**, 274-282.
46. Ha, S-J, Wei, Q, Kim, SR, Galazka, JM, Cate, J, Jin, Y-S. 2011. Cofermentation of Cellobiose and Galactose by an Engineered *Saccharomyces cerevisiae* Strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 5822-5825.
47. Vinuselvi, P, Lee, SK. 2012. Engineered *Escherichia coli* capable of co-utilization of cellobiose and xylose. *Enzyme Microb. Technol.*, **50**, 1-4.
48. Seo, SW, Yang, J-S, Kim, I, Yang, J, Min, BE, Kim, S, Jung, GY. 2013. Predictive design of mRNA translation initiation region to control prokaryotic translation efficiency. *Metab. Eng.*, **15**, 67-74.
49. Lian, J, Chao, R, Zhao, H. 2014. Metabolic engineering of a *Saccharomyces cerevisiae* strain capable of simultaneously utilizing glucose and galactose to produce enantiopure (2R,3R)-butanediol. *Metab. Eng.*, **23**, 92-99.
50. Yun, EJ, Shin, MH, Yoon, J-J, Kim, YJ, Choi, I-G, Kim, KH. 2011. Production of 3,6-anhydro-l-galactose from agarose by agarolytic enzymes of *Saccharophagus degradans* 2-40. *Process Biochem.*, **46**, 88-93.
51. Yun, E, Lee, S, Kim, J, Kim, B, Kim, H, Lee, S, Pelton, J, Kang, N, Choi, I-G, Kim, K. 2013. Enzymatic production of 3,6-anhydro-l-galactose from agarose and its purification and in vitro skin whitening and anti-inflammatory activities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 2961-2970.

52. Wargacki, AJ, Leonard, E, Win, MN, Regitsky, DD, Santos, CNS, Kim, PB, Cooper, SR, Raisner, RM, Herman, A, Sivitz, AB, et al. 2012. An Engineered Microbial Platform for Direct Biofuel Production from Brown Macroalgae. *Science*, **335**, 308-313.
53. Adams, J, Gallagher, J, Donnison, I. 2009. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pre-treatments. *J. Appl. Phycol.*, **21**, 569-574.
54. Horn, SJ, Aasen, IM, Østgaard, K. 2000. Ethanol production from seaweed extract. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, **25**, 249-254.
55. Lee, S-M, Lee, J-H. 2012. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**, 16-18.
56. Takeda, H, Yoneyama, F, Kawai, S, Hashimoto, W, Murata, K. 2011. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ. Sci.*, **4**, 2575-2581.
57. Hashimoto, W, Yamasaki, M, Itoh, T, Momma, K, Mikami, B, Murata, K. 2004. Super-channel in bacteria: Structural and functional aspects of a novel biosystem for the import and depolymerization of macromolecules. *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 399-413.
58. Enquist-Newman, M, Faust, AME, Bravo, DD, Santos, CNS, Raisner, RM, Hanel, A, Sarvabhowman, P, Le, C, Regitsky, DD, Cooper, SR, et al. 2014. Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, **505**, 239-243.
59. Quain, DE, Boulton, CA. 1987. Growth and Metabolism of Mannitol by Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbio.*, **133**, 1675-1684.
60. Berrios-Rivera, SJ, Bennett, G. N., San, K. 2002. Metabolic Engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH Availability by Overexpressing an NAD⁺-Dependent Formate Dehydrogenase. *Metab. Eng.*, **4**, 217-229.