Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 20, No. 1, 91-95 (1992)

*Pichia stipitis*에 의한 Glucose, Xylose 및 Cellobiose의 발효

이유석 · 권윤중[1] · 변유량*
연세대학교 식품공학과, [1]경기대학교 식품가공학과

Fermentation of Glucose, Xylose and Cellobiose by *Pichia stipitis*

Lee, You-Seok, Yun-Joong Kwon[1] and Yu-Ryang Pyun*
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
[1]Department of Food Technology, Kyonggi University, Suwon 440-270, Korea

Abstract — The hydrolyzates of lignocellulosic biomass contain a mixture of glucose, xylose and cellobiose. The yeast which can produce ethanol efficiently from xylose and cellobiose was selected and its growth and ethanol formation behavior on each sugar and their mixture were investigated. Ethanol yields during batch culture of *Pichia stipitis* CBS 5776 were 0.4, 0.36 and 0.23 g/g substrate on glucose, xylose and cellobiose, respectively. Mixed sugar fermentation data indicate that glucose causes catabolite regulation on xylose and cellobiose utilization. However, xylose and cellobiose were utilized simultaneously. Ethanol yields on mixtures of sugars were generally additive for each of the substrates.

목질계 바이오매스(biomass)는 그 부존량이 막대하며 재생산 자원이므로, 경제적이고 효율적인 당화공정 및 발효공정을 개발한다면 중요한 대체 에너지원이 될 수 있을 것이다. 이러한 목질계 바이오매스의 가수분해물은 주로 glucose, xylose 및 cellobiose의 혼합물을 함유하는데, 연료용 알콜생산의 경제성을 높이기 위해서는 이들 당들을 모두 효율적으로 이용할 수 있어야 한다.

Xylose는 hemicellulose의 주성분으로서 일반적인 알콜발효 효모로는 발효되지 않는다고 알려져 왔으나, 1980년대에 들어와서 *Pachysolen tannophilus*가 xylose에서 에탄올을 생산한다고 알려진 이래 많은 연구가 진행되어 왔다(1, 2). 최근에는 *Candida shehatae* (3, 4)와 *Pichia stipitis*(5-9)가 xylose 발효에 아주 효율적인 효모임이 알려졌다. Slininger 등(6)은 xylose 발효균주 중에서 고농도 xylose에서의 에탄올 생성능력을 조사하여 *P. stipitis* NRRL Y-7124가 가장 우수하다고 보고하였다.

Key words: *Pichia stipitis*, mixed sugars, diauxic growth
*Corresponding author

Cellulose를 효소에 의하여 당화시킬 경우 가수분해 효소는 생성물인 glucose와 cellobiose에 의해 저해를 받아 가수분해 속도가 저하된다(10). Glucose와 cellobiose를 동시에 발효시킬 수 있는 효모에 의해 생성물을 바로 에탄올로 전환시키면 당화 동시 발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation) 공정에서 cellulase complex의 저해작용을 감소시킬 수 있게 된다. Freer와 Detroy(11)는 22종의 효모에 대하여 cellobiose 발효능력을 시험한 결과 *Candida lusitaniae*와 *Candida wickerhamii*가 가장 우수하다고 보고하였으며, du Preeze 등(7)은 *C. shehatae*와 *P. stipitis*에 의한 cellobiose로부터의 에탄올 생산에 관한 연구에서 단지 *P. stipitis*만 20 g/*l*의 cellobiose로부터 48시간내에 6.5 g/*l*의 에탄올을 생성하였다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 cellobiose와 xylose를 발효시킬 수 있는 것으로 보고된 20여종의 효모중에서 cellobiose와 xylose를 모두 에탄올로 발효시키면서 그 생성능력이 우수한 효모를 선발하여 glucose, xylose 및 cellobiose 각 단당과 여러 조합의 혼합당에서의 생육 및 에탄올 생성 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용균주

20여종의 효모를 YM agar(3 g/*l* yeast extract, 3 g/*l* malt extract, 5 g/*l* peptone, 10 g/*l* glucose 및 20 g/*l* agar) 사면배지에서 계대배양하여 사용하였다.

배지

본 실험에서 사용한 배지는 $(NH_4)_2SO_4$ 5g, KH_2PO_4 5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.05g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5 mg, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.6 mg, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.76 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 mg, HCl(cocn.) 0.005 ml 및 yeast extract 5g과 각각 다른 종류의 탄소원 3.2g~10g을 증류수 1*l*에 녹인 후 pH 4.5로 조절하여 사용하였다.

배양방법

균주선발을 위한 예비실험에서 cellobiose 발효는 silicon cap을 씌운 100 m*l* 삼각 플라스크에 탄소원을 cellobiose로 한 60 ml 배지를 넣어 30℃, 200 rpm에서 진탕배양하였으며, xylose 발효는 porous silicon cap을 씌워서 탄소원을 xylose로 한 배지로 위와같은 조건에서 배양하였다. 발효조 실험은 2*l* jar fermentor (Marubishi Co., Model MD-250)에 배지 1*l*를 넣고 교반속도 200 rpm, 통기량 0.01 vvm, pH 4.5, 30℃에서 배양하였다. 전배양액을 배지의 5% 접종하여 초기 균체량을 약 0.1 g/*l* 되도록 조절하였다. 일정 시간간격으로 배양액 시료를 채취하여 원심분리후에 흡광도를 측정하고 상등액은 분석을 위하여 냉동실에 보관하였다.

분석방법

균체량은 원심분리후에 적당히 희석하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다. 단독당 실험에서의 당농도는 DNS법(12)으로 구했으며, 혼합당 발효에서 잔존기질 농도는 HPX-87P cation exchange column (Bio-Rad)을 이용하여 HPLC(Waters Associates)로 분석하였다. 에탄올은 표준물질로써 isopropanol을 가한 뒤 gas chromatography(Varian 1440)로써 정량하였다.

결과 및 고찰

실험균주의 선발

실험균주의 선발을 위해서 xylose와 cellobiose에서 에탄올을 생산할 수 있다고 알려진 20여종의 효모를 CBS, IFO 및 NRRL에서 분양받아 xylose와 cellobiose 각각을 단일 기질로 하여 플라스크 배양하여 시험균주 중 어느 정도 에탄올 생성능력이 있는 것만을 Table 1 및 Table 2에 나타내었다. Xylose를 기질로 플라스크 배양한 결과를 Table 1에서 살펴보면 초기 xylose 농도 40 g/*l*에서 대부분의 균들은 2~3일만에 기질을 모두 소비하였고 *P. tannophilus*는 5일만에 모두 소비하였으나, *Kluyveromyces marxianus*는 10일이 지난 후에도 잔당이 20 g/*l*가 남았다. *C. shehatae* CBS 4705는 3일만에 기질을 다 소비하여 0.46 g/g의 가장 높은 에탄올 수율을 나타내었으며, *P. stipitis*는 대개 0.39~0.41 g/g의 에탄올 수율을 나타내었다. 한편 cellobiose를 기질로 한 경우 Table 2에 나타낸 것과 같이 *C. lusitaniae*는 초기 40 g/*l*의 cellobiose를 3일만에 모두 소비하여 0.48 g/g의 가장 높은 에탄올 수율을 나타내었지만 xylose에서는 전혀 에탄올을 생성하지 못하였다. 또한 xylose 발효능력이 우수한 *C. shehatae*도 cellobiose를 발효시키지 못하였으나, *P. stipitis* CBS 5775와 5776은 cellobiose에

Table 1. Comparision of xylose fermentation by different organisms

Species	Initial sugar (g/*l*)	Residual sugar (g/*l*)	Time (day)	Ethanol yield (g/g)
P. stipitis				
CBS 5773	40	0	2.5	0.41
5774	40	0	3.0	0.41
5775	40	0	3.0	0.42
5776	40	0	2.5	0.41
6054	40	0	2.5	0.39
C. shehatae				
CBS 4705	40	0	3.0	0.46
5712	40	0	3.5	0.43
5813	40	0	2.0	0.42
C. tenuis				
CBS 4113	40	0	2.5	0.32
4435	40	0	2.5	0.32
P. tannophilus				
CBS 4044	40	0	5.0	0.24
K. marxianus				
NRRL Y-2415	40	20	10	0.14

서도 0.31~0.35 g/g의 비교적 높은 에탄올 수율을 나타내었다.

따라서 본 실험에서는 xylose와 cellobiose를 모두 이용하여 에탄올을 생성할 수 있는 *P. stipitis* CBS 5776을 선정하여 다음 연구를 수행하였다.

단독당의 발효

P. stipitis CBS 5776을 2*l* 발효조(working volume 1*l*)에서 glucose, xylose 및 cellobiose를 각각 10 g/*l* 함유한 배지에서 회분배양했을 때의 균체생육, 당의 소비 및 에탄올 생성을 Fig. 1에 나타내었다. Glucose가 xylose나 cellobiose보다 빨리 소비되었으며, 최대 비증식 속도는 glucose, xylose 및 cellobiose에서 각각 0.26, 0.12 및 0.09 h^{-1}이었다. Xylose에서의 에탄올 수율은 0.36 g/g으로써 플라스크 배양보다도 낮게 나왔는데, 이것은 용존산소 농도의 차이 때문인 것으로 생각된다. 배양중 용존산소 농도는 초기에 계속 감소하여 대수 증식기 말기에 4%를 나타내었는데, du Preeze 등(13)에 의하면 *P. stipitis*를 0~1.4%의 용존산소 농도의 변화에 의해 에탄올 수율이 0.4에서 0.19로 감소하였다고 보고하였다. Cellobiose에서는 높은 균체수율(0.5 g/g)과 낮은 에탄올 수율(0.23 g/g)을 나타내었는데 통기량을 적절히 조절하여 최적조건을 구하면 에탄올 수율을 향상 시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이상의 단독당 발효결과를 Table 3에 정리하였는데, 각 기질에서의 포화상수(K)는 단독당 발효결과로 부터 least-square curve fitting program을 사용하여 추정하였다(14). 이 program은 균

Table 2. Comparision of cellobiose fermentation by different organisms

Species	Initial sugar (g/*l*)	Residual sugar (g/*l*)	Time (day)	Ethanol yield (g/g)
P. stipitis				
CBS 5775	40	0	3.5	0.35
5776	10	0	2.5	0.31
C. lusitaniae				
NRRL Y-5394	40	0	3.0	0.48
B. anomalus				
IFO 0796	40	0	3.0	0.36
B. claussenii				
IFO 0627	40	0	4.0	0.35
C. versatilis				
IFO 1231	40	0	8.0	0.26
C. wickerhamii				
NRRL Y-2563	40	0	4.0	0.31
C. blankii				
IFO 10230	40	20	8.0	0.025

Table 3. Kinetic parameters for growth and ethanol production from batch culture of *P. stipitis* on single substrate

Parameters	Substrates		
	Glucose	Xylose	Cellobiose
μ_m (hr^{-1})	0.26	0.12	0.09
Max. ethanol conc. (g/*l*)	4.0	3.6	2.3
$Y_{x/s}$	0.17	0.14	0.50
$Y_{p/s}$	0.40	0.36	0.23
q_s (g substrate/g cell·hr)	1.34	0.43	0.11
q_p (g ethanol/g cell·hr)	0.5	0.3	0.04
K (g/*l*)	0.33	0.36	0.35
Fermentation time (hr)	13.5	29.0	53.5

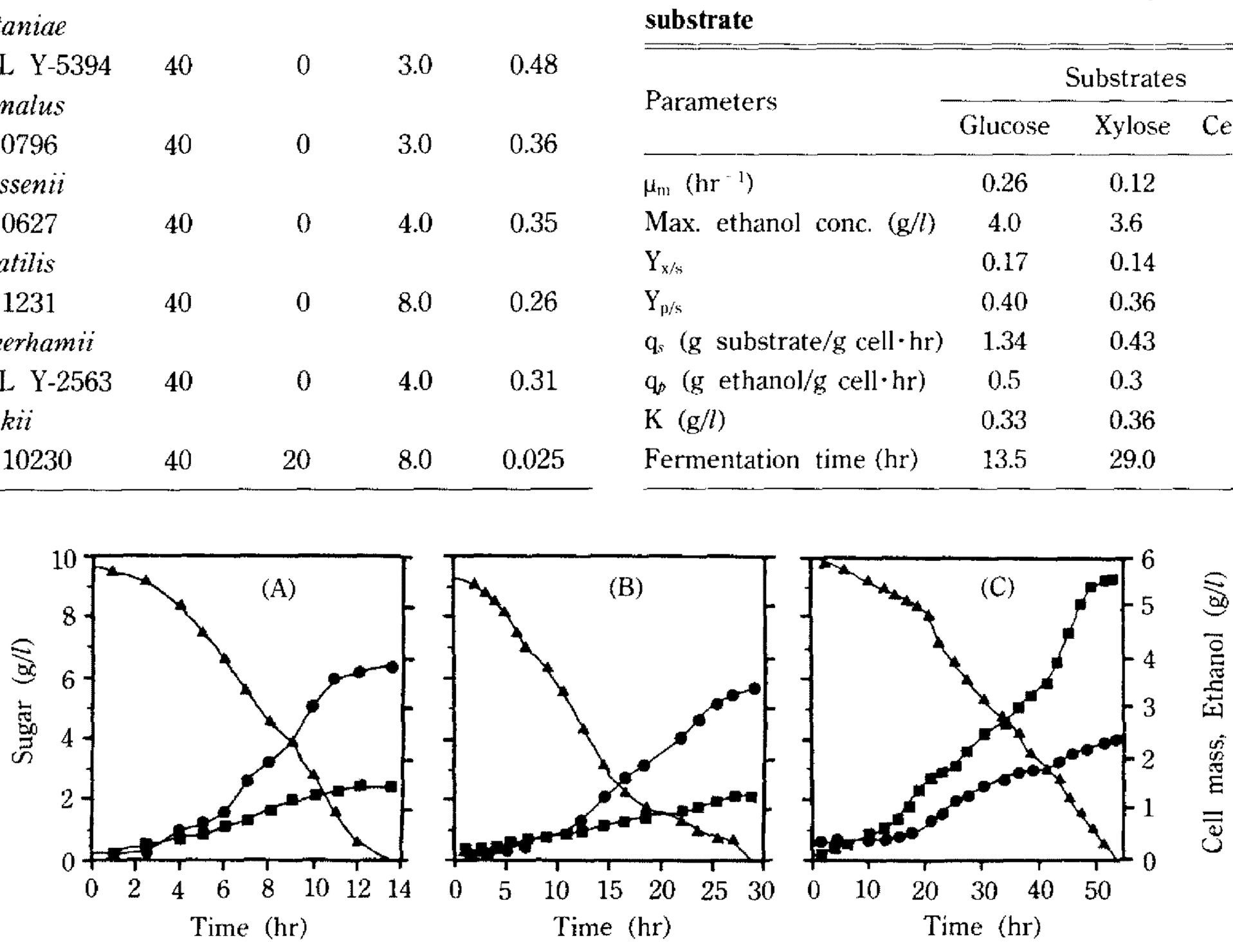

Fig. 1. Batch culture of *P. stipitis* on 1% (a) glucose, (b) xylose, and (c) cellobiose.
(▲) sugar, (■) cell mass, and (●) ethanol

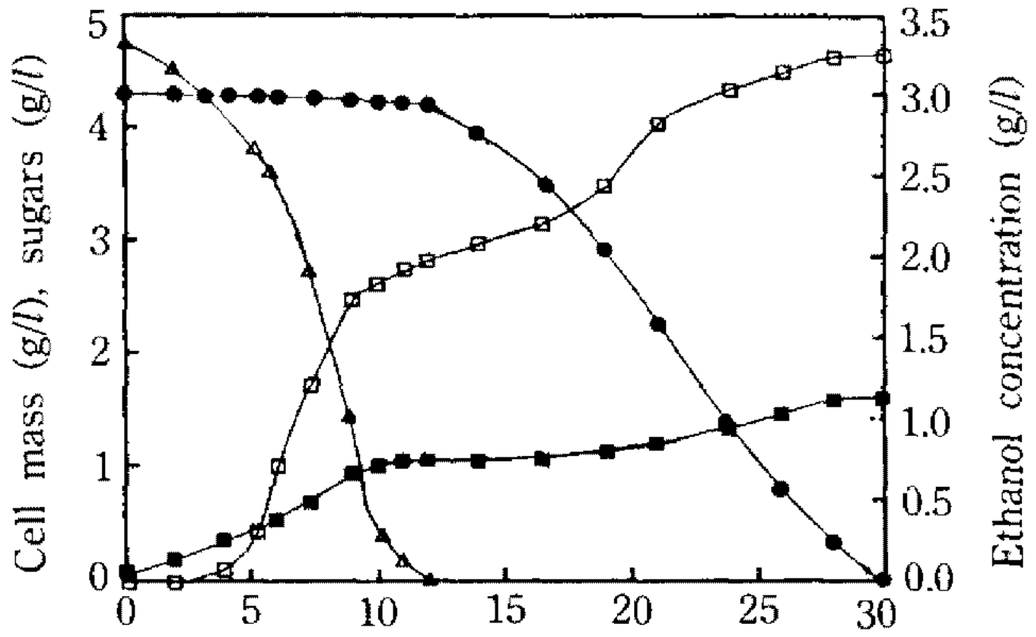

Fig. 2. Glucose/xylose mixture fermentation by *P. stipitis*.
(△) glucose, (●) xylose, (■) cell mass, (□) ethanol

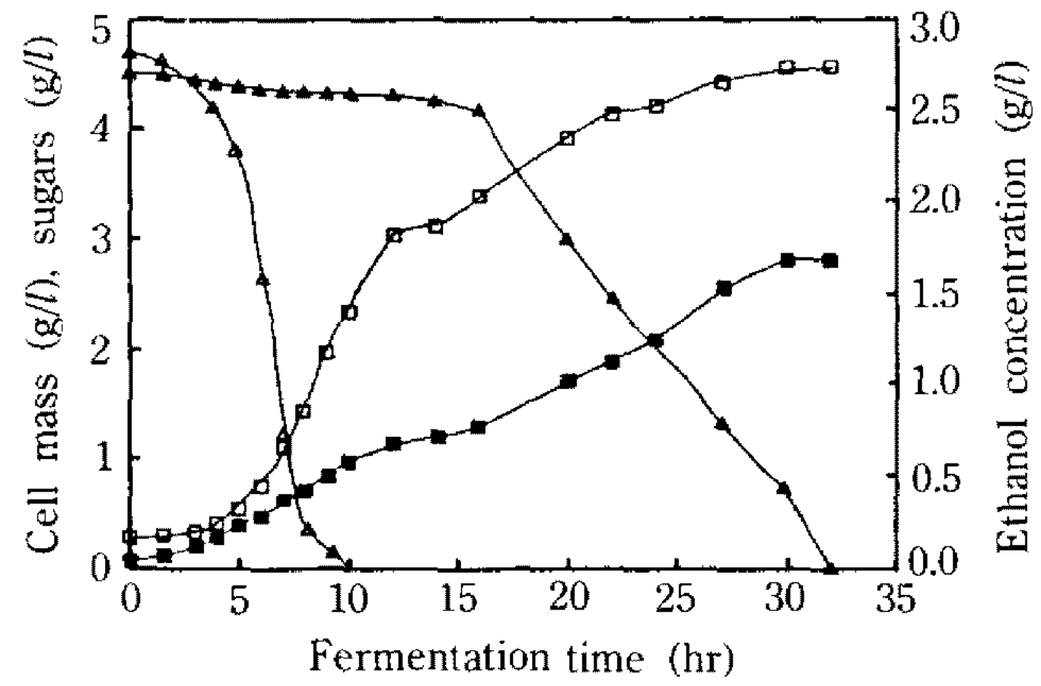

Fig. 3. Glucose/cellobiose mixture fermentation by *P. stipitis*.
(△) glucose, (▲) cellobiose, (■) cell mass, (□) ethanol

체농도, 기질농도의 실험결과에 가장 근접한 값을 나타내는 K값을 구하기 위하여 Runge-Kutta법을 이용하였다.

혼합당의 발효

Glucose 4.79 g/*l*와 xylose 4.3 g/*l*의 혼합기질에서의 *P. stipitis* CBS 5776의 생육특성 및 에탄올 생산양상을 Fig. 2에 나타내었다. 배양 12시간만에 glucose가 모두 소비된 이후에 비로써 xylose가 소비되어 glucose가 xylose 이용에 대하여 catabolite regulation을 나타내는 diauxic 생육특성을 보였으며, 총 30시간만에 두 기질을 모두 소비하였다. Xylose 이용단계에서 균체의 비증식 속도는 0.037 h^{-1}로써 xylose 단일기질에서의 값의 절반 이하로 감소하였다. 그러나 glucose를 이용하는데 있어서의 xylose는 아무런 영향도 미치지 않았다. 에탄올 생성량은 3.3 g/*l*로써 단일기

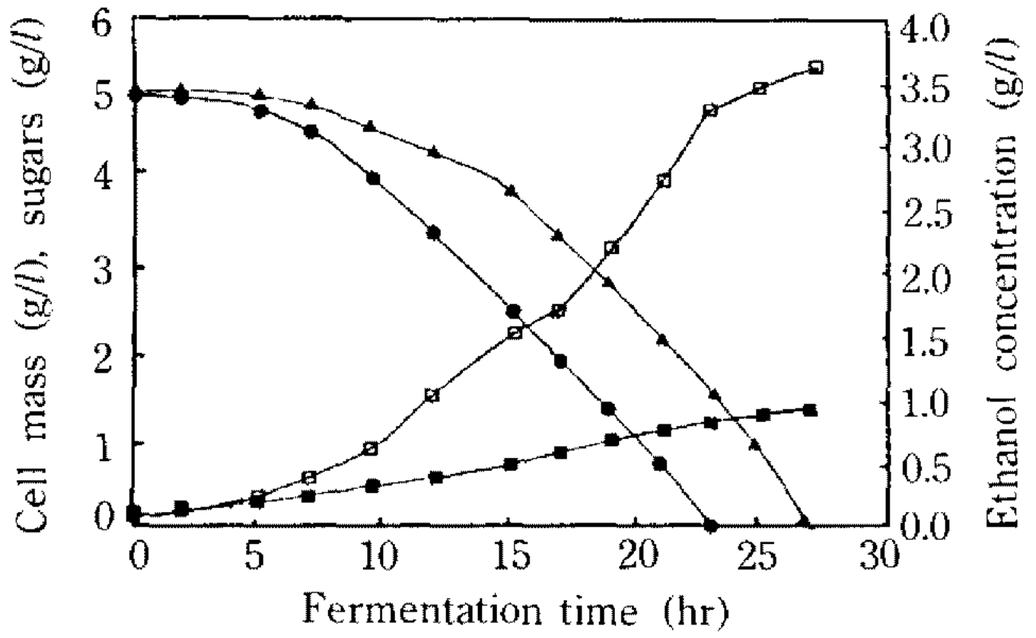

Fig. 4. Xylose/cellobiose mixture fermentation by *P. stipitis*.
(●) xylose, (▲) cellobiose, (■) cell mass, (□) ethanol

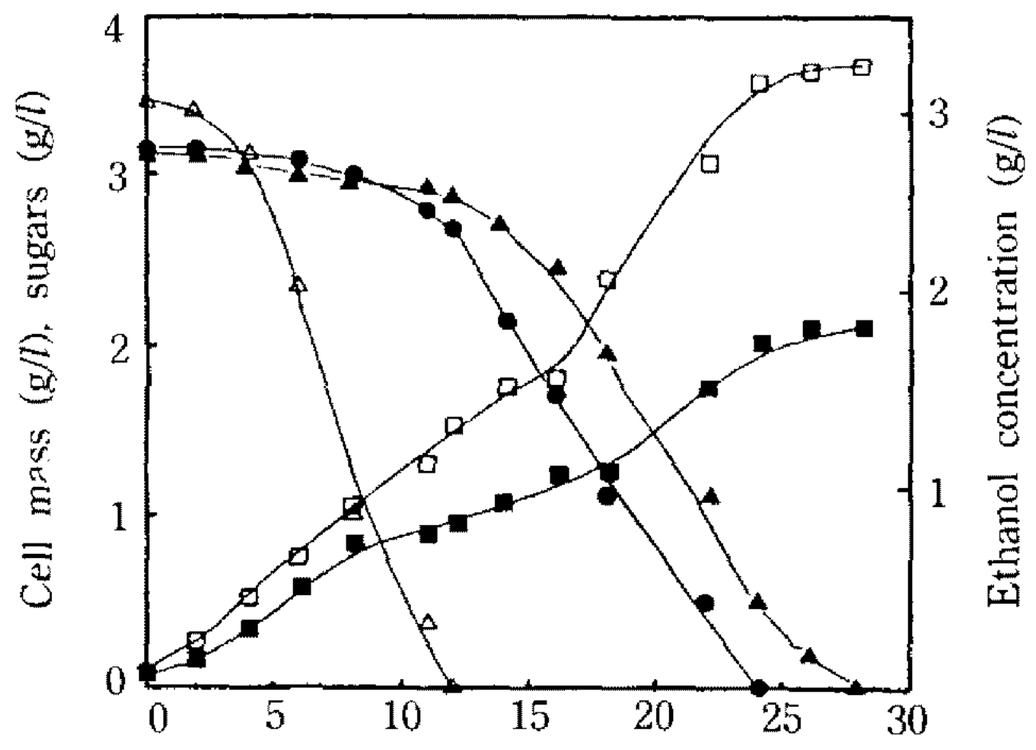

Fig. 5. Glucose/xylose/cellobiose mixture fermentation by *P. stipitis*.
(△) glucose, (●) xylose, (▲) cellobiose, (■) cell mass, (□) ethanol

질에서의 수율의 합보다 약간 감소하였다.

Glucose(4.7 g/*l*)와 cellobiose(4.5 g/*l*)의 혼합당에서의 회분배양한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Glucose는 10시간만에 모두 소비되었고 그 후에 cellobiose가 소비되는 diauxic 생육특성을 역시 보였다. Cellobiose 소비단계에서 균체의 비증식 속도는 0.06 h^{-1}로서 cellobiose 단일기질에서의 속도 0.09 h^{-1}보다 약간 감소되었으나, glucose 소비에 있어서 cellobiose는 아무런 영향도 미치지 않았다.

반면에 xylose와 cellobiose의 혼합당 발효에서는 Fig. 4에서와 같이 동시에 소비되어 일반적인 diauxic 양상을 나타내지 않았다. 두 기질의 소비에서 초기에 존재하는 약 5시간의 lag는 전배양을 glucose에서 하였기 때문에 나타난 것으로 생각되며, 최종 에탄올

농도는 3.63 g/*l*로써 단일 기질에서의 수율의 합보다 약간 증가되었다.

Glucose(3.52 g/*l*), xylose(3.23 g/*l*) 및 cellobiose (3.2 g/*l*)의 혼합당에서 회분배양한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 두 당의 혼합기질에서의 결과처럼 glucose가 먼저 고갈되고 난 뒤 xylose와 cellobiose가 동시에 이용되었으며, 12시간만에 glucose가 모두 소비되고 총 28시간만에 모든 기질이 소비되었다. 최종 에탄올 농도는 3.24 g/*l*로써 단독당에서의 에탄올 수율의 합과 거의 일치하였다.

요 약

Xylose와 cellobiose를 모두 발효할 수 있는 효모를 선발한 결과 *Pichia stipitis* CBS 5775와 5776이 가장 우수하였다. *P. stipitis* CBS 5776은 glucose, xylose 및 cellobiose에서 각각 0.4, 0.36 및 0.23 g/g substrate의 에탄올 수율을 나타내었다. 혼합당에서의 발효결과 glucose는 xylose와 cellobiose 이용에 대하여 catabolite regulation을 일으켜서 glucose가 다 소비된 후에 다른 기질이 소비되었다. 그러나 xylose와 cellobiose는 동시에 소비되었다. 혼합기질에서의 에탄올 수율은 단일기질에서의 각각의 수율의 합과 거의 유사하였다.

참고문헌

1. Schneider, H., P.Y. Wang, Y.K. Chan, and R. Maleszka. 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.* **3**: 89-92.
2. Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. van Cauwenberg, and C.P. Kurtzman. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 371-384.
3. Wayman, M. and S. Parekh. 1985. Ethanol and sugar tolerance of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **7**: 909-912.
4. Sreenath, H.K., T.W. Chapman, and T.W. Jeffries. 1986. Ethanol producetion from D-xylose in batch fermentaions with *Candida shehatae*: process variables. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 294-299.
5. Dellweg, H., M. Rizzi, H. Methner, and D. Debus. 1984. Xylose fermentation by yeasts. 3. Comparision of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* **6**: 395-400.
6. Slininger, P.J., R.J. Bothast, M.R. Okos, and M.R. Ladish. 1985. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. *Biotechnol. Lett.* **7**: 431-436.
7. du Preeze, J.C., M. Bosch, and B.A. Prior. 1986. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida sheatae and Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 228-233.
8. Skoog, K. and B. Hahn-Hägerdal. 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3389-3394.
9. Slininger, P.J., R. J. Bothast, M.R. Ladisch, and M.R. Okos. 1990. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 727-731.
10. Ryu, D.D.Y. and M. Mandels. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme Microb. Technol.* **2**: 91-101.
11. Freer, S.N. and R.W. Detroy. 1983. Characterization of cellobiose fermentations to ethanol by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 541-557.
12. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
13. du Preeze, J.C., B. van Drissel, and B.A. Prior. 1989. D-xylose fermentation by *Candida shehatae and Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.* **11**: 131-137.
14. Kwon, Y.J. 1988. Kinetics of mixed culture fermentation of multiple substrates. Ph. D. Dissertation. Texas A & M University. TX. U.S.A.

(Received December 9, 1991)