

## 오탄당과 육탄당의 혼합용액에서 *Pichia stipitis*에 의한 에탄올 발효

정 봉 환 · \*유 연 우 · 서 진 호

서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재연구센터, \*아주대학교 생물공학과

## Ethanol Fermentation by *Pichia stipitis* in a Mixture of Pentoses and Hexoses

Bong-Hwan Chung, \*Yeon-Woo Ryu and Jin-Ho Seo

Department of Food Science & Technology and Research Center for New Bio-materials in Agriculture  
Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

\*Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 441-749, Korea

### ABSTRACT

*P. stipitis* CBS5776 was cultivated to examine the characteristics of ethanol fermentation for hexoses (mannose, glucose, and galactose) and pentoses(xylose and arabinose). Glucose was the best carbon source among the sugars used in terms of ethanol yield. Glucose was used to produce ethanol with an yield coefficient 0.376g ethanol/g glucose, whereas mannose was converted to produce ethanol with an yield coefficient 0.326g ethanol/g mannose. *P. stipitis* CBS5776 was also grown in a mixture of sugars to study the pattern of carbon utilization. The yeast utilized glucose and mannose first, and then galactose and xylose as carbon sources. Arabinose was partially used for biomass when it was present as a sole carbon source, but it was not metabolized at all in a mixture of carbon sources. *P. stipitis* produced 12.2g/ℓ ethanol with a yield coefficient 0.332 g ethanol/g sugar in a mixture of sugars.

### 서 론

자연계에 다량 존재하고 있는 섬유소 물질은 주로 cellulose 40%, hemicellulose 30%, lignin 20%의 세가지 성분으로 구성되어 있다(1). 따라서 섬유소 물질의 경제적인 이용을 위해서는 이 세 가지 물질을 모두 이용하는 것이 바람직하다. 그러나 이들 섬유소 구성 성분들은 효소 또는 산분해에 의하여 6탄당과 5탄당이 혼합된 당이 생성된다. Cellulose의 대표적인 분해 산물인 포도당을 이용한 에탄올 발효에 대한 연구는 국내·외에서 다각적으로 이루어져 왔다. 그러나 hemicellulose의 주요 분해 산물인 xylose의 에탄올 전환에 대한 연구는 상대적으로 부진한 상태이다. Hemicellulose 활용의 문제점은 주성

분인 xylose를 재래의 에탄올 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*가 직접 에탄올로 전환시킬 수 없다는 것이다(2).

Hemicellulose의 주요 분해 산물인 xylose가 일부 yeasts 및 mold에 의해서 직접 에탄올로 전환될 수 있다는 연구 결과가 보고되었다. Yeasts중에는 *Pachysolen tannophilus*(3, 4), *Candida tropicalis*(5), *C. shehatae*(6), *Pichia stipitis*(7), *Kluveromyces* sp(8, 9) 등과 *Fusarium* sp(10) 및 *Mucor* sp(11)와 같은 mold는 xylose를 이용해서 상당량의 에탄올을 생성한다. *Bacillus* sp 등 일부 박테리아는 에탄올을 생성하나 에탄올에 대한 내성이 낮아 에탄올 생성량이 매우 적고, 또한 부산물의 생성에 의하여 에탄올 수율도 매우 낮다(1). 정(12)은 *P. stipitis*

에 의한 xylose의 직접 발효시 산소가 에탄올 수율에 미치는 효과를 고찰하였고, 권 등(13)은 *P. stipitis*에 의한 xylose 발효의 최적조건을 결정하였다. 그러나 yeasts 및 molds에 의한 D-xylose의 직접 에탄올발효공정에서 에탄올 생산성이 매우 낮아 부피를 기준으로 최대 1g EtOH/ℓ · hr로, 포도당에서부터 효모에 의한 에탄올 생산성의 10% 또는 그 이하에 불과하다. 대부분의 에탄올 생산에 관한 연구는 하나의 탄소원에 국한되었다.

섭유소물질을 가수분해시켰을 경우 6탄당과 5탄당이 혼합된 당화액이 생성되므로 혼합용액에 대한 에탄올 발효 연구가 필요하다. 이 등(14)은 포도당, xylose 및 cellobiose의 발효에 관한 연구를 수행하여 *P. stipitis* CBS5775와 5776이 가장 우수한 발효능력을 나타냄을 알았다. 선발된 *P. stipitis* CBS5776은 포도당, xylose 및 cellobiose에서 각각 0.4, 0.36 및 0.23 g/g 기질의 에탄올 수율을 나타내었다. 또한 혼합당에서의 발효결과 포도당은 xylose와 cellobiose의 이용에 대하여 catabolite regulation을 일으켜서 포도당이 다 소비된 후에 다른 기질이 소비됨을 보였다.

본 연구에서는 *P. stipitis* CBS5776를 이용하여 5탄당과 6탄당 혼합당에서의 발효 능력을 알아 보기 위한 일련의 기초 실험을 수행하였다. 펄프 제지 공장에서 부산물로 배출되는 spent sulfite liquor (SSL)를 사용할 목적으로 SSL과 비슷한 혼합당 조성을 갖는 혼합용액을 기질로 사용하였다(15). 혼합용액에 함유된 각 탄소원별로 에탄올 발효 정도를 살펴본 후, 이들의 혼합용액으로 구성된 배지에서 에탄올 생산 속도와 수율을 측정하여 단일 탄소원에서의 에탄올 생성능력을 비교하였다.

### 실험재료 및 연구방법

#### 균주 및 배지조성

본 연구에서는 6탄당과 5탄당 모두를 이용하여 에탄올을 생성할 수 있는 균주들 중에서 에탄올 생산성과 효율이 우수한 것으로 알려진 *P. stipitis* CBS5776를 사용하였다(15).

접종용 배지는 2% 포도당, 1% yeast extract, 2% peptone으로 만들어진 YPD 배지를 사용하였으며, 발효배지는 4.5% 또는 5.0% 탄소원, 0.5% yeast extract, 0.5% peptone, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.02%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.04%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 만들어 사용하였다. 배지의 pH는 5.0으로 조정하였다.

#### 에탄올 발효

500ml 삼각 flask에서 200ml의 working volume을 가지고 발효를 수행하였는데 이 때 발효온도는 30°C, 교반속도는 200rpm이었다.

#### 분석방법

균체의 농도는 spectrophotometer(Hitachi U1100)로 600nm에서 흡광도를 측정하여 건조균체량과의 표준곡선을 이용하여 구하였다. 건조균체농도는 균체를 회수하여 80°C에서 24시간 건조시킨 후 측정하였다. 에탄올 농도는 gas chromatography(Pye Unicam PU4500)를 이용하여 측정하였고, 탄소원의 농도는 HPLC(Tosoh)를 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 탄소원에 따른 발효 능력 비교

탄소원으로 포도당, mannose, galactose, xylose, arabinose를 각 50g/ℓ 함유하는 발효 배지를 만들어 30°C, 200rpm에서 에탄올 발효 실험을 수행하였다. Table 1에 나타난 실험 결과에서 알 수 있듯이, 5탄당(xylose, arabinose)보다 6탄당(포도당, mannose, galactose)의 경우가 에탄올 생산 수율과 최대 에탄올 농도에서 더 높은 수치를 보여주고 있다. 특히 6탄당 중 포도당 함유 배지가 에탄올 생산수율 0.376, 최대 에탄올 농도 18.8 g/ℓ로 가장 탁월한 에탄올 발효 정도를 보여 주었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 mannose 함유 배지 또한 포도당 함유 배지에 못지 않은 에탄올 생산성을 나타내어 에탄올 생산수율 0.326, 최대 에탄올 농도 16.3g/ℓ

Table 1. Effects of carbon sources on the specific growth rate, ethanol yield, and maximum ethanol concentration of *P. stipitis* CBS5776 at 30°C and pH 5.

Carbon Source	Specific Growth Rate (hr <sup>-1</sup> )	Ethanol Yield (g Ethanol/g Sugar)	Maximum Ethanol Concentration (g/ℓ)
Mannose	0.172	0.326	16.3
Glucose	0.148	0.376	18.8
Galactose	0.105	0.292	14.6
Xylose	0.139	0.260	13.0
Arabinose	0.080	0.000	0.0

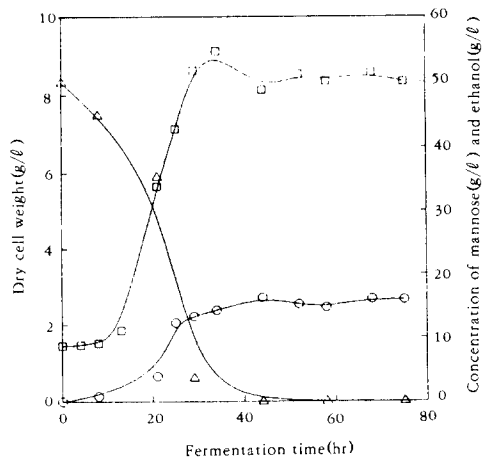


Fig 1. Profiles of cell growth(□), mannose concentration(△), and ethanol concentration (○) in a flask culture using *Pichia stipitis* CBS5776.

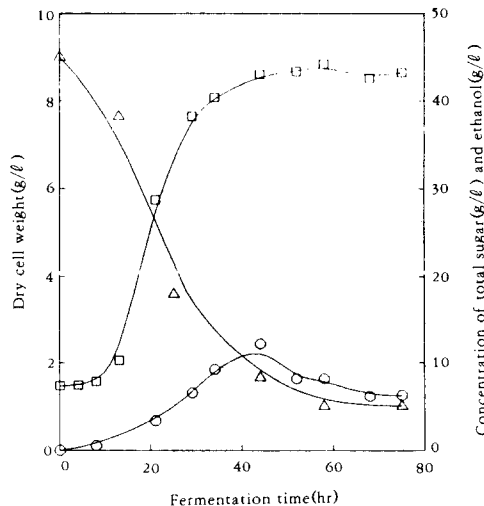


Fig 3. Profiles of cell growth(□), total sugar concentration(△), and ethanol concentration (○) in a flask culture using *Pichia stipitis* CBS5776 (Initial sugar concentrations: 21g/l mannose, 7g/l glucose, 6g/l galactose, 9g/l xylose, and 2g/l arabinose).

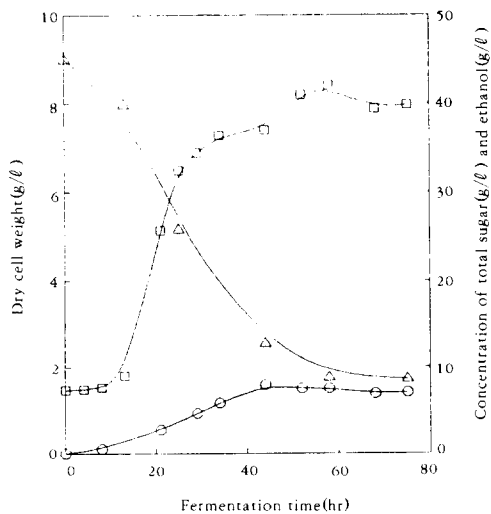


Fig 2. Profiles of cell growth(□), total sugar concentration(△), and ethanol concentration (○) in a flask culture using *Pichia stipitis* CBS5776 (initial sugar concentrations: 9g/l mannose, 9g/l glucose, 9g/l galactose, 9g/l xylose and 9 g/l arabinose)

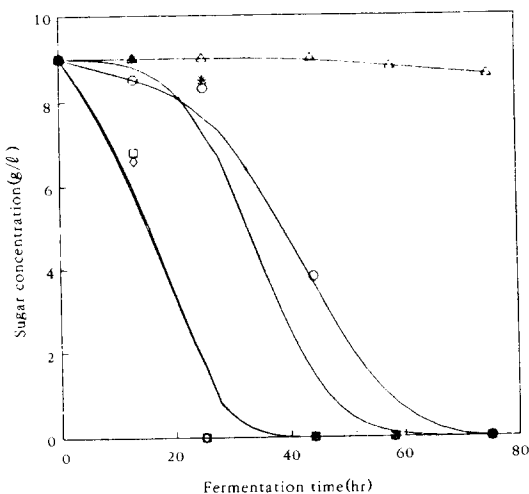


Fig 4. Time trajectories of individual sugar concentrations in a culture of *Pichia stipitis* CBS5776 (Initial sugar concentrations: 9g/l mannose(◇), 9g/l glucose(□), 9g/l galactose(\*), 9g/l xylose(○), and 9g/l arabinose(△)).

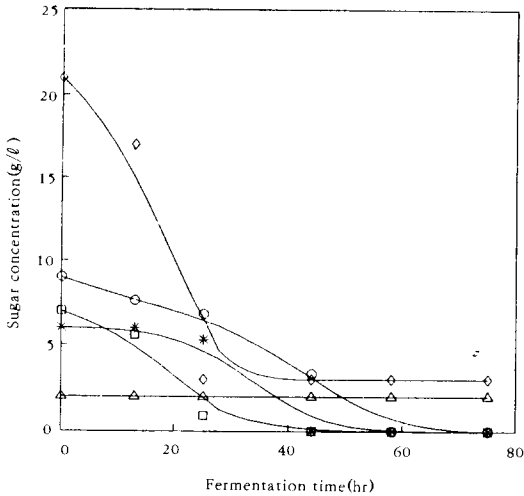


Fig 5. Time trajectories of individual sugar concentrations in a culture of *Pichia stipitis* CBS5776 (Initial sugar concentrations: 21g/l mannose( $\diamond$ ), 7g/l glucose( $\square$ ), 6g/l galactose(\*), 9g/l xylose( $\circ$ ), and 2g/l arabinose( $\triangle$ )).

이었다. 5탄당인 xylose 함유 배지에서 비교적 많은 양의 에탄올(에탄올 농도 13g/l)이 생산되었으나, arabinose 함유 배지의 경우 느린 속도의 세포 성장은 가능했지만 에탄올은 전혀 생산되지 않았다. 이는 문헌의 결과와 일치하는 것으로 *P. stipitis* CBS5776이 arabinose를 제외한 당을 효과적으로 에탄올로 전환시킴을 알았다(14).

#### 혼합당에서의 에탄올 발효 특성

6탄당과 5탄당의 혼합용액에서 발효 특성을 알아보기 위하여 다음의 두 가지 실험을 수행하였다. 첫 번째 실험은 다섯 종류의 당이 9g/l 씩 같은 양을 갖는 혼합당 배지를 사용하였고, 두 번째 실험은 SSL(spent sulfite liquor)의 당조성비를 갖는 혼합당 배지를 사용하였다. SSL의 당조성은 mannose 21g/l, 포도당 7g/l, galactose 6g/l, xylose 9g/l, arabinose 2g/l로 총 당농도는 45g/l이다. 실험 결과를 Fig. 2~5에 나타내었고, 이로부터 얻어진 에탄올 발효 인자들은 Table 2에 정리하였다.

두 경우 모두 당을 탄소원으로 균체가 성장하고

Table 2. Specific growth rate, ethanol yield, and maximum ethanol concentration for *P. stipitis* grown in a mixture of carbon sources.

	Specific Growth rate (hr <sup>-1</sup> )	Ethanol Yield (g Ethanol/g Sugar)	Maximum Ethanol Concentration (g/l)
Exp. 1	0.155	0.245	7.9
Exp. 2	0.157	0.332	12.2

Exp. 1: The growth medium has equal amounts of sugars at 9g/l each.

Exp. 2: The growth medium has the composition of spent sulfite liquor.

에탄올을 생산하지만 SSL 조성으로 혼합당을 만든 경우가 동일 양의 당을 혼합한 경우보다 에탄올 생성효율 및 최대 에탄올 농도에서 훨씬 높은 수치를 보여주고 있다. SSL 조성비를 갖는 배지에서는 에탄올 생산수율 0.332, 최대 에탄올 농도 12.2 g/l의 값을 얻었다. 이들 값은 동일 조성비를 갖는 그것보다 각각 35.5%, 54.4% 향상된 것이다. 비성장 속도와 최대균체농도는 두 경우 모두 비슷한 값을 보여 주었다. 이러한 양상은 개별당을 함유한 배지에서의 실험결과와 일치한다. 즉, arabinose를 제외한 mannose, 포도당, galactose, xylose가 효율적인 에탄올 발효기질이므로, arabinose의 함유량이 상대적으로 적은 SSL 조성의 혼합당 배지에서 높은 에탄올 수율을 보여 주었다. 시간에 따른 각 당의 소모 형태를 살펴 보면 이러한 사실을 명확히 알 수 있다 (Fig. 4, 5). 두 경우, 모두 5탄당(xylose, arabinose)보다 6탄당(mannose, glucose, galactose)의 소모 속도가 빨랐다. 특히 5탄당 중 arabinose는 단일 탄소원으로 존재할 경우, 일부분이 균체 성장에 이용되었지만 혼합당에서는 발효 75시간까지는 거의 사용되지 않았다. *P. stipitis*가 이용하기 쉬운 당부터 빠른 속도로 사용함을 알 수 있었다. 동일 조성비를 갖는 배지에서는 예상한 대로 포도당과 mannose가 같은 속도로 소모된 후, galactose와 xylose가 탄소원으로 이용되었다. 기질의 단계별 이용에 따른 diauxic growth는 다른 혼합당 배지에서도 흔히 발견되는 현상이지만, galactose와 xylose가 비슷한 이용 효율을 갖는 당인 것을 발견한 것은 아주 흥미있는 일이라 하겠다. SSL 조성을 갖는 배지에서의 정상적인 발효 양상은 앞의 실험 결과와 매우 흡사하였다. 높은 농도(21g/l)의 mannose

와 포도당이 우선적으로 이용되며, galactose와 xylose의 이용이 뒤따랐다. 역시 arabinose는 전혀 이용되지 못하였다. 하나 특이한 현상은 mannose의 경우 단일 탄소원으로 사용되었거나(Fig. 1), 혼합용액에서 농도가 낮을 때는 *P. stipitis*에 의해 완전히 이용되었으나 혼합용액에서 농도가 높을 때는 3g/l 까지 빠른 속도로 소모되었지만 실험이 끝날 때까지 더 이상의 mannose가 기질로 사용되지 못하고 3g/l로 일정하게 유지되었다. 효모의 mannose 대사과정에서만 존재하는 특이한 효소인 phospho-mannose isomerase가 생성된 에탄올에 의해 저해를 받아 더 이상의 mannose가 이용되지 못하거나, 에탄올 농도가 arabinose를 제외한 당농도보다 높아 에탄올 이용이 더 촉진되었기 때문일 것으로 추정되나(16) 이에 대한 이유는 불분명하다. 또한 포도당과 galactose가 다 소비된 시점인 42시간 이후부터는 생성된 에탄올이 다시 탄소원으로 재이용되는 현상을 보여 주었다. 에탄올 농도도 42시간에 최대값인 12.2g/l에 도달한 후, 75시간에는 오히려 6.2g/l 까지 감소하였다. SSL을 기질로 하여 에탄올 생산을 할 경우, 최대에탄올을 생성하는 최적의 발효시간이 존재함을 알 수 있다. 혼합당에서 *P. stipitis* CBS5776의 mannose와 arabinose의 이용형태는 단일 탄소원 용액에서의 특성과 다른 양상을 보임을 본 실험을 통해서 실험적으로 규명되었다.

## 요 약

*Pichia stipitis* CBS5776를 이용하여 6탄당과 5탄당을 함유한 혼합당 배지에서의 에탄올 발효 특성을 알아 보기 위한 실험을 수행하였다. 탄소원으로 사용된 당 중 에탄올 수율면에서는 포도당, mannose, galactose, xylose 순으로 5탄당보다는 6탄당이 우수한 기질로 판명되었다. 포도당의 에탄올 수율이 0.376g ethanol/g glucose로 제일 높았으며, 다음으로 mannose의 에탄올 수율은 0.326g ethanol/g mannose이었다.

Spent sulfite liquor와 같은 조성을 가진 혼합당 함유 배지에서 6탄당인 mannose, 포도당이 먼저 이용된 후 galactose와 5탄당인 xylose가 이용됨을 알 수 있었다. Arabinose가 단일 탄소원으로 존재할 경우, 일부가 균체 성장에 이용되었으나 혼합당 배지에서는 전혀 이용되지 못하였다. 발효 결과 최대 에탄올 농도는 12.2 g/l 이었고, 에탄올 생산 수율은

0.332g ethanol/g sugar이었다.

## 감 사

본 연구는 대체에너지자원기술개발지원센터의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. T. M. Enari and M. L. Suihko (1984), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **1**, 229.
2. J. A. Banett, R. W. Payne and D. Yarrow (1979), *A Guard to Identifying and Classifying yeasts*, Cambridge Univ. Press., London.
3. H. Schneider, P. Y. Wang, Y. K. Chan and R. Maleszka (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 89.
4. P. J. Slininger, R. J. Bothast, J. E. van Cauwenberge and C. P. Kurtzman(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 371.
5. T. W. Jeffrier (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 213.
6. J. C. Du Preez and J. P. van der Walt (1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 357.
7. H. Dellweg, M. Rizzi, H. Methner and D. Debus (1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 395.
8. A. Margaritis and P. Bajpai (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1039.
9. M. L. Suihko and M. Drazic (1983), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 107.
10. M. L. Suihko and T. M. Enari (1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 723.
11. P. P. Ueng and C. S. Cong (1982), *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 169.
12. 정인식 (1989), *한국생물공학회지*, **4**, 69.
13. 권순효, 유연우, 서진호 (1993), *한국생물공학회지*, **8**, 452.
14. 이유석, 권윤중, 변유량 (1992), *산업미생물학회지*, **20**, 91.
15. T. Bjorling and B. Lindman (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 240.
16. N. van Uden (1987), *Alcohol Toxicity in Yeasts and Bacteria*, CRC Press., Florida.