

섬유소 물질의 동시당화발효에 적합한 Glucose/Cellobiose 혼합당 발효균주의 개발

박승원 · 홍영기¹ · 김승욱* · 홍석인
고려대학교 화학공학과, ¹수원대학교 유전공학과

Development of Strain Fermenting the Glucose/Cellobiose Mixed Sugar for Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulosic Materials. Park, Seung-Won, Yong-Ki Hong¹, Seung-Wook Kim*, and Suk-In Hong. Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ¹Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon 445-743, Korea - *Brettanomyces custersii* CBS 5512 which has reported as a thermotolerant glucose-cellobiose co-fermentable yeast strain was mutated with UV and NTG to improve ethanol yield at higher than 40°C. *B. custersii* H1-23, H1-39, H1-55 and H1-62 were finally selected for hyper-fermentable strains at higher than 40°C from thermotolerant 7510 colonies through 5th selection. Among the selected strains, H1-39 mutant had better fermentability at 40°C and 43°C from different concentrations of glucose. H1-39 and H1-23 mutants yielded more than 70% of the theoretical ethanol yield in 4 and 8% mixed sugars at above 40°C, which was 5-11% higher than those by original strain. Especially, H1-39 mutant had better fermentability in 4% mixed sugar. It showed 78.5% of the theoretical yield at 40°C and 72.2% of the theoretical yield at 43°C. On the other hand, theoretical yield of ethanol by H1-39 mutant in 8% mixed sugar at 40°C and 43°C were 75.2% and 70.2%, respectively. These values increased up to 7-11% as compared to those by original strain. By the simultaneous saccharification and fermentation, ethanol production by H1-39 mutant increased up to more than 23% as compared to that by original strain.

Key words: strain development, mutation, simultaneous saccharification and fermentation

섬유소 물질을 기질로 이용하여 에탄올 발효를 하는 공정중 하나인 동시당화발효공정은 Takagi 등[11]에 의해 처음 연구되었는데, 당화공정과 발효공정을 동시에 수행함으로써 기존의 분리당화 발효공정에 비해 한개의 반응기만 필요하기 때문에 설비비용이 절감된다. 그리고 당화효소의 억제제인 glucose가 발효균주에 의해 생성되자마자 소모되므로 전체공정에 필요한 비용의 25%를 차지하는 당화효소의 투입량을 감소시킬 수 있어 공정의 생산비용을 절감할 수 있다. 또한 고온에서 운용되므로 부수적인 장점으로 오염의 가능성 감소 및 냉각비의 절감효과를 가져올 수 있다. 그러나 일반적인 에탄올 발효균주의 최적 성장온도는 30-35°C인데 반해 cellulase 복합효소의 최적반응 온도는 50°C 정도이기 때문에 당화효소의 투입량을 감소시켜 생산성을 향상시키기 위해서는 고온내성 균주를 선별 및 개발하여 동시당화발효공정에 적용시켜야 한다.

에탄올 발효산업에서 주로 이용된 균주로 *Saccharomyces* sp., *Schizosaccharomyces pombe*와 *Kluyveromyces* sp. 등의

효모가 있는데, 이중 *S. cerevisiae*는 에탄올 생산성이 높아 가장 많이 이용되어 왔다. 그러나 *S. cerevisiae*는 28-35°C에서는 정상적으로 성장을 하고 발효력도 높으나 40°C에서는 거의 성장을 할 수 없는 것으로 알려졌는데 [12], 이 균주가 내열성이 약한 것은 40°C 정도의 고온에서 autolysis가 되기 때문이다[13]. 이러한 결과를 볼때 결국 기존의 에탄올 발효에 이용되어 왔던 균주는 동시당화발효공정에 적용하는데에는 부적절하다 할 수 있다.

에탄올 발효에서 세포의 성장이 발효보다는 온도에 더 영향을 받는것으로 알려져 있어[7], 일반적으로 고온내성균주의 선별은 1차적으로 고온에서 정상적인 성장을 하는지의 여부로 결정한다. 기존의 대표적인 고온내성균주로 *Kluyveromyces* sp.가 주종을 이루는데 이 균주는 *S. cerevisiae* 보다는 다소 발효력이 낮은 것으로 알려졌다[4]. Hacking 등[4]은 55 효모균주중 40°C에서 glucose를 기질로 에탄올 수율이 높은(90%이상) 고온내성균주로 *S. warrum* YSa85, *S. cerevisiae* YSa86, *Candida pseudotropicalis* YSa9를 선별하였다. 또한 Spindler 등[9]은 37-47°C에서 glucose를 기질로 에탄올 발효를 할 수 있는 균주로 *S. cerevisiae* SERI D5A, *S. warrum*, *C. acidothermophilum*, *C. brassicae*, *C. lusitanae*를 선

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3300, Fax. 82-2-926-6102
E-mail: swkim@prosys.korea.ac.kr

별하여 Sigmacell-50 cellulose를 기질로 이용한 동시당화발효공정에서 높은 에탄올 수율을 얻어냈다. 국내에서는 손 등 [8]이 토양에서 고온내성균주로 *S. cerevisiae*에 속하는 RA-74-2와 *K. marxianus*에 속하는 RA-912를 분리해냈고 이들 균주를 40°C에서 통기를 해줌으로서 에탄올 생산성을 2배정도 증가시켰다. 이와 같이 고온에서 glucose를 이용하여 에탄올로 변환시킬 수 있는 균주를 개발하려는 연구가 계속 진행되고 있다.

한편 cellulose를 이용한 동시당화발효공정에서는 고온내성 균주의 적용뿐 아니라 cellobiose를 발효할 수 있는 균주의 적용도 중요한데, 이것은 당화 공정중 생성되는 중간물질인 cellobiose가 cellobiohydrolase의 강력한 억제제로 작용하기 때문이다. Cellobiose 농도 0.1% 이하만으로도 cellobiohydrolase 기능의 80% 정도를 억제할 수 있어, cellobiose의 축적은 당화효소의 투입량의 증가 및 β -glucosidase의 첨가가 따르게 되어 운용비용의 증가를 가져와 생산성을 낮추게 된다. Cellobiose를 섭취할 수 있는 균주는 많이 알려져 왔는데, 발효를 할 수 있는 균주로는 *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* 등이 많이 연구되었다[5]. 그러나 이러한 균주들은 에탄올 수율과 내열성이 낮기 때문에 동시당화발효공정에 직접 이용할 수 없고, 돌연변이등을 통하여 균주를 개량해야 한다. Gonde 등[3]은 28°C, 12% cellobiose를 기질로 에탄올 발효력이 우수한 균주로 *B. custersii* CBS 5512와 *B. intermedius* CBS73을 선별하였고, Freer 등[11]은 28주의 glucose-cellobiose 동시발효 효모중 cellobiose 초기발효속도가 우수한 균주로 *C. lusitaniae* NRRL Y-5394와 *C. wickerhamii* NRRL Y-2563을 선별하였다. Spindler 등 [10]도 *B. custersii* CBS 5512를 이용하여 37°C에서 7.5% cellulose로부터 32 g/L의 에탄올(이론수율, 75%)을 생산하였다.

앞에서 언급한 여러 연구자들의 연구결과를 볼 때 동시당화발효공정에서 glucose만을 발효할 수 있는 내열성 균주로 *Kluyveromyces*가 적당하고, glucose-cellobiose 동시발효균주로 *Brettanomyces*와 *Candida*가 가장 적당한데, 문제는 이러한 균주들의 에탄올 수율이 낮다는 것이다. 특히 혼합당 발효균주는 내열성이 상당히 약한것으로 알려졌다.

따라서 본 연구에서는 동시당화발효공정에 적합한 glucose-cellobiose 혼합당 발효균주를 선별하여 돌연변이를 유발시켜 40°C이상의 고온에서 발효력이 우수한 변이주를 개발하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

사용균주

Glucose-cellobiose 동시발효균주들로 *Brettanomyces*

anomalus ATCC 10559, *Hansenula anomala* NRRL-Y-7174, *Brettanomyces custersii* CBS 5512와 *B. custersii*의 변이주들이 사용되었고, 이 균주들과 glucose 발효력을 비교하기 위하여 glucose발효균주로 *Saccharomyces cerevisiae* K35, *Saccharomyces uvarum* ATCC 26602, *Kluyveromyces marxianus* IFO 0206 가 이용되었다. 모든 균주는 YPD(2% dextrose, 2% peptone, 1.5% yeast extract) 한천배지에서 30°C에서 2일간 배양시킨후 4°C에서 보관하였다.

배지 및 발효

중균배지로는 YPD배지를 사용하였다. 발효배지로 탄소원으로 다양한 혼합비의 glucose와 cellobiose의 혼합당을 0.05M citrate buffer(pH 4.8)에 혼합하여 사용하였으며, 여기에 당화효소를 투입하여 50°C에서 48시간 동안 가수분해하여 얻어진 당화액에 2% peptone과 1.5% yeast extract를 첨가하여 이용하였다.

균주선별을 위한 배지는 다양한 농도(4-18%)의 glucose와 다양한 농도(4-8%)의 cellobiose 및 다양한 혼합비의 glucose/cellobiose 혼합당을 탄소원으로 사용하였으며, 여기에 2% peptone과 1.5% yeast extract를 첨가하여 이용하였다. 유리세포의 에탄올 발효는 중균배지에서 진탕 배양기나 항온기를 이용하여 30°C에서 1일간 배양시켜 활성화된 균체를 발효배지에 10%(v/v)로 접종하였고, 에탄올 발효는 다양한 발효배지와 다양한 온도에서 250 ml 삼각 플라스크에 조업부피가 50 ml가 되도록 하고 160 rpm으로 교반시켜 배양하였다.

Cellulose(α -cellulose, Sigma)의 동시당화발효는 10% (w/v)의 cellulose와 30 FPU/g의 효소(Cellsoft, Novo, Denmark)를 500 ml 삼각 플라스크에 첨가하여 실험하였으며, 여기에 중균배양에서 활성화된 균체 10%(v/v)를 접종한 후, 진탕배양기에서 200 rpm, 40°C를 유지하였다.

UV 및 NTG에 의한 우수 변이주 선별

B. custersii 균주에 100.32 erg/mm² 범위의 UV를 조사하여 사멸율이 95% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰고, 또한 NTG 농도를 50 g/ml 로하여 85분간 처리하여 사멸율이 97% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰다.

변이주들을 glucose를 첨가한 YPD 배지를 이용하여 40°C에서 성장을 잘하는 것들을 3차 과정에 걸쳐 선별한 후, 10 ml의 YPD를 채운 15 ml cap tube에 Durham tube를 넣고 30°C에서 정지 배양하면서 기포 수집량을 측정하는 Durham tube 방법을 이용하여 초기 발효속도를 측정하여 우수한 변이주를 선별한후 18% glucose를 첨가한 YPD배지에서 에탄올 발효효율이 우수한 변이주를 선별하였다. 선별된 변이주를 다양한 농도의 cello-

biose, 혼합당, 당화액을 이용하여 발효력을 조사하여 우수균주를 최종적으로 선별하였다.

분석방법

환원당의 농도는 발효액을 원심분리시켜 얻은 상등액을 DNS방법[6]을 이용하여 분광광도계로 575 nm에서 흡광도를 측정하여 얻었다. 에탄올의 정량은 Bernet and Gutmann[1]의 방법을 변형한 효소적방법을 이용하여, 340 nm에서 흡광도를 측정함으로써 에탄올의 농도를 측정하였고 분석시약은 Sigma사의 에탄올 정량분석 kit를 사용하였다. Glucose정량은 (주)영동제약의 포도당 측정용시약 Glucose-E Kit를 사용하였다. Cellobiose의 농도는 DNS 방법으로 정량된 환원당에서 glucose농도를 빼서 계산하였다. 균체수는 혈구계수기를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

발효력 조사

Glucose 발효력이 우수한 *S. cerevisiae* K35 와 고온성 균주인 *K. marxianus* IFO 0206, 응집력이 강한 *S. uvarum* ATCC 26602, glucose-cellobiose 혼합당 발효 균주인 *B. anomalous* ATCC 10559, *H. anomala* NRRL-Y-7174 그리고 *B. custersii* CBS 5512 균주를 8% glucose와 4% cellobiose를 탄소원으로 YPD 배지에 첨가하여 다양한 온도에서 에탄올 발효력을 조사하였다(Table 1). 전반적으로 온도가 상승하면서 발효력이 감소하는 양상을 보였고, 특히 cellobiose를 탄소원으로 사용했을

때 감소폭이 컸으며 또한 43℃에서도 급격하게 감소하였다. Glucose를 탄소원 사용했을 때 *S. cerevisiae* CBS 5512가 발효력이 가장 우수하였으며, *K. marxianus* IFO 0206는 상대적으로 저온에서는 발효력이 낮았지만 40℃이상의 고온에서는 발효력이 우수하였다. *B. custersii* CBS 5512는 *S. cerevisiae* K35 보다는 다소 발효력이 떨어지지만 다른 glucose-cellobiose 발효균주보다 glucose를 이용한 에탄올 발효력이 단연 우수하였다. 탄소원이 cellobiose일 때 *S. cerevisiae* K35, *K. marxianus* IFO 0206, *S. uvarum* ATCC 26602 등의 균주는 전혀 발효를 하지 못했으며, *B. anomalous* ATCC 10559가 가장 우수한 발효력을 보였다.

B. custersii CBS 5512는 cellobiose를 탄소원으로 *B. anomalous* ATCC 10559보다 5-10% 정도 수율이 적게 나타났지만 glucose에서의 수율이 15-30% 정도 우수하고, 또한 고온으로 온도가 상승함에 따르는 발효력 감소폭이 상대적으로 작기 때문에 동시당화발효공정에 적당한 균주로 평가되어 여러 mutagen을 이용하여 돌연변이를 유발시켜 고온내성을 지니고 발효력이 우수한 변이주를 선별하려는 실험에 원균주로 이용하였다.

우수변이주의 선별

돌연변이를 유발시킨후 37℃, 2% YPD plate상에서 24시간 성장시켜 상대적으로 colony 크기가 큰 변이주를 선별하였고, 선별된 변이주를 동일배지, 40℃와 43℃에서 2차, 3차 선별하였고, 3차 선별된 변이주를 Durham tube 방법을 이용하여 3.5% glucose를 탄소원으로 40℃에서 발효력을 조사하여 초기발효 속도가 빠른 변이주를

Table 1. Ethanol production by yeast strains in the YPD media supplemented with 8% glucose or 4% cellobiose as a carbon source

Strains	Theoretical ethanol yield (%)			
	Temperature			
	30℃	37℃	40℃	43℃
8% glucose				
<i>K. marxianus</i> IFO 0206	80.3	77.6	75.4	70.8
<i>S. cerevisiae</i> K 35	94.2	88.3	80.1	62.1
<i>S. uvarum</i> ATCC 26602	86.3	70.9	63.1	49.9
<i>B. custersii</i> CBS 5512	86.5	80.3	72.5	51.4
<i>B. anomalous</i> ATCC 10559	72.3	65.2	48.3	40.7
<i>H. anomala</i> NRRL-Y-7174	62.1	50.2	41.3	36.4
4% cellobiose				
<i>K. marxianus</i> IFO 0206	-	-	-	-
<i>S. cerevisiae</i> K 35	-	-	-	-
<i>S. uvarum</i> ATCC 26602	-	-	-	-
<i>B. custersii</i> CBS 5512	71.5	66.3	53.7	41.5
<i>B. anomalous</i> ATCC 10559	81.7	75.2	64.1	47.3
<i>H. anomala</i> NRRL-Y-7174	72.5	67.9	48.7	40.6

Fermentations were conducted for 30 hours.

Table 2. Ethanol production of the selected mutants in the YPD media supplemented with 4% or 8% glucose as a carbon source

Strains	Theoretical ethanol yield (%)	
	4% glucose ⁽¹⁾	8% glucose ⁽²⁾
<i>B. custersii</i>	71.3	70.4
H1-23*	78.1	75.9
H1-36	75.8	73.2
H1-39*	79.5	77.4
H1-45	74.1	72.5
H1-49	70.7	71.7
H1-53	75.1	73.5
H1-55*	77.6	75.2
H1-62*	76.8	74.8
H1-64	74.7	72.9

The fermentations were conducted for 24⁽¹⁾, and 48 hours⁽²⁾.

* means selected strains with better fermentability.

4차 선별하였다. 선별된 변이주를 4%, 8% glucose를 첨가한 YPD 배지에서 40℃에서 각각 24, 48시간 동안 에탄올 발효를 시켰을 때 원균주보다 발효력이 향상된 H1-23, H1-39, H1-55, H1-62 변이주를 5차 선별하였다 (Table 2). 5차 선별된 4변이주는 원균주보다 에탄올 수율이 5.5-8.2 정도 향상되었으며, 특히 H1-39, H1-23 변이주가 4%, 8% glucose에서 모두 이론수율의 75-80% 정도의 에탄올 수율을 보여 발효력이 우수하였다.

Glucose를 이용한 발효력 조사

다양한 온도에서, 다양한 농도의 glucose를 탄소원으로 사용하여 우수균주로 선별된 4 변이주의 발효력을 조사하였다 (Table 3). 다양한 온도에서 4% glucose를 탄소원으로 *B. custersii* CBS 5512와 그 변이주인 H1-23, H1-39, H1-55, H1-62의 에탄올 발효력을 조사하였는데, H1-23, H1-39, 그리고 H1-55 변이주는 30℃에서 각각 이론수율의 90% 정도의 에탄올 수율을 보여 원균주 (이론수율의 87.3% 에탄올 수율)보다 약간 향상되었고, 37℃와 40℃에서는 변이주들의 수율이 원균주보다 평균 6-9% 정도 에탄올 수율이 향상되었다. 온도가 37℃일 때 H1-55와 H1-62 변이주는 각각 이론수율의 86.8%, 86.1%의 수율을 보여 원균주 (이론수율의 78.7% 에탄올 수율)보다 발효력이 크게 향상되었으며, 40℃에서는 H1-39 변이주가 이론수율의 79.5% 수율을 나타내 가장 우수하였다. 또한 온도가 43℃일 때 H1-39 변이주는 에탄올 수율이 이론수율의 76.4%로 원균주보다 15% 정도 높았으며 다른 변이주의 수율보다 월등히 높게 나타났다. 고온내성을 지닌 특성으로 인해 변이주들이 30℃보다는 37℃이상의 고온에서 원균주보다 우수한 발효력을 보였으며, 특히 H1-39 변이주의 경우 40℃와 43℃에서 가장

Table 3. Comparisons of ethanol production from glucose by *B. custersii* and its mutants at different temperatures

Strains	Theoretical ethanol yield (%)		
	Glucose concentration		
	4% ⁽¹⁾	8% ⁽²⁾	13% ⁽³⁾
	30℃		
<i>B. custersii</i>	87.3	86.5	84.2
H1-23	90.5	88.7	87.2
H1-39	91.3	89.9	89.2
H1-55	89.5	89.2	87.5
H1-62	86.7	85.2	84.8
	37℃		
<i>B. custersii</i>	81.3	80.3	79.1
H1-23	85.2	84.8	83.1
H1-39	84.9	83.7	82.4
H1-55	86.8	85.3	83.8
H1-62	86.1	84.7	81.5
	40℃		
<i>B. custersii</i>	71.2	74.4	65.2
H1-23	78.1	75.9	72.1
H1-39	79.5	77.4	76.1
H1-55	77.6	75.2	71.0
H1-62	76.8	74.8	72.7
	43℃		
<i>B. custersii</i>	61.3	51.4	45.9
H1-23	72.5	68.5	61.3
H1-39	76.4	70.3	64.8
H1-55	67.5	61.4	56.4
H1-62	65.1	59.6	53.2

Fermentations were conducted for 18⁽¹⁾, 30⁽²⁾ and 42 hours⁽³⁾.

우수한 발효력을 보였다.

*B. custersii*와 그 변이주를 8% glucose를 탄소원으로 하여 다양한 온도에서 발효력을 조사하였는데 온도가 30℃일 때는 전반적으로 원균주와 변이주들의 에탄올 수율이 큰차이 없이 이론수율의 87-90%정도였다. 온도가 37℃에서는 변이주가 전반적으로 5% 내외 정도 수율이 향상되었으며 H1-55 변이주가 이론수율의 85.3%의 수율을 보여 원균주(이론수율의 80.3 에탄올 수율)보다 향상되었다. H1-39 변이주는 40℃에서 에탄올 수율이 원균주보다 3%정도 향상되었고, 그외 변이주는 1-2% 정도 향상되었다. 전반적으로 모든 균주가 43℃에서 에탄올 수율이 급격하게 하락되었으나 H1-39과 H1-23 변이주는 각각 이론수율의 70.3%, 68.5%의 에탄올 수율을 보여 다른 변이주보다 10% 정도 우수하였으며 이조건에서 이론수율의 51.4% 수율을 보인 원균주보다는 월등하게 우수한 발효력을 보였다.

탄소원이 13% glucose일 때 다양한 온도에서 계속적으로 발효력을 조사하였는데 전반적으로 4%, 8% glucose를 기질로 했을 때보다 발효력이 약간 감소하였고,

Table 4. Comparisons of ethanol production from mixed sugar by *B. custersii* and its mutants at different temperatures

Strains	4% mixed sugar			8% mixed sugar		
	37℃	40℃	43℃	37℃	40℃	43℃
	Theoretical ethanol yield (%)					
<i>Brettanomyces custersii</i>	75.0	72.0	61.0	72.1	68.3	58.9
H1-23	87.0	75.3	73.1	83.2	73.2	67.5
H1-39	84.0	78.5	72.2	81.5	75.2	70.2
H1-55	82.5	77.2	67.6	77.4	71.8	65.0
H1-62	80.1	76.2	69.3	78.3	72.8	66.5
	Productivity (g ethanol/L·h)					
<i>Brettanomyces custersii</i>	0.64	0.46	0.42	0.49	0.39	0.33
H1-23	0.59	0.64	0.50	0.57	0.50	0.46
H1-39	0.72	0.54	0.54	0.56	0.51	0.48
H1-55	0.70	0.53	0.44	0.53	0.49	0.44
H1-62	0.68	0.65	0.39	0.53	0.49	0.45

특히 고온으로 올라가면서 그 감소폭은 증가하여 43℃에서는 6-10%정도 수율이 감소하였다. 이는 고온이 되면서 발효력 뿐만 아니라 당내성도 동시에 감소하기 때문이다. 대부분의 변이주가 37℃ 이상의 고온에서 원균주보다 발효력이 우수하였고, 특히 H1-39 변이주는 40℃, 43℃에서 각각 에탄올 수율이 이론수율의 76.1%, 64.8%로 높게 나타났다. 반면 37℃에서는 H1-55 변이주가 발효력이 우수한 것으로 나타났다.

우수변이주들의 당화액모사 혼합당에서의 발효력 조사 당화산물의 glucose와 cellobiose의 조성비와 유사한 3:1 혼합비로 혼합당을 이용하여 *B. custersii*와 그 변이주의 발효력을 시간대별로 조사해 보았다. Table 4는 3% glucose와 1% cellobiose가 혼합된 4% 혼합당과 6% glucose와 2% cellobiose가 혼합된 8% 혼합당에서 원균주와 변이주의 발효력을 보여준다.

4% 혼합당을 기질로 H1-23변이주가 37℃와 40℃에서 각각 이론수율의 87%, 75.3%를 보여 발효력이 우수하였고, 40℃에서는 H1-39변이주가 78.5%수율을 보여 우수한 발효력을 보였다. 이 두 변이주는 원균주보다 8-11%정도 발효력이 향상되었으며, 다른 두 변이주도 원균주보다는 4-8%정도 향상되었다. H1-23변이주는 37℃에서 17.8 g/L 에탄올을 생산하여 이론수율의 87%을 보여 원균주(이론수율의 75%)를 포함한 다른 변이주보다 우수한 발효력을 보였다. 그렇지만 H1-39변이주는 생산성이 0.72 g/L·h로 0.59 g/L·h인 H1-23보다 생산성은 더 높았다.

40℃에서는 H1-39 변이주가 16.1 g/L 에탄올을 생산하여 13.7 g/L 에탄올을 생산한 원균주보다 수율이 6.5% 증가하였고, H1-55, H1-62 그리고 H1-23 변이주가 각각 15.8, 15.6, 15.4 g/L 에탄올을 생산하여 거의 비슷한 수준을 보였다. 전반적으로 37℃에 비해 수율이 5-7% 정도 감소하였으며 특히 H1-23 변이주가 11.7%의 큰폭으

로 감소하였다. 반면 생산성은 0.64 g/L·h를 나타낸 H1-23 변이주와 0.65 g/L·h를 보인 H1-62 변이주가 우수하였고, H1-23 변이주의 경우 37℃ 보다 오히려 약간 증가한 생산성을 보였다.

온도를 올려 43℃에서 발효를 하였는데 전반적으로 37℃보다 수율이 10-15% 정도 감소하였고, 생산성 또한 급격하게 감소하였다. H1-23 변이주는 최대수율이 이론수율의 73.1% 가장 우수하였으며 생산성은 H1-39 변이주가 0.67 g/L·h로 우수하였다. 그외 다른 변이주는 0.4-0.5 g/L·h정도의 생산성을 보였다. 이러한 결과는 원균주를 포함하여 다른 변이주들은 온도가 고온으로 상승함에 따라 발효속도가 현저하게 둔화되지만 H1-39 변이주는 발효속도에 별다른 영향을 받지 않는다는 사실을 입증해 주는 것이다.

Glucose와 cellobiose 조성비가 3:1인 4% 혼합당은 실제 당화액과 농도나 glucose, cellobiose 조성비가 아주 유사한 것으로 이 조건에서 수율이나 생산성 측면에서 우수한 변이주가 동시당화발효공정에 가장 적당한 균주로 평가될 수 있는데 H1-39 변이주가 가장 우수하게 평가되었고 그 다음으로 H1-23 변이주가 우수하였다.

8% 혼합당에서의 발효특성을 보면 온도가 증가함에 따라 4% 혼합당에서 보다 발효력의 감소폭이 커져 고온에서 당내성이 상승작용으로 감소됨을 알 수 있었으며, 또한 생산성도 감소되었다. 그러나 H1-39 변이주의 경우 온도가 증가해도 수율의 감소폭이 5% 내외로 다른 균주보다 감소폭이 작아 상대적으로 우월한 고온내성과 당내성을 보였다. H1-23, H1-39 변이주가 37℃에서 우수한 에탄올 수율을 보였고, 40℃, 43℃에서는 H1-39 변이주가 우수한 에탄올 수율을 나타냈다. 온도가 37℃에서 H1-23 변이주는 이론수율의 83.2% 에탄올 수율을 나타내 원균주보다 11.1%의 수율이 향상되었고, 생산성도 0.57 g/L·h로 우수하였다. 그 다음으로 H1-39 변이주가 수율

81.5%, 생산성 0.56 g/L·h로 우수하였으며 다른 변이주는 78% 정도의 수율을 보였다. H1-39 변이주는 40°C에서 이론수율의 75.2% 에탄올 수율을 보여 원균주보다 7% 향상되어 가장 우수하였고, 4 변이주 모두 0.5 g/L·h의 생산성을 보여 원균주 (0.39 g/L·h)보다 생산성이 크게 향상되었다. 온도를 높여 43°C에서 발효력을 조사해 보았는데 마찬가지로 H1-39 변이주가 60시간 발효후 28.9 g/L 에탄올을 생산하여 우수한 발효력을 보였다. 이 수율은 원균주보다 11% 정도 향상된 것이며 또한 생산성도 0.48 g/L·h로 원균주의 0.33 g/L·h보다 크게 향상되었다.

섬유소 물질을 당화시켜 생성된 당화액의 농도는 glu-

cose와 cellobiose 조성비가 3:1인 4% 내외의 혼합당이 생기게 되는데 이것은 어디까지나 단순당화 반응일 경우이고, 실제 당화효소의 억제제인 glucose나 cellobiose가 발효균주에 의해 소모되어 당화수율이 높아지는 동시당화발효공정에서는 혼합당의 농도가 4% 이상으로 높아질 것으로 예상되는데 이때문에 8% 당화액에서의 발효특성을 규명하는것도 중요하다 하겠다. 이 배지조건에서 수율 및 생산성 측면에서 H1-39 변이주가 가장 우수하였다.

H1-39 변이주의 혼합당에서의 발효

Fig. 1-A는 4% 혼합당을 발효배지에 첨가하여 40°C에

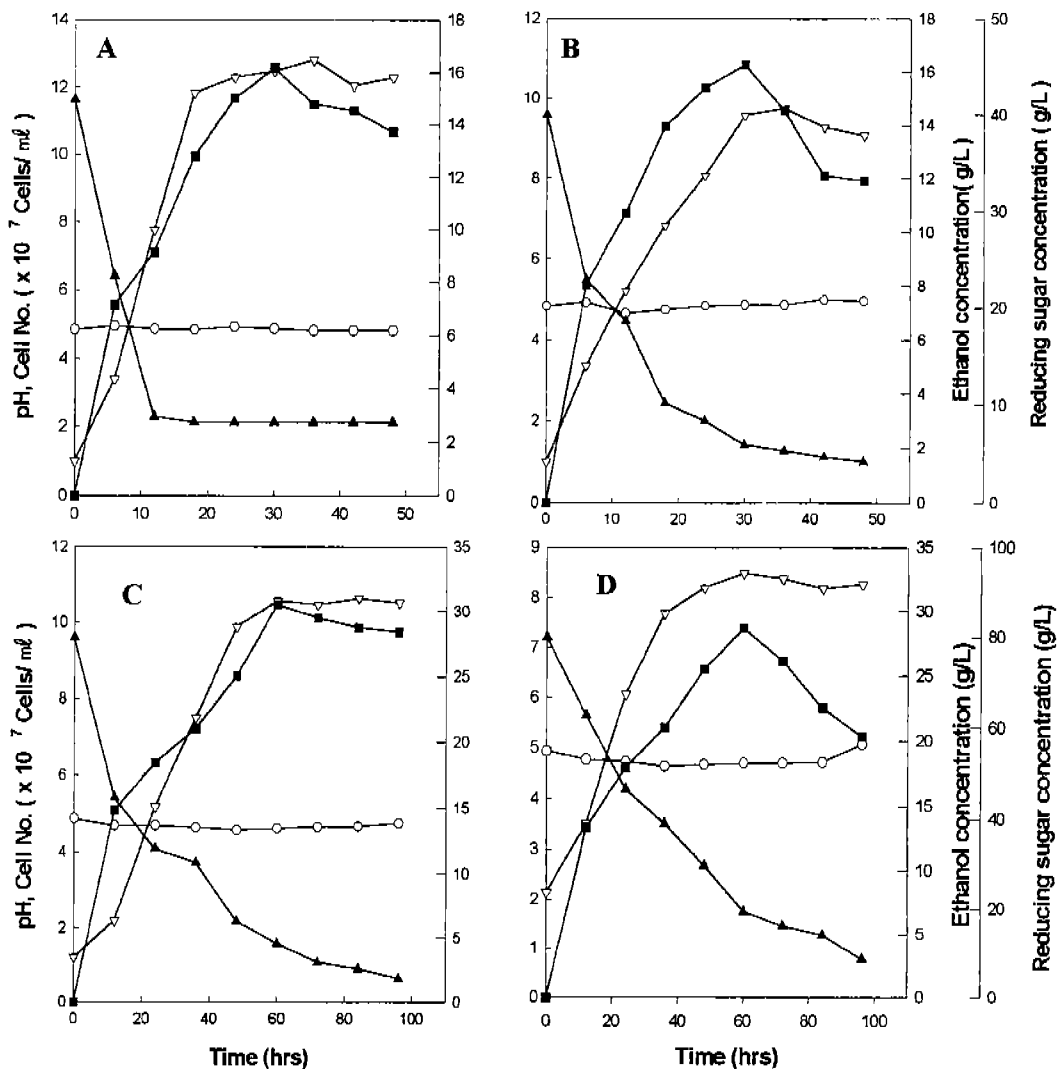


Fig. 1. Ethanol fermentation from mixed sugar by H1-39 mutant at different temperature.
 A: Cultivation was performed at 40°C in the fermentation broth supplemented with mixed sugars which contains 3% (w/v) glucose and 1% (w/v) cellobiose. B: Cultivation was performed at 43°C in the fermentation broth supplemented with mixed sugars which contains 3% (w/v) glucose and 1% (w/v) cellobiose. C: Cultivation was performed at 40°C in the fermentation broth supplemented with mixed sugars which contains 6% (w/v) glucose and 2% (w/v) cellobiose. D: Cultivation was performed at 43°C in the fermentation broth supplemented with mixed sugars which contains 6% (w/v) glucose and 2% (w/v) cellobiose. Symbols: ○, pH ∇, Cell No. ■, Ethanol; ▲, Reducing sugar.

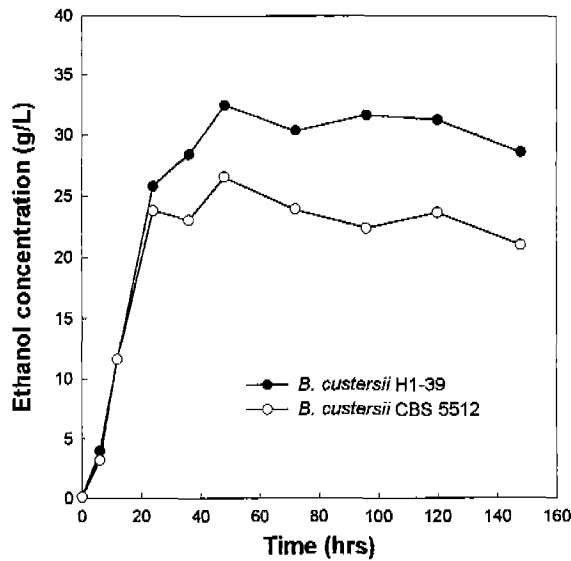


Fig. 2. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose by *B. custersii* CBS 5512 and its mutant H1-39.

Cultivation was performed at 40°C in the fermentation broth supplemented with 10% (w/v) cellulose.

서 H1-39 변이주의 에탄올 발효특성을 나타낸 것으로 발효후 30시간이 경과하여 최대 수율을 나타내 16.1 g/L 에탄올을 생산하였다. pH는 4.8 정도를 계속 유지하였으며, 세포농도는 18시간정도 발효가 진행되면서 1.19×10^8 /ml 정도로 증가하다가 정체기에 도달하였다. 최대 세포농도는 1.29×10^8 /ml 정도로 30°C에 비해 20-25% 정도밖에 되지 않는것으로 고온에서 세포의 성장이 억제됨을 알 수 있었다. 혼합당은 12시간 경과후 거의 다 소모되었다.

Fig. 1-B는 동일배지를 이용하여 43°C에서 에탄올 발효한 결과로 세포농도가 30시간 발효경과후 0.98×10^8 /ml 정도로 40°C 보다 다소 감소하였으며, 세포성장속도도 현저하게 감소하였다. 30시간이 경과후 에탄올 16.1 g/L 를 생산하여 40°C와 거의 차이가 없었다. 발효후 18시간이 경과할 때 기질소모속도가 컸으며, 그후 완만하게 소모되다가 36시간 경과후 거의 소모되지 않아 0.5% 정도의 잔당이 발효되지 않고 남았다.

Fig. 1-C는 8% 혼합당을 탄소원으로 40°C에서 에탄올 발효를 한것으로 발효 60시간 경과후 30.8 g/L 에탄올을 생산하였고, 55시간 경과후 세포 농도는 1.06×10^8 /ml로 성장속도가 늦어졌다. 60시간이 경과 할 때까지 기질이 거의 소모되고 최종적으로 0.5% 잔당이 소모되지 않고 남았다.

Fig. 1-D는 동일배지에서 43°C에서 발효한 것으로 세포농도가 0.85×10^8 /ml 정도로 낮았으며, 30.6 g/L 에탄올을 생산하였다. 소모되지 않은 잔당은 1% 정도였다. 40°C와 비교하여 수율은 거의 비슷하였고 다만 잔당이

다소 많이 남았고, 세포농도가 낮았다.

이러한 결과로부터 H1-39변이주가 40°C 및 43°C에서 뛰어난 에탄올 생산을 나타냄을 알 수 있었다.

Cellulose를 이용한 동시당화발효

Fig. 2는 10%(w/v) cellulose를 탄소원으로 사용하여 40°C에서 동시당화발효를 하였을 때 원균주인 *B. custersii* CBS 5512와 H1-39변이주의 에탄올 생산을 비교한 것으로, H1-39변이주가 48시간 발효후에 32.5 g/L의 가장 높은 에탄올을 생산하였고, 이것은 원 균주의 26.5 g/L보다 약 23%정도 증가한 것이다. 이같은 결과는 Spindler 등[10]의 보고와 비교하여 에탄올 생산량은 비슷하나, 발효 72시간 경과 후에 최대 에탄올을 생산하는 Spindler 등의 보고와는 달리 본 연구에서는 이보다 빠른 48시간만에 최대 에탄올을 생산함을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 고온내성을 지니는 glucose-cellobiose 발효균주인 *Brettanomyces custersii* CBS 5512를 UV, NTG 등으로 돌연변이시켜 40°C 이상의 고온에서 발효력을 향상시키는데 목적이 있다. 총 7510 변이주에서 5차에 걸쳐 고온에서의 성장 및 발효력의 우수여부에 따라 H1-55, H1-23, H1-39, H3-63 변이주를 선별하였다. H1-39와 H1-23변이주는 4%, 8% 혼합당을 기질로 40°C 이상에서 이론수율의 70%정도를 상회하는 에탄올 수율을 보여 원균주보다 5-11%정도 향상되었다. 특히 H1-39는 4%의 혼합당을 기질로 사용하였을 때 40°C에서 이론수율의 78.5%, 43°C에서 75.2%를 보여 다른 변이주보다 우수함을 보였고, 8%의 혼합당을 기질로 사용하였을 때도, 40°C에서 이론적 수율의 75.2%, 43°C에서 70.2%를 보여 다른 변이주보다 뛰어난 것을 알 수 있었다. cellulose를 탄소원으로 사용하여 40°C에서 동시당화발효를 하였을 때 H1-39변이주는 48시간 발효후에 100 g/L cellulose로부터 32.5 g/L의 에탄올을 생산하였고, 이것은 원 균주의 26.5 g/L 보다 약 23%정도 증가한 것이다.

감사의 말

본 연구는 고려대학교 교내 특별연구비 및 에너지자원 기술개발 지원센터의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

- Bernet, E. and I. Gutmann. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD, pp. 1499-1502. In H. U. Bergmeyer(ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*,

3. Academic Press, New York.
2. Freer, S. N. and R. W. Detroy. 1983. Characterization of cellobiose fermentation to ethanol by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 541–557.
3. Gonde, P., B. Blondin, R. Ratamahenina, A. Arnaud, and P. Galzy. 1982. Selection of yeast strains for cellobiose alcoholic fermentation. *J. Ferment. Technol.* **60**: 579–584.
4. Hacking, A. J., I. W. F. Taylor, and C. M. Hanas. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 361–363.
5. Lodder, J. 1970. *The Yeast*, 2nd ed. North Holland, Amsterdam.
6. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426–428.
7. Slapack, G. E., I. Russel, and S. G. G. Stewart. 1987. *Boca Raton-FI*. CRC Press.
8. Sohn, H., Y., W. Park, and I. N. Jin. 1994. The fermentation characteristics of newly selected thermotolerant yeasts at high temperature. *J. Kor. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 222–229.
9. Spindler, D. D., E. W. Charles, M. Ali, and G. Karel. 1988. Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **10**: 279–293.
10. Spindler, D. D., W. Charles, K. Grohmann, and G. P. Philippidis. 1992. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Letts.* **14**: 403–407.
11. Takagi, M., S. Abe, S. Suzuki, G. H. Emert, and N. Yata. 1977. Symposium of bioconversion of cellulose substances in energy. *Chemicals and Microbial Protein, III*. Delhi, India 551.
12. Walsh, R. M. and P. A. Martin. 1977. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brewing.* **83**: 169–172.
13. Yamamura, M., K. Takes, and T. Kanihare. 1991. *Saccharomyces* yeast cells gram at elevated temperatures are susceptible to autolysis. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2861–2864.

(Received January 2, 1999)