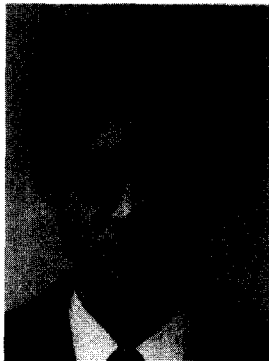


# 자일로스를 이용한 에탄올 생산 기술



서진호

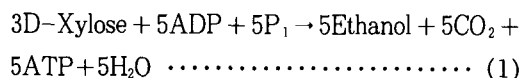
<서울대학교 식품공학과 교수>

## 1. 서론

D-xylose는 섬유소자원의 약 30%를 차지하는 hemicellulose의 주성분으로, 섬유소자원에 존재하는 당질 중 포도당 다음으로 풍부한 5탄당이다(1). Hemicellulose의 산 가수분해에 의하여 Xylose는 80~85% 수율로 얻을 수 있다(2). 섬유소 자원은 재생가능한 자원이므로 이를 이용한 에탄올 생산기술 개발에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 기술적인 문제점은 Xylose가 전통적으로 에탄올 발효에 사용해 온 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해서 에탄올로 전환될 수 없다는 것이다(3).

미생물에 의한 Xylose 발효의 첫 단계는 Xylulose로 전환시키는 것이다(4)(Fig. 1). 박테리아의 경우 자일로스 이성화효소(Xylose isomerase)에 의하여 Xylose를 이성화 시켜 Xylulose를 생성한다(5). 반면 균류나 효모는 Xylose reductase에 의하여 Xylose를 Xylitol로 환원시킨 후 Xylitol dehydrogenase에 의하여 Xylulose로 산화시킨다. 생성된 Xylulose는 박테리아, 효모 모두 Xylulose-5-phosphate로 인산화되며(6, 7), Xylulose-5-phosphate는 Pentoses 대사 과정인 Embden-Meyerhof-Parnas(EMP) 대사과정을 거쳐 최종적으로 에탄올로 전환된다(8). *S. cerevisiae*는 Xylose를 Xylulose로 이성화시킬 수 있는 대사 능력이 없어 이용할 수 없다. 그러나 생성된 Xylose의 이성체인 Xylulose는 에탄올로 전환시킬 수 있다.

Xylose로부터 에탄올 생성에 대한 Stoichiometry는 식 (1)에 나타나 있듯이 3mol의 Xylose로부터 5mol의 에탄올이 생성되며, 이론적인 에탄올 수율은 0.511g 에탄올/g Xylose이다. 이값은 포도당 발효의 수율과 비슷하다(1).



### ■ 목 차 ■

- 1. 서론
- 2. 실험재료 및 방법
- 3. 결과 및 고찰

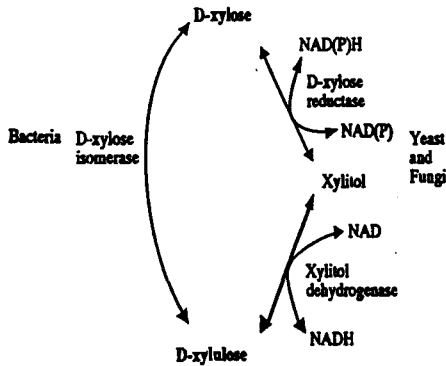


Fig. 1 Conversion of D-xylose to D-xylulose

그러나 지금까지 문헌에 발표된 실제 수율은 이 른값의 80~90% 정도이다. 이는 Xylose가 균체 생산이나 Xylitol 생성에 이용되기 때문이다(1).

효모 중 *Pichia stipitis*(9), *Candida shehatae* (10), *Pachysolen tannophilus*(11, 12) 등이 Xylose를 에탄올로 직접 발효시킬 수 있지만 발효속도와 에탄올 수율이 낮은 편이다(1). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 유전공학 기술을 이용한 새로운 균주개발에 대한 연구가 수행되어 왔다. *Zymomonas mobilis*의 Pyruvate decarboxylase효소의 구조 유전자인 *pcd*유전자와 Alcohol dehydrogenase 유전자인 *adh*를 동시에 대장균에 형질전환시켰다. 개발된 재조합 대장균은 8% Xylose를 함유한 배지에서 36g/l의 에탄올을 생성하여 에탄올 수율 0.45g/g을 얻었다(13, 14). 그러나 대규모 발효공정에서의 재조합 균주의 불안정성을 해결해야 하는 문제점을 지니고 있다.

본 연구에서는 *P. stipitis*에 의한 Xylose의 직접 에탄올 발효공정과 *S. cerevisiae*와 고정화 Xylose isomerase를 이용한 2단계 발효공정의 특성을 조사하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 균 주

본 실험에서 사용한 균주는 *S. cerevisiae* ATCC 3967와 *P. stipitis* CBS 5776이다. 배지의 조성은 Yease extract 5g/l, Bacto peptone 10g/l 이고 탄소원은 Xylose 또는 Xylulose를 실험조건에 따라 다른 농도를 사용하였다.

### 분석 방법

시료의 전처리에는 발효중 채취된 시료를 -70°C 냉동고에 보관하였다가 분석시 원심분리하여 그중 상정액을 20μm Filter를 통과시켜 여과액을 분석에 이용하였다. Xylose의 정량은 DNS 방법을 사용하여 측정하였으며 Xylulose 농도는 Biorad HPX-87C Aminex columns을 이용하여 HPLC로 분석하였다. 에탄올은 Propack Q column이 부착된 Gas chromatography를 이용하였다. Injector, Column, Detector의 온도는 각각 200°C, 100°C, 200°C이었다. 담체 기체로 사용한 질소의 유속은 20ml/min이었다.

## 3. 결과 및 고찰

### A. *P. stipitis*에 의한 Xylose의 직접 에탄올 발효

Xylose 이용균주로는 *P. tannophilus*, *C. shehatae* 등이 있으나 이들보다 *P. stipitis*가 에탄올 발효성능이 뛰어났으며 특히 *P. stipitis* CBS 5776이 에탄올 수율면에서 우수하였다. *P. stipitis*가 에탄올 발효성능이 뛰어났으며 특히 *P. stipitis*에 의한 에탄올 발효는 혐기적 조건에서 일어나지만, Xylose의 이용에는 미량의 산소가 전자수용체로 작용한다(15). 배지의 용존산소는 Redox balance에 관여하여(10, 15, 16) Xylose의 초기 대사속도를 촉진

시킴으로 Xylose 발효에는 최적의 용존 산소 농도가 존재한다(10, 15, 17, 18). 발효과정 중의 통기 조절은 0.05VVM이고 300rpm으로 교반하였고, 초기 pH는 5.0으로 조절하였다.

### 발효 온도의 영향

발효 온도를 25°C, 30°C 및 35°C로 변화하면서 에탄올 발효를 수행하였다. 실험결과는 Fig. 2에 나타내었다. 세포의 성장속도는 온도 증가에 따라 증가하여 비성장속도는 35°C에서 0.16hr<sup>-1</sup>으로 최대값을 나타낸 반면, 최대 세포농도는 25°C와 30°C에서 동일하게 1.3×10<sup>9</sup> cell/ml로 나타났다. 발효 온도에 따른 에탄올 생성에 있어서도 발효 온도 증가에 따라 에탄올 생산성, 농도 및 수율은 30°C까지 증가하여 30°C에서 각각 최대값에 도달한 후 온도 증가에 따라 감소하였다. 이러한 결과는 *P. stipitis*가 30°C에서 최대 발효 속도를 가지며, 30°C 이상에서는 에탄올 생성속도와 에탄올 수율이 급격히 감소하는 반면, Xylitol생성이 증가한다는 보고와 일치하였다(19). 본 실험결과에서도 온도 증가에 따라 Xylitol의 최대 생성량이 증가함을 보여주었다.

### Xylose농도에 대한 영향

발효조건은 30°C에서 0.55VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 알콜발효를 수행하였으며, 발효배지의 초기 pH는 5.0이었다. Xylose의 농도는 50g/l, 100g/l 및 150g/l에서 실험을 수행하였다. 각각의 Xylose 농도에 대한 실험결과를 Table 1에 나타내었다. Xylose 농도 50g/l에서의 최대 비성장속도는 0.17hr<sup>-1</sup>로 가장 높았으며 세포성장은 5일간 발효시까지 계속 증가하여 최대 세포농도는 2.0×10<sup>9</sup>cells/ml이 되었다. 반면 에탄올 생성은 25시간 발효시에 최대 에탄올 농도가 19.5g/l였으며, 이때의 에탄올 생산성은 0.79g/l-hr로 가장 높았다. 에탄올 수율은 0.40g 에탄

올/g Xylose로 이론값의 78%였다. 그러나 24시간 발효이후 부터는 에탄올 농도가 계속적으로 감소한 반면 세포성장은 5일까지 계속되었는데, 이는 배지 내의 당농도가 1.2g/l 정도밖에 존재하지 않는 반면, 낮은 에탄올 농도이면서 산소가 존재하여 *P. stipitis*는 자신이 생성한 에탄올을 이용하면서 세포 성장을 계속하기 때문인 것으로 추측된다. 반면 기질농도가 100g/l에서는 보고된 바와 같이(20) 에탄올 농도와 생성속도가 가장 높았으며, 150g/l 이상에서는 세포성장 및 에탄올 생성이 매우 저조하였다. 또한 Xylitol의 최대 생성 농도는 기질의 농도가 증가함에 따라 함께 증가함을 보여주었다. 이러한 결과는 *P. stipitis*가 높은 기질 농도에서 세포성장이 억제를 받을 뿐만 아니라 기질 농도 증가에 의하여 Xylitol의 생성이 증가되기 때문이라는 보고와도 일치한다.(19) 따라서 *P. stipitis* CBS 5776에 의한 Xylose의 최적 발효조건은 초기 pH가 5.0이고 기질 농도 100g/l인 배지에서 0.05VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 알콜 발효를 수행하는 것이다.

### B. *S. cerevisiae*와 Xylose isomerase( X I )

#### 효소를 이용한 Xylose의 2단계 에탄올 발효

*S. cerevisiae*는 Xylose를 Xylulose로 전환시킬 수 없기 때문에 Xylose를 직접 이용할 수 없다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 2단계 공정에 대한 연구를 수행하였다. 즉, 고정화된 Xylose isomerase에 의해 Xylose를 Xylulose로 이성화시킨 후 이성화된 Xylulose를 *S. cerevisiae*에 의해 에탄올로 발효시키는 것이다.

#### Xylose로부터 Xylulose의 제조

Xylose를 Xylulose로 전환시키기 위하여 NOV-O 제품의 Sweetzyme<sup>®</sup> Type Q Xylose isomerase (265 IGIC/g)을 이용하였다. Xylose isomerase

를 충전시킨 Column을 Water jacket을 사용하여 60°C로 유지시키면서 pH 8.0으로 조정된 Xylose 용액을 통과시켰다. 이때 Xylose isomerase의 Co-factor로서  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 1g/ℓ로 첨가하였다. 효소반응기를 통과한 당액의 조성은 약 23%의 Xylose가 Xylulose로 전환되는 것으로 밝혀졌다. 이 값은 60°C에서의 평형값에 해당한다.  $K_i$ 는 가역적 특성을 지니므로 더이상의 시간이 경과되어도 Xylose의 전환율은 변화가 없었다.

### Xylulose 농도별 에탄올 생산 특성

초기 Xylulose 농도를 1.8g/ℓ에서 16.2g/ℓ까지 변화시키면서 최대 성장속도, 에탄올 수율 및 최대 에탄올 농도를 측정하여 Table 2에 정리하였다. 대수증식기에서 최대 비성장속도는 Xylulose 농도 5-9g/ℓ 사이에서 최대값인  $0.087hr^{-1}$ 를 보였고 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 이는 효소 반응기를 거친 Xylose/Xylulose 혼합액 중 반응하지 않은 다량의 Xylose가 세포배양을 저해하는 것으로 추정된다. 그러나 최대 세포농도는 Xylulose 농도에 따라 증가하였다.(Table 2 참조). Fig. 3에서와 같이 에탄올 생성효율은 Xylulose 농도가 증가함에 따라 향상되었고, 최대에탄올 농도도 Xylulose 농도에 비례하였다. 높은 Xylose 농도에서 세포증식은 높은 농도의 Xylose에 의해 저해된 반면 에탄올 농도는 계속 증가하였기 때문에 상대적으로 에탄올 수율의 향상이 두드러졌다. 초기 Xylulose 농도가 16.2g/ℓ 일때의 최대 에탄올 농도는 8g/ℓ로 증가하였으며 그 결과 에탄올 수율은 이론값의 90% 이상인 0.494g EtOH/g Xylulose를 얻었다.

## 요 약

농산폐자원에 대량으로 함유된 섬유소자원을 경제적으로 활용하기 위해서는 6탄당은 물론 5탄당을 효율적으로 에탄올로 전환시켜야 한다. Xylose를 이용한 에탄올 생산기술을 개발하기 위해서 Xylose 직접발효공정과 Xylose isomerase와 *S. ce-*

*revisiae*를 사용한 2단계 발효공정에 대한 연구를 수행하였다.

*P. stipitis* CBS 5776을 에탄올 발효균주로 사용하여 Xylose의 최적 알콜발효조건을 결정하였다. 최적 세포성장 및 최대 Ethanol 생성은 초기 pH가 5.0인 100g/ℓ의 Xylose배지를 이용하여 30°C에서 0.05VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하는 발효조건에서 얻을 수 있었다. 이러한 최적 발효조건에서의 최대 비성장 속도와 최대 세포농도는 각각  $0.14hr^{-1}$ 와  $1.3 \times 10^9$  cells/ℓ이었다. 또한 최대 Ethanol농도는 72시간 발효시에 100g/ℓ의 Xylose중에서 96%를 이용하여 40.2g/ℓ을 얻었으며, 이때의 단위부피당 Ethanol 생산성은 0.56g/ℓ-hr이고 Ethanol수율은 0.42g Ethanol/g Xylose로서 이론수율의 82%였다.

Xylose의 이성체인 Xylulose를 이용한 에탄올 발효를 실시하였다. Xylulose로부터 에탄올 생산의 최적조건을 찾기위해 Xylulose의 농도, 발효 온도 등을 변화 시켜가면서 발효양상을 고찰하였다. 비성장속도는 Xylulose농도 5g/ℓ에서 최대값인  $0.087hr^{-1}$ 를 보여주었으며, 에탄올 생성 수율은 Xylulose 농도에 비례하여 증가하여 Xylulose 농도 16g/ℓ에서는 이론수율의 90%에 해당하는 0.49g EtOH/g Xylulose를 얻었다.

Table 1 The fermentation kinetic parameters of *P. stipitis* CBS 5776 under various xylose concentrations.

Xylose Conc.	$\mu_{max}$	$X_m$	P	$P_m$	$Y_{p/s}$	$Xyl_{(m)}$
50g/L	0.17	20.0	0.79	19.5	0.40	1.6
100g/L	0.14	13.0	0.56	40.2	0.42	4.5
150g/L	0.09	7.5	0.16	19.7	0.35	6.1

$\mu_{max}$ : Maximum specific growth rate( $hr^{-1}$ )

$X_m$ : Maximum cell concentration( $\times 10^8$  cell/ml)

P : Overall ethanol productivity(g/ ℓ -hr)  
 P<sub>m</sub> : Maximum ethanol concentration(g/ ℓ )  
 Y<sub>p/s</sub> : Ethanol yield(g ethanol/g xylose consumed)  
 Xyl<sub>(m)</sub> : Maximum xylitol concentration(g/ ℓ )

Table 2. Specific growth rate and ethanol yield as a function of initial xylulose concentrations.

Initial xylulose concentration (g/ ℓ )	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	Maximum cell density (OD600)	Ethanol yield (g/g)	Maximum ethanol concentration (g/ ℓ )
1.83	0.041	7.01	0.128	0.24
4.48	0.087	11.20	0.101	0.45
8.50	0.084	16.50	0.370	3.05
12.20	0.065	20.00	0.432	5.28
16.20	0.050	18.80	0.494	8.00

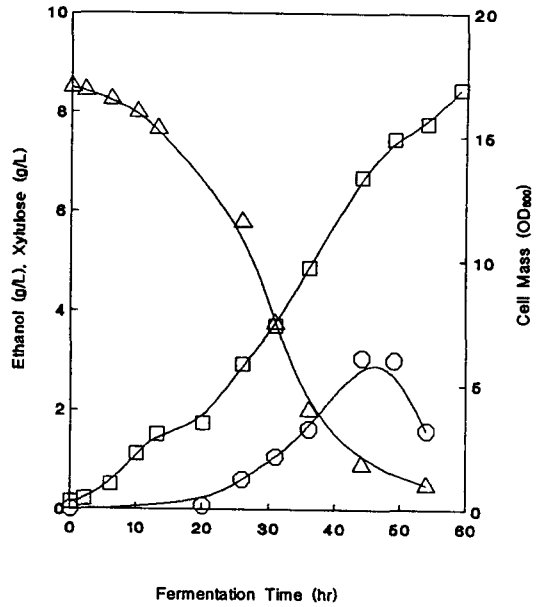


Fig. 3 Time dependence of cell mass(□) and concentrations of ethanol(○) and xylulose(△) at 30°C, and pH 6.3 initial xylulose concentration : 8.5g/ ℓ

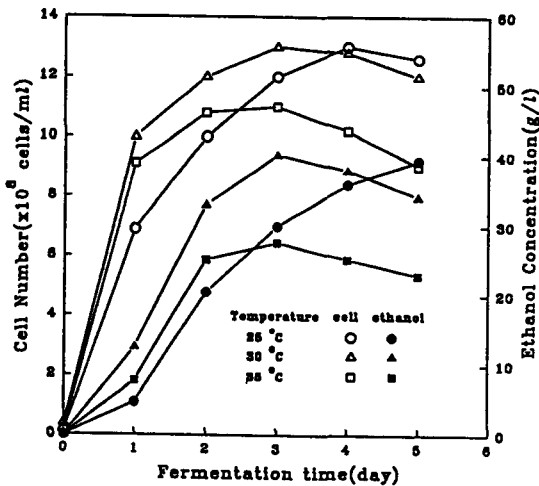


Fig. 2 The cell growth and ethanol production during the batch fermentation of 100g/ ℓ xylose by *P. stipitis* under various fermentation temperatures.

참고문헌

- Enari, T. M. and M. L. Suihko, "Ethanol production of pentose and hexoses from cellulosic materials." *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, 1 (3),229-240(1984)
- Harris, J. F., H. E. Scott, E. L. Springer and T. H. Wenger, in "*Progress in Biomass Conversion*", Academic Press, New York, Vol. 4(1983)
- Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow, *A guide to identifying and classifying yeasts*, Cambridge Univ. Press, Lon-

- don(1979)
4. Jeffries, T. W. "Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi." *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*, 27, 1-32(1983)
  5. Gong, C. S., "Recent advances in D-Xylose conversion by yeasts" in "Annual Reports on Fermentation Processes"(G. T. Tsao ed), Academic Press, Vol. 6, 253-297(1983)
  6. Chiang, C. and S. G. Knight "Metabolism of D-Xylose by moulds." *Nature*, 188, 79(1960)
  7. Hoffer, M., A. Betz and A. Kotyk *Biochem, Biophys, Acta.*, 252, 1(1971)
  8. Gong, C. S., L. F. Chen, M. C. Flickinger, L. C. Chiang and G. T. Tsao, "Production of ethanol from D-Xylose isomerase and yeasts." *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 430-436(1981)
  9. Dellweg, H., M. Rizzi, H. Methner and D. Debus, "Xylose fermentation by yeasts." *Biotechnol. Lett.*, 6, 395-400(1984)
  10. du Preez, J. C. and J. P. van der Walt, "Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida tropicalis*." *Biotechnol. Lett.*, 5, 357-362(1983)
  11. Schneider, H., P. Y. Wang, Y. K. Chan and R. Maleszka, "Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*." *Biotechnol Lett.*, 3, 89-92 (1981)
  12. Slilinger, P. J., R. J. Bothast, J. E. Van Cauwenberge and C. P. Kurtzman, "Conversion of D-xylose to ethanol by the *Pachysolen tannophilus*." *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 371-384(1982)
  13. Ingram, L. O., Conway, T., Alterthum, F. "Ethanol Production by *Escherichia coli* Strains coexpressing *Zymomonas P-DC* and *ADH* Genes." *United States Patent* N. 5,000,000.(1991)
  14. Ingram, L. O., Conway, T. "Expression of Different Levels of Ethanologenic Enzymes from *Zymomonas mobilis* in Recombinant Strains of *Escherichia coli*." *Appl. and Environ. Microbiol.* 54, 396-404(1988)
  15. Bruinenberg, P. M., P. H. M. de Bot, J. B. van Dijken and W. A. Scheffers. "N-ADH-linked aldose reductase : the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts." *Appl. Microbiol. biotechnol.*, 19, 256-260(1984)
  16. du Preez, J. C., B. A. Prior and A. M. T. Montero, "The effect of aeration on xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilyus*." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 261-266(1984)
  17. Lightem, M. E., B. A. Prior and J. C. du Preez. "The oxygen requirement of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol." *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 63-68(1988)
  18. Delgenes, J. P., R. Moletta and J. M. Navarro, "The effect of aeration on D-xylose fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluveromyces marxianus* and *Candida shehatae*." *Biotechnol. Lett.*, 8, 897-900(1986)
  19. J. C. du Preez, M. Bosch and B. A. Prior. "The fermentation of Hexose and Pentose Sugars by *Candida shehatae* and

*Pichia stipitis.*" *Appl. Microbiot. Biotec-  
hno.*, 23, 228-233(1986)  
20. B. A. Prior, S. G. Kilian and K. C. du  
Preez. "Fermentation of D-xylose by the

Yeasts *Candida shehatae* and *Pichia  
stipitis.*" *Process Biochemistry*(Feb.), 21-  
32,(1989)

肝受病則目不能視，腎受病則耳不能聽，病受於人所不見，  
心發於人所共見。故君子欲無得罪於昭昭，先無得罪於冥冥。

간에 병이 들면 눈이 보지 못하고, 콩팥에 병이 들면 귀가  
듣지 못한다. 병은 남들이 보지 못하는 곳에 들지만, 반드시  
남들이 보는 곳에 나타나는 법이다. 그러므로, 군자가 밝은  
곳에서 죄를 얻지 않으려면, 모름지기 어두운 곳에서도 죄를  
짓지 말아야 한다.

— 菜根譚중에서 —