

1. 서 론

돌연변이에 의한 GLUCOSE- CELLOBIOSE 동시발효 우수균주의 개발



김 승 욱

〈수원대학교 유전공학과 교수〉

홍 영 기

〈수원대학교 유전공학과 석사과정〉

■ 目 次 ■

1. 서 론
2. 실험재료 및 방법
3. 결과 및 고찰
4. 결 론
5. 참고문헌

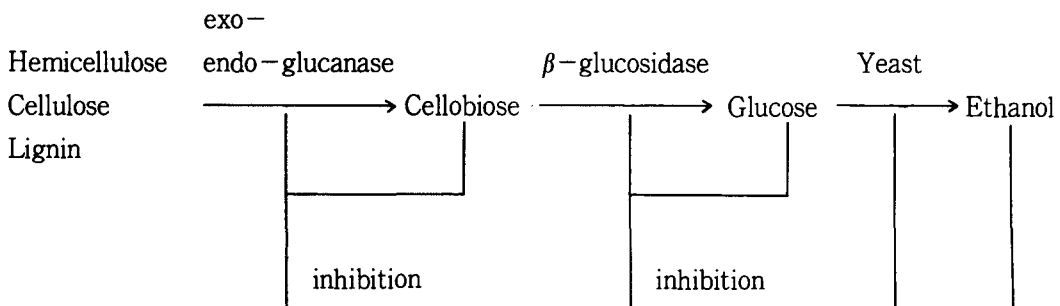
섬유소 물질을 기질로 이용하여 에탄올 발효를 하는 공정중 하나인 동시당화발효공정은 Takagi 등(1977)에 의해 처음 연구되었는데, 당화공정과 발효공정을 동시에 수행함으로써 기존의 분리당화 발효공정에 비해 한개의 반응기만 필요하기 때문에 설비비용이 절감된다. 그리고 당화효소의 억제제인 Glucose가 발효균주에 의해 생성되자마자 소모되므로 전체공정에 필요한 비용의 25%를 차지하는 당화효소의 투입량을 감소시킬 수 있어 공정의 생산성을 향상시킬 수 있다. 또한 고온에서 운용되므로 부수적인 장점으로 오염의 가능성 감소 및 냉각비의 절감효과를 가져올 수 있다. 그러나 일반적인 에탄올 발효균주의 최적 성장온도는 30~35℃인데 반해 Cellulase 복합효소의 최적반응 온도는 45~50℃ 정도이기 때문에 당화효소의 투입량을 감소시켜 생산성을 향상시키기 위해서는 고온내성 균주를 선별 및 개발하여 동시당화발효공정에 적용시켜야 한다.

에탄올 발효산업에서 주로 이용된 균주로 *Sacchromyces* sp., *Schizosaccharomyces pomb*와 *Kluyveromyces* sp. 등의 효모가 있는데, 이중 *Saccharomyces cerevisiae*는 에탄올 생산성이 높아 가장 많이 이용되어 왔다. 그러나 *Saccharomyces cerevisiae*는 28~35℃에서는 정상적으로 성장을 하고 발효력도 높으나 40℃에서는 거의 성장을 할 수 없는 것으로 알려졌는데 (Walsh and Martin, 1977), 이 균주가 내열성이 약한 것은 40℃정도의 고온에서 Autolysis가 되기 때문이다(Yamanura et al., 1991). 이들에 의하면 특히 40℃이상의 고온에서 온도가 증가함에 따라 Autolysis는 더욱 잘 일어난다고 한다. 이러한 결과를 볼때 결국 기존의 에탄올 발효에 이용되어 왔던 균주는 동시당화발효공정에 적용하는데에는 부적절하다 할 수 있다.

현재까지 연구된 결과에 의하면 동시당화발효 공정의 최적온도는 37℃인데(Takagi et al., 1977; Ghose et al., 1982; Spindler et al., 1988), 이 온도는 여전히 당화효소의 최적반응 온도에는 못미치는 것으로 Cellulose에 대한 Glucose수율이 낮은 수준이다. 이러한 관점에서 40℃이상의 고온에서 내성을 가지고 있는 균주의 선별 및 개발이 중요하다 할 수 있다. 에탄올 발효에서 세포의 성장이 발효보다는 온도에 더 영향을 받는 것으로 알려져 있어(Slapack et al., 1987), 일반적으로 고온내성 균주의 선별은 1차적으로 고온에서 정상적인 성장을 하는지의 여부로 결정한다. 기존의 대표적인 고온내성 균주로 *Kluyveromyces* sp.가 주종을 이루는데 이 균주는 *S. cerevisiae* 보다는 다소 발효력이 낮은 것으로 알려졌다(Hacking et al., 1984). Hacking 등(1984)은 55 효모균주중 40℃에서 Glucose를 기질로 에탄올 수율이 높은(90% 이상) 고온내성 균주로 *Saccharomyces uvarum* YSa85, *S. cerevisiae* YSa86, *Candida pseudotropicalis* YSa9를 선별하였다. Szczo dark 등(1987)은 58주의 효모를 고온에서 standard Durham tube 방법을 이용하여 발효력이 우수한 균주로 *Fabospora fragilit* CCY51-1-1과 *K. fragilis* FT23을 선별하였는데, 이균주들은 43℃에서 13% Glucose를 기질로 78정도의 이론수율을 나타냈다. 또한,

Spindler 등(1988)은 37~47℃에서 Glucose를 기질로 에탄올 발효를 할 수 있는 균주로 *S. cerevisiae* SERI D5A, *S. uvarum*, *C. acidothermophilum*, *C. brassicae*, *C. lusitaniae*를 선별하여 Sigmacell-50 cellulose를 기질로 이용한 동시당화발효공정에서 높은 에탄올 수율을 얻어냈다. Ballesteros 등(1991)도 5% Glucose를 기질로 42℃에서 에탄올 발효력이 우수한 고온내성 균주로 *C. lusitaniae* 1799, *K. marxianus* L.G., *K. fragilis* 2671, *K. fragilis* L.G., *K. veronae* 1853 균주를 선별하였고, 이중 *K. marxianus* L.G와 *K. fragilis* 2671은 43℃에서도 높은 에탄올 수율을 나타냈다. 국내에서는 손 등(1994)이 토양에서 고온내성균주로 *S. cerevisiae*에 속하는 RA-74-2와 *Kmarxianus*이 속하는 RA-912를 분리해 냈고, 이들 균주를 40℃에서 통기를 해줌으로써 에탄올 생산성을 2배 정도 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 당화과정중 생성되는 중간물질인 Cellobiose가 Cellobiohydrolase의 강력한 억제제로 작용하기 때문이다[그림 1].



[그림 1] 동시당화발효공정에서 최종 생산물의 억제기작

Cellobiose 농도 0.01% 이하만으로도 Cellobi-
 hydrolase 기능의 80%정도를 억제할 수 있어
 (Wood, 1980), Cellobiose의 축적은 당화효소의
 투입량의 증가 및 β -glucosidase의 첨가가 따르
 게 되어 운영비용의 증가를 가져와 생산성을 낮추
 게 된다. 동시당화발효공정에서 이러한 Cellobi-
 ose의 축적은 Cellulase 복합요중 β -glucosidase
 활성도가 낮기 때문이다. Cellobiose를 섭취할 수
 있는 균주는 많이 알려져 왔는데, 발효를 할 수
 있는 균주로는 *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera*
 등이 많이 연구되었다(Lodder, 1970). 그러나
 이러한 균주들은 에탄올 수율과 내열성이 낮기 때
 문에 동시당화발효공정에 직접 이용할 수 없고,
 돌연변이등을 통하여 균주를 개량해야 한다.
 Blondin 등(1982)은 *Dekkera intermedia*를 이용
 하여 28℃에서 18% Cellobiose기질로한 에탄올
 발효에서 80 정도의 이론수율을 얻어냈고, 통기
 를 해줌으로서 발효속도를 빠르게 하였다. Gon-
 de등(1982)은 28℃, 12% Cellobiose를 기질로
 에탄올 발효력이 우수한 균주로 *B. custersii* CBS
 5512와 *B. intermedius* CBS73를 선별하였고,
 Freer 등(1983)은 28주의 Glucose-cellobiose
 동시발효 효모중 Cellobiose 초기발효 속도가 우
 수한 균주로 *C. lusitanae* NRRL Y-5394와 *C.*
wickerhamii NRRL Y-2563을 선별하였다.
 Wyman 등(1986)은 β -glucosidase활성도가
 낮은 조건에서 동시당화발효공정을 수행하여 *S.*
*cerevisiae*보다 *B. clausenii*를 이용하여 더 높은 에
 탄올 수율을 얻어냈고, 두균주를 혼합배양했을때
 각각 순수배양에서 보다 높은 에탄올 수율을 얻었
 다. Spindler등(1992)도 *B. custersii* CBS5512를
 이용하여 37℃에서 7.5% Cellulose로부터 32g/
 L의 에탄올(이론수율, 75)을 생산하였다.

앞에서 언급한 여러 연구자들의 연구결과를 볼
 때 동시당화발효공정에서 Glucose만을 발효할
 수 있는 내열성 균주로 *Kluyveromyces*가 적당하

고, Glucose-cellobiose 동시발효균주로 *Bretta-*
*nomycetes*와 *Candida*가 가장 적당한데, 문제는 이
 러한 균주들의 에탄올 수율이 낮다는 것이다. 특
 히 혼합당 발효균주는 내열성이 상당히 약한 것으
 로 알려졌다.

본 연구에서는 동시당화발효공정에 적합한
 Glucose-cellobiose 혼합당 발효균주를 선별하여
 돌연변이를 유발시켜 40℃이상의 고온에서 발효
 력이 우수한 변이주를 개발하여 전체공정의 생산
 성을 향상시키는데 목적이 있다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 사용균주

Glucose-cellobiose 동시발효균주로 *Brettano-*
myces custersii CBS 5512가 사용되었고, 이 균주
 와 Glucose 발효력을 비교하기 위하여 Glucose
 발효균주로 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharo-*
myces uvarum 26602, *Kluyveromyces marxianus*
 IFO 0206가 이용되었다.

2.2 배지 및 발효

종균배지로는 YPD배지(2% dextrose, 2%,
 peptone, 2% yeast extract)를 사용하였다. 발
 효배지로 Glucose 및 Cellobiose, 그리고 두당을
 합친 혼합당의 농도를 변화시켜 이용하였다.
 Glucose는 4~18%, Cellobiose는 4~8%의 농
 도를 이용하였고, 혼합당은 4% glucose+2%
 cellobiose, 4% glucose+4% cellobiose, 8%
 glucose+2% cellobiose, 8% glucose+4%
 cellobiose가 이용되었다.

종균배지에서 Shaking incubator나 항온기를
 이용 30℃에서 1일간 배양시켜 활성화된 균을 발
 효배지에 1 loopful/ml로 접종하였고, 에탄올 발
 효는 다양한 발효배지와 다양한 온도에서 15ml
 cap tube에서 5ml working volume으로 정치배

양하였다.

2.3 분석방법

에탄올의 정량은 Bernet and Gutmann (1974)의 방법을 변형한 효소적방법을 이용하였다. 분석하고자 하는 시약을 적당하게 희석한 후 (0.01~0.06% w/v), Glycine buffer 및 ADH, β -NAD와 혼합한 후 반응혼합물(75mM sodium pyrophosphate, 21mM glycine, 75mM semicarbozide-HCl, 1.35mM β -NAD)을 37°C에서 25분간 반응시킨 후 생성된 NADH를 340nm에서 흡광도를 측정함으로써 에탄올의 농도를 측정하였다.

환원당의 정량은 환원당의 농도가 0.025~0.1%(w/v)이 되도록 적당하게 희석한 시료용액 1ml과 DNS용액 3ml을 혼합하여 100°C 항온수조에서 10분간 끓인 후 냉각시켜 10ml의 1차증류수를 첨가하여 분광광도계로 575nm에서 흡광도를 측정하는 Miller (1959) 방법을 이용하였다.

Glucose정량은 (주)영동제약의 포도당 측정용 시약 Glucose-E kit를 이용하였고, 시료내 Cellobiose의 농도는 환원당에서 Glucose 농도를 빼서 계산하였다.

균체량은 분광광도계로 570nm에서 측정하여 보정곡선에 의해 환산하여 건조중량을 얻었으며, 건조중량은 건조기에서 건조중량이 일정해질 때까지 75°C에서 건조한후 측정하였다.

2.4 UV 및 NTG에 의한 발효력이 우수한 변이주 선별

S. cerevisiae, *Saccharomyces sp.*, *S. uvarum*, *B. custersii* 균주에 100.32erg/mm²범위의 UV를 조사하여 사멸율이 95% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰고, 또한 NTG 농도를 50 μ g/ml로 하여 85분간 처리하여 사멸율이 97% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰다.

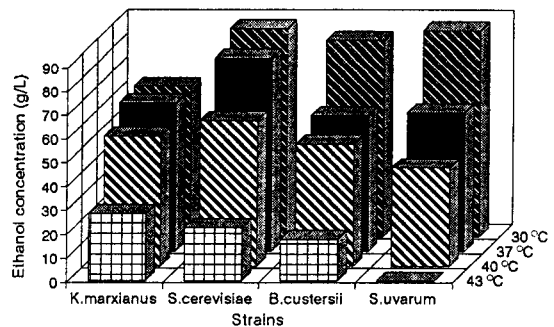
변이주들중 40°C에서 성장을 잘하는 것들을 3차과정에 걸쳐 선별한 후, Durham tube 방법을 이용 초기 발효속도를 측정하여 우수한 변이주를 선별한 후 18% Glucose를 기질로 에탄올 발효효율이 우수한 변이주를 선별하였다.

최종적으로 동시당화 발효공정에 적용될 수 있는 균주는 다양한 Glucose-cellobiose혼합당의 농도에 따른 에탄올 발효력을 조사하여 선별하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 다양한 균주의 Glucose발효력 조사

Glucose 발효력이 우수한 *S. cerevisiae*와 고온성균주인 *K. marxianus*, 응집력이 강한 *S. uvarum*, Glucose-cellobiose 혼합당 발효균주중 비교적 에탄올 생산성이 높은 *B. custersii*균주를 18% Glucose를 기질로 다양한 온도에서 에탄올 발효력을 조사하였다[그림 2],



[그림 2] 다양한 온도에서 18% Glucose를 이용하여 여러 효모들에 의해 생성된 에탄올 농도

전반적으로 온도가 상승하면서 발효력이 감소하는 양상을 보였고, 특히 43°C에서는 급격하게 감소하였다. *S. cerevisiae*가 발효력이 가장 우수

하였으며, *K. marxianus*는 저온에서는 발효력이 낮았지만 40℃이상의 고온에서는 상대적으로 발효력이 우수하였다. *B. custersii*는 *S. cerevisiae*보다는 다소 발효력이 떨어지지만 Glucose-cellobiose를 동시에 발효할 수 있는 능력을 감안한다면 동시당화발효공정에 적용될 가능성이 높다 하겠다.

3.2 고온내성을 지닌 우수 발효변이주의 선별

돌연변이를 유발시킨후 37℃, 2% Agar plate 상에서 Picking을 한 후 24시간 성장시켜 상대적으로 Clony 크기가 큰 변이주 3120주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 변이주를 동일배지에 Picking한 후 40℃에서 Colony가 크게 자란 변이주 173주를 2차 선별하였고, 성장이 잘된 Colony를 좀더 확연히 구분하기 위해 동일조건에서 2차 선별된 변이주를 Streaking하여 잘자란 변이주 46주를 3차 선별하였다. 이상에서와 같이 3차에 걸친 선별과정을 통해 40℃에서 상대적으로 성장이 잘되는 변이주를 선별하였다. 3차 선별된 변이주를 Durham tube 방법을 통하여 3.5% Glucose를 기질로 40℃에서 발효력을 조사하여 초기발효속도가 빠른 변이주 9주를 4차 선별하였다. 4차 선별된 변이주를 18% Glucose를 기질로 40℃에서 48시간 에탄올 발효를 시켜 효소적 방법을 통해 발효력을 조사하여 원균주보다 발효력이 향상된 H1-39, H1-62, H1-55, H1-23 변이주를 5차 선별하였다(표 1).

〈표 1〉 40℃에서 18% Glucose를 이용하여 변이주에 의해 생산된 에탄올 농도

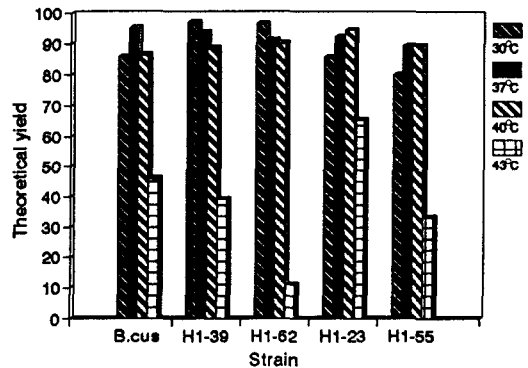
Strains	Fermentation time	
	Ethanol(g/L)	
	24h	48h
<i>B. custersii</i>	48	56
H1-39	44.2	60.2
H1-62	42.9	58
H1-55	38.8	60.2
H1-23	42.1	63

전반적으로 원균주보다 변이주가 초기 발효속도는 낮으나 48시간 경과후 발효력이 우수함을 보였다. 특히 H1-23 변이주는 63g/L의 에탄올을 생산하여 56g/L의 에탄올을 생산한 원균주 *B. custersii* 보다 발효력이 크게 향상되었다.

3.3 5차 선별된 *B. custersii* 변이주의 발효력 조사

3.3.1 Glucose를 기질로 했을때 발효력 조사

다양한 온도에서 4% Glucose를 기질로 *B. custersii*와 그 변이주인 H1-39, H1-62, H1-23, H1-55의 에탄올 발효력을 조사하였다(그림 3).

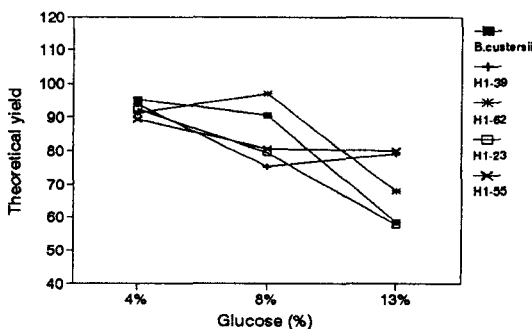


〔그림 3〕 다양한 온도에서 4% Glucose를 이용했을때 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이룬수율

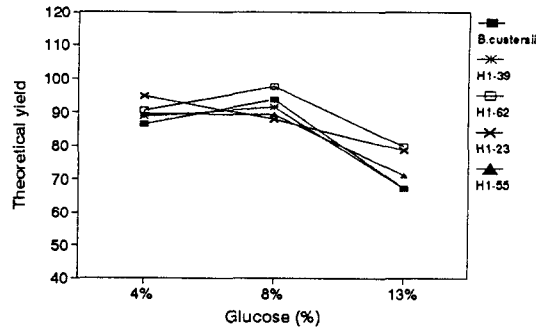
H1-39, H1-62 변이주는 30℃에서 이룬수율이 각각 96.96, 96.74로 원균주(이룬수율, 85.89)에 비해 에탄올 수율이 향상되었고, H1-23 변이주는 이룬수율이 85.75으로 비슷한 수준을 나타냈다. H1-23 변이주(이룬수율, 94.54)는 40℃에서 원균주(이룬수율, 86.33)보다 발효력이 향상되었고, 그의 다른 변이주는 원균주와 비슷한 발효력을 유지하였다 전반적으로 모든 균주가 43℃가 되면서 절반이하로 에탄올 수율이 급격하

게 감소하였으나, H1-23 변이주는 에탄올 이론수율이 65.36으로 이 온도에서 다른 균주에 비해 2~4배 정도 높은 에탄올 발효력을 나타내 고온 내성이 우수함을 보였다. 또한 30~40℃ 사이에서 H1-39, H1-62 변이주는 온도가 증가함에 따라 에탄올 발효력이 감소하였으나, H1-23, H1-55 변이주는 오히려 증가한 결과를 보였다.

*B. custersii*와 그 변이주를 8% Glucose를 기질로 하여 다양한 온도에서 발효력을 조사하였다 [그림 4, 5]. H1-55 변이주는 30℃에서 이론수율이 90.4로 원균주(이론수율, 74.6)보다 크게 향상되었으며, 다른 변이주들도 이론수율이 80~82.5 정도로 다소 향상되었다. 그러나 이러한 결과는 4% Glucose에서 보다는 전반적으로 낮은 것이었다. H1-62 변이주는 37℃에서 이론수율이 96.9로 원균주(이론수율, 90.5)보다 발효력이 향상되었으나 나머지 변이주는 더 낮은 75.2~80.6의 이론수율을 나타냈다. 또한 H1-62 변이주는 40℃에서도 원균주보다 약간 발효력이 향상되었고, 그외 변이주는 비슷한 수준을 유지하였다. 전반적으로 모든 균주가 43℃에서는 이론수율이 약 30~40 정도로 낮았으나 H1-55 변이주는 이론수율이 50.4로 상대적으로 고온에서 우수한 발효력을 보였다.



[그림 4] 370℃에서 Glucose 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율



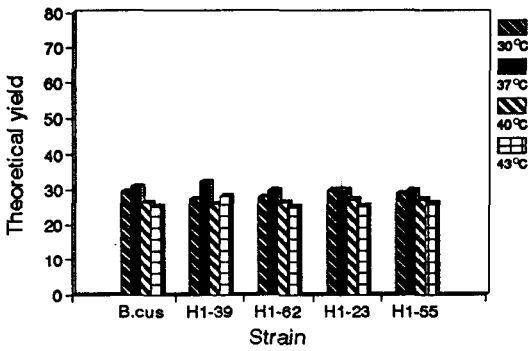
[그림 5] 40℃에서 Glucose 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율

13% Glucose를 기질로 다양한 온도에서 계속적으로 발효력을 조사하였다 [그림 4, 5]. 전반적으로 30℃에서 이론수율이 61~70 정도로 4% Glucose에서의 80~95나 8% Glucose에서의 70~80보다 감소하였는데 이는 이균주들이 당내성이 약하기 때문으로 추정된다. 원균주와 변이주의 에탄올 발효력은 거의 비슷한 수준을 보였다. 대부분의 변이주가 37℃에서는 원균주보다 발효력이 우수하였고, 특히 H1-39 변이주는 이론수율이 79이었고 H1-55 변이주는 이론수율이 80.1으로 원균주(이론수율, 58.5)보다 에탄올 발효력이 크게 향상되었다. H1-62 변이주(이론수율, 79.6)와 H1-55(이론수율, 77.5)가 40℃에서는 원균주(이론수율, 67.2)보다 발효력이 향상되었고, 43℃에서도 비슷한 에탄올 수율을 보였다.

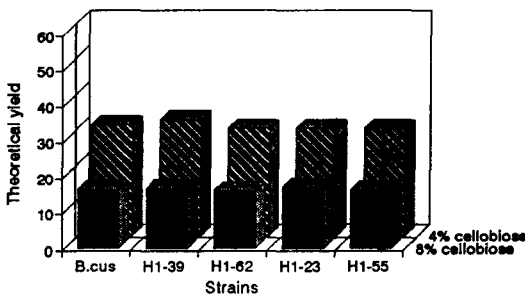
3.3.2. Cellobiose를 기질로 했을때의 발효력 조사

*B. custersii*와 변이주를 다양한 온도에서 4% Cellobiose를 기질로 하여 에탄올 발효를 하였다. 대체로 모든 온도에서 25~35 정도의 낮은 이론수율을 보였고 [그림 6], Glucose 발효보다 전반

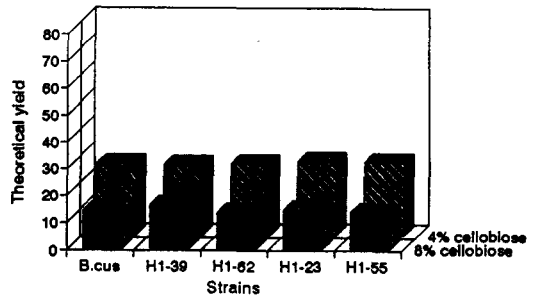
적으로 cell 농도도 낮았고, 발효되지 않고 남은 잔당의 농도도 투입된 당의 25~70%로 높았다. Cellobiose 8%를 기질로 에탄올 발효를 했을 때는 이론수율이 15~20 정도로 아주 낮게 나타났는데[그림 6, 7, 8], 이것은 4% Cellobiose에 대해 60% 수준에 불과한 것으로 Glucose-cellobiose 동시발효균주도 고농도의 Cellobiose를 효과적으로 발효하지 못한다는 사실을 나타내는 것으로 일반적으로 동시당화 발효공정에서 생산되는 혼합당중 Cellobiose의 농도는 최대한 낮아야만 효과적으로 에탄올 발효가 될것으로 사료된다.



[그림 6] 다양한 온도에서 4% Cellobiose를 이용했을 때 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율



[그림 7] 37°C에서 Cellobiose 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율



[그림 8] 40°C에서 Cellobiose 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율

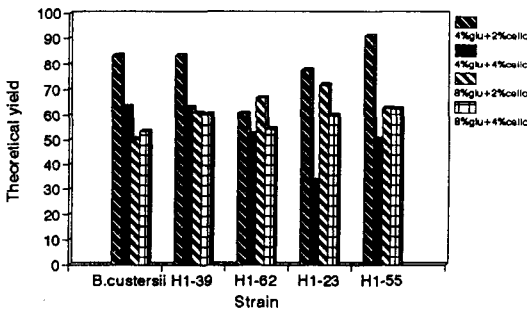
[그림 7]은 37°C에서 Cellobiose의 농도에 따른 에탄올 발효력을 나타낸 것으로 4% Cellobiose를 기질로 하였을때는 전반적으로 모든 균주가 이론수율이 30 정도로 나타났으나, 8% Cellobiose를 기질로 발효를 하였을때는 15~20 정도의 이론수율을 보여 Cellobiose의 농도가 증가할수록 발효력이 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Glucose를 기질로 했을때와 같이 각 균주의 약한 당대성 때문으로 사료되며, 특히 Glucose 보다는 Cellobiose를 기질로 하였을때 이러한 감소효과가 훨씬 크게 나타났다[그림 4, 7, 8].

3.4.3 혼합당을 기질로 하였을때의 발효력 조사

Glucose-cellobiose 동시발효균주인 *B. custersii*와 그 변이주들을 다양한 농도의 Glucose와 Cellobiose을 기질로 다양한 온도에서 발효력을 조사해 보았는데, Glucose를 기질로 에탄올 발효를 하면 H1-62 변이주가 발효력이 가장 우수하고, Cellobiose를 기질로 에탄올 발효를 하면 H1-39가 다소 발효력이 우수한 것으로 나타났다. 결국 당의 종류에 따라 발효력이 우수한 변이주가 각기 다르게 나타났는데, 이러한 결과를 토

대로 동시당화발효공정에 투입될 변이주를 선별하는 것은 부적절하여 다양한 농도의 Glucose-cellobiose 혼합당을 기질로 효과적으로 에탄올 발효를 하는 변이주를 동시당화발효공정이 수행될 온도인 37℃와 40℃에서 에탄올 발효력을 조사하였다.

다양한 농도의 혼합당을 기질로 하여 37℃에서 에탄올 발효를 했을 때 원균주를 포함하여 변이주들이 4% Glucose와 2% Cellobiose 혼합당에서 다른 혼합당보다 우수한 에탄올 발효력(이론수율, 80~90)을 보였으며, 4% Glucose와 4% Cellobiose 혼합당에서 에탄올 발효력이 가장 낮았다[그림 9].

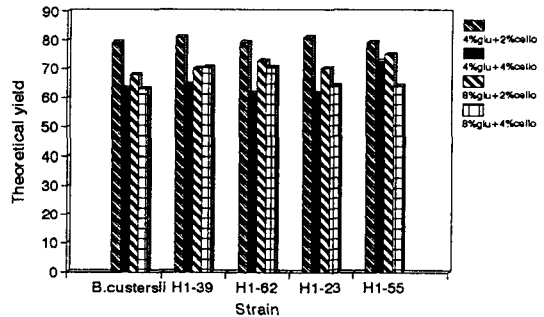


[그림 9] 37℃에서 혼합당 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율

이러한 결과는 조사된 균주들의 약한 당내성과 혼합당에서 상대적으로 Cellobiose의 농도가 높음으로 발생하는 균주의 성장억제 및 발효력 약화 때문으로 사료된다. H1-55 변이주(이론수율, 90.85)는 4% Glucose와 2% Cellobiose 혼합당을 기질로 37℃에서 원균주(이론수율, 83)보다 에탄올 발효력이 우수하였고, 원균주가 4% Glucose-4% Cellobiose 혼합당에서는 변이주보다 발효력이 우수하였다. 동일한 온도에서 8% Glucose와 2% Cellobiose 혼합당을 기질로 발효력

을 조사했는데 원균주 보다 전체적으로 변이주들이 에탄올 발효력이 우수하였고, 특히 H1-23 변이주는 이론수율이 71.49로 원균주(이론수율, 50.14)보다 발효력이 크게 향상되었다. 이러한 혼합당은 실제 동시당화 발효공정에서의 당화과정에서 생성되는 혼합당의 농도와 유사한 것으로 H1-23 변이주는 37℃에서 동시당화 발효공정에 적합하다고 사료된다.

H1-39, H1-23 변이주는 이 온도에서 8% Glucose와 4% Cellobiose 혼합당을 기질로 이용하여 이론수율이 약 60정도로 원균주(이론수율, 53.27) 보다 발효력이 향상되었다. 온도를 높여 40℃에서 다양한 농도의 혼합당을 기질로 에탄올 발효력을 조사하였는데 4% Glucose와 2% Cellobiose 혼합당에서 이론수율이 약 80정도였으며 그외의 혼합당에서는 65~70정도의 이론수율을 보였다[그림 10].



[그림 10] 40℃에서 혼합당 농도에 따른 *B. custersii*와 변이주들의 에탄올 이론수율

원균주와 변이주는 40℃, 4% Glucose와 2% Cellobiose 혼합당에서 에탄올 발효력이 거의 비슷하게 나타났고, 4% Glucose와 4% Cellobiose 혼합당에서 H1-55 변이주(이론수율, 72.68)가 원균주(이론수율, 63.2)보다 발효력이 향상되었다. 모든 변이주가 8% Glucose와 2%

Cellobiose 혼합당에서는 원균주(이른수율, 67.89) 보다 에탄올 이룬수율이 높았는데, 특히 H1-55 변이주(이른수율, 75.05)는 발효력이 크게 향상된 것으로 40℃ 고온에서 운용될 동시당화발효공정에 가장 적합한 균주로 평가되었다. 또한 H1-62 변이주(이른수율 72.67), H1-23 변이주(이른수율, 70.31)들도 동시당화발효공정에 이용가능성이 높은 것으로 평가되었다. H1-39, H1-62 변이주가 8% Glucose와 4% Cellobiose 혼합당에서는 이른수율이 약 70.5 정도로 원균주(이른수율 63.1) 보다 향상되었다.

4. 결 론

1. 37℃ 이상의 고온에서 동시당화발효공정에 적용될 가능성이 있는 발효균주를 개발하기 위해 5차에 걸쳐 총 3120 Colonies 중 최종적으로 *Brettanomyces custersii* 균주의 4변이주인 H1-55, H1-39, H1-62, H1-23가 선별되었다.
2. 변이주중 Glucose를 기질로 하였을때 H1-62가 다른 3변이주보다 다소 높은 에탄올 발효력을 보였으나 혼합당에서 발효력이 낮았다.
3. Cellobiose를 기질로 이용하였을때 전반적으로 발효력이 향상되지 못하였으나, H1-39 변이주는 4% Cellobiose를 기질로 37℃에서 에탄올 이룬수율이 32.3으로 원균주(이른수율, 30.8)보다 다소 발효력이 향상되었다.
4. H1-55 변이주는 실제 동시당화발효공정에서와 유사한 조성의 혼합당(8% Glucose-2% Cellobiose 혼합당)을 기질로 40℃에서 발효후 에탄올 이룬수율이 75.05로 원균주(이른수율, 67.89)를 포함한 다른 변이주들보다 높아 동시당화 발효공정에 가장 적합한 균주로 평가되었다.

5. 참고문헌

1. Ballesteros, I., M. Ballesteros, A. Cabanas, J. Carrasco, C. Martin, M. J. Negro, F. Saez, and R. Saez. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28 ; 307(1991).
2. Bernet, E. and I. Gutmann. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD. 1499~1502(1974), H. U. Bergmeyer Ed., *In methods of enzymatic analysis* ; 3 Academic Press, New York.
3. Blondin, B., R. Ratomahemia, A. Arnaud, and P. Galzy. A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain. *Biotechnol.*, 24 ; 2031(1982).
4. Ghosh, P., N. B. Pamment, and W. R. B. Martin. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose-effect of β -D-glucosidase activity and ethanol inhibition of cellulase. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 4 ; 425(1982).
5. Freer, S. N., and R. W. Detroy. Characterization of cellobiose fermentation to ethanol by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 25 ; 541(1983).
6. Gonde, P., B. Blondin, R. Ratomaheina, A. Arnaud, and P. Galzy. Selection of yeast strains for cellobiose alcoholic fermentation. *J. Ferment. Technol.* 60 ; 579(1982).
7. Hacking A. J., I. W. F. Taylor, and C. M. Hanas. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40℃,

- Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19 : 361(1984).
8. Lalce, C., C. L. Abed, W. Granhalf, and M.F.S.Peres. Thermotolerance behavior in sugarcane syrup fermentation of wild type yeast strains selected under pressures of temperature, high sugar, added ethanol. *Biotechnol. Letts.*, 15 ; 609(1993).
 9. Lodder, J.(1970), *The Yeast*, 2nd ed. North Holland, Amsterdam.
 10. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 9:561(1969).
 11. Slapack, G. E., I. Russel, and S. G. G. Stewart(1987), Boca Raton-Fl. ;CRC Press.
 12. Sohn, H., Y., W. Park, I. N. Jin. The fermentation characteristics of newly selected thermotolerant yeasts at high temperature. *J. Kor. Microbiol. Biotechnol.*, 4:222(1994).
 13. Spindler D. D., E.W. Charles, M. Ali, and G. Karel Thermotolerant yeast for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *The Human Press Inc.*, 279(1988).
 14. Spindler, D. D., W. Charles, and G. Karel The simultaneous saccharification and fermentation of pretreated woody crops to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 28:773(1991).
 15. Spindler, D. D., W. Charles, K. Grohmann, and G. P. Philippidis. Evaluation of the cellobiose-fermenting yeast *Brettanomyces custersii* in the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Letts.*, 14:403 (1992).
 16. Szczodrak, J. and Z. Targonski. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 31 ; 300(1988).
 17. Takagi, M., S. Abe, S. Suzuki, G. H. Emert, and N. Yata. Symposium of bioconversion of cellulose substances in energy. *Chemicals and Microbial Protein*, II T, Delhi, India 551(1977).
 18. Walsh, R. M. and P. A. Martin. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brewing.*, 83 ; 169(1977).
 19. Wyman, C. E. D. D. Spindler, K. Grohmann, and S. M. Lastick Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose with the yeast *Brettanomyces clausenii*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 17, 221(1986).
 20. Yamamura, M. K. Takes, and T. Kanihare. *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolysis. *Agric. Biol. Chem.*, 55 ; 2861(1991).