

*Pichia stipitis*에 의한 D-xylose로 부터의 에탄올 생산



권 상 일
(국세청 기술연구소 소장)

I. 서론

천연에 풍부하게 존재하는 식물 Bio mass의 주성분인 lignocellulose는 lignin, cellulose 및 hemi-cellulose의 3가지 성분으로 되어 있다. D-xylose는 hemicellulose계 성분인 xylan의 오탄당¹⁾으로 구성되어 있어, 앞으로 유효하게 이용할 수 있는 임산물 및 농산물 폐자원 중의 주요 구성성분이다. Sciamanna 등²⁾은 리그노셀룰로스의 가수분해물로부터 얻을 수 있는 환원당의 약 30~40%가 펜토스분의 D-xylose라고 시사하고 있다. 이와 같은 재생자원으로부터의 에탄올 생산은 에너지문제에 일조를 할 수 있고, 셀룰로스와 함께 그 이용이 주목되고 있다.

예전부터 D-xylose는 글루코스와 달리 미생물에 의해서 자화될 수 없는 것으로 알려졌지만^{3,4)}, 1981년 이후 이것을 자화할 수 있다는 다수의 논문이 나왔다⁵⁻¹³⁾.

대부분의 세균, 곰팡이 및 효모는 자일로스를 자화할 수 있지만, 세균과 곰팡이는 바람직스럽지 못한 부산물을 생성하거나 에탄올에 대한 내성이 약하기 때문에 Jefferies 등¹⁴⁾은 펜토스나 헥소스를 에탄올로 변환하는데 이용이 가능한 미생물로서는 효모가 가장 바람직한 것으로 보고하고 있다.

■ 目 次 ■

- I. 서론
- II. 재료 및 실험 방법
 - 1. 使用菌株
 - 2. 培地
 - 3. 培養條件
 - 4. 分析方法
- III. 결과
 - 1. 균체증식 및 에탄올생산에 대한 통기량의 영향
 - 2. 초기기질농도의 영향
 - 3. 에탄올의 저해
 - 4. 연속배양에 의한 속도론적 해석
- IV. 고찰
- V. 요약

또한 Toivola¹⁵⁾는 자일로스를 탄소원으로 하는 효모 193주를 분리하고, du Pureez와 Prior¹⁶⁾는 56주의 자일로스 자화성효모를 정량적방법에 따라 스크린하여, *Pichia Stipitis*¹⁷⁻¹⁸⁾, *Pachysolen tannophilus*^{10,17-18,24,29-41)}, *Candida sp.*^{13,16,20-22,26,32-33,42-43)}가 자일로스로부터 에탄올을 생산할 수 있는 가장 유용한 미생물이라는 것을 밝혀내었다. 그러나 이들 효모 대부분이 자일로스를 자화할 수는 있지만, 어느 것이나 에탄올수율이 이론수율(0.15g ethanol/g xylose)에 비하여 떨어지고^{6,9,10,13)}, *Saccharomyces cerevisiae*에 비하여 발효속도도 느릴 뿐만아니라, 에탄올 내성도 낮다.

전통적으로 알코올발효에 이용되고 있는 *S. cerevisiae*는 글루코스는 자화하기 쉽지만, D-xylose는 자화할 수 없다. 이것에 대하여 Ueng 등⁴⁵⁾은 *S. cerevisiae*를 이용하여 배양액에 자일로스이소메라제를 첨가했던 바, 생성된 자일로스로부터 에탄올 생성이 인정되어, 이 균은 세포내에서 자일로스를 자일루로스로 변환할 수 없는 것이라고 추정하였다.

일반적으로 세균은 자일로스이소메라제를 이용하여 자일로스를 자일루로스로 변환할 수가 있지만, 자일로스 자화성 효모는 자일로스이소메라제가 존재하지 않기 때문에 자일로스리닥타제와 자일리톨디히드로게나제의 두 가

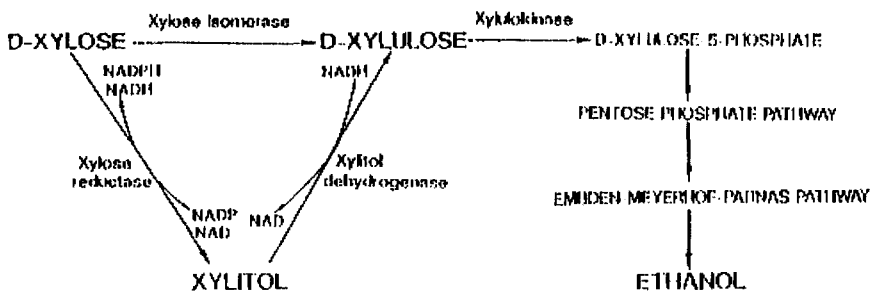
지 효소를 이용하여 2단계의 산화·환원반응에 의해서 자일리톨을 거쳐 자일루로스로 변환이 된다.

Batt 등⁴⁶⁾은 *S. cerevisiae*에서도 자일로스 대사의 초기 2단계 반응을 촉매하는 효소, xylose reductase와 xylitol dehydrogenase가 존재하지만, 자일로스를 자화하여 생육할 수는 없다고 시사하고 있다. Bruinenberg 등⁴⁷⁾은 이 원인의 하나로서 *Candida utilis*의 보조소 NADPH의 생성과 소비에 대하여 조사했던 바, xylose reductase는 NADPH를 xylitol dehydrogenase는 NAD를 보조소로서 요구하기 때문에 공역 반응이 일어나지 않아 자일로스를 자일루로스로 변화하기가 어려운 것이라고 생각하고 있다.

그러나 효모, *P. stipitis* 등의 xylose reductase는 NADPH와 NADH의 양쪽 모두를 보조소로 이용할 수가 있어, xylitol dehydrogenase와 공역할 수가 있을 것이다. 결국 이들 효모의 자일로스 대사경로는 자일로스 수송 및 두 효소와 관련이 있다고 생각된다.

D-xylose 자화성 효모에 의한 유효한 발효 프로세스에 있어서 가장 중요한 문제점으로서 이들 효모의 에탄올 생산성이 다른 균주의 글루코스로부터의 에탄올 생산성에 비해서 낮다고 하는 것이다⁴⁸⁻⁵¹⁾. 이것은 자일로스 대사의 율속단계로서 자일로스로부터 자일루로스

[그림 1] Pathway of D-xylose utilization



까지의 산화·환원 경로 때문이라고 생각된다 (33,47,52-54).

그런데 D-xylose 대사는 NADH, H⁺의 과잉 생산을 유도하고, 산소에 의해 부분적으로 컨트롤되기 때문에 이들 효모에 있어서의 산소는 중요한 역할을 한다고 생각된다. 산소는 보호소 NADPH의 recycling과 관계가 있는 것으로 시사되고 있지만, 이것에 대한 정확한 메카니즘은 알려져 있지 않다. 이와 같이 효모에 의한 자일로스 발효에 있어서, 배양조건으로 산소의 공급을 최적화하는 것은 필수적이다. 산소는 에탄올의 생성속도를 촉진하는 것으로 알려져 있지만, 실제 통기량과 발효 파라미터와의 관계에 대해서는 그다지 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구는 자일로스 자화성효모 *P. stipitis* CBS 5773에 의한 D-xylose로부터 에탄올을 생산하는 프로세스에 있어서, 중요한 조건으로 통기량과 기질저해 및 산물 에탄올에 의한 저해를 생각할 수 있기 때문에 이것에 대한 연구와 동시에 연속배양법을 이용하여 최적발효조건에 관한 각종 파라미터를 검토하였다.

II. 재료 및 실험방법

1. 使用菌株

D-xylose 자화성효모 *Pichia stipitis* C.B.S 5773주를 사용했다. 이 균주는 YPD한천사면배지(2% 글루코스, 1% 폴리펩톤[DIFCO], 0.5% 효모엑기스[DIFCO], 1% 한천)상에서 30°C, 24시간 배양한 후, 4°C에서 보관했다.

2. 培地

전 배양배지는 YPD배지로서, 글루코스 2g/

l, 폴리펩톤 1g/l, 효모엑기스 0.5g/l를, 본 배양에서는 전 배양배지 중의 탄소원인 글루코스 대신에 D-xylose를 실험목적에 따라 10~200g/l로 넣고, 120°C에서 15분간 살균하여 사용하였다. D-xylose는 다른 성분과의 반응을 방지하기 위하여 별도로 살균하여 사용시에 혼합하였다. 또한 jar fermentor에 의한 회분 및 연속배양시에는 소포제로서 아데칸을 LG-109(아사히덴화 공업주식회사제품) 원액의 0.1%의 용액을 250ml 플라스크에 넣고, 폴리에틸렌 튜브에 접속하여 거품이 일어날 때마다 수동으로 첨가하였다.

3. 培養條件

1) 플라스크 培養

D-xylose로부터의 에탄올발효에 있어서 산소의 영향에 대한 예비실험과 초기기질농도의 영향을 조사하기 위하여 종균배양은 사면배지에서 1 백금이를 취하여 배지 2.5ml를 넣은 10 ml 시험관에 접종한 후, 30°C의 rotary shaker (150 rev. min⁻¹)에서 24시간 배양하였다. 이것을 다시 47.5ml의 배지가 들어있는 500ml용 삼각플라스크에 접종한 후, 30°C에서 호기적으로 진탕배양한 것을 전 배양플라스크에 식균하였다. 호기배양은 본 배양배지 90ml(100 g/l 자일로스)를 넣은 환류플라스크에 10ml의 전 배양액을 식균하여 30 l, 90 rpm(rev./min)의 rotary shaker에서 120시간 배양하였다.

반혐기배양은 본 배양배지 90ml (100 g/l 자일로스, 초발기질농도의 영향에 대해서는 50~200g/l 자일로스)를 넣고, 농황산을 채운 발효마개가 붙은 500ml 엘렌마이어 플라스크에 전배양액 10ml를 식균하여 호기조건과 같은 방법으로 배양하였다. 산소의 영향에 대한

검토는 호기 및 반혐기배양의 결과를 비교하였다. 이 결과를 토대로 하여 초발기질농도의 영향에 대해서는 반혐기배양을 하고, 각각의 배양에 따른 경시변화의 데이터로부터 각종 파라미터를 산출하였다.

2) 回分培養

통기량이 발효파라미터에 미치는 영향을 조사하기 위하여 jar fermentor배양에 대한 평균 조제는 다음과 같이 실시하였다. 사면배지로부터 15ml배지를 넣은 300ml용 플라스크에 배양한 것을 30°C에서 24시간 호기적으로 배양한 후, 이중에 3ml를 취하여 150ml배지를 넣은 1 l 용 삼각플라스크에 이식하고 30°C, 24시간 배양한 것(균체농도 약 8.0g/l)을 전 배양액으로 하여 jar fermentor에 식균하였다. 이 jar fermentor는 마루비씨 바이오엔지사제품 MDL 250형 2.6 l로 여기에 배지 1.5 l를 넣고, 초기 자일로스농도 100g/l, 30°C, 교반속도 200 rpm에서 실험을 하였다. pH는 자동pH조절기에서 1N-NaOH와 1N-HCl로 pH 6.0으로 자동제어가 되고, 용존산소는 jar fermentor내에 삽입되어 있는 폴라로형 센서로 모니터링하였다. 통기량은 동일조건에서 0.05에서부터 1.0 vvm [vol. air(STP)/(vol. broth) (min)]까지의 범위에서 조작하였다. 한편 별도의 실험으로 완전한 혐기 조건하에서 배양데이터를 얻기 위하여 접촉개시전에 jar fermentor에 질소가스를 주입하여 용존산소가 "0"가 되도록 한 다음 통기를 하지 않고 배양하였다.

3) 連續培養^{55,56)}

연속배양은 회분배양과 마찬가지로 jar fermentor에 배지(초기 자일로스농도 10g/l) 1.0 l를 넣고, 30°C, pH 6.0, 교반속도 200 rpm, 공급기질의 자일로스농도를 10g/l로 하여 배

양하였다.

4. 分析方法

1) 샘플링

각 실험에서 약 5ml의 배양시료를 채취하여, 1ml는 OD600 nm에서 균체농도의 측정에 사용하고, 나머지 4ml는 10,000rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상층액을 -20°C에서 동결보존하여 다음의 각 성분의 경시변화 분석에 사용하였다.

2) 菌體濃度

전균체량(Xt)은 시마쯔분광광도계 모델 UV 120-01(시마쯔제작소)를 이용하여, 파장 600nm에서 흡광도(A)를 읽는 탁도법으로 측정하였다. 여기서 시료의 흡광도 A는 0.05 < A < 0.5의 범위가 되도록 희석하였다. 비어의 법칙(Beer's law)에 따라서 $X_t = k \cdot A$ 의 관계가 있고, $k=0.2283$ 이었다($1A_{600}=0.2283g/l$ dry cell mass).

3) D-자일로스, 자일리톨 및 자일루로스

D-xylose는 Somogyi - Nelson법⁵⁸⁾에 의한 비색법(파장 660nm), xylitol은 Karl - Heinz Bassler법으로서 보효소 NAD와 함께 SDH(sorbitol dehydrogenase)에 의한 산화반응을 동반하는 효소법(파장 340nm)으로 측정하고, xylulose는 시스테인 카바졸 유산법(파장 540nm)에 따랐다.

4) 에탄올

가스 크로마토그래피법으로 측정하였다. 배양 시료에 내부표준물질로서 n-프로판올을 가하여 혼합한 시료를 가스 크로마토그래피(833형 크로마토 데이터 처리장치를 붙인 히타찌 163

형)로 분석하였다. 이용한 칼럼은 3mm×2m의 PEG-1000, 측정조건으로서는 N2압:1.0 kg/cm², He압:1.0kg/cm², 공기 1.0kg/cm²로 설정하고, 점화후는 1.5kg/cm², 시료주입구 온도:100 l, 칼럼온도:80°C로 설정하였으며, 에탄올 농도는 에탄올의 피크면적/n-푸로판올의 피크면적과의 비율을 이용하여 최소자승법으로 얻어진 검량선으로부터 산출하였다.

5) 각종 발효속도론 파라미터 계산

회분배양의 생산성(Q_p)과 각종 비속도(μ : 비증식속도, q_p : 에탄올비생산속도, ν : 기질비소비속도)는 균체량과 에탄올농도의 경시변화에 대한 초기(0~18시간) 직선부분의 회귀분석으로 계산하였다.

여기서

$$\mu = 1/x \cdot dx/dt(h^{-1}), q_p = 1/x \cdot dp/dt (g/g \text{ cell/h})$$

$$\nu = 1/x \cdot (-ds/dt)(g/g \text{ cell/h})$$

그리고 이 기간중 균체농도(X_t)는 상대적으로 일정하고, 평균균체량($X_{t,av}$)은 흡광도 데이터로부터 구했다. 에탄올 비생산속도는 에탄올의 경시변화를 회귀분석하여 $q_p = Q_p/X_{t,av}$ 식으로부터 계산했다.

연속배양에서의 생산성과 비속도는 균체 및 증식제한기질의 물질수지식⁶¹⁾에 의해 계산했다. 즉 에탄올의 비생산속도: $q_p = D^* \cdot p/x$ (g/g cell mass/h), 기질비소비속도: $\nu = D^* \cdot (S_0 - s)/x$, 에탄올생산성: $Q_p = D^* \cdot p$ 에서 배양기에서의 기질(자일로스)와 산물(에탄올)의 Wash out는 $C_t = (1 - e^{-Dt})S_0 + C_0 \cdot e^{-Dt}$ 식으로부터 계산되었다.

다만 여기서

D : 희석율 (h^{-1})

S_0 : 초발기질농도 (g/l)

x : 정상상태에서의 균체량 (g/l)

s : 정상상태에서의 잔존기질농도 (g/l)

p : 정상상태에서의 산물의 농도 (g/l)

C_0 : 효모에 의해 이용 또는 생성되지 않는 물질의 초기농도 (g/l)

C_t : t시간후 효모에 의해 이용 또는 생성되지 않는 물질의 초기농도 (g/l)

t : 배양시간 (h)

III. 결과

1. 균체증식 및 에탄올생산에 대한 통기량의 영향

D-자일로스 자화성효모는 자일로스대사의 초기단계에 자일로스를 당알코올인 자일리톨로, 다음 단계에서 케토인 자일루로스로 변환시킨다. 이들 반응을 촉매하는 두 종류의 효소, xylose reductase 및 xylitol dehydrogenase는 수소(H^+)를 전달하기 위해서 보조소 NADPH(또는 NADH)와 NAD를 각각 필요로 한다. 여기서 Bruinenberg⁴⁷⁾는 xylitol dehydrogenase 반응으로 생성된 NADH가 NAD로 변환할 때 산소를 필요로 한다고 시사하고 있다.

여기서 필자는 플라스크 배양을 통해서 산소의 필요성에 대한 기초적 사실을 얻기 위해서 Jar fermenter(이하 Jar 또는 발효조라고 한다) 배양에서 통기량이 각종 발효파라미터에 미치는 영향을 비교검토하여 최적통기량을 찾아 내었다.

(1) Flask배양

본 실험은 *P. stipitis*에 의한 자일로스로부터의 에탄올발효에 있어서 jar배양에 앞서 통기의 필요성 등 기초적인 데이터를 얻기 위해서 예비실험을 하였다. 초발기질농도를 10%로 하고 30°C의 진탕배양기에서 두 종류의 500ml 플라스크배양을 통해서 비교 시험하였다. 호기조

건으로서는 산소이동이 가능한 면전플라스크에서, 반혐기조건으로는 산소이동을 없애기 위해서 농황산을 채운 발효전이 붙은 플라스크에서 각각 배양하고 모니터된 pH, 균체량, 자일로스 및 에탄올농도에 대한 경시변화를 Fig.2에 나타내었다.

그 결과 호기조건 플라스크에서는 배양후 44시간째에 8.8g/l의 최대 에탄올농도가 얻어졌으나 그 후로는 급격하게 감소하였고, 균체량은 12.2g/l에 달했다.

그러나 반혐기조건 플라스크에서는 배양후 104시간째에 에탄올농도 18g/l, 균체량 6.8g/l로서 호기조건에 비해서 상당히 다른 패턴을 나타내고 있다.

호기·반혐기조건하에서 배양중의 pH의 변화는 6.5~4.7이고, 발효초기의 pH6.5에서 배양시간의 경과에 따라 pH4.7까지 떨어진 다음 잠시후 pH5.0에서 배양종료까지 일정하게 유지되었다. pH가 최소값으로 되는 시기는 호기조건하에서는 배양후 40시간째 였지만, 반혐기조건에서는 70시간째이고, 자일로스의 소비는

전자에 비해서 후자의 경우가 다소 완만하게 변화되었다. 즉 pH의 변화가 기질소비패턴에 의존한다고 생각된다. pH의 감소는 발효중에서 카르본산 등 유기산의 생성때문이며 이것의 생성은 혐기조건에 비해서 호기조건 쪽이 빠르다는 것을 알 수 있다.

<표 1>에서는 [그림 2]의 배양 경시변화에 따라 계산된 호기조건과 반혐기조건하에서의 각종 파라미터를 비교하였다. 그 결과 최대 비증식속도(μ_{max})는 호기조건에서는 $0.15h^{-1}$ 이고 반혐기조건에서는 $0.12h^{-1}$ 로서 약간 높지만, 반혐기조건하에서의 최대 에탄올비생산속도(ρ_{max})와 에탄올수율($Y_{e/s}$)은 호기조건에 비해 2배이상이나 높은 값을 나타내었다.

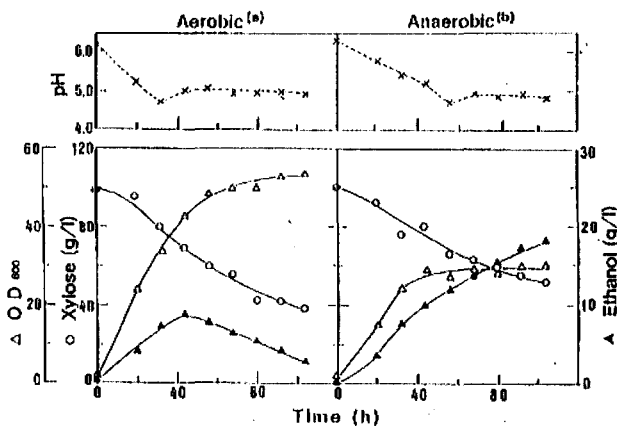
이상과 같이 플라스크배양에 의한 자일로스로부터의 에탄올발효에서 균체증식과 에탄올생산을 위해서는 어느 정도의 산소가 필요하다는 것을 알 수 있었다.

(2) Jar 배양 실험

산소의 필요성이 일응 인정되고 있는 플라스크 배양의 결과를 토대로 2.6 l 배양기를 이

[그림 2] Composition of time courses of D-xylose fermentation under aerobic and anaerobic conditions in 500ml flask culture by *Pichia stipitis*.

a : 500ml-Erlenmeyer flask with a cotton plug. b : 500ml-Sakaguchi flask with a fermentation plug filling with conc.sulfuric acid



용하여 균체증식 및 에탄올 생산성에 미치는 최적통기량을 구하기 위해서 통기량을 0에서 1.0vvm까지 변화시키면서 배양을 하였다. 초기자일로스농도는 10w/v%로 하고 pH6.0, 30°C, 교반속도 200rpm에서 배양했다.

[그림 3]과 [그림 4]는 통기량을 각각 달리 한 배양실험의 결과이고, 어느 것이나 균체량(OD), 자일로스농도, 에탄올 및 자일리톨과 자일루로스의 농도에 대한 경시변화를 나타낸다.

무통기 배양은 접종전 배양기의 배지에 질소가스를 넣지 않았기 때문에 완전한 혐기조건이 아닌 상태의 배양이다. 배양후 72시간째의 결과를 보면 균체량 0.19g/l, 에탄올 4.2g/l, 자일리톨 0.9g/l 이고, 기질 자일로스 는 불과 10%밖에 이용되지 않았다. 그 후 138시간까지 배양을 계속했지만, 균체증식과 기질소비 및 대사산물에 그다지 큰 변화는 관찰되지 않았다. 여기서 약간의 균체량이 보인 것은 배지 중의 용존산소이거나 또는 배양기의 배기가스 출입구로부터 역으로 확산되어 들어온 공기의

영향으로 추정된다.

더욱이 통기량을 0.05, 0.2, 0.5, 1.0vvm에서 각각 제한적인 통기를 했던 바, 통기량 0.05vvm에서의 발효시간은 210시간인 데 반하여 0.5vvm에서는 54시간으로서 156시간 단축되어 통기량의 증가에 따라 발효시간이 단축된다는 것을 알 수가 있다.

균체증식에서는 통기량에 관계없이 어느 것이나 lag기는 인정되지 않으며, 배지\중의 용존산소는 발효초기에 "0"으로 되어 이 시기부터 에탄올을 생성하기 시작하였다. 통기 0.05vvm에서 균체량은 8.9g/l 였지만, 1.0vvm에서는 14.2g/l 으로 되어 통기량의 증가에 따라 증대되고 있다. 각각의 통기량에서 최대 에탄올농도를 살펴보면 0.05vvm에서는 배양후 210시간째에 29.6g/l, 0.2에서는 114시간째에 32.5g/l, 0.5vvm에서는 54시간째에 16.3g/l 로서 통기량의 증가에 따라 발효시간은 단축되었다. 통기량에 의한 최대 에탄올농도는 통기량 0.2vvm에서 얻어졌다.

자일로스의 소비를 비교해 보면, 통기 0.05

< 표 1 > Comparison of Kinetic parametres in D-xylose fermentation under aerobic and anaerobic conditions by pichia stipitis C. B. S. 5773

* Initial xylose concentration, 10 w/v%.

a : 500ml-Erlenmyer flask with cotton plug. b : 500ml-sakaguchi flask with fermented plug filling with conc.sulfuric acid.

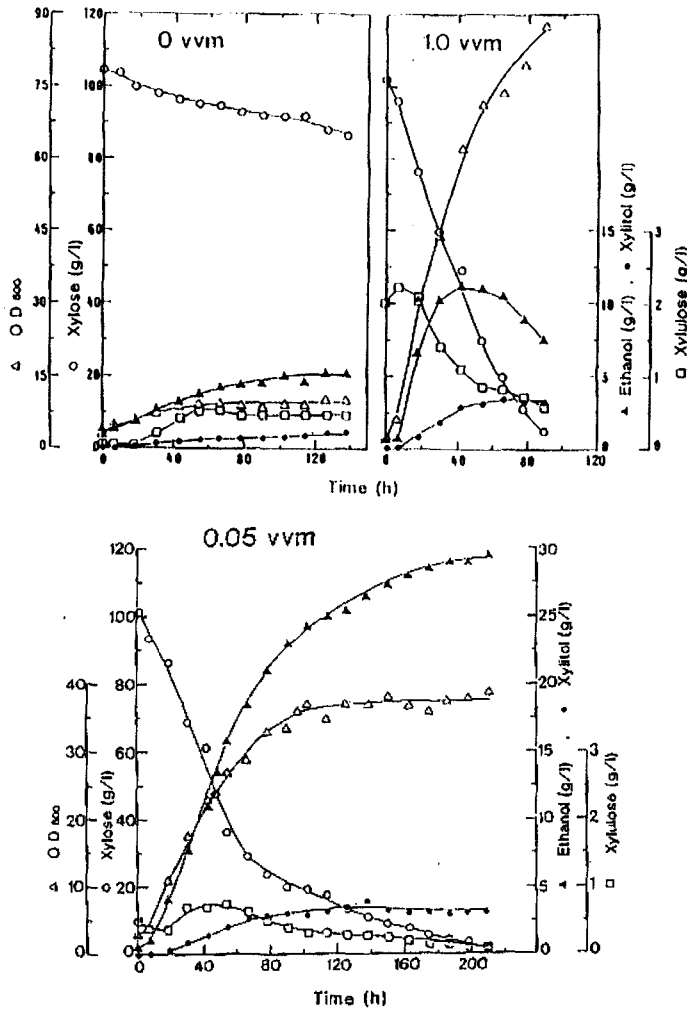
Symbols : Yx/s, cell yield; Ye/s, ethanol yield; μ max, maximum

Parameters	Oxygen	
	Aerobic ^a	Anaerobic ^b
Yx/s	0.28	0.21
Ye/s	0.19	0.38
μ max	0.15	0.12
ρ max	0.03	0.07

specific growth rate; ρ max, maximum specific production rate

[그림 3] Time courses of ethanol fermentation from D-xylose in 2.6L-jar fermentor culture with no aeration, 1.0 and 0.05 vvm of aeration rate.

Cultivations were carried out at 30°C, pH6.0, initial xylose concentration 10w/v%, and agitation rate 200rpm



에서는 배양후 210시간째에 99%(잔당은 1.2), 0.2에서는 138시간째에 99%(1.0), 0.5에서는 138시간째에 92%(8.2), 1.0vvm에서는 90시간째에 95%(잔당은 4.7g/l)가 되어 통기량의 증가에 따라서 기질의 소비속도가 빨라졌다.

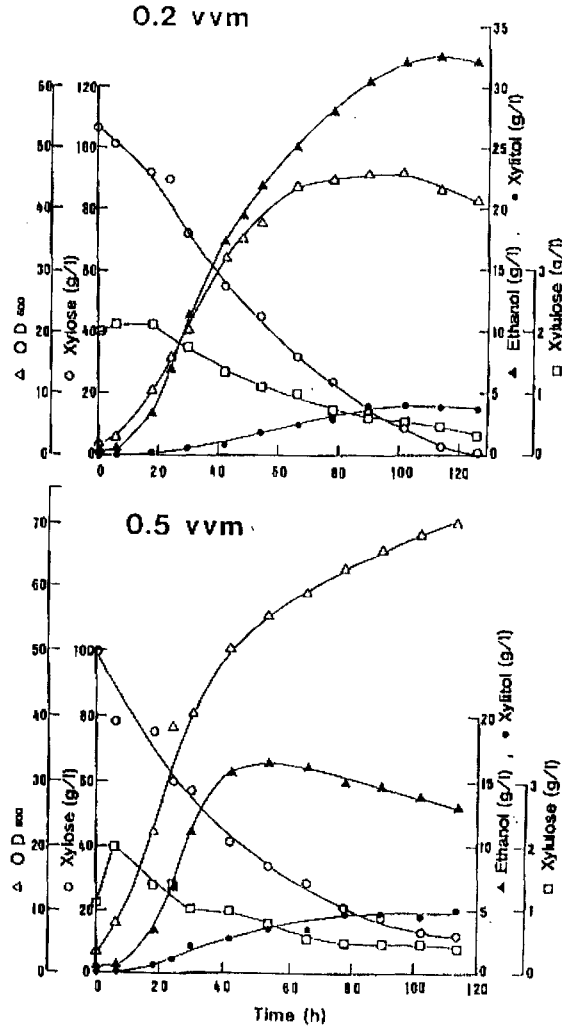
자일리톨의 생성은 통기 0.05에서 4.0g/l, 0.2에서 3.7g/l, 0.5에서 3.4g/l, 1.0vvm에서 2.9g/l로 통기량의 증가에 따라 감소하고 있다.

자일루로스의 생성은 통기량의 증가에 따라 증가하고 있지만, 어느 것이나 발효초기에는 증가하다가 말기로 감에 따라서 서서히 감소하였다.

이들 결과로부터 *P. stipitis*에 의한 자일로스로부터의 에탄올발효에 있어서 에탄올생산이 최대로 되는 통기레벨은 비교적 낮고, 0.2vvm이 최적이라고 말할 수 있다. 균체중식은 통기량이 높을수록 양호하였다.

[그림 4] Time courses of ethanol fermentation from D-xylose in 2.6L-jar fermentor culture with aeration rate, 0.2 and 0.5 vvm.

Cultivations were carried out at 30°C, pH6.0, initial xylose concentration 10w/v%, and agitation speed 200rpm



[그림 5]에서는 [그림 3] 및 [그림 4]에서 통기량을 달리한 배양결과의 경시변화를 토대로 하여 각종 파라미터로서 균체 및 대사산물의 수율, 최대비증식속도(μ_{max}), 최대에탄올비생산속도(q_p) 및 에탄올생산성(Q_p)을 통기량의 상관계수로서 나타내었다. 통기량의 증가에 따라서 균체량은 완만하게 증가했지만, 에탄올 생산은 0.2vvm에서 최대가 되었고 그 이상에서는 감소하고 있다. 자일리톨의 축적은 그다

지 큰 차이를 보이지 않지만 통기량의 증가에 따라 통기량 0.05vvm에서 4.0g/l 이었던 것이 1.0vvm에서는 2.9g/l 까지 감소하였다. 수율에 대해서 살펴보면 균체수율은 통기량의 증가에 따라서 증가하고, 통기량 0.05vvm에서 0.089g/g이었지만 1.0vvm에서는 0.209g/g으로서 2배이상이 되었다. 이 때의 발효시간은 210시간에서 54시간으로 156시간이나 단축되었다. 에탄올수율은 0.2vvm이상에서는 통기량의 증

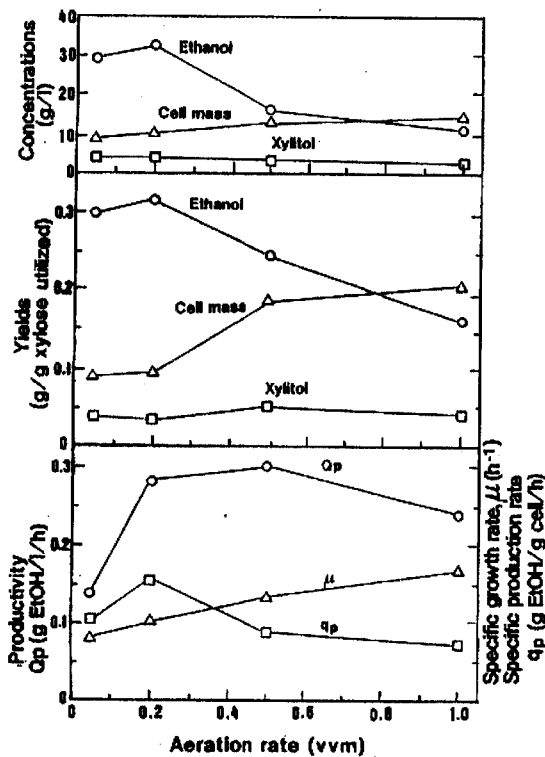
가에 따라 감소하고, 통기량 0.2vvm에서 0.317g/g이었던 것이 1.0vvm에서는 0.167g/g로 감소하였다. 자일리톨수율은 에탄올수율과 비슷하고 통기량의 증가에 따라 조금씩 감소되었다.

최대비증식속도(μ_{max})는 0.05vvm에서 0.081h⁻¹이었지만 1.0vvm에서는 0.170h⁻¹로 되어 통기량의 증가에 따라 직선적으로 완만하게 증가하였다. 최대에탄올비생산속도(q_p)는 에탄올축적이 가장 높았던 통기량 0.2vvm에서 최대가 되었지만 그 이후로는 감소하고 있고, 에탄올생산성(Q_p)은 0.5vvm까지는 증가하였지만 그 이상의 통기에서는 감소하고 있다. 이들의 최대값은 각각 0.153g/g/h 및 0.302g/l/h 이었다.

[그림 5]에서 나타낸 바와 같이 에탄올수율은 생산성이 증가하는 통기량보다 훨씬 낮은 통기량에서 높았다. 이것은 높은 산소공급조건 하에서 균체생성이 양호하기 때문이라고 생각된다. 그리고 에탄올생산성이 최대가 되는 통기량보다 높은 통기량에서는 균체증식을 증가시키는 정의 효과보다 생산을 감소시키는 부의 효과가 더 크진다는 것을 알 수가 있다.

<표 2>에서는 에탄올농도가 가장 높았던 통기량 0.2vvm에서의 각종 발효파라미터를 나타내고 있다. 실험상 최적통기량에서는 이 표에서 보는 바와 같이, 최대에탄올농도가 32.5g/l 이고 에탄올수율은 0.318g-EtOH/g-xylose utilized이며 에탄올생산성은 0.285g/l/h이다.

[그림 5] Effect of aeration rate on the fermentation parameters in 2.6L-jar fermentor. Cultivations were done at 30°C, pH6.0, initial xylose concentration 10w/v%, and agitation speed 200rpm



2. 초기기질농도의 영향

*P. stipitis*에 의한 D-자일로스로부터의 에탄올생산에 있어서 균체증식 및 대사산물생성에 미치는 초기 기질농도(S_0)의 영향에 대해서 검토하였다. 반협기조건하의 플라스크배양(재료 및 실험방법 참조)에서 초기 기질농도를 5, 10, 15, 20w/v%로 바꾸어 배양한 실험의 결과, [그림 6]에서 나타낸 것과 같은 균체 및 대사산물의 경시변화를 얻었다. 또한 초기 기질농도의 상관계수로서 균체수율, 에탄올 및 자일리톨수율, 최대비증식속도(μ_{max}), 최대에탄올비생산속도(q_p)와 에탄올생산성(Q_p) 등의 각종 발효파라미터를 [그림 7]에 정리하였다. 여기서 발효파라미터는 배양후 108시간째를 기준으로 하여 계산하였다.

초기기질농도의 증가에 따라서 균체농도는 15%까지는 증가하였지만 그 이상에서는 감소하고, 에탄올농도는 $S_0=10\%$ 에서 가장 높았지만 10%를 초과하면 감소했다. 자일리톨농도는 어느 것이나 2.5~3.0g/l의 범주에 있고 에탄올축적도 동일한 패턴으로 감소하였다.

그렇지만 일반적으로 S_0 의 증가에 따라 에탄올농도는 감소하고 자일리톨농도는 증가하는 것으로 전해지고 있지만 이 원인에 대해서는 확실하게 알려져 있지 않다. S_0 의 증가에 따라서 배양후 108시간째의 자일로스는 $S_0=5\%$ 에서 96%, 10%에서 62%, 15%에서 48%, 20%에서는 35%가 각각 소비되었다. 한편 자일루로스의 생성은 S_0 의 증가에 따라 증가하였다[그림 6].

수율에 대해서는 다음과 같은 결과가 얻어졌다. 초기 자일로스농도의 증가에 따라 균체, 에탄올 및 자일리톨의 수율 모두가 감소하고 있다. 균체수율($Y_{x/s}$)은 $S_0=5\%$ 에서 0.137g/g이지만 20%에서는 0.103g/g으로 감소하였다.

이것은 기질농도가 높으면 높을수록 산소의 제한이 보다 크기 때문이라고 생각된다. 에탄올수율($Y_{e/s}$)은 $S_0=5\%$ 에서 0.33g/g이었지만 20%에서는 0.16g/g으로 되어 반으로 감소하였다. 최대에탄올수율은 $S_0=5\%$ 에서 0.33g/g으로서 이론수율의 75%에 상당한다. S_0 에 대해서 $Y_{e/s}$ 는 $Y_{x/s}$ 에 비하여 보다 감수성이 크다고 생각된다.

< 표 2 > Fermentation parameters at Aeration rate 0.2 w/m.
Initial xylose concentration, 106g/l. Fermentation time, 114h.

Parameters	Value
Biomass concentration (g dry cell / l)	9.8
Ethanol concentration (g ethanol / l)	32.5
Xylitol concentration (g xylitol / l)	3.7
Biomass yield (g cell / g xylose utilized)	0.096
Ethanol yield (g ethanol / g xylose utilized)	0.318
Maximum specific growth rate (h ⁻¹)	0.098
Maximum specific production rate (g ethanol / g cell / h)	0.153
Volumetric productivity (g ethanol / l / h)	0.285

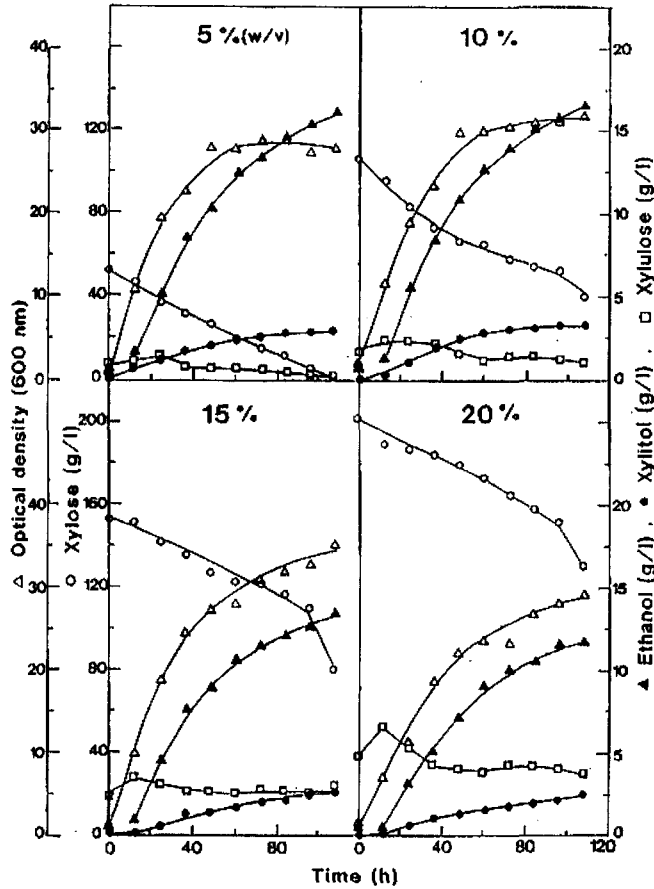
최대비증식속도(μ_{max}) 및 에탄올비생산속도(q_p)와 생산성(Q_p)은 초기 자일로스농도 10%까지는 증가되었지만 보다 높은 농도에서는 모두 점차적으로 감소하였다. 이들의 최대값은 $S_0=10\%$ 에서 각각 $\mu_{max}=0.154h^{-1}$, $q_p=0.08g/g/h$, $Q_p=0.157g/l/h$ 이었다[그림 7]. 또한 S_0 의 증가에 따라 μ_{max} 에 이르는 발효시간도 증가했다. q_p 와 Q_p 는 $S_0=10\%$ 에서 보다 5%의 쪽이 낮은 것은 배양후 108시간째에서는 균체 증식속도가 5%에서 보다 10%의 쪽이 빠르고,

또한 발효액중의 잔당에서 에탄올로의 전환속도가 느렸기 때문이라고 생각된다.

초기 기질농도는 에탄올비생산속도, 생산성 및 수율에 대해서 제한적이고 더욱이 최대수율을 가져다 주는 기질농도는 최대에탄올비생산속도와 최대생산성을 가져다 주는 기질농도보다 낮기 때문이라고 알려져 있다. 본 실험의 결과에서도 최대에탄올수율은 초기 자일로스농도가 가장 낮은 5%에서 얻어졌지만 최대에탄올비생산속도와 최대생산성은 초기 자일로

[그림 6] Comparison of time courses of optical density, and D-xylose, ethanol, xylitol and xylulose concentration under different initial xylose concentrations by *P.stipitis*.

Cultivations were carried with 100ml growth medium in 500ml Erlenmyer flask equipped with a fermented plug filling with conc. sulfuric acid on the reciprocal shaker at 30°C and 90 rev./min.



스농도 10%에서 얻어졌다.

이상의 결과로부터 초기 자일로스농도가 10%를 초과하면 균체증식 및 에탄올생산에 대한 기질저해가 인정된다고 생각된다.

3. 에탄올의 저해

일반적으로 알코올발효에 있어서 균체증식과 에탄올생산성에 대한 에탄올저해에 대해서 Luong⁶²⁾은 다음과 같은 모델을 제시하고 있다.

$$(1-\mu/\mu_0) = \alpha \ln P - \alpha \ln P_m$$

여기서

$\mu_1:P>0$ 에서의 $\mu(h^{-1})$, $\mu_0:P=0$ 에서의 $\mu(h^{-1})$

P : 에탄올의 농도(g/l)

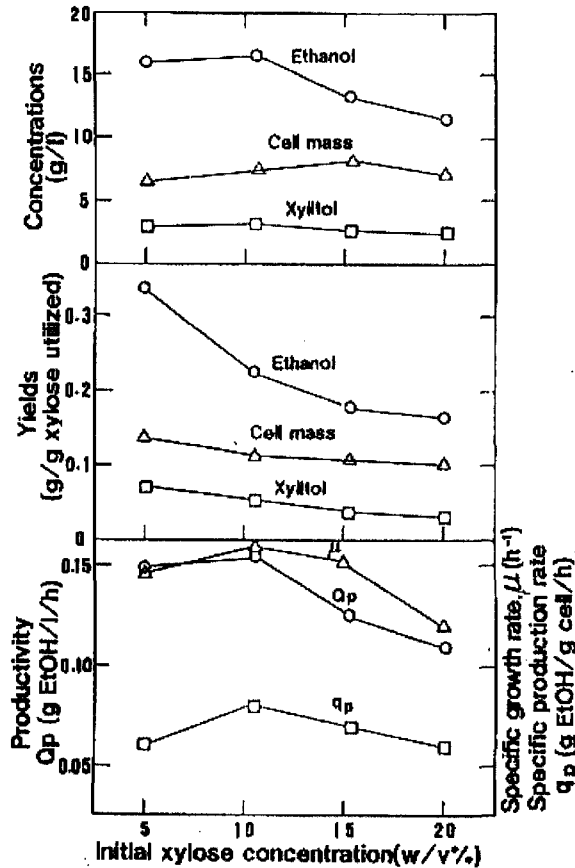
P_m : 균체증식이 완전히 정지되었을 때의 에탄올농도(g/l)

α : 무차원 상수

이 식으로부터 발효속도와 최대에탄올의 축적은 에탄올농도에 대한 세포의 내성에 의존한다는 것을 알 수가 있다.

*P. stipitis*에 의한 자일로스로부터의 에탄올 발효에 있어서 주요 산물인 에탄올의 균체증식에 미치는 영향에 대해서 검토하였다. 배양 조건으로서는 500ml 환저플라스크에 YP배지

[그림 7] Effect of initial xylose concentration on fermentation parameters in 500ml-flask culture. Cultivations were carried at 30°C and 90 rev./min.



50ml(자일로스농도 10%)를 넣고 에탄올을 첨가하여 그것의 농도를 0~4%까지 바꾸어 가면서 30°C에서 10시간 진탕배양을 하면서 경시적으로 측정된 OD(A:흡광도)를 [그림 8]에 나타내었다. 또한 에탄올농도별로 대수증식기 중의 평균비증식속도($\mu=1/A \text{ dA/dt}$ 에 의해)를 계산하고 에탄올 농도의 상관계수로서 표시하였다[그림 9].

첨가한 에탄올농도의 균체증식에 미치는 영향에 대하여 검토한 결과 비증식 속도(μ)는 에탄올농도가 낮을 때는 최대가 되고 그것이 증가함에 따라 급속히 감소하였다. 특히 에탄올농도 2%(이때의 $\mu=0.330\text{h}^{-1}$)에서 비증식속도가 늦어지고 3%($\mu=0.115\text{h}^{-1}$)에서의 증식은 현저하게 저해되었다[그림 9].

한편 에탄올을 첨가하지 않은 실제배양에서 μ 는 더욱 낮고, 플라스크배양에서는 생성된 에탄올농도 1.5%에 대하여 0.15h^{-1} 이고[그림 7], 최대에탄올농도를 가져다 준 통기량 0.2vvm의 발효조배양에서는 축적된 에탄올농도 3%에 대하여 μ_{max} 는 0.1h^{-1} 이었다[그림 5]. 이것은 균체증식이 첨가한 에탄올보다 생성된 에탄올에 의해서 보다 강하게 저해를 받기 때문이라고 생각된다.

4. 연속배양에 의한 속도론적 해석

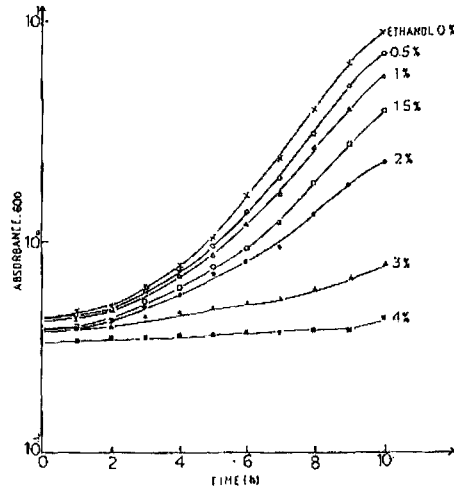
앞에서는 회분배양에 있어서의 각종 파라미터에 대하여 검토하였지만 보다 정확한 Kinetic parameter를 결정하기 위해서 연속배양에 의한 균체증식 및 에탄올생산에 대한 속도론적 해석을 하였다. 배양조건으로서 2.6 l 자퍼멘트를 이용하여 30 l, pH 6.0, 통기량 0.1 vvm과 교반속도 200rpm에서 공급 자일로스농도를 10g/l로 하고 기질회석속도(D)를 0.05에서 0.12 h⁻¹까지 변화시키면서 검토했다.

[그림 10]과 [그림 11]은 각종 발효속도를 계산하기 위해서 회석율별 균체량(OD), 자일로스농도, 에탄올 및 자일리톨농도의 경시변화를 나타낸 것이다. 각각의 배양은 어느 것이나 24시간 회분배양을 한 다음 연속배양을 개시하였다. 균체 및 에탄올농도는 D=0.05 h⁻¹에서는 배양후 66시간째, 0.08 h⁻¹에서는 54시간째, 0.1 h⁻¹에서는 48시간째, 0.12 h⁻¹에서는 배양후 44시간째에 각각 정상상태로 되었다. 자일로스는 D=0.05 h⁻¹에서 95%가 소비되었지만 42시간째부터 일정하게 유지되고, 0.08 h⁻¹에서는 99%가 소비되어 54시간째, 그리고 0.1과 0.12 h⁻¹에서는 양쪽 모두다 96%가 소비되었지만 연속배양 개시후 점차적으로 증가하여 54시간째에 정상상태에 이르렀다. 자일리톨은 어느 경우든 회분배양에서 0.27g/l 정도가 축적되었지만 연속배양으로 변경하고부터는 점차적으로 소멸되어 거의 축적되지 않았다.

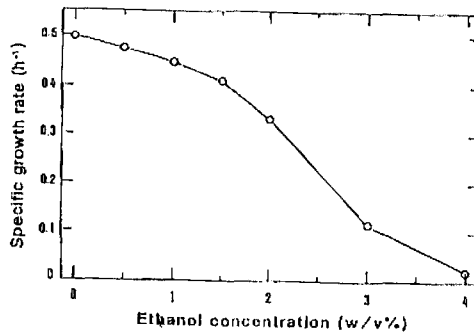
[그림 12]는 연속배양의 정상상태에서 얻어진 균체량, 에탄올 및 자일로스의 농도와 이들의 수율을 각각 회석율의 상관계수로서 플롯한 것이다. 회석속도를 0.04에서 0.12 h⁻¹까지 변화시켰던 바, 균체량과 에탄올농도는 D=0.08 h⁻¹이상에서 잔존 자일로스 농도의 증가에 따라 감소하였다. 그런데 회석율 0.08 h⁻¹ 이하에서의 에탄올농도의 감소는 자일로스가 거의 소비되어 버리고 생성된 에탄올이 기질로서 이용되었기 때문이라고 생각된다.

이 그래프에서는 나타나 있지 않지만 자일리톨은 D=0.05h⁻¹에서 약 0.27g/l로서 회석속도의 증가에 따라 감소하여 0.1h⁻¹이상에서는 거의 검출되지 않았다. 다음은 수율을 살펴보면 균체수율은 D=0.05 와 0.08 h⁻¹에서는 그다지 큰 차이가 없지만 그 이상에서는 점차적으로 감소하는 경향을 보이는 반면, 에탄올수율은 D=0.08h⁻¹에서 최대치를 나타내고 그 이상

[그림 8] Time courses of the absorbance on the growth of *P. stipitis* in different added ethanol concentration.



[그림 9] Effect of added ethanol concentration on specific growth rate *P. stipitis* in 500ml-flask culture. The temperature and initial xylose concentration were 30°C and 10w/v%, respectively.



에서는 점차적으로 감소하였다. 이 때의 에탄올수율은 소비 자일로스 1g당 0.434g으로서 이론수율 대비 94%였다.

[그림 13]에서는 유입 자일로스 농도 10g/l에서 비증식속도와 증식제한기질농도의 역수를 플롯한 것이다. 그 결과 최대비증식속도는 0.155 h⁻¹이고 증식제한기질농도는 1.64g/l였다. 이 때 생성된 에탄올농도는 약 2~4g/l로서 이 범위에서의 비증식속도식은 Monod model로 나타낼 수가 있었다.

[그림 14]는 자일로스의 비소비속도(ν) 및

에탄올의 비생산속도(q_p)를 비증식속도의 상관계수로서 표시하였다. 그 결과 ν 와 q_p 는 μ 의 증가에 따라서 직선적으로 증가하였다. 즉 이것은 앞에서 검토된 희석율의 조작범위내에서 기질 소비속도와 에탄올 생산속도가 균체증식속도에 의존하고 있다는 것을 의미한다.

IV. 고찰

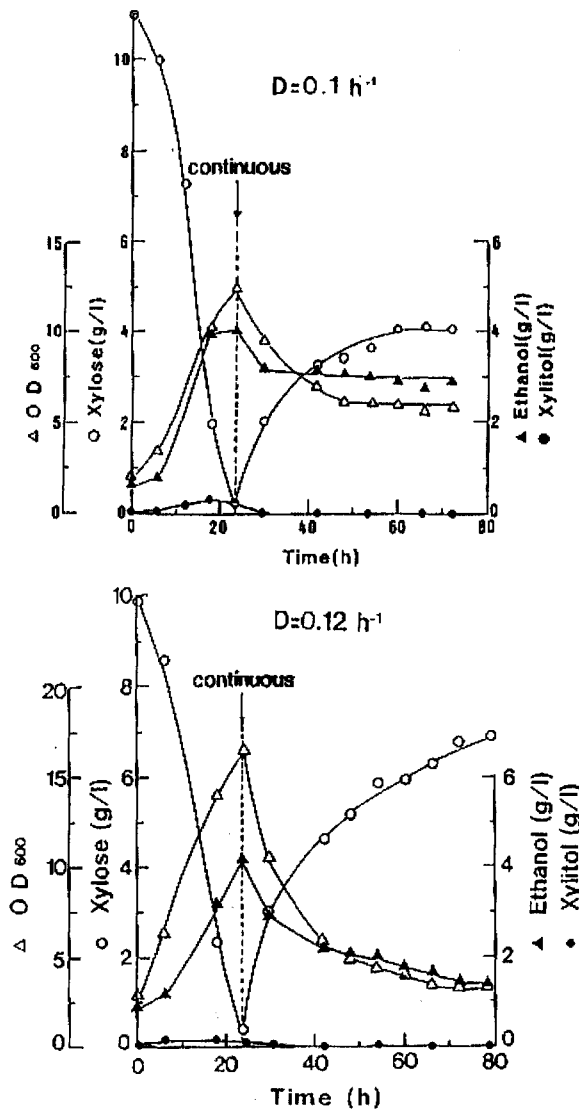
자일로스 자화성효모에 의한 D-xylose로부터의 에탄올발효에 관한 많은 논문을 검토하

였지만 동일 균체에서도 연구자에 따라 에탄올 및 부산물의 생성이 상당히 차이가 있다는 것을 알 수가 있었다. 이것은 자일로스로부터의 에탄올생산이 상당히 배양조건에 의존하고 있다는 것을 시사하고 있다. 자일로스 자화성 효모에 의한 자일로스에서 에탄올생산으로의

직접전환프로세스에 있어서 가장 중요한 배양 조건 파라미터로서는 통기조작, 당 및 에탄올의 내성과 부산물 자일리톨의 생성제어 등이 라고 전해지고 있다. 이것과 관련해서 아직 종합적으로 최적배양조건과 발효파라미터와의 상호관계에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

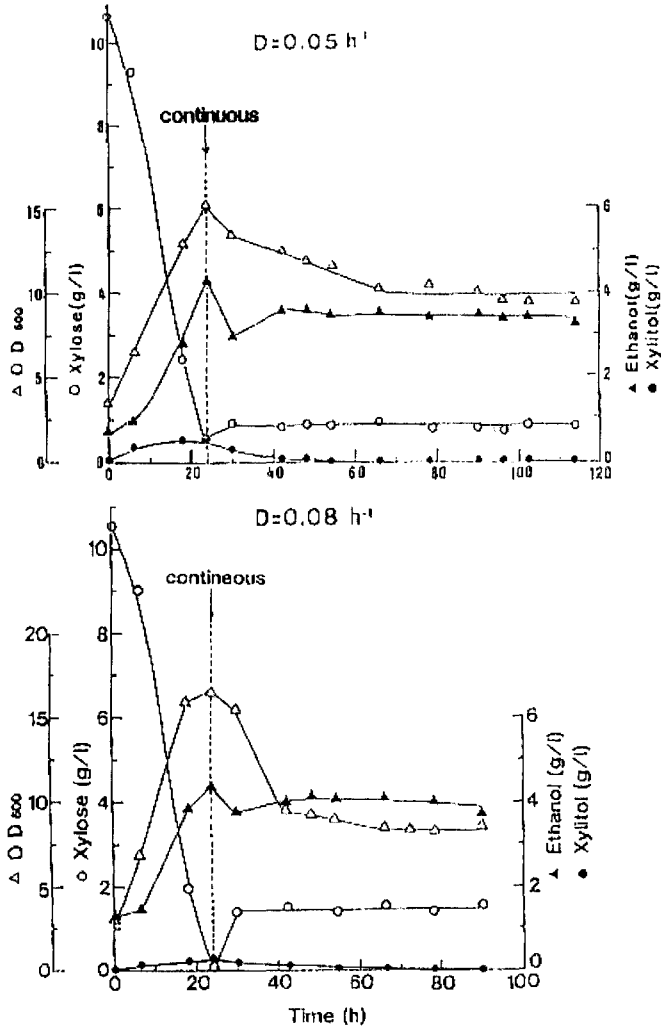
[그림 10] Time courses of ethanol fermentation from D-xylose in continuous culture process with 10 g/l of feed xylose concentration at dilution rate, 0.1 and 0.12/h, respectively.

Cultivations were done at 30°C, pH6.0, aeration 0.1vvm, and agitation 200 rpm.



[그림 11] Time courses of ethanol fermentation from D-xylose in continuous culture process with 10 g/l of feed xylose concentration at dilution rate, 0.05 and 0.08/h, respectively.

Cultivations are the same as in [그림 10].



그래서 본 연구에서는 자일로스 자화성효모인 *P. stipitis*에 의한 D-xylose로부터의 에탄올 생산의 최적화방안을 생각하고 회분 및 연속 배양에서 통기량, 초발기질농도, 희석율 등 배양조건이 주요 발효파라미터에 미치는 영향과 에탄올의 내성에 대해서 검토하였다.

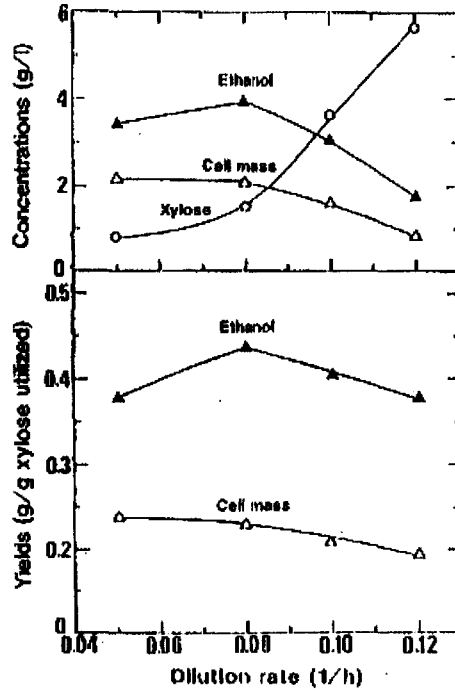
자일로스대사에 있어서 산소는 대사초기단계의 자일리톨에서 자일루로스으로 변환할 때에 생성되는 NADH의 산화에 필수적인 요소

라고 알려져 있다. 많은 연구자들이 다양한 방법으로 자일로스발효에 있어서 산소의 이용정도를 측정하고 그것이 에탄올생산에 어떠한 영향을 미치는가에 대해서 조사한 바 있다^{5-7,13,31-32,34,63}).

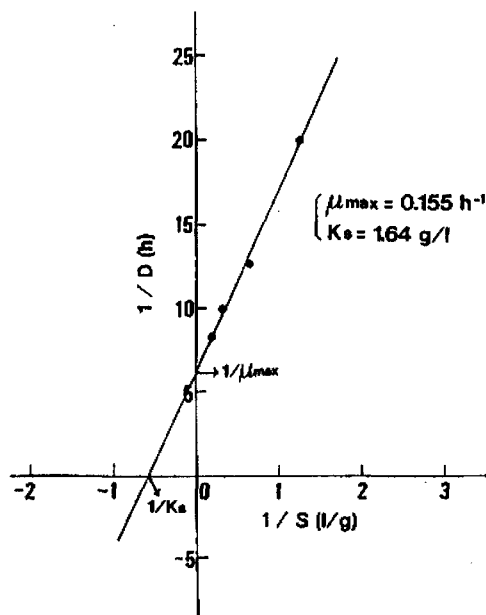
자일로스로부터의 에탄올생산에 있어서 산소의 영향을 조사하는 경우 더욱 현상을 복잡하게 하는 것은 산소량을 증가시키면 에탄올이 재산화되는 것이다⁶⁴. 즉 자일로스가 어느

[그림 12] Effect of dilution rate on the concentration of xylose, cell mass and ethanol, and yield of cell mass and ethanol.

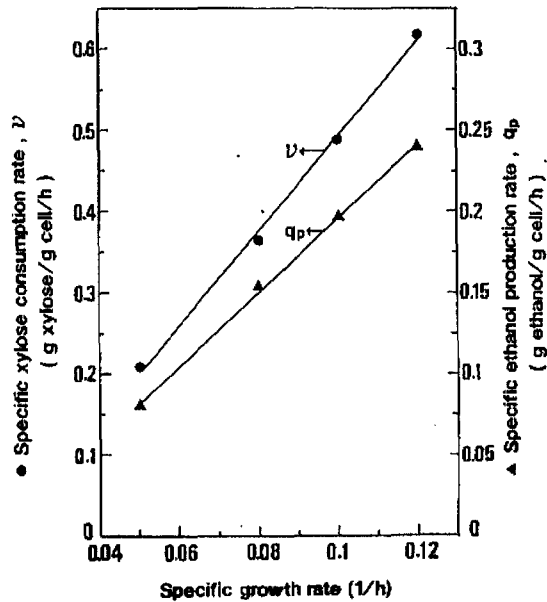
Cultivations were done at 30°C, pH6.0, aeration rate 0.1vvm, agitation speed 200rpm, and feed xylose concentration 10g/l.



[그림 13] μ_{max} and K_s for the growth of *P. stipitis* on D-xylose.



[그림 13] Effect of specific growth rate (μ) on specific rates of xylose consumption (ν) and ethanol production (q_p).



정도까지 소비된 다음 효모는 다시 탄소원으로 생성된 에탄올을 이용한다는 점이다⁶⁵⁾. *Pachysolen tannophilus*는 자일리로스 자화성효모 중에서 산소의 영향에 대해서 가장 철저하게 조사된 바 있고, 최근의 보고서에도 인정되고 있다. 그것에 의하면 호기조건에서 균체를, 혐기조건에서 자일리톨을, 산소제한조건에서는 에탄올을 각각 생성한다고 보고하고 있다^{5, 34, 63)}. 이것에 대해서 Brinennberg 등은 *P. stipitis*의 xylose reductase는 NADH보다 NADPH쪽과 보다 친화력이 크고, 활성이 높기 때문이라고 시사했다³⁴⁾. 그러나 통기량이 너무 과다하면 에탄올은 생산하지 않고 증식만 활발해진 다^{13,33)}.

Pa. tannophilus, *C. shehatae*, *P. stipitis*에 의한 자일리로스발효에 있어서 산소공급을 어느 정도 제한했을 때, 에탄올수율 및 에탄올생산 속도와 생산성이 자극되어^{32,34)}, 자일리톨은 축적되지 않았다고 시사했다^{24,65)}.

본 연구의 산소의 영향에 관한 플라스크배양에서도 에탄올비생산속도는 반험기조건(이 때의 $q_p=0.07$)이 호기조건($q_p=0.03g/l/h$)에 비해서 2배이상으로 높았다[그림 2] 및 <표 1>. 호기조건하에서는 균체증식속도가 증가하였다. 최적통기량을 조사하기 위해서 발효조에 의한 회분배양실험에서 통기량을 0.05에서 1.0vvm까지 변화시켜 제한통기를 한 결과, 에탄올수율은 그 생산성이 높은 통기량보다 훨씬 낮은 통기량에서 보다 높아진다고 하는 종래의 연구에서 시사한 바대로 에탄올수율은 통기 0.5vvm(이 때의 수율: $Y_{e/s}=0.247$)보다 0.2vvm($Y_{e/s}=0.317g/g$)에서 더 높았지만, 에탄올 생산성은 0.5vvm(이 때의 생산성: $Q_p=0.302$) 쪽이 0.2vvm($Q_p=0.285g/l/h$)보다 더 높았다[그림 5]. 즉 수율이 최대가 되는 통기량과 생산성이 최대가 되는 통기량은 서로 다르다. 이것은 산소의 공급속도를 높히므로서 균체증식속도가 촉진되기 때문이라고 생각된

다^{31,66}).

산소제한조건하에서 초발기질농도(S_0)를 5%에서 20%(w/v)까지 변화시키면서 배양하였던 바 에탄올수율은 $S_0=5\%$ 에서 0.33g/g가 20%에서는 0.16g/g로 되어 2배나 감소하였다. 최대비증식속도 및 에탄올비생산속도와 에탄올생산성은 $S_0=10\%$ 까지는 증가했지만, 그 이상의 높은 기질농도에서는 어느경우에서나 점차적으로 감소하고 있다. 그 결과 자일로스농도는 균체증식과 발효 및 수율에 제한적이고^{10,30}, 최대수율을 가져다 주는 기질농도는 에탄올비생산성과 에탄올생산성을 최대로 하는 기질농도보다도 더 낮았다[그림 7]. 비생산속도와 달리 에탄올수율은 자일로스농도의 증가에 따라 연속적으로 감소하고 있다. $S_0=5\%$ 에서 최대에탄올수율 0.33g/g를 얻었다. 여기서 에탄올의 감소는 기질레벨이 보호소 NAD를 제한하여 자일리톨에서 자일루로스로 변환하는 속도보다 자일루스가 자일리톨로 변환하는 속도가 클 때, 부분적으로 자일리톨의 축적을 증가시키기 때문이라고 생각된다[그림 7]. 가장 높은 발효성적은 에탄올수율이 0.25g/l이고, 에탄올생산성이 0.154g/l/h인 $S_0=10\%$ 에서 얻어졌다. 발효속도론적인 파라미터에 대한 초발기질농도의 영향을 살펴보면 배지중의 산소의 존재에 따라 에탄올생산프로세스에 있어서 초발기질농도에 의한 저해현상이 경감되었다. 그 실험로서 S_0 를 5에서20%까지 증가시켰던 바, $S_0=5$ 에서 10%까지는 에탄올비생산속도가 높아지고, 그 이후로는 기질저해가 일어났다.

일반적으로 알코올발효에 있어서 균체증식과 에탄올생산성에 대한 에탄올내성은 Luong의 모델이 적용되며⁶², 이것에 의하면 균체증식에 의존하는 발효속도 및 에탄올축적은 에탄올농도에 대한 세포내성에 의존한다. 최근

Slininger와 Bolen⁴⁰)에 의해 균체의 증식과 사멸속도에 관한 에탄올농도의 영향을 조사한 바 있다. 본 연구에서는 *P. stipitis*의 에탄올내성에 대해서 배지중의 에탄올농도 0에서 4%가 되도록 에탄올을 첨가하여 균체증식에 미치는 영향을 조사한 결과 에탄올농도 2%에서 비증식속도가 감소되고 3%에서는 증식이 현저하게 저하되었다[그림 7].

에탄올내성은 온도에 의존성이며 실제 배양도중 세포에 의해서 생성된 에탄올농도는 배지에 첨가한 에탄올농도보다 훨씬 증식을 저해한다⁶⁷⁻⁷⁰. 이것은 세포내의 에탄올축적 때문이라고 알려져 있다^{69,71-72}).

더욱이 이 현상은 세포내 에탄올축적에 대한 가설로 되었다⁷³⁻⁷⁵). 최근 Slininger등은 자일로스로부터 25 l에서 57g/l의 에탄올생산을 보고하고 있다¹⁸).

자일로스 발효는 글루코스 발효에 비해 에탄올저해에 대한 감수성이 높다. Du preez 등은 자일로스를 기질로 할 때 에탄올내성의 한계는 11~20°C에서 46~48g/l이며²¹), 이것은 *S. cerevisiae*의 13~27°C에서 76~112g/l에 비해 상당히 낮다^{62,76-77}). 이러한 점이 자일로스 자원으로부터 에탄올생산프로세스에 있어서 가장 큰 장애요소이다.

이를 극복하기 위한 방법으로는 에탄올내성 균주의 육종 또는 균체고정화 및 리사이클법에 의한 발효라든가 물리적 화학적 수단에 의해 산물 에탄올을 계외로 제거하는 추출발효 등이 검토되어야 할 것이라고 생각된다.

연속배양에 있어서 균체증식 및 에탄올생산에 대한 속도론적인 검토를 한 결과 에탄올수율은 희석율(D) 0.08h⁻¹에서 소비된 자일로스 1g당 0.434g의 에탄올생산으로 최대값을 나타내며 이론수율대비 94%였다[그림 12].

그리고 공급 자일로스 농도 10g/l에서 비

증식속도와 증식제한기질농도의 역수관계를 나타낸 Lineweaver Burg plot로부터 최대비증식속도(μ_{max}) 0.155h⁻¹에서, 증식제한기질농도(K_s)는 1.64g/l 이었다[그림 13].

생성된 에탄올농도 2~4g/l의 범위에서 비증식속도식은 Monod model로 나타낼 수 있다는 것을 알게 되었다. 또한 자일로스비소비속도(ν)와 에탄올비생산속도(q_p)는 비증식속도의 증가에 따라 거의 직선적으로 증가하였다(Fig.14). 한편 *Pa. tannophilus*에 의한 자일로스의 에탄올발효에 있어서 에탄올비생산속도는 균체증식속도에 의존하고 있다는 사실이 분명하게 관찰되었다. 희석율의 증가에 따라서 에탄올비생산속도의 직선적인 증가는 균체증식이 산물생성과 밀접한 관계가 있다는 것을 나타낸다.

*P. stipitis*는 비교적 에탄올수율이 높고 자일리톨생성이 낮기 때문에 헤미셀룰로스당으로부터 에탄올을 생산할 수 있는 유망한 자일로스 자화성효모이지만, 알코올발효에 이용되고 있는 *S. cerevisiae*에 비해서 자일로스발효속도가 느리고 에탄올내성이 약하다.

Jeffry 등은 자일로스로부터의 에탄올발효 프로세스는 산업화하기전에 적어도 실험실적 레벨에서 에탄올농도 40~50g/l, 에탄올수율 0.4g/g이상이 되어야 한다고 시사하고 있다.

이와 같은 문제점을 해결하기 위해서 현재로서는 고정화촉매기술을 응용함으로써 실현 가능성을 생각할 수 있다.

그리고 장래에는 유전자조작에 의한 균주의 개량으로서 *P. stipitis*의 자일로스 자화에 관여하는 효소를 *S. cerevisiae*에 도입하여 발현을 성공시키는 일과 이 효모의 자일로스대사에서 보조소 NADPH결합활성 즉 자일리톨생성을 제거하는 방법 및 알코올내성주의 개발 등이 기대되고 있다.

V. 요약

D-xylose는 글루코스에 비해서 미생물에 의해 자화되기 어렵고, 전통적인 알코올발효에 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*는 이것을 자화할 수가 없다. 자일로스로부터 알코올을 생산하는 효모로서는 *Pachysolen*속, *Pichia*속 또는 *Candida*속이 알려져 있지만 어느 것이나 알코올생성능력이 약하다. 이들 효모는 NADH(NADPH)-NAD(NADP)계를 보조소로 하여 자일로스가 자일리톨을 경유하여 자일루로스로서 변환하여 자화되는 것으로 알려져 있으며, 미량의 산소가 이 변환을 촉진하는 것으로 시사되고 있다.

본 연구에서는 자일로스 자화성효모 *Pichia stipitis* CBS 5773를 이용하여 자일로스로부터 에탄올생산에 대한 최적프로세스를 생각하고 통기량에 대해서 검토함과 동시에 연속배양법에 의한 최적발효조건에 관한 각종 파라미터를 검토하고 아래와 같은 결과를 얻었다.

(1) 균체증식 및 에탄올생산에 대한 통기량의 효과

플라스크 배양의 결과를 토대로 해서 2.6 l 발효조를 이용하여 pH6.0, 30°C, 교반속도 200rpm에서 초기 기질농도를 10%로 하고, 통기조건을 0.05~1.0vvm까지 변화시키면서 배양한 결과 균체증식은 통기량의 증가에 따라서 향상되었지만, 에탄올 축적량은 통기량 0.2vvm에서 32.4g/l로 최대값을 얻었고, 마찬가지로 소비된 자일로스량에 대한 에탄올수율($Y_{e/s}$) 및 그 생산성(Q_p)은 각각 0.318g/g과 0.285g/l/h로 최대가 되었다. 이 때의 최대비증식속도(μ_{max})와 최대에탄올비생산속도(q_p)는 각각 0.098h⁻¹과 0.153g/g/h이었다. 그러나 통기량 0.5vvm이상에서는 이들 배양파라미터값이

떨어졌다. 한편 중간생성물인 자일리톨의 생성은 통기량의 증가에 따라 감소하였다. 이러한 결과로부터 통기량은 0.2vvm이 최적조건이라고 생각되었다.

(2) 초기 기질농도의 영향

회분배양에 있어서 균체증식 및 에탄올생산에 대한 초기 기질농도(S_0)의 영향을 검토한 결과 S_0 를 5~20%(w/v)까지 증가시켰던 바, 최종 균체량에는 별로 영향을 미치지 않았지만 최대비증식속도(μ_{max})는 $S_0=15\%$ 이상에서는 저하되었다.

에탄올생산은 $S_0=10\%$ 까지는 거의 일정했지만 그 이상에서는 기질저해가 인정되며, 또한 에탄올수율($Y_{e/s}$)은 초기 기질농도의 증가에 따라서 감소하였다. 이들 결과로부터 초기 기질농도는 각종 파라미터에 대해서 제한적이고 $S_0=10\%$ 를 초과하면 균체증식과 에탄올생산에 대한 기질저해가 인정된다고 생각되었다.

(3) 에탄올에 대한 내성

플라스크배양에서 30°C, 자일로스농도 10%로 하고 에탄올농도를 0~4%(w/v)의 범위에서 변화시키면서 에탄올에 의한 균체증식의 저해에 대해서 검토한 바, 에탄올농도 2%(이 시점에서의 $\mu=0.33h^{-1}$)에서 비증식속도가 점차로 저하되어 3%($\mu=0.115h^{-1}$)에서는 현저하게 증식이 저하된다는 사실을 알 수가 있었다.

한편 최적 배양온도는 30°C이고 25°C에서는 30°C에서보다 에탄올수율은 다소 높지만, 균체증식과 기질소비 및 에탄올생산속도 등이 저하되고 생산성도 크게 떨어졌다.

(4) 연속배양을 이용한 속도론적 해석

회분배양에서는 각종 발효파라미터를 정확히 결정할 수 없기 때문에 회분배양과 동일한

발효조를 이용하여 통기량 0.1vvm, 교반속도 200rpm에서 공급 기질농도를 약 10g/l로 하여 기질희석속도(D)를 0.05에서 0.18h⁻¹까지 변화시키면서 균체증식 및 에탄올생산에 대한 속도론적인 검토를 한 결과, 생성된 에탄올농도 1.8~3.9g/l의 범위에서 최대 비증식속도 및 증식제한기질농도는 각각 0.155h⁻¹과 1.64g/l이고 비증식속도(μ)에 대한 자일로스농도의 영향은 Monod model식으로 표현할 수가 있었다. 또한 자일로스 비소비속도(ν)와 에탄올 비생산속도(q_p)는 μ 의 증가에 따라서 거의 직선적으로 증가하였다. 이 때 소비된 자일로스량에 대한 에탄올수율은 이론수율의 94%로서 0.434g/g이었다.

〈使用記號〉

A[OD]	optical density
C0	initial concentration of substance not produced or utilized by yeast at start of continuous culture (g/l)
Ct	concentration of substance not produced or utilized by yeast (g/l)
D	dilution rate (1/h)
k	proportional constant in Beer's law
P	product, ethanol concentration (g/l)
Pm	ethanol concentration which completely stops growth
$q_p(\rho)$	specific product rate of ethanol (g EtOH/g dry cell/h)
$q_{p,max}(\mu_{max})$	maximum specific production rate of ethanol(g EtOH/g dry cell/h)
Q_p	volumetric productivity of ethanol (g EtOH/l/h)
$Q_{p,max}$	maximum volumetric productivity of ethanol (g EtOH/l/h)

S_0	initial D-xylose concentration (g/l)
S	residual D-xylose concentration (g/l)
t	fermentation time (h)
X	dry cell concentration (g/l)
X_T	total dry cell concentration (g/l)
X_U	% xylose utilized
X_O	xylitol concentration (g/l)
x, s, p - - -	X, S, P at steady state of continuous culture (g/l)
$Y_{x/s}$	cell yield (g cell/g xylose utilized)
$Y_{e/s}$	ethanol yield (g ethanol/g xylose utilized)
$Y_{xo/s}$	xylitol yield (g xylitol/g xylose utilized)
α	dimensionless constant in Luong's equation
μ	average specific growth rate (h^{-1})
μ_{max}	maximum specific growth rate (h^{-1})
μ	specific growth rate at $P > 0$
μ_0	specific growth rate at $P = 0$
ν	specific xylose consumption rate (g xylose/g cell/h)
ν_{max}	maximum xylose consumption rate (g xylose/g cell/h)

〈参考文献〉

1. Tsao, G. T., Ladish, M. R., Voloch, M., Bienkowski, P. : Production of ethanol and chemicals from cellulosic materials, *Process. Biochem.*, 17, 5, 34-38 (1982)
2. Sciamanna, A. F., Freitas, R. F., and Wilke, C. R. : in "Composition and utilization of cellulose for chemicals from agricultural residues", Lawrence Berkeley Laboratory, publication 5966, Berkeley, CA (1977)
3. Barnett, J. A. : The utilization of sugars by yeasts, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 32, 125-234 (1976)
4. Phaff, H. J., Miller, M. W., Mark, E. W. : The life of yeasts, 2nd ed., Harvard University Press, Cambridge, Mass., p 142 (1978)
5. Schneider, H., Wang, P. Y., Chan, Y. K., Maleszka, R. : Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Lett.*, 3, 89-92 (1981)
6. Jeffries, T. W. : Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*, *Biotechnol. Lett.*, 3, 213-218 (1981)
7. Gong, C. -S., McCracken, L. D., Tsao, G. T. : Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, *Candida sp. XF217*, *Biotechnol. Lett.*, 3, 245-250 (1981)
8. Maleszka, R., Schneider, H. : Fermentation of D-xylose, xylitol and D-xylulose by yeasts, *Can. J. Microbiol.*, 28, 360-363 (1982)
9. Margritis, A., Bajpai, P. : Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces marxianus* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1039-1041 (1982)
10. Slininger, P. J., Bothast, R. J., van Cauwenberge, J. E., Kurtzman, C. P. : Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 371-384 (1982)
11. Dekker, R. F. H. : Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Lett.*, 4, 411-416 (1982)
12. Suihko, M. L., Drazic, M. : Pentose fermentation by yeasts, *Biotechnol.*

- Lett., 5, 107-112 (1983)
13. Du preez, J. C., van der walt, J. P. : Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*, *Biotechnol. Lett.*, 5, 357-362 (1983)
 14. Jefferies, T. W. : Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, 27, 1-32 (1983)
 15. Toivola, A., Yarrow, D., van der Bosch, E., van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A. : Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1221-1223 (1984)
 16. Du preez, J. C., and prior, B. A. : A quantitative screening of some xylose-fermenting yeast isolates, *Biotechnol. Lett.*, 7, 241-246 (1985)
 17. Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H., and Debus, D. : Xylose fermentation by yeasts, 3. Composition of *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*, *Biotechnol. Lett.*, 6, 395-400 (1984)
 18. Slininger, P. J., Bothast, R. J., Okos, M. R., and Ladish, M. R. : Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations, *Biotechnol. Lett.*, 7, 431-436 (1985)
 19. Linko, Y. -Y., Linko, P., etal. : Alcoholic fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis* yeast, *Biotechnol. Lett.*, 8, 47-52 (1986)
 20. Du preez, J. C., Bosch, M., and prior, P. A. : Xylose fermentation by *Candia shehatae* and *Pichia stipitis* : effects of pH, temperature and substrate concentration, *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 360-364 (1986)
 21. Du preez, J. C., Bosch, M., and prior, P. A. : Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 521-525 (1987)
 22. Panchal, C. H., Bast, L., Russell, I., and Stewart, G. : Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts, *Can. J. Microbiol.*, 34, 1317-1320 (1988)
 23. Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. : Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y7124 : sugar tolerance, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 29, 155-161 (1988)
 24. Ligthelm, M. E., prior, B. A., and du preez, J. C. : The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 63-68 (1988)
 25. Delgenes, J. P., Moletta, R., and Navarro, J. M. : Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y7124 : effects of the oxygen transfer rate on fermentation performance, *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 398-402 (1989)
 26. Du preez, J. C., van Driessel, B., and prior, B. A. : D-xylose fermentation by *Candia shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures, *Biotechnol. Lett.*, 11-2, 131-136 (1989)
 27. Rizzi, M., Klein, C., Schulze, C., Bui-Thanh, N. -A., and Dellweg, H. : Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP

- balances for modeling oxygen-limited growth and fermentation of yeasts *Pichia stipitis* with xylose as carbon source, *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 509-514 (1989)
28. Slininger, P. J., Bothast, R. J., Ladish, M. R., and Okos, M. R. : Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 35, 727-731 (1990)
29. Schneider, H., Wang, P. Y., Chan, Y. K., and Maleszka, R. : Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Lett.*, 3, 89-92 (1981)
30. Slininger, R. J., Bothast, R. J., Black, L. T., and Mcghee, J. E. : Continuous conversion of D-xylose to ethanol by immobilized *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2241-2251 (1982)
31. Schvester, P., Robinson, C. W., and Moo-Young, M. : Xylose fermentation to ethanol by *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 13, 131-152 (1983).
32. Du preez, J. C., prior, B. A., and Monteiro, A. -M.T. : The effect of aeration on xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pachysolen tannophilus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 261-266 (1984)
33. Bruinenberg, P. M., de Bot, P. H. M., van Dijken, and Scheffers, W. A. : NADH-linked aldose reductase : the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19, 256-260 (1984)
34. Watson, N. E., prior, B. A., du preez, J. C., and Lategan, P. M. : Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 447-450 (1984)
35. Jefferies, T. W., Fady, J. H., Lightfoot, E. N. : Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 171-176 (1985)
36. Bolen, P. L., and Detroy, R. W. : Induction of NADH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose, or D-galactose, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 302-307 (1985)
37. Alexander, N. J. : Temperature sensitivity of the induction of D-xylose reductase in *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 26, 1739-1744(1985)
38. Dekker, R. F. H. : Lipid-enhanced ethanol production from xylose by *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 605-608 (1986)
39. Lee, H., James, A. P., Zahab, D. M., Mahmoudides, G., Maleszka, R., and Schneider, H. : Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from D-xylose, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 1252-1258 (1986)
40. Slininger, P. J., Bolen, P. L., Kurtzm