

고정화 *Pichia stipitis*를 이용한 글루코오스/자일로오스 혼합당으로부터 에탄올 생산

신현석¹ · 강성우¹ · 이상준¹ · 장은지¹ · 서영웅² · 김승욱^{1*}

¹고려대학교 화공생명공학과

²한국과학기술연구원 청정에너지기술센터

Ethanol Production with Glucose/Xylose Mixture by Immobilized *Pichia stipitis*

Hyun Seok Shin¹, Seong Woo Kang¹, Sang Jun Lee¹, Eun Ji Jang¹,
Young-Woong Suh², and Seung Wook Kim^{1*}

¹Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

²Korea Institute of Science and Technology, Clean Energy Center Seoul 136-791, Korea

Abstract To increase the production of ethanol by using sugar from lignocellulosic biomass, pentose and hexose have to be fermented simultaneously by yeast. The effects of mixed sugar and nitrogen on ethanol production by immobilized *Pichia stipitis* KCCM 12009 were investigated. When optimal mixed sugar and nitrogen concentration were 5% (Glucose/Xylose = 3:1) and 1%, respectively, ethanol concentration produced by immobilized *P. stipitis* was 19-20 g/L. In repeated fed-batch by immobilized *P. stipitis*, all glucose was consumed very quickly at 1-3% mixed sugar concentration. But, xylose consumption was decreased as the mixed sugar concentration increased. Also, ethanol (5.6 g/L) was stably produced and ethanol production rate was 0.13 g/L · h in immobilized cell reactor (ICR) with 1% mixed sugar (Glucose/Xylose = 3:1) as feeding media.

Keywords: Ethanol, Glucose/xylose mixture, *Pichia stipitis*; Immobilized cell reactor (ICR)

서 론

바이오에탄올은 석유를 대체하여 수송용 연료로 사용될 수 있는 주요한 연료이다. Cellulosic 에탄올은 나무나 풀, 식물의 비식용 부분으로부터 생산되는 에탄올을 말한다. 즉, cellulosic 에탄올은 식물의 가장 큰 부분을 차지하는 리그노셀룰로오스로부터 생산되는 바이오연료이다. 리그노셀룰로오스는 크게 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 그리고 리그닌으로 구성되어 있다 [1-4]. Corn stover, switchgrass, miscanthus, woodchips 그리고 잔디나 나뭇가지는 에탄올 생산을 위한 대표적인 cellulosic 물질들이다. 리그노셀룰로오스를 이용하

여 에탄올을 생산하는 것은 옥수수나 사탕수수를 이용하는 것과 비교했을 때 다양하고 풍부한 원료를 이용할 수 있다는 장점이 있으나 미생물 발효를 통해 에탄올을 생산하기 위해서는 당 단위체를 만들기 위해 복잡한 공정이 필요하다는 단점이 있다 [5,6]. 전통적으로 6탄당을 탄소원으로 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 에탄올을 생산하는 방법은 주류산업에서 사용되어 왔다. 리그노셀룰로오스의 경우, 복잡한 탄수화물적 특성으로 인해 가수분해물에 자일로오스와 아라비노오스 (리그노셀룰로오스의 헤미셀룰로오스부터 발생되는 5탄당 물질) 같은 물질이 존재하게 된다. 예를 들면, 옥수수 껍데기의 가수분해물의 경우는 전체 발효 가능한 당의 30% 정도가 자일로오스이다. 결과적으로 가수분해물에 존재하는 모든 당을 이용할 수 있는 균주의 발효 능력이 cellulosic 에탄올과 바이오 기반 화학물질의 경제적 경쟁력을 증가시키기 위해 필수적인 요소다.

*Corresponding author

Tel: +82-2-3290-3300, Fax: +82-2-926-6102

e-mail: kimswo@korea.ac.kr

식물의 바이오매스 가수분해물의 경우, 5탄당인 자일로오스가 주요 단당이지만 이는 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해 발효가 되지 않는다. 비록 *S. cerevisiae*가 자일로오스를 발효하거나 동화시킬 수 없지만 이는 효모의 일반적인 성질이 아니다. 자일로오스의 발효에 관한 연구는 1980년대 초부터 이루어져 왔으며 *Pachysolen tannophilus*와 *Candida tropicalis* 같은 효모는 자일로오스를 발효하여 알코올을 생산할 수 있다는 것이 밝혀졌다 [7,8]. 자일로오스 배지에서 성장하는 200여종의 효모 균주들을 집중적으로 분류, 선별하여 실험한 결과 20 g/L의 자일로오스를 탄소원으로 발효 실험을 한 결과 0.1-1.0 g/L의 에탄올을 생산하는 19가지 균주들을 찾아냈다. *Brettanomyces naardenensis*, *Candida shehatae*, *Candida tenuis*, *Pa.tannophilus*, *Pichia segobiensis*, 그리고 *Pichia stipitis*와 같은 균주들은 1.0 g/L 이상의 에탄올을 생산하였다 [9].

자일로오스의 이용은 리그노셀룰로오스를 연료나 화학물질로 효율적인 전환을 하기 위한 필수적인 부분이다 [10]. 현재 소수의 효모만이 자일로오스를 직접 에탄올로 발효시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, 전환율과 수율의 측면에서 바이오에탄올의 상업화를 위해 개선이 필요한 상황이다. 리그노셀룰로오스 가수분해물에 존재하는 글루코오스가 자일로오스 이용을 억제하기 때문에 자일로오스로부터 에탄올로 전환을 최대화하기 위해서는 글루코오스의 조절이 이루어져야 한다. 리그노셀룰로오스로부터 에탄올로 상업적인 생물전환을 위해서는 혼합당의 효율적인 발효가 필요하며 생산 수율이 낮고 폐기물의 처리비용이 비싸다는 단점을 극복해야 한다. 리그노셀룰로오스는 공급 원료에 따라 다양하지만 크게 6탄당인 D-글루코오스, D-마노오스, D-갈락토오스와 5탄당인 D-자일로오스, L-아라비노오스의 5가지 종류의 당을 포함하고 있다. 과당과 수크로오스는 일반적으로 리그노셀룰로오스에서는 나타나지 않는다. *S. cerevisiae*를 이용한 글루코오스의 발효는 수 천년 동안 이루어져 온데 비해 5탄당의 발효는 상대적으로 최근에 많은 연구가 이루어져 왔다. 그러나 아직까지 여러 문제점을 안고 있다. 그러므로 본 연구의 목적은 글루코오스와 자일로오스의 혼합당을 동시에 발효하여 에탄올 생산을 증가시키는 것이며, 또한 에탄올 생산에서의 세포고정화의 영향과 ICR (immobilized cell reactor)을 이용한 혼합당에서의 에탄올 연속생산을 수행하는데 있다.

실험재료 및 방법

균주

본 연구에서는 에탄올 발효를 위한 균주로서 *Pichia stipitis* KCCM 12009가 사용되었으며 1개월에 한번씩 YM 한천 배지에 계대배양하였다.

배지와 배양조건

P. stipitis KCCM 12009은 YM broth에서 24시간 동안 30°C, 200 rpm 조건하에서 종균배양한 후 혼합당 (글루코오스/자일로오스 = 3 : 1) 50 g/L, yeast extract 5 g/L, Bacto-peptone 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 1 g/L으로 구성된 본 배양 배지에 종균 배양액을 5% (v/v)로 접종하고, 30°C, 200 rpm 조건으로 배양하였다. 또한 고정화된 세포는 100 mL 본배양 배지가 들어있는 500 mL 플라스크에서 30°C, 150 rpm 조건으로 배양하였다.

세포고정화

세포고정화는 소듐알지네이트 (Sodium alginate)를 이용한 포괄법을 이용하였다. 세포성장이 대수기에 있을 때 원심분리로 세포를 회수한 후 2% 소듐알지네이트 용액과 혼합하였다. 혼합액을 정량펌프를 이용하여 주사바늘 (ID 1.0 mm)로부터 방울로 0.1 M CaCl₂ 용액에 떨어뜨린 후 고정화된 담체의 강도를 높이기 위하여 4°C에서 24시간 보관하였다. 고정화된 세포를 이용하여 에탄올을 생산하기 위해서 담체를 멸균수로 충분히 씻었다.

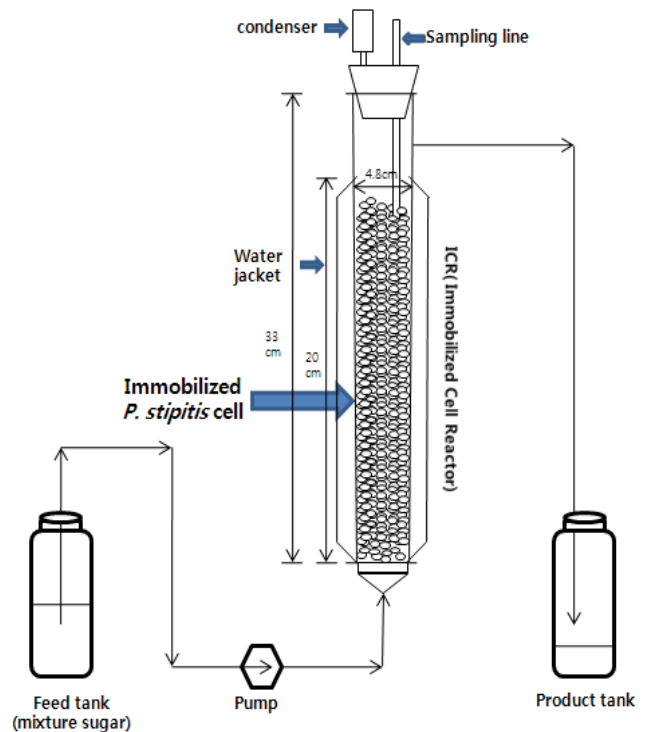


Fig. 1. Schematic diagram of ICR (immobilized cell reactor).

에탄올 (ethanol) 및 당 (sugar) 농도 측정

에탄올 및 당 농도를 측정하기 위해 배양액 5 mL을 취하고 8,000 × g에서 15분 동안 원심분리기를 이용하여 균체

를 침강시킨 후 상등액을 0.20 μm 의 필터 (Advantec, Japan) 로 필터링한 후 HPLC 분석용 샘플을 준비하였다. HPLC는 refractive index detector가 탑재된 YOUNG-LIN M930 (Korea)모델을 이용하였으며, 컬럼 (column)은 BioRad사의 Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm)을 사용하였다. 이때, 컬럼의 온도는 55 $^{\circ}\text{C}$ 였으며, 이동상(mobile phase)은 5 mmol H_2SO_4 이었고, 유량은 0.8 mL/min로 하였다.

고정화 세포 반응기 (Immobilized Cell Reactor, ICR) 시스템

ICR 반응기는 Fig. 1에 도식하였다. 500 mL 반응기에 고정화된 담체를 약 400 mL 넣고 120 mL 생산배지 (2% 혼합당)를 공급한 후 세포 활성화를 위하여 6시간 정체배양 하였다. 세포활성화 후 새로운 1% 혼합당 생산배지를 정량 펌프 (EYELA, Japan)를 이용하여 0.32 mL/min 속도로 연속적으로 반응기에 공급하면서 에탄올을 생산하였다.

결과 및 고찰

고정화 cell에 대한 혼합당 (글루코오스/자일로오스)의 영향

혼합당을 이용하여 에탄올을 생산하기 전에 xylose 농도에 따른 free cell의 성장을 관찰하여 고정화 실험에서의 당 농도를 결정하고자하였다. *P. stipitis* KCCM 12009의 발효 시, 여러 가지 자일로오스 농도 중에서 5% 자일로오스만이 48시간 내에 모두 소비되었으며, 그 이상의 자일로오스 농도에서도 거의 비슷하게 48시간 동안에 약 50 g/L 자일로오스를 사용하였다. 에탄올 농도와 생산속도, 그리고 수율 ($Y_{p/s}$, g/g)은 10% 자일로오스 농도까지는 비슷하였지만 12.5% 자일로오스 농도에서는 낮아졌다 (Table 1). 따라서 고정화 실험에서는 탄소원 농도를 5%로 맞추어 실험하였다. *P. stipitis*를 이용하여 10% 이하의 자일로오스 농도로부터 에탄올 발효시 에탄올 생산속도는 약 0.34-0.35 g/L·h 이었지만, 12.5%에서는 생산속도가 0.26 g/L·h로 낮았다. 이러한 결과로부터 자일로오스 농도가 10% 이상에서는 높은 당 농도로 인하여 발효보다는 균체 생존을 위한 대사당 소비가 이루어진다고 사료된다. Agbogbo 등 [11]은 *P. stipitis* CBS 6054를 이용하여 6% 자일로오스로부터 에탄올을 생산할 때 에탄올 생산속도는 0.20 g/L·h이었다.

Table 1. Comparison of parameters on various xylose concentrations in ethanol fermentation by using free *Pichia stipitis*

Parameter	Xylose concentration (g/L)			
	50	75	100	125
Maximum ethanol conc. (g/L)	16.59	16.47	16.08	12.44
Ethanol production rate (g/L·h)	0.35	0.34	0.34	0.26
Residual xylose conc. (g/L)	0	23.36	48.61	75.40
Ethanol yield on substrate ($Y_{g/g}$)	0.33	0.32	0.31	0.25

*P. stipitis*가 자일로오스보다 더 선호하는 기질이 글루코오스이므로 혼합당의 경우 자일로오스가 소비되기 전에 글루코오스가 먼저 사용된다. 이것은 이화작용 억제현상에 따라 글루코오스가 자일로오스 흡수를 억제하기 때문이다. 그러므로 5% 혼합당에서 글루코오스와 자일로오스의 혼합비를 변화시켜서 발효함으로써 에탄올 생산에 적절한 비율을 찾고자 하였다. 이러한 혼합당으로 부터 고정화된 *P. stipitis*를 이용하여 에탄올 생산에 대한 결과는 Fig. 2에 나타내었으며, 여러 가지 변수들에 대해서는 표 2에 정리하였다. Fig. 2에 나타나는 바와 같이 글루코오스가 먼저 소비된 후 자일로오스가 소비되었다. 글루코오스와 자일로오스가 1 대 3으로 섞인 혼합당에서 글루코오스가 12시간 만에 소비된 반면 자일로오스는 48시간에 약 70%만이 소비되었다. 그러나 글루코오스와 자일로오스가 3 대 1로 섞인 혼합당에서는 글루코오스와 자일로오스는 각각 24시간과 48시간에 소비되었고, 48시간에 21.4 g/L 에탄올이 생산되었다. 48시간 후의 최대 전환율 (conversion rate)은 글루코오스와 자일로오스가 3 : 1로 섞인 혼합당에서 91% 이었으며, 최종 에탄올 농도와 에탄올 수율 등도 다른 혼합당보다도 가장 높았다 (Table 2). 따라서, 계속적인 실험에서는 글루코오스와 자일로오스가 3 : 1로 혼합된 5% 당을 사용하였다.

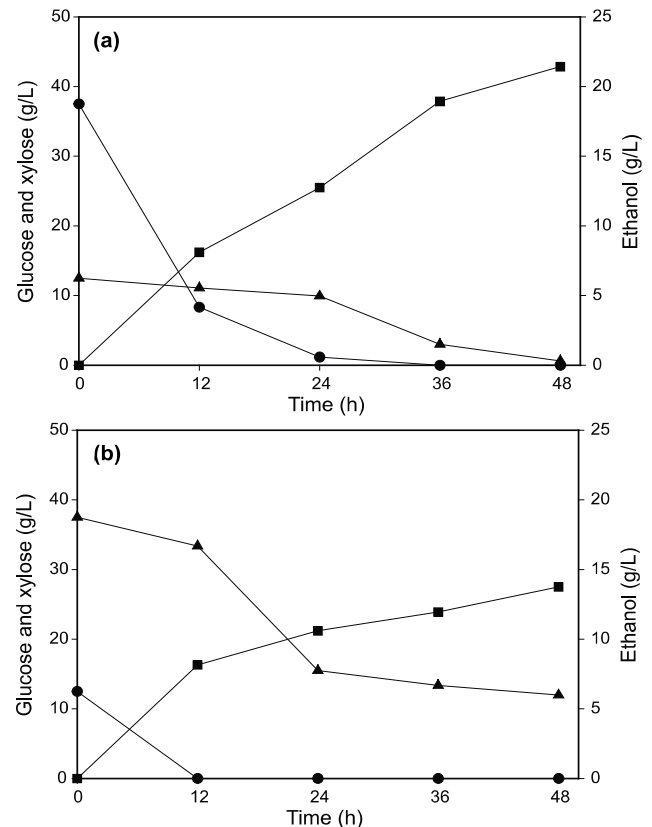


Fig. 2. Effect of mixed ratio between glucose and xylose on the production of ethanol by immobilized *P. stipitis*. The medium contained 5% mixed sugar. A; Glucose : Xylose = 3 : 1, B; Glucose : Xylose = 1 : 3. ●; glucose, ▲; xylose, ■; ethanol.

Table 2. Comparison of parameters on the ratio of glucose and xylose in ethanol fermentation using 5% mixed sugar by immobilized *Pichia stipitis*

Parameter	Ratio of glucose and xylose		
	3 : 1	1 : 1	1 : 3
Maximum ethanol conc. (g/L)	21.43	19.0	13.75
Ethanol production rate (g/L·h)	0.45	0.40	0.29
Ethanol yield on substrate ($Y_{g/g}$)	0.43	0.37	0.36

고정화 cell에 대한 Peptone과 Yeast Extract의 영향

에탄올 생산배지는 peptone과 yeast extract가 질소원으로 사용되었다. 2개 질소원의 비율은 1 : 1로 일정하게하고 농도만을 0-5%로 변화시켜 고정화된 *P. stipitis*을 이용하여 에탄올 생산변화를 조사하였다 (Fig. 3). 질소원을 첨가하지 않은 경우는 글루코오스와 자일로오스의 소비속도가 가장 느렸다. 또한 질소원 0.05%와 0.1% 농도에서도 글루코오스와 자일로오스의 소비속도가 나머지 다른 농도에 비해서 크게 떨어졌으며, 에탄올 생산도 약 9.6-9.9 g/L로 낮았다. 질소원이 1%, 2%, 그리고 5% 농도로 첨가된 경우에는 글루코오스가 발효 12시간 만에 완전히 소비되고 자일로오스도 발효 36시간에 거의 소비되었으며, 이때 에탄올 생산은 약 18.9-20.3 g/L로 비슷하였다. 이러한 결과로부터 고정화된 *P. stipitis*을 이용하여 에탄올 생산에는 5% 혼합당과 1% (w/v) peptone과 1% (w/v) yeast extract가 선정되었다.

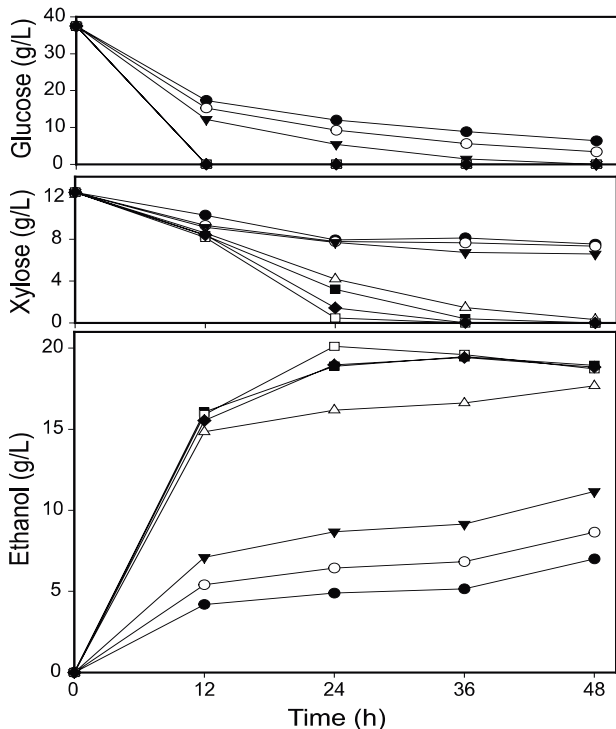


Fig. 3. Effect of nitrogen (peptone and yeast extract) concentration on the production of ethanol by immobilized *P. stipitis* with 5% mixed sugar (Glucose : Xylose = 3 : 1). ●, none; ○, 0.05%, ▼, 0.1%, △, 0.5%, ■, 1.0%, □, 2.5%, ◆, 5.0%.

반복적 유가식 배양에 의한 에탄올 생산

고정화된 *P. stipitis*을 이용하여 반복적 유가식배양 (repeated fed-batch)으로 에탄올을 생산하였다 (Fig. 4). 공급용 배지의 혼합당 농도를 1%-3%까지 변화시키면서 에탄올을 생산했을 때 모든 당 농도에서 글루코오스는 빠르게 소비되어지만, 혼합당의 농도가 높아질수록 자일로오스의 소비속도는 점차적으로 감소하였다. 즉 혼합당 농도가 증가하면서 더불어 당 소비속도는 감소하였다. 그러므로 에탄올 생산시간도 혼합당 농도의 증가와 함께 늘어났다. 1% 혼합당을 이용한 경우는 처음 발효 12시간 후부터 6시간 마다 신선한 생산배지를 공급하였으며, 3회 반복 배양 후 고정화된 *P. stipitis*가 활성화되어 에탄올 생산량도 증가하여 전환율이 95% 이상이었다. 또한 2%와 3% 혼합당을 이용한 경우는 처음 발효 24시간과 30시간 후부터 12시간과 18시간 마다 새로운 생산배지를 공급하였으며, 이때 에탄올 전환율은 약 85% 이하였다. 이러한 결과를 기초로 하여 고정화된 *P. stipitis*가 충전된 ICR (Immobilized cell reactor)에서 반응기의 크기, 혼합당의 농도, 그리고 생산배지 공급속도 등 에탄올 생산을 위한 운전조건에 대한 정보를 예측할 수 있었다.

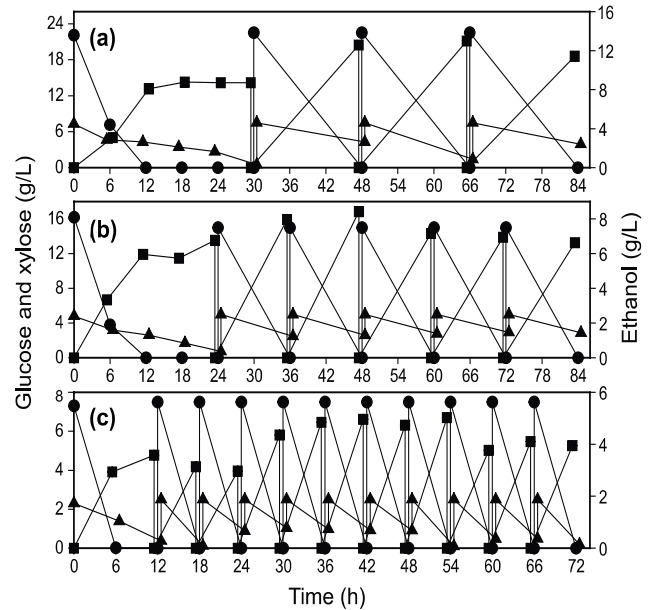


Fig. 4. Repeated fed-batch culture of immobilized *P. stipitis* with various mixed sugar (Glucose : Xylose = 3 : 1) concentration. A; 3%, B; 2%, C; 1%. ●; glucose, ▲; xylose, ■; ethanol.

ICR에서 에탄올 생산

반복적 유가식 배양 결과와 여러 가지 변수 등을 고려했을 때 ICR에 적용할 수 있는 혼합당의 농도는 2% 이하였다. 그러므로 500 mL ICR 반응기에 고정화된 *P. stipitis* 담체를 약 400 mL 넣고 120 mL 생산배지 (2% 혼합당)를

공급한 후 세포 활성화를 위하여 6시간 정체배양하였다. 세포활성화 후 새로운 1% 혼합당 (글루코오스/자일로오스 = 3 : 1) 생산배지를 정량펌프를 이용하여 0.32 mL/min 속도로 연속적으로 반응기에 공급하면서 에탄올을 생산하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이 글루코오스는 전체 발효 동안 완전히 소모되었으며, 새로운 생산배지를 공급하는 초기에는 자일로오스의 농도가 증가하는 그림을 보여주고 있는데, 이는 고정화된 *P. stipitis*의 활성화 시간이 짧아서 충분히 자일로오스를 이용하지 못하였기 때문으로 판단된다. 그러나, 시간이 지남에 따라 고정화된 *P. stipitis*이 활성화되어 자일로오스 이용율이 높아짐에 따라 자일로오스 농도는 감소하기 시작하여 발효 후반부에는 일정한 자일로오스 농도 (0.3 g/L)를 유지하면서 안정적으로 에탄올을 생산하였다. 최종적으로 70시간 동안 생산된 에탄올 농도는 5.6 g/L이었으며, 혼합당은 약 92-95% 소비되었고, 이때 에탄올 생산속도는 0.13 g/L·h이었다. 한편 2% 혼합당을 이용하여 ICR에 공급했을 때는 글루코오스는 완전히 소비되었지만 자일로오스는 30-40%만 이용되었다. 이러한 혼합당을 이용한 에탄올 연속배양에서 균주들의 자일로오스의 이용이 낮기 때문에, 전체적인 공정에서 혼합당이 낮은 농도로 공급되는 생산배지의 문제점을 해결하기 위하여 여러 가지 시도가 이루어지고 있다.

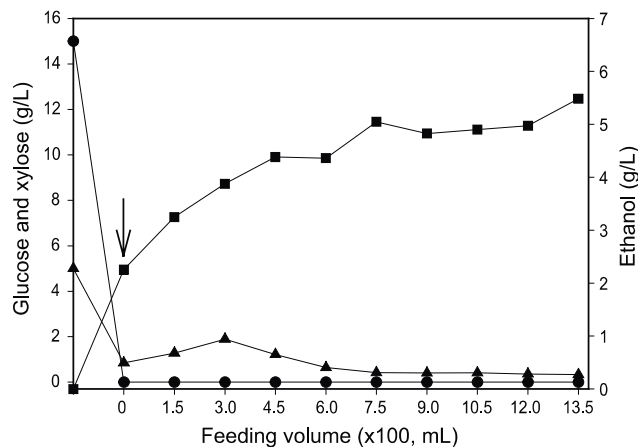


Fig. 5. Ethanol production by immobilized *P. stipitis* in ICR containing 1.0% mixed sugar (Glucose : Xylose = 3 : 1). Feeding rate was 0.32 mL/min. Arrow indicates feeding start after 6 h of activation. ●; glucose, ▲; xylose, ■; ethanol.

요약

리브노셀룰로오스로부터 생산된 글루코오스와 자일로오스의 혼합당을 동시에 발효하여 에탄올 생산을 증가시키며, 또한 에탄올 생산에서의 세포고정화의 영향과 ICR (immobilized cell reactor)을 이용한 혼합당에서의 에탄올 연속생산을 수행하였다. 고정화 *P. stipitis*를 이용한 플라스크에서 에탄올을 생산에 대한 혼합당과 질소원의 영향으

로부터 5% 혼합당 (글루코오스/자일로오스 = 3 : 1)과 1% 질소원이 최적으로 타나났으며, 이때 생산된 에탄올 농도는 약 19-20 g/L이었다. 고정화된 *P. stipitis*을 이용하여 반복적 유가식배양 (repeated fed-batch)으로 에탄올을 생산하였을 때는 모든 당 농도에서 글루코오스는 빠르게 소비되었지만, 혼합당의 농도가 높아질수록 자일로오스의 소비속도는 점차적으로 감소하였다. 즉 혼합당 농도가 증가하면서 더불어 당 소비속도는 감소하였다. 또한 ICR에서 1% 혼합당을 연속적으로 공급하면서 에탄올을 안정적으로 생산하여, 에탄올 농도는 5.6 g/L이었고 에탄올 생산 속도는 0.13 g/L·h이었다.

감사

본 연구는 한국과학기술연구원 청정에너지기술센터의 미래원천연구사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 5월 14일, 게재승인 : 2010년 8월 9일

REFERENCES

- Jeffries, T. W. and Y. S. Jin (2006) Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 495-509.
- Ingram, L. O., H. C. Aldrich, A. C. Borges, T. B. Causey, A. Martinez, F. Morales, A. Saleh, S. A. Underwood, L. P. Yomano, S. W. York, J. Zaldivar, and S. Zhou (1999) Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol. Prog.* 15: 855-866.
- Perez, J., J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia, and J. Martinez (2004) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5: 53-63.
- Zaldivar, J., J. Nielsen, and L. Olsson (2002) Fuel ethanol production from lingocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 17-34.
- Aristidou, A. and M. Penttila (2000) Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 187-198.
- Klinke, H. B., A. B. Thomsen, and B. K. Ahring (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 10-26.
- Kuyper, M., M. M. Hartog, M. J. Toirkens, M. J. Almering, A. A. Winkler, J. P. van Dijken, and J. T. Pronk (2005) Metabolic engineering of a xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain

- for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Res.* 5: 399-409.
8. Gárdonyi, M. and B. Hahn-Hägerdal (2003) The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 252-259.
 9. Toivola, A., D. Yarrow, E. Van den Bosch, J. P. van Dijken, and W. A. Scheffers (2004) Ethanol fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1221-1223.
 10. Kang, S. W., Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong, and S. W. Kim (2004) Production of cellulases and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 91: 153-156.
 11. Agbogbo, F. K., C. K. Guillermo, T. S. Mads, and S. W. Kevin (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* 41: 2333-2336.