한국생물공학회지 제7권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 7. No. 1. 27-31(1992)

# 효모에 의한 Xylulose 로부터의 에탄올 생산

안 동 군·이 광 근·*서 진 호
서울대학교 식품공학과

# Ethanol Production from Xylulose by Saccharomyces cerevisiae

Dong-Kun Ahn, Kwang-Geun Lee and *Jin-Ho Seo
Department of Food Science and Technology
College of Agriculture and Life Science
Seoul National University

## ABSTRACT

Xylose represents a major component of cellulosic materials. This paper describes patterns of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* from xylulose, which is an isomer of xylose. Special emphasis was placed on the effects of xylulose concentration and growth temperature on cell growth and ethanol yield. The maximum specific growth of 0.087 $1/hr^{-1}$ was obtained at an initial xylulose concentration of 5 g/l. The ethanol yield was propotional to initial xylulose concentrations. A xylulose concentration of 16 g/l resulted in the maximum ethanol yield of 0.49 g EtOH/g xylulose, which corresponds to 90% of a theoretical value. It is interesting to note that xylulose metabolism was accelerated by the presence of glucose as a carbon source.

## 서 론

D-xylose 는 재생자원의 약 30%을 구성하는 hemicellulose 의 주성분으로, 목재와 농산폐기물로부터 얻어지는 재생자원에 존재하는 당질 가운데서 포도당 다음으로 풍부하며 5탄당으로서는 가장 풍부한 당질이다 (1). 산의 가수분해에 의해서 xylose 는 hemicellulose 로부터 80-85%의 수율로 얻을 수 있다. 이러한 hemicellulose 를 이용하여 경제적으로 알콜을 생산하기 위한 연구는 국내·국외에서 다각적으로 이루어지고 있으나, 기술상의 문제점은 hemicellulose 의 주성분인 D-xylose 를 재래의 발효 효모인 *S.cerevisiae* 가 직접 알콜로 전환할 수 없다는 것이다 (2).

미생물에 의한 xylulose 이용의 첫 단계는 xylulose 로 전환시키는 것이다. Bacteria의 경우는 xylose isomerase에 의하여 xylose 를 xylulose 로 이성화시킨 후 xylulose 가 xylulose-5-phosphate 로 인산화된다 (3). 반면 mycelial fungi와 yeast 는 xylose 가 NADPH-linked xylose reductase 에 의하여 xylitol 로 환원되고, 다시 NAD-linked xylitol dehydrogenase 에 의하여 xylulose 로 산화된 후, xylulokinase 에 의하여 xylulose-5-phosphate 로 인산화되며, 이들 효소들은 xylose 에 의해 유도된다 (4,5). Xylulose-5-phosphate 의 다음 대사경로는 pentose phosphate 와 Embden-Meyerhof-Parnas pathway 를 거쳐 pyruvate가 된 후 에탄올, glycerol, $CO_2$ 가 생산되는 것으로 추정되고 있다 (6). 따라서 xylulose 로부터 에탄올 생성에 대한 stoichiometry 는 식(1)에 나타나 있듯이 3 mole 의 xylose 로부터 5 mole 의 에탄올과 5mole의 $CO_2$ 가 생성되므로 이론적인 에탄올 수율은 1g의 xylose 로부터 0.511g의 에탄올이 생산되어 일반적인 효모에의한 포도당으로부터 에탄올 생성수율과 비슷하다 (7).

3 D-Xylose $---> 5$ ethanol $+ 5CO_2$ (1)

그러나 지금까지 문헌에 발표된 실제수율은 80-90% 정도로 이는 xylose 가 세포성장이나 xylitol 생성에 이용되기 때문인 것으로 알려져 있다.

Xylose 를 이용한 알콜생산에 대한 연구는 주로 *Pichia stipitis* (8),*Candida shehatae* (9), 그리고 *Pachysolen tannopilus* (10,11) 등에 의한 직접 생산기술개발이었다. 정 (12)은 *Pichia stipitis* 에 의한 xylose 의 직접발효시 산소가 ethanol 수율에 미치

는 효과에 대한 연구를 수행하였고, Slininger 등 (13)은 *P.stipitis*를 이용한 발효공정을 개발하여 에탄올을 6%까지 생산하였다. 문 등 (14)은 섬유성 당화액에서의 ethanol 생산에 적합한 균주를 개발할 목적으로 원형질체융합실험과 분자생물학적 접근방법으로 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 *S.cerevisiae* 를 이용한 xylose 로부터 에탄올 생성 연구의 한 부분으로서 xylose 의 이성체인 xylulose 를 기질로 사용하여 에탄올 발효 특성을 알아보았다. Xylose 는 xylose isomerase 에 의해 xylulose 로 이성화된 후 xylulose 는 *S.cerevisiae* 에 의해 에탄올로 전환된다. *S.cerevisiae*는 알콜에 대한 내성이 높고, 고농도 세포배양이 가능한 장점을 지니고 있기 때문에 알콜 생산균주로 사용되고 있다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 실험에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATTC 3967이다. 배지의 조성은 다음과 같다. Yeast extract ; 5.0g/1, Bacto peptone ; 10.0g /1, 탄소원 ; 포도당 또는 xylulose. pH ; 6.3

균주 보관용 사면배지는 2% glucose, 1% yeast extract, 1% peptone 및 2% agar 가 포함된 slant 를 제조하여 사용하였다. Slant에 균을 접종시켜 incubator에서 30℃로 24시간 배양한후 4℃에 보관하면서 사용하였으며 3주마다 동일한 배지조성의 slant에 옮겨주었다. 접종용 균주배양은 300ml 삼각 flask에 균주 보관용 사면배지에서 agar를 제외한 성분의 배지 50ml를 첨가하여 멸균한 후 효모를 접종하여 30℃에서 10시간 동안 150rpm으로 진탕배양하여 사용하였다. 모든 배양 및 발효를 위한 inoculum양은 5% (v./v)로 하였다.

### Xylose로부터 Xylulose의 제조

Xylose를 xylulose로 전환시키기 위하여 NOVO 제품의 Sweetzyme$^R$ Type Q xylose isomerase (265 IGIC/g)을 이용하였다. Xylose isomerase를 충진시킨 column을 water jacket을 사용하여 60℃로 유지시키면서 pH8.0으로 조정된 xylose액을 통과시켰다. 이때 xylose isomerase의 cofactor로서 $MgSO_4 7H_2O$를 1 g/L로 첨가하였다. 효소반응기를 통과한 당액의 조성은 약 23%의 xylose가 xylulose로 전환되는 것으로 밝혀졌다.

### 분석방법

시료의 전처리는 발효중 채취된 시료를 -70℃ 냉동고에 보관했다가 분석시 원심분리하여 그중 상징액을 20㎛ filter를 통과시켜 여과액을 HPLC와 GC분석에 이용하였다.

당정량은 Biorad HPX-87C Aminex ion exclusion column를 이용하여 xylulose농도를 측정하였다. HPLC oven의 온도는 85℃를 유지하였고, mobile phase로 3차 증류수를 이용하였다.

에탄올의 정량은 Porapack Q column이 부착된 Gas chromatography(Philips, PYE UNICAM PU-4500)를 이용하였다. Injector, column,detector의 온도는 각각 200℃, 100℃, 260℃이었다. 담체기체로 이용한 질소의 유속은 20ml/min이었다.

## 결과 및 고찰

### Glucose-Xylulose동시 발효

포도당과 xylulose 각 10g/1를 공동 탄소원으로 하여 알콜발효를 수행하였다. 실험 결과는 Fig.1에 나타나 있다. 효모에 의한 탄소원의 대사과정에서 예상할 수 있듯이, 포도당을 먼저 자화하였고 포도당이 고갈된 뒤에서야 xylulose를 이용하는 diauxic 현상을 보였다. 포도당을 이용하는 단계에서의 최대 비성장 속도 ($\mu$max)는 0.258hr$^{-1}$, 에탄올 수율($Y_{P/S}$)는 0.42g Ethanol/g glucose이었으며, 에탄올

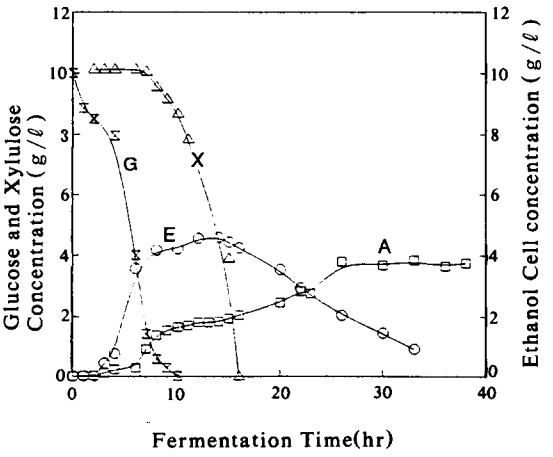


**Fig. 1. Time courses of culture biomass (□) and concentrations of ethanol (○), Glucose (☒) and Xylulose (△) during fermentation at 30℃, initial pH6.3.**

농도는 4g/1까지 상승하였다. 반면 xylulose이용시기에서의 최대 비성장속도($\mu$max)는 0.101hr$^{-1}$, $Y_{P/S}$는 0.038g Ethanol/g xylulose이었다. 이 시기에서 특히 $Y_{P/S}$가 급격히 감소한 이유는 앞 단계에서 생성된 에탄올에 의한 저해현상이라 생각된다. Xylulose 8.5g/1를 단일 탄소원으로 이용하였을때의 최대비성장속도($\mu$max)는 0.084hr$^{-1}$, 에탄올수율($Y_{P/S}$)은 0.37g EtOH/g xylulose로서 포도당을 공동탄소원으로 할 때보다 생성된 에탄올에 의한 저해현상이 없어 에탄올수율이 약 10배 증가하였다. 그러나 비성장속도는 xylulose를 단독탄소원으로 하였을 경우, xylulose와 포도당이 공존하였을 경우에 비하여 17%감소되었다. 이에 대한 이유는 아직 확실치 않으나 공동 탄소원으로 주어진 포도당이 xylulose보다 우선 대사되면서 xylulose의 동화에 촉진역활을 한것으로 여겨진다. 포도당 외에 D-ribose가 xylose 또는 xylulose의 동화에 상당한 촉진효과를 준다는 결과와 일치함을 보여주었다. D-xylose와 D-ribose를 공통 탄소원으로 존재할 경우 D-xylose, 포도당 조합때보다 약 2배 더 많은 양의 xylose가 동화되었다. (15).

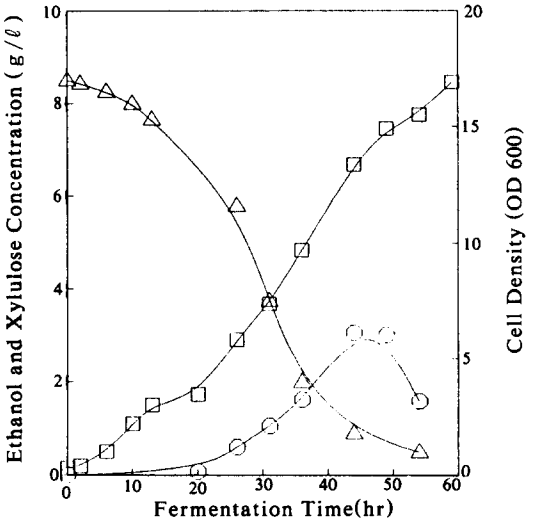


Fig. 2. Time dependence of culture biomass(□) and concentrations of ethnol(○), and Xylulose(△) during fermentation at 30℃, initial pH6.3 and 70rpm low aeration. Initial xylulose concentration: 8.5g/1.

### Xylulose농도별 에탄올 생산특성

초기 xylulose농도를 1.8g/1 에서 16.2g/1까지 변화시키면서 최대성장속도, 에탄올 수율 및 최대 에탄올농도를 측정하여 Table 1에 정리하였다. 대수증식기에서 측정한 최대성장속도와의 관계는 Fig. 3에 나와 있다. 최대성장속도는 xylulose농도 5-9g/1사이에서 최대값인 0.087hr$^{-1}$를 보였고 그 이상의

Table 1. Specific growth rate and ethanol yield as a function of initial xylulose concentrations.

| Initial xylulose concentation (g/1) | Specific growth rate (1/h) | Maximum cell density (OD600) | Ethanol yield (g/g) | Maximum ethanol concentration (g/1) |
|---|---|---|---|---|
| 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 |

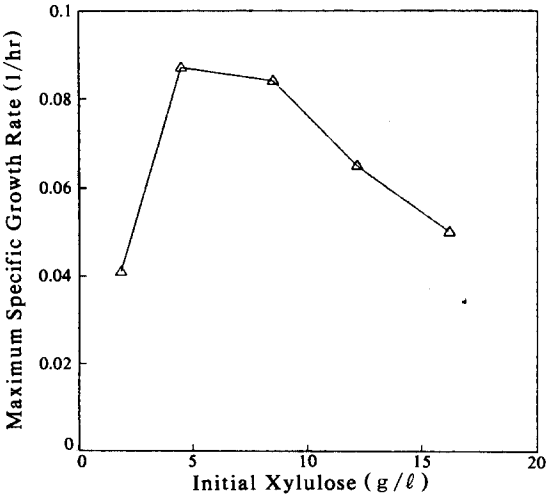


Fig. 3. Effects of xylulose concentrations on the maximum specific growth rate of S.cerevisiae 3967. Temperature:30℃, initial pH:6.3.

농도에서는 오히려 감소하였다. 이는 효소반응기를 거친 xylose/xylulose혼합액중 반응하지 않은 다량의 xylose가 세포배양을 저해하는 것으로 추정된다. 그러나 최대세포농도는 xylulose농도에 따라 증가하였다(Table 1 참조). Fig. 4에서와 같이 에탄올 생성효율은 xylulose농도가 증가함에 따라 향상되었고, 최대에탄올 농도도 xylulose농도에

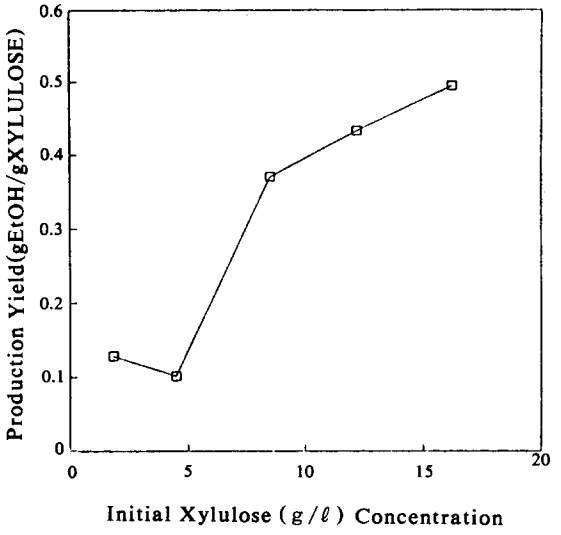


Fig. 4 Effects of xylulose concentrations on the production yield of ethanol from xylulose by S. cerevisiae 3967. Temperature:30℃, initial pH:6.3.

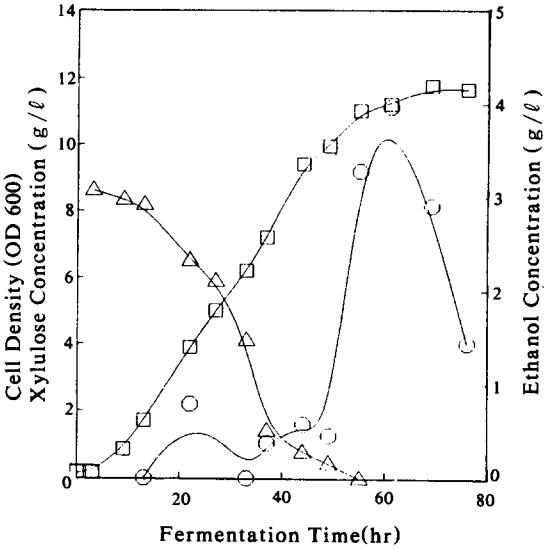


Fig. 5 Fermentation profiles at 35℃. Experimental conditions are the same as Figure 2 except for temperature. Biomass(□), ethanol concentration(○) and xylulose concentration(△).

레하였다. 특히 에탄올 수율의 경우, 높은 xylulose 농도에서 세포증식은 높은 농도의 xylose에 의해 저해된 반면 에탄올 농도는 계속 증가하였기 때문에 상대적으로 에탄올 수율의 향상이 두드러졌다. 초기 xylulose농도가 16.2g/l일때의 최대 에탄올 농도는 8g/l로 증가하였으며 그 결과 에탄올 생산수율은 이론값의 90 % 이상인 0.494g EtOH / g xylulose를 얻었다.

### 온도의 영향

온도에 따른 세포성장과 에탄올 생성을 관찰하기 위하여 shaking incubator를 이용하여 온도를 25℃에서 35℃까지 변화하면서 실험을 행하였다. 이때 초기 xylulose농도는 8g/l로 고정하였다. 35℃에서의 발효양상은 Fig. 5에 나타내었으며, 실험결과는 Table 2.에 정리하였다. 최대세포농도는 30℃에서 20.0(OD.600)으로 가장 높았으나, 최대비성장속도는 35℃에서 0.118$hr^{-1}$로 최대치를 보였다. 에탄올 수율도 35℃에서 0.47g EtOH/g xylulose로 최대치를 보였다. 이는 Chiang등의 실험결과와 일치함을 보여 준다 (16). 일반적으로 최적 알콜발효의 온도는 최적 성장 속도보다 높은것으로 알려져 있다.

Table 2. Effects of temperature on specific growth rate and ethanol yield.

| Temperature (℃) | Specific growth rate (1/h) | Maximum cell density (OD600) | Ethanol yield (g EtOH / g Xylulose) |
|---|---|---|---|
| 25 | 0.056 | 18.6 | 0.350 |
| 30 | 0.084 | 20.0 | 0.368 |
| 35 | 0.118 | 11.7 | 0.461 |

## 요 약

목질계 자원에 다량으로 함유되어 있는 xylose를 이용하기 위하여 xylose의 이성체인 xylulose를 이용한 에탄올 발효를 실시하였다. Xylulose로부터 에탄올 생산의 최적조건을 찾기위해 xylulose의 농도, 발효 온도등을 변화시켜가면서 발효양상을 고찰하였다. 비성장속도는 xylulose농도 5g/l에서 최대값인 0.087g/l를 보여 주었으며, 에탄올 생성수율은 xylulose농도에 비례하여 증가하여 xylulose농도 16 g/l에서는 최대이용율의 90%에 해당하는 0.49g EtOH/g xylulose를 얻었다. 발효온도의 영향에서는

에탄올 생성수율은 35℃에서 0.47g EtOH/g xylulose로 최대였고 비성장속도도 35℃에서 최대값인 $0.118hr^{-1}$을 보여 주었다. 포도당과 xylulose를 공통기질로 사용하였을 경우, xylulose에 의한 성장속도가 증가하였다. 이는 먼저 자화된 포도당의 중간 대사산물이 xylulose의 대사작용을 촉진한 것이라 여겨진다.

## 감 사

본 연구는 동력자원부 대체에너지개발센터의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사의 말씀을 드립니다.

## 참고문헌

1. N.Kosaric, A.Wieczorek, G.P.Consentino, and R.J.Magee (1983), *Ethanol fermentation in Biotechnology*, **3**, 257-285.
2. J.A.Barnett, R.W.Payne, and D.Yarrow (1979), *A guide to identifying and classifying yeasts*, Cambridge Univ.Press.London.
3. C.S.Gong (1983), *Annual Reports on Fermentation Processes*, **6**, 253-297.
4. C.Chiang, and S.G.Knight (1960), *Nature*, **188**, 79.
5. M.Hoffer, A.Betz, and A.Kotyk (1971), *Biochem. Biophys. Acta*, **252**, 1.
6. C.S.Gong, L.F.Chen, M.C.Flickinger, L.C. Chiang, and G.T.Tsao (1981), *Appl.Environ. Microbiol.*, **41**, 430.
7. T.M.Enari, and M.L.Suihko (1984), *CRC Crit. Rev. Biotechnol.*, **1(3)**, 229-240.
8. H.Dellweg, M.Rizzi, H.Methner and D.Debus (1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 395-400.
9. J.C.Du Preez, and J.P.van der Walt (1983), *Biotechnol.Lett.*, **5**, 357-362.
10. H.Schneider, P.Y.Wang, Y.K.Chan, and R. Maleszka (1981), *Biotechnol.Lett.*, **3**, 89-92.
11. P.J.Slininger, R.J.Bothast, J.E.Van Cauwenverge, and C.P.Kurtzman (1982), *Biotech. Bioeng.* **24**, 371-384.
12. I.S.Chung (1989), 한국생물공학회지, **4(2)**, 69-73.
13. P.J.Slininger, Bothast, M.R.Ladish, and M.R. Okos (1990), *Biotech.Bioeng.*, **35**, 727.
14. J.S.Mun, H.R.Ko, K.H.Shim and N.K.Sung (1991), *Kor. J. Appl. Miocrobial. Biotechnol.*, **19(4)**, 325-330.
15. V.Carinar, and B.A.Prior (1989), *Jounal of General Microbiology*, **135**, 2791-2798.
16. L.C.Chiang, C.S.Gong, L.F.Chen, and G.T. Tsao (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **42(2)**, 284-289.