

혼합당에서의 *Pichia stipitis*의 생육 모델

이 유 석 · *권 윤 중 · 변 유 량
연세대학교 식품공학과, *경기대학교 식품가공학과

Growth model for *Pichia stipitis* growing on sugar mixtures

You seek Lee, *Yun Joong Kwon and Yu Ryang Pyun

Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
*Department of Food Technology, Kyonggi University, Suwon 440-760, Korea

ABSTRACT

Low cost fermentation substrates frequently contain a mixture of carbon sources including hexoses, pentoses and disaccharides. Fermentation of such mixtures requires an understanding of how each of these substrates is utilized. During batch culture of *Pichia stipitis* CBS 5776 on sugar mixtures, glucose causes catabolite repression of xylose and cellobiose utilization. Also, glucose causes a permanent repression of xylose utilization as evidenced by reduced growth rates during the xylose phase of glucose/xylose fermentation. The growth model for multiple substrates is developed based on a cyclic AMP mediated catabolite repression mechanism and this model adequately described the growth and ethanol production from sugar mixtures.

서 론

자연계에 가장 풍부하게 존재하며 재생산 자원인 목질계 바이오매스는 대체 에너지원으로서 관심을 끌고 있는데 그 가수분해물은 주로 glucose, xylose 및 cellobiose 등의 당혼합물로 구성된다. 이러한 바이오매스 가수분해물을 에탄올 발효기질로 이용하는데 경제성을 향상시키기 위해서는 존재하는 모든 탄소원들을 에탄올로 효율적으로 전환시켜야 한다.

Xylose로부터 에탄올을 생산하는 균주로는 *Candida shehatae*와 *Pichia stipitis*가 우수한 효모로 보고되었으며(1-4), *Candida lusitanae* 등이 cellobiose로부터 에탄올을 우수하게 생산한다고 알려졌다(5). Du Preeze등(3)은 *P. stipitis*만이 xylose와 cellobiose로부터 동시에 에탄올을 생성한다고 하였다. 또한 전보(6)에서 효모 20여 종으로 실험한 결과 *Pichia stipitis* CBS 5775와 5776이 xylose와

cellobiose로부터 가장 우수하게 에탄올을 생성하는 균주로 보고하였다.

발효공정의 최적화 및 scale up을 위해서는 사용될 미생물의 생육 및 생성물 생산에 대한 정확한 동력학적 모델이 요구된다. 일반적으로 복합탄소원에서 생육하는 효모는 한 탄소원이 다른 탄소원들의 이용을 억제하는 diauxic 생육 특성을 나타낸다(6, 7). Yoon 등(8)은 각 기질이 다른 기질의 이용에 경쟁적 저해효과를 고려함으로써 catabolite repression을 받지 않는 혼합기질 시스템에서 diauxic 생육에 대한 일반화된 Monod식을 유도하였다. 또한 catabolite repression에 의한 diauxic 생육을 설명하기 위한 많은 이론적인 모델이 제안되었다. Van Dem과 Moo-Young(9)은 induction과 catabolite repression이 inducer의 수송에 관여하는 효소의 합성을 조절한다고 가정하여 diauxic growth의 모델식을 제안하였으며, Toda(10)는 invertase 합성

을 위한 operator의 두 부위에서 induction과 repression이 동시에 일어난다고 가정하는 dual control mechanism을 제안하였다. Slaff와 Humphrey (11)는 Toda의 식을 이용하여 glucose와 cellobiose 혼합기질에서의 *Clostridium thermohydro-sulfuricum*의 생육 모델을 설정하였으며, Imanaka와 Aiba(12)는 catabolite repression에서의 cyclic AMP의 역할을 도입하여 Toda의 식을 수정하였다.

본 논문에서는 *P. stipitis*에 의한 혼합 기질의 이용기작을 밝히고 생육모형을 설정하여 혼합기질에서의 생육 및 생성물 생산을 표현하였으며, 컴퓨터 simulation을 행하여 실험자료와 비교한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

네덜란드의 Centraalbureau voor Schimmelcultures에서 분양받은 *Pichia stipitis* CBS 5776을 사용하여 본 실험을 수행하였다. 균주는 YM agar(3g/L yeast extract, 3g/L malt extract, 5g/L peptone, 10g/L glucose 및 20g/L agar) 사면배지에서 계대배양하여 사용하였다.

배지

본 실험에서 사용한 배지는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g, KH_2PO_4 5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5mg, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.6mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.76mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mg, HCl(conc.) 0.005ml 및 yeast extract 5g과 각각 다른 종류의 탄소원 3.2g~10g을 증류수 1L에 녹인 후 pH 4.5로 조절하여 사용하였다.

실험 조건

회분 및 연속 배양은 2 L jar fermentor(Marubishi Co., Model MD-250)에 배지 1 L를 넣고 교반속도 200rpm, 통기량 0.01vvm 및 30°C에서 배양하였으며, 배양중의 pH는 2 N NaOH를 사용하여 4.5로 자동조절하였다. 플라스크에서 배양된 전 배양액을 배지의 5%로 접종하여 초기 균체량이 약 0.1g/L가 되도록 조절하였다. 일정한 시간마다 배양액을 채취하여 원심분리한 후 흡광도를 측정하고 상등액은 당과 에탄올 분석을 위하여 냉동실에 보관하였다.

시료의 분석

균체량은 원심분리후에 증류수로 적당히 희석하여 660nm에서 흡광도를 측정한 후 미리 작성한 균체량과 흡광도의 표준곡선으로부터 건조 균체량을 구했다.

당정량은 Bio-Rad HPX-87P cation exchange column을 이용하여 HPLC(waters Associates)로 측정하였다. Column의 온도는 90°C로 유지하였고 mobile phase로 물(0.6mL/min)을 이용하였다. 에탄올 농도는 표준물질로써 isopropanol을 가한 뒤 Porapak Q column이 부착된 gas chromatography (Varian 1440)로써 정량하였다.

결과 및 고찰

Diauxic growth의 mechanism

Glucose/xylose 또는 glucose/cellobiose 혼합기질을 이용할 때 xylose와 cellobiose는 glucose가 다 소비된 후에 이용되기 시작하는 diauxic 양상을 나타낸다(6). 이러한 diauxic growth에서 glucose가 어떻게 xylose이용을 억제하는가는 두가지 다른 기작에 의해 설명되어질 수 있다. 하나는 xylose의 이동이나 이용에 필요한 효소의 활성 부위에 glucose가 경쟁하는 저해이며, 또 다른 기작은 xylose이용에 필요한 효소의 합성을 glucose가 억제하는 것이다. 이 두가지 현상의 차이점을 알아보기 위하여 xylose에서 *P. stipitis*를 연속배양하였다.

Xylose 10g/L의 신선한 배지를 사용하여 희석율 0.08h⁻¹로 연속배양하면서 정상상태로 도달된 후 1.7g/L의 glucose를 순간적으로 배양액 중에 첨가하여 glucose와 xylose의 소비 양상을 측정하였다. Fig. 1에서 glucose가 첨가된 직후 당의 농도변화를 살펴보면 glucose의 존재가 xylose의 농도에 아무런 영향을 미치지 않았음을 알 수 있다. 만약 glucose가 xylose이용효소를 저해한다면 xylose 이용효소는 첨가해준 glucose에 의해 저해를 받아서 xylose가 이용되지 못하므로 농도는 즉각 상승해야 할 것이다. 반면에 xylose이용에 대해 glucose가 repression을 일으킨다면 새로운 효소의 합성은 억제되지만 이미 존재하는 효소의 작용으로 xylose 이용에는 glucose가 아무런 영향을 미치지 못하므로 glucose와 xylose는 동시에 소비되어 xylose의 농도는 변하지 않을 것이다. 따라서 본 실험에서는 xylose의 농도는 변하지 않고 glucose가 3시간만에 모두 소비되었으므로 glucose는 *P. stipitis*에 의한 xylose이용에 관여하는 효소에 저해작용이 없었다. 즉 glucose는

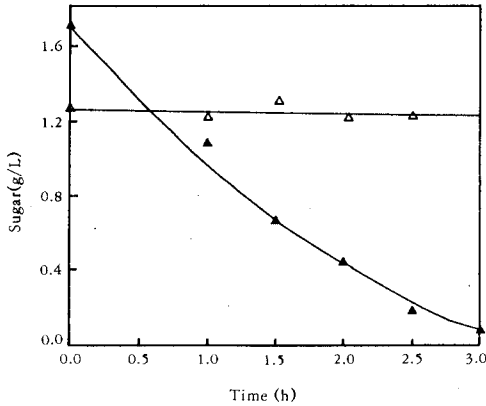


Fig. 1. Effects of addition of 1.7g/L glucose on the steady-state concentration of xylose in a continuous culture of *P. stipitis*. Dilution rate is $0.08h^{-1}$. (▲): glucose (△):xylose

xylose이용에 catabolite repression을 일으킴을 알 수 있었다.

Xylose 소비에 미치는 glucose 농도의 영향

Glucose와 xylose를 혼합한 기질에서 xylose의 이용은 glucose에 의해 억제됨을 알 수 있다. 또한 glucose의 초기 농도에 따라서 xylose의 이용단계에서 균체의 생육속도가 영향을 받을 것으로 생각된

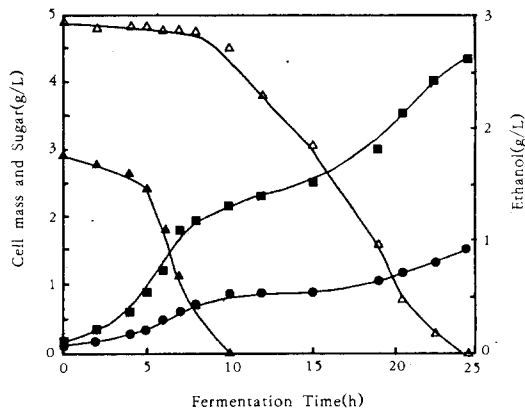


Fig. 2. Glucose/xylose mixture fermentation by *P. stipitis* (▲):glucose, (△):xylose, (●):cell mass, (■):Ethanol

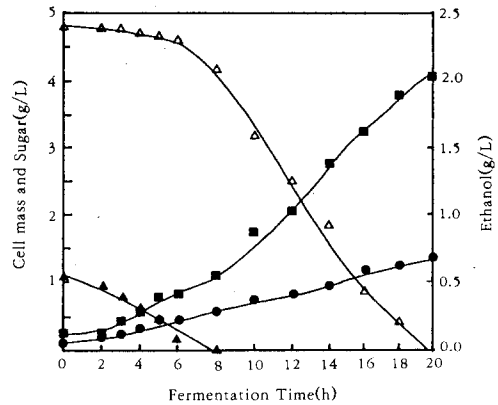


Fig. 3. Glucose/xylose mixture fermentation by *P. stipitis* (▲):glucose, (△):xylose, (●):Cell mass, (■):Ethanol

다. 따라서 본 실험에서는 glucose의 초기농도를 달리 하였을 때 xylose 소비단계에서의 생육속도를 비교하였으며 그 결과는 Fig. 2와 Fig. 3과 같았다.

Fig. 2는 3g/L의 glucose와 5g/L의 xylose를 혼합한 기질에서 *P. stipitis*를 회분배양시 생육, 에탄올 생성 및 기질소비를 나타낸 것이고 xylose 소비 단계에서 균체의 비증식속도는 $0.08h^{-1}$ 로써 초기 glucose 농도가 5g/L(Fig. 4)일 때의 $0.037h^{-1}$ 보다 증가하였으며 이 값은 xylose 단일 기질에서의 비증식속도 $0.12h^{-1}$ 보다 약간 낮은 값을 나타내었다(6).

초기 glucose 농도 1g/L에 xylose 5g/L를 혼합한 기질에서 배양시(Fig. 3) xylose 이용단계에서의 균체의 비증식속도는 $0.09h^{-1}$ 를 나타내어 xylose 단일 기질에서와 거의 비슷한 값을 나타내었다. 또한 glucose가 모두 고갈되고 난 뒤의 xylose 소비시간도 초기 glucose 농도에 따라 영향을 받아서 glucose 5, 3 및 1g/L에서 각각 18, 15 및 12시간으로 감소하였다.

이상의 결과를 Table 1에 요약하였는데, 혼합기질에서 초기 glucose농도는 xylose 이용단계에서의 증식속도에 큰 영향을 미쳤다. 즉 초기 glucose 농도가 증가할 수록 xylose 이용에서의 증식속도는 감소하였다. Xylose가 소비되기 시작할 때의 에탄올 농도는 약 0.5~1.8g/L로써 균체의 생육에는 큰 영향을 미치지 않을 정도의 농도였다. 이러한 두번째 기질에 대한 증식속도의 감소현상은 permanent repres-

Table 1. Effects of glucose concentration on the growth rate of *P. stipitis* on xylose

Substrates(g/L)	Specific growth rate(h ⁻¹)	
	Glucose	Xylose
Glucose (9.65)	0.26	—
Xylose (9.27)	—	0.12
Glu/Xyl (1.1/4.8)	0.21	0.09
Glu/Xyl (2.91/4.71)	0.23	0.08
Glu/Xyl (4.79/4.3)	0.24	0.04

션으로 설명될 수 있다(11). 즉 glucose의 농도가 어떤 특정한 값 이하로 떨어지면 xylose를 이용하는데 필요한 효소합성의 억제작용은 해제되지만 효소의 합성속도는 억제를 받지 않았던 단일기질에서 배양될 때의 효소합성속도보다 더 낮은 상태를 유지하게 된다.

Kinetic Model

Catabolite repression 에서 cAMP, CAP(cAMP-catabolite gene activator protein) 및 P(promoter gene)와 같은 물질들이 RNA 전사를 시작하는데 있어 중요한 역할을 하고 있다는 사실이 알려졌다. CAP가 존재하지 않으면 RNA Polymerase는 promoter 부위에 대한 친화력이 크게 떨어지게 되고 CAP가 cAMP와 결합하지 않으면 promoter와 반응을 할 수 없게 된다. 즉 cAMP에 의해 중개되는 catabolite repression model(12, 13)에서는 CAP나 cAMP·CAP 결합체가 promoter와 충돌할 확률이 catabolite repression을 조절한다고 가정하였다. 전체 promoter gene의 양에 대한 CAP 혹은 cAMP·CAP 복합체에 의해 점유된 promoter gene의 비율을 Q라고 정의하며 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$Q = \frac{1 + AS_1^n}{1 + BS_1^n} \dots\dots\dots (1)$$

여기서 A와 B는 상수, S₁은 catabolite repression을 일으키는 기질의 농도, 그리고 n은 CAP에 대한 cAMP의 결합상수로서 정수이다. 효소합성이 억제받지 않는 경우에는 Q가 1이 되며, 부분적으로 억제 받게되면 1보다 작아진다. 두번째 기질의 이용이 완전히 억제되는 경우에는 A의 값은 0이 된다.

Q값은 catabolite repression이 일어나는 정도를 나타내므로 억제를 받는 두번째 기질에서의 증식속도는 Q에 비례하므로 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu_{m2R} = \mu_2 \cdot Q \dots\dots\dots (2)$$

여기서 μ_{m2R} 는 S₁이 존재할 때 S₂에서의 최대증식속도이고, μ_{m2} 는 순수한 S₂에서의 최대증식속도이다.

전보(6)와 앞의 실험결과에서 glucose는 xylose와 cellobiose 이용에 대해 catabolite repression을 일으켰고 xylose와 cellobiose는 서로의 이용에 아무런 영향을 미치지 않았다. 따라서 glucose, xylose와 cellobiose를 각각 S₁, S₂와 S₃로 나타낸다면 세 종류의 당혼합물의 각 기질 위에서의 비증식속도는 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu_1 = \frac{\mu_{m1} \cdot S_1}{K_1 + S_1} \dots\dots\dots (3)$$

$$\mu_2 = \left[\frac{\mu_{m2} \cdot S_2}{K_2 + S_2} \right] \left[\frac{1}{1 + B_2 S_1^n} \right] \dots\dots\dots (4)$$

$$\mu_3 = \left[\frac{\mu_{m3} \cdot S_3}{K_3 + S_3} \right] \left[\frac{1}{1 + B_3 S_1^n} \right] \dots\dots\dots (5)$$

여기서 K는 포화상수, B₂와 B₃는 xylose와 cellobiose에 대한 glucose의 repression 상수이다.

증식속도를 나타내는 위 식들은 다음의 미분방정식에 대입하여 혼합기질에서의 *P. stipitis*의 생육, 에탄올 생성 및 기질소비를 나타내었다.

$$\frac{dX}{dt} = D(X_0 - X) + (\mu_1 + \mu_2 + \mu_3) \cdot X \dots\dots (6)$$

$$\frac{dS_1}{dt} = D(S_{1,0} - S_1) - \frac{1}{Y_1} \cdot \mu_1 \cdot X \dots\dots\dots (7)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = D(S_{2,0} - S_2) - \frac{1}{Y_2} \cdot \mu_2 \cdot X \dots\dots\dots (8)$$

$$\frac{dS_3}{dt} = D(S_{3,0} - S_3) - \frac{1}{Y_3} \cdot \mu_3 \cdot X \dots\dots\dots (9)$$

$$\frac{dP}{dt} = D(P_0 - P) - (Y_{P1}/Y_1) \cdot \mu_1 \cdot X + (Y_{P2}/Y_2) \cdot \mu_2 \cdot X + (Y_{P3}/Y_3) \cdot \mu_3 \cdot X \dots\dots\dots (10)$$

여기서 X는 균체의 농도, D는 희석율(h⁻¹), P는 에탄올 농도, Y는 균체 수율(g cell/g substrate) 및 Y_P는 생성물 수율(g ethanol/g substrate)이다.

두 당 혹은 세 당에서의 희분발효는 위의 식에서 D=0으로 놓고 4차의 Runge-Kutta 법에 의해 미분방정식을 풀어 simulation하였다. 컴퓨터 simulation을 위한 kinetic parameter는 단독당에서의 희분배양의 결과를 이용하였고 Table 2에 정리하였다. 모델식에서의 n과 B는 glucose와 xylose 혼합당에

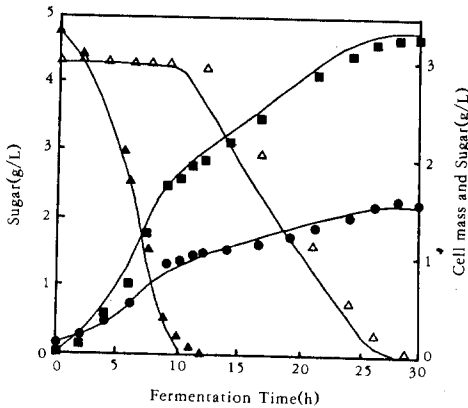


Fig. 4. Comparison of model predictions (solid lines) and experimental data for batch culture on a glucose/xylose mixture (▲):glucose, (△):xylose, (●): Cell mass, (■):Ethanol

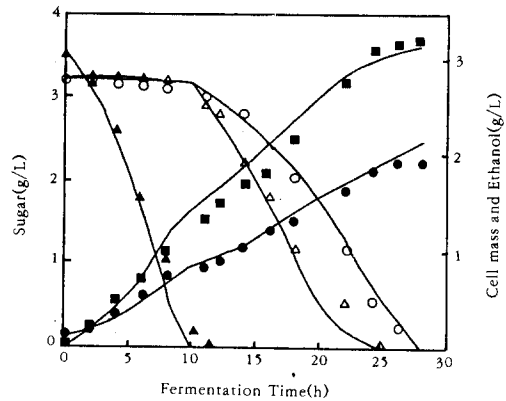


Fig. 5. Comparison of model predictions (solid lines) and experimental data for batch culture on a glucose/xylose/cellobiose mixture (▲):glucose, (△):xylose, (○):cellobiose, (●):Cell mass, (■):Ethanol

Table 2. Kinetic parameters used for model simulations

Parameters	Glu/Xyl	Glu/Xyl/Cell
μ_{m1}	0.26	0.26
μ_{m2}	0.12	0.12
μ_{m3}	—	0.09
K_1	0.33	0.33
K_2	0.36	0.36
K_3	—	0.35
Y_1	0.17	0.17
Y_2	0.14	0.14
Y_3	—	0.5
Y_{p1}	0.4	0.4
Y_{p2}	0.36	0.36
Y_{p3}	—	0.23
n	1	1
B_2	50	50
B_3	—	50

서의 회분배양 실험값과 가장 잘 맞도록 변화시켜가면서 결정하였다.

Glucose와 xylose 혼합당에 대한 simulation 결과를 Fig. 4에 나타내었고 glucose, xylose 및 cellobiose의 혼합당에 대한 simulation 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 전체적으로 실험값과 유사한 경향을 갖는 값을 나타냈으며 실험값과 다소 차이가 나타나

는 부분은 단독당에서의 K값을 구하는데 있어서의 오차와 다른 parameter의 측정에서의 오차에서 기인되는 것 같다.

요 약

자연계에 널리 존재하는 저렴한 기질들은 대부분 여러 종류의 탄소원들을 함유한다. 이러한 혼합기질을 이용하는 효율적인 발효 공정을 개발하기 위해서는 이들 기질들이 서로 어떻게 이용되는가를 알아야 하며, 사용되는 미생물의 생육과 생성물 생산을 잘 표현할 수 있는 동력학적 모델이 필요하다.

*P. stipitis*에 의해 혼합기질에서 에탄올을 생산할 때 glucose는 xylose와 cellobiose 이용에 대해 catabolite repression을 일으켰으며, 초기 glucose농도가 높을수록 xylose 이용에서 균체의 생육속도는 감소하였으며 xylose 이용시간도 길어졌다. 또한 glucose/xylose 발효시 xylose 이용에서 감소된 생육속도는 glucose가 xylose 이용에 permanent repression을 야기시킨다는 것을 알 수 있었다.

Cyclic AMP가 증대하는 catabolite repression mechanism에 기초하여 혼합기질에서 생육하는 *P. stipitis*의 생육모델을 발전시켰다. 이 모델식들을 이용하여 컴퓨터 simulation한 결과는 혼합기질로부터 *P. stipitis*에 의한 생육 및 에탄올 생성 실험결과

와 비교적 잘 일치하였다.

참고문헌

1. M. Wayman and S. Parekh (1985), *Biotechnol. Lett.*, **7**, 909.
2. H. K. Sreenath, T. W. Chapman and T. W. Jeffries (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 294.
3. J. C. Du Preeze, M. Bosch and B. A. Prior (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 228.
4. P. J. Slininger, R. J. Bothast, M. R. Ladisch and M. R. Okos (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 727.
5. S. N. Freer and R. W. Detroy (1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 541.
6. Y. S. Lee, Y. J. Kwon and Y. R. Pyun (1992), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 91.
7. S. G. Kilian, B. A. Prior and P. M. Lategan (1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 369.
8. H. Yoon, G. Klinzing and H. W. Blanch (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1193.
9. G. Van Dedem and M. Moo-Young (1975), *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1301.
10. K. Toda (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 1117.
11. G. F. Slaff and A. E. Humphrey (1986), *Chem. Eng. Commu.*, **45**, 33.
12. T. Imanaka and S. Aiba (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 757.
13. S. Gondo, K. Venkasubramanian, W. R. Vieth and A. Constantinides (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1797.