

*Pichia stipitis*에 의한 Xylose 발효의 최적조건 결정

권순효·유연우·*서진호

이주대학교 공과대학 생물공학과, *서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과

Determination of Optimum Conditions for Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*

Soon Hyo Kweon, Yeon Woo Ryu and Jin Ho Seo*

Dept. of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 213-5141, Korea

*Dept. Food Sci. Tech., Seoul National University, Suwon 441-749, Korea

ABSTRACT

This study was carried out to optimize the fermentation conditions for direct alcohol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. The best cell growth and the ethanol production were obtained under 0.05 VVM aeration and 300rpm agitation at 30°C using 100 g/ℓ xylose medium of the initial pH 5.0. In the above condition, the maximum specific growth rate and maximum cell concentration were 0.14hr⁻¹ and 1.3×10⁹ cells/ml, respectively. *Pichia stipitis* CBS 5776 also produced 40.2 g/ℓ ethanol utilizing about 96% of 100 g/ℓ xylose after 72hr fermentation. At this point, the overall volumetric ethanol productivity was 0.56 g/ℓ-hr and the ethanol yield was 0.42 g-ethanol/g-xylose consumed, which corresponds to 82% of the theoretical yield.

서론

Yeasts중에는 *Pachysolen tannophilus*(1, 2), *Candida shehatae*(3), *Pichia stipitis*(4) 등이 xylose를 직접 발효시킬 수 있지만 공업적인 이용을 위해서는 발효속도와 ethanol 수율이 매우 낮은 편이다. 따라서 높은 발효속도와 ethanol 수율을 얻기 위한 균주 선발과 발효조건들에 대한 연구들이 수행되어 왔다.

Yeasts에 의한 xylose의 알코올 발효에서 산소는 ethanol 생성 및 수율에 중요한 요소로 작용한다. 즉 *P. stipitis*에 의한 xylose의 알코올 발효는 혐기적 조건에서 일어나지만 산소가 존재하지 않으면 세포 성장이 매우 제한되며 ethanol 생성도 크게 감소되는 반면(5-8), 미량의 산소가 존재하면 세포성장과

ethanol 생성이 촉진된다(3, 5, 9). 그러나 통기를 증가시켜 용존산소량이 증가되면 세포성장속도가 증가되어 세포수율은 증가되지만(10), ethanol 수율과 생성량은 감소한다(3, 9). 따라서 xylose 발효에서는 산소의 제한이 ethanol 생성을 향상시키는데, 이는 산소가 호흡의 최종 전자수용체로 작용할 뿐만 아니라 xylose의 초기 두 단계 대사과정에서 부분적으로 redox balance에 관여하기 때문이다(6).

기질농도에 따른 *P. stipitis*의 초기 당농도에 대한 영향에서 최대 ethanol 농도는 150 g/ℓ의 xylose에서 얻을 수 있었지만 첨가한 xylose를 모두 이용하지는 못하였다. 반면 최대 ethanol 생산성은 100 g/ℓ의 xylose 농도에서 얻었다(11). 그러나 ethanol과 xylitol 수율은 기질의 농도에 매우 민감하여,

가장 높은 ethanol 수율은 50~100 g/l 의 xylose 농도에서 얻을 수 있었으며(11,12), 그 이상의 xylose 농도에서는 기질 농도 증가에 따라 xylose 대사 과정의 초기 중간생성물인 xylitol의 축적이 증가하여 ethanol 수율이 감소한다(12).

Xylose 알코올 발효에서 배지의 초기 pH에 대한 영향은 *P. stipitis*의 경우 세포성장은 pH 4.5~5.5 범위에서 최대였으나, ethanol 수율은 pH 3.5~4.5 범위에서 최대값을 나타내었으며, 세포 수율은 pH에 영향이 없었다(11). 이와 같이 *P. stipitis*에 의한 xylose 발효의 최적 pH가 낮은 것은 xylose의 흡수를 위해서는 세포막 사이에 proton(H⁺)의 농도차가 요구되기 때문으로 추정되고 있다.

발효온도는 *P. stipitis*의 경우 30°C에서 최대 발효속도와 세포성장을 나타내며, 30°C 이상에서는 ethanol 생성속도와 ethanol 수율이 급격히 감소하는 반면, xylitol 수율은 증가한다(11). 반면 30°C 이하의 발효온도에서는 ethanol 수율에는 변화가 없으나 ethanol 생성속도는 온도감소에 따라 감소한다(11). Xylose 발효균주들의 ethanol에 대한 내성은 균주와 발효조건에 따라 다르다. 즉 *P. stipitis*가 생성할 수 있는 ethanol 농도는 33 g/l ~ 57 g/l로 보고되었지만(12), 30°C에서 세포성장이 완전히 억제되는 ethanol 첨가농도는 30 g/l 이다(13). 따라서 *P. stipitis*의 ethanol에 대한 독성은 자신이 생성한 것이나 외부에서 주입한 것이나 세포성장에 미치는 영향은 동일하다. 반면 ethanol 생성은 44 g/l의 ethanol 첨가에 의하여 중단된다. 이러한 균주의 ethanol에 대한 내성은 발효온도에 따라 크게 달라져 *P. stipitis*의 경우 11~22°C 사이에서는 46~48 g/l의 ethanol에 대한 내성이 있는데(13), 이는 *P. stipitis*가 25°C에서 30°C보다 더 높은 ethanol을 생성할 수 있는 것과 일치한다(12).

실제로 상업적 응용을 위해서는 xylose 발효균들이 36시간 이내에 적어도 0.40g-ethanol/g-xylose의 ethanol 수율로 50~60 g/l의 ethanol을 생성할 수 있어야 한다(14). 현재까지는 xylose의 알코올 발효를 위하여 *P. stipitis*가 가장 우수하지만, 아직 원하는 ethanol 농도를 얻기 위한 발효시간이 순수 xylose 배지나 가수분해 기질에서 36시간 이상이 소요된다(12). 단지 *P. stipitis*가 xylitol 축적이 거의 없기 때문에 ethanol 수율이 상당히 높은 편이며, 또한 산업적 이용을 위하여 *P. stipitis*는 배지에 vitamins 첨가없이도 D-xylose 발효가 가능하고

(15) D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-cellobiose 및 xylan으로 부터도 ethanol을 직접 생산할 수 있는 장점이 있다(16-18). 또한 *P. stipitis*는 L-arabinose, L-rhamnose 및 xylitol을 이용하여 ethanol을 생성할 수는 없지만 세포성장을 위한 탄소원으로서의 이용이 가능하다(16).

따라서 본 연구에서는 *P. stipitis*를 이용한 xylose 발효에서의 ethanol 수율과 생산성을 향상시키기 위하여 발효 최적조건에 대한 연구를 수행하였다.

실험재료 및 연구방법

균주 및 배지조성

본 연구에서는 xylose를 직접 발효시킬 수 있는 *Pichia stipitis* CBS 5776을 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 300ml 삼각 flask에 1% glucose, 0.3% yeast extract 및 0.5% peptone이 존재하는 배지 50ml을 첨가하여 멸균한 후 균을 접종하여 30°C에서 18시간 동안 300rpm으로 진탕배양하여 사용하였다. 모든 배양 및 발효를 위한 접종량은 5%(v/v)로 하였다. 알코올 발효를 위한 기본 배지는 5 g/l yeast extract, 5 g/l peptone, 5 g/l KH₂PO₄, 0.2 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/l MgSO₄·7H₂O로 구성되어 있으며, xylose(Sigma)의 농도는 실험조건에 따라 50~150 g/l로 하여 사용하였다.

알코올 발효

알코올 발효는 발효배지를 2 l Jar Fermentor (NBS Co., U. S. A.)에 1 l를 넣고 300rpm으로 교반하면서 알코올 발효를 수행하였다. 발효조건은 초기 pH, 발효온도, 통기량, 기질농도에 대한 영향을 검토하였다. 이때 통기량에 대한 연구에서 완전 혐기조건을 위해서는 전과정의 발효 동안에 질소를 0.05VVM으로 통과시켰으며, 부분 혐기조건은 통기를 하지 않은 경우이다.

분석방법

Xylose의 정량은 DNS 방법(19)을 사용하여 측정하였으며, 배양액 중의 ethanol 농도는 flame ionization detector를 이용한 Gas chromatography (Hitachi Model 263-30, Japan)로 측정하였다. 균수는 현미경 하에서 hemacytometer를 이용하여 counting하였고, 발효용액 내의 xylitol 농도는 RI detector(Spectra-physics)를 이용한 HPLC(Wa

ters)로 측정하였다. 이때 사용한 column은 Shodex Sugar sp 0810 column(Waters)을 이용하였다.

결과 및 고찰

Pichia stipitis CBS 5776에 의한 xylose 알코올 발효에서 통기, 발효온도, 초기 pH, 기질농도에 대한 영향을 검토하여 ethanol 생산성 및 ethanol수율이 최대값이 되는 최적 발효조건에 대한 연구를 수행하였다.

통기의 영향

알코올 발효는 30°C에서 300rpm으로 교반하면서 완전 혐기 및 부분 혐기조건과 0.05, 0.1 및 0.5VVM의 통기조건하에서 실험을 수행하였으며, 발효배지의 초기 pH는 5.0이었다. 세포성장에 대한 통기의 영향에서 세포의 최대 비성장속도는 통기조건이 0.1VVM일 때 0.15hr^{-1} 로 가장 높았으며, 최대 세포농도는 통기조건이 0.1VVM과 0.5VVM에서 동일하게 1.5×10^9 cells/ml로 가장 높았다(Fig. 1). 반면 ethanol 생성에서는 0.05VVM으로 통기할 때 최대 ethanol 농도가 40.2 g/l 로 가장 높았으며(Fig. 2), 이때의 ethanol 생산성은 0.56 g/l-hr 로 완전 혐기조건일 때보다 7배 증가하였다. 또한 ethanol 수율도 0.05VVM의 통기조건일 때 $0.42\text{ g-ethanol/g-xylose}$ 로서 이론값의 82%로서 가장 높았으며 그 이상의 통기조건에서는 통기량의 증가에 따라 감소하였다. 이러한 이유는 *P. stipitis*에 의한 xylose의 알코올 발효에서 산소가 세포성장과 ethanol 생성을 촉진시키며 완전한 혐기조건에서는 세포 성장이 제한되어 ethanol 수율과 생산성이 크게 감소한다는 보고와 일치하였다(3, 5, 6, 7, 9). 즉 *P. stipitis*에 의한 알코올 발효는 혐기적인 조건에서 일어나지만 미량의 산소가 최종 전자수용체로 작용함으로써 세포내의 redox balance에 관하여 xylose의 초기 두 단계 대사과정을 용이하게 하여 주기 때문으로 추정하고 있다(6). 반면 통기에 의한 ethanol 수율의 감소는 xylose가 세포성장에 더 많이 이용되었을 뿐만 아니라 높은 통기에 의한 일부 ethanol의 증발에 의한 손실로 추정된다(3, 9, 10).

발효온도의 영향

알코올 발효는 0.05 VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 25°C, 30°C 및 35°C에서 알코올 발효를 수행하였으며 발효배지의 초기 pH는 5.0이었다. 발효온도에 대한 실험결과는 Fig. 3에 나타내

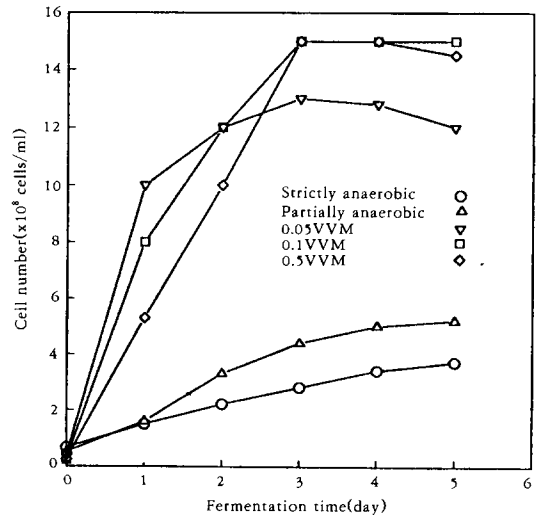


Fig. 1. Cell growth curve during the batch fermentation of 100 g/l xylose by *P. stipitis* under various aeration conditions.

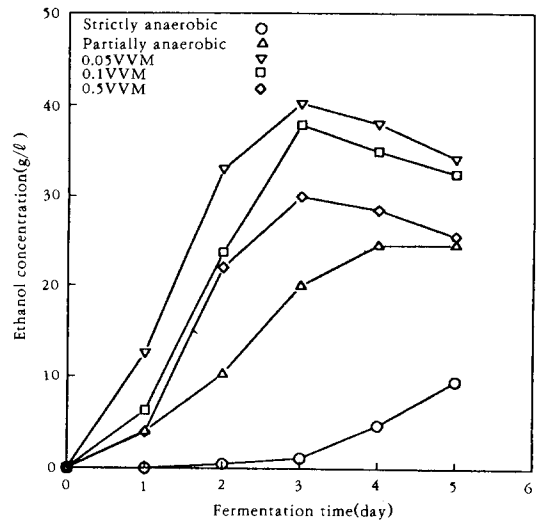


Fig. 2. The production of ethanol during the batch fermentation of 100 g/l xylose by *P. stipitis* under various aeration conditions.

었다. 실험결과 세포의 성장속도는 온도증가에 따라 증가하여 최대 비성장속도는 30°C에서 0.14hr^{-1} 으로 최대값이었으며, 최대세포농도는 25°C와 30°C에서 동일하게 1.3×10^9 cells/ml로 나타났다. 발효온도에 따른 ethanol 생성에서도 발효온도 증가에 따라 ethanol 생산성, 농도 및 수율은 30°C까지 증가

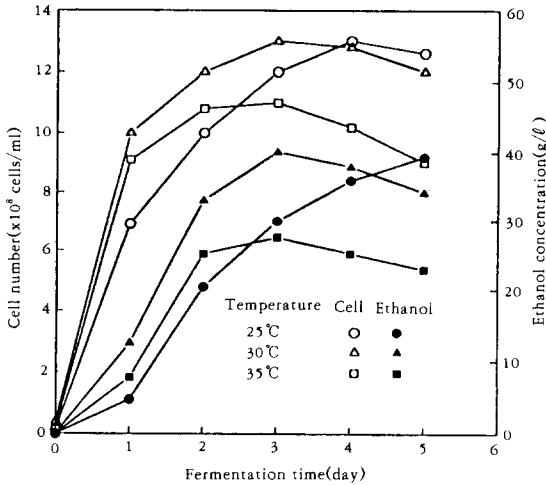


Fig. 3. The cell growth and ethanol production during the batch fermentation of 100 g/l xylose by *P. stipitis* under various fermentation temperatures.

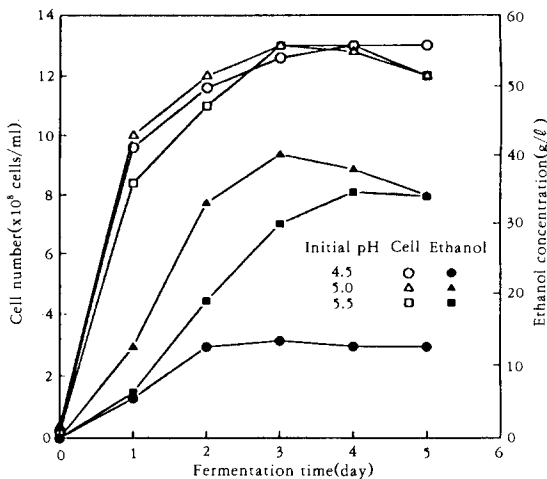


Fig. 4. The profiles of cell growth and ethanol production during the batch fermentation of 100 g/l xylose by *P. stipitis* under various initial pH.

하여 30°C에서 각각 최대값에 도달한 후 온도 증가에 따라 감소하였다. 이러한 결과는 *P. stipitis*가 30°C에서 최대 발효속도를 가지며, 30°C 이상에서는 ethanol 생성속도와 ethanol 수율이 급격히 감소하는 반면, xylitol 생성이 증가한다는 보고와 일치하였다(11). 본 실험결과에서도 온도증가에 따라

xylitol의 최대 생성량이 증가함을 나타내었다.

초기 pH에 대한 영향

알코올 발효는 30°C에서 0.05VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 발효배지의 초기 pH를 4.5, 5.0 및 5.5로 조절하여 실험을 수행하였으며, 초기 pH의 영향에 대한 실험결과를 Fig. 4에 나타내었다. *P. stipitis*의 최대 발효속도를 위한 최적 pH는 4.0~5.5 범위로 보고된(11) 바와 같이 본 연구에서도 xylose의 최적 발효조건은 초기 pH가 5.0으로 나타났다. 또한 초기 pH가 5.5인 경우에는 초기 pH가 5.0인 경우보다 세포성장속도는 더 양호하였으나 ethanol 생산성 및 효율은 더 낮게 나타났다. 반면 최대 세포농도 및 xylitol 생성농도는 pH 4.5~pH 5.5 사이에서 현격한 차이는 보이지 않았다. 따라서 xylose의 알코올 발효를 위한 발효배지의 초기 pH는 5.0이 최적조건이었다.

발효기질농도에 대한 영향

발효조건은 30°C에서 0.05 VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 알코올 발효를 수행하였으며, 발효배지의 초기 pH는 5.0이었다. 발효기질의 농도는 50 g/l, 100 g/l 및 150 g/l에서 실험을 수행하였다. 각각의 발효기질에 대한 실험결과를 Table 1에 나타내었다. 기질농도 50 g/l에서의 최대 비성장속도는 0.17hr⁻¹로 가장 높았으며 세포성장은 5일간 발효시까지 계속 증가하여 최대 세포농도는 2.0×10⁸cells/ml이 되었다. 반면 ethanol 생성은 24시간 발효시에 최대 ethanol 농도가 19.5 g/l였으며, 이때의 ethanol 생산성은 0.79 g/l-hr로 가장 높았으며, ethanol 수율은 0.40 g-ethanol/g-xylose로서 이론값의 78%였다. 그러나 24시간 발효 이후부터는 ethanol 농도가 계속적으로 감소한 반면 세포성장은 5일까지 계속 되었는데, 이는 배지 내의 당농도가 1.2g/l 정도밖에 존재하지 않는 반면, 낮은 ethanol 농도이면서 산소가 존재하여 *P. stipitis*는 자신이 생성한 ethanol을 탄소원으로 이용하면서 세포성장을 계속하기 때문인 것으로 추정된다. 반면 기질농도가 100 g/l에서는 보고된 바와 같이(15) ethanol 농도와 수율이 가장 높았으며, 150 g/l 이상에서는 세포성장 및 ethanol 생성이 매우 저조하였다. 또한 xylitol의 최대 농도는 기질의 농도가 증가함에 따라 증가함을 보여주었다. 이러한 결과는 *P. stipitis*가 높은 기질 농도에서 세포 성장이 억제를 받을 뿐만 아니라 기질농도 증가에

Table 1. The fermentation kinetic parameters of *P. stipitis* CBS 5776 under various xylose concentrations.

Xylose Conc.	μ_{max}	X_m	P	P_m	$Y_{p/s}$	$Xyl_{(m)}$
50 g/ℓ	0.17	20.0	0.79	19.5	0.40	1.6
100 g/ℓ	0.14	13.0	0.56	40.2	0.42	4.5
150 g/ℓ	0.09	7.5	0.16	19.7	0.35	6.1

μ_{max} : Maximum specific growth rate(hr⁻¹)

X_m : Maximum cell concentration($\times 10^8$ cell/ml)

P : Overall ethanol productivity(g/ℓ-hr)

P_m : Maximum ethanol concentration(g/ℓ)

$Y_{p/s}$: Ethanol yield(g-ethanol/g-xylose consumed)

$Xyl_{(m)}$: Maximum xylitol concentration(g/ℓ)

의하여 xylitol의 생성이 증가되기 때문이라는 보고와도 일치한다(11). 따라서 *P. stipitis* CBS 5776에 의한 xylose의 최적 발효조건은 초기 pH가 5.0이고 기질농도 100 g/ℓ 인 배지를 30℃에서 0.05VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하면서 알코올 발효를 수행하는 것이다.

요 약

Pichia stipitis CBS 5776에 의한 xylose의 최적 알코올 발효조건에 대한 연구를 수행하였다. 최적 세포성장 및 최대 ethanol 생성은 초기 pH가 5.0인 100 g/ℓ의 xylose배지를 이용하여 30℃에서 0.05VVM으로 통기하고 300rpm으로 교반하는 발효 조건에서 얻을 수 있었다. 이러한 최적 발효조건에서의 최대 비성장속도와 최대 세포농도는 각각 0.14hr⁻¹와 1.3×10⁹cells/ml이었다. 또한 최대 ethanol 농도는 72시간 발효시에 100g/ℓ의 xylose 중 96%을 이용하여 40.2g/ℓ을 얻었으며, 이때의 단위부피당 ethanol 생산성은 0.56 g/ℓ-hr이고 ethanol 수율은 0.42g-ethanol/g-xylose로서 이론수율의 82%였다.

감 사

본 연구는 상공자원부 대체에너지 기술개발사업의 연구비지원과 한국과학재단 지정 생물공정연구센터의 일부 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참 고 문 헌

- H. Schneider, P. Y. Wang, Y. K. Chan and R. Maleszka(1981), *Biotechnol. Lett.*, **3**, 89.
- P. J. Slininger, R. J. Bothast, J. E. van Cauwenberge and C. P. Kurtzman(1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 371.
- J. C. du Preez and J. P. van der Walt(1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 357.
- H. Dellweg, M. Rizzi, H. Methner and D. Debus(1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 395.
- J. C. du Preez, B. A. Prior and A. M. T. Monterio(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 261.
- P. M. Bruinenberg, P. H. M. de Bot, van Dijken and W. A. Scheffers(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 256.
- J. P. Delgenes, R. Moletta and J. M. Navarro (1986), *Biotechnol. Lett.*, **8**, 897.
- K. Skoog and B. Han-Hagerdal, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3389.
- M. E. Lighelm, B. A. Prior and J. C. du Preez, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 63.
- M. A. Alexander, T. W. Chapman and T. W. Jeffries, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 478.
- J. C. du Preez, M. Bosch and B. A. Prior (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 360.
- P. J. Slininger, R. J. Bothast, M. R. Okos and M. R. Ladisch, *Biotechnol. Lett.*, **7**, 431.
- J. C. du Preez, M. Bosch and B. A. Prior (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 521.
- T. W. Jeffries(1985), *Trends Biotechnol.*, **3**, 208.
- B. A. Prior, S. G. Killian and J. C. du Preez (1989), *Process Biochem.*, Feb., 21.
- J. C. du Preez, M. Bosch and B. A. Prior (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 228.
- S. R. Parekh, S. Yu and M. Wayman(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 300.
- H. Lee, P. Biely, R. K. Latta, M. F. S. Barbosa and H. Schneider(1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 320.
- G. L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426.