

목질계 당화액배지로부터 고온내성 변이주 *Brettanomyces custersii* H1-39의 고정화에 의한 에탄올생산

박승원 · 홍영기¹ · 김승욱* · 홍석인
고려대학교 화학공학과, ¹수원대학교 유전공학과

Ethanol Production by an Immobilized Thermotolerant Mutant of *Brettanomyces custersii* H1-39 from Wood Hydrolyzate Media. Park, Seung-Won, Yong-Ki Hong¹, Seung-Wook Kim*, and Suk-In Hong. Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ¹Department of Genetic Engineering, Suwon University, Suwon 445-743, Korea – *Brettanomyces custersii* H1-39 mutant was immobilized with various carriers. Immobilized mutant H1-39 produced more ethanol and showed higher productivity and cell concentration than those of free H1-39 in 3.4% hydrolyzate of wood-chips at different temperatures (37°C, 40°C and 43°C). At 37°C, ethanol concentration produced by mutant H1-39 immobilized in Ca-alginate and ABG(1% Ca-alginate, 1.67% bentonite, 0.33% glutaraldehyde) bead were higher than those produced by the other carriers (ACG; 1% Ca-alginate, 1.67% celite R-634, 0.33% glutaraldehyde, ABP; 1% Ca-alginate, 1.67% bentonite, 0.33% pectin. ACP; 1% Ca-alginate, 1.67% celite R-634, 0.33% pectin). The highest value of productivity(1.23 g/l-h) was obtained by using ABG beads. At 40°C, ethanol concentration and productivity obtained by ABG beads were 15.2 g/L and 0.84 g/L-h, respectively, which showed the highest value compared to other carriers. Particularly, productivity of immobilized cell was increased up to 90% as compared to that of free cell. On the other hand, ABP(1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin) beads gave the best results at 43°C for production of ethanol and productivity, which were 13.8 g/l and 0.77 g/l-h, respectively.

Key words: *Brettanomyces custersii*, immobilization, ethanol production

에탄올 발효산업에서 *Sacchomyces cerevisiae*가 가장 많이 이용되고 있지만, 28-35°C에서는 정상적으로 성장을 하고 발효력도 높으나 40°C에서는 거의 성장을 할 수 없는 것으로 알려져 있다[22,23]. 고온에서 에탄올 발효를 수행함으로써 얻을 수 있는 장점으로는 오염을 최소화 할 수 있고, 기존의 공정에서 사용하는 발효온도에서 소요되는 에너지 비용을 감소시킬 수 있을 뿐 아니라, 에탄올 회수의 효율성을 증가시킬 수 있다. 따라서 40°C 이상의 고온에서 활성을 가지는 균주의 선별 및 개발에 관한 연구가 많은 연구자들에 의해 진행되고 있다[1,8,20,21].

한편 목질계 당화액으로부터 전처리 공정을 통한 에탄올 생산에 관한 연구가 여러 연구자들에 의해 보고되었으나[13, 15,16], 목질계 전처리공정에서 얻어지는 중간물질인 cellobiose는 cellobiohydrolase의 강력한 억제제로 작용하므로 cellobiose를 발효할 수 있는 균주의 개발이 필요하다. Cellobiose 발효를 할 수 있는 균주로는 *Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera* 등이 우수한 것으로 보고 되었으나[12], 이러한 균주들은 에탄올 수율과 내열성이 낮기 때문에 발

효공정에 직접 이용할 수 없고, 돌연변이등을 통하여 균주를 개량해야 한다[3,6,8].

에탄올 발효공정에서 생산성을 높이기 위해 다양한 고정화 방법이 이용되어 왔는데 그중 고정화 비용이 저렴하고 기계적 강도가 비교적 우수한 alginate에 의한 포괄법이 많이 이용되어 왔다 [10,17,19]. Alginate는 pH 5-10에서 화학적으로 안정하며 고온에서도 열적 안정성을 유지하는 특징을 지니고 있다. 이러한 고정화 방법을 통해 기존의 유리 세포배양에 비해 세포생존율의 향상, 고농도의 세포배양 및 세포의 반복사용 그리고 연속식 공정에서 높은 희석률에서도 균체의 유실방지등의 효과를 얻을 수 있다. 그러나 세포와 기질의 물질전달 감소를 초래하며, 추가비용의 단점을 가지고 있다. 특히 alginate gel의 경우 세포성장에 필수적인 phosphate에 의해 쉽게 분해가 되는데[4], 이러한 문제점을 보완하기 위하여 glutaraldehyde, polyamine등의 가교제를 첨가하거나, poly-L-lysine과 같은 물질을 이용한 encapsulation 또는 alumina, celite 및 bentonite등을 이용한 흡착법을 병행할 수 있다. 한 등[9]은 *Zymomonas mobilis*를 alginate, K-carageenan, agar등으로 고정화하여 유리균체보다 3-5°C 정도 높은 온도에서 glucose나 sucrose등을 이용하여 에탄올발효를 할 수 있다고 보고하였다. 또한 Goida 등[6]은 연속공정에 의한 에탄올발효에서 발효균주를 alginate를 이

*Corresponding author
Tel. 82-2-3290-3300, Fax 82-2-926-6102
E-mail: swkim@prosys.korea.ac.kr.

용하여 고정화 함으로써 기존의 현탁배양방법보다 세포생존도가 장시간 높게 유지되었으며, 균체손실을 방지하여 생산성이 향상되었다고 보고하였다. 현재 glucose를 이용한 30°C정도에서의 에탄올발효공정에서 고정화방법에 관한 연구는 많이 되어왔지만, 40°C이상의 고온에서 목질계 당화액을 기질로 이용하여 운영되는 발효공정에서의 균체고정화에 대한 연구는 상당히 미진한 상태인데, 공정의 생산성을 향상시키고 또한 고온에서의 세포안정성, 성장, 발효력을 증진시키기 위하여 연구가 이루어져야 한다.

이전 연구[18]에서 glucose와 cellobiose 혼합당 발효균주를 돌연변이시켜 40°C이상의 고온에서 발효력이 우수한 변이주를 개발하였고, 본 연구에서는 이같은 변이주를 이용하여 외부 고온에 대해 세포의 열 안정성을 향상시키고, 생산성을 증대시키기 위한 고정화 방법을 도입하고자 하며, 적당히 고정화 담체를 개발 적용함으로써 생산성을 향상시키는데 목적이 있다.

재료 및 방법

시용균주

발효균주로 *Brettanomyces custersii* CBS 5512의 변이주인 H1-39 [19]를 사용하였다.

배지 및 발효

종균배지로는 YPD배지(2% dextrose, 2% peptone, 1.5% yeast extract)를 사용하였다. 발효배지로 1% 묽은 황산으로 8분간 처리하고 증기폭삭시킨 wood-chips을 pH 4.8로 맞춘 0.05 M citrate buffer에 혼합한후 51°C에서 48시간동안 당화효소에 의해 가수분해시킨 당화액에 2% peptone과 1.5% yeast extract를 첨가하여 이용하였다. 사용된 배지는 Difco 사 제품을 사용하였고, wood-chips 과 당화효소는 한국 에너지 기술 연구소에서 제공받았다. 당화액은 3.4% (2.6% glucose+0.8% cellobiose)의 농도가 이용되었다.

유리세포의 에탄올 발효는 종균배지에서 shaking incubator나 항온기를 이용 30°C에서 1일간 배양시켜 활성화된 균을 발효배지에 10%(v/v) 로 접종하였고, 에탄올 발효는 다양한 발효배지와 다양한 온도에서 250-ml Erlenmeyer flask 에 조업부피가 50 ml가 되도록 하고 160 rpm으로 교반을 시켜 배양하였다. 고정화 세포에 의한 에탄올 발효는 접종량이 20% (bcad 의 부피/조업부피)가 되도록 하였으며 (실제 활성화된 현탁배양액은 10% 접종된 것임) 조업부피는 32.5 ml 이었고 그외는 유리세포와 동일한 조건이었다.

UV 및 NTG에 의한 우수 변이주 선별

Brettanomyces custersii 균주에 100.32 erg/mm² 범위의 UV를 조사하여 사멸율이 95% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰고, 또한 NTG 농도를 50 g/ml 로하여 85분간

처리하여 사멸율이 97% 정도 되도록 하여 돌연변이를 유발시켰다. 변이주들을 glucose 배지를 이용하여 40°C 에서 성장을 잘하는 것들을 3차 과정에 걸쳐 선별한후, Durham tube 방법을 이용 초기 발효속도를 측정하여 우수한 변이주를 선별한후 18% glucose를 기질로 에탄올 발효효율이 우수한 변이주를 선별하였다. 선별된 변이주를 다양한 농도의 cellobiose, 혼합당, 당화액을 이용하여 발효력을 조사하여 우수균주를 최종적으로 선별하였다.

Gamma-ray 조사에 의한 우수 변이주 선별

첨유소 물질을 당화효소로 가수분해시켜 생성되는 당화액과 조성이 유사한 혼합당을 기질로 고온에서 우수한 발효력을 보인 H1-39, H1-23 변이주 그리고 이들의 원균주인 *B. custersii*를 사멸율이 95% 정도가 되도록 2.6 Kgy dosage 로 Gamma-ray를 조사시켜 돌연변이를 유발시킨후 고온내성을 지니는 발효력이 우수한 변이주를 선별하였다.

고정화 방법

2% Na-alginate를 증류수에 녹여 가압 멸균한 후, 24시간동안 활성화된 동일 부피의 세포 현탁액을 혼합하였으며, 연동펌프를 이용하여 18 gauge 주사바늘에 통과시켜 0.1 M CaCl₂ 경화액에 떨어뜨려 직경 2 mm 의 bead를 제조하였다. Bead의 완전한 겔화를 위해 2% YPD 배지가 포함된 0.1M CaCl₂ 에 4°C, 12시간동안 침전시켰다.

첨가제로는 1.67%(w/v) bentonite(Shinyo chemical Co.), 무기담체로 Mesh size가 50/100인 1.67%(w/v) Celite R-634, 가교제로 0.33%(v/v) glutaraldehyde (Fluka Chemical A.G.) 와 0.33%(w/v) pectin을 이용하였다.

분석방법

에탄올 정량. 에탄올의 정량은 Bernet and Gutmann[2]의 방법을 변형한 효소적방법을 이용하였다. 분석하고자 하는 시약을 적당하게 희석한후 (0.01-0.06%, w/v), glycine buffer 및 ADH, β-NAD와 혼합한후 반응혼합물(75 mM sodium pyrophosphate, 21 mM glycine, 75 mM semicarbazide-HCl, 1.35 mM β-NAD)을 37°C에서 25분간 반응시킨후 생성된 NADH를 340 nm 에서 흡광도를 측정함으로써 에탄올의 농도를 측정하였고 분석시약은 Sigma사의 에탄올 정량분석 kit 를 사용하였다.

이론적 수율. 에탄올 수율은 이론적 수율(% of theoretical yield)로 표시하였다. 이론적으로 glucose가 100% 에탄올로 전환된다면, 1 M glucose(분자량, 180.16)는 발효되어 2 M ethanol을 생성하므로 180.16 X = 92.4에서 X = 0.5114이다. 즉 투입된 glucose 질량에 0.5114를 곱해주면 이론 수율의 100%가 되는 에탄올 생성량이 된다. 또한 cellobiose가 이론적으로 100% 에탄올로 전환된다면, 1 M cellobiose (분자량, 342.3)은 발효되어 4 M ethanol (분자량, 184.28)을 생

성함으로 $X = 0.538$ 이 된다. 이러한 식을 통해 투입된 cellobiose 질량에 0.538을 곱해주면 이론 수율의 100%가 되는 에탄올 생성량이 된다.

환원당 정량. 환원당의 정량은 시료용액 1 ml 와 DNS 용액 3 ml를 혼합하여 100°C 항온수조에서 10분간 끓인 후 냉각시켜 10 ml 의 1차증류수를 첨가하여 분광광도계로 575 nm에서 흡광도를 측정하는 Miller 방법[15]을 이용하였다.

Glucose 정량. Glucose정량은 (주)영동제약의 포도당 측정용시약 Glucose-E Kit를 이용하였는데 10-50배 정도 적당하게 희석된 시료 0.02 ml를 발색효소액(PGO enzyme) 3 ml에 혼합한 후 38°C 에서 18분간 반응시킨 후 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cellobiose 정량. Cellobiose 의 농도는 DNS 방법으로 정량된 환원당에서 Glucose-E Kit로 정량된 glucose농도를 빼서 계산하였다.

균체량, 균체수 및 세포생존율 측정

균체량은 여러 농도의 세포배양액을 각각 10배 희석한 후 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정한 후 각각 건조기에서 건조중량이 일정해질 때까지 75°C에서 건조하여 건조중량을 구한 후 보정곡선을 만들었다. 각 시료를 희석한 후 흡광도를 측정하여 보정곡선에 의해 환산하여 건조중량을 얻었다.

균체수는 혈구계수기를 이용하여 측정하였으며, 세포 생존율은 Lee 등[11]의 방법을 이용하였는데, 이 방법은 Methylene blue 염색방법을 변형한 것으로 0.025%(w/v) Methylene blue 와 1% glucose를 첨가한 full strength Ringer solution 을 혼합하여 표준염색용액으로 만들어 염색을 하여 죽은 세포와 살아있는 세포를 구분하였다. 발효가 끝난 시료를 적절하게 희석한 후 0.1 ml를 취해 0.9 ml의 염색용액에 희석한 후 혈구계수기로 관찰하였다.

결과 및 고찰

우수변이주 선별

Fig. 1에서 보여주듯이 *B. custersii*를 UV, NTG, 및 γ -ray 로 돌연변이시켜 선별된 우수균주인 H1-23, H1-39, H2-1, H2-41, H3-63을 당화액(3.3% glucose와 1.4% cellobiose 포함)을 기질로 하여 40°C와 43°C에서 에탄올 발효를 행하였다(Fig. 2). 선별된 균주들은 온도가 증가함에 따라 발효 속도와 최대수율은 감소하였으며, 온도 40°C에서 선별 균주들중 H1-39 변이주가 발효 후 30시간에 이론수율의 76.3% 수율을 보여 가장 우수하였고, 이는 원균주보다 약 10% 향상된 것이다. 또한 43°C에서도 H1-39 변이주가 다른 선별균주들과 비교하여 우수한 에탄올 생산을 보였으며, 이때의 이론적 수율은 약 72.5%였다. 이와같이 H1-39 변이주가 40°C 와 43°C에서 다른 선별균주들보다 발효력이 뛰어난 것을 알

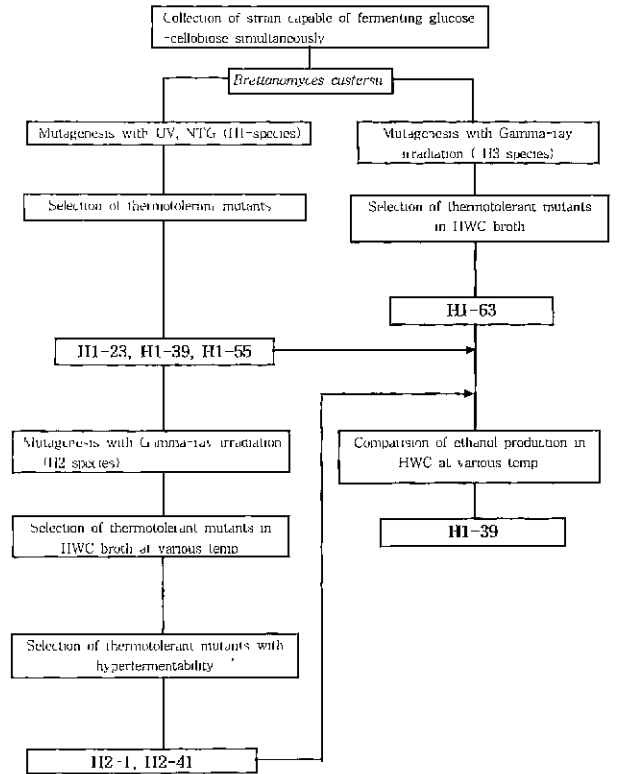


Fig. 1. Schematic diagram of selection of thermotolerant yeast with hyperfermentability (HWC means hydrolyzate of wood-chips).

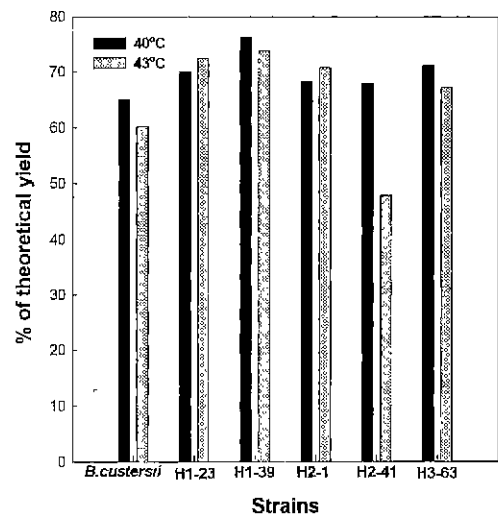


Fig. 2. Comparison of ethanol production at different temperatures by *B. custersii* and its mutants from hydrolyzate of wood-chips containing 3.3%(w/v) glucose and 1.4%(w/v) cellobiose.

수 있었다. Fig. 3 는 40°C와 43°C에서의 시간에 따른 에탄올 발효력을 나타낸 것으로 40°C에서 발효 후 6시간만에 15.9 g/L의 에탄올을 생산하여 급격히 증가하다가, 이후 소

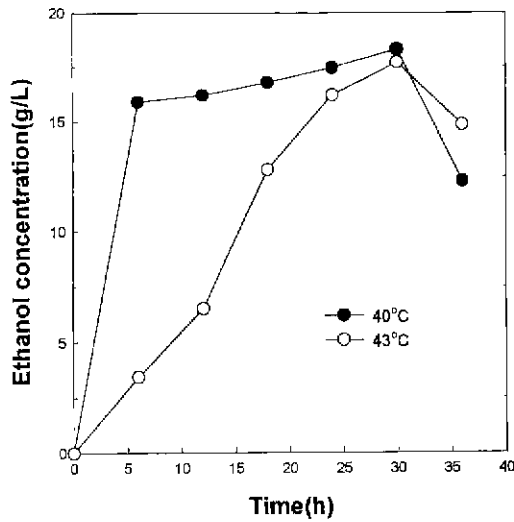


Fig. 3. Ethanol fermentation by mutant H1-39 at 40°C and 43°C in hydrolyzate of wood-chips containing 3.3%(w/v) glucose and 1.4%(w/v) cellobiose.

폭으로 증가하였으며, 30시간 후 18.3 g/l의 가장 많은 에탄올을 생산하였다. 이는 이론수율의 76.3%에 해당하는 값이다. 또한 온도 43°C에서는 30시간 발효후 17.7 g/l의 에탄올을 생산하여 이론수율의 72.5%로 나타났으며, 이는 40°C에 서보다 2.5% 감소한것이다.

Ca-alginate bead에 의한 고정화

Ca-alginate에 의해 고정화된 H1-39 변이주는 37°C에서 3.4%의 당화액을 기질로 이용하였을 때 18시간 배양후 유리세포가 생산한 13.9 g/l보다 약 5% 증가한 14.8 g/l의 에탄올을 생산하였다(Fig. 4). 온도 40°C에서는 유리세포 배양의 경우 30시간 발효후 13.3 g/l 에탄올을 생산하였지만 Ca-alginate로 고정화시킨 H1-39 변이주는 18시간 발효후 14.6 g/l 에탄올을 생산하였으며, 이때의 생산성은 유리세포의 경우 0.44 g/l/h, Ca-alginate에 고정화했을 경우는 0.82 g/l/h였다. 이는 에탄올 생산은 약 10%, 생산성은 약 86% 정도 증가된 것으로 37°C보다 상승된 폭이 월등히 증가되

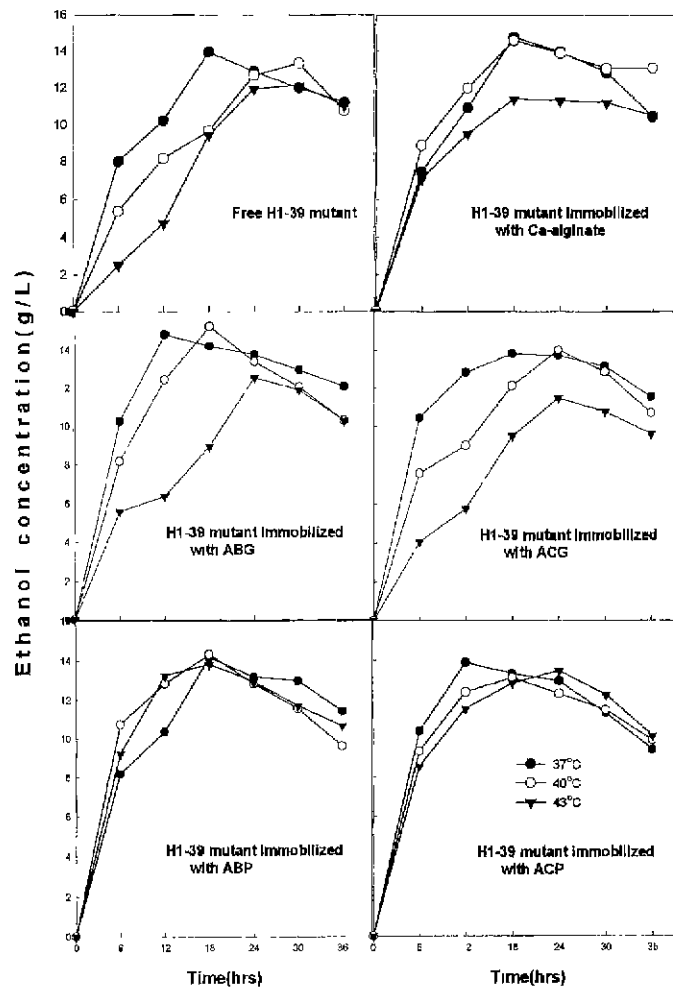


Fig. 4. Ethanol fermentation by free and immobilized mutant H1-39 with various carriers at different temperatures in 3.4% hydrolyzate of wood-chips (2.6% glucose+0.8% cellobiose).

어 고정화 담체가 균주의 고온내성을 증진시켰다는 사실을 입증하였다.

온도 43°C에서의 에탄올 생산은 유리세포로 발효하였을 때보다 다소 작았지만, 유리세포가 발효 30시간 후에 12.1 g/l의 최대에탄올을 생산하는것에 비하여 고정화된 변이주는 발효 18시간후에 11.54 g/l의 가장 많은 에탄올을 생산함을 알수 있었다. 따라서 생산성 측면에서 유리세포에 비해 Ca-Alginate에 고정화된 변이주가 뛰어난 것을 알 수 있었다. 유리세포와 Ca-alginate에 고정화하였을때의 각 온도에 따른 에탄올 생산을 비교하면, 37°C에서는 거의 같은 18시간 만에 각각 최대 에탄올 생산을 나타냈으며, 40°C, 43°C에서는 유리세포가 30시간 이후에 최대 에탄올을 생산하였으나, Ca-Alginate에 고정화된 세포는 18시간만에 최대 에탄올을 생산하였다. 이와같은 결과들을 고려할때 고온에서 고정화에 의한 에탄올 생산은 유리세포 배양에서 보다 뛰어난 에탄올 생산 특성을 나타낼 수 있고 이를 보다 발전시키기 위하여 다양한 담체의 개발이 필요하다.

ABG bead에 의한 고정화

ABG (1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% glutaraldehyde) bead에 고정화된 세포는 온도 37°C에서 12시간 발효후 14.8 g/l 에탄올을 생산하여 18시간 발효후 13.9 g/l를 생산한 유리세포 배양보다 다소 높은 에탄올 생산을 나타냈으며(Fig. 4), 이때의 생산성은 1.23 g/l·h로 유리세포보다 58% 정도 향상 되었다. 온도 40°C에서 18시간 발효후 15.2 g/l의 에탄올을 생산하여 30시간 발효후 13.3 g/l의 에탄올 생산을 나타낸 유리세포보다 약 14%가 증가하였으며, productivity는 0.84 g/l·h로 유리세포의 0.44 g/l·h보다 약 91%가 증가하였다. 또한 온도 43°C에서는 24시간 발효후 12.5 g/l의 에탄올을 생산하여 생산성이 0.52 g/l·h였다. 이것은 유리세포로 배양하였을때의 12.1 g/l의 에탄올 생산과 0.40 g/l·h의 생산성에 비하여 다소 증가 하였음을 알수 있다.

ABG로 고정화시킨 H1-39변이주의 온도가 증가함에 따른 에탄올생산 특성을 보면, 37°C, 40°C, 43°C에서 각각 14.8 g/l, 15.2 g/l, 12.5 g/l의 최대 에탄올 생산을 보여, 37°C에서 40°C로 온도가 증가함에 따라 오히려 약간의 증가 추세를 보였고, 40°C에서 43°C로 온도가 증가함에 따라 18%정도 감소하였다. 또한 생산성은 각각 1.23 g/l·h, 0.84 g/l·h, 0.52 g/l·h로 온도가 증가함에 따라 뚜렷하게 감소하였다.

ACG bead에 의한 고정화

ACG (1% Ca-alginate+1.67% celite R-634+0.33% glutaraldehyde) 고정화 세포를 이용 37°C 에서 에탄올 발효를 하였을 때, 유리세포로 배양하였을때와 거의 비슷한 에탄올 생산과 생산성을 나타냈다(Fig. 4). 그러나 40°C 에서는 24시간 경과 후 14 g/l 에탄올을 생산하여 유리세포 배양시의

30시간후 13.3 g/l 보다 약 5% 증가하였고, 생산성도 0.12 g/l·h 가 증가 하였다. 온도 43°C에서는 생산성만 0.08 g/l·h 증가 했을뿐 에탄올 생산은 오히려 유리세포 배양시 보다 낮았다. 따라서 ACG에 고정화했을 때 유리세포에 비하여 모든 온도에서 에탄올 생산이 비슷하거나 감소하여 고정화담체로는 적당하지 않았다. 온도가 37°C, 40°C, 43°C로 증가함에 따라 최대 에탄올 생산은 각각 13.8 g/l, 14.0 g/l, 11.4 g/l 로 나타나 40°C에서 43°C로 올라가면서 에탄올 생산이 22% 정도 큰 폭으로 하락 하였으며, 37°C와 40°C에서 에탄올 생산은 비슷하였지만 생산성은 0.79 g/l·h에서 0.56 g/l·h로 하락하였다.

ABP bead에 의한 고정화

ABP (1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin)에 의해 고정화된 세포는 37°C에서 유리세포와 에탄올 생산 및 생산성이 거의 비슷한 수준이었다(Fig. 4). 그렇지만 40°C와 43°C에서는 에탄올 생산과 생산성이 증가하여 고정화 담체가 외부고온과 세포와의 완충적인 작용을 했으므로 생각된다. 온도 40°C에서 ABP bead에 의해 고정화된 세포는 18시간 발효후 14.3 g/l의 에탄올 생산을 보여 유리세포보다 약 7.5% 증가하였고, 생산성도 0.79 g/l·h로 0.44 g/l·h의 유리세포보다 약 79% 증가하였다. 온도 43°C에서는 18시간 발효후 13.8 g/l의 에탄올을 생산하여, 30시간 발효후 12.1 g/l의 에탄올을 생산한 유리세포보다 에탄올 생산은 14%, 생산성은 약 93%증가하였다.

ACP bead에 의한 고정화

ACP (1% Ca-alginate+1.67% celite R-634+0.33% pectin) 고정화 세포는 37°C에서 12시간 발효후 최대 13.8 g/l 에탄올을 생산하여 유리세포와 거의 비슷하였으나(Fig. 4) 생산성은 1.15 g/l·h로 약 49%가 향상되어 발효속도가 우수하였다. 40°C에서도 18시간후 13.0 g/l의 에탄올을 생산하여 유리세포와 비슷하였고 생산성은 0.72 g/l·h로 63% 증가하였다. 또한 43°C에서는 24시간 발효후 13.4 g/l의 에탄올을 생산하여 유리세포의 30시간 발효후 12.1 g/l 보다 약 11% 증가하였고, 생산성도 40% 정도 증가하였다. ACP고정화세포의 온도증가시 발효특성을 보면, 37°C, 40°C, 43°C로 각각 온도가 증가함에 따라 최대 에탄올 생산은 13.8 g/l, 13.0 g/l, 13.4 g/l로 거의 비슷하였으나, 생산성은 1.15 g/l·h, 0.72 g/l·h, 0.56 g/l·h로 뚜렷하게 감소하는 추세를 보였다.

다양한 고정화 방법에 의한 에탄올 생산 특성비교

여러 재질의 담체를 이용하여 H1-39 변이주를 고정화시켜 3.4% 당화액 (2.6% glucose+0.8% cellobiose)를 기질로 37°C, 40°C, 43°C 에서 에탄올 발효를 하였는데, 전반적으로 유리세포 배양시 보다 에탄올 수율, 생산성, 세포 수율, 세포 생존율이 향상되었다(Table 1, 2, 3). 이러한 상

Table 1. Comparison of ethanol production by free and immobilized mutant H1-39 with various carriers at 37°C in 3.4% hydrolyzate of wood-chips*

Immobilization method	Ethanol (g/l)	% of Theoretical yield	Productivity (g Ethanol/l·h)	Cell No. (per ml bead, $\times 10^8$ cells)	Cell viability % (after 24 hours)
Free cell	13.9	80.5	0.77	1.52	95.0
Ca-alginate	14.8	84.9	0.81	16.65	96.4
ABG	14.8	84.9	1.23	13.4	96.0
ACG	13.8	79.1	0.77	10.8	96.4
ABP	14.1	81.0	0.78	10.2	96.1
ACP	13.8	79.1	1.15	15.1	94.2

ABG ; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% glutaraldehyde, ACG ; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634+0.33% glutaraldehyde, ABP ; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin, ACP; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634 +0.33% pectin, * ; 2.6% glucose + 0.8% cellobiose

Table 2. Comparison of ethanol production by free and immobilized H1-39 mutant with various carriers at 40°C in 3.4% hydrolyzate of wood-chips*

Immobilization method	Ethanol (g/l)	% of Theoretical yield	Productivity (g Ethanol/L·h)	Cell No. (per ml bead, $\times 10^8$ cells)	Cell viability % (after 24 hours)
Free cell	13.3	76.3	0.44	0.51	91.0
Ca-alginate	14.6	83.9	0.82	9.9	93.8
ABG	15.2	87.1	0.84	11.25	93.6
ACG	14.0	80.6	0.56	7.26	92.8
ABP	14.3	82.0	0.79	9.3	92.1
ACP	13.0	74.8	0.72	10.4	92.7

ABG; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% glutaraldehyde, ACG; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634+0.33% glutaraldehyde, ABP; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin, ACP; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634 +0.33% pectin, * ; 2.6% glucose + 0.8% cellobiose

Table 3. Comparison of ethanol production by free and immobilized H1-39 mutant with various carriers at 43°C in 3.4% hydrolyzate of wood-chips*

Immobilization method	Ethanol (g/l)	% of Theoretical yield	Productivity (g Ethanol/L·h)	Cell No. (per ml bead, $\times 10^8$ cells)	Cell viability % (after 24hours)
Free cell	12.1	69.5	0.40	0.37	82.8
Ca-alginate	11.4	65.4	0.63	3.16	83.1
ABG	12.5	71.9	0.52	6.4	88.1
ACG	11.4	65.3	0.48	4.6	82.9
ABP	13.8	79.1	0.77	10.6	85.9
ACP	13.4	77	0.56	9.7	85.6

ABG ; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% glutaraldehyde, ACG ; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634+0.33% glutaraldehyde, ABP ; 1% Ca-alginate+1.67% bentonite+0.33% pectin, ACP; 1% Ca-alginate+1.67% celite R-634 +0.33% pectin, * ; 2.6% glucose + 0.8% cellobiose

승효과는 온도가 고온으로 올라가면서 뚜렷하게 나타나 37°C에서는 5% 정도 수율이 향상되었는데 반해 40°C에서는 14%, 43°C에서는 10% 정도 수율이 향상되었다. 또한 세포농도도 40°C, 43°C에서 각각 190%, 120% 정도 향상되었다. 이러한 세포 성장속도의 증가는 생산성을 높이는 원인이 되어 각 온도에서 현저하게 증가된 추세를 보였다. 온도 37°C에서는 Ca-alginate와 ABG 고정화시 가장높은 최대 에탄올 수율을 보였고(각각 이론수율의 84.9%), ABG 고정화 세포 배양시 생산성이 1.23 g/l·h로 가장 우수하게 나타났다(Table 1). 최대 세포수는 Ca-alginate 고정화시 1.665×10^8 cells/ml로 가장 높았고, 다른 담체로 고정화시킨 세포는 유리세포보다 오히려 다소 낮았다. 발효 24시간후

세포생존율은 유리세포 및 고정화 세포 모두 비슷한 94-96%정도 였다. 전반적인 발효결과를 분석할때 에탄올 수율과 생산성이 우수한 ABG 담체가 이 조건에서는 비교적 우수한 담체로 평가 되었다. 온도 40°C에서는 최대수율이 이론수율의 87.1%, 생산성이 0.84 g/L·h, 최대 세포수가 1.125×10^8 cells/ml인 ABG 고정화 세포가 가장 우수하였으며, 이 고정화 담체로 고정화 시킨 세포는 유리세포 배양시 보다 수율 10.8%, 생산성 0.4 g/l·h, 세포수 0.615×10^8 cells/ml가 증가하여 큰 폭으로 발효력 및 세포 수율이 향상되었다. ABG 담체로 고정화 했을때 24시간 발효 후 세포 생존율은 93.6% 이었다(Table 2). 온도 43°C에서는 ABP로 세포를 고정화 했을때 최대 에탄올 수율이 이론 수율의

79.1%, 생산성이 0.77 g/l·h, 최대 세포수가 1.06×10^8 cells/ml로 나타나 가장 우수 하였다(Table 3). 특히 세포수는 유리세포 배양시 보다 180% 정도 향상된 것으로 세포수가 이렇게 큰폭으로 증가 했다는 것은 이 고정화 담체가 외부 고온과 세포 사이에 충분한 완충작용을 한다는 사실을 간접적으로 입증해준다고 할 수 있다.

위와 같은 결과들을 통해, 여러가지 고정화 방법을 통한 에탄올 발효는 유리세포 배양보다 뛰어난 에탄올 수율, 생산성, 세포 수율, 세포 생존율을 나타냈고, 특히 H1-39변이주를 ABG bead에 고정화하였을때, 40°C에서 가장 높은 15.2 g/L의 에탄올을 생산하였으며, 생산성도 0.84 g/l·h로 유리세포 배양시보다 약 91% 증가하였다.

이같은 결과들로서 고정화 담체가 고온에서 활성을 증가시키는 역할을 함을 알수 있으나, 43°C 이상에서는 상대적으로 낮은 온도에서와 비교하여 낮은 에탄올 생산을 나타내어 담체의 개선이 필요함을 알수 있다.

요 약

여러 재질의 담체를 이용하여 H1-39변이주를 고정화시켜 3.4% 목질계 당화액을 탄소원으로 37°C, 40°C, 43°C에서 에탄올 발효를 하였는데, 전반적으로 유리세포 배양시보다 에탄올 수율, 생산성, 세포 수율, 세포 생존율이 향상되었다. 온도 37°C에서는 Ca-alginate와 ABG bead에 고정화된 H1-39변이주에서 각각 가장 높은 14.8 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 특히 H1-39변이주를 ABG bead에 고정화하여 배양하였을때 생산성이 1.23 g/l·h로 가장 높았다. 40°C에서는 ABG bead에 고정화된 H1-39 변이주에서 가장 높은 15.2 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 생산성도 0.84g/l·h로 유리세포 배양시보다 약 91% 증가하였다. 한편 43°C에서는 ABP고정화 배양을 통해 가장 높은 13.8 g/l의 에탄올 생산과 0.77 g/l·h의 생산성을 나타내어 유리세포 배양시 보다 각각 14%와 93%의 증가를 보였다.

감사의 글

본 연구는 에너지지원기술개발 지원센터의 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

- Ballesteros, I., M. Ballesteros, A. Cabanas, J. Carrasco, C. Martin, M. Negro, F. Saez, and R. Saez. 1991. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28**: 307-315.
- Bernet, E. and I. Gutmann. 1974. Ethanol determination with alcohol dehydrogenase and NAD, H. U. Bergmeyer Ed. Academic Press. New York. In *Methods of Enzymatic analysis*. **3**: 1499-1502.
- Blondin, B., R. Ratomahemia, A. Arnaud, and P. Galzy. 1982. A study of cellobiose fermentation by a *Dekkera* strain *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 2031-2037.
- Cheetham, P. S. J., K. Blunt, and C. Bucke. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 2155-2168.
- Freer, S. N., and R. W. Detroy. 1983. Characterization of cellobiose fermentation to ethanol by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **25**: 541-557.
- Goida, F., C. Casas, and C. Sola. 1987. A survey of continuous ethanol fermentation systems using immobilized cells. *Process Biochem.* **4**: 43-48.
- Gonde, P., B. Blondin, R. Ratomahemina, A. Arnaud, and P. Galzy. 1982. Selection of yeast strains for cellobiose alcoholic fermentation. *J. Ferment. Technol.* **60**: 579-584.
- Hacking A. J., I. W. F. Taylor, and C. M. Hanas. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 361-363.
- Han, M. S. and D. H. Chung. 1992. Ethanol production using alginate immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 588-596.
- Klein, J. and P. Schara. 1980. Entrapment of living microbial cells in covalent polymeric networks: I. Preparation and properties of different networks. *J. Solid Phase Biochem.* **5**: 61-78.
- Lee, T. H., J. C. Ahn, and D. Y. Ryu. 1983. Performance of immobilized yeast reactor system for ethanol production. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 41-45.
- Lodder, J. 1970. *The Yeast*. **2nd ed.** North Holland. Amsterdam.
- McMillan J.D., M.M. Newman, D.W. Templeton, and A. Mohagheghi. 1999. Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated popur hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77/79**: 649-665
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
- Nguyen, Q.A., M.P. Tucker, F.A. Keller, D.A. Beaty, K.M. Connors and F.P. Eddy. 1999. Dilute acid hydrolysis of softwoods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77/79**: 133-142.
- Nguyen, Q.A., F.A. Keller, M.P. Tucker, C.K. Lombard, B.M. Jenkins, D.E. Yomogida, and V.M. Tiangco. 1999. Bioconversion of mixed solids waste to ethanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **77/79**: 455-472.
- Nunez, M. J. and J. M. Lema. 1987. Cell immobilization: Application to alcohol production. *Enzyme Microb. Technol.* **9**: 561-642.
- Park, S.W. Y. K. Hong, S. W. Kim, S. I. Hong. 1999. Development of strain fermenting the glucose/cellobiose mixed sugar for simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic materials. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 145-152.
- Smidsrd, O. and G. Skjak. 1990. Alginate as immobilization

- matrix for cells. *Trends Biotechnol.* **8**: 71–78.
20. Sohn, H., Y. W. Park, I. N. Jin, 1994. The fermentation characteristics of newly selected thermotolerant yeasts at high temperature. *J. Kor. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 222–229.
21. Szczodrak, J. and Z. Targonski. 1988. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 300–303.
22. Walsh, R. M. and P. A. Martin. 1977. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator. *J. Inst. Brewing.* **83**: 169–172.
23. Yamamura, M. K. Takes, and T. Kanihare. 1991. *Saccharomyces* yeast cells grown at elevated temperatures are susceptible to autolysis. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 2861–2864.

(Received April 3, 2000)