

# 섬유질계 동시당화발효를 위한 내열성 융합 효모, *Kluyveromyces marxianus* CHY1612의 개발

강현우 · 김 울 · 박주용<sup>1</sup> · 민지호<sup>1</sup> · 최기욱\*

(주)창해에탄올, <sup>1</sup>전북대학교 반도체 · 화학공학부

## Development of Thermostable Fusant, CHY1612 for Lignocellulosic Simultaneous Saccharification and Fermentation

Hyun-Woo Kang, Yule Kim, Ju-Yong Park<sup>1</sup>, Jiho Min<sup>1</sup>, and Gi-Wook Choi\*

Changhae Institute of Cassava and Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd, Jeonju 561-203, Korea

<sup>1</sup>Graduate School of Semiconductor and Chemical Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

**Abstract** To develop thermostable ethanol fermentative yeast strain for lignocellulosic simultaneous saccharification and fermentation, high ethanol producing yeast, *Saccharomyces cerevisiae* CHY1012 and thermostable yeast, *Kluyveromyces marxianus* CHY1703 were fused by protoplast fusion. The thermostable fusant, CHY1612 was identified as a *Kluyveromyces marxianus* by phenotypic and physiological characteristics, as well as molecular analysis based on the D1/D2 domains of the large subunit (26S) rDNA gene and the internally transcribed spacer (ITS) 1 + 2 regions. For lignocellulosic ethanol production, AFEX pretreated barley straw at 150°C for 90 min was used in a simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process using thermotolerant CHY1612. The SSF from 16% pretreated barley straw at 43°C gave a saccharification ratio of 90.5%, a final ethanol concentration of 38.5 g/L, and a theoretical yield of 91.2%. These results show that *K. marxianus* CHY1612 has potential for lignocellulosic ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation with further development of process.

**Keywords:** Protoplast fusion, *Kluyveromyces marxianus*, Lignocellulosic bioethanol, SSF

### 서 론

2세대 바이오에탄올인 섬유질계 에탄올은 보릿짚, 억새, 폐목재 등의 섬유질계 바이오매스를 원료로 하여 박테리아나 효모와 같은 미생물을 이용한 에탄올 발효를 통해 얻어진다 [1]. 식량 자원과 경쟁하지 않는 섬유질계 바이오매스로부터 당을 얻어내기 위해 다양한 전처리 기술과 미생물 발효 기술 등이 개발되고 있으며, 전처리된 바이오매스의 당화를 위한 효소의 경제적인 대량생산 기술이 개발 중에 있다 [2-8]. 섬유질계 바이오매스의 원료 가격은 매우 저렴하나 아직까지

는 전처리 및 당화에 대한 비용 부담이 커서 가격 경쟁력을 갖는데 어려움이 있다.

이러한 섬유질계 바이오에탄올의 가격 경쟁력을 향상시키기 위해 고효율의 전처리 기술 개발 및 고효율 효소 개발과 함께 동시당화발효 (SSF)와 같은 에탄올 발효 공정 개발은 또 하나의 대안이 될 수 있다 [9-11]. 동시당화발효는 초기 고농도 당에 대한 발효 미생물의 기질 저해가 감소될 뿐 아니라 생성된 당이 바로 소모됨에 따라 당화효소에 의한 당화가 효율적으로 진행된다. 이는 고가의 당화효소를 최적으로 활용할 수 있으므로 섬유질계 에탄올 생산 비용 절감에 크게 기여할 수 있다 [12].

그러나, 섬유질계 바이오에탄올 생산을 위한 동시당화발효의 적용을 위해서는 최적 당화 온도와 발효 온도의 차이를 극복해야만 한다. 당화효소의 최적 활성 온도는 45-50°C 이

### \*Corresponding author

Tel: +82-63-214-7800, Fax: +82-63-214-7805

e-mail: changrd@chethanol.com

나, 그 온도에서는 미생물이 생육하기 어려우며, 생육 가능하다 할지라도 에탄올 발효율이 현저히 낮다. 또한, 일반적인 고효율의 에탄올 발효 효모의 최적 발효 온도는 30-35°C 이나, 이 온도에서는 당화효율이 현저히 낮아 고가의 당화 효소의 사용량이 증가할 수 밖에 없다 [13-14].

그러므로, 섬유질계 동시당화발효의 적용을 위해서는 당화 효소의 최적 활성 온도 수준에서도 에탄올 발효능이 우수한 내열성 에탄올 발효 효모의 개발이 필수적이다 [15-16]. 본 연구에서는 내열성이 우수한 *Kluyveromyces marxianus*와 에탄올 생산성 및 저해내성이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae*를 선택하여 도입된 선별 마커를 이용한 원형질 융합으로 두 균주의 장점을 모두 가진 융합 효모를 선별하였고, 그 융합 효모를 이용한 섬유질계 동시당화발효의 적용을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용된 효모는 32-35°C에서 에탄올 발효능이 우수하고 호흡결여 선별표지가 도입된 *Saccharomyces cerevisiae* CHY1012와 40°C 이상에서도 생육이 가능하고 영양요구성 선별표지가 도입된 *Kluyveromyces marxianus* CHY1703였다. 두 균주를 모균주로 원형질 융합 실험에 사용하였고, 전처리 보릿짚의 에탄올 발효 실험에는 내열성 융합 효모, *Kluyveromyces marxianus* CHY1612 (KCTC 11757BP)를 사용하였다.

### 배지 및 배양 조건

효모의 유지 및 성장 배지로는 YPD 배지 (10 g/L Yeast Extract (Difco), 20 g/L Peptone (Difco), 20 g/L Glucose (Junsei))를 사용하였고, 융합체 선별을 위한 최소 배지는 MM 배지 (6.7 g Yeast nitrogen base w/o a.a. (Difco), 20 g/L Glucose (Junsei))를 사용하여 고체 배지의 경우 2% (w/v) agar를 추가하였다.

CHY1612의 모균주와의 에탄올 발효능 비교 실험은 산업용 YPD 배지 (2.5 g/L Yeast Extract (Difco), 2.5 g/L Peptone (Difco), 0.25 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (Junsei), 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Junsei), 140 g/L Glucose (Junsei))를 이용하였다 [17].

### 선별 마커를 가진 돌연변이주의 획득

*Saccharomyces cerevisiae* CHY1011에 대한 호흡결여 돌연변이의 제조를 위해 CHY1011을 대수기로 배양한 후, 적정 농도로 희석하여 돌연변이원, acriflavine 100 µM을 30분간 처리하였다. 처리된 배양액은 YPD 고체 배지에 도말하여 32°C에서 48-72시간 배양한 후, 저농도 환천이 포함된 2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 용액 (5 g/L Glucose

(Junsei), 10 g/L Agar (Junsei), 0.5 g/L TTC)을 1시간 가량 중층 배양하였다. 정상 세포의 경우 TTC를 환원시켜 붉은색의 발색반응이 일어나는 한편, acriflavine에 의해 미토콘드리아 내의 유전자 변이로 호흡관련 효소가 불활성화된 균주는 TTC에도 발색반응을 일으키지 않는다. 그러므로 그러한 선별 마커를 가진 호흡결여 돌연변이를 선별하기 위해 TTC 중층 배양 후 발색반응이 없는 흰색 콜로니만을 분리하였다. 상기 방법으로 얻어진 균주들 중에서 에탄올 발효능을 확인하여 CHY1011과 에탄올 발효능이 유사한 균주를 최종 선별하였다 [18].

*Kluyveromyces marxianus* KCTC17631에 대한 영양요구성 마커를 적용하기 위해 KCTC17631을 대수기로 배양한 후, 적정 농도로 희석하여 돌연변이원 EMS 1 mg/mL, NTG 5 mg/mL을 각각 1시간, 3시간 처리하였고, 이후 고체배지에 도말하여 35°C에서 48-72시간 배양하였다. 이렇게 얻어진 콜로니들은 YPD 배지와 최소 고체 배지에 각각 replica 배양하여 최소배지에서는 자라지 않는 영양 요구성 변이주를 검출하였다 [19].

### 원형질 융합

두 모균주의 우수한 특성을 보유한 원형질 융합 균주를 제조하기 위해 두 모균주를 32°C에서 대수기 상태로 배양한 후, 각각 반응완충액 (0.06 M phosphate buffer, 0.2% β-mercaptoethanol, 0.6 M KCl, 0.8 M sorbitol)에서 Lyticase (Sigma)를 이용하여 33°C에서 30분간 효소 처리하였다. 그 후 세포벽이 제거되어 원형질 (protoplast) 상태로 제조된 두 균주를 1 : 1로 혼합하고, 융합 완충액 (30% PEG 6000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl buffer, pH7.5)을 이용하여 35°C에서 60분 또는 120분간 처리하여 융합을 유도하였다 [16]. 융합을 유도하기 위해 제조된 혼합액은 융합되지 않은 영양요구성 돌연변이 CHY1703은 자라지 못하도록 최소 배지 (MM, 6.7 g yeast nitrogen base w/o a.a. (Difco), 20 g/L glucose (Junsei), 20 g/L Agar (junsei))에 도말하고, 마찬가지로 내열성이 없는 CHY1012들은 자라지 못하도록 41°C 고온 조건에서 48-72시간 배양하였다. 배양에 의해 콜로니를 형성한 균주는 최소 배지를 이용하여 고온에서 계대배양하여 생육여부를 확인하고, TTC 중층 배양하여 호흡결여 여부를 반복 확인하여 내열성 융합 균주만을 선별하였다.

### CHY1612의 분자생물학적 동정

효모 균주 동정을 위한 염기 서열의 분석은 26S rDNA D1/D2와 ITS (internal transcribed spacer) 서열 결정을 통한 분자생물학적 분류를 이용하였다 [20]. CHY1612 균주를 배양하고, 상기 배양액에 대해 원심분리를 수행하여 균체를 회수한 후, 균체로부터 genomic DNA 추출하였다. 추출된 genomic DNA에 대하여, ITS5 프라이머 (5'-GAAGTAAA AGTCGTAACAAGG-3')와 NL4 프라이머 (5'-GGTCCGTG

TTTCAAGACGG-3'), NL1 프라이머 (5'-GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG-3') 및 ITS4 프라이머 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3')를 이용하여 PCR을 통해 26S rDNA D1/D2와 ITS 지역을 포함한 1300 bp 가량의 DNA를 증폭 하였다. 이렇게 얻어진 PCR 산물은 T-vector를 이용하여 클로닝하였고, sequencing 의뢰 기관인 SolGent Co. (대전)을 통해 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 NCBI의 blast search를 이용하여 분자생물학적 동정을 수행하였다.

### 섬유질계 바이오매스의 전처리 및 분석

섬유질계 바이오매스는 잉여 농부산물인 보릿짚을 선택하였다. 보릿짚은 파쇄기 및 분쇄기를 이용하여 1 mm 이하로 분쇄한 후, (주)창해에탄올 연구소의 CHEMEX (ChangHae Ethanol Multi-EXplosion) 전처리 장치를 이용하여 보릿짚 10 % (w/v)를 15 % (v/v) 암모니아 용액으로 150°C에서 90분간 처리 후 폭쇄하였다. 전처리된 보릿짚은 건조 후, 0.3 g을 사용하여 NREL (National Renewable Energy Laboratory) 표준분석법에 따라 성분분석하여 섬유질계 에탄올 발효의 데이터로 사용하였다 [21].

성분 분석 시 glucose 및 xylose 등의 당 분석은 RI detector와 Bio-Rad HPX-87P column를 사용하여 HPLC를 사용하여 분석하였다 [17]. 이동상은 증류수로 유속 0.6 mL/min으로 운전하였다. 이 때 column의 온도는 85°C, detector의 온도는 30°C로 조절하였다. 에탄올은 밀도계 (DA-510, KEM Co, Ltd., Japan)와 Supelco 6.6% CARBOWAX 20 M column (Agilent, USA)이 장착된 gas chromatography (GC)를 사용하여 분석하였다.

### 전처리 보릿짚의 당화 및 발효

전처리된 보릿짚 80 g에 0.1 M Sodium citrate buffer (pH 4.8) 200 mL과 증류수 211 mL을 혼합한 후 당화를 위하여 복합 셀룰레이즈 (Novozyme, NS50015) 30 FPU/g과  $\beta$ -glucosidase (Novozyme, NS50010) 30 CBU/g을 첨가하여 진탕 배양기에서 각 온도 조건에서 150 rpm으로 72시간 당화시켰다. 당화가 완료된 당화액은 HPLC를 이용하여 당을 분석하였고, 당화율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{당화율} = (\text{전환된 glucose 질량 (g)}/\text{이론적인 glucose 질량 (80 g} \times 0.571)) \times 100 (\%)$$

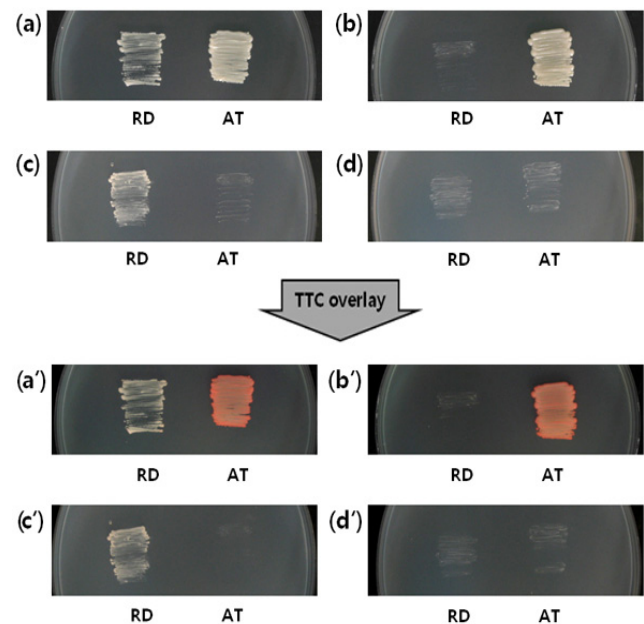
섬유질계 동시당화발효를 위한 배지의 준비와 접종은 다음과 같다. 전처리 보릿짚 80 g에 0.1 M Sodium citrate buffer (pH 4.8) 200 mL과 증류수 211 mL을 혼합하여 멸균한 후, 당화를 위한 복합 셀룰레이즈 (Novozyme, NS50015) 30 FPU/g과  $\beta$ -glucosidase (Novozyme, NS50010) 30 CBU/g을 첨가하여 동시당화발효 배지로 준비하였다. 그 후, YPD 배지 (3 g/L Yeast Extract (Difco), 5 g/L Peptone (Difco),

50 g/L Glucose (Junsei))를 이용하여 35°C에서 18-24시간 동안 전배양한 CHY1612 배양액을 5% (v/v)로 접종하여 43°C에서 동시당화발효를 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### 모균주에 대한 선별 마커의 도입

원형질 융합 후 융합체만을 선별하기 위해 각 모균주에 선별 마커를 도입하였다. 에탄올 생산성이 좋은 *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011의 경우, 에탄올 발효능이 뛰어난 산업용 균주이나 어떠한 선별 마커도 가지고 있지 않아 균주의 개량과 선별이 어렵다. 그러므로 CHY1011에 대한 호흡 결여 돌연변이를 유도하여 선별 마커로 사용하고자 하였다. 에탄올 발효능이 우수한 *S. cerevisiae*의 경우, acriflavine과 같은 돌연변이원에 의해 안정적인 호흡결여 돌연변이를 42 균주를 얻었으나, 내열성이 우수한 *K. marxianus*의 경우는 호흡결여 돌연변이를 얻기 어려웠다. 이는 세포의 내열성이 미토콘드리아와 관련있다는 문헌을 볼때 [22], 미토콘드리아의 손상에 의해 발생하는 호흡결여 돌연변이들은 내열성을 잃어버려 고온의 선별 조건에서 얻어지지 않는 것으로 판단되었다. 그러므로 내열성 효모의 선별 마커는 EMS, NTG 등의 화학적 돌연변이원을 이용하여 영양요구성 마커가 도입된 3 균주를 선별하였다. 이렇게 얻어진 돌연변이주들은 발효능



**Fig. 1.** Confirmation of a respiratory deficient marker in *S. cerevisiae* CHY1012 (RD) and a auxotrophic marker in *K. marxianus* CHY1703 (AT). (a), on YPD agar plate at 32°C, (b), on YPD agar plate at 41°C, (c), on MM agar plate at 32°C, (d), on MM agar plate at 41°C, (a'), (b'), (c'), (d'); after TTC overlay reaction of (a), (b), (c), (d).

과 내열성을 확인한 결과, 돌연변이로 인한 에탄올 발효능을 잃거나, 생육이 느려진 경우가 대부분이었고, 모균주의 생육과 에탄올 발효능이 유사한 1균주씩을 선별하여 각각 *S. cerevisiae* CHY1012, *K. marxianus* CHY1703로 명명하였다. 각 모균주에 대한 최종 선별 마커 확인 결과는 Fig. 1과 같다. CHY1012는 호흡결여 돌연변이 (RD)로 TTC overlay 후에도 붉은색의 대조균 (CHY1703, AT)과 달리 발색반응이 일어나지 않았고, 41°C 고온 조건에서는 영양분이 충분한 YPD 배지에서 잘 생육하지 않았다. CHY1703은 YPD 배지의 41°C 고온 조건에서 생육이 가능하였으나, 영양요구성 돌연변이 (AT)는 아미노산이 첨가되지 않은 최소 (MM) 배지에서는 생육이 불가능하였다. 이 균주들은 섬유질계 동시당화 발효 균주를 위한 원형질 융합의 모균주로 사용하였다. 선별 마커의 특성을 이용하여 융합 후 호흡결여와 영양요구성이 보상되어 내열성과 우수한 에탄올 발효능을 동시에 갖춘 융합체를 선별하고자 Fig. 1(d)와 같이 모균주들은 생육할 수 없는 41°C, MM 배지 조건을 선별 조건으로 택하였다.

### 원형질 융합 및 우수 융합체의 선별

원형질 융합은 두 균주의 원형질체의 형성 조건과 융합 조건이 실험의 결과를 좌우하므로 세포벽 분해효소인 lyticase의 처리 조건과 PEG 처리 농도 및 시간을 조절하여 융합을 시도하였다. 최종적으로 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 원형질 융합을 수행하여 MM 배지, 41°C 조건에서 성장한 colony를 357개 얻었다. 이렇게 선별된 균주들은 유전적 안정성을 확보하기 위해, 수차례 계대 배양을 한 후 그 이후에도 41°C, MM 배지에서 생육이 가능하고 TTC 중층 배양 결과 붉은색으로 변하는 융합 균주만을 121개 선별하였다. 선별된 균주들은 YPD 배지 (Glucose 11%)에 배양하여 에탄올 발효 실험을 수행하였으며, 각 균주들의 발효능을 비교하여 고온 조건에서도 에탄올 발효능이 우수한 균주를 최종 우수 균주로 선별하여 CHY1612라 명명하였다. 우수 융합체 CHY1612는 모균주들과의 발효 실험을 통해 35°C, 일반 발효 조건과 41°C, 우수 균주 선별 조건에서 Fig. 2와 같이 모균주들보다 내열성과 에탄올 발효능이 우수함을 확인하였다. CHY1612는 일반 효모의 발효 온도에서 고생산성 효모 CHY1012에 비해 발효 속도는 다소 느리나 72시간 이내에 최종적으로 유사한 에탄올 발효능을 보이고, 고온 조건에서 CHY1012는 생육 및 에탄올 발효가 현저히 저해를 받는 반면, 우수 융합체 CHY1612는 내열성 효모 CHY1703과 같이 원활한 생육과 함께 에탄올 발효능도 가장 우수한 결과를 나타내었다.

### 우수 융합체 CHY1612의 특성 확인 및 동정

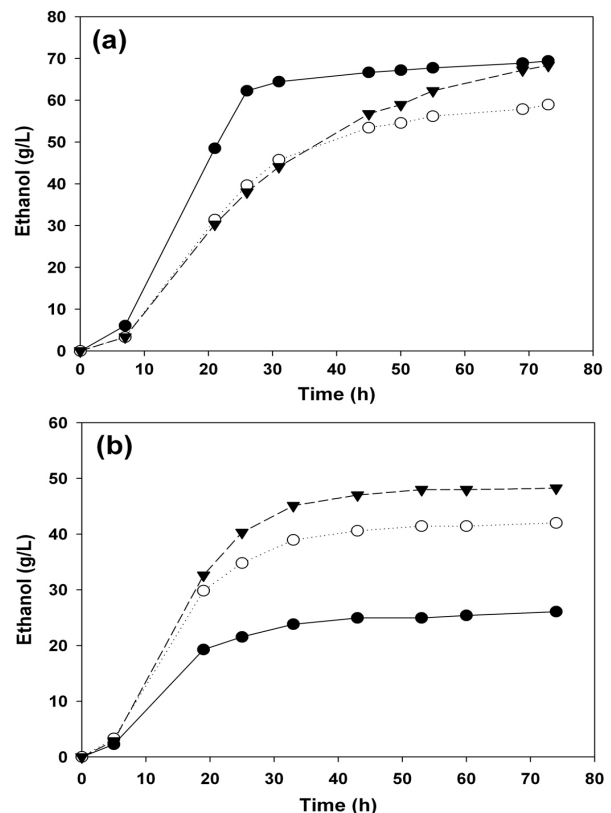
고온에서 성장 가능하고, 발효 수율이 우수한 것으로 확인된 융합 효모 CHY1612는 형태학적 관찰 결과와 생화학적 특성 및 26S rDNA D1/D2 및 ITS에 대하여 DNA sequencing

을 수행한 결과를 기초로 동정하였다.

**Table 1.** Assimilation test of fusant CHY1612 and parent strains (CHY1012, CHY1703) using API20 C AUX kit

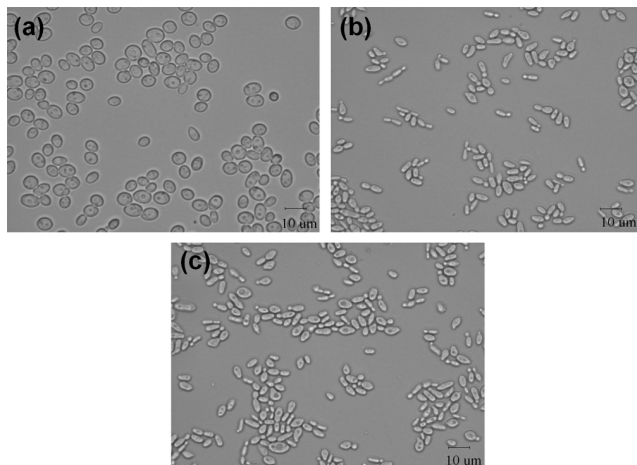
	CHY1012	CHY1703	CHY1612
Glucose	+++	+++	+++
Glycerol	-	+++	+++
2-Keto-D-Gluconate	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
Adonitol	-	+	++
Xylitol	-	++	+++
D-Galactose	+++	+++	+++
Inositol	-	-	-
D-Sorbitol	-	+++	+++
α-Methyl-D-Glucoside	-	-	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-
D-Lactose	-	-	-
D-Maltose	+++	-	++
D-Saccharose(Sucrose)	+++	+++	+++
D-Trehalose	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-
D-raffinose	+	+	+++

(-), negative; (+), weakly positive; (++) , positive; (+++) , strongly positive.



**Fig. 2.** The time course of ethanol production by novel fusant, CHY1612 and parent strains at two different temperatures, 35°C (a) and 41°C (b). ●; CHY1012, ○; CHY1703, ▼; CHY1612.

형태학적 관찰 결과, CHY1612는 Fig. 3과 같이 타원형 또는 막대형으로 CHY1012보다는 단축이 짧아 CHY1703과 유사한 형태이나 CHY1703보다는 크기가 조금 더 컸다. 이는 일반적인 원형질 융합의 결과, 핵수체의 증가로 크기가 커지는 경우가 보고되는데 이와 유사한 것으로 판단된다 [23]. 또한 생화학적 특성은 Biomerieux의 효모 자화성 확인 kit인 API20 C AUX를 사용하였고, 자화성 여부의 결과를 -, +, ++, +++로 나타내었다. 모균주와 우수 융합체 CHY1612의 생화학적 특성은 Table 1에 나타내었다. 기질 자화성 확인 결과, 모균주 *K. marxianus*와 유사하나 크게 maltose 자화능이 추가되었고, raffinose에 대한 자화능이 향상되었음을 확인하였다. 융합 효모 CHY1612는 주로 *K. marxianus*와 유사하나 모균주와는 다른 특성들을 가지고 있는 것으로 판단된다.



**Fig. 3.** Morphological characteristics of fusant CHY1612 and parent strains under microscope. (a); CHY1012, (b); CHY1703, (c); CHY1612.

마지막으로 효모 균주 동정을 위한 분자생물학적 분류는 CHY1612의 26S rDNA D1/D2와 ITS region을 분석하여 NCBI database를 이용한 유사성 비교 결과 Table 2와 같이 나타났다. CHY1612는 *Kluyveromyces* 속에 속하는 효모로 판단되며 기존에 보고된 *K. marxianus* 균주의 염기서열과 99% 이상의 매우 높은 유사도를 보였다. *K. marxianus* 균주들과는 1-7개의 염기서열의 차이를 보였으나 *K. lactis* 균주

들과는 28개 이상의 염기서열의 차이로 97% 이하의 다소 낮은 유사도를 보였다. 이와같이 상기 형태학적, 생화학적, 분자생물학적 비교 결과, 우수 융합체 CHY1612는 *K. marxianus* 균주로 동정되었고, 기존 보고된 *K. marxianus* 균주보다 우수한 내열성과 에탄올 발효능으로 섬유질계 에탄올 동시당화발효에 유용할 것으로 판단되었다. 이에 본 균주는 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 기탁번호 KCTC 11757BP로 기탁하였고, 분석된 26S rDNA D1/D2 및 ITS에 대한 염기서열은 NCBI database에 등록번호 HQ396523으로 등록하였다.

**섬유질계 동시당화발효 (SSF)**

본 연구의 내열성 융합 효모 CHY1612는 고온에서도 생육과 에탄올 발효가 가능하므로 섬유질계 에탄올 동시당화발효에 유용하다. 동시당화발효를 수행할 경우, 당화로 생성된 당을 동시에 소모하여 당화 효소의 기질 저해를 감소시켜 당화율을 증가시키고, 당화와 함께 에탄올 발효가 동시에 수행될 수 있으므로 총 당화 및 발효 시간의 감소로 에탄올 생산성의 증대를 가져올 수 있다고 판단하였다.

동시당화발효 실험을 위한 섬유질계 바이오매스로는 전북 지역에서 쉽게 구할 수 있고 가축 사료로는 사용될 수 없어 소각처리되는 보릿짚을 선택하였다. 전처리는 발효 저해 물질의 생성이 적은 것으로 알려진 암모니아를 이용하여 창해 에탄올의 폭쇄 반응기인 CHEMEX에서 수행하였다 [24]. 전처리된 보릿짚의 성분 분석 결과는 암모니아 처리에 의해 리그닌이 추출됨에 따라 셀룰로스 (glucan) 비율이 전처리 전 39%에서 후 57.1%로 증가하였고, 이는 glucose로 당화되었을 때, 57.1 g glucose/100 g pretreated biomass를 얻을 수 있는 값이다. 또한, 헤미셀룰로스 (xylan)는 19.2%, 리그닌 14.7%, 수분 5.5%, 회분 2.3%로 나타났다. 이렇게 처리된 보릿짚을 이용하여 섬유질계 에탄올 발효를 실시할 경우, 고농도 바이오매스의 당화 및 발효는 매스의 점도 및 교반에 많은 영향을 준다 [25]. 그로인한 교반기의 개발이나 교반 방법의 개량등이 시도되고 있으나 본 연구에서는 진탕배양기를 이용하여 원활한 교반이 이루어지는 정도에서 최대 16%의 전처리 바이오매스를 사용하였다. 동시당화발효 실험시의 당화, 발효 온도는 당화효소의 당화율에 영향을 미치지 않을 정도의 최저 온도와 CHY1612의 에탄올 발효율을 고려한 최대한의 온도인 43°C에서 수행하였다. 내열성 융합 효모

**Table 2.** Result of NCBI blast search using 26s rDNA and ITS sequence of CHY1612

Strain	26s rDNA and ITS regions	Accession number
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Identities = 719/720 (99%), Gaps = 1/720 (0%)	AF543841
<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate VA116042-03	Identities = 718/720 (99%), Gaps = 0/720 (0%)	AY939806
<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate AS2.1549	Identities = 716/720 (99%), Gaps = 0/720 (0%)	EU019227
<i>Kluyveromyces marxianus</i> isolate F4-3	Identities = 715/723 (99%), Gaps = 3/723 (0%)	EU019224
<i>Kluyveromyces lactis</i> isolate UOA/HCPFBUL74	Identities = 698/726 (97%), Gaps = 14/726 (1%)	GQ376079
<i>Kluyveromyces lactis</i> strain NRRL Y-1140	Identities = 697/726 (96%), Gaps = 14/726 (0%)	CR382124
<i>Kluyveromyces dobzhanskii</i>	Identities = 612/635 (96%), Gaps = 5/635 (0%)	AJ401722

CHY1612를 이용한 섬유질계 동시당화발효는 Fig. 4와 같이 전처리 보릿짚을 이용하여 바이오에탄올 생산이 원활하게 이루어졌으며, 72시간 이내에 glucose를 다 소모하였고, 최종 당화율 90.5%, 에탄올 발효비율 91.2%의 고수율을 얻었다. 당화효소의 최적 당화 온도인 45-50°C에서의 당화율이 90% 수준임을 감안하면 비록 당화온도는 낮았지만 동시당화발효로 인한 당화율의 향상으로 최적 당화율을 보충할 수 있었던 것으로 판단된다. 또한, 고온조건에서도 내열성 융합 효모 CHY1612의 에탄올 발효 안정성으로 인해 91% 이상의 에탄올 발효비율을 얻을 수 있었다. 이와 같은 결과는 내열성 융합 효모 *K. marxianus* CHY1612가 내열성과 고온에서의 에탄올 발효능을 이용한 섬유질계 동시당화발효의 적용이 가능하여 보다 경쟁력 있는 섬유질계 에탄올 생산 균주로서의 가능성을 보여준다. 또한 차후에 유전자 재조합을 통한 오타당 발효까지 가능할 경우 20 g/L 수준의 xylose를 이용하여 보다 고수율의 에탄올 생산성을 가질 수 있을 것으로 판단된다.

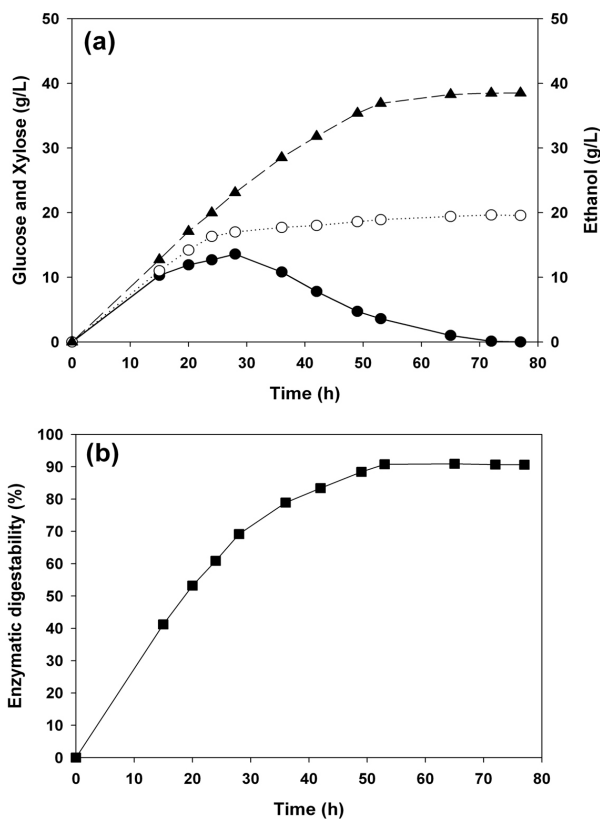


Fig. 4. The time course profiles of lignocellulosic ethanol production ((a)-▲), released glucose ((a)-●), xylose ((a)-○), and enzymatic digestibility ((b)-■) on SSF at 43°C using CHY1612.

## 결론

본 연구에서는 섬유질계 에탄올 발효에 있어 동시당화

발효를 적용하기 위한 에탄올 고생산성, 고온 내성 효모 균주의 개발을 수행하였다. 원형질 융합을 통해 에탄올 고생산성 효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 내열성 효모 *Kluyveromyces marxianus*를 융합하여 고온에서도 에탄올 발효능이 우수한 융합체를 선별하였고, 생화학적, 분자생물학적 효모 동정 결과, *Kluyveromyces marxianus* CHY1612로 확인되었다. 효율적인 섬유질계 에탄올 발효를 위해 암모니아로 전처리된 보릿짚을 기질로하여 효소의 당화율과 효모의 발효율을 고려한 43°C 조건에서 동시당화발효 실험을 수행하였다. 그 결과 16%의 고농도 바이오매스로부터 72시간내에 섬유질계 바이오에탄올 총 38.5 g/L를 얻었고, 당화율 90.5%, 전환당 대비 발효율 91.2%의 우수한 결과를 얻었다. 이는 동시당화발효의 공정 개선과 함께 보다 효율적인 섬유질계 바이오에탄올 생산 균주로서의 가능성을 보여준다.

## 감사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역 혁신인력양성사업으로 수행된 연구 결과임.

접수 : 2010년 11월 30일, 게재승인 : 2010년 12월 22일

## REFERENCES

1. Chung, C. H. (2008) Cellulosic ethanol production. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 1-7.
2. Chang, V. S. and M. T. Holtzapple (2000) Fundamental Factors Affecting Biomass. Enzymatic Reactivity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 84-86: 5-37.
3. Sun, Y. and J. Cheng (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1-11.
4. Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96: 673-686.
5. Hahn-Hägerdal, B., K. Karhumaa, C. Fonseca, I. Spencer-Martins, and M. F. Gorwa-Grauslund (2007) Toward industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 937-953.
6. Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi (2006) Bio-ethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24: 549-556.
7. Sonderegger, M., M. Jeppsson, C. Larsson, M. F. Gorwa-Grauslund, E. Boles, L. Olsson, I. Spencer-Martins, B. Hahn-Hägerdal, and U. Sauer (2004) Fermentation performance of engineered and evolved xylose-fermenting

- Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 87: 90-98.
8. Dmytruk, O. V., K. V. Dmytruk, A. Ya. Voronovsky, and A. A. Sibirny (2008) Metabolic engineering of the initial stages of xylose catabolism in yeast for the purpose of constructing efficient producers of ethanol from lignocellulosics. *Cytol. Genet.* 42: 127-138
  9. Choi, G. W., M. H. Han, and Y. Kim (2008) Development of glucoamylase and simultaneous saccharification and fermentation process for high-yield bioethanol. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 499-503.
  10. Wyman, C. E., D. D. Spindler, and K. Grohmann (1992) Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass Bioenergy* 3: 301-307.
  11. Kádár, Zs., Zs. Szengyel, and K. Réczey (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crop Prod.* 20: 103-110.
  12. Tomas-Pejo, E, J. M. Oliva, M. Ballesteros, and L. Olsson (2008) Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnol. Bioeng.* 6: 1122-1131.
  13. Turner, P., G. Mamo, and E. N. Karlsson (2007) Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb. Cell Fact.* 6: 9-31.
  14. Jang, H. W. and Y. W. Ryu (1992) Study on the factors affecting the ethanol tolerance of yeast strains by fermentation temperature. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 7: 33-37.
  15. Banat, I. M. and R. Marchant (1995) Characterization and potential industrial applications of five novel, thermotolerant, fermentative, yeast strains. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 304-306.
  16. Choi, G. W., H. J. Um, H. W. Kang, Y. Kim, M. Kim, and Y. H. kim (2010) Bioethanol production by a flocculent hybrid, CHFY0321 obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. *Biomass Bioenergy* 34: 1232-1242.
  17. Choi, G. W., H. J. Um, Y. Kim, H. W. Kang, M. Kim, B. W. Chung, and Y. H. kim (2010) Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol production on Cassava starch. *Biomass Bioenergy* 34: 1223-1231.
  18. Herman, A. I. and P. S. Griffin (1968) Respiratory-deficient mutants in *Saccharomyces latis*. *J. Bacteriol.* 96: 457-461.
  19. Barclay, A. J. and J. G. Little (1977) Selection of yeast auxotrophs by thymidylate starvation. *J. Bacteriol.* 132: 1036-1037.
  20. White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 In: Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York. USA.
  21. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).(2010).
  22. Sakanaka, K, W. Yan, M. Kishida, and T. Sakai (1996) Introduction of mitochondria into respiratory-deficient mutant of yeast and improvement of thermostability. *J. Ferment. Bioeng.* 81: 109-114.
  23. Bai, S., M. W. Kim, J. C. Park, J. H. Kim, and S. B. Chun (1990) Protoplast fusion of *Phaffia rhodozyma*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 5: 255-261.
  24. Han, M. H., S. K. Moon, Y. Kim, Y. R. Kim, B. W. Chung, and G. W. Choi (2009) Bioethanol production from ammonia percolated wheat straw. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 606-611.
  25. Zhang, J., D. Chu, J. Huang, Z. Yu, G. Dai, and J. Bao (2009) Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol Bioeng.* 105: 718-728.