

Immobilization of Yeast *Pichia stipitis* for Ethanol Production*Sang-Eun Lee^{1*}, Ji-Eun Lee^{1*}, Eun-Jin Kim^{1*}, Joon Ho Choi², Woon Yong Choi³, Do Hyung Kang⁴, Hyeon-Yong Lee³ and Kyung-Hwan Jung^{1*}¹Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung 368-701, Korea²Department of Food Science and Biotechnology, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea³Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea⁴Korea Ocean Research & Development Institute, Ansan 426-744, Korea

Received January 3, 2012 / Revised March 13, 2012 / Accepted March 13, 2012

In this study, DEAE-cotton [derivatized by 2-(diethylamino)ethyl chloride hydrochloride (DEAE·HCl)] was prepared as a carrier for immobilized *Pichia stipitis* for ethanol production. When cotton was derivatized with 0.5 M DEAE·HCl, the yeast cell suspension was adsorbed at 100% of the initial cell OD₆₀₀. The adsorbed yeast cells were estimated to be 101.8 mg-dry cells/g-DEAE-cotton. In particular, when a flask culture using the immobilized yeast cells was conducted in a glucose and xylose-containing medium, the yeast cells on the DEAE-cotton gradually produced ethanol, according to glucose and xylose consumption; the ethanol yield was approximately 0.33 g-ethanol/g-monosaccharide. Because DEAE-cotton was successfully used as a carrier for ethanol production from a glucose and xylose-containing medium, we expect that this bioethanol production process may be used for the bioethanol production process from the hydrolysate of lignocellulosic biomass. All the results of DEAE-cotton were compared with those of DEAE-cellulose as a carrier for immobilization.

Key words : Cotton, DEAE·HCl derivatization, yeast cell immobilization, ethanol production, *Pichia stipitis*

서 론

효모를 고정화하여 ethanol 생산에 이용하는 방법은 여러 문헌에서 보고되고 있으며, 효모 세포 고정화를 통하여 생산성 향상과 같은 공정상의 여러가지 잇점을 얻을 수 있었다 [12-14,20,22]. 그리고, 이러한 고정화 효모 세포를 이용하는 다양한 반응기 시스템이 연구되어 왔으며 [2,3,8-10,14,26], 특히, 경제성을 고려하여 세포의 흡착을 이용한 다양한 부산물 [2,3,5,9,13,17,18,26]이 세포 고정화를 위한 담체로서 관심을 끌고 있다. 그 중에서 woodchips, sugarcane bagasse, sorghum bagasse, 그리고 corncob과 같은 agricultural byproducts가 특히 이러한 경제성과 간편한 방법 때문에 많이 연구되어왔다.

그 동안 cotton은 세포 고정화 담체로서 보다는 분리/정제를 위한 담체로서 많이 사용되어져 왔다 [4,6,7,15,19]. 본 연구에서는 이러한 선행연구결과를 바탕으로 2-(diethylamino)ethyl chloride hydrochloride [DEAE·HCl, (C₂H₅)₂NCH₂CH₂Cl·HCl] 으로 cotton (탈지면)을 derivatization하여 cellulose로 이루어진 cotton을 효모 세포의 고정화 담체로서 사용하기 위한 연구를 시도하였다. 즉, 효모의 세포 표면이 주로 negative charge

를 가지는 것으로 알려져 있기 때문에 [1], 효모와 cotton과의 흡착력을 증가시키기 위하여, 중성 pH에서 positive charge를 가지는 ligand인 "DEAE-" (pK=11.5)를 가지도록 DEAE·HCl을 처리하였다.

본 연구에서는 먼저 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 효모 세포를 흡착시키는 최적의 조건에 대하여 조사하였다. 그리고, 최적의 조건에서 효모 세포를 흡착시킨 후, glucose와 xylose가 들어 있는 배지에 넣어 배양하여, 세포성장, 단당류 소비, 그리고 ethanol 생산 등에 대하여 조사하였다. 특히, cotton에 "DEAE-" 를 붙인 담체가 효모를 이용한 ethanol 생산용 담체로서 이용 가능하다는 것을 보여 주려고 하였으며, 그 성능을 DEAE-cellulose와 비교하여 분석하였다. 본 연구에서 glucose와 xylose가 들어간 배지를 사용하여 흡착 고정화된 효모로 ethanol 생산을 연구한 이유는, 많은 lignocellulosic biomass의 가수분해물에는 육탄당인 glucose 뿐만 아니라 오탄당인 xylose가 포함되어 있기 때문이다. 즉, DEAE-cotton을 육탄당과 오탄당이 포함된 가수분해물에서 ethanol을 생산하는 공정의 담체로 이용하기 위하여서였다.

재료 및 방법

시약

2-(Diethylamino)ethyl chloride hydrochloride (DEAE·HCl) 그리고 DEAE-cellulose는 각각 Acros (USA)와 Sigma

*These three authors contributed equally to this work and should be considered as equal first authors.

*Corresponding author

Tel : +82-43-820-5246, Fax : +82-43-820-5272

E-mail : khjung@cjnu.ac.kr

Aldrich (USA) 것을 사용하였다. yeast extract와 peptone은 Becton Dickinson (USA) 것을 사용하였고, acetonitrile과 α -naphthol은 Daejung Chemical Co. (Korea)과 Sigma-Aldrich (USA) 제품을 사용하였다. 그 외의 시약들은 reagent-grade급으로 사용하였다.

효모

본 연구에서는 육탄당과 오탄당을 이용하여 ethanol을 생산할 수 있는 효모 *Pichia stipitis* (*P. stipitis*) CBS 7126을 사용하였다.

DEAE-Cotton 제조방법

250 ml Erlenmeyer flask에 cotton (탈지면)과 18% NaOH의 비율이 1:50 (w:v) 되게 넣고, 4°C에서 overnight 동안 방치한다. 그리고 NaOH 용액을 버린 후, cotton과 DEAE·HCl 용액 비율이 1:50 (w:v) 되게 DEAE·HCl 용액을 넣고, 상온에서 정지된 상태로 1시간 반응시켰다.

DEAE-cotton에 효모 고정화

50 ml conical tube에 DEAE-cotton과 증류수 혹은 YPD 배지(yeast extract, 10 g/l; peptone, 20 g/l; glucose, 5 g/l; xylose, 2.5 g/l)를 1:50 (w:v)의 비율로 넣고, 10분 동안 방치한다. 그리고, DEAE-cotton을 건져내어 50 ml conical tube에 넣고, 여기에 10 ml 효모 현탁액을 넣는다. 그리고 나서 이것을 상온에서 shaking plate에 올려 놓고, 효모세포가 DEAE-cotton에 부착되도록 한다.

DEAE-cellulose에 효모 고정화

50 ml conical tube에서 DEAE-cellulose과 증류수 혹은 YPD 배지를 1:50 (w:v)의 비율로 넣고, 10분 동안 방치한다. 그리고, 이 용액을 원심분리하여, 그 상등액을 버린 후, 여기에 효모 현탁액 10 ml을 넣는다. 그리고 나서 이것을 상온에서 shaking plate에 올려 놓고, 효모세포가 DEAE-cellulose에 부착되도록 한다.

효모가 흡착 고정화된 DEAE-cotton를 이용한 flask culture

DEAE-cotton의 경우, 250 ml Erlenmeyer flask에 0.4 g DEAE-cotton과 YPD 배지에 넣고 10분 동안 방치한다. 그리고, 배지를 제거한 후, 여기에 OD₆₀₀ (optical density at 600 nm) 7.6인 10 ml 효모 현탁액을 넣는다. 그리고, shaking incubator에 넣고, 효모 세포가 DEAE-cotton에 부착되도록 한다. 완전히 효모 세포가 흡착된 것을 확인 한 후, 이것을 새로운 30 ml YPD 배지가 들어있는 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 배양을 시작한다. DEAE-cellulose의 경우, 250 ml Erlenmeyer flask에 YPD 15 ml과 DEAE-cellulose 2 g을 넣

고 멸균한 후, OD₆₀₀이 5.8인 효모 현탁액 15 ml을 넣는다. 그리고 shaking incubator에 넣고, 효모 세포가 DEAE-cotton에 부착되도록 한다. 완전히 효모 세포가 흡착된 것을 확인 한 후, 이를 원심분리로 회수하여, 새로운 30 ml YPD 배지가 들어있는 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 배양을 시작한다. 두 경우 모두, shaking incubator (30°C, 60 rpm)에서 배양을 실시하였다.

전자현미경

효모가 고정화된 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose를 증류수로 씻은 후, 60°C에서 24시간 건조한다[5]. 그리고 scanning electron microscope (ESEM, FEI Quanta™ 400, The Netherlands)를 이용하여 관찰하였다.

분석

효모성장은 spectrophotometer (Spectronic, Thermo Scientific, USA)로 600 nm에서 optical density (OD₆₀₀)를 측정하여 monitoring하였으며, 배양액 중의 에탄올 함량은 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였다. 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L=6 ft, ID=1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, 자세한 운전 조건은 선행 논문에서 설명하였다[23-25]. Glucose와 xylose의 양은 thin-layer chromatography (TLC)를 이용하여 분석하였으며, TLC plate (Partisil® K5F, Whatman)는 20×10 cm로 잘라서 사용하였고, 시료는 1 µl를 loading 하였으며, 전개용매는 acetonitrile과 증류수를 85:15 비율로 혼합하여 사용하였다. 전개가 끝난 후, TLC plate를 발색시약(0.5% α -naphthol, 5% H₂SO₄ in ethanol)에 담갔다 꺼낸 후, dry oven에 넣고 80°C에서 15분간 말려서 발색시켰다. Glucose, iso-maltodextrin와 maltodextrin이 TLC plate 상에서 나타내는 spot의 강도와 그들 농도와의 관계가 선형적으로 비례하였다는 Robyt와 Mukerjea의 논문[15]에서의 이론을 근간으로 glucose와 xylose의 양은 TLC를 통하여 정량분석 하였으며, 이때 당류의 정량 분석을 위해서 당류의 spot을 AlphaEase FC software (Alpha Innotech, USA)를 이용하여 일차원상의 peak로 전환한 후, 농도를 알고 있는 표준물질과 비교하여 당류의 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 효모 세포 흡착 고정화

Cotton을 효모 세포의 고정화 담체로 사용하기 위하여, cotton을 DEAE로 derivatization 시키는 최적조건에 대하여 연구하였다. Fig. 1과 같이 여러가지 DEAE·HCl 농도(0.0-2.0 M)로 처리한 0.1 g의 DEAE-cotton에 효모 세포(OD₆₀₀=2.9, 5.0, 7.1)

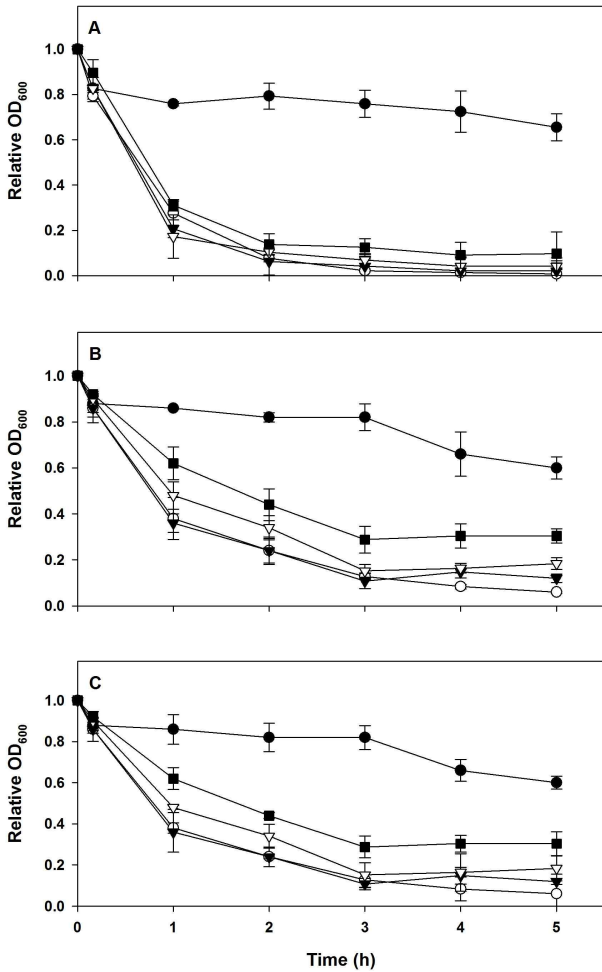


Fig. 1. Immobilizations of yeast cell on DEAE-cotton. DEAE-cotton of 0.1 g was added, and the initial yeast cell OD₆₀₀ was (A) 2.9, (B) 5.0, and (C) 7.1, respectively. DEAE·HCl concentrations were 0.0 (●), 0.25 (○), 0.5 (▼), 1.0 (▽), and 2.0 M (■), respectively. A 10 ml yeast cell suspension was prepared in distilled water. Triplicate samples were used for the measurement, and the average and standard deviation were calculated.

를 흡착시켜 보았다. 그 결과 효모 세포 농도가 2.9일 경우에는 0.25에서 2.0 M DEAE·HCl, 효모 세포 농도가 5.0 혹은 7.1일 경우에는 0.25에서 1.0 M의 DEAE·HCl로 cotton을 처리하였을 때, 적어도 3시간 정도 효모세포를 흡착을 시키면, 약 95% 이상의 세포가 세포농도와 관계없이 DEAE-cotton에 붙을 수 있음을 확인 하였다. 그러나 Fig. 1의 실험은 증류수에 효모 세포를 현탁시킨 환경에서 수행한 실험이었다. 효모 세포의 활성을 고정화 단계에서 좀 더 잘 유지하고, 배양환경으로 효모 세포의 보다 빠른 적응을 위하여, Fig. 2와 같이 YPDX 배지에서 DEAE-cotton과 효모 세포와의 흡착을 조사하였다. 이때 Fig. 1과 같이 0.1 g의 cotton을 여러가지 농도의 DEAE·HCl (0.0-2.0 M)로 처리하였고, 효모 세포의 OD₆₀₀은 2.8과 6.2로

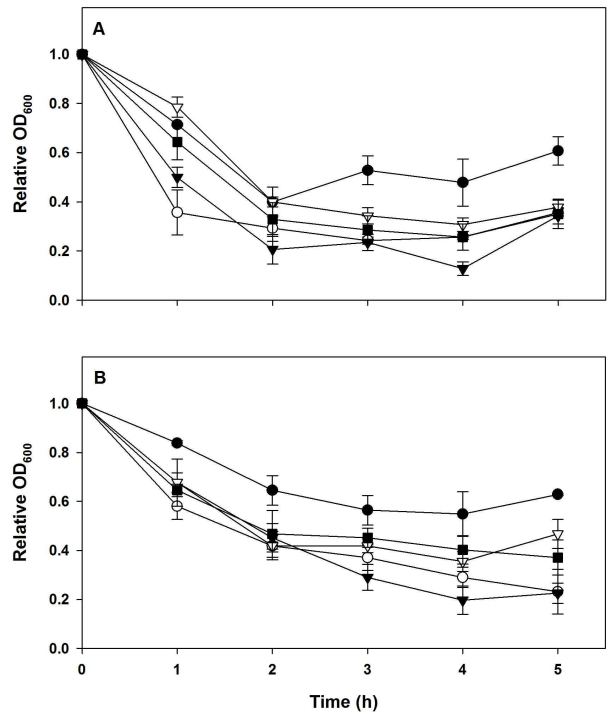


Fig. 2. Immobilizations of yeast cell on DEAE-cotton. DEAE-cotton of 0.1 g was added, and the initial yeast cell OD₆₀₀ was (A) 2.8 and (B) 6.2, respectively. DEAE·HCl concentrations were 0.0 (●), 0.25 (○), 0.5 (▼), 1.0 (▽), and 2.0 M (■), respectively. A 10 ml yeast cell suspension was prepared in YPDX medium. Triplicate samples were used for the measurement, and the average and standard deviation were calculated.

조절하였다. 그 결과 Fig. 2와 같이 cotton을 DEAE·HCl 농도 0.5 M로 처리하였을 때, 가장 많은 효모가 DEAE-cotton에 흡착하였다. 그러나 증류수를 사용한 경우 보다는 흡착 정도가 감소한 약 85-90% 세포 흡착 결과를 4시간 후에 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 배지 중 성분이 효모와 경쟁적으로 흡착에 참여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 이와 같은 세포 흡착 정도를 증가 시키기 위하여, 이번에는 YPDX 배지에 세포를 현탁시킨 후, DEAE·HCl로 처리된 cotton의 양을 증가시키는 실험을 수행하여 보았다. 이 때 앞의 두 실험의 결과에서 얻은 최적의 DEAE·HCl 농도인 0.5 M로 cotton을 처리하였고, cotton은 0.1에서 0.2, 0.4 g으로 증가시켰다. 또한 YPDX 배지에서 효모 세포 농도도 변화를 주었다. 그 결과 Fig. 3과 같이 효모 세포와 DEAE-cotton의 흡착현상이 관찰 되었으며 Fig. 3A 에서는 Fig. 2에서와 같이 완전한 흡착이 일어나지 않았으나, Fig. 3B와 Fig. 3C 에서는 DEAE-cotton 양의 증가로 효모 세포와 DEAE-cotton간의 완전한 흡착이 관찰되었다. 결론적으로 여러가지 최적 조건을 유추 할 수 있었으나, DEAE-cotton이 0.4 g이고 효모 세포의 OD₆₀₀이 9.6 이하일 때에 적어도 1시간 내에 거의 100% 흡착이 일어날 수 있음을 확인하였다

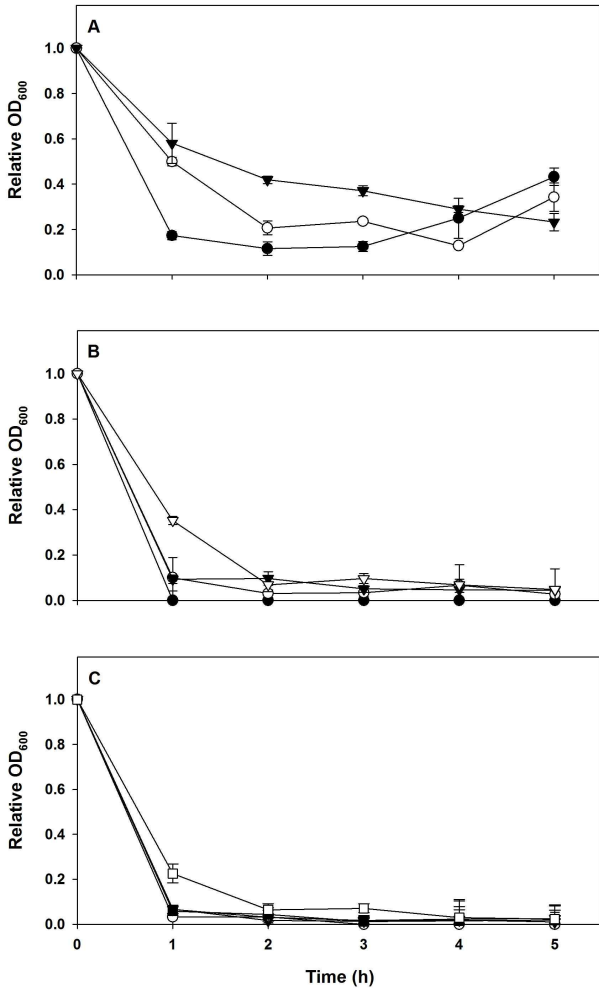


Fig. 3. Immobilizations of yeast cell on DEAE-cotton. DEAE-cottons of (A) 0.1, (B) 0.2, and (C) 0.4 g were added, and the initial yeast cell OD₆₀₀ was 1.04 (●), 3.0 (○), 6.0 (▼), 8.2 (▽), 9.6 (■), and 12.4 (□), respectively. DEAE·HCl concentrations was 0.5 M. A 10 ml yeast cell suspension was prepared in YPDx medium. Triplicate samples were used for the measurement, and the average and standard deviation were calculated.

(Fig. 3C). 그러나 보다 완전한 효모 세포의 흡착을 위하여 OD₆₀₀이 7.6의 효모를 사용하는 조건을 최적 조건으로 하고, 다음 실험에 적용하였다.

DEAE-cotton의 효모 흡착을 위한 담체로서의 성능을 비교하기 위하여 시판되고 있는 DEAE-cellulose와 비교 실험을 수행하였다. Fig. 4와 같이 먼저 효모 세포를 증류수에 현탁시킨 후, 효모 세포와 DEAE-cellulose와의 흡착을 관찰하였다. 이때 효모 세포의 OD₆₀₀은 1.3, 2.9, 7.1로 조절하였으며 DEAE-cellulose양은 0.1 g에서 1.0 g까지 변화를 주었다. 그 결과 효모 세포의 농도에 따라 차이가 있었으나, Fig. 4A와 Fig. 4B에서는 0.1 g 이상의 DEAE-cellulose로 30분 정도에 모든 효모 세포가 흡착됨이 관찰되었다. 그리고 Fig. 4C에서는

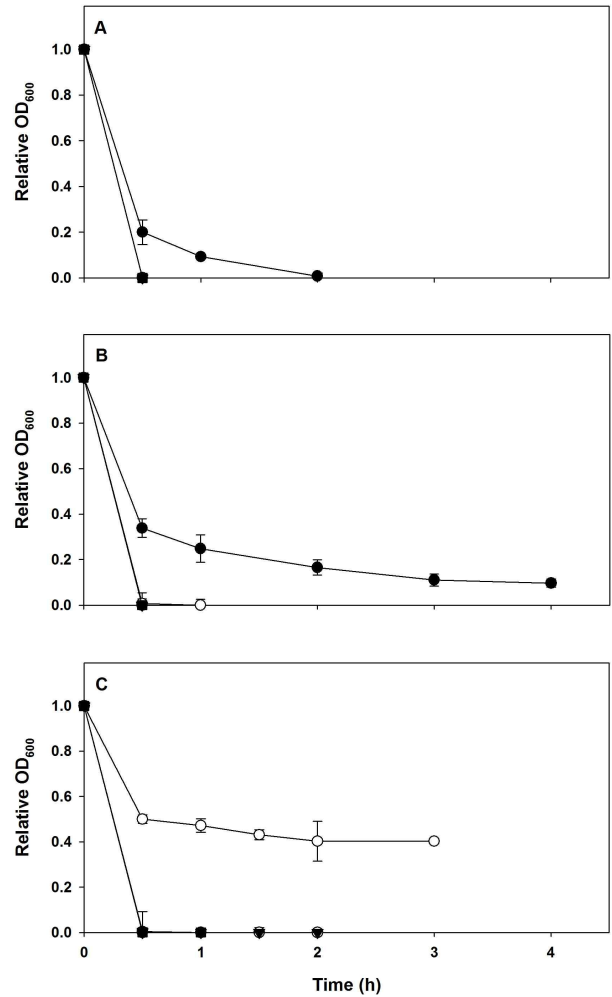


Fig. 4. Immobilizations of yeast cell on DEAE-cellulose. The initial yeast cell OD₆₀₀ was (A) 1.3, (B) 2.9, and (C) 7.1, respectively. DEAE-cellulose of 0.1 (●), 0.2 (○), 0.5 (▼), 0.7 (▽), and 1.0 g (■) were added, respectively. A 10 ml yeast cell suspension was prepared in distilled water. Triplicate samples were used for the measurement, and the average and standard deviation were calculated.

0.5 g 이상의 DEAE-cellulose에서 완전한 효모 세포 흡착이 관찰되었다. 한편 Fig. 2와 Fig. 3의 DEAE-cotton에서의 실험에서와 같이 흡착 현상을 YPDx 배지 내에서 다시 관찰하였다 (Fig. 5). 이 때 효모 세포의 OD₆₀₀은 1.2, 2.9, 7.2로 조절하였고 DEAE-cellulose는 0.1 g에서 1.0 g까지의 양으로 조절하였다. 그 결과 효모 세포가 DEAE-cellulose에 완전히 흡착하는 조건을 관찰할 수 있었다. 이 때도 전체적인 흡착 정도가 효모 세포를 증류수에 현탁 시킨 것 보다 떨어졌으며, 그 이유는 위에 언급한 바와 같이 배지 성분 때문인 것으로 추론된다. 이 결과를 바탕으로 우리는 효모 세포 OD₆₀₀ 2.9에 1.0 g의 DEAE-cellulose를 사용할 경우에 적어도 1시간 반 내에는 효모 세포가 모두 흡착할 수 있다는 결론을 얻었으며, 이를 다음 실험의

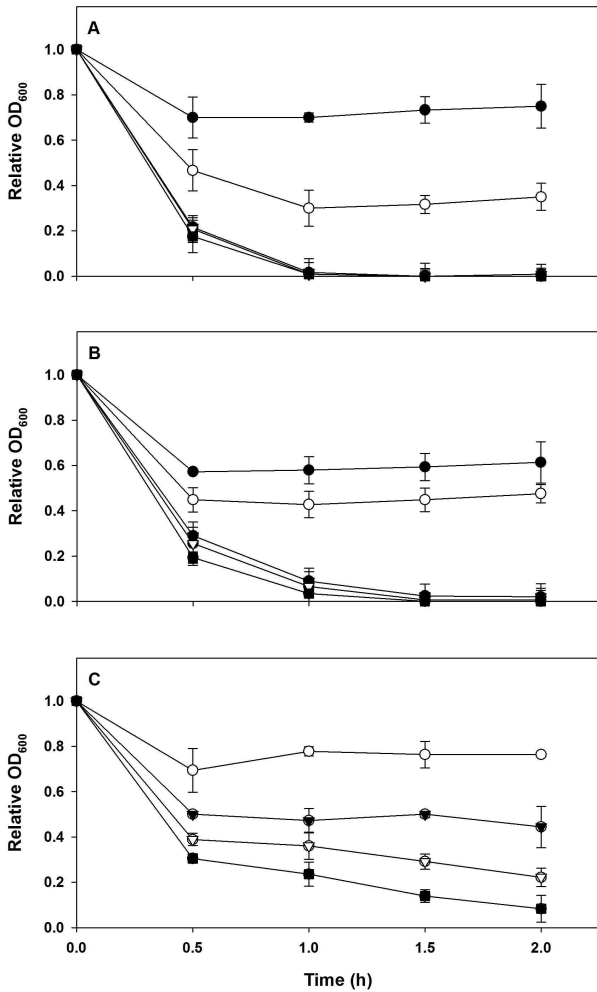


Fig. 5. Immobilizations of yeast cell on DEAE-cellulose. The initial yeast cell OD₆₀₀ was (A) 1.2, (B) 2.9, and (C) 7.2, respectively. DEAE-cellulose of 0.1 (●), 0.2 (○), 0.5 (▼), 0.7 (▽), and 1.0 g (■) were used, respectively. A 10 ml yeast cell suspension was prepared in YPD_X medium. Triplicate samples were used for the measurement, and the average and standard deviation were calculated.

최적 조건으로 사용하였다.

한편 최적 흡착 조건에서의 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose 무게당(g) 흡착되는 효모 세포의 양을 건조균체량(mg)으로 표시하여 보면, DEAE-cotton은 101.8 mg/g, DEAE-cellulose는 15.5 mg/g으로 계산되어진다. 이는 DEAE-cotton이 DEAE-cellulose에 비해 6배 이상의 효모에 대한 흡착능력을 가지고 있다는 것을 의미하며, DEAE-cotton이 보다 더 효율적인 세포고정화 담체로서 사용되어 질 수 있다는 것을 보여주는 결과라 하겠다. 선행 문헌에서 효모 세포의 흡착량을 살펴보면, woodchip의 경우 188 mg/g [13], sorghum bagasse의 경우 600 mg/g [26], corncob의 경우 22.2 mg/g [5]으로 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서의 DEAE-cotton은 비

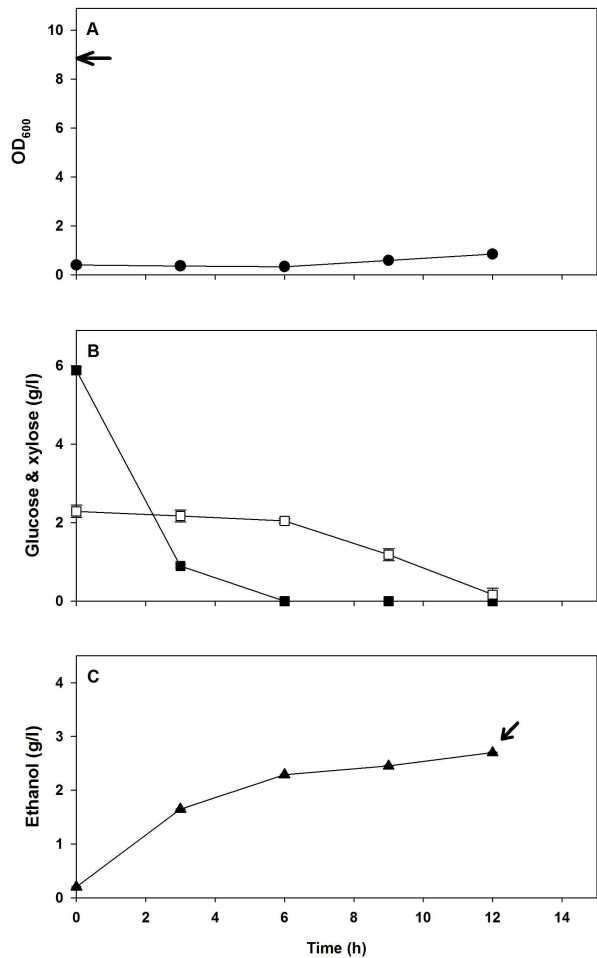


Fig. 6. Flask culture of immobilized *P. stipitis* on DEAE-cotton, in which 0.4 g DEAE-cotton and initial cell OD₆₀₀ of 7.6 were added for the immobilization. (A) cell growth, (B) residual glucose (■) and xylose (□) concentration, (C) ethanol production. Arrow in panel A indicates OD₆₀₀ of seed culture. Cell-immobilized DEAE-cotton arrowed in panel C was used for the electron microscopy observations in Fig. 8. Triple measurements were conducted, and the average and standard deviation were calculated.

교적 우수한 효모 세포 흡착능력을 가지는 담체임을 알 수 있으며, 이를 이용한 다양한 생물공정 개발에 효과적으로 응용이 가능할 것으로 판단된다.

DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 흡착 고정화된 *P. stipitis*를 이용한 flask culture

위와 같이 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 흡착된 효모 세포를 ethanol 생산에 적용하여, 그 성능을 비교분석하기 위하여, 육탄당인 glucose와 오탄당인 xylose가 포함된 배지에서 배양실험을 실시하였다. 이 때 효모를 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 흡착 고정화 시킨 후, 배지가 포함된 flask

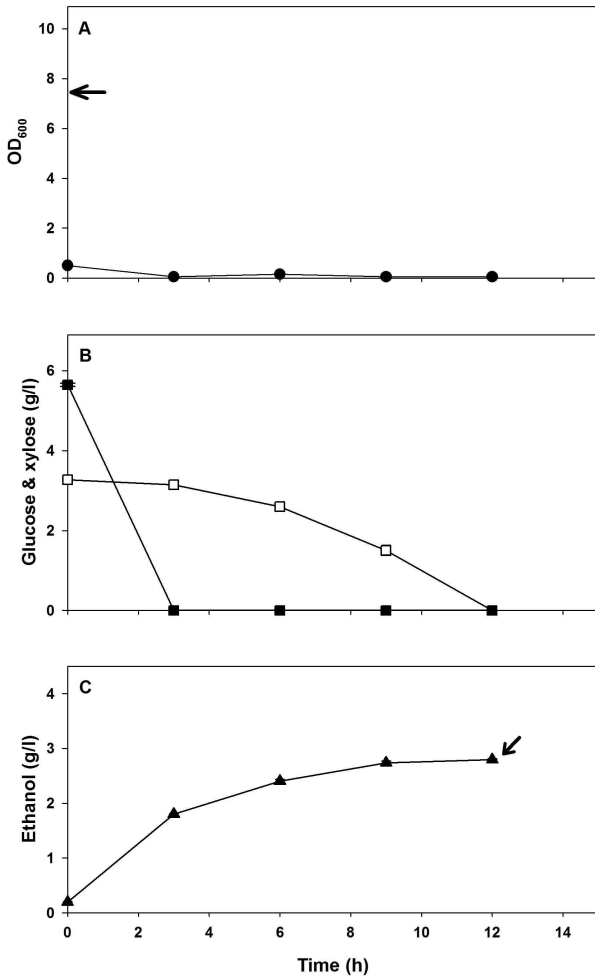


Fig. 7. Flask culture of immobilized *P. stipitis* on DEAE-cellulose, in which 2.0 g DEAE-cellulose and initial cell OD₆₀₀ of 5.8 were added for the immobilization. (A) cell growth, (B) residual glucose (■) and xylose (□) concentration, (C) ethanol production. Arrow in panel A indicates OD₆₀₀ of seed culture. Cell-immobilized DEAE-cellulose arrowed in panel C was used for the electron microscopy observations in Fig. 8. Triple measurements were conducted, and the average and standard deviation were calculated.

에 옮겨 배양을 시작하였으며, flask 배지 내의 free cell 농도, glucose와 xylose의 소비, 그리고 ethanol 생성을 관찰하였다 (Fig. 6, 7). Fig. 6A와 Fig. 7A에서 처럼 대부분의 효모 세포가 배양 중에 떨어지지 않고 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 잘 붙어있는 것이 관찰되었으며, 이 현상은 Fig. 6A와 Fig. 7A에 표시된 seed culture의 OD₆₀₀과 비교하면 더 명확히 알 수 있다. 그리고 glucose와 xylose는 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose에 붙어 있는 효모 세포에 의하여 Fig. 6B와 Fig. 7B와 같이 glucose가 소모된 후 xylose가 소비되는 현상이 관찰되었으며, ethanol의 생성 양상을 관찰하여 본 결과 Fig. 6C와 Fig.

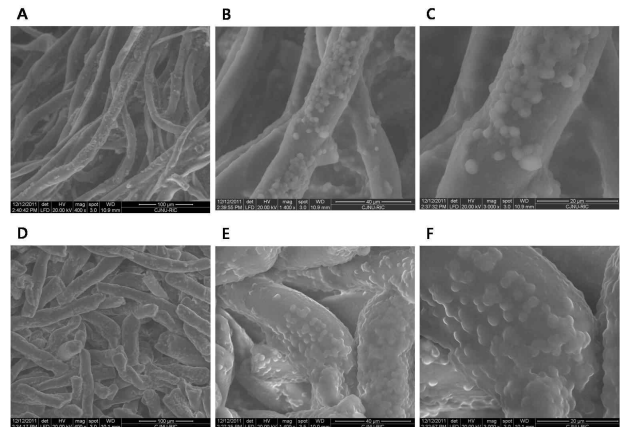


Fig. 8. Electron micrographs of yeast cell-immobilized (A)(B)(C) DEAE-cotton and (D)(E)(F) DEAE-cellulose. Magnification of the electron micrographs: (A)(D) 400x, (B)(E) 1,400x and (C)(F) 3,000x, respectively.

7C처럼 glucose를 완전히 소비한 후 xylose를 소비하면서 ethanol을 생성함을 확인하였다. 이 때 DEAE-cotton을 담체로 한 flask culture에서는 glucose와 xylose의 총합 8.1 g/l에서 2.7 g/l의 ethanol이 생산 되었고, DEAE-cellulose의 경우에는 glucose와 xylose의 총합 8.8 g/l에서 2.8 g/l의 ethanol이 생산 되었다. 이는 두 단당류의 합에 대한 ethanol 생산 수율로서 각각 약 0.33과 0.32이며, 이것은 이론치의 약 62에서 64%에 해당하는 것이다. 한편 본 연구팀의 선행연구에서 glucose와 xylose가 포함된 가수분해물에서의 ethanol 생산에서 ethanol 수율이 0.297~0.357[25]과 0.368[23] 정도로 관찰되고 있다. 또한 수율 증진을 위한 미량공기 공급의 조절을 통하여, ethanol 수율 향상도 기대 할 수 있었다[11]. 본 연구에서의 ethanol 수율은 이러한 최적 환경에서 얻어진 것이 아니기 때문에 아마도 상대적으로 약간 낮은 값을 보이는 것으로 추론된다. 그래서 ethanol 수율 향상을 위하여서는 ethanol 생산 환경에 대한 최적화 과정이 필요하다고 할 수 있으며, 특히 xylose를 이용하여 ethanol을 생산하기 위한 배양환경 최적화가 선행되어야 할 것으로 생각된다.

본 연구에서 두 가지 담체 안의 효모 세포의 농도를 직접 측정하지는 못하였지만, Fig. 6A와 Fig. 7A의 결과로 보아서 세포가 잘 흡착되어 자라면서 glucose와 xylose를 소비하고, ethanol을 생산 하였다는 것을 추론 할 수 있었다. 담체에 효모 세포가 흡착된 것을 직접 관찰하기 위하여 Fig. 6과 Fig. 7의 flask culture를 수행 후, 제일 마지막 sampling 후 남아있는 효모 세포가 흡착된 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose를 수확하여 전자현미경으로 Fig. 8과 같이 관찰하였다. 400배, 1400배, 3000배의 배율에서 섬유상 구조의 DEAE-cotton과 DEAE-cellulose 표면에 효모 세포가 흡착되어 있음을 관찰할 수 있었다.

결론적으로, cotton을 DEAE·HCl로 처리한 DEAE-cotton은 효모를 이용한 ethanol 생산에 담체로서 사용되어질 수 있다는 것을 확인 하였으며, 특히 lignocellulosic biomass의 가수분해물에 포함될 수 있는 glucose와 xylose가 함유된 배지에서 두 단당류를 이용하여 ethanol 생산이 가능하다는 것을 보여주었다. 앞으로 실제 lignocellulosic biomass의 가수분해물을 이용하여 효모 세포가 흡착된 DEAE-cotton을 이용한 bio-ethanol 생산 공정개발이 기대 되어진다.

감사의 글

이 연구는 한국해양연구원(Korea Ocean Research & Development Institute)의 연구비 지원(Project No. PP00740)에 의하여 이루어졌으며, 이에 심심한 감사를 드립니다.

References

- Amory, D. E. and Rouxhet, P. G. 1988. Surface properties of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces carlsbergensis*: chemical composition, electrostatic charge and hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta* **938**, 16-70.
- Bardi, E. P. and Koutinas, A. A. 1994. Immobilization of yeast on delignified cellulosic material for room temperature and low-temperature wine making. *J. Agric. Food Chem* **42**, 221-226.
- Brányik, T., Silva, D. P., Vicente, A. A., Lehnert, R., Silva, J. B. A. e, Dostálek, P. and Teixeira, J. A. 2006. Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 1010-1018.
- El-Hilw, Z. H. 1999. Synthesis of cotton-bearing DEAE, carbamoyethyl, carboxyethyl, and poly(acrylamide) graft for utilization in dye removal. *J. Polym. Sci.* **73**, 1007-1014.
- Genisheva, Z., Mussatto, S. I., Oliveira, J. M. and Teixeira, J. A. 2011. Evaluating the potential of wine-making residues and corncobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. *Ind. Crop. Prod.* **34**, 979-985.
- Hamaker, K., Rau, S.-L., Hendrickson, R., Liu, J., Ladisch, C. M. and Ladisch, M. R. 1999. Rolled stationary phases: Dimensionally structured textile adsorbents for rapid liquid chromatography of proteins. *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 865-872.
- Hebeish, A. and El-Hilw, Z. H. 1998. Preparation of DEAE cotton-g-poly(methacrylic acid) for use as ion exchanger. *J. Polym. Sci.* **67**, 739-745.
- Inloes, D. S., Taylor, D. P., Cohen, S. N., Michaels, A. S. and Robertson, C. R. 1983. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in hollow-fiber membrane bioreactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 264-278.
- Kumar, S., Singh, S. P., Mishra, I. M. and Adhikari, D. K. 2011. Continuous ethanol production by *Kluyveromyces* sp. IIP453 immobilized on bagasse chips in packed bed reactor. *J. Petrol. Technol. Altern. Fuels* **2**, 1-6.
- Lee, C. W. and Chang, H. N. 1987. Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 1105-1112.
- Lee, S. E., Kim, H. J., Choi, W. Y., Kang, D. H., Lee, H.-Y. and Jung, K.-H. 2011. Optimal surface aeration rate for bio-ethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum* using *Pichia stipitis*. *KSBB J.* **26**, 311-316.
- Margaritis, A. and Merchant, F. J. A. 1984. Advances in ethanol production using immobilized cell systems. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**, 339-393.
- Moo-Young, M., Lamprey, J. and Robinson, C. W. 1980. Immobilization of yeast cells on various supports for ethanol production. *Biotechnol. Lett.* **2**, 541-548.
- Nagashima, M., Azuma, M., Noguchi, S., Inuzuka, K. and Samejima, H. 1984. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 992-997.
- Roberts, E. J. and Rowland, S. P. 1973. Removal of mercury from aqueous solutions by nitrogen-containing chemically modified cotton. *Environ. Sci. Technol.* **7**, 552-555.
- Robyt, J. F. and Mukerjee, R. 1994. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydr. Res.* **251**, 187-202.
- Silva, D. P., Brányik, T., Dragone, G., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. and Silva, J. B. A. e. 2008. High gravity batch and continuous processes for beer production: Evaluation of fermentation performance and beer quality. *Chem. Pap.* **62**, 34-41.
- Singh, N. L., Srivastava, P. and Mishra, P. K. 2009. Studies on ethanol production using immobilized cells of *Kluyveromyces thermotolerans* in a packed bed reactor. *J. Sci. Ind. Res.* **68**, 617-623.
- Sungur, S. and Babaoğlu, S. 2005. Synthesis of a new cellulose ion exchanger and use for the separation of heavy metals in aqueous solutions. *Sep. Sci. Technol.* **40**, 2067-2078.
- Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J. and Delvaux, F. R. 2006. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1515-1525.
- Wada, M., Kato, J. and Chibata, I. 1980. Continuous production of ethanol using immobilized growing yeast cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 275-287.
- Williams, D. and Munnecke, D. M. 1981. The production of ethanol by immobilized yeast cells. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1813-1825.
- Yeon, J.-H., Lee, S.-E., Choi, W. Y., Choi, W. S., Kim, I. C., Lee, H.-Y. and Jung, K.-H. 2011. Bioethanol production from the hydrolysate of rape stem in a surface-aerated fermentor. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 109-114.
- Yeon, J.-H., Lee, S.-E., Choi, W. Y., Kang, D. H., Lee, H.-Y. and Jung, K.-H. 2011. Repeated-batch operation of surface-aerated fermentor for bioethanol production from the hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 323-331.
- Yeon, J.-H., Seo, H.-B., Oh, S. H., Choi, W. S., Kang, D. H.,

Lee, H.-Y. and Jung, K.-H. 2010. Bioethanol production from hydrolysate of seaweed *Sargassum sagamianum*. *KSBB J.* **25**, 283-288.

26. Yu, J., Zhang, X. and Tan, T. 2007. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *J. Biotechnol.* **129**, 415-420.

초록 : 에탄올 생산을 위한 효모 *Pichia stipitis*의 고정화

이상은^{1*} · 이지은^{1*} · 김은진^{1*} · 최준호² · 최운용³ · 강도형⁴ · 이현용³ · 정경환^{1*}

(¹충주대학교 생명공학과, ²원광대학교 식품생명공학과, ³강원대학교 생물소재공학전공, ⁴한국해양연구원)

Cotton을 효모 세포(*Pichia stipitis*)의 고정화 담체로 사용하기 위하여 2-(diethylamino)ethyl chloride hydrochloride (DEAE·HCl)로 derivatization 시켰다. 0.5 M DEAE·HCl로 처리하였을 때, 효모 세포가 완전히 흡착하였으며, 이것은 DEAE-cotton g 당 101.8 mg의 효모 세포가 흡착하는 것이고, DEAE-cellulose에 효모 세포가 흡착하는 양의 약 6배 이상인 것으로 확인되었다. DEAE-cotton을 이용하여 효모 세포를 고정화하고, 이것을 ethanol 생산에 이용하였을 경우, glucose와 xylose가 포함된 배지에서 당당류에 대한 ethanol 수율로 0.33 정도로 ethanol을 생산 할 수 있다는 것을 실험적으로 확인하였다. 이를 이용하여 lignocellulosic biomass의 가수분해물로부터 bioethanol 생산에 이용될 수 있을 것으로 기대되어진다. DEAE-cotton에서 얻어진 결과는 DEAE-cellulose에서 같은 실험을 실시하여 서로 비교 분석하였다.