

시네라리아 꽃으로부터 에탄올 생산성 및 내열성이 우수한 효모 *Hanseniaspora opuntiae* 균주 분리

윤정아¹, 도영은¹, 박은희¹, 배영우¹, 김명동^{1,2*}

¹강원대학교 바이오산업공학부

²강원대학교 누룩연구소

Received: March 9, 2020 / Revised: May 22, 2020 / Accepted: May 27, 2020

Isolation of Ethanol-producing Thermotolerant Yeast *Hanseniaspora opuntiae* from *Senecio cruentus*

Jeong-Ah Yoon¹, Young-Eun Do¹, Eun-Hee Park¹, Young-Woo Bae¹, and Myoung-Dong Kim^{1,2*}

¹Division of Food Biotechnology and Biosystems Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

²Institute of Fermentation and Brewing, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Republic of Korea

The MBY/L6793 strain showing the highest ethanol yield of 0.48 ± 0.00 g ethanol/ g glucose was isolated from *Senecio cruentus*. Its ethanol yield was approximately 1.5 times that of the MBY/L6986 isolated from *Callistephus chinensis*. The strain was identified as *Hanseniaspora opuntiae* by sequence analysis of the 18S rRNA gene, and the sequenced gene was registered to the GenBank (MN859968). When grown at 40 °C, the strain produced 3.82 ± 0.98 g ethanol from 20 g glucose and 10.05 ± 0.06 g ethanol from 60 g glucose, corresponding to approximately 2.45 and 5.74 times, respectively, compared to the control strain *H. opuntiae* KCCM50747. The MBY/L6793 strain was deposited to KCTC (Korean Collection for Type Culture) as KCTC37025.

Keywords: Ethanol, yeast, thermotolerance, flower, *Hanseniaspora opuntiae*

최근 화석연료의 고갈과 원유의 가격상승, 수반되는 환경 문제 등으로 인하여 친환경 바이오에너지에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있으며, 전세계적으로 관련 연구가 활발히 진행되고 있다[1, 2].

목질계 바이오매스는 셀룰로오스계열의 물질들로 구성되어 있어 미생물 발효를 위해서는 전처리공정이 필요하며, 산이나 알칼리를 이용한 화학적 분해방법 또는 cellulase 등의 효소를 이용한 가수분해방법이 사용된다[3, 4]. 바이오에탄올을 생산하는 과정에서 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation)는 분리당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation) 공정보다 상대적으로 시간 및 생산비용 절감 등의 이유로 경제적인 방법으로 평가되지만[5, 6], 당화 온도(45–50°C)와 발효 온도(25–30°C)의 차이를 극복해야하는 근본적인 문제점이 있다. 따라

서, 바이오에탄올을 생산하는데 적합한 균주는 내열성, 내산성, 에탄올 생산성 등의 특성을 갖는 것이 바람직하다[7, 8].

현재까지 토양, 나무 껍질, 썩은 과일, 음식물 쓰레기 등을 비롯한 다양한 분리원으로부터 내열성 효모가 분리되었으며[9–11], 일본의 온천지역의 강으로부터 44°C에서 4.0%의 에탄올을 생산하는 *Issatchenkia orientalis* [12], 누룩으로부터 44°C에서 생육이 가능한 *Pichia farinosa* [13] 균주 등이 분리된 바 있다. 내열성이 우수한 *Kluyveromyces marxianus* 균주와 에탄올 생산성 및 저해제에 대한 내성이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 융합하는 등 동시당화발효 공정에 적합한 균주를 개발하기 위한 연구가 보고되었다[14].

다양한 분리원으로부터 분리된 내열성 효모는 40°C 이상의 온도에서 탄소원의 종류 및 농도, 발효저해제 등에 따른 에탄올 생산성을 평가한 연구결과들이 보고된 바 있다[9–11]. Choudhary 등[9]에 따르면 폐수로부터 분리된 *Saccharomyces cerevisiae* JR6 균주는 cellobiose와 xylose를 대사하지는 못하였으나, furfural과 5-hydroxymethyl

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-259-5565

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

furfural과 같은 발효 저해제 내성이 우수하고 전처리한 볏짚에서 40°C으로 배양하였을 때 3.8 g/l의 에탄올을 생산하여 바이오에탄올을 생산하기 위한 균주로 선발되었다. Kang 등[14]에 따르면 내열성이 우수한 *Kluyveromyces marxianus* 균주와 에탄올 생산성 및 저해제에 대한 내성이 우수한 *Saccharomyces cerevisiae* 균주를 융합하여 바이오에탄올 생산공정에 적합한 내열성이 균주가 개발된 바 있다.

Hanseniaspora opuntiae 균주는 충청남도 금산군 명곡리의 야생화에서 분리 되었으며[15], *Vibrio splendidus* 감염에 대한 면역성과 내성을 증가시키는 것으로 보고되었다[16]. Baek 등[17]은 발효식품으로부터 고농도의 포도당 및 에탄올이 함유된 배지에서 생육가능한 *H. opuntiae* 균주를 분리 하였다.

본 연구에서는 시네라리아(*Senecio cruentus*) 꽃으로부터 분리한 *H. opuntiae* 균주의 에탄올 생산특성과 내열성을 평가하였다.

강원도 춘천시에서 수집한 6종의 꽃으로부터 효모를 분리하기 위하여 시료 1 ml을 9 ml의 펩톤수에 현탁하여 적정 농도로 희석한 후, chloramphenicol (100 mg/l, Sigma-Aldrich, USA)이 첨가된 YEPD (yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l, BD Diagnostic, USA) 평판 배지에 도말하였다. 도말한 평판 배지는 30°C에서 48시간 동안 배양하여 단일집락을 확보하였다.

에탄올 생산성이 우수한 효모를 선발하기 위하여 단일집락을 YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리(5,000 ×g, 2 min)하여 균체를 회수한 후, 멸균 증류수로 3회 세척하여 10% (w/v) 포도당이 첨가된 100 ml의 YEPD 배지에 세포 흡광도(OD₆₀₀)가 1.0이 되도록 접종하였다. 배양온도 30°C에서 200 rpm의 교반속도로 48시간 동안 배양한 후, 배양액을 회수하여 포도당 및 에탄올 농도를 측정하였다.

선발된 균주는 YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 200 rpm의 교반속도로 24시간 동안 배양한 후 염색체 유전자를 추출하였다[13]. 프라이머 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3')과 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') [18]를 사용하여 18s rRNA 유전자 단편을 증폭한 후 염기서열을 분석하였다. Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 사용하여 확보한 염기서열과 문헌에 보고된 균주의 염기서열과의 상동성을 비교하여 균주를 동정하였다. 계통수 분석은 MEGA7 (7.0.26, MEGA software, USA) [19] 프로그램의 이웃연결방법(neighbor-joining method) [20]을 사용하여 분석하였다. 탄소원에 대한 균주의 탄소원 대사 특성은 API 20C AUX kit (BioMérieux, France)를 사용하여 조사하였다.

균주의 에탄올 생산과 내열성을 평가하기 위하여 단일집락을 YEPD 배지에 접종하여 30°C에서 배양한 후, 원심분리

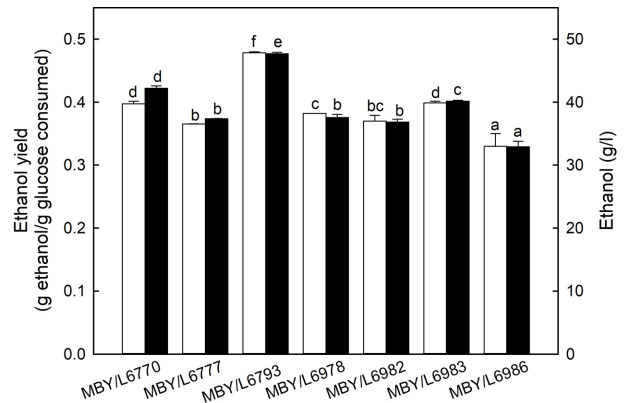


Fig. 1. Yeast isolates from flowers with high ethanol production yield (□) and production (■). Glucose (100 g/l glucose) was used as a carbon source, and shake flasks cultures (100 ml) were grown at 30°C for 48 h. Averages and standard errors from three independent cultures are shown. Different letters indicate a significant difference between averages.

를 통해 회수된 균체를 멸균 증류수로 3회 세척하여 포도당이 2% 및 6% 농도로 첨가된 YEPD 배지에 세포 흡광도가 1.0이 되도록 접종하고 30°C 및 40°C에서 배양하였다.

포도당 및 에탄올 농도는 Rezex ROA-Organic Acid H⁺ (Phenomenex, USA) 컬럼과 굴절률 검출기(Shimadzu, Japan)가 장착된 High Performance Liquid Chromatography (Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. 이동상으로서 0.005 N의 황산용액(H₂SO₄)을 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주었으며, 컬럼온도는 65°C로 유지하였다. 모든 측정은 3회 이상 반복하였으며, SPSS Statistics (v22, IBM, USA)를 이용하여 Duncan의 다중범위 검정법[21]으로 유의성을 검정하였다.

강원도 춘천에서 수집한 꽃으로부터 160점의 효모를 분리하였다. 포도당이 10% 농도로 첨가된 YEPD 배지를 사용하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였을 때, 에탄올 생산량과 수율이 우수한 7점을 선발하여 에탄올 생산 수율을 조사하였다(Fig. 1). 시네라리아 꽃에서 분리한 MBY/L6793 균주는 0.48 ± 0.00 g ethanol/g glucose로 가장 높은 에탄올 생산 수율을 나타냈다. 과꽃(*Callistephus chinensis*)에서 분리한 MBY/L6986 균주는 0.33 ± 0.02 g ethanol/g glucose로 상대적으로 가장 낮은 생산 수율을 나타냈다. MBY/L6793 균주의 에탄올 생산 농도는 47.70 ± 0.22 g/l로 MBY/L6986 균주보다 약 14.79 g/l 높게 나타났다.

Goshima 등[22]의 연구에 따르면 2%의 포도당이 첨가된 YEPD배지에서 24시간 동안 배양한 경우 *S. cerevisiae* BY4743 균주는 0.46 ± 0.00 g ethanol/g glucose [22], *K. marxianus* NBRC1777 균주는 0.44 ± 0.00 g ethanol/g glucose [22]의 에탄올 생산 수율을 나타내어 시네라리아 꽃

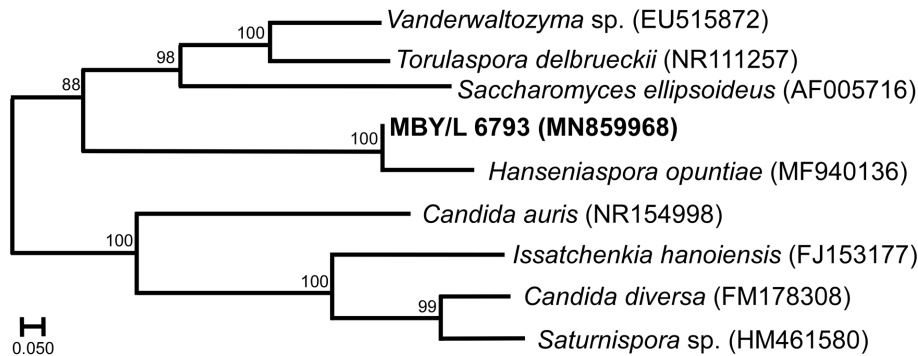


Fig. 2. Phylogenetic tree constructed using the neighbor-joining method [20]. The GenBank accession numbers are shown in parentheses.

에서 분리한 MBY/6793 균주의 에탄올 생산 수율이 상대적으로 우수한 것으로 판단되었다.

MBY/L6793 균주의 18S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 동정하였다. MBY/L6793 균주는 *Hanseniaspora opuntiae* (MF940136) 균주와 100%의 상동성을 나타냈으며, 분석된 염기서열은 GenBank에 등록(MN859968)하고 *Hanseniaspora opuntiae* MBY/L6793으로 명명하였다

Table 1. Characteristics of carbohydrate utilization by *H. opuntiae* KCCM50747 and *H. opuntiae* MBY/L6793.

Characteristics	<i>H. opuntiae</i> KCCM50747	<i>H. opuntiae</i> MBY/L6793
Control	-	-
Glucose	+	+
Glycerol	-	-
2-Keto-D-Gluconate	+	+
L-Arabitol	-	-
D-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
Xylitol	-	-
D-Galactose	-	-
Inositol	-	-
D-Sorbitol	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-
D Cellobiose	+	+
D-Lactose	-	-
D-Maltose	-	-
D-Saccharose	-	-
D-Trehalose	-	-
D-Melezitose	-	-
D-Raffinose	-	-

+, positive; -, negative.

(Fig. 2).

H. opuntiae 균주는 충청남도 금산군의 야생화[15]와 산균 과수원의 과일과 꽃[23]으로부터 분리되어 보고된 바 있다. Luan 등[24]의 연구에서 *H. opuntiae*와 *S. cerevisiae*를 사용하여 와인을 제조하였을 때, *S. cerevisiae* 단일 균주를 사용한 경우보다 다양한 향기성분을 생성하는 것으로 나타났다.

H. opuntiae MBY/L6793 균주와 대조구로 사용한 *H. opuntiae* KCCM50747 균주의 탄수화물 대사 특성을 조사한 결과(Table 1), 두 균주 모두 포도당, 2-케토-D-글루콘산, 셀로비오스를 대사하여 *H. opuntiae* KCCM50747 균주와의 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

H. opuntiae MBY/L6793 균주의 에탄올 생산 특성과 내열성을 평가하기 위하여 2%와 6%의 포도당이 첨가된 YEPD 배지를 사용하여 30°C 및 40°C에서 배양하였다(Fig. 3, Table 2). 대조구 균주인 *H. opuntiae* KCCM50747 와 MBY/L6793 균주는 30°C에서 유사한 수준의 에탄올 생산 농도와 수율을 나타냈으나, 40°C에서는 에탄올 생산성의 차이를 나타냈다. *H. opuntiae* KCCM50747 균주는 20 g의 포도당을 첨가한 배지에서 1.56 ± 0.10 g의 에탄올을 생산하였으며, 60 g의 포도당을 첨가한 배지에서는 1.75 ± 0.25 g의 에탄올을 생산하였다. 반면, *H. opuntiae* MBY/L6793 균주는 각각 3.82 ± 0.98 g/l, 10.05 ± 0.06 g/l의 에탄올을 생산하여 대조구인 *H. opuntiae* KCTC5709 균주보다 약 2.45배 및 5.74배 우수한 에탄올 생산 농도를 나타냈다. 포도당을 60 g 첨가한 배지에서 *H. opuntiae* MBY/L6793 균주의 에탄올 생산 속도와 수율은 각각 0.63 ± 0.00 g/l h, 0.37 ± 0.01 g/g으로 대조구 균주보다 우수한 내열성 및 에탄올 생산성을 나타냈다. *H. opuntiae* MBY/L6793 균주는 한국생물자원센터에 KCTC37025로 기탁하였다.

본 연구를 통하여 시네라리아 꽃으로부터 분리한 *H. opuntiae* MBY/L6793 균주의 내열성 및 에탄올 생산성이 대

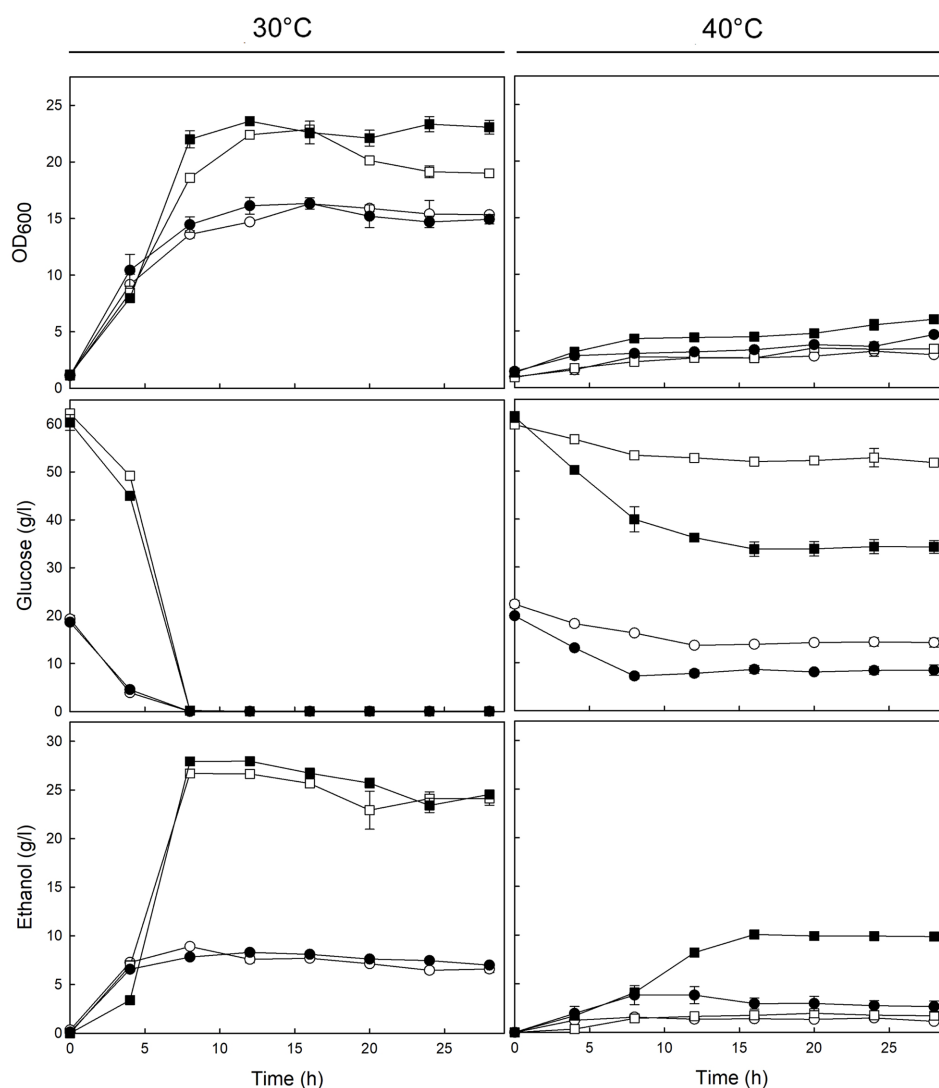


Fig. 3. Profiles of growth, glucose consumption, and ethanol production by *H. opuntiae* KCCM50747 (open) and MBY/L6793 (closed) grown in 2% glucose (circle) and 6% glucose (quadrangle). Shake flask cultures were grown at 30 °C and 40 °C. Averages and standard errors from three independent cultures are shown.

Table 2. Effects of temperature on the growth and ethanol production by *H. opuntiae* KCCM50747 and *H. opuntiae* MBY/L6793.

Temperature (°C)	Glucose (%)	<i>H. opuntiae</i> strain	Cell growth (OD ₆₀₀)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol production rate (g/l-h)	Ethanol yield (g ethanol/g glucose consumed)
30	2	KCCM50747	13.60 ± 0.33	8.91 ± 0.15	1.11 ± 0.02	0.46 ± 0.00
		MBY/L6793	16.13 ± 0.74	8.31 ± 0.31	0.69 ± 0.01	0.45 ± 0.00
	6	KCCM50747	18.60 ± 0.40	26.69 ± 0.41	3.34 ± 0.05	0.43 ± 0.00
		MBY/L6793	22.00 ± 0.75	27.93 ± 0.31	3.49 ± 0.04	0.46 ± 0.01
40	2	KCCM50747	2.72 ± 0.10	1.56 ± 0.10	0.20 ± 0.01	0.27 ± 0.00
		MBY/L6793	3.01 ± 0.09	3.82 ± 0.98	0.48 ± 0.12	0.30 ± 0.06
	6	KCCM50747	2.60 ± 0.10	1.75 ± 0.25	0.11 ± 0.02	0.22 ± 0.05
		MBY/L6793	4.48 ± 0.17	10.05 ± 0.06	0.63 ± 0.00	0.37 ± 0.01

조구 균주인 *H. opuntiae* KCCM50747 균주와 비교하여 상대적으로 우수한 것을 확인하였으며, 동시당화 발효 등 산업적 활용을 위한 추가연구가 필요할 것으로 판단된다.

요약

다양한 꽃으로부터 분리된 160점의 효모 균주 중 시네라리아 꽃에서 분리된 MBY/L6793은 0.48 ± 0.00 g ethanol/g glucose 으로 분리된 균주 중 가장 우수한 에탄올 생산 수율을 나타냈으며, 과꽃으로부터 분리된 MBY/L6986 균주의 약 1.5배 수준이었다. MBY/L6793 균주의 18s rRNA 유전자의 염기서열을 분석한 결과 *Hanseniaspora opuntiae*로 동정되었으며, 분석된 염기서열은 GenBank (MN859968)에 등록하였다. 40°C에서 배양하였을 때, *H. opuntiae* MBY/L6793 균주는 20 g의 포도당으로부터 3.82 ± 0.98 g의 에탄올을 생산하였으며, 60g의 포도당으로부터 10.05 ± 0.06 g의 에탄올을 생산하여 대조구 균주인 *H. opuntiae* KCCM50747 균주의 약 2.45배와 5.74배 수준이었다. *H. opuntiae* MBY/L6793 균주는 한국생물자원센터에 KCTC37025로 기탁하였다.

Acknowledgments

Following are results of a study on the "Leaders in Industry-university Cooperation +" Project, supported by the Ministry of Education and National Research Foundation of Korea and 2015 Research Grant from Kangwon National University (No. 520150114)

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Cazetta ML, Celligoi MAPC, Buzato JB, Scarmino IS. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresour. Technol.* **98**: 2824-2828.
- Kádár Z, Szengyel Z, Réczey K. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crops Prod.* **20**: 103-110.
- Xu Z, Huang F. 2014. Pretreatment methods for bioethanol production. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**: 43-62.
- Sun S, Sun S, Cao X, Sun R. 2016. The role of pretreatment in improving the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. *Bioresour. Technol.* **199**: 49-58.
- Paulova L, Patakova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K. 2015. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnol. Adv.* **33**: 1091-1107.
- Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M, Olsson L. 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.* **100**: 1122-1131.
- Pattanakittivorakul S, Lertwattanasakul N, Yamada M, Limtong S. 2019. Selection of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* for high temperature ethanol production from molasses and increasing ethanol production by strain improvement. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **112**: 975-990.
- Auesukaree C. 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **124**: 133-142.
- Choudhary J, Singh S, Nain L. 2017. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *J. Biosci. Bioeng.* **123**: 342-346.
- Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. 2018. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Braz. J. Microbiol.* **49**: 378-391.
- Yuan SF, Guo GL, Hwang WS. 2017. Ethanol production from dilute-acid steam exploded lignocellulosic feedstocks using an isolated multistress-tolerant *Pichia kudriavzevii* strain. *Microb. Biotechnol.* **10**: 1581-1590.
- Isono N, Hayakawa H, Usami A, Mishima T, Hisamatsu M. 2012. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 76-78.
- Kwon HJ, Kim MD. 2016. Isolation of stress-tolerant *Pichia farinosa* from nuruk. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 349-354.
- Kang HW, Kim Y, Park JY, Min J, Choi GW. 2010. Development of thermostable fusant, CHY1612 for lignocellulosic simultaneous saccharification and fermentation. *KSBB J.* **25**: 565-571.
- Hyun SH, Lee HB, Kim CM, Lee JS. 2013. New records of yeasts from wild flowers in coast near areas and inland areas, Korea. *Korean J. Mycol.* **41**: 74-80.
- Ma Y, Liu Z, Yang Z, Li M, Liu J, Song J. 2013. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Fish & Shellfish Immunol.* **4**: 66-73.
- Baek SY, Lee YJ, Kim JH, Yeo SH. 2015. Isolation and characterization of wild yeasts for improving liquor flavor and quality. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **43**: 56-64.
- Guillamón JM, Sabaté J, Barrio E, Cano J, Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Arch. Microbiol.* **169**: 387-392.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **33**: 1870-1874.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new

- method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
21. Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F test. *Biometrics.* **11**: 1-42.
 22. Goshima T, Tsuji M, Inoue H, Yano S, Hoshino T, Matsushika A. 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 1505-1510.
 23. Hyun SH, Lee JG, Park WJ, Kim HK, Lee JS. 2014. Isolation and diversity of yeasts from fruits and flowers of orchard in Sinamyeon of Yesan-gun, Chungcheongnam-do, Korea. *Korean J. Mycol.* **42**: 21-27.
 24. Luan Y, Zhang BQ, Duan CQ, Yan GL. 2018. Effects of different pre-fermentation cold maceration time on aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with *Hanseniaspora opuntiae* or *Pichia kudriavzevii*. *LWT-Food Sci. Technol.* **92**: 177-186.