



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년03월04일
(11) 등록번호 10-1599997
(24) 등록일자 2016년02월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12R 1/84 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0145735
(22) 출원일자 2013년11월27일
심사청구일자 2014년03월05일
(65) 공개번호 10-2014-0067947
(43) 공개일자 2014년06월05일
(30) 우선권주장
1020120135583 2012년11월27일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
EP01721988 A3
US20120107889 A1
JP2008518638 A
Appl Microbiol Biotechnol. 2007, Vol. 75,
pp.303-310.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
- (72) 발명자
손정훈
대전광역시 유성구 과학로 125
이선희
대전광역시 유성구 과학로 125
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 이미옥

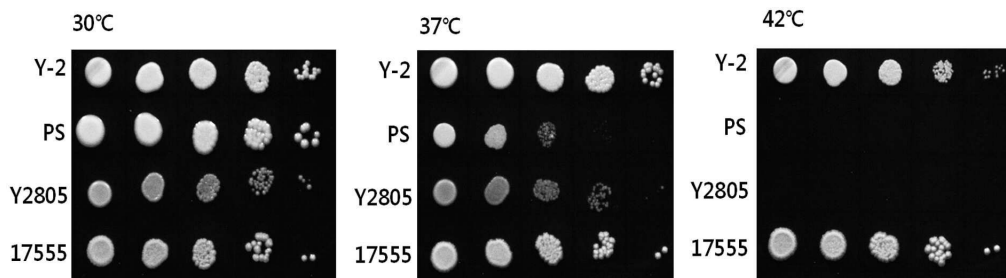
(54) 발명의 명칭 **신규한 고온 효모 피키아 길리에르몽디 Y-2 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주, 상기 균주 및 이의 배양물을 포함하는 에탄올 생산용 조성물 및 당을 포함하는 시료에 상기 균주 및 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올 또는 자일리톨의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 신규한 고온안정성 효모 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주는 고온에서 안정적으로 생장가능하며, 에탄올 발효능을 보유함을 확인하였다. 이에 자일로스 대사 과정에 작용하는 효소를 코딩하는 유전자를 도입하여 재조합 균주를 제조함으로써 옥탄당 뿐만 아니라 오탄당을 이용한 에탄올 생산능을 갖는 균주를 제공한다. 따라서 본 발명의 재조합 균주는 고온에서 오탄당 및 옥탄당을 모두 이용하여 에탄올 발효가 가능하므로, 셀룰로스에 바이오매스로부터의 바이오에탄올 제조 등의 산업공정에 널리 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

배정훈

대전광역시 유성구 과학로 125

성봉현

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 AGM0151314

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 바이오 신소재 생산기술 개발
 비목재자원을 활용한 바이오신소재 개발: 고온성 효모(KM) 세포공장 플랫폼 구축 및 그린

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.07.01 ~ 2014.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20103010090020-12-2-400

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 팜(Palm) 오일 산업부산물 활용 바이오에너지 생산기술개발

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20113010090030-11-1-000

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국에너지기술평가원

연구사업명 에너지기술개발사업

연구과제명 고지방산 저급 팜 슬러지오일(PSO) 기반 바이오디젤 생산용 다기능성 촉매 개발

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0028383

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(대전)

연구사업명 원천기술개발사업(글로벌프론티어)

연구과제명 차세대 바이오매스 기반 바이오에너지 생산 효모 균주 및 공정개발

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SEED-10-3

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 협동연구개발사업(기초기술연구회)

연구과제명 Cellulose-basedbiofuel 생산효율 향상을 위한 합성생물학 기술개발

기여율 20/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주.

청구항 2

제1항의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 에탄올 생산용 조성물.

청구항 3

제1항의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 포함하는, 자일리톨 생산용 조성물.

청구항 4

당을 포함하는 시료에 제1항의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발효는 15 내지 45℃에서 수행되는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

발효시키기 전에 12시간 내지 36시간의 종균배양 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 당을 포함하는 시료는 바이오매스를 당화시켜 수득한 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 당은 단당류(monosaccharide) 또는 이당류(disaccharide)인 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 단당류는 오탄당(pentose) 또는 육탄당(hexose)인 것인 방법.

청구항 10

당을 포함하는 시료에 제1항의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 자일리톨의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,
상기 발효는 15 내지 45℃에서 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,
발효시키기 전에 12시간 내지 36시간의 종균배양 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,
상기 당을 포함하는 시료는 바이오매스를 당화시켜 수득한 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,
상기 바이오매스는 리그노셀룰로스 바이오매스(lignocellulosic biomass)인 것인 방법.

청구항 15

제10항에 있어서,
상기 당은 오탄당인 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,
상기 당은 자일로스인 것인 방법.

청구항 17

제10항에 있어서,

상기 당을 포함하는 시료는 에탄올 생산공정에서 발생하는 발효 폐기물인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 고온안정성 균주인 기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주, 상기 균주 및 이의 배양물을 포함하는 에탄올 생산용 조성물 및 당에 상기 균주 및 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올 또는 자일리톨의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 전세계적으로 부각되고 있는 기후 변화 및 에너지 위기로 인한 문제를 해결하기 위하여 지속가능한 신재생 에너지의 필요성이 대두되고 있다. 녹색연료로써 높은 잠재적 가능성을 가진 바이오에탄올은 석유에너지에 대한 의존도를 줄이고, 지구 온난화와 같은 심각한 환경문제를 동시에 해결할 수 있는 대체연료로서 활용되고 있다.

[0003] 전세계적으로 약 800억 리터 규모의 바이오에탄올이 생산되고 있는데(바이오에너지 시장 분석 및 전망, 화학경제연구원, 2008), 미국과 브라질이 주도적이다. 현재까지 바이오에탄올 생산은 주로 식량자원인 옥수수과 사탕수수 등에서 얻어지는 포도당을 발효시켜 얻은 알콜로서, 석유 유래의 가솔린을 부분적으로 대체함으로써 가솔린의 소비량을 줄이고, 아울러 환경오염물질의 배출량도 감소시키고 있다. 이와 같이 식량자원을 이용하여 생산되는 바이오에탄올을 일반적으로 1세대 바이오에탄올 연료라고 하는데, 이에 대한 급격한 수요증대로 인한 옥수수, 사탕수수와 같은 농작물의 가격이 폭등하고, 이와 더불어 다른 곡물의 가격상승을 유발하여 에너지문제 해결을 위한 바이오에탄올의 생산이 또 다른 식량문제를 일으키는 원인이 될 수 있다.

[0004] 이러한 문제점 때문에 2015년 이후부터는 1세대 바이오에탄올의 생산이 한계에 이를 것으로 예상되며, 이에 따라 새로운 대안으로서 이른바 2세대 바이오연료인 셀룰로스 에탄올(cellulosic bioethanol)이 각광을 받고 있다. 셀룰로스 에탄올이란 지구상에서 가장 풍부한 유기물이자 식물 세포벽의 주요 구성 물질인 셀룰로스를 분해하여 포도당을 생산하고, 이로부터 에탄올을 제조하는 것이다. 따라서, 2세대 셀룰로스 에탄올은 현재 옥수수 녹말을 발효시켜 에탄올을 생산하는 1세대 방법과는 달리, 방치하거나 소각시켰던 옥수수의 잎, 줄기, 뿌리 등 모든 조직을 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 방법이다. 이 방법을 이용하여 옥수수 껍질, 짚겨, 목초, 갈채, 억새, 목재폐기물 등 모든 식물의 조직으로부터 바이오에탄올을 생산할 수 있다.

[0005] 상기 2세대 바이오연료의 원료가 되는 물질을 섬유질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)라 하며, 이러한 섬유질계 바이오매스는 크게 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose) 또는 리그닌(lignin)의 세 가지 성분으로 구성된다. 이중 헤미셀룰로스는 함량의 약 5 내지 20%의 아라비노스(arabinose)와 자일로스(xylose)를 포함하고 있다. 이처럼 헤미셀룰로스의 상당부분을 차지하고 있는 오탄당을 이용한 바이오에탄올의 생산은 현재로서는 매우 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다.

[0006] 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 이러한 섬유질계 바이오매스 가수분해 산물로부터 에탄올을 생산하는 가장 효율적인 균주로 평가되고 있다. 그러나, 자연계에 존재하는 *S. 세레비지*에는 오탄당인 아라비노스 또는 자일로스를 영양원으로 이용할 수 없기 때문에 헤미셀룰로스 가수분해 산물을 이용한 에탄올 발효에는 활용하기 어려운 단점이 있다. 이를 극복하기 위하여 섬유질계 바이오매스 가수분해 산물로부터 얻어지는 옥탄당과 오탄당의 동시 발효가 가능한 *S. 세레비지*에의 대사공학적 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히 이들 옥탄당과 오탄당의 혼합당 발효를 위하여 자연계에 존재하는 대표적인 자일로스 발효 효모인 피키아 스티피티스(*Pichia stipitis*)로부터 분리한 자일로스를 자일롤로스로 전환시키는 효소인 자일로스 환원효소(xylose reductase) 및 자일리톨 탈수소효소(xylitol dehydrogenase)를 활용하거나 사상 곰팡이인 피로마이세스 종(*Piromyces sp.*)이나 혐기성 박테리아(anaerobic bacterium)인 클로스트리디움 파이토펜페르멘탄스(*Clostridium phytofermentans*) 또는 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*)로부터 분리한 자일로스 이성화효소(xylose isomerase)를 *S. 세레비지*에 도입하여 자일로스 발효 재조합 *S. 세레비지* 균주를 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있으며, 나아가 에탄올 발효능을 향상시키기 위해 이들 효소의 활성을 조절하는 방법에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나 이러한 재조합 균주들을 이용한 바이오에탄올 생산은 야생형 균주를 이용하는 것에 비해 효율성이 다소 떨어진다는 단점이 한계점으로 지적되고 있다.

[0007] 또한, 섬유질계 바이오매스를 당화시키기 위하여 효소처리하는 과정을 필요로 하고, 상기 효소처리 과정에서 발효조 내의 온도는 섬유질 분해효소의 활성을 위한 최적온도를 고려하여 다소 높은 온도로 유지된다. 따라서, 단일 균주를 이용하여 셀룰로스의 효소적 분해 및 생산된 당류의 발효단계를 동시에 수행하는 통합적 단일 생물공정(consolidated bioprocessing; CBP)을 적용하기 위해서 상기 균주는 고온에서 잘 자라거나 견딜 수 있는 균주여야 한다. 그러나, 지금까지 연구되고 있는 많은 균주들은 대부분 중온성 효모 균주에 국한되어 있으며, 매우 제한적으로 고온성 효모를 이용한 연구들이 진행되고 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 고온에서도 에탄올 발효 가능한 효모 균주와 동시에 오탄당 및 육탄당을 모두 이용하여 에탄올을 발효할 수 있는 효모 균주를 확보하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 이에 토양샘플을 채취하여 고온에서 농화배양하여 고온 저항성 효모를 분리하였고, 이를 동정하여 고온에서 에탄올 발효능을 가지며 오탄당과 육탄당을 모두 이용할 수 있는 신규 효모임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 에탄올 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 자일리톨 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 당을 포함하는 시료에 상기 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 당을 포함하는 시료에 상기 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 자일리톨의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 12322BP의 신규한 고온안정성 균주인 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주를 제공한다.

[0015] 전세계적으로 확대되고 있는 환경오염 및 에너지 고갈 문제로 인해 지속가능한 신재생에너지의 필요성이 대두되면서 친환경적 대체에너지인 바이오에탄올의 중요성이 부각되고 있다. 현재 바이오에탄올은 1세대 바이오에탄올이라고 하여 주로 식량자원인 옥수수, 사탕수수 등에서 얻어지는 포도당을 발효시켜 알코올을 얻는 방식으로 제조되는 바, 원료인 농작물 수요의 급증으로 인한 가격폭등 등의 문제점이 파생될 수 있다는 단점이 있다. 이에 따라, 셀룰로스 등의 섬유질계 바이오매스를 원료로 하는 2세대 바이오에탄올이 주목받기 시작하였다. 상기 2세대 바이오에탄올의 원료가 되는 섬유질계 바이오매스는 식물 세포벽의 주요성분으로 그간 방치하거나 소각시켰던 옥수수 껍질, 잎, 줄기, 뿌리 등 모든 조직, 쌀겨, 목초, 갈대, 억새, 목재폐기물을 원료로 이용할 수 있다는 점에서 바람직하게 여겨지고 있다. 그러나, 포도당을 직접 발효시켜 에탄올을 생산하는 1세대 바이오에탄올과는 달리 2세대 에탄올은 먼저 섬유질계 바이오매스 즉, 다당류를 에탄올로 발효가능한 단당류 또는 이당류 등으로 당화시키는 과정을 필요로 한다. 이러한 당화과정은 효소 또는 산을 이용하여 수행될 수 있다.

[0016] 상기 효소 당화는 셀룰라아제 등의 섬유질 분해효소를 이용하여 바이오매스의 탄수화물을 단당류로 분해하는 과정으로 효소 자체가 생물학적 촉매이며 반응온도가 상대적으로 낮고 폐기물이 거의 나오지 않아 친환경적이며 낮은 에너지를 필요로 한다는 장점이 있다. 반면, 높은 효소 가격으로 인한 비용문제 및 반응시간이 길다는 단점이 있다. 또한 효소활성이 다양한 요소에 의해 제한될 수 있다는 것 또한 단점으로 지적되고 있다.

[0017] 한편, 산 당화는 산과 고온을 이용한 가수분해를 통해 바이오매스의 탄수화물을 단당류로 분해하는 과정으로 주고 저렴한 황산 등을 이용한다. 따라서, 반응시간이 짧고 비용이 저렴하다는 것이 장점이나, 산을 이용하므로

중화과정이 필요하고 그 과정에서 폐기물(침전)이 생성되며, 고온의 산성조건에서 당분해산물이 생성되어 이후 발효공정을 저해하는 요소로 작용할 수 있고 분해가 더욱 진행되면 포름산, 포름알데히드 등의 원치않는 부산물이 생성될 수 있다는 단점이 있다.

[0018] 따라서, 현재로서는 효소를 이용한 당화과정이 바람직한 공정으로 인식되고 있어 널리 연구되고 있다. 이와 같은 효소를 이용한 당화과정은 반응조건은 비교적 온화하므로 하나의 반응기에서 당화와 발효공정을 동시에 수행하는 통합적 단일 생물공정을 가능하게 할 수 있다. 이러한 통합적 단일 생물공정을 수행하면 발효가능한 단당류 등이 생성됨과 동시에 발효되어 소비되므로 당화와 발효를 별도로 수행할 때 효소 당화과정에서 생성물인 단당류 등이 축적되어 농도가 높아짐으로써 반응이 종결되는 단점을 자연스럽게 해결할 수 있고 나아가 지속적인 효소 당화과정이 진행되므로 적은 양의 효소로 높은 당화효율을 얻을 수 있으므로 비용 또한 절감할 수 있다는 장점이 있다. 그러나, 효소 당화과정의 반응조건이 온화하다고는 하지만 최적의 효소활성을 나타내기 위해서는 다소 높은 온도(약 40℃)로 반응기 내의 온도를 유지할 필요가 있다. 따라서, 이러한 통합적 단일 생물공정에 의한 2세대 바이오에탄올의 생산을 위해서는 고온에서 안정적으로 성장가능하며 동시에 에탄올 발효능을 갖는 균주의 발굴이 필수적이다.

[0019] 피키아 길리에르몽디 균주는 무성의 일그러진 형태(asexual and anamorphic)의 피키아 속 효모 종으로, 피키아 속과 칸디다 속 간의 구별이 어려워 칸디다 길리에르몽디이라고 불리기도 하며, 면역 억제된 환자의 다양한 인간 감염 예컨대 대부분은 피부 유래의 감염으로부터 분리된다. 뿐만 아니라 정상 피부, 해수, 동물의 배설물(faeces of animals), 무화과 말벌(fig wasp), 버터밀크, 가죽, 어류 및 맥주로부터 분리되기도 한다. 형태적으로 피키아 길리에르몽디 집락은 평평하고 축축하며 매끈하고, 사브로 텍스트로스 한천(Sabouraud dextrose agar) 상에서 크립 내지는 황색을 띤다. 옥수수가루 트윈 80 한천(cornmeal tween 80 agar) 상에 25℃에서 72 시간 후 가성균사(pseudohyphae)를 따라 특히 중격점(septal point)에서 작은 분아포자(blastospore)의 집락을 형성한다.

[0020] 본 발명의 신규한 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주는 토양시료로부터 최초로 분리 동정한 균주로 특성분석을 통해 고온에서도 안정적으로 성장가능한 균주이며, 당류를 이용하여 성장하고 에탄올 발효 가능한 균주임을 확인하였다. 상기 균주에 대하여 염기서열을 분석하여 비교한 결과 피키아 길리에르몽디와 99.2%의 상동성을 나타내었으므로 피키아 길리에르몽디 Y-2로 명명하였다. 이의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열(서열번호 1)은 NCBI의 GeneBank에 등록번호 JX069771로 등록하였다. 또한, 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture; KCTC)에 2012년 11월 23일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC 12322BP을 부여받았다.

[0021] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주는 동일 속의 에탄올 발효균주로 알려진 피키아 스티피티스와 달리 42℃의 고온에서도 성장가능한 고온안정성 균주임을 확인하였다(도 2). 나아가, 상기 고온에서도 글루코스를 이용한 에탄올 발효가 가능한 에탄올 발효균주임을 확인하였다(도 5). 또한, 본 발명의 균주는 오탄당인 자일로스를 사용하여 자일리톨을 생산할 수 있으며(도 7), 자일로스를 포함하는 에탄올 발효 폐액으로부터 자일리톨을 생산할 수 있는 균주이다(도 10 및 11). 따라서, 본 발명의 Y-2 균주는 셀룰로스의 효소적 분해 및 이로부터 생산된 당류의 발효단계를 동시에 수행하는, 따라서 효소활성을 위해 발효조 내의 온도를 고온으로 유지할 필요가 있는, 통합적 단일 생물공정에 적용하기에 적합한 균주일 수 있다.

[0022] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 에탄올 생산용 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 Y-2 균주에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[0024] 본 발명의 용어 "배양물"은 본 발명의 Y-2 균주가 시험관 내에서 성장 및 생존할 수 있도록 영양분을 공급할 수 있는 배지에 상기 균주를 일정기간 배양하여 얻는, 배양된 균주, 이의 대사물, 여분의 영양분 등을 포함하는 배지를 의미하나, 균주 배양 후 균주를 제거한 배양액도 포함한다. 상기 Y-2 균주는 당류를 이용하는 에탄올 발효능을 가지는 균주이므로, 상기 Y-2 균주 또는 이의 배양물은 당류로부터 에탄올을 생성하기 위한 에탄올 생산용 조성물로 이용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 상기 Y-2 균주는 다양한 당류에 대한 동화작용을 나타내는(표 1), 당류를 소비하여 성장 가능한 균주(도 3)이며, 당류, 특히 글루코스를 탄소원으로 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 균주임을 확인하였다(도 4).

- [0026] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 당을 포함하는 시료에 본 발명의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 용어 "발효"는 내재적 전자받개를 이용하여 탄수화물과 같은 유기화합물을 산화시켜 에너지를 추출하는 과정을 의미하는 것으로 전자 운반 사슬을 통해 산소와 같은 외인성 전자받개에 전자를 공여하는 호흡과는 상반된 의미로 사용되는 용어이다. 예컨대, 본 발명에서는 균류에 의해 당을 분해하여 알코올을 생산하는 과정을 의미할 수 있다. 이와 같이 발효의 가장 보편적인 기질은 설탕류이며, 대표적인 발효 산물의 예는 에탄올, 락트산, 락토스 및 수소 등이다. 발효는 필수적인 것은 아니나 무산소 조건에서 일어나는 중요한 과정 중 하나이다. 상기 발효는 바람직하게 15 내지 45℃에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 균류가 성장가능하며 발효능을 나타낼 수 있는 한, 온도의 제한없이 수행될 수 있다.
- [0028] 상기 발효는 발효에 사용되는 원균을 증식시키기 위하여 발효시키기 전에 12시간 내지 36시간의 종균배양 단계를 추가로 수행할 수 있다. 즉, 본 배양 즉 발효에 앞서 일정한 수의 균주를 확보하기 위하여 증식시키는 종균배양 단계를 수행할 수 있다.
- [0029] 상기 본 발명의 에탄올 발효과정에서 탄소원으로 사용되는 당은 바이오매스를 당화시켜 수득된 생산물일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 용어 "바이오매스(biomass)"는 특정 생물군의 양을 중량이나 에너지량으로 나타내는 것으로 생물체량 또는 생물량이라고도 한다. 일반적으로 건조중량을 사용하지만, 습중량이나 때로는 생물체의 주요한 구성성분인 탄소나 질소량으로 나타내기도 한다. 현존량과 같은 뜻으로도 빈번히 사용되며 특히 식물의 경우 그러하다. 생물량은 생물생만에 따라 증가하는데 균집의 호흡량, 고사탈락량, 피식량 등을 공제한 것이 축적량이 된다. 생태계에 있어서는 영양단계가 낮은 생물군의 생물량이 많고 포식자인 고차 생물군의 생물량은 적다. 땃나무, 숲, 생물의 기체 등 직접 화학 에너지로 이용될 수 있는 생물을 포함하며, 이 외에도 추가적인 공정에 의해 에너지로 전환될 수 있는 동식물이나 미생물 등 생물체가 만들어내는 유기물을 모두 포함한다. 구체적으로, 동물, 식물, 미생물 등 생물체의 유기물을 총망라하는 개념으로 각종 동식물을 비롯하여 농업에서 나온 부산물 및 폐기물, 음식물 쓰레기, 생물체에 기초한 산업폐기물, 생물연료 생산을 목적으로 재배된 작물(에너지 작물) 등 그 종류가 다양하다. 상기 바이오매스는 물리, 화학, 생물학적 기술을 적용하여 고체, 액체, 기체 상태의 생물연료로 전환할 수 있다. 본 발명에서 바이오매스는 제한없이 사용할 수 있으며, 동물유래 또는 식물유래일 수 있으나, 바람직하게는 섬유질계 바이오매스 등 다당류로 구성된 것일 수 있다.
- [0031] 상기 당은 프락토스, 소르보스, 글루코스, 만노스, 갈락토스, 람노스, 아라비노스, 자일로스 등의 단당류(monosaccharide) 또는 수크로스, 락토스, 말토스, 트레할로스, 투라노스, 셀로비오스 등의 이당류(disaccharide)일 수 있다.
- [0032] 또한 상기 단당류는 아라비노스, 자일로스 등의 오탄당(pentose) 또는 프락토스, 글루코스, 갈락토스, 만노스 등의 육탄당(hexose)일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, Y-2 균주는 글루코스, 갈락토스, 만노스와 같은 육탄당 단당류 뿐만 아니라, 셀로비오스와 같은 이당류 및 아라비노스, 자일로스와 같은 오탄당을 이용하는 능력이 있음을 확인하였으며(도 3), 글루코스를 탄소원으로 사용하는 경우 기존의 에탄올 발효 균주로 알려진 피키아 스티피디스 및 사카로마이세스 세레비지에와 유사한 수준으로 에탄올을 발효하는 능력이 있음을 확인하였다(도 4). 또한 중온에 비해 다소 전환율이 감소하기는 하지만 40℃의 고온에서도 에탄올 발효능을 나타내는 것을 확인하였다(도 5).
- [0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 기탁번호 KCTC 12322BP의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 자일리톨 생산용 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 용어 "자일리톨(xylitol)"은 알콜계 당으로 건강식의 성분으로 설탕 대용품으로 또는 치아 관리용품에 이용되는 물질로, 화학식은 $(\text{CHOH})_3(\text{CH}_2\text{OH})_2$ 로 표시된다. 동일한 질량의 수크로스(sucrose)와 유사한 정도의 단맛을 내지만 칼로리는 60% 정도밖에 되지 않는다. 다른 합성 또는 천연 감미료(sweetener)와 달리 충치의 주요 원인균인 뮤탄스균(*S. mutans*)이 발효시키지 못해 산을 발생시키지 않으므로 치아를 보호하는데 도움을 주며, 재석회화(reminerlization) 작용을 하므로 손상된 치아표면을 복원하는 데에도 도움을 준다. 인슐린을 소모하지 않으므로 당뇨병 환자에게 설탕 대용으로 사용된다. 이러한 자일리톨은 당(sugar; aldehyde)을 일차알

콜(primary alcohol)로 전환시키는 자일로스의 수소화에 의해 생성된다. 또한 천연물로부터 추출하거나 수액(birch sap)을 생산하는 자작나무(birch tree)를 두드려(by tapping) 수확할 수 있다. 자일리톨을 생산하는 다른 생산방법은 박테리아(bacteria), 균류(fungi) 및 효모세포(yeast cells)에서의 발효(fermentative) 및 생촉매(biocatalytic) 공정을 포함하는 미생물공정(microbial process)으로, 이는 자일로스-매개 발효를 통해 자일리톨을 고수율로 생산할 수 있는 장점을 갖는다.

- [0036] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 당을 포함하는 시료에 본 발명의 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*) Y-2 균주 또는 이의 배양물을 처리하여 발효시키는 단계를 포함하는 자일리톨의 제조방법을 제공한다.
- [0037] 상기 Y-2 균주, 배양물 및 발효에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [0038] 바람직하게 상기 발효는 15 내지 45℃에서 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 균류가 성장가능하며 발효능을 나타낼 수 있는 한 제한없이 수행될 수 있다.
- [0039] 또한 발효에 사용되는 원균을 증식시키기 위하여 발효시키기 전에 12시간 내지 36시간의 종균배양 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0040] 상기 당을 포함하는 시료는 바이오매스를 당화시키는 단계를 포함하여 수득한 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 바이오매스는 섬유질계 바이오매스, 당은 오탄당일 수 있으며, 보다 바람직하게 상기 당은 자일로스일 수 있다. 상기 용어들의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0041] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 당을 포함하는 시료는 에탄올 생산공정에서 발생하는 발효 폐기물일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 용어, "에탄올 생산공정에서 발생하는 발효 폐기물"은 바이오매스를 물리·화학적 전처리 및 당화 공정을 통하여 에탄올 발효시키면서 생성되는, 오탄당을 포함하는 폐기물을 의미하며, 그 예로 리그노셀룰로스 바이오매스 및 셀룰로스 바이오매스로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상을 물리·화학적 전처리 및 당화 공정을 통하여 생성된 혼합물이 있다.
- [0043] 이러한 에탄올 생산 공정에서 발생하는 발효 폐기물은 상기 발효 폐기물은 글루코오스, 갈락토오스 및 만노오스 등을 포함하는 육탄당, 및 자일로스와 아라비노오스등을 포함하는 오탄당으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상의 당을 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 발효 폐기물은 고체 성분을 제거한 발효 폐기물 또는 고체 성분을 제거하지 않은 발효 폐기물을 이용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 종래 오탄당 발효능을 갖는 효모로 알려진 피키아 스티피티스와 유사하게 자일로스를 소모하면서 성장하는 것을 확인할 수 있었으며(도 6), 이로부터 자일리톨을 생산하여 축적하는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 나아가, 육탄당인 글루코스와 오탄당인 자일로스를 혼합한 기질에서 각각을 에탄올과 자일리톨로 전환시킬 수 있음을 확인하였다(도 8). 또한 오탄당과 육탄당을 모두 제공하는 리그노셀룰로스계 바이오매스 당화물에 대해서도 상기 오탄당 및 육탄당 모두를 소모하여 에탄올과 자일리톨을 생산할 수 있음을 확인하였다(도 9). 뿐만 아니라, 에탄올을 발효시키고 남은 자일로스를 주성분으로 하는 발효 폐액을 이용하여 자일리톨을 생산할 수 있음을 확인하였다(도 10 및 11). 따라서, 본 발명에 따른 신규 균주 Y-2는 오탄당과 육탄당을 모두 발효시킬 수 있으므로, 리그노셀룰로스계 바이오매스 당화물로부터 에탄올 및 자일리톨 생산 및 폐기물로 인식되었던 발효 폐액으로부터 고부가가치의 자일리톨 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명의 신규한 고온안정성 효모 피키아 길리에르몽디 Y-2 균주는 고온에서 안정적으로 성장가능하며, 에탄올 발효능을 보유하며, 고온에서 오탄당 및 육탄당을 모두 이용하여 에탄올 발효가 가능하므로, 셀룰로스계 바이오매스로부터의 바이오에탄올 제조 등의 산업공정에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 분리 정제된 Y-2 균주의 YPD 한천 배지 상에서의 집락 형태를 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주 및 기존의 에탄올 발효 균주로 알려진 효모들 간의 온도별 성장률을 나타낸 도이다. Y-2; *Pichia guilliermandii* Y-2, PS; *Pichia stipitis*, Y2805; *Saccharomyces cerevisiae*, 17555; *Kluyveromyces marxianus*.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주 및 기존의 에탄올 발효 균주로 알려진 효모들의 바이오매스로부터 유래하는 당 단량체를 단일 탄소원으로 포함하는 배지에서의 성장률을 나타낸 도이다. Y-2; *Pichia guilliermandii* Y-2, PS; *Pichia stipitis*, Y2805; *Saccharomyces cerevisiae*, 17555; *Kluyveromyces marxianus*.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 글루코스를 탄소원으로 이용하는 성장률, 글루코스 소모율 및 에탄올 발효율을 나타낸 도이다. 대조군으로는 기존에 알려진 에탄올 발효 균주인 PS 및 SC를 이용하였다. PS; *Pichia stipitis*, SC; *Saccharomyces cerevisiae*.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 온도에 따른 에탄올 발효율을 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 자일로스 이용율을 나타낸 도이다. (a)는 배양시간에 따른 세포 성장률을, (b)는 자일로스의 잔여량을 나타낸 도이다. 대조군으로는 기존에 알려진 에탄올 발효 균주를 이용하였다. Y-2; *Pichia guilliermandii* Y-2, PS; *Pichia stipitis*, SC D-452-2; *Saccharomyces cerevisiae*, KM7155; *Kluyveromyces marxianus*.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 자일로스를 이용한 균주 성장률 및 자일리톨 생산물을 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 글루코스와 자일로스 혼합기질 내에서의 에탄올과 자일리톨의 생산물을 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 빈 과실다발(empty fruit bunch; EFB)을 이용한 에탄올 및 자일리톨의 생산물을 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 돼지감자 발효 폐액을 이용한 자일로스 이용율 및 자일리톨의 생산물을 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 Y-2 균주의 역세 발효 폐액을 이용한 자일로스 이용율 및 자일리톨 생산물을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0049]

실시예 1: 토양 유래 신규 고온 효모 탐색을 위한 효모의 분리

[0050]

신규 고온 효모 탐색을 위하여 본 발명자들은 대전광역시 한국생명공학연구원 내의 토양시료를 채취하여 10 g의 토양을 40 ml의 멸균 증류수에 넣고 한 시간 동안 보텍스(vortex)를 이용하여 혼합하였다. 이후, 상등액을 20 ml 취하여 박테리아를 저해하기 위한 효모배지인 YMPS(1 L 당 효모 추출물 3 g, 맥아 추출물 3 g, 펩톤 5 g, 글루코스 10 g, 항생제(페니실린, 스트렙토마이신 50 mg)) 배지 2 L에 접종하여 5 L 통발효기(jar fermentor)로 40℃에서 36시간 동안 배양한 뒤, 1.8 L의 배양액을 제거하고, 신선한 배지를 1.8L 보충하여 다시 배양하는 농화배양 과정을 3회 반복하였다. 이후, 농화배양된 시료를 YMPS 한천 배지에 도말하여, 40℃에서 48시간 동안 배양하여, 곰팡이 포자 형태가 아닌 효모형태의 집락을 형성하는 균주를 확보하였다. 분리된 미생물 집락을 YMPS 한천 배지에 다시 접종하여 순수하게 분리 및 배양하였으며, 상기 분리된 균주를 Y-2로 명명하였다(도 1).

[0051] 실시예 2: 신규 미생물의 동정을 위한 유전학적 및 생리학적 분석

[0052] 상기 실시예 1에서 확보한 고온 효모 균주의 종 분석을 위하여, 균주 Y-2를 3 ml YMPS 액체 배지로 40°C에서 180 rpm으로 48시간 동안 진탕배양한 후, 원심분리하여 세포만을 회수하여, i-유전체 BYF DNA 추출 미니 키트 (i-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit, iNTRON Biotechnology Inc., Sungnam, Korea)를 사용하여 유전체 DNA(genomic DNA)를 추출하였다. 상기 추출된 DNA에서 진핵세포 미생물의 진화 계통연구에 가장 유용한 분자마커로 이용되고 있는 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열을 분석하기 위하여 프라이머 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; 서열번호 2)과 LR3R(5'-GGTCCGTGTTCAAGAC-3'; 서열번호 3)을 이용하여 PCR 기법을 이용하여 염기서열을 증폭시켰다. 상기 염기서열을 증폭시키기 위하여 기질 DNA(template DNA) 1 µl, 10 pmol ITS1 1.5 µl, 10 pmol LR3R 1.5 µl, EX taq 완충액(Takara) 5 µl, 2.5 mM dNTP 4 µl, 증류수 36.5 µl, EX taq DNA 중합효소(Takara) 0.5 µl을 포함하는 반응물을 이용하여, 하기 조건에 따라 PCR을 수행하였다: 95°C 5분간 반응 후; 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분 30초로 30 사이클; 72°C에서 10분간 추가 반응. 상기 PCR 반응 후 2 µl의 반응액을 취하여 아가로스 겔에서 전기영동을 이용하여 분석한 결과, 1.2 kb 크기의 단편이 증폭되었고, 이를 솔벤트 PCR 정제 키트(solgent PCT purification kit)를 이용하여 PCR 산물을 정제하였다. 상기 정제된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다(제노텍사). 이와 같이 분석된 염기서열은 동정을 위하여 National Center for Biotechnology Information(NCBI)에서 제공하는 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 이용하여 공지된 염기서열들과 비교하였다.

[0053] 그 결과, 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*)와 99.2%의 상동성을 나타내어 피키아 길리에르몽디에 속하는 신규한 균주임을 나타내었다. 상기 균주를 피키아 길리에르몽디 Y-2(*Pichia guilliermondii* Y-2)로 명명하였고, 상기 균주의 ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA 염기서열을 NCBI의 GeneBank에 등록하여 JX069771의 등록번호를 부여받았다. 또한, 상기 균주는 부다페스트 조약 하의 국제기탁기관인 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2012년 11월 23일자로 기탁하고, 수탁번호 KCTC 12322BP를 부여받았다.

[0054] 또한, 상기 균주의 탄소 동화작용(carbon assimilation)을 통한 균주 동정을 위하여, 한국미생물보존센터(KCCM)에 의뢰하여 API 키트(20C AUX)를 이용하여 분석하였다.

[0055] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 글루코스(glucose), 글리세롤(glycerol), 2-케토-D-글루콘산염(2-keto-D-gluconate), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 아도니톨(adonitol), 갈락토스(galactose), 소르비톨(sorbitol), α-메틸-D-글루코사이드(a-methyl-D-glucoside), N-아세틸-D-글루코사민(N-acetyl-D-glucosamine), 셀로비오스(cellobiose), 말토스(maltose), 사카로스(saccharose), 트레할로스(trehalose), 멜레지토스(melezitose), 라피노스(raffinose)를 이용하는 반면, 자일리톨(xylitol), 이노시톨(inositol), 락토스(lactose)는 이용하지 못하는 것으로 확인되었다. 이로부터의 동정결과는, 전체 일치율(matching rate)을 100%로 보았을 때, 칸디다 길리에르몽디(*Candida guilliermondii* a.k.a. 피키아 길리에르몽디(*Pichia guilliermondii*))와 60.3%, 칸디다 파마타(*Candida famata*)와 39.6%의 일치율을 나타내어 피키아 길리에르몽디로 동정되었다.

표 1

No.	분석항목	API 20C AUX
1	대조군(control)	-
2	글루코스 동화작용(glucose assimilation)	+
3	글리세롤 동화작용(glycerol assimilation)	+
4	2-케토-D-글루콘산염 동화작용 (2-keto-D-gluconate assimilation)	+
5	아라비노스 동화작용(arabinose assimilation)	+
6	자일로스 동화작용(xylose assimilation)	+
7	아도니톨 동화작용(adonitol assimilation)	+
8	자일리톨 동화작용(xylitol assimilation)	-
9	갈락토스 동화작용(galactose assimilation)	+
10	이노시톨 동화작용(inositol assimilation)	-
11	소르비톨 동화작용(sorbitol assimilation)	+
12	α-메틸-D-글루코사이드 동화작용 (α-methyl-D-glucoside assimilation)	+

13	N-아세틸-D-글루코사민 동화작용 (N-acetyl-D-glucosamine assimilation)	+
14	셀로비오스 동화작용(cellobiose assimilation)	+
15	락토스 동화작용(lactose assimilation)	-
16	말토스 동화작용(maltose assimilation)	+
17	사카로스 동화작용(saccharose assimilation)	+
18	트레할로스 동화작용(trehalose assimilation)	+
19	멜레지토스 동화작용(melezitose assimilation)	+
20	라피노스 동화작용(raffinose assimilation)	+
21	균사(hyphae)	-

[0057] 실시예 3: 신규 효모 Y-2의 고온 성장성 및 바이오매스로부터 유래하는 다양한 탄소원에 대한 이용가능성

[0058] 상기 균주는 고온에서 생장이 가능한 효모로 분리되었으므로, 고온에서의 성장성을 확인하기 위하여, 중온 및 고온 조건에서의 성장을 비교 확인하였다. YPD(효모 추출물 1%, 펩톤 2%, 글루코스 2%) 액체배지(broth) 3 ml에 상기 균주를 접종하여 시험관 내에서 24시간 동안 배양한 뒤 O.D.가 1이 되도록 희석하고, 연속희석(serial dilution)하여 희석 배율대로 YPD 한천 플레이트에 10 µl 씩 떨어뜨린 후, 각각의 온도조건(30, 37 및 42℃)에서 48시간 동안 배양하였다. 이때, 대조균주로서는 대표적인 고온 효모로 알려진 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*)와 오타당 및 옥탄당을 모두 효율적으로 이용하여 에탄올 발효할 수 있는 균주로 알려진 피키아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 대표적인 에탄올 발효균주인 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 같이 배양하였다. 또한 셀룰로스계 바이오매스를 분해하여 생산될 수 있는 단량체 형태의 탄소원에서의 성장도 확인하였다. 상기 실험은 YP 배지에 탄소원만 달리 첨가하여 상기한 바와 동일한 방법으로 30℃에서 48시간 동안 배양하여 성장여부를 확인하고 해당 탄소원을 이용하는지 확인하였다. 상기 탄소원으로는 셀룰로스계 바이오매스를 분해할 때 형성되는 주요 단량체 성분인 글루코스, 갈락토스, 만노스(mannose), 아라비노스, 자일로스, 셀로비오스를 사용하였다.

[0059] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 균주는 중온인 30℃에서 뿐만 아니라 37℃와 42℃의 고온조건에서도 *K. 마르시아누스*와 유사한 수준의 뛰어난 성장율을 나타내었다. 이로부터 본 발명의 신규한 Y-2 균주는 고온에서도 성장가능한 고온 효모임을 확인하였다.

[0060] 또한, 바이오매스 유래의 다양한 당에 대한 이용 가능성을 확인하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061] 도 3에서 확인된 바와 같이, 본 발명의 Y-2 균주는 오타당과 옥탄당 모두를 이용하여 성장하였다. 대조균으로 사용된 균주인 *P. 스티피티스* 역시 제시된 모든 당류를 이용하여 성장하였으나, 37℃ 이상의 고온에서 성장능이 급속히 저하되었다(PS; 도 2). 한편, *K. 마르시아누스*는 고온에서 성장능은 뛰어난 반면(17555; 도 2), 아라비노스 또는 자일로스와 같은 오타당을 이용율이 낮을 뿐만 아니라, 이당형태의 탄소원인 셀로비오스의 이용율도 현저히 낮게 나타남을 확인하였다(17555; 도 3). 또 다른 대조균인 에탄올 발효 균주인 *S. 세레비지*에는 고온에서의 성장율도 낮을 뿐만 아니라 옥탄당을 제외한 오타당 및 이당형태의 탄소원을 이용한 생장이 불가함을 확인하였다(Y2805; 도 2 및 도3). 따라서, 본 발명의 신규한 Y-2 균주는 고온성인 동시에, 셀룰로스계 바이오매스로부터 유래하는 모든 종류의 당 즉, 오타당 및 옥탄당을 모두 이용하는 균주임을 확인하였다.

[0062] 실시예 4: 신규 효소 Y-2의 에탄올 발효능 및 온도에 따른 에탄올 발효

[0063] 상기 균주의 에탄올 발효능을 확인하기 위하여, 24시간 동안 5 ml의 YPD에 상기 균주를 접종하여 종균배양한 뒤, 500 ml 배플플라스크(baffle flask)에 100 ml의 에탄올 발효용 배지(글루코스 4.5%, 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 황산암모늄 0.2%, 황산 마그네슘 0.04%)를 취하여 상기 종균배양액을 접종한 뒤 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하면서, 약 8시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률과 탄소원 잔여량 및 에탄올 생산량을 측정하였다. 세포 성장률은 흡광도(O.D.)로 측정하였고, 탄소원 잔여량과 에탄올 생산량은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 정량하였다. 또한 에탄올 발효능을 비교하기 위하여 상기 신규 균주 뿐만 아니라, 기존에 에탄올 발효능이 뛰어난 균주로 알려진 *S. 세레비지*와 *P. 스티피티스*를 이용한 발효를 함께

수행하였다. 시료 채취는 균주가 정체기에 들어가는 약 40시간까지 이루어졌다.

[0064] 그 결과는 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 Y-2 균주는 다른 에탄올 발효 균주와 비교하여 약 24시간만에 O.D. 값이 최대값에 이르렀으며, 40시간 후에는 45 g/L의 글루코스를 모두 소비하여 약 20 g/L의 에탄올을 생산하였다. 이는 탄소원으로부터 약 44%의 전환율로 에탄올을 생산하는 것으로써, 각각 48% 및 46%의 에탄올 전환율을 나타내는 공지된 에탄올 발효균인 *S. 세레비지에*와 *P. 스티피티스*와 비슷한 수준의 에탄올 전환율을 나타내는 것이다. 이로부터 상기 본 발명의 신규한 균주인 Y-2는 뛰어난 에탄올 발효능을 갖는 균주임을 확인할 수 있었다.

[0065] 한편, 상기 균주는 고온에서 생존 가능한 효모이므로, 이러한 고온조건에서 에탄올 발효능을 갖는지 확인하기 위하여, 온도를 변화시키면서 온도에 따른 에탄올 발효능을 확인하였다. 에탄올 발효조건은 상기 명시된 바와 동일하며, 온도만 달리하여 수행하였다. 각각 30, 35 및 40℃에서 수행하여 중온 및 고온에서의 에탄올 발효능을 확인하였다.

[0066] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 각각 40 g/L의 글루코스를 첨가하여 30, 35 또는 40℃에서 에탄올 발효를 수행하였을 때, 상기 결과와 마찬가지로 약 40시간 배양시 균주가 정체기에 들어가는 것이 확인되었으며, 이때, 생성된 에탄올의 농도는 각각 30℃에서 약 19 g/L, 35℃에서 17.5 g/L, 40℃에서 9 g/L로 측정되었다. 이를 탄소원으로부터 에탄올로의 전환율로 환산하면 각각 47.5%, 43.7%, 22.5%에 해당하는 것으로, 이는 본 발명의 Y-2 균주는 고온에서도 글루코스를 탄소원으로 이용하여 에탄올 발효가 가능한 균주임을 나타낸다. 40℃에서 에탄올 전환율은 22.5%로 30℃ 및 35℃에서 보다는 낮은 수준이나, 고온균이라는 장점을 가지므로 바이오매스를 당화하는 과정에 적용가능할 것이라는 이점이 있다.

[0067] **실시예 5: 신규 효모 Y-2의 오타당 이용 가능성**

[0068] 상기 실시예 3에서 본 발명의 Y-2 균주가 오타당을 탄소원으로 활용할 수 있음을 자일로스와 아라비노스를 이용한 성장실험을 통해 확인하였으므로, 자일로스 활용능력을 다른 효모균주와 비교하였다. 자일로스를 이용하여 에탄올 발효하는 균주로 알려진 *P. 스티피티스*, 바이오매스를 이용한 발효균주로 알려진 *S. 세레비지에* 및 고온 에탄올 발효균주로 알려진 *K. 마르시아누스*를 대상으로 자일로스 이용 가능성을 평가하였다. 각각의 균주를 5 ml의 YPD에 접종하여 24시간 동안 중균배양한 뒤, 100 ml의 자일로스 발효용 배지(자일로스 4.5%, 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 황산 암모늄 0.2%, 황산 마그네슘 0.04%)를 포함하는 500 ml 배플플라스크에 중균배양액을 접종하고, 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하며 약 8시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률 및 자일로스 잔여량을 측정하였다. 이때, 세포 성장률은 O.D.로 측정하였고, 자일로스 잔여량은 HPLC를 이용하여 정량하였다.

[0069] 그 결과는 도 6에 나타내었으며, *P. 스티피티스*가 가장 높은 자일로스 섭취율(uptake)을 나타내었으며, 세포 성장률도 가장 높아서 36시간 이후에는 정체기에 들어가는 것으로 확인되었다. 본 발명의 Y-2 균주의 경우, *P. 스티피티스*에 비해서는 다소 낮은 수준을 나타내기는 하였으나, *S. 세레비지에* 및 *K. 마르시아누스* 보다는 높은 자일로스 섭취율을 나타내었다. 또한, 본 발명의 균주는 지속적으로 성장하여 O.D. 28에 이를 정도로 현저한 세포 성장률을 나타내었다.

[0070] 한편, 상기 결과로부터 *S. 세레비지에* 및 *K. 마르시아누스*는 자일로스 이용능력이 거의 없음을 확인하였다.

[0071] 종합하면 본 발명의 Y-2 균주는 자일로스를 이용한 세포 성장률이 월등하고 따라서 셀룰로스를 바이오매스의 당화산물인 오타당을 이용한 발효가 가능할 것으로 예측가능하며, 이는 셀룰로스를 바이오매스 당화산물을 이용한 발효균주로의 활용이 가능함을 나타내는 바이다.

[0072] **실시예 6: 신규 효모 Y-2의 자일로스를 이용한 발효 및 자일리톨의 생산**

[0073] 상기 실시예 5에서 확인한 바와 같이, 본 발명의 Y-2 균주는 오타당인 자일로스 이용능력이 있는 효모이므로, 상기 균주가 자일로스를 이용하여 에탄올 발효 또는 그 밖의 다른 물질을 생산하는 능력을 가지는지 확인하기

위하여 자일로스를 탄소원으로 이용하는 발효를 수행하였다. 구체적으로, 상기 균주를 5 ml의 YPD에 접종하여 24시간 동안 중균배양한 뒤, 100 ml의 자일로스 발효용 배지(자일로스 2%, 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 황산 암모늄 0.2%, 황산 마그네슘 0.04%)를 포함하는 500 ml 배플플라스크에 중균배양액을 접종하고, 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하며 약 12시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률, 자일로스 잔여량, 에탄올 생산량 및 자일리톨 생산량을 측정하였다.

[0074] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 배양 72시간 후부터 0.D. 값이 일정해지는 정체기에 들어서는 것을 확인하였으며, 이때 자일로스의 소모량은 약 12 g/L이며, 에탄올은 생산되지 않았으나 7.5 g/L의 자일리톨이 생산되었다. 이로부터 계산된 자일로스로부터 자일리톨로의 전환율은 약 62.5%에 해당하며, 이는 자일로스에서 자일리톨로의 높은 전환율을 갖는 대표적인 균주로 알려진 *P. 길리에르몽디*와 비교하기 위하여 1995년 Roberto 등에 의해 보고된 70%, 1991년 Meyrial 등에 의해 보고된 75% 전환율을 고려할 때, 본 발명의 균주 역시 자일리톨 합성율이 뛰어난 균주임을 확인하였다.

[0075] 이로부터, 본 발명의 균주는 자일로스를 이용하여 에탄올을 생산하지는 않으나 높은 자일리톨 생산성을 갖는 것으로 자일리톨 생산균주로서 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0076] **실시예 7: 신규 효모 Y-2의 글루코스와 자일로스 혼합 기질을 이용한 발효 및 에탄올과 자일리톨의 생산**

[0077] 상기 실시예 4 및 6에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 Y-2 균주는 탄소원으로써 육탄당 또는 오탄당이 각각 공급되는 시스템에서 글루코스를 이용하여 에탄올 발효를 수행하고, 자일로스를 이용하여 자일리톨을 생산할 수 있음을 확인하였다. 그러나, 일반적인 경우 리그노셀룰로스계 바이오매스를 당화시키는 경우, 생산물로서 육탄당인 글루코스와 오탄당인 자일로스가 공존하는 혼합물을 제공함을 고려하여, 글루코스와 자일로스의 혼합기질을 효율적으로 이용할 수 있는지 확인하고자 글루코스 및 자일로스 혼합물을 이용한 발효를 수행하였다.

[0078] 구체적으로, 상기 균주를 5 ml의 YPD에 접종하여 24시간 동안 중균배양한 뒤, 500 ml 배플플라스크에 글루코스와 자일로스를 포함하는 발효용 배지(글루코스 2.5 %, 자일로스 2.5%, 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 황산 암모늄 0.2%, 황산 마그네슘 0.04%) 100 ml을 포함하는 중균배양액을 접종하고, 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하며 약 8시간 내지 12시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률, 글루코스 및 자일로스의 잔여량, 에탄올 생산량 및 자일리톨 생산량을 측정하여 도 8에 나타내었다.

[0079] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 각각 25 g/L의 동일한 양으로 글루코스와 자일로스를 공급하였을 때, 약 18시간 경과 후 글루코스를 완전히 소모하여 약 10 g/L의 에탄올을 생산하였다. 이때, 자일로스의 소모량은 적었으나, 글루코스가 완전히 소진된 18시간 이후부터 급격히 자일로스 소모량이 증가하면서 자일리톨 생산을 증가시켰다. 최종적으로 발효시작 후 약 70시간 정도에 자일로스가 고갈되었으며, 이때 생성된 자일리톨의 양은 7.5 g/L였다.

[0080] 상기 결과를 종합하여 보면, 본 발명에 따른 신규 균주 Y-2는 오탄당과 육탄당의 혼합기질에서 두 기질을 모두 이용하여 각각 에탄올과 자일리톨을 생산할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0081] **실시예 8: 신규 효모 Y-2의 리그노셀룰로스계 바이오매스를 기질로 이용한 발효 및 에탄올과 자일리톨의 생산**

[0082] 본 발명자들은 상기 실시예 7로부터, 본 발명에 따른 Y-2 균주는 오탄당과 육탄당을 동시에 사용하여, 육탄당으로는 에탄올 발효를, 오탄당으로는 자일리톨 생산을 할 수 있음을 확인하였다. 나아가, 오탄당과 육탄당의 혼합물인 리그노셀룰로스계 바이오매스의 당화 생성물을 기질로 사용하여 에탄올과 자일리톨을 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0083] 구체적으로, 최근 말레이시아에서 폐기물로 취급되다가 재사용 가능한 재생자원으로 인식되기 시작한 팜부산물 즉, 빈 과실다발(empty fruit bunch; EFB)을 당화시켜 생성된 물질을 기질로 사용하여 발효를 수행하였다. 상기 균주를 5 ml의 YPD에 접종하여 24시간 동안 중균배양하였다. 500 ml 배플플라스크에 100 ml의 EFB를 첨가한 발효용 배지(EFB 5 %, 효모 추출물 0.5%, 펩톤 0.5%, 황산 암모늄 0.2%, 황산 마그네슘 0.04%)를 취하여 노보자임사의 Cellic[®] CTec(aggressive cellulases and high level of β -glucosidase)과 Cellic[®] HTec(endoxylanases)

e)의 7:3의 비율로 혼합한 30 여과지 유닛(filter paper unit)의 당화효소를 이용하여 50℃에서 약 18시간 동안 당화시켰다. 그 다음 온도를 30℃로 낮추어 상기 중간배양액을 접종하고, 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하며 약 8시간 내지 12시간 간격으로 시료를 채취하여 글루코스 및 자일로스의 잔여량, 에탄올 생산량 및 자일리톨 생산량을 측정하였고, 그 결과를 도 9에 나타내었다. 도 9의 그래프에서 x 축은 당화시간을 포함한 총 인큐베이션 시간을 나타내는 것으로, 18시간에 Y-2를 접종하여 18시간 이후로 이에 의한 발효가 진행되었다.

[0084] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 18시간까지는 당화효소에 의해 글루코스 및 자일로스가 생성되면서 각각 27.5 g/L 및 12 g/L 수준까지 빠르게 증가하였으며, 균주를 접종하고 나서 글루코스를 빠르게 소모하여 24시간 이후(총 42시간)에는 생성되었던 글루코스를 모두 이용하여 총 16 g/L의 에탄올을 생성하였으며, 이후 자일로스의 소모가 증가하면서 72시간(접종 후 54시간) 무렵까지 대부분의 자일로스를 소모하여 총 4.5 g/L의 자일리톨을 생산하였다. 이로부터 상기 실시예 7에서 글루코스와 자일로스 혼합물을 기질로 사용한 경우와 동일한 경향을 나타냄을 확인하였다.

[0085] 따라서, 리그노셀룰로소계 바이오매스를 당화시켜 생성되는 오타당 및 옥탄당을 모두 이용하여 에탄올 및 자일리톨로 전환할 수 있음을 확인하였다.

[0086] **실시예 9: 신규 효모 Y-2의 발효 폐액 내의 자일로스를 이용한 발효 및 자일리톨의 생산**

[0087] 상기 실시예 6으로부터 본 발명에 따른 Y-2 균주는 자일로스로부터 자일리톨을 생산 가능한 균주임을 확인하였다. 이에 따라, 일반적으로 에탄올 발효를 진행하면서 발생하는, 자일로스를 주성분으로 포함하는, 발효 폐액을 이용하여, 상기 발효 폐액에서의 균주의 성장 가능성 및 이로부터 자일리톨의 생산 가능성을 확인하였다. 이를 확인하기 위한 발효 폐액으로는 돼지감자 및 억새를 이용하여 에탄올 발효를 진행한 후 증류를 마친 폐액을 사용하였다. 상기 2종의 발효 폐액의 성상을 하기 표 2에 나타내었다.

[0088] 표 2에 나타난 바와 같이, 돼지감자 폐액이 자일로스 함량은 다소 낮은 반면, 총 질소 함량은 더 높았다.

표 2

	돼지감자	억새
pH	5.7	4.7
총 질소(g/L)	2.56	1.7
자일로스(g/L)	19.4	25

[0090] 구체적으로, 상기 균주를 200 ml의 YPD에 접종하여 24시간 동안 중간배양하여 준비하였다. 5 L 자 발효기(jar fermentor)에 900 ml 돼지감자 발효 폐액과 400 ml 증류수를 넣고 멸균한 후, 상기 중간배양액을 접종하여 30℃에서 180 rpm, 1 vvm, pH 6의 조건으로 진탕배양하였다. 8시간 간격으로 시료를 채취하여 자일로스의 잔여량 및 자일리톨 생산량을 측정하여 도 10에 나타내었다.

[0091] 또한 억새 폐액을 이용하는 경우 증류수로 희석하지 않고 1.95 L의 폐액 자체를 멸균하고, Y-2 배양액 2L를 원심분리하여 수득한 총 균량을 50 ml 증류수에 현탁하여 접종하였다. 이와 같이 초기 접종량이 많은 조건을 고려하여 상기 돼지감자 발효 폐액과 동일한 조건으로 진탕배양하되 공급되는 공기의 양을 0.5 vvm으로 조절하여 자일리톨 생합성률을 향상시켰다. 상기 배양을 유지하면서 약 8시간 간격으로 시료를 채취하여 세포 성장률, 자일로스의 잔여량 및 자일리톨 생산량을 측정하여 도 11에 나타내었다.

[0092] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 돼지감자 폐액을 기질로 사용한 경우 12 g/L의 자일로스를 24시간 이내에 모두 소모하여 약 6.5 g/L의 자일리톨을 생산하였다. 이는 약 54.2%의 전환률에 상응하는 결과였다.

[0093] 또한 도 11에 나타난 바와 같이, 억새 폐액을 기질로 사용한 경우 약 80시간에 걸쳐 25 g/L의 자일로스를 모두 소모하여 약 17 g/L의 자일리톨을 생산하였다. 이때, 자일로스의 자일리톨로의 전환률은 68%이었다. 또한 세포 성장률은 다소 증가한 후 일정 수준을 유지하였다. 이로부터 낮은 DO(dissolved oxygen) 조건(1 vvm 대 0.5 vvm)에서는 자일로스를 세포 성장에 이용하기 보다, 자일리톨로 전환시키는 방향으로 보다 많이 이용함을 확인하였다. 이는 DO 수치를 조절하여 전환률을 보다 향상시킬 수 있음을 나타내는 바이다.

[0094] 종합적으로, 버려지는 발효 폐액 내의 오타당을 재활용하여 고부가가치의 자일리톨을 생산할 수 있음을 확인하

였으며, DO 등의 배양조건을 조절하여 자일리톨 전환율을 보다 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0095]

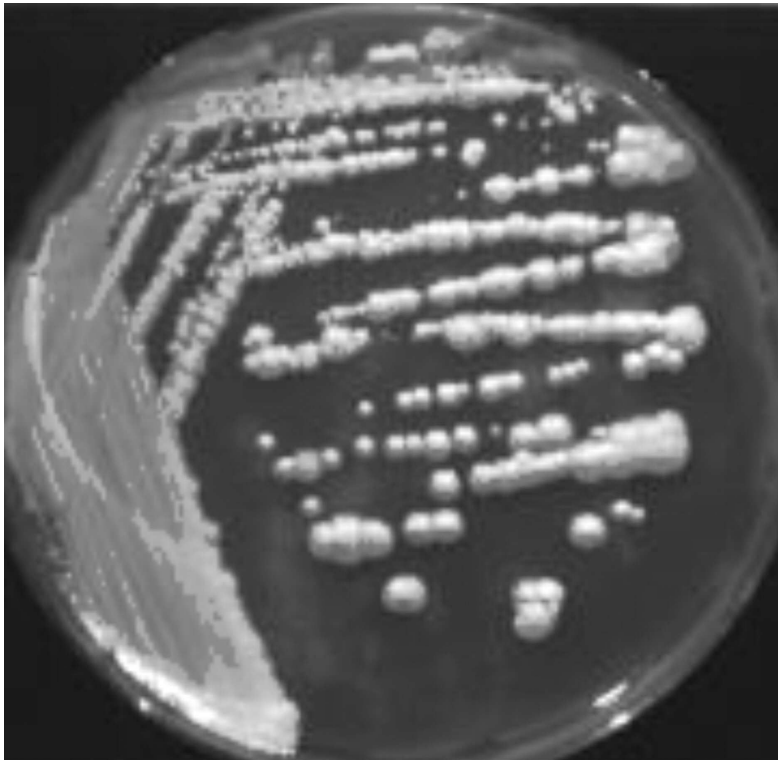
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터

수탁번호 : KCTC12322BP

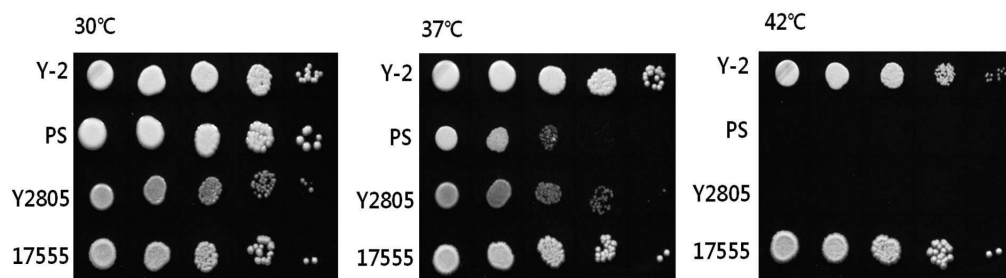
수탁일자 : 20121123

도면

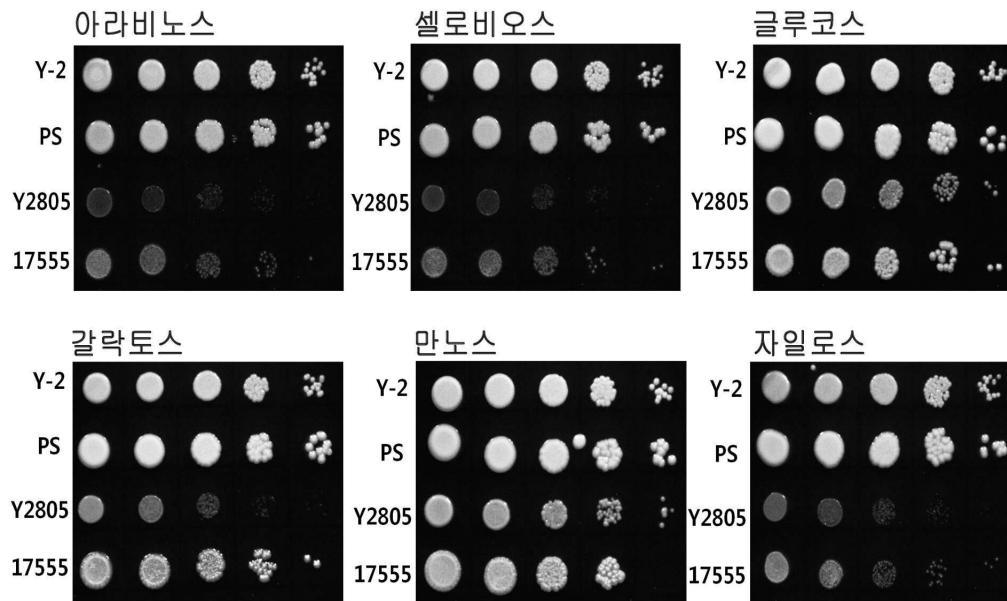
도면1



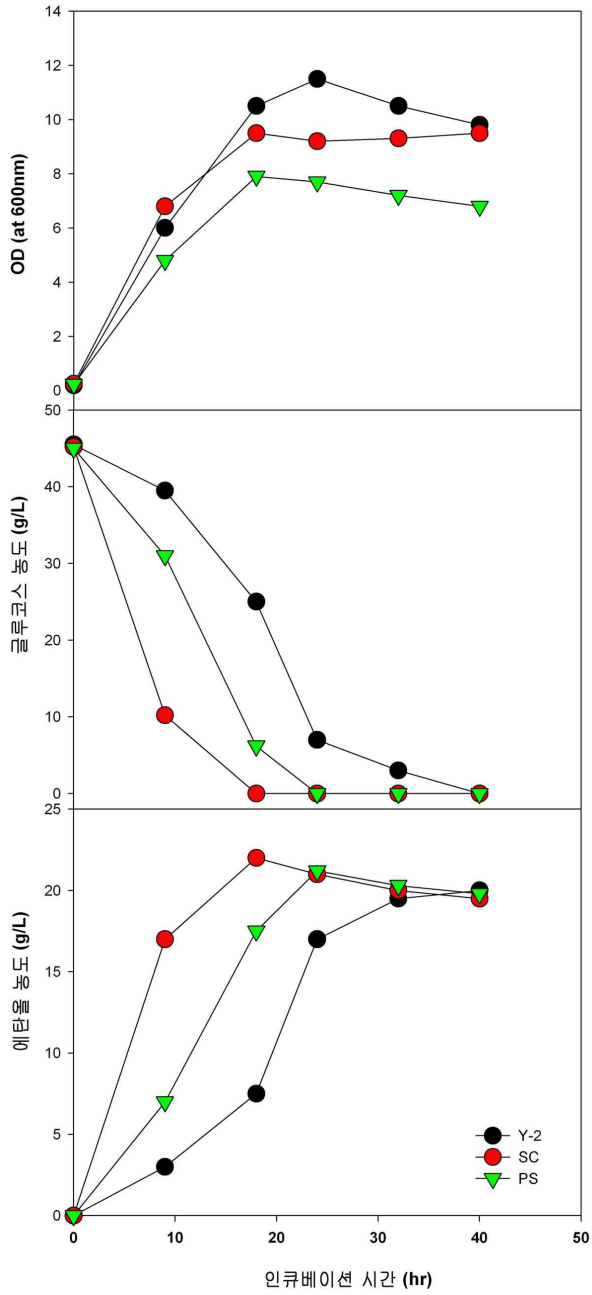
도면2



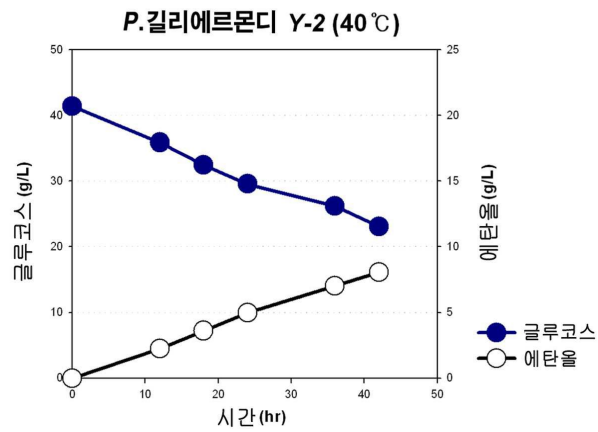
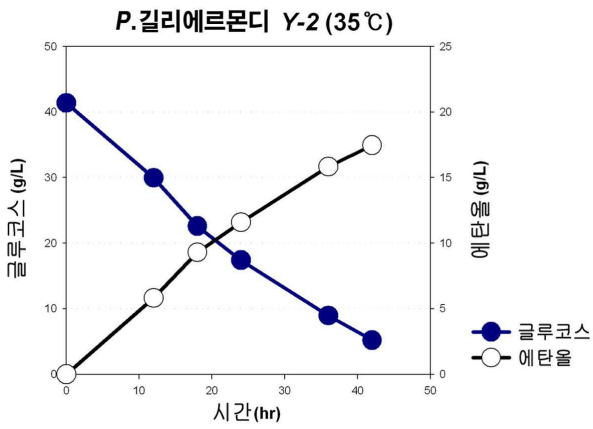
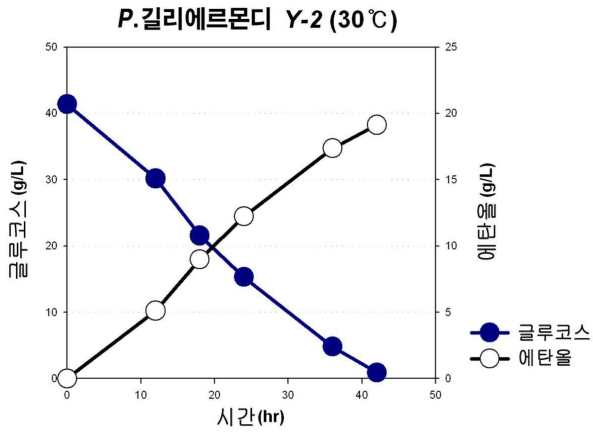
도면3



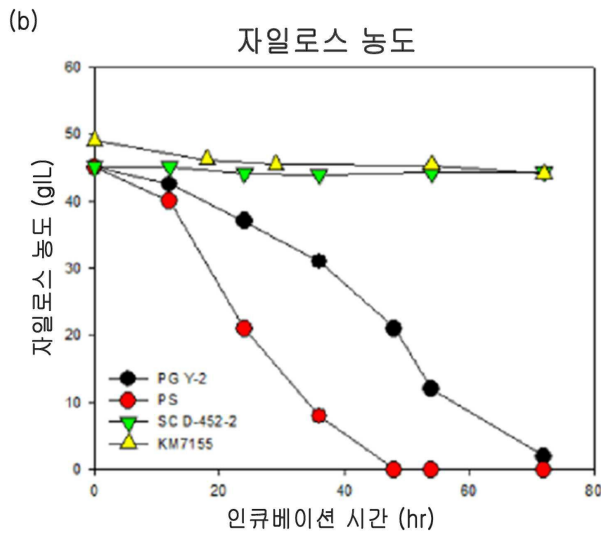
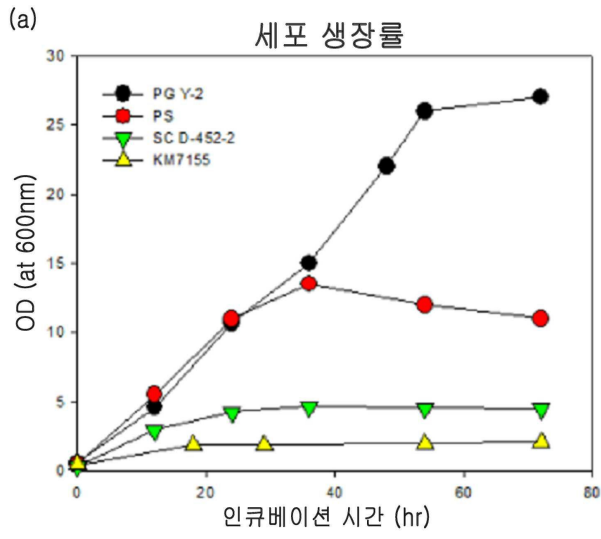
도면4



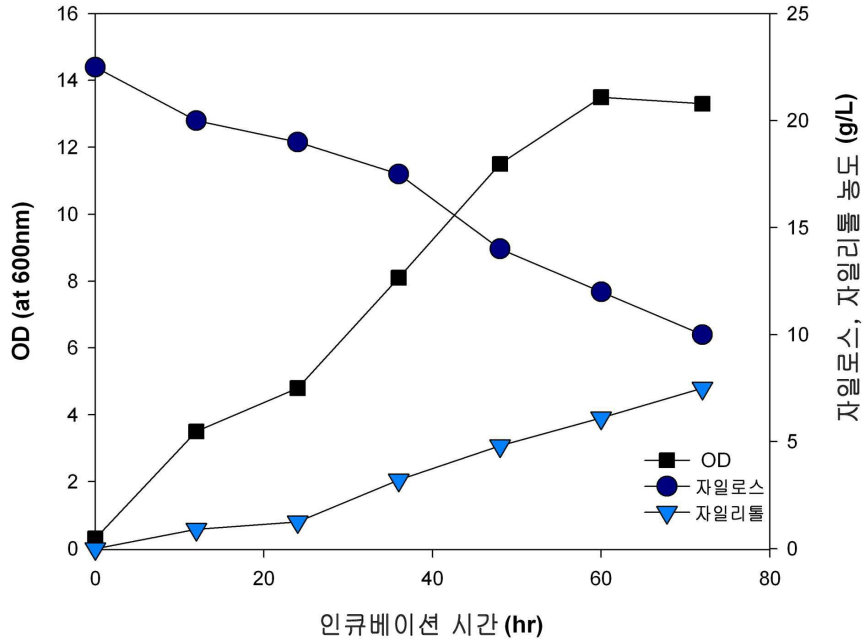
도면5



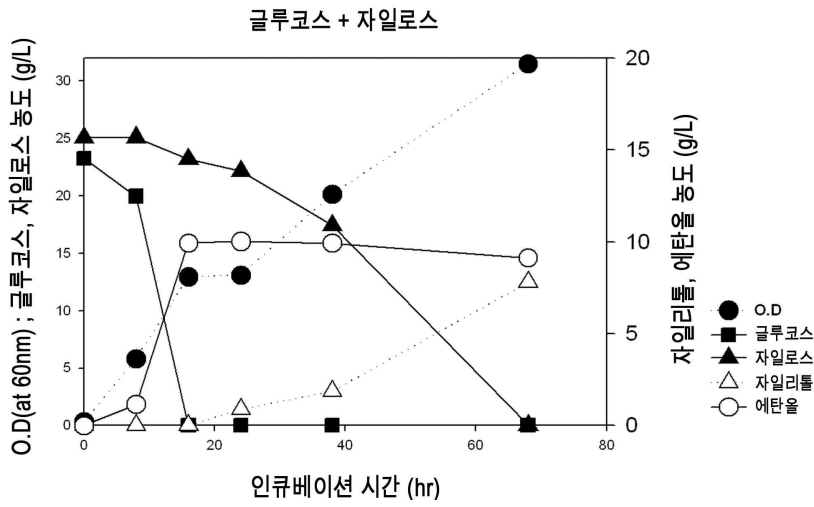
도면6



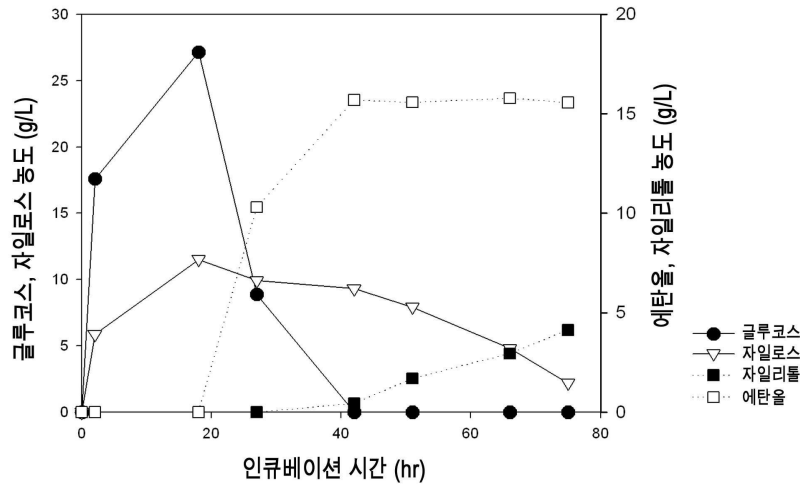
도면7



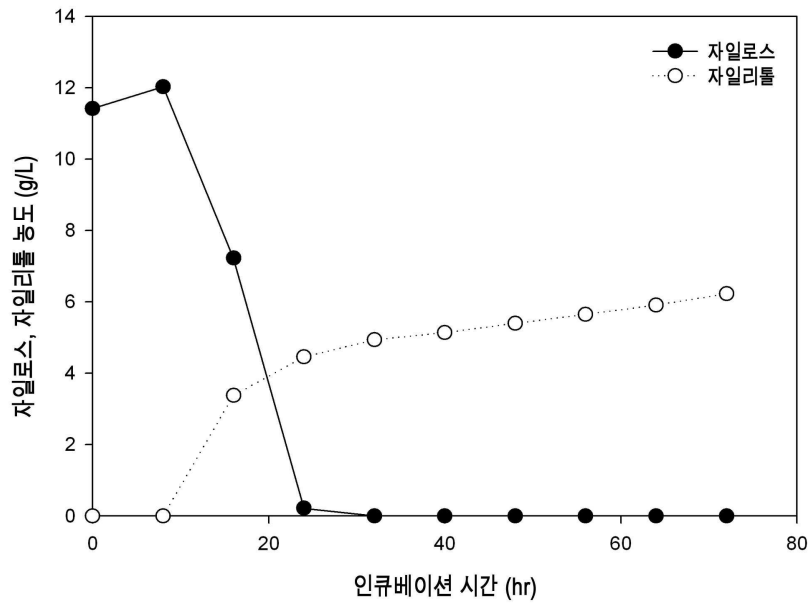
도면8



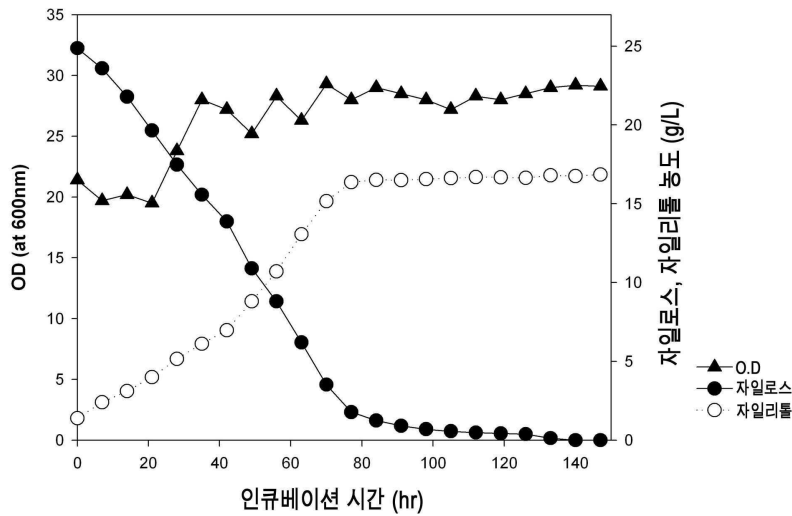
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A novel thermostable yeast *Pichia guilliermondii* Y-2 and use thereof
- <130> PA131014/KR
- <150> 10-2012-0135583
- <151> 2012-11-27
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1102
- <212> DNA
- <213> *Pichia guilliermondii* Y-2
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1102)
- <223> ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA
- <400> 1

aaaaancnnt gcagcgcgctta ctgcgcggcg aaaaccttac acacagtgtc ttttgatac 60

agaactcttg ctttggtttg gcctagagat aggttgggcc agaggtttaa caaacacaa 120

tttaattatt ttacagtta gtcaaat ttt gaattaatct tcaaaacttt caacaacgga 180

tctcttggtt ctgcacatga tgaagaacgc agcgaatgc gataagtaat atgaattgca 240

gattttcgtg aatcatcgaa tctttgaacg cacattgcgc cctctggtat tccagagggc 300

atgcctgttt gagcgtcatt tctctctcaa acccccgggt ttggtattga gtgatactct 360
tagtccgact aggcgtttgc ttgaaaagta ttggcatggg tagtactgga tagtgctgtc 420
gacctctcaa tgtattaggt ttatccaact cgttgaatgg tgtggcggga tatttctggt 480

attgttgcc cggccttaca acaaccaaac aagtttgacc tcaaatcagg taggaatacc 540
cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaaaagaac caacaggat tgccttagta 600
gcgcgagtg aagcgcaaa agctcaaatt tgaatctgg cgccttcggg gtccgagtg 660
taatttgaag attgtaacct tggggttggc tcttgtctat gtttcttga acaggacgtc 720
acagagggtg agaatcccgt gcgatgagat gcccaattct atgtaagggt ctttcgaaga 780
gtcgagttgt ttgggaatgc agctctaagt gggtggtaaa ttccatctaa agctaaatat 840
tggcgagaga ccgatagcga acaagtacag tgatggaaaa gatgaaaaga actttggaaa 900

agagagtga aaaagtacgt gaaaatggtt gaaaagggga aggggtttga agaacaagac 960
tcngatattt tggtaagcc cttgnccttc ngtggncggg ggtggaccn ccaanctta 1020
tcgggncca gccatcngg tttngggcgc ggttaaggaan aangggcngt aaggaantgt 1080
gnacctttac cttccggggg aa 1102

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ITS1 primer
<400> 2
tccgtagtg aacctgagg 19

<210>
> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> LR3R primer
<400> 3
ggtccgtgtt tcaagac 17