

農産廢資源의 微生物學的 利用에 관한 研究

(第11報) 纖維質資源에서 Ethanol 및 Xylose 의 生産

金炳弘 · 裨 武

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

(1979년 4월 5일 수리)

Studies on the Microbial Utilization of Agricultural Wastes

(Part 11) Production of Ethanol and Xylose by Simultaneous
Hydrolysis-Fermentation Using Cellulases and Yeast

Byoung. Hong Kim and Moo. Bae

Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea

(Received April 5, 1979)

Abstract

Ethanol and Xylose were produced from cellulosic agricultural waste such as rice straw and corn cob by a single-step simultaneous hydrolysis-fermentation process utilizing semi-solid culture of *Trichoderma* as enzyme source and *Saccharomyces* yeast. By this process all the hexoses produced by the enzyme were converted to ethanol leaving pentoses which are not fermented by the yeast.

By processing 50 g of rice straw, 18 ml of ethanol and 2.7 g of xylose were produced and 50 g corn cob produced 3.8 ml of ethanol and 10.8 g of xylose.

Alkali-treatment of rice straw showed little effects on the productivities of ethanol and xylose. The possible reasons are discussed.

緒 論

纖維素는 매년 植物의 炭素同化作用으로 매년 10¹¹ ton 이라는 막대한 量이 合成되는 有機物로 이를 利用하여 energy 食糧源 혹은 化學物質의 原料로 使用코자 많은 研究가 있었으며 現在도 進行중 에 있다. 이를 성취하기 위해 纖維素分解力이 강한 微生物을 直接 培養하여 菌體를 飼料 혹은 食糧으로 使用하거나 酸 또는 酵素로 分解시켜 構成 糖인 glucose 를 生産하여 이를 다시 利用하는 方法이 있다. 本研究室에서 셀룰로스 資源의 酸糖化⁽¹⁾ 및 直接醱酵法^(2~4)에 관한 보고가 있었다.

纖維素의 酵素分解에 依한 糖生産에 관한 많은 研究^(5~8)가 있었으며 이들 研究에서는 現在까지 cellulase 活性이 가장 강한 것으로 알려진 *Tricho-*

*derma*屬 糸狀菌의 extra-cellular enzyme 을 利用하였다. *Trichoderma* cellulase 는 酵素反應產物인 cellobiose^(9~10) 및 glucose^(11~12)에 依해서 강한 阻害作用을 받아 反應液 中の 糖濃度가 낮은 것으로 알려졌다. 이러한 product inhibition 을 극복하여 高濃度의 糖溶液을 얻기 위해 酵素反應系에 높은 濃度의 酵素를 使用하거나⁽¹²⁾ 阻害作用이 강한 cellobiose 를 分解하기 위해 β -glucosidase 를 첨가해 주는 方法⁽¹³⁾이 보고되었다. 또한 Ghose 등⁽¹⁴⁾은 ultra-filter 를 利用하여 酵素作用으로 生成된 glucose 및 cellobiose 를 선택적으로 反應系에서 除去하는 연속식 反應법을 시도하였으나 基質의 分解率을 增加시킬 수 있었으나 糖溶液의 濃度는 높일 수 없었다.

最近 Tagaki⁽¹⁵⁾등은 cellulase 反應系에 酵母를 同時에 作用시켜 生成되는 糖을 ethanol 로 醱酵시켜

product inhibition 을 除去하는 方法을 보고하였다.

本 研究에서는 土壤 分離菌 *Trichoderma* SPKF 7-2⁽¹⁰⁾ 및 *T. viride* 改良菌株인 *T. reesei* QM9414⁽¹⁷⁾를 利用해서 cellulase 를 生産해서 벗짚 및 옥수수속대 (corn cob)를 원료로 *Saccharomyces cerevisiae* 를 同時에 作用시키는 醱酵方法으로 處理하여 ethanol 과 xylose 를 同時에 生産하는 效果의인 方法을 보고한다.

材料 및 方法

使生菌株

cellulase 및 hemicellulase 生産菌으로 土壤 分離菌 *Trichoderma* sp. KI 7-2⁽¹⁶⁾ 및 *T. reesei* QM 9414⁽¹⁷⁾를 使用하였으며 *Saccharomyces cerevisiae* NC YC 478 을 alcohol 醱酵菌으로 使用하였다.

醱酵基質

Cellulose 및 hemicellulose 含有物로 벗짚, 옥수수속대 (corn cob) 및 solka-floc 을 사용하였다. 벗짚과 corn cob 는 hammer mill 로 분쇄하여 40 mesh 의 분말로 前處理없이 使用하거나 前報⁽²⁾의 方法에 따라 1N-NaOH 로 室溫에서 6時間 處理한 벗짚분말로 使用하였다.

酵素生産

酵素生産菌을 밀기울 固體培地(밀기울과 물을 1:1로 混合하여 121°C 에서 25분간 殺菌한 것)40 g 을 含有한 250 ml 三角 flask 에 接種하여 28°C 에서 7日間 培養하여 酵素源으로 使用하였다.

酵母 前培養

Malt-dextrose broth (malt ext. 1.5 %, dextrose 1.0 %, pH 4.5) 50 ml 을 含有한 250 ml 三角 flask 에 酵母를 接種하여 26°C 에서 3일간 진탕배양하여 酵母菌液으로 使用하였다.

Ethanol 醱酵

醱酵基質 50 g 을 수도수 300 ml 에 현탁시키고 KH₂PO₄ 0.3 g 을 加하고 5 N-HCl 로 pH 를 4.0 으로 조절하여 121°C 15 분간 加壓殺菌한 後 미리 준비한 酵素源인 밀기울 培養物 40 g 과 酵母液 50 ml 를 混合하여 26°C 에서 5일간 정치시켜 醱酵시켰다.

分析法

醱酵液 中の ethanol 含量은 AOAC 方法 11,006⁽¹⁸⁾에 따라 정량분석하였으며 還元糖은 前報⁽¹⁾의 方法에 따라 Somogyi-Nelson 法으로 D-xylose 를 표준물질로 比色定量하였다. 還元糖 中の xylose 및 arabinose 의 量은 前報⁽¹⁾의 方法에 따라 butanol-pyridine-H₂O (6:4:3 v/v) 용매계로 TLC 하여 aniline-H₂-phthalate 시약으로 發色시켜 Wilson⁽¹⁹⁾의 方法으로 分析하였다.

結果 및 考察

벗짚분말 및 solka-floc 의 醱酵

前處理하지 않은 벗짚과 solka-floc 을 基質로 하여 酵素源과 酵母液을 混合하여 醱酵시킨 결과 Table 1 과 같다. 벗짚을 原料로 한 醱酵液 中에 *T. reesei* 를 酵素源으로 使用한 것에 3.8 %의 ethanol 과 0.7 %의 還元糖이 축적되었으며 土壤 分離菌 *Trichoderma* sp. KI 7-2 를 使用한 實驗區에서는 그보다 높은 濃度 즉 4.3 %의 ethanol 과 0.8 %의 還元糖이 얻어졌으며 solka-floc 에서는 *T. reesei* 가 3.2 %, *Trichoderma* sp. KI 7-2 는 3.8 %의 ethanol 과 양자 모두 미량의 還元糖을 축적했다. 이 결과에서 土壤 分離菌 *Trichoderma* sp. KI 7-2 가 固體培養에서 *T. reesei* QM 9414 보다 높은 酵素活性을 나타내는 것을 알 수 있다.

Table 1. Simultaneous Hydrolysis-Fermentation of Cellulosic Materials.

Enzyme Source	Rice Straw		Solka-floc	
	Ethanol % v/v	Pentoses % w/v	Ethanol % v/v	Pentoses % w/v
<i>T. reesei</i> QM9414	3.8	0.7	3.2	trace
<i>Trichoderma</i> sp. KI7-2	4.3	0.8	3.8	trace

醱酵液 中の 還元糖을 TLC 로 分離한 結果 cellulose 의 酵素反應物인 glucose 혹은 cellobiose 의 存在가 확인되지 않았으며 全 還元糖이 pentose 인 xylose 와 arabinose 였다 (Fig. 1), Cellulose 를 *Trichoderma* cellulase 로 分解시킬 때 통상 glucose 와 cellobiose 가 2:1 의 比率로 生産되는 것으로 알려져 있으며⁽⁷⁾ ethanol 醱酵菌 *Saccharomyces cere-*

visiae 는 cellobiose 를 資化할 수 없다. *T. reesei* cellulase 를 使用하여 cellulose 를 分解시킬 때 *Aspergillus* 가 生産한 β -glucosidase 를 同時에 作用시켜 反應產物이 glucose 뿐이 있으며 cellulase 의 分解도 높았다는 보고⁽¹³⁾가 있다. 本 實驗에서 醱酵液 中에 cellobiose 가 축적되지않은 것은 生成된 glucose 를 ethanol 로 醱酵시켜 β -glucosidase 가 反應產物의 阻害를 받지않아 cellobiose 를 完全히 分解시키는 것으로 판단된다. 또한 cellobiose 는 cellulase 를 non-competitive inhibition 으로 그 活性을 저해하나⁽¹⁰⁾ 本 實驗 結果 Sternberg⁽¹³⁾ 등의 結

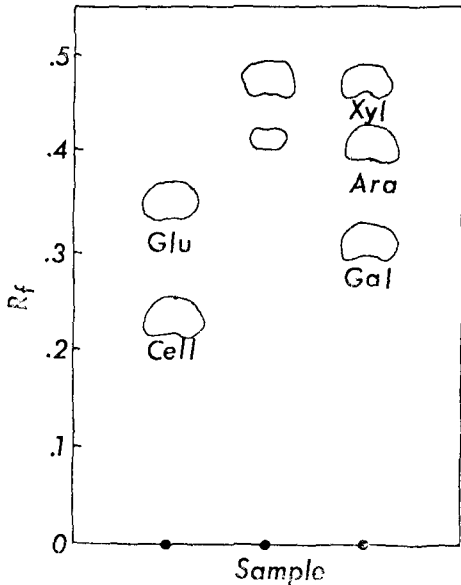


Fig. 1. Thin Layer Chromatogram of Sugars Produced from Rice Straw by Simultaneous Hydrolysis Fermentation Process.

Glu, Cell, Xyl, Ara and Gal represent D-glucose, D-cellobiose D-xylose, L-arabinose and D-galactose respectively.

과와 같이 cellobiose 의 축적이 없어 cellulase 活性이 높아 최종산물인 ethanol 의 量도 높아진 것으로 생각된다.

醱酵液 中の pentose 를 定量分析한 結果 95 %이상이 xylose 였으며 그 나머지는 全量 arabinose 였다. 이는 甘味料인 xylitol 의 生産에 使用되는 xylose 를 비교적 순수한 狀態로 얻을 수 있는 것으로 특히 저농도의 xylose 를 iso-propanol 로 회수하는 方法⁽²⁰⁾이 있어 경제적으로 중요한 副產物이

될 것이다

Alkali 處理 芻藎의 醱酵

芻藎분말을 1 N-NaOH 로 실온에서 6 시간 處理하고 5 N-HCl 로 中和하여 醱酵基質을 만들어 前實驗과 同一한 方法으로 醱酵시킨 結果 Table 2 와 같다. 이 結果를 前處理하지 않은 芻藎 醱酵와 비교할 때 pentose 生産量은 차이가 거의 없으며 ethanol 은 處理區에서 *T. reesei* 는 약 10 % *Trichoderma* sp. KI 7-2 는 약 20 % 많은 量이 生産되었다. 同一한 方法으로 處理한 芻藎를 *Cellulomonas* 屬 細菌의 醱酵基質로 使用했을 때 處理하지 않은 대조구보다 基質資化率이 2.5 倍以上인 것으로 보고되었으며⁽²⁾ *Trichoderma* cellulase Onozuka SS-1500으로 分解할 때 無處理區보다 分解率이 약 50 % 增加하는 것으로 보고되었다⁽²¹⁾ 以上の 結果를 종합하면 本 實驗方法으로 芻藎를 分解·醱酵할 경우 酵素分解 혹은 纖維素資化細菌의 培養 때보다 前處理의 效果가 적음을 알 수있다. 이는 이미 지적인 바와 같이 酵素作用으로 生産된 cellobiose 및 glucose 가 反應系로부터 除去되어 酵素活性이 反應產物의 阻害를 받지않아 處理하지 않은 基質도 쉽게 分解되는 것으로 생각된다. Cellulose 含有物質을 alkali 로 處理하면 lignin 이 溶出되고⁽²²⁾ cellulose 의 結晶度가 낮아진다⁽²³⁾. *Trichoderma* 屬 系狀菌은 lignin 分解力이 없으므로 本 實驗方法에서 alkali 處理의 效果가 酵素反應에서보다 낮은 것은 反應產物의 阻害가 없으면 結晶性 cellulose 로 *Trichoderma* cellulase 에 依해서 쉽게 分解됨을 알 수 있다. 이는 酵素反應產物인 cellobiose 혹은 glucose 가 cellulase 의 結晶度를 감소시키는 酵素活性, 즉 C_1 酵素의 活性을 強하게 阻害하는 것으로 해석된다.

Table 2. Simultaneous Hydrolysis-Fermentation of Alkali-Treated Rice Straw

Enzyme Source	Ethanol % v/v	Pentoses % w/v
<i>T. reesei</i> QM 9414	4.1	0.8
<i>Trichoderma</i> sp. KI7-2	5.2	0.7

옥수수속대의 醱酵

Pentose 를 高濃度로 얻기 위해 hemicellulose 의

함량이 높은 옥수수속대를 原料로하여 醱酵시킨 結果 Table 3과 같다. 예상했던 것과 같이 hexose의 함량이 낮아 ethanol의 生産量이 芻藳에서보다 적었으며 還元糖의 함량은 芻藳 醱酵液에서 보다 훨씬 높았다. 醱酵液의 還元糖을 TLC로 分離한 結果 Fig. 1과 비슷한 chromatogram을 얻었다. 즉, hexose 혹은 hexose의 uric acid의 存在가 확인되지 않았고 xylose와 arabinose의 spot만 나타났다. 이들을 Wilson의 方法으로 定量分析한 結果 xylose의 함량이 전체의 95% 이상이었다. Reilly⁽²⁴⁾에 依하면 옥수수속대의 hemicellulose中 D-xylose의 함량이 약 90%이며 그외에 L-arabinose, D-glucuronic acid, D-galactose 등으로 이루어져 있다고 보고되었다. 本實驗 結果 uronic acid 및 galactose가 醱酵液中에서 검출되지않은 것은 *Saccharomyces cerevisiae*가 이들을 資化했거나 그 量이 적어 TLC plate에서 發色되지 않은 것으로 판단된다.

Table 3. Simultaneous Hydrolysis-Fermentation of Corn-Cob.

Enzyme Source	Ethanol % v/v	Pentoses % w/v
<i>T. reesei</i> QM 9414	1.1	2.3
<i>Trichoderma</i> sp. KI7-2	1.3	3.1

要約

Cellulose 및 hemicellulose를 含有하는 芻藳 등 農産廢資源을 *Trichoderma*로 만든 Koji와 酵母를 同時에 처리하여 單一工程으로 ethanol과 xylose를 生産할 수 있었다. 芻藳 50g을 처리하여 ethanol 18 ml와 xylose 2.7g을 生産할 수 있었으며 옥수수속대 50g에서 ethanol 3.8 ml와 xylose 10.8g을 얻을 수 있었다. 이 處理에서 土壤 分離菌 *Trichoderma* sp. KI 7-2로 만든 Koji가 *T. reesei*의 그것보다 높은 酵素活性을 보였다. 芻藳의 alkali前處理는 ethanol 및 xylose의 生産에 큰 效果가 없었으며 이에 대하여 論하였다.

참고문헌

1) M. Bae, B.H. Kim and A.S. Yoon: Kor.

J. Appl. Microbiol. Bioeng., **1**, 31 (1973).
 2) M. Bae and B.H. Kim: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., **2**, 1 (1974).
 3) M. Bae and B.H. Kim: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., **2**, 79 (1974).
 4) Y.H. Kho, K.J. Lee and M. Bae: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., **5**, 119 (1977).
 5) N. Toyama and K. Ogawa: Biotechnol. Bioeng. Symp. **5**, 225 (1975).
 6) A.A. Huang: Biotechnol. Bioeng. Symp. **5**, 245 (1975).
 7) R.K. Andren and J.M. Nystrom: AIChE Symp. Ser. **72**, (158), 91 (1977).
 8) C.R. Wilke, U.V. Stockar and R.D. Yang: AIChE Symp. Ser. **72** (158), 104 (1977).
 9) T. Wood and S.I. McCare: in "Symp. on enzymic hydrolysis of cellulose" ed by M. Bailey *et al*, SITRA, Helsinki, p. 231 (1975)
 10) J.A. Howell and J.D. Stuck: Biotechnol. Bioeng. **17**, 873 (1975).
 11) N-Toyama and K. Ogawa: in "Fementation technology today" ed. G. Terui, Soc. Fermen. technol. Osaka. Japan p. 743 (1972).
 12) M. Katz and E. T. Reese: Appl. Microbiol. **16**, 419 (1968).
 13) D. Sternberg, P. vijayakumar and E. T. Reese: Can. J. Microbiol. **23**, 139 (1977).
 14) T.K. Ghose and J.A. Kostick: Biotechnol. Bioeng. **12**, 921 (1970).
 15) M. Takagi, S. Abe, S. Suzuki, G.H. Emert and N. Yata: in "Bioconversion of cellulosic substances to energy, chemical and microbial protein ed. T.K. Ghose, IIT, New Dehli, India p. 551 (1977).
 16) M. Bae, B.H. Kim and K.J. Lee: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **4**, 105 (1976).
 17) M. Mandels: Biotechnol. Bioeng. Symp. **5**, 81 (1975).
 18) W. Horwitz, P. Chichilo and H. Reynolds (ed): official methods of analysis of the association of official analythic chemists. 11th ed., p. 183 AOAC Washington DC (1970).
 19) S.M. Wilson: Anal. Chem. **31**, 1199(1959).
 20) J. Yashiro, K. Kinoshita, M. Kaneyasu, T.

- Oguma N. Moritani, K. Nakajima and J. Okabe: Japanese Kokai **78**, 59698 599 (1978).
- 21) M. Bae, K. J. Lee, S. M. Tack and B.H. Kim: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **6**, 1 (1978).
- 22) H. Tarkow and W.C. Feist: Adv. Chem. Ser. **95**, 197 (1969).
- 23) P. B. Marsh, G. V. Merola and M. E. Simpson: Textile Res. J. **23**, 831 (1953).
- 24) P. J. Reilly: Report No. ISO-ERI-Ames-77312, Eng. Res. Inst., Iowa State Univ., 83pp(1977).