

農産廢資源의 微生物學的 利用에 관한 研究

(第十二報) Ethanol 生産을 위한 Cellulose 含有物의 糖化法比較

金炳弘, 李貞允, 裴 武, 金成器*

韓國科學技術院 應用微生物研究室

*檀國大學校 文理大 食品營養學科

(1981년 2월 25일 수리)

Studies on the Microbial Utilization of Agricultural Wastes

(Part 12) Comparisions of Cellulolytic Methods for Ethanol
Production from Cellulosic Material.

B. Hong Kim, Jung Yun Lee, Moo Bae, Sung-Kih Kim*

Applied Microbiology Laboratory Korea Institute of Science and
Technology, Seoul, Korea

*Department of Food Science and Nutrition, Dan Kook
University, Seoul, Korea

(Received February 25, 1981)

Abstract

As a process to utilize agricultural residues, simultaneous hydrolysis-fermentation (SSF) was compared with fermentation of enzymic hydrolyzate using koji cultures of *Trichoderma* sp. KI 7-2 and a thermo-tolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 716. Cellobiose was not detected in SSF broth whilst 15 mg/ml of the disaccharide was found in enzymic hydrolysate of rice straw using the same enzyme source. It was found that converting glucose to ethanol in SSF process reactivated the cellobiase activity, which is inhibited by the accumulation of glucose in enzymic hydrolysis process. Cutting milled rice straw was fermented as effectively as ball milled one in SSF process. From the results discussions are made on the product inhibition mechanism of cellulolytic enzyme system.

序 論

農産廢資源을 포함한 cellulosic biomass를 微生物學的方法에 의해 代替 에너지 혹은 食糧資源으로 이용하고자 많은 연구가 進行되고 있으나¹⁻³⁾ cellulose의 分解가 어려워 현재까지 工業化된 예가 거의 없다. cellulose의 生化學的 分解에서 어려운 점은 cellulase의 活性이 낮아 酵素의 生産價가 전 工程에 필요한 비용의 60% 정도를 차지하

며⁴⁾ 分解過程에서 生産되는 反應產物이 cellulase의 活性을 阻害하므로 分解速度가 낮아지는 것이다. 酵素의 生産價를 낮추기 위해 *Trichoderma*屬 곰팡이를 이용하여 cellulase 高生産性 變異株가 개발되었다⁵⁻⁶⁾. 개발된 變異株는 菌體外 蛋白質을 菌體蛋白과 거의 같은 양으로 생산하나 cellulase 含量은 wild type의 3배정도 밖에 되지 않아 含量이 있는 것으로 생각되고 있다. 反應產物에 의한 cellulase 含量의 阻害를 막기위한 방법으로

cellulose의 酵素에 의한 分解時 酵母를 동시에 사용하는 同時 糖化—醱酵法이 研究되었다⁷⁾.

本研究에서는 同時 糖化—醱酵法과 糖化 및 糖化液의 醱酵法을 比較하였다.

材料 및 方法

使用菌株

Cellulose 生産菌으로 *Trichoderma* sp. KI7-2⁽⁸⁾와 耐熱性 ethanal 醱酵菌으로 *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 716을 사용하였다.

醱酵基質 및 前處理

벼짚을 cutting mill로 분쇄하여 40mesh의 분말로 處理없이 사용하거나 24시간 ball milling하여 사용하였다. 순수한 cellulose가 필요한 실험에서는 Avicel PH-101 (Brinkman Co., Westburg U.S.A.)을 사용하였다.

酵素生産

Cellulase 生産菌 *Trichoderma* sp. KI 7-2를 potato-dextrose agar slant에서 胞子를 생산하고 생리식염수를 가하여 胞子數가 2.4×10^7 /ml 되도록 현탁액을 만들어 4°C에서 보관하였다. 따로 밀기울과 벼짚의 3:2 혼합물과 무기염류용액(NaNO₃ 2.0, KH₂PO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, KCl 1.0 g/l, pH4.5)을 1:1로 혼합하여 121°C에서 20분간 殺菌한 배양기 10g당 胞子현탁액 1ml의 비율로 接種하여 28°C에서 7일간 培養한 koji를 酵素源으로 사용하였다. Whatman Filter Paper No. 1을 基質로 사용하여 Mandels 등⁹⁾의 방법으로 酵素活性를 측정할 때 酵素源 1g당 3.21 units였다.

酵母의 前培養

Malt-dextrose agar (malt extract 15, dextrose 10, agar 15g/l, pH4.5) slant에 30°C에서 24시간 배양한 酵母를 4°C에 보관하면서 필요할 때 동일한 조성의 液體培地에 接種하여 30°C에서 24시간 進糖배양하였다. 이때 菌體濃度는 4×10^8 cell/ml였다.

벼짚의 酵素糖化

基質 13g과 0.1M acetate buffer (pH4.5) 70ml를 혼합한 현탁액에 미리 준비한 酵素源인 koji를 10g 가하여 45°C에서 48시간 반응시켰다.

Ethanol 醱酵

Yeast extract.와 malt extract 각 1g/l를 함유하는 糖용액을 통상의 방법으로 殺菌하고 前培養한 酵母를 10%의 inoculum size로 接種하여 37°C에서 醱酵시켰다. 벼짚糖化液을 사용한 경우에는

yeast extract. 및 malt extract. 대신 KH₂PO₄를 1g/l 첨가하였다.

同時糖化—醱酵

250ml 3각 후라스크에서 0.1% KH₂PO₄ 용액 70ml (pH4.5)와 基質 13g의 현탁액을 만들어 殺菌하고 미리 준비한 koji 10g과 酵母培養液 10ml를 혼합하여 37°C에서 3일간 醱酵시켰다.

分析法

還元糖은 前報⁸⁾의 방법에 따라 Somogyi-Nelson法으로 분석하였다.還元糖을 분리 定量하기 위해 Wilson의¹⁰⁾ 방법으로 paper chromatography하여 비색 定量하였다. 또한 全糖은 H₂SO₄-phenol法¹¹⁾으로 定量하였다. Ethanol은 1/8 inch, 1m의 porapak Q column을 부착한 Varian 3700 gas chromatograph를 사용하여 분석하였다. 시료 1ml와 2.5% m-HPO₃ 용액 1ml를 혼합하여 10분간 靜置한 후 원심분리하여 상등액 중의 ethanol 함량을 flame ionization detector를 사용하여 定量하였다. 이 때 column 온도는 120°C였으며 carrier gas는 N₂를 40ml/min로 사용하였다.

結果 및 考察

벼짚의 酵素糖化

Ball mill로 처리한 벼짚을 *Trichoderma* sp. KI 7-2가 생산한 酵素로 糖化시키면서 매시간 채취한 시료 중의 glucose, cellobiose, xylose를 paper chromatography하여 Wilson의 방법에 의해 분리 定量한 결과 Fig. 1과 같다. 酵素反應速度가 반응

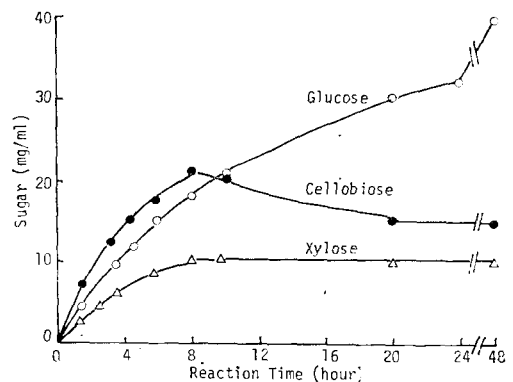


Fig. 1 Enzymic Hydrolysis of Rice Straw

Ball milled rice straw (13g) was suspended in 70ml of 0.1M acetate buffer pH4.5 and incubated in a water bath at 45°C after *T. viride* koji culture was added as an enzyme source

초기에는 일정하였으나 2시간 후에는 속도가 늦어졌다. Glucose의 생성속도를 보면 2시간까지는 일정하였으나 시간이 지날수록 속도가 낮아졌다. 이것으로 2시간 이후부터 생성물에 의한 저해가 나타나기 시작한다는 것을 알 수 있다. Xylan의 분해산물인 xylose는 8시간까지 증가하여 당화액 ml당 10mg 정도 생산되었으나 더 이상 증가하지 않았다. 이것은 원료 벚짚중 xylan의 분해가 비교적 쉽게되기 때문에 8시간 이내에 완전히 분해된 것으로 생각된다. 또한 cellobiose는 8시간까지는 증가하였으나 그 이후는 감소하였으며 24시간 후에도 당화액 중의 cellobiose는 glucose 양의 약 반가량 남아 있었다. 이러한 결과는 반응 초기에는 基質의 濃도가 충분히 높고 glucose나 cellobiose의 濃도가 낮아 cellobiase나 cellulase의 활성이 저해를 받지않아 cellobiose의 濃도가 酵素의 활성에 따라 평형을 이루게 되나 반응이 진행되면서 基質中 분해가 쉬운 부분이 거의 분해되고 glucose에 의해 cellobiase가 阻害를 받게되면 cellobiose의 生成速度보다 分解速度가 빨라 濃도가 감소하는 것을 나타낸다. 그리고 24시간 후에도 cellobiose가 남아 있는것은 glucose에 의한 cellobiase의 저해 혹은 본 酵素의 transglucosylation 활성때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 二糖類인 cellobiose는 酵母에 의해서 醱酵되지 않는 것으로 알려져 있으므로 糖化液을 ethanol로 醱酵시킬 때 생성된 糖의 1/3은 이용이 불가능하다는 것을 알 수 있다.

Glucose와 Cellobiose 혼합물의 醱酵

Cellulose 糖化液을 酵母로 醱酵시킬 때 醱酵되지 않는 것으로 알려진 cellobiose가 糖化液의 ethanol 醱酵에 미치는 영향을 보기위해 glucose와 여러가지 濃도의 cellobiose의 혼합물을 醱酵시켜 생성된 ethanal과 全糖을 精量하였다(Table 1).

Table 1 Fermentation of Glucose-Cellobiose Mixture by *S cerevisiae* NCYC 716 at 37°C for 24 Hours

Mixture (mg/ml)		Ethanol (ml/ml)	Residual sugar (mg/ml)
Glucose	Collobiose		
50	0	20.5	3.4
50	5	22.0	8.7
50	10	22.5	14.8
50	20	22.5	23.6
50	30	20.5	34.3

Ethanol 생성은 첨가한 cellobiose의 농도와는 관계없이 거의 일정하였고, 全糖分析結果 cellobiose는 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해 전혀 醱酵되지 않는 것을 알 수 있었다. 이런 결과는 ethanol 醱酵時 cellobiose가 아무런 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내고, cellulose 糖化液을 ethanol로 醱酵시켰을 때 糖化液 중의 糖을 완전히 이용하지 못한다는 것을 나타낸다.

벚짚 糖化液의 Ethanol 醱酵

Ball mill로 처리한 벚짚을 48시간 당화시킨 다음 분해되지 않고 남아있는 基質과 酵素源으로 사용한 koji 등 고형물을 제거한 후 autoclave로 殺菌하거나, Millipore filter HA (Millipore co., Bedford, U. S. A.)를 사용하여 除菌시킨 후 37°C에서 24시간 동안 醱酵시켰다. Control로 未糖化 基質과 酵素를 함유하는 糖化液을 역시 동일한 조건에서 醱酵시켰다(Table 2). 酵素活性和 基質이 남아 있는 control에서 酵素活性만 남아있는 membrane filter 한 것 혹은 酵素活性도 없는 autoclave 한 것보다 다소 많은 ethanol이 생성되었다. 또한 세가지 醱酵液을 paper chromatography 해본 결과 membrane filter 한 것과 control의 醱酵液에서는 cellobiose의 존재를 확인할 수 없었으나 autoclave 한 것의 醱酵液에서는 cellobiose가 남아있는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 cellobiase 활성이 glucose가 ethanol로 醱酵되어 阻害를 받지않아 계속 유지되기 때문에 autoclave 하지않은 糖化液의 경우 계속 반응이 진행되어 cellobiose가 분해된 것을 나타내며, 고형물을 제거하지 않은 control에서 membrane filter 한 糖化液에서 보다 많은 ethanol이 생성된 것은 cellobiose가 분해되어 cell

Table 2 Effect of Cellobiase Denaturation on the Ethanol Fermentation of rice Straw Hydrolysate

Hydrolysate	Ethanol (ml/ml)	Residual sugar (mg/ml)
Control	22.3	12.7
Membrane Filtered	20.0	10.3
Autoclaved	17.3	37.4

The rice straw hydrolysate was prepared by enzymic hydrolysis for 48 hours at 45°C using *T. viride* koji culture as the enzyme source. The hydrolysate was inoculated by *S. cerevisiae* NCYC 716 after it had been autoclaved to destroy enzyme activity or filtered through Millipore filter HA. Control was prepared without any treatment.

lulase의 活性阻害가 없으므로 未分解된 cellulose가 분해된 것으로 생각된다. 또한 *Trichoderma* sp. 균사 혹은 cellulase가 *Saccharomyces cerevisiae*의 醱酵能에 아무런 영향을 주지않는다는 것을 이상의 결과에서 알 수 있다.

同時 糖化-醱酵와 酵素糖化時 前處理의 영향

벼짚의 前處理가 酵素糖化 및 同時 糖化-醱酵에 미치는 영향을 보기 위해 cutting mill 한 벼짚과 ballmill 한 벼짚 각 13g을 酵素糖化 및 同時 糖化-醱酵法으로 생성된 還元糖과 ethanal을 각각 定量하였다(Table 3). Table에서 보는 바와 같이 基質을 ball mill 하면 酵素에 의한 糖化에서는 cutting mill 한 것 보다 多糖類의 분해가 53% 증가하였으나, 同時 糖化-醱酵로는 ethanol 生産에 2% 밖에 증가하지 않았다. 이상의 결과는 同時 糖化-醱酵法으로 cellulose를 醱酵시킬 때 結晶性 cellulose도 非結晶性 cellulose와 같은 정도로 쉽게 분해되므로 本 方法에서는 基質의 結晶度를 감소시키기 위한 前處理의 필요성이 적다는 것을 나타낸다.

이상 두 방법의 차이는 糖化法에서는 생성된 糖이 축적되어 酵素活性이 阻害를 받는 반면 同時 糖化-醱酵法에서는 酵素反應物이 反應界에서 제거되므로 酵素가 阻害를 받지 않는 점이다. 結晶性 cellulose가 酵素에 의해서 분해될 때 非結晶化過程이 加水分解過程보다 늦어 rate limiting 要素인 것은 널리 알려진 사실이다. 따라서 糖化法에서 cutting mill 한 벼짚이 ball mill 한 벼짚보다 분해가 늦은 것은 生成된 糖이 加水分解過程에서 阻害作用을 하는 것이 아니며 非結晶化過程에서 阻害作用을 하는 것을 나타낸다.

Table 3 Effect of Rice Straw Pretreatment on SSF and Enzymic Hydrolysis

Substrate	Enzymic Hydrolysis* Sugar(mg/ml)	SSF Ethanol (ml/ml)
Control	47.9	26.5
Ball Milled	73.3	27.0

* for 48 hours at 45°C

Xylose가 cellulose의 同時 糖化-醱酵에 미치는 영향

벼짚을 酵素로 糖化시킬 때 xylose가 약 10mg/ml 생산되는 것으로 나타났다. 벼짚을 同時 糖化-醱酵시킬 때 생산되는 xylose의 영향을 보기 위하여 순수한 cellulose인 Avicel pH 101을 여러가지 濃度의 xylose를 첨가하여 同時 糖化-醱酵시켜 생산되

는 ethanal을 분석하였다(Table 4). 표에서 보는 바와 같이 xylose는 10mg/ml 농도까지도 同時 糖化-醱酵에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

Table 4 Effect of Xylose on SSF of Avicel PH-101

Xylose (mg/ml)	Ethanol (%)			
	Incubation Time (day)			
	1	2	3	5
0	1.71	3.07	3.44	3.91
1	1.28	2.39	2.52	3.05
3	1.51	2.85	3.05	3.13
5	1.71	3.10	3.45	3.90
10	1.71	3.07	3.45	3.93

要約

農産廢資源을 이용하기 위한 방법으로써 *Trichoderma* sp. K27-2로 만든 koji와 耐熱性 酵母를 사용하여 同時 糖化-醱酵와 糖化液 醱酵를 비교하였다. 벼짚의 糖化液에서는 15mg/ml의 cellobiose가 존재하였으나 동일한 酵素原을 사용한 同時 糖化-醱酵液에서는 존재하지 않았다. 酵素糖化法에서는 cellulase enzyme system의 反應產物인 glucose가 cellobiase의 活性을 阻害하므로 cellobiose가 축적되었으나 同時 糖化-醱酵法에서는 glucose가 ethanol로 醱酵되어 cellobiose의 축적이 없었다. Cutting mill 한 벼짚은 同時 糖化-醱酵過程에서는 ball mill 한 것과 같은 정도로 효과적으로 醱酵되었다. 이결과로 부터 cellylolytic enzyme system의 반응산물에 의한 저해 mechanism을 논의하였다. 또한 벼짚 糖化時 약10mg/ml 생산되는 xylose는 同時 糖化-醱酵에 아무런 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

本 研究의 一部는 Proc. VIth Intern. Ferment. Symp.에 발표되었음.

참고문헌

- 1) Wilke, C. R.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* Vol. 5 (1975).
- 2) Garden, E. L., Mandels, M. H., Reese, E. T. and Spone, L. A.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* Vol. 6. (1976).

- 3) Brown Jr., R.D. and Jurasek, L.: *Adv. Chem. Ser.* **181**. (1979).
- 4) Allen, A.L.: *aiiche Symp. Ser.* **72 (158)** 1 15. (1976).
- 5) Montenecourt, B.S. and Eveleigh, D.S.: *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 777(1977).
- 6) Nevalainen, K.M.H. and Palva, E. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **35**,11 (1978).
- 7) Kim, B.H. and Bae, M: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **7**, 91 (1979).
- 8) Bae, M., Kim, B.H. and Lee, K. J.: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **4**, 105 (1976).
- 9) Mandels, M., Hontz, L. and Nystrom, J.: *Biotechnol. Bioeng.* **16**, 1471 (1974).
- 10) Wilson, C.M.: *Amal. Chem.* **31**, 1199 (1959).
- 11) Dubois, M., Giles, K. A., Rebers, P. A. yand Smith, F.: *Amal. Chem.* **28**, 350 (1956).