

## 農生廢資源의 微生物學的 利用에 관한 研究

(第十三報) Ethanol 生産을 위한 同時糖化-醱酵條件의 檢討

李貞允, 金炳弘, 裴 武, 金成器\*

韓國科學技術院 應用微生物研究

\*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 13) Optimization of Simultaneous Hydrolysis-Fermentation  
for Ethanol Production from Rice Straw

Jung Yun Lee, Byung Hong Kim, 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

Studies were made to optimize the simultaneous hydrolysis-fermentation (SSF) process for the production of ethanol from rice straw. *Trichoderma* sp. KI 7-2 was selected to produce cellulase by solid culture for SSF. Ethanol production was highest when the SSF process utilized koji culture of the fungus grown on a medium of wheat bran-rice straw 3 : 2 mixture with moisture content of 50% adjusted to pH 4.5 for 7 days as the enzyme source. It was found that pretreatment of the substrate is not necessary.

To ferment 1g of rice straw by SSF 2.47 units of cellulase were required, and the initial yeast concentration of  $2.5 \times 10^7$  cell/ml was found to be sufficient. Optimum pH and temperature for the process were 4.5 and 40°C, respectively. It was also found that higher ethanol concentration in the broth can be obtained by the addition of substrate or substrate and enzyme to SSF broth.

### 緒 論

前報<sup>1)</sup>에서 農産廢資源등 cellulosic biomass를 微生物學的으로 利用할 때 酵素糖化法 보다 同時糖化-醱酵法이 基質의 前處理가 필요치 않아 經濟的임을 보고하였다.

본 연구에서는 cellulase 生産菌 중에서 同時糖

化-醱酵法에 적합한 것을 선별하고 이를 이용한 條件을 검토하였다.

### 材料 및 方法

#### 使用菌株

前報<sup>1)</sup>에서 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* NC YC 716 및 본 研究室에서 보존 중인 cellulase 生産菌을 사용하였다.

**醱酵基質**

벼짚을 cutting mill<sup>®</sup>하여 40 mesh 의 분말로 사용하였다.

**基質의 前處理**

40 mesh 의 벼짚을 24시간 ball mill, 140°C 에서 2시간 熱處理, NaOH 처리<sup>(2)</sup>, peracetic acid 처리<sup>(3)</sup>, 및 NaOH 로 포화시킨 butanol 용액에 24시간 침지시켜 물로 세척하여 基質로 사용하였다. NaOH 처리, peracetic acid 처리 및 alkaline butanol 처리에는 溶液의 양을 벼짚의 10 배를 사용하였으며 水洗후 건조시키지 않고 사용하였다.

**同時糖化-醱酵**

醱酵生産, 酵母의 前培養 및 同時糖化-醱酵은 前報(1)의 方法에 따랐다.

**分析**

Ethanol 은 前報(1)와 같이 gas chromatography 法으로 分析하였다.

**結果 및 考察**

**Cellulase 生産菌의 選別**

본 연구실에 보존 중인 cellulase 生産菌 중에서 벼짚의 同時糖化-醱酵法에 가장 적합한 菌을 찾

기위하여 이들을 이용하여 生産된 koji를 cutting mill 한 벼짚을 원료로 同時糖化-醱酵시킨 결과 Table. 1 과 같다. *Aspergillus* 屬은 同時糖化-醱酵 조건에서 왕성하게 생육하여 ethanol 의 生産이 낮은 것으로 나타난 반면 *Trichoderma* 屬 絲狀菌은 菌絲의 생육이 없이 높은 ethanol 生産性を 보였다. *Penicillium* 屬과 *Neurospora* 屬 絲狀菌은 生育速度가 *Aspergillus* 屬 보다 늦어 3일후에 菌絲가 나타났다. *Trichoderma* 屬 중 KI 7-2 가 가장 우수하여 본 연구에 사용하였다.

**醱酵生産條件**

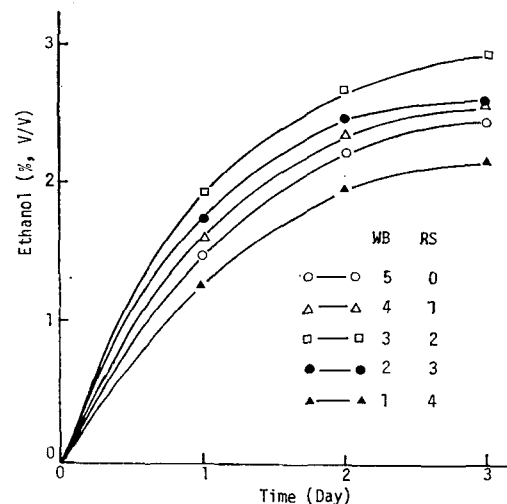
選別된 *Trichoderma* sp. KI 7-2 를 이용하여 同時糖化-醱酵에 사용한 醱酵의 生産條件을 검토하기 위하여 固體培地の 조성, 수분함량 및 pH의 영향과 培養時間을 달리하여 醱酵을 生産하여 cutting mill 한 벼짚을 同時糖化-醱酵法으로 醱酵시켜 生産되는 ethanol 의 양을 측정하였다.

밀기울과 벼짚분말의 비율을 달리하여 수분함량을 50%로 만든 固體培地에서 7일간 培養한 koji를 이용하여 同時糖化-醱酵시킨 결과 밀기울 3에 대해 벼짚분말 2로 혼합한 實驗區에서 가장 많은 ethanol 이 生産되었다(Fig. 1).

**Table 1. SSF of Cutting Milled Rice Straw Using Enzyme Produced by Various Cellulolytic Fungi.**

Strain No.	Ethanol Production (% v/v)
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9123	1.47
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	2.23
<i>Trichoderma viride</i> TO 4	0.98
<i>Trichoderma</i> sp. KI 7-2	2.46
KI 7-5	0.82
Tri 2	0.59
Tri 5	0.56
Tri 6	1.13
Tri 7	2.20
Su 4-2B	0.80
<i>Aspergillus</i> sp. Asp-9	0.43
CH 9-2	0.64
KY 10-1	0.47
<i>Penicillium</i> sp. KI 1-1-4F	1.58
<i>Neurospora</i> sp. CH 2-6	2.00

Rice straw powder was fermented by SSF method at 37°C for 48 hours before the concentration of ethanol was measured.



**Fig. 1. Effect of Rice Straw(RS) Addition to Wheat Bran (WB) Solid Culture Medium on Cellulase Production for SSF**

밀기울과 벼짚의 3:2 혼합물에 無機鹽類 溶液의 양을 달리하여 生産된 koji를 사용한 결과 50%의 水分含量이 가장 좋았다(Table 2).

無機鹽類 溶液의 pH를 달리하여 만든 koji를

**Table 2. Effect of Moisture Content in Koji Culture on SSF**

Solid-Moisture Ratio	Ethanol (% , v/v)		
	Incubation time (day)		
	1	2	3
1.0 : 0.8	1.265	1.440	1.515
1.0 : 0.9	1.290	1.135	1.615
1.0 : 1.0	1.340	1.563	1.835
1.0 : 1.1	1.120	1.240	1.685
1.0 : 1.2	1.220	1.515	1.820
1.0 : 1.3	1.055	1.290	1.810
1.0 : 1.4	1.045	1.315	1.475
1.0 : 1.5	1.040	1.265	1.455
1.0 : 1.6	1.025	1.260	1.375

**Table 3. Effect of pH on the Cellulase Production by Koji Culture Measured by SSF**

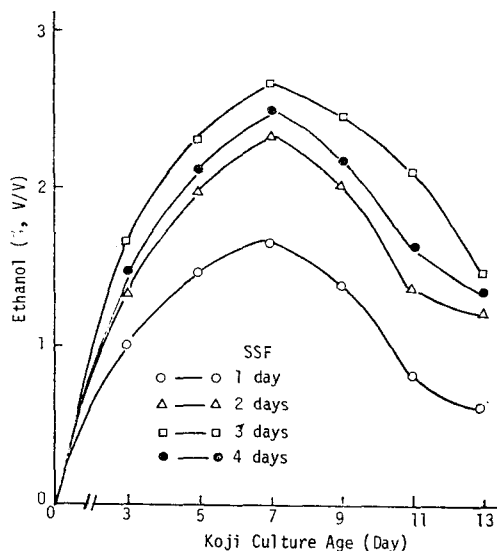
pH	Ethanol (% , v/v)		
	Incubation time (day)		
	1	2	3
4.0	1.54	2.03	2.365
4.5	1.81	2.265	2.65
5.0	1.64	2.215	2.535
5.5	1.52	1.945	2.225
6.0	1.28	1.53	2.035
6.5	1.21	1.455	1.715
7.0	1.20	1.385	1.720

사용한 실험에서는 pH를 4.5~5.0으로 조절할 때가 가장 좋은 것으로 나타났다(Table 3).

밀기울과 볏짚 3:2 혼합물에 pH 4.5로 조절한 無機鹽類 溶液을 1:1로 만든 固體培地에 *Trichoderma* sp. KI 7-2를 接種하여 培養時間을 달리 하여 만든 koji를 사용한 결과 培養時間이 7일까지는 ethanol 生産性이 증가하였으나 그 후에는 감소하였다(Fig. 2). 이 결과는 *Trichoderma* sp. KI 7-2를 培養할 때 生産되는 cellulase가 7일 후에는 不活化되는 것을 나타낸다.

#### 각종 前處理의 效果

Cutting mill한 볏짚을 物理的 및 化學的 方法으로 前處理하여 同時糖化-醱酵시킨 결과 ethanol 生産에는 control과 별 차이를 나타내지 않았다(Table 4). 이 결과는 前報<sup>1)</sup>에서 考察한 바와 같



**Fig. 2. Effect of Koji Culture Age on SSF**

**Table 4. Effect of Various Pretreatments of Rice Straw on SSF**

Pretreatment	Ethanol (% , v/v)				
	Incubation time (day)				
	1	2	3	4	6
Control	1.15	1.69	1.31	1.11	1.10
Ball mill	1.33	1.66	1.70	0.91	1.36
Thermal treatment	0.93	1.09	1.44	0.69	1.04
NaOH	1.32	1.46	1.25	0.82	1.24
Peracetic acid	0.81	1.12	1.41	0.83	1.23
Alkaline-Butanol	1.15	1.43	1.29	1.11	1.22

The conditions for each treatment is as follows;

Ball mill for 24 hours.

Thermal treatment at 140°C for 2 hours under N<sub>2</sub> atmosphere.

NaOH (2%) at ambient temperature for 24 hours.

Peracetic acid treatment at ambient temperature for 24 hours.

Alkaline-Butanol (NaOH-saturated butanol) treatment at ambient temperature for 24 hours.

이 同時糖化-醱酵法으로 cellulose 含有物을 醱酵시킬 때는 結晶性 cellulose가 非結晶性 cellulose와 같은 速度로 分解된다는 것을 뜻한다.

#### 同時糖化-醱酵 條件

이상의 실험에서 cellulase 生産菌으로 *Tricho-*

**Table 5. Effect of Cellulase Activity on SSF of Rice Straw**

Koji(g)	Ethanol (%)		
	Incubation time(day)		
	1	2	3
4g	0.83	1.28	1.486
5g	0.91	1.675	1.745
10g	1.74	1.915	2.36
14g	1.90	2.14	2.24
20g	1.92	2.165	2.05

**Table 6. Effect of Initial Yeast Cell Concentration on SSF of Rice Straw**

Yeast (cell/ml)	Ethanol (%)		
	Incubation time (day)		
	1	2	3
$2.5 \times 10^7$	1.63	1.89	2.00
$5.0 \times 10^7$	1.70	2.04	2.22
$7.5 \times 10^7$	1.68	1.96	1.91
$1.0 \times 10^8$	1.68	1.86	1.93

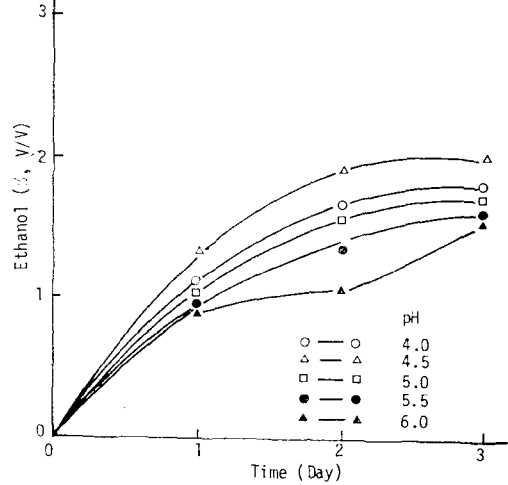
Yeast was added to SSF broth consisting of 13g of rice straw powder 10g of koji and 70ml of salt solution (pH 4.5) before the mixture was incubated at 37°C

*derma* sp. KI 7-2를 볏짚의 同時糖化-醱酵用 酵素生産의 最適條件과 이를 이용할때 基質을 前處理할 필요가 없다는 것을 알았다. 이상의 결과를 바탕으로 볏짚의 同時糖化-醱酵時 酵素를, 酵母量, 醱酵 pH 및 온도의 영향을 살펴보았다.

Cutting mill 한 볏짚 13g 당 酵素源으로 *Trichoderma* sp. KI 7-2 koji 4~20g을 사용한 결과 (Table 5) 10g까지는 ethanol 생산의 증가가 있었으나 그 이상에서 초기에는 ethanol의 생산이 빨랐으나 3일에는 10g 때보다 낮은 것이 관찰되었다. 이상의 결과에서 1g의 볏짚분말을 同時糖化-醱酵시키기 위해 Whatman No. 1 filter paper를 기질로 측정된 cellulase activity는 2.47 units면 충분한 것으로 나타났다.

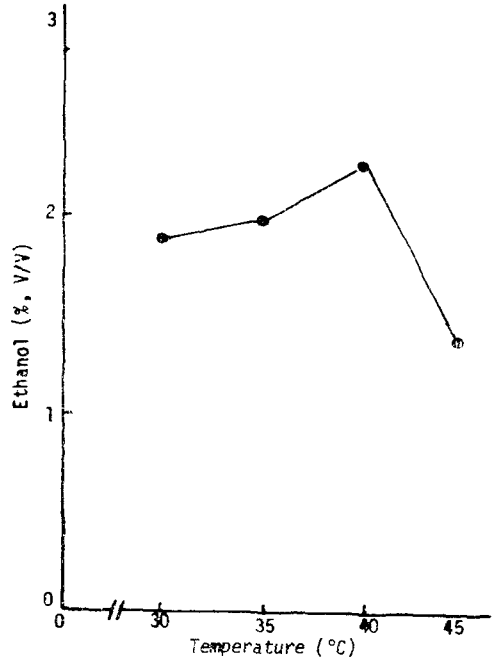
초기 酵母의 濃度를  $2.5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$  cell/ml로 달리한 경우 아무런 차이가 나타나지 않았다 (Table 6). 이 결과는 초기 酵母濃度가  $2.5 \times 10^7$  cell/ml 이상일 때 cellulose의 분해가 同時糖化-醱酵에서 rate limiting step임을 나타낸다.

醱酵液의 pH를 달리한 실험에서는 pH 4.5가 가장 적합한 것으로 나타났다 (Fig. 3). 앞서 언급한 바와 같이 cellulose의 분해가 볏짚의 同時糖化-醱酵에서 rate limiting step이므로 最適醱酵 pH가 cellulase 最適 pH<sup>(4)</sup>와 등달한 것으로 생각된다.



**Fig. 3. Effect of pH on SSF of Rice Straw**

온도를 달리한 볏짚의 同時糖化-醱酵에서는 40°C에서 좋은 결과를 얻었다 (Fig. 4). 40°C는 酵母의 最適醱酵溫度보다 높고 cellulase의 最適反



**Fig. 4. Effect of Temperature on SSF**

應溫度보다 낮은 것으로 이 온도에서는 cellulase 에 의한 glucose 의 生産産度와 酵母에 의한 醱酵 速度가 거의 비슷한 것으로 판단된다.

### 酵素 및 基質의 追加추가에 의한 高濃度 Ethanol 의 생산

벗짚은 부피가 크므로 基質의 농도가 높은 현탁 액을 만들 수 없어 지금까지의 실험에서 ethanol 의 함 이 2~3% 정도 였다. 본 실험에서는 ethanol 의 농도를 높이기 위해 37°C 에서 同時 糖 化-醱酵시키면서 벗짚이 분해되어 그 양이 줄어든 후 1일 및 2일 2차례에 액의 양은 늘리지 않고 基質, 酵素 혹은 基質과 酵素를 동시에 추가하여 Fig. 5 의 결과를 얻었다. 基質과 酵素를 동시에 추

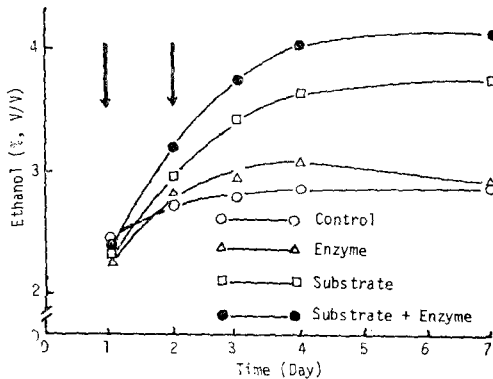


Fig. 5. Effect of Enzyme and Substrate Supplement on SSF. Arrow marks indicate the addition points

가한 경우 추가하지 않은 control 보다 현저히 높은 ethanol 을 생산할 수 있었다. 酵素만 추가한 實驗 區에서는 control 과 비슷한 결과를 얻었으나 基質 만 추가 하여서는 酵素만을 추가할 때 보다 좋은 결과를 얻었다. 이상의 결과는 同時糖化-醱酵過

程에서 基質 혹은 基質과 酵素를 추가하여 ethanol 濃度가 높은 醱酵液을 얻을 수 있음을 나타낸다.

### 要 約

*Trichoderma* sp. KI 7-2 와 耐熱性 酵母를 이용 하여 벗짚에서 ethanol 을 生産하기 위한 同時糖化-醱酵의 最適條件을 검토하였다. 酵素生産時 固體 培養에서의 培地는 밀기울과 벗짚을 3:2 로 혼합 하고 pH 를 4.5 로 조절한 수분함량 50%의 固體 培地에서 7일간 培養한 koji 를 사용 했을때 가장 높은 ethanol 이 生産되었다. 基質의 前處理는 ethanol 生産性에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 벗짚의 同時糖化-醱酵를 위해서는 酵素量은 벗짚 1g 당 2.47 units 가 요구되며, 醱酵液中 초기 효모 농도가  $2.5 \times 10^7$  cell/ml 이면 충분하였다. 同時糖化-醱酵 過程을 위한 最適 pH 와 온도는 각각 4.5 와 40°C 였다. 또한 同時糖化-醱酵液에 다시 基質 또는 酵素와 基質을 첨가하여 최종 ethanol 농도를 높일 수 있었다.

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

### 참 고 문 헌

- 1) Lee, J. Y., Kim, B. H., Bae, M. and Kim, S. K.: Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng 9, 101 (1981).
- 2) Bae, M., Kim, B. H. and Yoon, A. S.: Kor. J. Appl. Microbiol Bioeng. 1, 31, (1973)
- 3) Toyama, N. and Ogawa, K.: Proc. IV IFS; Fermentation Technology Today, 743 (1972).
- 4) 이제준: *Trichoderma viride* KI-72 가 생산하는 섬유소 분해효소에 관한 연구, 건국대학교 석사학위 논문, (1976).