

木材를 이용한 Alcohol 生産에 관한 研究¹

鄭 鎮 澈²

Studies on the Production of Alcohol from Woods¹

Jin Cheol Cheong²

要 約

針葉樹인 소나무, 리기다소나무, 일본잎갈나무 3樹種과 闊葉樹인 오리나무, 밤나무, 이태리포푸라 3樹種의 木材로부터 alcohol 을 生産하기 위하여 木材의 化學成分 分析과 酸 加水分解 條件을 確立하고 또한 纖維素 分解力이 강한 菌株를 分離 同定하여 菌株의 酵素 生産條件, 酵素의 特性 및 alcohol 醱酵條件 등을 研究 調查한 바 다음과 같은 結果를 얻었다. 1) 樹種別 酸 加水分解에서 HCl 은 1.0%와 2.0%, H₂SO₄ 는 2.0%에서 높은 糖化率을 보였고 樹種은 오리나무가 23.4%로 제일 좋았다. 2) HCl과 H₂SO₄으로 酸 加水分解할 때 壓力은 1.5kg/cm², 酸의 添加量은 30倍量, 分解時間은 HCl 45분과 H₂SO₄ 30분에서 糖化率이 良好하였다. 3) 前處理에 있어서 濃 HCl 보다는 濃 H₂SO₄ 이 더 効果的이었고 그 濃度는 50~60%이었으며 熱處理는 190°C에서 30分間 處理함으로써 無處理보다 糖化率이 約 1.5% 增加하였다. 4) 木粉 1g에 있어서 酸 加水分解液의 糖組成은 소나무는 glucose 137.78mg, arabinose 68.24mg 이었고 오리나무는 glucose 162.22mg, arabinose 65.89mg 을 含有하고 있었으며, xylose와 galactose도 檢出되었다. 5) 10個의 菌株 中에 alcohol 醱酵力이 旺盛한 菌株는 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101과 *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* JAFM 125 이었다. 6) 酸 加水分解液은 CaCO₃와 NaOH로 中和하는 것이 alcohol 生産과 酵母生育이 良好하였고 alcohol 生産은 pH 4.5~5.5, 30°C, 菌株生育에는 pH 5.0~6.0, 24°C에서 醱酵시키는 것이 좋았다. 7) Alcohol 生産에는 0.02%의 (NH₂)₂CO와 (NH₄)₂SO₄, 0.1%의 KH₂PO₄, 0.05%의 MgSO₄ 그 밖에 0.025%의 CaCl₂, 0.002%의 MnCl₂ 添加가 效果的이었고 酵母增殖에는 0.04~0.06%의 (NH₂)₂CO와 (NH₄)₂SO₄, 0.2%의 K₂HPO₄와 K₃PO₄, 0.05%의 MgSO₄ 그 밖에 0.025%의 CaCl₂, 0.002%의 NaCl 添加가 效果的이었다. 8) 여러가지 vitamin 中에서 alcohol 生産은 pyridoxine과 riboflavin, 酵母增殖에는 thiamin과 Ca-pantothenate, biotin과 inositol 의 添加가 좋았고 tannin과 furfural은 0.01% 濃度에서 alcohol 生産이 오히려 增加하였으며 그 以上の 濃度에서는 沮害를 받았다. 9) 醱酵液 100ml에서 소나무는 2.201~2.275 ml의 alcohol과 168~228mg의 酵母가 生産되었고 殘留糖은 0.55~0.60g 이었다. 오리나무는 2.075~2.125 ml의 alcohol과 208~256mg의 酵母를 生産했으며 殘留糖은 0.60~0.65g 이었고 pH는 3.3~3.6으로 變化했다. 10) *Trichoderma viride* JJK 107을 纖維素 分解力이 강한 菌株로서 選定하여 同定하였다. 11) 酵素 生産 條件으로 CMCase는 pH 6.0, 30°C, xylanase는 pH 5.0, 35°C에서 5일간 培養할 때 最高의 酵素生産을 나타냈고 酵素作用의 最適條件은 CMCase는 pH 4.5, 50°C, xylanase는 pH 4.5, 40°C에서 最高의 活性化를 보였다. 12) 木粉을 peracetic acid로 脫 lignin하고 酵素 加水分解하여 醱酵시킬 때 alcohol 生産이 좋았으며 peracetic acid 添加比는 10倍量 移度 添加하는 것이 좋았다. 13) 醱酵에 있어서 木粉과 밀기울 Koji의 混合比率는 10:8일 때에 alcohol 生産이 좋았고 木粉 10g에서 소나무는 2.01~2.14 ml, 오리나무는 2.11~2.20 ml의 alcohol을 生産하였다.

¹ 接授 2月 25日 Received February 25, 1983.

² 圓光大學校 農科大學 College of Agriculture, Wonkwang University, Iri, Korea.

ABSTRACT

In order to examine the alcohol production from softwoods (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc., *Pinus rigida* Miller, *Larix leptolepis* Gordon) and hardwoods (*Alnus japonica* Steud., *Castanea crenata* Sieb. et Zucc. *Populus euramericana* CV 214), chemical compositions were analyzed and conditions of acid hydrolysis with wood meals were established. Also strains which could remarkably decompose the cellulose were identified, and conditions of cellulase production of strains, characteristics of cellulase, and alcohol fermentation were examined. The results were summarized as follows. 1) In acid hydrolysis of wood, the high yield of reducing sugars was shown from 1.0% to 2.0% of hydrochloric acid and 2.0% of sulfuric acid. The highest yield was produced 23.4% at wood meals of *Alnus japonica* treated with 1.0% of hydrochloric acid. 2) The effect of raising the hydrolysis was good at 1.5kg/cm^2 , 30 times (acid/wood meal), and 45 min in treating hydrochloric acid and 30 min in treating sulfuric acid. 3) The pretreatments with concentrated sulfuric acid were more effective concentration ranged from 50% to 60% than that with hydrochloric acid and its concentration ranged from 50% to 60%. 4) The quantitative analysis of sugar composition of acid hydrolysates revealed that glucose and arabinose were assayed 137.78mg and 68.24mg with *Pinus densiflora*, and 102.22mg and 65.89mg with *Alnus japonica*, respectively. Also xylose and galactose were derived. 5) The two strains of yeast which showed remarkably high alcohol productivity were *Saccharomyces cerevisiae* JAFM 101 and *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* JAFM 125. 6) The production of alcohol and the growth of yeasts were effective with the neutralization of acid hydrolysates by CaCO_3 and NaOH . Production of alcohol was excellent in being fermented between pH 4.5–5.5 at 30°C and growth of yeasts between pH 5.0–6.0 at 24°C . 7) The production of alcohol was effective with the addition of 0.02% $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.025% CaCl_2 , 0.02% MnCl_2 . Growth of yeasts was effective with 0.04–0.06% $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% K_2HPO_4 and K_3PO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.025% CaCl_2 , and 0.002% NaCl . 8) Among various vitamins, the production of alcohol was effective with the addition to pyridoxine and riboflavin, and the growth of yeasts with the addition to thiamin, Ca-pantothenate, and biotin. The production of alcohol was increased in 0.1% concentration of tannin and furfural, but was decreased in above concentration. 9) In 100ml of fermented solution, alcohol and yeast were produced 2.201–2.275ml and 84–114mg for wood meals of *Pinus densiflora*, and 2.075–2.125ml and 104–128mg for that of *Alnus japonica*. Residual sugars were 0.55–0.60g and 0.60–0.65g for wood meals of *Pinus densiflora* and *Alnus japonica*, respectively, and pH varied from 3.3 to 3.6. 10) A strain of *Trichoderma viride* JJK 107 was selected and identified as its having the highest activity of decomposing cellulose. 11) The highest cellulase production was good when CMCase incubated for 5 days at pH 6.0, 30°C and xylanase at pH 5.0, 35°C . The optimum conditions of cellulase activity were proper in case of CMCase at pH 4.5, 50°C and xylanase at pH 4.5, 40°C . 12) In fermentation with enzymatic hydrolysates, the peracetic acid treatment for delignification showed the best yields of alcohol and its ratio was effective with the addition of about 10 times. 13) The production of alcohol was excellent when wood meals and Koji of wheat bran was mixed with 10 to 8 and the 10g of wood meals of *Pinus densiflora* produced 2.01–2.14ml of alcohol and *Alnus japonica* 2.11–2.20ml.

Key words: alcohol production; chemical composition; acid hydrolysis; woods.

序 論

科學技術의 發達과 人口의 增加 및 生活樣式의 多

邊化로 인하여 에너지 需要가 全世界의으로 急增하고 있다. 이들 에너지의 대부분이 原油에 依存하고 있는데 1973年 石油波動 以來 國際的 에너지 危機가 날로 深化되어 原油의 경우 物量 確保가 어려울 뿐 아니라 그

限界성이豫見되고 있다. 資源確保 및 代替에너지開發이 시급함에 따라 核燃料, 太陽熱, 風力, 水力利用 등에 관한 研究가 활발히 進行 중에 있고 有機物質을 에너지화하는 bio-conversion에까지 研究의 領域이 擴大되어 가고 있는 實情이다.

植物體를 構成하고 있는 纖維素는 地上에서 풍부한 資源으로 각종 農産 廢棄物을 酸處理 및 酵素處理하여 直接 飼料로서 또는 그 分解物에 微生物을 培養하여 醱酵飼料로서 利用하려는 試圖는 많았고^{7,27,43} 最近에서 再生資源인 biomass에 微生物 등을 處理하여 醱酵 alcohol을 生産하고 이로부터 gasohol과 같은 代替에너지 뿐만 아니라 여러가지 化學燃料을 生産하고자 하는 研究가 널리 이루어지고 있다.^{41,42,25}

지금까지 使用되어 온 alcohol 醱酵 原料의 炭素源은 주로 農産 廢棄物인 糖密과 薯類 등이었으나 그 資源이 아주 부족하다. 食糧雜으로 이를 醱酵原料로 使用할 수 없는 形편이다. 그러므로 纖維素 資源 중 間伐材, 腐朽材, 木粉, 木材殘存物 등을 加水分解하여 糖類로 轉換시키고 이들 糖類를 利用하여 alcohol을 増産할 수 있는 研究가 잘 이루어진다면 앞으로 代替에너지源으로서의 効用성이 크게 期待될 수 있을 것이다. 이미 林業 先進國에서는 풍부한 林木과 廢材를 利用한 液化燃料의 經濟性和 効用성에 對한 많은 研究 報告^{9,14,54,59} 등이 發表된 바 있다.

따라서 이러한 液化 代用燃料인 alcohol의 大量 生産過程의 開發은 시급히 解決되어야 할 重要한 課題이다. 그러나 國家別로 保有樹木의 種類가 다르고 이들 原木의 生産費가 다르기 때문에 저렴한 原木의 生産과 液化燃料 製造過程이 合理的으로 確立되어야 할 것이다.

이런 점을 감안하여 筆者는 우리나라에 分布된 樹種 중 針葉樹인 소나무, 리기다소나무, 일본잎갈나무와 闊葉樹인 오리나무, 밤나무, 이태리포푸라 등을 選定하여 化學成分을 分析하고 纖維素의 酸 加水分解에 있어서 酸의 濃度, 分解時間, 蒸氣壓, 酸의 添加量 및 前處理 등의 影響을 比較 檢討하여 酸 加水分解의 最適條件을 確立하였다. 그리고 酸 加水分解液의 alcohol 醱酵에서 優秀菌株을 選定하고 이들 菌株의 最適 培養條件과 生理的인 營養條件을 아울러 檢討하였다.

또한 纖維素 分解力이 강한 優秀 菌株을 分離 同定하고 이들 菌株의 纖維素 分解酵素를 生産하는 條件과 特性을 밝혔으며 이들 纖維素 分解酵素를 利用하여 纖維素 分解와 alcohol 醱酵을 試圖하여 몇가지

結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

本 論文을 始終 指導하여 주신 魏煥 博士, 高大植 博士, 洪載植 博士께 심심한 感謝를 드리는 바이며 實驗遂行에 있어서 協助하여준 金東翰 碩士, 微生物 實驗室 學生, 林學科 學生 그리고 原稿 整理를 도와준 田環秀 君에게 謝意를 表하는 바이다.

研究 史

우리나라 alcohol 工業의 發展은 日本이 戰爭目的을 위한 燃料供給의 인찬으로 1937年 酒精會社를 設立하여 穀類로 酒精을 製造하기 시작하였고 1952年 糖蜜이 처음 輸入됨에 따라 穀類 澱粉原料에서 糖質原料로 바꾸어지게 되어 酒精工業이 급속한 發達을 보게 되었다. 그러나 外貨關係로 糖蜜輸入이 中斷됨에 따라 새로운 炭素源의 開發이 시급해지고 있다.

木材 酸糖化에 關한 研究는 1819年 Bracconat가 木材의 酸 加水分解에 의한 glucose 生成을 發見하고 Shöller가 물은 黃酸으로 木材 加水分解을 試圖하였으며 그 以後 Bergius가 진한 黃酸에 의한 木材糖化法을 發見한 이래 많은 學者들에 의하여 研究가 進行되어 왔으나 細鄒的인 研究過程에는 差異가 있었다.⁴⁵

高田⁵³은 芻草, 왕겨, 보리짚을 0.5~1.0% 黃酸으로 90~120 psi 壓力 하에서 3번 糖化하여 46%의 還元糖을 얻었다고 報告했고 Kibblewhite와 Harwood¹⁸는 약 70%의 纖維質을 갖고 있는 木材에서 약 52%의 糖을 얻을 수 있으나 精確한 糖組成은 木材에 含有되어 있는 多糖類에 좌우된다고 報告했으며 成과 金⁴⁵은 廢新聞紙, 톱밥, 왕겨, 芻草의 糖化方法을 報告한 바 있다. 또한 柳 等⁶⁰은 芻草를 低濃度의 黃酸으로 加水分解하여 이 加水分解液으로부터 飼料酵母를 生産하였고 Dudkin 等⁹은 酸糖化時의 糖化液 중 hexose와 pentose의 含量에 대하여 調査 報告한 바 있다. 鄭 等³은 산오리나무材의 酸 加水分解에서 最大의 還元糖量은 16.0%라 했고 Lee와 Hyun²⁵은 몇 樹種의 酸 加水分解에서 黃酸의 濃度를 增加시킴에 따라 還元糖量이 增加했다고 報告한 바 있다. 濃黃酸에 의한 木材糖化로서 小林 等^{22,23}은 酸 加水分解의 條件에 대하여 研究 報告한 바 있으며 Odincov³⁹는 酸을 少量 使用하고 機械力을 有效하게 利用하는 加水分解 方法을 報告했고 西尾 等³⁰은 밀감 外皮의 糖化方法의 反應條件에 대하여 報告한 바 있다.

Cellulase에 관한 研究는 1920年代 Karrer 等¹⁷⁾이 달팽이의 cellulase를 纖維素에 作用시켜 glucose를 檢出한 이래 纖維素 分解酵素에 관한 研究^{10,15,30)}가 활발하였다. Reese⁴³⁾는 纖維素를 高温加熱하여 粉粹하는 것이 纖維素 分解力이 增大된다고 報告하였고 Toyama와 Ogawa⁵⁰⁾는 木材多糖類는 일반적으로 前處理를 하지 않으면 纖維素 分解酵素가 잘 作用하지 않으므로 peracetic acid로 脫lignin하면 *Trichoderma viride*와 *Aspergillus niger* 酵素로써 용이하게 糖化시킬 수 있다고 하였으며 Sudo 等^{31,53)}은 各濃度別로 葉酸 처리한 소나무, 일본잎갈나무 등에 *Trichoderma viride* 酵素를 처리하므로써 糖化率이 增加되었음을 報告하였다. 또한 外山⁵⁷⁾은 農産 廢棄物의 酵素分解에 있어서 큰 阻害要因은 硅酸質 灰分과 lignin, phenol性 化合物, tannin 및 leuco-anthothyanin 等の 成分에 기인한다고 報告하였다.

國內에서도 李 等²⁷⁾은 cellulase 生産 最適條件과 諸 特性을 報告하였고 禹 等⁵⁹⁾은 왕겨를 分解하는 優秀菌株을 選定하고 酵素의 特性과 分解에 대하여 報告한 바 있으며 또한 食品加工 工場 廢棄物을 原料로 한 研究⁶⁰⁾, 澱粉質 廢棄物을 原料로 한 研究²⁸⁾, 廢棄澱粉粕을 活用한 酵母生産에 관한 研究^{6,46)} 등이 있다.

Alcohol 醱酵에 관한 研究는 이제까지 사용해 오던 工程을 좀더 經濟的이며 生産効率을 極大化할 수 있는 方法^{37,44)}으로 進行되고 있다. 最近 Takagi 等⁵⁴⁾은 cellulase 反應系에 酵母를 同時에 作用시켜 生成된 糖으로 alcohol 醱酵을 시킨 바 있고 Blotcamp 等²⁾은 *Trichoderma reesei*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 連續醱酵에 대한 基質濃度の 影響 等を 報告하였고 Gordon⁹⁾은 各種 纖維資源으로부터 alcohol 生産價를 推定한 바 있으며 Whithworth^{61,62)}는 라디아타소나무를 중심으로 하여 糖의 醱酵에 따른 代替에 너지의 經濟性에 대하여 報告한 바 있다.

國內에서는 Lee와 Hyun²⁶⁾이 몇 種의 林木을 原料로 하여 ethanol 生産에 대한 林木 biomass의 利用性을 報告하였고 朱와 權⁶⁾은 人蔘粕이 alcohol 醱酵 및 菌體增殖에 미치는 影響 等を 報告하였으며 金과 裴¹⁹⁾는 벗짚 및 옥수수 속대를 原料로 하여 cellulase 및 *Sacch. cerevisiae*를 同時에 作用시키는 醱酵 方法을 報告한 바 있다. 그러나 纖維素의 加水分解에 의한 alcohol 生産을 實用化 하기에는 아직도 研究해야 할 問題가 많이 남아 있다.

材料 및 方法

I. 木材의 酸 加水分解

1. 供試材料

全北大學校 農科大學 德律 演習林에 生育하고 있는 樹齡 15~20年生 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.), 리기다소나무(*Pinus rigida* Miller), 일본잎갈나무(*Larix lepotolepis* Gordon)의 針葉樹 3 樹種과 오리나무(*Alnus japonica* Steud.), 밤나무(*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.), 이대리포푸라(*Populus euramericana* CV 214)의 濶葉樹 3 樹種을 各 5 株씩 選定 切斷하고 줄기의 上, 中, 下 部位를 製材함으로써 木粉을 만들었다. 各 樹種의 木粉을 溫度 40℃인 乾燥機 內에서 3日 동안 乾燥시킨 후 28mesh로 粉粹하여 本 實驗에 使用하였다.

2. 方 法

1) 材料의 化學成分 分析

① 水分, 灰分: 一般 分析法에 準하였다.¹²⁾

② 總窒素: 乾燥試料 0.5g을 秤量하여 micro kjeldahl 法으로 定量하였다.²⁴⁾

③ 粗纖維: A. O. A. C 法으로 定量하였다.¹⁾

④ Lignin: 試料 1g을 脫脂하여 乾燥한 후 72% H₂SO₄를 加하여 一定 時間 放置한 다음 蒸溜水로 洗滌하고 遺流冷却機를 붙여 加熱한 후 不溶解 殘留物을 濾過(1-G-4 glass filter)하여 乾燥 秤量하고 灰分量을 除하여 lignin 含量을 求했다.^{32,56)}

⑤ Pentosan: 木粉 0.5g에 12% HCl을 加하여 蒸溜하고 溜出液을 定容하여 그 一定量에 aniline acetate 溶液과 安定劑 溶液을 加하고 25℃에서 1時間 放置 後 spectro photometer (M. P. S 5,000 Shimadzu)로 515 mμ 波長에서 吸光度를 測定하여 標準曲線과 比較 定量하였다.^{32,56)}

⑥ Furfural: 酸 糖化液을 pentosan과 같은 方法으로 定量하였다.^{32,56)}

⑦ Tannin: 試料를 一定量 취하여 濕水로 數回 抽出하여 定容한 다음 一定量의 抽出液에 H₂SO₄와 indigocarmine 液을 一定量 加하고 1/25NK MnO₄로 適定하는 Löwenthal 法을 약간 改良하여 定量하였다.³²⁾

2) 酸 加水分解의 方法

0.5~5.0%의 H₂SO₄ 및 HCl을 試料에 대하여

10~40倍(W/V) 加하고, 0.5~2.0 kg/cm² 蒸氣壓에서 15~60分間 分解시켰다.⁴⁰⁾

3) 木粉의 前處理

① 強酸에 의한 處理

試料에 10~70% H₂SO₄와 10~30% HCl을 10 倍量을 加한 후 40°C 水浴槽에서 3時間 振盪(40rpm) 하여 前處理하고 酸濃度を 2.0%로 調整하여 1.5kg/cm² 蒸氣壓에서 30分間 分解하였다.

② 熱處理

木粉을 溫度 170~230°C에서 30~60分間 熱處理한 다음 2.0% 酸을 試料에 대하여 30倍 加하고 1.5kg/cm² 蒸氣壓에서 30分間 分解하였다.

4) 糖化率 測定

糖化液을 濾過하여 中和하고 還元糖을 Somogyi 變法으로 定量한 다음 glucose로 換算하여 原料의 重量比로 나타내었다.^{24, 28)}

5) 酸 加水分解液의 遊離糖의 定量 소나무와 오리나무를 試料로 한 遊離糖의 分別定量은 thin layer chromatography⁵⁰⁾에 의하여 다음과 같이 測定하였다.

① 遊離糖의 抽出: 두 樹種의 酸 加水分解한 濾液을 Dowex-1 resin column(H⁺型) 및 Amberlite IR-120column(OH⁻型)에서 流速 1~2ml/min로 통과시켜 아미노酸과 有機酸을 分離하고 溶出液을 回轉減壓濃縮機로 濃縮하여 T.L.C用 供試糖液으로 하였다.

② 遊離糖의 分離 및 同定: 供試糖液을 0.1M CH₃-COONa 溶液으로 포화시킨 silica-gel G로 제조한 薄層(두께 250 μm)에 點滴하여 chloroform: methanol (60:40) 溶媒로서 一次元上昇展開法으로 展開하였다. 發色劑로는 p-anisaldehyde: sulfuric acid: acetic acid (5:1:50v/v/v)를 사용하였으며 100~105°C에서 10分間 加熱 發色시켜 標準糖의 Rf值와 比較 同定하였다.

③ 遊離糖의 定量: 以上과 같이 T.L.C에 의하여 分別 確認된 각 遊離糖은 T.L.C Scanner (Shimadzu, Dual-Wavelength)에 의하여 그 含量을 求하였는데

Table 1. Instrument and operating condition for TLC Scanner

Instrument	TLC Scanner CS-900
Wavelength	Sample 540nm, reference 700mμ
Slit	1.25×1.25
Scanner speed	10 mm/min
Scanning method	Reflection zig-zag scanning
Sensitivity	X 5
Chart speed	10 mm/min

그 操作條件은 Table 1과 같다.

II. 酸 加水分解液의 Alcohol 醱酵

1. 使用 酵母

Alcohol 醱酵 菌으로는 全北大學校 農科大學 醱酵微生物室에서 分離 또는 保存하고 있는 Table 2와 같은 酵母를 分讓받아 Einhorn 醱酵管에서 CO₂의 發生量을 總的으로 測定하여 CO₂ 發生이 旺盛한 優秀 菌株을 選定하여 使用하였다.

Table 2. Kinds of used yeast

No.	Strains
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAFM 101
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAFM 109
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAFM 117
4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAFM 118
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> JAFM 121
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> JAFM 125
7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i> JAFM 127
8	<i>Saccharomyces formosensis</i> 396
9	<i>Saccharomyces formosensis</i> Nakazawa
10	<i>Saccharomyces sake</i>

2. 醱酵 基本培地의 調製

소나무, 오리나무 木粉에 2.0% H₂SO₄를 10倍量 加하여 1.5kg/cm²의 蒸氣壓에서 30分間 加水分解시킨 分解液을 中和한 후 5.0% 糖濃도로 調整하여 醱酵基質로 使用하였으며 基本培地의 組成은 Table 3과 같다.

단, 目的에 따라 中和劑, 培地의 pH, 無機鹽의 添加 또는 添加量을 달리하거나 기타 vitamin 등을 다음과 같이 添加 調製하였다.

Table 3. Composition of basel medium for alcohol fermentation (unit: %)

Constituent	Percentage
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.15
KH ₂ PO ₄	0.10
Mg SO ₄	0.05
Hydrolyzate*	
pH	5.0

* Concentration of reducing sugar : 5.0 %

1) 中和劑: 酸 糖化液에 KOH, Ca(OH)₂, CaCO₃, NH₄OH, NaOH를 加하여 中和하였다.

2) 培地の pH: 醱酵液의 pH를 H₂SO₄와 NaOH를 使用하여 pH 2.0~9.0으로 調整하였다.

3) 培地の 窒素源: 基本培地の 窒素源 대신 Table 16, 17과 같은 窒素源을 窒素量이 0.02~0.08% 되게 加하여 調整하였다.

4) 培地の K.P源: KH₂PO₄를 除外한 基本培地에 KH₂PO₄, K₂HPO₄, K₃PO₄를 0.1~0.3% 되게 加하여 調整하였다.

5) 培地の Mg源: MgSO₄를 除外한 基本培地에 MgSO₄ · 7H₂O와 MgCl₂ · 6H₂O를 0.05~0.15% 되게 加하여 調整하였다.

6) 기타 無機塩類: 基本培地에 각종 無機塩을 Table 20과 같은 濃度로 加하여 調整하였다.

7) Vitamin의 添加: 基本培地에 각종 vitamin을 Table 21과 같은 濃度로 加하여 調整하였다.

8) Tannin 및 furfural 添加: 炭素源으로 5.0%의 glucose를 加한 基本培地에 tannin과 furfural을 0.001~1.0% 되게 加하여 調整하였다.

3. 酵母 前培養

Malt extract(Brix 12%, pH 5.0) 50ml를 含有한 250ml 容 삼각 flask에 酵母 1 白金耳量을 接種, 30°C에서 24時間 培養하여 使用하였다.

4. Alcohol의 醱酵方法

培地 50ml를 100ml 容 삼각 flask에 넣고 1.0kg/cm²의 蒸氣壓에서 殺菌한 다음 前培養한 酵母液 0.5 ml를 接種하여 醱酵溫度 實驗區(24~37°C)를 除外한 나머지 實驗區는 30°C에서 5日間 醱酵시켜 菌體量, pH, alcohol 및 殘溜糖을 測定하였다.

1) 菌體量의 定量

醱酵液을 東洋濾紙(No. 7)로 濾過하고 蒸溜水로 數回 洗滌한 후 60°C의 眞空乾燥器에 3時間 乾燥한 후 秤量하여 菌體量으로 나타냈다.

2) 醱酵液의 pH 測定

1)의 濾液의 pH meter(Beckman pH meter)로 測定하였다.

3) Alcohol의 定量

1)의 濾液 10ml를 水蒸氣 蒸溜하여 얻은 溜液 80ml를 100ml로 定容한 후 一定量을 取하여 0.2N K₂Cr₂O₇ 溶液과 진한 H₂SO₄ 10ml를 加하여 1時間 放冷하고 蒸溜水 150~200ml를 加하여 稀釋, 8.0%

KI 溶液 6.5ml를 加한 후 遊離되는 요오드를 0.1N Na₂S₂O₃ 溶液으로 適正하여 醱酵液에 대한 v/v%로 表示하였다.

단, 酵素 加水分解에 의한 alcohol 醱酵에는 木粉을 除外한 밀기울 Koji와 酵母液만을 混化하였을 때 생산된 alcohol 量을 對照區로 하고 각 實驗區에서 생산된 총 alcohol 量에서 이를 控除하여 醱酵液의 alcohol 量으로 나타내었다.

4) 殘溜糖의 定量

1)의 濾液을 一定量 取하여 Somogyi 變法²⁴⁾으로 定量하였다.

III. 纖維素 分解酵素를 生産하는 菌株의 分離 및 同定

1. 菌株 分離源

木材腐朽物, 推肥, 古木の 木屑, 土壤 腐朽枯葉等 주로 纖維質이 많이 包含된 腐植物을 全州 近郊에서 蒐集하여 菌 分離源으로 하였다.

2. 使用 培地

使用培地는 Table 4와 같다.

Table 4. Composition of culture medium for isolation. (unit: %)

Constituent	Percentage
CMC	2.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
KCl	0.05
Fe-Citrate	0.001
Agar	1.5
pH	5.0

3. 菌 分離 및 一次選定

菌 分離源用 試料 1.0g을 滅菌水에 넣어 충분히 懸濁시킨 후 上澄液 1ml를 沙레에 넣고 Table 4의 培地를 20ml를 加하여 混化한 다음 30°C 恒溫器에서 5日間 培養한 후 生長速度가 빠른 獨立聚落을 취하여 斜面培地에 移植하는 것으로 一次 選定하였다.

4. 二次 選定

250ml 容 삼각 flask에 밀기울 20g과 水道水 20ml를 加하고 加壓 殺菌한 다음 一次選定 菌株를 接種하여 30°C에서 5日間 培養하였다. 여기에 5배의

蒸留수를 넣고 磨碎한 다음 室溫에서 3時間 抽出 濾過한 후 遠心分離(6,000 rpm, 20 min)한 上澄液을 粗酵素液으로 하여 CMCase와 xylanase 活性이 강한 菌株를 選定하여 使用하였다.

5. 酵素活性의 測定方法

1) CMCase의 糖化活性²⁶⁾

0.5% Na-CMC 溶液 2ml에 Mcilvaine 緩衝液 2ml와 粗酵素液 1ml를 加하고 40°C에서 120分間 反應시켜 遊離된 還元糖을 Somogyi-Nelson 法으로 比色(波長 660nm) 定量하여 酵素液 1ml에서 生成된 還元糖을 cellulase 糖化活性의 比較 單位로 하였다.

2) Xylanase의 活性²⁵⁾

Xylan을 1N-NaOH로 溶解한 후 HCl로 中和한 10% xylan 溶液 5ml, Mcilvaine 緩衝液 4ml와 粗酵素液 1ml를 加하여 30分間 反應시킨 다음 CM-Case 糖化活性과 같은 方法으로 測定하였다.

6. 酵素의 生産條件

培養條件은 培養時間을 1~7日, 培地의 pH를 3.0~8.0, 培養溫度를 20~40°C로 달리하여 培養하였을 때의 酵素活性을 測定하였다.

7. 酵素의 特性

酵素反應에서 溫度를 30~70°C, pH를 2.0~8.0으로 달리하였을 때 生成된 還元糖을 定量하여 酵素活性을 測定하였다.

IV. 酵素 加水分解에 의한 直接 醱酵

1. 使用 菌株

纖維素 分解酵素 生産菌으로 木材腐朽物에서 分離한 *Trichoderma viride* JJK-107을 사용하고 alcohol 醱酵酵母는 前記 酸加水分解液의 alcohol 醱酵에

서 醱酵力이 강한 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101과 *Sacch. cerevisiae* var *ellipsoideus* JAFM125의 두 菌株를 使用하였다.

2. 使用 培地

Cellulose 및 hemicellulose 含有物로 소나무와 오리나무 木粉에 1) peracetic acid (28% H₂O₂ : anhydrous acetic acid : 2H₂O = 1 : 1 : 1), 2) alkaline-butanol 溶液 (10g NaOH : 100ml n-butanol), 3) 4.0% NaOH 溶液, 4) 1N-NH₄OH 溶液을 각각 10倍量 加한 다음 常溫에서 24時間 前處理한 木粉과 無處理 木粉을 190°C에서 30分間 熱處理하여 醱酵基質로 使用하였다.

3. 酵素의 生産

40g의 Koji에 纖維素 分解力이 강한 前記 *Trichoderma viride* JJK-107을 接種, 30°C에서 5日間 培養하여 纖維素 分解酵素源으로 使用하였다.

4. 酵母의 前培養

酸 加水分解液의 alcohol 醱酵와 같은 方法으로 하였다.

5. Alcohol 醱酵

0.1% KH₂PO₄ 溶液 72ml에 醱酵基質 10g을 混化하여 pH를 4.5로 調節하고 殺菌한 다음 酵素源인 Koji 8.0g과 前培養한 酵母液 10ml를 混合하여 35°C에서 5일간 醱酵시켰다.

結果 및 考察

I. 原料의 化學成分

研究에 使用된 소나무, 리기다소나무, 일본잎갈나무

Table 5. Chemical composition of wood meals (unit : %)

Species	Moisture	Ash	Crude cellulose	Lignin	Pentosan	Total nitrogen	Tannin
<i>Pinus densiflora</i>	8.57	1.24	57.41	24.71	12.35	1.23	0.24
<i>Pinus rigida</i>	9.39	0.96	56.37	23.01	10.31	1.16	0.20
<i>Larix leptolepis</i>	9.96	0.97	59.76	21.34	9.91	1.19	0.29
<i>Castanea crenata</i>	8.41	1.08	58.03	28.76	19.59	2.07	0.44
<i>Alnus japonica</i>	7.66	1.08	61.81	22.70	29.05	1.86	0.47
<i>Populus euramericana</i>	7.19	0.96	58.74	24.16	28.12	1.19	0.48

무, 오리나무, 밤나무 및 이태리포푸라의 化學成分을 分析한 結果는 Table 5와 같다.

즉 Table 5에서 보는 바와 같이 각 成分의 含量은 灰分 0.96~1.24%, 粗纖維 56.37~58.74%, lignin 21.34~28.76%, pentosan 9.91~29.05%, 總窒素 1.16~2.07%, tannin 0.20~0.48% 이었다.

II. 樹種別 酸 加水分解 條件의 檢討

1. 酸 濃度의 影響

HCl과 H₂SO₄의 濃度가 酸 加水分解에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 6과 같다.

糖化率을 HCl의 濃度別로 檢討하여 보면 一般적으로 1.0%와 2.0%에서 모든 樹種이 높은 糖化率을 보였으며 그 以上の 濃度에서는 점차로 減少하는 傾向을 보였다. 즉 1.0% 濃度에서는 오리나무 23.4%,

일본잎갈나무 22.1%, 2.0% 濃度에서는 오리나무 22.9%, 일본잎갈나무 21.6%로서 糖化率이 가장 높았고 이태리포푸라는 각 濃度에서 비교적 낮은 糖化率을 보였다.

H₂SO₄는 2.0% 濃度에서 모든 樹種이 가장 높은 糖化率을 보였으며 HCl과 마찬가지로 오리나무가 23.1%로 가장 높았다. 樹種別로 보면 오리나무, 밤나무, 일본잎갈나무, 소나무, 리기다소나무, 이태리포푸라의 順이었으나 이들 중 이태리포푸라는 19.8%로서 낮은 糖化率을 보였다.

Lee와 Hyun²⁵⁾, 鄭과 閔²⁶⁾은 몇 樹種에서 H₂SO₄의 濃度를 높임에 따라 還元糖이 增加하였다는 報告와는 약간 相異한 反面, *밤송이 前加水分解 條件에서 H₂SO₄ 4.0% 濃度까지는 還元糖이 增加하였으나 그 以上の 濃度에서는 減少하였다는 柳 等의 報告⁶⁵⁾와는 거의 一致하는 傾向이었다.

Table 6. Effect of acid concentration on the hydrolysis of wood meals. Hydrolysed for 30min at 1.5 kg/cm²

(unit: %)

Species	Acides Concent. (%)	HCl					H ₂ SO ₄						
		0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
<i>Pinus densiflora</i>		16.5	20.4	21.3	20.3	19.5	19.2	14.7	20.3	21.0	20.0	19.7	19.5
<i>Pinus rigida</i>		15.6	19.2	20.7	19.8	18.6	18.0	15.6	19.7	20.5	19.6	19.5	19.5
<i>Larix leptolepis</i>		16.8	22.1	21.6	21.1	20.7	20.1	16.2	19.5	21.0	20.9	21.6	20.5
<i>Castanea crenata</i>		19.5	21.0	20.9	20.7	20.1	18.6	15.9	20.7	22.5	21.4	21.1	21.6
<i>Alnus japonica</i>		18.9	23.4	22.9	21.9	9.1	18.3	15.0	21.7	23.1	22.0	21.1	21.6
<i>Populus euramericana</i>		14.7	18.9	18.8	18.7	7.6	17.4	15.4	18.6	19.8	18.6	18.6	18.1

Table 7. Effect of pressure by acid concentration on hydrolysis of wood meals.

Hydrolysed for 30 min at solid/liquid ratio of 1/30

(unit: %)

Acids	Species	Concent. (%)	1.0				2.0				3.0			
			0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0
HCl	<i>Pinus densiflora</i>		14.1	18.3	20.4	21.1	17.7	20.1	21.3	20.9	17.4	17.8	20.1	19.8
	<i>Pinus rigida</i>		13.8	17.3	19.2	19.7	16.5	17.7	20.7	19.5	17.4	16.8	19.8	18.3
	<i>Larix leptolepis</i>		17.0	20.5	22.1	22.9	18.7	20.6	21.6	21.3	18.7	19.6	21.1	19.0
	<i>Castanea crenata</i>		16.5	20.7	21.0	22.4	19.5	20.3	20.9	20.3	20.4	20.7	20.7	17.7
	<i>Alnus japonica</i>		17.3	20.6	23.4	22.8	19.7	19.5	22.8	20.3	21.0	20.1	21.9	18.8
	<i>Populus euramericana</i>		15.0	17.4	18.9	19.1	16.1	18.1	19.5	20.1	16.9	18.5	18.7	17.9
H ₂ SO ₄	<i>Pinus densiflora</i>		13.7	16.2	18.3	19.5	15.2	19.8	21.0	20.7	16.7	20.1	20.8	20.5
	<i>Pinus rigida</i>		12.6	16.7	18.3	18.5	13.1	14.0	20.5	19.2	14.7	19.5	19.4	18.8
	<i>Larix leptolepis</i>		17.1	18.9	19.5	19.8	15.8	20.5	21.0	20.8	16.4	20.1	20.8	20.5
	<i>Castanea crenata</i>		12.3	16.4	20.7	21.0	16.5	19.3	20.9	19.1	17.1	20.1	21.4	20.6
	<i>Alnus japonica</i>		14.9	16.4	21.7	20.7	16.4	21.2	23.1	21.8	18.3	19.7	22.0	21.3
	<i>Populus euramericana</i>		15.0	16.3	18.6	19.8	15.7	17.9	18.6	18.7	16.3	16.9	18.6	18.1

그러므로 각 樹種別로 酸 加水分解條件을 檢討하기 위한 實驗은 비교적 糖化率이 良好한 1.0%, 2.0%, 3.0%의 酸 濃度를 사용하였다.

2. 酸 濃度와 蒸氣壓의 影響

酸의 濃度와 處理 壓力이 酸 加水分解에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 7과 같다.

HCl 濃度에 따라 壓力을 달리하였을 때의 糖化率은 濃度 1.0%에서는 오리나무를 除外하고 모든 樹種이 2.0 kg/cm² 壓力 下에서 가장 높았으나 2.0%와 3.0% 濃度에서는 이태리포푸라 外에는 1.5 kg/cm²의 壓力 下에서 좋은 結果를 보였다. H₂SO₄도 HCl과 마찬가지로 條件 下에서 좋은 糖化率을 보였다.

이는 옥수수 澱粉粕을 이용한 酸 糖化條件의 檢討에서 1.0% HCl, 2.0 kg/cm² 壓力으로 30分間 加水分解한 것이 糖化率이 가장 높았고 이보다 높은 酸 濃度와 2.0 kg/cm² 壓力 下에서 糖化率이 減少된다는 成의 報告⁴⁷⁾와는 같은 傾向이었으나 樹種에 따라 酸 濃度와 壓力의 影響에 다소 差異가 있었다.

3. 酸 濃度와 分解時間의 影響

酸의 濃度와 分解時間이 酸 加水分解에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 8과 같다. Table 8에서 보는 바와 같이 일반적으로 HCl은 濃度 1.0%, 2.0%, 3.0% 모두 時間의 經過에 따라 糖化率이 점진적으로 增加하여 45分에 最高值를 보였고 60分에서

는 減少하는 傾向이었다. 樹種別로 보면 1.0% 濃度, 45分 處理일 때 소나무 20.7%, 일본잎갈나무 22.8%, 밤나무 21.9%, 오리나무 23.4%로서 最高 糖化率을 나타내었으나 리기다소나무와 이태리포푸라는 2.0% 濃度, 45分 處理일 때 각각 20.6%, 19.5%로서 最高值를 나타내어 오리나무와 일본잎갈나무의 糖化率이 가장 높았음을 알 수 있었다.

H₂SO₄에 있어서는 각 濃度 모두 30分 處理에서 높은 糖化率을 보여준다 그 以後부터는 時間의 經過와 함께 漸減함을 알 수 있었다. 樹種別로 보면 2.0% 濃度, 30分 處理일 때 소나무 21.0%, 리기다소나무 20.5%, 일본잎갈나무 21.0%, 밤나무 22.5%, 오리나무 23.1%의 最高 糖化率을 보여준다 이태리포푸라는 19.8%로서 1.0% 濃度, 30分 處理일 때 最高值를 나타내어 오리나무와 밤나무가 가장 높은 糖化率을 나타내고 있음을 알 수 있었다.

이는 산오리나무材 酸糖化에서 가장 낮은 糖化率을 나타낸 것은 15분이었고, 45분에서는 16.0%로 가장 높았다는 鄭 等의 報告^{5,33)}와 밤송이를 1.5 kg/cm², 4.0% H₂SO₄으로 處理한 때 30分까지는 糖化率이 加水分解 時間과 함께 增加하고 35分 以上에서는 減少하는 傾向이었다는 柳 等의 報告⁶⁹⁾와 거의 一致하였으나 纖維質을 0.5% H₂SO₄로 15分間 加水分解시켰을 때 糖化率이 22.5%, 30分에서는 20.8%로 時間의 延長에 따라 減少하였다는 Simenson의 報告³⁴⁾와는 약간 相異했다.

Table 8. Effect of time by acid concentration on hydrolysis of wood meals.

Hydrolysed at 1.5 kg/cm² of solid/liquid ratio of 1/30 (unit: %)

Acids	Species	Concent (%)											
		1.0				2.0				3.0			
		Time (min)											
		15	30	45	60	15	30	45	60	15	30	45	60
HCl	<i>Pinus densiflora</i>	18.3	20.4	20.7	19.8	20.6	20.7	21.0	19.4	19.3	20.1	20.4	19.5
	<i>Pinus rigida</i>	17.1	19.2	19.8	18.8	19.5	20.4	20.6	19.7	18.7	19.8	19.5	19.2
	<i>Larix leptolepis</i>	19.2	22.1	22.8	18.9	20.4	21.6	21.9	20.9	21.0	21.1	21.0	20.1
	<i>Castanea crenata</i>	20.2	21.0	21.9	19.8	20.9	21.0	21.6	21.0	18.1	20.7	21.4	19.5
	<i>Alnus japonica</i>	20.7	23.3	23.4	21.3	22.2	22.8	22.9	21.8	20.4	21.9	22.5	19.5
	<i>Populus euramericana</i>	16.5	18.9	19.1	17.3	18.2	18.8	19.5	18.0	18.2	18.7	18.9	17.1
H ₂ SO ₄	<i>Pinus densiflora</i>	16.4	20.3	17.4	17.1	18.0	21.0	19.3	19.2	18.8	20.0	19.0	19.8
	<i>Pinus rigida</i>	15.5	19.7	17.6	16.7	17.4	20.5	18.6	18.6	18.5	19.6	19.6	19.3
	<i>Larix leptolepis</i>	17.1	19.5	18.9	17.4	18.3	21.0	19.8	19.5	20.0	20.8	20.8	20.6
	<i>Castanea crenata</i>	18.3	20.7	19.7	19.2	19.8	22.5	21.0	21.0	20.5	21.4	20.4	19.7
	<i>Alnus japonica</i>	17.7	21.7	21.5	20.1	19.8	23.1	21.3	20.7	21.0	22.0	21.0	21.5
	<i>Populus euramericana</i>	13.5	19.8	19.5	17.6	16.1	18.6	17.9	17.8	17.6	18.6	18.6	18.1

Table 9. Effect of ratio of solid/liquid on hydrolysis of wood meals.
Hydrolysed for 30 min at 1.5 kg/cm² (unit: %)

Acids	Concent. (%)		1.0				2.0				3.0			
	Species	Ratio	1/10	1/20	1/30	1/40	1/10	1/20	1/30	1/40	1/10	1/20	1/30	1/40
HCl	<i>Pinus densiflora</i>		18.0	18.9	20.4	19.7	20.8	21.0	21.3	21.1	19.7	20.0	20.3	20.0
	<i>Pinus rigida</i>		18.2	18.2	19.2	18.8	19.5	20.1	20.7	20.4	18.9	19.8	19.9	19.4
	<i>Larix leptolepis</i>		19.7	21.3	22.1	22.0	20.1	21.5	21.6	21.3	19.7	20.9	21.1	20.7
	<i>Castanea crenata</i>		19.2	19.7	21.0	20.9	20.1	20.6	20.9	20.7	18.3	19.8	10.7	20.4
	<i>Alnus japonica</i>		20.7	20.0	23.4	21.2	22.1	22.1	22.8	22.4	19.4	20.4	21.1	20.1
	<i>Populus euramericana</i>		17.7	17.8	18.0	18.3	19.3	19.7	19.5	20.1	17.1	15.6	18.7	18.4
H ₂ SO ₄	<i>Pinus densiflora</i>		16.9	19.1	19.5	18.7	18.3	18.9	21.0	19.4	18.3	18.3	19.7	19.3
	<i>Pinus rigida</i>		16.2	16.0	19.7	18.3	18.0	18.0	20.5	18.6	19.3	19.5	19.4	18.9
	<i>Larix leptolepis</i>		18.7	19.1	19.5	18.7	19.3	21.0	21.0	20.7	20.7	20.4	20.8	20.1
	<i>Castanea crenata</i>		17.1	19.1	19.5	18.7	19.2	20.7	22.5	21.2	20.1	20.7	21.4	21.3
	<i>Alnus japonica</i>		17.0	18.0	21.7	19.1	21.5	21.5	23.1	22.4	20.9	21.9	22.0	20.1
	<i>Populus euramericana</i>		16.4	18.7	19.8	19.1	17.8	18.3	18.6	18.8	17.1	18.3	18.6	18.1

Table 10. Effect of acid concentration on the prehydrolysis of wood meals.
Pretreatment; hydrolysed for 3 hrs at 40°C, Solid/liquid of 1/10,
Posttreatment; hydrolysed for 30 min at 1.5 kg/cm², with dilution
of solution. (unit: %)

Acids	Species	HCl				H ₂ SO ₄								
		Concent (%)	None	10	20	30	None	10	20	30	40	50	60	70
	<i>Pinus densiflora</i>		21.3	17.7	19.8	21.4	21.0	16.8	19.4	19.8	21.8	53.5	54.5	36.4
	<i>Pinus rigida</i>		20.7	15.8	20.1	21.0	20.5	16.4	18.2	17.4	22.5	54.0	52.0	37.1
	<i>Larix leptolepis</i>		22.6	18.6	20.7	21.6	21.0	16.5	18.6	19.4	23.3	52.8	53.8	36.6
	<i>Castanea crenate</i>		20.9	18.3	19.1	20.4	22.5	19.5	21.0	22.8	23.2	52.4	51.0	28.5
	<i>Alnus japonica</i>		22.8	19.5	20.9	22.1	23.1	21.9	22.5	22.2	24.0	52.2	45.5	29.3
	<i>Populus euramericana</i>		18.8	15.8	16.4	17.7	19.8	16.4	16.2	18.6	22.1	53.3	51.5	32.3

4. 酸 濃度와 酸 添加量의 影響

酸의 濃度와 酸 添加量이 加水分解 時 糖生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 9와 같다. Table 9와 같이 각 濃度別로 HCl과 H₂SO₄의 添加量을 달리했을 때 樹種間에 큰 差異는 없었으나 30 倍量 添加가 가장 良好하였으며 그 以上과 그 以下の 添加量에서는 다소 減少하는 傾向을 보였는데 이 중 濃度 1.0%에 있어서 10 倍量 添加는 30 倍量 添加보다 현저하게 糖化率이 낮았다. 그러나 濃度 2.0%와 3.0%에서는 이와같은 현저한 差異는 볼 수 없었다.

옥수수를 原料로 하여 酸 溶液의 比가 10 倍量 以上으로 增加해도 糖化率에 별 差異가 없었다는 成等의 報告⁴⁷⁾와 밤송이 原料에 대해 33 倍量 添加하여도 아무런 變化가 없었다는 柳 等의 報告⁵⁵⁾는 本 實

驗 結果와 다소 差異가 있었는데 試料에 따라 酸의 添加量이 다른 것으로 생각된다.

5. 濃酸의 前處理에 依한 影響

濃酸의 前處理가 樹種別 糖의 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 10과 같다.

Table 10과 같이 進한 HCl의 前處理는 前處理 없이 酸 加水分解한 것보다 오히려 糖化率이 減少하는 傾向을 보였으나 HCl의 濃度를 增加함에 따라 糖化率이 높아지는 傾向이었으며, 30% 濃度일 때 오리나무가 22.1%로 비교적 높은 糖化率을 나타내었다. 糖化率이 減少한다는 成等의 報告⁴⁵⁾와는 다소 差異가 있었다.

H₂SO₄에 있어서는 濃度의 增加에 따라 糖化率이

점차로 증가하여 50~60% 사이에서最適值에 달했고 이濃度を 넘으면 급격히減少하는傾向을 보였다. 樹種別로 檢討해 보면 50% 濃度에서는 높은糖化率을 보인 樹種은 밤나무 52.4%, 리기다소나무 52.2%, 오리나무 52.2%, 이태리포푸라 53.3%였으며, 60%의 濃度에서는 일본잎갈나무 53.8%와 소나무 54.5%의 糖化率을 보였는데 이는 濃酸에 의한廢纖維資源의 利用에 관한成等의 實驗結果¹⁹⁾와 거의一致하는傾向이었다.

以上の結果를 보면 濃酸의 前處理 効果는 HCl 보다는 H₂SO₄가 좋았고 H₂SO₄의 濃度에 따라 樹種別로 糖化率이 異なり었음을 알 수 있었다. 50~60% 濃酸으로 前處理하여 糖化한 結果는 糖化率이 매우 높았으나 묽은 酸으로 稀釋하여야 하므로 糖液의 濃度가 낮아서 問題가 될 것 같다.

6. 熱處理 溫度 및 時間에 의한 影響

熱處理 溫度와 處理 時間이 酸 加水分解에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 11, 12와 같다.

모든 樹種이 熱處理 溫度 190℃에서 가장 높은 糖化率을 보였고 이 溫度를 벗어나면 점차로 減少하는

傾向이었는데 일반적으로 170℃ 보다는 230℃에서의 處理區가 減少率이 심했으며 이 중에서도 밤나무와 이태리포푸라가 더욱 심하였다. 190℃에서의 HCl 處理는 오리나무가 23.7%로 가장 높았고 소나무가 20.7%로 가장 낮았으며 H₂SO₄에서는 오리나무가 22.5%로 역시 높았고 리기다소나무와 이태리포푸라가 19.8%로 낮은 糖化率을 보였다.

그러므로 190℃에서 處理 時間을 달리하여 檢討한 結果, 일본잎갈나무를 除外하고는 모두 30分 處理에서 다소 높았으며 그 以上の 時間에서는 減少하는 傾向이었다. 오리나무는 HCl 處理에서 24.0%, H₂SO₄ 處理에서 23.4%로 糖化率이 가장 높았고, 이태리포푸라는 HCl 處理에서 20.9%, H₂SO₄ 處理에서 20.7%로 각각 낮았으나 對照區보다는 모두 增加 趨勢를 보였다.

이는 일반적으로 基質을 加熱하여 粉碎함으로써 糖化率이 增大된다는 Reese의 報告⁴²⁾와 포고 재빠 廢材의 熱處理에서의 岡의 報告³⁴⁾와는 類似한 結果이었다.

以上에서 얻은 酸 加水分解 條件에 따라 우리나라 全地域에 植栽되어 있는 針葉樹인 소나무와 比較적

Table 11. Effect of temperature of heat treatment on hydrolysis of wood meals. Hydrolysed for 30min after 45min of heat treatment (unit: %)

Species	Acids	Temp. (°C)	HCl					H ₂ SO ₄				
			None	170	190	210	230	None	170	190	210	230
<i>Pinus densiflora</i>			20.7	20.4	20.7	19.8	18.3	21.0	18.8	20.4	18.3	17.1
<i>Pinus rigida</i>			21.3	21.0	21.9	19.5	18.7	19.5	19.8	19.8	18.3	16.8
<i>Larix leptolepis</i>			21.6	19.4	22.8	21.0	20.4	21.0	20.6	21.6	19.8	19.7
<i>Castanea crenata</i>			21.0	18.9	22.8	20.4	18.0	22.5	18.0	21.0	20.1	16.5
<i>Alnus japonica</i>			22.8	21.3	23.7	21.3	21.0	23.1	21.9	22.5	20.7	21.0
<i>Populus euramericana</i>			19.5	18.3	21.0	18.3	15.0	18.6	18.9	19.8	19.2	13.8

Table 12. Effect of time of heat treatment on the hydrolysis of wood meals. Hydrolysed for 30min at 1.5kg/cm² with dilution of 2.0% acid after 190°C of heat treatment. (unit: %)

Species	Acids	Time(min)	HCl				H ₂ SO ₄			
			None	30	45	60	None	30	45	60
<i>Pinus densiflora</i>			20.7	22.7	20.7	20.6	21.0	21.5	20.4	20.1
<i>Pinus rigida</i>			21.3	22.3	21.9	21.9	19.5	20.0	19.8	19.8
<i>Larix leptolepis</i>			21.6	22.3	22.8	22.1	21.0	22.1	22.6	20.9
<i>Castanea crenata</i>			21.0	22.8	22.8	22.5	22.5	22.5	22.3	21.8
<i>Alnus japonica</i>			22.8	24.0	23.7	22.5	23.1	23.4	22.5	22.4
<i>Populus euramericana</i>			19.5	20.9	20.0	21.4	18.6	20.7	19.8	19.4

빨리 자라고 糖化率이 높은 潤葉樹인 오리나무를 以後의 實驗材料로 選擇하였고 加水分解를 위한 酸은 일반적으로 HCl 이 다소 높은 傾向이었으나 經濟性和 alcohol 醱酵에 미칠 수 있는 影響 등을 고려하여 H₂-SO₄ 를 擇하였다. 加水分解 條件은 190℃에서 30分間 熱處理하고 分解液의 糖 濃度를 고려하여 2.0% H₂SO₄ 를 10倍量 加하였으며 1.5kg/cm²의 壓力에서 30分間 酸處理한 液을 다음의 alcohol 醱酵에 使用하였다.

7. 酸 加水分解液의 糖 組成

分解液을 이은 交換樹脂 및 thin layer chromatography로 分別 同定한 糖의 種類는 Fig. 1 과 같으며 이 chromatogram을 T.L.C. Scanner에 의하여 作成한 profile 및 integration curve는 Fig. 2와 같았다.

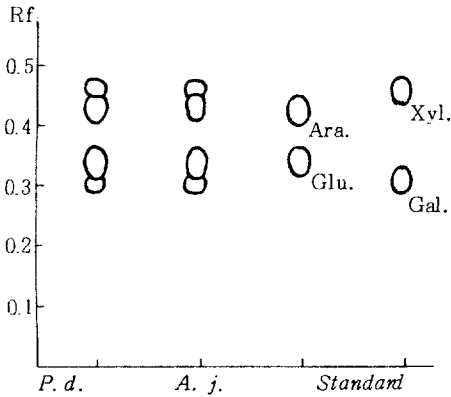


Fig. 1. Thin layer chromatogram of free sugars produced at hydrolyzates of *Pinus densiflora* and *Alnus japonica* with 2% sulfuric acid.

Fig. 1과 같이 glucose, arabinose, galactose 및 xylose의 4種이 分離 同定되었는데 그 중에서 galactose와 xylose는 微量 檢出되어 T.L.C. Scanner 상에서는 定量할 수 없었고 glucose, arabinose만을 分離하여 scanning한 結果 Fig. 2와 같았다. 즉 오리나무는 소나무보다 遊離糖의 含量이 많았다. 木粉 1g에서 소나무는 glucose 137.78mg, arabinose 68.24mg이었고 오리나무에서는 glucose 162.22mg, arabinose 68.24mg이었고 오리나무에서는 glucose 162.22mg, arabinose 65.89mg이 定量되었는데 分解液의 6탄당 比率는 소나무에서 66.8%, 오리나무에서 71.0%이었다.

몇가지 農産物을 2% HCl로 分解시켜 얻은 加水

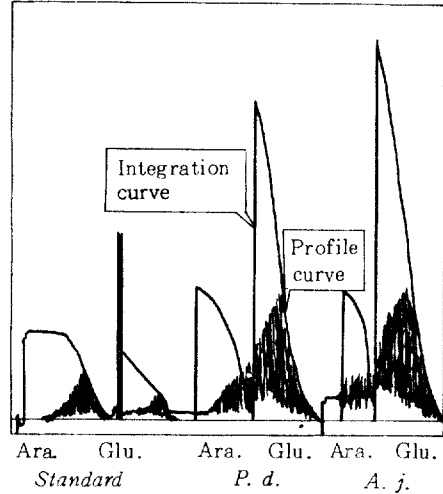


Fig. 2. Distribution profile and integration curve obtained by zig-zag scanning to zone on thin layer chromatogram of free sugars produced at hydrolyzates of *Pinus densiflora* and *Alnus japonica* with 2% sulfuric acid.

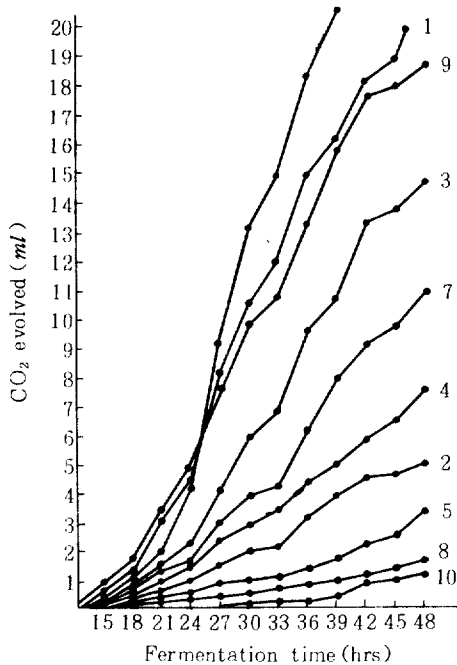
分解液에서 glucose, xylose, arabinose 및 galactose의 遊離糖이 檢出되었다는 Dudkin의 報告⁵⁰와 소나무의 酵素 加水分解에서 酵素 處理할 때에 1時間內에 xylose와 arabinose가 檢出되고 處理時間이 경과함에 따라 glucose, mannose, galactose가 檢出되어 酸 加水分解液과 酵素 加水分解液의 糖組成이 初期에는 相異하였다는 Sudo 등의 報告⁵³ 등이 있는데 본 實驗에서는 galactose와 xylose는 微量 檢出되었으나 mannose는 確認할 수 없었다.

III. 酸 加水分解液의 Alcohol의 醱酵

1. 優秀 酵母의 選定

基本培地 20ml를 注加한 Einhorn 醱酵管에 酵母를 一定量씩 接種하고 30℃에서 48時間 醱酵시키면서 經時的으로 CO₂ 發生量을 測定한 結果는 Fig. 3과 같다.

Alcohol 醱酵에서 生成되는 CO₂는 15時間을 前後하여 發生되기 시작하였고 菌株間에 CO₂ 發生量은 差異가 현저하였다. 이들 菌株 중에서 CO₂ 發生이 왕성한 *Sacch. cerevisiae* JAFM101과 *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* JAFM 125를 選定하여 以下 實驗에 使用하였다.



1. *Sach. cerevisiae* JAFM 101
2. *Sach. cerevisiae* JAFM 109
3. *Sach. cerevisiae* JAFM 117
4. *Sach. cerevisiae* JAFM 118
5. *Sach. cerevisiae* JAFM 121
6. *Sach. cerevisiae* var. *ellipsoideus* JAFM 125
7. *Sach. cerevisiae* var. *ellipsoideus* JAFM 127
8. *Sach. formosensis* 396
9. *Sach. formosensis* Nakazawa
10. *Sach. sake*

Fig 3. Changes of CO₂ contents during alcohol fermentation

2. 中和劑의 影響

Alcohol 醱酵에서 酸 加水分解液을 中和한 알카리

의 種類가 alcohol 生産, 菌體量 및 pH에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 13과 같다.

Alcohol 生産에는 CaCO₃로 中和했을 때가 가장 좋았고 그 다음으로 Ca(OH)₂, NaOH 順이었다. 菌體量은 樹種, 菌株間에 다소 差異가 있었으나 일반적으로 NaOH, KOH 및 Ca(OH)₂로 中和할 때가 좋았으며 pH는 CaCO₃로 中和했을 때가 다른 中和劑보다 낮았다.

이는 芻料과 왕겨의 酸 糖化液을 이용한 *Hansenula subpelliculosa* 培養에서 酵母 生産에 좋은 中和劑는 CaCO₃, Ca(OH)₂, NH₄OH 順이었다는 成 等의 報告⁴⁸⁾와는 差異가 있었다.

3. pH의 影響

醱酵 培地의 pH가 alcohol 醱酵에 미치는 影響은 Table 14와 같다. Alcohol 生産과 菌體量의 增加는 pH 2.0~2.5 범위의 強酸性에서는 극히 不良했으며 pH 3.0에서 alcohol 生産은 현저하게 增加하였으나 菌體量은 完滿하게 增加하였다. Alcohol 生産의 最適 pH는 4.5~5.5로 菌株間에 큰 差異는 볼 수 없으나 樹種間에 있어서 소나무는 오리나무보다 alcohol 生産이 높았다. 菌體量 增加는 pH 5.0~6.0 사이에서 最高值를 나타냈으며 그 以上에서는 서서히 減少하였다.

菌株間에는 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101이 優秀했고 樹種間에는 오리나무가 良好하였다. 醱酵 종료 후 醱酵液의 pH는 初發 pH가 낮으면 pH變化가 적었으나 높은 pH에서는 減少가 심하였다.

以上の 結果는 밤송이 加水分解에서의 *Candida tropicalis*와 *Candida utilis*의 菌體培養의 最適 pH는 각각 6.0과 5.0이었다는 柳 等의 報告⁶⁵⁾와 木粉 및 廢新聞紙를 이용한 酵母 菌體培養에서 pH 5.0~7.0 사이에서 좋았다는 成 等의 報告⁴⁹⁾와 대체적으로 일치하였다.

Table 13. Effect of neutralizer on alcohol fermentation

Strains	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125					
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
KOH	2.25	0.081	3.41	1.95	0.119	3.71	2.12	0.076	3.95	2.09	0.061	3.61
Ca(OH) ₂	2.35	0.069	3.30	2.08	2.121	4.01	2.34	0.061	3.40	2.18	0.083	3.90
CaCO ₃	2.37	0.062	3.02	2.15	0.111	3.73	2.42	0.068	3.20	2.22	0.075	3.41
NH ₄ OH	2.27	0.054	3.91	2.03	0.076	3.72	2.02	0.054	3.50	2.02	0.078	3.73
NaOH	2.29	0.078	3.81	2.06	0.129	3.91	2.40	0.061	3.45	2.06	0.086	3.61

Table 14. Effect of pH on alcohol fermentation

Strains	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAF A 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAF M 125					
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
Species	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
2.0	0.10	0.021	2.25	0.075	0.027	2.28	0.20	0.027	2.26	0.10	0.026	2.22
2.5	0.49	0.049	2.65	0.105	0.064	2.71	0.32	0.052	2.68	0.13	0.057	2.73
3.0	1.27	0.077	2.72	1.250	0.081	2.90	1.62	0.070	2.80	1.33	0.080	2.90
3.5	2.25	0.080	2.88	1.990	0.100	3.11	2.27	0.076	2.85	1.95	0.093	3.11
4.0	2.29	0.090	3.04	2.090	0.120	3.41	2.29	0.082	3.11	2.05	0.097	3.52
4.5	2.35	0.098	3.20	2.100	0.142	3.83	2.35	0.085	3.20	2.10	0.105	3.95
5.0	2.44	0.105	3.44	2.120	0.160	4.39	2.44	0.089	3.55	2.09	0.110	4.48
5.5	2.40	0.107	3.68	1.990	0.165	4.55	2.42	0.091	3.85	2.03	0.115	4.67
6.0	2.33	0.104	3.81	1.930	0.163	4.67	2.35	0.080	3.90	1.90	0.107	4.75
6.5	2.15	0.097	3.96	1.870	0.142	4.75	2.10	0.087	4.02	1.80	0.093	4.80
7.0	2.05	0.088	3.98	1.850	0.121	4.77	2.02	0.080	4.10	1.75	0.084	4.85
7.5	2.03	0.076	3.98	1.840	0.105	4.86	2.01	0.078	4.15	1.73	0.083	4.85
8.0	2.02	0.069	4.01	1.770	0.097	4.87	1.99	0.070	4.15	1.70	0.077	4.87
9.0	2.01	0.075	4.07	1.770	0.092	4.90	1.98	0.064	4.18	1.66	0.022	4.92

Table 15. Effect of temperature on alcohol fermentation

Strains	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAF M 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAF M 125					
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
Species	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
24	2.27	0.107	3.57	2.15	0.112	4.25	2.38	0.099	3.71	2.20	0.115	4.30
27	2.30	0.101	3.55	2.17	0.107	4.24	2.44	0.095	3.62	2.22	0.111	4.20
30	2.42	0.087	3.83	2.37	0.099	4.30	2.47	0.090	3.91	2.27	0.098	4.32
33	2.33	0.074	3.85	2.25	0.089	4.35	2.44	0.084	3.90	2.22	0.076	4.35
37	2.25	0.062	3.92	2.18	0.076	4.44	2.37	0.075	4.01	2.10	0.072	4.50

4. 温度의 影響

Alcohol 生産과 菌體 增殖에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 15와 같다.

Table 15에 의하면 alcohol 生産量은 30°C에서 제일 높았고 菌株間에는 별 差異가 없었으나 樹種間에 差異가 있었다. 菌體量은 alcohol 生産 適温인 30°C보다 낮은 25°C에서 높았으며 菌株間에는 별 差異가 없었으나 樹種間에는 다소 差異가 있었다. pH는 兩 菌株에서 모두 오리나무보다는 소나무가 낮았다.

이러한 結果는 *Saccharomyces* 屬의 ethanol 醱酵 最適温度는 生育温度보다 10°C 程度 높다는 Stokes의 報告⁵²와 *Candida* 屬의 菌體培養에 있어서 生育 適温이 30°C 이었다는 朴 等의 報告⁴⁰와는 약간의 差異가 있었다.

5. 窒素源의 影響

基本 培地에 각종 窒素源을 窒素量이 0.02% 되도록 添加하고 또 양호한 窒素源을 濃度別로 添加한 結果는 Table 16, 17과 같다.

암모니아態 窒素가 窒素態나 亞窒素態 窒素보다 alcohol 生産이나 菌體量 增加에 현저하게 効果的이었는데 亞窒素態 窒素는 無添加보다 減少하는 趨勢를 보였다. 이는 *Saccharomyces* 屬은 일반적으로 窒素鹽이나 亞窒素鹽을 質化하지 못한다는 Reed 等의 報告⁴²와 一致하였다.

Alcohol 生産에는 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 및 NH_4NO_3 이 効果的이었고 菌體增殖에는 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 가 효과적이어서 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 等を 濃度別로 添

Table 16. Effect of various nitrogen salts on alcohol fermentation

Strains Species	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM125					
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
	Nitrogen salt (%)	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)
None	1.90	0.059	3.60	1.60	0.072	3.85	1.62	0.045	3.80	1.85	0.058	4.00
NH ₄ Cl 0.02	2.17	0.080	3.20	1.78	0.095	3.70	2.18	0.066	3.22	1.90	0.073	3.90
(NH ₄) ₂ CO 0.02	2.25	0.093	3.73	1.95	0.118	4.11	2.20	0.070	3.70	1.90	0.080	4.10
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.02	2.27	0.082	3.32	1.90	0.094	3.80	2.30	0.071	3.30	1.92	0.085	3.83
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 0.02	2.20	0.090	3.31	1.95	0.119	4.12	2.15	0.073	3.40	1.85	0.110	4.01
KNO ₃ 0.02	1.85	0.058	3.80	1.75	0.076	4.30	1.65	0.056	3.81	1.80	0.057	4.30
KNO ₂ 0.02	1.55	0.044	4.32	1.70	0.062	4.60	1.33	0.050	4.70	1.78	0.054	4.61
NaNO ₃ 0.02	1.60	0.067	3.91	1.78	0.075	4.34	1.65	0.050	3.92	1.89	0.046	4.32
NaNO ₂ 0.02	1.25	0.046	4.30	1.77	0.072	4.60	1.17	0.040	4.40	1.84	0.045	4.71
NH ₄ NO ₃ 0.02	2.25	0.087	3.41	1.93	0.108	3.81	2.27	0.062	3.34	1.94	0.077	3.82

Table 17. Effect of nitrogen salt concentration on alcohol fermentation

Strains Species	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125						
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			
	Nitrogen salts (%)	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
None	1.95	0.065	3.60	1.60	0.082	3.85	1.62	0.040	3.80	1.90	0.068	4.00	
0.02	2.27	0.105	3.60	2.02	0.105	4.10	2.25	0.068	3.60	2.05	0.082	4.04	
(NH ₂) ₂ CO	0.04	2.18	0.111	3.97	1.93	0.119	4.10	2.20	0.085	3.75	1.98	0.107	4.10
	0.06	2.09	0.126	4.20	1.90	0.118	4.14	2.12	0.080	4.01	1.94	0.095	4.20
	0.08	2.02	0.168	4.44	1.90	0.111	4.15	2.07	0.076	4.20	1.90	0.092	4.30
	0.02	2.30	0.093	3.10	2.07	0.108	3.68	2.35	0.071	3.20	1.99	0.094	3.72
	0.04	2.25	0.100	3.15	1.95	0.126	3.69	2.25	0.075	3.08	2.09	0.098	3.79
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.06	2.17	0.110	3.15	1.93	0.135	3.62	2.17	0.081	3.10	2.03	0.100	3.80
	0.08	2.12	0.083	3.10	1.89	0.124	3.28	2.15	0.062	3.09	1.93	0.087	3.89
	0.02	2.27	0.087	3.21	1.98	0.112	3.70	2.22	0.067	3.08	2.07	0.088	3.71
	0.04	2.17	0.095	3.01	1.87	0.134	4.18	2.15	0.068	3.10	2.12	0.088	3.73
NH ₄ NO ₃	0.06	2.14	0.105	3.10	1.84	0.128	3.60	2.12	0.077	3.03	1.98	0.090	3.73
	0.08	2.12	0.102	3.80	1.84	0.104	3.62	2.09	0.064	3.04	1.89	0.087	3.80

加한 결과 alcohol 生産에는 모두 濃度 0.02%의 添加에서 가장 높았고 이 중 (NH₄)₂SO₄가 가장 優秀했으며 菌株間에는 별 差異가 없었으나 樹種間에는 소나무에서 더 많이 生産되었다.

酵母 增殖에는 0.04~0.0%의 濃度에서 좋았으며 (NH₂)₂CO와 (NH₄)₂SO₄의 添加가 더 効果的이었다. 그리고 菌株間에는 *Sacch. cerevisiae* JAFM101이 좋았고 樹種間에는 오리나무 木粉에서 効果的이었다. pH는 일반적으로 오리나무보다 소나무에서 더 낮았으며 窒素源 間에도 상당한 差異가 있었다.

以上の 結果는 방송이 加水分解液에서의 *Candida utilis* 菌株 培養에 (NH₂)₂CO₃와 (NH₄)₂SO₄이 좋은 窒素源이었다고 하는 朴 等의 報告⁴⁰⁾와 또한 옥수수 澱粉粕에서의 *Candida tropicalis* 培養에 (NH₂)₂CO 添加가 좋았다는 成 等의 報告⁴²⁾의 類似하였다.

6. K와 P의 影響

基本培地에 3가지 磷酸鹽을 濃度別로 處理하여 實驗한 結果는 Table 18과 같다.

Table 18에 의하면 磷酸鹽은 無添加보다 添加할

때 alcohol 生産과 菌體量 增殖이 良好하였고 alcohol 生産은 KH_2PO_4 0.1% 添加에서 가장 좋았다. 菌株 別로 보면 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101에서는 소나무가 良好하였고 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125에서는 오리나무가 良好하였다.

菌體量은 일반적으로 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125 보다는 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101이 좋았고 소나무 보다는 오리나무에서 良好하였으며 이 중에서도 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101의 경우 오리나무 加水 分解液에 K_3PO_4 0.1%와 0.2% 그리고 K_2HPO_4 0.3%로 添加할 때 현저한 增加를 보였다.

*Hansenula subpelliculosa*에서 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 를 0.2~0.6% 添加할 때 生育度가 좋았다는 成 等의 報告⁴⁹⁾와는 類似하나 *Candida tropicalis*와 *Candida utilis*는 0.08% 添加에서 菌體 成長이 좋았다는 報告^{49, 50)}와는 다소 差異가 있었다.

7. Mg의 影響

Mg 源을 濃度別로 添加하여 檢討한 結果는 Table 19와 같다.

Alcohol 生産과 菌體量에 있어서 Mg 無添加보다는 Mg 源을 0.05와 0.1% 添加할 때 약간의 效果가 있었고 이 중에서도 0.05%에서 더 良好하였다. MgSO_4 가 MgCl 보다 다소 效果의 있었고 0.15%에서는 오히려 無添加와 類似하거나 減少하는 趨勢를 보였다.

以上の 結果로 보아 菌株와 樹種間에는 별 差異가 없었고 Mg 源은 酸 加水分解液의 alcohol 醱酵에서 磷酸鹽類와 같이 큰 效果는 없었다.

8. 其他 無機鹽類의 影響

基本 培地에 각종 無機鹽類를 添加하여 alcohol 醱酵에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 20과 같다.

Table 20에 의하면 alcohol 生産에는 여러가지 無

Table 18. Effect of K and P-source and it's concentration on alcohol fermentation

Strains Species	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125						
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			
	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	
None	1.85	0.092	3.68	1.90	0.090	3.84	1.92	0.080	3.80	1.95	0.083	3.95	
KH_2PO_4	0.1	2.25	0.102	3.55	2.27	0.110	3.71	2.23	0.090	3.65	2.29	0.090	3.85
	0.2	2.22	0.120	3.37	2.18	0.119	3.70	2.20	0.006	3.64	2.30	0.091	3.89
	0.3	2.20	0.105	3.38	2.14	0.127	3.63	2.18	0.104	3.63	2.22	0.093	3.85
K_2HPO_4	0.1	2.23	0.099	3.50	2.15	0.129	3.62	2.20	0.102	3.55	2.30	0.087	3.73
	0.2	2.20	0.123	3.48	2.14	0.136	3.56	2.18	0.100	3.68	2.25	0.099	3.90
	0.3	2.17	0.144	3.55	2.09	0.155	3.89	2.17	0.084	3.76	2.18	0.119	4.05
K_3PO_4	0.1	2.17	0.115	3.71	2.07	0.165	3.69	2.22	0.115	3.78	2.29	0.101	3.95
	0.2	2.03	0.140	3.48	2.02	0.159	3.63	2.17	0.101	3.55	2.25	0.105	4.00
	0.3	1.95	0.120	3.70	1.98	0.138	3.78	2.02	0.096	3.60	2.07	0.109	4.20

Table 19. Effect of Mg-source and it's concentration on alcohol fermentation

Strains Species	<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125						
	<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			
	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	
None	1.94	0.102	3.70	1.90	0.106	3.8	1.98	0.087	3.80	1.91	1.101	3.95	
MgSO_4	0.05	2.15	0.112	3.36	2.12	0.115	3.6	2.20	0.110	3.65	2.19	0.114	3.70
	0.10	2.04	0.106	3.98	2.01	0.110	3.7	2.13	0.105	3.70	2.10	0.109	3.90
	0.15	1.88	0.094	4.02	1.85	0.101	3.9	1.95	0.099	3.85	1.93	0.094	4.00
MgCl_2	0.05	2.12	0.110	3.40	2.10	0.114	3.7	2.19	0.108	3.40	2.18	0.108	3.75
	0.10	2.01	0.102	3.63	1.99	0.110	3.9	2.07	0.100	3.80	2.03	0.103	3.85
	0.15	1.89	0.094	3.80	1.88	0.092	4.1	1.90	0.084	4.25	1.87	0.094	4.00

Table 20. Effect of inorganic salt on alcohol fermentation

Strains		<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125					
Species		<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
Inorganic salts (mg/ℓ)		Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
None		2.25	0.068	3.19	2.05	0.082	3.55	2.32	0.057	3.21	2.05	0.066	3.65
CaCl ₂	250	2.33	0.084	3.24	2.07	0.091	3.70	2.35	0.085	3.31	2.05	0.065	3.70
NaCl	200	2.26	0.083	3.23	2.05	0.087	3.73	2.27	0.069	3.29	2.15	0.075	3.85
MnCl ₂	210	2.29	0.069	3.22	2.05	0.090	3.67	2.35	0.061	3.30	2.12	0.083	3.75
Fe-citrate	10	2.21	0.067	3.24	2.07	0.086	3.73	2.30	0.067	3.26	2.07	0.073	3.79
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	2.33	0.075	3.18	2.05	0.090	3.53	2.33	0.067	3.23	1.93	0.068	3.55
CuSO ₄	1	2.30	0.068	3.21	2.01	0.086	3.51	2.38	0.067	3.38	2.12	0.070	3.55

Table 21. Effect of various vitamins on alcohol fermentation

Strains		<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101						<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125					
Species		<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>			<i>Pinus densiflora</i>			<i>Alnus japonica</i>		
Vitamins (μg/100ml)		Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
None		2.07	0.090	3.49	1.85	0.094	4.15	2.02	0.080	3.49	1.80	0.090	4.05
Thiamin	100	2.35	0.005	3.70	2.07	0.096	4.21	2.11	0.097	3.60	1.91	0.094	4.04
Ca-Pantothenate	100	1.99	0.013	3.30	1.99	0.118	4.02	1.78	0.098	3.30	1.89	0.096	4.00
Biotin	5	2.12	0.005	3.36	1.84	0.110	4.18	1.94	0.970	3.36	1.70	0.094	3.99
Inositol	200	2.22	0.099	3.42	1.87	0.086	4.13	1.95	0.830	3.42	1.77	0.091	4.02
Pyridoxine	100	2.32	0.090	3.48	1.85	0.087	4.20	2.05	0.075	3.48	1.87	0.099	4.00
Riboflavin	100	2.44	0.090	3.50	2.09	1.100	4.16	2.16	0.068	3.62	1.93	0.087	4.11

機塩類 중에서 CaCl₂, MnCl₂, CuSO₄ 의添加는 약간의 효과가 있었으나 그밖의 無機塩의 効果는 없었다. 菌種別로 보면 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125 가 良好했고 樹種別로 보면 오리나무보다 소나무가 비교적 良好하였다.

또 無機塩이 菌株増殖에는 약간의 효과가 있었으나 이 중에서도 CaCl₂, NaCl 이 더 效果的이었으며 pH 는 큰 差異가 없었다. 그러므로 酸加水分解液의 alcohol 醱酵에는 CaCl₂ 添加가 效果的이었다.

9. 각종 vitamin 에 의한 影響

基本 培地에 각종 vitamin 을 添加하여 alcohol 醱酵에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 21과 같다.

Table 21에 의하면 일반적으로 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101에서는 無添加보다 vitamin 添加가 alcohol 生産에 약간의 差異가 있었으나 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125에서는 效果가 없었다. 다만 thiamin 과 riboflavin 만은 兩 菌株에서 效果가 있었다.

樹種別로 보면 兩 菌株에서 오리나무보다 소나무에서 alcohol 生産이 良好하였다.

菌體量은 兩 菌株에서 Ca-pantothenate, biotin 이 제일 良好하였고 樹種別로 보면 vitamin 의 種類에 따라서 다소 差異가 있었다. pH 는 역시 兩 菌株 모두 소나무에서 낮았다.

고구마 澱粉 糖化에 있어서 酵母増殖에 Ca-pantothenate 와 inositol 이 効果적이었다는 梁 等의 報告⁵⁰와 다소 差異가 있었으나 清酒 酵母의 vitamin 要求性에 對한 實驗에서 有機窒素를 사용하였을 경우 Ca-pantothenate 가 必須要因이고 기타 inositol, thiamin, biotin 은 補民의 效果가 있었다는 福井의 報告¹³⁾와는 부분적으로 類似하였다.

10. Tannin 및 furfural 의 影響

木材에 비교적 많이 含有되어 있는 tannin 과 加水分解의 中間 産物인 furfural 을 基本培地에 添加하여 alcohol 의 醱酵에 미치는 影響을 檢討한 結果는

Table 22. Effect of tannin and furfural concentration on alcohol fermentation

Strains		<i>Sacch. cerevisiae</i> JAFM 101			<i>Sacch. ellipsoideus</i> JAFM 125		
Tannin and furfural (%)		Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH	Ethanol (v/v %)	Cell mass (mg)	pH
None		2.10	0.040	2.68	2.14	0.051	2.55
	0.001	2.15	0.044	2.69	2.18	0.053	2.55
	0.01	2.18	0.048	2.70	2.25	0.052	2.55
	0.1	2.10	0.058	2.70	2.14	0.059	2.61
	1.0	1.57	0.040	2.90	1.86	0.047	3.05
Tannin	0.001	2.15	0.047	2.70	2.29	0.052	2.50
	0.01	2.23	0.045	2.65	2.71	0.048	2.52
	0.1	2.21	0.039	2.65	2.60	0.033	2.17
Furfural	1.0	1.65	0.030	3.40	1.74	0.024	3.25

Table 22와 같다.

Table 22와 같이 兩 菌株의 alcohol 生産에 있어서 tannin 에서는 0.001~0.01%, furfural 0.001~0.1% 범위 내에서는 약간 增加 趨勢를 보였으나 1.0% 濃度에서는 심한 沮害現狀을 나타냈다. 菌體量도 tannin 0.1%까지는 濃度の 增加에 따라서 점진적으로 增加現狀을 보였으나 그 以上の 濃度에서는 오히려 減少되었으며 furfural 에서는 濃度の 增加에 따라 점진적인 減少現狀을 보였다. pH는 tannin 과 furfural 모두 1.0% 濃度を 除外하고는 濃度別로 큰 差異를 볼 수 없었다.

酸 加水分解 過程 중에 酸의 濃도가 furfural 의 量이 점진적으로 增加하였다. 樹種別 tannin 含量은 Table 5 와 같이 0.20~0.48%이고 furfural 含量은 Table 23과 같이 2% H₂SO₄에서 9.02~9.20mg 이므로 실제 醱酵 培地에 들어 있는 量은 0.09%로서 本 實驗 條件에서는 酸 加水分解 중에 들어있는 furfural 이 alcohol 醱酵에 沮害를 주는 濃度は 아니었다.

Table 23. Formation of furfural in hydrolysis of wood meals.
Hydrolysed for 30 min at 1.5kg/cm²
(unit:mg/d.w.g)

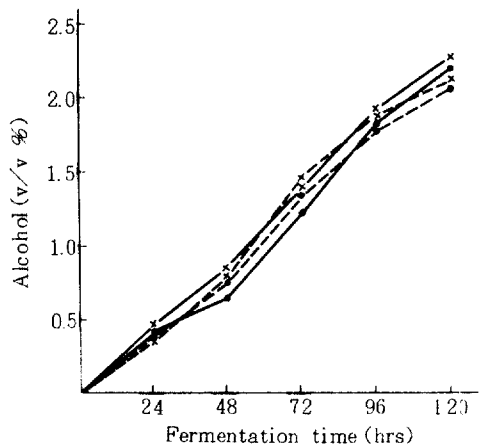
Species H ₂ SO ₄	<i>Pinus densiflora</i> <i>Alnus japonica</i>	
	1.0	3.60
2.0	9.02	9.20
3.0	14.40	14.42
4.0	21.80	22.41
5.0	24.41	27.20
10.0	48.40	54.81

Tannin 成分이 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101의 alcohol 醱酵을 促進한다는 Sikovec 의 報告⁴⁹⁾와는 거의 일치하였으나 furfural 0.008% 以上の 濃度에서 *Candida tropicalis*의 菌株增殖에 심한 沮害를 한다는 成 等의 報告⁴⁵⁾와는 다소 差異가 있었다.

11. 醱酵期間 중의 經時的인 變化

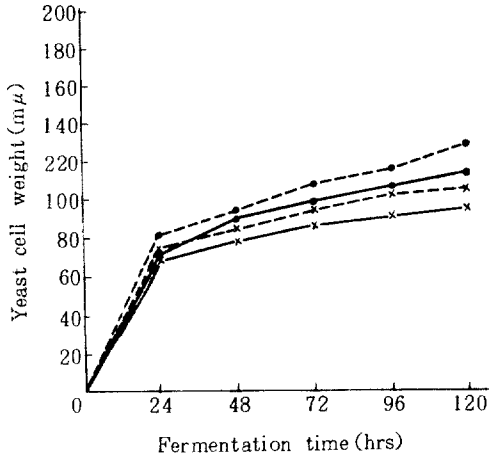
1) Alcohol

Alcohol 生産力이 강한 菌株로 選定된 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101과 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125 에 의한 소나무와 오리나무 木粉의 酸 糖化液 醱酵



- - ○ *Sach cerevisiae* JAFM 101, *Pinus densiflora*
- - □ *Sach cerevisiae* JAFM 101, *Alnus japonica*
- × - × *Sach ellipsoideus* JAFM 125, *Pinus densiflora*
- × · × *Sach ellipsoideus* JAFM 125, *Alnus japonica*

Fig. 4. Changes of alcohol contents during alcohol fermentation



○-○ *Sach. cerevisiae* JAFM 101, *Pinus densiflora*
 ○-○ *Sach. cerevisiae* JAFM 101, *Alnus japonica*
 × × *Sach. ellipsoideus* JAFM 125, *Pinus densiflora*
 × × *Sach. ellipsoideus* JAFM 125, *Alnus japonica*

Fig. 5. Changes of yeast cell contents during alcohol fermentation

에서 alcohol 生産量의 變化는 Fig. 4와 같다.

Fig. 4와 같이 醱酵期間이 경과됨에 따라 점진적으로 alcohol 量이 增加되었으며 특히 48~96時間 사이에는 더 급격히 上昇하였다. 120時間 醱酵에는 alcohol 이 2.10~2.25% 정도 生産되었으며 醱酵率은 81.2~87.7% 정도였다. 兩 菌株間에는 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125, 樹種間에는 소나무가 alcohol 生産이 더 良好하였다.

2) 酵母의 菌體量

醱酵期間 중의 酵母 菌體量의 變化는 Fig. 5와 같다. Fig. 5와 같이 醱酵期間 중의 菌體量은 接種 後 24時間까지는 급격히 上昇되었으나 그 以後부터는 점진적인 增加를 보였다. 兩 菌株間에는 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101 이, 樹種間에는 오리나무 木粉에서 菌體量이 약간 많아 alcohol 生産량과 菌體 生産량과는 相反된 結果를 나타내었다. 이는 菌株의 生理的인 特性과 加水分解液의 成分組成의 差異에 그 原因이 있는 것 같다.

3) 殘留糖

醱酵 종료 후 醱酵液의 殘留糖을 檢討한 結果는 Fig 6과 같다. Fig. 6과 같이 醱酵時間의 경과에 따라 醱酵液 중의 糖量이 점진적으로 減少되어 120時間 以後에는 殘留糖이 0.55~0.65% 정도에 이르렀고 糖 消費率은 87.0~89.0%이었다. 菌 接種 후 24時

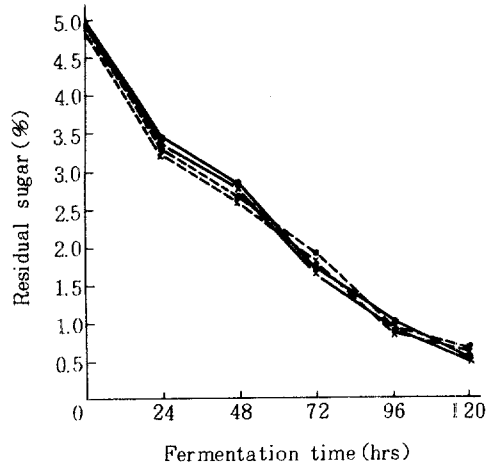


Fig. 6. Changes of residual sugars during alcohol fermentation.

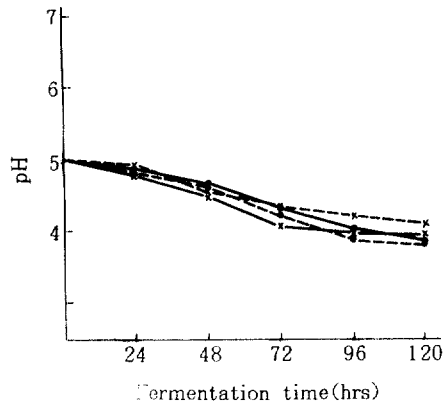


Fig. 7. Changes of pH during alcohol fermentation

間까지는 활발한 酵母增殖이 이루어지고 48~96時間 사이에는 왕성한 alcohol 醱酵에 의해서 전체 糖의 消費가 많았다.

以上 醱酵液 중의 殘留糖이 0.55~0.65%이고 Fig. 2에서와 같이 分解液 중의 6탄당이 66.8~71.0%인데 그 以上으로 糖이 消費된 것으로 보아 酵母 增殖에 일부 5탄당도 消費된 것으로 보이며 L型 糖類와 pentose는 醱酵되지는 않으나 酵母 生育에 利用된다는 Kamp 等의 報告¹⁶⁾와 類似하였다. 清酒 酵母의 麴汁(Brix 12°) 醱酵에서 初期 2日間에 全 消費糖의 50~70%를 消費한다는 兩宮 等의 報告³⁰⁾보다는 醱酵 速度가 낮은 傾向이었다. 이는 培地의 組成과 菌株가 서로 다른데 基因하는 것 같다.

4) pH

醱酵期間 중의 pH 變化는 Fig. 7 과 같다. 全 醱酵 期間 중의 pH 變化는 初發 pH가 5.0 이던 것이 醱酵 經過에 따라 4.0 前後까지 減少하였고 菌株別로 보면 *Sacch. cerevisiae* JAFM 101은 24~96시간, *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125는 24~72시간 사이에 pH의 減少 差가 약간 더 했다.

IV. 纖維素 分解酵素를 生産하는 菌株의 分離 및 同定

1. 優秀 菌株의 分離 選別 및 同定

20점의 菌 分離原用 試料에서 生育速度가 빠른 37개 菌株를 選別하여 粗酵素液을 調製하고 그 중에서 酵素活性이 비교적 強한 菌株의 酵素力價는 Table 24와 같다.

Table 24에서 보는 바와 같이 CMCase와 xylanase 活性이 強한 JJK-107을 選定하여 形態學的으로 觀察한 結果 平板培養時 發芽 初期에는 短線毛狀의

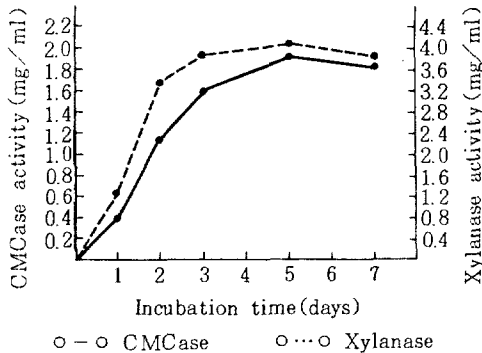


Fig. 8. Effect of incubation time on enzymes production

Table 24. Enzyme activity of isolated microorganisms (unit : mg/ml)

Isolates	CMCase	Xylanase
JJK-105	1.40	2.85
107	1.95	4.15
110	1.10	2.70
115	1.75	3.75
121	1.90	3.25
124	1.45	3.10
127	1.35	3.05
132	1.20	2.95
136	1.90	3.70

白色 菌絲가 培養基 全面에 퍼지며 약 50시간 후 有 綠色의 胞子가 生겼다. 胞子形成은 不規則하게 形成 되며 培養基 뒷면이 淡綠色을 띄었다. 胞子 着生 狀態는 梗子 先端에 약 20개 程度 球狀으로 集合되어 되어 있었고 分生子柄은 分岐되어 있었으며 色은 無色이었다.

以上的 結果는 李 等의 記載事項²⁰과 一致되어 *Trichoderma*屬으로 推定된다. 따라서 JJK-107을 *Trichoderma viride* JJK-107로 同定하였으며 以下 實驗에서는 本 菌株를 使用하였다.

2. 酵素 生産條件의 檢討

1) 培養時間의 影響

培養時間에 따른 酵素生産을 알기 위하여 培養時間을 달리하여 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 8과 같다. Fig. 8과 같이 xylanase는 培養 2일, CMCase는 培養 3일까지는 급격히 上昇하였고 그 以後부터는 점진적으로 增加하여 5일에 最高의 酵素活性을 보였고 5일이 經過하면 兩 酵素 모두 약간 減少趨勢를 보였다. 本 菌株의 最適 培養期間은 5日이었다.

이는 *Trichoderma viride*의 CMCase가 培養日數 5日에서 最高의 活性을 보였다는 李의 報告²⁰와는 類似하나 5日 후에도 酵素生産이 完만한 增加를 보였다고 한 金의 報告¹⁹와는 다소 差異가 있었다.

2) 培地 pH의 影響

培地의 pH를 달리하여 5日間 培養하였을 때의 酵素生産은 Fig. 9와 같다.

Fig. 9와 같이 CMCase는 pH 6.0, xylanase는 pH 5.0에서 最高의 酵素生産을 보였고 이 pH 범위를 벗어나면 점진적으로 減少되었는데 이는 中性側에서 보다 酸性側에서 더 심했다. 그러므로 本 菌株의 酵素生産을 위한 培地의 最適 pH는 5.0~6.0이라 할 수

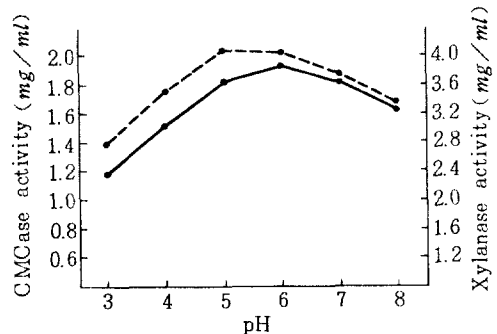


Fig. 9. Effect of pH on enzymes production

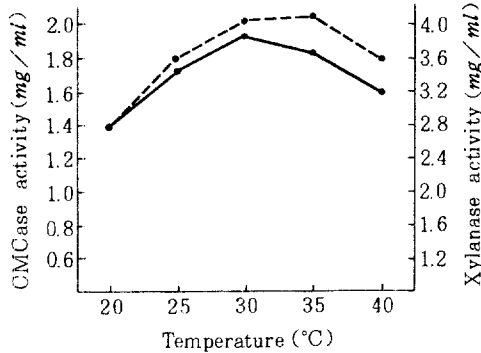


Fig. 10. Effect of temperature on enzymes production

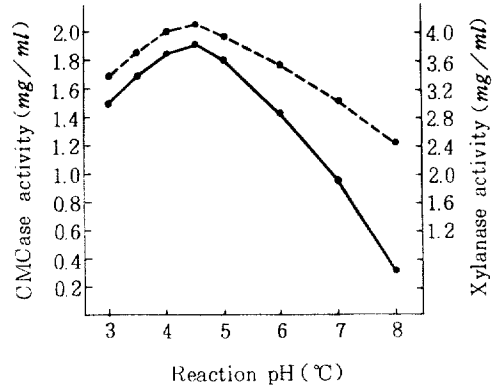


Fig. 11. Effect of reaction pH on enzymes activity

있다.

이는 *Asp. niger*와 *Trich. viride*의培養時 *Asp. niger*의 cellulase生産은 pH 5.0, *Trich. viride*는 pH 6.0에서 좋았다는 李 等의 報告²⁶⁾와 거의 일치하였으며 *Asp. niger*의 xylanase生産이 pH 3.5~6.0이라는 禹 等의 報告⁶³⁾와는 다소의 差異가 있었다.

3) 培養溫度의 影響

培養溫度를 20~40°C로 달리하여 5日間 培養하였을 때 酵素生産을 檢討한 結果는 Fig. 10과 같다. Fig. 10과 같이 CMCase는 30°C에서 xylanase는 35°C에서 最高의 酵素生産을 보였고 그 以後부터는 점진적으로 減少하였다. 그러므로 本 菌株의 酵素生産을 위한 最適溫度는 30~35°C라 할 수 있다.

이와 같은 結果는 *Trichoderma*屬의 cellulase 生成에서 最適溫度가 30~35°C라고 한 金과 崔의 報告²⁰⁾와 대체로 일치되었다.

3. 酵素의 特性

1) 最適 pH

酵素의 最適活性 pH를 알아보기 위하여 각종 pH에서 酵素活性을 檢討한 結果는 Fig. 11과 같다.

Fig. 11에서 보는 바와 같이 兩 酵素가 pH 4.5에서 最高의 活性을 나타냈고 이 pH 범위를 벗어나면 점진적으로 減少의 趨勢를 보였는데 이 중에서도 CMCase는 中性側으로 기울어질수록 酵素活性이 급격히 減少되었다.

金 等²¹⁾이 *Trich. viride*의 最適 pH가 5.0이라 한 것 보다는 약간 낮았고 李 等이 報告²⁷⁾한 pH 4.0 보다는 다소 높았으나 pH 4.0~5.5라는 鄭 等의 報告¹³⁾와는 거의 類似한 結果를 보였다.

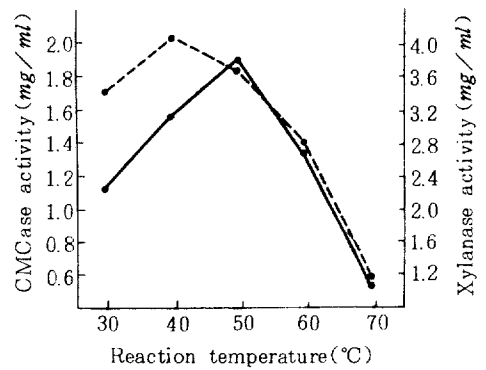


Fig. 12. Effect of reaction temperature on enzymes activity

2) 最適 溫度

酵素의 最適 活性溫度를 알아보기 위하여 30~70°C에서 酵素活性을 檢討한 結果는 Fig. 12와 같다.

Fig. 12에서 보는 바와 같이 CMCase는 50°C, xylanase는 40°C에서 最高의 酵素活性을 나타냈으며 그 以後부터는 兩 酵素가 점진적으로 減少하였는데 이 減少現狀은 xylanase보다는 CMCase가 더 심했다.

*Trich. viride*의 cellulase活性이 40~50°C에서 가장 높았다는 鄭 等의 報告¹³⁾보다는 本 酵素가 다소 높았으나 *Trich. viride* 酵素活性이 60°C라고 한 李 等의 報告²⁷⁾ 結果보다는 낮았다.

V. 酵素 加水分解에 의한 直接醱酵

1. 醱酵基質의 前處理가 alcohol 生産에 미치는 影響

木粉 醱酵基質의 脫 lignin 處理를 달리하여 alco-

Table 25. Simultaneous hydrolysis/fermentation of wood meals with delignifying methods

(unit : v/v %)

Treatment	Species	Strains		Sacch. cerevisiae JAFM 101		Sacch. ellipsoideus JAFM 125	
		Pinus densiflora	Alnus japonica	Pinus densiflora	Alnus japonica		
None		1.36	1.43	1.41	1.48		
Peracetic acid		1.98	2.10	2.08	2.17		
Alkaline - butanol		1.95	2.01	2.02	2.14		
4.0% NaOH		1.72	1.79	1.80	1.86		
1.0% NH ₄ OH		1.61	1.63	1.71	1.69		

Table 26. Effect of solid/liquid of peracetic acid upon Simultaneous hydrolysis/fermentation

(unit : v/v %)

Solid/liquid	Species	Strains		Sacch. cerevisiae JAFM 101		Sacch. ellipsoideus JAFM 125	
		Pinus densiflora	Alnus japonica	Pinus densiflora	Alnus japonica		
None		1.38	1.42	1.43	1.47		
1/5		1.82	1.87	1.95	1.97		
1/10		1.99	2.08	2.11	2.18		
1/20		2.05	2.12	2.16	2.20		

Table 27. Effect of ratio of wheat bran Koji at wood meals simultaneous hydrolysis/fermentation

(unit : v/v %)

Ratio	Species	Strains		Sacch. cerevisiae JAFM 101		Sacch. ellipsoideus JAFM 125	
		Pinus densiflora	Alnus japonica	Pinus densiflora	Alnus japonica		
10 : 2		1.52	1.61	1.62	1.67		
10 : 4		1.71	1.84	1.83	1.88		
10 : 6		1.85	2.01	1.97	2.05		
10 : 8		1.98	2.12	2.10	2.17		
10 : 10		2.01	2.14	2.11	2.20		

hol 生産을 檢討한 結果는 Table 25와 같다.

Table 25와 같이 alcohol 生産量은 정도의 差異는 있지만 前處理 하는 것이 無處理 基質보다 良好하였는데 이 중에 peracetic acid 處理가 收率이 가장 좋았고 그 다음으로는 alkaline butanol, NaOH, NH₄-OH 處理 順이었다. 菌株間에는 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125가 良好하였으며 樹種別로 보면 일반적으로 酸 加水分解液에서 소나무 木粉이 alcohol 收率이 약간 높은 傾向이었으나 이와는 달리 纖維素 分解 酵素 加水分解液에서는 오리나무가 다소 높은 趨勢를 보였다.

이와 같은 脫 lignin 處理 効果는 酵素 및 微生物이 細胞膜內 浸透를 용이하게 하는데 그 原因이 있는 것 같으며^{31, 51, 60)}, 軟材와 硬材의 脫 lignin 處理에 의한 酵素活性에서 脫 lignin 處理時 酵素 浸透가 軟

材에 있어 더 容易했다는 Sudo 등의 報告⁵³⁾와 같은 傾向이었다. 또한 alcohol 生産보다는 다소 떨어지는 傾向이었으나 Lee와 Hyun²⁵⁾의 포푸라類를 利用한 alcohol 보다는 다소 높았다.

2. 前處理時 過醋酸의 添加量이 alcohol 生産에 미치는 影響

木粉 前處理 方法 중에서 peracetic acid의 處理가 alcohol 生産이 가장 良好하였으므로 이의 添加量을 달리하여 alcohol 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 26과 같다.

木粉 基質에 peracetic acid를 處理한 것이 無處理보다는 alcohol 生産이 좋았으며 添加量을 높임에 따라 다소 增加하는 傾向이었으나 큰 差異는 볼 수 없었다.

菌株別로 보면 *Sacch. ellipsoideus* JAFM 125가 良

好하였으며 樹種別로는 오리나무 木粉이 소나무木粉보다 약간 높은 生産量을 보였다.

3. 木粉과 밀기울 Koji의 混合比率이

alcohol 生産에 미치는 影響

醱酵時 基質인 木粉에 酵素源인 밀기울 Koji의 添加率을 달리할 때 alcohol 生産에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Table 27과 같다.

Table 27에서 보는 바와 같이 木粉에 밀기울 Koji의 添加量을 增加시킴에 따라 alcohol 生産量이 점차로 높아졌는데 木粉과 Koji의 配合比가 10:8 以上에서는 alcohol 生産이 별 差異가 없었다.

引用 文 献

1. Association of Official Analytical Chemists, 1970. Official Method of A. O. A. C. p.297.
2. Blotkamp, P. J., Takafi, M., Pemberton, M. S. and G. H. Embert. 1978. Enzymatic hydrolysis of cellulose and simultaneous fermentation to alcohol. The American Institute of Chemical Engineers, Symposium Series 74(181): 85~90.
3. 鄭大戎, 閔斗植. 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究(1). 基質處理의 效果. 韓林誌 38: 13-18.
4. 鄭東孝. 1969. Cellulase에 의한 研究, (第一報) cellulase 生成菌의 分理와 粗酵素의 諸 性質. 韓農化誌 11:109.
5. 鄭寅杓, 金洪殷, 閔斗植. 1979. 물은 黃酸 및 cellulose에 의한 木材糖化에 關한 研究. 韓林誌 41: 1-6
6. 朱鉉圭, 權宇鍵. 1979. 人蔘粕 糖化液이 酵母의 增殖 및 알콜 醱酵에 미치는 影響. 産微誌 7(4): 191-195.
7. Dietrichs, von H. H. and Hennecke, E. E. 1974. Enzymatischer Abbau von Holzpolysacchariden nach Vorbehandlung mit Alkali. Holz als Roh und Werkstoff 32:13-18.
8. Dudkin, M. S. 1962. Chemistry abstracts 59: 8960.
9. Gordon, J. C. 1975. The productive potential of woody plants. Iowa State Jour. Res. 49(3):267-274.

10. Gutgerts, N. 1937. Spisto-Vodochnya Prom., 14:52. Cited by Sueng(1976).
11. Hall, D. O. 1979. Biological solar energy conversion for fuels, Nature 278(5700):114-117.
12. Hammond, A. L. 1977. Alcohol: A Brazilian answer to the energy crisis. Science 195:545-66.
13. 幅井谷. 1955. 日醱工誌. 33:1 Cited by Sung(1976).
14. Humpherey, H. E. 1975. Economical factors in assesment of various cellulosic substances as chemical and energy resources. Biotechnol. and Bioeng. Symp. 5:49-65.
15. Ishihara, T. and Ishihara, M. 1975. Enzymatic hydrolysis of wood. IV. The effect of pretreatment with aqueous ammonia. Mokuzai Gakkai-shi 25(12):804-807.
16. Kamp, A. F., Lariviere, J. W. M. and Verhoeven, W. 1959. Albert Jan Kluyver, his life and work, North Holland Publishing Co, Amsterdam, Holland. p.119-120.
17. Karrer, P. Schubert, P. and Wehrli, W. 1928. Uber das verholten vershmenener Cellulosen gegen Schneck Cellulase. Helvetica Chim. Acta. 11: 229-230.
18. Kibblewhite, R. P. and Harwood, V. D. 1973. Effects of alkaline extraction on the structure and chemistry of lignified and delignified *Pinus radiata* wood. Cellulose Chem. and Tech. 7:669-678.
19. 金炳弘, 裴武. 1979. 農産 廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究. (第 11 報) 섬유질 資源에서 ethanol 및 xylose의 生産. 産微誌 7(2):91-95.
20. 金燦祚, 崔宇永. 1970. たく 양조중 thiamin의 소장에 關한 研究. 韓農化誌 13(1):105-109.
21. 김 은수, 김 영빈, 이 인규, 최 태주. 1975. 몇 種類의 곰팡이에서 분리되는 crude cellulose의 다당류 分解能力의 調査. 韓微誌 13:85-90.
22. 小林達古, 菊池啓明. 1962. 濃硫酸による 木材糖化關する 研究(第14報). 透氣乾燥糖化プロセスの(そのて)木材チップの乾燥糖化. 醱工誌 40(8): 406-413.
23. 小林達古, 露崎主計, 廣瀬保, 見立和夫. 1963. 濃硫酸法木材糖化プロセスの研究(第16報). 糖化廢

- 硫酸의利用(Ⅲ). 磷酸苦土安門副産法. 酸工誌 41(4): 196-205.
24. 京都大學 農學部 食品工學 教室編. 1970. 食品工學 實驗書 上. 養賢堂. p.538-540.
 25. Lee, D. K. and Hyun, S. K. 1980. Woody biomass products as an energy source. Research Report of the Institute of Forest Genetics 16:78-86.
 26. 李啓, 高正三, 朴性五. 1976. 農産 廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 관한 研究(第三報). *Aspergillus niger*와 *Trichoderma viride*에 의한 cellulose 의 生産性에 關하여. 韓農化誌 19(3):130-138.
 27. 李啓, 高正三, 李康治. 1976. 農産廢棄物에서 醱酵飼料의 生産에 관한 研究(第四報). 韓農化誌 19(3): 139-144.
 28. 李啓準, 高永喜, 襄武. 1976. 農産廢棄資源의 微生物學 利用에 관한 研究(第四報). 基質處理時의 알칼리, 산 중화 條件에 對하여. 韓微誌 4(3): 99-104.
 29. Leonard, R. H. and Hajny, G. J. 1945. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. Ind. and Engg. Chem. 37: 390-395.
 30. Mandels, M. and D. Sternberg. 1976. Recent advances in cellulase technology. Jour. Ferment. Technol. 54(4):267-286.
 31. Matsumura, Y., Sudo, K. and Shimizu, K. 1977. Enzymatic hydrolysis of wood. II. Effect of grinding and alkali treatment on hydrolysis of woods by *Trichoderma viride* cellulase. Mokuzai Gakkaishi 23(11):562-570.
 32. 右田伸彦. 1968. 木材化學(下). 共立出所. p. 4.
 33. 閔斗植. 1976. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究(Ⅱ). 反應條件의 效果. 韓林誌 39:57-63.
 34. 閔斗植. 1979. 표고栽培 廢材의 糖化에 관한 研究. 韓林誌 43:31-34.
 35. 南宮熙, 洪載植. 1970. 清酒 酵母에 對한 研究. 全北大學校 農大學報 1: 65-76.
 36. 西尾尙道, 奧幸夫, 河材大造, 永井史郎. 1979. みかん廢棄物(みかん外皮)의 可溶化および糖化. 酸工誌 57(5):354-359.
 37. 西山繁義, 八江淑郎, 今井造富雄, 1966. マルエールの連續醱酵에 關する 研究(第一報). 連續醱酵에 關する 各種要因につし. 酸工誌 44(12):902-909.
 38. 小原哲二郎, 鈴木降雄, 岩尾裕氏. 1970. 食品分析ハンドブック, 建昌社. p.17.
 39. Odincov, P. N. 1959. Trudy Inst Lesokholz Problem Akad. Nak, Latv. S. S. R. 7:65-68. Cited by Kobayashi(1965).
 40. 朴正吉, 梁降, 柳洲鉉. 1975. 農産 廢資源의 飼料化에 관한 研究(第二報). 남송이의 後加水分解의 條件과 後加水分解에 對한 酵母生産. 産微誌 3:141-146.
 41. Porteus, A. 1969. The economical recovery of fermentation products from cellulose waste via acid Lydrolysis. 3rd National Chemical Engineering Conference, Mildura, Victoria, Australia.
 42. Reed, C. and Peppelo, H. J. 1973. Yeast technology. A. V. I. Publishing Company. p.40.
 43. Reese, E. T. 1968. Cellulases and their applications. Ameri. Chem. Soc. Pub. p.470.
 44. Saeman, J. F. and Andreason, A. A. 1954. The production of alcohol from wood waste. Industrial Ferment 1:136-171.
 45. 成洛突, 金鍾奎. 1976. 廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 관한 研究(第一報). 酸 糖化 方法 및 糖化液의 利用性 檢討. 産微誌 4(1):1-8.
 46. 金明燦, 沈奇煥. 1976. 廢纖維 資源의 醱酵工學的 利用에 관한 研究(第二報). 톱밥 및 廢新聞紙 糖化液을 利用한 酵母培養. 産微誌 4(2):51-56.
 47. 金明燦. 1976. 옥수수 澱粉粕을 利用한 食飼料 酵母生産에 관한 研究. 韓農化誌 19(4):219-226.
 48. 金明燦, 沈奇煥, 李千洙. 1976. 廢纖維 資源의 醱酵工學的 利用에 관한 研究(第二報). 볏짚, 왕겨 및 澱粉粕 糖化液을 利用한 酵母培養. 韓産微誌 4(4):152-158.
 49. Sikovec, S. 1966. Effect of some polyphenols on the physiology of wine yeast. I. Effect of polyphenols on the course of alcoholic fermentation, especially of refermentation. Mitt Rebe Wein, Klasterneuburg 16: 127-138.
 50. Stahl, E. 1969. Thin layer chromatography. A. Laboratory Handbook. George Allen & Unwine Ltd, London p.13-21.
 51. Sternberg, D. 1976. A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viride*. Bi-

- oeng. 16: 1751-1760.
52. Stokes, J. L. 1971. The yeast. Academic Press, London, New York 2:119-134.
 53. Sudo, K., Matsumura, Y. and Sgimizu, K. 1976. Enzymatic hydrolysis of woods. I. Effect of delignification on hydrolysis of woods, by *Trichoderma viride* cellulase. Mokuzaï Gakkaishi 22(12):570-676.
 54. Takagi, M. 外 四人. 1977. Direct production of alcohol from cellulose and yeast. Symposium on bioconversion of cellulosic substances in energy. Chemicals and Microbial Protein, New-Delhi, India.
 55. 高田亮平, 佐佐木博介. 1942. 日釀學誌 20: 118. Cited by Woo(1972).
 56. 東京大學 農學部 林産化學 教室編. 1956. 林産化學 實驗書. 産業圖書 p.87.
 57. 外山信男. 1977. ワシ ケシカルスの現象よび 將來石由わる資源としての期待. 化學と生物 15(6): 336-367.
 58. Toyama, N. and Ogawa, K. 1975. Sugar production from agricultural woody wastes by saccharification with *Trichoderma viride* cellulase. Biotech, Bioeng. Symp. 5:225-244.
 59. Withworth, D. A. 1976. Production of liquid transport fuel from cellulose material(wood). I. Economic consideration of acid hydrolysis of wood for subsequent conversion to ethyl alcohol. The New Zealand Energy Journal, N.Z. F. S. 49 (11):173-177.
 60. Withworth, D. A. 1977. Production of liquid transport fuel from cellulose material(wood). II. Energy conversion efficiencies of the processes. The New Zealand Journal. N. Z. F. S. 50 :14-17.
 61. Withworth, D. A. 1978. Forest and wood waste utilisation. Conversion to fuel alcohol-AFRI Study New Zealand Service 996:863-864.
 62. Withworth, D. A. and Hardwood, V. D. 1977. Production of liquid transport fuel from cellulose material(wood). III. Laboratory preparation of wood sugars and fermentation to ethanol and yeast. The New Zealand Energy Journal. 19.
 63. 禹昌命, 李瑞來. 1982. 農産廢棄物の 成分 分析 및 酵素分解에 關한 研究. 韓農化誌 4(4):300-308.
 64. 梁漢詰, 崔 鎮, 成河珍. 1974. 酵母生産에 關한 研究(第一報). 韓微誌 2(2):95-101.
 65. 柳洲鉉, 梁降, 洪允命, 朴正吉. 1975. 農産 廢資源의 飼料化에 關한 研究(第一報). 밤송이 前加水分解의 條件과 前加水分解에 對한 酵母生産. 産微誌 3:135-140.