

## 纖維質資源의 飼料 轉換

李啓瑚 · 成昌根 · 鄭圭玉

서울大學校 農科大學 食品工學科

### A Study on the Conversion to Feed Stuff from Cellulosic Biomass

Ke-Ho Lee · Chang-Geun Sung · Kyu-Ok Chung

Department of Food Sci. & Technology, College of Agriculture,  
Seoul National University

#### Abstract

To utilize several species of hard wood as raw materials of feed products, fermentation characteristics of cellulosic substrates to single cell protein was investigated, and results were summarized as follows.

Among the microorganisms investigated, *Tricoderma viride* was selected as one of the most cellulolytic.

Mixed culture of fungi did not show a synergistic effect on cellulose degradation.

When the fungi were cultured at 28°C for 7 days in a medium containing wheat bran 25 g, cellulose 0.25 g, proteose peptone 0.025 g and tween 80 0.025 g, cellulotic activities on carboxy methyl cellulose and filter paper reached maximum at 12 hr.

The alkali treatment resulted in increased degradation of substrate from 13 to 18% when treated with enzymes for 12h, and reducing sugar formation increased with decreased size of substrates.

Glucose was a very good feedback inhibitor of the enzyme from *T. viride* than that of xylose.

When the substrate was rehydrolyzed, hydrolysis rate was 31% to reducing sugars within 12 hr.

Quantative anlysis with HPLC showed the ratio of glucose to xylose in sugar syrups as 1.77 to 1.

For the purpose of producing cellulosic-single cell protein from the sawdust of mulberry tree, 15 strains of xylose-assimilating yeast were isolated from 42 samples of rotten woods and compost soils and examined for their ability to utilize xylose. Then three strains were selected by their strong xylose-assimilating activities.

The cultivative condition, the growth characteristics, and protein and nucleic acid productivities of three strains were investigated.

The results obtained were,

1. Wood hydrolysate of mulberry tree was assimilated by 5 strains of CHS-2, CHS-3, ST-40, CHS-12 and CHS-13.
2. The optimum initial pH and temperature for the growth of strain CHS-13 were 4.4 and 30°C.
3. The specific growth rate of strain CHS-13 was 0.23 h<sup>-1</sup> and generation time was 3.01 hrs at the optimum condition.
4. CHS-13 strain assimilated 81% of sugar in wood hydrolysate.
5. CHS-13 strain was identified as *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*
6. When the CHS-13 strain was cultured in the wood hydrolysate containing yeast extract, L-protein content was increased with yeast extract concentration.
7. The L-protein and nucleic acid yields from wood hydrolysate were 0.73 mg/ml and 4.92 × 10<sup>-2</sup> mg/ml respectively.
8. An optimal nucleic acid content of CHS-13 strain was observed in the medium containing 0.2% of yeast extract.

## 緒 論

人口의 急增으로 食糧 및 飼料不足現象이 심각해짐에 따라 人類가 直面하게 될 새로운 蛋白質資源開發은 切實히 要請되고 있어 各種 醱酵基質을 利用하여 微生物 菌體 蛋白質 生産에 注目を 끌게 되었다. 이에 수반하여 微生物이 利用한 醱酵基質도 餘裕가 없게 되었으므로 農産廢資源 및 木質資源과 같은 纖維素資源의 利用이 가장 重要한 課題라 할수 있는데 그 理由는 每年 光energy의 0.1%가 光合成에 依하여 地表面에서 CO<sub>2</sub>로부터 固定有機物로 1,090 億톤이 轉換되는데 이中 2/3인 926 億톤이 cellulose (490 億톤), hemicellulose (218 億톤), lignin (218 億톤)인데 벼(3 億 7 千萬톤), 밀 (3 億 8 千萬톤), 옥수수 (3 億 6 千萬톤), 보리 (1 億 7 千萬톤), 과맥, 연맥 (8 千萬톤) 등 穀物이 13.6 億톤 生産되고 있음을 감안하면 纖維質資源의 量은 利用面에서 큰 價値를 認定할 수 있다.

이와 같은 莫大한 量의 纖維質資源을 物理, 化學 및 微生物學的인 處理를 加하여 有用하게 變質된 形態로 利用한다면 食糧難, 飼料不足, energy 危機等 現在 人類가 處해 있는 資源問題를 長期的으로 解決하는데 가장 크게 功獻할 것이다. 이와 같은 纖維質資源은 가장 豊富한 資源이지만 cellulose 以外에 lignin, 灰分等이 共存하고 있어 그 分解가 어려워 現在까지 開發된 技術로서는 木質

糖化시켜 直接 利用하거나 其他 醱酵基質로 利用하여 食糧, 飼料化하는데는 檢討 開發할 難題가 많은 것으로 알려지고 있다.

더우기 食糧事情과 人口問題인데 1970 년에 36 億이던 世界人口는 1986 년에 44 億, 2011 년에는 80 億이 되리라 한다. 이와 같이 人口의 急激한 增加는 世界의 食糧事情을 날로 惡化시키고 있으며, 特히 蛋白質 不足은 가장 심각한 問題로 대두되고 있다.

UN Protein Advisory Group은 人類의 蛋白質 危機를 解決할 對策으로 穀類의 amino acid 強化, 油糧種子의 食用化, 濃縮魚類蛋白質의 利用, 綠葉蛋白質開發을 提案한 바 있으나<sup>1)</sup> 在來의 農, 畜, 水産業에 依한 蛋白質의 生産은 限界點에 到達하였으며 最終적으로 人類가 期待할 수 있는 蛋白質源은 莫大한 纖維素資源의 分解産物인 glucose, xylose 와 無機窒素 (암모니아등)를 同化하는 酵母菌體 (蛋白質의 50%含有)를 生産하여 食糧, 飼料化하는 것으로 單細胞蛋白質 (Single Cell Protein)의 開發<sup>2,3)</sup>이라 할수 있다.

木質資源은 주로 glucose 單의 重合體인 cellulose 가 약 50%, 5 炭糖의 重合體인 xylan이 약 15~20%, lignin 15~20%, pectin 이 약 15~20%로 構成되고 있으며 lignin이 cellulose를 保護하고 있는 한편 cellulose는 結晶狀으로 되어 있어 加水分解하기에 어렵게 되어 있다.

Cellulose는 β-1,4 linkage로 구성된 high

polymer로서 Goring<sup>4)</sup> Timell (1964) 등은<sup>5)</sup> 潤葉樹 纖維素에 대한 DP-Values는 8,000 ~ 10,000 이라고 報告했으며, 現在까지 纖維素에 對한 3가지의 다른 形態學的 model이 Marx<sup>6)</sup>, Meier, Mamley<sup>7)</sup> 등에 依해 提案되었다.

Lignin은 phenyl propane 單位の three dimensional polymer로서 構成되며 침엽수에서는 quaiacyl 또는 syringyl propane 등이 存在하는 것으로 알려져 있으며 생체내의에서의 리그닌 생합성이 Freudenberg (1964)<sup>8)</sup>, Heish (1964), Stewart (1960)<sup>9)</sup> 등에 依해 研究되어 왔으며 침엽수에서는 primary wall과 lamella 地域에 20%의 리그닌중 약 90% 程度가 存在하는 것으로 알려져 있다.

1950年에서 부터 Elwyn Reese와 그의 동료들이 복합효소 component를 가진 活性이 강한 *Trichoderma* 속 菌株를 동정한 이후, 수많은 菌株가 分離報告 되었으나<sup>10~14)</sup>, 아직도 전분, 당밀등과 같은 글루코오스  $\alpha$ -1,4 linkage를 가수분해하는 아밀라아제에 비해 200~500배 낮은 역가를 가지고 있어서, 利用하기에는 經濟的으로 問題가 많은 것으로 報告되고 있다. 그러므로 最近에는 높은 活性을 갖는 *T. rossei*의 變異株와<sup>15,16)</sup> 또한 *Thermophilic actinomyces*<sup>17~19)</sup>, *Thermophilic*<sup>20)</sup>, Yeast<sup>21)</sup>, 다른 變異株<sup>22)</sup> 등에 많은 관심이 모아지고 있다.

Cellulase는 유도효소로서 Reese 등에 依하여 纖維素的 효소가수분해에 對한 기작이 研究되기 始作했는데 그들은 Cx와 C<sub>1</sub>의 multienzyme system을 提案했었다. 그후 이와 같은 개념이 커다란 자극이 되어 Halliwell<sup>23)</sup>, King<sup>24)</sup>, Nisizawa<sup>25)</sup>, Wood<sup>26)</sup>, Petterson<sup>27)</sup>, Broum<sup>28)</sup>, Tsao<sup>29)</sup> 등에 依해 纖維素에 酵素分解에 對한 기작이 研究되어 왔으며, 아직도 確實한 기작은 알수 없지만 endo와 exo- $\beta$ -glucanase (cellulase), 그리고  $\beta$ -glucosidase (cellubiose)가 상호적으로 작용하여 glucose까지 分解하는 parallel model이 提案되고 있다.

가수분해 kinetics는 酵素의 기질에 對한 흡착<sup>30)</sup>, 반응기작<sup>31)</sup>, 저해<sup>32)</sup>, 불활성<sup>15)</sup>, 효소와 기질의 농도<sup>30)</sup> 등의 각도에서 研究된 것이 많으며 Brandt, Hontz 등은<sup>33)</sup> 공학적인면은 고려한 kinetics를 報告하기도 하였다.

纖維素 分解酵素의 應用은 다른 어느 酵素보다도 보다 많은 研究가 이루어져 왔으며 특히 食品<sup>37)</sup>.

單細胞蛋白質<sup>38,39)</sup>, 動物飼料<sup>34~36)</sup> 등이 많으며, 아세톤과 초산<sup>40)</sup>, xylitol, xylan과 xylose<sup>41)</sup>, plastic polymer<sup>42)</sup>, wood sugar chemicals<sup>43,44)</sup> 등도 報告되어 있다.

本 研究에서는 biomass로서 成長이 매우 빠른 潤葉樹 현사시, 이태리코플러, 뽕나무 3樹種을 기질로 하여, ball mill과 알칼리용액으로 前處理한 다음 微生物性 纖維素分解 酵素를 작용시켜 木材糖化液 生産을 爲한 基礎的인 實驗을 行하였으며, 또한 이 糖化液을 利用하여 酵母를 培養함에 있어 糖化液中 glucose 資化性酵母, xylose 資化性酵母에 依한 同時培養함으로서 酵母菌體生産性을 높이고 木材糖化液中的 糖類 利用度를 높이기 爲한 目的으로 自然界에 있는 野生酵母中 xylose 資化性 優秀酵母를 分離 選抜하여 醱酵工學的 諸特性을 살펴서 單細胞蛋白質의 生産可能性을 檢討하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌 株

#### (1) Cellulase 生産菌

서울大學校 農科大學 食品工學科에서 分離 保管 중인 cellulase 生産菌 *Trichoderma viride* sm-6<sup>45)</sup>, *Aspergillus niger* sm-10<sup>66)</sup>과 Central bureau voor schimmel cultures에서 구해서 보관중인 *Irpex lacteus*<sup>56)</sup>를 纖維素 分解酵素 生産菌으로 使用하였다.

#### (2) 酵 母

서울大學校 農科大學 食品工學科에서 分離 保管 중인<sup>45,56)</sup> *Saccharomyces cerevisiae* sm-7080, *Candida tropicalis* NCYC 478과 土壤中에서 分離한 xylose 資化能에 있는 酵母를 使用하였다.

### 2. Cellulase 生産

밀기울 25g, cellulose 0.25g, proteose peptone 0.025g, Tween 80 0.025g과 수도수 20 ml를 1l 삼각플라스크내에 넣고, 121°C 溫度下에 20分間 殺菌한후 약 5%의 seed를 接種하고 28°C에서 7일간 배양하여 코오지를 만든 다음, 이 코오지양 4배의 0.05 M citrate buffer (pH 4.8)를 가하여 酵素를 침출시키고, 여과를 하여 그 여액에 -20°C acetone 2배를 가하고

원심 분리하여 침전물을  $-50^{\circ}\text{C}$ , 2~5 mmHg 의 동결건조기에서 6~12時間 乾燥한 후 얻은 powder 를  $4^{\circ}\text{C}$  에서 保管하였으며<sup>46)</sup>, 實驗에 使用時에는 酵素를 0.05 M citrate buffer (pH 4.8) 에 녹여 酵素濃度 1% (w/v) 로 調整하였다.

### 3. 酵母의 前培養

500 ml 삼각플라스크에 100 ml 의 malt 배지를 넣고 멸균한후 酵母를 接種하여  $30^{\circ}\text{C}$  진탕 항온조에서 48時間 120 rpm 으로 진탕 培養하여 酵母菌液으로 使用하였다.

### 4. 基質(本材)의 前處理

纖維素 기질로서는 Biomass로서 糊葉樹이며 속성수인 뽕나무, 현사시, 이태리포플라(各 1年生)를 使用하였으며 전처리 방법은 다음과 같다.

#### (1) 物理的 處理

기질을 24 시간 동안  $40^{\circ}\text{C}$  에서 건조시킨후 平削機를 使用하여 분쇄시키고 cutting milling 을 한후 ball milling 을 24 시간하여 mesh 별로 선별하여 기질로 使用하였다.

#### (2) 化學的 處理

##### ① 탈리그닌

과초산액의 농도를 40%로 하여 500 ml 용 비이커에 200 ml 를 취하고 80 mesh 기질 10g 을 가지고 상온에서 24 시간 탈리그닌 시킨후 물로 여러번 세척하였다.

##### ② 1% NaOH 處理

상기 방법에 따라 선별된 기질 10g 을 1% NaOH 240 ml 가 채워진 삼각플라스크에 넣고  $100^{\circ}\text{C}$  에서 1 시간 가열시킨후 물로 여러번 세척하여 pH 를 5 로 조절한 후에 건조하지 않고 기질로 使用하였다<sup>47~48)</sup>.

### 5. 木材糖化液 調製

0.05 M citrate buffer (pH 4.8) 에서 酵素液 1% 1 ml 와 기질 1% 1 ml 를  $50^{\circ}\text{C}$  에서 반응시키고 여과한후 원심분리시킨 上澄液을 木材糖化液으로 하였다. 이때의 효소역가는 carboxy methyl cellulase 역가 118 mu, filter paper 역가 40 mu 이었고, protein 양은  $3.9 \times 10^{-4} \text{g/ml}$  이었다.

### 6. 同時糖化 醱酵 (Simultaneous Saccharification Fermentation)

Takagi<sup>49)</sup> 등과 金<sup>50)</sup>, 李<sup>64)</sup> 등의 방법에 따라 1% NaOH 處理 또는 無處理의 기질 10g 을 수도 수 100 ml 를 넣은 삼각플라스크에 넣고  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g 을 添加하고 pH 를 1 N-HCl 로 4.0 으로 하여  $121^{\circ}\text{C}$  20 분간으로 멸균한후 미리 준비한 분말 효소 2.5 g 과, 種酵母液 10 ml ( $8 \sim 4 \times 10^8 / \text{ml}$ ) 를 가지고  $37^{\circ}\text{C}$  에서 5 일간 진탕 培養하였다.

### 7. 木材糖化液의 成分

#### (1) 糖定性 및 定量

##### ① 환원당

Mendels<sup>46)</sup> 등이 기술한 dinitro salicylic acid 법으로 glucose 를 표준 물질로 비색 정량하였으며 그에 따라 환원당의 양을 계산하였다.

##### ② Thin layer chromatography 法에 依한 糖定性

유리판에 0.3 mm 의 Kiesel gel G 를 (E. Merck) 를 코팅하고, 사용전  $110^{\circ}\text{C}$  에서 1 시간 활성화했다. 이때 전개 용매는 ethylacetate:isopropanol = 35:65 (v/v) 이었고<sup>51)</sup>, 정성에는 aniline-H<sub>2</sub>-phthalate 시약을 使用하였으며, 정량에는 미리 요오드 가스를 포화시킨 chamber 에 유리판을 넣고 발색시킨후 발색된 부분을 제거하고 요오드 가스를 날려보낸후 DNS 방법에 따라 정량하였다.

##### ③ High Performance Liquid

##### Chromatography 에 依한 糖定量

당화액의 조성을 살피기 위하여 Brandao 의 carbohydrate analysis column<sup>52)</sup> 을 사용하여 고속액체 크로마토그래피 (Varian Model 5021) 를 하였는데 이때 용매제는 acetonitrile:water, 85/15 v/v, flow rate 는 1.5 ml/min Attenuation 8x 이었고 시료량은 20  $\mu\text{l}$  를 주입했다.

#### (2) Cellulase 力價測定方法

효소액의 역가는 Mendels 등의<sup>46)</sup> 방법에 따라 아래와 같은 방법에 의해 filter paper, carboxyl methyl cellulose, xylan, salicin 등으로 부터 생성되는 환원당을 DNS 법으로 비색정량하여 분당 글루코오스 1  $\mu\text{mole}$  을 생성할 수 있는 효소의 역가를 1 unit 로 하였으며, 이때 단백질은 Lowry<sup>54)</sup> 법에 따라 정량했다.

① C<sub>1</sub>의 力價: What man No. 1 filter paper 50 mg 을 0.5 ml enzyme, 1.0 ml buffer

에서 50°C 1시간 작용시킨후 DNS 3 ml를 첨가하고 비등액 속에서 5분간 처리한후 생성된 환원당을 비색 정량하였는데 표준물질로서는 글루코오스를 사용하였다.

② Cx역가: carboxy methyl cellulose 1% 용액 0.5 ml에 효소액 0.5 ml를 넣고 30분간 작용시킨후 상기와 같은 방법으로 측정했다.

③ Xylanase 역가: xylan 1% 용액을 상기 Cx역가와 같은 방법으로 측정했다.

④ Cellobiase 역가: salicin 1% 용액을 상기 Cx역가와 같은 방법에 따라 측정했다.

(3) 기질(Hard Wood)의 성분 함량분석

Cellulose, 리그닌, alcohol benzen extract는 Tappi의<sup>55)</sup> 방법에 준해 분석하였으며, 기타는 상법에 따라 분석하였다.

### 8. Xylose 資化性 酵母의 分離 選拔

수원근교 및 설악산 등지에서 蒐取한 썩은나무, 퇴비, 수액, 토양등의 분리용시료 약 1g을 생리 식염수에 현탁시키고 그 上澄液을 회석하여 Table 1과 같은 조성의 분리용 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양하여 나타나는 colony를 동일한 배지에 사면배양하였다.

Table 1. Medium for isolation of xylose-assimilating yeast

Components	Contents (w/v %)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.6
MgSO <sub>4</sub>	0.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.03
NaCl	0.1
Xylose	4.0

### 9. Xylose 資化性 酵母의 同定

#### (1) 形態學的 特性

細胞의 모양, 크기 및 表面등의 狀態를 觀察하였고 分類 同定에 중요한 特徵이 되는 子囊孢子 形成의 有無를 觀察하기 위하여 Gorodokowa 한 천 배지를 使用하였으며 菌사, 위균사 觀察을 위하여 Dalmau plate culture 法을 使用하였으며, 현미경(Olympus model BH)으로 檢鏡하였다.

#### (2) 生理學的 特性

糖의 醱酵能, 糖의 資化能, ethanol의 同化能,

窒酸鹽(KNO<sub>3</sub>)의 同化能, 50% glucose 배지에서 生育여부, arbutin의 分解能, urea 加水分解, litmus milk 反應, 산의 生産能, 澱粉樣 物質의 生産能을 觀察하였으며 각 培地의 組成등은 Lodder方法<sup>57)</sup>에 準하였다.

### 10. Xylose 資化性 酵母의 培養條件

選拔된 菌株를 木材糖化액에서 다음과 같은 條件하에서 배양하여 菌의 生育條件을 檢討하였다.

#### (1) 培養液의 初期 pH

木材糖化液의 初期 pH를 pH 3.8~pH 6.4로 調節하여 培養후의 生育을 比較 檢討하였다.

#### (2) 培養溫度

菌培養溫度를 15°~40°C로 調節하여 培養後 菌株의 生育을 比較 檢討하였다.

#### (3) 種培養

分離菌株를 malt extract 배지에서 24시간 배양후 3회 연속계대하고 11시간 培養된 것을 種菌으로 使用하였으며 種菌接種量은 糖化液 배지량의 5%로 하였다.

#### (4) 主培養

##### ① Flask 培養

糖化液 培地에 種菌을 接種한후 初期 pH 4.4, 溫度 30°C, 교반 120 strokes로 하여 진탕 培養시켰다.

##### ② Fermentor 培養

Jar fermentor: New Brunswick의 Model MF-114를 使用하였는데 本 발효조에는 pH controller와 foam controller가 부착되어 있고 통기는 glass fiber를 使用하여 무균적으로 매분당 8,000 cc까지 공급할 수 있으며 3개의 impeller가 부착되어 최고 800 rpm까지 교반 가능한 5ℓ 발효조이며 또한 온도가 자동조절되며 공기배출시 배지의 수분증발을 막기위하여 凝縮水를 循環시킬 수 있게 하였다.

##### ③ Jar Fermentor 培養

Jar fermentor의 발효조에 糖化液 배지 2ℓ를 넣고 살균한 다음 種菌을 接種한 후 培養을 시작하였으며 통기는 1.5vvm, 교반은 600 rpm, 온도 30°C, 初期 pH 4.4로 調節하여 菌體를 培養시켰다. 배양중 심하게 foam이 形成될 때에는 antifoamer로서 octyl alcohol을 使用하였으며 이때 菌生育에 미치는 影響을 고려하여 첨가량을 극소로 하였다.

11. 酵母菌體 分析

採取한 培養液으로 菌의 成長率, 乾燥重量 菌體核酸 및 蛋白質 含量을 測定하였으며 이들의 測定方法은 다음과 같이 하였다.

(1) 菌體測定

① 濁度 (O. D)

初期培地를 blank 로 하고 Spectrophotometer 를 사용하여 520 nm 에서 absorbance 로서 測定하였다.

② 乾燥菌體量

培養液을 원심분리하여 얻은 菌體를 칭량병에 담고 105 °C 에서 10 ~ 12 시간 乾燥後 測定하였다.

(2) Specific growth rate, Generation time

다음식을 使用하여 比成長率과 世代時間을 구하였다.

$$\text{Specific growth rate } (\mu) = \frac{1 \ln (N / N_0)}{(t - t_0)}$$

$$\text{Generation time } (G) = \frac{0.693}{\mu}$$

式에서 No : 초기균수 (O. D)

N : 말기균수 (O. D)

t<sub>0</sub> : 배양초기시간

t : 배양후기시간

(3) 基質消費率

糖化液에 分離株 CHS-13 을 배양하면서 시간 마다 培養液을 採取하여 원심분리한 후 各時間別 上등액의 환원당을 精量하여 배양액중의 환원당량

의 감소를 測定하였다.

(4) 菌體蛋白質 定量

Bovine serum albumin 을 standard 로 하고 培養液 1 ml 를 取하여 modified Lowry法<sup>54)</sup> 에 準하여 精量하였다.

(5) 核酸定量

Fleck & Begg 法에<sup>58)</sup> 準하였다. 培養液 1 ml 를 30 분간 원심분리후 ice-cold 0.25 N HClO<sub>4</sub> 5 ml 添加하여 30 분간 ice-water bath 에 담가 교반하면서 산가용성 물질을 추출하여 원심분리하여 버린다. 침전물에 0.2 N NaOH 3 ml 를 添加하여 현탁시킨후 37 °C water bath 에서 1 시간 유리시킨후 원심분리하여 상등액에 대한 260 과 232 nm 에서 흡광도를 測定하여 다음과 같은 식으로 RNA 含量을 구한다.

$$\text{RNA } (10^{-2} \text{ mg/ml}) = 3.5 \text{ absorbance } (260 \text{ nm}) - 1.5 \text{ absorbance } (232 \text{ nm})$$

結果 및 考察

1. 木質資源 一般成分

현사시, 이태리포플라, 뽕나무등 本 研究에서 酵素 糖化液의 生成을 爲해 기질로 使用한 속성수의 一般成分의 造成은 Table 2 와 같다. 즉, 셀룰로오스의 含量은 65 ~ 70 % 가 되고, 자연계에서 가장 분해가 어려운 물질중의 하나로 알려진 리그닌은 25 ~ 30 % 程度이었는데 타 研究者에 依해 밝혀진 農産 廢資源인<sup>59)</sup> 벚짚, 밀짚, 보릿짚등에 비하여 리그닌은 약 15 %, 셀룰로오스는 약 20 % 정도 높은 含量을 나타내었다.

Table 2. General Composition of Biomass

Composition Speciman	Moisture	Crude Protein	Crude Fat	Cellulose	Lignin	Ash	Alcohol benzen extract	Hot water soluble substrate
Hyun. T	10.1	2.0	2.2	66.4	24.9	2.1	5.2	6.1
Italy. T	9.5	1.2	1.7	65.5	27.1	1.5	7.5	3.9
Mulberry. T	10.0	2.3	1.9	70.8	23.1	1.3	3.9	6.5

\* crude cellulose : Cellulose + Hemicellulose + Pectin.

2. Cellulase 酵素糖化 反應條件

微生物에 依한 셀룰라아제의 力價를 比較하고 저 酵素生産 培地에서 供試菌株인 *Aspergillus niger*, *Irper lacteus*, *Trichoderma viride* 를 各各 28 °C 에서 7 일간 培養하고 培養物을 아세톤 處理하고 냉동건조하여 효소분말을 제조

이들 酵素에 대한 효소학적 特性을 比較하기 위해 다음과 같은 예비실험을 하였다.

(1) 最適反應 pH

反應液 pH 는 0.05 M 의 citrate buffer 로서 變化시켜 酵素活性을 測定한 결과는 Fig. 1 과 같다. 즉 3 菌株 모두 pH 4 ~ 5 에서 최대 활성을 나타내었고 그 이하와 이상에서는 활성이

떨어진 것을 알수 있었다. 따라서 이들 菌株의 酵素는 약 산성에서 최대의 酵素活性을 보여 주고 있음을 알수 있었다.

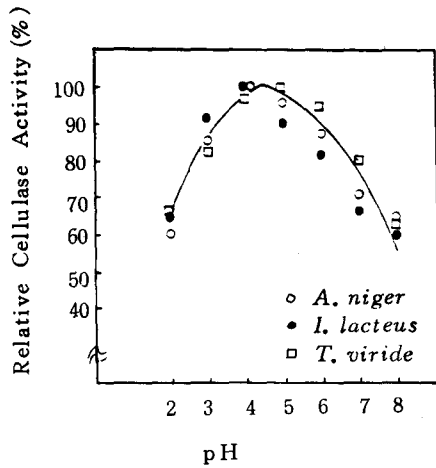


Fig. 1. Effect of pH on the Activity of Crude Cellulase from Three Fungi Strains (Half ml of the enzyme reactioned on 50 mg of filter paper at 50°C for 1 hr)

(2) 最適反應溫度

Fig. 2 에서 나타난 것과 같이 *A. niger*와 *T. viride* 는 55°C에서 活性이 가장 強하였고, *I. lacteus* 는 45°C에서 가장 강한 역가를 보여주었다. 그런데 특히 *A. niger* 는 80°C에서도 약 80%의 相對의 活性을 나타내었으므로 열에 안정함을, *I. lacteus* 는 30°C에서 85%의 相對

Table 3. Comparison of Enzyme Activity from Several Fungi Strains Activity (Units  $\times 10^3/ml$ )

Kind of Fungi Substrate	<i>A. niger</i>	<i>I. lacteus</i>	<i>T. vitide</i>
Salicin	550	112	644
CMC	107	85	118
FP	24	31	40
Cotton	0.8	0.78	0.66
Xylan	444	195	666
Pectin	111	490	570
Protein	$3.66 \times 10^{-4} g$	$1.42 \times 10^{-3} g$	$3.9 \times 10^{-4} g/ml$

(at 50°C pH 4.8)

活性을 가졌으므로 저온에서도 比較的 酵素活性

이 活潑함을 알수 있었다. 그러므로 最適反應 온도 條件으로서 *A. niger*, *T. viride* 55°C 와, *I. lacteus* 45°C 를 各各 考慮하여 50°C로 하였으며 이상과 같은 結果에서 最適反應 pH를 4.8, 最適反應溫度를 50°C로 하여 셀룰라아제 力價가 強한 菌株를 選拔하기 위해 다음의 實驗을 하였다.

(3) 木材糖化菌의 各 酵素活性度 比較

Table 3 에 요약되어 있는 바와 같이 3 菌株의 酵素力價를 比較해 본 結果 탈지면 纖維素 기질을 除外하고 모든 기질에서 다소 *T. viride* 의 酵素力價가 높았다. 이와 같은 *T. viride* 의 酵素力價는 國內에서도 수많은 研究者들에 의하여 研究되었지만<sup>45,62)</sup> 기질농도, 효소농도, 효소역가 표시 방법등이 서로가 상이하였기 때문에 比較가 곤란하였으며, *T. reesei* QM6a 와 그변이주<sup>16)</sup> *Thermomonospora curvata*<sup>60)</sup> 등에 비하여는 比較적 낮은 역가였다.

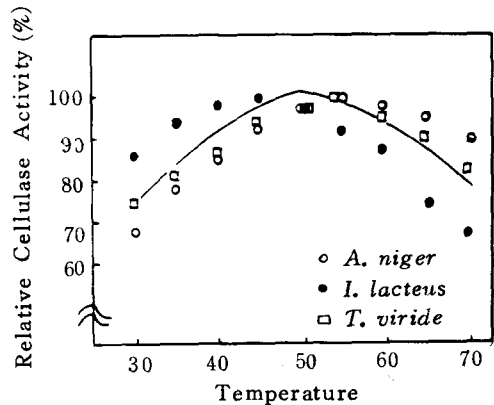


Fig. 2. Effect of Temperature on the Activity of Crude Cellulase from Three Fungi Strains (Half ml of the enzyme reactioned on 50mg of filter paper at 50°C for 1 hr)

(4) 木質糖化菌의 酵素間 相乘效果

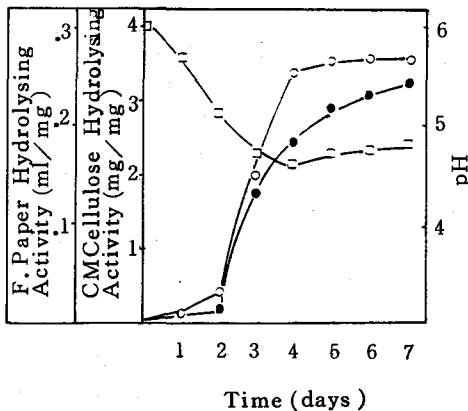
Sawao<sup>61)</sup> 등은 몇가지 酵素를 混合하여 約 4.5 倍의 酵素간 力價 相乘效果를 報告한바 있으나 Table 4 에서와 같이 各 菌株에서 生産된 酵素를 1:1 또는 4:1 비로 混合하였을때 本 實驗에서는 力價相乘이 나타나지 않았으며 混合한것과 *T. viride* 단독의 酵素力價가 비슷하게 나타났으므로, 금후의 實驗을 위해서 使用한 酵素는 *T. viride* 의 단일한 酵素로서 實驗을 實施하였다.

**Table 4. Synergistic Effect of Enzyme Activity in Combination**

Strains	Combina- tion ratio	Absorbance (550 mm)	Synergistic Effect (%)
<i>A. niger</i> (A)		15	60
<i>I. lacteus</i> (I)		20	80
<i>T. viride</i> (T)		25	100
A + I	1 : 1	18	72
I + T	1 : 1	23	92
T + A	1 : 1	25	100
A + I	4 : 1	16	64
I + T	4 : 1	22	88
T + A	4 : 1	24	96

**3. Tricho derma가 分泌하는 Cellulase活性和 培養學的 特性**

Fig. 3 에서와 같이 *T. viride* 의 培養時間에 따른 酵素生産과 酵素力價를 살펴본 結果, C. M. C 分解力價는 96 時間에 최대의 力價를 보이고, 그 후 시간이 경과함에 따라서 큰 增加를 나타내지 않는데 비해, F.P. 分解力價는 72 時間에 急激한 增加를 보였으며 그 후 서서히 完만한 增加를 보인다. 그러므로 이와 같은 特性을 고려하여 *T. viride* 를 7 일동안 고체 培養한 후에 收穫하여 조효소를 얻어 實驗에 使用하였다.



**Fig. 3. Time Course of Cellulase Production and pH during Cultivation of *T. viride*.**

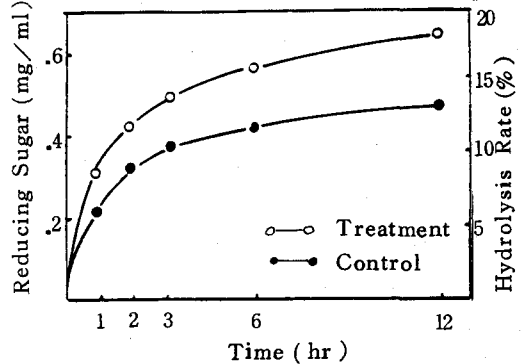
**4. 木質資源의 糖化**

以上과 같이 *T. viride* 의 培養에 依하여 酵素生産條件과 酵素學的 特性등 여러 條件들에 依하

여 最適條件을 定하였으므로 이를 考慮하여 환원당 生産에 對한 實驗을 하였다. 즉, 이때의 條件은 反應溫度 50°C, 反應 pH 4.8, 酵素濃度 1% (w/v), 기질농도 1% (w/v)가 되었는데 이때의 酵素力價는 CMC 118 mu, F. P 40 mu, 그리고 蛋白質의 양은  $3.9 \times 10^{-4} \text{ g/ml}$ 이었다. 그리고 기질은 뽕나무의 분말도 80 mesh 를 使用하여 糖化實驗을 하였다.

**(1) 前處理效果**

기질을 1% NaOH 液에서 80°C로 1시간 加熱하여 前處理를 한것은, 處理하지 않은 대조구에 比하여 약 40%의 환원당의 增加를 나타내고 있다 (Fig.4). 이와 같은 原因으로서는 NaOH 의 前處理가 澗葉樹에 含有된 저해제를 제거하고, ligno-cellulose complex의 cross-linkage를 끊어주어 리그닌을 용출시키며 cellulose 분자간 수화와, carboxyl group과 saponification이 일어나면서 swelling 등에 基因되는 것으로 간주된다.



**Fig. 4. Effect of NaOH-treatment of Mulberry Tree Powder on Cellulase Hydrolysis.**

**(2) 基質濃도에 따른 糖化**

酵素의 濃度を 1% (w/v)로 고정하고 基質의 濃度を 1~4%까지 달리하여 生成되는 환원당을 測定해 본 結果는 Fig.5 와 같다. 즉 1% 基質濃度에서는 12時間 反應時 환원당이 0.65 mg 生成되었으나 4%에서는 1.2 mg 이 生成되어 基質濃도가 增加하면서 生成된 환원당의 양은 增加되었으나, 반면 가수분해도 (Hydrolysis Rate)를 比較時에는 1%의 基質에서 約 18%가 환원당으로 전환되었으나 4%基質에서는 約 7%밖에 전환되지 않아 相對的으로 基質濃도가 높아지면서 가수분해율은 저하됨을 알수 있었다.



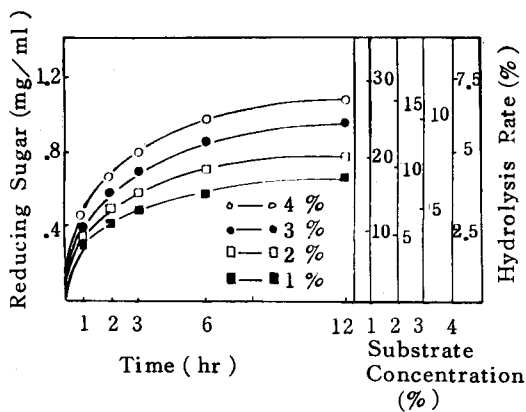


Fig. 5. Effect Conc. of Substrate on Saccharification

$$\text{Conversion Rate (\%)} = \frac{\text{Produced Reducing Sugar}}{\text{Weight of Substrate} \times 0.7} \times 100$$

(3) 樹種間的 糖化特性

現在 全世界的으로 代替燃料, 食糧, 飼料등을 生産하기 위하여 biomass 등의 利用에 많은 관심이 모아지고 있는 바, 本 實驗에서 使用한 Biomass 로서는 木材工業에서도 그 利用性이 적은 潤葉樹이며 生育이 빠른 速成수로서 현사시, 이태리포플라, 뽕나무의 환원당 生成을 比較한 結果는 Fig. 6 과 같다.

현사시와 뽕나무에 비해 이태리포플라는 약간 낮은 生産率을 나타냈는데 이와 같은 이유로서는 현사시와 뽕나무는 1年生 樹種인데 비하여 이태리포플라는 10~20年生으로서 이미 많은 部分에서 리그닌화가 일어나 酵素分解가 어려웠기 때문으로 추측된다.

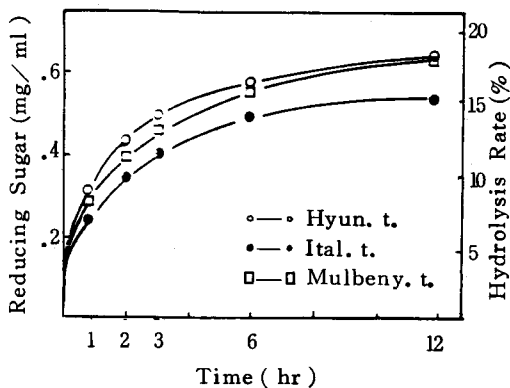


Fig. 6. Saccharification of Three Different Substrates

(4) 基質粉碎粒자에 따른 糖化

各 mesh 別 환원당 生成에는 基質粒자가 작아 지면서 환원당 生성이 Fig.7 에서와 같이 비례하면서 增加하였다. 이와 같은 이유로서는 基質의 표면적 增加로 酵素의 공격을 더 많이 받을 수 있으며 cellulose 와 결합된 lignin 이 어느 정도 제거되었기 때문으로 추측된다.

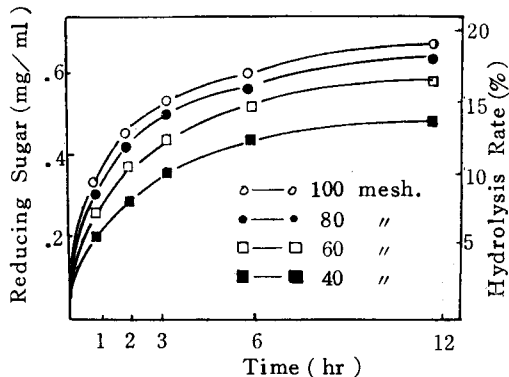


Fig. 7. Effect of Substrate Size on Saccharification

(5) 糖種類, 糖濃度別 Cellulase 의 阻害特性

Cellulase는 feed back inhibition<sup>31,50)</sup> 이 매우 큰 것으로 알려져 있다. 그러므로 셀룰라아제를 利用 cellulose 를 분해시켜 당으로 전환시킬때 生成된 糖에 의한 inhibition 程度를 살펴 본 結果는 Fig.8 과 같다. 즉 glucose 가 反應液 中에 0.2%의 濃度이었을 때는 셀룰라아제 酵素力價가 약 60% inhibition 을 보였으며 glucose 의 濃度가 1.5% 이었을 때는 무려 약 80%의

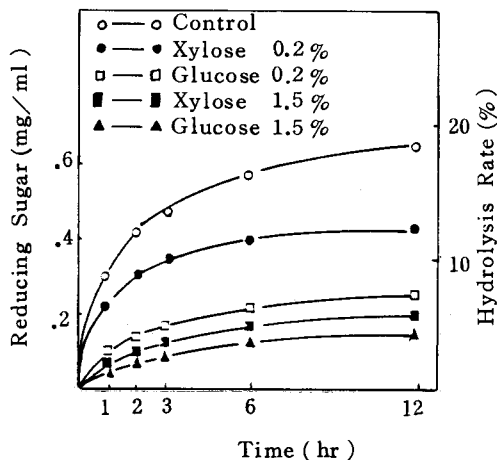


Fig. 8. Inhibition of the Cellulases by Various Sugars

活性 阻害를 받는 것으로 나타났다. 그러나 xylose에서는 이보다 다소 둔화되었는데이점은 목질자원의 酵素糖化時 크게 考慮해야 할 問題로 생각되며, 만약 이와 같이 生成된 糖을 選擇적으로 反應液으로부터 分別제거할 수 있는 方法이나 장치가 고안되면 더욱 높은 환원당 전환을 가능케 할 수 있음을 추측해 볼 수 있다.

(6) 一次酵素處理殘渣의 再基質化 效果

以上の 結果로 보아, 基質에 酵素를 反應시키고 6時間 程度가<sup>16)</sup> 지난 후에는 환원당 生成이 매우 둔화됨을 알 수 있었다. 그러므로 최대의 糖化液 生産을 위하여<sup>48)</sup> 이미 12時間 동안 酵素處理를 하고난 cellulose 基質殘渣를 다시 190°C에서 30분간 drying하고 12시간 ball milling을 한 후 새로운 酵素로 12시간 反應시킨 것을 rehydrolysis 구로 하였으며, 이와 대조하기 위한 control 구에서는 12시간 酵素處理를 한 基質殘渣를 단지 60°C에서 건조후 다시 새로운 酵素를 가하여 재반응시켰다. 이때 control 구와 rehydrolysis 구를 비교한 바, rehydrolysis 구에서는 다시 基質量의 12.5%가 당으로 전환되었음에 비하여 control 구에서는 불과 3%만이 당으로 전환되었다.

그러므로 Fig.9에서 알 수 있는 바와 같이 酵素基質 反應時 時間이 흐름에 따라 환원당 生成 커브가 급격히 완만해지는 이유로서는 酵素의 不活性보다는 基質 특이성의 變化가 큰 要因이 됨을 알 수 있다.

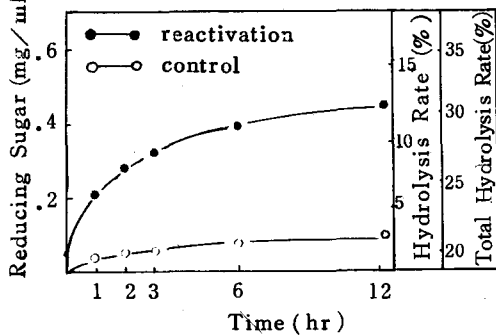


Fig.9. Hydrolysis of the Substrate which was Once Digested.

5. 酵素處理 木材糖化液의 糖類分析

(1) TLC 정성

상기와 같은 反應에 의해 生成된 糖化液을 酵素處理時間 1,6,12 hr 別로 TLC plate 위에 점

적하여 전개해본 結果 Biomass로부터 酵素處理하여 가수분해로 生成된 糖은 glucose와 xylose가 대부분임을 Fig.10을 통해 알 수 있었다. 이때 S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>는 각각 1,6,12시간의 酵素作用을 받은 反應物 (hydrolyzate)이다.

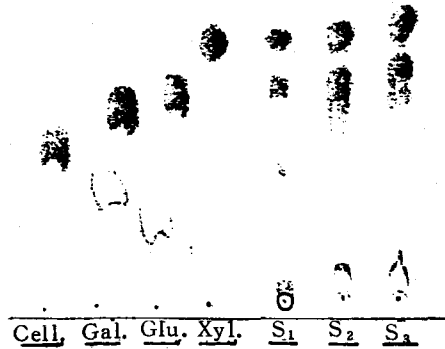


Fig. 10. Thin layer chromatogram of sugar produced from biomass at 1,6,12hr.

(2) TLC 정량

이와 같이 나타난 glucose와 xylose의 造成을 알아보기 위해 Fig.11과 같은 方法으로 시료를 여러곳에 spotting하고, I<sub>2</sub> 승화가스에 의해 발색된 부분을 採取하여, DNS 方法으로 정량해본 結果 glucose : xylose의 비가 1.53 : 1로서 glucose의 含量이 많았다.

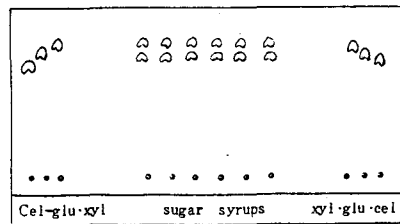


Fig. 11. Composition of Sugar Syrups.

(3) HPLC 정량

이를 다시 Fig.12와 같이 HPLC를 통하여 당 조성을 확인 해본 결과 glucose : xylose = 1.77 : 1임을 알 수 있었다. 즉 HPLC에서는 목질자원의 酵素糖化液에서 TLC보다 약간의 glucose가 더 많은 양으로 檢出되었다. 이와 같은 점으로 미루어 목질 糖化液에서 에탄올 전환시 xylose의 양이 생각보다 많이 檢出되었으므로 이를 考慮하여 glucose는 물론 xylose 同化가 可能한 菌株

를 사용하여 培養한다면 菌體 生産收率이 훨씬 유리하게 될 것임을 알 수 있다.

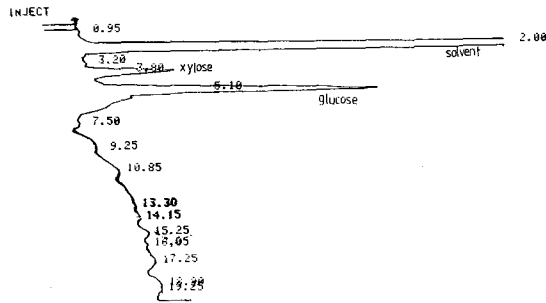


Fig. 12. HPLC chromatogram CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (85/15) 1.5 ml/min Attenuation 8× Carbohydrate Analysis.

6. Xylose 資化性 酵母의 選定

Table 1. 組成의 분리용 培地에서 1차 48 菌株를 선별하여 보존용 사면배지에 이식하였다. 1차 선별에서 분리된 48 菌株를 YPX (yeast extract-peptone-xylose) 培地에서 生育이 양호한 CHS-2, CHS-3, ST-21, ST-40, CS-18, CS-6, CHS-12, CHS-13, CHS-15의 15 個 菌株를 選拔하였다<sup>65)</sup>. 2차 선별에서 選拔된 菌株를 Table 1의 분리용 培地에서 agar를 除外한 培地에 培養한 結果, 이중 CHS-2, CHS-3, ST-40, CHS-12, CHS-13, CHS-15 菌株가 대조 菌株인 *Candida tropicalis* NCYC 478 과 比較해 볼때 다소 양호하였음을 Table 5,6에서 알 수 있다.

Table 5. Turbidity at 520 nm of the isolates in YPX media

Isolates	O. D
CS - 33	0.781
CHS - 2	1.76
CHS - 3	1.881
ST - 21	1.87
5	1.32
6	0.88
7	1.375
ST - 40	1.54
CS - 18	1.76
10	1.76
CS - 6	1.749
CHS-12	1.87
CHS-13	1.925
CHS-14	0.825
CHS-15	1.705
<i>Candida tropicalis</i> NCYC 478	0.531

Table 6. Turbidity at 520 nm of the isolates in isolating media

Isolates	O. D.
CHS - 2	0.41
CHS - 3	0.52
ST - 21	0.17
ST - 40	0.265
CS - 18	0.169
CS - 6	0.25
CHS - 12	0.415
CHS - 13	0.66
CHS - 15	1.30
<i>Candida tropicalis</i> NCYC 478	0.062

最終選拔로서 糖化液에서의 生育과 또한 糖化液에 Table 1의 培地中 탄소원을 除外한 나머지 성분들을 添加한 培地에서의 生育度를 比較해 본 結果는 Fig.13 과 같다.

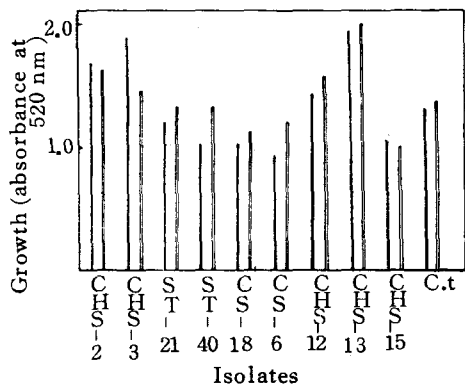


Fig. 13. Cell growth in the final screening ( — ; wood hydrolysate / — ; wood hydrolysate + isolating media except xylose)

最終 選拔에서 CHS-2, CHS-13, CHS-3 菌株가 control 菌株인 *Candida tropicalis* NCYC 478과 比較時 優秀菌株로서 選定되었으며 그중 최우수 菌株로서 CHS-13을 選定하였으며 앞으로의 모든 實驗에서 CHS-13 菌株를 使用하였다.

### 7. Xylose資化性 選拔酵母의 同定

分離菌株中에서 xylose 資化力이 가장 강한 酵母로서 CHS-13을 選定하고 形態의 培養學的 生理的 特性을 調査하였다.

Table 7. Morphological and cultural characteristics of isolate

Characteristics	CHS - 13
Form	spherical, in groups
Size	3-7 $\mu$ m
Pellicle formation	ring
Agar slant	echinulate
Broth	uniformly turbid
Colony : form	circle
elevation	umbonate
margin	entire
Dalmau plate culture on PDA	pseudomycelium developed

### (2) 生理學的 特性

CHS-13 菌株의 生理學的 特徵으로서 탄소원의 자화능은 2주일간 培養後 control과 比較하여 生育이 뚜렷한 것을 positive로 하였다. 탄소원의 醱酵能 試驗은 Duhram 관을 使用하여 gas 發生有無로 判別하였으며 ethanol 同化試驗은 皮膜·環이 생기는가 여부에 따라서 判別하였다.

KNO<sub>3</sub> 同化試驗은 control과 生育程度를 比較하였으며 滲透性 試驗도 酵母의 生育을 觀察하였다.

Arbutin 分解能은 colony의 周邊에 암갈색이 나타나면 positive (+), 무색이면 negative (-)로 표시하였다.

澱粉 生成能 試驗은 petri dish 위에 iodine 溶液을 흘려 내리거나 Lugol 液으로 염색하여 청색으로 colony가 물이들면 전분이 合成되었고 자색을 띄면 生成되지 않은 것으로 判定하였다.

酸의 生成能은 培養後 colony 週邊이 녹아난 것 같으면 positive로 判別하였으며 urea 加水分解 試驗은 Christensen's urea agar 에 25°C에서 5일간 사면배양하여 어두운 분홍색이 나타나면 (+)로 표시하였다. 또한 이 試驗은 무자낭포자효모와 유자낭포자효모를 區分할 수 있으며 무자낭포자는 (+)을 나타낸다.

### (1) 形態學的 培養學的 特性

실악산에서 採取한 土壤에서 分離한 CHS-13의 形態學的 培養學的 特徵은 Table 7과 같다.

出芽에 依해 增殖하였으며 細胞는 대개 球形으로 3~7  $\mu$ m 程度였으며 malt extract에서 培養時 cell 들간에 應集現象이 강하였으며 ring을 形成하였다. Potato dextrose agar 培地上的 Dalmau plate culture에서 pseudomycelium을 形成하였다.

Litmus milk 반응은 25°C에서 2~4주일간 培養하면서 색의 變化와 凝固를 觀察했다<sup>63)</sup>. 이상의 實驗結果는 Table 8과 같다.

Table 8. Physiological characteristics of isolate

Characteristics	CHS-13
Fermentation	
Glucose	+
Galactose	+
Inulin	-
Lactose	-
Maltose	-
Saccharose	+
Xylose	-
Assimilation of carbon compounds	
Cellobiose	+
Galactose	+
Inositol	+
Maltose	+
Melibiose	+
Lactose	-
Raffinose	+
Saccharose	+
Trehalose	-
Xylose	+

Characteristics	CHS-13
Splitting of Arbutin	+
Hydrolysis of Urea	+
Reaction in Litmus milk	usually coagulated
Assimilation of potassium nitrate	-
Assimilation of Ethanol	-(weak)
Growth on 50% (w/w) Glucose-Yeast extract agar	+
Production of Acids	-
Production of Starch-like compounds	-

Glucose, galactose, saccharose 를 醱酵하며 lactose 와 trehalose 를 자화하지 못하였다. potassium nitrate 를 資化하지 못하며 urea 를 加水分解 할수 있으며 澱粉을 生成하지 않으며 arbutin을 분해 하였다.

Table 7, 8의 形態學的 培養學的 實驗의 結果로서 살펴볼때 cell 모양은 구형이며 出芽로 繁殖하며 PDA 배지상에서 pseudomycelium을 觀察할 수 있었으며, sucrose, galactose, saccharose 를 醱酵할 수 있으며 arbutin을 분해하였다.

Lodder의 "The Yeast"의 standard description과 비교해서 거의 일치하므로 CHS-13 菌株는 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii*로 동정되었다.

## 8. Xylose資化性 酵母의 醱酵工學的 特性

### (1) 溫度的 影響

培養溫度가 菌株生育에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 pH 4.4 에서 溫度를 5°C 간격으로 하여 15~40°C로 調節하여 菌體生育度를 比較한 結果는 Fig. 14와 같다.

즉, 分離菌株 CHS-2, CHS-3, CHS-13 菌株를 糖化液에서 培養時 28~35°C 範圍의 溫度에서 양호한 生育을 보였으며 특히 30°C에서 最高의 生育度를 보였다.

### (2) pH의 影響

培地의 初期 pH가 菌株 生育에 미치는 影響을 檢討하기 위하여 溫度 30°C에서 pH 3.8~pH 6.4로 조절하여 菌의 生育度를 測定한 結果는

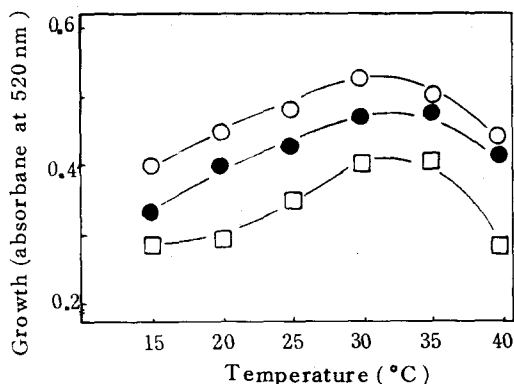


Fig. 14. Effect of temperature on the cell growth of isolates at pH 4.4 (○—○; CHS-13/ ●—●; CHS-3/ □—□; CHS-2)

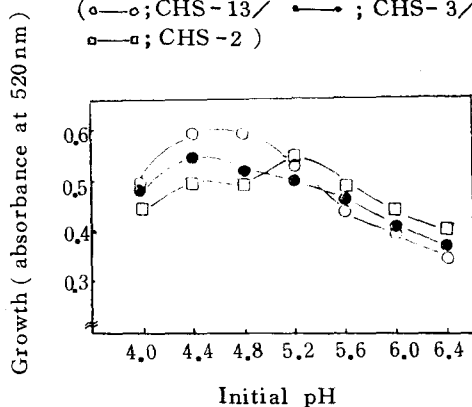


Fig. 15. Effect of initial pH on the cell growth of isolates at 30°C (○—○; CHS-13/ ●—●; CHS-3/ □—□; CHS-2)

Fig. 15와 같다.

pH 4.4~pH 5.2 사이의 範圍에서 양호한 生育을 보였으며, 특히 pH 4.4에서 最高의 生育度를 보였다.

### (5) 生育曲線

分離菌인 CHS-13, CHS-3, CHS-2 菌株를 糖化液에 flask 培養時 生育曲線은 Fig. 16과 같다.

初期 4時間 동안 거의 生育이 저조하였으며 그 후 13時間까지 급격히 增加하였으며 그후는 거의 모든 菌株가 일정하였다. 3種類의 分離菌株들의 세대시간을 比較한 바 CHS-13 菌株는  $\mu = 0.17h^{-1}$ ,  $G = 4.14h$  이었으며 CHS-2 菌株의  $\mu = 0.15h^{-1}$ ,  $G = 4.68h$  이었으며 CHS-3 菌株의  $\mu = 0.12h^{-1}$ ,  $G = 5.94h$  로서 分離菌株중 CHS-13 菌株의 세대시간이 가장 짧음을 알 수 있었다.

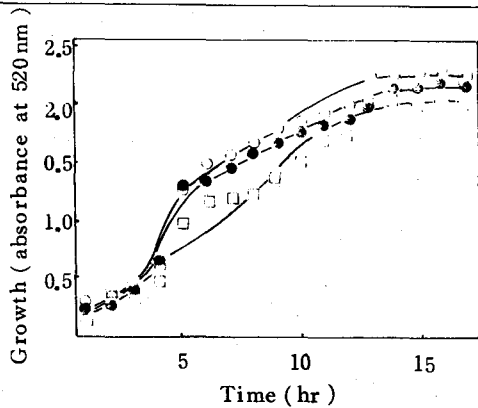


Fig. 16. Time course cell propagation of isolates at 30°C, pH 4.4, 120 strokes/min (○—○; CHS-13 / ●—●; CHS-3 / □—□; CHS-2)

(4) 分離選定 菌體의 Flask 培養에서의 基質 消費

選定한 CHS-13 菌株의 flask 培養에서의 基質 消費率을 알아보기 위하여 30°C, 初期 pH 4.4, 120 strokes 로 培養했을때 基質消費는 Fig.17 과 같다.

처음 4時間까지 당량은 약간의 減少를 보였고 그후 10時間까지 急激한 소모를 보이다가 그후 일정하였다. 초기당량은 0.75 mg/ℓ였으며 81 %까지 消費하였다.

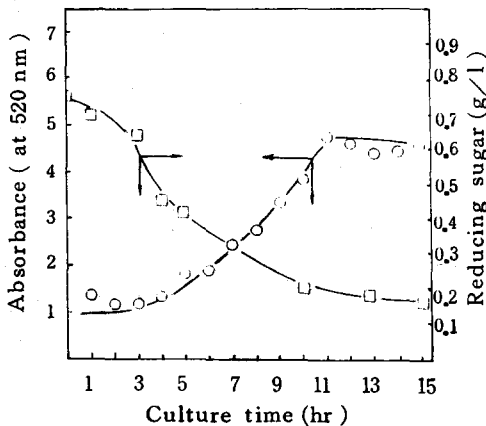


Fig. 17. Growth curve of CHS-13 isolate at 30°C, pH 4.4, 120 strokes/min.

(5) Fermentor 培養에서의 選定菌株의 生育 曲線과 基質消費

選定한 CHS-13 菌株의 jar fermentor에서의 生育을 살피기 위하여 30°C, 初期 pH 4.4, 600 rpm, 1.5 vvm으로 調節한 5ℓ fermentor에서의 菌 生育度는 Fig. 18 과 같다.

培養後 7時間까지는 生育이 거의 없었으며 그 후 13時間까지 급격히 增加하였고 그후 一定하였다. 糖量은 培養 7時間까지 거의 소모가 없다가 그후 13시간까지 급격한 소모를 보였으며 그후는 一定하였다.

초기의 生育遲延은 菌의 培地에의 적응에 起因하는 듯 하며 13時間 培養後의 生育정지는 營養源의 消費와 cell의 代謝物에 依한 阻害에 起因하는 듯하다. 이때의 CHS-13 菌株의  $\mu=0.26$  h<sup>-1</sup>, G=2.63 h 이었고 基質消費率은 73 %였다.

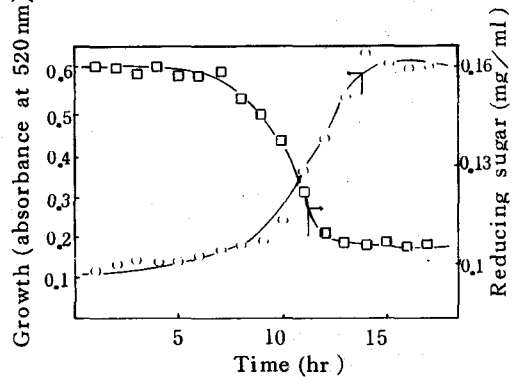


Fig. 18. Growth curve of CHS-13 isolate at 30°C, pH 4.4, 600 rpm, 1.5 vvm

9. Yeast extract 添加培養이 菌體에 미치는 영향

糖化液에 yeast extract 를 濃度別로 添加하여 pH 4.4, 30°C, 120 strokes 에서 酵母生育과 造成에 미치는 影響을 檢討한 結果는 Fig. 19, 20 과 같다.

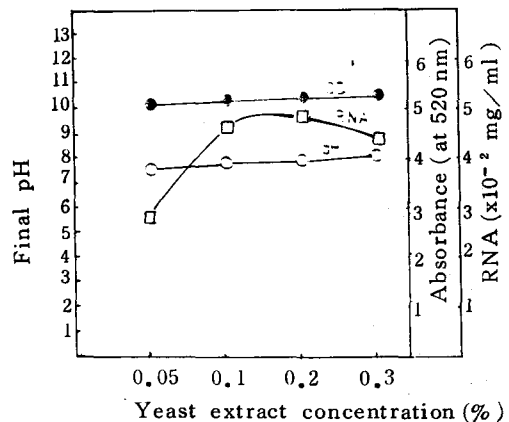


Fig. 19. Effect of yeast extract concentration on the growth of CHS-13 isolate.

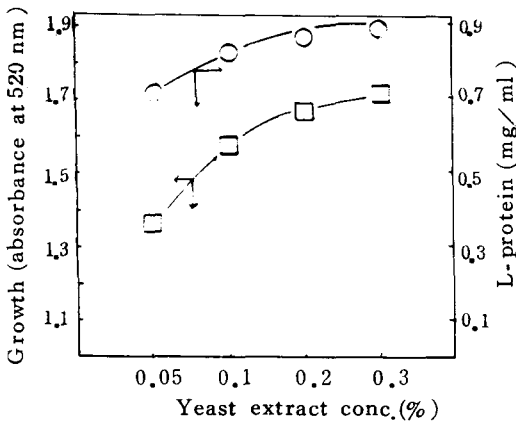


Fig. 20. Effect of yeast extract concentration on Lowry-protein content of CHS-13 isolate.

그림에서 보는 바와 같이 yeast extract 농도가 0.05%에서 0.3%까지 증가함에 따라 Lowry

-protein 함량은 약간의 증가를 보였으며 生育度에는 거의 변화가 없었으나 RNA 함량은 0.2%까지 증가를 보이다가 그후 감소하였다. 이것은 糖化液에 yeast extract 添加量이 0.2%까지 증가함에 따라 培地の C/N率이 낮아진 結果로 생각된다.

RNA 함량은 微生物의 種類, 成長時期, 培養條件에 따라 多樣하며 培地成分의 C/N率이 낮을수록 增加한다고 하며 朴 등<sup>63)</sup>은 酵母의 RNA 함량 증가에 관한 논문에서 培地の 最適 C/N率이 8:1 이라고 報告하였다.

#### 10. 單細胞 蛋白質의 組成

##### (1) 培養時間이 菌體中 蛋白質 含量에 미치는 影響

培養時間別 菌體의 Lowry-protein 含量을 測定한 結果는 Fig. 21 와 같다.

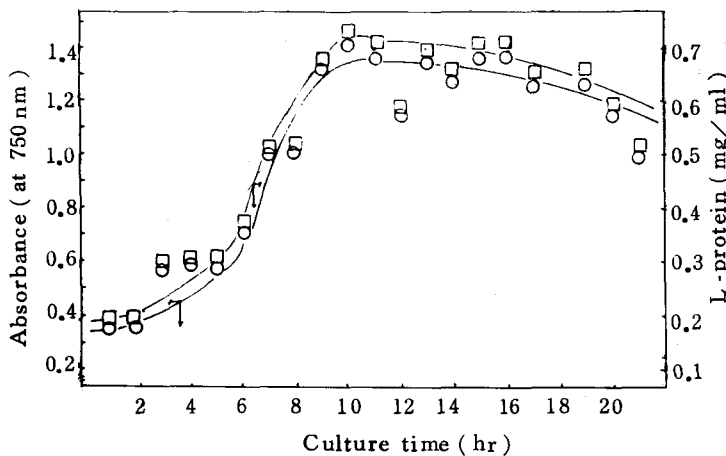


Fig. 21. Time course L-protein content of CHS-13 isolate

時間에 따른 菌體의 Lowry-protein 含量은 培養 5時間부터 增加하여 11時間에 最大含量을 보였으며 그후는 一定하다가 19時間 以後부터 減少하였다.

##### (2) 培養時間이 核酸含量에 미치는 影響

本實驗에서는 Fleck and Begg 法<sup>58)</sup>에 準하였다. Shimadzu double beam spectrophotometer UV-200 을 使用하여 抽出한 核酸의 spectrum 을 보면 Fig. 22 와 같다. 260 nm에서 최대 peak, 235 nm에서 최소 peak 를 보여 주며 280 nm에서의 蛋白質 peak 를 보이지 않아 核酸이 잘 분리되었음을 알 수 있었다.

培養時間이 菌體의 核酸含量에 미치는 影響을

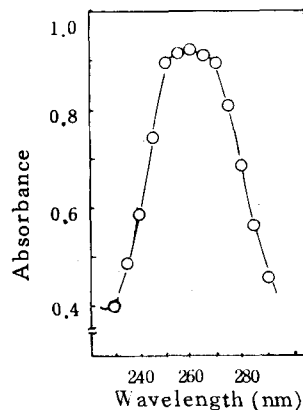


Fig. 22. Spectrum of the nucleic acid extracted from CHS-13 isolate by Fleck & Begg method

檢討하기 위하여 30°C, pH 4.4, 120 strokes 로 조절하여 時間別 核酸含量을 測定한 結果는 Fig. 23 과 같다.

培養 5時間부터 增加하여 12時間後에 最大核酸 含量을 보였으며 그후부터는 서서히 減少하는 傾向을 보였다.

本實驗에서는 木材 (뽕나무, 현사시, 이태리포플러)로부터 前處理한 후 酵素的으로 加水分解하

여 木材糖化液 (wood hydrolysate)을 만든후 그것을 培地로하여 yeast 를 培養하는 菌體蛋白質 生産에 대하여 調査하였다.

앞으로 高活性的의 酵素調製와 正確한 酵素取扱法으로 高濃度の 木材糖化液을 生産해야 할 것이며 菌體蛋白質의 營養의 側面에 대한 研究가 이루어져야 할 것이다.

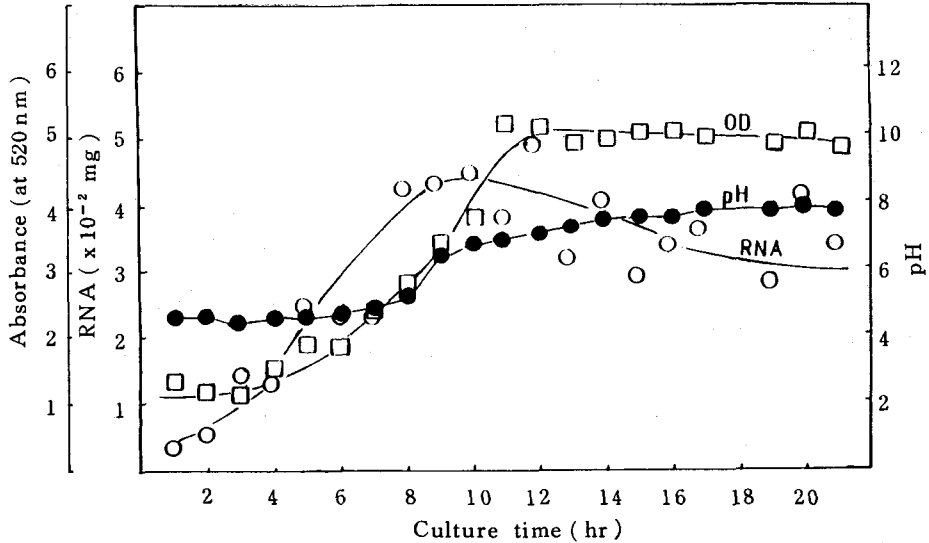


Fig. 23. Time course nucleic acid content change of CHS-13 isolate

### 摘 要

속성수로서 현재까지 이용면이 그리 넓지 못한 潤葉樹를 利用한 糖化液으로 單細胞蛋白質 生産에 依한 飼料化 轉換에 關한 基礎的인 몇가지 實驗을 한 結果는 아래와 같다.

*Aspergillus niger* sm-10, *Irpex lacteus*, *Trichoderma viride* sm-6 3 菌株의 셀룰라아제 力價를 比較해 본 結果 *Trichoderma viride* sm-6 의 力價가 가장 높았으며, 이들을 combination 하였을 때에는 상호에 의한 力價上昇 (Synergistic effect) 은 보이지 않았다.

*T. viride* sm-6 의 培養學的인 면을 살펴본 結果 밀기울배지에 질소원으로서 proteose peptone, 유도제 (inducer)로서 Tween 80, cellulose를 添加했을 때 力價增加 現象이 나타났으며 이와 같은 배지에서 培養時 C. M. Cellulose 와 Filter paper 분해 酵素力價는 120hr 에 최고에

到達했다.

基質에 酵素를 反應시켜 糖化液을 生成하는데 있어서 前處理를 한 基質은 대조구에 비해 약 40%의 환원당 增加를 보였고, 또한 基質粒子가 작을수록 환원당 增加現象을 보였으며 글루코스 등의 糖은 反應液中 적은 濃度에서도 커다란 feed back inhibition 현상을 나타냈다.

基質을 rehydrolysis 시에는 약 31%의 환원당 轉換率을 보였다. 이때 糖化液을 정량해본 結果 glucose : xylose 의 양이 1.77:1로서 glucose 의 양이 많았다.

여기에 單細胞 蛋白質을 生産할 目的으로 부식토, 퇴비, 수액, 토양등의 42점의 시료로부터 xylose 자화성 酵母 13 菌株를 선별하였으며 그때의 優秀菌株로서 3 個菌株를 選拔하였다. 이들 분리주의 培養學的 特徵을 살펴본 結果는 다음과 같다.

1. 分離株中 CHS-2, CHS-3, ST-40, CHS-12, CHS-13 菌株가 糖化液을 잘 자화함을 알았다.



2. 分離菌株中 CHS-13 菌株의 生育度가 가장 양호하였으며 초기 최적 pH는 4.4 이었으며最適溫度는 30°C 이었다.
  3. CHS-13 菌株의 specific growth rate 는 0.23 h<sup>-1</sup>, generation time 은 3.01h 이었다.
  4. CHS-13 菌株의 基質消費率은 81 % 이었다.
  5. CHS-13 菌株의 形態學的 培養學的 特性을 調査한 結果 *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* 로 同定되었다.
  6. CHS-13 菌株를 糖化液에 培養시켰을 때 Lowry-protein 함량은 0.72 mg/ml 이었으며, yeast extract 添加하여 培養時는 yeast extract 濃도가 增加함에 따라 蛋白質 含量도 增加하였다.
  7. CHS-13 菌株의 RNA 含量은 4.92 × 10<sup>-2</sup> mg/ml 이었으며 yeast extract 濃도가 增加함에 따라 增加하다가 濃도 0.2 %에서 最大含量을 나타내고 그후는 減少하였다.
- 參 考 文 獻
1. Brown, L. R.: Science (1973). 1980, 373
  2. Deppler, H. J. and Derlman, D.: Microbial Technol. (1979). 1, 93
  3. Martini, A.V., M.W. Miller, A. Martini : J. Agr. Food Chem. (1979). 27, 50
  4. Goring, D.A.I., and Timell, T.E.: (1962) Tappi 45, 454 - 460
  5. Timell, T.E.: (1964) Advan. carbohydrate chem. 19, 247 - 302.
  6. Marx-Finigi, M., and Schulz, G. V.: (1966 b). Naturwissenschaften 53, 466 - 474.
  7. Manley, R. st. J.: (1964). Nature 204, 1155 - 1157
  8. Freudenberg, k.: (1964). In "The Formation of wood in Forest Trees", PP. 203 - 218. Academic press New York
  9. Stewart, C.M.: (1966). Science 153, 1068 - 1074
  10. Ghose, T.K. and Kostick, J. A.: Biotechnol. Bioeng. (1970). 12, 921
  11. Mandels, M., Hontz, L.: B.B. (1974). 16, 1471
  12. Montenecourt, B. S. and Eveleigh, D.E.: Appl. Environ. Microbiol. (1977). 34, 777
  13. Ferchak, T. D., Hagerdal, B. and pye, K. E.: B. B. in press
  14. Martinez, G.D.V., Ogawa, T.,: Hakkokogaku Zasshi (1974), 52, 378
  15. Howell, J.A. and Mangat, M.: B.B. (1978) 20, 847
  16. Mary Mondels and David Stenberg: J. Ferment. Technol. 54, 267 - 286, (1976)
  17. Romanelli, R.A., Houston, C. W. Appl. Microbiol. (1975), 30, 276
  18. Stutzonberger, F. J. Appl. Microbiol. (1971), 22, 147
  19. Wood, T.M. and phillips, D. R. Nature (London) (1969), 222, 986
  20. Lee, B. H. and Blackburn, T. H. Appl. Microbiol. (1975), 30, 276
  21. Dennis, C.J., Gen. Microbiol. (1972), 71, 409
  22. King, N.J. and Smith, G.A. Int. Biodeterior. Bull. (1973), 9, 87
  23. Halliwell, G. and Griffin, M. Biochem. J. (1973), 135, 587
  24. Li, L.H., Flora, R.M. and king, K.W. Arch. Biochem. Biophys. (1965), 111, 439
  25. Nisizawa, K.J. Ferment. Technol. (1973), 51, 267
  26. Wood, T.M. and Mccrae, S.I. Adr. chem. Ser. in press
  27. Pettersson, L.G., Ferment. Technol. Today (1972), 727
  28. Gum, Jr, E.K. and Brown, Jr, R.D. Biochem. Biophys. Acta (1976), 446, 371
  29. Gong, D.S., Ladisch, M.R. and Tsao, G. J. B.B. (1977), 19, 959
  30. Huang, A.A. B.B. (1975), 17, 1421
  31. Howell, J.A. and Stuek, J.D. B.B. (1975) 17, 873
  32. SaSaki, T., Tanaka, T., Nanbu, N, Sato, Y. B.B. (1979), 21, 1031
  33. Brandt, D, Hontz, L. and Mandels, M. AlchE symp. (1973), 69, 127
  34. Wilke, C.R., Cysewski, G.R., Yang, R.D. and Von stockar, U.B.B. (1976), 18, 1315
  35. Spano, L.J. Caatings Technol. (1978), 50, 71

36. Mandels, M. Proc. 3rd Annu. Biomass Energy Syst. Conf. (1979), p. 285
37. Spano, L.A., Medeiros, J.J. Wash. Acad. Sci., (1976), 66, 279
38. Eriksson, K.E. and Larsson, K. Biotechnol. Bioeng. (1975), 17, 327
39. Eriksson, K.E. Appl. Polym. Symp. (1975), 28, 197
40. Miller, D. L. 3rd Annu. Biomass Energy Syst. conf. p 345 (1979)
41. Morrison, L.M., Biochem. Soc. Trans. (1975), 3, 992
42. Deanin, R.D. Appl. polym. symp. (1975), 28, 71
43. Funk, H. F. Appl. polym. Symp. (1975), 28, 145
44. McLoughlin, A.J. Irish Forestry. (1972), 29, 15
45. 李啓翹, 高正三, 李康恰. 한국농화학회지 : (1976) 19, 139-144
46. Mandels, M. Symposium on Bioconversion of cellulose Materials into Energy. New Delhi India (1977)
47. Surinder Dhawan and J.K. Gupta J.Gen. APPL. microbiol., (1977), 23, 155-161
48. 민두식. 한국임학회지 : (1978), No. 39 P. 57-63
49. P.J. Blotkamp, M. Takagi, M.S. Pemberton and G.H. Emert. AICHE. Symp. Seri. (1978), 74: 85-89
50. B.H.Kim and M. Bae. Hydrolysis-Fermentation Using Cellulase and Yeasts. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. (1979), 7-2 : 91-94
51. T.L.C. edited by Egon Stahl. (Toppan printing co.) P.807-815 (1969)
52. S.C.C. Brandao, M. L. Richmond, J. I. Gray, J. Food Science. 45 (1980) 1492-1493
53. Lee, J. Y. Studies on the bioconversion of cellulosic materials into ethanol. 단국대학교 대학원 가정학과 석사학위논문
54. Lowry, O. H., Farr, A. L. Rose braugh, N.J. and Randall, R. T. J. Biol Chem., (1951), 193, 265
55. Tech. Associat. of pulp and paper Industry: TAPPI Standard method, New York (1961)
56. 李啓翹, 高正三 : 韓農化. 18, 117 (1975)
57. Method in Microbiology Vol. 5B. P 209
58. Joseph Boudrant : Biotechnol. and Bioeng., 21, 659. (1979)
59. 배무, 김병홍, 윤애숙 : Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng. Vol. 1 No.1 June. (1973)
60. Fred. J. Stutzenberger : Appl. Microbiol. 24, 83-90
61. Sawao. Murao : J. Ferment. Technol., 517, 151-156 (1979)
62. 정동효 한국농화학회지 14, 59-91(1971)
63. M. S. Park : Kor. J. Microbiol., 10, 51 (1972)
64. 李啓翹, 成昌根 : 서울대학교 대학원 碩士學位論文 (1981)
65. 李啓翹, 鄭圭玉 : 서울대학교 대학원 碩士學位論文 (1982)
66. 李啓翹, 高正三, 朴性五 : 韓農化. 19, 130 (1976)