

Fusarium sp.에 의한 D-Xylose로 부터 Ethanol 생산

이상협·이왕식·방원기*

고려대학교 농과대학 농화학과

Production of Ethanol from D-Xylose by *Fusarium* sp.

Lee, Sang-Hyub, Wang-Sik, Lee, and Won-Gi, Bang*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea Univ., Seoul 132, Korea

Microorganisms capable of utilizing D-xylose as a sole carbon and energy source were isolated to ferment D-xylose directly to ethanol. Among them, the strain, which showed the best ability to produce ethanol, was selected and was identified as *Fusarium* sp. The optimal conditions for the production of ethanol were 8.0 of initial pH, 33°C of temperature, and 2% of substrate concentration. Under this optimal condition, the following results were obtained: maximum ethanol concentration, 7.0g/l; ethanol yield, 0.35g of ethanol per g of D-xylose (68.6% of theoretical); biomass yield, 0.27g of dry biomass per g of D-xylose.

지구상에 존재하는 식물체에서 유래되는 재생 biomass는 원천에 따라 차이가 있으나, 일반적으로 cellulose 40%, hemicellulose 30% 및 lignin 20% 정도로 구성되어 있다(1). 지금까지 cellulose를 이용하여 에탄올을 생산하기 위한 연구(2-11)는 많이 진행되어 왔으나, 재생 biomass의 약 30%를 구성하는 hemicellulose를 효율적으로 이용하여 에탄올을 생산하기 위한 연구(12-16)는 그다지 많지 않았다. 이유는 hemicellulose의 주성분이 5탄당인 D-xylose로 구성되어 있으며, 재래의 발효 효모로는 D-xylose로 부터 직접 에탄올을 생산할 수 없었기 때문이었다. 그러나 최근에 *Pachysolen tannophilus* (17), *Fusarium* sp. (18), *Candida* sp. XF 217 (19), *Candida shehatae* (20), *Candida tropicalis* (21), *Clavispora* sp. (22), *Kluyveromyces marxianus* (23), *Pichia stipitis* (24), *Aeromonas hydrophila* (25), *Bacillus macerans* (9) 등이 D-xylose를 자화하여 에탄올을 직접 생산할 수 있음이 밝혀짐에 따라 D-xylose로 부터 에탄올 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

D-xylose는 묽은 산 가수분해와 같이 비교적 단순한 공정과 낮은 경비로서 hemicellulose로 부터 고수

율로 회수될 수 있으며(26), 에탄올 생산을 위한 유용하고 값싼 기질이 될 수 있는 것으로 평가되고 있다(27). 따라서, D-xylose로 부터 에탄올을 직접 생산할 수 있는 균주의 개발은 재생 biomass의 응용성을 크게 증대시킬 것으로 기대된다.

본 연구는 D-xylose를 자화하여 에탄올을 직접 생산할 수 있는 균주를 토양으로부터 분리 및 선별하고, 균주의 동정과 에탄올 생산 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

토양으로부터 xylose(이하 D-isomer, Sigma X-1500) 자화능을 지닌 균주들을 분리하고, 이들 중에서 xylose로 부터의 에탄올 생산성이 가장 우수한 균주를 선별하여 *Fusarium* sp.로 동정하였다. PDA 사면배지에 계대배양하여 사용하였으며, 상온에서 보존하였다.

균주의 분리 및 선별

Xylose 2%, K₂HPO₄ 0.136%, (NH₄)₂SO₄ 0.

Key words: Ethanol production, D-xylose, *Fusarium* sp.

* Corresponding author

0.66%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0213%, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ 0.0017% 및 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0006% (pH 7.2)의 조성을 지닌 분리용 배지에 토양 시료를 가하고 30°C에서 진탕배양으로 2-3회 enrichment culture를 행한 후 pour plate법에 의해 xylose 자화능을 지닌 colony를 순수 분리하였다.

에탄올 생산성이 높은 균주를 선별하기 위하여 각각의 분리주를 xylose 1%, KNO_3 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.066%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075%, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.007%, $ZuSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.007% 및 yeast extract 0.1% (pH 6.5)의 조성을 지닌 배지 10 ml에 한 백금니썩 접종하여 일정시간 간격으로 흔들며 주면서 30°C에서 6일간 정치배양하였다. 배양액을 원심분리하여 얻어진 상등액중의 에탄올 양을 측정하여, 가장 에탄올 생산성이 높은 균주를 선택하였다.

배양배지 및 배양방법

전배양은 2% xylose, 0.47% $(NH_4)_2SO_4$, 1.35% K_2HPO_4 , 0.47% KH_2PO_4 , 1% K_2SO_4 , 0.25% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.5% yeast extract (pH 5.0)의 조성을 지닌 에탄올 생산배지에 공시균주의 균사 및 포자 현탁액을 접종하고, 30°C에서 2-3일간 진탕배양하여 균체중식이 약 0.6% (w/v)의 건체량에 이를 때까지 수행하였다.

본 배양은 상기조성의 에탄올 생산배지 (pH 8.0)를 500 ml용 삼각 플라스크에 분주하여 121°C에서 15분간 고압살균한 후, 여과 멸균한 20% xylose용액과 전배양 5 ml를 가하여 총 100 ml가 되게 하였다. 배양은 33°C에서 온화한 진탕배양(60 strokes/min)하에서 이뤄졌으며, 3개의 플라스크에서 5 ml의 배양액을 취하여 균체 중식, pH 및 당정량에 사용하였다.

분석방법

균체 중식은 배양액 5 ml을 미리 무게를 아는 여과지(Whatman No.1)로 거르고 세척한 후, 105°C에서 함량이 될 때까지 건조시켜 건체량으로 측정하였다. Xylose는 dinitrosalicylic acid 반응(28)에 의해 측정하였다. 에탄올은 gas chromatography (Packard M₄₁₉, porapack Q, FID, N₂ 30 cc/min, oven temp. 165°C)에 의하여 분석하였다.

균주의 동정

Nelson 등(29)의 방법에 따라 형태적 및 배양학적

특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

에탄올 생산균주의 분리 및 선별

토양으로 부터 xylose를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 균주를 30여종 순수분리하였다. 분리주들을 형태학적으로 세균류와 곰팡이류로 분류한 후, 1% xylose를 사용하여 정치배양한 후, 에탄올 생산성을 비교 검토한 결과 Table 1과 같이, 전반적으로 곰팡이류가 세균류에 비하여 더욱 높은 에탄올 생산성을 지니는 것으로 관찰되었다. 특히, 0.132% (w/v)의 에탄올 생산성을 나타내는 No. 26 균주를 최종 선별하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

공시균주(No. 26)의 동정

No. 26 분리 균주의 형태학적 특징은 Fig. 1과 같

Table 1. Ethanol production by various strains on D-xylose (1% w/v) in static culture

Strains	Origin	Ethanol%(w/v)
<i>B. macerans</i> IFO 3490	collection	0.046
<i>A. hydrophila</i> IFO 12658	"	0.061
<i>F. oxysporm f. sp. lini</i> IFO 5880	"	0.066
Isolated strains	soil	
Molds		
XD-8	"	0.094
XD-13	"	0.086
XD-16	"	0.085
XD-24	"	0.091
XD-26	"	0.132
Bacteria		
XD-2	"	0.011
XD-7	"	0.012
XD-10	"	0.024
XD-14	"	0.034
XD-15	"	0.034
XD-17	"	0.045
XD-18	"	0.031
XD-21	"	0.024
XD-25	"	0.024



Fig. 1. Photograph of *Fusarium* sp. No. 26 ($\times 1000$)
 a. clamydospore
 b. microconidia
 c. macroconidia

이 macroconidia는 일반적으로 3-5개의 septum으로 나누어진 반달 모양을 이루고 있으며, microconidia와 clamydospores도 풍부하였다. 표준화 조건(25°C

light/ 20°C dark)하에서 PDA 사면배지에서의 생육 속도는 8.5 cm diameter/ 10 days로 비교적 빠른 편이었으며, colony 아래에 강한 자주색 색소를 형성하며 배양이 경과함에 따라 강한 자주색 색소가 한천으로 확산되었다. 또한, pentachloronitrobenzene이 함유된 선택배지상에서 강한 생육을 보이는 등의 *Fusarium*속 균주의 뚜렷한 특징을 나타내고 있어서 No.26 균주를 *Fusarium* sp.로 부분동정하였다.

에탄올 생산을 위한 배양조건의 검토

에탄올 생산에 미치는 초기 pH의 영향: 초기 pH의 영향을 검토하기 위하여 멸균전에 생산배지의 pH를 5.0에서 9.0까지 조절하여 에탄올 수율과 균체수율을 비교 검토한 결과 Table 2와 같이 비교적 넓은 pH 범위에서 에탄올 생성이 이루어지나 중성이나 약알칼리성 영역이 에탄올 생성에 보다 더 유효한 것이었다. 균체 수율은 산성조건에서 더 좋았으나 발효시간이 길어지며 에탄올 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. pH2 이하와 pH11 이상에서는 균체의 증식이 이뤄지지 않았다. 최대 에탄올 수율은 pH8.0에서 이뤄졌으며, 이때의 에탄올 생산량은 6.3g/l이었다. 이 결과는 Suihko 등(18)이 *Fusarium* sp.에서 보고한 pH5.0과는 상이한 것이었다.

온도가 에탄올 생산에 미치는 영향

초기 pH를 8.0으로 하여 배양온도를 24°C에서 36°C까지 변화시키면서 에탄올 생산량을 비교 검토한 결과, Table 3과 같이 33°C에서의 에탄올 수율은 0.35g/g으로 24°C와 비교하여 약 1.9배 정도 높은 것이었으며, 균체 증식도 비교적 빠르며 발효시간도 단축되는 것으로 나타났다. 30°C 미만이나 36°C 이

Table 2. Effect of initial pH on the production of ethanol by *Fusarium* sp.

Initial pH	Final pH	Fermentation time (day)	Maximum ethanol concentration (g/l)	Maximum ethanol yield coefficient (g ethanol/g D-xylose)	Maximum cell yield coefficient (g dry cell/g D-xylose)	% of theoretical ethanol yield*
5.0	4.6	7	4.8	0.27	0.32	52.9
6.0	5.8	7	5.6	0.29	0.28	56.8
7.0	6.6	6	6.0	0.31	0.24	60.7
8.0	7.2	5	6.3	0.32	0.25	62.7
9.0	7.5	5	5.6	0.29	0.26	56.8

* Theoretical yield was assumed to be 0.51 g of ethanol per g of D-xylose

Table 3. Effect of temperature on the production of ethanol by *Fusarium* sp.

Temperature (°C)	Fermentation time(day)	Maximum ethanol concentration (g/l)	Maximum ethanol yield coefficient (g ethanol/g D-xylose)	Maximum cell yield coefficient (g dry cell / g D-xylose)	% of theoretical ethanol yield*
24	7	4.5	0.23	0.23	45.0
27	6	5.2	0.26	0.24	58.8
30	5	6.3	0.32	0.28	62.7
33	5	7.0	0.35	0.27	68.6
36	6	5.3	0.26	0.22	51.0

* Theoretical ethanol yield was assumed to be 0.51 g of ethanol per g of D-xylose

상에서는 균체와 에탄올 수율이 감소하고 발효시간도 길어지는 경향이 있는데, 이는 본 공시 균주가 에탄올 생산에 있어서 온도에 비교적 민감함을 보여주는 것이었다. 이 결과는 Suihko 등(18)이 *Fusarium* sp.에서 보고한 30°C와 Sciarini 등(12)이 *Fusarium lini*에서 보고한 28°C와는 다소 차이가 있는 것이었다.

에탄올 생산에 미치는 기질농도의 영향

초기 pH 8.0, 온도 33°C로 하여 기질농도를 2%에서 10%까지 변화시키면서 에탄올 생산량을 비교 검토한 결과, Fig.2와 같이 기질의 농도가 증가함에 따라 에탄올 생산량도 계속적으로 증가되나, 에탄올 수율과 균체 수율은 반대로 감소하는 경향을 보여주고 있다. 4% 이상의 기질 농도에서 에탄올 수율은 0.21~0.27g/g으로 2% (0.35g/g) 기질농도에 비

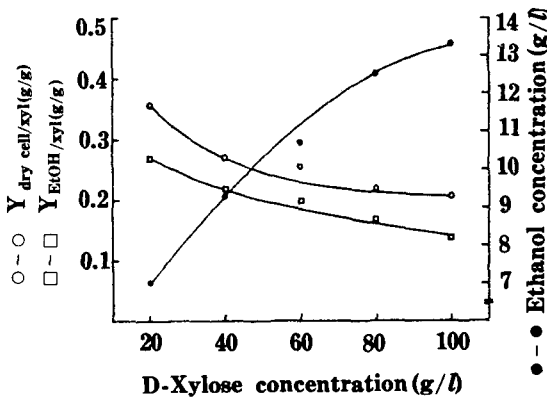


Fig. 2. Effect of substrate concentration on the production of ethanol by *Fusarium* sp.

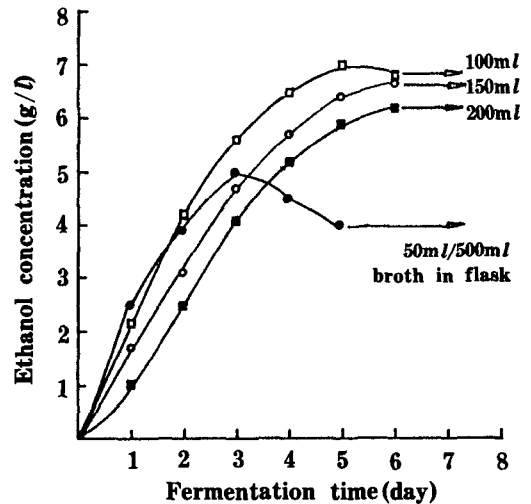


Fig. 3. Effect of aeration on the production of ethanol by *Fusarium* sp.

해 40% 정도의 낮은 값을 나타내었다. 또한 4% 이상의 기질농도에서는 6일 이상의 배양으로도 완전한 xylose 소비가 이뤄지지 않았다. 이는 높은 초기 기질농도가 xylose 이용의 효율성을 감소시킬 뿐만 아니라, 균체 생육과 에탄올 생산을 저해하는 것으로 고찰되었다. 이 결과는 Nigam 등(22)이 *Claviceps* sp.에서 보고한 결과나 Suihko 등(18)이 *Fusarium* sp.에서 사용한 5% 기질농도가 7일간의 배양으로도 완전히 소비되지 않았다는 결과와 일치하는 것이었다.

에탄올 생산에 미치는 통기의 효과

초기 pH 8.0, 온도 33°C 및 기질농도 2%로 하여

배지의 working volume를 50, 100, 150 및 200 ml로 하여 surface/ volume비를 변화시키면서 에탄올 생산성을 비교한 결과 Fig.3과 같이 surface/ volume비가 감소함에 따라 발효시간이 길어지는 경향을 보이는데 이는 xylose 소비가 산소공급과 어떤 관계를 갖고 있는 것으로 추측되었다. 50 ml의 경우에 xylose 소비는 3일만에 완전히 이뤄지나 에탄올 생산량은 5g/ g로서 100 ml에 비해 70%밖에 못 미치는 것이었으나, 균체 수율은 0.35g/ g으로 100 ml (0.27 g/ g)에 비해 22% 정도 높은 것이었다. 이는 산소 공급이 균체증식과 xylose 소비를 촉진하나 에탄올 생산을 감소시키는 것으로 생각되었다. 실험적으로 본 공시균주는 엄밀한 혐기조건에서 xylose를 소비하지 못했으며, 따라서 에탄올 생산은 이뤄지지 않았다. 산소 공급이 xylose 소비, 균체생육 및 ethanol 생산과 밀접한 관계를 지니는 것으로 본 공시균주도 산소공급에 의해 xylose 이용과 에탄올 생산이 조절받는 것으로 생각되었다.

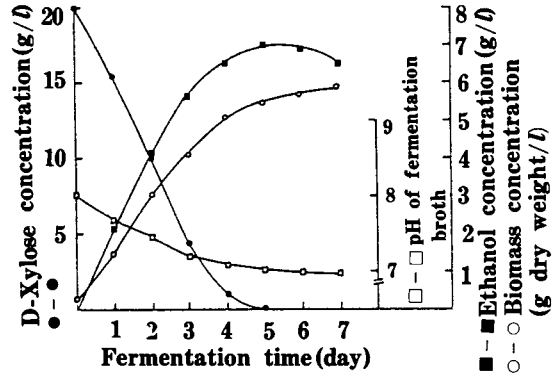
발효성 당류로 부터 에탄올 생산성 비교

Fusarium sp. No.26주는 에너지원과 탄소원으로 D-glucose, D-fructose, D-xylose, L-arabinose, maltose, lactose를 이용하였으며, 각 당을 2%로 하여 호기적 조건에서 배양하였을 시 Table 4와 같이 xylose와 L-arabinose의 경우에 에탄올 생산성에 뚜렷한 차이를 나타내었다. L-arabinose도 hemicellulose의 한 구성성분으로 이를 이용하여 에탄올로 전환할 수 있는 능력을 균주가 지닌다면, hemicel-

Table 4. Ethanol production from different sugars by *Fusarium* sp.

Fermentable sugars	Ethanol concentration (g/l)	Fermentation time (day)
Glucose	6.72	3
Fructose	6.18	3
Xylose	7.0	5
L-Arabinose	1.15	5
Sucrose	5.71	3
Maltose	3.96	3
Lactose	0.94	3

Incubation was carried out in flask culture at 33°C, shaken at 60 strokes/min. The initial pH was 8.0 and the initial sugar concentration was 20g/l.



lulose 이용면에서 큰 장점이 된다. 2 당류인 sucrose, maltose 및 lactose의 경우에도 에탄올 생산성에 뚜렷한 차이가 있었으며, 본 공시균주는 lactose로 부터 에탄올을 거의 생산하지 못하였다. 6탄당인 glucose와 fructose는 유사한 발효속도와 에탄올 생산성을 나타내었다. 이상에서 xylose는 비록 느린 속도로 소비되나, 에탄올 생산을 위한 좋은 기질이 될 수 있다.

최적 조건하에서의 에탄올 생산

상기의 실험결과에서 얻어진 최적 조건하에서 배양시간에 따른 xylose의 소비, 균체 증식, 에탄올 생산량 및 pH 변화를 조사한 결과, Fig.4와 같이 전반적으로 에탄올 수율이 균체 수율보다 높으며, xylose의 완전한 소비후에 축적된 에탄올이 자화되는 발효 형태를 나타내었다.

Xylose는 배양 5일째 완전히 소비되었다. 이때 최대 에탄올 생산량은 7g/ g이었으며, 에탄올 수율과 균체수율은 각각 0.35g/ g과 0.27g/ g이었다. 1g의 xylose로 부터 0.51g/ g의 에탄올이 생산된다고 가정하면 이론적 전환율은 68.6%이었다. 배양 후기에 xylose 소비가 완전히 이루어지는 경향은 균체증식에 따라 배지의 점도가 증가하여 산소의 공급이 발효 초기보다 제한되어 xylose 소비가 저해되기 때문인 것으로 생각되었다. 또한, xylose 소비후에 일어나는 에탄올의 자화도 산소공급의 제한에 의해 완전히 이뤄지는 것으로 사료되었다.

본 연구결과는 에탄올 수율면에서 볼 때, 본 공시균주의 에탄올 수율은 0.35g/ g으로서 Schneider 등(17)이 *P. tannophilus*에서 보고한 0.26g/ g, Jefries(21)가 *C. tropicalis*에서 보고한 0.11g/ g, Margaritis 등(23)이 *K. marxianus*에서 보고한

0.28g/g보다 높은 값이었으나, Gong 등(19)이 변이주 *Candida* sp. XF 217에서 보고한 0.42g/g이나 Suihko 등(18)이 *F. oxysporum*에서 보고한 0.42g/g에는 못 미치는 것이었다.

Fusarium sp. No. 26 균주에 의한 xylose 발효는 비교적 높은 에탄올 수율을 나타내나, 효모에 의한 발효와 비교하여 발효속도가 느린 단점을 지니고 있다.

요 약

D-xylose로부터 에탄올을 직접생산하기 위하여 D-xylose를 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용하는 균주들을 토양에서 분리하였다. 이들 중에서 에탄올 생산성이 가장 높은 균주를 선별하여 *Fusarium* sp.로 부분동정하였다. 이 균주에 의한 에탄올 생산의 최적 조건을 검토한 결과, 에탄올의 최대생산은 초기 pH 8.0, 온도 33°C, 기질농도 2%일 때 이루어졌다. 상기 조건하에서 최대 에탄올 생산량은 7.0g/g이었으며, 에탄올 수율과 균체 수율은 각각 0.35g/g(이론적 전환율: 68.6%)와 0.27g/g이었다.

참고문헌

1. 旧中三男: 醱酵工學, 58, 145(1980).
2. 福島達: 化學工學, 44, 770(1980).
3. Bisania, V.S. and Ghose, T.K.: *Enzyme Microb. Technol.* 3, 90 (1981)
4. Weiner, P.J. and Zeikus, J.G.: *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 289 (1977)
5. 田谷正仁, 伊藤泰洋, 大官邦雄, 小林猛, 山崎一: 農化, 52, 567(1978).
6. Ronald Brooks, Tah-Mun Su, Michael Brenner, and Joane Frick: General Electric Corporate Research and Development (GE/CRD). 275 (1978)
7. Kosaric, N., Ng, D.C.M., Russell, I. and Stewart, G.S.: *Ad. Appl. Microbiol.* 26, 147 (1980)
8. Wilke, C.R.: Report LBL-7880 Lawrence Berkeley Laboratory, University of California (1978)
9. Wilke, C.R. and Blanch, H.W.: Report LBL-9220 Lawrence Berkeley Laboratory, University of Cali-

10. Wilkie, C.R., Blanch, H.W.: Report LBL-9909. Lawrence Berkeley Laboratory, University of California (1979)
11. 外山信男, 小川喜入郎, 外山英男: 醱酵と工業, 39, 813(1980).
12. Sciarini, L.J. and Wirth, J.C.: *Cereal Chem.* 22, 11 (1945)
13. Wang, P.Y., Shopsis, C. and Schneider, H.: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 94, 248 (1980)
14. Rosenberg, S.L.: *Enzyme Microb. Technol.* 2, 185 (1980)
15. Maddox, I.S.: *Biotechnol. Lett.* 4, 23 (1982)
16. Maleszka, R., Wang, R.Y. and Schneider, H.: *Biotechnol. Lett.* 4, 133 (1982)
17. Slininger, P.J., Bothart, R.J., Van Cauwenberg, J.E. and Kurtzman, C.P.: *Biotechnol. and Bioeng.* 24, 371 (1982)
18. Suihko, M.L. and Enari, T.M.: *Biotechnol. Lett.* 3(12), 723 (1981)
19. Gong, C.S., MoCracken, L.D. and Tsao, G.T.: *Biotechnol. Lett.* 3, 245 (1981)
20. Du Preez, J.C. and Van Der Walt, J.P.: *Biotechnol. Lett.* 5(5), 357 (1983)
21. Jeffries, T.W.: *Biotechnol. Lett.* 3(5), 213 (1981)
22. Nigam, J.N., Margaritis, A. and Laehance, M.A.: *Appl. Environ. Microbiol.* 50(4) 763 (1985)
23. Margaritis, A. and Bajpai, P.: *Appl. Environ. Microbiol.* 44(5), 1039 (1982)
24. Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H. and Debus, D.: *Biotechnol. Lett.* 6(6), 395 (1984)
25. Flickinger, M.C., Tetzlaff, C.J. and G.T. Tasa: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 10 (1980)
26. Lee, Y.Y., Lin, C.M., Johnson, T. and Chambers, R.P.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 8, 75 (1978)
27. Flickinger, M.C.: *Biotechnol. Bioeng.* 22, 27 (1980)
28. Miller, G.L., Blum, R., Glennon, W.E. and Burton, A.L.: *Analytical Chem.* 2, 127 (1960)
29. Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.: *Fusarium* species: An illustrated manual for identification, The Pennsylvania State University press (1983)

(Received August 19, 1987)