

## 섬유질 가수분해물로부터 효율적인 Ethanol 생산균주의 분리

고학룡 · 문종상 · 심기환 · 성낙계\*

경상대학교 식품공학과

### Isolation of Strains that Produce Ethanol Efficiently from Cellulosic Materials

Ko, Hack-Ryong, Jong-Sang Mun, Ki-Hwan Shim and Nack-Kie Sung\*

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

**Abstract** — Three strains able to efficiently produce ethanol from cellulosic hydrolysates were isolated from soil samples by enrichment culture in liquid saccharified wheat bran medium. The profiles of physiological and biochemical properties of two yeasts KM-09 and KM-402 and a bacterium Hg-225 were almost identical from those of *Candida* sp. and *Klebsiella* sp., respectively. Strains KM-09 and HG-225 used xylose and cellobiose as fermentable sugars, and HG-225 had a wide range of sugar utilization for ethanol fermentation. The optimal pH and temperature for growth of KM-09, KM-402 and HG-225 were 5.8, 5.6 and 6.8 and 32°C, 30°C and 38°C, respectively. During the ethanol fermentation in saccharified wheat bran by the isolated strains, optimal temperature for ethanol production was more or less higher than those for growth, and addition of 0.2% (w/v) MgSO<sub>4</sub> into the medium enhanced ethanol productivity. Of the three strains ethanol content of KM-09 was the highest with about 2.3% (v/v), and ethanol production rate of HG-225 was faster than the others and maximum productivity was after 4 days. KM-09 (1.42%, v/v) and HG-225 (1.05%, v/v) produced ethanol from 4% (w/v) xylose but growth rate was slower than on glucose. Otherwise KM-402 showed the highest ethanol productivity on glucose, but no ethanol was detected on xylose and cellobiose.

섬유성 biomass의 ethanol로의 전환공정은 당화과 발효의 두 단계로 대별될 수 있으며 당화시, *Trichoderma reesei*(1-3) 및 *Clostridium thermocellum*(3-5) 등의 섬유소 분해효소를 이용한 효소적 가수분해에 관한 연구가 이미 활발히 진행되고 있다. 그러나, 효소에 의한 가수분해에는 효소의 작용을 보다 용이하게 하기 위하여 ball-milling 및 묽은 산·알칼리에 의한 전처리를 행하게 되는데 이들 섬유성 당 가수분해물을 고온·고압 살균시 여러 가지 유해화합물이 생성되어 발효 미생물의 생육을 저해하게 된다(6, 7). 한편, 천연 섬유성 물질은 상당량(약 35%)의 hemicellulose를 포함하고 있어(8) biomass의 효율적인 이용을 위해서는 hemicellulose의 주요 구성당인 D-xylose 등을

발효당으로 이용할 필요가 있는데 D-xylose로부터 ethanol 생산에 관한 연구(9-12)는 많이 보고되어 있다.

본 연구에서는 천연 섬유성 물질로부터 ethanol을 생산하기 위해 우선, 섬유성 당 가수분해물에서 생육이 우수할 뿐만 아니라 육탄당, 오탄당 및 cellobiose 등의 소당류를 동시에 발효하여 ethanol 생성능이 우수한 균주를 분리하여 분리균의 특성 및 ethanol 생성조건을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

Ethanol 생산을 위한 섬유성 기질의 당화효소를 생산하는 균주로서는 *Pseudomonas* sp. LBC-505를 사용하였으며, 섬유성 당 가수분해물에서 ethanol 생

**Key words:** Cellulosic hydrolysates, ethanol production

\*Corresponding author

성능이 우수한 KM-09, KM-402 및 HG-225를 분리하여 균학적 특성 및 ethanol 생성조건을 조사하였다.

### 배지 및 배양

*Pseudomonas* sp. LBC-505는 PY-CMC(CMC 10g, yeast extract 5g, polypeptone 5g, NaCl 5g,  $K_2HPO_4$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, 1l D.W., pH 6.8) 배지에서 37°C, 48시간 진탕배양하였으며, ethanol 생산 미생물 분리는 liter당 yeast extract 2g, polypeptone 1g,  $NH_4Cl$  3g,  $KH_2PO_4$  2g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g 및 환원당으로서 6.44%의 당을 포함하는 밀기울 당화액으로 구성된 분리용 배지를 사용하였다. 분리균의 ethanol 발효는 분리용 배지와 동일 조성의 배지를 사용하여 약 7일간 정지배양하였다.

### 당화효소의 제조

PY-CMC 배지에서 배양된 *Pseudomonas* sp. LBC-505의 원심 상정액을 acetone(1:1)으로 효소단백질을 침전시킨 후 원심분리하여 회수된 침전물을 약 24시간 투석한 다음 동결건조하였다. 조효소 제조는 4°C로 고정된 저온실에서 행하였다.

### 섬유성 기질의 전처리 및 효소당화

Cutting mill로 분말화(40 mesh)한 건조 밀기울 25g을 5% HCl로 상온에서 24시간 전처리한 후 NaOH로 중화(pH 6.8)하고 이 전처리액에 *Pseudomonas* sp. LBC-505의 조효소액(50 mM phosphate buffer, pH 6.8에 조효소를 100 mg/ml의 농도로 용해)을 1%량으로 첨가한 다음 미리 55°C로 조절된 진탕수조에서 약 2시간 반응시켜 당화를 행하였다.

### 당 분석

분해된 당 용액을 적당히 희석하고 그 환원당을 DNS(13)법으로 550 nm에서 흡광도를 측정, glucose standard curve를 이용하여 glucose량으로 환산하였다.

### Ethanol 생산균주의 분리

밀기울 당화액을 포함하는 분리용 액체배지(5 ml)가 들어있는 cap-test tube에 각 토양시료 0.5g을 넣어 30°C에서 약 3일간 집적배양한 후 밀기울 당화액 대신

2% glucose를 탄소원으로 하는 분리용 한천배지에 도말·배양(30°C, 48시간)하였다. 여기서 성장한 colony를 동일조성의 액체배지가 든 Durham tube에 배양하면서 균체증식속도 및 gas 생성능이 우수한 균주를 선발하였다. 일차 선발된 균주는 전배양하여 밀기울 당화액을 포함하는 분리용 배지 50 ml가 들어있는 300 ml 삼각 플라스크에서 약 7일간 정지배양한 후 gas chromatography로 ethanol 생성능을 조사하여 우수균주를 최종 선발하였다.

### 분리균의 특성조사

최종 선정된 분리균은 효모의 경우 Lodder(14)의 방법에 따라, 세균은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology(15)에 의하여 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하였다.

### Ethanol 분석

Ethanol은 gas chromatography로 분석하였으며, GC기종은 HEWLETT-PACKARD 5890, column은 HP-FFAP capillary(50 m×0.2 μm×0.33 μm)를 사용하였고 carrier gas는 helium, temperature는 200°C, 시료 주입량은 2 μl(split=100:1)였으며 detector는 FID를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### Ethanol 생산균주의 분리

섬유성 당화액에서 생육 및 ethanol 생성능이 비교적 우수한 510여종의 균주를 분리하여 이들 중 KM-09, KM-402 및 HG-225를 최종 우량균주로 선발한 결과 KM-09와 KM-402는 효모, HG-225는 세균인 것으로 관찰되었다(Fig. 1).

### 분리균의 균학적 특성

최종 선정된 세 가지 균주의 특성을 조사해 본 결과(Table 1), 형태학적으로 효모인 KM-09 및 KM-402는 주로 타원형을 이루었으며 multilateral budding에 의한 reproduction을 행하였고 potato dextrose agar 배지에서 pseudomycelium 및 spore 형성이 관찰되었다. 세균인 HG-225는 단일 또는 쌍을 이루어 존재하는 간균으로서 점질성을 가졌으며 colony 표면에 윤기가 있었다. 한편, 당의 이용특성에 있어서 HG-225

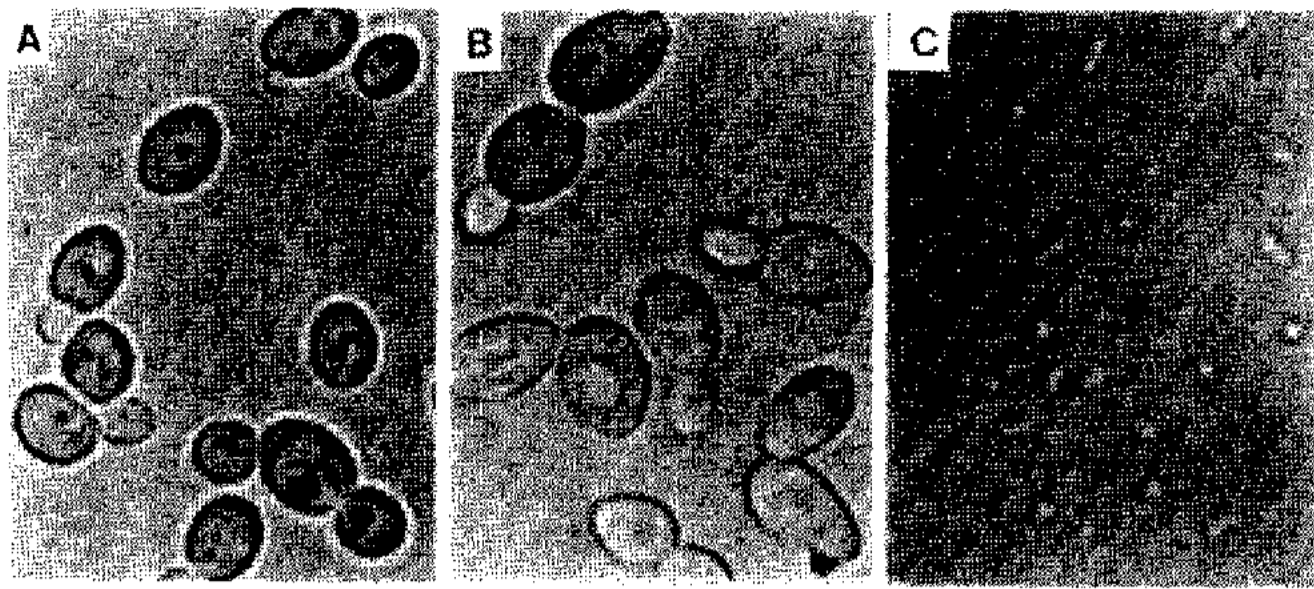


Fig. 1. Microscopic photographs of the isolates KM-09 (A), KM-402 (B), and HG-225 (C).

Table 1. Morphological properties of the isolated strains

Characteristics	KM-09 <sup>a</sup>	KM-402 <sup>a</sup>	HG-225 <sup>b</sup>
Shape	Ovoid	Ovoid	Rod
Size	3.0-6.0 μm	3.0-7.5 μm	1.0-1.5 μm
Color	White	White or cream	Yellowish white
Motility	-	-	-
Budding	Multilateral	Multilateral	-
Occurrence	single or chains	Single or chains	Single or in pairs
Surface	Slightly wrinkle	Smooth, glittering	Mucoidal, Smooth, glittering
Pseudomycelium <sup>c</sup>	Abundant	+	-
Spore <sup>c</sup>	-	-	-

<sup>a</sup>Strains KM-09 and KM-402 were cultivated in glucose-yeast extract-peptone water at 25°C for 5 days.

<sup>b</sup>Strain Hg-225 was cultivated in meat extract medium at 30°C for 3 days.

<sup>c</sup>Pseudomycelium and spore formation were tested from slide culture on potato-dextrose agar medium.

는 당 자화 및 발효에서 넓은 당 이용성을 나타내었고 오탄당인 xylose 및 이당류인 cellobiose도 발효할 수 있었다(Table 2). KM-09와 KM-402는 HG-225에 비해 당 이용 범위는 좁으나 xylose 및 cellobiose를 발효(KM-09)하였으며 arabinose 및 melibiose는 발효당으로 이용할 수 없었다. HG-225의 넓은 당 이용성 및 cellobiose 발효특성과 KM-09의 xylose 발효특성은 섬유성 당화액이 육탄당 뿐만 아니라 오탄당 등 여러 종류의 단당류 및 소당류들을 포함하며 이 중 xylose와 cellobiose가 주요 분해산물이라는 점을 고려할 때 섬유성 당 발효에서 매우 유용한 특성으로 사료된다. 또한, 이들 세 가지 균주의 생리학적 특성을 조사해 본 결과(Table 3), KM-09와 KM-402의 생육 최적온도 및 pH는 각각 32°C, 30°C 및 5.8, 5.6으로 나타났으며 10% NaCl을 포함한 배지에서는 생육이

Table 2. Cultural properties of the isolated strains

Characteristics	KM-09	KM-402	HG-225
Fermentation:			
Glucose	+	+	+
Galactose	+	+	+
Arabinose	-	-	+
Maltose	+	-	+
Sucrose	-	-	+
Trehalose	±	-	-
Melibiose	-	-	+
Cellobiose	+	-	+
Raffinose	-	±	±
Xylose	+	-	+
Inulin	-	-	-
Starch	-	-	-
Lactose	-	-	-
Inositol	-	-	+
Growth:			
Arabinose	±	-	+
Maltose	+	+	+
Ribose	-	-	-
Xylose	+	+	+
Sucrose	+	-	+
Trehalose	+	+	+
Cellobiose	+	-	+
Melibiose	-	-	+
Raffinose	-	+	+
Inulin	±	-	-
Starch	+	+	-
Inositol	+	+	-
Ethanol	+	+	-

정지되었다. 두 균주 공히 색소, urease, H<sub>2</sub>S 및 acid test에서 negative를 나타내었고, catalase와 ester 형성에서 positive를 나타내었다. HG-225의 경우 38°C, pH 6.8에서 가장 생육이 좋았고 indol, methyl red test에서 negative였으며 tartarate를 탄소원으로 이용하였다.

이상의 결과에서, 효모인 KM-09와 KM-402는 형태나 multilateral budding에 의한 reproduction, pseudomycelium의 형성 및 색소 비생성 등의 특징으로 보다 *Candida*속 균주로 추정되며, 세균인 HG-225는 gram 염색, 점질성, 넓은 범위의 당 이용성, 유기산의 이용, inositol 발효, 산 생성 등을 고려해 볼 때 *Klebsiella*속 균주로 추정되었다.

**Table 3. Physiological properties of the isolated strains**

Characteristics	KM-09	KM-402	HG-225
Growth:			
Optimal temp.	32°C	30°C	38°C
Optimal pH	5.8	5.6	6.8
Gram staining			-
10% NaCl	-	-	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Pigment	-	-	-
Ester formation	+	+	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-
urease	-	-	+
Acid production	-	-	+
Tartrate			-
Indol production			-
Methyl red			-
Voges-Proskauer			+

**Table 4. Effect of temperature on ethanol production by the isolated strains from saccharified wheat bran containing 6.44% reducing sugars**

Strains	Ethanol (% v/v)						
	25°C	30°C	32°C	35°C	38°C	40°C	42°C
KM-09	0.83	1.57	1.98	2.12	1.05	-	-
KM-402	0.74	1.30	1.92	1.45	0.63	-	-
HG-225	0.56	1.15	1.34	1.62	1.78	1.80	0.54

\*Cells were cultivated in isolation medium containing saccharified wheat bran for 7 days.

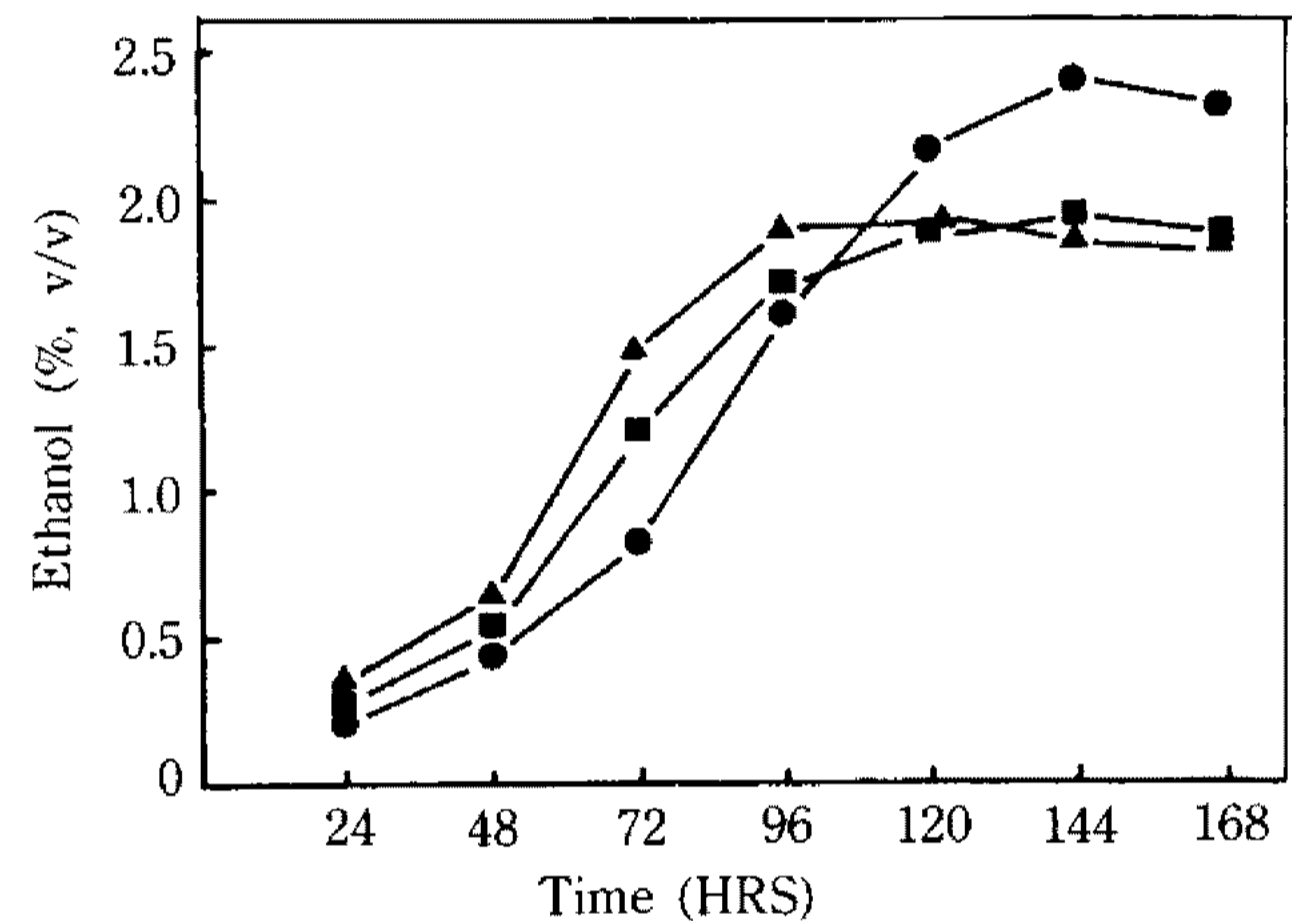
**분리균의 ethanol 생산 특성**

섭유성 당화액에서 분리균의 최적 ethanol 생산조건을 조사하기 위해 먼저 온도별로 배양해 본 결과 (Table 4), KM-09, KM-402 및 HG-225는 각각 최적 생육온도보다 다소 높은 35°C, 32°C 및 40°C에서 최대 ethanol 생산능을 나타내었다. 한편, 발효액 중 Mg<sup>2+</sup>의 첨가는 ethanol 생산량을 증가시킬 뿐만 아니라 발효균의 ethanol에 대한 독성을 감소시키는 역할을 하는 것으로 알려져(15) 있으므로 MgSO<sub>4</sub>를 농도별로 첨가하여 ethanol 생성량의 변화를 조사해 본 결과 (Table 5), 세 가지 균주 모두 무 첨가시에 비해 0.2% 첨가농도까지 ethanol 생성능이 다소 증가하다가 그 이후에는 별다른 변화를 보이지 않았다. 이는 Zymo-

**Table 5. Effect of MgSO<sub>4</sub> on ethanol production by the isolated strains from saccharified wheat bran**

Strains	Ethanol (% v/v)				
	None	0.05% <sup>a</sup>	0.10%	0.20%	0.50%
KM-09	1.53	1.89	2.15	2.26	2.23
KM-402	1.34	1.75	1.93	1.98	1.99
HG-225	1.12	1.54	1.78	1.82	1.81

\*Strains KM-09, KM-402, and HG-225 were cultivated at 35°C, 32°C and 40°C for 7 days, respectively. a: Concentration of MgSO<sub>4</sub> added.



**Fig. 2. Effect of culture time on ethanol production by KM-09 (●), KM-402 (■), and HG-225 (▲) from saccharified wheat bran.**

*monas mobilis*(16)에서와 같이 Mg<sup>2+</sup>에 의해 glucose에서 pyruvate로 전환되는 대사경로가 촉진되어 ethanol 수율이 증가된 것으로 사료된다. 앞의 결과를 토대로, KM-09, KM-402 및 HG-225 균주를 각각 35°C, 32°C 및 40°C로 0.2% MgSO<sub>4</sub>와 밀기울 당화액을 포함하는 배지에서 배양시간별 ethanol 생성량을 조사하였다(Fig. 2). 세균인 HG-225는 약 4일 발효 후 ethanol 생성량이 최대에 달했으며, 효모인 KM-09와 KM-402보다 ethanol 생성속도가 빠르게 나타났다. 이러한 현상은 HG-225 균주가 KM-09 및 KM-402에 비해 당 이용범위가 넓기 때문인 것으로 사료된다. 한편, KM-09 및 KM-402 두 효모는 지속적으로 성장하여 ethanol을 생산하였으며 KM-09가 배양 6일째에 약 2.3%(v/v)의 ethanol을 생산하여 가장 높았고, 6일 이후 생성된 ethanol의 양이 약간 감소하는 것은 배양액 중의 영양분 고갈로 ethanol을 자화 또는 분해하기 때문으로 생각된다(18). 또한, 발효당으로서 넓은 당 이용성을 가졌음에도 불구하고 HG-225의

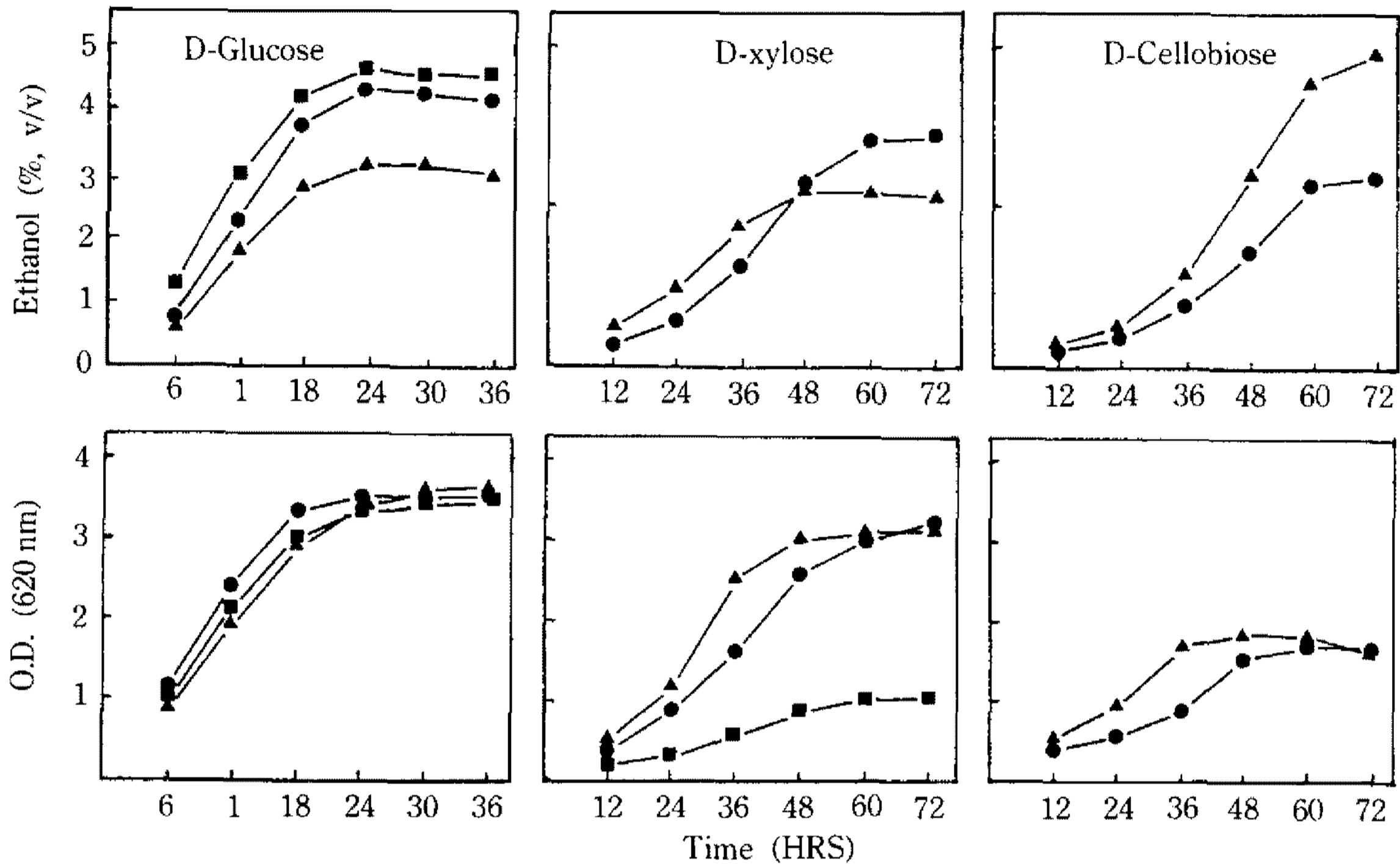


Fig. 3. Growth and ethanol production of KM-09 (●), KM-402 (■) and HG-225 (▲) on the glucose (10%, w/v), xylose (4%, w/v) and cellobiose (2%, w/v), respectively.

최종 생성 ethanol량이 KM-09 및 KM-402보다 다소 낮은 것은 HG-225 균주가 *Klebsiella*속으로 추정되므로 이들의 발효대사 특성상 ethanol외에 butanol, acetic acid 및 formic acid 등의 부산물을 생성하기 때문인 것으로 사료된다(15, 19).

섬유성 당화액의 주요 분해당인 glucose, xylose 및 cellobiose에 대한 ethanol 생산능을 조사해 본 결과 (Fig. 3), KM-09와 HG-225는 xylose로부터 각각 약 1.40, 1.05%(v/v)의 ethanol을 생산하였고 cellobiose에서도 ethanol을 생성하였으나, 생육에 있어서 glucose에 비해 정상기에 도달하는 시간이 훨씬 늦게 나타났다. 한편, KM-402의 경우 xylose 및 cellobiose의 발효능은 없으나 glucose의 발효능이 세 가지 균주 중 가장 뛰어난 것으로 나타났으며 ethanol 생성속도도 이들 glucose에 의해 초기에 빠른 경향을 보였다. 또한, xylose에서는 균 증식은 있었으나 생성된 ethanol은 없었다.

요 약

섬유성 가수분해물로부터 효율적으로 ethanol을 생산하는 세 가지 균주를 밀기울 당화액에서의 집적 배양에 의해 토양에서 분리하였다. 효모인 KM-09와

KM-402 및 세균인 HG-225의 생리학적 및 생화학적 특성은 각각 *Candida* sp. 및 *Klebsiella* sp.과 거의 유사하였다. KM-09와 HG-225 균주는 발효당으로 xylose와 cellobiose를 이용하였고 HG-225는 발효시 넓은 당 이용성을 가졌다. KM-09, KM-402 및 HG-225의 최적 생육 pH 및 온도는 각각 5.8, 5.6 및 6.8 그리고 32°C, 30°C 및 38°C였다. 분리균에 의한 밀기울 당화액에서 ethanol 발효 동안 최대 ethanol 생산온도는 최적생육온도보다 다소 높았으며, 0.2% MgSO<sub>4</sub>의 첨가는 ethanol 생산성을 향상시켰다. 세 가지 균주 중 KM-09의 ethanol 함량이 약 2.3%(v/v)로서 가장 높았고, HG-225의 ethanol 생산속도가 가장 빨랐으며 이때 최대 생산성은 배양 4일 후였다. KM-09와 HG-225는 4%(w/v) xylose로부터 각각 1.42 및 1.05%(v/v)의 ethanol을 생산하였으나 균 증식속도는 glucose에 비해 매우 느린 것으로 나타났다. 한편, KM-402는 glucose에서는 가장 ethanol 생산성이 좋았으나 xylose 및 cellobiose에서는 생산하지 못하였다.

감사의 말

본 연구를 위하여 연구비('89년도)를 지원해주신

동력자원부 에너지 관리공단에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Enari, T.M., and P. Markkanen: *Adv. Biochem. Eng.*, **5**, 1 (1977)
2. Mandels, M., L. Houtz, and J. Nystrom: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1471 (1974)
3. Thomas K.N.G. and J.G. Zeikus: *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 231 (1981)
4. Cooney, C.L., D. Wang, S.D. Wang, J. Gordon and M. Jiminez: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 103 (1978)
5. Thomas K.N.G., P.J. Weimer and J.G. Zeikus: *Arch. Microbiol.*, **114**, 1 (1977)
6. Chang, M.M., T.Y.C. Chou and G.T. Tsao: *Adv. Biochem. Eng.*, **20**, 15 (1981)
7. Kato, N. and I. Shibasaki: *J. Ferment. Technol.*, **52**, 177 (1974)
8. Dunning, J.W. and E.C. Lathrop: *Ind. Eng. Chem.*, **37**, 24 (1945)
9. Gong, C.S., L.D. McCracken and G.T. Tsao: *Biotechnol. Lett.*, **3**, 245-250 (1981)
10. Kazuyoshi, O., Flavio, A., and L.O. Ingram: *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 463 (1990)
11. Wang, P.Y., C. Shopsis, and H. Schneider: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 248 (1980)
12. Hung, L., Allen, P.J., Diana, M.Z., George, M., Ryszard, M., and H. Schneider: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 1252 (1986)
13. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
14. Lodder, J.: *The yeasts, North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London*, 2nd ed. (1970)
15. Noel, R.K. and G.H. John: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriol.* Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, London (1984)
16. Cromies, S. and H.W. Doelle: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 116 (1981)
17. Osman, Y.A., and L.O. Ingram: *J. Bacteriol.*, **164**, 173 (1985)
18. Jeffries, T.W.: *Biotech. Lett.*, **3**, 213 (1981)
19. Jeffrey S.T. and R.K. Finn: *Appl. Environ. Bioeng.*, 2039 (1987)

(Received May 11, 1991)