

# 활엽수로부터 D-xylose의 분리 및 에탄올 생산\*<sup>1</sup>

白 起 鉉\*<sup>2</sup>

## The Isolation of D-Xylose from Hardwood and it's Fermentation to Ethanol by Yeasts \*<sup>1</sup>

Paik Ki Hyon \*<sup>2</sup>

D-xylose는 임산 바이오마스의 화학적 조성분 중 셀룰로오스와 리그닌 다음으로 가장 많이 존재하는 성분이다. 그럼에도 불구하고 D-glucose만큼의 연구가 진행되지 못해왔다. 단지 xylitol, furfural 및 xylonic acids 등의 몇가지 산으로 전환시켜 이용될 뿐이다. 이런 이유는 D-xylose를 공업적으로 다량 추출하는 방법과, 특히 정선 방법에 어려운 문제점이 있기 때문이다. 그러므로 본 총설에서는 D-xylose를 보다 경제적으로 분리하는 방법과 D-xylose를 에탄올로 발효시키는 과정중의 제 문제점들에 관해 기존에 발표된 논문들을 정리하고자 한다.

즉 공업적으로 D-xylose를 다량 분리시키는 방법으로서 해섬/추출, 폭쇄/추출, 초산펄핑, 전가수분해 방법들이 논의 되었으며, 분리된 D-xylose를 에탄올로 발효시킬 경우 D-xylose의 대사, 발효 조건들의 영향, 헤미셀룰로오스 가수분해물의 발효, 발효의 전망과 문제점등이 포함되었다.

### 1. D-xylose의 공업적 분리

활엽수에 다량 함유되어 있는 D-xylose를 공업적으로 분리하려는 시도는 오래전부터 연구되어 왔다. 즉, 금세기 초부터 알칼리 추출 후 알콜로 침전시키는 방법,<sup>(1)</sup> 무기산에 의한 가수분해<sup>(2,3,4)</sup> 방법들을 거쳐 작금의 여러 방법들로 발전되어 왔다. 그 중에서도 오늘날 공업적으로 경제성이 있으며 여러 연구실들에서 진행시키고 있는 방법들은 다음과 같다.

#### 1.1 해섬과 연속추출(Asplund defiberator and extraction)

활엽수 칩을 아스플런트에 넣고 고온(160~200°C)의 증기로 10~15분간 처리한 후 defiberator로 해섬시킨다. 해섬된 섬유를 온수 및 알칼리 용액(0.5~1.0%)으로 연속 추출하면 헤미셀룰로오스의 성분 즉 xylan과 xylose가 다량 회수된다. 추출 잔사는 리그닌과 셀룰로오스로 구성되어 있으므로 섬유판제조, 조사

\*1. 접수 1991년 5월 25일 Received May 25, 1991.

\*2. 고려대학교 농과대학 College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea.

료, 산 또는 효소 가수분해 등을 통하여 부산물을 얻을 수 있다.<sup>12)</sup>

Dietrichs 등<sup>13)</sup>은 자작나무, 참나무, 너도밤나무 및 사시나무의 칩을 아스플렌트에서 해설했던 후 온수추출(100°C, 1hr.)하여 13~18%(칩기준)추출물, 또한 1% NaOH 연속추출(25°C, 0.5hr.)로 16~18%의 추출물을 얻었으며 이들 추출물 중 전자에는 75%, 후자에는 85%가 xylose로 구성되어져 있음을 확인하였다. 추출잔사는 조사료로 이용 가능성이 연구되었다.<sup>14)</sup> Simizu 등<sup>15,16)</sup>도 너도밤나무를 해설했으며 물로 추출할 경우 추출물 중에는 xylose가 약 65%가 함유되어 있으며, 높은 온도(203°C)에서는 증기처리를 5분정도, 낮은 온도(183°C)에서는 증기처리를 15분 이상하는 것이 xylose추출에 유리하다고 발표하였다. Jeong과 Paik<sup>17)</sup>은 신갈나무와 가중나무칩을 아스플렌트에서 해설했으며 온수로 추출하고 이온교환수지에서 정선한 결과 5.0~8.3%(칩기준)의 순수 당을 회수했으며, 1% NaOH로 연속 추출하여 2.5~4.2% 정도의 정선된 당을 분리하였다. 이들 당은 53~87%가 xylose으로 구성되어 있다.<sup>18)</sup>

## 1.2 폭쇄 후 추출(Explosion/extraction)

폭쇄 처리는 일명 Masonite방법으로 섬유판 제조시에 고온, 고압(220~285°C)에서 칩을 2~10분간 처리하고 순간적으로 대기압 조건으로 방출시켜 목재를 구성하고 있는 섬유로 해리, 폭쇄시키는 방법이다<sup>19)</sup>. 여기서 목재의 헤미셀룰로오스는 저분자화되어 수용성화된다. 또한 리그닌은  $\beta$ -O-4결합이 개열되어 유기용매나 묽은 알칼리에 잘 용해된다. 즉 구성 조성이 화학적으로 크게 변화되어 있으므로 추출등 각종 처리로 성분을 분리·이용할 수 있다.<sup>14,15)</sup> 특히 폭쇄재를 메탄올로 추출하여 리그닌을 용출시킨다음 잔사물질을 효소 또는 산으로 가수분해시켜 당을 회수할 수 있는 방법이 주로 연구되고 있다.<sup>16)</sup>

Tanahashi<sup>16,17)</sup>는 자작나무와 소나무를 폭쇄

시켜(20~28Kg/cm<sup>2</sup>, 1~16분)온수로 추출한 결과 19~30%(칩기준)의 추출물을 회수하였다. 자작나무를 폭쇄처리(28Kg/cm<sup>2</sup>, 2~4분)한 후 온수로 추출하여 얻은 추출물은 대부분 단당류로 구성되어 있으며 그 중 약 55%가 xylose로 구성되어 있다.<sup>18)</sup>

李<sup>19)</sup>도 졸참나무와 자작나무 칩을 폭쇄처리(20~30Kg/cm<sup>2</sup> 2~6분)한후 온수와 NaOH(0.1~10%)로 추출하여 추출물을 회수하였다. 25Kg/cm<sup>2</sup>~4분으로 폭쇄시킬 경우 졸참나무에서는 온수추출물이 20%, 1% NaOH 추출물이 46.8%였으며, 자작나무에서는 14%와 50.9%를 각각 나타내고 있다. 특히 추출량은 고압, 장시간 폭쇄처리 될 수록 증가한다고 보고하였다. 白<sup>20)</sup>은 자작나무 칩(28Kg/cm<sup>2</sup>~2분)을 폭쇄시켜 얻은 섬유를 온수로 추출하고 이온교환 수지로 정선하여 8.84%(칩기준)의 당을 회수하였고, 1%NaOH 추출에서는 8.53%, 온수+1 NaOH연속 추출시에는 9.23%의 당을 회수하였다. 이들 당 중 80~85%가 xylose로 구성되어 있다.

## 1.3 초산펄핑(Acetosolv pulping)

상압초산펄핑은 저에너지로 펄프를 생산할 뿐만 아니라 폐액에 용해된 당과 리그닌을 경제적으로 분리할 수 있는 장점을 지니고 있다. 또한 펄핑 후 폐액중의 당과 리그닌을 연소시키지 않고 초산도 회수할 수 있다. Nimg<sup>21,22,23)</sup>은 상압초산 펄핑 폐액에 과량의 물을 첨가하여 리그닌을 침전 분리한 후 나머지 용액을 농축시켜 시럽을 얻었으며 이 방법은 펄프 및 조성분 분리 이용에 최적 방법이라고 발표하였다.

白<sup>24,25,26)</sup>은 현사시나무와 신갈나무 칩을 초산 증해시킨 폐액에서 18~23%(칩기준)의 당을 회수하였으며 이중에 당이 86~91%, 체놀성 물질이 5.8~10.9%로 구성되어 있으며 이들 당은 70~75%가 xylose로 구성되어 있음을 확인하였다.

이상의 결과들로 볼때 상압초산중해 폐액으로부터 다량의 xylose를 간단하게 분리할 수 있다. 그러므로 이 방법은 좀더 연구가 계속된다면 초산펄핑 폐액에서 회수되는 당은 에탄올 발효의 기질로서 양적, 질적 잠재력을 지니고 있다고 사료된다.

#### 1.4 전가수분해(prehydrolysis)

이것은 목재 및 농업 부산물을 산 또는 알칼리로 가수분해시켜 그 여액으로부터 당을 회수하는 기존의 방법들이다. 이 방법들은 1) 기존의 산 가수 분해, 2) 당화 과정 중에 첫 단계로서 전가수분해, 3) 용해용 펄프 공장에서 헤미셀룰로오스 제거 전가수분해 방법등이 있으며 이들에 관한 수많은 논문들이 발표되었다. 그러나 공장에서 연속 작업시 부산물로 헤미셀룰로오스가 쉽게 분리되는 특수한 경우를 제외하고는 현재로서는 경제성이 없다고 본다.

## 2. D-Xylose로부터 에탄올 발효

D-xylose는 세균, 곰팡이 및 효소에 의해서 에탄올로 전환된다. 그러나 세균에 의한 발표 방법은 근년에 들어서는 거의 연구가 진전되지 않으므로 여기서는 효모에 의한 에탄올 생산에만 국한한다.

### 2.1 효모에 의한 D-Xylose의 대사

Schneider<sup>(27)</sup> 등은 효모인 *Pachysolen tannophilus*가 호기적인 조건에서 D-xylose를 직접 에탄올로 전환시킬 수 있다고 보고하였다. 이러한 발견은 일반 xylose isomerase를 사용하여 알콜로 쉽게 전환이 일어날 수 있다는 것을 암시한다. 그 후 효모에 의한 에탄올 생산에 관한 많은 논문이 발표되었다. Jeffries<sup>(28)</sup>도 *Candida tropicalis*를 이용하여 호기적인 조건에서 에탄올 발효를 수행하여 D-xylose대사에 미치는 여러가지 인자들에 관하여 검토하였다. 이상과 같이 두 효모를 중점적으로 이용하

여 D-xylose의 대사가 구명되어 왔다.

거의 대부분의 효모는 NAPH<sub>2</sub>-dependent aldoreductase를 사용하여 D-xylose를 D-xylose를 D-xylitol로 환원시키며 그 다음 NAD-dependent xylitol dehydrogenase에 의해 D-xylitol을 D-xylulose로 산화 시킨다.<sup>(29,30)</sup> 또한 D-xylulose는 D-xylulose-5-phosphate로 인산화되며 PPP(HMP)와 EMP 경로를 통하여 pyruvate로 전환된다.

D-xylose의 xylitol의 전환은 aldose reductase로 알려진 alditol:NADP 1-oxidoreductase에 의하여 촉매된다.<sup>(31)</sup> 정제된 효소는 다양한 기질에 대해 활성을 나타내지만, 특히 D-glycero배위의 2번째 탄소에 OH기를 갖는 당에 대한 활성이 가장 높다<sup>(32)</sup>. 효모나 곰팡이에 있어서는 D-xxylose환원을 촉매하는 효소는 NADPH에 대한 특이성을 갖는다. Xyiltol의 D-xylulose에로의 산화는 xylitol:NAD-2-oxidoreductase에 의해 촉매된다<sup>(32)</sup>. 이 반응은 가역적이고, NADP의 산화에 의해 D-xylulose, D-fructose, D-ribulose를 포함하는 많은 etulose가 형성된다.<sup>(33,34)</sup>

D-xylulokinase는 D-xylulose에서 D-xylulose-5-phosphate로의 인산화 반응을 촉매한다. 이 효소는 Mitsuhashi<sup>(35)</sup> 등에 의해 처음으로 lactobacilli에서 밝혀졌다. Wilson<sup>(36)</sup> 등은 *Aerobacter aerogenes*에서 2개의 분리된 D-xylulokinase가 D-xylose나 D-arabitol에 의해 유도됨을 발견했다. 효모에 있어서 D-xylulokinase의 존재는 많은 효모가 D-xylulose를 호기적 또는 혐기적으로 이용할 수 있는 능력에 의해 간접적으로 인지되고 있다.<sup>(37)</sup> 따라서, D-xylulokinase는 constitutive enzyme으로서 세포내에 존재하거나 또는 적당한 기질에 의해 매우 신속히 유도되는 효소임을 암시한다.

### 2.2 효모에 의한 에탄올 발효

초기 연구는 주로 효모중에서 *pachysolen* spp.

Table 1. Comparison of the Fermentation Parameters of D-xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* strains under Oxygen-limited Conditions.

Strain number	Fermentation conditions	Concentration (gl <sup>-1</sup> )		Maximum rate			Yield (gsubstrate <sup>-1</sup> )		
		Initial D-xylose	Maximum ethanol	Specific growth (h <sup>-1</sup> )	Volumetric ethanol (gl <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific ethanol (h <sup>-1</sup> )	Cell	Xylitol	Ethanol
<i>C. shehatae</i> strains									
CBS 2779	CA.V.M.30°C.pH4.5	30	26.1	0.25	1.31	0.28	0.10	0.20	0.29
CBS 2779	CA.V.M.30°C.pH5.5	30	16.5	0.15	0.70	0.34	0.09	0.15	0.36
CBS 4705	YE.M.U.25°C.pH4.5	50	24.0	NS	0.29	0.19	NS	0.02	0.45
CBS 5712	YE.M.U.25°C.pH4.5	50	21.0	NS	0.14	0.07	NS	0.02	0.44
CSIR Y981	CA.V.M.30°C.pH4.5	50	20.7	0.13	0.82	NS	NS	0	0.42
CSIR Y981	CA.V.M.30°C.pH4.5	23	44.3	0.08	0.65	0.35	0.03	0.13	0.38
<i>P. stipitis</i> strains									
CBS 5773	YE.M.U.25°C.pH4.5	50	20.0	NS	0.28	0.17	NS	0	0.41
CBS 7126	CA.V.M.30°C.pH5.5	50	21.5	0.14	0.92	NS	NS	0	0.45
CBS 7126	CA.YNB.30°C.pH5.2	40	15.3	0.08	NS	0.20	0.05	0.06	0.47
CBS 7126	CA.V.M.30°C.pH5.5	50	22.2	0.14	0.79	0.25	0.12	0	0.43
CBS 7126	CA.V.M.30°C.pH4.5	FB	28.8	0.11	1.58	0.32	0.18	0	0.39

Fermentation conditions. Medium containing casamino acids(CA), vitamins(V), mineral salts(M), urea(U), yeast extract(YE), or yeast nitrogen base(YNB)

가 주로 이용되었으나 최근에는 공업적인 측면에서 볼때 경제성이 가장 높다고 보는 *Candida shehatae*와 *Pichia stipitis*가 집중 연구 이용되고 있다. 그러므로 여기서는 이 두 효모에 의한 D-xylose의 에탄올 발효에 국한하여 자료를 정리하였다.

### 2.2.1 *C. shehatae*와 *P. stipitis*의 발효능력 비교.

*C. shehatae* 균주로 알려진 대부분의 효모들은 D-xylose를 발효시키는 능력들이 있다.<sup>(38, 39, 40)</sup> Table 1. 은 두 균주의 D-xylose 발효 능력을 비교해 준 것이다. 그 중에서도 CBS2779가 가장 많이 연구되고 있다. 이 균주는 에탄올 생산시 0.28~0.34h<sup>-1</sup>사이에서 최대 비 생산 속도를 나타내며, 이때에 에탄올 생산 수율은 0.29~0.37, xylitol 생산은 0.07~0.20g<sup>-1</sup>이다. 다른 *C. shehatae* 균주들도 CBS 2779와 비슷한 용적 에탄올을 생산한다. 그러나 보다 높은 에

탄올 수율과 낮은 xylitol수율은 다른 균주에서 관찰된다.

*P. stipitis* CBS 7126가 Table 1. 에서 조사된 다른 균주들에 비하여 D-xylose의 발효 능력이 가장 높다. 그러나 *C. shehatae*중에서 가장 성능이 높은 CBS2779에 비하여 *P. stipitis* CBS 7126은 D-xylose를 다소 늦게 발효시키나 에탄올 수율은 현저히 높고 또한 xylitol수율은 낮다.<sup>(41)</sup>

*P. tannophilus*에 비하여 *C. shehatae*와 *P. stipitis*의 D-xylose발효율은 에탄올 생산으로 비교하면 4배나 높으며 그 양은 상업적으로 받아 드릴수 있는 최대 이론치 0.51에 접근한다<sup>(42)</sup>. 더불어 xylitol의 수율이 낮아지는 장점이 있다<sup>(43)</sup>.

이 두효모는 *Pichia angophore*와는 달리 xylitol로 부터 에탄올을 생산시키지는 못한다<sup>(44)</sup>. Glycerol, arabitol 및 ribitol도 D-xylose

가 이 두 효모에 의하여 에탄올로 전환되는 동안에 집적되지만 그 농도가 xylitol보다도 낮다.

### 2.2.2. D-xylose 발효에 영향을 주는 인자들

#### 1) 영양요소

*P. stipitis* CBS 7126은 비타민이 결핍되도 D-xylose를 발효시킨다.<sup>(44,45)</sup> 한편 *C. shehatae* CBS 2779는 biotin, thiamine 또는 pyridoxine이 없으면 D-xylose의 발효가 잘 일어나지 않는다.<sup>(46)</sup> 특히 biotin과 thiamine은 *P. stipitis* CBS 7126을 포함하여 D-xylose를 발효시키는 효모의 에탄올 생산량과 생산율을 현저히 증가시킨다. 비록 biotin혹은 thiamine이 없는 경우 *P. stipitis*도 D-xylose를 완전히 발효시키기 위해서는 pyridoxine이 필수적일지라도, 기타 바이타민 즉 pyridoxine, myo-inositol, pantothenate등은 *C. shehatae* CBS 2779에 의한 D-xylose 발효에 결정적인 요소는 아니다. *C. shehatae*와 *P. stipitis*은 질소를 이용할 수 없으나 이스트 추출물과 같은 질소원 즉 peptone과 casamino acids는 *P. stipitis*와 *C. shehatae*의 여러 변이주들에 의한 에탄올 생산력을 촉진시킨다.<sup>(45,46)</sup>

#### 2) 온도와 pH

*C. shehatae* CBS 2779와 *P. stipitis* CBS 7126의 경우 D-xylose 50 g l<sup>-1</sup>의 발효율은 pH 4.0~5.5 범위가 적당하다. 한편 에탄올 수율은 pH 2.5~6.5 범위에서 크게 영향받지 않는다. pH 4이하와 pH 5.5이상에서 배양은 발효율의 저하를 초래한다.<sup>(41)</sup> 그러나 이와 반대되는 이론으로서 *C. shehatae* ATCC 22984는 오히려 pH 3.2~3.4에서 에탄올 생산력이 가장 높다는 보고도 있다.<sup>(47)</sup>

일반적으로 D-xylose의 최대 발효율과 세포성장은 30°C 정도에서 최대를 나타낸다.<sup>(38)</sup> 발효온도가 30°C를 넘으면 에탄올 생산량과 생산력이 급격하게 감소된다. 그러나 xylitol의 수율은 증가한다. 30°C 이하의 온도에서는 에탄올

수율은 거의 영향 받지 않으나, 에탄올 생산율은 저하된다. 36°C에서 *C. shehatae*는 D-xylose를 느리게 소모시키며 에탄올 생산이 발효 초기 단계에 국한되나, *P. stipitis*에서는 D-xylose가 87%나 이용된다. 이것은 *C. shehatae*가 *P. stipitis*보다 온도에 민감하다는 것을 의미한다.<sup>(41)</sup>

#### 3) 산소공급

제한된 산소공급은 *P. stipitis*와 *C. shehatae*의 성장 및 D-xylose와 D-glucose로부터 에탄올 생성을 촉진시킨다.<sup>(48,49,50)</sup> 혐기성 조건에서는 성장이 엄격하게 제한 받으며 에탄올 생산력은 현저하게 저하되나 호기성 조건에서는 에탄올 생산력이 증가된다.<sup>(49,50,51)</sup> 한편 완전한 호기성 조건에서는 에탄올이 생성되지 않는 것이 일반적이나,<sup>(51,52)</sup> *C. shehatae*와 어떤 *Candida* 변이주는 D-xylose를 에탄올로 변화시킨다는 보고도 있다.<sup>(53)</sup> 에탄올 생산에 미치는 산소의 영향은 아직 완전하게 구명되지 않은 부분이 많다.

DOT(dissolved oxygen tension)가 잘 조절되는 단속식 발효조에서 *C. shehatae*에 의한 에탄올 수율(0.35~0.38)은 0.2~1.4% 공기 포화의 DOT 수준에서는 영향 받지 않는다. 한편 *P. stipitis*는 DOT가 0.44에서 0.99로 조절됨에 따라 에탄올 수율이 감소한다.<sup>(29)</sup> *C. shehatae*와 *P. stipitis*의 비 생산 에탄올율은 각각 0.79와 0.2% DOT 수준에서 0.35h<sup>-1</sup>과 0.32h<sup>-1</sup>로 각각 최대치에 달한다. 이것은 *P. stipitis*가 *C. shehatae*보다 D-xylose 최적 발효조건으로 낮은 DOT를 요구한다는 것을 의미한다.

#### 4) 혼합기질

D-xylose 발효시 육탄당의 영향에는 서로 다른 결과들이 보고되고 있다. D-galactose, D-cellobiose 및 L-arabinose는 D-xylose 발효에 불리한 영향을 주지 못한다는 데는 일치되고 있다.<sup>(44)</sup> 보고에 따르면 D-glucose는 *P. stipitis* CBS 7126과 *C. shehatae* CBS 2779에 의한 D-xylose의 발효를 억제하나, D-man-

nose는 어떤 영향을 끼치지 않는다.<sup>(44)</sup> 또한 다른 논문들에 따르면 D-glucose, mannose 모두 *P. stipitis*에 의한 D-xylose의 전환을 억제하거나,<sup>(55)</sup> 혹은 에탄올로의 전환을 현저히 지연시킨다고 한다.<sup>(56)</sup> 이러한 결과의 차이는 각자가 사용한 당농도, 균주, 발효조건, 전환과정 등의 차이에 기인한다고 본다. D-mannose, D-glucose는 *P. stipitis* CBS 5773에서 xylitol dehydrogenase의 생성을 억제시킨다. 한편 D-galactose, D-cellobiose와 L-arabinose는 어떤 방향도 주지 않는다.<sup>(56)</sup>

### 5) 기질농도

최대 에탄올 농도, 에탄올생산율 및 에탄올과 자이리톨의 최대 생산시에 있어서의 D-xylose 농도는 *P. stipitis*나 *C. shehatae* strain 간에 일반적으로 비슷하다. 대부분의 경우 D-xylose의 농도가 100g<sup>-1</sup>이거나 이보다 약간 높을 때 에탄올 생산율과 에탄올 농도가 가장 높다. 한편 최고의 에탄올 농도와 비 생산율은 D-xylose 농도가 100g<sup>-1</sup>이거나 이보다 낮은 농도에서 달성된다. 에탄올과 자이리톨의 수율은 기질 농도에 특히 민감하다.<sup>(41, 49, 57)</sup> 어떤 결과에 따르면 에탄올 최대 수율은 D-xylose의 농도가 5-10g<sup>-1</sup>에서 이루어진다는 발표도 있다.<sup>(46)</sup> 그러나 대부분의 경우 가장 높은 수율을 나타내는 D-xylose 농도는 최대 에탄올 농도와 최대 에탄올 생산 용적율이 달성되는 D-xylose의 농도보다 현저히 낮다. D-xylose의 농도가 증가함에 따라 자이리톨의 수율도 증가한다는 것이 이러한 사실을 증명해 주고 있다.<sup>(41)</sup>

### 6) 에탄올 농도

*C. shehatae*와 *P. stipitis*의 여러 균주들로부터 생산된 최대 에탄올 농도에 관한 여러 논문들이 발견되고 있다. 즉 *C. shehatae* CBS 5712에 의해서는 25g<sup>-1</sup>, *C. shehatae* ATCC 22984에서는 100g<sup>-1</sup>, *P. stipitis* CBS 5776은 33g<sup>-1</sup> 및 *P. stipitis* CBS 5773에서는 57g<sup>-1</sup>까지 다양하게 보고되고 있다.<sup>(40)</sup> 이렇게 다양한 것은 에

탄올 tolerance가 균주 간에 차이가 있고 동일 균주에서도 발효조건에 따라 차이가 온다는 것을 의미한다. 30°C에서 D-xylose에 *P. stipitis* CBS 7126과 *C. shehatae* CBS 2779의 성장은 각각 33과 30g<sup>-1</sup>에탄올에서 에탄올 tolerance가 제한 받는다.<sup>(58, 59)</sup>

D-xylose를 발효시키는 효모의 알콜 tolerance는 온도 조절에 크게 의존한다. Du Preez 등<sup>(59)</sup>은 *P. stipitis* CBS 7126과 *C. shehatae* CBS 2779의 생육이 11~22°C 온도 범위에서는 46~48g<sup>-1</sup>에탄올 농도에서도 가능하다고 발표하였다. 이러한 수치는 30°C에서 조사된 것보다 15g<sup>-1</sup>이나 더 높은 농도이다. 이와 같이 생육 온도 조건에도 에탄올 tolerance가 차이가 난다. D-xylose를 발효시키는 에탄올 tolerance가 낮은 이유는 아직 분명하게 이해되고 있지는 못하다.

### 2.2.3 헤미셀룰로오스 가수분해물의 발효

대부분의 연구는 고온, 고압하에서 산(HCl, H<sub>2</sub>S<sub>4</sub>) 또는 SO<sub>2</sub>로 목재 및 농업 부산물로 처리한 후 헤미셀룰로오스 가수분해물들을 회수한 후 이들을 발효시키는데 집중되고 있다. Table 2. 는 *C. shehatae*와 *P. stipitis*에 의한 헤미셀룰로오스 가수분해물의 발효를 나타내고 있다.

Tran a. Chambers<sup>(61)</sup>는 참나무(*Quercus falcata*) 칩을 약산 가수분해시켜 목재에 함유된 D-xylose의 80%를 회수하였다. 그러나 이런 가수분해물들은 초산, 홀후랄, 하드록실홀후랄, 리그닌 분해물을 함유하고 있으므로 효모의 발효를 억제시킨다.<sup>(62, 63, 64)</sup> 특히 *C. shehatae* 균주는 *P. tannophilus*나 *S. cerevisiae*보다 이런 현상에 더욱 민감하다.<sup>(70)</sup>

홀후랄은 *P. stipitis*의 성장과 호흡을 직접적으로 억제할 뿐만이 아니라 홀후랄 알콜로 환원되어 균체생산 및 비에탄올생산율도 감소킨다.<sup>(65)</sup> 초산도 일반적으로 효모에 억제물질로 작용한다.<sup>(66)</sup> 그리고 그 독성 정도는 pH에 따라 다르다.<sup>(67)</sup> 적정 pH범위는 4~5.5정도이다.<sup>(41)</sup> 그러나 pH가 이보다 낮으면 초산이 효모의 세

Table 2. Fermentation of Hemicellulose Hydrolysates by *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* under oxygen-limited Batch culture inditions.

Yeast and source of hydrolysate	Hydrolysis or treatment technique		Fermentation conditions	Yeast strain	Glucose (gl <sup>-1</sup> )	Xylose (gl <sup>-1</sup> )	Other (gl <sup>-1</sup> )	Acetate (gl <sup>-1</sup> )	Max. ethanol (gl <sup>-1</sup> )	Substrate used (%)	Fermentation time (h)	Ethanol yield (gl <sup>-1</sup> ) (gg) sugar
C.shehatae												
Spent sulphite liquor	Steam-stripped	pH5.5	ATCC	2.9	6.5	20.1	NS	15.3	96	18	NS	0.48
		30°C	22984	3.3	7.8	22.2						0.48
Barley	NS	MS	ATCC	126	54	0	NS	84	97	72	NS	
		pH5.5	22984									
Red Oak (Quercus falcata)	150°C CH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1h	pH6.0	CBS 5776	NS	24.1	0.6	11.3	7.1	NS	NS	NS	0.40
		30°C recycled yeast										
Red Oak (Quercus falcata)	150°C CH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1h	pH6.0	CBS 5776	NS	21.7	0.1	6.8	9.9	NS	NS	NS	0.47
		30°C Molecular sieve										
Aspen (Populus tremuloides)	165°C. CHI	pH5.5	CBS 5776	6.3	15.3	3.1	0.6	8.9	88	24	0.46	0.44
		30°C high inoculum(12gl <sup>-1</sup> ) MS										
Pine (Pinus resinosa)	167°C. HCl	pH1.5	CBS5776	5.2	5.6	12.3	0.4	10.3	96	24	0.65	0.47
		2.5min. steam stripped										
Aspen (Populus tremuloides)	SO <sub>2</sub> hydrolysis enzyme	pH5.5	CBS5776	NS	MS	123	NS	52	95	NS	NS	0.44
		30°C, MS saccharification										
Maize stower (Zea mays)	SO <sub>2</sub> hydrolysis enzyme	pH5.5	CBS 5776	NS	NS	120	NS	52	95	NS	NS	0.46
		30°C MS saccharification										
Hardwood spent sulphite liquor	steam stripped	pH5.5	CBS5776	5.0	35.1	14.3	0.5	18.0	85	72	0.30	0.42
		30°C										
Mixed pine & spruce	SO <sub>2</sub> hydrolysis	pH4.8, 30°C	CBS5776	NS	NS	134	NS	55	96	NS	NS	0.43

MS : mineral salts.

포질 내로 자유롭게 확산되므로 셀내부의 pH를 낮추고, 높은 pH에서는 세포막이 이온화된 초산에 대하여 비투과성을 지니므로 그 결과로 부분적으로 자이로즈 발효밖에 일어나지 않는다. 그러므로 헤미셀룰로오스 가수분해물을 중성화 시켜야 하는데 일반적으로  $MgCO_3$ ,  $NaOH$ ,  $NH_4OH$ 보다는  $Ca(OH)_2$ 로 중성화시키는 것이 바람직하다. 칼슘염은 용해도가 낮으므로 침전과 동시에 미지의 독성 물질까지 흡착침전시키는 효과가 있다.<sup>(67)</sup>

흡후탈과 초산을 제거시키는 방법으로는 anion-exchange resin, molecular sieves 및 증기처리 방법들이 있으나,<sup>(55,64,72)</sup> 이 방법들은 시료와 균주에 따라서 그 효과가 다르다. 바카세의 경우 이온교환수지를 사용하여 양호한 결과를 얻었으나 참나무의 산가수분해물은 molecular sieves로 처리하는 것이 오히려 더 양호하다.<sup>(68)</sup>

이상의 방법으로 헤미셀룰로오스의 가수분해물로부터 장해 인자들을 전처리 하면 에탄올 수율과 용적에탄올 생산성은 순수한 xylose를 *C. shahatae*나 *P. stipitis*로 발효하여 얻은 것보다 높거나 또는 거의 동일한 수준이다(Table 2.). 이것은 독성 물질들이 제거되면 가수분해물들은 당을 알콜로 전환시키는 효모의 능력에 아무 지장도 주지 않는다.<sup>(68)</sup> 그러나 가수분해물에 잔존하는 L-arabinose는 *C. shahatae* 또는 *P. stipitis*에 의해 발효되지 않는다.<sup>(64,69,70)</sup>

#### 2.2.4 전망과 문제점

상업적인 적용을 고려할 때 D-xylose를 발효시키는 효모는 최소한  $0.3g\ l^{-1}$ 의 수율로 36시간내에  $50-60g\ l^{-1}$  에탄올을 생산하는 것이 요구된다.<sup>(82)</sup> *C. shahatae*와 *P. stipitis*를 D-xylose로부터 에탄올 생산수율과 생산을 측면에서 보면 이상의 조건들을 충족시킨다는 것이 일반적 견해이다. 그러나 순수한 D-xylose 또는 가수분해로 얻어진 당인 기질에서 만족할 만한 에탄올 농도에 도달하는데 요구되는 발효시간이 36시간보다 더 길다는 보고도 있다 *C.*

*shahatae* 또는 *P. stipitis*로 얻어지는 에탄올 수율은 *S. cerevisiae*로 D-glucose를 발효시킬 경우와 비슷하다. 특히 *S. stipitis*에서는 순수한 D-xylose를 기질로 사용할 경우보다 높은 에탄올 수율을 얻을 수 있다. 왜냐하면 부산물로 xyloitol이 전혀 생기지 않거나 또는 극소량만이 생산되기 때문이다(Table 2.).

또한 *P. stipitis*를 이용하는 상업적 방법은 CBS7126 균주가 D-xylose를 발효시킬때 비타민 첨가가 필요없으며 D-cellobiose도 에탄올로 발효시킬 수 있다는 장점이 있다. *P. stipitis* CBS5773과 CBS5775도 xylan을 함유한 가수분해물을 에탄올로 전환시킬 수 있으며, 어떤 *C. shahatae* 균주들을 에탄올 생산의 다소간 높은 비율(specific rate)을 지니고 있다(Table 2.).

한편 최적의 발효조건을 유지하기 위한 산소 요구도가 다르므로 적당한 효모를 선택할 때 어려움이 있다. 즉 D-xylose로 부터 에탄올 생산수율과 생산율을 최대로 향상시키기 위해서는 제한된 호기 조건이 요구되나 발효시에 산소 요구도를 계속적으로 변화 조절해 나가는 것은 기술적으로 어려움이 있다.<sup>(71)</sup> 산화전위차(redox potential)를 이용하여 요구되는 산소량을 검지하는 방법들이 방법이 제시되고 있으나 이 방법은 균주에 따라 제한된 범위에서 성공적이라고 보고되고 있다.<sup>(72,73)</sup>

발효 효율을 높이기 위해 *C. shahatae*와 *P. stipitis* 균주의 유전자 조작은 이들에 대한 생물학적 특성이 아직 덜 구명되었으므로 여여러 가지 어려움이 있다. 현재 *C. shahatae* ATT 22984와 같은 변이종도 개발되었으나,<sup>(74)</sup> 아직 충분하지는 못하다. 또다른 접근 방법으로 이들 효모에 transhydrogenase gene을 cloning하는 방법,<sup>(75)</sup> *S. shahatae*가 D-xylose로 발효시킬 수 있도록 *S. shahatae*에 *P. stipitis*의 xylose reductase와 xyloitol dehydrogenase를 gene cloning 시키거나<sup>(76)</sup> 또는 *E. coli* xylose isomerase gene을 *S. cerevisiae*에 cloning시키



는 방법<sup>(77, 78)</sup>들이 연구되고 있다.

### 참 고 문 헌

1. Koch, Pharm. Zig. Russ., 25, 657, 1886.
2. Hudson, C.S. a. Hardy, T.S., J. Am. Chem., Soc., 39, 1038, 1917.
3. LaForge, T. a Hudson, C.S., Ind. Eng. Chem., 10925, 1918.
4. Schreiber, W.T., Geib, N.V., Wingfield, B., a. Acree, S. F., Ind. Eng. Chem., 22(5), 497, 1940.
5. Sinner M., J. Plus and H.H. Dietrichs. Fed. Res. Centre for forestry and forest prod. Hamburg-Reinbek, 124, 52-68, 1979.
6. Dietrichs, H.H., M. Sinner and J. Plus. Holzforschung, 32(6), 193-199, 1979.
7. Kaufmann, W., M.Sinner, and H.H. Dietrichs, Tierphysiol., Tierernähig, and Futtermittelkde. 40, 91-96, 1978.
8. Shimizu, K., K. Sudo, S. Nagasawa and M. ishihara. Mokuzai Gakkaishi. 29(6), 428-437, 1983.
9. Shimizu, K., Mokuzai Gakkaishi, 31(10), 783-792, 1985.
10. Jeong, Cheol, and K.H. Paik, Tappik, 18(1), 14-23, 1986.
11. Paik, K.H., and J.W. Lim, Tappik, 9(2), 16-25, 1987.
12. Mason, W.H., U.S.Pat., 1655618. 1928.
13. Saito, N., Y. Omiya, H. Akutsu and A. Kasai, J.Hokkaido For. Prod. Res. Inst., 410(3), 7-14, 1986.
14. Saito, N., Y.Omiya, H. Endo, and A. Matsumoto, J. Hokkaido For. Prod Res. Inst., 1(3) 18-22, 1987.
15. Endo, H., A. Kasai, M. Moriyama. S. Nakamura and Y. Omiya, J. Kokkaido For. Prod. Res. Inst., 1(6) 27-33, 1987.
16. Tanahashi, M., Wood research and technical notes, 18, 34-65, 1983.
17. Tanahashi, M., and T. Higuchi, Kami Pa Gikyoshi, 39(1), 118-127, 1985.
18. Tanahashi, M., T. Aokiand, and T. Higuchi, Holzforschung, 36, 117, 1982.
19. Lee, J.Y., J.P. Chang, and J.K. Yang. Tappik 22(3), 56-63 1990.
20. Paik, K.H., J.H. kang, S.Y. Lee, and Kim, D.H., Report, Adm. Technol. 17-41, 1989.
21. Nimz, H., Casten, R., Ger. Offen, ED3445132, 1986.
22. Nimz, H., Casten, R., Ger, Offen Ed 3446 237, 1983.
23. Nimz, H., Granzow, C., Berg, A., Holz als Roh-und Werkstoff. 44(9), 362. 1986.
24. Paik, K. H., W.S. Nahm B.J. An, and Moon C.K., Tappik, 21(3), 35-47, 1989.
25. Paik, K.H., W.S. Nahm, and J.M. Jo, Rural Devel. Admi. Agri, Korea, 31, 423-431, 1988.
26. Paik. K.H., B.J. An., and W.S. Nahm, Korean Wood Sci. Techno., 16(4), 71-77, 1986.
27. Schneider, P.J., Wang, P.Y., Chan, Y.U., and Maloszka, R., Biotechnol. Lett. 3, 89, 1981.
28. Jeffries, T.W., Biotechnol. Lett. 3, 213, 1981.
29. Hofer. M., Betz. A., Kotyk, a. Biochim. Biophys. Acta. 184, 155, 1971.
30. Chang, C. a. Knight, S G., Natur. 18, 79, 1963.
31. Suzuki, T. a. Onishi, H, Agric. Biol. chem. 39, 2389, 1975.
32. Hontzu, H., Tomoeda, M. a. Kumakai, H,

- Agri, Biol. Chem. 32, 514, 1968.
33. Scher, B.M. a. Horecker, B.L., Arch. Biochem. Biophys. 98, 124, 1962.
  34. Sugai, J.K. a. veiga, L.A., An Acad. Brasil Cieme., 53, 183, 1981.
  35. Mitsuhashi, S. a. Lampen, J.O., J. Biol. Chem. 204, 1011, 1953.
  36. Wilson, B.C. a. Mortlock, R.P., J. Bacteriol., 113, 1404, 1973.
  37. Gong, C.S., Chem, L.R., Flickinger, M.C. a. Tsao, G.T., Adv. Biochem. Engng. 20, 93, 1981.
  38. Lucas, C., a. Van Uden, N Appl. Microbial. Biotechnol., 23, 491, 1986.
  39. Du preea, J.C., a. Prior, B.A., Biotechnol., 19, 256, 1984.
  40. Sliniger, P.J., Bothast, R.T., Okos, M.R. a. Ladisch. M.R., Biotechnol. Lett., 7,431, 1985.
  41. Du Preez, J.C., Bosch, M. a. Prior, B.A. Enzyme Microb. Technol, 8,360, 1986.
  42. Slininger, P.J., Bolen, P.L. a Kurtzman, C.P. Enzyme Microb. Technol. 9, 5, 1987.
  43. Lee, H., A. Schneider, H. Biotechnol. Lett., 9,581, 1987.
  44. Du Preez, J.C., Boscle, M. a. Prior, B.A., APPI. Microbial. Technol. 23, 228, 1986.
  45. Dellweg, H., Rizzi, M., Methner, H., a. Debus, D. Biotechnol. lett. 6, 395, 1984.
  46. Du Preez J.C., Koch, J.L.F., Monteiro, A.M.T. a. Prior, B.A., FEMS Microbiol. Lett., 28, 271, 1985.
  47. Jeffries, T.W. Biotechnol. Bioeng. Symp., 15, 149, 1985.
  48. Du Preez, J.C., a. Van der Walt, J.P. Biotechnol. Lett., 5,357, 1983.
  49. Du Preez, J.C., Prior, B.A. a. Monterio, A.M.T., Appl. Microbial. Biotechnol. 28, 63, 1988.
  50. Ligthelm, M.E., Prior, B.A. a. Du preez, J.C., Appl. Microbial. Biotechnol. 28, 63, 1988.
  51. Delgenes, J.P., Moletta, R., A. Navarro, J.M., Biotechnol. Lett 8,897, 1986.
  52. Du Preez, J.C., Van Driessel. a. Prior, B.A., Arch. Microbiol, (accepted) 1989.
  53. Wijsman, M.R., Bruinenberg, P.M., Van Dijken, J.P. a. Scheffers, W. A., The European Biotechnology Congress. Poster. Sec. 1984.
  54. Parekh, S.D., parekh, R.S. a. Waymam, M., process Biochemistry, 22, 85, 1987.
  55. Bicho, P.A., Runnals, P.L., Cunningham, J.D., a. Lee, H. Appl. Environ. Microbiol. 54. 50, 1988.
  56. Kurzman. C.P., In proc. 88th Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol., 1988.
  57. Johonmsen, E., Eagle. L., a. Bredenham. G. Curr. Genet., 9,313, 1985.
  58. Rizzi, M., Erlemann, P., Bui-Thank, N.A. a. Dellweg, H., Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 148-154, 1988.
  59. Du preez J.C., bosch, M. a. Prior, B.A., Appl. Microbiol. Biotechnol., 25. 521, 1987.
  60. Ligthelm, M.E., Prior, B.A. a. Du Preez, J.C., Biotechnol. Lett. 207, 10,1988.
  61. Tran, A.U. a. Chambers, R.P., Enzyme. Microb. Technol., 8,439, 1986.
  62. Casey, G.P. a. Ingledew, W.M., Amer. Soc. Brew. chem, J. 43, 75, 1985.
  63. Watson, N.E., Prior, B.A., Lategon, P.M., a. Lussi, H., Enzyme Microb. Technol. 6,451, 1984.
  64. Van zyl, C., Prior, B.A., a. Du Preez, J.C., Appl Biochem. Biotechnol. Symp., Paris, 1988.

65. Weigert, B., Prahl, S., Rizzi, M. a. Dellweg, H., 8th Int. Biotechnol. Symp., Paris, 1988.
66. Phaff, H.J., Miller, M.W., a. Mrak, E.W., The Life of Yeasts. Cambridge press., 142. 1978.
67. Herrero, A.A., Gomez, R.F., Snedecor, B., Tolman, C.J. a. Roberts, M.F., Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 53, 1985.
68. Van zyl, C., Prior, B.A., a. Du Preez, J.C., Enzyme Microb. Technol.,(accepted). 1989.
69. Yu, S., Wayman, M., a. parekh, S.K., Biotechnol. Bioeng., 29, 1144, 1987.
70. Jeffries, T.W. Trends Biotechnol., 3,208, 1985.
71. Preez, J.C., Van Driessel, B., a. prior, B.A., Biotechnol.(submitted). 1989.
72. Chung, I.S., a. Lee, Y.Y., Enzyme Miciob. Biotechnol. 8,503, 1986.
73. Dupreez, J.C., Van Driessel, B., a. Prior, B.A., Biotechnol. Lett. 10,901, 1988.
74. jeffries, P.W., Proc. 4th Europ. Cong. Biotechnol. 3,463, 1987.
75. Van Dijken, J.P., a. Scheffers. W.A., FEMS Microbiol. Kev., 199, 32, 1986.
76. Alexender, N.J., Holzforschung. 40(10), 99, 1986.
77. Briggs, K.A., lancashire, W.E. a. Hartley, B.S., EMBO J., 3,611, 1984.
78. Sathy, A.V., McConaughy. B.L.,k Lobo, Z., Sandotram, J.A., Furlong, C.E., a. Hall, B.D., Appl. Environ. Microbiol., 53, 1996, 1987.
79. Beck, M.J., Biotechnol. Bioeng, Symp., 17, 617, 1986.