

경제적 에탄올 생산을 위한 균주분리 및 특성

한 효 정 · † 김 성 준

전남대학교 공과대학 환경공학과

(접수 : 2006. 2. 28., 게재승인 : 2006. 8. 11.)

Isolation and Characterization of a Strain for Economical Ethanol Production

Hyo-Jung Han and Seong-Jun Kim†

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2006. 2. 28., Accepted : 2006. 8. 11.)

Five strains producing ethanol were isolated from soil near traditional alcohol production factory in Gwangju, Korea. One of the isolated strains maintained relatively stable ethanol production in shaking culture. The isolated strain KJ was proved to be *Saccharomyces italicus*, based on several biochemical and morphological tests containing assimilation of carbon compounds. In investment of the most suitable carbon for ethanol production, ethanol concentration of 5.46 g/L and yield of 0.53 g-ethanol/g-glucose were obtained in condition of glucose 10 g/L in YM medium. Experimental optimal conditions for ethanol fermentation by *S. italicus* KJ were as follows; temperature 30°C, initial pH 5.0, initial concentration 10% of glucose, anaerobic condition in the liquid cultivation. When enzymatically saccharified food wastes (SFW) were used as the production medium, ethanol production yield was 0.57 g-ethanol/g-reducing sugar. Therefore, SFW will contribute to lower the production cost of ethanol for industrial application.

Key Words : Ethanol, *Saccharomyces italicus*, food wastes, saccharification

서 론

급격한 에너지 수요의 증대, 화석연료의 개발 한계성 및 고갈, 화석연료로 인한 자연·생활환경의 파괴 (지구온난화, 오존층감소) 등으로 인해 화석연료를 대체할 수 있는 청정에너지 개발이 급격히 대두되어지고 있으며, 우리나라도 OECD 가입에 따른 환경규약에 따라 2010년까지 에너지원의 5% 이상을 환경 친화적 신에너지원 (태양열, 지열, 풍력, 수소, 에탄올, 메탄 등)으로 대체해야 한다. 이 중에서 에탄올은 열 발생량이 높고 연소생성물면에서나 경제적인 면에서 석유를 대체할 수 있는 연료 중의 하나로 거론되고 있다(1). 에탄올은 연소과정에서 CO₂ 및 CO 발생량이 적고(2), 휘발유에 에탄올을 10% 혼합하여 사용할 경우 휘발유만 사용할 때보다 일산화탄소 배출량이 평균 27% 감소하는 것으로 밝혀져 지속가능한 에너지원으로 평

가되고 있다(3).

에탄올이 석유처럼 다양하게 연료로 사용되기 위해서는 경제성을 갖춘 대량생산기술이 개발되어야 한다. 세계 에탄올 생산량의 70% 이상이 발효에 의해 생산되고 있듯이 에탄올 발효기술은 그만큼 고도화되어 왔다. 현재의 에탄올 생산기술에서 개선되어야 할 중요한 부분은 생산단가를 낮추기 위한 발효배지원 검토라고 사료된다. 현재 화석연료와 함께 에탄올을 수송연료로 부분 사용하고 있는 미주지역 특히 미국과 브라질의 경우, 지역적 특성을 살려 발효원료로써 옥수수, 수수 등 전분질계와 사탕수수, 사탕무우 등 당질계 기질을 주로 사용하고 있다(4). 미국에서는 에탄올의 90% 이상을 전분질계와 당질계의 잉여곡물을 이용한 발효로부터 얻고 있다(5). 세계제일의 사탕수수 생산국인 브라질은 지난 1976~2002년 기간에 에탄올 생산에 의해 국제수지에 무려 500억 달러나 기여하였다.

그러나 미국 및 브라질 같이 넓은 잉여토지와 뜨거운 태양이 있는 곳에서는 이와 같은 에탄올 생산방법이 어느 정도 타당성이 있지만, 우리나라는 잉여농지가 많지 않고 노임이 상대적으로 높기 때문에 이러한 에탄올 생산방법은 경제성과 현실성을 맞추기 어렵다. 그래서 한국 실정에 맞도록 보다 더 저렴하고 대량으로 쉽게 확보할 수 있는

† Corresponding Author : Department of Civil, Earth and Environmental Engineering, College of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

Tel : +82-62-530-1864, Fax : +82-62-530-0864

E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

에탄올 발효원료를 이용한 경제적인 에탄올 발효기술이 요구된다.

2002년 기준으로 우리나라 음식물쓰레기 일일배출량은 11,397톤으로 생활쓰레기 구성 중에서 가장 비중이 크고 대량으로 발생하고 있다. 음식물쓰레기 성장(수분, 부패, 염분, 계절적 편차 등)의 문제점은 다양한 처리 및 처분 기술을 출현시켰으나 현재까지의 모든 기술이 지속가능한 21세기 환경정책에 부응하지 못하고 있고, 많은 2차적인 문제점 때문에 기술적 공황상태에 직면한 상황이다. 현재 사용되고 있는 음식물쓰레기 자원화기술을 보다 고도화시켜 지속가능한 환경기술을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

음식물쓰레기에는 발효산업의 탄소 및 에너지원으로 이용될 수 있는 유기물질(셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 전분, 단백질 등)을 다량 함유하고 있으므로(6), 이들을 적절한 방법으로 가수분해하면 고급 발효 원료(단당류, 아미노산 등)를 다량으로 얻을 수 있다. 그리고 가수분해된 당화액을 생물전환기술을 통해 고급발효시키면 고부가가치의 다양한 친환경 소재 또는 에너지로서 전환 및 회수가 가능하다.

현재 당 연구실은 대체에너지인 에탄올의 발효단가를 낮추기 위해, 한국 상황에서 가장 현실적이고 효율적인 방법으로서, 다양한 유기성폐기물의 혼합체인 음식물쓰레기를 발효배지원으로 사용하는 저비용 대량생산시스템 구축을 최종목표로 하고 있다. 본 연구에서는 음식물쓰레기의 효소당화액을 에탄올발효 배지원으로 유용할 수 있는 균주를 확보하고, 당화액배지에 적용할 수 있도록 배양인자의 특성을 검토하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

음식물쓰레기 효소당화를 위한 효소액 즉 섬유소분해효소 생산을 위한 균주는 당연구실의 Kim 등(7)이 분리한 *Trichoderma harzianum* FJ1을 이용하였다. 생산배양은 Kim 등이 보고한 바와 같이 YMEA 배지(yeast extract 0.4 wt %, malt extract 1 wt %, glucose 0.4 wt %)에서 3일 배양 후, Mendel's medium(7)의 탄소원 대신 벧짚 1 wt %와 페박스 1 wt %를 포함한 변형된 Mendel's medium 배지에서 4일 배양하여 효소액을 생산하였다.

에탄올생산을 위해서는 주정공장 근처 토양으로부터 분리하여 동정한 *Saccharomyces italicus* KJ를 사용하였다. 또한 배양특성 및 생화학적 특성의 비교실험을 위해서 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11304을 대조균주로 사용하였다. *S. italicus* KJ의 에탄올 생산 배양은 YM 배지(yeast extract 0.3 wt %, malt extract 0.3 wt %, peptone 0.5 wt %, glucose 1 wt %)를 이용하였고, 배양조건은 1.5일, 100 rpm, 30°C에서 혐기적으로 배양하였다.

에탄올 생산균주의 분리 및 동정

에탄올 생산균주의 분리는 주정공장 근처 토양을 사용

하였으며, 콜로니 분리 및 에탄올 생산능 조사를 위한 배지는 상기의 YM 배지에서 탄소원 1 wt %, 질소원 0.078 wt %로 사용하였다.

분리된 균주(KJ)의 동정은 Yeasts: characteristics and identification(9)에 의거한 생화학적 특성조사와 SEM 촬영을 통해 결정하였다. 생화학적 특성조사에 사용된 탄소원으로 glucose, starch, D-mannitol, lactose, xylose, maltose, cellobiose, fructose, galactose, saccharose, sorbitol, melezitose, raffinose, melibiose를 조사하였으며, 질소원으로는 KNO₃를 조사하였다.

균의 형태를 관찰하기 위하여 SEM을 이용하였다. 분리된 균주를 100 mL vial에 YM 배지 20 mL 넣고 분리균주를 1% (v/v) 접종하여 30°C, 2일 동안 교반배양하여 얻은 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 다음 멸균수로 수세한 후 Arain medium solution에 녹여 30분 동안 진공 건조하여 1~2 시간동안 -20°C에서 보관한다. 이를 cacodylate buffer로 15분 간격으로 2~3회 수세한 후 에탄올 농도를 50, 75, 90, 95, 100% (v/v) 순으로 20~30분 정도 각각 균체를 담구어 4°C에서 점차적으로 탈수시킨 후 고정액(pH 7.2 cacodylate buffer에 2% glutaraldehyde와 2% paraformaldehyde를 혼합)으로 처리하여 충분히 건조시킨 시료를 gold coating하여 SEM으로 관찰하였다.

에탄올 생산배양에 대한 탄소원의 영향

분리균주 KJ의 에탄올 생산에 대한 탄소원의 영향을 검토하기 위해, YM 배지에 단당류(glucose, maltose, fructose, xylose), 이당류(cellobiose, galactose, lactose), 다당류(raffinose, starch, saccharose), 기타 당류(succinate, mannitol, citrate, inositol, non carbon)를 사용하여 조사하였다. 각 배지 10 mL를 test tube에 넣고 121°C, 15분간 멸균처리한 후 전 배양액을 1% (v/v)씩 접종하여 30°C, 100 rpm, 1.5일간 혐기적으로 배양하였다. 배양이 끝난 후 환원당, 에탄올, 균체량을 측정하였다.

음식물쓰레기 당화

본 실험에 사용된 전남대학교 제1학생회관에서 수집한 음식물쓰레기(FW)의 조성은 함수율 82%, TOC(Total organic carbon) 43%이고 원소분석치는 C 44%, N 2.4%이었다. FW의 당화반응은 Kim 등이 제시한 방법(8)에 따라서 *T. harzianum* FJ1의 5일 배양 상등액(효소액)으로 분쇄된 음식물쓰레기를 200 rpm, 50°C, 1일간 가수분해하였다. 당화액의 원심분리 상등액을 당화액배지(SFW 배지)로 에탄올 생산 배지원으로 사용하였다. 당화반응에 사용된 효소 농도는 FPase 0.18 U/mL, Amylase 2.2 U/mL였다.

환원당 및 균체량, ethanol 분석

일정량의 배양액을 채취하여 12000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하여 환원당과 에탄올 분석에 사용하였다. 환원당은 DNS법(10)으로 측정하였다.

균체량은 spectrophotometer를 사용하여 흡광도(660 nm)를 측정하고 일정량을 분취하여 원심 수세한 후 건조중량을 계량하였다.

에탄올 정량은 Gas Chromatography (column : HP-FFAP Capillary; 50 m/0.32 mm/0.5 μm)을 사용하였다. 불꽃이온화 검출기 (FID)를 사용하고, carrier gas는 He (초고순도 33.335%), 검출기 보조가스는 H₂, air를 사용하였다. GC의 oven, injector, detector 온도는 각각 80℃, 200℃, 200℃이며, He, air, H₂의 flow는 각각 2 mL/min, 350 mL/min, 35 mL/min로 하였다.

산소, 온도, 초기 당과 pH, 에탄올의 영향

배양의 기본조건인 30℃, 100 rpm, 초기 pH 5.0, 혐기에서 온도의 영향을 살펴보기 위해 25, 30, 35, 40℃로 변화시켰고(10, 11), 내당성은 glucose를 5, 10, 15, 20, 25%로 바꾸어 검토하였다. 초기 pH는 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조건을 바꾸었으며, 에탄올의 내성은 4.8, 9.13, 13.22%의 에탄올을 첨가하여 검토하였다. 산소의 영향은 호기와 혐기로 수행하였으며 호기조건은 100 mL vial에 통기성의 실리콘 마개를 사용하였고, 혐기조건은 vial 병의 공기를 질소로 치환한 후 고무마개로 닫아 주었다.

결과 및 고찰

균주 KJ의 분리 및 동정

YM 고체배지에서 에탄올을 생산하는 8종의 균이 분리되었다. 그 중에서 에탄올 전환 수율이 0.53 g-ethanol/g-glucose으로 가장 높은 발효균을 선택하였다. 분리균주의 SEM 관찰은 Fig. 1에 보이는 바와 같이 전형적인 효모균주의 형태를 보이고 있다. 이 균의 동정을 위해 Yeasts: Characteristics and Identification(9)에 의거해 생화학적 특성을 조사한 결과 탄소원 glucose, maltose, fructose, galactose, raffinose에서 균체 성장이 양호하였고 starch, D-mannitol, lactose, xylose, cellobiose, sorbitol, melezitose, melibiose에서는 성장하지 못하였다(Table 1). 그리고 KNO₃를 질소원으로 사용하지 못했다. 그 결과 분리균주 KJ는 *Saccharomyces italicus*로 판명되었다.

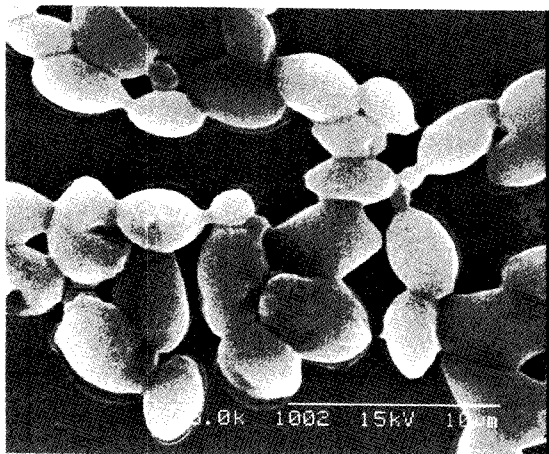


Figure 1. Morphology of an isolated strain KJ observed by SEM.

에탄올 생산배양에서 탄소원의 영향

YM 배지에서 탄소원을 조사한 결과 에탄올 5 g/L 이상 생산하는 탄소원은 단당류인 glucose, maltose, 이당류인 fructose와 다당류인 saccharose로 조사되었다. 얻어진 에탄올 농도는 glucose 5.68 g/L, maltose 6.21 g/L, fructose 5.22 g/L, saccharose 4.49 g/L이고, glucose보다 에탄올이 높게 생성된 탄소원은 maltose이었다(Fig. 2). Schaefer and Cooney의 연구(13)에 의하면 *Saccharomyces italicus*가 maltase를 생산하기 때문에 maltose를 잘 이용한다고 보고하고 있다. *Saccharomyces italicus* KJ에서도 maltase가 분비되어 균체 성장과 에탄올 생산을 촉진시킨 것으로 사료된다. 다행히, 음식물쓰레기 당류 중에는 대부분을 전분이 차지하고 있고, 전분은 효소가수분해과정에서 maltase를 생산하기 때문에 KJ균주의 β-amylase 생성여부와 관계없이 본 연구에서 배지원으로 지향하는 음식물쓰레기 당화액이 에탄올 생산 배지원으로 유용될 수 있으리라 시사된다.

Table 1. Effect of carbon and nitrogen sources on growth of strain KJ

carbon source	
glucose	+
starch	-
D-mannitol	-
lactose	-
xylose	-
maltose	+
cellobiose	-
fructose	+
galactose	+
saccharose	+
sorbitol	-
melezitose	-
raffinose	+
melibiose	-
nitrogen source	
KNO ₃	-

(+ : strong, - : absent)

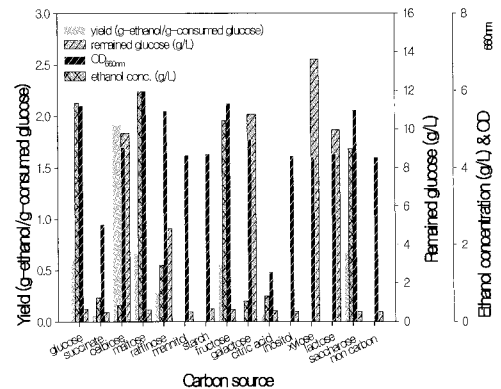


Figure 2. Effect of carbon source on medium for ethanol production.

성장곡선과 에탄올 농도 monitor

기본배지인 YM배지를 사용하여 시간별로 균체농도, 에탄올 농도와 당소비량을 구하였다(Fig. 3). 에탄올 생산은

균체의 성장과 동시에 진행되는 성장관련산물의 전형적인 형태를 보여주고 있다. 대수증식기 이후인 정지기에도 에탄올 생산이 완만하게 진행되고 있는 것은 은밀성장에 의한 에탄올생산이라고 사료된다. 배양 72 시간에 도달했을 때 에탄올 농도는 5.4 g/L이고, 잔류환원당 농도는 13 g/L로서 환원당의 87%가 소비되었다. 그리고 증식속도는 23 시간째 52.4 CFU/L · hr로 가장 높게 나타났으므로 전배양 시간은 가장 활발한 대수성장기인 23시간으로 결정하였다.

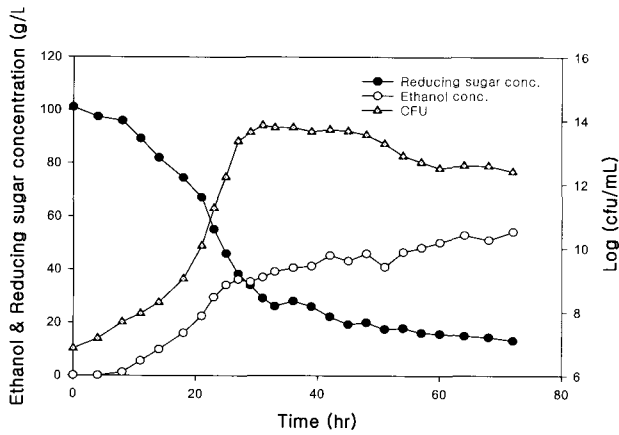


Figure 3. Changes of growth, reducing sugar (RS) and ethanol concentrations in liquid culture of KJ with SFW medium.

산소의 영향

KJ균주의 에탄올 생산에 대한 산소의 영향을 검토한 결과, Fig. 4에 보여주는 바와 같이 혐기성 배양은 5.31 g/L의 에탄올이 얻어졌고, 호기성 배양에서는 3.09 g/L의 에탄올 농도를 보였다. 균체성장 면에서는 호기성 배양에서 660 nm에서 OD 값이 8.86으로 혐기성 배양에서의 5.50보다 높게 얻어졌다. 한편 잔류환원당은 혐기성 배양과 호기성 배양 모두에서 거의 소진한 상태이었다. 호기성배양에서는 탄소원을 균체의 성장에 주로 이용하고 있음이 확인되었고, 혐기배양에서는 에탄올로 전환된 탄소원이 상대적으로 많음이 확인되었다. *S. cerevisiae* 에서 산소는 단지 지방산이나 sterol 합성에 요구되는 것이 아니며, 호기성 조건에서 통기의 증가에 의하여 세포 성장은 증가하지만, 에탄올 수율과 생성량은 감소한다고 알려져 있다(14).

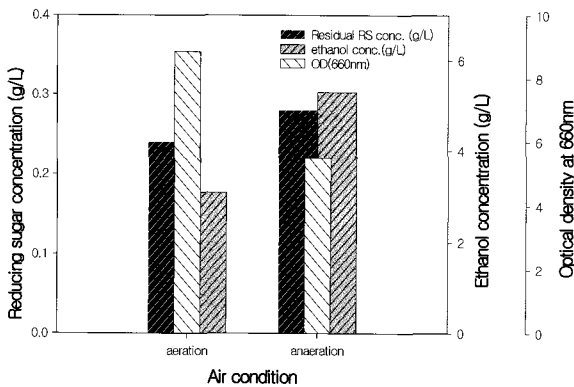


Figure 4. Effect of oxygen (aeration and anaeration) in ethanol production cultivation of KJ.

온도의 영향

에탄올 생산배양에 대한 온도조건을 검토한 결과, 30℃에서 0.5 g-ethanol/g-glucose의 수율을 나타내었으나 40℃에서는 0.2 g-ethanol/g-glucose으로 나타났다(Fig. 5). KJ균주도 일반적 에탄올발효 효모균주와 비슷하게 30℃ 근방에서 최적으로 밝혀졌다. 내열성이 약한 균주의 경우 온도가 증가함에 따라 autolysis는 더욱 잘 일어난다는 보고가 있다 (15). 본 균주의 경우도 40℃에서 탄소원의 전환수율이 높은 반면 에탄올의 농도가 아주 낮은 점으로 미루어 보아 균체속도가 아주 낮거나 고온에서 autolysis가 활발하게 일어났기 때문이라고 사료된다.

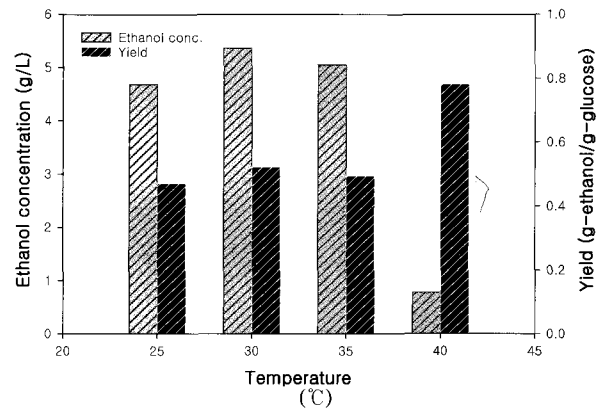


Figure 5. Effect of temperature in ethanol production cultivation of KJ.

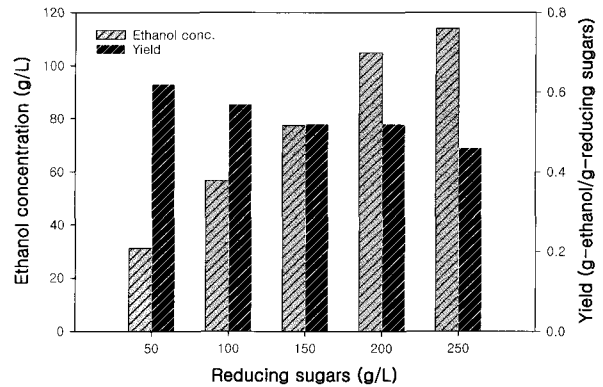


Figure 6. Effect of reducing sugars concentration in ethanol production cultivation of KJ.

초기 당농도의 영향

에탄올 생산배양에서 초기 당 농도에 의한 저해 영향을 검토한 결과, Fig. 6에 보이는 바와 같이 배양액 내 glucose가 250 g/L (25%)에서 가장 높은 에탄올 농도 113.9 g/L를 보였으며 수율에서는 가장 낮은 0.46 g-ethanol/g-glucose를 보였다. 상대적으로 낮은 초기 당농도인 glucose 50 g/L (5%)에서 가장 높은 수율 0.62 g-ethanol/g-glucose를 보였고, glucose 100 g/L (10%)에서는 에탄올 농도 56.8g/L이며 수율은 0.55 g-ethanol/g-glucose를 보였다. 음식물쓰레기 당화공정에서 생산되는 당화액 (SFW)은 환원당이 평균 100 g/L이고 glucose는 78 g/L (환원당 내 glucose함량 80%)가 포함되어 있고, glucose 100 g/L의 초기 당농도에서 저해현상이 발견되지 않았으므로 SFW 배지에서 에탄올 발효는 100 g/L에서 수행하였다.

에탄올에 대한 내성 조사

KJ의 에탄올 생산배양에서 에탄올에 대한 내성정도를 검토하였다. Fig. 7에 그 결과를 보이고 있다. 4.8%의 에탄올을 첨가한 경우, 수율 0.363 g-ethanol/g-glucose와 에탄올 농도 3.6 g/L를 보였으나 9.13, 13.22%의 에탄올 첨가한 배지에서는 에탄올 생산 뿐만 아니라 균체 성장과 당의 소모가 전혀 나타나지 않았다. 이는 균주 KJ가 에탄올 5%까지는 에탄올의 영향이 크게 나타나지 않았으나 그 이상이 되면 저해를 받아 에탄올을 생산하지 않는 것으로 사료된다.

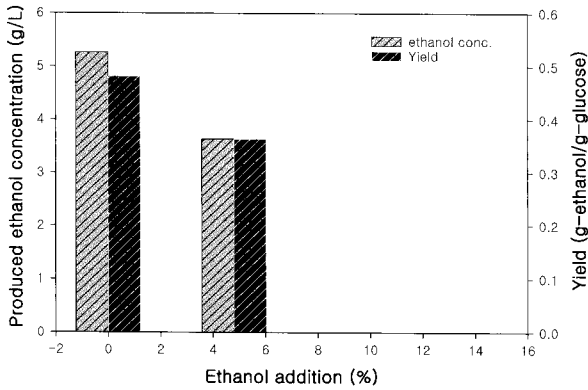


Figure 7. Effect of ethanol addition in ethanol production cultivation of KJ.

초기 pH의 영향

에탄올 발효배양에서 초기 pH의 영향은 pH 5.0을 기준으로 하여 3.0~7.0으로 변화시켜 조사하였다. Fig. 8에서 보여지는 것처럼, 초기 pH 4.0~7.0에서는 ±0.2 g/L의 에탄올 농도로 큰 차이를 보이지 않았으나 초기 pH 3.0에서는 균체의 성장률도 타 조건에 비해 절반 수준이었고 에탄올 농도도 4.4 g/L로 다소 낮게 얻어졌다. 그러나 pH 3에서 균체의 농도에 비하면 에탄올 농도가 상대적으로 높아, 낮은 pH 조건에서는 탄소원이 균체의 성장보다는 에탄올로의 전환율이 높게 나타났다. 음식물쓰레기 당화반응후의 무조정 SFW 배지의 초기 pH는 4.0보다 낮으므로 초기 pH를 5 정도로 조정하고 발효배양을 수행하여야 하는 것으로 사료된다.

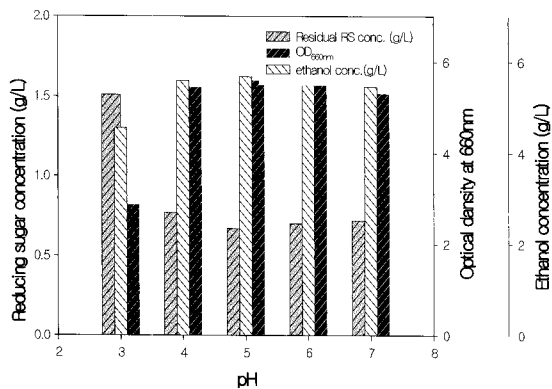


Figure 8. Effect of initial pH in ethanol production cultivation of KJ.

YM 배지와 SFW 배지의 에탄올생산성 비교

일반적인 에탄올 생산복합배지인 YM 배지와 음식물쓰레기 당화액 (SFW)을 균주 KJ의 발효배지원으로 사용하여 에탄올생산성을 검토하였다. 초기 탄소원이 동일한 조건에서 YM배지 (glucose 10 g/L)와 SFW배지 (RS 10 g/L)에서 에탄올 생산은 각각 5.34, 5.68 g/L로 나타나, KJ균주는 음식물쓰레기 당화액을 에탄올발효배지로 적절하게 사용될 수 있음이 확인되었다(Fig. 9). 에탄올배양에 SFW배지의 사용은 경제적인 면에서 상당한 우위를 확보하게 되고, 향후 음식물쓰레기의 신 고부가 자원화기술로 거듭날 수 있게 될 것이다.

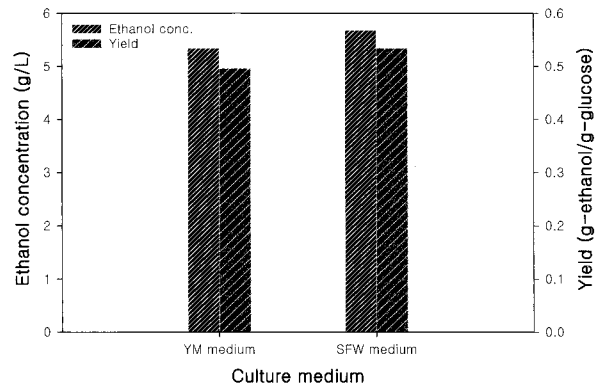


Figure 9. Comparison of YM and SFW media for ethanol production.

요 약

주정공장 근처 토양에서 분리한 에탄올 발효균주 KJ는 *Saccharomyces italicus*로 판명되었으며, glucose가 최적의 탄소원으로 확인되었다. 균주 KJ의 최적배양조건은 온도 30℃, 초기 당 농도 10%, 초기 pH 5 균방, 혐기조건으로 판명되었다. 초기 탄소원이 동일한 조건에서 YM배지 (glucose 10 g/L)와 SFW배지 (RS 10 g/L)에서 에탄올 생산은 각각 5.34, 5.68 g/L로 나타나, KJ균주는 음식물쓰레기 당화액을 에탄올 발효배지로 적절하게 사용될 수 있음이 확인되었다. 에탄올 생산배양에 SFW의 이용은 에탄올생산단가를 대폭 낮추게 하여 대체에너지인 에탄올의 대량생산기술의 경제성을 확보하는데 크게 기여할 것이다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Brandt, D., In S, S, sofer, and O. R. Zaborski (ed.) (1981), Ethanol production by fermentation, Biomass conversion process for energy and fuel, Plenum Press, New York, 357-373.

2. 김재윤, 임태윤 (2003), 수소에너지 혁명을 주도하는 연료전지, CEO information 432호, 1-24.
3. 조강래, 김종춘, 엄명도, 박용희, 김수연, 홍유덕, 김선문, 한상묵 (1994), 알콜 혼합연료 사용 휘발유 자동차의 배출가스 및 에너지소비효율에 관한 연구, 국립환경연구원 자동차공해연구소
4. Lee, Y. S., W. G. Lee, B. G. Park, Y. K. Chang, and H. N. Chang (1995), Ethanol production from tapioca hydrolysate by batch and continuous cell retention cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 598-603.
5. Song, B. L. (1994), Modelling of cellulose simultaneous saccharification and fermentation process and application to ethanol production, Seoul National University.
6. Hong, J. H. and J. D. Chung (2005), Effect of broth on purple photosynthetic bacteria on garbage, *J. Korea Society of Waste Management* **22**, 113-119.
7. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, and S. J. Kim (2003), Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 1-8.
8. Kim, K. C., S. W. Kim, M. J. Kim, and S. J. Kim (2005), Saccharification of foodwastes using cellulolytic and amylolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* FJ1 and its kinetics, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 52-59.
9. Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow (1983), Yeasts: Characteristics and identification, p644-647, Cambridge University Press, New York.
10. Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1998), Methods for measuring cellulase activities, *Method Enzymol.*, **160**, 87-112.
11. Ryu, B. H., K. D. Nam, H. S. Kim, Y. A. Ji, and S. J. Jung (1988), Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 265-269.
12. Sree, N. K., M. Sridhar, L. V. Rao, and A. Pandey (1999), Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast, *Process Biochem.* **34**, 115-119.
13. Schaefer, E. J. and C. L. Cooney (1982), Production of maltase by wild-type and a constitutive mutant of *Saccharomyces italicus*, *Appl. and Environ. Microbiol.* **43**, 75-80.
14. Ligthem, M. E., B. A. Prior, and J. C. Du Preez (1988), The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 63-68.
15. Yamamura, M., K. Takes, and T. Kanihare (1991), *Saccharomyces* yeast cells gram at elevated temperatures are susceptible to autolysis, *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2861-2864.