

## 볏짚의 Nafion 가수분해물에 대한 *Pichia stipitis* CBS 5776의 에탄올 발효

정인식\* · 전재근<sup>1</sup>

경희대학교 유전공학과, <sup>1</sup>서울대학교 식품공학과

**초록 :** *Pichia stipitis* CBS 5776을 이용하여 볏짚 가수분해물의 fermentability를 조사하고 가수분해시 고체 강력산인 Nafion과 재래식 황산에 의한 가수분해물을 비교 검토하였다. 볏짚의 Nafion 가수분해물은 산 가수분해물보다 세포 증식 및 발효에 대한 저해 수준이 낮았으며 3.2 g/l 이상의 *Pichia stipitis* inoculum을 사용하면 Nafion 가수분해물의 발효에서 에탄올 생산이 가능하였다(1994년 7월 25일 접수, 1994년 9월 26일 수리).

### 서 론

바이오매스는 임산 및 농산자원으로 많이 분포되어 있으며 대부분의 바이오 매스는 cellulose, hemicellulose, lignin 그리고 기타 extractive 등으로 구성되어 있다.<sup>1,2)</sup> 이와 같은 재생 가능한 바이오매스로부터의 에탄올 생산은 많은 관심을 갖게 한다. 따라서 바이오매스를 발효가 가능한 당으로 전환시키기 위해서 가수분해 과정이 필요하며 촉매로써 산 또는 효소를 사용한다.<sup>3-8)</sup> 그러나 바이오매스의 가수분해 및 가수분해물로부터의 에탄올 생산에는 해결해야 할 많은 문제점이 있다.

효소 가수분해 공정은 효소 가격 때문에 공정의 경제성이 낮을 수 있다.<sup>6)</sup> 그리고 산 가수분해는 값싼 촉매를 사용하지만 산에 의한 기기의 부식, 당의 분해 또는 원하지 않는 물질로의 변화 등의 단점을 가지고 있다.<sup>8)</sup> 최근에 황산보다 더 좋은 양성자 공여체인 강력산(supercid)의 사용에 많은 관심을 갖게 되었고 hydrogen fluoride에 의한 나무의 당화 실험을 통해 황산보다 더 좋은 촉매 활성을 가지고 있음을 발견하였다.<sup>9,10)</sup> 이와 같은 관점에서 고체 강력산의 하나인 Nafion은 효소처럼 좋은 selectivity를 보여주며 부식성이 적은 조건에서 반응이 되고 고체상태이므로 촉매의 재이용이 가능하여 재래식 황산에 의한 가수분해공정의 단점을 보완한 바이오매스 가수분해의 새로운 공정이 될 수 있다.<sup>10,11)</sup>

본 연구에서는 농산 자원인 볏짚을 고체 강력산인 Nafion에 의해 가수분해시키고 *Pichia stipitis* CBS 5776을 사용하여 가수분해물의 에탄올 발효실험을 수행하였

다. 아울러 고체 강력산인 Nafion에 의한 가수분해물의 fermentability를 재래식 산에 의한 가수분해물과 비교 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료

볏짚(아기바레 품종)은 경희대 부속농장에서 얻었고 가수분해하기에 적합한 크기로 절단하여 사용하였으며 시료 볏짚의 크기는 1~2 mm의 범위에 속하였다.

#### 볏짚의 prehydrolysis

첫번째 단계에서 볏짚은 촉매의 사용없이 steam으로 처리함으로써 prehydrolysis 반응을 진행하였다(autohydrolysis). Prehydrolysis 반응은 볏짚과 증류수의 비율을 1:4로 하여 진행되었다. 그리고 반응 후 oligomer를 포함하고 있는 hemicellulose는 여과하여 분리되었다.

#### Hemicellulose의 hydrolysis

##### 1) 황산 가수분해

Prehydrolysis에서 얻어진 oligomer를 monomer로 전환시키기 위하여 황산으로 pH를 1.0으로 조정하고 120 °C에서 60분간 반응을 시켰다.<sup>12,13)</sup>

##### 2) Nafion산 가수분해

Prehydrolysis에서 얻어진 가수분해물 중의 oligomer를 monomer로 전환시키기 위하여 고체 강력산인 Nafion(perfluorinated sulfonic acid; 40~60 mesh, Dupont/So-

Key words : Nafion, Fermentability, *Pichia stipitis*

\*Corresponding author : I.-S. Chung

lution Technology, Mendenhall, PA)을 촉매로 사용하였다. 가수분해 반응은 100 ml 당 15 g Nafion을 사용하여 100°C 에서 한시간 동안 진행하였다. Nafion 촉매는 사용 후 70°C 에서 HNO<sub>3</sub>를 사용하여 regeneration 시켜서 다시 사용하였다.<sup>12,13)</sup>

### 균주 및 발효 실험

균주는 *Pichia stipitis* CBS 5776을 사용하였으며 stock culture 는 20 g/l xylose, 6.7 g/l yeast nitrogen base 및 15 g/l agar를 함유한 slant에 보관되었다. Stock culture로부터 test tube 및 shake flask로 접종한 후 inoculum으로 이용하였으며 산과 Nafion 가수분해물의 비교 실험에 준비된 inoculum을 균등하게 사용하였다. 그리고 명시된 경우를 제외하고는 산 또는 Nafion 가수분해물 1당 6.7 g의 yeast nitrogen base를 첨가한 후 shaking incubator(비전과학)를 사용하여 발효실험을 수행하였다. 발효시 교반속도는 200 rpm이었으며 초기 pH는 5.5로 조정하였고 온도는 32°C 로 유지하였다.

### 분석방법

세포농도는 dry cell weight(DCW)로 측정하였다. 당 농도는 Tosoh의 HPLC를 이용하여 분석하였다.

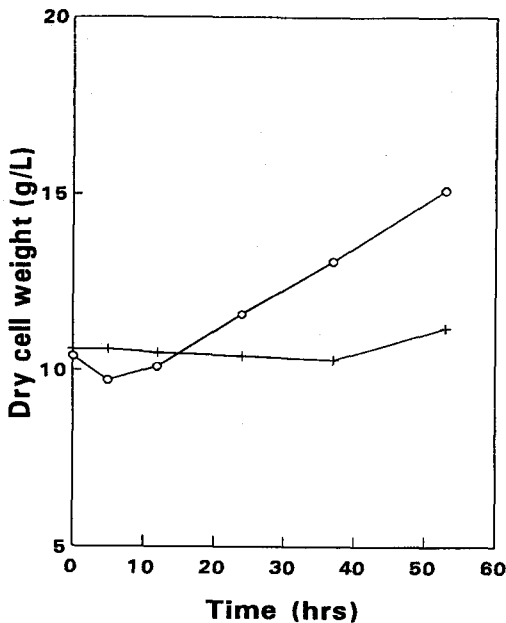


Fig. 1. Cell growth in sulfuric acid and Nafion hydrolyzates. Initial DCW: 10.5 g/l.

○, Nafion hydrolyzate; +, sulfuric acid hydrolyzate.

Column은 Merck의 LiChrosorb NH<sub>2</sub>를 사용하였으며 유출액은 acetonitrile/water(80 : 20)이었다. 그리고 에탄올 농도의 분석을 위해서 Vega의 Gas chromatograph 및 Chromosorb 101 column을 사용하였다.

### 결과 및 고찰

넷짚 가수분해물의 fermentability를 조사하기 위해 *P. stipitis*에 의한 산 또는 Nafion 가수분해물의 발효 실험을 수행하였다. 최적조건에서 반응된 산 가수분해물과 Nafion 가수분해물이 비교되었는데 두 가지 공정상에서 생기는 xylose의 양이 약간 다르게 나타났으므로 산 가수분해물의 당 농도를 희석시켜 Nafion 가수분해물의 함유 당 농도와 같게 하여 실험을 수행하였다.

Fig. 1은 산과 Nafion 가수분해물에서의 세포증식을 나타내고 있다. 그림에서 알 수 있듯이 Nafion 가수분해물의 경우 세포증식이 더 좋게 나타났다. Fig. 2는 시간 경과에 따른 당 소모 및 에탄올 생산량을 나타내는데 Nafion 가수분해물의 경우 당 소모율이 조금 더 좋게 나타났다. 이때 에탄올 생산량은 감소하였는데 이것은 많은 양의 기질이 에탄올 생산보다 세포증식으로 전환

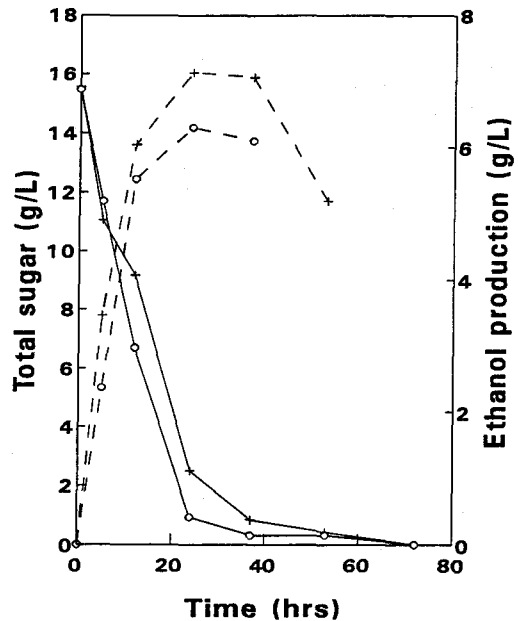


Fig. 2. Time course changes of sugar consumption and ethanol production in sulfuric acid and Nafion hydrolyzates. Initial DCW: 10.5 g/l.

—, Total sugar; ----, Ethanol.

○, Nafion hydrolyzate; +, sulfuric acid hydrolyzate.

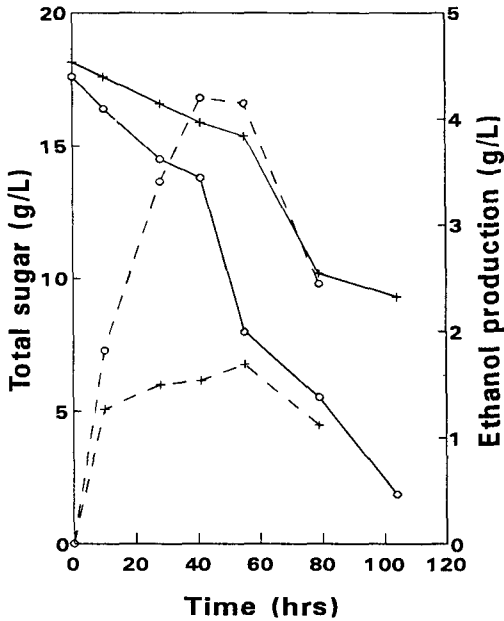


Fig. 3. Time course changes of sugar consumption and ethanol production in sulfuric acid and Nafion hydrolyzates. Initial DCW: 5 g/l. —, Total sugar; ----, Ethanol. ○, Nafion hydrolyzate; +, sulfuric acid hydrolyzate.

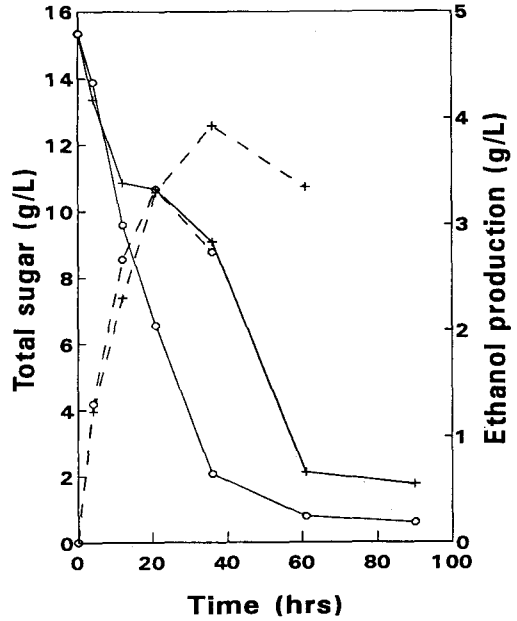


Fig. 4. Time course changes of sugar consumption and ethanol production in sulfuric acid and Nafion hydrolyzates. Initial DCW: 10 g/l. —, Total sugar; ----, Ethanol. ○, Nafion hydrolyzate; +, sulfuric acid hydrolyzate.

되기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 이러한 점은 실제적인 발효에서 세포증식이 발효 조건에 따라 조절될 수 있으므로 문제가 되지 않는다. 일반적으로 산 또는 고체 강력산 Nafion 가수분해물의 fermentability를 비교하는 데에는 세포의 생존과 증식이 더 중요한 기준이므로 Nafion에 의한 가수분해가 벚짚 hemicellulose를 발효 가능한 당으로 전환시키는 공정에 이용될 수 있는 새로운 효율적인 방법으로 사료된다.

벚짚의 Nafion 가수분해물에서 좋은 세포 증식을 보여 주었지만 에탄올 수율은 높지 못하였다. 따라서 기질이 세포증식으로 전환되는 것을 감소시켜 에탄올 생산을 향상시키기 위하여 질소 성분인 yeast nitrogen base를 첨가하지 않고 발효 실험을 수행하였다. Fig. 3에 나타나 있듯이 5 g/l의 초기 *P. stipitis* 세포농도를 사용한 경우 질소원이 첨가되지 않은 산 가수분해물의 발효에서 80 시간 후의 당 소모 속도는 급격히 감소하여 발효 저해인자에 의해 크게 영향받음을 알 수 있었다. 그러나 Nafion 가수분해물 발효에서 당의 소모 및 에탄올 생산 속도는 산 가수분해물에 비해 현저히 증가하였다.

발효 저해인자가 많이 함유되어 있는 나무의 산 가수분해물에서 제한된 질소원의 존재하에서 높은 농도의

yeast inoculum을 사용하여 성공적으로 발효실험을 행한 보고가 있다.<sup>14,15</sup> 그래서 벚짚의 산 및 Nafion 가수분해물을 yeast nitrogen base를 첨가하지 않고 높은 농도인 10 g/l의 *P. stipitis*를 사용하여 발효실험을 수행한 후 그 효과를 조사하였다. Fig. 4에서 보여 주듯이 질소원이 첨가된 경우(Fig. 2)와 비교하여 당 소모 속도는 저하되었고 80시간이 되어도 당이 완전히 소모되지 않았다. 그러나 Nafion 가수분해물의 경우 yeast nitrogen base가 첨가된 경우처럼 당 소모율이 약간 좋게 나타났으며 각각의 가수분해물에서 에탄올 생산을 확인할 수 있었다. 이것은 inoculum의 농도가 낮으면 산 가수분해물의 경우 가수분해물에 포함된 저해인자 때문에 발효가 제대로 진행되지 않았지만 inoculum의 농도를 높여 10 g/l를 사용했을 때 나무의 산 가수분해물의 발효에 대한 보고<sup>14,15</sup>와 같이 가수분해물의 저해인자에 의한 발효저해를 극복하여 두 가지의 다른 가수분해물의 발효에서 비슷한 양상으로 당을 소모하고 에탄올을 생산하는 것으로 해석된다.

Inoculum 농도가 발효와 중요한 관계를 가지고 있는 것으로 판단되므로 Nafion 가수분해물의 발효 경우에도 critical inoculum 농도가 존재하는 지를 조사하였다. *P.*

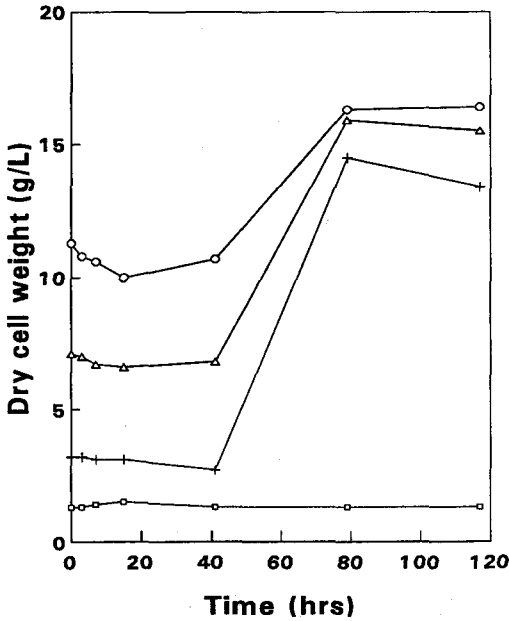


Fig. 5. Effect of inoculum level on cell growth in Nafion hydrolyzate fermentation.  
DCW level: □, 1.3 g/l; +, 3.2 g/l; △, 7.1 g/l; ○, 11.4 g/l.

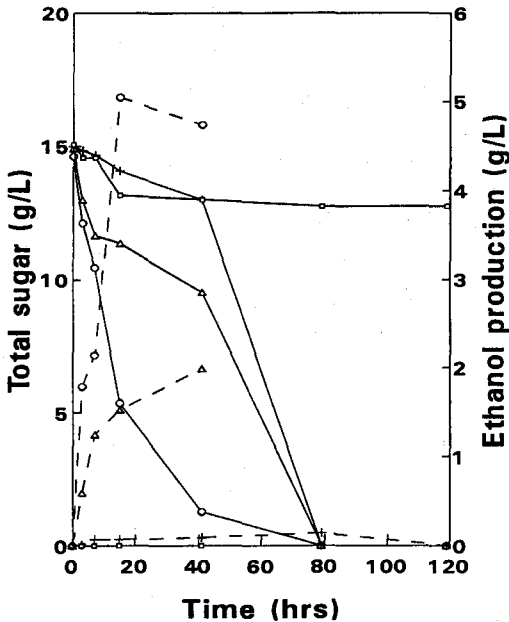


Fig. 6. Effect of inoculum level on sugar consumption and ethanol production in Nafion hydrolyzate fermentation.  
—, Total sugar; ----, Ethanol.  
DCW level: □, 1.3 g/l; +, 3.2 g/l; △, 7.1 g/l; ○, 11.4 g/l.

*stipitis* inoculum 농도를 변화시키면서 실험을 수행하였는데 Fig. 5와 6에서 보여주듯이 inoculum 농도가 높을수록 세포 성장 및 에탄올 생산이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그리고 1.3 g/l의 농도에서는 세포 성장이 거의 없고 inoculum 농도가 3.2 g/l이 되어야 세포 성장이 진행되었다. 이러한 결과로 산 가수분해물보다 발효 저해인자는 적지만 Nafion 가수분해물에도 저해인자가 존재하므로 벗질의 Nafion 가수분해물의 에탄올 발효를 가능케 하려면 3.2 g/l 이상의 *P. stipitis* inoculum을 사용해야 한다는 것을 알 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 상공자원부 에너지 관리공단 및 농업생물신소재 연구센터의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Katzen, R. and O. F. Otherner (1942) Wood hydrolysis, *Ind. and Eng. Chem.*, 34-314
2. Leonard, R. H. and G. J. Hajny (1945) Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol, *Ind. Eng. Chem.*, 37-390
3. Saeman, J. F. (1945) Kinetics of wood saccharification, *Ind. and Eng. Chem.*, 37-43
4. Dorland, R. M. (1944) The hydrolysis of Lignocellulose, *Chem. and Eng. News*, 22-1352
5. Lee, Y. Y., C. M. Lin, T. Johnson and R. P. Chambers (1979) Selective hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids, *Biotech. Bioeng. Symp.*, 8-75
6. Fan, L. T., M. M. Gharpuray and Y. H. Lee, Eds., (1987) Cellulose Hydrolysis, Springer-Verlag, N. Y.
7. Dekker, R. F. H. and A. F. E. Wallis (1983) Enzymatic saccharification of sugarcane bagasse pretreated by autohydrolysis-steam explosion, *Biotech. Bioeng.*, 25-3027
8. Song, S. K. (1983) Process and kinetic investigation on acid catalyzed cellulose hydrolysis, Ph. D. Thesis, Auburn University
9. Brot, W., C. G. (1984) Processing Inc., Rockland, Delaware, Personal communication
10. Kim, S. B. (1986) Kinetic and process investigation on hydrolysis of biomass derived substrates by free and solid acids, Ph. D. Thesis, Auburn University
11. Kim, S. B., I. S. Chung, V. G. Balagopal and Y.

- Y. Lee (1985) Hydrolysis of hemicellulose by solid superacid, Seventh Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatinsburg, TN
12. 정인식 (1992) 고체 강력산에 의한 바이오매스의 전처리 및 바이오 에너지 생산공정의 개발, 상공자 원부 보고서
  13. I. S. Chung, B. H. Chung, C. H. Kim, H. R. Kim, J. K. Chun and Y. Y. Lee (1991) On fermentability of Nafion catalyzed hemicellulose hydrolyzate, Thirteenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, Colorado Springs, CO.
  14. Chung, I. S. and Y. Y. Lee (1985) Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high level yeast inocula, *Biotech. Bioeng.*, 27-308
  15. Chung, I. S. and T. R. Hahn (1987) Ethanol fermentation of hemicellulose hydrolyzate using high-level inocula of a *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460, *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, 30(4)-311

---

**Ethanol Fermentation of Nafion-Catalyzed Hydrolyzates of Rice Straw by *Pichia stipitis* CBS 5776**

In-Sik Chung\* and Jae-Kun Chun<sup>1</sup> (Department of Genetic Eng., Kyung Hee University, <sup>1</sup>Department of Food Technology, Seoul National University, Suwon, Korea)

**Abstract :** Use of a solid superacid (Nafion) in hydrolysis of rice straw was investigated focusing on the fermentability of the hydrolyzates by *Pichia stipitis* CBS 5776. Comparisons were made with the hydrolyzates produced by a conventional method of sulfuric acid treatment. The Nafion-catalyzed hydrolyzates of rice straw exhibited low level of inhibition for both cell growth and fermentation in comparison to the hydrolyzates produced by sulfuric acid. *Pichia stipitis* cells were able to produce ethanol by fermentation of Nafion-catalyzed hydrolyzates when the inoculum level exceeded 3.2 g dry cells/l.