

## 바이오에탄올 생산에 적합한 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)의 oxalic acid 전처리 효과 탐색\*<sup>1</sup>

김혜연\*<sup>2</sup> · 이재원\*<sup>3</sup> · Thomas W. Jeffries\*<sup>3</sup> · 곽기섭\*<sup>2</sup> · 최인규\*<sup>2†</sup>

### Effect of Oxalic Acid Pretreatment on Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*) for Ethanol Production\*<sup>1</sup>

Hye-Yun Kim\*<sup>2</sup> · Jae-Won Lee\*<sup>3</sup> · Thomas W. Jeffries\*<sup>3</sup> · Ki-Seob Gwak\*<sup>2</sup> · In-Gyu Choi\*<sup>2†</sup>

#### 요 약

본 연구에서는 국내 조림 수종인 백합나무를 바이오에탄올 생산용 자원으로 이용하고자 oxalic acid 전처리 방법을 도입하여 가능성을 타진하였다. 160°C에서 0.037 g/g oxalic acid로 20분 전처리하였을 때 40.22 g/l의 발효가능한 당을 생산하였으며, 처리된 고형 바이오매스를 이용하여 동시당화발효를 수행한 결과 72시간 후 8.6 g/l의 에탄올을 생산하였다. 같은 조건에서 반응시간을 증가시켜 40분 처리하였을 때 32.66 g/l의 발효가능한 당을 생산하였고 동시당화발효로 72시간 후 9.5 g/l의 에탄올을 생산하였다. 가수분해산물을 분석한 결과, 같은 조건에서 반응시간이 증가함에 따라 acetic acid, 5-HMF, furfural, total phenols와 같은 발효저해물질이 증가하였다. 이와 같은 발효저해물질은 반응시간보다는 초기 oxalic acid 첨가량에 영향을 받았다. Acetic acid 생산량은 저농도(0.013 g/g)의 oxalic acid를 사용하였을 때 3.39~5.78 g/l로 나타났으며 xylose 분해산물인 furfural은 glucose의 분해산물인 5-HMF보다 2~3배 많게 가수분해산물에 존재하였다. 리그닌 분해산물로 예측되는 total phenols는 모든 조건에서 5 g/l 이상이 검출되었다. 가수분해산물과 동시당화발효로부터 에탄올 생산량을 분석한 결과 0.037 g/g oxalic acid로 20분 전처리한 가수분해산물과 고형 바이오매스로부터 가장 높은 에탄올 생산을 예측할 수 있다.

\*<sup>1</sup> 접수 2009년 4월 22일, 채택 2009년 5월 25일

\*<sup>2</sup> 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. of Environmental Materials Science, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

\*<sup>3</sup> Forest Products Laboratory, One Gifford Pinchod Drive, Madison, Wisconsin, 53726-2398, USA

† 주저자(corresponding author) : 최인규(e-mail: cingyu@snu.ac.kr)

## ABSTRACT

In this study, we investigated the potential of producing bioethanol from *Liriodendron tulipifera* by using oxalic acid pretreatment. Amounts of fermentable sugars, mostly xylose and glucose, in the liquid fraction (hydrolysate) was 40.22 g/l after the biomass was pretreated with 0.037 g/g of oxalic acid for 20 minutes at 160°C. Production amounts of ethanol was 8.6 g/l from the 72 hours of simultaneous saccharification and fermentation (SSF) on solid fraction of the pretreated sample. At the same condition, when the reaction time increased to 40 minutes, 32.66 g/l of fermentable sugars in the hydrolysate and 9.5 g/l of ethanol was produced from the process of pretreatment and SSF. As a result of analyzing the fermentation inhibitors, such as acetic acid, 5-HMF, furfural and total phenolic compounds, as the reaction time increased, the amount of the fermentation inhibitors in the hydrolysate increased. Production of the fermentation inhibitors was more affected by initial concentration of oxalic acid rather than reaction time. 3.39~5.78 g/l of acetic acid was produced by pretreatment with 0.013 g/g of oxalic acid, and the amount of furfural produced by decomposition of xylose was 2~3 times higher than the amount of 5-HMF produced by decomposition of glucose. All the hydrolysates contained more than 5 g/l of total phenols considered as the degradation product of lignin. Therefore, by analyzing the amount of fermentable sugars and fermentation inhibitors in the hydrolysate, and producing ethanol from SSF of solid fraction of the pretreated sample, the biomass pretreated with 0.037 g/g of oxalic acid for 20 minutes at 160°C can be expected to produce the most ethanol.

**Keywords:** yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*), oxalic acid pretreatment, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), bioethanol, hydrolysate

## 1. 서 론

현재 바이오에탄올은 화석연료 대체에너지로 관심을 받고 있으며 활발한 연구가 진행되고 있다. 바이오에탄올은 연료 효율이 좋으며, 식물 자원을 이용한 생물학적인 처리로 생산할 수 있기 때문에 풍부한 자원을 바탕으로 에너지 고갈의 염려가 없다는 장점을 가지고 있다. 특히 바이오에탄올을 생산하기 위한 바이오매스로 농업 폐자재, 목재, 폐지 등을 이용한 연구는 이미 활발히 진행되어 왔다(Wyman, 1999; Saha *et al.*, 2008; Teramoto *et al.*, 2008). 그 중 탄소 중립적이며, 식량자원과 경쟁할 필요가 없다는 측면에서 목질계 바이오매스는 이용가치가 높은 자원으로 간주되고 있다(Sasner *et al.*, 2008;

Wingre *et al.*, 2008). 포플러, 사시나무, 백합나무 등과 같은 단벌기 속성수는 바이오에탄올 생산을 위한 유용한 바이오매스로 간주되고 그 연구가 활발하게 수행되고 있다(Allen *et al.*, 2001; Yemshanov *et al.*, 2008; Yat *et al.*, 2008). 특히 백합나무(*Yellow poplar, Liriodendron tulipifera*)는 다른 수종에 비해 목재 구성성분 중 리그닌이 차지하는 비율이 다른 성분에 비해 적고, 성장 속도가 빠르기 때문에 바이오매스로 이용하기에 매우 용이하다는 장점이 있다(Allen *et al.*, 2001).

목질계 바이오매스를 이용하여 바이오에탄올을 생성하는 공정은 크게 전처리, 효소 당화, 발효 공정으로 나뉘며, 전처리는 바이오매스를 발효가능한 당으로 전환시키기 용이하도록 만들어주는 첫 번째 단

계로 목적에 따라 산, 알칼리, 유기용매를 이용한 전처리 방법이 사용되고 있다(Saha *et al.*, 2008; Teramoto *et al.*, 2008). 산을 이용한 전처리 방법으로는 주로 황산이 사용되어 왔으나, 전처리 후 발효에 영향을 미치는 많은 저해인자를 생산하기 때문에 최근에는 maleic acid, fumaric acid, oxalic acid와 같은 유기산을 이용하는 연구도 수행되고 있다(Kenealy *et al.*, 2007; Kootstra *et al.*, 2009).

특히, oxalic acid는 목재 부후균이 목재를 분해시킬 때 분비하는 성분으로, 목재를 분해하는데 중요한 역할을 하는 물질로 알려져 있다. 백색 부후균은 oxalic acid를 분비하여, Mn, Fe와 같은 금속 이온들을 chealate시켜 리그닌을 분해시킨다고 알려져 있다(Shimada *et al.*, 1994). 셀룰로오스 조직을 분해시키는 갈색 부후균 역시 oxalic acid를 분비하며, oxalic acid 자체가 산 촉매로 작용하여, 목질 세포벽 구조를 변형시켜 xylan을 분해시키는 것으로 알려져 있다(Meyer-Pinson *et al.*, 2004). 따라서 oxalic acid를 이용한 전처리 방법은 헤미셀룰로오스와 리그닌을 동시에 분해시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 뿐만 아니라 oxalic acid는 다른 산에 비해 가격이 저렴하고 비독성이며, 전처리 과정에서 유해한 가스 배출문제를 일으키지 않기 때문에 다른 산을 이용한 전처리 방법보다는 친환경적인 전처리 방법이 될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 oxalic acid를 이용하여 백합나무의 전처리를 수행하고, 전처리로 얻어진 헤미셀룰로오스 가수분해 산물을 분석하며, 전처리된 고품 바이오매스를 이용하여 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)를 수행하여 에탄올 생산에 적합한 전처리 조건을 구명하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시재료

경기도 남양주시 산업인력개발원에서 제공받은 20년생 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)를 사용하였으며, Wiley mill Model No. 2 (Philadelphia, USA)

Table 1. Experimental design by oxalic acid concentration and reaction time

Sample No	Oxalic acid (g/g*)	Reaction time (min)	Temperature (°C)
1	0.013 (0.325%)	20	160
2	0.037 (0.925%)	20	160
3	0.013 (0.325%)	40	160
4	0.037 (0.925%)	40	160

\* Oxalic acid concentration(g) / dry weight of biomass (g)

를 사용하여 직경 20 mm 이하의 칩 형태로 균일하게 분쇄하였다. 초기 함수율은 10%였으며, 전처리에 이용되기 전까지 4°C에서 보관하였다.

### 2.2. 전처리

Oxalic acid 전처리는 21 ℓ의 회전식 digester에서 수행되었다. 전처리 조건은 Table 1과 같다. 전건중량 1 kg의 백합나무 목재 칩과 4 ℓ의 oxalic acid 용액을 첨가하여 증기로 열을 가한 후 반응을 시작하였다. Mass balance를 위하여 증기는 digester jacket에 가하였고 목재 칩과 직접 접촉하지 않도록 하였다. 처리된 칩은 스크린을 이용하여 액상부분(가수분해산물)과 분리하였으며 동시당화발효를 위해 처리된 고품 바이오매스는 증류수로 세척하였다. 처리된 고품 바이오매스와 가수분해산물은 4°C에 유지하였다.

### 2.3. 가수분해산물 분석

액상 가수분해산물에 포함되어있는 구성당, acetic acid, 5-hydroxymethylfuraldehyde (5-HMF)와 furfural, total phenols 등을 분석하였다.

헤미셀룰로오스가 분해되면서 생성되는 acetic acid와 발효에 관여하는 주요 당당류인 glucose, xylose를 HPLC (Gilson 307, Middleton, USA)로 분석하였다. 이 HPLC에서는 Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Bio-rad, Hercules, USA)과 refractive index detector (RID)를 사용하였으며, mobile phase (isocratic elution)로는 5 mM 황산 수용

액을 flow rate 0.3 ml/min으로 하여 55분 동안 분석하였다.

5-HMF와 furfural은 HPLC (HP series II 1090, USA)를 이용하여 분석하였다. C18(2) column (5  $\mu$ m, 250  $\times$  4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA)을 사용하였고 flow rate은 0.8 ml/min로 조절하였으며, mobile phase (isocratic elution)는 acetonitrile 100 ml, H<sub>2</sub>O 800 ml, acetic acid 100 ml로 구성되었다.

Total phenols는 Scalbert (1989)의 방법을 이용하여 측정하였다. Vanillin을 표준물질로 하여 가수분해 산물에 포함되어있는 total phenols를 측정하였다. 1 : 10으로 희석된 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (2 N)(Sigma-Aldrich, USA) 1 ml와 적당한 농도로 희석된 시료 200  $\mu$ l를 혼합하고, 곧바로 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.8 ml를 혼합하여 2시간 동안 암실에 방치하였다. 반응 후 분광광도계(Agilent 8453, USA)로 760 nm에서 흡광도를 측정하였으며, vanillin 표준곡선을 이용하여 3반복한 평균값으로 total phenols 함량을 구하였다.

## 2.4. 공시균주

동시당화발효를 위해 wild type xylose fermenting *Pichia stipitis* CBS 6054를 사용하였다. 4°C YPD (yeast extract, peptone, dextrose agar) 배지에 보관 중인 균주는 glucose 20 g/l, yeast extract 10 g/l, peptone 10 g/l을 배지로 사용하여 선 배양하였으며 30°C, 200 rpm에서 24시간 배양(Innova 4450, New Brunswick Scientific, USA)한 후 5000 rpm에서 10분 동안 원심분리기를 사용하여 yeast cell을 수집하고 멸균수로 세척한 후 동시당화발효를 위해 사용하였다.

## 2.5. 동시당화발효

동시당화발효를 수행하기 위해 전건무게 5 g의 전처리된 고행 바이오매스 고행분, 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5) 50 ml를 125 ml Erlenmeyer flask에 첨가한 후 5 M NaOH를 이용하여 최종 pH

를 5.0으로 조절하였다. 준비된 flask는 120°C에서 20분 동안 멸균한 후 yeast 성장을 위해 멸균된 urea 3.6 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 14.4 g/l 과 mineral 성분 (FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.003 g/l, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0045 g/l, CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.0045 g/l, MnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.00084 g/l, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.003 g/l, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.003 g/l, NaMoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.004 g/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.001 g/l, KI 0.0001 g/l, Na-EDTA 0.015 g/l)을 첨가하였다. 효소가수분해를 위해 500 CMC U/g,  $\beta$ -glucosidase 80 pNPG/g의 Accellerase 1000 (Genencor, Rochester, USA)을 첨가하였고 발효를 위해 2 g/l의 yeast를 첨가하였다. 동시당화발효는 30°C, 150 rpm 조건에서 수행되었으며 96 시간까지 24시간 간격으로 시료를 취해서 HPLC에 의해 잔류하고 있는 단당류 및 에탄올을 분석을 수행하였다. 단당류 및 에탄올 분석 조건은 2.3 항목의 단당류 분석 조건과 동일하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 가수분해산물 분석

백합나무의 전처리 결과, 전처리 조건 1, 2, 3, 4로 부터 투입된 바이오매스 대비 각각 68.88, 70.91, 65.67, 62.41%의 전처리 고행 바이오매스를 획득할 수 있었으며, 백합나무 전처리 전, 후의 glucan, xylan 등 탄수화물 함량과 리그닌 함량은 다음과 같다 (Table 2). 전처리 결과, xylan이 가장 많이 분해되었으며, glucan, 리그닌 등이 그 다음으로 많이 분해되었다.

Oxalic acid 전처리 후 얻어진 가수분해 산물의 단당류 분석 결과는 Fig. 1과 같다. Oxalic acid 전처리로 주로 xylose가 얻어졌으며 이것은 Valerie 등 (2004)이 제시한 oxalic acid가 non-cellulosic 성분 중에서도 주로 헤미셀룰로오스를 구성하는 xylan을 공격한다는 연구결과와 일치하였다. 본 실험은 예비 실험(153~187°C) 결과를 바탕으로 160°C 단일온도에서 수행되었으며, 동일 농도의 oxalic acid (0.013 g/g)를 서로 다른 반응시간(20분, 40분)으로 처리하

Table 2. Chemical compositions of *L. tulipifera* before pretreatment and solid fraction after pretreatment

Pretreatment	Sample No.	Carbohydrates (%)							Klason lignin (%)
		Arabinan	Galactan	Rhamnan	Glucan	Xylan	Mannan	Total	
Before	·	0.55	0.61	0.36	40.23	17.01	2.42	61.18	21.88
After	1	0.03	0.08	0.05	36.09	5.53	0.79	42.58	19.27
	2	0.05	0.04	0.04	39.15	3.57	0.53	43.37	21.30
	3	0.01	0.02	ND <sup>a</sup>	35.47	3.52	0.48	39.49	18.92
	4	0.03	0.02	0.02	35.39	2.05	0.23	37.73	18.80

a ND : not detected

\* The amount of carbohydrates and lignin after pretreatment was calculated on the basis of dry weight of initial biomass (1 kg) before pretreatment.

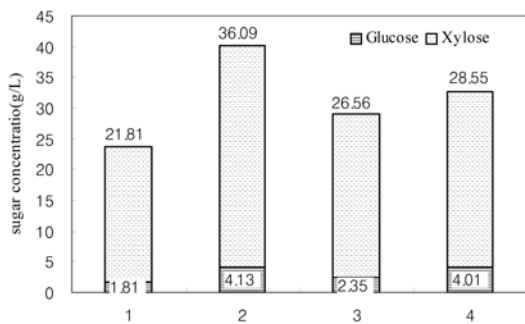


Fig. 1. Sugar concentration resulting from liquid fraction (hydrolysate) after pretreatment.

였을 때(전처리 조건 1, 3), 40분 반응시간에서 26.56 g/l로 높은 xylose를 얻었다. 반면 oxalic acid 함량을 0.0037 g/g으로 증가시켜 20분 처리하였을 때(전처리 조건 2) xylose 함량이 36.09 g/l로 40분 반응시간에서보다 높은 xylose를 얻을 수 있었다. Glucose 생산량은 4.13 g/l 미만으로 xylose에 비해 상대적으로 낮았으며 이는 oxalic acid에 의해 xylose가 선택적으로 분해되었음을 나타내고 있다. 이와 같은 결과는 전처리된 고품 바이오매스는 충분한 셀룰로오스를 포함하고 있고, 구조적으로 많은 양의 헤미셀룰로오스가 분해되어 동시당화발효에 적합한 조건임을 의미하고 있다. 따라서 가수분해산물의 발효가능한 총 당량은 0.037 g/g의 oxalic acid로 20분 처리하였을 때 40.22 g/l로 가장 높았다.

전처리 조건 4의 경우 oxalic acid 농도와 반응시간이 다른 조건에 비해 높아 가장 많은 당당이 추출될 것이라 기대했으나 xylose와 glucose 함량이 낮았다. 이와 같은 이유는 높은 oxalic acid 농도에서 오랜 시간동안 열에 노출되었을 경우 xylose의 분해가 진행되어 에탄올 발효에 저해인자 중 하나인 furfural로 분해되어 더 이상 xylose의 형태로 존재하지 않기 때문이다. 이러한 결과는 acetic acid, furfural과 5-HMF 생산량으로 확인하였다(Table 3, Fig. 2).

Xylose 2번, 3번 탄소의 OH 그룹이 O-acetyl group으로 치환되는 과정에서 acetic acid가 형성된다(Fengel *et al.*, 1989; Shimizu *et al.*, 1991). 따라서 헤미셀룰로오스로부터 생성된 xylose와 acetic acid 양의 비율로 xylose 분해 여부를 간접적으로 확인할 수 있었다(Table 3). 가장 온화한 조건인 1번에서는 xylose와 acetic acid 비율이 6.4 : 1로 가장 높은 비율을 나타낸 반면, 가장 높은 농도의 산을 가하고, 처리시간을 길게 적용한 조건인 4번에서는 그 비율이 3.9 : 1로 낮아 이는 많은 양의 xylose가 분해되었음을 간접적으로 나타내고 있다. Oxalic acid 처리농도에 따라 비교한 결과 0.037 g/g의 높은 농도에서(전처리 조건 2, 4)보다 0.013 g/g의 낮은 농도에서(전처리 조건 1, 3) 그 비율이 높았다. Oxalic acid 농도(1, 3과 2, 4)와 반응시간(1, 2와 3, 4)에 따라 생성된 acetic acid 생산량을 비교한 결과, 반응시간보다 초기 oxalic acid 첨가량에 영향을 받았음을 확인하였다.

Xylose, glucose 분해로 생성된 furfural, 5-HMF

Table 3. Acetic acid concentration and ratio of xylose to acetic acid in liquid fraction (hydrolysate)

Sample No.	Acetic acid (g/ℓ)	Ratio of xylose to acetic acid
1	3.39	6.4
2	8.24	4.4
3	5.78	4.6
4	7.33	3.9

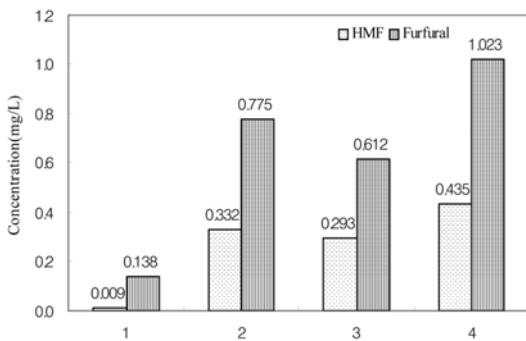


Fig. 2. Concentration of 5-HMF and furfural in liquid fraction (hydrolysate).

을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. Xylose는 산과 열에 노출되었을 때 furfural로 분해되고 glucose는 5-HMF로 분해되며, 이러한 성분은 발효를 저해하는 인자로 작용하여 가수분해산물에 각각 2 g/ℓ 이상을 함유할 경우 에탄올 발효에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Delgenes *et al.*, 1996; Larsson *et al.*, 1999; Heer *et al.*, 2008). 위의 당분석 결과와 acetic acid 분석을 바탕으로 예상한 것과 같이 2번과 4번 조건에서 높은 함량의 furfural과 5-HMF가 검출되었으며 furfural 함량이 5-HMF에 비해 상대적으로 높은 것으로 glucose보다 xylose가 더 많이 분해되었음을 확인하였다. 전처리 조건 1번에서 반응시간의 증가(전처리 조건 3번)보다 oxalic acid 농도의 증가(전처리 조건 2번)에 의해 acetic acid 생성량의 증가가 더 크게 측정된 결과로부터 5-HMF와 furfural 생성량 또한 반응시간보다 oxalic acid 초기농도에 영향을 받고 있음을 확인할 수 있었다.

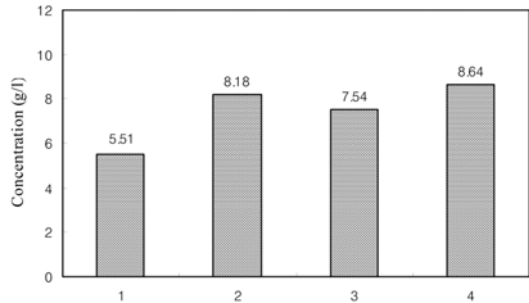


Fig. 3. Concentration of total phenols in liquid fraction (hydrolysate).

Acetic acid, furfural과 5-HMF는 발효에 영향을 미치는 인자이며 동시에 발효가능한 당 수율을 결정짓는 중요한 인자이다. 따라서 가수분해산물을 이용한 발효를 위해서 최대의 당 생산과 동시에 최소의 acetic acid, furfural과 5-HMF를 생산하는 전처리 조건을 찾는 것이 가장 중요하다.

가수분해산물 발효에 total phenols 역시 저해인자로 작용하고 있으며 분석 결과는 Fig. 3과 같다. Total phenols 함량은 oxalic acid 농도와 반응시간에 영향을 받았으며, total phenols 함량을 농도와 반응시간에 따라 분석한 결과 반응시간에 비해 oxalic acid 첨가량이 중요한 인자로 작용하는 것을 확인하였다. Oxalic acid 전처리에 의해 total phenols는 5.51~8.64 g/ℓ로 나타났으며 0.037 g/g의 oxalic acid로 40분 전처리하였을 때 8.64 g/ℓ로 가장 높은 total phenols를 얻었다.

Total phenols는 전처리 시 리그닌 분해산물로 얻어진 산물이며 산처리로 얻어진 가수분해산물에서 total phenols의 주성분은 4-hydroxy benzoic acid, vanillin, catechol, p-hydroxybenzoic acid 등이며(Ando *et al.*, 1986; Palmqvist *et al.*, 1999), 아직까지 밝혀지지 않은 성분이 많다. 이러한 성분은 yeast의 생체막 안으로 유입되어 생합성 과정을 방해하여 효소기작을 방해하는 것으로 알려져 있다(Heipieper *et al.*, 1994; Palmqvist *et al.*, 2000). 따라서 yeast 성장에 영향하여 결과적으로 에탄올 생산을 저해하게 된다고 알려져 있다. 지금까지 알려진 에탄올 생산을 저해하는 인자 중 phenolic compounds가 가장

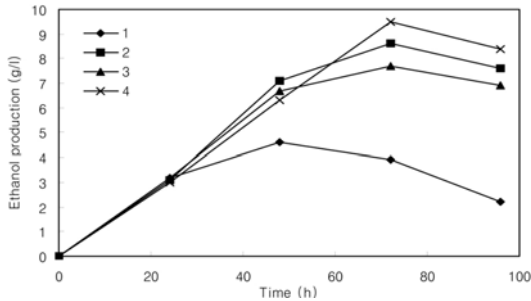


Fig. 4. Ethanol production during SSF.

큰 영향을 주는 인자로 알려져 있으며(Clark *et al.*, 1984), 그 함량에 따라 에탄올 생산에 민감하게 영향을 미친다고 보고하고 있다(Pfeifer *et al.*, 1984).

그러나 높은 함량의 total phenols는 목재 칩에서 리그닌이 많이 분해되어 나왔음을 의미하며, 이는 동시당화발효를 수행하기에 구조적으로 유리한 조건이 되었음을 의미한다.

### 3.2. 동시당화발효(SSF)

동시당화발효로 얻어진 에탄올 생산량은 Fig. 4와 같다. 에탄올 생산량은 동시당화발효 48시간과 72시간 사이에서 최대로 나타났으며 72시간 이후에는 glucose, xylose와 같은 탄소원이 소모되어 에탄올을 탄소원으로 사용하기 때문에 에탄올이 감소되는 경향을 나타냈다. 0.037 g/g oxalic acid로 40분 반응한 고형 바이오매스(전처리 조건 4)에서 동시당화발효 72시간 후 9.5 g/l (전처리 고형 바이오매스에 함유된 발효가능 당 대비 수율 : 25.4%)로 가장 높은 에탄올 생산을 나타냈다. 이러한 결과는 고농도 oxalic acid와 반응시간에 의한 헤미셀룰로오스 및 일부 리그닌의 분해로 셀룰로오스에 대한 효소의 접근성을 증가시킨 결과로 사료된다. 반면 가장 온화한 조건에서 처리된 고형 바이오매스에서는 48시간 후 4.6 g/l (전처리 고형 바이오매스에 함유된 발효가능 당 대비 수율 : 11.1%) 에탄올 생산량을 나타냈으며 다른 조건의 시료에 비해 상대적으로 에탄올 생산량이 낮았다. 낮은 oxalic acid 농도와 짧은 반응시간으로 전처리시켰을 때, 헤미셀룰로오스의 분해가 충분히

Table 4. Specific yield at maximum ethanol production

Sample No.	Ethanol production (g/l)	Time at maximum ethanol production (h)	Specific yield (g/(l*h))
1	4.6	48	0.09
2	8.6	72	0.12
3	7.7	72	0.11
4	9.5	72	0.13

일어나지 않아 효소의 접근성이 떨어지고 셀룰로오스 또한 견고한 구조를 유지하고 있어 충분한 에탄올을 생산하지 못한 것으로 예측할 수 있다. 따라서 동시당화발효에 있어 초기 산농도와 반응시간은 에탄올 생산에 중요한 인자로 작용하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

최고의 에탄올 생산 효율에 해당하는 시간당 에탄올 비생산(Specific ethanol yield, g/(l\*h))을 비교한 결과는 Table 4과 같다. 시료 1은 0.09로 가장 적은 생산 속도 효율을 보인 반면, 시료 4에서는 0.13으로 시간당 에탄올 생산속도가 가장 우수한 것으로 나타났다.

## 4. 결 론

단별기 속성수종의 하나인 백합나무를 이용하여 oxalic acid 전처리를 얻어진 가수분해산물 분석과 고형 바이오매스를 이용한 동시당화발효로 에탄올 생산에 적합한 전처리 조건을 구명하고자 하였다. 0.037 g/g의 oxalic acid로 20분 처리하였을 때, 전처리 후 헤미셀룰로오스로부터 분해되어 가수분해산물에 용해된 발효가능한 당의 농도는 총 40.22 g/l이었으며, 네 조건 중 위의 조건에서 가장 많은 당을 얻었다. 발효가능한 당으로부터 에탄올로의 전환에 0.51의 이론적 수치를 적용하였을 때, 약 20 g/l의 에탄올 생산을 예측할 수 있다. 같은 조건에서 고형 바이오매스를 이용한 동시당화발효를 수행한 결과, 8.6 g/l의 에탄올을 얻었다. 반면 0.037 g/g oxalic acid로 40분 처리한 고형 바이오매스에서 동시당화

발효로 9.6 g/l의 가장 많은 에탄올을 얻었으며, 같은 조건의 가수분해산물에 포함된 발효가능한 당 32.56 g/l로부터 약 16 g/l의 에탄올 생산을 예측할 수 있다.

같은 oxalic acid의 농도 조건에서 진처리 반응시간이 길어짐에 따라 가수분해산물에 생성된 발효가능한 당은 분해가 진행되어 5-HMF나 furfural을 생성하기 때문에 이와 같은 저해물질 생성을 최소화하며 최대의 당을 생산할 수 있는 조건이 최적의 에탄올 생산에 적합하다. 따라서 가수분해산물로부터 예측 가능한 에탄올 생산량을 고려하였을 때 160°C에서 0.037 g/g oxalic acid로 20분 처리하였을 때 가수분해산물 발효와 동시당화발효로 가장 높은 에탄올을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 산림청 '산림과학기술개발사업(과제번호 : S120808L1401704C)'과 미국 Forest products laboratory의 Thomas W. Jeffries 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

## 참 고 문 헌

- Allen, S. G., D. Schulman, J. Lichwa, M. J. Altal, E. Jennings, and R. Elander. 2001. A comparison of aqueous and dilute-acid-single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40(10): 2352~2361.
- Ando, S., I. Arai, K. Kiyoto, and S. Hanai. 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influence on ethanol fermentation. *J. Ferment. Technol.* 64: 567~570.
- Clark, T. and K. L. Mackie. 1984. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Biotechnol.* 34: 101~110.
- Delgenes, J. P., R. Moletta, and J. M. Navarro. 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 220~225.
- Fengel, D. and G. Wegener, 1989. Polyoses (Hemicelluloses). In: *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin: Walter de Gruyter & Co. pp. 106~131.
- Heer, D. and U. Sauer. 2008. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial Biotechnology* 1 (6): 497~506.
- Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Kewelo, and J. A. M. de Bont. 1994. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *TIBTECH* 12: 409~415.
- Kenealy, W., E. Horn, and C. Houtman. 2007. Vapor-phase diethyl oxalate pretreatment of wood chips. Part 1. Energy saving and improved pulps. *Holzforschung* 61: 223~229.
- Kootstra, A. M. J., N. S. Mosier, E. L. Scott, H. H. Beeftink, and J. P. M. Sanders. 2009. Differential effects of mineral and organic acids on the kinetics of arabinose degradation under lignocellulose pretreatment conditions. *Biochem. Engine. J.* 43: 92~97.
- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborng, K. Stenberg, G. Zacchi, and N. Nilverbrant. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 151~159.
- Meyer-Pinson, V., K. Ruel, F. Gaudard, G. Valtat, M. Petit-Conil, and B. Kurek. 2004. Oxalic acid: a microbial metabolite of interest for the pulping industry. *Plant biology and pathology* 327: 917~925.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II : inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74: 25~33.
- Palmqvist, E., J. Almeida, and B. Hahn-Hägerdal. 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 46~55.
- Pfeifer, P. A., G. Bonn, and O. Bobbeler. 1984. Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Sac-*



- aromyces carlsbergensis W. Biotechnol. Lett. 6: 541~546.
15. Saha, B. C. and M. A. Cotta. 2008. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. Biomass and Bioenergy 32: 971~977.
  16. Sasner, P., M. Galbe, and G. Zacchi. 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. Biomass and Bioenergy 32: 422~430.
  17. Scalbert, A., B. Monties, and G. Janin. 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. J. Agric. Food. Chem. 37(5): 1324~1329.
  18. Shimada, M., D. B. Mad, Y. Akamatsu, and T. Hattori. 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. FEMS microbiol. Rev. 13: 285~296.
  19. Shimizu, K. 1991. Chemistry of hemicelluloses. In: Wood and cellulosic chemistry. New York and Basel: Marcel Dekker, Inc.: p. 177~214.
  20. Teramoto, Y., S. Lee, and T. Endo. 2008. Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. Bioresource Technology 18: 8856~8863.
  21. Valerie, M. P., K. Ruel, F. Gaudard, G. Valtat, M. Petit-Conil, and B. Kurek. 2004. Oxalic acid: a microbial metabolite of interest for the pulping industry. Comptes Rendus Biologies. 327: 917~925.
  22. Wingre, A., M. Galbe, and G. Zacchi. 2008. Energy consideration for a SSF-based softwood ethanol plant. Bioresource Technology 99: 222~231.
  23. Wyman, C. E. 1999. Biomass ethanol: technical progress, opportunities and commercial challenges. Annu. Rev. Eng. Environ. 24: 189~226.
  24. Yat, S., A. Berger, and D. R. Shonnard. 2008. Kinetic characterization for dilute sulfuric acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. Bioresource Technology 99: 3855~3863.
  25. Yemshanov, D. and D. McKenney. 2008. Fast-growing poplar plantations as a bioenergy supply source for Canada. Biomass and Bioenergy 32: 185~197.