

목질계 바이오매스 가수분해물 중 발효저해 물질에 대한 생물학적 및 물리화학적 무독화 방법의 평가

조대행 · 김용환*

광운대학교 화학공학과

Evaluation of Biological and Physico-chemical Detoxification Methods for the Removal of Inhibitors in Lignocellulose Hydrolysate

Dae Haeng Cho and Yong Hwan Kim*

Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Korea

Abstract In this study, the detoxification methods were evaluated for the removal of fermentation inhibitors from synthetic solution containing the composition similar to the lignocellulosic hydrolysate. The enzyme peroxidase and laccase were used as a biological treatment method. The physico-chemical methods such as adsorption and ion exchange were applied by using activated charcoal and ion exchange resins. The enzyme peroxidase showed an excellent removal of phenolic compounds. The 5-HMF and furfural were completely removed by activated charcoal. The anion exchange resin showed a good result for detoxification of acetic acid. The activated charcoal and ion exchange resins lead to a loss of sugars more or less. The choice of detoxification method must be made after considering the composition and inhibitors in hydrolysates.

Keywords: detoxification, lignocellulose, hydrolysate, peroxidase, activated charcoal, ion exchange resin

서 론

최근 바이오매스로부터 기존 석유연료를 대체할 수 있는 바이오연료를 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 바이오에탄올과 바이오부탄올 등의 알콜연료를 생산하기 위한 바이오매스로는 전분유래 기질 이외에 목질계 유래 기질인 리그노셀룰로스 (lignocellulose)가 있다. 리그노셀룰로스가 알콜 생산을 위해 미생물의 기질로 사용되기 위해서는 리그닌 (lignin), 셀룰로스 (cellulose), 헤미셀룰로스 (hemicellulose)로 분해하는 전처리 과정과 셀룰로스, 헤미셀룰로스를 미생물이 이용할 수 있는 5탄당, 6탄당의 단당으로 만드는 가수분해과정이 필요하다 [1,2]. 이를 위해 주로 사용되는 방법은 물리화학적 전처리와 산 가수분해인데,

이 방법의 경우 가수분해 과정에서 미생물의 성장에 심각한 영향을 줄 수 있는 저해물질이 발생하게 되고 이것이 알콜 연료 생산에 큰 영향을 주게 된다 [3,4]. 따라서 발효 공정에 들어가기 전단계로 기질 중 저해물질을 제거하는 무독화공정이 매우 중요하다.

리그노셀룰로스 분해산물 중 일반적으로 알려져 있는 저해물질 (inhibitor)은 사용 된 바이오매스의 종류와 전처리 방법 등에 따라 매우 다양한데 이를 두 부류로 나누면 크게 페놀계 화합물과 비페놀계 화합물로 나눌 수 있다. 페놀계 화합물에는 ferulic acid, *p*-coumaric acid, hydroxybenzoic acid, syringaldehyde, vanillin 등이 있으며 대부분 리그닌의 가수분해 산물이다. 비페놀계 화합물은 furan, furfural, hydroxymethyl furfural (HMF), 아세트산 등이며 주로 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 단당으로 만드는 가수분해 과정에서 발생한다 [5].

이러한 저해물질들의 독성에 대해서는 주로 에탄올 발효와 관련되어 연구되어 왔는데, furan과 HMF는 알콜 합성

*Corresponding author

Tel: +82-2-910-5675, Fax: +82-2-941-1785

e-mail: metalkim@kw.ac.kr

에 관여하는 효소들을 저해하며 해당과정과 관련한 에너지 대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [6]. 유기산들은 ATP 합성 메커니즘에 영향을 줘 ATP의 생산을 방해하며 방향족 아미노산의 흡수를 줄여 미생물 성장에 직접적인 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [7]. 또한 페놀계 화합물들은 미생물의 세포막 기능을 상실하게 하거나 미토콘드리아막의 전기화학적 균형을 파괴하여 미생물의 성장과 에탄올 생산성에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다 [8]. 그러나 최근에 발표된 논문들에 의하면 부탄올 발효에 이용하는 *Clostridium*의 경우 furfural이나 HMF는 미생물의 성장과 부탄올 생산에 영향이 없으며 페놀계 화합물 중 ferulic acid, *p*-coumaric acid, syringaldehyde 등이 심각한 영향을 주는 것으로 보고되었다 [9].

리그노셀룰로스 분해산물 중 저해물질 (inhibitor)을 제거하는 무독화 (detoxification) 방법은 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 물리화학적 방법에는 증발 (evaporation), 용매추출 (solvent extraction), 알칼리 처리 (overliming), 흡착 (adsorption) 등이 있는데 이 중 가장 널리 이용되고 있는 흡착은 활성탄이나 이온교환수지를 이용하여 저해물질들을 흡착 제거하는 방법이다 [10,11]. 생물학적 방법에는 peroxidase나 laccase와 같은 효소를 이용하여 저분자의 페놀계 단량체들을 고분자화 시켜 침전시키는 방법이 있고 *Trichoderma reesei*와 같은 곰팡이를 이용하여 저해물질들을 분해하는 방법이 있다 [12,13].

본 연구에서는 리그노셀룰로스 가수분해물과 유사한 조성을 갖는 합성 용액을 이용하여 무독화 실험을 진행하였다. 생물학적 무독화 방법으로는 peroxidase와 laccase와 같은 효소를 이용하였고, 물리화학적 방법으로는 이온교환수지와 활성탄을 이용하였다. 또한 무독화 방법의 비교를 통해 저해물질의 종류에 따른 최적의 무독화 방법을 제시하였다.

재료 및 방법

실험 재료

Peroxidase는 *Coprinus Cinereus* IFO8371에서 생산된 CiP (*C. cinereus* peroxidase)를 정제, 농축하여 사용하였으며, 효소의 활성도는 20,000 U/mL이었다 [14]. Laccase는 활성

도가 120 LAMU/g 인 Novozyme사 (Bagsvaedr, Denmark)의 Denilite II S를 사용하였다. 음이온 교환수지는 (주)삼양 (Seoul, Korea)의 AMP 24 (0.35-0.55 mm, 0.9 meq/mL), 양이온 교환수지는 (주)삼양의 CMP 16 (0.35-0.55 mm, 1.75 meq/mL)을 사용하였으며, 비이온성 수지로는 Sigma사 (st. Louis, USA)의 XAD 4 (20-60 mesh)를 사용하였다. 활성탄은 Sigma사의 4-8 mesh 크기의 Granular 형태를 사용하였다. 이온교환수지는 1 N의 NaOH와 HCl을 이용하여 음이온교환수지는 OH⁻ form으로, 양이온 교환수지는 H⁺ form으로 처리 한 후 사용하였다.

무독화 방법

무독화 실험을 위한 대상용액으로 실제 당화액과 유사한 합성용액을 조제하여 사용하였으며, 그 조성은 Table 1과 같다. 효소를 이용한 무독화를 위해 합성용액 10 mL에 CiP 20 U/mL, Laccase 0.2g (24 LAMU)를 첨가하였으며, CiP 사용 시 과산화수소 15 μ L를 첨가하였다. 물리화학적 무독화를 위해 합성용액 10 mL에 이온교환수지 20% (v/v), 활성탄 0.5 g을 각각 첨가하였다. 무독화는 상온에서 1시간 동안 교반 반응한 후 각각의 성분을 분석하였으며, 초기 농도와 비교하여 제거율을 평가하였다.

Table 1. The composition of synthetic solution for detoxification

Compounds and concentration	
Sugars	Glucose 30 g/L, Xylose 10 g/L
Furfurals	5-Hydroxymethyl furfural (5-HMF) 1 g/L, Furfural 1 g/L
Phenolics	4-Hydroxybenzoic acid (4-HBA), Vanillic acid, Vanillin Syringaldehyde, <i>p</i> -coumaric acid, Ferulic acid 0.3 g/L, respectively
Weak acid	Acetic acid 5 g/L

분석방법

페놀계, 푸란계 화합물 및 당, 아세트산의 농도는 액체 크로마토그래프 (Agilent model 1200 liquid chromatograph)로 분석하였다. 페놀계 화합물과 5-HMF, furfural은 다이오드어레이 검출기로 분석하였고, 당과 아세트산은 굴절률 검출기로 분석하였다. 각각의 분석에 사용된 컬럼과 용매조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Analysis condition of HPLC

Analytes	Column	Detector	Solvent
Phenolics	Zorbax eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 μ M, Agilent)	Diode Array Detector at 280 nm	0.3% acetic acid : methanol (93 : 7), 1.0 mL/min
Furfurals	Zorbax eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 μ M, Agilent)	Diode Array Detector at 280 nm	0.3% acetic acid : methanol (70 : 30), 0.8 mL/min
Sugars acetic acid	Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD)	Refractive Index Detector	5mM H ₂ SO ₄ , 0.6 mL/min

결과 및 고찰

효소를 이용한 무독화

일반적으로 페놀계 화합물들은 산화환원 효소에 의해 phenoxy radical을 생성하고 이 radical 사이의 반응에 의해 dimer, oligomer나 polymer 형태의 물질을 만들 수 있는 것으로 알려져 있으며, 페놀계 물질을 포함하고 있는 폐수의 처리 등에 이용되어져 왔다 [15,16]. 생물학적 무독화 방법 중 효소를 이용하는 방법은 산화환원효소인 peroxidase나 laccase를 이용하여 저분자의 페놀계 화합물을 고분자화시켜 제거하는 것으로 발효저해물질 중 페놀계 화합물에 대해 탁월한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다 [12,13]. Fig. 1에서 보는바와 같이 peroxidase와 laccase 모두 합성용액 중의 발효저해물질 중 페놀계 화합물에 대해서만 특이적인 제거율을 나타내는 것을 알 수 있다. Peroxidase가 laccase에 비해 조금 더 우수한 특성을 보였는데, peroxidase가 vanillic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, vanillin과 같은 산, 알데히드계 물질에 대해 약 100%의 제거율을 보인 반면, laccase는 vanillin, syringaldehyde와 같은 알데히드계 물질에 대해 80% 내외의 비교적 낮은 제거율을 나타내었다. 특히 4-HBA의 경우 laccase에 의해서는 거의 제거되지 않는 것으로 나타났는데, 이는 이 물질이 본 효소에 대해 매우 낮은 turnover capacity를 갖는 것으로 판단된다 [13]. 5-HMF, furfural, 아세트산은 효소를 이용한 무독화 방법으로는 거의 제거 되지 않았다. 따라서 페놀계 화합물이 발효를 저해하는 주요 물질일 경우 효소를 이용한 방법이 저해물질 제거를 위한 탁월한 무독화 수단이 될 수 있을 것으로 판단된다. 보고에 의하면 biobutanol을 생산하는 *Clostridium*의 경우 저해물질 중 페놀계 화합물에 가장 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다 [9].

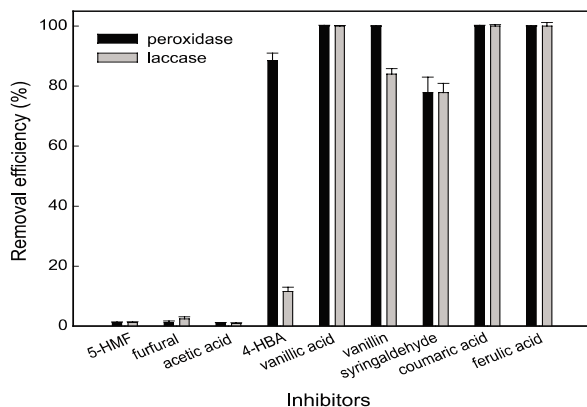


Fig. 1. The removal efficiency of inhibitors in synthetic solution by enzymes.

활성탄을 이용한 무독화

활성탄은 페놀계, 아세트산, furfural, 방향족 화합물 등을

흡착에 의해 제거할 수 있는 효과적인 방법으로 알려져 있다 [10,17]. 본 연구에서는 4-8 mesh 크기의 granular 형태의 활성탄을 이용하여 무독화 실험을 진행하였다. Fig. 2에서 보는바와 같이, 활성탄은 합성용액에 포함되어 있는 대부분의 저해물질들에 대해 탁월한 효과를 나타내었다. 5-HMF, furfural과 같은 퓨란계 화합물을 비롯하여 대부분의 페놀계 화합물들에 대해 100%에 가까운 제거율을 보여 주었으나, 아세트산의 제거율은 12%로 상대적으로 매우 낮은 제거율을 나타내었다.

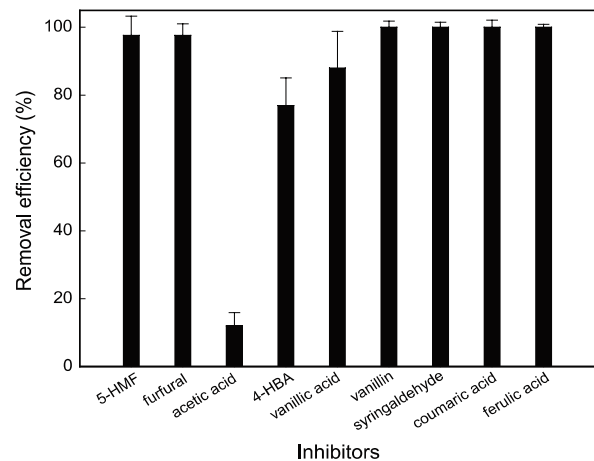


Fig. 2. The removal efficiency of inhibitors in synthetic solution by activated charcoal.

이온교환수지를 이용한 무독화

이온교환수지 또한 리그노셀룰로스 당화액의 무독화를 위해 널리 사용되고 있다 [11,18]. 본 연구에서는 음이온 교환수지 (anion exchange resin, AER), 양이온 교환수지 (cation exchange resin, CER), 비이온성 교환수지 (XAD 4, XAD) 등 세 가지의 이온교환수지를 이용하여 무독화 실험을 실시하였는데, Fig. 3에서 보는바와 같이 사용된 수지에 따라 저해물질의 종류에 따라 상이한 제거율을 나타냈다. 페놀계 화합물의 경우 음이온 교환수지에 의한 제거율이 약 100%로 가장 높게 나타난 반면, 양이온교환수지와 비이온성 교환수지의 제거율은 상대적으로 낮게 나타났다. 음이온 교환수지의 경우 대부분의 페놀계 산들은 합성용액의 pH 7.0에서 이온의 형태로 존재하게 됨으로 음이온교환수지의 작용기와 강한 이온결합을 하게 되어 제거효율이 매우 높게 나타났음을 알 수 있다. 또한 이온교환이 진행됨에 따라 수지로부터 교환기인 OH가 떨어져 나와 용액의 pH가 증가하게 되고, 이온화상수가 7.0 이상인 vanillin, syringaldehyde도 이온화되어 음이온교환수지에 의해 제거되는 것으로 판단된다. 양이온 교환수지도 40%에서 60% 정도의 제거효율을 나타냈는데, 이는 양이온교환수지와 페놀계 화합물의 방향족간의 결합에 의한 것으로 이온교환 메커니즘과는 다른 기작으로 판단된다. XAD 4의 경우는 페놀계

산의 제거율이 50% 미만으로 낮은 반면, 알데히드 계열의 페놀계 화합물인 vanillin, syringaldehyde의 제거율은 95% 이상으로 매우 높게 나타났다. 실험에 사용된 합성용액의 pH는 7.0으로 산계열의 페놀계 화합물인 4-HBA, vanillic acid, coumaric acid, ferulic acid의 경우 이 pH에서는 이온의 형태로 존재하게 되므로 비이온성 수지인 XAD 4는 산계열의 페놀계 화합물에 대해 낮은 제거효율을 보인 것으로 판단된다.

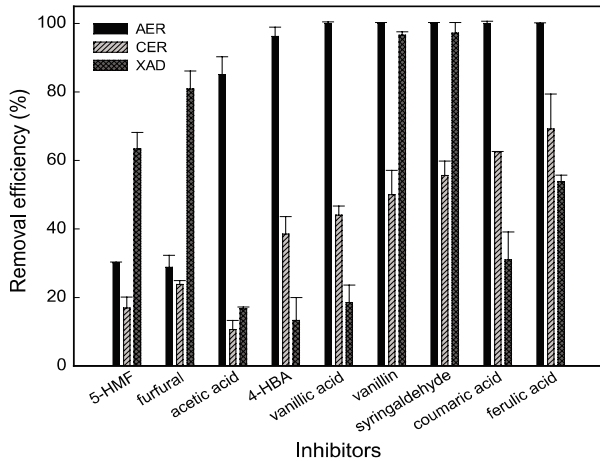


Fig. 3. The removal efficiency of inhibitors in synthetic solution by ion exchange resins.

5-HMF와 furfural은 음이온교환수지와 양이온교환수지에 의해서는 약 20% 내외의 낮은 제거효율을 보인 반면, 비이온성수지인 XAD 4에 의해서는 5-HMF 63%, furfural 81%의 높은 제거효율을 보였다. 기존의 연구에 의하면 비이온성수지인 XAD 8이 음이온교환수지나 양이온교환수지에 비해 furan 알데히드의 제거에 탁월하다는 보고가 있다 [11].

아세트산은 음이온교환수지에 의해 약 85% 제거되었으며, 양이온교환수지와 비이온성수지에 의해서는 거의 제거되지 않았다. 아세트산의 이온화상수는 약 4.8로 사용된 합성용액의 pH 7.0에서는 거의 대부분 이온화된 형태로 존재하기 때문에 음이온교환수지에 의한 제거효율이 가장 높게 나타난 것으로 판단된다. 음이온교환수지는 acetic acid, formic acid, levulinic acid와 같은 유기산들에 대한 제거효율이 매우 높은 것으로 알려져 있다 [17].

당 손실

실제 당화액은 발효저해물질과 당이 함께 포함되어 있는 혼합물이다. 그러므로 당화액의 무독화처리 시 사용되는 무독화 방법에 따라 포함되어 있는 당의 손실이 생길 수 있는데, 본 연구에서는 합성용액을 사용하여 여러 가지 무독화 방법에 따른 당 손실의 정도를 알아보았다. 당은 6 탄당인 glucose와 5 탄당인 xylose를 대상으로 하였다.

Fig. 4에서 보듯이와 같이 효소를 이용한 무독화의 경우 peroxidase, laccase 모두 당의 손실은 없는 것으로 나타났다. 즉 효소 처리 시 당과 페놀계 화합물과의 증합은 일어나지 않는 것으로 판단된다. 효소처리 이외의 방법에서는 다소간의 당 손실이 발생하였는데, 음이온교환수지와 활성탄의 경우 glucose와 xylose 모두 약 10% 내외의 당손실을 보였으며, 양이온교환수지는 4%, XAD 4는 7% 내외의 당 손실을 나타내었다.

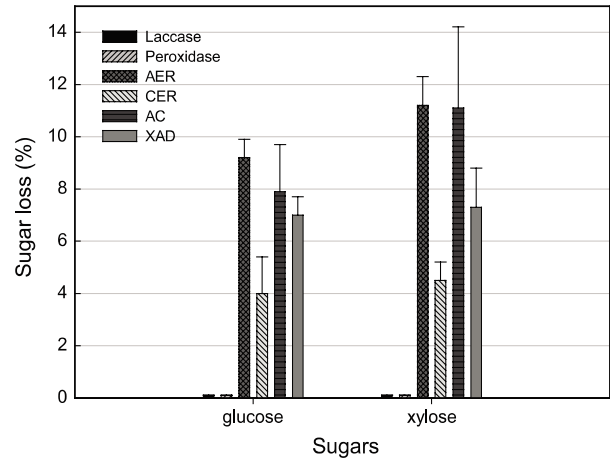


Fig. 4. The sugar loss in synthetic solution by detoxification methods.

무독화 처리 시 당화액 중 당의 손실은 전체 전처리 공정이나 알콜 발효의 경제성에 부정적인 영향을 줄 수 있기 때문에 반드시 고려되어야 할 요소이다. 음이온교환수지에 의한 당손실을 막기 위해 sulfate를 첨가하는 방법을 사용하기도 하는데, 이는 페놀계 화합물, 아세트산 등과 경쟁을 유발할 수 있기 때문에 반드시 당 손실이 없는 범위 내에서 사용하는 음이온교환수지의 양을 조절할 필요가 있다 [11].

리그노셀룰로스 당화액으로부터 발효저해물질들의 제거를 위한 무독화 방법을 적용하기 위해서는 각각의 방법들이 가지고 있는 무독화 효율을 파악하는 것이 매우 중요하다. 왜냐하면 발효저해물질의 종류와 양은 사용되는 바이오매스의 종류에 따라, 전처리 방법에 따라 크게 달라질 수 있기 때문이다. 또한 알콜연료 생산을 위한 발효 미생물들도 발효저해물질들의 독성에 각기 다른 저항성을 보이기 때문에 실제 적용하고자 하는 시스템에 맞는 무독화 전략이 필요하다고 할 수 있다. 본 연구결과에 따르면, 페놀계 화합물이 주된 저해물질이라면 효소를 이용한 무독화 방법이 가장 효율적일 것으로 판단된다. 활성탄과 음이온교환수지도 페놀계 물질의 제거에 좋은 결과를 보였지만, 효소에 비해 재사용의 번거로움과 당손실 등의 단점을 고려하여야 한다. 5-HMF, furfural 등은 활성탄이나 XAD계열의 비이온성 수지를 사용하는 것이, 아세트산의 경우는 음이온교환수지를 사용하는 것이 가장 효율적일 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 리그노셀룰로스 가수분해물과 유사한 조성을 갖는 합성 용액을 이용하여 무독화 실험을 진행하였다. 생물학적 무독화 방법으로는 peroxidase와 laccase와 같은 효소를 이용하였고, 이온교환과 흡착과 같은 물리화학적 방법으로는 이온교환수지와 활성탄을 이용하였다. 효소 중 peroxidase는 페놀계 화합물의 제거에 탁월한 효율을 보였으며, 5-HMF와 furfural은 활성탄에 의해 거의 모두 제거되었고, 아세트산은 음이온교환수지를 사용하는 것이 가장 효율적이었다. 활성탄과 이온교환수지는 다스 간의 당손실을 일으켰다. 무독화 방법은 당화액에 포함되어 있는 저해물질의 조성을 고려하여 결정되어야 한다.

감 사

본 연구는 지식경제부 에너지 혁신 프로그램 (ETI)의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 7월 17일, 게재승인 : 2009년 9월 25일

REFERENCES

- Berlin, A., V. Maximenko, N. Gilkes, and J. Saddler (2007) Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 287-296.
- Torget, R. W., J. S. Kim, and Y. Y. Lee (2000) Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fractionation kinetics of hardwood carbohydrates. 1. cellulose hydrolysis. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39: 2817-2825.
- Almeida, J. R., T. Modig, A. Petersson, B. Hahn-Hägerdal, G. Liden, and M. F. Gorwa-Grauslund (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82: 340-349.
- Klinke, H. B., A. B. Thomsen, and B. K. Ahring (2004) Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 10-26.
- Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I : inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74: 17-24.
- Banerjee, N., R. Bhatnagar, and L. Viswanathan (1981) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 226-228.
- Zaldivar, M. and L. O. Ingram (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 203-210.
- Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh, and J. A. M. de Bont (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* 12: 409-415.
- Ezeji, T., N. Qureshi, and H. P. Blaschek (2007) Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 97: 1460-1469.
- Miyafuji, H., H. Danner, M. Neureiter, C. Thomasser, J. Bvochora, O. Szolar, and R. Braun, (2003) Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 396-400.
- Nilvebrant, N., A. Reimann, S. Larsson, and L. Jönsson (2001) Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 91-93: 35-49.
- Jönsson, L. J., E. Palmqvist, N. O. Nilvebrant, and B. Hahn-Hägerdal (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 691-697.
- Cho, D. H., J. L. Yun, Y. Um, B. I. Sang, and Y. H. Kim (2009) Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83: 1035-1043.
- Kim, H. S., D. H. Cho, and Y. H. Kim (2008) In the presence of organic solvent stability of CiP (*Corprinus cenerius* peroxidase). *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 340-344.
- Caza, N., J. K. Bewtra, N. Biswas, and K. E. Taylor (1999) Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase. *Water Res.* 33: 3012-3018.
- Ward, G., Y. Hadar, and C. G. Dosoretz (2003) Lignin peroxidase-catalyzed polymerization and detoxification of toxic halogenated phenols. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78: 1239-1245.
- Carvalho, F., L. C. Duarte, S. Lopes, J. C. Paraj, H. Pereira, and F. M. Girio (2005) Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1941. *Process Biochem.* 40: 1215-1223.
- Larsson, S., A. Reimann, N. O. Nilvebrant, and L. Jönsson (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77: 91-103.