

바이오매스 유래의 저해물질이 에탄올 생산에 미치는 영향

이명구 · 조대행 · 김용환 · 이진원¹ · 이종호² · 김승욱² · 조재훈³ · 이도훈³ · 김상용³ · 박철환*

광운대학교 화학공학과, ¹서강대학교 화공생명공학과, ²고려대학교 화공생명공학과, ³한국생산기술연구원 그린공정연구부

Effect of Biomass-derived Inhibitors on Ethanol Production

Myunggu Lee, Dae Haeng Cho, Yong Hwan Kim, Jinwon Lee¹, Jong Ho Lee²,
Seung Wook Kim², Jaehoon Cho³, Dohoon Lee³, Sangyong Kim³, and Chulhwan Park*

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

¹Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

²Department of Chemical and Biological Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

³Green Process R&D Department, Korea Institute of Industrial Technology (KITECH), ChonAn 330-825, Korea

Abstract The process for ethanol production requires lignocellulosic biomass to be hydrolyzed to generate monomeric sugars for the fermentation. During hydrolysis step, a monomeric sugars and a broad range of inhibitory compounds (furan derivatives, weak acids, phenolics) are formed and released. In this study, we investigated the effects of inhibitory compounds on the fermentative performance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 and *Pichia stipitis* KCCM 12009 in ethanol production, two yeast strains were fermented in the synthetic medium including six inhibitory compounds such as 5-hydroxymethylfurfura (5-HMF), furfural, acetic acid, syringaldehyde, vanillic acid and syringic acid. Ethanol of over 40 g/L was produced by two yeast strains in the absence of inhibitory compounds, respectively. Most inhibitory compounds except acetic acid had a little effect on the ethanol production, but acetic acid showed high inhibition effect on the cell growth and ethanol production.

Keywords: bioethanol, lignocellulosic biomass, inhibitor, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*

서 론

전 세계적으로 지구온난화 방지를 위해 화석연료의 대체 물질로서 바이오연료 (biofuel)로의 관심이 증대되고 있는 실정이다. 바이오연료 중 바이오에탄올 (bioethanol)은 전분 (starch)계 또는 목질 (lignocellulose)계 바이오매스로부터 생산되어질 수 있으며, 원료물질로 빠른 성장 주기를 가진 식물을 사용할 수 있는 재생에너지로서 화석연료보다 공해 배출이 낮으며 현재 화석연료 시장의 대부분의 인프라를 활용할 수 있는 장점을 지니고 있다 [1]. 전분 (사탕수수 (브라질), 옥수수 (미국))계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산기술은 상용화 수준으로 빠른 기술개발을 이룩하였으나,

원재료의 지역적 한정성과 가격이 비싸다는 문제점을 가진다. 그러나 목질 (침엽수, 활엽수, 곡물줄기)계 바이오매스는 70% 이상의 당질 (cellulose and hemicellulose)을 보유하고 있으며 지역적 한정성도 적은 값싼 원재료이나 (Table 1), 생물학적 바이오에탄올 생산에 필요한 당을 얻기 위해서는 전처리 과정인 목질계의 가수분해 (lignocellulose hydrolysis)가 요구된다. 전처리를 통한 가수분해액 속에는 녹지 않은 섬유질 (cellulose-rich fraction)과 녹아 있는 당류와 분해산물 등이 포함되어 있다. 분해산물로 유기산 (organic acid) 계열의 acetate 및 약산과 퓨란 (furan) 계열의 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural, 그리고 페놀 (phenol) 계열인 vanillin, syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid 등이 발생하게 된다 [2-8]. 이러한 분해산물들은 바이오에탄올을 생산하는 균주의 대사과정 및 발효시 균주 자체에 영향을 미쳐 바이오에탄올 생산에 저해를 주게 된다 [8,9]. 현재 선진국의 연구자들은 이를 극복하기 위해 새로운 전처리공정, 균주개량 및

*Corresponding author

Tel: +82-2-940-5173, Fax: +82-2-912-5173

e-mail: chpark@kw.ac.kr

Table 1. Composition of lignocellulosic biomass and derived-inhibitors by lignocellulose hydrate

Three main type of lignocellulosic biomass Composition (%)			Derived-inhibitors by lignocellulosic hydrate Concentration (g/L) of compound			
Cellulose	Total	24-53	Levulinic acid			
	Softwood	41-50	0.9 ^a -2.6 ^b			
	Hardwood	39-53	-		HMF	Formic acid
	Herbaceous plant	24-50	-		2.0 ^b -5.9 ^a	1.6 ^b -3.1 ^a
Hemi-cellulose	Total	11-38	Furfural	Acetic acid	-	-
	Softwood	11-33	0.5 ^a -1.0 ^b	2.4 ^a	0.06 ^f -0.6 ^e	1.4 ^{e,d}
	Hardwood	19-36	-	-		
	Herbaceous plant	12-38	1.9 ^d	1.6 ^d -4.4 ^e		
Lignin	Total	6-30	Total phenolics	Syringaldehyde	Vanillic acid	Syringic acid
	Softwood	19-30	3.1 ^b -3.7 ^a	0.017 ^a	0.017 ^b -0.034 ^a	-
	Hardwood	17-24	2.5 ^c	-	-	-
	Herbaceous plant	6-29	0.7 ^d -4.5 ^e	0.024 ^a	0.067 ^d	0.022 ^d

Biomass source and pretreatment employed :

^a upper values; two-step dilute acid spruce (*Picea abies*) [2]

^b lower values; one-step dilute acid spruce [3]

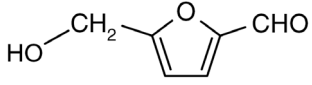
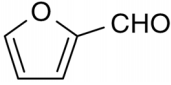
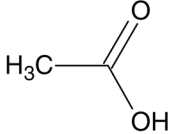
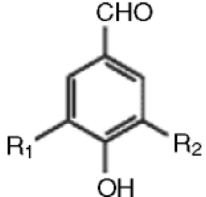
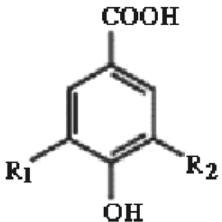
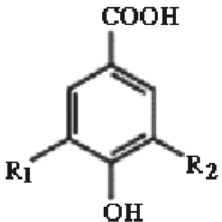
^c dilute acid willow (*Salix caprea*) [4]

^d wet oxidation wheat straw (*Triticum aestivum* L.) [5]

^e steam pretreatment sugar cane bagasse [6]

^f steam pretreatment corn stover [7]

Table 2. Inhibition mechanism by lignocellulosic inhibitors on the yeast cell

Group of compounds		Main inhibition mechanism
Furans		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Inhibition of ADH (alcohol dehydrogenase), (PDH) pyruvate dehydrogenase and ALDH (aldehyde dehydrogenase) ◦ Inhibition of glycolysis (either enzyme and/or cofactors)
		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Same as HMF ◦ Cell membrane damages
Organic acids		<ul style="list-style-type: none"> ◦ ATP depletion ◦ Toxic anion accumulation ◦ Inhibition of aromatic amino acids uptake
Phenols		<ul style="list-style-type: none"> ◦ Uncoupling, generation of reactive O₂ species ◦ Membrane damage
		
		

개발된 균주에 대한 분해산물의 저해영향에 대한 다양한 연구가 활발히 진행 중에 있다 [10-12].

본 연구에서는 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올의 경제적 생산을 위한 기초 연구로서 분해산물의 잔류 농도에 따른 에탄올 발효균주의 내성 및 저해제가 미치는 영향을 평가하고자 6탄당 (glucose)을 탄소원으로 한 합성배지에 저해물질인 유기산 (organic acid) 계열의 acetate와 퓨란 (furan) 계열의 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), furfural, 그리고 페놀 (phenol) 계열인 syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid 등의 저해물질이 존재시, *Saccharomyces cerevisiae* K35와 *Pichia stipitis* KCCM 12009를 이용한 발효공정에서 두 균주의 성장과 에탄올 생산에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며, 이를 통하여 전처리 공정시 고려되어야 할 분해산물의 적정 처리 농도를 파악함으로써 경제적인 목질계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에 기초자료를 제공하고자 하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

본 연구에서는 에탄올 발효 및 저해영향 파악을 위한 균주로서 *S. cerevisiae* K35 및 *P. KCCM 12009*가 사용되었다. YM broth, yeast extract, peptone 등의 배지는 Difco (Detroit, MI, USA)에서 구입하였다. Acetic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural, syringaldehyde는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, vanillic acid는 Alfa (Shore Road, Heysham, Lancs), 그리고 syringic acid는 Acros (New Jersey, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약들은 experimental grade 또는 그 이상의 순도를 갖는 시약을 이용하였다.

실험방법

S. cerevisiae K35와 *P. stipitis* KCCM 12009은 YM broth에서 각각 18시간과 36시간 동안 30°C, 200 rpm 조건하에서 배양하여 균체량 (OD₆₀₀)이 약 10-14의 값을 갖도록 종균 배양 (seed culture) 후 glucose 100 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, K₂HPO₄ 1 g/L, MgSO₄ 1 g/L로 구성된 주배지에 균주를 5% (v/v)로 접종하고, 30°C, 200 rpm 조건에서 단계적으로 변화된 농도의 저해제를 공급하여 48시간 동안 배양하였으며, 초기 pH는 조절하지 않고 배양하였다. 이때 주입된 저해제의 양은 furfural, 5-hydroxymethylfurfural, syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid는 1 g/L와 2 g/L 그리고 acetate는 5 g/L와 10 g/L의 농도로 하였다.

균체량, 에탄올 (ethanol)의 농도 및 글루코오스 (glucose)의 농도 측정

배양액에서 채취한 샘플은 분광광도계 (Shimadzu UV-1800,

Japan)를 사용하여 600 nm에서 균체량을 측정하였다. 에탄올 (ethanol) 및 글루코오스 (glucose)의 농도를 측정하기 위해 배양액 5 mL을 취하고 10,000 G에서 15분 동안 원심분리기를 이용하여 균체를 침강시킨 후 상등액을 0.20 µM의 필터 (Advantec DISMIC 13JP PTFE 0.20 µM, Japan)로 필터링한 후 HPLC 분석용 샘플을 준비하였다. HPLC는 refractive index detector가 탑재된 Agilent 1200 series 모델을 이용하였으며, 컬럼 (column)은 Biorad사의 Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm)을 사용하였다. 이때, 컬럼의 온도는 45°C였으며, 이동상 (mobile phase)은 5 mmol H₂SO₄였으며, 유량은 0.6 mL/min로 하였다.

결과 및 고찰

저해물질이 존재하지 않는 경우의 발효 경향

저해물질이 첨가되지 않은 *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009의 발효 (reference fermentation)시, 24시간 내에 100 g/L의 glucose를 모두 소비했으며, 균체량 (cell growth)의 경우, 24시간 배양 후의 OD₆₀₀ 값은 각각 약 15와 12, 48시간 배양 후에는 각각 약 16과 20의 값을 보였다. *S. cerevisiae* K35의 균체량 패턴은 glucose의 소비 추이와 뚜렷한 반대 경향을 보였으며 24시간에 균체량이 최대를 나타내었고 이후 감속기에 접어드는 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 48시간까지 지속적인 대수기 상태에 있었다. 세포 성장의 차이가 있음에도 에탄올 생산 패턴은 24시간에 모두 40 g/L 이상의 농도를 보였으며, 이후 큰 변화가 없었다 (Fig. 1). 이후 기술된 내용에서는 농도별로 저해제가 첨가된 실험을 통하여 *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009가 일부 세포 성장에 대한 내용과 함께 에탄올 생산에 미치는 영향을 중심으로 결과를 나타내었다.

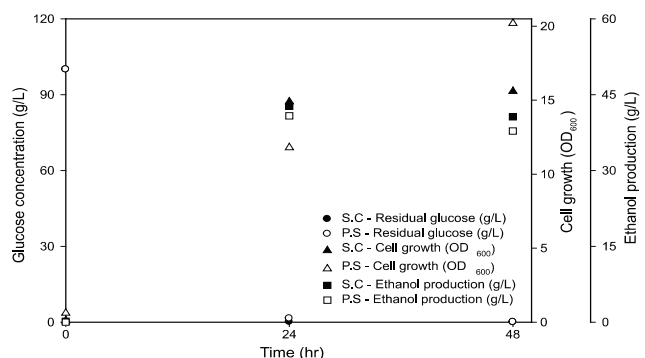


Fig. 1. Cell growth and ethanol production without inhibitors by *S. cerevisiae* K35 (S.C) and *P. stipitis* KCCM 12009 (P.S).

퓨란 (5-HMF, furfural)류가 존재하는 경우의 발효 경향

퓨란류인 5-HMF와 furfural은 목질계의 가수분해시

cellulose와 hemicellulose로부터 생성된 6탄당 (hexoses)과 5탄당 (pentoses)들의 탈수 (dehydration)반응에 의해서 형성되며 [13,14], 생성량은 목질계의 수종 및 전처리 과정에 따라 달라질 수 있으나 5-HMF의 경우 0.06-5.9 g/L, furfural은 0.5-1.9 g/L가 존재한다 [15,16]. 5-HMF는 효소를 이용한 바이오에탄올 생산시 glycolytic enzymes 저해 및 pyruvate에서 ethanol로 전환시 사용될 NAD⁺가 furfural을 furfuryl alcohol로 전환하기 위해 경쟁적으로 사용함으로써 glucose의 이용 감소 및 에탄올 생산 속도 저하를 유발시키며, furfural의 경우에는 유사한 기작을 보이며, 부가적으로 세포벽 (cell membrane)의 손상을 준다고 보고되었다 [17,18].

S. cerevisiae K35와 *P. stipitis* KCCM 12009를 이용한 에탄올 발효에 있어 퓨란류인 5-HMF와 furfural이 미치는 영향을 확인하였다 (Fig. 2, Fig. 3). 배양액에 5-HMF가 1 g/L 및 2 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 경과 후 각각 18.9% 및 32.3%의 상대적 에탄올 생산량 (relative ethanol productivity, %)을 보였고, 48시간 경과 후 100.7% 및 94.5%의 상대적 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 경과 후 각각 93.6% 및 84.3%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 경과 후에는 99.7% 및 101.0%의 상대적 에탄올 생산량을 보였다. 배양액에 furfural이 1 g/L 및 2 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 경과 후 11.0% 및 107.0%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 경과 후 102.7% 및 100.9%의 상대적 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 경과 후 각각 87.9% 및 71.3%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 경과 후 102.6% 및 104.2%의 상대적 에탄올 생산량을 보였다. *S. cerevisiae* K35는 5-HMF 존재시 세포성장에 저해를 받아 세포성장속도가 감소되었으며, 이와 함께 에탄올 생산량이 감소하는 경향을 보인 반면, furfural 존재시 세포성장의 저해는 받았으나 에탄올 생산에 큰 영향을 미치지 않았다. 반면, *P. stipitis* KCCM 12009의 경우, 5-HMF와 furfural의 저해영향은 *S. cerevisiae* K35에 비해 상대적으로 적었으나 그 값의 차이는 크지 않았다.

Delgenes 등 [19]은 glucose가 주기질인 합성배지에 *S. cerevisiae* CBS 1200 균주에 5-HMF가 8 mM 및 24 mM 존재시 균생장에 급격한 저해를 보고하였으며, 상대적 에탄올 생산량은 각각 35% 및 15%로 보고하였으며, *Z. mobilis* ATCC 10988에 대해서는 5-HMF가 24 mM 및 40 mM 존재에도 균생장에 저해를 받았으며, 상대적 에탄올 생산량은 각각 87% 및 47%로 나타났으며, furfural의 경우 *S. cerevisiae* CBS 1200 균주에 furfural이 10 mM 및 21 mM 존재시 균생장에 급격한 저해를 받았고, 상대적 에탄올 생산량은 각각 20% 및 10%를 보였으며, *Z. mobilis* ATCC 10988에 대해서는 furfural이 10 mM 및 21 mM 존재시 균생장에 저해를 받았으며, 상대적 에탄올 생산량은 각각 82% 및 56%로 저해물질이 존재하지 않는 경우에 비해 저해영향이 있음을 보고하였다.

유기산 (acetate)이 존재하는 경우의 발효 경향

유기산인 acetate는 헤미셀룰로스 (hemicellulose)의 탈아세틸화 (deacetylation)반응에 의해서 형성되며 [13,14], 생성량은 목질계의 수종 및 전처리 과정에 따라 달라질 수 있으나 1.6-4.4 g/L가 존재하며 [15,16], acetate는 원형질막 (plasma membrane)을 연속적으로 선택적 투과 후 원형질 내에서 음이온 (lypophobic acetate)과 양이온 (proton)으로 분리되어 음이온의 원형질내의 축적을 유발시키고 축적된 음이온은 glycolysis를 방해하여 에탄올 생산을 저해하게 된다. 동시에 원형질 내의 양이온을 세포 밖으로 내보내기 위해 ATP를 소비하여 자체 ATP고갈을 유발시켜 세포의 성장 및 에탄올 생산에 저해를 준다고 보고되었다 [20].

S. cerevisiae K35와 *P. stipitis* KCCM 12009를 이용한 에탄올 발효에 있어 acetate가 미치는 영향을 확인하였다 (Fig. 2, Fig. 3). 배양액에 acetate가 5 g/L 및 10 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 경과 후 각각 13.4% 및 2.1%의 상대적 에탄올 생산량을 보였으며, 48시간 경과 후에는 105.4% 및 0%의 상대적 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 경과 후 각각 0.2% 및 0.2%의 에탄올 생산량을 보였으며, 48시간 경과 후에도 그 값의 변화는 없었다. *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009는 acetate가 5 g/L 및 10 g/L 존재시 동일하게 acetate의 독성으로 인한 급격한 저해영향을 보였으며, *S. cerevisiae* K35의 경우 acetate 5 g/L 존재시 48시간 경과 후 저해영향에서 벗어나 정상적으로 에탄올이 생산되었으며, 그 외 조건에서는 에탄올 생산이 이루어지지 않았다. 이는 유기산으로 인한 저해영향과 함께 pH가 일부 조절된 조건에서의 에탄올 발효 실험이 요구됨과 함께 목질계 바이오매스의 전처리 후 acetate를 제거하는 후처리 공정에 대한 연구의 필요성을 제시하고 있다.

Keating 등 [21]은 glucose가 주기질인 합성배지에 *S. cerevisiae* Y-1528과 Tembec T1 두 균주에 acetate가 0, 5.0, 10.0 및 15.0 g/L 존재시 이론적 상대적 에탄올 생산량에 대한 연구를 통하여 *S. cerevisiae* Y-1528 경우 각각 72.0%, 78.0%, 81.0% 및 60.0%의 상대적 에탄올 생산량을 보고하였으며, Tembec T1에 대해서는 각각 73.0%, 79.0%, 70.0% 및 58.0%의 상대적 에탄올 생산량을 보고하였다. 이는 두 균주에 상대적으로 낮은 농도의 acetate (5-10 g/L) 존재시 에탄올 생산량이 증가하는 경향을 보이다가 높은 농도의 acetate (15 g/L)의 존재시에는 저해를 받음을 확인하였다.

페놀 (syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid)류가 존재하는 경우의 발효 경향

페놀류인 syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid는 리그닌 (lignin)의 붕괴 및 산 가수분해 동안 탄수화물의 분해에 의해서 형성되며, 생성량은 목질계의 수종 및 전처리

과정에 따라 달라질 수 있으나 전체적인 폐놀류는 0.7-4.5 g/L 가 존재하며 각각의 경우 syringaldehyde는 0.017-0.024 g/L, vanillic acid는 0.017-0.067 g/L, syringic acid는 0.022 g/L 가 존재한다 [15,16]. Syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid은 용해도가 낮은 물질로서 목질계 전처리시 미량 발생 하는데 주요기작은 폐놀기에 붙어 있는 메틸그룹이 세포벽에 침투하여 세포벽 손상 및 활성 산소를 발생시켜 짝폴림 (uncoupling) 작용을 유발시켜 미생물의 성장을 저해한다고 알려져 있다 [5,19].

S. cerevisiae K35와 *P. stipitis* KCCM 12009를 이용한 에탄올 발효에 있어 폐놀류인 syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid가 미치는 영향을 확인하였다 (Fig. 2, Fig. 3). 먼저, 배양액에 syringaldehyde가 1 g/L 및 2 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 경과 후 99.5% 및 98.5%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 경과 후 99.5% 및 97.7%의 상대적 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 경과 후 각각 94.8% 및 5.6%의 상대적 에탄올 생산량을 보였고, 48시간 경과 후 102.3% 및 97.6%의 상대적 에탄올 생산량을 보였다. 두 번째로, 배양액에 vanillic acid가 1 g/L 및 2 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 경과 후 98.8% 및 107.7%의 상대적 에탄올 생산량을 보였고, 48시간 경과 후에는 107.6% 및 100.4%의 상대적 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 경과 후 85.5% 및 0.4%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 경과 후 각각 105.5% 및 106.3%의 상대적 에탄올 생산량을 보였다. 마지막으로 배양액에 syringic acid가 1 g/L 및 2 g/L 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35는 24시간 배양 후 108.4% 및 102.8%의 상대적 에탄올 생산량을 보였으며, *P. stipitis* KCCM 12009는 24시간 배양 후 각각 9.3% 및 87.2%의 상대적 에탄올 생산량을, 48시간 배양 후 100% 및 108.4%의 상대적 에탄올 생산량을 보였다. Syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid가 각각 1-2 g/L 존재시 *S. cerevisiae* K35는 저해물질이 존재하지 않는 발효에 비해 상대적으로 적은 세포성장을 보였으나 에탄올 생산량은 비슷하거나 미량 증가하는 특성을 보였다. 반면, *P. stipitis* KCCM 12009의 경우, *S. cerevisiae* K35의 세포성장과 에탄올 생산시 비슷한 경향을 보였으나, syringaldehyde와 vanillic acid가 2 g/L 존재시에는 24시간에 균생장이 급격히 감소함과 동시에 에탄올 생산량도 감소하였고, 48시간 경과 후 저해물질의 영향에서 벗어나 정상적인 균생장과 에탄올을 생산하는 경향을 나타내었다.

Delgenes 등 [19]은 glucose가 주기질인 합성배지에 *S. cerevisiae* CBS 1200 균주에 syringaldehyde가 1 mM, 4 mM 및 8 mM 존재시 1 mM을 제외한 나머지 조건에서 단계적으로 저해물질의 농도가 높아짐에 따라 균생장에 저해를 받으며 상대적 에탄올 생산량은 각각 74%, 46% 및 33%를 보였다. 또한, *Z. mobilis* ATCC 10988에 대해서는 syringaldehyde 8 mM 존재시 균생장에 저해를 받으며 상대적 에탄올 생산량은 83%로 저해물질이 존재하지 않는

발효에 비해 저해를 받는다고 보고하였다. Ando 등 [22]은 glucose가 주기질인 합성배지에 *S. cerevisiae* Hakken No. 1 균주를 이용하여 vanillic acid 및 syringic acid를 각각 6 mM 및 5.1 mM 존재시 상대적 에탄올 생산량은 98% 및 117%로 저해경향이 미비하거나 에탄올 생산량을 증가시킨다고 보고하였고, Klinke 등 [5]은 glucose가 주기질인 합성배지에 *S. cerevisiae* ATCC 96581 균주를 이용하여 vanillic acid와 syringic acid가 각각 10 mM 존재시 상대적 에탄올 생산량은 102%, 102%로 소량 증가할 수 있음을 보고하였다.

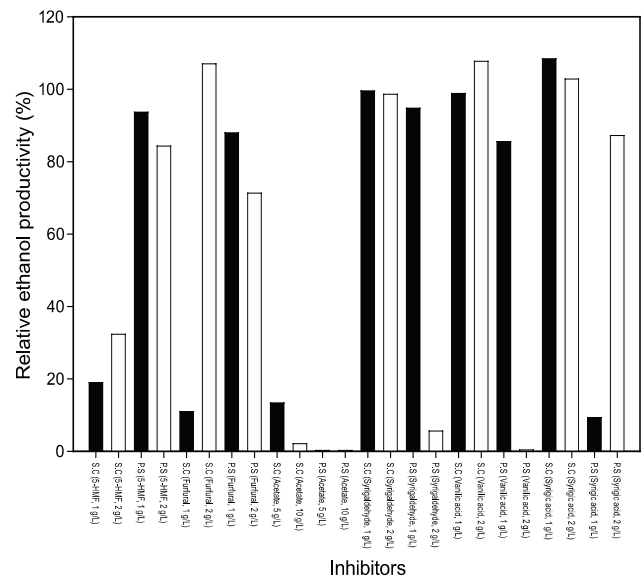


Fig. 2. Relative levels of ethanol production of *S. cerevisiae* K35 (S.C) and *P. stipitis* KCCM 12009 (P.S) in the presence of inhibitors after 24 h.

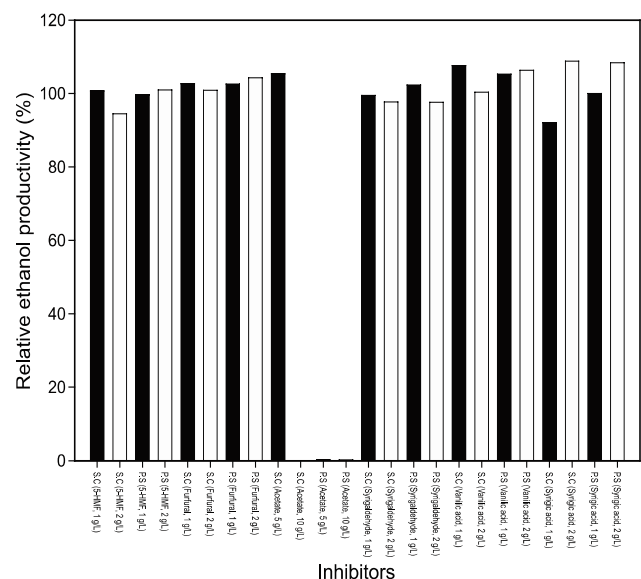


Fig. 3. Relative levels of ethanol production of *S. cerevisiae* K35 (S.C) and *P. stipitis* KCCM 12009 (P.S) in the presence of inhibitors after 48 h.

요 약

목질계 바이오매스 전처리시 발생하는 저해물질로써 퓨란류, 유기산류, 페놀류를 포함한 발효에 있어, *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009가 에탄올 생산에 미치는 영향을 중심으로 연구를 수행하였다. 본 연구에 사용된 두 균주 모두 24시간 내에 100 g/L의 glucose를 모두 소비하였으며, 40 g/L 이상의 에탄올을 생산하였다. 저해물질로 퓨란(5-HMF, furfural)류가 1-2 g/L 존재시, *S. cerevisiae* K35는 furfural에 비해 5-HMF에 의한 저해영향을 높았으며, *P. stipitis* KCCM 12009는 그와 반대의 경향을 보였다. Acetate가 5 g/L 이상 존재하는 경우, *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009 두 균주 모두에 균체량 및 에탄올 생산에 대한 저해정도가 가장 높았다. 또한, 페놀류(syringaldehyde, vanillic acid, syringic acid)가 각각 1-2 g/L 존재시, *S. cerevisiae* K35는 비교적 적은 세포성장 저해영향과 소량 증가하는 에탄올 생산량을 보인 반면, *P. stipitis* KCCM 12009는 전반적으로 *S. cerevisiae* K35의 세포성장과 에탄올 생산에 있어 유사한 경향을 보였으나, syringaldehyde와 vanillic acid가 2 g/L 존재시에는 24시간에 균생장이 급격히 감소함과 동시에 에탄올 생산량도 감소함을 보였고, 48시간 배양 후 저해물질의 영향에서 벗어나 정상적인 세포성장과 에탄올을 생산하는 경향을 보였다. *S. cerevisiae* K35와 *P. stipitis* KCCM 12009에 동일한 농도의 저해물질이 존재시 저해영향의 차이를 보이는 것은 균주 자체의 특성 차이로 인한 저해물질에 대한 민감도를 나타내는 것으로 보인다. 본 연구를 통해 두 균주를 이용한 바이오에탄올 생산시 발생하는 저해물질의 농도별 선택적 특이성을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 목질계 바이오매스 전처리시 발생하는 저해물질의 적정농도를 확인할 수 있었다.

감 사

본 연구는 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업(08-01-013 및 2009-03002-0019-0)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 8월 22일, 게재승인 : 2009년 10월 22일

REFERENCES

1. Wingren, A., M. Galbe, and G. Zacchi (2003) Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Progr.* 19: 1109-1117.
2. Larsson, S., A. Reimann, N. Nilvebrant, and L. J. Jonsson (1999) Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. *Appl. Biochem. Biotech.* 77: 91-103.
3. Nilvebrant, N. O., P. Persson, A. Reimann, F. D. Sousa, L. Gorton, and L. J. Jonsson (2003) Limits for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulose hydrolysates. *Appl. Biochem. Biotech.* 105-108: 615-628.
4. Jonsson, L. J., E. Palmqvist, N. O. Nilvebrant, and B. Hahn-Hagerdal (1998) Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl. Microbiol. Biot.* 49: 691-697.
5. Klinke, H. B., L. Olsson, A. B. Thomsen, and B. K. Ahring (2003) Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 81: 738-747.
6. Martin, C., F. Wahlbom, M. Galbe, L. J. Jonsson, and B. Hahn-Hagerdal (2001) Preparation of sugarcane bagasse hydrolysates for alcoholic fermentation by yeasts, *6th Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components*. pp. 361-367. Brazil.
7. Ohgren, K., A. Rudolf, M. Galbe, and G. Zacchi (2006) Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass Bioenerg.* 30: 863-869.
8. Almeida, J. R. M., T. Modig, A. Petersson, B. Hahn-Hagerdal, G. Liden, and M. F. Gorwa-Grauslund (2007) Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Chem. Technol. Biot.* 82: 340-349.
9. Pitkanen, J. P., E. Rintala, A. Aristidou, L. Ruohonen, and M. Penttila (2005) Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. *Appl. Microbiol. Biot.* 67: 827-837.
10. Sommer, P. (1998) *Conversion of Hemicellulose and D-xylose into Ethanol by the Use of Thermophilic Anaerobic Bacteria*. Ph. D. Dissertation. Denmark Technical University, Copenhagen, Denmark.
11. Klinke, H. B., A. B. Thomsen, and B. K. Ahring (2001) Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on growth and ethanol production by *Thermoanaerobacter mathranii*. *Appl. Microbiol. Biot.* 57: 631-638.
12. Zaldivar, J. and L. O. Ingram (1999) Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnol. Bioeng.* 66: 203-210.
13. Dunlop, A. P. (1948) Furfural formation and behavior. *Ind. Eng. Chem. Res.* 40: 204-209.
14. Ulbricht, R. J., S. J. Northup, and J. A. Thomas (1984)

- A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fund. Appl. Toxicol.* 4: 843-853.
15. Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, and N-O. Nilvebrant (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Tech.* 24: 151-159.
 16. Eklund, T. (1983) The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 383-389.
 17. Banerjee, N., R. Bhatnagar, and L. Viswanathan (1981) Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European J. Appl. Microbiol. Biotech.* 11: 226-228.
 18. Palmqvist, E., J. Almeida, and B. Hahn-Hagerdal (1999) Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 62: 447-454.
 19. 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 Microb. Tech.* 19: 220-225.
 20. Taherzadeh, M. J., L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Liden (2000) Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biot.* 53: 701-708.
 21. Keating, J. D., C. Panganiban, and S. D. Mansfield (2006) Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol. Bioeng.* 93: 1196-1206.
 22. Ando, S., I. Arai, K. Kiyoto, and S. Hanai (1986) Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Tech.* 64: 567-570.