

*Pichia stipitis*를 이용한 리그노셀룰로스계 바이오매스 기반의 바이오에탄올 생산

배양원 · 성필제 · 조대행 · 신수정¹ · 김승욱² · 한성욱³ · 김용환* · 박철환*

광운대학교 화학공학과, ¹충북대학교 목재종이과학과, ²고려대학교 화공생명공학과, ³고려대학교 생명과학부

Bioethanol Production Based on Lignocellulosic Biomass with *Pichia stipitis*

Yangwon Bae, Pil-Je Seong, Dae Haeng Cho, Soo-Jeong Shin¹, Seung Wook Kim²,
Sung Ok Han³, Yong Hwan Kim*, and Chulhwan Park*

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

¹Department of Wood and Paper Science, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea

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

³School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract We investigated the effect of inhibitory compounds derived lignocellulosic hydrolysates on cell growth, sugar consumption and ethanol productivity, and also we intended to identify the potential for ethanol production based on lignocellulosic hydrolysates. Cell growth and ethanol production in the presence of acetate were initiated after 12 hr. Furans showed a longer lag time and phenolics showed a significant effect on strain and ethanol production in comparison to other model compounds. In the case of lignocellulosic hydrolysates, the acetate strongly affected cell growth and ethanol production.

Keywords: bioethanol, lignocellulose, hydrolysate, inhibitory compound, *Pichia stipitis*

서 론

지속적인 산업화에 따른 화석연료의 고갈이 대두되면서 대체에너지의 하나인 바이오에탄올에 대한 관심이 세계적으로 증가하고 있다. 바이오에탄올은 브라질, 미국을 중심으로 발전하여 상용화 단계에 이르렀으나 식용작물인 사탕수수나 옥수수를 사용하는 점이 지적되어 왔다 [1]. 리그노셀룰로스계 바이오매스를 이용한 에탄올 생산은 비식용작물인 목질계 및 초질계 자원을 원료로 사용하는 장점이 있으며, 건축 및 농업으로부터 발생하는 폐자원을 활용하여 운송용 에너지로 전환시킬 수 있다. 리그노셀룰로스계 바이오매스로부터 에탄올을 생산하기 위해서는 리그노셀룰로스의

구성성분인 셀룰로스, 헤미셀룰로스를 가수분해하여 당화액을 제조하고, 이러한 당화액을 발효시켜 에탄올을 생산한다. 이러한 리그노셀룰로스를 이용한 바이오에탄올의 생산에서, 경제적인 가수분해 방법은 황산을 이용한 열처리 방법이다 [2-4]. 황산에 의한 열처리 과정에서 acetate, formic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), syringaldehyde, coumaric acid 등의 물질들이 발생하며 [5-10], 이러한 물질들은 에탄올 생산 균주의 균체성장, 대사과정에 저해를 초래하여 결국 바이오에탄올 생산에 영향을 미친다 [2,5-11,14-16]. 에탄올 생산균주에는 대장균, 효모, 곰팡이 등이 활용될 수 있으며 [2,4-13], 리그노셀룰로스계 바이오매스로부터 유래되는 저해물질에 강한 내성을 가진 효모를 주로 사용한다 [14]. 리그노셀룰로스계 바이오매스를 가수분해하면 글루코스, 갈락토스, 만노스 등의 6탄당과 자일로스, 아라비노스 등의 5탄당을 얻는다 [2]. 에탄올 생산균주인 *Saccharomyces cerevisiae* 는 6탄당을 탄소원으로 사용하는 반면, *Pichia stipitis* 는 5탄

*Corresponding author

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

e-mail: metalkim@kw.ac.kr (Y.H. Kim), chpark@kw.ac.kr (C. Park)

당과 6탄당을 모두 이용하여 에탄올 생산이 가능하다 [11]. Cho 등 [17]은 acetate 농도의 증가로 인한 에탄올 발효에 문제점을 지적하였다. 왕겨는 매년 128,000 toe의 가용 자원량이 비료 및 퇴비로 활용되고 있는 실정이며, 이를 활용하기 위하여 가수분해물의 원료로 왕겨를 사용하였으며, 고성장 수종으로 주목받고 있는 변종 포플러나무 가수분해물의 원료로 선정하였다.

본 연구는 리그노셀룰로오스계 바이오매스를 이용한 바이오 에탄올의 경제적 생산을 위한 기초 연구로서 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 유래되는 저해물질의 종류 및 농도에 따른 *P. stipitis*의 균체성장 및 에탄올 생산에 미치는 영향을 평가하고 실제 가수분해물 (왕겨 가수분해물, 전처리된 왕겨 가수분해물, 변종 포플러나무 가수분해물, 전처리된 변종 포플러나무 가수분해물)의 에탄올 생산 가능성을 확인하고자 하였다. 글루코스를 탄소원으로 이용한 합성배지에 유기산 (organic acids) 계열의 acetate와 퓨란 (furans) 계열의 5-HMF, furfural, 그리고 페놀 (phenolics) 계열인 syringaldehyde, coumaric acid를 농도별로 첨가하여 그 영향을 조사하였다.

실험재료 및 방법

균주 및 시약

실험을 위한 균주로 *Pichia stipitis* KCCM 12009를 사용하였다. 종균배양은 YM배지를 사용하였으며, 반응은 진탕 배양기 30°C, 200 rpm 조건하에서 28-36시간 동안 배양하였으며, 건조중량 (dry cell weight, DCW)이 3.1-3.9 g/L 사이의 값을 갖도록 배양하였다. YM배지, yeast extract, peptone은 Difco (Detroit, MI, USA)사의 제품을 구입하였으며, acetate, furfural, coumaric acid, syringaldehyde, 5-HMF (5-hydroxymethylfurfural, HMF)는 Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA)사의 제품을 사용하였다. 이외의 모든 시약들은 experimental grade 또는 그 이상의 순도를 갖는 시약을 구입하여 사용하였다.

가수분해물 및 전처리 (deacetylated) 가수분해물의 제조 방법

가수분해물의 제조를 위하여 잡종 포플러나무 (hybrid poplar), 왕겨 (rice husk)를 칩핑 (chipping)하고 1주일 동안 건조시킨 후 윌레이 밀 (Wiley mill)을 사용하여 20-40 메쉬 (mesh) 또는 381-864 μm 의 크기로 정제하여 준비하였다. 정제된 목재 파편 2 g당 3.2 mL의 24 N H_2SO_4 에 30°C 조건에서 1시간 동안 반응시킨 후 12.8 mL의 증류수를 첨가하여 105°C 조건에서 1시간 동안 반응시켰다. 냉욕조 (ice bath)를 사용하여 냉각시키고 1G2필터 (Iwaki, Japan)로 필터링하여 가수분해물을 얻었다. 가수분해물은 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 사용하여 pH를 6.0-8.0 사이의 값을 갖도록 중화시켜 준비하였다.

전처리 (deacetylated) 가수분해물은 가수분해물을 제조하기 전에 전처리 과정을 수행하였다. 20-40 메쉬로 정제된 목재 파편 5 g을 50 mL의 NaOH에 반응시켰다. NaOH의 농도 0%, 0.25%, 0.5%, 0.75%, 반응온도 45°C, 60°C, 75°C, 90°C, 반응시간은 0, 30, 60, 90분으로 설정하여 30분 간격으로 NaOH의 농도와 반응온도를 증가시켜 목재 파편의 스웰링 (swelling)을 유도하였다.

실험방법

본 실험에 사용된 배지는 글루코스 100 g/L, yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, MgSO_4 1 g/L로 구성된 복합배지이며, 모델화합물이 *P. stipitis*에 미치는 영향을 파악하기 위해 상기의 복합배지에 모델화합물을 농도별로 첨가하여 저해영향을 파악하였다. 모델화합물의 종류 및 농도 범위는 유기산 (acetate) 1-10 g/L, 퓨란 및 페놀계열 1-5 g/L로 설정하였다. 가수분해물의 에탄올 발효를 위하여 각각의 가수분해물에 yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, MgSO_4 1 g/L, K_2HPO_4 1 g/L를 첨가하여 에탄올 생산 배지로 사용하였다. 1 N H_2SO_4 와 1 N NaOH를 이용하여 pH를 6.0으로 하였다. 250 mL 삼각플라스크에 반응 부피는 80 mL로 하였으며, 실험에 사용된 모든 배지는 접종하기 전에 멸균하여 준비하고 균주를 종균배양하여 5% (v/v)로 접종하였다. 반응은 진탕배양기를 사용하였으며, 30°C, 200 rpm 조건으로 72시간 동안 반응시켰다.

균체성장, 당 소모량 및 에탄올 생산량 측정

균체성장 측정을 위하여 배양액에서 0.05 mL을 채취하고 1.5 mL 튜브에 1/20배 희석하여 준비된 샘플을 분광광도계 (Shimadzu UV-1800, Japan)를 사용하여 600 nm에서 균체량을 측정하였다. 에탄올 및 글루코스의 농도를 측정하기 위해 배양액 1 mL을 취하고 5,000 G에서 15분 동안 원심분리기를 이용하여 균체를 침전시킨 후 상등액을 필터 (Advantec DISMIC 13JP PTFE 0.20 μm , Japan)로 필터링하여 HPLC 분석용 샘플을 준비하였다. HPLC는 refractive index detector가 탑재된 Agilent 1200 series 모델을 이용하였으며, 컬럼은 Biorad사의 Aminex HPX-87H column (300 \times 7.8 mm)을 사용하였다. 이때, 컬럼의 온도는 45°C였으며, 이동상 (mobile phase)은 5 mmol H_2SO_4 를 사용하였으며, 유량은 분당 0.6 mL로 설정하였다.

결과 및 고찰

복합배지에 모델화합물이 존재하는 경우의 저해영향

복합배지에 모델화합물 (acetate, furfural, 5-HMF, coumaric acid, syringaldehyde)을 첨가하여 *Pichia stipitis* KCCM 12009

의 균체성장 및 에탄올 생산 경향을 조사하였다. 대조군 설정을 위하여 저해물질이 포함되지 않은 복합 배지를 이용한 경우, 최대 균체량 (OD_{600})은 36시간에서 17.3 g/L을 보였으며, 최대 에탄올 생산량은 72시간에서 41.14 g/L였다. 에탄올 생산 수율은 0.45 g (ethanol)/g (glucose)으로 이론수율의 87.6%를 보였다.

배지에 유기산이 존재하는 경우, 유기산의 농도에 비례하여 균체의 성장, 당 소모 및 에탄올 생산능력이 감소하였다. 유기산 (acetate) 1 g/L의 경우가 가장 적은 저해영향을 보였으며, 유기산 10 g/L의 경우가 가장 큰 저해영향을 받았다. 에탄올 생산 수율은 0.46-0.39 g/g으로, 에탄올 생산 수율에 미치는 영향은 적은 반면, 에탄올 생산량은 강한 저해를 보였다. 유기산을 1-10 g/L 첨가한 배지의 균체성장은 36시간에서 대조군 대비 72.5-23.9%의 성장률을 보였다. 유기산 농도가 증가함에 따라 글루코스 소모속도가 감소하였으며, 유기산을 첨가한 모든 배지 조건에서 72시간 내에 글루코스를 모두 소모하지 못하였다. 이러한 영향으로 에탄올 생산량 및 생산수율이 감소하였다. 72시간에서 에탄올 생산율은 대조군 대비 88.2-27.46%였으며, 배지내 유기산의 농도가 증가함에 따라 에탄올 생산량이 감소함을 확인하였다. 글루코스 소모량 대비 에탄올 생산량 수율은 각각 0.43-0.39 g/g으로, 배지에 유기산을 첨가한 영향으로 인하여 에탄올 생산 수율이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

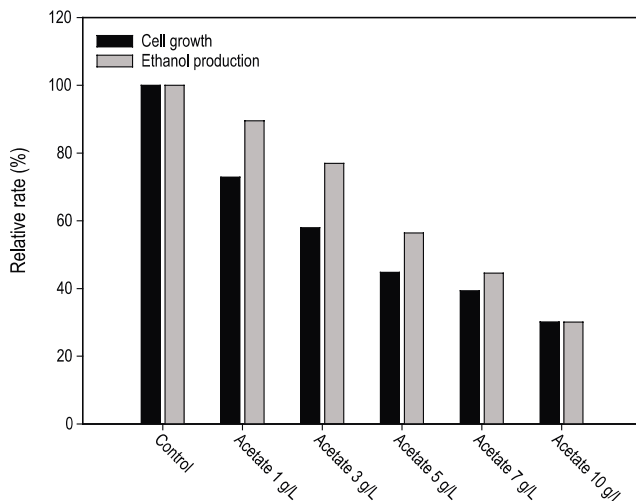


Fig. 1. Relative cell growth (36 h) and relative ethanol production (72 h) by *P. stipitis* KCCM 12009 in various concentration of acetate.

Russell [19]은 acetate와 같은 산성 물질이 미생물 배양에 존재하는 경우, 산의 언커플러 (uncoupler) 역할에 대하여 보고하였다. 카복실기 (carboxyl group)를 포함하는 acetate와 같은 물질들은 일반적으로 친유성 (lipophilic) 물질이며, 세포막을 통과할 수 있는 물질들이다. 이러한 물질들의 양성자 (H^+)는 세포막에 있는 ATPase에 의하여 세포막 밖으로 배출된다. 배출되고 남은 음이온 ($XCOO^-$)들은 소수성 (lipophobic)

물질로, 세포막을 통과할 수 없으며, 세포 내 pH가 알칼리일 경우, 음이온이 축적될 수 있다. ATP를 ADP로 전환시키는 과정에서 발생하는 양성자를 이용하여 세포 내에 형성된 음이온들을 세포 밖으로 배출시키며 이러한 과정에서 ATP의 손실이 발생한다. 일반적으로 언커플러는 산화적 인산화 반응 해제제 (uncoupling agent)라 불리며, 산화적 인산화 반응에 있어서 산소의 흡수를 저해함으로써 인산의 산화를 억제하는 화합물이다. 언커플러가 고농도로 존재하는 경우 산소 호흡에도 저해를 미치지만, 인산화 반응만을 저해하는 낮은 농도의 경우에는 미생물의 산소호흡이 촉진된다. Keating [20] 등은 합성배지에 저농도의 유기산을 첨가하는 경우, 에탄올 생산량이 대조군과 비교하여 상대적으로 증가하는 경향이 있음을 보고한 바 있다.

배지에 푸란계열이 존재하는 경우, furfural 및 5-HMF의 농도가 높아질수록 균체성장의 지연시간이 증가하였으며, 균체성장이 지연됨에 따라 에탄올 생산도 지연되는 현상을 보였다. Furfural 5 g/L를 첨가한 배지에서는 균주가 배지의 독성에 적응하지 못한 반면, 5-HMF 5 g/L를 첨가한 배지에서는 균주가 에탄올을 생산하여, 5-HMF보다 furfural이 *P. stipitis*에 미치는 저해영향이 더 큰 것을 확인할 수 있었다.

푸란계열의 저해에 의한 균체성장의 지연기가 지속됨에 따라 에탄올 생산에 있어서도 지연되는 영향으로 72시간에서의 에탄올 생산량이 감소하였다. Furfural 1-5 g/L가 첨가된 배지의 균체성장은 36시간에서 대조군 대비 103.9-2.5%의 성장률을 보였다. 5-HMF가 1-5 g/L 첨가된 배지의 균체성장은 36시간에서 대조군 대비 108.8-72.7%의 성장률을 보였다. Furfural 1 g/L와 5-HMF 1-2 g/L의 경우 72시간 내에 글루코스를 모두 소모하였으며, 대조군과 비교하여 에탄올 생산 및 수율의 저해영향이 크지 않음을 확인할 수 있었다. 상기의 세 가지 조건에서의 에탄올 생산율은 대조군 대비 101-99.8%였으며, 에탄올 생산 수율은 0.42-0.41 g/g였다. Furfural 3 g/L, 5-HMF 4-5 g/L의 경우 균체량에서 24-36시간의 지연기를 보임에 따라 글루코스 소모에서도 지연현상을 보였으며, 72시간까지도 당을 모두 소모하지 못하였다. 72시간에서의 에탄올 생산율은 대조군 대비 84.8-62%였으며, 에탄올 생산 수율은 0.43-0.42 g/g였다.

Boopthy 등 [15]은 균주가 furfural 및 HMF (5-HMF)에 생체 내 변화를 일으켜 furfural을 furfuryl alcohol로 전환시킨다고 보고하였으며, HMF가 HMF alcohol로 전환될 것이라 추측하였다. UV흡광도 282 nm에서 최대 흡광도를 가지는 HMF와 비교하여 HMF와 관련된 화합물을 UV흡광도 222 nm에서 확인하였다. 미지의 화합물을 분리, 정제하여 NMR (nuclear magnetic resonance)을 이용하여 분석하였으며, 미지의 화합물을 HMF alcohol이라 추측하였다. 또한, Almeida 등 [11]은 Ps-XR (*P. stipitis* xylose reductase)이 5-HMF를 감소시켜, 5-HMF에 의한 저해현상을 완화시켜주는 현상이 있음을 보고하였다.

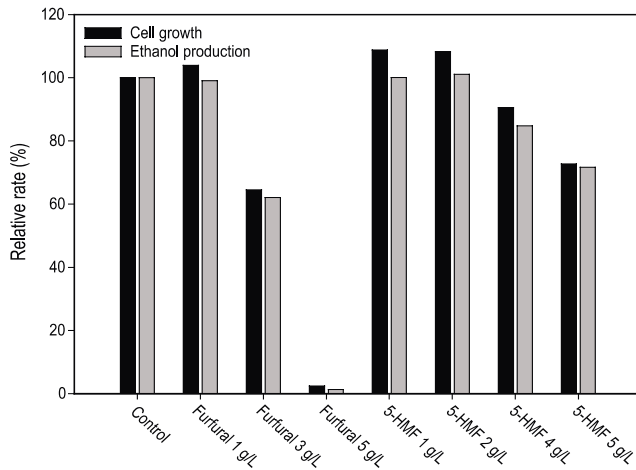


Fig. 2. Relative cell growth (36 h) and relative ethanol production (72 h) by *P. stipitis* KCCM 12009 in various concentration of furfural and 5-HMF.

동일 농도 조건의 유기산 및 퓨란류와 비교하여 페놀의 저해영향이 가장 강하게 나타나는 것으로 확인되었으며, 페놀의 강한 독성으로 인하여 페놀류 3 g/L 이상 첨가된 배지에서 균주가 성장하지 못하였다. 배지에 coumaric acid가 1 g/L 존재하는 경우, 균체성장은 대조군 대비 36.1%였으며, 지연기가 없었다. 에탄올 생산율은 대조군 대비 47%, 에탄올 생산수율은 0.52 g/g였다. Syringaldehyde 1 g/L의 경우, 균체성장은 대조군 대비 56.4%였으며, 6시간의 지연기가 관찰되었다. 에탄올 생산율은 대조군 대비 67.54%였으며, 에탄올 생산수율은 0.43 g/g였다.

페놀류는 주로 리그닌의 기본 구성성분인 페닐-프로판이 분해되는 과정에서 형성되며, 건설용 목재 혹은 가구, 합판재 등의 폐목재에는 코팅 및 접착제로부터 페놀류를 다량 함유하고 있다. 이러한 페놀류는 에탄올 생산 균주의 균체성장 및 에탄올 생산에 강한 저해영향을 보인다. 효모생장에서, 페놀류로 인한 저해 메커니즘에 대하여 완전히 규명된 바는 없으나, 에탄올 생산 균주의 세포막에 영향을 주어 세포막의 주요 기능 (selective barrier, enzyme matrix)에 저해를 주는 것으로 예상되고 있다 [16,18]. 페놀류가 포함된 배지의 에탄올 발효 배양에서 *ortho* 자리에 메톡실 치환기 (methoxyl substituent)를 가지는 수산화페놀 그룹 (phenol hydroxyl group)이 페놀류의 독성을 감소시키는 현상이 일부 연구자들에 의해 보고되었다 [21-23]. De Wulf 등 [24]은 *S. cerevisiae*가 vanillin을 vanillyl alcohol로 전환시킬 수 있음을 보고하였으며, Klinke 등 [25]은 글루코스를 주요 기질로 사용하고, 모델화합물로 페놀 및 2-furoic acid 등을 첨가한 합성 배지에 *S. cerevisiae*를 이용하여 발효배양을 하였다. 페놀 및 2-furoic acid의 독성을 완화하기 위해 10 mmol의 수산화페놀 그룹을 첨가하여 그 현상을 관찰한 결과, 알데하이드류는 에탄올 발효 균주에 의해 흡수되었으며, 발효 배지에서 페놀 및 2-furoic acid와 관련된 알콜 (4-hydroxybenzylalcohol, vanillyl alcohol, syringyl alcohol)이 존재함을 확인하였다.

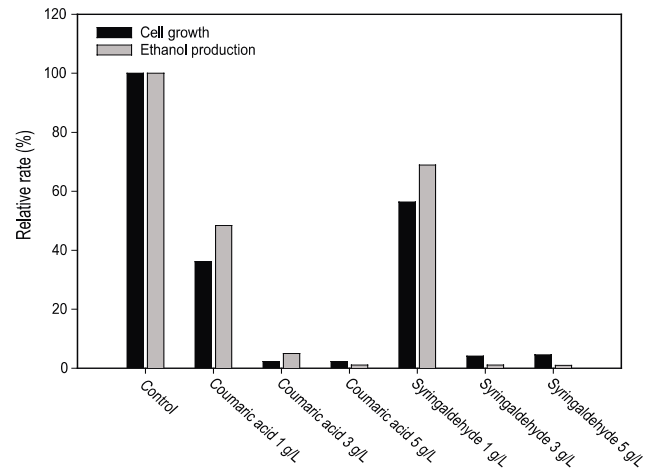


Fig. 3. Relative cell growth (36 h) and relative ethanol production (72 h) by *P. stipitis* KCCM 12009 in various concentration of coumaric acid and syringaldehyde.

가수분해물 (왕겨, 잡종 포플러나무) 및 전처리된 (deacetylated) 가수분해물을 사용하는 경우의 에탄올 생산 경향

활엽수의 경우, 침엽수와 비교하여 헤미셀룰로스에 아세틸기를 다량 포함하고 있으며, 이러한 아세틸기는 산에 의한 가수분해 시 다양한 종류의 유기산이 발생되며, 고농도의 아세트산 (acetate)이 발생될 확률이 높다. 고농도의 아세트산이 존재하는 가수분해물을 에탄올 생산 배지로 활용할 경우, 미생물 생장억제, 에탄올 생산량의 감소가 야기된다. 이러한 아세트산이 유래되는 아세틸기를 선택적으로 제거하기 위한 전처리 (deacetylated) 공정을 추가하였다. H_2SO_4 를 이용한 가수분해단계 이전에 낮은 농도의 NaOH용액으로 전처리하였으며, 왕겨 가수분해물 및 잡종 포플러나무 가수분해물의 아세트산의 농도는 각각 2.2 g/L, 6.9 g/L였으며, 전처리된 왕겨가수분해물 및 전처리된 잡종 포플러나무 가수분해물의 경우, 아세트산이 0.9 g/L, 1.1 g/L로 각각 59%, 84%의 아세트산 감소 효과가 있었다. 실험에 사용된 가수분해물들의 주요 당의 구성성분은, 왕겨 가수분해물의 경우, 글루코스 47 g/L, 자일로스 24.3 g/L, 전처리된 왕겨 가수분해물의 경우, 글루코스 63.9 g/L, 자일로스 21.4 g/L, 변종 포플러나무 가수분해물의 경우, 글루코스 44.9 g/L, 자일로스 21.9 g/L, 전처리된 변종 포플러나무 가수분해물의 경우, 글루코스 42.5 g/L, 자일로스 22.8 g/L로 이루어져 있다. 가수분해물을 이용한 *P. stipitis*의 배양에서, 글루코스를 모두 소모한 뒤 자일로스의 매우 낮은 섭취 경향을 보였다. Agbogbo 등 [26]은 자일로스가 글루코스과 비교하여 상대적으로 친화도가 낮기 때문에 *P. stipitis*가 글루코스를 선호하여 섭취 및 이용하는 경향이 있으며, 자일로스 배양에서, *P. stipitis*는 비타민과 같은 영양성분 없이 발효가 가능함을 보고하였다.

왕겨 가수분해물 (rice husk, RH), 전처리된 왕겨 가수분해물 (deacetylated rice husk, DRH)에 포함된 저해물질의 총

량은 각각 3.48 g/L, 2.84 g/L로 큰 차이를 보이지 않는 반면 acetate가 각각 2.2 g/L, 0.9 g/L가 포함되어 acetate로 인한 저해 영향이 강한 것을 확인할 수 있었다. 왕겨 가수분해물의 경우, 균체 성장에 12시간의 지연기를 보였으며, 72시간 동안 글루코스를 모두 소모하였으나 자일로스는 모두 소모하지 못하였다. 전처리된 왕겨 가수분해물의 경우, 24시간 동안 균체가 성장하였으며, 24시간부터 48시간 동안 균체량이 소량 증가하는 경향을 보였다. 에탄올 생산량은 왕겨 가수분해물 및 전처리된 왕겨 가수분해물에서 각각 20.79 g/L, 21.67 g/L였으며, 에탄올 생산 수율은 0.43 g/g, 0.42 g/g였다.

저해영향 외에도, 퓨란 및 페놀류의 영향이 동반 상승효과를 가져온 것으로, Cho 등 [17]은 백합나무 가수분해물을 이용한 에탄올 생산에서, 백합나무 가수분해물에 포함된 소량의 퓨란 및 페놀류가 높은 농도의 유기산과 동반 상승효과를 초래하여 에탄올 생산에 저해영향이 있음을 보고하였다. 에탄올 생산균주를 이용한 에탄올 생산에서, 퓨란 및 페놀 계열로 인한 저해영향을 줄이는 방법은 앞서 설명한 바와 같이, 효모의 효소에 의한 저해물질의 생체 내 (*in vivo*) 전환을 이용하는 것이나, 저해물질이 효모의 수용능력을 초과할 경우, 효모의 사멸이 야기된다.

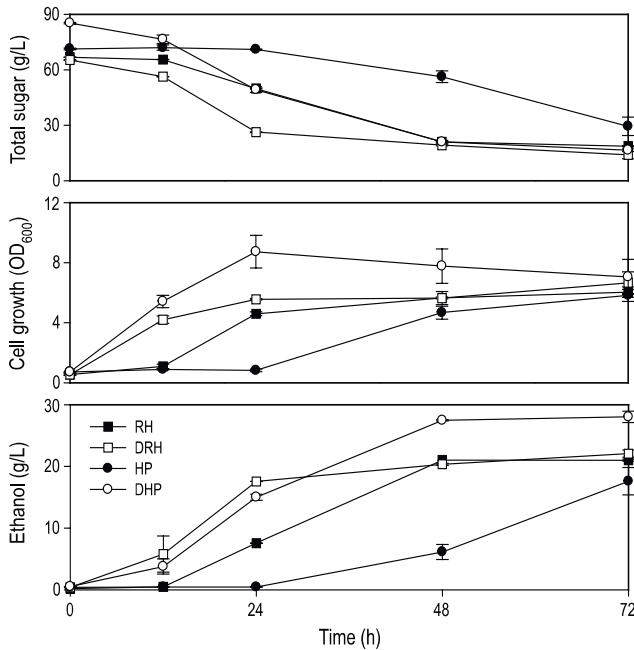


Fig. 4. Cell growth, glucose consumption and ethanol production in rice husk (RH), deacetylated rice husk (DRH), hybrid poplar (HP) and deacetylated hybrid poplar (DHP) by *P. stipitis* KCCM 12009.

잡종 포플러나무 가수분해물 (hybrid poplar, HP) 및 전처리된 잡종 포플러나무 가수분해물 (deacetylated hybrid poplar, DHP)에 포함된 저해물질의 총량은 각각 7.85 g/L, 2.11 g/L였으며, acetate의 농도는 각각 6.9 g/L, 1.1 g/L로 높은 농도의 acetate가 포함된 가수분해물의 저해영향을 파악할 수 있었다. 잡종 포플러나무 가수분해물의 경우, 균체 성장에 24시간의 지연기를 보였으며, 72시간 동안 글루코스를 모두 소모하지 못하였다. 전처리된 잡종 포플러나무 가수분해물의 경우, 균체 성장에 지연기가 없었으며, 24시간에 최대 균체량을 보였다. 48시간 동안 글루코스를 모두 소모하였으며, 높은 글루코스 농도로 인하여 *P. stipitis*가 자일로스를 탄소원으로 이용하지 못하는 경향을 보였다. 에탄올 생산량은 잡종 포플러나무 가수분해물 및 전처리된 잡종 포플러나무 가수분해물에서 각각 19.2 g/L, 27.5 g/L였으며, 에탄올 생산 수율은 각각 0.41 g/g, 0.41 g/g였다. 이러한 저해영향은 acetate로 인한

결론

리그노셀룰로스계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산 공정에 저해요인으로 작용하는 모델화합물 (유기산, 퓨란계, 페놀계)이 효모 발효에 미치는 저해현상을 파악하여 리그노셀룰로스계 바이오매스를 가수분해하여 얻은 당화액을 효모 발효하는 경우의 저해현상 및 에탄올 발효 가능성을 파악하였다. 모델화합물이 *P. stipitis*의 균체 성장 및 에탄올 생산에 미치는 영향은 균체 성장의 지연, 균체량의 감소, 에탄올 생산의 지연, 에탄올 생산량의 감소로 파악할 수 있었다. 모델화합물이 존재하는 경우, 에탄올 생산 수율이 감소하는 뚜렷한 경향은 관찰되지 않았다. 유기산의 경우, 농도가 높아질수록 균체 성장 및 균주의 에탄올 생산능력이 저하됨을 관찰하였다. 퓨란계열의 경우, 농도가 높아질수록 균체 성장 및 에탄올 생산에서, 지연기가 증가하는 것을 확인하였으며, 페놀계열에 균체가 가장 민감하게 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 리그노셀룰로스계 바이오매스인 왕겨 및 잡종 포플러나무를 원료로, 가수분해물과 전처리된 가수분해물을 제조하여 이들의 에탄올 생산 경향성을 비교·분석하였으며, 유기산을 제거하는 전처리 공정을 도입함으로써 가수분해물에 포함된 저해물질이 균주에 미치는 영향을 저감시켜 에탄올 생산 효율을 향상시켰다. 본 연구를 통하여 리그노셀룰로스계 바이오매스를 기반으로 한 바이오에탄올 생산 가능성을 확인할 수 있었으며, 가수분해물에 존재하는 저해물질의 제거를 통하여 다양한 종류의 리그노셀룰로스계 바이오매스의 활용 가능성에 대한 방향성을 제시하였다.

감사

본 연구는 교육과학기술부 한국연구재단의 기초연구사업 (2010-0002313) 및 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업 (폐자원에너지화Non-CO₂ 온실가스 사업)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 11월 10일, 게재승인 : 2010년 12월 25일

REFERENCES

- Luo, L., E. Voet, and G. Huppes (2009) Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 13: 1613-1619.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technol.* 83: 1-11.
- Saha, B. C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 30: 279-291.
- Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch (2005) Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 96: 673-686.
- Liu, Z. L., P. J. Slininger, and S. W. Gorisch (2005) Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl. Biochem. Biotech.* 121-124: 451-460.
- Balat, M. (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conv. Manag.* 52: 858-875.
- Modig, T., J. R. M. Almeida, M. F. Gorwa-Grauslund, and G. Lidén (2008) Variability of the response of *Saccharomyces cerevisiae* strains to lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol. Bioeng.* 100: 423-429.
- Sakai, S., Y. Tsuchida, S. Okino, O. Ichihashi, H. Kawaguchi, T. Watanabe, M. Inui, and H. Yukawa (2007) Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth of ethanol production by growth-arrested *Corynebacterium glutamicum* R[▽]. *Appl. Environ. Microb.* 73: 2349-2353.
- 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.
- Faraco, V. and Y. Hadarc (2011) The potential of lignocellulosic ethanol production in the Mediterranean Basin. *renew. sust. energ. rev.* 15: 252-266.
- Almeida, J. R. M., T. Modig, A. Röder, G. Lidén, and M. F. Gorwa-Grauslund (2008) *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnol. Biofuels* 1: 12.
- Tolan, J. S. and R. K. Finn (1987) Fermentation of D-xylose and L-arabinose to ethanol by *Erwinia chrysanthemi*. *Appl. Environ. Microb.* 53: 2033-2038.
- Nigam, J. N., R. S. Ireland, A. Margaritis, and M. A. Lachance (1985) Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. *Appl. Environ. Microb.* 50: 1486-1489.
- Modig, T., G. Lidén, and J. Taherzadeh (2002) Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochem. J.* 363: 769-776.
- Boopathy, R., H. Bokang, and L. Daniels (1993) Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 11: 147-150.
- 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. Biot.* 66: 10-26.
- Cho, D. H., S. -J. Shin, Y. Bae, C. Park, and Y. H. Kim (2010) Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol.* 101: 4947-4951.
- 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.
- Russell, J. B. (1992) Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Microbiol.* 73: 363-370.
- 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.
- Ando, S., I. Arai, K. Koichi, and S. Hanai (1986) Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 64: 567-670.
- Clark, T. A. and K. L. Mackie (1984) Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *J. Chem. Technol. Biot.* 34B: 101-110.
- Delgenes, J. P., R. Moletta, and J. M. Navarro (1996) Effects of lignocellulosic 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.
- De Wulf, O., P. Thonart, P. Gaignage, M. Marlier, A. Paris, and M. Paquot (1986) Bioconversion of vanillin to vanillyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 17: 605-616.
- 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.
- Agbogbo, F. K., G. Coward-Kelly, M. Torry-Smith, and K. S. Wenger (2006) Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* 41: 2333-2336.