

옥살산 전처리 옥수수대를 이용한 동시당화발효 최적 조건 탐색*1

서 영 준*2 · 임 우 석*2 · 이 재 원*2†

Optimal Condition for Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Pretreated Corncob by Oxalic Acid*1

Young-Jun Seo*2 · Woo-Seok Lim*2 · Jae-Won Lee*2†

요 약

본 연구는 옥살산으로 전처리를 수행한 후 얻어진 옥수수대를 이용하여 동시당화발효를 위한 최적조건을 탐색하였다. *Pichia stipitis* CBS 6054를 이용한 동시당화발효에서 독립변수인 반응온도(25.8~34.2°C)와 교반속도(80~220 rpm)에 대한 에탄올 생산량은 각각 99% 신뢰구간을 가졌다. 종속변수로 에탄올 생산량을 적용하였을 때 30°C, 170 rpm에서 최대의 에탄올 생산을 예측할 수 있었다(22.5 g/L). 최적의 온도 및 교반속도에서 최적 질소원을 조사한 결과 yeast extract (1.25 g/L)와 urea (1.25 g/L)를 혼합하여 사용하였을 경우 에탄올 생산량은 증가하였으며 trace metal 성분과 비타민은 첨가하지 않았을 때 에탄올 생산이 촉진되었다. 동시당화발효를 위한 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 최적 농도는 각각 1 g/L, 0.25 g/L로 나타났다.

ABSTRACT

In this study, we determined optimal conditions for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using corncob biomass pretreated with oxalic acid. The effect of SSF temperature (25.8~34.2°C) and agitation speed (80~220 rpm) were significant at a 99% confidence level in its effect on ethanol production. The highest ethanol production was expected when SSF was performed at 30°C, 170 rpm (22.5 g/L). The ethanol production was improved by mixture of yeast extract (1.25 g/L) and urea (1.25 g/L) as nitrogen source. However, addition of trace metal

*1 접수 2011년 8월 9일, 채택 2011년 11월 4일

*2 전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학부, Department of Forest Products and Technology (BK21 Program), Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 이재원(e-mail: ljw43376@chonnam.ac.kr)

components and vitamin for SSF was not affected in the ethanol production. Optimal concentration of KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ for SSF was 1 g/L, 0.25 g/L respectively.

Keywords: optimal condition, oxalic acid pretreatment, simultaneous saccharification and fermentation, ethanol

1. 서 론

최근 인구증가와 화석연료 고갈에 따른 에너지 수요가 증가되면서 많은 연구자들은 2050년까지 250억 배럴에서 50억 배럴로 연간 오일 생산량이 감소될 것이라고 전망하였다. 따라서 미국을 비롯한 여러 나라에서는 대체에너지 개발에 관심을 모으고 있으며 또한 이러한 문제점을 풀기위해 많은 연구자들은 친환경적인 바이오매스를 이용한 연료용 에탄올 생산에 초점을 모으고 있다(Cheung and Anderson, 1997).

바이오매스는 재생 가능한 에너지원으로 주목을 받고 있으며 특히 목질 바이오매스, 농 폐잔물과 같은 lignocellulosic 바이오매스는 재생가능하며 풍부한 탄수화물을 포함하고 있어 대체에너지원으로 여겨지고 있다(Sun and Cheng, 2002; Soderstrom *et al.*, 2003). 이러한 농 폐잔물 중에서 옥수수대는 옥수수 산업에서 가장 많은 부분을 차지하는 부산물로 주로 가축사료로 사용되거나 버려지곤 했다(Inglett, 1970). 옥수수대는 약 70%의 탄수화물, 10%의 리그닌 그리고 10%의 단백질을 함유하고 있어 대체에너지 생산을 위한 에너지원으로 충분한 가능성을 가지고 있다(Barl *et al.*, 1991).

옥살산은 다른 산에 비해 비독성이며, 전처리과정에서 유해한 가스 배출문제를 일으키지 않는 장점을 가지고 있다(Mosier *et al.*, 2001). 따라서 기존의 황산을 대체하려는 방법으로 옥살산과 같은 대체산에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Kootstra *et al.*, 2009; Lu and Mosier, 2007; Lee *et al.*, 2009). 뿐만 아니라 옥살산은 목재 부후균이 분비하는 것으로 목재의 헤미셀룰로오스를 선택적으로 분해시킨다고 알려져 있다(Shimada and Takahashi, 1994).

본 연구에서는 옥살산 전처리로 대부분의 헤미셀룰로오스가 제거된 바이오매스를 이용하여 동시당화

발효를 위한 최적 조건을 탐색하였다. 동시당화발효를 위해서는 발효온도, 교반속도, 질소원, 미네랄, 비타민 등이 필수 조건이다. 하지만 지금까지 이와 같은 인자는 동시당화발효에 사용되는 바이오매스, 미생물 및 효소의 특성을 고려하지 않고 고전적인 방법에 의해 일정한 농도의 필수원소 및 교반속도로 진행되어왔다(Lee *et al.*, 2009; 김 등 2011). 동시당화발효에 사용되는 미생물, 효소 및 바이오매스는 그 형태가 다양하고 동시당화발효를 위한 서로 다른 최적의 조건을 가지고 있기 때문에 기존의 동일한 조건으로 동시당화발효를 수행할 경우 최대의 에탄올 생산을 기대할 수 없다. 특히 바이오매스는 전처리 방법에 따라 서로 다른 화학적 성분 및 물리적 특징을 가지고 있어 요구되는 배지조성도 다르게 된다(Bafncova *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2010). 질소원, trace elements, 비타민과 같은 영양분은 경제적인 측면에서 밀접한 관계를 가지고 있어 최적의 조합을 찾는 것이 필요하다. 최근 배지의 비용을 절감하기 위하여 값싼 corn steep liquor와 같은 대체 질소원에 대한 연구도 진행되고 있다(Pereira *et al.*, 2010).

따라서 본 연구에서는 옥살산으로 전처리를 수행한 옥수수대를 이용하여 경제적이고 효율적인 에탄올 생산을 위한 동시당화발효 최적 조건을 탐색하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 옥살산 전처리

미국 Pestell pet products co.로부터 분쇄된 옥수수대(직경 0.5 cm 구형)를 제공받아 사용하였으며 함수율은 5% 미만으로 유지하여 전처리를 수행하였

Table 1. The 2² full factorial design with four axial points and three replicates in the central point matrix employed for two independent variables

Run	Agitation speed (rpm) (X1)	Temperature (°C) (X2)	Coded level (X1)	Coded level (X2)
1	150	30	0	0
2	150	30	0	0
3	150	30	0	0
4	200	33	1	1
5	100	33	-1	1
6	200	27	1	-1
7	100	27	-1	-1
8	150	34.2	0	1.4
9	220	30	1.4	0
10	150	25.8	0	-1.4
11	80	30	-1.4	0

* Yeast extract 25 g/ℓ, KH₂PO₄ 1 g/ℓ, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/ℓ, trace metal and vitamin were added for simultaneous saccharification and fermentation.

다. 전처리 조건은 선행연구 결과로 얻어진 동시당화 발효 최적 조건에서 수행하였다(Lee *et al.*, 2009). 옥살산 전처리를 위해 21 ℓ digester에서 1.5 kg의 분쇄 옥수수대를 첨가한 후 옥살산 흡수를 돕기 위해 10분 동안 진공상태를 유지하였다. 진공 상태에서 옥수수대 1.5kg에 0.036 kg의 옥살산(purity 98%)을 첨가하고 실온에서 20분 동안 방치한 후 180°C에서 50분 동안 전처리를 수행하였다. 전처리 후 고체상 바이오매스와 액상의 가수분해산물을 스크린 (100 mesh, Chung Gye Sang Gong Sa.)을 이용하여 분리하였으며 고체상 바이오매스는 세척 후 동시당화발효에 사용하기 위해 4°C에서 보관하였다.

2.2. 바이오매스 성분분석

전처리 전후의 바이오매스 구성성분 분석은 NREL 방법(Laboratory Analytical Procedure-Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass)에 의해 리그닌, 글루칸, 자일란, 아라비난, 갈락탄 함량을 측정하였다(Sluiser *et al.*, 2008).

2.3. 발효균주 및 동시당화발효

에탄올 발효를 위해 5탄당 발효 가능한 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하였다. *P. stipitis* CBS 6054는 20 g/ℓ glucose, 10 g/ℓ yeast extract, 10 g/ℓ peptone 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양 후 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 효모를 수집하고 효모 표면에 잔류하는 배지성분을 제거하기 위해 멸균수로 세척한 후 동시당화발효에 사용하였다.

동시당화발효 최적조건을 탐색하기 위하여 발효 온도, 교반속도, 배지조성에 따른 에탄올 생산량을 비교하기 위한 조건은 Tables 1, 2, 3과 같다. Table 1 조건에 따라 동시당화발효를 수행하여 최적의 반응 온도 및 교반속도를 결정한 후 Tables 2, 3에 의해 동시당화발효를 위한 배지성분을 결정하였다. 동시당화발효를 위해 125 ml Erlenmeyer flask에 옥살산으로 전처리된 바이오매스 5 g과 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) 50 ml, 질소원을 첨가한 후 120°C에서 15분 동안 멸균하였다. KH₂PO₄ 1 g/ℓ, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/ℓ, trace metal (nitrioloacetic acid 1.5 g/ℓ, MnSO₄·H₂O 0.5 g/ℓ, NaCl 1 g/ℓ,

Table 2. Nitrogen sources for simultaneous saccharification and fermentation performed at 170 rpm and 30°C

Run	Nitrogen source	Trace metal	Vitamin
1	Yeast extract 1.25 g/ℓ + Urea 1.25 g/ℓ	Added	Added
2	Yeast extract 1.25 g/ℓ + Urea 1.25 g/ℓ		
3	Urea 25 g/ℓ	Added	Added
4	Urea 25 g/ℓ		
5	(NH ₄) ₂ SO ₄ 25 g/ℓ	Added	Added
6	(NH ₄) ₂ SO ₄ 25 g/ℓ		

Table 3. The others supplements for simultaneous saccharification and fermentation performed at 170 rpm and 30°C

Run	KH ₂ PO ₄ (g/ℓ)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/ℓ)
1	0.5	0.25
2	0.5	0.5
3	0.5	0.75
4	1	0.25
5	1	0.5
6	1	0.75

FeSO₄ · 7H₂O 1 g/ℓ, CoCl₂ 0.1 g/ℓ, CaCl₂ 0.1 g/ℓ, ZnSO₄ · 7H₂O 0.1 g/ℓ, CuSO₄ · 7H₂O 0.05 g/ℓ, AlK(SO₄)₂ · 12H₂O 0.01 g/ℓ, H₃BO₃ 0.01 g/ℓ, NaMoO₄ · 4H₂O 0.01 g/ℓ), 비타민(thiamine-HCl 0.1 g/ℓ)은 각각 제조하여 멸균된 0.45 μm filter를 이용하여 여과한 후 멸균된 바이오매스에 첨가하였다. 효소가수분해를 위해 Genencor (Danisco, Rochester, NY)로부터 제공받은 Acellerase 1,000 (cellulase 500 CMC U/g과 β-glucosidase 80 pNPG/g)을 첨가하였으며 발효를 위해 배양된 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/L를 첨가하여 동시당화발효를 수행하였다. 동시당화발효가 진행되는 동안 24시간 간격으로 96시간까지 시료를 취해서 0.45 μm filter로 여과한 후 HPLC에 의해 잔류 당당류 및 생성된 에탄올 분석을 수행하였다. 교반속도와 반응온도에 대한 에탄올 생산량은 Design Expert 8.0.1 (Statease, USA)을 사용하여 분석하였다.

2.4. 발효산물 분석

동시당화발효 과정에서 잔류하는 당당류(글루코오스, 자일로오스, 갈락토오스, 아라비노오스, 만노오스)와 에탄올 농도는 HPLC (Gilson 307, Middleton, USA)를 이용하여 측정하였다. Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Bio-rad, Hercules, USA)을 사용하였으며 칼럼 온도는 55°C로 유지시켰다. 이동상으로는 5 mM 황산을 사용하였고 flow rate은 0.3 ml/min으로 55분 동안 분석하였다. Refractive index detector (Hitachi High-Technologies Corporation model L-2490, Japan)를 사용하여 당당류 및 에탄올을 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 바이오매스 성분분석

옥수수대 전처리 전후의 바이오매스 성분분석은

Table 4. Chemical composition of untreated biomass and pretreated corncob by oxalic acid (based on dried biomass)

	Lignin (%)	Glucan (%)	Xylan (%)	Arabinan (%)	Galactan (%)
Untreated biomass	13.9	37	27.8	2.2	0.6
Pretreated biomass	22.4	59.4	7.5	0.58	0.03

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for ethanol production by *P. stipitis* CBS 6054 during simultaneous saccharification and fermentation as a function of temperature (X1) and agitation speed (X2)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	p-value
Model	322.01	5	64.40	80.46	0.0001
X1	119.52	1	119.52	149.32	0.0001
X2	25.89	1	25.89	32.35	0.0023
X1X2	12.25	1	12.25	15.30	0.0113
X1 ²	160.50	1	160.50	200.52	0.0001
X2 ²	31.35	1	31.35	39.17	0.0015
Residual	4.00	5	0.80		
Lack of fit	3.92	3	1.31	32.68	0.0289
Pure error	0.080	2	0.040		
Corrected total	326.01	10			

* R-squared = 91.39% R-squared (adjusted for df.) = 97.54%

Table 4와 같다. 처리전 바이오매스는 13.9%의 리그닌과 67.6%의 탄수화물을 포함하고 있으며 이것은 Barl (1991) 등의 연구결과와 일치하였다. 헤미셀룰로오스의 선택적 분해는 효소가수분해 동안 셀룰로오스에 대한 효소의 접근성을 향상시켜 효소가수분해를 촉진시키기 때문에 전처리 단계에서 효율적으로 제거되어야 한다(Meyer-Pinson *et al.*, 2004; Berlin *et al.*, 2006). 본 연구에서 옥살산 전처리 후 바이오매스는 탄수화물 중 특히 자일란 성분이 27.8%에서 7.5%로 선택적으로 분해되었으며 이것은 기존의 옥살산 촉매특성으로 밝혀진 연구결과와 일치하였다(Lee *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011). 자일란 뿐만 아니라 헤미셀룰로오스 성분에 관여하는 소량의 아라비난, 갈락탄도 각각 2.2, 0.6%에서 0.58, 0.03%로 감소하였다. 반면 리그닌과 글루칸 성분은 옥살산 촉매에 의해 거의 분해되지 않았으며 헤미셀룰로오스 성분의 선택적 분해에 따라 상대적으로 증가하였다.

3.2. 동시당화발효 최적조건

옥살산 전처리 후 바이오매스는 충분히 세척하여 동시당화발효에 사용하였다. 우선 반응온도, 교반속도의 최적조건을 조사하기 위해 Table 1에 의해 동시당화발효를 수행한 결과 Fig. 1, Table 5와 같다. 온도는 30°C (level 0), 170 rpm (level 0.4)에서 동시당화발효 72시간 후 최대의 에탄올 생산을 나타냈으며 교반속도는 125~175 rpm, 반응온도는 28~31°C사이에서 비교적 높은 에탄올 생산량을 나타냈다. 반응온도 뿐만 아니라 교반속도 또한 에탄올 생산에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. Fig. 1로부터 유도된 식(1)은 99%의 신뢰구간을 가지며 각각의 독립변수 (교반속도 X1, 온도 X2)는 99%의 유의성을 가지고 있어 동시당화발효에 의해 생산되는 에탄올 생산량에 유의적인 인자임을 확인하였다. 0.005보다 낮은 p 값을 가지는 X1, X2, X1X2, X1², X2² 각각의 경우 또한 유의성을 가지고 있어 에탄올 생산에 영향을

Table 6. Ethanol production after 72 h of simultaneous saccharification and fermentation according to nitrogen sources

Run	Nitrogen source	Trace metal	Vitamin	Ethanol production (g/L)
1	Yeast extract + Urea	Added	Added	23.0
2	Yeast extract + Urea			24.1
3	Urea	Added	Added	21.2
4	Urea			21.3
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	Added	Added	21.5
6	(NH ₄) ₂ SO ₄			22.0

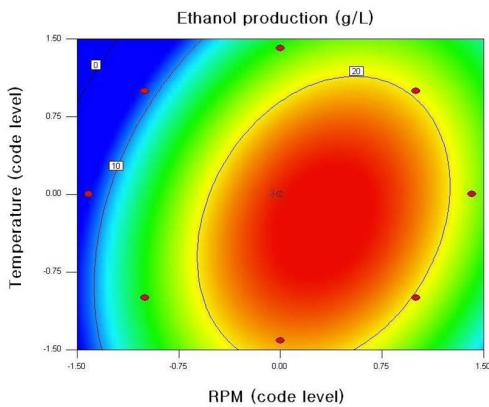


Fig. 1. Response surface and contour plot of agitation speed vs. reaction temperature on ethanol production by *P. stipitis* CBS 6054 during 72 h of simultaneous saccharification and fermentation.

미치는 인자로 확인하였다. 교반속도는 에탄올 발효 이전에 효모의 성장에 영향을 주는 인자로 최적의 교반속도는 효모의 성장에 영향을 주어 최종적으로 에탄올 생산에 관여한다.

동시당화발효에 사용되는 질소원 조합을 조사한 결과 Table 6과 같다. 동시당화발효는 Fig. 1의 결과를 바탕으로 30°C, 170 rpm에서 실시하였다. 동시당화발효 72시간 후 에탄올 생산량은 trace metal과 비타민을 넣지 않고 질소원으로는 단독 질소원보다 yeast extract와 urea를 혼합한 경우 24.1 g/l로 높은 에탄올 생산을 보였다. Trace metal과 비타민과 같은 필수 미량원소는 첨가 농도에 따라 미생물의 성장에 영향을 주기 때문에 탄소원으로 제공되는 바이

오매스 형태 및 미생물의 종류에 따라 최적의 농도로 첨가되어야 한다. 이와 같은 결과는 옥살산으로 전처리된 옥수수대는 충분히 trace metal과 비타민을 제공할 수 있는 조건으로 판단되었다. 질소원으로 (NH₄)₂SO₄와 같은 제한배지를 사용하였을 때 보다 yeast extract와 같은 복합배지를 사용하였을 경우 에탄올 생산이 향상되었다. 이것은 (NH₄)₂SO₄가 에탄올 생산에 부정적인 효과를 나타낸다는 연구결과와 일치하였다(Pereira *et al.*, 2010).

Fig. 1과 Table 6의 결과를 바탕으로 동시당화발효를 위한 필수 다량원소 최적조건을 탐색한 결과 Table. 7과 같다. 인과 마그네슘, 황과 같은 성분은 미생물 성장에 필요한 필수 다량원소로 특히 인은 TPP (thiamin pyrophosphate) 형성에 관여하여 TPP-피루브산으로부터 발효를 시작하게 하는 필수 원소로 주로 인산염의 형태로 첨가된다. 특히 마그네슘은 에탄올 스트레스 조건에서 plasma membrane permeability를 감소시켜 발효과정에서 효모 세포를 보호하는 역할을 하기 때문에 필요한 인자이다(Birch and Walker 2000; Hu *et al.*, 2003). 따라서 마그네슘은 바이오매스에 따라 간접적으로 공급될 수 있어 최적의 농도 조절이 필요하다.

본 실험에서 동시당화발효에 의한 에탄올 생산에 있어 옥살산 전처리 바이오매스에 적합한 KH₂PO₄, MgSO₄ · 7H₂O 농도는 각각 1.0 g/l, 0.25 g/l로 나타났다으며 이때 에탄올 생산량은 25.5 g/L로 가장 높게 나타났다. KH₂PO₄ 1.0 g/l에서 0.25 g/l 이상의 마그네슘 농도는 에탄올 생산을 감소시키는 결과를 가져왔다. 이와 같은 최적의 조건에서 동시당화발효를 수행하였을 경우 에탄올 생산량은 21.5 g/l에서

Table 7. Ethanol production after 72 h of simultaneous saccharification and fermentation according to other supplements

Run	KH ₂ PO ₄ (g/L)	MgSO ₄ · 7H ₂ O (g/L)	Ethanol production (g/L)
1	0.5	0.25	21.9
2	0.5	0.5	22.1
3	0.5	0.75	22.5
4	1	0.25	25.5
5	1	0.5	23.7
6	1	0.75	23

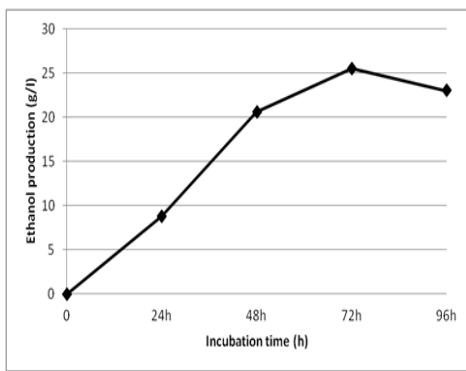


Fig. 2. Ethanol production profile by simultaneous saccharification and fermentation at optimal condition.

25.5 g/l로 약 15.6% 증가하였음을 확인하였다. 최적조건에서 동시당화발효가 진행되는 동안 생성된 에탄올은 Fig. 2와 같다. 동시당화발효 최적조건을 확립하는 것은 에탄올 생산을 증가시키는 것은 물론 배지 비용 절감의 효과도 동시에 얻을 수 있을 것이다.

$$\text{Ethanol production (g/l)} = 22.5 + 3.87X_1 - 1.80X_2 + 1.75X_1X_2 - 5.33X_1^2 - 2.36X_2^2 \dots \dots \quad (1)$$

4. 결 론

기존의 동시당화발효에는 바이오매스의 전처리 방법, 효소의 조합 및 효모의 종류를 고려하지 않고 일정한 농도의 배지를 사용하였다. 본 연구에서는 배지 비용을 절감하고 에탄올 생산량을 증가시킬 수 있는

동시당화발효에 적합한 배양조건 및 배지조성을 조사하였다. *P. stipitis* CBS 6054 생장에 영향을 미치는 교반속도와 반응온도는 각각 170 rpm, 30°C에서 높은 에탄올 생산량을 나타냈으며 그밖에도 질소원을 포함한 필수다량원소 및 필수미량원소의 조합을 확인하였다. 이러한 최적의 조건에서 전처리 된 옥수수 슛대로부터 얻어진 에탄올 생산량은 25.5 g/L로 배지조성을 조정하지 않았을 때 보다 약 15.6% 증가하였다. 하지만 동시당화발효를 위한 질소원의 종류 및 농도에 대한 범위를 더욱 확대할 필요가 있다. 뿐만 아니라 효모의 성장 및 발효에 관여하는 인자로 trace metal 성분에는 포함된 Cu²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺ 등과 같은 이온은 가수분해효소 활성을 향상시키거나 억제시킬 수 있는 독립인자로 작용하기 때문에 최종적으로 에탄올 생산에 관여한다. 따라서 각각의 필수미량원소의 최적 농도 및 조합에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

사 사

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원인 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업으로 수행된 연구임(2011-0018393).

참 고 문 헌

1. 김혜연, 이재원, Thomas W. Jeffries, 최인규. 2011. 바이오에탄올 생산을 위한 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)칩의 동시당화발효 및 Response Surface Method를 이용한 옥살산 전처리 조건 탐색. 목재공학

- 39(1): 75~85.
2. Bafrncova, P., D. Smogrovicova, I. Slavikova, J. Patkova, and Z. Domeny. 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by mediasupplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letter*. 21: 337~341.
 3. Barl, B., C. G. Biliaderis, E. D. Murray, and A. W. Macgregor. 1991. Combined chemical and enzymatic treatment of corn husks lignocellulosics. *Journal of Food Science Agricultural* 56: 195~14.
 4. Berlin, A., N. Gilkes, D. Kilburn, V. Maximenko, R. Bura, A. Markov, A. Skomarovsky, A. Gusakov, A. Sinitsyn, O. Okunev, J. Solovieva, and J. N. Saddler. 2006. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130: 528~545.
 5. Birch, R. M. and G. M. Walker. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 678~687.
 6. Hu, C. K., F. W. Bai, and L. J. An. 2003. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculation fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg²⁺ via reduction in plasma membrane permeability. *Biotechnology Letter* 25: 1191~1194.
 7. Kootstra, A. M., H. H. Beeftink, E. L. Scott, and J. P. M. Sanders. 2009. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal* 46: 126~131.
 8. Lee, J. W., R. C. L. B. Rodrigues, H. Y. Kim, I. G. Choi, and T. W. Jeffries. 2010. The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 101: 4379~4385.
 9. Lee, J. W., R. C. L. B. Rodrigues, and T. W. Jeffries. 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. *Bioresource Technology* 100: 6307~6311.
 10. Lu, Y. and N. S. Mosier. 2007. Biomimetic catalysis for hemicelluloses hydrolysis in corn stover. *Biotechnology Progress* 23: 116~123.
 11. 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. *Comptes Rendus Biologies* 327(9~10): 917~925.
 12. Mosier, N. S., A. Sarikaya, C. M. Ladisch, and M. R. Ladisch. 2001. Characterization of dicarboxylic acids for cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* 17(3): 474~480.
 13. Pereira F. B., P. M. R. Guimaraes, J. A. Teixeira, and L. Domingues. 2010. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology* 101: 7856~7863.
 14. Shimada, M. and M. Takahashi. 1994. Biodegradation of cellulosic materials. In: Dekker, M. (Ed.), *Wood and Cellulosic Chemistry*. New York (Chapter 13).
 15. Inglett, G. E. 1970. *Corn: Culture, Processing and Products*. AVI Publishing Co., Westport, CT.
 16. Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*; National Renewable Energy Laboratory.
 17. Soderstrom, J., L. Pilcher, M. Galbe, and G. Zacchi. 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production. *Biomass Bioenergy* 24: 475~486.
 18. Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. *Bioresource Technology* 83: 1~11.
 19. Cheung, S. W. and B. C. Anderson. 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary waste water solids. *Bioresource Technology* 59: 81~86.