

바이오에탄올 생산을 위한 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)칩의 동시당화발효 및 Response Surface Method를 이용한 옥살산 전처리 조건 탐색*1

김혜연*2 · 이재원*3 · Thomas W. Jeffries*4 · 최인규*2†

Evaluation of Oxalic Acid Pretreatment Condition Using Response Surface Method for Producing Bio-ethanol from Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*) by Simultaneous Saccharification and Fermentation *1

Hye-Yun Kim*2 · Jae-Won Lee*3 · Thomas W. Jeffries*4 · In-Gyu Choi*2†

요약

이 연구에서는 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)를 옥살산으로 전처리한 시료로부터 에탄올 생산 가능성을 조사하고, response surface methodology (RSM)를 도입하여 전처리 조건을 분석하고자 한다. 산농도, 전처리 시간, 반응 온도를 조절하여 2³ factorial central composite experimental design을 바탕으로 각기 다른 15가지의 전처리 조건에서 시험하였다(central point에서 2반복). 전처리 후 고체 시료는 발효 균주인 *Pichia stipitis*를 사용하여 동시당화발효로 에탄올 생산에 이용되었으며, 각각의 시료에서의 72시간에서의 에탄올 생산량(y, g/ℓ)이 최대값으로, 종속변수로서 RSM에 적용되었다. 180°C에서 40분간 0.013 g/g의 옥살산으로 처리한 시료가 가장 많은 양의 에탄올(9.7 g/ℓ)을 생산하였으며, response surface methodology 분석에 따르면, 전처리 조건에서 온도 인자가 ethanol에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 제시되었으며, 결과는 수식화되어 나타내었다.

*1 접수 2010년 7월 30일, 채택 2010년 11월 4일

*2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Dept. of Forest Sciences, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, 599 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-921, Korea

*3 전남대학교 농업생명과학대학. Dept. of Forest Products and Technology (BK 21 Program), Chonnam National University, Gwang-ju 500-757, Korea

*4 Forest Products Laboratory, One Gifford Pinchod Drive, Madison, Wisconsin, 53726-2398, USA

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

ABSTRACT

The main purpose of this study is to evaluate the potential of producing bioethanol from yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) wood chips by oxalic acid pretreatment and to examine the pretreatment conditions by response surface methodology (RSM). Based on 2^3 factorial design, adjusted variables were reaction temperature ($^{\circ}\text{C}$), residence time (min), and acid loading (g/g), and a series of distinct 15 experimental conditions was organized with duplication at central point (total 16 performances). After pretreatment, simultaneous saccharification and fermentation (SSF) was subjected on solid fraction with yeast strain *Pichia stipitis*. Maximum ethanol yields of the most samples were measured at 72 hours and applied to RSM as a dependent variable. 9.7 g/ℓ of ethanol was produced from the solid pretreated at 180°C for 40 min with 0.013 g/g of oxalic acid loading. According to the response surface methodology, it was determined that the temperature is the most governing factor via statistic analysis.

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

1. 서 론

지금까지 지구의 대부분의 산업 및 생활 시스템이 석유와 같은 화석 연료에 대한 매우 높은 의존도를 보였기 때문에, 화석 연료의 고갈 문제로 인한 대응이 시급하다. 특히 지구 온난화 문제와 맞물려, 탄소를 적게 배출하면서 기존의 연료를 대체할 수 있는 바이오에너지의 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Duff and Murray, 1996; Galbe and Zacchi, 2002; Qureshi *et al.*, 2008). 특히, 수송용 연료로써 바이오 에탄올에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이미 일부 국가에서는 가솔린 및 첨가제를 대신하여 일정 비율 이상 사용되고 있다. 특히 현재까지 이용되고 있는 전분계 바이오에탄올을 대체할 원료로 lignocellulosic biomass가 각광을 받게 되면서, 자원의 종류와 각종 전처리 방법에 대한 연구 역시 활발히 진행되고 있다(Wyman, 2007; Jorgensen, 2007). Lignocellulosic biomass는 농업 폐자재, 목재, 제지 등의 다양한 종류의 풍부한 자원을 공급받기에 용이하고, 식량자원과 경쟁하지 않아 가격 안정성을 유지할 수 있으며, 고갈 염려가 없다는 것이 큰 장점이다. 목질계 바이오매스는 탄소중립적인 특징으로 인해 이용

가치가 강조되고 있으며, 포플러, 사시나무 등의 단벌기 속성수종에 대한 연구 역시 광범위하게 진행되고 있다. 단벌기 속성수종인 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)는 연료용 목질계 바이오매스의 효율적인 이용에 대한 연구가 이루어져 왔으며(Allen *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 1998), 국내 조림수종으로써 다양한 생육환경에서 좋은 성장을 보이며 이용가치가 인정되어 여러 이용 분야에서 연구 중이다.

옥살산은 목재 부후균이 목재를 분해시킬 때 분비하는 성분으로(Shimada *et al.*, 1994), 옥살산 전처리 이전의 펄프 공정에서 연구되었으며(Kenealy *et al.*, 2007; Swaney *et al.*, 2003), 황산 전처리에 비해 환경에 영향을 덜 미치는 촉매로 가치를 인정받고 있다(Lee *et al.*, 2009). 기존의 동시당화발효에 관한 연구에서 *Saccharomyces cerevisiae*가 발효균 주로 가장 많이 사용되었다. 그러나 이 연구에서는 당화 효율을 높이기 위해 5탄당과 6탄당을 모두 발효시킬 뿐만 아니라 xylanase, β -glucosidase를 분비하는 *Pichia stipitis*를 발효 균주로 채택하였다(Ozcan *et al.*, 1991; Jeffries *et al.*, 2007).

이전에 실행된 백합나무의 옥살산 전처리 실험(김 등, 2009)에 이어 동시당화발효에 의한 에탄올 생산

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

Sample No	Variables			Coded levels		
	Temperature (°C)	Oxalic acid (g/g)	Reaction time (min)	Temperature (°C)	Oxalic acid (g/g)	Reaction time (min)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	160	0.013	20	-1	-1	-1
2	180	0.013	20	1	-1	-1
3	160	0.037	20	-1	1	-1
4	180	0.037	20	1	1	-1
5	160	0.013	40	-1	-1	1
6	180	0.013	40	1	-1	1
7	160	0.037	40	-1	1	1
8	180	0.037	40	1	1	1
9	153	0.025	30	-1.68	0	0
10	187	0.025	30	1.68	0	0
11	170	0.005	30	0	-1.68	0
12	170	0.045	30	0	1.68	0
13	170	0.025	13	0	0	-1.68
14	170	0.025	47	0	0	1.68
15	170	0.025	30	0	0	0
16	170	0.025	30	0	0	0

량과 전처리 영향 인자(시간, 산 농도, 온도) 사이의 회귀 분석 및 수식화하는 방법을 도입하였다. Response surface methodology를 이용한 modeling (Lee *et al.*, 2009; Perez *et al.*, 2008; Roberto *et al.*, 2003)은 각 전처리 인자에 대한 결과를 수식으로 쉽게 얻어낼 수 있어 전처리 조건과 종속 변수로 도입된 실험 결과 사이의 관계와 최적 조건 탐색에 용이하다. 이와 같은 modeling은 산업용 에탄올 생산을 위한 대규모 실험 설계 및 결과 예측에 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

따라서 이 실험에서는 response surface methodology를 통하여 백합나무의 옥살산 전처리 조건과 에탄올 생산량을 모델화하고, 높은 에탄올 생산을 위한 전처리 조건 인자들 사이의 관계를 구명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

20년생 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)는 경기도 남양주시 산업인력개발원에서 재배되었으며, 수

피를 제거하고 기건상태에서 건조시킨 목부를 국립 산림과학원에서 일부 chipping 한 후, 미국의 Forest products laboratory의 Wiley mill Model No. 2 (Philadelphia, USA)로 직경 20 mm 이하의 칩으로 균일하게 분쇄하여 4°C 창고에서 보관 후 전처리에 사용하였다. 전처리 되지 않은 생재의 초기함수율은 10%였으며, glucan 40.23%, xyln 17.01%을 함유하였으며 arabinan, mannan, galactan, rhamnan을 포함한 총 탄수화물 함량 61.18%, klason lignin 21.9% 그리고 16.9%의 회분 및 기타 물질들을 포함하였다.

2.2. 전처리

옥살산을 이용한 전처리를 Forest products laboratory의 23 ℓ 용량의 스테인리스 회전식 반응기에서 수행하였다. 전처리 조건에 따라 옥살산을 400 ml 물에 용해시킨 후, 1 ℓ 스테인리스 용기에 전건무게 100 g (초기 함수율 10% 고려)의 시료를 담고 밀봉하여 반응기 내부에 고정시킨 후, 증기를 주입하여 내부 반응온도를 올렸다. 그 과정에서 mass balance를 유지하기 위하여 시료와 증기는 직접 접촉하지 않

있다. 위의 반응기는 열 공급원인 증기를 수동 압력 벨브와 온도 벨브를 조절하여 투입하였기 때문에, 상승 시간이 약 12분 정도의 차이가 있었다. 153도까지 올라가는데 5분가량이 걸리며, 160~187도 사이에 올라가는데 6~8분 가량의 시간이 소요되었으며, 온도 상승 시간에 의한 반응의 변화는 크지 않은 것으로 판단하여 반응시간에 포함되지 않았다. 반응을 마친 후 고형분과 액상가수분해 산물을 스크린으로 분리하여 후 4°C로 유지시켜 보관하였다. 전처리한 고형분을 물로 여러 번 세척하여 동시당화발효에 사용하였다.

2.3. 실험 설계 및 전처리 조건

전처리 조건은 2^3 factorial 실험계획법에 의하여 계획되었으며, response surface method로 분석하기 용이하도록 통계적인 수치로 변환하여 Table 1에 제시되었다. 독립변수로 첨가된 전처리 온도(X_1 , °C), 옥살산의 농도(X_2 , g/g), 그리고 최대 온도에서 반응 시간(X_3 , 분)이 조절되었으며, 종속변수는 전처리된 고형분이 72시간 동안 동시당화발효과정에서 생산한 에탄올의 농도(y , g/l)로 정하였다.

99%의 신뢰구간을 갖도록 -1.68~1.68 구간에서 조건을 설정하였으며, central point에서의 각각의 독립변수를 0으로 고정하여 2 반복을 실시하여 총 16번의 전처리를 수행하였다. 홀수번호의 시료들과 비교했을 때 짝수 번호의 시료들이 상대적으로 더 강한 조건에서 처리가 되도록 위치시켰다. Central point는 온도 170°C, 반응시간 30분, 옥살산 농도 0.025 g/g로 지정하였으며, 각각의 독립 변수는 통계적 수치로 $X_1 = (\text{반응온도} - 170)/10$, $X_2 = (\text{농도} - 2.5)/1.2$, $X_3 = (\text{반응시간} - 30)/10$ 과 같이 변환시켜 각각의 조건에 따라 전처리한 시료에서 생산된 72시간동안 발효되어 생산된 에탄올의 농도(y , g/l)가 종속변수로서 지정되었다. 실험 결과는 Design Expert 8.0.1(Statease, USA)를 사용하여 분석하였으며, 도식화하여 Equation (1)과 Table 2에 식과 반응 계수들을 각각 제시하였다.

2.4. 균주 배양

동시 당화 발효 균주로써 wild type yeast strain, *Pichia stipitis* CBS 6054를 채택했다. 4°C 저장고에서 YPD (yeast extract, peptone, dextrose agar) 배지가 담긴 petri dish에 보관한 균주를 액체 배지 (glucose 10 g/l, peptone 10 g/l, yeast extract 10 g/l)에 접종시켜 30°C, 200 rpm의 배양기(Innova 4450, New Brunswick Scientific, USA)에서 24시간 동안 배양하였다. Cell은 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리기를 사용하여 배지 상층액과 분리된 후, 멸균수로 세척한 후 같은 과정을 반복하여 배지를 완전히 씻어낸 후, 수집하여 동시 당화 발효에 이용하였다.

2.5. 동시 당화 발효

각각의 조건에서 전처리된 고체 시료를 전건 무게 5 g씩 125 ml Erlenmeyer flask에 투입되었으며, 배양액의 부피는 고체 시료의 수분 함량을 고려하여 총 50 ml가 되도록 50 mM sodium citrate buffer (pH 5.5)를 주입하였다. 5 M NaOH로 최종 pH를 5가 되도록 조절하였다. 각 시료들을 120°C 오토클레이브에서 20분간 멸균하여, 효소 Accellerase 1,000 (Genencor, Rochester, USA)가 500 CMC U/g, β -glucosidase 80 pNPG/g와 전건중량 2 g/l의 yeast를 첨가하였다. Yeast nutrient는 urea 3.6 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, KH_2PO_4 14.4 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003 g/l, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0045 g/l, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0045 g/l, $MnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.00084 g/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.003 g/l, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.003 g/l, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.004 g/l, H_3BO_3 0.001 g/l, KI 0.0001 g/l, Na-EDTA 0.015 g/l로 구성되어 있다. 동시당화발효의 시간당 에탄올 전환율을 비교하기 위해, control 실험으로써 위와 같은 방법으로 시료를 준비한 후에 균을 접종시키지 않은 효소가수분해를 수행하였다.

동시당화발효는 30°C, 150 rpm 조건에서 24시간 간격으로 시료를 취해서 0시간부터 96시간까지 에탄올 생산량(g/l)을 분석하였으며, HPLC로 주요 단

당류(glucose, xylose) 및 에탄올 분석을 수행하였다.

2.6. 시료 분석

전처리 후 남은 고형 가수분해 산물은 액상가수분해 산물과 분리되어, klason lignin 및 당성분 분석을 실시하였다. 전처리 후 남은 고형분의 mass balance를 유지하기 위하여 고형분의 총 회수율을 고려하여, xylan, glucan, klason lignin 및 이외 탄수화물의 제거율을 계산하였다. 당화 및 동시 당화발효에서 생성된 glucose, xylose, ethanol을 분석한 HPLC (Gilson 307, Villiers-le-Bel, France)는 Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Bio-rad, Hercules, USA)과 refractive index detector를 사용하였다. Mobile phase (isocratic elution)로 5 mM 황산 수용액(flow rate 0.3 ml/min)을 사용하여, 각 시료를 55분간 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 전처리 후 고형분 시료의 구성 성분 변화

전처리 후 가수분해된 약 30~40% 가량의 탄소화합물에는 소량의 리그닌과 glucose, 다량의 xylan과 소량의 당들(arabinan, mannan, galactan, rhamnan)은 모두 분해되어 액상 가수분해 산물에 단당이나 이당체, 유기산, 혹은 발효저해화합물의 형태로 용해되었을 것으로 추정된다(Cara *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2008). 특히, 구성성분 중 전체적으로 약 80% 이상의 xylan이 분해되었으며, 특히 온도조건이 180도 이상, 40분 이상으로 처리된 조건에서는 90% 이상의 xylan이 분해되었으며 고형분 중량감소를 역시 60% 미만으로 나타났다. 이는 옥살산이 세포벽의 non-cellulosic 다당류를 cellulosic 조직을 분해하기에 앞서 선분해시킨다는 기존의 연구(Meyer-Pinson *et al.*, 2004)를 참고하여, 산가수분해를 통한 헤미셀룰로오스의 제거로 인해 cellulose의 표면을 드러내면서 효소접근성을 향상시키는데 도움이 되고

록 생체의 구조적 변화를 유도하였음을 예측할 수 있다. Lignin의 손실량은 시료 1, 2, 3, 5, 6, 11에서 10% 미만, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 15, 16에서는 10~16%였으며, 10에서는 20%의 제거율을 보였다. Glucan의 경우 많은 시료들이 7.0~12% 가량 제거되었으나, 강한 전처리 조건이 적용된 시료 4와 10에서의 glucan의 총 손실량이 각각 28.39%와 24.43%이었다(고형분 시료의 회수율이 각각 54%, 53%). Glucose의 손실량이 커질수록, 리그닌의 손실량 역시 증가하였으나 이는 에탄올의 생산량과의 유의적인 관계를 보이지 않았다. 산 전처리의 기작이 lignin의 분해보다는 헤미셀룰로오스의 분해에 더 유리하다는 점을 고려하였을 때, 에탄올의 생산량은 xylan의 분해율과 상관관계를 보이는 것으로 사료된다(Lee *et al.*, 2010). 이 실험과 비슷한 크기의 목재 칩(aspen, maple)을 사용하여 autohydrolysis를 시행한 이전 연구와 비교해 보았을 때(Mittal *et al.*, 2009), 최대 75%의 xylan solubilization을 얻기 위해 175°C에서 2시간 동안 전처리를 시행하였다. 이와 비교했을 때 본 연구에서는 옥살산을 첨가하여 160~180°C에서 13~47분 범위 사이에서 70% 이상의 xylose solubilization을 얻을 수 있었다(Kim *et al.*, 2010). 옥살산 전처리를 통해 훨씬 짧은 시간 동안에 이에 준하는 양의 xylan을 목재로부터 제거한 점을 미루어 보아 비록 같은 반응기 디자인은 아니지만, 옥살산을 첨가함으로써 같은 효과를 내기 위해 많은 시간을 단축했다고 볼 수 있다.

3.2. 동시당화발효에 의한 에탄올 생산량 및 response surface analysis

동시당화발효 공정에서 72시간까지 진행되었을 때 생산된 에탄올의 양을 response surface methodology로 분석하여 다음과 같은 Equation (1)과 같은 2차식으로 수식화하였으며, 각각의 변수를 대입하였을 때, z (g/l)에서 예상되는 에탄올 생산량을 구할 수 있다. Equation (1)의 계수들과 ANOVA table은 Table 2에 제시되었다.

Table 2. Analysis of variance for ethanol yield at Simultaneous saccharification and fermentation, shown as quadratic model coefficients for the centered and scaled variables

	Degrees of freedom	Sum of square	Mean square	F value	P-value	Coefficient	Parameter estimate	p-value
Model	5	76.42702	15.28540	13.48	0.0004	a ₀	5381	0.0001
Error	10	11.33735	1.13374			a ₁	2028	0.0001
						a ₂	0.6344	0.0530
						a ₃	0.5276	0.0957
Corrected total	15	87.76437				a ₁₂	-0.9750	0.0270
						a ₂₃	-0.6000	0.1421

* R-Square : 0.8708, Adjusted R-Square : 0.8062

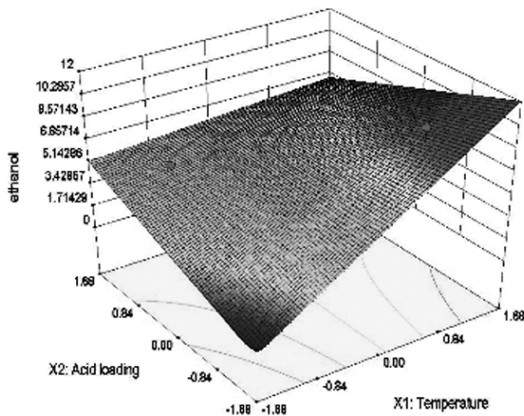


Fig. 1. Response surface methodology of ethanol yield by SSF (Time fixed at 40 min).

$$z = a_0 + a_1 \times X_1 + a_2 \times X_2 + a_3 \times X_3 + a_{12} \times X_1 \times X_2 + a_{23} \times X_2 \times X_3 \quad \text{Equation (1)}$$

Equation (1)은 99%의 신뢰구간을 가짐을 확인할 수 있다(p-value 0.0004). 온도(X₁)와 산 농도(X₂), 시간(X₃)는 각각 99%와 95%, 90%의 유의성을 가지며, 이들은 전처리 조건과 동시당화발효를 통한 에탄올 생산량의 관계에서 유의적인 인자들이라 할 수 있다. 온도는 가장 큰 영향을 미치는 독립변수이며, 시간 인자가 가장 낮은 영향을 미치는 인자이다. 농도와 온도 사이의 상호작용은 97%의 높은 영향력을 가진 인자로 확인되었으나, 농도와 시간 사이의 상호작용은 85%의 신뢰구간을 가지므로 영향력이 크지 않

았다. Fig. 1은 Equation (1)을 3차원 그래프로 나타낸 것으로, 시간은 40분으로 고정시켰다. 실험 결과 180°C에서 0.013 g/g의 산을 가하여 40분 동안 전처리하였을 때(실험 6) 가장 많은 양의 에탄올을 생산하였다. 이와 마찬가지로 Fig. 1을 참고했을 때 높은 온도에서 오랜 시간동안 적정량의 낮은 농도의 산을 가하여 처리하였을 때, 가장 많은 에탄올을 생산함을 확인할 수 있다. 이는 높은 농도의 산을 가한 경우, 전처리로 인한 목재의 효소 접근성은 증가하지만, 당의 분해로 인한 발효저해인자가 발생하면서 목재 표면에서의 균 및 효소의 접근을 방해하여 에탄올을 저해함을 추정할 수 있다(Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000).

위의 식에서는 전처리를 위한 최적 조건을 찾을 수 없었지만, 많은 양의 에탄올을 생산하기 위해서는 높은 온도에서 상대적으로 낮은 농도의 산을 가하는 것이 좋은 조건임을 Equation (1)과 Fig. 1을 통해 확인할 수 있었으며, 최적 조건을 찾을 추가실험을 위하여 수정된 계획을 모델링 과정에서 얻을 수 있었다. 위의 정방형 실험계획 점에서 오른쪽의 네 면이 가장 높은 온도를 갖는 면인데, 시료 2번에 위치한 [1, -1, -1]([온도, 농도, 시간])을 [1.2, -0.78, -0.89] 조건에서 세 개의 독립 변수를 모두 증가시켜 전처리를 수행하는 것이 추천되었다. 또 시료 4([1, 1, -1])는 [1.11, 1.22, 0.993]로, 시료 6은 [1, -1, 1]에서 [1.3, 0.22, 1.11]로, 시료 8([1, 1, 1])에서 [1.11, 0.22, 0.993]로 움직여 온도와 농도, 시간을 조절하여 전처

Table 3. Ethanol yield, specific ethanol yield and volumetric productivity at 72 hours by SSF

No	Ethanol yield (g/ℓ)	Specific Ethanol yield ^a	Volumetric ethanol productivity (g · ℓ ⁻¹ · h ⁻¹)	No	Ethanol yield (g/ℓ)	Specific Ethanol yield ^a	Volumetric ethanol productivity (g · ℓ ⁻¹ · h ⁻¹)
1	0	0.00	0.0	2	6.8	0.53	0.1033
3	3.4	0.30	0.0595	4	8.6	0.80	0.1561
5	2.2	0.22	0.0431	6	9.7	0.80	0.1568
7	5.5	0.48	0.0938	8	6.8	0.57	0.1126
9	3	0.28	0.0555	10	7.2	0.63	0.1238
11	4.5	0.41	0.0809	12	6.3	0.49	0.0958
13	5.3	0.45	0.0873	14	6.4	0.53	0.1037
15	5.2	0.43	0.0848	16	5.2	0.47	0.0915

^a Conversion rate was calculated based on the theoretical conversion rate 0.51 from fermentable sugars to ethanol. Conversion rate = ethanol yield / (total sugars released during enzymatic hydrolysis in the absence of yeast*0.51).

$$\text{Digestibility after acid pretreatment (\%)} = \frac{\text{Sugars at 72h (g/l)} \times 0.0051}{5g \times \{\text{percentage of glucan (\%)} \times 1.11 + \text{percentage of xylan (\%)} \times 1.13\}} \div 100 \times 100 \quad \text{Equation (2)}$$

* Conversion constant of polysaccharide to monosaccharide : glucan to glucose is 1.11, xylan to xylose 1.13 (Olofsson, K, *et al.*, 2008).

리를 한 후 다시 모델링을 해 보면 최적 조건에 더 가까워질 수 있을 것으로 예측하였다. 그러나 경제적인 비용을 고려했을 때 이미 많은 양의 에너지가 투입되었고, 더 많은 양의 발효저해인자가 발생하여 발효를 저해할 수 있음을 고려했을 때, 위의 모델링 방법은 적용하기에 충분하다고 사료된다.

3.3. 72시간에서의 에탄올 생산량, 시간당 에탄올 생산을 및 에탄올 비생산율

Table 3에서는 각 시료의 72시간에서 나타난 최대 에탄올 생산량(Ethanol yield, g/ℓ)과 전처리된 시료의 당이 에탄올로 전환되는 비생산율(Specific ethanol yield), 그리고 시간당 에탄올 생산율(Volumetric ethanol productivity, g · ℓ⁻¹ · h⁻¹), 전처리 후 효소당화를 통해 분석한 digestibility (%) 등이 제시되었다. 비생산율은 전처리 후 균을 투입하지 않고 같은 조건에서 효소당화를 하였을 때(control) 시간당 생산되는 당이, 균을 투입하여 동시당화발효 공정을 거쳐 에탄올로 전환되는 이론적 수치(0.51)와 비교하였다. Digestibility(소화율)는 전처리된 고형분 구성

성분 중, 72시간 동안 30°C, 150 rpm에서 효소당화를 통해 생산된 당(glucose, xylose)의 비율을 구한 값으로, Equation (2)와 같이 계산되었다.

약 20% 가량의 digestibility를 보였으며, 이는 기존의 연구 논문들에 비해 현저히 낮은 수치이다. 그러나 목재의 chip을 사용한 점을 고려했을 때, 180°C 이하의 온도에서 전처리를 하기에 적합하지 않으며, 충분한 size reduction이 필요하다. 기존의 연구들에서 8 mm 이하의 목재 칩의 경우 확산의 방해 없이 (diffusion limit) 반응이 내부까지 충분히 일어날 것이라고 가정했다(Mittal *et al.*, 2009). 다른 연구 결과들을 비교했을 때 20~40 mesh의 작은 크기의 시료에서 우수한 효소접근성 및 소화율을 보였으며 (Allen *et al.*, 2002; Jacobsen and Wyman, 2002), 이와 같은 이유 때문에 초기 비용을 감수하더라도 size-reduction을 통해 표면적을 충분히 확보하는 방법이 선호된다(Nguyen *et al.*, 2000). 전처리 후 filtration으로 액상과 고형분을 분리하는 과정에서, 고형분을 물로만 씻어낸 경우 chip의 inhibitor들(흡착된 유기 화합물 및 lignin droplet, hemicellulose 잔사)이 완벽하게 제거되지 않은 채 표면에 남아 효소

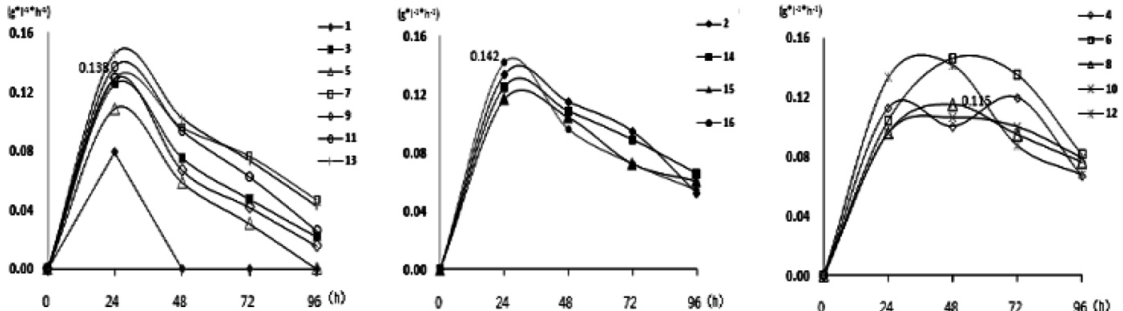


Fig. 2. Volumetric ethanol productivity by simultaneous saccharification and fermentation ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).
 A. Volumetric ethanol productivity showed maximum at 24 h, and less than 0.05 at 96 h (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13).
 B. Volumetric ethanol productivity showed maximum at 24 h, and 0.05 to 0.08 at 96 h (2, 14, 15, 16 (Central point)).
 C. Volumetric ethanol productivity showed maximum at 48 h or more, more than 0.08 at 96 h (4, 6, 8, 10, 12).

가수분해 및 발효를 저해할 수 있다는 한계점이 있습니다(Selig *et al.*, 2007). 때문에 세척의 부분에서도 발효 및 당화 효율을 높일 수 있는 방안을 모색, 적용해보아야 할 것이다.

대부분의 시료들에서 동시당화 발효과정에서 48시간과 72시간 사이에서 가장 많은 양의 에탄올을 생산하였으며, 72시간 이후에는 glucose, xylose와 같은 탄소원이 고갈되면서, 이스트가 에탄올을 분해시켜 탄소원으로 사용하면서 에탄올 수율이 감소되는 경향을 보였다. 가장 적은 양을 생산한 시료 1은 SSF 공정 중 24시간이 되었을 때 1.9 g/l 의 에탄올을 생산하고, 그 이후에는 에탄올이 균에 의해 다시 분해되어 48시간 이후에는 0 g/l 로 나타났다. 전처리 후 남은 고형분의 성분을 분석한 결과 xylan의 분해율이 가장 낮으므로(66%) 이와 같은 전처리 조건은 효소 접근성을 증가시키에 충분하지 못하다는 사실을 확인할 수 있었다. 가장 많은 양인 9.7 g/l 의 에탄올을 생산한 시료 6은 0.013 g/g 의 옥살산을 가하였으며 180도에서 40분 동안 전처리하였다. 약 90%의 xylan이 감소된 것에서 헤미셀룰로오스를 상당량 분해시켰으며, control 상태의 동시당화발효와 비교했을 때 비생산량이 0.8이었다. *P. stipitis*는 β -glucosidase 및 xylobinase 등의 효소를 분비하는 것으로 알려져 있으며(Ozcan *et al.*, 1991; Jeffries *et al.*, 2007), 위와 같은 작용에 의하여 발효와 동시에 이당류의 분해로 인한 추가적인 당화가 가속화되어 control 실험에서 분해된 당보다 더 많은 양의 당이 에탄

올로 전환된 것으로 추정할 수 있다.

Fig. 2과 Fig. 3은 각각 에탄올의 시간당 에탄올 생산율(해당 시간에서의 ethanol yield, $\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)과 control 가수분해 실험을 통해 생산된 발효가능 당(glucose, xylose)의 양(g/l)을 24시간 단위로 비교 분석한 그래프이다. 최대 생산 속도는 전체적으로 큰 차이는 없으나, 최대 생산 속도가 나타나는 시간대의 차이가 관찰되었다. Fig. 2A는 비교적 낮은 온도에서 짧은 시간동안 적은 양의 산을 가하여 전처리를 실행한 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 번 시료들의 시간당 에탄올 생산율을 나타낸 그래프이다. 이 시료들은 24시간에서 최대 속도를 보이다가 48시간 이후에 급격히 감소하며 96시간에서는 0에 가까운 값을 갖는 경향이 있었다. Fig. 2B의 시료들(2, 14, 15, 16)과 비교했을 때 96시간에서 더 높은 시간당 에탄올 생산율을 수치를 보였으며, Fig. 3B에서도 96시간까지 더 많은 단당을 생산했음을 확인할 수 있다. 강한 전처리 조건을 가한 시료(Fig. 2C)에서는 48시간에서 가장 빠른 시간당 전환 속도를 나타내었다. A, B의 시료들은 C의 그룹의 시료들과 비교하였을 때, 효소 접근성이 충분히 향상될 만큼의 충분한 전처리가 이루어지지 않은 것으로 보인다. Fig. 3에서 A와 B에서는 24시간 이후에 기울기가 감소되면서 단당류의 생산 속도가 급격히 감소하였으며 최종 생산되는 당의 양(g/l)에서도 각각 차이를 보였다. 이에 반하여 C에서는 당의 속도가 급격히 감소하는 구간이 48~72시간 이후로 나타나며 B와 비교했을 때에도 최종 당

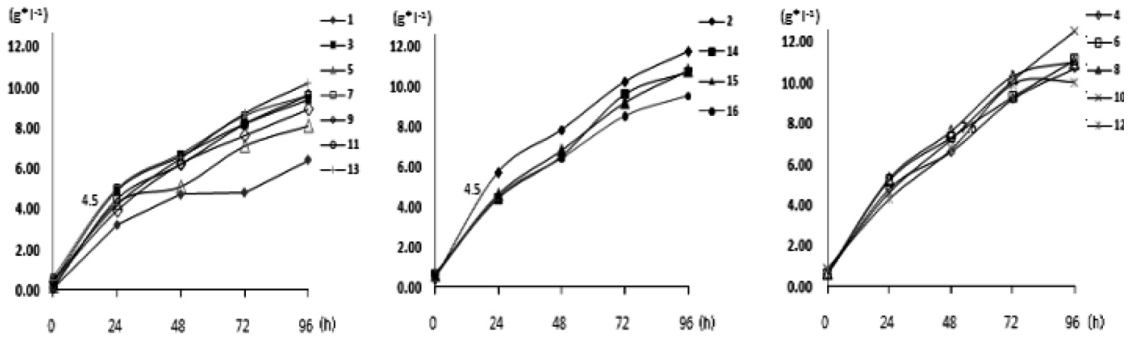


Fig. 3. Production of sugars (glucose, xylose) in enzymatic hydrolysis at 30°C with 150 rpm (g/ℓ).

* This control hydrolysis was performed without yeast at same condition with SSF.

- A. Rate of producing glucose decreased drastically after 24 h (decrease of gradient), and final yield of sugars was 6~9 g/ℓ at 96 h (1, 3, 5, 7, 9, 11, 13).
- B. Rate of producing glucose decreased drastically after 24 h (decrease of gradient), and final yield of sugars was 9~11 g/ℓ at 96 h (2, 14, 15, 16 (Central point)).
- C. Rate of producing sugars decreased after 48 h (decrease of gradient), but not drastically, and higher amount of sugars was produced compared with A and B at 96 h. The line of sample 10 was almost linear steadily (4, 6, 8, 10, 12).

의 생산량이 증가했으며, 시료 10의 경우에는 거의 선형을 이루는 것을 관찰할 수 있다. 이는 C의 시료들이 비교적 높은 온도에서 더 많은 양의 산축매를 가하여 오랜 시간동안 전처리를 한 시료로 효소에 의한 가수분해가 더 오랜 시간 지속될 수 있도록 효소 및 균의 접근성이 상당히 개선된 될 수 있도록 바이오매스 내부의 구조적 변화를 유도한 것으로 추측될 수 있다. 따라서 에탄올을 생산하기에 적합한 정도로 전처리가 충분해 된 시료의 경우 지속적으로 효소가 수분해에 의해 당이 생산될 수 있으므로 에탄올의 분해없이, 균의 성장과 동시에 많은 양의 에탄올을 생산할 수 있는 것으로 사료된다.

4. 결 론

위의 실험의 목적은 칩 상태의 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)를 옥살산으로 전처리 후 동시당화발효를 하여 에탄올을 생산하고, 그 결과를 response surface method에 도입하여 modeling하는 것이다. 산농도, 전처리 시간, 반응 온도를 조절하여 2³ factorial central composite experimental design을 바탕으로 15가지의 각기 다른 조건에서 전처리를 실행하였으며, 전처리 후 고체 시료는 *P. sipitis*를 이용한 동시

당화발효로 에탄올 생산에 이용되었다. 매 24시간마다 시료의 ethanol 생산량을 관찰하였으며, 대부분의 시료가 72시간에서 최대 생산량을 보였다. 180°C에서 40분간 0.013 g/g의 옥살산으로 처리한 시료가 가장 많은 양의 에탄올(9.7 g/ℓ)을 생산하였으며, 160°C에서 20분간 0.013 g/g의 옥살산으로 처리한 시료에서는 72시간에서 에탄올이 생성되지 않았다. Response surface methodology 분석에 따르면, 온도 인자가 전처리 조건과 ethanol 생산량 사이에서 가장 큰 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 또한 더 높은 당화 효율을 이끌어 내기 위해서는 발효 저해 산물의 제거 기술과 적절한 size reduction에 대한 연구가 진행되어야 할 것이다.

사 사

본 연구는 산림청 '산림과학기술개발사업(과제번호 : S120810L140130)'과 'BK협력사업(과제번호 : 20100301-030-078-001-06-00)' 미국 Forest products laboratory의 Thomas W. Jeffries 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. 김혜연, 이재원, T. W. Jeffries, 광기섭, 최인규. 2009. 바이오에탄올 생산에 적합한 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)의 oxalic acid 전처리 효과 탐색. 목재공학 37(4): 397~405.
2. Allen, S., D. Schulman, J. Lichwa, M. Antal Jr., E. Jennings, and R. Elander. 2001. A comparison of aqueous and dilute-acid single-temperature pretreatment of yellow poplar sawdust. Industrial & Engineering Chemistry Research 40(10): 2352~2361.
3. Cara, C., E. Ruiz, J. Oliva, F. Saez, and E. Castro. 2008. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. Bioresource Technology 99(6): 1869~1876.
4. Duff, S. and W. Murray. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. Bioresource Technology 55(1): 1~33.
5. Galbe, M. and G. Zacchi. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. Applied Microbiology and Biotechnology 59(6): 618~628.
6. Jacobsen, S. E. and C. E. Wyman. 2002. Xylose monomer and oligomer yields for uncatalyzed hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose at varying solids concentration. Industrial & Engineering Chemistry Research 41(6): 1454~1461.
7. Jeffries, T., I. Grigoriev, J. Grimwood, J. Laplaza, A. Aerts, A. Salamov, J. Schmutz, E. Lindquist, P. Dehal, and H. Shapiro. 2007. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. Nature Biotechnology 25(3): 319~326.
8. Jorgensen, H., J. Kristensen, and C. Felby. 2007. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. Biofuels, Bioproducts and Biorefining 1(2): 119~134.
9. Kenealy, W., E. Horn, and C. Houtman. 2007. Vapor-phase diethyl oxalate pretreatment of wood chips: Part 1. Energy savings and improved pulps. Holzforschung 61(3): 223~229.
10. Kim, H., J. Lee, T. Jeffries, and I. Choi. 2010. Response surface optimization of oxalic acid pretreatment of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) for production of glucose and xylose monosaccharides. Bioresource Technology (online published).
11. Lee, J., R. Rodrigues, and T. Jeffries. 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. Bioresource Technology 100(24): 6307~6311.
12. Lee, J., R. Rodrigues, H. Kim, I. Choi, and T. Jeffries. 2010. The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. Bioresource Technology 101(12): 4379~4385.
13. 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.
14. Mittal, A., S. Chatterjee, G. Scott, and T. Amidon. 2009. Modeling xylan solubilization during autohydrolysis of sugar maple and aspen wood chips: Reaction kinetics and mass transfer. Chemical Engineering Science 64(13): 3031~3041.
15. Navarro, A. 1994. Effects of furfural on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Mathematical models. Current Microbiology 29(2): 87~90.
16. Nguyen, Q., M. Tucker, F. Keller, and F. Eddy. 2000. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. Applied Biochemistry and Biotechnology 84(1): 561~576.
17. Nichols, N., L. Sharma, R. Mowery, C. Chambliss, G. Van Walsum, B. Dien, and L. Iten. 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology 42(7): 624~630.
18. Olofsson, K., A. Rudolf, and G. Liden. 2008. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biotechnology 134(1~2): 112~120.
19. Ozcan, S., P. Kotter, and M. Ciciary. 1991. Xylan-hydrolysing enzymes of the yeast *Pichia stipitis*. Applied Microbiology and Biotechnology 36(2): 112~120.

- 190~195.
20. Perez, J., I. Ballesteros, M. Ballesteros, F. Saez, M. Negro, and P. Manzanares. 2008. Optimizing Liquid Hot Water pretreatment conditions to enhance sugar recovery from wheat straw for fuel-ethanol production. *Fuel* 87(17~18): 3640~3647.
 21. Qureshi, N. and T. Ezeji. 2008. Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 2(4): 319~330.
 22. Roberto, I., S. Mussatto, and R. Rodrigues. 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products* 17(3): 171~176.
 23. Selig, M., S. Viamajala, S. Decker, M. Tucker, M. Himmel, and T. Vinzant. 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnology Progress* 23(6): 1333~1339.
 24. Shimada, M., M. Ma, Y. Akamatsu, and T. Hattori. 1994. A proposed role of oxalic acid in wood decay systems of wood-rotting basidiomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 13(2): 285~295.
 25. Swaney, R., M. Akhtar, E. Horn, M. Lenz, J. Klungness, and M. Sabourin. 2003. Oxalic acid pretreatment for mechanical pulping greatly improves paper strength while maintaining scattering power and reducing shives and triglycerides. In: *Proceedings of the Tappi Fall Technical Conference: Engineering pulping and PCE and I*. Tappi Press. Atlanta. GA.
 26. Tucker, M., J. Farmer, F. Keller, D. Schell, and Q. Nguyen. 1998. Comparison of yellow poplar pretreatment between NREL digester and Sunda hydrolyzer. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70(1): 25~35.
 27. Wyman, C., B. Dale, M. Holtzapple, M. Ladisch, Y. Lee, and J. Saddler. 2007. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol Biofuels. *Bioproducts and Biorefining* 2(1): 26~40.