

효모를 이용한 에탄올 생산을 위한 감귤껍질 전처리조건의 최적화

이종섭¹, 박은희¹, 권세영¹, 여수환², 김명동^{1*}

¹강원대학교 식품생명공학과

²농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부

Received: March 11, 2014 / Revised: April 1, 2014 / Accepted: April 2, 2014

Optimization of Pretreatment of Persimmon Peel for Ethanol Production by Yeast Fermentation

Jong-Sub Lee¹, Eun-Hee Park¹, Se-Young Kwun¹, Soo-Hwan Yeo², and Myoung-Dong Kim^{1*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Republic of Korea

²Fermentation and Food Processing Division, Department of Agrofood Resources, NAAS, RDA, Suwon 411-853, Republic of Korea

A response surface method based on a central composite design experiment was used to determine the optimum conditions for pretreatment of persimmon peel. It was mathematically predicted that the maximum amount of reducing sugars would be obtained at an H₂SO₄ concentration of 1.77% (w/v) and a heat treatment time of 26.4 min. A reducing sugar concentration of 63.23 g/l was obtained under the optimum pretreatment conditions determined by RSM. Under anaerobic growth conditions, *Saccharomyces cerevisiae* NK28 produced 15.52 g/l of ethanol with a yield of 0.34 g ethanol/g glucose from pretreated persimmon peel, which corresponded to 14% and 26% enhancements in ethanol productivity and ethanol yield, respectively, compared with those obtained in aerobic growth conditions. This study suggests that persimmon peel might be a useful substrate for bioethanol production by yeast fermentation.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, persimmon peel, fermentation, pretreatment, response surface method

최근 화석연료의 고갈과 고유가, 지구온난화 문제로 인하여 대체에너지 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 2005년 이후 전세계 바이오연료의 개발 및 보급이 빠르게 증가하고 있는 추세이다[22]. 바이오연료에는 바이오디젤, 바이오에탄올 등이 있으며, 그 중에서도 바이오에탄올은 식물을 원료물질로 이용하여 생산되는 에탄올로 옥수수, 사탕수수 등 당질계와 전분질계 바이오매스를 이용하여 생산하고 있다[1]. 그러나 2010년 이후 곡물가격의 급등, 식량자원의 무기화 등의 문제점이 제기되면서 생산량이 둔화되었으며, 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 목질계, 미세조류를 비롯한 해양 생물자원 등의 다양한 바이오매스를 활용하여 바이오에탄올을 생산하는 연구가 진행되고 있다[2, 4, 12].

목질계 바이오매스는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 구성된 자원으로 그 중에서도 밀짚, 벼짚, 옥수수대, 폐목재 및

농업 부산물 등을 이용한 바이오매스가 바이오에탄올 생산을 위한 원료물질로서 기대되고 있다[9, 17, 19, 28]. 목질계 바이오매스는 셀룰로오스 상태이기 때문에 미생물을 이용한 에탄올 발효 공정 전에 효모를 비롯한 발효미생물이 대사할 수 있는 포도당으로 변환시키는 전처리 공정이 필요하다[1, 28]. 셀룰로오스를 에탄올로 전환하기 위한 주요 전처리공정으로는 묽은 산, 농축 산 그리고 효소 가수분해법이 있다[18, 24, 26, 28]. 셀룰로오스의 산가수분해에 의한 당화공정은 효소를 이용하는 당화공정보다 더 오래된 역사를 가지고 있으며, 최근에는 목질계 바이오매스에서 묽은 산 가수분해를 통해 전처리하는 방법이 꾸준히 보고되고 있다[1, 3, 7]. 목질계 바이오매스는 전처리 과정에서 부가적으로 생산되는 다양한 발효 저해제들을 함유하고 있으며, 저해제에 의하여 에탄올을 생산하는 미생물의 생육이 저해되는 문제점을 지니고 있다[11, 29, 30]. 보릿짚, 유채대, 벼짚, 고추대, 감귤껍질 등과 같은 농업부산물들은 재활용가능성 및 경제적인 가치가 높은 잠재력이 있지만[8, 16, 20, 32], 우리나라에서 매년 발생하는 농업부산물의 80% 이상이 자원으로 재활용되지 못하고 있으

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6458, Fax: +82-33-241-0508

E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

며 폐기를 위하여 막대한 경제적인 비용이 발생하고 있을 뿐만 아니라 환경오염 등의 문제를 유발시키고 있어 이를 효율적으로 활용하여 자원화할 수 있는 기술개발이 필요하다 [10].

감은 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 과일로서 재배에 큰 어려움이 없어 생산 농가의 소득증대에 기여하고 있는 작목이다. 국내에서 생산되는 감은 크게 단감과 뽕은 감으로 구별되며, 전체적인 감의 생산량 중 대부분이 꽃감 생산에 사용된다. 꽃감을 생산하는 과정에서 생성되는 감껍질은 사용되는 감의 30%에 달하며 대부분 폐기되고 있는 실정이며, 현재로서는 활용방안 및 관련기술의 개발이 매우 미흡한 상황이다[14].

본 연구에서는 감 가공과정에서 부산물로 발생되는 감껍질을 이용하여 바이오에탄올을 생산하기 위하여 반응표면분석법(Response Surface Method, RSM) [5]을 이용하여 묶은 황산을 이용한 전처리공정을 최적화하고 효모를 이용한 에탄올 생산 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

감껍질은 경상북도 청도의 감 고부가가치화 클러스터 사업단에서 제공받은 2012년산 감껍질을 실험실용 건조기(JSR, Korea)를 이용하여 65°C에서 48시간 동안 건조하여 분쇄기(HMF-3000S, Hanil, Korea)로 분쇄한 후 -20°C에 보관하였다.

전처리 방법

분쇄한 감껍질은 농도별로 제조한 황산용액(1.4, 1.5, 1.75, 2.0, 2.1% (w/v))과 10% (v/v) 비율로 혼합하여 실온에서 1시간 동안 침지한 후 121°C에서 열처리하였다[27]. 전처리된 시료는 상온으로 냉각시킨 후, 원심분리(16,000 ×g, 10 min)하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 CaCO₃를 사용하여 pH 5.5로 중화시킨 후 원심분리(16,000 ×g, 10 min)하여 상등액을 회수한 후 멸균된 여과지(0.45 μm, Advantec, USA)로 여과하여 -20°C에 보관하였다.

실험설계

감껍질의 전처리조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석

법을 이용하였다[21]. 전처리 조건은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD) [31]을 이용하여 황산농도(0.5-3.0% (w/v))와 열처리시간(15-30분)의 범위를 설정하였다. 독립변수로서 황산농도(X₁, %) 및 가열처리 시간(X₂, min)을 설정하고 종속변수는 전처리 후 생성된 환원당의 농도(Y_R, g/l)로 지정하여 실험을 설계하였으며 Table 1에 나타냈다. 실험 결과의 분석은 Design Expert 8.0 (stat-Ease, USA)를 사용하였다.

분석방법

본 연구에 사용된 효모는 키위로부터 분리한 *S. cerevisiae* NK28 [15]이며, 균체 성장속도는 흡광광도계(GE Healthcare, Sweden)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

전처리를 통하여 생성된 환원당의 정량은 DNS(3, 5-dinitrosalicylic acid)법[23]을 사용하였다. 전처리 된 감껍질에 함유된 당류의 정성분석은 Bio-LC(HPAEC-PAD system, Dionex, USA)를 이용하여 분석하였다. CarboPac™ PA1 (Dionex) 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로는 18 mM NaOH를 1.0 ml/min의 유속으로 사용하였다. 전처리 된 감껍질에 함유된 발효 저해제 중 furfural, 5-Hydroxymethylfurfural 및 acetic acid의 분석은 HPLC (Shimadzu, Japan)를 사용하였으며 Rezex ROA-Organic Acid H+ (Phenomenex, USA) 컬럼 및 0.6 ml/min 유속의 0.005 N 황산용액을 이동상으로 사용하였다.

발효조건

S. cerevisiae NK28은 5 ml의 YEPD (yeast extract 1% (w/v), peptone 2% (w/v), glucose 2% (w/v))에 접종하여 35°C에서 12시간 동안 배양한 후, 전처리 과정에서 생산되는 저해제들이 효모의 성장에 영향을 미치는 것을 고려하여 전처리물에서 12시간 동안 전배양하였다. 100 ml의 감껍질 전처리물(총환원당 63.23 g/l, pH 5.5, Table 3)이 포함된 500 ml의 플라스크에 초기 세포흡광도(OD₆₀₀)가 0.1이 되도록 접종하여 35°C에서 96시간 동안 배양하였다. 호기적 배양은 진탕배양기의 교반속도를 200 rpm으로 유지하였으며, 혐기적 조건은 100 ml 배지에 oxyrase(Bioworld, USA) 1 ml를 첨가하고 스크류 타입의 마개를 이용하여 플라스크를 밀봉한 후 진탕배양기에서 배양하였다.

Table 1. Code and level of variables used for central composite design of pretreatment.

Variable	Unit	Parameter	Code level				
			-α	-1	0	1	+α
Sulfuric acid	%	X ₁	1.40	1.50	1.75	2.00	2.10
Reaction time	min	X ₂	23.96	25.00	27.50	30.00	31.04

결과 및 고찰

반응표면분석법을 이용한 감귤껍질 전처리 최적화

중심합성 계획법에 따라 Table 1과 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 2와 같이 13가지의 전처리 조건을 설정하고 감귤껍질을 전처리하였다. 황산농도(X_1)와 가열처리시간(X_2)을 독립변수로 설정하고 종속변수(환원당 생성량, Y_p)에 대한 회귀방정식을 얻어 전처리조건에서 독립변수의 상호영향 및 최적 전처리조건을 구하였다. 중심합성 계획에 따라 얻은 13개의 실험값을 이용하여 아래와 같은 식을 구하였다.

$$Y_p = -257.942 + 151.713 X_1 + 14.114 X_2 + 0.310 X_1 X_2 - 45.064 X_1^2 - 0.278 X_2^2 \quad (1)$$

전처리 조건에 대한 contour map 및 반응표면은 Fig. 1에 나타내었으며 환원당 생성량에 대한 식 (1)의 결정계수(R^2)는 0.98로 황산농도와 가열처리시간에 따라 환원당 생성량이 증가하였으며, 황산농도보다는 가열처리시간이 환원당 생성에 영향을 상대적으로 크게 미치는 것으로 나타났다(Fig. 1). 최대 환원당 생성량은 63.05 g/l로 예측되었으며, 이때 전처리조건은 황산농도 1.77% 및 가열처리시간 26.4분이었다. 최적의 조건으로 예측된 전처리조건에서 감귤껍질을 전처리한 결과 약 63.23 g/l의 환원당이 생성되는 것을 확인하였다. 전처리물에 포함된 주요 당함량은 Table 3에 나타냈으며

Table 2. Central composite design for optimization of persimmon peel pretreatment using response surface method.

Run	Independent variables		Dependent variable
	X_1 Sulfuric acid (%)	X_2 Treatment time (min)	Y_p Reducing sugar (g/l)
1	1.40	27.50	56.16
2	1.50	30.00	59.22
3	1.50	25.00	55.78
4	1.75	27.50	61.37
5	1.75	27.50	57.06
6	1.75	27.50	62.69
7	1.75	23.96	62.69
8	1.75	27.50	62.69
9	1.75	27.50	62.69
10	1.75	31.04	62.69
11	2.00	25.00	60.10
12	2.00	30.00	57.43
13	2.10	27.50	57.94

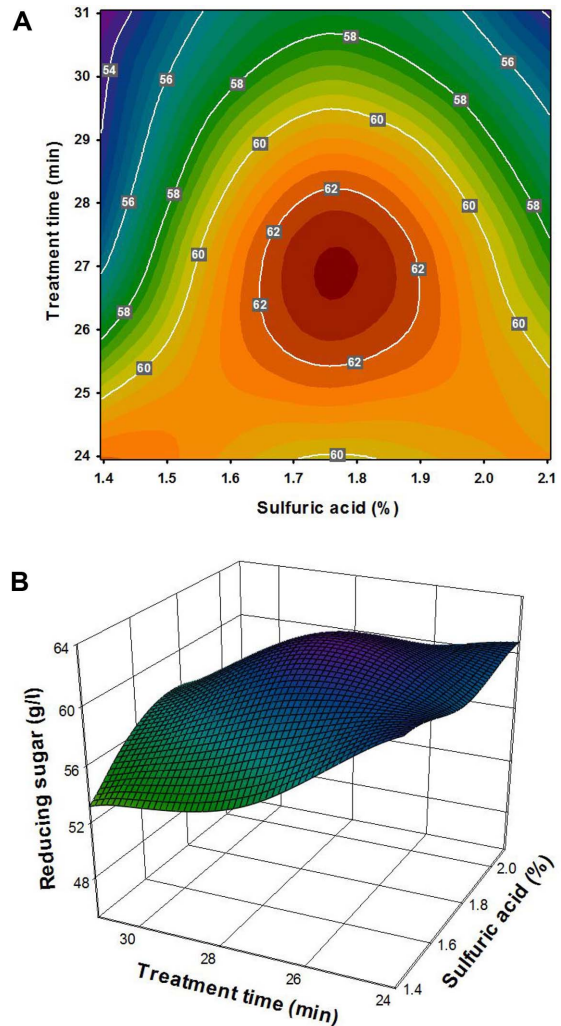


Fig. 1. Contour (A) and response surface (B) plots showing the influences of sulfuric acid concentration and pretreatment time on reducing sugar formation from persimmon peel.

Table 3. Composition of the sugar in sulfuric acid- pretreated persimmon peel*.

Sugar	Concentration (g/l)
Arabinose	2.06 ± 0.01
Fructose	18.85 ± 0.06
Fucose	2.98 ± 0.01
Galactose	1.5 ± 0.01
Glucose	18.83 ± 0.04
Rhamnose	0.17 ± 0.00
Xylose	18.84 ± 0.05

*Data were obtained from persimmon peel which was pretreated with 1.77% sulfuric acid at 121°C for 26.4 min.

glucose, xylose 및 fructose가 전체 환원당 중 약 89%에 해당하였다.

바이오매스를 산과 열을 이용하여 전처리 하면 환원당 외에도 5-HMF, furfural 등의 발효 저해제가 생산된다[6, 12]. Furfural의 경우 1 g/l 이상을 포함하고 있을 경우 에탄올 발효에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며[6, 13], acetic acid는 5 g/l 이상을 포함할 경우 에탄올 발효를 저해하는 것으로 알려져 있다[25]. 묽은 황산을 이용한 감껍질의 전처리 과정에서 생산되는 발효 저해제는 furfural (0.22 ± 0.02 g/l), 5-HMF (0.04 ± 0.01 g/l) 및 acetic acid (2.89 ± 0.04 g/l)가 검출되어 에탄올 생산을 위한 효모의 성장에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

효모발효를 통한 에탄올 생산

반응표면분석법을 통하여 설정한 전처리조건을 이용하여 감 껍질 전처리물을 제작하여 에탄올 생산을 위한 배지로 사용하였다. 감껍질 전처리물 100 ml에 *S. cerevisiae* NK28을 접종한 후 호기 및 혐기조건에서 균체 성장속도, 환원당 소모량 및 에탄올 생산속도를 측정하였다(Fig. 2). 호기적 배양

에서 *S. cerevisiae* NK28은 49.1 g/l의 환원당을 소모하였으며, 약 13.3 g/l의 에탄올을 생산하였다(Fig. 2A). 에탄올 생산성은 0.14 ± 0.01 g/l·h이었으며, 수율은 0.27 ± 0.01 g/g 로 나타났다. 혐기배양에서는 환원당을 약 45.26 g/l를 소모하여 15.52 ± 0.36 g/l의 에탄올이 생산되었으며, 에탄올 생산성은 0.16 ± 0.01 g/l·h로 호기배양보다 생산성이 약 14% 증가하였다. 혐기적 배양에서는 호기적 배양보다 환원당의 소모량이 감소하였고, 에탄올 수율은 0.34 ± 0.01 g/g 로 호기적 배양보다 약 26% 증가하였다(Fig. 2B).

요 약

본 연구에서는 감가공 과정에서 매년 막대한 양으로 발생하는 감껍질을 이용하여 에탄올을 생산하기 위하여 묽은 황산으로 감껍질을 전처리하는 조건을 중심합성계획법과 반응표면분석법을 통하여 최적화하였다. 감껍질의 최적 전처리 조건은 황산농도 1.77%와 열처리 시간 26.4분이었으며 RSM 모델에서 예측한 수준과 비슷한 수율로 환원당을 생성하였다. 감껍질 전처리물을 이용한 효모발효에서 혐기적 배양조건에서 15.52 g/l의 에탄올이 생산되는 것을 확인하였다. 본 연구를 통하여 매년 막대한 양으로 발생하는 감껍질을 활용하는 방안 중의 하나로써 효모를 이용한 에탄올 생산의 가능성을 제시하였다.

Acknowledgments

This work was carried out with the support of “Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009477)” Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

1. Cho WS, Chung YC, Kim BK, Suh SJ, Koh WS, Choe SH. 2007. Cellulosic ethanol as renewable alternative fuel. *J. Plant Biotechnol.* **34**: 111-118.
2. Choi SJ, Lee SM, Lee JH. 2012. Production of bio-ethanol from red algae by acid hydrolysis and enzyme treatment. *Appl. Chem. Eng.* **23**: 279-283.
3. Eyini M, Rajapandy V, Parani K, Lee MW. 2004. Effect of different pretreatment methods on the bioconversion of rice bran into ethanol. *Korean Soc. Mycol.* **32**: 170-172.
4. Goshima T, Tsuji M, Inoue H, Yano S, Hoshino T, Matsushika A. 2013. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by a novel *Kluyveromyces marxianus* strain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 1505-1510.
5. Grahovac JA, Dodić JM, Dodić SN, Popov SD, Jokić AI. 2011. Optimization of bioethanol production from intermediates of

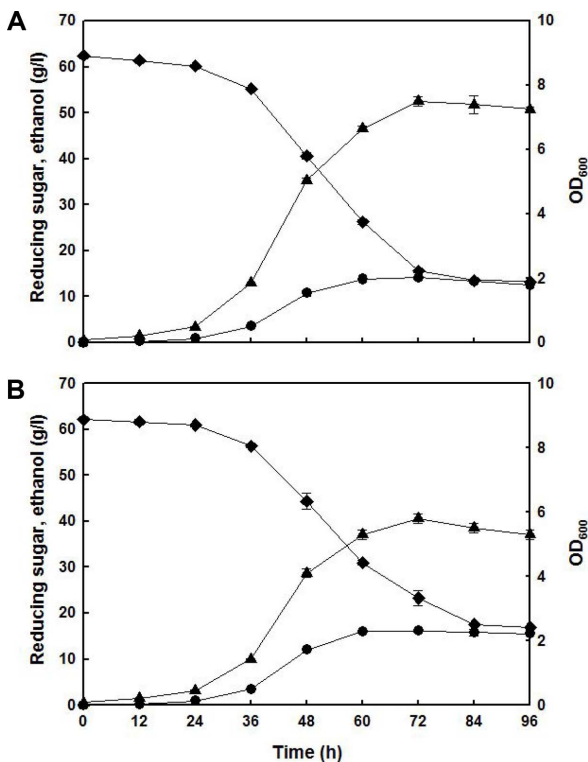


Fig. 2. Profiles of cell growth (▲), ethanol production (●), and reducing sugar consumption (◆) of *S. cerevisiae* NK28 grown in sulfuric acid-pretreated persimmon peel. Averages and standard errors were obtained from three independent aerobic (A) and anaerobic (B) cultivations.

- sugar beet processing by response surface methodology. *Biomass Bioenerg.* **35**: 4290-4296.
6. Heer D, Sauer U. 2008. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microb. Biotechnol.* **1**: 497-506.
 7. Jeong TS, Oh KK. 2009. Behaviors of glucose decomposition during dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **24**: 267-272.
 8. Kim HY, Lee JW, Jeffries TW, Choi IG. 2011. Evaluation of oxalic acid pretreatment condition using response surface method for producing bio-ethanol from Yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) by simultaneous saccharification and fermentation. *Mokchae Konghak* **39**: 75-85.
 9. Kim KS, Kim JS. 2010. Optimization of ammonia percolation process for ethanol production from miscanthus sinensis. *Korean Chem. Eng. Res.* **48**: 704-711.
 10. Kim SK, Lee GD, Chung SK. 2003. Monitoring on fermentation of persimmon vinegar from persimmon peel. *Korean J. Food Sci. Technol.* **35**: 642-647.
 11. Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**: 10-26.
 12. Ko JJ, Yun S, Kang SW, Kim SK. 2008. A review on thermochemical pretreatment in lignocellulosic bioethanol production. *Korea Organic Res. Recy. Assoc.* **16**: 79-88.
 13. Krahulec S, Petschacher B, Wallner M, Longus K, Klimacek M, Nidetzky B. 2010. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microb. Cell Fact.* **9**: 16.
 14. Lee GD, Jeong YJ. 1998. Optimization on organoleptic properties of *Kochujang* with addition of persimmon fruits. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 1132-1136.
 15. Lee JS, Park EH, Kim JW, Yeo SH, Kim MD. 2011. Growth and fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* NK28 isolated from kiwi fruit. *J. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 33-39.
 16. Lee JW, Kim HY, Jeffries TW, Choi IG. 2010. Bioethanol production using by-product of VPP (value prior to pulping). *Mokchae Konghak* **38**: 561-567.
 17. Lee SB, Lee JD. 2010. Effect of pretreatment process on cellulosic ethanol production using waste papers. *J. Korean Solid Wastes Eng. Soc.* **27**: 553-557.
 18. Lee SM, Choi IS, Kim SK, Lee JH. 2009. Production of bio-ethanol from brown algae by enzymic hydrolysis. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **24**: 483-488.
 19. Lee SM, Lee JH. 2010. Influence of acid and salt content on the ethanol production from *Laminaria japonica*. *Appl. Chem. Eng.* **21**: 154-161.
 20. Lim WS, Lee JW. 2012. Enzymatic hydrolysis condition of pre-treated corncob by oxalic acid to improve ethanol production. *J. Korea Wood Sci. Technol.* **40**: 294-301.
 21. Lu X, Zhang Y, Angelidaki I. 2009. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bio-conversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresour. Technol.* **100**: 3048-3053.
 22. McLaren JS. 2005. Crop biotechnology provides an opportunity to develop a sustainable future. *Trends Biotechnol.* **23**: 339-342.
 23. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
 24. Oh KK, Hong SI, Lee YY. 1998. Optimization of ammonia recycled percolation process for lignocellulosic biomass pretreatment. *Korean J. Chem. Eng.* **36**: 784-791.
 25. Palmqvist E, Grage H, Meinander NQ, Hahn-Hägerdal B. 1999. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and *p*-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 46-55.
 26. Piccolo C, Bezzo F. 2009. A techno-economic comparison between two technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biomass Bioenerg.* **33**: 478-491.
 27. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, Wu YV. 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnol. Prog.* **21**: 816-822.
 28. Sassner P, Galbe M, Zacchi G. 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenerg.* **32**: 422-430.
 29. Taherzadeh MJ, Eklund R, Gustafsson L, Niklasson C, Lidén G. 1997. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Ind. Eng. Chem. Res.* **36**: 4659-4665.
 30. Tran AV, Chabmers PR. 1986. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2, 3-butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 191-197.
 31. Vilaplana M, García AB, Caminal G, Guillén F, Sarrà M. 2012. Optimisation of the operational conditions of trichloroethylene degradation using *trametes versicolor* under quinone redox cycling conditions using central composite design methodology. *Biodegradation* **23**: 333-341.
 32. Won KY, Oh KK. 2009. Optimization the xylose fractionation conditions of pepper stem with dilute sulfuric acid. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **24**: 361-366.