

흑액 유래 유기산의 *Escherichia coli* MG 1655 성장에 미치는 영향 탐색¹

문 준 관² · 엄 병 환^{3,†}

Effect of Organic Acids Derived from Black Liquor on Growth of Selected *Escherichia coli* MG 1655¹

Joon-Kwan Moon² · Byung-Hwan Um^{3,†}

요 약

본 연구는 펄프 흑액 내 포함된 아라비노스를 당기질로 대사할 수 있는 대장균 균주인 *Escherichia coli* MG 1655를 선별하고 흑액 유래 유기산(초산, 포름산, 및 젖산)이 선별 균주의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 서로 다른 유기산 농도 및 유기산 조합에 의한 대장균 성장에 미치는 영향을 분석하기 위해서 발효배지 내 다양한 유기산 농도의 조합에 따른 *E. coli* MG 1665의 성장을 관찰하였다. 유기산 포함된 배지에서의 *E. coli* MG 1665 배양 실험 결과에 의하면 초산 1.0 g/l, 젖산 1.2 g/l, 포름산 0.8 g/l 조건에서는 유기산이 포함되지 않은 대조군과 유사한 성장을 보였으나, 초산 1.5 g/l, 젖산 2.0 g/l, 포름산 1.2 g/l 이상을 포함하는 배지 조건에서는 *E. coli* MG 1665의 성장이 강하게 억제됨을 관찰하였다. 이와 더불어 유기산들의 혼합된 배지에서는 3종의 유기산 중 포름산이 가장 중요한 요소로 작용함을 알 수 있었다. 결과적으로 흑액 내 아라비노스를 당기질로 이용하여 높은 발효 수율을 얻기 위해서는 흑액 내 포함된 유기산인 초산, 젖산, 포름산이 각각 최소 1.0 g/l, 1.2 g/l, 0.8 g/l 이하로 흑액 내 존재하는 유기산 제거 방법을 개발하거나 높은 유기산 농도에서도 정상적인 성장을 갖는 유기산 내성 균주의 개발이 요구될 수 있다.

ABSTRACT

In this study, we selected an *Escherichia coli* strain (*E. coli* MG 1655) metabolizing arabinose derived from acid hydrolyzed black liquor as a carbon source and investigated effect of organic acids (acetic acid, formic acid, and lactic acid) presented in black liquor on growth of the *E. coli* MG 1655. We measured growth of *E. coli* MG 1655 under various concentration of each and combined three kinds of organic acids. The *E. coli* MG 1655 shows tolerance to acetic acid, lactic acid and formic acid at these concentrations (1.0 g/l acetic acid, 1.2 g/l lactic acid and 0.8 g/l formic

¹ Date Received June 7, 2014, Date Accepted August 4, 2014

² 환경대학교 식물생명환경과학과 Department of Plant Life and Environmental Sciences, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do, 456-749, Korea

³ 환경대학교 화학공학과, 화학기술연구소 Department of Chemical Engineering and Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University, Anseong, Gyeonggi-do, 456-749, Korea

[†] 교신저자(corresponding author) : 엄병환(e-mail: bhun11@hknu.ac.kr)

acid, respectively), but displays some growth retardation over 1.5 g/l acetic acid, lactic acid 2.0 g/l, and formic acid 1.2 g/l, respectively. In addition, formic acid was shown to be a critical factor affecting growth of the *E. coli* MG 1655 in the presence of three kinds of organic acids. These results indicate that the inhibitors should be removed at least 1.0 g/l of acetic acid, 1.2 g/l of lactic acid, 0.8 g/l of formic acid for normal cell growth required for high yield fermentation. In addition, there is a need to construct recombinant strains that may be resistant to the same or higher organic acids concentration (> 1.2 g/l) in the growth.

Keywords : black liquor, fermentation, inhibitor, *E. coli* MG 1655, organic acid

1. 서 론

오늘날 디지털 미디어 홍수 속에서도 펄프의 수요는 높은 수준으로 유지되고 있다. 따라서 펄프생산 산업은 중장기적인 관점에서 펄프 생산뿐만 아니라 생산 공정에서 발생하는 부산물의 최소화 및 재활용에 대한 관심을 가져야 한다. 펄프를 주된 산업으로 이용하는 국가들은 산림자원인 펄프를 만들고 남은 폐기물을 재사용하여 친환경적으로 바꾸기 위한 기술개발에 힘쓰고 있다(Amidon 2006; Um과 van Walsum 2010; Um 2012; Park 등 2013). 이러한 시대적 요구에 맞추어 산업폐기물로 여겨졌던 펄프 폐액을 재이용할 수 있는 공정을 채택함으로써 환경개선 및 이산화탄소 저감을 꾀하고 있다. 기존 펄프생산공정에 열 화학 및 생물학적 공정을 추가 및 보완하여 바이오 에탄올과 같은 수송용 바이오 에너지 개발과 바이오매스 유래 플라스틱과 같은 친환경 화학제품 등을 생산할 수 있다. 이와 같은 부산물의 재활용은 폐수 처리비용 감소 및 에너지효율 향상을 유도하여 경제적인 효과를 낼 수 있을 것으로 판단된다. 펄프생산공정에서 발생하는 대표적 에너지 고부가 부산물로서 흑액(black liquor)이 있다. 흑액은 40% 가량 회수 가능한 화학펄프와 60%의 유기산물의 혼합물로 펄프공정 중 추출된다(Sricharoenchaikul 등 2003). 발생된 유기산물에 포함된 대부분의 당은 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 당으로 구성되어 있다. 헤미셀룰로오스는 다양한 단당체 단위로 구성되어 있고, 셀룰로오스(cellulose)보다 중합도가 낮은 단당체로서 주요 단당은 자일로스(xylose), 아라비노스(arabinose)가 대표적이다. Fig. 1은 기존 펄프공정

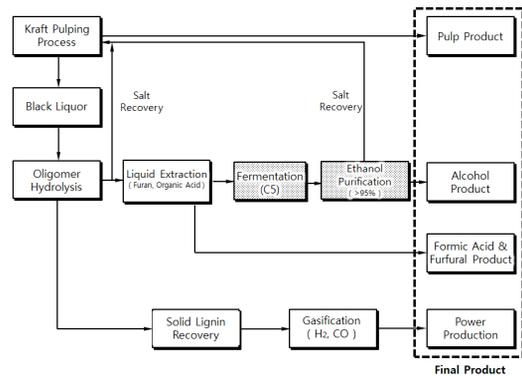


Fig. 1. Simplified block flow diagram (BFD). The process flow of a black liquor biorefinery in a pulp mill plant producing wood pulp, alcohol, new chemicals, and electricity. The C5 fermentation step is the focus of this study.

에 공정변형을 통하여 에너지효율 향상 및 고부가 물질 생산방안을 제안한 그림이다. 이 중 흑액 내 헤미셀룰로오스 기질을 이용하여 에탄올 발효를 할 수 있다. *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*은 대표적인 자일로스 기질기반 에탄올 생산 균주로 알려져 있다(Jeffries와 Jin 2000; Agbogbo 등 2006; Sanchez와 Cardona 2008). 특히 *Pichia stipitis*를 이용한 자일로스 발효공정은 산업적인 적용에 있어 가장 긍정적인 결과를 보여주었다(du Preez 등 1986). 높은 에탄올 수율로 자일로스, 만노스(mannose)와 같은 오탄당 뿐만 아니라 글루코스(glucose), 갈락토스(galactose)와 같은 육탄당을 발효할 수 있고 발효과정 중 비타민을 필요로 하지 않아 경제적이고 간단한 조작이 가능하다(Parekh 등

1986; Agbogbo와 Wenger 2006). 하지만, L-arabinose의 경우 *P. stipitis* 자체적으로 대사를 할 수 없기 때문에 L-아라비노스(L-arabinose)를 이용한 에탄올 생산은 불가능하다(Nigam 2002). 반면에 *Escherichia coli* MG 1655는 L-아라비노스를 기질로 이용하여 에탄올을 생산할 수 있는 대사경로를 자체적으로 갖고 있어 L-아라비노스를 이용한 에탄올 생산이 가능하다(Baev 등 2006). 그러나, 흑액을 이용한 에탄올 생산에 있어서 문제점 중 하나는 펄핑과정 시 발생하는 유기화합물 및 과분해 화합물들이 에탄올 생산 및 균주의 대사과정에 저해영향을 초래한다는 것이다. 흑액 내 대표적 저해물질로는 헤미셀룰로오스에 포함된 아세트기(CH_3CO -)가 분해되는 과정에서 유기산(초산, 포름산, 레블린산, 젯산)을 들 수 있다(Pampulha와 Loureiro-Dias 1989; Modig 등 2002). 흑액 내 이들 저해물질들은 2차 가수분해 및 농축조건에 따라 농도가 유동적이며, 최근 이에 대한 다양한 연구들이 진행되고 있다(Hendriks와 Zeeman 2009; Um과 Park 2014).

본 연구에서는 흑액 내 포함된 헤미셀룰로오스 당을 고효율 2차 가수분해와 분리정제 과정을 거쳐 L-아라비노스 발효당을 확보하고 이를 발효하여 에탄올을 생산할 수 있는 대장균(*E. coli* MG 1655)을 선별하였다. 이와 더불어 흑액에 포함된 대표 발효 저해물질(초산, 포름산, 젯산)을 규명하고, 이들의 농도에 따른 발효균주의 성장에 미치는 영향을 파악하였다. 따라서 본 연구는 펄프폐액(흑액)에 포함된 저해물질을 규명 및 발효 허용 농도를 제시함으로써 흑액에서 유래한 당을 이용한 성공적인 에탄올 발효조건을 정립하는데 기여할 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시시료

본 연구에 사용된 펄프폐액(흑액)은 2012년 6월에 무림 P & P (울산광역시 울주군) 펄프공장에서 수령한 기질을 사용하였다. 실험에 사용한 기질은 아카시아와 유칼립투스의 혼합 활엽수 목재 칩을 원료한 펄

Table 1. Major composition of acid hydrolyzed black liquor used for fermentation.

Components	Concentration (g/l)
Glucose	1.62
Xylose	0.30
Arabinose	5.60
Formic acid	4.10
Lactic acid	10.40
Acetic acid	6.38

- Secondary acid hydrolysis condition: 121 °C, pH = 1, and t = 60 min.

핑과정에서 확보한 흑액이다. 발효당 확보를 위해 96% 황산을 시료로 하여 pH = 1로 적정한 후, 121 °C 에서 60분 동안 가수분해를 수행하였다. 가수분해 후 흑액 내 조성은 HPLC를 이용하여 결정하였다(Table 1). 또한 경제적 당 농도 확보를 위해서 증기증착기(OKLA® FV 06-ML, Were GmbH & Co KG, Germany)를 통해 농축 후 발효당을 확보하였다.

2.2. 균주 및 배지

아라비노스를 이용한 에탄올 발효 균주로는 *Escherichia coli* MG 1655를 사용하였다. 종균배양(seed culture)은 Luria-Bertani (NaCl 10 g/l, tryptone 10 g/l, yeast extract 5 g/l) 배지를 사용하였으며, 37 °C, 200 rpm 조건에서 진탕배양기에서 16시간 동안 배양하였다.

2.3. 배양 조건

멸균된 M9 (M9 salt 20 g/l, MgSO_4 0.2 g/l, CaCl_2 0.01 g/l, arabinose 20 g/l) 배지를 250 ml 삼각플라스크에 반응 부피 150 ml로 하여 7.5 % (v/v)를 집중하고 진탕배양기를 사용하여 37 °C, 200 rpm 조건으로 설정하고 30시간 동안 반응시켰다. 샘플은 3시간에 각 1회씩 채취하여 분광광도계를 사용하여 O.D. (optical density)를 측정하였다.

Table 2. The average concentration of inhibitors (organic acids) in cocktail

Level of mixing two acids in cocktail (g/l)			Level of mixing three acids in cocktail (g/l)
^a AA + ^b LA	LA + FA	AA + ^c FA	LA + AA + FA
0.5 + 0.6 (^d CT 1)	0.6 + 0.4 (CT 4)	0.5 + 0.4 (CT 7)	0.6 + 0.5 + 0.4 (CT 10)
1.0 + 1.2 (CT 2)	1.2 + 0.8 (CT 5)	1.0 + 0.8 (CT 8)	1.2 + 1.0 + 0.6 (CT 11)
1.5 + 1.8 (CT 3)	1.8 + 1.2 (CT 6)	1.5 + 1.2 (CT 9)	1.8 + 1.5 + 0.9 (CT 12)

^a Acetic acid, ^b Lactic acid, ^c Formic acid, and ^d Cocktail

2.4. *E. coli* MG 1655 발효 저해 농도 측정

2차 가수분해 된 흑액 내 존재하는 유기산(초산, 포름산, 그리고 젖산)의 농도를 변화시켜 M9배지에 첨가하여 발효배지를 제조하였다. 초산은 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g/l로 첨가하였으며, 포름산은 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 g/l의 농도로 첨가하였다. 젖산은 1.2, 2, 4, 8 g/l의 농도로 첨가하였다. 실제 흑액 내에는 위 3가지 저해물질이 동시에 포함되어 있기 때문에 이들의 상호 복합적인 영향을 파악하기 위해 각각의 저해물질을 농도별로 조합된 배지를 제조하여 실험을 수행하였다(Table 2).

2.5. 균체성장, 당 소모량, 에탄올 측정

대장균 성장을 측정하기 위하여 배양액에서 1 ml의 샘플 채취하여 분광광도계를 사용하여 O.D. (optical density)를 측정하였으며, 배지성분에 의한 흡광을 최소화하기 위하여 600 nm에서 균체량을 측정하였다. O.D. 값이 0.8을 넘어가는 경우에는 희석을 하였으며, 0.2~0.8 사이의 값을 측정하였다. O.D. 값 1당 8×10^8 cell/ml로 본다. 생성 에탄올 및 소모 아라비노스의 농도를 측정하기 위하여 배양액에서 1 ml를 채취하고 배양액을 필터로 정제한 후 HPLC 분석기기를 통해 분석하였다.

2.6. 고성능액체크로마토그래피 분석 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

HPLC는 YL9100 series (영린기기, 경기도 안양시)를 이용하였으며, 컬럼은 Bio-Rad사(Hercules, CA, USA)의 Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm)을 사용하였다. 컬럼 온도는 60°C이며, 이동상(mobile phase)으로는 5 mM의 sulfuric acid를 사용하였으며 유량은 분당 0.5 ml로 설정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 펄프흑액 성분 분석

본 실험에서는 확보된 펄프유래 흑액을 발효당으로 당화시키기 위해 96% 황산을 시료로 하여 pH = 1로 적정한 후, 121°C에서 60분 동안 가수분해를 수행하였다. 가수분해 후 HPLC를 이용하여 흑액 내 조성을 분석하였으며, Table 1에서 보는 것과 같이 발효당으로 아라비노스(5.60 g/l), 자일로스(0.30 g/l) 및 글루코스(1.62 g/l)가 확인되었고 이와 더불어 유기산으로는 포름산(4.10 g/l), 젖산(10.40 g/l), 및 초산(6.38 g/l)이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 본 실험조건에서 준비된 펄프 유래 흑액의 주요당 성분이 아라비노스로 확인되어 이를 대사할 수 있는 균주 선정 작업을 진행하였다.

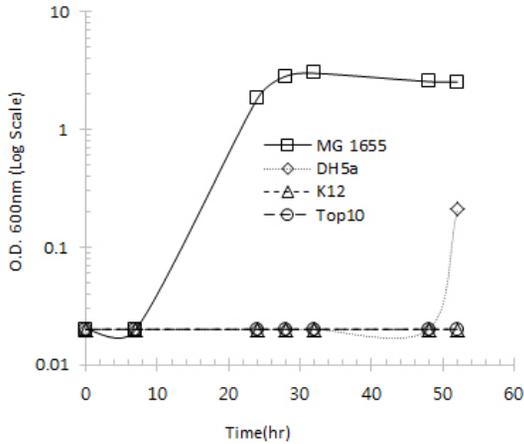


Fig. 2. The selection of *E. coli* strain capable of metabolizing arabinose among *E. coli* MG 1655, *E. coli* K12, *E. coli* DH5 α , and *E. coli* TOP10 using M9 minimal media containing arabinose as a sole carbon source.

3.2. 아라비노스 발효균주 선정

아라비노스 대사가 가능한 균주를 선별하기 위해 4종류 대장균 균주(*E. coli* MG 1655 (ATCC 700926), K12 (KCTC 22006), DH5 α (invitrogen, USA), TOP10 (invitrogen, USA))를 분양받아 M9 배지에서 arabinose를 유일 탄소원으로 사용하여 발효 실험을 진행하였다. 각 *E. coli*의 genotype[araD139 Δ (ara leu) 7697]을 확인한 결과 TOP10이 arabinose 대사가 가능한 부분을 제거(araD139)하였기 때문에 대사가 불가능할 것으로 예상되었다(<http://www.lifetechnologies.com>). 나머지 균들은 대사가 가능할 것이라고 예상하였으나 *E. coli* MG 1655가 유일하게 아라비노스를 대사하여 성장할 수 있음을 확인하였다 (Fig. 2). 또한 *E. coli* DH5 α 도 균주 성장이 보였으나 *E. coli* MG 1655 대비 상당히 오랜 시간 후(52시간)에 성장이 시작됨을 보였으며, 나머지 대장균 균주의 성장은 관찰되지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 정상적으로 아라비노스를 대사할 수 *E. coli* MG 1655를 호스트 균주로 선정하여 흑액 내 포함된 유기산에 대한 영향 실험을 진행하였다.

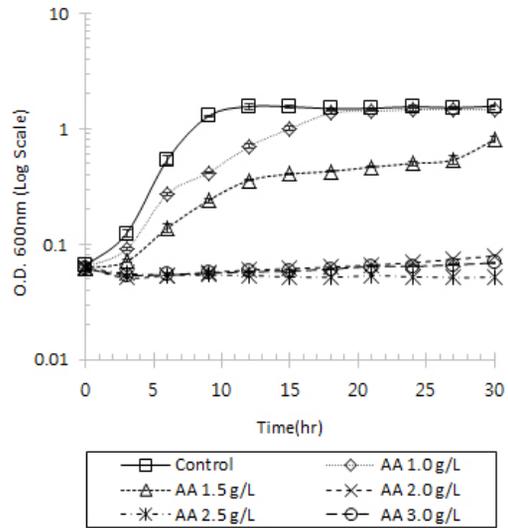


Fig. 3. Growth of *E. coli* MG 1655 in the presence of acetic acid. The M9 minimal media contains 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 g/l of acetic acid (AA), respectively.

3.3. E. coli MG 1655의 유기산 별 성장 저해 농도

초산의 농도별 그리고 시간에 따른 *E. coli* MG 1655 성장이 어떤 영향을 받는지 관찰하였다. 2% 아라비노스가 포함된 M9배지에 0 g/l, 1.0 g/l, 1.5 g/l, 2.0 g/l, 2.5 g/l 및 3.0 g/l의 초산이 첨가된 배지에서 시간별 *E. coli* MG 1655 성장을 관찰하였다. Fig. 3에서의 결과값처럼 초산 농도가 1.0 g/l에서는 초산이 첨가되지 않은 대조군과 거의 유사한 성장 유형을 보였다. 하지만 1.5 g/l의 초산 농도 하에서는 대조군 대비 50% 정도의 흡광도(OD₆₀₀)값을 보였다. 초산이 2.0 g/l, 2.5 g/l 및 3.0 g/l 존재하는 경우는 *E. coli* MG 1655가 성장하지 못함을 알 수 있었다. 이러한 실험결과는 *E. coli* MG 1655를 이용한 발효의 경우 펄프 유래 흑액의 농도가 최소한 1.5 g/l 이하가 되도록 전처리 되어야 하며 대조군과 유사한 정상성장을 위해서는 1.0 g/l 이하의 초산 농도가 유지되도록 당화공정 및 정제 공정을 거쳐야 한다는

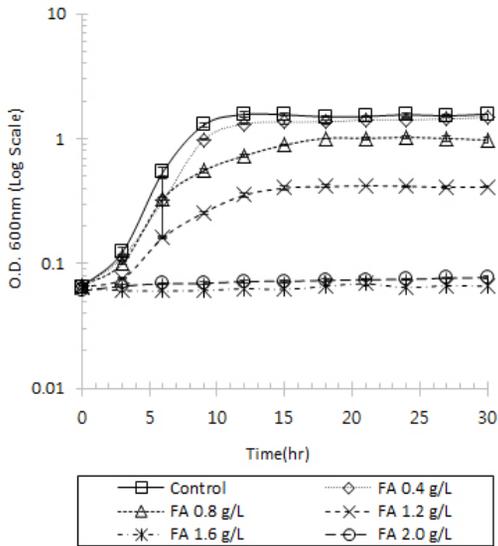


Fig. 4. Growth of *E. coli* MG 1655 in the presence of formic acid. The M9 minimal media contains 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 g/l of formic acid (FA), respectively.

것을 의미한다.

Fig. 4는 포름산 농도별 균주성장 경향을 시간대별 나타낸 결과 값이다. 포름산의 경우 앞서 초산의 실험과 유사하게 M9배지에 각각 0 g/l, 0.4 g/l, 0.8 g/l, 1.2 g/l, 1.6 g/l 및 2.0 g/l의 농도로 첨가하여 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 포름산 농도 0.4 g/l 조건에서는 대조군과 거의 유사한 성장을 보였으나, 0.8 g/l 포름산부터는 성장률이 대조군 대비 64% 정도로 감소되는 현상을 보였다(Fig. 4). 1.2 g/l의 포름산 존재 시 최대 흡광도 값이 대조군 대비 30% 정도로 성장의 저해를 받는 것으로 관찰되었다. 또한 성장률도 대조군 대비 26% 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 포름산 1.6 g/l와 2.0 g/l가 존재하는 경우 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과로부터 펄프 유래 흑액을 발효용 당화용액으로 사용하기 위해서는 유기산 중 포름산의 농도를 최소 0.8 g/l 이하로 감소시켜 제조하여야 하며 1.2 g/l 정도의 포름산이 존재할 경우 정상 성장 대비

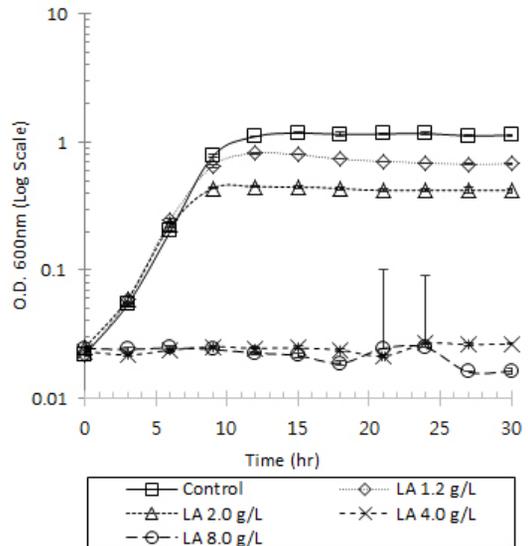


Fig. 5. Growth of *E. coli* MG 1655 in the presence of lactic acid. The M9 minimal media contains 0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, and 3.0 g/l of lactic acid (LA), respectively.

30% 정도의 균주성장이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다.

젖산의 경우도 앞서 실험과 유사하게 M9배지에 각각 0 g/l, 1.2 g/l, 2 g/l, 4 g/l 및 8 g/l의 농도로 첨가하여 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. 젖산이 1.2 g/l 존재하는 조건에서는 최대 흡광도 값이 0.8로 대조군 대비 70% 정도로 관찰되었다(Fig. 5). 젖산 농도가 2.0 g/l로 증가할 경우 최대 흡광도 값은 0.44로 대조군 대비 40% 수준으로 감소되는 것을 알 수 있었다. 젖산이 4.0 g/l와 8.0 g/l 존재하는 경우 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로부터 젖산의 경우 최소 1.2 g/l 이하의 농도가 될 수 있게 펄프 유래 흑액 발효당을 제조해야 함을 알 수 있었다. 상기 3종의 유기산의 *E. coli* MG 1655에 대한 성장저해 실험 결과를 정리하면 초산의 경우 1.0 g/l, 포름산의 경우 0.8 g/l, 젖산의 경우 1.2 g/l 이하의 농도일 때 대조군과 유사한 성장을 가질 수 있었다. 따라서, 펄프 흑액을 이용한 발효당

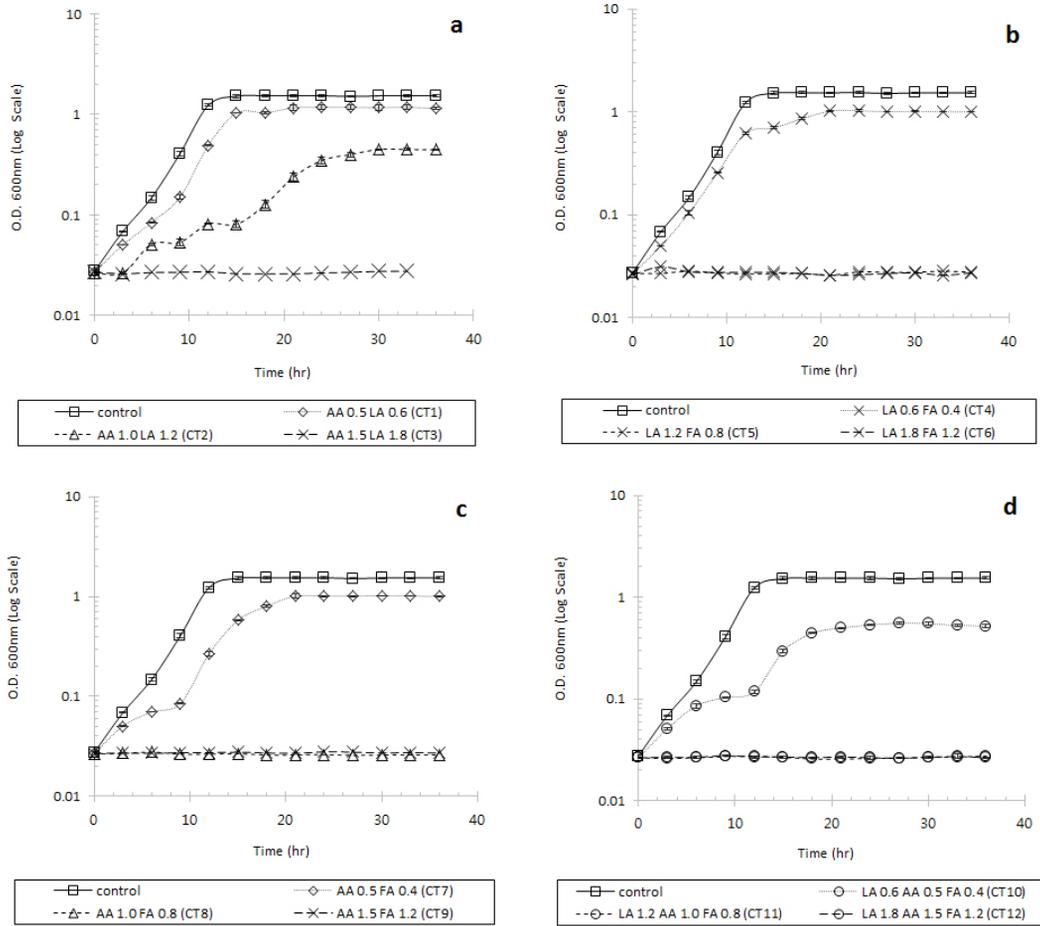


Fig. 6. Growth of *E. coli* MG 1655 in the presence of combinatory inhibitors. The M9 minimal media contains two or three kinds of organic acids. Note: AA: acetic acid, LA: lactic acid, FA: formic acid.

제조에 있어서 흑액 내 포함된 유기산의 농도는 개별적으로 상기 농도 이하로 유지해야만 생산균주의 정상적인 성장 및 발효를 진행할 수 있음을 의미한다. 이와 더불어 상기 규정된 최소농도 보다 더 낮은 수준의 유기산 농도로 제조해야 하는 것은 이들 유기산들이 같이 존재하여 시너지 효과를 낼 수 있기 때문에 상기 규명된 유기산 농도보다 낮은 농도의 유기산이 존재하는 흑액 발효당이 제조되어야 할 것이다. 이를 정량적으로 규명하기 위해 각 유기산을 혼합하여 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 영향을 관찰하는 실험을 수행하였다.

각각의 유기산 발효 저해인자 실험을 통해 *E. coli* MG 1655의 각각의 유기산의 저해 농도를 확인한 뒤, 각각 유기산 혼합에 의한 시너지효과를 확인하기 위하여 유기산 2종과 3종이 첨가된 12종의 유기산 혼합 M9배지를 제조하여 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 영향을 관찰하였다(Table 2). 각각의 유기산 농도는 최소 저해 농도의 절반, 저해농도 및 저해농도의 1.5배로 설정하여 실험을 수행하였다. Fig. 6a에서의 결과값과 같이 초산과 젖산의 혼합 배지에서는 CT1 (초산 0.5 g/l와 젖산 0.6 g/l)과 CT2 (초산 1.0 g/l와 젖산 1.2 g/l)에서는 *E. coli* MG 1655의 성장

이 관찰됐지만, CT2 (초산 1.5 g/l와 젖산 1.8 g/l)에서는 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어나지 않았다. 개별적 유기산의 성장 저해 실험에서는 대조군과 유사한 성장을 보인 초산 1.0 g/l와 젖산 1.2 g/l의 조합인 CT2의 경우 대조군 대비 67%의 성장률과 최대 흡광도 값을 보이는 것으로 보아 개별적 유기산들이 혼합되었을 경우 성장저해에 대한 시너지 효과가 존재함을 확인할 수 있었다. 젖산과 포름산의 혼합배지인 CT4, CT5 및 CT6를 이용한 실험에서는 CT4 조건에서만 대조군과 유사한 성장률과 최대 흡광도 값을 보였을 뿐 나머지 두 조건에서는 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어나지 않았다(Fig. 6b). 이와 더불어 초산과 포름산의 혼합배지인 CT7, CT8 및 CT9의 경우도 포름산이 0.4 g/l 함유되어 있는 CT7에서와 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어났고, 포름산이 0.8 g/l 이상 함유된 CT8과 CT9에서는 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어나지 않았다(Fig. 6c). 또한 Fig. 6d에 보는 것과 같이 3종의 유기산이 포함된 CT10, CT11, 및 CT12의 경우도 포름산 0.4 g/l과 함유된 CT10에서만 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어났고(대조군 대비 80% 성장률 및 최대 흡광도 값) 나머지 두 혼합물에서는 *E. coli* MG 1655의 성장이 관찰되지 않았다. 이러한 유기산 혼합물 실험결과는 공통적으로 포름산 0.4 g/l일 때는 *E. coli* MG 1655의 성장이 일어났지만, 0.8 g/l일 때는 성장이 일어나지 않았음을 알 수 있다. 이 중 유기산 혼합물의 *E. coli* MG 1655 성장에 대한 저해 시너지 중 포름산의 농도가 다른 두 유기산인 초산과 젖산 보다 중요한 요소가 될 수 있다고 볼 수 있다.

M9배지에 유기산 혼합을 이용한 *E. coli* MG 1655의 성장을 측정할 후 본 실험에서 제조한 흑액 당화액을 첨가하여 *E. coli* MG 1655의 성장을 관찰하였다. 앞서 M9 유기산의 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 성장 결과를 기반으로 제조된 흑액 당화액과 이를 10배로 희석하고 부족한 arabinose당을 2%가 되도록 첨가하여 *E. coli* MG 1655의 성장을 관찰하였다. Fig. 7에서 보는 것과 같이 흑액 당화액을 희석 하지 않은 원액 배지에서는 균체성장이 관찰되지 않았으며 10배로 희석한 후 아라비노스를 추

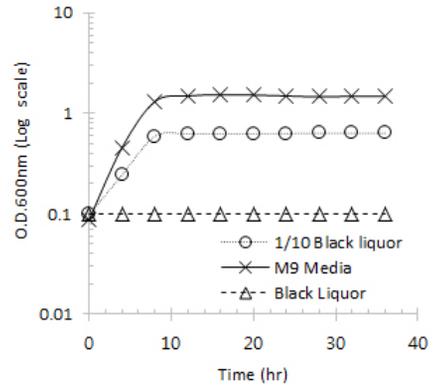


Fig. 7. Growth of *E. coli* MG 1655 with the black liquor.

가한 배지에서는 대조군 대비 40%의 최대 흡광도를 나타남을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 M9배지에 각각의 유기산과 이들 혼합물이 첨가된 배지에서의 실험결과와 거의 유사하게 일치함을 알 수 있었다.

4. 결 론

크라프트(Kraft) 펄프공정에서 유래된 흑액을 활용하여 에너지 및 새로운 화학물질 생산은 기존공정의 에너지 효율향상과 추가 이윤창출이 기대된다. 특히 이러한 예로 에너지생산 측면에서 흑액 내 잔류 당 성분을 활용한 에탄올 생산공정을 들 수 있다 (Fig. 1). 본 연구에서는 흑액에 포함된 아라비노스를 대사할 수 있는 대장균 균주인 *E. coli* MG 1655를 선정하여 흑액에 포함된 유기산이 *E. coli* MG 1655의 성장에 미치는 유기산 농도를 규명하였다. 그 결과 포름산이 가장 크게 영향을 주는 저해 물질로 확인되었다. 다른 저해물질의 농도가 같아도 포름산이 들어간 실험군의 균체가 많이 성장하지 못하는 것을 확인하였다. 따라서, 흑액 유래 발효당 제조에 있어서 발효저해 물질인 유기산을 상기 실험 결과보다 낮은 농도로 분리 및 정제하는 것이 필요하며, 최소 초산 1.0 g/l, 포름산 0.8 g/l 및 젖산 1.2 g/l 이하의 농도를 유지해야 한다. 이와 더불어 기존 2차 가수분해 및 분리/정제된 흑액 발효당에 포함된

유기산에 대해 강한 내성을 갖는 에탄올 생산 균주의 개발이 필요하다.

사 사

본 연구는 2012년도 지식경제부의 재원으로 한국 에너지기술평가원(KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구 과제입니다(연구과제 번호: 20128520100020). 또한 저자는 기질인 흑액을 제공하여 주신 무림 P & P 담당자 분들께 감사 드립니다.

REFERENCES

- Agbogbo, F.K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M., Wenger, K.S. 2006. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipites*. *Process Biochemistry* 41: 2333-2336.
- Agbogbo, F.K., Wenger, K.S. 2006. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia stipites*. *Biotechnology Letters* 28: 2065-2069.
- Amidon, T. 2006. The biorefinery in New York: Woody biomass into commercial ethanol. *Pulp and Paper Canada*, 107: 47-50.
- Baev, M.V., Baev, D., Radek, A.J., Campbell, J.W. 2006. Growth of *Escherichia coli* MG 1655 on LB medium: determining metabolic strategy with transcriptional microarrays. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71: 323-328.
- du Preez, J.C., Bosch, M., Prior, B.A. 1986. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme and Microbial Technology* 8: 360-364.
- Hendriks, A.T.W.M., Zeeman1, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 100: 10-18.
- Jeffries, T.W., Jin, Y.S. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology* 47: 221-268.
- Modig, T., Lid'en, G., Taherzadeh, M.J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* 363: 769-776.
- Nigam, J.N. 2002. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *Biotechnology* 97: 107-116.
- Pampulha, M.E., Loureiro-Dias, M.C. 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* 20: 286-293.
- Parekh, S.R., Yu, S., Wayman, M. 1986. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 25: 300-304.
- Park, S.J., Moon, J.K., Um, B.H. 2013. Evaluation of the Efficiency of Solvent Systems to Remove Acetic Acid Derived from Pre-Pulping Extraction. *Journal of The Korean Wood Science and Technology* 41(5), 447-455.
- Sanchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* 99: 5270-5295.
- Sricharoenchaikula, V., Frederick Jr.b, W.J., Agrawalc, P. 2003. Carbon distribution in char residue from gasification of kraft black liquor. *Biomass and Bioenergy* 25: 209-220.
- Um, B.H., Park, S.J. 2014. Extraction of Hemicellulosic Sugar and Acetic Acid from Different Wood Species with Pressurized Dilute Acid Pretreatment. *Journal of The Korean Wood Science and Technology* 42(2): 172-182.

Um, B.H. 2012. Evaluation of Secondary Acid and Enzymatic Hydrolysis of Hemicellulose in Hot Water Pre-Pulping Extract of Mixed Hardwoods. *Journal of The Korean Wood Science and Technology* 40(2): 123-132.

Um, B.H., van Walsum, G.P. 2010. Mass balance on green liquor pre-pulping extraction of northeast mixed hardwood. *Bioresource Technology* 101: 5978-5987.