

목질계 바이오매스로부터 생산된 바이오에탄올 투과증발 과정에서 발생한 투과증발 잔류물의 항산화 활성¹

신 경 진² · 정 소 연² · 이 홍 주³ · 이 재 원^{2,†}

Antioxidant Activity of The Residue Generated During Pervaporation of Bioethanol Produced from Lignocellulosic Biomass¹

Gyeong-Jin Shin² · So-Yeon Jeong² · Hong-Joo Lee³ · Jae-Won Lee^{2,†}

요 약

본 연구에서는 목질계 바이오매스로부터 옥살산 전처리 액상 가수분해산물을 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다. 생산된 바이오에탄올은 투과증발에 의해 분리, 농축하였으며 투과증발 잔류물에 대한 항산화 활성을 측정하였다. 옥살산 전처리 후 액상 가수분해산물에는 자일로스(37.28 g/l)가 대부분을 차지하고 있었으며 발효저해물질인 초산, 푸르푸랄 및 페놀성 화합물을 포함하고 있었다. 전기투석에 의해 초산을 제거하였으며 전기투석 후 가수분해산물로 발효를 수행한 결과 12.21 g/l의 에탄올을 생산하였다. 에탄올 농축 후 투과증발 잔류물의 에틸아세테이트 분획에서는 86.81 mg/100 g(추출물)의 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 환원력에 대한 IC₅₀ 값은 각각 0.87 mg/ml, 0.85 mg/ml, 0.59 mg/ml로 나타났다. GC-MS로 구성성분을 확인한 결과 당 분해산물과 페놀 유도체들이 검출되었다.

ABSTRACT

In this study, we produced bioethanol from the original hydrolysate obtained during oxalic acid pretreatment of lignocellulosic biomass. The bioethanol was separated and concentrated by pervaporation and the residue after pervaporation was evaluated for its antioxidant activity. Xylose (37.28 g/l) was the major product in the original hydrolysate. The original hydrolysate contained acetic acid, furfural and total phenolic compounds (TPC) as fermentation inhibitors. Acetic acid was removed by electro dialysis (ED), and 12.21 g/l of bioethanol was produced from ED-treated hydrolysate. The TPC of ethyl acetate extracts from the residue obtained (OA-E) during pervaporation was 86.81 mg/100 g (extract). The IC₅₀ values of DPPH and ABTS radical scavenging activities, and reducing power of OA-E

¹ Date Received June 10, 2015, Date Accepted August 10, 2015

² 전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학부. Department of Forest Products and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

³ 전남대학교 농업생명과학대학 바이오에너지공학과. Department of Bioenergy and Technology, Chonnam National University, Gwangju 61186, Republic of Korea

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

were 0.87 mg/ml, 0.85 mg/ml, and 0.59 mg/ml, respectively. Sugar degradation products and the phenolic compounds in OA-E were determined by GC-MS.

Keywords : lignocellulosic biomass, hydrolysate, bioethanol, pervaporation, antioxidant activity

1. 서 론

현재까지 세계 각국에서는 비 재생 에너지자원인 천연가스와 석유, 석탄 등의 화석연료를 주로 사용해 왔으나 가까운 미래에 고갈될 것으로 전망하고 있다. 화석연료를 대체할 수 있는 에너지로 태양광, 풍력, 조력, 수소에너지 등 다양한 대안이 있으나 그중에서도 바이오에너지 분야가 가장 빠른 성장세를 보이고 있다. 바이오에너지는 수송용 연료를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 일정 수준의 자립적인 에너지 공급이 가능한 장점을 가지고 있어 전 세계적으로 각광받고 있다(Rajagopal *et al.*, 2007).

옥수수, 감자 등 전분으로 이루어진 1세대 바이오매스로부터 생산되는 바이오에너지는 식량자원과 경쟁해야 하는 단점이 있어 이를 보완하기 위한 방안으로 2세대 바이오매스가 제안되었다. 2세대 바이오매스인 목질계 바이오매스는 그 양이 풍부하고 식량 자원과의 경쟁을 피할 수 있을 뿐만 아니라 대기 중의 이산화탄소를 증가시키지 않는 탄소중립적인 청정 에너지원으로서의 특징을 가지고 있다(Silva *et al.*, 2009). 목질계 바이오매스는 주로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이 복잡하게 연결되어 분해하기 어려운 구조로 이루어져 있다. 일반적으로 목재 내 셀룰로오스 함량은 40-45%, 헤미셀룰로오스는 25-35%가 존재하므로 목재는 약 70%에 이르는 풍부한 다당류를 함유하고 있다. 목질계 바이오매스는 전분계 바이오매스와 달리 단단한 구조적 특성을 가지고 있으므로 발효가능한 당을 생성하기 위해서 전처리 공정이 요구된다(Silva *et al.*, 2009). 일반적으로 산 촉매를 이용한 전처리 공정이 잘 알려져 있지만 발효저해물질을 유발시킨다는 단점을 갖고 있다. 전처리 액상 가수분해산물 내 발효저해물질로는 aliphatic acids (초산, 개미산 및 레볼린산), fur-aldehydes (푸르푸랄, 5-hydroxymethylfurfural) 및 페

놀 등의 방향족 화합물과 추출물이 있다(Jonsson *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2014). 일정 농도 이상의 발효저해물질은 균의 성장과 발효를 저해하는 것으로 알려져 있으므로 발효공정에서 에탄올의 생산을 증대시키기 위해서는 이러한 물질들의 선택적 분리 및 제거가 중요하다.

발효로 생산된 에탄올은 증류·탈수의 정제공정을 거친 후 연료로 이용될 수 있다. 지난 20년간 미국을 포함한 세계 각지에서 옥수수를 이용한 에탄올 증류 산업의 급속한 성장으로 인해 얻어지는 부산물의 양이 급증했다(Robinson *et al.*, 2008). 따라서 부산물들을 이용한 활용방안이 요구되고 있다. 전처리와 발효공정을 거쳐 생산된 에탄올을 농축한 후 남겨진 액상산물에는 아직 제거되지 못한 퓨란 및 페놀 유도체들을 다량 함유하고 있다. 페놀 유도체로는 *p*-coumaric acid, ferulic acid, syringaldehyde, vanillin 등이 잘 알려져 있으며 이들은 선행 연구결과에 의해 항산화 활성을 가지고 있다고 확인되었다(Kiliç and Yeşiloğlu, 2013; Mourtzinou *et al.*, 2009).

식품 산업에서는 주로 propyl gallate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone 등과 같은 합성 항산화제를 방부제 기능으로 사용해왔으나 독성에 대한 위험성으로 심각하게 규제됨에 따라 천연물들을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Park *et al.*, 2008). 최근에는 천연식물뿐만 아니라 농업 및 식품 부산물에서 발생하는 여러 농업폐산물들을 이용한 연구도 증가하고 있는 추세이다. 이러한 부산물들의 재사용으로부터 환경적 측면뿐만 아니라 경제적 측면에서도 긍정적인 효과를 기대할 수 있다. 이들 성분들은 산화 스트레스로부터 동식물 및 식품을 보호하기 때문에 많은 연구진들에 의해 항산화제로 개발되어 사용되고 있다(Do *et al.*, 2014).

따라서 본 연구에서는 활엽수 혼합수종으로부터

발효를 거쳐 생산된 에탄올을 투과증발막을 이용하여 농축한 후 남겨진 투과증발 잔류물로부터 향산화 활성 여부를 측정하여 부산물의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료와 전처리

본 연구에서는 (주)풍림에서 구입한 아카시아 (*Robinia pseudoacacia* L.), 밤나무(*Cartanea crenata*), 참나무(*Quercus mongolica*)로 구성된 활엽수 혼합수종을 사용하였다. 실험에 사용하기 위하여 시료를 20-80 mesh로 분쇄한 후, 실온에 보관하였다.

전처리는 회전식 반응기(DM-848; Daeil Machinery, Daejeon, Korea)에서 수행하였다. 스테인리스 스틸 반응기에 활엽수 혼합수종의 전건시료 50 g과 산 촉매로서 0.1 M 옥살산(pH 1.3) 용액 200 ml를 투입하여 반응온도 170℃에서 60분간 전처리를 실시하였다. 반응 종료 후 반응기를 냉각시킨 후, 여과지(Hyundai Micro NO. 20)로 여과하여 액상 가수분해 산물과 고형 바이오매스로 분리하였다.

2.2. 초산 제거를 위한 전기투석

액상 가수분해산물에 포함된 초산 등의 이온성 발효저해물질을 제거하기 위하여 전기투석을 수행하였다. 전기투석장치의 이온 교환막으로는 양이온 교환막(ASTOM Crop., NEOSEPTA® CMX, Japan) 및 음이온 교환막(ASTOM Crop., NEOSEPTA® AMX, Japan)을 사용하였다. 유효막 면적은 550 cm²으로 이루어져 있으며 10 V 정전압 조건으로 실시하였다.

2.3. 액상 가수분해산물의 발효

전기투석 후 액상 가수분해산물로부터 바이오에탄올을 생산하기 위하여 오타당 발효가 가능한 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하였다. 균주를 YPD (Yeast Extract, Peptone, Dextrose, Agar) 배지

에 배양한 후 액체배지(Yeast Extract 2 g/100 ml, Peptone 4 g/100 ml, Dextrose Agar 4 g/100 ml)에 접종하여 30℃, 150 rpm으로 24시간 동안 선 배양한 후 발효에 사용하였다. 발효를 위해 액상 가수분해산물 pH는 6.0으로 조절하였으며, KH₂PO₄ (1 g/l), MgSO₄ (0.5 g/l), Yeast Extract (5 g/l), Urea (5 g/l)를 첨가하여 121℃에서 15분간 멸균하였다. 멸균된 액상 가수분해산물에 배양된 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/l을 첨가하여 30℃, 150 rpm에서 에탄올 발효를 수행하였다. 24시간 간격으로 시료를 채취하여 HPLC로 분석하였다.

2.4. 에탄올 농축

Polyetherimide (PEI)를 지지층으로 하고 Poly(dimethylsiloxane) (PDMS) 선택층으로 하는 복합층 공사막(유효막면적 890 cm²)을 이용하여 40℃에서 에탄올 농축을 수행하였다. 회수부에서 5 mmHg의 진공 하에 투과증발막 공정에서 기화된 상태로 투과한 용액을 액체질소를 이용하여 응축된 형태로 회수하였다. HPLC를 이용하여 회수부와 유입부의 에탄올 농도를 분석하여 에탄올의 투과도(flux)와 선택도(selectivity)를 계산하였다.

2.5. 액상 가수분해산물 성분분석

전처리 후 액상 가수분해산물에 포함된 발효가능한 당(글루코오스, 자일로스) 및 당 분해산물(푸르푸랄, 초산, 5-hydroxymethylfurfural (HMF))과 발효에 의해 생성된 에탄올은 HPLC (Waters e2695, USA)를 이용하여 분석하였다. 칼럼은 Aminex 87H column (300 × 7.8 mm, BIO-RAD)을 사용하였고, Refractive index detector (Waters 2414, USA)로 검출하였다. 이동상으로는 5 mM 황산을 flow rate 0.6 ml/min으로 분석하였다. 모든 분석용 시료는 0.22 µm filter를 통과시켜 희석배율을 조정하여 분석을 수행하였다.

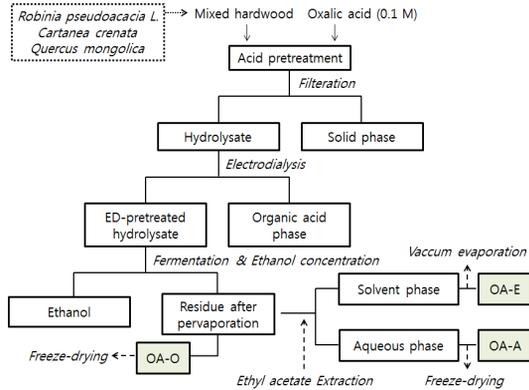


Fig. 1. Flow-chart of the preparation of extracts from mixed hardwood hydrolysate.

2.6. 에탄올 농축 후 투과증발 잔류물의 액체-액체 추출

투과증발막을 이용하여 에탄올을 회수, 농축한 후 투과증발 잔류물의 추출은 액체-액체 추출법으로 수행하였다. 분별 깔때기에 투과증발 잔류물과 에틸아세테이트를 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 추출하였다. 이와 같은 과정을 3회 실시하였으며 에틸아세테이트 가용부는 회전식 감압농축기를 사용하여 농축시킨 후 냉장 보관하였다(OA-E). 수용액층인 에틸아세테이트 불용부(OA-A)는 동결건조 후 분석 전까지 -20℃에서 보관하였다. 투과증발 잔류물 획득 및 추출 과정은 Fig. 1에 나타냈다.

2.7. 페놀성 화합물 측정

투과증발 잔류물(OA-O)과 에틸아세테이트 가용성·불용성 추출물(OA-E, OA-A)의 페놀성 화합물 함량을 측정하기 위하여 Folin-Denis법을 사용하였다 (Singleton *et al.*, 1999). 각각의 추출물 0.2 ml에 1 ml의 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 혼합한 후 7.5% Na₂CO₃ 0.8 ml을 첨가하였다. 그 후 실온에서 차광상태로 2시간 동안 방치한 후 UV-vis spectrophotometer (JP/UV1800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 페놀성 화합

물 함량은 vanillin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하여 구하였다.

2.8. 항산화 활성 측정

2.8.1. DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity 측정

DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity는 Brand-Williams 등(1995)의 방법을 변형하여 측정하였다. 에탄올에 희석된 추출물 0.1 ml와 0.4 mM DPPH 용액 1 ml를 혼합한 후 에탄올을 첨가하여 최종부피를 2.5 ml로 조절하였다. 혼합물은 실온에서 차광상태로 30분간 반응시킨 다음 UV-vis spectrophotometer (JP/UV1800, Shimadzu, Japan)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 BHT (Butylated hydroxytoluene)와 BHA (Butylated hydroxyanisole)를 사용하였다. DPPH radical scavenging activity는 다음 식 (1)에 의해 구하였다.

$$DPPH \text{ radical 소거활성 (\%)} = \left(1 - \frac{As}{Ac}\right) \times 100$$

As : 추출물 첨가군의 흡광도
Ac : 무첨가군의 흡광도
..... 식 (1)

2.8.2. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging activity 측정

7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate 용액을 1 : 1 (v/v)로 혼합하여 12~16시간 동안 차광상태로 방치시켜 ABTS⁺를 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.7 ± 0.02가 되도록 에탄올로 희석하였다. 희석된 ABTS⁺용액 1 ml에 농도별로 희석된 추출물 0.2 ml를 첨가하고 6분 후 흡광도의 변화를 측정한 다음 식 (1)에 의거하여 계산하였다(Ozgen *et al.*, 2006).

Table 1. Sugar and inhibitors in hydrolysate during oxalic acid pretreatment of mixed hardwood (unit: g/l)

Oxalic acid pretreatment	Fermentable sugar		Fermentation inhibitor			
	Glucose	Xylose	Acetic acid	HMF	Furfural	TPC
Original hydrolysate	5.63 (0.34)	37.28 (1.65)	12.70 (0.28)	0.21 (0.03)	2.37 (0.61)	5.29 (0.24)
ED-treated hydrolysate	5.28 (0.03)	34.55 (0.04)	0.31 (0.02)	0.20 (0.01)	1.84 (0.05)	4.34 (0.10)

* TPC: total phenolic compounds, HMF: 5-hydroxymethylfurfural, ED: Electrodialysis

* The parentheses contains the standard deviation with the analysis repeated three times.

2.8.3. 환원력(Reducing power) 측정

환원력은 Ozgen 등(2006)에 의해 제안된 방법을 변형시켜 측정하였다. 에탄올에 희석된 시료 0.5 ml 에 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6.6) 2.5 ml 와 2.5 ml의 potassium ferricyanide (1%, w/v)를 혼합시킨 후 50℃에서 20분간 방치시켰다. 반응을 멈추기 위하여 2.5 ml의 trichloroacetic acid (10%, w/v)을 첨가한 후 10분간 원심분리 하였다. 상등액 2.5 ml에 2.5 ml의 증류수를 첨가한 후 0.1% ferric chloride 0.5 ml 투입하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.9. GC-MS (Gas chromatograph-mass spectrometer) 분석

에탄올 농축 후 투과증발 잔류물의 에틸아세테이트 가용부에 함유된 물질은 GC/MS (7890, Agilent) 분석으로 확인하였다. 분석 칼럼은 HP5MS (30 m, 0.25 mm × 0.25 um)이며, MS (Agilent 5975C)는 EI 모드로 분석하였다. 온도조건은 초기 80℃에서 5분간 유지시킨 후 승온속도를 5℃/min하여 250℃까지 상승시켰다. 250℃에서 10℃/min 속도로 최종 온도가 320℃가 되도록 유지하여 분석을 수행하였다. 이동상 가스로 헬륨을 사용하였으며 flow rate 1 ml/min으로 분석하였으며 주입은 20 : 1의 분할 방식으로 하였다. GC-MS에 의해 얻어진 결과는 MS library data (NIST)와 비교하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 액상 가수분해산물 분석

옥살산 전처리 후 액상 가수분해산물 분석결과는 Table 1과 같다. 옥살산 전처리에 의해 헤미셀룰로오스가 선택적으로 분해되어 액상 가수분해산물에는 주로 자일로스를 포함하고 있다(Lee *et al.*, 2010). HMF, 푸르푸랄은 대표적인 당 분해산물로서 3 g/l 이상의 HMF와 2.5 g/l 이상의 푸르푸랄은 *Pichia stipitidis*의 활성을 저해시켜 에탄올 생산 효율을 감소시키는 것으로 보고되고 있다(Delgenes *et al.*, 1996). 또한 페놀성 화합물은 리그닌 분해산물로 2 g/l 이상을 포함할 경우 발효과정에서 미생물의 활성을 억제시킨다고 보고된 바 있다(Jonsson *et al.*, 2013). 본 실험에서는 액상 가수분해산물 내 0.21 g/l의 HMF로 소량 함유하고 있었지만 2.37 g/l의 푸르푸랄 및 5.29 g/l의 페놀성 화합물을 포함하고 있어 발효에 부정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다. 뿐만 아니라 5 g/l 이상의 초산은 미생물 세포 활성을 저해시킨다고 보고되었다(Cho *et al.*, 2010). 따라서 에탄올 생산 효율을 증대시키기 위해 전기투석을 수행하였으며, 그 결과 대부분의 초산이 제거되었음을 확인하였다(Table 1). 이온 성질을 가지는 초산을 제외한 대부분의 당 분해산물들은 액상 가수분해산물에 남아있었다. 소량의 푸르푸랄과 페놀성 화합물이 전기투석에 의해 제거되었지만 이것은 막 흡착에 의한 것으로 사료된다(Lee *et al.*, 2013). 이러한 경향은 기존의 연구 결과와 일치하였다(Jeong *et al.*, 2014). 따라서 전기투석으로 인한 초산 및 소량의 페놀성 화

Table 2. Ethanol fermentation performance on the ED-treated hydrolysate

	Initial fermentable sugar concentration (g/l)	Ethanol production (g/l)	Ethanol productivity (g/l · h)	Ethanol yield (g/g sugar)
ED-pretreated hydrolysate	32.28 (4.57) ^a	12.21 ^b	0.0019	0.44

^a Remaining fermentable sugar after fermentation.

^b The highest ethanol production was observed after 240 h of fermentation.

* ED: Electrodialysis

* The parentheses contains the standard deviation with the analysis repeated three times.

합물, 푸르푸랄의 감소가 발효에 긍정적인 영향을 줄 것으로 판단된다.

3.2. 액상 가수분해산물의 발효

전기투석으로 발효저해물질들이 일부 제거된 옥살산 액상 가수분해산물로부터 에탄올 생산에 대한 결과는 Table 2에 나타났다. 발효 240시간 후 12.21 g/l의 에탄올을 생산하였다. 발효가능한 당에 대한 에탄올 수율은 0.44 g/g, 시간당 생산되는 에탄올은 0.0019 g/l · h로 나타났다. 전기투석-액상 가수분해산물로부터 낮은 에탄올 생산을 나타냈으며 이는 가수분해산물 내 남아있는 퓨란계 및 페놀성 화합물에 의한 것으로 에탄올 생산에 부정적인 영향을 나타냈다 (Cho *et al.*, 2010). 따라서 전기투석만을 사용하였을 때 유기산만 제거되고 대부분의 HMF, 푸르푸랄, 페놀성 화합물은 가수분해산물에 존재하였다. 에탄올 생산을 향상시키기 위해서는 이들을 제거하기 위한 추가적인 처리가 필요하다.

3.3. 에탄올 농축

투과증발(Pervaporation)은 끓는점의 차이를 이용하여 액체혼합물을 분리하는 막분리 공정이다. 현재 널리 사용되고 있는 증류공정에 비해 공정이 단순하여 설비비가 낮고, 에너지 소모가 낮은 장점을 지니고 있다. 최근 연구에서는 휘발성 유기화합물뿐만 아니라 알콜계의 탈수에 대해 양호한 성능을 보고하였다(Shao and Huang, 2007; Beltran *et al.*, 2013). 또한 발효공정에서 사용되는 미생물에 부정적인 영향

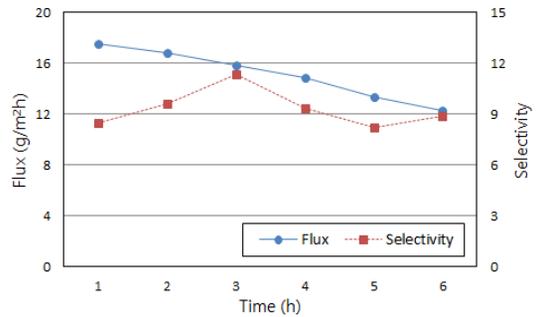


Fig. 2. Ethanol flux and selectivity with increasing operating time of pervaporation process.

을 미치지 않기 때문에 발효액으로부터 생산된 알코올을 회수하는데 효과적인 공정으로 고려되고 있다 (Shao and Huang, 2007; Trinh *et al.*, 2014).

Fig. 2는 PEI/PDMS 복합중공사막을 이용한 투과증발 공정을 사용하여 에탄올을 회수한 결과이다. 에탄올 투과도는 시간에 따라 감소하는 경향을 나타냈는데, 17.6 g/m²h에서 12.3 g/m²h로 감소하였다. 한편, 시간에 따른 에탄올의 선택도는 거의 일정한 경향을 나타냈다. 일반적으로 막분리 공정에서 막의 성능은 투과도가 증가함에 따라 선택도가 감소하는 trade-off가 성립한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 시간에 따라 투과도가 감소하였지만 선택도가 변하지 않았는데, 이는 발효액에 있는 유기물이 막표면에 쌓이는 농도분극현상으로 볼 수 있다(Trinh *et al.*, 2014). Table 3은 에탄올 농축 과정에서 투과증발 공정 효율을 나타냈다. 옥살산 액상 가수분해산물의 에탄올 농도가 1.2%인 조건에서 투과증발 실험을 한 결과, 투과도와 선택도는 각각 12.3 g/m² · h, 9.3을

Table 3 Ethanol separation and concentration from fermented hydrolysate during pervaporation process

Sample	Ethanol in initial feed (%)	Ethanol in product (Max at 2 h) (%)	Concentration ratio (Max at 2 h)	Ethanol flux (g/m ² h)	Ethanol selectivity
Fermented hydrolysate	1.2	6.1	5.1	12.3	9.3

Table 4. Extraction yield and phenolic compound in extracts of residue after ethanol concentration

Sample	Extraction yield (%)	Total phenolic compound (mg VAE ^d /100 g extract)
OA-A ^a	2.89	-
OA-O ^b	2.64	2.52 (0.19)
OA-E ^c	0.28	86.81 (0.04)

^a Aqueous phase extract after ethyl acetate extraction

^b Residue after ethanol concentration

^c Solvent phase extract after ethyl acetate extraction

^d Vanillin equivalent

* The parentheses contains the standard deviation with the analysis repeated three times.

나타냈다. 투과증발 공정에서 회수부의 최대 농도는 6.1%로 최대 농축비는 5.1이었다. 투과증발을 이용하여 6시간 동안 에탄올을 농축한 결과 투과증발 잔류물에는 2.56 g/l의 에탄올이 남아 있었다. 본 연구에서는 단일 투과증발막으로 에탄올 농축을 실시하여 서너 개 막을 직렬로 연결한 상용화된 투과증발막 공정보다 낮은 농축율을 나타냈으며 이는 투과증발 공정에서 발효액의 유기물이 막표면 쌓여 에탄올의 투과도를 감소시키는 농도분극 현상에 의한 결과이다.

3.4. 추출 수율 및 총 페놀성 화합물 함량

에탄올 농축 후 투과증발 잔류물 분획물의 추출 수율과 페놀성 화합물 함량에 대한 결과는 Table 4와 같다. 추출 수율은 추출에 사용된 잔류물 부피를 기준으로 용매(에틸아세테이트)와 수용액에 포함된 추출물 함량으로 구하였다. 투과증발 잔류물을 에틸아세테이트로 추출한 결과(OA-E), 0.28%의 추출물을 획득하였다. 에틸아세테이트로 추출한 후 불용부인 수용액층(OA-A)과 투과증발 잔류물(OA-O)의 추출 수율은 각각 2.89%, 2.64%로 나타났다. 추출 수율은 용매의 극성, 추출 온도, 고액비, pH, 추출 시간

에 따라 달라질 수 있으며, 추출 온도의 경우 용해도 및 용질의 확산 계수와 직접적인 관련이 있다(Do *et al.* 2014).

리그닌은 세 개의 페닐 프로판올(*p*-hydroxyl-phenyl propanol, guaiacyl-propanol, syringyl-propanol)로 구성된 비정질 고분자로 C-C 결합(5-5, β - β , β -5와 β -1 결합)과 에테르 결합(α -O-4, 5-O-4, β -O-4)으로 연결되어 있어 분해 시 다양한 형태의 페놀성 화합물을 얻을 수 있다(Cheng *et al.*, 2012). 페놀성 화합물은 자연계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물로 그 형태가 다양하며 phenolic hydroxyl기로 인해 항산화, 항균 등의 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다(Do *et al.*, 2014). 0.1 mg/ml의 에틸아세테이트 추출물(OA-E)에 포함된 페놀성 화합물은 86.81 mg으로 나타났다. OA-A는 0.1 mg/ml의 농도에서 페놀성 화합물을 나타내지 않았으며, OA-O는 2.52 mg로 페놀성 화합물이 소량 검출되었다. Vázquez 등(2008)의 보고에 의하면 밤나무 껍질의 에탄올 추출물은 26.6 g GAE (gallic acid equivalent)/100 g의 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 유칼립투스 나무껍질의 경우 11.9 g GAE/100 g을 함유하고 있어 높은 항산화 활성이 측정되었다. 따라서 본 실험에서 에틸아세테이트 추출물의 페놀성 화합물 함

량을 조사한 결과 높은 항산화 활성을 예측할 수 있다.

3.5. 투과증발 잔류물 추출물의 항산화 활성 평가

투과증발에 의한 에탄올 농축 후 남은 액상 가수분해산물로부터 유래된 각 추출물 및 양성 대조군으로 사용된 BHT와 BHA의 DPPH radical scavenging activity는 Fig. 3과 같다. 모든 추출물들의 DPPH radical scavenging activity는 농도 의존적으로 증가하였으며, OA-E의 경우 11.90~86.56%의 소거능을 보였으며, OA-A는 0~19.65% 보였고, OA-O의 경우 0~31.36%으로 나타나 전체적으로 에틸아세테이트 추출물이 다른 추출물보다 높은 항산화 활성을 나타냈다. 그러나 추출물의 DPPH radical을 50% 억제하기 위해 요구되는 시료의 농도(IC₅₀)에 대한 결과, OA-E의 IC₅₀은 BHT와 BHA보다 높은 값을 나타내고 있어 합성 항산화제보다 낮은 항산화력을 나타냈다(Table 5). OA-E는 0.87 mg/ml로 나타났으며 BHT와 BHA는 각각 0.69 mg/ml와 0.40 mg/ml이었다. Moure 등(2014)의 보고에 의하면 밤송이를 120~130℃에서 60분간 황산으로 가수분해 시킨 추출물의 IC₅₀은 0.79~0.80 mg/ml이었으며 본 연구와 유사한 결과이다.

ABTS radical scavenging activity를 측정된 결과는 Fig. 3에 나타났다. 대부분의 추출물에서 농도가 증가할수록 ABTS radical scavenging activity가 증가하였다. 한편 OA-E와 양성 대조군을 제외한 나머지 추출물들에서는 가장 높은 실험농도(2 mg/ml)에서도 소거활성이 10%를 넘지 못하는 매우 낮은 활성을 나타냈다. IC₅₀에 대한 결과 OA-E의 경우 0.85 mg/ml로 추출물 중에서 가장 높은 활성을 나타냈으나 BHA (0.21 mg/ml)와 BHT (0.47 mg/ml)의 합성 항산화제보다는 낮았다(Table 5).

에탄올 농축 후 투과증발 잔류물의 각 분획물에 대한 환원력을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타났다. 0.125~1 mg/ml 농도에 따른 환원력을 측정된 결과 OA-E의 경우 0.184~0.784, OA-O는 0~0.121으로

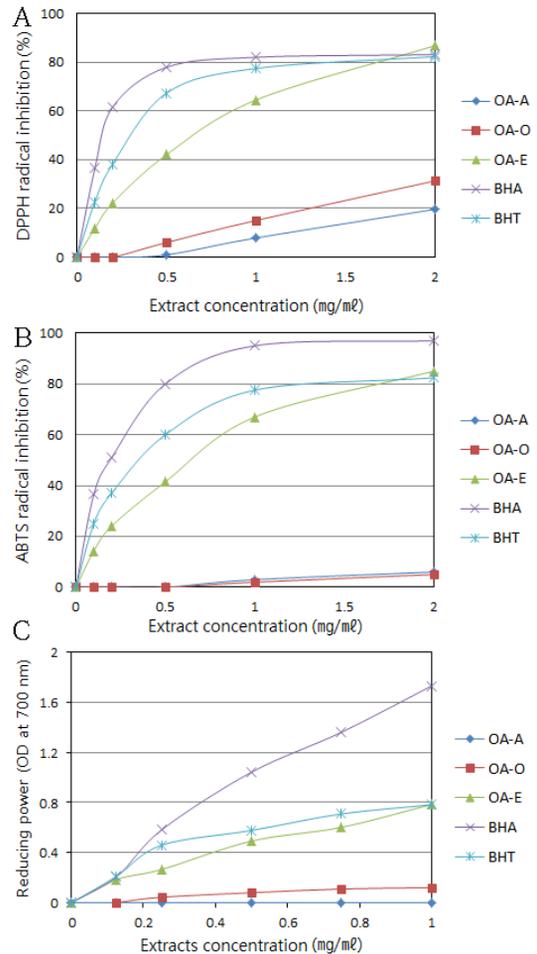


Fig. 3. Antioxidant activities of extracts. DPPH radical scavenging activity (A), ABTS radical scavenging activity (B), and reducing power (C) of extracts obtained from fermented hydrolysate after ethanol concentration.

낮았으며 OA-A에서는 환원력이 나타나지 않았다. 합성 항산화제의 경우, BHA는 가장 높은 환원력을 보여준 반면, BHT는 0.211~0.782로 OA-E와 유사한 환원력을 나타냈다. 추출물의 환원력을 EC₅₀으로 나타냈을 때 OA-E는 0.71 mg/ml로 BHA (EC₅₀ = 0.25 mg/ml)보다는 환원력이 낮았으나 BHT (EC₅₀ = 0.51 mg/ml)보다 높은 환원력을 나타냈다(Table 5). 따라서 에탄올을 회수·농축 후 투과증발 잔류물의

Table 5. IC₅₀ and EC₅₀ values of extracts obtained from residue after ethanol concentration

Sample	^a IC ₅₀ value (mg/ml)		EC ₅₀ value (mg/ml) ^b
	DPPH scavenging	ABTS scavenging	Reducing power
OA-A	5.05 (0.08)	-	-
OA-O	3.14 (0.36)	-	3.80 (0.05)
OA-E	0.87 (0.04)	0.85 (0.11)	0.59 (0.09)
BHT	0.69 (0.14)	0.47 (0.02)	0.51 (0.16)
BHA	0.40 (0.06)	0.21 (0.04)	0.25 (0.61)

^a IC₅₀: the effective concentration at which the DPPH or ABTS scavenging activity was 50%.

^b EC₅₀: the effective concentration at which the reducing power was 50%.

*The parentheses contains the standard deviation with the analysis repeated three times.

Table 6. List of compounds identified by GC/MS in the ethyl acetate extract of residue after ethanol concentration

Peak no.	Retention time (min)	Compound name	Area (%)
Sugar derived compounds			3.59
5	12.50	Butanedioic acid, bis (trimethylsilyl) ester	0.70
6	19.74	D-Xylose, tetrakis (trimethylsilyl)	0.65
7	22.00	Xylulose tetrakis (trimethylsilyl)-	2.24
Phenolic compounds			5.42
8	20.43	Vanillyl alcohol, bis (trimethylsilyl)-deriv.	1.15
9	23.11	Benzoic acid, 3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester	1.41
10	24.25	3-Vanilpropanol, bis (trimethylsilyl)-	0.55
11	24.83	(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl) ethylene glycol tris (trimethylsilyl) ether	0.42
12	27.38	3-Vanil-1,2-bis (trimethylsilyloxy) propane	1.41
13	36.80	1,2-Benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethylhexyl) ester	0.48
Miscellaneous			37.36
1	4.48	Silane, (2-furanylmethoxy) trimethyl-	28.34
2	4.58	3,6-Dioxa-2,7-disilaoctane, 2,2,4,7,7-pentamethyl-	2.71
3	10.55	Urea, N,N'-bis (trimethylsilyl)-	5.70

OA-E 추출물은 BHT와 견줄만한 항산화 활성을 나타내고 있어 합성 항산화제를 대체할 수 있는 새로운 자원으로서 판단된다.

3.6. GC-MS 분석

높은 항산화 활성을 나타낸 에틸아세테이트 가용부(OA-E)에 함유된 성분을 분석하고자 GC-MS 분석을 실시하였다. Table 6은 투과증발 잔류물의 에틸아

세테이트 가용부에서 검출된 화합물을 나타냈다. 전기투석 후 가수분해산물에 포함된 당 및 당 유래 분해산물은 발효공정에서 완전히 이용되지 못하고 일부 남았으며, 이와 같은 성분들은 에탄올 농축 후 에틸아세테이트 가용부 및 불용부에 포함되어 GC/MS에 의해 검출되었다. 리그닌 유래 페놀성 화합물로는 주로 Vanillyl alcohol, bis (trimethylsilyl)-deriv., Benzoic acid, 3-methoxy-4-[(trimethylsilyl)oxy]-, trimethylsilyl ester, 3-Vanilpropanol, bis

(trimethylsilyl)-이 확인되었다. 이는 guaiacyl 및 syringyl 리그닌 유도체로부터 파생된 것으로 사료된다. 페놀성 화합물은 항산화 활성을 나타낸다고 보고된 바 있다(Conde *et al.*, 2009). Ezhilan 등(2012)에 의하면 페놀성 화합물은 항산화뿐만 아니라 항균 활성도 갖는다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 획득한 OA-E 추출물은 항균 활성도 나타낼 것으로 예측된다.

4. 결 론

본 연구에서는 화석연료의 고갈로 인해 세계 각국에서 각광받고 있는 대체에너지인 바이오에탄올을 생산·농축 후 투과증발 잔류물로부터 항산화 활성 여부를 측정하여 부산물의 이용 가능성을 확인하였다. 옥살산 전처리 가수분해산물에 포함된 초산을 전기투석으로 제거하였지만 비이온성 물질인 HMF, 푸르푸랄, 페놀성 화합물은 가수분해산물에 남아 에탄올 발효를 지연시켰다. 생산된 에탄올은 투과증발법에 의해 회수, 농축되었다. 하지만 투과증발 잔류물에는 대부분의 발효저해산물이 잔존하였다. 투과증발 잔류물을 에틸아세테이트로 분획하여 가용부와 불용부, 그리고 미추출부에 대한 항산화 활성(DPPH radical scavenging activity, ABTS radical scavenging activity, reducing power)을 평가한 결과, 에틸아세테이트 가용부에서 가장 높은 페놀성 화합물을 함유하고 있었으며 이에 따라 높은 항산화 활성을 나타냈다. 본 연구에서는 항산화 물질 구명은 수행하지 못하였으나 투과증발 잔류물에 함유된 생리활성물질에 대한 추가적인 연구가 이루어진다면 고부가가치산물 생산을 위한 투과증발 잔류물의 활용가능성을 기대할 수 있다.

사 사

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(S121314L030110)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Beltran, A.B., Nisola, G.M., Vivas, E.L., Cho, W., Chung, W.J. 2013. Poly (octylmethylsiloxane)/ oleyl alcohol supported liquid membrane for the pervaporative recovery of 1-butanol from aqueous and ABE model solutions. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19: 182-189.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free-radical method to evaluate anti-oxidant activity. *Food Science and Technology* 28(1): 25-30.
- Cheng, S., Wilks, C., Yuan, Z., Leitch, M., Xu, C.C. 2012. Hydrothermal degradation of alkali lignin to bio-phenolic compounds in sub/supercritical ethanol and water-ethanol co-solvent. *Polymer Degradation and Stability* 97(6): 839-848.
- Cho, D.H., Shin S.J., Bae, Y.W., Park, C.H. 2010. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology* 101(13): 4947-4951.
- Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H. 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry* 114: 806-812.
- Delgenes, J.P., Moletta, R., Navarro, J.M. 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 220-225.
- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredijo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and anti-oxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis* 22: 296-302.

- Ezhilan B.P., Neelamegam, R. 2012. GC-MS analysis of phytochemicals in the ethanol extract of *Polygonum chinense* L. *Pharmacognosy Research* 4(1): 11-4.
- Jeong, S.Y., Trinh, L.T.P., Lee, H.J., Lee, J.W. 2014. Improvement of the fermentability of oxalic acid hydrolysates by detoxification using electro-dialysis and adsorption. *Bioresource Technology* 152: 444-449.
- Jonsson, L.J., Aliksson, B., Nilvebrant, N. 2013. Bioconversion of lignocellulosic: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels* 6: 16-25.
- Kiliç, I., Yeşiloğlu, Y. 2013. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of *p*-coumaric acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 115: 719-724.
- Lee, H.J., Ahn, S.J., Seo, Y.J., Lee J.W. 2013. A feasibility study on the multistage process for the oxalic acid pretreatment of a lignocellulosic biomass using electro-dialysis. *Bioresource Technology* 130: 211-217.
- Lee, J.W., Rodrigues, C.L.B., Kim, H.J., Choi, I.G., Jeffries, T.W. 2010. The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 101: 4379-4385.
- Moure, A., Conde, E., Falqué, E., Domínguez, H., Parajó J.C. 2014. Production of nutraceuticals from chestnut burs by hydrolytic treatment. *Food Research International* 65: 359-366.
- Mourtzinis, I., Konteles, S., Kalogeropoulos, N., Karathanos, V.T. 2009. Thermal oxidation of vanillin affects its antioxidant and antimicrobial properties. *Food Chemistry* 114(3): 791-797.
- Ozgen, M., Reese, R.N., Tulio, A.Z., Scheerens, J.C., Miller, A.R. Modified 2006. 2, 2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(4): 1151-1157.
- Park, M.J., Choi, W.S., Min, B.C., Kim, H.Y., Kang, H.Y., Choi, I.G. 2008. Antioxidant Activities of Essential Oils from *Charmaechyparis obtusa*. *Journal of the Wood Science and Technology* 36(6): 159-167.
- Rajagopal, D., Sexton, S.E., Roland-Holst, D., Zilberman, D. 2007. Challenge of biofuel: filling the tank without emptying the stomach?. *Environmental Research Letters* 2: 1-9.
- Robinson, P.H., Karges, K. Gibson, M.L. 2008. Nutritional evaluation of four co-product feed-stuffs from the motor fuel ethanol distillation industry in the Midwestern USA. *Animal Feed Science and Technology* 146: 345-352.
- Shao, P., Huang, R.Y.M. 2007. Polymeric membrane pervaporation. *Journal of Membrane Science* 287: 162-179.
- Silva, E.A.B., Zabkova, M., Araujo, J.D., Cateto, C.A., Barreiro, M.F., Belgacem M.N., Rodrigues, A.E. 2009. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chemical Engineering Research and Design* 87: 1276-1292.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Trinh, L.T.P., Lee, Y.J., Bae, H.J., Lee, H.J. 2014. Pervaporative separation of butanol using a composite PDMS/PEI hollow fiber membrane. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20(5): 2814-2818.

목질계 바이오매스로부터 생산된 바이오에탄올 투과증발 과정에서 발생한 투과증발 잔류물의 항산화 활성

Vázquez, G., Fontenla, E., Santos, J., Freire, M.S.,
González-Álvarez, J., Antorrena, G. 2008.
Antioxidant activity and phenolic content of

chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus
(*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial
Crops and Products* 28(3): 279-285.