

에탄올 생산 향상을 위한 발효저해물질 제거와 리그닌 유래 발효저해물질이 에탄올 발효에 미치는 영향¹

엄 민² · 신 경 진² · 이재 원^{2,†}

Enhancement of Ethanol Production by The Removal of Fermentation Inhibitors, and Effect of Lignin-derived Inhibitors on Fermentation¹

Min Um² · Gyeong-Jin Shin² · Jae-Won Lee^{2,†}

요 약

본 연구에서는 옥살산 전처리 바이오매스의 액상가수분해산물에 포함된 발효저해물질을 전기투석과 XAD 수지 처리하여 제거한 후 에탄올을 생산하였다. 전기투석 과정에서 아세트산은 대부분 제거되었으며(95.6%), 비이온성 발효저해물질(Total phenolic compound: TPC, 5-hydroxymethyl furfural: HMF, furfural)은 XAD 수지 처리에 의해 효과적으로 제거되었다. 전기투석과 XAD 수지 처리된 액상가수분해산물로 발효를 수행한 결과 XAD 수지의 침지시간이 짧을수록 에탄올 생산이 향상되었다. 최대 에탄올 생산은 발효 72시간 후 6.16 g/l로 전기투석 후 액상가수분해산물을 XAD-4 수지에서 5분 침지하였을 때 나타났다. 리그닌 유래 발효저해물질 중 syringaldehyde는 저농도(1 mM, 2 mM)에서 에탄올 생산을 향상시켰으며 5 mM에서는 발효에 부정적인 영향을 주었다. 리그닌 유래 발효저해물질의 시너지 효과를 확인하고자 합성배지로 발효를 수행하였으며, Syringaldehyde (1 mM)와 ferulic acid (1 mM) 합성배지를 이용하여 발효를 수행한 결과 syringaldehyde보다 ferulic acid의 영향으로 에탄올 생산이 감소했다.

ABSTRACT

In this study, ethanol was produced from a biomass hydrolysate that had been treated by electro dialysis (ED) and Amberlite XAD resin to remove fermentation inhibitors. Most of the acetic acid (95.6%) was removed during the ED process. Non-ionizable compounds such as total phenolic compounds, 5-hydroxymethyl furfural, and furfural were effectively removed by the XAD resin treatment. Ethanol production was improved when the ED-treated hydrolysate was treated with XAD-4 resin for a short reaction time. The highest ethanol production from ED-treated hydrolysate was 6.16 g/l (after 72 h of fermentation) when the treatment with XAD-4 resin was for 5 min. Among the lignin-derived fermentation inhibitors tested, syringaldehyde in low concentrations (1 and 2 mM) in the hydrolysate increased ethanol production, whereas a high concentration (5 mM) inhibited the ethanol production process. A synthetic

¹ Date Received February 29, 2016, Date Accepted April 23, 2016

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

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

medium containing syringaldehyde and ferulic acid was prepared to investigate the synergistic effect of inhibitors on ethanol fermentation. Ethanol production decreased in the mixture of 1 mM syringaldehyde and 1 mM ferulic acid, implying that the effect of ferulic acid on ethanol fermentation is comparable to that of syringaldehyde.

Keywords : ethanol, electrodialysis, XAD resin, fermentation inhibitors

1. 서 론

현재 화석연료의 고갈과 무분별한 사용에 따른 환경오염 문제로 대체 에너지 개발에 대한 관심이 집중되고 있다. 다양한 대체 에너지 중에서 바이오매스로부터 생산되는 바이오에너지는 친환경적이고 재생 가능한 자원을 활용하기 때문에 청정에너지로 알려져 있다(Sim, 2012). 특히 바이오매스로부터 생산되는 바이오에탄올은 석유기반 수송용 연료를 대체할 수 있어 그 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Kim *et al.*, 2011).

1세대 바이오매스인 감자와 옥수수 등의 전분을 이용한 바이오에탄올 생산은 일부 상용화되어 있으나 식량자원과의 경쟁으로 인한 원료가격 상승과 식량부족 문제를 야기할 수 있다. 따라서 식량자원과 경쟁하지 않는 2세대 목질계 바이오매스의 이용에 대한 연구가 증가하고 있다(Shin *et al.*, 2015). 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌으로 구성되어 있고, 셀룰로오스는 40-45%, 헤미셀룰로오스는 25-35%가 존재한다. 이것은 풍부한 당으로 구성되어 있으나 유기적으로 견고하게 연결되어 있어 목질계 바이오매스를 이용하기 위해서는 전처리 과정이 필요하다(Seo *et al.*, 2011). 열과 산을 이용한 전처리를 통해 효과적으로 가수분해 된 바이오매스는 효소에 의해 5탄당과 6탄당 등 발효가능한 당의 형태로 전환될 수 있다(Szczodrak and Fiedurek, 1996). 하지만 이와 같은 전처리 과정에서 발효가능한 당뿐만 아니라 푸르푸랄과 HMF (5-hydroxymethyl furfural), TPC (Total phenolic compound)와 같은 바이오매스 유래 발효저해물질이 생성된다(Lim and Lee, 2012).

푸르푸랄은 헤미셀룰로오스의 5탄당으로부터 유래되며 그 자체로는 furfuryl alcohol, tetrahydrofuran

등과 같은 고부가가치 화합물 생산 및 alcohol resin, 6,6-Ny론의 전구물질로 이용되고 있다(Vargas *et al.*, 2014). 발효저해물질로 작용하는 리그닌 유래 분해산물로는 syringaldehyde, ferulic acid, vanillic acid, syringic acid가 대표적이다. 이는 각각의 성분마다 발효에 영향을 미치는 정도가 다르며 소량의 vanillic acid, syringic acid, syringaldehyde는 에탄올 생산을 향상시키기도 하지만 일정 농도 이상에서는 에탄올 발효에 부정적인 영향을 준다. 반면 ferulic acid는 낮은 농도에서도 에탄올 생산을 감소시키는 것으로 알려져 있다(Klinke *et al.*, 2003; Kundu, 2015).

이러한 발효저해물질을 제거하는 방법으로는 알칼리 처리(overliming), 흡착(adsorption), 용매추출(solvent extraction) 등이 있으며 최근에는 두 가지 이상의 방법(XAD 수지 흡착과 전기투석)을 연속적으로 사용하여 발효저해물질 제거 효율을 향상시켰다(Lee *et al.*, 2009). 전기투석 공정은 양이온 교환막과 음이온 교환막을 이용하여 분리하는 막 분리 공정으로 이온성 물질에 대해 선택 투과성을 가진다. 따라서 전기투석은 전처리 과정에서 생산되는 대표적인 이온성 발효저해물질인 아세트산을 제거할 수 있으며 산 전처리에 사용되는 이온성 촉매도 제거할 수 있다(Jeong *et al.*, 2014). 반면 전기투석에서 제거하지 못하는 비이온성의 발효저해물질은 XAD 수지 처리에 의해 제거된다(Li *et al.*, 2013). 비극성인 XAD 수지는 전처리 후 액상가수분해산물에 포함된 HMF, 푸르푸랄, TPC와 같은 비이온성 발효저해물질을 흡착할 수 있다(Weil *et al.*, 2002). 반면 액상가수분해산물에 포함되어 있는 당은 XAD 수지에 흡착되지 않고 통과하여 에탄올 생산에 유리한 조건을 유도한다(Imai *et al.*, 2002).

본 연구에서는 옥살산 촉매 전처리로부터 유래된 액상가수분해산물로부터 에탄올을 생산하였으며 에

에탄올 생산 향상을 위한 발효저해물질 제거와 리그닌 유래 발효저해물질이 에탄올 발효에 미치는 영향

Table 1. Properties of XAD-4 and XAD-16 resin

Macroporous resin	Polarity	Structure	Dry density (g/ml)	Specific surface area (m ² /g)	Pore diameter (nm)	Mesh size
XAD-4	Non Polar	Poly styrene	1.08	725	5	20-60
XAD-16	Non Polar	Poly styrene	1.02	800	10	20-60

탄올 생산을 향상시키기 위한 발효저해물질 제거의 최적 조건을 탐색하였다. 또한 리그닌 유래 발효저해물질이 에탄올 발효에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

국립산림과학원에서 칩 형태로 제공받은 백합나무 (*Liriodendron tulipifera* L.)를 사용하였다. 칩은 20~80 mesh로 분쇄한 후 전처리에 사용하였으며 함유율은 6.11 ± 0.04%였다.

2.2. 옥살산 전처리

백합나무의 옥살산 전처리는 회전식 반응기 (DM-848; Daeil Machinery, Daejeon, Korea)에서 수행되었다. 전건 시료 50 g과 옥살산 100 mM (교액비 1:4)을 반응기에 투입한 후 170℃, 50분의 조건으로 전처리를 수행하였다(Kundu, 2015). 전처리 후 액상가수분해산물과 고행바이오매스는 진공 여과기를 이용하여 분리하였고, 액상가수분해산물은 성분 분석 후 4℃에서 보관하였다.

2.3. 액상가수분해산물 분석

전처리 후 액상가수분해산물의 주요 당(글루코스, 자일로스, 아라비노스)과 당 분해산물(푸르푸랄, HMF, 아세트산)은 HPLC (Waters e2695, USA)를 이용하여 분석하였으며 refractive index detector (Waters 2414 system)를 사용하였다. Aminex 87 H column

(300 × 7.8 mm, BIO-RAD)을 사용하여 0.5 mM의 황산을 이동상으로 0.6 ml/min으로 흘려주며 45분 동안 분석하였다. 액상가수분해산물에 존재하는 TPC 함량은 Folin-Ciocalteu's reagent를 이용하여 760 nm에서 UV spectrophotometer (SHIMADZU, Japan)로 농도를 측정하였다.

2.4. 전기투석에 의한 아세트산 제거

전기투석은 전처리 후 액상가수분해산물에 포함된 아세트산을 제거하기 위해 수행하였다. 유효막 면적 550 cm²로 양이온 교환막(NEOSEPTA[®] CMX; ASTOM Crop., Tokyo, Japan)과 음이온 교환막(NEOSEPTA[®] AMX; ASTOM Crop., Tokyo, Japan)이 사용되었다. 희석액, 농축액, 전극액은 1.56 l/min의 유속으로 일정하게 공급되었고, 10 V 정전압 조건으로 전기투석을 실시하였다(Shin *et al.*, 2015).

2.5. XAD 수지를 이용한 발효저해물질 제거

전기투석 후 얻어진 액상가수분해산물에 함유된 발효저해물질을 제거하기 위해 XAD-4와 XAD-16 수지를 사용하였다(Table 1). 사용 전 XAD 수지는 물로 세척한 후 건조하였다. 기건상태의 XAD 수지는 isopropyl alcohol에 침지시켜 24시간 동안 활성화 시킨 후 50 × 3 cm의 open column에 충전하였다. 충전된 XAD 수지는 물로 세척한 후 액상가수분해산물과 교액비 1:10으로 고정하였다. Open column에서 액상가수분해산물은 각각 5분, 30분, 1시간, 2시간 동안 침지시켜 발효저해물질 흡착 실험을 수행하였다.

2.6. 발효저해물질 제거 후 액상가수분해 산물 발효

전기투석과 XAD 수지 처리로 발효저해물질을 제거한 액상가수분해산물을 이용하여 에탄올 발효를 실시하였다. 에탄올 발효균주로는 *Pichia stipitis* CBS 6054를 이용하였다. 액체배지(20 g/l 글루코스, 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone)에 균을 접종하여 30℃에서 24시간 동안 150 rpm에서 배양한 후 발효에 이용하였다. 균주의 생장을 위해 액상가수분해산물은 pH 5.5로 조절한 후 멸균된 urea 5 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, yeast extract 5 g/l를 첨가하였다. 그 후 액상가수분해산물에 배양된 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/l를 첨가하여 에탄올 발효를 진행하였다. 30℃, 150 rpm 조건에서 96시간 동안 발효를 수행하였다. 24시간 간격으로 시료를 채취하여 생산된 에탄올과 남아 있는 당은 HPLC로 측정하고 식(1)에 의해 에탄올 수율을 계산하였다.

$$Ethanol\ yield(\%) = \left(\frac{E_{MAX}}{I_S \times 0.51} \right) \times 100 \dots\dots (1)$$

E_{MAX} 는 HPLC를 통해 정량되어진 에탄올 농도를 의미하고, I_S 는 글루코스와 자일로스의 초기 당 농도를 의미한다. 0.51은 당으로부터 에탄올 전환에 적용되는 변환계수이다.

2.7. 발효저해물질을 포함한 합성배지에서 발효

액상가수분해산물로부터 검출된 성분이 발효에 미치는 영향을 확인하기 위해 글루코스와 자일로스 합성배지(GX: 5 g/l 글루코스, 10 g/l 자일로스)에서 발효를 수행하였다. 발효저해물질이 첨가되지 않은 GX 배지를 대조군으로 이용하였다. GX 배지에 syringaldehyde를 농도별(1 mM, 2 mM, 5 mM)로 첨가하였고 ferulic acid 1 mM과 syringaldehyde 1 mM을 혼합하여 발효를 진행하였다. 에탄올 발효과정은 2.6항과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 액상가수분해산물로부터 XAD 흡착에 의한 발효저해물질 제거

전처리 후 액상가수분해산물과 전기투석, XAD 수지 처리에 의한 액상가수분해산물의 성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 전처리 후 액상가수분해산물은 자일로스(18.00 g/l)가 가장 높은 농도로 검출되었고 아세트산은 2.05 g/l로 나타났다. 자일로스의 분해가 더욱 진행되어 푸르푸랄은 2.35 g/l로 검출되었다. 이것은 옥살산 전처리에 의해 헤미셀룰로오스의 가수분해가 촉진되었음을 의미한다(Pu *et al.*, 2013). 이후 이온성 발효저해물질을 제거하기 위해 전기투석을 수행한 결과, 아세트산(95.6%)이 대부분 제거되었고 당과 비이온성 발효저해물질인 HMF, 푸르푸랄, TPC가 소량 감소하였다. 이는 막 분리 공정에서 막 흡착에 의한 것으로 사료된다(Mulder, 1996).

전기투석 후 대부분 남아있는 비이온성 발효저해물질은 XAD 수지를 이용하여 제거하였다. 비이온성 발효저해물질 제거에 대한 최적 조건을 탐색하기 위해 XAD 수지(XAD-4, XAD-16)를 이용하여 침지시간(5분, 30분, 60분, 120분)에 따라 실험을 수행하였다. 다공성의 비극성인 XAD 수지에 TPC, HMF, 푸르푸랄은 반데르발스 상호작용에 의해 흡착된다(Jia *et al.*, 2015). 따라서 대부분의 TPC와 HMF, 푸르푸랄은 XAD 수지에 흡착되었다. 각 성분에 따른 흡착률은 XAD-4 수지와 XAD-16 수지에서 유사한 경향을 나타냈다(Fig. 1). 침지시간에 따른 흡착 경향도 유사하였다. XAD-4 수지와 XAD-16 수지에서 모두 침지시간 5분에서 60분까지 흡착률이 급격하게 증가하지만 120분에서는 60분 침지조건과 유사하였다. 이것은 침지 60분에서 충분히 흡착평형을 이루었던 것으로 판단된다. XAD-16 수지에서 TPC 흡착이 가장 효과적이었다. XAD-4 수지에서 5분 침지하였을 때 TPC가 45.87%, 푸르푸랄이 69.38%가 흡착되었고 XAD-16 수지에서 5분 침지하였을 때 TPC가 59.45%, 푸르푸랄이 68.11% 흡착되었다. 이것은 수지 공극의 직경 차이에 의한 것으로 XAD-4 수지는

에탄올 생산 향상을 위한 발효저해물질 제거와 리그닌 유래 발효저해물질이 에탄올 발효에 미치는 영향

Table 2. Sugars and inhibitors concentration in the original and detoxified hydrolysate (g/l)

	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid	HMF	Furfural	TPC
Original	4.97 (0.02)	18.00 (0.11)	0.32 (0.01)	2.05 (0.03)	0.26 (0.01)	2.34 (0.06)	3.76 (0.07)
ED-treated	3.32 (0.23)	14.79 (0.51)	0.19 (0.01)	0.09 (0.00)	0.18 (0.03)	2.23 (0.06)	2.79 (0.06)
XAD-4 5 min	3.10 (0.05)	14.14 (0.04)	0.17 (0.00)	ND	0.08 (0.00)	0.68 (0.01)	1.51 (0.04)
XAD-4 30 min	3.06 (0.05)	14.00 (0.11)	0.18 (0.00)	ND	0.08 (0.00)	0.67 (0.01)	1.37 (0.02)
XAD-4 1 h	2.86 (0.02)	13.68 (0.07)	0.19 (0.00)	ND	0.02 (0.00)	0.29 (0.00)	0.52 (0.00)
XAD-4 2 h	2.79 (0.08)	13.46 (0.13)	0.16 (0.02)	ND	0.02 (0.00)	0.12 (0.02)	0.47 (0.19)
XAD-16 5 min	3.04 (0.06)	13.83 (0.14)	0.16 (0.01)	ND	0.08 (0.01)	0.71 (0.00)	1.13 (0.07)
XAD-16 30 min	2.95 (0.10)	13.68 (0.05)	0.17 (0.00)	ND	0.05 (0.00)	0.45 (0.00)	0.70 (0.05)
XAD-16 1 h	2.79 (0.14)	13.16 (0.69)	0.15 (0.07)	ND	0.03 (0.00)	0.40 (0.00)	0.34 (0.01)
XAD-16 2 h	2.74 (0.05)	12.98 (0.03)	0.14 (0.04)	ND	0.03 (0.00)	0.06 (0.03)	0.32 (0.12)

*ED: electrodialysis, HMF: 5-hydroxymethyl furfural, TPC: total phenolic compound, ND: not detectable.

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

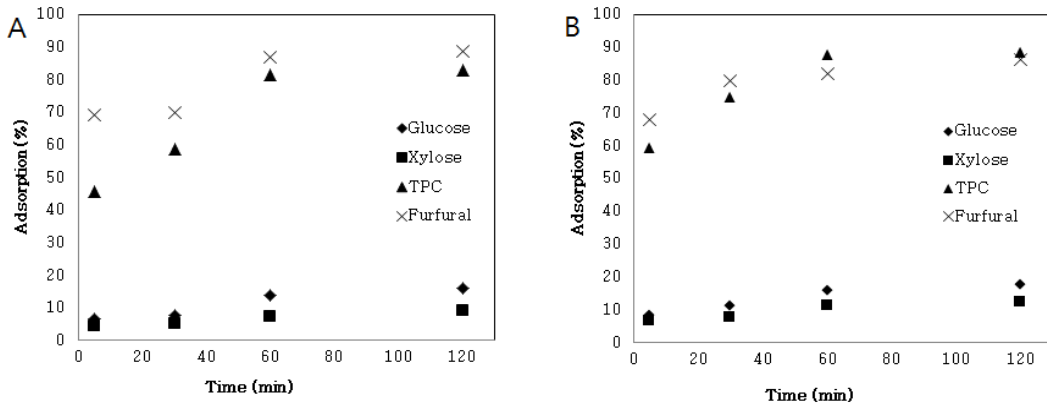


Fig. 1. Adsorption performance of chemical compositions in the ED-treated hydrolysate during XAD resin treatment (A: XAD-4 resin, B: XAD-16 resin).

공극 직경이 5 nm로 XAD-16 수지(10 nm)보다 물리적으로 흡착의 제한을 받았기 때문에 TPC 흡착에 있어 XAD-16 수지에서 높은 흡착률을 보인 것으로 판단된다(Viia, 1999; Aimin *et al.*, 2001).

3.2. 전기투석과 XAD 수지 처리 후 액상가수분해산물 발효

전기투석과 XAD 수지 처리 후 액상가수분해산물

Table 3. Ethanol fermentation performance on the detoxified hydrolysate

	Initial fermentable sugar concentration (g/l)	Ethanol production (g/l)	Ethanol yield (%)
ED	18.83 ± 1.63 (3.75 ± 0.70) ^a	4.18 ± 0.08 ^b	43.52
XAD-4 (5 m)	15.01 ± 1.75 (0.11 ± 0.01) ^a	6.16 ± 0.06 ^c	80.43
XAD-4 (30 m)	14.39 ± 1.77 (0.15 ± 0.02) ^a	5.74 ± 0.21 ^c	76.54
XAD-4 (1h)	14.49 ± 1.66 (0.04 ± 0.07) ^a	5.49 ± 0.40 ^c	74.24
XAD-16 (5 min)	14.49 ± 1.64 (0.11 ± 0.01) ^a	5.94 ± 0.04 ^c	83.19
XAD-16 (30 min)	13.81 ± 1.70 (0.16 ± 0.01) ^a	5.59 ± 0.07 ^c	79.40
XAD-16 (1 h)	13.49 ± 2.15 (0.14 ± 0.03) ^a	5.28 ± 0.28 ^b	74.90

*ED: electrodialysis.

^a Remaining sugar after fermentation.

^b The highest ethanol production was observed after 96 h of fermentation.

^c The highest ethanol production was observed after 72 h of fermentation.

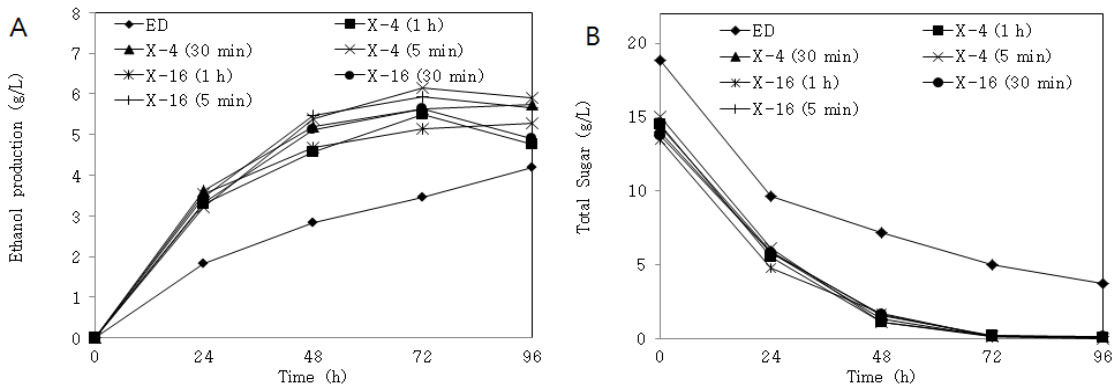


Fig. 2. Ethanol fermentation of detoxified hydrolysate by *Pichia stipitis* CBS 6054 (A: ethanol production, B: sugar consumption, ED: electrodialysis, X-4: ED and XAD-4 resin treatment, X-16: ED and XAD-16 resin treatment).

을 이용하여 발효를 수행한 결과를 Fig. 2에 나타냈다. 전기투석 후 액상가수분해산물 발효에서 96시간 후 4.18 g/l의 에탄올을 생산하였으며 이에 해당하는 에탄올 수율은 43.52%로 전기투석과 XAD 수지 처리를 연속적으로 처리한 시료(74.24~83.19%)와 비교하여 상대적으로 낮은 수율을 나타냈다. 뿐만 아니라 발효 96시간까지 당이 소모되지 못하고 3.75 g/l 남아 있었다. 이는 전기투석을 통해 이온성 발효저해물질을 제거하였지만 여전히 푸르푸랄(2.23 g/l)과 TPC (2.79 g/l)와 같은 비이온성 발효저해물질이 잔류하여 효모의 당 소모와 에탄올 생산을 저해한 것으로 판단된다(Lee *et al.*, 2009). 일부 조건에서는 72시간 이후 에탄올 생산이 감소하였는데 이것은 발

효과정에서 당의 소모와 관계있으며 당이 완전히 소모된 후 에탄올 분해가 일어난 것으로 사료된다.

전기투석과 XAD 수지를 연속적으로 처리한 액상가수분해산물 발효에서는 96시간까지 대부분의 당을 소모하였으며, XAD 수지 침지시간에 따라 에탄올 생산에서 차이를 나타냈다. 침지시간의 증가는 초기 당 농도를 감소시켜 에탄올 생산량을 감소시켰다 (Table 3). 에탄올 수율 또한 침지시간 증가와 함께 감소하였다. 이것은 TPC에 포함된 발효상승물질 감소에 의한 것으로 사료된다. TPC는 수지 침지시간 증가에 따라 제거율이 증가하였기 때문에 TPC에 포함된 일부 발효상승물질이 제거되어 발효 수율에 영향을 주었다. 전기투석과 XAD 처리 조건 중 가장 높

에탄올 생산 향상을 위한 발효저해물질 제거와 리그닌 유래 발효저해물질이 에탄올 발효에 미치는 영향

Table 4. Ethanol fermentation performance on the synthetic medium containing syringaldehyde and ferulic acid

	Initial fermentable sugar concentration (g/l)	Ethanol production (g/l)	Ethanol yield (%)
GX control	12.16 ± 0.60 (0.10 ± 0.07) ^a	5.52 ± 0.13 ^b	89.03
S 1 mM + F 1 mM	14.50 ± 0.80 (0.16 ± 0.07) ^a	6.08 ± 0.54 ^b	82.17
S 1 mM	13.99 ± 0.72 (0.13 ± 0.12) ^a	6.70 ± 0.31 ^c	93.93
S 2 mM	13.30 ± 0.78 (0.05 ± 0.03) ^a	6.28 ± 0.30 ^c	92.66
S 5 mM	15.72 ± 0.44 (3.56 ± 0.54) ^a	4.99 ± 0.38 ^b	62.25

*GX: synthetic medium with glucose and xylose, S: syringaldehyde, F: ferulic acid.

^a Remaining sugar after fermentation.

^b The highest ethanol production was observed after 96 h of fermentation.

^c The highest ethanol production was observed after 48 h of fermentation.

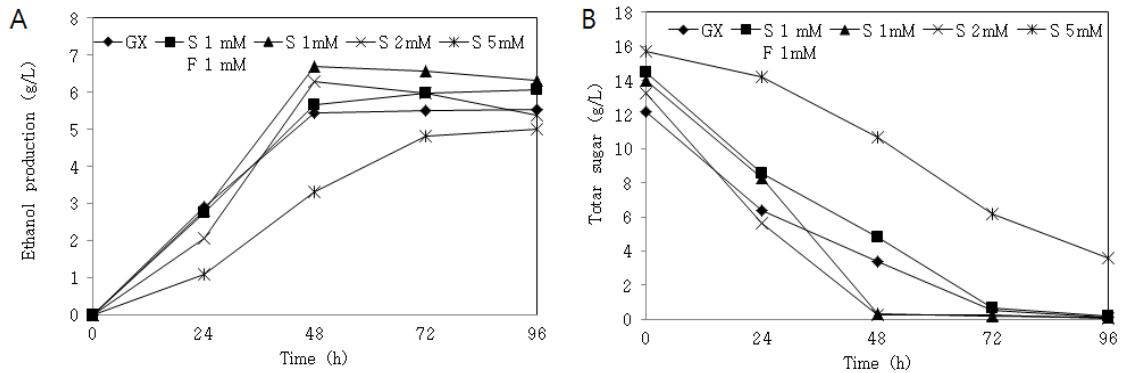


Fig. 3. Ethanol fermentation on synthetic medium containing syringaldehyde and ferulic acid (A: ethanol production, B: sugar consumption, GX: synthetic medium with glucose and xylose, S: syringaldehyde, F: ferulic acid).

은 에탄올 생산은 XAD-4 수지에서 5분 침지한 것으로 6.16 g/l를 생산하였다(80.43%). 하지만 초기 당 농도를 고려하여 에탄올 수율을 비교한 결과 XAD-16 수지에서 5분 침지하였을 때 83.19% (5.49 g/l)로 가장 높은 수율을 나타냈다. 이와 같은 에탄올 수율의 차이는 전기투석과 XAD 수지 처리 후 당 농도와 리그닌 유래 발효저해물질과 발효상승물질을 포함하고 있는 TPC의 농도에 의한 것으로 사료된다. 종합하면, XAD-4 수지에서 5분 동안 침지하였을 경우 에탄올 생산을 향상시키기 위한 최적 조건으로 판단된다.

3.3. 에탄올 발효에서 리그닌 유래 발효저해물질의 영향

액상가수분해산물의 LC-MS 분석에서 검출된 주

요 발효저해물질을 합성배지에 첨가하여 발효를 수행한 후 에탄올 발효에 미치는 영향을 확인하였다. 선행연구에 의해 검출된 단일물질 중 상대적으로 소량 포함하고 있어도 발효에 영향을 미치는 ferulic acid와 syringaldehyde를 선택하였다(Kundu, 2015). Syringaldehyde를 농도별(1 mM, 2 mM, 5 mM)로 첨가한 배지와 syringaldehyde와 ferulic acid를 혼합(각각 1 mM)하여 첨가한 배지에서 발효를 수행하였다 (Fig. 3, Table 4).

Syringaldehyde 1 mM (6.70 g/l)과 2 mM (6.28 g/l) 조건에서는 48시간에 최대 에탄올 생산을 나타냈으며 대부분의 당이 소모되었다. GX 대조군(5.52 g/l)과 비교하였을 때 syringaldehyde 1 mM과 2 mM 조건에서 에탄올 수율이 소량 상승하였다. 반면 syringaldehyde 5 mM (4.99 g/l) 조건은 96시간까지

당을 완전히 소모하지 못하고 남아 있었고 가장 낮은 에탄올 생산과 수율을 나타냈다. 이것은 syringaldehyde가 저농도에서 에탄올 생산을 상승시키지만 일정 농도 이상(5 mM 이상)에서는 에탄올 발효를 저해한 것으로 나타났다(Delgenes *et al.*, 1996). Syringaldehyde와 ferulic acid를 혼합한 경우 상대적으로 낮은 에탄올 수율을 나타냈다(82.17%). 발효 72 시간에서 대부분의 당이 소모되었는데 이것은 syringaldehyde보다 ferulic acid에 대한 영향으로 발효에 부정적인 영향을 준 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 액상가수분해산물을 전기투석과 XAD 수지 처리하여 발효저해물질을 제거한 후 에탄올을 생산하였고 리그닌 유래의 발효저해물질이 에탄올 생산에 미치는 영향을 확인하였다. XAD 수지에 의한 TPC, 푸르푸랄, HMF 등의 발효저해물질 제거율은 XAD 수지 침지시간이 증가할수록 증가하였다. 특히 XAD-16 수지에서는 TPC의 흡착이 효과적이었으며 XAD-4 수지에서는 푸르푸랄의 흡착이 효과적이었다. 에탄올 생산을 위한 최적의 발효저해물질 제거 조건은 초기 당 농도와 에탄올 생산량을 고려하여 XAD-4 수지에 5분 침지 조건으로 나타났다(6.16 g/l, 80.43%). 리그닌 유래 발효저해물질(syringaldehyde, ferulic acid)이 에탄올 생산에 미치는 영향을 확인하기 위해 합성배지에서 단일물질과 혼합물질에 대한 발효를 수행한 결과, 소량의 syringaldehyde는 에탄올 생산을 향상시켰으나 일정 농도 이상에서는 발효를 저해하는 인자로 작용하였다. Syringaldehyde와 ferulic acid 혼합 조건에서는 ferulic acid의 영향으로 에탄올 생산에 부정적인 영향을 주었다. 리그닌 유래 발효저해물질은 다양하며 각 성분이 발효에 미치는 영향 또한 다르다. 따라서 에탄올 생산 향상을 위해서는 최적의 발효저해물질 제거 조건이 필요하고 이러한 방법은 실제 에탄올 생산 공정에 적용 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 산림청 ‘산림과학기술개발사업(S121315L030110)’의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

REFERENCES

- Aimin, L., Quanxing, Z., Jinlong, C., Zhenghao, F., Chao, L., Wanxing, L. 2001. Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4. *Reactive and Functional Polymers* 49: 225-233.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.H., Choi, K. 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from waste water treatment plants. *Water Research* 36: 859-870.
- 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.
- Jia, C., Li, X., Liu, Z., Xu, B., Yao, S., Song, H. 2015. Adsorption process and mechanism for furfural separation with macroporous resin. *Desalination and Water Treatment* 56(8): 2214-2224.
- Kim, H.Y., Lee, J.W., Thomas, W. J., Choi, I.G. 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, *Journal of Korean Wood Science and Technology* 39(1): 75-85.
- Klinke, H.B., Olsson, L., Thomsen, A.B., Ahring, B.K. 2003. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: Wet oxidation and fermentation by yeast. *Biotechnology*

- and *Bioengineering* 81(6): 738-747.
- Kundu, C. 2015. Enhanced bioethanol production from oxalic acid pretreated hydrolysate of lignocellulosic biomass by combined detoxification process. Master's Thesis, Chonnam National University, Korea.
- Lee, M.G., Cho, D.H., Kim, Y.H., Lee, J.W., Lee, J.H., Kim, S.W., Cho, J.H., Kim, S.G., Park, C.H. 2009. Evaluation of biological and physico-chemical detoxification methods for the removal of inhibitors in lignocellulose hydrolysate. *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering* 24(5): 439-445.
- Li, C., Xu, M., Sun, X., Han, S., Wu, X., Liu, Y.N., Huan, J., Deng, S. 2013. Chemical modification of Amberlite XAD-4 by carbonyl groups for phenol adsorption from wastewater. *Chemical Engineering Journal* 229: 20-26.
- Lim, W.S., Lee, J.W. 2012. Enzymatic hydrolysis condition of pretreated corncob by oxalic acid to improve ethanol production. *Journal of Korean Wood Science and Technology* 40(4): 294-301.
- Mulder, M. 1996. Basic principles of membrane technology. Kulwer Academic Publishers.
- Pu, Y., Hu, F., Huang, F., Davison, B.H. Ragauskas, A.J. 2013. Assessing the molecular structure basis for biomass recalcitrance during dilute acid and hydrothermal pretreatments. *Biotechnology for Biofuels* 6:15.
- Seo, Y.J., Lim, W.S., Lee, J.W. 2011. Optimal condition for simultaneous saccharification and fermentation using pretreated corncob by oxalic acid, *Journal of Korean Wood Science and Technology* 39(6): 490-497.
- Shin, G.J., Jeong, S.Y., Lee, H.J., Lee, J.W. 2015. Furfural production and recovery by two-stage acid treatment of lignocellulosic biomass. *Journal of Korean Wood Science and Technology* 43(1): 76-85.
- Sim, S.W. 2012. Economical efficiency analysis of bioethanol for transportation, Master's Thesis, Korea University, Korea.
- Szczodrak, J., Fiedurek, J. 1996. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy* 10(5-6): 367-375.
- Vargas-Hernández, D., Rubio-Caballero, J.M., Santamaría-González, J., Pérez-Cruza, R., Jiménez-López, M.A., Hernández-Huesca, R., Maireles-Torres, P. 2014. Furfuryl alcohol from furfural hydrogenation over copper supported on SBA-15 silica catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 383-384: 106-113.
- Viiä, L. 1999. Comparison of XAD resins for the isolation of humic substances from seawater. *Journal of Chromatography A* 845: 1-2.
- Weil, J.R., Dien, B., Bothast, R., Hendrickson, R., Mosier, N.S., Ladisch, M. R., 2002. Removal of fermentation inhibitors formed during pretreatment of biomass by polymeric adsorbents. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 41: 6132-6138.