

에탄올 향상을 위한 탈아세틸화 백합나무 당화액의 발효저해물질 제거와 semi-동시당화발효

김조은 · 이재원[†]

전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학부
61186 광주광역시 북구 용봉로 77
(2015년 10월 12일 접수, 2016년 2월 18일 수정본 접수, 2016년 3월 2일 채택)

Improved Ethanol Production from Deacetylated Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*) by Detoxification of Hydrolysate and Semi-SSF

Jo-Eun Kim and Jae-Won Lee[†]

Department of Forest Products and Technology, Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju, 61186, Korea
(Received 12 October 2015; Received in revised form 18 February 2016; accepted 2 March 2016)

요 약

본 연구에서는 백합나무의 아세틸기 제거를 위해 전처리 전에 수산화나트륨을 이용하여 탈아세틸화를 수행하였다. 0.8%의 수산화나트륨을 첨가하여 60 °C에서 80분 동안 반응시켜 헤미셀룰로오스로부터 대부분의 아세틸기를 제거하였다. 탈아세틸화 처리된 바이오매스를 옥살산 전처리에 이용하였으며, 전처리된 바이오매스 투입량(10, 12.5, 15%) 및 효모 투입시간(0, 6, 12, 24시간)에 따라 동시당화발효 및 semi-동시당화발효를 수행하였다. 최대 에탄올 수율은 바이오매스 투입량 10%에서 효모를 당화시작과 동시에 첨가했을 때 120시간 후 26.73 g/L의 에탄올을 생산하였으며 이것은 88.14%의 에탄올 수율에 해당하였다. 바이오매스 투입량 12.5%와 15% 조건에서는 효모 투입시간 6시간 조건에서 각각 32.34 g/L, 27.15 g/L의 에탄올을 생산하였고, 이는 각각 85.58%와 59.87%의 에탄올 수율에 해당하였다. 옥살산 전처리 후 얻어진 액상 가수분해산물로부터 발효저해물질의 제거를 위해 수산화칼슘을 처리하였으며 발효 72시간 후 5.28 g/L의 최대 에탄올을 얻었다.

Abstract – In order to remove acetyl group from yellow poplar, deacetylation was performed using sodium hydroxide (NaOH) prior to oxalic acid pretreatment. During the deacetylation (60 °C for 80 min, 0.8% NaOH), most of the acetyl group were removed from hemicellulose. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and semi-SSF were carried out based on solid loading (10, 12.5, 15%) of deacetylated biomass and pre-hydrolysis with enzymes (0, 6, 12, 24 h). The highest ethanol was obtained as 26.73 g/L after 120 h when 10% of biomass was used for SSF. It is corresponding to 88.14% of theoretical ethanol yield. At the 12.5% and 15% of biomass loading, the highest ethanol was obtained from 6 h pre-hydrolysis. It was 32.34 g/L and 27.15 g/L, respectively, and corresponding to ethanol yield of 85.58 and 59.87%. In order to remove fermentation inhibitors from hydrolysates, overliming was performed using calcium hydroxide (Ca(OH)₂). The highest ethanol was 5.28 g/L after 72 h of fermentation.

Key words: Oxalic acid pretreatment, Semi-simultaneous saccharification and fermentation (semi-SSF), Biomass loading, Ethanol

1. 서 론

19세기 산업혁명 이후 화석연료에 대한 의존도가 높아지면서 이에 따른 화석연료 고갈이 예상되고 있다[1]. 따라서 여러 나라에서는 대체에너지로 친환경적인 바이오매스를 이용한 연료용 에탄올 생산에

초점을 모으고 있다[2]. 리그노셀룰로오스계 바이오매스는 재생가능하며 풍부한 탄수화물을 포함하고 있어 바이오에탄올 생산에 적합한 자원으로 알려져 있다[3]. 특히 백합나무(*Yellow poplar*, *Liriodendron tulipifera*)는 다른 수종에 비해 목재 구성성분 중 리그닌이 차지하는 비율이 적고, 생장 속도가 빠른 특징으로 그 이용이 용이하다[4].

바이오매스로부터 바이오에탄올 생산을 위해서는 전처리, 효소가수분해, 에탄올 발효 과정이 필요하다[5]. 일반적으로 사용되는 산 전처리는 탄수화물의 가수분해를 촉진하여 바이오매스를 발효가능한 당으로 쉽게 전환시켜주고, 효소의 접근성을 방해하는 헤미셀룰로오스를 분해시켜 준다. 산 전처리에 의해 헤미셀룰로오스로부터

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ljw43376@chonnam.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

아세트산(acetic acid)이 발효저해물질로 생산된다. 활엽수 헤미셀룰로오스의 대부분은 글루쿠로노자이란(glucuronoxylan)으로 이루어져 있으며 10개 중 7개의 자이란 분자의 C₂와 C₃ 위치에 아세틸기(acetyl group)를 함유한다. 따라서 전처리를 수행하기 전에 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 아세틸기를 제거할 필요가 있다[6]. 뿐만 아니라 산 촉매 전처리에 의해 alphatic acids (acetic acid, formic acid, levulinic acid), furan aldehydes (furfural, 5-hydroxymethylfurfural), aromatic compounds (phenolics) 등의 부산물이 생성되며 액상 가수분해산물을 이용하여 발효를 수행할 경우 이와 같은 발효저해물질을 제거해야 한다. 발효저해물질 제거방법으로 물리적 방법(evaporation, extraction, adsorption), 화학적 방법(neutralization, overliming, alkaline detoxification, ion exchange), 생물학적 방법(enzymatic, microbial), 전기화학적 방법(electrodialysis) 등이 알려져 왔다[7]. 본 연구에서는 수산화칼슘(Ca(OH)₂)처리로 발효저해물질을 제거하고 에탄올 생산을 향상시키고자 한다. 수산화칼슘 처리는 발효저해물질 제거와 함께 발효에 적합한 pH로 조절할 수 있으며 가용성 염 생산을 제한하여 발효에 부정적인 영향을 주지 않는다[8].

효소가수분해와 발효 공정을 하나의 공정으로 만든 공정을 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)라고 한다. 동시당화발효의 장점은 분리된 공정으로 알려진 당화와 발효를 동시에 수행할 수 있다는 것이다[9]. 당화를 통해 발효가능한 당이 생성되고 생성된 당은 효모에 의해서 에탄올로 전환되므로 발효 효율이 증가된다. 뿐만 아니라 두 개의 분리된 공정을 한 반응기에서 진행하게 되어 에너지 측면에서 경제적인 공정으로 알려져 있

다. 반면 당화와 발효의 최적 조건이 서로 다르기 때문에 동시당화발효를 위한 최적 조건을 찾는 것이 어렵다[10-12]. 이와 같은 문제점을 극복하고자 semi-동시당화발효가 제안되었다[13]. Semi-동시당화발효는 선 효소가수분해 후 효모를 투입하여 동시당화발효를 진행하는 것으로 당화와 발효를 분리하여 연속적으로 수행하는 방법(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)과 SSF의 중간단계로, 선 효소가수분해 시간이 최적화 된다면 SSF와 SHF 보다 효율적인 방법이 될 것이다[13].

따라서 본 연구에서는 옥살산(oxalic acid) 전처리로부터 얻어진 액상 가수분해산물 내에 발효저해물질을 제거하여 발효 효율을 향상시키고, 전처리된 백합나무의 동시당화발효와 semi-동시당화발효로부터 에탄올 생산 최적 조건을 탐색하고자 한다. 본 연구의 전체적인 실험 과정은 Fig. 1에 나타났다.

2. 실험

2-1. 공시재료

국립산림과학원에서 제공받은 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)를 사용하였으며, 백합나무 칩을 과쇄한 후 20~80 mesh로 분쇄하였다. 전처리를 수행하기 전 백합나무의 초기 함수율은 6.11% 이었다.

2-2. 바이오매스의 탈아세틸화

바이오매스와 0.8% 수산화나트륨을 1:8 비율로 혼합하여 60°C에서 80분 동안 반응시켰다[6]. 탈아세틸화 후 액상 산물과 고체상 바이오

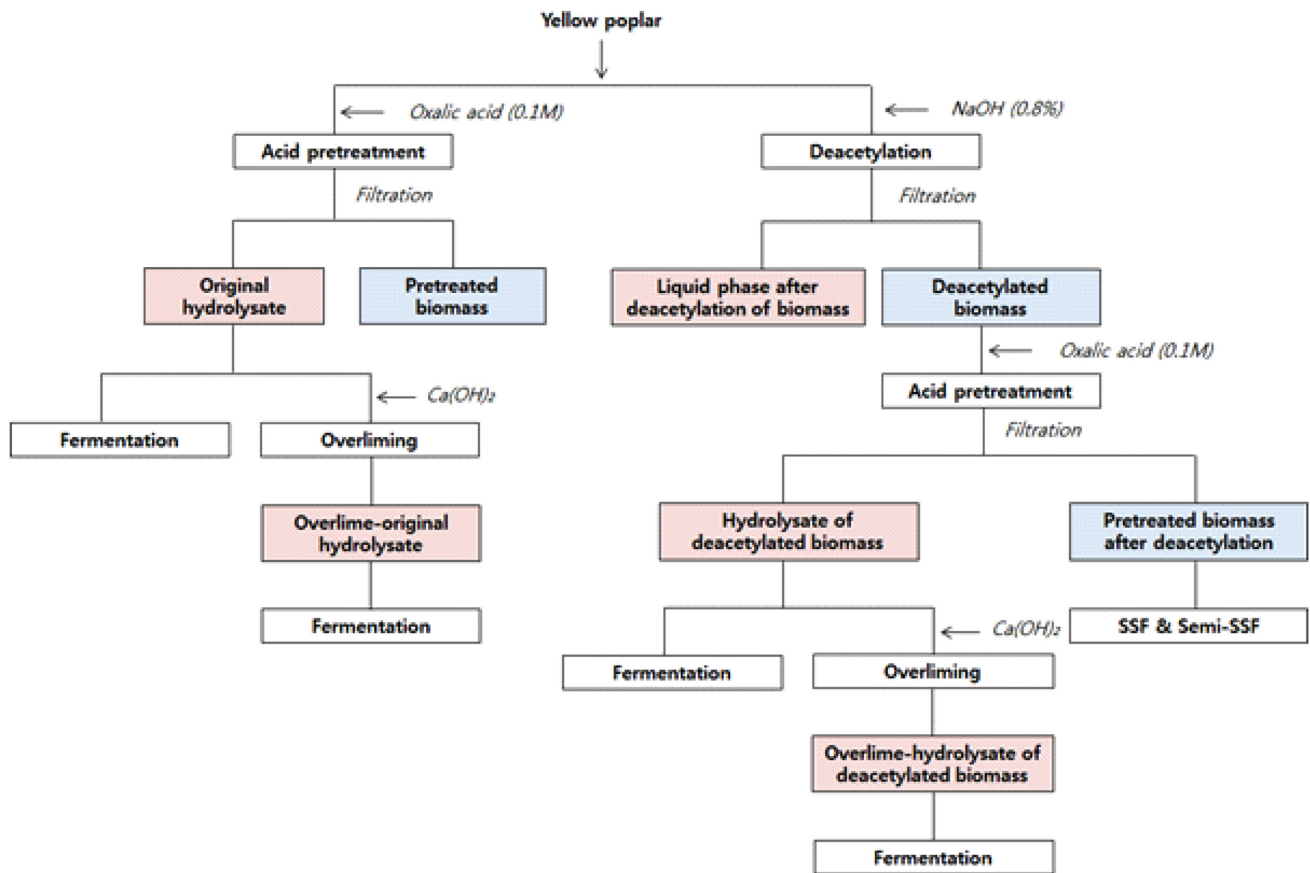


Fig. 1. Schematic diagram for ethanol production from yellow poplar by oxalic acid pretreatment (red column: liquid phase, blue column: solid phase).

매스를 분리하였다. 액상 산물은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 분석하였으며, 고체상 바이오매스는 옥살산 전처리를 수행하기 위해 pH 6.0에 도달할 때까지 증류수로 세척한 후 4 °C에서 냉장 보관하였다.

2-3. 바이오매스의 옥살산 전처리

선행연구 결과를 바탕으로 발효가능한 당 생산을 위한 최적의 전처리 조건을 선택하였다[14]. 600 mL 반응기(EMV-HT/HP600, E.M.S. Korea)에 전건 시료 35 g과 옥살산 0.1 M (pH 1.3)의 산 촉매 용액 280 mL를 투입하여 163 °C에서 30분간 전처리를 수행하였다. 옥살산 전처리 후 고형 바이오매스와 액상 가수분해산물을 분리하였으며 고형 바이오매스는 세척 후 동시당화발효에 사용하기 위해 4 °C에서 보관하였다.

2-4. 액상 가수분해산물 성분 분석

액상 가수분해산물 내의 주요 발효가능한 당(글루코오스 (glucose), 자일로스(xylose)) 및 당 분해산물(푸르푸랄(furfural), 아세트산, 5-hydroxymethylfurfural (HMF))은 HPLC (Waters e2695, USA)를 이용하여 분석하였다. 칼럼으로는 Aminex 87H column (300×7.8 mm, BIO-RAD)을 사용하였으며, 이동상으로 5 mM H₂SO₄, flow rate 0.6 mL/min으로 분석하였다. 액상 가수분해산물 내에 포함되어 있는 total phenolic compounds (TPC)의 함량은 Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 이용하여 측정하였다[15].

2-5. 액상 가수분해산물로부터 발효저해물질 제거를 위한 수산화칼슘 처리

액상 가수분해산물 300 mL에 수산화칼슘을 pH 10에 도달할 때까지 교반하면서 천천히 첨가하였다[16]. 수산화칼슘 처리한 액상 가수분해산물 내에 침전물을 제거하기 위해 4000 rpm에서 15분 동안 원심분리 하여 상등액을 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 후 분리하였다. 수산화칼슘 처리한 액상 가수분해산물을 발효에 이용하기 위해서 pH 6.0로 조절한 후, 4 °C에서 냉장 보관하였다.

2-6. 액상 가수분해산물의 에탄올 발효

에탄올 발효를 위해 5탄당 발효 가능한 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하였다. 바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스의 수산화칼슘 처리 전과 후 액상 가수분해산물을 각각 25 mL씩 125 mL 삼각플라스크에 투입하였다. 액상 가수분해산물은 pH를 6.0으로 조절한 후, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Urea 5 g/L를 각각 첨가하였다. 이 혼합물을 121 °C에서 15분 동안 멸균한 후, 발효를 위해 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/L를 접종하고 30 °C, 150 rpm 조건에서 발효를 진행하였다. 24시간 간격으로 시료를 취하여 HPLC로 주요 당류(글루코오스, 자일로스), 발효저해물질

및 에탄올 분석을 수행하였다.

2-7. 고형 바이오매스의 성분 분석

백합나무 전처리 전후의 바이오매스 구성성분 분석은 NREL방법 (Laboratory Analytical Procedure Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass)에 의해 수행하였다[17].

2-8. 동시당화발효(SSF)와 semi-동시당화발효

탈아세틸화 및 옥살산 전처리된 바이오매스 투입량 및 효모 투입 시간을 에탄올 생산에 영향을 미치는 인자로 하여 동시당화발효 및 semi-동시당화발효를 수행하였다. 바이오매스 투입량(10, 12.5, 15%)에 따라 전처리된 고형 바이오매스를 125 mL 삼각플라스크에 투입하였다. 50 mM sodium citrate buffer (pH 6.0)를 첨가한 후, 교반배양기 (30 °C, 150 rpm)에서 1시간 동안 교반하였다. 발효를 위해 pH를 6.0으로 조절한 후, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Urea 5 g/L를 각각 첨가하였다. 이 혼합물을 121 °C에서 15분간 멸균한 후, 효소가수분해를 위해 바이오매스 투입량에 따라 효소 mixture (Celluclast 1.5 L 17.5 FPU/biomass g, β-glucosidase NS 50010 12.5 CBU/biomass g)를 첨가하였다. 발효를 위해 배양된 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/L를 첨가하여 30 °C, 150 rpm 조건에서 동시당화발효를 수행하였다. 동시당화발효가 진행되는 동안 24시간 간격으로 시료를 취하여 HPLC로 당류 및 에탄올 분석을 수행하였다[2]. Semi-동시당화발효를 위해 효소를 첨가하고 50 °C, 150 rpm 조건에서 일정시간(6, 12, 24시간) 동안 교반한 후, 효모를 첨가하여 30 °C, 150 rpm 조건에서 semi-동시당화발효를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 바이오매스 탈아세틸화와 옥살산 전처리

바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스(deacetylated biomass)에 대한 옥살산 전처리 전후 바이오매스의 구성성분 분석 결과는 Table 1과 같다. 백합나무는 글루칸 38.36%, 자이란 13.51%, 리그닌 24.91%로 구성되었다. 탈아세틸화에 의해 바이오매스에 함유되어 있던 2.59%의 아세틸기는 제거되었으며 글루칸, 자이란, 리그닌 성분은 거의 분해되지 않았다. 탈아세틸화 액상 산물(liquid phase after deacetylation of biomass) 내에서 8.03 g/L의 아세트산이 검출되어 아세틸기가 제거되었음을 확인하였다. 따라서 탈아세틸화 바이오매스의 옥살산 전처리 후 액상 가수분해산물에서 아세트산은 검출되지 않았다(Table 2). 옥살산 전처리 바이오매스(바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스: pretreated biomass, pretreated biomass after deacetylation)의 헤미셀룰로오스 성분은 선택적으로 분해되어 각각 2.40%, 2.91% 남아있었다. 헤미셀룰로오스 분해로 전처리 바이오매스의 글루칸 및 리그닌 함량이 상대적으로 높게 나타났으며, 이는 전형적인 옥살산 전처

Table 1. Chemical compositions of biomass and treated biomass (Unit: %)

	Glucan	Xylan	Arabinan	Acetyl group	Lignin
Biomass	38.36 (0.55)*	13.51 (0.03)	1.99 (0.79)	2.59 (0.08)	24.91 (0.13)
Deacetylated biomass	40.88 (0.73)	13.34 (0.01)	2.77 (0.35)	N.D	24.83 (0.04)
Pretreated biomass	54.99 (0.77)	2.40 (0.14)	N.D	0.04 (0.00)	37.39 (0.06)
Pretreated biomass after deacetylation	54.51 (0.45)	2.91 (0.15)	N.D	N.D	31.87 (0.02)

*The parentheses contain the standard deviation with the analysis repeated three times

*ND means not detectable

Table 2. Sugar and inhibitors in original and overlime treated hydrolysate (Unit: g/L)

	Fermentable sugar			Inhibitor			
	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic acid	Furfural	HMF	TPC
Original hydrolysate	4.44 (0.00)	18.53 (0.30)	0.31 (0.01)	6.62 (0.05)	3.77 (0.07)	0.40 (0.01)	4.66 (0.03)
Hydrolysate of deacetylated biomass	2.60 (0.00)	17.43 (0.03)	0.91 (0.01)	N.D	2.33 (0.00)	0.15 (0.00)	2.87 (0.03)
Overlime-original hydrolysate	4.43 (0.01)	17.09 (0.04)	0.29 (0.01)	6.48 (0.01)	3.42 (0.02)	0.35 (0.00)	3.81 (0.01)
Overlime-hydrolysate of deacetylated biomass	2.56 (0.01)	17.19 (0.04)	0.91 (0.02)	N.D	2.07 (0.00)	0.14 (0.01)	2.43 (0.03)

리 효과와 일치하였다[18].

바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스로부터 옥살산 전처리 후 얻어진 액상 가수분해산물 성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 바이오매스 액상 가수분해산물(original hydrolysate) 주요 성분은 자일로스로 18.53 g/L을 얻었다. 글루코오스 생산량은 자일로스에 비해 낮았으며 이는 옥살산 전처리의 전형적인 특징으로 헤미셀룰로오스가 선택적으로 분해되었음을 의미한다[19]. 옥살산에 의한 헤미셀룰로오스의 선택적 분해는 효소가수분해 동안 셀룰로오스에 대한 효소의 접근성을 향상시켜 효소가수분해를 촉진시킬 것이다[20]. 바이오매스 액상 가수분해산물에는 6.62 g/L의 아세트산 및 발효저해물질인 푸르푸랄, HMF, TPC가 검출되었다. 푸르푸랄 함량이 HMF에 비해 상대적으로 높았으며 이는 당당류의 분해속도 차이에 의한 것으로 글루코오스보다 자일로스 분해가 촉진되었음을 의미한다[21]. TPC는 리그닌의 분해산물 중 페놀성 화합물을 나타내는 것으로 4.66 g/L 검출되었다. 이는 옥살산 전처리에 의해 부분적인 리그닌 분해가 이루어졌음을 나타내고 있다[22]. 본 연구에서 나타난 바이오매스 액상 가수분해산물의 발효저해물질 농도는 발효 속도를 지연시키거나 효모의 생장에 영향을 주어 에탄올 발효에 있어 저해물질로 작용할 것으로 예상된다[7].

탈아세틸화 바이오매스 액상 가수분해산물(hydrolysate of deacetylated biomass)에 포함된 구성성분 함량은 바이오매스 액상 가수분해산물 결과와 차이를 나타내는데 이것은 탈아세틸화 후 충분히 바이오매스를 세척하였음에도 불구하고 일부 수산화나트륨이 탈아세틸화 바이오매스에 존재하여 전처리 효과의 차이를 나타낸 것으로 사료된다. 탈아세틸화 공정에 의해 아세틸기가 대부분 제거되어 액상 가수분해산물 내에서 아세트산은 검출되지 않았다[6]. 자일로스가 주요성분으로 검출되었으며 아세트산을 제외한 발효저해물질은 에탄올 발효에 영향을 미치는 수준으로 검출되었다.

3-2. 액상 가수분해산물로부터 발효저해물질 제거

액상 가수분해산물의 수산화칼슘 처리에 의해 효율적으로 발효저해물질이 제거되었다. 수산화칼슘 처리 전후 액상 가수분해산물(바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스 액상 가수분해산물: original hydrolysate, hydrolysate of deacetylated biomass)의 성분 분석 결과는 Table 2와 같다. 액상 가수분해산물 내 발효가능한 당은 수산화칼슘 처리 후에도 손실되지 않았다. 반면 TPC, HMF, 푸르푸랄 등의 발효저해물질은 수산화칼슘 처리된 바이오매스 액상 가수분해산물(overlime-original hydrolysate)로부터 각각 18.24%, 12.5%, 9.28% 감소되었고, 탈아세틸화 바이오매스 액상 가수분해산물(overlime-hydrolysate of deacetylated biomass)로부터 각각 15.33%, 6.67%, 11.16% 감소되었다. 발효저해물질 제거 효과는 수산화칼슘 처리 온

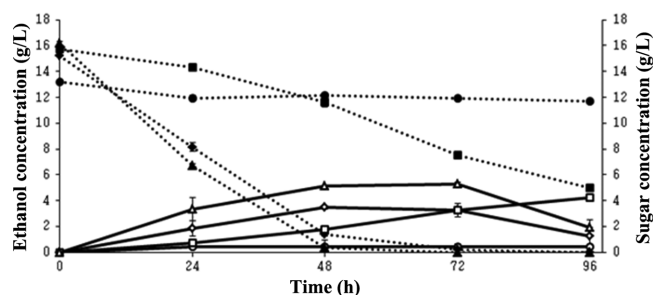


Fig. 2. Ethanol fermentation of original, deacetylation and overlime treated hydrolysate (solid line: ethanol, dotted line: fermentable sugar, (●○: original hydrolysate), (◆◇: hydrolysate of deacetylated biomass), (■□: overlime-original hydrolysate), (▲△: overlime-hydrolysate of deacetylated biomass)).

도와 시간에 따라 다르다[23]. 일반적으로 발효저해물질 제거와 함께 발효가능한 당이 제거되지만 본 연구에서 수행한 조건에서는 당 손실을 최소화하고 발효저해물질을 감소시키는 효과를 얻었다.

3-3. 액상 가수분해산물 발효

바이오매스와 탈아세틸화 바이오매스의 수산화칼슘 처리 전후 액상 가수분해산물을 이용하여 발효를 수행한 결과는 Fig. 2와 같다. 바이오매스 액상 가수분해산물은 비교적 높은 함량의 발효저해물질을 포함하고 있어 발효 96시간 후 1 g/L 미만의 에탄올을 생산하였으므로 이것은 6.43%의 에탄올 수율에 해당한다. 발효가능한 당은 96시간 동안 거의 소모되지 않고 대부분 남아있었다. 반면 발효저해물질로 작용하는 아세틸기가 제거된 탈아세틸화 바이오매스 액상 가수분해산물에서는 발효 48시간 후 최대 3.45 g/L 에탄올을 생산하였으며 이는 44.45%의 이론적 에탄올 수율에 해당한다. 동시에 발효가능한 당은 급격하게 소모되어 에탄올 생산에 사용되었다. 수산화칼슘 처리 후 TPC, HMF, 푸르푸랄 등 발효저해물질의 감소로 발효 효율을 향상시킬 수 있었다[24]. 수산화칼슘 처리 후 바이오매스 액상 가수분해산물로부터 발효 96시간 후 52.72% 에탄올 수율을 나타냈다. 이것은 수산화칼슘 처리 전과 비교하여 에탄올 수율이 46.46% 향상된 결과이다. 탈아세틸화와 수산화칼슘을 모두 처리한 액상 가수분해산물로부터 발효 72시간 후 5.28 g/L의 에탄올을 생산하였으며 64.07%의 이론적 수율을 얻었다. 이것은 수산화칼슘 처리 전과 비교하여 에탄올 수율이 22.07% 향상된 결과이다.

3-4. 동시당화발효와 semi-동시당화발효

당화와 발효의 최적 조건을 충족시키는 semi-동시당화발효는 일부 조건에서 동시당화발효와 비교하여 효율적으로 에탄올을 생산하였

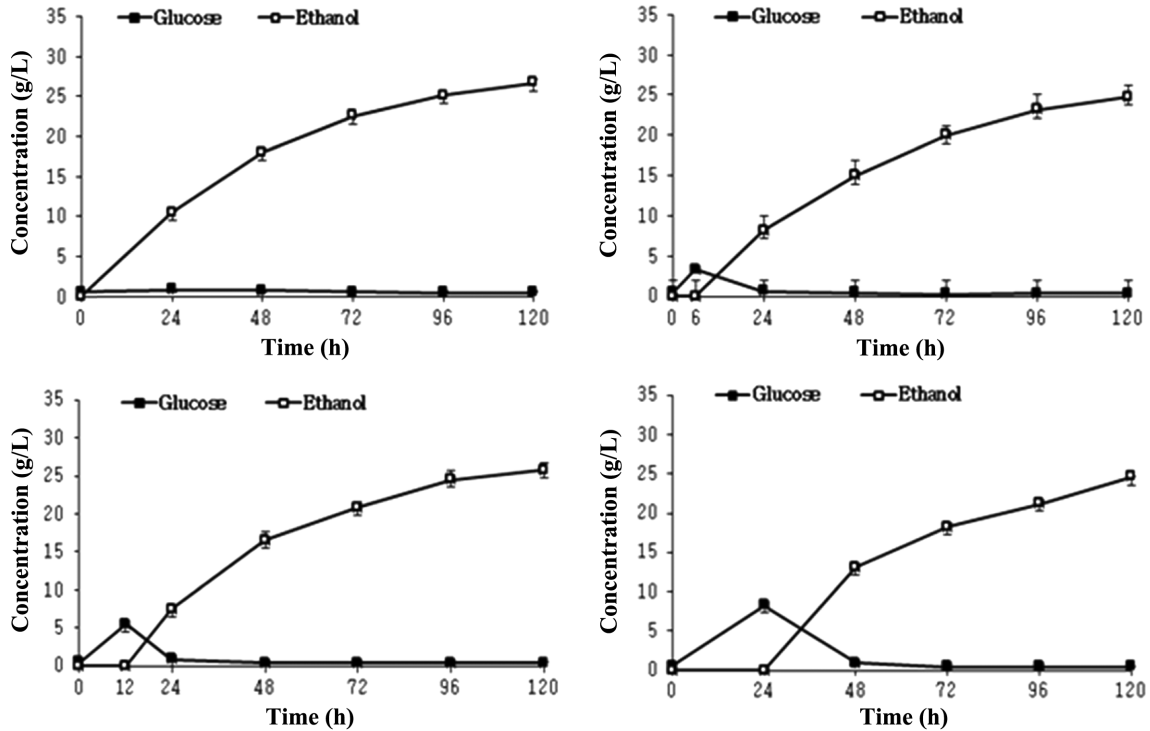


Fig. 3. Ethanol and glucose concentration during SSF and semi-SSF of deacetylated-oxalic acid pretreated biomass at 10% of biomass loading.

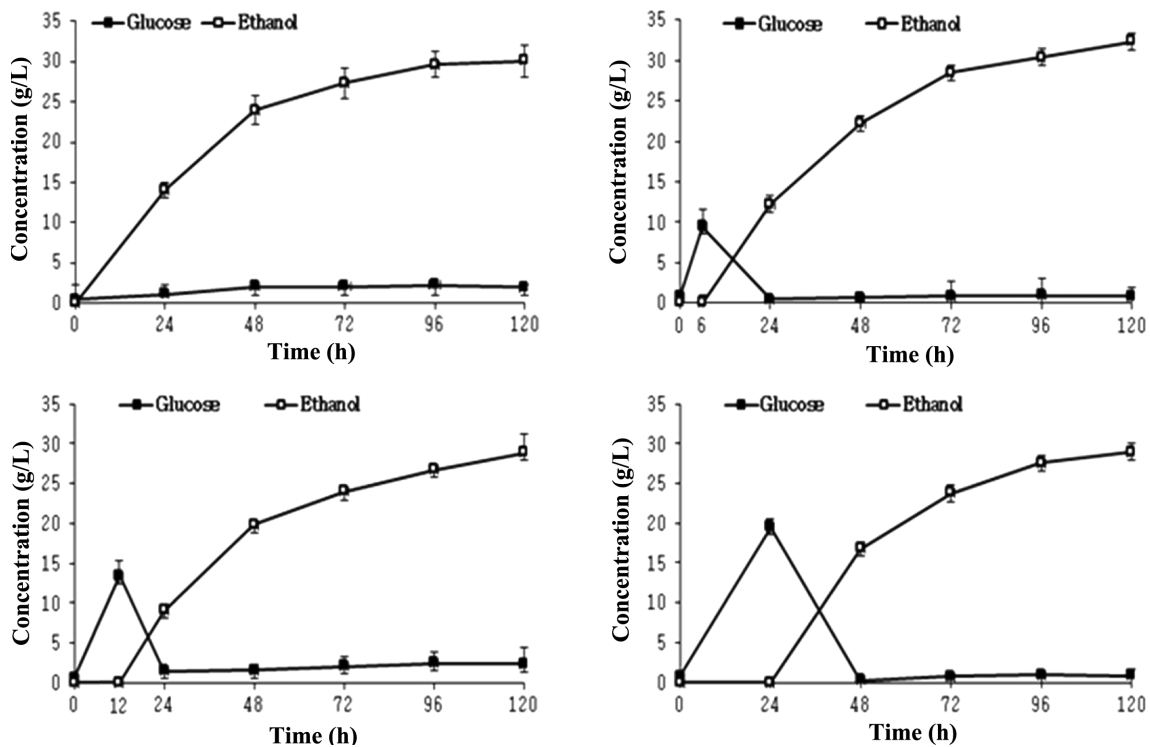


Fig. 4. Ethanol and glucose concentration during SSF and semi-SSF of deacetylated-oxalic acid pretreated biomass at 12.5% of biomass loading.

다. 바이오매스 투입량, 선 효소가수분해 시간 등이 에탄올 생산에 관여하는 중요한 인자로 작용한다[24].

바이오매스 투입량 및 선 효소가수분해 시간에 따라 생산된 에탄올 및 당 분석 결과는 Fig. 3, 4, 5와 같다. 동시당화발효에서 효소에 의해 생산된 당은 동시에 첨가된 효모에 의해 신속하게 에탄올로 전

환된 것을 확인할 수 있었고, semi-동시당화발효에서는 일정시간 효소가수분해 후 효모를 첨가한 순간부터 발효가능한 당이 에탄올로 전환된 것을 확인하였다. 바이오매스 투입량에 따른 에탄올 생산량을 분석한 결과, 10% 조건에서는 동시당화발효에서 최대 26.73 g/L의 에탄올을 생산하였고 이는 88.41%의 에탄올 수율을 나타낸다. 효소

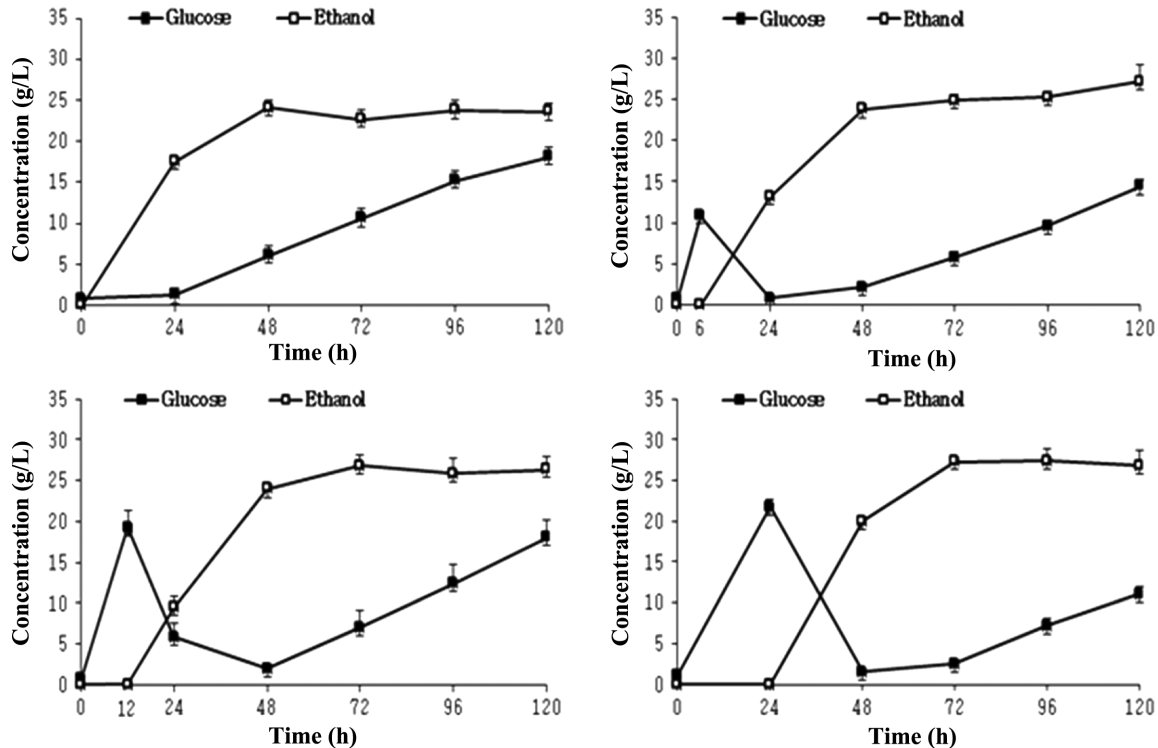


Fig. 5. Ethanol and glucose concentration during SSF and semi-SSF of deacetylated-oxalic acid pretreated biomass at 15% of biomass loading.

첨가 후 효모를 주입하는 시간이 경과할수록 에탄올 생산량이 감소하는 경향을 확인하였다. 이것은 선 효소가수분해를 통해 생산된 당에 따른 삼투압 변화로 효모의 생리적 변화를 유도하여 에탄올 생산에 영향을 준 것으로 사료된다[25]. 뿐만 아니라 선 효소가수분해 시간이 길어지면 효소에 의해 생성된 발효가능한 당의 축적으로 효소활성을 저해시키기도 한다[8]. 따라서 바이오매스 투입량 12.5%와 15% 조건에서는 semi-동시당화발효 중 6시간 효소가수분해 후 발효를 수행하였을 때 각각 120시간에서 최대 32.34 g/L, 27.15 g/L의 에탄올을 생산하였고, 이는 85.58%, 59.87%의 에탄올 수율을 나타낸다. 바이오매스 투입량 12.5%와 15% 조건에서 발효 전 선 효소가수분해는 에탄올 농도와 수율 향상에 긍정적인 효과를 나타냈다. 하지만 12시간 이상의 선 효소가수분해 후 발효를 수행하였을 때 에탄올 생산량이 감소되었는데 이것은 축적된 당에 의한 삼투압 변화가 효모에 부정적인 영향을 준 것으로 사료된다. 10% 조건과 비교하여 바이오매스 투입량이 증가함에 따라 발효가능한 당 생산이 증가하여 최대 에탄올 농도의 향상을 확인하였지만, 에탄올 수율 측면에서는 감소하였다. 특히 바이오매스 투입량 15%에서는 발효가 진행되는 동안 발효가능한 당이 에탄올로 전환되지 못하고 일부 존재하는 것을 확인하였다.

4. 결 론

탈아세틸화 처리로 바이오매스로부터 아세트산은 효율적으로 제거되었으며 액상 가수분해산물에 포함된 발효저해물질은 수산화칼슘 처리에 의해 제거되었다. 따라서 탈아세틸화와 수산화칼슘 처리에 의해 액상 가수분해산물로부터 에탄올 생산이 향상되었다. 탈아세틸화 및 옥살산 전처리된 백합나무의 투입량에 따라 바이오에탄올

생산에 가장 적합한 당화 및 발효 조건을 탐색하였다. 바이오매스 투입량의 증가는 동시당화발효 효율을 감소시켰다. 10% 조건에서 동시당화발효를 수행하였을 때 가장 높은 에탄올 수율(88.41%)을 얻었다. 하지만 바이오매스 투입량 증가 및 효소가수분해 시간이 길어질수록 생성된 당에 의한 삼투압 변화로 당은 신속하게 에탄올 생산에 사용되지 못하여 에탄올 생산에 부정적인 영향을 주었다. 따라서 경제적인 측면을 고려할 때 12.5%의 바이오매스 투입과 6시간 효소가수분해 후 발효를 수행할 경우 에탄올 생산 수율은 10% 조건에서 동시당화발효 효율보다 다소 낮지만 같은 시간에 고 농도 에탄올을 생산하여 에탄올 생산에 적합할 것으로 사료된다.

References

- Kim, H. Y., Lee, J. W., Jeffries, T. W. and Choi, I. G., "Evaluation of Oxalic Acid Pretreatment Condition Using Response Surface Method for Producing Bio-ethanol from Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*) by Simultaneous Saccharification and Fermentation," *J. Korean Wood Sci. Tech.*, **39**(1), 75-85(2011).
- Lim, W. S. and Lee, J. W., "Enzymatic Hydrolysis Condition of Pretreated Corncob by Oxalic Acid To Improve Ethanol Production," *J. Korean Wood Sci. Tech.*, **40**(4), 294-301(2012).
- Sun, Y. and Cheng, J., "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production," *Bioresour. Technol.*, **83**, 1-11(2002).
- Allen, S. G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M. J., Jennings, E. and Elander, R., "A Comparison of Aqueous and Dilute-acid-single-temperature Pretreatment of Yellow Poplar Sawdust," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**(10), 2352-2361(2001).
- Gupta, R., Sharma, K. K. and Kuhad, R. C., "Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) of Prosopis Juliflora, a Woody Substrate, for

- the Production of Cellulosic Ethanol by *Saccharomyces Cerevisia* and *Pichia Stipitis*-NCIM 3498," *Bioresour. Technol.*, **100**, 1214-1220(2009).
6. Kundu, C., Lee, H. J. and Lee, J. W., "Enhanced Bioethanol Production from Yellow Poplar by Deacetylation and Oxalic Acid Pretreatment Without Detoxification," *Bioresour. Technol.*, **178**, 28-35(2014).
 7. Jeong, S. Y., Trinh, L. T., Lee, H. J. and Lee, J. W., "Improvement of the Fermentability of Oxalic Acid Hydrolysates by Detoxification Using Electrodialysis and Adsorption," *Bioresour. Technol.*, **152**, 444-449(2014).
 8. Pandey, A., "Pretreatment of Biomass," *Elsevier, Netherlands*, 27-60(2014).
 9. Kim, N. and Kim, J. S., "Acetic Acid Production from Cellulosic Biomass by Simultaneous Saccharification and Fermentation," *Theories Applicat. Chem. Eng.*, **10**(2), 1546-1549(2004).
 10. Aggarwal, N. K., Nigam, P., Singh, D. and Yadav, B. S., "Process Optimization for the Production of Sugar for the Bioethanol Industry from Tapioca, a Non-Conventional Source of Starch," *J. Microbiol. Biotech.*, **17**, 738-787(2001).
 11. Mukerjea, R., Slocum, G. and Robyt, J. F., "Significant Differences in the Activities of α -amylase in the Absence and Presence of Polyethylene Glycol Assayed on Eight Starches Solubilized by Two Methods," *Carbohydr Research*, **341**, 2049-2054(2006).
 12. Kim, S. and Dale, B. E., "Global Potential Bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues," *Biomass Bioener.*, **26**, 361-375(2004).
 13. Shen, J. and Agblevor, F. A., "Modeling Semi-simultaneous Saccharification and Fermentation of Ethanol Production from Cellulose," *Biomass Bioener.*, **34**, 1098-1107(2010).
 14. Lee, J. W. and Jeffries, T. W., "Efficiencies of Acid Catalysts in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass Over a Range of Combined Severity Factors," *Bioresour. Technol.*, **102**, 5884-5890(2011).
 15. Kim, J. S., "The Characteristics of Alkaline Pretreatment Methods of Cellulosic Biomass," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**(3), 303-307(2013).
 16. Tian, S., Luo, X. L., Yang, X. S. and Zhu, J. Y., "Robust Cellulosic Ethanol Production from SPORL-Pretreated Lodgepole Pine Using an Adapted Strain *Saccharomyces Cerevisiae* Without Detoxification," *Bioresour. Technol.*, **101**(22), 8678-8685(2010).
 17. Selig, M., Weiss, N. and Ji, Y., "Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass, NREL/TP-510-42629," National Renewable Energy Laboratory(2008).
 18. Lee, J. W., Rodrigues, R. C. L. B. and Jeffries, T. W., "Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Oxalic Acid Pretreated Corncob Assessed with Response Surface Methodology," *Bioresour. Technol.*, **100**, 6307-6311(2009).
 19. Ji, Z., Zhang, X., Ling, Z., Zhou, X., Ramaswamy, S. and Xu, F., "Visualization of *Miscanthus $\times$ giganteus* Cell Wall Deconstruction Subjected to Dilute Acid Pretreatment for Enhanced Enzymatic Digestibility," *Biotechnology for Biofuels*, **8**, 103(2015).
 20. Seo, Y. J., Lim, W. S. and Lee, J. W., "Optimal Condition for Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Pretreated Corncob by Oxalic Acid," *J. Korean Wood Sci. Tech.*, **39**(6), 490-497(2011).
 21. Kim, S. B., Lee, J. H., Yang, X., Lee, J. W. and Kim, S. W., "Furfural Production from Hydrolysate of Barley Straw After Dilute Sulfuric Acid Pretreatment," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**(11), 2280-2284(2015).
 22. Kim, H. Y., Lee, J. W., Jeffries, T. W. and Gwak, K. S., "Effect of Oxalic Acid Pretreatment on Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*) for Ethanol Production," *J. Korean Wood Sci. Tech.*, **37**(4), 397-405(2009).
 23. Millati, R., Niklasson, C. and Taherzadeh, J. M., "Effect of pH, Time and Temperature of Overliming on Detoxification of Dilute-acid Hydrolyzates for Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*," *Bioresour. Technol.*, **38**(4), 515-522(2002).
 24. Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q. and Hahn-Hagerdal, B., "Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and p-Hydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts," *Biotechnol. Bioeng.*, **63**, 46-55(1999).
 25. Lu, J., Li, X., Yang, R., Yang, L., Zhao, J., Liu, Y. and Qu, Y., "Fed-Batch Semi-simultaneous Saccharification and Fermentation of Reed Pretreated with Liquid Hot Water for Bio-ethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae*," *Bioresour. Technol.*, **144**, 539-547(2013).