



[2019-12-BE-009]

백합나무(*Liriodendron tulipifera*) 옥살산 전처리에 의해 생성된 액상가수분해산물의 에탄올 발효에 영향을 미치는 요인 분석

정소연¹⁾ · 이재원^{2)*}

Analysis of Factors Affecting Ethanol Fermentation of Hydrolysate Derived from the Oxalic Acid Pretreatment of Yellow Poplar (*Liriodendron tulipifera*)

So-Yeon Jeong¹⁾ · Jae-Won Lee^{2)*}

Received 22 August 2019 Revised 7 October 2019 Accepted 17 October 2019

ABSTRACT This study examined the optimal conditions for the oxalic acid pretreatment of yellow poplar for ethanol production depending on the combined severity factor (CSF). The factors affecting the ethanol fermentation of the hydrolysate were also analyzed. Xylose was the most abundant compound (2.80-16.44 g/L) in the hydrolysate, whereas the concentration of glucose was relatively low at 1.65-3.69 g/L. Ethanol production was highest at CSF 1.22 (10 min, 41 mM) after fermentation for 96 h, which resulted in a theoretical yield of 74.51% and an ethanol productivity of 0.027 g/L·h. The concentration of fermentation inhibitors (acetic acid, furfural, and total phenolic compounds) increased with increasing CSF. Ethanol production decreased significantly with increasing concentration of fermentation inhibitors at CSF higher than 1.59. The xylo-oligomer concentration was highest (18.77 g/L) at CSF 0.72, and the concentration decreased at CSF 1.52. The average molecular weights of the hydrolysate decreased slightly with increasing CSF. The degradation products contained in the hydrolysate were detected by gas chromatography-mass spectrometry. Among these products, the concentration of vanillin and syringaldehyde increased rapidly at high CSF.

Key words Bioethanol(바이오에탄올), Oxalic acid(옥살산), Pretreatment(전처리), Biomass(바이오매스), Fermentation inhibitor(발효저해물질), Hydrolysate(액상가수분해산물)

1. 서론

전 세계적인 에너지 및 경제문제를 해결하기 위해 바이

오연료 및 바이오화학물질 생산에 대한 연구가 지속되고 있다. 미국, 브라질, 중국을 포함한 많은 국가들은 화석연료를 대체하기 위해 바이오에탄올 사용을 허용하였다^[1]. 바이오에탄올은 주로 전분이나 당 기반의 작물에서 추출된다.^[2] 식량자원과 경쟁하지 않는 농업 부산물과 같은 목질계 바이오매스는 바이오에탄올 생산을 위한 대체원료로 적합하다^[2]. 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이 유기적으로 결합된 난분해성 구조이며 이러한 복잡한

1) Ph. D. Candidate, Department of Wood Science and Engineering, Chonnam National University

2) Professor, Department of Wood Science and Engineering, Chonnam National University

*Corresponding author: ljw43376@chonnam.ac.kr
Tel: +82-62-530-2098 Fax: +82-62-530-2099

구조로부터 효율적으로 발효가능한 당 전환이 이루어지면 바이오에탄올 생산을 향상시킬 수 있다^[3].

목질계 바이오매스의 당 전환율을 향상시키기 위해 바이오매스의 종류 및 특성에 따라 생물학적, 물리적, 물리화학적, 화학적 전처리가 수행되고 있다^[4]. 화학적 전처리의 대표적인 산 전처리는 헤미셀룰로오스의 가수분해와 셀룰로오스의 결정화도 감소를 유도하여 목질계 바이오매스를 분해하고 효소가수분해 효율을 향상시킨다^[5]. 산 전처리는 비교적 저렴하며 높은 효율성을 가진 황산을 이용하여 수행되어 왔으나 전처리 후 수행되는 발효과정에 부정적인 영향을 미치는 발효저해물질을 고농도로 생산할 수 있다. 이러한 단점을 해결하기 위해 유기산의 일종인 옥살산을 이용한 전처리가 제안되었다^[4]. 옥살산은 황산과 비교하여 저농도의 발효저해물질을 생성하며 발효과정 중 사용되는 효모에 낮은 독성을 나타낸다. 황산에 비해 높은 가격을 가진 옥살산은 상업적으로 이용이 어려우나 이온 교환 및 흡착과 같은 기술을 사용하여 회수 가능하여 경제적 측면을 보완할 수 있는 장점을 가진다^[5,6].

바이오매스로부터 당 전환을 위해서는 높은 반응온도 및 고농도 촉매(산)가 요구된다^[7]. 그러나 높은 전처리에서 생성된 액상가수분해산물에는 발효가능한 당 뿐만 아니라 furfural 및 5-hydroxymethylfurfural(HMF)과 같은 퓨란 유도체, 약산(levulinic acid, formic acid, acetic acid 등), 방향족 화합물(vanillin, vanillic acid, syringaldehyde, syringic acid, 4-hydroxybenzaldehyde 등) 등의 발효저해물질을 생산하여 에탄올 생산을 억제한다^[7]. 낮은 조건하에 수행되는 전처리는 발효저해물질의 농도를 낮출 수 있으나 에탄올 생산을 저해하는 고농도의 올리고머 생성을 유도한다^[8]. 따라서 액상가수분해산물에 포함된 발효저해물질의 발효에 미치는 영향을 확인하고 적절한 방법으로 제거한다면 에탄올 발효 효율을 향상시킬 수 있다.

우리나라는 목재생산 조립 및 원료 공급용 바이오순환림 조성과 같은 산림자원의 고부가가치 창출을 위해 백합나무, 소나무, 낙엽송, 참나무 등을 포함한 경제림육성단지(387개, 234만 ha)를 조성하였다^[9]. 특히 백합나무(*Liriodendron tulipifera*)는 산림청에서 권장하는 주요 조립 수종으로 이용 방안에 대한 여러 가지 연구가 수행되고 있다. 또한 다른 수종에 비해 목재 구성성분 중 리그닌 함량이 적으며 빠

른 생장 및 높은 탄소 흡수량을 가져 바이오에탄올 생산에 적합한 경제수종으로 높은 활용가치를 가지고 있다^[10].

본 연구에서는 옥살산을 이용하여 효과적인 발효를 위한 최적의 전처리 조건을 탐색하였으며 다양한 전처리 정도에 따라 생성되는 액상가수분해산물의 성분 및 특성 분석을 통해 발효과정에 영향을 미치는 인자를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 바이오매스

본 연구에서는 국립산림과학원에서 제공받은 백합나무(*Liriodendron tulipifera*) 칩을 20–80 mesh로 분쇄하여 공시재료로 사용하였다. 초기 구성성분은 글루칸 41.33 ± 0.34%, 자일란 16.28 ± 0.14%, 총 리그닌 24.36 ± 0.07%, 회분 0.68 ± 0.05%, 아세틸기 4.10 ± 0.10%였다.

2.2 옥살산 전처리

옥살산 전처리는 반응기(Model EMV-HT/HP600, E.M.S. Korea)에 전진시료 25 g과 200 mL 산 촉매 용액을 1:8(w/w)의 비율로 투입하여 160°C의 고정된 반응온도에서 150 rpm의 교반속도로 수행하였다. 반응온도 및 바이오매스/산 촉매 용액 비율은 선행연구 결과를 적용하였다^[11,12,13]. 전처리 정도는 반응시간과 반응온도, pH(옥살산 농도)의 영향을 통합하여 단일변수로 나타낼 수 있는 combined severity factor(CSF)를 적용하였으며 본 연구에서는 반응온도를 고정하였으며 반응시간 및 산농도를 변수로하여 CSF로 나타냈다(Table 1)^[14,15]. 전처리 후 반응기를 10분 동안 냉각하고 생성된 반응물은 고행바이오매스와 액상가수분해산물로 여과하여 분리하였다.

2.3 액상가수분해산물 발효

액상가수분해산물의 에탄올 발효는 5탄당과 6탄당을 동시에 발효가능한 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하여 수행하였다. *P. stipitis*는 YPD(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, Dextrose Agar 20 g/L) 배지에 배양한 후 액체배지(yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L, glucose 20 g/L)에 접종하여 30°C, 150 rpm 조건에

Table 1. Two independent variables and their levels for the central composite design with three central points used in the present study

Sample No.	Variables		Coded levels		CSF ^a
	Time (min) X ₁	Acid concentration (mM) X ₂	Time X ₁	Acid concentration X ₂	
1	30	82	0	0	1,89
2	30	82	0	0	1,89
3	30	82	0	0	1,89
4	50	122	1	1	2,29
5	10	122	-1	1	1,59
6	50	41	1	-1	1,92
7	10	41	-1	-1	1,22
8	30	139	0	1,4	2,08
9	58	82	1,4	0	2,18
10	30	24	0	-1,4	1,52
11	2	82	-1,4	0	0,72

^aCombined severity factor (CSF) = log{t*exp[(T_H-T_R)/14,75]}-pH (t: the reaction time for the pretreatment in minutes, T_H: the reaction temperature in °C, and T_R: the reference temperature, most often 100°C)

서 24시간 동안 선 배양한 후 발효에 사용하였다. 액상가수분해산물의 pH는 NaOH를 이용하여 pH 5.5로 조절한 후, KH₂PO₄ 1 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L, yeast extract 5 g/L, urea 5 g/L를 각각 첨가하여, 121°C에서 15분간 멸균하였다. 배양된 *P. stipitis* 2 g(dry cell weight)/L를 멸균된 액상가수분해산물에 첨가하여 30°C, 150 rpm 조건에서 96시간 동안 발효를 수행하였다.

2.4 액상가수분해산물 분석

액상가수분해산물에 포함된 발효가능한 당(글루코오스, 자일로스와)과 furfural, acetic acid, HMF, formic acid와 같은 발효저해물질의 농도는 Aminex 87H column(300×7.8 mm, BIO-RAD)과 refractive index detector(Waters 2414, USA)로 구성된 HPLC(Waters e2695, USA)를 이용하여 분석하였다. 이동상은 5 mM H₂SO₄을 이용하여 유량 0.6 mL/min으로 55분 동안 분석하였다. 액상가수분해산물에 포함된 total phenolic compounds(TPC)의 함량은 Folin-Ciocalteu's reagent로 측정하였다^[16].

2.5 올리고머 분석

액상가수분해산물에 존재하는 발효가능한 당 이외의 올

리고머를 확인하기 위해 National Renewable Energy Laboratory(NREL)의 방법에 따라 post-hydrolysis를 수행하였다^[17]. 액상가수분해산물 1 mL와 4% H₂SO₄ 9 mL를 50 mL 삼각플라스크에 투입하여 121°C에서 60분간 처리하였다. 그 후 0,22 μm micro centrifuge filter를 이용하여 분리된 액상가수분해산물은 발효가능한 당 측정에 사용된 조건에서 HPLC로 분석하였다.

2.6 평균 분자량 및 다분산도 측정

액상가수분해산물의 분자량 분포는 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 측정하였다. Waters Ultrahydrogel 120, 500, 1000 column 3개를 연결하여 사용하였고, refractive index detector를 포함하는 Dionex HPLC Ultimate 3000(USA, Thermo)으로 분석하였다. 이동상으로 sodium azide 0.1 M을 사용하였으며, 유량은 1 mL/min으로 분석하였다. Pullulan(Mw: 342~805000)을 표준물질로 사용하였다.

2.7 Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 분석

GC-MS 분석을 위해 ethyl acetate와 액상가수분해산물

을 3:1로 혼합하여 추출하였다. 추출 후, anhydrous MgSO₄를 이용하여 수분을 제거하고 30°C에서 감압 농축하였다. 유도체화를 위해 50 μl의 pyridine과 100 μl의 BSTFA(N, O-Bis(trimethylsilyl), TMS) trifluoroacetamide)를 첨가하여 70°C에서 60분 동안 반응시켰다. 반응이 완료된 샘플은 0.22 μm micro centrifuge filter를 이용하여 분리한 후 분석을 수행하였다. GC-MS(5975C, Agilent)를 이용하여 분석하였으며, column은 HP-5MS(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 이동상은 He(gas), split ratio는 20:1, mass range는 1.6~1050 m/z, 시료 주입량은 1 μl로 하였다. 주입구 및 검출기의 온도는 각각 250°C와 300°C, 검출기는 flame ionization detector(FID)를 사용하였다. 오븐온도는 80°C에서 5분간 유지한 후 5°C/min의 승온속도로 250°C까지 상승시킨 후 10°C/min의 승온속도로 320°C까지 상승시켰다.

2.8 통계분석

데이터의 유의미한 차이는 통계 프로그램 IBM SPSS Statistics version 23을 이용한 일원배치 분산분석(One-way ANOVA)으로 통계분석 하였으며 모든 통계치의 유의수준은 사후분석(Tukey법)을 통해 유의수준 0.05에서 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 액상가수분해산물의 발효가능한 당 분석

옥살산 전처리 정도에 따라 유래된 백합나무의 액상가수분해산물 분석결과는 Fig. 1과 같다. 모든 CSF 조건에서 단당류인 자일로스(12.80~16.44 g/L)가 가장 높은 농도로 검출되었으며 글루코오스(1.65~3.69 g/L)는 상대적으로 낮은 농도를 나타냈다. 일반적으로 옥살산의 H⁺가 헤미셀룰로오스의 glycosidic bond를 분해하므로 자일로스의 생산을 촉진시킨다^[18]. 이에 따라 목질계 바이오매스 전처리 과정에서 옥살산은 헤미셀룰로오스를 선택적으로 가수분해하였다^[19]. CSF가 높아질수록 글루코오스 농도는 증가하였으며 이는 전처리 정도 증가에 의한 셀룰로오스의 가수분해 향상을 나타낸다. 자일로스 농도는 CSF가 높아짐에 따라 증가하는 경향을 나타냈으나 CSF 1.59 이상에서 감소하였다. 일정 수준 이상의 전처리 정도는 자일로스의 furfural 전환을 유도하는 탈수화 반응을 촉진시키는 것으로 나타났다^[8]. 가장 많은 발효가능한 당(19.28 g/L)은 CSF 1.59(10 min, 122 mM)에서 검출되었다.

3.2 액상가수분해산물 발효

CSF에 따라 생성된 액상가수분해산물의 에탄올 생산량을 Table 2에 나타냈다. 14.26~15.40 g/L의 발효가능한 당을 포함한 CSF 1.52 이하의 조건에서 2.31 g/L~2.56 g/L

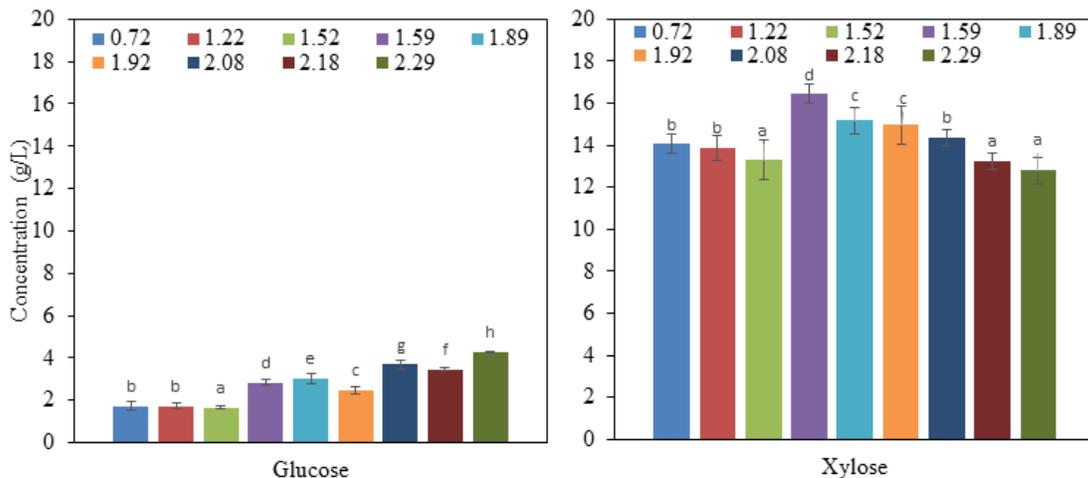


Fig. 1. Sugars concentration in the hydrolysate during oxalic acid pretreatment of yellow poplar at various CSF (combined severity factors). Same letters on the column are not significantly different from each other at the $p < 0.05$.

Table 2. Ethanol fermentation performance of the hydrolysate obtained from oxalic acid pretreatment

CSF	Initial fermentable sugar concentration (g/L)	Ethanol production (g/L)	Ethanol productivity (g/L·h)	Ethanol yield (g/g)	Theoretical yield of ethanol (%)
0.72	15.40 (7.18) ^a	2.31 ^c	0.024	0.28	54.90
1.22	14.85 (8.06)	2.56 ^c	0.027	0.38	74.51
1.52	14.26 (5.09)	2.39 ^c	0.025	0.26	50.98
1.59	18.46 (13.71)	0.28 ^b	0.003	0.06	11.76
1.89	16.90 (12.58)	0.21 ^b	0.003	0.05	9.61
1.92	16.33 (11.23)	0.20 ^c	0.002	0.04	7.84
2.08	17.34 (10.74)	0.20 ^c	0.002	0.03	5.88
2.18	15.37 (10.74)	0.13 ^c	0.001	0.01	1.96
2.29	15.27 (11.40)	0.11 ^c	0.001	0.03	5.88

^aRemaining fermentable sugar after fermentation.

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

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

의 에탄올 생산을 확인하였다. 반면 상대적으로 높은 농도의 발효가능한 당(15.27–18.46 g/L)을 포함한 CSF 1.59 이상의 조건에서 0.3 g/L 미만의 에탄올이 검출되었다. 이는 상대적으로 높은 CSF 조건에서 발효저해물질에 영향을 받아 에탄올 생산이 저해되는 것을 의미한다. 최대 에탄올 함량은 CSF 1.22(10 min, 41mM) 조건에서 96시간 경과 후 생산되었으며 발효가능한 당으로부터 시간당 얻을 수 있는 에탄올 생산량 및 이론적 수율은 각각 0.027 g/L·h와 74.51%로 나타났다. 그러나 모든 CSF 조건에서 96시간의 발효과정이 종료되었음에도 불구하고 에탄올로 변환되지 못한 5 g/L 이상의 당이 잔류하였다. 옥살산 전처리 과정에서 액상가수분해산물 내에 발효저해물질의 생성이 불가피한 것으로 알려져 있다.^[19] 발효저해물질의 존재는 발효 과정에서 *P. stipitis*의 활성을 억제시키며 에탄올 생산속도를 감소시킬 수 있다^[20,21]. 발효저해물질을 포함한 액상가수분해산물에 존재하는 여러 가지 요인들은 에탄올 수율 감소를 유도할 수 있다. 따라서 효율적인 발효를 위해서는 액상가수분해산물에 존재하는 발효를 저해하는 다양한 인자에 대한 이해가 필요하다.

3.3 에탄올 생산에 영향을 미치는 액상가수분해산물 특성

3.3.1 발효저해물질

액상가수분해산물에 포함된 발효저해물질인 HMF(0.00–

0.38 g/L), furfural(0.30–3.37 g/L), formic acid(0.00–2.67 g/L), acetic acid(5.91–8.43 g/L), TPC(1.97–5.24 g/L)는 CSF 조건에 따라 검출된 농도의 차이를 나타냈다 (Fig. 2). CSF 증가는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 가수분해를 향상시키며 과도한 전처리 조건은 분해산물을 유도한다. 전처리 과정에서 HMF와 furfural은 각각 글루코오스와 자일로스로부터 생성되는 당 분해산물이며 고온의 산성 조건하에 formic acid로 추가적인 분해를 유도한다^[22]. Acetic acid는 약산성 조건하에 헤미셀룰로오스에 존재하는 아세틸기 가수분해에 의해 생성된다^[23, 24]. 리그닌 분해는 다양한 폐놀성 화합물인 TPC 생성을 유도한다^[25]. 일반적으로 5 g/L 이상의 acetic acid와 2.5 g/L 이상의 furfural, 3 g/L 이상의 HMF, 2 g/L 이상의 TPC는 발효 시 *P. stipitis*의 활성을 저해시켜 에탄올 생산을 억제시키는 것으로 밝혀졌다^[26, 27]. 본 연구에서 발효저해물질의 함량은 CSF가 높아질수록 증가하는 경향을 보였으며 CSF 1.59이상에서는 그 농도가 급격하게 증가하였다. 에탄올 생산수율은 발효저해물질의 농도 증가와 함께 급격히 감소한 것으로 확인되었다. 반면 CSF 1.52 이하 조건의 경우 비교적 낮은 농도의 발효저해물질을 함유하여 상대적으로 에탄올 생산에 긍정적인 영향을 주었으나 TPC(1.97–2.21 g/L) 및 acetic acid(5.91–6.21 g/L)의 영향으로 완전한 당 소비가 이루어지지 않은 것으로 판단된다.

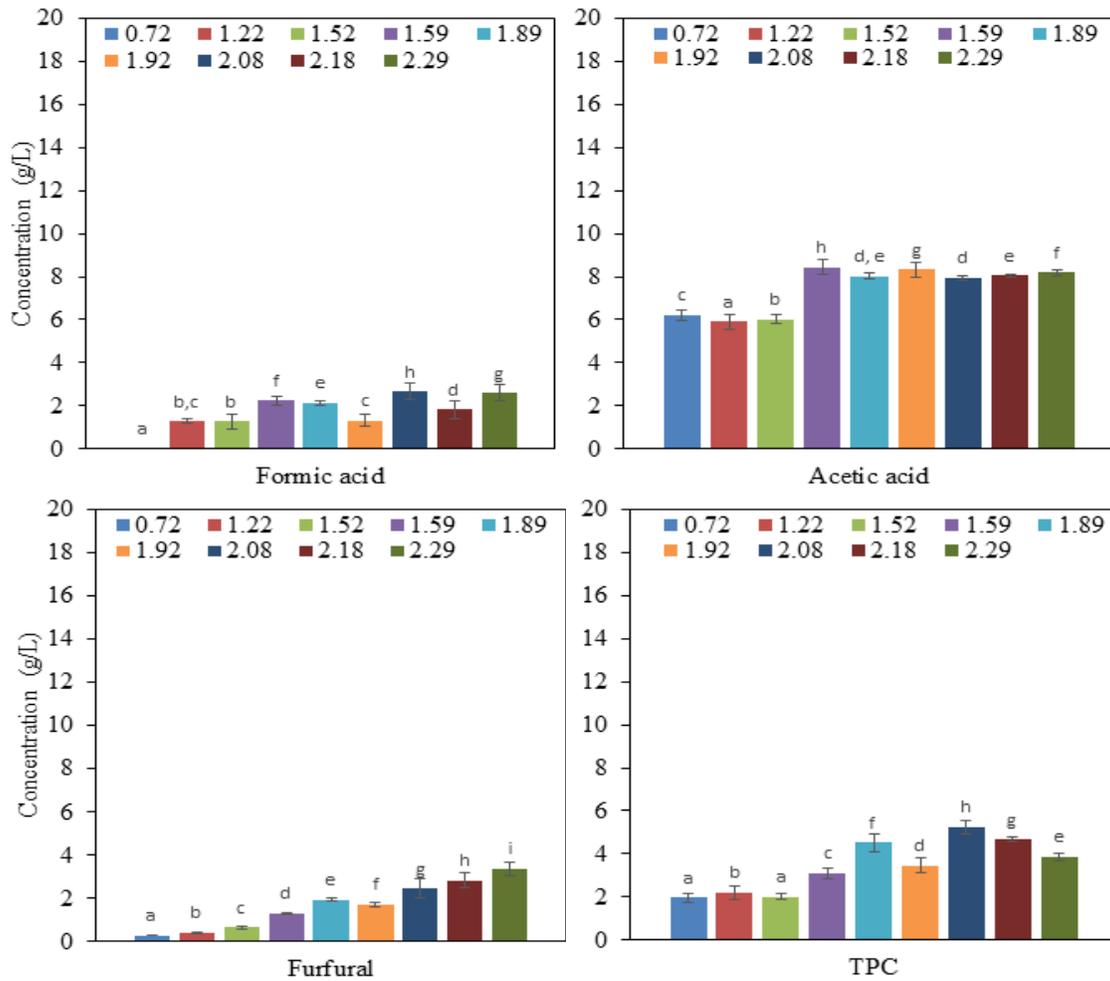


Fig. 2. Fermentation inhibitors concentration in the hydrolysate during oxalic acid pretreatment of yellow poplar at various CSF (combined severity factors). Same letters on the column are not significantly different from each other at the $p < 0.05$. TPC is total phenolic compounds).

3.3.2 올리고머

3.3.1의 발효저해물질 분석결과를 바탕으로 서로 다른 전처리 조건 3가지(CSF 0.72, 1.52, 1.92)를 선택하여 올리고머, 분자량 분포, 분해산물을 분석하였다. 전처리 정도에 따라 액상가수분해산물에 포함된 자일로 올리고머에 대한 결과는 Fig. 3과 같다. CSF 0.72의 액상가수분해산물에서 가장 높은 농도(18.77 g/L)의 자일로 올리고머가 검출되었다. 낮은 전처리 조건에서 헤미셀룰로오스는 자일로스로 완전히 분해되지 못하고 일부는 자일로 올리고머의 형태로 분해되어 액상가수분해산물에 존재하였으며 이것은 기존의 연구결과와 일치한다^[28]. 자일로 올리고머 농도는 CSF 1.52 조건에서 급격하게 감소하였으며 CSF 1.92 조건에서 약 1 g/L의 농도를 나타냈다. CSF 증가에 의해

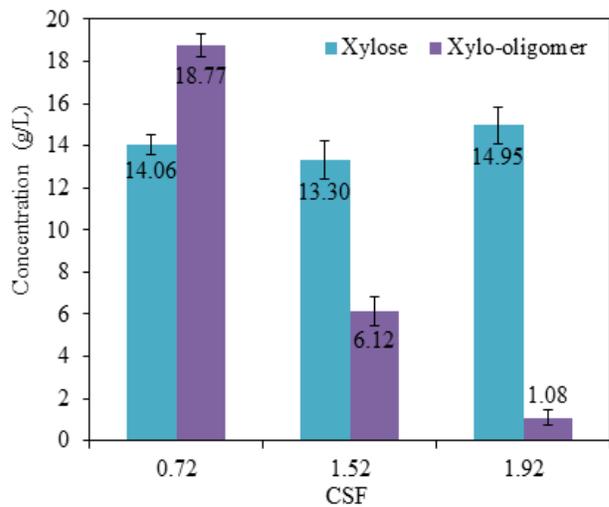


Fig. 3. Xylose and xylo-oligomer in the hydrolysate depending on the pretreatment conditions

자일로 올리고머 분해 정도가 향상되었음을 확인하였다. 일반적으로 액상가수분해산물에 포함된 올리고머는 효소가수분해 과정에서 효소의 활성을 저해시키거나 발효과정의 에탄올 생산량을 감소시킨다^[29,30]. 그러나 본 연구에서는 낮은 CSF 조건에서 자일로 올리고머의 함량이 가장 높은 값을 나타냄에도 불구하고 다른 조건과 비교하여 에탄올 생산량이 높게 나타났으며, 에탄올 수율에 자일로 올리고머의 존재가 부정적인 영향을 미치지 않은 것을 의미한다. 이것은 올리고머의 분자량 분포에 대한 차이 및 발효저해에 결정적인 영향을 주는 다른 인자에 의한 것으로 판단된다.

3.3.3 분자량 분포

본 연구에서 생산된 액상가수분해산물에는 대부분 헤미셀룰로오스 분해산물이며 소량의 셀룰로오스와 리그닌 분해산물을 포함한다(Fig. 1, 2). 낮은 CSF 조건에 포함된 높은 농도의 올리고머는 에탄올 생산량을 감소시키지 않았으므로 CSF에 따라 생성되는 올리고머의 분자량 크기가 에탄올 생성에 영향을 주었을 것으로 판단하였다. 옥살산 전처리로부터 유래된 액상가수분해산물의 주성분은 헤미셀룰로오스 분해산물이다. 수용성 헤미셀룰로오스의 올리고머는 1-30의 중합도를 가지며 그 중 자일로 올리고머는 약 25이하의 중합도를 나타낸다^[31]. 액상가수분해산물의 수평균 분자량 중합도(DP_n)와 중량평균 분자량 중합도(DP_w)가 모든 조건에서 25보다 낮게 나타났다(Table 3). 이는 전처리에 의해 바이오매스의 헤미셀룰로오스가 대부분 분해되어 낮은 중합도의 올리고머를 생산한 것을 의미하며, CSF 증가에 의해 액상가수분해산물의 분자량이 감소하였다. 전처리 정도의 증가는 올리고머 감소를 유도하여 단당류의 생성을 촉진시킨다^[22]. 이것은 Fig. 2의 자일로 올리고머 분석 결과와 일치한다. 그러나 모든 조건에서 다분산도(1.24-1.26)는 비교적 낮게 나타나 대부분의 조건에서 저

분자량의 올리고머를 함유한 것으로 확인되었다. 저분자량의 올리고머는 잠재적인 발효성 기질로 보고되었다^[32]. 낮은 CSF 조건은 높은 농도의 자일로 올리고머를 함유하여 발효를 저해시킬 것으로 예상했으나 저분자 자일로 올리고머를 포함하고 있어 에탄올 생산에 부정적인 영향은 주지 않은 것으로 판단된다.

3.3.4 GC-MS 분석

GC-MS 분석을 통해 액상가수분해산물로부터 총 18종의 화합물을 검출하였다(Table 4, Fig. 4). CSF 조건에 따라 검출되는 물질의 종류 및 농도는 차이를 나타냈으며 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스의 탈수, 탈 아세틸화, 해중합, 가수분해와 같은 반응에 의한 분해산물로 셀룰로오스계(14종)와 리그닌 고분자에서 유래한 리그닌계(4종) 화합물로 구분하였다^[33]. CSF 0.72 조건과 비교하여 CSF 1.52 이상의 조건에서 검출된 화합물의 농도는 상대적으로 높았다. 특히 발효저해물질로 알려진 vanillin과 syringaldehyde는 높은 CSF 조건에서 급격히 증가하였다^[34]. 이것은 CSF 증가에 따른 TPC 농도변화와 일치하였다(Fig. 2). 이러한 결과를 바탕으로 자일로 올리고머와 비교하여 발효저해물질 및 방향족 화합물은 에탄올 생산을 저해시키는 결정적인 인자로 판단할 수 있다.

4. 결론

옥살산 전처리 후 생성되는 액상가수분해산물에 포함된 발효가능한 당 및 올리고머, 발효저해물질 농도는 CSF에 따라 차이를 나타냈다. 낮은 전처리 조건에서는 고농도의 올리고머를 생성함과 동시에 저농도의 발효저해물질을 포함하였으며 에탄올 생산은 효과적으로 이루어졌다. CSF

Table 3. Average molecular weights of the hydrolysate obtained from oxalic acid pretreatment

CSF	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	DP _n	DP _w	PDI ^a
0.72	1280	1610	8.53	10.73	1.26
1.52	1100	1359	7.33	9.06	1.24
1.92	1032	1290	6.88	8.60	1.25

^aPolydispersity index

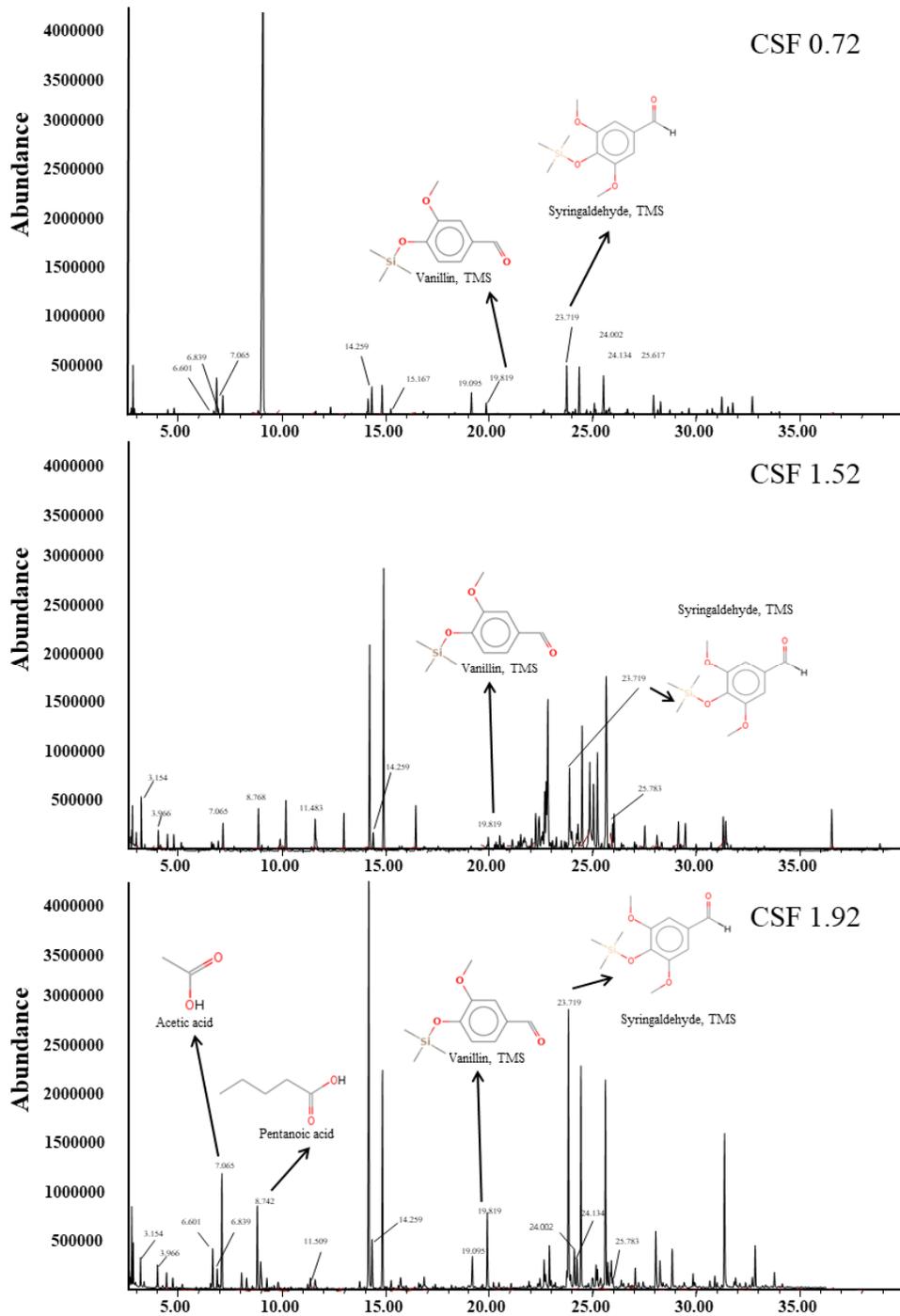


Fig. 4. GC-MS chromatograms of the ethyl acetate extracts of the hydrolysates obtained from oxalic acid pretreatment

1.22는 에탄올 생산을 위한 최적의 조건으로 74.51%의 최대 에탄올 수율을 나타냈다. 전처리 정도의 증가는 발효가 능한당 농도를 증가시켰으나 에탄올 생산량을 감소시켰다. CSF 증가에 따른 발효저해물질 농도 증가는 올리고머 및 분자량 증가와 비교하여 에탄올 생산에서 직접적인 영향을

주었다. 하지만 액상가수분해산물에는 다양한 종류의 발효 저해물질이 존재하여 각 물질의 농도에 따른 에탄올 생산량 분석이 추가적으로 이루어진다면 발효에 민감하게 영향 받는 인자를 구명할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Major compounds identified by GC-MS in the ethyl acetate extract of the hydrolysate

Peak No.	Retention time (min)	Compound name	Area (%)		
			CSF 0.72	CSF 1.52	CSF 1.92
Sugar derived compounds					
1	3,154	2 (5H)-Furanone	-	1.62	0.79
2	3,966	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl-	-	0.61	0.71
3	6,601	Propanoic acid	0.26	-	1.44
4	6,839	Hexanoic acid	0.25	-	0.66
5	7,065	Acetic acid	1.24	1.18	4.14
6	8,742	Pentanoic acid	-	-	3.39
7	8,768	2-Furancarboxylic acid	-	2.24	-
8	11,483	2-Furancarboxaldehyde,5-(hydroxymethyl)-	-	2.09	-
9	14,259	Butanedioic acid	1.73	0.85	1.84
10	15,167	Fumaric acid, bis-TMS ester	0.46	-	-
11	19,095	Malic acid	1.43	-	1.35
12	24,002	Rhamnose, tetrakis-TMS	0.27	-	1.65
13	24,134	Levoglucosan	0.36	-	1.09
14	25,783	Azelaic acid	-	0.9	0.59
Lignin derived compounds					
15	11,509	Silane, trimethyl (2-phenylethoxy)-	-	-	0.45
16	19,819	Vanillin, TMS	0.79	0.8	2.95
17	23,719	Syringaldehyde, TMS	3.14	3.70	10.3
18	25,617	1,4-Benzenedicarboxylic acid	0.25	-	-

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 기본연구지원사업의 지원(2016 R1D1A1B0393516)을 받아 수행되었습니다.

References

- [1] Yu, J., Xu, Z., Liu, L., Chen, S., Wang, S., and Jin, M., 2019, "Process integration for ethanol production from corn and corn stover as mixed substrates", *Bioresour. Technol.*, **279**, 10-16.
- [2] Liu, L., Zhang, Z., Wang, J., Fan, Y., Shi, W., Liu, X., and Shun, Q., 2019, "Simultaneous saccharification and co-fermentation of corn stover pretreated by H₂O₂ oxidative degradation for ethanol production", *Energy*, **168**, 946-952.
- [3] Mikulski, D., and Kłosowski, G., 2018, "Efficiency of dilute sulfuric acid pretreatment of distillery stillage in the production of cellulosic ethanol", *Bioresour. Technol.*, **268**, 424-433.
- [4] Jeong, S.Y., and Lee, J.W., 2016, "Optimization of pretreatment condition for ethanol production from oxalic acid pretreated biomass by response surface methodology", *Ind. Crops and Prod.*, **79**, 1-6.
- [5] Trinh, L.T.P. Lee, Y.J., Lee, J.W., Bae, H.J., and Lee, H.J., 2013, "Recovery of an ionic liquid[BMIM]Cl from a hydrolysate of lignocellulosic biomass using electro dialysis", *Sep. Purif. Technol.*, **120**, 86-91.
- [6] Lee, H.J., Ahn, S.J., Seo, Y.J., and Lee, J.W., 2013, "A feasibility study on the multi stage process for the oxalic acid pretreatment of a lignocellulosic biomass using electro dialysis", *Bioresour. Technol.*, **130**, 211-217.
- [7] Mikulski, D., Kłosowski, G., Menka, A., and Koim-Puchowska, B., 2019, "Microwave-assisted pretreatment

- of maize distillery stillage with the use of dilute sulfuric acid in the production of cellulosic ethanol”, *Bioresour. Technol.*, **278**, 318-328.
- [8] Toscan, A., Fontana, R.C., Andraeus, J., Camassola, M., Lukasik, R.M., and Dillon, A.J.P., 2019, “New two-stage pretreatment for the fractionation of lignocellulosic components using hydrothermal pretreatment followed by imidazole delignification: Focus on the polysaccharide valorization”, *Bioresour. Technol.*, **285**, 121346-121355.
- [9] Korea Forest Service, 2017, “Annual report on forest and forestry trends”, pp. 1-465.
- [10] Kim, H.Y., Lee, J.W., Jeffries, T.W., and Choi, I.G., 2011, “Response surface optimization of oxalic acid pretreatment of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) for production of glucose and xylose monosaccharides”, *Bioresour. Technol.*, **102**(2), 1440-1446.
- [11] Jeong, S.Y., and Lee, J.W., 2016, “Sequential Fenton oxidation and hydrothermal treatment to improve the effect of pretreatment and enzymatic hydrolysis on mixed hardwood”, *Bioresour. Technol.*, **200**, 121-7.
- [12] Pedersen, M., Johansen, K.S., and Meyer, A.S., 2010, “Low temperature lignocellulose pretreatment: effects and interactions of pretreatment pH are critical for maximizing enzymatic monosaccharide yields from wheat straw”, *Biotechnol. Biofuels*, **4**, 1-10.
- [13] Lim, W.S., and Lee, J.W., 2013, “Effects of pretreatment factors on fermentable sugar production and enzymatic hydrolysis of mixed hardwood”, *Bioresour. Technol.*, **130**, 97-101.
- [14] Abatzoglou, N., Chornet, E., Belkacemi, K., and Overend, R.P., 1992, “Phenomenological kinetics of complex systems: the development of a generalized severity parameter and its application to lignocellulosics fractionation”, *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 1109-1122.
- [15] Scordia, D., Cosentino, S.L., and Jeffries, T.W., 2013, “Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus × giganteus* biomass for ethanol production”, *Biomass and Bioenergy*, **59**, 540-548.
- [16] Singleton, V.L., Orthofer, R., and 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.
- [17] Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., and Crocker, D., 2004, “Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL Laboratory Analytical Procedures”, National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO, USA.
- [18] Wang, X., Li, H., Lin, Q., Li, R., Li, W., Wang, X., Peng, F., and Ren, J., 2019, “Efficient catalytic conversion of dilute-oxalic acid pretreated bagasse hydrolysate to furfural using recyclable iron phosphates catalysts”, *Bioresour. Technol.*, **290**, 121764-121771.
- [19] Jeong, S.Y., Trinh, L.T.P., Lee, H.J., and Lee, J.W., 2014, “Improvement of the fermentability of oxalic acid hydrolysates by dextoxification using electro dialysis and adsorption”, *Bioresour. Technol.*, **152**, 444-449.
- [20] Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Marques, S., and Bogel-kuksik, R., 2010, “Hemicelluloses for fuel ethanol: a review”, *Bioresour. Technol.*, **101**(13), 4775-4800.
- [21] Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G., and Nilvebrant, N., 1999, “The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood”, *Enzyme Microb. Technol.*, **24**(3-4), 151-159.
- [22] Yu, Z., Du, Y., Shang, X., Zheng, Y., and Zhou, J., 2018, “Enhancing fermentable sugar yield from cassava residue using a two-step dilute ultra-low acid pretreatment process”, *Ind. Crops and Prod.*, **124**, 555-562.
- [23] Lee, J.W. and Jeffries, T.W., 2011, “Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors”, *Bioresour. Technol.*, **102**(10), 5884-5890.
- [24] Lee, Y.J., Choi, J.h., Jeong, S.Y., and Lee, J.W., 2019, “Evaluation of the reuse of the hydrolysate generated from an empty fruit bunch hydrothermal pretreatment”, *New. Renew. Energy*, **15**(2), 52-60.
- [25] Xue, S., Jones, A.D., Sousa, L., Piotrowski, J., Jin, M., Sarks, C., Dale, B.E., and Balan, V., 2018, “Water-soluble phenolic compounds produced from extractive ammonia pretreatment exerted binary inhibitory effects on yeast fermentation using synthetic hydrolysate”, *PLOS One*, **13**(3), e0194012.
- [26] Delgenes, J., Moletta, R., and Navarro, J., 1996, “Effects

- of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*”, *Enzyme Microb. Technol.*, **19**(3), 220-225.
- [27] Heipieper, H.J., Weber, F.J., Sikkema, J., Keweloh, H., and De-Bont, J.A.M., 1994, “Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents”, *Trends Biotechnol.*, **12**(10), 409-415.
- [28] Xiao, L.P., Shia, Z.J., Xu, F., and Sun, R.C., 2013, “Hydrothermal treatment and enzymatic hydrolysis of *Tamarix ramosissima*: Evaluation of the process as a conversion method in a biorefinery concept”, *Bioresour. Technol.*, **135**, 73-81.
- [29] Xue, S., Uppugundla, N., Bowman, M.J., Cavalier, D., Da Costa Sousa, L., Dale, E., and Balan, V., 2015, “Sugar loss and enzyme inhibition due to oligosaccharide accumulation during high solids-loading enzymatic hydrolysis”, *Biotechnol. Biofuels*, **8**, 195-208.
- [30] Bowman, M.J., Dien, B.S., Hector, R.E., Sarath, G., and Cotta, M.A., 2012, “Liquid chromatography-mass spectrometry investigation of enzyme-resistant xylooligosaccharide structures of switchgrass associated with ammonia pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation”, *Bioresour. Technol.*, **110**, 437-447.
- [31] Ma, X.J., Yang, X.F., Zheng, X., Lin, L., Chen, L.H., Huang, L.L., and Cao, S.L., 2014, “Degradation and dissolution of hemicelluloses during bamboo hydrothermal pretreatment”, *Bioresour. Technol.*, **161**, 215-220.
- [32] Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L. C., and Carvalheiro, F., 2014, “Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw”, *Ind. Crops and Prod.*, **62**, 460-465.
- [33] Garrote, G., Domínguez, H., and Parajó, J.C., 1999, “Hydrothermal processing of lignocellulosic materials”, *Holz als Roh- und Werkstoff*, **57**(3), 191-202.
- [34] Zhang, Y., Xia, C., Lu, M., and Tu, M., 2018, “Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates”, *Bioresour. Technol.*, **11**, 178-191.