유채대 가수분해물에서 inhibitor 저항성 효모선별과 이를 이용한 bioethanol 생산

연지현 · 김혜지 · 오성호[1] · 이현용[1] · 정경환*

충주대학교 바이오산업학과, [1]강원대학교 생물소재공학전공

Selection of Inhibitor-resistance Yeast and its Application to Bioethanol Production in the Hydrolysate of Rape Stem

Ji-Hyeon Yeon, Hye-Ji Kim, Sung Ho Oh[1], Hyeon-Yong Lee[1], and Kyung-Hwan Jung*

Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-701, Korea
[1]Division of Biomaterials Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract We established a strategy for bioethanol production using the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail was added intentionally. The final goal of this study was to circumvent the detoxification process when the hydrolysate of lignocelluloisic biomass contained the toxic substances in high concentration. When six yeast strains were examined, *Sacchromyces cerevisiae* ATCC 96581 and *Pichia stipitis* CBS 7126 were relatively resistant to inhibitor cocktail. Then, using strains 96581 and 7126, we designed a process strategy for bioethanol production, assuming that the concentration of toxic substance in the hydrolysate of rape stem was remarkably high. When strains 96581 and 7126 were inoculated simultaneously, it was observed that strain 7126 produced bioethanol as well as strain 96581, although the concentration of inhibitor cocktail was 18.2% (v/v). Finally, throughout this co-cultivation of strains 96581 and 7126, bioethanol was produced about 6.0 (g/L), and bioethanol yield reached at 0.4 (g-bioethanol/g-reducing sugar) (78.4% of theoretical value).

Keywords: hydrolysate of rape stem, bioethanol, inhibitor cocktail, *Sacchromyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*

서 론

Bioethanol을 생산하기 위하여 lignocellulosic biomass를 가수분해 할 때 furan 유도체 (furfural, 5-hydroxymethlyfurfural), phenolic compounds 그리고 유기산과 같은 toxic substance [1-7]가 약 0.6-3.0 g/L 정도 만들지는 것으로 알려져 있다 [3,4]. 또한 이러한 물질은 효모의 cell growth rate과 ethanol production rate, membrane function 등에 좋지 않은 영향을 주어서 bioethanol 생산성을 감소시키는 것으로 알려져 있다 [1,7,8]. 그래서 많은 연구자들은 detoxification 방법을 사용하여 이러한 toxic substance의 ethanol 생산에 대한 inhibition을 제거하려고 시도하여 왔다 [9,10].

그 동안의 연구 결과에 비추어 볼 때, inhibitor를 제거하는 detoxification 공정 또한 bioethanol 생산 전체공정에서 부가적인 공정이라 생각되어지기 때문에, 본 연구에서는 공정의 편의성을 위하여 detoxifocation 공정을 생략하거나, 혹은 detoxification 공정으로 완전히 inhibitor가 제거되지 않을 경우를 대비하여, inhibitor에 저항성이 있는 효모 균주를 선별/확보하려고 시도하였다.

본 연구에서는 먼저 2단 고온 전처리 방법 [11]을 이용한 유채대 가수분해물에 인위적으로 inhibitor cocktail을 첨가한 배지 [2]를 만들어서 가장 잘 견디는 효모 균주를 선별하는 실험을 실시하였다. 이때 inhibitor cocktail은 발표된 연구문헌을 근거로 biomass의 가수분해물에서 나올 수 있

***Corresponding author**
Tel: +82-43-820-5246, Fax: +82-43-820-5272
e-mail: khjung@cjnu.ac.kr

는 6가지의 inhibitor가 선정되었고, 또 그 농도도 정해졌다. 그리고 본 연구팀의 선행연구 결과에서 ethanol 생산성을 근거로 선별된 [12,13] 각각 세 종류의 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)와 *Pichia stipitis* (*P. stipitis*) 균주를 가지고 실험을 실시하였는데, 최종적으로 inhibitor에서 더 잘 견디는 *S. cerevisiae*와 *P. stipitis* 효모 균주를 각각 한 가지씩 선별하여 동시배양법으로 bioethanol 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

효모 균주

본 연구에 사용한 효모는 *S. cerevisiae* 세 가지 균주 *S. cerevisiae* SC 1024, *S. cerevisiae* ATCC 24858, *S. cerevisiae* ATCC 95681와 *P. stipitis* 세 가지 균주 *P. stipitis* ATCC 58376, *P. stipitis* ATCC 58784, *P. stipitis* CBS 7126 이다. 본문에서는 이를 1024, 24858, 96581, 58376, 58784과 7126으로 표시하였다.

유채대 가수분해물 제조

제주도에서 수확한 유채에서 유채씨를 채취한 후, 나머지 유채 전체를 열풍 건조기에서 40℃에서 48시간 건조하였다. 건조된 유채대를 볼밀로 미세한 분말상태로 만들어 가수분해에 사용하였고, 이때 이단 고온 전처리 방법을 이용하여 유채대 가수분해물을 제조하였으며 자세한 조건과 방법은 본 연구팀의 선행연구에 기록되어 있다 [11].

Inhibitor cocktail 조성

Inhibitor cocktail의 조성은 3.5 g/L formic acid, 4.5 g/L acetic acid, 2.9 g/L furfural, 3.8 g/L 5-hydroxymethyl furfural, 0.15 g/L cinnamic acid, 0.18 g/L 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde이며, 5배 농축하여 만든 후 filter sterilization 하였다 [2].

Inhibitor cocktail이 첨가된 배지에서 효모선별 flask culture

Seed culture는 250 mL 삼각 flask에 50 mL YPD 배지 (yeast extract, 10 g/L; peptone, 20 g/L; glucose; 20 g/L)를 만들어 30℃, 150 rpm의 조건으로 shaking incubator에서 overnight 배양하여 준비하였다. Inhibitor cocktail에 보다 저항성이 있는 효모선별을 위한 flask culture는 100 mL flask에서 20 mL 부피로 실시하였으며, 배지는 유채대 가수분해물에 10 g/L의 yeast extract와 20 g/L의 peptone를 녹이고 inhibitor cocktail을 부피비로 첨가하여 제조하였다. *S. cerevisiae*의 선별은 control을 포함하여 11.3, 17.0, 22.7, 27.3% (v/v)의 inhibitor cocktail이 포함된 배지에서 실시하였고, *P. stipitis*의 선별은 control을 포함하여 11.3, 14.1, 17.0, 22.7% (v/v)의 inhibitor cocktail이 포함된 배지에서 실시하였다. 배양은 배양부피의 10% (v/v)인 2 mL를 접종하여 시작하였으며, shaking incubator에서 30℃, 100 rpm의 조건으로 수행하였다.

Inhibitor cocktail이 첨가된 agar plate에서 효모선별

먼저 효모균주 stock vial (-70℃ 보관)에서 한 백금이씩 YPD agar 배지에 도말하여 효모균주가 colony로 자라게 한다. 그리고 유채대 가수분해물에 10 g/L의 yeast extract, 20 g/L의 peptone, 그리고 inhibitor cocktail을 넣어 제조한 agar plate 위에 효모균주 colony를 멸균된 이쑤시개로 접종하여 30℃에서 배양하였다. 이때 14, 16, 18, 20, 22, 24% (v/v)의 inhibitor cocktail이 포함된 agar plate를 제조하여 실험하였다. Inhibitor cocktail이 포함된 agar plate에서의 효모균주의 성장 정도는 colony의 상대적인 크기로 판단하였다.

Inhibitor cocktail이 첨가된 배지에서 동시접종배양

두 가지 종류의 효모를 동시접종배양 실험을 위하여 유채대 가수분해물을 rotary vacuum evaporator (EYELA, Japan)을 이용하여 약 3배 정도 농축한 후, yeast extract 10 g/L와 peptone 20 g/L, inhibitor cocktail 20% (v/v)가 첨가된 배지를 제조하였다. 이때 100 mL 삼각 flask에 20 mL 배지를 제조하여 배양을 수행하였고, YPD 배지에서 길러진 두 종류의 효모를 각각 1 mL씩 전체 배양부피의 10% (v/v)이 되는 총 2 mL를 seed로 접종하여 배양을 시작하였다. 배양조건의 위에서 언급한 flask 배양과 동일하였다.

분석방법

Cell growth는 spectrophotometer (Spectronic, Thermo Scientific, USA)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 표시하였고, 배지내의 잔여 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법을 사용하여 측정하였다 [14]. 배양액 중의 에탄올 함량은 gas chromatography (8610C, SRI, USA)를 이용하여 분석하였고, 이때 컬럼은 Chromosomb 101 [L=6 ft, ID = 1/8 inch, 80/100 mesh, stainless steel tubing (Alltech, USA)]을 사용하였고, 기타 분석조건은 선행연구에 기술하였다 [13]. 그리고 배지 중의 glucose와 xylose의 분석은 thin-layer charomatography (TLC)를 이용하여 실시하였다. 이때 Partisil® K5F (20 × 10 cm, Whatman)를 TLC plate로 사용하였고, mobile phase로는 acetonitrile 용액 (acetonitrile : water = 85 : 15, v/v)을 사용하였다. sample loading volume은 1.0 μL 였으며, 발색은 ethanol에 0.5% α-naphtol과 4% H_2SO_4을 녹인 발색시약에 TLC plate를 담근 후, 80℃에서 15분간 oven에서 TLC plate를 incubation하여 실시하

였다. 이때 동시에 알고 있는 농도의 glucose와 xylose를 같이 TLC plate에서 전개하였으며, TLC plate의 image를 AlphaEase FC software (Alpha Innotech, USA)를 이용하여 peak로 전환한 후, glucose, xylose의 standard curve에 근거하여 glucose와 xylose의 양을 계산하였다.

결과 및 고찰

Inhibitor cocktail에 대한 저항성 효모선별

S. cerevisiae 1024, 24858, 96581 균주를 사용하여 유채대 가수분해물에 inhibitor cocktail을 넣지 않은 control을 포함하여 11.3% (v/v)에서 27.3% (v/v)까지 변화시키면서 flask 배양을 실시한 결과 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3과 같은 결과를 얻었다. 이때 96581 균주가 상대적으로 inhibitor cocktail에 저항성이 더 있는 것으로 확인되었으나 이 때, 생산되는 bioethanol의 최고 양은 약 2 (g/L)로 세 효모 균주에서 유사하였다. 흥미롭게도 27.3% (v/v)의 inhibitor cocktail이 첨가된 배양에서는 96581 균주를 제외하고는 세포성장이 거의 일어나지는 않았으나, 단당류를 소비하면서 이론수율에 근접하는 정도의 bioethanol을 생산하였다. 다른 경우와 달리 이 경우에는 효모의 호흡대사가 inhibitor cocktail에 의해서 저해 받으므로 인하여 호흡대사를 통한 ethanol의 소비가 감소하여서 일어나는 현상으로 추론되어진다. 이러한 실험 결과를 근거로 본 연구를 위하여 상대적으로 inhibitor cocktail의 저항성이 있는 *S. cerevisiae* 균주로서 96581을 선택하였다. *P. stipitis*의 경우에는 58376, 58784, 7126 균주를 사용하여 유채대 가수분해물에 inhibitor cocktail을 넣지 않은 control을 포함하여 11.3% (v/v)에서 22.7% (v/v)까지 변화시키면서 flask 배양을 실시하였다. 그 결과 Fig. 1, Fig. 4, Fig. 5와 같이 17.0% (v/v) 이상의 inhibitor cocktail 농도에서는 세포성장이 이루어 지지 않으면서 bioethanol 생산도 전혀 없는 결과를 얻었다. 그리고 *S. cerevisiae*의 경우와 마찬가지로 14.1% (v/v)의 inhibitor cocktail의 농도까지는 약 2 g/L의 bioethanol 이 생성되었음을 확인하였다. 본 실험을 통하여서는 *P. stipitis* 경우에는 세 균주 가운데서 특별히 상대적으로 더 저항성이 있는 균주를 확인할 수 없었다.

Inhibitor cocktail의 농도를 변화시키면서 실시한 flask 배양실험에서의 glucose와 xylose 소비양상 변화는 Fig. 6, Fig. 7과 같이 TLC 분석을 통하여 알 수 있었다. TLC 분석 결과에서 *S. cerevisiae*는 xylose를 전혀 소비하지 못했으며 inhibitor cocktail의 농도가 증가하면서 glucose의 소비가 지연됨을 확인할 수 있었다. 또한 *P. stipitis* 경우에는 glucose와 xylose 소비가 inhibitor cocktail의 농도가 증가하면서 점차 적으로 지연됨을 확인할 수 있었다.

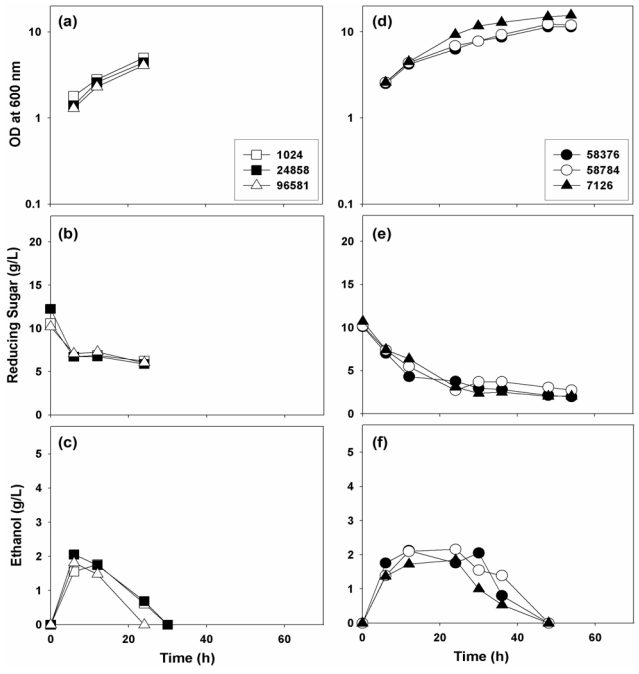

Fig. 1. Control flask cultures of *S. cerevisiae* and *P. stipitis* in the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail is not added. Data of *S. cerevisiae* and *P. stipitis* are described in (a)(b)(c) and (d)(e)(f), respectively. (a)(d) Cell growth, (b)(e) residual reducing sugar, and (c)(f) ethanol production. Yeast strains used in this experiment are described in panel (a) and (d).

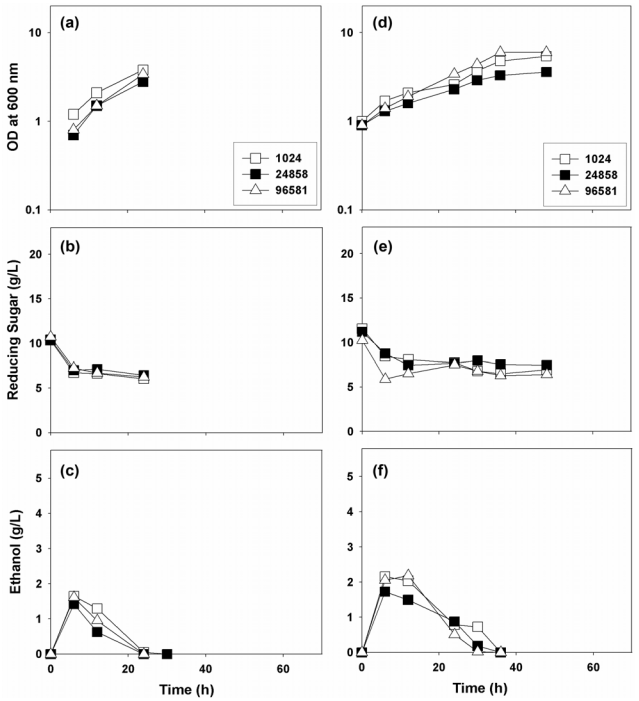

Fig. 2. Flask cultures of *S. cerevisiae* in the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail is added at 11.3% (v/v) in (a)(b)(c) and 17.0% (v/v) in (d)(e)(f), respectively. (a)(d) Cell growth, (b)(e) residual reducing sugar, and (c)(f) ethanol production. *S. cerevisiae* used in this experiment are described in panel (a) and (d).

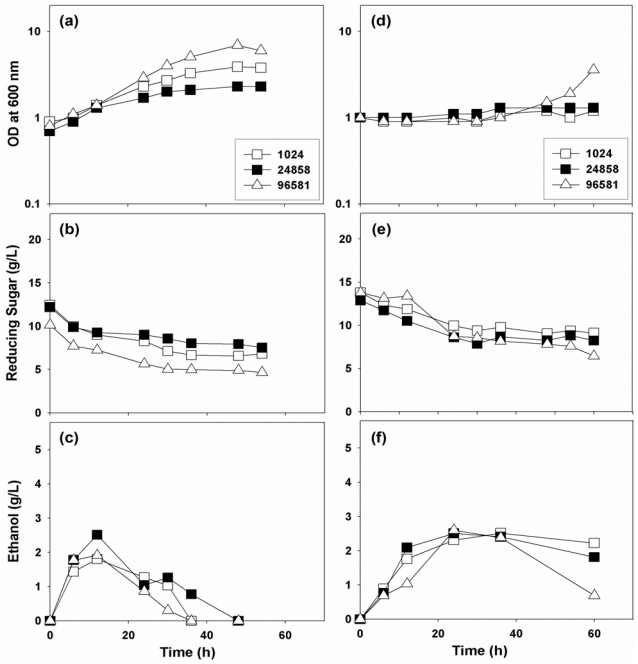

Fig. 3. Flask cultures of *S. cerevisiae* in the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail is added at 22.7% (v/v) in (a)(b)(c) and 27.3% (v/v) in (d)(e)(f), respectively. (a)(d) Cell growth, (b)(e) residual reducing sugar, and (c)(f) ethanol production. *S. cerevisiae* used in this experiment are described in panel (a) and (d).

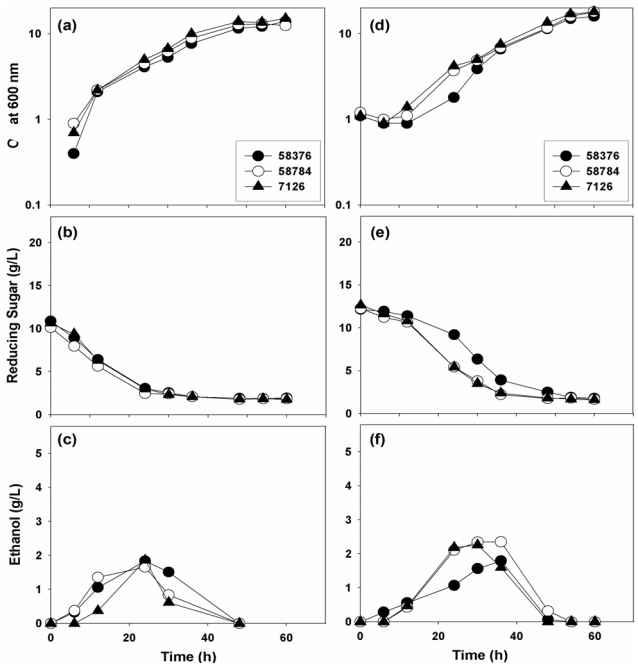

Fig. 4. Flask cultures of *P. stipitis* in the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail is added at 11.3% (v/v) in (a)(b)(c) and 14.1% (v/v) in (d)(e)(f), respectively. (a)(d) Cell growth, (b)(e) residual reducing sugar, and (c)(f) ethanol production. *P. stipitis* used in this experiment are described in panel (a) and (d).

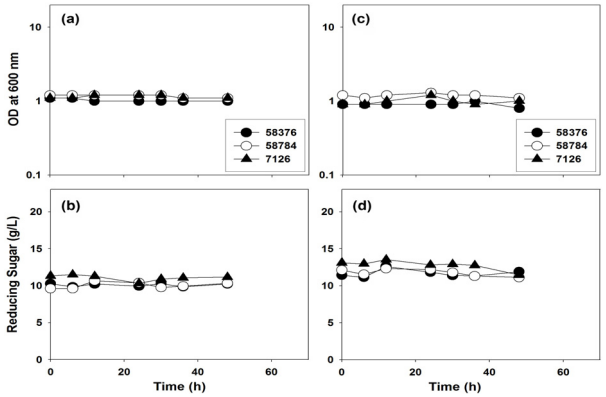

Fig. 5. Flask cultures of *P. stipitis* in the hydrolysate of rape stem, in which the inhibitor cocktail is added at 17.0% (v/v) in (a)(b)(c) and 22.7% (v/v) in (d)(e)(f), respectively. (a)(d) Cell growth, (b)(e) residual reducing sugar, and (c)(f) ethanol production. *P. stipitis* used in this experiment are described in panel (a) and (d).

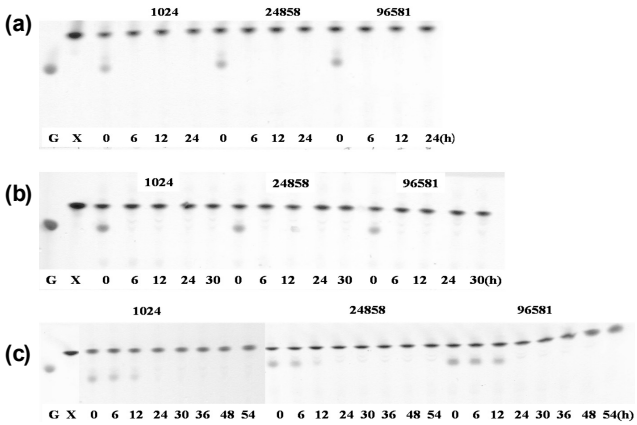

Fig. 6. TLCs of the culture supernatant. (a) Control flask culture (Fig. 1(a)(b)(c)), (b) 17% (v/v) inhibitor cocktail-containing flask culture (Fig. 2(d)(e)(f)), (c) 27.3% (v/v) inhibitor cocktail-containing flask culture (Fig. 3(d)(e)(f)).

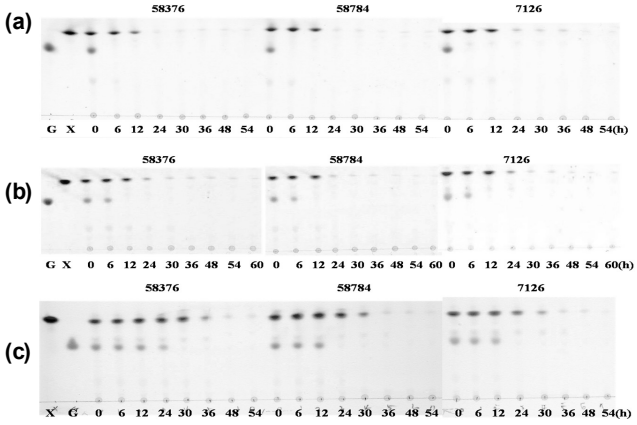

Fig. 7. TLCs of the culture supernatant. (a) Control flask culture (Fig. 1(d)(e)(f)), (b) 11.3% (v/v) inhibitor cocktail-containing flask culture (Fig. 4(a)(b)(c)), (c) 14.1% (v/v) inhibitor cocktail-containing flask culture (Fig. 4(d)(e)(f)).

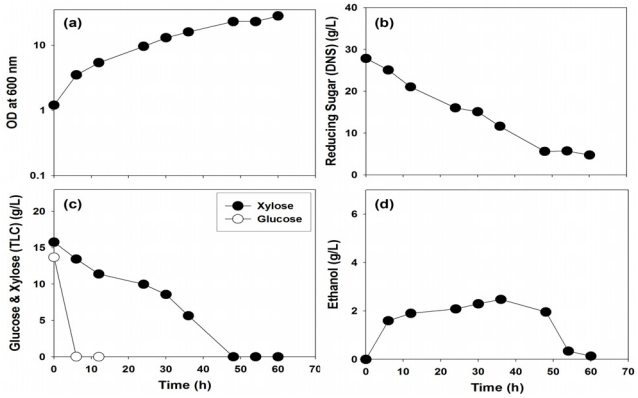

Fig. 8. Flask culture of strain 7126 in the concentrated hydrolysate of rape stem. No inhibitor cocktail is added. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar by DNS method, (c) residual glucose and xylose concentrations by TLC, and (d) ethanol production.

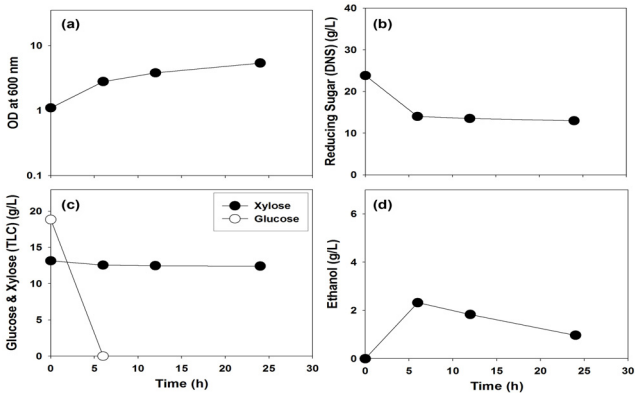

Fig. 9. Flask culture of strain 96581 in the concentrated hydrolysate of rape stem. No inhibitor cocktail is added. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar by DNS method, (c) residual glucose and xylose concentrations by TLC, and (d) ethanol production.

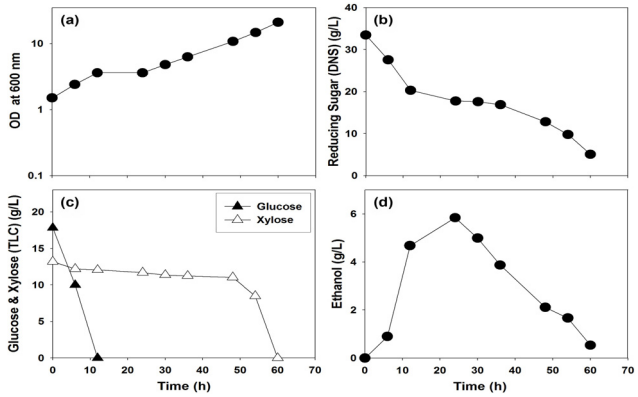

Fig. 10. Flask culture of strains 96581 and 7126 in the concentrated hydrolysate of rape stem, in which strains 96581 and 7126 are inoculated simultaneously. Inhibitor cocktail of 18.2% (v/v) is added. (a) Cell growth, (b) residual reducing sugar by DNS method, (c) residual glucose and xylose concentrations by TLC, and (d) ethanol production.

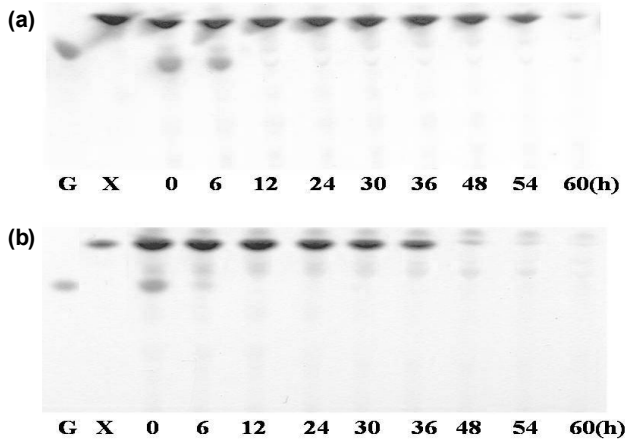

Fig. 11. TLCs of the culture supernatant. (a) Culture supernatant of Fig. 10, (b) culture supernatant of Fig. 8. G and X indicate xylose and glucose, respectively, as standard.

P. stipitis 경우에는 inhibitor cocktail의 보다 저항성이 있는 균주를 flask배양실험에서 확인할 수 없었기 때문에 *S. cerevisiae* 균주와 *P. stipitis* 균주를 inhibitor cocktail이 첨가 된 agar plate에서 확인하는 재실험을 실시하였다. Table 1과 같이 *S. cerevisiae* 경우에는 flask 배양과 동일하게 96581이 가장 inhibitor cocktail에 저항성이 있는 균주로 확인되었고, *P. stipitis* 경우에는 7126이 상대적으로 더 저항성 있는 것으로 확인 되었다. 그래서 7126 균주를 다음 실험을 위한 보다 저항성 있는 *P. stipitis* 균주로 선택하였다.

Table 1. Cell growth on inhibitor cocktail-containing agar plate

IC	*S. cerevisiae*			IC	*P. stipitis*		
(%,v/v)	1024	24858	96581	(%,v/v)	58376	58784	7126
18	++	+	+++	14	++	++	++
25	+	+	+++	16	+	+	++
27	-	-	-	20	-	-	-
30	-	-	-	22	-	-	-
34	-	-	-	24	-	-	-

Inhibitor cocktail에 저항성 있는 균주를 이용한 bioethanol 생산

위의 연구 결과를 바탕으로 inhibitor cocktail에 대하여 보다 더 저항성이 있는 96581과 7126을 유채대 가수분해물로부터 bioethanol을 생산하는데 어떻게 이용 할 수 있을지에 대한 연구를 수행하였다. *Pichia* 효모는 6탄당과 5탄당을 모두 이용하여 ethanol을 만들 수 있는 균주이기 때문에 만약 7126 균주로 bioethanol 생산이 가능하다면, 이 효모를 이용하면 유채대 가수분해물의 inhibitor로 인하여 발생할 수 있는 문제를 해결 할 수 있을 것이라고 생각하였다. 그래서 먼저 3배 농축한 유채대 가수분해물을 이용한 bioethanol 생산실험을 수행하였다 (Fig. 8). 그 결과 Fig. 8(d)와 같이 bioethanol 생산이 약 2 (g/L) 정도 밖에

되지 않았으며, 단당류에 대한 bioethanol 수율도 약 0.133 (DNS 환원당 분석 근거) 와 약 0.09 (정량 TLC 분석 근거)에 지나지 않았다. 이때 3배 농축한 유채대 가수분해물에서의 bioethanol 생산이 control에서의 bioethanol 생산 (Fig. 1(f))에 비하여 차이가 없는 것은 농축에 의한 inhibitor 농도의 증가가 원인인 것으로 추론된다. 본 연구팀에서 발표한 선행 결과에서는 5-hydroxymethyl furfural이 0.2 ppm 존재하는 것으로 보고 하였다 [11]. 그러나 Fig. 8의 결과는 inhibitor가 0.2 ppm보다는 더 높을 수 있을 가능성을 보여 주고 있다고 할 수 있다.

한편, 96581 균주를 3배 농축한 유채대 가수분해물을 이용하여 bioethanol 생산을 시도한 결과 Fig. 9와 같이 낮은 수율로 glucose만을 이용하여 bioethanol을 만드는 현상을 관찰되었다. 그러나 이때의 bioethanol 수율은 DNS 분석 기준으로 약 0.21, TLC 분석 기준으로 약 0.12 정도로 이론 수율에 비하여 적은 값이었다. 마찬가지로 이러한 현상도 3배 농축한 유채대 가수분해물 안의 inhibitor에 의한 것으로 생각되며, 이는 농축하지 않은 유채대 가수분해물을 사용한 Fig. 1(c)에서의 bioethanol 양보다 3배 농축한 유채대 가수분해물을 사용한 경우의 bioethanol 생산이 그다지 높지 않다는 결과가 이를 잘 뒷받침하고 있다.

그래서, 이 두 균주를 효율적으로 이용하기 위하여, 단독으로 사용하는 것 보다는 동시배양을 통한 bioethanol 생산법을 고안하여 그 효용성을 높이기로 하였다. 이는 Taherzadeh *et al.* [15]이 발표한 논문에 근거 한 것으로 lignocellulosic biomass의 가수분해에서 발생하는 furfural이 *S. cerevisiae*에 의하여 덜 toxic한 물질로 전환된다는 연구결과로부터 고안되었다. 이때 좀 더 극한 상황을 만들어 선별된 두 효모의 효용성을 확인하기 위하여, 유채대 가수분해물을 3배 농축하여 배지에 *S. cerevisiae* 균주의 세포성장은 가능하나, *P. stipitis* 균주의 세포성장이 불가능한 18.2% (v/v)의 inhibitor cocktail을 더 첨가한 배지를 만들어 두 균주를 동시 접종하는 실험을 수행하였다 (Fig. 10). Fig. 10(d)과 같이 glucose와 xylose 소비하면서 bioethanol이 약 6 (g/L)까지 생성되는 것을 확인하였고 특이하게도 glucose 완전히 소모된 뒤 12시간부터 24시간 사이에 약 1.2 (g/L)의 bioethanol 더 생성됨을 확인하였다. 이는 *P. stipitis*에 의하여 xylose로부터 ethanol이 더 생성되었기 때문이며, 이때 단당류에 대한 bioethanol 수율도 약 0.4 (DNS 환원당 분석 근거)와 약 0.32 (정량 TLC 분석 근거)로 어느 정도 inhibition을 극복하는 것으로 나타났다. 한편 glucose와 xylose의 소비 양상은 Fig. 11(a)처럼 Fig. 8의 7126 균주 배양에서의 glucose와 xylose 소비 양상인 Fig. 11(b)에 비하여 많이 늦춰지는 것으로 나타났다. 이것은 Fig. 10의 7126과 96581의 동시접종 배양이 보다 많은 inhibitor 농도를 함유하고 있다는 것을 보여주는 것이라 하겠다.

*S. cerevisiae*는 glucose 소모 뒤에 xylose를 소모할 수 없기 때문에 동시접종으로 인한 bioethanol 생산량 증가는 *P. stipitis*의 xylose 소비에 의한 bioethanol 생산으로 추정되어진다. 다시 말하자면 *S. cerevisiae*가 성장하면서 inhibitor cocktail 안의 세포독성 물질이 분해되어 그 후 *P. stipitis*의 세포성장과 bioethanol 생산이 가능하게 된 것으로 추정되어진다. 위의 결과는 두 효모 균주의 동시 접종에 의하여 얻어질 수 있는 긍정적인 결과로 해석할 수 있지만, 두 효모 균주를 분별하여 분석하지 않았기 때문에 위의 언급한 추론이 과학적으로 합리적이지 않을 수 있다. 그래서 앞으로 두 균주를 분별하여 분석하는 시도가 필요할 것으로 생각되어진다.

본 연구에서 유채대 가수분해물의 inhibitor에 대한 저항성이 있는 두 가지 효모를 사용하여 bioethanol 생산을 시도한 결과 glucose가 완전히 소모된 이후에 추가적으로 bioethanol 생산이 이루어진다는 것을 관찰하였다. 이는 일반적으로 biomass의 가수분해물에 세포성장에 유해한 물질이 함유되어 있을 경우에 detoxification 공정을 사용하는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에서 밝혀진 두 가지 inhibitor 저항성 효모를 사용 할 경우에는 이러한 공정을 생략 가능하다고 할 수 있겠다.

감 사

This study was carried out with the support of Research Cooperating Program for Agricultural Science & Technology Development (Project No.200802A01036002), Rural Development Administration, Republic of Korea.

접수 : 2010년 6월 1일, 게재승인 : 2010년 8월 23일

REFERENCES

1. Lee, M., D. H. Cho, Y. H. Kim, J. Lee, J. H. Lee, S. W. Kim, J. Cho, D. Lee, S. Kim, and C. Park (2009) Effect of biomass-derived inhibitors on ethanol production. *KSBB J.* 24: 439-445.
2. Martín, C. and L. J. Jönsson (2003) Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. *Enzyme Microb. Technol.* 32: 386-395.
3. Carvalheiro, F., L. C. Duarte, S. Lopes, J. C. Parajó, H. Pereira, and F. M. Gírio (2005) Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. *Process Biochem.* 40: 1215-1223.
4. Chandel, A. K., R. K. Kapoor, A. Singh, and R. C. Kuhad (2007) Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresour. Technol.* 98: 1947-1950.

5. Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, and N. O. Nilvebrant (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 151-159.
6. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour. Technol.* 74: 17-24.
7. Palmqvist, E. and B. Hahn-Hägerdal (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74: 25-33.
8. Saha, B. C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279-291.
9. Sánchez, Ó. J. and C. A. Cardona (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270-5295.
10. Cho, D. H. and Y. H. Kim (2009) Evaluation of biological and physico-chemical detoxification methods for the removal of inhibitors in lignocellulose hydrolysate. *KSBB J.* 24: 415-419.
11. Han, J. -G., S. -H. Oh, M. -H. Jeong, S. -S. Kim, H. -B. Seo, K. -H. Jung, Y. -S. Jang, I. -C. Kim, and H. -Y. Lee (2009) Two-step high temperature pretreatment process for bioethanol production from rape stems. *KSBB J.* 24: 489-494.
12. Seo, H. -B., S. S. Kim, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2009) High-level production of ethanol during fed-batch ethanol fermentation with a controlled aeration rate and non-sterile glucose powder feeding of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 14: 591-598.
13. Yeon, J. -H., S. -E. Lee, Y. C. Seo, W. -S. Choi, I. -C. Kim, H. -Y. Lee, and K. -H. Jung (2010) Bioethanol production from the hydrolysate of rape stem in a surface-aerated fermentor. *J. Microbiol. Biotechnol.* (submitted)
14. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy (1986) *Carbohydrate analysis; A practical approach.* p. 3. IRL press, Oxford, UK.
15. Taherzadeh, M. J., L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Lindén (1999) Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Sacchromyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 87: 169-174.