

## 2단 흐름형 침출공정에 의한 돼지감자 줄기의 전처리

박용철 · 김준석<sup>†</sup>

경기대학교 화학공학과  
16227 경기도 수원시 영통구 광교산로 154-42  
(2014년 9월 19일 접수, 2014년 10월 7일 수정본 접수, 2014년 10월 11일 채택)

## Pretreatment of *Helianthus tuberosus* Residue by Two-Stage Flow Through Process

Yong Cheol Park and Jun Seok Kim<sup>†</sup>

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, 154-42 Gwanggyosan-ro, Yeongtong-gu, Suwon, Gyeonggi 16227, Korea  
(Received 19 September 2014; Received in revised form 7 October 2014; accepted 11 October 2014)

### 요 약

본 연구에서는 목질계 바이오매스인 돼지감자 줄기에 대한 전처리 공정을 수행하였다. 공정은 효소 당화 수율을 높이기 위하여 흐름형 침출 전처리 공정에 2단 전처리 공정으로 적용하였다. 전처리 용매로 암모니아수에 의한 탈 리그닌 효과와 황산 용액에 의한 헤미셀룰로오스의 분해가 효소당화 및 발효에 미치는 영향을 확인하였다. 암모니아수와 황산용액을 이용한 2단 전처리 공정을 수행하였다. 먼저 1단계 공정은 40분 동안 163.2 °C의 온도에서 암모니아수로 처리를 진행하였고 다음 2단계 공정은 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 처리를 수행하여 물질수지를 구하였다. 그리고 앞의 공정과 반대의 순서로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정을 수행하였다. 이때 암모니아수를 먼저 처리한 공정에서 글루코오스 생산량은 30.7 g으로 72.4%의 수율이 나타났다. 반대로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 글루코오스 생산량이 20.9 g으로 49.3%의 수율을 보였다.

**Abstract** – In this study, the pretreatment of *Helianthus tuberosus* residue had been performed. The two-stage pretreatment on flow-through process were applied in the interests of increase of sugar production yield on enzymatic saccharification. The delignification by aqueous ammonia and the fractionation of hemicellulose by sulfuric acid solution as pretreatment solution were confirmed for effects of enzymatic saccharification. Two-stage pretreatment process was performed using aqueous ammonia and sulfuric acid. The first step was performed with aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C and the second step was performed with sulfuric acid solution for 20 min at 169.7 °C. And then, the first step was performed with sulfuric acid solution and the second step was pretreated with aqueous ammonia. At this time, the glucose production was 30.7 g and the glucose yield was 72.4% in the first step process with aqueous ammonia. And, the glucose production was 20.9 g and the glucose yield was 49.3% in the first step process with sulfuric acid solution.

Key words: Pretreatment, Two-stage Flow Through, *Helianthus tuberosus*, Enzymatic Hydrolysis

### 1. 서 론

목질계 바이오매스를 이용한 바이오 에탄올 생산 공정의 문제점은 리그닌 제거 과정인 전처리 공정의 비용 상승과 함께, 낮은 생산성의 문제로 제1세대 바이오매스와 비교하였을 때 경제성이 낮아 여러 가지로 개선해야 할 부분이 존재한다. 목질계 바이오매스는 자연적으로 효소당화에 적용하기 어려운 까닭에 전처리 공정이 필수적인 과정이라고 할 수 있다[1,2].

목질계 바이오에탄올 기술 선진국의 바이오매스 전처리에 관한 연구는 산 또는 염기 용매를 이용한 화학적 전처리 공정에 관한 연구가 많이 진행되어 왔다. 목질계 바이오매스는 당 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 펙틴계 고분자인 리그닌으로 구성되어 있어 에탄올로 전환하기 위해서는 가용 원료인 당 성분을 분리하는 전처리 공정이 우선적으로 적용되어야 한다. 이러한 성분별 분리를 위해서는 pH 차이에 따른 성분별 분리 방법이 가장 널리 이용되고 있다. 암모니아, 수산화나트륨 등 염기 용매를 전처리 과정에 사용할 경우 pH가 높은 조건이 되며 결과적으로 염기에 용해되는 리그닌의 선택적 분리에 의해 당 성분이 남게 되어 효소 당화에 의해 에탄올 생산이 가능하게 된다. pH가 중성인 고온 열수 전처리에서는 열에 약한 헤미셀룰로오스 성분이 비교적 용해되어 선택적으로 분리가 가능하다. 약산을 적용하는 낮은 pH 영역에서는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jskim84@kyonggi.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.

스의 용해에 의한 선택적 분리가 가능하다. 이러한 목질계 바이오매스 구성 성분의 물성 차이에 의해 성분 분리를 하게 된다[3]. 전처리 시약으로서 암모니아수는 바이오매스의 팽윤뿐만 아니라 효과적인 탈 리그닌에 대해 많은 장점을 가지고 있다. 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실도 최소화할 수 있다[4-9].

산에 의한 전처리 공정은 약산에 의한 전 가수분해(prehydrolysis)가 많이 연구되었는데, 이 공정은 헤미셀룰로오스를 효과적으로 제거하고 분해된 헤미셀룰로오스 구성당의 회수율도 높을 뿐만 아니라 셀룰로오스의 당화 수율도 크게 증가시켜주는 효과적인 전처리 방법이지만 산의 사용으로 인한 경제적, 환경적인 문제의 해결이 수반되어야 한다. 또한 생성된 당화액 내에 에탄올 발효 공정에 저해 작용을 유발하는 독성 물질의 한계점을 극복하여야 한다. 결국 산 가수분해를 이용한 당화 공정은 주요 섬유소 구성 성분을 효율적으로 환원당으로 전환시키면서, 높은 농도의 당화액을 생성할 수 있는 공정 조건의 최적화가 필수적이다[10,11].

바이오매스의 전처리는 당화와 발효에 저해되는 성분을 분별하기 위한 공정이다. 이러한 바이오매스의 전처리 효율을 높이고 두 가지 이상의 특정 성분을 액상으로 분별하기 위한 공정으로 2단 전처리 공정을 적용하고자 하였다. 2단 전처리 공정은 첫 번째 공정으로 염기 용매를 흘려서 리그닌을 제거하고 두 번째 공정으로 산 용매를 흘려서 헤미셀룰로오스를 분별하는 공정으로 구성된다. 또한 반대의 순서로 용매를 흘려서 각각 용매와의 효율적인 반응을 유도하기도 하였다. 본 연구에서는 목질계 바이오매스인 돼지감자 줄기를 이용하여 2단 흐름형 전처리 공정을 적용하여 주요 성분을 분별하는 동시에 효소 당화 수율을 높이고자 하였다[12]. 암모니아수에 의한 탈 리그닌 효과와 황산 용액에 의한 헤미셀룰로오스의 분해가 효소 당화 및 에탄올 발효에 미치는 영향을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2-1. 재료

본 연구에 사용된 바이오매스는 돼지감자 줄기(*Helianthus tuberosus* residue)를 사용하였다. 또한 바이오매스의 전처리 및 특성 파악을 위한 비교군으로 filter paper(Whatman No.1)를 사용하였다.

바이오매스는 30~50 mesh를 사용하여 균일한 크기의 기질을 사용하였고 45 °C의 오븐에서 건조하여 사용하였다. 바이오매스의 주요 구성성분은 Glucan 42.4%, Xylan 17.1%, Galactan 1.1%, Arabinan 0.9%, Mannan 1.6%, Lignin 21.9%, Ash 4.9% 그리고 Extractive 4.7%로 구성되어 있다.

사용된 효소는 Celluclast 1.5L(Cellulase, Novo Co., Denmark)과 Novozyme-188( $\beta$ -glucosidase, Novo Co., Denmark)을 사용하였다. 효소 활성화도(Activity)는 Celluclast 1.5L의 활성화도는 65 FPU/ml 이고 Novozyme-188의 활성화도는 48 CbU/ml로 측정되었다 [13,14].

### 2-2. 전처리 공정

흐름형 전처리 공정의 주요 구성은 원액 탱크, 펌프, 온도 조절 오븐, 침출 반응기(내부직경 3 cm, 길이 19.4 cm, 내부부피 137 cm<sup>3</sup>) 그리고 액상 저장 탱크로 구성되어 있다. 주요한 반응은 바이오매스가 충전된 침출 반응기 내부로 적용 용매를 흘려보내서 고액 침출

반응을 유도하도록 하였다.

침출 반응기는 스테인리스 스틸(SS-316)로 제작되었으며, 용매 공급 펌프는 51K40GN-CW(Oriental motor Co., LTD, Japan)를 사용하였다. 강제 대류 오븐을 사용하여 일정 반응 온도를 유지시켰다. 질소가스를 사용하여 Back pressure를 유지시킴으로써 용매 투입부 터 액상 저장 탱크까지 적용 용매의 증발을 방지하도록 하여 침출 반응기에서 항상 고액 반응이 유지되도록 하였다. 용매 침출 공정을 통하여 반응기 밖으로 유출되는 액상 성분은 액상 저장 탱크로 분별하였다. 반응기에 투입되는 바이오매스의 질량은 바이오매스 밀도에 의존하여 20 g을 충전하였다. 침출 반응을 위한 용매 투입은 반응기 내부가 일정 온도에 도달한 이후부터 시작되었다. 반응기 내부가 반응 온도로 도달하기 위해서는 일정 시간의 예열시간(Preheating time)이 필요하였다. 용매의 유속은 전처리 시간에 따라 5~10 ml/min 사이에서 조절되었다. 전처리된 바이오매스는 깨끗한 물로 헹군 후에 45 °C의 오븐에서 건조하여 잔류 수분을 제거하였다 [12,15-17]. 또한 흐름형 반응기에서는 서로 다른 용매를 전처리 조건에 따라 차례로 적용할 2단 전처리를 수행할 수 있었다. 2단 전처리 공정은 하나의 침출 반응기를 사용하여 염기 및 산 용매를 순차적으로 적용하였으며, 이러한 공정은 단일 용매 침출 전처리 공정의 주요한 장점을 융합하도록 하였다[12,18].

### 2-3. 효소당화

효소 당화는 삼각 플라스크에 각각 바이오매스와 전처리된 바이오매스를 sodium citrate buffer solution(0.5 M, pH 4.8)에 기질농도 5%(w/w)로 혼합한 후 온도 50 °C에서 72시간 동안 180 rpm의 진탕 배양기에서 수행되었다. 효소는 Celluclast 1.5 L과 Novozyme-188을 각각 60 FPU/ml와 32 CbU/ml의 활성화도(Activity)로 접종하였다. 이후 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 HPLC(Waters, USA)로 분석하였다. 분석된 글루코오스 농도를 이용한 효소 당화율은 다음과 같이 정의된다[19].

Enzymatic digestibility (%)

$$= \frac{\text{The amount of glucose released (g)} \times 0.9}{\text{Total initial glucan (g)}} \times 100$$

### 2-4. 분석방법

전처리 전후 바이오매스의 당과 리그닌은 미국신재생에너지연구소(NREL: National Renewable Energy Laboratory)에서 제공한 분석방법을 사용하여 각 성분의 함유량을 분석하였다[20]. 샘플을 황산(72%)에 넣고 30 °C에서 2시간 동안 1차 산 가수분해를 시킨 뒤에 희석한 후 1시간 동안 121 °C에서 2차 가수분해를 하였다. 가수분해된 액체를 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량분석을 수행하였다. 리그닌 성분은 NREL procedures LAP-003에서의 방법으로 분석하였다. 샘플은 황산(72%)에 넣고 20 °C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤에 황산(3%)에서 4시간 동안 끓였다. 그 이후에 용해되지 않은 잔여물을 측정하여 리그닌 성분을 계산하였다. 본 실험에서 생성된 글루코오스, 자일로오스 등의 당과 에탄올은 HPLC(Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였다. HPLC 구동에 쓰이는 이동상은 5 mM의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액을 사용하였고 유속은 0.6 ml/min으로 운전하였다. 이때 검출기는 Waters 410 RI(Refractive Index)를 사용하였고 RI 검출기의 온도는 50 °C로 설정하였다. 주요 고체성분

인 글루코오스, 자일로오스 등의 바이오매스의 성분 분석은 Bio-lad 社の Aminex HPX-87P column을 사용하였고 컬럼의 온도는 85 °C로 설정되었다. 그리고 당화액의 당분석 및 발효액의 에탄올 분석은 Aminex HPX-87H column을 사용하였고 컬럼의 온도는 60 °C로 설정되었다[21].

### 3. 결과 및 고찰

효소 당화율 증가를 위해 흐름형 침출 전처리 공정에 돼지감자 줄기의 전처리를 적용시켰다. 돼지감자 줄기의 침출 전처리 조건에 대한 최적 조건을 예측해보기 위해 바이오매스의 전처리에 대한 영향을 통합적으로 분석하기 위해 통계학적 최적화 도구인 반응표면 분석법(RSM: Response Surface Method)을 사용하여 실험을 진행하여 최적조건을 탐색하였다. 반응 표면 분석에 사용된 소프트웨어는 Stat-Ease software사의 Design-expert 8.0이다. 최적화는 Box-Behnken experimental design으로 설계하여 사용하였다.

공정 변수에 따라 글루코오스 회수율과 리그닌 제거율에 미치는 영향에 대해 알아보았으며 최적조건을 예측하여 효소 당화율을 구하였다. 최적 조건을 예측하기 위한 전처리는 암모니아수와 황산 용액에 대하여 수행되었다. 전처리가 수행된 바이오매스는 모두 성분 분석을 하였고 효소당화를 진행하였다.

#### 3-1. 암모니아수에 의한 RSM 최적화

암모니아수에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 Table 1과 같은 조건을 설정해서 수행하였다. 실험은 선행 연구에서

**Table 1. Independent variables for optimization of flow-through pretreatment by aqueous ammonia**

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Aqueous Ammonia concentration (%(w/w))	X <sub>1</sub>	10	15	20
Temperature (°C)	X <sub>2</sub>	130	170	210
Reaction time (min)	X <sub>3</sub>	20	30	40

**Table 2. Optimization results of flow-through pretreatment by aqueous ammonia**

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	0	1	1	56.0	80.3	31.9	90.1
2	1	1	0	56.4	86.3	37.4	99.9
3	0	0	0	64.4	94.9	38.6	75.1
4	1	0	1	61.6	95.1	49.4	82.8
5	-1	0	-1	67.2	91.2	31.3	63.5
6	-1	-1	0	76.8	88.6	18.8	53.5
7	0	0	0	65.7	90.1	37.0	75.6
8	-1	1	0	55.4	81.5	17.5	97.7
9	1	0	-1	63.3	84.9	30.9	77.0
10	0	0	0	65.0	86.2	40.4	78.7
11	0	-1	1	75.2	94.1	20.9	56.6
12	0	1	-1	56.6	88.1	33.0	99.6
13	0	-1	-1	77.2	92.9	15.5	45.5
14	0	0	0	64.1	88.4	39.1	77.4
15	1	-1	0	74.8	85.2	24.0	62.0
16	-1	0	1	65.7	95.2	40.0	75.0
17	0	0	0	64.8	92.3	38.2	72.6

초본계 바이오매스와 농업부산물 전처리에 효과가 있었던 10~20% (w/w) 농도의 암모니아수를 용매로 하여 수행하였다[16,21]. 또한 온도 조건의 범위는 130~210 °C로 설정하여 실험을 하였다. 온도 조건이 210 °C 이상이 되는 경우 반응기 내부의 압력이 한계를 넘어서기 때문에 원활한 실험이 진행될 수가 없었다. 그래서 온도의 상한선을 210 °C로 설정하였다. 그리고 반응 시간은 20분에서 40분 사이의 범위로 설정하여 수행하였다. 반응시간은 용매의 흐름을 5~10 ml/min의 유속으로 조절하는 것으로 결정하였다. 최적화는 효소 당화율의 증가에 목표로 하여 실험의 결과로 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소 당화율을 구하여 적용하였고 그 결과는 Table 2에 나타내었다.

#### Enzymatic digestibility

$$= 75.9 + 4.0X_1 + 21.2X_2 + 2.38X_3 - 1.57X_1X_2 - 1.41X_1X_3 - 5.17X_2X_3 + 2X_1^2 + 0.38X_2^2 - 3.34X_3^2$$

또한 예측된 최적 조건의 반응 표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 반응표면분석법에 의하면 암모니아수에 의한 돼지감자줄기의 침출 전처리 공정은 20%(w/w) 농도의 암모니아수로 163.2 °C의 반응온도에서 40분의 반응시간으로 전처리가 수행될 때 전처리 최적 조건으로 수행이 될 수 있다고 예측하였다. 반응표면분석법에서 예측된 최적 전처리 조건을 돼지감자줄기의 침출 전처리 공정에 적용하여 전처리 실험을 수행하였다. 암모니아수의 전처리 공정에 대한 비교군으로 같은 온도와 반응시간 조건으로 열수에 의한 전처리를 수행하였다. 예측된 최적 조건을 통한 침출 전처리 공정에서 고형물 잔존율은 64.1%로 나타났고 63.0%의 리그닌 제거율과 95.6%의 글루코오스 회수율을 확인하였다. 이 전처리 바이오매스에 대해 효소당화를 진행하여 Fig. 2와 같이 70.9%의 효소 당화율을 확인하였다.

전체적인 바이오매스의 전처리 효율, 당화율 및 에탄올 생산 수율을 얻기 위해서는 공정에 대한 물질 수지(Mass balance)를 구하는 것이 중요하다. 바이오매스로부터 얻어질 수 있는 당화율은 전처리 혹은 당화, 발효과정에서 손실되는 당 및 기타 성분을 파악해야만 정확한 당 생산량을 얻을 수 있다.

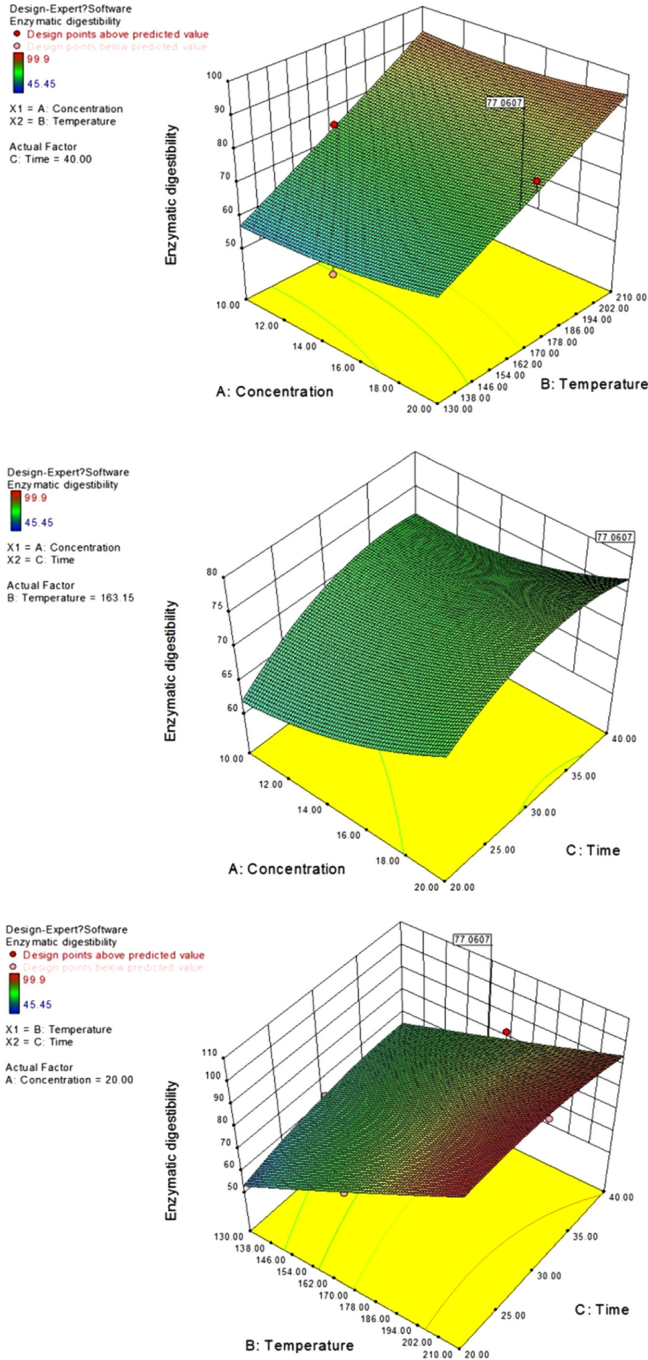


Fig. 1. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia.

Fig. 3에 따르면 163.2 °C에서 40분 동안 20%(w/w) 농도의 암모니아수와 열수에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 보면 암모니아수에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 28.7 g으로 전체 바이오매스의 67.7%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 15.7 g으로 37.0%의 수율을 나타냈다. 효소당화의 저해 물질로 작용하는 리그닌은 암모니아수의 전처리 공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. 암모니아수로 전처리를 수행한 바이오매스의 효소당화에 대한 효소 당화율이 70.9%로 나타났다. 이것은 전처리를 수행하기 전 바이오매스의 효소당화에

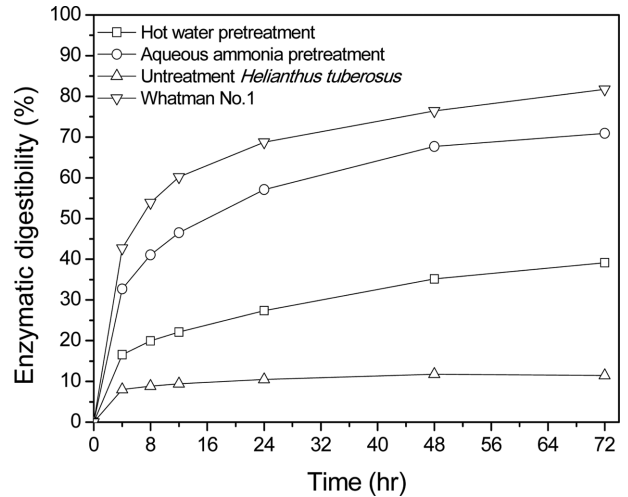


Fig. 2. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia at 163.2 °C for 40 min.

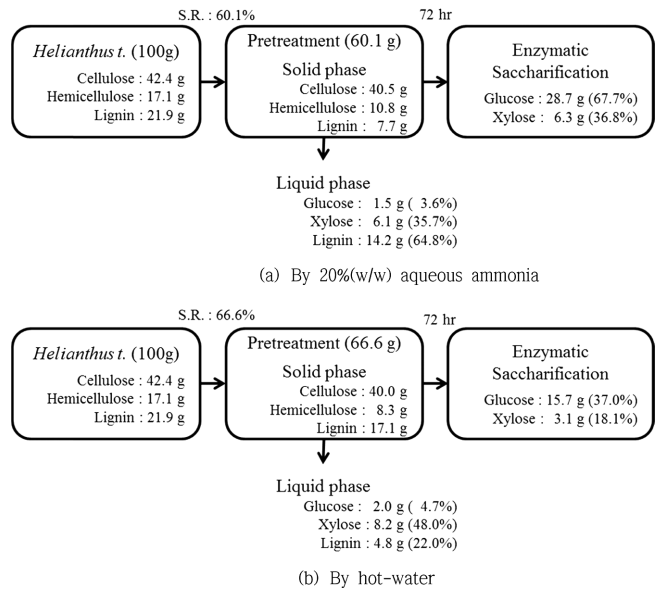


Fig. 3. Mass balance of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 163.2 °C for 40 min.

대한 효소 당화율이 11.5%인 것과 비교하여 약 6.2배의 증가 효과를 확인하였다. 또한 같은 조건으로 열수로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 효소 당화율이 39.2%로 전처리 전과 비교하였을 때 비교하면 약 3.4배가 증가한 것을 볼 수 있었다. 그러나 전체적인 글루코오스의 생산 수율을 고려하였을 때 37.0%의 수율을 보인 열수 전처리는 암모니아수 전처리에 비해 효율적이지 않다고 판단하였다.

Table 3. Independent variables for optimization of flow-through pretreatment by sulfuric acid solution

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Sulfuric acid solution concentration (%(w/w))	X <sub>1</sub>	0.5	1.0	1.5
Temperature (°C)	X <sub>2</sub>	130	170	210
Reaction time (min)	X <sub>3</sub>	20	30	40

Table 4. Optimization results of flow-through pretreatment by sulfuric acid solution

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	-1	0	1	52.0	80.4	27.3	65.3
2	1	1	0	26.8	0.9	1.3	63.9
3	0	1	-1	26.4	3.8	1.0	93.4
4	-1	1	0	26.9	12.2	4.8	98.1
5	0	-1	1	66.5	80.8	18.7	26.1
6	0	0	0	53.8	82.5	22.5	61.0
7	1	-1	0	66.0	84.2	1.1	31.7
8	1	0	-1	49.6	72.5	24.1	69.6
9	-1	-1	0	74.7	79.5	16.6	24.0
10	-1	0	-1	53.1	85.5	37.8	60.0
11	0	0	0	52.4	77.0	15.7	65.5
12	1	0	1	48.1	72.8	24.8	71.6
13	0	0	0	51.1	75.0	21.0	67.1
14	0	1	1	27.9	1.4	3.2	72.2
15	0	-1	-1	71.2	90.2	14.0	24.9
16	0	0	0	50.5	72.1	15.9	71.4
17	0	0	0	51.4	75.2	16.1	65.8

### 3-2. 묽은 황산 용액에 의한 RSM 최적화

묽은 황산 용액에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 Table 3과 같은 조건을 설정해서 수행하였다. 실험은 사전에 수행한 회분식 반응실험에서 확인한 농도인 0.5~1.5%(w/w) 농도의 황산 용액을 용매로 하여 수행되었고 앞서 암모니아수 전처리 실험 조건과 같은 130~210 °C의 반응온도와 20~40분의 반응시간으로 설정하여 전처리를 수행하였다. 최적화는 암모니아수에 의한 전처리 최적화와 마찬가지로 효소 당화율의 증가에 목표로 하여 실험의 결과로 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소 당화율을 구하여 적용하였고 그 결과는 Table 4에 나타내었다. 또한 예측한 결과는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

#### Enzymatic digestibility

$$= 66.16 - 1.32X_1 + 27.6X_2 - 1.6X_3 - 10.47X_1X_2 - 0.84X_1X_3 - 5.62X_2X_3 + 0.38X_1^2 - 12.12X_2^2 + 0.099X_3^2$$

앞서 암모니아수와 마찬가지로 예측된 최적 조건의 반응 표면 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 또한 황산용액에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 구하여 Fig. 5와 같이 나타내었다. 169.7 °C에서 20분 동안 0.5%(w/w) 황산 용액과 열수에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 보면 황산 용액에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 18.2 g으로 전체 바이오매스의 42.9%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 12.2 g으로 28.8%의 수율을 나타냈다. 효소당화의 저해물질로 작용하는 리그닌은 황산 용액의 전처리 공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. Fig. 6에 따르면 바이오매스에 대해 황산 용액과 열수 공정으로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 효소 당화율이 각각 48.1%와 31.5%로 두 공정을 비교하면 약 1.5배 정도의 차이를 보였다. 그리고 11.5%의 효소 당화율을 보인 전처리 전의 바이오매스와 비교하면 2.7배에서 4.2배 정도 효소 당화율의 증가 효과는 있지만 암모니아수에 의한 전처리의 경우보다 전처리 시간은 짧지만 고형물 잔존율도 떨어지고 효소 당화율도 크게 떨어지는 결과를 보이는 것을 알 수 있었다.

### 3-3. 2단 흐름형 침출 전처리

이전 실험에서 돼지감자줄기에 대한 암모니아수와 황산 용액의 전처리 최적 조건을 구하였다. 먼저 1단으로 침출 전처리가 된 돼지감자 줄기의 최대 당화율은 암모니아수에 의한 전처리 공정일 때 70.9%로 나타내었다. 이러한 효소 당화율을 더 향상시키기 위해 암모니아수와 황산용액의 각각 최적화된 전처리 조건을 기본으로 한 2단 침출 전처리 공정을 Table 5와 같은 조건으로 수행하였다. 2단 침출 전처리는 각 조건별로 암모니아수와 열수, 열수와 암모니아수, 황산 용액과 열수, 열수와 황산 용액, 암모니아수와 황산 용액 그리고 황산 용액과 암모니아수의 순서로 전처리를 수행하여 비교하였다. 각각 전처리가 된 바이오매스는 효소당화를 진행하여 효소 당화율을 구하였다.

Fig. 7은 2단 전처리 공정을 거친 바이오매스의 효소당화 결과를 나타낸 그래프이다. 효소당화를 72시간 동안 수행한 결과를 보면 효소 당화율이 최대인 1단계로 암모니아수를 처리한 후 2단계로 황산 용액으로 처리한 전처리의 경우 효소 당화율이 79.8%이고 글루코오스 농도는 29.2 g/L이었다. 1단계로 암모니아수를 적용하여 효소당화의 저해요소로 작용하는 리그닌을 바이오매스에서 제거하여 바이오매스의 구조를 헐겁게 한 후 2단계로 황산 용액을 반응시켜서 헤미셀룰로오스 성분을 액상으로 빠져 나가게 하였다. 헤미셀룰로오스와 리그닌이 빠져나가면서 빈 공간이 만들어서 효소당화를 수행할 때 효소와 셀룰로오스가 반응하는 면적을 넓게 하는 효과를 주어서 효소 당화율을 높이는 데 큰 기여를 하는 것으로 판단이 되었다.

앞서 암모니아수의 전처리 공정과 황산 용액의 전처리 공정과 마찬가지로 2단 전처리에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 구하였다. 먼저 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간 동안 열수로 전처리를 수행하고 용매의 투입 순서를 달리하여 같은 온도와 같은 시간 동안 열수에 의한 전처리를 수행한 후에 암모니아수로 전처리를 수행하고 Fig. 8과 같이 물질 수지를 구하였다. 암모니아수를 먼저 투입한 공정에서 글루코오스 생산량은 28.9 g으로 전체 바이오매스의 68.2%의 수율을 나타냈다. 암모니아수뿐만 아니라 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리

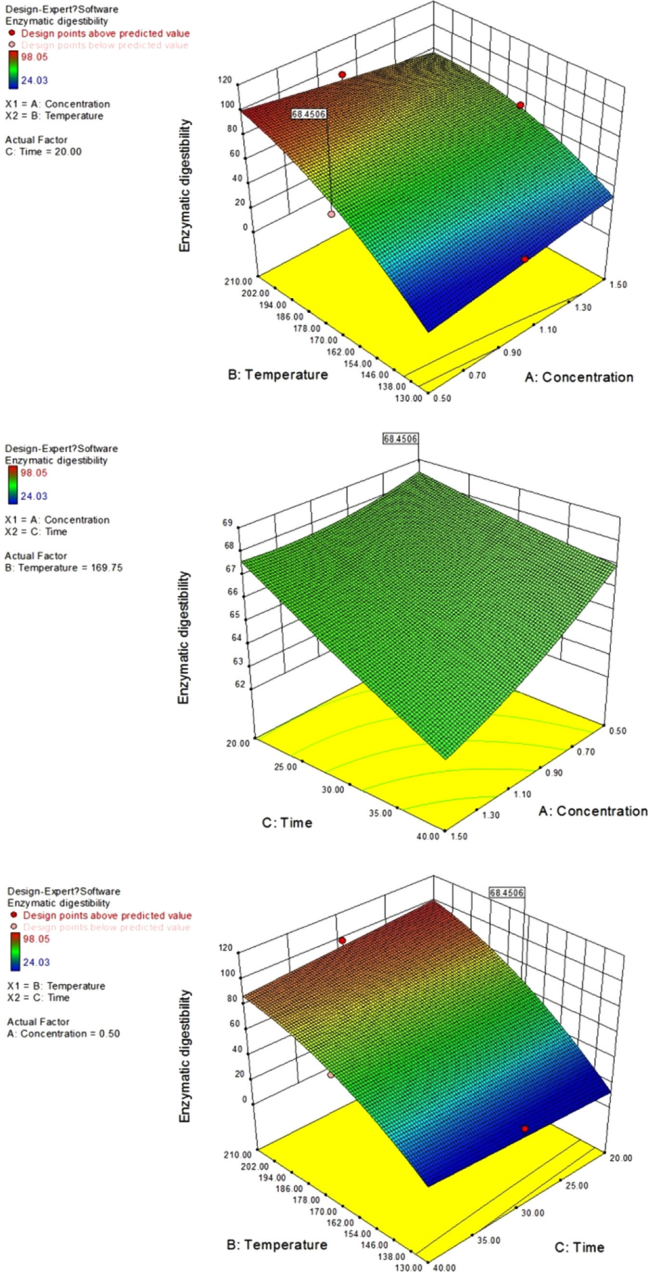


Fig. 4. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution.

한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 효소 당화율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 열수를 먼저 투입한 공정에서 글루코오스 생산량은 23.6 g으로 전체 바이오매스의 55.7%의 수율을 보였다. 열수만 전처리를 하였을 때보다 암모니아수를 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 50%의 글루코오스

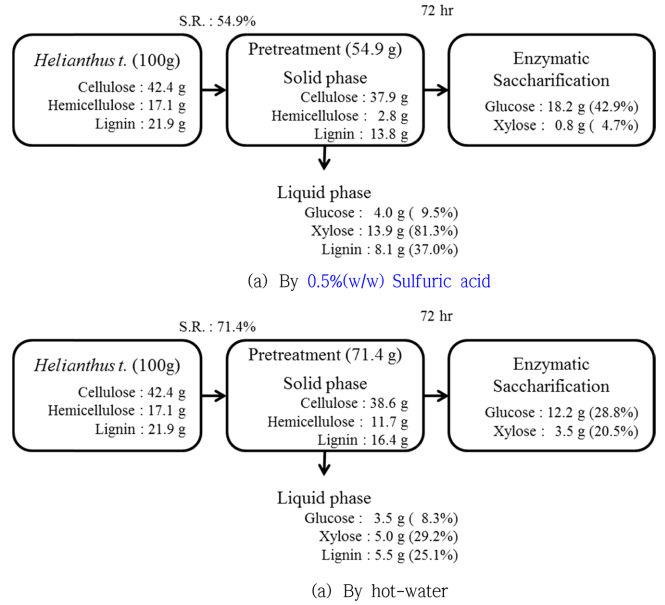


Fig. 5. Mass balance of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 169.7 °C for 20 min.

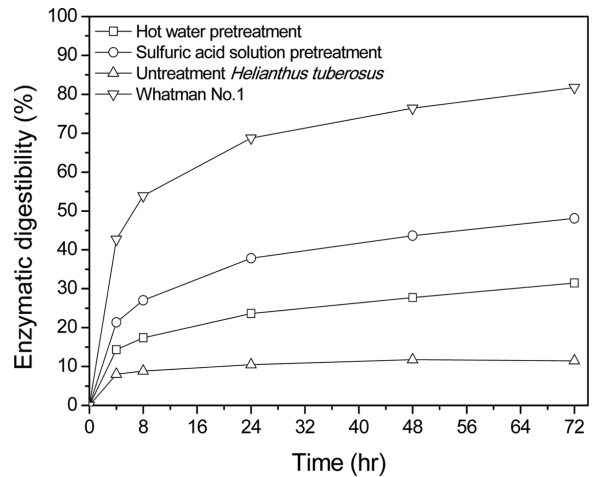


Fig. 6. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution at 169.7 °C for 20 min.

생산량 향상을 나타냈다. 그러나 암모니아수를 먼저 처리한 공정 보다는 글루코오스 생산량이 낮은 경향을 보였다. 암모니아수에 의한 탈 리그닌으로 인해 바이오매스 사이의 공간을 넓힌 후 열수에 의한 헤미셀룰로오스의 분리로 효소의 접촉 면적을 넓혀서 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 도움을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

1단계로 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간 동안 열수로 2단계 전처리를 하였다. 그리고

Table 5. The experimental conditions for two-stage pretreatment process

	Condition 1	Condition 2	Condition 3			
Solution	Aqueous ammonia	Hot water	Sulfuric acid	Hot water	Aqueous ammonia	Sulfuric acid
Concentration (%(w/w))	20	-	0.5	-	20	0.5
Temperature (°C)	163.2	163.2	169.7	169.7	163.2	169.7
Reaction time (min)	40	40	20	20	40	20

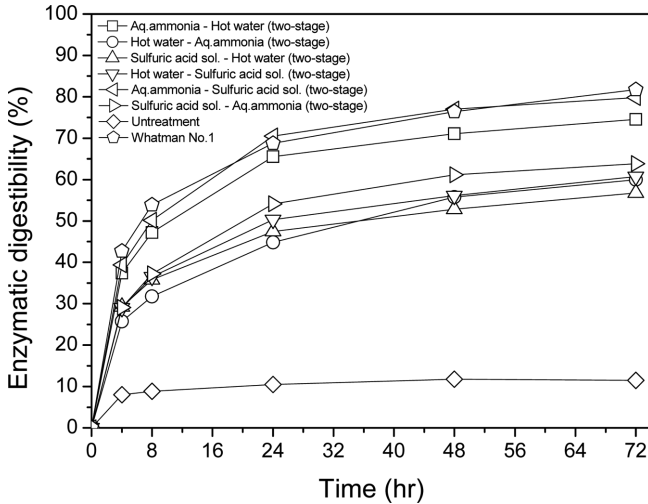


Fig. 7. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by two-stage methods.

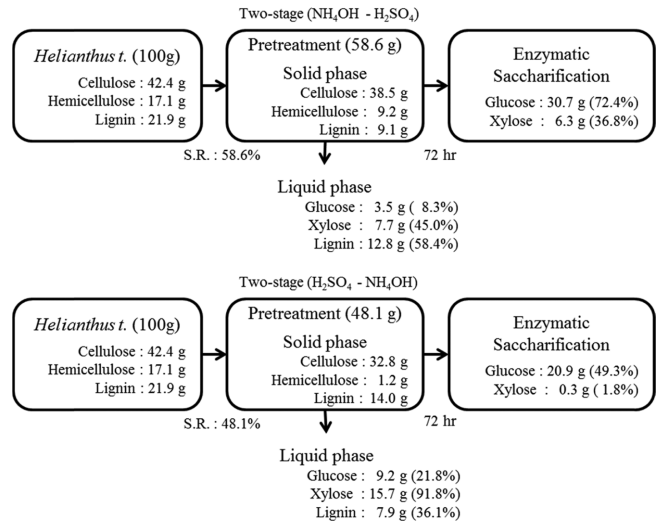


Fig. 10. Mass balance of pretreatment by 20% (w/w) Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C and 0.5% (w/w) Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7 °C.

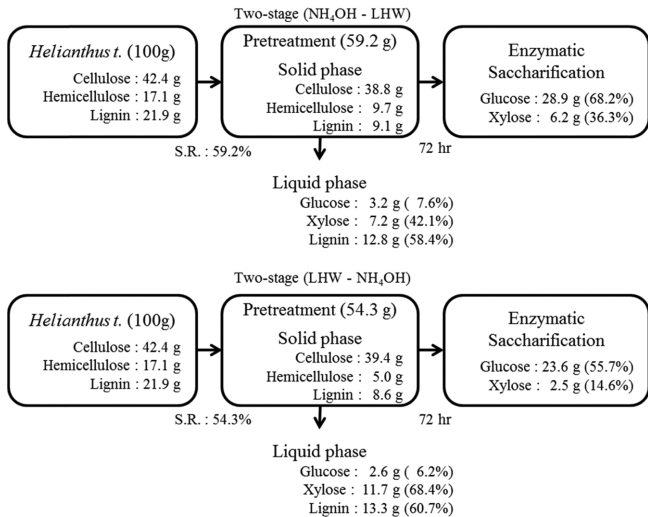


Fig. 8. Mass balance of pretreatment by 20% (w/w) Aqueous ammonia for 40 min and Hot-water for 40 min at 163.2 °C.

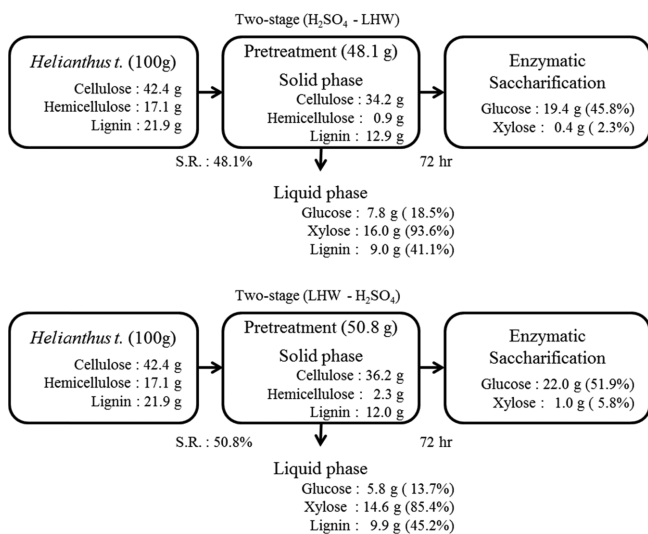


Fig. 9. Mass balance of pretreatment by 0.5% (w/w) Sulfuric acid solution for 20 min and Hot-water for 20 min at 169.7 °C.

순서를 바꾸어 전처리를 수행하였고 그 결과는 Fig. 9와 같이 물질 수지를 나타내었다. 이때 황산을 먼저 처리한 공정에서 글루코오스 생산량은 19.4 g으로 전체 바이오매스의 45.8%의 수율을 나타내었다. 황산 용액으로만 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 효소 당화율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 열수를 먼저 투입한 전처리 공정에서 글루코오스 생산량은 22.0 g으로 전체 바이오매스의 51.9%의 수율을 보였다. 돼지감자 줄기를 열수로만 전처리를 하였을 때보다 황산 용액을 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 80%의 높은 글루코오스 생산량 향상을 나타냈다. 또한 암모니아수와의 다르게 열수를 먼저 처리한 후 황산 용액을 처리한 바이오매스가 상대적으로 글루코오스 생산량이 높게 생산된 경향을 보였다.

마지막으로 암모니아수와 황산용액을 이용한 2단 전처리 공정을 수행하였다. 1단계 공정으로 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 2단계 공정으로 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 한 공정과 반대로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정에서 Fig. 10과 같이 물질 수지를 구하였다. 이때 암모니아수를 먼저 투입한 공정에서 글루코오스 생산량은 30.7 g으로 72.4%의 수율이 나타났다. 이 공정은 다른 공정 보다는 상대적으로 높은 결과를 나타내주었다. 반대로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 글루코오스 생산량이 20.9 g으로 49.3%의 수율을 보였다. 황산 용액을 먼저 처리한 2단 전처리 공정은 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리 공정에 비해 글루코오스가 약 30% 낮게 생산되었다. 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리는 효소당화의 수율을 높이는 작용을 하는 것으로 판단되었다. 암모니아수에 의한 탈 리그닌으로 인해 바이오매스 사이의 공간을 넓힌 후 황산 용액에 의해 헤미셀룰로오스가 분리되어 효소와의 접촉 면적을 넓혀서 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 큰 역할을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 그렇지만 황산 용액이 먼저 처리된 2단 전처리 바이오매스는 수율의 향상과는 크게 영향이 없는 경향을 보였다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 목질계 바이오매스인 돼지감자 줄기에 대하여 반응표면분석법을 통해 최적화 전처리 조건을 찾아보았다. 그 결과로 암모니아수에 의한 전처리에서는 20%(w/w)의 농도에서 163.2°C의 반응온도로 40분간 전처리를 하였을 때가 최적 전처리 조건으로 나타났고 황산용액에 의한 전처리에서는 0.5%(w/w)의 농도에서 169.7°C의 반응온도에서 20분간 전처리를 수행하였을 때 최적 전처리 조건인 것을 확인 하였다. 또한 각각 최적 전처리 조건으로 2단 전처리 공정에 전처리 용액의 순서를 변화시켜 적용을 시켰을 때 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리는 효소 당화의 수율을 높이는 작용을 하지만 황산 용액이 먼저 처리된 2단 전처리 바이오매스는 수율의 향상과는 크게 영향이 없음을 알 수 있었다. 효소당화의 저해요소로 작용하는 리그닌을 바이오매스에서 제거하여 바이오매스의 구조를 헐겁게 한 후 2단계로 황산 용액을 반응시켜 헤미셀룰로오스 성분을 액상으로 분별되게 하면 헤미셀룰로오스와 리그닌이 빠져나가면서 빈 공간이 만들어져 표면적의 증가로 인해 효소당화를 수행할 때 효소의 넓은 접촉 면적으로 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 도움을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

결과적으로 발효 가능한 당 생산의 효율적인 전처리 공정으로 산과 염기의 장점을 융합한 2단(NH<sub>4</sub>OH - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 침출 전처리 공정을 적용시킬 경우 효율적인 당화 공정을 유도할 수 있었다.

#### 감 사

본 연구는 환경부의 폐자원에너지화 기술개발사업(유기성폐자원 에너지화 사업단)에서 지원받았습니다. (과제번호: 201300158001)

#### References

- Kim, K. H., Tucker, M. and Nguyen, Q., "Conversion of Barkrich Biomass Mixture Into Fermentable Sugar by Two-stage Dilute Acid-catalyzed Hydrolysis," *Bioresour. Technol.*, **96**, 1249-1255 (2005).
- Lynd, L. R., Wyman, C. E. and Gerngross, T. U., "Biocommodity Engineering," *Biotechnol. Prog.*, **15**, 777-793(1999).
- Agbor, V. B., Cicek, N., Sparling, R., Berlin A. and Levin, D. B., "Biomass Pretreatment: Fundamentals Toward Application," *Biotechnology Adv.*, **29**, 675-685(2011).
- Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **121-124**, 1119-1132(2005).
- Holtzapple, M. T., Lundeen, J. E. and Sturgis, R., "Pretreatment of Lignocellulosic Municipal Solid Waste by Ammonia Fiber Explosion (AFEX)," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34/35**, 5-21(1992a).
- Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B., "Bioethanol Production From Barley Hull Using SAA(soaking in aqueous ammonia) Pretreatment," *Bioresour. Technol.*, **99**, 5694-5702(2008).
- Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Fractionation of Corn Stover by Hot Water and Aqueous Ammonia Treatment," *Bioresour. Technol.*, **97**(2), 224-232(2006).
- Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia at Moderate Temperature," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136-140**, 81-92(2007).
- Iyer, P. V., Wu, Z. W., Kim, S. B. and Lee, Y. Y., "Ammonia Recycled Percolation Process for Pretreatment of Herbaceous Biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57/58**, 121-132(1996).
- Sivers, M. V. and Zacchi, G., "A Techno-economical Comparison of Three Processes for the Production of Ethanol From Pine," *Bioresour. Technol.*, **51**, 43-52(1995).
- Mackie, K. L., Brownell, H. H., West, K. L. and Saddler, J. N., "Effect of Sulphur Dioxide and Sulphuric Acid on Steam Explosion of Aspenwood," *J. Wood Chem. Technol.*, **5**, 405-425(1985).
- Kim, J. W., Kim, K. S., Lee, J. S., Park, S. M., Cho, H. Y., Park, J. C. and Kim, J. S., "Two-stage Pretreatment of Rice Straw Using Aqueous Ammonia and Dilute Acid," *Bioresour. Technol.*, **102**, 8992-8999(2011).
- Ghose, T. K., "Measurement of Cellulase Activities," *Pure Appl. Chem.*, **59**(2), 257-268(1987).
- Adney, B. and Baker, J., "Measurement of Cellulase Activities," NREL(2008).
- Park, Y. C. and Kim, J. S., "Comparison of Various Alkaline Pretreatment Methods of Lignocellulosic Biomass," *Energy*, **47**(1), 31-35(2012).
- Kim, K. S. and Kim, J. S., "Optimization of Ammonia Percolation Process for Ethanol Production from *Miscanthus Sinensis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **48**(6), 704-711(2010).
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Bioresour. Technol.*, **90**, 39-47(2003).
- Kim, T. H., "Sequential Hydrolysis of Hemicellulose and Lignin In Lignocellulosic Biomass by Two-stage Percolation Process Using Dilute Sulfuric Acid and Ammonium Hydroxide," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(11), 2156-2162(2011).
- Murai, T., Yoshino, T., Ueda, T., Haranoya, I., Ashikari, T., Hajime, S., Yoshizumi, A. and Tanaka, A., "Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol," *J. Ferment. Bioeng.*, **86**(6), 569-572(1998).
- National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures, [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).
- Park, Y. C. and Kim, J. S., "Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Pretreated Rice Straw by Aqueous Ammonia for Bioethanol Production," *Korean Chem. Eng. Res.*, **49**(4), 470-474(2011).