

탈지미세조류의 무효소 당화를 위한 마이크로파 전처리 조건 최적화

정현진 · 민보라 · 김승기 · 조재민 · 김진우[†]

신문대학교 식품과학과
31460 충남 아산시 탕정면 신문로 221번길 70 신문대학교
(2017년 5월 28일 접수, 2017년 11월 10일 수정본 접수, 2017년 11월 21일 채택)

Optimization of Microwave-Assisted Pretreatment Conditions for Enzyme-free Hydrolysis of Lipid Extracted Microalgae

Hyun jin Jung, Bora Min, Seung Ki Kim, Jae min Jo and Jin Woo Kim[†]

Department of Food Science, Sunmoon University, 70, Sunmoon-ro 221beon-gil, Tangjeong-myeon, Asan-si, Chungcheongnam-do, 31460, Korea

(Received 28 May 2017; Received in revised form 10 November 2017; accepted 21 November 2017)

요 약

본 연구의 목적은 탈지미세조류(LEA) 세포벽 분해를 통한 바이오당 생산에 있어 당화효소 사용없이 마이크로파 전처리만을 이용하여 글루코오스와 자일로오스를 생산하는 것이다. LEA의 주성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 무효소 당화를 위해 산 가수분해 기반의 마이크로파 전처리 조건을 반응표면분석법을 이용하여 최적화하였다. 마이크로파를 이용한 무효소 당화 공정의 주요 변수는 마이크로파 출력(198~702 W), 전처리 시간(39~241 sec)와 황산 농도(0~0.1 mol)로 최적 조건 예측을 위해 중심합성계획법을 이용하여 2차 회귀함수를 도출하였다. 마이크로파 출력과 전처리 시간이 LEA로부터 육탄당(C6)과 오탄당(C5) 생산에 유의한 영향을 주는 변수이며 증가에 따라 육탄당과 오탄당 당화율이 증가하는 경향을 확인하였다. 육탄당과 오탄당 당화율 최대화를 위한 산 가수분해를 적용한 마이크로파 전처리 최적 조건은 마이크로파 출력 700 W, 전처리 시간 185.7 sec와 황산 0.48 mol으로 육탄당 당화율 92.7%와 오탄당 당화율 74.5%가 예측되었으며 확인 실험을 통해 육탄당 당화율 94.2%와 오탄당 당화율 70.8%가 확인되어 예측의 유효성을 확인할 수 있었다. 이는 LEA의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 당화를 위해 산 가수분해 적용 마이크로파 전처리만을 이용한 무효소 당화 공정 적용과 100 °C 이하의 낮은 온도와 짧은 전처리 시간 적용을 가능하여 기존 전처리 대비 효과적인 공정 임을 입증했다.

Abstract – The purpose of this study was to effectively produce the biosugar from cell wall of lipid extracted microalgae (LEA) by using microwave-assisted pretreatment without enzymatic hydrolysis process. Response surface methodology (RSM) was applied to optimization of microwave-assisted pretreatment conditions for the production of biosugar based on enzyme-free process from LEA. Microwave power (198~702 W), extraction time (39~241 sec), and sulfuric acid (0~1.0 mol) were used as independent variables for central composite design (CCD) in order to predict optimum pretreatment conditions. It was noted that the pretreatment variables that affect the production of glucose (C6) and xylose (C5) significantly have been identified as the microwave power and extraction time. Additionally, the increase in microwave power and time had led to an increase in biosugar production. The superimposed contour plot for maximizing dependent variables showed the maximum C6 (hexose) and C5 (pentose) yields of 92.7 and 74.5% were estimated by the predicted model under pretreatment condition of 700 w, 185.7 sec, and 0.48 mol, and the yields of C6 and C5 were confirmed as 94.2 and 71.8% by experimental validation, respectively. This study showed that microwave-assisted pretreatment under low temperature below 100 °C with short pretreatment time was verified to be an effective enzyme free pretreatment process for the production of biosugar from LEA compared to conventional pretreatment methods.

Key words: Microalgae, biosugar, Pretreatment, Microwave, Optimization

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: kimjw1028@sunmoon.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.

1. 서 론

오늘날 세계는 화석 연료의 과도한 사용으로 연료 고갈에 대한 우려와 함께 연소 과정에서 생성되는 이산화탄소 배출로 인한 환경 문제로 인류의 지속적인 성장이 위협받고 있다[1]. 따라서 재생 가능한 자원을 이용한 탄소 중립적인 신재생 에너지 개발을 통해 화석연료에 대한 의존도를 낮추기 위한 노력이 심도 있게 진행되고 있다[2,3]. 화석연료를 대체할 수 있는 신재생 에너지는 수력, 풍력, 태양력 그리고 바이오연료 등이 있다. 이 중 바이오연료는 광합성으로 생산된 바이오매스를 분해, 추출, 발효를 통해 생산되는 신재생 에너지로, 화석연료와 달리 바이오연료는 연소 과정 중 생산되는 이산화탄소가 광합성 과정에서 재흡수 되기 때문에, 전주기적 관점에서 보면 탄소 중립을 이룰 수 있다는 장점이 있다[4,5]. 그 중에서도 바이오디젤과 바이오알코올(에탄올과 부탄올)은 대형 운송수단의 연료인 경유와 휘발유를 대체할 수 있는 대안으로 인식되고 있다[6]. 하지만, 바이오디젤과 바이오알코올은 1세대 바이오매스인 대두, 유채, 옥수수과 카사바 등 식량자원 이용이라는 윤리적인 문제와 함께 원료 수급 불안정으로 원료가격 상승의 위험성이 높아 식량 자원과 충돌이 없는 비식용 바이오매스인 2세대와 3세대 바이오매스에 대한 관심이 높아지고 있다[7,8]. 특히, 3세대 바이오매스인 미세조류를 이용한 바이오연료 생산이 크게 주목 받고 있으며 미세조류로부터 지질 추출을 통한 바이오디젤의 상업화 진입을 앞두고 있다[9-11].

3세대 바이오매스인 해조류의 대부분은 식물 플랑크톤이라 불리는 미세조류(microalgae)와 다세포성 거대조류(macroalgae)로 나뉘는데, 그 중 미세조류는 이산화탄소 고정 능력이 뛰어나고, 단위 면적당 지질 생산량이 콩과 같은 기존 식용 자원에 비해 50~100배 이상 높으며 배양 조건에 따라 생체 내에 지질을 최대 70%까지 축적할 수 있다[12]. LEA는 미세조류로부터 바이오디젤을 생산 후, 부산물로 발생하는 유기물로 소량의 잔류 지질 외에 세포벽으로 구성되어 있어 2세대 목질계 바이오매스와 구조적으로 유사한 특징을 가지나 리그닌 함량이 낮다는 특이점이 있다. LEA의 세포벽을 이루는 주 성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 단량체인 글루코오스와 자일로오스의 고분자로 구성되어 있으며, 폐놀 단량체의 다양한 결합으로 이루어진 소량의 리그닌이 그물망 구조를 형성하여 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 외부에서 강건하게 결합 해 주는 역할을 한다[13].

목질계 바이오매스와 같이 세포벽을 가진 LEA의 경우, 전분계 바이오매스에 존재하지 않는 리그닌과 헤미셀룰로오스로 인한 강한 결합의 부분적 파괴가 필요하며, 이를 위한 고온/고압 전처리 운전 비용 발생과 고가의 설비가 필요하다[14,15]. LEA의 주요성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 분해를 통한 글루코오스와 자일로오스와 같은 바이오당 생산을 위해 외벽을 형성하고 있는 리그닌을 제거하고, 결정성 구조인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 부분적으로 분해시키는 전처리 공정을 필요로 한다. 목질계 바이오매스 전처리에 적용되는 기존 공정으로는 증기 폭쇄법, 열수 처리법, 산 처리법, 염기처리법(APEX)과 열수추출법 등이 있으며, 이 중 묽은 산을 이용한 전처리가 가장 널리 활용되고 있다[16-18]. 목질계 바이오매스의 효율적 전처리를 위해서는 고온/고압 공정 수행이 필수적이며, 전도와 대류를 바탕으로 하는 기존의 가열법이 보편적으로 이용된다. 하지만 목질계 바이오매스는 낮은 열전도율로 인해

외부로부터 효과적으로 열을 전달하기가 어려워 비균일한 가열로 인한 당의 과분해 등 공정상의 한계점이 존재한다[19]. 이러한 기존 공정의 열 전달 문제를 극복하기 위한 대체 가열방식으로 마이크로파 가열법이 식품가공 등에 널리 사용되고 있으며 목질계 바이오매스 전처리에 일부 적용된 사례가 있다. 마이크로파 가열법은 유전체를 포함하는 물질의 전기장 내 분자의 상호작용을 통해 전자기에너지를 열에너지로 변환하는 방법으로 300 MHz에서 300 GHz 범위의 전자기파로 바이오매스에 포함 된 물 분자의 쌍극자(dipole) 회전과 동시에 진동에너지를 부여하여 분자의 마찰로 발열을 유도해 내부 발열을 발생시킨다. 이는 외부 발열 방식인 재래식 가열 방식에 비해 전처리 용기 내의 모든 바이오매스가 균일하게 가열되며, 마이크로파가 극성 용매 분자에 분극화 현상을 발생시켜 높은 이온교환 능력 및 분해 능력이 형성된다는 장점이 있다[20-22].

LEA를 이용한 바이오당 생산 시, 리그닌을 선택적으로 분리하고 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 결정성을 효과적으로 감소시키기 위한 산 가수분해 적용 마이크로파 전처리 공정을 도입함으로써 LEA 적합형 전처리 공정 개발이 가능 할 것으로 보이며 이러한 마이크로파를 이용한 전처리 방법은 미세조류 전처리에 있어 일부 적용된 사례가 있으나 무효소 당화 공정에 대한 연구 사례는 수행된 바가 없어 마이크로파를 이용한 무효소 당화 공정 개발의 필요성이 높다고 하겠다. 본 연구의 목적은 산 가수분해 적용 마이크로파 전처리 공정만으로 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 단당화를 진행하여 효소당화가 생략되는 무효소 전처리 공정을 개발하는 것이다. 이를 위해, 바이오당 생산의 효율을 높일 수 있는 마이크로파 전처리법을 도입하고, 전처리 주요 인자인 전처리 시간, 마이크로파 출력과 황산 용액 농도를 최적화하여 상업화에 적용이 가능한 마이크로파를 이용한 무효소 당화 공정을 제안함에 있다.

2. 실험

2-1. 실험재료 및 시약

본 연구에서 사용한 미세조류는 인하대학교 해양바이오연구센터 실내 배양장에서 배양 된 *Tetraselmis* KCTC 12236BP의 핵산:메탄올=7:3(v/v) 추출을 이용한 탈지공정을 완료하고 잔류한 탈지미세조류를 제공받아 -20 °C 냉동 보관하여 전처리 실험의 시료로 사용하였다. 시료로 사용 직전에 60 °C 열풍건조기(FC-49, Lab house, Korea)에 넣어 잔류 수분을 제거하여 건조 무게 변화가 없을 때까지 건조하여 시료로 사용하였다. 전처리 용매는 1차 증류수와 Sigma-Aldrich 사(Sigma, St. Louis, MO, USA)와 Samchun Pure Chemical 사(Seoul, Korea)의 순도 95~98% 황산을 희석하여 사용하였다.

2-2. 전처리 조건

마이크로파를 이용한 전처리를 위해 건조 LEA 2 g과 전처리 조건에 따라 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8과 1 mol 황산 용액 20 ml를 혼합하여 고압 용기인 pressure vessel (XF100, Anton-Paar, Austria)에 넣고 전처리 조건에 따라 출력과 시간을 변화시켜 마이크로파 장치인 Anton Paar microwave (Multiwave 3000, Anton Paar, Austria)에서 전처리를 진행하였다. 전처리 후, 원심분리 하여 상등액 회수하여 필요에 따라 칼슘카보네이트(CaCO₃)로 중화시켜 당 성분 분석에 사용하였다.

2-3. 성분분석 방법

각 당 성분의 함량은 미국 신재생에너지연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory)의 표준 분석법(NREL Laboratory Analytical Procedures)에 따라 분석하였다[23,24]. 건조 LEA 0.3 g 을 황산 3 ml (72 wt%)에 넣고 30 °C에서 2시간 동안 1차 산 가수 분해하여 84 ml의 증류수를 가하여 4%로 희석한 후 121 °C에서 1 시간 동안 2차 가수분해 진행하였다. 가수분해 결과물을 칼슘카보 네이트(CaCO₃)로 중화하고 8,000 rpm에서 5분간 원심분리(Varispin 15, Hanil science, Korea)하여 상등액을 취하고 0.2 μm 실린지 필터로 여과한 후, HPLC를 이용한 당 분석(Waters 1525, Waters Co., USA)에 사용하였다. 당분석을 위한 HPLC 운전을 위해 5 mM의 황산용액을 사용하였고 0.6 ml/min의 유속으로 운전하였다. 검출기 로는 RI detector (Waters 410, Waters Co., USA)를 사용하였고, 검 출기 온도는 60 °C로 설정하였다. 주요 바이오매스를 구성하는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 당화 결과물인 글루코오스, 자일로 오스, 만노스와 아라비노스의 정량은 Aminex Column (HPX-87H, Bio-Red Inc., USA)을 사용하였고 컬럼의 온도는 60 °C로 설정하 였다.

2-4. 원소분석 방법

LEA의 무기질 조성은 주사전자 현미경(SEM: Scanning Electron Microscope, MAIA3, TESCAN, Czech)을 이용하여 입자 형상과 표면을 관찰하였으며 에너지 분산형 분광기(EDS: Energy Dispersive Spectroscopy, X-MaxN, Oxford instruments, UK)를 사용하여 물질 조성을 분석하였다. SEM/EDS 측정에 적합하도록 분말형태의 건조 된 LEA 시료를 알루미늄 원판 위에 carbon tape를 이용하여 고정시켰으며 입자 형태로 샘플을 선별하여 EDS분석 컴퓨터 프로그램인(AZtecEnergy, Oxford instruments, UK)을 사용하여 분석하 였다.

2-5. 당화율 분석

당화율의 경우 기존 NREL 표준분석법에 따라 바이오매스에 존재하는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 절대량을 단당으로 환산하였다[24]. 고체분석을 통해 계산 된 바이오매스의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스에 존재하는 단당(글루코오스와 자일로오스)의 절대 량 대비 전처리에 의해 단당화 되어 당화액에 존재하는 단당의 비 율(당수율)을 아래와 같은 식을 이용하여 계산하였다. 잔류 고체비 (solid residue)는 마이크로파 전처리 수행 후, 잔류 된 고체의 무게를 전처리 이전의 시료의 무게로 나누어 그 비율로 나타냈다. 아래 계 산에서 옥탄당 당수율 환산계수 0.9는 셀룰로오스 구성 시 글루코 오스 1단위에 물분자 1단위가 결합되어 셀룰로오스가 글루코오스로 전환될 때 물분자가 셀룰로오스 고분자에서 빠져나감으로 당수율 계산에서 물분자를 제외하여 계산하였고, 오탄당 당수율 환산계수 인 0.88은 헤미셀룰로오스 1단위 당 물분자 1개가 결합된 결정형 구조를 기반으로 산출하였다[25].

$$\text{옥탄당 당수율(\%)} = \left[\frac{\text{당화 된 당의 무게(g)} \times 0.90}{\text{셀룰로오스의 무게(g)}} \right] \times 100$$

$$\text{오탄당 당수율(\%)} = \left[\frac{\text{당화 된 당의 무게(g)} \times 0.88}{\text{셀룰로오스의 무게(g)}} \right] \times 100$$

$$\text{잔류고체비(\%)} = \left[\frac{\text{전처리 이전 고체무게(g)}}{\text{전처리 이후 고체(g)}} \times \text{무게} \right] \times 100$$

2-6. 실험 계획 및 전처리 조건 최적화

본 실험에서는 LEA 세포벽의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 부터 분해 된 바이오당인 글루코오스와 자일로오스 생산을 최대로 하는 최적 전처리 조건을 결정하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였다[26]. 중심합성계획법을 이용하여 전처리 조건에 대한 실험 계획을 진행하기 위해 Design Expert 8.0 (Stat-Ease, Inc., USA)을 이용한 계산과정을 통해 전처 리 공정에서 중요한 변수임이 확인 된 마이크로파 출력(200~600 W, X₁), 전처리 시간(20~80 sec., X₂), 황산 농도(0~1 mol, X₃)를 중 심 3반복 실험을 포함한 17개 조건에서 전처리 실험을 실시하였다 (Table 1). 또한 3개의 독립변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y)를 잔류 고체 비율, 옥탄당과 오탄당 당화율로 설정하여 아래와 같은 회귀분석을 이용하여 전처리 조건 최적화를 진행하였다.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2$$

where α₀ is the intercept; α₁, α₂, and α₃ are linear coefficients; α₁₁, α₂₂, and α₃₃ are squared coefficients; α₁₂, α₁₃, and α₂₃ are interaction coefficients.

위의 2차 회귀식을 기반으로 3가지 종속변수에 대한 전처리 특 성의 모니터링과 최적조건범위와 최대 생산 농도 예측을 각 변수의 3차원 그래프와 contour 그래프의 중첩(superimposing)을 이용하여 진행하였다.

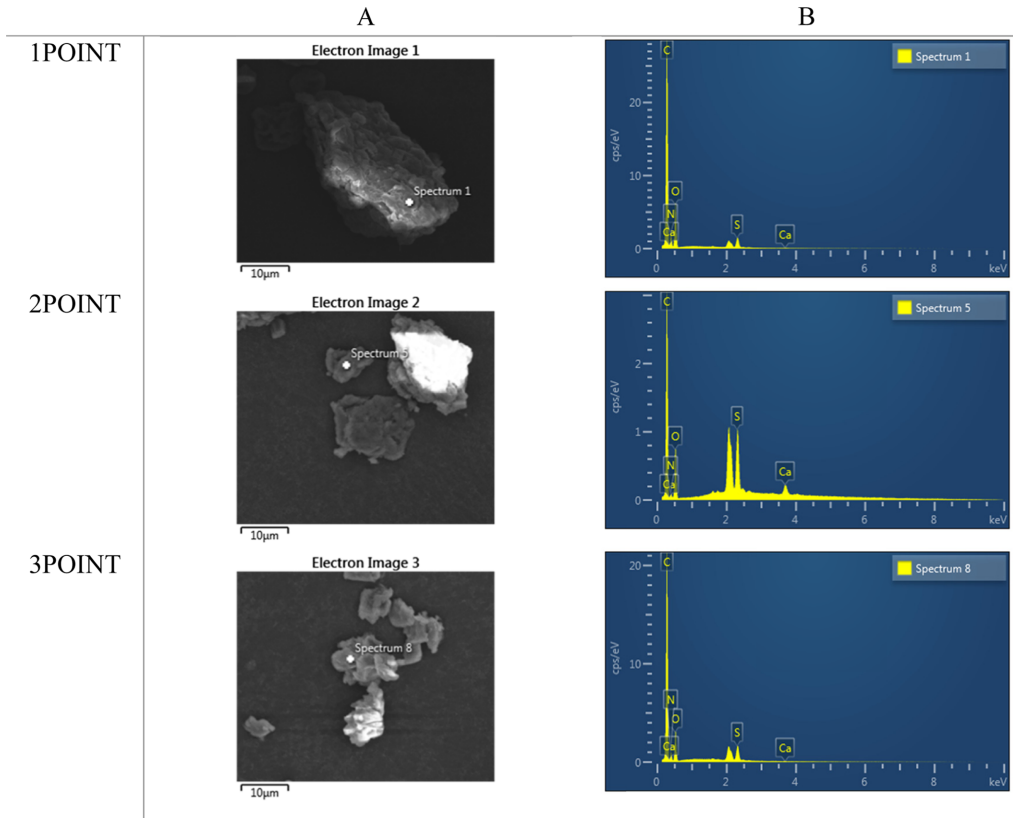
3. 결과 및 고찰

3-1. 탈지미세조류 성분분석

NREL 표준분석법으로 측정된 LEA의 구성성분은 10.8%의 셀룰로오스, 5.5%의 헤미셀룰로오스로와 리그닌 0.4%로 구성되어 있었으며 단백질 22.1%, 회분이 34.1%를 차지하고 있었다. 회분을 구성하는 무기물질을 평가를 위해 SEM/EDS법을 사용하였으며 분석결과를 (Fig. 1)에 나타냈다. 결과에서 나타난 칼슘과 산소의 상대 함량이 64.6%와 16.4%를 차지하였으며 N, S와 Ca 순으로 함량 비율을 보였다(Table 2). 칼슘 함량이 높은 것은 미세조류를 포함한 해조류가 광합성에 필요한 탄소를 탄산칼슘 형태로 저장함에 기인 한다고 예상할 수 있으며, 산소 비율이 높은 것은 산소가 무기질인 규소와 칼슘과 결합하여 이산화규소와 산화칼슘 형태로 고정되어

Table 1. Experimental design of microwave-assisted pretreatment conditions for the production of C6 and C5 with enzyme-free hydrolysis

Variables	Coded and actual level				
	-1.68	-1	0	+1	+1.68
X ₁ Power (W)	198	300	450	600	702
X ₂ Time (sec)	39	80	140	200	241
X ₃ Sulfuric acid Conc. (mol)	0	0.2	0.5	0.8	1.0



A: SEM image; B: EDS spectrum of complete element distribution; images

Fig. 1. SEM image and EDS spectrum/data showing the mineral composition found at the surface of LEA. A: SEM image; B: EDS spectrum of complete element distribution; images.extracted microalgae.

Table 2. Mineral analysis of LEA using energy dispersive spectroscopy (EDS)

Element	Point 1 (wt%)	Point 2 (wt%)	Point 3 (wt%)	Average (wt%)
C	58.8	68.3	66.6	64.6±5.0
N	15.6	12.0	11.7	9.8±2.2
O	21.4	12.6	15.3	16.4±4.5
S	4.0	12.8	6.4	7.7±4.5
Ca	0.13	4.3	0.16	1.5±2.4

Quantitative analysis using EDS-based procedure which allows to identify what particular elements are and their relative proportions. Each element was measured at three different examine points.

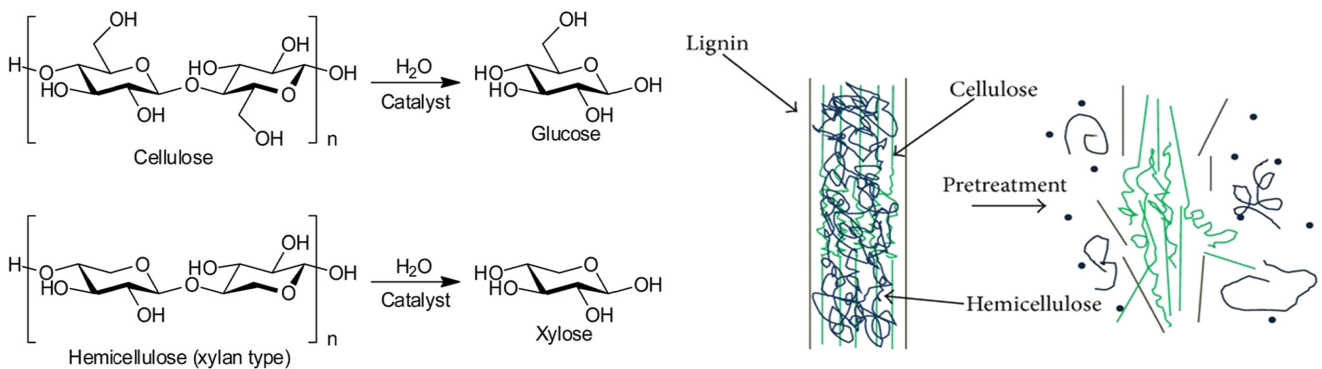


Fig. 2. Structure of cellulose and hemicellulose and schematic of goals of pretreatment on lignocellulosic material [29].

각각 존재하기 때문이라 보고되고 있다[27,28].

일반적으로 목질계 리그노셀룰로오스의 구조는 Fig. 2와 같다. 구성성분을 이루는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 효소 또는 화

학적 분해에 의해 각각 글루코오스와 자일로오스 등의 바이오당으로 전환 될 수 있으나 구조가 강건한 리그닌에 의해 둘러싸여 있어 효소 접근성 제한으로 바이오당 생산이 저해된다. 그러므로 목질계

바이오매스로부터 바이오당 생산을 위해서는 리그닌을 제거하여 효소의 접근성을 향상시키는 동시에 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 부분적으로 분해시켜 효소에 의한 당화를 용이하게 하는 전처리 과정이 필수적이다[29]. LEA의 경우 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 함량이 각각 10.7%와 5.5%로 목질계 대비 1/2~1/3 수준임을 확인할 수 있었다. 또한, LEA의 리그닌 함량이 0.4%로 매우 낮은 것을 알 수 있는데 바이오디젤 추출 공정 중 탈지를 위해 사용된 벤젠과 같은 유기용매에 의해 소수성 성분인 리그닌이 대부분 제거되었기 때문이라 예상할 수 있었다. LEA의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 함량이 낮아 바이오당 생산 시 목질계 바이오매스 대비 바이오당 생산량이 낮을 것으로 보이나 낮은 리그닌 함량으로 세포벽의 강건도가 떨어져 당화가 용이한 장점을 지닌다. 낮은 리그닌 함량은 전처리-당화 공정의 단순화를 가능케하여 전처리만으로 바이오당을 생산하는 무효소 당화 공정 구성이 가능할 수 있다.

3-2. 마이크로파 전처리 조건 최적화

내부 가열 방식인 마이크로파 전처리는 기존의 전도/대류 가열에 비해 바이오매스 내부와 외부에 효과적으로 에너지를 전달하여 전처리 바이오매스 전체에 균일하고 빠른 가열 효과를 얻을 수 있어 식품 건조 등 다양한 용도로 활용된다. 특히 마이크로파를 이용한 건조에 있어 기존의 가열법에 비해 공정 시간이 1/2~1/100로 획기적인 단축이 가능하다고 알려져 있다[30]. 마이크로파를 이용한 LEA로부터 바이오당 생산을 최대화하기 위한 전처리 조건 도출을 위해, 황산을 이용한 약산 전처리에 영향을 미치는 주요변수를 반응표면분석법을 사용하여 최적화하였다. 마이크로파 전처리 시 주요변수와 실험 구간 설정은 예비 실험 결과를 통해 선정하였다. 또한 반응표면분석법을 이용한 공정조건 최적화에서 종속변수인 잔

류 고체량과 바이오당(육탄당, 오탄당) 생산에 미치는 독립변수인 마이크로파 출력, 전처리 시간 및 황산농도의 영향을 중심합성계획법에 의한 17개 조건을 이용하여 평가하였다(Table 3). 실험에 적용된 전처리 조건에 따른 결과값의 통계적인 유의성 ANOVA로 평가하였고, 2차 회귀방정식 도출을 위해 유의성이 인정되는 변수만을 채택하여 각 종속변수 별 모델을 설정한 후 반응표면분석법에 의해 최적조건을 탐색하였다. 독립변수 X_1 (마이크로파 출력), X_2 (전처리 시간)과 X_3 (황산농도)에 대한 종속변수 Y_1 (잔류고체), Y_2 (육탄당)와 Y_3 (오탄당)을 포함하는 2차회귀방정식은 아래와 같다(Table 4).

Table 5의 ANOVA표에서 나타내는 바와 같이 p와 F 값은 각 계수의 유의성과 모델의 적합성을 판단하는 지표로 사용된다[31]. 잔류고체에 미치는 독립변수의 영향 평가를 하였을 때, 마이크로파 출력 450 W, 전처리 시간 240 sec과 황산농도 0.5 mol에서 가장 낮은 잔류고체량인 10.3%를 보였다. 이는 상기와 같은 조건에서 LEA 세포벽의 리그노셀룰로오스의 분해가 많아 LEA 고체성분의 손실이 많았다는 결과를 보였다(Table 3). 잔류고체량에 있어 출력과 전처리 시간이 잔류고체량에 미치는 영향이 매우 유의함($p=0.0013$)을 알 수 있었으나 황산농도의 영향은 유의하지 않은 것으로 평가되었다($p=0.4176$). 육탄당과 오탄당 당화율에 있어 유의성이 인정되지 않는 X_2^2 과 X_1^2 의 영향을 2차 회귀함수에서 제외하였을 때, 육탄당의 마이크로파 출력과 전처리 시간의 F값이 각각 13.21과 7.70로 계산되었다. 오탄당은 각각 15.75과 7.27로 유의한 영향($p<0.05$)이 있음을 확인할 수 있었으나 잔류고체량에서 보는 바와 같이 황산농도는 육탄당과 오탄당 당화율에 미치는 영향이 유의하지 않음이 확인되었다($p>0.1$). 각각의 반응표면분석 결과 반응 회귀식에 대한 결정계수(R^2)는 0.94, 0.82와 0.84로 계산되었는데, 이는 실험값과 회귀함수에 의한 예측값이 실제 실험값과 82%이상 적

Table 3. Values of independent variables and pretreatment conditions by central composite design

Run No	X_1	X_2	X_3	Solid remaining (%)	C6 hydrolysis (%)	C5 hydrolysis (%)
1	300	80	0.2	69.9	1.2	1.7
2	600	80	0.2	61.3	8.1	8.4
3	300	200	0.2	68.5	1.1	1.4
4	600	200	0.2	17.1	5.1	3.9
5	300	80	0.8	64.7	1.1	1.5
6	600	80	0.8	73.1	12.1	11.9
7	300	200	0.8	69.9	1.6	2.1
8	600	200	0.8	22.1	96.0	81.7
9	198	140	0.5	69.0	2.5	3.2
10	702	140	0.5	16.8	93.2	74.9
11	450	39	0.5	64.5	7.9	8.9
12	450	241	0.5	10.3	81.5	58.7
13	450	140	0	57.2	1.7	2.6
14	450	140	1.0	63.9	13.8	13.3
15	450	140	0.5	55.1	30.2	28.4
16	450	140	0.5	53.2	36.9	33.8
17	450	140	0.5	55.3	26.2	25.2

X_1 : Power; X_2 : Time; X_3 : Sulfuric acid concentration

Table 4. Polynomial equation calculated by BSM program for extraction of LEA

Response	Second order polynomials	R^2	Significance
Solid remaining (%)	$Y_{SR}=53.9-13.7\chi_1-13.4\chi_2+1.8\chi_3-12.4\chi_1\chi_2+2.6\chi_1\chi_3-0.031\chi_2\chi_3-2.04\chi_1^2-3.99\chi_2^2+4.21\chi_3^2$	0.9443	0.0013
C6 hydrolysis (%)	$Y_{C6}=33.4+19.7\chi_1-15.0\chi_2+8.5\chi_3-10.1\chi_1\chi_2+11.8\chi_1\chi_3+10.9\chi_2\chi_3+1.71\chi_1^2-12.9\chi_3^2$	0.8183	0.0239
C5 hydrolysis (%)	$Y_{C5}=30.8+16.1\chi_1+10.9\chi_2+7.3\chi_3+8.1\chi_1\chi_2+10.1\chi_1\chi_3+9.4\chi_2\chi_3-1.37\chi_2^2-10.2\chi_3^2$	0.8384	0.0158

χ_1 : Power; χ_2 : Time; χ_3 : Sulfuric acid concentration

Table 5. Analysis of variance (ANOVA) for solid remaining, C6 hydrolysis, and C5 hydrolysis

	Solid Remaining			C6			C5		
	Sum of Squares	F value	p value	Sum of Squares	F value	p value	Sum of Squares	F value	p value
Model	6927.51	13.18	0.0013	14419.14	4.50	0.0239	9336.73	5.19	0.0158
X ₁	2567.35	43.97	0.0003	5288.64	13.21	0.0066	3542.13	15.75	0.0041
X ₂	2445.45	41.88	0.0003	3081.53	7.70	0.0241	1634.40	7.27	0.0272
X ₃	43.31	0.74	0.4176	975.05	244	0.1572	725.45	3.23	0.1102
X ₁ X ₂	1222.90	20.94	0.0026	810.77	2.03	0.1925	530.06	2.36	0.1633
X ₁ X ₃	54.03	0.93	0.3681	1115.60	2.79	0.1336	816.83	3.63	0.0931
X ₂ X ₃	0.0078	0.0078	0.9911	957.96	2.39	0.1604	707.01	3.14	0.1141
X ₁ ²	46.69	0.80	0.4009	36.25	0.091	0.7711	-	-	-
X ₂ ²	179.18	3.07	0.1233	-	-	-	23.05	0.10	0.7571
X ₃ ²	199.85	3.42	0.1068	1919.18	4.80	0.0599	1366.93	6.08	0.0390

X₁: Power; X₂: Time; X₃: Sulfuric acid concentration

합성이 있음을 보여준다. 중심합성계획법에 의해 도출된 2차회귀 방정식의 1차항의 계수를 비교하면, 육탄당과 오탄당 당화율의 출력(X₁)과 전처리 시간(X₂)의 계수가 모두 양수임을 감안할 때 바이오매스 생산은 출력과 전처리 시간이 증가함에 따라 비례하여 유의하게 증가함(p<0.05)을 예상할 수 있었으며, 잔류고체량은 음의 계수를 가져 두 개의 독립변수 증가에 따라 유의하게 감소한다는 함을 확인할 수 있었다(p<0.05). 종속변수에 미치는 각 독립변수들의 영향을 Fig. 3에서 시각화 했을 때, 잔류고체량은 출력과 시간에 따라 비례하여 감소하지만 황산의 농도변화에 따른 잔류고체량의 증가와 감소 경향성은 확인할 수 없었다(Fig. 3-A). 육탄당과 오탄당 당화율의 경우 Fig. 3-B와 3-C에서 보는 바와 같이 출력과 시간에 따라 당화율이 비례하여 증가하는 경향을 보이며 출력이 시간에 비해 더 큰 영향이 있음을 확인할 수 있었다. 이는 산을 이용한 전처리에 있어 바이오매스의 주요성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌의 가수분해로 육탄당과 오탄당이 분해되어 액체상으로 이동함에 따라 바이오매스의 질량이 감소한 것으로 보인다. 마이크로파와 전처리 시간 증가에 따라 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 분해 증가에 따라 당당화가 가속되어 잔류고체량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 전처리 조건이 고온이고 시간이 길어짐에 따라 세포벽 구성 성분의 저분자화 진행 속도가 증가되며 이에 따라 잔류고체량이 감소한다는 기존의 연구 내용과 일치한다[32].

잔류고체량, 육탄당과 오탄당 당화율에 미치는 전처리 조건의 상호영향을 평가하고자 반응표면법을 이용하여 두 인자 간의 영향을 평가하였다. Fig. 4-A는 LEA의 마이크로파 전처리 시 황산농도를 0.5 mol로 고정하여 전처리를 진행할 경우 잔류고체량에 미치는 마이크로파 출력과 전처리 시간의 영향을 나타낸다. Fig. 4-A에서 보는 바와 같이, 잔류고체량은 마이크로파의 출력이 낮고 전처리 시간이 짧을 때 60.2%로 감소폭이 크지 않았으나, 출력과 전처리 시간이 증가함에 따라 잔류고체량이 급속히 감소하여 572 W과 224 sec 이상 조건에서 전처리 후 잔류하는 고체가 없는 결과를 보였다. 이는 LEA 고체성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스가 높은 출력과 긴 전처리 조건에서 빠르게 당당화되어 당화액으로 이동되기 때문에 잔류 고체가 0%에 가까운 결과를 보였다. 잔류고체량 변화에 황산 농도가 미치는 영향을 평가하였을 때, 황산농도는 출력과 시간의 상호작용에 있어서도 잔류고체량 감소에 큰 영향이 없는 것으로 나타났다(Fig. 4-B, Fig. 4-C). 이는 LEA의 탈지과정에서 황산과 유기용매를 이용한 추출이 선행되어 황산에 의한 세포벽 분해가 수행

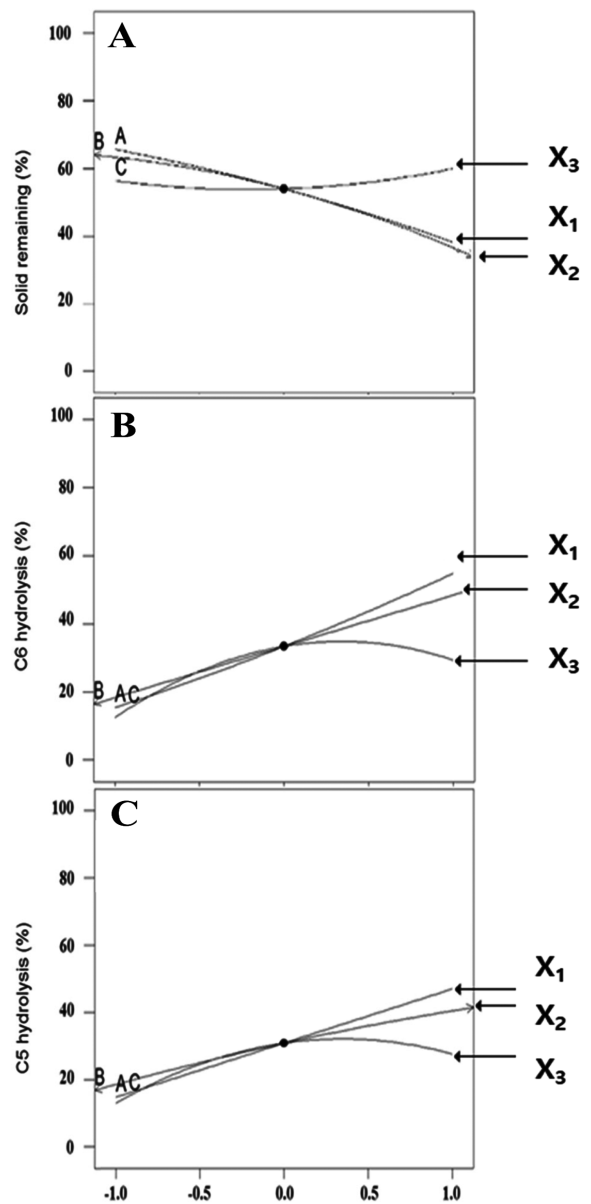


Fig. 3. Effects of independent variables on solid remaining (Fig. 3-A), C6 hydrolysis (Fig. 3-B), and C5 hydrolysis (Fig. 3-C). Each level of variable was expressed as the code values. (X₁): Microwave-power; (X₂): extraction time (Sec.); (X₃): sulfuric acid concentration (mol).

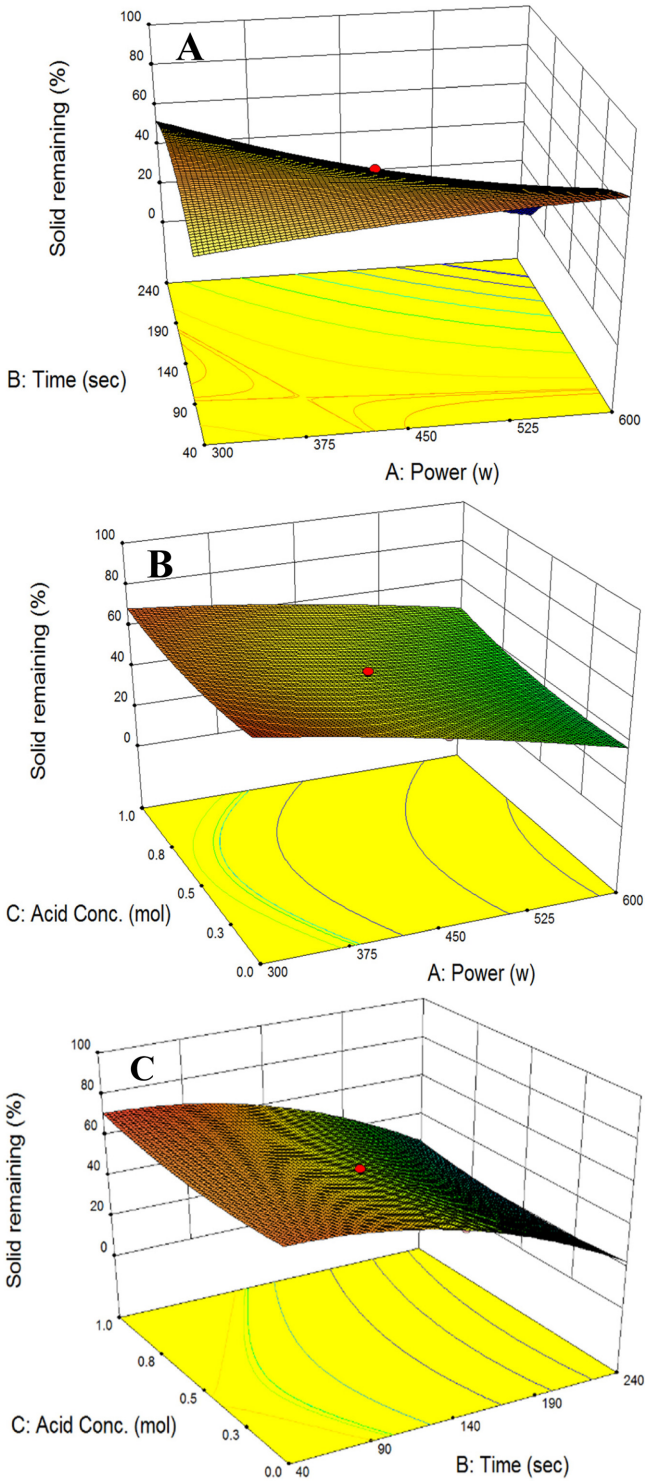


Fig. 4. Response surface plot for solid remaining from microwave extraction of lipid extracted microalgae.

되었던 이유로 전처리 과정에서 첨가한 황산에 의한 추가적인 세포벽 분해 효과가 크지 않은 것을 알 수 있다.

Fig. 5은 황산농도를 0.5 mol로 고정하였을 때, LEA로부터 마이크로파 출력과 전처리 시간 변화에 따른 바이오당(오탄당과 육탄당)의 생산을 보여준다. 출력과 전처리 시간이 각각 300 W와 40 sec 조건에서 오탄당 당화율이 6.3%로 매우 낮았다. 반면 두 변수의 증가에 따라

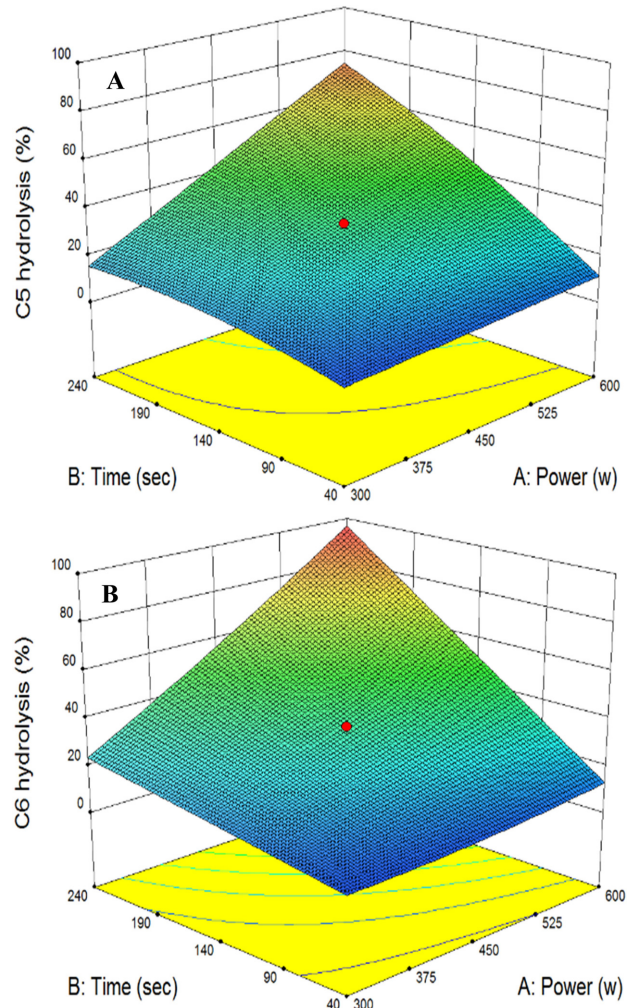


Fig. 5. Relative effects of microwave power and extraction time on C6 (Fig. 5-A) and C5 (Fig. 5-B) hydrolysis from microwave extraction of lipid extracted microalgae.

오탄당 당화율이 빠르게 증가하여 최대 당화율인 74.8%를 확보할 수 있었다(Fig. 5-A). 육탄당 당화에 있어서도 오탄당과 유사한 결과를 보였는데, 출력과 전처리 시간의 조합이 300 W와 40 sec 조건인 상태에서 육탄당 당화율이 7.3%로 매우 낮았으며, 출력과 시간의 증가에 따라 당화율이 급격하게 증가하여 최대 95.4%에 도달하였다(Fig. 5-B). 이는 셀룰로오스 분해를 통한 육탄당 생산 시, 마이크로파와 전처리 시간의 증가에 따른 상승효과가 크기 때문에 효과적인 당화를 위해서는 두 변수의 동시 증가가 필요하다는 결론을 얻을 수 있었다. 이는 마이크로파를 이용한 바이오당 산당화에 있어 출력과 전처리 시간이 충분치 않을 때 바이오매스에 전달된 에너지의 총량이 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 β -1,4 결합 분해에 충분하지 못한 것으로 판단된다. 또한 마이크로파 출력과 시간의 증가에 따라 세포벽의 리그노셀룰로오스 내부의 분자 운동의 증가에 따라 열 발생량이 증가하여 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 가수분해가 가속화 되었음을 예상할 수 있다. 본 실험에서 확인된 바와 같이, LEA의 마이크로파를 이용한 당화 시 산당화 만으로도 육탄당 95.4%와 오탄당 74.8%의 높은 당화율을 얻을 수 있어 효소당화가 필요 없는 무효소 당화 공정 구성이 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다.

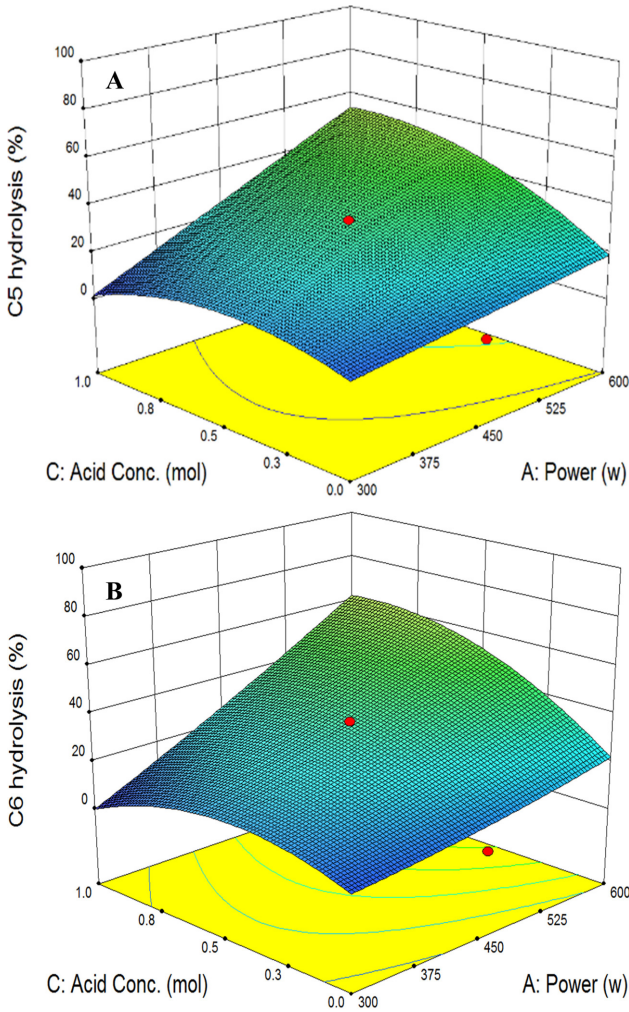


Fig. 6. Relative effects of microwave power and sulfuric acid concentration on C6 (Fig. 6-A) and C5 (Fig. 6-B) hydrolysis from microwave extraction of lipid extracted microalgae.

탈지미세로류로부터 마이크로파를 이용한 오탄당과 육탄당 생산에 있어 마이크로파 출력과 황산농도의 영향을 확인하기 위해 마이크로파 출력을 140 W로 고정하여 상관관계를 살펴보았다. Fig. 6-A와 Fig. 6-B에 나타난 바와 같이 출력과 산농도에 따른 오탄당과 육탄당의 당화율 경향은 매우 유사한 것으로 보이나 육탄당 당화율이 보다 높은 것으로 보이며, 황산농도보다는 출력에 보다 민감하게 변화하는 것을 알 수 있다. 오탄당과 육탄당 모두에서 출력 증가에 따라 당화율이 증가함을 확인할 수 있으나 황산 농도 변화에 따른 당화율의 변화는 완만한 곡선 형태를 보이며 황산 0.5~0.8 mol 부근에서 최대값을 가짐을 확인할 수 있었다. 이는 황산농도 증가에 따라 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 가수분해가 촉진되어 오탄당과 육탄당의 당화율이 증가하나 일정 농도 이상에서 생산된 당은 과분해로 인해 프르프릴(furfural)과 HMF (Hydromethylfurfural)로 전환되어 오탄당과 육탄당의 농도가 감소한다고 볼 수 있었다[33,34]. 동일 조건에서 육탄당과 오탄당의 당화율을 비교했을 때 육탄당의 당화율이 60.2%로 오탄당의 당화율 53.9%에 비해 높음을 확인할 수 있는데 이는 마이크로파를 이용한 전처리에 있어 셀룰로오스가 헤미셀룰로오스에 비해 분해가 용이해 육탄당의 당화율이 높다고 볼 수 있었다. 하지만 일반적으로 산을 이용한 전처리에 있어 헤미

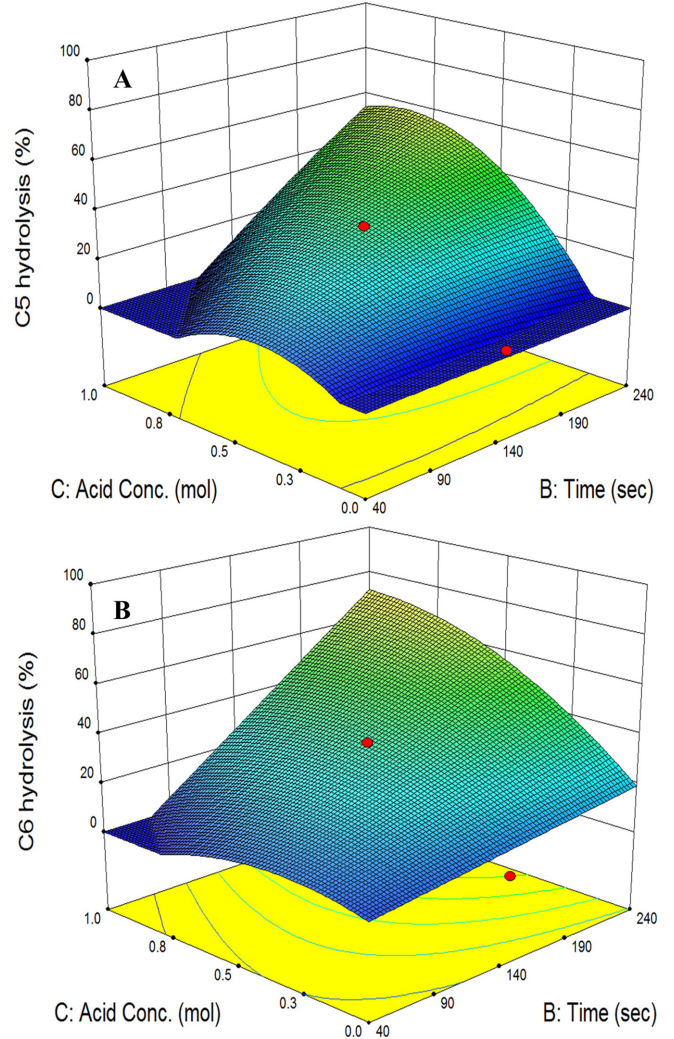


Fig. 7. Relative effects of extraction time and sulfuric acid concentration on C6 (Fig. 7-A) and C5 (Fig. 7-B) hydrolysis from microwave extraction of lipid extracted microalgae.

셀룰로오스의 단당화 결과물인 자일로오스의 과분해가 발생하여 프르프릴 생산에 의해 당화율이 감소할 가능성도 함께 예상 할 수 있었다.

한편 황산농도와 전처리 시간과의 상관관계 평가를 위해 마이크로파 출력을 450 W에 고정한 후 표면반응그래프를 이용하여 오탄당과 육탄당 당화율을 나타냈다(Fig. 7). 오탄당 당화에 있어서 전처리 시간 증가에 따른 당화율 증가가 발생하였으며 황산농도가 일정 수준까지 증가함에 따라 당화율이 증가하나 이후에 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 7-A). 육탄당 당화에 있어서 시간과 황산농도의 증가에 따라 당화율이 증가하는 경향을 보여 1.0 mol과 240 sec 조건에서 최대 당화율인 68.3%를 얻을 수 있었다(Fig. 7-B). 위의 두 가지 결과에 있어 황산농도 증가에 따라 육탄당의 과분해 영향은 크지 않은 것으로 보이나 오탄당의 과분해에 대한 가능성이 보다 큰 것으로 확인되었다. 동일한 전처리 조건(600 W, 240 sec)에서 황산 0과 1.0 mol을 각각 첨가하여 전처리 실험을 통해 생산된 프르프릴의 농도를 HPLC를 이용한 정량 결과 황산 첨가가 없을 경우 프르프릴과 HMF의 생산이 없었으나 1.0 mol 첨가에서는 HMF 0.42 g/L 확인되어 황산농도가 0.8 mol 이상에서 글루코오스가

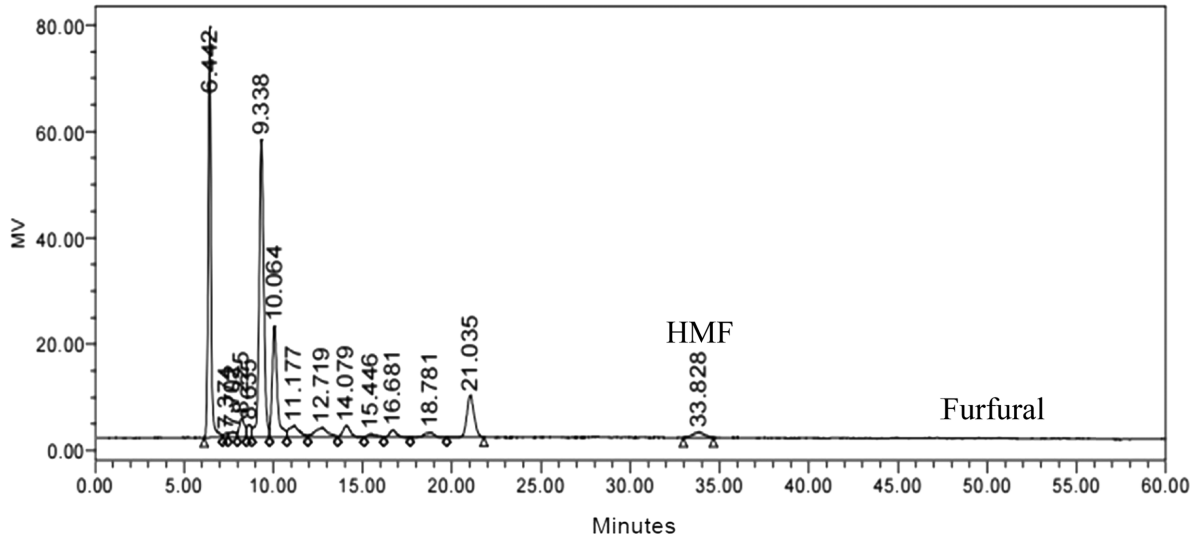


Fig. 8. HPLC chromatograms of furfural and HMF from supernatant from microwave-assisted extraction of lipid extracted microalgae with addition of 0,1 M sulfuric acid.

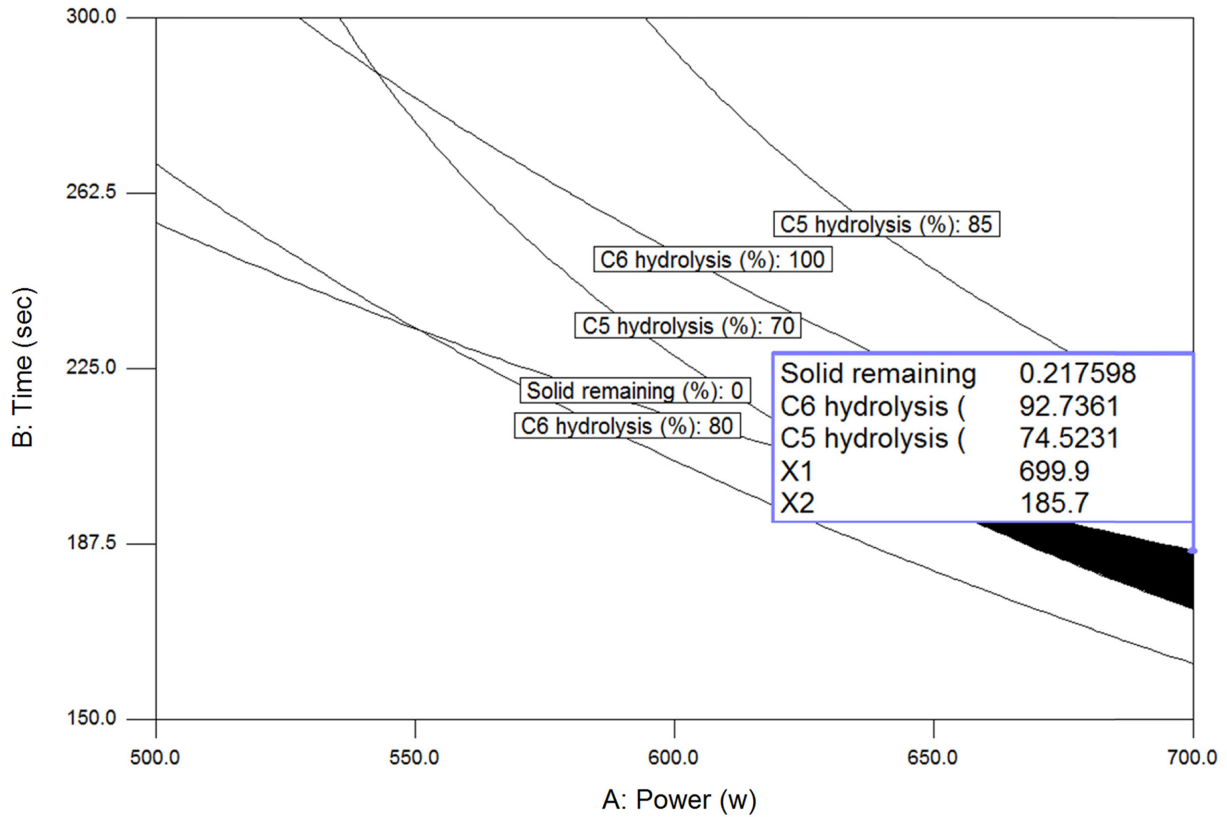


Fig. 9. Super imposing contour maps of C6 and C5 hydrolysis for the optimization of microwave assisted pretreatment from lipid extracted microalgae.

HMF로 미량 분해 됨을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 반면, 프르프릴의 생산은 확인되지 않았는데 이는 자일로스로부터 생산된 프르프릴이 분해과정을 거쳐 유기산(말릭산, 개미산 등)등으로 분해되는 과정을 거쳐 중간 산물인 프르프릴의 농도가 낮아졌기 때문으로 예상된다. 목질계 바이오매스를 이용한 바이오당 생산에 있어 약산 전처리 조건에 따른 글루코오스와 자일로오스의 과분해물 생산에 대한 많은 연구가 진행되었는데 산농도가 증가할수록 바이오당 생

산이 증가하나 일정수준(>1 mol)이상에서는 당농도가 다시 감소한다고 알려져 있다. 이는 생산된 글루코오스와 자일로오스의 산성 조건에서 열 안정성이 약해 분해과정을 거쳐 발효와 당화 저해 물질인 HMF와 프르프릴로 각각 과분해되어 바이오당 생산 수율을 감소시키는 동시에 발효 수율을 저하시킬 우려가 있다고 보고되어 전처리 공정에 있어 과분해를 방지하기 위한 전처리 조건 탐색이 중요하다 알려져 있다[35].

3-3. 최적 전처리 조건 예측 및 검증

마이크로파를 이용한 최적 전처리조건을 도출하기 위해 LEA로부터 전처리를 통해 생산되는 옥탄당과 오탄당 당화율의 반응표면을 superimposing 하여 Fig. 9에 나타내었다. 각 옥탄당과 오탄당의 독립 최적조건으로 도출된 최대값의 반응표면을 중복시켜 공통되는 부분의 독립변수의 범위를 최적 전처리 조건 범위로 결정하였다. LEA로부터 옥탄당(당화율 80~100%)과 오탄당(당화율 70~85%) 생산을 만족하는 마이크로파 전처리 조건은 출력 639~700 W와 전처리 시간 186~202 sec로 나타났으며 이로부터 예상되는 최적 전처리 조건은 출력 700 W, 전처리 시간 185.7 sec와 황산 0.48 mol로 최대 옥탄당 당화율 92.7%와 오탄당 당화율 74.5%가 예측되었다. 예측된 최적 조건의 검증을 위해 위의 조건에서 마이크로파 전처리 실험을 수행하였을 때, 옥탄당 당화율 94.2%와 오탄당 당화율 70.8%를 실험값으로 확인할 수 있어 2차 회귀함수에 의한 최적화와 예측이 유효함을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 바이오디젤 생산의 부산물인 LEA의 세포벽의 주 성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 마이크로파 전처리를 이용하여 바이오당 생산이 가능한 무효소 당화공정을 개발함에 있다. 바이오당의 생산성 증대를 위하여 반응표면분석법을 이용한 LEA의 무효소 전처리 공정의 특성을 모니터링 하여 최적의 전처리 조건을 예측하였을 때, 마이크로파를 이용한 무효소 전처리 공정에서 공정에 유의한 영향을 주는 변수가 마이크로파 출력과 전처리 시간을 확인할 수 있었다. 목질계와 달리 LEA는 마이크로파 전처리만을 적용하여 높은 당화율(옥탄당 94.2%, 오탄당 70.8%)을 확보할 수 있었다. 마이크로파를 이용한 LEA의 무효소 전처리로 생산된 바이오당을 활용하여 바이오연료 및 바이오케미칼을 생산할 수 있으며, 이를 통해 부산물 부가가치를 확보하고 미세조류 바이오디젤의 가격 경쟁력을 높일 수 있을 것으로 보인다. 또한 마이크로파를 이용한 무효소 당화 공정 개발을 통해 LEA 이외에 미세조류 및 거대조류에 적용이 가능한 기술로 기존 목질계 대비 보다 효과적이고 경제적인 바이오당 생산이 가능함을 확인하였다.

References

- Lee, J. S., "Status and Prospects of Cellulosic Ethanol R&D," *Korean Ind. Chem. News.*, **16**(2), 38-48(2013).
- Choi, K. S., Ryu, J. H., Park, D. J., Oh, S. C. and Kwak, H., "Lipid Extraction from *Nannochloropsis* sp. Microalgae for Biodiesel Production Using Supercritical Carbon Dioxide," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(2), 205-210(2015).
- Yusuf, C., "Biodiesel from Microalgae," *Biotechnol. Adv.*, **25**, 294-306(2007).
- 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).
- Demirbas, A., "Political, Economic and Environmental Impacts of Biofuels. A Review," *Appl. Energy*, **86**, 108-117(2009).
- Zhu, L. D., Hiltunen, E., Antila, E., Zhong, J. J., Yuan, Z. H. and Wang, Z. M., "Microalgal Biofuels: Flexible Bioenergies for Sustain-

- able Development," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **30**, 1035-1046(2014).
- Yoo, S. J., Oh, S. K. and Lee, J. M., "Sensitivity Analysis with Optimal Input Design and Model Predictive Control for Microalgal Bioreactor Systems," *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**, 87-92(2013).
- Kim, J. T., Ahn, D. G., Park, J. R., Park, J. W. and Jeong, S. H., "Recent Trends of the Development of Photobioreactors to Cultivate Microalgae," *J. Korean Soc. Prec. Eng.*, **28**, 125-132(2011).
- Antonio, D. L. H., Angel, D. O. and andrés, M., "Microwaves in Organic Synthesis. Thermal and Non-thermal Microwave Effects," *Chem. Soc. Rev.*, **34**, 164-168(2005).
- Hu, Z. H. and Wen, Z. Y., "Enhancing Enzymatic Digestibility of Switchgrass by Microwave-assisted Alkali Pretreatment," *Biochem, Eng. J.*, **38**, 369-378(2008).
- Lee, S. M., Choi, I. S., Kim, S. K. and Lee, J. H., "Production of Bio-ethanol from Brown Algae by Enzymic Hydrolysis," *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 483-488(2009).
- Park, J. Y., Lee, G. A., Kim, K. T., Kim, K. Y., Choi, S. A., Jung, M. J. and Oh, Y. K., "Microalgal Oil Recovery by Solvent Extraction from *Nannochloropsis Oceanica*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 88-91(2014).
- Gomez, L. D., Steele-King, C. and McQueen-Mason, S. J., "Sustainable Liquid Biofuels from Biomass: the Writing's on the Walls," *New Phytologist.*, **178**, 473-485(2008).
- Nigam, P. S. and Singh, A., "Production of Liquid Biofuels from Renewable Resources," *Prog. energy comb. Sci.*, **37**, 52-68(2011).
- Singh, A., Nigam, P. S. and Murphy, J. D., "Renewable Fuels from Algae: An Answer to Debatable Land Based Fuels," *Bioresour. Technol.*, **102**, 10-16(2011).
- Johan, B. Ragna, P. and Folke, T., "Enhanced Enzymatic Conversion of Softwood Lignocellulose by Poly(ethylene glycol) Addition," *Enz. Microb. Technol.*, **40**, 754-762(2007).
- Yoshida, M., Liu, Y., Uchida, S., Kawarada, K., Ukagami, Y., Ichinose, H., Kaneko, S. and Fukuda, K., "Effects of Cellulose Crystallinity, Hemicellulose, and Lignin on the enzymatic hydrolysis of *Miscanthus sinensis* to monosaccharides," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 805-810(2008).
- Balata, M., Balata, H. and Cahide, Oz., "Progress in Bioethanol Processing," *Prog. Energy Comb. Sci.*, **34**, 551-573(2008).
- Cha, H. R., In, Y. S. and Kim, S. K., "Bioethanol Production from Macroalgal Biomass," *J. Life Sci.*, **26**, 976-982(2016).
- Chen, W. H., Tu, Y. J. and Sheen, H. K., "Impact of Dilute Acid Pretreatment on the Structure of Bagasse for Producing Bioethanol," *Int. J. Energy Res.*, **34**, 265-274(2010).
- Song, M. K. and Na, C. K., "Microwave-Assisted Acid-Hydrolysis of *Laminaria Japonica* and its Ethanol Productivity: Comparison with Conventional Heating," *J. Korean Soc. New Renewable Energy*, **9**, 5-14(2013).
- Mandal, V., Mohan, Y. and Hemalatha, S., "Microwaveassisted Extraction - An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Research," *Phcog. Rev.*, **1**, 7-18(2007).
- Raymond, R. and Ehrman, T., "Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography," *Lab. Anal. Proced.* No.002, National Renewable Research Laboratory(1996).
- D, Templeton. and Ehrman, T., "Determination of acid-insoluble lignin in biomass," *Lab. Anal. Proced.* No.002, National Renewable Research Laboratory(1995).

25. Zhang, L., Hong, L. J., Zhong, L. S. and Lewis, L. Z., "Challenges of cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues," *Bioresour. Technol.*, **6**(4), 4302-4316(2011).
26. Benzerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. and Escaleira, L. A., "Response Surface Methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry," *Talanta.*, **76**, 965-977 (2008).
27. Oh, H. M., Kim, J. S. and Lee, S. J., "Biological Fixation of Global Warming Gas by Microalgae," *Korean J. Enviro. Biol.*, **16**, 291-297(1998).
28. Jang, E. K., Shin, H. K. and Pack, S. P., "Recent Researches for Diatom as Inorganic and Bioenvironmental Materials," *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 9-21(2014).
29. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Ekander, R., Lee, Y. Y., Holtzaple, M. and Ladisch, M., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresour. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
30. Im, J. Y., Hong, S. S., Lee, G. D. and Park, S. S., "Application of Microwave Energy in Chemical Engineering," *Korean Chem. Eng. Res.*, **42**(5), 485-493(2004).
31. Jeong, G. T., Yang, H. S., Park, S. H. and Park, D. H., "Optimization of Biodiesel Production from Rapeseed Oil Using Response Surface Methodology," *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 222-227(2007).
32. Seo, D. I., Kim, C. J. and Kim, S. B., "Pretreatment of Waste-paper using Aqueous Glycerol under High Pressure to Enhance Enzymatic Hydrolysis," *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng.*, **29**(3), 193-198(2014).
33. Kim, H. Y., Lee, E. S., Kim, W. S., Suh, D. J. and Ahn, B. S., "Material and Heat Balances of Bioethanol Production Process by Concentrated Acid Saccharification Process from Lignocellulosic Biomass," *Clean Technol.*, **17**, 156-165(2011).
34. Park, J. H. and Kim, J. S., "Two-step Acid Hydrolysis Method for Producing Fermentable Sugar from Lignocellulosic Biomass," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**(1), 1-5(2016).
35. Wu, F. C., Wu, J. Y., Liao, Y. J., Wang, M. Y. and Shin, I. L., "Sequential Acid and Enzymatic Hydrolysis in situ and Bioethanol Production from Gracilaria biomass," *Bioresour. Technol.*, **156**, 123-131(2014).