

HPLC 분석기를 이용한 펄프용 단풍나무의 펄핑 추출액에 관한 물질수지*¹

엄 병 환*^{2†}

Mass Balance on the Pulping Extracts of Maple Hardwood using High Performance Liquid Chromatography*¹

Byung-Hwan Um *^{2†}

요 약

현재 메인 주립대학에서는 펄프용 목재 성분 중 헤미셀룰로오스 추출 기술에 관한 연구개발이 한창 진행 중이다. 펄프의 수율 향상과 용액 회수에 필요한 유기 및 무기물 사용을 줄이고 새로운 바이오 물질 생산에 필요한 도입부 추가 공정이 연구의 핵심이다. 바이오 물질 중 경제적으로 상용 가능한 에탄올 생산(pilot-scale)에 있어 전 처리되지 않은 기질, 전 처리된 기질 및 펄핑 전 추출액의 화학적 성분분석은 아주 중요한 공정이다.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 펄프목재 성분분석 결과, H-column으로 분석한 총 물질수지(total analytical mass balance)는 전 처리되지 않은 칩의 경우 100.6%, 전 처리된 목재 칩은 100.3%, 그리고 펄핑 전 추출액은 81.6%의 결과를 보였다. 한편, P-column으로 분석한 결과, 전 처리되지 않은 기질, 전 처리된 기질, 그리고 전 추출액은 각각, 97.8%, 97.4%, 그리고 80.7%로 나타났다. 총 물질수지가 100%를 넘거나 부족한 수치는 분석해석 중 발생한 약간의 오류로 보인다. 펄프-바이오리파이너리(Biorefinery) 공정을 통해 생성된 기질(substrate) 각각의 정확한 성분분석 결과는 에탄올 상용화 공정에 필요한 중요한 자료가 될 것으로 기대한다.

ABSTRACT

At the University of Maine, a hemicellulose pre-extraction technology is now being investigated to improve pulp yields, reduce the organic and inorganic load for liquor recovery, and create a feed stream for the generation of new biomaterials. It is important to understand the composition

*¹ 접수 2008년 4월 14일, 채택 2008년 5월 2일

*² 메인 주립대 공과대학, 화학공학과, Forest Bioproducts Research Initiative, Department of Chemical and Biological Engineering, University of Maine, Orono, Maine 04469, USA

† 주저자(corresponding author) : 엄병환(e-mail: BHUm@umche.maine.edu)

of unextracted wood, extracted wood, and pulping extracts in the design of an economically viable pilot-scale ethanol plant. For analysis of wood pulp composition, the total analytical mass balance closure was 100.6, 100.3, and 81.6% for unextracted chips, extracted chips, and pulping extracts from HPLC-H column analysis. Meanwhile, the total analytical mass balance from the HPLC-P column was 97.8, 86.3, and 80.7%, respectively. This slight variability between H- and P-column results for analytical mass balance may be within the experimental error of the measurement. The data generated by this analysis are important to further design work in commercializing this process.

Keywords: High Performance Liquid Chromatography (HPLC), pre-extraction, Green Liquor, Maple hardwood, Rocking digester.

1. 서 론

펄프목재의 화학적 성분분석은 종이의 질을 결정하는 주요 요소일 뿐만 아니라 펄핑 선 추출액의 특성을 결정하는 아주 중요한 공정이다. 건조기준 펄프목재 성분의 대부분은 포도당 소 단위체가 1-4 탈수결합(β -1,4-glucoside)에 의하여 이루어진 고분자 물질 셀룰로오스(40~45%), 헤미셀룰로오스 (20~30%)와 리그닌(약 25%)으로 이루어져 있다(Bailey and Ollis, 1986; Capanema *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 1987).

전통적인 펄프공정에서의 주 생산품은 펄프이고, 부산물로 tall oil, 그리고 turpentine이 생산된다. 부산물로 추출된 헤미셀룰로오스 경우는 대부분은 버려지거나 리그닌과 함께 종종 보일러실에서 연소되었다. 그러나 펄핑공정에서 부산물로만 여겨졌던 헤미셀룰로오스 성분이 최근 바이오 에탄올 원료로 주목 받고 있다. 기존 Kraft 공정에 앞서 선 헤미셀룰로오스 추출 공정을 추가함으로써, 추출된 헤미셀룰로오스 성분은 동시당화발효공정(Simultaneous Saccharification and Fermentation)을 거쳐 에탄올로 생산될 수 있기 때문이다.

목재 펄프의 경우는 강산이나 염기 또는 고온, 고압에서의 전처리 공정과 가수분해에 의해 급격하게 목재 칩의 물리적 또는 화학적 특성이 변화 될 수 있다(Goering and Van Soest, 1970; Ranatunga *et al.*, 2000). 특히 펄핑공정에서 가장 현저한 물리/화학적 변화로는 전처리 후 칩의 형태변형 그리고 리그닌 성분 제거와 동시에 고분자 셀룰로오스와 헤미

셀룰로오스 성분들이 저당류(이당류, 단당류) 로 가수분해 된다는 점이다. 이러한 전처리 공정을 거쳐 추출된 추출액 성분 대부분은 올리고 당 헤미셀룰로오스와 리그닌 성분들이다.

본 연구에서는 Kraft 공정 도입부에 추가된 동시당화발효공정의 최적화를 위해서 다양한 성분분석 기재를 이용한 전 처리되지 않은 기질(unextracted), 전 처리된 기질(extracted) 및 펄핑 선 추출액(pulping extract)의 화학적 성분분석을 시행하였다. 이를 통해 물질수지에 관하여 조사하였으며, 분석한 당 성분의 조성을 바탕으로 효율적인 에탄올 발효공정에 필요한 기본적인 정보를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 연구에 사용된 목질계 기질은 2007년 10월에 Red-Shield Kraft Pulp Mill (Old Town, ME, USA) 공장에서 수령한 활엽수 단풍나무 칩(Northeast Maple hardwood chips)을 사용하였다.

2.2. 시료의 전처리 및 분석

수령한 목재기질은 스크린(Screen) 공정을 통해 평균적으로 가로와 세로 길이가 16.0~22.6 mm인 것과 두께가 3~5 mm의 목재 칩만을 선별하여 전처

리 추출공정에 사용하였다. 그 외 여분의 칩 조각을 분쇄기(Willey mill)로 분쇄 후 체로 걸러서 30~40 mesh (0.595~0.420 mm) 크기의 목분만을 분석용으로 사용하였다. 시료의 수분, 당 함량(carbohydrate), 리그닌(Klason and acid soluble lignin), 회분(ash), 추출성분(extractives), 질소(nitrogen), 아세틸(acetyl group), 초산(acetic acid), 그리고, 우론산(uronic acid)은 NREL 표준 분석법 지침에 따라서 각각 결정되었다(NREL, 1994).

2.3. 헤미셀룰로오스 추출공정

추출공정은 미국 메인 주립대(University of Maine)에 설치되어 있는 Pilot 규모의 펄프제지 공정실 내 20 l 회전-회분식 반응기(Rocking digester)를 이용하였다. 우선, 건조기준 목재 칩 2 kg을 반응기에 넣은 후 기질 3%에 상응하는 녹액(Green Liquor)을 충전 하였다. 본 연구에 사용된 녹액 성분은 Kraft 공정을 거친 펄프를 물로 세척/농축 후 회수한 약 알칼리성 시약(reagent)이다. 중화공정을 거쳐 분석한 녹액 성분 및 농도는 Table 1에 제시되었다. 나머지는 물로 희석시켜 용매와 기질의 비율을 4:1로 맞추었다. 반응조건은 반응온도 160°C 에서 110분 동안 반응 시켰고, 교반속도는 2 rpm 일정 유지 하였으며, H-Factor는 800이었다.

2.4. 회전 증기증착법(Rotary Evaporation)

추출반응 후에 열교환공정을 거친 펄핑 선 추출액은 과량의 물 성분으로 희석 되었다. 따라서 당 성분의 농도를 높이기 위해서 증기 증착기 (OKLA® FV 06-ML, Were GmbH & Co KG, Germany)를 통해 농축시켰다. 총 6 l 추출액 중 일부(0.5 l)를 채취해서 대략 30분과 40분 간격으로 농축시킨 후 분석을 위한 샘플을 채취 하였다.

Table 1. Chemical composition of Green Liquor used in extraction process

Chemicals	Concentration
Total titrated alkali (TTA)	3% on wood as Na ₂ O ^a
Sodium hydroxide (NaOH)	9.0 g/l as Na ₂ O
Sodium sulfide (Na ₂ S)	291 g/l as Na ₂ O
Sodium Carbonate (Na ₂ CO ₃)	70.0 g/l as Na ₂ O
Sodium Sulfate (Na ₂ SO ₄)	0.8 g/l as Na ₂ O
TTA	108.9 g/l as Na ₂ O

^a The dissolved solution in the Green Liquor had a mass 3% of the wood mass fraction.

2.5. 분석기기

반응종료와 동시에 추출액과 전 처리된 목재 칩을 회수한 다음 각종 성분을 분석하였다. 유기산과 당 분석은 Shimadzu model HPLC (LC-10AT Liquid Chromatogram, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)를 이용해 분석하였다. H-column의 경우 황산 이동상(mobile phase, 5 mM H₂SO₄)의 유량은 0.6 mL/min 이고, column 온도는 60°C를 유지 하였다. 반면, P-column의 경우는 이동상으로 물(HPLC grade water)을 사용했으며, column 온도는 80°C를 유지 하였으며 검출기로는 RI detector와 UV absorption 이 사용되었다. 총 유기탄소와 질소는 Shimadzu (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) TOC-V_{CPH/CPN} model을 이용하여 분석하였다. 본 연구에서는 보다 구체적인 헤미셀룰로오스 성분분석을 위해 두 종류의 칼럼을 사용하였다. 아세틸(acetyl)성분 분석의 경우는 H-column만을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 활엽수 펄프목재 기질 내 당(Carbohydrate) 성분조성

Fig. 1은 단풍나무 기질의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 사진이다. 그림에서와 같이 전처리 전

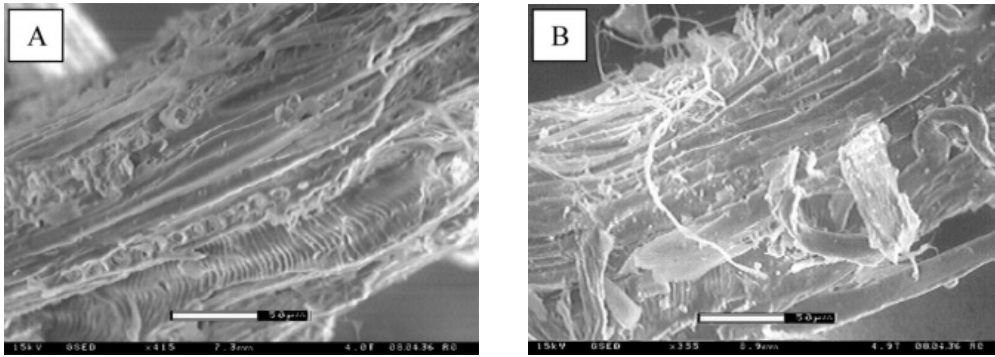


Fig. 1. Surface of untreated (A) and treated Maple chips (B) by scanning electron microscopy. Note: (B) treated by Green Liquor (=NaOH, Na₂S, Na₂CO₃ and Na₂SO₄).

Table 2. Analysis of chemical composition of Maple hardwoods using HPLC.

Run #	Feedstock	Yield ^a (%)	Glucan (%)	XMG			Arabinan (%)	Acetyl (%)	Lignin (%)	Ash (%)	Extractives (%)	N ^b (%)	UA ^c (%)	Total ^d (%)
				Xylan (%)	Mannan (%)	Galactan (%)								
1	Unextracted	100	42.1 ± 0.4		23.1 ± 0.5		2.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1	24.4 ± 0.5	0.5 ± 0.05	1.9 ± 0.2	0.26 ± 0.01	2.39 ± 0.1	100.6 (100.6) ^e ± 1.96
2	Unextracted	100	40.5 ± 0.3	18.3 ± 0.5	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2	3.6 ± 0.1	24.4 ± 0.5	0.5 ± 0.05	1.9 ± 0.2	0.26 ± 0.01	2.39 ± 0.1	97.8 (97.6) ± 2.36
3	Extracted	88.6	40.7 ± 0.2		20.1 ± 0.6		1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.5	22.6 ± 0.6	0.3 ± 0.06	nd ^f	0.136 ± 0.02	1.76 ± 0.2	88.9 (100.3) ± 2.56
4	Extracted	88.6	39.3 ± 0.1	16.2 ± 0.6	1.8 ± 0.1	1.2 ± 0.04	1.3 ± 0.3	1.7 ± 0.5	22.6 ± 0.6	0.3 ± 0.06	nd	0.136 ± 0.02	1.76 ± 0.2	86.3 (97.4) ± 2.51
5	Extract	11.4	0.3 ± 0.1		2.6 ± 0.2		0.2 ± 0.2	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.6	nd	nd	0.091 ± 0.01	0.37 ± 0.05	9.3 (81.6) ± 1.26
6	Extract	11.4	0.2 ± 0.08	1.7 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.01	1.8 ± 0.1	3.9 ± 0.6	nd	nd	0.091 ± 0.01	0.37 ± 0.05	9.2 (80.7) ± 1.61

^a Yield: solid remaining and recovery percent after extraction process. ^b N: measured Nitrogen percent. ^c UA: Uronic acid was measured by Spectrophotometer at 405 nm and 450 nm. ^d Total: the amount of all composition analyzed by chromatogram in the unextracted, extracted, and pulping liquid extract. ^e Parentheses: total analytical mass balances (=Total [%]/ Yield [%]). ^f nd: not determined. HPLC: Aminex 87H-column - Run # 1, 3, and 5. HPLC: Aminex 87P-column - Run # 2, 3, and 6.

기질과 전처리 후 기질의 섬유소 구조가 상당히 많이 변형되었음을 알 수 있다. 이는 알칼리성(녹액) 전처리 공정을 통해서 일부 섬유성 기질 외 다른 성분이 추출액상으로 용해되었음을 가시적으로 짐작하게 한다.

우선, 전 처리되지 않은 단풍나무 목재 칩의 화학적 성분분석 결과는 Table 2에 나타나 있다. 모든 기질(substrate) 및 펄핑 전 추출액 성분분석은 100% 건조기질 상태를 기준으로 하였다. 본 연구에서 사용한 HPLC의 두 column은 Bio-Rad사 Aminex

HPX-87H과 -87P이다. 우선 HPLC의 H-column으로 분석한 전 처리되지 않은 기질(unextracted)의 성분은 각각 글루칸(glucan) 42.1%, XMG (xylan, mannan, 그리고 galactan) 23.1%, 그리고 아라비난(arabinan) 2.3%로 나타났다. 반면, P-column의 경우는 H-column과 달리 XMG 각 성분의 peak이 겹치지 않아, 각각의 세 성분을 분리 분석 할 수 있었다. 분석결과 글루칸 40.5%, 자일란 18.3%, 만난 2.2%, 갈락탄 1.9% 그리고 아라비난이 1.8%였다. H-column으로 분석한 총 XMG의 함량(%)은 P-column으로 분석한 각각의 헤미셀룰로오스 성분의 합과 거의 차이를 보이지 않았다. 따라서 P-column의 분석결과를 통해서, 단풍나무 기질 내 XMG 성분 중 82% 가량이 자일란임을 알 수 있었다. 특히, 두 칼럼에서의 성분함량 오차는 분석용 샘플 시료가 모두 72%의 황산으로 처리 되어 분석되었기 때문으로 보인다. 다시 말하면, H-column의 경우는 이동상이 황산이므로 황산으로 처리된 샘플 분석 시 peak baseline이 아주 안정적으로 나타났다. 반면 이동상이 물인 P-column의 경우는 수산화칼슘(calcium hydroxide)으로 중화한 후 분석을 하였음에도 불구하고, peak baseline이 H-column에 비해서 상당히 불안정하고 noise가 많은 편이었다. 따라서 두 칼럼 peak integration을 실시할 경우, 균일하지 않은 baseline으로 인해서 peak height나 area가 일정하지 않은 관계로 약간의 오차를 초래 한 것으로 보인다.

전 처리된 기질의 경우 글루칸의 성분비율은 상대적으로 전 처리되지 않은 기질의 것보다 높게 나타났다. 이는 추출과정 중 소량의 셀룰로오스 성분과 상대적으로 다량의 헤미셀룰로오스와 리그닌 성분이 추출액상으로 회수되었음을 알 수 있었다. Table 2에 나타낸 결과를 보면, 전 처리된 기질 성분분석 결과 대략 1.4%의 글루칸과 3%의 XMG, 그리고 대략 1.3%의 아라비난 성분이 추출액상으로 회수되었음을 짐작하게 한다.

3.2. 펄핑 선 추출액 성분조성

본 연구에서의 전처리 공정은 셀룰로오스 성분을

가능한 고상에 남겨두고 Kraft 공정에서 회수된 녹액성분을 재사용하여 적당량의 헤미셀룰로오스를 액상으로 회수하는데 주목적이 있다. 이유는, 전 처리된 고상 기질은 Kraft 공정을 거쳐 펄프로 생산되어야 하기 때문이다.

추출과정 중 고상 기질로부터 추출액상으로 회수된 성분 총 함량은 대략 11.4%이었다(Table 2). 따라서 물질 수지상 전 처리되지 않은 기질을 100% 건조 기준으로 본다면, 100%에서 추출된 11.4%를 제외 하면, 88.6% 성분이 전 처리된 기질에 남아있음을 알 수 있다. 특히, 회수된 추출액 함량은 전통적인 에탄올 공정에서의 수율보다 상대적으로 아주 소량이다. 이는 현재 메인 주립대에서 연구 개발 중인 에탄올 생산 공정이 기존 Kraft 펄프공정 도입부에 추가된 것이기 때문에 펄핑용으로 규격화 된 칩 크기에 대해 보다 과한 물리적 전처리(milling process)를 가할 수 없어 시약의 침투 및 당 추출 속도가 기존의 에탄올 공정에서의 전 처리과정보다 현저히 느리다. 그리고 시료의 경우는 Kraft 공정을 거친 펄프에서 회수한 녹액을 재사용하기 때문에 백액보다 현저히 약 알칼리성을 띤다. 따라서 상대적으로 낮은 회수율은 현재 연구개발 중인 펄프-바이오리파이너리 공정에서는 당연한 결과로 보인다.

펄핑 선 추출액(11.4%) 내 당을 분석한 결과 글루칸 0.3%, XMG 2.6%, 그리고 아라비난 0.2%이었다. 전 처리되지 않은 기질과 전 처리된 기질의 물질수지 비교(Table 2)와 HPLC의 Peak을 시간대별로(residence time) 분석(data not shown)한 결과 추출액상의 소량의 당 성분 일부가 추출과정 중 HMF와 Furfural로 분해(decomposition) 되었음을 알 수 있었다. 앞서 말한 바와 같이, 추출반응이 끝나 수집한 추출액성분은 상당히 물로 희석된 상태이다. 따라서 당 성분의 농도를 높이기 위해서 물을 증발하여 농축시키는 증기흡착 공정을 거쳤다. 최초 추출 공정 종료 후 추출액 내 고상부분은 3.56%(consistency)이었다. 고상부분이 각각 5.78 그리고 8.81% 가 될 때까지 농축 시킨 후 분석한 결과, 예상대로, 증발 전과 비교하면 총 올리고 당 함량은 0.73 g/100 mL 에서 최대 1.78 g/100 mL 까지 증가하였음을 알

Table 3. Composition of concentrated hemicellulose extracts

Total Solids ^a [%]	Glucan [g/100 mL]	XMG			Arabinan [g/100 mL]	Acetyl [g/100 mL]	Total Sugars ^b [g/100 mL]	Chromatography
		Xylan [g/100 mL]	Mannan [g/100 mL]	Galactan [g/100 mL]				
3.56	0.04		0.59		0.10	0.68	0.73	HPLC-H Column
	± 0.004		± 0.05		± 0.03	± 0.003	± 0.084	
	0.04	0.53	0.03	0.08	0.07	0.68	0.68	HPLC-P Column
5.78	± 0.003	± 0.02	± 0.001	± 0.004	± 0.004	± 0.003	± 0.032	HPLC-H Column
	0.06		0.95		0.17	1.03	1.18	
	± 0.01		± 0.08		± 0.006	± 0.007	± 0.096	
8.81	0.06	0.77	0.04	0.13	0.12	1.03	1.12	HPLC-P Column
	± 0.003	± 0.04	± 0.001	± 0.01	± 0.01	± 0.007	± 0.064	HPLC-H Column
	0.08		1.44		0.26	1.48	1.78	
8.81	± 0.01		± 0.02		± 0.02	± 0.003	± 0.05	HPLC-P Column
	0.08	1.12	0.05	0.18	0.20	1.48	1.63	
	± 0.006	± 0.05	± 0.002	± 0.01	± 0.006	± 0.03	± 0.074	

In order to increase the sugar fraction, the pulping liquid extract withdrawn from extraction process was evaporated by rotary evaporator: 1. The Rotating Evaporator was operating at 150 RPM agitation, 30°C. 2. The evaporation time of extracts was 0, 30, and 40 minutes.

^a Total Solids: total solid fraction in the pulping liquid extract after extraction and evaporation.

^b Total Sugars: total amount of glucan, xylan, mannan, and galactan in pulping liquid extract.

수 있다(Table 3). 당 함량의 증가는 당연한 결과이나, 정확한 성분농도의 정량적 분석은 동시당화발효 공정에 있어 고가인 효소(enzyme)의 적당량 사용량을 결정 할 뿐 아니라 경제적인 공정의 최적화를 위해 상당히 중요한 결과다.

3.3. 비 섬유질(Non-cellulosic) 성분조성 및 총 물질수지

전 처리되지 않은 기질, 전 처리된 기질, 그리고 펄핑 선 추출액의 비 섬유질 성분 또한 Table 2에 잘 나타나 있다. 우선, 단풍나무 기질의 리그닌(Klason lignin)은 24.4%, 그리고 회분(inorganic ash)과 추출성분(extractives)은 각각 0.5%, 1.9%이었다. 펄프-바이오리파이너리 공정 중 중요한 부가가치 상품은 제지와 펄핑 선 추출액상에서의 당을 발효해 얻는 에탄올과 초산이다. 아세틸의 경우는 단풍나무 기질 내 3.6% 가량 차지하고 있으며, 펄핑 선 추출액 내 회수된 량은 대략 1.8%였다. 또한, 추출반응

후 침출된 질소(nitrogen)성분은 잠재적으로 가축농가에 아주 중요한 사료(protein 성분)로써 상품성을 가질 수가 있다. 단풍나무 기질의 경우 질소 함량은 0.26%이고 우론산(uronic acid)은 2.39%였다. 추출 공정으로 침출된 질소와 우론산의 함량은 각각 0.1%와 0.4%였다. 그리고 Fig. 2에서 알 수 있듯이, 증기 증착법 공정 동안 추출액 성분 내 고상의 농도가 증가할수록 총 질소함량이 비례적으로 증가하는 것을 알 수 있었으며 최대 0.8 g/l 까지 증가 하였다. 이는 또한 상대적으로 농축공정을 거칠 경우에는 단백질(protein) 성분 또한 비례적으로 증가하였음을 암시한다.

4. 결 론

이번 실험은 곡물 바이오 매스(crop biomass)를 이용한 전통적인 에탄올 공정의 것과 비교하면 상대적으로 아주 적은 양의 헤미셀룰로오스 회수율을 보였다. 이는 펄프의 수율을 고려한 공정이기 때문에

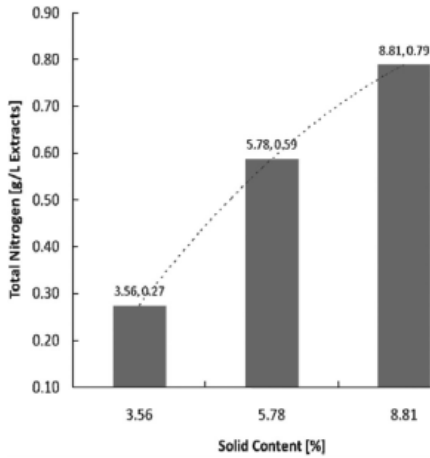


Fig. 2. Total carbon and nitrogen amounts in the pulping extracts as function of consistency.

당연한 결과로 받아들여진다. 본 연구에서 HPLC H-column으로 분석한 총 물질수지(total analytical mass balance)는 전 처리되지 않은 단풍나무 기질의 경우 100.6%, 전 처리된 기질은 100.3%, 그리고 펄핑 선 추출액의 경우는 81.6% 를 보였다. 반면, P-column으로 분석한 결과, 전 처리되지 않은 기질, 전 처리된 기질, 그리고 펄핑 선 추출액 각각, 97.8%, 97.4%, 그리고 80.7%로 나타났다.

본 실험에서 회수된 11.4%의 펄핑 선 추출액 내 헤미셀룰로오스 및 셀룰로오스 성분은 동시당화발효공정을 거쳐 에탄올과 초산으로 회수 될 것이다.

추출액상에 발효 가능한 당 성분분석에 기초한 새로운 공정계획으로 말미암아 장기적으로는 현재의 파일럿 규모 에탄올 생산에서 경제적 효율성이 보다 증대될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. Bailey, J. E. and D. F. Ollis, 1986. Biochemical Engineering Fundamentals, second ed., McGraw-Hill: New York.
2. Capanema, E. A., M. Y. Balakshin, and C. L. Chen, 2004. An improved procedure for isolation of residual lignins from hardwood kraft pulps. *Holzforchung*, 58, 464~472.
3. Fan, L. T., M. M. Gharpuray, and Y. H. Lee, 1987. Cellulose Hydrolysis. Springer-Verlag, Berlin.
4. Goering, H. K. and P. J. Van Soest, 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agriculture Handbook No. 379, Agriculture Research Service, USDA, 387~598.
5. NREL Chemical Analysis and Testing Standard Procedure Series, 1994.
6. Ranatunga, T. D., J. Jervis, R. F. Helm, J. D. McMillan, and R. J. Wooley, 2000. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme and Microbial Technology*. 27, 240~247.