

## 옥수수 줄기의 암모니아수 침지 전처리에 의한 효소 당화 향상\*<sup>1</sup>

신수정\*<sup>2</sup> · 유주현\*<sup>3</sup> · 조남석\*<sup>2</sup> · 한심희\*<sup>4</sup> · 김문성\*<sup>2</sup> · 박종문\*<sup>2†</sup>

### Enhancing Enzymatic Saccharification of Corn Stover by Aqueous Ammonia Soaking Pretreatment\*<sup>1</sup>

Soo-Jeong Shin\*<sup>2</sup> · Ju-Hyun Yu\*<sup>3</sup> · Nam-Seok Cho\*<sup>2</sup> · Sim-Hee Han\*<sup>4</sup> ·  
Mun-Sung Kim\*<sup>2</sup> · Jong-Moon Park\*<sup>2†</sup>

#### 요약

본 연구는 암모니아수 침지 처리가 옥수수대의 화학 조성과 효소당화 특성에 미치는 영향에 대하여 연구한 것이다. 암모니아수 침지에서 처리 온도와 시간이 본 연구에서 주요 변수였다. 무 처리 분말과 침지 처리 분말의 전체 조성 분석과 탄수화물 조성 분석 결과, 3가지 다른 수준의 암모니아수 침지 조건(140°C - 1 h, 90°C - 16 h 및 50°C - 6일)에서 고온 단기간 처리가 더 많은 양의 자이란과 리그닌을 용출시켰다. 암모니아 침지에 의한 자이란과 리그닌 용출 제거 효과가 고온 침지 처리된 옥수수 줄기 분말에서 상업용 셀룰라아제를 사용하는 셀룰로오스와 자이란의 효소 당화를 촉진시켰다.

#### ABSTRACT

Enhancing enzymatic saccharification of corn stover by aqueous ammonia soaking pretreatment was investigated on chemical compositional changes and enzymatic hydrolysis characteristics. At three different levels of aqueous ammonia soaking temperature and time (140°C-1 h, 90°C-16 h and

\*<sup>1</sup> 접수 2009년 2월 23일, 채택 2009년 5월 12일

\*<sup>2</sup> 충북대학교 농업생명환경대학 목재·종이과학전공. Chungbuk National University, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Dept. of Wood and Paper Science, Cheongju 361-763, Korea

\*<sup>3</sup> 한국화학연구원 신화학연구단 바이오정밀화학 센터. Korea Research Institute of Chemical Technology, Chemical Biotechnology Research Center, Daejeon 305-600, Korea

\*<sup>4</sup> 국립산림과학원 산림자원육성부 산림유전자원과. Dept. of Forest Resources Development, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

† 주저자(corresponding author) : 박종문(e-mail: jmpark@cbnu.ac.kr)

50°C-6 days), higher temperature and shorter treatment time led to more xylan and lignin removal based on overall composition analysis and carbohydrate compositional analysis. More xylan and lignin removal in higher temperature treatment led to higher enzymatic saccharification of cellulose and xylan to monosaccharide by commercial cellulase mixtures (Celluclast 15L and Novozym 342 from Novozyme, Denmark).

**Keywords:** aqueous ammonia soaking, xylan, lignin, NMR, glucose, xylose, corn stover, enzymatic saccharification

## 1. 서 론

화석자원은 재생산이 불가능한 자원이므로 재생산 가능한 자원을 이용한 연료개발에 많은 관심과 연구가 진행되고 있다. 특히 에탄올은 수송용 연료를 대체할 수 있기 때문에 관심이 집중되고 있다. 식물 바이오매스는 전세계적으로 널리 분포되어 있는 대표적인 재생산가능 자원이다. 식물 바이오매스 자원을 구성하는 성분은 대부분 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌으로 구성되어 있다. 1차 오일 파동 이후 브라질에서는 사탕수수 기반 바이오 에탄올 생산이 상용화 되어 현재 주요 수송용 연료 원료로 사용되고 있다. 미국에서는 옥수수 전분을 사용하는 바이오 에탄올 생산이 2000년대에 급격하게 증대되고 있다. 오늘날 가장 널리 이용되는 재생가능 연료는 당 또는 전분으로부터 에탄올을 생산하는 것이지만, 충분한 양이 아니기 때문에 결국은 대량 공급이 가능한 리그노셀룰로오스계 바이오매스로부터 에탄올을 대량생산해야 한다고 보고한 바 있다(Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). 2001년 미국에서는 폐기물로부터 에탄올을 생산하는 2개의 공장이 가동하였으나, 여전히 바이오매스의 초기 전처리와 셀룰로오스 분해효소의 가격이 가장 큰 저해요인이라고 지적하였다(Mielenz *et al.*, 2001).

설탕이나 전분으로 사용되는 식용 자원 이외의 목질계 바이오매스의 당화 및 발효에 대한 관심이 증가하고 있다. 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 효과적으로 분해하면 단당류를 생산할 수 있기 때문에, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 단당류를 기반으로 하는 바이오리파이너리 산업의 원료 물질로 공급이

가능하다.

지구상의 유기물 중 그 총량이 가장 많은 바이오매스 자원인 목질계 자원은 당화 공정에서 당화 효율이 낮다는 것이 가장 큰 장애 요인이다. 효소 반응 측면에서 본다면, 리그닌이 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스를 둘러싸고 있기 때문에 헤미셀룰로오스나 셀룰로오스 분해 효소의 접근이 용이하지 않고, 헤미셀룰로오스 중 자이란이 셀룰로오스에 접근하기 어렵게 만들어 셀룰라아제에 의한 효소 당화가 일어나기 어렵기 때문이다. 또 다른 당화 방법인 산 가수분해의 경우 단당류를 최종 산물로 얻을 수 있는 것이 아니라 산 촉매 조건에서 반응하기 쉬운 중간물질이기 때문에, 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스에서 단당류가 생성되는 반응과 동시에 이미 생성된 단당류가 산 촉매반응에 의하여 furfural이나 5-hydroxymethylfurfural구조를 거쳐 다른 반응으로 진행되기 때문이다.

목질계 바이오매스에 적절한 물리적, 화학적, 생물학적 전처리를 실시하면 셀룰로오스의 효소 당화 효율을 크게 증가시킬 수 있다(Wyman *et al.*, 2005; Moisie *et al.*, 2005; Gollapalli *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). 여러 가지 물리적, 화학적 전처리 방법이 있는데, 그 중의 암모니아 처리는 리그닌을 용해시켜 제거해주고 동시에 셀룰로오스에 접근을 어렵게 만드는 자이란을 제거해 줄 수 있다는 장점이 있다(Kim and Lee, 2007). 그 결과 리그닌과 자이란으로부터 셀룰로오스가 노출되어 효소당화 공정의 효율성을 향상시켜준다(Kim and Lee, 2007; 신수정 등, 2009).

옥수수 줄기는 초분류를 대표하는 식물 바이오매스로 미국에서 널리 연구되고 있다. 본 연구에서는

몇 가지 초본류 목질 바이오매스의 효소 당화 특성을 연구하기 이전에, 옥수수 줄기의 암모니아 침지 처리에 대한 효과를 일차적으로 확인하고자 하였다. 암모니아 침지처리 온도와 시간에 따른 옥수수 줄기 바이오매스 성분 제거에 미치는 영향과 효소 당화에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 옥수수 줄기 분말 제조

충북 청원군 북이면 농가에서 2008년 4월 말 파종하여 동년 7월에 열매를 수확한 후 밭에 버려진 옥수수 줄기를 8월 7일에 잘라서 공기 중에 2주 간 건조시킨 후 분말을 제조하였다. 옥수수 줄기 분말은 체로 쳐서 40~60 mesh 부분을 골라서 실험에 사용하였다.

### 2.2. 암모니아수 침지

온도가 암모니아 수용액 침지 효과에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시약용 암모니아수(30% w/w) 용액을 같은 양의 물을 사용하여 희석한 다음 목분 2.5 g에 대하여 45 ml를 첨가하여 밀폐 가능한 유리 용기에서 반응을 시켰다. 반응 온도와 시간은 50°C에서는 6일, 90°C에서는 16시간, 140°C에서는 1시간 반응시킨 후, 세척 여과하여 반응 후 용액에 녹는 부분을 제거하고, 고형분을 공기 중에서 건조시킨 후, 조성분석에 사용하였다. 140°C에서 반응은 높은 압력에 의한 암모니아 기체의 유출을 막기 위하여 고압에 견딜 수 있도록 100 ml 용량으로 설계된 스테인레스 반응기에 시료와 약액을 넣은 다음 적정 온도로 가온된 오일조(oil bath)에서 반응을 진행시켰다.

### 2.3. 옥수수 줄기 무처리 분말 및 암모니아 침지 처리 분말의 화학 조성 분석

미국 국립 재생에너지 연구실의 연구 분석 과정(Sluiser *et al.*, 2005)에 따라 옥수수 줄기 분말을 아세톤과 끓는 물로 각각 추출하여 유기용매 추출분과

열수 추출분을 측정하였고, 추출된 시료로 Klason 리그닌을 정량하여 리그닌 함량과 다당류 함량을 측정하였다. 암모니아 처리 후 시료로 Klason 리그닌 정량을 실시한 후, 전체적인 질량 균형을 계산하여 암모니아수 침지 처리에서 리그닌과 다당류의 침출 정도를 추정하였다.

### 2.4. 옥수수 줄기 무처리 분말 및 암모니아 침지 처리 잔사의 탄수화물 조성 분석

분석하고자 하는 시료 40.0 mg을 0.4 ml의 72% 황산으로 30°C에서 한 시간 동안 1차 산 가수분해 후 2.0 ml의 중수(D<sub>2</sub>O)를 사용하여 희석시킨 후 121°C에서 한 시간 동안 2차 가수분해를 실시하였다. 가수분해 후 여과하여 가수분해액을 수집하여 <sup>1</sup>H NMR 분석을 실시하였다. 분석에 사용한 기기는 Bruker AVACE NMR Spectrometer (500 MHz)로 NMR 데이터는 Win NMR 소프트웨어를 사용하여 피크를 해상하고 적분하였다. 분석 조건은 Broadband Observe Probe type, 30°C, pulse: 11 μsec, delay between pulse: 10 s, acquisition time: 2.73 s, sweep width: 10 ppm, center of spectrum: 4.5 ppm, reference: acetone at 2.2 ppm 이다. NMR 스펙트럼 상에서 anomeric hydrogen (아노머성 수소) 피크를 적분하여 탄수화물의 조성을 계산하였다 (Shin and Cho, 2008).

### 2.5. 효소당화 및 당화액의 탄수화물 조성 분석

암모니아 수용액 침지 후 여과하여 녹지 않는 잔사를 0.05 M sodium acetate buffer 수용액 170 ml와 함께 250 ml 삼각 플라스크에 넣었다. 이를 121°C에서 20분 간 멸균하고 식힌 후 교반 반응기에 넣고 45°C에서 120 rpm으로 교반하였다. 온도가 평형에 도달한 다음 셀룰로오스 분해 효소 중 Novozyme사에서 상업용으로 시판하고 있는 Celluclast 1.5L 0.8 ml와 Novozym 342 0.2 ml를 각각 삼각 플라스크에 첨

Table 1. Chemical composition of corn stover

Components	Contents (%)	
	Corn stover	Yellow poplar*2
Acetone solubles (A)	10	25
Hot-water solubles (H)	23.3	14.0
Klason lignin (L)	13.6	17.5
Carbohydrates (C)*1	62.1	66.0

\*1: C = 100-A-HL

\*2: From Shin *et al.* (2009)

가하여 효소 가수분해하였다. 사용한 효소는 Celluclast 1.5L이 70 FPU/g (FPU: filter paper unit), Novozyme 342가 90 ECU/g (ECU: endo-1, 4-β-glucanase unit) 의 역가를 가지고 있었다. 효소 분해 정도를 알아보기 위하여 효소 가수분해 개시 2, 4, 10, 24 및 48 시간 후에 각각 시료 1 ml를 채취한 다음 즉시 냉동 보관하였다.

효소 가수분해 후 당화액 200 μl를 acetonitrile/중류수 혼합액(5:5 v/v) 800 μl로 희석한 다음 원심 분리하여 상정액을 당분석에 사용하였다. ELSD (evaporative light scattering detector, Alltech, model ELSD 2000, 미국 제품)가 부착된 HPLC (Waters 1525 Binary HPLC Pump, Waters 717plus Autosampler, 미국 제품)에 apHera™ NH<sub>2</sub> column (4.6 mm i.d. × 250 mm, SUPELCO, 미국 제품)을 연결하고 이동상으로 acetonitrile/중류수 혼합액(80 : 20 v/v)을 1.2 ml/min으로 흘려 주면서 시료 용액 20 μl를 주입하여 자일로스와 포도당 농도를 분석하였다. 표준용액은 자일로스와 포도당(Sigma 제품, 미국)을 50% acetonitrile 수용액에 녹여 조제하였다. HPLC를 이용한 당분석에서 자일로스는 7.9분, 포도당은 12.0분에서 각각 검출되었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 옥수수 줄기의 화학적 조성

옥수수 줄기의 건조 분말에는 유기용매 추출물과 열수 추출물과 같은 비구조 성분(non-structural

components, 또는 extractives)의 함량이 24.3%로 나타났으며, 구조적인 성분은 리그닌 함량이 13.6%로 나타났다. 이로부터 탄수화물 함량을 62.1%로 추정할 수 있었다(Table 1). 활엽수인 백합나무의 화학적 조성 분석(신수정 외 2009) 열수 추출물 함량이 높았고 Klason 리그닌 함량과 다당류의 함량은 낮게 나왔다. 이는 일년생 초본류의 대사 과정에서 리그닌화와 셀룰로오스화 반응이 덜 진행되어 구조용 성분 함량이 낮고 열수 추출물 함량이 높은 것으로 생각된다.

#### 3.2. 암모니아 침지 처리에 의한 화학적 조성 변화

암모니아 침지 처리 후 아세톤 추출물은 침지 처리하지 않은 시료에 비하여 50~70%가 제거되었는데, 고온 단기간 처리에 의해 아세톤 추출물의 용출 정도가 더 크게 나타났다. 열수 추출물의 경우는 이와 달리 저온 장기간 처리의 경우 추출물의 용출이 크게 나타났으며 용출 정도는 71~77%로 나타났다(Table 2).

구조용 성분의 용출 정도는 리그닌의 경우 63~75%로 나타났으면 저온 장기간 암모니아 침지 처리 보다는 고온 단기간 처리에 용출이 더 크게 나타났다. 고온 단기간 처리에서 더 많은 탄수화물의 용출이 일어났다(Table 2). 고온 단기간 침지 처리에서 셀룰로오스와 자이란의 용출 정도가 가장 크게 나타났으며 140°C-1 h 처리의 경우 32%의 구조용 탄수화물의 용출이 일어났다.

암모니아 수용액 침지 처리 후 고형분 중 탄수화물 조성 분석은 2단계 산 가수분해 후 여과한 당화액을 분석하였다. NMR 스펙트럼의 anomeric hydrogen 피크 영역을(Fig. 1) 적분하여 분석하였으며 산 가수분해 조건에서 자이란과 자이로스의 빠른 분해속도로 인하여 생성된 자이로스의 일부가 furfuraldehyde를 거쳐 산 축합 반응이 일어나기 때문에 이를 보정한 후(Shin and Cho, 2008) 탄수화물 조성을 분석하였다.

NMR 피크 분석 결과 암모니아 침지 처리에 따라 옥수수의 줄기의 당 조성의 다르게 나타났다(Table

Table 2. Chemical compositional changes by aqueous ammonia treatment to corn stover

	Residual (%)	Chemical composition (%)			
		Acetone solubles	Hot-water solubles	Lignin	Carbohydrates
140°C-1 h	52.2	0.3	6.3	3.4	42.2
90°C-16 h	65.3	0.4	6.8	3.7	54.4
50°C-6 day	63.8	0.5	5.1	5.0	53.2
Non treated	100	1.0	23.3	13.6	62.1

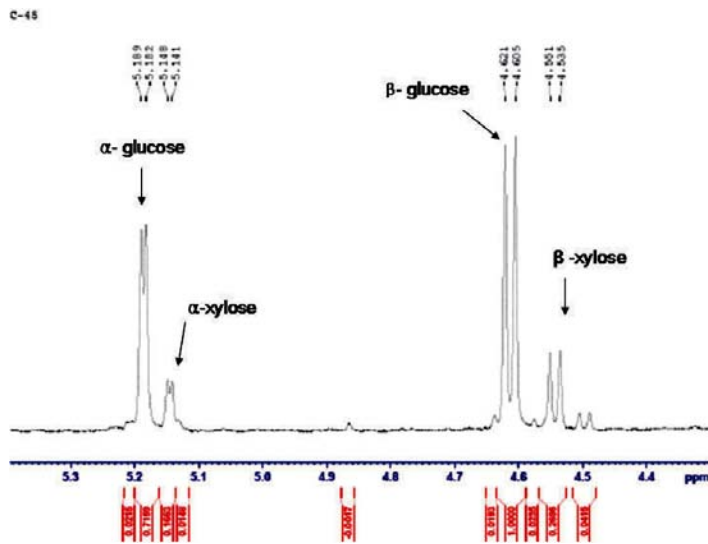


Fig. 1. NMR spectrum of corn stover (50°C, 6 days aqueous ammonia soaked).

Table 3. Carbohydrate compositional changes by aqueous ammonia treatment to corn stover

	NMR peak areas		Relative composition of carbohydrates (%)		Composition of carbohydrates (%)	
	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Cellulose	Xylan
140°C-1 h	0.4443	1.6926	65.6	34.4	27.7	14.5
90°C-16 h	0.3749	1.6926	69.3	30.7	37.7	16.7
50°C-6 day	0.4774	1.7159	64.2	35.8	34.2	19.0
Non treated	0.4800	1.7036	64.0	36.0	39.7	22.4

3). 고온 짧은 시간 처리(140°C - 1 h)의 경우 자이란의 35%, 셀룰로오스의 30%가 용출되었다. 고온 짧은 시간 처리에 셀룰로오스의 높은 용출에 대해서는 보다 깊은 연구가 필요하다.

### 3.3. 암모니아 침지 처리가 효소 당화에 미치는 영향

암모니아 침지 처리 후 잔사물의 상업용 셀룰라아제에 의한 효소 당화도를 측정하였다. 140°C - 1 시

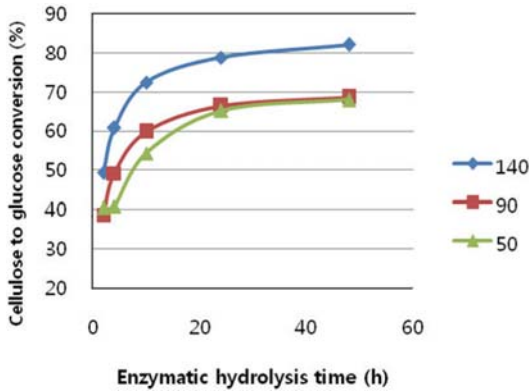


Fig. 2. Enzymatic saccharification of aqueous ammonia soaked corn stover with different treatment temperature and time (140°C-1 h, 90°C-16 h, and 50°C-6 days).

간 처리 시료가 다른 시료에 비하여 10% 이상 높은 당화율을 나타냈다. 다른 처리 조건에 비하여 셀룰로오스의 용출 정도가 크게 나타났는데 이런 효과로 인하여 셀룰로오스에서 포도당으로 당화가 잘 일어난 것으로 판단되었다(Fig. 2). 90°C-16시간 처리 시료와 50°C-6일 처리 시료의 경우 초기 당화는 90°C 처리 분말이 빠르지만 24시간이 지나면서 비슷한 포도당 전환율을 나타냈다.

암모니아 처리 분말 잔사에 존재하는 자이란의 효소 당화 정도를 비교 하였는데 50°C에서 6일 암모니아 침지 처리 시료가 140°C -1 시간이나 90°C -16 시간 침지 처리 시료에 비하여 30% 낮은 당화율을 보였다(Fig. 3). 이는 저온 장기간 암모니아 침지 처리에서 상대적으로 낮은 자이란 용출 정도 때문으로 생각된다. 세가지 처리 조건 모두 전반적인 자이란의 단당 전환율이 셀룰로오스의 단당 전환율에 비하여 낮게 나타났다.

#### 4. 결 론

암모니아 수용액 침지 처리에 의해 옥수수 줄기 분말로부터 유기 용매 추출물이나 열수 추출물의 상당 부분이 용출되었으며, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌 의 구조적 성분 의 용출 정도는 추출물보

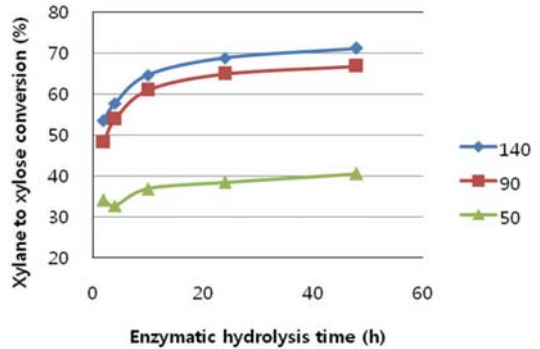


Fig. 3. Enzymatic saccharification of xylan to xylose from aqueous ammonia soaked corn stover with different treatment temperature and time (140°C-1 h, 90°C-16 h, and 50°C-6 days).

다는 많지 않았다. 구조적 성분 중에는 리그닌이 탄수화물 보다 암모니아 수용액 처리에 의한 용출 정도가 더 높게 나타났다.

고온에서 단기간 처리가 리그닌과 자이란의 용출 제거에 보다 효과적이었다. 140°C 용출 처리에서 셀룰로오스의 용출도 가장 크게 나타났다. 효과적인 구조용 성분의 용출에 의하여 셀룰로오스와 자이란의 효소 당화가 더 잘 진행되었다. 셀룰로오스의 당화는 50°C와 90°C도 처리 조건에서 70% 전환율을 보인데 비하여 140°C 처리 조건에서 80%의 전환율을 보였다. 자이란의 단당 전환율은 셀룰로오스 보다 낮게 나타났으며 90°C와 140°C로 처리한 옥수수 줄기의 경우 70%인데 비하여 50°C로 처리한 경우 40%이었다.

#### 사 사

본 연구는 학술진흥재단 2007년도 지역대학 우수과 학자 지원 사업(F00023)에 의하여 수행되었습니다.

#### 참 고 문 헌

1. 신수정, 유주현, 조남석, 최인규, 김문성, 박종문. 2009. 암모니아수 침지처리가 백합나무(*Liriodendron tu-*

- lipifera* L)의 화학적 조성 변화와 효소 당화에 미치는 영향. 펄프·종이 기술. 펄프·종이기술. 41(1): 61~66.
- Gollapalli, L. E., B. E. Dale, and D. M. Rivers. 2002. Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw, Appl. Biochem. Biotechnol. 98~100: 22~35.
  - Hahn-Hägerdal, B. M. Galbe, M. F. Gorwa-Grauslund, G. Liden, and G. Zacchi. 2006. Bio-ethanol the fuel of tomorrow from the residues of today, Trends Biotechnol. 24(12): 549~556.
  - Kim, T. H., J. S. Kim, C. Sunwoo, and Y. Y. Lee. 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia, Bioresour. Technol. 90: 39~47.
  - Kim, T. H. and Y. Y. Lee. (2007) Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures, Appl. Biochem. Biotechnol. 137~140: 81~92
  - Mielenz, J. R. 2001. Ethanol production from biomass technology and commercial status, Ecol. Ind. Microb. 4(3): 324~329.
  - Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Bioresour. Technol. 96: 673~686.
  - Shin, S.-J. and N.-S. Cho. 2008. Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, Cellulose 15: 255~260.
  - Sluiter, A., R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, and D. Templeton. 2005. Determination of Extractives in biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL (National Renewable Energy Laboratory). [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html).
  - Wyman, C. E., B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch, and Y. Y. Lee. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, Bioresour. Technol. 96: 1959~1966.