

유채대의 이단 고온 처리에 의한 알콜 발효용 당화물 생산

한재건¹ · 오성호¹ · 정명훈¹ · 김승섭¹ · 서현범² · 정경환² · 장영석³ · 김일철⁴ · 이현용^{1,5*}

¹강원대학교 BT특성화 학부대학, ²충주대학교 바이오산업학과, ³농촌진흥청 작물과학원 목포시험장, ⁴전남대학교 생물학과, ⁵강원대학교 생명공학연구소

Two-step High Temperature Pretreatment Process for Bioethanol Production from Rape Stems

Jae-Gun Han¹, Sung-Ho Oh¹, Myoung-Hoon Jeong¹, Seung-Seop Kim¹, Hyeon-Beom Seo²,
Kyung-Hwan Jeong², Young-Seok Jang³, Il-Cheol Kim⁴, and Hyeon-Yong Lee^{1,5*}

¹College of Bioscience & Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

²Department of Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyung, Chungbuk 368-702, Republic of Korea

³Mokpo Experiment Station, National Institute of Crop Science, RDA, Muan, Chonnam 534-830, Korea

⁴Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁵Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract Two-step pretreatment process was investigated to efficiently hydrolyzed rape stems for obtaining fermentable sugars. The process was consisted of two consecutive steps as 200°C and 15 MPa and 374°C and 24 MPa with the flow rate of 5 mL/min. Under this condition, 5.5 (g/L) of glucose and 25.6 (g/L) of xylose were obtained from rape stems, showing 18% of glucose yield based on 25% cellulose in the rape stems. It was also found that this process could generate less amounts of toxic residues, such as HMF (Hydroxy- Methyl-Furfural) and other fufural components during hydrolysis process. It could reaction maintain relatively high ethanol production yield as 90% of theoretical conversion yield from glucose. Therefore, this pretreatment process could be applied to hydrolyze other cellulose and marine resources such as woods, stem and algae for bioethanol production.

Keywords: rape stems, two-step pretreatment, alcohol fermentation

서 론

유채는 올레인산 (C18 : 1)의 함량이 높아 바이오 디젤로서의 상용 가능성이 매우 높아 이상적인 바이오디젤용 자원으로 평가받고 있다 [1]. 그러나 바이오 디젤용 종자 채취 후, 남은 부산물인 유채대는 소재화 할 수 있는 처리 방안이 미비하므로 목질계 바이오매스인 유채대의 처리방안이 요구되는 실정이다. 지금까지는 대부분의 유채대는 폐존자원으로서 사료나 거름으로 이용되어 왔다. 그러나 목질계 바이오매스는 식량자원에 영향을 끼치지 않아 바

이오 에너지 자원으로 가치가 있다 [2]. 대부분의 리그노셀룰로오스 물질 또는 식물 바이오매스는 바이오 에탄올생산을 위한 높은 당함유를 가지고 있다. 주로 리그노셀룰로오스 바이오매스의 경우 셀룰로스 (35-50%), 헤미셀룰로스 (20-35%) 그리고 리그닌 (10-25%)을 함유한다 [3]. 셀룰로스는 glucose가 수소결합 및 Van der Waals 힘에 의해 규칙적으로 결합된 고분자 화합물이며 헤미셀룰로스는 5탄당이 β-1,4 형태로 결합되어 셀룰로스와 리그닌을 이어주는 역할을 수행하며 pentose (xylose, arabinose), hexose (mannose, glucose, galactose)로 이루어져 있다 [4-5].

그러나 목질계 바이오매스 성분 중 리그닌은 *p*-hydroxyphenylpropanoid로 구성되어 있으며 C-C와 C-O-C로 연결되어 있다. 세포벽의 구성요소이며 물에 대항하여 매우 안정적인 불용성 난분해성고분자 화합물이기 때문에

*Corresponding author

Tel: +82-33-250-6455, Fax: +82-33-250-6560

e-mail: hyeonl@kangwon.ac.kr

다당류의 분해를 막는다 [6]. 이러한 리그닌의 높은 함량으로 인해 바이오 에탄올 제조에 있어서 기술적 경제적 어려움에 직면하였다. 따라서 바이오매스의 생산단가를 낮추기 위해 다양한 전처리 공정을 이용해 리그닌 제거 후, 헤미셀룰로스와 셀룰로스의 결정성을 감소시켜 가수분해율을 높이고 다당류의 수율을 증진시키는 방법에 관한 최적화 처리 조건 확립에 집중적인 관심을 갖고 있다.

기존의 산을 가하는 전처리는 가수높은 가수분해 반응으로 인해 반응기의 부식을 초래 할 수 있으며 발효과정에서의 바이오매스와 효소와의 반응을 저해 하여 바이오 에탄올 생성 수율을 떨어뜨린다 [7,8]. 이러한 기존의 전처리 공정상의 문제점을 해결하고자 산처리를 통한 초임계 조건을 통한 전처리 공정이 연구되고 있다 [9]. 헤미셀룰로스, 셀룰로스는 270°C 부근에서 분해가 시작되어 370°C 부근에서 (아임계) 급격하게 분해현상이 발생하여 리그닌은 200°C 이상에서 분해가 일어나기 시작하여 초임계 온도인 400°C 부근에서 가수분해 현상이 활발한 것으로 알려져 있다 [10]. 그러나 처리 과정에 있어서 셀룰로스 및 리그닌 성분은 다당류 형태로 가수분해 되나 일부는 효모 생산에 해로운 부산물인, furfural, 5-hydroxy methylfurfural (HMF), levulinic acid, penolic compound 등이 생성될 수 있다 [11].

유체대의 가수분해율 증가와 더불어 다당류의 회수율을 높이며 발효저해 부산물을 최소화하기 위해서는 산을 사용하지 않는 공정을 통해 오탄당 (C₅)인 xylose와 육탄당인 (C₆) glucose를 모두 회수할 수 있는 공정이 이상적인 대안이라고 볼 수 있다. 따라서 본 연구는 고온고압 상태의 아임계 및 초임계의 연속적 전처리 조건을 통한 가수분해 공정을 도입하여 셀룰로직 농산 부산물인 유체대를 효과적으로 분해하고 바이오 에탄올 생산이 가능한 당화물질의 가수분해 수율을 높여 기존의 산처리시 수반되는 해로운 부산물을 최소화 하고자 한다. 이로서 궁극적으로 에탄올 생산수율 향상에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

재료

제주도에서 수확한 (2008년) 유채를 종자 채취 후, 유채 전체를 열풍건조기 40°C에서 48시간 건조한 후 불밀로 미세한 분말상태로 분해하였다.

이단 고온 전처리 조건

본 연구에 사용된 전처리 장치는 Fig. 1에서 보듯이 유체대의 가수분해를 위한 주반응기 (heat reactor), 물주입용 펌프 (pump), 반응정지를 위한 쿨러 (cooler), 가수분해물 분획을 위한 필터 (filter) 및 밸브 (valve)로 이루어져 있으며 이단 복합 가수분해 반응으로서 1단계로 220°C,

15 Mpa 조건에서 미세하게 분쇄된 유채대 10 g을 5 mL/min로 증류수를 관내 투입하며 가수분해를 시킨 후 (step 1), 1단계 조건에서 처리된 유체대의 액상을 여과 후 액상부분을 회수하고 1단계 고체 부산물을 다시 375°C, 23 Mpa 조건에서 0.5 mL/min로 증류수를 관내 투입하며 이단 추출했다 (step 2). Step 1에서 처리된 가수 분해액을 Compositeness Sub Critical Water Pretreatment (CSCWP1), Step 2에서 처리한 가수분해물을 Compositeness Super Critical Water Pretreatment (CSCWP2)라 명하였다.

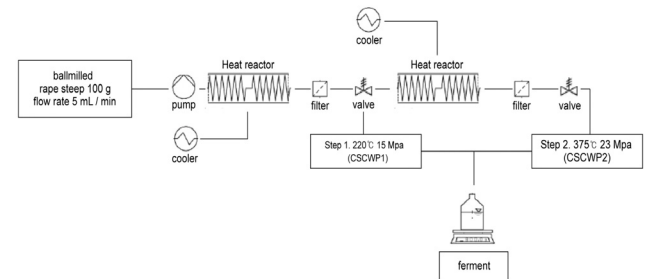


Fig. 1. Continuous two-step pretreatment for rape stems.

가수 분해액의 glucose 및 xylose 농도 측정

각 단계별로 가수분해된 당화액내 존재하는 glucose와 xylose의 정량분석을 위해 HPLC를 통한 정량분석을 실시하였다. 해당 시간에 따른 조건의 가수분해물을 0.4 μm 필터로 여과하여 HPLC로 (Dionex, USA) 분석하였다. 조건은 85°C에서 물을 전개용매로 하여 0.6 mL/min의 유속으로 Aminex-87P (Bio-Rad, USA) 컬럼을 이용하여 refractive-index detector로 분석하였다 [12].

전처리 부산물 내 발효저해물질 농도 측정

발효저해 부산물 중 대표 물질인 5-hydroxy methylfurfural (HMF, sigma USA)를 기준물질로 하여 상기 조건의 가수분해물 (step1, step 2)을 0.2 μm 필터로 여과하여 HPLC로 (Dionex, USA)분석하였다. 조건은 65°C에서 5 mM 황산을 전개용매로하여 0.5 mL/min의 유속으로 Aminex HPX-87H 컬럼 (Bio-Rad)을 이용하여 refractive-index detector로 분석하였다 [12].

전처리 당화물의 에탄올 발효

위 step 1과 step 2에서 얻어진 가수분해 액을 5배 농축하여 글루코스 농도를 27.5 g/L하여 바이오 에탄올 생산성 검증을 위하여 Flask culture를 하였다. seed culture는 효모균주 *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 24858)을 사용하여, YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%) 배지를 이용하여 shaking incubator (30°C, 150 rpm)에서 24시간 동안 배양하였다. Flask culture를 위해 기본 YPD

배지에서 glucose를 대신하고 최적조건 가수분해 당화물 200 mL에 yeast extract 1%, peptone 2%를 넣어 제조 하였다. 배지의 pH는 NaOH powder를 이용하여 5.5로 맞추며 5 mL (배양부피 10%)의 seed culture를 접종하여 shaking incubator (30°C, 150 rpm)에서 배양 하였다.

배양액의 바이오 에탄올 함량을 측정을 위해 GC (HP-5890 II, Agilent)를 이용하여 분석하였다. Flame Ionization Detector (FID)를 이용하여 오븐온도를 150°C, injector와 FID 온도는 250°C로 조절하였다. N₂를 carrier gas로 이용 하였으며 흐름은 50 mL/min, 컬럼은 INNOWax column (30 m × 0.32 mm, Agilent 19091N-113)을 사용하였다.

통계

SPSS program (ver. 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 t-test로 검정하였으며 모든 data는 평균 ± 표준편차 (Mean ± standard deviation)로 나타내었다.

결과 및 고찰

단계별 전처리 액 내 당분석

Fig. 2와 Fig. 3는 각 단계 별로 처리시간대에 따른 글루코스와 자일로스의 생성을 나타낸 그림이다. 본 연구에서는 사전 유체대로부터 자일로스 구성성분인 헤미셀룰로스와 글루코스 구성성분인 셀룰로스의 성분비를 연구하였다 [13].

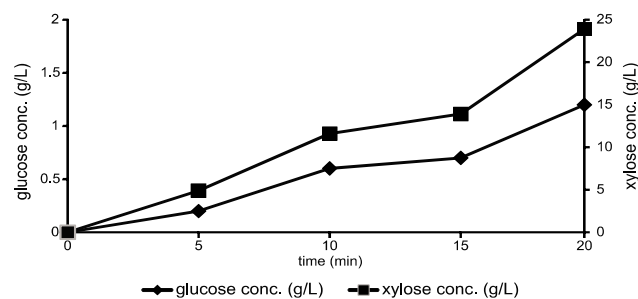


Fig. 2. Time profile of yielding glucose and xylose from rape stems by step1 process (CSCWP1).

연구 결과 유체대 중 23%의 셀룰로스와 32.4%의 헤미셀룰로스로 구성 됨을 확인하였다. Step 1인 CSCWP1의 경우 15분 안에 유체대 전체 전처리 용량 대비 가수분해율이 55%인 23.9 g/L의 xylose가 가수분해되었고 가수분해율이 4%인 1.2 g/L의 글루코스가 가수분해 되었다. 또한 step 2인 CSCWP2에서는 1단계에서 가수분해 되지 않았던 셀룰로스 분해효소인, 셀룰라제 처리를 통하지 않고 가수분해율이 14%인 4.3 g/L의 글루코스가 가수분해 되었다. 이는 Table 2에서 나타나듯이 다른 전처리 방식의 가수분해 수율을 비교해본 바, 오탄당인 자일로스는 비슷한 수치를 보이나

현재 상용되는 효모균주로 즉시 에탄올 발효가 가능한 육탄당인 글루코스의 경우는 18%의 높은 전처리 가수분해 수율을 나타내었다 [14-15].

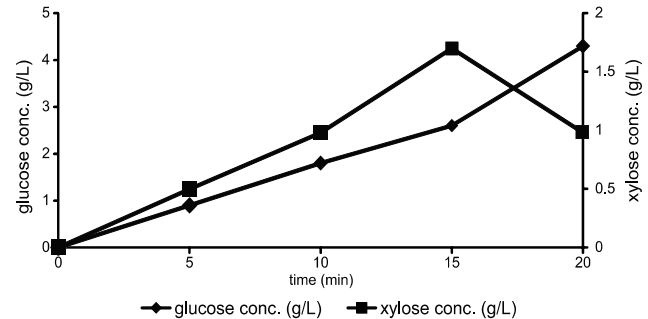


Fig. 3. Time profile of yielding glucose and xylose from rape stems by step2 process (CSCWP2).

처리 단계별 결과로 볼 때, 유체대에서 가수분해되는 바이오매스의 종류가 다르며 이단 고온 처리를 통해 glucose와 xylose를 모두 고 수율로 가수분해할 수 있었으나, 처리 시간에 따른 원료의 크기, 수분함량 등을 고려되었다면 당화물 회수율을 더욱 높일 수 있을 것이라 사료된다 [10,16].

Table 1은 복합가수분해 공정별 전체 환원당과 에탄올 발효 가능 당인 step1과 step2의 전처리 가수분해를 통한 글루코스와 자일로스의 농도를 측정할 결과이며 기존 다른 공정에서는 글루코스 가수분해를 위해 별도의 셀룰라제 (cellulase) 처리를 통하였다. 그러나 본 공정에서의 이단 고온 전처리 공정만으로 고온, 고압의 증기들로 인하여 구조가 해리되면서 step 1에서는 자일로스 생성량 (23.9 g/L)이 높았으며 step 2에서는 글루코스의 생성량 (4.3 g/L)이 높아 졌다 [14,15,17].

Table 1. Analysis of fermentable sugar concentrations by CSCWP1 and CSCWP2 (TRS^{*}: Total Reducing Sugar)

process	concentration(g/L)		
	TRS [*]	glu	xy
CSCWP1(step 1)	25.1 ± 0.2 [†]	1.2 ± 0.2	23.9 ± 0.1
CSCWP2(step 2)	6.0 ± 0.1	4.3 ± 0.3	1.7 ± 0.3
Total	31.1 ± 0.2	5.5 ± 0.3	25.6 ± 0.2

[†] Mean values ± standard deviation from triplicate separated experiments are shown.

Table 2에서는 Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment (DCF) 공정에서 2% H₂SO₄ 용액, flow rate 8 L/min, 95°C, 103 Mpa, 60 min의 조건에서 최대 62%의 xylose 회수율을 보이며 본 공정보다 저온 저압의 처리 공정이나 산 처리로 인한 회수율의 증가로 xylose의 회수율이 3% 높은 보인 것으로 보인다. 그러나 시간에 따른 물의 소비량이 480 L로 막대한 양의 물의 소비되어 천연자원의 물의 낭비로 인한 수자원의 고갈, 황산 함유 물의 방출로 인한

수질오염 등 부가적인 문제가 발생 할 수 있다. 이에 반해 적은 양의 물의 유입 (10 mL/min)을 통한 flow through와 Partial flow-through 연구에서는 200°C, 24 min에서 xylose 최대 회수율을 보였으나 본 연구에 비해 20% 이상의 xylose 회수율의 차이를 보인다 [14,15,17]. 이는 200°C의 고온의 처리공정이나 부분 batch 공정의 도입으로 인한 낮은 물의 용량으로 인해 수증기압의 저 상승으로 인해 충분한 가수분해가 충분히 진행되지 못한 것으로 사료 된다. 이는 현사시 목분의 분해특성을 조사한 경우처럼 처리온도가 상승한 것에 기인되어 섬유소의 물리적 파괴가 시작되고 아세틸 관능기가 유발되어 유기산은 헤미셀룰로스의 가수분해율을 높여 리그닌의 고분자 에테르 고분자 결합이 고온의 조건에서 분해되는 것으로 사료되며, 기존 효소반응성이 높고 리그닌 처리가 용이한 알칼리처리의 단점인 긴 반응시간을 단축할 수 있을 것으로 본다 [8,18-20].

Table 2. Comparison of total sugar, xylose and glucose yields under various pretreatment conditions

Method	Sugar conversion yield		
	Xylose yield, % [*]	Glucose yield, % [*]	Total sugar, g/L
Two-step high temp. treatment	59.0	18.0	31.1
DCF Flow-through [†] (Lishi et al, 2008)	62.0	6.7	31.1
Flow-through [‡] (Liu and Wyman, 2005)	36.3	4.5	7.2
Partial flow-through [‡] (Liu and Wyman, 2005)	33.6	4.3	13.8

^{*} hydrolysis conversion yield (% w/w).

[†] highest yield conditions of pretreatment under 2% H₂SO₄, flow rate 8 L/min, 95°C, 103 Mpa, reaction time 60 min.

[‡] highest yield conditions of pretreatment under water flow rate 10 mL/min, 200°C, reaction time 24 min.

또한 부착된 증압 시스템으로 인해 적은 양의 물의 투입 (5 mL/min)으로도 농도가 증가하는 이유는 이단 고온 처리에 뿐만이 아니라 압력 조건 상승에 의한 아임계 조건과 초임계 조건의 영향으로 인하여 자일로스를 뿐만이 아니라 글루코스의 추출 수율이 증가한 것으로 보인다. 따라서 현재 상용되는 효모 균주로 즉시 처리가 가능한 글루코스 수득을 면해서는 12% 이상의 높은 차이를 보이며 저항산 전처리 공정인 DCF 공정처럼 발효저해물질인 약산그룹과, furan 그룹, 리그닌에서 파생되는 페놀계 방향족물질은 생성농도가 낮을 것으로 사료된다 [14,15,17].

가수분해물 HMF 정량분석

Fig. 4는 목질계 셀룰로스 고온 가수분해 시 생성되는 대표 발효 저해물질인 HMF 100 ppm의 농도를 지표물질로 하여, 각 처리 단계별로 생성된 HMF 농도를 비교해 보았

다. Step 1 (CSCWP1) 및 Step 2 (CSCWP2)에서 보여지는 가수분해물에 존재하는 HMF의 농도는 기존의 황산, 염산, 질산 등의 산 전처리 과정 및 효소등을 촉매로 처리하지 않아 극히 낮은 농도인 0.2 ppm이 존재 하는것으로 측정되었다. 이는 기존의 다른 공정으로 처리시 현사시 목분을 415°C 초임계 전처리조건에서 생성된 1,070 ppm 보다 현저히 낮은 수치다 [19].

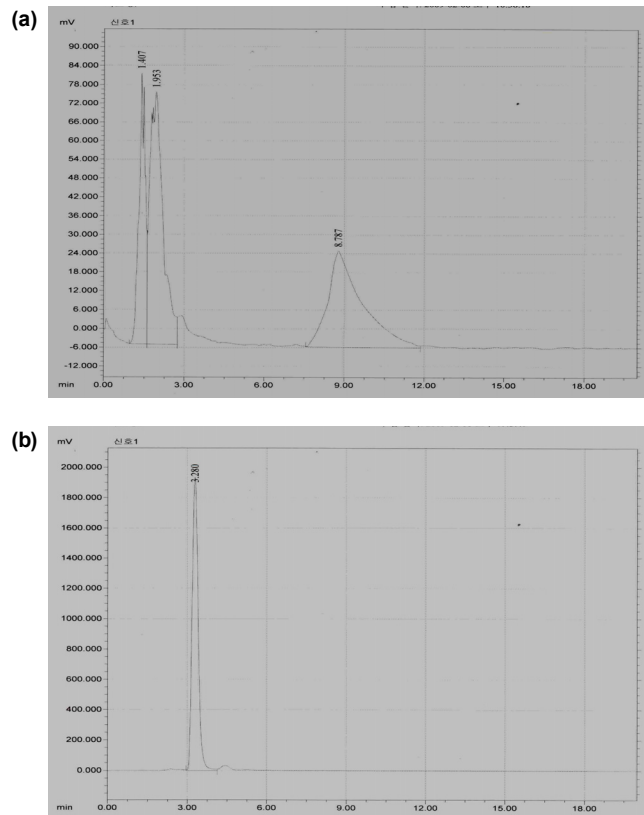


Fig. 4. Comparison of HPLC peaks of HMF concentrations by CSCWP1 and CSCWP2 : (a) Two stage high temp. treatment hydrolysates (b) HMF standard peak (100 ppm).

따라서 본 연구에 사용된 처리 공정의 가수 분해물에서는 glucose 및 xylose 이외의 가수분해 전환물질인 HMF 생성으로 인한 발효저해 및 환경적인 측면에서 문제가 없을 것으로 보인다. 이는 1,2 단계에서 처리된 온도와 압력을 대비하여 처리되는 경우, 상대적으로 안전한 완만한 온도 상승과 증가로 인해 HMF 생성반응이 저해되고 결국 최종적으로 HMF 전환율이 감소하고 고수율의 당화물이 생성된 것으로 예측된다.

이단 가수분해물의 에탄올 발효

2단 고온 전처리에 의해 얻어진 가수 분해물을 이용해 에탄올 발효실험 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 배양초기 30시간 동안은 가수 분해물을 포함한 배지환경에 대한 효

모의 적응시간으로 사료되며 30시간 이후 부터로는 효모 이차대사 산물인 바이오에탄올 생성이 급격히 된 것으로 추정된다. 바이오 에탄올의 농도는 90시간까지 급속하게 12.5 g/L까지 증가 하다가 110시간부터 12.7 g/L로 농도 증가도가 감소하였다. 결과로 보아, 낮은 농도의 발효저해 산물로 배양 후, 110시간대에 에탄올 농도가 12.7 g/L의 최대농도를 보여, 글루코스의 경우만 효모가 반응하여, 90% 이상 에탄올로 전환 되었다고 사료된다. 따라서 농산부산물을 이용한 당화물을 경제성이 있는 완전히 바이오 에탄올 생산을 위해서는 오타당인 자일로스까지 발효 가능한 균주의 개발이 필요하다고 생각된다.

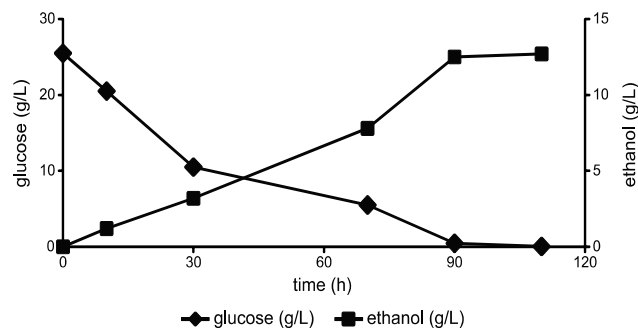


Fig. 5. Ethanol concentration and glucose consumption by the growth of *S. cerevisiae*. in adding two-step pretreatment by hydrolysates.

요 약

우리 연구팀은, 농산부산물인 유채대의 알콜 발효용 당화물 생산 가능성을 연구하였다. 이를 위해 농산부산물인 유채대를 연속적으로 5 mL/min의 속도로 산을 이용하지 않고 증류수만을 이용해 이단 고온 처리 (200°C and 15 Mpa, 375°C and 23 Mpa)하였다. 본 전처리 공정을 통한 가수분해물의 당화물 생성은 최종적으로 자일로스와 글루코스의 경우 25.6 g/L, 5.5 g/L가 생성되었다. 이는 유채대에 존재하는 글루코스과 자일로스의 초기 양 대비 각각 18%와 59%의 전환 수율을 나타낸다. 또한 이 공정은 타 공정들에 비하여 대표발효 저해 산물인 HMF의 생성량이 0.2 ppm으로 극히 낮은 수치를 보였으며, 가수분해물의 에탄올 생산시, 글루코스의 발효를 통한 에탄올 생성 전환수율이 90% 이상으로 높은 생성율을 보였다. 따라서 본 공정을 통해 다른 농산부산물이나 해조류 전체에 응용된다면, 고 수율의 에탄올 생산용 당화물을 생산할 것으로 예상된다.

감 사

본 연구는 농촌진흥청 농업과학기술개발 공동연구사업 (과제번호: 200802A01036002)의 지원에 의해 이루어졌습니다.

접수 : 2009년 3월 11일, 게재승인 : 2009년 9월 8일

REFERENCES

- Fangrui, M. and M. A. Hanna (1999) Biodiesel production : a review. *Bioresour Technol.* 70: 1-15.
- Sandburg, T. and K. Bertmont (2005) *Bioenergy-Realizing the Potential.* p. 113. Swedish Energy Agency press, Eskilstuna, Sweden.
- Wyman, C. E. (1994) Alternative fuels from biomass and their impact on carbon dioxide accumulation. *Appl. Biochem. Bioethanol.* 45-46: 897-915.
- Beguin, P. and J. P. Aubert (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS microbiol. Rev.* 13: 25-58.
- Saha, B. C. (2003) Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 279-291
- Saulnier, L., C. Marot, E. Chanliaud, and J. F. Thibault (1995) Cell wall polysaccharide interaction in maize bran. *Carbohydr. Polym.* 26: 279-287.
- Faaij, A. P. C. (2006) Bio-energy in Europe : Changing technology choices. *Energy Policy.* 34: 322-342.
- Gray, K. A. Zhao, L., and Emptage, M. (2006) *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.* 10: 1-6
- Miyafuji, H. and S. Saka (2007) Bioethanol production from lignocellulosics using supercritical water. *ACS sym. Ser.* 954: 422-433.
- Ferner, R. A. and J. O. Lephadr (1981) Examination of the thermal decomposition of kraft pine lignin by fourier transform infrared evolved gas analysis. *J. Agric. Food Chem.* 29: 29-38.
- Larsson, S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, and G. Zacchi (1999) The generation of fermentation inhibitor during dilute and hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb. Technol.* 24: 151-159.
- Linde, M., M. Galbe, and G. Zacchi (2008) Bioethanol production from non-starch carbohydrate residues in process stream from a dry-mill ethanol plant. *Bioresour Technol.* 99: 6505-6511.
- Sun, J. X., F. Xu, X. F. Sun, B. Xiao, and R. C. Sun (2005) Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. *Polym Degrad Stabil.* 88: 521-531.
- Lishi, Y., Z. Hongman, C. Jingwen, L. Zengxiang, J. Qiang, J. Honghua, and H. He (2008) Dilute sulfuric acid cycle spray flow-through pretreatment of corn stover for enhancement of sugar recovery. *Bioresour Technol.* 100: 1803-1808.
- Chaogang, L. and C. E. Wyman (2005) Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresour Technol.* 96: 1978-1985.

16. Sassner, P., C. G. Martensson, M. Galbe, and G. Zacchi (2008) Steam pretreatment of H₂SO₄ impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresour Technol.* 99: 137-145.
17. Araque, E., C. Parra, J. Freer, D. Contreras, J. Rodriguez, R. Mendonc, and J. Benza (2008) Evaluation of organosolv pretreatment for the conversion of *Pinus radita* D. Don to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 43: 157-162.
18. Kim, C. H., M. C. Kwon, S. A. Qadir, B. Hwang, J. H. Nam, and H. Y. Lee (2007) Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola schalinensis* A. Bor by ultra high pressure extracts process. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 6: 411-416.
19. Choi, J. W., H. J. Lim, K. S. Han, H. Y. Kang, and D. H. Choi (2005) Characterization of degradation features and degradative product of poplar wood (*populus alba* × *glandulosa*) by flow type-supercritical water treatment. *J. Kor. For. En.* 24: 39-46.
20. Silverstein, R. A., Y. Chen, R. R. Sharma-Shivappa, M. D. Boyette, and J. Osborne (2007) A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour Technol.* 98: 3000-3011.