

# 초분류 3가지 암모니아수 침지 처리에서 바이오매스 성분(자이란과 리그닌) 용출 정도와 효소당화의 관계

신수정 · 한심희<sup>1</sup> · 조남석 · 박종문<sup>†</sup>

(2010년 2월 2일 접수: 2010년 3월 15일 채택)

## Relationship between biomass components dissolution (xylan and lignin) and enzymatic saccharification of several ammonium hydroxide soaked biomasses

Soo-Jeong Shin, Sim-Hee Han<sup>1</sup>, Nam-Seok Cho and Jong-Moon Park<sup>†</sup>

(Received February 2, 2010: Accepted March 15, 2010)

### ABSTRACT

Corn stover, hemp woody core and tobacco stalk were treated by dilute ammonium hydroxide soaking for improving the enzymatic saccharification of cellulose and xylan to monosaccharides by commercial cellulase mixtures. As more lignin removal by dilute ammonium hydroxide impregnation led to more enzymatic saccharification of cellulose and xylan to monosaccharides (corn stover vs tobacco stalk). There was no relationship between xylan removal by dilute ammonium hydroxide impregnation and enzymatic saccharification of polysaccharides in pretreated samples. Except corn stover, lower temperature and longer treatment (50°C-6 day) was less lignin removal than higher temperature and shorter treatment (90°C 16 h). Corn stover showed the highest enzymatic saccharification of cellulose and xylan but tobacco stalk showed the lowest.

**Keywords** : *ammonium hydroxide soaking, xylan, lignin, enzymatic saccharification, corn stover, hemp woody core, tobacco stalk*

• 충북대학교 농업생명환경대학 목재·종이과학과 (Chungbuk National University, College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Department of Wood and Paper Science, Cheongju, Chungbuk, South Korea)

<sup>1</sup> 국립산림과학원 산림자원육성부 산림유전자원과, Department of Forest Resources & Development, Division of Forest Genetic Resources, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

<sup>†</sup> 교신저자 (Corresponding Author): E-mail: jmpark@cbu.ac.kr

## 1. 서론

목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌을 주성분으로 구성되어 있다. 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 단당류가 목재 생합성 과정에서 탈수 축합 반응에 의하여 생성된 다당류 물질로 산이나 효소를 사용하는 가수분해 반응으로 단당류로 전환시킬 수 있다. 산에 의한 단당류로의 가수분해는 역사적으로 1819년 프랑스의 화학자 Braconnot가 목재를 진한 황산으로 처리하여 단당을 생성시킨 이래, 190년간 세계 각국에서 많은 연구와 실용화가 시도되어왔다. 산 가수분해 반응은 상온에서 진한 산을 이용해 1차 가수분해하여 희석하고, 끓여서 2차 가수분해에 의하여 단당류를 회수하는 방법과 묽은 산 상태로 고온(170-190°C)에서 처리하여 단당을 회수하는 묽은 산 방법이 있다.<sup>1)</sup> 목질계 바이오매스는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌 사이의 복잡한 구조로 인하여 효소에 의하여 효과적으로 가수분해되기 어려운 구조를 하고 있다. 이를 극복하기 위하여 리그닌이나 헤미셀룰로오스 제거, 셀룰로오스의 결정 구조의 완화, 재료 내 공극 증가에 의하여 효소가 효과적으로 작용할 수 있게 도와주는 전처리 공정이 필수적이다. 물리적, 화학적, 생물학적 방법이나 이들의 조합에 의한 전처리 공정을 통하여 효소가 가수분해 효율을 획기적으로 증대시킬 수 있다.<sup>2)</sup>

암모니아나 암모니아수를 사용하는 전처리 공정은 암모니아 폭쇄법(ammonia fiber explosion, AFEX), 암모니아수 침지법이 있다. 암모니아 폭쇄법은 물리화학적 전처리 방법으로 액체 상태의 암모니아를 일정시간 고온 고압조건에서 처리한 후, 급격하게 압력을 완화시키는 방법으로 증기 폭쇄법과 유사하다. 증기 대신에 암모니아 기체가 사용되며, 처리 조건은 전건 바이오매스 1kg에 대하여, 1-2kg의 암모니아를 투입하여 90°C에서 30분간 반응을 유지한 후, 급격하게 압력을 제거한다.<sup>3-5)</sup> 암모니아수 침지법은 바이오매스 성분 내 에스테르 결합을 분해하여 헤미셀룰로오스나 리그닌의 용출을 일으킨다. 옥수수 바이오매스나 스위치그래스(switchgrass)에 대한 암모니아수 처리 결과, 옥수수 바이오매스에서는 60-80%의 리그닌 용출을 보였고, switchgrass에서는 65-85%를 리그닌을 용출시켰다.<sup>6-8)</sup>

자가 가수분해와 묽은 산 가수분해로 전처리를 한,

옥수수 바이오매스의 셀룰로오스 효소 당화에서 자이란이 제거될수록 셀룰로오스의 효소당화가 증가하였다.<sup>9)</sup> 자가 가수분해와 산 가수분해 반응조건에서 자이란이나 리그닌의 제거 정도가 셀룰로오스의 효소 당화를 향상시켰다.

묽은 산이나 자가 가수분해에 의한 자이란 제거에 의한 전처리 기술에서는 자이란 제거에 의한 공극 생성으로 셀룰라아제가 효과적으로 작용하여 효소당화율이 높아진다고 보고되어 왔다. 리그닌 제거와 자이란 제거에 효과적인 암모니아수 침지 처리를 통하여 어느것이 더 효소당화에 영향을 미치는지 분석하고자 하였다. 본 연구에서는 옥수수 바이오매스, 대마 목부, 담배 줄기 3가지 초분류 목질계 바이오매스의 화학적 조성과 탄수화물 조성을 분석하였다. 이들 시료를 암모니아 침지 처리하여 후, 전체적인 물질평형으로부터 리그닌과 자이란의 제거 정도를 계산하였고, 침지 처리 시료를 상업용 효소 복합제를 사용하여 효소당화를 실시한 후, 리그닌과 자이란의 제거 정도가 잔류 셀룰로오스와 잔류 자이란의 효소 당화에 미치는 영향에 대하여 탐구하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

옥수수 바이오매스는 충북 청원군 북이면 농가에서 2008년 4월 말 파종하여 같은 해 7월에 열매를 수확한 후, 밭에 버려진 옥수수 줄기를 8월 7일에 잘라서 공기 중에 2주간 건조시킨 후, 분말을 제조하였다. 산업용 대마는 충남 당진군 농업기술센터의 도움으로 2007년 4월에 파종하여 같은 해 8월에 수확한 산업용 대마 시료를 공급받았다. 이런 시료를 손으로 인피 섬유와 목부 바이오매스로 분리한 다음, 목부 바이오매스를 분쇄하여 분말을 제조하였다. 담배 줄기는 충북대학교 구내 농장에서 2007년 4월에 이식 재배하여, 잎 수확이 끝난 후 버려지는 줄기를 8월 15일에 잘라서 공기 중에 2주간 건조시킨 후 분쇄하였다. 각 분말은 체로 쳐서 40-60 mesh 부분을 골라서 실험에 사용하였다.

### 2.2 실험 방법

암모니아수 침지 방법, 침지 전 후 화학조성 분석, 암

모니아 침지 처리 시료의 효소 당화 및 당화액 분석은 전보에서 기술한 방법에 따라 실시하였다.<sup>10-12)</sup> 반응 온도와 시간은 50℃에서는 6일과 90℃에서는 16시간 반응시킨 후, 세척 여과하여 반응 후 용액에 녹는 부분을 제거하고, 고형분을 공기 중에서 건조시킨 후, 조성분석에 사용하였다. 암모니아수 침지 처리 후, 효소당화에 사용하는 시료는 세척 후 건조시키지 않은 상태에서 농도를 조절하여 효소당화에 사용하였다.

### 2.3 물질평형 및 자이란과 리그닌의 용출 제거도 계산

물질 평형의 계산은 암모니아수 침지 처리 후, 암모니아 침지 처리에 의하여 용출 제거된 바이오매스의 양을 측정하고, 암모니아 침지 처리 후 세척 건조된 시료의 화학 조성을 분석하여, 전체적인 물질 평형을 계산하였다. 무처리 시료의 자이란과 리그닌 함량을 기준으로, 용출 제거된 자이란과 리그닌 양의 용출 정도를 계산하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 옥수수 바이오매스, 대마 목부 및 담배 줄기의 화학적 조성

옥수수 바이오매스, 대마 목부 및 담배 줄기의 화학적 조성 분석과 당류 조성 분석 결과 (Table 1 및 Table 2), 초본류 목질 바이오매스 내 화학적 조성의 차이가 크게 나타났다. 옥수수 줄기에서는 열수 추출물 함량이 담배 줄기나 대마 목부에 비하여 특이하게 높았다. 리그닌 함량은 옥수수 바이오매스와 담배 줄기가 비슷하였지만, 대마 목부의 경우, 3.6-3.9% 높게 나타났다. 열수 추출물 함량이 높은 옥수수 바이오매스에서 다당류 함량이 담배 줄기나 대마 목부에 비하여 4.4-5.6% 낮게 나타났다. 다당류 내 당 조성 분석에서 셀룰로오스의 함량은 37.5-41.2%로 비슷하였지만, 자이란의 함량은 담배 줄기에서 32.9%로 옥수수 바이오매스(22.4%)보다 월등하게 높게 나타났다.

### 3.2 암모니아수 침지 처리에 의한 리그닌의 제거

암모니아수 침지 처리에서, 옥수수 바이오매스 내 산불용성 리그닌 성분의 용출이 크게 나타났다 (Table 3). 옥수수 바이오매스의 높은 열수 추출물 함량과 산불용성 리그닌의 암모니아수에 의해 용출이 용이했던 것은, 아마도 옥수수 바이오매스 내 성분들이 담배 줄기나 대마 목부에 비하여 상대적으로 목질화 과정이 덜 진행되어, 열수 추출과 암모니아수 침지 처리에서 더 많은 성

**Table 1. Chemical composition of hemp woody core, corn stover and tobacco stalk**

	Chemical Composition (%)			
	Acetone solubles	Hot-water solubles	Lignin	Carbohydrates
Corn stover <sup>11)</sup>	1.0	23.3	13.6	62.1
Tobacco stalk	0.3	16.0	13.3	70.4
Hemp woody core <sup>12)</sup>	0.8	10.4	17.2	71.6

**Table 2. Carbohydrate composition of hemp woody core, corn stover and tobacco stalk from 1H-NMR spectroscopic analysis**

	NMR peak areas		Relative composition of carbohydrates (%)		Composition of carbohydrates (%)	
	Glucose	Xylose	Glucose	Xylose	Cellulose	Xylan
Corn stover <sup>11)</sup>	1.7036	0.4800	64.0	36.0	39.7	22.4
Tobacco stalk	1.6112	0.7077	53.2	46.8	37.5	32.9
Hemp woody core <sup>12)</sup>	1.5746	0.5816	57.5	42.5	41.2	30.4

**Table 3. Residual lignin in hemp woody core, corn stover and tobacco stalk after ammonium hydroxide treatment (based on untreated biomass) (in parenthesis, degree of lignin removal as percentage)**

	Lignin in biomass (%)		
	Untreated	50°C -6 day treated	90°C -16 h treated
Corn stover <sup>11)</sup>	13.6	5.0 (63.2%)	3.7 (72.8%)
Tobacco stalk	13.3	11.7 (12.0%)	12.5 (6.0%)
Hemp woody core <sup>12)</sup>	17.2	13.4 (22.1%)	15.0 (12.8%)

분들이 제거된 것으로 추정된다. 이러한 특성은 옥수수 줄기가 다른 초본류 바이오매스 보다 효소 당화에서 단당류로 전환이 용이한 원인으로 생각된다. 즉, 열수 추출물의 제거나 리그닌의 용출 제거로 인하여, 효소당화에 적합한 구조로 변화하여, 효소당화에 의해 단당류로의 전환율이 담배 줄기나 대마 목부보다 크게 나타났다. 암모니아 침지 처리에 의한 옥수수 바이오매스나 switchgrass 내 리그닌의 용출 정도가 옥수수 바이오매스에서는 60-80%의 리그닌 용출을, switchgrass에서는 65-85%의 리그닌을 용출시킨다고 보고 되었다.<sup>6)</sup> 리그닌 제거 정도는 담배 줄기에서는 6.0-12.0%로 낮았으며, 대마 목부에서는 21.5-30.2%로 옥수수 바이오매스에 비하여 현저하게 낮은 양의 리그닌이 용출되었다 (Table 3).

### 3.3 암모니아수 침지 처리에 의한 자이란 제거 정도

암모니아수 침지 처리에서 옥수수 바이오매스 내 자이란 성분의 용출이 가장 작게 나타났다 (Table 4). 옥수수 바이오매스에서는 상대적으로 저온 장기간 처리 조건 보다 고온 단기간 처리조건에서 더 많은 자이란이 용출되었는데, 담배 줄기나 대마 목부에서는 이와 반대의

경향을 나타내었다. 자이란 함량이 높은 담배 줄기에서, 암모니아수 침지에 의한 자이란 용출 효과도 가장 크게 나타났다. 대마 목부의 경우, 담배 줄기와 옥수수 바이오매스의 중간 정도로 자이란 용출에 의한 제거가 일어났다.

### 3.4 암모니아 침지 처리된 초본류 바이오매스의 효소 당화율과 리그닌 및 자이란 제거 정도와의 관계

자이란이나 리그닌이 제거될수록 목질계 바이오매스의 복합 셀룰라아제의 의한 효소 당화율이 향상 된다.<sup>9)</sup> 이러한 경향이 암모니아수 침지 처리 후, 자이란과 리그닌 용출 정도와의 관계에 적용할 수 있는지를 알아보기 위하여, 자이란과 리그닌의 용출 정도와 상업용 복합 셀룰라아제를 사용하는 효소당화에 의한 셀룰로오스와 자이란의 당화 정도와 비교하였다.

암모니아수 침지 처리에 의한 리그닌 용출 정도 (Table 3)와 전처리재의 효소 당화율의 비교 (Table 5)에서, 리그닌의 용출 정도가 가장 높은 옥수수 바이오매스에서 셀룰로오스 및 자이란의 효소 당화율이 가장 높게 나타났고, 리그닌 용출 정도가 가장 낮은 담배 줄기의 셀룰로오스 및 자이란의 효소 당화율이 가장 낮게

**Table 4. Residual xylan in hemp woody core, corn stover and tobacco stalk after ammonium hydroxide treatment (based on untreated biomass) (in parenthesis, degree of xylan removal as percentage)**

	Xylan in biomass (%)		
	Untreated	50°C -6 day treated	90°C -16 h treated
Corn stover <sup>11)</sup>	22.4	19.0 (15.2%)	16.7(25.4%)
Tobacco stalk	32.9	17.8(45.9%)	19.9(39.5%)
Hemp woody core <sup>12)</sup>	30.4	23.0 (24.3%)	26.3 (13.5%)

**Table 5. Degree of enzymatic saccharification at 48 h incubation for ammonium hydroxide treated hemp woody core, corn stover and tobacco stalk**

		Degree of saccharification (%)	
		50°C -6 day treated	90°C -16 h treated
Corn stover <sup>11)</sup>	Cellulose	68.0	68.6
	Xylan	40.5	66.8
Tobacco stalk	Cellulose	16.6	43.1
	Xylan	30.0	40.3
Hemp woody core <sup>12)</sup>	Cellulose	37.1	60.7
	Xylan	32.6	48.0

나타났다. 담배 줄기의 셀룰로오스 효소 당화를 제외하고는, 저온에서 장기간 침지 처리가 고온에서 단기간 침지 처리 보다 높은 효소 당화율을 보였다.

암모니아수 침지 처리에 의한 자이란의 용출 정도 (Table 4)와 전처리재의 효소 당화율 비교(Table 5)에서는, 자이란의 용출 정도와 효소 당화율의 증가 사이에 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다. 담배 줄기의 경우, 자이란의 용출이 가장 많았지만, 가장 낮은 효소 당화율을 보였고, 옥수수 바이오매스와 대마 목부의 비슷한 자이란 용출 제거 정도에서도 상이한 효소 당화율을 나타냈다.

일반적인 자이란 제거에 의한 효소 당화율 향상과 암모니아수 침지 처리에 의한 자이란 용출 제거 사이에는 상이한 메커니즘이 존재하는 것으로 생각된다. 묽은 산 가수분해나 자가 가수분해(autohydrolysis) 공정에서는 산 촉매에 의한 자이란의 산 가수분해에 의하여, 올리고당 형태의 자이란과 단당 자일로스 형태를 통해서 제거되며, 자이란이 존재하였던 위치에 공극이 만들어지고, 이렇게 형성된 공극이 복합 셀룰라아제 효소의 흡착을 용이하게 하여 효소 당화율의 향상에 기여한다. 그러나 암모니아수 침지 처리에 의하여 용출 제거되는 자이란에 대한 보다 자세한 연구가 필요하다. 유기용매 추출이나 열수 추출과정에서 제거되지 않은 자이란의 일부가 세포벽의 복합 구조를 구성하지 못한 부분에서, 암모니아수 침지 처리에 의하여 제거 된다면, 복합 셀룰라아제 효소의 흡착에 도움이 되지 않기 때문에 효소 당화율의 향상에 기여하지 못할 것으로 생각된다.

## 4. 결론

옥수수 바이오매스, 대마 목부, 담배 줄기 바이오매스에 대한 암모니아수 침지 처리 후, 자이란과 리그닌의 제거를 분석하였다. 옥수수 바이오매스의 경우, 대부분의 산 불용성 리그닌 성분들이 암모니아수 침지 처리에서 제거 되었지만, 담배 줄기의 암모니아 침지 처리에서는 산 불용성 리그닌 성분의 제거 정도가 상대적으로 적었다. 담배 줄기에서는 자이란의 제거 정도가 대마 목부나 옥수수 바이오매스 보다 컸다.

목질 성분의 제거 정도와 셀룰로오스와 자이란의 효소당화율 향상에 대한 비교에서 암모니아수 침지 처리에서 리그닌의 용출 제거가 클수록 셀룰로오스와 자이란의 효소 당화율이 높게 나타났다. 암모니아수 침지 처리에 의한 자이란의 용출 제거는 복합 셀룰라아제에 의한 효소 당화율과 사이에 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

옥수수 바이오매스, 대마 목부 및 담배 줄기의 암모니아수 침지 처리 결과, 고온에서 단기간 침지 처리한 옥수수 바이오매스의 효소 당화에 의한 단당류 생산에 가장 적합한 원료로 생각되었고 담배 줄기가 리그닌 성분의 용출이 크지 않아 가장 어려운 원료로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2008년도 정부 (교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (No. 521-2007-1-F00023)

## 인용문헌

1. 신수정, 박중문, 조대행, 김용환, 조남석, 백합나무 목분의 고농도 단당류 생산을 위한 산 가수분해 특성 연구, 목재공학, 37(6): 578-584 (2009).
2. Sun, Y. and Cheng, J., Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, Bioreour. Technol. 83:1-11 (2002).
3. Holzapple, M.T, Lundeen, J.E. and Strugis, R., Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion (APEX), Appl. Biochem. Biotechnol. 34/35:5-21 (1992).
4. Holzapple, M.T, Jun, J.-H., Ashok, G, Patibandla, S.L. and Dale, B.E., The ammonia free explosion (AFEX) pretreatment process: a practical lignocellulose pretreatment, Appl. Biochem. Biotechnol. 28/29:59-74 (1991).
5. Gollapalli, L.E., Dale, B.E. and Rivers, D.M., Predicting digestibility of ammonia fiber explosion (AFEX)-treated rice straw, Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100: 22-35 (2002).
6. 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).
7. Kim, T.H., Kim, J.S., Sunwoo, C. and Lee.Y.Y., Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia, Bioresour. Technol. 90: 39-47 (2003).
8. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia at moderate temperatures, Appl. Biochem. Biotechnol. 137-140: 81-92 (2007).
9. Yang, B. and Wyman, C.E., Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose, Biotechnol. Bioeng. 86(1): 88-95 (2004).
10. 신수정, 유주현, 조남석, 최인규, 김문성, 박중문, 암모니아수 침지처리가 백합나무(*Liriodendron tulipifera* L.)의 화학적 조성 변화와 효소 당화에 미치는 영향. 펄프 · 종이기술. 41(1): 61-66 (2009).
11. 신수정, 유주현, 조남석, 한심희, 김문성, 박중문, 옥수수 줄기의 암모니아수 침지 전처리에 의한 효소당화 향상, 목재공학 37(4): 381-387 (2009).
12. Shin, S.-J., Han, S.-H., Park, J.-M. and Cho, N.-S., Monosaccharides from industrial hemp woody core pretreatment with ammonium hydroxide, J Korea Tappi 41(5): 15-19 (2009).