

목질계 바이오매스의 효소당화에서 반탄화 전처리 영향

최효연 · 박대원[†]

서울과학기술대학교 에너지환경대학원

(2015년 1월 27일 접수, 2015년 7월 10일 수정, 2015년 7월 15일 채택)

Effect of torrefaction on enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass

Choi Hyoyeon, Pak Daewon[†]

Graduate School of Energy & Environment, Seoul National University of Science and Technology, Seoul 139-743, Korea

(Received 27 January 2015, Revised 10 July 2015, Accepted 15 June 2015)

요 약

본 연구는 바이오에탄올을 생산하고자 목질계 바이오매스의 효소당화에서의 반탄화의 영향을 비교분석하였다. 전처리로서, 목질계 바이오매스의 반탄화는 무산소 조건에서 250~350℃의 온도로 시행되었다. 또한 비이온성 계면활성제인 Tween-80을 첨가하여 반탄화로 인한 소수성변환에 대처하여 당화효율을 높이기 위한 실험을 진행하였다. 그 결과, 반탄화 전처리한 바이오매스를 효소당화한 후 글루코즈 생산량이 전처리하지 않은 바이오매스의 글루코즈 생산량보다 높았다. 그리고 Tween-80의 첨가하여 효소당화하였을 때 당 전환율이 더 높았다. 이로 인해 반탄화를 목질계 바이오매스의 전처리로 적용할 수 있으며 Tween-80을 첨가하였을 때 효소당화에 영향이 있다는 것을 알 수 있었다.

주요어 : 목질계 바이오매스, 반탄화, 전처리, 효소가수분해, Tween-80

Abstract - This study is to investigate the effect of torrefaction on enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for bio-ethanol production. As a pretreatment, the torrefaction of lignocellulosic biomass was conducted in temperature of 250~350°C in the absence of oxygen. Tween-80, nonionic surfactant, was tested to enhance saccharification efficiency by coping with hydrophobicity resulted from torrefaction. As a result, the glucose production from enzymatic hydrolysis of biomass pretreated by torrefaction was greater than that obtained from the non-pretreated biomass. Sugar conversion was higher when the biomass was saccharified with addition of tween-80. It was found that torrefaction can be applied as a pretreatment for lignocellulosic biomass and tween-80 is needed to enhance its enzyme saccharification.

Key words : lignocellulosic biomass, pretreatment, saccharification, Tween-80, enzymatic hydrolysis

[†]To whom corresponding should be addressed.
Professor, Department of Environmental Energy Engineering,
The Graduate School of Energy and Environment
Seoul National University of Science and Technology
Tel : 02-970-6595 E-mail : daewon@seoultech.ac.kr

1. 서론

현재 전 세계는 화석에너지의 고갈 및 화석연료의 한계성을 해결하기 위해 재생 가능한 바이오에너지원에 대한 관심이 증가하고 있다. 그 가운데 생물자원을 이용한 바이오 연료 및 바이오 화학 물질로의 전환은 세계적인 추세이다. 휘발유의 대체연료로는 바이오매스를 이용한 바이오에탄올의 생산이 유력한 대체 에너지원으로 알려져 있다. 바이오에탄올 생산은 사탕수수, 옥수수, 사탕무와 밀 등 당질계 및 전분질계 식용 작물로부터 생산되고 있으며, 현재 가동 중인 모든 상용화된 공정은 이러한 원료를 사용하고 있다. 미국의 경우 옥수수전분을 원료로 하여 바이오에탄올을 생산하고 있으며 브라질의 경우 사탕수수를 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 하지만, 이와 같이 식용 작물을 사용할 경우 인류의 식량문제와 부다치게 되며 따라서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적절하지 못하며, 앞으로 급속하게 증가하게 될 수송용 에탄올의 수요량을 충족시키기 위해서는 안정적인 바이오에너지 원료원이 될 수 있는 비식용 바이오매스를 활용한 에탄올을 생성하는 것이 필요하다. 2세대 바이오원료는 1세대 바이오원료와는 달리 식량 문제와 연계되지 않아서 원료 수급 안정성이 우수하여 세계 각 국에서 관심을 가지고 연구에 투자하고 있다.

바이오에탄올 생산을 위해서는 가수분해과정을 통한 당화 과정이 필수적이다. 바이오에탄올의 전체 생산 공정 중 전처리공정은 다음단계의 당화공정 및 발효공정의 효율 및 반응시간에 크게 영향을 주게 된다. 전처리 공정은 에탄올의 생산을 위한 원료인 전분질계, 목질계, 당질계 원료를 위해 이용되며, 특히 목질계 바이오매스의 경우에는 필수불가결한 공정이다.

우리나라의 경우 잉여농지가 없어서 전분질 계를 이용하여 에탄올을 생산하는 것은 많은 문제를 있으며, 목질계는 전처리 기술이나 생산비용의 증가, 낮은 수율 등의 문제가 있다. 이와 같이 여러 가지 부작용과 문제로 인해 농업부산물(옥수수대, 벗짚, 보리짚 등)과 임업부산물 및 다양한 비식용 작물을 이용하여 바이오에탄올 생산량을 늘려 나가야 할 것으로 보인다. 하지만 식물의 기관 중 나뭇잎을 바이오 에탄올 생산의 발효 원료 공급원으로서 그 가능성을 평가한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 낙엽은 연간 약 4만 톤 정도가 발생되고 있고 이를 재활용 비율은 12% 밖에 되지 않고 나머지는 대부분 폐기하고 있는데 이는 경제적 문제,

환경적 문제가 도시에서 발생하는 폐기물로 인식되고 있다. 하지만 위에 제시된 것과 같이 낙엽은 임업부산물로서 리그닌을 제거하여 당을 얻어야 하기 때문에 전처리가 필요하다.

에탄올 생산의 전처리공정에는 바이오매스 내 존재하는 셀룰로오스 결정들을 칩핑(chipping), 분쇄(grinding), 그리고 제분(milling)과 같은 물리적 처리 공정, 증기처리법, 산 전처리, 알칼리 전처리 등과 같은 물리화학공정이 있으며 미생물을 이용하여 바이오매스의 리그닌과 헤미셀룰로오스를 분해하는 생물학적 처리 공정이 있다[1-4]. 물리화학공정 중 산처리는 황산이나 염산과 같은 강산을 사용하는데 바이오매스의 가용화 효율이 높다는 장점이 있지만 강산자체의 독성과 부식으로 인한 반응기의 독성 등의 문제점이 있다. 하지만 묽은 산을 이용하면 이러한 문제점을 절감시키고 셀룰로오스의 가용화효율을 높게 한다. 또한 알칼리처리는 그 효율이 리그닌 함량에 따라 크게 달라지며 그 분해 메커니즘은 자일란, 헤미셀룰로오스와 다른 구성 성분들 간의 에스테르결합을 비누화(saponification)한다. 희석된 수산화 나트륨처리는 바이오매스의 팽창을 유도하여 이로 인한 내부표면적 증가, 결정화도의 감소, 리그닌과 탄수화물의 구조적 결합 분리 그리고 리그닌 구조의 분열 등을 유발하게 된다. 하지만 이러한 화학적 전처리를 시행할 경우 다소 문제점을 동반하기 때문에 더욱 더 적절한 전처리 방법을 모색하였고 이와 같은 문제를 해결하기 위해 250~350℃의 온도에서 열분해하는 반탄화(Torrefaction)를 적용하였다. 따라서 반탄화 전처리한 후 효소가수분해를 통해 얻을 수 있는 특성을 파악하고자 하였다. 또한 반탄화 공정 후 생기는 소수성에 대한 문제점을 보완하기 위해 비이온성 계면활성제인 Tween-80을 첨가하여 당화효율을 향상시키고자 하였다. 이에 본 실험은 낙엽을 바이오 에탄올 원료로 활용하기 위한 목적을 가지며, 연구의 목표는 반탄화 전처리 공정을 시행하여 에탄올의 발효 가능한 단당류를 생산하고 전에 통용되던 화학적 전처리의 문제점을 보완하는 것이다[5, 6, 7, 8].

2. 실험재료 및 방법

2-1. 실험원료 및 재료

본 논문에 사용된 임업부산물 계열의 바이오매스는 교내의 가로수에서 떨어진 낙엽을 무작위로 수집하여 사용하였다. 사용된 바이오매스의 반응 표면적을 높이

기 위해 1 μm 이하로 만드는 성능을 가진 분쇄기를 이용해 분말의 형태로 만들었다. 분말형태로 처리된 바이오매스는 수분이 제거되도록 dry oven을 사용하여 24 시간 이상 건조한 후 고체 성분분석 및 전처리 실험에 사용하였다.

전처리에 대한 영향을 알아보기 위한 효소당화에 이용된 효소는 Celluclast(Cellulase 1.5L, Novo Co.), Viscozyme L(Hemicellulase, Novo Co.)를 사용하였다. 또 당화에 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer)를 pH 5.5로 제조하여 사용하였다.[7]

2-2. 실험방법 및 분석방법

2-2-1. 전처리

전처리 방법은 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 바이오매스의 전처리에 적용된 반탄화 공정은 무산소 조건에서 250~300℃의 온도에서 30분 동안 시행하였다.

2-2-2. 효소당화

당화실험은 기존 셀룰로오스 계열 바이오매스의 최적 당화조건을 적용하여 수행하였다. 여기에 적용된 조건은 반응온도 50℃, 반응 pH 5.5 그리고 반응시간 24hr으로 당화에 사용된 완충용액은 potassium phosphate buffer(0.1N, pH 5.5)를 사용하였다. 산과 알칼리용액으로 전처리된 낙엽분말 1g과 potassium phosphate buffer 용액을 혼합시킨 후 전체 2%의 효소를 넣어 50℃의 shaking incubator 안에서 200rpm의 속도로 교반시키며 당화하였다. 그리고 Working Volume 대비 1, 2, 5, 10%의 Tween-80을 첨가하여 효소당화하였다. 이 때 Working volume은 50 ml이며 당화액을 원심분리 후 환원당을 측정하였다.

2-2-3. 분석방법

바이오매스의 원소 분석, 삼성분 분석, 탄수화물, 조단백 함유량 분석 등 기초특성을 분석하였다. 그리고 각각의 전처리와 효소당화 후 글루코즈 생산량을 측정하였다. 효소당화 후의 환원당 측정은 High Performance Liquid Chromatography(HPLC Acme 9000, Younglin, KOREA)를 이용하여, 이동상은 75% acetonitrile 용액으로 1.5 ml/min, 오븐 온도는 35℃ 조건에서 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 바이오매스의 기초특성 분석

낙엽의 원소 분석, 삼성분 분석 및 탄수화물 함유량을 분석하여 결과를 Table 1에 나타내었다. 바이오매스 내 탄소성분이 49.2%로 절반 가까이 분포하고 있고 약 85% 가연분으로 이루어져 있었다. 그 중 탄수화물 함량이 76.04%을 차지하고 있어 적절한 전처리 공정을 적용한다면 효과적인 글루코즈 전환율을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

3-2. 전처리로서 반탄화 후 효소당화

본 연구에서는 반탄화공정을 효소가수분해를 잘 이루어지게 하기 위해 바이오매스를 분해하는 방법인 전처리로서 적용하였다. 반탄화를 통해서 바이오매스는

Table 1. Composition of biomass

Component(%)	Biomass
C	49.195
H	5.235
S	0.202
N	0.825
Moisture	6.7015
Combustible	85.9615
Ash	7.337
Carbohydrate	76.04
Crude protein	6.64

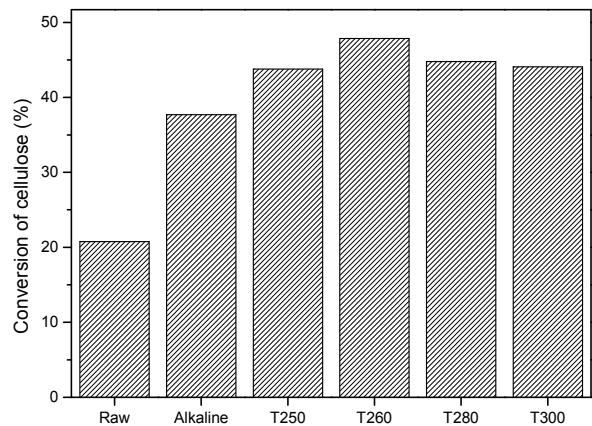


Figure 1. Comparison of alkaline and torrefaction as a pretreatment

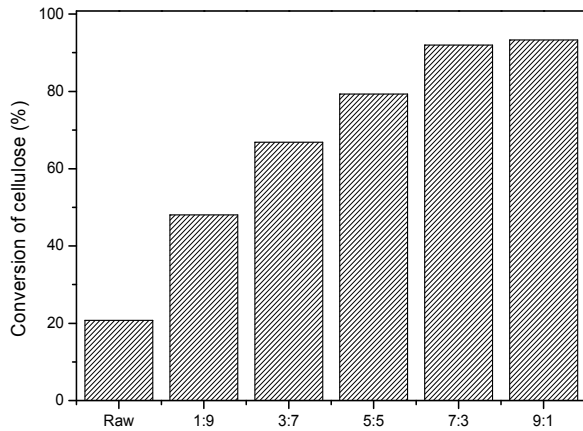


Figure 2. Enzymatic ratio(cellulase : hemi-cellulase) for hydrolysis of torrefied biomass

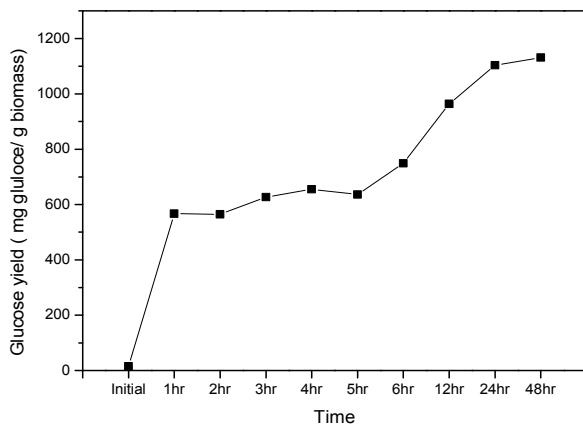


Figure 3. Glucose yield by Time course of hydrolysis of torrefied biomass

가수분해효소가 잘 침투할 수 있도록 작은 입자로 분해할 수 있었다. 반탄화 전처리한 바이오매스를 효소 당화하여 얻은 글루코즈 생산량을 알칼리 전처리 결과와 비교하여 Figure 1.에 나타내었다. 알칼리 전처리한 바이오매스의 당 전환율은 전처리하지 않은 바이오매스의 당 전환율보다 두 배 정도 높았으며 또한 반탄화 전처리한 후의 당 전환율을 비교하였을 때 37% 이상의 높은 당전환율을 나타내었다. 따라서 결과적으로 반탄화 전처리 후 당화하였을 때 효율이 높다는 것을 알 수 있었다.

3-3. 효소 주입량별 효소당화

효소당화를 할 때 효소주입량은 글루코즈 생산량에 중요한 요소로 작용한다. 셀룰로오스를 당으로 전환하는 촉매 역할을 하는 효소를 양을 다르게 하여 효소당화

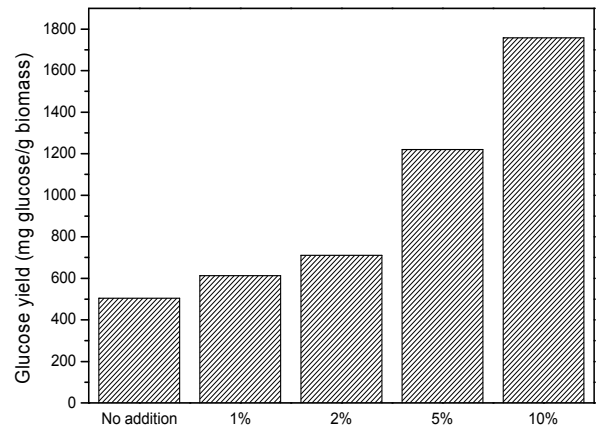


Figure 4. Glucose yield by hydrolysis with Addition of Tween-80

하였고 효소를 얼마나 주입하였을 때 가장 높은 당 전환율을 보이는지 최적조건을 도출하였다.

이 때 실험은 셀룰라아제의 주입량을 높일수록 헤미셀룰라아제의 양을 줄여나갔다. 주입량 비율이 1:9일 때 당 전환율이 이미 50% 가까웠으며 셀룰라아제의 양이 높아질수록 당 전환율은 높아졌다. 또한 이를 통해 셀룰로오스가 바이오매스에 많이 분포하고 있음을 알 수 있었다. 결과적으로 7:3과 9:1일 때 당 전환율이 비슷했다. 하지만 이 후 실험의 효소주입량 비율은 셀룰라아제의 되도록 줄이는 방향으로 실험하기 위해 5:5로 주입하여 시행하였다.

3-4. 시간별 효소당화

반탄화 전처리 후 셀룰라제와 헤미셀룰라제 효소를 주입하여 초기부터 48시간 동안 효소당화하였다. 점진적으로 당 전환율이 높아졌으며 글루코즈 생산량이 증가하였다. 1시간 후 글루코즈는 약 600 mg까지 증가하였으며, 24시간 후에도 계속적으로 증가하였다. 그러다 48시간에서는 더 이상 증가하지 않았다. 이로 인해 24시간이 반탄화 전처리 후 효소당화의 최적시간임을 판단할 수 있었고 약 1200 mg glucose /g biomass를 얻을 수 있었다.

3-5. 계면활성제의 첨가 효소당화

계면활성제를 첨가하여 효소당화의 효율을 높이는 자료들은 몇몇 있었다. 통상적으로 계면활성제를 첨가하는 이유는 기질의 결정도를 높이기 위해 계면활성제의 첨가 영향을 긍정적으로 보여주었다. 또한 소량의 효소에 계면활성제를 첨가하였을 때 더욱 효과적인 결과를

나타내었다. 하지만 본 연구에서는 반탄화 전처리한 바이오매스의 효소당화를 향상시키기 위해 계면활성제를 첨가하였다. 반탄화 전처리 과정에서 휘발성물질과 수분이 제거되면서 친수성에서 소수성으로 성질을 변화하는 것을 알 수 있었고 이는 효소당화에 영향을 끼치는 것으로 판단되었다. 따라서 용액에 아무런 영향을 주지 않는 비이온성 계면활성제인 Tween-80을 사용하여 효소당화하였다. Tween-80을 1%에서 10% 첨가하였고, 10%일 때 글루코즈 생산량은 1800mg glucose /g biomass를 얻을 수 있었다.[9,10]

4. 결론

본 연구는 알칼리 전처리와 같은 물리화학적 전처리와 비교하여 반탄화가 전처리로서 효과적인지 평가하기 위한 실험하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 낙엽은 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스로 이루어져있고 그 중 셀룰로오스의 함유량이 많기 때문에 이를 분해하는 효소인 셀룰라제의 주입량이 높으면 높을수록 높은 글루코즈 전환 효과가 있다.
2. 효소당화 시간에 따라 당 전환율은 달라졌으며 24시간 이후로 당 전환율의 변화는 없었기에 최적 당화 시간은 24시간이다.
3. 반탄화 과정 중 성질변화를 대처하기 위해 비이온성 계면활성제 Tween-80을 첨가하였고 넣지 않은 대조군보다 높은 글루코즈 생산량을 얻을 수 있었다. 또한 계면활성제의 양이 늘수록 높아짐을 알 수 있었으며 바이오매스와 계면활성제의 양을 적절히 조절하여 당화할 경우 높은 효과를 낼 수 있을 것으로 예상된다.

이로서 물리화학적 전처리보다 반탄화 전처리 후 당화하였을 때 높은 효율을 나타내며 이는 에탄올 발효단계에서도 영향을 끼칠 것으로 예상된다.

References

1. Kyung Seob Kim, Jun Seok Kim, "Characterization of Pretreatment for Barley Straw by Alkali solution", Korean Chem. Eng. Res., Vol. 50, No. 1, February, 2012, pp.18-24

2. So ri Jung, Sung Jun Kim, Gwang Yong Kim, Richard Kim, "Characteristics of Enzymatic Hydrolysis of *Ulva pertusa* Kjellman by Various Pretreatments", Journal of Korean Society of Urban Environment, Vol. 12, No. 1, 1~7(2012.6.)
3. Kevin A Gray, Lishan Zhao, Mark Emptage, "Bioethanol", Current Opinion in Chemical Biology 2006, 10:141-146
4. Parveen kumar, Diane M. Barrett, Michael J. Delwiche, Pieter Stroeve, "Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production", *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009, 48, 3713-3729
5. Sang Woo Park, Jae Kyung Yang, Kyuny Ryul Baek, "Fuel Ratio and Combustion Characteristics of Torrefied Biomass", J. of Korea Society of Waste Management, 2013, Vol. 30, No. 4. pp. 376-382
6. J.Y. Zhu, X.J. Pan, "Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation", *Bioresesource Technology*, 2010, 101, 4992-5002
7. Hyo Yeon Choi, Jae Hyung Kim, Dae Won Pak, "Comparison of Pretreatment of Fallen leaves for application evaluation", 2014, Journal of Energy Engineering, Vol. 23, No. 3, pp. 251-256
8. Wei-Hsin Chen, Po-Chih Kuo, "Torrefaction and Co-torrefaction characterization of hemicellulose, cellulose and lignin as well as torrefaction of some basic constituents in biomass, *Energy*, 2011, 36, 803-811
9. Torny Eriksson, Johan Borijesson, Folke Tjerneld, "Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose, 2002, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 353-364
10. Maobing Tu, Xiao Zhang and Mike Paice, Paul McFarlane and Jack N. Saddler, 2009, American Institute of Chemical Engineers, Vol. 25, No. 4, DOI 10.1021/bp.198