

알칼리처리에 따른 미더덕 껍질의 이화학적 특성

김민정^{1,2} · 김원백¹ · 황지희¹ · 김수애¹ · 김보람¹ · 구경윤¹ · 손흥주³ · 황대연⁴ · 정영진⁴ · 이희섭¹

¹부산대학교 식품영양학과 및 김치연구소, ²부산식품의약품안전청
³부산대학교 생명환경화학과, ⁴부산대학교 바이오소재학과

Characterization of *Styela clava* Tunic after Alkaline Treatment

Min Jung Kim^{1,2}, Won Baek Kim¹, Ji Hoe Hwang¹, Suae Kim¹, Bo Ram Kim¹, Kyoung Yoon Koo¹,
Hong Joo Son³, Dae Youn Hwang⁴, Young Jin Jung⁴, and Heeseob Lee¹

¹Department of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute, ³Department of Life Science and
Environment Biochemistry, and ⁴Department of Biomaterials Science, Pusan National University

²Busan Regional Office of Food and Drug Safety

ABSTRACT This study was performed to evaluate the effect of alkaline treatment on *Styela clava* tunic (SCT). Considerable damage to the surface of alkali-treated SCT was observed by scanning electron microscopy (SEM) in a concentration-dependent manner upon alkaline treatment. The amount of crystalline region in SCT gradually increased with increasing NaOH concentration, which was analyzed by X-ray diffraction and thermogravimetric analysis. The initial enzymatic reaction of Celluclast toward SCT was elevated by treatment with NaOH up to 1.0 N concentration due to disruption of the SCT surface by promoting binding of enzymes with SCT. However, in the late stage of the enzyme reaction, hydrolysis rate decreased with elevation of NaOH concentration, thereby increasing the amount of non-reacted residuals. This result was due to the increase in the crystalline regions in SCT.

Key words: *Styela clava* tunic (SCT), alkaline treatment, crystallinity, cellulose, cellulase digestibility

서 론

미더덕(*Styela clava*)은 우렁쟁이(*Halocynthia roretzi*)와 같은 미색류에 속하는 무척추동물로(1) 한국, 중국, 일본 뿐만 아니라 전 세계적으로 분포하는 척삭동물문 미색동물아문에 속하는 해양생물이다(2-4). 건조된 미더덕의 성분 구성은 탄수화물 42.52%, 단백질 33.12%, 회분 10.77%, 수분 9.34%, 지방질 4.25%로 보고되고 있으며, 껍질의 경우 약 60.38%가 탄수화물로 구성되어 있으나 미더덕의 살 조직은 다른 조직에 비해 67.80%의 단백질의 함량을 나타내는 것으로 알려졌다(5).

미더덕은 수산물 중에서 아미노산, 핵산계 물질, 미네랄 등이 풍부하여 영양학적으로 우수하며(6) 독특한 풍미를 지니고 있어 찜이나 찌개 등으로 이용되고 있는 식품재료(7)로, 최근 기능성 식품 및 신선식품을 선호하는 소비패턴과 맞물려 미더덕의 소비가 증가하고 있으며, 이와 더불어 미더덕의 국내 총생산량은 2005년 1,412 M/T에서 2013년 2,766 M/T로 급격히 증가하고 있다(8).

미더덕의 외피는 단백질과 산성 뮤코다당류의 복합체로 이루어진 proteoglycan으로 구성된 단단한 셀룰로오스 형태로 덮여 있으며(9), 일반적인 해양 동물과는 달리 식물성 셀룰로오스와 유사한 beta-1,4-glucoside 결합으로 구성된 치밀하고 견고한 구조의 동물성 셀룰로오스로 이루어져 있다(10). 미더덕의 39.9%에 해당하는 가식부(11)를 제외한 겉껍질 부위는 씹어서 소화하기에는 매우 단단하여, 대부분의 껍질은 폐기물로 처리되어 바닷가 등지에 방치되므로 생산지 근처의 미관을 해치고 악취를 유발하여 환경오염과 관련된 문제가 제기되고 있는 실정이다(10,12).

최근 분쇄 미더덕 껍질을 이용한 어묵의 제조(13) 및 미더덕 껍질 추출물을 활용한 곤약의 제조(14)와 같은 미더덕 껍질을 활용한 식품가공 연구들이 일부 보고되고 있으며, 식품 이외의 분야에서는 미더덕 껍질로부터 추출한 glycosaminoglycan을 이용한 기능성 화장품의 개발(9)과 용혈성 항균펩타이드에 대한 연구(7) 및 미더덕 껍질의 셀룰로오스를 이용한 창상치료제품의 개발(15) 등에 관한 연구가 있다. 하지만 폐기되는 미더덕 껍질을 소비하기 위해서는 미더덕 껍질에 존재하는 셀룰로오스를 활용한 다양한 산업적 접근이 필요한 실정이며, 미더덕 껍질 유래의 셀룰로오스를 대량으로 사용 가능한 분야로는 바이오 연료, 섬유소재, 의료용 셀룰로오스 소재 및 식품첨가물로 판단된다.

Received 7 December 2015; Accepted 15 April 2016

Corresponding author: Heeseob Lee, Department of Food Science and Nutrition, College of Human Ecology, Pusan National University, Busan 46241, Korea
E-mail: heeseoble@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2838

건조 미더덕 껍질의 대부분은 셀룰로오스를 주성분으로 하는 탄수화물로 이루어져 있으나(5), 일부 단백질 및 불순물을 제거하여 천연 셀룰로오스 막 또는 분말을 얻기 위하여 일반 목재로부터 90% 이상의 α -셀룰로오스를 얻는 공정에 NaOH를 사용하는 크라프트법 등과 같은 전처리 공정이 필요하다(12). 이를 위하여 고농도의 산과 알칼리를 고온에서 장시간 처리하는 과정이 필요하게 된다(16). 전처리 과정을 통해서 미더덕 껍질에 존재하는 셀룰로오스의 물리화학적 특성은 영향을 받게 되며, 이러한 변화는 이후의 공정에도 영향을 줄 수 있으나 알칼리처리에 따른 미더덕 껍질에 존재하는 셀룰로오스의 물리화학적 특성에 대한 연구는 상당히 미비한 상황이다.

본 연구에서는 미더덕 껍질의 전처리과정에 사용되는 수산화나트륨을 농도별로 처리하여, 알칼리처리에 의한 미더덕 껍질 셀룰로오스의 물리화학적 특성 및 효소학적 특성 연구를 통해서 미더덕 껍질 유래 셀룰로오스의 산업적 활용에 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 미더덕 껍질(*Styela clava tunic*; SCT)은 2013년 경상남도 마산시 진동면에서 자연건조한 상태의 껍질을 수집하여 이물질을 제거하고 증류수로 세척하여 동결건조한 후 micro hammer-cutter mill(Type 3, Culatti Co., Zurich, Switzerland)을 이용하여 50 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 다른 시약들은 모두 특급 이상의 시약을 사용하였다.

알칼리처리

분쇄 SCT에 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 N에 해당하는 NaOH를 처리한 후 Autoclave(HB-506-8, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 121°C에서 30분간 처리하였다. Autoclave 처리한 시료를 filter paper(Whatman No. 2, Whatman, Maidstone, UK)로 여과한 후 증류수로 수차례 세척하여 동결건조한 다음 실험에 사용하였다.

Scanning electron microscopy(SEM)

시료를 silver paste로 고정하고 ion-coater(gold)로 coating 한 후에 주사전자현미경(S3500N, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다. 20 kV에 해당하는 가속전압을 이용하여 미더덕 껍질의 표면을 이미지로 측정하였다.

X-ray diffraction(XRD)

미더덕 껍질의 X-선 회절 분석은 XRD(Empyrean series2, PANalytical, Almelo, Netherlands)를 사용하여 CuK α -1 radiation에서 가속전압 30 kV, 전류 15 mA로 하여

반사법으로 측정하였다. Diffraction pattern은 Bragg's angle $2\theta=5^\circ\sim 45^\circ$ 사이에서 $2^\circ/\text{min}$ 의 속도로 측정하였다. 시료의 상대적 결정화도(CrI, crystallinity index)는 Segal 등(17)이 제안한 방법을 변형하여 사용하였으며 결정화도는 아래의 식으로부터 구하였다.

$$\text{CrI} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100$$

식에서 I_{002} 는 $2\theta=22.8^\circ$ 에서의 피크의 크기를 의미하고, I_{am} 는 $2\theta=18^\circ$ 에서의 비결정질 함량과 관련된 최저 피크의 크기를 의미한다.

Thermogravimetric analysis(TGA)

SCT의 열중량 분석은 PerkinElmer Pyris 1 TGA system(PerkinElmer Japan Co., Ltd., Yokohama, Japan)을 이용하였으며, 승온 온도를 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 으로 하여 질소기체 하에서 30°C 에서 300°C 의 범위에서 측정하였다.

Cellulase 효소반응

NaOH 처리에 따른 SCT의 효소의 초기 반응 특성을 분석하기 위하여 cellulase 효소인 Celluclast(Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)를 이용하여 효소반응을 수행하였다. 기질의 최종 농도가 10 mg/mL가 되도록 100 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)에 녹인 후 반응용액 1 mL당 Celluclast 0.08 U를 첨가하여 40°C , 120 rpm으로 맞춰진 항온수조(JSSB-30T, JSR, Gongju, Korea)에서 효소반응을 시작하였으며, 반응시간별로 시료를 샘플링하여 4°C 에서 5분간 10,000 rpm으로 원심분리(VS-15000N, Vision Co., Bucheon, Korea) 한 후 상등액에 존재하는 환원당의 함량을 DNS법(18)을 이용하여 측정하였다. 100°C 에서 5분간 발색시킨 후 microplate reader Model 680(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 포도당을 기준물질로 사용하여 정량하였다.

NaOH 처리에 따른 SCT의 분해도를 비교하기 위하여 반응액 1 mL당 0.4 U에 해당하는 Celluclast를 이용하여 동일한 효소반응을 수행하였으며, 48시간 반응시킨 후 반응하지 않고 남은 기질을 에탄올 용액으로 침전시킨 다음, 4°C 에서 5분간 10,000 rpm으로 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 이러한 과정을 수차례 반복하여 분해된 산물을 완전히 제거한 후 동결건조 하여 남아 있는 기질의 무게를 측정하였다.

결과 및 고찰

형태학적 특성

미더덕 껍질의 셀룰로오스 막은 microfibril이 그물망 형태로 중첩된 복잡한 구조를 나타낸다고 알려졌고, 바깥쪽 표면은 상대적으로 굵은 microfibril이 형성하지만 단단하

게 부착되어 있어서 micropore가 적게 존재하나 표면 안쪽의 부분은 가는 microfibril이 부드럽게 연결되어 있어서 상대적으로 가는 그물망 형태를 나타내기 때문에 많은 micropore를 가지고 있는 것으로 알려졌다(19).

SCT를 NaOH로 처리한 시료의 형태학적인 특성을 분석하기 위하여 주사전자현미경을 이용하여 분석하였으며 그 결과는 Fig. 1과 같다. NaOH와 고온처리를 하지 않은 SCT(SCT-NT)의 경우에는 Fig. 1A에서 보는 바와 같이 일반적인 식물성 섬유질에서 나타나는(20-22) 균열이 없고 부드러우며 상대적으로 매끈한 표면을 보이고, NaOH 처리를 하지 않고 단순히 고온처리를 한 SCT(SCT-0N)에서는 표면의 박리가 관찰되고 있으며 일부는 표면 일부가 떨어져 나가 micropore가 보이나(Fig. 1B) 전반적으로는 SCT와 큰 차이를 보이고 있지는 않다. 고온에서 NaOH를 처리한 경우에는 SCT의 바깥쪽 표면이 영향을 받아서 얇은 막의 형태로 일어나는 것을 볼 수 있으며 1.5 N과 2.0 N NaOH 처리와 같이 더 강한 알칼리처리를 한 경우에는 낮은 알칼리처리에서 생긴 얇은 막이 없어지면서 바깥쪽의 표면이 많이 손상된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 알칼리처리는 SCT의 셀룰로오스 막의 바깥쪽 표면에 상당한 영향을 미치는 것으로 판단된다.

X-선 회절 분석

셀룰로오스의 결정구조는 cellulose I, II, III, IV의 4가지 형태로 나누어지는데, 목재 펄프에서 유래한 천연 셀룰로오스는 cellulose I의 구조를 나타내며 X-선의 회절 패턴은 $2\theta=14.6^\circ$ 와 16.4° 에서 각각 (101)면과 (10 $\bar{1}$)면의 피크가 doublet으로, 22.6° 에는 (002)면의 피크가 singlet으로 강하게 나타나는 것으로 알려졌다(23).

SCT의 X-선 회절 패턴은 Fig. 2A에서와 같이 $2\theta=14.6^\circ$ 와 16.5° 뚜렷한 singlet 피크가 보이고 22.8° 에는 (002)면의 강한 singlet 피크를 나타내고 있다. 알칼리처리를 한 SCT의 경우에도 마찬가지로 같은 형태의 패턴이 나타나기는 하지만 처리한 NaOH의 농도가 증가할수록 3개의 피크의 크기가 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. Jung(10)의 연구에서 미더덕 껍질이 $2\theta=14.6^\circ$ 와 16.5° 에서 singlet 피크로 나타나는 것은 알칼리처리와 표백에 의한 것으로 보고하였으나, Fig. 2A에서와 같이 알칼리처리와 무관하게 모든 시료에서 동일한 패턴을 나타내므로 이러한 패턴은 미더덕 껍질에 존재하는 셀룰로오스의 고유한 특성으로 판단된다. SCT의 X-선 회절은 목재 펄프 유래의 셀룰로오스와는 달리 $2\theta=14.6^\circ$ 와 16.5° 에서와 달리 singlet 피크를 보이고는 있지만, cellulose II에서 특징적으로 나타나는 20° 와 21.7° 의 doublet 피크가 존재하지 않기 때문에 SCT는 cellulose I의 형태인 것으로 판단된다(23). 또한 X-선 회절의 결과로부터 알칼리처리 한 SCT의 결정화도를 분석한 결과는 Fig. 2B에서와 같이 고온처리와 알칼리처리 모두 SCT의 결정화도를 증가시키는 요인으로 작용하는 것으로 판단된다.

TGA 분석

TGA 분석은 온도 상승에 따른 무게의 변화 감소율을 나타내며, 시료의 고분자가 연소하는 특정 온도 영역에서의 분해속도 변화를 통해 고분자물질의 정량이 가능한 방법이다. SCT의 열적 특성에 셀룰로오스 결정의 함량이 미치는 영향은 초기 열분해온도에서 나타나며, 결정화도가 낮을수록 열에 대한 안정성이 낮아진다. Fig. 3에서와 같이 SCT-NT의 경우 비경질의 cellulose 부분이 많고, hemicellulose가 제

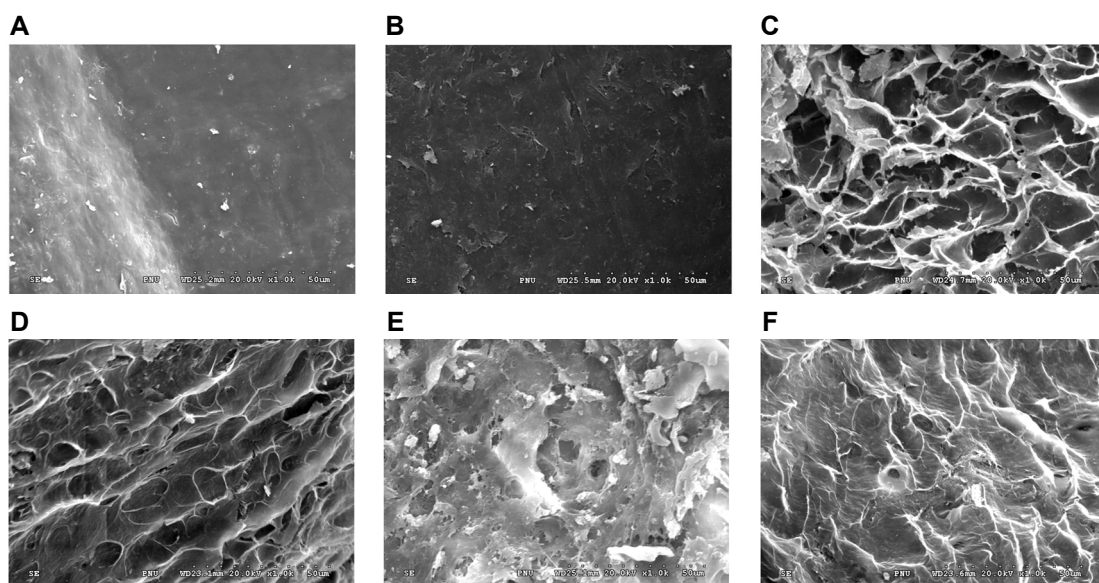


Fig. 1. SEM photographs of *Styela clava* tunic (SCT) treated with various concentrations of NaOH. A, not treated (SCT-NT); B, treated with 0 N NaOH (SCT-0N); C, treated with 0.5 N NaOH (SCT-0.5N); D, treated with 1.0 N NaOH (SCT-1.0N); E, treated with 1.5 N NaOH (SCT-1.5N); F, treated with 2.0 N NaOH (SCT-2.0N).

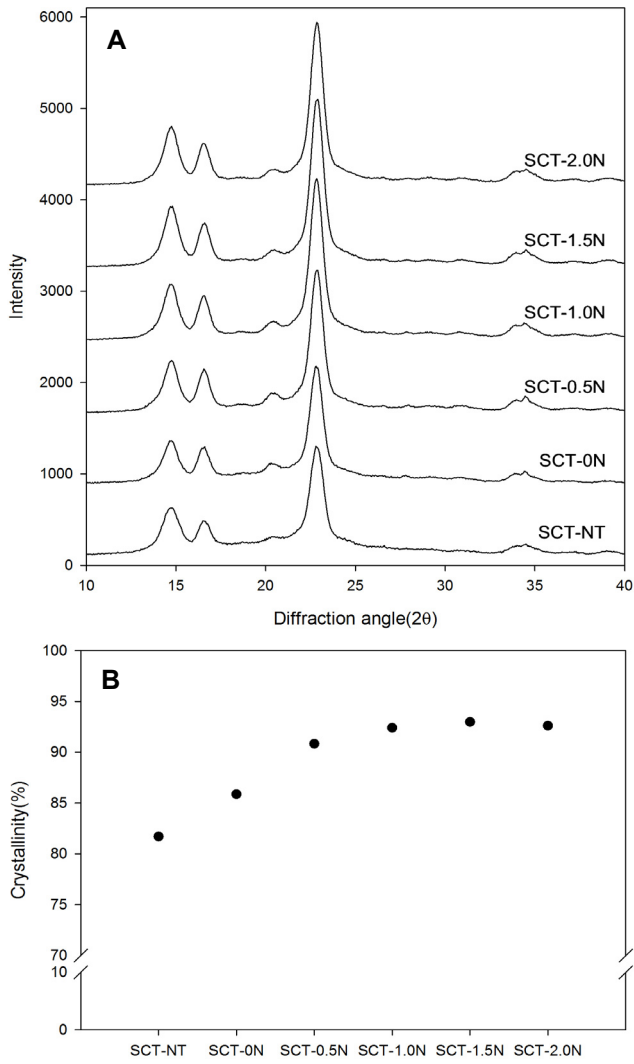


Fig. 2. X-ray diffractograms (A) and crystallinity (B) of SCT treated with various concentrations of NaOH. Abbreviations are same in Fig. 1.

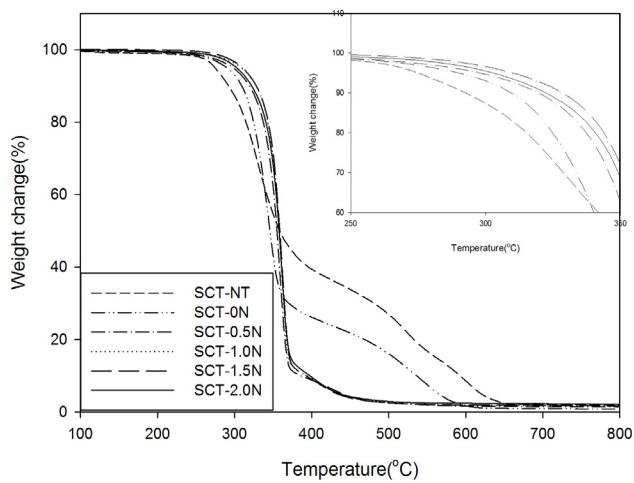


Fig. 3. TGA thermograms of SCT treated with various concentrations of NaOH. The inset shows the close view of the region between 250°C and 350°C. Abbreviations are same in Fig. 1.

거되지 않아 열안정성이 낮으므로 쉽게 고온에 파괴되기 쉬우며, 이는 알칼리처리 된 SCT와 비교했을 때 중량의 손실이 낮은 온도에서 일어나는 것으로부터 알 수 있다. SCT-0N의 경우 TGA 그래프가 hemicellulose의 열 중량 손실 그래프와 유사하므로(22), 이는 고온의 처리만으로는 hemicellulose가 제거되지 않았음을 의미한다. 이와 대조적으로 알칼리를 처리한 SCT의 경우에는 알칼리처리 농도에 따라 열안정성이 증가하는 경향이 나타나긴 하지만 전반적으로는 비슷한 형태의 패턴을 보여, 알칼리처리로 인해 SCT의 hemicellulose가 제거되었음을 의미하며 셀룰로오스가 312°C에서 열 중량 손실이 일어나는 정도와 유사한 경향을 나타내었다(24).

효소반응 특성

알칼리처리 한 SCT의 cellulase에 대한 효소반응 특성을 분석하기 위하여 Celluclast 처리 후 시간별로 반응산물을 정량하여 반응패턴을 분석하였다(Fig. 4A). SCT-NT보다 전반적으로 알칼리처리를 한 시료에서 효소반응이 잘 이루어

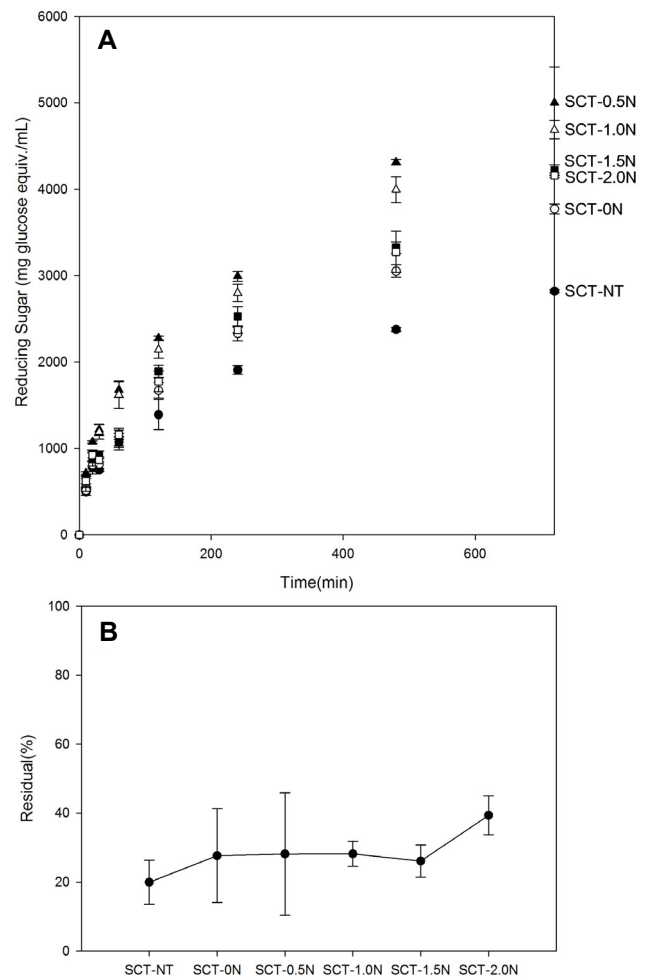


Fig. 4. Celluclast hydrolysis patterns (A) and residuals (B) of SCT after 48 h enzyme reaction. Abbreviations are same in Fig. 1.

어지는 것을 알 수 있었고, 또한 주사전자현미경에서 알칼리 처리로 인해 표면에 손상을 입은 상태와 효소반응의 속도가 관련성이 있는 것으로 보이며, Celluclast에 의한 초기반응은 효소가 기질에 접근하기 쉬울수록 반응속도가 높게 나타나는 것으로 판단된다.

5배 많은 양의 Celluclast를 첨가하여 48시간 효소반응을 수행한 후 반응하지 않고 남은 기질의 양을 측정된 결과는 Fig. 4B와 같으며, 초기반응과는 달리 결정화도가 높을수록 분해되지 않고 남는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 SCT에 대한 효소의 반응은 초기에는 표면의 손상 및 기질에 대한 접근 용이성에 따라서 반응속도가 좌우되지만, 반응 후기에는 셀룰로오스의 결정이 효소반응을 제어하는 요인으로 판단된다.

이상의 결과를 통해 SCT에 알칼리처리를 한 경우 hemi-cellulose와 같은 불순물을 제거하여 셀룰로오스만을 얻을 수 있음을 TGA 분석을 통해 확인할 수 있었지만, 이러한 처리로 인해서 SCT의 표면손상 및 결정화도의 증가를 초래하게 되며 결과적으로 효소반응속도를 감소시키는 요인으로 작용하게 되므로 SCT의 전처리 시에 알칼리처리 조건을 낮은 농도에서 진행하는 것이 필요하며, 또한 알칼리처리에 따른 결정화도를 감소시킬 수 있는 방법에 대한 연구나 기술 검토가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 미더덕 껍질(SCT)의 전처리과정에 사용되는 수산화나트륨을 농도별로 처리하여 알칼리처리에 따른 SCT 셀룰로오스의 물리화학적 특성 및 효소학적 특성에 대한 연구를 수행하였다. 알칼리처리 한 SCT를 주사전자현미경으로 분석한 결과 알칼리처리에 의해 표면에 농도 의존적으로 상당히 많은 손상을 초래하는 것을 확인할 수 있었으며, X-선 회절 분석을 통한 결정화도의 분석으로 알칼리처리에 따라서 SCT 셀룰로오스의 결정화도가 증가함을 알 수 있었다. Celluclast를 이용한 효소의 초기반응에서는 알칼리처리에 따른 SCT 표면 손상과 효소반응이 밀접한 관계가 있었으나 장시간 동안 완전분해를 하는 경우에는 알칼리처리로 인한 결정화도의 증가로 인해 분해되지 않고 남은 SCT가 많음을 확인할 수 있었다. 따라서 SCT의 전처리 시에 알칼리 사용을 최대한 적게 사용하거나 결정화도를 감소시킬 수 있는 대체 기술에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국해양과학기술진흥원의 수산실용화기술개발사업(과제번호: 112088-3)의 지원을 받아 수행되었습니다.

REFERENCES

- Houghton DR, Millar RH. 1960. Spread of the ascidian, *Styela mammiculata* Carlisle. *Nature* 185: 862.
- Hillock KA, Costello MJ. 2013. Tolerance of the invasive tunicate *Styela clava* to air exposure. *Biofouling* 29: 1181-1187.
- Wonham MJ, Carlton JT. 2005. Trends in marine biological invasions at local and regional scales: the Northeast Pacific Ocean as a model system. *Biol Invasions* 7: 369-392.
- Davis MH, Davis ME. 2005. *Styela clava* (Tunicata: Ascidiacea)—a new addition to the fauna of the Portuguese coast. *J Mar Biol Assoc UK* 85: 403-405.
- Ko SC, Lee JK, Byun HG, Lee SC, Jeon YJ. 2012. Purification and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from enzymatic hydrolysates of *Styela clava* flesh tissue. *Process Biochem* 47: 34-40.
- Lee KH, Kim MG, Hong BI, Jung BC, Lee DH, Park CS. 1995. Seasonal variations of taste components in warty sea squirt (*Styela clava*). *J Korean Soc Food Nutr* 24: 274-279.
- Lee KH, Park CS, Hong BI, Jung BC, Cho HS, Jea YG. 1995. Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt (*Styela clava*). *J Korean Soc Food Nutr* 24: 268-273.
- Information System Division. 2014. *Statistics for oceans and fisheries*. Ministry of Oceans and Fisheries, Sejong, Korea. p 69,74.
- Ahn SH, Jung SH, Kang SJ, Jeong TS, Choi BD. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Korean J Biotechnol Bioeng* 18: 180-185.
- Jung YJ. 2008. Properties of regenerated cellulose films prepared from the tunicate *Styela clava*. *J Kor Fish Soc* 41: 237-242.
- National Institute of Fisheries Science. 2009. *Chemical composition of marine products in Korea 2009*. National Institute of Fisheries Science, Busan, Korea. p 88-89.
- Seong KY, Lee S, Yim SG, Son HJ, Lee YH, Hwang DY, Jung YJ. 2015. Study for biodegradability of cellulose derived from *Styela clava* tunics. *Text Coloration Finish* 27: 149-154.
- Choi SY, Choi EY, Lee KE, Song AS, Park SH, Lee SC. 2012. Preparation and quality analysis of fish paste containing *Styela clava* tunic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1591-1595.
- Kim SK, Kim SW, Noh SJ, Kim YJ, Kang JH, Lee SC. 2013. Qualities of konjac containing tunic extract from *Styela clava*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 410-414.
- Seong KY, Koh EK, Lee S, Kwak MH, Son HJ, Lee HS, Hwang DY, Jung YJ. 2015. Preparation and characterization of high absorptive cellulose film derived from *Styela Clava* tunic for wound dressing. *Text Coloration Finish* 27: 70-79.
- Kim SM, Lee JH, Jo JA, Lee SC, Lee SK. 2005. Development of a bioactive cellulose membrane from sea squirt skin for bone regeneration—a preliminary research. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 10: 440-453.
- Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text Res J* 29: 786-794.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31: 426-428.
- Kim SM, Park JM, Kang TY, Kim YS, Lee SK. 2012. Purification of squirt cellulose membrane from the cystic tunic of *Styela clava* and identification of its osteoconductive effect. *Cellulose* 20: 655-673.

20. Gabhane J, William SP, Vaidya AN, Das S, Wate SR. 2015. Solar assisted alkali pretreatment of garden biomass: Effects on lignocellulose degradation, enzymatic hydrolysis, crystallinity and ultra-structural changes in lignocellulose. *Waste Manag* 40: 92-99.
21. Kim TH, Kim JS, Sunwoo C, Lee YY. 2003. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol* 90: 39-47.
22. Gabhane J, William P, Vaidya AN, Mahapatra K, Chakrabarti T. 2011. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment—a cellulosic ethanol perspective. *Biomass Bioenergy* 35: 96-102.
23. Krässig HA. 1993. *Cellulose, structure, accessibility and reactivity*. Gordon and Breach Publishers, Philadelphia, PA, USA. p 64-103.
24. Meng A, Chen S, Zhou H, Long Y, Zhang Y, Li Q. 2015. Pyrolysis and simulation of typical components in wastes with macro-TGA. *Fuel* 157: 1-8.