(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0015753
(43) 공개일자 2011년02월17일

(51) Int. Cl.
C08B 1/00 (2006.01) *C08B 5/14* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0073137
(22) 출원일자 2009년08월10일
심사청구일자 2009년08월10일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
김성배
경상남도 진주시 칠암동 520-1 한주빌라 401
이동헌
경상남도 진주시 호탄동 622-7
(74) 대리인
특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법

(57) 요 약

본 발명은 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 전처리 방법은 에틸렌글리콜을 용매로 사용함으로써, 바이오매스 성분 내의 셀룰로오스를 제외한 다른 주요 구성 성분들(헤미셀룰로오스와 리그닌)을 효과적으로 제거할 수 있어, 회수된 셀룰로오스를 효소에 의해 쉽게 가수분해 하여 셀룰로오스의 총 회수율을 최대화한다. 또한, 본 발명에 따른 전처리 방법은 반응시간이 짧으며 고압장치가 불필요하고 에틸렌글리콜의 재사용이 가능하여 공정 단가를 절감할 수 있으므로 경제적이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 03-2009-0224
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관
연구사업명 2009년도 일반연구자지원사업
연구과제명 바이오 에탄올 생산을 위해 ethylene glycol을 사용한 폐지의 전처리
기여율
주관기관 경상대학교
연구기간 2009. 05. 01.~ 2010. 04 .30.

특허청구의 범위

청구항 1

1) 섬유질계 바이오매스 기질을 분쇄한 후 건조하는 단계,

2) 반응기에 건조한 기질을 넣은 다음, 에틸렌글리콜과 황산 촉매를 넣어 기질을 침지하는 단계,

3) 상기 반응 혼합물을 가열하면서 교반하는 단계,

4) 반응 완료 후, 반응기를 냉각한 다음 반응 혼합물에 디옥산/증류수의 혼합용매를 가하여 교반하는 단계, 및

5) 교반 후 반응 혼합물을 여과하고, 증류수로 세척한 다음 에틸렌글리콜을 회수하는 단계를 포함하는, 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 섬유질계 바이오매스 기질은 볏짚, 폐목, 옥수수 줄기와 대, 및 폐지로 이루어진 군으로부터 선택된 것임을 특징으로 하는 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 에틸렌글리콜은 바이오매스 기질 1 중량부에 대해 3~5 중량부를 사용하는 것을 특징으로 하는 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 황산 촉매는 바이오매스 기질 1 중량부에 대해 0.01~0.2 중량부를 사용하는 것을 특징으로 하는 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 2)단계에서 황산 촉매의 농도는 1~5%인 것을 특징으로 하는 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 3)단계에서 반응조건은 반응온도 140~180℃ 및 반응시간 5~20분인 것을 특징으로 하는 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 전처리되고, 효소 당화율이 90~99%인 섬유질계 바이오매스.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 섬유질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 리그닌을 포함한 목본계와 초본계 물질을 포함하는 재생가능한 물질을 일컫는 것으로, 이들을 분해 또는 전환하면 생물자원을 이용한 연료, 화학원료 및 고분자 물질의 생산이라는 생물자원 정제공정(bio-refinery)에 의해 인간생활에 유용한 많은 유도물질을 얻을 수 있다. 특히, 최근에는 지구 온난화에 의한 온실효과와 석유 고갈 문제를 해결하기 위하여 에탄올과 같은 바이오에너지(bio-energy) 생산에 많은 관심이 집중되고 있는 바, 목본 및 초본류의 재생가능한 바이오매스 자원으로부터 생산하는 제 2세대 셀룰로오스 에탄올에 관한 연구가 미국을 중심으로 진행되고 있다.

[0003] 상기한 바와 같이, 지구상에 풍부한 바이오매스 자원은 에너지와 화학물질의 생산으로 석유를 대체할 수 있다는 측면과 이산화탄소의 감축이라는 환경적인 측면에서 각광을 받고 있다. 바이오매스 자원은 에너지원으로서 기질 분쇄, 전처리, 효소당화, 발효 및 증류 공정을 거쳐 바이오 에탄올을 생산하는 공정에 이용될 수 있다. 상기 바이오 에탄올의 생산 공정 중 전처리 공정의 경우 비용이 가장 많이 드는 공정으로, 전처리 공정의 전·후 공정인 기질 분쇄나 효소당화 및 발효공정의 비용에도 상당한 영향을 미친다.

[0004] 전처리 공정은 치밀한 조직의 섬유질계 기질을 효소에 의해 가수분해를 쉽게 하도록 하기 위한 것으로, 전처리 방법은 바이오매스의 종류에 따라 다양한 물리적·화학적 방법, 예를 들어 증기 폭쇄법, 알칼리 처리법, 이산화황 처리법, 과산화수소 처리법, 초임계 암모니아 처리법, 산 처리법, 암모니아 동결 폭쇄법, 유기용매 처리법 등이 알려져 있으며, 실제로 이들 방법을 단독으로 또는 조합하여 사용하고 있다. 상기 방법 중에서 유기용매를 사용한 organosolve 공정은 리그린 제거에 효과적이어서 펄핑공정에서 많이 연구되어 왔다. 그러나 유기용매 중 에탄올과 같은 저비점 용매는 고온에서 높은 기화성으로 인한 폭발 위험성 등으로 사용이 제한되고 있다. 따라서, 대안적으로 페놀(181.7℃), 글리세롤(290℃), 에탄올아민(170℃), 에틸렌글리콜(197.6℃)과 같은 고비점 유기용매를 전처리 방법에 사용하려는 연구가 시도되고 있다. 상기 고비점 유기용매들은 펄핑공정 뿐만 아니라 바이오매스 액화공정에도 사용되고 있는데, organosolve 공정과 액화공정의 차이점은 전자는 유기용매 수용액을 사용하고 산 촉매를 선택적으로 사용하나, 후자는 물을 포함하지 않은 유기용매를 사용하고 산 촉매를 필수적으로 사용한다는 점이다.

[0005] 에틸렌글리콜은 목재로부터 리그닌을 제거하여 펄프 제조용 용매로서 사용되어 왔으며, 1941년 이후 많은 연구자들이 에틸렌글리콜을 펄핑 공정에 사용하여 왔다. 또한 펄핑 효율을 높이기 위하여, 황산, 황산알루미늄(aluminium sulfate), 또는 염화알루미늄(aluminium chloride)을 촉매로 사용하였다. 또한, 에틸렌글리콜을 사용하면 섬유질 물질을 액화시켜 폴리우레탄과 같은 고분자를 만들 수 있으므로, 최근 에틸렌글리콜을 사용한 섬유질계 기질의 액화에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

[0006] 본 발명자들은 최근 에틸렌글리콜을 사용하여 신문지의 액화에 관한 연구를 수행한 적이 있으며, 구체적으로는 촉매로 황산 3%, 반응온도 160℃, 용매/기질의 비 = 4의 반응 조건으로 에틸렌글리콜/에틸렌 카보네이트(부피비 4/1)의 혼합용매에서 신문지의 시간에 따른 분해 정도를 정량적으로 측정하였다. 여기서 에틸렌 카보네이트는 액화속도를 높이기 위해 첨가되었다. 실험 결과, 기질의 3대 구성성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 분해속도가 모두 다르게 나타났고, 헤미셀룰로오스의 분해속도는 셀룰로오스보다 7배, 리그닌의 분해속도는 셀룰로오스보다 13배 정도 크게 나타났다. 반응시작 10분에 리그닌은 80% 이상, 헤미셀룰로오스는 70% 정도 제거되었고, 셀룰로오스는 약 10% 정도만 제거되었다. 이러한 결과는, 에틸렌글리콜이 셀룰로오스는 기질에 남겨두고 리그닌과 헤미셀룰로오스만 선택적으로 제거할 수 있다는 것을 의미한다. 전처리의 목적이 효소 가수분해 반응에 방해가 되는 리그닌과 헤미셀룰로오스를 제거하고 셀룰로오스는 가능한 많이 기질에 남겨 두어 결과적으로 효소에 의해 셀룰로오스가 쉽게 가수분해되도록 하는 것이기 때문에, 섬유질 기질의 전처리 방법에 유기용매로 에틸렌글리콜을 이용하면 유용할 것으로 생각된다. 또한, 전처리 공정의 경제성을 높이기 위해서는, 제거된 리그닌과 헤미셀룰로오스를 모두 이용해야 한다.

[0007] 최근 고비점 유기용매 중 글리세롤 수용액을 사용한 전처리 공정에 관한 연구가 발표되었는데, 상기 전처리 공정은 촉매를 사용하지 않아 반응조건으로 200℃ 이상의 높은 온도, 1시간 이상의 긴 반응시간, 및 10 이상의 높은 용매/기질의 비 등이 필요하게 되어 비경제적이다.

[0008] 에틸렌글리콜을 전처리 공정에 사용하면 에틸렌글리콜의 고비점으로 인하여 일반적인 전처리 공정에서 필요로 하는 고압 장치가 필요없는 장점이 있지만, 다른 전처리 용매에 비해 에틸렌글리콜의 가격이 비싸다는 단점이 있다. 따라서, 에틸렌글리콜을 회수하여 여러 번 반복 사용하거나 사용한 에틸렌글리콜에서 리그닌과 헤미셀룰로오스의 농도를 높여 고분자 물질을 제조할 수 있으면 어느 정도 보상이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 글리세롤보다 에틸렌글리콜이 점도가 낮아 취급이 용이하기 때문에 에틸렌글리콜을 전처리 공정에 이용하려는 연구가 시도되었다.

[0009] 우리나라에서는 바이오매스 자원이 풍부하지 못하다. 따라서, 이의 대체자원으로 폐지와 같은 폐기물을 이용하는 방법이 꾸준히 시도되고 있다. 그러나, 폐지는 종이를 제조할 때 화학물질이 첨가되고 인쇄 때 잉크가 사용되므로 이들 물질이 효소 가수분해를 방해한다. 따라서, 폐지를 전처리하여 효소 당화율을 높이기 위해서는 전처리와 동시에 잉크를 제거하여야 한다. 잉크를 제거할 수 있는 전처리 방법으로는 계면활성제, 암모니아 또는 과산화수소를 이용하는 방법이 보고되어 있다. 일 예로, 40℃에서 계면활성제 농도를 0.5%로 하여 진탕항온조(shaking bath)에서 400rpm으로 1시간 동안 폐지를 전처리하면 효소 당화율이 약 75% 정도로 낮게 나타난다

(Kim, H. J., Kim, S. B., Kim, C. J. 2007. The effects of nonionic surfactants on the Engineering. 12, 147-15 pretreatment and enzymatic hydrolysis of recycled newspaper. Biotechnology and Bioprocess 1.; Kim, S. B., Kim, H. J., Kim, C. J. 2006. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using Tween. Applied Biochemistry and Biotechnology. 129-131, 486-495.).

[0010] 따라서, 폐지의 잉크 제거와 전처리를 동시에 수행하여 효소 당화율을 높일 수 있는 전처리 방법에 대한 연구의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명자들은 폐지의 잉크 제거와 전처리를 동시에 수행하여 효소 당화율을 높일 수 있는 전처리 방법에 대해 연구하던 중, 전처리 용매로 에틸렌글리콜을 사용하여 폐지 내의 잉크 성분을 대부분 용해시키고 셀룰로오스를 제외한 다른 주요 구성 성분들(헤미셀룰로오스와 리그닌)을 효과적으로 제거할 수 있어, 매우 높은 효소 당화율을 나타내며 셀룰로오스의 총 회수율을 약 90% 이상으로 최대화할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명은 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법을 제공하고자 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은

[0014] 1) 섬유질계 바이오매스 기질을 분쇄한 후 건조하는 단계,

[0015] 2) 반응기에 건조한 기질을 넣은 다음, 에틸렌글리콜과 황산 촉매를 넣어 기질을 침지하는 단계,

[0016] 3) 상기 반응 혼합물을 가열하면서 교반하는 단계,

[0017] 4) 반응 완료 후, 반응기를 냉각한 다음 반응 혼합물에 디옥산/증류수의 혼합용매를 가하여 교반하는 단계, 및

[0018] 5) 교반 후 반응 혼합물을 여과하고, 증류수로 세척한 다음 에틸렌글리콜을 회수하는 단계를 포함하는, 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법을 제공한다.

[0019] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명에 따른 에틸렌글리콜을 이용한 섬유질계 바이오매스의 전처리 방법은 바이오매스 기질을 에틸렌글리콜 및 황산 촉매에 가하여 침지한 후, 반응온도 140~180℃ 및 반응시간 5~20분의 반응조건 하에서 반응시켜 전처리하는 것을 특징으로 한다. 이때, 황산 촉매의 농도는 1~5%, 침지시간은 2~5시간인 것이 바람직하다.

[0021] 상기 섬유질계 바이오매스 기질은 볏짚, 폐목, 옥수수 줄기와 대 등의 농임산폐기물, 폐지와 같은 섬유성 폐기물 등을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 본 발명에서는 폐지가 바람직하다.

[0022] 상기 에틸렌글리콜은 바이오매스 기질 1 중량부에 대해 3~5 중량부를 사용하는 것이 바람직하다. 만일 에틸렌글리콜의 함량이 3 중량부 미만이면 반응이 균일하게 일어나지 않으며, 5 중량부를 초과하면 에틸렌글리콜이 많이 소요되어 비용이 증가하게 되므로 비경제적이다.

[0023] 상기 황산 촉매는 바이오매스 기질 1 중량부에 대해 0.01~0.2 중량부를 사용하는 것이 바람직하다. 만일 황산 촉매의 함량이 0.01 중량부 미만이면 반응이 잘 일어나지 않으며, 0.2 중량부를 초과하면 반응 후 황산 처리과정에서 문제가 발생할 수 있다.

[0024] 본 발명의 전처리 방법에 사용된 디옥산/증류수의 혼합용매는 3~5/1~2의 부피비로 혼합하는 것이 바람직하며, 4/1의 부피비로 혼합하는 것이 더욱 바람직하다.

[0025] 본 발명에 따른 전처리 방법은 헤미셀룰로오스를 약 60~90%, 리그닌을 약 70~90% 정도 제거시키고, 효소 당화율을 약 90~99%로 높게 나타내며, 셀룰로오스의 총 회수율을 약 90% 이상으로 높게 나타낸다. 또한, 미사용 에틸렌글리콜 용액과 회수한 에틸렌글리콜 용액의 pH를 비교한 결과 폐지가 상당히 많은 양의 황산을 중화시키고, pH를 수소이온농도로 환산하면 수소이온농도가 약 4.3배의 차이를 나타내는 것을 확인하였다. 따라서, 수소이온농도 차이에 해당하는 황산을 회수한 에틸렌글리콜 용액에 보충한 후 전처리 과정을 반복 실시하면 에틸렌글리

콜의 재사용이 가능할 것으로 생각된다.

[0026] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 전처리 방법은 에틸렌글리콜을 용매로 사용함으로써, 바이오매스 성분 내의 셀룰로오스를 제외한 다른 주요 구성 성분들(헤미셀룰로오스와 리그닌)을 효과적으로 제거할 수 있어, 회수된 셀룰로오스를 효소에 의해 쉽게 가수분해 하여 셀룰로오스의 총 회수율을 최대화한다. 또한, 본 발명에 따른 전처리 방법은 반응시간이 짧으며 고압장치가 불필요하고 에틸렌글리콜의 재사용이 가능하여 공정 단가를 절감할 수 있으므로 경제적이다.

[0027] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1 : 에틸렌글리콜을 이용한 바이오매스의 전처리 방법**

[0029] 바이오매스 기질로는 회수된 신문지를 사용하였으며, 신문지를 임의로 혼합하여 5㎜ 스크린이 장착된 분쇄기(MF10, Ika Lab, Germany)로 분쇄하여 사용하였다. 수분(약 6.5%)을 제외한 건조 기질의 초기 조성은 셀룰로오스 60.3%, 헤미셀룰로오스 16.4%, 클라손 리그닌(klason lignin) 11.7%, 및 회분 7.2% 이었다.

[0030] 수분을 제외한 건조 바이오매스 기질(신문지) 6g을 2구 둥근바닥 플라스크에 넣은 다음, 여기에 에틸렌글리콜(Junsei Chemical Co., Japan) 24g과 2% 황산 촉매(Merck KGaA, Germany) 0.48g(순도가 96.1%인 것을 고려하면 약 0.5g)을 넣어 기질에 골고루 묻히도록 하고 3시간 동안 침지시켰다. 반응기에 수직으로 교반기를 걸고 나머지 구멍에는 냉각기를 걸었다. 미리 원하는 온도로 예열한 항온유조(oil bath)에 반응기를 설치하고 2분 동안 교반없이 가열하였다. 2분 후를 반응시간 0으로 하고, 반응시작 3분 후에 100rpm에서 교반하였다. 반응이 끝나면 반응기를 얼음물에 넣고 냉각하였다. 그 다음 200㎖의 디옥산(Junsei Chemical Co., Japan)/증류수(부피비 4/1)의 혼합용매를 조금씩 사용하여 반응기 내에 있는 혼합물을 뚜껑이 달린 삼각플라스크에 조심스럽게 옮기고 2시간 동안 마그네틱 바(magnetic bar)로 교반하였다. 교반 후 큰 여과지를 사용하여 여과한 다음 100㎖의 디옥산/증류수(부피비 4/1)의 혼합용매를 사용하여 플라스크를 헹구었다. 그리고 400㎖의 증류수를 사용하여 기질과 여과지를 헹구었으며, 여과지 윗부분을 잘 세척하였다. 기질의 건조 전과 후의 무게를 측정하여 기질의 수분 함량을 결정하였으며, 기질의 반은 효소 가수분해에 사용하였다. 그리고 여과 후 회수된 용액은 진공회전증발기를 사용하여 디옥산과 에틸렌글리콜(전처리에서 용해된 고체성분 포함)을 분리하였으며, 분리된 각각의 용매는 재사용하였다.

[0031] 전처리 방법의 최적 조건을 찾기 위하여 CCD((central-composite experimental design)라는 통계적인 방법을 사용하였다(Shin, H. J., Kim, C.-J., Kim, S. B. 2007. Optimization of culture medium for rifamycin SV production by Amycolatopsis mediterranei MM2 using statistical design. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12, 457-461.). 중심조건은 반응온도 160℃, 황산농도 3%, 반응시간 10분을 잡고, 온도는 143.18~176.72℃, 황산농도는 1.318~4.682%, 반응시간은 1.59~18.41분의 범위에서 14번의 실험과 실험오차 정도를 예측하기 위해 중심조건에서 6번의 같은 실험을 반복하였다. 실험결과는 표 1에 나타내었고, 모든 실험은 2번씩 실시하여 평균 값을 나타내었다.

[0032] **실험예 1 : 전처리된 바이오매스에 포함된 당함량 분석**

[0033] 본 발명의 바이오매스의 초기 기질이나 전처리 후 남은 기질에 포함된 당함량을 측정하기 위하여, 미국 NREL(National Renewable Energy Laboratory) standard procedure No.002에 준하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0034] 상기 실시예 1에서 전처리된 수분 측정한 바이오매스 기질 약 0.3g을 시험관에 넣었다. 기질이 들어있는 시험관에 72% 황산용액을 3㎖ 넣고 완전히 섞일 때까지 유리막대로 저어주었다. 항온조를 30℃로 설정하고, 1시간 동안 시료를 넣어두었다. 5~10분마다 시료를 항온조에서 꺼내지 않고 저어주었다. 84㎖의 물을 사용하여 시료를 고압증기멸균용 병에 옮겨 담았다. 이때, 시료가 조금이라도 남거나 새어나가지 않게 조심해서 옮기고 시험관과 유리막대에 시료가 남지 않았는지 잘 확인한다. 당분석 과정에서 손실된 글루코오스 또는 자일로오스를 보정해 주기 위해 같은 방법으로 글루코오스 또는 자일로오스 0.3g에 물 84㎖를 먼저 넣은 다음, 72% 황산 3㎖를 넣었다(SRS 측정용). SRS 측정용은 항온조에 넣지 않고 실온에 두었다. 고압증기멸균기에서 121℃로 60분 동안 반응시켰다. SRS 측정용도 동일한 조건으로 반응시켰다. 멸균시킨 후 식히고 무게를 측정하여 고압증기멸균기 중 손실된 물을 보정하였다. Aminex-C 컬럼의 경우는 $CaCO_3$로 중화시켰다. 대략 시료 3㎖에 0.25g의 $CaCO_3$가 사용되

었다. 한 시료 당 e-tube에 두 개씩 나누어 담고 원심분리시켰다. 원심분리 시간은 5분 정도로 하였다. 원심분리 후 상층액만 뽑아서 다시 원심분리하고 상층액만 뽑아서 HPLC로 분석하였다. 바이오매스의 당분석을 하여 얻은 액체 시료는 Bio-Rad Aminex HPX-87C 컬럼(conditions: 0.6㎖/min, 85℃, DI-water)이 장착된 HPLC 시스템으로 분석하였다. HPLC 시스템은 Lab Alliance P6000 pump(Apple Valley, MN, USA), Shodex RI-101 detecter(Showa Denko, Japan), Spectra System AS1000 autosampler(Themo Separation Product Inc., Riviera Beach, FL, USA)이었다. 자료 분석은 MultiChro(Yullin Technologies Co., Seoul, Korea)를 사용하였다. 사용한 Aminex 87C 컬럼은 자일로오스, 만노오스, 갈락토오스를 분리하지 못하기 때문에 이들을 합쳐 헤미셀룰로오스로 표기하였다.

[0035] **실험예 2 : 전처리된 바이오매스에 포함된 리그닌 함량 분석**

[0036] 본 발명의 바이오매스의 초기 기질이나 전처리 후 남은 기질에 포함된 리그닌 함량을 측정하기 위하여, NREL No.002에 준하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0037] 상기 실시예 1에서 전처리된 수분 측정한 바이오매스 기질 약 1.0g을 시험관에 넣었다. 15㎖의 H_2SO_4(72%)를 넣고, 충분히 섞일 때까지 유리막대로 저어주면서 20℃에서 2시간 동안 15분마다 저어주었다. 가수분해물을 1000㎖ 플라스크에 다시 담고 3%로 희석하기 위해 560㎖의 증류수를 넣어주었다. 플라스크에 환류 응축기를 연결하여 4시간 동안 가열한 다음, 환류장치를 분해하기 전 소량의 탈이온수로 냉각기를 헹구었다. 회분이 포함되지 않는 여과지의 무게를 재서 기록하고, 진공여과하기 위해 장치한 뒤 플라스크의 내용물을 여과하였다. 이때 플라스크 벽면의 들러붙은 고체입자는 뜨거운 탈이온수로 세척하였다. 내용물과 도가니의 무게를 측정한 다음, 105℃에서 2시간 동안 건조시켰다. 데시케이터에서 식힌 후 리그닌과 회분의 혼합무게를 재었다. 내용물을 도가니에 담고 575℃의 소각로에서 최소 4시간 이상 태웠다. 태우고 남은 도가니는 데시케이터에서 식힌 후 무게를 측정하였다. 리그닌의 함량은 하기 수학식 1로 계산하였다.

수학식 1

[0038] 리그닌 함량(%) = {[(도가니+불용성 잔류물)의 무게 - (도가니+회분)의 무게]/초기 시료 무게}×100

[0039] **실험예 3 : 전처리된 바이오매스의 효소 당화율과 셀룰로오스의 총 회수율 측정**

[0040] 본 발명의 전처리된 바이오매스의 효소 당화율과 셀룰로오스의 총 회수율을 측정하기 위하여, NREL No.009에 준하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0041] 250㎖ 플라스크에 셀룰로오스가 0.5g이 되도록 계산하여 상기 실시예 1에서 전처리된 바이오매스 기질을 넣었다. 각 플라스크에 0.05M pH4.8의 구연산 완충액 25㎖를 넣었다. 각 플라스크에 오염방지를 위해 항생제인 테트라사이클린 40㎕(400㎍), 시클로헥사미드 30㎕(300㎍)를 넣었다. 이때, 테트라사이클린은 1% 희석액을 만들어 사용하였다. 각 플라스크에 총 부피가 50㎖가 되도록 증류수를 넣었다. 각 플라스크의 뚜껑을 잠그고 진탕항온조에 넣은 뒤, 90rpm에서 50℃에 도달할 때 셀룰라제(cellulase)와 β-글루코시다제(β-glucosidase) (Novo Nordisk, Bagvard, Denmark)를 넣고 72시간 동안 반응시켰다. 셀로비오스(cellobiose)의 최종-산물 (end-product) 효과를 줄이기 위해 Celluclast 1.5ℓ(60 FPU/㎖)와 Novozym 188 (250 CBU/g)을 4/1의 부피비로 사용하였다. 매 24시간 마다 각 시료를 1.5㎖씩 채취하여 e-tube에 담고, 건조로(dry bath)에 10분간 넣어 효소 활성을 제거하였다. 원심분리 후 상층액을 뽑아서 다시 원심분리를 반복하고 상층액을 취해 HPLC로 분석하였다. 분석 후 바이오매스 기질의 효소 당화율을 측정하였다. 측정된 효소 당화율과 셀룰로오스의 총 회수율을 각각 하기 수학식 2 및 수학식 3으로 계산하였다.

수학식 2

[0042] 효소 당화율(%) = (가수분해된 셀룰로오스의 양/사용된 셀룰로오스의 양) × 100

수학식 3

[0043] 셀룰로오스의 총 회수율(%) = 회수된 셀룰로오스의 분율 × 효소 당화율 × 100

[0044] 본 발명의 전처리된 바이오매스의 전처리 조건, 용해율, 효소 당화율 및 셀룰로오스의 총 회수율은 표 1에 나타내었다.

표 1

전처리 조건			용해율 (%)	72시간 후 효소 당화율(%)	셀룰로오스의 총 회수율(%)
산농도 (%)	온도 (℃)	시간 (분)			
2	150	5	12.0	83.8	83.8
2	150	15	20.8	93.8	93.8
2	170	5	17.5	89.6	89.6
2	170	15	32.0	97.1	92.5
4	150	5	18.1	82.1	82.1
4	150	15	30.3	96.8	93.2
4	170	5	24.5	89.7	89.7
4	170	15	46.2	100	76.3
1.318	160	10	10.0	78.1	78.1
4.682	160	10	32.0	94.1	88.9
3	143.18	10	17.8	75.3	73.9
3	176.72	10	38.8	100	86.1
3	160	1.59	10.9	72.2	72.2
3	160	18.41	33.8	98.9	91.2
3	160	10	28.8	95.9	93.4
3	160	10	27.6	95.2	93.2
3	160	10	31.2	94.9	91.1
3	160	10	28.7	94.3	90.5
3	160	10	31.4	94.4	89.3
3	160	10	29.4	95.8	92.1

[0045]

[0046] 표 1에 나타난 바와 같이, 반응시간이 15분 이내의 범위에서 셀룰로오스의 총 회수율이 90%가 넘는 조건을 4개 선택하여 바이오매스 전처리의 최적 조건으로 하였다[(2%, 150℃, 15분), (2%, 170℃, 15분), (4%, 150℃, 15분), (3%, 160℃, 10분)]. 따라서, 본 발명에 따른 바이오매스의 전처리 조건은 황산농도 1~5%, 반응온도 140~180℃, 반응시간 5~20분이 바람직하며, 특히 황산농도 2%, 반응온도 150℃, 반응시간 15분의 조건에서 헤미셀룰로오스가 60%, 리그닌은 75% 정도 제거되었으며, 전처리 반응 후 셀룰로오스가 손실없이 100% 고체 상태로 회수되고 효소 당화율이 93.8%이며 셀룰로오스의 총 회수율이 약 94%로 나타나므로, 상기 조건이 가장 바람직하다고 볼 수 있다. 폐지를 계면활성제, 암모니아 또는 과산화수소를 단독으로 또는 이들을 혼합하여 전처리 하였을 때 동일한 효소 가수분해 조건에서 효소 당화율이 약 70~75% 정도인 것을 고려하면, 바이오매스의 전처리 방법에 에틸렌글리콜을 사용하는 것이 매우 효과적이라는 것을 알 수 있다.

[0047] **실험예 4 : 반응 후 회수된 에틸렌글리콜의 재사용**

[0048] 바이오매스 기질(폐지)의 전처리 방법에 사용된 에틸렌글리콜을 회수하여 재사용하기 위하여, 미사용 에틸렌글리콜 용액과 회수한 에틸렌글리콜 용액의 pH를 비교하여 바이오매스 기질(폐지)에 의해 황산이 얼마나 중화되는지를 확인하였다.

[0049] 구체적으로는, 2% 황산을 포함한 에틸렌글리콜 용액을 제조하였다. 첫 번째 용액은 상기 제조한 에틸렌글리콜 용액 25g을 상온에서 200g의 디옥산/증류수(부피비 4/1)의 혼합용매에 희석시켜 제조하였다. 두 번째 용액은 상기 제조한 에틸렌글리콜 용액 25g을 150℃에서 15분간 가열한 다음 200g의 디옥산/증류수(부피비 4/1)의 혼합용매에 희석시켜 제조하였다. 세 번째 용액은 상기 제조한 에틸렌글리콜 용액 25g에 폐지 6g을 넣고 150℃에서 15분간 반응시킨 다음 200g의 디옥산/증류수(부피비 4/1)의 혼합용매에 희석시켜 제조하였다. 상기 3가지 용액의 pH를 측정하였으며, 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0050]

	pH	수소이온농도(mol/ℓ)
첫 번째 용액	1.15	0.0166
두 번째 용액	1.15	0.0166
세 번째 용액	1.78	0.0708

[0051] 표 2에 나타난 바와 같이, 첫 번째와 두 번째 용액의 pH는 1.15로 동일하였고, 세 번째 용액의 pH는 1.78이었다. 첫 번째와 두 번째 용액의 pH가 동일하다는 것은 150℃에서 에틸렌글리콜과 황산이 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 두 번째와 세 번째 용액의 pH를 비교하면 펄지가 상당히 많은 양의 황산을 중화시킴을 알 수 있다. 또한, pH를 수소이온농도로 환산하면 수소이온농도가 약 4.3배의 차이를 나타내었다. 따라서, 수소이온농도 차이에 해당하는 황산을 회수한 에틸렌글리콜 용액에 보충한 후 전처리 과정을 반복 실시하면 에틸렌글리콜의 재사용이 가능할 것으로 생각된다.

산업이용 가능성

[0052] 본 발명에 따른 전처리 방법은 에틸렌글리콜을 용매로 사용함으로써, 바이오매스 성분 내의 셀룰로오스를 제외한 다른 주요 구성 성분들(헤미셀룰로오스와 리그닌)을 효과적으로 제거할 수 있어, 회수된 셀룰로오스를 효소에 의해 쉽게 가수분해 하여 셀룰로오스의 총 회수율을 최대화한다. 또한, 본 발명에 따른 전처리 방법은 반응시간이 짧으며 고압장치가 불필요하고 에틸렌글리콜의 재사용이 가능하여 공정 단가를 절감할 수 있으므로 경제적이다.