(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0100039
(43) 공개일자 2013년09월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/02 (2006.01) *C13K 1/04* (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0020592
(22) 출원일자 2012년02월28일
심사청구일자 2012년02월28일

(71) 출원인
전라남도
전라남도 무안군 삼향읍 오룡길 1
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
유석봉
전라남도 고흥군 남양면 침교리 995번지
위안진
광주광역시 남구 진월동 대주아파트 201동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

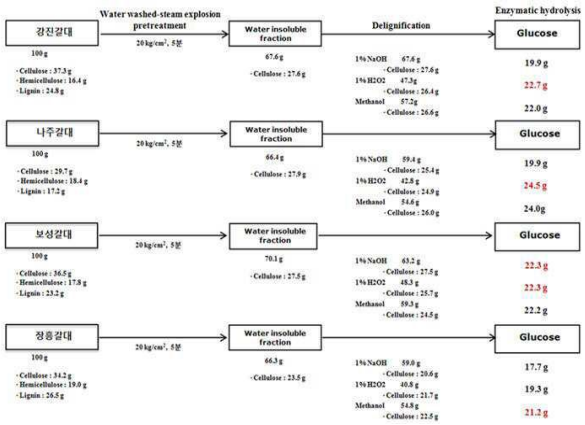
(54) 발명의 명칭 **식물성 바이오매스로부터 글루코오스의 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 식물성 바이오매스를 증기폭쇄 처리하는 단계; 상기 폭쇄물을 물에 침지시켜 30 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 교반 후 여과하는 단계; 상기 여과물을 수산화나트륨, 과산화수소 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용액과 혼합하여 탈리그닌화하는 단계; 및 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제로 효소가수분해 하여 당화하는 단계; 를 포함하는 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따르면, 증기폭쇄, 물세척 및 탈리그닌화 공정을 통해 높은 효율로 글루코오스가 생성되는 바, 이를 통해 에너지 자원으로 활용될 수 있는 바이오에탄올을 높은 효율로 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도11



(72) 발명자

윤병선

광주광역시 남구 봉선2동 무등파크 201동 1003호

양재경

경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 103동 302호

최명석

경상남도 진주시 평안동 롯데인벤스 A동 1401호

정지영

경상남도 사천시 향촌동 9차 에이스빌라 가동 403호

김지수

경상남도 창원시 마산합포구 문화동 8-1번지 동성아트빌라 102호

김학곤

경상남도 창원시 사림동 39-10번지

특허청구의 범위

청구항 1

식물성 바이오매스를 증기폭쇄 처리하는 단계;

상기 폭쇄물을 물에 침지시켜 30 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 교반 후 여과하는 단계;

상기 여과물을 수산화나트륨, 과산화수소 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합 용액과 혼합하여 탈리그닌화하는 단계; 및

셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제로 효소가수분해 하여 당화하는 단계; 를 포함하는 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물성 바이오매스가 갈대(*Phragmites australis*) 인 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 증기폭쇄 처리는 200 내지 250℃에서 10 내지 30kg/cm^2 의 압력으로 1 내지 10분간 수행되는 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 탈리그닌화단계는

여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 수산화나트륨 수용액 20 내지 30 중량부를 혼합하고 1 내지 5시간 동안 교반하여 수행되는 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 탈리그닌화단계는

여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 과산화수소 수용액 20 내지 30 중량부를 혼합하고 30분 내지 2시간 동안 교반하여 수행되는 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 탈리그닌화단계는

여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 메탄올 20 내지 30 중량부를 혼합하고 속슬렛추출기(soxhlet

extractor)에서 6 내지 18시간 동안 가열하여 수행되는 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 당화하는 단계의 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제의 비가 1 : 0.25-1인 것인 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 높은 효율로 생산하기 위한 전처리 과정에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 갈대(*Phragmites australis*)는 다년생 식물로서 연중 수확이 가능하고 연간 18 - 28 ton/acre의 높은 생산성을 나타내며, large-scale planting에 용이하여(Noppadon Sathitsuksanoh., 2009) 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 자원으로서의 가치가 높다(Duke, J., 1979). 하지만 갈대를 에너지 작물로 사용함에 있어서 고체연료로 제조될 수 있는 리그닌(20 - 25 %, w/w)을 이용한 개발(Graneli, W., 1984; Bjork, S., & Graneli, W., 1978; Monti, A et al., 2008)에만 치중되고 있을 뿐 높은 함량의 셀룰로오스 (33 - 36 %, w/w)와 헤미셀룰로오스(20 - 22 %, w/w)를 지니고 있음에도 불구하고 이러한 주요성분으로 부터 바이오에탄올을 생산해내는 연구는 미비한 실정이다 (Nora Szijarto et al., 2009). 또한 효소를 사용하여 셀룰로오스를 가수분해 시킬 경우, 셀룰로오스의 용해도가 낮기 때문에 전처리 과정이 필요하다.

[0003] 일반적으로 기존의 바이오매스의 전처리 공정으로는 증기 폭쇄법, 알칼리 처리법, 이산화황 처리법, 과산화수소 처리법, 초임계 암모니아 처리법, 약산 추출 처리법, 그리고 암모니아 동결 폭쇄법 등이 있다. 이와 같은 전처리 방법들 중 약산 추출 처리 방법과 증기 폭쇄법이 폭넓게 연구되었으며, 우수한 전처리 방법으로 고려되고 있다. 두 공정 모두 효과적으로 헤미셀룰로오스를 용해시킬 수 있고 따라서 목재 등 바이오매스의 조직이 현저하게 연화되어 남게되는 셀룰로오스의 추가적 분해에는 어려움이 없지만 불순물인 리그닌의 제거에는 다소 효과가 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 따라서 본 발명은 갈대를 비롯한 식물성 바이오매스의 전처리 과정으로, 이를 통해 글루코오스를 높은 효율로 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제의 해결을 위하여, 본 발명은 식물성 바이오매스를 증기폭쇄 처리하는 단계; 상기 폭쇄물을 물에 침지시켜 30 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 교반 후 여과하는 단계; 상기 여과물을 수산화나트륨, 과산화수소 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용액과 혼합하여 탈리그닌화하는 단계; 및 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제로 효소가수분해 하여 당화하는 단계; 를 포함하는 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0006] 본 발명의 방법에 따르면 증기폭쇄, 물세척 및 탈리그닌화 공정을 통해 높은 효율로 글루코오스가 생성되는 바, 이를 통해 에너지 자원으로 활용될 수 있는 바이오에탄올을 높은 효율로 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0007] 도 1은 증기폭쇄 전처리 전 건조된 강진지역 갈대 시료의 사진이다.

도 2는 증기폭쇄 전처리 갈대시료 및 물세척한 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 고체 회수율에 대한 그래프이다.

도 3은 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 당 회수율(%)에 대한 그래프이다. 고체 시료에서의 글루코오스 회수율 (▩) 및 여과액에서의 회수율(▥) 및 고체 시료에서의 헤미셀룰로오스-유래된 당 회수율(■) 및 여과액에서의 당 회수율 (≣).

도 4는 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 당 손실률(%)에 대한 그래프이다. (●)헤미셀룰로오스-유래된 당, (○) 글루코오스.

도 5는 증기폭쇄 후 물세척 전처리 갈대시료의 당 회수율(%)에 대한 그래프이다. 고체 시료에서의 글루코오스 회수율 (▩) 및 여과액에서의 회수율(▥) 및 고체 시료에서의 헤미셀룰로오스-유래된 당 회수율(■) 및 여과액에서의 당 회수율 (≣).

도 6은 증기폭쇄 후 물세척 전처리 갈대시료의 당 손실률(%)에 대한 그래프이다. (●)헤미셀룰로오스-유래된 당, (○) 글루코오스.

도 7은 실험예 3의 공정에 대한 플로우 차트이다.

도 8은 전남 지역별 갈대 4종의 NaOH, H_2O_2, 메탄올 처리에 따른 총 중량회수율(total gravimetric recovery, (g))과 글루코오스 함량 (g)에 대한 그래프이다.

도 9는 탈리그닌처리에 따른 리그닌 손실률(%)에 대한 그래프이다.

도 10은 효소투여농도에 따른 글루코오스 전환율을 나타낸다.

도 11은 각 실험군에 대한 글루코오스 전환율을 나타낸 실험 과정 요약도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 본 발명은 식물성 바이오매스를 증기폭쇄 처리하는 단계; 상기 폭쇄물을 물에 침지시켜 30 내지 90℃에서 1 내지 5시간 동안 교반 후 여과하는 단계; 상기 여과물을 수산화나트륨, 과산화수소 및 메탄올로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용액과 혼합하여 탈리그닌화하는 단계; 및 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제로 효소가수분해 하여 당화하는 단계; 를 포함하는 식물성 바이오매스로부터 글루코오스를 생산하는 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 식물성 바이오매스로는 옥수수 속대, 면실각, 볏짚, 사탕수수 깍지, 곡류 껍질, 밀기울, 목재, 갈대 등을 사용할 수 있으며, 보다 구체적으로는 갈대(*Phragmites australis*) 를 사용하는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0010] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 증기폭쇄 처리는 200 내지 250℃에서 10 내지 30kg/cm^2 의 압력으로 1 내지 10분간 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적으로 200 내지 230℃에서 15 내지 25kg/cm^2 의 압력으로 3 내지 10분간, 또는 210 내지 230℃에서 17 내지 25kg/cm^2 의 압력으로 3 내지 7분간 수행될 수 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 폭쇄물을 물에 침지시켜 교반하는 물세척 단계는 진탕배양기 내에서 수행될 수 있다. 보다 구체적으로는 증기폭쇄된 산물을 물에 침지시키고 30 내지 90℃, 40 내지 80℃ 또는 50 내지 70℃ 에서 1 내지 5시간, 또는 2 내지 4시간 동안 진탕배양기 내에서 교반할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 물 세척 과정을 통해 헤미셀룰로오스의 제거율이 증가되며, 이를 통해 증기폭쇄 중 고온·고압반응으로 인해 글루코오스 및 헤미셀룰로오스로부터 생성된 발효저해물질인 푸르푸랄(furfural), HMF(5-hydroxymethyl furfural)등이 제거되어 이후 발효과정에 긍정적인 효과가 도출될 수 있다.

[0012] 상기 물세척 단계 이후 여과 공정이 수행되며, 여과 후 수불용성 여과물을 수산화나트륨, 과산화수소 및 메탄올

로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 혼합용액과 혼합하여 탈리그닌화하는 단계가 수행된다.

[0013] 보다 구체적으로, 상기 탈리그닌화 단계는 수산화나트륨, 과산화수소 또는 메탄올 단독의 수용액, 메탄올 및 수산화나트륨 혼합용액, 메탄올 및 과산화수소 혼합용액, 메탄올, 수산화나트륨 및 과산화수소 혼합용액을 사용하여 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 수산화나트륨으로 탈리그닌화 공정이 수행되는 경우, 상기 탈리그닌화 공정은 여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 수산화나트륨 수용액 20 내지 30 중량부를 혼합하고 1 내지 5시간 동안 교반하는 방법으로 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적으로 1% NaOH 수용액에 여과물을 침지시켜 약 30℃의 진탕 배양기에서 50 내지 200 rpm, 또는 약 100 rpm으로 약 3시간 동안 교반시킨 후 여과하여 불용성 분획을 취할 수 있다.

[0015] 또한 과산화수소로 탈리그닌화 공정이 수행되는 경우, 상기 탈리그닌화 공정은 여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 과산화수소 수용액 20 내지 30 중량부를 혼합하고 30분 내지 2시간 동안 교반하는 방법으로 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적으로 1% H_2O_2 수용액에 여과물을 침지시켜 약 30℃ 에서 약 1 시간 동안 교반시킨 후 여과하여 불용성 분획을 취할 수 있다.

[0016] 또한 메탄올로 탈리그닌화 공정이 수행되는 경우, 상기 탈리그닌화 공정은 여과물 1 중량부 및 여과물 1 중량부 대비 메탄올 20 내지 30 중량부를 혼합하고 속슬렛추출기(soxhlet extractor)에서 6 내지 18시간 동안 가열하는 방법으로 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 보다 구체적으로 메탄올에 여과물을 침지시킨 후 속슬렛추출기(soxhlet extractor)에서 10 내지 14시간 동안 끓여 메탄올을 증발시키고 여과하여 불용성 분획을 취할 수 있다.

[0017] 상기 탈리그닌 과정을 거친 불용성 분획은 이후 분쇄된 후 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제로 효소가수분해되어 당화되어 글루코오스를 생산하게 된다.

[0018] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 효소가수분해에 사용되는 셀룰라아제 및 베타-글루코시다아제 혼합 효소를 사용할 수 있으며, 이들의 비는 1 : 0.25-1 일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 상기 효소가수분해에 사용되는 버퍼로는 시트르산 버퍼가 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 시트르산 버퍼에 상기 분쇄된 탈리그닌 과정을 거친 불용성 분획 및 효소를 첨가한 후 진탕 배양기에서 12 내지 120시간 동안 반응이 이루어질 수 있다. 상기 반응 후의 상등액에서 글루코오스의 존재를 확인할 수 있었다.

[0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 실험예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0021] **<실험예 1> 바이오매스의 발효 가능 원료 함량 분석**

[0022] **1) 시료**

[0023] 전남 산림자원연구소에서 제공받은 건조 및 절단된 전남 지역별 갈대(강진, 나주, 보성, 장흥)시료를 윌리스 밀로 분쇄하고 20-mesh sieve와 80-mesh sieve를 사용하여 분획 분리를 하였고, -20/+80 mesh 분획은 추출물 함량 측정, 탄수화물 함량 측정 및 리그닌 함량 측정의 분석 시료로 사용하였으며, -80 mesh 분획은 회분(ash) 함량 측정 및 단백질 함량 측정의 분석시료로 사용하였다.

[0024] **2) 전남 지역별 갈대의 화학적 조성 분석**

[0025] 가) 에탄올 추출물 분석 (NREL/TP510-42619)

[0026] 원통여지(Thimble filter)에 시료 2 - 10 g을 투입 후 조립된 속슬렛 추출기에 삽입하고 boiling flask에 95 % 에탄올을 투입한 후 시간당 6 - 10 siphon cycle의 속도로 24시간 동안 추출하였다. 추출물이 제거된 잔사는 추출물 함량 측정, 탄수화물 함량 측정 및 리그닌 함량 측정을 위한 분석 시료로 사용하였다. 추출물 함량, %는 이하의 식 1에 의하여 계산하였다.

[0027] [식 1]

$$EtOHExtr = \frac{extractives}{rawmat`1} \times 100$$

[0028]

[0029] 상기 식에서 *EtOHExtr* 은 건조 중량 대비 에탄올 추출물 백분율(%)이고, *extractives*는 증류 후 남아있는 추출물 중량(g)이며, *rawmat'1*은 기질의 초기 건조 중량(g)을 의미한다.

[0030] 나) 회분(Ash) 분석 (NREL/TP510-42622)

[0031] 도가니에 시료를 2 g을 정칭하여 도가니에 넣고 600 ± 25 ℃의 전기로에서 24시간 동안 완전히 탄화시켜서 회분(ash)의 함량을 측정하였다. 회분 함량, %는 식 2에 의하여 계산하였다.

[0032] [식 2]

$$Ash = \frac{ash}{rawmat`1} \times 100$$

[0033]

[0034] 상기 식에서 *Ash* 는 건조 중량 대비 회분 백분율(%)이고, *ash*는 600℃에서의 회분화(Ashing) 후 남아있는 잔부의 중량(g)이며, *rawmat'1*은 기질의 초기 건조 중량(g)을 의미한다.

[0035] 다) 탄수화물 및 리그닌 분석 (NREL/TP510-42618)

[0036] 탄수화물 함량과 리그닌 함량은 에탄올 추출한 탈지시료를 사용하여 72 % H_2SO_4로 30 ℃ 에서 60 분간 가수분해한 후 증류수를 첨가하여 4 % H_2SO_4로 희석시킨 가수분해액을 121 ℃에서 1시간 동안 오토클레이브한 후 여과하였다. 여과액은 탄수화물 함량 및 산 가용성 리그닌 함량을 측정하였고 잔사는 산 불용성 리그닌 함량을 측정하였다. 산 불용성 리그닌 함량과 산 가용성 리그닌 함량, %은 식 3과 식 4에 의하여 계산하였다.

[0037] [식 3]

$$AcidInsol = \frac{acidinsol - ash}{rawmat`1} \times 100$$

[0038]

[0039] 상기 식에서 *AcidInsol* 은 건조 중량 대비 산 불용성 잔사의 백분율(%)이고, *acidinsol* 은 산 불용성 잔사의 건조중량(g) 이며, *ash*는 600℃에서의 회분화(Ashing) 후 남아있는 잔사의 중량(g)이며, *rawmat'1*은 시료의 초기 건조 중량(g)을 의미한다.

[0040] [식 4]

$$Acidsol = \frac{UV\,abs \times filtrate\ volume \times dilution}{\varepsilon \times rawmat`1} \times 100$$

[0041]

[0042] 상기 식에서 *Acidsol* 은 건조 중량 대비 산 가용성 리그닌 잔사의 백분율(%)이고, *UV abs* 는 샘플의 평균 UV-Vis 흡광도 이며, *filtrate volume*은 여과된 액체의 부피, ε 는 특정 파장에서 바이오매스의 흡수율, *rawmat'1* 은 시료의 초기 건조 중량(g)을 의미한다.

[0043] 라) 당 분석 (ASTM, E1821-96)

[0044] 탄수화물 함량 분석을 위해 GC (Young Lin Instrument., 6000 series, KOREA)를 사용하여 단당류 분석을 수행

하였다. 샘플은 Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by Gas Chromatography (ASTM, E1821-96)에 의해 제조하였으며, 분석조건은 컬럼 : DB-255 (Agilent technologies, Inc., 30 m x 0.250 mm x 0.15 μm), 운반 가스: 질소 3 mL/min, 스플리트비율 : 1 : 30, 1.0 분간 190 ° C, 220 ° C까지 10 ° C/분, 10 분간 유지, 총 반응시간: 20 분으로 하였다.

[0045] 마) 단백질 분석(TP-510-42625)

[0046] 시료의 -80 mesh 분획 100 mg (약 nitrogen 0.2 - 20% 함유)을 CHN 분석기 (CE Instruments, EA1110, UK)를 사용하여 nitrogen 분석을 하였다. 단백질 함량, %는 식 5에 의하여 계산하였다.

[0047] [식 5]

[0048] $Protein = Nitrogen \times 6.25$

[0049] 상기 식에서, *Protein* 은 건조 중량 대비 단백질의 백분율(%)이며, *Nitrogen*은 건조 중량 대비 질소의 백분율(%)이다.

[0050] **3) 결과**

[0051] 표 1은 전남 4개 지역별(강진, 보성, 장흥 및 나주) 갈대에 대한 화학적 조성을 나타낸 결과로, 표 1을 참조하면, 셀룰로오스의 함량에 있어서 강진갈대가 37.3 %로 가장 높은 수치를 나타내는 것을 알 수 있었다. 보성지역 갈대와 장흥지역 갈대의 셀룰로오스 함량은 각각 36.5 % 및 34.2 %로 나타났으며, 나주지역의 갈대는 29.7 %로 다소 낮은 셀룰로오스 함량을 나타냈다. 셀룰로오스 함량은 에탄올 생산에 있어서 중요한 요소이며 셀룰로오스를 많이 함유할수록 바이오에탄올 생산에 유리한 원료라 판단된다.

표 1

[0052]

Composition[a], %	Cultivation region			
	강진	나주	보성	장흥
추출물	5.8 ± 0.8[b]	17.5 ± 0.8	6.1 ± 0.8	10.7 ± 0.1
셀룰로오스	37.3	29.7	36.5	34.2
헤미셀룰로오스[d]	16.4	18.4	17.8	19.0
자일로오스	14.0	14.0	14.6	15.1
갈락토오스	0.5	1.0	0.9	1.1
아라비노스	1.9	3.4	2.3	2.8
만노스	nd[d]	nd	nd	nd
리그닌	24.8	17.2	23.2	26.5
산 불용성 리그닌	20.7 ± 0.4	9.1 ± 0.3	18.7 ± 0.2	21.9 ± 0.1
산 가용성 리그닌	4.1 ± 0.1	8.1 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.2
회분	3.9 ± 0.1	10.5 ± 0.2	6.9 ± 0.1	7.1 ± 0.1
단백질	5.0	17.0	8.7	8.4

[a] Composition percentages are on a dry-weight basis.

[b] Mean values of triplicate samples with standard deviations.

[c] 헤미셀룰로오스 : 자일로오스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스.

[d] nd : 검출 안됨

[0053] 헤미셀룰로오스(Hemicellulose) 함량은 강진, 나주, 보성, 장흥지역 갈대에서 각각 16.4 %, 18.4%, 17.8 % 및 19.0 %로 나타났고 헤미셀룰로오스의 주요 성분으로는 자일로오스(xylose), 갈락토오스(galactose) 및 아라비노스(arabinose)가 검출되었으며, 만노오스(mannose)는 검출되지 않았다.

[0054] 효소가수분해에 있어서 저해물질로 전환되는 리그닌(lignin) 함량은 강진, 보성, 장흥지역 갈대에서 각각 24.8 %, 23.2 % 및 26.5 %를 나타냈으나 나주지역 갈대에서는 17.2 % 의 낮은 수치를 나타냈다. 나주지역 갈대는 다른 지역 갈대에 비해 글루코오스 함량과 리그닌 함량이 낮았으며, 추출물 함량 및 단백질 함량이 각각 17.5 % 및 17.0 %로 다소 높게 나타났다.

[0055] 탄수화물 함량, 추출물 함량 및 리그닌 함량의 차이는 수확된 지역의 토양상태, 기후 및 생장조건에 따른 차이

라고 판단되며, 탄수화물 함량이 높은 강진, 보성 및 장흥 지역 갈대가 바이오에탄올 생산을 위한 원료로서 적합하다고 판단된다.

[0056] **<실험예 2> 갈대 바이오매스에 적합한 물리·화학적 전처리 기술 도출**

[0057] 전처리는 시료중의 셀룰로오스를 노출시켜 효소가수분해에 있어서 효소의 접근성을 향상시키는데 그 목적이 있으며, 전처리를 하지 않은 채 가수분해를 하였을 때 약 20 % 이내로 가수분해가 되는 반면에 전처리를 하였을 때는 약 90 %를 초과하는 가수분해율을 나타낸다 (Hamelinck CN., et al., 2005).

[0058] 전남 자생갈대로부터 바이오에탄올 생산을 위한 전처리 방법으로 사용될 증기폭쇄 물리·화학적 전처리는 셀룰로오스의 결정화 증가, 헤미셀룰로오스의 분해 및 탈리그닌화를 촉진 시키며 (Jeoh T., 1998), 증기를 이용한 전처리로서 화학약품을 사용하지 않아 친환경적이다 (Tomas-Pejo E., 2008)

[0059] **1) 시료**

[0060] 전남 산림자원연구소에서 제공받은 전남 지역별 갈대(강진, 나주, 보성 및 장흥)의 화학적 조성을 분석한 결과 (표 1 참조) 셀룰로오스 함량이 가장 높은 강진지역 갈대를 이용하여 화본과 바이오매스에 적합한 물리·화학적 전처리조건을 찾아내고자 하였으며, 건조된 강진지역 갈대를 2 x 3 cm 크기로 절단 후 증기폭쇄 전처리 시료로 사용하였다(도 1 참조).

[0061] **2) 증기폭쇄 전처리**

[0062] 가) 강도 지수

[0063] $$Ro = \int_0^t \exp[(\mathrm{Tr} - \mathrm{Tb}) / 14.75]dt$$

[0064] R_0 = Reaction Ordinate

[0065] t = 유지시간

[0066] Tr = 유지온도 (℃)

[0067] Tb = 기본온도 100℃

[0068] Reaction Ordinate의 로그 값은 바이오매스에 있어서 증기폭쇄 영향의 강도 지수가 된다.

[0069] $$\mathrm{Severity} = \log_{10}(R_o)$$

[0070] Severity = 강도 지수

[0071] R_0 = Reaction Ordinate

[0072] 나) 증기폭쇄 조건 탐색

[0073] 전남지역 갈대시료에 있어서 증기폭쇄 전처리 조건을 찾기 위해 1 L reaction vessel이 장착된 lab scale 수준의 증기폭쇄 장치를 사용하였다.

[0074] 증기폭쇄 전처리 조건으로서 15 kg/cm^2 수증기 압력으로 1분 (*Ro* 2.94), 20 kg/cm^2 수증기 압력으로 1분 (*Ro* 3.33), 5분 (*Ro* 4.03) 및 10분 (*Ro* 4.33) 그리고 25 kg/cm^2 수증기 압력으로 1분 (*Ro* 3.68) 및 10분 (*Ro* 4.68) 동안 처리하였으며, 증기폭쇄 조건은 표 2에 나타냈다.

표 2

[0075]

샘플	Kg/cm^2	온도 (℃)	유지시간 (분)	Severity log (R_0)
1	15	200	1	2.94
2	20	213	1	3.33
3	25	225	1	3.68
4	20	213	5	4.03
5	20	213	10	4.33
6	25	225	10	4.68

[0076] **3) 증기폭쇄 후 물세척**

[0077] 증기폭쇄 전처리된 강진지역 갈대 (Ro 2.94, Ro 3.33, Ro 3.68, Ro 4.03, Ro 4.33 및 Ro 4.68)시료를 증류수 1 L에 침지시켜 60 ℃로 설정된 진탕 배양기에서 100 rpm 으로 3시간 동안 교반 하였다. 교반 후 여과하여 수불용 분획물과 수가용 분획물로 분리하였으며, 수불용 분획물은 고체 회수율 및 화학적 조성분석을 위한 시료로 사용하였고 수가용 분획물은 물세척으로 인해 제거된 탄수화물 및 pH측정을 위한 시료로 사용하였다.

[0078] **4) 증기폭쇄 전처리 후 물세척에 있어서 갈대의 화학적 분석을 통한 주성분 변화**

[0079] 가) 수불용 분획물의 화학적 조성 분석은 실험예 1에서 “ 2) 전남 지역별 갈대의 화학적 조성 분석” 항목의 분석법과 동일하게 실행하였다.

[0080] 나) 수가용 분획물의 화학적 조성 분석은 수가용 분획(hydrolysate)을 72% H_2SO_4를 첨가하여 4 % H_2SO_4로 희석시킨 후 121℃에서 1시간 동안 오토클레이브한 후 Standard Test Method for Determination of carbohydrates in Biomass by Gas Chromatography (ASTM, E1821-96)에 따라 샘플을 제조한 다음 GC를 사용하여 단당류 분석을 수행하였다.

[0081] **5) 결과분석**

[0082] 도 2에 증기폭쇄 전처리 갈대시료 및 물세척한 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 고체 회수율 (%)를 나타내었다.

[0083] 도 2를 참조하면, 증기 폭쇄 전처리 갈대 시료의 강도 지수(R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68에 대하여 각각 81.0 %, 80.3 %, 70.8 %, 69.5 %, 66.9 % 및 65.6 %의 고체 회수율이 나타났다. 물세척한 증기폭쇄 전처리 시료의 고체 회수율을 확인하였을 때 무처리보다 0 - 5.4 % 수준으로 감소하였다. 이는 증기폭쇄 전처리시 생성된 푸르푸랄, 5-하이드록시메틸 푸르푸랄 등이 휘발 또는 물세척에 의한 용해되어 고체 회수율이 감소된 것으로 판단된다.

[0084] 표 3과 표 4에 강도 지수 (R_0) 값에 따른 증기폭쇄 전처리만 수행한 갈대시료(표 3) 및 물세척까지 수행한 증기폭쇄 전처리 갈대시료(표 4)에 대한 회수율 및 화학적 조성을 각각 나타내었다.

표 3

[0085]

Treatment severity (R_0)	Total gravimetric recovery	글루코오스	자일로오스	만노오스	갈락토오스	아라비노스	산불용성리그닌	회분
2.94	81.0	36.5(29.6)	13.9(11.3)	0.5(0.4)	nd	2.1(1.7)	30.0(24.3)	5.0(4.1)
3.33	80.3	30.5(24.5)	5.6(4.5)	nd	0.1(0.1)	0.7(0.6)	31.4(25.4)	5.8(4.7)
3.68	70.8	25.1(17.8)	2.1(1.5)	nd	nd	0.3(0.2)	37.4(36.5)	6.8(4.8)
4.03	69.5	46.6(32.4)	3.2(2.2)	nd	nd	0.6(0.4)	36.1(25.1)	5.4(3.8)
4.33	66.9	36.0(24.1)	2.2(1.5)	nd	nd	0.6(0.4)	37.3(25.0)	5.6(3.7)
4.68	65.6	38.3(25.1)	3.8(2.5)	0.5(0.3)	nd	0.8(0.5)	37.0(24.3)	5.9(3.9)

nd : 검출 안됨. [a] 괄호 안 데이터는 Total gravimetric에 기초한 g임

표 4

[0086]

Treatment severity (R_0)	Total gravimetric recovery	글루코오스	자일로오스	만노오스	갈락토오스	아라비노스	산불용성리그닌	회분
2.94	81.0	31.4(25.4)	12.7(10.3)	nd	0.2(0.2)	1.4(1.1)	27.3(22.1)	4.4(3.6)
3.33	78.1	33.8(26.4)	11.2(8.7)	0.3(0.2)	0.1(0.1)	1.2(0.9)	28.7(22.4)	4.9(3.8)
3.68	65.4	20.5(13.4)	1.0(0.7)	nd	nd	0.4(0.3)	37.7(24.7)	5.5(3.6)
4.03	67.6	41.3(27.9)	3.4(2.3)	nd	nd	0.6(0.4)	31.1(21.0)	5.2(3.5)
4.33	66.0	26.7(17.6)	1.8(1.2)	0.1(0.1)	nd	0.4(0.3)	38.4(25.3)	5.7(3.8)
4.68	65.1	31.6(20.6)	2.2(1.4)	nd	nd	0.5(0.3)	39.9(26.0)	5.1(3.3)

nd : 검출 안됨

[a] 괄호 안 데이터는 Total gravimetric에 기초한 g임

[0087] 증기폭쇄 전처리 후 회수되는 고체 양은 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68에서 각각 81.0 g, 80.3 g, 70.8 g, 69.5 g, 66.9 g 및 65.6 g으로 나타났다. 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 전처리 하였을 때 글루코오스 함량이 46.6 %로 가장 높은 수치를 나타냈고 이는 증기폭쇄 전처리 후 회수된 고체 69.5 g 중 32.4 g의 글루코오스를 함유한다는 것으로 다른 강도 지수 (R_0) 값 보다 글루코오스 함량이 높은 것으로 나타났으며, 산 불용해 리그닌은 24.3 g - 25.1 g 수준으로 나타났다. 증기폭쇄 전처리로 인해 원료 물질에 존재하였던 아라비노스 및 갈락토오스가 손실되었는데 이는 고온·고압조건에서 헤미셀룰로오스의 해중합에 의한 손실로 판단된다.

[0088] 물추출한 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 고체 회수양은 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68에서 각각 81.0 g, 78.1 g, 65.4 g, 67.6 g, 66.0 g 및 65.1 g으로 나타났으며, 강도 지수 (R_0) 4.03 조건에서 글루코오스 함량이 41.3 %로 다른 강도 지수 (R_0) 조건보다 높은 수치를 나타냈고 이는 물추출한 증기폭쇄 전처리 갈대시료의 고체 회수 중량 67.6 g 중 27.9 g의 글루코오스를 함유한다는 것으로 다른 강도 지수 (R_0) 값 보다 글루코오스 함량이 높은 것으로 나타났다. 산 불용성 리그닌은 21.0 g - 26.0 g 수준으로 나타났다.

[0089] 증기폭쇄 전처리 후 물추출에 대한 화학적 변화를 확인하였을 때 물추출을 하기 전보다 강도 지수 (R_0) 2.94에서는 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 아라비노스, 산 불용해 리그닌 및 회분(ash)에서 각각 4.2 g, 1.0 g, 0.4 g, 0.6 g, 2.2 g 및 0.5 g이 손실되었으며, 강도 지수 (R_0) 3.33에서는 산 불용해 리그닌 및 회분(ash)에서 각각 2.0 g 및 0.9 g이 손실되었다. 강도 지수 (R_0) 3.68에서는 글루코오스, 자일로오스, 만노오스, 아라비노스, 산 불용해 리그닌 및 회분(ash) 함량에 있어서 각각 4.4 g, 0.8 g, 11.8 g 및 1.2 g이 손실되었고 강도 지수 (R_0) 4.03에서는 글루코오스, 산 불용해 리그닌 및 회분(ash) 에서 각각 4.5 g, 4.1 g 및 0.3 g이 손실되었다. 강도 지수 (R_0) 4.33에서는 글루코오스, 자일로오스 및 아라비노스가 각각 6.5 g, 0.3 g 및 0.1 g이 손실되었으며, 강도 지수 (R_0) 4.68에서는 글루코오스, 자일로오스, 아라비노스 및 회분(ash)에서 각각 4.5 g, 1.1 g, 0.2 g 및 0.6 g이 손실되었다. 이는 증기폭쇄 전처리시 고온·고압으로 기질상의 헤미셀룰로오스가 분해되어 휘발 또는 용해 되었으며, 기질상에 잔류하는 헤미셀룰로오스의 구성성분인 자일로오스, 만노오스, 갈락코오스 및 아라비노스가 물세척에 의해 세척 또는 제거되어 고체 회수율이 감소된 것으로 판단된다. 리그닌은 강도 지수 (R_0) 값이 커짐에 따라서 증가하였는데 이는 탄수화물과 리그닌사이에 있어서 고온·고압으로 인한 중합반응에 의한 증가인 것으로 판단된다.

[0090] 표 5 및 표 6에 각각 강도 지수 (R_0)에 따른 증기폭쇄 전처리만 수행한 여과액(표 5) 및 물세척까지 수행한 증기폭쇄 전처리 여과액(표 6)에 대한 회수율 및 화학적 조성을 각각 나타내었다.

표 5

[0091]

Composition	Treatment severity (R_0)					
	2.94	3.33	3.68	4.03	4.33	4.68
글루코오스	0.5	0.6	0.7	0.8	0.7	0.7
자일로오스	0.9	2.4	1.7	1.5	0.5	0.3
만노오스	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
갈락토오스	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0
아라비노스	0.3	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
pH	4.75	3.87	3.67	3.54	3.66	3.55

표 6

[0092]

Composition	Treatment severity (R_0)					
	2.94	3.33	3.68	4.03	4.33	4.68
글루코오스	0.5	0.6	0.8	0.7	0.6	7.2
자일로오스	1.2	2.9	1.3	2.0	0.0	0.4
만노오스	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.4
갈락토오스	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	3.1
아라비노스	0.3	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1
pH	4.36	4.10	3.60	3.57	3.48	3.44

[0093] 증기폭쇄만 수행된 전처리 여과액의 화학적 조성을 확인하였을 때 (표 5 참조) 강도 지수 (R_0) 값에 따라서 자일로오스가 0.3 - 2.4 g 수준으로 용해되어 나왔다. 이는 글루코오스, 만노오스, 갈락토오스, 아라비노스에 비해 높은 수치를 나타냈으며, 증기폭쇄 전처리로 인해 헤미셀룰로오스의 주요성분인 자일로오스가 주로 용해화되었음을 확인할 수 있다. 증기폭쇄 전처리 여과액의 pH는 강도 지수 (R_0) 2.94에서부터 4.68까지 pH 4.75 - 3.55 범위에서 측정되었으며, 강도 지수 (R_0) 값이 증가함에 따라 pH도 산성에 가까워짐을 나타냈다.

[0094] 물추출까지 수행된 증기폭쇄 전처리 여과액의 화학적 조성을 확인하였을 때 (표 6 참조) 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 4.03 및 4.68에서 자일로오스가 각각 0.3 g, 0.5 g, 0.5 g 및 0.1 g 용해되었고 강도 지수 (R_0) 3.68 및 4.68에서 글루코오스가 각각 0.1 g 및 0.2 g 용해되었으며, 강도 지수 (R_0) 3.33에서는 아라비노스가 0.2 g 용해되어 나왔다. 결과적으로 증기폭쇄 전처리 후 물추출을 할 경우 고체에 잔류하는 헤미셀룰로오스 구성 성분(자일로스, 아라비노스 등) 및 발효 저해물질을 용해화 및 제거 할 수 있을 것으로 판단되며, pH는 강도 지수 (R_0) 2.94에서부터 4.68까지 pH 4.36 - 3.44 범위에서 측정되었고 증기폭쇄 처리 여과액보다 낮은 pH 수치를 나타냈다.

[0095] 강도 지수 (R_0) 값에 따른 증기폭쇄 전처리에 대한 당 회수율(%) 및 당 손실률(%)을 각각 도 3과 도 4에 나타냈다.

[0096] 증기폭쇄 전처리 갈대시료 및 여과액의 글루코오스 회수율과 헤미셀룰로오스 회수율을 도 3에 나타내었다. 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 고체와 여과액에서 각각 79.4 %, 65.7 %, 47.7 %, 86.9 %, 64.6 %, 67.3 % 및 1.3 %, 1.6 %, 1.9 %, 2.1 %, 1.9 %, 1.9 %의 글루코오스 회수율을 나타냈으며, 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 고체와 여과액에서 각각 81.7 %, 31.7 %, 10.4 %, 15.9 %, 11.6 %, 20.1 % 및 8.5 %, 17.1 %, 12.8 %, 11.6 %, 4.9 %, 2.4 %의 헤미셀룰로오스 회수율을 나타냈다. 도 3을 참조하면, 강도 지수 (R_0) 값이 증가함에 따라 헤미셀룰로오스 회수율이 낮아짐을 확인할 수 있다.

[0097] 증기폭쇄 전처리 갈대시료 및 여과액의 글루코오스 손실률과 헤미셀룰로오스 손실률을 도 4에 나타내었다. 강도

지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 글루코오스는 각각 19.3 %, 32.7 %, 50.4 %, 11.0 %, 33.5 % 및 30.8 % 의 손실이 일어난 것으로 나타났고 헤미셀룰로오스는 각각 9.8 %, 51.2 %, 76.8 %, 72.6 %, 83.5 % 및 77.4 %의 손실이 일어난 것으로 나타났다.

[0098] 강도 지수 (R_0) 값에 따른 증기폭쇄 후 물세척 전처리에 대한 당 회수율(%) 및 당 손실률(%)을 각각 도 5와 도 6에 나타내었다.

[0099] 증기폭쇄후 물세척 전처리 갈대시료 및 여과액의 글루코오스 회수율과 헤미셀룰로오스 회수율을 도 5에 나타내었다. 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 고체와 여과액에서 각각 68.1 %, 70.8 %, 35.9 %, 74.8 %, 47.2 %, 55.2 % 및 1.3 %, 1.6 %, 2.1 %, 1.9 %,1.6 %, 19.3 %의 글루코오스 회수율을 나타냈으며, 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 고체와 여과액에서 각각 70.7 %, 60.4 %, 6.1 %, 16.5 %, 9.8 %, 10.4 % 및 0.1 %, 0.2 %, 0.1 %, 0.1 %, 0.0 %, 0.2 %의 헤미셀룰로오스 회수율을 나타냈다.

[0100] 증기폭쇄 후 물세척 전처리 갈대시료 및 여과액의 글루코오스 손실률과 헤미셀룰로오스 손실률을 도 6에 나타내었다. 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68일 때 글루코오스는 각각 30.6 %, 27.6 %, 61.9 %, 23.3 %, 51.2 % 및 25.5 % 의 손실이 일어난 것으로 나타났고 헤미셀룰로오스는 각각 29.2 %, 39.4 %, 93.8 %, 83.4 %, 90.2 % 및 89.4 %의 손실이 일어난 것으로 나타났다.

[0101] 물세척을 하지 않았을 때 보다 물세척을 수행하였을 때 헤미셀룰로오스 제거율에 있어서 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.68, 4.03, 4.33 및 4.68에 대하여 각각 19.4%, 17.0 %, 10.8 %, 6.7 % 및 12.0 %의 헤미셀룰로오스가 더 제거된 것으로 나타났으며, 이는 증기폭쇄 전처리 후 물세척을 함으로서 고온·고압반응으로 인해 글루코오스 및 헤미셀룰로오스로부터 생성되는 발효저해물질인 HMF, 푸르푸랄등을 제거하여 이어서 시행될 발효에 대하여 긍정적인 효과를 나타낼 것이라 판단되며, 고체에 있어서 물세척으로 인해 강도 지수 (R_0) 2.94, 3.33, 3.68 및 4.03에서 AIL (acid insoluble lignin)이 각각 2.2 %, 3.0 %, 11.8 % 및 4.1 % 제거되어 효소가수분해에 있어서 효소-리그닌 축합 반응이 일어날 확률이 낮아지게 됨으로서 효소가수분해율을 상승시킬 수 있을것이라 판단된다.

[0102] **<실험예 3> 탈리그닌화 공정 최적화**

[0103] **1) 시료**

[0104] 전남 지역별 갈대(강진, 나주, 보성 및 장흥)를 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 처리 후 물세척된 시료를 사용하였다.

[0105] **2) 1 % NaOH 처리**

[0106] 증기폭쇄 처리 후 물세척된 전남 지역별 갈대 (R_0) 4.03를 각각 1 : 25 (solid : liquid)의 비율로 1 % NaOH에 침지시켜 30℃로 설정된 진탕 배양기에서 100 rpm 으로 3시간 동안 교반 하였다. 교반 후 여과하여 각각의 불용성 분획을 65℃에서 건조시킨 후 화학적 조성 분석을 하였다

[0107] **3) 1 % H_2O_2 처리**

[0108] 증기폭쇄 처리 후 물세척된 전남 지역별 갈대 (R_0) 4.03를 각각 1 : 25 (solid : liquid)의 비율로 1 % H_2O_2에 침지시켜 30 ℃에서 1시간 동안 교반 시켰다. 반응 후 여과하여 불용성 분획을 65℃에서 건조시킨 후 화학적 조성 분석을 하였다.

[0109] **4) 메탄올 처리**

[0110] 증기폭쇄 처리 후 물세척된 전남 지역별 갈대 R_0 4.03를 각각 1 : 25 (solid : liquid)의 비율로 메탄올에 침지시켜 속슬렛추출기에서 12시간 동안 가열하였다. 반응 후 여과하여 불용성 분획을 65℃에서 건조시킨 후 화학적

조성 분석을 하였다.

[0111] **5) 결과 분석**

[0112] 증기폭쇄 전처리 및 물세척 후 1 % NaOH 처리, 1 % H_2O_2 처리 및 메탄올 처리로 탈리그닌화된 전남 지역별 갈대의 화학적 분석을 통하여 주성분 변화 및 탈리그닌율을 확인하였다.

[0113] 1 % NaOH 불용성 분획, 1 % H_2O_2 불용성 분획 및 메탄올 불용성 분획의 화학적 조성 분석은 실험예 1 에서 " 2) 전남 지역별 갈대의 화학적 조성 분석 " 항목의 분석법과 동일하게 실행하였다. 상기 방법에 관한 플로우 차트를 도 7에 나타내었다.

[0114] 표 7에 탈리그닌처리에 사용될 시료로서 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 처리 및 물세척된 전남 지역별 갈대의 화학적 조성을 나타내었다. 하기 표 7을 참조하면, 글루코오스로서의 셀룰로오스 함량은 강진, 나주 및 보성에서 각각 41.3 %, 40.6 % 및 39.3 %로 나타났으며, 장흥 갈대의 글루코오스 함량이 35.5 %로 낮게 나타났다.

표 7

[0115]

Composition[a]	Cultivation region			
	강진	나주	보성	장흥
수율[b]	67.6 ± 0.3[c]	66.4 ± 1.9	70.1 ± 0.4	66.3 ± 1.0
셀룰로오스	41.3 ± 0.3	40.6 ± 1.4	39.3 ± 0.1	35.5 ± 1.0
헤미셀룰로오스[d]	4.0	2.1	3.0	1.7
자일로오스	3.4 ± 0.5	1.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1
갈락토오스	nd[e]	nd	nd	nd
아라비노스	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1
만노스	nd	nd	nd	nd
리그닌	31.0	38.3	33.8	43.2
산 불용성 리그닌	31.0 ± 0.4	37.0 ± 1.2	33.1 ± 0.5	41.9 ± 0.6
산 가용성 리그닌	0.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.7 ± 0.0	1.3 ± 0.0
회분	5.2 ± 0.1	5.4 ± 0.1	7.2 ± 0.2	6.6 ± 0.3
단백질	3.8	9.5	5.4	12.3

[a] Composition percentages are on a dry-weight basis.

[b] 수율 : severity log (R_0) 4.03 증기폭쇄 전처리 후 수율

[c] Mean values of triplicate samples with standard deviations.

[d] 헤미셀룰로오스 : 자일로오스 + 갈락토오스 + 아라비노스 + 만노오스

[e] nd : 검출 안됨

[0116] 표 8에 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 전처리 및 물세척된 각 지역별 갈대시료에 대하여 1 % NaOH 탈리그닌 처리 후 고형물 대한 화학적 조성을 나타냈다. 물세척된 증기폭쇄 전처리 시료 100 g을 1 % NaOH 탈리그닌 처리하였을 때 강진, 나주, 보성 및 장흥갈대에서 각각 89.1 g, 89.5 g, 90.1 g 및 89.0 g의 고체 회수가 이루어 졌으며, 글루코오스는 각각 42.1 g, 38.3 g, 42.4 g 및 31.1 g 으로 나타났다.

표 8

[0117]

Cultivation region	Total gravimetric recovery	글루코오스	자일로오스	만노오스	갈락토오스	아라비노스	산불용성리그닌	회분
강진	89.1	47.2(42.1)	2.2(2.0)	nd	nd	0.9(0.8)	34.7(30.9)	2.4(2.1)
나주	89.5	42.8(38.3)	1.6(1.4)	nd	nd	0.7(0.6)	40.8(36.5)	3.7(3.3)
보성	90.1	47.1(42.4)	2.5(2.3)	nd	nd	0.9(0.8)	33.3(30.0)	2.6(2.3)
장흥	89.0	34.9(31.1)	1.5(1.3)	nd	nd	0.8(0.7)	44.7(39.7)	4.5(4.0)

nd : 검출안됨.

[a] 괄호 안 데이터는 Total gravimetric에 기초한 g임

[0118] 표 9에 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 전처리 및 물세척된 각 지역별 갈대시료에 대하여 1 % H_2O_2 탈리그닌 처리 후 고형물 대한 화학적 조성을 나타냈다. 물세척된 증기폭쇄 전처리 시료 100 g을 1 % H_2O_2 탈리그닌 처리하였을 때 강진, 나주, 보성 및 장흥갈대에서 각각 69.9 g, 64.5 g, 68.9 g 및 61.5 g의 고체 회수가 이루어 졌으며, 글루코오스는 각각 39.1 g, 37.5 g, 36.7 g 및 32.8 g 로 나타났다.

표 9

[0119]

Cultivation region	Total gravimetric recovery	글루코오스	자일로오스	만노오스	갈락토오스	아라비노스	산불용성리그닌	회분
강진	69.9	55.9(39.1)	2.1(1.5)	nd	nd	0.6(0.4)	13.5(9.4)	7.1(5.0)
나주	64.5	58.1(37.5)	2.3(1.5)	nd	nd	0.8(0.5)	12.9(8.3)	6.1(3.9)
보성	68.9	53.2(36.7)	2.5(1.7)	nd	nd	0.8(0.6)	16.9(11.6)	7.3(5.0)
장흥	61.5	53.3(32.8)	1.9(1.2)	nd	nd	0.7(0.4)	17.4(10.7)	7.4(4.6)

nd : 검출안됨.

[a] 괄호 안 데이터는 Total gravimetric에 기초한 g임

[0120] 표 10에 강도 지수 (R_0) 4.03으로 증기폭쇄 전처리 및 물세척된 각 지역별 갈대시료에 대하여 메탄올 탈리그닌 처리 후 고형물 대한 화학적 조성을 나타냈다. 물세척된 증기폭쇄 전처리 시료 100 g을 메탄올로 탈리그닌화 처리하였을 때 강진, 나주, 보성 및 장흥갈대에서 각각 84.6 g, 82.3 g, 84.6 g 및 82.7 g 의 고체 회수가 이루어 졌으며, 글루코오스는 각각 39.3 g, 39.1 g, 34.9 g 및 33.9 g 로 나타났다.

표 10

[0121]

Cultivation region	Total gravimetric recovery	글루코오스	자일로오스	만노오스	갈락토오스	아라비노스	산불용성리그닌	회분
강진	84.6	46.5(39.3)	2.6(2.2)	nd	nd	0.9(0.8)	25.9(21.9)	7.3(6.2)
나주	82.3	47.5(39.1)	2.5(2.1)	nd	nd	0.7(0.6)	37.2(30.6)	6.0(4.9)
보성	84.6	41.3(34.9)	3.0(2.5)	nd	nd	1.0(0.8)	27.3(23.1)	9.0(7.6)
장흥	82.7	41.0(33.9)	3.4(2.8)	nd	nd	1.7(1.4)	35.5(29.4)	7.5(6.2)

nd : 검출안됨.

[a] 괄호 안 데이터는 시료 건조 중량에 기초한 %임

[0122] 도 8에 전남 지역별 갈대 4종의 1 % NaOH, 1 % H_2O_2, 메탄올 처리에 따른 총 중량회수율(total gravimetric recovery (g))과 글루코오스 함량 (g)을 나타냈고 도 9에 탈리그닌처리에 따른 리그닌 손실률(%)를 나타냈다.

[0123] 도 9를 참조하면, 탈리그닌 처리 했을 때 리그닌 손실률(%)은 1 % NaOH 처리 했을 때 강진, 나주, 보성 및 장흥 갈대에서 각각 7.4 %, 5.5 %, 11.2 % 및 7.9 %를 나타냈고 1 % H_2O_2 처리 했을 때 각각 71.4 %, 77.3 %, 64.5 % 및 74.1 %를 나타냈으며, 메탄올 처리하였을 때 각각 34.5 %, 19.1 %, 31.7 % 및 32.1 %의 수치를 나타냈다. 탈리그닌율은 1 % H_2O_2 > 메탄올 > 1 % NaOH 순으로 높게 나타났다.

[0124] **<실험예 4> 당화 공정 최적화**

[0125] **1) 시료**

[0126] 셀룰로오스 함량이 높게 나타난 1 % H_2O_2 탈리그닌 처리된 물추출 증기폭쇄 전처리된 나주 갈대시료를 이용하여 최적 당화효소 선발 및 혼합 비율을 찾아내고자 하였으며, 건조된 1 % H_2O_2 탈리그닌 처리된 물추출 증기폭쇄 전처리된 나주 갈대시료를 믹서기로 분쇄한 다음 20-mesh sieve와 80-mesh sieve를 사용하여 분획 분리를 하였고, -20/+80 mesh 분획을 최적 당효소 선발 및 혼합 비율 탐색을 위한 효소가수분해 시료로 사용하였다.

[0127] **2) 효소가수분해**

[0128] 효소가수분해에 이용된 효소는 cellulase와 β-glucosidase이며, cellulase는 Novozyme Co. (Denmark)의 celluclast 1.5 L® 및 β-glucosidase는 Novozyme Co. (Denmark)의 viscozyme L을 이용하였다. 효소가수분해 조건으로는 250 mL Erlenmeyer flask에 시료 1 g 과 0.1 M citrate buffer (pH 4.8) 50 mL을 넣어준 다음 효소를 각 농도별로 투입하여 shaking incubator (IS-97IR, Jeio-Tech Co., Korea)에서 50 ℃, 150 rpm 조건으로 96 h 효소가수분해를 실시하였으며, 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 및 96 h 가수분해액의 상등액을 1 mL을 샘플링하였다. 샘플링된 상등액은 water bath 100 ℃에서 10 min간 효소사멸하였으며, 실온에서 식힌다음 3000 rpm에서 15 min간 원심분리(Hanilmicro-12, Hanil Csience Industrial Co., Korea)후 상등액을 글루코오스 함량 분석 시료로 이용하였다.

[0129] **3) 당 분석(ASTM, E1821-96)**

[0130] 글루코오스 함량 분석을 위해 GC (Young Lin Instrument., 6000 series, KOREA)를 이용하였다. 샘플은 Standard Test Method for Determination of Carbohydrates in Biomass by Gas Chromatography (ASTM, E1821-96)에 의해 제조하였으며, 분석조건은 Column : DB-255 (Agilent technologies, Inc., 30 m x 0.250 mm x 0.15 μm), Carrier gas : Nitrogen 3 mL/min, Split ratio : 1 : 30, 190 ° C for 1.0 min, 10 ° C/min to 220 ° C Hold for 10 min, Total run time : 20 min 으로 하였다.

[0131] **4) 연구결과**

[0132] 최적 당화효소선발 및 혼합 비율 도출을 위하여 셀룰로오스 함량이 높게 나타난 1 % H_2O_2 탈리그닌 처리된 나주 갈대시료를 이용하였으며, 셀룰라아제 (celluclast 1.5 L®)와 β-글루코시다아제 (viscozyme L)을 각각 셀룰라아제 단독 0.8 mL, 셀룰라아제 0.8 mL + β-글루코시다아제 0.2 mL, 셀룰라아제 0.8 mL + β- 글루코시다아제 0.4 mL, 셀룰라아제 0.8 mL + β-글루코시다아제 0.6 mL 및 셀룰라아제 0.8 mL + β-글루코시다아제 0.8 mL을 투입한 다음 96 h 동안 반응하였다. 도 10은 효소투여농도에 따른 글루코오스 전환율을 나타냈다.

[0133] 셀룰라아제를 단독이용하여 효소가수분해 하였을 때는 63.3 %의 글루코오스 전환율을 나타내었으나 β-글루코시다아제 를 0.2 mL, 0.4 mL, 0.6 mL 및 0.8 mL을 넣어주었을 때 각각 85.9 %, 88.8 %, 88.9 % 및 90.0 %의 글루코오스 전환율이 나타났다. 셀룰라아제를 단독으로 사용할 때 보다 β-글루코시다아제 를 혼합하여 효소가수분해 하였을 때 글루코오스 전환율이 높게 나타났으며, β- 글루코시다아제 투여량이 높아질수록 글루코오스 전환율이 증가하였으나 미비한 수치를 나타내었다. 상업적 공정에 있어서 셀룰라아제와 β-글루코시다아제 혼합효소를 이용한 효소투여량은 각각 0.8 mL 및 0.2 mL을 이용하는 것이 합리적이라 판단된다.

[0134] 강진, 나주, 보성, 장흥 갈대 각각에 대한 무처리, 물추출 증기폭쇄 및 1 % NaOH, 1 % H_2O_2, 메탄올 처리된 물추출 증기폭쇄 전처리 갈대시료에 혼합효소 최적농도인 셀룰라아제 0.8 mL과 β-글루코시다아제 0.2 mL 를 투입한 다음 96 h 효소가수분해 후 글루코오스 전환율을 조사하였고, 결과 요약은 도 11에 나타냈다.

[0135] 강진, 나주 및 보성갈대는 1 % H_2O_2 처리하였을 때 각각 85.9 %, 98.4 % 및 86.7 % 의 글루코오스 전환율 (%)을 나타내어 최대 22.7 g, 24.5 g 및 22.3 g의 글루코오스를 생산하였고 장흥갈대는 메탄올 처리 하였을 때 94.0 %의 글루코오스 conversion (%)을 나타내어 최대 21.2 g의 글루코오스를 생산하였다. 전체적으로 1 % H_2O_2 처리하였을 때 글루코오스 생산량이 높게 나타났으나 메탄올 처리에서 높은 수치를 나타낸 장흥갈대는 선택적인 처리가 필요하다고 판단된다.

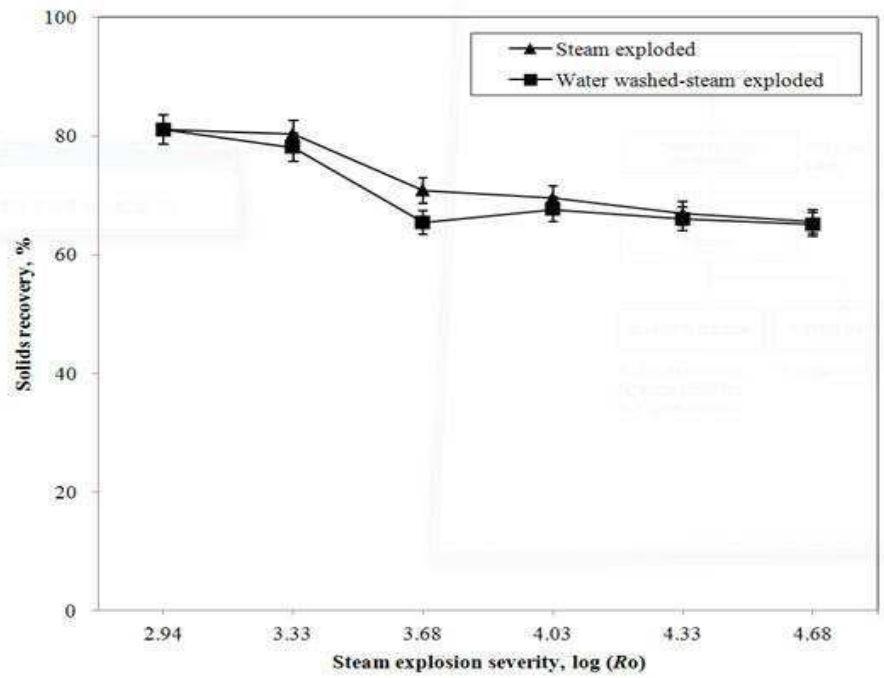
[0136] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

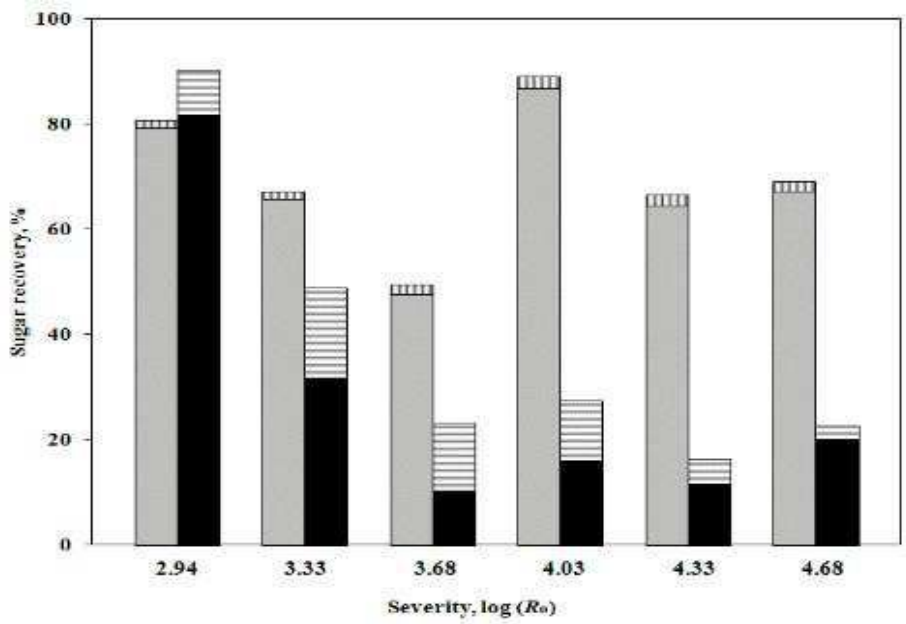
도면1



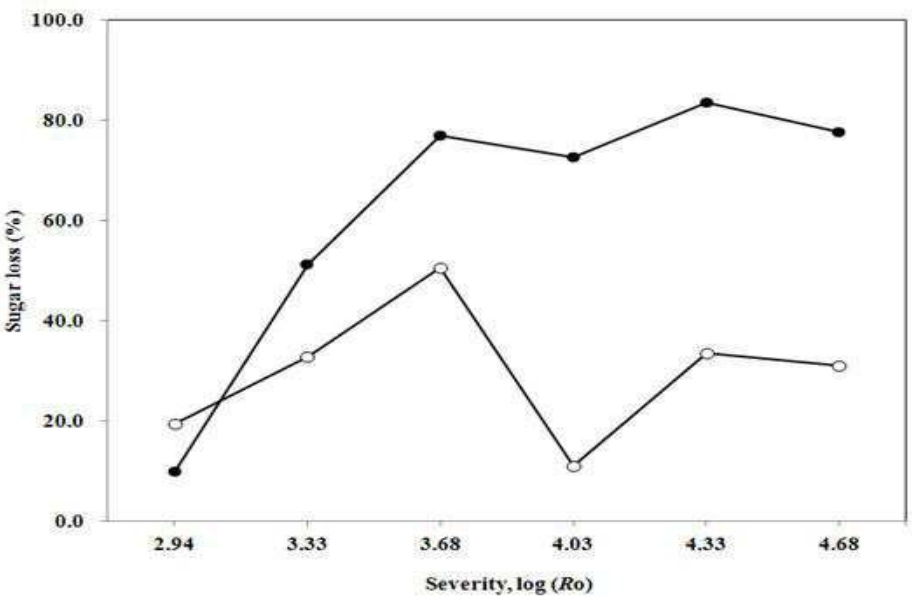
도면2


100
80
60
40
20
0
Solids recovery, %
2.94
3.33
3.68
4.03
4.33
4.68
Steam explosion severity, log (Ro)
Steam exploded
Water washed-steam exploded

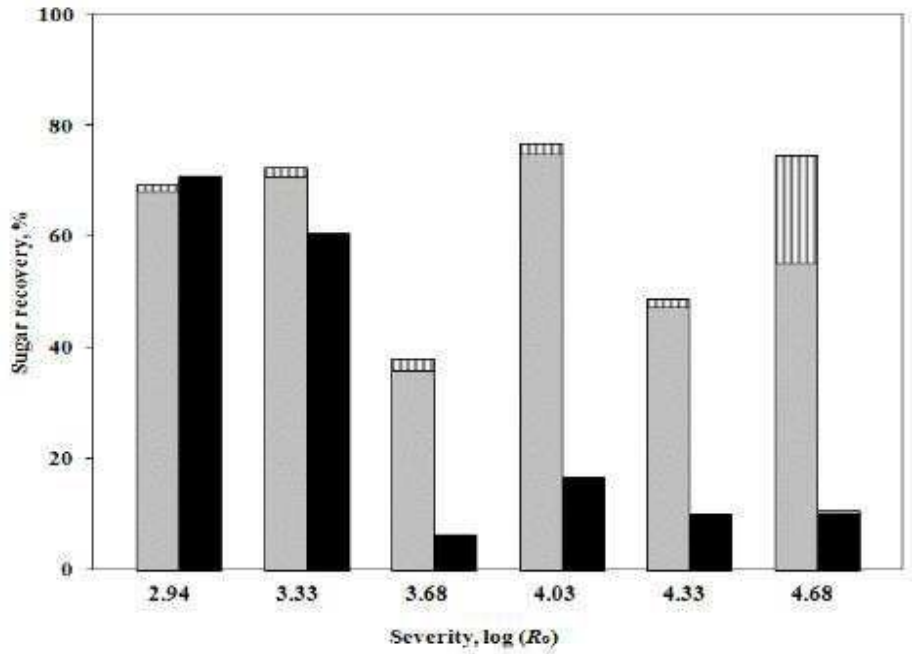
도면3


100
80
60
40
20
0
Sugar recovery, %
2.94
3.33
3.68
4.03
4.33
4.68
Severity, log (Ro)

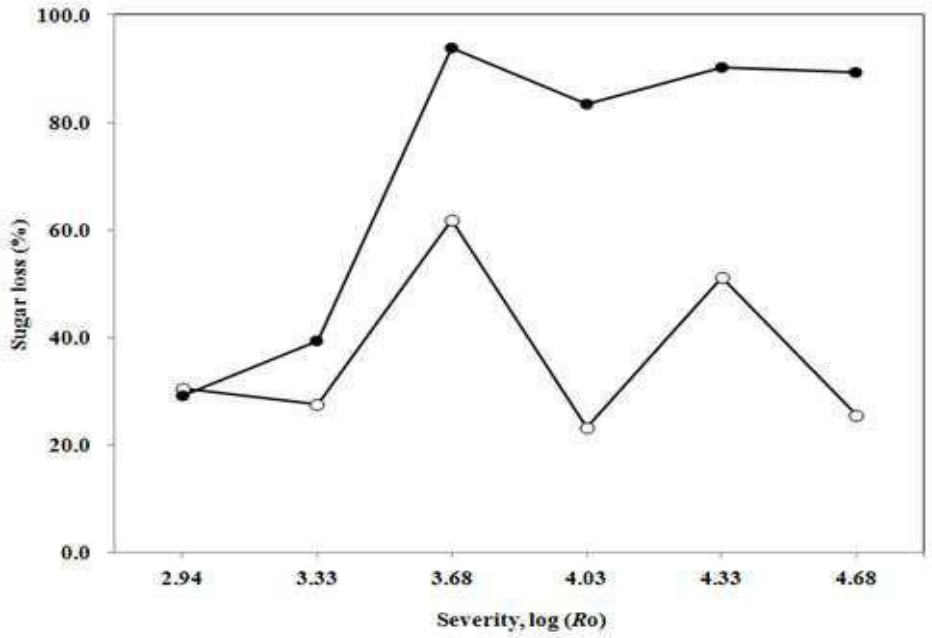
도면4


100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
Sugar loss (%)
2.94
3.33
3.68
4.03
4.33
4.68
Severity, log (Ro)

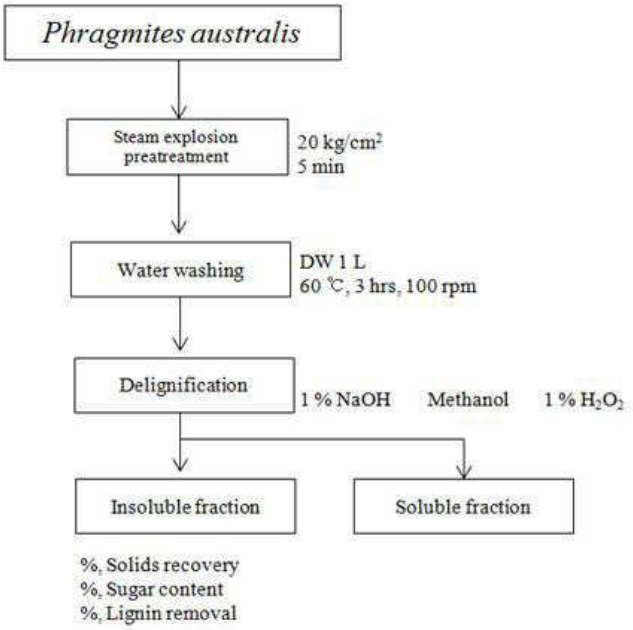
도면5


100
80
60
40
20
0
Sugar recovery, %
2.94
3.33
3.68
4.03
4.33
4.68
Severity, log (Ro)

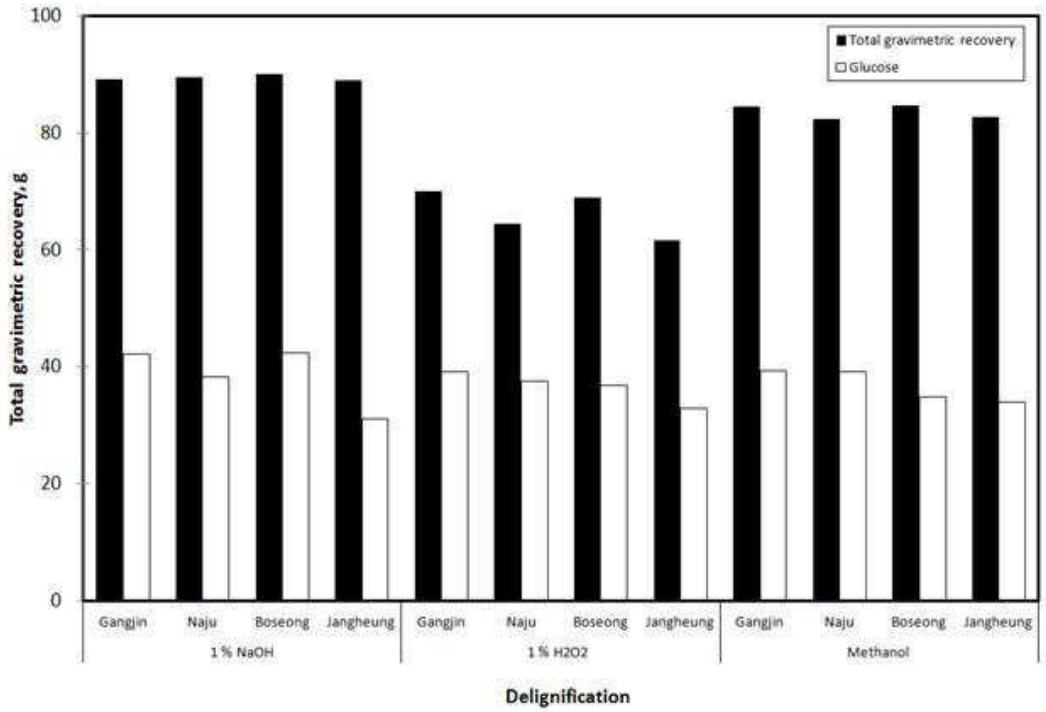
도면6


100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
Sugar loss (%)
2.94
3.33
3.68
4.03
4.33
4.68
Severity, log (Ro)

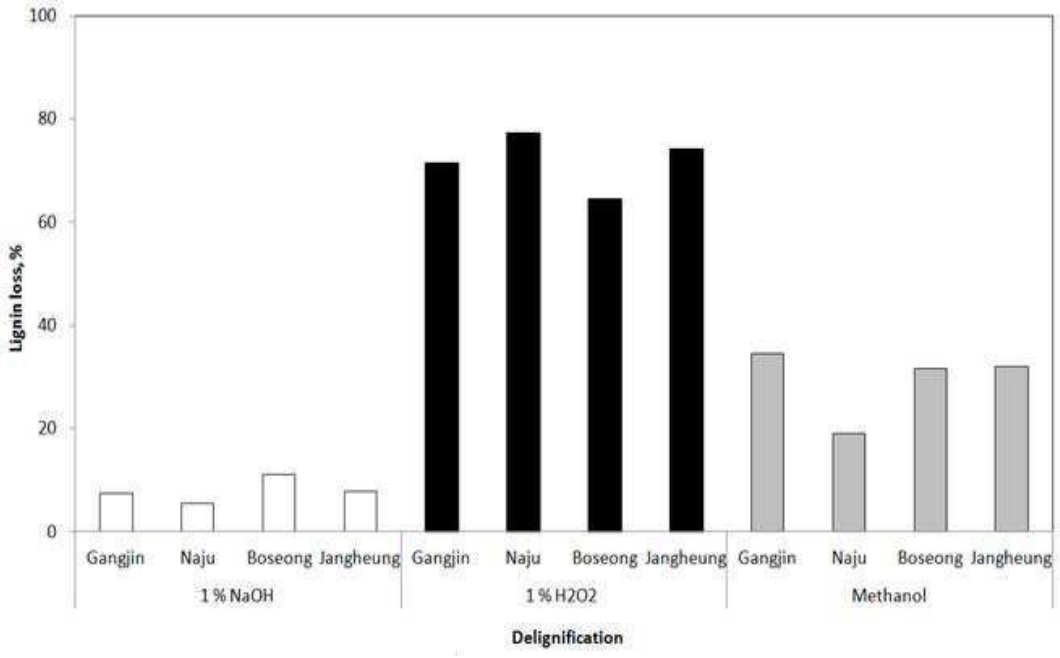
도면7


Phragmites australis
Steam explosion preatreatment
20 kg/cm²
5 min
Water washing
DW 1 L
60 ℃, 3 hrs, 100 rpm
Delignification
1 % NaOH
Methanol
1 % H2O2
Insoluble fraction
Soluble fraction
%, Solids recovery
%, Sugar content
%, Lignin removal

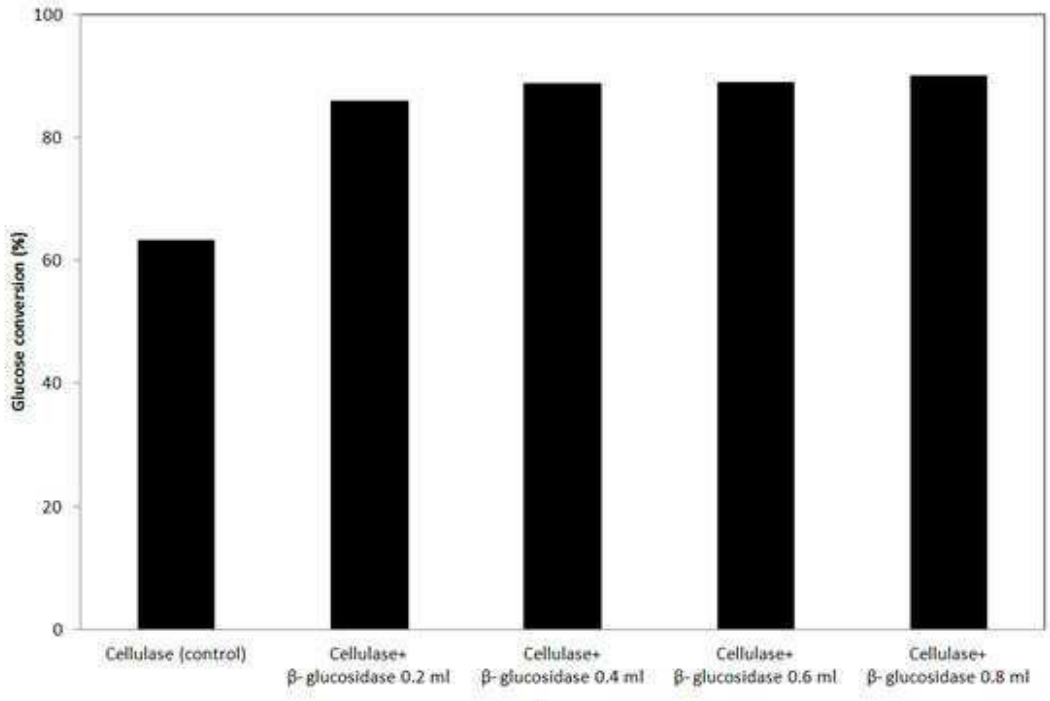
도면8


Total gravimetric recovery
Glucose
Total gravimetric recovery,g
100
80
60
40
20
0
Gangjin
Naju
Boseong
Jangheung
1 % NaOH
1 % H2O2
Methanol
Delignification

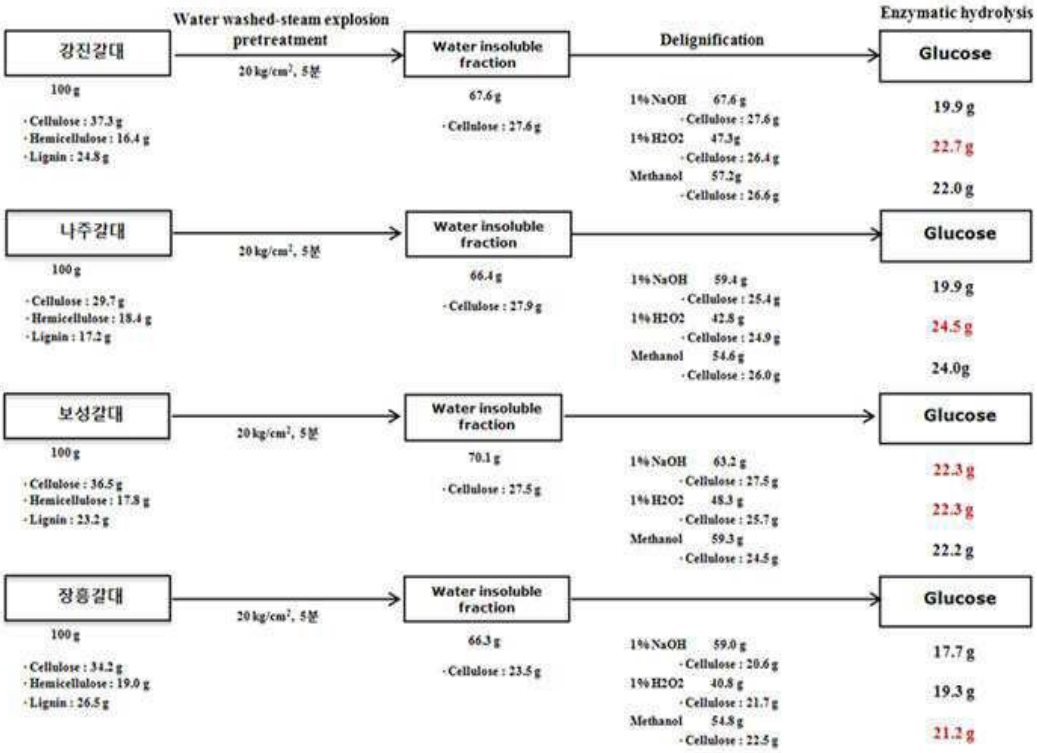
도면9


100
80
60
40
20
0
Lignin loss, %
Gangjin
Naju
Boseong
Jangheung
Gangjin
Naju
Boseong
Jangheung
Gangjin
Naju
Boseong
Jangheung
1 % NaOH
1 % H2O2
Methanol
Delignification

도면10


100
80
60
40
20
0
Glucose conversion (%)
Cellulase (control)
Cellulase+ β- glucosidase 0.2 ml
Cellulase+ β- glucosidase 0.4 ml
Cellulase+ β- glucosidase 0.6 ml
Cellulase+ β- glucosidase 0.8 ml

도면11


Water washed-steam explosion pretreatment
Delignification
Enzymatic hydrolysis
강진갈대
100 g
· Cellulose : 37.3 g
· Hemicellulose : 16.4 g
· Lignin : 24.8 g
20 kg/cm², 5분
Water insoluble fraction
67.6 g
· Cellulose : 27.6 g
1% NaOH 67.6 g
· Cellulose : 27.6 g
1% H2O2 47.3 g
· Cellulose : 26.4 g
Methanol 57.2 g
· Cellulose : 26.6 g
Glucose
19.9 g
22.7 g
22.0 g
나주갈대
100 g
· Cellulose : 29.7 g
· Hemicellulose : 18.4 g
· Lignin : 17.2 g
20 kg/cm², 5분
Water insoluble fraction
66.4 g
· Cellulose : 27.9 g
1% NaOH 59.4 g
· Cellulose : 25.4 g
1% H2O2 42.8 g
· Cellulose : 24.9 g
Methanol 54.6 g
· Cellulose : 26.0 g
Glucose
19.9 g
24.5 g
24.0g
보성갈대
100 g
· Cellulose : 36.5 g
· Hemicellulose : 17.8 g
· Lignin : 23.2 g
20 kg/cm², 5분
Water insoluble fraction
70.1 g
· Cellulose : 27.5 g
1% NaOH 63.2 g
· Cellulose : 27.5 g
1% H2O2 48.3 g
· Cellulose : 25.7 g
Methanol 59.3 g
· Cellulose : 24.5 g
Glucose
22.3 g
22.3 g
22.2 g
장흥갈대
100 g
· Cellulose : 34.2 g
· Hemicellulose : 19.0 g
· Lignin : 26.5 g
20 kg/cm², 5분
Water insoluble fraction
66.3 g
· Cellulose : 23.5 g
1% NaOH 59.0 g
· Cellulose : 20.6 g
1% H2O2 40.8 g
· Cellulose : 21.7 g
Methanol 54.8 g
· Cellulose : 22.5 g
Glucose
17.7 g
19.3 g
21.2 g