

## 바이오에탄올을 원료로서 활용평가를 위한 낙엽의 전처리 비교

최효연 · 김재형 · 박대원<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 에너지환경대학원

(2014년 6월 9일 접수, 2014년 9월 10일 수정, 2014년 9월 15일 채택)

### Comparison of pretreatment of fallen leaves for application evaluation by Bio-ethanol raw material

Choi Hyoyeon · Kim Jaehyung · Daewon Pak<sup>†</sup>

Graduate School of energy and Environment, Seoul National University of Technology & Science

(Received 9 June 2014, Revised 10 September 2014, Accepted 15 September 2014)

#### 요약

본 연구는 바이오에탄올을 생산하고자 대표적인 임업부산물인 낙엽을 바이오매스로 하여 전처리 과정을 거친 후 효소가수분해 공정을 적용하여 당화반응 특성을 비교 하였다. 전처리 방법은 화학적으로 산(HCl), 알칼리(NaOH, NH<sub>3</sub>)처리하였고 각각 침지법, 교반법, 고압멸균법을 적용하여 실험하였다. 처리 효율은 효소가수분해 진행 후 포도당 생산량으로 확인하였다. 실험결과, 알칼리 전처리에서는 산 전처리 대비 18% 높은 글루코즈 생산량을 보여 바이오에탄올 생산을 위한 임업폐기물 화학적 전처리 방법으로는 알칼리처리가 효율이 더 높은 것으로 확인되었다. 또한 화학적 처리방법 중 각 방법을 적용하여 비교한 결과, 모든 방법이 알칼리-수산화나트륨 처리하였을 때 가장 높게 나왔다. 본 연구의 결과를 바탕으로 목질계 바이오매스 중 하나인 낙엽을 기질로 전처리 및 효소가수분해 공정의 가능성을 확인하였고 차후 바이오에탄올 생산에도 영향을 미칠 것으로 예상된다.

주요어 : 낙엽, 전처리, 화학적 처리, 포도당, 알칼리, 효소가수분해

Abstract - This study is to compare characteristics of saccharification reactions applying to enzymatic hydrolysis of pretreated fallen leaves for bio-ethanol production. It experimented pretreatment of acid, alkaline in the chemical. This experiment includes pretreatment of acid and alkaline in chemical, soaking, shaking and autoclaving method, which were applied to biomass. In result, the glucose production from alkaline-NaOH method was 263 mg glucose/ g biomass comparing with them of acid-HCl method. Thus, alkaline-NaOH method is superior than the acid-HCl method for chemical pretreatment of fallen leaves. Also, when various chemical treatments were compared, they were all. Based on the results of this study, we found that leaves, one of biomass, are possible in pretreatment and enzymatic hydrolysis process, and they are likely to affect bio-ethanol production in the future.

**Key words** : pretreatment, saccharification, enzymatic hydrolysis, alkaline method, glucose

### 1. 서 론

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 전분질

<sup>†</sup>To whom corresponding should be addressed.  
The Graduate School of Energy and Environment,  
Seoul National University of Science and Technology  
Tel : 02-970-6595 E-mail : daewon@seoultech.ac.kr

계 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 식용작물을 사용할 경우 인류의 식량문제와 부딪치게 되며 따라서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적정하지 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, 볏짚, 보리짚 등)과 임업부산물 및 다양한 비식용 작물을 이용하여 바이오 에탄올 생산량을 늘려 나가야할 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 얻어야하기 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 바이오

매스의 리그닌과 헤미셀룰로오스를 분해하는 생물학적 처리 공정이 있다.[1-4] 물리화학적공정 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 구성성분들 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. 이에 리그닌, 셀룰로오스 함량이 많은 낙엽의 전처리 공정으로 적합하다고 생각되어 산과 알칼리 용액으로 전처리한 후 효소가수분해를 통해 얻을 수 있는 특성을 파악하고자 하였다. 이에 본 실험은 낙엽을 바이오 에탄올 원료로 활용하기 위한 목적을 가지며, 연구의 목표는 적절한 전처리 공정을 시행하여 에탄올의 발효 가능한 단당류를 생산하는 것이다.

## 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 높이기 위해 1  $\mu\text{m}$  이하로 만드는 성능을 가진 분쇄기를 이용해 분말의 형태로 만들었다. 분말형태로 처리된 바이오매스는 수분이 제거되도록 dry oven을 사용하여 24시간 이상 건조한 후 고체 성분분석 및 전처리 실험에 사용하였다.

바이오매스의 전처리에 사용된 산 전처리 용매는 HCl를 사용하였고 알칼리 용매는  $\text{NH}_3$ , NaOH를 각각 사용하여 반응시킨다. 전처리 후 각 전처리에 대한 영향을 알아보기 위한 효소당화에 이용된 효소는 Celluclast 1.5L, Novoprime B359(Cellulase, Novo Co.), Viscozyme L, Pectinex Ultra SP-L(Hemicellulase, Novo Co.), Spirizyme plus FG(Gluco-amylase, Novo Co.)를 사용하였다[1,6]. 또 당화에 인산칼륨 완충용액(potassium phosphate buffer)를 pH 5.5로 제조하여 사용하였다[6].

2-2. 전처리 방법

각 전처리 방법은 다음과 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 먼저 전처리공정은 기존에 활용되던 바이오매스에 적용하던 방법으로 실험하였다. 전처리에 사용된 용액은 염산, 암모니아, 수산화나트륨을 사용하였고 [4,5,6], 각각의 반응 농도는 HCl 0.5M, NaOH 0.5M, NH<sub>3</sub> 15%(w/w), 고액 비율은 1:10(10 g : 100 ml)으로 고정하여 실험하였다. 위와 같은 조건으로 80°C의 온도에서 침지시켜 Shaking Incubator에서 200rpm에서 교반하였고 12시간, 24시간으로 나누어 실험하였다.(침지법) 그리고 120°C, 1.16기압의 autoclave에서 15분, 20분 고압 멸균하였다.(고압멸균법) 이 후 반응액을 진공펌프로 충분히 세척, 여과하였다.

2-3. 효소당화

당화실험은 기존 셀룰로오즈 계열 바이오매스의 최적 당화조건을 적용하여 수행하였다. 여기에 적용된 조건은 반응온도 50°C, 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°C의 shaking incubator 안에서 200rpm의 속도로 교반시키며 당화하였다. 이 때 Working volume은 50 ml이며 당화액을 원심분리 후 환원당을 측정하였다.

2-4. 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°C 조건에서 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 바이오매스의 기초특성 분석

낙엽의 원소 분석, 삼성분 분석 및 탄수화물 함유량을 분석하여 결과를 Table 1에 나타내었다. 바이오

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

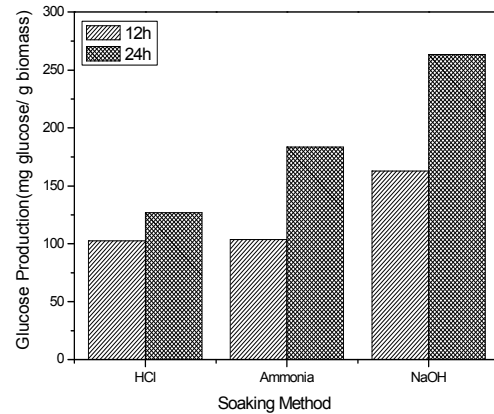


Fig. 1. Glucose production of Soaking method

매스 내 탄소성분이 49.2%로 절반 가까이 분포하고 있고 약 85% 가연분으로 이루어져 있었다. 그 중 탄수화물 함량이 76.04%를 차지하고 있어 적절한 전처리 공정을 적용한다면 효과적인 글루코즈 전환율을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

3-2. 염산, 암모니아, 수산화나트륨용액으로 전처리 후 효소당화

3-2-1. 침지법

실험방법으로 제시된 침지법, 고압멸균법의 전처리와 효소당화 후 측정된 글루코즈 생산량 도출, 분석하여 그림과 표로 나타내었으며, 이를 토대로 각 전처리에 대한 효과를 비교해 보았다. 여기서 글루코즈 생산량은 환원당 측정으로 얻은 농도에서 부피를 Working Volume이었던 50 ml로 환산하여 도출하였다.

먼저 기존의 가장 많이 시행되고 있는 침지법을 시행하였다. 이는 말 그대로 용액에 바이오매스를 담그는 방법으로 그에 따른 반응의 효과를 비교 분석하였

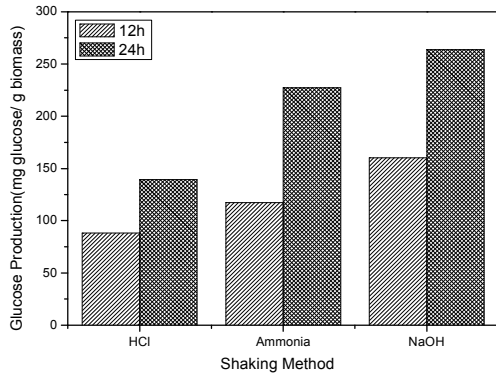


Fig. 2. Glucose production of Shaking method

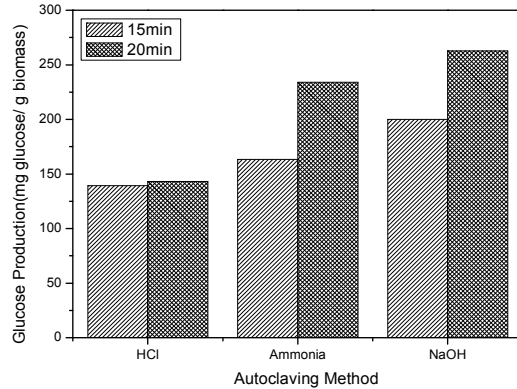


Fig. 3. Glucose production of Autoclaving method

다. 염산과 암모니아로 12시간 침지 전처리 후 환산한 글루코즈 생산량은 바이오매스 1g 당 102.7 mg, 103.6 mg와 같이 비슷한 값을 보였지만 수산화나트륨 침지 전처리 후 바이오매스 1 g 당 162.8 g으로 염산과 암모니아 전처리 보다 더 높은 생산량을 보였다.

24시간의 전처리 하였을 때는 염산 전처리보다 수산화나트륨 전처리 시 약 2배 차이를 보였으며 이를 바탕으로 침지법에서는 수산화나트륨으로 전처리 하였을 때 바이오매스 1 g 당 263.4 mg로 가장 높은 글루코즈 생산량을 얻을 수 있었고, 수산화나트륨 용액이 다른 용액보다 글루코즈 전환율도 높을 것임을 예상할 수 있었다.

다음으로 Shaking Incubator에서 침지된 바이오매스를 200 rpm 속도로 교반시키는 전처리를 시행하였다. 이 또한 12시간, 24시간으로 나누어 시행하였다. 실험결과 12시간부터 산과 알칼리 용액 전처리에 따른 글루코즈 생산량의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 12시간 전처리 시 바이오매스 1 g 88 mg에서 160 mg 까지 염산, 암모니아, 수산화나트륨 순으로 생산량이 높아짐을 알 수 있었다. 24시간 전처리 시 침지법 결과와 비슷한 경향을 보여 수산화나트륨 전처리에서 가장 높게 바이오매스 1 g 당 236.8 mg 글루코즈를 얻을 수 있었으며 이 또한 높은 글루코즈 전환율로 이어질 것으로 파악된다.

두 실험결과를 비교, 분석해보았다. 염산에서 전처리했을 때 침지법의 12시간 반응 결과보다 교반법 12시간의 결과가 글루코즈 생산량이 더 적고 24시간 반응 시 교반법에서 더 많은 글루코즈 생산량을 얻을 것을 알 수 있다.

이를 바탕으로 산 용액으로 짧은 시간 전처리할 때는 높은 온도조건이 필요하며 온도조건에서는 교반을 같이 시행하면 보다 높은 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 알칼리 용액으로 전처리 공정을 시행했을 때 대체적으로 산 처리보다 더 높은 글루코즈 생산량을 보이고 있다. 그 중 암모니아는 목질계 바이오매스에 가장 많이 쓰이는 전처리 용액으로서 침지법(SAA)이 가장 많이 알려져 있다. 침지된 바이오매스를 교반시키면 더 활발한 반응촉진을 예상하여 시행하였다. 본 실험에서는 침지법보다 교반하였을 때 좀 더 많은 글루코즈를 얻을 수 있었지만 침지와 교반의 결과가 최대 4%정도의 차이 밖에 보이지 않아 별다른 차이가 없다고 하겠다. 또한 수산화나트륨 용액으로 전처리 시 침지, 교반 실험결과 모두 비슷한 수치를 나타내고 있으며 24시간에서는 거의 동일한 값이 나타나 같은 시간 조건일 경우 어느 공정을 시행해도 무방하다고 판단된다.

3-2-2. 고압멸균법

다음으로 침지된 바이오매스를 고온에 일정한 압력으로 전처리한 고압멸균법의 결과를 분석하였다. 고온멸균 전처리 시 침지, 교반 전처리에 비해 결과적으로 많은 글루코즈 생산량을 보였다. 염산 처리 시 15분, 20분 반응 후 바이오매스 1 g 당 글루코즈 139 mg, 143 mg로 별 다른 차이가 나지 않지만 알칼리용액에서는 15분의 짧은 시간에서도 바이오매스 1 g 당 150 mg 이상의 글루코즈를 얻을 수 있었으며 암모니아, 수산화나트륨 전처리 시 시간에 따라 일정한 증가한 것을 알 수 있었다. 이 결과 높은 온도와

압력을 가해주면 전처리 반응이 더 활발히 일어나고 그에 따라 효소가수분해도도 증가하는 것으로 파악되며, 시간을 적절히 늘려간다면 보다 높은 효율을 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

3.3. 각 공정 별 탄수화물 대비 당 전환율 비교

위의 내용에서도 볼 수 있듯이 알칼리 용액인 암모니아와 수산화나트륨으로 전처리 하였을 때 산처리보다 높은 포도당 생산량을 알 수 있었으며 이는 당 전환율로 이어진다. 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

당 전환율은 바이오매스에 함유된 탄수화물이 글루코스로 변환된 비율을 나타내며 화학적 조성분석으로 알아낸 탄수화물 함유율을 이용하여 글루코스 전환율을 도출해 보았다. 침지법과 교반법의 결과는 서로 비슷한 수치를 보였다. 반면 고온멸균법에서는 산 전처리와 알칼리 전처리 시 침지법 실험의 글루코스 전환율보다 높은 값을 얻었고 알칼리 전처리에서는 12시간 이후부터 모두 20% 이상 글루코스 전환율을 보였다. 따라서 낙엽을 바이오매스로 하는 경우 고온 멸균 전처리 공정이 효소당화에 있어서 침지, 교반법의 결과와 비슷한 수치를 보이기에 시간 대비 효율이 높은 전처리 방법으로 판단할 수 있었다.

김경섭, 김준석(2011)은 보리짚을 기질로 하여 암모니아와 수산화나트륨 용액으로 전처리 후 효소당화를 통해 전처리에 의한 리그닌 제거효과가 당화와 발효에 미치는 영향을 확인하였다. 암모니아와 수산화나트륨에 의한 리그닌 제거 후 효소당화를 통한 글루코스 전환율은 각 67.8%, 58.5%이다[1]. 이로서 보리짚의 경우 암모니아 전처리가 효소당화에 있어서는 좀 더 유리한 전처리 방법임을 알 수 있다. 반면 기질은 다르지만 본 연구의 암모니아와 수산화나트륨에 의한 리그닌 제거 후 효소당화를 통한 글루코스 전환율은 각 30.8%, 34.7%으로 수산화나트륨의 당 전환율이 높았다. 낙엽을 기질로 하여 전처리 하였을 때 보리짚에 비해 모두 그 효과가 낮은 것으로 나타났지만 낙엽의 전처리는 알칼리용액이 효과가 있는 것으로 볼 수 있다.

4. 결론

본 연구는 바이오에탄올을 생산하기 위해 낙엽을 바이오매스로 활용 가능한 지을 평가하기 위한 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 목질계 바이오

Table 2. Sugar conversion of pretreated biomass

Treatment Method and Time	Conversion(%)		
	HCl	NH <sub>3</sub>	NaOH
Soaking			
12h	13.51	13.63	21.41
24h	16.67	24.14	34.64
Shaking			
12h	11.60	15.42	21.09
24h	18.33	29.91	34.70
Autoclaving			
15min	18.29	21.46	26.28

매스의 한 종류로 낙엽은 리그닌이라는 성분이 당 전환이 가능한 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 둘러싸고 있어 효소가수분해만으로는 당 전환이 어려워 리그닌을 제거하는 전처리를 시행하였다. 이에 산과 알칼리 용액으로 여러 가지 방법을 적용하여 그 효과를 비교분석하여 몇 가지의 결론을 도출하였다.

산 용액으로 전처리 하였을 때 보다 알칼리용액으로 처리 하였을 때 글루코스 전환율이 높음을 알 수 있었고 또한 수산화나트륨을 사용하였을 때 가장 높은 글루코스 전환 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

전처리 시간에 따라 글루코스 전환율에 영향을 미치며 시간이 증가함에 따라 당 전환율 또한 증가하는 것을 알 수 있었다.

전처리 방법 중 고압멸균법을 적용했을 때 12시간, 24시간 처리한 다른 전처리 방법에 비해 분단위의 짧은 시간에도 높은 효율을 얻을 수 있었다.

이로서 낙엽은 알칼리 용액을 통한 전처리에서 높은 효율이 나타나며 이는 발효물질 생산 가능 당 및 발효물질 생산에도 유리한 기질임을 판단할 수 있었다.

향후, 좀 더 효과적인 전처리 병합 등 또 다른 연구 자료를 확보할 필요가 있으며 더욱이 전처리 방법 적용에 있어 에탄올 생산에도 영향을 미칠 것으로 예상된다.

사 사

이 논문은 2014년도 SL공사의 환경에너지대학원 인재양성 프로그램에서 지원받아 수행된 연구임

References

1. 김경섭, 김준석, “염기 용매를 이용한 보리짚의 전처리 특성”, *Korean Chem. Eng. Res.*, Vol. 50, No. 1, February, 2012, pp.18-24
2. 정소리, 김성준, 김광용, Richard Kim, “구멍갈 파래의 전처리 조건에 따른 효소 가수분해 특성”, *한국도시환경학회지 제 12권 1호* 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. T. H. Kim, Frank Taylor, Kevin B. Hicks, “Bioethanol production from barley hull using SAA(Soaking in aqueous ammonia) pretreatment”, *Bioresource Technology* 99(2008) 5694-5702
6. S. hari Krishna, K. Prasanthi, G. V. Chowdary and C. Ayyanna, “Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol”, PII: S0032-9592(98)00051-X
7. S. Hari Krishna, T. Janardhan Reddy, G.V, Chowdary, “Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast”, *Bioresource Technology* 77 (2001) 193-196
8. 김재형, “효소가수분해를 이용한 음식물쓰레기의 바이오에탄올 생산”, *서울과학기술대학교*, 2008
9. 이원규, “낙엽으로부터 바이오 에탄올을 생산하기 위한 산, 효소, 수열 당화 반응의 특성 평가”, *서울대학교 대학원*, 2011
10. F. Carrillo, M.J. Lis, X. Colom, M. Lpez-Mesas, J. Valldeperas, “Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study”, *Process Biochemistry* 40 (2005) 3360.3364