

에탄올 유기용매 전처리를 이용한 옥수수대의 효소당화

박장한 · 김태현* · 김준석†

경기대학교 화학공학과
 16227 경기도 수원시 영통구 광교산로 154-42
 *공주대학교 환경공학과

31080 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24
 (2016년 3월 3일 접수, 2016년 3월 28일 수정본 접수, 2016년 3월 31일 채택)

The Effect of Enzymatic Hydrolysis by Ethanol Organosolv Pretreatment of Corn Stover

Jang Han Park, Tae Huyn Kim* and Jun Seok Kim†

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, 154-42, Gwanggyosan-ro, Yeongtong-gu, Suwon, Gyeonggi, 16227, Korea

*Department of Environmental Engineering, Kongju National University, 1223-24, Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam, 31080, Korea

(Received 3 March 2016; Received in revised form 28 March 2016; accepted 31 March 2016)

요 약

새로운 수송용 에너지자원으로 각광받는 바이오매스의 효율적인 당화를 위한 전처리방법이 연구되고 있다. 최근 바이오매스의 에너지 전환 공정 중 전처리 비용이 높은 비중을 차지하고 있으며 이중 폐수처리가 커다란 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 폐수발생을 줄이고 재사용이 용이한 유기용매(Organosolv)를 이용한 전처리를 수행하였으며, 전처리 바이오매스의 잔류 고형물의 양과 제거된 성분의 양을 이용하여 바이오매스의 전처리 효과를 효소당화를 통해 알아보았다. 전처리에 사용한 유기용매로는 99.5 wt% 에탄올을 사용하였고, 초본계 바이오매스인 옥수수대(corn stover)를 이용하여 전처리 하였다. 전처리 효과는 130~190 °C 조건에서 시간대별로 진행하여 전처리된 바이오매스의 효소당화를 통하여 확인하였다. 효소당화결과로 가장 높은 글루코오스 당화율을 보였던 전처리 온도는 190 °C에서 반응시간 70분 이상의 조건이었으며, 이 때 68% 이상의 당화율을 얻을 수 있었다. 또한 전처리 바이오매스의 잔류 고형물(Solid remaining)은 70% 이상이었으며, 대부분의 셀룰로오스(Cellulose)와 헤미셀룰로오스(Hemicellulose)의 손실이 미비하여 대부분의 당 성분을 회수할 수 있다는 장점을 보였다.

Abstract – This study is for the effective pretreatment and saccharification of lignocellulosic biomass for a transport fuel receiving attention. The waste water during the pretreatment of biomass is major factor for determining the price of biofuel. Therefore, we conducted high concentration of organosolv pretreatment for decline waste water and reusing the solvent. We confirmed effect of organosolv pretreatment by components analysis and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. The corn stover was used for and 99.5 wt% of ethanol as a organosolv pretreatment. The pretreatment condition was varied 130 to 190 °C during the designated reaction times and the effect of pretreatment was investigated by enzymatic hydrolysis. The highest glucose conversion was more than 68% the pretreatment condition of 190 °C for 70 min or more. The solid remaining was more than 70% and almost of cellulose and hemicellulose were survived.

Key words: Organosolv pretreatment, Enzyme hydrolysis, Corn stover, Solid remaining

1. 서 론

바이오 에탄올과 바이오 디젤 같은 수송용 연료를 대체할 수 있는 대체에너지로 바이오매스는 가장 적합한 에너지 자원으로 각광받고 있다[1]. 바이오매스는 크게 1세대부터 3세대까지 분류된다. 1세대

바이오매스는 식용작물로 오늘날 가장 상업화된 바이오 에너지를 만드는 원료로 사용되지만, 최근 식용작물을 사용하는데 세계 식량 문제로 인해서 경제적, 환경적 문제에 직면하게 되었다. 따라서 1세대 바이오매스인 식용작물을 대체하여 바이오 에너지를 생산하기 위해 2세대 바이오매스인 목질계 바이오매스가 새로운 원료로 주목받고 있다[2]. 옥수수대(corn stover)는 바이오에너지를 생산하기 위해 가장 풍부한 농업부산물 중 하나이다. USDA (2002)에 따르면 미국에서 연간 생산되는 옥수수대는 153 million dry t/year로 풍부한 농업부산물 자원 중 하나로 알려져 있다[3]. 목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)중 하나인 옥수수대를 효과적으로 효소당화를

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jskim84@kyonggi.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

하기 위해서는 전처리 과정이 요구된다[4]. 전처리는 산 또는 알칼리 조건에서 효소의 기질 접근성을 더 용이하게 하기 위한 방법이다[5]. 유기용매 전처리(Organosolve)는 제지공정의 펄프화(pulping)을 위해 처음 고안되었지만, 동시에 목질계 바이오매스의 리그닌을 제거하는 전처리 방법 중 하나로 연구되었다[6]. 그 중 유기용매를 이용한 전처리는 산(acid)을 촉매로 첨가한 공정, 무촉매 공정 등 다양한 방법으로 지난 100년간 많은 연구가 이루어졌고 계속해서 유기용매 공정에 대한 연구는 증가하는 추세이다[7]. 유기용매 전처리는 목질계 바이오매스의 바이오연료 생산을 위한 효소 당화율을 증가시킬 뿐 만 아니라 비교적 많은 양의 질 높은 리그닌(lignin)추출에도 좋은 공정으로 알려져 있다. 특히 리그닌은 앞으로 접착제, 섬유, 필름, 생 분해성 고분자 등의 부가가치 생성물에 충분히 응용될 가능성이 있기 때문에 각광받는 전처리공정 중 하나이고 용매의 재사용이 용이하다는 점 등의 이점이 있다[8]. 리그닌의 역할 중 하나는 셀룰로오스(Cellulose)와 헤미셀룰로오스(Hemicellulose) 사이에 밀접하게 연결되어 구조적 견고함을 유지시키고 섬유, 펄프, 생 분해성 고분자 등의 부가가치 생성물에 충분히 응용될 가능성이 있기 때문에 각광받는 전처리공정 중 하나이고 용매의 재사용이 용이하다는 점 등의 이점이 있다[8]. 리그닌의 역할 중 하나는 셀룰로오스(Cellulose)와 헤미셀룰로오스(Hemicellulose) 사이에 밀접하게 연결되어 구조적 견고함을 유지시키고 섬유의 팽창을 방지한다. 따라서 리그닌에 의한 셀룰로오스 구조적 견고함의 정도가 효소의 접근성과 효소 당화율에 중대한 관여를 한다[9]. 그러므로 전처리 바이오매스의 효소 당화율은 바이오매스의 복잡하고 얽혀있는 구조를 잘 풀어내어 효소의 접근성을 얼마나 증가시키는 지에 따라 달라진다[10]. 에탄올을 이용한 유기용매 전처리는 일반적으로 50~60 wt%의 에탄올을 이용하는 것이 보편적이나[11], 본 연구는 전처리 바이오매스의 세척수 사용량의 감소와 용매 재사용에 더 용이할 수 있는 부분을 고려하여 99.5 wt%의 에탄올을 이용해 목질계 바이오매스의 전처리를 수행하였다. 반응조건과 시간에 따라 바이오매스와 전처리된 바이오매스의 성분 제거율에 따른 효소 당화율을 비교해 보았다.

2. 실험방법

2-1. 재료

본 연구에 사용된 바이오매스는 목질계(lignocellulosic)인 옥수수대(corn stover)를 사용하였다. 각 바이오매스는 30~50 mesh의 균일한 크기의 기질을 사용하였고 분쇄 후에 45 °C 오븐에서 건조하였다. 바이오매스의 성분분석을 위한 기질의 비교군으로 여과지(whatman No.1, Cat No: 1001-150, GE Healthcare co., UK)와 α -셀룰로오스(α -cellulose, CAS No : 9004-34-6, Sigma Aldrich co., USA)를 사용하였고 모든 기질은 분쇄하여 균일한 크기를 가진 기질을 이용하였다.

2-2. 성분분석

바이오매스의 성분은 미국 신재생 에너지 연구소(National Renewable Energy Laboratory) NREL procedures LAP-002에 제시된 방법으로 성분을 분석하였다. 샘플을 황산(72 wt%)에 넣고 30 °C에서 2시간 동안 1차 산 가수분해를 시킨 뒤에 희석한 후 1시간동안 121 °C에서 2차 가수분해를 하였다. 가수분해 후 얻은 액상을 HPLC (waters, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량을 하였다[13].

시료의 성분분석과 당화액의 분석은 HPLC (Waters, USA)를 사용하였다. 분석에 사용된 column은 Biorad사의 Aminex HPX-87을 사용하였고, detector는 Waters 410 RI (Refractive Index)를 사용하였다. RI 검출기와 칼럼(column)의 온도는 각각 50 °C와 60 °C로 설정되었다. 분석한 전처리 전 바이오매스의 성분은 Fig. 1에 나타내었다.

성분 제거율은 전처리 이전 바이오매스에 함유된 리그닌과 그 외

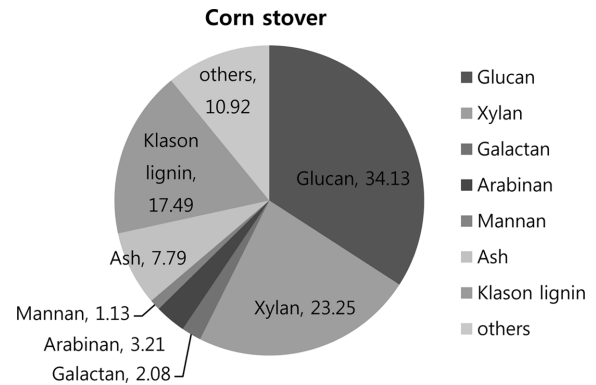


Fig. 1. Components of raw corn stover.

성분의 총 량에서 전처리 바이오매스의 리그닌과 Etc.(리그닌, 글루코오스, XMG를 제외한 나머지 성분)합의 차이로 아래 식과 같이 계산하였다.

$$\text{Component removal (\%)} = \frac{\text{raw biomass [lignin + Etc.]} (\%)}{\text{pretreated biomass [lignin + Etc.]} (\%)} - 1$$

2-3. 유기용매를 이용한 전처리

바이오매스는 옥수수대(corn stover)를 사용하였고, 99.5 wt%의 에탄올을 이용하여 전처리를 수행하였다. 전처리는 지름 2.5 cm, 높이 19.5 cm의 튜브형 회분식 반응기(batch reactor)에서 1:10의 고액비로 하였고, 전처리 전 고른 고액 접촉을 위해 12시간 회분식 반응기에서 상온(25 °C)으로 침지(soaking)하였다. 침지 후 반응기는 기름 중탕(oil bath)으로 반응온도(130~190 °C), 반응시간(5~150 min)에 따라 전처리를 수행하였다. 이 때 반응기의 예열시간(preheating time)은 5~6 min으로 일정하게 유지하였다. 전처리 후 바이오매스는 500 ml의 일정량 증류수를 이용하여 여과한 후 45 °C 오븐에서 48시간 동안 건조하였다. 완전히 건조된 전처리 바이오매스의 질량을 이용하여 전처리 후 잔류 고형물의 양을 알아보았다.

2-4. 효소당화

전처리 바이오매스의 전처리 효과를 알아보기 위하여 효소당화를 수행하였다. 효소당화는 삼각 플라스크에 각각 바이오매스, 전처리 바이오매스 그리고 비교군(whatman No.1, α -cellulose)을 sodium citrate buffer solution (0.5 M, pH 4.8)에 기질농도 2.0 wt%로 혼합한 후 50 °C에서 72시간 동안 150 rpm의 진탕 배양기에서 수행하였다. 효소는 Cellic-Ctec 2 (Novozyme co., Denmark)를 65 FPU/ml의 활성화도(Activity)로 접종하였다. 분석된 글루코오스 농도를 이용한 효소 당화율은 다음과 같이 정의된다[12].

$$\text{Enzymatic digestibility (\%)} = \frac{\text{The amount of glucose released (g)} \times 0.9}{\text{Total initial glucan (g)}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

3-1. 전처리 바이오매스의 잔류 고형물

전처리 바이오매스의 잔류성분 분석은 바이오매스의 효소당화에 필수적으로 고려되어야 할 부분이다. 효소 당화율이 좋아도 잔류

Table 1. Solid remain of pretreated corn stover for reaction time and temperature

Temp. (°C)	Solid remain									
	Time (min)									
	5	10	15	20	40	50	70	90	120	150
190	79.6%	80.2%	78.6%	78.2%	75.2%	75.0%	72.6%	72.0%	69.4%	67.8%
170	80.8%	77.2%	77.2%	77.4%	77.0%	75.6%	73.4%	74.6%		
150				80.8%		81.0%	81.4%		79.0%	
130					81.0%		82.4%		79.8%	81.0%

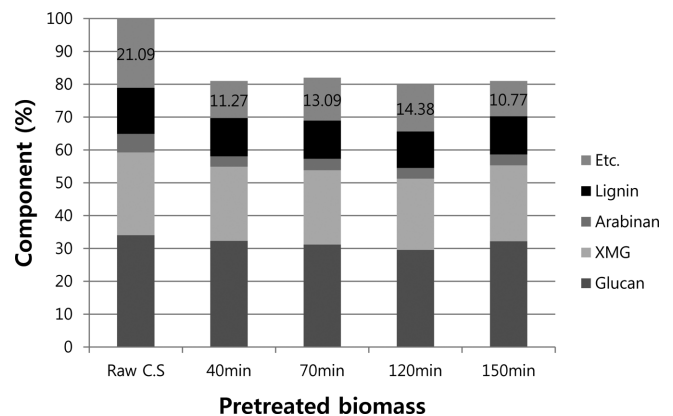
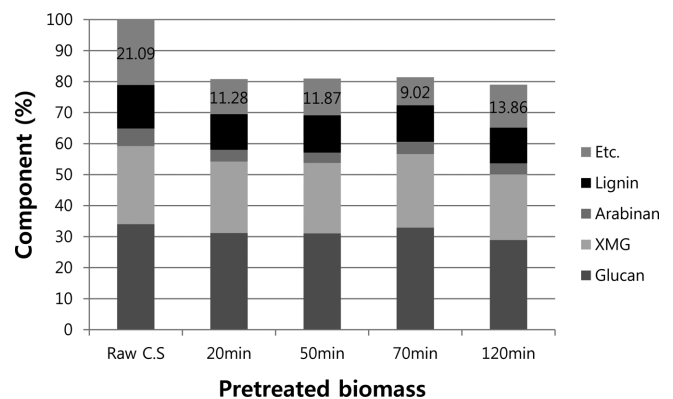
고형물의 양이 줄어들면 최종 당화를 통해 얻는 환원당의 양은 많지 않을 것이다. 또한 리그닌은 전처리를 통해 제거되어야 할 성분으로 알려져 왔지만, 최근 리그닌을 이용한 부가치 창출에 대해 많은 연구가 이루어지고 있기 때문에 잔류 고형물을 최대한 많이 유지하면서 전처리 효율을 증대시키는 방법이 요구되고 있다[13]. 그러므로 전처리 방법은 바이오매스의 특정 성분을 제거하는 목적이 아닌 바이오매스의 구조적인 팽윤 작용이 뛰어난 전처리 방법이 요구될 것이기 때문에 잔류 고형물의 양을 고려하여 전처리 바이오매스의 효소당화를 수행하였다.

바이오매스는 옥수수대를 사용하였고, 전처리는 바이오매스를 반응온도, 시간에 따라 유기용매인 99.5 wt% 에탄올을 이용하여 수행하였으며, 전처리 바이오매스의 잔류 고형물의 양을 분석해 보았다. 잔류 고형물에 대한 결과는 Table 1에 나타내었다. 온도조건은 130~150 °C, 반응시간은 5~150분 까지 설정하여 전처리를 수행하였다. 130 °C에서 전처리 바이오매스의 잔류 고형물을 보면 최대로 설정한 반응시간인 150분 까지도 잔류 고형물의 양은 큰 변화가 없었다. 150 °C의 경우에도 130 °C와 비슷하게 150 분 까지 잔류 고형물의 양은 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 130 °C와 150 °C 모두 80% 이상의 많은 잔류 고형물의 양을 보였다. 130~150 °C에서의 전처리는 5~20분의 반응시간은 의미가 없을 것이라 판단하여 설정한 조건에서 40~150분 사이의 반응시간 동안 전처리 하였다.

170 °C에서 전처리를 수행했을 경우 10~70 분 사이에서 잔류 고형물의 양이 줄어들었고 그 이후의 반응시간에서는 큰 차이가 없었다. 잔류 고형물의 양은 130~150 °C에서 전처리 보다는 낮은 73.4%로 나왔다. 190 °C에서 전처리를 수행했을 경우 설정한 최대 반응시간인 150분 까지 잔류 고형물의 양이 줄어드는 것으로 보였다. 또한 40분 이후부터 170 °C에서보다 빠르게 잔류 고형물의 양이 줄어들었고 150분에서는 잔류 고형물의 양이 67.8%로 가장 적은 양이 남았다. 유기용매인 99.5 wt% 에탄올을 이용한 전처리의 효과는 전처리 바이오매스의 성분분석과 효소당화를 통하여 알아보았다.

3-2. 전처리 바이오매스 성분분석

잔류 고형물의 양을 최대로 얻으면서 효소 당화율을 최대로 얻기 위해서는 바이오매스의 특정 성분제거(리그닌)보다 구조적으로 열린 공간을 만들어 효소의 접근성을 향상 시키기 위한 전처리가 우선시 되어야 하며, 이는 성분 제거율(Component removal)을 정의하여 간접적으로 확인하였다. 본 실험에서는 유기용매만 이용하여 전처리를 하였으며, 비교적 낮은 온도에서 전처리를 하여 가장 많은 잔류 고형물을 얻었을 경우 약 81% 정도로, 19% 이상의 바이오매스 성분이 항상 빠져나갔다. 성분이 제거된 만큼 전처리 바이오매스에는 구조적으로 열리게 되기 때문에 효소 당화율에 영향을 미칠 것으로 보인다. 따라서 전처리 바이오매스가 얼마나 효소의 접근성이 좋아졌는

**Fig. 2. Components of pretreated corn stover at 130 °C for each reaction time (XMG; Xylan, Mannan, Galactan).****Fig. 3. Components of pretreated corn stover at 150 °C for each reaction time (XMG; Xylan, Mannan, Galactan).**

지 예측해보기 위하여 성분분석을 통해 성분 제거율을 알아보았다.

전처리 바이오매스의 반응온도, 시간에 따른 성분분석 결과를 Fig. 2~5에 나타내었다. 전처리되지 않은 옥수수대를 기준으로 130~150 °C에서 전처리 바이오매스의 성분을 보면 리그닌과 그 외 성분들이 130 °C에서는 6.7~11.0%, 150 °C에서는 7.2~12.0%가량 다량 빠져나갔고 대부분의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 손실이 미비한 것을 알 수 있었다. 이는 리그닌과 그 외 성분의 추출에 용이한 에탄올 용매 전처리의 특징 때문으로 판단된다[14]. 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 손실 없이 전처리하여 다음 공정(발효, 농축 등)으로 당을 생성할 수 있다는 점은 공정 효율 면에서 큰 이점이 될 것이다. 170~190 °C에서도 대부분의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 함량은 유지되었고, 글루코오스와 XMG (Xylan, Mannan, Arabinan)을 제외한 나머지 성분에서 많은 차이를 보였다. 170 °C의 경우 그 외 성분이 13.0~19.2% 만큼 빠져나갔고, 190 °C의 경우 17.9~23.2% 만

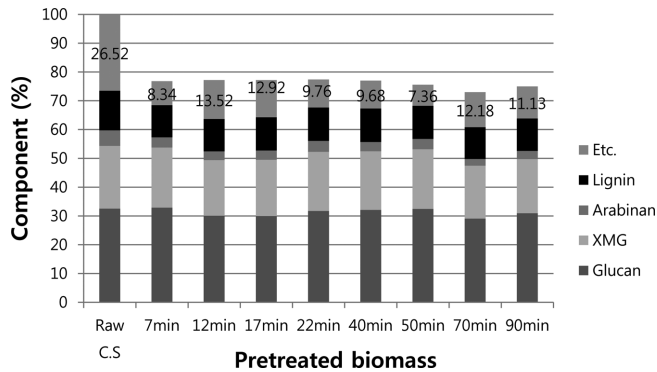


Fig. 4. Components of pretreated corn stover at 170 °C for each reaction time (XMG; Xylan, Mannan, Galactan).

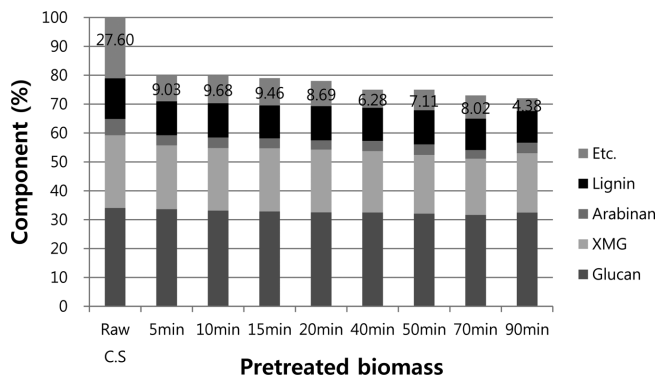


Fig. 5. Components of pretreated corn stover at 190 °C for each reaction time (XMG; Xylan, Mannan, Galactan).

크 제거되어 잔류 고형물의 결과에서와 마찬가지로 반응온도가 높을수록 많은 양의 성분이 빠져나가는 것을 알 수 있었다. 대부분의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스가 일정 수준으로 유지된 것으로 나타났다. 효소의 접근성 향상을 위한 구조적인 와해는 글루코오스와 XMG를 제외한 리그닌과 그 외 성분이 다량으로 빠져나갈수록 효소의 접근성이 용이할 것이라고 판단하였다. 따라서 해당 조건에서 유기용매를 이용한 전처리의 경우, 보다 많은 리그닌과 그 외 성분이 빠져나간 170~190 °C에서의 전처리를 수행한 바이오매스가 효소 당화율에서 더 높은 당화율을 보일 것으로 예상하고 효소당화를 진행하였다.

3-3. 전처리 바이오매스 성분분석

설정된 반응조건에서 전처리한 바이오매스를 이용하여 효소당화를 하였다. 효소당화 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 성분분석 결과에서 보았듯이 대부분의 육탄당과 오탄당이 일정수준 이상으로 유지됨을 보였고 전처리한 바이오매스의 효소접근성을 향상시키기 위한 구조적 팽윤은 리그닌과 그 외 성분의 손실에 따라 효소 당화율이 증가할 것으로 예상했다. 따라서 전처리되지 않은 바이오매스 중 제거된 리그닌과 그 외 성분의 양을 더해서 성분 제거율(component removal)을 정의하였다. 전처리 바이오매스의 성분분석 결과 130 °C에서의 제거된 성분의 양이 9.6%로 가장 적었고, 효소당화 결과를 보면 최대 당화율은 반응시간 120 분에서 43.2%로 가장 낮은 당화율을 보였다. 150 °C에서 전처리한 바이오매스의 경우 130 °C 보다 제거된 성분이 약간 많은 9.8%였으며, 최대 당화율은 반응시간 120 분에서 47.7%로

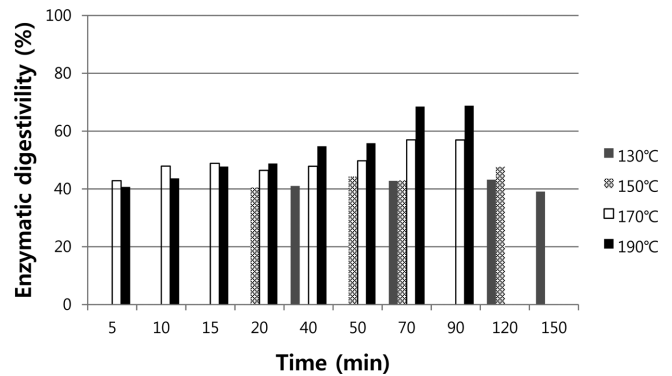


Fig. 6. Enzyme digestibility of pretreated cornstover.

나타났다. 170 °C의 경우 17.9%의 성분이 제거된 70 분 동안 전처리 하였을 경우가 56.9%로 보다 높은 당화율을 보였다. 190 °C에서는 26.3%의 성분이 제거된 90 분 동안 전처리 하였을 경우가 68.76%로 가장 높은 효소 당화율을 보였다. 제거된 성분의 양이 효소 당화율에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

3-4. 성분 제거율과 효소당화

효소당화를 통해 전처리 바이오매스의 성분 제거율이 최종 당화율에 영향을 미치는 것으로 판단하였다. 따라서 각 반응조건의 최대 효소 당화율과 그 때 성분 제거율을 나타내었다. 전처리 바이오매스의 성분분석에서 보았듯이 바이오매스의 구조적 팽윤 정도는 리그닌과 그 외 성분의 제거율이 좌우할 것이라고 판단하였고, 따라서 리그닌과 그 외 성분의 제거율을 통해 성분 제거율을 계산하였다. 성분제거율과 각 반응조건에서의 최대 효소 당화율은 Fig. 7에 나타내었다.

최대 효소 당화율을 통해 성분 제거율을 보았을 때 성분 제거율이 증가하면 효소 당화율 역시 증가하는 것으로 나타났다. 특히 본 실험에서는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 대부분 손실이 없고, 성분 제거율은 리그닌과 그 외 성분의 손실만 포함되며, 따라서 성분 제거율이 증가해도 전처리 바이오매스에 포함된 당의 총량은 변함이 없으며, 단지 전처리 바이오매스가 구조적으로 얼마나 열리게 되는지 간접적으로 나타낸 지표이다. 또한 성분 제거율이 높을수록 전처리 바이오매스의 구조적인 팽윤이 잘 되었고 바이오매스에 포함된 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 성분에는 거의 변화가 없기 때문에 효소당화에서 더 많은 당을 이용할 수 있고 따라서 높은 당화율을 얻은 것으로 판단된다.

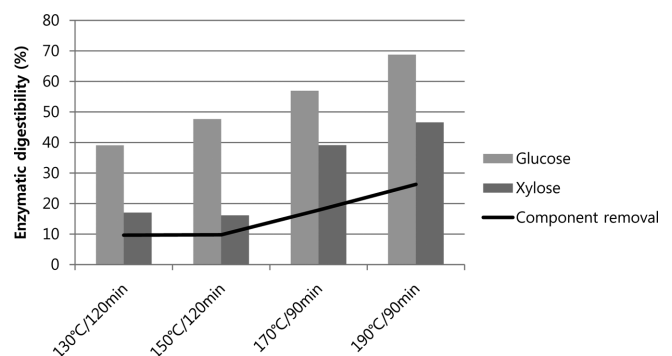


Fig. 7. Relation with Component removal and enzyme digestibility.

감 사

본 연구는 2016학년도 경기대학교 대학원 연구원장학생 장학금 지원에 의하여 수행되었음.

References

1. Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M. J., "Pretreatment Technologies for An Efficient Bioethanol Production Process Based on Enzymatic Hydrolysis: a Review," *Biore-source Technology*, **101**, 4851-4861(2010).
2. Park, J. H. and Kim, J. S., "Two-step Acid Hydrolysis Method for Producing Fermentable Sugar from Lignocellulosic Bio-mass," *Korean Chem. Eng. Res.*, **54**, 1-5(2016).
3. Kadam, K. L. and McMillan, J. D., "Availability of Corn Stover as a Sustainable Feedstock for Bioethanol Production," *Biore-source Technology*, **88**, 17-25(2003).
4. Oh, Y. H., Eom, I. Y., Joo, J. C., Yu, J. H., Song, B. K., Lee, S. H., Hong, S. H. and Park, S. J., "Recent Advances in Development of Biomass Pretreatment Technologies Used in Biorefinery for the Production of Bio-based Fuels, Chemicals and Polymers," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1945-1959(2015).
5. Kaar, W. E. and Holtzapple, M. T., "Using Lime Pretreatment to Facilitate the Enzymic Hydrolysis of Corn Stover," *Biomass and Bioenergy*, **18**, 189-199(2000).
6. Huijgen, W. J., Reith, J. H. and den Uil, H., "Pretreatment and Fractionation of Wheat Straw by An Acetone-based Organosolv Process," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49**, 10132-10140(2010).
7. Li, M. F., Yang, S. and Sun, R. C., "Recent Advances in Alcohol and Organic Acid Fractionation of Lignocellulosic Biomass," *Biore-source technology*, **200**, 971-980(2016).
8. El Hage, R., Brosse, N., Sannigrahi, P. and Ragauskas, A., "Effects of Process Severity on the Chemical Structure of Miscanthus Ethanol Organosolv Lignin," *Polymer Degradation and Stabil-ity*, **95**, 997-1003(2010).
9. Zhu, L., O'Dwyer, J. P., Chang, V. S., Granda, C. B. and Holtzapple, M. T., "Structural Features Affecting Biomass Enzymatic Digestibil-ity," *Biore-source Technology*, **99**, 3817-3828(2008).
10. Mooney, C. A., Mansfield, S. D., Touhy, M. G. and Saddler, J. N., "The Effect of Initial Pore Volume and Lignin Content on the Enzymatic Hydrolysis of Softwoods," *Biore-source Technology*, **64**, 113-119(1998).
11. Li, M. F., Yang, S. and Sun, R. C., "Recent advances in Alcohol and Organic Acid Fractionation of Lignocellulosic Biomass," *Biore-source Technology*, **200**, 971-980(2016).
12. Park, Y. C. and Kim, J. S., "Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Pretreated Rice Straw By Aqueous Ammonia for Bioethanol Production," *Korean Chem. Eng. Res.*, **49**, 470-474(2011).
13. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
14. Stewart, D., "Lignin as a Base Material for Materials Applica-tions: Chemistry, Application and Economics," *Industrial Crops and Products*, **27**, 202-207(2008).
15. Sun, Y. and Cheng, J., "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review," *Biore-source technology*, **83**, 1-11(2002).