

효소당화 효율 향상을 위한 섬유소계 바이오매스의 고농도 유기용매 전처리 공정

김준석*

경기대학교 화학공학과
16227 경기도 수원시 영통구 광교산로 154-42
(2020년 11월 20일 접수, 2020년 12월 25일 채택)

Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass by Organosolv Pretreatment Using High Concentration of Ethanol

Jun Seok Kim*

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, Gwanggyosan-ro, Suwon-Si, Gyeonggi-Do 16227, Korea
(Received 20 November 2020; Accepted 25 December 2020)

요 약

섬유소계 바이오매스는 전분질계 바이오매스에 비해 리그닌이 많아 전처리가 필수적으로 요구된다. 섬유소계 바이오매스를 전처리하기 위한 용매인 에탄올은 효소당화(enzymatic hydrolysis)에 저해가 되는 물질을 분별하기 쉬우며, 증류를 과정을 통해 쉽게 재사용이 가능하다. 침출식 전처리 공정은 반응기 내에서 연속적으로 성분을 분별하여 고-액 분리가 용이하며 향후 스케일업에서도 유리하다. 본 연구에서는 이러한 장점들을 활용하여 대표 섬유소계 바이오매스인 옥수수대(corn stover)로 전처리를 진행하였으며 해당 공정을 밀대(wheat straw)와 거대억새(miscanthus)에 적용하여 추가적인 바이오매스의 적용 가능성을 확인하였다.

Abstract – The pretreatment of cellulosic biomass is essentially needed because it has more lignin compared with a starch biomass. Ethanol as an organosolv for pretreatment can easily separate some components which can inhibit enzymatic hydrolysis and be re-usable by distillation. The flow-through process have some strength, separating components continuously, development for scale up. In this research, two-kinds (wheat straw, miscanthus) of biomass was pretreated for development of enzymatic hydrolysis by adoption of pretreatment process of corn stover.

Key words: Organosolv pretreatment, Percolation process, Cellulosic biomass

1. 서 론

바이오에탄올(bio ethanol)은 식물체로부터 유래되며 추가 시설에 대한 투자 없이 기존의 인프라로 생산할 수 있다는 점에서 큰 장점이 있고, 연소 시 상대적으로 저농도의 환경오염 물질의 배출하는 친환경 에너지다[1]. 이러한 바이오에탄올의 원료로서 목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 전세계적으로 풍부한 양과 재생 특성 등의 장점을 갖고 있어 화석연료와는 달리 고갈 우려가 낮은 원료로서 주목받고 있다.

바이오매스는 당질계, 전분질계, 초본계 그리고 목본계 바이오매스 등 여러 종류로 나뉜다. 특히 당질계 및 전분질계 바이오매스의

경우, 에너지 전환에 대한 연구가 활발히 이루어졌고 일부 국가에서는 연료로서 전환하여 상용화를 하는 수준까지 도달했다[2]. 하지만 비식용작물인 목질계 바이오매스(초본계 및 목본계 바이오매스)는 구조적인 특성으로 인해 다른 화학물질로의 전환이 상대적으로 어렵다. 이는 구성성분 함량의 차이가 원인인데, 대부분의 성분이 탄수화물인 당질계 및 전분질계 바이오매스와는 달리 목질계 바이오매스는 리그닌(lignin)을 다량 함유하고 있기 때문이다. 리그닌은 방향족 구조를 갖는 무정형(amorphous)의 물질로, 목질계 바이오매스의 약 30%를 차지하고, 셀룰로오스 다음으로 가장 풍부한 자연계 고분자 물질이다. 하지만 리그닌은 효소당화(enzymatic hydrolysis)에 직접 참여하지 않고 오히려 효소의 활성도를 저하시키기 때문에 바이오에탄올 생산공정에서는 리그닌의 제거가 필수적이며, 이 과정을 전처리(pretreatment)라고 한다[3].

전처리는 방법에 따라 물리적 전처리, 화학적 전처리 등으로 분류할 수 있다. 물리적 전처리는 분쇄와 같은 공정을 통해 바이오매스 자체의 크기를 줄이거나, 파쇄처럼 고압의 반응기에서 순간적인

*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.

로 압력을 낮춰 구조적으로 열리게끔 만드는 방법이다. 하지만 기존의 물리적 전처리만으로는 충분한 효과를 보지 못했기 때문에 화학적 전처리 방법과 함께 수행되는 전처리 방법이 개발되기도 했다 [4]. 한편 화학적 전처리 방법은 화학물질을 이용한 전처리 방법인데, 전처리에 쓰이는 화학물질의 특성을 이용하여 사용한다. 대표적인 방법으로는 pH 특성을 이용한 방법인데, 산(acid), 염기(alkaline) 그리고 중성의 에탄올 또는 물을 이용한 방법이 있다. 그 중에서도 산을 이용할 경우 농도에 따라 장비의 부식이나 목적물질의 과분해를 야기할 수 있기 때문에 약산 전처리법(dilute acid)으로 하는 연구가 많이 진행되었다[5]. 산, 염기를 활용한 전처리 방법은 섬유소의 구조를 효과적으로 넓혀 효소의 접근성을 증대하는 동시에 주용 성분을 분별(fractionation)하는 효과가 높으나, 높은 에너지가 필요하고 후단의 증화 공정이 필수적이다[6]. 그 외 전처리 방법 중에는 유기용매를 이용한 방법이 있다. 유기용매 전처리(organosolv pretreatment)는 헤미셀룰로오스의 회수율을 높이고 리그닌을 효과적으로 제거할 수 있다는 장점이 있으나 산, 염기 전처리에 비해 낮은 수율이 단점으로 지적되고 있다. 전처리 효율의 향상을 위해 산이나 염기 촉매를 첨가하기도 하며 대표적으로 아세트산, 메탄올, 에탄올, 에틸렌 글리콜을 사용한다. 특히 메탄올이나 에탄올과 같은 분자량이 낮은 용매의 경우 증류를 통해 쉽게 재사용할 수 있기 때문에 경제적으로 우수하다는 장점이 있다.

본 연구에서는 유기용매(organosolv)로 에탄올을 이용하여 침출식 반응(percolation)을 통해 전처리를 유도했다. 침출식 전처리는 기존의 회분식 공정의 단점으로 지적되었던 분별 성분의 재결합을 최소화할 수 있기 때문에 목적 물질의 회수율을 높일 수 있다는 장점이 있다. 이러한 장점을 활용하여 옥수수(corn stover)에 대해 전처리를 진행했으며, 해당 공정을 밀대(wheat straw)와 거대역새(miscanthus)에 적용하여 전처리 특성을 알아보고자 했다.

2. 재료 및 실험방법

2-1. 재료

본 연구에서 사용한 바이오매스는 섬유소계 바이오매스(cellulosic biomass)로서 옥수수대(corn stover), 밀대(wheat straw), 그리고 거대역새(miscanthus)를 CJ제일제당으로부터 제공받아 사용하였다. 해당 바이오매스 3 종의 성분분석결과를 Table 1에 나타내었다. 바이오매스는 50~100 mesh의 균일한 크기로 분쇄 후 45 °C 오븐에서 건조해 반응에 사용하였다. 해당 바이오매스의 전처리 및 특성 파악을 위한 비교군으로 α -cellulose (Sigma Aldrich Co., LLC)와 Whatman No.1 (HYUNDAI Micro Co., LTD)를 사용하였다.

Table 1. Component content of untreated biomass

	Corn stover	Wheat straw	Miscanthus
Glucan	34.2	38.2	43.2
XMG*	22.4	27.6	25.4
Arabinan	3.4	1.8	2.0
Lignin	13.3	18.3	19.3
Ash	11.7	6.5	3.3
Others	15.0	7.6	5.6

*XMG is xylan, mannan and galactan.

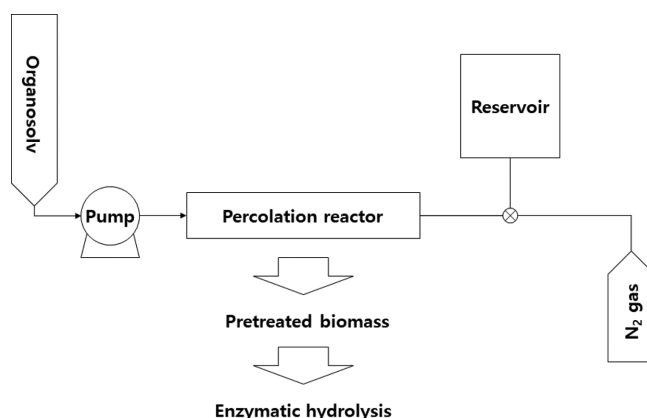


Fig. 1. Schematic diagram of biomass pretreatment process.

2-2. 전처리

회분식 전처리는 지름 2.5 cm, 높이 19.5 cm의 튜브형 회분식 반응기에서 진행되었으며, 더욱 원활한 고-액 반응을 유도하고자 반응 전 12 시간동안 반응기 내에서 침지 시켰다. 고온반응을 위해 기름 중탕(oil bath)을 이용했으며, 190 °C에서 설정한 반응시간에 따라 전처리를 수행하였다.

침출식 전처리 장치는 크게 용매 주입구, 용매 공급 펌프, 온도조절오븐, 반응기, 그리고 질소 분배로 이루어져 있다. 본 연구에서 사용한 침출식 전처리의 전체적인 구성도는 Fig. 1에 나타내었다. 침출식 반응기는 스테인리스 스틸(SS-316)로 제작되었으며 용매 공급 펌프는 51K40GN-CW (Oriental motor Co., LTD, Japan)를 사용하였다. 반응기에는 옥수수대가 가득 채워지도록 했으며 유기용매(organosolv)와의 고(옥수수대)-액(유기용매)비는 1 : 8 wt%으로 일정하게 유지했다. 유기용매(organosolv)로서 에탄올(Ethyl alcohol, 99.5%, CAS No. 64-17-5, SAMCHUN)을 이용하였고 30~99.5 wt% 농도 범위에서 전처리 특성을 알아보았으며, 모든 전처리는 촉매의 첨가 없이 진행되었다. 온도 조절에 사용된 오븐은 가스스크로마토그래피 오븐인 M600D (Young Lin Co., LTD)를 일부 개조하여 사용하였고, 일정한 반응온도를 나타내도록 유지시켰다. 끓는점이 낮은 에탄올을 사용하였기에 기화를 방지하고자 질소 가스를 연결하여 400~600 psig의 후압을 유지함으로써 원활한 고-액 반응이 일어나도록 하였다. 전처리는 170~190 °C의 온도 범위 내에서 20~60 min 동안 진행되었다.

각 전처리 후 획득한 바이오매스에 대해서는 48시간 동안 45 °C 오븐에서 건조한 뒤 당(sugar)과 리그닌에 대한 성분분석을 진행하였으며 효소당화를 통해 전처리 효과를 평가하였다.

2-3. 성분분석

전처리를 수행한 바이오매스의 당과 리그닌에 대한 성분분석은 미국신재생에너지연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory)에서 제시한 NREL Procedures LAP-002와 LAP-003에 제시된 방법으로 진행하였다[7,8]. 전처리가 수행된 바이오매스와 효소당화액은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography; Waters Co., USA)로 분석하였고, 이 때 5.0 mM의 황산용액을 이동상으로 하여 0.6 ml/min의 유속으로 운전하였다. 검출기는 Waters 410 RI Detector (Refractive Index)를 사용하였고 검출기의 온도는 50 °C로 설정하였다. HPLC에 사용된 컬럼은 Bio-lad사의 Aminex

HPX-87H Column을 사용하였고 컬럼의 온도는 60 °C로 설정하여 분석했다.

2-4. 효소당화

각 조건으로 전처리 된 바이오매스의 효소당화율을 알아보기 위하여 전처리를 거친 바이오매스와 비교군으로 사용된 α -cellulose 및 Whatman No.1, 그리고 전처리를 수행하지 않은 바이오매스를 이용하여 250 ml 삼각플라스크(Erlenmeyer flask)에서 효소당화를 수행하였다. 각 기질은 sodium citrate buffer solution (0.5 M, pH 4.8)에 기질농도 2 wt%로 혼합하고 Cellic C-tec2를 60 FPU/ml의 활성화도로 접종한 후 50 °C의 진탕배양기(shaking incubator) 내에서 150 rpm의 혼합속도로 72시간동안 효소당화를 수행하였다. 이후 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 HPLC로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 회분식 전처리

기존의 연구에서 고온의 조건으로 전처리를 진행했을 경우 탈리 그닌효과와 더불어 당 분별능력이 향상되었다는 보고가 있다[9]. 그렇기 때문에 회분식 전처리 공정을 통해 190 °C에서 반응시간에 따른 바이오매스의 성분함량 변화를 알아보고자 했다. Fig. 2는 회분식 반응을 거친 바이오매스들의 성분분석 변화를 나타낸 그래프이다.

옥수수대의 회분식 전처리 결과, 반응시간이 증가함에 따라 구성 성분들의 함량이 줄어드는 것을 관찰 할 수 있다. 하지만 글루칸(glucan)의 경우 다른 성분들에 비해 반응시간 증가에 따라 함량의 감소폭이 낮게 나타났다. 이와 달리 고체 잔류량(solid remaining)의 수치가 최종 48.4%로 낮아진 것으로 보아, 효소당화 직접적으로 참여하지 않거나 저해되는 물질인 리그닌과 기타성분을 선택적으로 분별했다고 판단된다. 일반적으로 물은 고온에서 자가 가수분해(autohydrolysis)를 일으킨다[10]. 때문에 반응시간의 증가에 따라 성분들의 분별이 원활히 이루어졌으며, 이것이 효소당화에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

옥수수대의 공정의 운전조건을 밀대와 거대억새에 대해 적용해 보았고, 그 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다. 밀대와 거대억새는

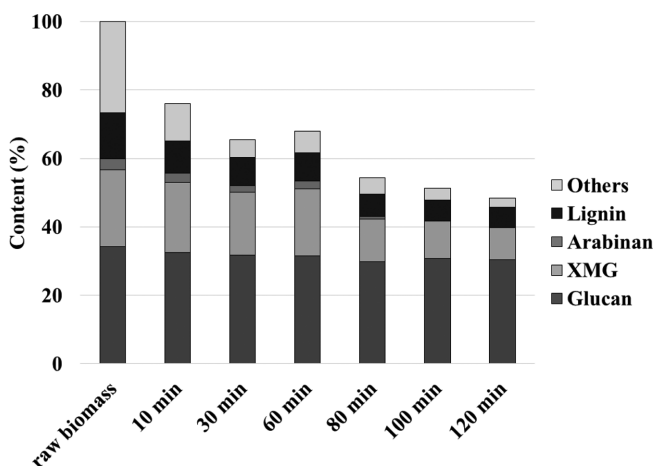


Fig. 2. Component content changes of pretreated corn stover using 60 wt% of ethanol at 190 °C in batch process.

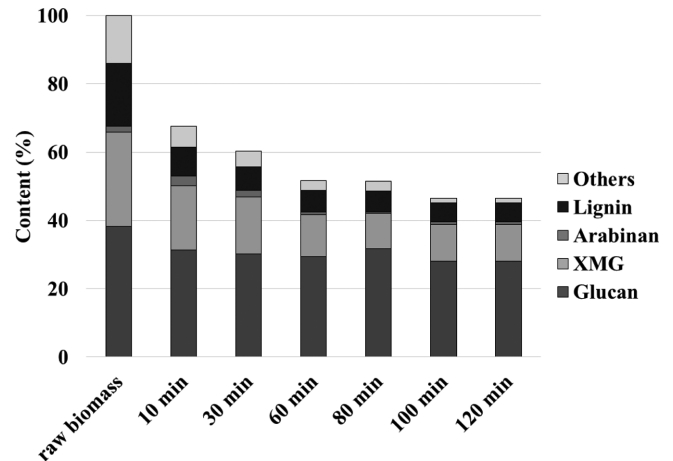


Fig. 3. Component content changes of pretreated wheat straw using 60 wt% of ethanol at 190 °C in batch process.

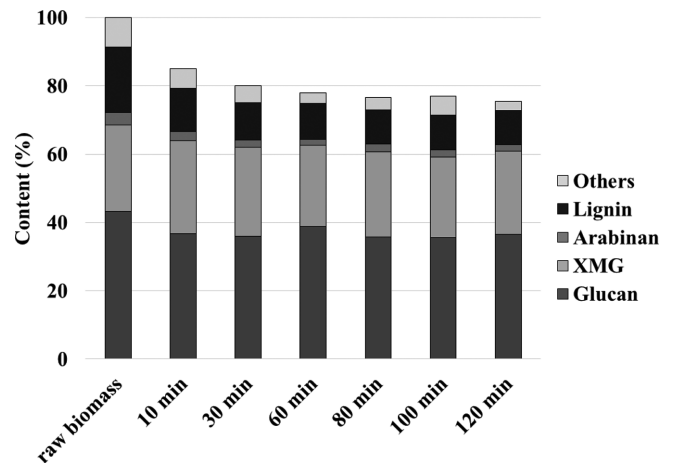


Fig. 4. Component content changes of pretreated miscanthus using 60 wt% of ethanol at 190 °C in batch process.

각각 회분식 반응기에서 190 °C의 반응온도로 60 wt% 에탄올 용액에 의해 회분식 전처리 되었다. 밀대의 경우 글루칸의 함량 감소에 비해 다른 성분들의 함량 감소가 커져 고체 잔류량이 줄어들었으며, 대부분 옥수수대와 비슷한 거동을 보인다. 한편 거대억새의 경우 120 min 동안 전처리를 하더라도 고체 잔류량은 75.4%로, 옥수수대와 밀대에 비해 높은 수치로 나타났다. 일단 반응이 시작되면, 반응시간이 증가하더라도 글루칸의 함량은 변화가 미미했으며, 다른 성분들의 함량 변화는 옥수수대와 비슷한 경향으로 나타났다. 전처리 되지 않은 바이오매스 3 종의 성분함량을 보면 거대억새의 글루칸 함량이 43.2%로 가장 높는데, 효소당화 시 더 많은 당 생산을 할 수 있다는 것을 의미한다. 회분식 전처리를 하더라도 글루칸의 함량 변화가 적은 것으로 보아, 짧은 시간의 전처리를 하더라도 안정적으로 당을 공급할 수 있을 것으로 보여진다.

3-2. 침출식 전처리

효소당화율이 증가하기 위해서는 효소와 결합하여 당화를 저해하는 물질을 제거해야 한다. 하지만 회분식 전처리의 경우 반응이 종료되는 시점까지 분별된 성분과 잔류 고형분이 접촉하기 때문에 재결합하는 경우가 발생하여 효소당화를 여전히 저해할 수 있는 요

Table 2. Component content changes of pretreated corn stover at 190 °C by percolation process.

Ethanol (wt%)	Time (min)	S/R*	Glucan	XMG**	Arabinan	Lignin	Etc.
Raw corn stover		-	34.2	22.4	3.4	13.3	26.7
60	20	56.5	30.1	15.3	0.6	5.0	5.4
	40	49.5	29.5	11.6	0.3	3.5	4.6
	60	41.8	27.9	8.2	0.5	2.3	2.9
30	20	37.1	26.5	5.1	0.5	3.6	1.3
	40	34.2	27.2	3.6	0.2	2.3	0.9
	60	33.0	27.1	3.3	0.1	2.1	0.3

*S/R is solid remaining and which is the amount of biomass after pretreatment.

**XMG is xylan, mannan and galactan.

소가 존재한다. 이를 탈피하기 위해 침출식 전처리를 통해 기존의 회분식 공정의 단점을 보완하고자 한다.

침출식 전처리는 회분식 공정과 같은 온도 조건인 190 °C로 설정했으며, 20~60 min 동안 진행되었다. 한편 에탄올 용액의 농도는 30~60 wt%로 설정했고, 고온 조건에서의 유기용매(organosolv)에 의한 자가가수분해(autohydrolysis) 효과를 높이하고자 했다.

Table 2는 침출식 공정을 통해 옥수수를 전처리 한 후 성분변화를 나타낸 결과이다. 옥수수대의 침출식 전처리 결과, 반응시간 부여 정도에 따라 고체 잔류량이 줄어드는데, 이는 XMG (Xylose, Mannose, Galactose)와 리그닌, 그리고 기타성분이 큰 폭으로 감소되었기 때문이다. 특히 30 wt% 에탄올 용액을 사용했을 경우 전처리를 하지 않은 바이오매스에 비해 구성 성분의 함유량이 현저히 감소한 것을 볼 수 있는데, 더 많은 수분을 함유한 에탄올 용액에서 자가가수분해가 더 활발히 진행되었기 때문에 나타난 결과라고 판단된다. 본 실험에서 주요 목적 물질은 글루칸인데 반해, 효소당화를 저해하거나 직접적으로 참여하지 않는 성분을 제거하는 것으로 보아 효소당화율이 큰 폭으로 증가될 수 있을 것으로 보인다.

Table 3과 Table 4는 밀대와 거대억새의 침출식 전처리를 진행한

뒤 성분분석 변화를 나타낸 결과이다. 특히 2가지 바이오매스 모두 XMG와 리그닌의 제거가 활발히 이루어져 초기 바이오매스에 비해 그 양이 현저히 감소된 것을 볼 수 있는데, 효소당화 과정에 영향을 미칠 수 있는 요소의 제거가 효소당화 효율의 향상 도울 수 있을 것으로 판단된다. 한편 글루칸의 경우 두 바이오매스(밀대, 거대억새)에서 큰 변화가 없었다. 이는 에탄올의 전처리 용매로서의 대표적인 특징으로, 효소당화의 주 원료가 되는 글루칸을 최대한 확보하면서 그 외 성분의 제거를 통해 효소당화율을 높일 수 있는 용매로서 적합하다는 것을 의미한다.

3-3. 바이오매스의 효소당화

전처리 공정의 효율 평가를 위해 효소당화를 진행하였다. 효소당화는 전처리된 바이오매스를 건조하여 사용하였으며 반응은 72시간 동안 진행하였다. 옥수수대와 밀대, 그리고 거대억새의 효소당화율을 Table 5에 나타내었다.

모든 전처리 바이오매스에서 효소당화율이 큰 폭으로 증가한 것을 볼 수 있었다. 그 중에서 30 wt% 에탄올을 이용해 60 min 동안 전처리를 진행한 밀대에서 최고 당화율이 나타났다. 전처리를 하지

Table 3. Component content changes of pretreated wheat straw at 190 °C by percolation process

Ethanol (wt%)	Time (min)	S/R*	Glucan	XMG**	Arabinan	Lignin	Etc.
Raw wheat straw		-	38.2	27.6	1.8	18.3	14.1
60	20	70.2	34.7	20.8	0.6	8.0	6.1
	40	64.9	33.5	17.6	0.5	6.5	6.8
	60	58.8	34.3	16.8	0.4	4.9	2.4
30	20	49.7	35.0	7.7	0.5	4.8	1.7
	40	43.6	31.9	4.7	0.0	3.5	3.4
	60	42.0	31.8	4.2	0.0	2.8	3.2

*S/R is solid remaining and which is the amount of biomass after pretreatment.

**XMG is xylan, mannan and galactan.

Table 4. Component content changes of pretreated miscanthus at 190 °C by percolation process

Ethanol (wt%)	Time (min)	S/R*	Glucan	XMG**	Arabinan	Lignin	Etc.
Raw miscanthus		-	43.2	25.4	2.0	19.3	8.6
60	20	80.5	43.4	20.1	0.4	10.3	6.2
	40	74.8	42.9	16.6	0.2	9.0	6.1
	60	68.2	44.0	15.6	0.6	7.3	0.7
30	20	56.4	41.5	6.4	0.0	4.6	3.9
	40	50.5	40.8	4.6	0.0	3.1	2.0
	60	51.0	41.9	4.2	0.0	3.1	1.8

*S/R is solid remaining and which is the amount of biomass after pretreatment.

**XMG is xylan, mannan and galactan.

Table 5. Glucose conversion by enzymatic hydrolysis of biomass pretreated at 190 °C using percolation process

Ethanol (wt%)	Pretreatment time (min)	Enzymatic hydrolysis (%)		
		Corn stover	Wheat straw	Miscanthus
60	20	67.1	60.9	28.3
	40	77.2	72.4	39.8
	60	87.0	84.6	48.4
30	20	89.0	87.6	70.2
	40	91.9	96.1	77.2
	60	94.3	98.2	83.5
Raw biomass		39.9	23.7	13.1

않은 밀대에서는 23.7%의 효소당화율을 보였는데, 전처리를 통해 98.2% 높은 당화율을 나타내는 것으로 보아 전처리를 통해 효소당화에 저해되는 요소를 제거하여 그 공간으로 효소가 침투하여 높은 활성도를 보였기 때문이라고 판단된다[11].

한편 전처리를 하지 않은 3종의 바이오매스 중 가장 낮은 당화율은 거대역새에서 나타났다. 하지만 옥수수대와 밀대에서 적용했던 공정으로 전처리를 한 결과, 30 wt% 에탄올로 60 min 동안 반응시켰을 때 83.5%의 당화율을 나타냈다. 전처리를 하지 않은 거대역새에서 나타났던 낮은 당화율은 거대역새의 생장과 관련있다고 판단된다. 거대역새는 일반적으로 약 3~4 m의 큰 생장크기를 갖고 있어 섬유소계 바이오매스와 목본계 바이오매스의 중간적 특성을 지니고 있다고 할 수 있다. 구성성분 사이의 견고한 결합이 생장크기가 큰 생물에 대해 높은 내구성을 지닐 수 있게 해줄 수 있다. 이러한 특성에 따라 목본계 바이오매스는 상대적으로 높은 리그닌 함유율을 갖고 있게 된다[12]. 하지만 일반적인 목본계 바이오매스와는 달리 거대역새는 다소 낮은 리그닌을 함유하고 있다. 본 연구의 바이오매스 성분분석 결과, 19.3%의 리그닌 함유율을 나타냈는데, 밀대 또한 18.3%로 비슷한 수치를 나타낸다. 밀대는 생장크기가 약 1 m인 생물로, 거대역새에 비해 현저히 낮은 생장크기를 가진다. 이러한 특성을 미루어보았을 때, 거대역새의 생장 크기에는 리그닌 함량보다 성분들 사이의 결합력과 더욱 연관이 있을 것으로 판단된다. 그렇기 때문에 거대역새에 대해서는 탈리그닌(delignification)뿐만 아니라, 구성성분 사이의 결합력을 효과적으로 낮출 수 있는 공정이 필요할 것이다.

4. 결 론

3종의 바이오매스(옥수수대, 밀대, 거대역새)의 회분식 전처리 및 침출식 전처리를 통해 효소당화율을 높이기 위해 다양한 방법으로 접근했다. 특히 화학적 특성 및 공정비용의 절감, 그리고 공정 효율을 높이기 위한 방법으로 유기용매(에탄올)를 사용했다. 실험에 사용된 바이오매스에 대해서 글루칸의 회수율을 높이고 효소당화에 저해될 수 있는 물질을 효과적으로 제거하는 것으로 보아, 일부 섬유소계 바이오매스에 대해 용기용매로서 에탄올의 효과는 뛰어났다. 침출식 전처리는 회분식 전처리에 비해 효율적으로 성분들을 분리해낼 수 있었으며, 이를 통해 분별된 성분들의 재결합을 방지할 수 있었다.

효소당화에는 다양한 요소가 영향을 미치지만, 기본적으로 효소당화에 저해되는 물질을 제거하는 것이 우선이며, 이를 통해 기질에 대한 효소의 접근성을 높여 효소 당화율을 향상시킬 수 있었다.

다만, 일부 바이오매스의 경우 리그닌 함유율보다는 다른 요인이 효소당화에 작용할 수 있기 때문에 이런 현상을 완화시킬 수 있는 전처리 공정 또는 촉매가 필요할 것이다.

감 사

본 논문은 2017학년도 경기대학교 연구년 수혜(2017-025-001)로 연구되었습니다.

References

1. Park, J. K., Mun, H. S., Park, M. J., Jang, H. W. and Jeong, D. W., "Bioethanol Production Using Microalgae," *J. Korean Soc of Environ Eng.*, **42**(3), 164-176(2020).
2. Wilkie, A. C., Riedesel, K. J. and Owens, J. M., "Stillage Characterization and Anaerobic Treatment of Ethanol Stillage from Conventional and Cellulosic Feedstocks," *Biomass Bioenergy*, **19**(2), 63-102(2000).
3. Yang, Q. and Pan, X., "Correlation Between Lignin Physicochemical Properties and Inhibition to Enzymatic Hydrolysis of Cellulose," *Biotechnol Bioeng.*, **113**(6), 1213-1224(2016).
4. Ballesteros, I., Oliva, J. M., Negro, M. J., Manzanares, P. and Ballesteros, M., "Enzymic Hydrolysis of Steam Exploded Herbaceous Agricultural Waste (*Brassica carinata*) at Different Particle Sizes," *Process Biochem.*, **38**(2), 187-192(2002).
5. Bhagia, S., Li, H., Gao, X., Kumar, R. and Wyman, C. E., "Flowthrough Pretreatment with Very Dilute Acid Provides Insights into High Lignin Contribution to Biomass Recalcitrance," *Biotechnol Biofuels*, **9**(1), 245(2016).
6. Badiei, M., Asim, N., Jahim, J. M. and Sopian K. S., "Comparison of Chemical Pretreatment Methods for Cellulosic Biomass," *APCBEE Procedia*, **9**, 170-174(2014).
7. Raymond, R. and Ehrman, T., "Determination of Carbohydrates in Biomass by High Performance Liquid Chromatography," Laboratory Analytical Procedure No. 002, National Renewable Research Laboratory, Golden(1996).
8. Templeton, D. and Ehrman, T., "Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass," Laboratory Analytical Procedure No. 003, National Renewable Research Laboratory, Golden(1995).
9. Moniz, P., Lino, J., Duarte, L. C., Roseiro, L. B., Boeriu, C. G., Pereira, H. and Carvalho, F., "Fractionation of Hemicelluloses and Lignin from Rice Straw by Combining Autohydrolysis and Optimised Mild Organosolv Delignification," *BioResources*, **10**,

- 2626-2641(2015).
10. Wayman, M. and Chua, M. G. S., "Characterization of Autohydrolysis Aspen (*P. tremuloides*) Lignins. Part 1. Composition and Molecular Weight Distribution of Extracted Autohydrolysis Lignin," *Can. J. Chem.*, **57**(10), 1141-1149(1979).
11. Park, Y. C. and Kim, J. S., "Pretreatment of *Helianthus Tuberosus* Residue by Two-Stage Flow Through Process," *Korean Chem. Eng. Res.*, **53**(4), 417-424(2015).
12. Lee, Y. N., Lee, S. B. and Lee, J. D., "Characteristics of Lignin Removal in Cellulosic Ethanol Production Process," *Appl. Chem. Eng.*, **22**(1), 77-80(2011).