

목질계 바이오매스에 대한 암모니아 재순환 침출공정 최적화

오경근[†] · 홍석인* · Yoon Y. Lee**

단국대학교 공업화학과

*고려대학교 화학공학과

**Auburn University, Dept. of Chemical Engineering

(1998년 5월 4일 접수, 1998년 8월 7일 채택)

Optimization of Ammonia Recycled Percolation Process for Lignocellulosic Biomass Pretreatment

Kyeong Keun Oh[†], Suk In Hong* and Yoon Y. Lee**

Department of Chemical Technology, Dankook University, Cheonan 330-180, Korea

*Department of Chemical Engineering, Korea University, Seoul 136-701, Korea

**Department of Chemical Engineering, Auburn University, Auburn, AL 36830, U.S.A.

(Received 4 May 1998; accepted 7 August 1998)

요 약

목질계 바이오매스의 주요 구성성분인 섬유소와 헤미셀룰로오스, 그리고 리그닌을 효과적으로 분리할 수 있는 전처리 공정으로 암모니아 재순환 침출 공정(ARP; Ammonia Recycled Percolation)이 개발되었다. 본 연구에서는 ARP 공정에 대한 초기 연구로 ARP 공정의 타당성과 공정의 최적조건을 확립하여 전체 ARP 공정의 효율성에 대하여 조사하였다. ARP 공정에 크게 영향을 미칠 수 있는 주요 변수로 암모니아 농도, 반응 온도, 그리고 용매의 흐름속도를 선정하였다. 공정의 최적화 방법으로 위의 세 가지 변수들에 대하여 반응표면 분석법을 이용하였다. 바이오매스의 분해에 의한 무게 손실을 최소화하고, 리그닌의 함량을 감소시키고, 섬유소의 함량과 효소의 가수분해도를 최대화할 수 있는 ARP 공정의 최적 조건으로 암모니아 농도; 17.5 %, 반응온도; 185 °C, 그리고 용매 흐름속도; 1.5 ml/min으로 결정되었으며, 이 조건에서 ARP 공정 수행 결과 섬유소 함량; 72.33 %, 리그닌함량; 11.16 %, 그리고 효소의 가수분해도; 92.13 %의 만족할 만한 결과를 얻어, ARP 공정이 매우 효과적인 전처리 방법이라고 결론지을 수 있었다.

Abstract—ARP(Ammonia Recycled Percolation) process was developed as the effective treatment process for removing the lignin from cellulose and hemicellulose of lignocellulosic biomass. In this article, as the basic study of ARP, the properties and the optimum conditions of process were established, and then the overall efficiency of ARP was investigated. The important independent variables for ARP process were selected as ammonia concentration, percolation temperature, and flow rate of solvent. The percolation condition for maximizing the content of cellulose, the enzymatic digestibility, the remaining percent weight, and the lignin removal was optimized using the RSM(Response Surface Methodology). The determined optimum condition is ammonia concentration; 17.5 %, percolation temperature; 185 °C, and flow rate of solvent; 1.5 ml/min. The satisfying results were obtained under this optimized condition, that is, the results are as follows: cellulose content; 72.33 %, lignin content; 11.16 %, and enzymatic digestibility; 92.13 %.

Key words: Pretreatment, Percolation, ARP, RSM, Biomass

1. 서 론

목질계 바이오매스를 이용하여 화학물질 또는 연료용 에탄올을 생산하는 공정에서 바이오매스의 전처리 공정은 필수 불가결한 주요 공정으로 고려되고 있다. 전처리 공정의 주목적은 바이오매스의 구조를 변경함으로써, 효소로 하여금 흡착이 용이하게 하여 가수분해

효율을 증진시키는데 있다. 목질계 바이오매스는 90 % 이상이 섬유소, 헤미셀룰로오스, 그리고 리그닌으로 구성되어 있다. 이상적인 전처리 공정은 이러한 바이오매스를 그것의 주요 요소인 섬유소와 헤미셀룰로오스, 그리고 리그닌으로 수율높게 분리하는 것이다. 지금까지 목질계 바이오매스의 전처리 방법으로 증기 폭쇄법[1,2], 알칼리 처리법[3], 이산화황 처리법[4,5], Organosolv 처리법[6], 과산화수소 처리법[7], 초임계 암모니아 처리법[8], 약산처리법[9-13], 그리고 암모니아 동결 폭쇄법(AFEX)[14] 등 수많은 방법들이 연구되어 왔

[†]E-mail: kkoh@anseo.dankook.ac.kr

다. 이들 공정 외에 암모니아 재순환 침출공정(ARP; Ammonia Recycled Percolation)[15]이 개발되었다.

암모니아는 목질계 바이오매스의 전처리에 적당한 여러 가지 특징들을 가지고 있다. 암모니아는 탈리그닌 용매이며[16, 17], 그 외에도 바이오매스의 구조를 변경시키는 기능이 있다. 즉, 리그닌과 헤미셀룰로오스의 결합을 끊어주는 동시에 거대 리그닌 분자의 C-C, C-O 결합을 끊어주고 헤미셀룰로오스의 uronic acid ester group의 가암모니아 가수분해(ammonolysis)를 야기시킨다[18].

ARP 처리된 바이오매스는 α -cellulose 보다 가수분해 속도 및 가수분해 허용범위에서 높은 값을 얻을 수 있다. 또한 ARP 공정을 통해서 황이 포함되어 있지 않은 순수한 리그닌을 얻을 수 있고, 휘발성 암모니아는 회수되어 재사용되기 때문에 환경문제를 줄이거나 운전비를 감소시키는 등 공정의 경제성을 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 또한 ARP 공정에서는 바이오매스 중의 헤미셀룰로오스가 반 이상 리그닌과 함께 용해된다. 따라서 ARP 공정은 유효 효소의 손실을 감소시키며, 가수분해 반응 속도를 증가시킬 수 있다. ARP 공정에서 암모니아수는 전처리 용제로써 침출반응기에 주입되어 반응기내의 바이오매스로부터 리그닌과 헤미셀룰로오스를 용해시켜 반응기로부터 유출되어 나온 다음 증기화를 거쳐 연속적으로 재사용될 수 있다. 섬유소가 수분해 공정에서 ARP 공정의 효율성을 정리해보면 다음과 같다. 우선, 전처리된 바이오매스의 리그닌함량이 줄어들고 상대적으로 섬유소의 함량이 증가되어 효소의 손실을 줄이고 결과적으로 가수분해 속도를 증가시킬 수 있다. 두 번째로, 암모니아 전처리를 비롯해 대부분의 알칼리 처리의 경우 탄수화물의 손실이 적다는 것이다. 세 번째로는 ARP 공정을 통해 생산되는 리그닌은 일반적인 제지 공정에서 생산되는 리그닌과는 달리 황을 함유하고 있지 않기 때문에 순수한 리그닌을 얻을 수 있고, 이 리그닌은 용도개발을 통해 다른 화학물질로 쓰일 수 있어 전체 바이오매스 전환 공정의 경제성을 증가시킬 수 있다. 또한, ARP 공정에서는 암모니아의 휘발성이 높아 고압력의 반응이 요구되지만 온도가 140-180 °C인 ARP 공정에서의 요구되는 압력은 20 kg/cm³이나 290 psi 정도의 허용 가능한 압력범위를 요구한다. 이 온도의 범위에서 암모니아는 황산에 비해 부식성이 적어 공정설계나 공정의 조작에 있어 중요한 장점을 가지고 있다.

본 연구의 목적은 한국산 참나무에 대한 전처리 공정으로써 ARP 공정을 적용하고, 선정된 바이오매스에 대하여 ARP 공정 조건을 최적화시키는 것이다. ARP 공정에 대한 초기 연구로 전처리로서의 ARP 공정 타당성과 공정의 최적조건을 확립하여 전체 ARP 공정의 효율성을 조사하였다. 전처리된 바이오매스에 대하여 효소의 가수분해도 실험이 수행되었으며, 개선된 ARP 공정에서 처리된 바이오매스는 동시당화발효 공정을 통해 그 효율성이 조사되었다.

2. 실험 재료 및 방법

2-1. 재료

목질계 바이오매스는 한국에너지기술연구소(KIER; Korea Institute of Energy Research)로부터 공급받았다. 목질계 바이오매스는 밀링머신에 의하여 분쇄된 다음 12 mesh와 100 mesh의 스크린을 이용하여 분리하여 보관하였다. 사용된 효소는 Spezyme, Lot No, 41-95034-004로 Environmental Biotechnologies, Inc.(Menlo Park, CA)로부터 공급받았다. 평균 비활성도는 Filter paper activity가 64.5 FPU/ml, β -glucosidase activity는 57.6 p-NPG/ml로 공급회사에서 제시하였다. α -Cellulose는 Sigma사로부터 구입하였으며, 효소의 가수분해도(enzymatic digestibility) 비교시험에 이용되었다.

2-2. 실험장치

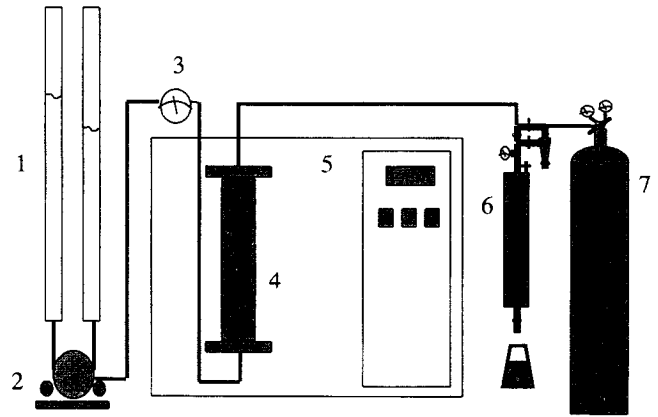


Fig. 1. Schematic diagram of experimental setup of percolation process.

- | | |
|------------------------|----------------------------------|
| 1. Liquid reservoirs | 5. Temperature programmable oven |
| 2. Dual pump | 6. Liquid holding tank |
| 3. Pressure gauge | 7. Nitrogen cylinder |
| 4. Percolation reactor | |

ARP 전처리 공정에 대한 실험장치를 Fig. 1에 나타내었다. 실험장치는 액체 저장고(de-ionized water and dilute acid solution), 펌프, 온도조절 오븐, 침출반응기(packed-bed flow-through reactor), 그리고 유출 액체의 저장고로 구성되어 있다. 침출반응기는 외경이 5/8 인치, 길이가 6인치인 관으로 제작되었으며, 반응기 부피는 33 cm³이다. 600 ml의 가압반응기(Parr Instrument)가 유출 액체 저장고로 이용되었으며, 질소 분배와 연결하여 반응기의 후압(back pressure)을 조절하고, 고온에서의 액체의 증기화를 방지하였다. Positive displacement pump(Metering Micro Pump, LDC)를 이용하여 암모니아수 또는 증류수를 반응기에 주입하였다.

침출반응은 농도가 결정된 암모니아수를 예열관을 통하여 반응기에 주입하여 바이오매스의 헤미셀룰로오스를 용해시키고, 용해된 헤미셀룰로오스와 암모니아수는 유출 액체 저장고에 수집되었다. 용액의 흐름속도는 펌프 미터와 압력 게이지에 의해 조절되었다. 반응이 끝난 후에는 증류수가 반응기내에 공급되어 바이오매스에 남아있는 당의 잔해물과 암모니아수를 제거하였다. 또한 질소 가스를 반응기에 불어주어 반응기내에 존재하는 수분도 제거하였다.

2-3. 가수분해도 결정

전처리된 기질의 효소에 의한 가수분해도가 50 °C, pH 4.8(0.05 M sodium citrate buffer)에서 측정되었다. 이때 기질의 섬유소량은 1 %를 기준으로 하였으며, 효소 첨가량은 60 IFPU/g-cellulose이었다. 일정 시간별로 시료를 채취하여 포도당 측정기를 이용하여 포도당을 분석하였다.

가수분해도는 다음과 같이 정의된다.

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

72시간 안에 최대 포도당 수율을 얻을 수 있으며, 그 수율은 결국 가수분해도를 계산하는데 이용된다. Tetracycline(10 mg/mL in 70 % ethanol)과 cyclohexamide(10 mg/mL water)가 가수분해 동안 미생물의 성장을 방지하기 위해 첨가되었다[19, 20].

2-4. 분석방법

바이오매스는 미국 신재생에너지연구소(NREL)로부터 제공된 Chem-

ical Analysis & Testing Standard Procedures에 따라 당[21] 및 리그닌(Klason lignin)[22] 등에 대하여 분석되었다.

가수분해물에 포함되어 있는 대부분의 헤미셀룰로오스는 올리고 형태로 존재하기 때문에 단량체로 분해하기 위해 4% 황산용액으로 121 °C에서 1시간 동안 2차 가수분해 반응이 수행되었다. 여러 당, 산, 그리고 여러 가지 분해물들이 Aminex HPX-87H 칼럼(Bio-Rad Co.)이 장착된 HPLC에 의해 분석되었다. 자일란(xylan), 만난(mannan), 아라비난(arabinan), 그리고 갈락탄(galactan)은 헤미셀룰로오스의 분해물로 본 실험에서 나타났다. 가수분해도 측정에서 포도당의 농도는 포도당 측정기(YSI 2300 Stat Plus, Yellow Springs, OH)에 의해 분석되었다.

2-5. 동시당발효 공정

전처리된 바이오매스는 NREL-CAT Standard Procedure-#008[23]에 근거한 동시당화 발효 공정에 의해 에탄올로 전환된다. 동시당화 발효 공정은 250 ml 플라스크에서 2%의 섬유소를 첨가하여, 반응온도 38 °C, 교반속도 150 rpm으로 수행되었다. 본 실험에서 사용한 발효균주로는 *Saccharomyces cerevisiae* D₅A로 YPD 배지를 이용하여 38 °C, 150 rpm에서 8-12시간 동안 활성화시킨 다음 동시당화발효를 수행하였으며, 이때 효소는 25 IFPU/g-glucan을 첨가하였다. 첨가된 효소의 β -glucosidase의 활성도는 약 26.7 pNPG이었다. 동시당화 발효가 진행 중인 동안 일정 시간별로 시료를 채취하여 시간에 따른 에탄올 농도의 변화를 구하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. ARP 공정에서의 반응온도의 영향

10%(wt/wt)의 암모니아수를 2 ml/min의 흐름속도로 ARP 반응기에 주입하면서 ARP 공정에 대한 온도의 영향을 비교하여 보았다. 반응온도를 149 °C에서 191 °C까지 변화시켜 가면서 1시간 동안 침출 공정을 수행한 다음, 반응기 내부에 남아있는 처리된 바이오매스의 무게손실(% weight remaining의 역)을 조사하고, 남아있는 바이오매스에 대하여 섬유소 농도 및 리그닌 농도에 대하여 조사하였다. Fig. 2에서 보여지는 것처럼 반응온도가 증가함에 따라 바이오매스

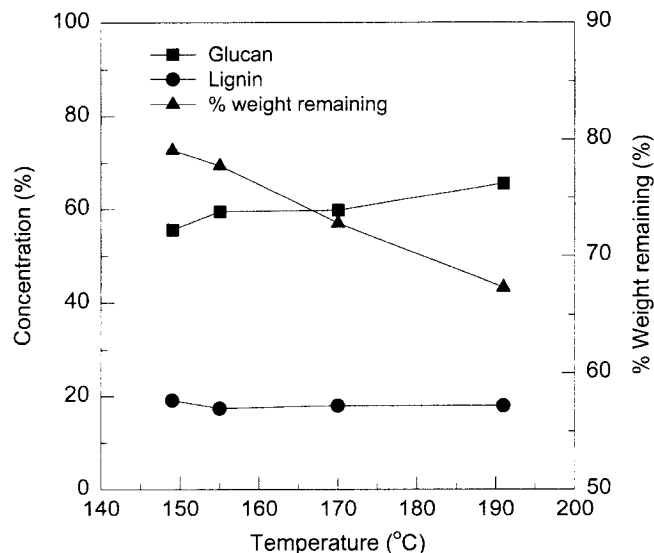


Fig. 2. The effect of temperature of ARP process on the composition of solid residue and % weight remaining. ARP conditions; flow rate: 2 ml/min, ammonia concentration: 10 % (wt/wt).

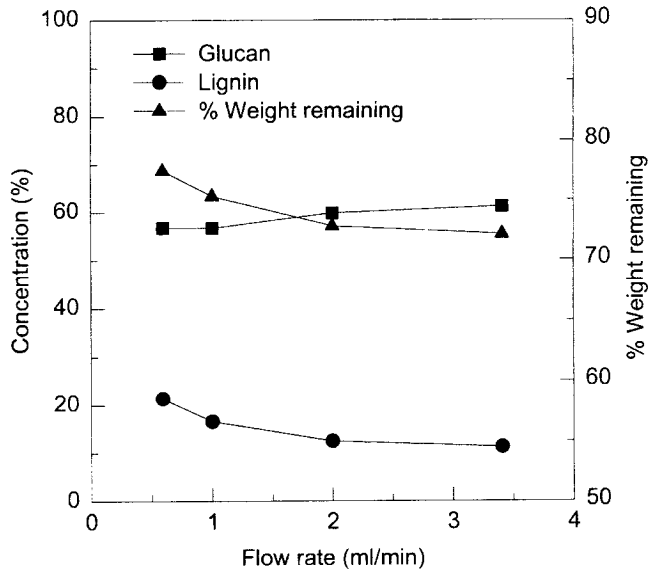


Fig. 3. The effect of flow rate of ARP process on the composition of solid residue and % weight remaining. ARP conditions; temperature: 170 °C, ammonia concentration: 10 % (wt/wt).

의 무게 손실(% weight remaining의 역)은 증가함을 알 수 있으며, 149 °C의 낮은 온도에서는 78 %를 유지하였지만 191 °C에서는 67 %의 낮은 값을 얻었다. 리그닌 함량은 온도에 따라 커다란 변화를 보이지 않는 것으로 나타났으며, 다양한 온도 범위에서 18-20 %의 리그닌 함량을 나타내었다. 섬유소 함량에 대해서는 온도가 증가함에 따라 높아지는 경향을 보였으며 온도가 191 °C일 때 65 % 이상의 섬유소 함량을 얻을 수 있었다.

3-2. ARP 공정에 미치는 흐름속도의 영향

ARP 공정에 있어서 용매(암모니아)의 흐름속도는 주요한 공정 변수 중 하나가 된다. 흐름속도를 0.59-3.41 ml/min까지 변화시켜가면서 ARP 공정에 미치는 용매의 흐름속도의 영향에 대하여 조사해 보았다(Fig. 3). 흐름속도가 증가함에 따라 % weight remaining과 리그닌의 함량이 낮아지는 경향을 보였으며, 특히 흐름속도가 3.41 ml/min에서 리그닌 함량은 9.37 %까지 낮아지는 결과를 얻었다. 섬유소의 함량에 대하여는 흐름 속도가 증가함에 따라 56.69 %에서 61.11 %까지 높아지는 경향을 보였다. 이때 반응온도는 전 공정 모두 170 °C로 수행되었으며, 암모니아수 농도는 10 %를 이용하여 ARP를 수행하였다.

3-3. ARP 공정조건 최적화

3-3-1. 공정조건의 설정

ARP 공정에 크게 영향을 미칠 수 있는 주요변수로 암모니아의 농도, 반응온도, 그리고 용매의 흐름속도를 선정하였다. 이외에 반응액의 양이나, 반응시간 등이 영향을 미칠 수 있지만 이러한 조건들은 암모니아 농도나 흐름속도 등과 상관관계를 가지게 되므로 위의 세 가지 조건에 대하여 최적화가 이루어지면 나머지 조건들에 대하여도 최적화가 이루어진 것으로 간주될 수 있다. 따라서 이 세 가지 조건들을 독립변수로 하여 이들 변수들 간의 상호작용을 관찰하고 전처리된 바이오매스의 섬유소 농도와 효소의 가수분해도를 극대화시키는, 또한 반응기내의 바이오매스의 무게 손실을 최소화하는 공정 조건을 반응표면분석법(response surface methodology)을 이용하여 ARP 공정 조건을 최적화시키고자 하였다[24, 25]. 반응표면분석법은 둘 이상의 공정 변수가 존재할 때 공정 변수가 미치는 반응계의 영

Table 1. The one-third fraction of the 3^3 factorial design for the response surface methodology

| Level | Ammonia concentration(%) | Reaction temperature(°C) | Flow rate (ml/min) |
|---------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| - 1.414 | | 149 | 0.59 |
| 1 | 5 | 155 | 1 |
| 0 | 10 | 170 | 2 |
| 1 | 15 | 185 | 3 |
| 1.414 | | 191 | 3.14 |
| Run | X(1) ^a | X(2) ^b | X(3) ^c |
| 1 | 0 | 0 | -1 |
| 2 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | 0 | -1 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | -1.414 | 0 |
| 6 | 0 | 1.414 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | -1.414 |
| 8 | 1 | -1 | -1 |
| 9 | -1 | 0 | 1 |
| 10 | -1 | 1 | 0 |
| 11 | 1 | 0 | 0 |
| 12 | 1 | 1 | -1 |
| 13 | 1 | -1 | 1 |
| 14 | 0 | 0 | 1.414 |
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 16 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |

^aX(1): Coded value of ammonia concentration.^bX(2): Coded value of reaction temperature.^cX(3): Coded value of flowrate.

향을 반응표면으로 가시화시킴으로써, 다양한 공정변수들의 고유한 기여뿐만 아니라 변수들간의 상호작용을 이해하여 공정변수를 최적화하는데 특히 유용하게 이용된다. ARP 예비실험결과를 근거로하여 암모니아 농도 10%, 반응온도 170 °C, 그리고 흐름속도 2 ml/min을 기준으로 각각 5-15%, 155-185 °C, 그리고 1-3 ml/min의 범위에서 ARP를 수행하여 변수들간의 영향에 대하여 조사하였다.

3-3-2. 실험계획 및 결과분석

실험계획은 Table 1에서 보여지는 것처럼 3변수 3수준 분류인자 설계(3^3 -fractional factorial design)에 따라 4 스타포인트와 4 중심점 반복실험을 통하여 모두 17가지 조건에서 실험을 수행하였다. 이 실험계획은 적은 실험구로 각각의 독립변수 즉 암모니아, 반응온도, 그리고 흐름속도에 대하여 5개의 수준에서 실험할 수 있는 장점이 있으며, 2차 다항회귀 모델을 적합시키는데 적절하게 이용할 수 있다. 실험결과는 RSREG(SAS; Statistical Analysis System)을 이용하여 통계적으로 분석되어 종속변수(% weight remaining, 섬유소 농도, 리그닌 농도, 효소의 가수분해도)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 ARP 반응 조건들에 대한 상호영향 및 최적 반응조건을 구하였다.

3-3-3. ARP 공정

각각의 독립변수들에 대하여 실험계획에 따라 변경시켜 가면서 1 시간 동안 ARP를 수행하여 전처리된 바이오매스의 섬유소 함량, 리그닌함량, 무게손실, 그리고 효소의 가수분해도에 대하여 조사해 보았다. 총 17구의 실험조건과 실험결과를 Table 2에 나타내었다. % weight remaining(무게손실의 역)은 17구의 실험에서 최저 66.05%에서 최대 83.33%를 얻을 수 있었다. % weight remaining 최저값은 온도와 흐름속도가 비교적 높은 실험조건에서 나타났으며, 대부분

Table 2. The results of ammonia recycled percolation process under various conditions

| Run | Results | | | |
|-----|-----------------------|-------------------|-------------------|----------------------------|
| | % Weight remaining(%) | Glucan content(%) | Lignin content(%) | Enzymatic digestibility(%) |
| 1 | 75.34 | 56.63 | 16.55 | 55.48 |
| 2 | 66.05 | 64.67 | 14.75 | 83.30 |
| 3 | 77.76 | 59.46 | 17.36 | 47.91 |
| 4 | 72.80 | 59.75 | 12.50 | 66.85 |
| 5 | 79.07 | 55.65 | 19.08 | 43.45 |
| 6 | 67.28 | 65.47 | 17.97 | 74.65 |
| 7 | 77.47 | 56.69 | 21.35 | 55.48 |
| 8 | 79.40 | 57.09 | 21.31 | 41.22 |
| 9 | 72.11 | 58.33 | 20.19 | 62.00 |
| 10 | 69.25 | 62.91 | 20.02 | 72.42 |
| 11 | 69.15 | 63.40 | 15.23 | 71.12 |
| 12 | 69.34 | 65.09 | 17.23 | 70.07 |
| 13 | 79.66 | 57.07 | 20.35 | 42.34 |
| 14 | 83.33 | 61.11 | 11.24 | 72.56 |
| 15 | 75.70 | 59.14 | 18.90 | 54.62 |
| 16 | 74.45 | 54.43 | 20.18 | 60.17 |
| 17 | 75.89 | 59.33 | 8.91 | 52.37 |

의 높은 % weight remaining의 값은 14번 실험구를 제외하고는 비교적 온도가 낮은 실험범위에서 얻을 수 있었다. 리그닌의 함량은 11.24%에서 21.35%까지 다양한 값을 얻었다. 흐름속도가 아주 높을 때 (3.41 ml/min) 최저값을 얻을 수 있었으며, 흐름속도가 아주 낮을 때 (0.59 ml/min)에 역시 최대값을 나타내었다. 따라서 리그닌의 함량은 흐름속도에 크게 영향받는 것을 알 수 있었다. 섬유소의 함량은 54.43%에서 65.47%까지의 값을 얻었으며 역시 온도가 높은 실험조건(191 °C)에서 최대 섬유소 함량을 얻을 수 있었다. 효소의 가수분해도에 대해서는 41.22%에서 83.3%까지 커다란 차이를 보였으며, 반응온도와 흐름속도가 큰 조건에서 최대값을 얻었고, 반대로 암모니아 농도, 반응온도, 그리고 흐름속도가 낮은 비교적 온화한 조건에서 수행된 ARP에서 가장 낮은 값을 얻었다.

Table 3. The coefficients and estimated parameters by the response surface equations

| Coefficient | Parameter | | | |
|--------------|--------------------|----------------|----------------|-------------------------|
| | % Weight remaining | Glucan content | Lignin content | Enzymatic digestibility |
| β_0 | 75.159 | 59.294 | 12.625 | 54.22 |
| β_1 | -3.656 | 2.109 | - | 12.273 |
| β_2 | -3.98 | 3.607 | -2.038 | 9.702 |
| β_3 | - ^a | - | -3.554 | - |
| β_{12} | -2.306 | 0.748 | -5.135 | -12.193 |
| β_{13} | 4.101 | - | -2.743 | -13.781 |
| β_{23} | -8.595 | 0.008 | - | 29.337 |
| β_{11} | -2.706 | 2.052 | 3.448 | 6.877 |
| β_{22} | -1.771 | 0.679 | 5.573 | 5.212 |
| β_{33} | - | -1.214 | 3.999 | - |
| R-square | 0.9892 | 0.99 | 0.8906 | 0.9969 |
| Prob>F | 0.0002 | 0.0001 | 0.0261 | 0.0015 |

RS equation: Objective= $\beta_0+\beta_1X+\beta_2Y+\beta_3Z+\beta_{12}XY+\beta_{13}XZ+\beta_{23}YZ+\beta_{11}X^2+\beta_{22}Y^2+\beta_{33}Z^2$

^a-. The coefficient beyond the 95 % confident level.

3-3-4. 반응표면 방정식 및 계수 결정

ARP 공정후 전처리된 바이오매스를 분석하여 이들의 결과를 다중회귀분석을 통하여 반응표면 방정식의 계수를 결정하였다. Table 3에 반응표면 방정식과 각각의 종속변수들에 대한 반응표면 방정식의 계수 값들을 정리하였다. 리그닌 함량을 나타내는 종속변수에 대한 회귀계수(R^2)는 0.89이었지만, 그밖의 종속변수들에 대하여는 0.99 이상으로 잘 일치함을 알 수 있었다. 또한 전체 다항식에 대한 F검정 결과 리그닌 함량에 대하여 95 %, 그리고 기타 종속변수들에 대해서는 99 %의 신뢰범위에서 유의성을 얻었다. 적합결여 및 잔차분석 등의 해석 결과, 본 실험에서 얻은 결과는 실험값과 계산값이 잘 일치함을 알 수 있었다. 각각의 계수들에 대해서는 T검정 결과 95 % 이상의 신뢰도 범위 안의 결과만을 이용하여 계수를 결정하였으며, Table 3에서 계수 값을 얻지 못한 항에 대해서는 실험적 가치를 인정받지 못하여 본 통계분석에서는 제외하였다.

3-4. 공정조건들의 영향

3-4-1. % weight remaining

Fig. 4는 % weight remaining(무게손실의 역)에 대한 ARP 공정 조건들의 영향에 대하여 조사한 것이다. 최근 들어 유전공학의 발전이나, 공정의 개발 등에 기인하여 전체 바이오매스의 전환공정에 소요되는 경비 중 기질의 가격 비중이 점점 높아져 가고 있으므로, 이런

관점으로 경제적인 면을 고려할 때 바이오매스의 무게손실은 전처리 공정에 대하여 주요한 종속변수가 될 수 있다. 용매의 흐름속도를 중심조건(흐름속도; 2 ml/min)에 놓고 암모니아 농도와 반응온도 간의 관계를 볼 때 두 변수간의 상호작용은 그렇게 크게 나타나지는 않았고, 각각의 두 변수들에 대하여 선형관계의 영향이 큰 것으로 나타났다. 중심조건에서 약 25 %의 무게 손실이 예측되었으며, 반응온도와 암모니아 농도가 증가함에 따라 무게손실도 증가하는 것으로 예측되었다. 암모니아 농도와 용매의 흐름속도의 영향에 대해서 보면(반응온도 170 °C 기준) 안부점을 얻어 최적화 조건을 얻을 수는 없었지만, 안부점이 최적조건이 두 가지 이상이 될 때 나타난다고 생각하면, 예비실험들을 통하여 얻은 결과들을 이용해 두 최적점 중 하나는 무시할 수 있다. 따라서 암모니아 농도가 낮은 범위에서 무게손실을 줄일 수 있는 조건을 찾는다면 용매의 흐름속도가 감소할 때 그 경향을 찾을 수 있다. 마찬가지로 방법으로 반응온도와 흐름속도와의 관계(암모니아 농도; 10 %)에서 볼 때 무게손실을 최소화할 수 있는 조건은 반응온도가 낮고 흐름속도가 높은 실험범위에서 얻어질 수 있다. 전체 실험구의 평균 % weight remaining은 73.85 %의 값을 얻었다.

3-4-2. 섬유소 함량

Fig. 5는 전처리된 바이오매스의 섬유소 함량에 대하여 ARP 조건들의 영향에 대하여 조사한 것이다. 암모니아의 농도가 증가하고,

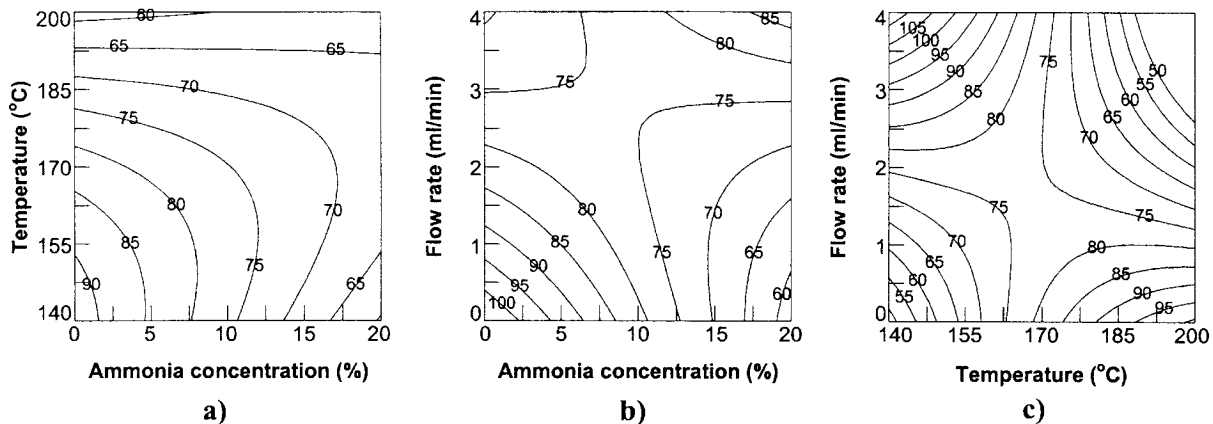


Fig. 4. The effect of ARP conditions on the % weight remaining.

a) ammonia concentration vs. temperature at the flow rate of 2 ml/min, b) ammonia concentration vs. flow rate at the temperature of 170 °C, c) temperature vs. flow rate at the ammonia concentration of 10 %.

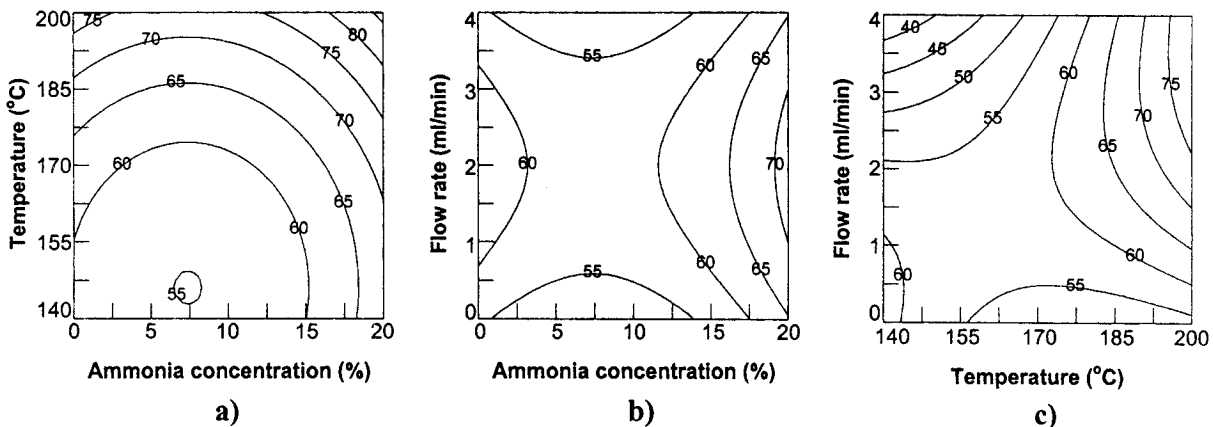


Fig. 5. The effect of ARP conditions on the glucan content of solid residue.

a) ammonia concentration vs. temperature at the flow rate of 2 ml/min, b) ammonia concentration vs. flow rate at the temperature of 170 °C, c) temperature vs. flow rate at the ammonia concentration of 10 %.

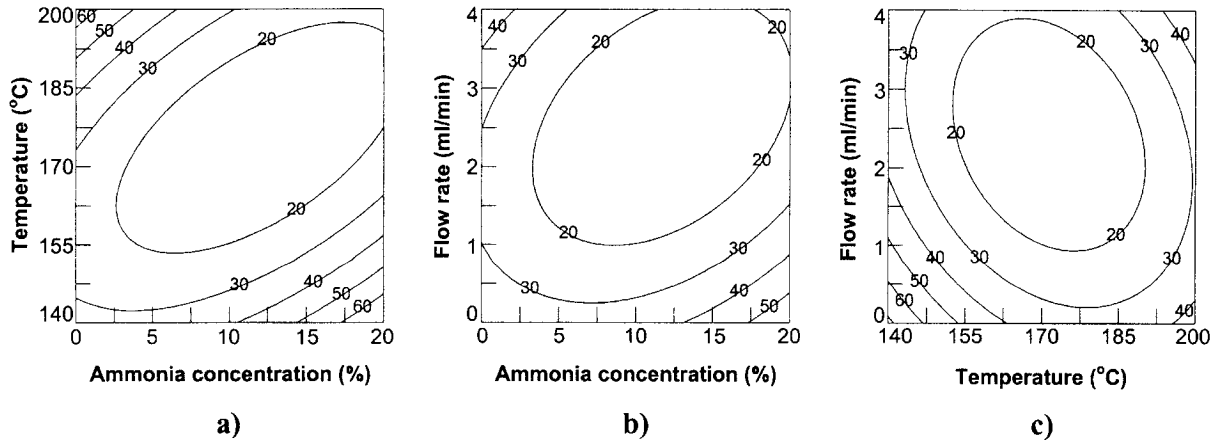


Fig. 6. The effect of ARP conditions on the lignin content of solid residue.

a) ammonia concentration vs. temperature at the flow rate of 2 ml/min, b) ammonia concentration vs. flow rate at the temperature of 170 °C, c) temperature vs. flow rate at the ammonia concentration of 10 %.

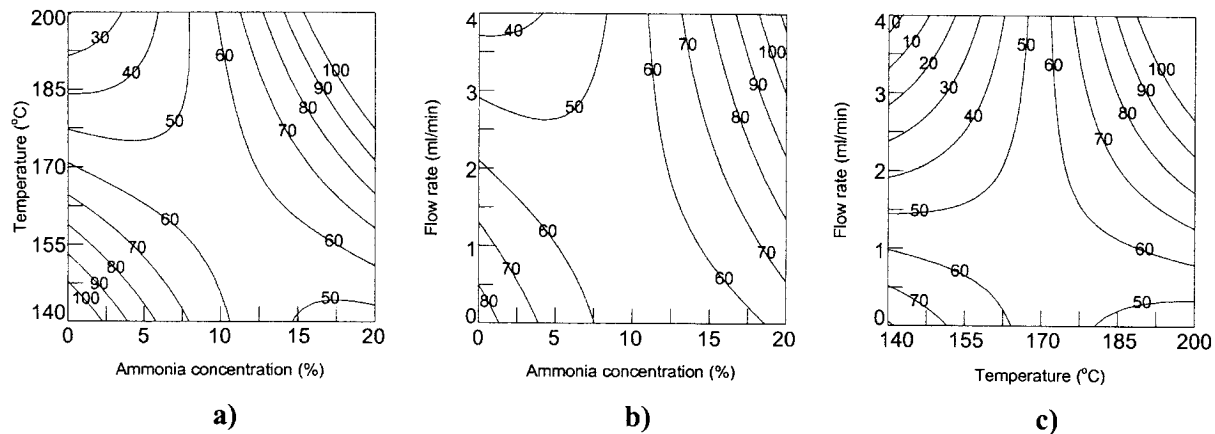


Fig. 7. The effect of ARP conditions on the enzymatic digestibility.

a) ammonia concentration vs. temperature at the flow rate of 2 ml/min, b) ammonia concentration vs. flow rate at the temperature of 170 °C, c) temperature vs. flow rate at the ammonia concentration of 10 %.

반응온도 또한 증가할 때 섬유소의 함량을 최대화시킬 수 있는 것으로 예측되었으며, 흐름속도가 2 ml/min으로 고정되었을 때 반응온도 보다는 암모니아의 농도가 더 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 무게손실에 대한 경향과 마찬가지로 각각의 변수들에 대하여 선형 관계로 영향을 받았고 변수들간의 상호작용은 거의 관찰되지 않은 것으로 관찰되었다. 반응온도가 170 °C로 고정되어 있을 때 섬유소의 함량은 암모니아 농도가 높을수록 증가하였으며, 흐름속도는 2 ml/min을 중심으로 더 높거나 낮을 때 섬유소의 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 또한 반응온도와 흐름속도의 관계에서는(암모니아 농도; 10 %) 높은 반응온도 영역에서 흐름속도가 증가할 때 미세하게 섬유소의 함량도 증가하는 결과를 얻었다. 전체 실험구의 평균 섬유소 함량은 60.08 %이었다.

3-4-3. 리그닌 함량

Fig. 6은 리그닌 함량에 대하여 나타낸 것이다. 무게손실 또는 섬유소 함량과는 달리 최적 조건을 찾을 수 있는 결과를 얻었다. 암모니아 농도가 12.5 %, 반응온도가 약 175 °C 그리고 흐름속도가 약 1.5 ml/min일 때 리그닌의 함량은 최소화될 수 있고, 이때 예상 리그닌의 함량은 11.11 %의 낮은 값을 유지할 수 있었다. 마찬가지로 세 변수들 모두 선형으로 영향을 미치고 세 변수 모두 비슷한 영향 정도를 나타내었다. 전체 실험구의 평균 리그닌 함량은 16.91 %이었다.

3-4-4. 효소의 가수분해도

바이오매스의 전환공정에 있어서 효소에 소요되는 경비 외에 경제적인 관점에서 중요한 관심사항은 바이오매스의 가격이다. 따라서 효과적으로 바이오매스를 이용하기 위해서는 가수분해 속도 외에도 효소의 가수분해도를 들 수 있다. 전체 바이오매스 전환공정의 속도 결정단계는 역시 당화공정이 되므로 가수분해 속도가 높고, 효소의 가수분해도가 높아야 효과적으로 포도당을 생산할 수 있기 때문이다. 효소의 가수분해도에 대한 ARP 조건들의 영향에 대하여 Fig. 7에 나타내었다. 암모니아 농도와 반응온도와의 관계에서는 섬유소의 함량에 대한 영향과 마찬가지로 암모니아 농도가 높은 범위의 조건에서 반응온도가 증가함에 따라 효소의 가수분해도를 증가시킬 수 있었으며, 흐름속도가 증가함에 따라 미세하게 가수분해도도 증가할 수 있는 것으로 나타났다. 또한 암모니아 농도에 비해 흐름속도의 영향은 극히 미약한 것으로 나타났다. 반응온도와 흐름속도의 관계에서 보면 높은 반응온도에서 흐름속도가 증가함에 따라 가수분해도도 증가시킬 수 있는 결과를 얻었다. 전체 평균 가수분해도는 59.30 %로 다소 낮은 결과를 얻었다.

3-5. 최적 조건 확립

Fig. 4부터 7까지를 통해 공정조건들과 종속변수들간의 관계를 중

Table 4. The effect of ARP treatment on the % weight remaining, compositions and enzymatic digestibility of biomass with the optimized condition

| | Glucan content (%) | Lignin content (%) | Enzymatic digestibility (%) | % Weight remaining (%) |
|---------------------|--------------------|--------------------|-----------------------------|------------------------|
| Untreated biomass | 46.78 | 24.77 | 4.9 | 100 |
| ARP treated biomass | 72.33 | 11.66 | 92.13 | 67.42 |

ARP condition ; Ammonia concentration : 17.5 %

Reaction temperature : 185 °C

Flow rate : 1.5 ml/min

함하여 효과적으로 바이오매스 전환 공정에 이용될 수 있는 ARP 최적 공정 조건을 확립할 수 있었다. 우선, 바이오매스의 무게손실과 섬유소의 농도를 고려할 때 무게 손실을 30 % 이하로 줄이고 섬유소의 농도를 70 % 이상 증가시킬 수 있는 공정조건의 범위는 암모니아 농도 15-17.5 %, 반응온도 170-185 °C, 그리고 용매의 흐름속도 2-2.5 ml/min가 된다. 마찬가지로 방법으로 바이오매스의 섬유소 농도를 70 % 이상 유지하면서 효소의 가수분해도를 80 % 이상 유지할 수 있는 공정 조건의 범위는 암모니아 농도 17.5-20 %, 반응온도 177.5-185 °C, 용매의 흐름속도 1-1.5 ml/min의 결과를 얻었다. 이들 결과를 종합하여 ARP 최적 공정 조건을 확립하고 이 조건에서 ARP 공정을 수행하여 ARP 최적 반응조건과 그 결과를 Table 4에 요약하였다. 무게 손실이 32.58 %로 허용범위를 벗어난 다소 증가한 값을 얻었지만 섬유소의 농도 72.33 %, 리그닌 함량 11.16 %, 그리고 효소의 가수분해도 92.13 %의 매우 높은 값을 얻어 만족할 만한 결과를 얻었다. 처리되지 않은 바이오매스와 비교하여 섬유소 함량의 경우 55 % 증가, 리그닌 함량에 대해 53 % 감소, 그리고 섬유소 가수분해도에 대해서는 약 18배까지 증가한 값을 얻어, ARP 공정은 효과적인 전처리 방법이라고 결론지을 수 있었다.

3-6. 동시당화 발효

ARP 처리된 바이오매스를 기질로하여 동시당화 발효 공정을 수

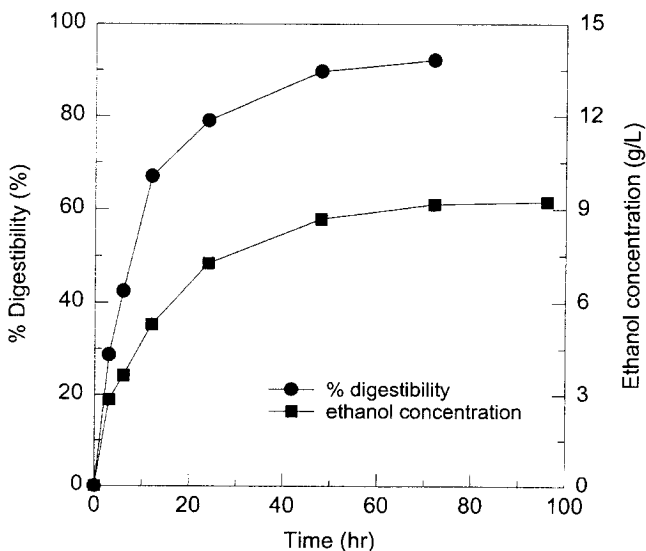


Fig. 8. The enzymatic digestibility of pretreated biomass and the production of ethanol by simultaneous saccharification and fermentation.

행하였다. 바이오매스의 농도는 섬유소의 함량에 근거하여 2 %의 섬유소, 그리고 효소는 25 IFPU/g-cellulose를 첨가하여 수행하였다. 반응온도는 38 °C이고, 배지내에 sodium citrate buffer를 첨가하여 pH는 4.8로 조절하였다. Fig. 8에서 보여지는 것처럼 반응 48시간에 8.68 g/L, 72시간 이후 96시간까지 약 9.15-9.23 g/L의 에탄올을 생산할 수 있었다. 첨가된 섬유소의 함량을 기준으로 이론 수율을 계산해보면 약 81.56-82.26 %를 얻었다. 생성된 당의 약 10 %가 미생물 성장이나 유지에 이용된다고 가정할 때, 이론수율은 만족할 만한 결과를 얻었다. 따라서 ARP 처리된 바이오매스에서 발효에 대한 독성물질은 존재하지 않는 것으로 추정되었다.

4. 결 론

(1) 바이오매스의 전처리 공정으로 암모니아 재순환 침출(ARP; Ammonia Recycled Percolation) 공정에 대하여 조사하였다.

(2) 반응표면분석법을 이용하여 ARP 공정 조건을 최적화시켰으며, 그 공정조건은 다음과 같다. 암모니아 농도: 17.5 %, 침출 반응온도: 185 °C, 용매 흐름속도: 1.5 ml/min. 이 조건에서 ARP 공정 수행 결과 섬유소 농도는 72.33 %로 55 %가 증가하였고, 리그닌 함량은 11.66 %로 53 %가 감소하여 ARP 공정이 효과적인 전처리 공정으로 확립될 수 있었다.

(3) 효소의 가수분해도 또한 92.13 %로 처리되지 않은 바이오매스와 비교할 때 약 18배가 증가하였으며, 동시당화발효를 실시한 결과 9.23 g/L의 에탄올을 생산하여 이론 수율 82.26 %를 얻어 ARP 공정이 효소 또는 미생물의 발효에 대하여 부정적 영향을 미치지 않는 것으로 추정할 수 있었다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 박사후 연수과정 지원(1996/1997)에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

- Galbe, M. and Zacchi, G.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **17**, 97(1986).
- Lee, J. S., Lee, J. P., Cho, J. K., Lee Y. W., Hong, J. J. and Park, S. C.: *HWAHAK KONGHAK*, **32**, 36(1994).
- Koullas, D. P., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J. and Koukios, E. G.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 113(1992).
- Mackie, K. L., Brownell, H. H., West, K. L. and Saddler, J. N.: *J. Wood Chem. and Technol.*, **5**(3), 405(1985).
- Wayman, M., Parekh, S., Chornet, E. and Overend, R. P.: *Biotech. Lett.*, **8**(10), 749(1986).
- Park, J. K. and Phillips, J. A.: *Chem. Eng. Commun.*, **65**, 187(1986).
- Gould, J. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 46(1984).
- Chen, S. L. and Sunol, A. K.: *AIChE For. Prod. Div. Sess.*, **33**.
- Cahela, D. R., Lee, Y. Y. and Chambers, R. P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3(1983).
- Lee, Y. Y., Lin, C. M., Johnson, T. and Chambers, R. P.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **8**, 75(1979).
- Lee, Y. Y. and McCaskey, T. A.: *Proc. Tappi R&D*, 317(1983).
- Grohmann, K., Torget, R. and Himmel, M.: *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **15**, 59(1985).
- Kim, S. B. and Lee, Y. Y.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **17**, 71 (1993).

14. Dale, B.E. and Moreira, M.J.: *Biotechnol. and Bioeng. Symp.*, **12**, 31(1982).
15. Yoon, H.H., Wu, Z.W. and Lee, Y.Y.: *Appl. Biochem. Biotech.*, **51**, 5(1995).
16. Jangali, N.R.: *Chem. Abstr.*, **98**(14), 109(1983).
17. Han, Y.W.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **23**, 119(1978).
18. Wang, P.Y., Bolker, H.I. and Purves, C.B.: *Tappi*, **50**, 123(1967).
19. Ghose, T.K.: *Pure & Appl. Chem.*, **59**, 257(1987).
20. Grohmann, K., Torget, R. and Himmel, M.: *Biotech., Bioeng. Symp.*, **17**, 135(1986).
21. Grohmann, K., Himmel, M., Rivard, C., Tucker, M., Baker, J., Torget, R. and Graboski, M.: *Biotech. Bioeng. Symp.*, **14**, 139 (1984).
22. Ehrman, T. and Magill, K.: NREL-CAT Standard Procedure No. 001-005(1992).
23. George, P.P., Tammy K.S. and Sherry L.S.: NREL Chemical Analysis & Testing Standard Procedure #008(1993).
24. Montgomery, D.C.: "Design and Analysis of Experiments", 4th ed., John Wiley & Sons Inc., New York, NY(1996).
25. Oh, K.K., Kim, S.W., Jeong, Y.S. and Hong, S.I.: *HWAHAK KONGHAK*, **34**, 418(1996).