

암모니아 재순환 침출공정을 이용한 볏짚의 전처리

강 춘 형[†]

전남대학교 공과대학 응용화학공학부
500-757 광주시 북구 용봉동 300번지
(2009년 1월 8일 접수, 2009년 1월 19일 채택)

Pretreatment of Rice Straw by Using Ammonia Recycled Percolation Process

Choon-Hyoung Kang[†]

Department of Applied Chemical Engineering, Chonnam National University, 300 Yongbong-dong, Buk-gu, Gwangju 500-757, Korea
(Received 8 January 2009; accepted 19 January 2009)

요 약

볏짚은 섬유소와 헤미셀룰로오스의 함유량이 높아, 바이오에탄올 생산을 위한 잠재적 가치가 매우 높은 목질계 바이오매스 원료이다. 본 연구에서는 볏짚으로부터 바이오 에탄올 생산하기 위한 전처리 공정으로써 암모니아 재순환 침출 공정을 적용하였다. 특히 생성된 고형물의 조성과 효소 가수분해도에 전처리 공정의 온도와 반응시간 그리고 암모니아의 농도가 미치는 영향을 조사하였다. 실험을 행한 전처리 공정의 온도, 반응시간, 그리고 암모니아의 범위는 차례로 150~190 °C, 10~90 min 그리고 0~20 wt%이다. 전처리 공정을 통하여 약 84%의 리그닌과 20~80%의 헤미셀룰로오스가 용해되었다. 또, 15 wt%의 암모니아 수용액을 이용하여 170 °C에서 90 min 동안 전처리한 고형 잔재물의 경우 15 FPU/g of glucan의 셀룰라제 효소를 첨가하여 약 90%의 효소 가수분해도를 얻을 수 있었다. 셀룰라제와 자일란 나아제를 함께 사용하면 가수분해도가 현저하게 향상되었으며, 이는 헤미셀룰로오스가 가수분해 과정에서 중요한 방해제 역할을 하고 있음을 보여주는 것이다. 150 °C에서 20 min 동안 15%의 암모니아수로 전처리된 시료를 이용한 동시당화발효 실험과 동시당화공동발효 실험에서는 각각 13.8 g/L(초기 glucan을 기준으로 81%)와 15.2 g/L(초기 glucan과 xylan의 합을 기준으로 89%)의 에탄올이 생성되었다.

Abstract – Because of high contents of cellulose (~37 wt%) and hemicellulose (~17%), rice straw seems to be a potential lignocellulosic biomass for production of bioethanol. In this study, Ammonia Recycled Percolation (ARP) pretreatment of rice straw was extensively investigated. In particular, the experimental study included the effects of temperature, reaction time and concentration of ammonia on compositions and enzymatic digestibility of the resulting solid residues; the ranges of pretreatment conditions were, in turn, 150~190 °C, 10~90 min and 0~20 wt%. Through ARP pretreatment, the lignin content was reduced by as high as ~84% while 20~80% of the hemicellulose was also solubilized. The solid residue resulted from the pretreatment with 15 wt% aqueous ammonia solution at 170 °C for 90 min showed as high as ~90% of digestibility with 15FPU/g of glucan enzyme loading. Supplement of xylanase to cellulase led to a notable enhancement of digestibility, indicating a discernable inhibitory role of hemicellulose. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) and Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation (SSCF) were performed to obtain ethanol productions of 13.8 g/L (corresponding to 81% yield) and 15 g/L (corresponding to 89% yield), respectively.

Key words: Ammonia Recycled Percolation, Rice Straw, Lignocellulosic Biomass, Bioethanol, Simultaneous Saccharification, Fermentation

1. 서 론

현재까지의 대부분의 에탄올은 전분을 기반으로 하는 발효공정을 통하여 얻고 있으며 나머지는 화학적인 합성을 통하여 생산하고 있

다. 곡물의 전분과 당을 기반으로 하는 에탄올 발효공정기술은 잘 정립되어 있다. 그러나 곡물의 경우에는 식량으로 활용할 수 있는 가치가 높고 당으로 전환시킬 수 있는 분율이 크지 않아 대량으로 소모되는 수송용 연료로 사용하기 위한 에탄올 생산공정으로는 경쟁력이 상당히 낮다. 따라서 자연에서 대량으로 값싸게 얻을 수 있으며 쉽게 당으로 전환시킬 수 있는 섬유소와 헤미셀룰로오스가 풍부하게 포함된 목질계 바이오매스를 원료로 하여 에탄올을 생산하

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: chkang@chonnam.ac.kr

[‡]이 논문은 서울대학교 최창균 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

기 위한 연구가 광범위하게 진행되어 왔다[1-6].

목질계 바이오매스는 포함되어 있는 섬유소를 발효가 가능한 환원당으로 전환하는 효소가수분해 단계와 생성된 당을 미생물을 이용하여 발효하는 단계를 차례로 거쳐 에탄올로 전환된다. 일반적으로 가수분해반응은 셀룰라제 효소에 의해 진행되며 발효과정은 효모나 박테리아를 이용하여 수행하게 된다. 효소 가수분해반응에서 기질의 농도를 낮게 유지하여 효소의 확산과 생성물에 의한 방해요인을 제거된 상황에서는 가수분해반응의 효율이 전적으로 얼마나 효과적으로 섬유소와 효소의 접촉이 이루어지는지에 의해 결정된다. 이 과정에 영향을 미치는 대표적인 인자로는 바이오매스의 세공 직경과 공극율, 효소가 접근이 가능한 섬유소의 유효 표면적, 리그닌과 헤미셀룰로오스의 함량, 섬유소의 결정성 및 중합도 등이 있다[7-10]. 특히 리그닌은 섬유소에 공유결합으로 밀접하게 결합되어 매우 안정된 소위 “lignin-carbohydrate complex(LCC)”를 형성하여 효소의 접근을 차단하는 가수분해반응에 대한 주요 방해제이다. 바이오매스 원료에 따라 다르기는 하지만, 일반적으로 리그닌의 제거와 가수분해도와는 좋은 상관관계를 보인다[7, 8]. 리그닌 구조가 해체되면 바이오매스가 팽창하여 바이오매스의 내부 표면적과 공극율이 증가되며 비가역적으로 리그닌에 흡착되는 효소의 양이 줄어들게 되어 유효효소가 증가한다. 헤미셀룰로오스도 효소를 흡착시키거나 물리적으로 섬유소와 접촉을 방해한다. 따라서 헤미셀룰로오스의 제거도 효소와 섬유소 간의 효과적인 접촉을 증진시킨다. 실제로 약 50% 이상의 헤미셀룰로오스가 제거되어야 효소 가수분해반응이 현저하게 촉진된다고 알려져 있다[11, 12]. 바이오매스의 전처리하는 효소가수분해의 속도와 환원당의 수율을 높이기 위해 가수분해반응에 방해가 되는 요인들을 제거하는 과정이다. 전처리 과정에서 리그닌과 헤미셀룰로오스를 제거하고 섬유소의 결정성을 낮추며 공극율을 높여서 후속 단계인 가수분해반응의 조건을 향상시키면 최종적으로 에탄올의 수율을 증가하게 된다.

지금까지 여러가지 전처리 방법들이 제시되고 연구되어 왔다[9, 10]. 최근에 제시된 암모니아수를 이용하여 전처리하는 소위 암모니아 재순환 침출공정(ARP, Ammonia Recycled Percolation)은 이들 중 하나이다[13]. 암모니아는 리그닌에 선택적으로 작용하여 리그닌 내의 C-O-C 결합을 파괴하고 리그닌과 탄수화물의 착화합물(LCC)에 포함되어 있는 에테르 결합과 에스테르 결합을 해체하는 매우 효과적인 탈리그닌 화합물이다. 또한 암모니아 가수분해 반응에 의해 리그닌과 헤미셀룰로오스의 결합을 해체시킴으로써 표면적을 증대시켜 후속반응인 효소 가수분해반응의 속도와 수율을 현저하게 향상시키는 역할을 한다. 따라서 암모니아 수용액을 이용하여 바이오매스를 전처리하면 리그닌이 제거됨에 따라 바이오매스가 팽창되어 섬유소와 효소의 효과적인 접촉을 향상시킬 뿐 아니라 효소가 소모적으로 리그닌과 헤미셀룰로오스에 비가역적으로 흡착되는 양을 감소시켜 가수분해반응의 전체적인 속도와 수율이 향상되게 된다. 한편, 암모니아로 처리된 바이오매스에서는 에탄올 발효에 필요한 탄수화물의 손실이 적어 높은 에탄올 수율을 기대할 수 있다. 사실 ARP 공정을 적용한 연구에서는 90%이상의 glucan과 50% 이상의 헤미셀룰로오스가 용해되지 않고 잔류하는 결과를 보여주고 있다[7, 13-16]. 또, ARP 공정을 통해 제거된 리그닌에는 황 등의 이물질이 함유되어 않아 부가가치가 높은 다른 화학물질로의 전환 공정개발이 용이하여 전체 공정의 경제성을 더욱 개선될 수 있다[11]. 암모니아는 일상적으로 사용하는 시약이며, 값이 매우 저렴할 뿐 아

니라 ARP 공정의 운전조건 범위 내에서는 부식성이 없는 비오염 물질이다. 다른 전처리 공정에 비교하여 두드러진 ARP 공정의 장점 중 하나는 암모니아의 휘발성이 강해 쉽게 회수하여 재사용할 수 있다는 것이며 공정의 이름도 여기서 연유하였을 뿐 아니라 전체적인 공정의 경제성 면에서도 다른 전처리 공정들과 비교할 수 있게 된 것이다. 관통형 반응기를 사용하는 ARP 공정은 처음 제안된 이후로 여러가지 목질계 바이오매스에 적용되어 그 효율성이 잘 입증되어 왔다[7, 13-16].

벚짚은 대략 40%의 glucan과 약 20%의 xylan을 포함하고 있으며 전세계적으로 매년 7억 톤 이상 생산되는 가장 풍부한 목질계 바이오매스 중 하나이다. 이는 연간 250억 L의 에탄올을 생산할 수 있는 양에 해당하며 단일종목으로는 가장 풍부한 원료이다[17]. 본 연구에서는 에탄올을 생산하기 위한 벚짚의 전처리에 ARP 공정을 적용하여 타당성과 함께 최적 공정조건을 탐색하였다. 조사한 ARP 공정 변수와 범위는 다음과 같다. 즉, 반응시간은 10~90 min, 반응온도는 150~190 °C, 암모니아 농도는 0~20%의 범위를 조사 대상으로 하였다. 또 ARP로 전처리된 시료의 효소 가수분해 실험 뿐 아니라 당화와 발효가 동시에 한 반응기 안에서 일어나는 동시당화발효 공정과 당화와 발효가 동시에 일어나며 특히 육탄당(hexose)과 오탄당(pentose)이 혼합된 혼합당이 하나의 미생물에 의해 공동으로 발효되는 동시당화공동발효 실험을 행하여 그 효율성을 확인하였다.

2. 재료 및 실험

2-1. 시약 및 재료

본 연구에 사용한 벚짚은 전남지방에서 2005년에 수확한 벚로부터 채취하였으며 45 °C의 강제대류 오븐에서 건조하였다. 건조된 벚짚을 잘게 분쇄하여 20~80 mesh 사이의 분획을 취하여 뚜껑이 있는 용기에 담아 냉장고에 보관하여 실험에 사용하였다. 다음에서 설명할 분석방법에 의해 측정된 벚짚의 초기조성은 다음과 같다. 즉, glucan 37.3%, xylan 17.1%, 총 lignin 19.2%, galactan 1.8%, arabinan 3.4%, mannan 1.8%, ash가 8.7%, 그리고 acetyl group이 약 1.7%이었다. 표준시료로 사용한 α -cellulose는 Sigma사로부터 구입하였으며 셀룰라제인 Spezyme CP(Lot No. 301-00348-257, 비활성도는 31.2 FPU/mL)와 자일라나제인 Multifect(단백질 함량이 43.7 mg/mL)는 Genencor International Corporate(Palo Alto, CA)에서, Novo Inc에서 구입한 β -glucosidase인 Novozyme 188(Lot No. 11K1088)의 비활성도는 750 CBU/mL이었다. 동시당화발효실험에서 사용된 발효균주 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 20062(D₅A)는 YP배지(1%의 yeast extract와 2% pepton)에서 38 °C, 150 rpm로 유지되는 진탕배양기에서 활성화시켜 사용하였다. 또 동시당화공동발효실험에 사용한 박테리아는 *Escherichia coli* ATCC 55124(KO11)로, -20 °C에 보관된 박테리아를 해동하여 Sigma사로부터 구입한 LB배지(1%의 tryptone 0.5%의 yeast extract 1%의 NaCl, 40 mL/L의 chloramphenicol이 포함됨)을 사용하여 진탕배양기에서 활성화시켜 사용하였다.

2-2. 분석방법

각종 시료들은 미국신재생에너지연구소(NERL)에서 제시한 방법(Chemical Analysis and Testing Standard Procedures(CATS), 2004)에 의거하여 각종 당, Klason 리그닌, 그리고 acid-soluble 리그닌 함

량을 측정하였으며 각각의 측정은 이중으로 행하였다. 수분함량은 적외선 수분 저울(Denver Instrument, IP-30)을 사용하여 측정하였다. 여러 당과 부산물들의 함량은 Aminex HPX-87P 컬럼이 장착된 HPLC를 사용하여 결정하였다. 또, 효소 가수분해, 동시당화발효 실험 및 동시당화공동발효 실험의 분석을 위한 glucose의 분석에는 Aminex HPX-87H 컬럼을 같이 사용하였다.

2-3. 암모니아 재순환 침출(ARP) 공정

바이오에탄올의 생산을 위한 암모니아 재순환 침출공정을 이용한 벚짚의 전처리에는 Kim 등[7]이 사용한 장치를 이용하였다. 장치는 액체 저장고, 펌프, 온도조절이 가능한 오븐, SS-316으로 제작된 반응기(9/10 in. ID × 10 in L, 내부부피는 101.9 cm³), 유출되는 액체를 저장하기 위한 고압액체용기로 구성되어 있다. 또 장치는 고압의 질소분배와 연결되어 있어 압력조절계를 이용하여 높은 온도로 유지되는 반응기 내로 유입되는 액체의 증발을 방지하기 위해 필요한 충분히 높은 압력을 유지할 수 있게 되어 있다. 온도조절 오븐 내에 장착된 반응기에 시료를 봉입하고 질소분배로부터의 후압을 대략 2.3 MPa 정도로 유지한 후 오븐의 온도를 조절한다. 오븐 내의 온도가 균일하게 유지되면 고압펌프를 작동하여 암모니아수를 반응기 내로 주입하기 시작하여 정해진 반응시간 동안 계속 흘러 보낸다. 본 연구의 모든 실험에서는 유속을 5.0 mL/min으로 고정하여 사용하였다. 전처리된 시료는 충분히 세척한 후 탈수시켜 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2-4. 효소 가수분해 실험

전처리된 시료의 분해효소에 의한 가수분해실험은 NREL의 CATS No. 009(2004)의 절차에 의거하여 수행하였다. 마개가 있는 250 mL 삼각 플라스크에 총 100 mL의 용액에 glucan 농도가 1%(w/v) 되도록 바이오매스를 정량하여 투입한다. 가수분해효소로는 15 FPU/g-glucan의 Spezyme CP와 30 CBU/g-glucan의 β-glucosidase와 함께 첨가하고 나머지는 pH가 4.8인 0.05 M sodium citrate buffer로 채워 전체부피가 100 mL 되도록 한다. 이렇게 준비된 플라스크를 50 °C로 유지되고 150 rpm으로 교반되는 진탕배양기(new Brunswick Scientific, Model Innova 4080)에서 가수분해반응을 진행시켰으며 일정한 시간간격으로 시료를 채취하여 Aminex HPX-87P가 장착된 HPLC를 이용하여 glucose의 함량을 측정하였으며 가수분해도는 이론적인 glucose에 대한 72시간 동안 배양하여 얻은 glucose의 백분율로 정의하여 계산하였다.

2-5. 동시당화발효와 동시당화공동발효 실험

두 실험에서는 셀룰라제로는 Spezyme CP(Genencor, Lot No. 301-00348-257)을, β-glucosidase로는 Novozyme 188(Novo Inc. Lot no. 11K1088)를 사용하였다. 250 mL의 삼각플라스크에 glucan의 함량이 3% w/v되도록 바이오매스를 정량하여 투입하고 전체부피가 100 mL 되도록 효소와 균주 그리고 완충용액(0.05 M sodium citrate buffer)으로 채운다. 용액에는 셀룰라제인 Spezyme CP는 15FPU/g-glucan, β-glucosidase인 Novozyme 188은 30 CBU/g-glucan가 포함되도록 한다. 준비된 반응기를 38 °C, 150 rpm의 교반속도로 유지되는 진탕 배양기에 탑재한 후, 동시당화발효 실험에는 YP 배지에서 활성화시킨 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 20062를, 동시당화공동발효 실험에는 LB배지에서 활성화시킨 *Escherichia Eoli* ATCC 55124

(KO11)를 접종함으로써 무산소 분위기에서 실험을 시작한다. 일정한 간격으로 채취한 시료를 HPLC로 분석하여 생성된 에탄올 양을 측정하였다. 에탄올 수율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{이론적인 최대 에탄올 수율}[\%] = \frac{\text{반응기내 생성된 에탄올(g)}}{\text{반응기내 초기 당(g)} \times 0.511} \times 100 \quad (1)$$

여기서 반응기 내의 초기 당은 동시당화발효실험의 경우에는 glucan의 양을 나타내며 동시당화공동발효실험의 경우에는 glucan과 xylan의 합을 의미한다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 전처리 조건이 성분변화 및 효소가수분해도에 미치는 영향

반응온도는 150~190 °C, 반응시간은 10~90 min의 범위에서 벚짚 시료에 대한 ARP 전처리 실험을 수행하였다. 각 실험에서 초기에 반응기 내에 봉입한 시료의 양은 약 13.5 g이었으며, 2.3 MPa로 유지되는 반응기 내로 15 wt%의 암모니아수를 5.0 mL/min 유속으로 미리 결정된 반응시간 동안 주입하였다. 반응이 끝난 시료는 물로 세척한 후 탈수시켜 밀봉하여 냉장고에 보관하여 사용하였다.

여러 조건에서 전처리한 시료들의 변화된 조성과 가수분해도를 Table 1에 정리하였다. 실험범위 안에서 30~60%의 바이오매스 무게손실이 발생하였으며 반응온도가 높을수록, 반응시간이 길수록 손실은 더욱 컸다. 150 °C와 170 °C 사이에서는 반응온도가 높을수록, 또한 반응시간이 길수록 헤미셀룰로우스와 리그닌의 제거율이 높았으며 그에 따라 효소 가수분해도(63~90%)도 향상되었다. 이 반응 온도 범위에서 리그닌 제거율은 33~83%, 헤미셀룰로우스 제거율은 대략 10~60%이었다. 모든 반응온도에서 탈리그닌 반응은 매우 빨라, 반응개시 30분 안에 최대 82%까지 제거되었다. 그러나 온도가 190 °C 이상이 되면 헤미셀룰로우스의 제거율은 반응시간에 따라 최대 62%까지 증가하지만 리그닌의 제거율(10~60%)과 가수분해도(27~47%)은 낮은 온도에서보다 현저하게 낮은 값을 보였다. 이러한 결과는 반응온도가 높지 않은 경우에는 리그닌의 분해반응이 진행되지만 반응온도가 높아지면 헤미셀룰로우스가 물에 의한 autohydrolysis에 의해 분해되지만 리그닌은 재응축되어 중합반응을 거쳐 불용성 물질로 변하게 되거나[18, 19] 섬유소에 결합하게 되어[20], 결과적으로 실질적인 리그닌 제거량은 줄어기 때문으로 보인다. 한편, 전체 실험범위에 걸쳐 대부분의 glucan(75~99%)은 용해되거나 분해되지 않고 잔류하고 있었다. 따라서 ARP 공정을 통하여 일반적으로 알려진 가수분해반응의 방해요소인 리그닌과 헤미셀룰로우스를 효과적으로 제거되지만 에탄올 발효의 기지가 되는 glucan의 대부분은 용해되거나 파괴되지 않고 잘 보존됨으로써 ARP 공정이 에탄올 생산을 위한 벚짚의 전처리에 매우 효과적으로 적용될 수 있음을 알 수 있다.

Fig. 1에는 170 °C에서 전처리한 시료의 반응시간에 따른 무게회수율과 잔류고체의 성분, 그리고 72 h 가수분해도 및 탈리그닌 정도의 변화가 도시되어 있다. 반응시간이 증가함에 따라 무게회수율과 헤미셀룰로우스와 리그닌의 함량은 감소하고 가수분해반응도는 증가하여 최대 90%까지 도달함을 알 수 있다. 위의 결과부터 효소 가수분해도가 리그닌과 헤미셀룰로우스의 제거 정도에 따라 현저하게 개선되는 것으로 알려진 기존의 연구결과[7-9]를 확인할 수 있었다.

Table 1. Effects of reaction temperature and time on composition of ARP-pretreated rice straw residues

Temp, C	Reaction Time, min	Solid remaining, %	Glucan, %	Xylan, %	Lignin, %	Delignification, %	Digestibility
Untreated		100.00	37.30	17.10	17.90		29.63
150	10	72.77	36.92	14.93	11.87	33.69	63.52
	20	55.53	33.37	10.61	5.83	67.43	85.26
	30	56.35	33.70	10.87	5.47	69.47	87.61
	60	48.21	31.48	9.02	3.91	78.18	88.85
	90	47.92	32.84	9.78	3.07	82.86	86.94
170	10	48.86	27.33	8.07	7.97	55.47	64.66
	20	45.81	28.30	7.97	5.94	66.79	68.15
	30	44.69	28.96	7.02	4.53	74.67	81.05
	60	43.09	30.73	6.64	3.75	79.05	80.29
	90	40.59	28.80	6.22	3.57	80.03	90.13
190	10	51.16	29.91	3.27	14.82	17.16	27.08
	20	41.42	25.52	1.62	11.81	34.03	33.52
	30	46.67	31.95	1.54	10.51	41.29	36.99
	60	38.70	28.45	2.55	9.97	61.07	47.30
	90	41.40	32.31	2.98	6.87	61.63	47.33

Notes. 1. All sugars and lignin contents are based on the oven-dry untreated sample
 2. Pretreatment conditions: 15 wt% ammonia, 5 mL/min of flow rate, 2.3 Mpa
 3. Enzymatic hydrolysis: 72 h, 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188, pH=4.8, 150 rpm
 4. Klason lignin

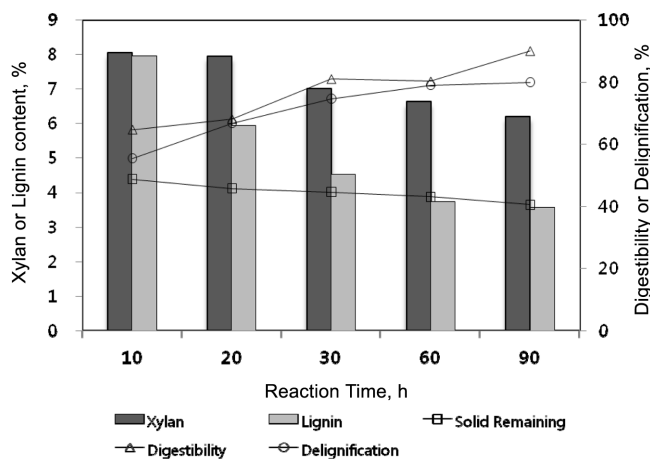


Fig. 1. Effect of reaction time on solid composition, digestibility and delignification for ARP-pretreated rice straw. All sugars and lignin content are based on the oven-dry untreated biomass. Pretreatment conditions are 15 wt% ammonia, 170 °C, 5 mL/min of flowrate and 2.3 MPa. Enzymatic conditions are 72 h, 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188, pH=4.8, 50 °C, and 150 rpm.

Fig. 2에는 여러 반응온도에서 30분 동안 전처리한 시료를 이용하여 효소 가수분해를 수행한 결과를 반응시간에 따라 도시하였다. 모든 경우에 전처리하지 않은 경우보다 높은 가수분해도를 나타냈으며 전처리 온도가 낮을수록 높은 가수분해도를 나타내었다. 150 °C와 170 °C의 경우에는 초기반응속도는 비슷하였으나, 72 h가 가수분해도에서는 150 °C인 경우가 가장 높은 값을 보였다. 그러나 190 °C의 경우에는 이보다 훨씬 낮은 초기반응속도와 가수분해도를 나타내었다. 전처리하지 않은 시료에 비해 초기반응속도와 가수분해도의 향상이 그다지 두드러지지 않았다. 이것은 반응온도가 너무 높으면 헤미셀룰로우스가 autohydrolysis 반응에 의해 분해되어 제거되지만 리그닌은 재응축되어 불용성 착화합물을 형성하게 되어 효

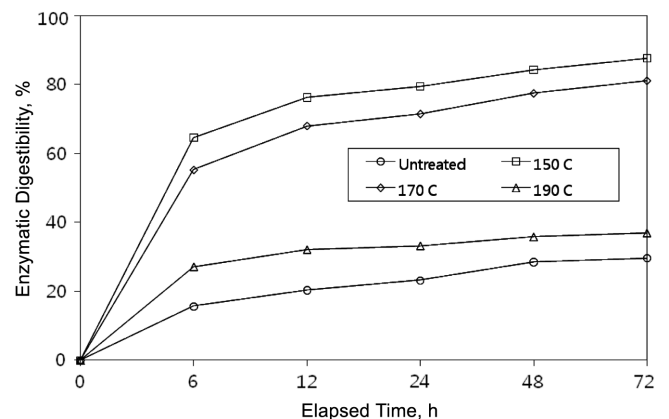


Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of ARP-pretreated rice straw at various reaction temperatures for 30 min with 15 wt% ammonia with 5 mL/min of flowrate under 2.3 Mpa. Enzymatic hydrolysis conditions are 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188 enzyme loading, pH=4.8, 50 °C and 150 rpm.

과적으로 제거되지 않을 뿐 아니라 효소를 비가역적으로 흡착하여 유효효소의 양을 감소시키고 전처리 후에 남은 glucan의 잔류량도 현저하게 낮아지기 때문으로 보인다. 따라서 벚짚에 대한 ARP 공정은 150 °C에서 가장 효율적으로 적용되는 결과를 얻었다.

적절한 전처리 시간을 알아보기 위해 150 °C에서 여러 반응시간 동안 전처리한 시료를 이용하여 가수분해반응을 수행하여 그 결과를 Fig. 3에 도시하였다. 확실한 구별을 위하여 30분과 60분의 경우만 비교하여 나타내었다. 이 결과로부터 반응시간이 30분 이상이 되면 더 이상 72 h 가수분해도에 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. 일반적으로, 가수분해는 효소가 섬유소에 접근하는 용이성에 의해 결정된다고 알려져 있다. 사실, 전처리 과정을 거쳐 비결정성 헤미셀룰로우스와 리그닌을 제거하면 결정성 섬유소의 노출이 증대되어 효소의 결합이 용이해진다[8-10]. Table 1에서 보는 바와 같이

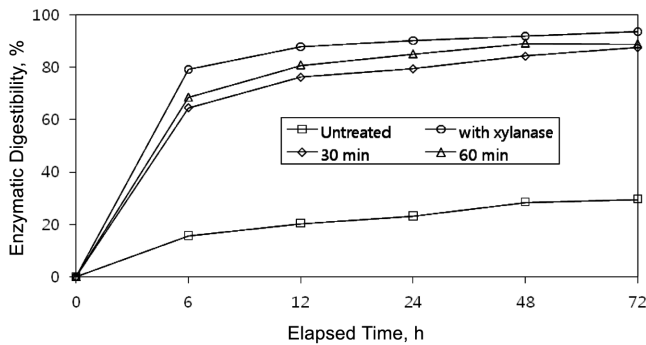


Fig. 3. Enzymatic digestibility of untreated and ARP-treated rice straw samples. Pretreatment conditions are 15 wt% ammonia with 5 mL/min of flowrate at 150 °C and 2.3 Mpa. Reaction times are indicated in legend. Enzymatic hydrolysis conditions are 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188 enzyme and Multifect xylanase with a protein content of 43.7 mg/mL loading, pH=4.8, 50 °C and 150 rpm. In the experiment for the effect of xylanase addition, rice straw ARP-treated at 150 °C for 20 min was used.

150 °C 정도의 낮은 반응온도의 ARP 공정에서는 리그닌은 효과적으로 제거되지만 60% 이상의 헤미셀룰로오스가 잔류하게 되어 효소 가수분해반응을 저해하는 요인으로 작용할 수 있다. 실제로 50% 이상의 헤미셀룰로오스가 제거되어야 섬유소의 효소 가수분해도가 현저하게 개선된다고 알려져 있다[15, 16]. 잔존하는 헤미셀룰로오스가 가수분해반응에 미치는 영향을 알아보기 위해 효소 가수분해반응 실험에 셀룰라제와 함께 자일라나제(Multifect, Genencor)를 투입하여 반응을 진행시킨 결과를 Fig. 3에 비교하여 도시하였다. 150 °C에서 20분간 전처리한 시료에 셀룰라제와 더불어 자일라나제를 함께 투입하여 가수분해를 진행하였다. 그림에서 보는 바와 같이 같은 온도에서 60분 이상 전처리한 시료(72 h 가수분해도가 86.84%)보다 높은 가수분해도(93.16%)를 보였다. 이로써 리그닌뿐만 아니라 헤미셀룰로오스의 충분한 제거도 가수분해반응을 한결 촉진시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

전처리에 사용되는 암모니아의 농도에 따른 영향을 알아보기 위해 반응온도와 반응시간 그리고 반응기 내로의 주입속도를 각각 170 °C, 30분 그리고 5 mL/min로 고정하고 암모니아 농도를 0~20% 사이에서 변화시켜 가면서 전처리된 시료들의 효소 가수분해반응을 수행하였다. 전처리된 시료의 조성은 Table 2에 수록하였으며 가수분해반응의 경과를 Fig. 4에 도시하였다. 암모니아의 농도가 높을수록 72 h 가수분해도가 증가하였으나, 15% 이상의 농도에서는 뚜렷한 향상이 관찰되지 않았다(15%인 경우 79.15%, 20%인 경우 77.33%).

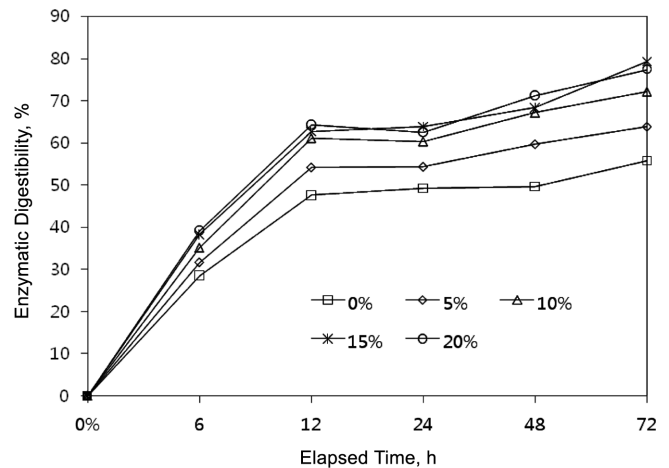


Fig. 4. Effect of ammonia concentration on enzymatic digestibility of ARP-treated rice straw. Pretreatment conditions are 170 °C, 5 mL/min of flow rate and 2.3 Mpa. Ammonia concentrations are indicated in legend. Enzymatic hydrolysis conditions are 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188 enzyme loading, pH=4.8 and 150 rpm.

따라서, 벚짚의 경우에도 다른 목질계 바이오매스의 경우와 마찬가지로 전처리에 가장 효과적인 암모니아 농도는 15 wt%임을 확인할 수 있었다[7-11].

3-2. 동시당화발효 공정(SSF)

효소 가수분해반응에는 그 생성물인 cellobiose와 glucose이 방해제로 작용한다. 이러한 문제를 극복하려는 노력 중 하나가 동시당화발효공정(SSF, Simultaneous Saccharification and fermentation)이다. SSF 공정에서는 한 반응기 내에서 당화와 발효가 동시 진행되어 cellobiose와 glucose가 가수분해에 의해 생성되는 즉시 미생물에 의한 발효되어 소모되기 때문에 가수분해반응이 방해받지 않게 된다. 따라서 가수분해반응과 발효를 별개로 진행하는 경우(SHF, Separate Hydrolysis and Fermentation)에 비해 중간 이송이나 분리단계가 생략되어 바이오 에탄올의 생성 속도가 빠를 뿐 아니라 수율도 높다.

본 연구에서 사용한 발효 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* D₅A 이었으며 YP 배지(1%의 yeast extract와 2%의 peptone이 포함됨)에서 활성화시켜 사용하였다. 250 mL의 삼각플라스크에 전체 부피 100 mL에 3%w/v의 glucan이 포함되도록 바이오매스를 정량하여 투입하였다. 15 FPU/g-glucan의 셀룰라제와 30 CBU/g-glucan의 β-glucosidase를 첨가하고 완충용액을 이용하여 초기 pH가 5가 되도록 하여 150 rpm으로 교반되는 진탕반응기에 장착하여 무산소 조

Table 2. Effect of ammonia concentration on solid composition of ARP-pretreated Rice straw

Ammonia Conc, wt%	Glucan, %	Xylan, %	Lignin, %	Acetic acid, %	Digestibility
0	47.8	20.3	25.29	2.4	55.73
5	57.3	19.5	12.47	1.8	63.76
10	58.8	19.1	13.38	2.7	72.12
15	60.6	18.1	10.95	2.5	79.15
20	61.8	15.9	10.81	2.3	77.33

Notes 1. All sugars and lignin contents are based on the resulting dry solid.

2. Pretreatment conditions: 170 °C, 5 mL/min of flow rate, 2.3 Mpa

3. Enzymatic hydrolysis: 72 h, 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188, pH=4.8, 150 rpm

4. Klason lignin

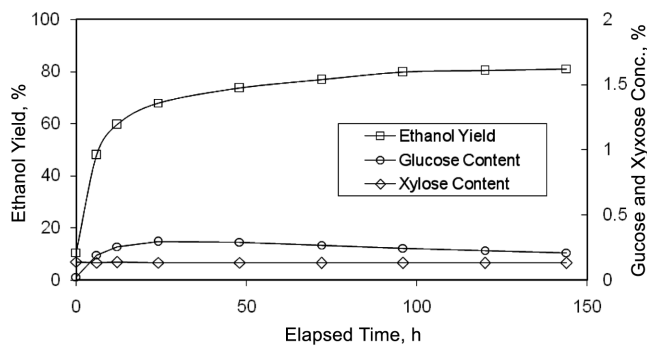


Fig. 5. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of ARP-pretreated rice straw by D₅A yeast. The sample was pretreated at 150 °C for 30min with 5.0 mL/min flowrate of 15 wt% ammonia. SSF test conditions are 15 FPU/g-glucan Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan Novozyme 188 enzyme loading, D₅A yeast in YP medium (1% of yeast extract, 2% of peptone), anaerobic condition, pH=5, 38 °C, and 150 rpm.

건에서 반응을 진행시켰으며 주기적으로 시료를 채취하여 Aminex HPX 87P 컬럼이 장착된 HPLC를 이용하여 당과 에탄올 함량을 분석하였다.

Fig. 5에는 150 °C에서 30 min 동안 15 wt%의 암모니아로 전처리된 시료를 사용하여 수행한 SSF 실험의 결과를 나타내었다. 앞서 설명한 바와 같이 가수분해에서 생성된 cellobiose와 glucose는 즉시 발효균주에 의해서 발효되어 반응기 내에는 아주 작은 양의 glucose만 잔존함을 보여주고 있다. 성장기를 지난 발효균주는 24시간이 지나면서 가수분해에 의한 생성속도보다 더 빨리 소모하기 시작하면서 glucan의 농도가 아주 낮아짐을 볼 수 있다. 따라서 가수분해반응이 생성물에 방해받지 않고 있으며 전체적으로는 발효과정이 율속단계임을 알 수 있다. 반면, xylose의 농도는 실험 전반에 걸쳐 거의 일정한 수준의 농도를 유지하고 있어 발효균주가 xylose에 대해서는 효과적으로 작용하지 않음을 나타내고 있다. 144 h 후의 에탄올 수율은 초기의 glucan을 기준으로 약 81%의 수율을 나타냈으며, 이는 에탄올 생성량으로 환산하면 약 13.8 g/L에 해당된다.

3-3. 동시당화공동발효공정(SSCF)

목질계 바이오매스로부터의 에탄올 수율을 높이는 한가지 방법으로, 미생물을 이용한 혼합당(주로 glucose와 xylose)의 발효를 가수분해반응과 같이 동시에 진행시키는 공정이 동시당화공동발효공정(SSCF, Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation)이다. 이 공정에서는 미생물에 의해 6탄당(hexose)뿐만 아니라 5탄당(pentose)도 동시에 발효되어 에탄올로 전환되므로 높은 수율과 빠른 반응속도를 기대할 수 있다.

본 시험에서 사용한 미생물은 지금까지 두 가지 당을 발효시킬 수 있는 것으로 잘 알려진 대표적인 재조합 *E. coli* ATCC 55124 (KO11)이다. -20 °C로 보관된 미생물을 해동하여 LB배지(0.5% of yeast extract, 1% of peptone)에서 활성화시킨 후 사용하였다. 250 mL 플라스크에 15 FPU/g-glucan의 Spezyme CP와 30 CBU/g-glucan의 Novozyme 188, 그리고 전처리된 시료가 전체 100 mL 중 3%w/v가 되도록 정량하여 투입하고 나머지 부피는 0.05 M sodium citrate buffer로 채운 뒤, 38 °C, 150 rpm으로 유지되는 진탕배양기(New Brunswick Scientific, Innova-40480)에 장착하였다. 150 °C에서 30 min

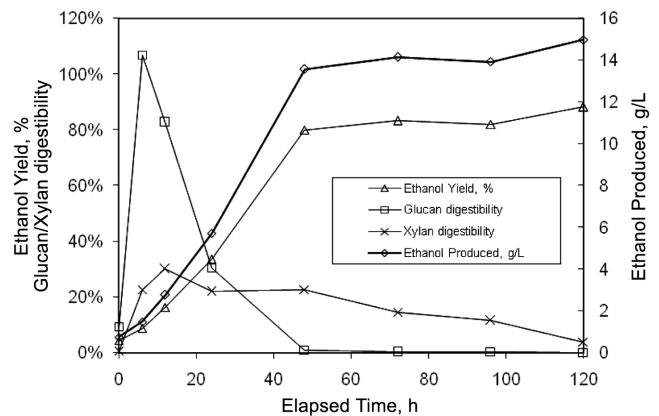


Fig. 6. Simultaneous saccharification and co-fermentation(SSCF) of ARP-pretreated rice straw by recombinant *E. coli*(KO11). The sample was pretreated at 150 °C for 30 min with 5.0 mL/min flowrate of 15 wt% ammonia. Substrate : 3% w/v glucan loading/100 mL working volume. SSF test conditions are 15 FPU/g-glucan of Spezyme CP, 30 CBU/g-glucan of Novozyme 188 enzyme loading, *Escherichia coli* ATCC 55124 in LB medium (0.5% of yeast extract, 1% of peptone), anaerobic condition, pH=5, 38 °C, and 150 rpm.

동안 15 wt% 암모니아로 전처리된 시료를 기질로 사용하였다. 실험은 활성화된 균주를 기질에 접종하여 무산소조건에서 진행하였으며 주기적으로 시료를 채취하여 각종 당과 생성된 에탄올을 Aminex HPX 87P 컬럼이 장착된 HPLC를 이용하여 분석하였다.

Fig. 6에 도시된 SSCF 실험의 결과에는 에탄올 수율, 생성된 에탄올의 양, 그리고 glucan과 xylan의 가수분해도가 나타나 있다. 투입한 바이오매스 중 33.70%가 glucan이고 10.87%가 xylan으로, 발효에 사용이 가능한 탄소원은 약 38.6 g/L가 된다. 최대 에탄올 농도는 120 h에 약 15.2 g/L의 값으로 나타났으며 이는 최대이론값의 약 89%에 해당한다. 위에서 서술한 SSF 실험의 결과와 비교하여 비례 약 10%의 높은 수율을 얻을 수 있었다. 이는 발효에 glucan뿐만 아니라 xylan까지 활용되는 SSCF 공정의 장점을 잘 나타내는 결과이다.

Fig. 6에는 SSCF 실험과정에 전반에 걸친 glucan과 xylan의 가수분해도가 함께 나타나 있다. 미생물의 성장기인 SSCF 공정의 초기에는 매우 빠른 glucan의 가수분해반응 속도를 보이다가 40 h 이후에는 거의 반응이 멈춘 것으로 보인다. 이는 반응시간이 지남에 따라 가수분해반응에 의해 생성되는 glucose는 즉시 미생물에 의해 소모되기 때문이다. 따라서 이 단계에서는 효소 가수분해반응이 율속단계로 작용함을 알 수 있다. 한편, 실험전반에 걸쳐 Xylan의 농도가 거의 일정하게 유지되는 SSF 공정과는 달리 SSCF 공정에서는 xylan도 소모되고 있음을 보여주고 있다. 또한 미생물은 glucose를 완전히 소모한 후 비로소 대사작용을 통하여 에탄올을 생성하고 있음을 보여주고 있다[21].

4. 결 론

본 연구에서는 바이오 에탄올 생산을 위한 볏짚의 전처리에 암모니아 재순환 침출공정(ARP, Ammonia Recycled Percolation) 공정을 적용하여 타당성을 조사하였다.

암모니아의 농도를 15 wt%, 주입유량을 5 mL 하였을 때 150 °C와

170 °C 사이에서는 반응온도가 높을수록, 또한 반응시간이 길수록 헤미셀룰로우스와 리그닌의 제거율이 높았으며 그에 따라 효소 가수분해도(63~90%)도 향상되었다. 리그닌 제거율은 30~83%, 헤미셀룰로우스 제거율은 10~60%이었다. 30 min 정도의 짧은 반응시간 내에 대부분의 리그닌과 헤미셀룰로우스가 제거되었다. 그러나 온도가 190 °C 이상에서는 같은 반응시간인 경우 낮은 반응온도에 서보다 리그닌의 제거율(10~60%)과 가수분해도(27~47%)가 현저하게 낮았다. 이것은 높은 반응온도에서는 리그닌이 재응축하여 불용성 착화합물 형성하거나 탄수화물에 단단히 결합하여 효소와의 접촉을 방해하고 효소가 비가역적으로 흡착되어 유효효소 양이 감소하기 때문으로 보인다. 조사된 실험범위 안에서는 약 30~60%의 무게손실이 발생하였으며 잔류 glucan은 약 75~99%이었다. 최대 가수분해도는 170 °C에서 90 min 동안 전처리한 시료의 경우로 약 90%에 달하였다. 가수분해도에 대한 암모니아 농도의 영향에 관한 실험에서는 15 wt%인 경우가 가장 효과적이었으며 셀룰라제와 자일라나아제를 함께 투입한 가수분해반응 실험의 결과로부터 효소 가수분해는 리그닌뿐만 아니라 헤미셀룰로우스에 의해서도 영향을 받기 때문에 헤미셀룰로우스를 추가적으로 제거하면 가수분해도가 현저하게 개선될 수 있음을 알 수 있었다.

동시당화발효실험에서는 13.8 g/L 에탄올이 생성되었으며 이는 초기 glucan 양을 기준으로 하여 약 81%의 수율을 나타낸다. 동시당화공동실험에서는 15.2 g/L의 에탄올 생성과 89%의 수율을 나타내어 동시당화발효의 결과보다 약 10%의 향상을 보였다.

감 사

본 연구는 2005년 전남대학교 연구년연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Szczodrack, J. and Fiedurek, J., "Technology for Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol," *Biomass and Bioenergy*, **10**, 367(1996).
2. Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G. and Faaij, A. PC., "Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-economic Performance in Short-, -Middle, and -Long Term," *Biomass and Bioenergy*, **28**, 384(2005).
3. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R. and Lee, Y. Y., "Comparative Sugar Recovery Data from Laboratory Scale Application of Leading Pretreatment Technologies to Corn Stover," *Biores. Technol.*, **96**, 2026-2032(2005).
4. Dale, B. E., Henk, L. L. and Shiang, M., "Fermentation of Lignocellulosic Materials Treated by Ammonia Freeze-explosion," *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 223-233(1984).
5. Wright, J. D., "Ethanol from Biomass by Enzymatic Hydrolysis," *Chem. Eng. Prog.*, **84**, 62-74(1998).
6. Sanchez, O. J. and Cardona, C. A., "Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol from Different Feedstocks," *Biores. Technol.*, **99**, 5270-5295(2008).
7. Kim, T. H., Kim, J. S., Kim, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Biores. Technol.*, **90**, 39-47(2003).
8. Zhu, L., O'Dwyer, J. P., Chang, V. S., Granda, C. B. and Holtzapple, M. T., "Structural Features Affecting Biomass Enzymatic Digestibility," *Biores. Technol.*, **99**, 3817-3828(2008).
9. Sun, Y. and Cheng, J., "Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review," *Biores. Technol.*, **83**, 1-11(2002).
10. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M. and Ladisch, M., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Biores. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
11. Oh, K. K., Hong, S. I. and Lee, Y. Y., "Optimization of Ammonia Recycled Percolation Process for Lignocellulosic Biomass Pretreatment," *HWAHAK KONGHAK*, **36**, 784-791(1998).
12. Ohgren, K., Bura, R., Saddler, J. and Zacchi, G., "Effect of Hemicellulose and Lignin Removal on Enzymatic Hydrolysis of Steam Pretreated Corn Stover," *Biores. Technol.*, **98**, 2503-2510(2007).
13. Yoon, H. H., Wu, Z. W. and Lee, Y. Y., "Ammonia-recycled Percolation Process for Pretreatment of Biomass Feedstock," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **51-52**, 5-19(1995).
14. Iyer, P. V., Wu, Z. W., Kim, S. B. and Lee, Y. Y., "Ammonia Recycled Percolation Process for Pretreatment of Herbaceous Biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57-58**, 121-132(1996).
15. Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Park, S. C., "Pretreatment of Wastepaper and Pulp Mill Sludge by Aqueous Ammonia and Hydrogen Peroxide," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84-86**, 129-139(2000).
16. Grohmann, K., Mitchell, D. J. and Himmel, M., "Dilute Acid Pretreatment of Biomass at High Solid Concentration," *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **17**, 135-151(1986).
17. Karimi, K., Emtiazi, G. and Taherzadeh, M. J., "Ethanol Production from Dilute-acid Pretreated Rice Straw by Simultaneous Saccharification and Fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*," *Enzyme and Microbial. technol.*, **40**, 30-44(2006).
18. Genco, J. M., Miller, W., Zou, H., Cole, B. J. W. and Liukkonen, A., *Effect of Kraft Pulping on Oxygen Delignification Kinetics*, Tappai press, **1**, 427-442(1997).
19. Lora, J. H. and Wayman, M., "Delignification of Hardwoods by Autohydrolysis and Extraction," *Tappai*, **61**, 47-50(1978).
20. Karlsson, O., "The Significance of Glucomannan for the Condensation of Cellulose and Lignin Under Kraft Pulping Conditions," *Nordic Pulp & Paper Research J.*, **12**, 203-206(1997).
21. Dien, B. S., Hespell, R. B., Wyckoff, H. A. and Bothast, R. J., "Fermentation of Hexose and Pentose Sugars Using a Novel Ethanologenic *Escherichia Coli* Strain," *Enzyme Microbial. Technol.*, **23**, 366-371(1998).