

바이오에탄올 생산을 위한 암모니아수에 의해 전처리된 볏짚의 효소당화 특성

박용철 · 김준석[†]

경기대학교 화학공학과
443-760 경기도 수원시 영통구 의의동 산94-6
(2010년 11월 29일 접수, 2010년 12월 18일 채택)

Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Pretreated Rice Straw By Aqueous Ammonia for Bioethanol Production

Yong Cheol Park and Jun Seok Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University
94-6, Yiui-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi 443-760, Korea
(Received 29 November 2010; accepted 18 December 2010)

요 약

볏짚은 한국에서 매년 대량 생산되는 주요 작물이다. 침지공정을 이용한 목질계 바이오매스의 전처리는 대기압과 60 °C의 온도에서 온화한 조건에서 수행되었다. 본 연구에서는 전처리된 바이오매스의 효소당화 조건을 찾아보았다. 볏짚의 경우에 이전의 목질계 바이오매스와 비교하여 당화시간이 다른 것들보다 짧은 것으로 나타났다. SAA(Soaking in Aqueous Ammonia) 전처리 볏짚의 당화는 40~48시간 사이에 종료가 되었고 50 °C에서 높은 글루코스 전환율을 나타냈다. 글루코스 전환율은 효소사용량이 각각 65 FPU/ml과 32 CbU/ml일 때 높았다. 기질 농도가 5%(w/v)일 때 전환율은 72시간 동안 당화 후에 83.8%로 나타났다. SAA 전처리 볏짚의 동시당화발효(SSF; Simultaneous Saccharification and Fermentation) 실험에서는 40 °C에서 높은 에탄올 생산수율을 보였다. 그때의 수율은 48시간에서 33.05%로 나타났다.

Abstract – Rice straw is the main grain straw and is produced in large quantities every year in Korea. Pretreatment of lignocellulosic biomass using soaking process was carried out mild conditions at atmospheric pressure and temperature of 60 °C. We found enzymatic hydrolysis condition of pretreated biomass. In case of a rice straw, compared with previous lignocellulosic biomass, we found that hydrolysis time was a shorter than others. Hydrolysis of SAA-treated rice straw has shown conversion rate was higher at 50 °C. Hydrolysis was ended between 40~48 hour. Glucose conversion rate was higher when enzyme loading is 65 FPU/ml and 32 CbU/ml. When substrate concentration was 5%(w/v), it was that conversion rate was 83.8% after hydrolysis for 72 hr. In simultaneous saccharification and fermentation(SSF) experiment about SAA-treated rice straw, ethanol productive yield was highest from 40 °C. The yield of that time was 33.05% from 48 hour.

Key words: Pretreatment, SAA, Rice Straw, Enzymatic Hydrolysis, Bio Ethanol

1. 서 론

바이오매스 에너지는 현재 연간 45±10 EJ에 해당하는 세계 에너지 공급의 9~13%를 기여한다[1,2]. 바이오매스 에너지는 전통적인 사용(예를 들면, 요리와 난방을 위한 땔감)과 현대적인 사용(예를 들면, 전기와 증기 그리고 액체 바이오연료 생산) 둘 다 포함한다. 현대적인 방법에서의 바이오매스 에너지의 사용은 나머지가 전통적인 사용되는 동안에 년 7 EJ로 추정된다. 바이오매스 에너지는 재생

가능 자원에서 시작되며 공급원료는 지속적으로 생산할 수 있다[2].

볏짚은 전세계에서 가장 많은 농업폐기물이고 그 양은 매년 약 7~8억톤으로 추산되고 있다. 이 바이오매스의 대부분은 아시아에 있고 전세계 생산량의 90%를 차지하고 있다. 따라서 볏짚은 아시아의 바이오연료 생산을 위한 우선 공급원료로서 잠재력이 있을 것으로 생각된다[2,3].

지구상에서 가장 풍부한 재생 가능한 자원인 목질계 바이오매스는 오랫동안 연료와 화학물질을 생산하고 있다. 현재 세계에 공급되는 대부분의 에탄올은 설탕과 옥수수로부터 생산되는 당분질계 혹은 전분질계 에탄올이다. 그러나 기존 바이오 에탄올의 주된 원료가 되어 온 제1세대 바이오매스와 그 대체 원료인 제2세대 바이오매스는

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jskim84@kyonggi.ac.kr

[‡]이 논문은 고려대학교 홍석인 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

각각 그들이 가지고 있는 문제점에 당면해 있다. 제1세대 바이오매스는 식량 고갈문제로 인한 장기적인 관점에서의 원료수급의 불안정으로 인한 원료비 상승과 원료확보의 문제점이 나타났으며 궁극적으로 이들 바이오매스로부터 생산되는 에탄올로 전 세계가 필요로 하는 에탄올 수요량을 충족시킬 수 없다는 것이다. 그리고 이러한 문제점의 대안인 제2세대 바이오매스 중 목질계 바이오매스의 문제점은 리그닌 제거 과정인 전처리 공정으로 인한 생산비용의 상승과 함께, 낮은 생산성의 문제로 이어져 제1세대 바이오매스와 비교하였을 때 경제성이 낮아 여러 가지로 개선해야 할 부분이 존재한다. 목질계 바이오매스는 자연적으로 효소당화에 적용하기 어려운 까닭에 전처리는 효소당화를 하여 당을 얻기 위해서는 필수적인 과정이라고 할 수 있다[4-8]. 전처리는 목질계 기질의 생물학적 전환에 필수적인 요소이다. 묽은 황산에 의한 바이오매스의 처리는 널리 목질계 물질의 전처리와 가수분해에 사용된다. 연속반응기에서 수행할 때 산처리는 상대적으로 짧은 체류 시간을 요구한다. 따라서 반응기에서 산분산 및 바이오매스로의 산 촉매의 침투는 전반적인 반응에 상당히 영향을 미칠 수 있다[9]. 묽은 황산 전처리는 부분적으로 헤미셀룰로오스와 리그닌 사이의 보호막을 제거하고 섬유유의 내부 표면적을 확대시킨다. 또한, 셀룰로오스의 효소 소화가 좀 더 용이하게 만들고 결정성을 감소시킨다. 묽은 황산 전처리의 장점으로는 높은 반응속도, 낮은 산 소비 그리고 상대적으로 낮은 황산 비용을 들 수 있다[10]. 암모니아는 전처리 시약으로 바람직한 특성을 가지고 있는데 그것은 목질계 재료에 대해 효과적인 팽윤 시약이며 탄수화물과 리그닌과의 반응에 높은 선택도를 가지고 있다. 또한 높은 휘발성으로 쉽게 회수하고 재사용할 수 있다. 목질계 바이오매스의 주요 성분인 리그닌과 그 부산물은 미생물에 독성물질로 작용하며 효소당화에 저해물질로 작용한다. 바이오 에탄올 생산을 위한 미생물 활동과 효소당화효율을 향상시키기 위해서는 리그닌의 함유량을 낮춰야 한다[11]. 전처리 시약으로서 암모니아는 바이오매스의 팽윤 뿐만 아니라 효과적인 탈리그닌에 대해 많은 장점을 가지고 있다. 암모니아수를 사용하는 전처리 방법은 에탄올 생산을 위해 연구되었다. 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실을 최소화할 수 있다[12-15].

이 연구는 에탄올 생산을 위한 전처리 방법 중에서 암모니아수에 의한 침지공정(SAA; Soaking in Aqueous Ammonia)을 이용하여 전처리된 볏짚의 주요 당화변수인 온도조건, 기질농도 및 효소의 적용효과를 확인하고자 하였다.

2. 실험방법

2-1. 재료

본 연구에서는 주요기질로 50~100 mesh의 크기로 분쇄된 볏짚을 사용하였다. 이 기질은 38.4%의 글루칸(Glucan), 17.9%의 자일란(Xylan) 그리고 12.4%의 클라손리그닌(Klason lignin)으로 구성되어 있다. 볏짚은 한국 에너지 기술연구소(KIER; Korea Institute of Energy Research)로부터 공급받았다. 실험에서는 기질의 비교군으로 알파셀룰로오스를 사용하였다. 이것은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich Co.)로부터 구입하였다. 효소당화를 위하여 Celluclast 1.5L(Cellulase, Novo Co., Denmark)과 Novozyme-188(β -glucosidase, Novo Co., Denmark)를 사용하였다. 이 효소들은 한국 에너지 기술연구소(KIER; Korea Institute of Energy Research)로부터 공급받았다.

2-2. 전처리

볶짚은 16%(v/v) 암모니아수에 의한 침지공정(SAA; Soaking in Aqueous Ammonia)으로 전처리하였다. 실험은 기질과 용액을 1:10의 비율로 혼합하여 24시간 동안 진탕배양기에서 반응시켰다. 그때의 반응 온도는 60 °C로 설정하였다. 전처리가 끝난 후에 깨끗한 물로 세척 후에 45 °C의 오븐에서 건조하여 잔류 수분을 제거하였다[12,13,15].

2-3. 효소당화

전처리된 볏짚의 당화는 삼각플라스크에서 진행하였다. 당화는 전처리된 기질을 삼각플라스크에 넣고 sodium citrate buffer solution (0.5M, pH 4.8)와 혼합한 후에 180 rpm의 진탕 배양기에서 진행하였다. 당화 조건은 온도가 30~50 °C, 기질 농도가 3~15 %(w/v)이었다. 효소는 Celluclast 1.5 L(10~65 FPU/ml)과 Novozyme-188(1~32 CbU/ml)을 사용하였다.

2-4. 분석방법

2-4-1. 당과 리그닌 성분 분석

당성분들은 미국 신재생 에너지 연구소(NREL)에서 제시한 NREL procedures LAP-002에 제시된 방법으로 성분을 분석하였다. 샘플을 황산(72%)에 넣고 30 °C에서 2시간 동안 1차 산 가수분해를 시킨 뒤에 희석한 후 1시간 동안 121 °C에서 2차 가수분해를 하였다. 가수분해된 액체를 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량분석을 수행하였다. 리그닌 성분은 NREL procedures LAP-003에서의 방법으로 분석하였다. 샘플은 황산(72%)에 넣고 20 °C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤에 황산(3%)에서 4시간 동안 끓였다. 그 이후에 용해되지 않은 잔여물을 측정하여 리그닌 성분을 계산하였다[16].

2-4-2. HPLC 분석

시료의 성분분석과 당화액 그리고 발효액의 분석은 HPLC(Waters, USA)를 사용하였다. 성분분석에 사용된 Column은 Biorad사의 Aminex HPX-87P column이고 당화액 및 발효액의 분석은 같은 회사 제품인 Aminex HPX-87H으로 하였다. 검출에 사용된 Detector는 Waters 410 RI detector(Waters, USA)를 사용하였다. 이동상은 5 mM의 H_2SO_4 를 사용하였고 유속을 0.6 ml/min으로 운전하였다. 각 column과 detector의 온도는 HPX-87H는 60 °C, HPX-87P는 85 °C 그리고 RI detector는 50 °C이었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 볏짚의 전처리

암모니아수에 의한 침지공정으로 볏짚의 전처리를 수행하였다. 볏짚과 암모니아수를 1:10의 비율로 Fig. 1과 같이 바이알에 넣고 밀봉하여 60 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 전처리 후의 볏짚은 깨끗한 물로 수 차례 세척 후에 45 °C의 오븐에서 건조시켰다. 전처리된 볏짚은 NREL 분석법으로 성분을 분석하였다. 전처리 전후 볏짚의 성분은 Fig. 2에서 나타내었다. 전처리 볏짚을 구성하는 3성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 그리고 리그닌 성분의 변화를 보면 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 거의 손실이 일어나지 않았다. 그러나 리그닌 성분의 경우에는 66%가 감소된 것을 보이고 있다. 이것은 효소당화에서도 영향이 있을 것으로 예상된다. 다만 에탄올로 전환이 가능한 셀룰로오스 성분은 거의 손실이 없이 보존되는 것으로 보이고

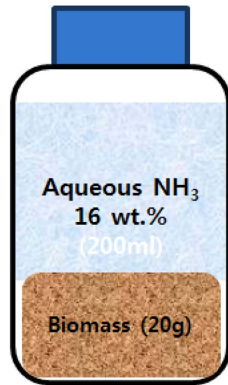


Fig. 1. Soaking in Aqueous Ammonia system.

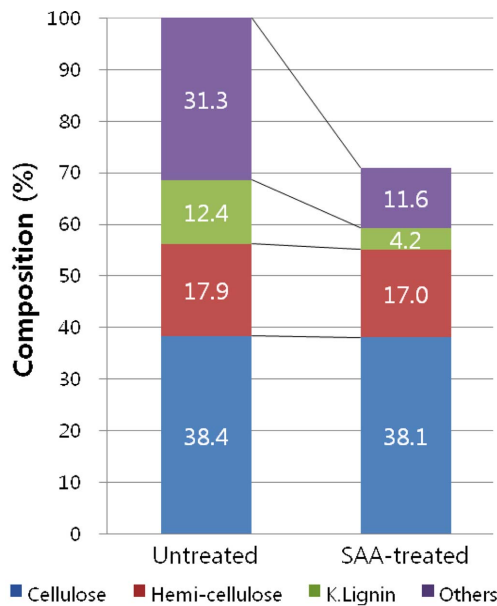


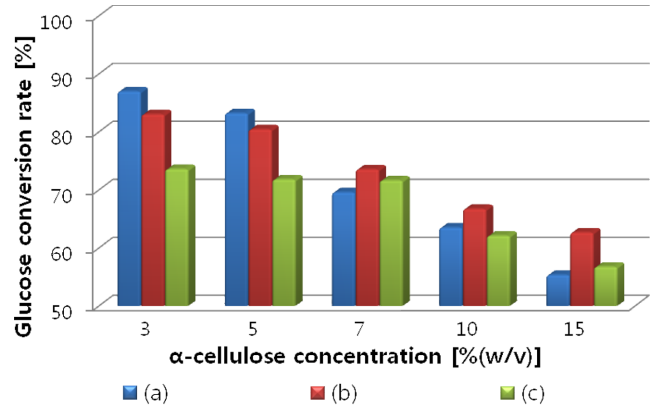
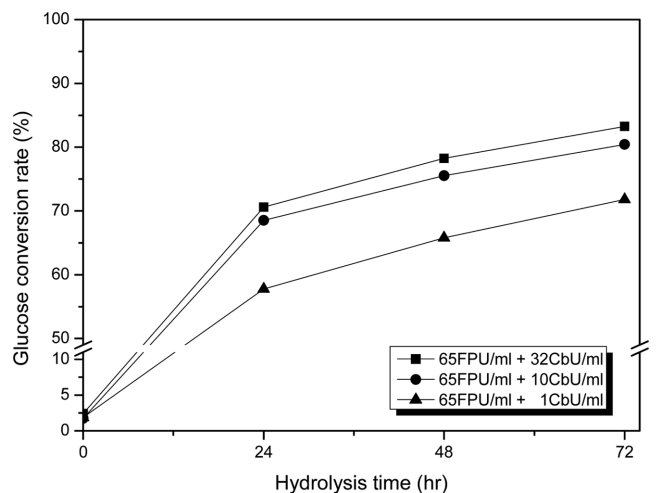
Fig. 2. Major compositions of untreated and SAA-treated rice straws.

또한 헤미셀룰로오스 성분도 크게 손실되지 않아서 충분한 활용가능성이 있을 것으로 예상된다.

3-2. 알파셀룰로오스의 효소당화

글루코스 전환율은 바이오매스의 기질농도에 따라서 변화한다. 기질농도와 효소량의 상관관계를 알아보기 위하여 알파셀룰로오스를 기질로 한 실험을 진행하였다. 알파셀룰로오스를 삼각플라스크에 넣고 sodium citrate buffer solution(0.5 M, pH 4.8)에 3~15%(w/v)의 농도로 효소당화를 하였다. 효소는 cellulase를 65 FPU/ml로 고정시키고 β -glucosidase를 1~32 CbU/ml의 농도를 사용하였다. 당화는 50 °C에서 72시간 동안 진탕 배양기에서 180 rpm의 속도로 진행하였다.

Fig. 3에 따르면 글루코스 전환율은 기질의 농도가 낮을수록 높게 나타났다. 플라스크 상의 당화실험이기 때문에 기질의 농도가 높은 경우에는 효소와 기질의 균일한 혼합이 이루어지지 않아서 낮은 전환율을 보였다. 3%(w/v)와 5%(w/v)의 경우에는 기질의 농도에 크게 영향을 받는 것처럼 보이지 않는다. 그러나 7%(w/v)를 넘어서면 효소가 기질과 효율적으로 반응하지 못한다고 볼 수 있다. 기질농도 5%(w/v)의 글루코스 전환율을 β -glucosidase의 사용량별로 보면 32,

Fig. 3. Effect of enzyme loading on the enzymatic hydrolysis of α -cellulose at 72 hr. Substrate concentration 3~15%(w/v), pH 4.8, temperature 50 °C (a) 65FPU/ml + 32CbU/ml (b) 65FPU/ml + 10CbU/ml (c) 65FPU/ml + 1CbU/ml.Fig. 4. Effect of enzyme loading on the enzymatic hydrolysis of α -cellulose at substrate concentration 5% (w/v). pH 4.8, temperature 50 °C.

10 그리고 1 CbU/ml의 경우에 각각 83.2, 80.4 그리고 71.8%로 Fig. 4에서 나타났다.

3-3. 암모니아 침지(SAA) 전처리된 볏짚의 효소당화

암모니아 침지(SAA) 전처리된 볏짚의 당화를 통해 온도, 효소사용량 그리고 기질농도 변화의 조건 변화에 대한 효과를 확인하였다. 알파셀룰로오스 당화실험의 결과를 바탕으로 볏짚의 당화실험은 기질농도 5%(w/v)로 고정하고 진행하였다. 또한 실험에 사용된 효소량은 β -glucosidase를 32 CbU/ml로 고정시키고 cellulase의 양을 10~65 FPU/ml로 변화시켰다. 반응온도는 30~50 °C에서 진행하였다.

Fig. 5는 30, 40 그리고 50 °C에서의 암모니아 침지 전처리된 볏짚의 효소 당화의 결과를 보인다. 실험에 의하면 72시간 동안 당화 후에 각각 73.2%, 78.1% 그리고 83.8%의 글루코스 전환율을 보였다. 그리고 당화는 40~48시간 사이에 종료가 되었다. Fig. 6에서는 암모니아 침지(SAA) 전처리된 볏짚의 효소당화에서 효소사용량의 효과를 나타냈다. 72시간 기준으로 cellulase의 사용량이 55%를 줄였을 때에는 글루코스 전환율이 8% 감소되었고 85%를 줄였을 때는 24%가 감소되었다.

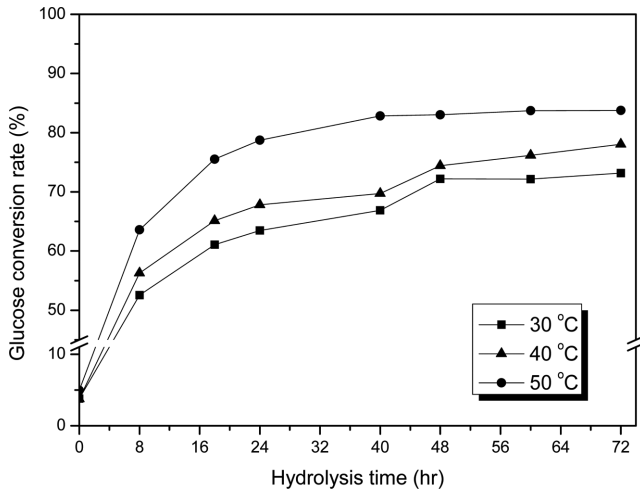


Fig. 5. Effect of temperature on the enzymatic hydrolysis of SAA-treated rice straw. Substrate concentration 5% (w/v), pH 4.8, enzyme loading 65 FPU/ml of glucan and 32CBU/ml of glucan.

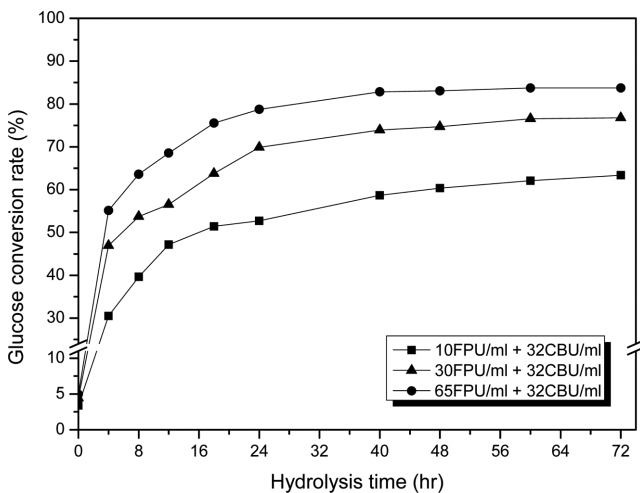


Fig. 6. Effect of enzyme loading on the enzymatic hydrolysis of SAA-treated rice straw. Substrate concentration 5% (w/v), pH 4.8, temperature 50 °C.

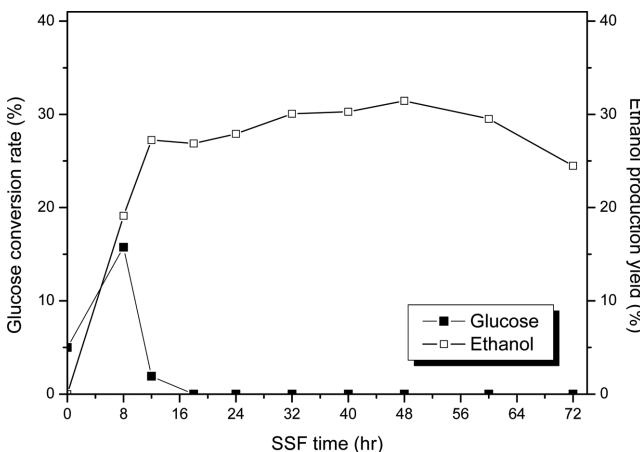


Fig. 7. Effect of temperature on the Simultaneous Saccharification and Fermentation of SAA-treated rice straw. Temperature 30 °C, pH 4.8, Substrate concentration 5%(w/v).

3-4. 암모니아 침지(SAA) 전처리된 볏짚의 동시당화발효(SSF) 암모니아수 침지공정에 의한 전처리 볏짚의 에탄올 생산을 위한

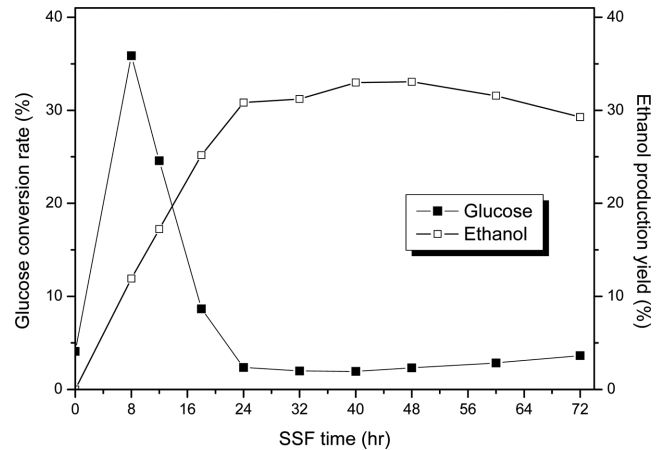


Fig. 8. Effect of temperature on the Simultaneous Saccharification and Fermentation of SAA-treated rice straw. Temperature 40 °C, pH 4.8, Substrate concentration 5%(w/v).

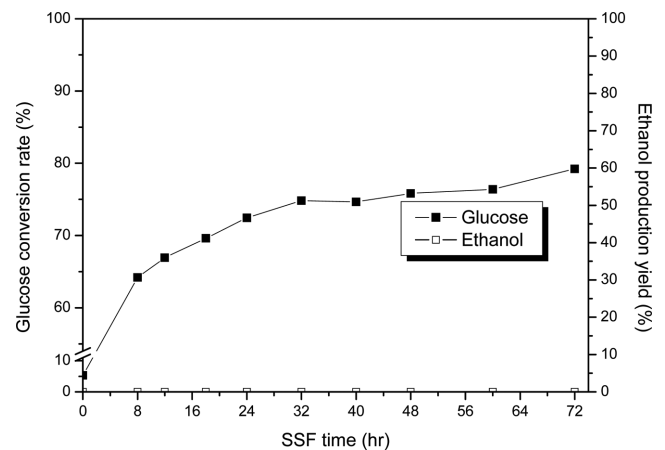


Fig. 9. Effect of temperature on the Simultaneous Saccharification and Fermentation of SAA-treated rice straw. Temperature 50 °C, pH 4.8, Substrate concentration 5%(w/v).

가능성을 알아보기 위해 동시당화발효를 진행하였다. 동시당화발효는 sodium citrate buffer solution(0.5 M, pH 4.8)에서 기질농도 5%(w/v)로 삼각플라스크에서 수행하였다. 발효는 30, 40 그리고 50 °C의 온도에서 72시간 동안 하여 비교하였다. Fig. 7-9에서는 각 온도별로 글루코스 전환율과 에탄올 생산 수율을 나타내었다. 50 g/L의 전처리 볏짚을 동시당화발효를 수행하였을 때 30 그리고 40 °C의 온도에서 각각 8.5 g/L, 8.9 g/L의 에탄올이 생산되었다. 발효가 48시간이 진행되었을 때 에탄올의 농도가 최대가 되는 것을 확인할 수 있다. 그러나 50 °C의 온도에서는 에탄올이 생산되지 않았고 글루코스 전환율만 높아지는 것을 확인하였으며, 이는 발효균주의 활동성이 떨어짐에 기인한 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 바이오 에탄올 생산을 위해 암모니아수에 의한 침지공정(SAA, Soaking in Aqueous Ammonia)에 의해 전처리된 볏짚의 효소당화의 특성을 알아보았다.

알파셀룰로오스의 당화에서 글루코스 전환율은 농도에 반비례하는 경향을 보이고 5와 7%(w/v) 사이에 큰 간격이 보인다. 5%(w/v)

의 농도에서 cellulase와 β -glucosidase의 사용량이 각각 65 FPU/ml과 32 CbU/ml일 때 글루코스 전환율은 가장 높게 보인다. 암모니아수 침지공정에 의한 전처리 벚짚의 글루코스 전환율은 50 °C에서 제일 높게 나타났고 당화는 40~48시간 사이에 종료가 되었다. 전처리 벚짚의 농도가 5%(w/v)일 때 72시간 당화후의 글루코스 전환율은 83.8%로 나타났다. 전처리 벚짚은 일반적인 셀룰로오스 기질에 비해 짧은 시간에 당화가 가능함을 확인할 수 있었다.

전처리 벚짚의 동시당화발효에서 에탄올은 40 °C에서 가장 높게 나타났고 그때의 에탄올 생산수율은 48시간에서 33.1%이었다. 반면에 50 °C에서는 발효균주가 활동하지 못하여 에탄올이 생산되지 않은 것으로 보인다. 효소당화에서 글루코스 전환율이 높게 나온 50 °C보다 낮은 온도에서도 발효의 가능성이 있다는 것을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 농림수산물식품부 농림기술개발사업(309016-5)에 의해 이루어진 것입니다.

참고문헌

1. United Nations Development Programme. World energyassessment. *United Nations Development Programme*. New York(2000).
2. Kim, S. D. and Dale, B. E., "Global Potential Bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues," *Biomass and Bioenergy*, **26**, 361-375(2004).
3. Hsu, T. and Guo, G., "Effect of Dilute Acid Pretreatment of Rice Straw on Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis," *Bioresource Technology*, **101**, 4907-4913(2010).
4. Kim, K. H., Tucker, M. and Nguyen, Q., "Conversion of Bark-rich Biomass Mixture into Fermentable Sugar by Two-stage Dilute Acid-catalyzed Hydrolysis," *Bioresource Technology*, **96**, 1249-1255(2005).
5. Sherrard, E. C. and Kressman, F. W., "Review of Processes in theUnited States Prior to World War II, Ind," *Eng. Chem.*, **37**, 5-8 (1945).
6. Lynd, L. R., Wyman, C. E. and Gerngross, T. U., "Biocommodityengineering," *Biotechnol. Prog.*, **15**, 777-793(1999).
7. Sudha, K., Rani, M., Swamy, V. and Seenayya, G., "Production of Ethanol From Various Pure and Natural Cellulosic Biomass by Clostridium Thermocellum Strains SS21 and SS22," *Process Biochem.*, **33**, 435-440(1998).
8. Bellamy, W. D., "Single Cell Protein from Cellulosic Wastes, *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 869-880(1974).
9. Kim, S. B. and Lee, Y. Y., "Diffusion of Sulfuric Acid Within Lignocellulosic Biomass Particles and Its Impact on Dilute-acid Pretreatment," *Bioresource Technology*, **83**, 165-171(2002).
10. Kalman, G., Varga, E. and Reczey, K., "Dilute Sulphuric Acid Pretreatment of Corn Stover at Long Residence Times," *Chem. Biochem.*, **16**(4), 151-157(2002).
11. Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Bioresource Technology*, **90**, 39-47(2003).
11. Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B., "Bioethanol Production from Barley Hull Using SAA(soaking in aqueous ammonia) Pretreatment," *Bioresource Technology*, **99**, 5694-5702(2008).
12. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover Bysoaking in Aqueous Ammonia," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **121-124**, 1119-1132(2005b).
13. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Fractionation of Corn Stover by Hot-waterand Aqueous Ammonia Treatment," *Bioresource Technology*, **97**(2), 224-232(2006).
14. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking Inaqueous Ammonia at Moderate Temperature," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136-140**, 81-92(2007).
15. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.