

순환식 암모니아 반응기(Ammonia Circulation Reactor (ACR))를 이용한 옥수수대의 전처리 및 효소 당화율 향상

Rubee koju Shrestha* · 허은숙** · 김태현*,†

*국립공주대학교 환경공학과
331-717 충남 천안시 서북구 부대동 275
**국립농업과학원 농업유전자원센터
441-707 경기도 수원시 권선구 수인로 126
(2013년 3월 12일 접수, 2013년 4월 10일 채택)

Pretreatment of Corn Stover for Improved Enzymatic Saccharification using Ammonia Circulation Reactor (ACR)

Rubee koju Shrestha*, Onsook Hur** and Tae Hyun Kim*,†

*Department of Environmental Engineering, Kongju National University, 275 Budae-dong, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam 331-717, Korea

**RDA-Genebank Information Center, Rural Development Administration (RDA), 126 Suin-ro, Kweonseon-gu, Suwon-si, Kyonggi 441-853, Korea
(Received 12 March 2013; accepted 10 April 2013)

요 약

목질계 바이오매스인 옥수수대 전처리를 위하여 고안된 순환식 암모니아 전처리 반응기(Ammonia Circulation Reactor (ACR))를 이용하여 연구하였다. 이 전처리 방법은 적은 양의 액체를 사용하도록 고안되었으며 이 연구에선 기존의 전처리 공정보다 낮은 전처리 온도(60~80 °C), 반응시간(4~12 hour) 그리고 고체:액체 비율(1:3~1:8) 등의 공정 조건을 실험 하여 효과를 비교하였다. 즉 여러 공정 조건에서 전처리 후 고형물의 잔류 고체량, 당, Lignin 함량, 그리고 효소당화율 등을 측정하였다. 여러 실험 조건에서 공통적으로 관찰된 것은 전처리 조건이 더 가혹해 지면 Lignin의 제거율이 가장 큰 영향을 받았으며, 47.6~70.6% 범위로 나타났다. 반면 다른 당(Glucan, Xylan)은 손실이 비교적 작게 나타났다. 모든 실험 조건에서, 전처리된 고형물의 Glucan 손실율은 4.7~15.2% 범위로 변화가 크지 않았으며 Xylan 손실율은 여러 조건의 변화에 따라 7.4~25.8% 정도 범위로 나타났다. 암모니아 순환 전처리로 8~12 hour 동안 처리된 옥수수대는 90.1~94.5%의 높은 72-h Glucan 당화율을 (15 FPU-GC220+30 CBU)/g-glucan의 효소 투입으로 나타냈으며 순수 Cellulose인 Avicel의 당화율(92.7%)과 비슷하거나 높았다. 또한 8~12 hour 처리된 옥수수대의 초기 24-h Glucan 당화 속도는 73.0~79.4%로 Avicel의 같은 시간 당화율인 69.5% 보다 높게 나타났다. 반응시간을 증가는 보다 많은 Lignin을 제거하였으며 따라서 효소 당화율 증가에 기인한 것으로 보인다.

Abstract – Ammonia circulation reactor (ACR) was devised for the effective pretreatment of corn stover. This method is designed to circulate aqueous ammonia continuously so that it can reduce the chemical and water consumption during pretreatment. In this study, ammonia pretreatment with various reaction conditions such as reaction time (4~12 hour), temperature (60~80 °C), and solid:liquid ratio (1:3~1:8) was tested. Chemical compositions including solid remaining after reaction, lignin and carbohydrates were analyzed and enzymatic digestibility was also measured. It was observed that as reaction conditions become more severe, lignin removal was significantly affected, which was in the range of 47.6~70.6%. On the other hands, glucan and xylan losses were not substantial as compared to that of lignin. At all tested conditions, the glucan loss was not changed substantially, which was between 4.7% and 15.2%, while the xylan loss varied, which was between 7.4% and 25.8%. With (15 FPU-GC220+30 CBU)/g-glucan of enzyme loading, corn stover treated using ammonia circulation reactor for 8~12 hours resulted in 90.1~94.5% of 72-h glucan digestibility, which was higher than 92.7% of Avicel[®]-101. In addition, initial hydrolysis rate (at 24 hour) of this treated corn stover was 73.0~79.4%, which was shown to be much faster than 69.5% of Avicel[®]-101. As reaction time increased, more lignin removal and it was assumed that the enhanced enzymatic digestibility of treated biomass was attributed to the lignin removal.

Key words: Bioenergy, Pretreatment, Biorefinery, Lignin, Ammonia, Fermentable Sugar

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: thkim@kongju.ac.kr

1. 서 론

현재 인류가 전적으로 의존하고 있는 화석에너지를 대신할 새로운 대체에너지로서 바이오연료 (Biofuel)가 주목받고 있으며 또한 재생 가능한 바이오매스로부터 생산되는 바이오 제품(Bio-based product)의 개발에 대한 요구가 지속적으로 증가하고 있다. 다시 말하면 새로운 석유 대체 자원으로서 목질계 바이오매스가 주목받고 있으며, 특히 석유 에너지를 대체할 수 있는 바이오 에탄올, 바이오 부탄올 같이 저장과 수송이 용이한 에너지원 및 열원으로의 이용뿐만 아니라 플라스틱 등의 석유제품의 대체 화학 원료 생산을 위한 재료로서 그 연구 가치가 증가하고 있다[1]. 2011년 현재 세계 연료용 에탄올 생산량은 84,501 million liter이었고 그 중 미국을 비롯한 북미와 중미의 생산량이 연간 54,765 million liter로 가장 많았고 그 다음이 브라질을 비롯한 남미의 연간 21,637 million liter이었다[2]. 그러나 미국과 브라질의 에탄올 생산은 현재 대부분 제1세대 바이오매스인 옥수수 전분과 사탕수수 즙을 원료로 이용하여 생산하는 수준에 머무르고 있고, 곡물을 연료 생산에 이용하는 점 때문에 많은 비판을 받고 있다. 따라서 다음 세대 바이오매스로써 농업 부산물, 에너지 작물, 산림자원 등의 목질계 바이오매스는 많은 주목을 받고 있다. 이 중 옥수수는 미국 등에서 주요 작물로 재배되고 있으며, 문헌에 따르면[3] 그 부산물인 옥수수 대(corn stover)의 세계 생산은 약 203.6 Tg (Tera gram)에 이르고 그를 이용한 가능한 에탄올 생산량은 58.6 GJ (Giga liter)에 이른다.

그러나 바이오매스로부터 여러 가지 바이오 화학 물질 및 소재들을 미생물 발효를 통해 경제적으로 대량 생산하기 위해서는 발효당 (Fermentable sugar)의 값싸고 대량으로 생산이 필수적이다. 일반적으로 목질계 바이오매스로부터 화학제품 및 바이오 에너지의 생산을 위한 공정은 효소와 미생물 반응의 저해 물질 성분을 제거하고 셀룰로오스와 Hemicellulose에 대한 효소의 접근성을 향상시키기 위한 전처리 공정(Pretreatment), 셀룰로오스와 Hemicellulose의 효소가수분해를 통해 발효 가능한 당류로 변환하는 효소 당화 공정(Enzymatic saccharification), 생성된 당을 효모, 박테리아 등을 이용하여 제품으로 전환시키는 미생물 발효공정(Microbial fermentation)으로 구분할 수 있으며 성공적인 생물학적 전환 공정을 위해서는 전처리 공정을 통한 바이오매스의 성분 별 분별 및 물리적-화학적 성질 변환이 당화 공정과 발효 공정에 필수적이다[4].

목질계 바이오매스는 Cellulose, Hemicellulose, Lignin의 세 가지 주요 성분으로 구성되어 있고, 이 중 Cellulose와 Hemicellulose는 탄수화물로서(glucose, xylose, arabinose, galactose, mannose 등의 5개의 주요 당) 효소나 산을 이용하여 당화 후, 미생물 발효를 통해 부가가치 제품으로 전환될 수 있다. 일반적으로 목질계 바이오매스는 효소가 잘 작용할 수 없어 가수 분해 수율과 속도가 극히 낮은 (대략 전체 탄수화물 함량의 5~20% 미만) 당화율을 보이는 재료이다. 전처리 연구의 목적은 바이오매스로부터 값싸고 대량으로 발효당을 생산하여 발효 공정에 공급하기 위한 기술을 개발하는 것이 목적이라고 할 수 있다.

목질계 바이오매스로부터 만들 수 있는 여러 가지 바이오 제품(bio-based product)들은 지금까지 낮은 효율과 높은 생산원가의 문제점 때문에 상용화에 어려움을 겪고 있다. 미국 NREL (National Renewable Energy Laboratory)의 보고서에 의하면 전처리 비용은 옥수수대로부터 에탄올 생산을 하는 공정에서 높은 효소 비용과 함

께 두 가지 주요 항목으로 분석되었다. 현재까지 여러 가지 전처리 공정과 반응기들이 연구되었고[5-14] 그 중 몇 가지는 목질계 바이오매스의 전처리 효과가 우수한 것으로 입증되었다. 그러나 경제성 있는 전처리 방법은 아직까지 확인되고 있지 않다. 전처리 비용에서 가장 큰 부분을 차지하는 것이 초기의 반응기 제작 비용과 더불어 에너지 비용이다. 또한 에너지 비용은 전처리에 사용되는 화학물질과 물 사용량에 직접적인 영향을 받는다. 기존에 개발된 전처리 기술과 반응기는 단위 무게의 바이오매스를 처리하는 데 일반적으로 5~10배의 양의 물과 화학물질을 사용한다[15]. 또한 전처리 후 세척에 필요한 물의 양은 아직까지 정확하게 제시되고 있지 않다.

이러한 문제점들은 효과적인 화학물질의 사용과 효율적인 반응기 설계를 통해 전처리 운전에 필요한 에너지 비용을 낮출 수 있다. 이 논문에서는 암모니아수-to-바이오매스 의 비율을 낮출 수 있는 반응기를 설계하고 이 반응기를 이용하여 옥수수대의 전처리 효과에 대해 연구하였다. 암모니아수는 전처리 화학물질로써 Lignin의 선택적 제거와 Cellulose의 팽윤(swelling)등에 효과적이어서 오랫동안 연구되어 왔다. 기존의 암모니아수를 이용한 percolation 반응기에서는 바이오매스를 한 번 침출한 후 암모니아수를 재사용하지 않기 때문에 액체의 사용량이 많았다. 본 연구에서 소개하는 반응기에서는 제한된 양의 암모니아 수를 펌프를 이용하여 percolation 반응기 시스템 내부를 계속 순환하도록 설계하여 적은 양의 암모니아수를 사용하였다. 또한 기존 공정들은 바이오매스 전처리 시 높은 온도와 높은 압력을 요구하여 높은 에너지 비용 부담 및 전처리 공정 시 생성되는 독성 물질에 의한 당화·발효 공정의 저해 요인 등의 여러 가지 문제점을 지니고 있어 경제적인 바이오리파이너리 실현을 어렵게 만들고 있었다. 본 연구에서는 낮은 온도를 적용하여 전체적인 에너지 사용량과 독성 물질 생성을 최소화하였다. 옥수수대를 전처리한 후 성분의 변화와 효소당화율을 측정하여 전처리 효과에 대하여 연구하였다.

2. 실험

2-1. 재료

본 연구에서 사용된 바이오매스 기질은 분쇄 후 10~35 mesh 크기의 체로 선택된 크기의 옥수수대(잎 포함; 이하 옥수수대로 지칭)를 사용하였다. 옥수수대는 38.5%의 Glucan (glucan), 24.4%의 Xylan (xylan), 4.4%의 Arabinan (arabinan), 17.0%의 Lignin (acid insoluble lignin+acid soluble lignin) 그리고 2.7% 재(ash)로 이루어져 있다. 옥수수대는 미국 아이오와 주에서 2010년 9월에 수확되었다. 본 실험에서는 Avicel® PH-101 (microcrystalline cellulose (MCC))을 효소당화율 측정 실험에서 비교군으로 사용하였으며, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich Co.)로부터 구입하였다(Sigma Cat. No. 11365; Lot No. 1094627-54804207). 효소당화를 위하여 Cellulase (셀룰라아제) 효소(GC 220; Lot # 301-04232-162)가 사용되었으며 DuPont 사(이전: Genencor International)로부터 공급받았다. Cellulase (GC-220) 활성도(activity)는 45 filter paper unit (FPU)/ml과 단백질 함량은 184 mg/ml이다. GC-220은 Cellulase 활성도 이외에 β -glucosidase (베타글루코시다아제) 활성도(196 cellobiase unit (CBU)/ml)와 Xylanase (자일라나아제) 활성도(1526 unit/ml)를 나타내는 것으로 알려져 있다[16]. Novozyme 188 (즉 β -glucosidase)은 Sigma-Aldrich (Sigma Cat. #C-6150)로부터 구입하여 사용하였으며, 활성도는 750 CBU/ml이

고 단백질 함량은 152 mg/ml로 측정되었다[17].

2-2. 전처리

전처리 반응기로는 SS-316 column reactor (2.3 cm internal diameter (ID)×25.4 cm length (L); 104.3 cm³ internal volume)를 제작하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 순환식 전처리 반응기 시스템은 특허 등록된(등록번호: 10-0977721) 반응기 시스템으로 펌프, 반응기, 가열오븐, 예열기, 저수조, 온도 조절 시스템 등으로 이루어져 있다(Fig. 1). 옥수수대 바이오매스 전처리를 위한 순환식 암모니아 반응기 시스템 운전은; (1) 목질계 바이오매스를 반응기에 투입한 후; (2) 60 °C의 온도로 가열된 암모니아수를 전처리 반응기에 투입한 후 바이오매스와 1시간 내지 24시간 동안 접촉시켜 바이오매스 중의 Lignin을 침출하였고; (3) 계속해서 암모니아수를 펌프로 연속 순환시키면서 60~80 °C의 온도로 반응시켰다. 옥수수대는 15% (w/w) 암모니아수를 이용하여 전처리하였다. 전처리 후에는 반응기를 열고 반응물을 필터링한 후 DI water로 세척하여 분석과 효소 당화 실험을 실시하였다.

2-3. 효소당화

전처리된 옥수수대의 효소 당화율 측정 실험은 250 ml 삼각플라스크에서 진행하였고 working volume은 100 ml이다. 효소 당화는 전처리된 기질을 삼각플라스크에 넣고 sodium citrate buffer solution (0.05 M, pH 4.8)와 혼합한 후에 진탕 배양기에서 진행하였다. 즉, 당화 실험 조건은 1% glucan (w/v) 기질 투입하여 50 °C에서 150 rpm으로 진탕배양기(New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA, model: Innova-4080) 이용하여 실시하였다. 효소는 GC-220과 Novozyme-188을 사용하였고 효소 사용량은 각각 15 FPU of Cellulase (GC-220)/g-glucan과 30 CBU of β-glucosidase (Novozyme 188)/g-glucan이었다. 당화 실험 샘플은 주기적으로(6, 12, 24, 48, 72, 그리고 96 h) 취하고 생성되는 Glucose와 Xylose의 농도를 HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용하여 측정하였다.

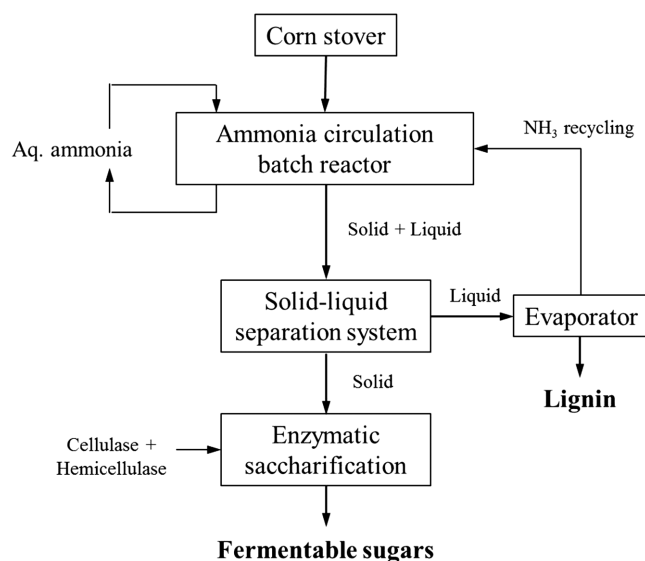


Fig. 1. Schematic of production of sugars from corn stover using ammonia circulation reactor and enzymes.

Table 1. Composition of untreated corn stover

Compositions	Unit	Untreated corn stover
S.R.	[%]	100
Glucan	[%]	38.5 ± 0.3
Xylan	[%]	24.4 ± 0.2
Galactan	[%]	-
Arabinan	[%]	4.4 ± 0.1
Mannan	[%]	-
Acid insoluble lignin	[%]	15.0 ± 0.3
Acid soluble lignin	[%]	2.0 ± 0.1
Ash	[%]	2.7 ± 0.1

Note. 1. S.R.: solid remaining % based on untreated corn stover.

2. All data in table are based on oven-dry original untreated corn stover.

3. Values are expressed as mean and standard deviation (n=3).

$$\text{Glucan 당화율} = \frac{\text{당화된 Glucose 양(g)} \times 0.9}{\text{초기 Glucan 투입량(g)}} \times 100 \quad (1)$$

(0.9는 Glucose와 Glucan의 분자량의 차이에 따른 전환 보정 상수임)

$$\text{Xylan 당화율} = \frac{\text{당화된 Xylose 양(g)} \times 0.88}{\text{초기 Xylan 투입량(g)}} \times 100 \quad (2)$$

(0.88는 Xylose와 Xylan의 분자량의 차이에 따른 전환 보정 상수임)

2-4. 분석방법

당 성분들은 미국 신재생 에너지 연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory)에서 제시한 NREL LAP (Laboratory Analytical Procedure)에 제시된 방법으로 성분을 분석하였다[18]. 분석할 고체 샘플 0.3 gram을 10배(3.0 ml) 부피의 고농도 황산(72% w/w)에 넣고 30 °C에서 1시간 동안 1차 산 가수분해를 시킨 뒤에 84 ml의 DI (deionized water)로 4.0% 황산 액으로 희석한 후 Autoclave를 이용하여 121 °C에서 1시간 동안 2차 가수분해를 하였다. 가수 분해된 액체를 HPLC (Bio-Rad Aminex HPX-87P column)와 Refractive index detector (Varian 356-LC, Varian, Inc., CA, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량분석을 수행하였다. HPLC 분석 조건은 DI water를 이동상으로 유속을 0.6 ml/min으로 운전하였고, column의 온도는 85 °C이었다. Lignin 성분은 NREL LAP에서의 방법으로 분석하였다[18]: 즉, 가수분해된 액체를 필터를 이용하여 잔여물을 측정하고 565 °C에서 전기로를 이용하여 24시간 동안 유기물을 연소시키고 재(Ash) 잔류물을 측정하여 계산하였다[18].

3. 결과 및 고찰

3-1. 반응시간에 따른 고체 성분 변화와 효소 당화율

Table 2은 암모니아 순환식 전처리를 한 옥수수대 바이오매스 고형물의 성분 변화와 72-시간 효소 당화율을 정리하였다. 암모니아 농도는 15% (w/w), 반응온도를 60 °C, 고체:액체의 비율은 1:5로 고정시키고 4 hour에서 12 hour까지의 반응시간 변화에 따라 전처리 후 고형 바이오매스의 성분 변화(Glucan, Xylan, 그리고 Lignin 함유율) 관찰해 보았다. Table 2에서 보이듯이 반응시간이 4 hour에서 12 hour로 증가시킴에 따라 S.R.은 71.4%에서 64.7%로 약 7% 줄어들었으며 그 중 Lignin은 7.2%에서 4.6%로 약 2.6% 줄어들었다. 전처리 되지 않은 옥수수대(untreated corn stover)와 비교하면 4 hour와

Table 2. Effects of reaction time on solid compositions of treated corn stover¹

Reaction time [h]	S.R. ² [%]	Lignin ³ [%]	Lignin removal [%]	Solid		Enzymatic Digestibility	
				Glucan [%]	Xylan [%]	Glucan [%]	Xylan [%]
Untreated	-	17.0 ± 0.4	-	38.5 ± 0.3	24.4 ± 0.2	27.1 ± 0.3	9.8 ± 0.1
4	71.4 ± 0.1	7.2 ± 0.3	57.6	34.6 ± 2.0	21.3 ± 1.5	75.3 ± 3.7	57.6 ± 1.7
6	69.1 ± 3.0	6.0 ± 0.4	64.7	34.4 ± 1.8	20.5 ± 1.4	85.6 ± 3.9	60.2 ± 1.4
8	65.9 ± 0.8	5.5 ± 0.1	67.6	34.4 ± 0.1	19.8 ± 0.1	90.1 ± 2.2	63.5 ± 1.5
12	64.7 ± 0.8	4.6 ± 0.2	72.9	32.6 ± 0.2	18.8 ± 0.1	94.5 ± 2.5	65.2 ± 1.9

Note. 1. Data in the table are based on the oven dry untreated biomass. Pretreatment conditions: 15 wt% of ammonia concentration, 60 °C of reaction temperature, 1:5 of solid:liquid ratio (based on wt.).

2. S.R. stands for solid remaining after reaction.

3. Acid insoluble lignin + acid soluble lignin

4. 72-h digestibility

12 hour 처리 샘플은 각각 57.6%과 72.9%의 Lignin 제거율을 나타내었다. Lignin과 더불어 주요한 감소 성분 중 하나인 Xylan은 21.3% (4 hour 처리) 에서 18.8%로 (12 hour 처리) 약 2.5% 감소하였다. 이 결과는 Untreated의 Xylan 함유량 기준으로 각각 12.8%와 23.1%의 Xylan 제거율이었으며 반응시간의 증가에 따라 비교적 정비례하며 증가하였다. 한편 Glucan 함유율의 변화는 반응시간이 4 hour 일 때 약 34.6%이고 반응시간이 12 hour일 때 약 32.6%로 반응 시간이 길어질수록 Glucan 함유율이 약간 감소한다는 결과를 얻었다. 그러나 전처리 되지 않은 샘플에 비해서 4 hour 처리된 샘플은 약 3.9%의 Glucan 함량이 감소하였는데(Untreated의 Glucan의 10%가 제거됨), 이것은 원래 바이오매스에 있던 Sucrose와 약간의 비구조당 (Non-structural carbohydrates)들이 전처리에 의해 액상에 침출되었기 때문이라고 추정된다. 반응시간이 4 hours부터 8 hour 구간에서는 Glucan의 추가적인 제거는 관찰되지 않았으나, 8 hour에서 12 hour으로 증가시켰을 때는 10.7% (8 hour 처리)에서 15.2% (12 hour 처리)로 현저히 증가하였다. 결론적으로 반응시간의 증가는 주로 Lignin 제거를 현저히 증가시켰고, 다른 당 성분에는 상대적으로 낮은 영향을 미쳤다고 보여진다.

72시간 동안 효소당화를 시킨 후 나타난 수율을 72-h 효소당화율 (digestibility)로 나타내었으며 Table 2의 마지막 행에 나타나 있다. 전처리 되지 않은 옥수수대의 경우 Glucan과 Xylan의 72-h 효소당화율은 각각 27.1%와 9.8%로 낮았으나 4 hour 처리 해준 샘플은 72-h 효소당화율이 각각 75.3%와 57.6%로 각각 약 3배와 6배 증가하였다. 본 연구에서 실험한 가장 긴 반응시간 동안(12 hour) 암모니아수로 처리한 샘플은 Glucan과 Xylan의 72-h 효소당화율이 각각 94.5%와 65.2%까지 증가하였다. 한편 6 hour과 8 hour 처리한

샘플의 경우도 Glucan 효소당화율이 각각 85.6%와 90.1%로서 높은 결과를 나타내었다. 추후 전처리에 필요한 에너지비용과 발효당 생산 수율을 고려한 면밀한 생산 단가 분석을 통해서 최적의 반응 시간 조건을 결정할 수 있을 것이다. 즉 반응 시간 연장에 따른 에너지 비용과 시설 투자 비용 대비 그에 따른 수율 증가로 얻을 수 있는 이익을 정확히 계산하여 최적 조건 및 수율을 결정하게 될 것이다.

3-2. 암모니아수와 바이오매스 비율에 따른 영향

암모니아수 순환 전처리 시 사용되는 총 액체의 양을 변화시켜 실험하였다. 암모니아 농도는 15% (w/w), 반응온도를 60 °C, 반응시간은 6 hour로 고정시키고 고체:액체의 비율을 (Solid:Liquid ratio) 1:3에서 1:8까지 변화시키면서 전처리 후 고형 바이오매스의 성분 변화를 (Glucan, Xylan, 그리고 Lignin 함유율) 관찰해 보았다. Table 3은 암모니아 순환식 전처리를 한 옥수수대 바이오매스 고형물의 구성 성분의 변화를 전처리 시 고체:액체 비율에 따라서 요약하고 있다.

고체:액체 비율에 따른 전처리 효과를 실험한 이유는 단위 바이오매스 양에 대한 액체 투입량은 전체 생산 공정의 운전비용에 밀접한 관계가 있기 때문이다. 왜냐하면 사용된 암모니아수로부터 암모니아를 회수하여 재사용하기 위해서는 사용된 액체 전체를 다단계 증발기로 보내서 물과 화학 촉매 전체를 높은 온도로 가열시켜야 하기 때문이다.

본 실험에서 고체:액체의 비율이 1:2에서 1:10으로 증가시킴에 따라 S.R. 값은 74.3%에서 65.0%로 감소하였다. 그러나 1:2에서 1:6으로 증가하였을 때 감소분에 비해 1:6 이상으로 증가시켰을 때에는

Table 3. Effect of solid:liquid ratio on the compositions of pretreated corn stover¹

Solid:Liquid [-]	S.R. ² [%]	Lignin ³ [%]	Lignin removal [%]	Solid	
				Glucan [%]	Xylan [%]
Untreated	-	17.0 ± 0.4	-	38.5 ± 0.3	24.4 ± 0.2
1:3	74.3 ± 1.9	8.9 ± 0.5	47.6	36.7 ± 1.9	22.6 ± 1.1
1:5	69.1 ± 3.0	6.0 ± 0.4	64.7	34.4 ± 1.8	20.5 ± 1.4
1:6	66.4 ± 2.3	5.5 ± 0.3	67.6	35.0 ± 1.3	18.8 ± 0.3
1:8	65.0 ± 1.5	5.3 ± 0.7	68.8	34.2 ± 2.1	18.1 ± 0.8

Note. 1. Data in the table are based on the oven dry untreated biomass. Pretreatment conditions: 15 wt% of ammonia concentration, 60 °C of reaction temperature, 1:3–1:10 of solid:liquid ratio (based on wt.), and 6 h of reaction time.

2. S.R. stands for solid remaining after reaction.

3. Acid insoluble lignin + acid soluble lignin

변화량이 거의 없거나 미미하게 나타났다. Lignin 함량의 경우도 고체:액체의 비율을 1:5~1:6 이상으로 증가시켰을 때 그 영향은 크지 않았다. 즉 Untreated 샘플에 비해서 1:3로 처리한 샘플은 47.6%의 Lignin 제거율을 나타내었고, 1:5, 1:6으로 차츰 증가했을 때 각각 64.7%와 67.6%로 증가하였으나 그 이상 증가시켰을 때 Lignin 제거율은 크게 증가하지 않았다. 그러므로 고체:액체의 비율이 1:6 이상에서는 그 액체 투입량 증가분이 Lignin 제거율에 미치는 영향이 미미하다고 보여진다.

한편 Lignin과 더불어 옥수수대의 주요 성분들인 당 함량 중 가장 많은 먼저 Glucan 함량을 살펴보면, 모든 고체:액체 비율에서 34.2~36.7% 범위 내에서 큰 변화가 나타나지 않았다. 반면 Xylan 함량은 1:6에서 18.8%, 1:8에서 18.1%로 Untreated 샘플 기준으로 각각 23.0%와 25.8%의 Xylan 제거율을 나타내었다. 이 결과로 여러 다른 고체:액체 비율에 의한 영향은 어느 정도(1:6) 이상에서는 전처리 반응 후 Lignin이나 Glucan (즉 Cellulose), Xylan (Hemicellulose)에 큰 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다. 실제 생산 공정 설계 시에는 더 자세하고 통계학적인 분석 기법과 실험을 통해 최적 조건을 찾아서 최소 비용으로 최대의 전처리 성능을 결과해야 할 것이다.

3-3. 암모니아수 전처리 온도의 영향

암모니아수 순환 전처리에서 두 가지 다른 온도를 (60 °C와 80 °C) 실험 비교하였다. 본 실험 기구에서는 15% 암모니아수의 높은 vapor pressure로 인해 80 °C 이상을 실험하는 것은 어렵다. 그러므로 이 연구에서는 기존 연구에서 효과적으로 보고된 15% 암모니아수 60 °C를 기준으로 최대 80 °C까지 실험하였다[19].

암모니아 농도는 15% (w/w), 반응시간은 6 hour, 고체:액체의 비율을 1:6으로 고정시키고 반응 후 고형 바이오매스의 성분 변화를 (Glucan, Xylan, 그리고 Lignin 함유율) 관찰해 보았다(Table 4). 전반적으로 반응 온도를 60 °C에서 80 °C로 높였을 때 Lignin과 Glucan 함량 변화는 크지 않았다. Lignin의 경우 60 °C와 80 °C에서 각각 67.6%와 70.6% 제거율을 나타냈는데 이 두 조건에서의 Lignin 함량 차이는 단지 0.5%이다. 반면 Xylan의 손실은 다른 성분에 비해 많았는데 온도 증가에 따라서 고체의 Xylan 함유량이 18.8%에서 15.9%로 감소하였다. 이 결과로 두 가지 다른 온도에서 암모니아 전처리 반응 후 Cellulose의 손실은 적으며, Hemicellulose의 손실이 상대적으로 많은 것을 알 수 있었다.

3-4. 전처리 후 효소당화

여러 다른 전처리 시간 조건에서 처리된 바이오매스를 이용하여 GC-220와 Novozyme-188을 이용한 효소 당화를 실시하였다(Fig. 2).

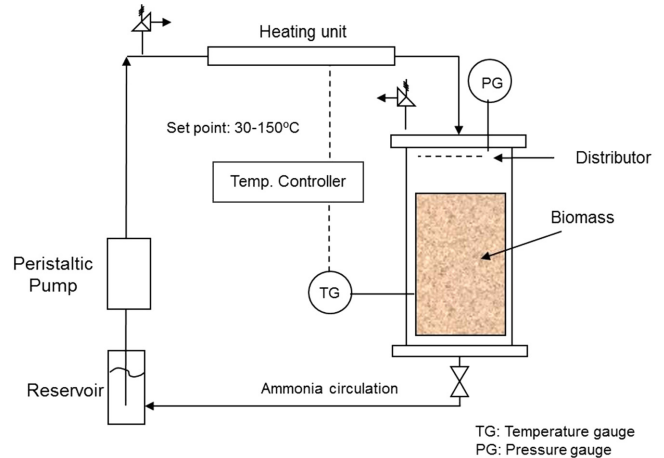


Fig. 2. Schematic diagram of ammonia circulation reaction system.

옥수수대의 효소당화 실험은 기질농도 1% (w/v)로 고정하고 진행하였다. Avicel은 순수 Cellulose로서 기준 물질로 같이 실험하여 비교하였다.

Fig. 2에서 옥수수대의 효소당화 결과 6~8 hour 전처리 샘플 모두 높은 72-h Glucan 당화율(Glucan에서 Glucose로의 전환율)을 보였다(85.6~94.5%). 반면 72-h Xylan 당화율은 60.2~65.2%에 그쳤다. 이는 사용된 Cellulase 효소인 GC-220는 Xylanase activity를 가지고 있으나 옥수수대가 함유한 Xylan을 충분히 Xylose로 당화시키기에는 부족하다는 것을 알 수 있다. 추가로 Xylanase 효소를 투입하면 더 높은 당화율을 나타낼 것으로 보이며, 이것은 이전에 실시한 보리겨를 이용한 연구에서 추가적인 Xylanase 투입의 효과를 증명하였다[20]. 이 실험에서 Cellobiose의 농도는 모든 구간에서 낮은 농도를 나타내었으며 Cellobiose의 축적에 의한 Cellulase 효소에 대한 방해는 없었다고 보여진다. 암모니아수로 4 hour 처리된 샘플은 72-h Glucan 당화율이 75.3%로 아주 낮지는 않았으나 6 hour 이상 처리된 샘플에 비교해서 낮게 나타났다. 기준 물질로 사용된 Avicel의 72-h Glucan 당화율은 92.7%로 나타났다. Avicel은 순수 Cellulose로서 Lignin과 Hemicellulose가 거의 없고 목질계 바이오매스 보다 낮은 Crystallinity를 가지고 있어 일반적으로 높은 효소 당화율을 나타낸다. 암모니아수로 12 hour 처리된 샘플인 경우 Avicel의 Glucan 당화율 보다 1.8% 높은 결과를 얻었으며, 0~24 hour 사이의 초기 가수분해 속도도 Avicel의 가수분해 속도 보다 훨씬 높게 나타났다. 즉 암모니아수로 12 hour 처리된 옥수수대와 Avicel의 12-h 당화율이 각각 70.2%와 58.2%였고 24-h Glucan 당화율은 각각 79.4%와 69.5%로 암모니아수로 12 hour 처리된 샘플

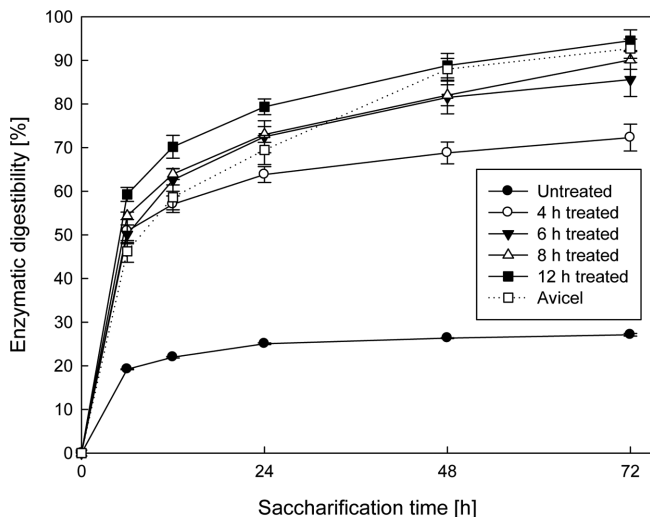
Table 4. Effect of temperature on the compositions of pretreated corn stover¹

Temperature [°C]	S.R. ² [%]	Lignin ³ [%]	Lignin removal [%]	Solid	
				Glucan [%]	Xylan [%]
Untreated	-	17.0 ± 0.4	-	38.5 ± 0.3	24.4 ± 0.2
60	66.4 ± 2.3	5.5 ± 0.3	67.6	35.0 ± 1.3	18.8 ± 0.3
80	62.4 ± 4.2	5.0 ± 0.7	70.6	34.1 ± 2.4	15.9 ± 1.9

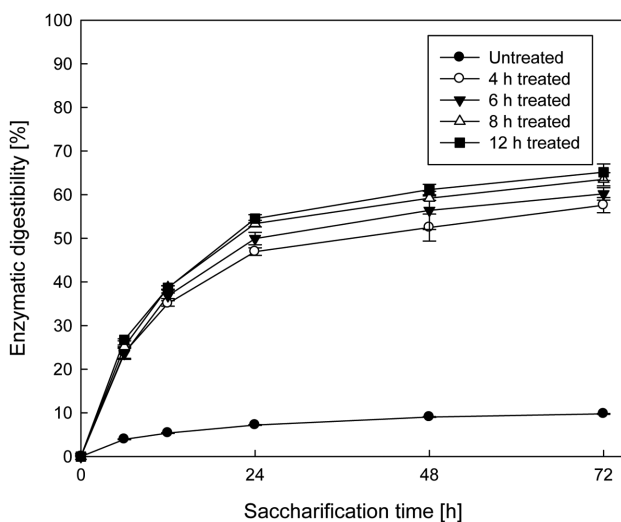
Note. 1. Data in the table are based on the oven dry untreated biomass. Pretreatment conditions: 15 wt% of ammonia concentration, 60 °C of reaction temperature, 1:6 of solid:liquid ratio (based on wt.), and 6 h of reaction time.

2. S.R. stands for solid remaining after reaction.

3. Acid insoluble lignin + acid soluble lignin



(a) Glucan digestibility



(b) Xylan digestibility

Fig. 3. Enzymatic digestibility of ammonium hydroxide treated corn stover samples.

의 당화 속도가 빠르게 진행되었다. 당화 속도가 빠르다는 것은 실제 상용 생산 공정 설계 시 당화 시간을 줄여서 시설 투자 비용 및 운전 비용을 줄일 수 있는 등 유리한 요인이 될 수 있다. 즉 당화 시간이 짧아지게 되면 당화발효에 필요한 반응기 숫자나 크기를 줄일 수 있고 가열과 교반 등에 필요한 에너지도 줄일 수 있다.

3-5. 암모니아수 순환 전처리 공정

Fig. 3은 옥수수대로부터 순환식 암모니아수 반응기를 이용하여 발효당(Fermentable sugar)을 생산하는 공정도를 나타내었다. 옥수수대는 순환식 암모니아수 반응기에서 수 시간 동안 전처리 되고 전처리 후 전체 고형물과 액상물은 고-액 분리기로 보내진다. 여기서 고체-액체 분리를 통해 고체는 효소당화 공정으로 보내지고 액체는 증발기로 보내져 암모니아를 회수하여 재사용하게 된다. 액상물은 Lignin과 약간의 당이 포함되어 있고, 다량의 암모니아가 들어 있다. 고형물도 어느 정도의 암모니아를 포함하고 있고 필요하다면 고형물의 암모니아도 증발을 통해 회수하는 공정이 필요하다. 간단한 시

물레이션 결과 3단 증발기를 이용하여 액상과 고상에 존재하는 99.5%의 암모니아를 회수할 수 있는 것으로 나타났다(미발표 결과). 이론적으로는 한번 투입된 암모니아수는 약간의 보충량을 빼고는 계속해서 재사용이 가능하여 친환경적인 생산 공정이 될 수 있을 것이다. 전처리된 고형물로부터 효소당화를 통해 발효당을 생산할 수 있고, 이어서 바이오연료 및 화학물질로 전환이 가능하다.

4. 결 론

본 연구에서는 새로운 형태의 전처리 반응기인 순환식 암모니아 반응기를 이용한 초본계 바이오매스의 전처리를 연구하였다. 반응 온도, 반응시간, 고체:액체 비율 등의 여러 가지 공정 조건에서 옥수수대의 전처리 효과에 대해 고찰하였다. 또한 다른 반응시간 동안 처리된 바이오매스의 효소 당화율을 측정하여 수율과 당화 속도에 대하여 살펴보았다. 8~12 hour 암모니아 처리된 옥수수대는 90.1~94.5%의 높은 72-h Glucan 당화율을 나타냈으며 순수 Cellulose인 Avicel의 당화율과 비슷하거나 높으며 당화 속도보다도 더 빠르게 나타났다. 반응시간을 증가는 보다 많은 Lignin을 제거하였으며 따라서 효소 당화율 증가에 기인 한 것으로 보인다. 반면 반응 조건이 가혹해 저도 전처리된 고형물의 Glucan 함량은 큰 변화가 없었으며 Xylan 손실은 여러 조건의 변화에 따라 10~25% 정도 범위로 나타났다. 이 연구를 통해 순환식 암모니아 전처리는 액체 투입량을 줄일 수 있으며 목질계 바이오매스 전처리법으로 효과적인 것을 확인할 수 있었다. 앞으로 추가적인 연구를 통해 공정 최적화를 이루면 전체 에너지 사용량을 줄일 수 있는 효율적인 운전조건을 확립하고, 발효당 생산을 위한 효율적인 공정 개발 및 효소의 투입량 역시 줄일 수 있을 것으로 보여진다.

감 사

본 연구는 국립 공주대학교 신입교수 정착연구비에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

1. Kamm, B., Gruber, P. R. Kamm, M., "Biorefineries - Industrial Processes and Products," Wiley-VCH Weinheim(2007).
2. 2013 Ethanol Industry Outlook, RFA (Renewable Fuels Association) Washington, DC. USA(2013).
3. Kim, S. D. and Dale, B. E., "Global Potential Bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues," *Biomass Bioenerg.*, **26**, 361-375(2004).
4. Mosier, N., Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresour. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
5. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Fractionation of Corn Stover by Hot water and Aqueous Ammonia Treatment," *Bioresour. Technol.*, **97**(2), 224-232(2006).
6. Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Bioresour. Technol.*, **90**, 39-47(2003).
7. Yoo, C. G., Lee, C. W. and Kim, T. H., "Optimization of Two-

- Stage Fractionation Process for Lignocellulosic Biomass using Response Surface Methodology (RSM)," *Biomass Bioenerg.*, **35**, 4901-4909(2011).
8. Zheng, Y., Lin, H. M., and Tsao, G. T., "Pretreatment for Cellulose Hydrolysis by Carbon Dioxide Explosion," *Biotechnol. Prog.*, **14**, 890-896(2008).
9. Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. and Holtzapple, M., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresour. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
10. Li, X., Kim, T. H. and Nghiem, N. P., "Bioethanol Production from Corn Stover using Aqueous Ammonia Pretreatment and Two-phase Simultaneous Saccharification and Fermentation (TPSSF)," *Bioresour. Technol.*, **101**, 5910-5916(2010).
11. Kootstra, A. M. J., Beftink, H. H., Scott, E. L. and Sanders, J. P., "Optimization of the Dilute Maleic Acid Pretreatment of Wheat Straw," *Biotechnology for Biofuels*, **2**, 31(2009).
12. Sun, Y. and Cheng, J. J., "Dilute Acid Pretreatment of Rye Straw and Bermudagrass for Ethanol Production," *Bioresour. Technol.*, **96**, 1599-1606(2005).
13. Par, C. and Kim, J. S., "Enzymatic Hydrolysis Characteristics of Pretreated Rice Straw By Aqueous Ammonia for Bioethanol Production," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **49**(4), 470-474(2011).
14. Kim, T. H., "Sequential Hydrolysis of Hemicellulose and lignin in Lignocellulosic Biomass by Two-stage Percolation using Dilute Sulfuric Acid and Ammonium Hydroxide," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(11), 2156-2162(2011).
15. Yoo, C. G., Nghiem, N. P., Hicks, K. B. and Kim T. H., "Pretreatment of Corn Stover using Low-Moisture Anhydrous Ammonia (LMAA) Process," *Bioresour. Technol.*, **102**, 10028-10034(2011).
16. Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., and Kubo, S., "Inhibition of Cellulase, Xylanase and β -glucosidase Activities by Softwood Lignin Preparations," *J. Biotechnol.*, **125**, 198-209(2006).
17. Ghosh, T. K., "Measurement of Cellulase Activities," *Pure Appl. Chem.*, **59**(2), 257-268(1987).
18. National Renewable Energy Laboratory, "Standard Biomass Analytical Procedures," http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
19. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia at Moderate Temperature," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136-140**, 81-92(2007).
20. Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B., "Bioethanol Production from Barley Hull Using SAA (soaking in aqueous ammonia) Pretreatment," *Bioresour. Technol.*, **99**, 5694-5702(2008).