

황산과 암모니아를 이용한 목질계 바이오매스의 전처리 공정에 따른 당화 및 발효공정 전략

Roent Dune Cayetano* · 김태현* · 엄병환†

한경대학교 화학공학과/화학기술연구소

456-749 경기도 안성시 중앙로 327

*국립공주대학교 환경공학과

330-717 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24

(2013년 8월 27일 접수, 2013년 9월 20일 수정본 접수, 2013년 9월 25일 채택)

Bioconversion Strategy in Conversion of Lignocellulosic Biomass upon Various Pretreatment Methods using Sulfuric Acid and Aqueous Ammonia

Roent Dune Cayetano*, Tae Hyun Kim* and Byung-Hwan Um†

Department of Chemical Engineering and Research Center of Chemical Technology, Hankyong National University,

327 Chungang-no, Anseong, Gyeonggi 456-749, Korea

*Department of Environmental Engineering, Kongju National University, 1223-24 Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, Chungnam 330-717, Korea

(Received 27 August 2013; Received in revised form 20 September 2013; accepted 25 September 2013)

요 약

본 연구는 농업 부산물인 옥수수대(corn stover)를 이용하여 묽은 황산법(DSA; dilute sulfuric acid)과 암모니아 침지법(SAA; soaking in aqueous ammonia) 그리고 암모니아 재순환 침출법(ARP; ammonia recycle percolation)을 비교하여 각 전처리법의 특징과 장단점을 분석하였고, 동시당화공통발효를 통한 에탄올 생산을 비교하였다. ARP, DSA, SAA를 이용하여 전처리된 고형물(3% 글루칸 투입)을 15 FPU/g-glucan, 30 CBU/g-glucan의 상업용 효소(Spezyme CP와 Novozyme 188)와 *E. coli* KO11 균주(ATCC® 55124)를 이용하여 동시당화공통발효를 수행하였다. 전처리 후에 남은 고형물에 있는 당의 최대이론적 에탄올 수율은 각각 87, 90 그리고 78%였다. 이것은 전처리되지 않은 원래 옥수수대의 총 당량(글루칸 + 자일란) 대비 각각 69, 58, 및 74%에 해당하는 것으로 SAA의 수율이 가장 높게 관찰되었다. 또한 전처리 당화액을 이용한 동시당화공통발효 실험결과는 DSA의 당화액이 발효균주에 대하여 가장 높은 독성을 나타내었고 ARP 전처리 당화액이 그 다음으로 저해효과가 큰 것으로 나타났다. 결국 SAA를 이용하여 전처리한 후 리그닌이 풍부한 당화액은 이용하지 않고 전처리된 고형물과 동시당화공통발효 공정을 이용한 에탄올 생산이 가장 간단하면서 경제적인 공정으로 제안되었다.

Abstract – This is to study the effects of various pretreatment methods of agricultural residue, corn stover, and to compare the feature and pros and cons of each method including dilute sulfuric acid (DSA), soaking in aqueous ammonia (SAA), and ammonia recycle percolation (ARP). In order to convert corn stover to ethanol, various pretreatments followed by simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) were tested and evaluated in terms of ethanol yield. With 3%, w/w of glucan loading using ARP-, DSA-, and SAA-treated solids, SSCFs using recombinant *E. coli* strain (ATCC® 55124) with commercial enzymes (15 FPU of Spezyme CP/g-glucan and 30 CBU/g-glucan enzyme loading) were tested. In the SSCF tests, 87, 90, and 78% of theoretical maximum ethanol yield were observed using ARP-, DSA-, and SAA-treated solids, respectively, which were 69, 58, and 74% on the basis of total carbohydrates (glucan + xylan) in the untreated corn stover. Ethanol yield of SAA-treated solid was higher than those of ARP- and DSA-treated solids. In addition, SSCF test using treated solids plus pretreated hydrolysate indicated that the DSA-treated hydrolysate showed the strongest inhibition effect on the KO11 strain, whereas the ARP-treated hydrolysate was found to have the second strongest inhibition effect. Bioconversion scheme using SAA pretreatment and SSCF can make the downstream process simple, which is suggested to produce ethanol economically because utilization of hemicellulose in the hydrolysate is not necessary.

Key words: Bioenergy, Bioethanol, Cellulose, Hemicellulose, Pretreatment

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: bhum11@hknu.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.

1. 서 론

최근 석유자원의 고갈과 지구의 급격한 기후변화로 인한 자연 환경적 문제들을 해결하기 위해 새로운 신재생 에너지자원을 이용한 액체수송연료 개발에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 바이오디젤, 에탄올, 바이오가스, 수소 등의 바이오연료 중, 특히 차세대 대체 수송용 에너지로 에탄올이 주목을 받고 있으며, 여러 가지 원료 중 목질계 바이오매스가 관심을 받고 있는데, 그 이유는 목질계 바이오매스는 일년에서 수년 정도의 단기간에 재생산이 가능하고 주요 구성성분으로 셀룰로오스(cellulose)와 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 등의 탄수화물이 풍부하게 포함되어 있어 연료용 에탄올의 대량생산이 가능한 원료이기 때문이다. 연료로써 에탄올은 수송용 휘발유를 대체할 수 있는 적합한 물질특성을 나타내고 기존의 석유산업의 기반시설과 재생 가능한 원료를 이용하여 생산과 사용이 가능하다는 특징 때문에 주목받고 있다. 특히 목질계 바이오매스 가운데 옥수수대의 경우는 농작물 중에서 세계적으로 쌀, 밀과 더불어 생산량이 많고, 세계 생산량은 약 2.04×10^8 톤이며 미국에서는 생산량이 가장 많은 대표적 농업 부산물이다[1].

목질계 바이오매스를 바이오연료나 화학제품으로 전환하기 위해서는 물리적 화학적 또는 생물학적 전처리, 효소가수분해, 미생물을 이용한 발효 과정이 필요하다[2]. 바이오매스의 전처리 공정에 대해서 지금까지 다양한 방법이 연구되었으며, 예를 들면 산이나 물을 이용한 증기폭쇄법, 산처리법, 알칼리법, 유기용매법, 산화제법, 초임계 암모니아 처리법 등이 있다[3-14]. 이 방법들은 묽은 황산법(DSA; dilute sulfuric acid)이나 암모니아 침지법(SAA; soaking in aqueous ammonia) 암모니아 재순환 침출법(ARP; ammonia recycle percolation) 등 다양하게 변형되거나 응용되어 왔다[7-9,15,16].

각 공정에서 암모니아를 이용한 전처리법과 묽은 황산법은 목질계 바이오매스 전처리 시 여러 특성을 나타낸다. 먼저 Table 5에 나타난 것과 같이 전처리법에 이용되는 용매인 황산과 암모니아수를 살펴보면, 묽은 황산은 리그닌(lignin) 보다는 헤미셀룰로오스의 가수분해에 효과적이지만 사용된 황산의 분리와 회수가 어렵다. 반면 암모니아수는 헤미셀룰로오스 보다는 리그닌의 가수분해에 효과적이지만 가격이 황산에 비하여 비싸므로 암모니아 회수를 위한 장치가 추가되어야 한다.

DSA 법은 값이 저렴한 황산을 이용하여 높은 온도에서 짧은 시간 동안 바이오매스를 처리하여 헤미셀룰로오스를 분해시킴으로써 효소당화율을 향상시킨다고 한다[12,16]. 반면 ARP 법은 암모니아수를 높은 온도에서 짧은 시간 동안 바이오매스를 처리하여 리그닌을 분해시킴으로써 효소당화율을 향상시킨다[7]. ARP 법을 사용하는 동안 상당량의 헤미셀룰로오스의 가수분해도 피할 수 없다는 점을 개선하기 위해 2002년 SAA 법이 개발되었으며, 이 방법에서는 온도를 낮추는 대신에 반응시간을 DSA나 ARP 법에 비해 길게 하였다[8,9]. 대신에 헤미셀룰로오스와 암모니아의 반응을 최소화하여 리그닌 제거에 대한 선택도를 높였으며 당분해물 생성을 최소화하였다.

이렇게 여러 전처리법에 따라 다른 생성물이 생산되고 처리된 물질의 특성이 다르기 때문에 하향류 공정(downstream process)인 당화-발효 공정에 많은 영향을 주게 된다. 최적의 생산을 위해서는 전처리 공정의 특성에 따라 최적의 하향류 공정이 설계되어 전체 바이오매스부터 제품 전환까지의 공정이 실현되어야 한다. 현재까지 당화 및 발효 공정은 분리당화발효(SHF; separate hydrolysis and fermentation),

동시당화발효(SSF; simultaneous saccharification and fermentation), 동시당화공동발효(SSCF; simultaneous saccharification and co-fermentation), 통합생물공정(CBP; consolidated bioprocessing) 및 직접미생물전환(DMC; direct microbial conversion) 등이 제안되어 왔으나 이중에서 동시당화공동발효 공정을 이용한 전처리된 기질의 효과적인 생물학적 전환은 (1) 생성된 당이 즉시 미생물에 소비되어, 당에 의한 발효 미생물 저해효과를 최소화하고 (2) 오탄당 (C5)과 육탄당 (C6)을 동시에 제품으로 전환시키는 점과 같은 장점으로 인해 중요한 발효공정으로 인정되고 있다[17,18]. 대부분의 전처리 공정은 헤미셀룰로오스(주로 오탄당)의 용해가 불가피하다. 문제는 오탄당 용해는 리그닌의 용해와 동시에 일어나게 된다는 것이고, 용해된 낮은 분자량을 갖는 리그닌은 미생물 발효공정에 저해효과가 크다[19]. 그러므로 이렇게 용해된 오탄당들은 리그닌으로부터 분리·정제하여 발효공정에서 제품으로 전환하여야 높은 전체 수율을 얻을 수 있다. 그러나 당과 리그닌의 분리과정은 복잡하고 높은 비용이 소요되며, 처리된 당액도 SHF, SSF, 및 SSCF 공정 운전 시 미생물에 대한 저해 현상이 관찰되었다.

본 연구에서는 앞서 소개한 세 가지 전처리법의 특성을 분석하고 각 바이오매스 성분의 분리·분별상태에 따라서 하향류 공정인 효소당화와 발효공정을 포함한 전체 바이오매스 전환공정의 설계와 전략에 대하여 논의하였다. 앞서 소개한 세 가지 전처리법으로 옥수수대를 전처리하여 고품과 액상의 당과 리그닌 시료를 생성하고, 생성된 기질을 기반으로 동시당화공동발효 공정을 수행하여 생물학적 전환공정 설계에 대한 확인을 하였다. 다만, 각 전처리와 당화발효공정 조건은 문헌조사를 실시하였고 본 연구에서 최적화는 실시하지 않았다.

2. 실험

2-1. 재료

본 연구에 사용된 바이오매스 옥수수대는 미국 신재생에너지 연구소(NREL; National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO, USA)에서 공급받았으며 세척, 건조 후 분쇄하여 10~35 mesh 크기의 체로 선택된 크기의 옥수수대(일 포함; 이하 옥수수대로 지칭)를 사용하였다. 초기 옥수수대 기질의 구성성분은 NREL/TP-510-42618성 분석법에 따라 결정되었다(Table 1)[20]. 분석된 바이오매스의 구성성분은 36.1%의 글루칸(glucan), 21.4%의 자일란(xylan), 3.5%의 아라비난(arabinan), 1.8%의 만난(mannan), 2.5%의 갈락탄(galactan), 17.2%의 리그닌(acid insoluble lignin + acid soluble lignin), 7.1%의 재(ash), 3.2%의 아세틸그룹(acetyl group), 4.0%의 단백질(protein), 3.6%의 우론산(uronic acid)이었다.

Table 1. Chemical compositions of untreated corn stover

Component	Composition [%w/w]
Glucan	36.1
Xylan	21.4
Arabinan	3.5
Mannan	1.8
Galactan	2.5
Lignin	17.2
Protein	4.0
Acetyl group	3.2
Uronic acid	3.6
Ash	7.1

All numbers are based on the oven dry weight.

효소당화 및 발효 실험의 표준기질로 α -셀룰로오스를 Sigma-Aldrich(Cat# C-8200, Lot# 11K0246)로부터 구입하여 실제 옥수수 대와 비교하였다. 효소당화에 사용한 셀룰로오스 분해 효소 셀룰라아제(cellulase)는 미국 DuPont 사(이전: Genencor International)로부터 제공받은 상업용 효소인 Spezyme CP(Genencor, Lot no. 301-00348-257)를 사용하였고 부족한 활성도 보강하기 위해 추가 사용된 β -글루코시다아제(β -glucosidase)는 Novozyme 188(Novozymes, NC, USA)을 Sigma-Aldrich(Cat. no. C-6105, Lot no. 11K1088)에서 구입 사용하였다. NREL/TP-510-42629에 따라 실험실에서 측정된 각 효소의 평균 활성도는 Spezyme CP의 Filter Paper Unit(FPU)가 31.2 FPU/ml, β -글루코시다아제는 750 CBU(Cellobiase Unit)/ml이고 단백질 함량은 152 mg/ml로 측정되었다[20].

2-2. 전처리장치 및 방법

DSA 및 ARP 전처리에 사용된 실험장치는 물, 황산 및 암모니아수를 공급하기 위한 펌프, 펌프, 온도조절 GC 오븐, 반응기(packed-bed flow through reactor), 샘플실린더, 질소탱크로 구성되어 있다. 침출반응기 외경이 9/10인치, 길이가 10인치 관형이고 SS304L 소재로 제작되었으며, 반응기 부피는 101.9 cm³이다. 반응 액체 저장을 위해서는 1,000 ml 내적을 가진 샘플실린더가 이용되었으며, 전처리 반응 중에 시스템은 고온에서 액체의 증기화를 방지하기 위해 질소탱크에 연결되어 사용된 화합물의 반응온도에서의 증기압 이상(250~300 psig)으로 압력이 유지되었다. HPLC(high pressure liquid chromatography)용 펌프(AccuFlow Series II, Lab Alliance)를 이용하여 황산과 암모니아수를 반응기로 이송하였다. 자세한 구성도는 선행 연구 논문에 포함되어 있다[7].

APR, DSA와 달리 SAA는 시료 15 g을 1:10 비율로 제조된 암모니아수 용액과 같이 250 ml 미디어병에 넣고 밀봉하여 실온(~25 °C)에서 교반하지 않고 10일 동안 반응시켰다. 본 연구에서 사용된 전처리 실험조건은 Table 2에 자세하게 나타내었다. 전처리 후에는 반응기를 열고 고형반응물을 여과지에 여과한 후 증류수로 세척하여 무게를 측정하였고 액상반응물을 모아 부피를 측정하였다. 고형반응물의 함수율 측정 후, 건조하여 성분분석과 추가로 효소당화 및 발효실험을 실시하였다. 액상반응물은 NREL/TP-510-42623 성분분석법에 따라 이차가수분해하여 성분분석을 실시하였다[21].

2-3. 효소가수분해 실험

효소가수분해 측정은 NREL/TP-510-42629 방법에 따라 실시하였다[22]. 실험은 250 ml 삼각 플라스크에 각 기질을 글루칸 1%(w/v)를 투입하고 완충용액(0.05 M citrate buffer)과 효소를 혼합하여 총 100 ml(고형물은 비중을 1.0으로 가정)로 만든 후에 실시하였다. 투입된 시료의 양은 1%(w/v)에 해당하는 1.0 g의 글루칸으로, 시료의 성분 분석 결과에 기초하여 글루칸 1.0 g에 해당하는 시료의 양을 계산하여 투입하였다(예를 들어 어떤 전처리된 시료의 글루칸 함량이 50%

(wt.) 라면, 총 2 g의 전처리된 시료가 투입). 플라스크는 반응온도 50 °C에서 96 h 동안 교반속도 150 rpm으로 진탕배양 되었다. 효소 투입량은 셀룰라아제 15 FPU of Spezyme CP/g-glucan과 β -글루코시다아제 30 CBU of Novozyme 188/g-glucan이었다. 당화실험 중 일정 시간(6, 12, 24, 48, 72, 96 h)마다 1.0 ml씩 시료를 채취하여 글루코스(glucose)와 자일로오스(xylose) 생성량을 HPLC를 이용하여 정량분석하였다.

2-4. 동시당화공동발효 공정

동시당화공동발효 실험은 NREL/TP-510-42630에 따라서 실시되었다[23]. 발효공정은 250 ml 삼각플라스크에 전체 100 ml의 실험부피(working volume)를 투입하여 실시하였다. 투입된 시료의 양은 3%(w/v)에 해당하는 3.0 g의 글루칸으로, 전처리 시료의 성분분석 결과에 기초하여 글루칸 3.0 g에 해당하는 시료의 양을 계산하여 투입하였다. 동시당화발효 실험은 37 °C에서 150 rpm의 교반속도로 120 h 동안 진탕배양기에서 진행되었다. 본 실험에서 사용한 발효균주는 글루코오스와 자일로오스 등의 육탄당과 오탄당을 모두 발효할 수 있도록 유전자 조작이 된 *E. coli* KO11(ATCC® 55124)였고, LB (Luria-Bertani) 배지를 이용하였다. 효소 투입량은 셀룰라아제 15 FPU of Spezyme CP/g-glucan과 β -글루코시다아제 30 CBU of Novozyme 188/g-glucan이었다. 반응이 진행되는 동안 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 h에 시료를 취해서 잔존 당 농도 및 생성된 에탄올 농도를 HPLC로 측정하였다. 본 연구에서 에탄올의 이론적 최대 수율값은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{에탄올 수율}[\%, \text{최대 이론량}] = \frac{\text{반응기 내부 에탄올 생산량(g)}}{\text{반응기 내부 초기 당량(g)} \times 0.511 \times 100} \quad (1)$$

여기서, 반응기내부 초기당량은 글루칸과 자일란의 합이다.

2-5. 분석방법

당 성분들은 NREL/TP-510-42618에 따라서 성분을 분석하였다[20]. 분석할 고체 샘플 0.3 g을 10배(3.0 ml) 부피의 고농도 72%(w/w) 황산에 넣고 30 °C에서 1 h 동안 1차 산 가수분해를 시킨 뒤에 84 ml의 증류수로 4.0% 황산 액으로 희석한 후 고압멸균기를 이용하여 121 °C에서 1 h 동안 2차 가수분해를 하였다. 가수 분해액은 Bio-Rad Aminex HPX-87P column이 장착된 HPLC(Varian 356-LC, Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량 분석을 수행하였다. HPLC 분석 조건은 분석용 고급 증류수를 이동상으로 유속을 0.6 ml/min으로 운전하였고, 컬럼(column)의 온도는 85 °C이었다. 리그닌과 재(ash)의 성분 또한 NREL/TP-510-42618에서 제시한 표준 방법으로 분석하였다[20]. 고체 샘플 1.0 g을 9.0 ml 부피의 고농도 72%(w/w) 황산에 넣고 25 °C에서 2 h 동안 반응시킨 후 증류수로 3.0% 황산 액으로 희석 후 4 h 동안 끓였다. 그 후에 용해되지 않은 잔여물을 측정하여 리그닌 성분을 계산하였고, 같은 잔여물을 565 °C 전기로를 이용하여 24 h 동안 유기물을 연소시키고 재의 성분을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 고형 부산물 수율 및 주요 당성분 분석

본 연구에서 시료 준비를 위해 사용된 전처리 조건(Table 2)들은

Table 2. Pretreatment conditions of ARP, DSA, and SAA methods

	ARP	DSA	SAA
Temp.	170 °C	170 °C	Ambient temp.
Pressure	1.9 MPa	1.9 MPa	Ambient press.
Reaction Time	10 min	4.4 min	10 days
Reagent	15 wt% NH ₃	1.0 wt% H ₂ SO ₄	30 wt% NH ₃
Remarks	Preheating	Preheating	No agitation

Table 3. Compositions of untreated and treated solids upon various pretreatments using corn stover

Samples	S.R. ¹ (wt%)	Glucan (wt%)	Xylan (wt%)	K-Lignin ² (wt%)	Xylan removal (wt%)	Lignin removal (wt%)
Untreated	100	36.1	21.4	17.2	-	-
SAA-treated	75.9	38.7	18.2	7.5	14.9	56.3
ARP-treated	57.5	35.6	9.2	5.1	57.0	70.2
DSA-treated	50.2	31.7	1.3	13.9	94.1	19.2

¹All numbers are based on the oven dry weight of untreated biomass.²Solid Remaining after pretreatment.³Klason lignin.**Table 4. Total sugar (glucan + xylan) loading in SSCF reactor**

	Solid		Hydrolysate		Total sugar Loading (g/100 ml)
	Glucan (g/100 ml)	Xylan (g/100 ml)	Glucan (g/100 ml)	Xylan (g/100 ml)	
SAA-treated	3.0 g	1.38 g	- None -		4.38 g
ARP-treated	3.0 g	0.78 g	0.0 g	1.0 g	4.78 g
DSA-treated	3.0 g	0.12 g	0.37 g	2.2 g	5.69 g

Table 5. Features of various pretreatment methods

Pretreatment	DSA	ARP	SAA
Typical reaction conditions	<ul style="list-style-type: none"> · 170-220 °C · 5-30 min · >150 psig 	<ul style="list-style-type: none"> · 160-210 °C · 5-30 min · >200 psig 	<ul style="list-style-type: none"> · 20-80 °C · 4-24 h · 0-50 psig
Features and effects	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for hemicellulose hydrolysis · High selectivity for hemicellulose removal 	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for delignification · Ammonia can be reused 	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for delignification · Ammonia can be reused · High retention of hemicellulose
Advantages and fates of components	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for hemicellulose solubilization (90-100% of cellulose and 60-80% of lignin retention in solid; 80-100% of hemicellulose solubilization) · Inexpensive chemical (sulfuric acid) · Short reaction time 	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for delignification (90-100% of cellulose and 50% of hemicellulose retention in solid; 70-95% of lignin removal) · Ammonia can be recovered and recycled · Short reaction time 	<ul style="list-style-type: none"> · Effective for delignification (50-70% of lignin removal) · Low reaction temperature (low energy input; no inhibitory product formations) · Ammonia can be recovered and recycled
Weakness	<ul style="list-style-type: none"> · High reaction temperature (more energy required; degradation of hemicellulose into inhibitory products) · Low lignin removal · pH Conditioning and detoxification units are required before saccharification & fermentation · C5 sugar (hemicellulose) recovery is necessary (sulfuric acid removal/recovery system is required) 	<ul style="list-style-type: none"> · High reaction temperature (more energy required) · Low selectivity for hemicellulose · C5 sugar (hemicellulose) recovery is necessary. · More expensive than sulfuric acid (ammonia recovery system is required) 	<ul style="list-style-type: none"> · More expensive than sulfuric acid (ammonia recovery system is required) · Long reaction time

이전 논문들의 최적 혹은 일반적으로 효과가 입증된 조건을 선별하여 결정하였다[6,7,10,12]. Table 3은 DSA, SAA, ARP를 이용해 전처리한 후 고형부산물의 잔류율(solid remaining %)과 반응고형물의 성분분석 결과를 보여준다.

Table 3에서 확인할 수 있듯이 전처리 되지 않은 기질(untreated) 기준(100%)으로 각각의 전처리 반응 후의 고형부산물의 잔류율은 각각 75.9%(SAA), 57.5%(ARP), 50.2%(DSA) 순으로 나타났다. 성분분석 결과에 의하면 제거된(액상으로 용해) 성분은, 전처리되지 않은 옥수수대를 기준으로 DSA법으로 전처리 하였을때, 94.1%의 헤미셀룰로오스가 액상으로 분리되었으나 약 19.2%의 리그닌만이 제거되어 앞서 Table 5에 정리된 것 같이 헤미셀룰로오스에 대한 황산의 선택도가 높음을 알 수 있다. 반대로 SAA의 경우 15% 정도의 헤미셀룰로오스만이 제거되고 56% 이상의 리그닌이 제거되어 리그닌에 대한 암모니아의 선택도가 높음을 알 수 있다. ARP의 경우 두 가지 방법의 효과가 혼합된 결과가 나타났으며 70.2%의 리그닌 제거

율을 나타내고 57%의 헤미셀룰로오스가 액상으로 제거되었다. 이와 같이 본 연구에서 비교한 세 가지 전처리 방법은 각자 주요 성분들이 전처리 공정 후에 고형과 액상으로 다양하게 분포되는 큰 특징들을 가지고 있다. 이러한 특징들을 비교하기 위해서 일단 고형물의 효소 당화율을 측정하고 에탄올 발효를 실험을 통해 다른 전처리법에 따라 전체 생물학적 공정의 설계가 달라질 수 있다는 것을 고찰하고자 한다.

3-2. 효소의 가수분해도

Table 3에서 살펴 본 바와 같이 DSA법은 옥수수대의 세 가지 주요 성분 중 “셀룰로오스 + 리그닌”의 고형물과 액상의 헤미셀룰로오스로 성분분별을 효과적으로 할 수 있으며, 액상의 오탄당을 황산용액으로부터 효과적으로 회수할 수 있다면 오탄당 발효를 통하여 전체 에탄올 수율을 높일 수 있다. 한편 SAA 전처리법을 적용하여 에탄올을 생산할 경우에는 대부분의 셀룰로오스 와 헤미셀룰로오스가

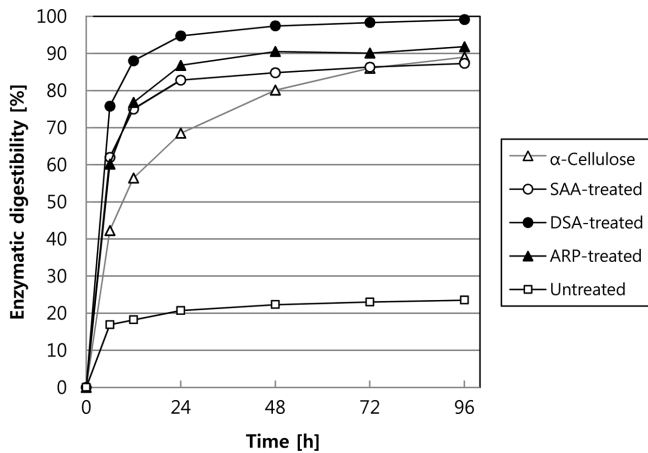


Fig. 1. Enzymatic digestibility test of various pretreated solids.

고형물에 남아 있으나 약 50% 이상의 리그닌은 제거되거나 반대로 40%가 넘는 리그닌이 고형물에 남아 있게 된다. 전처리된 고형물은 효소를 이용하여 글루코오스와 자일로오스 등의 단당으로 분해가 되고, 다시 미생물에 의해 에탄올로 전환이 되게 된다. 높은 수율의 에탄올 생산공정 설계를 위해서는 고형물의 효소에 의한 가수분해도(당화도)를 측정하는 것이 발효도 측정에 앞서 중요하다.

Fig. 1은 SAA, DSA, ARP 처리된 고형물의 효소반응시간에 따른 효소당화도의 경향을 나타내고 있다. DSA 법으로 처리된 경우 96시간에 거의 완전당화를 나타냈다. 그리고 ARP, SAA 전처리법으로 처리된 경우는 같은 시간대에서 각각 91.8%와 87.3%를 보였다. DSA 법으로 처리된 고형물의 전처리 효과가 높은 것을 나타내고 있으나 한 가지 주목해야 할 부분은 Table 3에 나타났듯이 DSA 처리 고형물의 경우 전처리 되지 않은 옥수수대에 비해서 약 4.4%의 글루칸 손실이 전처리 중에 생겼으며 이것은 총 글루칸의 12%에 해당하는 양이다. 반면 ARP, SAA 전처리 중에는 글루칸의 손실이 거의 없음을 알 수 있다. 전처리되지 않는 기질의 경우는 96 h 동안 당화율이 약 23%를 나타냈다. 전처리된 고형물의 효소당화율만 비교한다면 DSA 법이 효과적인 공정으로 판단될 수 있으나 앞서 설명하였듯이 전체 에탄올 생산공정에 투입되는 바이오매스 양에 비하여 전처리공정에서의 당손실과 효소당화율 등을 고려하여 전체적으로 수율을 판단해야 한다. Fig. 1에서 보듯이 세 가지 전처리법 모두 순수 셀룰로오스 기질인 α-셀룰로오스의 당화율보다 비슷하거나 높게 나타났으며 초기 가수분해 반응속도도 현저하게 빠르게 관찰되었다.

3.3. 동시당화공통발효 공정실험

DSA, ARP, 그리고 SAA 법을 이용하여 전처리한 옥수수대의 고형물과 K011 균주를 이용하여 동시당화발효 실험을 실시하여 에탄올 생산량을 측정하였고 그 결과를 Fig. 2에 나타냈다. K011 균주를 이용한 이유는 SAA와 ARP 전처리된 고형물에는 헤미셀룰로오스 성분이 많이 포함되어 있는데, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 두 가지 모두 당화발효시켜 에탄올로의 전환 수율을 측정할 목적이었다. 연료용 에탄올 생산공정의 상용화가 실현된다면 공정에 투입되는 총 바이오매스의 양에 비교해서 생산되는 최종 제품의 생산량이 중요할 것이다. 그러므로 전처리 방법은 달라도 결국 목질계 바이오매스에 포함되어 있는 모든 탄수화물 중 얼마만큼을 당으로 만

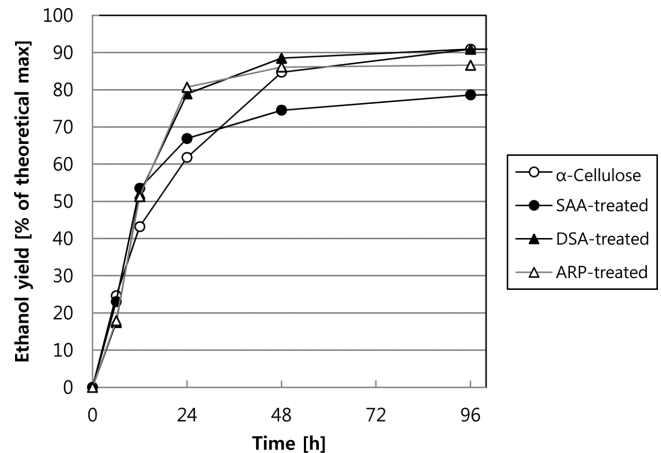


Fig. 2. SSCF tests of DSA-, ARP-, and SAA-treated solids.

들어 에탄올로 전환시키는 것이 가능한지를 측정하는 것이 중요하다. Fig. 2에 나타난 에탄올 생산수율은 SSCF 반응기 내부에 투입된 고형물의 글루칸과 자일란의 합에 대하여 이론적으로 생산될 수 있는 최대 에탄올 생산량에 대한 백분율로 계산되었다. Fig. 2에 보듯이 144시간의 반응 후 측정된 에탄올 수율은 DSA, ARP, SAA 순서로 나타났으며, 각각 90.3%, 87.0%, 그리고 79.0%였다. 같은 시간 동안 α-셀룰로오스의 경우 90.9%의 에탄올 수율을 나타냈다. SAA 전처리된 고형바이오매스를 이용한 동시당화공통발효 공정의 경우 반응기에 총 투입된 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 양은 다른 두 가지 경우 보다 많았으며 옥탄당과 오탄당으로부터 모두 에탄올이 생산되었으므로 수율은 낮았으나 생산된 총 에탄올 양은 가장 많았다. 그러나 ARP와 DSA 전처리의 경우 상당량 혹은 대부분의 헤미셀룰로오스가 액상으로 용해되므로 액상의 헤미셀룰로오스를 회수하여 당화발효시킬 수 있다면 SAA의 결과와 비교할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서 ARP 그리고 DSA 전처리 공정에서 당화된 액상성분을 회수하고 리그닌을 제거한 후 동시당화발효 실험을 수행하였다.

3.4. 전처리 당화액의 동시당화발효와 특성효과

SAA 전처리의 경우 전처리 당화액 중에 헤미셀룰로오스가 비교적 소량 포함되어 있는 반면 당화발효 공정에 저해효과가 큰 리그닌이 많이 포함되어 있다. 따라서 약간의 헤미셀룰로오스를 이용하기 위해서 리그닌을 전처리 당화액으로부터 분리하여 회수하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 이러한 고비용 저효율의 리그닌 분리 공정을 제거하는 것이, 전처리 당화액에 존재하는 약간의 헤미셀룰로오스에서 얻을 수 있는 당을 포기함에도 불구하고 가장 경제적이란 가정을 하였다. 따라서 Fig. 3의 실험에서 SAA의 경우 전처리된 고형물만을 반응기에 투입하여 실시하였으며 ARP와 DSA는 고형물과 당화액을 같이 투입하여 실시하여 비교하였다. Table 4에서는 각 반응기에 투입된 고형물과 당화액의 총 당함유량을 나타내었다. 투입된 당화액은 3% 글루칸의 고형물을 기본적으로 계산하여 투입하고, 투입된 고형물을 전처리 하였을 때 실제로 당화액으로 실험적으로 얻을 수 있었던 헤미셀룰로오스 양을 고려하여 결정하였다. Table 4에서 보이듯이 ARP 전처리 당화액의 경우 헤미셀룰로오스 양이 적은 이유는 전처리 당화액의 리그닌 성분을 활성탄으로 제거

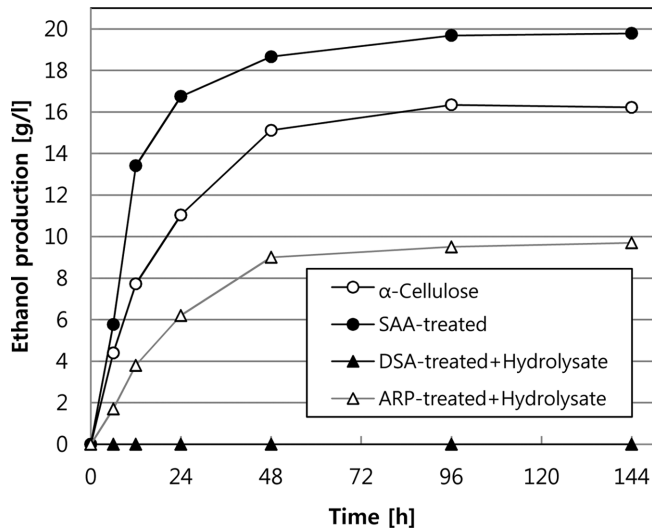


Fig. 3. SSCF tests of DSA-, ARP-, and SAA-treated solids and hydrolysates.

시키는 과정에서 활성탄소에 의한 자일란의 흡착으로 생기는 손실 때문이다. DSA 전처리 당화액의 경우 산도를 조절하기 위하여 CaCO_3 를 이용하여 황산을 제거한 후 투입하였는데, ARP 전처리 당화액에 비하여 높은 자일란 회수율을 보였다. 기본적으로 각각의 전처리 방법에 따른 당화액 생산과 저해물질(리그닌)을 어느 정도 제거하고 산도를 조절하여 실제 당손실 등을 사실적으로 반영하고자 의도하였다.

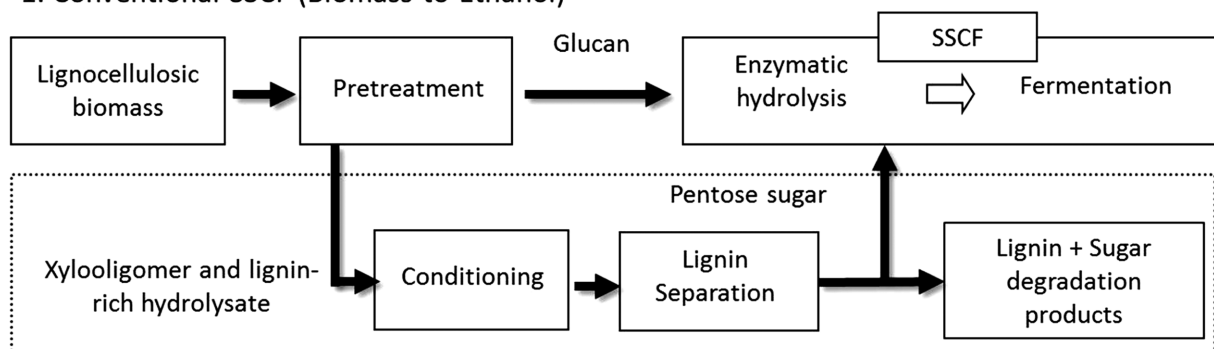
SAA 전처리된 고형물만 투입된 동시당화발효 실험에서는 96시간에 16.3 g/l의 에탄올이 생성되었다. 반면 ARP 전처리 후의 고형물과 당화액이 같이 투입된 반응기에서는 9.5 g/l, 그리고 DSA 전처리의 경우 발효가 전혀 일어나지 않고 미생물의 활동이 관찰되지 않았다. SAA를 이용한 에탄올 생산의 경우 총 투입 당량이 4.38 g으로 ARP와 DSA의

4.78, 5.69 g 보다 적었음에도 불구하고 가장 높은 생산량을 나타내었다. ARP 전처리 당화액의 경우 활성탄소를 이용하여 리그닌과 과분해물들을 제거하려 하였으나 효과적이지 않다고 추측할 수 있었다. 다른 제거방법들은 고비용의 방법들이라 본 연구에서는 고려하지 않았다[24]. DSA 전처리 당화액의 경우 탄산칼슘(CaCO_3)을 이용하여 황산을 침전시키고 산도를 조절하였으나 발효저해물질 제거에 효과가 없었다고 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 목질계 바이오매스인 옥수수대를 이용하여 DSA, ARP 그리고 SAA 전처리 방법의 특징을 살펴보고 각각의 전처리 후 동시당화발효 공정을 이용한 에탄올 생산을 비교 분석하였다. 본론에서 분석한 바와 같이 SAA 전처리는 소량(~17%)의 헤미셀룰로오스와 다량의(~56%)의 리그닌을 액상으로 제거한다. 본 연구에서 보듯이 ARP 전처리 당화액의 활성탄소를 이용한 리그닌 제거는 당의 손실과 함께 독성물질 제거에 효과가 낮았다. 따라서 SAA 전처리 당화액에 있는 소량의 오탄당을 이용하려고 고비용의 추가 공정을 추가 건설·운전하는 것은 비효율적이라는 결론이며, SAA 전처리 당화액을 포기하고 전처리 고형물만을 이용하여 동시당화공통발효하여 높은 수율의 에탄올 생산공정을 만들 수 있다. Fig. 4-1은 DSA나 ARP와 같은 높은 온도와 높은 압력의 반응기를 이용하는 전처리 공정과 동시당화공통발효 공정을 이용한 옥수수대의 에탄올 전환공정을 나타내며, Fig. 4-2는 SAA와 동시당화공통발효 공정을 이용한 전환공정을 설명하고 있다. Fig. 4-1의 점선으로 나타낸 사각형 안의 하향류 공정들은 전처리 당화액 안의 리그닌과 당의 과분해물을 제거하고 산도를 조절하기 위한 것들로 본 연구에서 살펴본 SAA와 동시당화공통발효 공정에서는 불필요하게 되는 부분이다. 따라서 많은 건설비용과 운전비용이 절감될 수 있어 경제적인 공정이 가능할 수 있다.

1. Conventional SSCF (Biomass-to-Ethanol)



2. SAA- SSCF (Biomass-to-Ethanol)

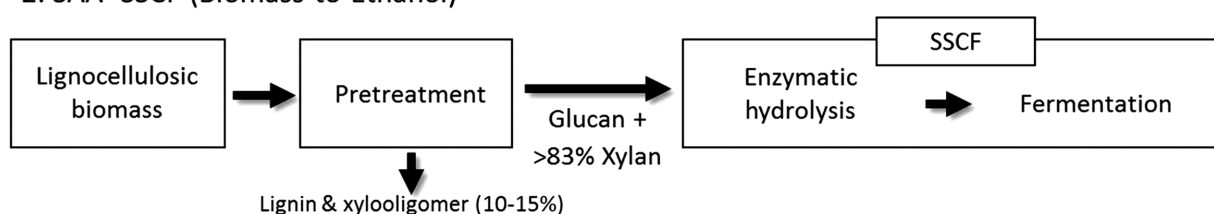


Fig. 4. Comparison between conventional bioconversion scheme and proposed bioconversion scheme using SAA and SSCF.

감 사

본 연구는 2012년도 환경대학교 학술연구조성비(과제번호 2012-052)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

References

- Kamm, B., Gruber, P. R. Kamm, M., Biorefineries - Industrial Processes and Products, Wiley-VCH Weinheim(2007).
- Mosier, N., Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R., Lee, Y. Y. and Holtzapple, M., "Features of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresour. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
- Fernandez-Bolanos, J., Felizon, B., Heredia, A. and Jimenez, A., "Characterization of the Lignin Obtained by Alkaline Delignification and of the Cellulose Residue from Steam-exploded Olive Stones," *Bioresour. Technol.*, **68**, 121-132(1999).
- Sawada, T., Nakamura, Y., Kobayashi, F., Kuwahara, M. and Watanabe, T., "Effects of Fungal Pretreatment and Steam Explosion Pretreatment on Enzymatic Saccharification of Plant Biomass," *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 719-724(1995).
- Schwald, W., Brownell, H. H. and Saddler, J. N., "Enzymatic Hydrolysis of Steam Treated Aspen Wood: Influence of Partial Hemicellulose and Lignin Removal Prior to Pretreatment," *J. Wood Chem. Technol.*, **8**(4), 543-560(1988).
- Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **121-124**, 1119-1132(2005).
- 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).
- Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment and Fractionation of Corn Stover by Ammonia Recycle Percolation (ARP) Process," *Bioresour. Technol.*, **96**, 2007-2013(2005).
- 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).
- Iyer, P. V., Wu, Z., Kim, S. B. and Lee, Y. Y., "Ammonia Recycled percolation Process for Pretreatment of Herbaceous Biomass," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57-58**, 121-132(1996).
- Jacobsen, S. E. and Wyman, C. E., "Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Process," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84-86**, 81-96(2000).
- Kim, J. S., Lee, Y. Y. and Torget, R. W., "Cellulose Hydrolysis Under Extremely Low Sulfuric Acid and High-temperature Conditions," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **91-93**, 331-340(2001).
- Allen, S. G., Schulman, D., Lichwa, J., Antal, M. J. Jr., Lynd, L. R., "A Comparison Between Hot Liquid Water and Steam Fractionation of Corn Fiber," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**(13), 2934-2941(2001).
- Park, Y. C., Kim, J. W. and Kim, J. S., "Pretreatment Characteristics of Ammonia Soaking Method for Cellulosic Biomass," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **49**(3), 292-296(2011).
- Holtzapple, M. T., Lundeen, J. E., Sturgis, R., Lewis, J. E. and Dale, B. E., "Pretreatment of Lignocellulosic Municipal Solid Waste by Ammonia Fiber Explosion (AFEX)," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34-35**(1), 5-21(1992).
- Zhu, Y., Lee, Y. Y. and Elander, R. T., "Dilute-acid Pretreatment of Corn Stover Using a High-solids Percolation Reactor," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **117**, 103-114(2004).
- Wyman C., Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Taylor & Francis, Washington D.C.(1996).
- Shrestha, R. K., Hur, O. S. and Kim, T. H., "Pretreatment of Corn Stover for Improved Enzymatic Saccharification using Ammonia Circulation Reactor (ACR)," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **51**(3), 335-341(2013).
- Hahn-Hägerdal, B., Jeppsson, H., Olsson, L. and Mohagegi, A., "An Interlaboratory Comparison of the Performance of Ethanol Producing Micro-organisms in a Xylose-rich Acid Hydrolysate," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **41**, 62-72(1994).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Tmpleton, D. and Crocker, D., "Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass," National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42618 ed. Golden, CO(2010).
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J. and Tmpleton, D., "Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples," National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42623 ed. Golden, CO(2008).
- Selig, M., Weiss, N. and Ji, Y., "Enzymatic Saccharification of Lignocellulosic Biomass," National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42629 ed. Golden, CO(2008).
- Dowe, N. and McMillan, J., "SSF Experimental Protocols-lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation," National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42630 ed. Golden, CO(2008).
- Maciel de Mancilha, I. and Karim, M. N., "Evaluation of ion Exchange Resins for Removal of Inhibitory Compounds from Corn Stover Hydrolyzate for Xylitol Fermentation," *Biotechnol. Prog.*, **19**(6), 1837-1841(2003).