

역새를 이용한 바이오 에탄올 생산을 위한 암모니아 침출 공정 최적화

김경섭 · 김준석[†]

경기대학교 화학공학과
443-760 수원시 영통구 이의동 산 94-6
(2010년 6월 1일 접수, 2010년 7월 8일 채택)

Optimization of Ammonia Percolation Process for Ethanol Production from Miscanthus Sinensis

Kyoung-Seob Kim and Jun Seok Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, 94-6, Yiui-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi 443-760, Korea
(Received 1 June 2010; accepted 8 July 2010)

요 약

당질계 및 전분질계 바이오 매스(1세대 바이오 매스)의 단점은 식량고갈의 문제로 인한 원료수급이 불안정하여 원료비 상승과 함께 원료 확보라는 문제에 당면해 있다. 이를 해결하기 위한 다양한 대책이 모색되었고 그 대책으로 목질계 바이오 매스(2세대 바이오 매스)에 대한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 목질계 바이오 매스는 매우 복잡하고 어려운 Lignin 제거 문제에 직면하게 되었다. 그리하여 현재는 기존의 바이오 매스의 단점을 극복할 새로운 바이오 매스인 비 식용작물의 관심이 증가하고 있다. 비 식용작물 바이오 매스는 당질계 및 전분질계 바이오 매스와 달리 식량문제로 인한 원료비의 상승이나 원료 확보 면에서 안전하며 또한 기존 목질계 바이오 매스에 비해 보다 쉽게 Lignin을 제거할 수 있는 장점이 있다. 본 논문에서는 이러한 비 식용작물 중 Cellulose 함량이 높고 Lignin 함량이 상대적으로 낮은 역새를 이용하여 암모니아 공정 전처리의 최적화 조건을 연구하였다. 공정변수로는 암모니아 농도, 반응시간, 반응온도를 선정하였으며 전처리 후 각 반응물의 Cellulose 함유율, Lignin 함유율, 잔류 고체량 및 가수분해도를 반응표면 분석법을 이용하여 최적 전처리 조건을 확립하였다. 최적조건 탐색 결과는 암모니아 반응농도; 11.27%, 반응온도; 157.75 °C, 반응시간; 10.01 min으로 최적 반응조건을 결정할 수 있었으며 최적조건으로 전처리 후 역새의 상대적 Cellulose 함유율; 39.98%, Lignin 함유율; 8.01%, 가수분해도; 85.89%의 결과를 얻어, 역새가 기존 목질계 바이오 매스들보다 전처리 및 당화 발효에 있어 유리한 기질이라고 결론지을 수 있다.

Abstract – Lignocellulose(2nd generation) is difficult to hydrolyze due to the presence of lignin and the technology developed for cellulose fermentation to ethanol is not yet economically viable. However, recent advances in the extremely new field of biotechnology for the ethanol production are making it possible to use of agriculture residuals and nonedible crops biomass, e.g., rice straw and miscanthus sinensis, because of their several superior aspects as agriculture residual and nonedible crops biomass; low lignin, high contents of carbohydrates. In this article, as the basic study of AP(Ammonia Percolation), the properties and the optimum conditions of process were established, and then the overall efficiency of AP was investigated. The important independent variables for AP process were selected as ammonia concentration, reaction temperature, and reaction time. The percolation condition for maximizing the content of cellulose, the enzymatic digestibility, and the lignin removal was optimized using RSM(Response Surface Methodology). The determined optimum condition is ammonia concentration; 11.27%, reaction temperature; 157.75 °C, and reaction time; 10.01 min. The satisfying results were obtained under this optimized condition, that is, the results are as follows: cellulose content(relative); 39.98%, lignin content(relative); 8.01%, and enzymatic digestibility; 85.89%.

Key words: Biomass Pretreatment, Ammonia Percolation, Enzymatic Hydrolysis, Bio Ethanol

1. 서 론

최근 화석연료 사용에 따른 고 유가와 지구온난화 문제로 인한 대체 에너지 개발이 활발히 진행되고 있는 가운데, 세계 각국에서는 차

세대 연료로서 바이오 에탄올의 보급이 급속하게 진행되고 있다. 대기중의 CO₂ 농도는 초기 산업화 이래 거의 25%가 증가되었으며, 과거 30년 동안 CO₂ 농도의 증가율은 훨씬 더 크다. 이에 미국은 2017년까지 석유소비를 20% 줄이는 대신 바이오 에탄올 등의 대체 에너지 이용을 확대하고(20 in 10) 2025년까지는 에너지의 25%(25 × 25 VISION)까지 확대하며, 2030년에는 자동차 가솔린의 30%를

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jskim84@kyonggi.ac.kr

(30×30 VISION, 2004년 기준) 바이오 에탄올로 공급한다는 계획을 수립하였다. 또한 유럽, 일본, 중국도 바이오 에탄올 생산 확대 정책을 추진 중에 있다. 이처럼 세계적으로 화석연료의 의존도를 낮추기 위한 대체 에너지 개발과 정책에 전력을 다하고 있다 [1-3]. 이러한 대체 에너지 중 바이오 연료로 통용되는 바이오 에탄올은 그 중심에 있다. 바이오 에탄올이란 일반적으로 식물을 원료물질로 하여 생산되는 에탄올을 말한다. 바이오 에탄올은 크게 사탕수수과 옥수수 등으로부터(제 1세대 바이오 매스) 생산되는 당분질, 전분질계 에탄올과 나무와 같은 바이오 매스(제 2세대 바이오 매스)를 원료로 하여 생산되는 섬유질계 에탄올로 구분될 수 있다. 이들 바이오 매스의 일반적인 바이오 에탄올 생산공정은 맥주생산 공정과 비슷하여 탄수화물을 Glucose(포도당)로 전환하고, 생성된 Glucose를 이용하여 발효하는 공정인 생물공정에 의해 생산된다. 이렇듯 바이오 에탄올은 재생 가능한 원료로부터 얻어지며 오염물질을 거의 배출하지 않아 환경 친화적인 연료이고, 온실가스의 양을 줄일 수 있다는 특성을 갖고 있다[4-7]. 현재 세계에 공급되는 대부분의 에탄올은 설탕과 옥수수로부터 생산되는 당분질계 혹은 전분질계 에탄올이다. 그러나 기존 바이오 에탄올의 주된 원료가 되어 온 제 1세대 바이오 매스와 그 대체 원료인 제2세대 바이오 매스는 각각 그들이 가지고 있는 문제점에 당면해 있다. 제 1세대 바이오 매스는 식량 고갈문제로 인한 장기적인 관점에서의 원료수급의 불안정으로 인한 원료비 상승과 원료 확보의 문제점이 나타났으며 궁극적으로 이들 바이오 매스로부터 생산되는 에탄올로 전 세계가 필요로 하는 에탄올 수요량을 충족시킬 수 없다는 것이다. 그리고 이러한 문제점의 대안인 제 2세대 바이오 매스 중 목질계 바이오 매스의 문제점은 Lignin 제거 과정인 전처리 공정으로 인한 생산비용의 상승과 함께, 낮은 생산성의 문제로 이어져 제1세대 바이오 매스와 비교하였을 때 경제성이 낮아 여러 가지로 개선해야 할 부분이 존재한다[8,9]. 그러나 본 논문에서 다루고자 하는 역새와 같은 비 식용작물 바이오 매스는 식량고갈의 문제를 극복할 수 있는 동시에 목질계 바이오 매스와는 달리 Lignin의 함량이 낮고 Lignin 제거방법에 있어서도 수월하다는 장점을 가지고 있어 목질계 바이오 매스의 문제 또한 극복할 수 있기 때문에 차세대 바이오 매스로서 각광 받고 있다. 따라서 본 논문에서는 역새를 이용하여 기존 Lignin 제거에 가장 효과가 좋은 암모니아 전처리 방법 중 암모니아 침출 공정의 최적화 조건을 설정하기 위해 반응표면 분석법을 이용하여 최적화 조건을 설정하는 연구를 수행하였다[10-13].

2. 실험재료 및 방법

2-1. 재료

본 실험에 사용된 바이오 매스는 비 식용작물 계열의 역새를 창해 에탄올 연료소로부터 공급받아 사용하였다. 기질은 40 mesh를 통과한 균일한 크기를 사용하였으며 45 °C에서 건조하여 수분이 제거된 기질을 사용하였다. 사용된 효소는 한국 에너지 기술연구소(KIER; Korea Institute of Energy Research)로부터 공급받은 Celluclast (Cellulase, Novo Co., Denmark)와 Novozyme-188(β-glucosidase, Novo Co., Denmark)를 사용하였다. 평균 비활성도는 Filter paper activity가 65FPU/ml, b-glucosidase activity는 48CBU/ml로 측정되었다. 에탄올을 생산하기 위한 균주로는 Saccharomyces cerevisiae를 인큐베이터에서 30 °C로 24시간 동안 중균 배지로 YPD(Yeast extract, Peptone, Dextrose)Broth를 사용하여 중균 배양한 후 4 °C에서 냉동

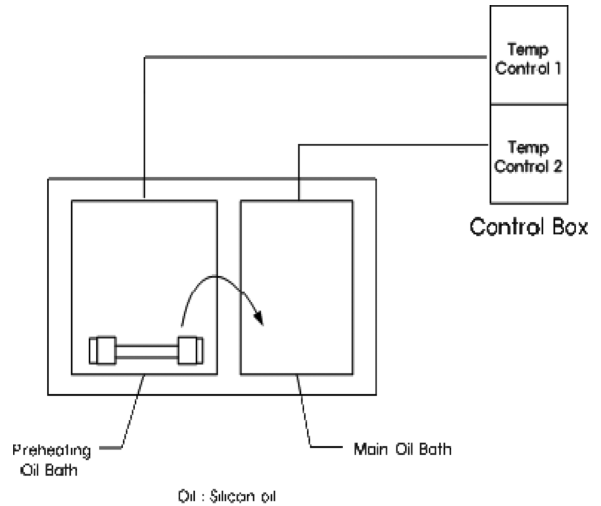


Fig. 1. Schematic diagram of experimental setup of batch process.

보관하여 사용하였다.

2-2. 전처리 장치

최적조건 설정을 위해 설계된 실험조건에 따라 각각의 암모니아 반응농도, 반응시간, 반응온도로 고액 비율 1:10(1 g : 10 ml)으로 역새를 단일 반응기를 이용하여 전처리하였다. 암모니아 침출 공정(AP)의 최적조건을 설정하기 위한 단일 반응기는 Fig. 1에 나타내었다. 실험장치는 Preheating oil bath, Main oil bath, 각각의 온도 조절 장치로 이루어져 있으며 반응기는 길이가 180 mm 내경이 9 mm의 Tube 형태이며 암모니아의 부식을 방지하기 위해 SUS재질로 제작되었다.

암모니아 침출 반응은 단일 반응기에 의해 결정된 최적조건으로 20 g의 기질을 200 ml의 암모니아 용액(1:10)으로 반응시켰으며 이를 반응표면 분석법으로 결정된 최적조건 결과와 비교하였다. 암모니아 침출 반응기는 Fig. 2에 나타내었다. 액체저장고, 펌프, 오븐, 침

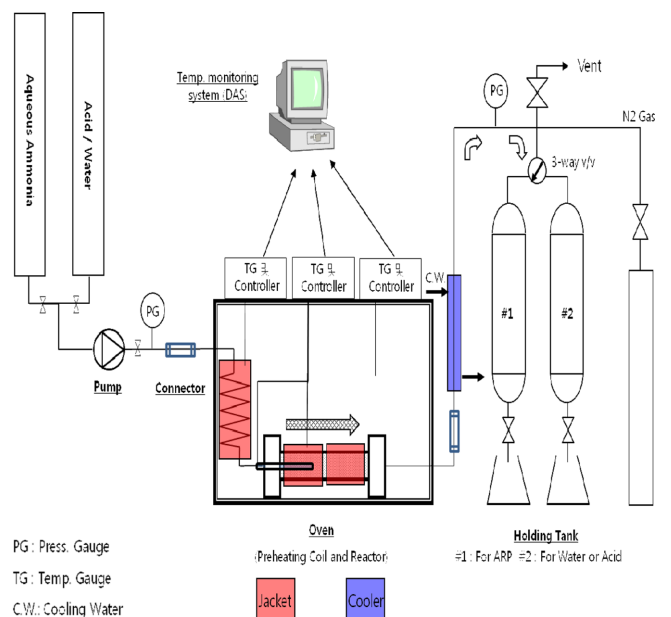


Fig. 2. Schematic diagram of experimental setup of ammonia percolation process.

출 반응기, 유출 액체 저장고로 구성되었으며 침출 반응기의 길이는 190 mm 내경이 30 mm의 Tube 형태이고 SUS 재질로 제작되었다. 반응기의 부피는 280.10 cm³이다. 질소 분배와 연결하여 압력을 조절하여 고온에서의 액체 증기화를 방지하였고 용액의 흐름은 펌프 미터와 압력 게이지에 의해 조절하였다. 전처리된 역사는 증류수를 사용하여 잔류 암모니아를 세척하고 45 °C oven에서 건조하여 수분을 제거하였다[12,14,15].

2-3. 효소당화 및 가수분해도 결정

당화실험은 기존 Cellulose 계열의 최적 당화조건인 50 °C, pH 4.8 로 72시간 동안 진행하였다. 삼각플라스크에 sodium citrate buffer (0.5 M, pH4.8)와 전처리된 역사를 기질농도 5%(w/v)로 혼합하여 Autoclave에서 121 °C로 15분 동안 멸균한 후 상온으로 냉각시켜 효소를 60FPU/ml의 양으로 접종하였고 50 °C의 Shaking incubator 안에서 180 RPM의 속도로 교반을 시키며 당화를 진행하였다[16]. 효소는 Celluclast와 Novozyme-188을 Cocktail(3:1)하여 접종하였다. 이후 일정시간 단위로 시료를 채취하여 HPLC를 통해 분석하였다. 분석에 사용된 Column과 Detector는 Aminex HPX-87-H column과 Waters 410 RI detector이다. 이동상은 0.005 M의 H₂SO₄용액, 유속은 0.6 ml/min, Column과 Detector의 온도는 50 °C로 운전하였다[22].

가수 분해도는 다음과 같이 정의된다.

Enzymatic digestibility =

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

2-4. 발효

발효 실험은 4 °C로 냉장 보관되었던 *Sachharomyces cerevisiae* 균주를 사용하여 YPD media에 Activation시키고 당화액은 121 °C에서 15분 동안 멸균한 후 상온으로 냉각시켰다. Activation된 균주를 당화액의 10%(v/v)양을 취하여 이를 멸균된 당화액에 혼합한 후 38 °C의 Shaking incubator 안에서 180 RPM의 속도로 교반을 시키며 발효를 진행하였다[16,17].

에탄올 수율은 다음과 같이 정의된다.

$$\text{Ethanol yield} = \frac{[\text{EtOH}]_f - [\text{EtOH}]_0}{0.568 \times f[\text{Biomass}]} \times 100\%$$

2-5. 분석방법

전처리 전 후의 역사의 성분분석은 미국 신재생 에너지 연구소(NREL)로부터 제공된 Chemical Analysis and Testing Standard Procedure LAP-002와 LAP-003을 따라 당 및 Lignin 성분 등으로 분석하였다[22]. 여러 당 성분의 분석에는 HPLC(Waters Co.,USA)를 사용하였으며, Aminex HPX-87-P column과 Waters 410 RI detector로 분석하였다. 이동상은 증류수, 유속은 0.6 ml/min, Column과 Detector의 온도는 85 °C로 맞추어 분석을 실시하였다[22].

전처리 최적 공정을 찾기 위해서는 반응표면분석법을 이용하였다. 반응온도, 반응시간, 암모니아 반응농도를 공정 변수로 설정하였으며 반응 후 고체 잔존류, Glucose 함유율, Lignin 함유율, 당화율 및 Ethanol 수율 등을 고려하여 최적 반응조건을 설정하였다[11,18-21]. 실험은 Central composite 방법으로 설계되었으며 다음 표과 같다. 반응표면분석은 Design Expert 7.1 Software를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 전처리 전, 후의 성분분석

역사의 전처리 전, 후의 성분을 미국 신재생 에너지 연구소(NREL)의 분석방법에 따라 분석하였으며 전처리 전 역사의 구성성분을 Table

Table 1. Composition of various biomass

| | Miscanthus sinensis | E.F.B | Bagasse | Cassava stem | Rigida |
|-------------|------------------------|-------|---------|-----------------|--------|
| Glucose (%) | 44.27 | 35.52 | 35.95 | 30.35 | 43.72 |
| Xylose (%) | 27.31 | 25.20 | 22.98 | 9.67 | 22.59 |
| Lignin (%) | 20.62 | 29.51 | 25.69 | 30.08 | 28.97 |
| Ash (%) | 3.61 | 3.97 | 11.66 | 4.32 | 0.61 |
| Others (%) | 4.19 | 5.8 | 3.72 | 25.58 | 4.11 |

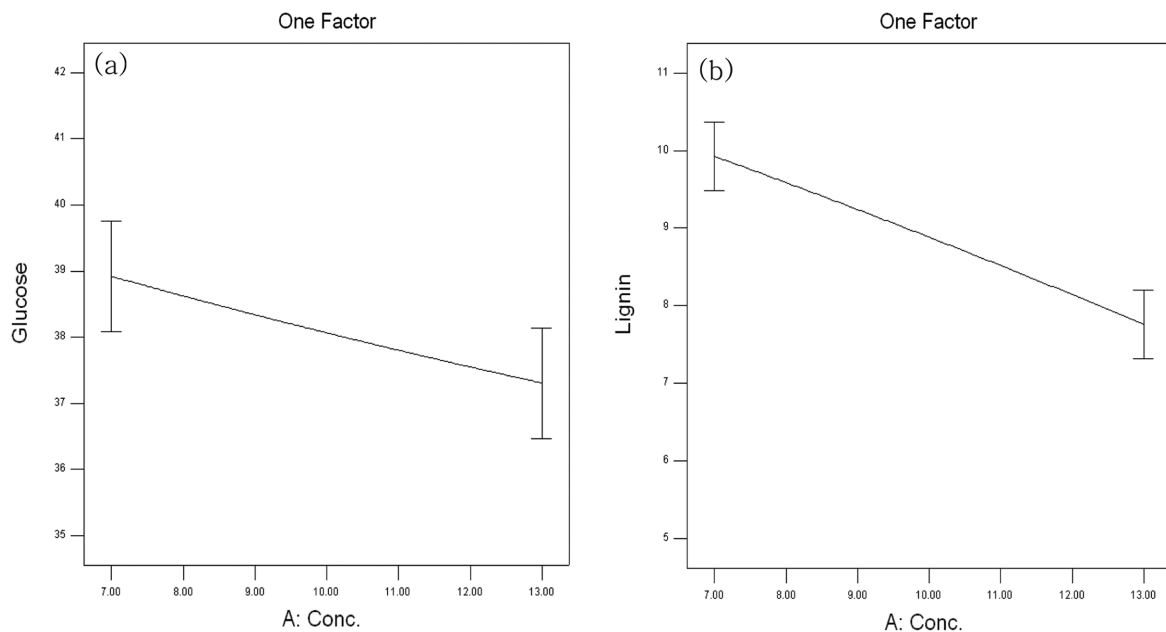


Fig. 3. The effect of ammonia concentration of AP process on the composition of glucose and lignin.

1에 나타냈다. 역새의 전처리 전 성분은 대표적인 목질계 바이오 매스인 리기다와 기타 대표적인 바이오 매스들과 비교하였을 때 Cellulose 및 Hemi-cellulose의 성분이 높으며 당화 저해를 일으키는 Lignin의 성분은 적은 것으로 나타났다. 이는 기존 목질계 바이오 매스를 전처리할때 필요한 에너지보다 작은 에너지로 전처리를 할 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

3-2. 암모니아 반응농도에 따른 영향

설계된 실험을 수행 후 그 결과를 이용해 반응온도는 157.7 °C, 반응시간을 20 min으로 고정시키고 5%에서 15%까지의 암모니아 반응농도 변화에 따른 기질의 상대적인 Glucose 함유율과 Lignin 함유율 변화에 대해 조사해 보았다. Fig. 3에서 나타나듯이 반응농도가 증가함에 따라 Glucose 함유율의 변화는 암모니아 반응농도가 5% 일 때 약 39%이고 암모니아 반응농도가 15%일 때 약 38%로 Glucose 함유율 손실이 거의 없다는 결론을 얻었다. Fig. 3에서 보이듯이 Lignin 함유율 변화에 대해서는 암모니아 반응농도가 5%일 때 Lignin 함유율이 약 10% 인데 반해 암모니아 반응농도가 15%일 때는 Lignin 함유율이 약 8%로 Lignin 함유율이 낮아지는 결과를 얻었다. 이는 암모니아 반응농도는 Glucose 함유율 변화보다 Lignin 함유율 변화에 더 밀접한 관계를 가지고 있음을 알 수 있다.

3-3. 반응온도에 따른 영향

암모니아 농도는 11.27%(wt/wt), 반응시간을 20 min으로 고정시키고 140 °C에서 190 °C까지의 반응온도 변화에 따른 기질의 상대적인 Glucose 함유율과 Lignin 함유율 변화에 대해 조사해 보았다. Fig. 4. 에서 보이듯이 140 °C 온도에서는 Glucose 함유율이 38.7%로 손실이 거의 없지만 190 °C에서는 Glucose 함유율이 36.8%로 약 2%의 손실이 일어나 반응온도가 증가함에 따라 Glucose 함유율이 감소됨을 알 수 있다. 반면 반응온도에 따른 Lignin 함유율의 변화는 Fig. 4에 나타나듯 140 °C에서 약 9% 정도의 Lignin 함유율을 나타냈고 190 °C

에서는 약 8%의 함유율을 나타내어 온도가 증가함에 따라 Lignin의 함유율이 다소 감소하기는 하지만 커다란 변화는 없는 것으로 나타났다. 이는 반응온도가 Glucose 함유율 변화에 더 밀접한 관계가 있음을 알 수 있다.

3-4. 반응시간에 따른 영향

암모니아 반응농도는 11.27%(wt/wt), 반응온도를 157.7 °C로 고정시키고 10 min에서 60 min까지의 반응시간 변화에 따른 기질의 상대적인 Glucose 함유율과 Lignin 함유율 변화에 대해 조사해 보았다. Fig. 5에서 나타나듯이 반응시간이 증가함에 따라 Glucose 함유율의 변화는 반응시간이 10 min일 때 약 39%이고 반응시간이 50 min일 때 약 35%로 반응 시간이 길어 질수록 Glucose 함유율이 감소한다는 결과를 얻었다. 또한 Fig. 5에서 보이듯이 Lignin 함유율 변화에 대해서도 반응시간이 10 min일 때 Lignin 함유율이 약 8.5%인데 반해 반응시간이 60 min일 때 Lignin 함유율이 약 6.8%로 Lignin 함유율이 낮아지는 결과를 얻었다. 이는 반응시간이 Glucose 함유율 변화와 Lignin 함유율 변화 둘 모두와 밀접한 관계를 가지고 있음을 알 수 있다.

3-5. RSM분석에 의한 암모니아 침출 공정의 최적조건

3-5-1. 공정변수 설정

암모니아 침출 공정의 최적조건을 설정하기 위해서 반응표면 분석법(Response Surface Methodology)을 사용하였다. 주요 변수로는 암모니아 농도, 반응온도, 반응시간을 선정하였으며 이외 다른 변수들이 영향을 미칠 수 있지만 다른 변수들은 암모니아 반응농도나 반응시간 등과 상관관계를 가지므로 위 세가지 조건에 대해 최적화가 이루어지면 나머지 변수들도 최적화가 이루어진 것으로 간주될 수 있다. 반응표면분석법은 둘 이상의 공정변수가 존재할 때 공정변수가 미치는 반응계의 영향을 반응표면으로 가시화시켜 다양한 공정변수들의 고유한 기여뿐만 아니라 변수들간의 상호작용을 이해하여 공

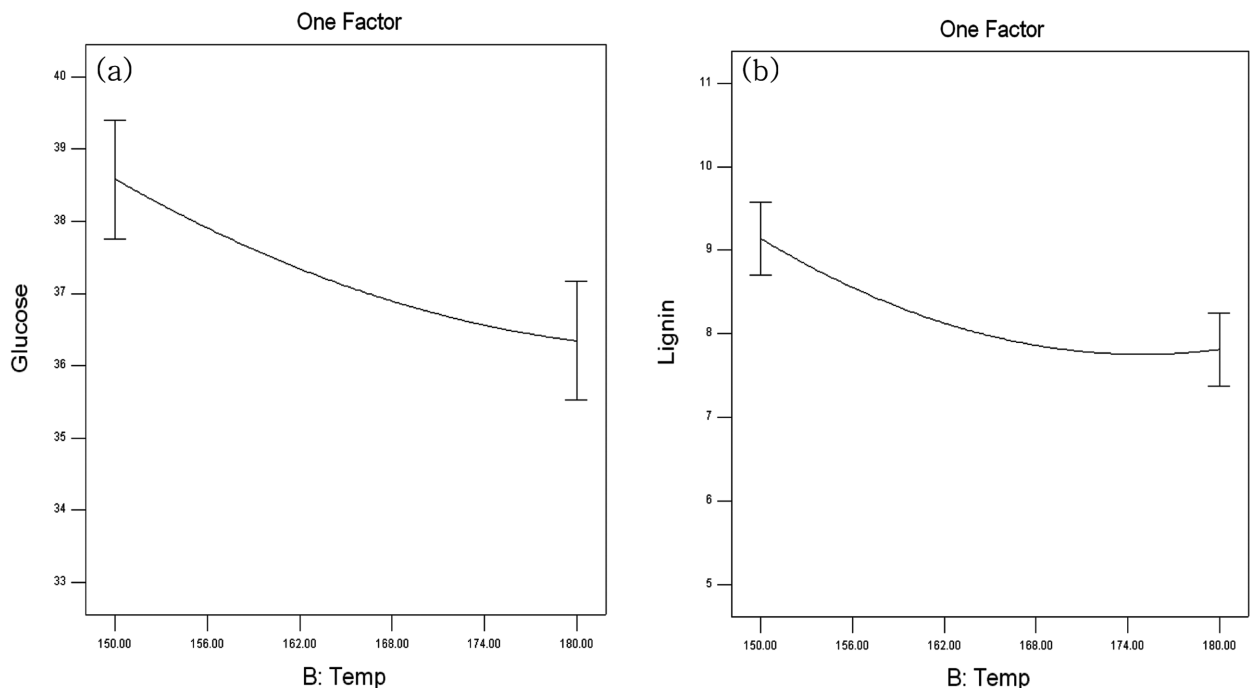


Fig. 4. The effect of temperature of AP process on the composition of glucose and lignin.

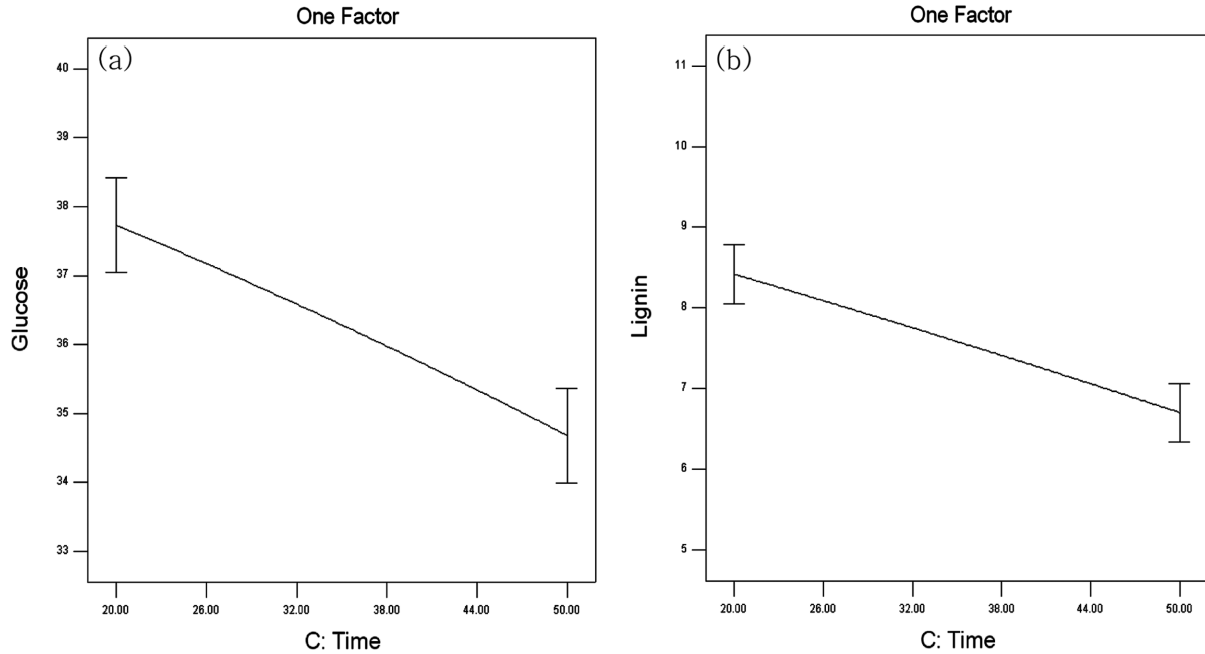


Fig. 5. The effect of time of AP process on the composition of glucose and lignin.

Table 2. The central composite design for the response surface methodolog

| Level | Ammonia concentration (%) | Reaction temperature (°C) | Reaction time (min) |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| -1.414 | 5 | 140 | 10 |
| -1 | 7 | 150 | 20 |
| 0 | 10 | 165 | 35 |
| 1 | 13 | 180 | 50 |
| 1.414 | 15 | 190 | 60 |
| Run | X(1) ^a | X(2) ^b | X(3) ^c |
| 1 | 1 | -1 | -1 |
| 2 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | -1 | 1 | -1 |
| 4 | -1 | 1 | 1 |
| 5 | 1 | 1 | -1 |
| 6 | -1 | -1 | 1 |
| 7 | 0 | 0 | -1.414 |
| 8 | -1.414 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 0 | -1.414 | 0 |
| 11 | 1 | 1 | 1 |
| 12 | 0 | 1.414 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 1.414 |
| 14 | -1 | -1 | -1 |
| 15 | 1.414 | 0 | 0 |
| 16 | 1 | -1 | 1 |
| 17 | 0 | 0 | 0 |

X(1)a : Coded value of ammonia concentration.

X(2)b : Coded value of reaction temperature.

X(3)c : Coded value of reaction time.

정변수를 최적화하는데 유용하게 이용된다[20].

3-5-2. 실험계획

Table 2에서 보여지는 것처럼 Central composite 설계에 따라 반복 실험을 통해 독립변수의 변화에 따라 17가지 조건에서 실험을 수행

Table 3. The result of batch reaction under varuous conditions

| Run | Result | |
|-----|---------------------|--------------------|
| | Glucose content (%) | Lignin content (%) |
| 1 | 37.65 | 8.28 |
| 2 | 36.45 | 7.56 |
| 3 | 38.26 | 9.21 |
| 4 | 37.93 | 6.93 |
| 5 | 35.97 | 6.85 |
| 6 | 37.26 | 8.80 |
| 7 | 38.54 | 9.40 |
| 8 | 38.35 | 9.24 |
| 9 | 36.26 | 7.37 |
| 10 | 39.12 | 10.61 |
| 11 | 33.85 | 5.55 |
| 12 | 35.22 | 7.78 |
| 13 | 33.37 | 6.06 |
| 14 | 39.25 | 10.23 |
| 15 | 34.25 | 6.12 |
| 16 | 34.45 | 6.49 |
| 17 | 36.46 | 7.56 |

하여 통계적으로 분석되어 종속변수(Glucose 함유율, Lignin 함유율)에 대한 회귀 방정식을 얻어 반응 조건에 대한 상호영향 및 최적 반응조건을 구하였다[20].

3-5-3. 공정변수에 대한 영향

위 실험계획에 따른 17가지 조건에서 실험을 수행한 각 기질의 Glucose 함유율과 Lignin 함유율에 대한 결과를 Table 3에 나타내었다. Glucose 함유율은 최대 39.25%, 최저 33.37%를 얻었으며 Lignin의 함유율은 최대 10.60%, 최저 5.54%를 얻었다.

각 독립변수에 따른 Glucose 함유율은 Fig. 3-5에 보여지듯이 반응시간에 따른 영향이 매우 크다는 것을 알 수 있으며, 반면 암모니아 반응농도와 반응온도에 있어서는 큰 영향을 받지 않음을 알 수 있다. Fig. 6은 독립변수들의 상호관계에 의한 Glucose 함유율 변화를

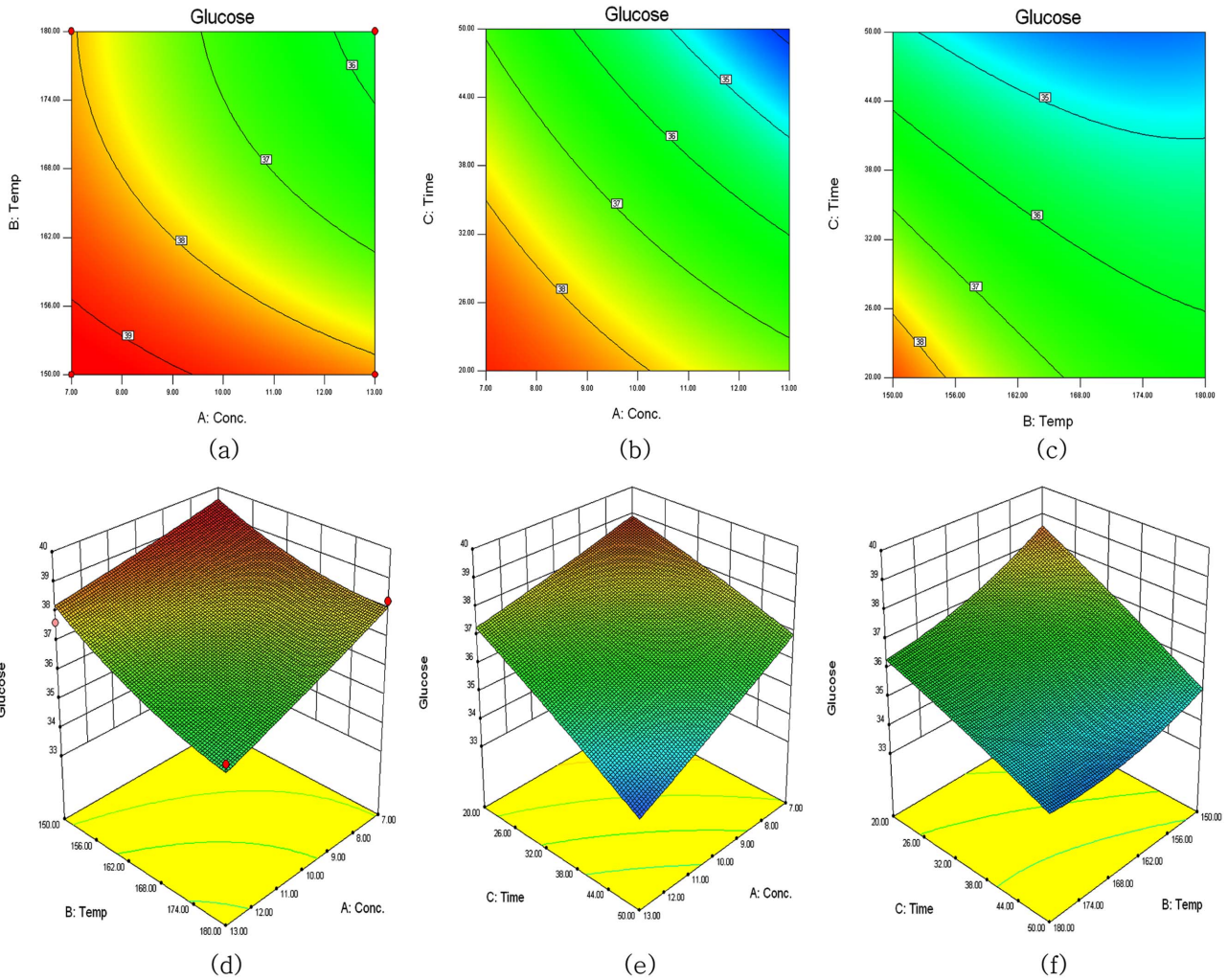


Fig. 6. The effect of AP conditions on the composition of glucose.

나타낸 것이고 반응시간을 20 min으로 고정하였을 때는 반응온도가 암모니아 반응농도보다 영향이 더 큰 것으로 나타났으며(Fig. 6(a), (d)) 암모니아 반응농도를 11.27%로 일정하게 유지하였을 때는 반응 온도에 대한 영향 보다는 반응시간에 대한 영향이 더욱 큰 것으로 나타났다(Fig. 6(c),(f)). 마지막으로 반응온도를 157.7 °C로 유지하였을 때 역시 암모니아 반응농도보다는 반응시간에 대한 영향이 더 큰 것을 알 수 있다(Fig. 6(b),(e)). 이로서 Glucose의 손실을 최소화하기 위해서는 반응시간을 짧게 가지고 가는 것이 유리하다는 결론을 얻을 수 있다.

Lignin 함유율의 각 독립변수에 따른 영향은 Fig. 3-5를 비교해 보았을 때 암모니아 반응농도와 반응시간에 따른 영향이 크다는 것을 알 수 있다. Fig. 7은 독립변수들의 상호관계에 의한 Lignin 함유율 변화를 나타낸 것이며 반응시간을 20 min으로 고정하였을 때는 암모니아 반응농도가 반응온도보다 영향이 더 큰 것으로 나타났으며(Fig. 7(a),(d)) 암모니아 반응농도를 11.27%로 일정하게 유지하였을 때는 반응온도에 대한 영향보다는 반응시간에 대한 영향이 더욱 큰 것으로 나타났다(Fig. 7(c),(f)). 마지막으로 반응온도를 157.7 °C로 유지하였을 때 역시 암모니아 반응농도보다 반응시간에 대한 영향이 더 큰 것을 알 수 있다(Fig. 7(b),(e)). 이로서 Lignin의 추출을 최대화하기 위해서는 암모니아 반응농도를 높이고 반응시간을 길게 가지고

가는 것이 유리하다는 결론을 얻을 수 있다. 이와 같은 결과는 암모니아가 흡착반응을 통해 Lignin을 제거하는 것을 간접적으로 알 수 있으며 또한 Lin 제거에 있어서 암모니아의 농도가 매우 중요함을 알 수 있다. 이들의 결과를 다중 회귀분석을 통해 종속변수에 대한 반응표면방정식을 얻어 내었다. 반응표면 방정식은 각각 다음과 같이 나타났다.

$$\begin{aligned}
 \text{Glucose} = & +91.47847 \\
 & + 0.65074 * \text{Conc.} \\
 & -0.57172 * \text{Temp.} \\
 & -0.22541 * \text{Time} \\
 & -5.45528 * 10^{-3} * \text{Conc.} * \text{Temp.} \\
 & -8.28972 * 10^{-3} * \text{Conc.} * \text{Time} \\
 & +1.52650 * 10^{-3} * \text{Temp.} * \text{Time} \\
 & +5.34831 * 10^{-3} * \text{Conc.}^2 \\
 & +1.60009 * 10^{-3} * \text{Temp.}^2 \\
 & -3.37188 * 10^{-3} * \text{Time}^2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Lignin} = & +82.84241 \\
 & -0.53062 * \text{Conc.} \\
 & -0.79130 * \text{Temp.}
 \end{aligned}$$

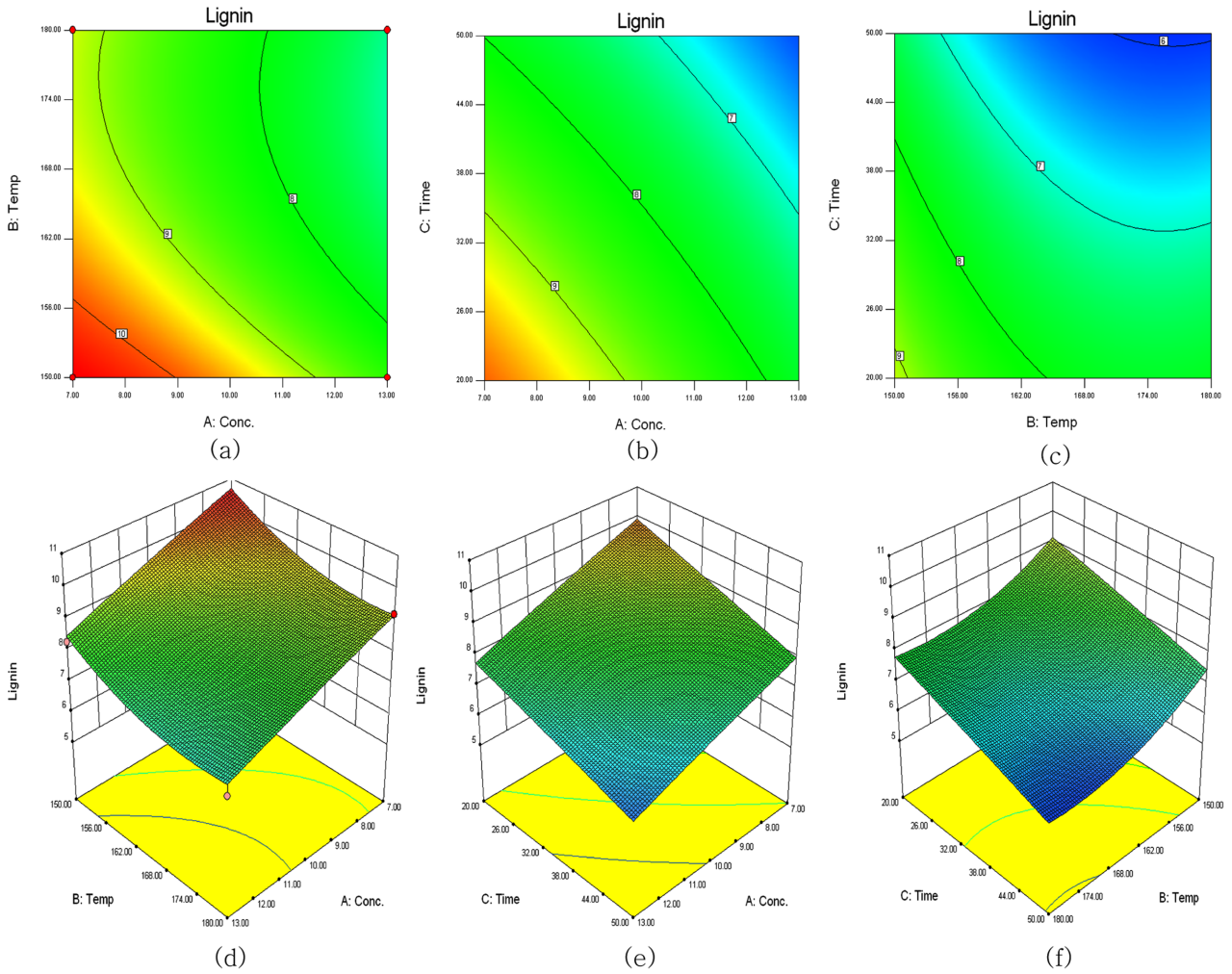


Fig. 7. The effect of AP conditions on the composition of lignin.

$$\begin{aligned}
 & -0.035655 * \text{Time} \\
 & +1.44019 * 10^{-3} * \text{Conc.} * \text{Temp.} \\
 & +1.71858 * 10^{-3} * \text{Conc.} * \text{Time} \\
 & -2.11828 * 10^{-4} * \text{Temp.} * \text{Time} \\
 & -4.58800 * 10^{-3} * \text{Conc.}^2 \\
 & +2.22769 * 10^{-3} * \text{Temp.}^2 \\
 & -1.06560 * 10^{-4} * \text{Time}^2
 \end{aligned}$$

Glucose 함유율에 대한 회귀계수 값은 0.92이며 Lignin 함유율에 대한 회귀계수 값은 0.96으로 둘 다 잘 일치함을 알 수 있다.

3-5-4. 최적조건 설정

위의 결과를 종합하여 암모니아 침출 공정의 최적공정조건을 반응표면분석법을 이용하여 확립할 수 있었다. Glucose 함유율은 최대

Table 4. The effect of AP treatment on the composition and enzymatic digestibility of biomass with the optimized condition

| | Glucose content (%) | Lignin content (%) | Enzymatic digestibility (%) | Ethanol yield (%) |
|---------------------|---------------------|--------------------|-----------------------------|-------------------|
| Untreatment biomass | 44.27 | 20.62 | 4.10 | 77.40 |
| AP treated biomass | 39.98 | 8.01 | 85.89 | 90.24 |

AP condition; Ammonia concentration : 11%
 Reaction Temperature: 157 °C
 Reaction Time: 10 min

로 설정하고 Lignin 함유율은 최소로 설정하여 Glucose의 손실을 최소화하고 Lignin의 제거는 최대화할 수 있는 조건을 Table 4에 나타내었다. 위와 같은 조건으로 암모니아 침출 공정을 수행하여 최적조건에서의 설정된 결과와 비교해 보았다. 비교 결과 Glucose 함유량은 39.98%, Lignin 함유량은 8.01%로 다소 만족할 만한 결과를 얻

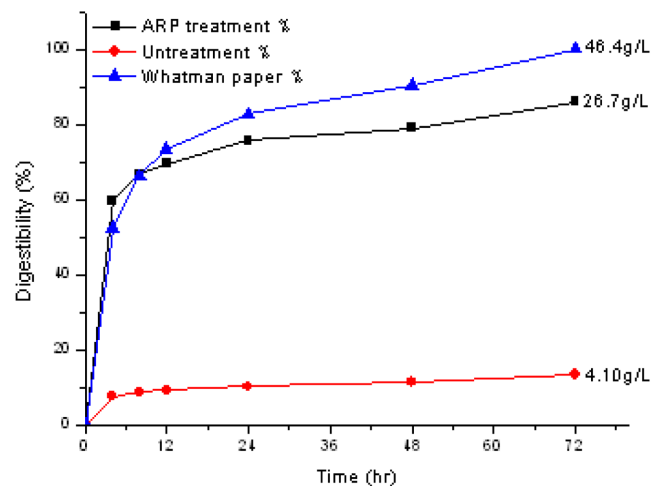


Fig. 8. The enzymatic digestibility of pretreated biomass and by saccharification.

Table 5. The enzymatic digestibility of pretreated biomass and the production of ethanol by saccharification and fermentation

| | Whatman paper. | Untreated biomass | Pretreated biomass by ARP |
|---------------|----------------|-------------------|---------------------------|
| Glucose (g/L) | 46.4 | 4.10 | 26.70 |
| Ethanol (g/L) | 23.58 | 1.65 | 13.40 |

었다. 이 후 전처리된 기질을 pH 4.8의 sodium citrate buffer에 기질 농도 5 wt/vol%로 맞추고 효소를 65 FPU/ml를 첨가하여 72시간 동안 당화하였을 때 Fig. 8에서 보여지듯이 당 농도는 26.70 g/L였으며 이는 당 전환율 85.9%로 매우 높은 결과를 얻을 수 있었다. 이후 *Saccharomyces cerevisiae* 효모를 사용하여 48시간 동안의 발효실험을 통해 Table 5에서 보여지듯이 13.4 g/L의 에탄올 농도를 얻었으며 이는 이론 수율의 90.24%로 매우 높은 수준의 에탄올 수율을 얻었다. 이러한 결과를 토대로 역새가 기존의 목질계 바이오 매스에 비해 전처리에 사용되는 에너지 소모가 적으며 높은 수준의 에탄올을 얻어 낼 수 있어 바이오 매스로서의 충분한 가치를 가지고 있다는 결론을 지을 수 있다.

4. 결 론

단일 반응기를 이용하여 역새에 대한 암모니아 침출 공정의 최적 조건 최적화에 대하여 조사하였다. 반응표면분석을 이용하여 탐색되어진 공정조건은 암모니아 반응농도; 11.27%, 반응온도; 157.75 °C, 반응시간; 10.01 min으로 결정되었다. 최적조건으로 암모니아 공정을 수행한 결과 Glucose 함유율은 44.27%에서 39.98%로 Glucose의 손실을 최소화하였으며 반면 Lignin 함유율은 20.62%에서 8.01%로 61.15% 감소하여 암모니아 침출 공정을 이용한 역새의 전처리가 기존의 목질계 바이오매스의 전처리보다 에너지 손실이 적고 효소가수분해도 또한 85.89%로 전처리되지 않은 역새와 비교했을 때 81.79% 증가하였고 에탄올 발효에 있어서도 13.40 g/L로 이론 수율의 90.24%를 얻어 당화와 발효과정에 있어서도 기존 목질계 바이오매스보다 유리한 기질로 작용할 수 있다는 결론을 내릴 수 있다.

참고문헌

- Lee, J. K. and Bransby, D., Biofuel Industry and Recent Research in USA. *J. Kor. Grass. Forage Sci.*, **28**(2), 129-138(2008).
- Hahn-Hagerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauclund, M. F., Liden, G. and Zacchu, G., "Bioethanol- the Fuel of Tomorrow from Residues of Today," *Trend Biotechnol.*, **24**, 549-556(2006).
- Chung, C.-H., Cellulosic Ethanol Production. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **23**(1), 1-7(2008).
- Ahn, D. and Chang, H. N., "Liquefaction and Saccharification of Starch Using α -amylase and Immobilized Glucoamylase," *Microbiol. Biotechnol.*, **19**(5), 497-503(1991).
- Ratnam, B. V. V., Rao, M. N., Rao, M. D. and Ayyanna, C., "Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Ethanol from Sago Starch Using Response Surface Methodology," *J. Microbiol. Biotech.*, **19**, 523-526(2003).
- Biröl, G., Onsan, Z. I., Kirdar, B. and Oliver, S. G., "Ethanol Production and Fermentation Characteristics of Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Grown on Starch," *Enzym. Microbiol. Technol.*, **22**, 672-677(1998).

- Zhao, H., Kwak, J. H., Zhang, C., Brown, H. M., Arey, B. W. and Johnathan, E. H., "Studying Cellulose Fiber Structure by SEM, XRD, NMR and Acid Hydrolysis," *Carbohydr. Sci. Direct.*, **68**, 235-241(2006).
- Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, T., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H. and Kondo, A., "Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(8), 5037-5040(2004).
- Keith, C., Economic Issues related to bio fuels; a written testimony for field hearing (Aug. 26, 2006), U.S. senate committee on agriculture, rural development, and related agencies(2006).
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapfle, M. and Ladisch, M., "Feature of Promising Technologies for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass," *Bioresour. Technol.*, **96**, 673-686(2005).
- Oh, K. K., Hong, S. I. and Lee, Y. Y., "Optimization of Ammonia Recycled Percolation Process for Lignocellulosic Biomass Pretreatment," *HWAHAK KONGHAK*, **34**, 418(1996).
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Ammonia Recycle Percolation Process," *Bioresour. Technol.*, **90**, 39-47(2003).
- Eggeman, T. and Elander, R. T., "Process and Economic Analysis of Pretreatment Technologies," *Bioresour. Technol.*, **86**, 105-115(2005).
- Kim, S. B., Yum, D. M. and Park, S. C., "Step-change Variation of Acid Concentration in a Percolation Reactor for Hydrolysis of Hardwood Hemicellulose," *Bioresour. Technol.*, **72**, 289-294(2000).
- Cahela, D. R., Lee, Y. Y. and Chambers, R. P., "Modeling of Percolation Process in Hemicellulose Hydrolysis," *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3-17(1983).
- Azzam, A. M., "Pretreatment of Cane Bagasse with Alkaline Hydrogen Peroxide for Enzymatic Hydrolysis of Cellulose and Ethanol Fermentation," *J. Environ. Sci. Health. B.* **24**, 421-433(1985).
- Murai, T., Yoshino, T., Ueda, T., Haranoya, I., Ashikari, T., Hajime, S., Yoshizumi, A. and Tanaka, A., "Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol," *J. Ferment. Bioengineering.*, **86**(6), 569-572(1998).
- Marques, J., Vila-Real, H. J., Alfaia, A. J. and Ribeiro, M. H. L., "Modeling of the High Pressure-temperature Effects on Naringin Hydrolysis Base on Response Surface Methodology," *Food Chem.* **105**, 504-510(2007).
- Roberto, E. C., Mussatto, S. I. and Rodrigues, R. C. L. B., "Dilute-acid Hydrolysis for Optimization of Xylose Recovery from Rice Straw in a Semi-pilot Reactor," *Industrial Crops and Products.* **17**, 171-176(2003).
- Montgomery, D. C., "Design and Analysis of Experiments," Fifth ed., *John Wiley & Sons, Inc.*(2001).
- Canettieri, E. V., Moraed Rocha, G. J., Jr. Carvalho, J. A. and Silva, J. B. A., "Optimization of Acid Hydrolysis from the Hemicellulosic Fraction of *Eucalyptus grandis* Residue Using Response Surface Methodology," *Bioresour. Technol.*, **98**, 422-428(2007).
- National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.