

Ethanosolv 전처리에 의한 보릿짚의 리그닌 제거

김영란* · 유안나 · 정봉우¹ · 한민희² · 최기욱²

전북대학교 생물공정공학과, ¹전북대학교 화학공학부, ²(주)창해에탄올

Lignin Removal from Barley Straw by Ethanosolv Pretreatment

Younggran Kim*, Anna Yu, Bongwoo Chung¹, Min-hee Han², and Gi-wook Choi²

Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

¹School of Chemical Engineering, Chonbuk National University, 664-14, Deokjin-dong, Jeonju 561-756, Korea

²Changhae Institute of Cassava & Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd., 829, 3-Ga Palbok-dong, Dukjin-ku, Jeonju 561-203, Korea

Abstract Lignocellulose represents a key sustainable source of biomass for transformation into biofuels and bio-based products. Unfortunately, lignocellulosic biomass is highly recalcitrant to biotransformation, both microbial and enzymatic, which limits its use and prevents. As a result, effective pretreatment strategies are necessary. The vast majority of pretreatment strategies have focused on achieving a reduction of lignin content. In this work, an ethanosolv pretreatment has been evaluated for extracting lignin from barley straw. 75% ethanol was used as a pretreatment solvent to extract lignin from barley straw. The influence on delignification of three independent variables are temperature, time, catalyst (1 M H₂SO₄) dose. The best pretreatment condition observed was 180°C, 120 min, 0.2% H₂SO₄ and delignification was 38%. A combined roasting and ethanosolv, 2-step pretreatment, was developed in order to improve the delignification. Roasting didn't increase the delignification but reduced the pretreatment time. X-ray diffraction results indicated that these physical changes enhance the enzymatic digestibility in the ethanosolv treated barley straw. The cellulose in the pretreated barley straw becomes more crystalline without undergoing ethanosolv.

Keywords: lignocellulose, lignin, ethanosolv, pretreatment

서 론

현재까지 바이오에탄올 제조에는 식물계에서 유래한 전분과 당이 이용되고 있으나 연료용 에탄올의 대량생산을 위해서는 섬유소계 (lignocellulosic) 바이오매스를 이용해야 한다. 섬유소계 바이오매스는 바이오연료 및 고부가가치 바이오기반 물질로 전환하기 위한 잠재적인 당 (sugar) 소스로서 인식되어져 왔다. 리그노셀룰로스는 셀룰로스 (cellulose), 헤미셀룰로스 (hemicellulose), 리그닌 (lignin) 의 세 가지 중합체로 구성되어있다. 이 세가지 물질은 모두 화학적, 물리적, 구조적으로 분명하게 다른 특징을 갖

는다. 헤미셀룰로스는 상대적으로 무정형이며 xylanase, glycosidase에 의해 당으로 분해되지만 셀룰로스는 높은 결정성구조를 지닌다. 리그닌은 방향족 고분자로서 phenylpropanoid 단위로 구성되어 있으며 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 결합시키는 접착체로서 작용하며 리그노셀룰로스에 내구성을 갖게 한다.

섬유소계 물질이 바이오에탄올로 전환되기 위해서는 다음의 세단계를 거쳐야 한다: ① 다당류 (polysaccharide) 의 미생물 혹은 효소 분해반응을 증진시키기 위한 전처리 (pretreatment); ② 셀룰로오스 (cellulose)와 헤미셀룰로스 (hemicellulose)를 발효가 가능한 환원당 (reducing sugar) 으로 전환하는 가수분해단계; ③ 당을 에탄올로 전환하는 발효단계. 이중 섬유소계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에서 극복해야할 가장 중요한 단계는 전처리이다. 효소 또는 미생물에 의한 리그노셀룰로스의 가수분해는

*Corresponding author

Tel: +82-63-270-2309, Fax: +82-63-270-2306

e-mail: kimyr@chonbuk.ac.kr

셀룰로오스 자체의 내구성과 리그닌의 난분해성 때문에 전처리가 반드시 선행되어야 한다. 적절한 전처리 없이는 리그노셀룰로스 중의 셀룰로스로부터 이론적 당화수율의 20% 정도의 당화가 가능하지만 적절한 전처리를 거친 후 효소당화 하게 되면 이론적 수율의 90%이상까지 포도당으로 전환 할 수 있다. 전처리 과정에서 리그노셀룰로스는 리그닌과 헤미셀룰로스로 분리되며 셀룰로오스의 결합이 느슨한 형태로 바뀌고 셀룰로오스 또한 부분적으로 분해되어 효소가 좀 더 쉽게 셀룰로오스에 접근할 수 있는 구조로 바뀌게 된다 [1-3].

지금까지 여러 전처리 방법들이 제시되어 왔고 그중 organosolv pretreatment도 그 중 하나이다. organosolv pretreatment는 제지공정의 organosolv pulping을 응용한 방법이며 이 organosolv pulping을 통해 리그닌이 선택적으로 추출되며 추출된 리그닌은 다른 이물질이 함유되지 않아 부가가치가 높은 다른 화합물질로의 전환 공정 개발이 용이하여 이와 관련된 여러 연구가 진행된 상태이다. 하지만 에탄올을 용매로 사용하는 ethanosolv (ethanol organosolv pretreatment)는 목재 바이오매스를 처리하는 몇몇 연구가 진행되었을 뿐이다. 에탄올은 고온, 고압 하에서 주로 소수성 화합물인 리그닌을 용해한다고 알려져 있다. 또한 에탄올은 취급이 용이하며, 중화를 시켜야 하는 경제적 부담도 제거되고, 장치 설계시 고려되는 산화에 대한 부분을 경감시켜 줄 수 있다. 그리고 에탄올의 끓는점이 물보다 낮기 때문에 물과 분리가 쉽고 에탄올은 수거해 재사용 할 수 있다는 큰 장점을 갖고 있다 [47].

보릿짚은 우리나라 농업부산물 바이오매스 중 가장 이용률이 낮으며 벼 이앙하기 전에 대부분 토양의 산성을 방지하기 위해 소각 처리하는 경우가 많으며 농촌 환경오염을 일으키는 원인이 되고 있다. 그러나 보릿짚은 발생 장소 및 시기가 집중되어있기 때문에 수거비용이 적고 품종별로 균일한 바이오매스를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 현재 전국의 보리 재배 면적은 약 15만 ha이며 이중 20%가 전라북도에 집중되어 있다. 따라서 농업부산물로서 발생하는 보릿짚을 바이오 에탄올의 원료로 사용함으로써 농업의 에너지 산업화를 촉진 할 수 있다.

바이오매스의 리그닌함량은 최종적인 가수 분해율에 결정적인 영향을 미치고 셀룰로오스의 결정성은 효소가 기질에 접근할 수 있는 흡착 자리에 영향을 미치기 때문에 초기가수분해 속도에 영향을 미치며 총 가수분해 시간 및 투입해야 하는 효소량을 결정짓는다 [8-11]. 따라서 본 연구에서는 에탄올을 생산하기 위한 보릿짚의 전처리에 ethanosolv공정을 적용하여 타당성과 함께 적정 공정조건을 탐색하기 위하여 전처리를 통한 리그닌제거율에 초점을 맞추었다. 이외에 XRD 측정을 통하여 결정도를 분석, ethanosolv 처리가 바이오매스의 결정도에 미치는 영향 및 리그닌제거와 결정도와의 관계를 확인하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 보릿짚은 2007. 7월에 수확한 것으로 (주)창해 에탄올로부터 제공받아 사용하였으며, 분쇄기 (cutter mill)를 이용하여 1 mm이하로 균일하게 분쇄하였다. 분쇄된 바이오매스는 실온의 밀폐용기 안에 보관하였다. Ethanosolv 전처리에 사용된 반응기는 지름 12 mm, 길이 120 mm, 부피 13 mL로 반응온도와 압력을 고려해 SUS 316으로 제작하였다.

Ethanosolv pretreatment

보릿짚 분말 0.8 g에 75 wt.% 에탄올 (C₂H₅OH)용액을 8 mL 가하여 전처리하였다. 시료와 용액의 비율을 1:10으로 적용하였다. 이때 촉매로써 황산 (H₂SO₄)을 사용하였는데 1M H₂SO₄를 이용하여 에탄올 용액에 대하여 0.2% 농도로 첨가하였다. 오일 항온조를 이용하여 120~200°C의 온도로 조절하였으며 반응시간은 30~300 min으로 하였다. 전처리 한 바이오매스는 여과하여 고형물과 액상으로 분리하고 분리된 고형물은 pH가 7 정도가 될 때까지 물로 세척한 후 액상과 고형물의 리그닌 함량을 분석하여 리그닌제거율 (delignification, %)을 계산하였다.

성분분석

전처리 후 남아있는 고형물 (residual solid)의 양, 리그닌 함량은 NREL (National Renewable Energy Laboratory)의 Standard Biomass Analytical Procedure No. 003, 004에 기초하여 분석하였다. 탄수화물 (carbohydrate)함량은 당 (sugar)로부터 유래되는 헤미셀룰로오스 (xylan, galactan, arabinan)와 셀룰로오스 (glucan)의 양을 측정함으로써 얻을 수 있는데 이것은 NREL procedure No. 002에 기초하여 분석하였다. 전처리 후 고형물은 45°C, 10 h 동안 건조한 후 이중 0.3 g을 취하여 72% H₂SO₄ 3 mL을 가하여 30°C, 2 h 동안 1차 산 가수분해 한다. 가수분해가 끝난 후 증류수 84 mL을 첨가하여 오토클레이브에서 121°C, 60 min 동안 2차 산 가수 분해한다. 여과하여 고형물과 액상으로 분리한 후 고형물은 550°C, 4 h 동안 회화시켜서 산에 녹지 않는 리그닌 (acid insoluble lignin) 양을 측정하고 액상은 UV-spectrophotometer를 이용하여 205 nm에서의 흡광도를 측정하여 산에 녹는 리그닌 양 (acid soluble lignin)을 측정한다. 전체 리그닌 양은 산에 녹는 리그닌과 산에 녹지 않는 리그닌의 총합이다. 전처리하지 않은 바이오매스의 리그닌 양과 비교하여 리그닌제거율 (delignification, %)을 계산한다. 또한 액상은 HPLC를 사용하여 glucan, xylan, galactan, arabinan을 분석하였으며 RI detector와 Bio-Rad HPX-87P column를 사용하였다. 이동상은 증류수를 사용

하여 유속 0.6 mL/min으로 운전하였다. 이 때 column의 온도는 85°C, detector의 온도는 30°C로 조절하였다.

XRD 분석

바이오매스의 결정성 (crystallinity)을 비교하기 위해 XRD (X-ray diffractometer, Rigaku, D/max2500)을 이용하여 분석하였다. 모든 시료는 < 140 mesh 크기로 준비하였다. 2θ = 5-45°, scan speed = 2°/min, step size = 0.05°의 조건으로 분석하였다. CrI (crystallinity index)는 다음과 같은 방법으로 계산하였다 [13,14].

$$CrI = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

I_{002} = intensity of the 002 peak at 2θ = 22.5°

I_{am} = intensity of the background scatter at 2θ = 18.7°

결과 및 고찰

보릿짚의 구성성분

보릿짚의 화학적 조성은 재배지역, 성장계절, 수확방법 등과 같은 환경에 따라 달라지며 또한 성분분석 방법에 따라 서로 달라진다. 실험에 사용된 보릿짚의 구성성분을 Table 1에 나타내었다. NREL procedure에 따라서 분석한 결과 당 성분은 55.9%로 나타났다. 셀룰로스의 주성분인 glucan은 41.2%, 헤미셀룰로스의 주성분인 xylan은 14.7%, arabinan은 매우 작은 양을 차지하고 있었으며 galactan과 mannan은 없었다. 이러한 성분들은 5탄당, 6탄당 발효 미생물에 의해 에탄올로 전환된다. 리그닌은 당화를 위한 효소반응 시 반응속도를 제한하는 가장 중요한 요인이다. 따라서 대부분 전처리 법은 발효가 가능한 당은 파괴하지 않고 리그닌 함량만 감소시키고 동시에 셀룰로오스의 결정성을 감소시키는데 초점을 맞추고 있다.

Table 1. Composition of untreated biomass

	barley straw ^a
Holocellulose (%)	55.9
Glucan (%)	41.2
Xylan (%)	12.8
Arabinan (%)	1.9
Acid-insoluble lignin (%)	22.3
Acid-soluble lignin (%)	1.8
Ash (%)	5.9
Others (%)	14.1

^a Composition percentages are on a dry-weight basis.

Ethanosolv 의 적정 산농도 결정

본 연구에서는 75 wt.% 에탄올을 사용하였는데 이것은

cooking liquor에서 물은 높은 온도, 압력에서 유기물을 분해하는 작용을 한다. 반대로 에탄올의 주요작용은 소수성 화합물인 리그닌을 용해하는 것이다. 따라서 에탄올농도, 75 wt.%는 유기물의 과도한 분해를 막고 리그닌 제거의 효과적인 활성제의 역할을 할 수 있는 조성으로 알려져 있다 [6,7]. ethanosolv의 촉매로서 황산을 선택하였다. ethanosolv에서 낮은 온도와 낮은 산 농도는 바이오매스 분말을 활성화하기에는 불충분하고 반면에 높은 온도와 높은 산 함량은 유기물의 과분해를 일으켜 HMF (hydroxy methyl furfural), furfural과 같은 퓨란 (furan) 화합물을 형성하여 5 탄당과 6 탄당의 손실을 가져온다. 투입해야 할 적정 산 농도를 알아보기 위하여 1M H₂SO₄를 이용하여 pH에 따른 리그닌 제거율을 확인하여 보았다 (Fig. 1). pH가 낮을수록 리그닌 제거율도 증가하였다. pH 1에서 리그닌 제거율은 가장 효과적이었지만 반응기가 부식 되는 등의 문제점이 있으며 일반적으로 산을 이용한 전처리에서는 pH가 2 정도의 처리를 해주는 사실을 감안하여 pH 2를 ethanosolv 전처리의 적정 산 농도로 결정하였다. 따라서 pH 2를 나타내는 1 M H₂SO₄, 0.2%농도를 적정 촉매농도로 결정하였다.

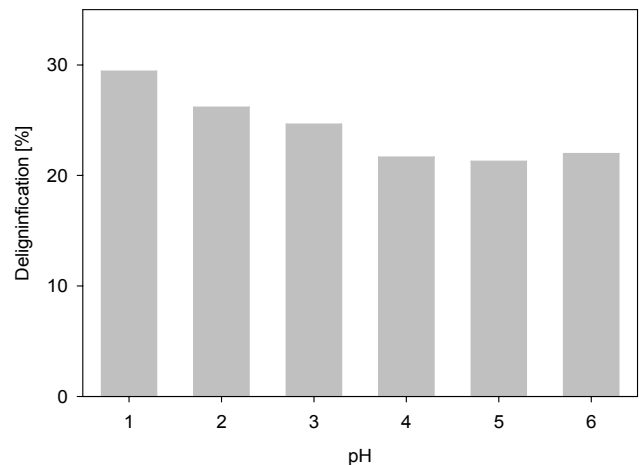


Fig. 1. Effect of pH on delignification of ethanosolv treated barley straw at 160°C for 2 h.

보릿짚의 ethanosolv 처리 효과

반응시간과 온도가 리그닌제거율에 미치는 영향을 알아보기 위해서 120°C, 140°C, 160°C, 180°C, 200°C에서 300 min 동안 ethanosolv 처리 하였다 (Fig. 2). 160°C 이상에서는 반응온도가 높을수록, 반응시간이 길수록 리그닌 제거율은 증가하였다. 이 반응온도 범위에서 리그닌 제거율은 대략 10~40% 이었다. 120°C, 140°C와 같은 낮은 온도에서 최대 리그닌제거율은 반응 60 min에 대략 25% 정도였으며 그 이후에는 리그닌제거율이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 낮은 온도에서는 리그닌이 에탄올에 용해되지 못하고 반응시간이 길어질수록 불용성 물질로 변하기 때문으로 판단된다. 200°C의 경우 빠른 초기반응속도를 보였는데 반

응 30 min에 42%의 리그닌제거율에 도달하였다. 하지만 바이오매스의 표면이 탄 것을 확인 할 수 있었는데 이것은 높은 반응 온도와 압력에서 보릿짚의 유기물이 과분해 되어 나타나는 것으로 효소반응 속도를 저해하는 요인으로 작용한다고 알려져 있다 [6,7]. 180°C의 경우 120 min이 경과한 후 38%의 리그닌제거율을 보였다. 200°C의 경우와 같은 탄 표면은 발견되지 않았다. 따라서 보릿짚의 ethanosolv 처리에서 적정 온도와 적정 반응시간은 180°C, 120 min으로 확인되었다.

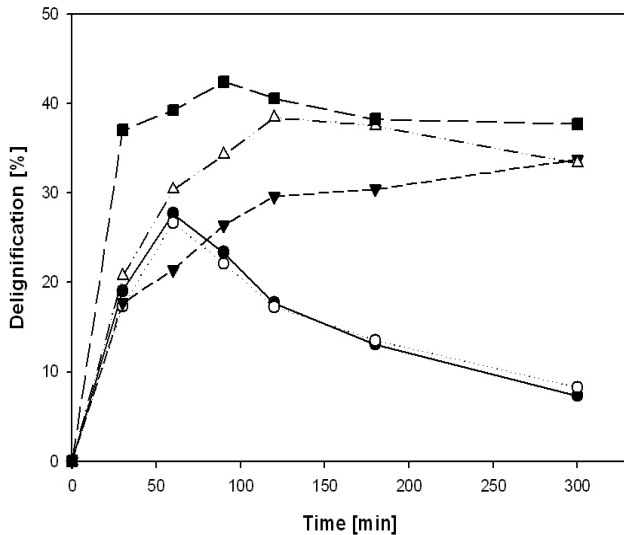


Fig. 2. Delignification of ethanosolv treated barley straw, showing the effect of temperature and time. ○ : 120°C, ● : 140°C, ▼ : 160°C, △ : 180°C, ■ : 200°C.

볶음 (roasting) 보릿짚의 ethanosolv 처리 효과

리그닌제거율을 증가시키기 위하여 보릿짚을 볶음 (roasting) 후 ethanosolv 처리하는 2단계 전처리를 하였다. 볶음은 보릿짚 구조의 물리적 변화를 유도하여 에탄올에 리그닌이 좀 더 쉽게 용해되어 빠져나오게 하기 위해 고안하였다. 따라서 보릿짚을 200°C, 10분간 볶은 후 ethanosolv 처리 하였다. ethanosolv 처리 온도와 시간에 따른 볶은 보릿짚의 리그닌 제거율은 Fig. 3에 나타냈다. 볶지 않고 ethanosolv만 단독 처리한 경우와 마찬가지로 반응온도와 시간이 증가함에 따라 리그닌제거율이 증가함을 확인할 수 있었으며 리그닌제거율이 향상 될 것이라는 예측과는 달리 리그닌제거율은 ethanosolv 단독처리 시와 유사하였다. 하지만 모든 온도에서 반응개시 60 min에 탈 리그닌화 반응이 평형에 도달하였다. 따라서 볶음처리가 보릿짚의 리그닌 제거율을 향상시키지는 못하지만 반응시간을 단축시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 140°C 이하의 온도에서 반응시간이 길어질 때 리그닌의 불용화 반응은 일어나지 않았다. ethanol을 이용하여 전처리 시 최대 리그닌제거율은 38%정도이다. 이는 약산 전처리나 암모니아 전처리의 80%

에 비교했을 때 낮은 수준에 해당한다. 하지만 황산, 암모니아, 석회 등에 비해 에탄올은 매우 많은 장점을 지니고 있다. 이러한 에탄올의 장점을 적극 활용하고 전처리 효율은 높이기 위해 볶음 (roasting)을 추가한 2단계의 전처리를 시도하였고 그 결과 리그닌제거율은 크게 다르지 않았지만 반응시간을 단축시켰고 효소 가수분해에 영향을 주는 요인 중 하나인 결정성을 감소시키는 것을 확인하였다. 이와 같은 연구결과를 바탕으로 미생물 처리 등 효소가수분해 반응의 비용을 낮출 수 있는 연구가 필요하다고 판단된다.

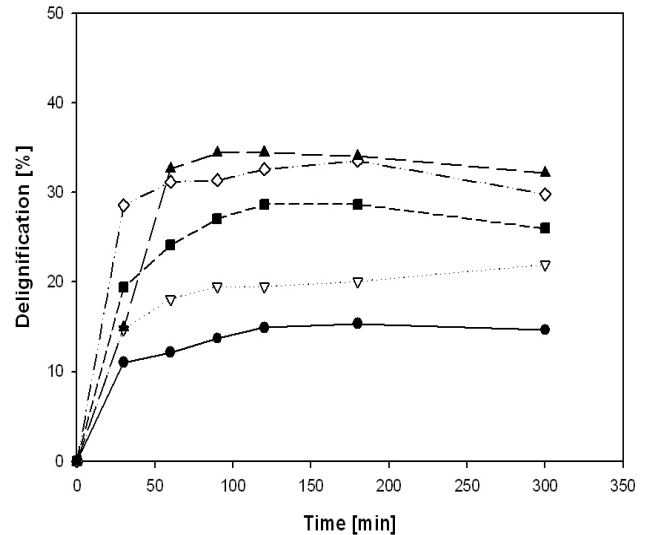


Fig. 3. Delignification of ethanosolv treated roasting barley straw, showing the effect of temperature and time. ● : 120°C, ▽ : 140°C, ■ : 160°C, ○ : 180°C, ▲ : 200°C.

XRD 분석

ethanosolv처리를 통한 리그닌제거가 셀룰로스의 결정성에 미치는 영향을 주는지 알아보기 위하여 XRD 측정을 통하여 결정성을 계산하였다. Fig. 4는 cellulose, lignin, 보릿짚의 X-ray diffraction spectra를 보여준다. microcrystalline cellulose는 결정면 (crystalline plane)의 피크는 $2\theta = 22.5^\circ$ 에서 나타났고 전처리하지 않은 보릿짚과 볶은 보릿짚은 $2\theta = 22.2^\circ$ 로 왼쪽으로 조금 이동하고 조금 넓어지고 약한 피크를 나타내며 14~16°의 피크가 더 약해지는 것을 확인할 수 있었다 [12,13].

180°C에서 ethanosolv 처리한 보릿짚과 볶은 후 ethanosolv 처리한 보릿짚의 CrI (Crystallinity index)를 Table 2에 나타내었다. ethanosolv 처리 하지 않은 보릿짚의 CrI가 각각 32.86, 42.76으로 ethanosolv 처리한 것 보다 상대적으로 낮았다. 이것은 ethanosolv 처리를 통해 리그닌부분이 제거됨으로서 결정성 셀룰로스의 함량이 상대적으로 높아지기 때문이다. 또한 ethanosolv 처리 된 보릿짚 사이의 비교에서는 최종적으로는 처리시간이 길어질수록 CrI 가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때

셀룰로오스의 결정성이 리그닌제거율에 영향을 주는 한 가지 요인이기는 하지만 리그닌제거율을 결정짓는 가장 큰 요인은 아니라는 사실을 알 수 있었다. 또한 미미한 차이이지만 볶은 보릿짚이 그렇지 않은 보릿짚에 비해 전체적으로 CrI 가 낮았다. 따라서 물리적인 변형을 유도하기 위해 시도한 볶음처리가 CrI에 미약하지만 효과가 있음을 확인하였다.

Table 2. Crystallinity index (CrI)

Time [min] (ethanosolv at 180°C)	Barley straw	Roasted barley straw
unpretreated	37.86	42.76
30min	51.32	47.92
60min	53.52	40.06
90min	56.37	46.92
120min	43.21	46.07
180min	41.33	45.61
300min	49.89	38.37

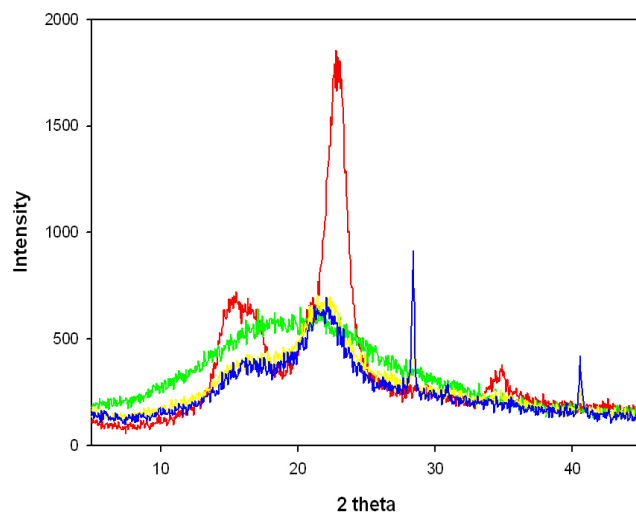


Fig. 4. X-ray diffraction spectra of microcrystalline cellulose (—), lignin (—), untreated barley straw (—) and roasted barley straw(—).

요약

본 연구에서는 바이오 에탄올 생산을 위한 보릿짚의 전처리에 ethanosolv 방법을 적용하여 그 타당성을 조사하였다. 리그닌제거율은 처리 온도와 시간에 따라 증가하였으며 180°C, 200°C에서 거의 38% 정도의 비슷한 제거율을 보였는데 비용절감 등의 부분을 감안할 때 180°C, 120 min가 적정조건이라는 결론을 얻었다. ethanosolv 전처리 효과를 증대시키기 위하여 2단계의 전처리 방법을 적용하였다. 볶은 후 ethanosolv 한 보릿짚의 경우 리그닌 제거율은 35% 정도로 그렇지 않은 경우와 거의 유사하여 볶음이 리그닌제거율에 큰 영향을 미치지 않음을 확인 할

수 있었다. XRD분석을 통하여 전처리 시간과 온도가 증가할수록 결정성은 감소하였다. 볶은 후 ethanosolv 한 것과 ethanosolv 단독 처리한 보릿짚 사이의 결정성은 미소하지만 물리적 변형을 한 단계 더 겪은 볶은 보릿짚이 전체적으로 낮게 나타났다.

감사

이 연구는 2008년도 정부재원 (교육과학기술부 지역혁신인력양성사업)으로 한국산업기술재단의 지원을 받아 수행하였기에 이에 감사드립니다.

접수 : 2009년 4월 30일, 게재승인 : 2009년 12월 18일

REFERENCES

- Sanchez, O. J. and C. A. Cardona (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 99: 5270-5295.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83: 1-11.
- Chung, C. (2008) cellulosic ethanol production. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 23: 1-7.
- Pan, X., N. Gilkes, J. Kadla, and K. Pye (2006) Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fraction process: optimization of process yields. *Biotechnol. Bioeng.* 94: 851-861.
- Pan, X., D. Xie, R. W. Yu, and N. J. Saddler (2008) The bioconversion of mountain pine beetle-killed lodgepole pine to fuel ethanol using the organosolv process. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 39-48.
- Teramoto, Y., S. H. Lee, and T. Endo (2008) Pretreatment of woody and herbaceous biomass for enzymatic saccharification using sulfuric acid-free ethanol cooking. *Bioresour. Technol.* 99: 8856-8863.
- Teramoto, Y., N. Tanaka, S. H. Lee, and T. Endo (2008) Pretreatment of eucalyptus wood chips for enzymatic saccharification using combined sulfuric acid-free ethanol cooking and ball milling. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 75-85.
- Zhu, L., J. P. O'Dwyer, V. S. Chnag, and C. B. Granda (2008) Structural features affecting biomass enzymatic digestibility. *Bioresour. Technol.* 99: 3817-3828.
- Öhgren, K., R. Bura, J. Saddler, and G. Zacchi (2007) Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresour. Technol.* 98: 2503-2510.

10. Yohsida, M., Y. Liu, and S. Uchida (2008) Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of miscanthus sinensis to monosaccharides. *Biosci. Biotechnol. biochem.* 72: 805-810.
11. Mooney, C. A., S. D. Mansfield, and M. G. Touhy (1998) The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresour. Technol.* 64: 113-119.
12. Thygesen, A., J. Oddershede, and H. Lilholt (2005) On the determination of crystallinity and cellulose content in plant fibres. *cellulose* 12: 563-576.
13. Lee, S. H., T. V. Doherty, R. J. Lingardt, and J. S. Dordick (2008) Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 1368-1376.