

에탄올 생산 향상을 위한 옥살산 전처리 옥수수대의 효소가수분해 조건 탐색*¹

임 우 석*² · 이 재 원*^{2†}

Enzymatic Hydrolysis Condition of Pretreated Corncob by Oxalic Acid to Improve Ethanol Production *¹

Woo-Seok Lim*² · Jae-Won Lee*^{2†}

요 약

본 연구는 농업 부산물인 옥수수대를 이용하여 옥살산 전처리와 효소가수분해를 통한 에탄올 발효 효율 향상 조건을 탐색하였다. 옥살산 전처리 옥수수대의 효소가수분해는 Accellerase 1000을 이용하였으며, 50°C 온도 조건과 pH 4.5에서 96시간 가수분해하여 가장 높은 단당류 수율인 64.8 g/ℓ의 단당류 수율을 나타냈다. 옥수수대에서 생산된 단당류의 발효에는 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하였고, 전처리 옥수수대 및 효소 투입량이 각각 10~14%와 15 FPU 이었을 때 효율적인 에탄올 생산에 가장 적합한 것으로 판명되었다. 이러한 조건에서 24시간 발효 후에 약 88.2%의 에탄올 전환율에 해당되는 0.45의 에탄올 수율을 얻었다.

ABSTRACT

In this study, we investigated the features of bioethanol fermentation of corncob biomass after oxalic acid pretreatment as well as enzymatic hydrolysis. The enzymatic hydrolysis was performed with Accellerase 1000 and the highest yield of monomeric sugars (64.8 g/ℓ) was obtained at 50°C and pH 4.5 for 96 hrs hydrolysis period. For the ethanol fermentation the monomeric sugars obtained from pretreated corncob were subjected to the biological treatment using *Pichia stipitis* CBS 6054. It was turned out that ethanol production from oxalic acid

*¹ 접수 2012년 6월 29일, 채택 2012년 7월 18일

*² 전남대학교 농업생명과학대학 산림자원학부, Department of Forest Products and Technology (BK21 Program), Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 이재원(e-mail: ljw43376@chonnam.ac.kr)

pretreated corncob was the most feasible at 10~14% of biomass loading as well as 15 FPU enzyme amount. Under these fermentation condition, the ethanol yield was approached to 0.47 after 24 hrs fermentation period, which was corresponded to 92.2% of conversion rate.

Keywords: optimal condition, oxalic acid pretreatment, enzymatic hydrolysis, ethanol fermentation

1. 서 론

리그노셀룰로오스계 바이오매스는 풍부한 탄수화물을 포함하고 있어 바이오에탄올 생산에 적합한 자원으로 알려져 있다. 이것은 석유계 연료를 대체할 수 있는 가능성을 가지며 재생가능하다는 특징 때문에 전 세계적으로 주목받고 있다. 리그노셀룰로오스계 바이오매스를 이용한 대체에너지 개발은 장기적인 관점에서 안정적인 에너지를 공급할 수 있고 에너지 수급의 해외 의존도를 감소시키며 이산화탄소를 감소시켜 기후변화협약과 관련하여 국가 차원에서 슬기롭게 대처할 수 있는 방법이다(Wyman, 1999).

현재 리그노셀룰로오스계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산에는 바이오매스 전처리, 효소가수분해, 에탄올 발효 과정이 필요하다(Gupta *et al.*, 2009). 특히 바이오매스의 효소가수분해 공정에 사용되는 고가의 효소비용은 에탄올 생산공정의 경제성 제고측면에서 중요한 요인으로 작용하고 있다(Galbe and Zacchi, 2002). 이러한 이유로 사용한 효소의 회수 및 재사용에 대한 관심도 증가하고 있다. 효소가수분해에서 극복해야 할 문제점은 비싼 효소비용뿐만 아니라 낮은 반응속도, 낮은 농도의 당 생산 등이 있으며 다양한 바이오매스에 대한 효소 기작의 이해도 요구된다(Bansal *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009). 효소가수분해에 영향을 미치는 인자로는 효소의 활성, 효소의 조합, 반응조건(바이오매스 투입량, 온도, pH 등)이 있으며 바이오매스의 구성성분 및 전처리 조건도 효소가수분해의 효율에 영향을 준다. 이와 같이 다양한 인자를 가지고 있어 효소가수분해 효율을 높이기 위한 최적조건 탐색이 필요하다(Ferreira *et al.*, 2009; Sun and Cheng 2002).

일반적인 효소가수분해 조건은 사용되는 효소가

제공하는 정보 또는 NREL (National Renewable Energy Laboratory) 방법에 의해 수행되고 있다. 하지만 바이오매스의 종류, 전처리의 정도 및 사용되는 효소의 종류가 다양하여 동일한 조건에서의 효소가수분해는 고농도의 발효 가능한 당 생산을 기대할 수 없다. 뿐만 아니라 효소가수분해에서 생산된 발효 가능한 당은 연속적으로 에탄올 발효에 사용되기 때문에 짧은 시간에 고농도의 발효 가능한 당 생산이 요구된다. 최적조건에서 효소가수분해는 경제적이며 효율적인 당화를 유도할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 옥살산 전처리 옥수수대를 이용하여 경제적이고 효율적인 발효 가능한 당 생산을 위한 효소가수분해 조건을 탐색하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 옥살산 전처리

미국 Pestell pet products co.로부터 분쇄된 옥수수대(직경 0.5 cm 구형)를 제공받아 사용하였으며 전처리를 수행하기 위해 5% 미만의 함수율로 유지하였다. 최적의 효소가수분해 조건을 구명하기 위해 선행연구 결과를 바탕으로 발효 가능한 당 생산에 최적인 전처리 조건을 반응표면분석에 의해 선택하였다(Lee *et al.*, 2009). 반응온도 168°C, 옥살산 농도 0.032 g/g(바이오매스 건전중량), 반응시간은 26분으로 전처리를 수행하였다. 전처리 과정은 선행연구에서 제시한 방법과 같다(Lee *et al.*, 2009). 전처리 후 고체상 바이오매스와 액상의 가수분해 산물은 스크린(100 mesh, Chung Gye Sang Gong Sa.)을 이용하여 분리하였으며 고체상 바이오매스는 물로 세척 후 효소가수분해를 위해 4°C에서 보관하였다.

Table 1. Enzymatic hydrolysis condition of pre-treated corn cob by oxalic acid

Factor	Condition
Temperature (°C)	50, 55, 60, 65
pH	4.0, 4.5, 5.0
Biomass loading ^a (%)	6, 10, 14, 16
Enzyme loading ^b (FPU)	7.5, 15, 22.5

^a Biomass loading was based on 50 mM sodium acetate buffer.

^b Enzyme loading was based on carbohydrate content in pretreated biomass.

2.2. 바이오매스 성분분석

전처리 전후의 바이오매스 구성성분 분석은 NREL 방법 (Laboratory Analytical Procedure-Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass)에 의해 수행되었다(Sluiser *et al.*, 2008).

2.3. 효소가수분해

전처리 옥수수대의 효소가수분해 최적 조건을 탐색하기 위한 조건은 Table 1과 같다. 반응온도, 초기 pH, 바이오매스 투입량 및 효소 투입량을 효소가수분해에 영향을 미치는 인자로 정하여 각각의 조건에서 효소가수분해를 실시하였다. 효소가수분해에 사용된 효소는 Accellerase 1000 (Genencor, NY, USA)으로 Table 1에 제시한 조건에 따라 효소가수분해를 실시하였다. 모든 효소가수분해는 150 rpm에서 수행되었으며 24, 48, 72, 96시간 후 시료를 취하여 당 분석을 수행하였다. 효소가수분해 반응온도, pH에 대한 최적조건을 분석한 후 최적의 반응온도와 pH 조건에서 바이오매스 투입량 및 효소 투입량을 순차적으로 조사하였다. 최적의 반응온도 및 초기 pH 탐색을 위한 효소가수분해는 전건중량 5 g의 옥살산 전처리 바이오매스, 50 ml의 sodium acetate buffer (pH 4~5), 15 FPU (Filter Paper Unit)의 Accellerase 1000을 첨가하여 수행하였다. 효소가수분해가 종료된 후 바이오매스와 액상의 가수분해 산물은 0.45 μ m filter로 분리하였으며 가수분해 산물은 에탄올 발효에 사용하였다.

2.4. 발효균주 및 에탄올 발효

최적의 조건에서 효소가수분해를 수행한 후 얻어진 가수분해 산물은 에탄올 발효에 사용되었다. 에탄올 발효를 위해 5탄당 발효 가능한 *Pichia stipitis* CBS 6054를 공시균주로 사용하였다. *P. stipitis* CBS 6054는 20 g/l glucose, 10 g/l yeast extract, 10 g/l peptone 배지를 사용하여 30°C에서 24시간 배양 후 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 효모를 수집하고 효모 표면에 잔류하는 배지성분을 제거하기 위해 멸균수로 세척한 후 발효에 사용하였다.

효소가수분해 산물은 NaOH를 이용하여 pH 5.5로 조절하였으며 효모 접종을 위해 120°C에서 20분 동안 멸균하였다. 효모의 성장을 위해 멸균된 urea 5 g/l, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l 등을 첨가한 후 배양된 *P. stipitis* 2 g (dry cell weight)/l를 첨가하여 에탄올 발효를 실시하였다. 배양은 30°C, 150 rpm에서 수행하였으며 12, 24, 36, 42시간 간격으로 시료를 취해서 남아있는 단당류 및 생성된 에탄올 농도를 HPLC로 측정하였다.

2.5. 효소가수분해 산물 및 발효산물 분석

효소가수분해 과정에서 생산된 단당류와 발효과정에서 잔류 단당류 및 에탄올 농도는 HPLC (Waters 2695 system)을 이용하여 측정하였다. Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Bio-rad, Hercules, USA)을 사용하였으며 칼럼 온도는 55°C로 유지시켰다. 이동상으로는 5 mM 황산을 사용하였고 flow rate는 0.3 ml/min으로 55분 동안 분석하였다. Refractive index detector (Waters 2414 system)를 사용하여 단당류 및 에탄올을 정량하였다. 분석용 시료는 모두 0.45 μ m filter를 통과시켜 적절한 희석배율을 적용하여 분석을 실시하였다. Total phenolic 성분은 바닐린을 표준물질로 하여 Scalbert (1989)의 방법에 의해 측정하였다.

Table 2. Chemical composition of untreated biomass and pretreated corncob by oxalic acid (% based on dried biomass)

	Lignin	Glucan	Xylan	Arabinan	Galactan
Untreated biomass	13.9	37.0	27.8	2.20	0.60
Pretreated biomass	22.4	56.1	10.8	0.88	0.16

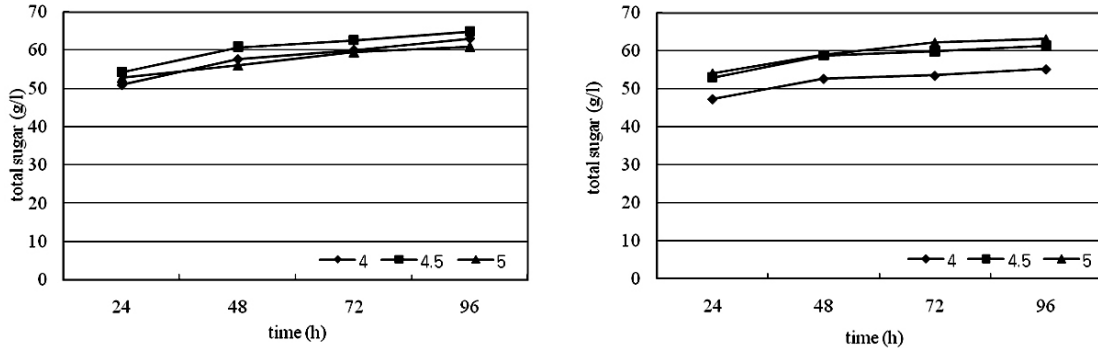


Fig. 1. Total sugar production by enzymatic hydrolysis at 50 (left) and 55°C (right) on different pH (total sugar includes glucose, xylose, galactose and arabinose).

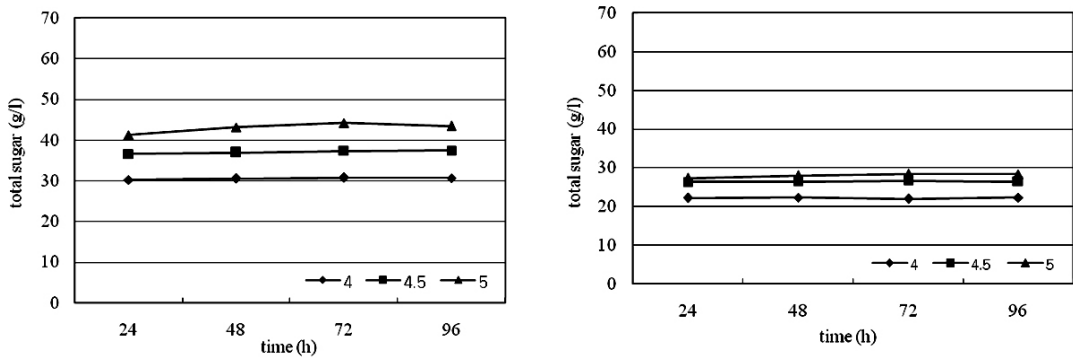


Fig. 2. Total sugar production by enzymatic hydrolysis at 60 (left) and 65°C (right) on different pH (total sugar includes glucose, xylose, galactose and arabinose).

3. 결과 및 고찰

3.1. 옥살산 전처리에 의한 액상 및 고체상 바이오매스 특성

옥살산 전처리에 의한 고체상 바이오매스 성분은 Table 2와 같다. 옥수수대 성분분석은 선행연구에서

수행되었으며(Lee *et al.*, 2009) 전처리에 의한 고체상 바이오매스의 성분은 22.4 %의 리그닌, 67.9%의 탄수화물로 구성되었다. 고체상 바이오매스의 헤미셀룰로오스 성분은 처리 전 바이오매스와 비교하여 감소하였고 리그닌 및 글루칸 성분은 상대적으로 증가하였다. 이것은 헤미셀룰로오스를 선택적으로 분해하는 전형적인 옥살산 전처리 효과와 일치하였다

Table 3. Carbohydrate conversion rate by enzymatic hydrolysis depend on enzyme and biomass loading

Enzyme (FPU)	Biomass (%)	Fermentable sugar produced by enzymatic hydrolysis (g/ℓ) ^a			Conversion rate (%)
		Glucose	Xylose	Total	
75	6	26.4	0.9	27.3	67.01
	10	37.6	0.8	38.4	56.55
	14	44.9	0.7	45.6	47.97
	16	45.4	0.5	45.9	42.25
15	6	31.8	1.2	33.0	81.00
	10	51.4	1.7	53.1	78.20
	14	59.4	1.4	60.8	63.96
	16	64.7	0.4	65.1	59.92
225	6	31.0	1.0	32.0	78.55
	10	49.7	1.9	53.6	78.94
	14	62.8	1.6	64.4	67.75
	16	72.0	1.2	73.2	67.38

(김 등, 2011; Lee *et al.*, 2010). 옥살산 전처리에 의해 셀룰로오스와 리그닌은 거의 분해되지 않았으며 이것은 액상 가수분해 산물 분석에 의해 확인되었다. 액상 가수분해 산물 구성성분은 글루코오스 2.8 g/ℓ, 자이로오스 30.8 g/ℓ, 아라비노오스 1.7 g/ℓ, acetic acid 4.1 g/ℓ로 나타났으며 대부분 헤미셀룰로오스로부터 유래된 단당류가 주를 이루었다. Furfural, 5-hydroxymethylfurfural과 같은 당분해 산물은 1 g/ℓ 미만, 리그닌 분해로부터 유래된 total phenolic 성분은 3 g/ℓ 미만의 낮은 농도로 검출되었다. 따라서 옥살산 전처리에 의한 고체상 바이오매스는 풍부한 탄수화물을 포함하고 있어 효소가수분해에 의한 발효 가능한 당 생산에 적합한 바이오매스가 될 수 있다.

3.2. 효소가수분해 최적조건

효소가수분해를 위한 최적 반응온도, 초기 pH 탐색을 위해 Table 1의 조건에서 효소가수분해를 수행한 결과 Figs. 1, 2와 같다. 반응온도 50°C에서 최대

의 단당류를 생산하였다. 전처리에 의한 자이란 분해는 효소가수분해 동안 셀룰로오스 분해를 촉진하였으며 이것은 자이란이 분해되어 효소가 셀룰로오스로의 접근이 쉬워졌다는 이론을 뒷받침해주고 있다 (Berlin *et al.*, 2006). 총 당량을 구성하고 있는 것은 주로 글루코오스로 헤미셀룰로오스 유래의 단당인 자이로스와 아라비노오스의 함량은 매우 낮았다. 본 연구에서 사용한 효소는 주로 셀룰로오스 분해에 관여하는 것으로 남아있는 소량의 자이란 분해에는 효과적이지 않았다. 반응온도 50°C에서 효소가수분해는 초기 pH에 관계없이 24시간 후 약 50 g/ℓ의 발효 가능한 당을 생산하였고, 96시간 후에는 모든 pH 조건에서 60 g/ℓ 이상의 발효 가능한 당을 생산하였다. 이것은 전처리 바이오매스 탄수화물의 90% 이상이 분해되었음을 나타내고 있고 특히, pH 4.5에서는 발효 가능한 당 64.8 g/ℓ의 생산으로 95.4%의 가수분해 효율을 나타냈다. 반응온도가 증가하면서 발효 가능한 당으로의 전환율은 감소하였으며 pH에 따른 차이도 뚜렷하게 나타났다. 60°C 이상에서는 효소의

활성이 감소되어 발효 가능한 당 생산이 제한되었다. 전반적으로 본 연구에서 사용된 효소는 β -glucosidase (80 pNPG/g)를 포함하고 있어 효소가수분해 과정에서 생성된 셀로비오스의 저해를 받지 않아 높은 효소가수분해 효율을 나타냈다. 반응온도, 초기 pH에 대한 결과를 종합할 때 50°C, pH 4.5가 효소가수분해를 위해서 적합할 것으로 사료된다.

최적반응온도와 pH를 바탕으로 바이오매스 투입량 및 효소 투입량을 분석한 결과 Table 3과 같다. 효소 투입량에 따른 효소가수분해 효율은 바이오매스 투입량에 관계없이 15 FPU에서 가장 높았다. 같은 효소 투입량에서는 바이오매스 투입량이 증가할수록 당으로 전환율은 감소하였다. 높은 바이오매스 투입량은 효소가수분해 과정에서 교반의 어려움을 일으키고 효소의 활성 및 기질의 반응성을 감소시켜 결과적으로 효소가수분해 효율을 감소시킨다(Ramos *et al.*, 1993; Reese 1980).

7.5 FPU의 효소투입은 전처리 바이오매스를 분해시키기 충분하지 못한 것으로 판단되며 다른 연구결과에서도 비슷한 경향을 확인할 수 있었다(Chen *et al.*, 2008). 효소 15 FPU, 6%의 바이오매스로 효소가수분해를 수행하였을 때 81%로 가장 높은 당 전환율을 나타냈다. 효소 투입량 22.5 FPU에서는 15 FPU를 첨가하였을 때보다 당으로 전환율이 크게 증가하지 않았으며 15 FPU의 첨가로도 충분한 효소가수분해가 진행되었음을 확인할 수 있었다. 하지만 초기 바이오매스 투입량이 낮으면 당으로 전환율이 높다고 하더라도 최종 생산되는 발효 가능한 당이 적어 경제적인 측면을 고려한 바이오매스 투입량 및 효소 투입량이 결정되어야 한다. 이러한 점을 고려할 때 옥살산 전처리 옥수수대의 효소가수분해를 위해서는 15 FPU의 효소, 10~14%의 바이오매스 투입량이 효소가수분해 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다.

3.3. 효소가수분해 산물의 에탄올 발효

최적의 조건에서 효소가수분해로 얻어진 가수분해 산물을 이용하여 에탄올 발효를 실시한 결과 Fig. 3과 같다. 15 FPU, 10% 바이오매스로 pH 4.5, 50°C에

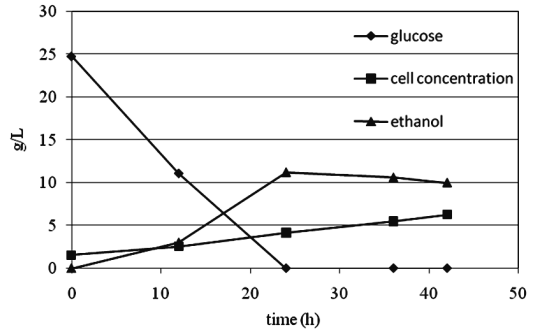


Fig. 3. Time-dependent glucose and ethanol concentrations during fermentation of glucose from separate enzymatic hydrolysis.

서 24시간 효소가수분해를 수행한 결과 53.1 g/l의 발효 가능한 당을 얻었다. 효소가수분해 산물은 높은 당농도를 포함하고 있어 에탄올 발효의 효율을 증가시키기 위해 가수분해 산물은 증류수로 희석하였다. 최종 24.8 g/l의 글루코오스를 포함한 가수분해 산물을 에탄올 발효에 사용하였다. 에탄올 발효과정에서 글루코오스의 소모는 24시간 안에 이루어졌으며 동시에 11.2 g/l의 최대 에탄올 생산을 나타냈다. 최대 에탄올 생산량에 대한 수율(1)은 0.45로 발효 가능한 당이 에탄올로 100% 전환되었을 때 수율 0.51의 88.2%에 이르는 높은 수율을 나타냈고 시간당 에탄올 생산량 0.47 g/(l*h)로 나타났다. 발효가 진행되면서 효모의 농도도 증가하였고 24시간 이후 에탄올 생산량은 다소 감소하였지만 효모의 농도는 계속 증가하는 경향을 나타냈다.

$$\text{에탄올 수율} = \frac{\text{에탄올 생산량(g/l)}}{\text{효소가수분해 산물의 발효가능한 당(g/l)}} \quad (1)$$

4. 결론

발효 가능한 당 생산을 위한 효소가수분해는 바이오매스 전처리 정도, 효소와 바이오매스 투입량을 고려하지 않고 수행되어왔다. 하지만 효소가수분해 공

정은 비싼 효소 비용, 낮은 가수분해 효율로 경제적인 측면에서 해결해야 할 문제점을 가지고 있다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 최적의 효소가수분해 조건 탐색으로 극복하고자 하였다. 바이오매스 투입량의 증가는 효소가수분해 효율을 감소시켰다. 하지만 낮은 바이오매스 투입량은 높은 효소가수분해 효율에서도 최종적으로 낮은 농도의 발효 가능한 당을 생산하기 때문에 이러한 점을 고려하였을 때 바이오매스 투입량은 10~14%가 적합하였다. 효소의 투입량 15 FPU 이하에서는 바이오매스 가수분해에 충분하지 못하였으며 15 FPU 이상에서는 가수분해 효율이 효소 투입량과 비례하여 증가하지 못했다. 따라서 옥살산 전처리 옥수숫대에서는 15 FPU의 효소 첨가가 적합하였다. 이와 같이 적절한 바이오매스 투입량과 효소 투입량의 상관관계를 구명하고 효소가수분해에 대한 최적조건을 탐색하는 것은 고농도의 발효 가능한 당 생산을 유도하여 바이오에탄올 생산을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2012-0008177).

참 고 문 헌

- 김혜연, 이재원, T. W. Jeffries, 최인규. 2011. 바이오에탄올 생산을 위한 백합나무(*Liriodendron tulipifera*) 칩의 동시당발효 및 Response Surface Method를 이용한 옥살산 전처리 조건 탐색. 목재공학 39(1): 75~85.
- Bansal, P., M. Hall, M. J. Realf, and J. H. Lee. 2009. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrate. *Biotechnology Advances* 27: 833~848.
- Berlin, A. N., Gilkes, D., Kilburn, V., Maximenko, R., Bura, A., Markov, A., Skomarovsky, A., Gusakov, A., Sinitsyn, O., Okunev, J., Solovieva, and J. N. Saddler. 2006. Evaluation of cellulase preparations for hydrolysis of hardwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 130: 528~545.
- Chen, M., J. Zhao, and L. Xia. 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers* 71: 411~415.
- Ferreira, S., A. R. Duarte, M. H. L. Riberio, J. A. Queiroz, and F. C. Domingues. 2009. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. *Biochemical Engineering Journal*. 45: 192~200.
- Galbe, M. and G. Zacchi. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology Biotechnology* 59: 618~628.
- Gupta, R., K. K. Sharma, and R. C. Kuhad. 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflor*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisia* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology* 100: 1214~1220.
- Lee, J. W., R. C. L. B. Rodrigues, H. Y. Kim, I. G. Choi, and T. W. Jeffries. 2010. The roles of xylan and lignin in oxalic acid pretreated corncob during separate enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. *Bioresource Technology* 101: 4379~4385.
- Lee, J. W., R. C. L. B. Rodrigues, and T. W. Jeffries. 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of oxalic acid pretreated corncob assessed with response surface methodology. *Bioresource Technology* 100: 6307~6311.
- Ramos, L. P., J. N. Breuil, and J. N. Saddler. 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 15: 91~125.
- Reese, E. T. 1980. Inactivation of cellulase by shaking and its prevention by surfactants. *Journal of Applied Biochemistry* 2: 36~39.
- Scalbert, A., B. Monties, and G. Janin. 1989. Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food. Chem.* 37(5): 1324~1329.
- Sluiter, B., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlate, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. 2010. Determination of structural carbohydrate and lignin in biomass. *Laboratory Analytical Procedure*.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.

- Bioresource Technology. 83: 1~11.
15. Wyman, C. E. 1999. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges, Annual Review of Energy the Environment 24: 189~226.
 16. Zheng, Y., Z. Pan, R. Zhang, and B. M. Jenkins. 2009. Kinetic modeling for enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. Biotechnology Bioengineering 102: 1558~1569.