

섬유소계 바이오매스의 분별을 위한 다양한 알칼리 전처리 특성

김준석*

경기대학교 화학공학과
443-760 경기도 수원시 영통구 이의동 산94-6
(2013년 2월 4일 접수, 2013년 2월 26일 채택)

The Characteristics of Alkaline Pretreatment Methods of Cellulosic Biomass

Jun Seok Kim*

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, San 94-6 Iui-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi 443-760, Korea
(Received 4 February 2013; accepted 26 February 2013)

요 약

이 연구는 목질계 바이오매스에 대한 알칼리 용액의 침지와 침출 전처리의 효능을 비교한다. 볏짚과 보리짚과 같은 다양한 바이오매스는 수산화나트륨 용액, 수산화칼륨 용액, 암모니아수 그리고 탄산나트륨 용액에 의해 침지 공정으로 수행되었다. 암모니아수에 의해 전처리된 볏짚과 보리짚의 효소 소화율은 80% 이상으로 나타났다. 전처리된 유칼립투스 부산물, 낙엽송 그리고 리기다 소나무의 효소 소화율은 상대적으로 낮은 범위로 나왔다. 하지만 전처리된 유칼립투스 부산물은 초기 바이오매스에 비해 효소 소화율이 약 5배 증가되었다. 또한 침출 공정으로 전처리된 유칼립투스 부산물의 효소 소화율은 약 12배가 증가되는 것을 확인하였다.

Abstract – This study compares the efficacy of soaking and percolation pretreatments with alkaline solutions for lignocellulosic biomass. Various biomass such as rice straw and barley were pretreated by soaking processes in various alkaline solutions including sodium hydroxide, potassium hydroxide, aqueous ammonia and sodium carbonate. The enzymatic digestibility of rice straw and barley that had been pretreated by soaking in aqueous ammonia was over 80%. Eucalyptus residue, *Larix leptolepis* and *Pinus rigida* exhibited relatively low enzymatic digestibility. Nevertheless, the enzymatic digestibility of pretreated eucalyptus residue was increased by five times compared to that of the initial biomass. And, the enzymatic digestibility of the percolation pretreated eucalyptus residue was increased 12 times.

Key words: Pretreatment, Soaking, Percolation, Enzymatic Hydrolysis

1. 서 론

목질계 섬유소 물질은 전 세계에서 가장 경제적인 재생 천연 자원이다[1]. 목질계 섬유소 물질은 미생물에 의해 발효되어 다른 화학물질을 형성하는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 고분자 형태의 당을 포함되어 있다[2]. 식물 바이오매스의 구성성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 그리고 리그닌은 펄프와 식품의 원료뿐만 아니라 알코올과 메탄 그리고 푸르루랄과 유기산과 같은 화학 원료 물질로서의 에너지 자원으로 변환이 가능한 것으로 알려져 있다[3]. 또한 석유의 높은 가격과 지구 온난화는 바이오에탄올과 같은 바이오연료의 중요성을 강조하고 있다[4].

유칼립투스는 상업적으로 중요한 속성수로 바이오매스 생산에 위한 섬유 원료로서의 중요성으로 인해 관리되고 연구되었다[5]. 유칼립투스는 높은 셀룰로오스 함량으로 인해 장기적으로 보면 에탄올 생산을 위한 주요한 촉망되는 원료이다. 유칼립투스의 건조 중량의

약 90%는 셀룰로오스 41.8%, 헤미셀룰로오스 18.7% 그리고 리그닌 30.1%의 형태로 구성되어 있다. 당으로의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 전환은 환원당과 에탄올과 같은 부가가치 화학물질의 생산에 대한 원료를 제공할 수 있다[6].

목질계 물질의 전처리는 셀룰로오스를 분해할 수 있는 효소에 대한 기질의 접근성을 크게 저해하는 다양한 물리 화학적 인자들 때문에 효율적인 효소당화를 위해 필수적인 공정이다. 전처리는 바이오매스에 대한 생물학적 전환의 핵심 요소들 중의 하나이다[7]. 전처리 시약으로써의 알칼리 용액은 바이오매스의 팽윤뿐만 아니라 효율적인 탈리그닌에 대한 많은 장점을 가지고 있다. 에탄올 생산에 대해 연구되는 알칼리 용액을 사용하는 전처리 방법들 중에 낮은 온도에서 알칼리 용액으로 침지하는 공정은 전처리되는 동안 헤미셀룰로오스와 상호작용을 최소화하여 고체상에서 헤미셀룰로오스를 함유한다. 이것은 발효 수율을 증가시키고 생물전환 방식을 단순화할 수 있는 방법으로 보고되었다[8].

본 논문에서는 전처리된 유칼립투스 부산물의 효소당화에 의한 에탄올 생산을 위한 당 생산에서 일부 당화 매개변수의 효과를 실험한

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

다. 이러한 연구는 바이오매스의 효율적인 효소당화를 위해 필요하다. 목질계 바이오매스의 전처리는 주로 리그닌 감소에 영향을 미치는 가장 효과적인 전처리 방법 중 하나이다. 지난 몇 년 동안 세계적으로 효율적인 전처리 기술을 개발하기 위해 다양한 연구가 실시되었다. 전처리의 목적은 최대 당 회수를 위해 효소가 셀룰로오스의 단단한 구조에 접촉되는 목질계 효소를 위해 셀룰로오스의 결정화를 감소시키고 헤미셀룰로오스 분해를 증가시키고 바이오매스 반응 면적을 넓히는 것이다. 전처리는 다양하게 물리적, 화학적, 생물학적 그리고 열적으로 조합하여 연구가 되고 있다[11]. 예를 들면 전통적인 희석산을 사용하는 전처리법[9,10], 암모니아 폭쇄법(AFEX)[11], 암모니아 침지공정(SAA)[12], 암모니아 침출회수공정(ARP)[13] 그리고 알칼리 용액을 이용한 전처리법[10] 등을 들 수 있다. 수산화 암모늄, 수산화 나트륨 그리고 수산화 칼슘과 같은 알칼리 시약은 목질계 바이오매스의 생물학적 전환을 위한 전처리 시약으로써 사용되고 있다. 알칼리 전처리의 주요 역할은 효소 소화율의 향상시키기 위한 바이오매스의 탈리그닌화이다. 리그닌의 알킬 아릴 결합은 알칼리 조건하에서 쉽게 쪼개진다. 그리고 반응은 pH가 10보다 크기 때문에 $[OH^-]$ 가 민감하지 않은 결합 구조에 의해 주로 제어된다. 탄산 나트륨은 수산화 나트륨에 비해 4-6배 저렴하고 회수하기도 용이하다[14]. 본 전처리는 탄산 나트륨 전처리의 잠재적인 능력의 향상에 초점을 맞추고 있다.

본 연구에서는 에탄올 생산을 위한 당 생산에서 알칼리 용액에 의해 전처리된 유칼립투스 부산물의 잠재력을 조사하였다.

2. 실험방법

2-1. 재료

본 연구에서 사용된 유칼립투스 부산물, 낙엽송, 리기다 소나무, 벚꽃 그리고 보리짚은 한국에너지기술연구원(KIER)에서 제공 받았다. 바이오매스는 사용하기 전에 30-50 mesh의 크기로 분쇄하였다. 실험에 사용된 알칼리 용액들은 수산화 나트륨, 수산화 칼슘 그리고 탄산 나트륨이고 그것들의 농도는 1 M (mol)이었다. 또한 15 wt% 농도의 암모니아수도 사용하였다. 효소 당화를 위해 사용된 효소는 cellulase로써 사용된 Celluclast 1.5 L (CAS No. 9012-54-8)과 β -glucosidase로써 사용된 Novozyme 188 (CAS No. 9001-22-3)를 사용하였다.

2-2. 알칼리용액의 전처리

다양한 알칼리 용액은 기존 벚꽃을 사용한 전처리의 경우와 같이 60 °C의 온도, 1:10의 고액비에서 24시간 동안 바이오매스의 전처리에 대해서 실험하였다. 전처리 후에 침지된 바이오매스는 여과공정으로 회수하고 그 후에 pH 7이 될 때까지 깨끗한 물로 세척하였다[8,12,15,16].

Fig. 1에는 침출 장비의 배치도를 나타내었다. 이 시스템은 용액 저장소, 펌프, 온도제어 오븐, SS-316 반응기(3 cm 내경×19.4 cm 길이, 137 cm³의 내부부피) 그리고 액체 보관 탱크로 구성되어 있다. 반응기는 바이오매스가 가득 채워진 반응기 단을 통해 액체가 흘러가는 유동모드로 작동하였다. 반응기 시스템은 순간 증발을 방지하기 위해 2.3 MPa의 질소가스로 가압하였다. 침출 실험에서 반응기에는 35 g의 바이오매스를 채워 넣었다. 반응은 강제 순환 오븐에서 반응 온도를 높이면서 시작되었다. 원하는 온도에 도달하기 위해서는 약 15분의 예열시간이 필요로 하였다. 반응시간은 원하는 온도에

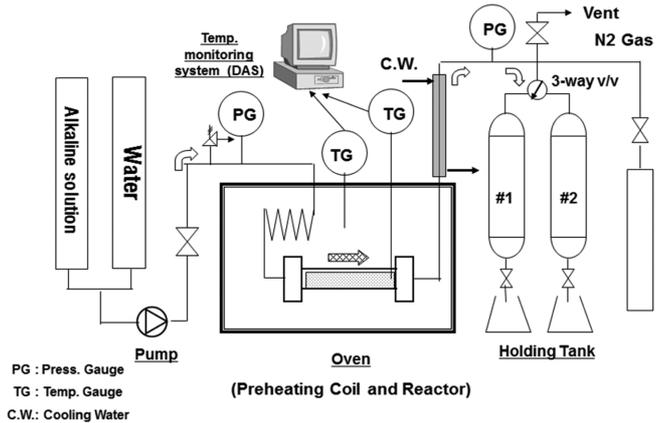


Fig. 1. Schematic diagram of the percolation system.

도달한 후부터 계산되었다. 침출 공정에서 액체의 유량은 5 ml/min 이었다[17].

2-3. 효소 당화

전처리된 목질계 바이오매스는 삼각 플라스크에서 당화되었다. 효소 당화는 진탕 배양기에서 150 rpm의 속도로 72시간 동안 수행되었다. 배양액은 0.1 M 구연산 완충용액(pH4.8)을 사용하였다. 또한 실험은 기질 농도가 5 wt%이고 반응 온도가 50 °C인 환경에서 수행되고 사용된 효소량은 Celluclast 1.5L은 65 FPU (Filter paper unit)/ml 이고 Novozyme 188은 32 CBU (Cellobiose unit)/ml이다[15-18].

2-4. 분석 방법

당과 리그닌의 구성성분은 신재생 에너지 연구소(NREL: National Renewable Energy Laboratory)의 표준 바이오매스 분석 절차에 따라 정해졌다. 효소당화로부터 생산된 탄수화물의 구성성분은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)로 분석하였다[18]. HPLC는 Bio-rad사의 Aminex HPX-87H 컬럼으로 분리하고 Refractive index 디텍터로 검출을 하는 시스템으로 구성되어 있다. 이동상은 5 mM의 황산용액을 사용하여 60 °C의 온도로 설정된 컬럼에 0.6 mL/min의 유속으로 제어를 하였다. HPLC에 시료를 주입하기 전에 모든 샘플은 15,000 rpm의 속도로 원심분리를 한 후에 0.2 μ m의 실린지 필터로 여과하였다[15-17].

3. 결과 및 고찰

3-1. 목질계 바이오매스의 구성성분

실험에 사용된 바이오매스는 벚꽃, 보리짚, 유칼립투스 부산물, 리기다 소나무 그리고 낙엽송이다. 각각 바이오매스의 구성성분은 전처리하기 전에 분석되었다[18]. 전처리 전의 유칼립투스 부산물 성분은 41.8% glucan (cellulose), 18.7% xylan (hemicellulose) 그리고 30.1% Klason lignin으로 구성되어 있다. 전처리 전의 낙엽송 성분은 43.4% glucan (cellulose), 24.4% xylan (hemicellulose) 그리고 28.9% Klason lignin으로 구성되어 있다. 전처리 전의 리기다 소나무 성분은 43.1% glucan (cellulose), 23.7% xylan (hemicellulose) 그리고 29.0% Klason lignin으로 구성되어 있다. 전처리 전의 벚꽃 성분은 39.1% glucan (cellulose), 23.6% xylan (hemicellulose) 그리고 12.1% Klason

Table 1. Major compositions of untreated and pretreated lignocellulosic biomass

	Eucalyptus residue				Larix leptolepis			
	Untreated	1M Sodium hydroxide	1M Pottassium hydroxide	15% aq. ammonia	Untreated	1M Sodium hydroxide	1M Pottassium hydroxide	15% aq. ammonia
Cellulose	41.8	39.3	39.7	40.3	43.4	42.8	43.2	43.4
Hemicellulose	18.7	10.7	11.9	15.4	24.4	18.4	19.7	21.3
Lignin	30.1	24.8	24.5	25.8	28.9	26.1	26.0	26.3
Others	9.4	8.4	7.4	8.6	3.3	4.2	2.0	0.1
Total	100	83.2	83.5	90.1	100.00	91.5	90.9	91.1

	Pinus rigida				Rice straw		Barley straw	
	Untreated	1M Sodium hydroxide	1M Pottassium hydroxide	15% aq. ammonia	Untreated	15% aq. ammonia	Untreated	15% aq. ammonia
Cellulose	43.1	42.8	42.5	43.1	39.1	34.7	35.9	32.5
Hemicellulose	23.7	20.6	20.3	23.1	23.6	18.2	29.1	21.1
Lignin	29.0	24.4	24.2	25.2	12.1	4.1	15.4	8.1
Others	4.2	3.1	2.7	1.3	25.2	7.9	19.6	4.2
Total	100	90.9	89.7	92.7	100	64.9	100	65.9

lignin으로 구성되어 있다. 전처리 전의 보리짚 성분은 35.9% glucan (cellulose), 29.1% xylan (hemicellulose) 그리고 15.4% Klason lignin 으로 구성되어 있다.

3-2. 침지 방법에 의한 전처리

탄산나트륨용액에 대해 전처리가 가능한 목질계 바이오매스를 선택하기 위해 수산화나트륨용액, 수산화칼륨용액 그리고 암모니아수를 사용한 침지공정으로 다양한 바이오매스에 대한 실험을 수행하였다. 전처리는 1:10의 고액비로 60 °C의 온도에서 24시간 동안 수행되었다. 이 전처리 조건은 이전에 볏짚의 전처리에 대해 보고된 것을 기준으로 하였다[16]. 전처리된 바이오매스의 구성성분은 Table 1에 나타내었다[18]. 리기다 소나무와 낙엽송의 셀룰로오스 성분은 다른 바이오매스와 비교하여 비교적 손실없이 보존된 것으로 나타났다. 그러나 유칼립투스 부산물, 볏짚 그리고 보리짚의 셀룰로오스 성분은 전처리 전에 비해 약 5~10%의 손실을 보였다. 또한, 유칼립투스 부산물, 리기다 소나무 그리고 낙엽송은 각각 약 16.8%, 15.1% 그리고 9.6%의 탈리그닌이 나타났다. 유칼립투스 부산물과 리기다 소나무의 탈리그닌은 낙엽송의 탈리그닌보다 상대적으로 높게 나타났다.

전처리가 된 바이오매스의 성분 변화만으로는 전처리의 효과에 대해 판단할 수가 없기 때문에 효소당화 실험을 수행하였다. Fig. 2에서 암모니아수에 의한 침지 공정으로 전처리된 볏짚과 보리짚의 효소 소화율을 보여준다. 효소 소화율은 각각 볏짚은 약 85%이고 보리짚은 약 95%으로 나타났다. 그리고 유칼립투스 부산물, 낙엽송 그리고 리기다 소나무의 효소 소화율은 3.2~8.3%의 범위에서 나타났다. Fig. 3에 의하면 리기다 소나무, 낙엽송, 볏짚 그리고 보리짚의 효소 소화율은 전처리 공정을 거치지 전과 비교하여 각각 약 1.8~3.6 배의 증가를 보였다. 반면에 유칼립투스 부산물의 효소 소화율은 약 5.1 배가 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과를 보았을 때, 높은 효소 소화율을 보인 볏짚과 보리짚은 낮은 에너지 조건에서 수행되는 침지 전처리의 가능성을 확인하였다.

3-3. 탄산나트륨 용액에 의한 전처리

볶짚과 보리짚은 침지 공정에서 높은 효소 소화율을 나타내었다. 그래서 두 바이오매스는 침지 공정보다 높은 에너지 조건이 요구되는 침출 공정보다 침지 공정에 좀 더 적합한 것을 판단하였다. 그레

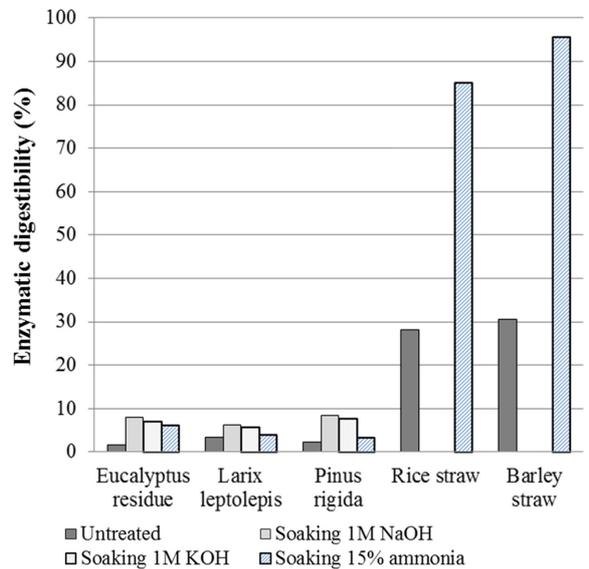


Fig. 2. Enzymatic digestibility of pretreated biomass by soaking process.

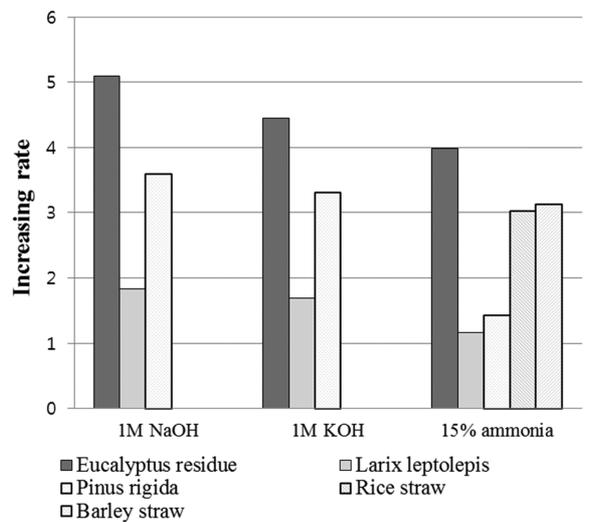


Fig. 3. Increasing ratio of enzymatic digestibility of pretreated biomass by soaking process.

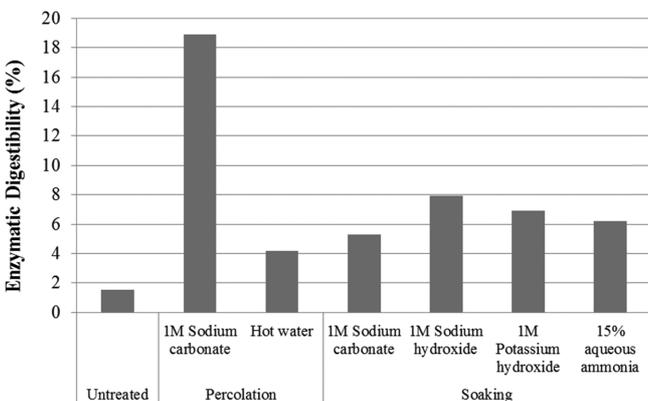
Table 2. Major compositions of untreated and pretreated Eucalyptus residue

	Untreated	1M Sodium carbonate		Hot water
		Soaking	Percolation	
Cellulose	41.8	40.8	41.1	41.8
Hemicellulose	18.7	15.7	13.3	15.2
Lignin	30.1	27.5	23.5	27.3
Others	9.4	9.3	1.2	4.4
Total	100	93.3	79.1	88.7

Unit : %

서 볏짚과 보리짚은 침출 공정에 대한 전처리에서 제외하였다. 따라서, 유칼립투스 부산물은 탄산나트륨 용액에 대한 전처리로 사용될 바이오매스로 선정되었고 탄산나트륨 용액에 의한 침지와 침출 공정의 능력을 조사하기 위한 실험이 수행되었다. 침지 공정은 앞서 수행된 실험과 동일한 농도와 온도에서 수행되었다. 침출 공정은 일반적으로 수행되는 온도 조건인 170~200 °C 보다 낮은 온도인 150 °C 에서 실시되었다. 또한 비교를 위해 같은 온도에서 열수에 의한 전처리를 수행하였다. 이러한 전처리 결과는 Table 2에 나타내었다. 탄산나트륨 전처리에서 침지공정에 대한 탈리그닌은 8.7%이고 침출공정에 대한 탈리그닌은 21.7%로 나타났다. 그리고 열수로의 침출 공정에 탈리그닌은 9.3%이다. 침출 전처리에 의한 탈리그닌은 침지 전처리와 비교하였을 때 두 배 이상의 효과를 보였다. 열수 침출 공정에 대한 탈리그닌은 침지 공정에 대한 것과 유사하게 나타났다. 전처리 효과는 열과 압력 조건에 강력하게 영향을 받았다.

열수에 의한 유칼립투스 부산물의 전처리를 다룬 논문에서 글루코스 수율은 전처리 온도에 따라 다양하였다. 전처리 바이오매스의 글루코스 수율은 140 °C에서 5.9%로 나타났다[19]. 효소 소화율은 탄산나트륨 용액 전처리의 효과를 결정하기 위해 측정되었고 Fig. 4는 그 결과이다. 수산화나트륨, 수산화칼륨 그리고 암모니아수로 침지 전처리를 수행하였을 때의 효소 소화율은 약 5.3~7.9%이다. 반면에 탄산나트륨 용액으로 수행한 침출 전처리의 바이오매스의 효소 소화율은 19%로 나타났다. 그리고 열수 침출 전처리를 수행한 바이오매스의 효소 소화율은 4.2%로 비교적 낮은 것을 알 수 있었다. 효소 소화율은 수산화나트륨 용액, 수산화칼륨 용액 그리고 암모니아수의 침지 공정에 차이가 크게 나오지는 않았다. 또한 탄산나트륨 용액의 전처리에 대해서도 큰 효과가 나타나지 않았다. 그러나 침출 공정을 거친 바이오매스의 효소 소화율은 약 12배 증가하였다. 이러한

**Fig. 4. Enzymatic digestibility of pretreated Eucalyptus residue by various solutions.**

결과는 유칼립투스 부산물과 같은 목질의 바이오매스의 전처리에 사용하기 위한 탄산나트륨 용액의 잠재력을 뒷받침 하는 것으로 사료 된다. 침출 공정은 침지 공정보다 훨씬 더 효과적인 것으로 확인하였다. 향후 발효가능한 당 생산을 위하여 탄산나트륨 용액을 적용시킨 침출 공정 실험에 대한 최적화 실험이 수행되어야 할 것이다.

4. 결 론

본 연구에서는 상대적으로 높은 효소 소화율을 보여준 볏짚과 보리짚과 같은 농업 부산물계 바이오매스에 대한 낮은 에너지 전처리의 가능성을 확인하였다. 상압에서 60 °C의 온도로 수행된 암모니아수의 침지 공정에 의해 전처리를 수행한 볏짚과 보리짚의 효소 소화율은 각각 85%와 95%였다. 유칼립투스 부산물의 효소 소화율은 초기 바이오매스에 비해 약 5.1배의 증가를 보이는 전처리 효과를 나타냈다.

탄산나트륨 용액의 전처리에서 침출 공정은 21.7%의 탈리그닌 효과를 보였고 19%의 효소 소화율을 나타내었다. 이러한 결과는 유칼립투스 부산물과 같은 목질의 바이오매스를 전처리 하기 위한 용매로서의 탄산나트륨 용액에 대한 잠재력을 확인 할 수 있는 것으로 사료된다. 침출 공정은 침지 공정보다 더 효과적인 것으로 확인했다.

감 사

본 연구는 2010학년도 경기대학교 연구년 수혜로 진행되었습니다.

참고문헌

- Zhu, S., Wu, Y., Yu, Z., Zhang, X., Li, H. and Gao, M., "The Effect of Microwave Irradiation on Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw," *Bioresour. Technol.*, **97**, 1964-1968(2006).
- Beak, S. C. and Kwon, Y. J., "Optimization of the Pretreatment of Rice Straw Hemicellulosic Hydrolyzates for Microbial Production of Xylitol," *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **12**, 404-409(2007).
- Sawada, T. and Nakamura, Y., "Low Energy Steam Explosion Treatment of Plant Biomass," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **76**, 139-146(2001).
- Bak, J. S., Ko, J. K., Han, Y. H., Lee, B. C., Choi, I. G. and Kim, K. H., "Improved Enzymatic Hydrolysis Yield of Rice Straw Using Electron Beam Irradiation Pretreatment," *Bioresour. Technol.*, **100**, 1285-1290(2009).
- Gonzalez, R., Treasure, T., Phillips, R., Jameel, H., Saloni, D., Abt, R. and Wright, J., "Converting Eucalyptus Biomass Into Ethanol: Financial and Sensitivity Analysis in a co-current Dilute Acid Process. Part II," *Biomass Bioenerg.*, **35**, 767-772(2011).
- Yu, Q., Zhuang, X., Yuan, Z., Wang, Q., Qi, Q., Wang, W., Zhang, Y., Xu, J. and Xu, H., "Two-step Liquid Hot Water Pretreatment of Eucalyptus Grandis to Enhance Sugar Recovery and Enzymatic Digestibility of Cellulose," *Bioresour. Technol.*, **101**, 4895-4899(2010).
- Emmel, A., Mathias, A. L., Wypych, F. and Ramos, L. O., "Fractionation of Eucalyptus Grandis Chips by Dilute Acid-catalysed Steam Explosion," *Bioresour. Technol.*, **86**, 105-115(2003).
- Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B., "Bioethanol Production

- from Barley Hull Using SAA (soaking in aqueous ammonia) Pretreatment," *Bioresour. Technol.*, **99**(13), 5694-5702(2008).
9. Kim, K. H., Tucker, M. P. and Nguyen, Q. A., "Effects of Pressing Lignocellulosic Biomass on Sugar Yield in Two-Stage Dilute-Acid Hydrolysis Process," *Biotechnol. Prog.*, **18**, 489-494(2002).
 10. Merino, S. and Cherry, J., "Progress and Challenges in Enzyme Development for Biomass Utilization," *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **108**, 95-120(2007).
 11. Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H. and Dale, B. E., "Optimization of the Ammonia Fiber Explosion (AFEX) Treatment Parameters for Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover," *Bioresour. Technol.*, **96**, 2014-2018(2005).
 12. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking in Aqueous Ammonia," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **121-124**, 1119-1132(2005).
 13. Kim, T. H., Lee, Y. Y., Sunwoo, C. and Kim, J. S., "Pretreatment of Corn Stover by Low-liquid Ammonia Recycle Percolation Process," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **133**, 41-57(2006).
 14. Kothari, U. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Herbaceous Plants by Sodium Carbonate," *The 32nd Symposium on biotechnology for fuels and chemicals*(2010).
 15. 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).
 16. Park, Y. 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).
 17. Kim, K. S. and Kim, J. S., "Optimization of Ammonia Percolation Process for Ethanol Production from Miscanthus Sinensis," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **48**(6), 704-711(2010).
 18. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.
 19. Hiroyuki, I., Shinichi, Y., Takashi, E., Tsuyoshi, S. and Shigeki, S., "Combining Hot-compressed Water and Ball Milling Pretreatments to Improve the Efficiency of the Enzymatic Hydrolysis of Eucalyptus," *Biotechnology for biofuels*, 1: doi:10.1186/1754-6834-1-2(2008).