

암모니아 Soaking 방법을 이용한 섬유소계 바이오매스의 전처리 특성

박용철 · 김진우* · 김준석†

경기대학교 화학공학과
443-760 경기도 수원시 영통구 이의동 산 94-6
*삼성전자(주) 삼성종합기술원
446-712 경기도 용인시 기흥구 농서동 산 14-1
(2010년 10월 26일 접수, 2010년 11월 15일 채택)

Pretreatment Characteristics of Ammonia Soaking Method for Cellulosic Biomass

Yong Cheol Park, Jin-Woo Kim* and Jun Seok Kim†

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, San 94-6, Yui-dong, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi 443-760, Korea
*Samsung Advanced Institute of Technology, San 14-1, Nongseo-dong Giheung-gu, Youngin-si, Gyeonggi 446-712, Korea
(Received 26 October 2010; accepted 15 November 2010)

요 약

섬유소계 바이오매스의 전처리를 위한 암모니아수에 의한 침지공정(SAA; Soaking in Aqueous Ammonia)은 낮은 온도와 낮은 압력의 조건에서 수행하는 전처리 공정으로 고온고압이 필요로 하는 다른 전처리방법에 비해 그에 대한 비용을 절감할 수 있다는 장점이 있다. 본 연구에서는 다양한 바이오매스를 SAA공정에 적용시켜 그 특성을 보고자 한다. 실험을 행한 전처리 공정의 온도, 반응시간 그리고 암모니아수의 농도는 각각 50 °C, 72시간 그리고 15 wt%이다. 전처리 공정에 의해 초본계열은 탈리그닌이 초기 성분 대비 60%로 되었고 전처리 전의 10~20%에 불과하던 당전환율이 전처리 후에 60~90%의 당전환율로 약 80%가 향상된 것으로 나타났지만 목본계열의 리그닌 성분은 10%정도만 제거되었고 당전환율은 전처리하지 않는 것과 별다른 차이를 보이지 않았다.

Abstract – Liberation of fermentable sugars from lignocellulosic biomass is one of the key challenges in production of cellulosic ethanol. Aqueous ammonia cleaves ether and ester bonds in lignin carbohydrate complexes. It is an effective swelling reagent for lignocellulosic biomass. The aqueous ammonia pretreatment selectively reduces the lignin content of biomass. However, at high temperatures, this process solubilizes more than 50% of the hemicellulose in the biomass. Here we conducted a SAA(Soaking in Aqueous Ammonia) process by moderate reaction temperatures at atmospheric pressure using various lignocellulosic biomass. The optimum condition of this process was 15 wt% of aqueous ammonia at 50 of reaction time during 72 hr. The delignification was up to 60% basis on initial biomass and the enzymatic digestibility was 60~90% for agricultural biomass, respectively.

Key words: Biomass Pretreatment, SAA, Enzymatic Hydrolysis, Bio Ethanol

1. 서 론

바이오 매스 에너지는 현재 연간 45 ± 10 EJ에 해당하는 세계 에너지 공급의 9~13%를 기여한다[1,2]. 바이오매스 에너지는 전통적인 사용(예를 들면, 요리와 난방을 위한 펄프)과 현대적인 사용(예를 들면, 전기와 증기 그리고 액체 바이오연료 생산) 둘 다 포함한다. 현대적인 방법에서의 바이오매스 에너지의 사용은 나머지가 전통적인 사용되는 동안에 년 7 EJ으로 추정된다. 바이오매스 에너지는 재생가능 자원에서 시작되며공급원료는 지속적으로 생산할 수 있다[2]. 지구상에서 가장 풍부한 재생 가능한 자원인 목질계 바이오매스

는 오랫동안 연료와 화학물질을 생산하고 있다. 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 제 2세대 바이오 매스는 각각 그들이 가지고 있는 문제점에 당면해 있다. 제 1세대 바이오매스는 식량 고갈문제로 인한 장기적인 관점에서의 원료수급의 불안정으로 인한 원료비 상승과 원료확보의 문제점이 나타났다. 그리고 궁극적으로 이들 바이오 매스로부터 생산되는 에탄올로 전 세계가 필요로 하는 에탄올 수요량을 충족시킬 수 없다는 것이다. 그리고 이러한 문제점의 대안인 제 2세대바이오 매스 중 목질계 바이오 매스의 문제점은 리그닌 제거 과정인 전처리 공정으로 인한 생산비용의 상승과 함께, 낮은 생산성의 문제로 이어져 제 1세대

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

바이오 매스와 비교하였을 때 경제성이 낮아 여러 가지로 개선해야 할 부분이 존재한다. 목질계 바이오매스는 자연적으로 효소당화에 적용하기 어려운 까닭에 전처리하는 효소당화를 하여 당을 얻기 위해서는 필수적인 과정이라고 할 수 있다[3-7]. 전처리는 목질계 기질의 생물학적 전환에 필수적인 요소이다. 암모니아는 전처리 시약으로 바람직한 특성을 가지고 있는데 그것은 목질계 재료에 대해 효과적인 팽윤 시약이며 탄수화물과 리그닌과의 반응에 높은 선택도를 가지고 있다. 또한 높은 휘발성으로 쉽게 회수하고 재사용할 수 있다. 목질계 바이오매스의 주요 성분인 리그닌과 그 부산물은 미생물에 독성물질로 작용하며 효소당화에 저해물질로 작용한다. 바이오 에탄올 생산을 위한 미생물 활동과 효소 당화효율을 향상시키기 위해서는 리그닌의 함유량을 낮춰야 한다[8]. 전처리 시약으로서 암모니아는 바이오매스의 팽윤에 뿐만 아니라 효과적인 탈리그닌에 대해 많은 장점을 가지고 있다. 암모니아수를 사용하는 전처리 방법은 에탄올 생산을 위해 연구되었다. 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실도 최소화할 수 있다[9-12].

이 연구는 에탄올 생산을 위한 바이오매스의 당화 효율을 높이는 전처리 방법 중에서 암모니아수에 의한 침지공정(SAA)을 이용하여 다양한 바이오매스의 전처리 효과를 알아보고자 하였다.

2. 실험방법

2-1. 재료

본 연구에 사용된 바이오매스는 벃짚(Rice straw), 억새(Miscanthus sinensis), 갈대(Phragmites communis), Empty fruit bunch(E.F.B.), 리기다 소나무(Pinus rigida) 그리고 낙엽송(Larix leptolepis)의 총 6가지를 사용하고 바이오매스의 비교군으로 filter paper(Whatman No.1)를 사용하였다.

각 바이오매스는 30~50 mesh의 균일한 크기의 기질을 사용하였고 분쇄 후에 45 °C의 오븐에서 건조하여 사용하였다. 바이오매스는 한국 에너지 기술연구소(KIER; Korea Institute of Energy Research)와 창해 에탄올 연구소로부터 공급받았다. 효소당화에 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.

2-2. 암모니아수에 의한 침지공정(SAA; Soaking in Aqueous Ammonia)

바이오매스는 암모니아수로 침지(soaking)하여 전처리를 하였다. 또한 몇 바이오매스는 비교를 위해 수산화나트륨수용액(NaOH_{aq}) 그리고 수산화칼륨수용액(KOH_{aq})으로 침지하여 전처리를 하였다. 각 용액의 농도는 15% 암모니아수, 1 M NaOH_{aq} 그리고 1 M KOH_{aq} 이다. 전처리는 기질과 용액을 1:10의 고-액비로 침지를 하고 60 °C에서 흔들면서 각각 6~72시간 동안 진행하였다. 이후 각각 침지된 바이오매스는 깨끗한 물로 행군 후에 45 °C의 오븐에서 건조하여 잔류 수분을 제거하였다[9,10,12].

2-3. 효소당화

효소당화는 삼각 플라스크에 각각 전처리된 바이오매스를

sodium citrate buffer solution(0.5 M, pH 4.8)에 기질농도 5%(w/v)로 혼합한 후에 온도 50 °C에서 72시간 동안 180 rpm의 진탕배양기에서 진행되었다. 효소는 Celluclast 1.5 L과 Novozyme-188을 3:1 비율로 혼합된 효소카테일을 사용하여 60 FPU/ml로 접종하였다. 일정시간 단위로 시료를 채취하여 HPLC(Waters, USA)로 분석하였다.

2-4. 분석방법

2-4-1. Carbohydrate and lignin content analysis

Carbohydrate 성분들은 미국 신재생 에너지 연구소(NREL)에서 제시한 NREL procedures LAP-002에 제시된 방법으로 성분을 분석 하였다. 샘플을 황산(72%)에 넣고 30 °C에서 2시간 동안 1차 가수분해를 시킨 뒤에 희석한 후 1시간동안 121 °C에서 2차 가수분해를 하였다. 가수분해된 액체를 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 각 성분에 대한 정량을 하였다. 리그닌 성분은 NREL procedures LAP-003에서의 방법으로 분석하였다. 샘플은 황산(72%)에 넣고 20 °C에서 2시간 동안 반응시킨 뒤에 황산(3%)에서 4시간 동안 끓였다. 그 이후에 용해되지 않은 잔여물을 측정하여 리그닌 성분을 계산하였다[13].

2-4-2. HPLC analysis

시료의 성분분석과 당화액의 분석은 HPLC(Waters, USA)를 사용하였다. 분석에 사용된 Column은 Biorad사의 Aminex HPX-87H column과 Aminex HPX-87P이고 Detector는 Waters 410 RI detector (Waters, USA)를 사용하였다. 이동상은 5 mM의 H_2SO_4 를 사용하였고 유속을 0.6 ml/min으로 운전하였다. 각 column과 detector의 온도는 HPX-87H는 60 °C, HPX-87P는 85 °C 그리고 RI detector는 50 °C이었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 암모니아 침지공정에 의한 바이오매스의 성분 변화

이 실험에 사용한 바이오매스는 벃짚(Rice straw), 억새(Miscanthus sinensis), 갈대(Phragmites communis), Empty fruit bunch(E.F.B.), 리기다 소나무(Pinus rigida) 그리고 낙엽송(Larix leptolepis)의 총 6가지를 사용하고 바이오매스의 비교군으로 filter paper(Whatman No.1)를 사용하였다. 전처리 전의 바이오매스는 미국 신재생 에너지 연구소(NREL)의 분석법에 의해 Table 1과 같이 분석하였다. 낙엽송과 같은 목본류 바이오매스는 벃짚과 같은 초본류 바이오매스에 비교하여 셀룰로오스의 성분은 약 10% 가량 높게 나타났다 반면에 효소당화에 저해성분으로 작용하는 리그닌 성분은 약 50% 이상 높은 것으로 나타났다.

바이오매스의 전처리는 침지(Soaking) 공정을 이용하여 전처리를

Table 1. Compositions of various untreated biomass

	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin	Others
Whatman No.1	99.50	0.5	-	-
Rice straw	39.88	23.77	12.97	23.38
Miscanthus S.	39.80	31.52	20.35	8.33
Phragmites C.	40.43	27.08	23.56	8.93
E.F.B.	20.84	21.96	34.21	22.99
Pinus rigida	43.50	24.99	28.66	2.85
Larix leptolepis	44.21	26.11	29.25	0.43

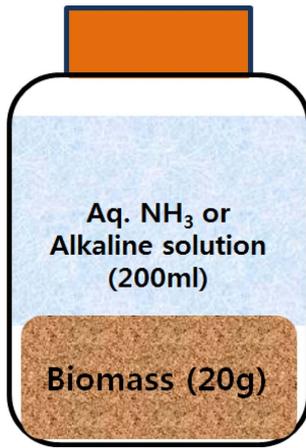


Fig. 1. Soaking in alkaline solution system.

하였다. 바이오매스와 알칼리용액을 1:10의 비율로 Fig. 1과 같이 바이알에 넣고 밀봉하여 60 °C에서 각각 72시간 동안 반응시켰다. 각각 전처리 후의 바이오매스들은 깨끗한 물로 수 차례 행군 후에 45 °C의 오븐에서 건조시켰다. 전처리된 바이오매스 역시 NREL 분석법으로 성분을 분석하여 Table 2와 같이 나타내었다. 목본류 바이오매스의 고형물 잔류량은 초본계 바이오매스에 비해 약 25% 가량 높게 나왔다. 그에 비해 리그닌 제거율은 초본계열이 약 60%인 반면에 목본계열은 훨씬 못미치는 약 10%로 낮게 나타났다. 이것은 효소당화에서도 영향이 있을 것으로 예상된다. 다만 에탄올로 전환이 가능한 셀룰로오스 성분은 거의 손실이 없이 보존되는 것으로 보이고 또한 헤미셀룰로오스 성분도 크게 손실되지 않아서 활용 가능성도 엿보인다.

Fig. 2와 3은 각각 전처리되지 않은 바이오매스와 암모니아수에 의한 침지 공정으로 전처리된 바이오매스의 효소당화 결과를 도시하였다. 효소당화가 72시간 진행된 후의 전처리하지 않은 바이오매스의 당전환율을 보면 벚짚을 제외한 5개의 바이오매스는 10% 안팎의 당전환율을 보이고 있다. 암모니아수로 의해 전처리된 바이오매스의 당전환율은 각 바이오매스마다 다양하게 나타났다. 벚짚의 경우에는 약 91%의 당전환율을 보이고 있다. 이것은 비교군으로 쓴 Whatman No.1(filter paper)의 약 94%의 당전환율과 비슷한 결과를 보이고 있다. 반면에 억새와 갈대는 약 61%를 보여주고 있고 그 외 목본계 바이오매스는 약 5~15%의 당전환율을 나타내고 있다. 초본계열은 약 60~90%의 당전환율을 보이는데 이는 전처리하지 않았을 때에 비해 대략 5배 이상의 효과를 보이는 것이다. 이것은 암모니아수에 의한 침지공정으로 충분한 전처리 효과를 보이고 있다고 볼 수 있다. 반면 목본계열 중 특히 낙엽송의 경우에는 전처리 전후의 바이오매스의 당전환율을 보면 암모니아수에 의한 침지공정이 전혀 효과가 없는 것으로 나타났다.

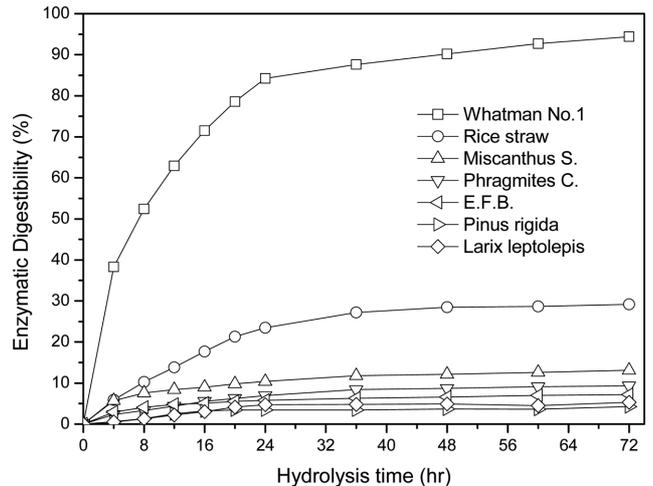


Fig. 2. Enzymatic hydrolysis of untreated biomass. Enzymatic hydrolysis conditions are 60 FPU/ml enzyme loading, pH4.8, 50 °C and 180 rpm.

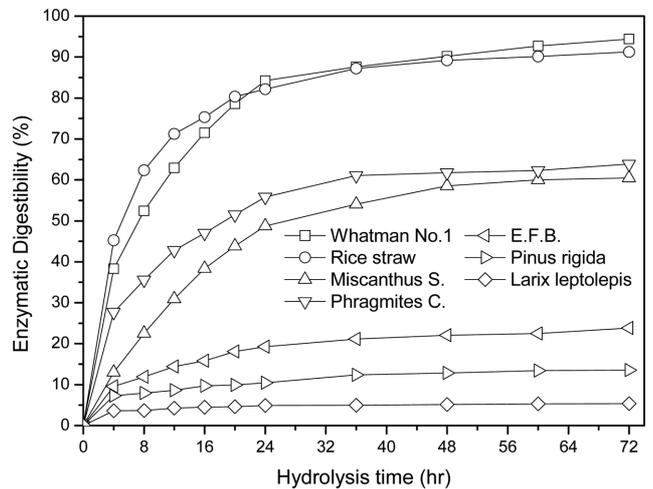


Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of Soaking pretreated biomass at 60 °C temperature for 72 hr with 15 wt% aqueous ammonia. Enzymatic hydrolysis conditions are 60 FPU/ml enzyme loading, pH4.8, 50 °C and 180 rpm.

3-2. 다양한 알칼리 용액을 이용한 침지공정에 의한 목본류 바이오매스 전처리

암모니아수에 의한 침지 효과가 거의 없던 목본계 바이오매스에 대하여 암모니아수 이외의 다른 알칼리용액을 사용하여 전처리 공정을 진행하였다. 앞서 암모니아수와 마찬가지로의 방법으로 암모니아수 대신에 1M의 NaOH 수용액과 1M의 KOH 수용액으로 Fig. 1의 방법으로 6시간과 24시간 동안 전처리를 하였다. 또한 15%의 암모니아수로도 같은 시간 동안 전처리를 하여 비교군으로 삼았다.

Table 2. Compositions of Soaking in aqueous ammonia treatment of various biomass (72hr)

	Solid remaining	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin	Others
Rice straw	65.45	39.56	9.53	5.42	10.94
Miscanthus S.	71.95	40.60	23.92	7.40	0.03
Phragmites C.	77.55	44.24	20.47	12.69	0.15
E.F.B.	58.75	17.96	16.47	16.01	8.31
Pinus rigida	84.10	39.23	18.54	23.4	2.93
Larix leptolepis	88.45	42.06	19.98	26.16	0.25

Table 3. Compositions of Soaking in alkaline solution treatment of woody biomass

		Solid remaining	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin	Others	
Larix leptolepis	Untreated	-	43.42	24.39	28.90	3.29	
	KOH	6 hr	91.60	42.46	19.40	26.01	3.73
		24 hr	90.92	43.22	19.69	26.00	2.01
	NaOH	6 hr	90.96	42.22	18.35	26.09	4.30
		24 hr	90.48	42.83	19.44	25.84	2.37
	Ammonia	6 hr	91.12	42.57	20.05	26.62	1.88
24 hr		89.05	42.43	20.79	25.71	0.12	
Pinus rigida	Untreated	-	43.50	24.99	28.66	2.85	
	KOH	6 hr	91.24	42.55	20.43	25.13	3.13
		24 hr	89.72	42.47	20.29	24.22	2.74
	NaOH	6 hr	90.88	42.83	20.60	24.40	3.05
		24 hr	89.12	41.79	21.14	24.72	1.47
	Ammonia	6 hr	92.68	43.09	20.79	25.16	3.64
24 hr		92.08	42.79	22.50	26.03	0.76	

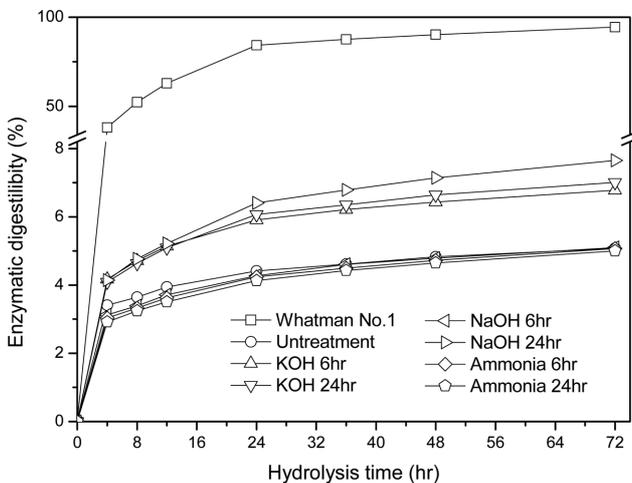


Fig. 4. Enzymatic hydrolysis of soaking pretreated Larix leptolepis at 60 °C temperature for 6~24 hr with 1 M NaOH, 1 M KOH and 15 wt% aqueous ammonia. Enzymatic hydrolysis conditions are 60 FPU/ml enzyme loading, pH4.8, 50 °C and 180rpm.

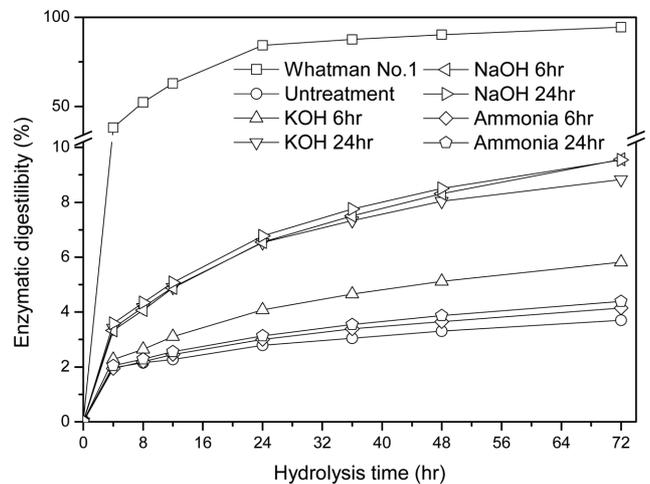


Fig. 5. Enzymatic hydrolysis of soaking pretreated Pinus rigida at 60 °C temperature for 6~24 hr with 1 M NaOH, 1 M KOH and 15 wt% aqueous ammonia. Enzymatic hydrolysis conditions are 60 FPU/ml enzyme loading, pH4.8, 50 °C and 180 rpm.

전처리 전후의 성분은 Table 3에서 확인할 수 있다. 전처리 전후의 특성을 살펴보면 고형물 잔류량이 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq}), 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq}) 그리고 암모니아수의 3가지 용액 모두 90% 전후로 크게 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 또한 셀룰로오스를 비롯한 3성분에 대한 변화의 차이도 크게 나지 않는다는 것을 볼 수 있다. 각 전처리된 바이오매스는 이전과 마찬가지로 방법으로 효소당화를 진행하였다. 효소당화의 결과는 Fig. 4와 5에서 확인할 수 있다. 효소당화의 결과를 보면 흥미로운 결과를 볼 수 있는데 3가지 알칼리 용액에 대하여 조금은 다른 결과를 나타내고 있다. 우선 암모니아수에 대해서는 낙엽송과 리기다 소나무 둘 다 효과가 없는 것을 다시 확인을 하였다. 전처리되지 않은 것과 비교하여 6시간과 24시간 암모니아 침지된 낙엽송과 리기다 소나무의 당전환율은 변화가 거의 없는 것을 볼 수 있었다. 그러나 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq})와 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq})의 경우에는 다른 결과를 보이는데 우선 전처리한 것이 전처리되지 않은 것에 비해 최대 1.5배의 당전환율을 확인하였다. 낙엽송의 경우 6시간 수산화나트륨

수용액(NaOH_{aq}) 처리한 것은 약 5%의 당전환율을 보여 전처리를 하지 않았을 때와 차이가 없어 전처리 효과가 없어 보이는 것에 반해 24시간 동안 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq})으로 전처리하였을 때 약 8%의 당전환율을 보였다. 또한 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq})의 경우 6시간 경과시 약 7% 가량의 당전환율을 보이고 24시간 경과시에는 6시간과 거의 유사한 당전환율을 보인다. 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq})의 기질과의 반응속도가 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq})의 경우보다 훨씬 빠르다는 것을 알 수 있었다. 리기다 소나무의 경우에는 역시 암모니아수에 대해서는 낙엽송과 비슷한 경향을 보였다. 그러나 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq})과 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq})의 경우에는 반대의 결과를 나타내었다. 리기다 소나무는 낙엽송과 달리 수산화칼륨 수용액(KOH_{aq})보다 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq})에 빠른 반응 속도를 보였다. 24시간 동안 수산화나트륨 수용액(NaOH_{aq}) 처리된 리기다 소나무는 당 전환율이 약 10%에 가까워 전처리되지 않은 것에 비해 약 2배 이상 향상된 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 바이오 에탄올 생산을 위한 섬유소계 바이오매스의 전처리에 암모니아수에 의한 침지공정(SAA, Soaking in Aqueous Ammonia)을 적용하였다.

초본계열과 목본계열의 경우 큰 차이가 있는데 초본계열은 종류에 따라 리그닌 성분이 60%가 제거되었고 전처리 전의 10~20%에 불과하던 당전환율이 전처리 후에 60~90%의 당전환율로 약 80%가 향상된 것으로 나타났다. 반면에 목본계열의 리그닌 성분은 10% 정도만 제거되었고 당전환율은 전처리하지 않는 것과 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한 암모니아수를 대신하여 다른 알칼리 용액으로 침지공정을 수행하였는데 이 경우에는 최대 10%의 당전환율을 보이긴 하였지만 전처리를 하지 않았을 때의 당전환율이 약 5%인 것을 고려하였을 때 2배의 향상을 보이긴 하지만 상대적으로 낮은 당전환율로 인해 큰 효과는 없다고 판단하였다.

암모니아수에 의한 침지공정은 목본계 바이오매스에 대해서는 그 효과를 기대할 수 없어 다른 전처리공정 개발의 필요성이 있다. 또한 초본계 바이오매스는 탈리그닌효과도 크고 높은 당전환율도 기대할 수 있기 때문에 암모니아수에 의한 침지공정(SAA, Soaking in Aqueous Ammonia)은 초본계 바이오매스에 적합한 전처리 공정이라 할 수 있을 것이다.

감 사

연구는 2009학년도 경기대학교 학술연구비(2009-027) 지원에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. United Nations Development Programme. World energyassessment. United Nations Development Programme. New York(2000).
2. Kim, S. D. and Dale, B. E., "Global Potential Bioethanol Pro-

duction from Wasted Crops and Crop Residues," *Biomass and Bioenergy*. **26**, 361-375(2004).

3. Kim, K. H., Tucker, M. and Nguyen, Q., "Conversion of Bark-rich Biomass Mixture into Fermentable Sugar by Two-stage Dilute Acid-catalyzed Hydrolysis," *Bioresource Technology*. **96**, 1249-1255(2005).
4. Sherrard, E. C. and Kressman, F. W., "Review of Processes in the United States Prior to World War II. Ind," *Eng. Chem.* **37**, 5-8(1945).
5. Lynd, L. R., Wyman, C. E. and Gerngross, T. U., "Biocommodityengineering," *Biotechnol. Prog.* **15**, 777-793(1999).
6. Sudha, K., Rani, M., Swamy, V. and Seenayya, G., "Production Ofethanol from Various Pure and Natural Cellulosic Biomass by Clostridium Thermocellum Strains SS21 and SS22," *Process Biochem.* **33**, 435-440(1998).
7. Bellamy, W. D., "Single Cell Protein from Cellulosic Wastes," *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 869-880(1974).
8. Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Aqueous Ammonia," *Bioresource Technology*. **90**, 39-47(2003).
9. Kim, T. H., Taylor, F. and Hicks, K. B., "Bioethanol Production from Barley Hull Using SAA(soaking in aqueous ammonia) Pretreatment," *Bioresource Technology*. **99**, 5694-5702(2008).
10. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover Bysoaking in Aqueous Ammonia," *Appl. Biochem. Biotechnol.* **121-124**, 1119-1132(2005b).
11. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Fractionation of Corn Stover by Hot-waterand Aqueous Ammonia Treatment," *Bioresource Technology*. **97**(2), 224-232(2006).
12. Kim, T. H. and Lee, Y. Y., "Pretreatment of Corn Stover by Soaking Inaqueous Ammonia at Moderate Temperature," *Appl. Biochem. Biotechnol.* **136-140**, 81-92(2007).
13. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures. http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html.