

전자선 조사와 4-메틸모포린-N-옥사이드 용액을 이용한 볏짚의 전처리 방법

이병민, 이진영, 강필현, 전준표*
한국원자력연구원 공업환경연구부

Received: July 15, 2014 / Revised: August 18, 2014 / Accepted: September 16, 2014

A Facile Pretreatment Method for Rice Straw using Electron Beam Irradiation and 4-methylmorpholine-N-oxide Solution

Byoung-Min Lee, Jin-Young Lee, Phil-Hyun Kang, and Joon-Pyo Jeun*

Research Division for Industry & Environment, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Republic of Korea

In this study, a facile two-step pretreatment method was investigated for producing fermentable sugars. Rice straw was pretreated using electron beam irradiation (EBI) and 4-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) prior to enzymatic hydrolysis. In the first stage, the EBI on the rice straw was carried out at various doses (100, 300, 500 kGy) and then, irradiated rice straw was stirred with NMMO solution at 120°C for 1 h for the second stage. The pretreated rice straw was hydrolyzed by cellulase 1.5 L (70 FPU/ml) and Novozyme-188 (40 CbU/ml) at 50°C for 24, 48, and 72 h. A sugar yield of 83.8% was obtained from the pretreated rice straw after 72 h of enzymatic hydrolysis. Also, FTIR and XRD results indicate that the pretreatment of the rice straw was effective due to the synergic effects of the two-step pretreatment. In conclusion, rice straw might be a potential substrate for bioethanol production by yeast fermentation.

Keywords: Biomass, pretreatment, lignocellulose, electron beam, rice straw

서론

세계적으로 화석연료의 사용은 지구온난화 문제 등의 환경문제를 초래함과 동시에 화석연료의 고갈로 인하여 지난 2005년부터 세계적으로 화석연료의 대체에너지 개발이 활발히 이루어져 왔으며 이 중 바이오연료(바이오디젤과 바이오에탄올)의 개발과 보급이 활발히 진행중이다[17]. 리그노셀룰로오스(lignocellulose)는 바이오연료의 생산을 위한 후보군으로서 양이 매우 풍부한 재생자원이다. 리그노셀룰로오스의 주성분은 셀룰로오스(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose), 리그닌(lignin)이며 이 세 가지 주성분 중 가장 많은 양을 차지하는 셀룰로오스는 글루코시드 결합(β -1,4-glucosidic bond)으로 연결된 글루코스(glucose)가 반복되어 이루어진 반결정성 고분자(semi-crystalline polymer)이다

[18]. 반면에, 헤미셀룰로오스는 펜토오스(pentose), 헥소오스(hexose), 아세틸화당(acetylated sugar)으로 이루어져 있는 무정형 고분자(amorphous polymer)이며 리그닌은 페닐프로펜들(phenyl propane units: *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohol)이 C-C, C-O-C 결합으로 이루어진 무정형 고분자이다[6, 10]. 이러한 세 가지 주성분으로 이루어진 리그노셀룰로오스의 구조는 글루코스(glucose), 자일로스(xylose) 등의 당으로 전환이 가능한 탄수화물 고분자(셀룰로오스와 헤미셀룰로오스)가 리그닌과의 물리적 결합에 의하여 둘러싸여 있으므로 가수분해 시 효소나 미생물의 접근성을 저해하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 탄수화물 고분자와 리그닌을 분리하기 위한 리그노셀룰로오스의 전처리는 필수적이다. 전처리의 주목적은 리그닌의 제거에 의한 탄수화물 고분자의 표면적 증대를 통한 효소나 미생물의 접근성 향상에 있다[13]. 대표적인 전처리 방법으로는 산이나 염기를 이용하는 화학적 전처리방법[19, 30], 증기폭쇄 전처리방법[9], 용매 전처리방법[28] 등이 있으며 이 단일공정들의 단점을 보완하기 위한 복합전처리방법[8, 14, 27]도 많이 연구

*Corresponding author

Tel: +82-62-570-3063, Fax: +82-62-570-3098

E-mail: jpjeun@kaeri.re.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

되고 있다.

4-methylmorpholine-*N*-oxide 용액(이하 NMMO)은 셀룰로오스의 용매로서 산업적으로 셀룰로오스 섬유 제조를 위한 소위 Lyocell process에서 사용되고 있다. Lyocell process는 NMMO의 구조 중에서 극성을 띠는 N-O 결합에 의하여 셀룰로오스의 수소결합이 해리되는 것을 이용하여 셀룰로오스를 용해하여 셀룰로오스 섬유를 제조하는 대표적인 공정이다[7]. 최근에 NMMO를 이용한 리그노셀룰로오스의 전처리법이 보고되고 있으며 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스에는 영향을 주지 않고 리그노셀룰로오스의 결정화도를 감소시키며 전처리 후 NMMO의 재활용률은 약 98%로 알려져 있다. NMMO 전처리는 셀룰로오스의 용해 후 비용매(non-solvent)에 의한 상전이(phase inversion)를 통하여 셀룰로오스를 획득하여 효소당화에 이용된다[11, 21, 25]. 그러나, NMMO를 이용하여 셀룰로오스의 용해 시 일반적으로 NMMO 용액 중 물이 17% 이하일 경우 즉 NMMO의 비율이 83% 이상에서 셀룰로오스가 용해되며 물이 17% 이상일 경우 낮은 용해도를 갖게 되고 주로 셀룰로오스가 팽윤되는 현상이 나타난다고 알려져 있다[5].

전자선 조사를 이용한 전처리는 물리적 방법이며 장점으로서는 (1) 리그노셀룰로오스의 기공크기와 표면적 증가, (2) 결정화도의 감소, (3) 전자선 조사량에 따라 전처리 조건의 조절 용이, (4) 짧은 전처리 시간, (5) 유해한 화학물질의 사용이 없으므로 친환경적이다[1]. 또한, 전처리 후 효소당화를 억제하는 중간반응생산물들의 생성도 거의 없다고 알려져 있다[15].

본 연구에서는 우리나라에서 양이 매우 풍부한 볏짚을 대상으로 볏짚의 전자선 조사 및 NMMO 처리, 두 단계로 전처리를 수행하였다. NMMO는 셀룰로오스의 용해가 목적이 아닌 볏짚의 팽윤제로 사용하여 전처리 시 볏짚의 화학적 결합력에 대한 영향을 목적으로 연구를 수행하였으며 볏짚의 전처리 전과 후를 비교대상으로 성분분석과 효소당화를 통하여 전처리의 효율을 알아보았고 이를 뒷받침하기 위하여 X-선 회절과 FT-IR 분석을 통하여 전처리 조건에 따른 볏짚의 물리화학적 변화를 분석하여 이를 바탕으로 새로운 전처리 방법으로서의 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 볏짚은 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 육종 시험농장에서 2013년에 재배한 것을 제공받아 실험용 고속분쇄기를 이용하여 분쇄한 후 체를 이용하여 500 μm 이하의 크기만 걸러내어 60°C의 진공건조오븐에서 12시간 건조하였다. NMMO(50% in water, 4.8 mol/l)는

TCI社에서 구입하여 사용하였고 효소당화에 사용된 효소는 Celluclast 1.5L (Cellulase 1.5L, Novo Co., Denmark)과 Novozyme-188 (β -glucosidase, Novo Co., Denmark)을 시그마알드리치(Sigma-Aldrich Co., USA)에서 구매하였으며 구연산나트륨(sodium citrate buffer, 0.1 M, pH 4.8)을 제조하여 완충용액으로 사용하였다.

전처리 방법

전자선 조사를 위하여 건조된 볏짚을 cell culture용도의 polystyrene bottle에 3 mm의 두께로 넣고 밀봉하였다. 전자선 조사는 2.5 MeV 선형 전자빔 가속기(ELV-8 type, EB Tech. Co., Korea)를 사용하여 25 mA의 전류세기, 25 kGy/scan의 조사강도, 카트속도 10 m/min의 조건으로 100, 300, 500 kGy의 흡수선량을 각각 조사하였다. 조사된 볏짚 15 g을 NMMO 용액 285 g에 첨가하여(볶짚농도: 5 wt%) 고온고압교반기에서 NMMO 용액이 끓지 않게 하기 위하여 10 bar의 압력 하에 120°C에서 1시간 동안 교반을 한 후 Whatman No.1 종이필터를 이용하여 증류수로 수 차례에 걸쳐 감압여과 및 세척한 후 잔류수분의 제거를 위하여 60°C의 건조오븐에서 12시간 건조하였다. 이하 전처리된 볏짚은 전자선 조사량에 따라서 E100N, E300N, E500N으로 명명하였고 볏짚의 전처리 실험과 분석은 각각 세 번씩 수행하여 결과의 평균값과 더불어 오차범위를 제시하였다.

효소 당화

전자선 조사 및 NMMO처리 공정을 거쳐 세척 및 건조된 볏짚은 미국 신재생에너지연구소(National Renewable Energy Laboratory, NREL)에서 발표한 리그노셀룰로오스의 최적 당화조건을 적용하여 효소당화 실험을 수행하였다[24]. 5% (w/v)의 볏짚을 구연산나트륨(0.1 M, pH 4.8) 완충용액과 혼합된 후 Celluclast 1.5L (70 FPU/ml)와 Novozyme-188 (40 CbU/ml)을 각각 첨가하고 진탕배양기(Jeio-Tech Co., Korea)에서 50°C의 온도에서 150 rpm의 속도로 교반하여 각각 24, 48, 72시간 동안 수행하였다.

당수율 분석

전처리의 효율을 판단할 수 있는 당수율 분석을 위하여 24, 48, 72시간 동안 효소당화된 효소당화액의 상층을 채취하여 0.2 μm 주사기 필터로 여과한 후 사용하였으며 high performance liquid chromatography (HPLC, Shimadzu Co., Japan)에서 수행하였다. HPLC 분석은 Aminex HPX-87P column(Bio-Rad, USA)으로 분리하고 RI detector (410 refractive index detector, Waters, USA)로 검출하는 절차로 진행하였다. HPLC 분석은 column과 detector 모두 65°C의 온도에서 column에 이동상(mobile phase)으로 초순

수 증류수(B&J HPLC certified solvent, SK chemical, Korea)를 0.6 ml/min의 유속으로 흘려주며 진행하였다. 본 연구에서 전처리 전후의 벚짚에 대한 당수율은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

$$\text{당수율(\%)} = \frac{\text{추출된 당의 양(g)}}{\text{효소당화 시 투입한 벚짚의 양(g)}} \times 100$$

성분 분석

전처리 조건에 따른 벚짚의 성분 변화와 당수율의 분석은 NREL의 표준 바이오매스 분석절차인 NREL Laboratory Analytical Procedures [22, 26]와 TAPPI 시험법(TAPPI standards and suggested methods) [29]에 따라 수행하였다.

ATR-FTIR

전처리 조건에 따른 벚짚의 화학구조의 변화를 분석하기 위하여 적외선 분광기의 전반사 측정법(ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spectrometer, Germany)으로 4 cm^{-1} 의 해상도로 64번 스캔하여 $4,000\text{-}500 \text{ cm}^{-1}$ 파장범위에 대한 흡광도를 측정하였다.

X-ray Diffraction

X-선 회절분석에서 얻을 수 있는 결정지수(crystallinity index, CrI)는 전처리의 목적인 리그노셀룰로오스의 무정형 부분이 얼마나 제거가 되었는지 판단할 수 있는 기준이라고 할 수 있다. 셀룰로오스는 반결정성 구조를 갖고 있고 리그닌과 헤미셀룰로오스는 무정형 구조를 갖고 있기 때문에 리그닌이나 헤미셀룰로오스가 제거됨으로 인하여 결정지수는 증가하게 되고 이는 곧 전처리 효율이 높아지게 되는 것과 관계가 있다. 전처리 조건에 따른 벚짚의 결정지수(CrI)를 측정하기 위하여 X-선 회절기(X'pert Powder, PANalytical, Netherlands)를 이용하여 40 kV, 30 mA, Cu K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), 주사속도 $1^\circ/\text{min}$, 0.03° 간격으로 2θ 의 $5\text{-}50^\circ$ 범위에서 측정하였다. 일반적으로 결정지수의 값은 Segal의 계산법[23]에 의하여 결정된다. I_{cry} 는 $2\theta = 22.4^\circ$ 일 때 결정형 영역의 피크 강도이고 I_{am} 는 $2\theta = 18.4^\circ$ 일 때 무정형 영역의 피크강도이다.

$$\text{Crystallinity Index (CrI, \%)} = \frac{I_{\text{cry}} - I_{\text{am}}}{I_{\text{cry}}} \times 100$$

결과 및 고찰

벚짚의 성분변화

벚짚의 구성성분과 전처리 조건에 따른 구성성분의 상대적인 함량변화를 Table 1에 나타내었다. 전처리 전 벚짚은 셀룰로오스 41.1%와 헤미셀룰로오스 25.3%를 포함하는

Table 1. The compositional changes of the rice straw using different pretreatment methods.

Samples	Holocellulose %	Lignin %	Ash %
Untreated	66.4 ± 0.2	19.8 ± 0.3	13.8 ± 0.5
E500	66.4 ± 0.3	19.8 ± 0.3	13.8 ± 0.6
NMMO	74.0 ± 0.3	18.1 ± 0.3	7.9 ± 0.4
E100N	79.8 ± 0.7	15.1 ± 0.4	5.1 ± 0.6
E300N	81.9 ± 0.6	13.2 ± 0.5	4.9 ± 0.5
E500N	84.2 ± 0.8	11.3 ± 0.7	4.5 ± 0.3

66.4%의 전섬유소(holocellulose), 리그닌 19.8%, 기타 이물질 13.8%로 이루어져 있었다. 전처리 조건에 따른 성분분석 결과 전자선 500 kGy 조사된 벚짚의 구성성분의 상대적인 함량변화는 미미하였으나 NMMO 단일처리된 벚짚의 경우 66.4%에서 74%로 약 7.6% 증가하였고 전자선 500 kGy 조사 후 NMMO 처리 과정을 통하여 전처리된 벚짚의 전섬유소의 상대적인 함량은 전처리 전의 66.4%에서 84.2%로 약 17.8% 증가하였다. 이는 두 단계의 전처리를 통하여 벚짚의 리그닌과 이물질이 제거됨으로 인하여 상대적인 함량이 증가한 것이다. 특히, 벚짚은 이물질의 함량이 다른 리그노셀룰로오스보다 높다고 알려져 있으며 이물질은 증기폭쇄법에서 효과적으로 제거되는 것으로 보고되었다[2, 3]. 이를 이용하여 전자선 조사된 벚짚을 증기폭쇄법과 유사하게 특정 압력 하에 고온에서 NMMO 처리하는 동안 이물질을 상당수 제거하였다. 또한, NMMO 단일처리와 비교하여 볼 때 서론에서 언급된 바와 같이 전자선 조사효과로 벚짚의 미세기공 크기가 증가함으로 NMMO의 침투가 용이하여 전자선 조사의 증가와 함께 리그닌과 이물질의 제거가 가속화된 것으로 판단된다[31]. 이를 바탕으로 전처리된 벚짚은 리그닌의 상대적인 함량 감소와 동시에 전섬유소의 상대적인 함량의 증가로 인하여 효소당화 시 효소접근성과 동시에 당수율을 높일 것으로 예상할 수 있다.

당수율 분석

기존의 연구결과들은 리그노셀룰로오스 별 이론적 당량(클루칸, 자일란 등) 대비 실제 당화된 양으로 계산한 것이 일반적이다. Table 2에서 알 수 있듯이 전처리를 하지 않은 벚짚은 72시간동안 효소당화를 거쳐 약 44.39%의 당수율을 보였으며 이때 글루코스는 약 32.57%이었다. 반면에, 전자선 단일 전처리 시 500 kGy 조사된 벚짚의 당수율은 약 58.6%, NMMO 단일처리 시 72%의 당수율을 획득하였다. 전처리전의 벚짚은 자일로스가 추출되지 않았고 전자선 조사와 NMMO 단일처리 시 글루코스는 각각 36.9%, 45.7% 그리고 자일로스는 각각 5.8%, 13.8%였다. 그러나 전자선 조사 후 NMMO 처리를 통하여 얻어진 벚짚의 당수율은 글루

Table 2. Sugar yields (%) of untreated and pretreated rice straw after 72 h of enzymatic hydrolysis.

Samples	Glucose	Xylose	Mannose	Galactose	Arabinose	Total
Untreated	32.57 ± 0.6	-	10.64 ± 0.3	0.35 ± 0.1	0.83 ± 0.1	44.39 ± 0.5
E500	36.94 ± 0.7	5.85 ± 0.7	12.93 ± 0.2	0.98 ± 0.1	1.91 ± 0.2	58.63 ± 0.6
NMMO	45.70 ± 0.5	13.89 ± 0.8	10.45 ± 0.3	0.25 ± 0.1	2.36 ± 0.2	72.65 ± 0.4
E100N	51.96 ± 0.6	11.89 ± 0.7	12.38 ± 0.3	0.25 ± 0.1	2.72 ± 0.2	79.20 ± 0.6
E300N	56.69 ± 0.8	11.10 ± 0.6	11.02 ± 0.2	0.28 ± 0.1	2.73 ± 0.1	81.82 ± 0.5
E500N	60.83 ± 0.7	9.74 ± 0.9	10.85 ± 0.4	0.28 ± 0.1	2.19 ± 0.2	83.89 ± 0.5

코스의 경우 전자선 조사량에 비례하여 증가하는 경향을 보였고 100, 300, 500 kGy에서 각각 51.9%, 56.6%, 60.8%의 당수율을 얻을 수 있었다. 반면에, 자일로스의 경우 NMMO 단일처리보다 전자선 조사 후 NMMO 처리 시 전자선 조사량의 증가에 따라 13.8%에서 11.8%, 11.1%, 9.7%로 점차 감소하는 경향을 보였다. 이는 앞서 Table 1에서 성분분석 결과 시 전자선 조사 효과로 인한 리그닌 제거의 가속화와 더불어 헤미셀룰로오스의 손실이 있는 것으로 판단할 수 있다. 그 밖에 마노스, 갈락토스, 아라비노스의 수율은 전처리 조건에 따라 오차범위 내에서 별 차이가 없었다. 서론에서 언급된 대표적인 전처리 공정인 산처리법은 약 70-80% 정도의 높은 당수율을 얻을 수 있는 장점이 있으나 전처리의 부가생성물인 푸르푸랄(furfural), 하이드록시메틸푸르푸랄(HMF) 등이 효소당화 억제제로 작용하여 바이오매스의 효소당화를 저해한다고 알려져 있다[12]. 그러나 본 연구의 공정에서는 전자선 조사와 친환경 용액을 사용함으로써 부가생성물이 발생하지 않으며 전처리에 사용된 NMMO의 회수율은 약 98%로 알려져 있으므로 재활용이 가능하여 경제적이며 전자선 조사 단일전처리와 NMMO 단일전처리 대비 각

각 43%, 15% 향상된 당수율을 얻을 수 있었다. Fig. 1에 전처리의 조건에 따른 효소당화 시간 별 당수율을 나타내었다. 전처리가 되지 않은 볏짚의 효소당화는 효소당화 시간의 증가와 관계없이 낮은 당수율(41.3-44.3%)을 보였으나 본 연구에서 수행한 두 단계 전처리법을 수행한 결과 24, 48, 72시간 효소당화 시 당수율은 각각 E100N (70.0%, 75.9%, 79.2%), E300N (72.1%, 77.9%, 81.8%), E500N (77.2%, 79.5%, 83.8%)으로 특히, 효소당화 24시간만에 각각 70%, 72.1%, 77.2%의 당수율을 획득하여 본 연구에서 수행한 전처리의 효율을 입증하였다.

적외선 분광 분석

적외선 분광 분석결과 주요 피크들은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 3,420 cm⁻¹, 2,919 cm⁻¹ 부근의 셀룰로오스 관련 피크들과 1,300-1,800 cm⁻¹ 파장범위에서의 리그닌과 헤미셀룰로오스 관련 피크들이다. 3,420 cm⁻¹ 부근의 피크는 셀룰로오스 내부의 수소결합에 의한 -OH 스트레칭으로 인하여 나타나며 이 피크강도의 증가는 전처리된 볏짚의 셀룰로오스 내부 수소결합이 약해진 것을 의미한다[20]. 2,919 cm⁻¹ 부근

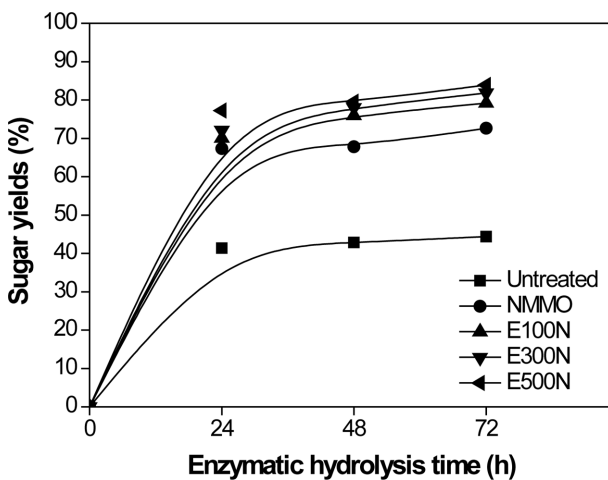


Fig. 1. Variations in the sugar yields based on the enzymatic hydrolysis time (24, 48, and 72 h) in untreated and pretreated samples.

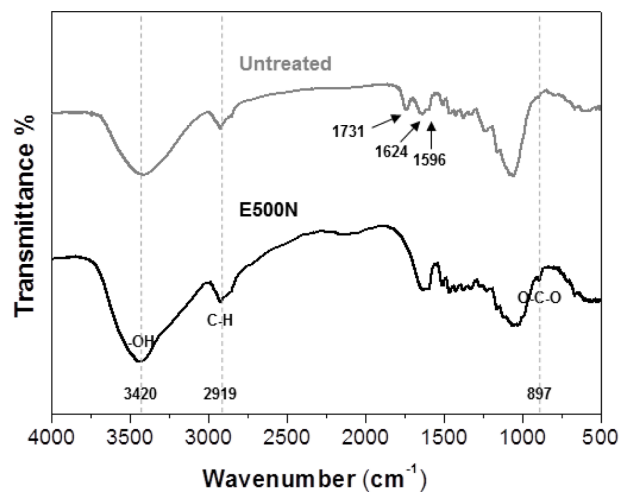


Fig. 2. FT-IR Spectra in the range of 4,000-500 cm⁻¹ indicating changes in the chemical structures of untreated and E500N sample.

Table 3. Crystallinity index measured by XRD for the different pretreatment conditions.

Samples	Crystallinity index (%)	Sugar yields (%)
Untreated	43.5 ± 0.2	44.39 ± 0.5
E500	44.1 ± 0.2	58.63 ± 0.6
NMMO	43.6 ± 0.2	72.65 ± 0.4
E100N	52.9 ± 0.2	79.20 ± 0.6
E300N	54.7 ± 0.2	81.82 ± 0.5
E500N	56.3 ± 0.2	83.89 ± 0.5

의 피크는 셀룰로오스의 메틸렌 구조 중 C-H 스트레칭으로 인하여 나타나며 전처리 후 피크의 강도가 약간 증가하는 것으로 알려져 있다[16]. 1,731 cm⁻¹ 부근의 피크는 리그닌과 헤미셀룰로오스의 에스터 결합(ester linkage) 관련 피크로 알려져 있고 이 피크강도의 감소는 전처리를 통하여 리그닌과 헤미셀룰로오스의 결합력이 감소되어 리그닌과 헤미셀룰로오스가 상당수 제거되었음을 의미한다. 그리고 1,596 cm⁻¹과 1,624 cm⁻¹ 피크강도의 감소 역시 전처리가 리그닌의 탄소-탄소 결합을 약화시켜 리그닌이 제거됨을 의미한다[4]. 897 cm⁻¹의 피크는 β-1,4-글루코시딕 결합(β-1,4-glucosidic bond)으로 나타나는데 전처리 후 피크강도가 증가하였으며 이는 셀룰로오스의 상대적 함량이 증가한 것을 의미한다.

X-선 회절 분석

Table 3에서 알 수 있듯이 결정지수가 증가할수록 전처리의 효율 또한 증가한다. 전처리 전의 벧짚의 결정지수는 약 43.5%에서 E500N 샘플의 경우 약 56.3%로 약 12.8% 증가하여 전자선 조사량에 따라 결정지수가 비례하여 증가함으로써 결과적으로 당수율에 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 셀룰로오스에 의한 벧짚의 결정성은 당수율에 큰 영향을 미치는 요인으로 벧짚의 결정지수 증가의 원인은 전처리 조건에 따라 벧짚의 무정형 영역인 리그닌이 상당수 제거됨으로 인한 셀룰로오스의 상대적 함량이 증가된 성분분석의 결과와 일치하게 해석할 수 있다.

요 약

2세대 바이오매스 벧짚을 이용하여 전자선 조사 후 NMMO 처리 공정을 수행하고 이를 분석하였다. 벧짚은 전자선 500 kGy 조사 후 NMMO 처리를 한 경우 72시간의 효소당화를 거쳐 글루코스 60.8%와 자일로스 9.7% 포함 약 83.8% 정도의 당수율을 보였다. 이 전처리 공정은 유해한 화학물질을 사용하지 않아서 친환경적이며 전자선 조사와 NMMO 처리의 시너지 효과가 있음을 알 수 있었다. 그러나 전자선 조

사량이 너무 높다는 단점이 있으며 추후에는 낮은 전자선 조사량과 여러 가지 단일공정을 통합한 새로운 복합전처리 방법 연구의 필요성이 있다. 따라서 이 단점을 보완한다면 전자선 조사는 친환경적 방법과 더불어 NMMO 용액의 재활용성을 이유로 바이오에탄올 생산 등의 산업현장에서의 적용 가능성이 높다는 것을 알 수 있었다.

Acknowledgments

This study was supported by the Nuclear R&D program of the Korea Science and Engineering Foundation, which is funded by the Ministry of Science, ICT and Future Planning of the Republic of Korea.

References

- Bak JS, Ko JK, Han YH, Lee BC, Choi IG, Kim KH. 2009. Improved enzymatic hydrolysis yield of rice straw using electron beam irradiation pretreatment. *Bioresource Technol.* **100**: 1285-1290.
- Bin Y, Hongzhang C. 2010. Effect of the ash on enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice straw. *Bioresource Technol.* **101**: 9114-9119.
- Binod P, Sindhu R, Singhanian RR, Vikram S, Devi L, Nagalakshmi S, et al. 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technol.* **101**: 4767-4774.
- Chundawat PSS, Venkatesh B, Dale BE. 2006. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **96**: 219-231.
- Cuissinat C, Navard P. 2006. Swelling and dissolution of cellulose Part 1: Free floating cotton and wood fibres in N-methylmorpholine-N-oxide-water mixtures. *Macromol. Symp.* **244**: 1-18.
- Demirbas A. 2008. Heavy metal adsorption onto agro-based waste materials: a review. *J. Hazard. Mater.* **157**: 220-229.
- Fink HP, Weigel P, Purz HJ, Ganster J. 2001. Structure formation of regenerated cellulose materials from NMMO-solution. *Prog. Polym. Sci.* **26**: 1473-1524.
- Gabhane J, William SPMP, Vaidya AN, Mahapatra K, Chakrabarti T. 2011. Influence of heating source on the efficacy of lignocellulosic pretreatment- a cellulosic ethanol perspective. *Biomass Bioenerg.* **35**: 96-102.
- Garcia-Aparicio MP, Ballesteros I, Gonzalez A. 2006. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biot.* **129**: 278-288.
- Girio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Lukasik R. 2010. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technol.* **101**: 4775-4800.
- Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2013. Ethanol and

- biogas production from birch by NMMO pretreatment. *Biomass Bioenerg.* **49**: 95-101.
12. Gumuskaya E, Usta M, Krici H. 2003. The effects of various pulping conditions on crystalline structure of cellulose in cotton linters. *Polym. Degrad. Stabil.* **81**: 559-564.
 13. Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, *et al.* 2007. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* **315**: 804-807.
 14. Jin S, Chen H. 2006. Superfine grinding of steam-exploded rice straw and its enzymatic hydrolysis. *Biochem. Eng. J.* **30**: 225-230.
 15. Khan AW. 1986. Effects of electron-beam irradiation pretreatment on the enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 1449-1453.
 16. Kumar R, Mago G, Balan V, Wyman CE. 2009. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Biosour. Bioeng.* **100**: 3948-3962.
 17. Lee JS, Park EH, Kwun SY, Yeo SH, Kim MD. 2014. Optimization of pretreatment of persimmon peel for ethanol production by Yeast fermentation. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 202-206.
 18. Li MF, Fan YM, Xu F, Sun RC, Zhang XL. 2010. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: characterization of the cellulose rich fraction. *Ind. Crop. Prod.* **32**: 551-559.
 19. Lu X, Zhang Y, Angelidaki I. 2009. Optimization of H₂SO₄ catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technol.* **100**: 3048-3053.
 20. Oh SY, Yoo DI, Shin Y, Kim HC, Kim HY, Chung YS, *et al.* 2005. Crystalline structure analysis of cellulose treated with sodium hydroxide and carbon dioxide by means of X-ray diffraction and FTIR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **340**: 2376-2391.
 21. Poomejad N, Karimi K, Behzad T. 2013. Improvement of saccharification and ethanol production from rice straw by NMMO and [BMIM][OAc] pretreatments. *Ind. Crop. Prod.* **41**: 408-413.
 22. Ruiz R, Ehrman T. 1996. Determining of carbohydrates in biomass by high performance liquid chromatography. Chemical Analysis and Testing Task Laboratory Analytical Procedure #002, NREL, Colorado, USA.
 23. Segal L, Creely JJ, Martin AE, Conrad CM. 1959. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer. *Text. Res. J.* **29**: 786-794.
 24. Selig M, Weiss N, Ji Y. 2008. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Technical Report NREL/TP-510-42629, NREL, Colorado, USA.
 25. Shafiei M, Karimi K, Taherzadeh MJ. 2011. Techno-economical study of ethanol and biogas from spruce wood by NMMO-pretreatment and rapid fermentation and digestion. *Bioresource Technol.* **102**: 7879-7886.
 26. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlate C, Sluiter J, Templeton D, *et al.* 2012. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618, NREL, Colorado, USA.
 27. Sun RC, Tomkinson J, Ma PL, Liang SF. 2000. Comparative study of hemicelluloses from rice straw by alkali and hydrogen peroxide treatments. *Carbohydr. Polym.* **42**: 111-122.
 28. Tan HT, Lee KT, Mohamed AR. 2010. Pretreatment of lignocellulosic palm biomass using a solvent-ionic liquid [BMIM]Cl for glucose recovery: An optimization study using response surface methodology. *Carbohydr. Polym.* **83**: 1862-1868.
 29. TAPPI T 222 om-02 2002. Acid-insoluble lignin in wood and pulp. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
 30. Wang Z, Keshwani DR, Redding AP, Cheng JJ, Cheng Jay J. 2010. Sodium hydroxide pretreatment and enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technol.* **101**: 3583-3585.
 31. Xin LZ, Kumakura M. 1993. Effect of radiation pretreatment on enzymatic hydrolysis of rice straw with low concentrations of alkali solution, *Bioresource Technol.* **43**: 13-17.