

발간등록번호

11-1543000-000481-01

바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발
(Development of pretreatment and saccharification processes for
application of biomass)

고려대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2014 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 김 승 옥

세부연구책임자 : 김 재 진

세부연구책임자 : 한 성 옥

협동연구기관명 : 수원대학교

협동연구책임자 : 김 근

협동연구기관명 : 경기대학교

협동연구책임자 : 김 준 석

협동연구기관명 : 단국대학교

협동연구책임자 : 오 경 근

협동연구기관명 : 전북대학교

협동연구책임자 : 박 승 문

협동연구기관명 : (주)창해에탄올

협동연구책임자 : 최 기 옥

요 약 문

I. 제 목

바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

전 세계적으로 석유자원 고갈과 환경문제에 대한 관심이 증가하고 있어 정부 차원에서 안정적이고 환경 친화적인 에너지 공급을 위해 새로운 에너지원의 발굴 및 공급을 준비하고 있음. 현재 수송용 연료 중 대표적인 휘발유를 대체 할 수 있는 바이오에탄올은 구축된 인프라와 기존 차량의 기관에 바로 적용할 수 있어 가장 궁극적인 수송용 대체 에너지로 평가 받고 있음. 또한 바이오에너지 생산 기술 개발은 바이오매스의 재사용을 통해 환경보전과 이산화탄소 저감 효과로 주목받고 있으며 특히, 탄소 배출권 제도를 살펴보면 바이오연료 사용에 의해 발생한 이산화탄소는 국가별 이산화탄소 배출량 통계에 포함시키지 않도록 협정되어 있어 전 세계적으로 바이오에너지 생산 상용화를 목표로 연구를 추진 중임.

본 연구개발의 목적은 비식량자원으로서 국내 농가에서 발생하는 벃짚, 보리짚, 감자줄기 등 농작 폐기물이 포함된 2세대 바이오매스로부터 수송용 바이오에탄올을 생산하는 통합 공정 시스템 구축이며, 이를 달성하기 위해 연구 목표를 전처리 기술 개발, 당화 기술 개발 그리고 통합공정 시스템 구축으로 크게 구분하고 각 세부 연구목표를 바탕으로 지난 5년간 기초연구부터 시작품제작까지 연구를 진행하였음.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 바이오매스의 전처리 기술 개발

- (1) 국내 바이오매스의 종류별 특성 분석 및 선정
- (2) 바이오매스의 화학적 전처리 기술 개발 및 공정 최적화
- (3) CTSR (Continuous Twin Screw-driven Reactor)를 이용한 연속 바이오매스 전처리
- (4) 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해용 효소의 cloning, 발현 및 분리정제, 특성 확인
- (5) 생물학적 전처리 및 Bioimaging 기술을 활용한 전처리과정의 특성 확인

2. 바이오매스의 당화 기술 개발

- (1) 고효성 섬유소분해효소 생산 균주 발굴 및 선별
- (2) 섬유소분해효소 생산 균주의 새로운 탐색기법 개발
- (3) 선발된 균주의 배양조건 탐색 및 최적화
- (4) 고효성 신규 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제 복합체 개발
- (5) 유전자조작에 의한 섬유소분해효소 생산 증진 기술 개발
- (6) 생산된 효소를 바이오매스 당화에 실제 적용하여 산업효소와 비교 평가

3. 바이오매스의 종류와 특성에 따른 복합처리 공정 개발
 - (1) 저해인자 제거를 위한 공정 최적화
 - (2) 고효율 저비용 당화공정 확립
 - (3) 바이오매스의 전처리된 효율을 분석하는 새로운 방법의 개발

4. 바이오에탄올 연속 생산을 위한 통합공정 구축
 - (1) 선행기술 조사 분석
 - (2) Lab-scale 전처리조건 설정 연구
 - (3) Bench-scale 전처리/당화 모듈 설계 및 제작
 - (4) 연속식 전처리/당화/용매회수 모듈 설계 및 제작
 - (5) 동시 당화발효 모듈 도입 및 통합공정 설비 시운전을 통한 개선
 - (6) 통합공정 가동 및 바이오에탄올 생산

5. 컴퓨터 소프트웨어를 활용한 공정모사 및 경제성 평가
 - (1) 다양한 화학용매 적용을 통한 전처리 공정
 - (2) NaOH 재순환 연속 전처리 (twin extrusion)공정

IV. 연구개발결과

1. 국내외 다양한 바이오매스들의 성분조성 분석을 통하여 활용 가능성이 높은 자원들을 선정하였음. 산과 알칼리 용매를 사용하여 다양한 화학적 전처리를 수행하였고, 처리하는 바이오매스에 적합한 방법과 조건들을 최적화 시켰음. 그동안 축적된 노하우들은 2단 복합 전처리 공정과 CTSR 연속전처리 공정과 같이 더욱 복잡하고 발전된 공정을 도출하는 기틀이 되었음. 통계 분석 방법을 도입하여 변수들의 영향 인자를 파악 하였고, 전 범위 공정에서 mass balance를 계산하여 경제성 평가의 초석을 마련함. 생물학적 전처리를 위하여 리그닌과 헤미셀룰로오스를 분해하는 효소들을 탐색하였으며, 형질전환체에 특정 효소 분비를 유도하여 대량 생산 가능성을 마련함. 아직은 연구단계에 머물고 있지만 화학 전처리와 비슷한 리그닌 제거율 보이는 등 앞으로의 가능성은 충분함.

2. 고효성 당화균주를 확보하기 위해 지난 5년간 수백 점의 균주를 분리하였고, 수천 점의 효소 활성을 평가하였음. 이 과정에서 여러 점의 신규 미생물 자원을 발굴하였고, 핵심 유전자 75점을 Genebank에 등록하였음. 본 과제의 핵심 목표 중 하나는 산업 효소와 비슷한 활성을 나타내는 고효성 균주 발굴인데, 최종 선별하고 개량한 균주인 *P. oxalicum* KL1-24에서 생산된 섬유소분해효소를 시판중인 산업효소들과 비교 평가한 결과 가장 널리 사용되는 Celluclast 1.5L보다 우수한 당화율을 보였음.

3. 전처리 후 발생하는 저해인자를 손쉽게 제거하는 방법으로 용매의 분배계수를 활용하는 방법을 고안하였음. 특히 furfural은 더 수월하게 ethyl acetate에 회수되며, 분리된 furfural은 building block으로서 활용이 가능함. 바이오매스의 광 발광 분석 방법은 간편하고 신속하게 바이오매스 내 xylan 함량과 전처리의 효과를 직접적으로 확인할 수 있어 앞으로의 활용이 기대됨.

4. (주) 창해에탄올 연구소는 2세대 바이오매스로부터 바이오에탄올을 연속적으로 생산하는 통합공정 구축을 목표로 하여 이를 전략적으로 달성하기 위해 많은 문헌조사와 현장 답사를 하였으며, 지난 5년 동안 공정 모듈별로 각 장치를 설계 및 제작하여 시운전 등 통합공정을 완성하였음. 시운전을 통해 아직 미흡한 부분을 지속적으로 개선하였으며, 현재 규모에서 하루에 24 kg의 바이오매스를 전처리하여 3.98 kg의 바이오에탄올을 생산이 가능함. 고가의 효소 가격, 바이오매스 원료 생산 및 운반, 상용화급 공정 Test 등 아직 해결해야할 과제들이 남아 있지만, 2세대 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산 상업화에 한걸음 더 다가간 것으로 판단됨.

5. 지금까지 축적된 자료들을 총망라하여 SuperPro Designer로부터 50 M gal. 급 상용화 규모 에탄올 생산 공정의 생산 비용을 모사함. 창해 Extrusion 반응을 통한 전처리 공정을 기준으로 전 공정을 평가하였으며, 최종 에탄올 생산 가능 가격은 \$ 2.67/gal 으로 평가되었음. 이러한 예측은 2011년 NREL의 약산공정을 기준으로 평가된 \$ 2.36/gal 보다는 낮은 수준으로 확인되나 평가 과정에서 예측되는 요소인자를 고려할 경우, 실질적으로 scale-up할 때 필요한 고려 사항을 효과적으로 구축할 수 있음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구 과제로부터 도출된 성과는 SCI급 게재 논문 47편, 비SCI급 게재 논문 3편, 특허출원 21건, 특허등록 12건, 유전자원 등록 82건 외 125건 이상의 국내외 학술발표 성과가 있으며, 기술실시 성과 2건(물질이전) 이 있음. 또한 본 연구과제는 미래창조과학부 2012년도 국가연구개발 우수성과 100선에 당선되어 2013년 8월 28일 수상 및 에너지 환경 분야 사례집 116p에 게재되었으며, 참여기업 (주)창해에탄올 연구소 김윤 팀장은 한국공학한림원에서 수여하는 2020년 미래 100대 기술과 주역으로 당선되어 2013년 12월 수상하였음.

지난 5년간 연구로부터 다수의 지적재산권을 확보해 왔으며, 아직 투고되어 심사 중인 논문이 6편 있음. 앞으로 출원 및 준비 중인 특허를 국제 출원할 계획이며, 지속적인 지적재산권 확보와 국제적인 학술교류를 통해 관련 기술을 꾸준히 확보할 예정임.

P. oxalicum KL1 (특허등록완료) 균주로부터 당화효소 시제품을 제작하여 여러 상용플랜트 설비에서 당화 실험을 진행할 예정임. 이를 통하여 산업효소를 생산한다면, 바이오에너지 산업의 한 부분인 효소 생산 분야에서 높은 비용을 차지하던 외국 균주의 수입에 대한 부담을 덜어 국내 산업의 경쟁력을 확보할 수 있음.

본 과제에서 도출된 통합공정 관련 특허는 공정 운전 조건 및 설비 형태가 해외 기술과 다른 독자적인 기술 확보로 해외기술의존도 및 수입 대체효과와 원천기술 및 설비 수출에 의한 해외시장 진출이 가능함.

본 과제로부터 도출된 고효율 고효율 당화균주 개발 핵심기술과 연속 전처리 당화 발효 통합공정을 바탕으로 수출 시장을 모색할 수 있고, 해외 공장 설립 및 현지 생산전략화는 국내 원료 및 자원 부족의 불리한 조건을 극복할 수 있음. 값싼 리그노셀룰로오스계 바이오매스 원료로부터 저비용의 발효성 당을 생산하여 국내 발효공업 및 화학소재 산업의 경쟁력을 증대하는데 기여할 것으로 기대함.

SUMMARY

(영문 요약문)

The production of cellulosic ethanol consists of unit processes: (1) pretreatment involving the removal of lignin and disruption of the crystalline structures of cellulose, (2) saccharification for the conversion of cellulose and xylose into fermentable sugars, (3) fermentation for combining fermentable sugars into ethanol. Of the three unit processes, pretreatment is the most costly step in terms of both the capital and operating costs and thus would have the greatest influence on the selling price of ethanol. Therefore, We have to evaluate the efficient pretreatment process for overall bio-ethanol production. Liberation of fermentable sugars from biomass is among the greatest technical and economical obstacles for cellulosic ethanol production. Here we conduct to develop a pretreatment process using aqueous ammonia and dilute sulfuric acid in the percolation mode to improve production of fermentable sugars from cellulosic biomass. Aqueous ammonia is used to remove lignin selectively, and dilute acid is used to remove most of hemicellulose, partially disrupts the crystalline structure of cellulose, and thus, enhances digestibility of cellulose in the remaining solids. Under the optimal pretreatment conditions, the overall sugar conversions of into glucose and xylose reached high values with low generation of byproducts. The process developed by this project, could be introduce the characteristics for cellulosic biomass to bio-ethanol production. Pretreatment process could be not only set the sugar platform up, but open the biorefinery industry successively.

CONTENTS

Chapter 1. Over view of research and development of project

Chapter 2. Review of previous study in Korea and Abroad

Chapter 3. Research contents and results

Chapter 4. Achievements and contributions

Chapter 5. Application of results

Chapter 6. International trend scientific information

Chapter 7. The present state of registered of equipments

Chapter 8. References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- 1절 연구 개발의 목적과 필요성
- 2절 연구 개발의 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1절 기술개발 및 특허 동향
- 2절 국외 기술개발 동향
- 3절 국내 기술개발 동향

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

- 1절 연구의 추진체계 및 세부과제별 목표
- 2절 바이오매스의 전처리 기술 개발
- 3절 바이오매스의 당화 기술 개발
- 4절 바이오매스의 종류와 특성에 따른 복합처리 공정 개발
- 5절 바이오에탄올 대량 생산을 위한 통합공정 구축
- 6절 컴퓨터 소프트웨어를 활용한 공정모사와 경제성 평가

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1절 연차별 연구개발목표의 달성도
- 2절 관련분야의 기술발전 기여도

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 1절 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적
- 2절 연구개발 성과 현황
- 3절 연구개발 성과활용 계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 1절 국제 동향
- 2절 바이오에탄올 생산 기술 및 plant 보유 회사

제 7 장 연구시설·장비 현황

제 8 장 참고문헌

제 1장 연구개발과제의 개요

1절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 개요

- 최근 몇 년간 불안정한 유가 급등락에 의한 지속적이고 안정적인 에너지 공급에 국가적인 차질과 석유자원 고갈에 대한 준비로 새로운 에너지원의 필요성이 대두되고 있으며 수송용 연료 중 대표적인 휘발유를 대체 할 수 있는 바이오 에탄올은 구축된 인프라와 기존 차량의 기관에 바로 적용할 수 있어 가장 궁극적인 수송용 에너지로 평가 받고 있음 (그림 1-1).
- 또한 바이오에너지 생산 기술 개발은 바이오매스의 재사용을 통해 환경보전과 이산화탄소 저감 효과로 주목받고 있으며 특히, 탄소 배출권 제도를 살펴보면 바이오연료 사용에 의해 발생한 이산화탄소는 국가별 이산화탄소 배출량 통계에 포함시키지 않도록 협정되어 있어 전 세계적으로 바이오에너지 생산 상용화를 목표로 연구를 추진 중임.

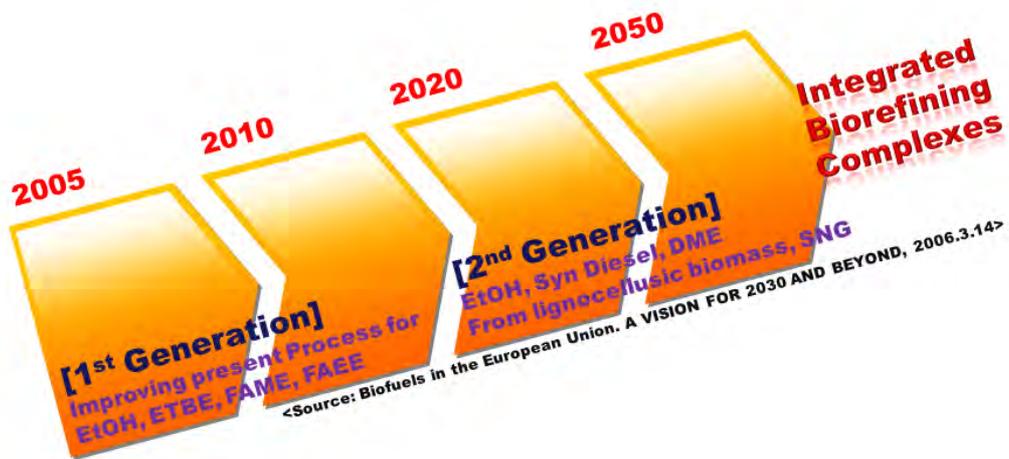
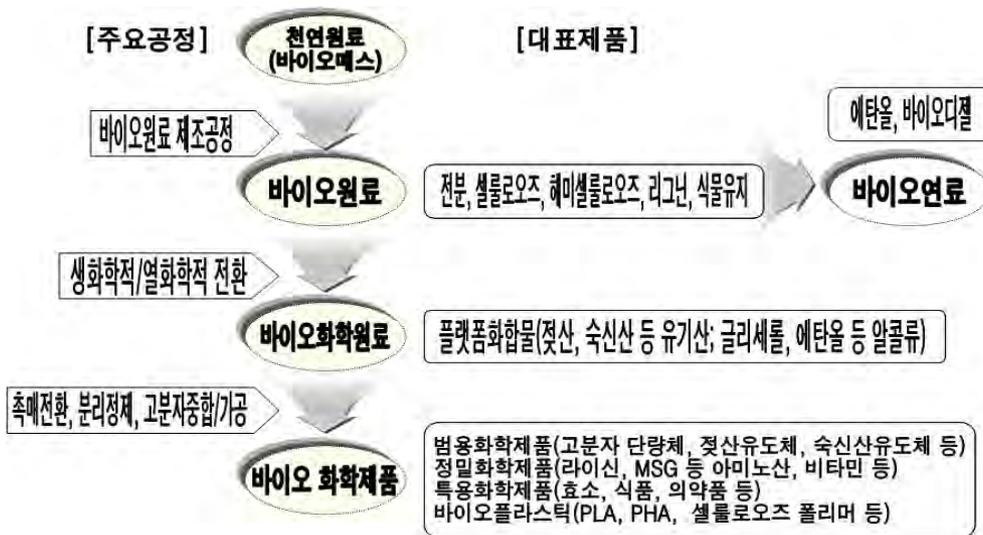


그림 1-1. EU의 바이오연료 기술개발 로드맵



그림 1-2. 바이오에너지 개발을 위한 국내 중장기 추진전략 로드맵

- 국내에서는 해외기술 개발 로드맵을 고려하여 수송 바이오연료 분야 기술개발 추진 전략을 마련하였음 (그림 1-2).
- 단기적으로는 이미 보급중이거나 보급 예정인 1세대 바이오연료의 보급 활성화에 필요한 애로 기술 개발 및 2세대 바이오연료 상용화를 위한 기반 기술 연구를 추진 중에 있음.
- 중기적으로는 2세대 바이오연료생산 기술 개발 및 3세대 바이오연료 생산관련 기반 기술 확보를 목표로 연구를 추진 중임.



- 바이오 원료 : 전분, 식물유지 외에 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등
- 바이오화학원료 : 바이오화학제품 제조에 광범위하게 사용되는 기본화합물 (플랫폼화합물로서 에탄올, 젖산, 숙신산, 글리세롤 등)
- 바이오화학제품 : 바이오플라스틱, 범용화학제품, 정밀화학제품, 특용화학제품 등
- 바이오 연료 : 바이오에탄올, 바이오디젤, 바이오부탄올, BTL-디젤 등

그림 1-3. 바이오리파이너리 4대 핵심공정의 가치사슬 체계도

- 장기적으로는 3세대 바이오연료의 상용화를 목표로 실증 연구를 추진하려는 로드맵을 마련하였음.
- 가치사슬 체계를 유지해 주는 바이오피파이너리의 4대 핵심공정은 바이오매스를 화학제품화하기에 용이한 형태로 전환해 주는 “바이오원료 전처리 공정”, 바이오매스 당화/발효에 의해 핵심 바이오 화학원료 플랫폼 화합물을 제조하는 “바이오화학원료 제조공정”, 플랫폼 화합물의 전환에 의해 바이오플라스틱 및 다양한 화학제품을 생산하는 “바이오화학제품 제조공정”, 바이오매스로부터 에탄올·부탄올·디젤 등 바이오연료를 생산하는 “바이오연료 제조공정“을 포함함 (그림 1-3).
- 바이오에너지는 바이오매스를 연료로 하여 얻어지는 에너지로 일반적으로 바이오매스라 하면 식물이나 미생물 등을 에너지원으로 이용하는 생물체로서 태양에너지를 이용한 광합성 과정을 통하여 모든 식물과 미생물이 생성되며 이를 먹고 동물체가 만들어지며 이와 같은 자연계 순환의 전 과정에서 생성된 유기성 생물체를 통틀어 바이오매스라고 정의함.
- 바이오매스는 사람이 식량으로 사용할 수 있는 당질계, 전분질(녹말)계 바이오매스(예: 사탕수수, 고구마, 옥수수, 콩 등)와 식량으로 사용할 수 없는 섬유소계 바이오매스(나무, 볏짚, 기타 농·임산 폐기물 등)로 대별됨.
- 섬유소계 바이오매스는 지구상에서 가장 많이 생산되고 순환이 가능한 신재생자원으로서 아직까지 그 활용도가 땀감, 목재, 건축재, 종이, 펄프 등으로 국한되어 있어 극히 낮은 상태임.
- 섬유소계 바이오매스는 리그닌 15-25%, 셀룰로오스 38-50%, 헤미셀룰로오스 23-32% 등으로 이루어진 리그닌 및 탄수화물 복합체임.
- 이러한 섬유소계 바이오매스는 임목, 각종 농산물의 부산물 및 폐기물이 포함되며 국내에서도 농·임산업 폐기물 발생량이 증가하고 있어 이에 대한 처리 및 활용문제가 대두되고 있음.
- 섬유소계 바이오매스로부터 바이오 알코올의 생산을 위한 공정은 1. 당화 저해 물질을 제거하고 셀룰로오스의 접근 가능성을 증가시키기 위한 전처리 공정 (Pretreatment), 2. 셀룰로오스의 가수분해를 통해 발효 가능한 당류로 변환하는 당화 공정 (Saccharification), 3. 생성된 당을 효모 및 박테리아를 이용하여 알코올로 전환 시키는 발효 공정 (Fermentation)으로 구성됨.
- 또한 이러한 바이오알코올의 성공적인 생산과 섬유소계 바이오매스의 효과적인 활용을 위해서는 전처리 공정을 통한 바이오매스의 분별 및 당화공정과 효소 당화공정을 거쳐 발효성 당(Fermentable sugar)으로 전환하여야 하며 후속 생물전환공정에서 최종제품을 얻는 과정까지 연계되면 이러한 발효성 당을 얻는 공정 중 원료작물과 섬유소 분해효소의 생산이 가장 고비용이 됨 (그림 1-4. 참조).

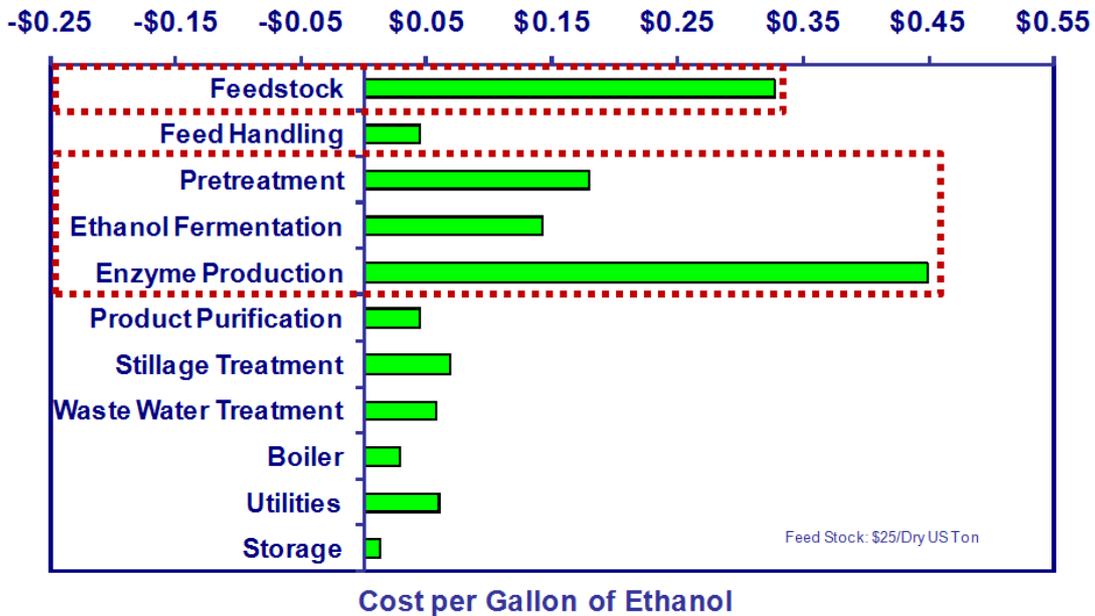


그림 1-4. 섬유소계 바이오알코올의 생산비용
출처: National Renewable Energy Laboratory, USA, 2000

- 특히 high volume, low cost의 수송용 에탄올 생산을 위해서는 이러한 고비용의 발효성당을 얻는 공정이 획기적으로 개선되어야 바이오연료의 실용화가 가능할 것이므로 생물공학기술을 이용한 신기술 개발이 필요한 시급한 상황임.
- 바이오연료 분야의 R&D를 선도하고 미국 에너지부에서도 이러한 상황을 고려하여 바이오에너지 작물을 통한 슈가 플랫폼(Sugar Platform) 개념의 연구 사업을 에너지부(DOE) 산하 NREL을 중심으로 2002년부터 연간 3,000만 달러의 연구비를 투입하여 실용화를 목표로 추진 중임.
- 국내에서도 슈가 플랫폼 사업이 추진되어 저비용의 발효성당을 생산할 수 있게 되면 이미 세계 일류 수준의 발효기술을 보유한 국내 기술에 의해 수송용 알코올을 비롯해 여러 가지 다양한 바이오 소재 생산기술의 실용화가 앞당겨질 수 있음.
- 또한 현재 진행 중인 바이오에탄올 생산 연구사업과도 연계가 될 수 있고 시너지 효과를 낼 수 있는 절실히 요구되는 연구 사업임.

나. 경제적·산업적 중요성 및 개발 필요성

- 바이오에너지 관련 산업은 원료물질을 자연계에 무한히 존재하는 천연 바이오매스를 이용하는 장점으로, 석유계 오일에 의존하고 있는 국내의 에너지 산업을 혁신적이고, 지속 성장 가능한 산업으로의 전환이 가능함.
- 기존의 원유로부터 유래하는 화학원료를 이용하는 대신 당질, 전분, 셀룰로오스 등의 재생 가능한 바이오매스 원료를 이용하여 바이오에탄올, 바이오디젤 등의 에너지 물질을 생산하며, 결과적으로는 원유 의존도를 낮추는 특성.
- 환경적인 측면에서는 독성 화합물을 배출하지 않으며, 상온/상압 공정이 대부분인 분리 공정에서 에너지 소모량을 크게 감소시킬 수 있다면 원유대비 충분한 경제적 경쟁력 확보 가능.

- 최근의 포스트 케놈시대를 맞이한 산업용 생명공학기술은 여러 가지 유용한 효소 또는 미생물 균주의 기능 개량을 위해 다양하게 활용되고 이를 이용한 바이오에너지 생산의 혁신적 발전 유도.
- 바이오 에탄올은 현재 당질 및 전분질을 원료로 하여 전처리, 당화와 발효, 및 정제공정을 통하여 생산되며, 브라질, 미국, 중국, 인도와 유럽 등의 국가에서는 에탄올 단독 또는 가솔린을 적정 비율로 혼합하여 자동차 연료로 사용.
- 국내의 바이오에탄올 생산 산업은 총생산량의 93%가 음료용 에탄올 생산에 집중되고 있고, 쌀, 보리, 옥수수, 고구마, 타피오카 등의 전분질 원료를 전처리 공정, 당화와 발효 공정 및 증류공정을 통하여 생산하고 있어 품질은 우수하나 생산성이 떨어지는 공정으로 구성.
- 최근에 세계 각국은 고유가 시대 대비와 온실가스 저감화를 위해 환경친화적인 바이오에너지 개발에 대한 심혈을 기울이고 있으며, 우리나라에서도 연료용 바이오에너지의 생산 필요성이 증가하는 추세이므로 다음과 같은 세부 단위 기술의 융합의 방향으로 진행 중임.
- 국내에는 10개의 에탄올 제조 회사가 있으며, 2004년도에 에탄올 제조량은 총 300천 kl로 이중 93%가 음료용으로 사용되고 7%만이 산업용으로 사용되고 있다. 하지만, 국제 에탄올 총생산량은 41,000천 kl (2004년)로 주류용으로 사용되는 것은 13%에 불과하며, 산업용으로 21%, 연료용으로 66%가 사용.
- 국내 에탄올 생산 공정의 특징은, 음료용 에탄올 생산설비로 품질은 우수하나 생산성이 떨어지는 회분식 공정으로 구성되어 있음. 즉, 음료용 에탄올에 대한 오랜 제조 경험을 바탕으로 하여 높은 생산 수율과 고품질의 에탄올을 생산하고 있으나, 회분식 발효 공정으로 인한 생산성이 선진국의 연속식에 비해 낮음.
- 국내에서는 원료의 가격 경쟁력 측면 때문에 연료용 바이오 에탄올은 현재 생산을 하지 않고 있으며, 대량 생산을 위한 산업화 기술은 선진국과 많은 차이를 보이고 있음.
- 국내의 바이오매스 원료로 제조하는 바이오에탄올은 국제 가격 경쟁력이 없기 때문에 바이오 에탄올의 국제 경쟁력 확보 및 산업화를 위해서는 정부가 대폭적인 R&D 지원, 세금 감면 및 보조금 지원 등의 기술적, 경제적 지원이 요구.
- 수송용 바이오연료의 수요는 선진국과 개발도상국 모두에서 급증할 것으로 예상되며 각국의 바이오연료 활성화 정책이 정상적으로 추진될 경우 2015년 73 Mtoe, 2030년 147 Mtoe로 연 평균 약 8%의 성장률을 나타낼 것으로 전망됨.
- 수송용 바이오연료의 기술은 현재 상용화 기술인 1세대 바이오연료는 2020년경 정점에 이를 것으로 2세대 바이오연료인 목질계 연료와 수소 등 3세대 바이오연료 기술은 각각 2010년 중반과 2020년대 중반 상용화 될 것으로 예상됨.
- 수송용 바이오연료의 수요 증대에 따른 바이오연료 생산 플랜트 수요 증가 (2030년 까지 전 세계 바이오연료 플랜트 시장 수요 →약 200조원)
- 전통적인 1세대 바이오매스 원료에 비하여 섬유질계 바이오매스는 당의 결합 구조가 견고하여 당 추출을 위한 기술적 난점이 많으며 이를 해결하는 것이 상용화의 중요한 요인임.
- 리그노 셀룰로오스 (목질계) 바이오매스 기반 바이오연료 및 바이오화학 시장은 자원의 바이오매스의 무한 생산성 및 식량자원과의 무관성 때문에 현재 석유 위주의 수송용 연

료 및 플라스틱 소재 등을 대체할 수 있는 거대한 시장 잠재력을 가지고 있으며, 실제 해외에 있는 우수기업 뿐만 아니라 국가단위로 이에 대한 연구가 진행되고 있는 상황으로 셀룰로오스 기반 전처리·당화공정은 매우 중요한 기술로 여겨지고 있음.

- 주요 요소 기술로는 바이오매스로부터 발효성 당을 효율적으로 추출하기 위하여 바이오매스 종류별 전처리 조건 설정이 필수적이나 기존 전처리/효소당화 공정 연계시 발생하는 문제점으로 증기 폭쇄를 실시하면 폭쇄 과정에서 다수의 발효 저해 물질이 발생하며, 약산 처리 시 처리된 바이오매스의 당 농도가 낮아 농축 공정이 필요함.
- 강산 처리 시 추가적인 효소 처리 반응이 필요 없으나 고온, 고압의 반응 조건으로 초기 시설비 및 운전비용이 상승하며, 전처리 바이오매스 내에 HMF와 같은 Toxic material 발생과 더불어 중화 처리에 문제점이 있다. 그러나 염기 처리 시 바이오매스의 전처리 효율이 초본계 바이오매스 자원에 높은 효율을 보이고 있지만 폭쇄 및 산 처리 시 발생하는 여러 가지 문제점을 극복할 수 있음.
- 또한, 목질계 기질 당화에 섬유소분해효소가 다량 필요하기 때문에 목질계 에탄올의 높은 생산비의 원인이 되므로 목질계 에탄올이 휘발유에 비하여 경쟁력을 갖기 위해서는 섬유소분해효소의 비용을 대폭 낮추어야함.
- 이를 위해 1) 효소의 생산성증가(volumetric productivity), 2) 값싼 기질들을 이용한 효소 생산, 3) 특정 공정을 위한 (예: 높은 온도, 특정 pH 등에) 안정성이 높은 효소의 생산, 4) 고체기질(insoluble cellulosic substrate)에 대해 높은 활성(specific activity)을 가진 효소 생산 등이 필요함.
- 당화과정에서 가장 비용이 많이 소요되는 효소 생산 단가를 낮추기 위해서는 유전적 변형 균주를 통한 분해효소개발(효소생산)과 사용되고 있는 효소들의 개량 및 개발된 효소의 기능을 개선하는 것임. 이러한 효소 생산 연구는 우선 우수한 효소 생산 균주를 선발하고 이를 활용하여 효소의 생산성과 효소 기능을 개선함으로써 이루어 질 수 있음.
- 성공적인 당화공정이 개발되면 이를 이용하여 바이오 에탄올, 부탄올, 바이오디젤 등 연료를 생산할 수 있을 뿐만 아니라 바이오 플라스틱, 바이오 소재, 아미노산등 다양한 생물 공정을 통하여 산업적으로 이용이 가능한 플랫폼을 구축 할 수 있음.

2절 연구개발의 범위

- 바이오에너지 사업의 범위는 에너지작물 생산, 바이오연료 생산요소 기술개발, 바이오연료 생산 공정 개발, 바이오연료 생산 연계 바이오정유공장 기술개발 등을 포함함.
- 바이오연료 생산 요소기술이란 바이오연료를 생산하기 위한 각 단계별 기술을 의미하며 이러한 기술을 조합하여 최적화함으로써 바이오연료 생산 공정이 완성됨.
- 지금까지 다양하게 연구 개발 되어온 전처리 공정 기술은 셀룰로오스 성분만을 회수하여 가수분해를 통한 당화액 생산에 국한되어 있으며 높은 온도와 압력을 요구하는 공정으로 에너지 비용의 부담 및 공정상 과생되는 독성 물질에 의한 당화/발효 공정의 저해 요인 등 여러 가지 문제점을 지니고 있음.
- 바이오 연료 생산을 위한 전처리 공정 기술을 상용화 단계 까지 효율적이고, 경제적으로 구축하기 위해서는 경제성이 확보되고 원천 기술 적용이 가능한 섬유소계 바이오매스의

선정과 더불어 기존 기술들의 문제점을 파악, 극복 하면서 전체 생산 수율을 높이는 동시에 에너지 저감형태의 새로운 전처리 공정 기술 개발이 필요한 실정임.

- 섬유소계 바이오매스는 그 종류에 따라 약 20% 내외의 함량을 차지하는 리그닌은 그 강한 내구성 때문에 자연계에 존재하는 천연 화합물 중 가장 분해가 어려운 물질로 간주되고 있으며, 이러한 리그닌이 식물의 주요한 탄수화물인 헤미셀룰로오스 및 셀룰로오스를 보호하는 구조 및 기능을 갖고 있어 재생 가능한 바이오매스의 활용을 위한 첫 단계로는 리그닌 분해 기작에 관한 연구가 매우 절실한 상태임.
- 특히 최근에 목재를 부패하여 생활하는 백색부후균 또는 목재부후균이 리그닌을 분해하는 효소를 생산하는 것이 밝혀진 뒤 이들 진균에 대한 genome sequencing이 완료되고 해당 유전자의 재조합을 통한 효소의 생산 및 활용에 대한 연구가 진행되어 진균 또는 세균에서 생산되는 ligninase를 활용하는 생물학적 전처리 방법이 새로운 대안으로 주목받고 있음.
- 리그닌 분해대사에 관여하는 효소에는 과산화효소계 (lignin peroxydase, Mn-peroxydase), 과산화수소 생성 산화효소 (glucose oxydase, glyoxal oxidase, aryl alcohol oxidase 등) 및 라카제(laccase)등이 있다. 목재부후균은 이들 효소를 생산하는데 균류에 따라 하나 혹은 둘이상의 효소를 분비하거나 분비 되더라도 활성도는 매우 다양한 것으로 알려져있어, 보다 다양한 효소자원의 확보 및 바이오매스에 따른 리그닌 분해 효소의 개발이 필요한 상태임.
- 바이오 알코올 생산비용의 절감을 위해 현재 가장 많은 부분을 나타내고 있는 당화효소의 생산비용을 절감하여야 하며 이에 고효율 효소 당화기술의 개발은 반드시 이루어져야 하는 연구 분야임.
- 그러므로 고효율 섬유소분해효소 탐색, *Trichoderma reesei*와 *Aspergillus niger* 등의 섬유소 분해효소가 많은 새로운 균주의 탐색 및 다량의 섬유소분해효소를 분비하는 균주의 선별에 의한 특정 섬유소 분해효소 유전자 개발 및 경제적 효소생산의 기반을 마련하여 고효율 당화기술을 확보해야함.
- 이러한 섬유소분해효소를 다량으로 분해하는 균주를 선별하는 과정은 매우 복잡하고 어려운 과정으로 구성되어 있어 이를 보완하기 위해 새롭고 편리한 탐색기법을 이용하여 선별 과정의 효율성을 극대화 하며 이러한 기술을 바탕으로 특수 환경유래 신규 섬유소 분해 효소를 선별하며 이를 개량 및 당화효율 검증을 통하여 고효율 당화공정을 확립이 필요한 실정임.
- 고효율 섬유소분해효소의 대량생산을 위한 저비용/고효율 신공정의 확립 및 공정변수 분석을 통한 최적화를 통한 당화효율 안정성을 개선하여 저비용/고효율의 당화공정을 확립해야함.
- 뿐만 아니라 국내 실정에 맞는 다양한 섬유소계 바이오매스에 적합한 당화효소처리 방법의 확립이 필요한 실정이며 고효율/저비용 당화공정의 확립을 위해 바이오매스 종류별 적절한 당화효소(Endo-glucanase, Exo-glucanase, Cellobioase, xylanase, β -xylosidase)의 비율을 확립하여 기존의 상업적으로 생산되고 있는 섬유소분해효소의 효율을 증대시키는 연구가 필요한 실정임.
- 섬유소계 바이오매스로부터 발효당 바이오알코올의 생산의 효율을 극대화하기 위하여 화학적 전처리 및 당화공정의 복합처리기술개발이 필수적으로 필요한 실정이며 이에 국내

실정에 맞는 바이오매스의 종류와 특성에 따른 화학적 전처리 공정 및 당화공정의 융합을 통한 복합처리기술을 개발하여 저비용/고효율의 발효성 당(Fermentable sugar)의 생산 공정을 확립해야함.

- 바이오 연료생산을 위한 공정개발은 당질확보(sugar platform) 기반구축을 위해 스케일업을 통한 실증화가 필요한 연구분야이며 이에 현재 연구단계에 있는 전처리 및 당화공정을 일차적으로 pilot scale까지 scale-up을 통한 실증화가 필요한 실정임.
- 특히, 전처리 및 당화공정과 마찬가지로 바이오연료의 생산은 수요증대 (2030년 약 147 Mtoe)에 따른 바이오연료 생산 플랜트 수요 증가(2030년 까지 전 세계 바이오연료 플랜트 시장 수요 →약 200조원)가 예상되며 이에 바이오 알코올 생산의 발효성 당의 생물학적 전환공정(Fermentation) 또한 실증화가 반드시 필요한 연구분야로서 이에 scale-up을 통한 각 단계별 기술 적용성 검토 및 최적화에 관한 연구가 반드시 필요한 상황임.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1절 기술개발 및 특허 동향

1. 국내·외의 주요 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
미국 National Renewable Energy Laboratory	바이오매스 전처리	미국 에너지부의 sugarplatform의 핵심기술로서 개발된약산전처리공정은 corn stover등의 lignocellulose에 적용시 셀룰라제에 의한 당화율이 이론적 수율의 90% 이상임.
캐나다 Iogen	바이오매스 당화공정	Trichoderma reesei유래 재조합 당화효소는 현재 wheat straw에 적용하여 cellulosic 에탄올을 생산하는 demonstration plant 운용에 사용 중
미국 Genencor International; 덴마크 Novozymes	당화 효소 개발	2004년 Genencor는 20배, Novozymes는 12배 가격 낮은 셀룰라제 개발 성공하여 논문발표 및 미국 특허 등록
미국 Univ. of Florida (L. O. Ingram)	바이오매스 당화액 발효균주	재조합E. coli를 이용하여 바이오매스 당화액을 lactic acid로 전환하는 공정 개발
서울대학교 (서진호)	자일로스 대사균주	Hemicellulose의 주성분인 자일로를 대사하여 에탄올을 co-ferment하는 재조합 균주 개발

2. 기술발전추세

- 최근 몇 년간 직속되는 국제유가상승과 석유 자원의 고갈에 대한 대중적 인식으로 새로운 에너지원의 필요성이 대두되고 있는 이 시점에서 수송용 연료인 휘발유를 대체 할 수 있는 바이오에탄올은 현재 구축된 인프라와 상용화에 가장 근접한 에너지원임.
- 현재 바이오에너지 생산 기술은 미국, 독일, 일본 등 선진국을 중심으로 국가 정책 사업으로 집중 투자, 육성하고 있으며 이들 국가의 기술 독주가 심화되고 있음.
- 특별히 당화 효소 생산 기술은 선진국과의 기술적인 격차가 심해, 효소 연구 기술의 국내 현실은 세계 주요국과 비교 할 때 매우 열악한 수준임.
- 발효 균주 개발 영역은 국내에서 관련분야의 연구 중 기초 기술 수준은 높은 편이나 에탄올 관련 균주에 대한 연구는 미진함.
- 바이오매스 전처리 기술은 과거 일부 연구원에서 주도적으로 진행 되었으나, 현재는 연구 진행이 미진하며 기술 개발 및 적용이 시급히 필요한 상태임.
- 기질의 선정 그리고 기질에 대한 적절한 효소 및 효모의 선정과 함께 바이오에탄올의 고농도 생산을 위하여 여러 형태의 생물 반응 시스템을 시험하고 확립.
- 바이오에탄올 산업화 최적공정 개발을 위하여 기질의 전처리 공정부터 생명공학기술이 도입된 발효공정, 분리공정까지 다양한 형태의 연속식 공정을 도입하여 수율 및 생산성 향상을 유도해야함.

- 미생물자원의 대사생리학적 연구의 진행과 바이오센서 및 관련 기기 산업의 급속한 성장에 힘입어 전통적인 수학적 제어보다 인공지능형 제어기법을 생물공정 전반에 도입하려는 시도가 선진국을 중심으로 추진되고 있음.
- 바이오에탄올 생산공정에도 이러한 새로운 제어시스템을 도입함으로써 배양환경의 진단 및 최적화를 통해 생산성을 극대화시키고 체계적으로 전체 공정을 감독하고 운전할 수 있는 혁신적인 공정개발과 더불어 에너지 절감형이며 컴팩트한 바이오에탄올 고생산을 위한 효율적인 다단계 연속식 발효공정의 개발이 필요함. 이는 전체 공정에 대한 해석 및 경제성 평가를 통해 검증되어야함.

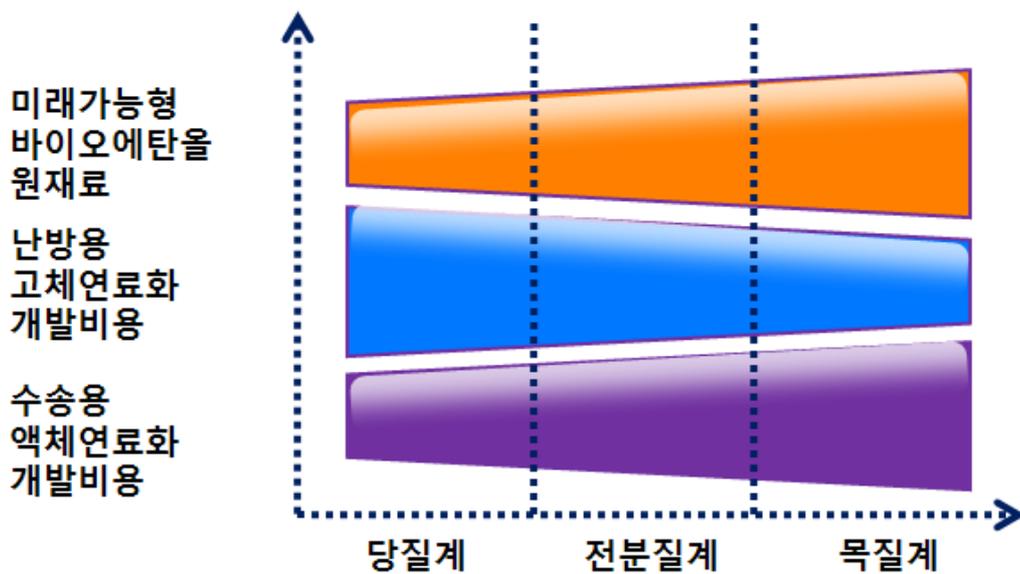


그림 2-1. 원료별 용도대비 기술발전 추세

3. 바이오에탄올 국내외 특허 동향

가. 분석방법 및 분석범위

- Wips(www.wips.co.kr) 검색엔진을 사용하여, 1970년부터 2007년 현재까지 공개된 한국 특허 공개 및 실용 공개, 일본 특허 공개 및 실용공개와 등록 실용, 유럽 공개 특허(EP-A)와 미국등록 및 공개특허를 대상으로 함.
- 바이오에너지 관련 검색어는 biomass, pretreatment, bioethanol, lignocellulose, cellulose, xylose, cellulase, xylanase, ethanol, fermentation, yeast등을 조합하여 검색함.

나. 국가별 특허등록 동향

- 미국은 1970년을 시작으로 현재까지 총 68건이 검색되어 한국, 미국, 일본, EU, 중국 중 가장 많은 바이오에너지 관련특허가 등록되어 있으며 이는 38%의 점유율을 나타내고 있으며, 1990년대에는 21편으로 바이오에탄올 관련기술의 특허가 급격히 증가함. 이후 지속적으로 감소하여 2004년에 최저치를 보였으나 2005년부터 최근까지 다시 급격히 증가하여 여전히 선두를 달리고 있어 이 분야에 대한 연구개발이 크게 신장되고 있음을 간접적으로 보여주고 있음.

- 유럽연합은 1980년대에 바이오매스 및 전처리 관련특허의 수가 급격히 증가하여 26편이 등록되었으나, 그 이후로는 지속적으로 감소하는 양상을 보여 2004년에 거의 출원되지 않음. 최근 친환경에 대한 관심의 증가로 2005년 이후로 증가추세를 보이고 있음.
- 한국은 총 32편의 바이오에탄올 국내 특허 중 90년대부터 2002년까지 18편이 등록된 이후 2004년까지 감소하였으나, 미국, 유럽 등의 선진국과 유사하게 2005년 이후 다시 특허 등록수가 증가하고 있음. 바이오에탄올 관련 점유율은 미비하였으나 최근 관심이 급증하여, 18%정도를 확보함.
- 일본은 1990년 말부터 출원되기 시작하였으나, 교토협약이후 급격히 증가하여 2005년부터 최근까지 13편이 등록됨. 유럽을 제치고 미국 다음으로 우위를 선점하고 있음. 출원시작시기가 늦어 점유율은 10%정도로 낮음.
- 중국은 1990년 이후부터 지속적인 증가를 보여 왔으나, 최근에는 주춤함.

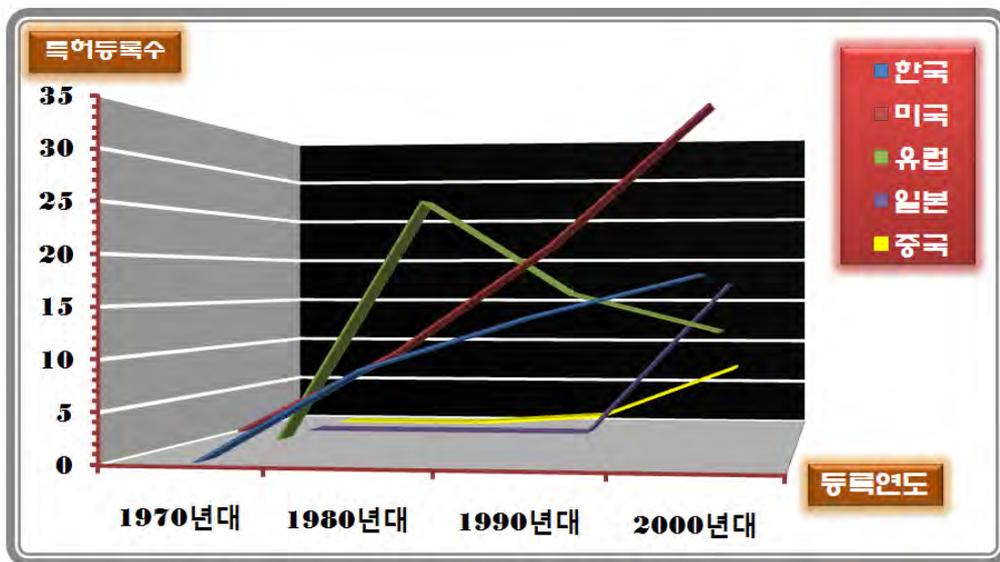


그림 2-2. 바이오에탄올 분야의 국가별 특허 등록 추세

- 미국의 바이오에너지 관련특허가 총 68편으로 바이오매스 전처리 관련하여 33편으로 대다수를 차지하고 그다음으로 발효공정(19편)과 효소관련(9편)의 순으로 이어짐.
- 유럽은 미국과는 달리 발효공정에서 31편으로 가장 많은 연구가 되었으며, 균주개발측면이 상대적으로 강조되어 14편이 등록됨.
- 일본은 발효공정(4편)과 바이오매스 전처리(13편)가 대부분을 차지하고 있으며, 최근의 연구경향은 바이오매스 전처리에 중점을 두어 다수의 특허가 등록되고 있음.
- 중국은 뒤늦게 특허등록을 시작하였으나 균주개발을 제외하고는 전 분야에 걸쳐서 연구가 진행됨. 그러나 특허의 수가 적고, 최근에는 연구결과가 거의 없음.

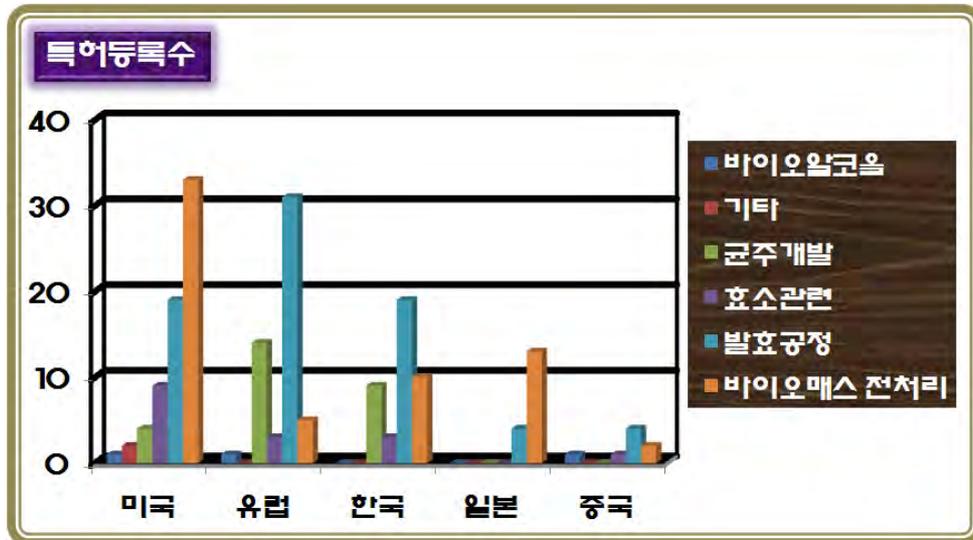


그림 2-3. 바이오에탄올 관련 분야 국가별 특허 등록 수

다. 국내동향

- 미국과 일본 등에서 연구가 많이 되어왔던 바이오매스 전처리분야의 기초 선행연구와 유럽의 발효공정분야의 많은 연구와 더불어, 국내의 바이오에너지 관련특허는 발효공정(19편)과 바이오매스 전처리(10편)가 대부분을 차지하고 있으며, 최근의 연구경향도 이와 유사하게 진행되고 있음.
- 또한 미생물의 생육환경개선 및 유전자 재조합 등의 균주개발을 통해 오탄당을 이용한 에탄올의 생산으로 수율의 향상도모. 그 외의 분야로 효소분야의 연구가 1980년 이후부터 진행되어왔는데, 2002년 이후로는 특별한 특허등록이 없음.
- 바이오에너지관련 특허 32편중 1990년대부터 2002년까지 18편이 등록된 이후 2004년까지 지속적으로 감소하였으나, 미국, 유럽 등의 선진국의 경우와 유사하게 2005년 이후에는 특허등록수가 증가하는 경향을 보여 5편이 등록됨.
- 바이오에너지 관련 점유율은 시작초기에는 미비하였으나 최근 관심이 급증하여, 주요 국가대비 18% 정도를 확보함.
- 최근 환경친화 및 교토협약의 영향으로 2005년 이후 주요 국가별 바이오에너지 관련 특허출원 수가 급증하고 있음.

표 2-1. 국내 바이오에너지관련 특허등록현황

분야 \ 연도	1970년대	1980년대	1990년대	2000년대	합계
효소공정	-	1	1	1	3
발효공정	-	6	6	7	19
바이오매스 전처리	-	-	2	8	10
균주개발	-	2	5	2	9
바이오에탄올	-	-	-	-	-

주) 바이오에너지 중복관련분야는 중복 집계함.

4. 국내 바이오에탄올 기술분야의 SWOT 분석

- 국내 기초 발효공정 (핵산/아미노산발효) 기술은 생명공학 분야에서 우리나라가 소유한 세계 초일류 기술에 속하며, 이들 기술은 바이오에탄올 산업 발전의 기반이 될 수 있음.
- 우리나라는 미국이나 서유럽국가에 비해 바이오매스로 활용할 농업자원이 부족하고 국토가 좁은 불리한 조건이 있으나, 이들 발효/생물공정 기술 경쟁력과 경험을 활용하여 생산요소기술 및 공정기술의 개발을 통한 기술 수출 및 해외 공장을 통한 현지 생산전략은 이러한 원료 및 자원 부족의 불리한 조건을 극복할 수 있음.
- 미생물 및 효소공정이 생명공학분야의 핵심임에도 불구하고 이 분야에 대한 지원정책이 특정 분야에 집중되지 못하고 산발적으로 이루어져 투자에 대비한 효과가 미미한 실정.



5. 선진국 대비 국내 해당분야의 기술수준

프로세스	기술군	산업과효과	한국 경쟁력	기술들과 가능성	핵심이슈 사항	기술 보유 대표 기업 (국가)
바이오매스 전처리	1. 목질계 바이오매스 전처리 2. 전분계 바이오매스 전처리	상중	하중	하중	-리그닌의 효과적 분리 및 활용 -전처리기술의 경제성	DOE(미국) DuPont(미국) Iogen(캐나다) JGC(일본)
당화	3. 전분계 당화기술 4. 목질계 당화기술 5. 효소공학기술	중상상	상하중	상하상	-대량생산 및 가수분해 효소 저가화 -활성 및 열안정성이 뛰어난 효소 개발	Novozyme(덴마크) Genencor(Danisco-네덜란드) DSM(네덜란드)
발효	6. 대사공학기술 7. 시스템 생명공학기술 8. 공정기술	상상중	중중중	상상중	-6탄당 및 5탄당 동시 이용 균주개발 -셀룰로오스 동시당화 및 발효	Cargill(미국) DuPont(미국) ADM(미국)
분리 정제	9. 추출정제기술	중	중	중	-선택적 분리효율 (투과도와 선택도) -분리시스템 운전비용	UOP(미국) GE(미국) JGC(일본)
바이오알콜 연료생산	10. 전분계 에탄올 생산 11. 셀룰로오스 에탄올 생산	상상	하하	하하	-비식용작물 원료활용 -이산화탄소 저감효과 -생산효율 증대 및 내성균주 개발	ADM(미국) Iogen(캐나다) BP(영국)

* 산업과급효과 : (상)단일품목 1조원 이상, 한국경쟁력 : 현재의 기술수준 고려
기술들과가능성 : 정부/민간의 R&D 투자가능성 및 개발제품의 국내 경제성 고려

2절 국외 기술개발 동향

1. 균주개발

- 미국은 해외 원유에 대한 의존을 줄이기 위해 자국 바이오매스 자원을 활용한 바이오연료 생산 기술 개발에 매우 적극적이다. 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산을 위한 개발 기술로서 1) 저가의 cellulase 생산 기술, 2) cellulose의 전처리 방법, 3) 발효 미생물 개발임.
- 중국, EU, 캐나다, 인도, 일본 등 세계 주요 국가들도 모두 목질계 에탄올 생산에 대한 기술 개발이 한창이며, 중국은 농업부산물, 잔디, 하수오물, 슬러지, switch grass, 식물줄기, 나무 등의 다양한 유기물로부터 에탄올 생산 연구를 하고 있고, 캐나다의 우드칩, 톱밥 등의 산림 폐기물과 벚짖 등의 폐섬유계 바이오매스의 에탄올 전환기술을 연구함.
- 섬유질 바이오매스의 전처리 방법으로 여러 가지가 연구되고 있는데, 그 중에서 낮은 비용으로 사용화 가능성이 가장 높은 방법은 dilute acid 전처리 방법이 사용되고 있으며, 발효 방법에는 separate hydrolysis and fermentation (SHF)와 simultaneous saccharification and fermentation (SSF)의 방법을 사용하고 있으며 가장 많이 사용되고 있는 방법은 SSF임.
- 당화효소에는 Genencore, Iogen, Novozyme, Rhom등 많은 기업들이 효소를 사용한 당화효소 제품 개발을 진행하고 있으며, 그 핵심 기술로 효소 생산 미생물의 개발과 대사과정을 최적화 하는 방법을 사용하고 있다. 또한 다양한 조건에서의 미생물로부터 얻어진 유전자를 재조합 하는 방식으로 cellulosome을 개발하는 연구도 진행되고 있음.
- 현재 여러 외국기업에서는 셀룰라아제의 경제적 대량생산 및 고효율 셀룰라아제 개발연구에 많은 연구비를 투자하고 있고, Novozymes사, Genencor사, Verenum사 등의 기업을 중심으로 경쟁이 강화되고 있음.
- 섬유소 당화용 효소는 당화과정 최적화를 목표로 하는 만큼 폭발적인 성장이 기대되고 있으나 효소단가에 대한 압박이 극심하므로 기존 효소시장에 공급되는 고가의 셀룰라아제와 섞일 경우 시장교란이 생길 수도 있음.



그림 2-4. 세계 당화 효소시장 추산치 (출처 : Transparency Market Research)

- 미국은 에너지와 원료수급 안정화를 위한 원유 의존도를 줄이기 위하여 자동차용 바이오

연료, 화학산업원료 등을 바이오산업을 통하여 확보하는 핵심적인 전략목표를 제시하였음 (Biomass R&D Act 2000).

- 상기의 전략목표는 2020년까지 전체 화학산업에 필요한 원료의 20%를 바이오자원에서부터 2050년까지 50%를 충당하려는 목표를 달성하려는 것이며, 미국바이오산업협회(BIO : Biotechnology Industry Organization)가 중심이 되어 활동 중임.
- 세계 효소시장은 미국·유럽(특히 덴마크)의 메이저 회사에 의해 주도되고 있는데, 미국 효소시장은 2007년도 기준 약 19억 달러 수준에 달하고 있으며 1997년~2007년 동안 6%대의 지속적인 성장세를 보여 미국의 일반 비 내구재 생산을 크게 앞서는 성장세를 보이고 있음.
- 미국은 산업용 효소시장의 활황이 연료용 에탄올 제조에 필요한 전분가공(starch processing) 효소의 급속한 수요 팽창에 기인해 2014년까지 이러한 성장세가 이어질 것이며, 이후 섬유질 유래 에탄올(cellulosic ethanol) 제조에 필요한 섬유소 당화효소(cellulase)에 의한 신규효소 수요가 이어질 것으로 기대됨.
- 세계최대의 산업용 효소 생산회사인 Novozymes사와 Danisco사 본부와 유제품용 효소제품의 선두기업인 Chr. Hansen사가 덴마크에 있으며, 독일도 높은 수준의 기술력을 보유하고 있음.
- 특히 현재 당화효소 시장을 주도하고 있는 Novozymes사의 경우 효소 시장의 약 47%를 점유하고 있을 정도로 높은 점유율을 보유하고 있으며, 매년 10% 이상의 성장률을 보이고 있음.
- 세계적으로 산업용 효소의 80% 이상을 Novozymes사, Genencor사, DSM에 의해 독과점 점유되고 있으며, 부품소재효소 개발과 상업적 활용기술을 개발함으로써 산업 바이오를 주도할 것으로 기대됨.
- 해외는 Novozymes사, Genencor (Danisco)사가 전세계 효소시장 70% 이상을 독점하고 있는 상황이며, Novozymes사에서는 100명 이상의 연구인력과 37.3M \$ 투입하여 경제성 있는 섬유소계 당화 효소 개발을 위한 DECREASE (Development of a commercial-Ready Enzyme Application System for Ethanol) 프로젝트 수행 중에 있음.
- Novozymes의 셀룰라아제는 celluclast 1.5L 이후에 Cellic Ctec이 개발되었고 최근에는 Cellic Ctec2를 출시하였음. Cellic Ctec은 celluclast 1.5L에 비해 약 5배 정도 활성이 증가하였고, Cellic Ctec2는 Cellic Ctec에 비해 약 15% 정도 활성이 증가하고 저해제에 대해 더 잘 견디는 것으로 알려졌음.
- Genencore, Iogen, Nozozymes, Rhom 등 많은 기업들이 효소를 사용한 셀룰로오스 생산기술의 발전을 위해 노력해 왔는데, 그 핵심은 효소생산 미생물의 대사설계를 최적화하는 방법이 사용되고 있음. 이와 관련된 대표적인 사례를 본다면, 캐나다의 회사인 Iogen Corporation은 특별하게 설계된 enzyme을 공급하고 있음. 이 효소는 Trichoderma reesei로부터 만들어지는데, 최근 들어서 이들 변종인 Rut-C30, RL-P37 and MCG-80로부터 셀룰라아제 효소가 개발되고 있음.

2 전처리·당화 기술 연구

- 미국, 유럽, 중국 등 세계주요국들은 국내에서 섬유질계 바이오에탄올 발효공정 연구가 정체되어 있었던 것과는 달리 섬유질계 바이오에탄올 생산기술 연구에 대한 집중적인 투

자가 이루어지면서 실험실 연구뿐만 아니라 파일럿 및 실증 규모 단계의 당화 및 발효공정이 전처리 및 분리공정과 통합되어 공정개발이 이루어지고 있음.

- 최근 세계적으로도 상업화 공정에 연속식기반 공정의 도입이 추세로서, 가장 많은 에탄올 생산 공정 적용 역사를 갖고 있는 브라질의 경우 연속식 발효방법에 의한 생산이 이미 1999년경에 약 30%를 차지하였고, 최근 에탄올 생산 공장의 신설이 활발한 미국의 경우도 회분식 공정이외에도 연속식 배양법을 다수 운영하고 있으며, EU의 경우도 바이오에탄올 생산성 향상을 위해 연구과제로서 고생산성 연속식 공정 개발 프로젝트 (FERMATEC)를 진행 중임. 최근 주요 에탄올 생산국가로 부상한 중국의 경우 BBKA사는 2005년 연 20만 톤 규모의 연속식 공정을 상용화하였음.
- 한편, 미국 NREL은 섬유질계 바이오에탄올 대량생산 생산 공정 계획안으로서 연속식 동시당화발효공정을 적용하여 설계하였으며, 실제로 9,000 L 규모로 구축한 pilot plant(퍼듀대 소재)는 연속식 동시당화발효로 운영 가능하도록 되어 있으며, 다수의 에너지회사가 이를 시험생산에 활용하고 있으며 중국의 한 회사는 고정화 세포를 이용하는 에탄올 생산 공정을 중간시험 공정(연산 400톤)에 적용 실험하여 일부 성공적 결과를 얻고 있는 것으로 파악되며, 유럽의 한 회사는 대량생산 공정 적용성이 개선된 담체를 개발하여 생산을 앞두고 있음.
- 섬유질계 바이오에탄올 생산을 위한 전처리/당화 공정의 기술을 확보하고 있는 대표적인 업체는 미국의 Arkenol과 캐나다의 Iogen임. Arkenol 공정은 강산을 이용하여 150 kL/day의 에탄올을 생산하고 있으며, Iogen은 약산 전처리 공정을 이용하여 효소 당화 공정을 거친 후 에탄올을 생산하는 공정으로 40 ton/day 규모의 섬유질계 바이오매스의 처리 능력을 보유하고 있음.
- 이러한 기술은 상용화 규모의 공정을 확보하여 상업화 단계에 들어선 공정으로 높이 평가받고 있다. 또한 미국의 바이오에탄올 연구는 자국에서 확보 가능한 원료인 옥수수대, 벧짚, 억새 등 초본계 작물에 적합한 바이오에탄올 생산 기술 개발이며, 미국의 바이오연료 생산을 위한 pilot plant 개발 동향 및 바이오연료 리파이너리 건설동향을 보면 2007년도 기준으로 미국에서는 옥수수를 사용한 바이오에탄올 리파이너리 공장 139개가 21개주에서 가동 중에 있고, 옥수수 이외의 다른 원료들을 포함하면 전국적으로 171개의 바이오리파이너리가 가동 중에 있으며, 앞으로 수년 이내에 현재 건설 중에 있는 68개의 바이오리파이너리로부터 연간 40억 갤런의 에탄올이 생산될 것으로 예상되고 있는데, 건설 중인 설비들이 모두 완공되면 미국의 가솔린 수요의 약 10%에 해당되는 130억 갤런 이상의 에탄올을 공급할 수 있을 것으로 예상됨.
- 한편, Genencor, Diversa, Novozymes 및 Dyadic 같은 회사에서 cellulosic 에탄올공정에 사용할 수 있는 효소생산하고 Iogen, Broin 및 Abengoa 같은 기업에서는 바이오매스에서 바이오에탄올을 생산 정제하는 공정을 구축하고 있으며 섬유질계 에탄올 산업은 2008년 이후 새로운 상업적 규모의 공장을 개발되어 연간 12,000KL를 공장이 운영 중에 있으며, 상용화급 섬유질계 에탄올 Plant 건설은 DOE(Department of Energy: 에너지성)에 주관으로 연간 80,000KL를 생산할 수 있는 26 개의 새로운 공장에서 설비를 건설하고 있는 것으로 알려져 있음. 아래 표는 미국에서 신규로 진행 중인 상용화급 섬유질계 설비 건설 계획임.

표 2-2. 미국의 상용화급 바이오에탄올 설비 구축 주요 계획

구분	주요 내역
Abengoa Bioenergy Hugoton, KS (76 백만 달러)	- 미국 Kansas 주 / 연 36만 KL 바이오에탄올 생산 예정 - 바이오매스 700톤/day (옥수수대, 밀대, switchgrass) - 투자자 그룹 : Abengoa Bioenergy R&D, Inc., Abengoa Engineering and Construction, LLC, Antares Corp. 및 Taylor Engineering - Ref : www.biorefineryprojecteis-abengoa.com
BlueFire Ethanol Irvine, CA (4,000만 달러)	- California에 건설 / 연 1,900만 갤런의 에탄올 생산 예정 - 바이오매스 700톤/day (잔디 폐기물, 목재 폐기물 등) - 투자 그룹 : BlueFire Ethanol, Inc.는 Waste Management, Inc.; JGC Corporation; MECS Inc.; NAES와 PetroDiamond
Broin Companies (8,000만 달러)	- Iowa주 Emmetsburg / 연 1억 2,500만 갤런의 에탄올 생산 - 바이오매스 842톤/day (옥수수대) - 투자자 그룹 : E. I. du Pont de Nemours and Company; Novozymes North America, Inc.와 DOE's National Renewable Energy Laboratory
Iogen Biorefinery Partners	- Idaho주 Shelley 건립 / 연 1,800만 갤런의 바이오에탄올 생산 - 바이오매스 700톤/day (밀대, 옥수수대 등 농업부산물) - 투자 그룹 : Iogen Energy Corporation; Iogen Corporation; Goldman Sachs와 The Royal Dutch/Shell Group

□ 경제 산업성의 NEDO 프로그램 지원으로 6개 연구소에서 셀룰로오스 에탄올 개발을 진행 중이며, 일본의 재생에너지 활성화 정책에 따라 지방의 여러 개 지역에서 바이오 에탄올, 셀룰로오스 에탄올, 바이오 디젤 기술의 실증화를 위한 시범사업을 진행 중에 있음. 이중 일본의 엔지니어링사인 JGC사가 미국의 바이오 회사인 Arkenol사와 공동으로 2002년부터 일본 NEDO 프로젝트로 Izumi시에서 폐목재 셀룰로오스 원료를 이용한 에탄올 생산의 파일럿 테스트를 수행하였다. 일본 바이오에탄올 로드맵에 주요 바이오매스로 벧짚과 목재폐기물 위주로 설정되어 있으며 각각의 바이오매스에 대해 생산비용을 리터 당 100엔 미만으로 낮출 것을 목표로 하고 있음.

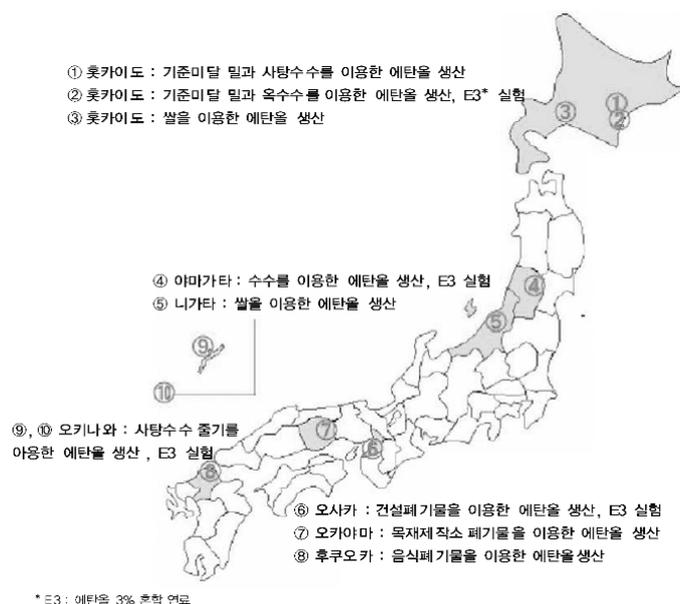


그림 2-5. 일본의 지역별 바이오에탄올 시범사업 현황

표 2-3. 미국의 상용화급 섬유질계 에탄올 설비

Company	Location	Capacity (MG/year)	Feedstock
Operating pilot plants:			
AE Biofuels	Montana	0.15	Corn, corn stover
KL Energy Corp	Wyoming	1.5	Wood
Poet	S. Dakota	0.02	Corn cobs
Verenium	Louisiana	1.4	Bagasse
Commercial scale plants not open yet:			
Abengoa Bioenergy	Kansas	30	Biomass
BlueFire Mecca Llc	Calif	17	Green waste
Colusa Biomass	Calif	12.5	Rice hulls
Gulf Coast Energy	Florida	25	Woody biomass
Mascoma Corp	Michigan	40	Woody biomass
Poet	Iowa	25	Corn cobs, stover
Range Fuels	Georgia	20	Woody biomass
US Enviropfuels LLC	Florida	20	Sorghum, sugar cane
Verenium-BP	Florida	36	Energy cane, sorghum
Pilot, or pre-commercial plants, not open yet:			
Abengoa	Nebraska	10	Corn stover
BlueFire	Calif	3.2	Green landfill waste
Citrus Energy Llc	Florida	4	Citrus waste
Clemson University	S. Carolina	10	Wood waste, algae
Coskata	Pennsylvania	0.04	Woody biomass, waste
Dupont Danisco	Tennessee	0.25	Switchgrass, stover
Ecofin Llc	Kentucky	1	Corn cobs
Fulcrum	Nevada	10.5	Municipal waste
GulfCoast Energy	Alabama	0.4	Wood Waste
Flambeau River	Wisconsin	6	Forest, paper waste
ICM Inc	Missouri	1.5	Switchgrass, sorghum
KL Energy Corp	Colorado	5	Wood pellets
Liberty Industries	Florida	7	Forest waste
NewPage	Wisconsin	5.5	Woody biomass
Pacific Ethanol	Oregon	2.7	Wheat straw, poplar
PureVision	Colorado	2	Corn stalks
RSE Pulp & Chem	Maine	2.2	Woody biomass
SunOpta	Minnesota	10	Corn stover, waste
University of Florida	Florida	2	Bagasse
West Biofuels	Calif	0.18	Wood chips

- 일본 바이오연료 정책의 또 다른 특징은 전국을 지역단위로 나눠 각 지역에서 바이오매스 수집에서부터 바이오연료 생산 및 사용에 이르기까지 모든 단계가 유기적으로 이루어지도록 되어 있음. 이러한 곳을 ‘바이오매스 타운(Biomass town)’이라고 부르는데, 이렇게 추진하는 것은 바이오연료원료의 수집과 수송이 용이 하고 또한 각 지역사정에 맞는 자원을 개발하여 사용할 수 있다는 장점이 있음.
- 일본의 마루베니 코퍼레이션과 츠키시마 키카이 컴퍼니 주식회사가 합작한 벤처회사인 바이오에탄올 일본(BioEthanol Japan)은 미국 베레니움사로부터 기술을 도입하여 섬유질계

에탄올을 생산하였으며, 바이오에탄올 일본 플랜트는 건축용 폐목재로부터 섬유질계 에탄올을 상업적 규모로 생산하는 세계 최초의 플랜트를 설립하여 2008년에 섬유질계 에탄올 생산 용량을 400만 리터로 확대함.

- 당화 및 발효기술로는 특히, C5, C6 동시 이용 및 당화 및 발효 효율을 높이기 위한 동시당화발효공정(SSF) 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며, 미국 에너지성(DOE)은 카길, 셀루놀, 듀퐁, 퍼듀대 등에 각각 4-5백만 달러 규모의 연구비를 투입하여 동시당화발효공정 개발을 지원하고 있다. NREL은 섬유질계 바이오에탄올 대량생산 생산 공정 계획안으로서 동시당화발효공정을 적용하여 설계하였으며, 실제로 9,000 L 규모로 구축한 pilot plant(퍼듀대 소재)는 연속식 동시당화발효로 운영 가능하도록 되어 있으며, 다수의 에너지회사가 이를 시험생산에 활용함.
- 섬유질계 바이오에탄올 발효 기술에서 연속발효공정(continuous fermentation)은 생산성 향상과 전처리과정 중 생산되는 발효저해물질의 영향을 줄이기 위한 방안으로서 연구가 진행되고 있으며, 고농도세포를 유지하기 위한 세포재순환 및 고정화 방법도 연구되고 있으며 C5, C6 동시 발효를 위한 균주 개발은 박테리아로부터 효모까지 다양한 균주를 활용하여 연구가 진행되고 있으며, 타 균주의 오탄당 대사 유전자를 에탄올 발효 균주에 도입하거나, 오탄당 대사 균주에 에탄올 발효 유전자 삽입과 내성 향상 등의 연구가 진행되고 있는 실정.

3절 국내 기술개발 동향

1. 균주개발

- 효율적인 효소 생산을 위한 균주의 탐색에 대한 연구가 성행하고 있으며, 국내에서도 cellulose나 xylan과 같은 목질계 바이오매스의 분해 효소 생산을 위한 균주의 탐색과 연구가 활발히 이루어지고 있음.
- 현재 국내에서 생산되는 상업적인 바이오매스용 셀룰라아제는 없는 상황이며, 수입되는 셀룰라아제는 바이오매스 당화 연구, 식물 protoplast 제조/연구 등 주로 연구 목적으로 사용되고 있음.
- 고려대학교에서는 *Saccharomycopsis fibuligera* 유래의 beta-glucosidase와 *Clostridium cellulovorans* 유래의 endoglucanase를 효모균에서 동시 발현하는 것을 성공하였으며, 동시에 외래 유전자를 세포 밖으로 배출시키는 것에도 성공하여 당화와 발효를 동시에 진행할 수 있는 시스템 개발에 성공하였음. 이렇게 개발된 균주를 사용하여 50시간 발효를 거쳐 에탄올을 9.15 g/L를 생산할 수 있다고 발표하였음.
- 단국대학교에서는 바실러스 아밀로리퀴파시엔스에서 산성 셀룰라아제를 분리하는데 성공하였고 이 효소는 최적온도가 50~60 °C이고 최적 pH가 4~5임. 이 연구를 통해 산성 셀룰라아제를 분배하는 균주를 사료에 적용하여 난소화성 탄수화물의 이용 효율을 높일 수 있게 되었으며, 또한 새로운 균주는 널리 사용되고 있는 곰팡이 균주보다 생육속도가 빠르므로, 대량생산을 위한 발효공정 적용이 용이할 것으로 보임.
- 한국생명공학연구원에서는 한국 내장산에서 분리한 신규 미생물 정읍피아 내장산에시스에서 셀룰로오스를 유전자를 찾아내었으며, 호열성 세균인 서머스 칼도필러스 GK23 균

주에서 셀룰로오스 분해효소 및 유전자 규명에 성공하였음. 특히 호열성 세균에서 분리한 셀룰라아제는 고온 환경에서 최대의 활성을 나타내어 불용성인 셀룰로오스 기질의 용해도를 극대화할 수 있어 광범위한 응용성이 기대됨.

- 현재 농림수산식품부와 농촌진흥청, 지식경제부 등에서 섬유소 에탄올 생산에 관한 연구를 지원하여 진행하고 있다. 여기에는 주로 섬유소 바이오매스의 생산, 전처리, 섬유소 분해효소 생산 및 당화에 집중되고 있다. 국내에서 섬유질계 기질로부터 에탄올 생산을 위한 산업적 균주 개발에 대한 연구가 부족하며, 산업적 균주 개발이란 실험실적 조건이 아니라 산업적인 환경에서 사용될 수 있는 효소 생산이 부족한 실정이다.
- 국내에서는 그동안 사료효율 향상을 목적으로 cellulase와 xylanase를 분비하는 곰팡이에 대한 연구는 보고되었지만 목질계 섬유소 분해를 위한 효소 생산 기술 개발에는 미미한 실정이다.
- 국내에서 효소당화를 위해 연구하는 균주들은 대부분 *T. reesei*와 같은 외국균주들이며, 국내 자생 균주 다수에 효소 생산 정보는 전무한 상태이다. 그 이유는 우선 국내에서 분리, 동정된 균주들과 그들에 대한 기초 정보가 없기 때문이다. 따라서 국내 자생 균류의 당화 효소에 대한 체계적인 연구가 필요하며, 이를 위해 국내 자생하는 환경 균류에 대한 수집과 분류가 필수적으로 선결되어야함.

2 전처리·당화 기술 연구

- 한국에너지기술연구소에서는 증기폭쇄를 활용한 바이오매스 전처리 기술인 SEDAP(Steam Explosion after Dilute Acid Percolation) 반응기를 이용하여 국내산 초본계인 벼짚의 SEDAP 운전 조건에 따른 헤미셀룰로스와 셀룰로스 수율을 비교하여 운전 조건을 도출함.



그림 2-6. SEDAP 폭쇄기 (한국에너지기술 연구원)

- 최근 섬유질계 바이오매스의 당화 및 발효율 향상을 위해 동시당화발효 기술의 개발이 대두되고 있으며 당화와 함께 생성된 당들은 발효 균주에 의해 소모가 이루어지므로 초기 당저해로 인한 당화 및 에탄올 생산 저해가 적고 값 비싼 당화효소의 효율 향상으로 공정비용이 감소하는 등 다양한 장점을 가지고 있어 섬유질계 에탄올 발효 공정에 더욱 적합한 것으로 사료됨.

제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

1절 연구의 추진체계 및 세부 주제별 목표

1. 본 연구과제의 추진체계

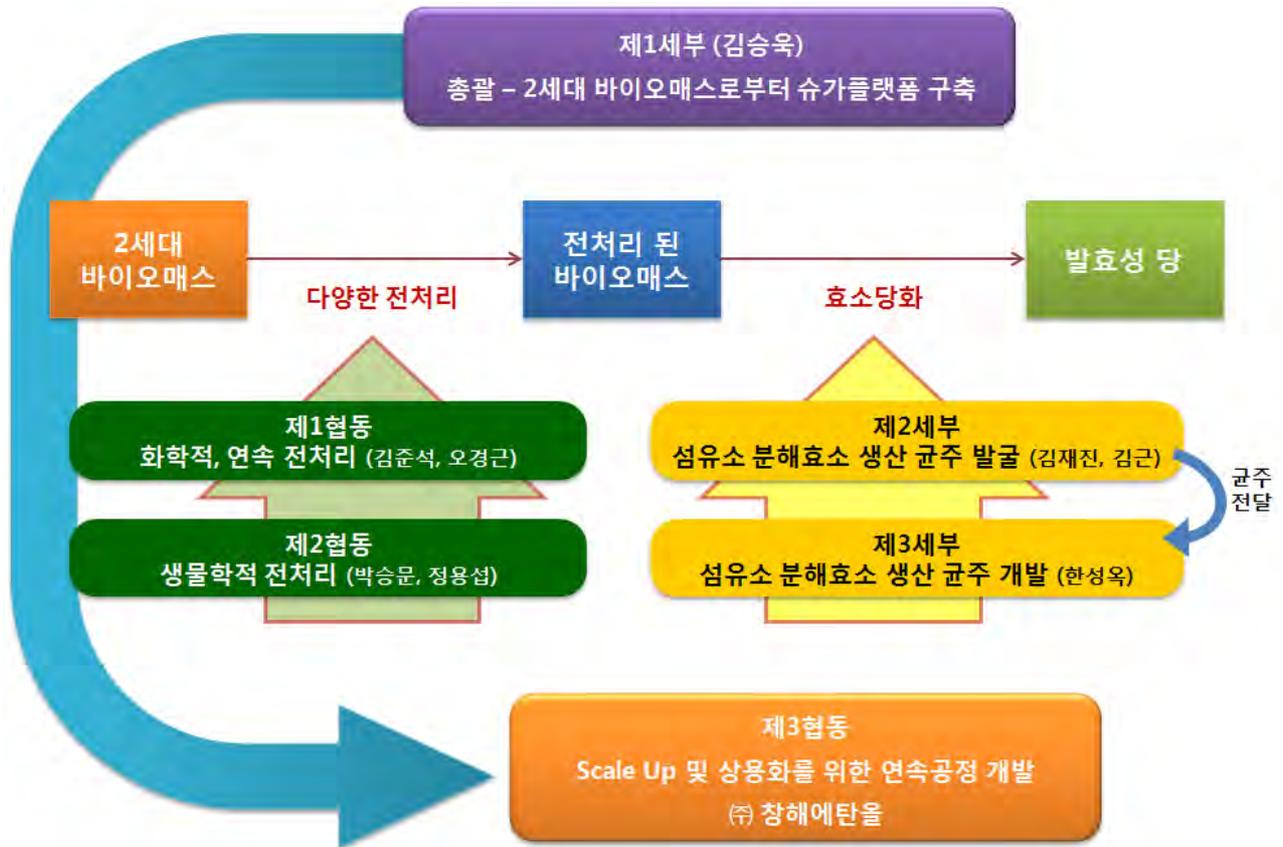


그림 3.1-1. 전체 과제의 연계도

- 본 과제는 농업폐기물 등 비식량자원인 2세대 바이오매스로부터 높은 효율로 발효가능한 당을 회수하는 것이 목표임.
- 핵심기술개발 내용을 크게 분류하면 전처리 기술 개발, 당화 기술 개발 그리고 바이오에탄올 대량생산을 위한 통합공정 시스템 구축으로 구분할 수 있으며, 총 6개 연구기관들이 (고려대학교, 경기대학교, 수원대학교, 단국대학교, 전북대학교, (주)창해에탄올) 각 세부 연구목표를 바탕으로 지난 5년간 기초연구부터 시작품제작까지 연구를 진행하였음.
- 각 연구 기관별 역할과 내용을 간단히 소개하면, 주관 1세부 연구진은 전체 연구를 총괄하였으며, 세부 및 협동 과제의 협력이 원활하게 이루어지도록 조율하는 역할을 수행함. 전략적인 목표인 scale up 및 통합공정이 가능하도록 각 세부연구의 결과들을 개발된 공정에 적용, 검증 및 평가를 수행하였음.

- 2세부 연구는 고려대학교 김재진 교수와 수원대학교 김근 교수 연구진으로 구성되었으며, 고활성 섬유소분해효소를 발굴하기 위해 다양한 환경에서 미생물자원을 수집하는 역할을 수행함. 효소활성이 우수한 균주와 샘플을 주관 1세부, 3세부 및 참여기업 연구소에 제공하여 균주개발과 당화공정에 활용하였으며, 신규 미생물 기탁과 많은 유전자원 (GenBank)을 등록하였고 수집된 미생물 자원들 중 특정 분비 효소를 빠르게 탐색하기 위한 기술을 개발하였음.
- 3세부 연구는 고려대학교 한성욱 교수 연구진으로 구성되었으며, 2세부 연구진에서 발굴된 우수한 미생물 자원을 분양받아 개량하여 보다 활성이 증진된 효소복합체를 개발하는 것이 연구 목표이며, 분석용 마커와 활성이 증진된 당화 발효 균주를 개발하였음.
- 1협동 연구는 경기대학교 김준석 교수와 단국대학교 오경근 교수 연구진으로 구성되었으며, 국내에서 발생하는 다양한 바이오매스의 특성 분석과 이를 활용하기 위한 연속전처리 장비를 개발하여 저비용 대량 전처리 시현 연구 그리고 공정 시뮬레이션을 통한 각 공정의 경제성 분석까지 진행하였음.
- 2협동 연구는 전북대학교 박승문, 정용섭 교수 연구진으로 구성되었으며, 생물학적(효소 반응)으로 리그닌 및 헤미셀룰로스를 제거하기 위해 효소를 탐색 및 선정하였음. 생산 효율을 향상시키기 위해 곰팡이 특정 유전자를 효모에 삽입 및 발현하여 대량 생산 연구를 수행하였고, 주관기관에 효소 및 샘플을 제공하여 바이오매스의 생물학적 전처리 연구를 수행함.
- 3협동 (주)창해에탄올 연구소는 2세대 바이오매스 유래 에탄올생산 상용화를 목표로 전처리, 당화, 발효가 통합된 연속 공정 시스템을 설계하여 시작품을 제작하였음. 지속적인 시 운전을 통해 미흡한 장치를 개조, 개선하여 목표로 한 통합공정 시스템을 구축하였으며, 공정의 scale-up을 위한 기초 자료들을 수집하였음. 또한 공정비를 낮추기 위한 유기용매 회수 장치를 새롭게 개발하여 제작하였음.

2. 본 연구과제의 세부 주제별 목표

1. 바이오매스의 전처리 기술 개발 (주관, 제 1, 2 협동과제)
 - (1) 국내 바이오매스의 종류별 특성 분석 및 선정
 - (2) 바이오매스의 화학적 전처리 기술 개발 및 공정 최적화
 - (3) CTSR (Continuous Twin Screw-driven Reactor)를 이용한 바이오매스 전처리
 - (4) 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해용 효소의 cloning, 발현 및 분리정제, 특성 확인
 - (5) 생물학적 전처리 및 Bioimaging 기술을 활용한 전처리과정의 특성 확인

2. 바이오매스의 당화 기술 개발 (주관, 제 2, 3 세부과제)
 - (1) 고효성 섬유소분해효소 생산 균주 발굴 및 선별
 - (2) 섬유소분해효소 생산 균주의 새로운 탐색기법 개발
 - (3) 선발된 균주의 배양조건 탐색 및 최적화
 - (4) 고효성 신규 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제 복합체 개발
 - (5) 유전자조작에 의한 섬유소분해효소 생산 증진 기술 개발
 - (6) 생산된 효소를 바이오매스 당화에 실제 적용하여 산업효소와 비교 평가

3. 바이오매스의 종류와 특성에 따른 복합처리 공정 개발 (주관과제)
 - (1) 저해인자 제거를 위한 공정 최적화
 - (2) 고효율 저비용 당화공정 확립
 - (3) 바이오매스의 전처리된 효율을 분석하는 새로운 방법의 개발

4. 바이오에탄올 연속 생산을 위한 통합공정 구축 (제 3 협동과제)
 - (1) 선행기술 조사 분석
 - (2) Lab-scale 전처리조건 설정 연구
 - (3) Bench-scale 전처리/당화 모듈 설계 및 제작
 - (4) 연속식 전처리/당화/용매회수 모듈 설계 및 제작
 - (5) 동시 당화발효 모듈 도입 및 통합공정 설비 시운전을 통한 개선
 - (6) 통합공정 가동 및 바이오에탄올 생산

5. 컴퓨터 소프트웨어를 활용한 공정모사 및 경제성 평가 (제 1 협동과제)
 - (1) 다양한 화학용매 적용을 통한 전처리 공정
 - (2) NaOH 재순환 연속 전처리 (twin extrusion)공정

2절 바이오매스의 전처리 기술 개발

1. 국내 바이오매스의 종류별 특성 분석 및 선정

가. 바이오매스 성분 분석

- 바이오매스의 구성 성분의 분석을 위하여 미국 NREL 기준 분석방법을 기준으로 글루코스, 자일로오스(헤미 셀룰로오스), 리그닌, 회분 및 기타 추출물의 분석 방법을 확립하였음. 기존의 바이오매스(목질계/섬유소계)의 분석의 경우 단순히 열분해를 통하여 전체 바이오매스의 구성 원소별 분석을 제시함으로써, 최종 전환 산물의 가능한 당화 범위 및 물질 수지 확립이 불가능하였으나, NREL의 분석법을 적용할 경우, 본 연구에서 확보하고자 하는 성분의 체계적인 분석이 가능 하였음. 본 연구에서 확립된 분석 방법은 최종 및 기술 단계별 수준 지표를 제시할 수 있으며, 각 공정 단계별로 물질 수지를 제공할 수 있는 중요한 핵심 기술임. 또한, 이 분석 방법을 적용할 경우, 초기 바이오매스 및 전처리 후의 바이오매스의 구성 성분을 확인할 수 있을 뿐 아니라, 각 전처리 단계에서 파생되는 고/액상의 구성 성분을 확인할 수 있음.
- NREL(National Renewable Energy Laboratory Standard Method)의 바이오매스 구성 성분 분석 흐름도를 그림 3.2-1에 나타내었고, 방법을 이하에서 설명하겠음.

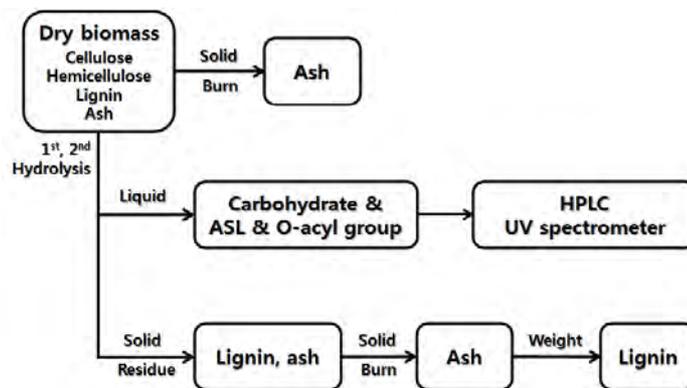


그림 3.2-1. NREL 바이오매스의 구성 성분 분석

(1) Carbohydrate analysis

- 당은 바이오매스를 이용한 화학물질 생산에 있어 매우 중요한 요소로서 당 함유량이 높을수록 바이오매스를 이용한 화학물질 생산에 있어서 유리함. 당 분석은 기본적으로 美 에너지 재생에너지 연구소의 “NREL Lap Procedure 002 - Determination of Carbohydrates”를 기준으로 분석 방법을 확립하여 수행하였음 (그림 3.2-2). 분석을 반복적으로 실시하여 각 바이오매스의 당 성분을 정확하게 파악하였음. 당 분석에는 High Performance Liquid Chromatography (Waters, 1525 HPLC Pumps)를 이용하였고, dual γ wavelength absorbance detector (Waters 2487)와 differential refractometer detector (Waters 410) 검출기를 사용하였음. 검출된 당 정량을 통해 섬유질계 구성 성분을 역산하였음. NREL 당 분석법을 본 연구 목적에 맞게 수정하여 분석을 수행했으며 분석방법은 아래에 나타내었음.

- ① Test tube에 시료를 0.3 ± 0.0005 g 가량 넣는다.

- ② H₂SO₄ (72%)를 3 ml씩 각각 넣는다.
 - ③ 시료와 H₂SO₄ (72%)를 넣은 test tube를 2시간 동안 30 °C에서 반응시킨다.
 - ④ 반응시킨 Test tube의 시료에 증류수를 84 ml 첨가하여 Vial에 넣는다. 또 다른 Vial에 증류수를 87 ml를 넣고 무게를 잰다.
 - ⑤ Vial을 121 °C에서 1시간 동안 Autoclave한다. 총 반응시간은 2시간 30분이다.
 - ⑥ Vial을 상온으로 식히고 물 87 ml를 첨가한 Vial의 무게를 잰다.
 - ⑦ Vial의 시료를 Test tube에 4 ml을 취해서 CaCO₃로 중화시킨다. 거품이 생기지 않을 때까지 넣어주고 상등액을 pH paper에 찍어 pH 7~8로 중화한다.
 - ⑧ 상등액을 취해 원심분리기 (15분 15,000 rpm)에 넣어 원심 분리한다. (2회)
 - ⑨ 원심분리가 된 상등액을 취해 HPLC를 이용 당 분석을 한다.
- (Column: Aminex HPX-87P, 이동상: 5 mM H₂SO₄, Flow rate: 0.6 ml/min, Temperature : 85 °C)



그림 3.2-2. NREL Carbohydrate analysis

$$\%Sugar = \frac{C_{corr} \times \frac{1g}{1000mg} \times V_F}{W_1 \times \frac{T_{as\ received}}{T_{pre}}} \times 100\% = \frac{C_{corr} \times \frac{1g}{1000mg} \times V_F}{W_1 \times \frac{T_{final}}{100\%}} \times 100\%$$

Where:

W_1 = initial weight of sample, in grams

V_F = volume of filtrate, 87.0 mL

C_{corr} = concentration of sugar in hydrolyzed sample corrected for loss on hydrolysis, is determined in previous step, in mg/mL

$\%T_{as\ received}$ = % total solids content of the original sample (prior to any preparation steps) on a 105 °C dry weight basis, as determined by the LAP-001

$\%T_{pre}$ = % total solids content of the sample as determined during the preparation of the sample for analysis (by lyophilization, oven-drying, or air drying)

$\%T_{final}$ = % total solids content of the prepared sample used in this carbohydrate analysis, on a 105 °C dry weight basis, as determined by the LAP-001

Note: If the sample used in the analysis required no preparation (analyzed as received), then $\%T_{pre} = 100\%$ and $\%T_{final} = \%T_{as\ received}$.

(2) Lignin analysis

□ 효소 당화 과정과 약산 및 열수용액의 가수분해에 있어 리그닌은 효소를 포함한 촉매반응의 활성을 방해하는 성분이기 때문에 본래 함량이 낮은 바이오매스를 선정하거나 전처리 과정을 통해 제거되어야 하는 성분임. 리그닌 분석은 기본적으로 美 에너지 재생에너지 연구소의 “NREL Lap procedure 003 & 004 - Determination of Lignin” (1996)를 기준으로 분석 방법을 확립하여 수행하였음. 분석은 반복적으로 실시하여 각 바이오매스의 리그닌 성분을 역산하여 정확하게 파악하였음. 리그닌은 크게 acid-insoluble lignin(AIL)과 acid-soluble lignin(ASL)으로 나누어지고, 이중 acid-insoluble lignin은 procedures 중 summative 분석법으로 리그닌을 분석하였음. NREL 리그닌 분석법을 본 연구 목적에 맞게 수정하여 분석을 수행했으며, 분석방법을 아래와 나타내었음.

- ① Test tube에 시료를 0.3±0.0005 g 가량 넣는다.
- ② H₂SO₄ (72%)를 3 ml씩 각각 넣는다.
- ③ 시료와 H₂SO₄ (72%)를 넣은 test tube를 2시간 동안 30 °C에서 반응시킨다.
- ④ 반응시킨 Test tube의 시료에 증류수를 84 ml 첨가하여 Vial에 넣는다. 또 다른 Vial에 증류수를 87 ml를 넣고 무게를 잰다.
- ⑤ Vial을 121 °C에서 1시간 동안 Autoclave한다. 총 반응시간은 2시간 30분이다.
- ⑥ Vial을 상온으로 식히고 물 87 ml를 첨가한 Vial의 무게를 잰다.
- ⑦ Vial의 시료를 Test tube에 4 ml을 취해서 CaCO₃로 중화시킨다. 거품이 생기지 않을 때까지 넣어주고 상등액을 pH paper에 찍어 pH 7~8로 중화 한다.
- ⑧ 상등액을 취해 원심분리기(15분 15,000 rpm)에 넣어 원심 분리한다. (2회 반복).
- ⑨ 가열 후 여과한다. (Whatman No. 1)

- ⑩ Filter paper를 포함한 여과물을 105 °C 오븐에서 2시간 동안 건조한다.
- ⑪ 도가니의 무게를 W1으로 하고 도가니 안에 건조물을 넣고 도가니의 무게를 재서 W2로 기록한다.
- ⑫ 도가니를 575±25 °C 의 화로에 넣고 발화한다.
- ⑬ 발화 후 상온으로 냉각 후 도가니만의 무게를 재서 W3로 기록한다.

$$\%acid-insoluble\ lignin = \frac{W_2 - W_3}{W_1 \times \frac{T_{final}}{100}} \times 100\%$$

Where:

W₁= initial sample weight.

W₂ = weight of crucible, acid-insoluble lignin, and acid-insoluble ash.

W₃ = weight of crucible and acid-insoluble ash.

T_{final} = % total solids content of the prepared sample used in this lignin analysis, on a 105 °C dry weight basis, as determined by the LAP-001.

(3) Ash analysis

□ 기본적으로 美 에너지 재생에너지 연구소의 “NREL Lap procedure 005 - Determination of Ash” (1996)를 기준으로 분석 방법을 확립하여 수행하였다. 분석은 반복적으로 실시하여 각 기질의 회분 성분을 역산하여 정확하게 파악하였다. 회분 분석은 유기물을 모두 발화시키고 남은 무기물 즉 재의 무게를 측정하여 분석하였다.

- ① 빈 도가니에 표시를 하여 575±25 °C에서 2시간 동안 가열시킨 후 다시 한 시간 동안 가열 시킨다.
- ② 데시케이터에 넣어 상온으로 냉각시켜 0.1 mg 의 오차 범위로 이 용기의 중량을 재어 기록한다. (이전 도가니의 무게와의 오차가 0.3 mg 이하까지 반복한다.)
- ③ 0.5 or 1.0±0.0005 g 의 준비된 샘플을 2의 도가니에 넣고 무게를 잰다. (샘플을 포함한 용기의 무게 - 용기의 무게 = W1)
- ④ 단열된 화로 안에 내용물과 용기를 넣고 575±25 °C에서 최소 3시간 또는 모든 탄소가 없어질 때까지 가열 한다.
- ⑤ 데시케이터에 넣어 상온으로 냉각시켜 0.1 mg 의 오차범위로 이 용기의 중량을 재어 기록한다. (한 시간 동안 냉각된 도가니 무게와의 오차가 0.3 mg 이하까지 냉각 후 중량을 잰다.)

$$Ash\% = \frac{W_1}{W_2 \times \frac{T}{100}} \times 100$$

Where:

W₁ = weight of ash,

W₂ = initial weight of sample, and

T = percent total solids of sample, on a 105 °C oven-dried weight basis

나. 국내 바이오매스의 구성 성분 분석

(1) 국내 농업 부산물들의 성분 분석

- 우리나라에서 발생하는 다양한 농업 부산물과 폐기성 바이오매스들을 확보해오고 있으며, 그 구성성분을 분석하여 그림 3.2-3과 같이 데이터베이스를 구축하고 있음. 우리 농가의 부가 소득을 위하여, 국내 불용성 농업폐기물의 현황 조사와 활용에 대한 연구가 추가적으로 필요함.
- 본 연구진이 성분 분석한 바이오매스는 보리짚, 벃짚, 유채대, 옥수수대, 옥수수 깎대기로 5종류의 농업 부산물과 억새대, 장미줄기, 장미잎, 플라타너스잎, 바나나껍질, 홍조류, 한약재 찌꺼기 등 7종류의 기타 폐기성 바이오매스가 있음.
- 1~3차년도 연구에서는 국내에서 발생하는 보리짚과 벃짚을 주로 이용하여 전처리에 대한 연구를 수행하였고, 4차년 이후 억새의 활용에 대하여 연구를 진행하였음.
- 최근 문헌에 따르면(2004~2008년 평균 곡물 총 생산량 기준) 국내 농업 부산물에서 발생하는 바이오매스량은 연간 약 11,600 천톤으로 추정되고 있으며, 이중 벃짚은 약 6,507 천톤, 왕겨 약 1,140 천톤으로 농업부분 중 75%를 차지하고 있음. 하지만 억새, 갈대 등 비식량 자원의 경우 자원조사가 이루어지지 않고 있어 잠재발생량의 산출에 어려움이 있음. 농업 부산물만 에너지원 활용에 고려하게 되면 계절에 따른 발생특성 때문에 바이오매스의 연중 안정된 수급이 어려울 것으로 사료됨. 따라서 활용 가능한 다양한 자원들의 조사와 확보, 연구가 지속적으로 이루어져 이용체계 확립에 박차를 가해야 함. (참고문헌: 농업부문 바이오매스 자원 환산계수 및 잠재발생량 산정 (2011), KJEA, 30(3), 252-260)

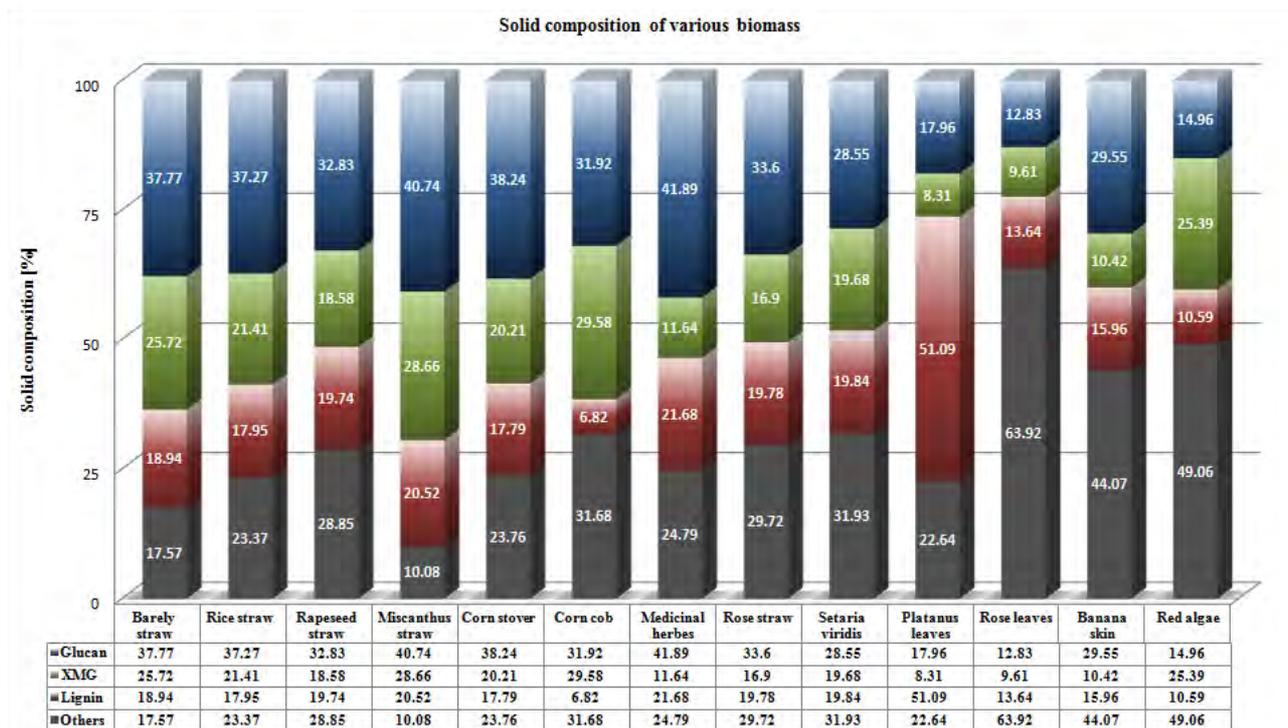
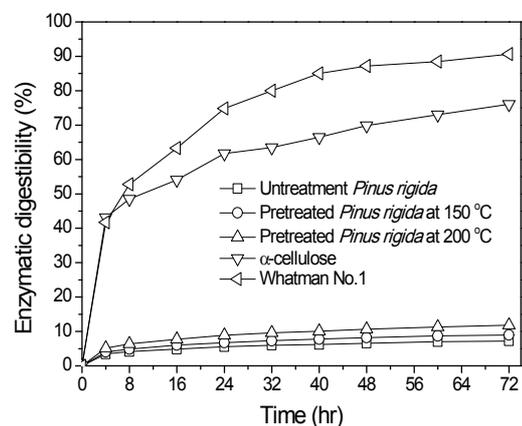
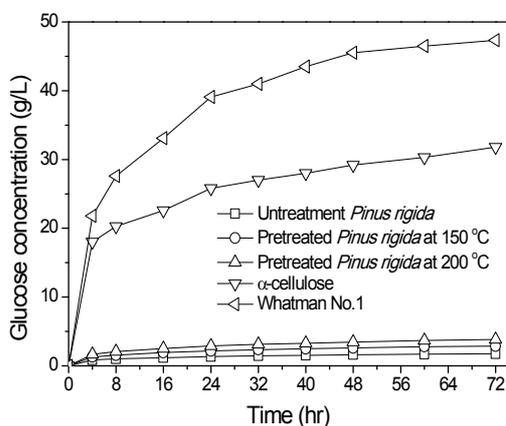


그림 3.2-3. 다양한 바이오매스들의 구성성분 조사

(2) 국내 대표적 수목자원의 활용성 평가

- 리기다소나무는 1911년 일제강점기 때 황폐지 복구를 위해 도입되었는데, 1960년대 본격적으로 산림녹화정책이 추진되면서 전국에 심어졌음. 그러나 리기다소나무는 조경용으로나 경제수종으로나 가치가 매우 떨어지고 실제로 사용이 적절하지 않는 수종이며, 우리나라 토양과 맞지 않아 성장이 둔화되면서 더 이상 산림증식에 도움을 주지 못하고 자원으로 이용가치마저 낮아져 다른 나무로 교체되는 수종갱신 대상이기도 함. 이러한 리기다소나무를 지속적으로 특징을 잘 살려서 활용방안 등을 강구하고 있는 실정임.
- 초본계 및 농업부산물을 이용한 바이오에탄올 생산을 위한 전처리 공정은 침지공정과 같은 저에너지 공정의 적용으로 효율적인 발효성 당을 생산 할 수 있음. 그러나 리기다와 같은 소프트우드계열의 목질계 바이오매스는 이러한 염기 침지 전처리 공정의 적용이 불가능 함. 목질계 바이오매스의 효율적인 전처리 공정은 증기 폭쇄, 유기성 용매 등을 적용한 고에너지 요구 방법이 적용되어야 할 필요성을 확인함.
- 따라서 저에너지 침지 공정에서 효소 당화의 효과가 없는 바이오매스에 대하여 흐름형 침출 공정(flow-through reactor)을 적용하여 수행하였음. 흐름형 침출 반응기에 암모니아수로 반응을 유도하여 효소 당화 저해 성분을 분별 시키고자 하였는데, 전처리 공정은 침출 반응기내에 암모니아수를 흘려 바이오매스로부터 리그닌을 제거하는 공정으로 잔류되는 고체상으로 셀룰로오스 성분을 회수하는 방법으로 분리하여 수행됨. 생산되는 잔류고체의 경우 리그닌이 제거된 형태로 저해요소를 제거하여 효소 당화를 수행하여 그 결과로 효소 당화 효과를 비교하여 볼 수 있음. 흐름형 침출 반응기를 이용하여 바이오매스를 반응기내에 투입하고 원하는 반응온도까지 온도를 조절하는 동시에 질소 가스를 이용하여 용매투입용 펌프 이후부터 전 공정에 일정한 back pressure를 유도하여 고온 반응기내에는 용매와 바이오매스 사이에 항상 고-액 반응을 유지할 수 있도록 함. 흐름형 침출 전처리의 온도 조건은 흐름형 침출 전처리 장치에서 용매가 반응기로 흐를 때 액상으로 유지하며 바이오매스와 반응을 할 수 있는 온도 범위인 200 °C와 침출 전처리에서 상대적으로 낮은 온도인 150 °C로 설정하였음. 그리고 용매는 5 mL/min의 용매 유속으로 반응기로 흘려 40분 동안 반응이 수행됨. 전처리 용매는 15%(w/w) 암모니아수가 사용되었음. 그리고 암모니아수에 의한 전처리는 용매 펌프를 이용하여 암모니아수를 일정 시간 동안 공급하여 반응기내에 투입된 바이오매스로부터 리그닌을 침출시켜 반응기 밖의 저장조로 제거시킴.



- 일정시간 반응 시킨 후 반응기내에 잔류되는 고체상을 회수하여 성분을 분석하였음. 리기다소나무를 채운 침출 반응기에 용매를 40분 동안 반응기내로 침출시켜 전처리한 후 그 효과를 확인하기 위해 효소 당화를 수행함. 리기다소나무의 전처리 전과 후의 효소 당화율과 글루코오스 농도는 위의 그림에 나타내었음. 침출 전처리 공정을 거친 리기다소나무는 150 °C와 200 °C의 온도 모두 10%에 못 미치는 효소 당화율을 보임. 이때의 글루코오스 생산 농도는 5 g/L을 넘지 못함. 따라서 리기다소나무와 같은 소프트우드계 열 바이오매스는 침출 전처리 공정에서도 침지 전처리 공정과 유사한 결과를 나타나는 것을 확인함. 200 °C의 고온에서의 침출 전처리 공정은 저에너지의 침지 전처리 공정과 마찬가지로 리기다소나무의 치밀한 구조를 효소 당화에 유리한 표면적이 큰 구조로 전환시키는 데에는 무리가 있다고 최종 결론을 내림.
- 따라서 국내 대표적으로 많은 양의 수목자원인 리기다소나무에 대해 활용을 고려하였지만, 기대이하의 결과를 보여 본 연구과제에 대한 대상 바이오매스에서 제외하였음.

2. 바이오매스의 화학적 전처리 기술 개발 및 공정 최적화

가. 화학적 전처리의 종류와 특징

- 목질계 바이오에탄올 기술 선진국의 바이오매스 전처리에 관한 연구는 산 또는 염기 용매를 이용한 화학적 전처리 공정에 관한 연구가 많이 진행되어 왔음. 목질계 바이오매스는 당 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 폐놀계 고분자인 리그닌으로 구성되어 있어 에탄올로 전환하기 위해서는 가용 원료인 당 성분을 분리하는 전처리 공정이 우선적으로 적용되어야 함. 이러한 성분별 분리를 위해서는 pH 차이에 따른 성분별 분리 방법이 가장 널리 이용되고 있음. 암모니아, 수산화나트륨 등 염기 용매를 전처리 과정에 사용할 경우 pH가 높은 조건이 되며 결과적으로 염기에 용해되는 리그닌의 선택적 분리에 의해 당 성분이 남게 되어 효소 당화에 의해 에탄올 생산이 가능함. pH가 중성인 고온 열수 전처리에서는 열에 약한 헤미셀룰로오스 성분이 비교적 용해되어 선택적으로 분리가 가능함. 약산을 적용하는 낮은 pH 영역에서는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스의 용해에 의한 선택적 분리가 가능함. 이러한 목질계 바이오매스 구성 성분의 물성 차이에 의해 성분 분리를 하게 됨.
- 산에 의한 전처리 공정은 약산에 의한 전 가수분해(prehydrolysis)가 많이 연구되었는데, 이 공정은 헤미셀룰로오스를 효과적으로 제거하고 분해된 헤미셀룰로오스 구성당의 회수율도 높을 뿐만 아니라 셀룰로오스의 당화 수율도 크게 증가시켜주는 효과적인 전처리 방법이지만 산의 사용으로 인한 경제적, 환경적인 문제의 해결이 수반되어야 함. 알칼리를 이용한 전처리로는 당화 저해 물질로 알려진 리그닌 제거를 목적으로 주로 수산화나트륨을 이용한 연구가 많이 진행되었다. 수산화나트륨을 이용한 전처리는 우수한 탈 리그닌 효과를 보여주었지만 비싼 가격과 회수가 어렵다는 경제적인 문제점들이 보고되었고, 이를 보완하기 위해 수산화칼슘 등을 이용하는 연구가 진행되었으나 만족할 만한 성과를 거두지는 못하였음.
- 산에 의한 전처리 공정 연구도 많이 진행되어 고온에서 약산을 이용한 전가수분해가 헤미셀룰로오스를 효과적으로 분해하여 셀룰로오스 당화 수율을 크게 증가시켜주고 분해된

헤미셀룰로오스의 회수를 통해 당회수율을 극대화할 수 있는 효과적인 방법이라는 결과를 얻었지만, 산의 사용으로 인한 장치 부식을 방지할 수 있는 고비용의 설비, 중화 공정 추가에 따른 비용 증가, 효소에 의한 당화 속도 저하 등으로 인한 경제적인 문제점과 산을 사용함으로써 발생하는 환경적인 문제점이 보고되었음. 기술 선진국에서는 바이오매스에 대한 다양한 물리, 화학적 전처리 방법에 관한 연구가 진행되었고, 상당량의 연구 결과를 축적하였음. 하지만 대상 바이오매스가 대부분 옥수수대와 같은 리그닌 함량이 낮은 바이오매스를 대상으로 진행되어 리그닌 함량이 높은 목질 바이오매스의 전처리를 위한 최적 공정 개발에는 미치지 못하고 있으며, 화학적 전처리 공정이 목질 바이오매스에 미치는 명확한 반응 기작의 구명 역시 이루어지지 않고 있다는 단점을 갖고 있음.

(1) 진한 산에 의한 당화공정

□ 산(acid)을 이용한 가수분해 분해 공정은 효소를 이용한 효소 당화 공정에 비해 반응 시간이 짧고, 높은 당화 수율을 확보할 수 있으나 이러한 산 당화 공정은 효율적인 공정 조건을 확보 하지 못할 경우, 생성된 글루코오스를 분해시키는 문제점을 지니고 있어, 산 농도 및 반응 온도 그리고, 반응 시스템에 따른 공정 변수의 최적화가 필수적임. Arkenol Co.는 다양한 화학물질과 운송연료를 생산할 수 있는 바이오 리파이너리의 건설과 조업 등을 주 사업으로 세계 전역에서 수행하고 있는 미국 내 회사로, California에서는 상업적 규모의 바이오 리파이너리에서 진한 황산(Conc. H2SO4)에 의한 가수분해를 이용하여, 현재 연간 4백만 gallon의 에탄올을 생산할 수 있는 공정을 확보하고 있음. 그러나 이러한 시스템은 결국 높은 농도의 산을 이용 하여야 하는 문제점을 지니고 있으며, 생성된 당화액내에 에탄올 발효 공정에 저해 작용을 유발하는 독성 물질의 한계점을 극복하여야 함. 결국 산 가수분해를 이용한 당화 공정은 주요 섬유소 구성 성분을 효율적으로 환원당으로 전환시키면서, 높은 농도의 당화액을 생성할 수 있는 공정 조건의 최적화가 필수적임.

(2) 묽은 산에 의한 전처리

□ 묽은 황산에 의한 바이오매스의 처리는 널리 섬유소계 물질의 전처리와 가수분해에 사용됨. 140 ~ 190 °C에서 묽은 산(0.5 ~ 1.0% 황산)에 의한 전처리는 헤미셀룰로오스를 효과적으로 제거하고 분해된 헤미셀룰로오스 구성당의 회수율도 높을 뿐만 아니라 셀룰로오스의 당화 수율도 크게 증가시켜주는 효과적인 전처리 방법임. 캐나다의 Iogen Co.는 이러한 약산 전처리 공정을 이용하여 에탄올을 생산하는 상용화 설비를 구축하였음. 전처리에 가장 큰 저해물질로 생각되고 있는 리그닌의 분해 정도는 작지만 헤미셀룰로오스의 효과적인 제거를 통해 유효 기공을 확장하고 이는 효소의 접근성을 증가시켜주게 됨. 연속반응기에서 수행할 때 산 처리는 상대적으로 짧은 체류 시간을 요구함. 묽은 황산 전처리는 부분적으로 헤미셀룰로오스의 분해를 통해 섬유소의 내부 표면적을 확대시키며, 리그닌도 전처리 전의 온전한 상태가 아닌 상당부분 분해가 이루어져 효소의 접근성은 더욱 크게 증가하게 되고 셀룰로오스의 효소 소화가 좀 더 용이하게 만들고 결정성을 감소시킴. 묽은 황산 전처리의 장점으로는 높은 반응속도, 낮은 산 소비 그리고 상대적으로 낮은 황산 비용을 들 수 있음.

(3) 암모니아를 이용한 전처리

- 암모니아를 폭쇄 처리 공정의 촉매로 적용하는 AFEX 방법은 전처리를 하지 않은 바이오매스의 효소당화 공정보다 적은 양의 효소를 적용하고도 이론적으로 가능한 최적 당화 수율에 도달할 수 있다고 보고됨. 암모니아 순환 침출 공정의 경우 탈리그닌화에 의한 전처리 효과를 얻으면서도 전처리 용매로 사용되는 암모니아를 회수, 재사용함으로써 경제적인 문제점도 해결할 수 있는 장점을 갖고 있다고 보고됨. 암모니아 침지법의 경우 상온에서 탈리그닌화 반응을 진행할 수 있다는 장점을 갖고 있었지만, 반응 시간이 지나치게 길어지게 되고 5탄당과 6탄당이 모두 잔존하게 되어 동시에 당화 발효하는 공정을 필요로 함. 암모니아수는 전처리 시약으로 바람직한 특성을 가지고 있는데 그것은 목질계 재료에 대해 효과적인 팽윤 시약이며 탄수화물과 리그닌과의 반응에 높은 선택도를 가지고 있고, 높은 휘발성으로 쉽게 회수 가능하여 재사용할 수 있음. 섬유소계 바이오매스의 주요 성분인 리그닌과 그 부산물은 미생물에 독성물질로 작용하며 효소당화에 저해물질로 작용함. 바이오에탄올 생산을 위한 미생물 활동과 효소 당화효율을 향상시키기 위해서는 리그닌의 함유량을 낮춰야 하는데, 전처리 시약으로서 암모니아수는 바이오매스의 팽윤에 뿐만 아니라 효과적인 탈 리그닌에 대해 많은 장점을 가지고 있음. 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실도 최소화할 수 있음.

(4) 2단 복합 전처리

- 바이오매스의 전처리는 당화와 발효에 저해되는 성분을 분별하기 위한 공정임. 이러한 바이오매스의 전처리 효율을 높이고 두 가지 이상의 특정 성분을 액상으로 분별하기 위한 공정으로 2단 전처리 공정을 수행함. 특정 용매와의 작용으로 고체상에서 액상으로 분별이 되며, 분별된 고체상이 빠져나가면서 바이오매스는 팽윤이 되고 이는 효소와 반응하는 셀룰로오스의 표면적을 넓히는 역할을 하게 됨. 예를 들면, 2단 전처리 공정은 첫 번째 공정으로 염기 용매를 흘려서 리그닌을 제거하고 두 번째 공정으로 산 용매를 흘려서 헤미셀룰로오스를 분별하는 공정으로 구성되거나 반대의 순서로 용매를 흘려서 각각 용매와의 효율적인 반응을 유도하기도 함. 그리고 효소 당화에 바로 적용하기 위한 염기와 산 용매를 연속으로 적절한 농도로 흘려주면서 최종 전처리 바이오매스의 효소 당화에 적절한 pH 값을 유도 할 수 있는 장점이 있음.

나. 주요 전처리 공정

(1) 전처리 공정 비교

- 기존 여러 전처리 방법 중에서 적용 가능성이 가장 높으며, 선행 연구를 통하여 입증된 암모니아 용액을 이용한 화학적 전처리 방법인 암모니아 침지공정 (SAA; Soaking in Aqueous Ammonia)과 암모니아 침출 공정 (ARP; Ammonia recycle percolation), 암모니아와 산을 이용한 화학적 복합공정인 2단 전처리 공정 (AA; ammonia-acid percolation)을 선정된 바이오매스에 적용하기 위해 각각의 전처리 최적 조건에 대해 탐색하기 전 각 공정의 특징 및 효과에 대해 검토해 보았음.

(가) 암모니아 침지 (SAA)

- 암모니아 침지공정은 암모니아를 이용하여 일정한 Solid/Liquid ratio (S/L ratio), 온도, 시간, RPM을 유지하며 바이오매스를 암모니아에 담가두는 방법임. 일반적인 조건은 S/L ratio 1:10, 암모니아 15 %, 24 hr, 60 °C에서 180 rpm 반응시키며 이는 바이오매스에 따라 달라질 수 있음. 암모니아 침지 공정은 이와 같이 낮은 공정조건에서 리그닌을 선택적으로 제거 할 수 있다는 장점을 가지고 있으나 반응시간이 길고 연속 공정이 어려운 단점이 있는 가장 보편적인 전처리 방법임

(나) 암모니아 침출 (ARP)

- 암모니아 침출 공정은 일정한 반응기 안에 바이오매스를 넣어두고 암모니아를 고온, 고압의 조건에서 일정한 유속으로 흘려주어 높은 온도에서 짧은 시간동안 리그닌을 선택적으로 침출 해내는 전처리 방법임. 침출 반응기는 염기 또는 산 용액을 사용하므로 반응기 및 모든 연결부위를 Sus 재질로 제작하여 부식으로 인한 문제를 예방하였음. 일반적인 암모니아 침출 반응조건은 S/L ratio 1:10, 150 °C, 40 min으로 반응시키며 바이오매스에 따라 달라질 수 있음. 이와 같이 침출공정은 침지공정에 비해 높은 공정조건에서 수행되며 hemicellulose의 손실이 많다는 단점은 있지만 사용된 암모니아의 회수가 용이하고 짧은 반응시간 안에 선택적으로 높은 리그닌 제거율을 나타내는 장점을 가지고 있는 전처리 방법임.

(다) 2단 전처리 공정 (AA)

- 약산 침출공정은 리그닌의 제거보다 hemicellulose를 선택적으로 침출시켜 당화공정에 있어서는 효소의 활성자리를 확보 할 수 있으며 선택적인 hemicellulose의 이용이 가능하다는 장점을 가지고 있음. 반면 리그닌을 제거하는 전처리보다 cellulose의 당 전환율이 낮다는 단점을 가지고 있음. 마지막으로 복합공정인 2단 전처리는 암모니아를 이용한 선택적인 리그닌 제거 과정을 거친 후 산을 이용한 hemicellulose의 침출과정을 거치는 알카리 전처리와 산 전처리의 장점을 복합시킨 전처리 방법임. 하지만 알카리 전처리 후 산 전처리를 하는 과정에 있어 적절한 pH zone을 설정해야하는 단점이 있음.

(2) 공정별 전처리 효율 비교

- 앞서 언급한 바와 같이 리그닌 제거는 효소 당화에 있어 매우 중요한 과정으로 리그닌 제거로 인해 효소의 활성 자리를 확보 할 수 있으며, 이는 곧 당화율에 영향을 준다는 것을 알 수 있음. 그러므로 리그닌 제거율을 파악하는 것이 매우 중요하며 이는 고체성분 분석을 통해 파악 할 수 있음. 다음 표 3.2-1은 각 바이오매스의 전처리 공정들을 거친 후 고체 성분 분석을 하여 cellulose, hemicellulose 및 lignin의 함량을 구하였고, 이로부터 바이오매스의 적절한 전처리 방법을 탐색해 보았음.

표 3.2-1 최적화 조건을 적용한 전처리 후 바이오매스의 성분 분석

	Untreatment				Soaking				Ammonia Percolation				Ammonia/acid Percolation			
	리기다	EFB	역새	벚짚	리기다	EFB	역새	벚짚	리기다	EFB	역새	벚짚	리기다	EFB	역새	벚짚
Cellulose [%]	43.05	20.84	39.80	39.88	39.23	17.96	39.20	39.56	40.90	22.46	38.82	39.09	38.90	19.45	38.65	38.90
Hemi-cellulose [%]	24.99	21.96	31.52	23.77	5.21	14.7	21.23	9.53	4.97	14.32	10.81	7.54	2.15	9.23	5.04	5.04
Lignin [%]	28.66	34.21	20.35	12.97	23.4	16.01	7.40	5.42	21.64	7.49	3.86	3.47	19.54	6.45	3.14	3.14
Others [%]	3.30	22.99	8.33	23.38	16.26	10.08	2.72	10.94	12.74	1.18	4.45	11.35	14.86	8.12	0.92	0.92
Total [%]	100	100	100	100	84.1	58.75	70.55	65.45	80.25	45.45	57.94	61.45	75.45	43.25	55.26	48.00

(가) 암모니아 침지

□ 전처리 공정에 따른 기질 별 성분 분석 결과를 바탕으로 전처리 별 기질의 타당성을 살펴 볼 때 암모니아 침지공정에 의한 벚짚의 cellulose 잔존율은 99.2%, hemicellulose 잔존율은 32.0%, lignin 제거율은 58.2%로 나타났으며 역새는 cellulose 잔존율이 98.5%, hemicellulose 잔존율은 61.4%, lignin 제거율은 63.6%로 두 바이오매스 모두 높은 cellulose 잔존율과 lignin 제거율과 나타내었고 hemicellulose 잔존율은 벚짚이 역새보다 많이 감소하는 것을 볼 수 있음. 이로서 역새가 벚짚보다 간접적으로 효소당화를 통한 당 생산에 있어 유리 할 것으로 보이며 EFB는 cellulose 잔존율이 86.2% 이며, hemicellulose 잔존율은 66.94%이고 lignin 제거율은 53.2%를 나타내어 벚짚과 역새에 비해 cellulose와 lignin 제거율에 있어 다소 떨어지지만 hemicellulose 잔존율은 높은 것으로 나타났음. 이로서 EFB 또한 벚짚, 역새와 더불어 효소당화를 통한 당 생산에 있어 유리한 바이오매스로 생각된다. 마지막으로 리기다는 cellulose 잔존율이 91.1%, hemicellulose의 잔존율은 20.8%, lignin 제거율은 18.4%를 나타내어 다른 바이오매스에 비해 비교적 낮은 cellulose 잔존율, hemicellulose 잔존율과 lignin 제거율을 나타내었음. 이는 초본 계열의 벚짚과 역새가 목본류인 리기다에 비해 좀더 soft 한 구조를 지니고 있어 낮은 조건의 전처리 공정인 암모니아 침지공정에 있어서도 lignin 제거에 유리한 것으로 보임.

표 3.2-2 기질 별 SAA 후 당 및 lignin 잔존율

	SAA			
	리기다	EFB	역새	벚짚
Cellulose 잔존율 (%)	91.12	86.62	98.49	99.19
Hemi-cellulose 잔존율 (%)	20.48	66.93	67.35	40.09
Lignin 잔존율 (%)	18.36	53.21	63.64	58.22

(나) 암모니아 침출

□ 암모니아 침출공정에서 벚짚의 cellulose 잔존율은 98.0%, hemicellulose 잔존율은 31.7%, lignin 제거율은 73.3%로 나타났으며 억새는 cellulose 잔존율이 97.5%, hemicellulose 잔존율은 34.3%, Lignin 제거율은 81.0%로 높은 cellulose 잔존율과 lignin 제거율과 나타났고 hemicellulose 잔존율은 많이 감소하였음. 이는 낮은 온도에서도 침출이 잘 이루어지는 hemicellulose가 고온 조건인 암모니아 침출 공정에서 보다 많이 침출 되지만 암모니아 침출 공정으로 침출되어진 hemicellulose를 효과적으로 이용 할 수 없다는 단점이 있음. EFB는 cellulose 잔존율이 100%이며 hemicellulose 잔존율은 65.2%이고 lignin 제거율은 78.1%를 나타내어 벚짚과 억새에 비해 lignin 제거율에 있어 다소 떨어지지만 EFB 또한 다소 높은 lignin 제거율을 보이고 있으며 hemicellulose 잔존율은 침지 공정보다는 다소 감소하였지만 벚짚과 억새에 비해서는 잔존율이 높다는 장점을 지니고 있음. 마지막으로 리기다는 cellulose 잔존율이 95.0%, hemicellulose의 잔존율은 19.9%, lignin 제거율은 24.5%를 나타내어 다른 바이오매스와 비교해 보았을 때 cellulose 잔존율과 lignin 제거율 모두 가장 낮은 것으로 나타났음. 이는 리기다의 rigid한 구조 때문인 것으로 보이며 고온 고압의 화학적인 전처리 공정만으로는 높은 lignin 제거율을 기대하기 어려울 것으로 보임. 이러한 문제는 물리적 전처리를 통해 rigid한 구조를 swelling시키는 공정을 통해 해결해야 할 것으로 보임. 반면 hemicellulose 잔존율 또한 낮아 cellulose와 lignin의 결합구조 보다는 hemicellulose와의 결합구조가 좀 더 약한 결합을 가지고 있어 hemicellulose가 lignin 보다 쉽게 침출 되어지는 것으로 보임. EFB의 lignin 제거율은 암모니아 침지공정에 비해 약 25% 상승한 78.1%로 나타나 lignin 제거에 있어서는 암모니아 침출 공정이 탁월한 전처리 방법으로 생각되며 전체적인 결과를 기초로 벚짚과 억새의 전처리에 있어서도 암모니아 침출 공정이 탁월한 전처리 방법으로 생각됨.

표 3.2-3 기질 별 암모니아 침출 전처리 후 당 및 lignin 잔존율

	Ammonia Percolation			
	리기다	EFB	억새	벚짚
Cellulose 잔존율 (%)	95.80	100	97.54	98.02
Hemi-cellulose 잔존율 (%)	19.89	65.21	34.30	31.72
Lignin 잔존율 (%)	24.49	78.11	18.97	26.75

(다) 2단 전처리 공정

□ 2단 전처리 공정에 의한 벚짚의 cellulose 잔존율은 97.5%, hemicellulose 잔존율은 21.2%, lignin 제거율은 75.8%로 나타났으며 억새는 cellulose 잔존율이 97.1%, hemicellulose 잔존율은 16.0%, lignin 제거율은 84.6%로 두 기질 모두 높은 cellulose 잔존율과 lignin 제거율이 나타났고 hemicellulose 잔존율은 많이 감소하는 것을 볼 수 있음. 이는 2단 전처리를 통한 hemicellulose의 회수가 용이하다는 것을 나타내며 암모니아 침출공정과 달리 침출용액을 혼합하여 적절한 pH만 맞추다며 hemicellulose를 이용 할 수 있다는 장점이 있음. EFB는 cellulose 잔존율이 93.3%이며 hemicellulose 잔존율은 42.0%이고 lignin 제거율은

81.2%를 나타내어 벚짚과 억새에 비해 cellulose 잔존율이 다소 떨어짐을 보이고 있지만 lignin 제거에 있어서는 벚짚보다 우수함. 하지만 산을 이용한 hemicellulose의 회수에 있어서는 다소 떨어짐 알 수 있으며, 이는 EFB의 결합구조에 따른 영향으로 생각됨. 마지막으로 리기다는 cellulose 잔존율이 90.4%, hemicellulose의 잔존율은 8.6%, lignin 제거율은 31.9%를 나타내어 4가지 바이오매스를 비교 cellulose 잔존율과 lignin 제거율이 가장 낮은 것으로 보임. 또한 벚짚과 억새와 같이 hemicellulose 잔존율이 많이 감소하는 것을 볼 수 있으며, 이는 위에서 언급한 것과 같이 hemicellulose 회수가 용이하다는 장점이 있음. 모든 결과를 참고하였을 때 리기다의 전처리 방법이 화학적 전처리보다는 물리 화학적인 방법을 통한 전처리가 필요하다고 생각됨. EFB는 lignin 제거율이 암모니아 침출공정보다 약 4% 정도 상승한 81.15%로 나타나 lignin 제거에 있어서는 매우 높은 효과를 나타내었지만 본래 cellulose의 함유량이 낮다는 단점을 지니고 있어 벚짚과 억새의 높은 cellulose 잔존율과 lignin 제거율의 결과를 미루어 봤을 때 2단 전처리는 벚짚과 억새 매우 둘 모두 우수한 바이오매스로 나타났음.

표 3.2-4 기질 별 2단 전처리 후 당 및 lignin 잔존율

	Ammonia/Acid Percolation			
	리기다	EFB	억새	벚짚
Cellulose 잔존율 (%)	90.36	93.33	97.11	97.54
Hemi-cellulose 잔존율 (%)	8.6	42.03	15.98	21.20
Lignin 잔존율 (%)	68.17	18.85	15.42	24.2

(3) 전처리 조건의 최적화

(가) 묽은 황산을 이용한 억새의 전처리 최적화

- 본 과제 1단계 연구부터 제작, 사용하였던 관형열반응기(그림 3.2-4) 이용하여 억새의 묽은 황산 전처리를 수행하였음. 약산전처리 반응의 가장 큰 영향인자인 온도와 시간 그리고 황산의 농도를 변수로 선정하였으며, hemicellulose가 분해되어 액상으로 침출된 xylose의 농도를 HPLC로 분석하여 전처리 지표로 삼았음.



그림 3.2-4. 바이오매스들 전처리하기 위한 관형반응기와 오일수조

□ 제작된 반응기의 최적 고액 비는 1:23으로 (0.3g/7ml) 선행연구에서 제시된 조건에서 반응 하였으며, 이번 연구에서는 반응온도 100~200 °C, 반응시간 5~15분, 황산농도 0.5~4% 범위에서 기초 실험을 수행함. 전처리 반응 후 상등액을 탄산칼슘(CaCO₃)으로 pH 7 범위까지 중화시키고 HPLC (컬럼 : Shodex sugar SH1011)로 xylose의 농도를 분석하여 그 결과를 그림 3.2-5에 나타내었음.

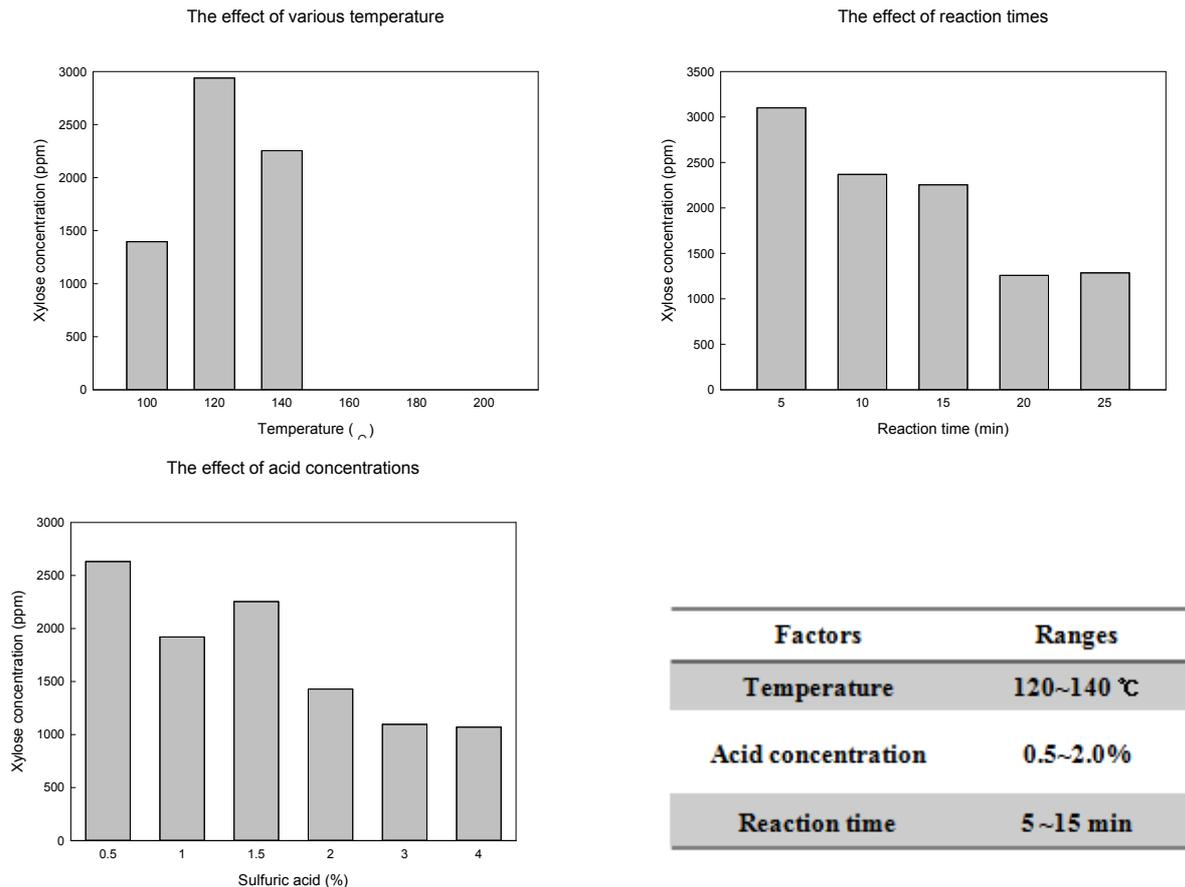


그림 3.2-5. 역사의 뭍은 황산 전처리 후 침출된 xylose 함량

□ 기초실험 결과를 바탕으로 반응 변수들을 최적화하기 위해 통계분석방법 중 Response surface methodology (RSM) Central composite rotatable design (CCRD)을 도입하였으며, 표 3.2-5에 code 값에 대한 변수들의 범위, 표 3.2-6에 quadratic model 실험디자인과 결과를 나타내었음.

표 3.2-5 Central composite rotatable design을 위한 변수와 범위

	Symbol	Coded values				
		-1.682	-1	0	1	1.682
Temperature (°C)	X1	69.55	90	120	150	170.43
Sulfuric acid conc. (%)	X2	0.16	0.5	1	1.5	1.84
Reaction time (min)	X3	1.59	5	10	15	18.41

표 3.2-6 Central composite rotatable design quadratic model 실험 디자인과 결과

Run	Coded X1	Temp.	Coded X2	Acid conc.	Coded X3	Time	Xylose conc. (ppm)
1	-1	90	-1	0.5	-1	5	652
2	1	150	-1	0.5	-1	5	7108
3	-1	90	1	1.5	-1	5	1721
4	1	150	1	1.5	-1	5	2583
5	-1	90	-1	0.5	1	15	716
6	1	150	-1	0.5	1	15	5303
7	-1	90	1	1.5	1	15	2164
8	1	150	1	1.5	1	15	1992
9	-1.68	69.55	0	1	0	10	251
10	1.68	170.45	0	1	0	10	236
11	0	120	-1.68	0.16	0	10	5232
12	0	120	1.68	1.84	0	10	7723
13	0	120	0	1	-1.68	1.59	10971
14	0	120	0	1	1.68	18.41	17032
15	0	120	0	1	0	10	13328
16	0	120	0	1	0	10	12759
17	0	120	0	1	0	10	14854
18	0	120	0	1	0	10	13204
19	0	120	0	1	0	10	15501
20	0	120	0	1	0	10	13200

□ 그림 3.2-6에 ANOVA를 나타내었으며, 모델의 P값이 0.0012, F값이 8.5로 quadratic model 기준에서 적합할만한 수치를 나타내었음. 또한 결정계수(R-Square)값이 0.885로 높은 신뢰도를 보임으로써 예측되는 모델에 적용이 가능함.

<Equation 1>

$$Y = 13,928 + 857 X1 - 83 X2 + 608 X3 - 1,294 X1X2 - 363 X1X3 + 199 X2X3 - 5,578 X1^2 - 3,374 X2^2 - 714 X3^2$$

표 3.2-7 반응표면 분석을 위한 analysis of variance (ANOVA)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	594,315,628	9	66,035,070	8.52	0.0012
X1	10,034,173	1	10,034,173	1.29	0.2818
X2	93,560	1	93,560	0.01	0.9147
X3	5,047,552	1	5,047,552	0.65	0.4385
X12	13,398,815	1	13,398,815	1.73	0.2180
X13	1,053,409	1	1,053,409	0.14	0.7201
X23	317,582	1	317,582	0.04	0.8437
X1^2	448,467,764	1	448,467,764	57.84	< 0.0001
X2^2	164,078,987	1	164,078,987	21.16	0.0010
X3^2	7,352,699	1	7,352,699	0.95	0.3531
Residual	77,531,142	10	7,753,114		
Lack of Fit	71,507,464	5	14,301,493	11.87	0.0084
Pure Error	6,023,678	5	1,204,736		
Cor Total	671,846,770	19			

Std. Dev.	2,784	R-Squared	0.885
Mean	7,327	Adj R-Squared	0.781
C.V. %	38	Pred R-Squared	0.182
		Adeq Precision	8.746

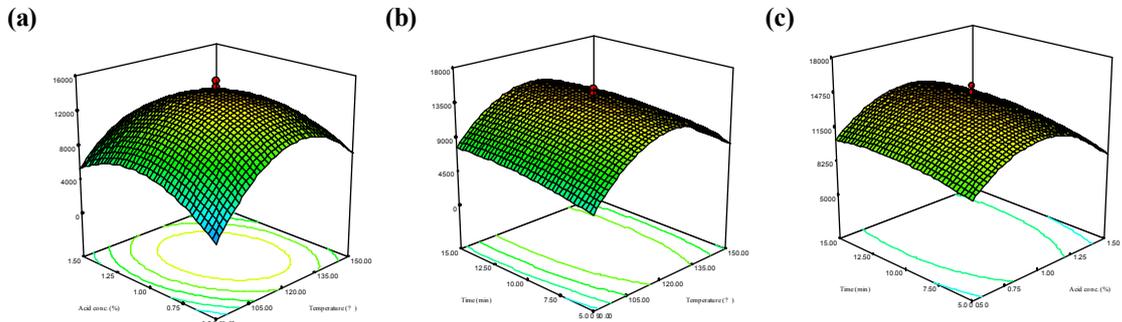


그림 3.2-6. 반응표면의 3차원 그래프 (a) 온도와 산농도, (b) 온도와 시간, (c) 온도와 산농도

표 3.2-8 역새의 묶은 황산 전처리 RSM 최적값

Factors	Coded	Actual
Temperature	0.065	121.95
Acid pretreatment	-0.013	0.99
Reaction time	0.407	12.03

□ 실험은 CCRD quadratic model에 의해 분석되었으며, 그 결과는 2차 다항식<Equation 1>으로 표현되었음. 위 다항식 각각의 변수에 대하여 편미분된 결과를 그림 3.2-6 3차원 그래프로 나타내었으며, 변수에 대한 상관관계를 볼 수 있음. 통계학적 분석을 통한 역새의 묶은 황산의 전처리 최적 조건은 121.95 °C의 반응온도, 0.99%의 황산 농도 그리고 12.03분의 반응시간으로 도출되었으며, 이 조건에서 전처리 수행 후 역새를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰한 결과 (그림 3.2-7) 매끈하고 균일했던 표면이 뒤틀리거나 거칠어진 것을 확인 할 수 있었고, 실제 당화 시 넓어진 표면적으로 인해 당화효율이 향상되었음.

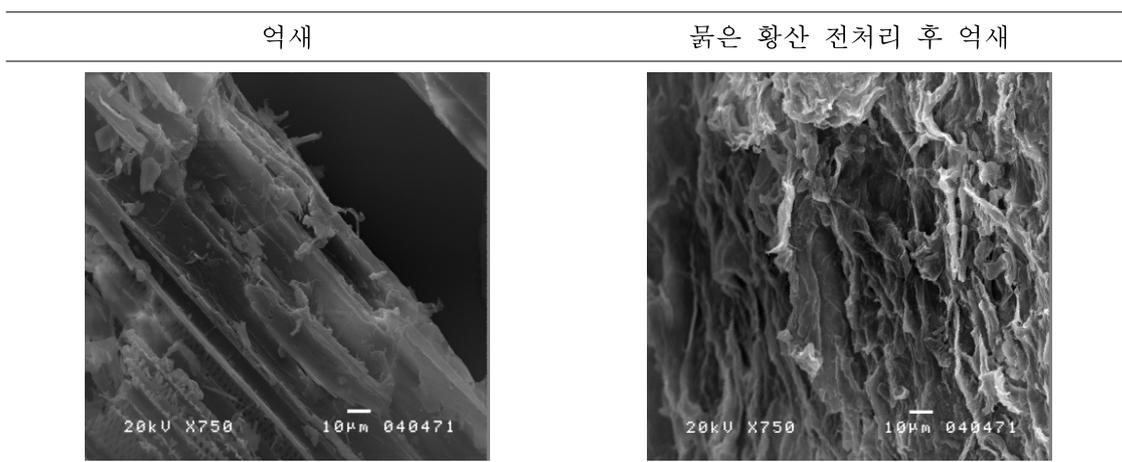


그림 3.2-7. 묶은 황산 전처리 전 후 역새의 표면 SEM사진

(나) 묶은 황산을 이용한 벚짚의 전처리 최적화

□ 위의 관형열반응기(그림 3.2-4) 이용하여 벚짚의 묶은 황산 전처리를 수행하였음. 표 3.2-9에 code 값과 실험 디자인, 모델 예측 값, 실험 결과 값을 나타내었음.

표 3.2-9 Coded value (위)와 Experimental design (아래)

		Coded values					
		Symbol	-1.682	-1	0	1	1.682
Temperature (°C)		X1	89.57	110	140	170	190.43
Acid Concentration (%)		X2	0.002	0.05	0.12	0.19	0.23
Reaction time (h)		X3	1.59	5	10	15	18.40

Run	Coded	Real	Coded	Real	Coded	Real	Predicted value of xylose conc.	Observed value of xylose conc.
1	-	110	-	0.05	-	5	22.14	30.91
2	+	170	-	0.05	-	5	22.54	24.20
3	-	110	+	0.19	-	5	35.51	13.65
4	+	170	+	0.19	-	5	25.91	9.41
5	-	110	-	0.05	+	15	48.53	58.55
6	+	170	-	0.05	+	15	49.11	64.50
7	-	110	+	0.19	+	15	28.47	20.33
8	+	170	+	0.19	+	15	19.05	3.81
9	-1.682	89.57	0	0.12	0	10	12.01	15.55
10	+1.682	190.43	0	0.12	0	10	4.42	1.03
11	0	140	-1.682	0.002	0	10	37.44	13.01
12	0	140	+1.682	0.23	0	10	23.40	56.99
13	0	140	0	0.12	-1.682	1.59	54.35	67.83
14	0	140	0	0.12	+1.682	18.40	70.76	66.43
15	0	140	0	0.12	0	10	72.22	70.79
16	0	140	0	0.12	0	10	72.22	71.56
17	0	140	0	0.12	0	10	72.22	70.87
18	0	140	0	0.12	0	10	72.22	75.55
19	0	140	0	0.12	0	10	72.22	74.21
20	0	140	0	0.12	0	10	72.22	68.78

□ 표 3.2-10에 실험 결과 ANOVA를 나타내었음. CV값은 41.9748로 정확도가 높은 것으로 나타났고 F, P 값도 통계학적 기준에서 모델의 적합도가 높아 이 결과를 신뢰할 수 있으며, 결정계수 또한 0.85 이상으로 높은 신뢰도를 보였음. ANOVA에서 온도와 산 농도의 control이 약산 전처리 공정에서 매우 중요한 요소로 나타났으며 반응시간도 무시할 수 없는 인자로 나타났음.

표 3.2-10 선택모델과 통계학적 분석을 위한 ANOVA

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P>F
Model	10905.25	9	1211.69	3.50	0.0321
Error	3465.93	10	346.59		
Corrected total	14371.19	19			

Coefficient of variation (CV) = 41.9748, Coefficient of determination (R²) = 0.8548

Factor	Mean square	F value	P value
X1	1092289.963	4.20	0.0676
X2	1389515.181	5.34	0.0434
X3	589864.422	2.27	0.1631
X11	5013859.313	16.00	0.0025
X22	1434505.494	8.75	0.0596
X33	1452241.646	5.58	0.0398
X12	4186.125	0.02	0.9016
X13	201930.125	0.78	0.3990
X23	103285.125	0.40	0.5428

□ 실험결과 값들은 CCD 모델에 의해 분석되었고, 회귀분석을 통해 아래의 2차 다항식 <Equation 2>으로 표현으로 되었음. 이 2차 다항식은 X1-X2, X2-X3, X1-X3에 대하여 편미분되었고 그 편미분된 결과는 그림 3.2-8의 세 3D, 등고선 그래프로 표현됨. 그래프의 등고점, 즉 미분시 0이 되는 부분이 두 인자간의 최적 점으로 표 3.2-11에 code값으로 나타나있고 이들의 실제 값 또한 환산하였음. 통계학적 분석을 통한 벗짚의 약산전처리 최적 조건은 110 °C의 온도와 1.2%의 황산 농도 그리고 14.02분의 반응시간으로 결정됨.

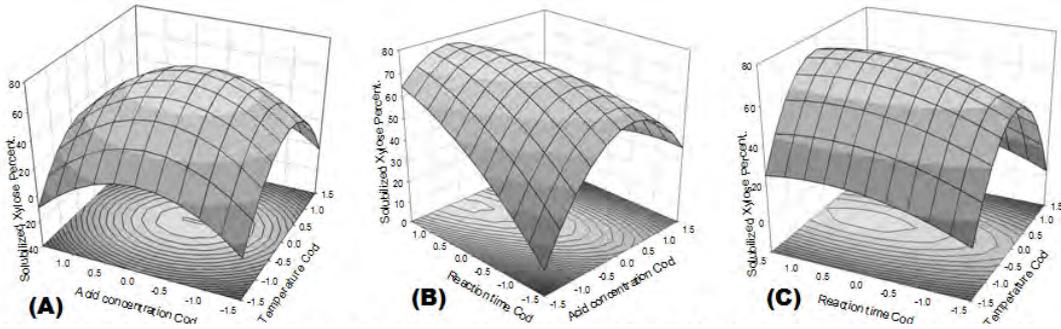


그림 3.2-8. 반응표면의 3차원 그래프 (a) 온도와 산농도, (b) 산농도와 시간, (c) 온도와 시간

<Equation 2>

$$Y=72.2261-2.2565X_1-4.1731X_2+4.8806X_3-22.6244X_1^2-14.7741X_2^2-3.4165X_3^2-2.5007X_1X_2+0.047X_1X_3-8.3577X_2X_3$$

표 3.2-11 벗짚의 묽은 황산 전처리 RSM 최적값

Factors	Coded	Real
Temperature	-0.3481	110 °C
Acid pretreatment	-0.0217	0.12% of sulfuric acid
Reaction time	4.0215	14.02 min

(다) 알칼리 시약을 이용한 유채대 전처리 최적화

- 그림 3.2-9는 알칼리 시약들(NaOH, aqueous ammonia)을 이용해 전처리를 수행하였고, 고체 성분 분석한 후 성분 조성의 변화를 나타낸 것임. 전처리 반응의 경우 70 °C, 120 rpm의 교반식 항온 수조에서 24 시간동안 침지하였음. NaOH를 전처리에 이용할 경우 aqueous ammonia와 비교하여 적정 농도 범위가 더 낮기 때문에 환경오염이 덜하고 가격이 저렴하기에 저비용 전처리에 활용하기 적합할 것으로 판단됨.
- 그림 3.2-9 (A)는 NaOH 전처리 후 성분 조성 변화를 나타내었음. 약 5~15%의 NaOH가 사용되었을 경우 65%가 넘는 glucan 함량을 보여 이후 시행될 RSM 및 통계학적 분석방법에서 기초데이터로 이용되었음. 그림 3.2-9 (B)는 aqueous ammonia를 이용한 전처리 수행 후 성분 조성을 나타내었음. 이 경우 ammonia의 농도가 높을수록 glucan의 비율이 높아짐을 알 수 있었음. 그림 3.2-9 (C)는 두 알칼리 시약을 이용하여 전처리 수행 후, 바이오매스의 무게를 측정하여 각 농도에 따른 회수율을 나타내었고 그 결과 무게 손실은 aqueous ammonia가 NaOH 보다 적었음.

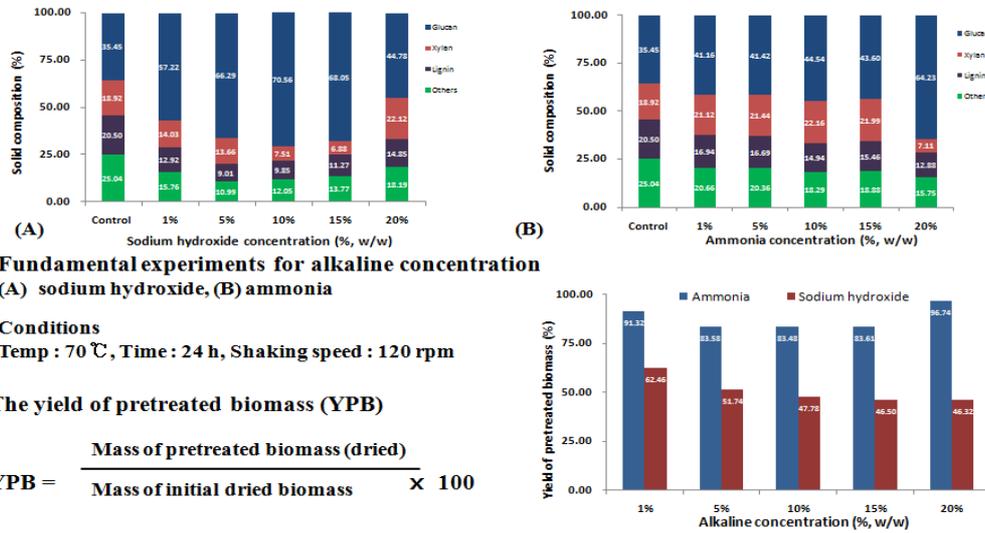


그림 3.2-9. 알칼리 시약(NaOH, aqueous ammonia)을 이용한 전처리 후 유체대 성분 조성

표 3.2-12 주요 factor들과 coded value 그리고 NaOH 전처리 실험 Design

		Coded values					
		Symbol	-1.682	-1	0	1	1.682
Temperature (°C)	X1	53.18	60	70	80	86.82	
Reaction time (h)	X2	7.91	12	18	24	28.09	
NaOH concentration (%)	X3	1.59	5	10	15	18.41	

Run	Coded X ₁	Temp.	Coded X ₂	Time	Coded X ₃	NaOH conc.	YPB (%)	Removal of lignin (%)	Enzymatic digestibility (%)	Conversion of glucose (%)
1	-1	60.00	-1	12.00	-1	5.00	52.60	33.33	51.71	87.08
2	1	80.00	-1	12.00	-1	5.00	45.00	40.00	53.45	89.30
3	-1	60.00	1	24.00	-1	5.00	49.80	36.67	54.31	86.37
4	1	80.00	1	24.00	-1	5.00	42.80	33.33	59.38	85.19
5	-1	60.00	-1	12.00	1	15.00	49.40	26.67	53.57	87.41
6	1	80.00	-1	12.00	1	15.00	40.20	30.00	60.81	85.03
7	-1	60.00	1	24.00	1	15.00	43.60	16.67	58.54	78.40
8	1	80.00	1	24.00	1	15.00	39.60	20.00	63.45	82.71
9	-1.68	53.18	0	18.00	0	10.00	49.80	23.33	52.47	83.59
10	1.68	86.83	0	18.00	0	10.00	40.20	36.67	60.44	86.91
11	0	70.00	-1.68	7.91	0	10.00	43.60	33.33	57.08	81.55
12	0	70.00	1.68	28.09	0	10.00	41.20	30.00	60.00	85.85
13	0	70.00	0	18.00	-1.68	1.59	51.80	36.67	44.70	88.17
14	0	70.00	0	18.00	1.68	18.41	39.40	26.67	59.34	82.05
15	0	70.00	0	18.00	0	10.00	42.00	33.33	57.88	86.49
16	0	70.00	0	18.00	0	10.00	41.40	40.00	59.81	85.09
17	0	70.00	0	18.00	0	10.00	41.80	33.33	57.80	90.57
18	0	70.00	0	18.00	0	10.00	41.60	36.67	58.53	88.26
19	0	70.00	0	18.00	0	10.00	42.40	40.00	57.50	87.65
20	0	70.00	0	18.00	0	10.00	41.80	40.00	58.50	86.44

표 3.2-13 NaOH 전처리 공정의 Analysis of variance (ANOVA)

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P>F
Model	302.51	9	33.61	10.03	0.0006
Error	33.50	10	3.35		
Corrected total	336.01	19			

Coefficient of variation (CV) % = 3.21, Coefficient of determination (R²) = 0.9003

ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance table

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-Value	Prob > F
Model	303.767	9	33.752	7.423	0.0021
X ₁	91.573	1	91.573	20.138	0.0012
X ₂	23.859	1	23.859	5.247	0.0450
X ₃	122.029	1	122.029	26.836	0.0004
X ₁₂	0.500	1	0.500	0.110	0.7470
X ₁₃	0.684	1	0.684	0.151	0.7062
X ₂₃	0.541	1	0.541	0.119	0.7373
X ₁ ²	0.937	1	0.937	0.206	0.6596
X ₂ ²	3.351	1	3.351	0.737	0.4108
X ₃ ²	57.632	1	57.632	12.674	0.0052
Residual	45.472	10	4.547		
Lack of Fit	42.041	5	8.408	12.252	0.0078
Pure Error	3.431	5	0.686		
Cor. Total	349.239	19			

- 앞서 수행된 기초실험 결과를 바탕으로 통계학적 분석을 위한 실험 디자인을 설계하였음 (표 3.2-12). 온도, 반응시간 그리고 NaOH 농도를 전처리 공정에 가장 영향을 미치는 변수로 결정하였고 Central composite rotatable design (CCRD) 모델에 의해서 실험을 설계하고 무작위 순서로 수행하였음. 반응표면분석(RSM)을 위한 데이터로는 효소의 소화도를 선택하였고 회귀분석을 통해 모델과의 적합성이나 통계학적 분석(ANOVA)을 수행하였음.
- 통계학적 분석 결과 표 3.2-13에 Analysis of variance를 도출하였음. R²는 90.03%를, CV는 3.21%를 나타내었고, 전체 모델의 F-value는 10.03, P-value는 0.0006으로 매우 신뢰도가 높은 결과임을 나타냄. 각 성분 factor의 ANOVA에서는 가장 영향력 있는 factor가 온도와 NaOH 농도로 밝혀졌으며, 성분 factor들 간에 영향력은 적은 것으로 나타남.
- 데이터의 회귀분석 결과 2차 다항식을 도출 하였고 다음과 같음.

$$Y = 58.27 + 2.59X_1 + 1.32X_2 + 2.99X_3 - 0.25X_1X_2 + 0.29X_1X_3 + 0.26X_2X_3 - 0.25X_1^2 - 0.48X_2^2 - 2.00X_3^2$$

표 3.2-14. 유체의 NaOH 전처리 RSM 최적값

Factors	Coded	Real
Temperature	0.339	73.39 °C
Alkali concentration	-0.546	7.27% of NaOH
Reaction time	-0.026	17.84 h

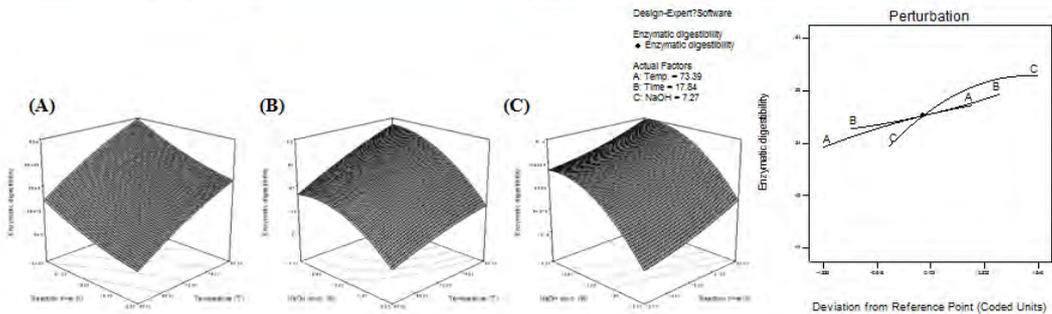


그림 3.2-10. 반응표면의 3차원 그래프

- 다항식을 2항씩 회귀분석을 하여 그림 3.2-10의 3차원 그래프를 도출하였고, 표 3.2-14에 회귀분석 결과의 최대값을 이용해 유체의 전처리 최적 조건을 도출하였음. 유체대를 NaOH로 전처리하는 공정을 통계학적으로 분석, 최적화한 결과 약 74 °C의 온도에서 약 7.3%의 NaOH를 이용해 약 17.8 시간동안 전처리하였을 경우 효소 소화 효율 최대값을 나타낼 것으로 분석되었음.

- 유체대의 aqueous ammonia를 이용한 전처리 역시 NaOH 처리와 같은 방법으로 통계학적 실험 디자인을 이용 분석하여 최적 조건을 도출하였음. 표 3.2-15에 전처리 공정의 coded value와 실험 design을 나타내었고, 표 3.2-16에 통계학적 분석의 ANOVA를 나타내었음. R²값이 86.9%, CV값이 3.05%를 나타내었고 7.37의 F-value와 0.0022의 P-value 값을 보여 이 모델의 신뢰도가 높은 것으로 나타났음. 분석결과 아래와 같은 2차 다항식을 회귀분석 한 후 그림 3.2-11의 3차원 그래프를 도출하였음.

표 3.2-15 Aqueous ammonia를 이용한 전처리 공정의 factor들과 실험 design

		Coded values				
	Symbol	-1.682	-1	0	1	1.682
Temperature (°C)	X1	53.18	60	70	80	86.82
Reaction time (h)	X2	7.91	12	18	24	28.09
Ammonia conc. (%)	X3	4.89	10	17.5	25	30.11

Run	Coded X ₁	Temp.	Coded X ₂	Time	Coded X ₃	NH3 conc.	YPB (%)	Removal of lignin (%)	Enzymatic digestibility (%)	Conversion of glucose (%)
1	-1	60.00	-1	12.00	-1	10.00	77.20	46.67	37.02	89.72
2	1	80.00	-1	12.00	-1	10.00	71.00	46.67	38.07	88.96
3	-1	60.00	1	24.00	-1	10.00	75.80	40.00	37.60	75.33
4	1	80.00	1	24.00	-1	10.00	69.60	50.00	39.98	82.01
5	-1	60.00	-1	12.00	1	25.00	76.20	50.00	37.99	66.93
6	1	80.00	-1	12.00	1	25.00	69.60	50.00	39.07	89.07
7	-1	60.00	1	24.00	1	25.00	75.20	43.33	37.48	69.37
8	1	80.00	1	24.00	1	25.00	71.20	56.67	41.29	93.09
9	-1.68	53.18	0	18.00	0	17.50	72.80	40.00	37.09	70.00
10	1.68	86.83	0	18.00	0	17.50	68.00	50.00	39.69	98.54
11	0	70.00	-1.68	7.91	0	17.50	72.80	50.00	35.79	94.42
12	0	70.00	1.68	28.09	0	17.50	69.00	46.67	35.77	90.02
13	0	70.00	0	18.00	-1.68	4.89	73.60	46.67	35.40	80.29
14	0	70.00	0	18.00	1.68	30.11	71.80	60.00	39.56	73.33
15	0	70.00	0	18.00	0	17.50	69.80	50.00	42.61	80.67
16	0	70.00	0	18.00	0	17.50	70.00	56.67	41.36	89.42
17	0	70.00	0	18.00	0	17.50	71.00	56.67	42.66	84.65
18	0	70.00	0	18.00	0	17.50	70.20	50.00	41.18	85.27
19	0	70.00	0	18.00	0	17.50	69.80	50.00	41.87	81.92
20	0	70.00	0	18.00	0	17.50	69.20	53.33	42.23	83.80

표 3.2-16 Aqueous ammonia 전처리 공정의 Analysis of variance (ANOVA)

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P>F
Model	94.79	9	10.53	7.37	0.0022
Error	14.29	10	1.43		
Corrected total	109.08	19			

Coefficient of variation (CV) % = 3.05, Coefficient of determination (R²) = 0.8690

ANOVA for response surface quadratic model analysis of variance table

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-Value	Prob > F
Model	94.788	9	10.532	7.370	0.0022
X ₁	11.773	1	11.773	8.238	0.0167
X ₂	1.267	1	1.267	0.887	0.3686
X ₃	7.551	1	7.551	5.284	0.0444
X ₁₂	2.062	1	2.062	1.443	0.2573
X ₁₃	0.269	1	0.269	0.188	0.6734
X ₂₃	0.077	1	0.077	0.054	0.8211
X ₁ ²	12.355	1	12.355	8.645	0.0148
X ₂ ²	49.169	1	49.169	34.405	0.0002
X ₃ ²	22.436	1	22.436	15.699	0.0027
Residual	14.291	10	1.429		
Lack of Fit	12.329	5	2.466	6.284	0.0325
Pure Error	1.962	5	0.392		
Cor. Total	109.079	19			

$$Y = 41.93 + 0.93X_1 + 0.30X_2 + 0.74X_3 + 0.51X_1X_2 + 0.18X_1X_3 - 0.098X_2X_3 - 0.93X_1^2 - 1.85X_2^2 - 1.25X_3^2$$

□ 표 3.2-17에 회귀분석 결과의 최대값을 이용해 유체의 전처리 최적 조건을 나타내었음. 유체대를 aqueous ammonia로 전처리하는 공정을 통계학적으로 분석, 최적화한 결과 약 75 °C의 온도에서 약 16.6%의 aqueous ammonia를 이용해 약 12.6 시간동안 전처리하였을 경우 효소 소화 효율 최대값을 나타낼 것으로 분석되었음.

표 3.2-17 유체의 aqueous ammonia 전처리 RSM 최적값

Factors	Coded	Real
Temperature	0.517	75.17 °C
Alkali concentration	-0.123	16.58% of Ammonia
Reaction time	-0.905	12.57 h

(라) 공정변수 최적화를 통한 당 생산 최대화

□ 공정 변수에 따른 glucose 함유량과 lignin 제거율이 어떠한 영향을 미치는지 알아보았으며 이는 batch 반응기를 통한 최적조건으로 전처리를 한 바이오매스와 그 당화율까지 비교하였음.

표 3.2-18 침출반응기를 사용한 벚짚의 2단 전처리의 최적조건 탐색 실험

No.1	Temperature (°C)	Acid		Ammonia		Solid remaining (%)	Glucan recovery yield (%)	Lignin removal (%)
		conc. (wt%)	treatment time (min)	conc. (wt%)	treatment time (min)			
1	140	1	20	15	20	39.20	77.13	65.01
2	140	5	20	15	20	43.00	70.69	43.48
3	140	1	20	15	40	43.35	75.69	70.70
4	140	5	20	15	40	40.10	69.47	58.26
5	120	1	20	15	30	44.20	79.04	70.94
6	120	5	20	15	30	42.60	73.52	56.66
7	160	1	20	15	30	36.10	59.79	47.72
8	160	5	20	15	30	32.70	40.01	23.22
9	120	3	20	15	20	43.35	75.79	59.81
10	120	3	20	15	40	43.00	80.57	63.83
11	160	3	20	15	20	41.30	44.43	11.86
12	160	3	20	15	40	36.05	57.71	41.95
13	140	3	20	15	30	38.75	69.54	58.13
14	140	3	20	15	30	41.65	75.49	61.70
15	140	3	20	15	30	39.70	71.76	60.48

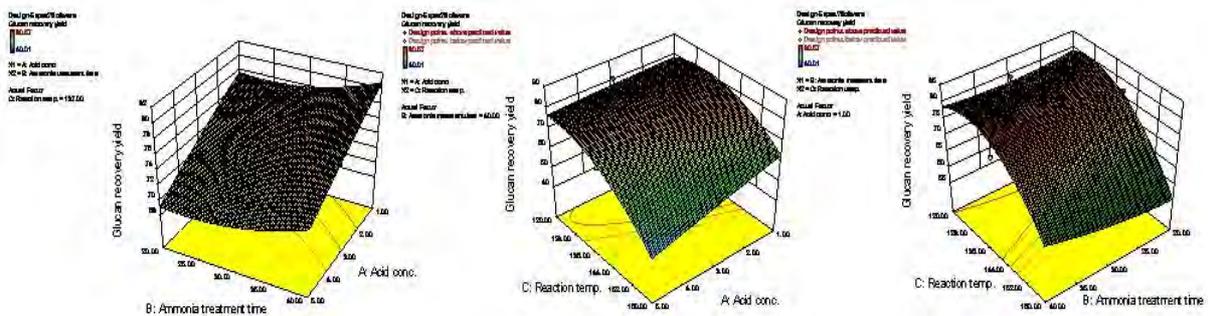


그림 3.2-11. 공정변수에 따른 Glucose 함유율 변화

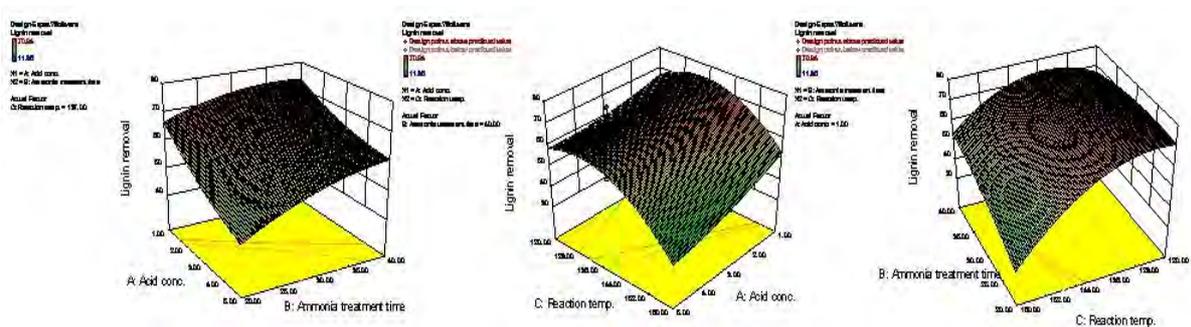


그림 3.2-12. 공정변수에 따른 Lignin 제거율 변화

- 위 실험 결과를 토대로 침출장치에서 얻은 최적조건을 탐색한 결과를 기존의 batch 반응기를 통한 결과와 비교하였다. 또한 각각의 최적화실험에서 얻은 조건을 각각 침출공정과 batch 공정에 적용하여 전처리를 수행한 후 고체분석과 효소당화를 통한 C6, C5 회수율과 당화율을 각각 비교해 보았음.

표 3.2-19 침출 반응기를 통한 벚짚 2단 전처리 최적조건

	암모니아 농도	Acid 농도	암모니아 반응온도	Acid 반응온도	암모니아 반응시간	Acid 반응시간
Batch 반응기	15 %	2 %	150 °C	130 °C	20 min	20 min
침출 반응기	15 %	1 %	150 °C	140 °C	20 min	20 min

표 3.2-20 최적조건 전처리 후 고체 성분 분석

	Cellulose	Hemi-cellulose	Lignin	Others	Total
Batch 반응기	38.90	5.04	3.14	0.92	48.00
침출 반응기	38.02	6.21	3.37	1.20	48.80

- 고체분석을 통한 lignin 제거율을 비교했을 때 lignin 제거율은 batch 반응기의 최적 조건에서는 75.8% 나타낸 반면 침출 반응기를 통한 최적조건 설정에 있어서는 74.00%로 조금 낮은 제거율을 보였지만 거의 비슷한 수준의 lignin 제거율을 보였으며 C6의 회수율에서도 batch 반응기의 최적조건에서는 93.04%를 나타낸 반면 침출 반응기를 이용한 최적조건에서는 89.28%를 나타내어 C6 회수율이 조금 떨어지긴 하지만 목표치 보다 높은 수준임을 알 수 있음. C5 회수율에 있어서는 92.27%를 나타낸 batch 반응기의 최적조건에 비해 침출 반응기를 이용한 최적조건에서는 96.26%로 다소 높아진 회수율을 나타내었음. 이는 침출반응에 의해 생산된 C5를 반응기 외부로 이동시켜 발효부산물질 생성을 줄여 회수율이 높아진 것으로 판단할 수 있음. 당화율에 있어서는 batch 반응기의 최적조건 반응 시 glucose 회수율 93.65%로 나타났고 침출 반응기의 최적 조건에서도 역시 95.25%로 나타나 염기와 산의 연속식 침출에 의해 당화저해물질 제거 및 cellulose 결정구조 파괴에 의해 효소당화능이 높아진 것으로 추측됨. 이로서 batch 반응기를 이용한 최적조건 과 침출장치를 이용한 최적조건의 차이는 그리 크지 않음을 확인 할 수 있었으며 C5 수율에 있어 침출공정에서 회수율이 더 높은 것을 확인할 수 있었음.

표 3.2-21 Batch 반응기와 침출 반응기의 최적조건 전처리 후 당화

	C6 회수율	C5 회수율		
		전처리 용액	당화액	Total
Batch 반응기	93.04 %	72.88 %	19.39 %	92.27 %
침출 반응기	89.28 %	73.80 %	22.46 %	96.26 %

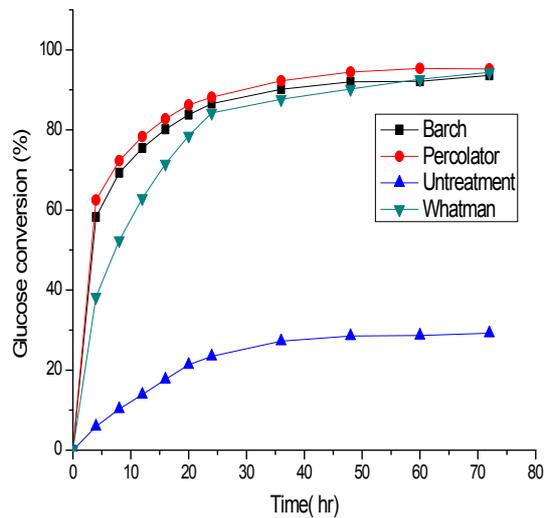


그림 3.2-13. Batch 반응기와 침출 반응기의 최적조건 전처리 후 당화

(4) 전처리 공정 별 당화효율 비교

(가) 실험방법

- 전처리를 거친 바이오매스를 이용하여 효소당화를 실시하여 전처리에 따른 glucose 전환율을 확인하였음. 실험에 사용된 효소는 에너지기술연구원에서 제공받은 celluclast 와 β -glucosidase로는 Novozyme 188을 사용하였으며, 효소는 각각 60 FPU/g Cellulose, 120 CBU/g Cellobiose를 첨가하였으며, 기질농도는 5 wt.%로 동일 한 농도를 맞추어 incubator 안에서 flask를 이용해 180 Rpm, 50 °C로 72 시간동안 실시하였음.

(나) 리기다

□ 리기다의 경우는 전처리 전, 후의 glucose 회수율이 4.25%에서 2단 전처리 공정 후 20.12%로 최고 약 5배 정도 증가 하였지만 전처리 후 매우 낮은 전환율이 나타났으며 당 농도 역시 최고 5.15 g/L로 매우 낮은 당 농도를 보였음. 또한 최대 C6회수율은 18.18%로 사용된 전처리 기술에 대한 효과가 거의 없는 것으로 나타났음.

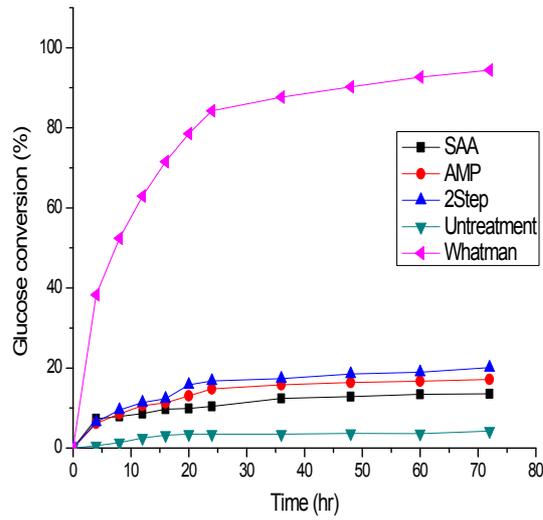


그림 3.2-14. 리기다의 전처리별 효소당화

표 3.2-22 리기다의 전처리별 당 회수율

	전처리종류	C6 회수율	C5 회수율		
			전처리용액	당화액	Total
리기다	Untreat	3.87 %	-	5.38 %	5.38 %
	SAA	12.85 %	-	20.84 %	20.84 %
	Ammonia Percolation	16.26 %	-	19.88 %	19.88 %
	Ammonia / acid Percolation	18.18 %	68.23 %	8.60 %	76.83 %

(다) EFB

□ EFB 역시 전처리 전, 후 lignin 제거율은 매우 높아 당 생산에 유리한 바이오매스로 생각되었지만 glucose 회수율이 35.78%로 생각보다 당 생산이 잘 이루어지지 않음을 알 수 있었음. glucose 회수율 4.25%에서 2단 전처리 공정 후 35.78%로 최고 약 8배 정도 증가는 하였지만 높은 lignin 제거율에 비해 전환율은 매우 낮은 수준으로 나타났음. 이는 높은 lignin 제거율이 바이오매스의 강건한 구조를 이루는 lignin을 제거하여 효소의 접근성을 높여준다는 일반적인 보고들과 상반되는 결과임. 벚짚의 경우 높은 lignin 제거율이 높은 당화율로 연관 되었으나 EFB의 경우는 높은 lignin 제거율에도 불구하고 당화율이 현저히 낮은 면을 봤을 때, 전처리 과정의 lignin 제거율과 함께 바이오매스의 물성 및 cellulose의 결정도도 당화율에 큰 영향을 미친다고 판단됨. 당 농도 역시 약 10.26 g/L로 리기다 보다는 약 2배 정도가 높지만 사용되어진 전처리 기술이 효과적인 전처리 방법으로는 생각되지 않음. 전체적인 C6 회수율은 최고 36.28%로 목표회수율에 미치지 못하는 것으로 나타났으며 C5 회수율은 최고 84.96%로 목표 회수율을 넘는 결과가 나왔음. EFB를 이용한 2단 전처리 공정은 C5의 회수에 있어서는 매우 유리하지만 C6의 회수율에는 효과적이지 못한 결과를 얻었음. 이러한 EFB의 낮은 C6 당화율 및 C6 회수율의 결과는 lignin 제거율은 높지만 EFB의 lignin으로부터 파생되어진 phenolic compound 또는 oil의 잔해물의 저해로 인한 당 생산의 저해가 있는 것으로 예상됨.

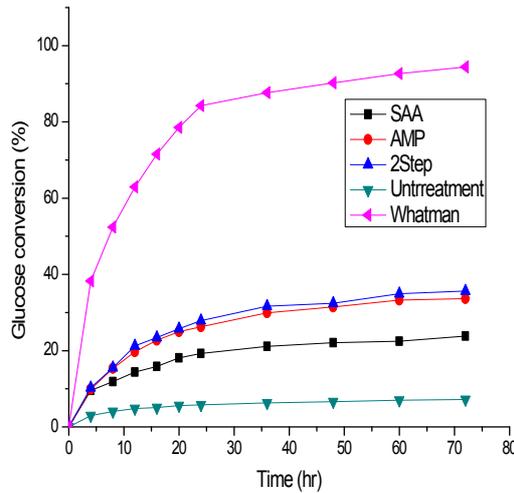


그림 3.2-15. EFB의 전처리별 효소당화

표 3.2-23 EFB의 전처리별 당 회수율

	전처리종류	C6 회수율	C5 회수율		
			전처리용액	당화액	Total
EFB	Untreat	1.50 %	-	1.32 %	1.32 %
	SAA	20.53 %	-	38.83 %	38.83 %
	Ammonia Percolation	36.28 %	-	50.86 %	50.86 %
	Ammonia / acid Percolation	33.39 %	41.73 %	43.23 %	84.96 %

(라) 역새

□ 역새는 암모니아 침지 전처리의 경우 전처리 전, 후 glucose 회수율 약 4 배 정도로 증가하여 60.47%의 전환율을 보였으며 20.0 g/L의 당 농도를 나타내었음. 더욱 주목 할 결과는 암모니아 침출 공정과 2단 전처리 공정에서 glucose 회수율이 약 6 배 정도 증가하여 약 81.08%와 85.23%의 전환율을 보였음. 당 농도 역시 31.34 g/L와 33.25 g/L로 높은 당 농도를 나타내었으며 C6 회수율과 C5 회수율은 각각 최고 82.77%와 87.73%로 사용되어진 암모니아 침출공정과 2단 전처리 기술이 매우 효과적임.

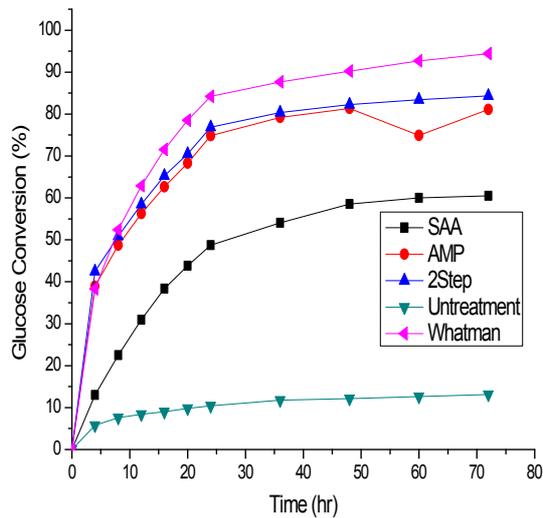


그림 3.2-16. 역새의 전처리별 효소당화

표 3.2-24 역새의 전처리별 당 회수율

	전처리종류	C6 회수율	C5 회수율		
			전처리용액	당화액	Total
역새	Untreat	13.12 %	-	39.74 %	39.74 %
	SAA	60.47 %	-	38.83 %	38.83 %
	Ammonia Percolation	81.08 %	-	33.03 %	33.03 %
	Ammonia / acid Percolation	82.77 %	67.00 %	20.73 %	87.73 %

(마) 볏짚

□ 볏짚은 모든 전처리에 있어 매우 높은 90% 이상의 glucose 회수율이 나타났으며 특이한 점은 기타 바이오매스를 이용한 전처리에 비해 당화율이 높고 당화 속도가 빠르다는 것임. 이는 대조군으로 쓰인 99.9% cellulose로 이루어진 Whatman #1 paper 보다 빠른 당화 속도로 당화속도를 줄여 공정시간을 단축할 수 있다는 점에서 매우 유리함. 또한 역새와의 비교했을 때 당화 시간이 약 2배 정도 빠름. 전환율 80%를 도달하는 시간이 역새는 36 시간 정도 걸렸다면 볏짚은 16 시간 정도의 당화만으로도 이에 도달함을 알 수 있었음. 암모니아 침지보다는 암모니아 침출이 암모니아 침출보다는 2단 전처리에서 단위 시간당 전환율이 더 높았고 최종 glucose 회수율은 95.25%, 당 농도는 34.85 g/L로 매우 높은 전환율과 당 농도를 나타내었으며 C6 회수율과 C5 회수율 또한 각각 최고 93.04% 와 92.27%로 볏짚을 이용한 2단 전처리는 당화시간 절감과 함께 높은 당회수율을 얻을 수 있는 매우 효과적인 전처리 기술이라고 판단됨.

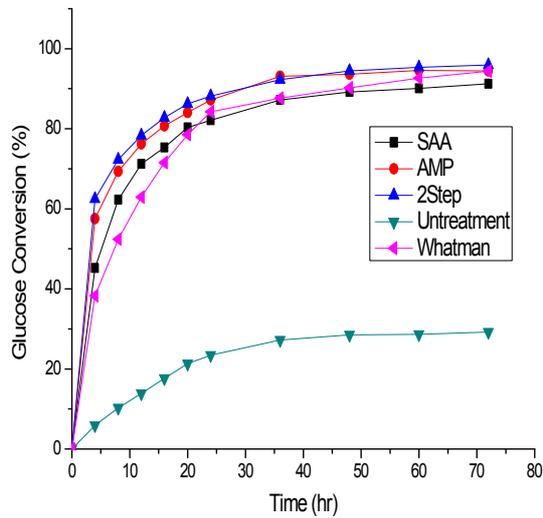


그림 3.2-17. 볏짚의 전처리별 효소당화

표 3.2-25 볏짚의 전처리별 당 회수율

	전처리종류	C6 회수율	C5 회수율		
			전처리용액	당화액	Total
볏짚	Untreat	29.21 %	-	58.61 %	58.61 %
	SAA	90.48 %	-	37.01 %	37.01 %
	Ammonia Percolation	92.55 %	-	30.61 %	30.61 %
	Ammonia / acid Percolation	93.04 %	72.88 %	19.39 %	92.27 %

다. 돼지감자 줄기의 침출 전처리 최적화

- 본 연구에서 효소 당화율 증가를 위한 돼지감자 줄기의 전처리는 흐름형 침출 전처리 공정에 적용시켰다. 돼지감자 줄기의 침출 전처리 조건에 대한 최적 조건을 예측해보기 위해 바이오매스의 전처리에 대한 영향을 통합적으로 분석하기 위해 최적조건을 탐색하였다. 그에 대한 방법으로 통계학적 최적화 도구인 반응표면 분석법(RSM : Response Surface Method)을 사용하여 실험을 진행하였다.
- 공정 변수에 따라 글루코오스 회수율과 리그닌 제거율에 미치는 영향에 대해 알아보았으며 최적조건을 예측하여 효소 당화율을 구하였다. 최적 조건을 예측하기 위한 전처리는 암모니아수와 황산 용액에 대하여 수행되었다. 전처리가 수행된 바이오매스는 모두 성분 분석을 하였고 효소당화를 진행하였다.

(1) 암모니아수에 의한 RSM 최적화

- 암모니아수에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 표 3.2-26과 같은 조건을 설정해서 수행하였다. 실험은 선행 연구에서 초본계 바이오매스와 농업부산물 전처리에 효과가 있었던 10 ~ 20%(w/w) 농도의 암모니아수를 용매로 하여 수행하였다. 또한 온도 조건의 범위는 130 ~ 210 °C로 설정하여 실험을 하였다. 온도 조건이 210 °C 이상이 되는 경우 반응기 내부의 압력이 한계를 넘어서기 때문에 원활한 실험이 진행될 수가 없었다. 그래서 온도의 상한선을 210 °C로 설정하였다. 그리고 반응 시간은 20분에서 40분사이의 범위로 설정하여 수행하였다. 반응시간은 용매의 흐름을 5 ~ 10 ml/min의 유속으로 조절하는 것으로 결정하였다. 최적화는 효소 당화율의 증가에 목표로 하여 실험의 결과로 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소 당화율을 구하여 적용하였고 그 결과는 표 3.2-27에 나타내었다.
- 위 실험 결과를 바탕으로 침출 반응기에서 얻은 최적 조건을 예측을 하여 효소 당화율에 대한 ANOVA를 표 3.2-28과 같이 나타내었다. 모델의 P값과 F값이 각각 0.0001과 43.93으로 quadratic model 기준에 부합되는 수치로 확인되었다. 또한 결정계수(R-square)값이 0.9826로 높은 신뢰도를 보임으로써 예측되는 모델에 적용이 가능하였다. 예측한 결과는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

Enzymatic digestibility

$$= 75.9 + 4.0X_1 + 21.2X_2 + 2.38X_3 \\ - 1.57X_1X_2 - 1.41X_1X_3 - 5.17X_2X_3 + 2X_1^2 + 0.38X_2^2 - 3.34X_3^2$$

- 또한 예측된 최적 조건의 결과는 그림 3.2-18 부터 그림 3.2-21 까지 나타내었다. 반응표면분석법에 의하면 암모니아수에 의한 돼지감자줄기의 침출 전처리 공정은 20 %(w/w) 농도의 암모니아수로 163.2 °C의 반응온도에서 40분의 반응시간으로 전처리가 수행될 때 전처리 최적 조건으로 수행이 될 수 있다고 예측하였다. 반응표면분석법에서 예측된 최적 전처리조건을 돼지감자줄기의 침출 전처리 공정에 적용하여 전처리 실험을 수행하였다. 암모니아수의 전처리 공정에 대한 비교군으로 같은 온도와 반응시간 조건으로 열수에 의한 전처리를 수행하였다. 예측된 최적 조건을 통한 침출 전처리 공정에서 고형물

잔존율은 64.1%로 나타났고 95.6%의 글루코오스 회수율과 63.0%의 리그닌 제거율을 보였다. 그때의 효소 당화율은 70.9%인 것으로 확인하였다.

표 3.2-26 Independent variables for optimization of flow-through pretreatment by aqueous ammonia

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Aqueous Ammonia concentration (%w/w)	X ₁	10	15	20
Temperature (°C)	X ₂	130	170	210
Reaction time (min)	X ₃	20	30	40

표 3.2-27 Optimization results of flow-through pretreatment by aqueous ammonia

No.	X ₁	X ₂	X ₃	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	0	1	1	56.0	80.3	31.9	90.1
2	1	1	0	56.4	86.3	37.4	99.9
3	0	0	0	64.4	94.9	38.6	75.1
4	1	0	1	61.6	95.1	49.4	82.8
5	-1	0	-1	67.2	91.2	31.3	63.5
6	-1	-1	0	76.8	88.6	18.8	53.5
7	0	0	0	65.7	90.1	37.0	75.6
8	-1	1	0	55.4	81.5	17.5	97.7
9	1	0	-1	63.3	84.9	30.9	77.0
10	0	0	0	65.0	86.2	40.4	78.7
11	0	-1	1	75.2	94.1	20.9	56.6
12	0	1	-1	56.6	88.1	33.0	99.6
13	0	-1	-1	77.2	92.9	15.5	45.5
14	0	0	0	64.1	88.4	39.1	77.4
15	1	-1	0	74.8	85.2	24.0	62.0
16	-1	0	1	65.7	95.2	40.0	75.0
17	0	0	0	64.8	92.3	38.2	72.6

Figure 3.2-28 The analysis of variance (ANOVA) for response surface methodology by aqueous ammonia (on enzymatic digestibility)

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	3955.31	9	439.48	43.93	0.0001
X ₁ -concentration	127.76	1	127.76	12.77	0.0091
X ₂ -temperature	3596.37	1	3596.37	359.46	0.0001
X ₃ -Time	45.17	1	45.17	4.52	0.0712
X ₁ X ₂	9.86	1	9.86	0.99	0.3539
X ₁ X ₃	7.92	1	7.92	0.79	0.4030
X ₂ X ₃	106.92	1	106.92	10.69	0.0137
X ₁ ²	16.80	1	16.80	1.68	0.2361
X ₂ ²	0.61	1	0.61	0.061	0.8122
X ₃ ²	46.89	1	46.89	4.69	0.0671
Residual	70.03	7	10.00		
Lack of Fit	48.11	3	16.04	2.93	0.1633
Pure Error	21.93	4	5.48		
Cor Total	4025.34	16			

Std. Dev.	3.16	R-Squared	0.9826
Mean	75.45	Adj R-Squared	0.9602
C.V. %	4.19	Pred R-Squared	0.8003
	803.96	Adeq Precision	23.790

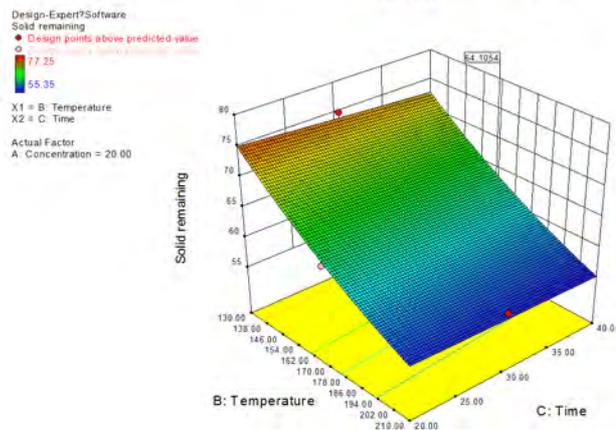
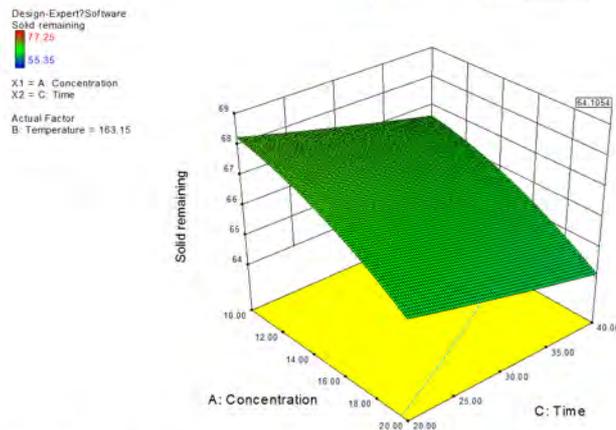
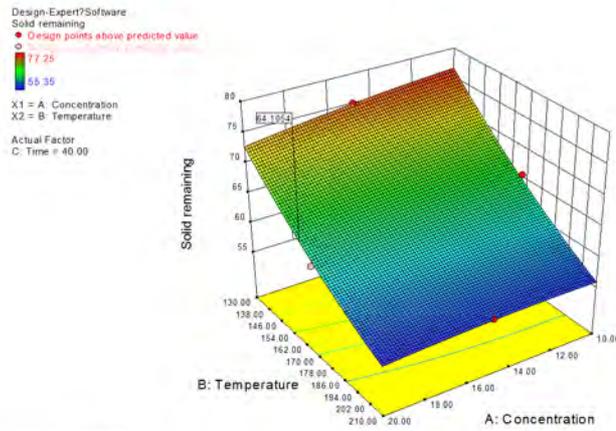


그림 3.2-18. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on solid remaining of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia

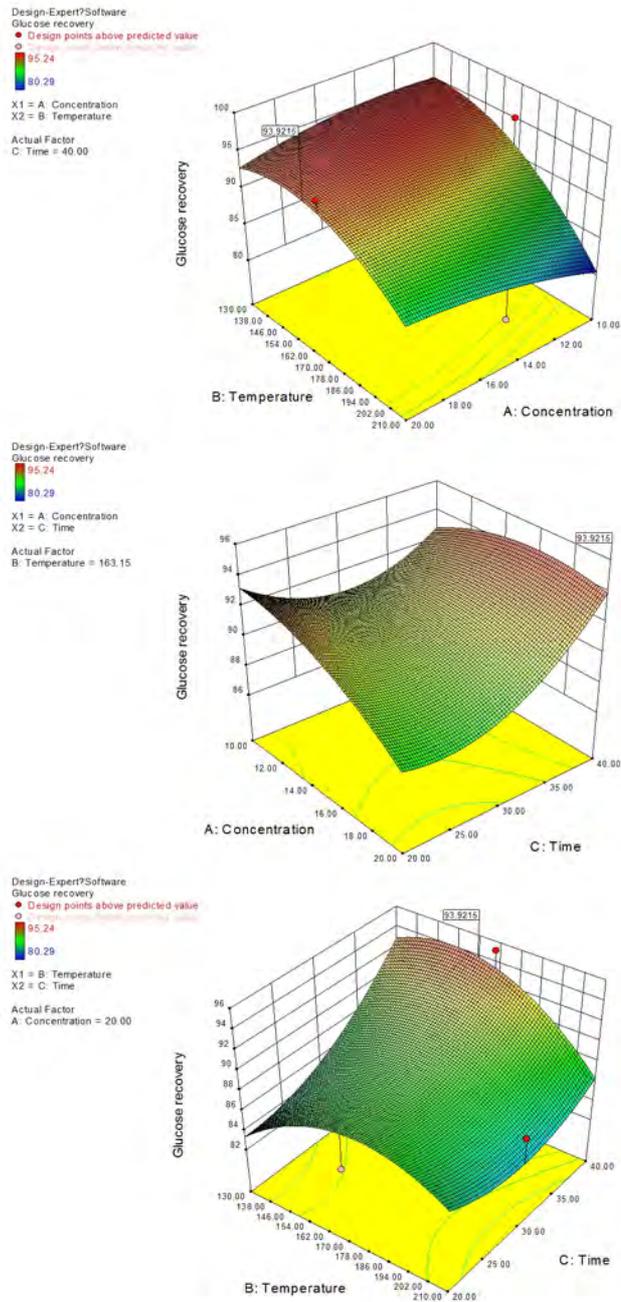


그림 3.2-19. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on glucose recovery yield of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia

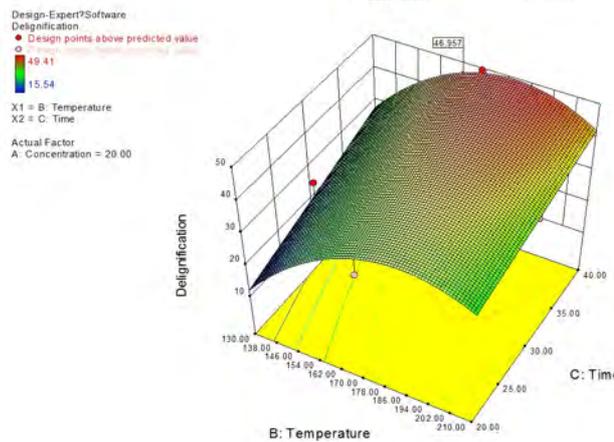
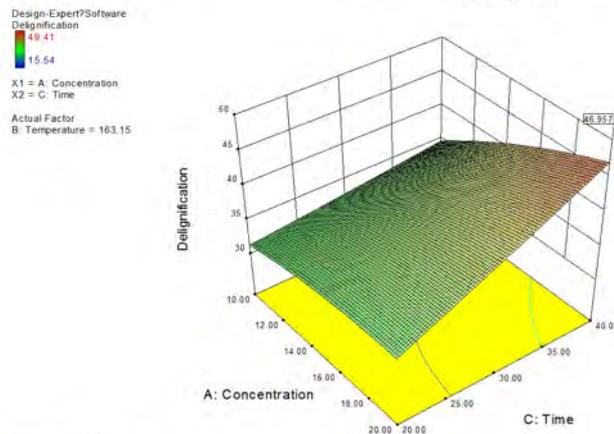
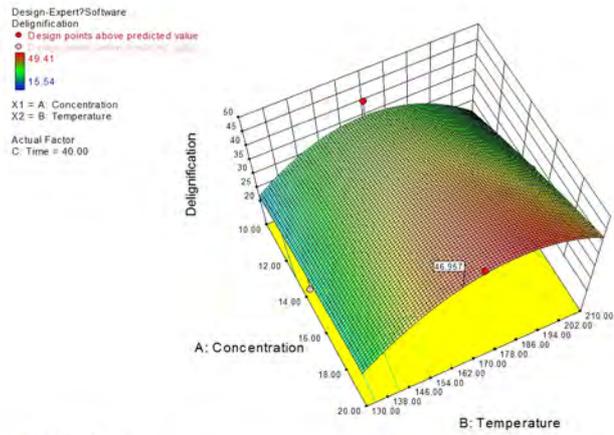


그림 3.2-20. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on delignification yield of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia

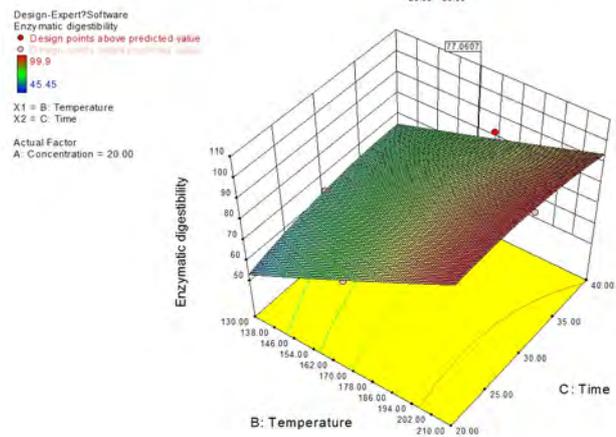
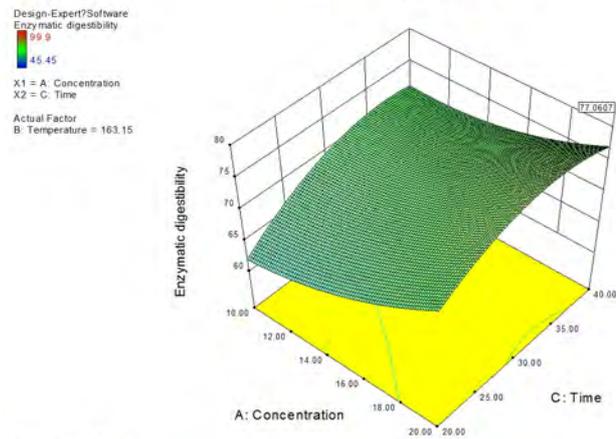
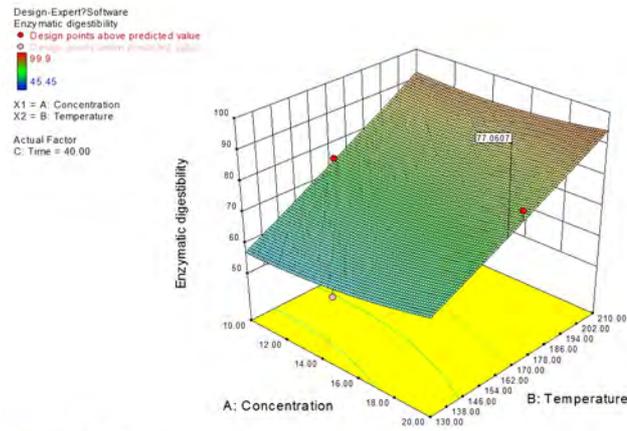


그림 3.2-21. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by aqueous ammonia

- 전체적인 바이오매스의 전처리 효율, 당화율 및 에탄올 생산 수율을 얻기 위해서는 공정에 대한 물질 수지(Mass balance)를 구하는 것이 중요하다. 바이오매스로부터 얻을 수 있는 당화율은 전처리 혹은 당화, 발효과정에서 손실되는 당 및 기타 성분을 파악해야만 정확한 당 생산량을 얻을 수 있다.
- 163.2 °C에서 40분 동안 20%(w/w) 농도의 암모니아수와 열수에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 보면 암모니아수에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 28.7 g으로 전체 바이오매스의 67.7%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 15.7 g으로 37.0%의 수율을 나타냈다. 효소당화의 저해물질로 작용하는 리그닌은 암모니아수의 전처리공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. 암모니아수로 전처리를 수행한 바이오매스의 효소당화에 대한 효소 당화율이 70.9%로 나타났다. 이것은 전처리를 수행하기 전 바이오매스의 효소당화에 대한 효소 당화율이 11.5%인 것과 비교하여 약 6.2배의 증가 효과를 확인하였다. 또한 같은 조건으로 열수로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 효소 당화율이 39.2%로 전처리 전과 비교하였을 때 비교하면 약 3.4배가 증가한 것을 볼 수 있었다. 그러나 전체적인 글루코오스의 생산수율을 고려하였을 때 37.0%의 수율을 보인 열수 전처리는 암모니아수 전처리에 비해 효율적이지 않다고 판단하였다.

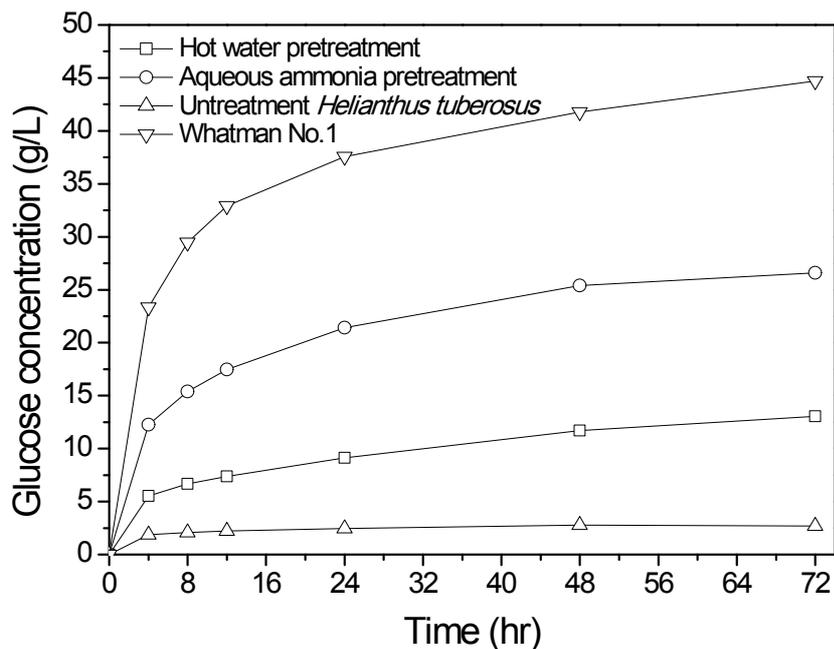


그림 3.2-22. Glucose concentration of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 163.2 °C for 40 min

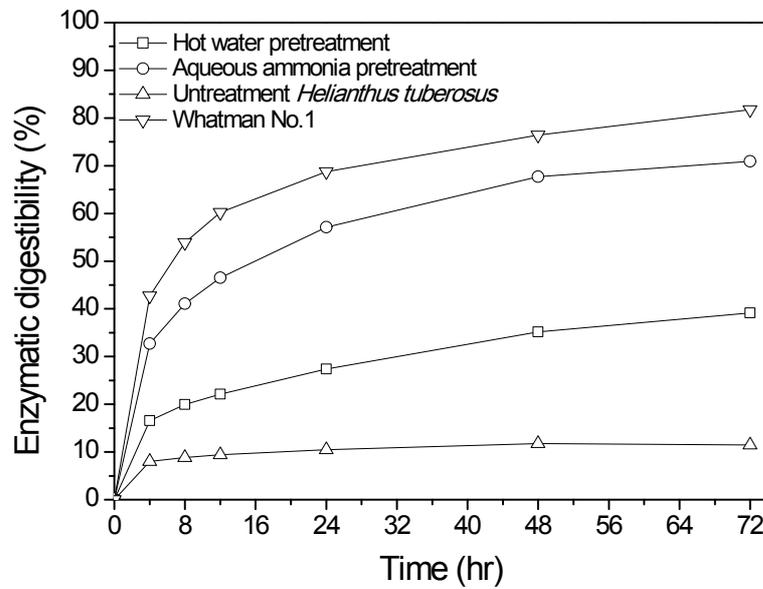


그림 3.2-23. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 163.2 °C for 40 min

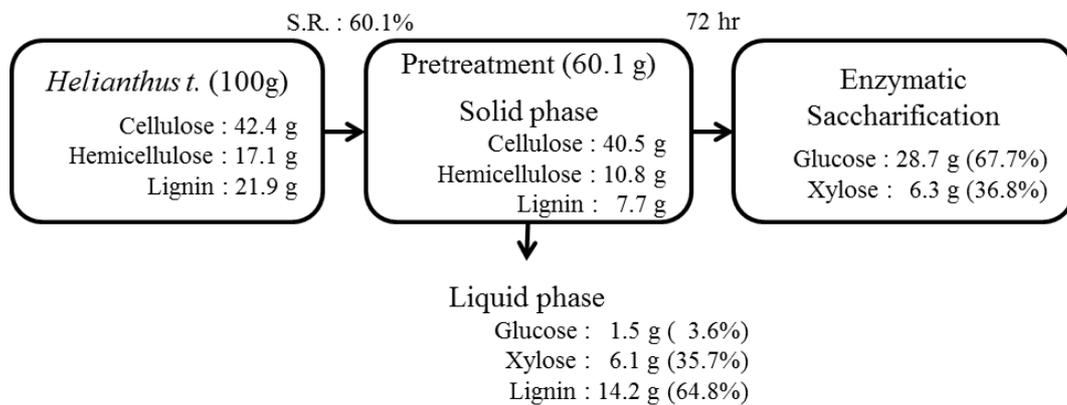


그림 3.2-24. Mass balance of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by 20%(w/w) of Aqueous ammonia at 163.2 °C for 40 min

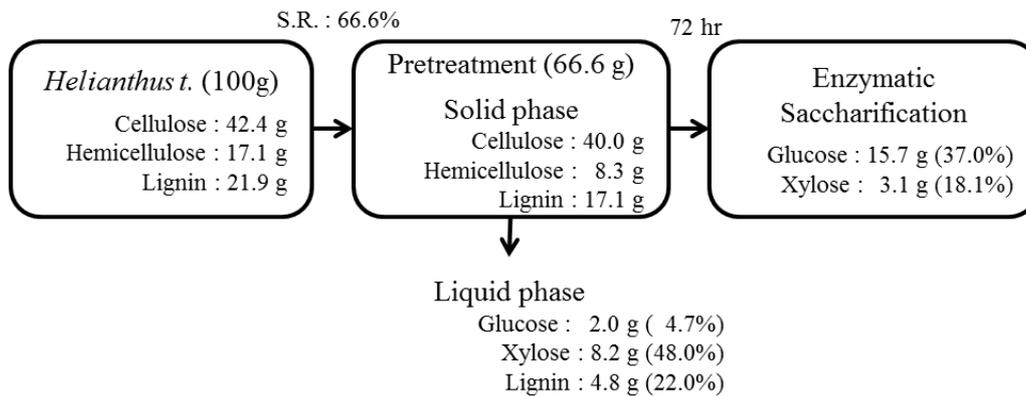


그림 3.2-25. Mass balance of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by Hot-water at 163.2 °C for 40 min

(2) 묽은 황산 용액에 의한 RSM 최적화 공정

- 묽은 황산 용액에 의한 침출 전처리의 최적 조건을 예측하기 위해 표 3.2-28과 같은 조건을 설정해서 수행하였다. 실험은 사전에 수행한 회분식 반응실험에서 확인한 농도인 0.5 ~ 1.5%(w/w) 농도의 황산 용액을 용매로 하여 수행되었고 앞서 암모니아수 전처리실험 조건과 같은 130 ~ 210 °C의 반응온도와 20 ~ 40 min의 반응시간으로 설정하여 전처리를 수행하였다. 최적화는 암모니아수에 의한 전처리 최적화와 마찬가지로 효소 당화율의 증가에 목표로 하여 실험의 결과로 고형물 잔존율, 글루코오스 회수율, 리그닌 제거율, 효소 당화율을 구하여 적용하였고 그 결과는 표 3.2-29에 나타내었다.
- 위 실험 결과를 바탕으로 침출 반응기에서 얻은 최적 조건을 예측을 하여 효소 당화율에 대한 ANOVA를 표 3.2-30과 같이 나타내었다. 모델의 P값과 F값이 각각 0.0009와 14.89로 quadratic model 기준에 부합되는 수치로 확인되었다. 또한 결정계수(R-square)값이 0.9504로 높은 신뢰도를 보임으로써 예측되는 모델에 적용이 가능하였다. 예측한 결과는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

Enzymatic digestibility

$$= 66.16 - 1.32X_1 + 27.6X_2 - 1.6X_3 - 10.47X_1X_2 - 0.84X_1X_3 - 5.62X_2X_3 + 0.38X_1^2 - 12.12X_2^2 + 0.099X_3^2$$

- 또한 예측된 최적 조건의 결과는 그림 3.2-26 부터 그림 3.2-29에 나타냈다. 반응표면분석법에 따라 황산 용액에 의한 돼지감자줄기에 대한 침출 전처리 공정은 0.5 %(w/w) 농도의 황산 용액으로 169.7 °C의 반응온도에서 20분의 반응시간에서 최적 전처리 결과를 낼 수 있는 조건임을 예측하였다. 반응 표면 분석 실험에서 예측된 최적조건으로 침출 전처리 공정에 적용하여 바이오매스의 전처리 실험을 수행하였다. 황산 용액에 대한 비교군으로 열수를 용매로 하여 같은 온도와 반응시간 조건으로 전처리를 수행하였다. 예측된 최적 조건을 통한 침출 전처리 공정에서 고형물 잔존율은 54.9%로 나타났고 89.2%의 글루코오스 회수율과 36.9%의 리그닌 제거율을 보였다. 그때의 효소 당화율은 48.1%인 것으로 확인하였다.

표 3.2-28 Independent variables for optimization of flow-through pretreatment by sulfuric acid solution

Independent Variable	Symbol	Levels		
		-1	0	1
Sulfuric acid solution concentration (%(w/w))	X ₁	0.5	1.0	1.5
Temperature (°C)	X ₂	130	170	210
Reaction time (min)	X ₃	20	30	40

표 3.2-29 Optimization results of flow-through pretreatment by sulfuric acid solution

No.	X ₁	X ₂	X ₃	Solid remaining (%)	Glucose recovery Rate (%)	Lignin removal rate (%)	Enzymatic digestibility (% theoretical max. glucose)
1	-1	0	1	52.0	80.4	27.3	65.3
2	1	1	0	26.8	0.9	1.3	63.9
3	0	1	-1	26.4	3.8	1.0	93.4
4	-1	1	0	26.9	12.2	4.8	98.1
5	0	-1	1	66.5	80.8	18.7	26.1
6	0	0	0	53.8	82.5	22.5	61.0
7	1	-1	0	66.0	84.2	1.1	31.7
8	1	0	-1	49.6	72.5	24.1	69.6
9	-1	-1	0	74.7	79.5	16.6	24.0
10	-1	0	-1	53.1	85.5	37.8	60.0
11	0	0	0	52.4	77.0	15.7	65.5
12	1	0	1	48.1	72.8	24.8	71.6
13	0	0	0	51.1	75.0	21.0	67.1
14	0	1	1	27.9	1.4	3.2	72.2
15	0	-1	-1	71.2	90.2	14.0	24.9
16	0	0	0	50.5	72.1	15.9	71.4
17	0	0	0	51.4	75.2	16.1	65.8

Figure 3.2-30 The analysis of variance (ANOVA) for response surface methodology by sulfuric acid solution (on enzymatic digestibility).

Source	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value
Model	7315.23	9	812.80	14.89	0.0009
X ₁ -concentration	13.97	1	13.97	0.26	0.6285
X ₂ -temperature	6093.53	1	6093.53	111.62	0.0001
X ₃ -Time	20.54	1	20.54	0.38	0.5590
X ₁ X ₂	438.06	1	438.06	8.02	0.0253
X ₁ X ₃	2.81	1	2.81	0.051	0.8271
X ₂ X ₃	126.45	1	126.45	2.32	0.1718
X ₁ ²	0.61	1	0.61	0.011	0.9185
X ₂ ²	618.30	1	618.30	11.33	0.0120
X ₃ ²	0.042	1	0.042	7.636×10 ⁻⁴	0.9787
Residual	382.14	7	54.59		
Lack of Fit	326.79	3	108.93	7.87	0.0374
Pure Error	55.34	4	13.84		
Cor Total	7697.36	16			

Std. Dev.	7.39	R-Squared	0.9504
Mean	60.68	Adj R-Squared	0.8865
C.V. %	12.18	Pred R-Squared	0.3095
	5315.19	Adeq Precision	13.434

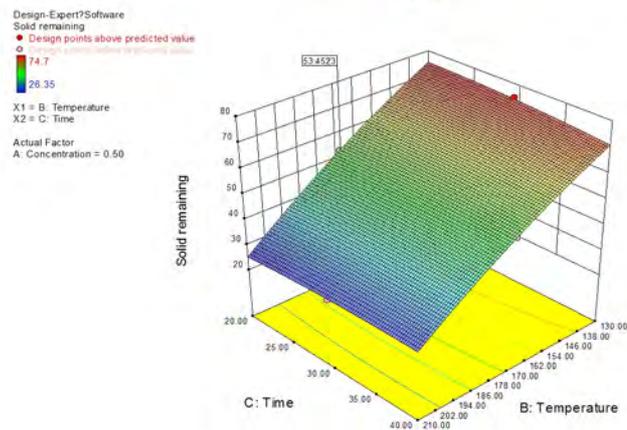
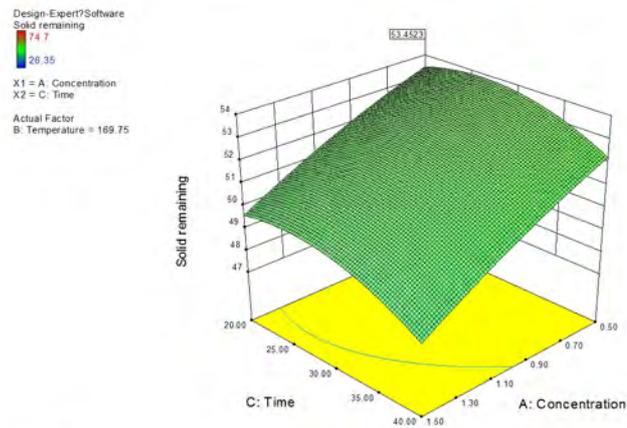
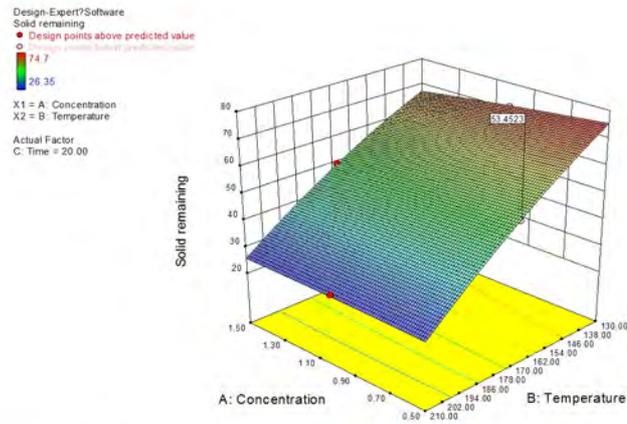


그림 3.2-26. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on solid remaining of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution

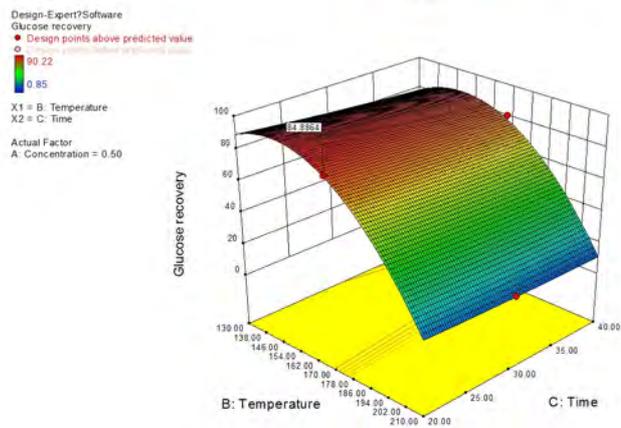
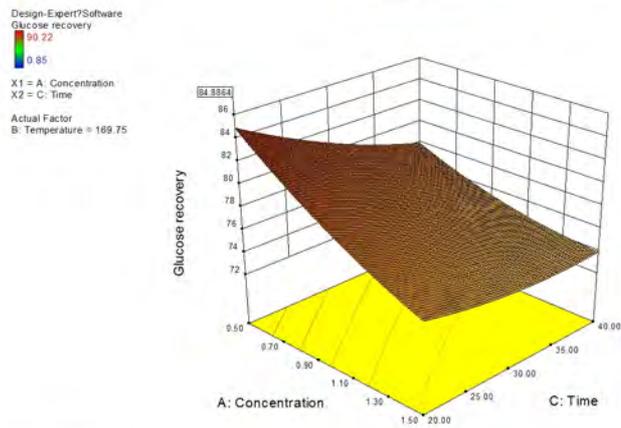
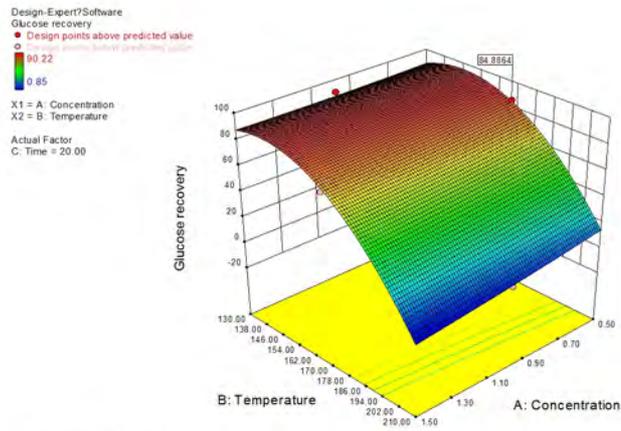


그림 3.2-27. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on glucose recovery yield of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution

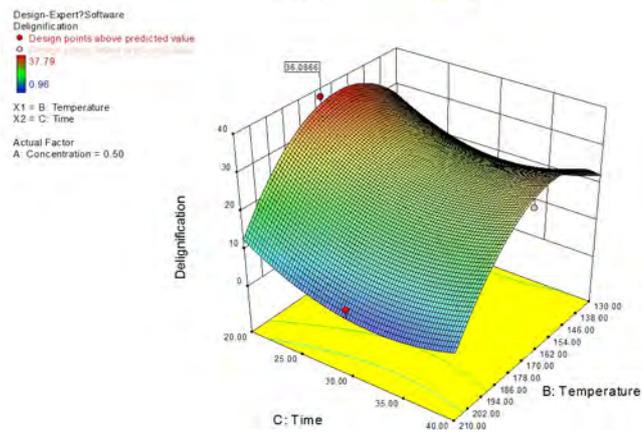
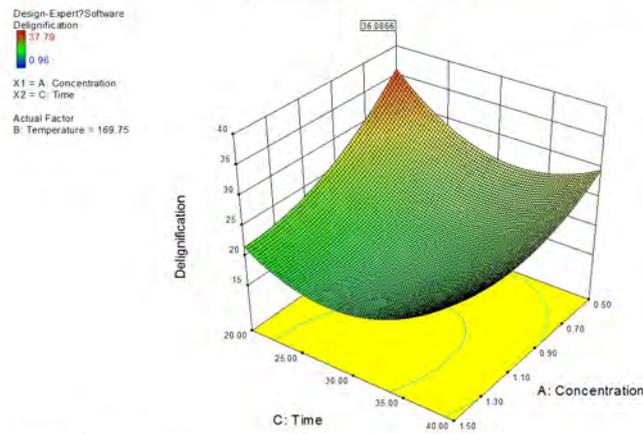
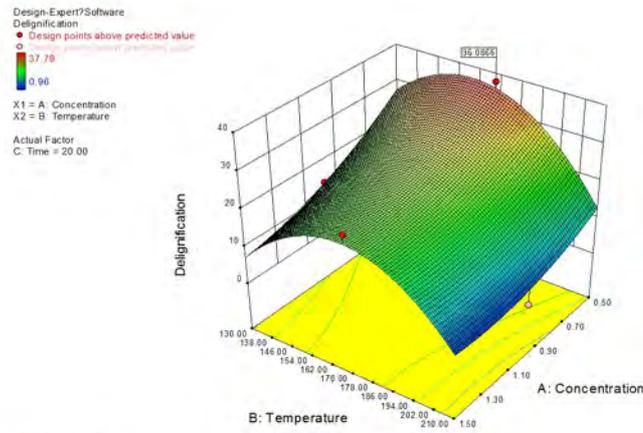


그림 3.2-28. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on delignification yield of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution

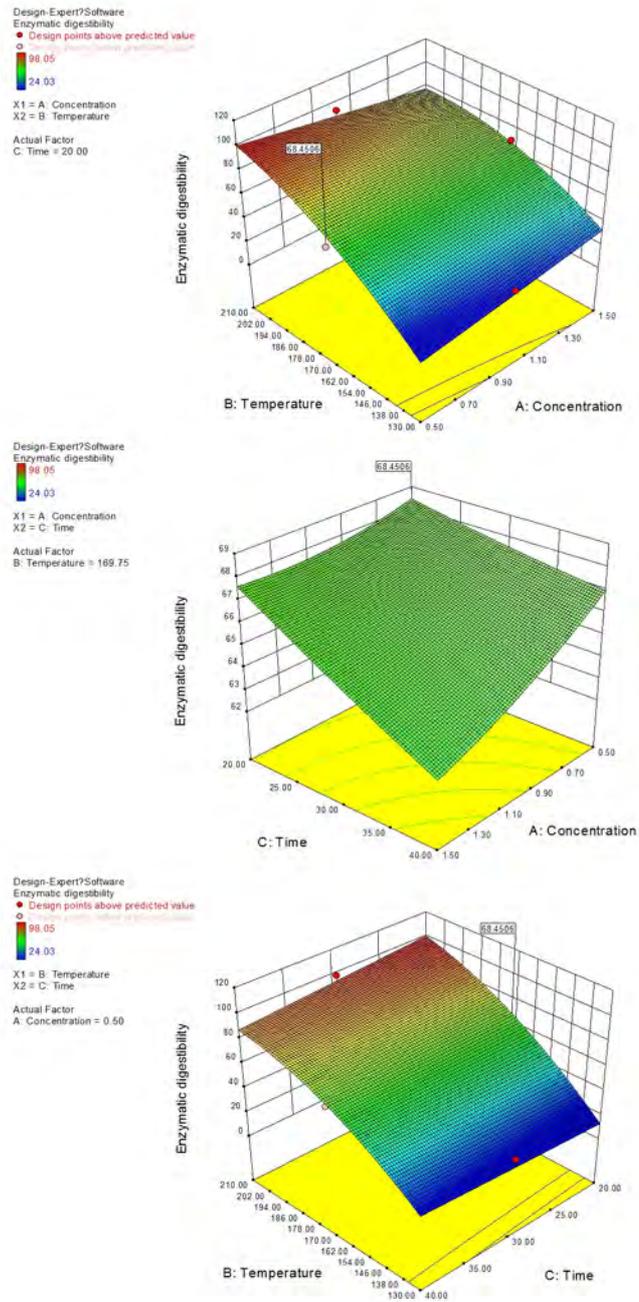


그림 3.2-29. The surface response plot of the effects of concentration, temperature and reaction time on enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by sulfuric acid solution

□ 앞서 암모니아수와 마찬가지로 황산용액에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 구하였다. 169.7 °C에서 20분 동안 0.5%(w/w) 황산 용액과 열수에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 보면 황산 용액에 의해 전처리된 바이오매스의 당화에 의한 글루코오스 생산량은 18.2 g으로 전체 바이오매스의 42.9%의 수율을 나타냈고 열수의 경우에는 12.2 g으로 28.8%의 수율을 나타냈다. 효소당화의 저해물질로 작용하는 리그닌은 황산 용액의 전처리공정으로 64.8%가 제거되었고 열수에 의해서는 22.0%가 제거되었다. 바이오매스에 대해 황산 용액과 열수 공정으로 전처리를 한 후 수행된 효소당화에서는 효소 당화율이 각각 48.1%와 31.5%로 두 공정을 비교하면 약 1.5배 정도의 차이를 보였다. 그리고 11.5%의 효소 당화율을 보인 전처리 전의 바이오매스와 비교하면 2.7배에서 4.2배 정도 효소 당화율의 증가 효과는 있지만 암모니아수에 의한 전처리의 경우보다 전처리 시간은 짧지만 고형물 잔존율도 떨어지고 효소 당화율도 크게 떨어지는 결과를 보이는 것을 알 수 있었다.

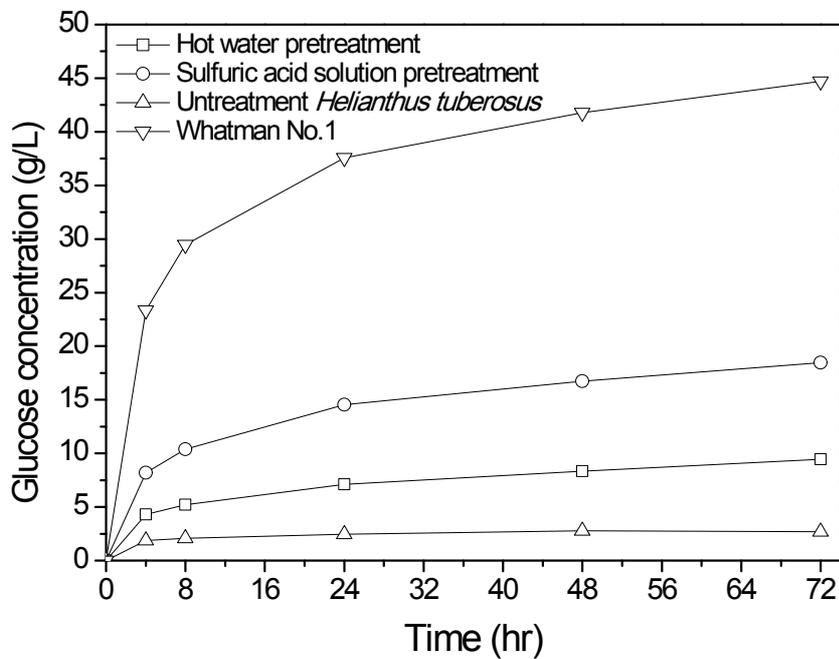


그림 3.2-30. Glucose concentration of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 169.7 °C for 20 min

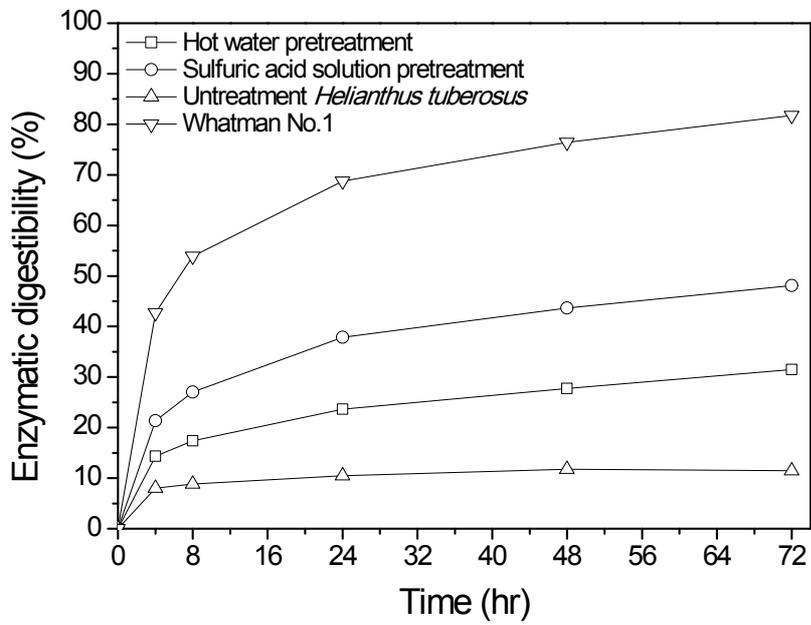


그림 3.2-31. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue at 169.7 °C for 20 min

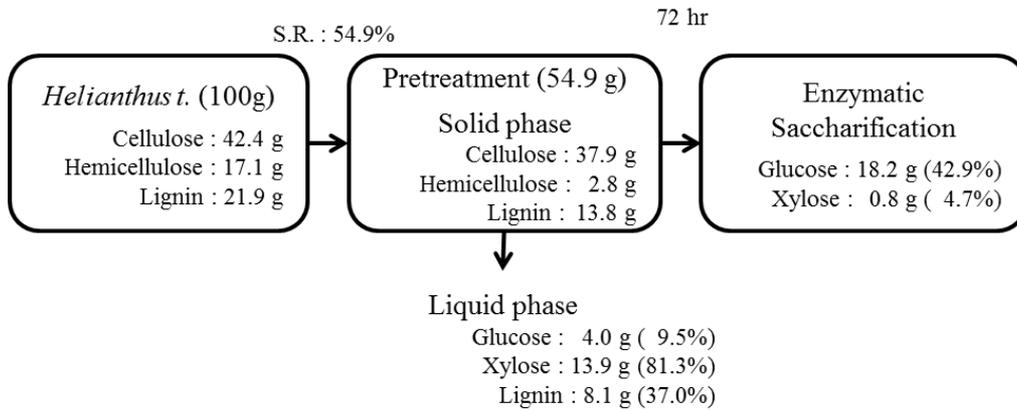


그림 3.2-32. Mass balance of pretreatment by 0.5%(w/w) Sulfuric acid solution at 169.7 °C for 20 min

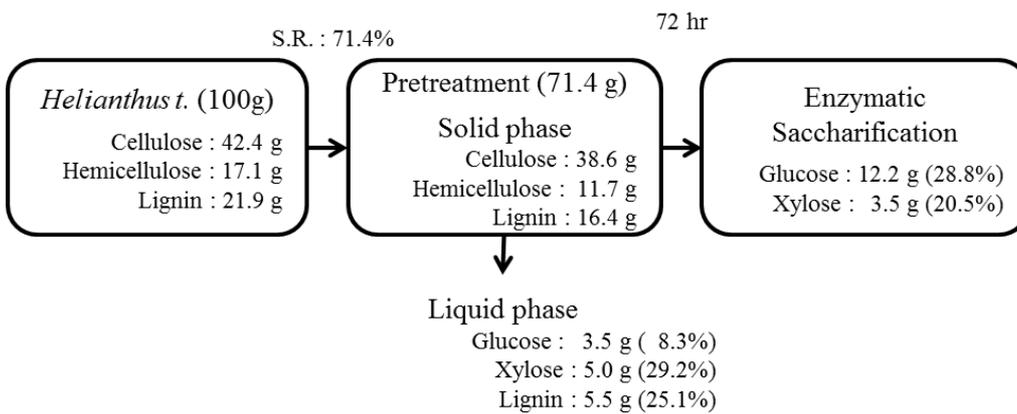


그림 3.2-33. Mass balance of pretreatment by Hot-water at 169.7 °C for 20 min

(3) 돼지감자 줄기의 2단 전처리

(가) 전처리 바이오매스의 효소당화

- 이전 실험에서 돼지감자줄기에 대한 암모니아수와 황산 용액의 전처리 최적 조건을 구하였다. 먼저 1단으로 침출 전처리가 된 돼지감자 줄기의 최대 당화율은 암모니아수에 의한 전처리 공정일 때 70.9%로 나타내었다. 이러한 효소 당화율을 더 향상시키기 위해 암모니아수와 황산용액의 각각 최적화된 전처리 조건을 기본으로 한 2단 침출 전처리 공정을 표 3.2-31과 같은 조건으로 수행하였다. 2단 침출 전처리는 각 조건별로 암모니아수와 열수, 열수와 암모니아수, 황산 용액과 열수, 열수와 황산 용액, 암모니아수와 황산 용액 그리고 황산 용액과 암모니아수의 순서로 전처리를 수행하여 비교하였다. 각각 전처리가 된 바이오매스는 효소당화를 진행하여 효소 당화율을 구하였다.
- 그림 3.2-34와 그림 3.2-35는 2단 전처리 공정을 거친 바이오매스의 효소당화 결과를 나타낸 그래프이다. 효소당화를 72시간 동안 수행한 결과를 보면 효소 당화율이 최대인 1단계로 암모니아수를 처리한 후 2단계로 황산 용액으로 처리한 전처리의 경우 효소 당화율이 79.8%이고 글루코오스 농도는 29.2 g/L이었다. 1단계로 암모니아수를 적용하여 효소당화의 저해요소로 작용하는 리그닌을 바이오매스에서 제거하여 바이오매스의 구조를 헐겁게 한 후 2단계로 황산 용액을 반응시켜서 헤미셀룰로오스 성분을 액상으로 빠져 나가게 하였다. 헤미셀룰로오스와 리그닌이 빠져나가면서 빈 공간이 만들어서 효소당화를 수행할 때 효소와 셀룰로오스가 반응하는 면적을 넓게 하는 효과를 주어서 효소 당화율을 높이는데 큰 기여를 하는 것으로 판단이 되었다.

표 3.2-31 The experimental conditions for two-step pretreatment process

Solution	Condition 1		Condition 2		Condition 3	
	Aqueous ammonia	Hot water	Sulfuric acid	Hot water	Aqueous ammonia	Sulfuric acid
Concentration (% (w/w))	20	-	0.5	-	20	0.5
Temperature (°C)	163.2	163.2	169.7	169.7	163.2	169.7
Reaction time (min)	40	40	20	20	40	20

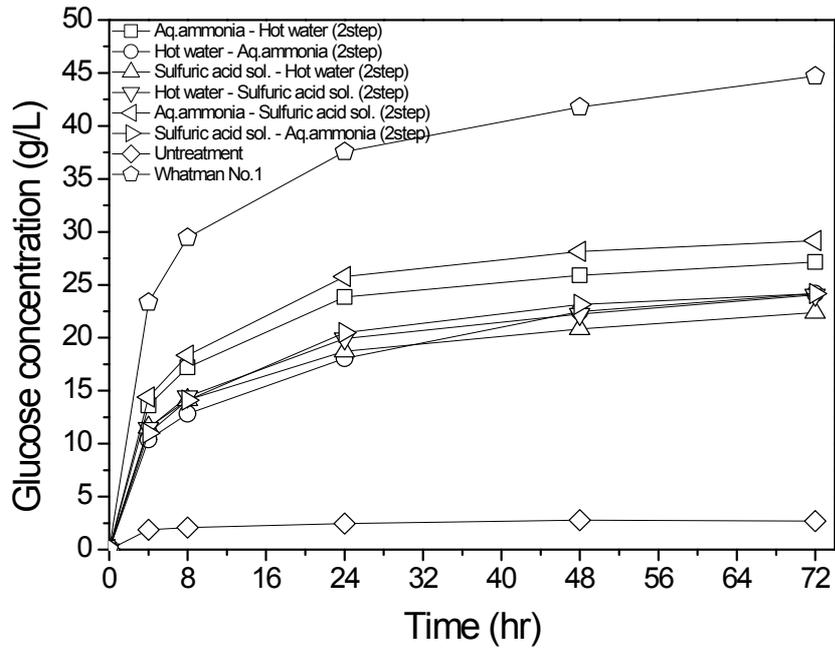


그림 3.2-34. Glucose concentration of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by 2 step methods

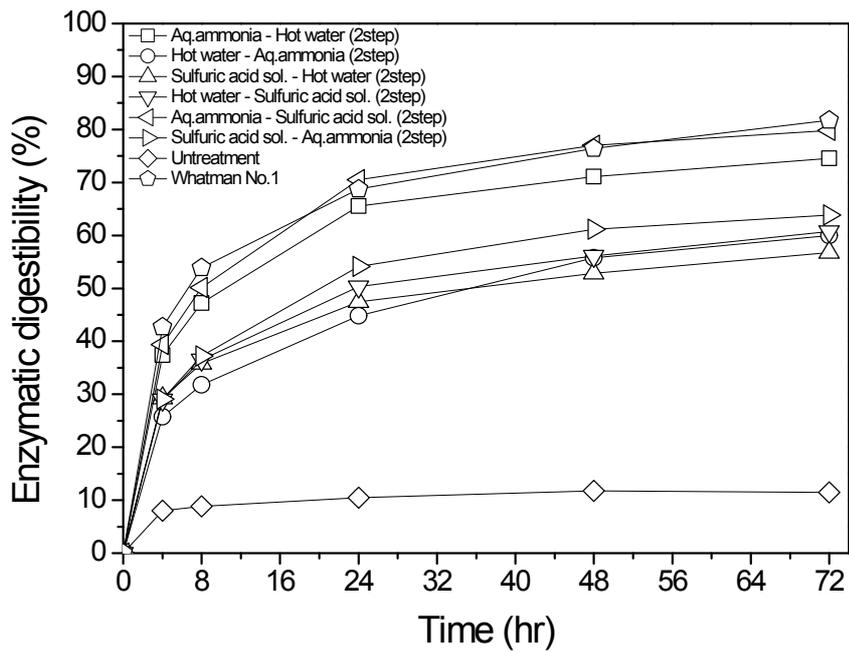


그림 3.2-35. Enzymatic digestibility of pretreated *Helianthus tuberosus* residue by 2 step methods

□ 앞서 암모니아수의 전처리 공정과 황산 용액의 전처리 공정과 마찬가지로 2단 전처리에 의한 전처리 공정에 대한 물질 수지를 구하였다. 먼저 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간동안 열수로 전처리를 하여 그림 3.2-36과 같이 물질 수지를 나타내었다. 이때 글루코오스 생산량은 28.9 g으로 전체 바이오매스의 68.2%의 수율을 나타냈다. 암모니아수로만 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 효소 당화율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 같은 온도와 같은 시간동안 열수에 의한 전처리를 수행한 후에 암모니아수로 전처리를 수행하고 그림 3.2-37처럼 물질 수지를 구하였다. 이때 글루코오스 생산량은 23.6 g으로 전체 바이오매스의 55.7%의 수율을 보였다. 열수로만 전처리를 하였을 때보다 암모니아수를 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 50%의 글루코오스 생산량 향상을 나타냈다. 그러나 암모니아수를 먼저 처리한 공정보다는 글루코오스 생산량이 낮은 경향을 보였다. 암모니아수에 의한 탈 리그닌으로 인해 바이오매스 사이의 공간을 넓힌 후 열수에 의한 헤미셀룰로오스의 분리로 효소의 접촉 면적을 넓혀서 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 도움을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

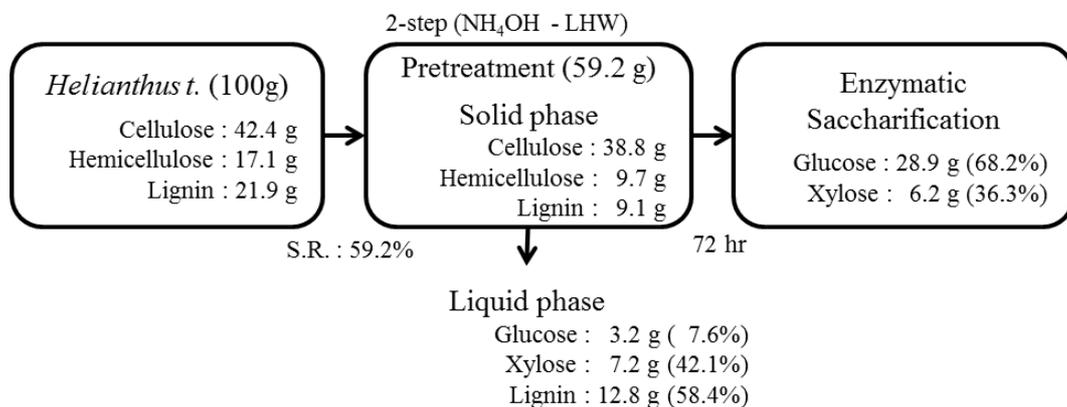


그림 3.2-36. Mass balance of pretreatment by 20%(w/w) Aqueous ammonia for 40 min and Hot-water for 40 min at 163.2 °C

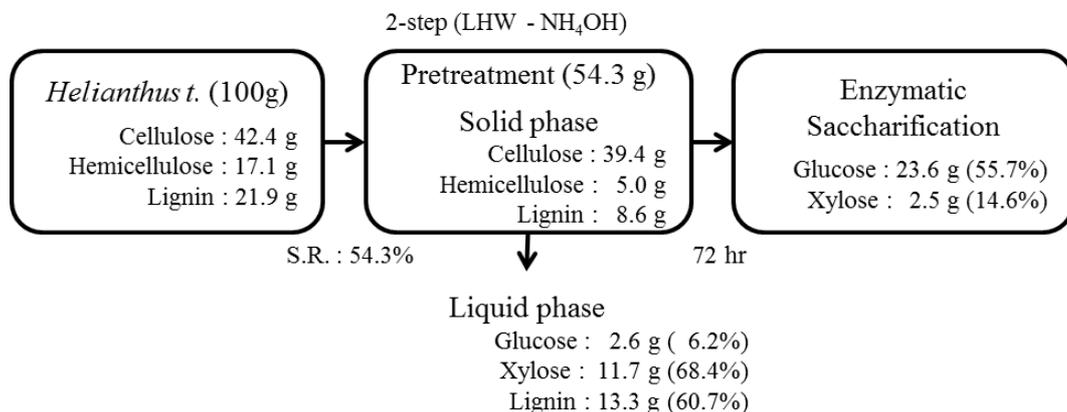


그림 3.2-37. Mass balance of pretreatment by Hot-water for 40 min and 20%(w/w) Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C

□ 1단계로 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 한 후 같은 온도와 같은 시간 동안 열수로 2단계 전처리를 하였다. 전처리 결과는 그림 3.2-38과 같이 물질 수지를 나타내었다. 이때 글루코오스 생산량은 19.4 g으로 전체 바이오매스의 45.8%의 수율을 나타내었다. 황산 용액으로만 전처리를 하였을 때와 비교하여 추가로 열수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 고형물 잔존율이 다소 낮아졌지만 효소 당화율은 소폭 상승한 것을 알 수 있었다. 그리고 같은 온도와 시간동안 열수를 먼저 전처리를 한 이후에 황산 용액으로 전처리를 수행하고 그림 3.2-39와 같이 물질 수지를 구하였다. 이때 글루코오스 생산량은 22.0 g으로 전체 바이오매스의 51.9%의 수율을 보였다. 돼지감자 줄기를 열수로만 전처리를 하였을 때보다 황산 용액을 추가로 처리한 2단 전처리 공정에서는 80%의 높은 글루코오스 생산량 향상을 나타냈다. 또한 암모니아수와는 다르게 열수를 먼저 처리한 후 황산 용액을 처리한 바이오매스가 상대적으로 글루코오스 생산량이 높게 생산된 경향을 보였다.

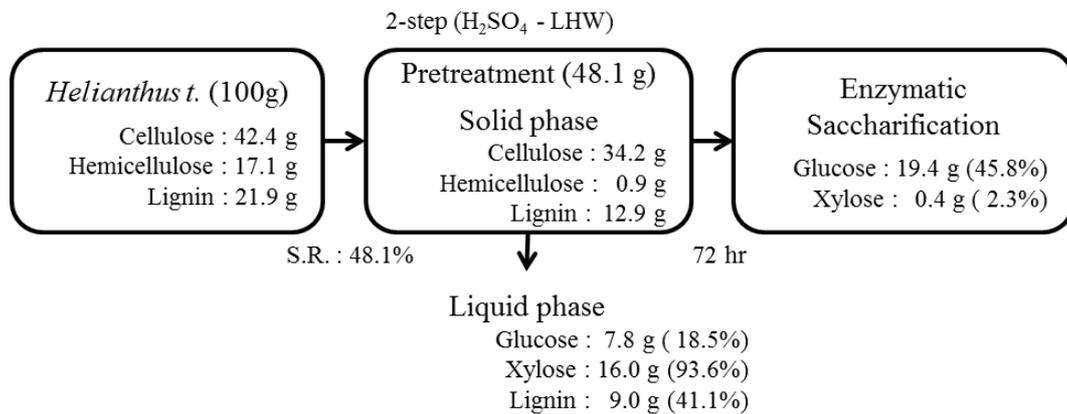


그림 3.2-38. Mass balance of pretreatment by 0.5%(w/w) Sulfuric acid solution for 20 min and Hot-water for 20 min at 169.7 °C

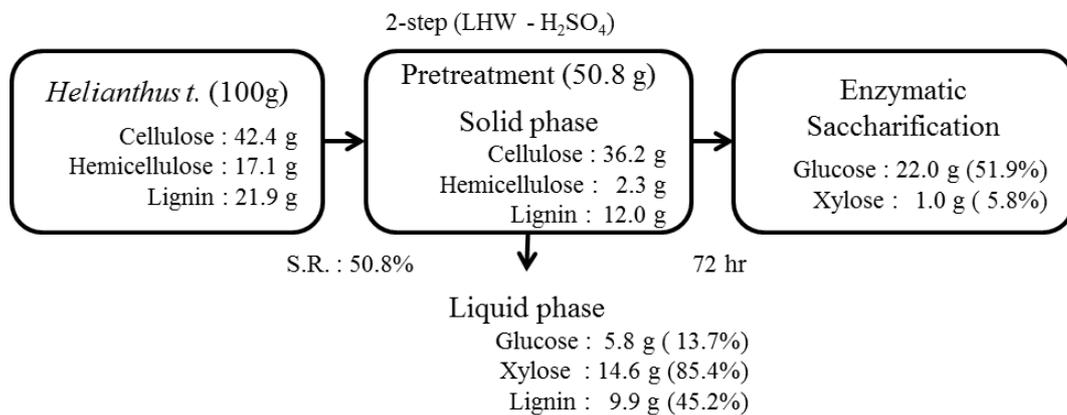


그림 3.2-39. Mass balance of pretreatment by Hot-water for 20 min and 0.5%(w/w) Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7 °C

□ 1단계 공정으로 163.2 °C에서 40분 동안 암모니아수로 전처리를 한 후 2단계 공정으로 169.7 °C에서 20분 동안 황산 용액으로 전처리를 하여 그림 3.2-40과 같이 물질 수지를 구하였다. 이때 글루코오스 생산량은 30.7 g으로 72.4%의 수율이 나타났다. 이 공정은 다른 공정보다는 상대적으로 높은 결과를 나타내주었다. 반대로 황산 용액을 먼저 처리한 후 암모니아수를 처리한 2단 전처리 공정에서는 글루코오스 생산량이 20.9 g으로 49.3%의 수율로 그림 3.2-41과 같이 나타났다. 황산 용액을 먼저 처리한 2단 전처리 공정은 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리공정에 비해 글루코오스가 약 30% 낮게 생산되었다. 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리는 효소당화의 수율을 높이는 작용을 하는 것으로 판단되었다. 암모니아수에 의한 탈 리그닌으로 인해 바이오매스 사이의 공간을 넓힌 후 황산 용액에 의해 헤미셀룰로오스가 분리되어 효소와의 접촉 면적을 넓혀서 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 큰 역할을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다. 그렇지만 황산 용액이 먼저 처리된 2단 전처리 바이오매스는 수율의 향상과는 크게 영향이 없는 경향을 보였다.

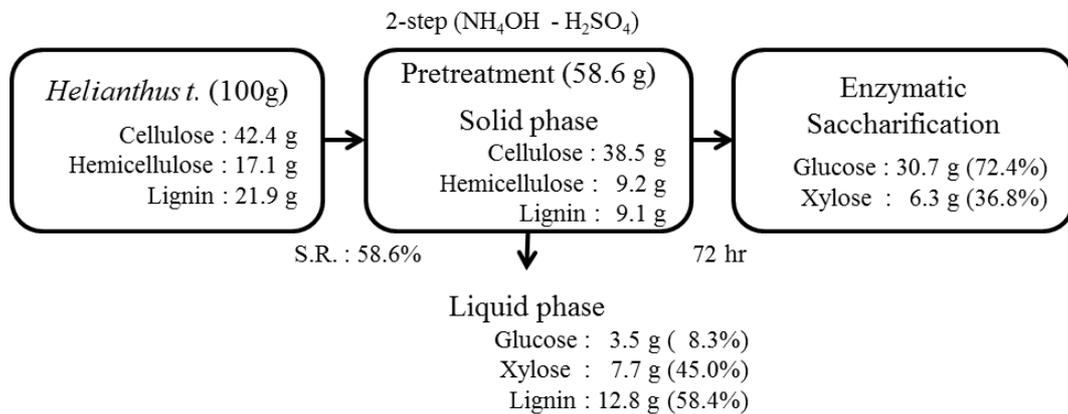


그림 3.2-40. Mass balance of pretreatment by 20%(w/w) Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C and 0.5%(w/w) Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7 °C

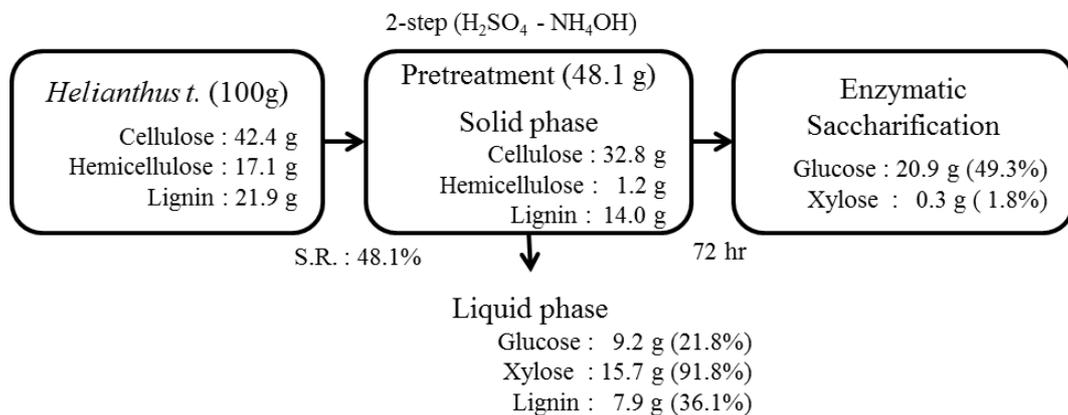


그림 3.2-41. Mass balance of pretreatment by 0.5%(w/w) Sulfuric acid solution for 20 min at 169.7 °C and 20%(w/w) Aqueous ammonia for 40 min at 163.2 °C

□ 그 결과로 암모니아수에 의한 전처리에서는 20%(w/w)의 농도에서 163.2 °C의 반응온도로 40분간 전처리를 하였을 때가 최적 전처리 조건으로 나타났고 황산용액에 의한 전처리에서는 0.5%(w/w)의 농도에서 169.7 °C의 반응온도에서 20분간 전처리를 수행하였을 때 최적 전처리 조건인 것을 확인 하였다. 또한 각각 최적 전처리 조건으로 2단 전처리 공정에 전처리 용액의 순서를 변화시켜 적용을 시켰을 때 암모니아수를 먼저 처리한 2단 전처리는 효소 당화의 수율을 높이는 작용을 하지만 황산 용액이 먼저 처리된 2단 전처리 바이오매스는 수율의 향상과는 크게 영향이 없음을 알 수 있었다. 효소당화의 저해요소로 작용하는 리그닌을 바이오매스에서 제거하여 바이오매스의 구조를 헐겁게 한 후 2단계로 황산 용액을 반응시켜 헤미셀룰로오스 성분을 액상으로 분별되게 하면 헤미셀룰로오스와 리그닌이 빠져나가면서 빈 공간이 만들어져 표면적의 증가로 인해 효소당화를 수행할 때 효소의 넓은 접촉 면적으로 셀룰로오스와 효소가 반응하는데 도움을 주는 효과가 있다는 것을 알 수 있었다.

3. CTSR (Continuous Twin Screw-driven Reactor)를 이용한 바이오매스 전처리

가. CTSR 설계 및 제작

(1) CTSR 설계

- CTSR을 제작하기 전 장치시스템을 설계하였으며, 설계도는 그림 3.2-42, 장치의 주요 사양은 표 3.2-32에 나타내었다.

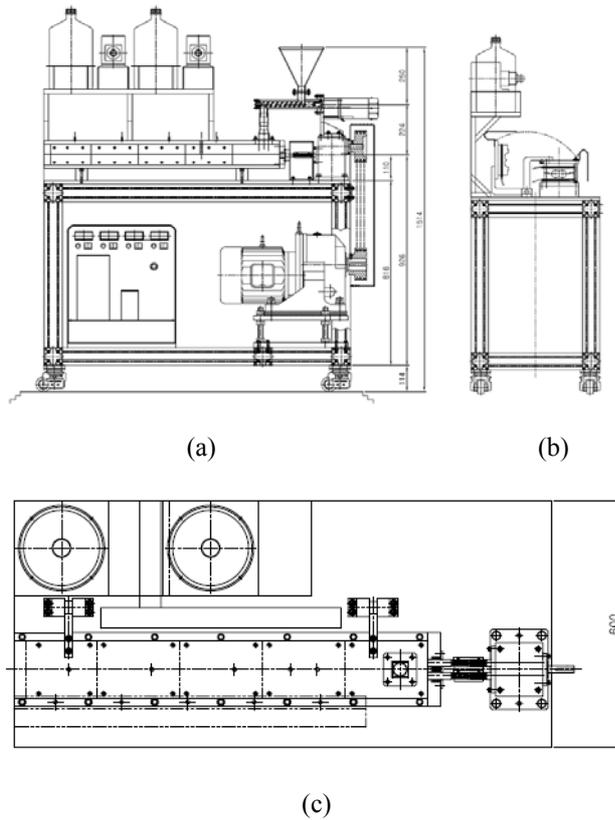


그림 3.2-42. Continuous Twin Screw-driven Reactor (CTSR) 설계도
(a) 정면, (b) 측면, (c) 평면

표 3.2-32 CTSR의 주요 사양

장치 Dimension		제어구성요소		장치구성요소		비고
바렐길이	1 M	원료 투입속도	2 g/min	구동모터	380 V, 3 ϕ , 5마력	온도조절 가능
스크류 직경	< 40 mm (Shaft dia, 20 mm)	바렐온도	250 °C	원료투입장치		회전속도 조절가능
구동모터	10 rpm	모터 제어방식	OVP or OAP 회로부착	용매 저장고	4 L	
용매 투입량	4 - 10 mL	용매 투입속도	4 - 10 mL/min	스크류	5, 10 mm	

(2) CTSR 제작

□ 바이오매스의 연속 분별/당화를 위한 장치 시스템 (CTSR)을 제작하였으며 CTSR 사진은 그림 3.2-43에 나타내었다. 장치는 본체와 컨트롤 박스로 구성하였으며, 본체는 가로 1300 mm, 세로 600 mm, 높이 1600 mm, 컨트롤 박스는 가로 460 mm, 세로 390 mm, 높이 1300 mm의 직육면체 형태로 제작하였다. 본체는 모터, 받침대, 바렐, 스크류, 시료투입장치로 구성하였으며, 모터는 3.7 kW, 5 HP의 성능을 가진 것을 장착하고 바렐은 sus 316을 이용, 총 5 부분으로 나누어 제작하였으며 바렐 내부에는 twin screw를 장착하였다. 바렐 각 부분에는 총 6개의 heating bar를 상단과 하단에 각각 3개씩 장착하여 반응온도에 도달할 수 있도록 하였으며, 바렐마다 thermocouple을 장착하여 온도 측정이 가능하도록 하였다. 1번 바렐에는 시료와 촉매투입을 위해 2개의 투입구를 각각 시료투입장치 및 50 mm 관과 연결하였으며, 시료 투입 시 고온으로 인하여 시료가 막히는 것을 방지하기 위해 냉각 파이프를 장착하였다. 시료와 촉매가 투입되는 스크류는 직경 20 mm, 길이 1300 mm인 축에 장착될 수 있도록 직경 38 mm, 길이 18 mm, 28 mm, 38 mm, 48 mm로, 길이에 따라 pitch size가 다르도록 제작하였고 정 방향과 역 방향, kneading block의 3가지 타입으로 구성하여 다양한 조합이 가능하도록 하였다. 촉매의 투입은 물과 촉매의 양을 각각의 펌프로 조절하여 촉매 투입구로 투입함으로써 촉매 농도에 따른 실험이 용이하도록 하였다. 컨트롤 박스에는 각각의 배럴과 스크류 모터, 시료투입장치 모터를 작동, 조절할 수 있는 컨트롤러를 장착하였으며, 이 때 배럴의 온도는 0 - 250 °C, 스크류 속도 및 시료 투입속도는 0.01 ~ 60.00 rpm까지 setting이 가능하도록 하였다.

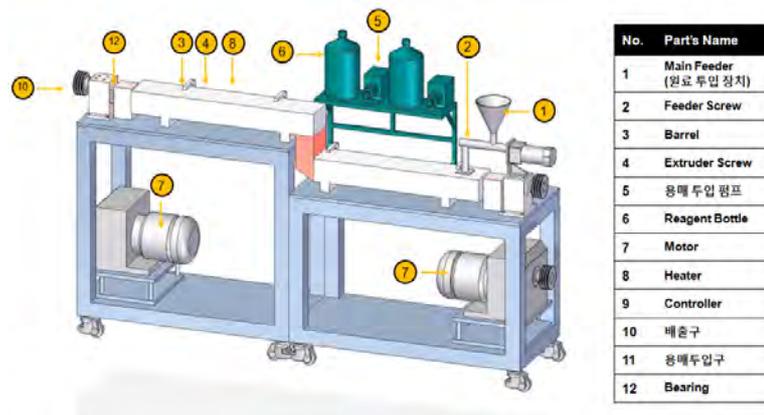


그림 3.2-43. Continuous Twin Screw-driven Reactor (CTSR)

나. CTSR을 이용한 전처리

(1) 실험방법

(가) 탄수화물 분석

□ 본 연구에 이용된 유채대의 탄수화물분석은 NREL/TP-510-42623에 따라 수행하였으며 실험과정은 다음과 같았다. 유채대 샘플 (8 - 14 mesh) 0.3 g과 72% H₂SO₄ 3 mL를 주입한 다음 항온수조 30 °C에서 1시간 동안 반응 후 84 mL의 증류수를 첨가하여 autoclave에서 121 °C, 1시간 반응 시켰다. 준비된 샘플의 당의 분석을 위해 분석기기는 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)를 사용하고 분석컬럼은 Aminex HPX-87H (Bio-rad, USA)를 사용하였다. 이 때 분석 용매는 0.005M H₂SO₄를 사용하였고, 용매유속은 0.5 mL/min, 컬럼과 RI 검출기의 온도는 각각 65 °C, 50 °C로 조절하였다.

(나) 리그닌/회분 분석

□ 유채대 샘플 (8 - 14 mesh) 2 g을 100 mL 유리시험관에 넣고 72% H₂SO₄ 30 mL를 주입하여 2시간동안 반응시킨 후, 560 mL의 증류수를 첨가한 후 4시간 동안 환류 냉각하여 잔류 당을 추출한 다음, 105±3 °C에서 24시간 건조 후 무게를 측정하여 리그닌 함량을 결정하였다. 회분분석은 유채대 샘플 (8 - 14 mesh) 2 g을 도가니에 넣고 575 ± 25 °C 전기로에서 4시간 회화 후 무게를 측정하여 회분 함량을 결정하였다.

(다) CTSR을 이용한 전처리

□ CTSR을 이용한 전처리를 수행하기 위해, 스크류는 그림 3.2-44와 같이 구성하였다. Chemical effect를 평가하기 위해 LHW (Liquid Hot Water), Acid (H₂SO₄), Alkaline (NaOH)를 이용한 CTSR 전처리를 수행하였으며, 각각의 전처리 조건은 표 3.2-33에 나타내었다. 각각의 방법을 이용하여 전처리 반응을 수행 후, 고체와 액체의 비율 (S/L ratio), 바렐 온도 및 축매농도에 따른 전처리 후 잔여고체물의 glucan 및 XMG (Xylan + Mannan + Galactan) 함량과 hydrolyzate내의 XMG 및 glucose 수율을 비교하였다.

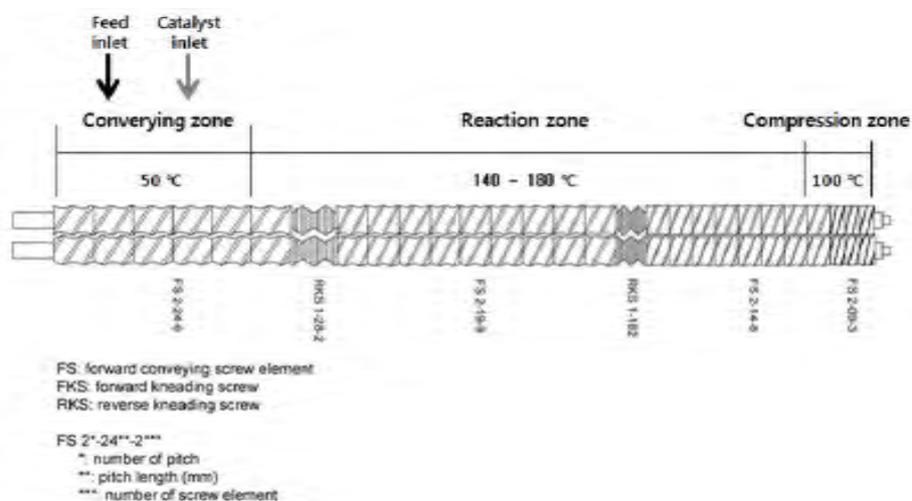


그림 3.2-44. CTSR의 Screw configuration

표 3.2-33 CTSR을 이용한 전처리 조건

S : L	Residence time (min)	Barrel Temperature (°C)	Catalyst concentration (H ₂ SO ₄ or NaOH, w/v, %)
1:1 - 1:4	10.2	140 - 180	-
1:3		170	0.5 - 2.5
1:3		170	0.25 - 2.0

(라) 효소당화율 (Enzymatic Digestibility) 측정

□ CTSR 전처리 및 촉매에 따른 전처리 효과를 확인하기 위하여 효소당화율을 측정하였으며, 이 때 전처리 전의 유채대와 α-cellulose를 대조군으로 사용하여 digestibility 차이를 비교하였다. 사용된 효소는 Celluclast 1.5L (Novozyme A/S Bagsvaerd, Denmark)와 Novozym 188 (Novozyme A/S Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였다. 1 g의 glucan을 포함하는 시료 (효소의 유효성 실험의 경우 1 g의 바이오매스)의 무게를 잰 후, pH 4.8의 0.1 M sodium citrate buffer 50 mL와 2% sodium azide 1 mL를 넣고 D.I. water를 30 FPU/g-glucan에 해당하는 cellulase 및 70 pNPGU/g-glucan에 해당하는 Novozyme-188을 넣어 48 시간동안 반응시키면서 일정시간 간격으로 시료를 채취했다. 채취한 시료는 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 취한 상등액을 syringe filter로 여과하여 HPLC (Breeze HPLC system, Waters Co., USA)로 분석하였다.

(마) Cellulose의 결정화도 (Crystallinity) 측정

□ 전처리 전의 유채대 및 CTSR 전처리 유채대의 Cellulose 결정화도를 측정하기 위하여 XRD (X-ray Diffraction, MAX - 3500V, Rigaku Co., Japan) 분석을 수행하였다. XRD 측정 시 Cu- Kα radiation은 40 kV, 40 mA를 사용하였고, scanning range는 10 - 80° (2°per min in 2θ)에서 측정하였다.

(2) 연구결과

(가) 유채대의 구성성분

□ 유채대의 탄수화물함량은 총 49.9%로 이 중 Cellulose는 32.9%, XMG는 17.1%였으며, Arabinan은 0.9%를 나타내었다. 비탄수화물로서 리그닌(extractive 포함)은 36.8%, 회분은 8.0%로 나타났다 (표 3.2-34).

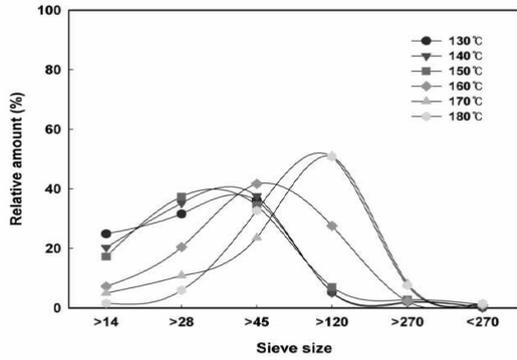
표 3.2-34 유채대의 구성성분

Glucan (%)	Arabinan (%)	XMG (%)	Lignin (%)	Ash (%)	Total (%)
32.86	0.86	17.06	36.80	7.95	95.53

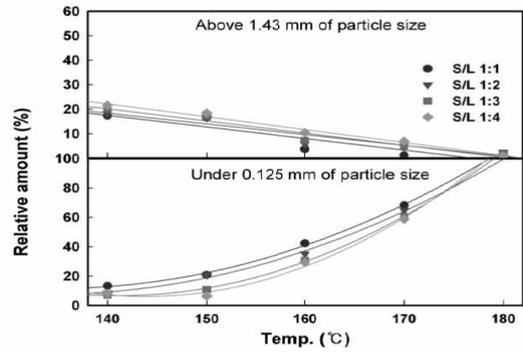
(나) CTSR을 이용한 LHW 전처리

① Particle size distribution

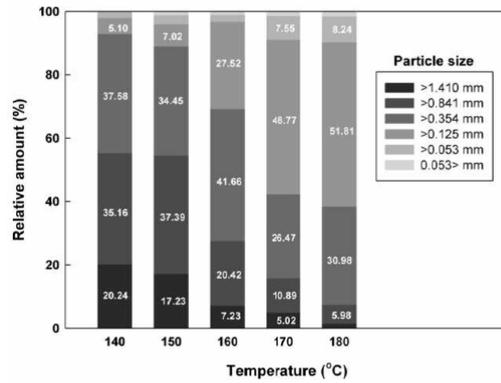
- 그림 3.2-45 (a), (b), (c)는 반응온도 (130~170 °C)에 따라 LHW 전처리된 유채대의 particle size distribution (a)과 1.41 mm 이상과 0.125 mm 이하의 particle size에서 고액비 (1:1~1:4) 및 반응온도에 따른 relative amount (b) 및 고액비 1:3일 때의 반응온도에 따른 particle size distribution (c)을 각각 나타낸 것이다. Particle size가 1.41 mm 이상 (14 mesh)일 경우에는 온도가 높아짐에 따라 그 양이 감소하고, 0.125 mm 이하 (120 mesh)의 particle size에서는 그 양이 급격히 증가하는 것을 알 수 있었으며 (그림 3.2-45 (a)), 0.125 mm 이하의 particle size에서는 고액비가 증가함에 따라 급격히 증가하고 1.41 mm이상의 particle size에서는 일정하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (그림 3.2-45 (b)). 이러한 결과는 고액비가 증가함에 따라 바이오매스의 미립자들 간의 마찰로 인한 severity가 증가하기 때문으로 판단된다. 한편, 고액비 1:3일 때 반응온도에 따른 particle size distribution (그림 3.2-45 (c))을 관찰한 결과, 반응온도 140 °C에서는 전체 particle 중 약 20%가 1.41 mm보다 큰 size인 것으로 나타났으나, 반응온도 170 °C에서는 1.41 mm보다 particle size의 비율이 약 5%, 180 °C에서는 2% 미만을 각각 나타내었다. 또한, 0.841에서 1.41 mm 사이의 particle size는 140 °C에서 약 35%, 180 °C에서는 6%의 비율을 나타내었으나, 0.125에서 0.354 mm 사이의 particle size는 반응온도가 증가함에 따라 증가하여 (140 °C일 때 5%, 180 °C일 때에는 52%), 반응온도가 particle size에 중요한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.
- 그림 3.2-46은 고액비 (1:1, 1:2, 1:3, 1:4) 및 반응온도(130~180 °C)에 따라 LHW 전처리된 유채대의 cellulose 및 XMG 함량을 나타낸 것이다. 그림에서 알 수 있듯이, CTSR을 이용하여 전처리된 유채대의 cellulose 함량은 모든 반응온도에서 고액비가 감소함에 따라 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 모든 고액비에서 반응온도가 증가함에 따라 cellulose 함량은 약간 증가하는 것을 알 수 있었다.
- 그림 3.2-47은 고액비가 1:4일 때 반응온도 (150~180 °C)를 달리하여 CTSR 전처리된 유채대의 효소당화율을 나타낸 것이다. 효소당화 6시간 후, 전처리되지 않은 유채대 및 CTSR 전처리된 유채대의 효소당화율은 모두 급격히 증가하여 전처리되지 않은 유채대는 16%, 150 °C, 160 °C, 170 °C, 180 °C에서 전처리된 유채대는 33%, 34%, 35%, 36%의 효소당화율을 각각 나타내어, 전처리 severity가 증가함에 따라 효소당화율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 particle size distribution의 결과와 상응하는 결과이며, 높은 반응온도와 높은 shearing force에서 cellulose의 표면의 노출정도가 증가하여 효소당화율을 상승시켰을 것으로 사료된다.



(a)



(b)



(c)

그림 3.2-45. CTSR을 이용한 LHW 전처리 유채대의 particle size distribution (a) 반응온도에 따른 size distribution, (b) 고액비 및 반응온도에 따른 particle size 분포도, (c) 반응온도에 따른 particle size

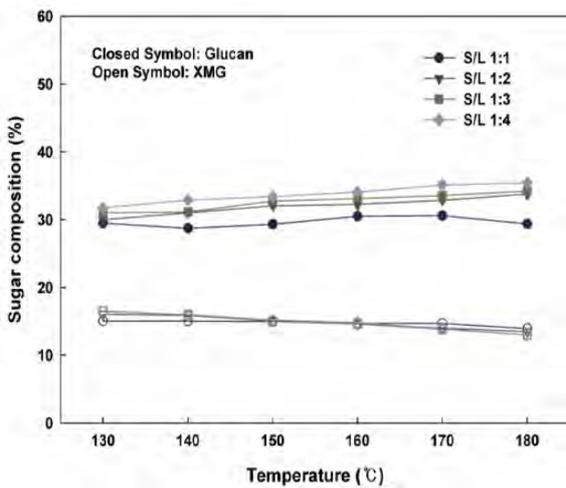


그림 3.2-46. 반응온도 및 고액비에 따른 LHW 전처리 유채대의 sugar composition

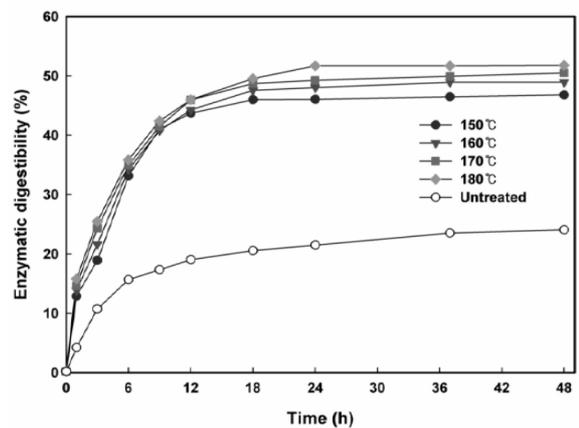


그림 3.2-47. 반응온도 150, 160, 170, 180 °C 에서 LHW 전처리된 유채대의 Enzymatic digestibility

(다) CTSR을 이용한 Chemical 전처리

① H₂SO₄ 전처리

□ Inorganic acid를 전처리 공정에 적용하는 것은 리그닌을 solubilization하기 위한 방법으로는 비효율적이거나 hemicellulose로부터 XMG를 fractionation하는 방법으로는 매우 유용하게 적용되어질 수 있다. 본 연구에서는 전처리공정에 대표적으로 이용되는 inorganic acid인 H₂SO₄ 을 이용하여 유채대를 전처리(조건: 반응온도 170 °C, 고액비 1:3, H₂SO₄ 농도 0.5~2.5%(w/v))하였으며, 전처리 후 hydrolyzate 내의 sugar 수율 및 잔여 고체물 내의 sugar 함량을 표 3.2-35에 나타내었다. 표에서 알 수 있듯이, 산농도가 0.5~2.5%로 변화함에 따라 XMG 수율은 40~75%의 분포를 나타내었으며, 가장 높은 수율인 75%는 2.0% 산농도, 170 °C의 반응온도 조건에서 얻을 수 있었다. 산농도 2.5%에서 XMG 수율이 60%까지 감소한 것은 pentose sugar (xylose와 arabinose)가 degradation되었기 때문으로 판단된다.

표 3.2-35 H₂SO₄ 농도에 따른 전처리 유채대 hydrolyzate의 sugar 수율 및 잔여고체의 sugar 함량

Pretreated rape straw	Dependent variables	Acid concentration (%(w/v), H ₂ SO ₄)				
		0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Retained sugar content	Cellulose content (%)	34.73±0.22	37.47±0.15	42.87±0.18	48.39±0.14	36.59±0.24
	Hemicellulose content (%)	11.06±0.11	8.47±0.13	7.79±0.09	4.00±0.01	2.76±0.01
Extracted sugar yield	Glucose yield (%)	1.06±0.03	1.89±0.07	2.60±0.07	4.27±0.13	9.83±0.11
	xmg yield (%)	40.82±1.32	52.71±2.22	71.37±2.78	74.59±3.15	60.06±2.36

② NaOH 전처리

□ 반응온도 170 °C, 고액비 1:3의 조건에서 NaOH 농도에 따라 유채대를 전처리하여 얻은 hydrolyzate내의 sugar 수율과 잔여고체물의 sugar 함량을 표 3.2-36에 나타내었다. 표에서 확인할 수 있듯이, NaOH 농도가 증가함에 따라 XMG와 glucose가 fractionation되는 양이 증가하였으며, NaOH 0.25~2.0% 농도의 조건에서 sugar (XMG)의 추출수율은 20~45%로 낮은 범위를 나타내었다. 비교적 높은 농도의 NaOH를 이용하여 전처리 하였을 때에도 XMG 수율이 낮았던 이유는 높은 NaOH 농도에서도 hemicellulose의 가수분해가 잘 이루어지지 않았기 때문으로 판단된다. 알칼리 전처리가 cellulose 구조를 swelling하여 리그닌을 solubilization하고 cellulose의 구조를 변화시켜 짧은 분자체인을 형성시키는 방법이며, hemicellulose를 fractionation 시키기에 적절한 전처리 방법은 아니라는 것을 감안할 때 XMG 수율이 낮은 것은 당연한 결과이며 또한, 표 3.2-36에서 나타낸 0.5%의 NaOH를 이용하여 전처리 후 AIL 함량이 7%로 감소한 것도 위의 내용에 상응하는 결과인 것으로 판단된다.

표 3.2-36 NaOH 농도에 따른 전처리 유채대 hydrolyzate의 sugar 수율 및 잔여고체의 sugar 함량

Pretreated rape straw	Dependent variables	Alkaline concentration (%(w/v), NaOH)							
		0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00
Retained sugar content	Cellulose content (%)	31.82±1.12	36.44±1.71	35.55±0.93	34.04±1.13	27.55±0.78	18.26±0.55	14.55±0.64	12.72±0.44
	Hemicellulose content (%)	21.03±0.98	19.49±0.77	17.55±1.03	15.37±0.45	7.55±0.48	2.05±0.39	1.55±0.25	0.71±0.11
Extracted sugar yield	Glucose yield (%)	1.35±0.18	2.06±0.22	2.55±0.28	2.96±0.31	7.55±1.11	10.69±0.98	12.55±0.88	15.76±0.14
	xmg yield (%)	20.59±1.57	27.06±1.33	28.55±1.89	29.49±2.03	35.55±2.11	38.79±3.01	44.55±2.56	46.96±2.32

③ Extraction Mass balance (EMB)

□ LHW, 2.0%의 H₂SO₄, 0.5%의 NaOH를 이용한 유채대의 전처리 후 composition 변화를 표 3.2-37에 나타내었다. 잔여 고체량의 퍼센트 변화는 LHW 전처리 후 62%, H₂SO₄ 전처리 후에는 54%, NaOH 전처리 후에는 77%를 각각 나타내었다. 잔여고체물의 cellulose 함량은 H₂SO₄ 전처리를 수행하였을 때를 제외하고서는 전처리 전과 큰 차이를 보이지 않았으나, XMG와 lignin 함량의 경우 큰 차이를 확인할 수 있었는데, 가령 H₂SO₄ 전처리 시에는 XMG함량의 경우 17%에서 4%로, NaOH 전처리 후에는 lignin 함량의 경우 13%에서 7%를 나타내는 것을 알 수 있었다. LHW 전처리된 유채대의 cellulose 함량은 34%를 나타내었으며, 잔여고체량을 대비하여 산출할 경우는 21%였는데, 이는 37%의 cellulose가 hydrolyzate로 되었다는 것을 의미하는 것이었다. 그러나 hydrolyzate 내의 cellulose 수율은 4%를 나타내어 (표 3.2-37), 26%의 glucose가 decomposition되어 sugar loss가 발생한 것을 확인할 수 있었다. 이와 유사한 경향은 hemicellulose의 경우에서도 관찰되어, 총 EMB는 cellulose의 경우 74%, hemicellulose의 경우 72%를 각각 나타내었다. 촉매를 이용하여 전처리한 경우의 sugar balance는 H₂SO₄ 전처리 시 92% cellulose, 91% hemicellulose, NaOH 전처리 시 89% cellulose와 99% hemicellulose를 각각 나타내었다.

표 3.2-37 CTSR을 이용한 유채대의 전처리 후 composition 및 mass closure

Pretreatment	Solid remaining (%)	Retained sugar content (%)			Extracted sugar yield (%)		Mass balance (%) ^{a)}	
		Glucan	XMG	Lignin	Glucan	XMG	Glucan	XMG
Untreated	100.0	32.86	17.06	13.09	-	-	-	-
Hot water	61.84	33.56	13.85	10.81	3.57	3.65	74.01	71.57
Hot water ^{b)}		20.75	8.56	17.48				
H ₂ SO ₄	53.92	48.39	4.00	9.22	4.27	12.73	92.39	87.28
H ₂ SO ₄ ^{b)}		26.09	2.16	17.09				
NaOH	76.71	36.44	19.49	7.46	2.06	2.07	91.33	99.77
NaOH ^{b)}		27.95	14.95	9.72				

The straw was pretreated using continuous twin screw-driven reactor (CTSR): Pretreatment conditions are;

- Hot Water: S/L ratio 1:3, Barrel temp. 170 °C
- H₂SO₄: S:L = 1:3, Barrel temp. 170 °C, Catalyst conc. 2.0% (w/v)
- NaOH: S:L = 1:3, Barrel temp. 170 °C, Catalyst conc. 0.5% (w/v)

a) Extraction Mass Balance (EMB) = $\frac{\sum C_{Li} + \sum C_{Sj}}{\sum C_{Rk}}$; where Ci is the mass of each sugar component as determined through

HPLC chromatography, the subscripts L, S and R refer to the extracted liquid, extracted solids and raw straw fractions, respectively.

b) Data are based on the oven dry untreated straw

④ 효소당화율 (Enzymatic digestibility)

□ CTSR 전처리에 있어서 효소당화율에 영향을 미치는 factor들을 평가하기 위해 효소가수 분해를 진행하였다. 그림 3.2-48은 LHW, H₂SO₄, NaOH를 이용하여 전처리한 유채대의 효소당화율을 비교한 결과를 나타낸 것이다. 가장 높은 효소당화율은 H₂SO₄ 전처리한 경우에서 당화 48 시간 후 얻을 수 있었으며 (77%, 30FPU), LHW와 NaOH를 이용하여 전처리한 경우 52%와 60%, 전처리하지 않은 경우에는 25%를 나타내었다. 촉매를 사용하지 않은 LHW 전처리 방법만으로도 약 2배의 효소당화율이 증진된 것은 CTSR에 의한 size reduction 효과 때문으로 사료된다. 한편, CrI 감소에 의한 효소당화율의 변화는 0.91%로, 전처리된 유채대의 CrI는 효소당화율에 영향을 미치는 중요한 인자가 아닌 것으로 나타나, crystallization은 초기 효소가수분해속도에 영향을 미치지만 최종 sugar 수율에는 영향을 미치지 않는다고 보고한 Chang and Holtzapple (2000)의 연구결과와 일치하는 결과를 확인할 수 있었다. 효소당화율에 영향을 미치는 또 다른 인자는 효소의 유효성 (Enzyme effectiveness, non-cellulosic한 부분의 제거에 의해 결정되어지며, 바이오매스량과 cellulose 양을 기반으로 하여 계산된 효소당화율로부터 계산되어짐)으로, H₂SO₄을 이용하여 전처리를 하였을 때에는 9%, NaOH를 이용한 경우에는 7%로 나타났다. 또한 촉매가 효소당화율에 미치는 영향을 관찰하여 본 결과, H₂SO₄이 NaOH보다 효소당화율에 더 큰 영향을 미쳐 (H₂SO₄의 경우 9%, NaOH의 경우 1%), size reduction이나 de-crystallization, porosity에 H₂SO₄이 NaOH보다 더 큰 효과를 주었음을 확인할 수 있었다.

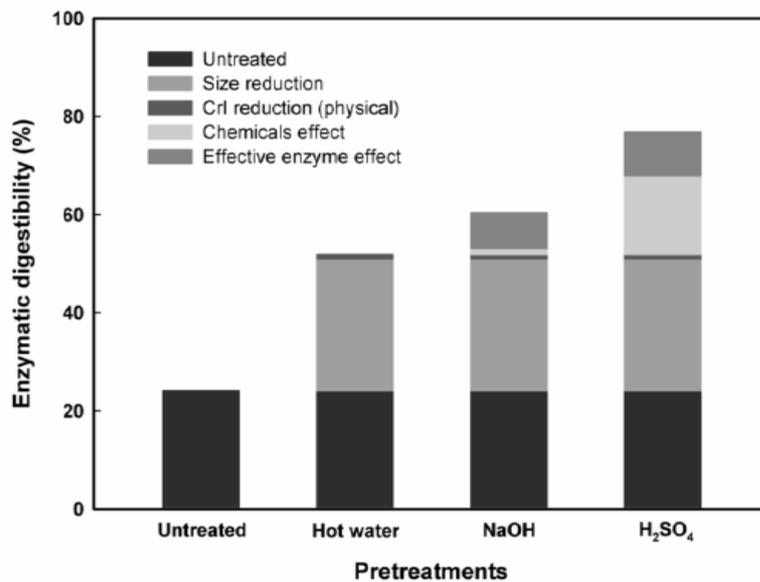


그림 3.2-48. CTSR을 이용하여 전처리된 유채대의 효소당화율에 영향을 미치는 factor에 대한 evaluation

4. 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해효소의 cloning, 발현 및 분리정제, 특성 확인

가. 백색부후균 *Phanaerochaete chrysosporium*의 cDNA library 구축

(1) 균주 및 배양방법

- *P. chrysosporium* BKM-F-1767 균주는 한국생명공학연구원에서 분양받아 사용 Tien 등이 사용했던 방법으로 배양했다. *Escherichia coli* Top10 은 LB한천 배지에서 배양했으며 필요에 따라 앰피실린 50 µg/ml, 지오신 50 µg/ml을 첨가해 선별했다. *Pichia pastoris* GS115 균주는 Invitrogen에서 구매하여 사용했으며 YPD 배지에서 배양하였다.

(2) 유전자의 분리 및 cloning

- cDNA를 합성하기 위해 *P. chrysosporium*을 대상으로 질소원이 결핍된 상태에서 4일간 배양한 후 total mRNA를 분리하여 여러 종류의 lignin peroxidase의 발현 유무를 real time PCR을 통해 확인하였다 (그림 3.2-48). 확인된 mRNA를 대상으로 cDNA를 제조하고 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해효소의 cloning 재료로 사용하였다.
- *P. pastoris*에서 발현시키기 위한 벡터는 pPICZαA를 Invitrogen 회사로부터 구매하여 사용했다. 각각의 벡터에는 메탄올에 의해 조절되는 AOX promoter가 있고 PICZαA 벡터에는 발현된 단백질을 세포 외부로 분비하는 효모의 α-secretion factor를 이용하였다.

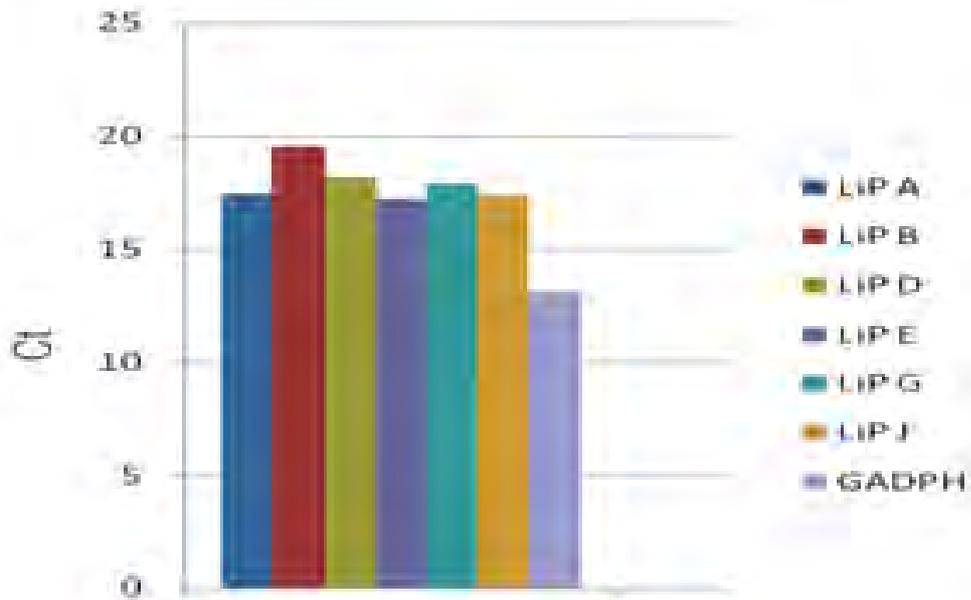


그림 3.2-48. Real time PCR from *P. chrysosporium*

나. 백색부후균 *Phanaerochaete chrysosporium*으로부터 lignin peroxidase의 cloning 및 발현

(1) *P. chrysosporium*으로부터 lignin peroxidase 5 (LG5)의 cloning 및 발현

(가) 실험 방법

① 유전자의 분리 및 cloning

- *P. pastoris*에서 발현시키기 위한 벡터는 pPICZaA를 Invitrogen 회사로부터 구매하여 사용했다. 각각의 벡터에는 메탄올에 의해 조절되는 AOX promoter가 있고 PICZaA 벡터에는 발현된 단백질을 세포 외부로 분비하는 효모의 α -secretion factor를 이용하였다.
- *P. chrysosporium*으로부터 LG5 유전자를 cloning하기 위해 질소원이 부족한 배지에서 30 °C, 5일 동안 배양한 세포에서 전체 mRNA를 분리하였으며 Clontech 회사의 SMARTer PCR cDNA synthesis Kit를 이용하여 cDNA를 합성했다.
- 합성된 전체 cDNA로부터 LG5 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'-GCA TCG ATT GCG ACC TGC TCG AAC GGC AAG-3'; reverse primer : 5'-CGT CTA GAA AAG CAC CAG GAG GAG GAG GG-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZaA에 클로닝 하여 pPICZaA/LG5를 제작하였다.
- 이렇게 제작된 재조합 DNA는 DNA 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 µg의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 뒤 전기충격 (electroporation) 방법으로 형질전환 한 뒤 형질전환된 세포를 100 µg/ml의 Zeocin이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

- 최소 각 열 개의 형질전환체를 선별하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재 현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density 가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 효소의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1%정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1 ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 효소를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Hisrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20

mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 확정했다.

③ 효소의 활성화도 측정

□ LipLG5 활성화도는 ABTS (2, 20-azino-bis [3-ethyl-6-benzothiazolinesulfonate])의 산화 정도를 420 nm에서 측정하여 결정하였다 (One unit is defined as one millimole of product formed per minute at 30° C). 반응 혼합액의 조성은 1 mM ABTS, 30 mM Sodium citrate buffer (pH 4.5), 그리고 Lip 효소 및 1 mM H₂O₂를 혼합하였다.

④ 효소의 생화학적 특성

□ LipLG5의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C에서 80 °C 까지 측정하였고 최적 pH의 결정을 위해서는 Sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 1.5 에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

□ 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 LipLG5의 cDNA는 *P. chrysosporium* 유래의 GLG5 (GeneBank accession no: X54256)와 100% 동일한 것으로 나타났다. 따라서 이 유전자들을 *P. pastoris*에서 발현시켰으며 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 *S. cerevisiae*의 α-factor secretion signal을 이용하여 세포외로 분비하도록 벡터를 구성 하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.

□ 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 콜로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.

□ 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 LipLG5의 활성도를 7일간 확인한 결과 그림 3.2-49와 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 통해 보았을 때 2일째에 효소 활성도가 50 UI⁻¹ 로 나타났고 이러한 발현양은 MnPH₄를 *Pichia*에서 발현 시켰을 때 보다 약 1/10 정도 생산되는 것을 알 수 있다.

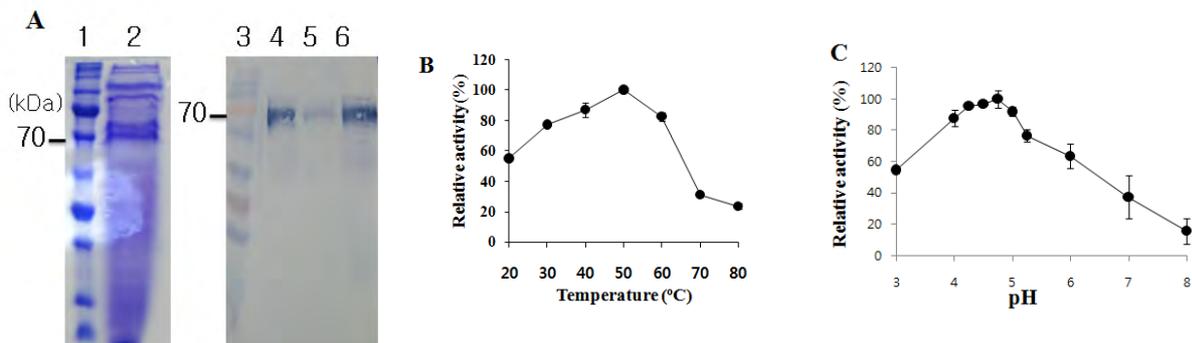


그림 3.2-49. A, SDS-PAGE analysis (lane 1-2) and western blot analysis of rLiPLG5 secreted from *P.pastoris*. Lane 1 and 3, Molecular weight marker; lane 2, total secreted proteins. lane 3-6, rLiPLG5. B, Effect of temperature on LipLG5 activity. C, Effect of pH on LipLG5 activity

- 재조합 LipLG5의 최적 온도를 20 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 50 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고, 최적 pH는 5로 나타났다 (그림 3.2-49, B-C).
- 이상의 발현된 효소를 통해 최소한으로 요구 되는 LipLG5 효소를 확보 했으며, 이를 통해 실제 바이오매스를 이용하여 리그닌 분해 정도를 확인하고 최적의 조건을 탐색하였지만 최종 생산되는 효소의 양이 상대적으로 적어 효소의 고 발현에 관련된 추가 연구가 필요한 상태이다.

(2) *P. chrysosporium*으로부터 lignin peroxidase 6 (LG6)의 cloning 및 발현

(가) 실험 방법

① 유전자의 분리 및 cloning

- *P. pastoris*에서 발현시키기 위한 벡터는 pPICZaA를 Invitrogen 회사로부터 구매하여 사용했다. 각각의 벡터에는 메탄올에 의해 조절되는 AOX promoter가 있고 PICZaA 벡터에는 발현된 단백질을 세포 외부로 분비하는 효모의 α -secretion factor를 이용하였다.
- *P. chrysosporium*으로부터 LipLG6유전자를 cloning하기 위해 질소원이 부족한 배지에서 30 °C, 5일 동안 배양한 세포에서 전체 mRNA를 분리하였으며 Clontech 회사의 SMARTer PCR cDNA synthesis Kit를 이용하여 cDNA를 합성했다.
- 합성된 전체 cDNA로부터 LipLG6 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'-GCGAATTCGCCACCTGCTCCAACGG-3'; reverse primer : 5'-CGTCTAGAAAAGCACCCGGAGGAGGCTGG-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 EcoRI 및 XbaI를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZaA에 클로닝 하여 pPICZaA/LG5를 제작하였다.
- 이렇게 제작된 재조합 DNA는 DNA 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어 졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 μ g의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 뒤 전기충격 (electrophoration) 방법으로 형질전환 한 뒤 형질전환된 세포를 100 μ g/ml 의 Zeocin 이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

- 최소 각 열 개의 형질전환체를 선발하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 효소의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1%정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1

ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 효소를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Histrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 측정하였다.

③ 효소의 활성도 측정

□ LipLG6 활성도는 ABTS (2, 20-azino-bis [3-ethyl-6-benzothiazolinesulfonate])의 산화 정도를 420 nm에서 측정하여 결정하였다 (One unit is defined as one millimole of product formed per minute at 30 °C). 반응 혼합액의 조성은 1 mM ABTS, 30 mM Sodium citrate buffer (pH 4.5), 그리고 Lip 효소 및 1 mM H₂O₂를 혼합하였다.

④ 효소의 생화학적 특성

□ LipLG6의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C에서 80 °C 까지 측정하였고 최적 pH의 결정을 위해서는 sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 1.5에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

□ 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 LipLG6의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 Lip GLG6 gene (GeneBank accession no: M80213.1)와 100% 동일한 것으로 나타났다. 따라서 이 유전자들을 *P. pastoris*에서 발현시켰으며, 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 *S. cerevisiae*의 α-factor secretio nsignal을 이용하여 세포외로 분비하도록 벡터를 구성하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.

□ 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 클로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.

□ 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 LipLG5의 활성도를 7일간 확인한 결과 그림 3.2-50와 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 통해 봤을 때 2일째에 효소 활성도가 50 UI⁻¹ 로 나타났고 이러한 발현양은 MnPH₄를 *Pichia*에서 발현 시켰을 때 보다 약 1/10 정도 생산되는 것을 알 수 있다.

□ 분비된 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다 (그림 3.2-50). 분리정제는 쉽게 효율적으로 진행되었으나 SDS-PAGE 상에서 확인했을 때 예상했던 크기인 50 kDa 보다 크게 약 70 kDa로 만들어지는 것을 확인했다. 이렇게 예상했던 크기보다 커지는 이유는 *Pichia* 균주에서 나타나는 glycosylation 때문으로 추측된다. 크기가 커진 LiPLG5를 검정하기 위해 trypsin 처리 후 matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)를 실행했다. 그 peptide mapping 결과 분리 정제된 효소는 LiPLG6과 일치하는 것으로 나타났다.

□ 재조합 LiPLG6의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 55 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고, 최적 pH는 4.5으로 나타났다 (그림 3.2-50).

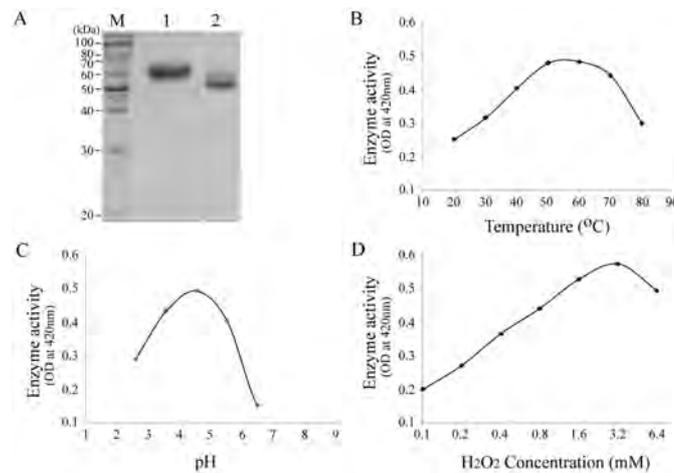


그림 3.2-50. A, SDS-PAGE analysis of rLiPLG6 purified from *P.pastoris*. M, Molecular weight markers; Lane 1, rLiPLG6; Lane 2, rLiPLG6 treated with PNGaseF. B, Effect of temperature. C, Effect of pH. D, H₂O₂ concentration on enzyme activity

□ 이상의 발현된 효소를 통해 최소한으로 요구 되는 LipLG6 효소를 확보 했으나 LG5 및 LG6의 경우 매우 적은 양으로 생산됨을 알 수 있다. 이 정도의 양은 바이오매스 분해관련 실험에 사용되기에는 작은 양이므로 리그닌 분해효소의 고 생산에 관련된 연구를 진행하였다.

(3) *Pichia pastoris*에서 lignin peroxidase (Lip)의 고발현을 위한 코돈 optimizing

(가) *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisia* 및 *P. chrysosporium*의 코돈 사용빈도 조사

□ *P. pastoris*에서의 고 발현을 유도하기 위해서 각 균주의 codon usage를 조사하였다. 다음의 그림에서 보는 것처럼 효모 균주에서의 사용빈도와 백색부후균의 사용빈도는 많은 차이가 있음을 알 수 있다.

표 3.2-38 Codon frequency per thousand

Amino acid	Codon	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. pastoris</i>	<i>P. chrysosporium</i>
Gly	GGG	5.8	5.8	18.8
Gly	GGA	10.6	19.1	12.0
Gly	GGU	25.0	25.5	8.0
Gly	GGC	9.6	8.1	31.8
Glu	GAG	19.4	29.0	33.3
Glu	GAA	47.1	37.4	22.7
Asp	GAU	38.6	35.7	17.4
Asp	GAC	20.4	25.9	46.7
Val	GUG	10.8	12.3	12.5
Val	GUA	11.4	9.9	5.7
Val	GUU	22.6	26.9	7.4
Val	GUC	11.8	14.9	31.8
Ala	GCG	6.1	3.9	41.0
Ala	GCA	16.3	15.1	14.3
Ala	GCU	21.9	28.9	19.4
Ala	GCC	13.1	16.6	39.6

□ 상기 표 3.2-38의 결과를 바탕으로 기존의 LG5 cDNA 염기서열을 *Pichia pastoris* 유래의 사용빈도가 많은 코돈으로 모두 바꿔 다음과 같은 새로운 유전자 염기서열을 갖는 합성 유전자를 제작했다. 제작된 유전자는 번역을 유도 하였을 때 LG5와 동일한 아미노산으로 구성이 되어 있으나 염기서열은 GC 함량이 62%에서 46%로 낮아진 상태로 제작 되었다. 이렇게 합성된 유전자는 앞서 *Pichia* 균주에서 발현되는 과정을 그대로 재현하여 발현 정도를 비교하였다.

```

1: GTCGAGAAGCCCGGGACCTGCTCGAACGGCAAGGTCGTCCCCGGCGGTCTTGCTGCACC 60
1: GTAGAGAAGCCGTGCAACATGCAGTAACGGAAAAGTTGTCCCCAGCCGAAGCTGCTGCACA 60

61: TGGTTCAACGTTCTGTCCGATATCCAGGAGAACCTCTTCAMTGGCGGCCAGTGTGGCGCC 120
61: TGGTTCAATGTTTTAATCTGATATTCAGGAAAATTTAATTAAACGGTGGTCAATGTGGCGCT 120

121: GAGGCTCATGAGTCCGATCCGTCCTCGTCTTCCACGACGCCATCGCTATCTCTCCCGCTATG 180
121: GAAGCTCACGAAAGTATCAGGTTAGTTTTTCATGATGCTATTGCCAATTTCACTGCAATG 180

181: GAGCCCGCAGGCCAGTTCCGGTCCGAGGCCGCCGATGGTTCTATCATGATCTTCGACGAGATC 240
181: GAACCCGCAAGGCTCTAGTGTAAAGAGGTGCCGACGGTTCCTATAATGATCTTTGACGAGATC 240

241: GAGACCAACTTCCATCCCAACATCCGGTCTCGACGAGATCGTCCGCCCTGCAGAACCCGCTTC 300
241: GAAACCAATTTCCATCCCAACATTTGGTTTGGATGAAATCGTAAAGATTACAAAACCTTTT 300

301: GTCCAGAAACAGGGTGTCACTCCCGGTGACTTCATCGCCCTTCGCTGGCGCCGGTGGCGGCTC 360
301: GTGCAGAAACATGGGGTAACTCCCGGTGATTTTATCGCAATTCGGCCGGTGGCTGTTGCCCTTA 360

361: AGTAACTGCCCCGGTGGTCCCGCAGATGAACTTCTTCACTGGTCCGTCTCCGCAACTCAG 420
361: AGTAACTGTCTCTGGGGCAACCGCAGATGAACTTCTTACTGGACGTGCACCCGCAACTCAG 420

421: CCAGCCCCGTGACGGCCCTCGTCCAGAGCCCTTCCACTCTGTTGACCAAATCATCGACCGT 480
421: CCAGCCCCAGATGGATTAGTTCAGAACCCCTTCCACTCAGTTGACCAAATCATCGACAGA 480

481: GTCTTCGATGCCGGTGAAATTCGATGAGCTCGAGCTTCGTCTGGATGCTCTCTGCACACTCC 540
481: GTCTTCGATGCCGGTGAGTTCGATGAAATGGAGTTAGTGTGGATGTTATCAGCCCACTCT 540

541: GTCGGGGCTGGCAACGATATCGACCCGAACATCCAGGGCTTGCCCTTCGACTCGACCCCC 600
541: GTTGGAGCTGCTAACGATATTGATCCAAACATCCAGGGCTTGCCCTTTGACTCGACTCCA 600

601: GGTATTTTCGATTCCCACTTCTTTCGTCCAGACTCAGCTTCTGGCACCGGCTTCACTGGC 660
601: GGTATATTTGACTCCCAATTCCTTTGTTGAGACACAGCTTGCAGGCACTGGATTTACAGGG 660

661: GGTTCATAACAACCAGGGCGAGTTTCCCTCCCGCTTCCAGGCGAGATGCGTCTCCAGTCT 720
661: GGTTCGAATAACCAGGGGGAAGTGTCTATCGCCACTACCTGGCGAATGCGATTGCATCT 720

721: GACTTCCTGATCGCTCGTGACGGCGCACCGCTGCGAGTGGCAGTCTGTTCTGCAAGAAC 780
721: GATTTTTTAAATGCACTGACGCAAGAACTGCTTGCGAATGGCAGCTTTTCTTTAATAAT 780

781: CAGTCCAAGCTCGTCTCCGACTTCCAATTCATCTTCTCGCCCTCACTCAGCTCGGCGAG 840
781: CAGTCCAAATGGTGTCTGATTTTCAATTTATATTCTTTGCCATTGACACAATTAGGCCAA 840

841: GACCCGGATGGGATGACCGACTGCTCTGCTGTCAATCCCATCTCCAAAGCCCGCCCGGAAC 900
841: GATCCGGATGCCATGACTGATTTGTTCTGCTGTCAATCCCAATAAGTAAACCAGCTCCGAAT 900

901: AACACCCCCGATTCTCTTCTTCCCGCCCGGATGACGATGGACGATGTCCAGCAGGCT 960
901: AATACTCCAGCTTTTACTCTTCTTCCCTCCGGGTATGACTATGGATGACGTTGAACAAGCG 960

961: TGCGCCGAGAGCCCTTCCCGACTCTCTCGACTCTCCCTGGCCCCCGGACCTCCGTGGCT 1020
961: TGTGCCGAACCCCTTTTCCGAGGTTGCTTACATTAACCGGTCCAGCAACATCTGTAGCT 1020

1021: CGCATCCCTCCCTCCCTCCGTTGGTCTTAA 1047
1021: CGTATTCCACGCCCGCGGGTGTCTA 1047

```

그림 3.2-51. Codon optimization of Lig5 ligninase for yeast expression

(나) 코돈 최적화를 통한 sLipLG5의 고 발현

- 효모 균주를 대상으로 코돈최적화가 진행된 유전자를 *Pichia* 벡터에 삽입하여 동일한 방법으로 발현을 시킨뒤 발현된 양을 Western blotting 방법으로 비교해 본 결과 10배 이상의 발현양에 차이가 있는 것을 관찰 할 수 있었다.

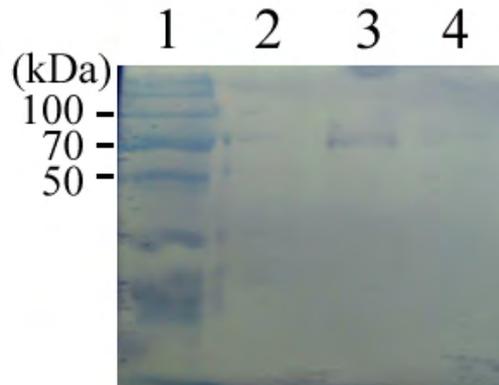


그림 3.2-52. Comparison of LG5 expression in *Pichia pastoris*. Lane 1, Size marker; lane 2, negative control (mock transformant); lane 3. codon optimezed sLipLG5; lane 4, normal LipLG5

(다) *Pichia pastoris* protease deficient 균주에서의 발현 비교

- 지금 까지 host로 사용되었던 GS115, X33 균주를 사용하는 대신 protease가 결손된 SMD1168 균주를 사용하여 LipLG5 및 sLipLG5를 발현시킨 결과 야생형 균주보다 10배 정도 향상되는 결과를 보였다.

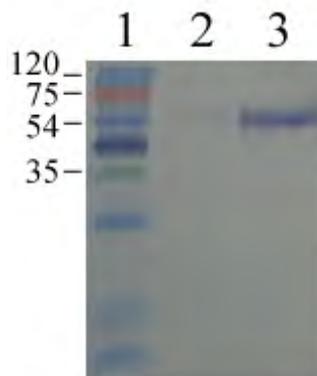


그림 3.2-53. Comparison of LG5 expression in *Pichia pastoris* SMD1168 strain. Lane 1, Size marker; lane 2, normal LipLG5; lane 3. codon optimezed sLipLG5

(4) Intron 첨가를 통한 고 발현 유도

- 진핵세포에서의 유전자 발현의 조절은 전사단계의 조절이 매우 큰 비중을 차지하고 있으나 전사된 mRNA 전구체가 핵 내에서 modification 되는 과정에서도 다양한 조절을 받는 것으로 알려져 있다. 이러한 modification 중 capping 및 intron이 제거되는 splicing 과정에

서도 조절이 되며 특히 첫 번째 intron의 제거 과정이 발현 효율에 영향을 미친다는 보고가 있다. 따라서 본 연구진에서는 발현 효율이 매우 낮은 lignin peroxidase LG6를 대상으로 LG6의 첫 번째 intron에 해당되는 부위에 효모의 intron을 삽입시켜 효모의 핵 내에서 splicing 효율을 높혀 전체적인 발현이 증가할 수 있는지를 확인하였다.

(가) Intron dependent over-expression of the recombinant lignin peroxidase (LipLG6)

- 효모에서 나타나는 intron sequence는 *P. chrysosporium* 유래의 sequence와 차이가 있을 것을 볼 수 있다. 따라서 *P. chrysosporium* 유래의 sequence는 효모 내에서 splicing이 잘 일어나지 않을 수 있으므로 효모의 SAC6 intron을 LipLG6의 첫 번째 intron 위치에 삽입시켜 재조합 LipLG6 유전자를 합성하고 이를 *P. pastoris* 벡터에 클로닝하고 발현시켜 발현량을 비교하였다. 그 결과 생산된 LiPLG6의 양이 두 배 정도 증가하는 것으로 나타났으나 이는 형질전환 균주간의 차이에서도 나타날 수 있는 정도의 차이 이므로 추가적인 연구가 필요한 상태이다.

Yeast consensus intron sequence

5' exon: GUAUGU-----UACUAAC-----yAG: 3' exon

LG6 2nd intron

GTAAGTGCCTCCGCTTGTTTCGGTCTAGAGCCTACTCACCGCGTCTACAG

Yeast SAC6 intron

GTATGTATGCCTTTCTCGAATTCACACTGCTGAGCACAGTGAAAAAGT
 TTTTCTACCTTTTAGGTTGTAATAAACGTTTCATATTACTAACAAACTCT
 TCTGCGATTAG



그림 3.2-53. Strategy for the intron insertion to LigLG6

(5) *P. chrysosporium*으로부터 Mn peroxidase (MnPH₄)의 cloning 및 발현

(가) 실험방법

① 유전자의 cloning

- 합성된 전체 cDNA로부터 MnP 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'-GCGAATTCGCAGTCTGTCCAGACGGTACC-3'; reverse primer : 5'-CGTCTAGAAACGCAGGGCCATCGAACTGAACA-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 EcoRI 및 XbaI를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZαA에 클로닝 하여 pPICZαA/MnP를 제작하였다.

□ 이렇게 제작된 재조합 DNA는 DNA 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 µg의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 뒤 전기충격 (electroporation) 방법으로 형질전환 한 뒤 형질전환된 세포를 100 µg/ml 의 Zeocin 이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

□ 최소 각 열 개의 형질전환체를 선발하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 자일라나제의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1% 정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1 ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 자일나제를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Histrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 측정하였다.

③ 효소의 활성도 측정

□ MnP의 활성도는 ABTS (2, 2'-azino-bis [3-ethyl-6-benzothiazolinesulfonate])의 산화 정도를 420 nm에서 측정하여 결정하였다 (One unit is defined as one millimole of product formed per minute at 30 °C). 반응 혼합액의 조성은 0.4 mM ABTS, 0.2 mM MnSO₄ in 50 mM sodium malonate buffer (pH 4.5), 그리고 MnP 효소 및 0.1 mM H₂O₂를 혼합하였다.

④ 효소의 생화학적 특성

□ MnP의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C 에서 80 °C 까지 측정하였고 최적 pH의 결정을 위해서는 sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 1.5 에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

□ 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 MnP의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 MnP isoenzyme H4 gene (GeneBank accession no: J04980.1)와 100% 동일한 것으로 나타났다. 따라서 이 유전자들을 *P. pastoris*에서 발현시켰으며 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 *S. cerevisiae*의 α-factor secretio nsignal을 이용하여 세포외로

분비하도록 벡터를 구성하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.

- 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 콜로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.
- 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 MnP의 활성도를 7일간 확인한 결과 그림 3.2-54와 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 통해 봤을 때 2일째에 효소 활성도가 500UI-1 로 나타났고 이러한 발현양은 기존에 *Aspergillus nidulanse*를 통해 발현시켰을 때 보다 약 4배정도 높게 생산되는 것을 알 수 있다 (그림 3.2-55).
- 분리된 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column (HiTrap, GE healthcare)에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다 (그림 3.2-55). 분리정제는 쉽게 효율적으로 진행되었으나 SDS-PAGE 상에서 확인했을 때 예상했던 크기인 40 kDa 보다 크게 약 50 kDa로 만들어지는 것을 확인했다. 이렇게 예상했던 크기보다 커지는 이유는 *Pichia* 균주에서 나타나는 glycosylation 때문으로 추측된다. 크기가 커진 MnP를 검정하기 위해 trypsin 처리 후 matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)를 실행했다. 그 peptide mapping 결과 분리 정제된 효소는 MnP과 일치하는 것으로 나타났다.
- 재조합 MnP의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 40 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고 (그림 3.2-56(A)), 최적 pH는 3.5으로 나타났다 (그림 3.2-56(B)). 이와 같은 결과는 기존에 *A. niger*에서 발현된 특징과 거의 유사한 값으로 나타난 결과이다. 그 외에 산화과정에 필요한 과산화수소의 농도도 결정하였으며 최적으로 요구되는 양은 0.1 mM로 나타났다 (그림 3.2-56(C))
- 이상의 발현된 효소를 통해 최소한으로 요구 되는 효소의 종류는 확보 했으며, 이를 통해 실제 바이오매스를 이용한 리그닌 유사물질의 분해 정도를 확인하였고, 그 결과들을 국제 SCIE 급 저널 (BBE)에 투고하였다.

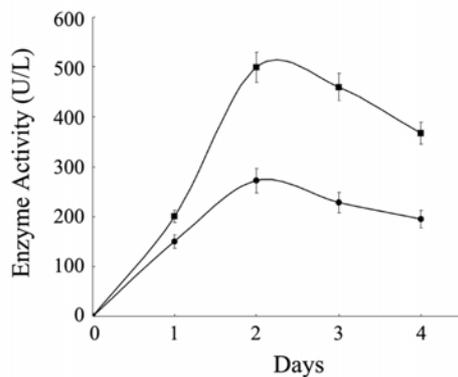


그림 3.2-54. Time course changes of rMnPH4 activities in the extracellular medium of *P. pastoris*. Data are shown as a representative profile based on two separate experiments, each with three samples for each data point. The closed squares represent rMnPH4 secreted on the Heme amended (0.5 mg/ml) BMMY medium, and the closed circles represent rMnPH4 secreted on normal BMMY medium

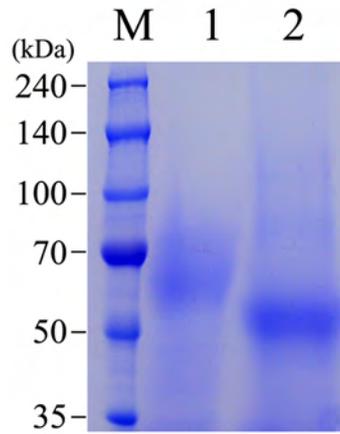


그림 3.2-55. SDS-PAGE analysis of rMnPH₄ purified from *P. pastoris*. M, Molecular weight markers; Lane 1, rMnPH₄; Lane 2, rMnPH₄ treated with PNGaseF

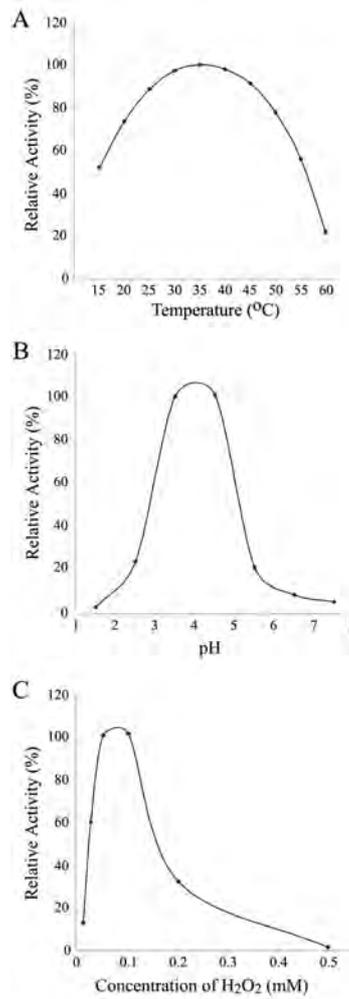


그림 3.2-56. Effect of temperature (A), pH (B) and H₂O₂ concentration (C) on enzyme activity

다. *P. chrysosporium*으로부터 헤미셀룰로스 분해효소의 cloning 및 특성 확인

(1) 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 Endo-beta-Xylanase A 및 C의 cloning 및 *Pichia pastoris*에서의 발현

- 헤미셀룰로스는 식물의 세포벽을 구성하는 직선형의 다당체로서 셀룰로스 미세섬유와 수소결합을 통해 연결되어 있고 리그닌과도 공유결합을 통해 연결되어 셀룰로스와 함께 복잡하고 튼튼한 네트워크 구조를 유지하고 있다. 현재까지 알려진 바로는 헤미셀룰로스는 일반적으로 네 종류 즉, 자일란(xylan), 만난(mannan), 베타글루칸(β -glucan), 자일로글루칸(xyloglucan)의 탄수화물로 구성되어 있으며, 주요성분은 자일란으로 D-xylopyranosyl unit가 β -1,4-glycosidic bonds를 통해 연결되어 있다. 헤미셀룰로스는 지구상에 두 번째로 풍부한 탄수화물이며 이는 재생 가능한 유기탄소의 1/3에 해당하는 자원이기도 하다. 이러한 헤미셀룰로스를 분해하기 위해서는 자일란 구조를 가수분해하는 endo-xylanase (Ec. 3.2.1.8)가 필요하며 대부분의 xylanase는 GH families 10 또는 11에 속하며 여러 종류의 미생물들에 의해 생산되고 있다.

(가) 실험방법

① 유전자의 cloning

- 합성된 전체 cDNA로부터 XynA 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'-GCGAATTCATGAAGCTCTCTGCCTCCTTCGCG-3'; reverse primer: 5'-CGGGGCCATTGCCGAAGCCAATAGCGATA-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이를 통해 만들어진 DNA 조각은 pGEM-T vector에 클로닝하고 제한효소 EcoRI 및 ApaI을 처리하여 분리 정제한 뒤 *Pichia* 벡터인 PICZA에 다시 클로닝을 하였다. 그 결과물로 자체 leader peptide를 포함하는 pPICZA/ss-XynA 재조합 DNA를 얻었다. 효모 *Sccharomyces cerevisiae*의 α -secretion factor를 포함하고 있는 *Pichia* 벡터인 PICZaA에 클로닝하기 위해서 다음과 같은 프라이머를 디자인 했다. forward primer: 5'-CGAATTCAGTCGCC TGTTTGGGGCC; reverse primer: 5'-CGCCGCGGAATTGCCGAAGCCAATAG-3'. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 EcoRI 및 SacII를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZaA에 클로닝 하여 pPICZaA/XynA를 제작하였다.
- XynC 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'- GCGAATTCATGTTCAAGTTCTCCGCGTCCCT-3' reverse primer: 5'-GCTCTAGACATGCGCTGAAGCCAGCGGC-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이를 통해 만들어진 DNA 조각은 pGEM-T vector에 클로닝하고 제한효소 EcoRI 및 XbaI을 처리하여 분리 정제한 뒤 *Pichia* 벡터인 pPICZB에 다시 클로닝을 하였다. 그 결과물로 자체 leader peptide를 포함하는 pPICZB/ss-XynC 재조합 DNA를 얻었다. 효모 *Sccharomyces cerevisiae*의 α -secretion factor를 포함하고 있는 *Pichia* 벡터인 PICZaA에 클로닝하기 위해서 다음과 같은 프라이머를 디자인 했다. forward primer: 5'-GCGAATTCAGTCACCCAGAGTGGGG CCAA-3'; reverse

primer: 5'- GCTCTAGACATGCGCTGAAGCCAGCGGC-3'. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 EcoRI 및 XbaI를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZaA에 클로닝 하여 pPICZaA/XynC를 제작하였다.

- 이렇게 제작된 재조합 DNA는 DNA 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 µg의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 뒤 전기충격 (electrophoration) 방법으로 형질전환 한 뒤 형질전환된 세포를 100 µg/ml 의 Zeocin 이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

- 최소 각 열 개의 형질전환체를 선발하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 자일라나제의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1% 정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1 ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 자일라나제를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Histrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 측정했다.

③ 효소의 활성도 측정

- 자일라나제의 활성도는 birchwood xylan을 기질로 하여 생성되는 reducing-sugar의 양을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNSA) 정량 방법을 통해 측정하였다. 배양액 (100 µl) 또는 정제된 효소 (1 µg)을 증류수에 섞어 200 µl 로 만들고 sodium citrate buffer (100 mM, pH 4.5)에 1% (w/v) birchwood xylan이 녹아있는 용액 200 µl를 섞어 of 1% (w/v) 70 °C에서 10분간 배양한 후 200 µl의 DNSA 용액을 첨가한 뒤 10분간 끓여 효소의 활성을 없앤 뒤 540 nm에서 reducing sugar의 양을 결정했다. 효소 활성도 측정을 위한 표준곡선은 D-xylose를 기질로 하여 나타나는 흡광도를 reducing sugar의 mole 농도로 변환하여 사용했으며 자일라나제 1 unit는 xylose 1 µmol/min의 활성도로 정의하였다.

④ 효소의 생화학적 특성

- 자일라나제 A 및 C의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C 에서 80 °C 까지 측정하였

고 최적 pH의 결정을 위해서는 sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 3.0 에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

- 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 xynA의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 xynA gene (GeneBank accession no.AF301903.1)와 99% 동일한 것으로 나타났다. 이 염기서열에서 유래된 아미노산 서열을 100% 동일하게 나타났다. xynC의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 xynC gene (GeneBank accession no. EU302794.1)와 99% 동일한 것으로 나타났다. 각각의 염기서열에서 유래된 아미노산 서열은 100% 동일하게 나타났다. 따라서 이 유전자들을 *P. pastoris*에서 발현시켰으며 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 xyn 유전자들의 자체 signal peptide를 이용한 경우와 벡터 내에 포함되어 있는 *S. cerevisiae*의 α -factor secretion signal을 이용한 경우 두 가지로 세포외로 분비하도록 벡터를 구성하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.
- 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 콜로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.
- 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 XynA의 활성도를 7일간 확인한 결과 그림 3.2-57과 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 통해 봤을 때 XynA 자체 signal peptide를 이용한 경우와 α -factor secretion signal peptides를 이용한 경우 모두 xylanase의 생산 및 분비가 원활히 이루어지고 있는 것을 알 수 있다. 다만 α -factor secretion signal peptide를 이용한 경우에 활성도가 조금 높게 나타났다. 1일째에 효소 활성도가 1,536 UI^{-1} 및 1,089 UI^{-1} 로 각각 나타났고 2일째에 가장 높게 나타나 2,496 UI^{-1} 및 1,946 UI^{-1} 으로 각각 활성도를 나타냈다. 이러한 발현양은 기존에 *Aspergillus niger*를 통해 발현 시켰을 때 보다 약 4배정도 높게 생산되는 것을 알 수 있다.
- XynC의 경우 활성도를 7일간 확인한 결과 그림 3.2-57과 같은 결과를 얻었다. XynC의 경우도 자체 signal peptide를 이용한 경우와 α -factor secretion signal peptides를 이용한 경우 모두 xylanase의 생산 및 분비가 원활히 이루어지고 있는 것을 알 수 있으며 두 경우 모두 활성도가 비슷하게 나타났다. 가장 높게 나타나는 활성도는 2일째에 2,369 UI^{-1} and 2,547 UI^{-1} 으로 각각 활성도를 나타냈다.
- 분비된 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column (HiTrap, GE healthcare)에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다 (그림 3.2-58). 분리정제는 쉽게 효율적으로 진행되었으나 SDS-PAGE 상에서 확인했을 때 예상했던 크기인 43 kDa 보다 크게 약 50 kDa로 만들어지는 것을 확인했다. 이렇게 예상했던 크기보다 커지는 이유는 *Pichia* 균주에서 나타나는 glycosylation 때문으로 추측된다. 크기가 커진 xylanase를 검정하기 위해 trypsin 처리 후 matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS)를 실행했다. 그 peptide mapping 결과 분리 정제된 효소는 XynA과 일치하는 것으로 나타났다.
- 재조합 자이나라나제의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 70 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고 (그림 3.2-59(A)), 최적 pH는 5.0으로 나타났다 (그림 3.2-59(B)). 이와 같은 결과는 기존에 *A. niger*에서 발현된 특징과 거의 유사한 값으로 나

타난 결과이다.

- 분리된 Xylanase C 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column (HiTrap, GE healthcare)에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다. 그림 3.2-58. 재조합 자이라나제의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 70 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고 (그림 3.2-59(A)), 최적 pH는 5.0으로 나타났다 (그림 3.2-59(B)).

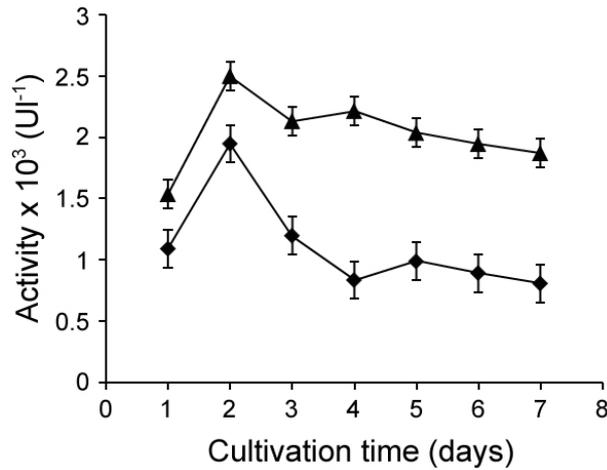


그림 3.2-57. Expression of XynA. The closed triangles represent XynA secreted by the α -factor secretion signal (pPICZ α A/XynA), and the closed diamonds represent XynA secreted by the intrinsic secretion signal (pPICZA/ss-XynA)

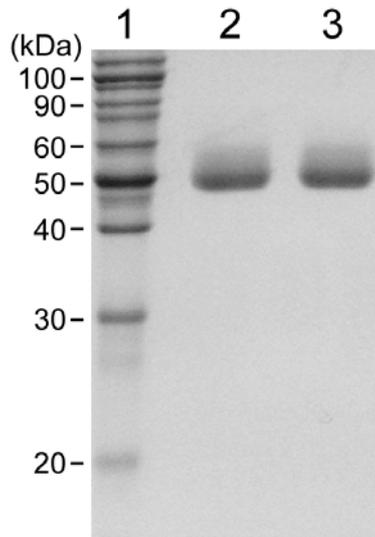


그림 3.2-58. SDS-PAGE of XynA isolated from *P. pastoris*. Lane1, Molecular weight markers; lane2, pPICZ α A/XynA; lane3, pPICZA/ss-XynA

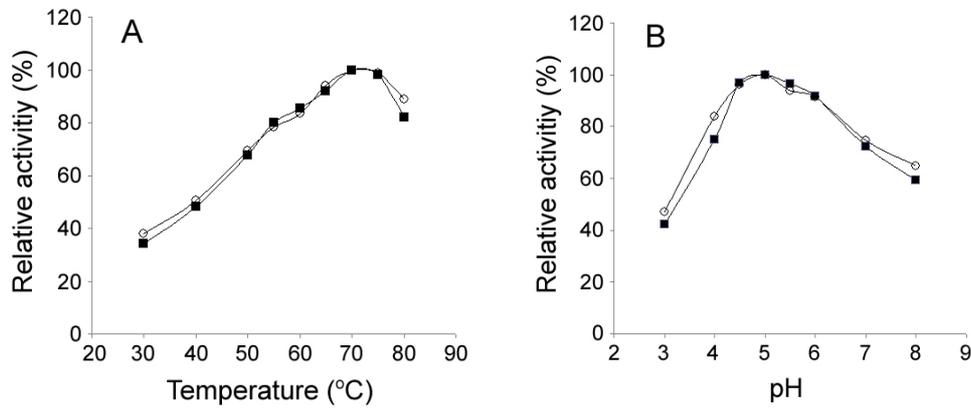


그림 3.2-59. Optimum temperature and pH of recombinant XynA. The closed squares represent XynA secreted by the intrinsic secretion signal (pPICZA/ss-XynA), and the open circles represent XynA secreted by the α -factor secretion signal (pPICZ α A/XynA).

(2) 백색부후균 *P. chryso sporium*으로부터 Acetyl xylan esterase (PcAXE)의 cloning 및 발현

□ Acetyl xylan esterase (AXE)는 헤미셀룰로스를 구성하고 있는 xylan chain에 결합되어 있는 acetyl group을 제거하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려진 효소이다. 헤미셀룰로스를 분해하기 위해서는 이러한 xylanase 같은 주 가수분해 효소외에도 side chain을 제거 할 수 있는 accessory 효소가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 xylan chain에 결합되어 있는 acetyl group을 제거 할 수 있는 AXE 효소를 *P. chryso sporium*으로부터 분리하여 *P. pastoris*에서 발현시켜 분리정제하고 그 특성을 분석하였다.

(가) 실험방법

① 유전자의 분리 및 cloning

□ 합성된 전체 cDNA로부터 PcAXE 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: primer 5' -ATCGATACAAGTGCCCGTTTGGGG-3' ; reverse primer : 5' -TCTAGATACGCGATGCCGAGGAAC-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 ClaI 및 XbaI를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZ α A에 클로닝 하여 pPICZ α A/AXE 를 제작하였다.

□ 이렇게 제작된 재조합 DNA는 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어 졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 μ g의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 뒤 전기충격 방법으로 형질전환 하고 형질전환된 세포를 100 μ g/ml 의 Zeocin이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

□ 최소 각 열 개의 형질전환체를 선별하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로

12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 효소의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1% 정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1 ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 효소를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Histrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 측정하였다.

③ 효소의 활성도 측정

□ PcAXE 효소의 활성도는 p-nitrophenyl acetate의 가수분해 정도를 410 nm에서 측정하여 결정하였다. 반응 혼합액의 조성은 10 mmol p-nitrophenyl acetate in 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 그리고 AXE 적당량 혼합하였다.

④ 효소의 생화학적 특성

□ PcAXE의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C 에서 80 °C 까지 측정하였고 최적 pH의 결정을 위해서는 sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 1.5 에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

□ 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 PcAXE의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 AXE1 gene과 약 98%의 similarity를 가지며 아미노산 염기서열은 99% 정도의 identity를 갖는 것으로 나타났고 이 유전자는 Genebank에 등록하여 accession no: JQ031636을 부여 받았다 (그림 3.2-60).

□ 이 유전자는 *P. pastoris*에서 발현시켰으며, 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 *S. cerevisiae*의 α-factor secretion signal을 이용하여 세포외로 분비하도록 벡터를 구성하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.

□ 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 콜로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.

□ 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 PcAXE의 활성도를 7일간 확인한 결과그림 3.2-61과 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과를 통해 봤을 때 2일째에 효소 활성도가 980UI⁻¹ 로 나타났다.

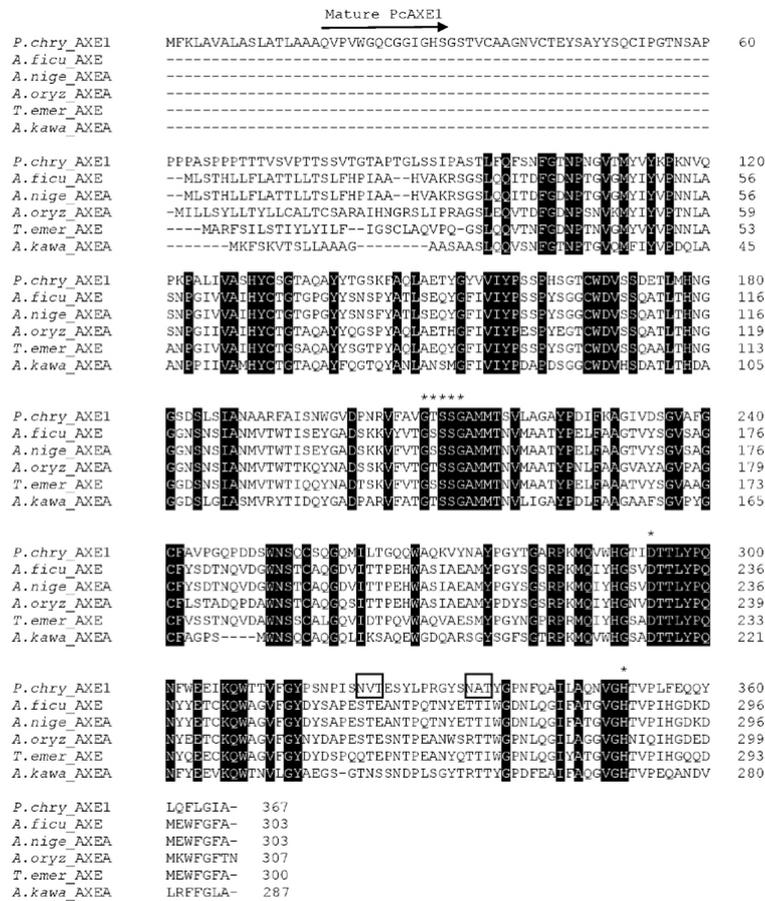


그림 3.2-60. The deduced amino acid sequence alignment of *P. chrysosporium* acetyl xylan esterase2 (pcAXE2) and other AXEs from *A. ficuum* (AF331757), *A. niger* (XP_001395572), *A. oryzae* (XM_001826277), *Talaromyces emersonii* (HQ185193), and *A. kawachii* (GAA86514). The consensus motif of the active site serine enzyme (Gly-Xaa-Ser-Xaa-Gly) and the Asp 294 and His 351 conserved catalytic residues are marked with asterisks. The two N-glycosylation sites (Asn - Xaa - Ser/Thr) are boxed

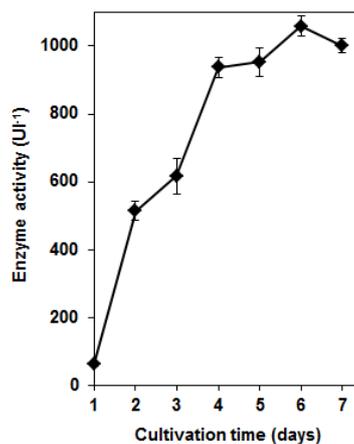


그림 3.2-61. Time course of recombinant acetyl xylan esterase (rPcAXE) activity in *P. pastoris* strain SMD1168 using the α -factor secretion signal. The experiments were replicated three times in 100 ml induction medium (1% peptone, 2% yeast extract, 100 mM sodium sulfate, 0.5% methanol, pH 6). Activity is presented as means \pm standard errors

□ 분리된 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column (HiTrap, GE healthcare)에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다 (그림 3.2-62). 분리정제는 쉽게 효율적으로 진행 되었으나 SDS-PAGE 상에서 확인했을 때 예상했던 크기인 50 kDa 보다 크게 약 65 kDa 로 만들어지는 것을 확인했다. 이렇게 예상했던 크기보다 커지는 이유는 *Pichia* 균주에서 나타나는 glycosylation 때문으로 추측된다.

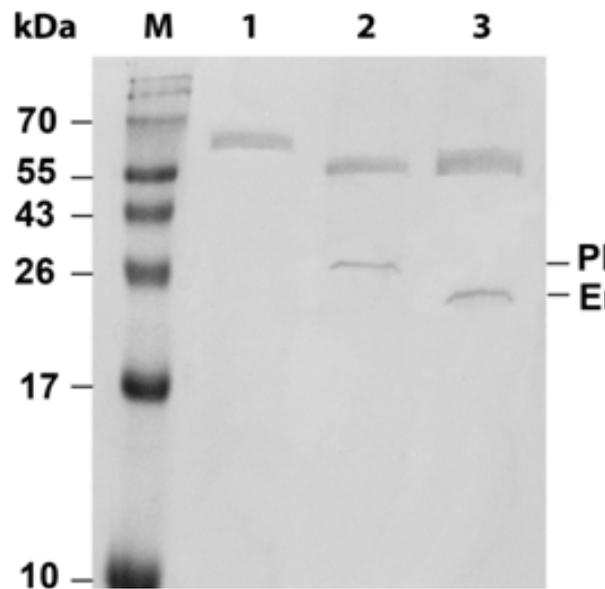


그림 3.2-62. SDS-PAGE analysis of purified recombinant acetyl xylan esterase (rPcAXE). Lane M, molecular mass markers; Lane 1, purified rPcAXE; Lane 2, peptide-N-glycosidase F-treated rPcAXE2; Lane 3, endoglycosidase H-treated rPcAXE

□ 재조합 rPcAXE의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 35 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고, 최적 pH는 7.0으로 나타났다 (그림 3.2-63).

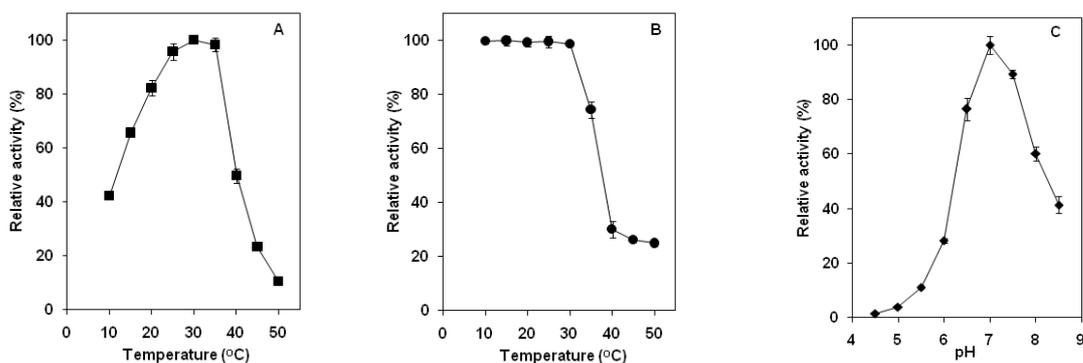


그림 3.2-63. Biochemical characterization of recombinant acetyl xylan esterase 2 (rPcAXE2) activity. (A) Effect of temperature. (B) Thermal stability. (C) Effect of pH.

□ 최근 본 연구진에 의해 *Aspergillus* 유래의 AXE 효소가 peracetic acid (PAA)를 생산하며 이들 peracetic acid에 의한 바이오매스의 전처리 기술개발에 관련된 논문이 최근 발표된 바 있어 본 연구에서 분리 정제된 rPcAXE 효소에 의한 PAA 생산능을 검정하였다.

표 3.2-39 Biochemical properties comparison of rAXE from *P. chrysosporium* and *A. ficcum*

Species	<i>P. chrysosporium</i>	<i>A. ficcum</i>
Factor		
Optimum pH	7.0	7.0
Optimum temperature	30-35	35-40
Specific activity (Umg ⁻¹)	39.86	32.5
K _m (μmol)	92.2	94.6
V _{max} (μmolmin ⁻¹)	7.4	4.5
PAA biosynthesis (mMμg ⁻¹)	0.145	0.134

- Enzyme activity was analyzed using *p*-nitrophenyl acetate as substrate

- 이상의 발현된 rPcAXE 효소는 기존의 *Aspergillus* 유래의 AXE 보다 10% 정도의 PAA 생산능이 향상된 효소임이 밝혀져 이를 이용한 PAA 생산을 통해 바이오매스의 전처리에 응용이 가능하다.

(3) *P. chrysosporium*으로부터 xylosidase/arabinofuranosidase (PcXyl)의 발현 및 특성 확인

(가) 재료 및 방법

① 유전자 cloning 및 발현

- PcXyl의 추정 (putative) cDNA의 뉴클레오티드 서열은 RP78 게놈 데이터베이스 (<http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>)에서 얻었다. PcXyl의 전장 cDNA는 정방향 프라이머 (PcXyl-F 5'-GAATTCATGCACCGTATTGCGAGGGC-3': 서열번호 3) 및 역방향 프라이머 (PcXyl-R 5'-GGGCCATAAACGTTCTCTACAGGTT-3': 서열번호 4)를 이용해 증폭했다. 추가적으로, 분비 신호가 없는 PcXyla cDNA는 정방향 프라이머 (PcXyla-F 5'-GAATTCGGTCGTGTCGCTCACTCGAA-3': 서열번호 5) 및 역방향 프라이머 (PcXyla-R 5'-CCGCGGAATAAACGTTCTCTACAGGT-3': 서열번호 6)를 각각 이용해서 생성했고, PcXyla로 간주되는 앰플리콘 (amplicon)을 얻었다.

② 효소의 생산

- 20개의 양성 *P. pastoris* 형질전환체의 선발하여 효소 생산을 확인하여, 최대로 분비된 형질전환체를 5 ml YPD 배지에서 30 °C 및 200 rpm으로 24시간 동안 배양하였고, 이어서 1% 글리세롤을 포함하는 새로운 YP 배지 50 ml에 옮겨 30 °C 및 180 rpm의 교반 배양기에서 배양하였다. 효소 유도는 최초 세포 광학 밀도 1.0인 100 ml의 YP 배지에 7일 동안 매 24시간마다 1% 메탄올을 첨가하여 수행하였다. 배양액 1 ml을 24시간마다 수집하여 5분 동안 15,000 rpm에서 원심분리 하였고, 이후 효소 활성을 측정하였다.

③ 효소의 활성화 측정

- 자일로시다아제 활성은 Kim 등에 의해 기재된 것처럼 *p*-니트로페닐-β-D-자일로피라노사이드 (pNPβX) (Sigma, St. Louis, MO, USA)로부터의 *p*-니트로페닐 (pNP)의 방출을 측정하여

결정하였다. 간략하게, 90 μl 의 상층액은 pH 5.0, 40 °C의 100 mM 소듐 아세테이트 100 μl 와 혼합하였다. 반응은 에탄올 중의 50 mM pNPX 10 μl 를 첨가하여 개시하였고, 40 °C에서 10분 동안 반응시켰다. 1 ml의 1 M 소듐 카보네이트를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 방출된 pNP의 양은 TCC-240A UV 분광광도계 (Shimadzu)를 이용하여 410 nm 파장에서 측정하였다. 표준 곡선은 pNP를 기질로 사용해서 생성했고, 흡광도는 방출된 pNP의 몰로 변환했다. 자일로시다아제 활성의 1 유닛 (unit)은 실험 조건 하에서 분당 pNP 1 nmol의 방출로 정의되었다.

④ 효소의 생화학적 특성

- 세포가 없는 상층액은 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 수집하였고, 0.45 μm 필터로 여과한 후, 10×결합 버퍼 (20 mM 소듐 포스페이트, 0.5 M NaCl 및 20 mM 이미다졸; pH 7.4)와 혼합하였다. 효소는 Ni²⁺ His-태그 컬럼 (HisTrap-GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 AKTA 고속 단백질 액체 크로마토그래피 시스템으로 정제했다.

(나) 결과

① PcXyl의 클로닝 및 서열 분석

- 유전자 서열분석 결과 PcXyl은 GH family 43에 속하며, 유전자는 26개 aa잔기의 leader 펩티드를 갖는 598개 아미노산을 코딩하는 유전자이다. PCR 앰플리콘은 백색 부후균 RP78의 예측 Xyl 유전자의 예상 크기와 완벽하게 일치했으며, 그에 따라 PcXyl로 명명하였다. 뉴클레오티드 서열은 PcXyl가 598개의 아미노산을 코딩하는 1,797개의 뉴클레오티드를 포함한다는 것을 나타냈다 (그림 3.2-64). 본 연구의 PcXyl의 전장 cDNA 뉴클레오티드 서열은 GenBank에 등록하였다 (등록 번호 JX625152).

② rPcXyl의 발현, 정제 및 특성 확인

- rPcXyl의 효소 활성은 4일째까지 극적으로 증가하여, 최대 26,141 U/L에 도달했다. 정제된 rPcXyl은 1,797 U/mg의 특이적 활성을 나타냈다. rPcXyl의 β -자일로시다아제 활성의 Km 및 Vmax는 12.7 mM 및 2,812 U/mg이었고, α -L-아라비노푸라노시다아제 활성의 동일한 동역학적 매개변수는 Km 및 Vmax에 대해 각각 12.6 mM 및 492 U/mg인 것으로 나타났다. 정제된 rPcXyl의 분자량은 SDS-PAGE를 이용한 측정에 의해 약 83 kDa인 것으로 나타났다 (그림 3.2-65). 그러나, endoH-처리 rPcXyl의 분자량은 서열 내에 존재하는 아미노산의 수로 산출한 이론적인 분자량 65.6 kDa과 유사한 약 66 kDa으로 나타났다. 따라서, 예측 및 재조합 효소 사이의 차이는 글리코실화 때문인 것으로 보인다.

③ rPcXyl에 대한 pH, 온도 및 당 농도의 영향

- 최대 rPcXyl 활성을 위한 최적 pH는 5.0인 것으로 나타났고, 최적 온도는 45 °C이다 (그림 3.2-65A, B). 이 효소 활성은 pH 및 온도가 각각 4.5 및 40 °C 미만 또는 5.5 및 45 °C를 초과할 때 급격히 감소했다. rPcXyl의 활성에 대한 다양한 금속 이온의 영향 또한 조사한 결과 rPcXyl은 Cu²⁺ 및 Zn²⁺에 의해 거의 완전히 저해되었다.

```

Phanerochaete MHRIARATFAVLSLLTALAGVPAVAAGRVAHSKSKSYHNPIISGFAPDPSCIRVDAQYFC 60
Geobacillus -----MAKIKNPILTGFHPDPSICRVGDDYYI 27
Butyrivibrio -----MVIANNPILKGFYPPDPSICRKGDDFYI 27
Selenomonas -----MNIQNPFVLKGFNPDPPIVIRAGDDYYI 26

Phanerochaete VTSSFSAPFGIPVYTSRDLVQWQQIGNVLSRPEQLPQLALVNOTTGGIWAATIRHHHGVF 120
Geobacillus AVSTFEWFPGVRIYHSKDLKNWRLVARPLNRLSOLNMIG--NPDSGGVWAPHLSYSDGKF 85
Butyrivibrio VCSSEVYAPGVPIFHTKDLAHFEQIGNILDRESQPLSG--DISRG-IFAPTREHNGIE 84
Selenomonas ATSTFEWFPGVQIHHSKDLVHWHLVAHFLSTTEFLDMKG--NPDSGGIWAAPDLSYADCKF 84

Phanerochaete YVTTTLVFDGAPQLSPTRWDNLIFFNTDIWANNGNGWSDPVHFT---FQCYDLSLFWDDD 177
Geobacillus WLIYTDVKVVEGQWKDG--HNYLVTCDTIDG---AWSDFIYLN---SSGFDPSELFHDED 136
Butyrivibrio YMITTNVSSGG-----NFIVTAKPAG---PWSSEFYLGDEAPGIDPSLFFDDD 131
Selenomonas WLIYTDVKVVDGMWKDC--HNYLTTAEDIK---PWSKPIILLN---GAGFDRSLFHPDS 135

Phanerochaete GTAYVQGS-----HAWHVFPATLQFKIDVRTGELNLEPIILWNG--TGGLAPFAHPVFK 229
Geobacillus CRKYLVMYWDHR-VDHHPFYGIIVLQEYSVEQKLVGEPKIIFKG--TDLRITFGPHLYK 193
Butyrivibrio GKCYVVGTRPNPDGVRYNGDWEIVVQELDLEQMKLVGPSMAIWKALKKDVWPEGPHLYK 191
Selenomonas CKKYLVMYWDQR-VYHNFYGIALQEYSVAEEKLIGKPEIYK--TDIAYTEGPHLYY 192

Phanerochaete RTDGYLMTAEGGTGLGHMVTMAKSPNVTGPYTGyanneVLTNANTSEY--LQTVGHADL 287
Geobacillus INGYYYLLTAEGGTRYNHAATIARSTSLYGPYEVHPDNPLLSWVYPRN-PLQKAGHASI 252
Butyrivibrio KDGYYLLBAEAGTSFHAISVARSKELFKWFEGCPNRIFFTHRNLGKDPVPCNVGHADL 251
Selenomonas INDMYYLMTAEGGTTYCHSETIARSKTIHGPEYIQPDYELLSAWKEVHN-PLQKCGHASL 251

Phanerochaete FTDTAGNWWGVALATRNATA-----NYPMGRETIVLPVWVEEGQFVFNAT 334
Geobacillus VHTHTDEMFLVHETGRPLPR-EGQP--LLEHRGYCPLGRETAIQRLEMKDG-WFVYVGGN 308
Butyrivibrio VDDINGNWMVMEASRPCKG-----KCSLGRETFIAKVIWEDG-WFVVPNGV 297
Selenomonas VETQNGQWYLAHETGRPLPAPAGFPRSREQHAFCLGRETAIQKIEWQDG-WFVYVGGQ 310

Phanerochaete PGRAYVNTGSLPASQRPTFSMDKDPLVGRAQHVVFPSPGHASLSDIPRQLVYRPLDFS 394
Geobacillus GPSLEIDGPSVEEVSWEKDYDEKDD-----FDGDTLNHHFQTLRIP-LG 351
Butyrivibrio GRLTDEVEMDLPEYRFSKEITTKDK-----MTFETVLDDRFPVGIERRS 341
Selenomonas QGSLEVEAPDLPQQEWAPTYEERD-----FDKDTLNINFTLRIP-FS 353

Phanerochaete RFTVSPPSHENTLRIMGSABNTITGGIGTSTFIARRQDALBFAEATLEFAPKLSDFV 454
Geobacillus EDIATLKAREGHLRLYGR-ESLTSRF---TQAFVARRWQHFFVAETKVSFR-----PTT 402
Butyrivibrio EDFYSLTDNPGFLRLKLRPEAIENTG---NPSYLGIRQKTHSFRASCGLKFT-----PAK 393
Selenomonas EHLGSLTAREGHLRLYGR-ESLQSKF---TQAHIARRWQSFNEDAGTSVBEFS-----PNS 404

Phanerochaete EDEEAGMTLFIQRTQHFDLGVVALRDATSGKLGKFIRLRTFSANSSADGMNDGYSQPGIV 514
Geobacillus FQOSAQLVNYNTQNWTTLQITWHEEKG-----RIELMTCDHLVVDQPLRGREI 452
Butyrivibrio DNECAGMVLQNNENHLELLVVKKDK-----LQFKVGPVIKGTIRLATFD 440
Selenomonas FQQMAGLTCYYNTENWSSIHVWNEEKG-----RIIDLVTADNGTFSMPLAGAEI 454

Phanerochaete PLPSNVDKLRLRVQAVNASYAFSYLASEG----VRSSKWTIVGYGAAREVSGGFTTLV 569
Geobacillus VVPDDIEYVLRVTVQ-ATTYKYSYFDGMNWIDLPTVFESYKLSDDYIKSRAAFVAFV 511
Butyrivibrio ISSGDLEIILEAANQL-ANIYIKKNEK-----ILVAECIDLSPYTTEESGGFVCTI 492
Selenomonas PIPDEVKTVHFVSVR-GRIVQYAYSFDGETFHTLPIELPSWKLSDDYVRRGGGFTAFV 513

Phanerochaete GMFATGNHNSITPAYFSDFTYEPVENVY 598
Geobacillus GMHCR-DGSGQNNYADFDFLYKEL---- 535
Butyrivibrio GLYASSNGKTSNDYCDYSYFTVEEV---- 517
Selenomonas GINAI-DITGTALPADFDYFTYKELD--- 538

```

그림 3.2-64. The deduced amino acid sequence alignment of *P. chrysosporium* xylosidase/arabinofuranosidase (PcXyl) and other Xyls from *G. Stearothermophilus* (PDB: 2EXK_A), *Butyrivibrio fibrisolvens* (AAA63609), *Fusarium graminearum* (XP_391670) and *Selenomonas ruminantium* (AAB97967) using the ClustalW2 tool

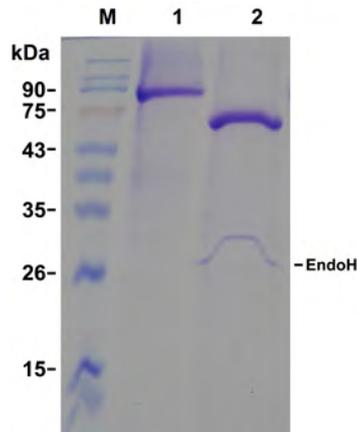


그림 3.2-65. SDS-PAGE analysis of purified recombinant xylosidase/arabinofuranosidase (rPcXyl). M, molecular mass markers; 1, purified recombinant xylosidase/arabinofuranosidase (rPcXyl); 2, rPcXyl treated with EndoH

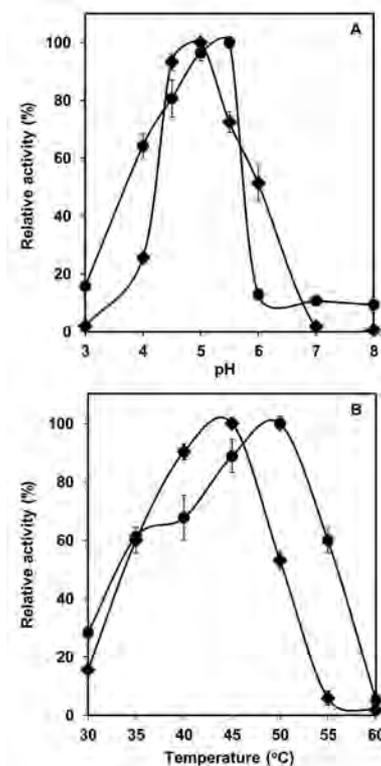


그림 3.2-66. Effect of pH (A) and temperature (B) on recombinant xylosidase and arabinofuranosidase activity

④ 기질 특이적 활성

□ *p*NPG, *p*NPαX, *p*NPA, 사탕무 아라비난, 탈분지화 아라비난, 밀 아라비노자일란, 자작나무 자일란 및 너도밤나무 자일란에 대한 rPcXyl의 가수분해 활성은 표 3.2-40에 제시하였다. rPcXyl은 *p*NPG 및 *p*NPαX를 가수분해하지 못했으나, *p*NPA에는 작용했다. *p*NPA를 기질로 사용했을 때, rPcXyl의 특이적 활성은 197 U/mg이었다. rPcXyl은 헤미셀룰로오스 기질에 대해서는 약한 가수분해 활성을 나타냈다. 이들 중에서도, rPcXyl은 0.28 U/mg 미만의 특이적 활성으로 밀 아라비노자일란을 효율적으로 분해했다.

표 3.2-40 재조합 자일로시다아제/아라비노푸라노시다아제 (rPcXyl)의 기질 특이적 활성

기질	활성 (U/mg)
<i>p</i> -니트로페닐-β-D-자일로피라노시드 (pNPβX)	1,797
<i>p</i> -니트로페닐-α-L-아라비노푸라노시드 (pNPA)	197
<i>p</i> -니트로페닐-α-D-자일로피라노시드 (pNPaX)	nd
4-니트로페닐-β-D-글루코피라노시드 (pNPG)	nd
자작나무 자일란	<0.03
너도밤나무 자일란	<0.1
사탕무 아라비난	<0.08
탈분지화 아라비난	<0.18
밀 아라비노자일란	<0.28

nd: 검출되지 않음

⑤ 자일로-올리고머 당의 가수분해 및 자일라나아제와의 상승 작용

□ rPcXyl의 작용 방식은 자일로-올리고머를 이용하여 분석되었다. rPcXyl은 자일로비오스를 자일로오스로, 자일로트리오스를 자일로오스 및 자일로비오스로 분해했다. 그러나, 이들 자일로-올리고머는 완전히 분해되지 않았다. 한편, 자일로테트라오스에 해당하는 스팟이 rPcXyl 및 자일로펜타오스의 반응 혼합물에서 관찰되었다.

□ 추가적으로, 자작나무 자일란 및 너도밤나무 자일란에 대한 rPcXyl 및 rPcXynC의 상승 작용의 효율성을 평가했다. rPcXyl은 자작나무 자일란 또는 너도밤나무 자일란을 가수분해하지 못했으나, rPcXyl 및 rPcXynC의 조합물은 자일로오스 농도를 증가시켰다. 상기 결과는 rPcXyl 및 rPcXyn의 상승 작용이 최종 가수분해 산물을 증가시킨다는 것을 나타내며, 이는 rPcXyl이 자일란 또는 다른 헤미셀룰로오스 기질을 분해하는데 이용될 수 있다는 것을 나타낸다 (그림 3.2-67).

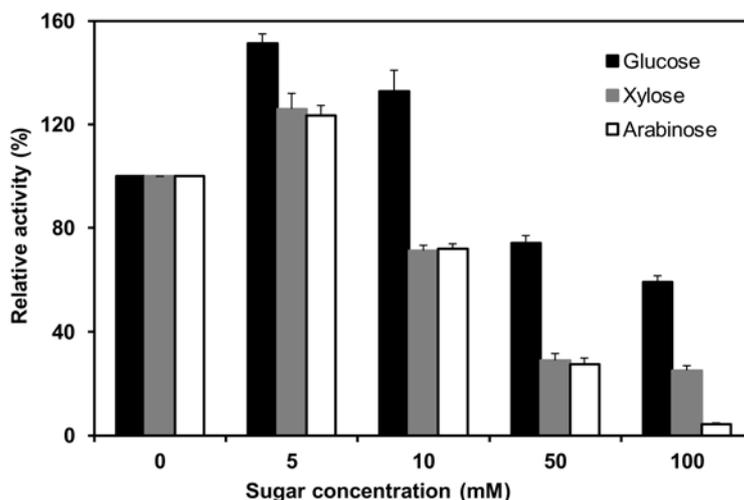


그림 3.2-67. Effect of sugar concentration on the xylosidase activity of recombinant xylosidase/arabinofuranosidase (rPcXyl)

(4) 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 arabinannase의 발현 및 특성 확인

(가) 재료 및 방법

□ 추정 PcARA의 뉴클레오티드 서열은 Wymelenberg에 의해 예측된 DOE Joint Genome Institute 웹사이트 (<http://genome.jgi-psf.org/Phchr1/Phchr1.home.html>)의 백색 부후균 유전체 데이터베이스에서 얻었다. 상기 서열은 프라이머를 고안하기 위해 사용되었다. 신호 펩티드를 포함하는 PcARA의 cDNA는 정방향 프라이머 (5'-CTCGAGATGTGGACCTCCATC GTTT-3': 서열번호 3) 및 역방향 프라이머 (5'-TACGTACACGACAATTGGCCACCCA-3': 서열번호 4)를 이용한 PCR로 증폭했다.

① 재조합 PcARA (rPcARA)의 발현 및 생산

□ 20개의 양성 *P. pastoris* 형질전환체의 rPcARA 분비 능력을 확인한 뒤, 최대 분비 *P. pastoris* 형질전환체는 5 ml의 YPD 배지에서 30 °C 및 200 rpm으로 밤새 배양했다. 이어서, 5 ml의 배양액을 1% 글리세롤을 포함하는 50 ml의 새로운 YP 배지에 옮겨 30 °C 및 150 rpm의 교반 배양기에서 밤새 배양하였다. 세포 펠렛은 2,000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 수집하였고, 세포 펠렛을 10 ml YP 배지에 다시 현탁 시켰다. 이어서, 흡광도 1에 도달할 때까지 현탁액을 90 ml의 신선한 YP 배지에 서서히 첨가했다. 최종적으로, 새로운 YP 배지를 첨가하여 최종 부피를 100 ml로 만들었다. rPcARA를 유도하기 위해, 1 ml의 100% 메탄올이 25 °C에서 배양 7일 동안 최종 농도 1%까지 매 24시간마다 첨가되었다. 1 ml의 배양액을 매 24시간마다 수집하였고, 15,000 rpm으로 5분 동안 원심분리한 후, 효소 활성을 측정했다.

② 효소 정제

□ rPcARA를 정제하기 위해, 배양 2일째에 세포가 없는 상층액을 2,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 수집하고, 0.45 μm 필터로 여과했다. 전체 90 ml의 여과된 상층액은 10 ml의 10×결합 버퍼 (20 mM 소듐 포스페이트, 0.5 M NaCl, 및 20 mM 이미다졸; pH 7.4)와 혼합했다. 혼합물은 AKTA 고속 단백질 액체 크로마토그래피 정제 시스템을 이용하여 Ni²⁺ His-태그 컬럼 (Histrap-GE Healthcare)에 적용했다.

③ 효소 분석

□ 아라비난나제 활성은 DNSA (3,5-dinitrosalicylic acid)를 이용하여 탈분지화된 아라비난 (Megazyme)으로부터의 환원당 말단의 생산을 측정함으로써 분석했다.

④ 아라비난나제 활성에 대한 pH, 온도 및 금속 이온의 영향

□ rPcARA에 대한 pH의 영향은 pH 3.0에서 6.0 (50 mM 소듐 아세테이트 이용) 및 pH 7.0에서 8.0 (50 mM 소듐 포스페이트 버퍼 이용)의 다양한 pH 값에서 50 °C의 효소 활성에 대한 분석으로 결정되었다. 최적 온도는 최적 pH에서 30 ~ 80 °C 범위에서 조사했다.

(나) 결과

① PcARA의 클로닝 및 서열 분석

□ PCR 앰플리콘은 백색 부후균 RP78의 예측된 ARA 유전자의 예상 크기와 완벽하게 일치

했으며, 따라서 PcARA로 명명했다. 상기 cDNA 산물의 뉴클레오티드 서열은 312개의 아미노산을 코딩하는 939개의 뉴클레오티드를 갖는다. 본 발명의 PcARA의 전장 cDNA 뉴클레오티드 서열은 GenBank에 기탁되었다 (등록번호 JQ838072).

P. chr_ARA	----MWTIVFLALVAMAVMAVAQPNPGRVTGDISVHDPFMC-RDDAGTYFIFATGTGIP	55
Pe.chr_ARA	----MHFGNIVKPVLFVAVLVQGYANPGSCSGACIVHDPFLIQRSSDNRYFRFSTGNKIS	55
A. nig_ARA	----MYQLLSVASVPLLASLVHGYADPGACSGVCTTHDPGLIRRESGDYFLESTGNKIS	56
A. acu_ARA	----MYSLLTALSVPLLAGLAHGYANPGSCSGSCNVHDPALIVRESDGKYFRFSTGNBIS	56
C. jap_ARA	MPTHHPITRQHWHSWLSALALLCASLACGAKQVDVHDPVMT--REGDTWYLESTGPGIT	58
P. chr_ARA	IHTSTDRIS-WTVIGSVWPDGAPTETNQFTGTTNGDLWAPDCTYKDGTFYLYAASTFGS	114
Pe.chr_ARA	YASSSINGPWTNIGSMLPGGS---SIDLAG--NDDLWAPDAQLVNGLYHVYTVSTFGS	110
A. nig_ARA	YVSASSIEGPWTSVGSMLPDGS---SIDLDG--NDDLWAPDVSVDGLYVYVAVSTFGS	111
A. acu_ARA	YASASSINGPWTATGVSVPAGS---KIDLSG--NTDLWAPDLSYVDGTYCYLVSVSTFGS	111
C. jap_ARA	IYSSKDRVNRYSDFRAFGTEPT--WAKRVSPSFDGHLWAPDIYQHKGLFYLYSVSAFGK	116
P. chr_ARA	QNSGIFFFATSPSGLPGS---WTDHCLV-TSTKAGDSYNAIDPNLLDGS-NWILSLGSF	168
Pe.chr_ARA	QDSATGLATSPTMESGS---WTDGATGIASSSSKAYNAIDGNLFNDGG-TYYMNGSFF	165
A. nig_ARA	QDSATGLATSETMEYGS---WTDHCGSTGIASSSAKIYNAIDPNLIYADG-TYYINFGSF	166
A. acu_ARA	QDSATGVSASTTMEELNT---WTDHCGSVGVASSSSKNYNAIDGNLLVDGS-SYLLQRFSGF	166
C. jap_ARA	NTSATGVTVNKTLNPASPDYRWEDKGVIESVPQRDLWNAIDPAIIADHDGQVWMSFGSF	176
P. chr_ARA	WTGIKEMALSPSTGKPSSSSVTS-----LAQRTANNGAIEASVIWKQGNFYLYLFT	218
Pe.chr_ARA	WHDIYQAPMNSAATKVASSSYN-----LAYDPAGTHAVEGAYMYKYGRYYLYLFY	214
A. nig_ARA	WDDIYQVPMKSTPTAAASSSYN-----LAYDPSGTHABEGSYMFQYGDYLYLYLFY	215
A. acu_ARA	WGDIYQVKMASPLKTAGSASYN-----IAYNATGTHSEEGSYLFKYGSYYLYLFF	215
C. jap_ARA	WGGLKLFKLNDDLTRPAEPQEWHSIAKLEERSVLMDDSQAGSAQIEAPFILRKGDYLYLFA	236
P. chr_ARA	SWDNCC-----QGLNSTYINIRVGRSSSAKGFVVDQNGVALTNGGGTLVLGTHGSVVGPG	272
Pe.chr_ARA	SAGICCGYDTSRPASGABYKIKVCRSTSPTEGDFVDAAGTACTSGGGTVVLESHGTVYGP	274
A. nig_ARA	SAGICCGYDTSMPASGEBYHIKVCRTSPTGDFVDSGDTACTDGGTMVLESHGEVYGP	275
A. acu_ARA	SSGTCCGYDTSRPAQGEYKIMVCRSTSATGDFVDKNGNACTESGGTIVLASHGTVYGP	275
C. jap_ARA	SWGLCR-----KGDSTYHLVVGRSKQVTGPLYLDTGRDMNQQGGSLIKGNKRWVGLG	290
P. chr_ARA	GQDLMSD-VDGTILVYHYTATT-----SLGGINRLDFSTGWPVIVV-----	312
Pe.chr_ARA	GQGVTDPDLGVPVLYYHYVDTTVGYADGQKRFGNQIDFSSGWPVIVV-----	320
A. nig_ARA	GQGVYDDPNLGPVLYYHYMNTTIGYADSDAQFGWNTIDFSSGWPVIVV-----	321
A. acu_ARA	GQGVYDDPTYGPVLYYHYVDTTIGYADDQKLFGNWNTIDFSSGWPVIVV-----	321
C. jap_ARA	HNSAYTWDGKDYLVLHAYEAADN---YLQKLIKILNLHWDGEGWPVQVDEKELDSYISQRLK	347

그림 3.2-68. The deduced amino acid sequence alignment of *P. chrysosporium* endo-arabinanase (PcARA) and other ARAs from *Penicillium chrysogenum* (BAD89094), *A. niger* (AAA32682), *A. aculeatus* (AAG27441), and *Cellvibrio japonicus* (CAA71485) using ClustalW2 tool

② rPcARA의 발현 및 정제

□ 효소 축적은 4일째까지 극적으로 증가했으며, 최대 1,660 U/l에 도달했다. rPcARA는 세포가 없는 상층액으로부터 정제했고, 이의 생화학적 특성을 분석했다. 그 결과는 rPcARA가 탈분지화된 아라비난에 대해 204 U/mg의 특이적 활성을 갖고, Km 및 Vmax 값은 각각 4.3 mg/ml 및 400 U/mg을 나타냈다. 다른 ARA들과 비교하면, rPcARA는 더 높은 특이적 활성을 나타낸다. 예를 들어, 페니실리움 크리소게눔 (*P. chrysogenum*), 칼디셀룰로시럽터 사카롤리티쿠스 (*C. saccharolyticus*) 유래의 아라비난나제들은 각각 18.8 및 12 U/mg의 특이적 활성을 갖는다. 정제된 rPcARA의 분자량은 SDS-PAGE로 측정했으며 그 결과는 33 kDa 부근의 단일 밴드를 나타냈다 (그림 3.2-69). 그 크기는 rPcARA 서열에 존재하는 아미노산의 수로 계산한 이론적 분자량 33.9 kDa에 매우 가깝다.

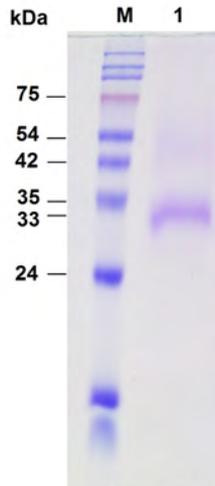


그림 3.2-69. SDS-PAGE analysis of purified recombinant arabinase (rPcARA). Lane M, molecular mass markers; Lane 1, purified rPcARA. The molecular weight of rPcARA was estimated to be 33 kDa

③ rPcARA 활성에 대한 온도, pH 및 금속 이온의 영향

□ 온도의 영향을 측정하기 위해, 0.3 U의 정제된 rPcARA를 상기 기재된 것처럼 탈분자화된 아라비난과 반응시켰다. 효소 분석은 rPcARA가 60 °C에서 최고 활성을 나타낸다는 것을 보여주었다 (그림 3.2-70). 효소 활성은 반응 온도가 60 °C를 초과할 때 급격히 감소했고, 80 °C에서는 대부분의 활성을 잃었다. rPcARA의 최적 온도는 rPcARA가 열안정성 효소라는 것을 나타낸다.

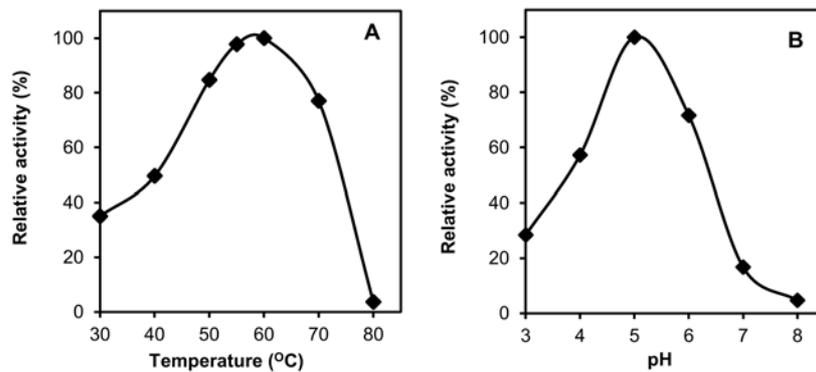


그림 3.2-70. Effect of temperature (A) and pH (B) on recombinant arabinase activity (rPcARA)

④ rPcARA의 기질 특이성 및 작용 방식

□ rPcARA의 아라비난나제 활성은 탈분지화된 아라비난, 사탕무 아라비난, 아라비노자일란 및 자작나무 자일란에 대해 시험했다. 그 결과는 rPcARA가 탈분지화된 아라비난에 대해서는 높은 활성을 나타내지만, 사탕무 아라비난 및 아라비노자일란에 대해서는 특이적 활성이 낮고, 자작나무 자일란은 가수분해하지 못하는 것으로 나타났다 (표 3.2-41).

표 3.2-41 백색 부후균 유래의 엔도-1,5- α -L-아라비난나제의 기질 특이적 활성

기질	특이적 활성 (U/mg)
탈분지화된 아라비난	204 \pm 12
사탕무 아라비난	13.7 \pm 1.2
아라비노자일란	4.4 \pm 0.2
자작나무 자일란	ND
<i>p</i> -니트로페닐 α -L-아라비노푸라노시드	ND

ND: 검출되지 않음

- rPcARA에 의한 탈분지화된 아라비난의 가수분해 산물은 TLC 결과를 통해 나타났다. 그림 3.2-71에 나타난 것처럼, rPcARA는 아라비노오스, 아라비노비오스 및 아라비노트리오스 당을 방출한다. 이러한 결과는 rPcARA가 아라비노비오스 및 아라비노트리오스를 주요한 최종 산물로 생성하는 엔도-아라비난나제라는 것을 나타낸다.

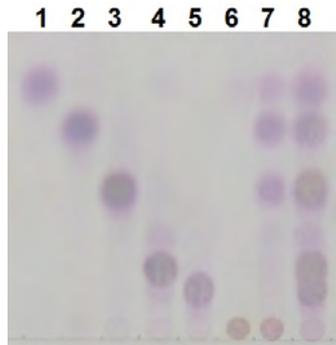


그림 3.2-71. Thin layer chromatography (TLC) analysis of reaction product by recombinant arabinanase (rPcARA)

⑤ 자일라나아제와의 상승 작용

- 본 연구에서는 상용 아라비노자일란 및 NaOH-전처리 보릿짚의 분해에 대한 두 효소들의 상승적 작용을 조사했다. 아라비노자일란은 37%의 아라비노오스 및 61%의 자일로오스로 이루어지는데, 이에 따라 본 연구에서는 rPcARA 및 rPcXynC 비율이 3:5인 혼합물을 밀 아라비노자일란의 분해에 이용했다. rPcXynC 및 rPcARA를 밀 아라비노자일란 분해에 각각 이용했을 때, rPcXynC는 0.66 mg의 당을 방출한 반면, rPcARA는 사용된 총 1 mg의 기질에서 단지 0.01 mg의 당을 생성했다. 그러나, 3:5 비율의 rPcARA 및 rPcXynC는 당 생성을 0.72 mg까지 증가시켰다 (그림 3.2-72A). 두 효소의 조합은 아라비노자일란 분해에 대한 효율 증가를 나타냈다. 이는 두 효소가 서로 보완하여, 결과적으로 특이적 활성을 향상시킨다는 것을 증명하였다. NaOH-전처리 보릿짚의 분해 효율은 그림 3.2-72B에 나타났다. rPcARA에 의한 효소 가수분해는 1.023 mg으로 나타난 반면, rPcXynC에 의해서는 8.729 mg가 생성되었다. rPcARA 및 rPcXynC의 조합은 당 생성을 9.376 mg까지 증가시켰다. 보릿짚의 분해에 대한 자일라나아제의 역할이 증명되었으며, rPcARA 및 rPcXynC의 상승 작용은 당 생산 수율을 개선했다.

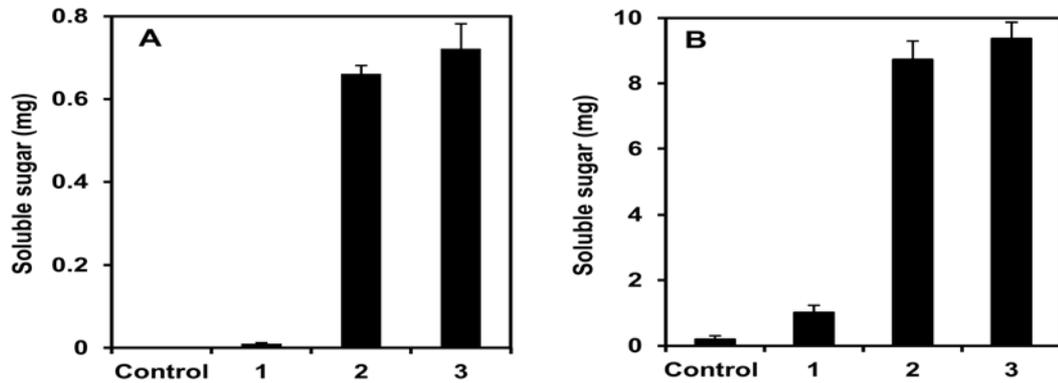


그림 3.2-72. Soluble sugar production following hydrolysis by the combination of rPcARA and rPcXynC on (A) commercial arabinoxylan and (B) NaOH-pretreated barley straw. Control, biomass without enzyme incubation; 1, biomass incubated with rPcARA; 2, Biomass incubated with rPcXynC; 3, biomass incubated with rPcARA and rPcXynC mixture

라. *P. chrysosporium*으로부터 기타 리그닌 분해효소의 cloning 및 특성 확인

(1) *P. chrysosporium*으로부터 Glyoxal oxidase (GLX1)의 발현 및 특성화

□ 리그닌 분해대사에 관여하는 효소에는 과산화효소계 (lignin peroxidase, Mn-peroxidase), 과산화수소 생성 산화효소 (glucose oxidase, glyoxal oxidase, aryl alcohol oxidase 등)가 있다. 즉 리그닌 분해에 직접 관련하는 LiP, MnP 등 외에 반응 과정에 필요한 H₂O₂를 공급해주는 효소가 필요하다. 따라서 본 연구에서는 안정적인 H₂O₂를 공급하는 glyoxal oxidase 유전자를 *P. chrysosporium*으로부터 분리하고 *Pichia pastoris*에서 발현시켜 분리정제하였으며 이를 통해 최적의 반응 조건을 탐색하였다.

① 유전자의 분리 및 cloning

□ 합성된 전체 cDNA로부터 GLX1 유전자의 cloning을 위해 다음과 같은 두 종류의 프라이머를 디자인하였다 (forward primer: 5'-GCGAATTCATGTTGTCGCTGCTAGCCGTAGT-3'; reverse primer : 5'-CGTACGTACTCCAGGGTCGGCGGAGGGT-3'). PCR 조건은 94 °C 1 min, 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min을 30 cycles 진행하였다. 이 프라이머를 사용하여 상기한 PCR 조건과 동일하게 30 cycle을 진행하여 만들어진 DNA 조각을 pGEM-T vector에 클로닝하고 정제한 뒤 제한효소 EcoRI 및 SnaBI를 처리한 뒤 다시 정제하여 pPICZαA에 클로닝 하여 pPICZαA/GLX1를 제작하였다.

□ 이렇게 제작된 재조합 DNA는 염기서열 분석을 통해 정상적인 클로닝이 이루어 졌는지를 확인하고 *Pichia* 세포내로 형질전환 시켰다. *Pichia* 세포내로 형질전환 시키기 위해 10 μg의 재조합 DNA를 제한효소 PmeI을 처리하여 linear DNA 형태로 만든 후 전기충격 (electroporation) 방법으로 형질전환 한 뒤 형질전환된 세포를 100 μg/ml의 Zeocin이 포함된 YPD 배지에 도말하여 30 °C에서 2-3일 배양한 뒤 나타나는 형질전환체를 선별하였다.

② 효소의 생산

- 최소 각 열 개의 형질전환체를 선발하여 PCR을 통해 재확인한 뒤 1%의 methanol이 포함된 YP medium 50 ml에 접종하여 세포외로 분비되는 효소의 활성도를 측정하였다. 배양 방법은 확인된 형질전환체의 콜로니를 5 ml YPD 배지에 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 12시간 배양한 뒤 5 ml 배양액을 100 ml의 YPD 배지에 재접종한 뒤 30 °C, 150 rpm에서 2일간 진탕배양 하였다. 배양액은 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 회수하였다. 회수된 세포는 10 ml YP 배지 (1% yeast extract, 2% peptone)에 재현탁하고 천천히 90 ml의 YP 배지를 optical density가 1이 되도록 희석하며 최종 100 ml이 되도록 하였다. 효소의 생산을 위하여 100% 메탄올 1 ml을 넣어 최종 1%정도 되게 유지하고 매 24시간마다 추가로 1 ml의 메탄올을 넣어주며 1주일 동안 배양하였다. 효소를 분리정제하기 위하여 활성도가 제일 높았던 2일째의 배양액을 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 *Pichia* 세포를 제거한 뒤 0.45 µm 필터에 통과시켜 부유 고형물을 제거하고 10 × binding buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, and 20 mM imidazole; pH 7.4)를 섞은 뒤 ÄKTA FPLC 시스템의 his-tag column (Histrap-GE Healthcare)에 통과시킨 뒤 elution buffer (20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl and 500 mM imidazole; pH 7.4)를 통해 분리정제 하였다. 분리된 단백질의 농도는 Bradford 방법을 통해 측정하였다.

③ 효소의 활성도 측정

- GLX1 활성도는 peroxidase-coupled assay 방법으로 진행했으며 peroxidase의 substrate는 phenol red를 사용했다. 반응 혼합액 (1ml)의 조성은 50 mM 2, 2-dimethylsuccinate (pH 6.0), 10 mM methyl glyoxal, 0.01% phenol red 또는 malachite green dye, 그리고 10µg의 horse radish peroxidase 또는 Mn Peroxidase를 혼합하여 사용했고, 반응의 중단은 50 ul의 2 N NaOH를 첨가하였으며 반응액은 610 nm 또는 600 nm의 흡광도를 측정을 했다.

④ 효소의 생화학적 특성

- GLX1의 활성을 위한 최적온도의 측정은 30 °C 에서 80 °C 까지 측정하였고 최적 pH의 결정을 위해서는 sodium citrate 또는 sodium phosphate buffer 등을 사용하여 pH 범위 1.5 에서 8.0 까지 측정하였다.

(나) 결과

- 클로닝된 유전자의 염기서열 결정 결과 GLX1의 cDNA는 *P. chrysosporium* ME446 유래의 glyoxal oxidase gene (GeneBank accession no: L47286.1)와 100% 동일한 것으로 나타났다. 따라서 이 유전자들을 *P. pastoris*에서 발현시켰으며 앞서 언급한 것처럼 AOX promoter의 발현 조절 아래 *S. cerevisiae*의 α-factor secretion signal을 이용하여 세포외로 분비하도록 벡터를 구성하였다. 또한 재조합단백질의 분리정제를 용이하게 할 수 있도록 각 유전자에 his-tag sequence가 융합되도록 구성 하였다.
- 이들 재조합 벡터를 *Pichia* 균주에 형질전환하고 선발된 Zeocin 저항성 형질전환체를 대상으로 PCR을 진행하여 재조합 DNA를 확인하였다. 확인된 형질전환체중 약 6개의 콜로니를 배양용 배지에 접종한 후 배양액에 나타나는 활성도를 측정하였다.
- 메탄올에 의한 유도아래 *P. pastoris* 형질전환체에서 나타나는 GLX1의 활성도를 7일간

확인한 결과 2일째에 효소 활성도가 가장 높게 나타나고 그 양은 $2,000\text{UI}^{-1}$ 로 나타났다.

- 분리된 효소의 분리정제를 위해 His-Tag column (HiTrap, GE healthcare)에 직접 적용하여 순수 분리된 효소를 확인 할 수 있었다 (그림 3.2-73). 분리정제는 쉽게 효율적으로 진행되었으나 SDS-PAGE 상에서 확인했을 때 예상했던 크기인 50 kDa 보다 크게 약 70 kDa 로 만들어지는 것을 확인했다. 이렇게 예상했던 크기보다 커지는 이유는 *Pichia* 균주에서 나타나는 glycosylation 때문으로 추측되어 n-glycosylation 부위를 제거 할 수 있는 PNGase F를 처리한 결과 약 60 kDa 정도로 크기가 줄어드는 것을 확인했다.

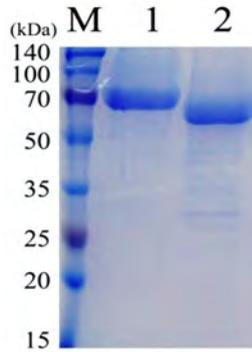


그림 3.2-73. SDS-PAGE analysis of recombinant glyoxal oxidase (GLX) purified from *P. pastoris*. M, Molecular weight markers; Lane 1, recombinant GLX; lane2, recombinant GLX treated with PNGaseF

- 재조합 GLX1의 최적 온도를 30 °C 에서 80 °C 까지 검정한 결과 35 °C에서 가장 활성도가 높은 것으로 나타났고, 최적 pH는 5.0으로 나타났다 (그림 3.2-74).

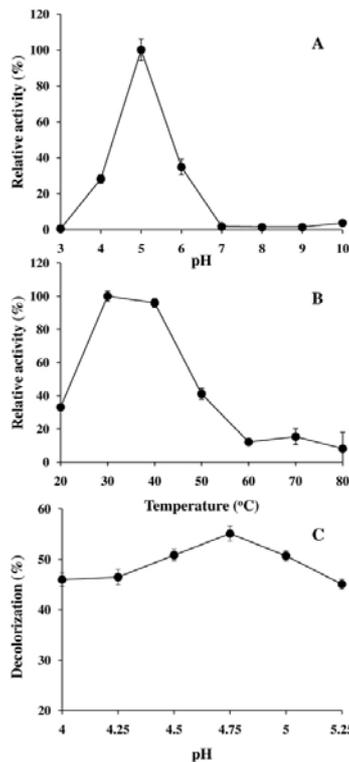


그림 3.2-74. The optimal pH (A) and temperature (B) for recombinant glyoxal oxidase (GLX) and effect of pH (C) on the decolorization of malachite green with recombinant MnPH₄ coupled with recombinant GLX (4.78 μM H₂O₂/min)

- MnPH₄의 활성 최적화를 위한 재조합 GLX1의 H₂O₂ 생산조건 확립
- 리그닌 분해를 직접 담당하고 있는 망간 퍼옥시다제 (MnP)를 대상으로 rGLX1에 의해 생성된 H₂O₂의 농도에 의한 최적 활성조건을 탐색하기 위해 MnP의 substrate는 합성염료 malachite green을 사용하고 rGLX1의 substrate로는 methyl glyoxal을 사용하여 최상의 coupled reaction 조건을 탐색하였다. rGLX1의 농도를 조정하여 각각 H₂O₂의 합성농도를 4.78, 7.0, 9.55, 12.5 uM/min으로 생산되는 조건에서 MnP의 coupled reaction을 조사한 결과 7.0 uM/min 이상의 H₂O₂ 농도에서는 일반적으로 외부에서 넣어 주는 0.1 mM의 H₂O₂의 농도에서 보다 두 배 이상의 반응속도가 빨라지는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 3.2-75A). 또한 rGLX1에 의한 9.55 uM H₂O₂/min 생성조건에서 45분 이내에 150 uM의 malachite green을 완전히 분해 할 수 있는 것으로 나타났다 (그림 3.2-75B). 따라서 리그닌분해효소 MnP와 H₂O₂ 공급효소인 rGLX1의 coupled reaction을 통해 리그닌분해 조건을 확립했으며 기존의 직접 H₂O₂ 첨가방식은 주기적으로 매 한 두 시간마다 H₂O₂를 공급해줘야하는 번거로움이 있었으나 효소적 H₂O₂ 생성 방식을 통해 보다 최적화된 조건을 확립했다.

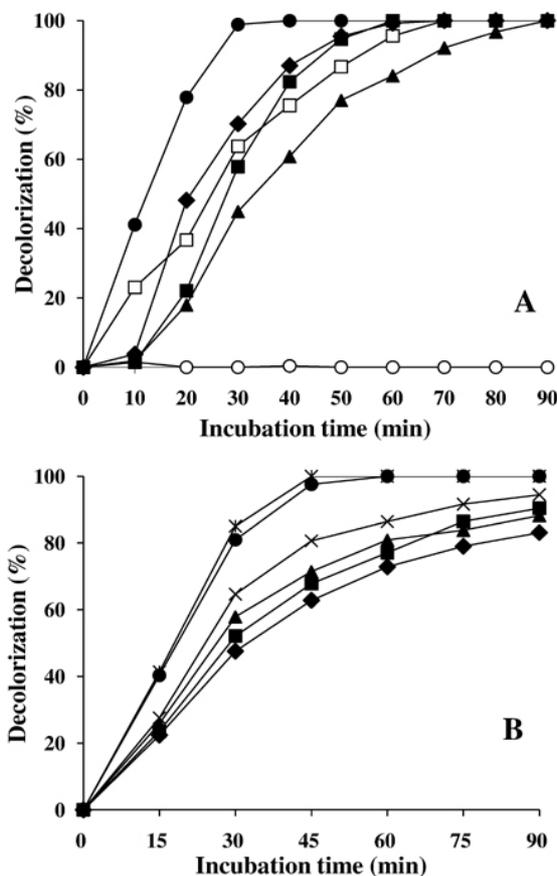


그림 3.2-75. Decolorization of malachite green by recombinant MnPH₄ coupled with recombinant GLX.rGLX was added into reaction mixture to produce 4.78 (▲), 7.00 (■), 9.55(◆) or 12.5 uM H₂O₂/min, respectively and H₂O₂ was added into reaction mixture to reach 100 uM (□) (A). In the presence of GLX to produce 9.55 of uM H₂O₂/min, malachite green was added into reaction mixture to reach 25 (●), 50 (*), 75 (×), 100 (▲), 125 (■), or 150(◆) uM, respectively (B)

5. 생물학적 전처리 및 Bioimaging 기술을 활용한 전처리과정의 특성 확인

가. Acetyl xylan esterase (AXE)의 고정화 및 peracetic acid (PAA) 생산

□ 이전 연구에서 헤미셀룰로오스 분해효소 중 하나인 acetyl xylan esterase (AXE)를 과량 생산하기 위하여 *Aspergillus ficcum* 균주의 유전자를 *Pichia pastoris*에 삽입하여 발현하는데 성공함. 생산된 AXE 효소의 새로운 사용방안으로 생물학적(효소반응) peracetic acid (PAA) 생산이 제안되었으며, 생물학적 전처리 효소에 관한 연구와 병행하여 peracetic acid를 ethyl acetate로부터 생산해 내는 acetyl xylan esterase를 생산하는 연구를 진행하였음. PAA는 바이오매스의 리그닌을 제거하고 표백하는 효과를 나타내며 바이오매스를 펄프 화 시키는 효과로 알려져 있음. 이 AXE를 담체에 고정화하여 안정성을 향상시키고 효소 재사용이 가능하도록 하여 PAA를 생산함. AXE를 생산하는 *P. pastoris* 균주의 발효액을 조사한 결과 약 150 µg/mL의 단백질이 발효액 원액에 존재하고 있었으며, 그 크기를 SDS page로 조사한 결과 약 40 kDa 단일크기의 단백질로 구성되어있음 (그림 3.2-76). 효소에 고정을 하기 위해 buffer에 효소가 충분히 녹아있어야 하고 그를 위해 단백질을 농축하였음. 단백질 농축은 ultrafiltration을 이용하였고 filter는 Viva flow 50 10,000 MWCO PES를 활용하였음, 이는 약 10 kDa 이상의 단백질을 걸러낼 수 있는 크기임. 농축된 단백질은 0.1 M의 phosphate buffer pH7.0에 희석하여 약 194 µg/mL의 단백질 농도로 고정화하였음.

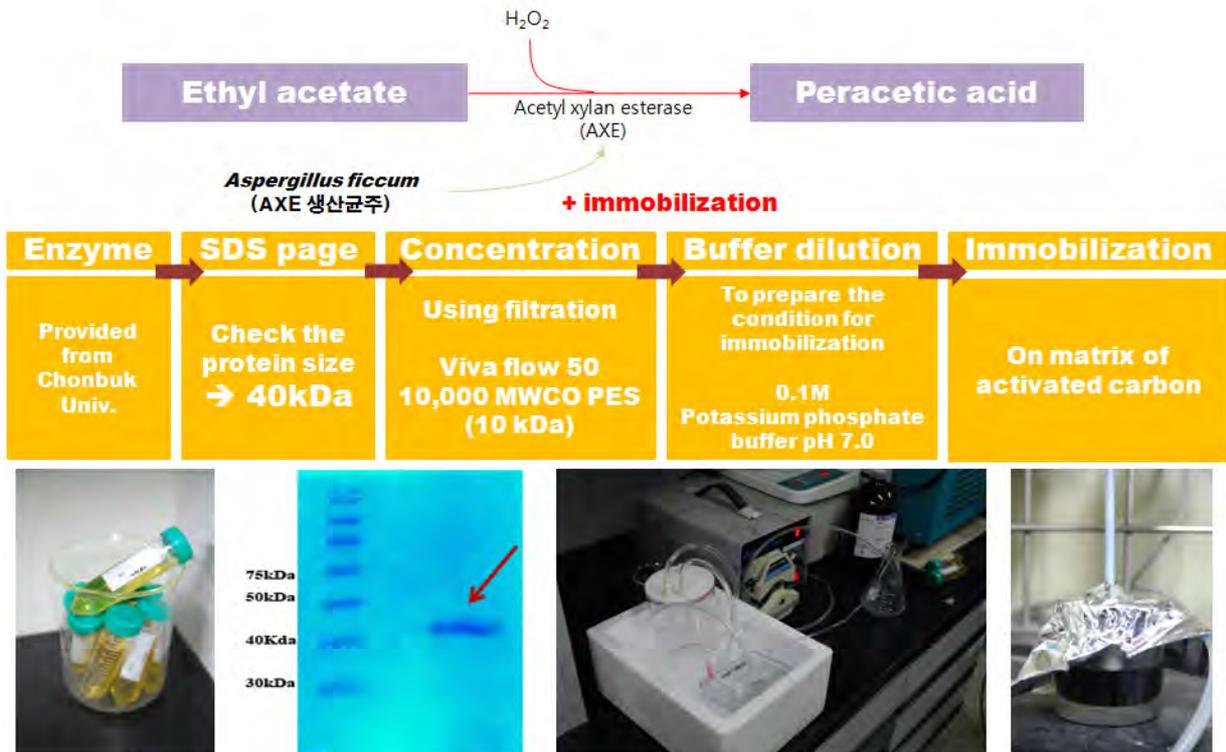


그림 3.2-76. Peracetic acid의 생산 메커니즘과 효소고정화 준비

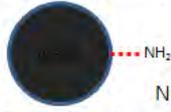
Immobilization of AXE

Novel matrix : Activated carbon

Cheap
Easy to supply
Various size
Good stability

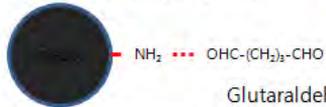


Step 1 : Formation of NH₂ group



Nitric acid,

Step 2 : Formation of coupling linker



Glutaraldehyde

Step 3 : Coupling of enzyme



$$\text{Protein immobilization rate} = (\text{Initial protein amount} - \text{Remained protein amount}) / \text{Initial protein amount} \times 100\% \\ = (194 \mu\text{g/ mL} - 120 \mu\text{g/ mL}) / 194 \mu\text{g/ mL} \times 100\% = 38.14\%$$

* Activity of immobilized AXE = 0.5 U/g (Free enzyme: Approx. 2,000 U/L)

* Immobilization condition was not optimized and enzyme was not pretreated

그림 3.2-77. 효소고정화 과정

- 고정화는 활성탄의 표면에 진행되었고 glutaraldehyde를 활용한 공유결합 cross linking을 이용하여 효소를 고정화하였고 그 과정을 그림 3.2-77에 정리하였음. 고정화 결과 효소용액의 약 38.14%의 단백질이 고정화되었음을 조사하였고 활성조사 결과 0.5 U/g의 효소활성을 나타내었음. Free enzyme의 경우 약 2,000 U/L의 활성을 보이며 부정확한 비교이긴 하나 free enzyme과 비교할 경우 약 2~30%의 활성을 나타내는 것으로 추정됨.

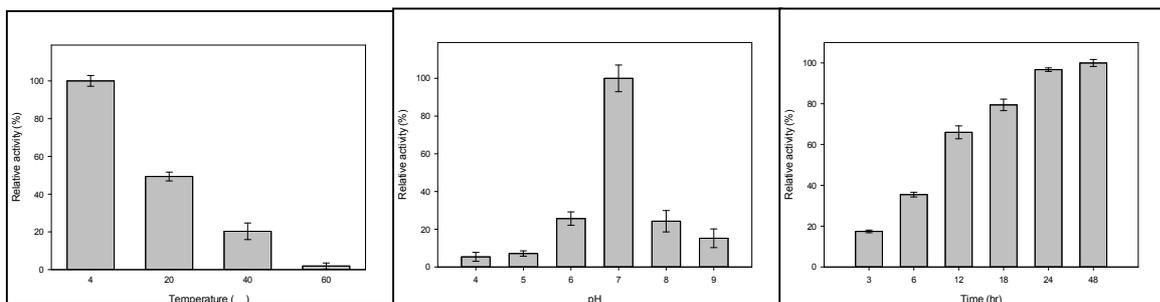


그림 3.2-78. AXE 효소 고정화 최적 조건

- 고정화 최적 조건을 탐색하기 위해, 담체의 표면개질 후 가교제를 부착한 담체와 AXE 효소의 가교결합 반응조건 변수를 온도, pH, 시간으로 두고 탐색하였으며, 그 결과를 그림 3.2-78에 나타내었음. 최적 조건은 4 °C, pH 7, 24시간 이상으로 선정 되었고, 이 조건에서 고정화한 결과 단위무게(g) 당 181±7 U의 활성을 보였음

나. 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해효소 각테일의 구성 및 생물학적 전처리

(1) Acetyl xylan esterase를 이용한 peracetic acid (PAA)의 생산 효과 확인

- Acetyl xylan esterase (AXE)는 헤미셀룰로스를 구성하고 있는 xylan chain에 결합되어 있는 acetyl group을 제거하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려진 효소이다. 이 효소는 carboxylic ester bond에 작용하는 hydrolase 종류이며 이들 esterase중에는 ethyl acetate를 산화시켜 peracetic acid를 생성하는 경우가 있다. PAA는 매우 산화력이 뛰어난 물질이나 폭발의 위험성이 있어 고농도로 보관하기가 어렵고 따라서 가격이 매우 높은 단점이 있다. 본 연구에서는 *Aspergillus* 유래의 AXE를 이용하여 PAA의 생산능을 검정하였고 이를 활용해 in situ 상태에서 PAA를 생산하고 생산된 PAA를 이용해 바이오매스의 전처리 효과를 분석했다.
- *Aspergillus ficumm*의 AXE를 coding하는 유전자를 pPICZaC에 cloning하여 *Pichia pastoris* GS115(his4)에 전기천공법 (electrophoretion)으로 형질전환체 (transformant)를 얻었다. 이렇게 얻은 형질전환체는 PDA 배지에서 접종 그리고 배양하여 보관하였다. AXE를 얻기 위해, 우선 형질전환체를 glycerol이 탄소원으로 첨가된 100 mL BMGY 배지에 소량 접종하고, 30 °C에서 진탕 배양 하였다. 배양 중 현탁액의 흡광도가 600 nm에서 6.0에 이르면 원심분리하여 pellet 만을 회수하였고, pellet에 잔존하고 있는 glycerol은 멸균 증류수로 2회 세척하여 제거하였다. 세척된 pellet만을 0.5% methanol이 첨가된 100 mL BMMY 배지에 현탁하고 진탕배양하여 AXE가 발현되도록 유도하였다. 3일정도 배양 후, rAXE 만을 분리하기 위해 다음과 같이 진행하였다. 우선 배양현탁액을 원심분리하여 배양 상등액 만을 회수하였다. Ni⁺² His tag column (Hisrap, GE Healthcare)을 이용하여 배양 상등액에서 rAXE 만을 분리하였고, 분리 중에 첨가된 염(salt)과 imidazole은 투석을 통해 제거하였으며, 단백질의 농도는 Bradford 방법으로 측정하였다. 이후 최종적으로 분리된 단백질은 SDS-PAGE로 확인하였다.
- PAA 생성능 검정: 앞서 기술한 방법으로 얻은 rAXE의 perhydrolysis 활성은 sulfoxide 생성을 HPLC를 통해 정량하여 측정하였다. 측정방법에 대해 간략하게 기술하면, PAA를 생성하기 위해 100 mM potassium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 500 mM의 ethyl acetate, 1 M의 hydrogen peroxide 그리고 0.1 mg의 rAXE를 첨가하여, 반응액의 부피는 1 mL로 37 °C에서 30분간 반응하였다. 반응 후, 반응액에서 0.1 mL 만을 취하여 methyl p-tolyl sulfide (MTS, 20 mM) 0.1 mL 그리고 60% acetonitrile 0.8 mL과 혼합하여 37 °C에서 30분간 반응하였다. 10 mg의 MnO₂를 반응액에 첨가하여 반응을 정지시키고 잔존하고 있는 MnO₂는 원심분리하여 제거하였다. 잔존하고 있는 MTS 양과 rAXE에 의한 perhydrolysis 반응으로 생성된 methyl p-tolyl sulfoxide (MTSO)와 methyl p-tolyl sulfone (MTSON)과 같은 MTS의 산화물의 양은 HPLC를 이용하여 정량 그리고 정성 분석하였다. 또한 HPLC/MS로 MTS의 perhydrolysis 결과로 MTSO와 MTSON가 생성 유무를 검증하였다. rAXE는 과산화수소 존재하에 ethyl acetate를 PAA로 전환시키는 perhydrolysis 활성을 지닌 것을 알 수 있었다. Perhydrolysis로 생성되는 PAA의 양은 MTS 산화로 간접적으로 측정할 수 있었다. MTS의 산화물은 HPLC로 측정하였다(그림 3.2-79). HPLC로 분석한 결과 네 개의 peak을 확인 할 수 있었는데 peak A와 peak B는 각각 PAA에 의한 MTS 산화로 형성된

MTSO 그리고 MTSON임을 알 수 있었다. 또한 반응시간에 따른 MTSO와 MTSON의 증감 정도를 관찰하였다 (그림 3.2-80). PPA에 의한 MTS의 산화의 첫 번째 산물로 MTSO가 생성되었으면 반응시간이 지속됨에 따라 MTSO가 재차 산화되어 MTSO의 양은 줄어든 반면 MTSON가 생성됨을 알 수 있었다. 120분 동안 지속된 PPA에 의한 MTS의 산화로 MTSO와 MTSON는 0.72 mM과 0.31 mM이 각각 생성됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 10 ug의 rAXE에 의해 1.34 mM의 PPA가 생성됨을 의미한다.

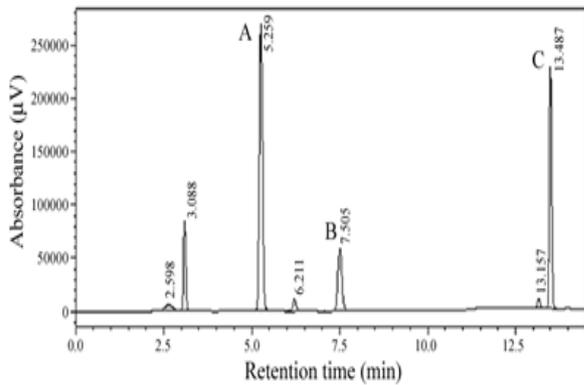


그림 3.2-79. Chromatogram of MTS (peak C) and its reaction products with PAA

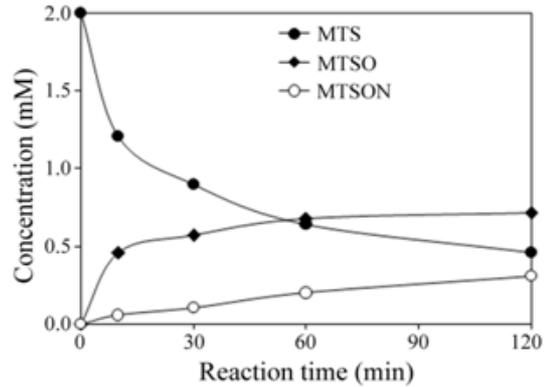


그림 3.2-80. Peracetic acid (PAA) production with AXE at different time periods

(2) Peracetic acid (PAA)를 이용한 보릿짚 및 뽕나무 바이오매스의 전처리 효과 확인

- 앞서 언급 한 것처럼 PAA의 강력한 산화작용에 의해 바이오매스의 전처리에 효과가 있을 것으로 판단되어 다양한 농도의 PAA를 처리한 보릿짚의 리그닌 함량을 측정하였다 (표 3.2-42).
- 그 결과 PAA 100mM 이상의 농도에서 두시간 처리된 보릿짚 전반에서 리그닌 함량이 최대 60% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PAA의 전처리 효과가 매우 효과적이며 이들 PAA의 생산을 보다 효율적이고 경제적인 방법으로 생산하게 된다면 충분히 가능성이 있는 방법으로 사료된다.

(3) 리그닌 분해를 위한 리그닌 분해효소의 조합 효과 확인

- 지금까지 리그닌 분해와 관련된 효소작용 및 redox mediator에 의한 효과, PAA에 의한 리그닌 분해능을 뽕나무 껍질을 이용한 펄프에 존재하는 리그닌을 대상으로 다양한 조합으로 리그닌 분해능을 점검하였다.
- 다음은 리그닌분해효소 및 PAA, redox mediator의 조합이며 MnP의 경우 30 °C에서 8시간, PAA의 경우 100 mM에서 12시간, xylanase의 경우 55 °C에서 12시간 처리한 결과이다. redox mediator는 2 mM HOBt, 0.05% Tween 80을 사용했다.

표 3.2-42 Pretreatment of Barley straw by various concentration of PAA

구분	전처리후 바이오매스 량 [g]	moisture 수분량 [%]	전처리전 바이오매스 수분보정	필터 페이퍼 [g]	105 건조후 [g]	105 건조후 바이오매스 dry weight [g]	도가니	550	재	재 [%]	리그닌	A	회석율	ALB(g/L)	% ALB	리그닌 합	
1	control	0.3001	3.61	0.2893	0.0975	0.1600	0.0625	32.0996	32.102	0.0024	0.83	20.78	0.315	16	0.046	1.38	22.16
2	100mM	0.3005	3.44	0.2902	0.0922	0.1455	0.0533	33.1207	33.1232	0.0025	0.86	17.51	0.425	16	0.062	1.85	19.36
3	400mM	0.3008	3.18	0.2912	0.0946	0.1394	0.0448	32.0638	32.0678	0.004	1.37	14.01	0.600	16	0.087	2.61	16.62
4	800mM	0.3026	3.25	0.2928	0.0981	0.1299	0.0318	34.9315	34.9345	0.003	1.02	9.84	0.578	16	0.084	2.50	12.33
5	cellulose	0.3008	3.50	0.2903	0.0926	0.0946	0.002	34.8689	34.8689	0	0.00	0.69	0.200	16	0.029	0.87	1.56

	Cellulose	Hemicellulose	lignin	moisture	others	total
control	39.90	17.50	22.16	3.61	16.83	100.00
100mM	41.79	17.95	19.36	3.44	17.47	100.00
400mM	41.41	18.14	16.62	3.18	20.65	100.00
800mM	44.17	18.83	12.33	3.25	21.42	100.00
cellulose	74.77	12.64	1.56	3.50	7.53	100.00

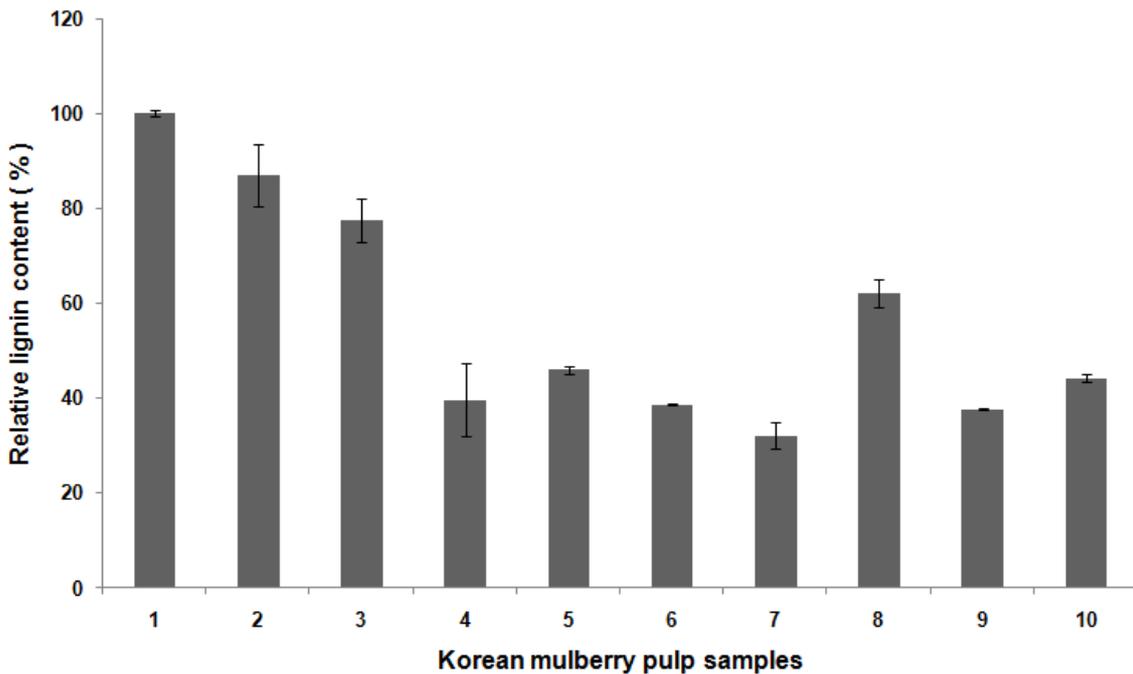
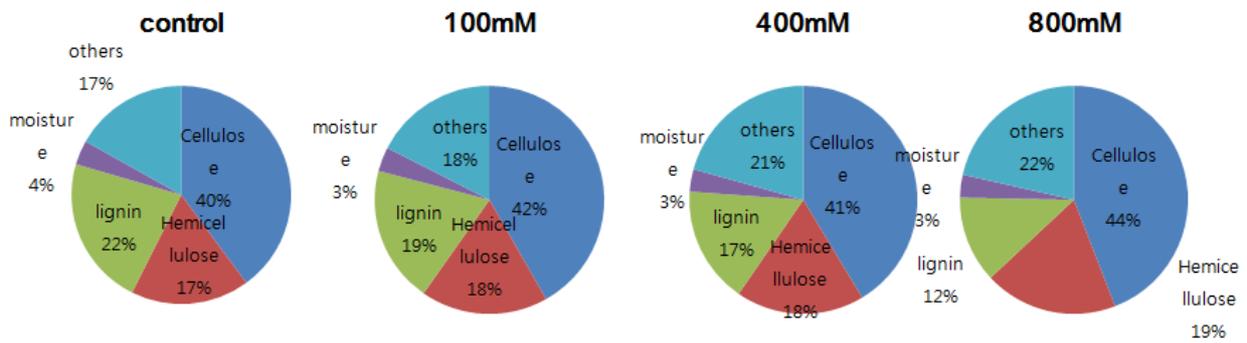


그림 3.2-81. Enzymatic and dilute acidic pretreatment of korean mulberry pulp. 1, Pulp (washed with H₂O); 2, Pulp + Malonate Buffer; 3, Pulp + MnP; 4, Pulp + MnP (with HOBT & Tween 80); 5, Pulp + PAA; 6, MnP treated pulp + PAA; 7, MnP treated pulp (with HOBT & Tween 80) + PAA; 8, Pulp + Xylanase A & C; 9, MnP treated pulp + Xylanase A & C; 10, MnP treated pulp (with HOBT & Tween 80) + Xylanase A & C

□ 이상의 여러 조합을 통한 결과를 보았을 때 MnP 효소 자체만으로 리그닌 분해능이 20% 미만이지만 HOBT 및 Tween 80 등의 redox mediator를 사용한 경우 최대 60%의 리그닌 제거율을 보였다. 이는 PAA 단독 처리하는 경우와 비슷한 제거율을 나타내고 PAA 및 MnP를 동시 처리 했을때는 최대 70%정도의 리그닌 제거율을 갖는 것으로 나타났다. 이는 암모니아 또는 NaOH 등으로 처리하는 화학적 전처리 시 나타나는 리그닌 제거율과 비슷한 수치이며 비록 효소의 생산등에 비용이 많이 소요되는 것을 감안해도 생물학적 전처리가 갖는 장점은 환경친화적이고 전처리 뒤의 발효과정에 직접 적용이 될 수 있는 환경을 제공하는 차원에서 꾸준한 연구가 뒷받침 되어야 할 것으로 생각된다.

(4) 헤미셀룰로스 분해용 효소 카테일의 구성 및 최적화

분리 정제된 헤미셀룰로스 분해효소의 조합을 통한 헤미셀룰로스 분해능 검정
Xylanase, xylosidase/arabinofuranosidase 및 arabinanase 효소 카테일의 최적화
효소 카테일 최적화 RSM 분석

다음과 같은 최종 결론을 도출

wheat arabinoxylan을 사용했을 때(기질 1 gram): 100% 당화에 필요한 효소 조건은

- Recombinant xylanase: 21.85 U
- Recombinant Arabinanase: 6.025 U
- Recombinant Xylosidase/arabinofuranosidase: 182 U
- Time: 11.46 hr

암모니아 전처리된 보릿짚을 사용했을 때 (기질 1 g): 다음의 조건에서 최대 42% 당화

- Recombinant xylanase : 25 U
- Recombinant Arabinanase: 5 U
- Recombinant Xylosidase/arabinofuranosidase: 200 U
- Time: 12 hr

표 3.2-43 Individual parameters for water soluble wheat arabinoxylan and barley straw saccharification optimization using RSM (1g substrate)

Independent Variables	Coded Independent variables	Independent Variable levels					Step change value
		-2	-1	0	1	2	
rPcXynC (U)	X ₁	10	15	20	25	30	5
rPcAra (U)	X ₂	2.5	5	7.5	10	12.5	2.5
rPcXyl (U)	X ₃	50	100	150	200	250	50
Time (h)	X ₄	3	6	9	12	15	3

Figure 3.2-44 Full factorial central composite design matrix and their observed responses for saccharification of water-soluble wheat arabinoxylan and barley straw by cocktail of recombinant enzymes at various time periods

Expt No	Coded values				Water soluble wheat arabinoxylan (WSWAX)	Barley straw (BS)
	rPcXynC(U)	rPcAra(U)	rPcXyl(U)	Time(Hr)	R1- Reducing Sugar released (%)	R2 -Reducing sugar released (%)
1	-1	-1	-1	-1	68.31	31.25
2	1	-1	-1	-1	79.69	32.67
3	-1	1	-1	-1	70.74	29.91
4	1	1	-1	-1	82.84	33.34
5	-1	-1	1	-1	73.56	29.69
6	1	-1	1	-1	82.50	32.37
7	-1	1	1	-1	72.40	29.91
8	1	1	1	-1	84.49	32.74
9	-1	-1	-1	1	90.39	37.21
10	1	-1	-1	1	97.42	39.64
11	-1	1	-1	1	91.83	35.69
12	1	1	-1	1	97.63	41.31
13	-1	-1	1	1	90.62	37.55
14	1	-1	1	1	97.83	41.95
15	-1	1	1	1	92.45	36.47
16	1	1	1	1	99.57	40.46
17	-2	0	0	0	70.41	32.74
18	2	0	0	0	98.58	40.35
19	0	-2	0	0	90.26	35.58
20	0	2	0	0	97.25	37.07
21	0	0	-2	0	75.59	36.40
22	0	0	2	0	94.43	34.68
23	0	0	0	-2	53.25	26.55
24	0	0	0	2	98.41	40.72
25	0	0	0	0	98.30	39.32
26	0	0	0	0	98.76	39.02
27	0	0	0	0	98.91	38.95
28	0	0	0	0	98.30	39.02
29	0	0	0	0	98.25	39.95
30	0	0	0	0	98.92	39.35

Figure 3.2-45 ANOVA for Response R1 (WSWAX-reducing sugar release (%)) R^2 : 0.9641; Adj R^2 : 0.9306; Pred R^2 : 0.7939; F-value: 28.79

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	4270.31	14	305.02	28.79	< 0.0001	significant
X ₁	682.77	1	682.77	64.45	< 0.0001	
X ₂	27.33	1	27.33	2.58	0.1291	
X ₃	113.75	1	113.75	10.74	0.0051	
X ₄	2272.34	1	2272.34	214.5	< 0.0001	
X ₁ X ₂	0.41	1	0.41	0.038	0.8473	
X ₁ X ₃	0.056	1	0.056	5.325E-003	0.9428	
X ₁ X ₄	18.81	1	18.81	1.78	0.2025	
X ₂ X ₃	0.5	1	0.5	0.047	0.8308	
X ₂ X ₄	0.089	1	0.089	8.355E-003	0.9284	
X ₃ X ₄	4.17	1	4.17	0.39	0.5397	
X ₁ ²	308.53	1	308.53	29.12	< 0.0001	
X ₂ ²	29.6	1	29.6	2.79	0.1153	
X ₃ ²	285.29	1	285.29	26.93	0.0001	
X ₄ ²	835.79	1	835.79	78.9	< 0.0001	

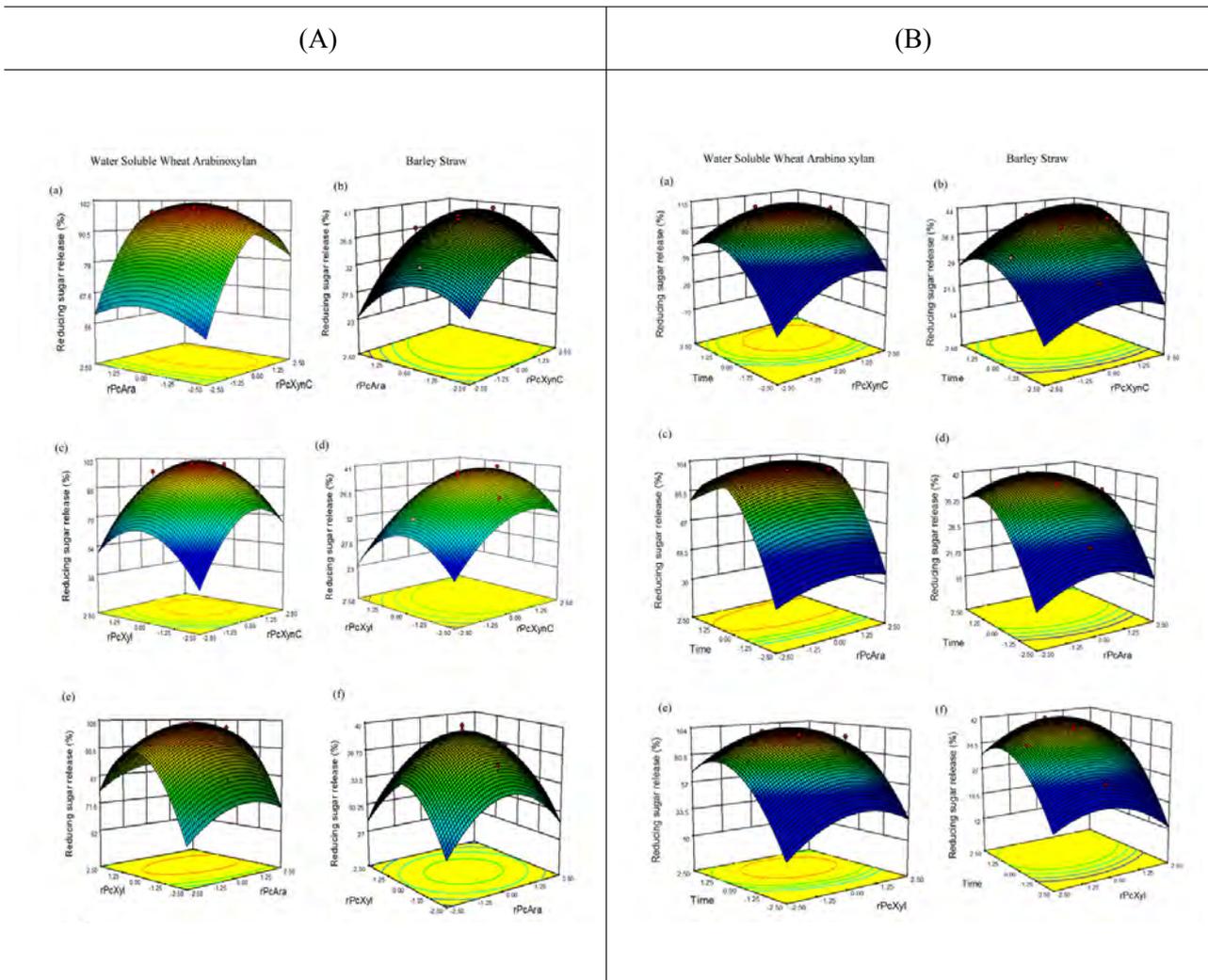
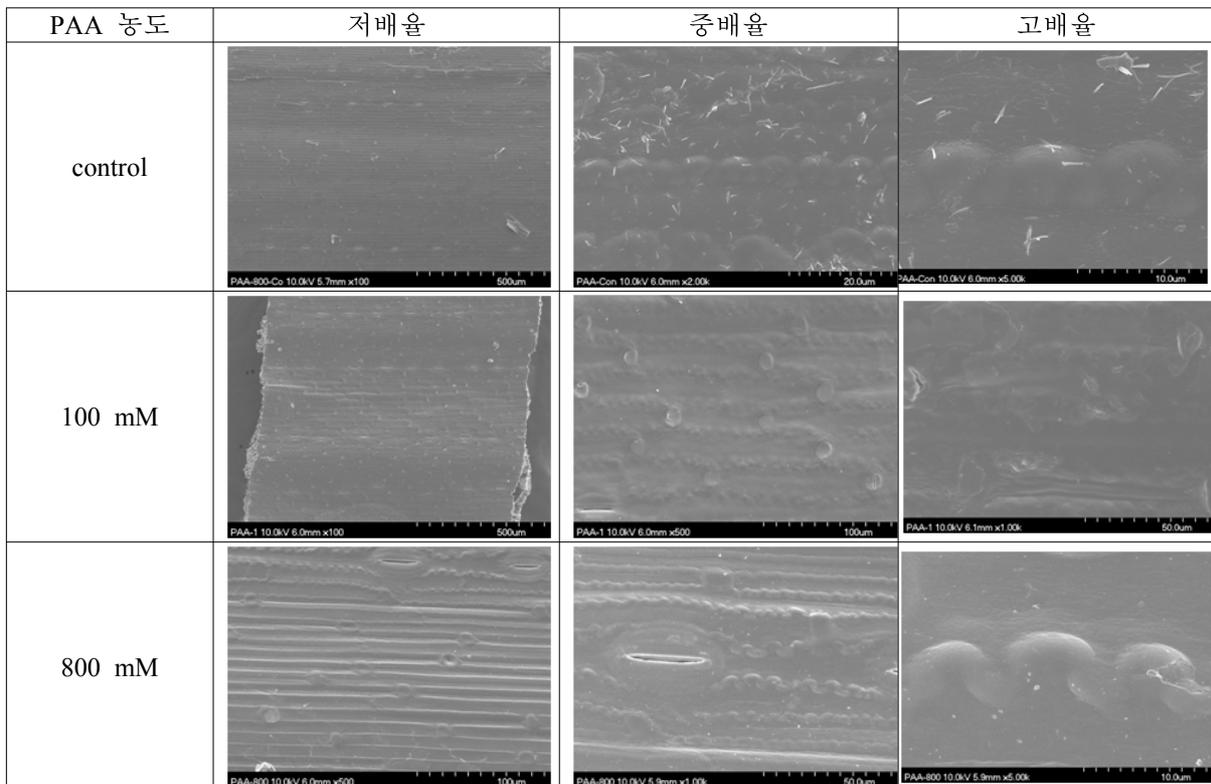


그림 3.2-82. The interaction between the recombinant enzymes (rPcXynC (X_1), rPcAra (X_2), rPcXyl (X_3)) for maximum saccharification (A) and time (X_4) (B) of WSWAX and BS. 3D contour plots are constructed for all possible combinations of factors, keeping one factor constant at a time. For comparison between WSWAX and BS the 3D response surface graphs are arranged side by side

다. Bioimaging 분석을 통한 리그노셀룰로스 전처리 과정의 특성

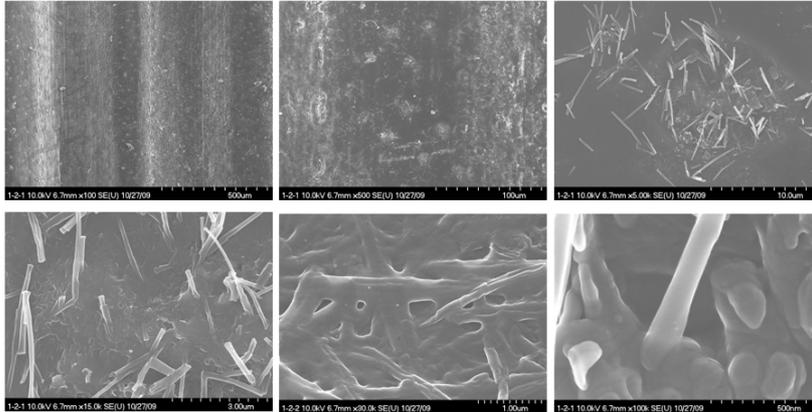
(1) 보릿짚의 peracetic acid에 의한 전처리 효과의 Bioimaging 분석

- 보릿짚의 PAA 전처리에 의한 표면의 변화를 FE-SEM을 통해 분석을 하였다.
- 다음의 그림에서 보듯이 PAA 전처리를 하지 않은 대조구의 경우 표면이 거칠고 micro fiber 형태의 구조가 노출되어 있으나 100 mM 또는 800 mM의 PAA 농도로 전처리를 하게 되면 표면이 매끈해 지면서 깊은 골이 드러나는 것을 볼 수 있다. 이는 리그닌 complex 구조 내에 형성되어 있는 cellulose fiber가 리그닌이 제거 되면서 그 모양이 뚜렷하게 보이는 것을 관찰 할 수 있다.

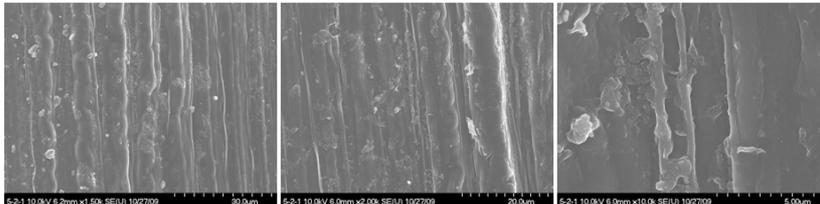


(2) Ammonia 전처리 후 lignin carbohydrate complex (LCC) 구조

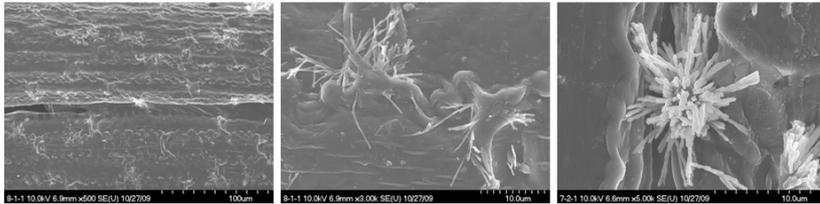
재료: 보리짚
전처리 전



170°C 증류수

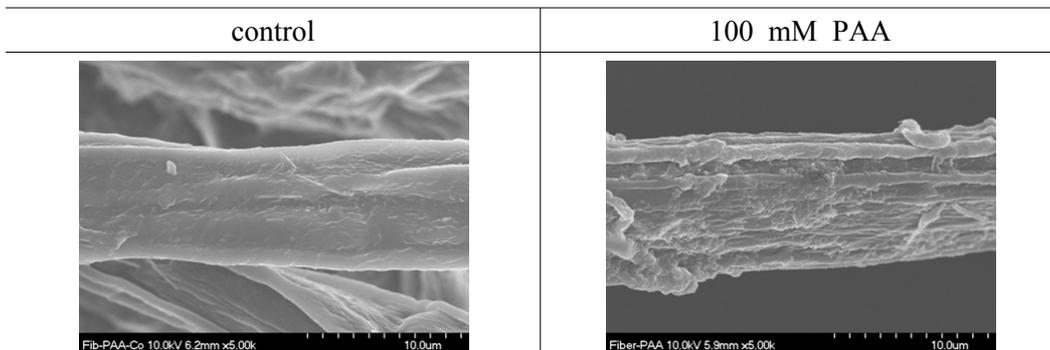


170°C, 15% Ammonia



(3) 뽕나무 바이오매스의 peracetic acid에 의한 전처리 효과의 Bioimaging 분석

- 뽕나무 껍질로 제조된 펄프에 PAA 전처리에 의한 표면의 변화를 FE-SEM을 통해 분석을 하였다.
- 다음의 그림에서 보듯이 PAA 전처리를 하지 않은 대조구의 경우 미끈한 구조의 fiber 형태의 구조가 노출되어 있으나 100 mM PAA 농도로 전처리를 하게 되면 표면에 형성되어 있는 매끈한 구조가 사라지면서 깊은 골이 드러나는 것을 볼 수 있다. 이는 리그닌 complex 구조 내에 형성되어 있는 cellulose fiber가 리그닌이 제거 되면서 그 모양이 뚜렷하게 보이는 것을 관찰 할 수 있다.



3절 바이오매스의 당화 기술 개발

1. 고효성 섬유소분해효소 생산 균주 발굴 및 선별

가. 고효성 섬유소분해효소 생산균주 발굴 방법

(1) 다양한 균주의 확보 및 섬유소 분해효소 생산을 위한 배양

- 고효성 섬유소분해효소 생산균주 발굴을 위한 스크리닝을 실시하기 위하여 기존 보유한 균주 및 다양한 지역, 자원으로부터 새로 채집한 균주를 확보하였다. Korea University Culture Collection (KUC)로부터 기존 보유하고 있는 균주를 비롯하여 새로운 균주를 얻기 위해 여러 지역의 썩은 목재, 벚짚, 퇴비, 및 버섯 자실체 등의 샘플 1 g을 9 ml의 생리 식염수에 넣고 vortex한 후 희석하여 TSA (tryptic soy agar, 211825, BD Difco), YPD (yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%) PDA (potato dextrose agar, 213400, BD Difco), YM (YM agar, 271120, BD Difco) 고체배지(2% agar 함유)에 도말하여 30, 37 °C에 2일 (세균), 4-6일(균) 동안 배양하여 생성된 콜로니들 중에서 섬유소 분해효소 우수 생산 균주의 선별을 위해 Mandel 고체배지(Mandels, 1981) plate 위에 백금으로 균체를 점 형태로 살짝 찍는 spotting 방식으로 접종한 후 30 °C에서 3일간 배양하였으며, Mandel 고체 배지 (pH 5.2)는 NaNO_3 2 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, MgSO_4 0.5g /L, KCl 0.5 g/L, carboxymethyl cellulose(CMC, low-viscosity, Sigma C5678, USA) 2 g/L, peptone 2 g/L, agar 17 g/L의 조성으로 제조하였다.
- 섬유소 분해 효소 균주의 선별을 위한 배양 배지로서 NaNO_3 2 g/L, K_2HPO_4 1 g/L, MgSO_4 0.5g /L, KCl 0.5 g/L, CMC 2 g/L, peptone 2 g/L, agar 17 g/L을 포함한 Mandel 고체배지(pH 5.2) (Mandels, 1981)를 사용하였다. 배양 후 고체배지 표면 위에 0.1%의 Congo red를 부어 30분간 염색하고 1 M NaCl 용액으로 15분간 탈색하여 생성된 투명환의 크기를 측정 비교하였다(Fig. 2) (Ramesh et al., 2008) Mandel 고체배지 plate에서 두께, 투명환 총 지름, 콜로니 지름을 측정함으로써 각 균주간의 섬유소 분해능을 비교하여 상대적으로 분해능이 우수한 균주들을 선별하였다.

(2) 섬유소 분해효소의 활성 분석

- 250 ml flask에서 Mandel 배지에 0.5% CMC를 첨가한 액체배지에 한개 콜로니 균체를 접종한 후 30 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하였고, 그 배양액을 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻은 상등액은 0.45 μm membrane에 통과시켜 효소활성 측정을 위한 효소액으로 사용하였다.

(가) CMCase activity (β -1,4-endoglucanase) 분석

- Endo- β -1,4-glucanase (EG)을 위한 CMCase 활성을 측정하기 위해 carboxymethyl cellulose을 사용하였다. Ghose (1987)의 방법을 변형하여, 25 μL CMC를 25 μL 의 sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8)와 25 μL 의 효소액이 들어있는 tube에 넣었다. 50 °C에서 30분 동안 반응한 후, 150 μL DNS 시약을 첨가하고 각각 5분 동안 boiling과 cooling 과정을 실

시하였다. 33 μL 의 샘플을 취하여 165 μL 증류수와 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 CMC로부터 1 μmol 의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(나) Filter paper activity (FPA) 분석

□ Xiao et al. (2004)가 설명한 것과 같이, dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 환원당을 측정하였다. 효소액 20 μL 을 7 mm 직경의 filter paper와 40 μL 의 sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8)가 들어있는 tube에 넣고, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응 시킨 후 120 μL DNS 시약을 넣었다. 각각 5분 동안 boiling과 cooling 과정을 거친 샘플 36 μL 를 취하여 160 μL 증류수와 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. FPA 1 unit은 1분 동안 기질로부터 1 μmol 의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(다) β -Glucosidase activity (BGL) 분석

□ p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside을 기질로 이용하여 BGL 활성을 측정하였다. 10 mM 농도로 sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0)에 녹인 기질 20 μL 과 20 μL 효소액을 포함하는 혼합액을 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응한 후, 20 μL sodium carbonate (2 M)을 넣었다. 5분 후에 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. BGL 1 unit은 1분 동안 기질로부터 1 μmol 의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(라) Avicelase activity 분석

□ Sodium acetate buffer (0.052 M, pH 5.2)에 1%(w/v)의 avicel (FMC type PH-101, 50 μm)을 녹인 반응액과 0.5 ml의 효소액을 혼합한 후 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 반응 후 DNS 방법으로 환원당을 측정하였다. Avicelase 1 unit은 1분 동안 기질로부터 1 μmol 의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(마) Xylanase activity (XYL) 분석

□ Bailey et al. (1992)의 방법을 변형하여 XYL 활성을 측정하였다. 1% birchwood xylan을 기질로서 sodium citrate buffer (50 mM, pH 5.3)에 넣고 81 μL 을 취하여 7 μL 효소액과 혼합하여 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응하였다. 135 μL DNS를 넣고 5분간 boiling과 cooling 과정을 실시하였다. 발색된 샘플 200 μL 은 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. XYL 1 unit은 1분 동안 기질로부터 1 μmol 의 xylose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(바) Pectinase activity 분석

□ Sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.8)에 1%(w/v)의 pectin(Junsei Chemical, Japan)을 녹인 기질액과 0.5 ml의 효소액을 혼합하여 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 반응 후 DNS 방법으로 환원당을 측정하였다. Pectinase 1 unit은 1분 동안 기질로부터 1 μmol 의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

(3) 균주동정

(가) 세균 동정

- 세균의 genomic DNA를 Accuprep Genomic DNA extraction kit(Bioneer Co. Korea)를 이용하여 분리 정제하였다. 16S rRNA 유전자는 PCR(PCR system 2700, GeneAmp co. Singapore)을 이용한 표준 실험과정으로 분석하였다(Saiki, 1988). PCR primer로 27F (5'-GATTTGGATCCTGG CTCAG-3')와 1492R (5'-AAGGAGGGGATCCAGCC-3')을 사용하였다. PCR 증폭은 Maxime PCR pre-mix kit (i-StarTaq, Intron, Co, Korea)를 사용하였다. PCR 증폭을 위해 template DNA를 2 μ l, 27F primer 1 μ l, 1492R primer 1 μ l에 증류수를 첨가하여 총 부피를 20 μ l로 하였다. PCR 조건은 94 °C에서 2분 동안 denaturation시킨 후, 94 °C에서 20초간 denaturation, 60 °C에서 20초간 annealing, 72 °C에서 1분 30초 동안 extension과정을 30회 반복하며 마지막으로 72 °C에서 5분간 extension하였다.
- PCR product는 정제하여 DNA sequencing하였다. 16S rRNA의 염기서열은 NCBI로부터 잘 알려지고 유사한 염기서열과 비교하였다.

(나) 효모와 곰팡이의 동정

- 본 실험에서는 분리된 균주를 동정하기 위하여 26S D1/D2 영역과 18S, ITS 염기서열을 조사하였다. 실험을 위해 먼저 균주로부터 Kurtzman et al. (1998)의 방법에 따라 genomic DNA를 추출하였으며, 분자분류에 사용한 primer는 26S D1/D2 영역 증폭을 위하여 NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') primer(O'Donnell, K., 1993)를 사용하였고, 18S 영역 증폭에는 NS1(5'-GTA GTC ATA TGC TTG TCT C-3')과 NS8(5'-TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA-3') primer (Thompson, 1994)를 사용하였고, ITS 영역 증폭에는 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')과 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') primer(Innis, 1990)를 사용하였다. PCR 수행시 annealing 온도는 60 °C를 사용하였다.
- 이 primer set을 이용하여 효모 균주의 26S rDNA D1/D2 및 18S, ITS 영역을 PCR (MJ Research PTC 225, Ramsey, Minnesota, USA)로 증폭한 후, 증폭된 PCR 생산물은 QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 정제하였다. 정제한 PCR 산물의 염기서열 분석은 ABI Prism BigDye Terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)와 ABI 310 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)를 이용하여 분석하였다. Colony, mycelia, conidia등 형태학적 분류를 위해서는 malt extract agar를 30 °C에서 6일간 배양하여 관찰하였다.

나. 다양한 환경에서 고효율성 섬유소분해효소 생산균주 발굴 (김근 교수 연구진)

(1) 국립공원 내 부패된 목재 및 그 주위의 토양으로부터 미생물 분리

□ 494 여주를 분리하였고, 이들을 Mandel 고체배지(Mandels, 1981)에 접종하여 clear zone을 형성하는 균주 50여 주를 분리하여 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에 접종하여 배양하고 투명한 크기 및 효소 활성 분석을 통하여 15주의 미생물을 선별하였다. 이들 15주의 효소 활성을 표 3.3-1에 나타내었다. 이중 가장 활성 높은 두 균주를 선별하였는데, YP 6-7-7은 *Bacillus tequilensis* NRRL B-41771(T)로 동정되었다. YP 3-6-3은 26S sequencing 결과 *Coniochaeta* sp.로, 또 ITS sequencing 결과 *Phialophora* sp.로 동정되었는데 이 둘은 결국 같은 균주로 판명되었다. 즉 Teleomorph(유성세대) name은 *Coniochaeta* sp.이고 Anamorph(무성세대) name은 *Phialophora* sp.이다.

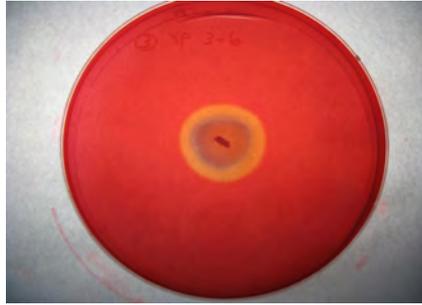
표 3.3-1 Cellulase activities of various cultures isolated from national park

Strain No.	Diameter (mm)						Enzyme activity (Unit)	
	Mandel's agar			Nutrient-CMC agar			CMCase	FPase
	Colony	Clear zone ^a	Total	Colony	Clear zone ^a	Total		
RW2-4-1	4	6	9	7	11	27	2.56	1.22
YP3-2-2	16	3	22	9	4	24	2.67	1.71
YP3-6-3 ^b	16	4	23	12	4	20	8.54	2.69
YP3-22-5	5	7	18	3	12	23	2.50	1.98
YP4-3-6	4	8	18	3	8	20	3.08	1.59
YP6-7-7 ^c	2	6	8	4	9	22	5.24	1.69
YP6-10-8	18	2	22	8	5	23	4.84	1.88
YP6-11-9	5	6	16	8	11	30	3.55	0.08
YP6-15-10	22	2	24	12	6	24	6.47	2.26
2RW53	19	1	20	15	1	18	4.37	1.18
2RW271	4	5	14	5	10	24	3.84	1.93
2RW275	7	6	19	7	11	30	1.80	0.58
2RW286	3	5	11	5	7	21	4.02	1.44
2RW288	4	6	17	5	11	31	2.79	0.39
2RW290	7	3	13	5	11	27	4.43	1.57

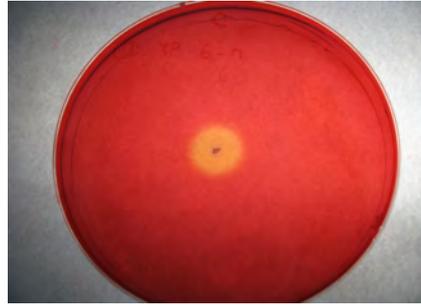
^a Radius of the clear zone minus radius of colony.

^b *Coniochaeta* sp.

^c *Bacillus tequilensis* NRRL B-41771(T).



< YP 3-6-3 >



< YP 6-7-7 >

그림 3.3-1. Clear zone formed around colonies producing cellulase. The two isolates were from the soils of national park. The agar plates were flooded with Congo red to visualize the clear zone

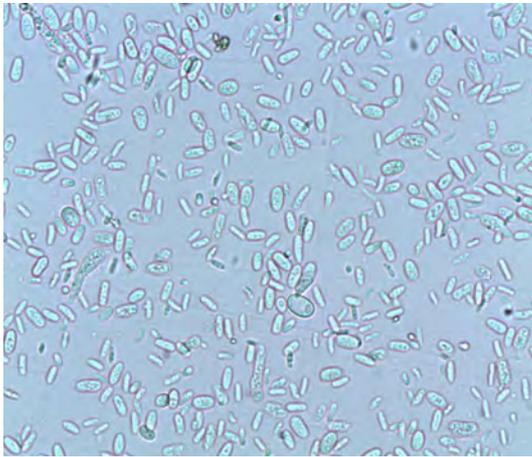


그림 3.3-2. Yeast like fungi < YP 3-6-3 > from national park

(2) 발효된 톱밥으로부터 미생물 분리

- 전북 남원 소재 발효 톱밥 제조장으로부터 발효톱밥을 수집하고 이로부터 미생물 500여주를 분리하였고, Mandel 고체 배지에서 clear zone을 형성하는 균주 100여주를 1차로 분리하였고, 다시 이들을 Mandel 고체 배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석을 통하여 22주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 Table 3에 나타내었다. 이들 균주들은 구균, 간균 filament 형태의 박테리아이었고, 효모와 사상균은 발견되지 않았다. 이들 중 3-84가 가장 높은 활성을 보였는데 동정결과 *Streptomyces brasiliensis*으로 동정되었다.

표 3.3-2 Cellulase activities of various cultures isolated from sawdust

Strain no.	Diameter (mm)						Enzyme activity (Unit)	
	Mandel's agar			Nutrient CMC agar			CMCase	FPase
	Colony	Clear zone	Total	Colony	Clear zone	Total		
1-76	-	-	-	9	1	12	5.07	1.59
1-77	7	6	17	5	3	12	6.88	1.13
2-33	7	3	13	5	4	12	5.71	1.31
2-36	8	4	15	6	5	15	3.72	1.34
3-84	5	4	11	-	-	-	11.15	3.05
5-73	5	5	16	5	10	25	4.72	1.20
5-74	5	0	5	3	8	18	6.88	1.78
6-10	9	4	17	6	18	33	1.68	3.17
6-14	8	3	15	7	8	28	3.61	1.37
6-48	8	2	12	-	-	-	6.36	1.91
6-50	3	2	7	-	-	-	6.00	1.53
7-52	3	6	14	6	11	30	0.57	0.08
7-53	4	3	10	-	-	-	5.19	1.62
7-58	5	7	19	-	-	-	2.67	1.28
8-24	7	3	13	6	3	14	2.10	0.00
8-27	5	3	12	7	11	28	4.66	1.19
8-28	5	2	9	3	3	9	5.19	1.53
8-30	5	2	7	4	3	12	5.13	1.34
9-61	5	5	15	-	-	-	4.78	1.02
9-62	7	4	15	-	-	-	3.49	1.34
9-65	5	4	13	-	-	-	4.02	1.41
12-3	8	5	15	-	-	-	4.95	2.09
13-19	5	4	18	7	10	28	4.25	1.62



< 3-84 >

그림 3.3-3. Clear zone formed around colonies producing cellulase. The isolates were from of sawdusts. The agar plate was flooded with Congo red to visualize the clear zone

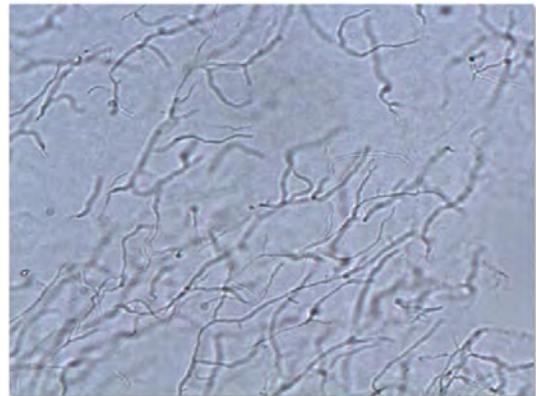


그림 3.3-4. Bacterial isolate 3-84 from sawdust

(3) 저온지대의 토양으로부터 미생물 분리

- 400여주를 분리하였고, 이들을 Mandel 고체배지에 접종하여 clear zone을 형성하는 균주 97여 주를 분리하여 다시 이들을 Mandel 고체배지와 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 11주의 미생물을 선별하였다 (표 3.3-3).

표 3.3-3 Cellulase activities of various cultures isolated from around of cold lake (20 °C)

Strain no.	Diameter(mm)			Enzyme activity (Unit)	
	Colony	Clear zone	Total	CMCae	FPase
40-20-5	4	4	10	2.34	1.30
40-20-10	2	6	12	2.72	1.04
40-20-14	3	2	6	1.26	0.54
40-20-16	2	4	11	2.68	0.25
40-20-30	3	4	12	3.44	1.15
40-20-36	2	5	10	1.83	1.01
40-20-37	2	4	10	1.67	0.81
40-30-3	3	5	12	2.46	0.63
44-20-18	3	8	18	6.64	0.47
44-30-17	2	5	13	3.92	0.82
44-30-22	3	5	13	4.77	1.03

(4) 축산연구소의 볏짚과 사료에서 미생물 분리

- 수원 소재 농촌진흥청 축산연구소에서 볏짚, 사일리지, 오차드그라스 등 사료를 수집하고 이로부터 미생물 500여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 92여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 33주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-4에 나타내었다. 이중 가장 활성 높은 균주를 분자동정 하였는데, 3-15는 *Pencillium oxalicum*으로 동정되었다.

(5) 고온지대에서의 미생물 분리

- 고온 산지대의 토양을 수집하고 이로부터 미생물 700여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 167여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 49주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-5에 나타내었다. 또 고온 (45 °C)에서 균주들을 배양하여 효소 활성 분석을 한 결과는 표 3.3-6에 나타내었다. 이중 가장 활성 높은 균주를 분자동정하였는데 아 3-9균주는 *Streptomyces thermocrophilus*으로 동정되었다.

3.3-4 Cellulase activities of various cultures isolated from Livestock Research Institute

Strain no.	Diameter(mm)			Enzyme assay		
	Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPA	
1	1-3	4	3	11	2.59	1.52
2	1-8	5	12	29	3.46	1.40
3	1-11	13	2	17	3.49	1.42
4	2-2	5	1	8	2.42	1.28
5	3-1	4	9	22	4.62	1.48
6	3-2	5	7	19	3.04	1.25
7	3-3	8	3	14	2.45	1.13
8	3-4	4	2	8	2.70	1.79
9	3-5	5	1	6	2.45	1.30
10	3-6	7	2	10	3.83	1.62
11	3-7	6	2	9	2.42	1.18
12	3-8	6	2	11	2.16	1.10
13	3-10	5	1	7	3.09	1.25
14	3-13	12	3	21	10.01	1.91
15	3-15	13	3	20	11.50	1.99
16	3-17	14	2	20	1.57	0
17	4-1	5	9	24	2.84	1.20
18	4-2	5	5	17	2.62	1.26
19	4-5	5	8	22	4.56	1.52
20	4-6	6	8	22	3.86	1.33
21	4-10	5	1	6	2.45	1.37
22	4-13	14	1	16	3.72	1.11
23	5-2	3	8	18	2.76	1.25
24	5-3	5	10	25	2.36	1.52
25	5-4	4	2	7	2.25	1.32
26	5-5	4	2	9	2.33	1.26
27	5-6	5	2	11	2.62	1.26
28	5-7	4	8	21	2.50	0.86
29	5-11	3	5	12	2.30	1.32
30	6-3	4	9	20	3.80	0.89
31	6-14	7	3	12	3.12	1.06
32	7-3	8	4	15	2.11	0.60
33	7-8	8	4	17	2.05	1.06

표 3.3-5 Cellulase activities of various cultures isolated from Soils near to Volcano

Numbers		Diameter(mm)			Enzyme activity (Unit)	
		Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPA
1	지1-1	3	3	10	2.08	1.10
2	지1-9	4	6	17	2.30	1.15
3	지1-10	7	5	18	2.11	1.14
4	지1-16	9	5	20	1.85	0.90
5	지2-1	8	5	19	2.22	1.05
6	지2-2	7	4	13	2.28	1.05
7	지2-3	8	7	22	1.88	1.00
8	지2-4	6	6	18	2.28	1.08
9	지2-5	4	4	13	2.05	1.05
10	지2-7	2	3	8	2.11	1.03
11	지2-8	4	6	17	2.39	1.11
12	지2-10	3	2	7	2.22	1.17
13	지2-12	3	5	13	2.56	1.11
14	지2-13	5	7	19	2.25	1.07
15	지2-14	4	4	12	2.67	0.97
16	지2-15	8	7	21	2.76	1.10
17	지2-16	2	3	8	1.29	1.04
18	지2-17	4	6	16	1.91	1.01
19	지2-18	4	7	17	1.68	1.15
20	지2-20	4	2	9	2.62	1.08
21	지2-21	3	4	11	1.88	1.03
22	지2-23	4	5	14	1.66	1.00
23	지2-26	7	4	16	1.83	1.03
24	지2-28	7	5	18	1.63	0.84
25	지2-29	5	2	11	2.59	1.01
26	지2-30	4	2	8	1.77	1.11
27	지2-31	5	5	15	2.14	1.10
28	지2-32	4	2	8	3.21	1.32
29	아 1-1	4	3	10	1.74	1.07
30	아 1-2	2	2	6	2.42	1.15
31	아 1-3	6	2	9	2.22	1.25
32	아1-11	6	1	8	1.77	1.08
33	아2-4	8	5	18	3.07	1.48
34	아2-9	6	4	14	2.22	1.05
35	아2-15	8	5	18	2.22	1.14
36	아3-f1	21	2	25	2.39	1.22
37	아3-17	8	5	19	2.67	1.14
38	유2-1	1	5	12	1.12	0.59
39	유2-9	4	2	8	2.93	1.52
40	절-2	3	1	4	2.22	1.08
41	절-3	5	1	8	2.19	1.01
42	절-5	3	6	16	0.47	0.24
43	절-7	4	6	15	4.11	1.77
44	절-8	5	6	17	1.97	1.07
45	절-9	6	3	13	1.91	1.18
46	절-11	5	5	15	2.22	1.17
47	절-12	4	2	9	1.97	0.93
48	절-13	4	4	12	1.80	0.81
49	절-19	6	5	16	1.04	0.52

표 3.3-6 Cellulase activity of microbial strains isolated from mountain in high temperature and cultivated at 45 °C

Strain No.	Diameter(mm)			Enzyme activity (Unit)		
	Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPase	
1	아1-2	4	2	6	1.11	0.39
2	아3-5	2	2	4	1.01	0.38
3	아1-10	2	1	4	1.49	0.11
4	아1-15	3	1	5	1.71	0.22
5	아3-2	12	1	14	3.68	0.86
6	아3-9	1	1	3	13.35	1.12

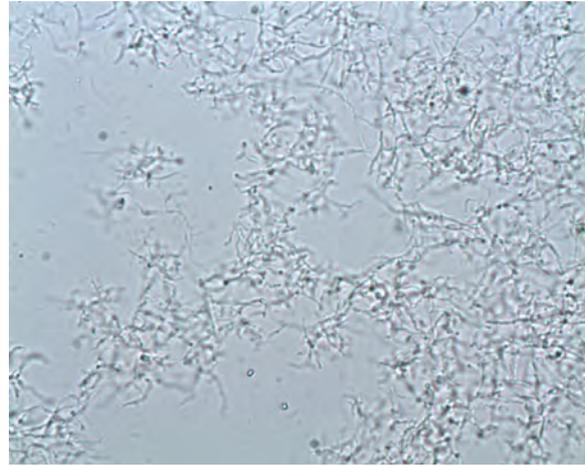


그림 3.3-5. Bacterial isolate 아3-9 from high-temperature mountain soil (x400)

(6) 대나무 숲 토양에서의 미생물 분리

□ 경주 유적지 대나무 숲 토양으로부터 미생물 400여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 50여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 11주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-7에 나타내었다. 이 중 가장 활성 높은 3 균주를 동정 하였는데, B-2-5균주는 *Bacillus methylotrophicus*으로, B-4-2균주는 *Streptomyces olivochromogenes*으로, B-4-4균주는 *Streptomyces drozdowiczii*으로 각각 동정되었다.

표 3.3-7 Cellulase activities of various cultures isolated from bamboo forest

Strain	Diameter (mm)			Enzyme activity(U/ml)	
	Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPA
B-2-5 ^a	6	3	12	3.47	1.83
B-3-2	3	3	10	2.97	1.04
B-4-2 ^b	2	1	4	1.36	0.49
B-4-4 ^c	9	4	17	4.17	1.63
B-10	4	3	11	3.57	1.43
B-1	3	3	9	3.97	1.34
B-2	5	2	8	2.37	1.04
B-6	3	1	5	2.67	1.24
B-7	6	5	15	7.79	1.58
B-8	3	3	7	3.87	1.73
B-9	2	1	4	2.37	1.29

^a *Bacillus methylotrophicus*

^b *Streptomyces olivochromogenes*

^c *Streptomyces drozdowiczii*

(7) 식물원 토양에서의 미생물 분리

□ 식물원 내의 여러 토양을 수집하여 이로부터 미생물 200여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 30여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 6주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-8에 나타내었다. 이중 가장 효소 활성 높은 I-2균주는 *Penicillium oxalicum*으로 동정되었다.

표3.3-8 Cellulase activities of various cultures isolated from soils of a botanical garden

Strain	Diameter (mm)			Enzyme activity(U/ml)	
	Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPA
I-2 ^a	8	4	15	6.68	1.63
I-4	7	3	12	3.57	1.14
I-1-6	4	1	5	1.57	0.05
I-2-6	2	1	4	2.47	1.14
I-1-14-s	4	2	8	3.17	1.63
I-1-14-m	9	1	10	2.57	1.24

^a *Penicillium oxalicum*

(8) 온천 지역에서의 미생물 분리

□ 온천 인근 지역 토양을 수집하여 이로부터 미생물 600여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 100여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 16주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-9에 나타내었다. 여기에서 보면 45 °C에서 3주, 55 °C에서 2주의 고온에서 성장하는 3균주를 분리하였는데. 45 °C에서 분리된 곰팡이 균주 V-k-1-4-8은 *Aspergillus fumigatus*로 동정되었고, 55 °C에서 분리된 V-k-2-4-2은 *Streptomyces thermodiastaticus*로 동정되었고, V-k-3-4-3은 *Streptomyces thermoviolaceus*로 동정되었다.

표 3.3-9 Cellulase activities of various cultures isolated from soils near to hot spring

Strain	Culture temperature (°C)	Diameter (mm)			Enzyme activity(U/ml)	
		Colony	Clear zone	Total	CMCase	FPA
V-k-1-3-5	30	4	4	14	2.17	1.7
V-y-1-4-G		9	1	10	2.41	1.9
V-y-1-4-N		7	2	12	2.77	0.83
V-k-1-4-B		8	3	12	2.54	1.66
V-k-1-4-L		8	3	15	1.93	1.5
V-k-3-4-K		6	4	15	2.13	0.67
V-y-3-3-3	37	15	2	20	2.5	0.57
V-s-4-3		4	2	8	2.02	0.99
V-y-1-4-3		10	1	12	3.2	0.71
V-y-2-4-1		5	5	13	2.06	1.5
V-s-2	45	15	2	20	3.16	0.71
V-k-1-4-7		6	5	15	4.28	1.27
V-k-1-4-8		7	5	14	3.03	1.05
V-y-2-3-3	55	12	1	14	1.53	0.5
V-k-2-4-2		10	7	23	1.96	0.51
V-k-3-4-3		12	7	25	2.06	1.05

(9) 부패된 목재 및 주변의 토양으로부터 미생물 분리

□ 분리된 YP3-6-3은 ITS 영역의 분석 결과 *Lecythophora savoryi* 가 YP3-6-3 균주와 93% 정도 일치하는 것으로 확인되었다. 그 다음으로 18S 영역을 확인한 결과 대상 균주가 *Lecythophora*속과 *Lecythophora*속이 포함된 clade에 있는 것을 확인하였다. 하지만 GenBank에 있는 어떠한 종과도 일치하지 않음을 알 수 있었다 (그림 3.3-6). 여기에서 *Lecythophora* 속은 *Phialophora*의 synonym이며 유성세대인 *Lecythophora*속의 무성세대이다. 마지막으로 그림 3.3-7에서 보여주듯이 26S 영역을 분석할 때에는 형태적으로 유사한 속인 *Collophora*, *phaeomoniella*을 추가하여 분석하였으며, YP3-6-3 균주는 *Lecythophora* 속의 종들과 단계통을 이룸을 알 수 있고 가장 가까운 종은 *Lecythophora subcorticalis* CBS551.75로 GenBank에서 98% 정도의 similarity를 보였다. 따라서 분리된 균주의 종 명 부여는 similarity가 조금 부족하여 우선 *Lecythophora* sp. 3-6-3으로 명명하였다(그림 3.3-8). *Lecythophora* sp. 3-6-3라고 하지 않은 이유는 완전세대, 즉 ascocarps에서 균분리를 한 것이 아니라 토양 등에 포함된 불완전 세대 상태의 포자(conidia) 등에서 분리된 것으로 사료되었다.

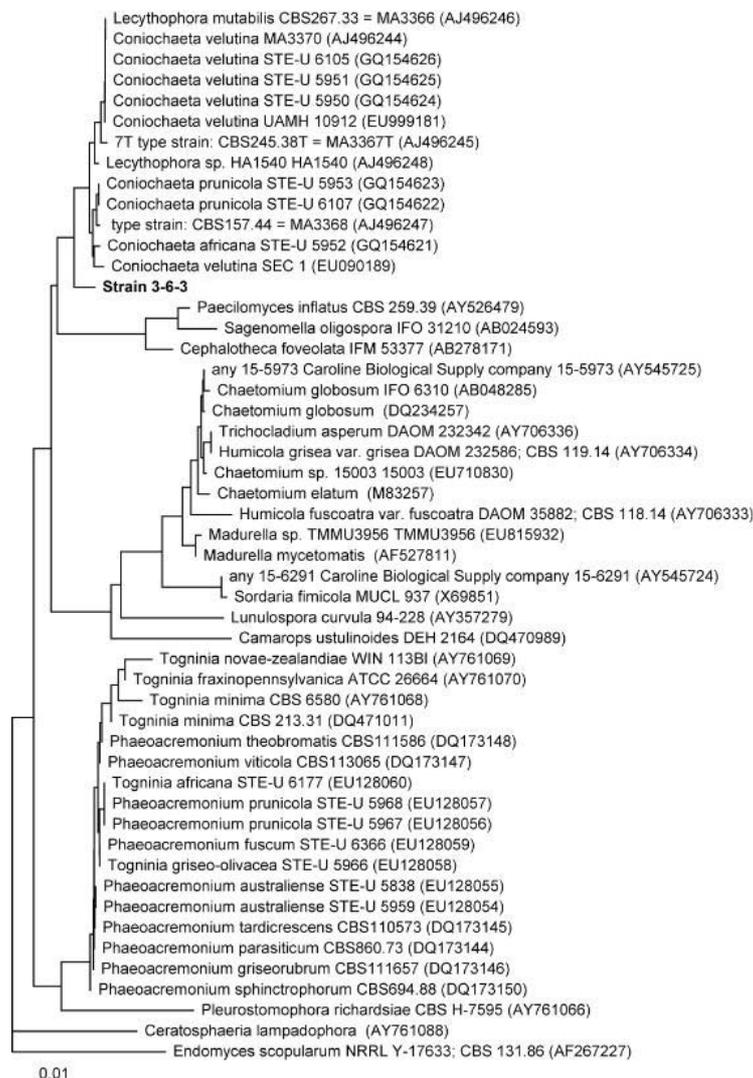


그림 3.3-6. Phylogenetic tree for 18S sequences of the strain YP3-6-3

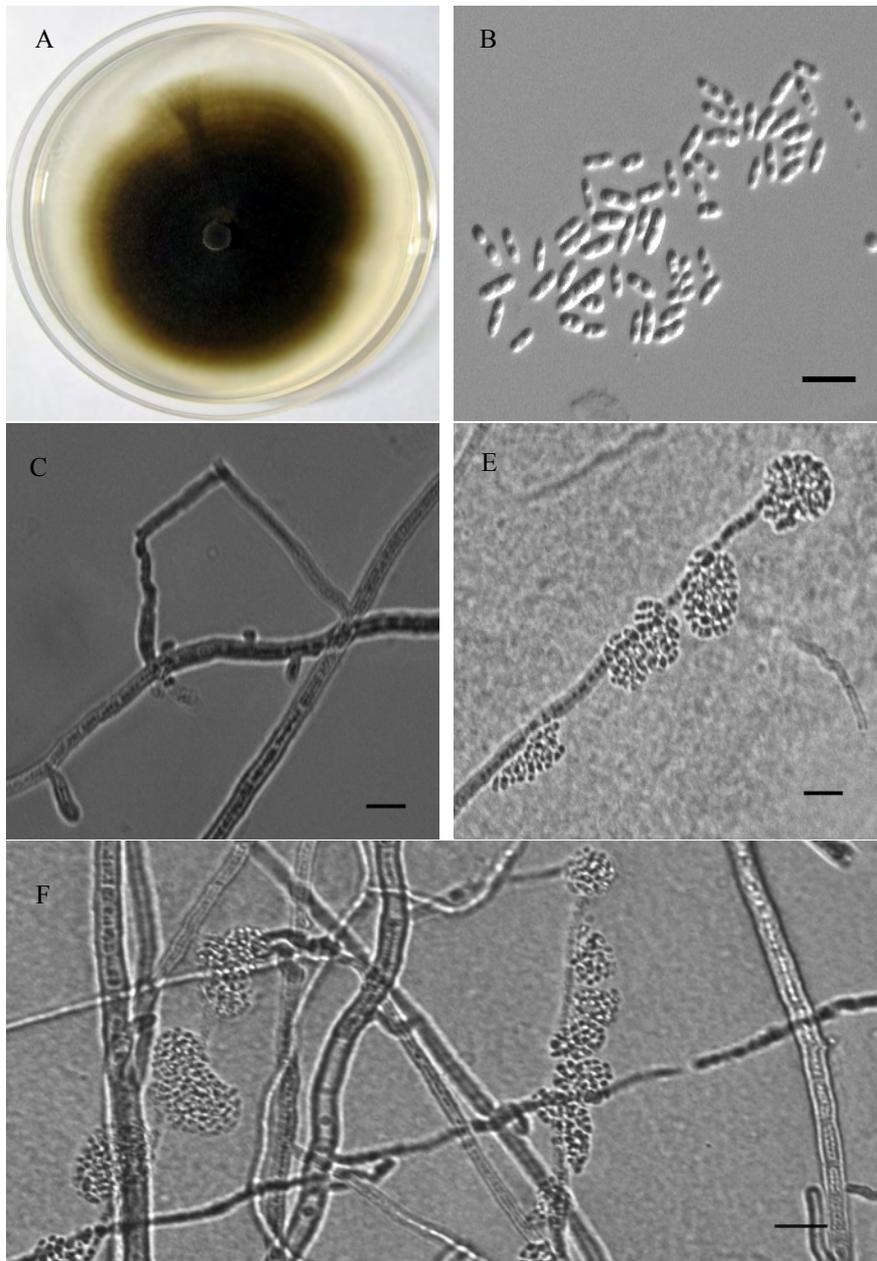


그림 3.3-7. Fungus YP3-6-3 isolated from rotten woods and surrounding soils

A, colony grown on MEA medium; b, conidia; c, conidia formed on hyphal cell; d, conidiogenous cells on hyphal cells; e, conidia formed on hyphal cells. - scale bar: 10 μ m

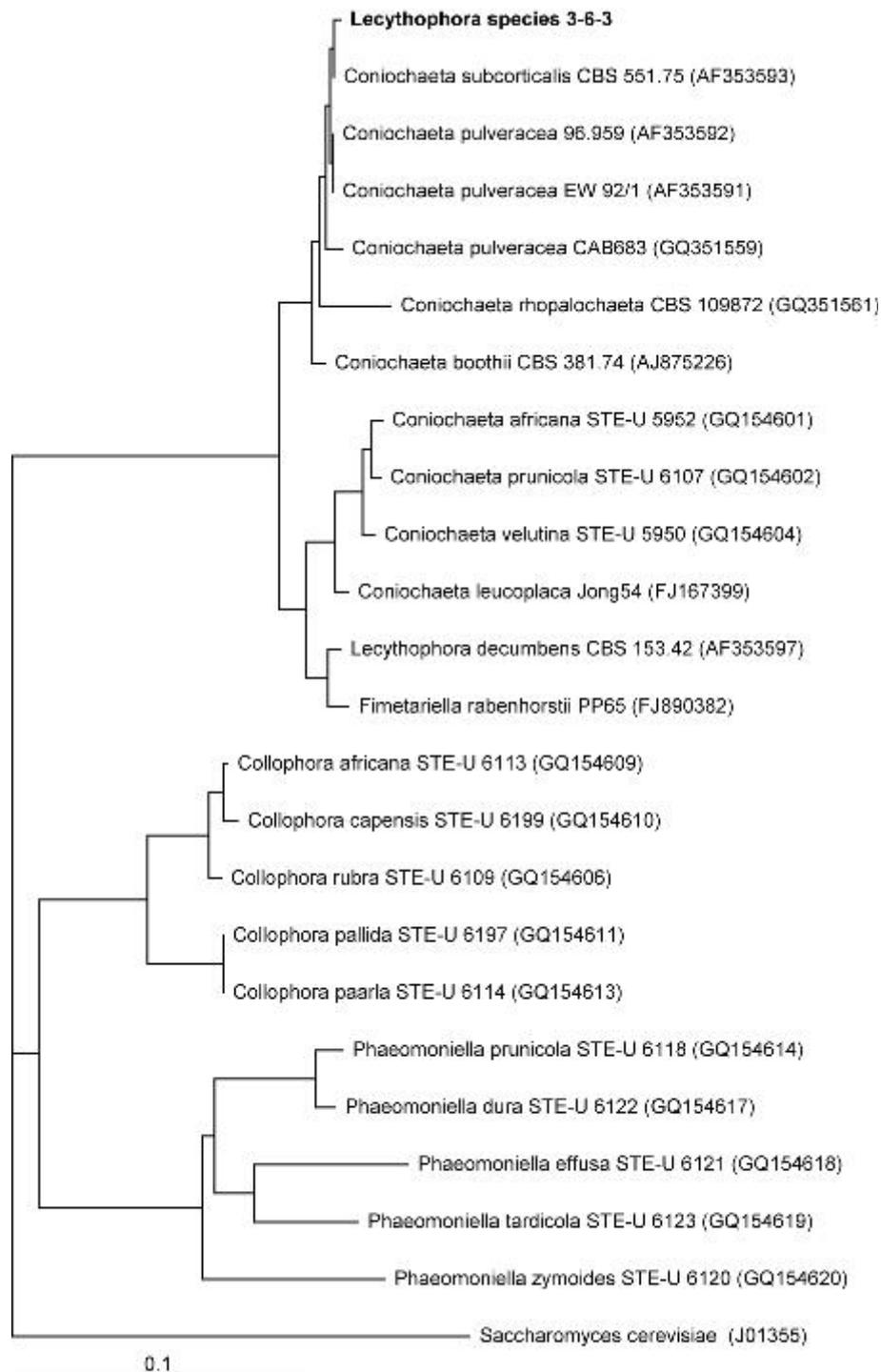


그림 3.3-8. Phylogenetic tree for 26S sequences of the strain YP3-6-3

(10) 국립공원 토양에서의 미생물 분리 및 우수 균주 선별

- 국립공원 내의 여러 토양을 수집하여 이로부터 미생물 400여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 43여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 12주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-10에 나타내었다. 이중 여러 효소활성이 우수한 Yfs 1-2의 경우 *Penicillium sp.*으로 동정되었다.

표 3.3-10 Cellulase activities of various isolates from national park

Strain	Enzyme activity(U/ml)					
	CMCase	FPase	β -Glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
Mfs 1	0.98	0.61	0.49	0.79	1.98	0.43
Mfs 4	1.1	0.55	0.49	2.9	3.05	0.52
Mfs 4-1	1.01	0.58	0.4	2.75	0.31	0.34
YS 1-6	1.25	0.76	0.55	1.71	2.04	0.61
YS 8	1.1	0.76	0.61	1.59	1.86	0.52
YS 12	4.27	0.76	6.8	4.24	4.91	3.75
Yfs 1-2	7.26	1.59	6.59	7.57	2.65	3.51
Yfs 2-2	1.01	0.52	0.37	1.28	1.77	0.34
Pfs	4.09	0.82	3.6	4.33	1.68	3.45
Pfs 1	1.13	0.7	0.46	1.22	1.07	0.52
Pfs 2	1.07	0.52	0.4	2.81	0.98	0.49
Pfs 2-1	1.13	0.79	0.58	1.28	1.25	0.55

(11) 고온지대의 토양에서 미생물 분리

- 고온지대의 여러 토양을 수집하여 이로부터 미생물 300여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 30여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 8주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-11에 나타내었으며 이중 우수한 균주인 TS 1-1의 동정결과 *Erwinia sp.*으로 동정되었다.

표 3.3-11 Cellulase activities of various isolates from a volcano

Strain	Enzyme activity(U/ml)					
	CMCase	FPase	β -Glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
TS 1-1	8.97	4.06	15.99	2.44	3.94	1.37
TS 2-3	4.09	0.7	3.42	2.38	0.76	2.59
TS 2-8	2.53	0.73	0.49	1.37	0.15	0.49
TS 3	1.07	0.61	0.64	0.92	3.39	0.61
TS 4	1.19	0.7	0.49	1.04	1.77	0.37
TS 10	7.35	4.67	4.61	9.58	2.23	7.2
S	2.2	0.55	3.48	2.65	0.31	1.53
S 1	7.87	1.83	14.4	6.28	1.46	3.14

(12) 화산지역 토양에서 미생물 분리

□ 화산지역 토양을 수집하여 이로부터 미생물 200여주를 분리하였고, Mandel 고체배지에서 clear zone을 형성하는 균주 20여주를 1차로 분리하였고 다시 이들을 Mandel 고체배지와 Mandel 액체배지에서 접종하여 배양하고 clear zone 크기 및 효소 활성 분석 통하여 7주의 미생물을 선별하였다. 이들의 효소 활성을 표 3.3-12에 나타내었다. 여기에서 YL-2균주가 가장 우수하였고, 특히 대조균주인 Rut C-30에 비해 YL-2균주는 높은 β -glucosidase 활성을 나타내었다.

표 3.3-12 Cellulase activities of various isolates from a soils

Strain	Enzyme activity(U/ml)					
	CMCase	FPase	β -Glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
SM-1	4.40	2.92	1.19	3.04	7.04	3.95
ML-4	10.79	2.54	5.18	2.85	11.59	6.62
YTF-1	4.50	2.88	5.73	4.67	18.77	6.83
ML-1	6.80	4.34	5.49	2.60	15.70	13.24
YL-1	7.71	4.57	6.04	2.24	20.36	11.79
YL-2(40°C)	6.55	2.01	6.82	4.25	12.49	10.81
YL-2	11.23	7.82	10.81	6.82	28.81	33.28
Rut C-30	12.56	7.71	2.63	5.69	47.19	11.57

다. 고효성 섬유소분해효소 생산균주 발굴 (김재진 교수 연구진)

□ 기존 KUC collection에 속한 다수의 균주와 벚짚, 백합나무, 퇴비, 토양 등에서 채집한 균주 총 117속, 233종, 814점에 대하여 섬유소분해효소 활성을 평가하였다 (표 3.3-13). 균주의 특성과 사용목적에 따라 다양한 섬유소분해효소를 측정하였고 고효성 섬유소분해효소 생산 균주를 선발하였다. 당화능 증진이 최종 목표인 만큼 한 가지 효소를 기준으로 선발하지 않고 각 효소에서 고효성을 보이는 균주들을 선발하였다. 3차년도까지 선별된 곰팡이는 7속, 8종, 16점으로 *Cladosporium cladosporioides* KUC1384, *Cladosporium perangustum* KUC1462, *Daedalea dickinsii* KUC8810, *Daedalea dickinsii* KUC9108, *Daedalea dickinsii* KUC9181, *Fusarium proliferatum* KUC5195, *Gloeophyllum* sp. KUC8057, *Gloeophyllum trabeum* KUC9211, *Penicillium marneffeii* KUC1907, *Penicillium oxalicum* KUC3083, *Phoma* sp. KUC5178, *Trichoderma harzianum* JJ1-1, *Trichoderma harzianum* KUC1716, *Trichoderma harzianum* KUC5193, *Trichoderma* sp. W4-4-2, Unknown basidiomycete KUC8721 이다. 선발된 균주에는 *Penicillium*, *Trichoderma* 속과 같이 고효율 섬유소분해 균주나 목재부후균으로 기존에 잘 알려진 균주가 있는 반면 섬유소분해효소에 대한 보고가 없는 균주도 포함되어있다.

표 3.3-13 Tested fungi and their enzyme activities

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
	<i>Aspergillus niger</i>	0.07	0.22	-	29.6
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.09	0.25	-	38.4
	<i>Aspergillus versicolor</i>	0.09	0.13	-	86.1
	<i>Aspergillus wentii</i>	0.10	0.16	-	46.1
	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0.02	0.25	-	6.7
	<i>Schizophyllum commune</i>	0.03	0.20	-	7.1
	<i>Trichoderma asperellum</i>	0.02	0.23	-	7.5
	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.03	0.15	-	0.2
	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.03	0.19	-	4.3
	<i>Trichoderma gamsii</i>	0.03	0.18	-	3.8
	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.19	0.18	-	0.8
	<i>Trichoderma harzianum-like</i>	0.12	0.24	-	41.4
	<i>Trichoderma koningtopsis</i>	0.06	0.12	-	5.5
	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.03	0.16	-	1.8
	<i>Trichoderma reesei</i>	0.09	0.22	-	14.1
	<i>Trichoderma sp.1</i>	0.03	0.17	-	1.8
	<i>Trichoderma viride</i>	0.03	0.20	-	1.3
	Unknown basidiomycete	0.10	0.29	-	16.5
	<i>Mycrococcum thermophilum</i>	0.17	-	0.15	2.4
	<i>Penicillium biourgeianum</i>	0.68	-	-	8.4
	<i>Penicillium brasilianum</i>	0.44	-	-	38.4
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.31	-	-	7.5
	<i>Penicillium citrinum</i>	0.11	-	-	2.8
	<i>Penicillium commune</i>	1.24	-	-	64.6
	<i>Penicillium crustosum</i>	0.66	-	-	150.1
	<i>Penicillium decaturense</i>	0.89	-	-	81.1
	<i>Penicillium diversum</i>	0.28	-	-	7.5
	<i>Penicillium expansum</i>	1.18	-	-	6.5
	<i>Penicillium fellutanum</i>	3.56	-	-	11.7
	<i>Penicillium funiculosum</i>	1.52	-	-	113.4
	<i>Penicillium glabrum</i>	1.33	-	-	54.5
	<i>Penicillium implicatum</i>	1.05	-	-	11.4
	<i>Penicillium janthinellum</i>	0.29	-	-	8.2
	<i>Penicillium kloeckeri</i>	0.84	-	-	302.2
	<i>Penicillium meleagrinum</i>	1.60	-	-	7116.2
	<i>Penicillium miczynskii</i>	2.10	-	-	82.2
	<i>Penicillium minioluteum</i>	0.29	-	-	10.1
	<i>Penicillium multicolor</i>	0.20	-	-	6.7
	<i>Penicillium ochrochloron</i>	0.71	-	-	187.3
	<i>Penicillium oxalicum</i>	0.66	-	-	20.0
	<i>Penicillium pinophilum</i>	0.81	-	-	98.7
	<i>Penicillium purpurascens</i>	0.71	-	-	52.7
	<i>Penicillium radicum</i>	0.91	-	-	15.7
	<i>Penicillium raistrickii</i>	1.05	-	-	20.6
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	0.91	-	-	32.0
	<i>Penicillium sp. 1</i>	0.53	-	-	13.4
	<i>Penicillium sp. 2</i>	0.31	-	-	9.5
	<i>Penicillium sp. 3</i>	1.24	-	-	36.9

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
H2	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
0701A-20	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8076	<i>Bjerkandera fumosa</i>	0.00	-	-	-
KUC8138	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC8139	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC8407	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.02	-	-	-
KUC8614	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.02	-	-	-
KUC8090	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC8606	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC20100701B-06	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC8111	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.07	-	-	-
0701B-06	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0701B-07-1	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0701B-25-2	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-02	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-11	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-11-2	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-20-1	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-22	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-27	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.02	-	-	-
0707-37	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.02	-	-	-
0707-42	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.02	-	-	-
0707-44-2	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-48-2	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-52-2	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.03	-	-	-
0707-60	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-63	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-66-1	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-74	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-76	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0911-15	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
0707-58	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	-	-	-
KUC20091127-01	<i>Cerrena consors</i>	0.00	-	-	-
KUC8416	<i>Cerrena consors</i>	0.01	-	-	-
KUC8421	<i>Cerrena consors</i>	0.00	-	-	-
KUC9091	<i>Cerrena consors</i>	0.00	-	-	-
KUC1384	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.17	-	-	-
KUC1385	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1420	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.05	-	-	-
KUC1516	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1545	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1580	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1699	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.05	-	-	-
KUC1701	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.09	-	-	-
KUC3006	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC3076	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1462	<i>Cladosporium perangustum</i>	0.16	-	-	-
KUC1767	<i>Cladosporium perangustum</i>	0.05	-	-	-

	<i>Penicillium sp. 4</i>	0.68	-	-	171.9
	<i>Penicillium sp. 5</i>	0.44	-	-	192.3
	<i>Penicillium sp. 6</i>	3.56	-	-	244.7
	<i>Penicillium steckii</i>	1.18	-	-	470.6
	<i>Penicillium sumatrense</i>	0.53	-	-	282.8
	<i>Penicillium variable</i>	0.81	-	-	26.0
	<i>Penicillium verruculosum</i>	0.89	-	-	69.7
	<i>Thermoascus aurantiacus</i>	0.12	-	0.53	1.9
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0.00	-	0.10	4.3
0707-25	<i>Agaricus sp.</i>	0.02	-	-	-
KUC20100525-01	<i>Agrocybe pediades</i>	0.00	-	-	-
0525-01-1	<i>Agrocybe pediades</i>	0.00	-	-	-
KUC8005	<i>Amphinema byssoides</i>	0.00	-	-	-
KUC20091127-33	<i>Anrodia albida</i>	0.10	-	-	-
KUC8802	<i>Anrodia albida</i>	0.00	-	-	-
0911-10	<i>Anrodia albida</i>	0.00	-	-	-
MJ33	<i>Anrodia albida</i>	0.02	-	-	-
KUC20090519-11	<i>Anrodia heteromorpha</i>	0.00	-	-	-
MR11	<i>Anrodia heteromorpha</i>	0.00	-	-	-
KUC20100728-31	<i>Anrodia malicola</i>	0.00	-	-	-
0728-31	<i>Anrodia malicola</i>	0.00	-	-	-
KUC8002	<i>Anrodia serialis</i>	0.00	-	-	-
KUC8202	<i>Anrodia sinuosa</i>	0.00	-	-	-
KUC8203	<i>Anrodia sinuosa</i>	0.00	-	-	-
KUC9031	<i>Anrodiaserialis</i>	0.00	-	-	-
KUC8864	<i>Anrodia romellii</i>	0.00	-	-	-
KUC20091127-22	<i>Athelia epiphylla</i>	0.05	-	-	-
MJ22	<i>Athelia epiphylla</i>	0.00	-	-	-
KUC8072	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8113	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8204	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8213	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8808	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC8874	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC9065	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC9068	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-
KUC9107	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.01	-	-	-
GSA28	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC8058	<i>Cystidiophorus castaneus</i>	0.00	-	-	-
KUC8822	<i>Cystidiophorus castaneus</i>	0.00	-	-	-
KUC8010	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.00	-	-	-
KUC9077	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.00	-	-	-
KUC9108	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.16	-	-	-
KUC9181	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.20	-	-	-
KUC8810	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.16	-	-	-
KUC8811	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.09	-	-	-
KUC20100701B-18	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.00	-	-	-
KUC8515	<i>Daedaleopsis sp.</i>	0.00	-	-	-
1027-01	<i>Daedaleopsis sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9116	<i>Dendrocartium roseocarneum</i>	0.00	-	-	-
KUC8846	<i>Dendrocartium roseocarneum</i>	0.00	-	-	-
KUC20090711-18	<i>Dentipellis dissita</i>	0.00	-	-	-
KUC8613	<i>Dentipellis dissita</i>	0.01	-	-	-
KUC5191	<i>Dothideomyces sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC5186	<i>Epicoccum nigrum</i>	0.00	-	-	-
KUC20100707-64	<i>Flavodon flavus</i>	0.14	-	-	-
KUC20090807-01	<i>Fomes fomentarius</i>	0.00	-	-	-
KUC9153	<i>Fomes fomentarius</i>	0.00	-	-	-
KUC9166	<i>Fomes fomentarius</i>	0.00	-	-	-
KUC8509	<i>Fomitopsis pinicola</i>	0.00	-	-	-
KUC5050	<i>Fusarium armeniacum</i>	0.10	-	-	-
KUC5051	<i>Fusarium armeniacum</i>	0.09	-	-	-
KUC5052	<i>Fusarium armeniacum</i>	0.10	-	-	-
KUC5053	<i>Fusarium armeniacum</i>	0.05	-	-	-
KUC1378	<i>Fusarium concentricum</i>	0.00	-	-	-
KUC5048	<i>Fusarium equiseti</i>	0.14	-	-	-
MS704	<i>Fusarium equiseti</i>	0.10	-	-	-
KUC5185	<i>Fusarium graminearum</i>	0.05	-	-	-
KUC5013	<i>Fusarium graminearum</i>	0.00	-	-	-
KUC5199	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.00	-	-	-
MS103	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.15	-	-	-
MS309	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.15	-	-	-
KUC5199	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.07	-	-	-
KUC5195	<i>Fusarium proliferatum</i>	0.16	-	-	-
MS308	<i>Fusarium proliferatum</i>	0.15	-	-	-
KUC5195	<i>Fusarium proliferatum</i>	0.00	-	-	-
MS504	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC1379	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC1464	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC3081	<i>Fusarium solani</i>	0.05	-	-	-
KUC1417	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC1463	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC1590	<i>Fusarium solani</i>	0.00	-	-	-
KUC5181	<i>Fusarium sp.</i>	0.05	-	-	-
KUC5205	<i>Fusarium sp.</i>	0.11	-	-	-
KUC5104	<i>Fusarium sp.</i>	0.00	-	-	-

KUC5085	<i>Cladosporium perangustum</i>	0.00	-	-	-
KUC1671	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC1700	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	0.10	-	-	-
KUC4095	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	0.00	-	-	-
KUC3027	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	0.00	-	-	-
KUC1421	<i>Cladosporium rectoides</i>	0.00	-	-	-
KUC1515	<i>Cladosporium rectoides</i>	0.00	-	-	-
KUC1667	<i>Cladosporium rectoides</i>	0.06	-	-	-
KUC5009	<i>Cladosporium rectoides</i>	0.00	-	-	-
KUC5188	<i>Cladosporium sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC1766	<i>Cladosporium sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC1773	<i>Cladosporium sp.</i>	0.05	-	-	-
KUC1698	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	0.00	-	-	-
KUC1736	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	0.00	-	-	-
KUC1903	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	0.00	-	-	-
KUC3009	<i>Cladosporium-likespecies1</i>	0.00	-	-	-
KUC1419	<i>Cladosporium-likespecies2</i>	0.10	-	-	-
KUC1299	<i>Cladosporium-likespecies3</i>	0.05	-	-	-
0701B-32	<i>Clitopilus sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC5198	<i>Cochliobolus sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9101	<i>Coniophora arida</i>	0.14	-	-	-
KUC8209	<i>Coprinellus domesticus</i>	0.00	-	-	-
KUC8610	<i>Coprinellus domesticus</i>	0.07	-	-	-
KUC9001	<i>Coprinellus domesticus</i>	0.00	-	-	-
KUC9002	<i>Coprinellus domesticus</i>	0.00	-	-	-
KUC9204	<i>Coprinellus domesticus</i>	0.00	-	-	-
KUC20100707-50	<i>Coprinus domesticus</i>	0.00	-	-	-
KUC8809	<i>Crepidotus variabilis</i>	0.00	-	-	-
KUC8001	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8012	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8065	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8611	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9003	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9004	<i>Crustoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC5194	<i>Curvularia intermedius</i>	0.00	-	-	-
KUC20100409-09	<i>Cylindrobasidium laeve</i>	0.12	-	-	-
KUC8725	<i>Cylindrobasidium laeve</i>	0.00	-	-	-
KUC8048	<i>Cystidiophorus castaneus</i>	0.00	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC8368	<i>Hypoholoma subviride</i>	0.00	-	-	-
KUC8373	<i>Hypoholoma subviride</i>	0.00	-	-	-
KUC8433	<i>Hypoholoma subviride</i>	0.00	-	-	-
KUC8408	<i>Hypochnicium albostramineum</i>	0.07	-	-	-
KUC9011	<i>Hypochnicium cremicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC9012	<i>Hypochnicium cremicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8321	<i>Hypochnicium cremicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8046	<i>Hypochnicium eichleri</i>	0.00	-	-	-
KUC8330	<i>Hypochnicium eichleri</i>	0.00	-	-	-
KUC8362	<i>Hypochnicium eichleri</i>	0.00	-	-	-
KUC8343	<i>Hypochnicium karstenii</i>	0.00	-	-	-
KUC8319	<i>Hypochnicium karstenii</i>	0.00	-	-	-
KUC8019	<i>Hypochnicium sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8713	<i>Hypochnicium sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC20090711-29	<i>Inonotus cuticularis</i>	0.00	-	-	-
KUC8506	<i>Irpex hacksungii</i>	0.00	-	-	-
KUC8505	<i>Irpex hacksungii</i>	0.00	-	-	-
KUC8503	<i>Irpex hacksungii</i>	0.00	-	-	-
KUC8504	<i>Irpex hacksungii</i>	0.00	-	-	-
KUC8502	<i>Irpex hydnooides</i>	0.01	-	-	-
KUC8501	<i>Irpex hydnooides</i>	0.00	-	-	-
KUC20090519-20	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC8507	<i>Irpex lacteus</i>	0.01	-	-	-
KUC8508	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC8075	<i>Irpex lacteus</i>	0.01	-	-	-
KUC8411	<i>Irpex lacteus</i>	0.01	-	-	-
KUC8604	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC8605	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC8843	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC9013	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC9014	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC9104	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC9122	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC9124	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC9126	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC8813	<i>Irpex lacteus</i>	0.00	-	-	-
KUC8817	<i>Irpex lacteus</i>	0.01	-	-	-
KUC8842	<i>Irpex lacteus</i>	0.02	-	-	-
KUC8853	<i>Irpex lacteus</i>	0.01	-	-	-
KUC20090502-07	<i>Junghuhnia nitida</i>	0.14	-	-	-
WG7	<i>Junghuhnia nitida</i>	0.00	-	-	-
KUC5189	<i>Khuskia oryzae</i>	0.06	-	-	-
KUC20090519-17	<i>Lentinellus sp.</i>	0.00	-	-	-
MR17	<i>Lentinellus sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9081	<i>Lenzites betulina</i>	0.02	-	-	-
KUC8819	<i>Lenzites betulina</i>	0.00	-	-	-
KUC8886	<i>Lenzites betulina</i>	0.00	-	-	-
0707-62	<i>Lopharia cinerascens</i>	0.00	-	-	-

KUC5105	<i>Fusarium sp.</i>	0.05	-	-	-
KUC8840	<i>Fusoporia formosana</i>	0.00	-	-	-
KUC8020	<i>Fusoporia formosana</i>	0.00	-	-	-
KUC5200	<i>Gaeumannomyces graminis</i>	0.00	-	-	-
KUC20100816-03	<i>Ganoderma applanatum</i>	0.00	-	-	-
100816-3	<i>Ganoderma applanatum</i>	0.00	-	-	-
KUC8053	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	0.07	-	-	-
KUC8056	<i>Gloeophyllum abietinum</i>	0.00	-	-	-
KUC8052	<i>Gloeophyllum sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8057	<i>Gloeophyllum sp.</i>	0.16	-	-	-
KUC8013	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8067	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.08	-	-	-
KUC8068	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.16	-	-	-
KUC8069	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8070	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8071	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8074	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8078	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8080	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8081	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.15	-	-	-
KUC8112	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.14	-	-	-
KUC9208	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.07	-	-	-
KUC9209	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.14	-	-	-
KUC9210	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.00	-	-	-
KUC9211	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.17	-	-	-
KUC9213	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	0.00	-	-	-
KUC20100707-61	<i>Gloeoporus dichrous</i>	0.00	-	-	-
0707-37(2)	<i>Gymnopus sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8320	<i>Heterobasidium annosum</i>	0.00	-	-	-
KUC9009	<i>Heterobasidium annosum</i>	0.00	-	-	-
KUC20100911-23	<i>Hydnochaete olivacea</i>	0.10	-	-	-
KUC20100409-18	<i>Hymenochaete corrugata</i>	0.09	-	-	-
HH18	<i>Hymenochaete corrugata</i>	0.00	-	-	-
KUC20091127-05	<i>Hymenochaete tabacina</i>	0.05	-	-	-
WG10	<i>Hyphoderma rude</i>	0.00	-	-	-
KUC9212	<i>Hyphodontia palmarum</i>	0.00	-	-	-
KUC20100911-18	<i>Hyphodontia paradoxa</i>	0.00	-	-	-
0911-18	<i>Hyphodontia paradoxa</i>	0.00	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC1678	<i>Penicillium meleagrimum</i>	0.03	-	-	-
KUC1551	<i>Penicillium miczynskii</i>	0.03	-	-	-
KUC1680	<i>Penicillium minioluteum</i>	0.03	-	-	-
KUC1626	<i>Penicillium multicolor</i>	0.03	-	-	-
KUC1348-1	<i>Penicillium ochrochloron</i>	0.06	-	-	-
KUC5184	<i>Penicillium oxalicum</i>	0.13	-	-	-
KUC1674	<i>Penicillium oxalicum</i>	0.13	-	-	-
KUC1758	<i>Penicillium pinophilum</i>	0.09	-	-	-
KUC1788	<i>Penicillium purpurascens</i>	0.04	-	-	-
KUC1679	<i>Penicillium radicum</i>	0.03	-	-	-
KUC1729	<i>Penicillium raistrickii</i>	0.03	-	-	-
KUC5153	<i>Penicillium simplicissimum</i>	0.12	-	-	-
KUC1434	<i>Penicillium sp.1</i>	0.03	-	-	-
KUC1552	<i>Penicillium sp.2</i>	0.03	-	-	-
KUC1795-3	<i>Penicillium sp.3</i>	0.03	-	-	-
KUC1907	<i>Penicillium sp.4</i>	0.16	-	-	-
KUC1754	<i>Penicillium sp.5</i>	0.04	-	-	-
KUC1651	<i>Penicillium sp.6</i>	0.05	-	-	-
KUC1681-1	<i>Penicillium steckii</i>	0.03	-	-	-
KUC1613	<i>Penicillium sumatrense</i>	0.03	-	-	-
KUC1476	<i>Penicillium variabile</i>	0.05	-	-	-
KUC1794	<i>Penicillium verruculosum</i>	0.04	-	-	-
KUC9140	<i>Peniophora cinerea</i>	0.00	-	-	-
KUC20100701A-16	<i>Peniophora incarnata</i>	0.05	-	-	-
KUC8015	<i>Peniophora sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8836	<i>Peniophora sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9017	<i>Peniophora sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8031	<i>Peniophorella praetermissa</i>	0.00	-	-	-
KUC20100701A-31	<i>Perenniporia fraxinea</i>	0.00	-	-	-
KUC8728	<i>Perenniporia fraxinea</i>	0.02	-	-	-
KUC8516	<i>Perenniporia medulla-panis</i>	0.00	-	-	-
KUC9032	<i>Phanerochaete aculeata</i>	0.00	-	-	-
KUC8419	<i>Phanerochaete calotricha</i>	0.00	-	-	-
KUC8003	<i>Phanerochaete calotricha</i>	0.00	-	-	-
KUC8040	<i>Phanerochaete calotricha</i>	0.01	-	-	-
KUC9092	<i>Phanerochaete laxa</i>	0.00	-	-	-
KUC9106	<i>Phanerochaete laxa</i>	0.00	-	-	-
KUC20090519-21	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8852	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.01	-	-	-
KUC8032	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8037	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9201	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9100	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9109	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8612	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8838	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9203	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9182	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-

KUC20100816-08	<i>Marasmiellus candidus</i>	0.00	-	-	-
0728-16	<i>Marasmius brunneospermus</i>	0.00	-	-	-
KUC9136	<i>Megalocystidium luridum</i>	0.00	-	-	-
KUC9148	<i>Megalocystidium luridum</i>	0.00	-	-	-
KUC9155	<i>Megalocystidium luridum</i>	0.00	-	-	-
KUC9072	<i>Megalocystidium luridum</i>	0.02	-	-	-
KUC9159	<i>Merulioopsis taxicola</i>	0.00	-	-	-
KUC9063	<i>Microporus vernicipes</i>	0.00	-	-	-
KUC9064	<i>Microporus vernicipes</i>	0.00	-	-	-
KUC6014	<i>Mucor circinelloides</i>	0.00	-	-	-
KUC8367	<i>Mucronella sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8381	<i>Mucronella sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8805	<i>Mycocyclia bispora</i>	0.00	-	-	-
KUC20100707-19	<i>Mycocyclia sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8201	<i>Mycocycliellabisporea</i>	0.00	-	-	-
KUC8828	<i>Oligoporus caesius</i>	0.00	-	-	-
KUC8829	<i>Oligoporus caesius</i>	0.00	-	-	-
KUC8517	<i>Pachykytospora papyraceus</i>	0.00	-	-	-
KUC8513	<i>Pachykytospora tephrope</i>	0.00	-	-	-
KUC20100525-02	<i>Panaeolus subbaleatus</i>	0.00	-	-	-
100525-2	<i>Panaeolus subbaleatus</i>	0.00	-	-	-
KUC8833	<i>Panellus stipiticus</i>	0.00	-	-	-
KUC8834	<i>Panellus stipiticus</i>	0.00	-	-	-
KUC1432	<i>Penicillium biourgeianum</i>	0.02	-	-	-
KUC1433	<i>Penicillium brasilianum</i>	0.03	-	-	-
KUC1628-1	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.03	-	-	-
KUC3084	<i>Penicillium citrinum</i>	0.03	-	-	-
KUC3029	<i>Penicillium commune</i>	0.09	-	-	-
KUC3019	<i>Penicillium crustosum</i>	0.01	-	-	-
KUC1522	<i>Penicillium decaturense</i>	0.02	-	-	-
KUC1284	<i>Penicillium diversum</i>	0.04	-	-	-
KUC1909	<i>Penicillium expansum</i>	0.02	-	-	-
KUC3020	<i>Penicillium fellutanum</i>	0.02	-	-	-
KUC3055	<i>Penicillium funiculosum</i>	0.03	-	-	-
KUC1553	<i>Penicillium glabrum</i>	0.04	-	-	-
KUC1619-2	<i>Penicillium implicatum</i>	0.03	-	-	-
KUC5018	<i>Penicillium janthinellum</i>	0.04	-	-	-
KUC1286	<i>Penicillium kloeckeri</i>	0.04	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC8089	<i>Phlebiella sp.1</i>	0.00	-	-	-
KUC8093	<i>Phlebiella sp.1</i>	0.01	-	-	-
KUC8325	<i>Phlebiella sp.1</i>	0.00	-	-	-
KUC9022	<i>Phlebiella sp.1</i>	0.00	-	-	-
KUC9207	<i>Phlebiella sp.1</i>	0.00	-	-	-
KUC8389	<i>Phlebiella sp.2</i>	0.00	-	-	-
KUC8312	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	0.00	-	-	-
KUC8322	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	0.00	-	-	-
KUC8303	<i>Phlebiopsis gigantea</i>	0.00	-	-	-
KUC5187	<i>Phoma sorghina</i>	0.05	-	-	-
KUC8891	<i>Phyllotopsis nidulans</i>	0.00	-	-	-
KUC9023	<i>Platyloea sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8724	<i>Pleurotus ostreatus</i>	0.00	-	-	-
KUC20100728-41	<i>Plicaturopsis crispa</i>	0.09	-	-	-
KUC9061	<i>Polyporales sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9160	<i>Polyporales sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8220	<i>Polyporus arcularius</i>	0.00	-	-	-
KUC20090519-13	<i>Porodiscus pendulus</i>	0.11	-	-	-
KUC20090502-20	<i>Porostereum spadiceum</i>	0.00	-	-	-
KUC8855	<i>Porostereum spadiceum</i>	0.00	-	-	-
KUC8602	<i>Porostereum spadiceum</i>	0.00	-	-	-
KUC20100918A-12	<i>Postia stipitica</i>	0.00	-	-	-
KUC20100707-78	<i>Psathyrella candolleana</i>	0.05	-	-	-
KUC9089	<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	0.00	-	-	-
KUC9076	<i>Pycnoporus sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC20100728-10	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0.15	-	-	-
KUC8826	<i>Radulomyces confluens</i>	0.00	-	-	-
KUC8827	<i>Radulomyces confluens</i>	0.00	-	-	-
KUC8382	<i>Rhizochaete radicata</i>	0.00	-	-	-
KUC8383	<i>Rhizochaete radicata</i>	0.00	-	-	-
KUC8357	<i>Rhizochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8364	<i>Rhizochaete sp.</i>	0.01	-	-	-
KUC8371	<i>Rhizochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8391	<i>Rhizochaete sp.</i>	0.01	-	-	-
KUC8839	<i>Rhizochaete sp.</i>	0.01	-	-	-
KUC8004	<i>Schizophyllum commune</i>	0.00	-	-	-
KUC8016	<i>Schizophyllum commune</i>	0.01	-	-	-
KUC8305	<i>Schizophyllum commune</i>	0.01	-	-	-
KUC8703	<i>Schizophyllum commune</i>	0.02	-	-	-
KUC9026	<i>Schizophyllum commune</i>	0.00	-	-	-
KUC9080	<i>Schizophyllum commune</i>	0.02	-	-	-
KUC9202	<i>Schizophyllum commune</i>	0.02	-	-	-
KUC9205	<i>Schizophyllum commune</i>	0.02	-	-	-
KUC8723	<i>Schizophyllum commune</i>	0.00	-	-	-
KUC8006	<i>Schizopora flavipora</i>	0.00	-	-	-
KUC8060	<i>Schizopora flavipora</i>	0.00	-	-	-
KUC8512	<i>Schizopora flavipora</i>	0.00	-	-	-
KUC9099	<i>Schizopora flavipora</i>	0.00	-	-	-

KUC8615	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8854	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC9118	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	-	-	-
KUC8423	<i>Phanerochaete sordida I</i>	0.00	-	-	-
KUC8405	<i>Phanerochaete sordida I</i>	0.00	-	-	-
KUC8404	<i>Phanerochaete sordida III</i>	0.00	-	-	-
KUC8323	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8608	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC9015	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8073	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8372	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.01	-	-	-
KUC8370	<i>Phanerochaete sp.1</i>	0.00	-	-	-
KUC8361	<i>Phanerochaete sp.2</i>	0.00	-	-	-
KUC20100816-10	<i>Phanerochaete stereoides</i>	0.00	-	-	-
KUC8727	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8324	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC9030	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.01	-	-	-
KUC8301	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8801	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8815	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8890	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8366	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8414	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC8430	<i>Phanerochaete velutina</i>	0.00	-	-	-
KUC9033	<i>Phlebia brevispora</i>	0.02	-	-	-
KUC8337	<i>Phlebia chrysocreas</i>	0.00	-	-	-
KUC20100701A-09	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC9067	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC8034	<i>Phlebia radiata</i>	0.01	-	-	-
KUC8406	<i>Phlebia radiata</i>	0.01	-	-	-
KUC8437	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC9020	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC8841	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC9035	<i>Phlebia radiata</i>	0.00	-	-	-
KUC9079	<i>Phlebia subochracea</i>	0.02	-	-	-
KUC8041	<i>Phlebia subserialis</i>	0.02	-	-	-
KUC9114	<i>Phlebia tremellosa</i>	0.02	-	-	-
KUC9161	<i>Phlebia tremellosa</i>	0.00	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC20100525-01	<i>Trametes hirsuta</i>	0.00	-	-	-
KUC8518	<i>Trametes pubescens</i>	0.00	-	-	-
KUC8607	<i>Trametes trogii</i>	0.00	-	-	-
KUC20090502-06	<i>Trametes versicolor</i>	0.10	-	-	-
KUC9085	<i>Trametes versicolor</i>	0.01	-	-	-
KUC8119	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8125	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8141	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8318	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8413	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8821	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8860	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8865	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8867	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC9028	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8859	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8230	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC9041	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	-	-	-
KUC8214	<i>Trichaptum abietinum</i>	0.00	-	-	-
KUC9130	<i>Trichaptum abietinum</i>	0.00	-	-	-
KUC1501	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1502	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1503	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1504	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1505	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1534	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1603	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1611	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1612	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1749	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1750	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1778	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1779	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1781	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1810	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1811	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1276	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1335	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1401	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1402	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1405	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1451	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1452	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1455	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1531	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1532	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1533	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1601	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-

KUC20100701B-05	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC8140	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC8851	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC9090	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC9121	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC9066	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC9071	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	-	-	-
KUC20090519-05	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.14	-	-	-
KUC8017	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8050	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8014	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC9029	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8051	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8054	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8055	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8059	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8116	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8123	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8350	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.01	-	-	-
KUC8353	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8363	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8341	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	-	-	-
KUC8217	<i>Sistotrema oblongisporum</i>	0.00	-	-	-
KUC8087	<i>Sistotrema oblongisporum</i>	0.00	-	-	-
KUC8218	<i>Sistotrema sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8348	<i>Sistotrema sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8336	<i>Skeletocutis amorphia</i>	0.00	-	-	-
KUC8514	<i>Skeletocutis perennis</i>	0.02	-	-	-
KUC5202	<i>Stachybotrys sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC20090502-02	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC8044	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC8219	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC8360	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC9073	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC9119	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	-	-	-
KUC20090519-09	<i>Stereum peculiare</i>	0.00	-	-	-
KUC8018	<i>Tapinella panuoides</i>	0.00	-	-	-
KUC9027	<i>Tilletiopsis albescens</i>	0.00	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC1457	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.06	-	-	-
KUC1456	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.05	-	-	-
KUC1408	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.05	-	-	-
KUC1407	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.04	-	-	-
KUC1406	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.01	-	-	-
KUC1337	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.08	-	-	-
KUC5139	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.05	-	-	-
KUC1863	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.06	-	-	-
KUC1275	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.07	-	-	-
KUC5217	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.01	-	-	-
SY-4-1	<i>Trichoderma hamatum</i>	0.04	-	-	-
W6-4-1	<i>Trichoderma hamatum</i>	0.05	-	-	-
W4-4-1	<i>Trichoderma hamatum</i>	0.02	-	-	-
S5-9-1	<i>Trichoderma hamatum</i>	0.00	-	-	-
KUC1272	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC1273	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC1281	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.04	-	-	-
KUC1283	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC1334	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
KUC1336	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.00	-	-	-
KUC1341	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.05	-	-	-
KUC1453	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
KUC1454	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.03	-	-	-
KUC1459	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.05	-	-	-
KUC1460	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC1461	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC1536	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC1537	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC1538	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.10	-	-	-
KUC1602	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.05	-	-	-
KUC1716	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.19	-	-	-
KUC1814	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
KUC1856	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.00	-	-	-
KUC1857	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.05	-	-	-
KUC1858	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC1859	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC1860	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC1862	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.00	-	-	-
KUC3039	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.00	-	-	-
KUC3089	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
KUC5192	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.04	-	-	-
W6-5-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
KUC1865	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC5193	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.07	-	-	-
KUC5220	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.08	-	-	-
KUC5182	<i>Trichoderma harzianum</i>	0.06	-	-	-
W4-3-1	<i>Trichoderma koningii</i>	0.00	-	-	-
S6-2-1	<i>Trichoderma koningii</i>	0.09	-	-	-

KUC1605	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1606	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1642	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1717	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1813	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1852	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1853	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1854	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1855	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC3090	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC5026	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC5138	<i>Trichoderma atroviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1280	<i>Trichoderma aureoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1271	<i>Trichoderma aureoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1278	<i>Trichoderma aureoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1282	<i>Trichoderma aureoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1712	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC5160	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC5158	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.03	-	-	-
KUC5099	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.06	-	-	-
KUC1655	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.06	-	-	-
KUC1338	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1506	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.05	-	-	-
KUC1507	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.04	-	-	-
KUC1654	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1787	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.04	-	-	-
KUC1786	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.07	-	-	-
KUC1785	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.03	-	-	-
KUC1784	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.07	-	-	-
KUC1783	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.07	-	-	-
KUC1711	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1710	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.06	-	-	-
KUC1646	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.02	-	-	-
KUC1645	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.05	-	-	-
KUC1643	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1610	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.08	-	-	-
KUC1541	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.00	-	-	-
KUC1458	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	0.08	-	-	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
MS3-3-2	<i>Phoma sp.</i>	-	0.25	0.05	-
MB1-10	<i>Rhizopus microsporus</i>	0.02	0.09	0.12	-
MS2-3	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	0.08	-
MB1-17	<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	0.04	-
MB3-2	<i>Unknown ascomycete</i>	-	-	0.02	-
KUC20120502-14C	<i>Abortiporus biennis</i>	0.00	0.00	0.05	-
0707-25	<i>Agaricus sp.</i>	0.00	0.00	0.08	-
111019A-36	<i>Antrodia albidia</i>	0.00	0.00	0.00	-
MJ10	<i>Antrodia heteromorpha</i>	0.00	0.00	0.00	-
110916-19	<i>Antrodia malicola</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9095	<i>Athelia sp.</i>	0.00	0.07	0.05	-
KUC20120618-17C	<i>Bjerkandera adusta</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120723C-29C	<i>Ceriporia lacerata</i>	0.00	0.00	0.00	-
110628-12	<i>Ceriporia unicolor</i>	0.00	0.16	0.03	-
KUC9337	<i>Clitocybe sp.</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC20120723A-30C	<i>Clitopilus sp.</i>	0.00	0.00	0.06	-
KUC20120605-24C	<i>Coprinellus radians</i>	0.00	0.00	0.04	-
0707-50	<i>Coprinus domesticus</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC20120509-03-2C	<i>Cystidiophorus castaneus</i>	0.00	0.00	0.06	-
KUC20120612-30C	<i>Daedalea dickinsii</i>	0.00	0.00	0.03	-
KUC20120605-28C	<i>Daedaleopsis confragosa</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC20120723B-07C	<i>Dentipellis dissita</i>	0.00	0.25	0.00	-
0707-64	<i>Flavodon flavus</i>	0.14	0.08	0.00	-
KUC9166	<i>Fomes fomentarius</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9342	<i>Fomitopsis palustris</i>	0.14	0.26	0.05	-
KUC20120717-41C	<i>Ganoderma applanatum</i>	0.00	0.00	0.04	-
111019C-07	<i>Gloeoporus dichrous</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9326	<i>Gymnopus junonius</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9310	<i>Gymnopus luxurians</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC20120712-02-2C	<i>Gymnopus sp.</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC9179	<i>Heterobasidium annosum</i>	0.14	0.16	0.05	-
KUC20120814-27C	<i>Hydnochaete tabacina</i>	0.00	0.00	0.00	-
110928-13	<i>Hymenochaete intricata</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC20120712-15C	<i>Hymenochaete yasudai</i>	0.00	0.00	0.00	-
WG10	<i>Hyphoderma rude</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC20120502-05C	<i>Hyphoderma setigerum</i>	0.17	0.11	0.06	-
110814-01	<i>Hyphodermella corrugata</i>	0.00	0.00	0.00	-
111019A-03-1	<i>Hyphodontia flavipora</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120605-36C	<i>Hyphodontia paradoxa</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120509-03-1C	<i>Hyphodontia radula</i>	0.00	0.00	0.00	-
110922-21	<i>Hyphodontia tropica</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120627-01C	<i>Hypochnictum karstenii</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC20120509-11C	<i>Irpex lacteus</i>	0.20	0.41	0.09	-
KUC20120601-17C	<i>Lenzites betulina</i>	0.21	0.52	0.13	-
0707-62	<i>Lopharia cinerascens</i>	0.00	0.18	0.09	-
110628-14	<i>Lycoperdon perlatum</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC20120723C-24C	<i>Marasmiellus sp.</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC9354	<i>Marasmiellus syndoticus</i>	0.00	0.06	0.05	-

KUC5064	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0.11	-	-	-
MS511	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0.04	-	-	-
KUC5100	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.04	-	-	-
KUC5218	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.03	-	-	-
KUC1609	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.05	-	-	-
KUC5222	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	0.05	-	-	-
JJ1-3	<i>Trichoderma sp.</i>	0.08	-	-	-
JJ1-2	<i>Trichoderma sp.</i>	0.05	-	-	-
JJ1-1	<i>Trichoderma sp.</i>	0.13	-	-	-
W6-4-2	<i>Trichoderma sp.</i>	0.05	-	-	-
MS1-11-1	<i>Trichoderma sp.</i>	0.09	-	-	-
W6-1-3	<i>Trichoderma sp.</i>	0.04	-	-	-
W4-4-2	<i>Trichoderma sp.</i>	0.06	-	-	-
W4-2-1	<i>Trichoderma sp.</i>	0.08	-	-	-
MS3-9	<i>Trichoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
S4-2-1	<i>Trichoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
W6-5-2	<i>Trichoderma sp.</i>	0.00	-	-	-
MS502	<i>Trichoderma viride</i>	0.06	-	-	-
KUC5062	<i>Trichoderma viride</i>	0.07	-	-	-
KUC5061	<i>Trichodermaasperellum</i>	0.00	-	-	-
KUC8100	<i>Tulasnella pruinoso</i>	0.00	-	-	-
KUC8328	<i>Tulasnella sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8349	<i>Tulasnella sp.</i>	0.00	-	-	-
KUC8830	<i>Tyromyces chioneus</i>	0.01	-	-	-
KUC8831	<i>Tyromyces chioneus</i>	0.02	-	-	-
KUC8882	<i>Tyromyces chioneus</i>	0.01	-	-	-
KUC9038	<i>Tyromyceschioneus</i>	0.01	-	-	-
KUC8721	<i>Unknown basidiomycete</i>	0.12	-	-	-
CHR4	<i>Unknown basidiomycete</i>	0.00	-	-	-
MS3-12-1	<i>Alternaria alternata</i>	0.01	0.22	0.95	-
MB2-8-2	<i>Aspergillus tubingensis</i>	-	-	0.06	-
MS3-17	<i>Chaetomium globosum</i>	-	-	0.04	-
MB1-3	<i>Cladosporium sp.</i>	-	-	0.02	-
MB1-9-2	<i>Curvularia intermed</i>	-	-	0.05	-
MB4-15	<i>Leucocoprinus birnbaumii</i>	-	-	0.04	-
MB1-5	<i>Penicillium fellutanum</i>	0.02	0.23	0.03	-
MS5-13	<i>Penicillium sclerotiorum</i>	0.02	0.21	0.09	-
MS1-13-2	<i>Phanerochaetesordida</i>	-	0.29	0.11	-

Fungal ID	Fungal name	Enzyme activity (U/ml)			
		FPU	EG	BGL	XYL
KUC9076	<i>Pycnoporus sp.</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120605-27C	<i>Schizophyllum commune</i>	0.14	0.27	0.71	-
KUC20120605-27C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	2.02	-
KUC20120618-01C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	2.51	-
KUC20120502-02C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.72	-
KUC20120723C-32-1C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.60	-
KUC20120717-14-1C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.79	-
110701-21	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.28	-
0707-52-1	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.10	-
KUC9088	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.00	-
KUC9080	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.29	-
M5	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.85	-
WG1	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.58	-
0707-20-2	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.59	-
MJ11	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.86	-
0707-05	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.54	-
KUC20120605-04C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.77	-
111019C-47	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.83	-
KUC20120605-31C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	0.36	-
0701B-23	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.23	-
KUC20120723A-22C	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	2.62	-
110928-28	<i>Schizophyllum commune</i>	-	-	1.46	-
KUC20120712-07C	<i>Schizopora paradoxa</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120627-14C	<i>Scytinostroma caudisporum</i>	0.00	0.00	0.00	-
111019A-70	<i>Scytinostroma sp.</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120723B-03C	<i>Sistotrema brinkmannii</i>	0.00	0.07	0.00	-
KUC9103	<i>Skeletocutis sp.</i>	0.00	0.13	0.06	-
111019B-23	<i>Steccherinum murashkinskyi</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9377	<i>Steccherinum ochraceum</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120601-09C	<i>Stereum hirsutum</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC9073	<i>Stereum sanguinolentum</i>	0.00	0.17	0.08	-
KUC20120605-15C	<i>Stereum sp.</i>	0.00	0.17	0.10	-
110722-36	<i>Stropharia rugosoannulata</i>	0.00	0.00	0.07	-
KUC9360	<i>Trametes cervina</i>	0.00	0.17	0.05	-
0728-15	<i>Trametes elegans</i>	0.00	0.16	0.09	-
110908-04	<i>Trametes trogii</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC20120605-22C	<i>Trametes versicolor</i>	0.00	0.38	0.20	-
111019A-59	<i>Trichaptum bifforme</i>	0.00	0.00	0.05	-
KUC20120712-04C	<i>Tyromyces chioneus</i>	0.00	0.14	0.05	-
111019C-54	<i>Vullemilia cystidiata</i>	0.00	0.00	0.00	-

KUC9200	<i>Marasmius tremellosus</i>	0.00	0.24	0.02	-
110701-20	<i>Microporus vermicipes</i>	0.00	0.20	0.05	-
0707-19	<i>Mycocyclia sp.</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC20120612-04C	<i>Oligoporus caesius</i>	0.00	0.23	0.00	-
KUC9160	<i>Oligoporus</i> sp.	0.00	0.06	0.07	-
111019A-53	<i>Oudemansiella canarii</i>	0.13	0.11	0.07	-
KUC20120814-07C	<i>Panellus stypticus</i>	0.00	0.00	0.00	-
0525-02	<i>Panellus subbalteatus</i>	0.00	0.00	0.04	-
KUC20120712-22C	<i>Peniophora incarnata</i>	0.00	0.00	0.05	-
111019B-51	<i>Peniophora nuda</i>	0.00	0.00	0.00	-
111019C-15	<i>Peniophora sp.</i>	0.00	0.00	0.02	-
110908-15	<i>Perenniporia corticola</i>	0.00	0.21	0.04	-
KUC20120731-33C	<i>Perenniporia fraxinea</i>	0.08	0.00	0.02	-
KUC9120	<i>Perenniporia ochroleuca</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120601-19C	<i>Perenniporia subacida</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC9370	<i>Phanerochaete chrysorhiza</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC20120717-43C	<i>Phanerochaete crassa</i>	0.18	0.35	0.04	-
KUC20120723B-04C	<i>Phanerochaete lamprocystidiata</i>	0.00	0.27	0.00	-
KUC20120618-29C	<i>Phanerochaete sordida</i>	0.00	0.22	0.00	-
KUC20120723C-36C	<i>Phanerochaete sp.</i>	0.00	0.07	0.00	-
KUC20120723B-02C	<i>Phanerochaete stereoides</i>	0.19	0.42	0.10	-
110701-12	<i>Phellinus gilvus</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9339	<i>Phlebia acanthocystis</i>	0.00	0.15	0.06	-
KUC20120723C-23C	<i>Phlebia acerina</i>	0.00	0.09	0.05	-
110628-74	<i>Phlebia radiata</i>	0.24	0.43	0.29	-
KUC20120723C-35C	<i>Phlebia sp.</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC9079	<i>Phlebia subochracea</i>	0.00	0.07	0.00	-
KUC9316	<i>Phlotia adiposa</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC20120814-16	<i>Pleurotu pulmonarius</i>	0.00	0.00	0.02	-
0728-41	<i>Plicaturopsis crispa</i>	0.00	0.00	0.02	-
KUC20120618-16C	<i>Polyporalessp.</i>	0.00	0.15	0.09	-
KUC20120723C-39C	<i>Polyporus alveolaris</i>	0.00	0.17	0.05	-
KUC20120717-04C	<i>Porostereum crassum</i>	0.00	0.07	0.02	-
KUC20120731-17C	<i>Porostereum spadiceum</i>	0.00	0.13	0.00	-
110908-39	<i>Postia stipitica</i>	0.00	0.00	0.00	-
KUC20120502-10C	<i>Psathyrella sp.</i>	0.00	0.19	0.10	-
KUC9110	<i>Pseudochaete tabacina</i>	0.00	0.14	0.06	-
KUC20120717-09-2C	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0.20	0.29	0.13	-

□ 3차년도까지 선발된 균주를 대상으로 2차 스크리닝을 진행하였고, 그 결과 *Trichoderma harzianum* KUC1716이 고활성 섬유소분해효소를 생산하였고 (Filter paper activity: 1.65 U/ml, endo-glucanase: 1.73 U/ml, β -glucosidase: 0.4 U/ml), 당화능 평가를 위한 효소생산 균주로 선발되었다. 하지만 *T. harzianum* KUC1716은 상대적으로 낮은 BGL활성을 보였고, 이를 보충하기 위해 4, 5차년도 연구에서 고활성 BGL 생산균주를 선발하였다. 총 150여점의 균주 중에서 *Schizophyllum commune*의 BGL활성이 두드러졌고, 그에 따라 보유한 *S. commune* 20점을 배양하여 β -glucosidase 활성을 조사한 결과 *Schizophyllum commune* KUC9397이 2.62 U/ml로 가장 높은 β -glucosidase 활성을 나타내었다. 따라서 이 균주를 *T. harzianum* KUC1716과 함께 당화능 평가를 위한 효소생산 균주로 최종 선발하였다.

라. 유전자원 등록

□ 본 연구가 진행되는 동안 다수의 섬유소분해효소 생산균주를 채집, 발굴하였고, 생물자원이로서의 보존을 위해 균주를 동정하는데 핵심이 되는 유전자를 Genebank에 등록하였다. *Alternaria* 속 24점, *Cladosporium* 속 28점, *Fusarium* 속 16점, *Heterobasidion* 속 7점으로 총 75점의 유전자원을 Genebank에 등록하였다.

2. 섬유소분해효소 생산 균주의 새로운 탐색기법 개발

가. 섬유소 분해 효소의 다양한 기질 분해능 분석을 위한 microplate assay system 개발

(1) Microplate assay system 개발

- 섬유소를 효과적으로 분해하기 위해 여러 효소 혼합물인 cocktail를 만드는 것이 필요하다. *Trichoderma reesei*는 중요한 cellulase 생산 균주이지만 cell wall degrading enzymes 구성이 효율적인 섬유소분해를 위해 전체적으로 완전하지 않다. 새로운 섬유소 분해 효소 생산 균주의 발굴을 위해서 각 균주가 분비하는 다양한 섬유소 분해 효소의 존재를 간편하고 빠르게 분석하는 방법을 개발 하고자 하였다.
- 본 연구에서 사용한 방법은 각기 다른 기질로 하여 96 well plate를 이용한 DNS환원당분석법을 사용한 분석 방법이다.

1. 분리된 균주(fungi)를 ¼ 농도의 Potato Dextrose Agar(PDA) 배지에 접종하여 30 °C에서 배양하였다.

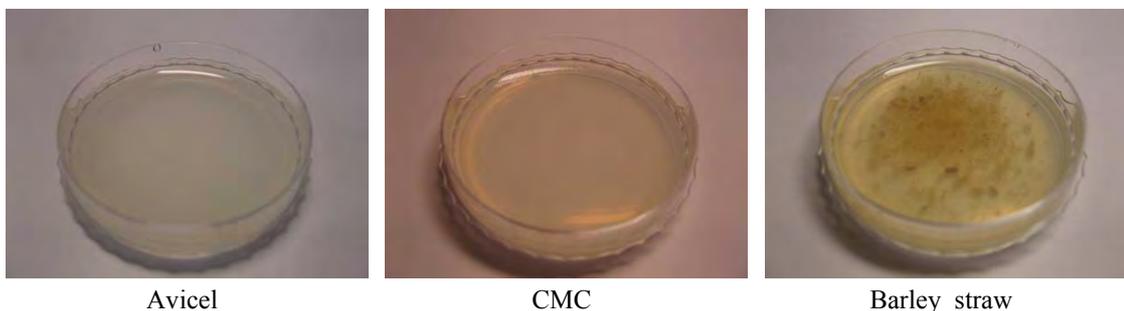
2. 균사체(mycelia)가 plate에 가득 찰 때 까지 배양하였다 (그림 3.3-9).



그림 3.3-9. Fungal culture to prepare mycelial plug on ¼x PDA plate

3. 섬유소 분해 효소 활성 분석을 위한 배지로서 ATCC cellulose medium 907을 변형하여 사용하였다. [0.5 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L-asparagine, 1 g KH₂PO₄, 0.5 g KCl, 0.41 g MgSO₄ 7·H₂O, 0.1 g CaCl₂, 0.5 g Yeast extract, 16 g Agar, 5 g cellulose, 1 L H₂O]

4. CMC외의 다른 탄소원으로서 avicel (FMC type PH-101, 50 μm)과 보리짚을 사용하며 여기서 사용한 petri dish 크기는 지름이 50 mm 이었다 (그림 3.3-10).



Avicel

CMC

Barley straw

그림 3.3-10. ATCC cellulose media containing different celluloses

5. Stainless hole cup(지름 7 mm)를 이용하여 mycelial plug를 만든 다음, 이 mycelial plug를 avicel, CMC, barley straw 고체배지(10 ml) 위에 올려놓는다 (그림 3.3-11).



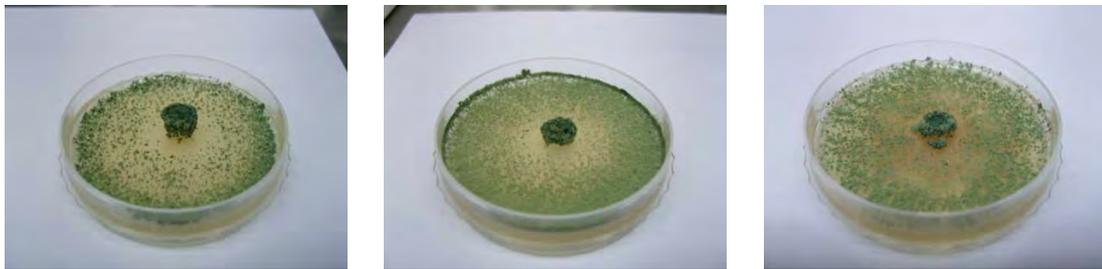
Avicel

CMC

Barley straw

그림 3.3-11. Mycelial plug placed on the fungal growth media

6. 30 °C에서 plate 표면을 mycelium이 다 덮을 때 까지 배양한다(약 2일) (그림 3.3-12).



Avicel

CMC

Barley straw

그림 3.3-12. Full mycelial growth on ATCC cellulose media

7. 배양 종료 후 처음 고체배지에 올려놓았던 mycelial plug을 제거하였다.

8. 균체와 agar 전체를 칼로 작은 조각(5 mm)으로 조각내어 25 ml의 0.05 M sodium acetate buffer(pH 5.5)에 넣고 2시간 30분 동안 흔들며 enzyme을 추출한다 (그림 3.3-13).

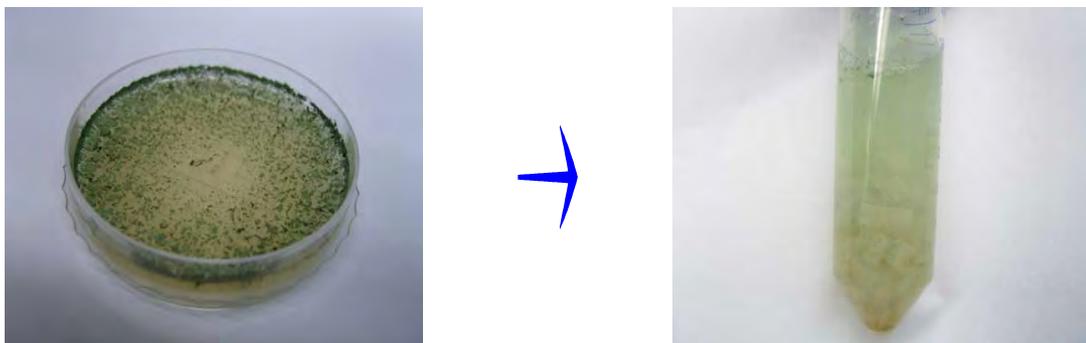


그림 3.3-13. Enzyme extraction

9. 4,000 rpm으로 원심 분리하여 상등액을 사용한다.

10. 다음과 같은 여러 기질(1%)을 섬유소분해 효소능의 측정을 위해 사용하였다.

- ① Carboxymethyl cellulose(CMC, low-viscosity Sigma C5678)
- ② Avicel(Avi, FMC type PH-101, 50 μ m)
- ③ Filter paper (FP, 7 mm disk of Whatman #1 filter paper)
- ④ Cellobiose(CB, Sigma C7252)
- ⑤ Barley straw
- ⑥ Arabinoxylan(XY, from Birchwood, Sigma X0502)
- ⑦ Pectin(PT, Junsei Chemical)

11. 각 효소 측정 기질을 96 well plate(용량 : 1 ml/well)에 50 μ l 씩 넣고 추출된 효소용액을 50 μ l 넣었다 (그림 3.3-14).

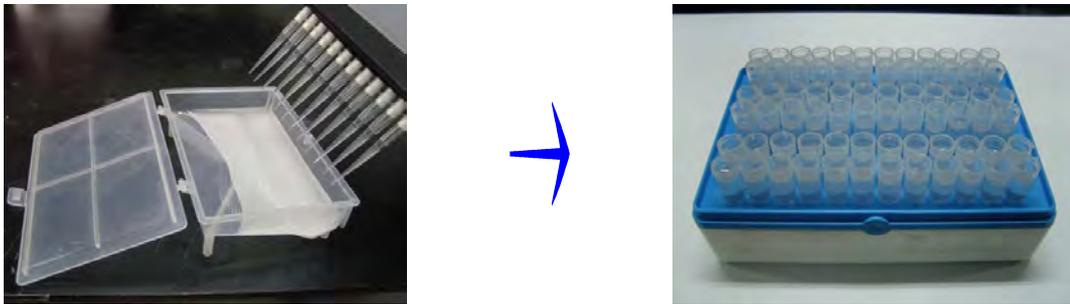


그림 3.3-14. 96 well plate with a capacity of 1 ml/well

12. 50 °C water bath에서 30분간 반응시켰다.

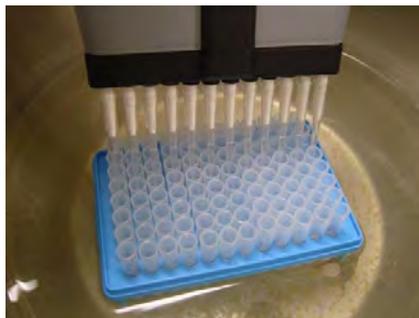


그림 3.3-15. Incubation of 96 well plate at 50 °C for 30 min

13. DNS method로 생성된 환원당을 측정하였다.

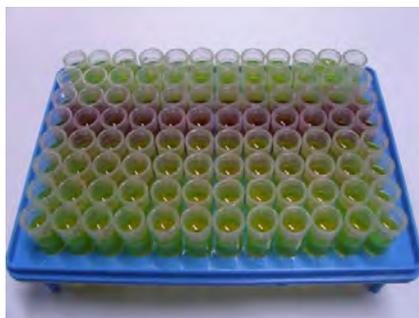


그림 3.3-16. Measurement of reducing sugar with DNS method

14. 96 well plate(용량: 300 $\mu\ell$ /well)에 다시 옮겨 ELISA reader로 OD 값을 측정하였고, 이로부터 환원당량을 계산하였다.

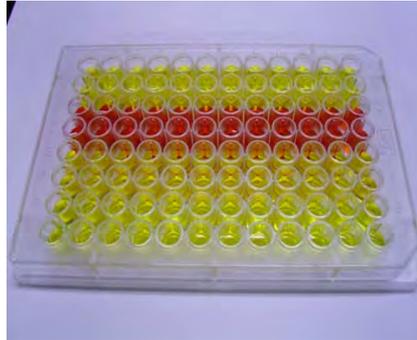


그림 3.3-17. Measurement of optical density using ELISA

15. 실험 후 다음과 같은 결과를 얻었다 (표 3.3-14).

표 3.3-14 Hydrolysis of celluloses by microbial culture extracts

Growth media	Species	Activity on substrate μM reducing sugar released/min						
		CMC	Avi	FP	CB	BS	XY	PT
Barley straw	KACC40517 (<i>Trichoderma reesei</i>)	1.18	0.36	0.53	4.66	1.74	2.85	2.98
CMC		3.63	4.15	0.87	6.34	1.69	3.07	1.65
Avicel		3.03	1.35	1.22	4.66	1.30	2.79	3.20
Barley straw	KACC40885 (<i>Trichoderma harzianum</i>)	3.54	3.54	0.66	2.08	1.00	5.34	1.48
CMC		4.41	4.71	0.79	2.51	1.78	2.76	1.78
Avicel		1.61	3.24	1.48	3.98	1.05	2.26	1.18
Barley straw	KACC40126 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	2.34	3.67	0.66	3.42	1.99	3.04	3.37
CMC		5.18	8.07	0.92	6.39	2.47	4.16	2.90
Avicel		2.94	3.50	2.38	5.35	1.26	2.67	2.17
Barley straw	KACC40516 (<i>Trichoderma pseudokoningii</i>)	0.87	3.76	0.75	4.10	0.96	3.78	1.13
CMC		4.79	6.52	0.79	8.02	2.68	3.26	2.42
Avicel		0.70	4.23	1.43	4.88	1.00	2.39	1.00
Barley straw	KACC41058 (<i>Pythium oedoehilum</i>)	0.70	3.37	1.22	9.44	1.48	2.57	3.24
CMC		0.92	8.76	1.18	4.88	2.12	2.82	3.63
Avicel		0.83	6.26	1.26	8.71	2.21	1.33	3.11
Barley straw	KACC40129 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	4.32	4.58	0.75	11.08	1.00	1.95	8.11
CMC		0.66	12.33	0.92	8.15	2.12	12.38	33.17
Avicel		0.49	4.58	1.30	9.79	0.92	2.42	8.11
Barley straw	<i>Coniochaeta sp</i>	4.71	3.24	0.87	10.91	0.66	21.87	8.80
CMC		7.51	4.97	1.52	10.13	1.61	20.44	2.55
Avicel		3.20	4.53	0.70	8.37	0.75	8.31	1.48
Barley straw	45 (<i>Streptomyces thermocoprophilus</i>)	0.40	1.69	0.66	8.58	0.92	1.33	0.96
CMC		0.96	3.89	0.87	8.88	1.18	1.71	2.47
Avicel		0.66	3.03	0.92	10.13	1.30	1.61	2.17
Barley straw	45 (Broth Culture) (<i>Streptomyces thermocoprophilus</i>)	6.86	1.75	2.94	12.79	1.71	42.01	4.00
CMC		0.95	1.77	1.33	12.19	1.66	1.28	3.08
Avicel		1.38	0.86	0.71	13.38	0.52	0.57	1.62

- 결과 분석으로 각 균주의 섬유소 분해 효소의 활성과 각 배지 조성에 따라 효소 활성을 한번에 측정이 가능하다. 따라서 이 개발된 방법은 간편하게 여러 섬유소기질에 대한 분해활성을 간편하게 한번에 측정할 수 있는 유용한 방법이다.
- *Trichoderma reesei*를 control 균주로 정하고 위와 같은 방법으로 실험 시 control 균주 보다 좋은 섬유소 분해 효소를 생산하는 균주를 쉽게 찾을 수 있다.
- 각 기질 분해능이 가장 우수한 균주는
- CMC : 3(*Coniochaeta* sp), avicel : KACC40129(*Rhizoctonia solani*), filter paper : KACC40126(*Rhizoctonia solani*), cellobiose : KACC40129(*Rhizoctonia solani*), barley straw : KACC40516(*Trichoderma pseudokoningii*), xylan : 3(uncultured fungus), pectin : KACC40129(*Rhizoctonia solani*) 이었다. 특히 *Rhizoctonia solani*는 식물 병원성 균으로서 식물체 침입 시 강력한 섬유소 분해효소를 필요하기 때문으로 해석된다.

표 3.3-15 Result of survey of reference on the isolated and identified strains with high cellulase activity

Strain	Identified scientific name (Similarity, %)	Reference	Content
YP6-6-3 (From national park)	<i>Coniochaeta</i> sp.	None	None
YP6-7-7 (From national park)	<i>Bacillus tequilensis</i> (100%)	None	None
3-84 (From sawdust)	<i>Streptomyces brasiliensis</i> (98.649%)	None	None
3-15 (From Livestock Research Institute)	<i>Pencillium oxalicum</i> (100%)	Yin Li et al. (2007) Pallavi Dwivedi et al. (2009) Jose Luis copa-patino et al. (1990)	Xylanse, β -glucosidase, 만 측정하고 다른 Cellulase 활성 측정 없음
7-8 (From Livestock Research Institute)	<i>Trichosporon asahii</i> (100%)	장계승 (2007) Comparative studies on morphologically similar <i>Trichosporon</i> species.	효소활성을 CMC 배지에서 투명한으로만 측정
3-9 (From solis near to Volcano)	<i>Streptomyces thermocoprophilus</i> (99.103%)	Kim et al. (2000)	Xylan 분해능 존재. CMC를 탄소원으로 사용못함.

Ref. Abstract Search Site : <http://www.sciencedirect.com>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, <http://www.riss4u.net>.

- 표 3.3-15에서 섬유소 분해능이 우수한 6점의 균주들은 그 cellulase 활성이 과거에 알려지지 않은 균주들이다. *Pencillium oxalicum* 경우는 xylanase, β -glucosidase가 알려져 있으나 다른 효소들의 활성은 아직 보고되지 않았고, *Trichosporon asahii*의 CMCase 활성은 보고되었으나 다른 효소들에 대한보고는 없다. 또한 *Streptomyces thermocoprophilus*는 xylan분해능만 알려져 있고 다른 효소활성은 보고된 적이 없다.
- 본 연구결과 문헌 기록에 없는 6주의 고효성 섬유소분해효소 생산균주를 발견하였고, 이들의 여러 기질에 대한 활성을 분석하였다.

(2) 선별된 균주 *T. reesei* Rut C-30와 YP3-6-3의 효소 생성량 측정

- 배양기질로는 시약급 원료인 CMC, xylan, avicel, pectin을 사용하였다. 각각의 기질을 0.5%(w/v)으로 하여 250 ml flask에서 ATCC cellulose medium 907 액상배지에 한개 콜로니 균체를 접종한 후 30 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하여 배양액을 12,000 rpm으로 원심 분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였다. 여러 시약급 기질에서 생산된 두 균주의 FPA를 측정 비교 하였다.
- 선별된 YP3-6-3균주의 섬유소 분해효소 활성을 기존에 전 세계적으로 잘 알려진 *T. reesei* Rut C-30균주와 시약급 원료인 CMC, xylan, avicel, pectin의 기질로 CMCase 생산량을 측정한 결과(그림 3.3-18) *T. reesei*은 CMC에서 14.8 U/ml, xylan에서 7.87 U/ml, avicel에서 7.82 U/ml, pectin에서 8.48 U/ml으로 나타났으며, YP3-6-3의 실험결과 CMC에서 6.37 U/ml, xylan에서 3.37 U/ml, avicel에서 2.48 U/ml, pectin에서 1.78 U/ml으로 나타났다. 실험 결과 시약급 원료들로부터 YP3-6-3 균주가 *T. reesei* 보다 상대적으로 적은 섬유소 분해효소 생산능이 상대적으로 적지만 값이 저렴한 천연 섬유소원료를 사용하고 발효생산 조건의 최적화를 통해 섬유소 분해능 생산 단가를 낮출 수 있을 것이라 예상된다.

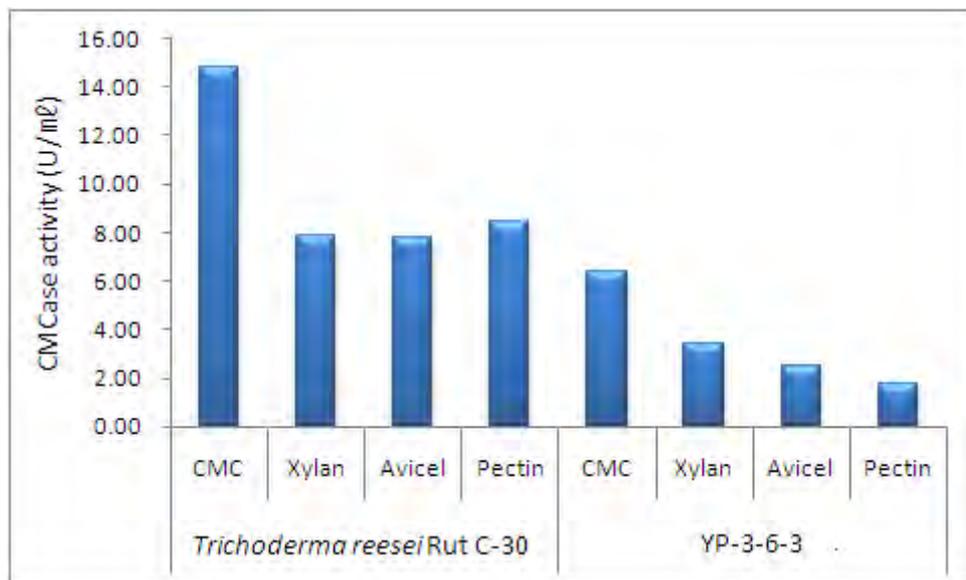


그림 3.3-18. Production of CMCase by *T. reesei* and isolate YP3-6-3 from different substrates

나. 스케일이 축소된 간편 탐색기법 개발

- 수많은 균주들 가운데 섬유소 분해효소를 생산할 수 있는 균주를 선별하기 위한 탐색 단계에서 주로 교반을 통한 진탕배양이 이루어진다. 이 과정에서 기존의 플라스크를 사용하는 진탕배양 방법은 많은 양의 시약, 물, 그리고 기질 등이 소모된다. 또한 섬유소 분해효소 활성을 측정하기 위한 기존의 방법들은 상당한 시간이 소요되고 측정을 위한 많은 양의 시약 및 효소가 낭비 되었다. 따라서 섬유소 분해효소 생산을 위한 배양방법을 축소화하고, CMCCase, XYL, BGL, β -xylosidase (BXL), 그리고 cellobiohydrolase (CBH)에 대한 축소된 활성측정 방법을 개발하였다.

(1) 대상균주 및 접종원과 배양액의 준비

- 대상균주로서 담자균과 자낭균 대표적인 *Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293와 *Trichoderma harzianum* KUC5182을 각각 사용하였다. 담자균인 *P. chrysosporium* KCTC6293는 1개의 agar 플러그를, 포자가 생성되는 자낭균인 *T. harzianum* KUC5182의 경우에는 10^6 spores/mL의 농도로 10 mL의 Mandels 배지(Juhász et al. 2005)에 접종하였으며, 탄소원 및 기질로서 5% 벧짚 (w/v)을 포함하였다.

(2) 축소화된 섬유소분해효소 생산 과정

- 섬유소분해효소 생산을 위한 배양과정에서, 기존에 250 mL의 플라스크를 이용하던 반해 축소화된 배양에서는 멸균된 50 mL의 conical centrifuge tube (SPL, Korea)를 사용하였고, 실리스토퍼를 준비하였다. 실리스토퍼와 배양액은 121 °C에서 15분간 멸균을 하였으며 벧짚은 30분간 멸균하였다. 멸균 후, 10 mL의 배양액과 0.5 g의 벧짚은 바로 conical tube에 담고 실리스토퍼로 입구를 막아주었다. 배양은 각각 3반복씩 진행하였으며, 모든 tube 들은 50개의 tube를 꽂을 수 있는 철선의 conical tube rack에 끼워 이 rack을 50° 각도를 준 스탠드에 장착을 하였다. conical tube rack이 장착된 스탠드는 회전식 진탕기에 끼워 100 - 250 rpm으로 회전하면서 28 °C에서 7일간 진탕배양 하였다.
- 기존에 주로 이용되었던 250 mL의 플라스크를 이용하는 방법에서는 50 mL의 Mandels 배지를 넣고 동일한 방법으로 균주를 접종하여 28 °C, 150 rpm에서 7일간 진탕배양 하였으며, 이 방법에 의한 효소활성은 본 연구에서 개발한 축소화된 방법과 비교하여 축소화된 방법의 이용 가능성을 평가하였다.

(3) 축소화된 효소활성 측정

- 축소화된 효소활성 측정 방법에서는 필요한 효소와 시약의 양을 CMCCase와 XYL의 경우에는 20배와 BGL, BXL, 그리고 CBH에 대해서는 5배 줄이도록 하였다. 또한 micro PCR tube와 96-well microplate를 사용하여 많은 양의 샘플을 동시에 측정할 수 있도록 하였다. 다양한 상용화 효소를 사용하여 축소화된 효소활성 측정 방법과 기존의 방법을 비교하였다.

(가) CMCCase 활성 측정

- Ghose (1987)에 의한 기존에 사용된 방법을 축소화하여 DNS 방법을 따라 환원당을 측정 하였다. micro PCR tube에 25 μ L CMC, 25 μ L의 sodium citrate buffer (50 mM, pH 4.8),

그리고 25 μL 의 효소액을 넣었다. 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 반응한 후, 150 μL DNS 시약을 첨가하고 각각 5분 동안 boiling과 cooling 과정을 실시하였다. 33 μL 의 샘플을 취하여 165 μL 증류수와 혼합한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) XYL 활성 측정

- Bailey et al. (1992) 기존의 방법을 축소화하여 DNS 방법에 따라 환원당을 측정하였다. Sodium citrate buffer (50 mM, pH 5.3)에 넣은 1% birchwood xylan 81 μL 와 7 μL 효소액을 혼합하여 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응하였다. 135 μL DNS를 넣고 5분간 boiling과 cooling 과정을 실시하여 발색된 샘플 200 μL 은 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(다) BGL, BXL 그리고 CBH 활성 측정

- BGL, BXL, 그리고 CBH의 활성 측정을 위해 *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (N7006, Sigma), *p*-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (N2132, Sigma), 그리고 *p*-nitrophenyl- β -D-cellobioside (N5759, Sigma)을 각각 기질로 사용하였다.
- 총 200 μL 의 혼합액은 10 mM의 기질 20 μL 과 효소액 20 μL 을 포함한다. 이것을 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 5, 10, 그리고 30분간 반응을 시켜준 후 20 μL 의 2 M Na_2CO_3 을 혼합액에 넣어주었다. 5분 후, 200 μL 의 혼합액은 96-well microplated에 넣어 microplate spectrophotometer로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 실험결과

- 본 실험에서 사용된 균주로는 섬유소 분해효소를 분비하는 것으로 잘 알려져 있는 대표적 담자균 및 자낭균으로서 *Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293과 *Trichoderma harzianum* KUC5182이 사용되었다. 효소 생산을 위해 Mandels 배지를 사용하였으며 MEA 배지에서 키운 각각의 곰팡이를 접종하고, 탄소원으로 5% (w/v) 벧짚을 첨가하여 28 $^{\circ}\text{C}$ 에서 7일간 진탕 배양하였다. 우선 효소 생산단계에서 배양의 small-scale 방법을 개발하기 위하여 10 mL의 배양액을 함유한 50 mL의 conical tube를 사용하였고 conical tube rack을 이용하여 50 $^{\circ}$ 각도로 기울여 진탕배양을 실시하였다. 하지만 기존의 교반 rpm에 관한 정보가 존재하지 않아 최적조건을 설정하기 위해 100에서 250 rpm까지 50 rpm 간격으로 shaking하였다. 그 결과 그림 3.3-19와 같이 두 균주 모두 대체로 150 rpm에서 가장 많은 효소를 분비하는 것으로 나타났다.
- 기존에는 50 mL의 배양액을 함유하는 250 mL Erlenmeyer flask 을 사용하여 150 rpm에서 일반적으로 효소생산이 이루어졌다. 따라서 본 연구에서 개발한 축소된 배양방법을 기존의 배양방법과 비교하기 위하여 각각의 최적조건에서 두 가지 배양방법이 동시에 이루어졌으며, 표 3.3-16에 정리한 바와 같이 모든 효소가 기존의 flask 배양에서보다 conical tube 에서 더 높은 활성을 나타내었음이 확인되었다. 즉, 효소를 생산하는 균주의 screening 단계에서는 본 연구에서 개발한 축소된 배양방법을 사용하기에 적당하다고 판단하였다.

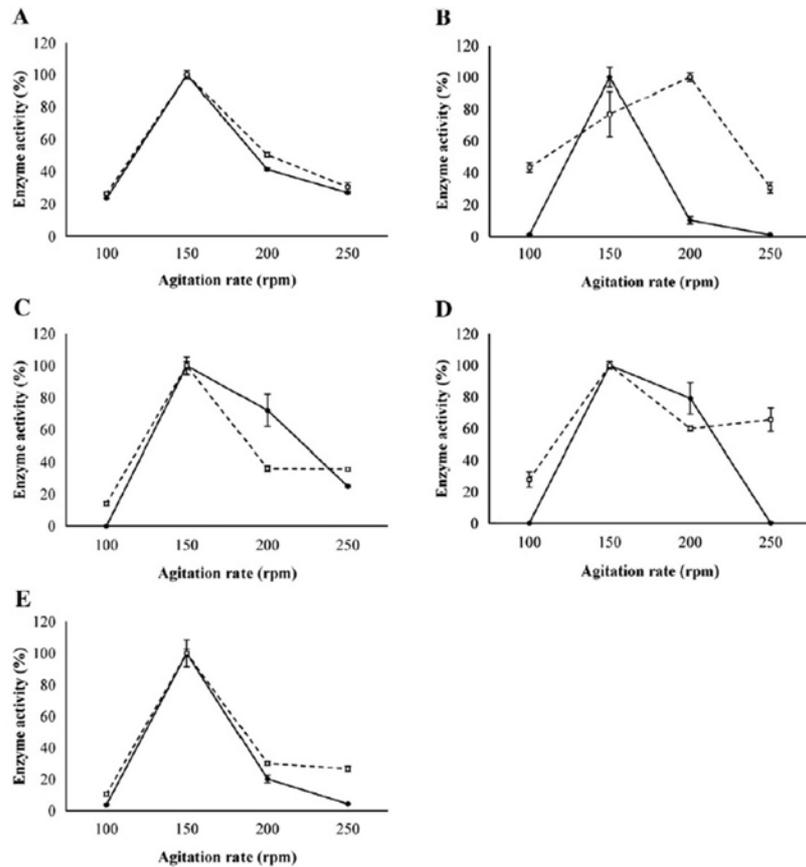


그림 3.3-19. Cell culture agitation rate and optimal production of various enzymes secreted from *Phanerochaete chrysosporium* KCTC6293(-●-) and *Trichoderma harzianum* KUC5182(-□-). A, CMCCase; B, xylanase; C, β -glucosidase; D, β -xylosidase; and E, cellobiohydrolase

표 3.3-16 Enzyme activities (U/mL) and protein concentration (mg/mL) obtained from flask or conical tube cultivation of fungi at 150 rpm

Enzymes	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>		<i>Trichoderma harzianum</i>	
	Flask	Conical tube	Flask	Conical tube
CMCase	0.63 ± 0.13	1.47 ± 0.03	1.08 ± 0.25	1.39 ± 0.04
Xylanase	14.58 ± 1.68	159.96 ± 11.95	239.85 ± 43.88	1287.79 ± 102.12
β -Glucosidase	0.02 ± 0.00	0.30 ± 0.04	0.57 ± 0.12	1.68 ± 0.12
β -Xylosidase	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.09 ± 0.01
Cellobiohydrolase	ND ^b	0.05 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.15 ± 0.02
Protein (mg/ml)	0.39 ± 0.09	0.46 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.32 ± 0.02

^a All experiments were carried out in triplicate for each cultivation method.

^b Not detected.

□ 다음으로 축소된 효소활성측정 방법(micro-assay)을 적용하기 위하여 기존의 방법 (macro-assay)에서 사용된 시약 및 효소의 양을 줄이도록 하였다. CMCCase 와 xylanase의 활성측정에서는 20배, β -glucosidase, β -xylosidase 및 cellobiohydrolase의 활성측정에서는 5 배 축소된 양의 시약 및 효소를 사용하였다. 또한 96-well microtiter plate를 사용하여 96 개의 sample을 동시에 측정하였다. 축소된 방법의 정확성을 증명하기 위하여, 환원당을 측정하기 위한 standard curve를 나타내어 기존의 방법과 비교하였다. 그림 3.3-20에서 보는 바와 같이 두 방법 모두 정확하게 glucose, xylose 및 p-nitrophenol의 양을 정확하게 측정할 수 있는 것으로 나타났다.

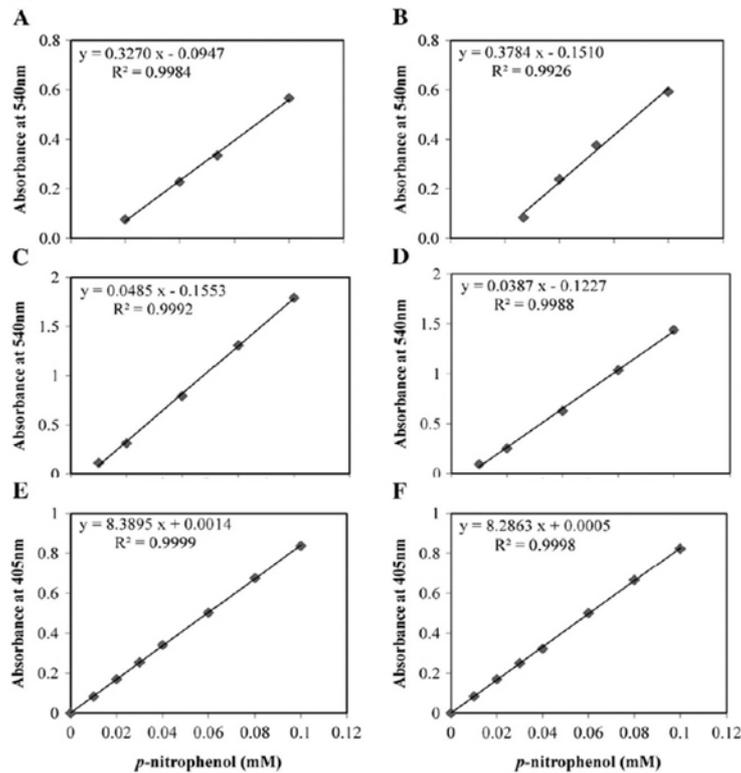


그림 3.3-20. Standard curves for measuring the release of glucose, xylose, and p-nitrophenol. A, C and E curves for macro-assay; and B, D, and F curves for micro-assay

□ 또한 다양한 상업용 효소를 이용하여 축소된 효소활성 측정 방법이 기존의 방법과 비슷한 수준으로 생산된 효소를 검출할 수 있음을 증명하였다 (표 3.3-17). 단, β -xylosidase와 xylanase의 경우 두 방법이 통계적으로 유의하지 않다는 결과는 측정된 10개의 sample 간의 활성 변이가 매우 낮았기 때문이라 할 수 있으며, 활성 수치상으로는 차이가 거의 없으므로 이는 screening 단계에서 크게 영향을 주지 않는다고 판단된다.

표 3.3-17 Statistical comparison of commercial enzyme activities (U/mL) between macro- and micro-assays

Repetitions	CMCase		Cellobiohydrolase		β -Glucosidase		β -Xylosidase		Xylanase	
	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro	Macro	Micro
1	476.4	452.5	14.0	14.2	352.5	337.1	64.8	63.2	5623.0	5262.0
2	473.8	463.2	14.0	14.5	348.7	344.8	66.0	63.3	5842.7	5184.0
3	490.7	466.8	14.3	14.5	364.3	327.2	65.7	62.3	6051.4	5292.3
4	489.6	472.6	14.3	14.4	352.2	339.5	65.6	63.0	6004.7	5305.3
5	483.6	471.0	14.4	14.4	348.4	362.7	65.3	62.7	5977.2	5162.4
6	476.0	483.3	14.5	14.8	349.3	370.4	66.0	63.1	5922.3	5192.7
7	481.3	483.3	14.4	14.4	357.9	364.1	66.2	63.7	5848.1	5456.8
8	489.2	480.4	14.7	14.7	356.6	346.3	65.8	64.6	5905.8	5326.9
9	490.0	488.2	14.2	14.7	366.8	364.6	65.0	64.1	5853.6	5487.2
10	478.1	490.1	14.7	14.6	350.9	366.5	65.6	64.4	5705.3	5322.6
Average	482.9 ± 6.6	475.1 ± 12.0	14.4 ± 0.2	14.5 ± 0.2	354.8 ± 6.5	352.3 ± 15.1	65.6 ± 0.4	63.4 ± 0.8	5873.4 ± 131.7	5299.2 ± 108.7
$t_{0.05}$	2.10 ^a		2.10 ^f		2.18 ^d		2.10 ^e		2.10 ^f	

^a All data obtained in triplicate. T-test: The data obtained from the micro-assay were compared to those obtained from the macro-assay.

^b The calculated t-value is 1.78, which is below the critical t-value of 2.10 at $P=0.05$ and $DF=18$.

^c The calculated t-value is 1.76, which is below the critical t-value of 2.10 at $P=0.05$ and $DF=18$.

^d The calculated t-value is 0.47, which is below the critical t-value of 2.18 at $P=0.05$ and $DF=12.3$.

^e The calculated t-value is 7.84, which is above the critical t-value of 2.10 at $P=0.05$ and $DF=18$.

^f The calculated t-value is 10.63, which is above the critical t-value of 2.10 at $P=0.05$ and $DF=18$.

□ 이와 같이 본 연구에서 개발한 micro-assay는 많은 수의 균주를 한 번에 다룰 수 있으며 적은 양의 시약 및 기질을 사용함으로써 자원의 낭비를 줄이고 훨씬 더 수월하게 효소측정을 함으로써 시간 절약 및 비용 절감에 크게 기여할 수 있다.

다. 신규 섬유소분해효소 탐색 기법 개발

- 혐기성 세균인 *Clostridium cellulovorans*가 형성하는 셀룰로솜은 각 Cellulosomal 단위효소와 Scaffolding Protein에 의하여 구성이 되며 Dockerin-Cohesin Interaction에 의해 복합체를 형성함. Dockerin-Cohesin Interaction을 이용하여 보다 정확한 셀룰로솜 단위 효소 분석들을 분석. 코히신 도메인을 *E. coli* 발현벡터(pET22b)에 구축 후 IPTG Induction을 통한 단백질 발현. 발현되어진 코히신 도메인을 His binding column을 이용하여 정제 후 이의 형광 표지를 통하여 바이오 마커를 구축함. 구축된 형광 표지 코히신은 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 결합을 하여 셀룰로솜 형성 효소들만 선택적으로 탐지 (Dockerin-Cohesin Interaction). 셀룰로솜 구성 효소의 분석시 기존의 Coomassie Blue 염색법으로 염색 시 약 70종의 단백질을 탐색하였지만 본 연구를 통하여 개발되어진 Cohesin Marker를 이용하여 염색시에는 약 11개 정도의 Cellulosomal Subunit만이 탐색이 되었음. 2D-PAGE를 이용하여 분리되어진 단위효소들을 분석하여 이미 알려진 셀룰라아제가 아닌 새로운 효소로 탐색되어진 부분을 Spotting하여 Peptide Sequence를 분석.
- 각기 다른 탄소원 (Avicel, Xylan, AXP)을 이용하여 배양시에 셀룰로솜을 구성하는 단위 효소들의 구성이 달라짐을 확인. 이중 기존의 셀룰로솜 구성 효소로 알려지지 않으며 특정 탄소원에서 과 발현 되어지는 Spot을 Spotting 하여 ESI MS/MS를 통한 Amino Acid Sequencing을 분석. 분석되어진 Amino Acid 서열을 Homology Searching한 결과 기존의 셀룰라아제와의 유사성을 나타내는 서열과 현재까지 알려지지 않은 서열들이 분석이 되었음. 각각의 Amino Acid를 Degenerate PCR을 통하여 Primer제작 후 새로운 효소 탐색.

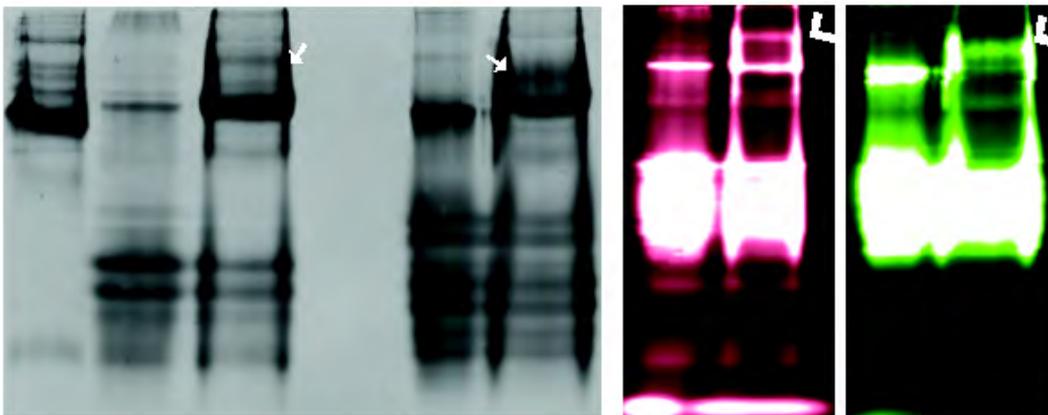


그림 3.3-21. 코히신 바이오 마커의 개발

- Cohesin-Dockerin Interaction의 Binding Selectivity 와 관련된 혐기성 미생물의 Cellulosome 형성 원리 분석을 통한 섬유소 분해 효소 복합체의 선택적 결합 및 제조합을 통한 유연한 분해 기작 규명하는 것을 목표로 함.
- Cohesin-dockerin interaction을 이용하여 바이오매스별 서로 다른 코히신 마커에서의 셀룰로솜 단위 효소의 발현 변화 관찰.

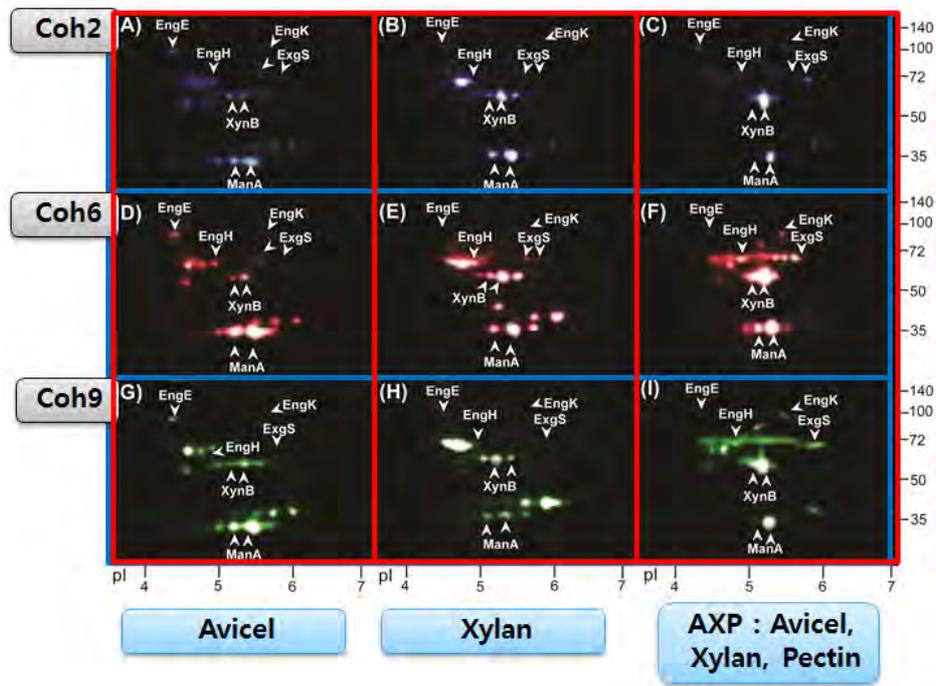


그림 3.3-22. 서로 다른 코히신 마커를 이용한 *Clostridium cellulovorans*의 셀룰로솜 단위 효소의 프로파일링 변화 관찰

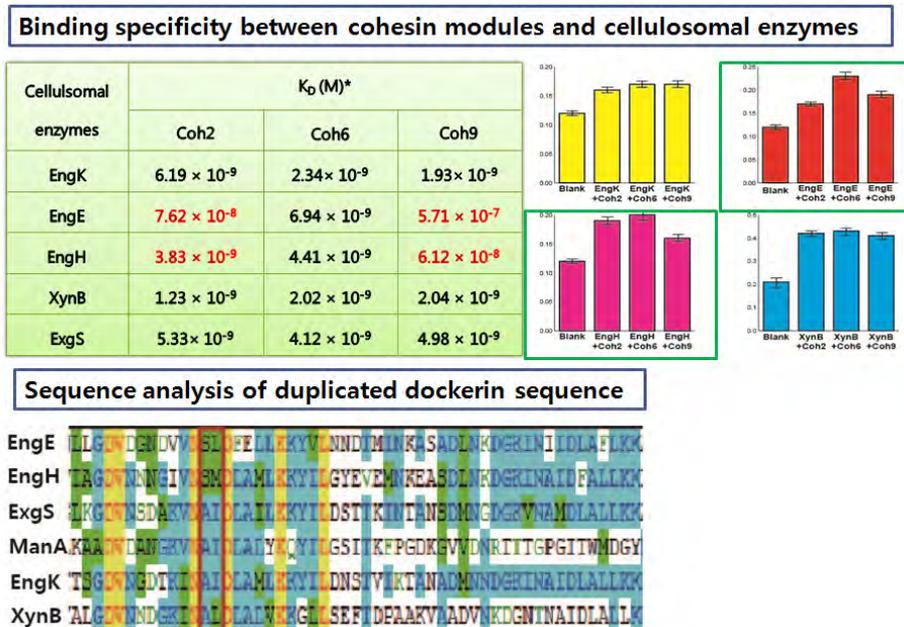


그림 3.3-23. Cohesin-Dockerin 상호작용이 가지는 Binding specificity 및 Dockerin Module의 Duplicated Sequence

- Site direct mutation을 이용하여 Dockerin Module 및 Cohesin Module의 Selective binding motif의 규명.
- 엔도글루카네이즈 EngE가 가지는 Dockerin Module의 아미노산을 치환 하였을 경우 (SL->AI) 기존 Cohesin 6에 보이던 Selectivity가 Cohesin 2 와 Cohesin 9 에 더 높은 Binding Affinity를 가지는 것을 확인함.

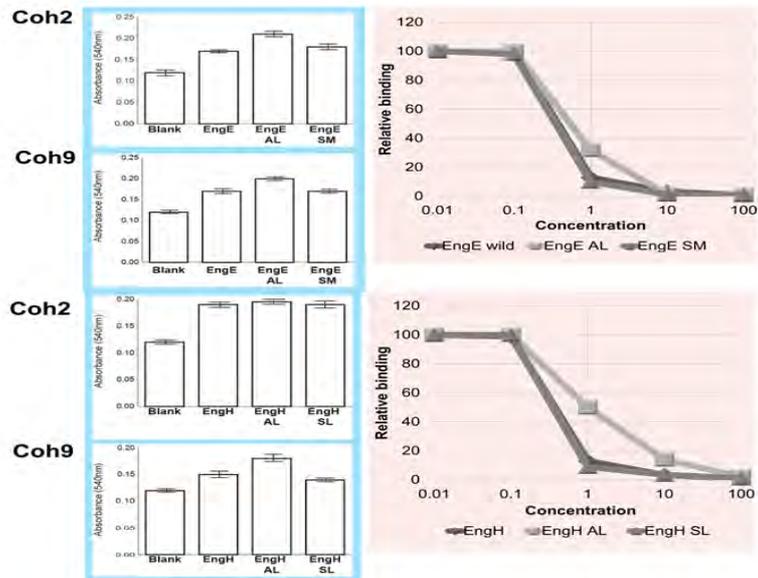


그림 3.3-24. Cellulosomal enzymes에서의 dockerin 부분 mutation

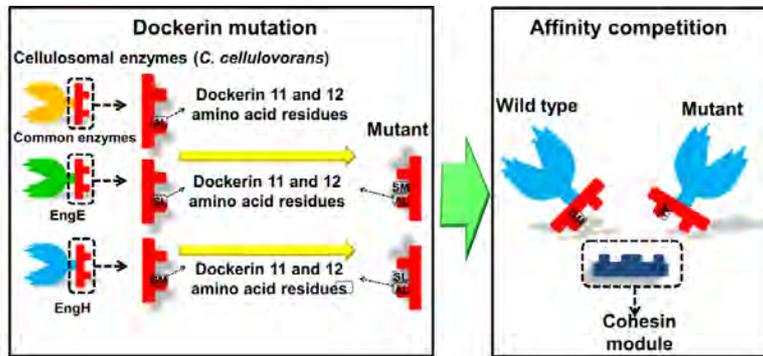


그림 3.3-25. CbpA의 Cohesin module과 Cellulosomal enzymes의 Mutant Dockerin사이의 ELIA

3. 선발된 균주의 배양 조건 탐색 및 최적화

가. 선발된 균주로부터 효소 생산을 위한 최적 배양 조건 탐색

(1) 효소 생산에 영향을 미치는 인자

(가) 기질이 효소 생산에 미치는 영향

□ 배양기질로는 여러 가지 천연 섬유질 원료로서 갈대, 억새, empty fruit bunch(EFB), 벚짳, 보리짳를 비교 기질로 사용하였다. 각각의 기질을 0.5%(w/v)로 하여 250 ml flask에서 ATCC cellulose medium 907 액상배지에 한개의 콜로니 균체를 접종한 후 30 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하고 배양액을 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였다.

(나) 온도가 효소 생산에 미치는 영향

□ 기질이 효소 생산에 미치는 영향의 실험결과에서 가장 우수하였던 보리짳과 벚짳을 기질로 하여 온도가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 보리짳를 0.5%(w/v)으로 하여 250 ml flask에서 ATCC cellulose medium 907 액상배지에 한개 콜로니 균체를 접종한 후 27, 30, 33, 36, 39 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하여 배양액을 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였으며, 생산된 효소의 CMCase, FPA, β -glucosidase, avicelase, xylanase, pectinase 효소활성 측정을 통해 기질에 따른 효소 생산량을 비교 분석하였다.

(다) pH가 효소 생산에 미치는 영향

□ 온도가 효소 생산에 미치는 영향의 실험결과에서 가장 우수하였던 33, 36 °C에서 초기 pH가 효소 생산에 미치는 영향을 알아보았다. 보리짳을 0.5%(w/v)으로 하여 250 ml flask에서 ATCC cellulose medium 907 액상배지를 만들고 NaOH와 HCl을 이용하여 배지 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조절한 후 한개 콜로니 균체를 접종한 후 36 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하였다. 그 배양액을 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였으며 생산된 효소의 여러 효소활성 측정을 통해 초기 pH에 따른 여러 효소 생산량을 비교 분석하였다.

(라) C/N ratio가 효소 생산에 미치는 영향

□ 탄소와 질소의 비율에 따른 생산량을 알아보기 위해 cellulose원으로서 0.5% 보리짳을 함유한 ATCC cellulose medium 907 액상배지(초기 pH 5)에 C/N ratio 3, 5, 7, 9, 11의 비율로 하여 한개 콜로니 균체를 접종한 후 36 °C에서 7일간 150 rpm으로 배양하여 배양액을 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였으며 생산된 효소의 여러 효소활성 측정을 통해 C/N ratio에 따른 여러 효소 생산량을 비교 분석하였다. 여기에서 배지에 첨가한 N량은 0.05% (NH₄)₂SO₄, 0.05% asparagine, 0.05% yeast extract의 3가지 성분을 합한 것으로 구성된 것으로 계산하였다.

(마) 배양 시간에 따른 효소 생산 측정

- ATCC cellulose medium 907 액상배지에 보리짚을 기질로 사용하고 33, 36 °C 온도와 pH 5, C/N ratio 7 비율로 하여 한개 콜로니 균체를 접종한 후 10일간 150 rpm으로 배양하여 매일 배양액을 채취하여 12,000 rpm으로 원심분리한 후 상등액을 효소액으로 사용하였으며 생산된 효소의 효소활성 측정을 통해 배양 일자에 따른 여러 효소 생산량을 비교 분석하였다.

(2) 균주 *Lecytophora* sp. YP3-6-3의 최적 배양 조건

- 선발된 균주 YP3-6-3의 배양 조건을 달리하여 섬유소 분해효소 생산을 위한 최적 배양 조건을 탐색하였다.

(가) 기질이 효소 생산에 미치는 영향

- 여러 가지 천연 섬유질 원료로서 갈대, 억새, EFB, 벚짚, 보리짚을 사용하였으며 각 기질이 생산하는 섬유소 분해능을 측정한 결과(그림 3.3-26) CMCase에서 보리짚이 6.74 ± 0.10 U/ml로 가장 높았으며 EFB도 5.70 ± 0.13 U/ml로 우수한 편이었다. 나머지 기질들은 3.34 ~ 4.56 U/ml 정도의 효소 생산량을 보여주었다. FPA에서 보리짚이 2.61 ± 0.26 U/ml로 가장 높았으며 EFB가 2.49 ± 0.14 U/ml로 우수하였다 나머지 다른 기질들은 1.39 ~ 1.60 U/ml 정도의 효소 생산량을 보여주었다. β -Glucosidase의 경우 모든 기질에서 2.60 ~ 3.34 U/ml 정도의 효소 생산량을 보여주었는데, 이 효소의 경우 기질에 따른 효소 활성이 거의 차이 없는 것으로 나타났다. Avicelase는 보리짚이 2.33 ± 0.29 U/ml로 가장 우수하였으나 나머지 다른 기질들은 비슷하였다. Xylanase의 경우 보리짚이 23.48 ± 1.18 U/ml의 효소 생산량으로 EFB의 11.19 ± 0.86 U/ml 보다 두 배 정도 우수하였으며, 다른 기질들은 5 U/ml 이하로 xylanase에서는 기질에 따른 차이가 매우 심하였다.
- 마지막으로 pectinase의 경우 보리짚이 3.09 ± 0.29 U/ml로 가장 우수하였으며 EFB와 벚짚이 각각 2.65 ± 0.18 U/ml, 2.34 ± 0.12 U/ml로 비슷하였으며 나머지 다른 기질들은 1 U/ml 정도로 나타났다.
- 이에 따라 본 연구에서는 섬유소 분해 효소 생산을 위한 우수 기질로서 보리짚을 선정하게 되었다. 현재까지 순수 정제된 섬유소 기질 외 grass, corn cob, bagasse (Liming and Xueliang, 2004; Sohail *et al.*, 2009)등의 천연 섬유소 원료가 fungi에 의한 섬유소 분해 효소 생산에 사용되어 왔는데, 이들 천연 섬유소 원료들은 정제된 섬유소 원료에 대등하는 양의 섬유소 분해 효소를 생산하였다(Liming and Xueliang, 2004; Sohail *et al.*, 2009). 따라서 이러한 천연 섬유소 원료로부터 섬유소 분해 효소를 생산하는 것은 섬유소 분해 효소 생산비를 줄이는데 큰 역할을 할 것으로 판단된다.

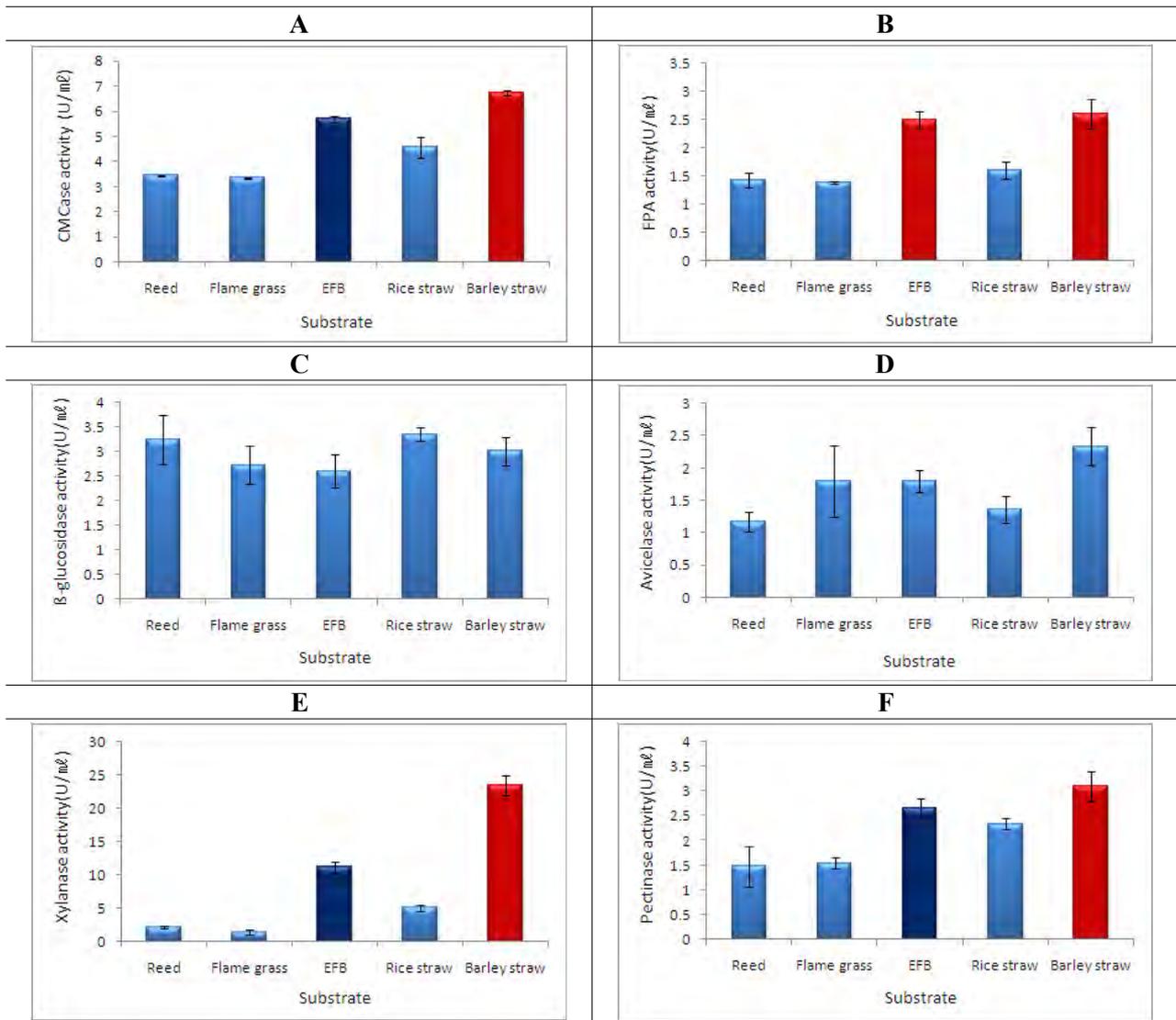


그림 3.3-26. Effect of substrate on the production of cellulases, xylanase, and pectinase by isolated YP3-6-3. A, CMCase; B, FPA; C, β -glucosidase; D, avicelase; E, xylanase; F, pectinase

(나) 온도가 효소 생산에 미치는 영향

□ 가장 우수한 기질인 보리짚을 배지에 첨가하여 온도가 효소생산에 미치는 영향을 조사하였고 그 결과를 그림 3.3-27에 나타내었다. CMCase의 경우 36 °C가 12.28±0.76 U/ml 으로 가장 우수하였으며 그 다음으로 33 °C가 7.74±0.09 U/ml으로 우수하였으며 나머지 다른 온도들은 6 U/ml정도의 효소 생산량을 나타내었다. FPA의 경우 36 °C에서 6.7±0.21 U/ml으로 다른 온도보다 3배 정도 우수 하였으며 다른 온도의 경우에는 2 U/ml정도의 효소 생산량을 나타내었다. β -Glucosidase의 경우 36 °C가 4.63±0.08 U/ml으로 우수하였으며, β -glucosidase의 경우에는 온도에 따른 차이가 1 U/ml 미만으로 크게 차이가 나지 않았다. Avicelase도 모든 온도에서 2 U/ml 정도로 온도에 따른 차이가 나타나지 않았다. Xylanase의 경우에는 36 °C가 65.19±2.55 U/ml이며 그 다음으로 33 °C가 44.93±2.27 U/ml으로 우수하였으며 다른 온도에서는 22 U/ml 정도의 효소 생산량이 나

타났다. Pectinase의 경우 36 °C와 30 °C가 3 U/ml 정도의 효소 생산량을 보였고 나머지 온도에서는 2 U/ml 이하의 효소 생산량을 보였다.

- 온도 실험결과 pectinase와 avicelase는 온도에 따른 효소생산의 차이가 거의 없었고 나머지 다른 효소는 모두 36 °C에서 가장 많은 효소 생산량을 보였다. 이에 따라 여러 효소 생산을 위한 가장 최적 온도는 36 °C으로 선정하였다.

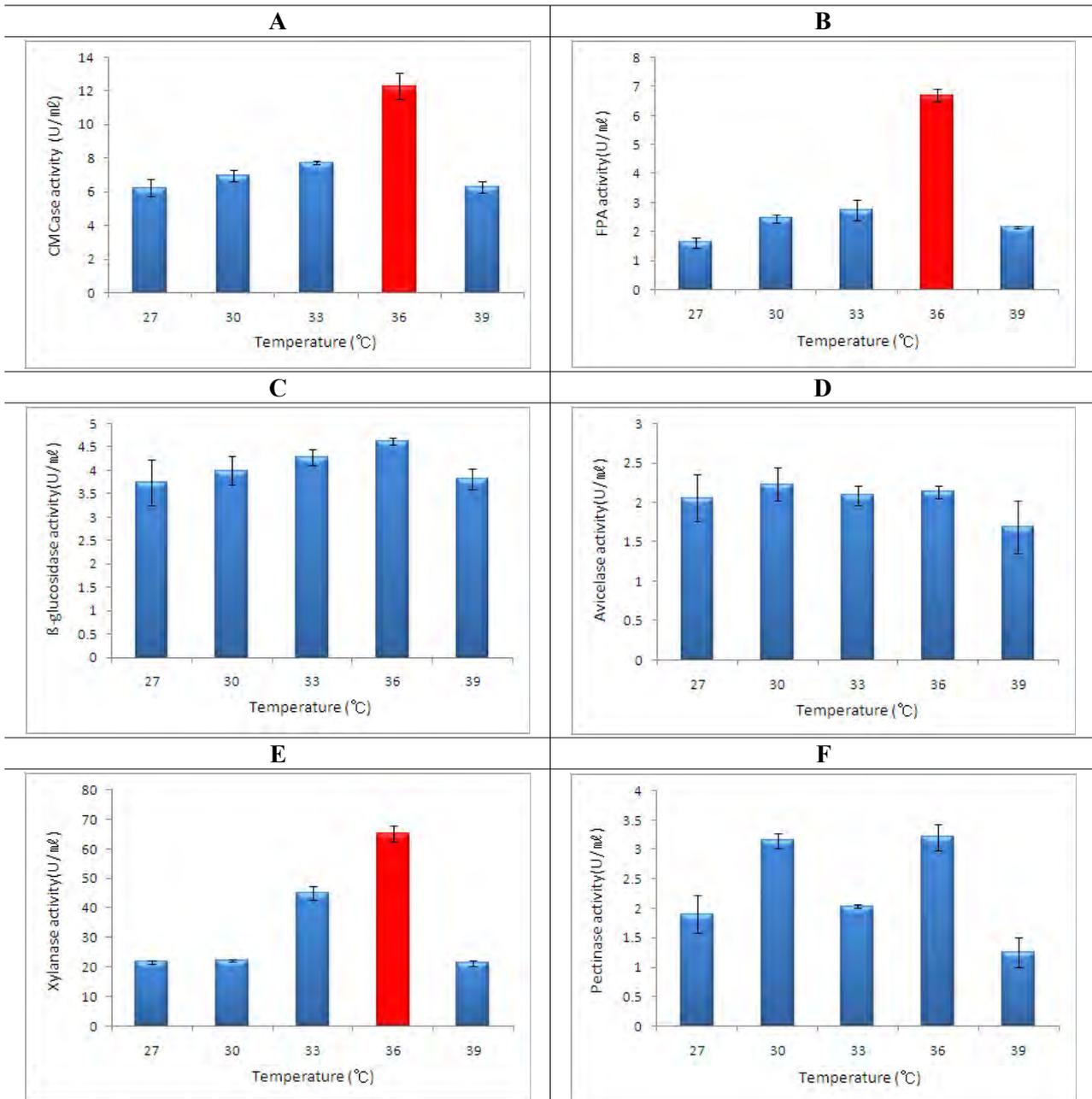


그림 3.3-27. Effect of temperature on the production of cellulases, xylanase, and pectinase by isolated YP3-6-3

(다) pH가 효소 생산에 미치는 영향

□ 최적기질인 보리짚과 최적 배양온도인 36 °C를 사용하여 초기 pH를 변화하여 실험하였으며 HCl과 NaOH 으로 pH를 조정하여 실험하였다. 실험결과(그림 3.3-28)로 CMCase 는 pH 5에서 10.37±0.18 U/ml으로 가장 높은 효소생산량을 보였으며 pH가 높아짐에 따라 효소 생산량이 점점 떨어지는 경향이 나타났으며 pH 4에서도 효소 생산량이 적게 나타났다. FPA의 경우 pH 6에서 5.37±0.44 U/ml으로 효소 생산량이 가장 높았으며 pH 5도 4.12±0.26 U/ml으로 우수하였다. β-Glucosidase의 경우 pH 5에서 4.08±0.26 U/ml으로 가장 우수하였고 avicelase의 경우에도 pH 5가 2.35±0.18 U/ml으로 가장 우수하였으나 두 효소 생산량 모두 pH에 따른 큰 차이는 없었다. Xylanase의 경우 pH 5에서 52.81±3.45 U/ml으로 뚜렷하게 가장 우수하였고 pH가 높아짐에 따라 효소 생산량이 감소하는 결과를 얻었으며 pH 4에서 가장 효소 생산량이 적은 것으로 나타났다. Pectinase의 경우 pH 6에서 4.39±0.10 U/ml으로 pH 5의 4.12±0.31 U/ml와 거의 차이가 없었으며 pH 9에서 가장 효소 생산량이 적게 나타났다. 이에 따라 여러 섬유소 분해 효소 생산에 전반적으로 가장 적절한 배지의 초기 pH는 5인 것으로 판단되었다.

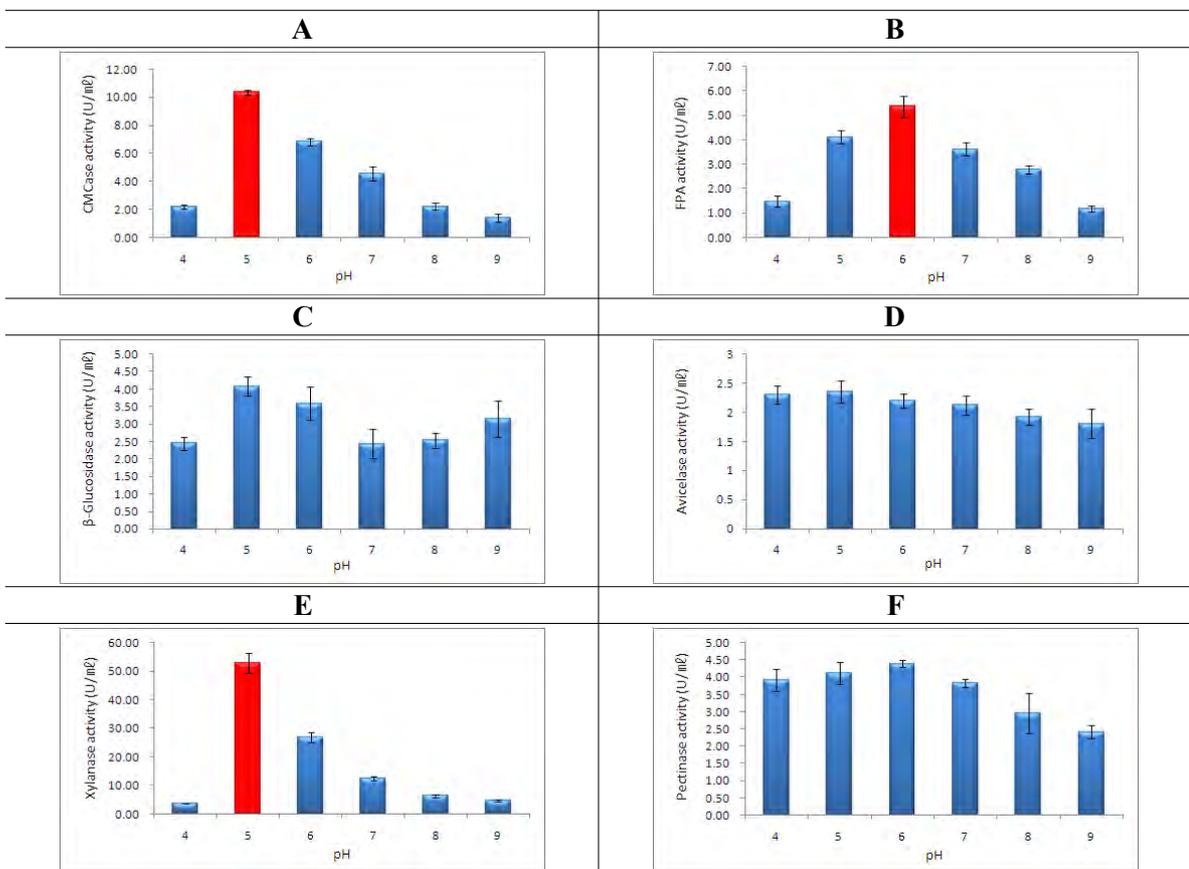


그림 3.3-28. Effect of pH on the production of cellulases, xylanase, and pectinase by isolate YP3-6-3. A, CMCase; B, FPA; C, β-glucosidase; D, avicelase; E, xylanase; F, pectinase

(라) C/N 비율이 효소 생산에 미치는 영향

□ 탄소와 질소의 비율에 따른 효소 생산량을 알아보기 위해 보리짚을 탄소원(C)로 하고 C/N의 비율을 3 (N=0.45%), 5 (0.75%), 7 (1.05%), 9 (1.35%), 11 (1.65%)로 하여 보리짚을 첨가하여 배양하였다(그림 3.3-29). CMCase의 경우 C/N 비율 7이 11.38 ± 0.69 U/ml로 효소 생산량이 가장 높았으며 C/N 비율 3이 8.42 ± 0.70 U/ml로 효소 생산량이 가장 적었다. FPA의 경우 C/N 비율 7이 6.08 ± 0.38 U/ml로 가장 높았다. 그러나 다른 C/N 비율에서도 크게 감소하지 않았다. β -Glucosidase의 경우 C/N 비율 5와 7이 2.7 U/ml 정도로 다른 농도에 비해 우수 하지만 다른 농도에 비해 크게 높지 않았다. Avicelase의 경우 모든 C/N 비율에서 2.3 U/ml로 C/N 비율에 따른 차이가 나타나지 않았다. Xylanase의 경우 C/N 비율 7에서 50.03 ± 2.31 U/ml로 가장 우수한 효소 생산량을 보이며 5 ~ 11 모두 46 U/ml 이상으로 우수하게 나타났다. Pectinase의 경우 C/N 비율 11(1.65%)에서 4.06 ± 0.06 U/ml로 가장 우수하였으며 C/N 비율이 증가함에 따라 효소 생산량도 증가하는 경향이 나타났지만 크게 증가하지는 않았다. 실험 결과 C/N 비율 7이 가장 높은 섬유소 효소 생성을 할 수 있는 것으로 나타났다.

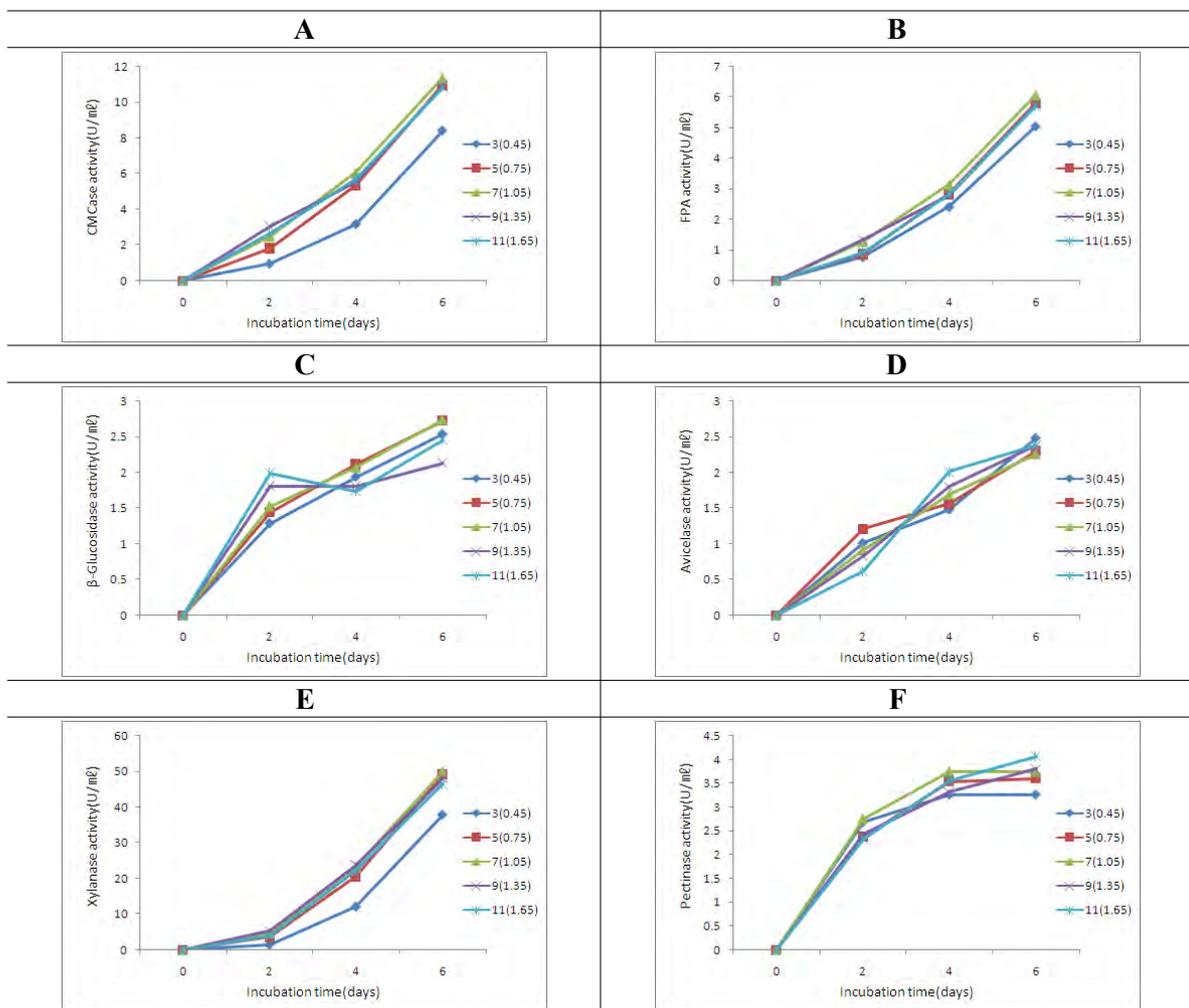


그림 3.3-29. Effect of C/N ratio on the production of cellulases, xylanase, and pectinase by isolated YP3-6-3. A, CMCase; B, FPA; C, β -glucosidase; D, avicelase; E, xylanase; F, pectinase

(마) 배양 시간에 따른 효소 생산 측정

□ 배양일 따른 효소 생산량을 조사하였고 그 결과를 3.3-30에 나타내었다. CMCase 경우 5일째에 11.82 U/ml으로 가장 높은 효소 생산량을 보였으며, 그 이후로는 10일째에도 11.49 U/ml으로 더 이상 효소 생산량이 증가 하지 않았다. FPA의 경우 5~7일째에 6.65 U/ml으로 가장 효소 생산량이 우수하였으나 그 이후로는 감소하여 10일째 4.68U/ml으로 효소 생산량이 감소하였다. β -Glucosidase의 경우 7일째 2.30 U/ml으로 가장 효소 생산량이 우수 하였지만 날짜가 지남에 따라 약간 감소하였다. Avicelase의 경우 6, 7일째 2.4 U/ml으로 가장 우수하였다. Xylanase의 경우 6일째 51.26 U/ml으로 가장 우수 하였으며 10일째에도 49.29 U/ml으로 효소 생산량이 크게 감소하지 않았다. Pectinase의 경우 6일째 4.09 U/ml으로 가장 우수 하였지만 3일부터 10일까지 효소 생산량이 크게 차이나지 않았다. 실험결과 모든 효소 생산량이 가장 우수하게 생성되는 시기는 6-7일으로 나타났다.

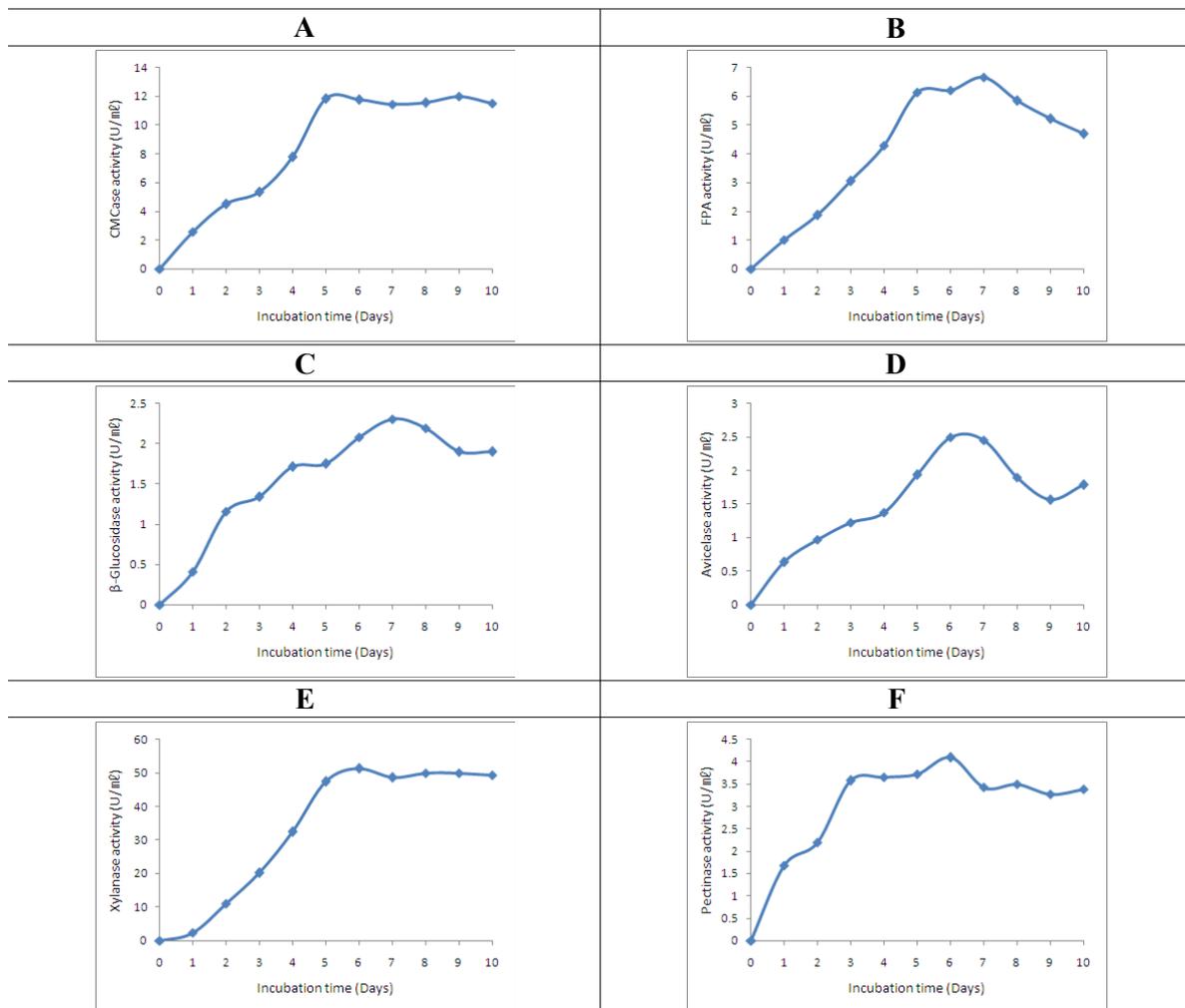


그림3.3-30. Time course of production of cellulases, xylanase, and pectinase by isolated YP3-6-3. A, CMCase; B, FPA; C, β -glucosidase; D, avicelase; E, xylanase; F, pectinase

(바) 효소의 내열성 조사

- 효소액을 60 °C water bath에서 1시간 처리 하고 total cellulase (FPA) 활성 측정을 한 결과(그림 3.3-31), *T. reesei*는 CMC를 배양 기질로 한 경우에는 FPA가 감소하지 않았으나 나머지 기질에서 배양한 균주의 FPA 저하되어 잔존 활성이 22 ~ 64%으로 감소하였다. 섬유소 분해에 필요한 50 °C 이상의 환경 하에서 반감기가 10분 정도로 가수 분해력이 시간 지남에 따라 가속도적으로 떨어진다는 점에 따라 신규 효소를 지속적으로 교체해주어야 한다는 단점이 있다(Chung. 2005) 이는 곧 높은 발효비용으로 나타나게 된다.
- 본 연구에서 분리한 *Lecytophora* sp. YP3-6-3의 경우에는 CMC, xylan, 보리짚를 배양 기질로 사용하였을 경우에는 FPA는 감소하지 않았으며 avicel, pectin 배양 기질에서는 열처리 후 80% 이상의 잔존 효소활성을 보였다.
- 또 효소 당화진행 하여 효소 내열성을 조사한 결과 50, 55, 60 °C의 당화 온도에서 48시간 후에 *T. reesei*는 각각 41.21%, 12.76%, 1.72% 효소 활성을 나타내었다. 본 연구의 분리주 *Lecytophora* sp. YP3-6-3의 경우에는 50, 55, 60 °C의 당화 온도에서 48시간 후에 각각 100%, 100%, 3.93%으로 55 °C까지의 당화 온도에서도 효소 활성이 줄어들지 않았다.

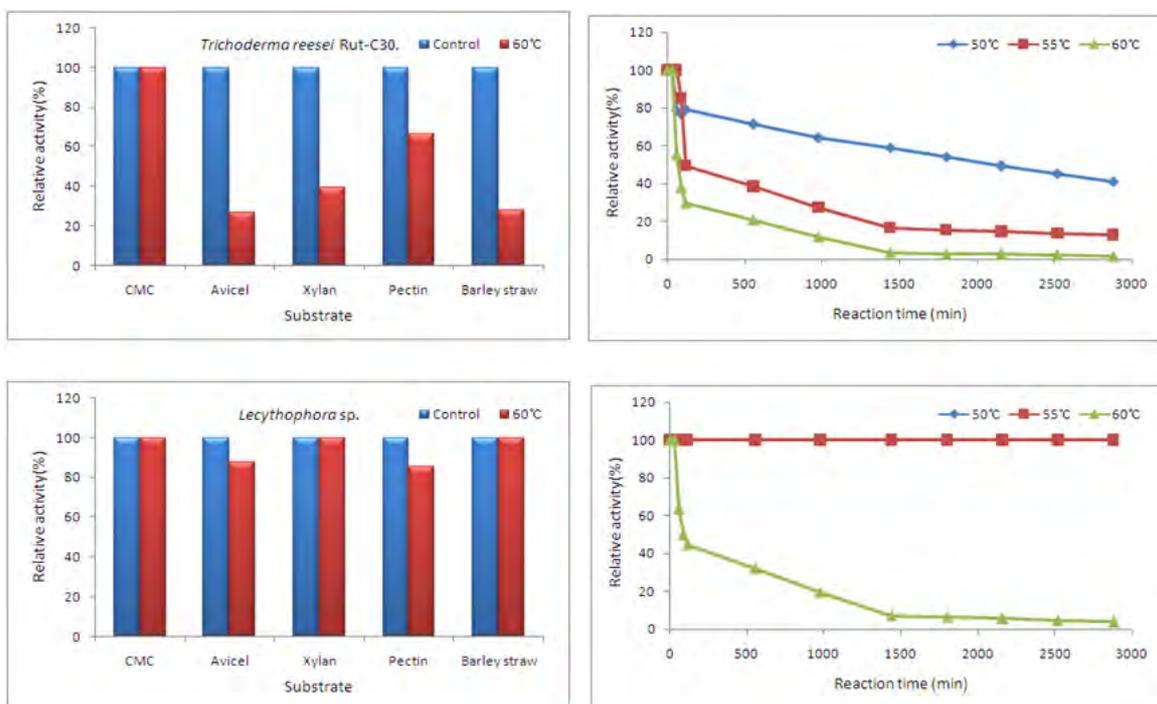


그림 3.3-31. The cellulytic enzyme activities of *T. reesei* Rut-C30 and *Lecytophora* sp. YP3-6-3 after heat treatment of the enzymes

(3) 균주 *P. oxalicum* KL1의 최적 배양 조건

- 선발된 균주 *P. oxalicum* KL1의 CMCase, FPase, β -glucosidase, avicellase, xylanase, 그리고 pectinase 생산을 위한 최적 배양 조건을 조사하였다.

(가) 기질이 효소 생산에 미치는 영향

- 여러 가지 천연 섬유질 원료로서 갈대, 억새, empty fruit bunch (EFB), 벚짚, 보리짚을 비교 기질로 사용하였으며 각 기질이 생산하는 섬유소 분해능을 측정한 결과(그림 3.3-32) CMCase 경우 모든 천연기질에서 10.01 ~ 11.19 U/ml으로 기존의 CMC 기질 (7.11 U/ml)에 비해 효소 활성이 우수하게 나타났다. FPase 경우 EFB가 11.72 U/ml으로 높은 활성을 나타냈으며 벚짚도 8.15 U/ml으로 우수한 효소 활성을 나타냈다. β -Glucosidase의 경우 벚짚에서 30.63 U/ml으로 높은 활성을 나타냈으며 보리짚이 17.19 U/ml으로 높은 활성을 나타냈고 나머지 기질은 6에서 9 U/ml의 활성을 나타냈다. Avicelase의 경우 모든 기질에서 1에서 2 U/ml의 활성을 나타내었다. Xylanase의 경우 CMC 기질보다 3배 이상의 활성이 모든 기질에서 나타났으며 평균 30 U/ml 이상의 높은 활성을 나타냈다. Pectinase의 경우 벚짚에서 47.34 U/ml으로 높은 활성을 나타냈고 다음으로 보리짚에서 42.19 U/ml으로 높은 활성을 나타냈다. 이에 따라 본 연구에서는 섬유소 분해 효소 생산을 위한 우수 기질로서 벚짚을 선정하게 되었다. 따라서 이러한 천연 섬유소 원료로부터 섬유소 분해 효소를 생산하는 것은 섬유소 분해 효소 생산비를 줄이는 데 큰 역할을 할 것으로 판단된다.

(나) pH가 효소 생산에 미치는 영향

- 기질이 효소 생산에 미치는 영향의 실험결과에서 가장 우수하였던 벚짚을 기질로 하여 pH가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과(그림 3.3-33)로 CMCase의 경우 pH 5, 6, 7에서 12 U/ml 이상으로 pH 4에서 8까지 효소 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. FPase의 경우 pH 5에서 9.44 U/ml으로 가장 높은 효소 활성을 나타냈으며 pH가 높아질수록 효소활성이 감소하는 것으로 나타났다. β -Glucosidase의 경우에도 pH 5에서 30.77 U/ml으로 가장 높은 효소 활성을 나타내다가 pH가 높아질수록 점점 효소 활성이 감소하였다. Avicelase의 경우 pH 5와 6에서 각각 5.92 U/ml, 5.44 U/ml으로 높은 활성을 나타냈다. Xylanase의 경우 pH 5에서 가장 높게 효소 활성 35.92 U/ml으로 나타났으며 pH가 높아짐에 따라 효소활성이 점점 감소하였다. Pectinase의 경우 pH 4, 5, 6에서 모두 50 U/ml 이상으로 높은 활성을 나타냈으며 pH가 높아져도 효소 활성이 크게 감소하지 않았다. 이에 따라 여러 섬유소 분해 효소 생산에 전반적으로 가장 적절한 배지의 초기 pH는 5인 것으로 판단되었다.

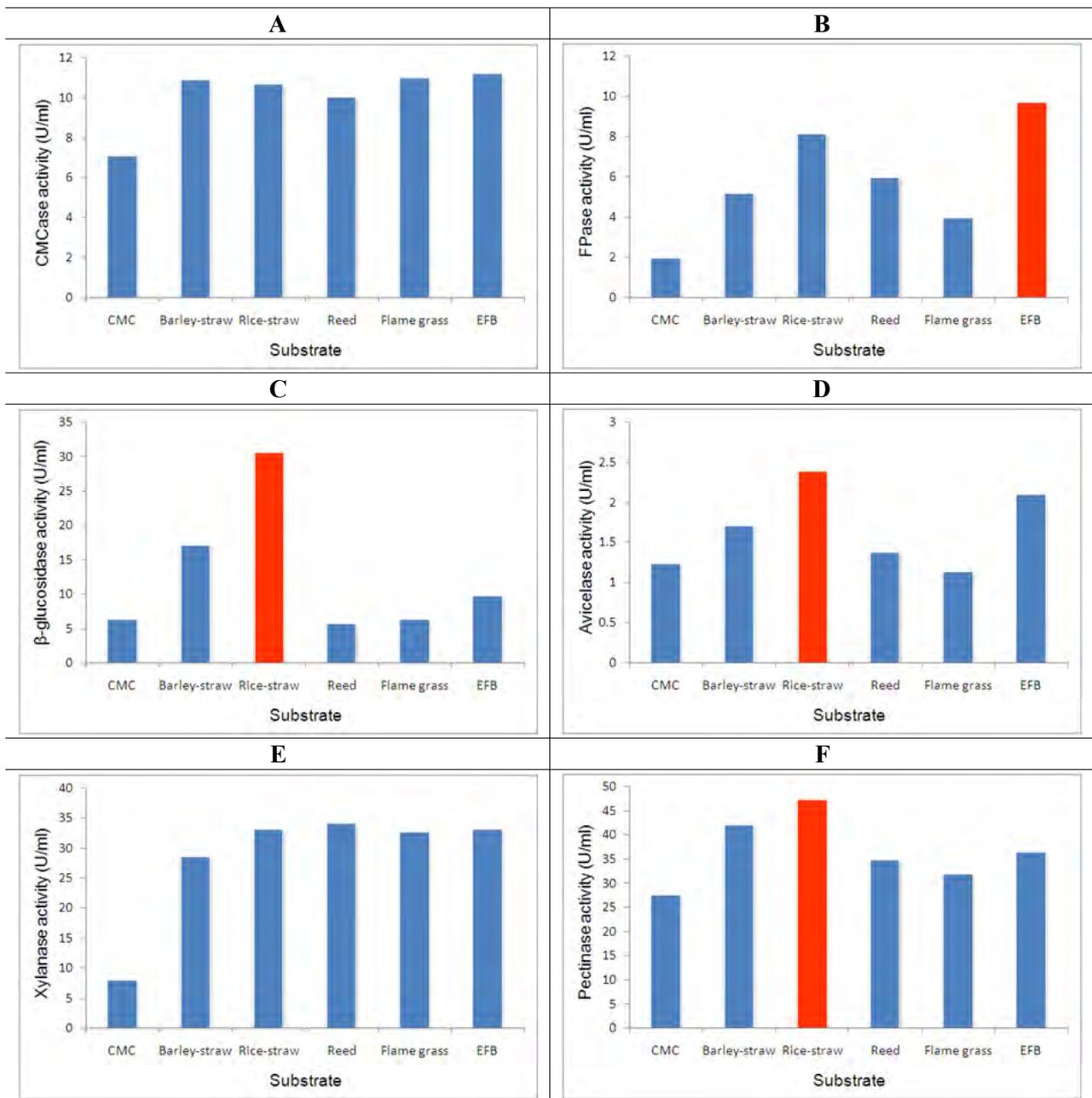


그림 3.3-32. Effect of substrate on the production of cellulase, xylanase, and pectinase by isolated *P. oxalicum* KL1. A, CMCase; B, FPase; C, β -Glucosidase; D, Avicelase; E, Xylanase; F, Pectinase

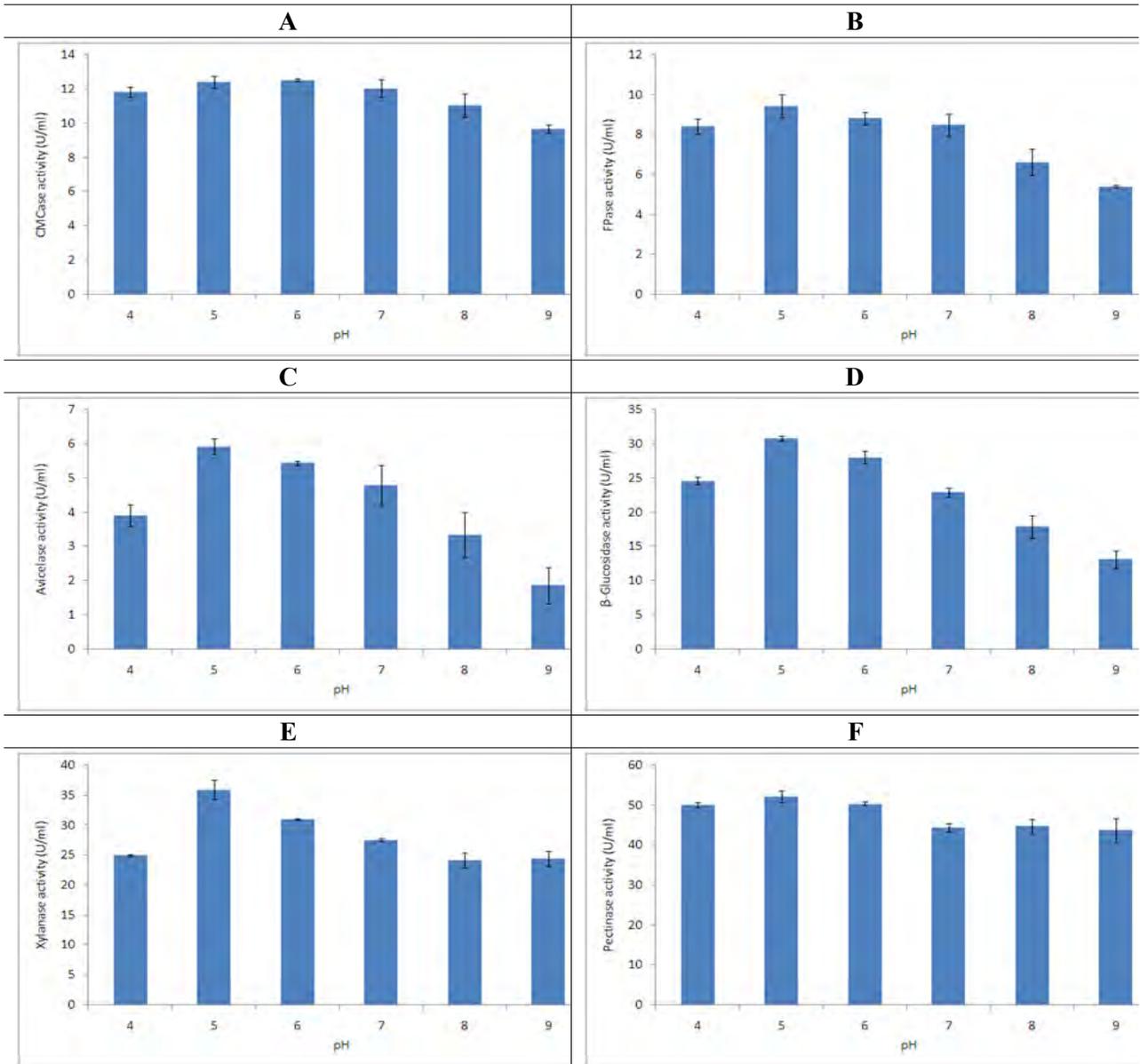


그림 3.3-33. Effect of pH on the production of cellulase, xylanase, and pectinase by isolated *P. oxalicum* KL1. A, CMCase; B, FPase; C, β -Glucosidase; D, Avicelase; E, Xylanase; F, Pectinase

(다) 온도가 효소 생산에 미치는 영향

□ pH가 효소 생산에 미치는 영향의 실험결과에서 가장 우수하였던 pH 5에서 여러 가지 온도 27, 30, 33, 36 °C으로 온도가 효소생산에 미치는 영향을 조사하였다(그림 3.3-34). CMCase의 경우 33 °C에서 12.33 U/ml으로 가장 높은 효소 활성을 나타냈으며 36 °C에서도 12.11 U/ml으로 높은 효소 활성을 나타냈다. FPase의 경우 33 °C에서 9.34 U/ml으로 높은 활성을 나타냈으며 다른 온도에서는 효소 활성이 감소하였다. β -Glucosidase의 경우 30, 33, 36 °C에서 모두 30 U/ml 정도로 유의성 있는 효소 활성의 차이를 보이지 않았다. Avicelase의 경우 33 °C에서 5.91 U/ml으로 가장 높았으며 나머지 온도에서는 약 2.5 U/ml 정도의 효소 활성을 나타냈다. Xylanase 경우에는 33 °C에서 36.26 U/ml으

로 가장 높은 효소 활성을 나타냈으며 나머지 온도에서는 약간씩 감소하였다. Pectinase의 경우 온도가 높아질수록 효소 활성이 증가하였으나, 30, 33, 36 °C에서 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다. 온도 실험 결과 β -glucosidase와 pectinase는 30, 33, 36 °C에서 효소생산의 차이가 거의 없었고, 나머지 다른 효소는 모두 33 °C에서 가장 많은 효소 생산량을 보였다. 이에 따라 여러 효소 생산을 위한 가장 최적 온도는 33 °C으로 선정하였다.

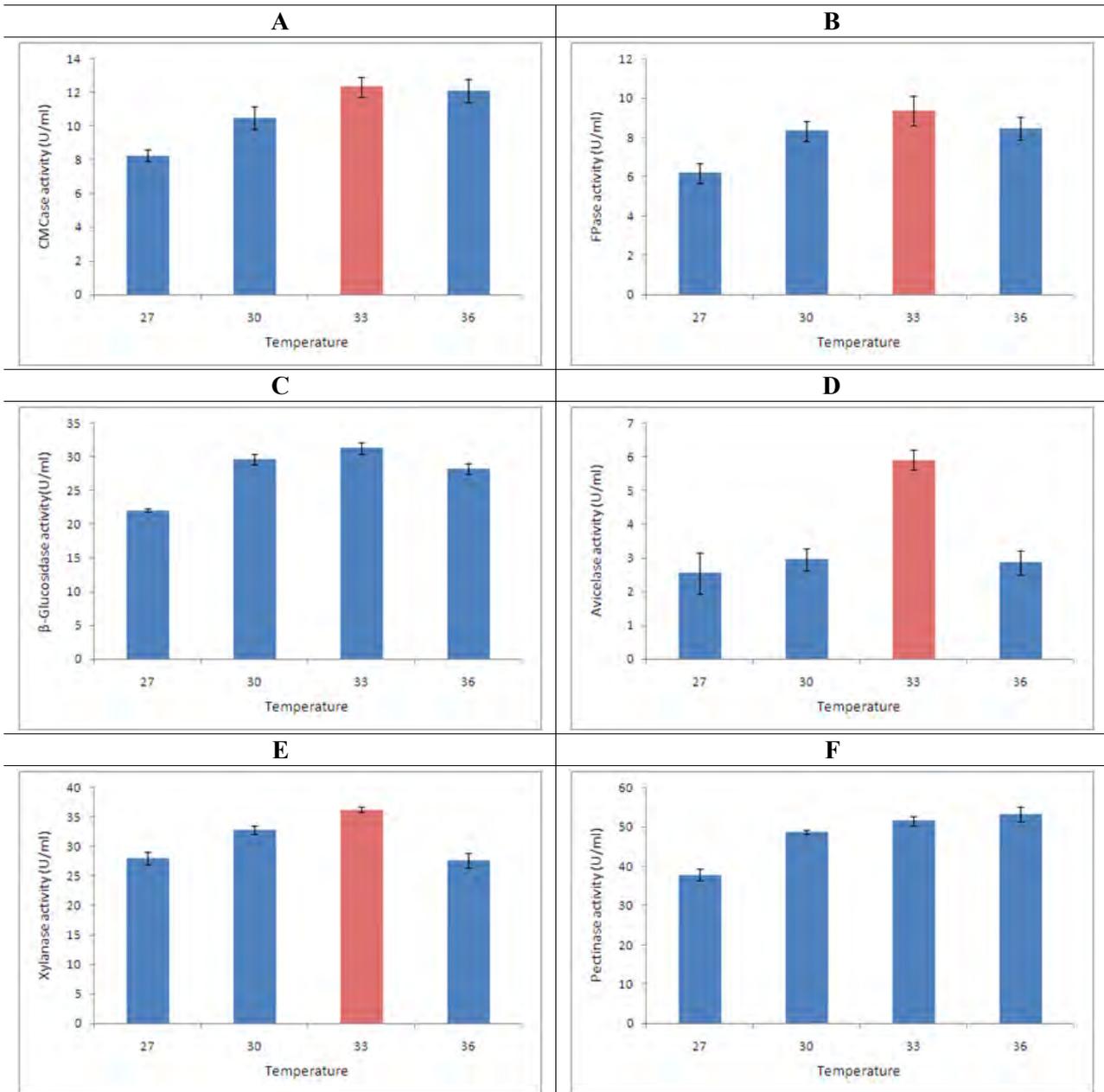


그림 3.3-34. Effect of temperature on the production of cellulase, xylanase, and pectinase by isolate *P. oxalicum* KL1. A, CMCase; B, FPase; C, β -Glucosidase; D, Avicelase; E, Xylanase; F, Pectinase

(4) 균주 *B. methylotrophicus* B25의 최적 배양 조건

(가) 탄소원과 질소원 탐색

□ *Bacillus methylotrophicus* B25의 배지 최적화를 위해 탄소원과 질소원을 탐색하였다. 탄소원 탐색에는 기존 ATCC cellulose 907 배지의 탄소원인 CMC를 대조구로 하여 rice straw, barley straw, reed, flame grass, EFB를 사용하였다. 질소원 탐색에는 yeast extract를 대조구로 하여 peptone, casein, soytone, skin milk, malt extract를 사용하여 2일간 배양하였으며 배양 종료 후 FPase를 측정하여 우수 탄소원과 질소원을 탐색하였다. 실험결과 (그림 3.3-35), 탄소원은 rice straw에서 3.31 ± 0.18 U/ml으로 기존 CMC 3.21 ± 0.02 U/ml 보다 효소 활성이 우수 하였으며 대부분의 천연 기질에서 효소 활성이 CMC를 기질로 하였을 때 보다 감소하였는데 rice straw에서는 효소활성이 증가하였다. 질소원 탐색에서는 soytone을 질소원으로 사용 하였을 때 4.72 ± 0.17 U/ml으로 기존의 yeast extract 3.24 ± 0.15 U/ml 보다 효소활성이 증가하였다.

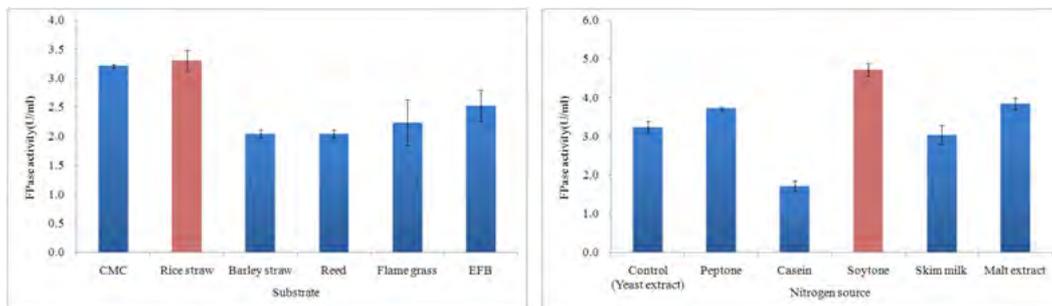


그림 3.3-35. Effect of carbon source and nitrogen source on the production of FPase by *B. methylotrophicus* B25

(나) pH와 온도 최적화

□ pH최적화를 위해 초기 pH를 4, 5, 6, 7, 8, 9으로 하여 배지를 제작하였으며 균주 접종 후 2일간 배양하여 효소 활성을 측정하였다. ATCC cellulose medium 907의 경우 초기 pH가 5정도인데 실험결과 pH 4에서 pH가 높아짐에 따라 효소 활성이 증가하다가 pH 8부터 점점 감소하였다. 최적 pH는 6 ~ 7에서 나타났는데 FPase 가 5.27 ± 0.14 U/ml으로 최적화 이전 pH 5에서 4.77 ± 0.43 U/ml 보다 효소 활성이 증가하였다. 이전까지 최적화된 조건으로 배양 온도 최적화를 진행하였다. 온도는 27도부터 2도 간격으로 최고 41도 까지 여러 조건에서 분석하였다. 실험결과 27도에서 온도가 올라감에 따라 효소 활성이 증가하다가 33도 이후에는 비슷하게 효소활성이 나타났으며 39도에서 효소활성이 5.68 ± 0.31 U/ml으로 가장 높게 나타났다. *Bacillus methylotrophicus* B25 균주의 배지와 배양조건 최적화 결과 기존 FPase가 3.21 ± 0.02 U/ml에서 최적화 이후 5.68 ± 0.31 U/ml으로 약 76% FPase가 증가하였다. 선발된 *Bacillus methylotrophicus* B25 균주는 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁번호 KACC91743으로 기탁되었다.

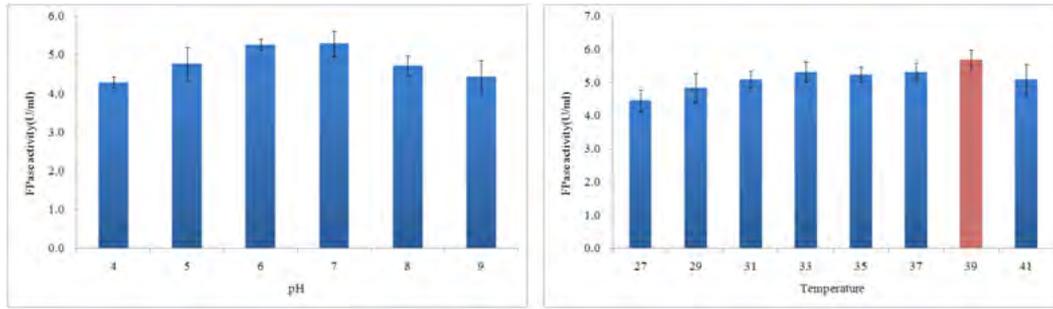


그림 3.3-36. Effect of pH and temperature on the production of FPase by *B. methylotrophicus* B25

나. 선발된 균주의 효소 생산 증진

(1) 동시배양을 통한 섬유소분해효소 생산 증진

- 균주마다 섬유소분해효소를 구성하는 요소가 상이하므로 효소간의 시너지효과를 상승시키기 위하여 선발된 균주들을 동시 접종, 배양하여 효소생산에 사용하였다. 선발된 균주 균사체의 가장자리로부터 plug를 획득하여 섬유소 분해효소 생산배지에 접종하였고, 섬유소 분해효소 생산을 위한 배양액은 Mandels 배지를 이용하였다. 대상균주의 특성과 사용 목적에 따라 벚짚, cellulose, avicel 등 탄소원 및 기질을 다양하게 사용하였으며, 배양 부피는 50 ml로 삼각플라스크에서 진행되었고 27 °C, 150 rpm에서 일주일간 배양하였다. 배양 후 원심분리한 상층액을 효소활성측정 및 단백질량 측정에 사용하였다.
- Wild type의 단일균주로 효소생산을 하였을 경우 그 활성수준이 개량한 것에 비해서 크게 높지 않다. 하지만 우수한 균들을 대상으로 동시배양을 할 경우 그 수준이 향상된다는 보고를 기반으로 하여 균주 간의 동시배양을 통한 효소생산 증진효과를 살펴보았다. 그 결과, *Trichoderma harzianum* KUC5182과 *Aspergillus versicolor* KUC5201를 같이 배양하였을 경우 단일배양보다 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 비록 생산한 효소의 활성이 뛰어나지는 않지만 균주 간의 조합을 통해 섬유소분해효소 생산 증진효과는 볼 수 있었다 (그림 3.3-37). 섬유소분해효소 생산 증진이 두드러지 않은 원인으로서는 균주들 간의 길항작용으로 인한 성장저해나 균주간의 시너지효과 미비를 생각할 수 있다.
- 그러므로 균주간의 길항작용을 최소화하고, 섬유소를 분해하는 여러 가지 효소들 간의 상승효과를 통해 효소생산을 극대화하기 위해 선별 과정에서 각각의 효소활성이 가장 우수한 *Trichoderma* 속을 동시배양 대상 균주로 선별하였다. 섬유소분해효소 중에서 Filter paper activity가 가장 높은 *Trichoderma harzianum* KUC1716, endo-glucanase 활성이 가장 높은 *Trichoderma* sp. JJ1-1, β -glucosidase 활성이 가장 높은 *Trichoderma* sp. W4-4-2과 *Trichoderma harzianum* KUC5193을 동시 배양 대상 균주로 선별하였다. 1% cellulose를 유일한 탄소원으로 효소생산 실험을 진행하였고, 단일 배양과 동시 배양에서 효소 생산의 차이를 측정하였다.

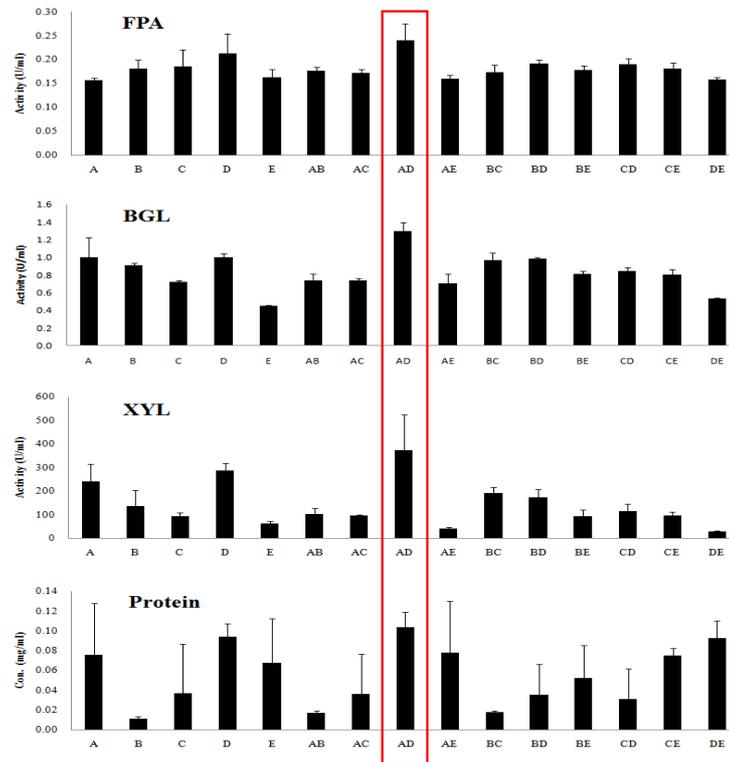


그림 3.3-37. Enzyme activities and protein contents by mono- and co-cultivation of selected fungi

Fungal strains: A, *Trichoderma harzianum* KUC5182; B, *Aspergillus niger* KUC5183; C, *Aspergillus ochraceus* KUC5204; D, *Aspergillus versicolor* KUC5201 and E, *Penicillium oxalicum* KUC5184.

Co-culture: AB, A + B; BC, B + C, etc.

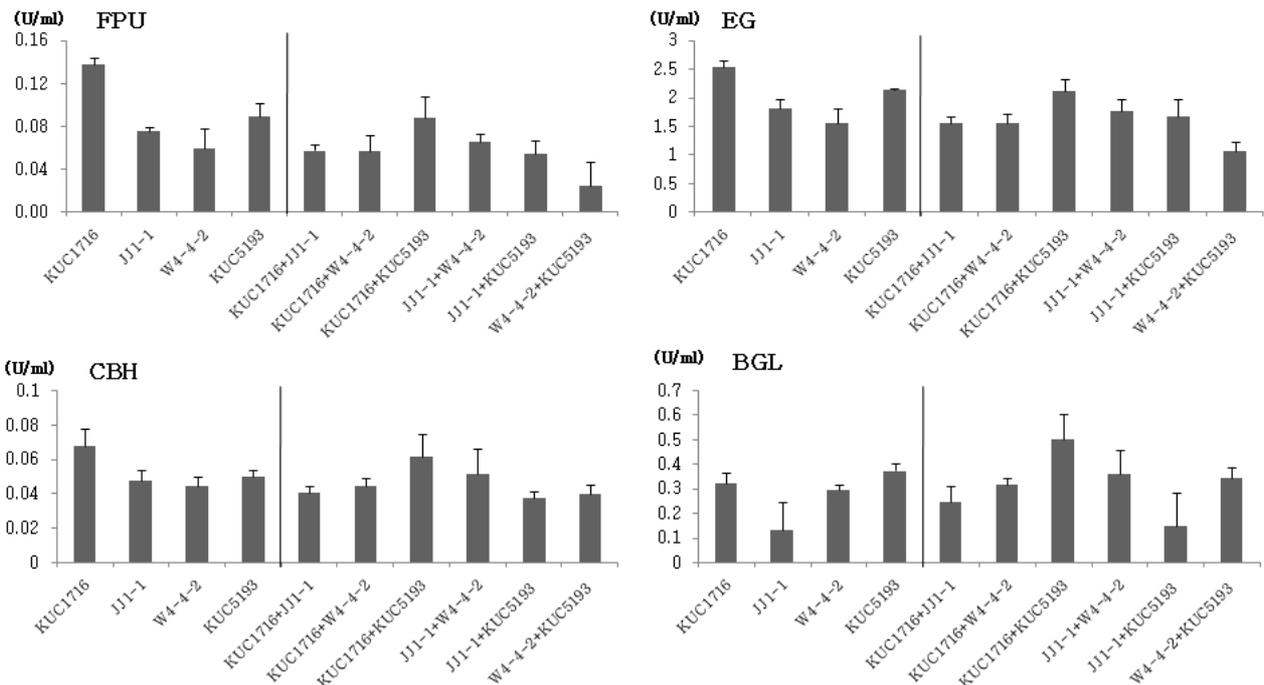


그림 3.3-38. Comparison of enzyme activities between mono-culture and co-culture

□ 선별한 균주를 동시배양 한 결과, 전체적으로 동시배양에 의한 효소 생산 증대의 효과는 없었다 (그림 3.3-38). β -glucosidase을 제외한 모든 효소에서 *T. harzianum* KUC1716의 활성이 가장 높았고, β -glucosidase는 *T. harzianum* KUC1716과 *T. harzianum* KUC5193을 동시배양한 조합에서 가장 높은 활성을 보였다. 하지만 동시 배양을 통해 생산한 효소를 당화에 이용할 수준의 효소 생산은 이뤄지지 않았다. 그러한 원인에는 균주 간의 조합, 효소 생산의 재현성, 효소 생산의 조건 등이 있겠지만, cellulose와 같이 homogeneous material을 기질로 사용할 경우 효소 간의 상승효과가 두드러지지 않는다는 보고에 따라 heterogeneous material을 기질로 이용하여 동시 배양의 증진효과를 알아보는 연구를 진행하였다. 단순한 cellulose를 탄소원으로 이용할 때 보다, 복잡한 biomass를 탄소원으로 이용할 때에 더욱 다양한 효소들이 필요하므로 각각 효소간의 상승효과를 기대해 볼 수 있다.

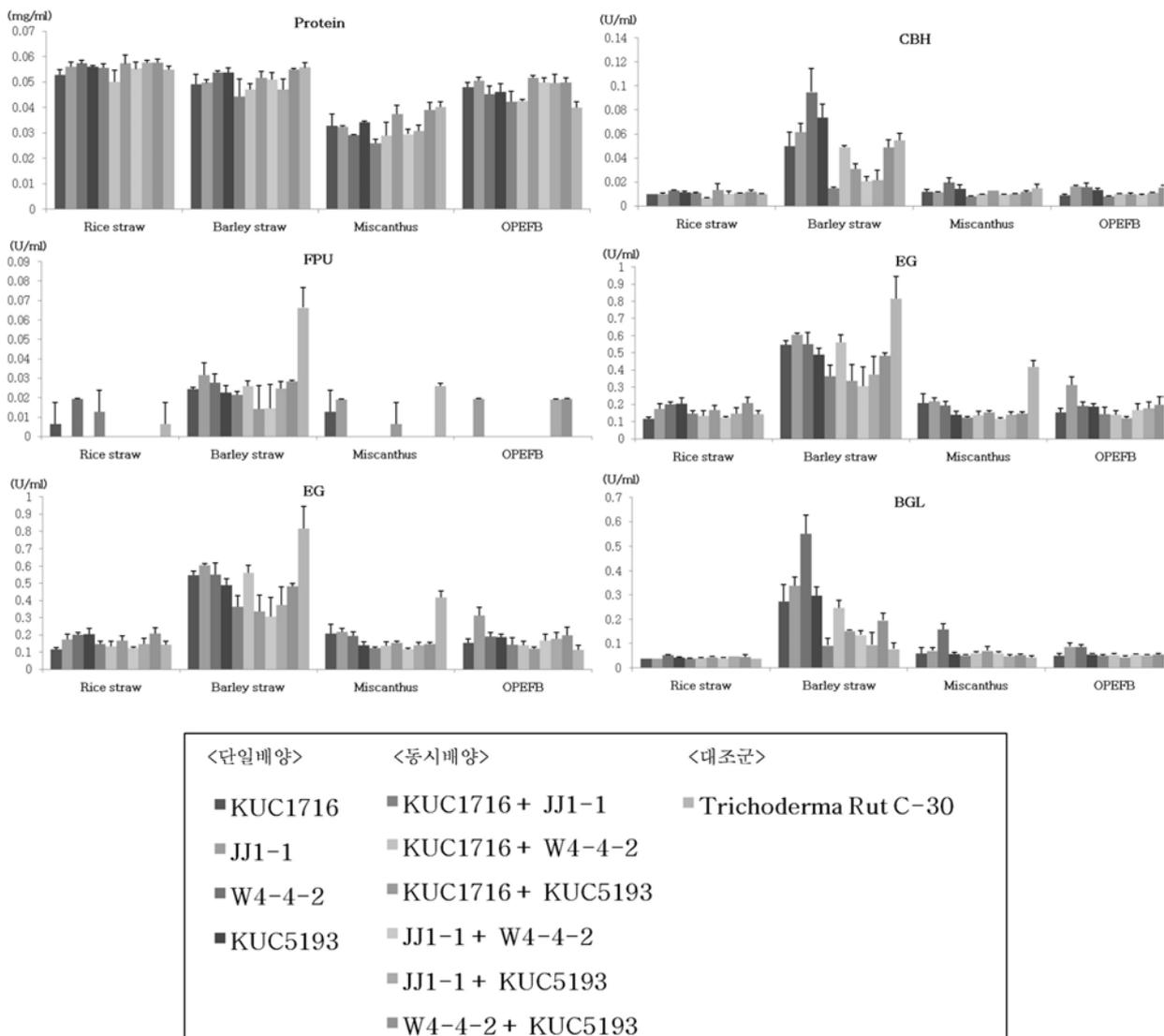


그림 3.3-39. Protein concentration and cellulolytic enzyme activities produced by selected fungi on the four biomass

- 다양한 biomass를 탄소원으로 이용했을 때, Barley straw에서 전체적으로 높은 효소 활성이 관찰되었다 (그림 3.3-39). 균주가 성장하면서 분비한 단백질의 양은 모든 biomass에서 큰 차이가 없으나, 효소 생산에 있어 두드러진 차이가 있었다. 모든 섬유소분해효소가 Barley straw를 탄소원으로 이용했을 때 가장 높은 활성을 나타내었는데, 이는 biomass 구성 성분 중 lignin 성분의 차이에 의한 것이라고 판단된다. *Trichoderma* 속이 이용하는 탄소원에 lignin 성분이 함유되어 있을 때는 *Trichoderma* 속의 섬유소분해효소 활성이 급격히 떨어진다는 다수의 연구결과에 비추어 볼 때, lignin 성분이 가장 적게 함유되어있는 Barley straw와 섬유소분해효소의 활성에는 높은 상관성이 있다고 판단된다.
- 하지만 다양한 biomass를 이용하여도 동시 배양을 통한 섬유소분해효소의 증진 효과는 없었다. 또한 동시배양을 통한 효소생산 실험은 재현성이 매우 떨어졌는데 이는 균주가 성장을 하는 과정이 복잡하고 예측할 수 없기 때문인 것으로 판단된다. 그러므로 공정에서 동시배양 방법을 통해 섬유소분해효소 생산을 증진하는 것은 어렵다고 판단한다.

(2) 최적화 실험을 통한 섬유소분해효소 생산 증진

- 기선별균주인 *Trichoderma harzianum* KUC1716의 최적 효소 생산조건을 탐색하기 위해 계면활성제를 첨가하여 실질적인 효소생산 증진효과를 알아보았다. 기존에 연구되었던 계면활성제중 Polyethylene glycol, Tween 80, Sodium hexametaphosphate, Polyacrylic acid, Polyvinylpyrrolidone, Sodium dodecylbenzene Sulfonate를 선정하여 첨가 농도에 따른 효소 생산량 증대효과를 알아보았다.
- 계면활성제를 다양한 농도(0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5%)로 첨가했을 때 *T. harzianum* KUC1716은 다양한 형태로 성장했다 (그림 3.3-40).

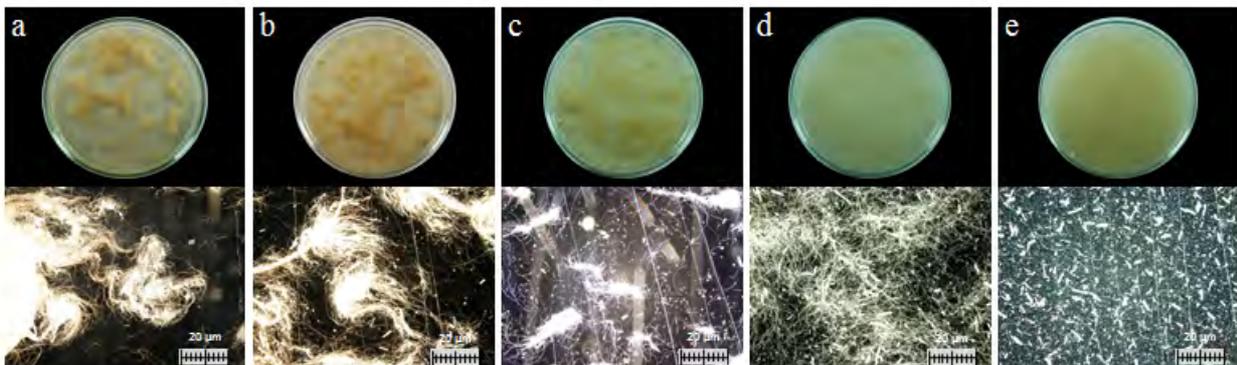


그림 3.3-40. Morphology comparison of *T. harzianum* KUC1716: 50 mL samples transferred from shake flasks to Petri dishes (upper pannel), samples collected at 7 days with (a) control with no surfactant added, (b) 0.1% Tween 80, (c) 0.5% Tween 80, (d) 1.0% tween 80, and (e) 1.5% Tween 80

- a에서 e로 갈수록 곰팡이가 분산되어 자라는 것을 확인할 수 있으며, 현미경 사진에서도 a에서는 밀집된 균사를 볼 수 있으나 e로 갈수록 균사가 풀어져 분산되어 있는 것을 확인할 수 있다. 반면에 Sodium dodecylbenzene Sulfonate을 첨가했을 때는 곰팡이가 아예 성장을 하지 못하고 cellulose 분말만이 남아있었다. 이는 세포벽을 느슨하게 하는 계면활성제가 곰팡이에 독성으로 작용했기 때문이라고 사료된다. 이러한 결과는 기존의 연구와 유사한 결과이며 아직 정확한 원인은 보고된 바가 없다. 계면활성제의 종류와 농도에 따

라서 *T. harzianum* KUC1716의 형태학적 특징은 다르지만 모든 실험군에서 농도가 증가함에 따라 분산형 균사로 성장하였다. 계면활성제의 종류와 농도에 따른 *T. harzianum* KUC1716의 배지 내 세포농도와 섬유소분해효소 활성은 그림 3.3-41과 같다.

- 섬유소분해효소의 생산은 Polyethylene glycol과 Tween 80을 각각 0.5%, 1.0% 첨가했을 때 각각 142%, 177% 상승하고 ($p < 0.01$), 1.5% 농도에서 성장을 저해했던 Sodium hexametaphosphate와 0.1%부터 성장을 저해했던 Sodium dodecylbenzene Sulfonate은 효소생산량이 줄어들었다. 전체적인 섬유소분해효소 생산량은 곰팡이의 성장량 보다는 곰팡이의 성장 형태와 상관이 있는 것으로 보인다. 나머지 영양요인들을 통제했을 때 이러한 결과가 나오는 것은 곰팡이의 성장형태에 따라 섬유소분해효소 생산이 달라진다는 것을 말한다. 이러한 결과는 기존의 연구와도 일치한다(Aftab Ahamed and Patrick Vermette, 2009). 계면활성제가 효소단백질이 기질과 잘 결합하게 하여 효소 측정 시 활성이 높게 측정된다는 보고에 따라 이번 실험에서 추출한 효소의 활성을 측정할 때 모든 계면활성제를 배양 시와 같은 농도로 첨가하여 측정을 하였으나 통계적인 차이를 보이지 않았다 ($p=0.45$). 즉, 본 실험에서의 높은 효소 활성은 실제 효소 생산량이 높았음을 의미한다.

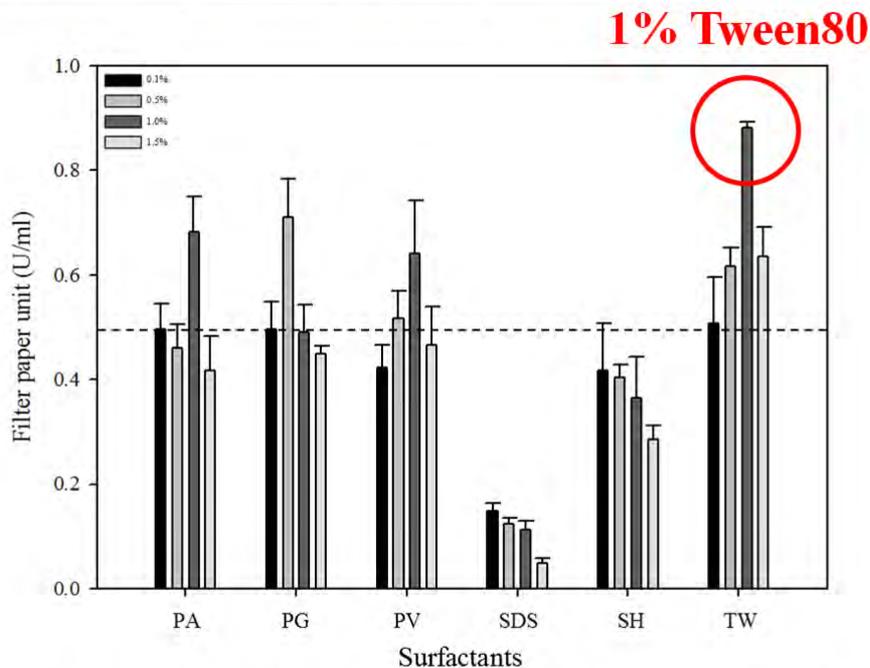


그림 3.3-41. Extracellular cellulase activities obtained from cultures with different concentrations of six surfactants compared to control (---): PG, polyethylene glycol; TW, tween 80; SH, sodium hexametaphosphate PA, polyacrylic acid; PV, polyvinylpyrrolidone and SDS, sodium dodecylbenzene sulfonate

- 계면활성제가 곰팡이의 세포막을 느슨하게 하여 세포 내 효소가 세포 밖으로 수월하게 나오도록 한다는 것이 많은 연구에서 밝혀진바 있으나, 이번 연구에서 측정된 세포 내 효소의 활성은 매우 낮아서 전체 효소량에 아무런 영향을 주지 못 했다. 즉, 이번 실험에서 측정된 효소는 계면활성제가 세포 내 효소의 이동을 촉진한 것이 아니라, 곰팡이의 성장형태를 조절하여 섬유소분해효소 생산량을 증가시킨 것으로 보인다.

(2) RSM 기법을 이용한 효소 생산 배지 최적화

□ 한편 β -glucosidase 우수 생산 균주로 선발된 *Schizophyllum commune* KUC9397은 영양조건 의 최적화를 통한 효소생산 증진을 수행하였다. 탄소원, 질소원 및 비타민을 대상 영양원 으로서 선정하고 반응표면분석법 (RSM)을 통해 배지최적조건을 탐색하였다. 중심합성계획 법 (central composite design, CCD)을 이용하여 최대의 β -glucosidase 을 생산하기 위해 cellulose (X1, %), soy peptone (X2, %) 그리고 thiamine HCl (X3, %)의 첨가량과 각각의 변수들간의 조합을 최적화하였다. 본 실험의 독립변수의 수준과 범위는 표 3.3-18에 나타 내었으며, 표 3.3-19와 같이 실험을 디자인하였다.

표 3.3-18 Experimental ranges and levels of the independent variables

Independent variable	Factor x_i	Ranges and levels				
		-1.68	-1	0	1	1.68
Cellulose (% w/v)	x_1	1.32	2	3	4	4.68
Soy peptone (% w/v)	x_2	0.32	1	2	3	3.68
Thiamine HCl (% w/v)	x_3	0.016	0.05	0.1	0.15	0.184

표 3.3-19 The CCD of RSM and the mean experimental responses of BGL production from *S. commune* KUC9397

Run No.	Coded value			Actual value			Activity (U/ml)
	x_1	x_2	x_3	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	-1	2	1	0.05	17.16
2	1	-1	-1	4	1	0.05	23.98
3	-1	1	-1	2	3	0.05	31.80
4	1	1	-1	4	3	0.05	24.22
5	-1	-1	1	2	1	0.15	15.08
6	1	-1	1	4	1	0.15	27.05
7	-1	1	1	2	3	0.15	41.24
8	1	1	1	4	3	0.15	24.26
9	-1.68	0	0	1.32	2	0.1	17.67
10	1.68	0	0	4.68	2	0.1	31.66
11	0	-1.68	0	3	0.32	0.1	3.42
12	0	1.68	0	3	3.68	0.1	22.86
13	0	0	-1.68	3	2	0.016	36.36
14	0	0	1.68	3	2	0.184	34.23
15	0	0	0	3	2	0.1	40.49
16	0	0	0	3	2	0.1	44.49
17	0	0	0	3	2	0.1	41.62
18	0	0	0	3	2	0.1	39.55
19	0	0	0	3	2	0.1	42.67
20	0	0	0	3	2	0.1	40.12

- R-square 값은 0.936으로 1에 가까운 값을 나타내어 반응모형이 신뢰할 수 있음을 나타내었으며, 낮은 coefficient of variation (CV) 값, 13.11% 또한 높은 실험 설계의 신뢰성을 의미하였다. 뿐만 아니라 모델의 lack of fit은 8.07을 나타내었으므로 이 모델은 유의하다고 할 수 있다. 분석결과 아래와 같은 2차 다항식 (Equation)을 얻어냈고, 그림 3.3-42의 3차원 그래프를 얻어냈다.

<Equation>

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3$$

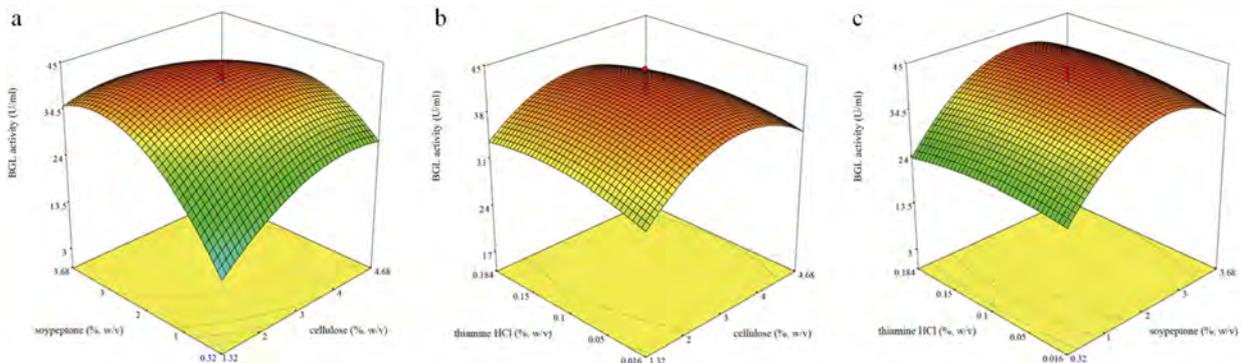


그림 3.3-42. Statistical optimization of enzyme production using RSM. a. Three dimensional response surface plot for the interaction between cellulose and soy peptone. b. Three dimensional response surface plot for the interaction between cellulose and thiamine HCl. c. Three dimensional response surface plot for the interaction between soy peptone and thiamine HCl

- 반응표면분석에 의하여 제시된 각각의 첨가량은 cellulose, soy peptone 그리고 thiamine HCl이 2.96, 2.3 그리고 0.113% (w/v) 이었고, 이때의 예측 가능한 최대의 β -glucosidase 활성은 42.22 U/ml을 나타내었다. 실제로 배양을 하였을 때, β -glucosidase 활성이 43.51 U/ml로 측정되었고, 이는 예측된 값과 유사한 값이며 최적화하기 전보다 7.2배 활성이 향상된 것이다. 뿐만 아니라 이 수치는 다른 연구에서의 *S. commune*을 통한 최적의 배양조건에서 생산된 β -glucosidase에 비해 상당히 높은 활성을 나타낸 것이다.
- 위 연구를 통해 *S. commune* KUC9397은 2.96% cellulose, 2.30% soy peptone 그리고 0.11% thiamine HCl을 basal medium에 첨가하였을 때 43.51 U/ml의 β -glucosidase을 생산하였으며, 이것은 최적화하지 않은 배지에서보다 7.2배 높은 수치임을 확인하였다. 또한 기존의 다른 연구에서 생산된 *S. commune* 유래의 β -glucosidase 활성보다 상당히 높았다.

4. 고효성 신규 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제 복합체 개발

가. 고효성 섬유소분해효소 생산 균주 선별 및 신규 효소 발굴

- 셀룰로좀 코히신 마커를 통한 당화효소 탐색
- 셀룰로좀 단위효소들을 분석하기 위하여 코히신 도메인을 정제하고 형광 표지 하여 바이오마커를 구축하였으며 구축된 형광 표지 코히신은 셀룰로좀 형성 효소의 도커린 도메인과 결합을 하여 셀룰로좀 형성 효소들만 선택적으로 탐지함.

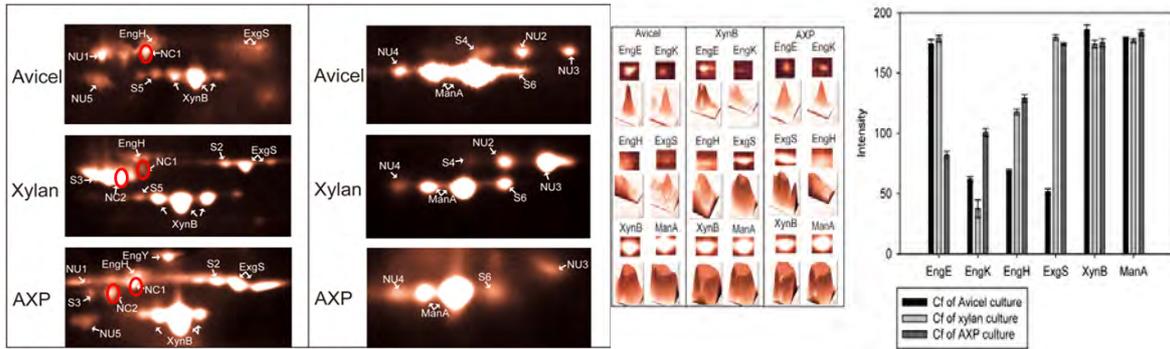


그림 3.3-43. 코히신 마커를 이용한 신규 섬유소분해효소의 탐지 및 3D spot과 intensity bars

(1) 새로운 고효성의 섬유소분해효소의 탐색

- 본 연구를 통하여 개발된 코히신 마커를 이용하여 2D-PAGE의 Spot을 분석하여 얻어진 Peptide 서열과 Dockerin서열을 토대로 Degenerated PCR 및 RACE-PCR을 실시하여 Novel Cellulase를 탐색.
- 섬유소분해효소의 분비가 많은 균의 형태학적 1차 동정을 거쳐 DNA를 분석하여 2차 동정을 시행하며 이러한 섬유소분해효소는 박테리아, 효모, 곰팡이로부터 유래하며 각 효소의 활성을 최적화 하는 조건을 검토하여 확립.

Protein	Molecular Weight (kDa)	pI	Mascot Score (value P=0.05) ^a	Partial peptide sequence	Homology ^b
NC1	75	4.9	65	SQIDYALGSTGR	<i>C. cellulolyticum</i> Cel9G
NC2	70	4.7	– (BL)	TTYNSPVVVTDEL FLGSFVDCPG SDSFTVVYPSNYT DVALFLVA	<i>C. cellulolyticum</i> H10 Glycoside hydrolase family 26
NU1	70	4.7	–	DESLTSLGLDTVWSASNVC	NS
NU2	48	5.8	–	MFKTLEPVQS TSNDL SCLQTW LDLPTSNDL	NS
NU3	48	6.0	–	MKTSNDLLY	NS
NU4	45	4.8	–	SSGLFDYNMTTTLVEL LFGSETLVT STSLFT EKLETLYNY	NS
NU5	65	4.5	–	WQEVGELEV ELDVGELMVL GSSLVGGW ADLGLN	NS

그림 3.3-44. 본 연구에서 개발되어진 코히신 마커를 이용하여 얻어진 아미노산 서열



그림 3.3-45. 새로운 섬유소분해효소의 탐색을 위한 cDNA합성 및 cloning

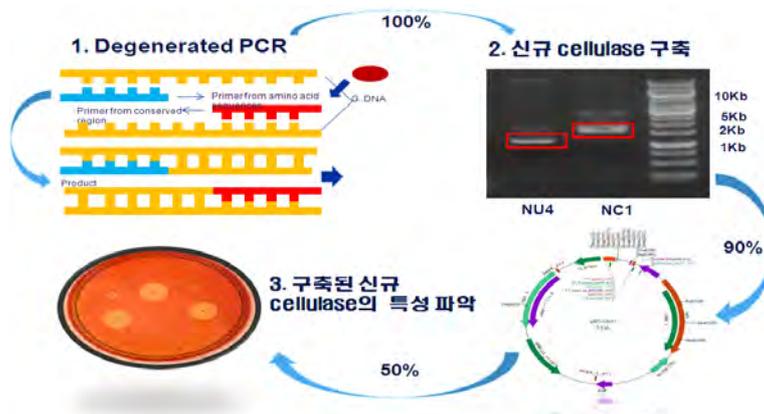


그림 3.3-46. 새로운 섬유소분해효소의 구축 및 이의 활성 확인

(2) 생체 외 재조합한 신규 엔도글루카나아제 (Endoglucanase Z)의 발현, 정제 및 특성분석
 □ 코히신 마커를 이용하여 다양한 탄소원 조건에서 *C. cellulovorans*의 신규 Cellulase 발현을 분석. 아미노산 서열을 통하여 분석된 신규 효소 Endoglucanase Z라 명명하고 Bacteria genome 상에서 서열을 분석하여 재조합 단백질을 만들어냄.

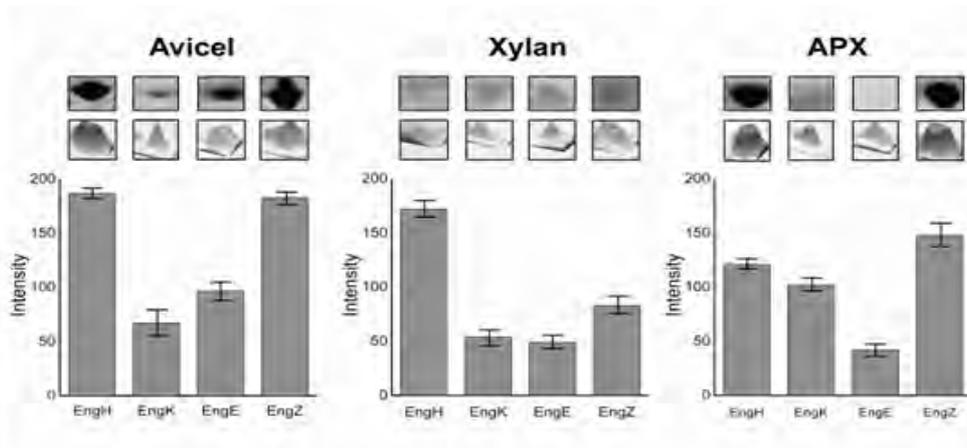


그림 3.3-47. EngZ의 *C. cellulovorans*에서 각각의 탄소원에서의 타 셀룰라아제와 발현 비교

□ 본 연구에서 탐색되어진 새로운 Cellulase (엔도글루카나아제)의 특성 및 활성을 탐색하기 위하여 대장균 단백질 발현벡터에 구축함. 발현되어진 단백질은 Affinity Gel (His-binding resin)을 이용하여 단백질을 분리 정제하며 정제된 단백질은 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE을 이용해 분석함.

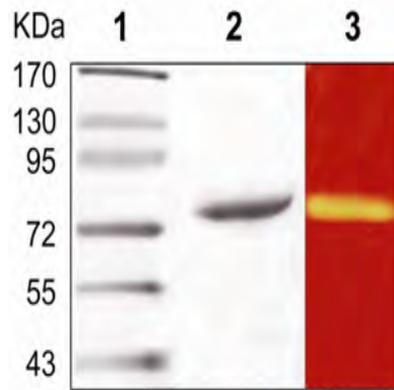


그림 3.3-48. *E. coli*에서의 생체 외 재조합한 단백질 발현 및 활성 확인

- 정제되어진 단백질의 온도, pH 및 기질 특이성 등에 대한 연구를 통하여 새로운 셀룰라아제의 특성을 분석 함.
- 신규 엔도글루카나아제의 전진적인 특성을 분석하기 위하여 환원당의 분배경향을 측정 함. (기존의 일반 엔도글루카나아제와 비교)

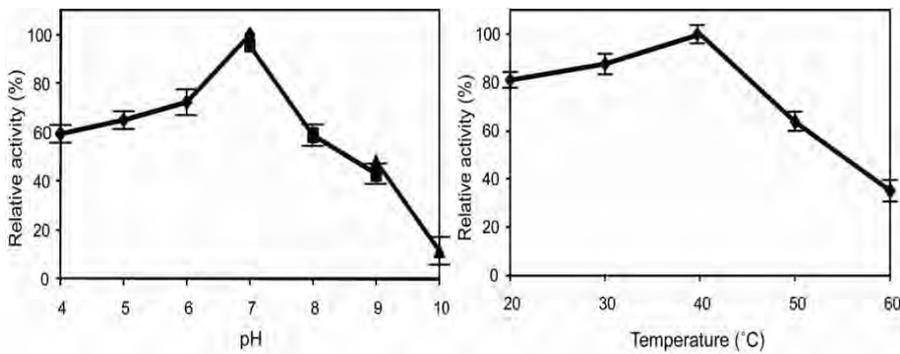


그림 3.3-49. EngZ의 최적 pH, 온도 확인

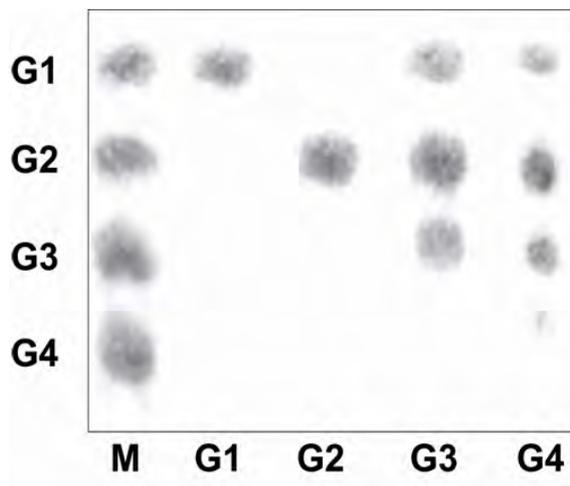


그림 3.3-50. TLC를 통한 cellulase 반응 product 확인

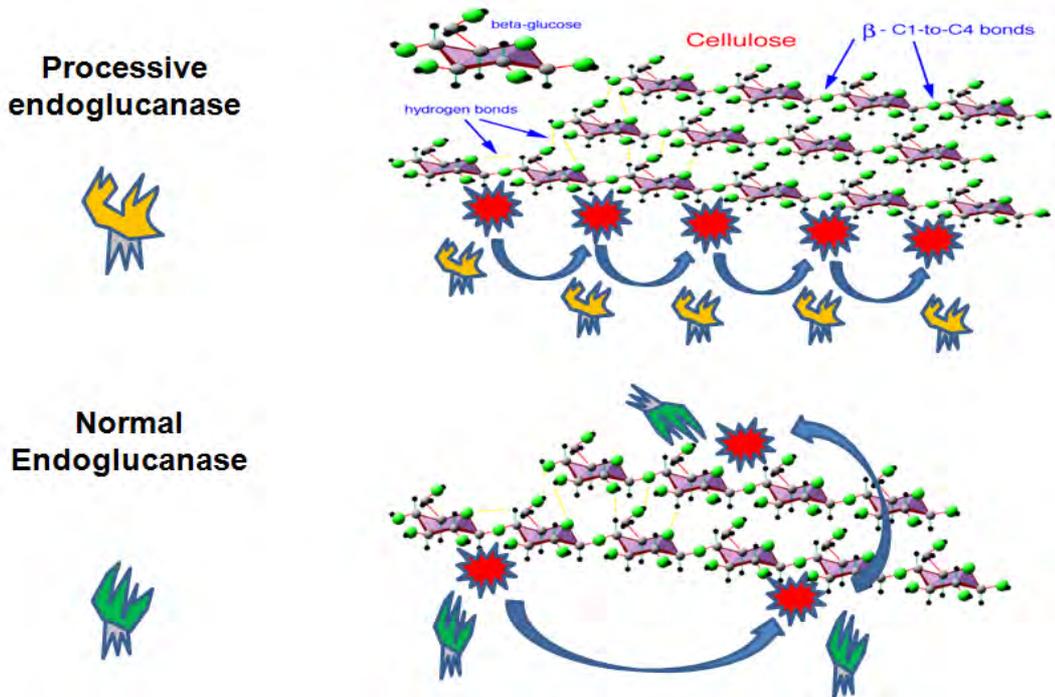


그림 3.3-51. 전진적인(processive), 일반(normal) 엔도글루카나아제의 분해 방법 비교

- 환원당 비교를 통하여 EngZ의 전진적인 특징 (processivity)을 확인하였고, 이를 통하여 분효소가 비결정성 셀룰로오스에 대하여 반응성이 높다는 것을 확인하였으며, 목질계 바이오매스에 적용 가능한 효소임을 확인함.

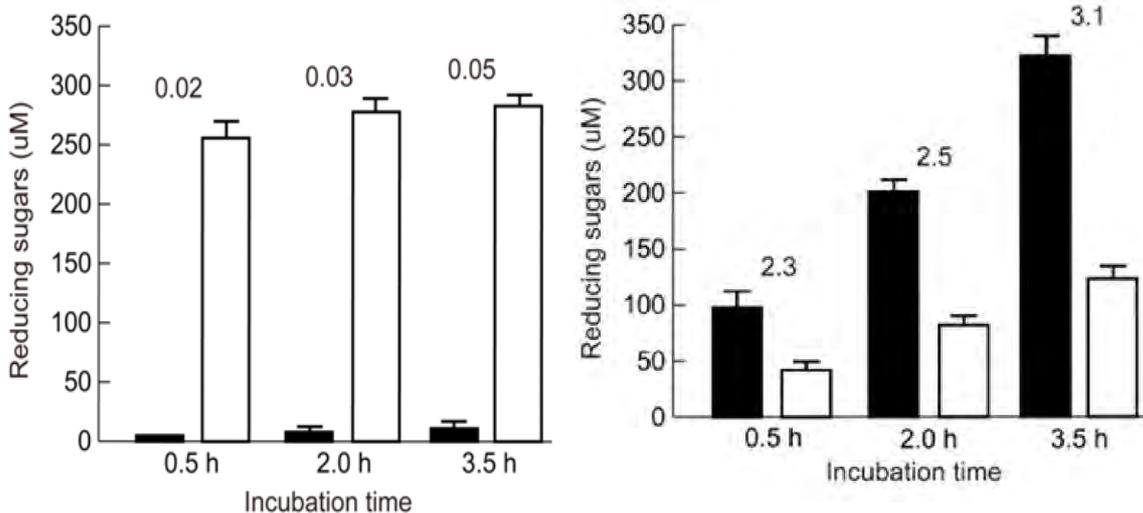


그림 3.3-52. 일반 엔도글루카나아제 (좌)와 신규 엔도글루카나아제 (우)의 환원당 분배 경향을 분석 및 비교에 따른 전진적인 엔도글루카나아제 (processive endoglucanase) 활성

(3) 생체 외 재조합한 신규 만난아제(mannanase)의 발현, 정제 및 특성분석

- 코히신 마커를 이용하여 다양한 탄소원 조건에서 *C. cellulovorans*의 신규 만난아제 발현을 분석 본 연구에서 탐색되어진 새로운 만난아제의 특성 및 활성을 탐색하기 위하여

대장균 단백질 발현벡터에 구축함. 발현되어진 단백질은 Affinity Gel (His-binding resin)을 이용하여 단백질을 분리 정제하며 정제된 단백질은 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-PAGE을 이용해 분석함.

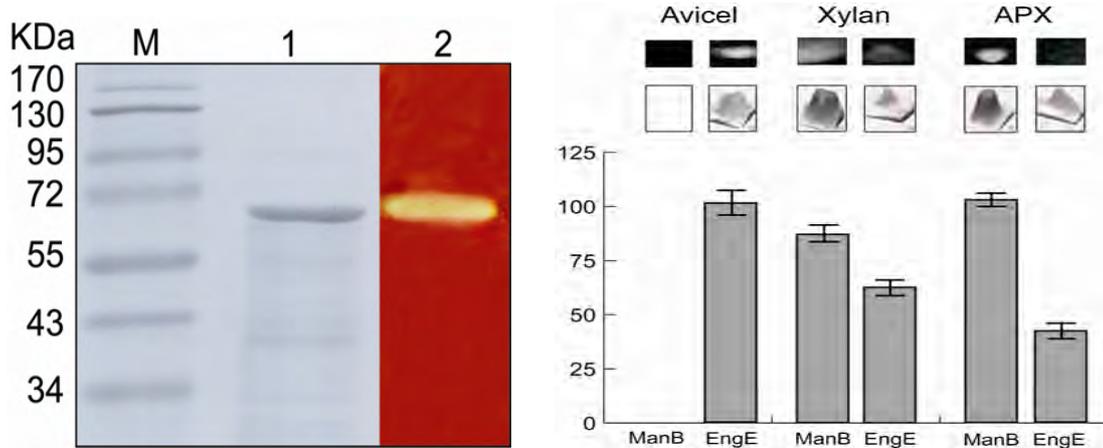


그림 3.3-53. ManB의 *C. cellulovorans*에서 각각의 탄소원에서의 발현 확인 및 활성 확인

□ 발현된 효소를 확인하고 최적의 pH와 온도에 대해서 최적조건을 탐색함. 효소에 기질은 갈락토만난으로 사용함.

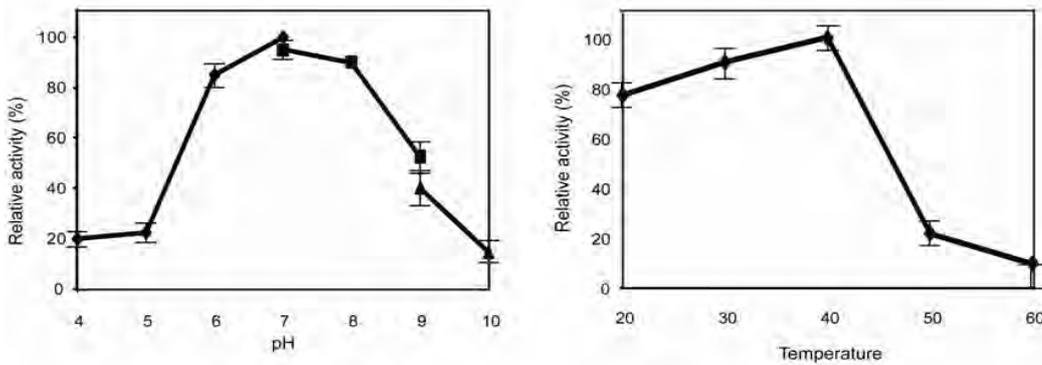


그림 3.3-54. ManB의 최적 pH, 온도 확인

□ 목질계 바이오매스에 다량 존재하는 갈락토 만난을 효율적으로 분해하기 위해서 신규 만난아제와 엔도글루카나아제 E를 지지체 단백질인 mini-CbpA에 조립시켜 복합체를 형성.

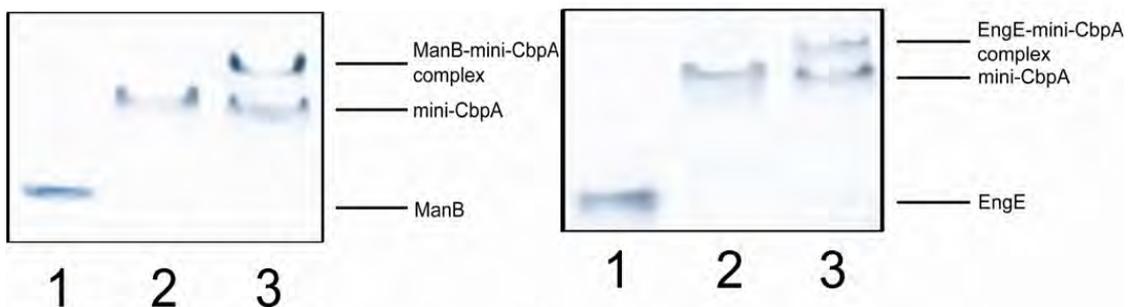


그림 3.3-55. ManB와 EngE의 mini-CbpA의 복합체 형성 확인

- 결합된 복합체를 몰 대비 조합을 통하여 최대의 갈락토만난 분해 상승효과를 측정함. 갈락토만난에서 ManB와 EngE의 조합에서 1:3또는 1:2 비율로 각테일을 섞었을 때 분해 상승효과가 최대화됨.

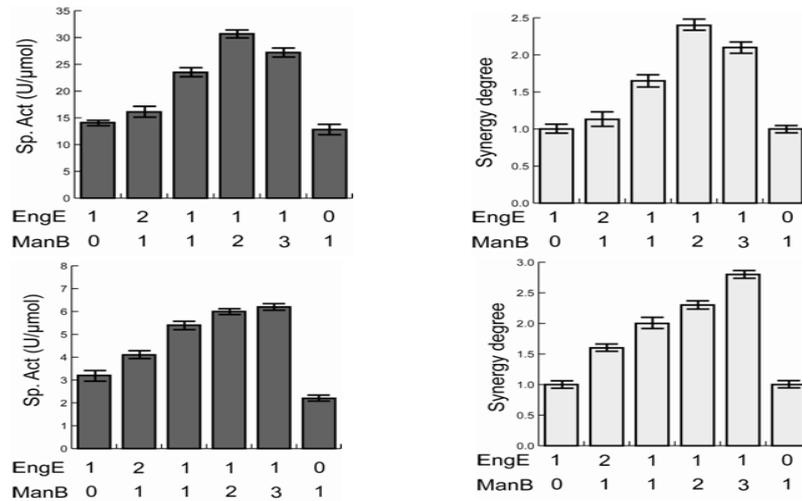


그림 3.3-56. ManB와 EngE 복합체의 갈락토만난 (galactomannan)에 대한 분해 synergic effect

- (4) 생체 외 재조합한 신규 엔도글루카나아제 (Endoglucanase G)의 발현, 정제 및 특성분석
- 코히신 바이오마커로 새롭게 찾아 낸 분해 효소 EngG의 Characterization 실험을 수행함. 대장균에서 유전자를 삽입한 벡터를 주입하고 재조합 단백질을 만들어냄. 발현 및 정제를 거친 재조합 단백질 EngG의 셀룰로오스에 대한 당화효소 활성 및 최적 pH와 온도를 측정함.

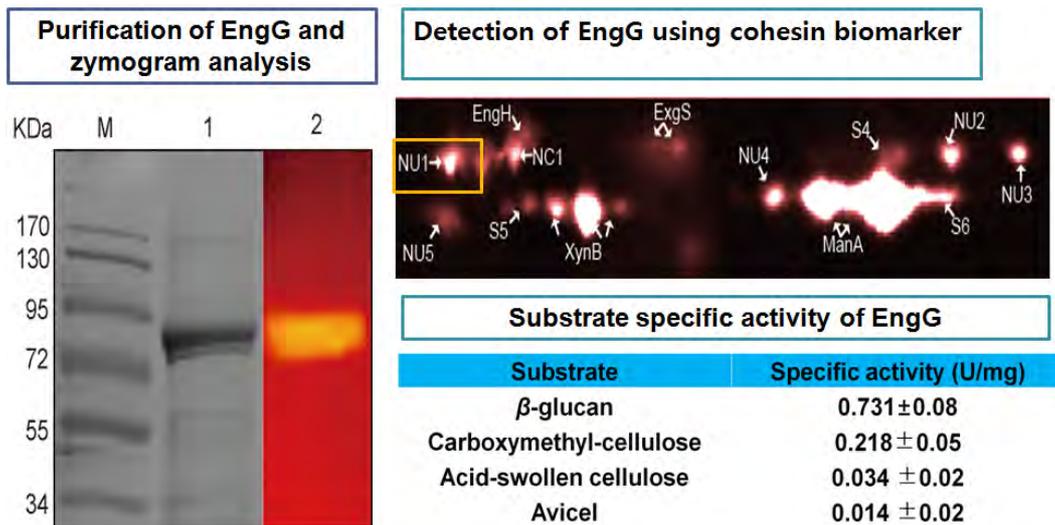
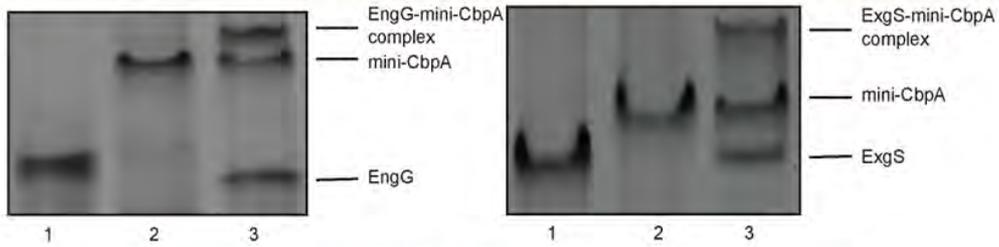


그림 3.3-57. Cohesin Biomarker를 이용한 새로운 효소 EngG의 탐색 및 Specific Activity

Native PAGE analysis of the purified cellulosomal enzymes (EngG and ExgS) and the purified mini-CbpA complex



Properties of EngG-cellulosome

Substrates	Activity ^a (U μmol ⁻¹)		
	With mini-CbpA	Without mini-CbpA	Synergy degree
CMC	5.3 (0.07)	5.6 (0.05)	1.1
Avicel	0.14 (0.012)	0.22 (0.008)	1.6
ASC	0.12 (0.008)	0.17 (0.010)	1.4
Filter paper	0.48 (0.011)	0.67 (0.008)	1.4

그림 3.3-58. Cohesin Biomarker를 이용한 새로운 효소 EngG의 탐색 및 Specific Activity

- 또한 셀룰로솜의 지지체 단백질인 miniCbpA 와의 결합 시에 비결정성 부분의 셀룰로오스인 Crystalline Cellulose에 대해 높은 활성을 가져왔음.
- 같은 종에 존재하는 *C. cellulovorans*에 있는 Exo-cellulase에 해당하는 Exoglucanase S (ExgS)와 복합체로써 분해에서의 시너지 효과를 밝혀냄. 코히신 바이오마커로 찾아낸 새로운 섬유소 분해 효소인 EngG에서의 선택적인 Cohesin-dockerin 상호작용을 발견함.

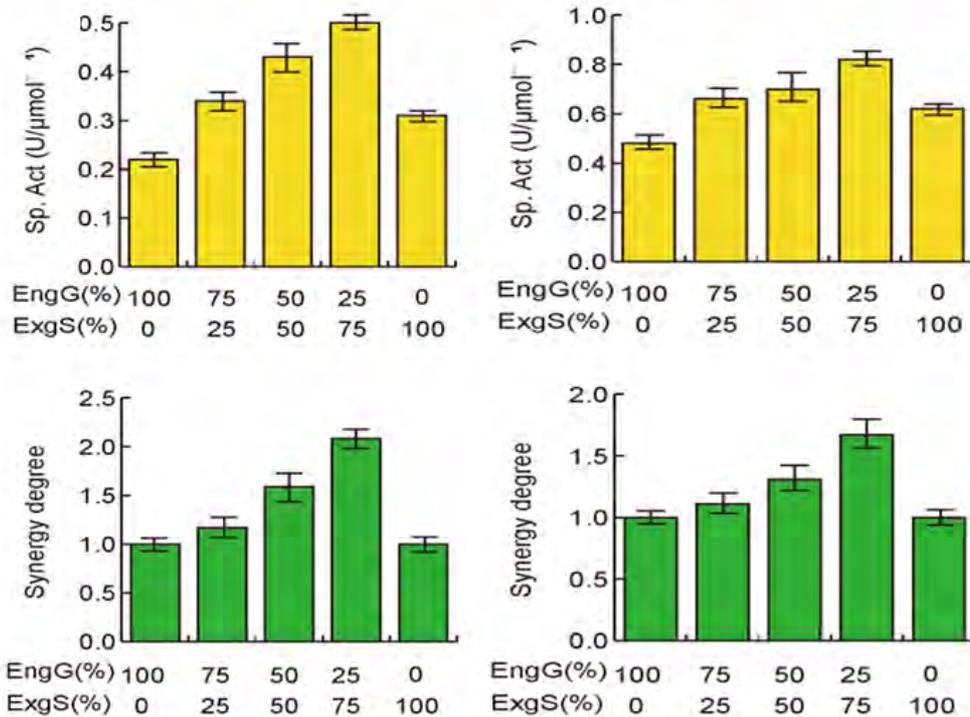


그림 3.3-59. Specific Activity and Synergy degrees against ASC and Filter Paper 연구 결과

- 새롭게 발견한 효소로부터 Cellulosome를 형성하는 단백질의 원리로 새로운 Dockerin부분을 발굴하고 이에 대한 특성을 분석함.

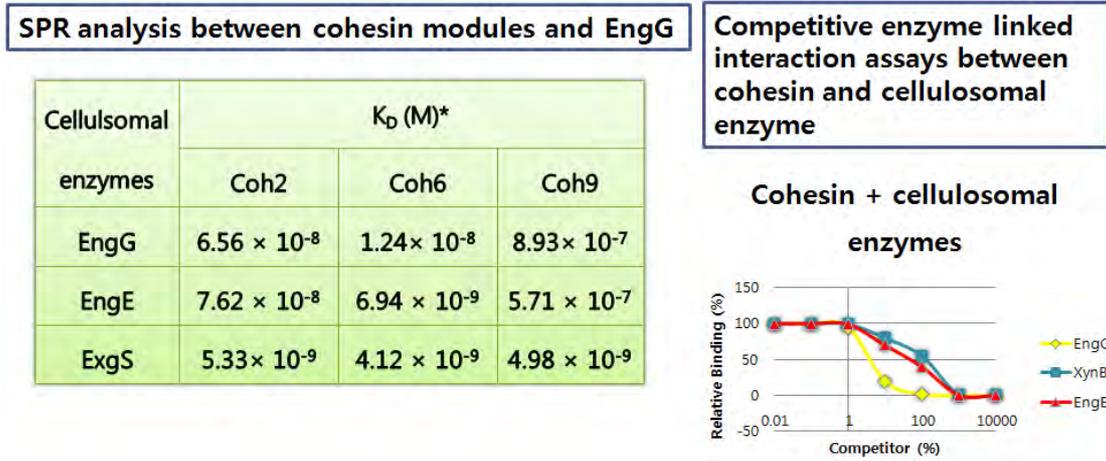


그림 3.3-60. SPR 기법을 이용한 Cohesin Module의 Binding 분석

- EngG에서 각각의 코히신에 대하여 서로 다른 binding affinity를 보이는 것을 확인함. 각각의 단위효소를 경쟁적으로 결합시킴으로써 타 효소와 다른 affinity를 보이는 것을 보임.

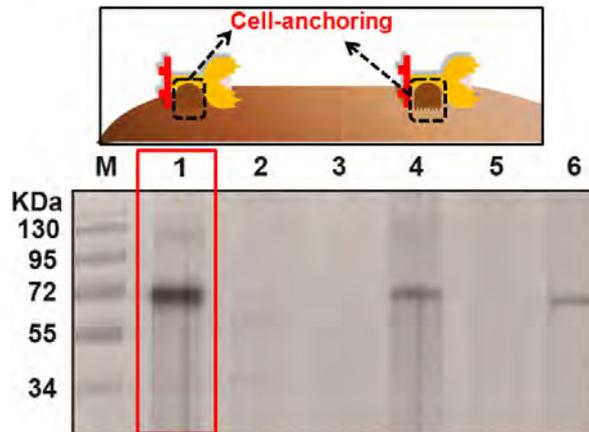


그림 3.3-61. EngG의 Cell surface binding assay 실험 결과

- EngG에 있는 새로운 기능부분을 찾아내어 미생물의 세포 표면에 결합할 수 있는 부분임을 밝혀냄. Surface Layer Homology Domain (SLH)과 Homology가 있는 functional domain이 존재 하여 이의 세포 표면 고정화 능력 분석. 이를 통하여 EngG의 세포 표면 고정화 능력을 증명함. 세포 표면 고정화 Domain에 대한 유전적 분석을 진행함.

나. 신규 곰팡이 유래 당화효소 탐색 및 동정

- 고효성의 당화효소 (셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제)를 포함하는 균주를 과제 2세부에 해당하는 김재진 교수 연구진으로부터 선별 받아 이로부터 곰팡이 유래 당화효소를 분리함. 셀룰로오스를 탄소원으로 배양함으로써 다양한 당화효소들이 과 발현 할 수 있는 환

경을 조성하였고, 이로부터 추출한 단백질을 DEAE Chromatography를 통하여 효소 활성도가 높은 부분은 추출하였음. 이를 통하여 단백질을 분리하여 특성분석을 진행하였고, 고활성 당화효소를 탐지하고 필요 유전자원을 확보 할 수 있음.

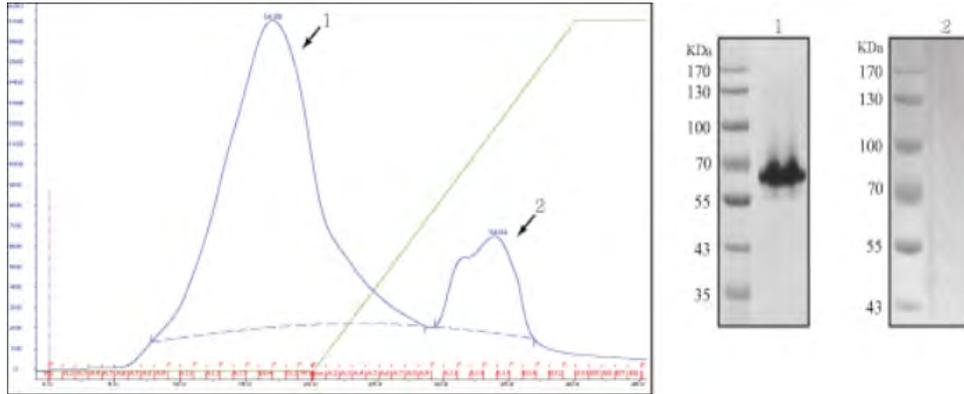


그림 3.3-62. DEAE를 통한 *T. harzianum*에서 분리된 당화효소 정제

- 분리된 아미노산 서열 분석을 통하여 높은 활성을 가지고 있는 fraction의 단백질을 동정해냄. 섬유소분해효소의 분비가 많은 균주의 탐색 Trichoderma에서 섬유소분해효소를 생산하는 미생물의 genomic DNA와 cDNA를 이용 cellulase를 코딩아미노산 서열 분석을 통한 유전자 확보 및 재조합 단백질 구축. 구축된 재조합 당화효소를 *Pichia pastoris* 균주에 삽입하여 재조합 단백질을 발현시키고 정제하여 효소의 활성을 측정함. 단백질 동정 및 효소 활성 특성 테스트 결과 Exocellulase에 해당하는 Cellobiosehydrolase로 추정됨.

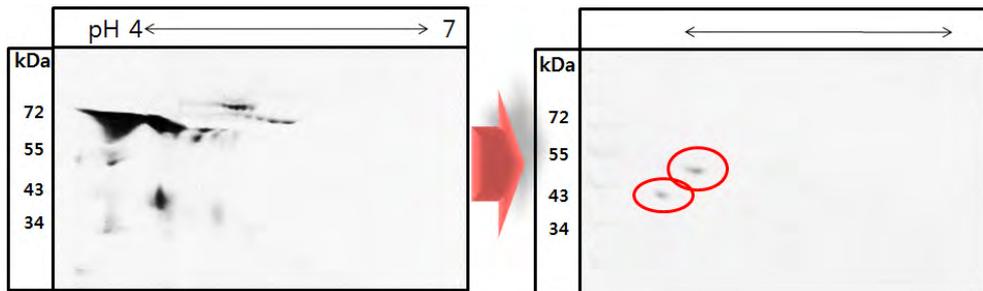


그림 3.3-63. DEAE chromatography를 통하여 단백질을 분리 정제함

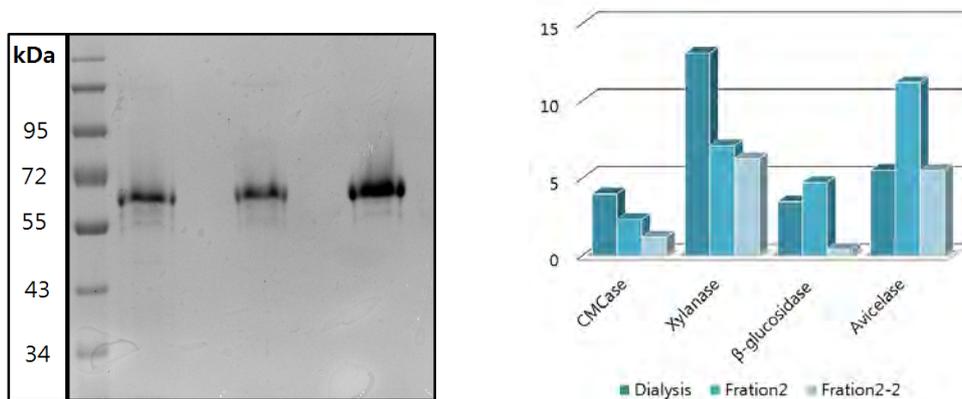


그림 3.3-64. SDS-PAGE에서 당화효소의 정제 과정 관찰 및 각 기질에 대한 효소 활성

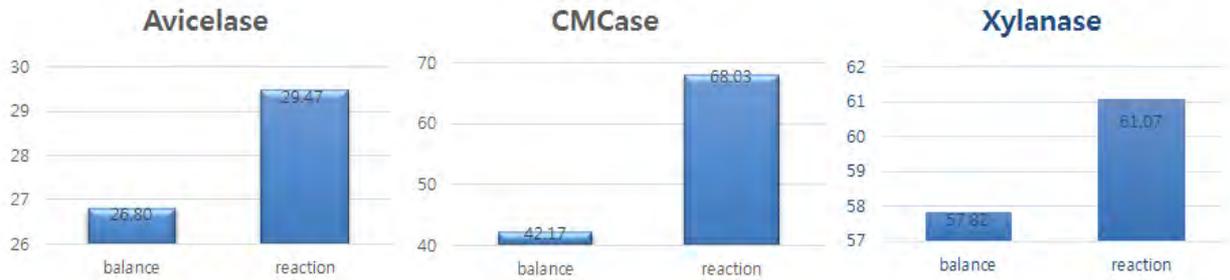


그림 3.3-65. 곰팡이 균주에서 추출한 당화효소의 각 활성

5. 유전자조작에 의한 섬유소분해효소 생산 증진 기술 개발

가. 돌연변이 방법에 의한 효소 생산 증진

□ 선발 균주인 *Lecytophora* sp. YP363와 *Penicillium oxalicum* KL1를 돌연변이 방법으로 효소 생산증진을 하였음. 돌연변이 방법에는 γ -ray와 UV, 그리고 NTG을 사용하였으며, γ -ray 방법은 균주에 γ -ray (Co^{60})를 2.5 KGY의 dose로 조사하여 돌연변이 균주를 제작하였고, UV 방법에는 10 W UV lamp를 사용하여 10 cm 높이에서 UV를 조사하였음. NTG 방법에는 배양액에 NTG 용액을 1 mg/ml 농도로 처리하여 돌연변이 균주를 제작하였음. 이로부터 얻어진 돌연변이 균주들의 FPase를 측정하여 우수 균주를 선별함.

(1) *Lecytophora* sp. YP363 균주의 돌연변이

□ 선발 균주인 *Lecytophora* sp. YP363를 돌연변이 방법으로 효소 생산증진을 하였다(그림 3.3-66). 1차 γ -ray방법으로 돌연변이 균주를 제작하였으며 FPase를 측정하여 우수 균주를 선별하였음. 1차 실험 결과 우수균주 총 200여 균주로 부터 GI-21, GI-33, GI-42, GI-57를 선별하였으며 각각 균주의 FPase activity (U/ml)은 7.24, 8.34, 8.13, 8.56으로 초기 6.55 U/ml 보다 상승한 돌연변이 균주를 제작하였다. 2차 UV 돌연변이 균주 제작방법으로 1차 γ -ray방법으로 선별된 돌연변이 균주에 UV를 조사하여 총 200여 균주로 부터 UV-7, UV-18, UV-2-3, UV-2-16, UV-2-32 균주를 선별하였으며 각각 균주의 FPase activity (U/ml)은 8.77, 9.0, 9.21, 9.21, 9.66으로 1차 γ -ray방법으로 선별된 돌연변이 균주 보다 더 상승하였음. 돌연변이 방법으로 초기 균주보다 FPase활성이 44% 정도 증가함.

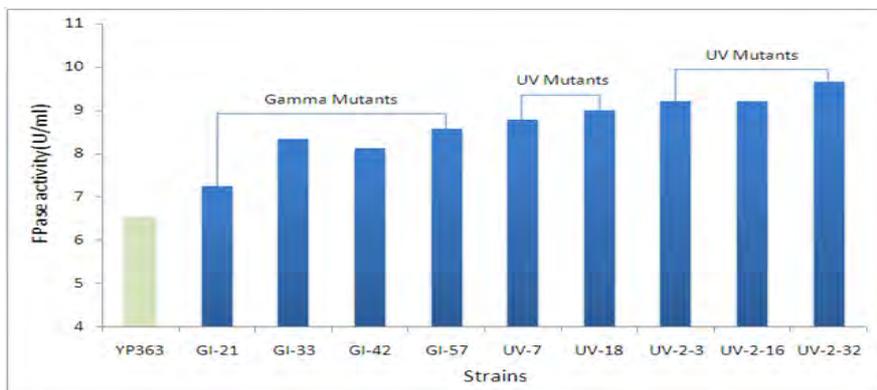


그림 3.3-66. Cellulase production by mutant strains of *Lecytophora* sp. YP363

- 전처리된 보리짚(10% 보리짚 + 15% 암모니아 용액, 150 °C 1시간)과 α-cellulose를 기질로 하여 여러 가지 효소농도 5, 10, 15, 20, 30, 40 cellulase unit/g으로 하여 생성된 환원당 양을 측정한 결과 (그림 3.3-67) *Trichoderma reesei* Rut C-30과 선발균주인 *Lecytophora* sp. YP 363 모두 효소량 15 unit/g에서 최대 당화 효율을 나타냄.

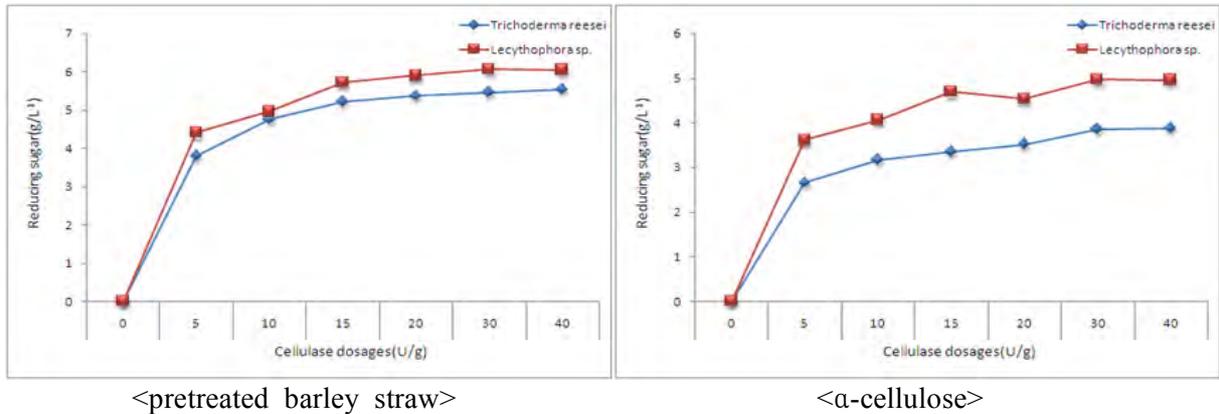


그림 3.3-67. Effect of cellulase dosages on the saccharification of pretreated barley straw and α-cellulose

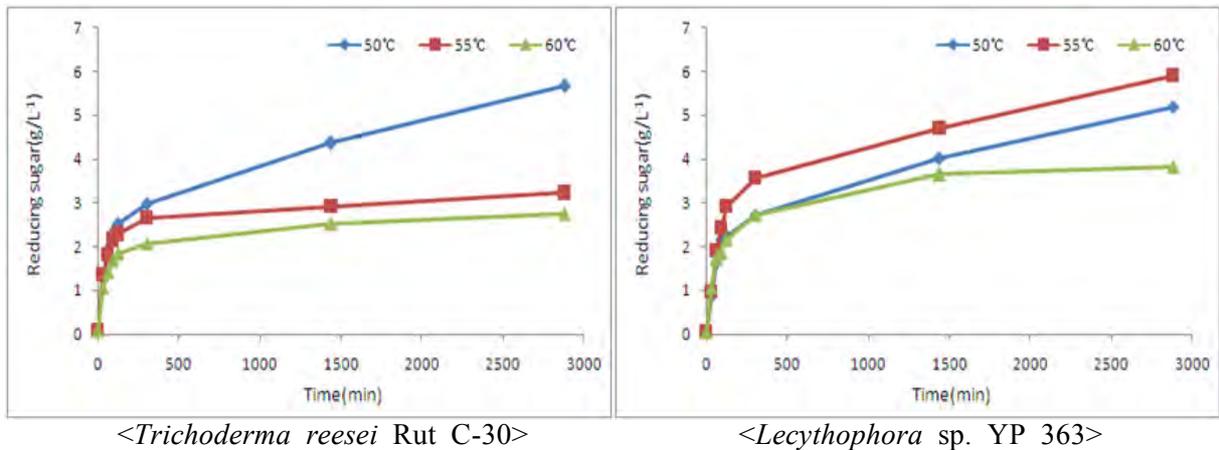


그림 3.3-68. Effect of temperature on the saccharification of pretreated barley straw

- 여러 가지 반응 온도 50, 55, 60 °C으로 반응하여 전처리된 보리짚으로부터 생성된 환원당량을 측정하여 최적 당화반응 온도를 측정한 결과는 그림 3.3-68에 나타내었음.
- 실험결과 *T. reesei* Rut C-30의 경우 최적 당화반응온도는 50 °C로 온도가 올라감에 따라서 당화율이 감소하는 것을 확인할 수 있었는데 선발 균주인 *Lecytophora* sp. YP 363의 경우 50 °C 보다 55 °C에서 더 높은 당화율을 보였으며 55 °C에서는 *T. reesei* Rut C-30보다 더 높은 효소 활성을 나타냈으며 60 °C에서도 *T. reesei* Rut C-30 보다 효소 활성 감소율이 적은 것을 확인할 수 있었음.

(2) *P. oxalicum* KL1 균주의 돌연변이

- 선발 균주인 *Penicillium oxalicum* KL1를 대상으로 UV, NTG 최적 처리 시간을 조사한 결과(그림 3.3-69) UV는 4분 이후 생존률이 5% 미만으로 최적 처리 시간을 보였으며, NTG의 경우 처리 80분 이후 생존률이 5% 미만으로 나타났음. 각 돌연변이원을 이용하여 4 ~ 5회 반복적으로 처리하여 각 300 돌연변이 주를 얻음.

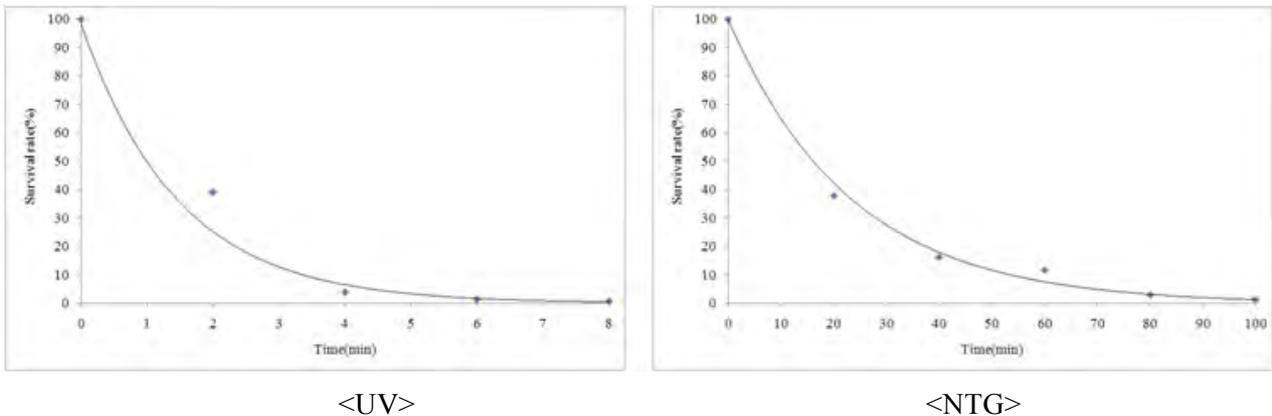


그림 3.3-69. Survival ratio of *P. oxalicum* KL1 after UV and NTG treatment

- 돌연변이주를 agar plate에 접종하여 생성된 투명환을 측정하여 기존 균주 보다 우수한 균주를 선발함 (표 3.3-20). 기존 균주의 투명환 크기가 27 mm 보다 넓은 균주들을 10균주씩 선발하였음.

표 3.3-20 The clear zone diameter of selected mutants

Clear zone diameter(mm)					
대조구 KL1 27 mm					
U-7	28	N-4	29	G-14	30
U-11	30	N-9	30	G-30	31
U-25	29	N-13	29	G-47	30
U-29	31	N-24	31	G-48	29
U-33	33	N-38	28	G-49	30
U-46	29	N-41	30	G-52	32
U-57	30	N-44	29	G-56	33
U-63	31	N-76	29	G-61	31
U-75	28	N-82	30	G-62	29
U-82	30	N-98	31	G-92	31

- 1차선별 균주들을 대상으로 CMC를 기질로한 Mandel 배지에 접종하여 96(24) well plate에서 배양하여 FPase를 측정함 (표 3.3-21). UV를 이용한 돌연변이 균주들에서는 U-11(7.92 U/ml)와 U-46(7.53 U/ml)으로 기존 균주보다 효소 활성이 증가되어 선발하였음. γ -ray를 이용한 돌연변이 균주에서는 G-47(7.66 U/ml), G-56(7.79 U/ml), G-61(8.48 U/ml)으로 이중 G-61 균주가 기존 균주에 비해 효소 활성이 26% 증가함.

표 3.3-21 The FPase activities of selected mutants

Strain	FPase (U/ml)	Relative activity (%)	Strain	FPase (U/ml)	Relative activity (%)	Strain	FPase (U/ml)	Relative activity (%)
대조구 KL1			6.71 U/ml			100%		
U-7	7.02	104.6	N-4	6.87	102.4	G-14	6.79	101.3
U-11	7.92	118	N-9	6.46	96.27	G-30	7.05	105.6
U-25	6.96	103.7	N-13	6.6	98.36	G-47	7.66	114.3
U-29	7.02	104.6	N-24	6.98	104	G-48	7.04	105
U-33	7.22	107.6	N-38	7.01	104.5	G-49	5.57	83.13
U-46	7.53	112.2	N-41	6.95	103.6	G-52	6.69	103.8
U-57	7.27	108.4	N-44	7.18	107	G-56	7.79	116.2
U-63	7.33	109.2	N-76	6.98	104	G-61	8.48	126.5
U-75	6.67	99.4	N-82	6.93	103.3	G-62	7.09	105.8
U-82	7.12	106.1	N-98	6.79	101.2	G-92	6.95	103.7

□ 2차선별 균주를 선별하기 위해 벃짚을 기질로 한 ATCC cellulose medium 907배지에 접종하여 flask에서 배양하였으며 배양 종료 후 CMCase, FPase, β -glucosidase, avicelase, xylanase, pectinase를 분석함. 분석결과(그림 3.3-70) 전체적으로 10 ~ 20% 효소 활성이 증가되었으며, γ -ray를 이용한 돌연변이 균주들에서 xylanase와 pectinase의 효소 활성이 많이 증가됨.

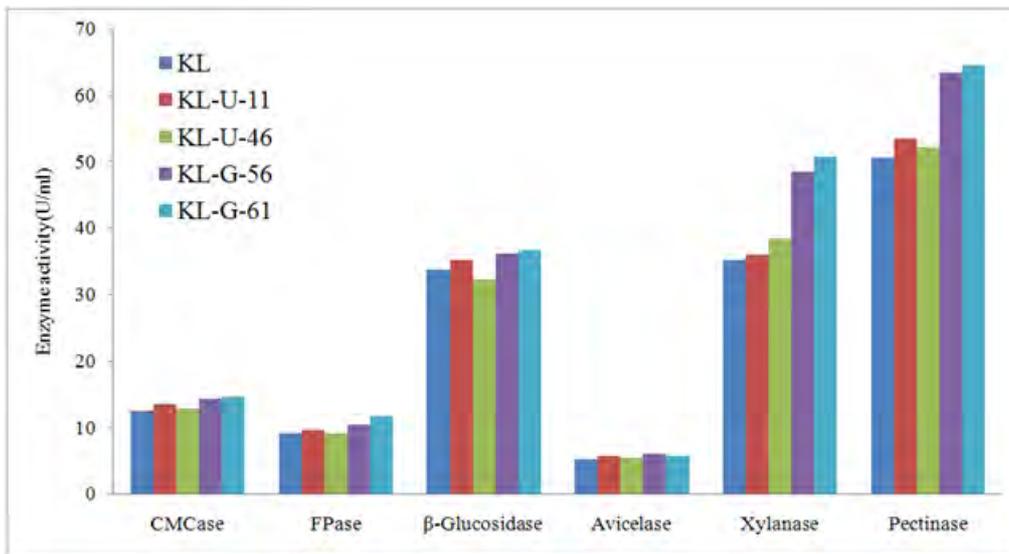


그림 3.3-70. The activities of cellulases, xylanase, pectinase of KL and its mutants

□ 선발된 돌연변이 균주들을 대상으로 반복적으로 UV 또는 NTG를 처리하여 돌연변이 균주들을 제작하였음. 실험결과 2차 돌연변이 균주들에서 FPase가 10 U/ml가 넘는 균주들을 선발 하였으며, 3차 돌연변이 균주 중 3-1이 기존 균주인 KL 보다 CMCase가 14%, FPase가 31% 상승한 균주를 선발함 (표 3.3-22).

표 3.3-22 CMCase and FPase activities of KL and its mutants obtained with different treatments

Strain	Mutagen	Enzyme activity(U/ml)		Relative activity(%)	
		CMCase	FPase	CMCase	FPase
KL	-	12.54	9.15	100	100
1-11	UV	13.54	9.65	107.97	105.46
1-46	UV	12.95	9.23	103.26	100.87
2-2	UV→UV	14.00	10.9	111.66	119.12
2-3	UV→NTG	13.91	11.58	110.98	126.56
2-4	UV→UV	13.71	10.68	109.4	116.8
2-6	UV→UV	14.20	11.38	113.26	124.4
3-1	UV→UV→UV	14.64	12.06	116.79	131.84
3-7	UV→UV→UV	14.38	11.78	114.72	128.74

(3) 돌연변이 균주들의 효소 활성 증진 확인

□ 선발 균주인 *Lecytophora* sp. YP363의 돌연변이 제작 결과 효소 활성이 가장 우수한 YP363(U-3-20) 균주를 제작하였으며 초기 균주 보다 효소 활성이 8 ~ 78% 증가되었음. 특히 FPase (43%), β -glucosidase (78%), avicelase (46%)에서 초기 균주보다 효소 활성이 많이 증가됨. *Penicillium oxalicum*의 돌연변이 균주 제작 결과 초기 균주보다 FPase (31%), β -glucosidase (38%), xylanase (42%)에서 효소 활성이 9 ~ 42% 증가 되었으며 두 균주 모두 대조구인 *T. reesei* Rut C-30 보다 효소 활성이 모두 높게 나타남 (표 3.3-23). *T. reesei* Rut C-30의 경우 β -glucosidase의 활성이 낮게 나오는데 *Penicillium oxalicum*의 경우 *T. reesei* Rut C-30보다 17배 높은 β -glucosidase 활성을 보임.

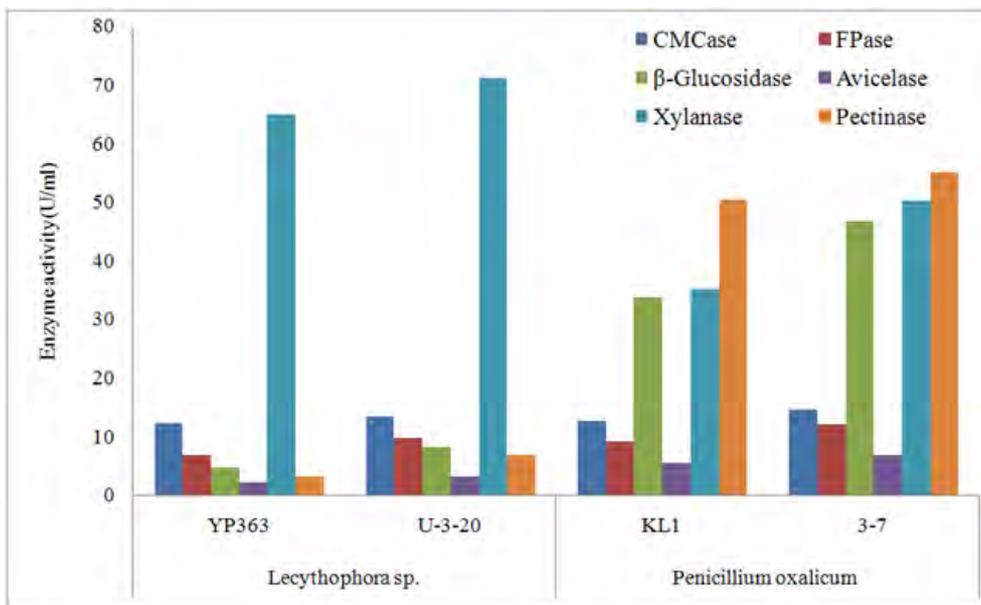


그림 3.3-71. Comparison of enzyme activities between parental and mutant strains

표 3.3-23 Comparison of enzyme activities among *T. reesei* Rut C-30 and mutant strains of *Lecytophora* sp. and *P. oxalicum*

Enzyme (U/ml)	<i>T. Reesei</i> Rut C-30	<i>Lecytophora</i> sp.		Relative activity(%)	<i>Penicillium oxalicum</i>		Relative activity(%)
		YP363	U-3-20		KL1	3-7	
CMCase	12.56	12.3	13.35	108	12.54	14.64	116
FPase	7.71	6.7	9.63	143	9.15	12.06	131
β-Glucosidase	2.63	4.6	8.22	178	33.82	46.78	138
Avicelase	5.69	2.1	3.08	146	5.34	6.84	128
Xylanase	47.19	65	71.21	109	35.24	50.35	142
Pectinase	11.57	3.2	6.88	115	50.58	55.14	109

나. Genome shuffling 방법에 의한 균주 개량

(1) Genome shuffling 수행 방법

- 돌연변이 방법에 의해 선발된 우수 균주인 *P. oxalicum* KL1 (3-1), *P. oxalicum* KL1 (3-7) 과 원 분리 균주인 *P. oxalicum* KL1의 원형질체(protoplast)를 제작하였음. 제작방법에는 균주들의 포자를 PDA와 0.5% 벧짖 또는 0.5% 밀기울을 포함하는 agar plate에 도말하여 30 °C 에서 11시간 동안 배양함. 배양 후 세포벽을 제거하기 위해 lysing enzyme (L1412, Sigma, USA)을 사용하여 34 °C에서 3시간동안 반응하여 세포벽을 제거하였으며 사용농도는 5 mg/ml이고 1.2 M sorbitol, 0.1 M KH₂PO₄으로 조성된 buffer에 녹여 사용함. 반응 종료 후 lysing enzyme을 제거하기 위해 washing buffer (1.2 M sorbitol, 50 mM CaCl₂, 1 M Tris-HCl, pH 7.5)으로 두 번 세척한 후 분해되지 않고 남아있는 균사(mycelia)를 filter paper (Whatman No. 1)로 걸러 제거함. 원형질체를 두 그룹으로 나누어 한 그룹은 50 ~ 70 °C에서 50분간 열처리(heat-killed)하였으며 다른 한 그룹은 UV를 5 ~ 10분간 처리하여 활성을 제거함 (UV-killed) (Cheng et al., 2009; Xu et al., 2012).
- 원형질체 융합을 위해 두 그룹의 원형질체들을 혼합하고 35% PEG (MW 6,000)를 넣고, 5 ~ 30분간 융합하였으며 반응 종료 후 PEG를 제거하기 위해 washing buffer로 2 ~ 3 회 세척하고, 융합된 원형질체의 세포벽 재생을 위해 PDA, 중층 PDA (Cheng et al., 2009; Zhou et al., 2008) plate를 사용하였으며 중층배지를 제작하기 위하여 2% agar가 포함되어 있는 PDB를 petri dish 아래층에 얇게 분주한 후, 굳어지면 그 위에 0.8% agar가 포함되어 있는 PDB를 분주함. 이를 18 °C ~ 36 °C incubator에서 배양함.
- 원형질체융합의 대조구로서 heat-killed 원형질체와 UV-killed 원형질체의 혼합물에 PEG를 첨가하지 않고, 동일하게 처리한 경우에는 세포벽재생 PDA 중층 plate에서 재생된 콜로니가 전혀 없음을 확인함.
- 중층 PDA plate에서 성장한 콜로니들의 효소활성을 측정하여 기존 균주보다 증진된 효소활성을 나타내는 균주들을 모아 다시 원형질체융합을 통하여 2차 genome shuffling 과정을 수행함. 여기에서 효소활성이 더욱 증진된 균주들을 모아 원형질체융합을 통하여 3차 genome shuffling을 수행하였고, 그 결과로 얻어진 융합체들의 효소활성을 측정하여 2차 genome shuffling 때보다 더욱 증진된 효소활성을 나타내는 균주들을 선발함.

(2) 원형질체 형성 배지 선정

□ 돌연변이 선발 균주인 *P. oxalicum* KL1 (3-1, 3-7) 균주와 원 분리균주인 *P. oxalicum* KL1 균주를 PDA plate, 밀기울 또는 벯짚이 함유된 Mandel agar plate에 도말하여 30 °C 에서 11시간 배양하고 효소 처리하여 원형질체를 만들었으며 각 agar medium에서 얻어진 원형질체의 농도는 PDA에서 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 밀기울에서 $4.2 \times 10^5/\text{ml}$, 벯짚에서 $12 \times 10^5/\text{ml}$ 으로 이들 중 벯짚이 함유된 고체배지에서 원형질체 형성율이 가장 높았음 (그림 3.3-72).

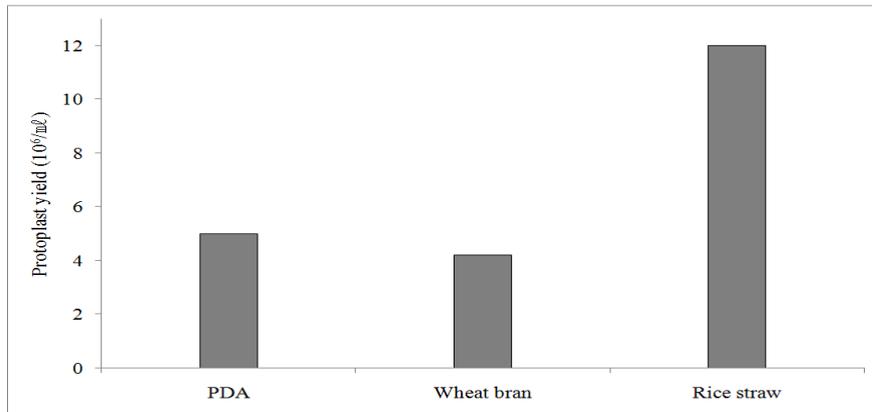


그림 3.3-72. Protoplast yield of *P. oxalicum* KL1 grown on different agar media

(3) 배지에 따른 원형질체의 세포벽 재생 효과

□ 원형질체 세포벽 재생(regeneration)을 위해 PDA + 2% agar, 1/4 PDA + 2% agar, 1/10 PDA + 2% agar, PDB + 0.8% agar (단층, monolayer), PDB + 0.8% top agar (중층, two layer)에 원형질체 용액을 도말하여 30 °C에서 1일간 배양하였다. 배양 후 재생빈도(regeneration frequency, %)를 측정된 결과 PDA + 2% agar는 6.4%, 1/4 PDA + 2% agar는 7.56%, 1/10 PDA + 2% agar는 3%, PDA + 0.8% agar (monolayer)는 9.3%, PDB + 0.8% top agar (two layer)는 10.5%로 나타남 (그림 3.3-73). 이후 세포벽 재생율이 가장 높은 PDB + 0.8% top agar (two layer)를 세포벽 재생배지로 사용하였다.

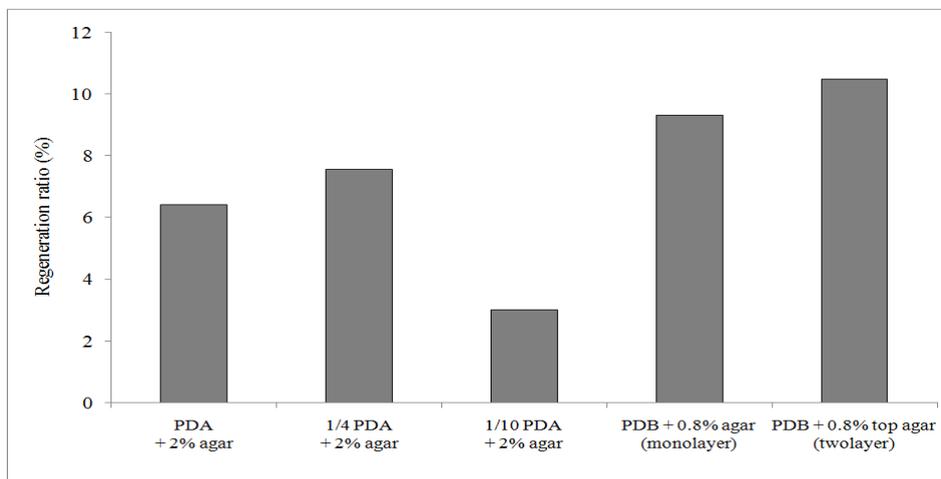


그림 3.3-73. Regeneration ratio of cell wall from protoplast of *P. oxalicum* KL1 grown on different agar media

(4) 온도에 따른 원형질체 세포벽 재생 효과

□ 원형질체를 PDB + 0.8% top agar (two layer) 배지에 도말한 다음 여러 온도(18 ~ 36 °C)에서 배양한 결과, 세포벽 재생빈도는 18 °C에서 11.89%, 21 °C에서 11.15%, 24 °C에서 12.13%, 27 °C에서 12.24%, 30 °C에서 11.26%, 33 °C에서 10.5%, 36 °C에서 6.3% 으로 27 °C 이하 낮은 온도에서 세포벽 재생빈도가 높았음 (그림 3.3-74).

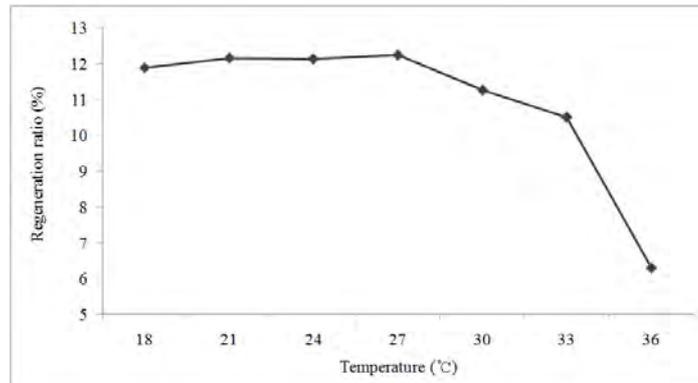


그림 3.3-74. Regeneration ratio of cell wall from protoplast of *P. oxalicum* KL1

(5) *P. oxalicum* KL1 균주의 돌연변이 및 genome shuffling 최종 결론

□ 초기 분리된 원 균주 *P. oxalicum* KL1을 UV, NTG, γ -ray 등의 돌연변이원을 이용하여 1차 돌연변이 우수균주를 제작하였으며 2차로 genome shuffling 방법을 이용하여 여러 돌연변이 균주를 fusion하여 효소 생산능이 증진된 균주를 제작함. 초기 *P. oxalicum* KL1 균주의 FPase는 9.15 U/ml로 1차 돌연변이 균주 제작 후 *P. oxalicum* KL1 (3-7) 균주가 11.78 U/ml로 초기 균주보다 섬유소 분해 효소 활성이 28.74% 증가된 균주를 얻음(그림 3.3-75). 이후 2차 genome shuffling 방법을 통해 fusion된 균주들을 얻을 수 있었으며 *P. oxalicum* KL1-24 균주가 13.21 U/ml으로 원 균주인 KL1 보다 FPase가 44.37% 증가된 균주를 얻을 수 있었음. FPase외에도 KL1-24균주는 KL1균주보다 CMCase, β -glucosidase, avicelase, xylanase, pectinase에서 각각 34.29, 54.19, 33.89, 50.82, 25.02% 증가함. Cheng 등(2009)은 *P. decumbens*를 genome shuffling 방법을 이용하여 효소 생산량을 6.48 FPU/ml 으로 증가시켰음. 문헌에 따른 연구결과와 본 실험결과를 비추어 보면 genome shuffling 방법이 mutation이외의 방법으로 *Penicillium* 균주의 섬유소 분해효소 생산량을 증가하는 효과적인 방법이라고 판단됨.

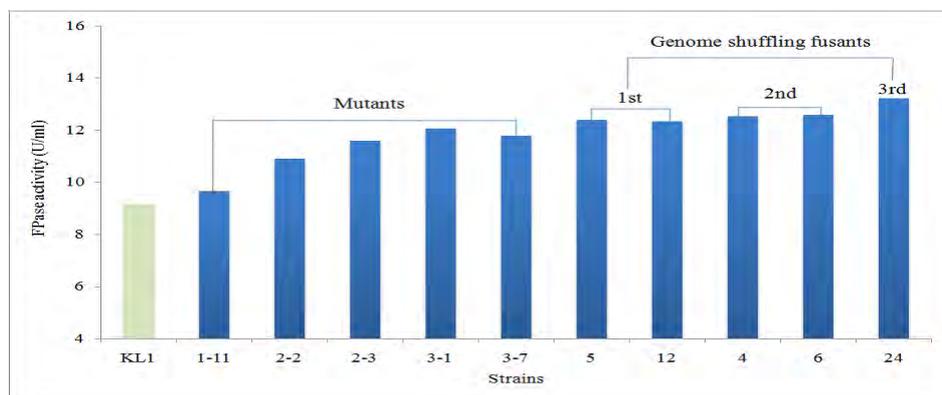


그림 3.3-75. FPase improvement of *P. oxalicum* KL1 by UV-mutation and genome shuffling

다. 고효율성 섬유소 분해효소의 개량

□ 변형 유도할 셀룰라아제 유전자 분석 및 생체 외 유전자 재조합 방법 구축. 특이적 활성도가 높아졌으며, 이의 안정성 또한 향상된 돌연변이체의 확보를 위하여 선행연구의 분석을 통해 최적의 프로토콜을 확보. StEP 및 SHIPREC을 통한 고효율성 및 온도 안정성이 증대된 돌연변이체의 생체 외 재조합. 효소의 활성이 증대되었거나, 온도안정성이 유도된 변이체를 단백질 발현벡터에 구축하여 발현 정제하였으며 정제되어진 돌연변이체의 온도 및 pH의 안정성을 확인하고 3D-modeling을 통한 분석.

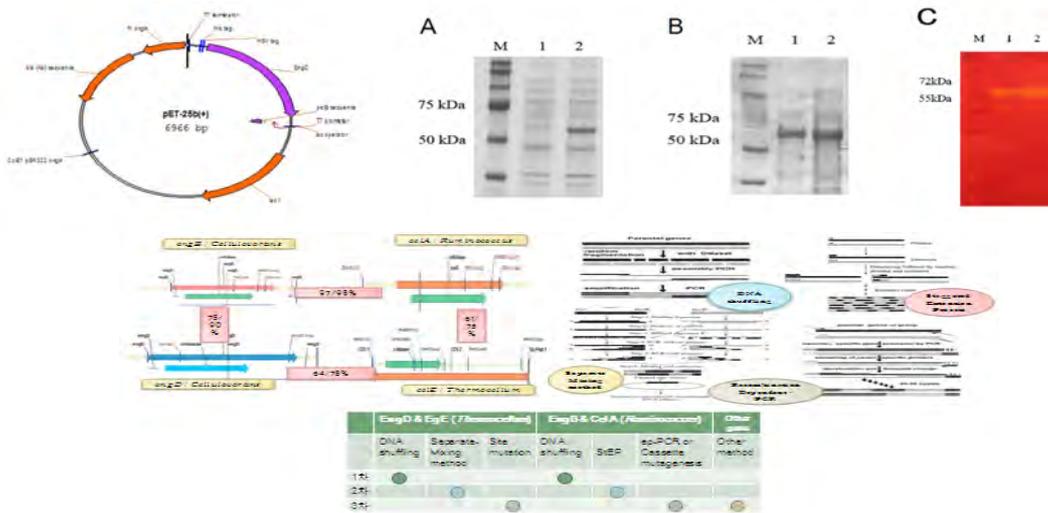


그림 3.3-76. StEP 방법을 통한 DNA shuffling 돌연변이체의 발현, 정제 및 zymogram 사진

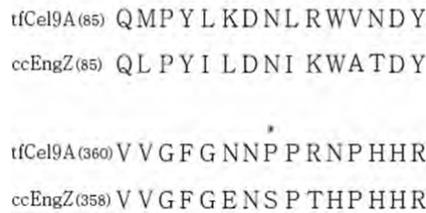


그림 3.3-77. 아미노산 서열 비교를 통하여 열 안정성 부분 탐색

□ 구축된 당화효소 변이체를 확인하고 대장균에서 발현하여 열 안정성과 효소활성 증대를 확인함, 여러가지 효소활성 확인법을 통하여 개량된 효소의 원리를 탐색함. 이에 따라 중온성 효소를 50 °C까지 효소 최적온도를 높임. 확인한 안정성을 바탕으로 효소 안정성 개량 원리를 확립함.

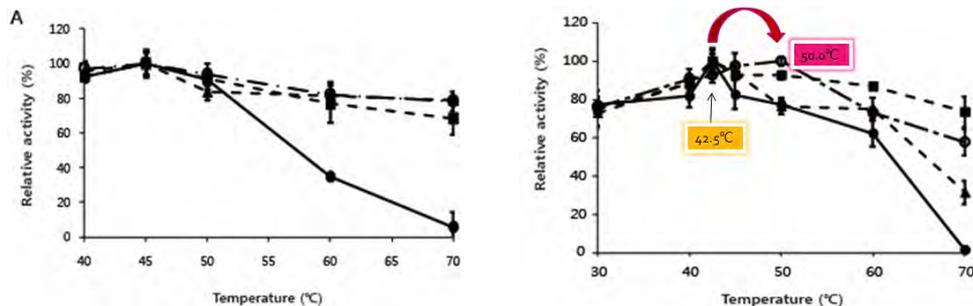


그림 3.3-78. 돌연변이체에 대한 열 안정성에 대한 변화 확인

표 3.3-24 돌연변이체에 대한 효소 효율성 증대 확인

Enzyme	Km (mg/ml)	Vmax (U/mg)	Kcat (1/min)	Kcat/Km (ml/mg.min)	half life (min)
	기질 친화도	효소 반응 속도	분해 속도 상수	속도 상수 효율	반감기
wild	8.98	1.24	20.73	2.31	10.97
mutant 1 (K94R)	4.02	1.03	16.04	3.99	33.46
mutant 2 (S365P)	6.37	1.05	12.38	1.94	44.14
mutant 3 (K94R/S365P)	5.4	3.05	95.33	17.67	53.22

나. 고효율 섬유소분해효소 대량 생산 유전자 변형체 균주 개발

- 고효율의 당화 효소 스크린 및 발효균주 선정.
- GenBank 등 유전자 데이터베이스와 유전자 분석 프로그램 (Vector NTI 등)을 이용하여 셀룰로솜 혐기성 생산 균주 중에서 결정형 섬유소의 효과적인 분해에 필요한 고 활성의 섬유소 분해효소의 탐색 및 이를 코딩하는 아미노산 서열의 분석.
- 형질전환을 위한 유전자의 고발현 벡터시스템의 구축 및 숙주 미생물에의 형질전환.
- 고효율 당화효소의 유전자를 탐색하여 이를 PCR을 통해 증폭한 후 yeast vector에 구축 *Escherichia coli* DH5α, subcloning용 Plasmid vectors 구축.
- pESC-TRP Yeast transformation - YEASTMAKER Yeast Transformation Kit2 (Clontech).

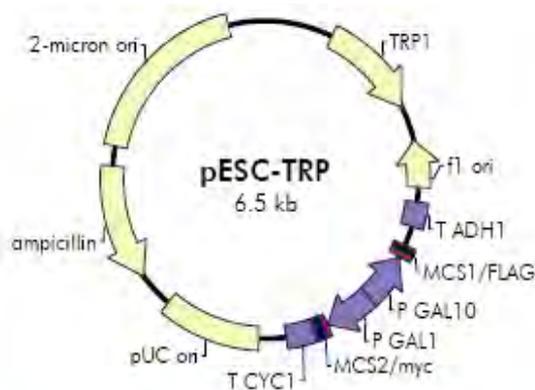
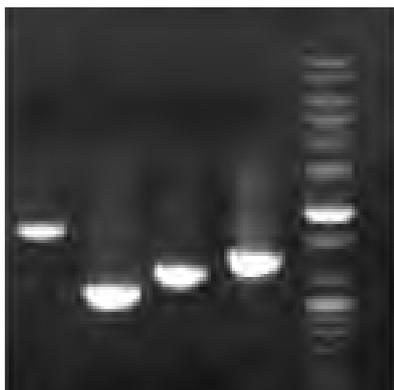


그림 3.3-79. Yeast 발현 벡터에의 구축

- 숙주 미생물에서의 발현 및 바이오 에탄올 생산 최적화.
- 형질전환체의 효소 단백질 발현을 확인하기 위하여 배지상에서 효소 활성대 (halo) 측정, SDS-PAGE와 Zymogram을 실행하여 확인.
- 갈락토오스로 발현 유도되는 형질전환체를 SG 배지에서 24시간 전 배양 후 48시간 진탕 배양하여 cellobiose가 기질로 첨가된 발효배지에서 30 °C, 100rpm에서 배양하여 일정시간 별로 배양액을 채취하여 가스크로마토그래피를 실시함으로 생산된 에탄올 측정.

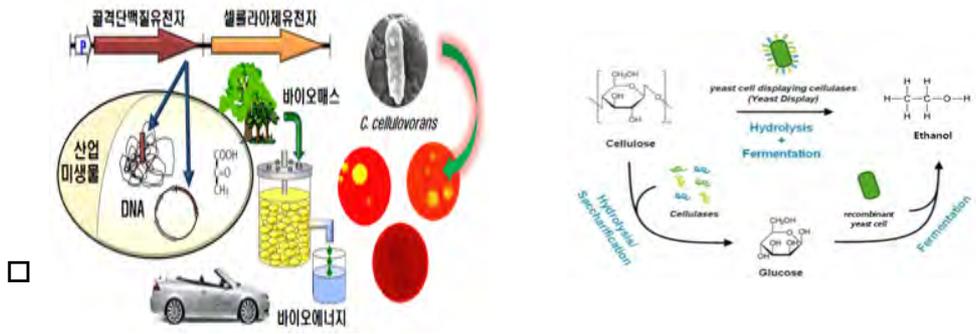


그림 3.3-80. 미니셀룰로솜의 효모를 통한 바이오에탄올 생산 가상 모식도

(1) 미니셀룰로솜의 복합체 형성

- 혐기성 세균이 생산해 내는 당화효소 복합체인 셀룰로솜의 구성 원리를 이용한 것으로 기존의 하나의 당화효소에 의하여 탈중합되던 cellulose의 미니셀룰로솜을 통한 효과적인 당화를 통한 에탄올 생산에 대한 증대 효과를 기대할 수 있음.

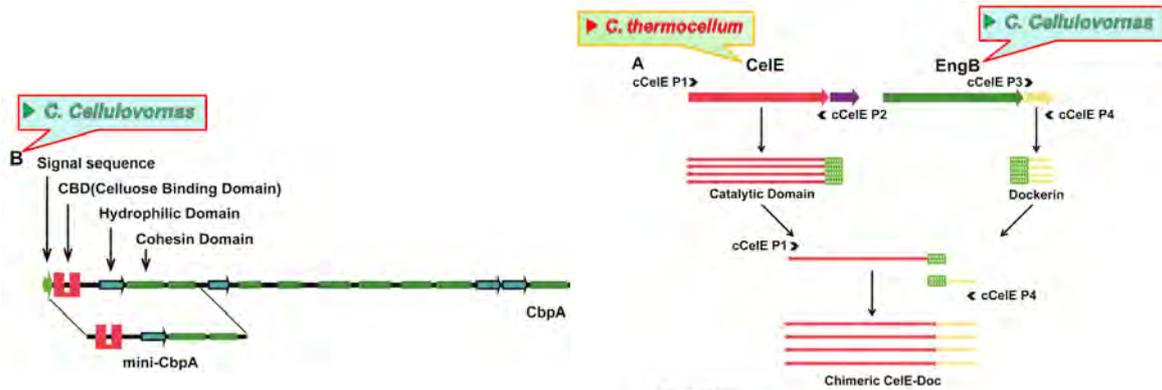


그림 3.3-81. 에탄올 생산 균주에의 미니셀룰로솜의 디자인

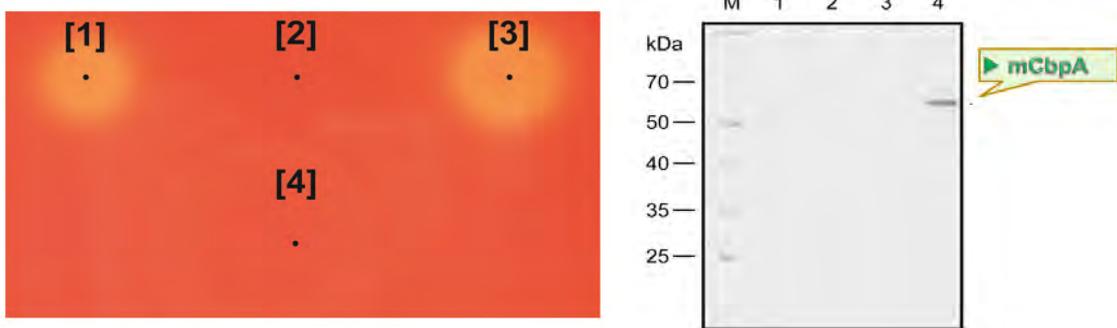


그림 3.3-82. 미니셀룰로솜의 단위 단백질들의 발현 및 활성화 확인

- 정제된 구조단백질 (mCbpA)과 새로운 cellulase를 일정 비율로 섞어 저온에서 배양한 후 복합체형성 여부를 Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)을 통해 분석함.

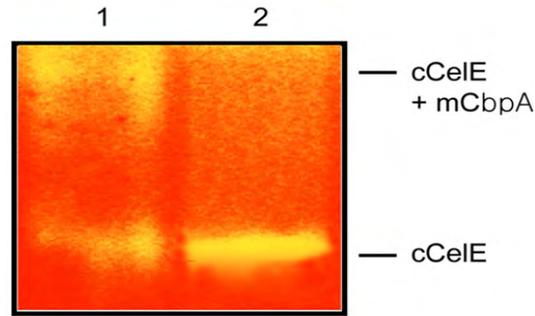


그림 3.3-83. Native PAGE 를 통한 미니셀룰로솜의 복합체 형성 확인
Zymogram of Mini-cellulosome, 1. Assembly of Minicellulosome, 2. Free Enzyme of cCelE

- 단위효소 및 미니셀룰로솜 복합체가 형성된 효소에서의 에탄올 생산 및 미니셀룰로솜에서의 시너지 효과 확인.

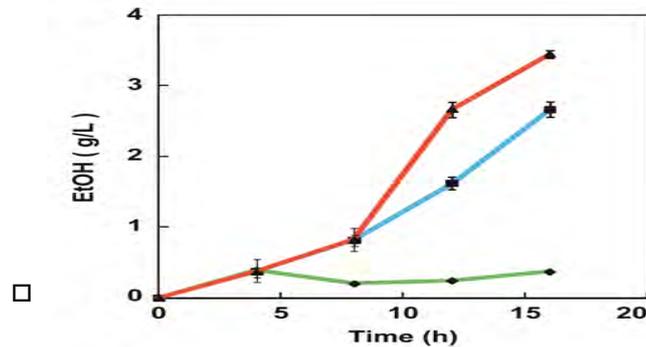


그림 3.3-84. 미니셀룰로솜의 도입을 통한 셀룰로오스 기반 에탄올 생산 증대
Substrate : CMC (10g/L CMC, OD600=10) - [Synergic Effect] : 1.4

(2) 미니셀룰로솜의 복합체의 세포 표면 고정화

- Cell-Anchoring Protein - Scaffoldin Protein(mCbpA) - Cellulosomal Enzyme
Cellulose의 Complex를 형성하여 미니셀룰로솜 시너지 극대화시킴.
- 각각의 미니셀룰로솜을 구성할 당화효소를 선택함. 셀룰로오스를 효과적으로 분해할 수 있는 endoglucanase와 β -glucosidase등의 고활성의 효소를 선별함.

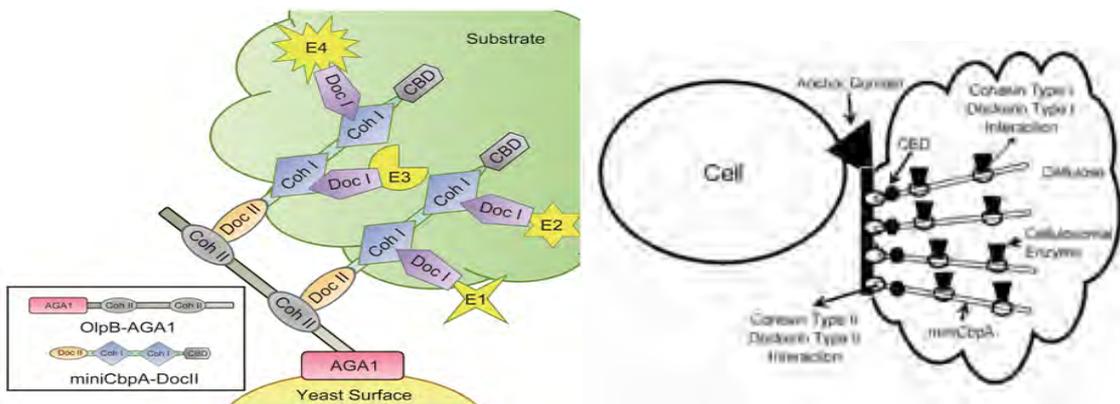


그림 3.3-85. 미니셀룰로솜의 디자인 및 모식도

- 혐기성 미생물 *Clostridium thermocellum* 의 세포 표면 단백질인 OlpB 의 Dockerin Type II - Cohesin Type II Interaction 을 응용.
- 미니셀룰로좀 복합체 형성을 통한 시너지 효과를 분석함. 셀룰로좀 소단위효소 대비 셀룰로좀 복합체의 효소 활성도 측정하여 효소 복합체를 최적화함.
- 구축한 재조합 균주와 기존의 일반균을 확인하여 볼 때 증대된 당화효소 활성을 확인할 수 있음.

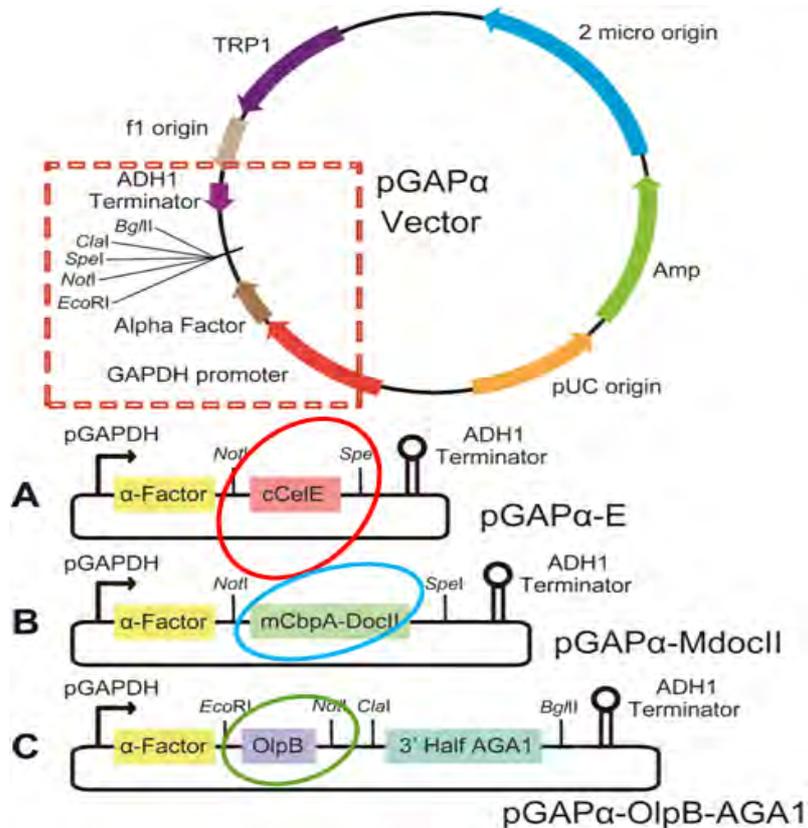


그림 3.3-86. 미니셀룰로좀의 세포 표면 고정화를 위한 벡터의 설계 모식도

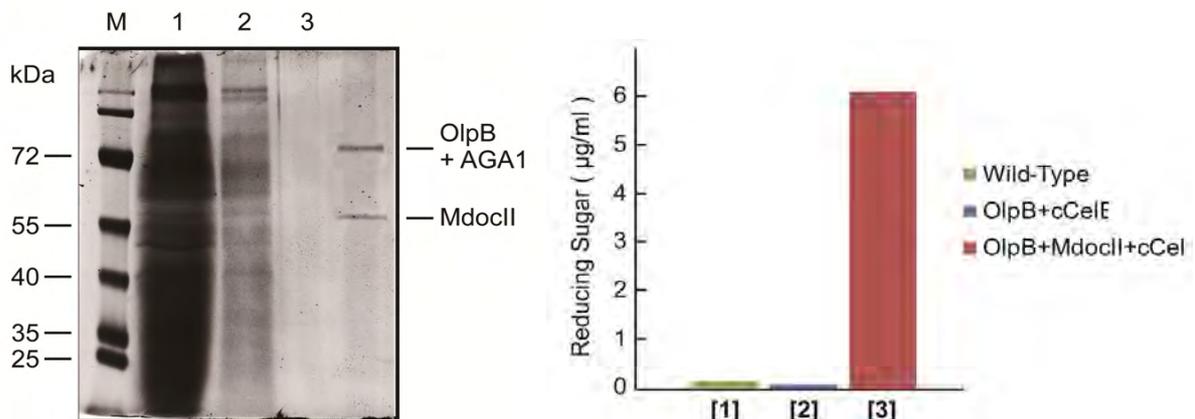


그림 3.3-87. SDS-PAGE와 Reducing sugar Assay를 통한 세포 표면 고정화의 확인

다. Flexible Biomass-utilizing 시스템 확립을 위한 다양한 산업 균주 구축

- 바이오매스 별로 가지고 있는 당화 시스템의 최적화 조건의 다양성을 극복하기 위하여 모든 바이오매스에 Flexible하기 대처할 수 있는 저비용 당화 공정 개발이 필요함. 이를 위하여 바이오매스 조건에 맞는 섬유소 분해 효소 복합체를 형성하는 것과 동시에 타겟 산업 균주를 다양화함으로써 조건에 맞는 Flexible Biomass Utilizing System의 확립함.
- 5탄당 바이오매스를 다량 함유한 바이오매스의 이용을 위해 *Pichia* 균주를 개발함. 뿐만 아니라 고온에서 최적 조건을 가지는 바이오매스에 응용함.

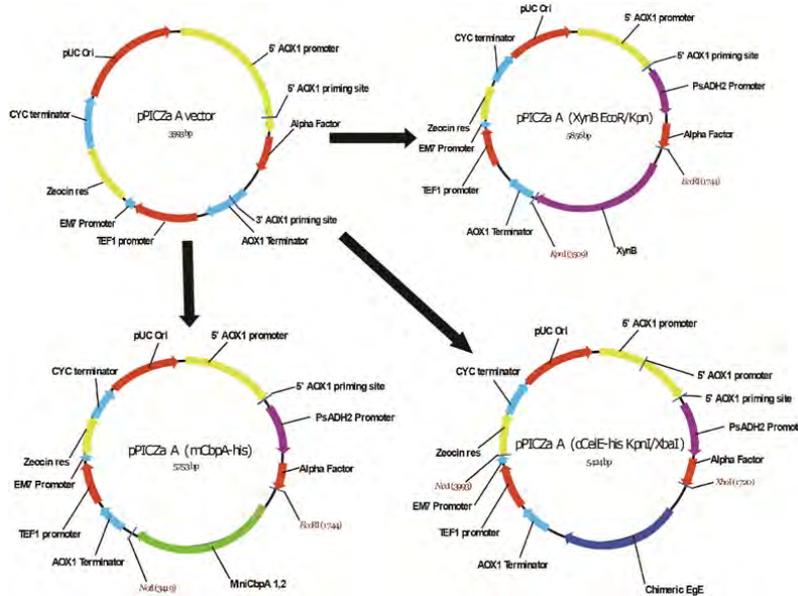


그림 3.3-88. 당화 효소 복합체 형성을 위한 유전자가 삽입된 플라스미드 모식도

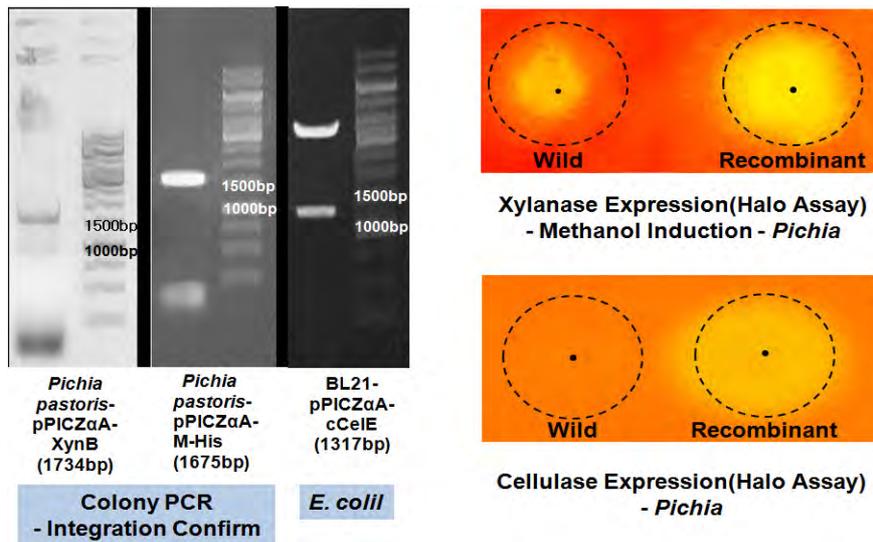


그림 3.3-89. *Pichia* 균주에서의 다양한 섬유소 분해 효소 발현 및 활성 분석

- *Pichia* 균주에서 vector system을 통하여 당화효소인 cellulase와 xylanase를 발현시킴. 이들을 셀룰로솜 시스템에 도입하여 assembly 되는 것을 확인함.
- 이를 이용하여 셀룰로오스를 탄소원으로 하여 *Pichia* 균주에서 기존의 wild type과 다르게 셀룰로오스를 탄소원으로 사용하였을 때 균주의 성장 및 에탄올 생산을 확인함.

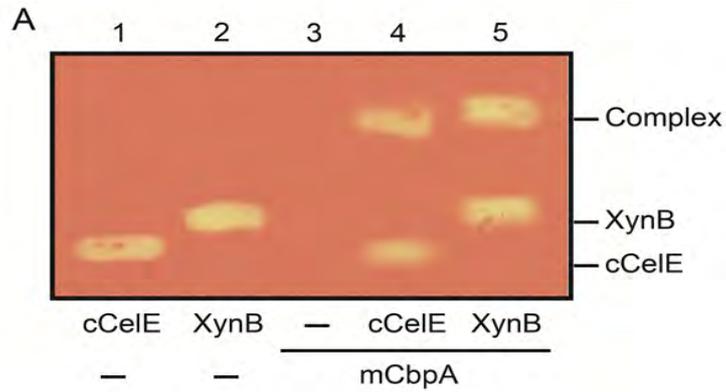


그림 3.3-90. *Pichia* 균주에서의 다양한 섬유소 분해 효소 발현 및 활성 분석

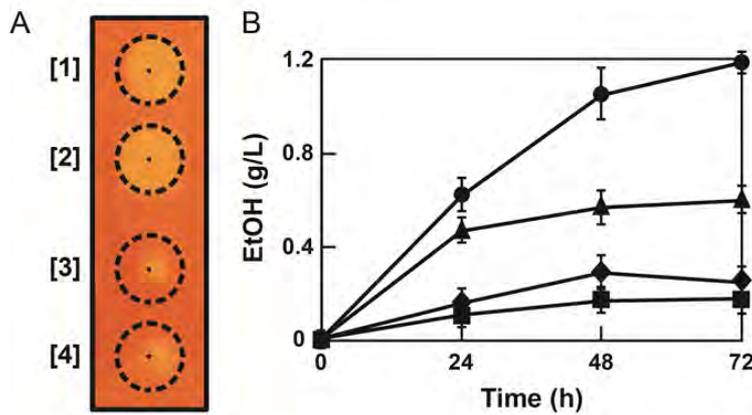


그림 3.3-91. *Pichia* 균주에서의 다양한 섬유소 분해 효소 발현 및 활성 분석

- 발굴한 효소들의 각테일(enzyme mixture)를 구성함으로써 당화효소 각테일 효과를 확인.
- 각각의 당화 효소를 벡터내 가지고 있는 제조합 균주를 통하여 발현 및 정제를 진행함.
- 신규당화효소인 EngZ, ExgS, EngE등을 이용하여 각테일을 구성함. 각각의 각테일을 구성 하였을 때 가장 높은 활성을 가진 부분을 확인함.

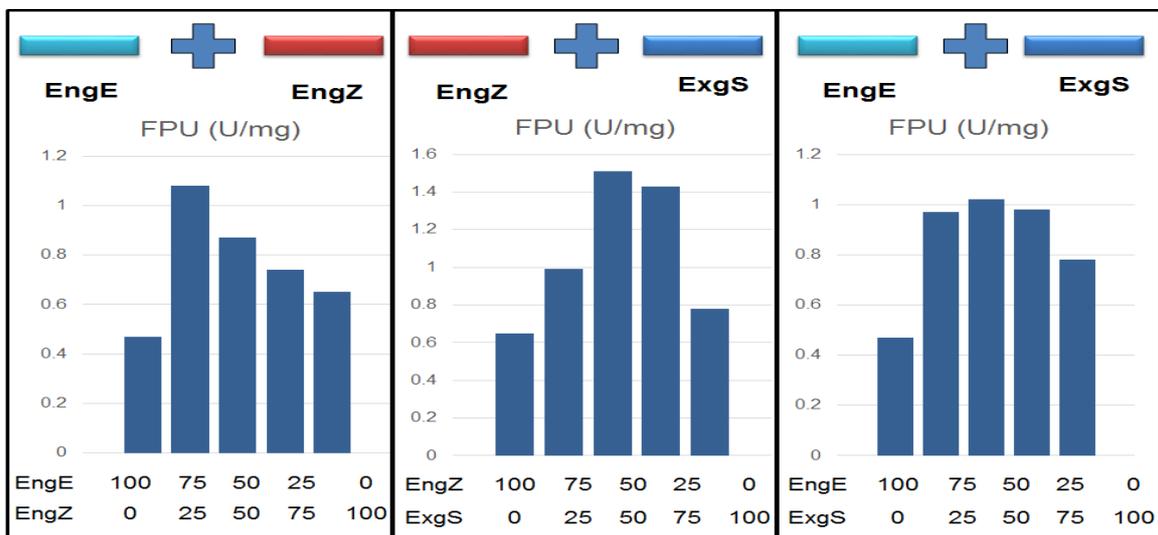


그림 3.3-92. 당화효소 각테일을 제조함으로써 효소 활성 측정 및 확인

6. 최종 선정된 균주로부터 섬유소분해효소 생산

가. 효소 생산을 위한 고상배양 최적화

(1) 고상배양을 위한 기질 선택

□ 우수 개량균주 *P. oxalicum* KL1-24의 고상 배양에 의한 효소 생산을 위한 기질을 선택하기 위하여 사용된 천연 섬유질 기질로는 억새, 갈대, 벼짚, 보리짚, EFB, 쌀, 대두박, 밀기울을 사용하였음. 각 기질이 생산하는 FPase 활성을 측정된 결과 (그림 3.3-93), 밀기울이 111.45 ± 0.90 U/ml으로 가장 높았으며 대두박도 71.44 ± 0.69 U/ml으로 그 다음으로 우수하였음. 나머지 기질들은 10.97 ~ 24.46 U/ml 정도의 낮은 FPase 생산량으로 보였기에 따라서 고상 배양을 위한 우수 기질로서 밀기울을 최종 선정함. 한편 Muthezhilan 등 (2007)은 *P. oxalicum*으로 xylanase를 생산하기 위한 고상배양 시 배지로서 밀기울, 미강, 벼짚, 깻묵, 나무껍질을 사용하였는데 이 중에서 밀기울이 가장 xylanase 생산량이 많았고, 벼짚은 가장 저조하였음. 본 실험에서의 FPase 생산 역시 밀기울이 가장 우수 하였고 벼짚은 낮은 생산량을 보이는 비슷한 결과를 보여주었음. 그러나 본 연구의 그림 3.3-93에서 보듯이 액상배양에서는 여러 효소를 생산하는데 벼짚이 가장 우수하거나 비교적 높은 효과를 나타내었는데, 이와 같이 벼짚은 액상배양과 고상배양에서 효소생산에 미치는 영향이 다른 것으로 보여 지며, 이에 대한 연구는 흥미로운 것으로 사료됨.

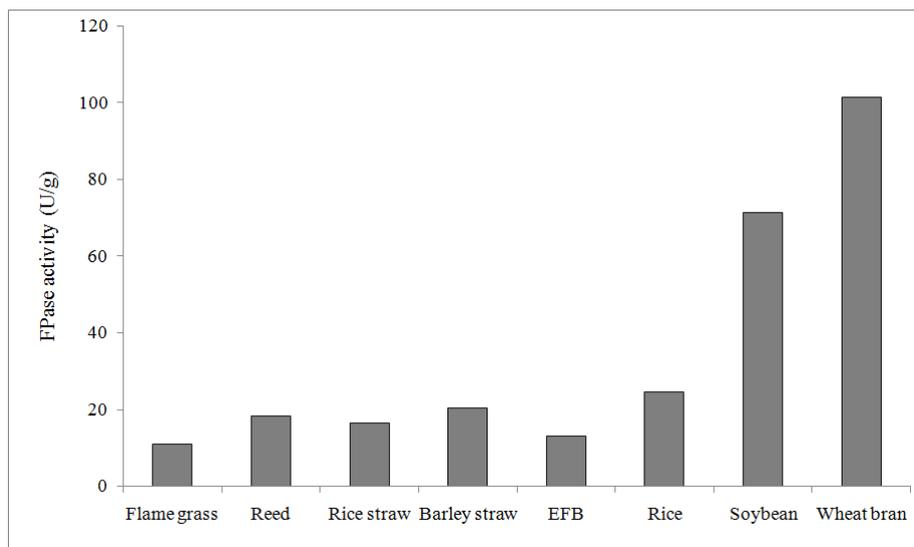


그림 3.3-93. The FPase produced in different media for SSF by *P. oxalicum* KL1-24

(2) 고상배양을 위한 최적 접종량

□ 밀기울을 기질로 하고, PDB에서 배양한 *P. oxalicum* KL1-24 배양액을 접종하여 여러 접종량 별(1, 3, 5, 10%)로 실험한 결과(표 3.3-25) 5% 접종량으로 배양한 결과에서 CMCase는 120.72 ± 1.64 U/ml이고, FPase는 101.15 ± 5.79 U/ml이며, β -glucosidase는 603.57 ± 5.28 U/ml으로 효소 활성이 나머지 접종량 결과와 비교해 가장 높았음. 이에 따라 고상배양을 위한 최적의 접종량을 5%로 선정함.

표 3.3-25 Effect of inoculum size on various enzymes production in SSF^a by *P. oxalicum* KL1-24

Enzyme activity (U/g)		Inoculum size (%)			
		1	3	5	10
	CMCase	122.35±4.38ab	118.47±6.04a	120.72±1.64a	120.53±3.40a
	FPase	101.16±2.17a	99.22±5.99a	101.15±5.79a	100.25±4.18a
	β-Glucosidase	554.13±11.80b	569.47±6.19b	603.57±5.28a	605.21±15.61a
	Avicelase	16.17±1.63a	15.47±0.76ab	15.72±0.81ab	13.75±0.87b
	Xylanase	349.56±15.3ab	367.92±11.12a	346.44±6.91ab	344.47±10.01b
	Pectinase	411.73±3.58b	432.48±10.08a	416.98±10.94ab	424.87±7.52ab

^aThe spores(1×10^8 /ml) were inoculated into a plastic bottle containing wheat bran with 50% moisture and initial pH 5 and the bottle was incubated at 30 °C for 6 days.

^bThe means in the same column followed by same letters were not significantly different in a pairwise t-test.

(3) 통계방법(RSM)에 의한 발효조건 최적화

□ 통계적 방법에 따라 디자인된 여러 배양 조건에 따른 반응표면분석(RSM)결과를 통해 CMCase, FPase, β-glucosidase의 활성을 최대화 하는 점을 탐색함(표 3.3-26).

표 3.3-26 CCD experiment for the 4 variables and experimental results

Run	Temperature	pH	Moisture content	Culture time	Enzyme activity (U/g)		
	X1	X2	X3	X4	CMCase	FPase	β-Glucosidase
1	25	4	50	5	107.02	88.62	537.93
2	35	4	50	5	111.69	94.10	602.34
3	25	6	50	5	99.84	83.58	539.82
4	35	6	50	5	106.94	89.84	570.59
5	25	4	70	5	97.31	75.12	450.97
6	35	4	70	5	103.73	85.19	517.64
7	25	6	70	5	91.77	77.92	495.80
8	35	6	70	5	101.98	87.15	559.96
9	25	4	50	7	114.31	95.11	587.39
10	35	4	50	7	121.21	98.01	612.00
11	25	6	50	7	124.61	102.01	624.59
12	35	6	50	7	121.51	97.51	639.80
13	25	4	70	7	103.71	84.60	503.16
14	35	4	70	7	105.51	91.60	572.69
15	25	6	70	7	98.61	80.70	549.97
16	35	6	70	7	114.31	95.11	588.50
17	20	5	60	6	98.13	81.50	532.25
18	40	5	60	6	74.71	39.97	238.25
19	30	3	60	6	81.49	54.23	334.27
20	30	7	60	6	106.24	82.20	500.00
21	30	5	40	6	101.06	87.30	571.89
22	30	5	80	6	100.38	84.21	534.34
23	30	5	60	4	98.19	76.33	479.69
24	30	5	60	8	120.61	99.95	638.49
25	30	5	60	6	113.45	102.82	649.94
26	30	5	60	6	119.354	105.408	689.810
27	30	5	60	6	114.012	103.688	678.748
28	30	5	60	6	122.054	101.773	713.148
29	30	5	60	6	118.766	99.044	691.053
30	30	5	60	6	117.648	98.553	663.365

□ CMCCase의 최적 활성화에 대한 2차 회귀방정식은 표 3.3-27에 의해 유도되었음.

$$Y = 117.548 + 0.119X_1 + 1.858X_2 - 3.815X_3 + 5.348X_4 + 0.633X_1X_2 + 1.160X_1X_3 - 0.444X_1X_4 - 0.142X_2X_3 + 2.095X_2X_4 - 1.800X_3X_4 - 6.088X_1^2 - 4.227X_2^2 - 2.514X_3^2 - 0.344X_4^2$$

표 3.3-27 Estimate of the response surface regression for CMCCase

Parameter	DF	Estimate	Standard error	t Value	Pr > t
Intercept	1	117.547667	4.086744	28.76	<.0001
x1	1	0.119375	2.043372	0.06	0.9542
x2	1	1.857708	2.043372	0.91	0.3777
x3	1	-3.814958	2.043372	-1.87	0.0816
x4	1	5.347708	2.043372	2.62	0.0194
x1*x1	1	-6.088094	1.911400	-3.19	0.0061
x2*x1	1	0.633188	2.502609	0.25	0.8037
x2*x2	1	-4.226719	1.911400	-2.21	0.0430
x3*x1	1	1.160188	2.502609	0.46	0.6496
x3*x2	1	-0.141938	2.502609	-0.06	0.9555
x3*x3	1	-2.513969	1.911400	-1.32	0.2082
x4*x1	1	-0.444313	2.502609	-0.18	0.8615
x4*x2	1	2.095313	2.502609	0.84	0.4156
x4*x3	1	-1.800187	2.502609	-0.72	0.4830
x4*x4	1	-0.343719	1.911400	-0.18	0.8597

□ 그림 3.3-94는 2차 회귀에 대한 삼차원 그래프이며, 모두 6개로 주어지는데, (온도, pH), (온도, 수분함량), (온도, 배양기간), (pH, 수분함량), (pH, 배양기간), (수분함량, 배양기간) 간의 CMCCase 생산 정도를 나타내고, 그림에서 보는 바와 같이 각 요인의 수준의 변화에 대해 2차 곡선효과가 존재하여 최적점을 유도할 수 있음. CMCCase 생산을 최대화하기 위한 반응표면분석 모형식에 의하여 유도된 최적점은 온도 29.83 °C, pH 5.23, 수분함량 55.51%, 배양기간 6.86일이었으며, 이때 CMCCase 최대치는 124.46 U/g 으로 추정됨.

□ FPase의 최적 활성화에 대한 2차 회귀방정식은 표 3.3-28에 의해 유도되었음

$$Y = 101.882 - 1.343X_1 + 2.392X_2 - 3.231X_3 + 4.599X_4 - 0.004X_1X_2 + 1.910X_1X_3 - 0.702X_1X_4 + 0.453X_2X_3 + 0.659X_2X_4 - 0.616X_3X_4 - 8.047X_1^2 - 6.179X_2^2 - 1.793X_3^2 - 1.197X_4^2$$

□ 그림 3.3-95는 2차 회귀에 대한 삼차원 그래프이며, 모두 6개로 주어지는데, (온도, pH), (온도, 수분함량), (온도, 배양기간), (pH, 수분함량), (pH, 배양기간), (수분함량, 배양기간) 간의 FPase 생산 정도를 나타내고, 그림에서 보는 바와 같이 각 요인의 수준의 변화에 대해 2차 곡선효과가 존재하여 최적점을 유도할 수 있음. FPase 생산을 최대화하기 위한 반응표면분석 모형식에 의하여 유도된 최적점은 온도 28.16 °C, pH 5.27, 수분함량 45.10%, 배양기간 8.48일이었으며, 이때 FPase 추정치는 110.58 U/g.

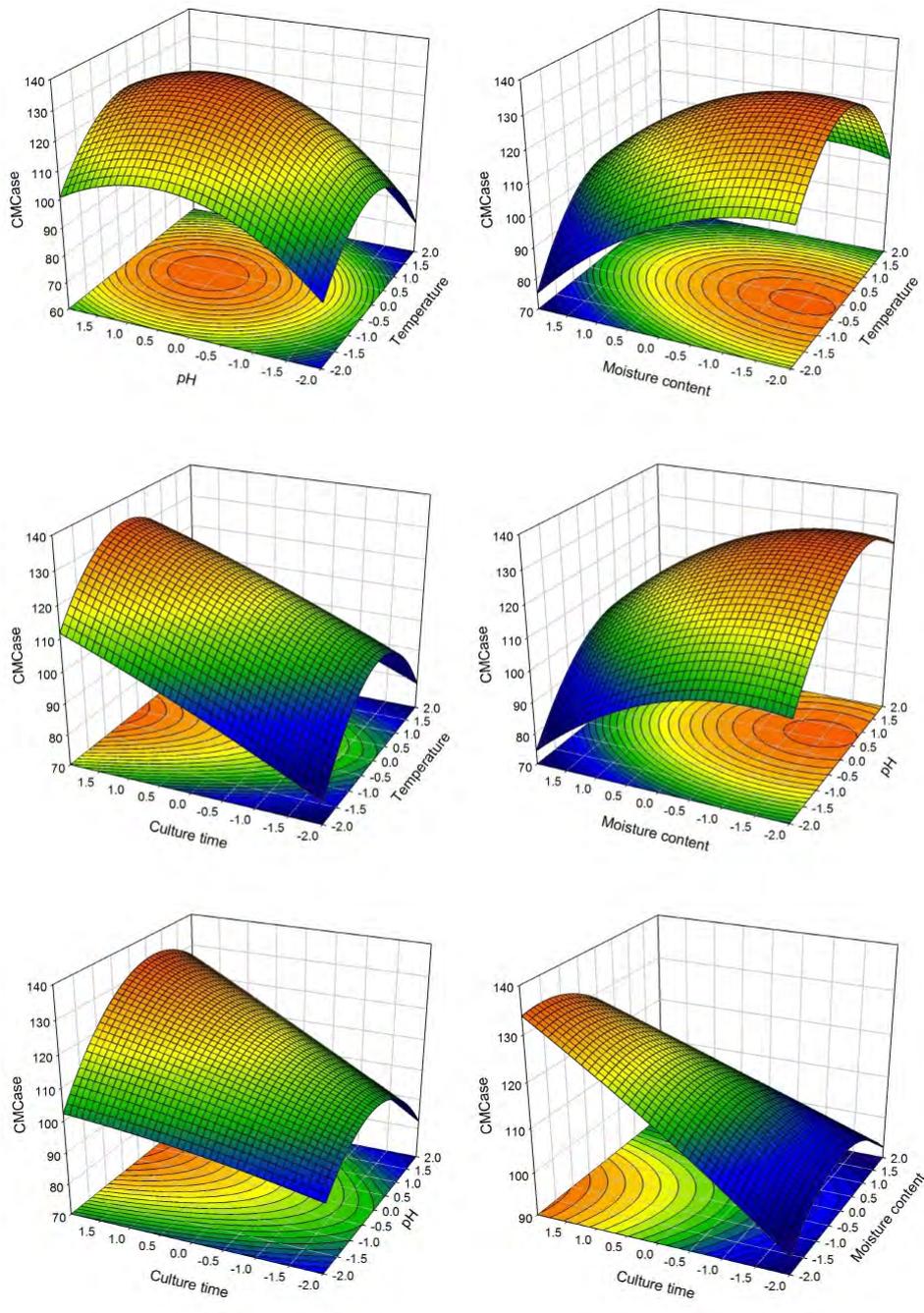


그림 3.3-94. Response surface plot and the corresponding contour plot for CMCCase

표 3.3-28 Estimate of the response surface regression for FPase

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	101.881500	5.157979	19.75	<.0001
x1	1	-1.342958	2.578989	-0.52	0.6102
x2	1	2.391958	2.578989	0.93	0.3684
x3	1	-3.231375	2.578989	-1.25	0.2294
x4	1	4.598708	2.578989	1.78	0.0948
x1*x1	1	-8.047719	2.412424	-3.34	0.0045
x2*x1	1	-0.004187	3.158604	-0.00	0.9990
x2*x2	1	-6.178594	2.412424	-2.56	0.0217
x3*x1	1	1.909937	3.158604	0.60	0.5544
x3*x2	1	0.453438	3.158604	0.14	0.8878
x3*x3	1	-1.793219	2.412424	-0.74	0.4688
x4*x1	1	-0.702187	3.158604	-0.22	0.8271
x4*x2	1	0.659062	3.158604	0.21	0.8375
x4*x3	1	-0.616062	3.158604	-0.20	0.8480
x4*x4	1	-1.197469	2.412424	-0.50	0.6268

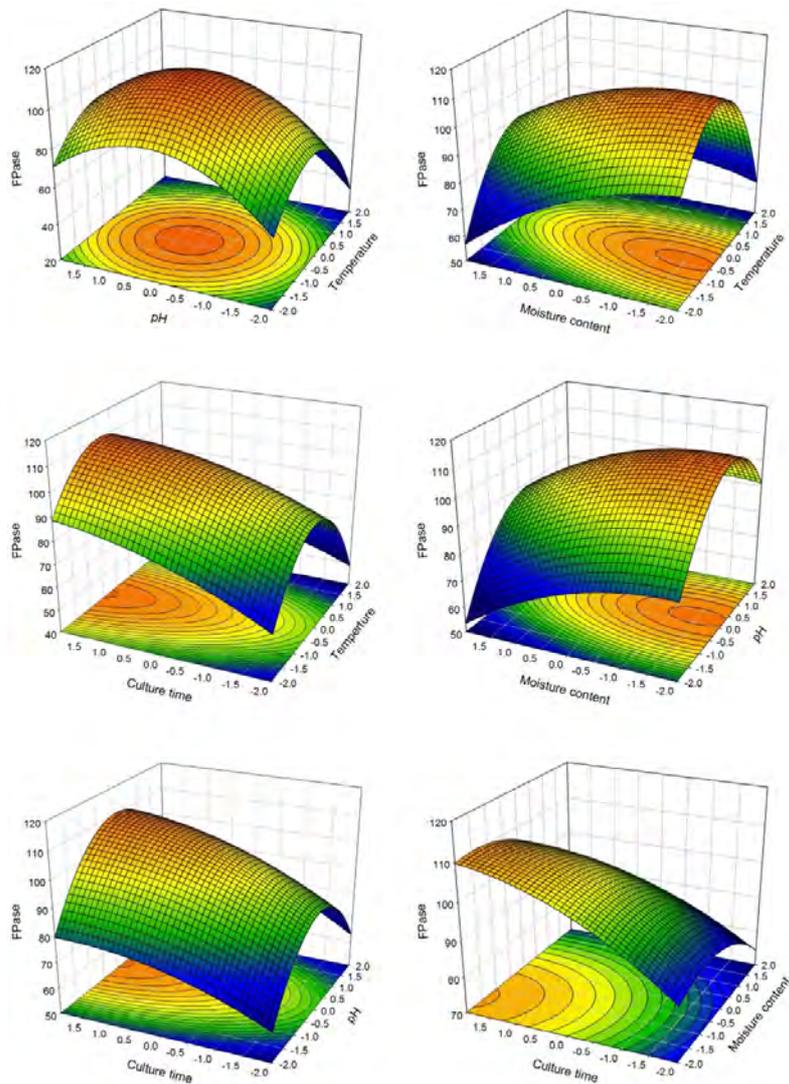


그림 3.3-95. Response surface plot and the corresponding contour plot for FPase

□ β -Glucosidase의 최적 활성에 대한 2차 회귀방정식은 표 3.3-29에 의해 유도됨.

$$Y = 681.011 - 8.922X_1 + 21.515X_2 - 22.953X_3 + 30.028X_4 - 4.785X_1X_2 + 6.493X_1X_3 - 4.884X_1X_4 + 7.164X_2X_3 + 4.396X_2X_4 - 1.447X_3X_4 - 60.451X_1^2 - 52.480X_2^2 - 18.486X_3^2 - 16.992X_4^2$$

표 3.3-29 Estimate of the response surface regression for β -glucosidase

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	681.010833	32.777474	20.78	<.0001
x1	1	-8.921750	16.388737	-0.54	0.5942
x2	1	21.515417	16.388737	1.31	0.2090
x3	1	-22.953417	16.388737	-1.40	0.1817
x4	1	30.027583	16.388737	1.83	0.0868
x1*x1	1	-60.450917	15.330260	-3.94	0.0013
x2*x1	1	-4.784500	20.072022	-0.24	0.8148
x2*x2	1	-52.480167	15.330260	-3.42	0.0038
x3*x1	1	6.492875	20.072022	0.32	0.7508
x3*x2	1	7.164375	20.072022	0.36	0.7261
x3*x3	1	-18.486292	15.330260	-1.21	0.2465
x4*x1	1	-4.883875	20.072022	-0.24	0.8111
x4*x2	1	4.395625	20.072022	0.22	0.8296
x4*x3	1	-1.447000	20.072022	-0.07	0.9435
x4*x4	1	-16.991792	15.330260	-1.11	0.2852

□ 그림 3.3-96은 2차 회귀에 대한 삼차원 그래프이며, 모두 6개로 주어지는데, (온도, pH), (온도, 수분함량), (온도, 배양기간), (pH, 수분함량), (pH, 배양기간), (수분함량, 배양기간) 간의 β -glucosidase 생산 정도를 나타내고, 그림에서 보는 바와 같이 각 요인의 수준의 변화에 대해 2차 곡선효과가 존재하여 최적점을 유도할 수 있음. β -Glucosidase 생산을 최대화하기 위한 반응표면분석 모형식에 의하여 유도된 최적점은 온도 29.22 °C, pH 5.20, 수분함량 53.55%, 배양기간 6.96일이었으며 이때 β -glucosidase 최대치는 705.77 U/g 으로 추정됨.

□ 한편 현재까지 최대로 얻어진 *P. oxalicum* KL1-24의 효소 생산량인 110.58 FPU/g wet substrate는 수분함량 45.1%의 경우 245.73 FPU/g dry substrate(ds)에 해당됨. 이 *P. oxalicum* KL1-24의 최대 FPase 수치인 245.73 FPU/gds는 다른 논문의 고상배양 경우와 비교하여 볼 때 *A. niger*와 *T. reesei* 혼합배양의 35.80 IU/gds (Dhillon *et al.*, 2011), *A. fumigatus* Z5의 144.60 U/gds (Liu *et al.*, 2011), *A. niger* NS-2의 17 U/gds (Bansal *et al.*, 2012)에 비하여 매우 높은 FPase 생산량이라 할 수 있으며, 이러한 결과는 *P. oxalicum* KL1-24 균주의 우수성을 다시 한 번 입증하는 자료임.

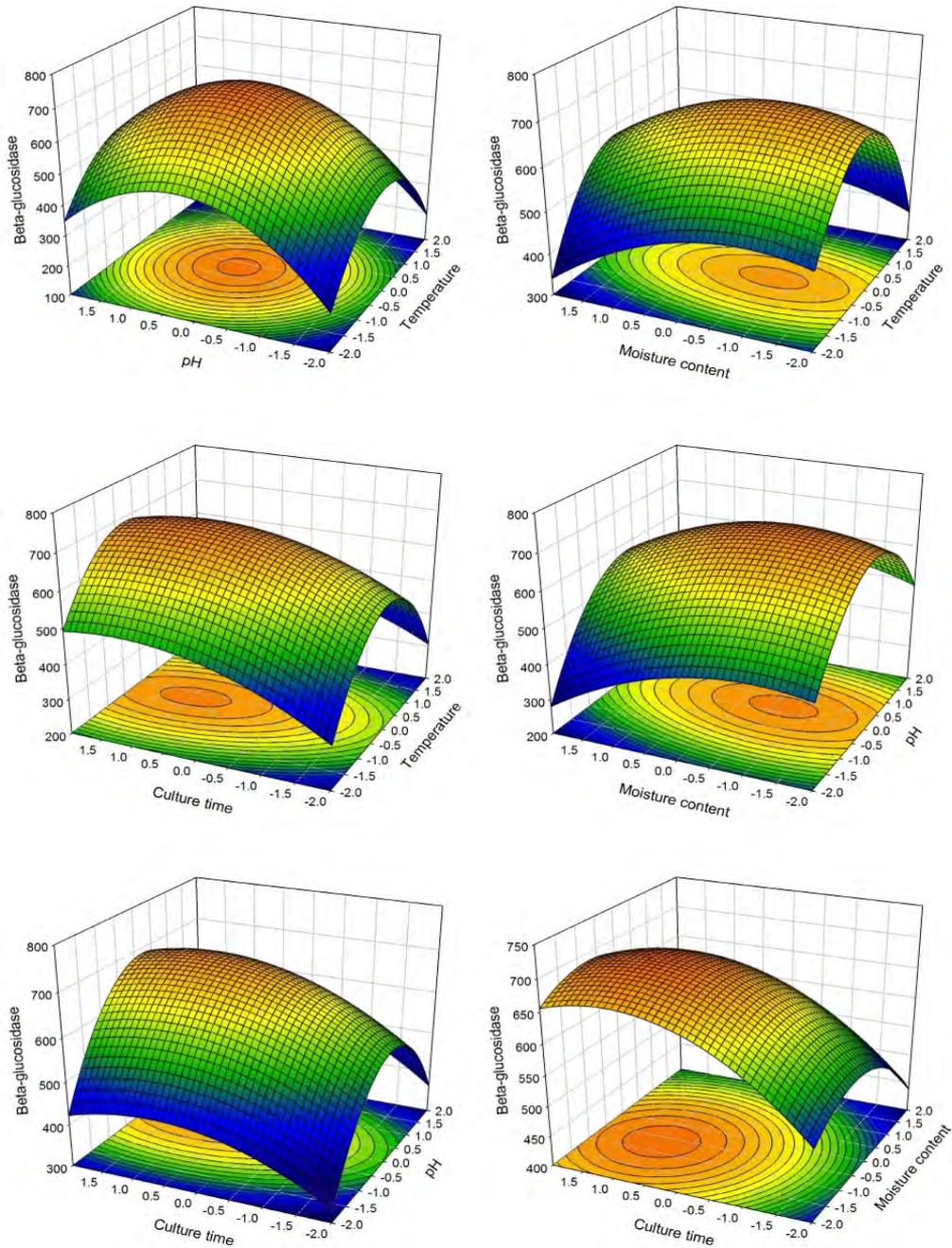


그림 3.3-96. Response surface plot and the corresponding contour plot for β -glucosidase

(4) 효소 생산을 위한 최적 배지 성분 최적화

- 질소원 최적화를 위해 NaNO_3 , $(\text{NH}_4)\text{Cl}$, yeast extract, soy bean meal, urea, CSL을 고체배지에 첨가하여 효소 생산량을 측정하 결과 질소원의 차이는 크지 않게 나타나지 않음 (표 3.3-30).
- 미네랄 첨가에 따른 효과를 알아보기 위해 CuSO_4 , MnCl_2 , NaCl , NiCl_2 , ZnSO_4 을 고체배지에 0.1% 첨가하여 효소 생산량을 측정하였고, 그 결과 (표 3.3-31) MnCl_2 을 첨가할 때 CMCcase, FPase, Avicelase, Xylanase, Pectinase에서 control이나 다른 미네랄 첨가물에 비해 효소 생산량이 우수하였음.

표 3.3-30 Effect of nitrogen source on various enzymes production in SSF by *P. oxalicum* KL1

Nitrogen	Enzyme activity (U/g)					
	CMCase	FPase	β -glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
Control	118.09±1.04a	97.52±4.91a	658.70±44.13ab	15.11±0.44c	300.13±10.88b	336.98±10.62b
NaNO ₃	114.02±2.61b	95.98±6.73a	654.80±10.67b	17.18±1.69b	313.74±23.43b	364.37±12.55a
(NH ₄)Cl	113.09±1.83b	98.02±0.41a	644.05±16.71b	17.62±1.44b	299.98±3.13b	323.53±6.69b
Yeast extract	109.39±0.26bc	92.43±1.71a	691.54±11.92a	16.29±0.81b	317.44±6.06b	368.22±0.83a
Soy bean meal	114.39±1.04b	97.19±7.53a	644.36±26.78b	17.62±0.64b	326.32±8.16b	377.39±5.02a
Urea	114.76±1.56b	99.92±1.34a	655.12±62.13ab	20.88±1.06a	391.14±27.83a	323.82±1.25b
C.S.L	112.54±4.70b	95.12±6.27a	631.05±28.05b	17.18±1.23b	303.98±2.09b	359.93±1.67a

표 3.3-31 Effect of mineral source on various enzymes production in SSF by *P. oxalicum* KL1

Mineral	Enzyme activity (U/g)					
	CMCase	FPase	β -glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
Control	110.39±3.27a	90.76±1.23b	669.89±35.07b	14.20±1.89b	335.79±8.86a	348.66±18.94a
CuSO ₄	107.13±3.94a	99.19±4.43a	648.53±18.51b	15.54±1.08b	333.83±8.80a	352.97±10.15a
MnCl ₂	112.50±3.33a	104.49±0.38a	653.36±20.46b	21.47±2.44a	348.12±14.38a	337.18±9.47a
NaCl	99.75±7.89ab	58.88±5.81c	658.48±35.62b	16.71±0.52b	296.99±14.88b	340.05±20.30a
NiCl ₂	90.33±5.28b	48.44±2.75c	675.06±1.46a	16.69±1.08b	302.26±31.80b	348.18±18.27a
ZnSO ₄	106.74±3.22a	98.96±2.64b	667.48±7.31b	20.32±0.81a	341.49±34.50a	345.31±3.38a

□ Surfactant 첨가에 따른 영향을 알아보기 위해 Tween 80, Triton X100, PEG 6000을 고상 배지에 0.1% 첨가하여 배양한 결과 CMCase에서는 control보다 surfactant를 첨가하는 것이 효소 생산량 증가에 도움이 되었지만 다른 효소에서는 크게 차이나지 않아 surfactant에 의한 효소 생산에 영향이 없는 것으로 판단됨 (표 3.3-32).

표 3.3-32 Effect of surfactant on various enzymes production in SSF by *P. oxalicum* KL1-24

Surfactant	Enzyme activity (U/g)					
	CMCase	FPase	β -glucosidase	Avicelase	Xylanase	Pectinase
Control	109.71±3.42b	87.75±0.92a	669.99±17.76a	13.94±0.30a	330.84±16.80b	350.21±13.58a
Tween 80	115.84±0.68a	79.86±3.86ab	646.26±14.75a	14.26±2.85a	370.30±13.80ab	346.78±6.74a
Triton X100	114.87±2.05ab	84.90±2.38ab	667.67±27.08a	12.24±0.30a	384.97±18.95a	354.68±15.44a
PEG 6000	115.35±0.46ab	79.22±3.60b	665.49±16.76a	11.07±2.25a	362.66±10.20ab	332.47±7.42a

나. 효소 생산을 위한 액상배양 최적화

(1) 액상배지 내 계면활성제 효과

- 기본 배지 조성을 바탕으로 하여 배양액의 부피와 계면활성제 유무에 따른 효과를 확인 하기위한 실험계획을 설계하였음(표 3.3-33). 계면활성제는 곰팡이 균 배양에 가장 많이 사용되는 Triton X-100을 사용하였으며, 총 배양일은 10일로 설정하고 매일 샘플링을 하여 효소 생산능을 확인함. 배양액을 8,000×g에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 효소용액으로 사용 하였고 4종류의 효소활성과 단백질 농도를 측정하였음.
- 단백질의 농도는 Bradford의 방법을 이용하여 bovine serum albumin(BSA) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, U.S.A.)을 표준시료로 하여 측정하였으며, 분광광도계 595nm 파장에서 효소의 상대적 단백질 농도를 측정하였음.

표 3.3-33. 배지 조성 및 계면활성제 효과에 대한 실험계획

배지조성 (g/L)	RYM1L	RYM2L	RYM-tx-1L	RYM-tx-2L
Rice straw	10	10	10	10
KH ₂ PO ₄ (mono)	1	1	1	1
Yeast extract	0.5	0.5	0.5	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.5	0.5	0.5
KCL	0.5	0.5	0.5	0.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.5	0.5	0.5	0.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.41	0.41	0.41	0.41
Triton X-100	-	-	0.5	0.5
Flask	1L	2L	1L	2L
Volume	250ml	750ml	250ml	750ml
pH	5	5	5	5

- 시간별로 각 비교균들의 FPase, Avicellase, CMCcase 그리고 xylanase의 활성을 비교하였음. 그림 3.3-97은 배양일자에 따른 효소 활성을 나타내고 있으며, 시간이 지날수록 효소활성은 증가를 하는 양상을 보였고, 균사체 배양에 일반적으로 효과를 보였던 계면활성제 효과는 적은 것으로 밝혀짐. FPase는 cellulose로 구성된 Filter Paper를 이용하여 효소의 분해능을 측정하는 방법이고 Avicellase는 결정성 cellulose인 Avicel (상표명)을 활용하여 효소분해능을 측정하는 방법임. CMCcase의 경우 carboxy methyl cellulase의 약자로 cellulose의 유도체인 CMC (carboxy methyl cellulose)의 분해능을 측정하는 방법이고, xylanase의 경우는 배양액 내 존재하는 5탄당 분해효소인 xylanase의 xylan 분해능을 측정하는 방법임. 섬유소 분해효소 생산에 사용된 균주의 배양에서 탄소원으로 벧짚(Rice straw), 질소원으로 효모(Yeast extract) 및 미량원소가 들어간 배지(culture medium)를 사용하였고, 이 배지를 RYM으로 명명함.

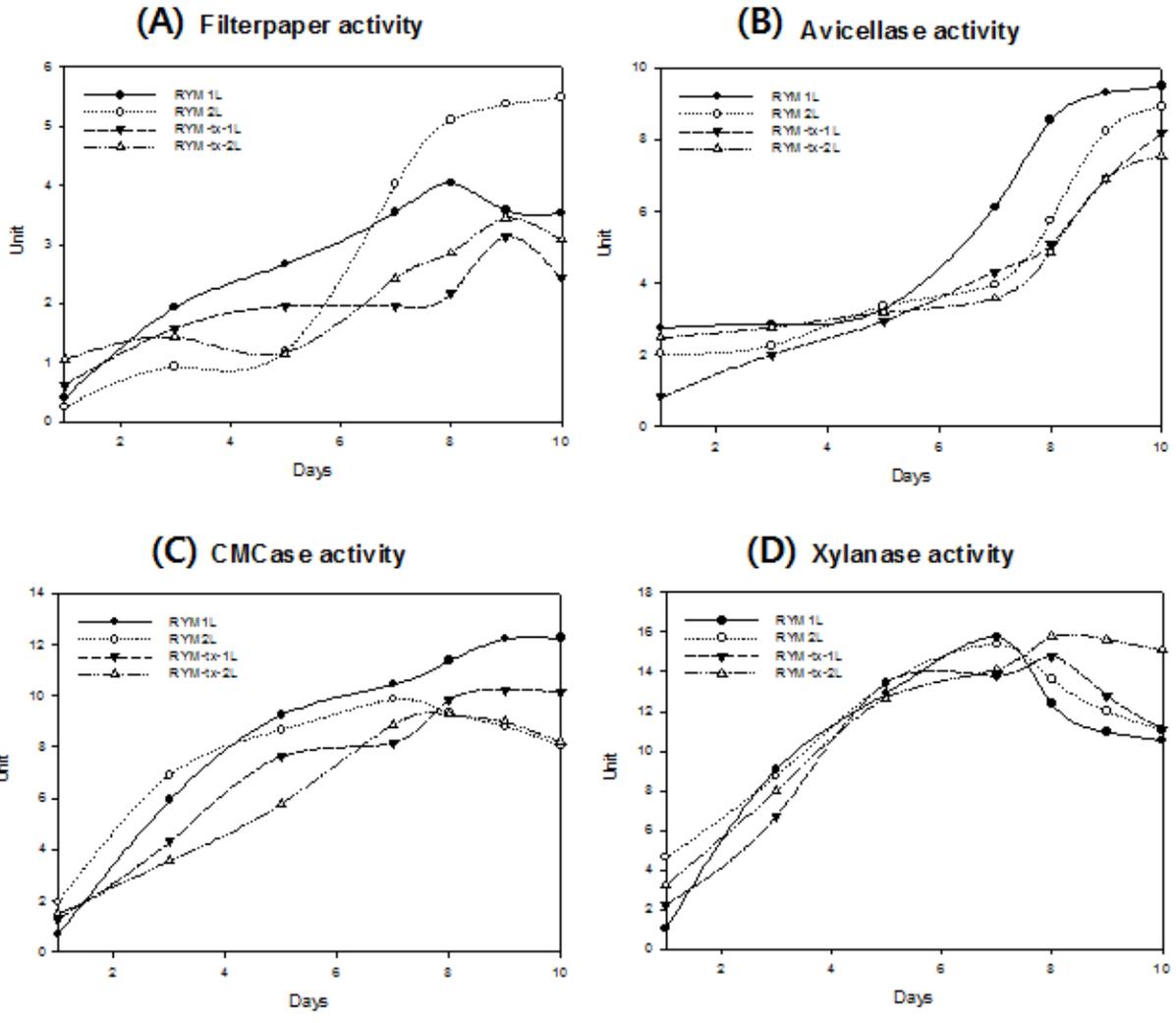


그림 3.3-97. 배양 일자별 효소활성

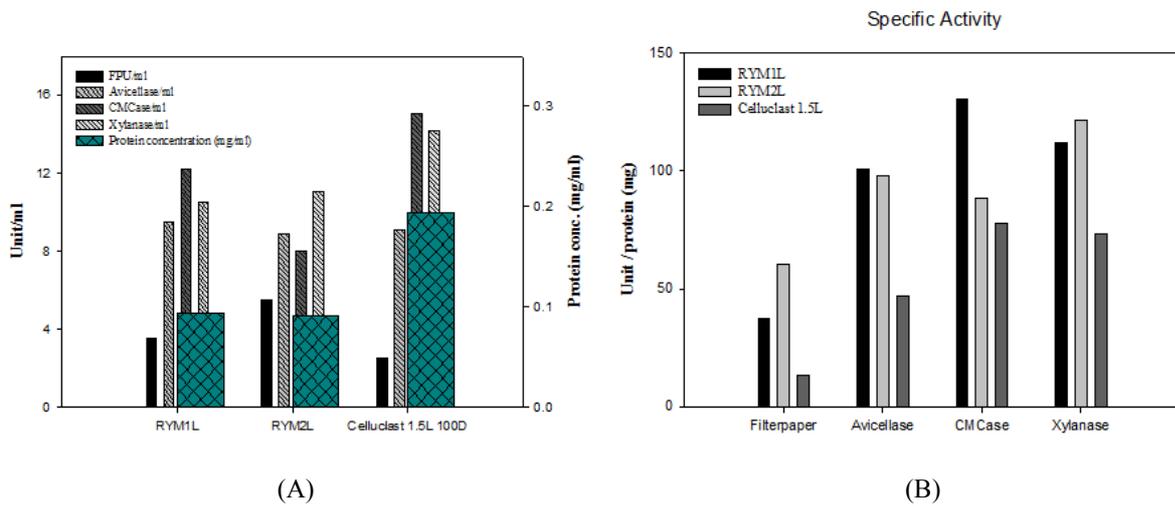


그림 3.3-98. 효소활성 및 단백질당 활성

- 배양 후 단백질을 회수하여 단백질량 및 효소활성을 측정하였음 (그림 3.3-98). 배양액을 8,000×g에서 20분간 원심분리 하여 상층액을 효소용액으로 사용였고, 얻어진 효소용액을 농축하기 위하여 Vivaflow 50 (Sartorius, Germany) 10,000 MWCO membrane ultrafiltration 방법을 사용 하였으며, 약 100 µg/mL의 단백질의 농도로 농축하였음. 실험의 통제변수(control)은 대표적인 상업당화효소이고 본 과제에서 최종적인 목표로 삼고 있는 Novozyme사의 Celluclast 1.5L로 선정하였음. 단백질량의 경우 같은 부피에서 통제변수 Celluclast 1.5L의 양이 RYM보다 약 2배 많은 양을 갖고 있었음. 반면 FPase, Avicellase, CMCase 그리고 Xylanase의 활성은 control인 Celluclast 1.5L의 것에 비교 하여 최대 80%에 해당하는 결과를 보였고 FPU의 경우 control 보다 더 높은 결과를 나타내었음.
- 단위 단백질 당 각 효소활성 (specific activity)을 계산한 결과 모든 효소활성 측정에서 상업용 효소 Celluclast 1.5L 보다 높은 결과를 나타내었음. FPU의 경우 2배 이상, Avicellase의 경우에도 약 2배 이상의 결과를 보였고 CMCase와 Xylanase의 경우 통제변수의 100%를 넘는 활성을 보였음.

(2) 5L 실험실 규모 발효기에서 효소 생산

- 이전 연구에서는 1L 플라스크에서 배양하여 각 효소의 활성과 단백질 함량을 분석하였고, 이번 연구에서는 5L 실험실 규모 발효기(그림 3.3-99) 3대를 이용하여 시간에 따른 pH 변화와 생산된 효소의 활성을 관찰하였음. 기존 배지조성 중 L-Asparagine은 고가의 질소원이기 때문에 scale up 시 대체할만한 성분이 필요한 실정임. 값싸고 대체할 만한 질소원으로 Corn Steep Liquor(CSL)를 선정하였으며, 각 발효기에 배지성분을 표 3.3-34와 같이 선정하여 효과를 평가하였음. 5L 발효기의 운전 조건은 온도 30 °C, 교반속도 250~300rpm, 공기주입량 0.7~1 vvm, 배지부피 3L 로 설정함.



그림 3.3-99. *Penicillium* sp. KL1 균주(좌)와 5L 실험실 규모 발효기(우)

표 3.3-34 Cellulase 생산을 위한 배지조성

	F1	F2
	g/L	g/L
Rice straw	15	15
KH ₂ PO ₄	1.0	1.0
Yeast extract	0.5	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0.5
KCL	0.5	0.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4	0.4
Corn Steep Liquor	-	0.5
L-Asparagine	0.5	-

□ 그림 3.3-100에 배양시간에 따른 효소활성과 pH 변화를 나타내었음. F1은 L-Asparagine 이 질소원으로 첨가된 배지이며, F2는 L-Asparagine 대신 CSL이 첨가된 배지임. F1의 경우 pH는 시간이 지남에 따라 점점 증가하였으며, F2는 pH가 초반에 떨어지다 4.5 정도로 유지되었음. 배양 시 두 배지 조성 모두 7일 전후로 최대 효소활성을 나타내었기에 7일을 최적시간으로 설정하고 이때 배양액을 회수하였음.

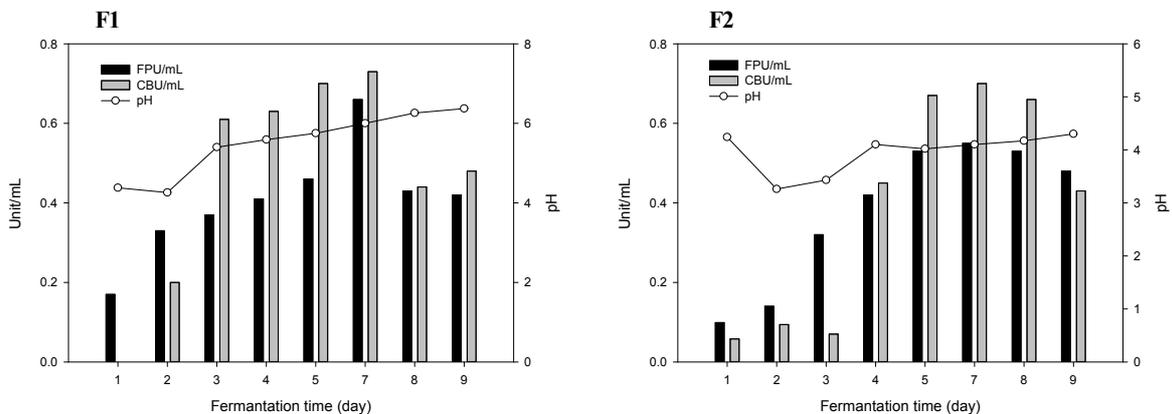


그림 3.3-100. *Penicillium* sp. KL1 균주로부터 섬유소분해효소 생산

□ 전반적인 세포 성장과 그에 따른 효소 생산량이 플라스크 배양 보다 떨어짐을 확인할 수 있었고, 이는 scale 이 커짐에 따라 민감하게 영향을 받는 변수가 있는 것으로 관찰됨. 우선적으로 액체배양 시 적합한 영양원의 조성을 조사할 필요가 있기에 다음 장에서 최적화 과정을 기술하였음.

(3) 액체배지 영양원의 통계학적 최적화

□ *Penicillium* sp. KL1 균주로부터 섬유소 분해효소 생산을 위한 기본 배지는 표 3.3-35와 같이 Mandel's medium을 기본으로 하였음. 액상배지의 scale up 시 사용할 수 있는 가격이 저렴한 탄소원으로서 억새대, 보리짚, 벼짚, 옥수수대 총 4 종류를 선정하였고 이들로부터 섬유소분해효소를 생산한 후 CMCcase 활성을 측정하여 그림 3.3-101과 같은 결과를 얻었음. 옥수수대를 사용 시 단위 부피당 가장 높은 효소활성을 기대할 수 있기에

탄소원으로 최종 선정하였음. Mandel's medium의 기본 성분들 중 효소 생산에 영향력을 가장 크게 미치는 성분을 조사하기 위해 Plackett-Burman design을 활용하여 표 3.3-36과 같이 농도범위를 설정하였음. 이 디자인을 분산분석(ANOVA)한 결과 결정계수 (R^2)는 0.98로 신뢰할만한 수치를 나타냈으며 (표 3.3-37), urea, 옥수수대, Ammonium sulfate 순서로 섬유소분해효소 생산에 영향을 주는 결과를 나타내었음. 이 세 성분들의 농도범위 최적화를 위해 반응표면분석(RSM)을 도입하였고, 표 3.3-38에 변수들의 설정된 농도 범위와 설계된 실험값을 나타내었음. 총 20개의 실험값과 도출되는 모델로부터 추정되는 값 역시 표에 나타나 있으며, 이를 통해 분산 분석한 결과는 표 3.3-39에 제시함.

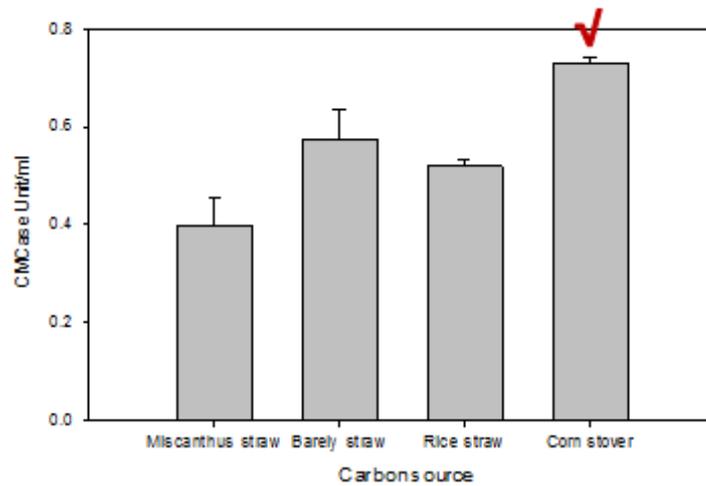


그림 3.3-101. 탄소원에 따라 생산된 *Penicillium sp.* KL1의 CMCase 활성

표 3.3-35 Mandel's medium의 성분

Mandel's medium	g/L
Carbon source	15
Urea	0.6
Protose peptone	1.5
Yeast extract	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.8
KH ₂ PO ₄	4
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.6
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.6
Trace elements	mg/L
FeSO ₄	10
MnSO ₄ ·7H ₂ O	3.2
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2.8
CoCl ₂ ·6H ₂ O	4

표 3.3-36 Plackett-Burman design의 변수와 범위

Variables (g/L)	Symbol	Coded factors levels	
		-1	1
Corn stover	X ₁	10	20
Urea	X ₂	0.3	0.9
Protose peptone	X ₃	1	2
Yeast extract	X ₄	0.25	0.75
(NH ₄) ₂ SO ₄	X ₅	1.8	3.8
KH ₂ PO ₄	X ₆	2	6
CaCl ₂ ·H ₂ O	X ₇	0.3	0.9
MgSO ₄ ·7H ₂ O	X ₈	0.3	0.9

표 3.3-37 Plackett-Burman design의 분산분석

Symbol	Coefficient	F-value	P-value
Model	0.679	18.6	0.0179
X ₁	0.097	48.5	0.0061
X ₂	0.108	59.6	0.0045
X ₃	0.035	6.30	0.0870
X ₄	0.026	3.55	0.1559
X ₅	0.066	22.5	0.0177
X ₆	0.000	0.00	0.9921
X ₇	0.013	0.84	0.4274
X ₈	0.033	5.77	0.0957

표 3.3-38 RSM의 실험 변수와 디자인, 실험결과와 모델의 예상 값

Variables	Symbol	Coded factors levels				
		-2	-1	0	1	2
Corn stover (g/L)	X ₁	6	9	12	15	18
Urea (g/L)	X ₂	0.4	1.2	2	2.8	3.6
Ammonium sulfate (g/L)	X ₅	3.0	3.8	4.6	5.4	6.2

Run	Coded value			CMCase activity (Unit/ml)	
	Corn stover (X ₁)	Urea (X ₂)	Ammonium sulfate (X ₅)	Experimental	Estimated
1	-1	-1	-1	0.917	0.878
2	1	-1	-1	0.881	0.973
3	-1	1	-1	0.218	0.383
4	1	1	-1	0.693	0.771
5	-1	-1	1	0.962	0.969
6	1	-1	1	1.045	0.966
7	-1	1	1	0.236	0.229
8	1	1	1	0.394	0.518
9	-2	0	0	0.499	0.478
10	2	0	0	0.926	0.862
11	0	-2	0	0.968	1.020
12	0	2	0	0.215	0.078
13	0	0	-2	1.030	0.925
14	0	0	2	0.744	0.764
15	0	0	0	0.818	0.781
16	0	0	0	0.806	0.781
17	0	0	0	0.854	0.781
18	0	0	0	0.771	0.781
19	0	0	0	0.744	0.781
20	0	0	0	0.780	0.781

표 3.3-39 RSM의 분산분석 결과

Symbol	Coefficient	F-value	P-value
Model	0.781	12.49	0.0002
X ₁	0.096	13.18	0.0046
X ₂	-0.236	79.47	<0.0001
X ₅	-0.040	2.33	0.1580
X ₁ X ₂	0.073	3.83	0.0787
X ₁ X ₅	-0.025	0.43	0.5246
X ₂ X ₅	-0.061	2.68	0.1324
X ₁ ²	-0.028	1.75	0.2152
X ₂ ²	-0.058	7.61	0.0202
X ₅ ²	0.016	0.56	0.4713

표 3.3-40 도출된 변수들의 최적 값

Variable	Optimal condition
Corn stover	12.39 g/L
Urea	0.48 g/L
Ammonium sulfate	6.12 g/L
Predicted CMCase activity	1.207 Unit/ml
Observed CMCase activity	1.184 Unit/ml
Degree of accuracy	98%
Increase rate	1.66 fold

□ RSM의 분산분석(ANOVA)한 결과 결정계수 (R^2)는 0.918로 신뢰할만한 수치를 나타냈으며(표 3.3-39), 이 모델로부터 얻을 수 있는 2차 회귀에 대한 삼차원 그래프를 그림 3.3-102에 나타내었고, 최적 농도 값을 도출하였음. 그 결과 배지조성을 12.39 g/L의 옥수수대, 0.48 g/L의 urea, 6.12g/L의 Ammonium sulfate의 농도로 하였을 때 1.207 U/ml의 CMCase 활성을 기대할 수 있고, 실제 이 농도에서 배양한 후 효소 활성을 측정한 결과 1.184 U/ml을 나타냄(표 3.3-40). 모델로부터 도출한 이론적 수치에 98%로 매우 근접한 값을 얻을 수 있었으며, 이는 본 연구진이 사용한 통계학적 배지 최적화 방법론이 관련 연구 분야로 응용 가능성이 높다는 것을 의미함. 최종 결론은 통계학적 배지 조성 최적화 후 효소의 생산량은 1.66배 증가하였음.

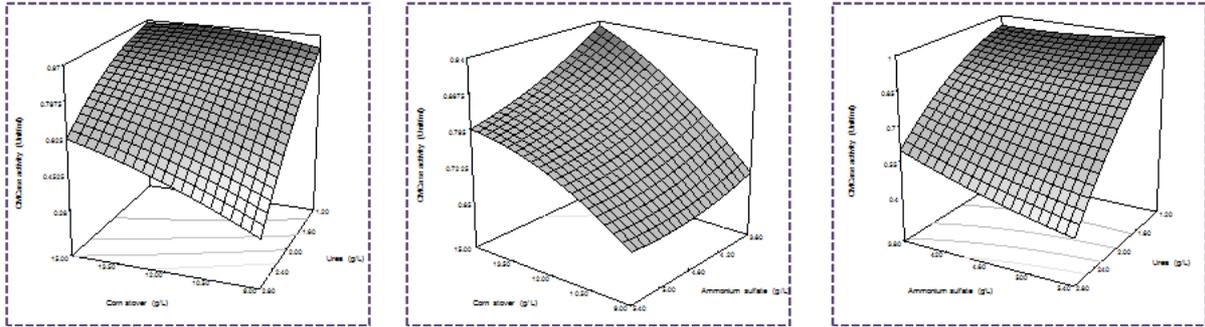


그림 3.3-102. Response surface plot representing the effect (A) Effect of corn stover and urea; (B) Effect of corn stover and ammonia sulfate; (C) Effect of urea and ammonia sulfate

□ 본 연구에서는 고효성 섬유소분해효소 생산균주의 효소 생산량을 극대화하기 위해 배양배지의 조건을 다양한 조건에서 최적화함. 최적 조건에서의 효소생산의 규모는 최대 5 L 규모에서 이뤄졌으며, 이는 실험실 환경 최대 규모 수준으로 50 - 100 L 급 bench 스케일 바로 이전의 단계임. 배양배지의 최적화를 통해 효소생산량의 비약적인 증가를 보여주었으므로 실용화를 위한 제품화 단계에서는 교반속도, 규모, 산소량, 교반방법 등 배양환경 최적화를 통해 대규모에서의 효소 생산 극대화에 대한 추가적인 연구 수행이 요구됨.

6. 생산된 효소를 바이오매스 당화에 실제 적용하여 산업효소와 비교 평가

가. 생산된 섬유소분해효소를 이용한 당화능 증진

□ 선별하여 배지최적화 시킨 *S. commune* KUC9397 유래 효소의 당화능을 평가하기 위하여 두 종류의 효소카테일을 준비함. 우선 조합1은 상용화효소들로 혼합하였으며, Celluclast® 1.5L과 Cellobiase을 혼합하였고, 조합 2는 Celluclast® 1.5L과, Cellobiase를 대신하여 *S. commune* KUC9397 유래 효소를 혼합하였음. 두 효소 조합을 알칼리 전처리한 목질섬유소 바이오매스 (표 3.3-41) 당화에 사용하여 Cellobiase와 *S. commune* KUC9397유래 효소의 당화능을 비교함.

표 3.3-41 Chemical compositions of pretreated biomass

		Total components (%)			
		Cellulose	Hemicelluloses	Lignin	Other
Barley straw	Raw material	37.88	37.39	14.68	10.05
	Treated at 30°C	49.75	29.81	14.12	6.32
	Treated at 70°C	56.52	28.83	10.43	4.22
Empty Fruit Bunch	Raw material	31.86	26.30	24.40	17.44
	Treated at 30°C	36.77	29.81	22.02	11.40
	Treated at 70°C	37.44	29.08	19.22	14.26
Miscanthus	Raw material	37.30	29.16	18.63	14.91
	Treated at 30°C	43.88	30.64	15.89	9.59
	Treated at 70°C	54.71	30.15	9.70	5.44
Rice straw	Raw material	40.64	23.28	10.14	25.94
	Treated at 30°C	49.59	26.31	8.55	15.55
	Treated at 70°C	57.12	25.82	8.99	8.07

표 3.3-42 Activities of the enzymes used for enzymatic hydrolysis

	Protein content (mg/g biomass)	FPU (FPU/g biomass)	EG (U/g biomass)	CBH (U/g biomass)	BGL (CBU/g biomass)	XYL (U/g biomass)	BXL (U/g biomass)
Combination 1	8.27	30.23	54.21	5.44	29.59	589.75	9.61
Combination 2	6.81	29.94	53.99	3.42	29.93	758.56	9.47

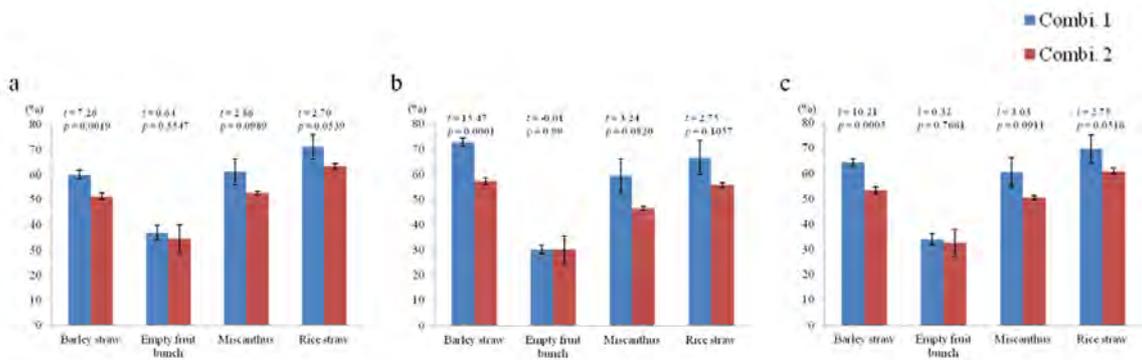


그림 3.3-103 The % yield of sugars released during enzymatic hydrolysis over 72 hours as measured by HPLC. The error bars represent the standard error of triplicate experiments. a. The yields of released glucose. b. The yields of released xylose. c. The yields of reducing sugars

□ 실험에서는 표 3.3-41에 열거한 4종류의 목질섬유소 바이오매스 중 암모니아 침지를 통하여 70 °C에서 전처리를 한 시료를 사용하였음. 그 결과, 그림 3.3-103에 나타난 바와 같이, 조합 1과 2의 총 당화율은 각각 34.0 - 69.7 % 와 27.7 - 60.9 %를 보였음. 그러나 보릿짚을 제외하고 모든 바이오매스에 대한 조합 1과 2의 당화율은 통계적으로 차이가 없는 것으로 확인됨. Celluclast® 1.5L과 *S. commune* KUC9397 유래 조효소로 이루어진 조합 2의 경우, 총 단백질량은 상용화 효소로만 이루어진 조합 1보다 적었으며, 조합 2의 endo-glucanase 및 cellobiohydrolase의 활성 또한 조합 1보다 낮음. 그럼에도 불구하고 조합 1과 2의 당화율이 통계적으로 차이가 없는 것은 상당히 고무적인 결과라 할 수 있으며, 조합 2의 적은 단백질 양은 *S. commune* KUC9397 유래 효소의 비활성이 높다는 것을 의미함. 비활성의 향상이 당화과정에 있어 효소의 비용을 절감할 수 있는 방법 중 하나임을 고려하였을 때, 위와 같은 결과는 *S. commune* KUC9397 유래 효소의 사용 가능성을 의미함. cellulose 분해과정에 있어서 endo-glucanase, cellobiohydrolase 그리고 β -glucosidase은 가장 중요한 요소이며 이들은 시너지효과를 내며 결정성 cellulose를 glucose로 전환함. β -glucosidase은 endo-glucanase와 cellobiohydrolase에 의해 생성된 올리고당을 glucose로 전환하는 역할을 하며, β -glucosidase의 활성이 낮을 경우, cellobiose의 축적 및 낮은 바이오매스 전환율을 야기함. 따라서 *S. commune* KUC9397 유래의 β -glucosidase은 cellulose로부터 glucose생산에 있어 중요한 역할을 하였을 것이라고 설명할 수 있음. 한편, 조합 2의 xylanase 활성은 조합 1에 비해 상당히 높았지만, xylan 전환율은 조합 1과 비교하였을 때 증가하지 않았기에 전체 당화율에는 hemicellulases 보다 cellulases들의 역할이 더 컸을 것으로 설명할 수 있으며 본 연구에서

생산한 균주의 효소는 상용화 효소인 Cellobiase를 대체하여 당화에 사용할 수 있음이 확인되었음. *S. commune* KUC9397 유래 BGL의 산업적 당화 시스템에서의 사용가능성이 평가됨.

- 최종적으로 *Trichoderma harzianum* KUC1716과 *Schizophyllum commune* KUC9397로부터 생산된 효소를 이용하여 당화 효율을 평가하였음. 이 실험은 앞선 실험과 마찬가지로 효소 콕테일을 이용하였으며 Filter paper activity는 *T. harzianum* KUC1716에서 충당하고 β -glucosidase는 *S. commune* KUC9397에서 충당하였음. 대조군으로는 상업용 효소 Celluclast® 1.5L과 Novozyme 188을 사용하였으며, 시료는 표 3.3-41과 같이 비처리, 전처리 시료 12가지를 모두 사용하여 생물학적 당화공정을 통한 바이오에탄올 생산에 적합한 섬유소를 평가하는 실험도 동시에 진행함.

표 3.3-43 Activities of the enzymes used for enzymatic hydrolysis

Enzyme preparation	Protein content (mg/g biomass)	FPA (FPU/g biomass)	EG (U/g biomass)	CBH (U/g biomass)	BGL (U/g biomass)
Fungal enzyme cocktail	7.32	15.0	153.6	11.3	15.0
Commercial enzyme cocktail	6.48	15.0	166.6	14.8	15.0

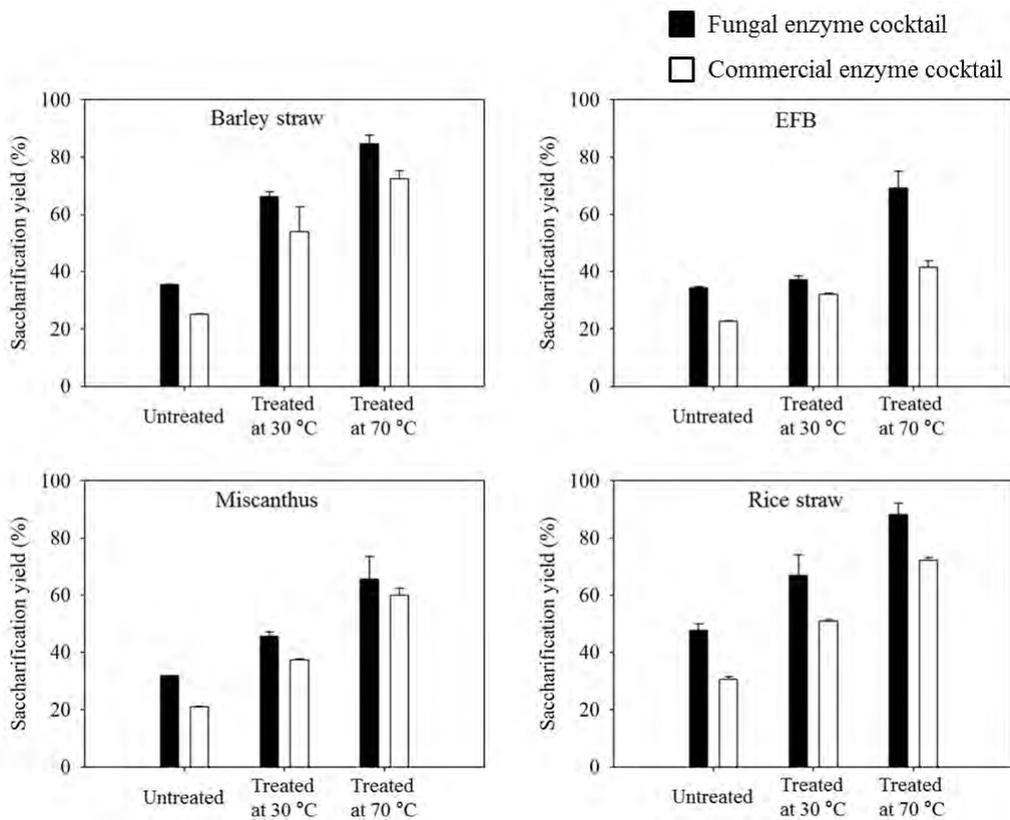


그림 3.3-104. Saccharification yield (%) of SAA-pretreated lignocellulosic materials. The hydrolysis were performed by fungal enzyme cocktail (■) and commercial enzyme cocktail (□)

- 전체적으로 고온에서 전처리한 바이오매스를 당화할 때 당화율이 높았음 (그림 3.3-104). 이는 고온에서의 처리가 섬유소를 당화공정에 적합한 구조로 만들었음을 의미한다. 또한 바이오매스의 구성성분비에 따라 상관관계가 나타났음. Cellulose의 비율과 당화율은 양의 상관관계를 보였으며 ($F=26.62$, $p<0.01$, and $R^2=0.72$) lignin의 비율과 당화율은 음의 상관관계를 보임 ($F=7.93$, $p<0.05$, and $R^2=0.44$). 이는 lignin이 줄어들수록 효소의 섬유소에 대한 접근성이 개선되었을 것으로 추정됨.
- 모든 실험군에서 균주 유래의 효소 카테일이 상업용 효소 카테일보다 높은 당화율을 보였음. 표 3.3-43에서 보이는 투입된 효소의 활성과 단백질 양의 차이가 거의 없다는 점에서 선발된 균주가 생산한 섬유소분해효소가 상업용 효소와 비교했을 때 더욱 뛰어나다는 점을 확인할 수 있음. 이는 균주 유래 효소의 경우 다양한 보조 섬유소분해효소가 포함되어 있기 때문이라고 판단되며, 균주는 영양분의 획득을 위해서 바이오매스를 분해에 용이한 갖가지 효소들을 생산, 분비하였을 것이고 그러한 효소들이 농축되어 섬유소분해에 시너지효과를 냈을 것으로 추측할 수 있음.

나. *Lecythophora* sp. YP363 균주로부터 생산한 효소의 당화효율 검증

- *Lecythophora* sp. YP363과 들연변이 균주인 *Lecythophora* sp. YP363(U-3-20) 그리고 *T. reesei* Rut C-30 균주를 배양하여 배양액을 농축하여 효소로 사용함. 산업 효소인 Celluclast 1.5 L, Accellerase 1500, Ctec2+Ntec2을 30 U/g 농도로 희석하고 이들을 대조군으로 사용하였다. 당화 반응에는 기질을 sodium citrate buffer (pH 5.0)와 효소와 혼합하여 반응함. 실험결과 당화 반응 종료 후 *T. reesei* Rut C-30은 44.84 g/L의 glucose를 생산하였으며 *Lecythophora* sp. YP363이 48.16 g/L, *Lecythophora* sp. YP363(U-3-20)이 53.18 g/L으로 *T. reesei* Rut C-30보다 당화효율이 우수하였음. 산업효소와 비교하여 Celluclast 1.5가 46.36 g/L, Accellerase 51.43 g/L, Ctec2+Ntec2 59.11 g/L으로 *Lecythophora* sp. YP363(U-3-20)균주가 Celluclast 1.5 L과 Accellerase 1500보다 우수하였음.

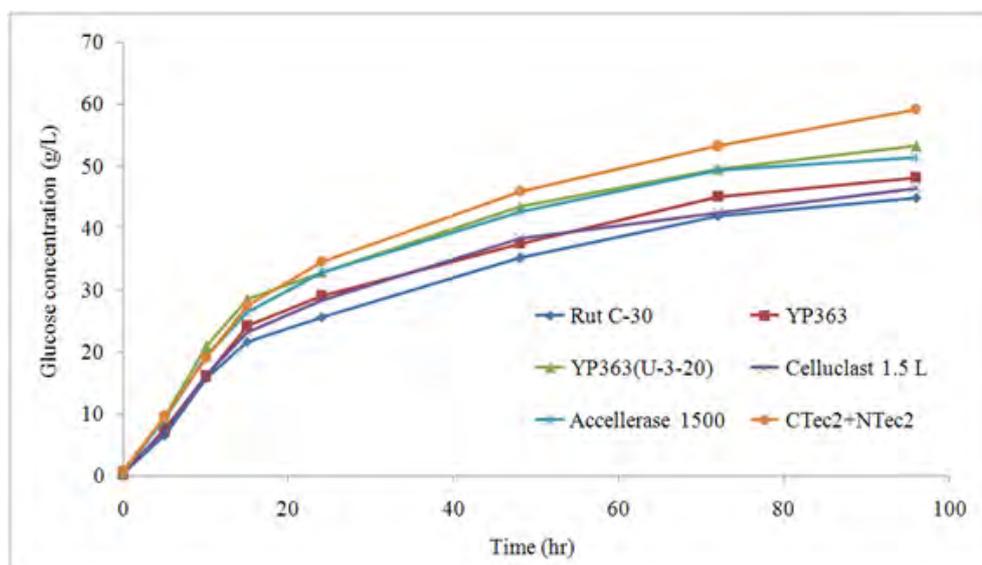


그림 3.3-105. Glucose concentrations released from pretreated barley straw by *Lecythophora* sp. YP3-6-3 cellulase and commercial cellulases

다. *P. oxalicum* KL1균주로부터 생산한 효소의 당화효율 검증

□ *P. oxalicum* KL1와 돌연변이 균주인 *P. oxalicum* KL1(3-7)을 배양하여 배양액을 농축하여 효소액으로 사용하였음. 당화 반응은 *Lecytophthora* sp. YP363과 동일한 조건에서 실험을 수행함. 실험결과 *P. oxalicum* KL1는 당화 반응 종료 후 53.15 g/L으로 Celluclast 1.5 L과 Accellerase 1500 보다 높은 당화 효율을 보여주었음. *P. oxalicum* KL1균주의 경우 돌연변이를 하지 않은 균주에서도 당화 효율이 매우 높게 나타났는데 이는 β -glucosidase의 효소 활성이 다른 균주보다 10배 정도 높아 당화에 더 효율적인 것으로 판단됨. 돌연변이 균주인 *P. oxalicum* KL1(3-7)의 경우 57.54 g/L으로 산업효소인 Ctec2+Ntec2를 제외한 효소들 중 가장 당화 효율이 우수하였음.

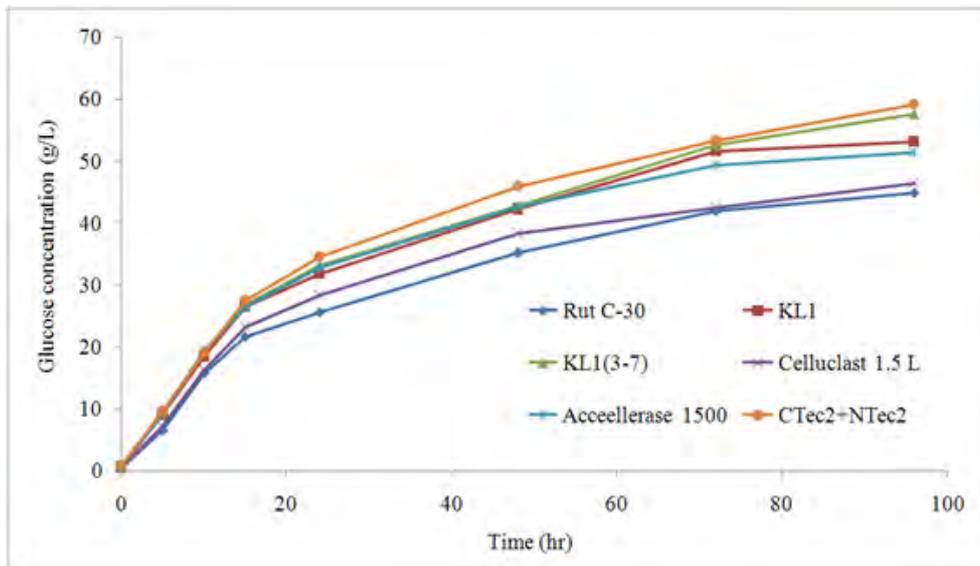


그림 3.3-106. Glucose concentrations released from pretreated barley straw by *P. oxalicum* KL1 cellulase and commercial cellulases

라. 바이오매스 당화에 적용하여 산업효소와 비교 평가

□ 섬유소분해효소 생산능이 가장 높은 균주 *P. oxalicum* KL1를 고상배양한 후 sodium acetate buffer (50mM, pH 4.8)로 회수하여 원심분리한 상등액을 효소로 사용함. 효소용액을 농축하기 위하여 Vivaflow 50 (Sartorius, Germany) 10,000 MWCO membrane ultrafiltration방법을 사용 하였으며, 29 FPU/g 의 농도로 농축시켰음. 실제 바이오매스 당화에 사용할 효소들은 생산된 효소(1번)와 현재 시판중인 산업효소들(2~5번)을 표 3.3-44에 목록과 단위 g 당 활성을 나타내었음. 당화에 사용할 바이오매스로 억새를 선정하였고, 아무처리도 하지 않은 순수 억새와 약산 전처리된 (전처리조건- 반응온도: 121 °C, 황산농도: 1%, 반응시간: 12 min) 억새 두 종류를 사용함. 순수 억새의 성분조성은 Glucan: 40.4%, Xylan: 28.7%, Lignin: 20.52% 를 함유하고 있으며, 약산 전처리된 억새는 Glucan: 56.73%, Xylan: 9.7%, Lignin: 16.12% 를 함유함. 당화 실험은 50 mL 삼각플라스크에 총 부피가 10 mL이 되도록 하고, 이때 모든 효소는 6 FPU/g-biomass 농도로 투여하였으며, 72시간 동안 당화를 수행함. 바이오매스 투여량은 1.5%, 3.0% 두 종류로 실험을 수행하였고, 당화율 결과를 표 3.3-45~7에 나타내었음.

표 3.3-44 바이오매스 당화에 적용할 효소와 활성도

No	Enzymes	FPU/g
1	P. KL1 solid state	29
2	C tec 2	171
3	Celluclast 1.5L	80
4	Filterase	27
5	Accellerase	61

표.3.3-45 순수 익새대의 당 전환율 (바이오매스 투여량 1.5%)

No	Enzymes	Glucose Conversion (%)
1	P. KL1 solid state	24.18
2	C tec 2	15.31
3	Celluclast 1.5L	17.54
4	Filterase	13.50
5	Accellerase	11.02

표.3.3-46 약산 전처리된 익새대의 당 전환율 (바이오매스 투여량 1.5%)

No	Enzymes	Glucose Conversion (%)
1	P. KL1 solid state	77.08
2	C tec 2	58.11
3	Celluclast 1.5L	50.77
4	Filterase	29.13
5	Accellerase	54.83

표.3.3-47 약산 전처리된 익새대의 당 전환율 (바이오매스 투여량 3.0%)

No	Enzymes	Glucose Conversion (%)
1	P. KL1 solid state	64.58
2	C tec 2	77.74
3	Celluclast 1.5L	58.27
4	Filterase	28.91
5	Accellerase	61.77

- 본 연구를 통하여 생산된 효소는 바이오매스 투여량 1.5%에서 순수 익새와 전처리된 익새 모두에서 가장 높은 당 전환율을 보였음. 하지만 바이오매스 투여량이 증가됨에 따라 전환율이 낮아지는 경향을 나타내었는데, 이는 효소 반응이 진행되면서 product inhibition 작용을 받는 것으로 판단되며, cellobiase와 같은 저분자 당을 분해하는 효소를 첨가한다면 이와 같은 문제를 해결할 수 있음. 본 과제에서 최종 목표로 삼았던 산업용 효소 Celluclast 1.5L과의 비교 및 평가 항목에서 목표를 초과 달성함.

4절 바이오매스의 종류와 특성에 따른 복합처리 공정 개발

1. 저해인자 제거를 위한 공정 최적화

가. 바이오매스별 전처리 산물 및 저해인자 분석

- 셀룰로스가 바이오매스를 화학적으로 전처리할 때에 그림 3.4-1과 같이 효소반응, 미생물 발효와 같은 물 공정에 저해를 일으키는 물질들이 생성되는 경우가 있음. 본 연구에서는 대표적으로 Furan 계열의 두 물질 5-HMF, Furaldehyde가 최적화되지 않은 산 전처리 조건에서 검출되었고, Acetic acid 와 기타 유기산들 또한 검출이 확인되었음. 셀룰로스가 바이오매스는 대표적으로 xylan과 cellulose 등으로 구성되어 있고 이러한 저해물질들은 바이오매스를 구성하고 있는 이들이 화학적으로 분해 될 때, 특히 선택적인 분해 이상의 단계로 갈 때 과분해 되는 반응물 및 그 반응물과 다른 물질들의 반응 등으로 생성되는 것으로 알려져 있음. 본 연구에서는 이러한 저해물질들이 효소반응에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 기초실험을 진행하였음.

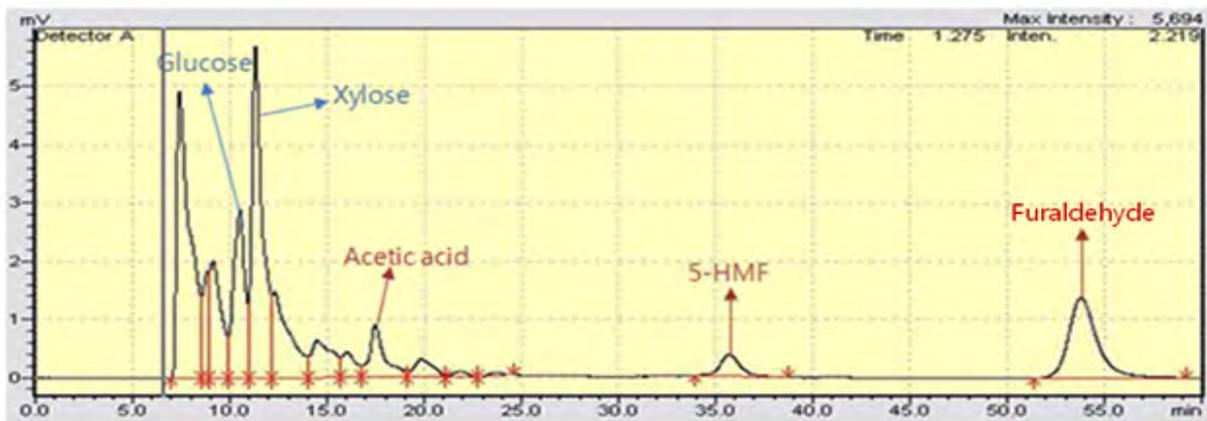


그림 3.4-1. 저해인자로 예상되는 물질(붉은색)의 예시. 조건 170 °C, 18 min, 1.84 % H₂SO₄에서 벚짚의 전처리 후 HPLC 분석 시 검출 되는 Peak (위), 같은 조건에서 보릿짚의 전처리 후 HPLC 분석 시 검출되는 Peak(아래)

- 저해인자 농도에 따른 섬유소분해효소의 활성 저해 실험결과를 그림 3.4-2에 나타내었고, furfural에 대하여 크게 영향을 받는 것으로 조사됨. 나머지 물질들(Acetic acid, Na₂SO₄, CaSO₄)은 5 g/L의 농도 범위에서도 효소 활성을 80% 정도 유지하였음.
- 실제 바이오매스 당화에 저해인자가 미치는 영향을 조사해 보기 위하여 암모니아 처리된 벚짚을 기질로 하여 1.5% 투입하였고, 각 저해 물질을 농도별로 첨가한 후, 섬유소분해효소 6 FPU/g cellulose를 투입하여 12시간 동안 당화를 수행함. 그림 3.4-3과 같이 전반적으로 1 g/L 이상의 농도 범위에서 바이오매스 당화에 저해를 받는 것을 확인함.

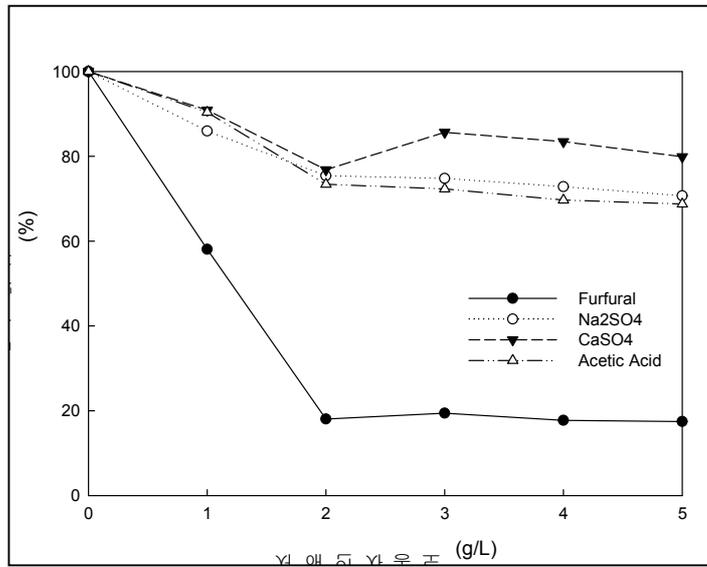
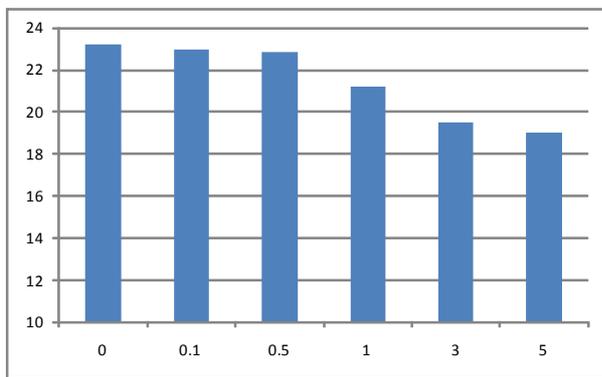
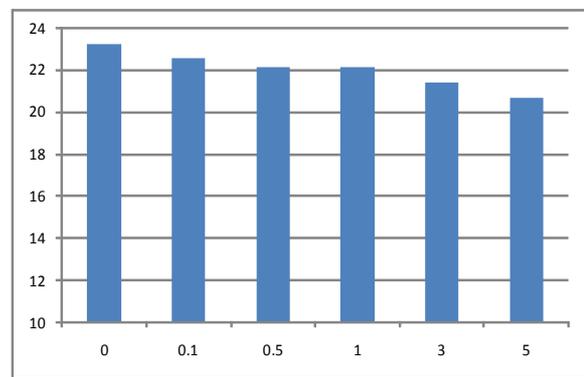


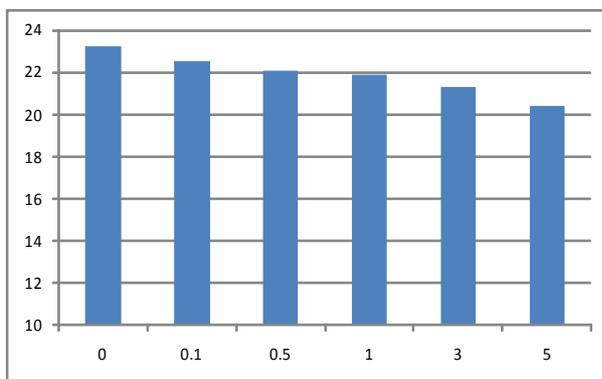
그림 3.4-2. 각 저해인자가 60 FPU 의 효소 (Celluclast) 활성에 미치는 영향



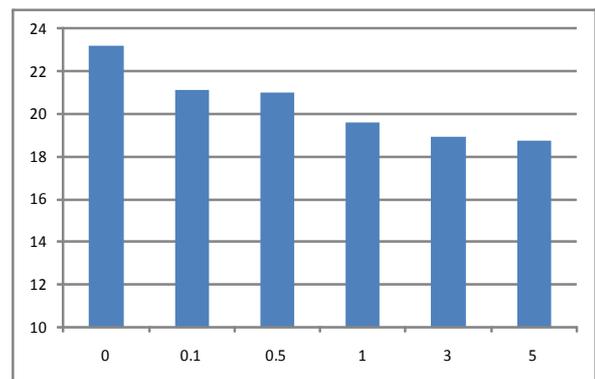
(A)



(B)



(C)



(D)

그림 3.4-3. 각 저해인자가 효소 당화에 미치는 영향. 암모니아 전처리 (SAA) 벚짚을 기질로 이용한 당화실험 1시간 시점에서 Furfural (A), CaSO₄ (B), Na₂SO₄ (C), Acetic acid (D)에 대한 초기반응속도 분석 (y축: 당 회수율 (%), x 축: 저해물질 농도 (g/L), Control: 0 g/L)

나. 당화 발효 저해인자 제거 연구

□ 바이오매스의 산 전처리 후 발생하게 되는 Furfural과 Acetic acid는 일정 농도를 넘어서면 당화 시 저해를 발생시키는 결과를 얻었고, 앞으로 전반적인 공정의 규모가 커질 경우 저해 작용을 하는 물질들의 제거가 필수적임. 전처리 후 바이오매스를 washing 하는 방법으로 어느 정도의 저해물질이 제거되는지 간단한 실험을 수행하였음. 그림 3.4-4는 대표적인 저해 물질인 Furfural과 Acetic acid가 전처리 후 바이오매스(고, 액 혼합물)에 존재할 때 1g의 바이오매스를 1L의 DI water로 washing하는 실험을 나타내었음. 실험결과 1회 washing으로 90% 정도 저해물질들이 제거되었음. 하지만 공정의 규모가 커질 경우 세척 공정이 필수적으로 포함되어야 하며, 이때 발생하는 폐수에 저해물질들의 성분이 함유된다면 2차 폐수 발생의 원인이 됨.

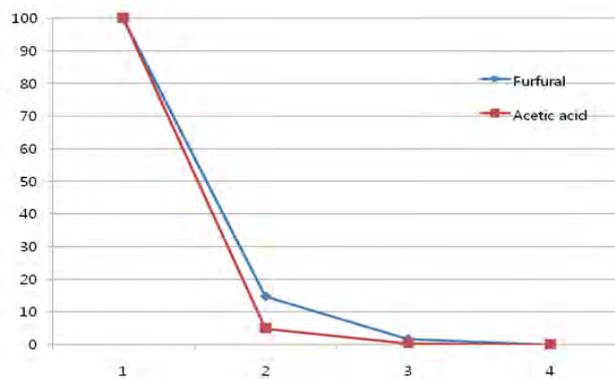


그림 3.4-4. 대표적 저해물질 Furfural과 Acetic acid의 제거

다. 분배계수를 이용한 furfural제거

□ 저해물질 중 furfural과 같은 fural계열의 compound는 유용한 물질로 전환이 가능하기에 산업적으로 가치 있는 물질로 인정받고 있음. 따라서 저해인자 중 furfural을 선택적으로 추출하는 방법을 모색하여, 저해인자 제거와 동시에 활용하는 측면에 대하여 연구를 진행하였음.

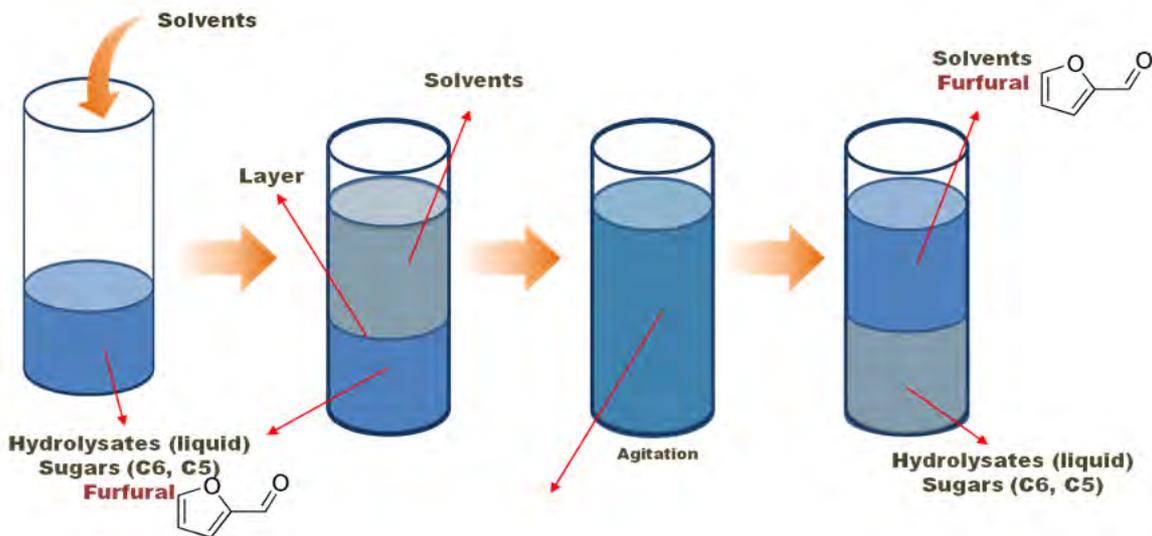


그림 3.4-5. furfural제거 공정의 계략도

- 전처리 후 액상 용액에는 바이오매스로부터 침출된 당이나 과 분해된 저해물질이 녹아 있기 때문에 저해물질만 선택적으로 분리하는 방법이 필요함. 용매를 사용할 경우 해당 용질에 대한 분배계수를 이용하여 조건만 맞으면 특유의 작용기 등의 특성을 통한 목적 물질의 용해를 이끌어 내어 선택적으로 제거가 가능함. 전처리 시 사용되는 용매는 물이기에 furan 고리를 용해시키는 비극성용매 종류를 먼저 조사하였음.
- 비극성용매로 최종 선정된 용매로는 ethyl acetate, heptane, hexane 그리고 isooctane 이 있으며, 표 3.4-1과 아래 수식에 분배계수를 제시하였다.

표 3.4-1 각 성분들의 분배계수

Component	log Pow	T (°C)
Acetamide ^[26]	-1.16	25
Methanol ^[27]	-0.82	19
Formic acid ^[28]	-0.41	25
Diethyl ether ^[27]	0.83	20
p-Dichlorobenzene ^[29]	3.37	25
Hexamethylbenzene ^[29]	4.61	25
2,2',4,4',5-Pentachlorobiphenyl ^[30]	6.41	Ambient

$$\log P_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{un-ionized}}} \right)$$

$$\log D_{\text{oct/wat}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{ionized}} + [\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{neutral}}} \right)$$

- 그림 3.4-5의 전체적인 개략도를 보면 전처리 산물에 비교대상 비극성용매를 혼합하고 10분간 교반하였고 층이 분리되기를 기다렸다가 층 분리가 되면 전처리 용액 층을 sampling하여 분석하였음.

표 3.4-2 각 용매 리스트와 저해물질 제거율

	Refereces		
	20 g/L	10 g/L	
Solvents	Xylose	Furfural	removal
Ethyl acetate	18.901 g/L	1.112 g/L	88.87%
Heptane	19.371 g/L	6.285 g/L	37.14%
Hexane	19.594 g/L	6.915 g/L	30.84%
Isooctane	11.166 g/L	4.386 g/L	56.13%

- 실험결과, 여러 용매 중 ethyl acetate가 10 g/L의 기존 furfural 농도에서 용매 처리 후 1.112 g/L로 약 88.87%의 furfural 제거율을 보였고, heptane은 37.14%, hexane은 30.84% 그리고 isooctane은 56.13%의 furfural을 제거함.

- Furfural을 제거하기 위한 최적의 비극성 용매는 ethyl acetate로 결정되었음. 용매 제거법 시행 후 ethyl acetate에 녹은 furfural은 ethyl acetate의 증류를 통해 90% 이상 회수 가능함. 용매 제거법을 통해 전처리 후 전처리 액에 가수분해된 당의 경우 후처리를 통해 다른 chemical로의 전환으로 이어지거나 균주의 탄소원으로 활용이 가능하며 분리된 furfural의 경우도 다른 chemical로 전환이 가능한 주요 building block으로 여겨지고 있어 본 과제에의 sugar platform을 구축하기 위해 매우 중요한 공정으로 생각되어짐.
- 그림 3.4-6에 위의 전반적인 공정의 개략도를 나타냄. 사진 (좌): 바이오매스 전처리 용액, (중): 용매의 혼합과 교반 후 상 분리, (우): 증류 후 furfural회수

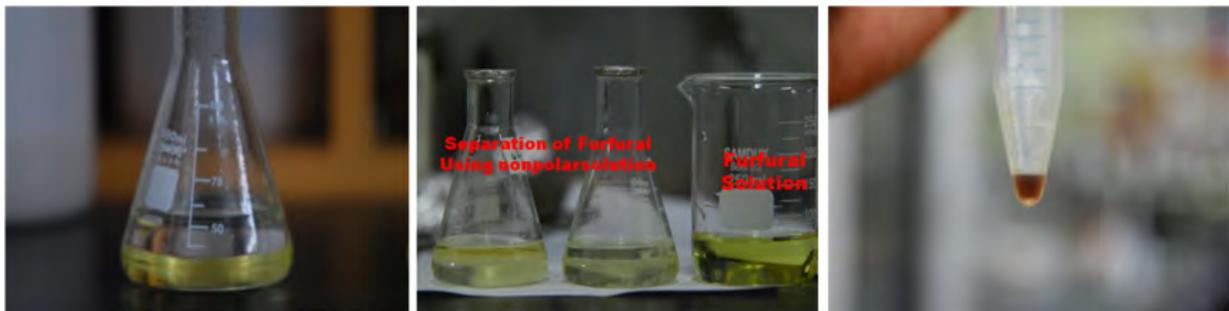


그림 3.4-6. Furfural 제거 공정의 개략도

표 3.4-3 각 용매의 선택도

Solvents	Solvent/water ratio	Log P of gallic acid	Log P of furfural
Ethylacetate	0.5:1	0.597	0.967
	1:1	0.618	1.230
	1.5:1	0.756	1.480
	2:1	0.766	1.498
Heptane	1:1	0.598	0.339
Hexane	1:1	0.558	0.277
Isooctane	1:1	0.716	0.551

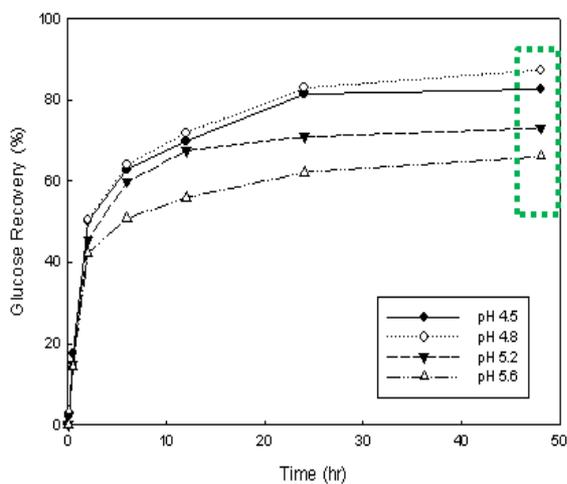
- 추가 연구로 ethyl acetate와 sample이 있는 water 층의 용매 비율별 선택도를 조사해보았음. Sample은 furfural과 gallic acid를 혼합한 시료를 사용 하였으며, 그 결과 ethyl acetate : water 비율이 1.5 : 1 이상인 지점에서 선택도가 높았음. (표 3.4-3)

2. 고효율 저비용 당화공정 확립

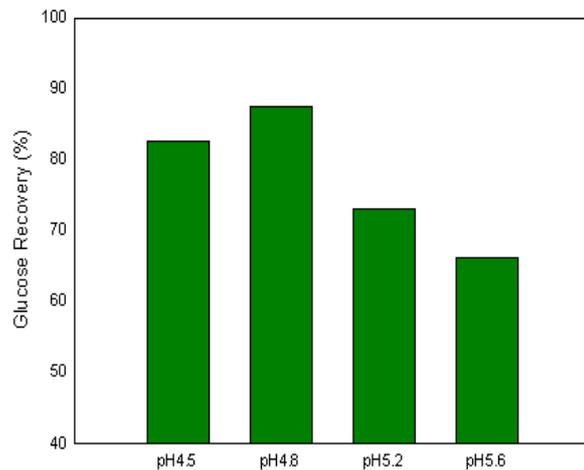
가. 전처리된 바이오매스의 적합한 당화조건 탐색

(1) pH의 영향

□ 상업용 효소인 Celluclast 1.5L을 사용하여 SAA 전처리된 벚짚을 당화하였음. pH를 4.5, 4.8, 5.2, 5.6으로 했을 때 가장 당 회수 효과가 좋은 pH 범위는 4.8로 나타났으며, 이는 타 문헌과 일치하는 값을 보임.

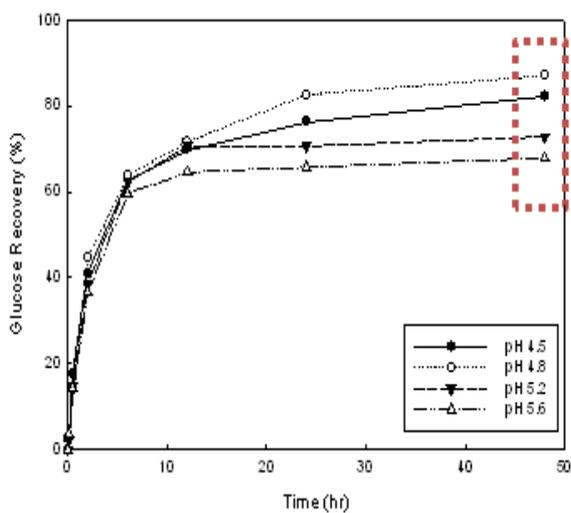


(A)

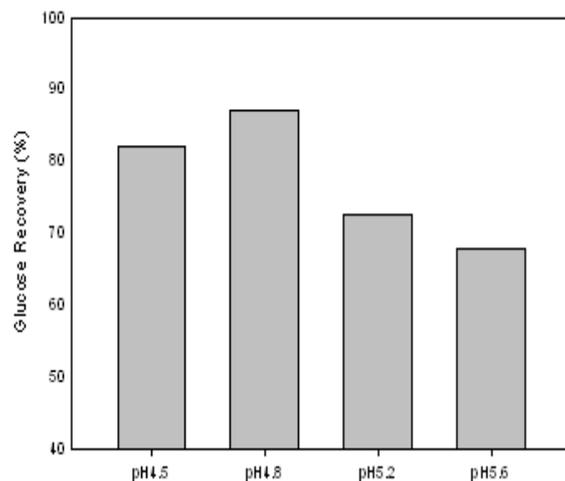


(B)

그림 3.4-7. SAA 처리된 벚짚 48시간 당화에 대한 pH 효과 (A), 48시간 후 각 pH 조건에서 당회수율



(A)



(B)

그림 3.4-8. SAA 처리된 보릿짚 48시간 당화에 대한 pH 효과 (A), 48시간 후 각 pH 조건에서의 당회수율

(2) 기질농도의 영향

□ 기질 농도를 10 ~ 80 g/L로 하였을 때, 당 전환율을 조사하였음. 기질로 벧짚과 보리짚을 사용하였으며 20 g/L 이상일 경우 기질저해를 받는 것으로 나타남.

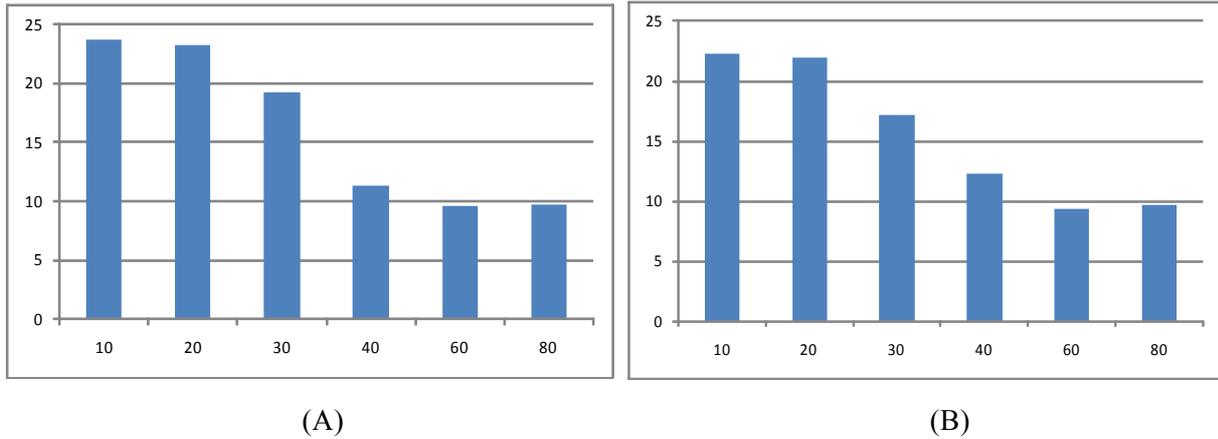


그림 3.4-9. 기질농도의 초기반응속도에 미치는 영향. y축: 당회수율 (%), x축: 기질농도 (g/L). 60 FPU에서 10 g/L부터 80 g/L 농도의 벧짚 (A), 보리짚 (B)

(3) 온도의 영향

□ 바이오매스 당화 공정에서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위해 온도 범위를 30 ~ 60 °C 설정하고 기질 농도는 1.5%, 효소 농도는 60 FPU/g cellulose 하여 당 전환율을 살펴봄. 기질은 SAA 처리된 벧짚과 보리짚을 사용하였으며, 48시간 당화 기준으로 보았을 때 50 °C에서 두 기질 모두 가장 높은 당 전환율을 나타내었음.

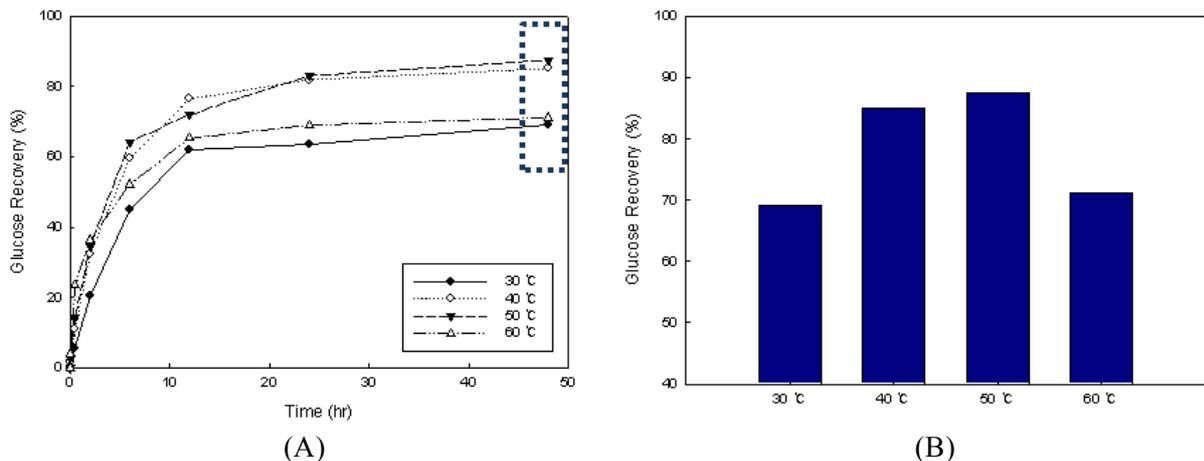


그림 3.4-10. SAA 처리된 벧짚 48시간 당화에 대한 온도 효과(A), 48시간 후 각 온도 조건에서의 당회수율 (B)

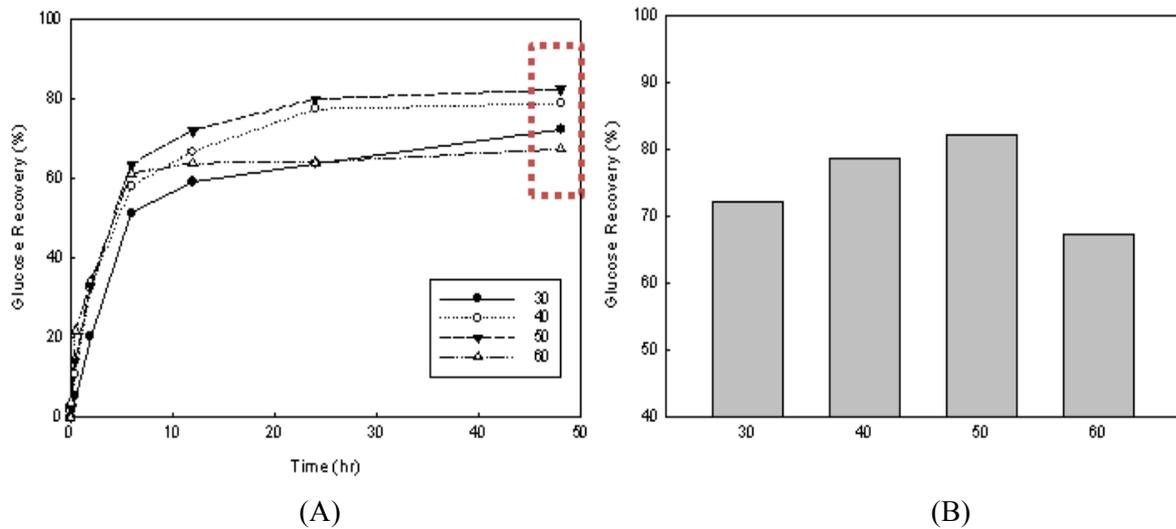


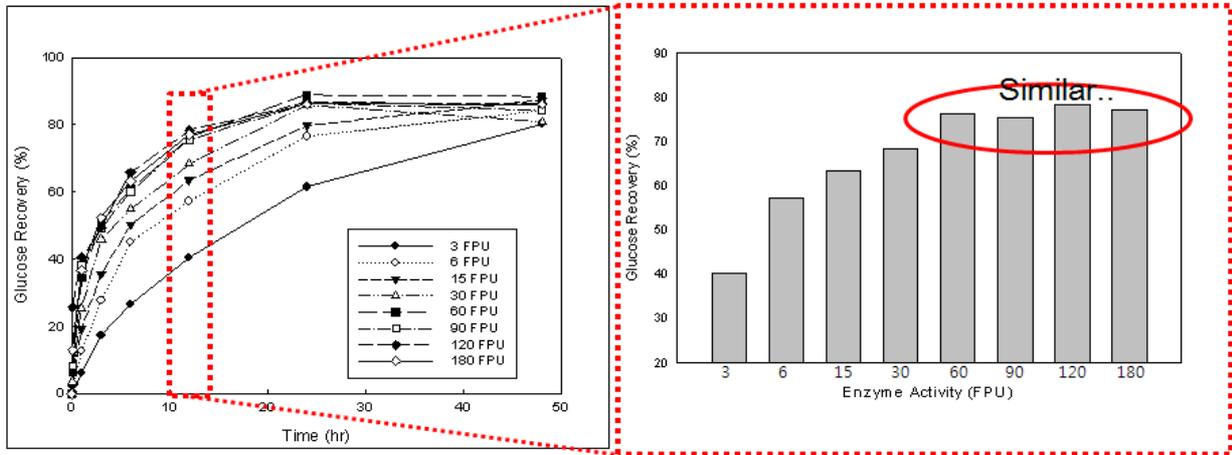
그림 3.4-11. SAA 처리된 보릿짚 48시간 당화에 대한 온도 효과(A), 48시간 후 각 온도 조건에서의 당회수율(B)

□ 전처리된 바이오매스의 당화 조건을 탐색한 결과 pH 4.8, 50 °C 그리고 기질농도 20 g/L 미만이 적절한 환경이었고, 타 문헌들과 거의 일치하는 결과를 얻음.

나. 바이오매스별 섬유소 분해효소의 적정비율 분석

표 3.4-4 바이오매스의 고체분석 결과

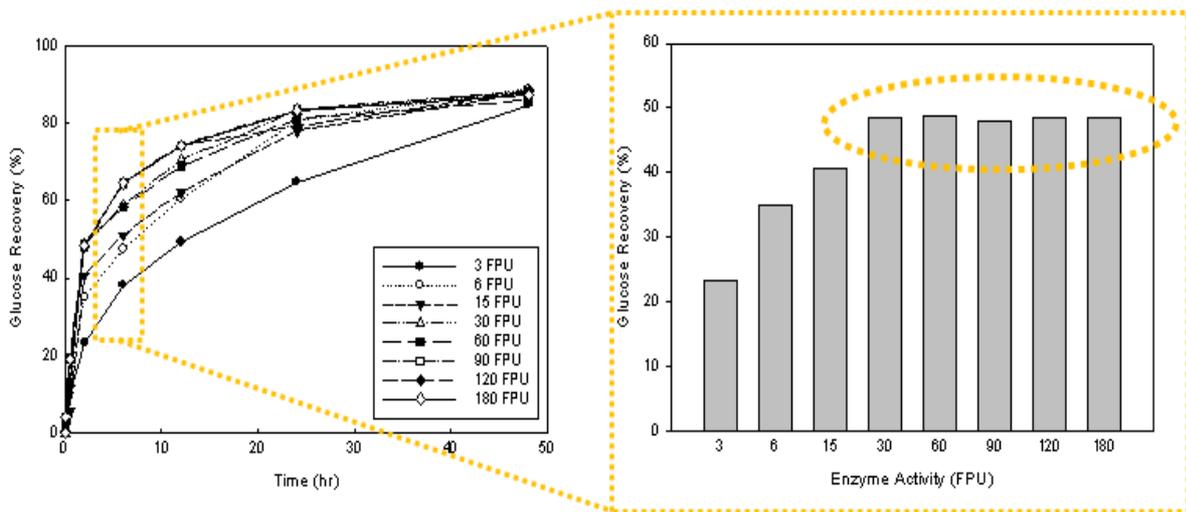
벼짚	Glucose	Xylose
	41.34 %	28.46 %
보릿짚	Glucose	Xylose
	34.13 %	22.89 %
암모니아 전처리 (SAA) 벼짚	Glucose	Xylose
	56.04 %	24.19 %
암모니아 전처리 (SAA) 보릿짚	Glucose	Xylose
	47.88 %	20.74 %



(A)

(B)

그림 3.4-12. SAA 처리된 벳짚 48시간 당화에 대한 온도 효과 (A), 12시간에 각 온도 조건에서의 당회수율 (B)



(A)

(B)

그림 3.4-13. SAA 처리된 보릿짚 48시간 당화에 대한 온도 효과 (A), 2시간에 각 온도 조건에서의 당회수율 (B)

- 벳짚의 경우 60 FPU/g cellulose 부터 그 이상으로는 초기 반응속도 및 최종 당 회수율이 비슷한 것으로 보임. 보릿짚의 경우 30 FPU/g cellulose 부터 그 이상으로는 초기 반응속도 및 최종 당 회수율이 비슷한 경향을 보였음. 벳짚, 보릿짚에 대한 임계 효소 활성도는 각각 60 FPU, 30 FPU 부근인 것으로 나타났음.
- 이러한 활성실험 결과를 토대로 벳짚, 보릿짚에 대한 상업용 효소 Celluclast 1.5L (Cellulase), Novozyme 188 (β -glucosidase)의 최적비율 탐색을 위한 RSM 실험설계를 실시하였음 (표 3.4-5).

표 3.4-5 최적 효소비율의 통계학적 분석을 위한 CCD 모델

RSM 선택 인자	-1.4	-1	0	1	1.414
Cellulcalst	7.9	70	200	330	402.5
Novozyme 188	1.975	17.5	50	82.5	100.5

표 3.4-6 RSM 실험 설계를 통한 각 효소의 coded, real 및 당화 1시간 후 당 농도 값

STD	Celluclast		Novozyme 188		벗짚의 1시간 후 당 농도 (g/L)	보릿짚의 1시간 후 당 농도 (g/L)
	Coded 값	실제 값	Coded 값	실제 값		
1	-1	100	-1	25	2.850	2.649
2	1	300	-1	25	3.102	2.976
3	-1	100	1	75	2.993	2.759
4	1	300	1	75	4.320	4.210
5	-1.4	58.6	0	50	2.790	2.014
6	1.41	341.4	0	50	4.363	3.778
7	0	200	-1.414	14.7	2.326	2.254
8	0	200	1.414	85.4	3.396	4.075
9	0	200	0	50	4.274	3.996
10	0	200	0	50	4.040	3.814
11	0	200	0	50	3.960	3.021
12	0	200	0	50	4.219	3.912
13	0	200	0	50	4.177	4.013

표 3.4-7 RSM 회귀분석 결과 표면 방정식

벗짚	$R = 2.329 + 0.454x_1 - 0.116x_2 - 0.183x_{11} - 0.068x_{21} - 0.072x_{22}$
보릿짚	$R = 2.194 + 0.519x_1 + 0.275x_2 - 0.248x_{11} - 0.071x_{21} - 0.147x_{22}$

표 3.4-8 RSM 회귀분석 결과

Source	벗 짚					보릿짚				
	Sum of squares	DF	Mean square	F 값	Pr > F	Sum of squares	DF	Mean square	F 값	Pr > F
Model	2.032	5	0.406	31.81	0.0001	2.717	5	0.543	14.38	0.0027
Error	0.089	7	0.012			0.226	6	0.037		
Corrected total	2.122	12				2.943	11			

Coefficient variation (CV) = 5.204

Coefficient of determination (R-square) = 0.957

Coefficient variation (CV) = 10.0855

Coefficient of determination (R-square) = 0.922

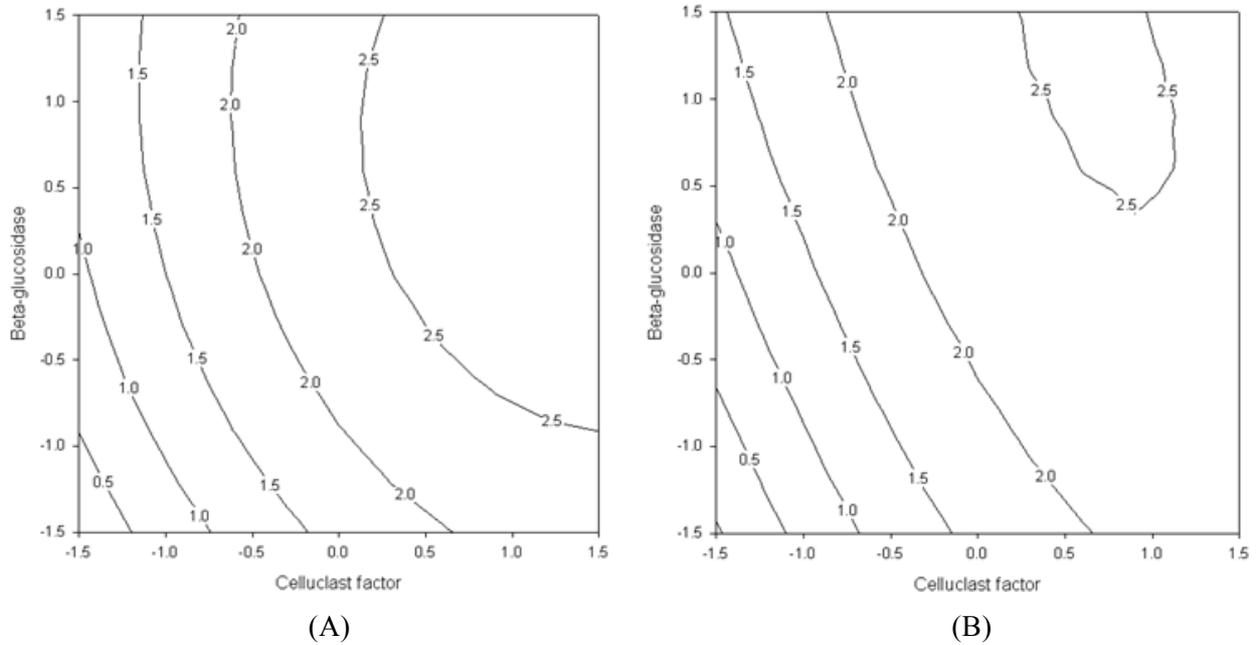


그림 3.4-13. RS-회귀분석 결과의 등고선 그래프. Celluclast와 β -glucosidase 비율 탐색, 24시간 암모니아 (SAA) 처리된 벯짚의 RSM 분석 (A), SAA 24시간 처리된 영양보리짚의 RSM 분석 (B)

표 3.4-9 최적 당화를 위한 효소 비율 RSM 결과

기질	효소	Cod 값	실제값	최적 비율
벯짚	Celluclast	0.8231	307.003	4.71
	Novozyme188	0.4669	95.174	1
보릿짚	Celluclast	0.9523	323.799	4.89
	Novozyme188	0.4987	66.207	1

- 통계학적 분석 결과 R-square 값이 신뢰도 있는 수준으로써 각각 0.957, 0.922 임.
- 통계학적 분석 결과 적정 벯짚, 보릿짚에 대한 효소비율은 4.71 대 1, 4.89 대 1 로 나타났음.

다. 고효율 당화공정 확립을 위한 공정변수 분석

표 3.4-9 ANOVA의 coded value

	Symbol	Coded values		
		-1	0	1
Agitation speed (rpm)	X1	100	140	180
Temperature (°C)	X2	20	50	80
Enzyme loading (FPU)	X3	10	60	110
pH	X4	3.8	4.8	5.8
Buffer concentration (M)	X5	0.05	0.1	0.15

□ 당화공정은 효소와 기질과의 반응임. 이 반응에서 관심이 있는 반응요소들은 표 3.4-9에 정리하였고 이들은 ANOVA (ANalysis Of VArious) 분석을 위해 code화 시켰고, 예상 최적점인 code 0은 논문이나 기초실험을 통해 알려진 값들의 근사치로 140rpm 교반속도, 50 °C 반응온도, 60 FPU의 효소 활성, pH 4.8의 산도 그리고 0.1 M의 버퍼 농도임. 표 3.4-10에는 이러한 요소들의 DOE (design of experiment)가 작성되어 있는데, 이 design은 FFD 모델에 의한 것으로 각 요소들의 영향력을 알아보기 위한 모델임. 표 3.4-11에는 통계학 프로그램에서 예측한 결과 값과 실험 결과 값을 나타내었음.

표 3.4-10 Experimental design

	Agitation speed X1		Temperature X2		Enzyme loading X3		pH X4		Buffer conc. X5	
	Codded	Exp.	Codded	Exp.	Codded	Exp.	Codded	Exp.	Codded	Exp.
	1	-	100	-	20	-	10	-	3.8	+
2	+	180	-	20	-	10	-	3.8	-	0.05
3	-	100	+	80	-	10	-	3.8	-	0.05
4	+	180	+	80	-	10	-	3.8	+	0.15
5	-	100	-	20	+	110	-	3.8	-	0.05
6	+	180	-	20	+	110	-	3.8	+	0.15
7	-	100	+	80	+	110	-	3.8	+	0.15
8	+	180	+	80	+	110	-	3.8	-	0.05
9	-	100	-	20	-	10	+	5.8	-	0.05
10	+	180	-	20	-	10	+	5.8	+	0.15
11	-	100	+	80	-	10	+	5.8	+	0.15
12	+	180	+	80	-	10	+	5.8	-	0.05
13	-	100	-	20	+	110	+	5.8	+	0.15
14	+	180	-	20	+	110	+	5.8	-	0.05
15	-	100	+	80	+	110	+	5.8	-	0.05
16	+	180	+	80	+	110	+	5.8	+	0.15
17	0	140	0	50	0	60	0	4.8	0	0.1
18	0	140	0	50	0	60	0	4.8	0	0.1
19	0	140	0	50	0	60	0	4.8	0	0.1
20	0	140	0	50	0	60	0	4.8	0	0.1

□ 실험결과 실험의 정확도를 나타내는 coefficient of variation (CV)값이 38.7377로 높은 값을 나타내었고 P값과 F값이 통계학적인 기준에서 신뢰성이 있는 수준에서 결정되었음. 결정계수 (R^2)는 0.9599로 모델의 예측값과 실험결과가 주는 신뢰도가 매우 높은 것으로 나타났으며 ANOVA 분석에서는 온도에 해당하는 X_2 , 효소 사용량에 해당하는 X_3 가 비교적 당화결과에 높은 영향을 미치는 요인으로 분석되었음. 반면 교반속도는 일정속도 이상의 값에서는 결과에 영향을 주지 않고 buffer농도의 경우도 마찬가지였던 것으로 나타났음. 이번 실험은 alpha-cellulose를 기질로, Celluclast와 Novozyme 188을 당화효

소로 이용하였을 때 결과이며 기질과 효소가 바뀔 때 마다 최소한의 실험횟수와 정확한 통계학적 분석으로 최적 당화공정의 최적화를 할 수 있을 것으로 예상됨.

표 3.4-11 ANOVA를 위한 실험 디자인(예측값 포함)과 결과

Run	X1	X2	X3	X4	X5	Predicted value of glucose conc. 2h	Observed value of glucose conc. at 2h
1	-	-	-	-	-	144	144
2	+	-	-	-	-	694	694
3	-	+	-	-	-	2300	2300
4	+	+	-	-	+	2514	2514
5	-	-	+	-	-	2884	2884
6	+	-	+	-	+	2436	2436
7	-	+	+	-	+	6240	6240
8	+	+	+	-	-	2756	2756
9	-	-	-	+	-	1609	1609
10	+	-	-	+	+	1289	1289
11	-	+	-	+	+	1010	1010
12	+	+	-	+	-	1998	1998
13	-	-	+	+	+	1263	1263
14	+	-	+	+	-	3832	3832
15	-	+	+	+	-	2914	2914
16	+	+	+	+	+	1030	1030
17	0	0	0	0	0	8618	7158
18	0	0	0	0	0	6626	7158
19	0	0	0	0	0	7745	7158
20	0	0	0	0	0	6045	7158

표 3.4-12 선택모델과 통계학적 분석을 위한 ANOVA

Source	Sum of squares	DF	Mean squares	F-value	P>F
Model	109785125	16	6861570.3	4.49	0.0604
Error	4583561	3	1527853.7		
Corrected total	114368686	19			

Coefficient of variation (CV) = 38.7377, Coefficient of determination (R²) = 0.9599

Factor	Mean square	F value	P value
X1	149189.06	0.10	0.0775
X2	2513017.06	3.64	0.0289
X3	8304483.06	5.44	0.0102
X4	1750990.56	1.15	0.0362
X5	693472.56	0.45	0.0548
X12	2878960.56	1.88	0.0263
X13	1530787.56	1.00	0.0390
X14	1129437.56	0.74	0.0453
X15	94710.06	0.06	0.0819
X23	104167.56	0.07	0.0810
X24	4434183.06	2.90	0.0187
X25	1551893.06	1.02	0.0387
X34	1729882.56	1.13	0.0365
X35	15438.06	0.01	0.0926
X45	4193280.06	2.74	0.0196

다. β -glucosidase 고정화를 위한 공정변수 분석

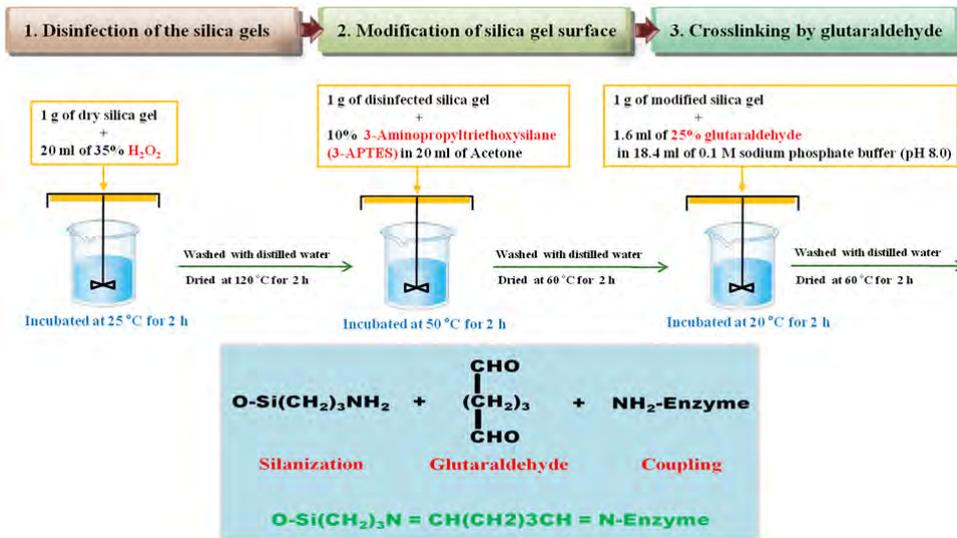


그림 3.4-14. β -glucosidase 고정화 메커니즘1

□ 당화공정의 경우 기질이 고체인 관계로 주 효소인 cellulase를 고정화하여 활용할 수 없음. 당화공정의 메커니즘은 고분자형태의 cellulose를 endo-glucanase가 무작위로 분해하여 포도당의 2량체인 cellobiose로 분해하면 β -glucosidase가 2량체를 단량체 포도당으로 분해하는 과정을 거치게 됨. 이 때 cellobiose의 경우 soluble하기 때문에 β -glucosidase를 고정화 할 수 있는 조건이 됨. β -glucosidase는 실리카 표면에 고정화 되었고 그 과정과 메커니즘은 그림 3.4-14에 표시되어 있음. 실리카는 H_2O_2 로 표면개질 하여 OH기가 형성되고 3-aminopropyltriethoxysilane(3-APTES)를 이용해 silanization을 하여 NH_2 기를 형성하게 됨. 이후 glutaraldehyde를 이용해 linker를 형성하고 β -glucosidase표면에 나와 있을 NH_2 기와 linker가 공유결합을 하는 메커니즘임.

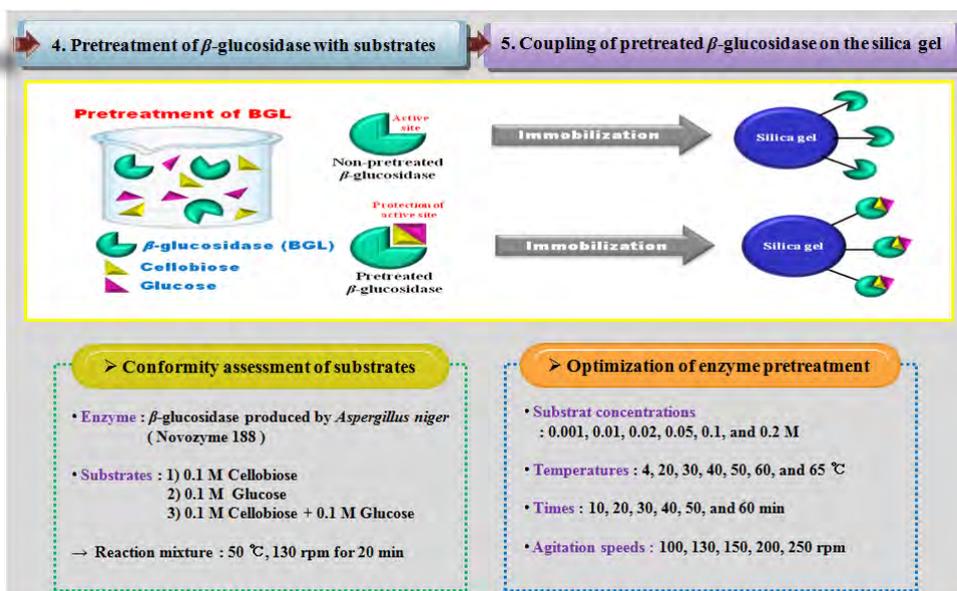


그림 3.4-15. β -glucosidase 고정화 메커니즘2

- NH₂기의 경우 β-glucosidase 활성자리나 그 근처에 존재할 수도 있기에 효소활성자리를 보호하는 공정도 병행되어야 함. 활성자리를 보호하는 물질로는 기질이나 기질의 전환 결과물질 등이 거론될 수 있음.

표 3.4-13 활성자리 보호물질의 활성증가에 관한 효과

Experiment	Immobilization time(h)	β-glucosidase pretreatment	Material Conc.(M)	Activity (U/g matrix)	Increased activity (%)
1	12	non-pretreated	-	55.6	-
2		pretreated	0.1 M cellobiose	132.0	137
3		pretreated	0.1 M glucose	130.9	135
4		pretreated	0.1 M cellobiose + 0.1 M glucose	135.2	143

- 전처리 후 효소활성은 전처리 전 보다 130%이상 향상되었음. 기질인 cellobiose와 결과물인 glucose를 각각 그리고 동시에 사용하였을 경우 동시에 사용했을 때가 각각 사용했을 때보다 높았음. 0.1 M의 cellobiose와 같은 양의 glucose를 동시에 처리하는 것을 전처리 방법으로 결정함.

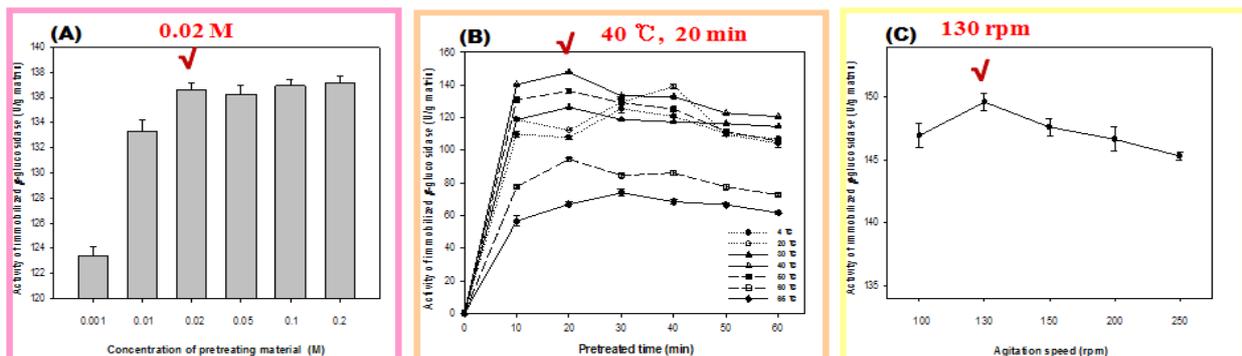


그림 3.4-16. 다양한 β-glucosidase 고정화 공정 변수에 대한 효과

- 전처리 물질의 농도에 대한 효과, 전처리 시간, 온도 그리고 교반속도에 대한 연구 또한 시행하였음. 각 실험은 50 °C, 130 rpm에서 20분 동안 진행되었고 전처리 물질은 cellobiose, glucose가 사용되었음. 약 0.02 M의 전처리 물질 농도, 40 °C의 온도, 20분 전처리 시간 그리고 약 130 rpm의 교반속도가 최적의 전처리 요건으로 결정되었음.

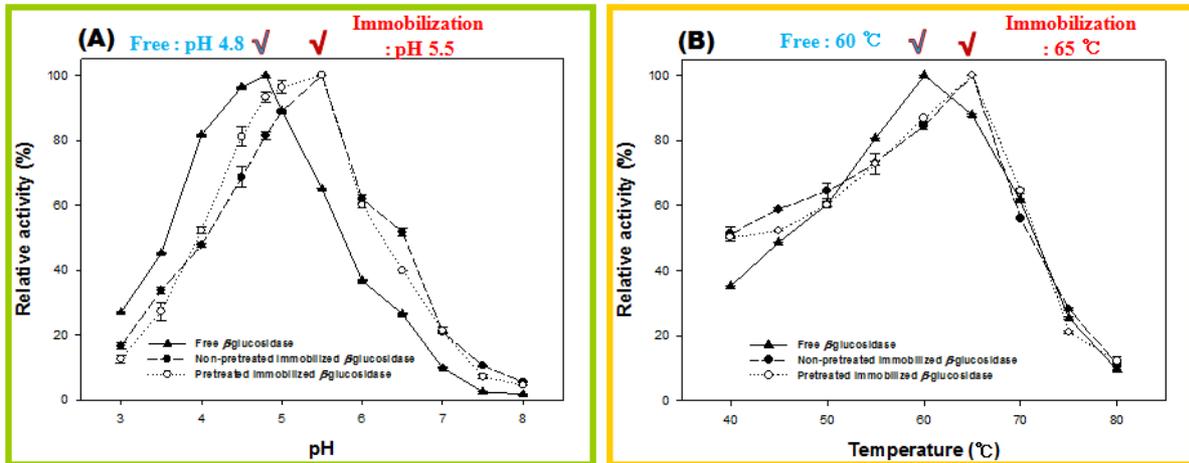


그림 3.4-17. 전처리 전 후의 당화 시 산도 (pH)와 온도의 효과

- 효소 고정화 이후 최적의 당화조건에 대한 연구도 시행되었음. 효소의 활성은 50 °C에서 0.05 M citrate buffer와 0.05 M phosphate buffer를 이용해 수행되었음. 산도의 경우 고정화 전에는 pH 4.8에서 최적의 조건을 나타내었음에 반해 전처리 후에는 pH 5.5로 변화하였음을 알 수 있었음. 온도의 경우에도 고정화 전 60 °C에서 고정화 후 65 °C로 변경되었음. 이는 효소가 고정화 될 때에 효소활성자리의 형태나 특성이 변화하였음을 간접적으로 알 수 있고 고정화 결과 온도에 더 안정성이 증가된 결과를 얻을 수 있었음.

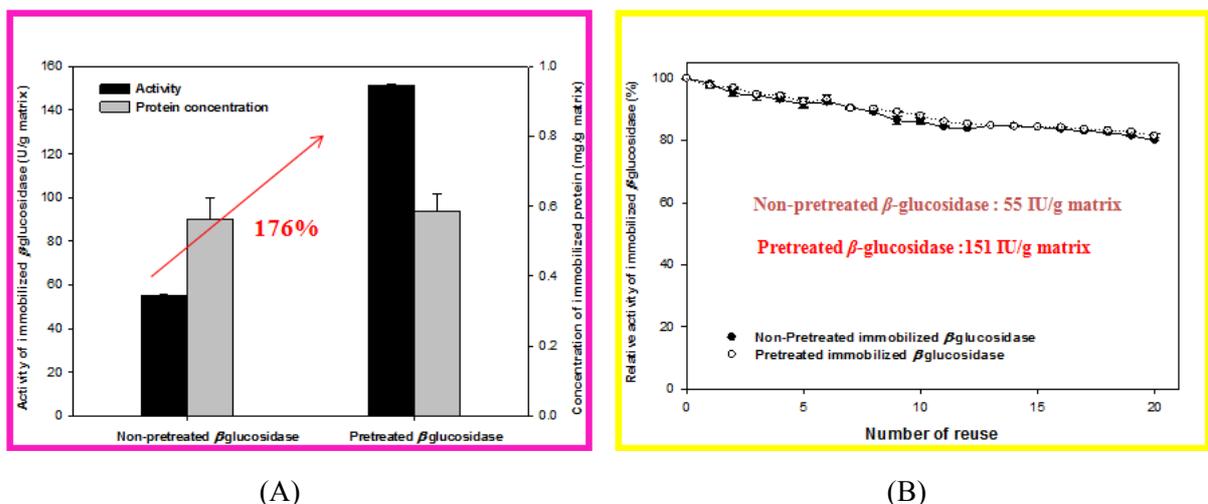


그림 3.4-18. 전처리 전 후의 β -glucosidase 활성도(A)와 효소 재사용율 (B)

- 고정화 전후의 효소활성과 재사용에 관한 실험도 수행되었음. 전처리 전, 후의 단백질 고정량은 변화가 없는 반면 전처리 전, 후의 효소활성은 전처리 공정, 고정화 공정의 최적화 이후 약 176%의 활성 증가의 결과를 보였음. 효소활성은 1 mM의 para-NPG를 0.05 M citrate buffer에서 pH 4.8, 50 °C, 150 rpm에서 20분 동안 수행되었음. 효소 재사용의 경우 전처리된 β -glucosidase나 전처리 안 된 β -glucosidase나 20회 재사용까지 약 80% 이상의 효소활성을 나타내었음. 처리 안 된 β -glucosidase의 경우 55 IU/g matrix의 활성을 100%로 전처리된 β -glucosidase의 경우 151 IU/g matrix의 효소활성을 100%로 상대적인 효소활성 감소를 관찰하였음.

3. 바이오매스의 전처리된 효율을 분석하는 새로운 방법의 개발

- 대용량 연속 바이오매스 전처리 공정이 도입됨에 따라 신속하고 높은 감도의 전처리 효율을 분석하는 방법이 필요하게 되었음. 기존에 주로 사용되어진 XRD분석 방법은 샘플당 약 30분 정도의 시간이 소모되고 분석된 바이오매스의 결정화도와 당화효율 사이의 상관관계가 잘 성립하지 않아 감도가 떨어지는 단점이 있음.
- 형광 현미경(fluorescence microscope)을 이용하여 바이오매스에 특정 파장대의 빛을 조사한 결과를 Lambert-Beer의 법칙에 따라 일정량의 빛을 흡수하고 파장이 shift 되어 방출하는 현상을 발견하였음. 파장에 따라 분석해본 결과 550 nm의 빛을 조사하였을 때, 바이오매스 내 xylan 성분이 650~680 nm 파장 영역에서 증폭되어 방출되는 현상을 발견하였고, 이를 바이오매스의 전처리 효율 분석에 응용할 수 있을 것으로 기대함.
- 이 방법의 장점은 분석 시간이 짧고 비파괴 검사가 가능하다는 점이며, 산으로 바이오매스를 처리하였을 경우, 침출되어 빠지는 셀룰로오스 양에 비례하여 당화효율이 증가할 것으로 판단됨.

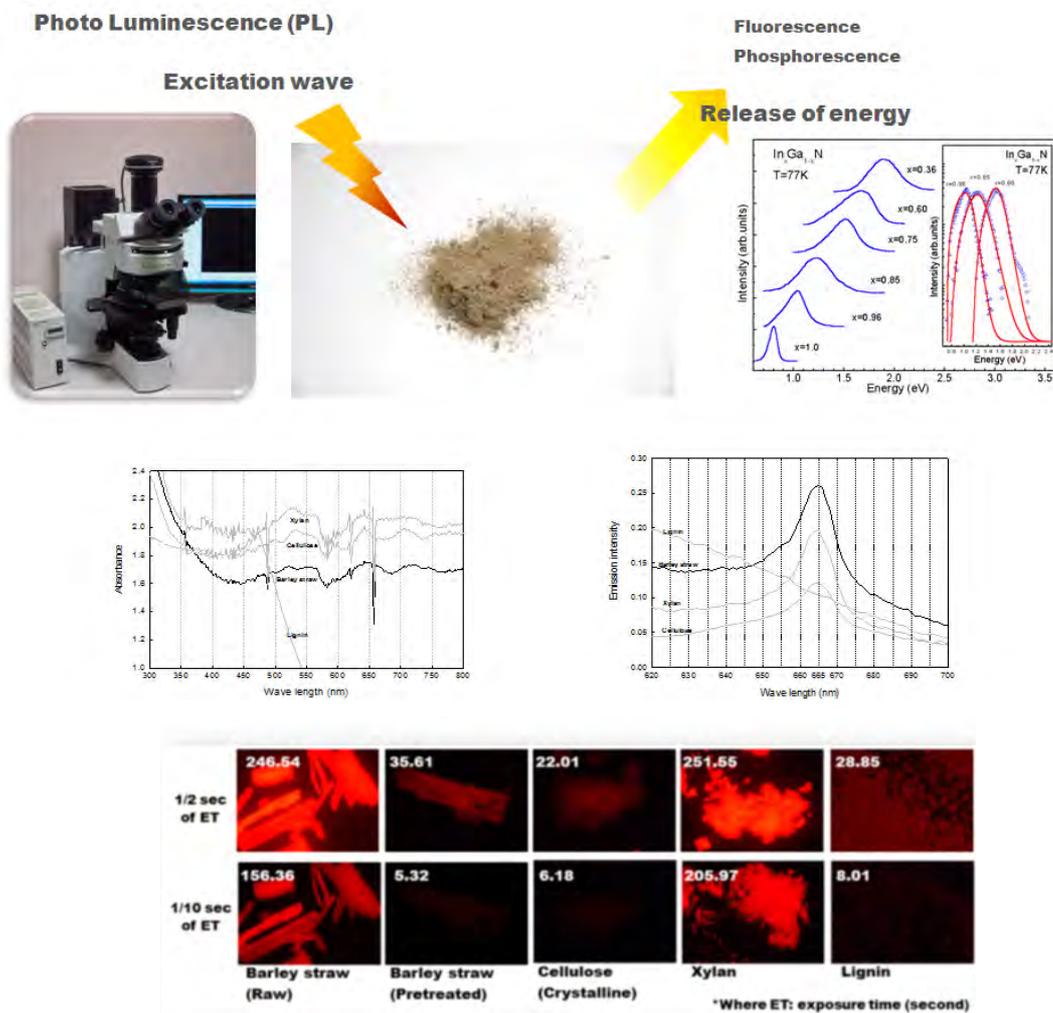


그림 3.4-19. 바이오매스의 광 발광 분석 방법

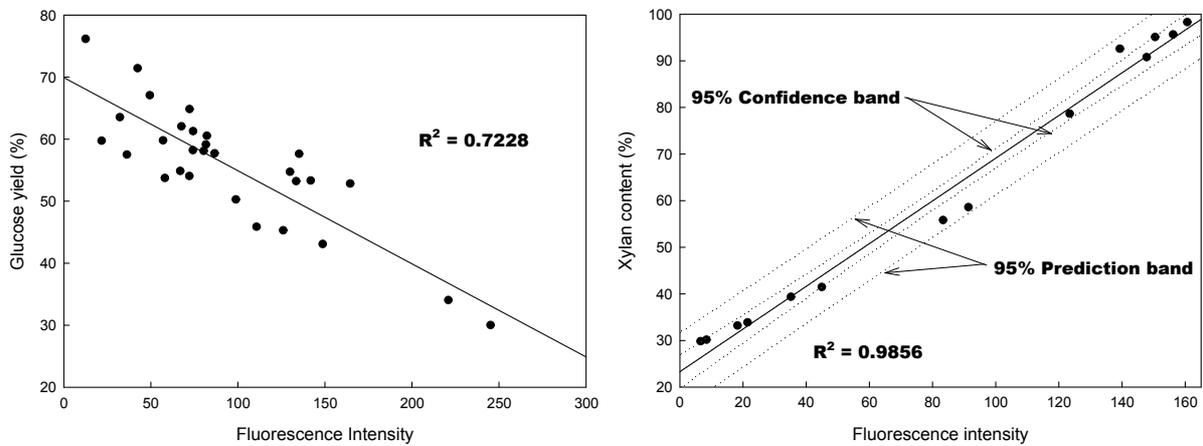


그림 3.4-20. 형광 세기와 바이오매스 당 전환율, Xylan 함량의 상관관계

- 반복 실험을 통하여 약산 전처리된 바이오매스 샘플들을 얻었고, 이들의 성분 조성과 당전환율 그에 해당하는 형광의 세기에 대한 자료를 수집하여 그림 3.4-20과 같은 표준 곡선을 도출하였음.
- 바이오매스 내 xylan 함량과 형광 세기의 상관관계는 결정계수 (R^2)가 0.9856로 매우 높은 수치를 나타내어 분석이 가능하다고 판단됨. 위의 자료들을 토대로 특히 1건 (바이오매스의 광 발광 분석 방법)을 출원하였고, 논문 1편을 투고하여 현재 출판되었음.
- 이 연구결과로부터 바이오매스 전처리 후 바이오매스의 조성의 변화를 간편하고 신속한 광 발광 분광법을 통해 확인하여, 전처리의 효과를 직접적으로 확인 및 분석이 가능함.

5절 바이오에탄올 대량 생산을 위한 통합공정 구축

1. 선행기술 조사 분석

가. 전처리 반응기 선행기술 연구

(1) 기존 전처리 반응기 특허관련 조사 및 연구

□ 섬유질계 전처리 반응기의 설계 및 제작에 앞서 기존 전처리 반응기에 대한 선행 연구로서 섬유질계 전처리 반응기 관련 국내외 특허를 조사하여 반응기 설계 및 제작에 반영하였다. 국내외 섬유질계 전처리 반응기 특허 분석결과 기존의 화학물질을 사용한 전처리 반응기는 이미 특허장벽을 형성하고 있으며 이를 극복하기 위해서는 각 반응기가 가지는 특징들을 융합하여 복합적인 특징을 갖는 반응기를 설계 및 제작하여야 한다는 결론을 내릴 수 있었다.

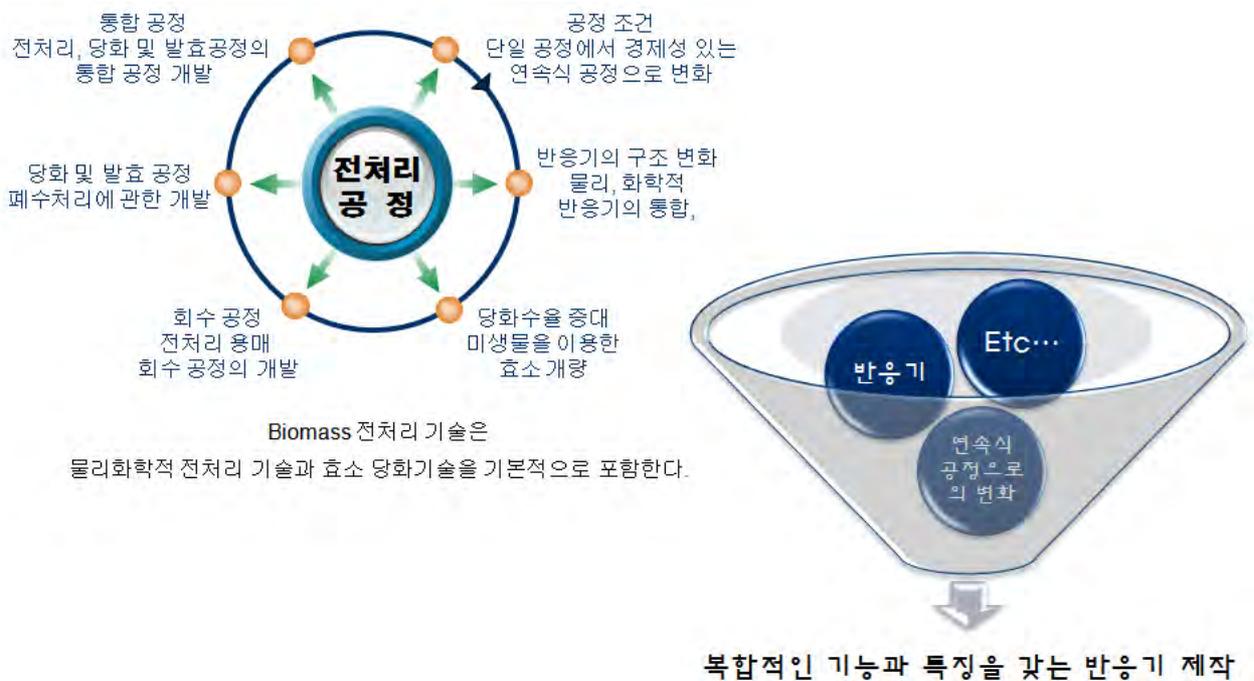


그림 3.5-1. 섬유질계 반응기 설계 및 제작 방향

표 3.5-1 바이오매스 전처리 관련 국내외 특허

개발 기술명		기존 전처리 기술의 조건 관련 특허	기존 전처리 기술의 조건 관련 특허
Keyword		Delignification, pretreatment, Biomass	Biomass, Pretreatment, Biomass
핵심특허 및 관련성	특허명	OXYGEN PULPING PROCESS	BIOMASS PRETREATMENT
	보유국 및 Inventor	Sterling Drug Inc [US] (4,182,648)	Sasidhar Varanasi etc. [US] (WO 2008/112291 A2)
	출원일	1980. 01. 08	2008.09.18
	차이점	고온 고압 조건에서 Alkaline solution의 Oxygen을 사용한 탈리그닌 공정 조건	Ionic liquid (EMIM Acetate)를 이용한 전처리 공정의 조건
핵심특허 및 관련성	특허명	SOLUBILIZATION OF LIGNOCELLULOSIC MATERIAL	BIOMASS PRETREATMENT
	보유국 및 Inventor	The United State of America as represented by the Secretary of Agiculture. [US] (4,304,649)	Susan Marie Hennessey. etc. [US] (US 2009/0053770 A1)
	출원일	1981.12.08	2009.02.26
	차이점	Alkaline solution 및 다양한 Solution과 biomass의 용해도에 따른 탈리그닌 공정조건	Ammonia solution을 이용한 전처리 공정에서 Inhibitor가 생성되지 않는 Ammonia concentration의 조건
핵심특허 및 관련성	특허명	DELIGNIFICATION OF NON-WOODY BIOMASS	ENZYMATIC HYDROLYSIS OF BIOMASSES HAVING A HIGH DRY MATTER(DM) CONTENT.
	보유국 및 Inventor	Xylan, Inc., Madison, Wis. [US] (5,023,097)	ELSAM ENGINEERING A/S, KOBENHAVNS UVIVERSITET [DK] (US 2008/0182323 A1)
	출원일	1991. 06. 11	2008.07.31
	차이점	Extruder를 이용한 각각의 Akali와 Acid 전처리 공정의 조건	Chamber Reactor를 이용한 전처리 후 Enzyme hydrolysis 공정의 조건
핵심특허 및 관련성	특허명	LIQUID AMMONIA EXPLOSION TREATMENT OF WOOD FIBERS	
	보유국 및 Inventor	Kimberly-Clark Worldwide, Inc. [US] (US 2003/0172464 A1)	
	출원일	2003. 09. 18	
	차이점	Ammonia를 이용한 폭쇄 전처리 공정의 조건	

개발 기술명	기존 전처리 반응기 관련 특허	
Keyword	Biomass, Pretreatment, Extruder	
핵심 특허 및 관련 성	특허명	PRETREATMENT OF BIOMASS FOR ETHANOL PRODUCTION
	보유국 및 Inventor	David Litzen etc. [US] (US 2006/0141584)
	출원일	2006.06.29
	차이점	Saw Dust 혹은 Wood chip을 Twin Screw Extruder로 전처리
핵심 특허 및 관련 성	특허명	COMPOSITE MATERIALS FROM CORNCOB GRANULES AND PROCESS FOR PREPARATION
	보유국 및 Inventor	Michigan state university [US] (US 2007/0288795)
	출원일	2007.12.13
	차이점	Corncob을 Twin Screw Extruder로 전처리
핵심 특허 및 관련 성	특허명	BIOMASS TREATMENT METHOD
	보유국 및 Inventor	Julie Friend, etc. [US] (US 2009/0050134 A1)
	출원일	2009.02.26
	차이점	여러 Biomass를 Cylindrical Chamber Reactor에서 Steam과 Ammonia로 전처리
핵심 특허 및 관련 성	특허명	SYSTEM AND METHOD FOR PRETREATING BIOMASS
	보유국 및 Inventor	The Texas A & M University System [US] (US 2009/0114591 A1)
	출원일	2009.05.07
	차이점	Akali solution을 이용한 Temperature Transpot Reactor

개발 기술명	기존 전처리 기술의 공정 및 복합공정 관련 특허	기존 전처리 기술의 공정 및 복합공정 관련 특허	
Keyword	Biomass, Pretreatment, Lignocellulosic, Lignocellulose	Biomass, Pretreatment, Lignocellulosic, Lignocellulose	
핵심특허 및 관련성	특허명	BIOMASS REFINING PROCESS	SYSTEM AND PROCESS FOR BIOMASS TREATMENT
	보유국 및 Inventor	AFEX CORPORATION [US] (WO 91/13099)	James B. Dunson JR. etc. [US] (US 2007/0029252 A1)
	출원일	1991. 09. 05	2007.02.08
	차이점	SHS (Steam) & SHA (Ammonia)를 이용한 Ammonia Recovery 복합공정	Cylindrical reaction vessel을 이용한 PHEReactor로 다양한 Biomass의 Ammonia 전처리 공정
핵심특허 및 관련성	특허명	METHOD FOR PROCESSING LIGNOCELLULOSIC MATERIAL	METHOD OF CONTINUOUS PROCESSING OF LIGNOCELLULOSIC FEEDSTOCK
	보유국 및 Inventor	Forskningscenter Riso. Birgitte Kiaer Ahring [DK] (US 6,555,350 B2)	IOGEN ENERGY CORPORATION [CA] (US 2008/0293114 A1)
	출원일	2003. 04. 29	2008.11.27
	차이점	Alkaline & Water Steam Explosion에 의한 Continuous 한 전처리 공정	Ammonia, Acid 를 이용한 Lignocellulosic biomass의 Continuous Pretreatment 공정
핵심특허 및 관련성	특허명	CELLULOSE PRODUCTION FROM LIGNOCELLULOSIC BIOMASS	PROCESS FOR PRODUCING SUGARS FROM CELLULOSIC BIOMASS
	보유국 및 Inventor	Purevision Technology, Richard C. Wingerson [US] (US 6,620,292 B2)	Board of Trustees of Michigan State University, [US] (US 2009/0011474 A1)
	출원일	2003.09.16	2009.01.08
	차이점	Akali 및 Steam을 사용하여 Hydrothermo Wash Reactor로 전처리한 후 Heat recovery 복합공정	Poplar, Bagasse를 이용한 Water soaking 후 AFEX 전처리 공정
핵심특허 및 관련성	특허명	SOLVENT PULPING OF BIOMASS	
	보유국 및 Inventor	ANDRITZ INC. NY [US] (US 2004/0060673)	
	출원일	2004.04.01	
	차이점	Plug screw feeder or compression screw device을 사용하여 여러 Biomass를 전처리하는 공정	

개발 기술명	기존 전처리 기술의 Recovery 관련 및 기타 특허	기존 전처리 기술의 Recovery 관련 및 기타 특허	
Keyword	Biomass, Ammonia, Pretreatment, Recovery	Biomass, Ammonia, Pretreatment, Recovery	
핵심 특허 및 관련 성	특허명	METHOD AND DEVICE FOR STRIPPING AMMONIA FROM LIQUIDS	APPARATUS AND METHOD FOR PRODUCING FULE ETHANOL FROM BIOMASS
	보유국 및 Inventor	Green Farm Energy, Torben A. Bonde [DK] (US 7,416,644 B2)	John J. SAVARESE [US] (US 2008/0020437 A1)
	출원일	2008.08.26	2008.01.24
	차이점	2단 Stripper를 이용한 Ammonia Recovery 공정	Extractor를 이용한 Ethanol 회수 공정
핵심 특허 및 관련 성	특허명	PROCESS FOR THE REGENERATION AND RECOVERY OF AMMONIA	APPARATUS FOR EXPANDING MATERIAL OF AN AGRICULTURAL ORIGIN
	보유국 및 Inventor	Western Minerals Tehchnology PTY LTY [AU] (WO 2005/097680 A1)	JAPAN Tobacco INC. [Japan] (WO 89/00821)
	출원일	2005. 10. 20	1989. 02. 09
	차이점	Ammonia Recovery 공정 (quicklime)	Rotary valve를 이용한 공정
핵심 특허 및 관련 성	특허명	RECOVERY OF AMMONIA FROM AQUEOUS STREAMS	
	보유국 및 Inventor	General Electronic Company [US] (4294812)	
	출원일	1981. 10. 13	
	차이점	Steam Stripper를 이용한 Ammonia Recovery 공정	
핵심 특허 및 관련 성	특허명	HEAT RECOVERY FROM A BIOMASS HEAT SOURCE	
	보유국 및 Inventor	Rollo J. Everett, etc. [US] (US 2006/0286628 A1)	
	출원일	2006.12.21	
	차이점	전처리 과정에서의 Heat Recovery System 공정	

구분	Title	Search word	Pub No.	Pub. Date
Acid관련 특허	ACID PREHYDROLYSIS REACTOR SYSTEM	Biomass, Acid hydrolysis	997,711	1994. 08. 16
	Two stage continuous hydrolysis of plant biomass to sugars	Biomass, Acid hydrolysis	WO81/024285	1984. 01. 24
	Method of treating biomass material	Biomass, Acid hydrolysis	4,384,897	1983. 05. 24
	A PROCESS AND AN APPARATUS FOR CHEMICAL TREATMENT OF BULKY ORGANIC MATERIALS, SUCH AS STRAW AND OTHER BIOMASS, WITH VOLATILE CHEMICALS	Biomass, Acid hydrolysis	WO 85/00133	1985. 01. 17
	Acid hydrolysis of biomass for alcohol production	Biomass, Acid hydrolysis	4,612,286	1986. 09. 16
	Process for hydrolysis of biomass	Biomass, Acid hydrolysis	4,556,430	1985. 12. 03
	Method of separation of sugars and concentrated sulfuric acid	Biomass, Acid hydrolysis	4,608,245	1986. 08. 26
	Cyclone reactor	Biomass, Acid hydrolysis	4,818,295	1989. 04. 04
	Method for producing ethanol from biomass	Biomass, Acid hydrolysis	4,952,504	1990. 08. 28
	Method of producing sugars using strong acid hydrolysis of cellulosic and hemicellulosic materials	Biomass, Acid hydrolysis	5,562,777	1996. 10. 08
	Hydrolysis and fractionation of lignocellulosic biomass	Biomass, Acid hydrolysis	6,022,419	200. 02. 08

나. 공정관련 선행기술 연구

(1) 국외 바이오에탄올 생산 공정

(가) Arkenol사의 농축산을 이용한 공정

□ Arkenol사의 공정은 산을 이용한 2단 처리로 반응기는 원뿔형이며 내부에 2단 스크류 교반기를 설치하여 고온 고압에서 처리 하도록 고안되어있다(그림 3.5-2). 그 후 전처리 된 바이오매스는 2단 여과장치를 거쳐 고형물과 액상을 분리시키고 액상은 다시 이온 교환 칼럼을 통하여 산과 당을 분리하여 최종적으로 당화액을 얻는다. 이 공정의 장점은 산을 이용하기 때문에 기타 용매에 비해 경제성이 뛰어나나 초기 설비 투자비가 많이 들며 산 회수에 이온교환 수지를 사용하기 때문에 비용이 증가하며 환경오염을 야기시킬 수 있는 단점이 있다.



그림 3.5-2. Arkenol사 공정

(나) MBI사의 연속 암모니아 폭쇄 공정

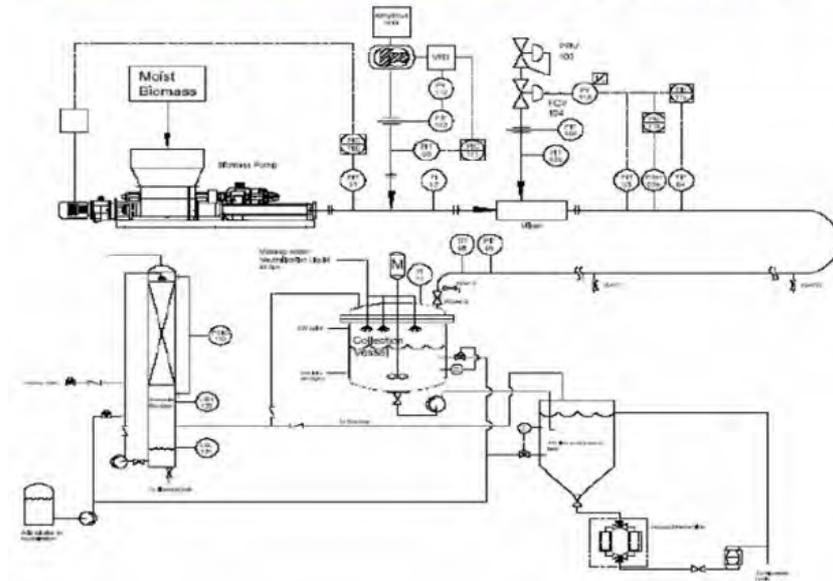


그림 3.5-3. MBI사 CAFEX 공정

- 암모니아를 이용한 폭쇄 공정을 연속식으로 사용할 수 있도록 고안된 장치이다. 원료 투입구에서 이송된 바이오매스는 밀어 라인 믹서에서 전처리 용매인 암모니아수와 섞이고 라인 반응기로 이송되어 열을 공급받게 된다. 열에 의해 일정 압력에 도달하면 자동으로 밸브가 열려 전처리된 바이오매스가 수집탱크로 모이게 된다. 연속적으로 바이오매스를 처리할 수 있는 장점이 있으나 전처리 시 높은 압력을 유지하지 못하여 효율이 낮은 단점이 있다.

(다) Dong Energy 사의 전처리 공정

- 동 에너지는 시간당 1,000kg을 처리할 수 있는 공정을 개발하여 운전하고 있다.
- 그림 3.3-4를 보면 바이오매스는 고온수에 의해 1번 탱크에서 침지되어 3번 펌프에 의해 이송된다. 4번 반응기를 따라 바이오매스는 이송되면서 5번에서 들어오는 고온수에 의해 다시 한 번 전처리된다. 이렇게 처리된 바이오매스는 당화 발효를 통하여 바이오에탄올로 만들어진다. 아래 그림 3.3-5는 실제 건설되고 있는 사진이다.
- 바이오에탄올 생산에 있어서 전체적인 공정에 관한 선행기술들에 관한 자료조사를 하였다. 조사 결과 선행기술들은 묽은 산을 이용한 가수분해 공정, 암모니아를 이용한 탈리그닌 공정 그리고 고온수 및 Steam을 이용한 공정 등이 주를 이루고 있으며 대부분 공정은 전처리에 사용된 용매를 회수하여 재사용하여 경제성을 높이고 환경 친화적인 공정이 되도록 하고 있는 것이 특징이다. 또한 가능한 연속식 공정이 이루어지도록 설

계하여 생산성을 높이는데 초점을 맞추고 있다. 이와 같은 선행기술들을 참조하여 반응기 설계에 있어 용매의 회수용이성 및 연속식 공정을 감안하여 설계해야 할 것으로 결론지었다.

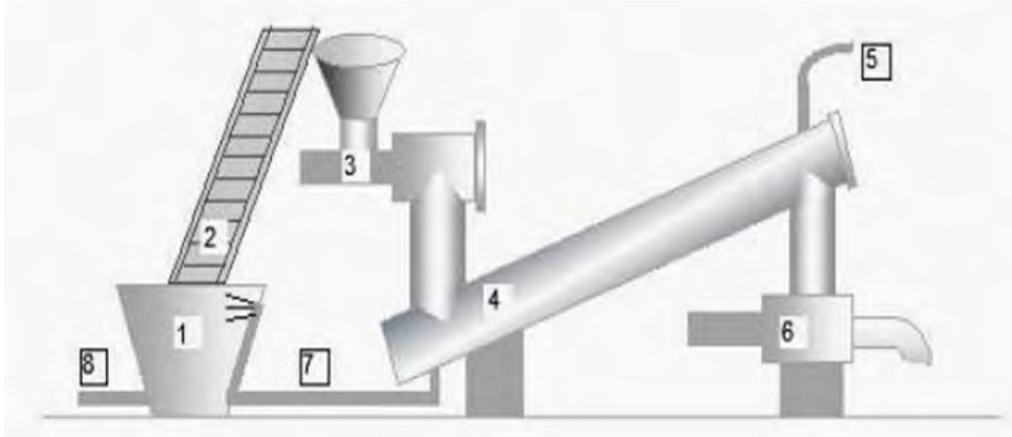


그림 3.5-4. DONG Energy사 공정의 모식도

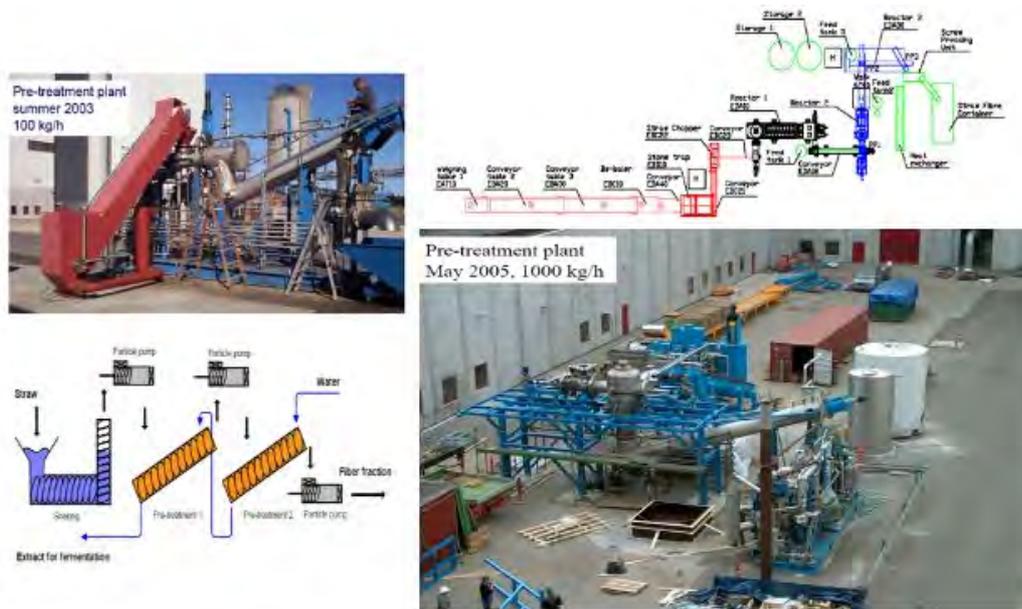


그림 3.5-5. DONG Energy사 공정

다. 바이오매스 분석 및 선정

(1) 분석 시스템 확보

□ 바이오매스 발굴 및 후보 선정을 위한 대상 바이오매스의 구성 성분의 분석을 위하여 미국 NREL 분석방법을 기준으로 glucose, xylose (hemicellulose), 리그닌, 회분 및 기타 추출물의 분석 방법을 확립하였다. 기존의 바이오매스 (섬유질계/섬유소계)의 분석은 단순히 열분해를 통하여 전체 바이오매스의 구성 원소별 분석을 제시함으로써, 최종 전환

산물의 가능한 당화 범위 및 물질 수지 확립이 불가능하였다. 그러나 이러한 분석법을 적용할 경우, 본 연구에서 확보하고자하는 당 성분 및 기타 성분의 체계적인 분석이 가능하다. 본 연구에서 확립된 분석 방법은 각 공정 단계별로 물질 수지를 제공할 수 있는 중요한 핵심 기술이다. 이 분석 방법을 적용할 경우, 초기 바이오매스 및 전처리 후의 바이오매스의 구성 성분을 확인할 수 있을 뿐 아니라, 각 전처리 단계에서 파생되는 고/액상의 구성 성분을 확인할 수 있다.

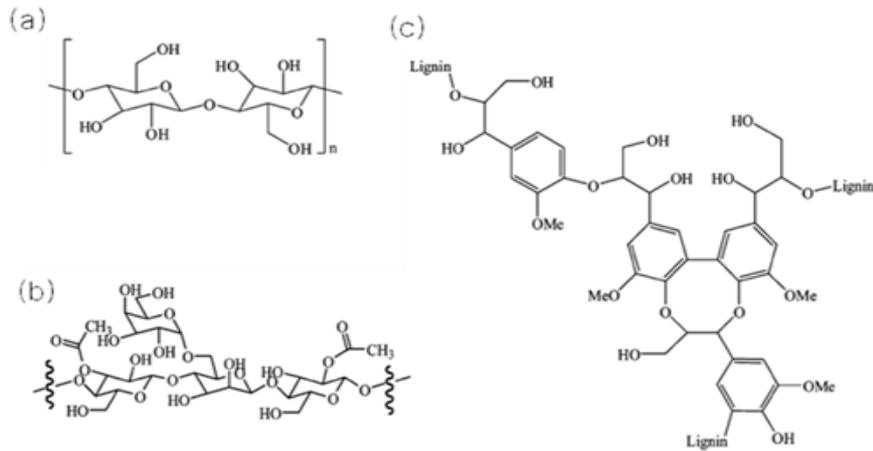


그림 3.5-6. 섬유질계 바이오매스의 구조 및 리그닌의 구조

(가) 당분석

□ 美 에너지 재생에너지 연구소의 Lap Procedure 002(1996)를 따라 기본적으로 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 여러 바이오매스를 반복적으로 분석하여 각 바이오매스의 당 성분을 정확하게 파악하였다.

-NREL Lap Procedure 002 - Determination of Carbohydrates-

- ① Test tube에 시료를 0.3 g ± 0.0005 가량 넣는다.
- ② H₂SO₄(72%)를 3 ml씩 각각 넣는다.
- ③ 시료와 H₂SO₄ (72%)를 넣은 test tube를 2시간 동안 30 °C에서 반응시킨다.
- ④ 반응시킨 Test tube의 시료에 증류수를 84ml 첨가하여 Vial에 넣는다.
또 다른 Vial에 증류수를 87 ml를 넣고 무게를 잰다.
- ⑤ Vial을 121 °C에서 1시간 동안 Autoclave한다. 총 반응시간은 2시간 30분이다.
- ⑥ Vial을 상온으로 식히고 물 87 ml를 첨가한 Vial의 무게를 잰다.
- ⑦ Vial의 시료를 Test tube에 4 ml을 취해서 CaCO₃로 중화시킨다.
거품이 생기지 않을 때까지 넣어주고 상등액을 pH paper에 찍어 pH 7~8로 중화한다.
- ⑧ 상등액을 취해 원심분리기(15분 15,000 rpm)에 넣어 원심 분리한다. (2회).
- ⑨ 원심분리가 된 상등액을 취해 LC를 이용 당 분석을 한다. (P-Column).

LC Condition - 이동상 : 0.005M H₂SO₄

Flow rate : 0.6 ml/min , Temperature : 80 °C

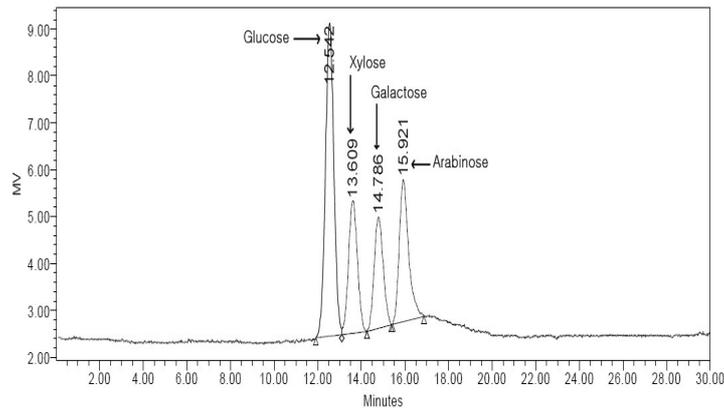


그림 3.5-7. HPLC Standard chromatograph



그림 3.5-8. NREL 당 분석법

(나) 리그닌 분석

□ 美 에너지 재생에너지 연구소의 Lap Procedure 003 & 004(1996)를 따라 기본적으로 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 여러 바이오매스를 반복적으로 분석하여 각 바이오매스의 리그닌 성분을 정확하게 파악하였다. 리그닌은 크게 Acid-Insoluble Lignin과 Acid-Soluble Lignin으로 나누고 이중 Acid-Insoluble Lignin은 Procedures중 Summative 분석법으로 리그닌을 분석하였다.

-NREL Lap Procedure 003 - Summative 분석법-

- ① Test tube에 시료를 0.3 g ± 0.0005 가량 넣는다.
- ② H₂SO₄ (72%)를 3 ml씩 각각 넣는다.
- ③ 시료와 H₂SO₄ (72%)를 넣은 test tube를 2시간 동안 30°C에서 반응시킨다.
- ④ 반응시킨 Test tube의 시료에 증류수를 84 ml 첨가하여 Vial에 넣는다.
또 다른 Vial에 증류수를 87 ml를 넣고 무게를 잰다.

- ⑤ Vial을 121 °C에서 1시간 동안 Autoclave한다. 총 반응시간은 2시간 30분이다.
- ⑥ Vial을 상온으로 식히고 물 87 ml를 첨가한 Vial의 무게를 잰다.
- ⑦ Vial의 시료를 Test tube에 4 ml을 취해서 CaCO₃로 중화시킨다.
거품이 생기지 않을 때까지 넣어주고 상등액을 pH paper에 찍어 pH 7~8로 중화한다.
- ⑧ 상등액을 취해 원심분리기(15 분 15,000rpm)에 넣어 원신 분리한다. (2회).
- ⑨ 가열 후 여과한다. (Whatman No. 1)
- ⑩ Filter paper를 포함한 여과물을 105 °C 오븐에서 2시간동안 건조한다.
- ⑪ 도가니의 무게를 W1으로 하고 도가니 안에 건조물을 넣고 도가니의 무게를 재서 W2로 기록한다.
- ⑫ 도가니를 575 ± 25 °C 의 화로에 넣고 발화한다.
- ⑬ 발화 후 상온으로 냉각 후 도가니만의 무게를 재서 W3로 기록한다.



그림 3.5-9. NREL Summative 리그닌 분석법

-NREL Lap Procedure 004 - ASL분석법-

당분석 Procedure ⑥번까지 동일하다.

- ① 이 후 sample의 상등액을 일정량 취하여 원심분리 시킨다.
- ② 상등액 취해 spectrometer cell에 넣는다. (Dilution이 필요하면 일정량으로 실시한다.)
- ③ Spectrometer를 사용하여 205 nm에서 흡광도를 측정한다.

(다) Ash 분석

□ 美 에너지 재생에너지 연구소의 Lap Procedure 005(1996)를 따라 기본적으로 실험을 수행하였다. 실험은 기본적으로 Lab에서 사용하고 있는 여러 바이오매스를 반복적으로 분석하여 각 바이오매스의 Ash 성분을 정확하게 파악하였다. Ash분석은 유기물을 모두 발화시키고 남은 무기물 즉 재의 무게를 측정하여 분석하였다.

- NREL Lap Procedure 005 - Standard Method for Ash in Biomass -

- ① 빈 도가니에 표시를 하여 575 ±25°C에서 2시간 동안 가열시킨 후 다시 한 시간

동안 가열 시킨다.

- ② 데시케이터에 넣어 상온으로 냉각시켜 0.1 mg 의 오차 범위로 이 용기의 중량을 제어 기록한다. (이전 도가니의 무게와의 오차가 0.3 mg 이하까지 반복한다.)
- ③ 0.5 or 1.0 ± 0.0005 g 의 준비된 샘플을 2의 도가니에 넣고 무게를 잰다.
(샘플을 포함한 용기의 무게 - 용기의 무게 = W1)
- ④ 단열된 화로 안에 내용물과 용기를 넣고 575 ±25 °C에서 최소 3시간 또는 모든 탄소가 없어질 때까지 가열 한다.
- ⑤ 데시케이터에 넣어 상온으로 냉각시켜 0.1mg 의 오차범위로 이 용기의 중량을 제어 기록한다.
(한 시간 동안 냉각된 도가니 무게와의 오차가 0.3 mg 이하까지 냉각 중량을 잰다.)



그림 3.5-10. NREL Ash 분석법

(2) 국내/외 잉여자원중 바이오에탄올 생산에 적합한 주요 바이오매스 선정

- 섬유질계 바이오매스란 통상적으로 폐목재류, 볏짚류, 식물협잡물(잔디, 잡초, 폐야채류 등)등을 포함하는 개념으로써 크게는 유기성폐기물에 해당되기 때문에 식량자원과 경쟁하지 않으며, 주변에서의 원료확보가 용이하고, 재생가능하다는 측면에서 매우 유리한 바이오에탄올의 원료물질로 평가되고 있다. 섬유질계 바이오매스는 해부학적 구성상 리그닌(lignin), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 셀룰로스(cellulose)로 이루어져 있으며, 1) 물리화학적인 전처리공정을 이용하여 리그닌과 헤미셀룰로스를 제거하고 셀룰로스를 고체상으로 추출 이후 이를 2) 효소당화 과정을 거쳐 단당류로 분해시키고(당화공정), 3) 발효공정을 거쳐 에탄올로 전환될 수 있다. 이러한 공정 중 가장 결정적인 단계는 전처리공정이다.
- 그 이유는 전처리기술에 따라 섬유질계 바이오매스로부터의 셀룰로스 추출량 또는 추출효율이 결정되고, 이를 바탕으로 추출된 셀룰로스가 당으로 전환되는 당화효율이 결정되기 때문이다. 그러나 획기적인 전처리 공정을 통하여 셀룰로스를 추출하여 얻어냈다 하더라도 원료 자체의 셀룰로스 함량이 적으면 최종 산물인 에탄올 생산성이 낮아지므로 원료 선정 또한 매우 중요하다. 본 연구에서는 섬유질계 바이오에탄올 생산 공정 기술을 확립하기 위한 기초실험으로 섬유질계 바이오매스 전처리기술과 후속공정인 셀룰로스 당화공정을 평가하고 이를 전체 생산 공정 기술개발에 반영하며 먼저 바이오에탄올 생산에 있어서 가장 적합한 바이오매스를 선별 하였다.
- 국내의 바이오매스 성분분석을 통한 기질 발굴 및 선정에 있어, 확보된 국내의 바이오매스의 구성성분 분석은 NREL 표준방법을 이용하여 분석을 하였다. 이때, 확보가 불가

능하거나 확보노력 중인 바이오매스에 대해서는 기존자료를 조사하여 성분데이터를 얻어 사용하였다. 특히 보릿짚은 리그닌의 함량이 다른 바이오매스에 비해 현격히 낮고 조직이 연하여 전처리가 용이할 것으로 보인다. 특히, 고온/고압 조건하에서 수행되는 전처리 후 보릿짚의 풍부한 헤미셀룰로스가 xylose로 분해되어 furfural과 같은 발효 저해 부산물로 빠르게 전환되어 축적될 가능성이 많으므로 반응조건 최적화를 통해 furfural을 최소화하는 노력이 필요하다. 반면, 국외 바이오매스의 성분분석에서는 보는 바와 같이 Cassava 줄기와 같은 리그닌 성분이 높은, 바이오매스의 경우, 전처리 시, 리그닌이 분해되어 생기는 부산물인 페놀릭스의 생산이 많을 것이라 예상할 수 있으며 이에 효과적인 탈 리그닌 과정이 수행되어야 된다고 예상된다.

표 3.5-2 NREL분석법에 따른 바이오매스별 성분분석

	Cellulose [%]	Hemi-cellulose [%]	Lignin [%]	Ash [%]
부들	35.85	11.69	21.13	0.43
카사바줄기	36.18	24.32	33.78	2.15
우리밀	37.58	24.74	19.54	4.55
유채대	37.63	19.53	22.78	4.53
벼짚	38.08	19.48	22.25	5.74
옥수수대	39.17	27.51	22.50	3.12
쌀보릿짚	39.82	23.48	22.14	2.54
겉보릿짚	39.50	20.74	21.21	2.51
갈대	41.16	17.13	23.48	6.56
억새	43.20	19.94	21.25	4.87

- 총 10여 가지 바이오매스를 확보하여 분석한 결과 셀룰로스 함량은 갈대/억새가 가장 높았고, 리그닌함량은 카사바줄기가 33.8%로 목질계와 유사하게 분석되었다. 분석된 바이오매스 중 Bench Scale에서 여러 조건을 대규모 연구 시 원활한 바이오매스자원 확보와 향후 상용화급 공정에 바이오매스 수급을 고려하여 초본계열로는 쌀보릿짚, 목질계로는 카사바줄기를 선정하였다.
- 카사바 줄기는 참여기업((주)창해에탄올)이 파푸아 뉴기니 카사바 농장 운영하므로 대규모의 원활한 수급이 가능하다. 또한, 국내 보릿짚 생산량은 14만 톤 이상이나 대부분의 보릿짚이 소각 되거나 버려지고 있으며, 호남농업연구센터(익산)에서 필요한 바이오매스를 수급할 수 있었다.

2. Lab-scale 전처리조건 설정 연구

가. Lab-scale(바이오매스 1g 이하) 규모에서 전처리조건 탐색

□ 기존 바이오매스의 전처리 방법 중에서 적용 가능성이 가장 높으며, 선행 연구를 통하여 입증된 산 및 알칼리, 암모니아 용액을 이용한 화학적 전처리 방법과 다양한 고체 산, 염기의 화학용매(NaOH, 옥살산, 황산암모늄 등)를 사용하여 대상 바이오매스에 적용 각각의 전처리 영향을 분석하였으며 이러한 화학적 전처리 공정의 영향을 분석하고 파악하기 위해서는 공정 조건에 맞는 변수를 확립하고 이에 따른 고/액상의 분석 방법이 확립 되어야 한다. 본 연구를 위하여 화학 용매를 적용 가능한 회분식 반응시스템을 구축하였다. 회분식 반응시스템은 화학 용매, 온도 및 반응 시간에 따른 전처리 영향을 분석하여 최적의 공정 조건을 제시할 수 있으며, 이렇게 제시된 공정 조건을 이용하여 암모니아 폭쇄 공정(AFEX Process)을 구축 하였다.

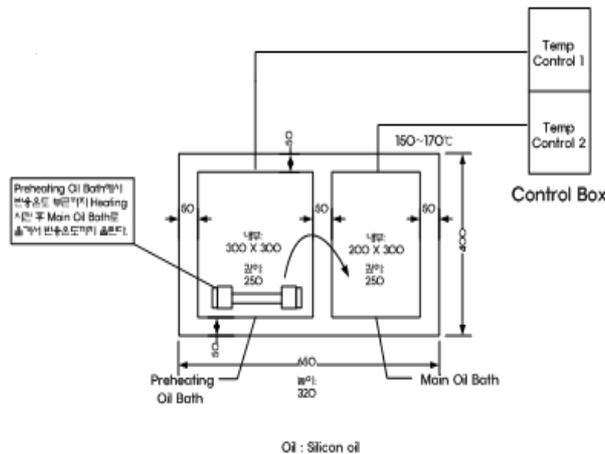
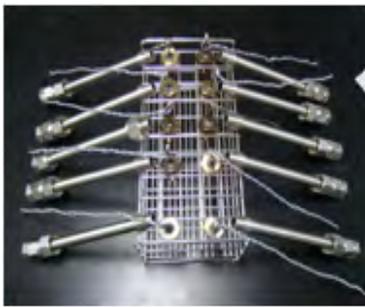


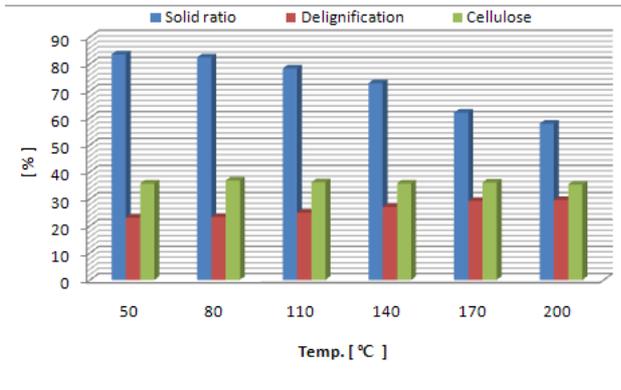
그림 3.5-11. Batch Type의 Lab scale (바이오매스 1g이하) 회분식 반응기

(1) 암모니아를 이용한 전처리

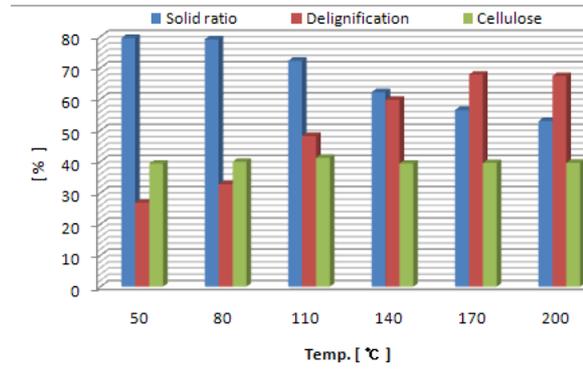
□ 조건: 암모니아 농도-15%(v/v), 바이오매스 농도-10%(w/v), 반응시간: 30분

암모니아를 이용하여 카사바 줄기와 보릿짚을 전처리하였다. 암모니아를 이용한 전처리는 셀룰로스의 성분은 유지하면서 얼마나 많은 리그닌을 제거 하여 고형물의 함량을 줄이는 것으로 그 효율을 지칭 할 수 있다. 실험결과 두 바이오매스 모두 온도가 높고 반응 시간이 길수록 전처리 효율이 증가하는 것으로 나타났다. 한편 카사바줄기 보다 보릿짚의 경우가 전처리 후 고형물 함량이 더 적은 것으로 나타났다. 이는 보릿짚이 보다 전처리 효율이 높으며 더 적은 에너지로 전처리가 가능하다는 것을 의미한다.

<카사바 줄기>



<보릿짚>



고형물 함량: 57~83%

리그닌 제거율: 23~29%

셀룰로스 함량: 35.3~36.8%

고형물 함량: 52~79%

리그닌 제거율: 26~67%

셀룰로스 함량: 39.3~41.2%

그림 3.5-12. 암모니아를 이용한 전처리

(2) 묽은 산을 이용한 전처리(카사바 줄기)

(가) 표면분석법을 이용한 전처리 최적 조건 탐색

□ 묽은 산을 이용하여 카사바 줄기를 전처리하였다. 산을 이용한 전처리는 산의 농도에 따라 셀룰로스 및 헤미셀룰로스를 선택적으로 추출하기 때문에 산의 농도가 매우 중요한 변수가 될 수 있다. 그래서 본 실험에서는 표면 분석법을 이용하여 최적 전처리 반응조건을 탐색하여 보았다. 실험에 사용된 소프트웨어는 Design-expert 7, Stat-Ease, Inc를 이용하였으며 실험 디자인은 Central-Composite 을 사용하여 반응온도, 시간, 산 농도를 변수로 하여 액상으로 추출된 셀룰로스 및 헤미셀룰로스의 함량을 알아보았다. 또한 고형물 중에 남아있는 셀룰로스 함량을 알아보기 위하여 액상/고형물 의 혼합액을 이용하여 효소 가수분해를 통하여 최종 당함량을 알아보았다. 그 결과 셀룰로스 함량이 가장 높고 헤미셀룰로스의 용해가 잘되는 전처리 조건은 반응온도, 시간, 산 농도가 각각 177.3 °C, 10분, 0.14M로 나타났다. 암모니아 전처리와 비교했을 때 반응온도가 높긴 하지만 헤미셀룰로스의 회수가 가능하다는 장점이 있는 반면 산 처리에 있어 과반응시 발효저해 물질에 대한 생성이 일어날 수 있다.

① 실험디자인

표 3.5-3 표면분석법을 위한 요인과 레벨

Coded levels of the experimental factors	X_1 : temperature (°C)	X_2 : Time (min)	X_3 : Acid concentration (M)
$-\sqrt{2}$	146.4	1.6	0.07
-1	160.0	5.0	0.10
0	180.0	10.0	0.15
1	200.0	15.0	0.20
$\sqrt{2}$	213.6	18.4	0.23

② 최적 전처리조건

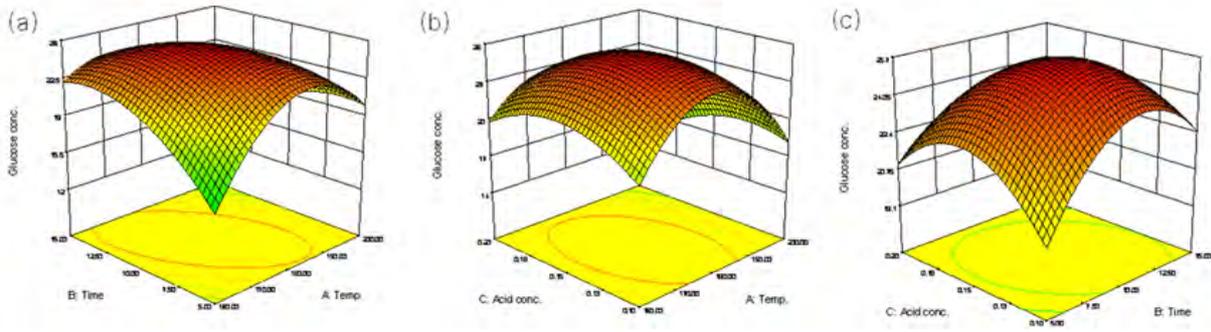


그림 3.5-13. 붉은 산을 이용한 전처리 - RSM 분석 Graph

표 3.5-4 RSM 분석법에 의한 최적조건

Variables	Cassava stem
X ₁ :Temperature(°C)	177.3
X ₂ :Time(min)	10.0
X ₃ :Acid concentration(M)	0.14

(3) NaOH를 이용한 전처리 (보릿짚)

(가) 실험디자인

표 3.5-5 표면분석법에 의한 NaOH를 이용한 전처리 실험구

Run	Temp. (°C)	Time (h)	NaOH Conc. (%)	Solid ratio (%)	Cellulose (%)
1	120	3	10	57.58	33.08
2	110	3	15	56.18	29.30
3	120	3	10	58.15	32.84
4	120	5	05	59.01	33.10
5	120	3	10	57.48	33.25
6	130	1	10	55.50	32.72
7	130	3	15	51.84	27.32
8	120	3	10	59.25	32.99
9	120	1	15	56.03	33.53
10	130	5	10	55.98	35.89
11	110	3	05	67.60	35.84
12	130	3	05	66.14	38.74
13	110	5	10	60.39	32.95
14	120	1	05	67.80	35.36
15	120	5	15	52.12	31.08
16	110	1	10	60.15	34.20
17	120	3	10	55.47	32.17

(나) 최적 전처리 조건

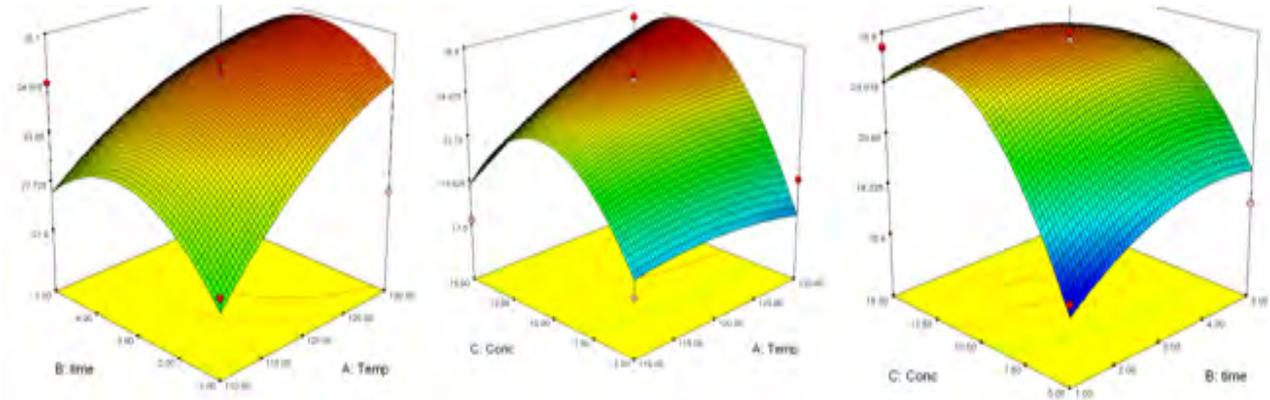


그림 3.5-14. NaOH를 이용한 전처리 - RSM 분석 Graph

표 3.5-6 RSM 분석법에 의한 최적조건

Variables	Barley straw
X ₁ :Temperature	129.0°C
X ₂ :Time	3.2hour
X ₃ :Concentration	12.60%

□ 표면분석법을 사용하여 NaOH를 이용한 보릿짚의 최적의 전처리 조건을 탐색하였다. 실험에 사용된 소프트웨어는 Design-expert 7, Stat-Ease, Inc 를 이용하였으며 실험 디자인은 Box-Behnken을 사용하여 반응온도, 시간, NaOH 농도를 변수로 하여 고형물의 함량과 셀룰로스 함량을 알아보았다. 그 결과 최적의 전처리 조건은 반응온도, 시간, NaOH 농도가 각각 129.0 °C, 3.2 시간, 12.60%로 나타났다. 이는 암모니아나 묽은 황산 전처리에 비해 반응온도는 낮으나 반응시간이 길어 경제성 부분에 있어 전처리 효율이 낮아짐을 예상 할 수 있다.

(4) 옥살산을 이용한 전처리 (보릿짚 전처리 시 옥살산 농도 탐색 (130°C, 1hr 반응))

(가) 농도별 전처리 후 고체성분 분석

□ 동일조건 (130°C, 1hr)에서 옥살산의 농도별 보릿짚 전처리를 실시하였다. 전처리 후 고체분석을 통하여 고체성분과 함께 액체로 추출되어진 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌의 양을 분석하였을 때 농도가 높아질수록 헤미셀룰로스의 추출량이 많아지며 어느 일정 농도(0.25g-12.5%) 이후에는 농도가 높아짐에도 헤미셀룰로스의 추출량이 감소하는 것을 확인 할 수 있다. 이는 추출된 헤미셀룰로스가 옥살산의 농도가 높아짐에 따라 과반응이 일어나 발효저해물질인 furfural을 형성한다고 예측할 수 있다. 실험결과 옥살산의 농도는 0.25g(12.5%)의 옥살산을 사용했을 때 헤미셀룰로스의 추출량이 가장 많고 셀룰로스의 잔류율이 높으므로 전처리 후 효소당화에 있어 유리할 수 있지만 묽은 황산 전처리나 암모니아 전처리에 비해 전처리 효율이 현격히 떨어진다.

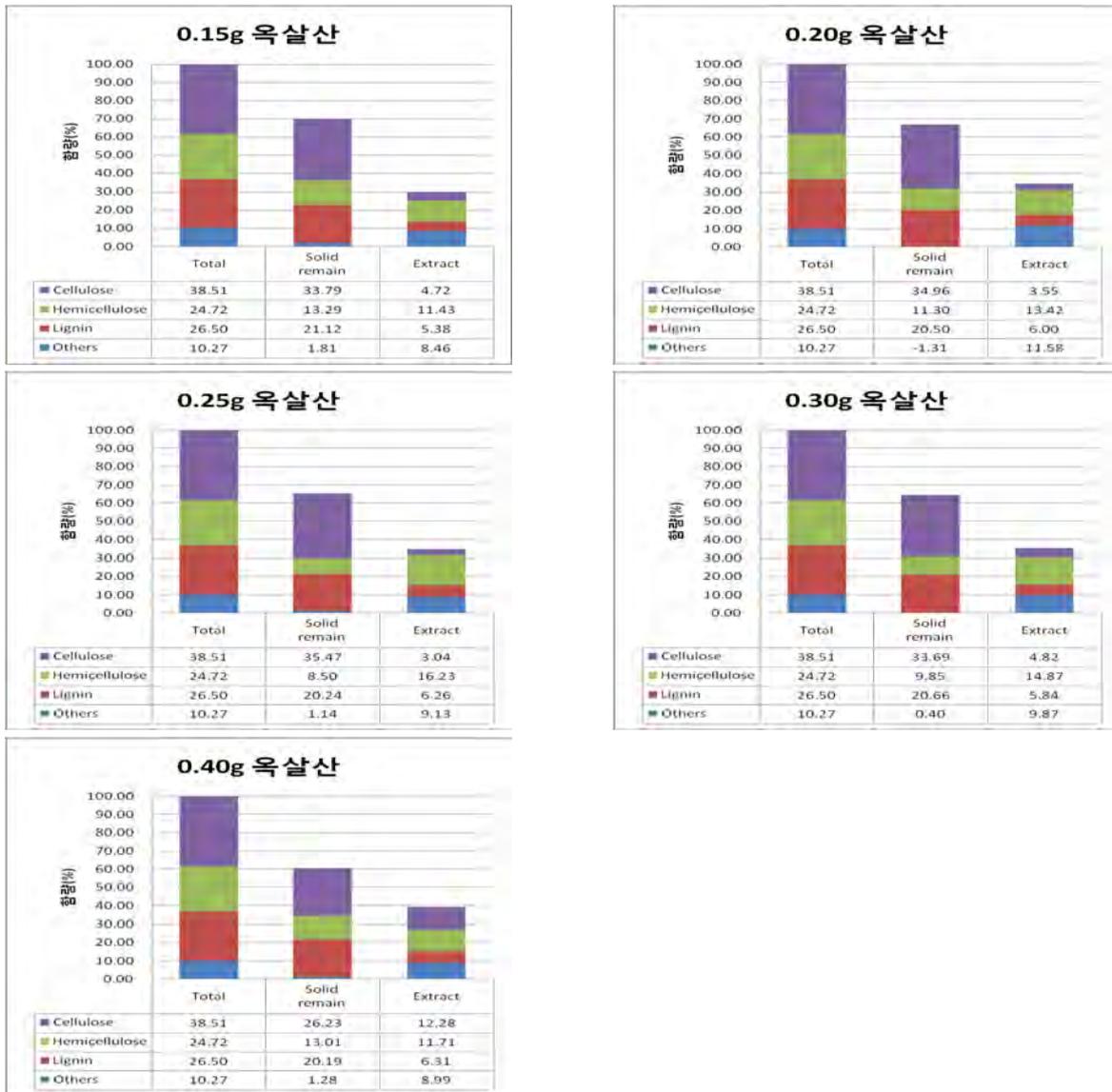


그림 3.5-15. 농도별 전처리 후 고체성분 분석

(5) 황산암모늄을 이용한 전처리 (보릿짚 - 황산암모늄 농도 탐색 (130°C, 1hr 반응))

(가) 농도별 전처리 후 고체성분 분석

□ 동일조건 (130°C, 1hr)에서 황산암모늄의 농도별 보릿짚 전처리를 실시하였다. 전처리 후 고체분석을 통하여 고체성분과 함께 액체로 추출되어진 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌의 양을 분석하였을 때 농도가 높아질수록 헤미셀룰로스의 추출량이 많아지며 어느 일정 농도(0.20g-10%) 이후에는 농도가 높아짐에도 헤미셀룰로스의 추출량이 감소하는 것을 확인 할 수 있다. 이는 추출된 헤미셀룰로스가 황산암모늄의 농도가 높아짐에 따라 과 반응이 일어나 발효저해 물질인 furfural을 형성한다고 예측할 수 있다. 그러나 황산암모늄의 경우는 전체적으로 추출되어지는 헤미셀룰로스의 양이나 리그닌의 양이 옥살산에 비해 떨어진다. 실험결과 황산암모늄의 농도는 0.2.g (10%)을 사용했을 때 헤미셀룰로스의 추출량이 가장 많고 셀룰로스의 잔류율이 높으므로 전처리 후 효소당화에 있어 유리할 수 있지만 옥살산의 경우보다 추출량이 떨어진다.

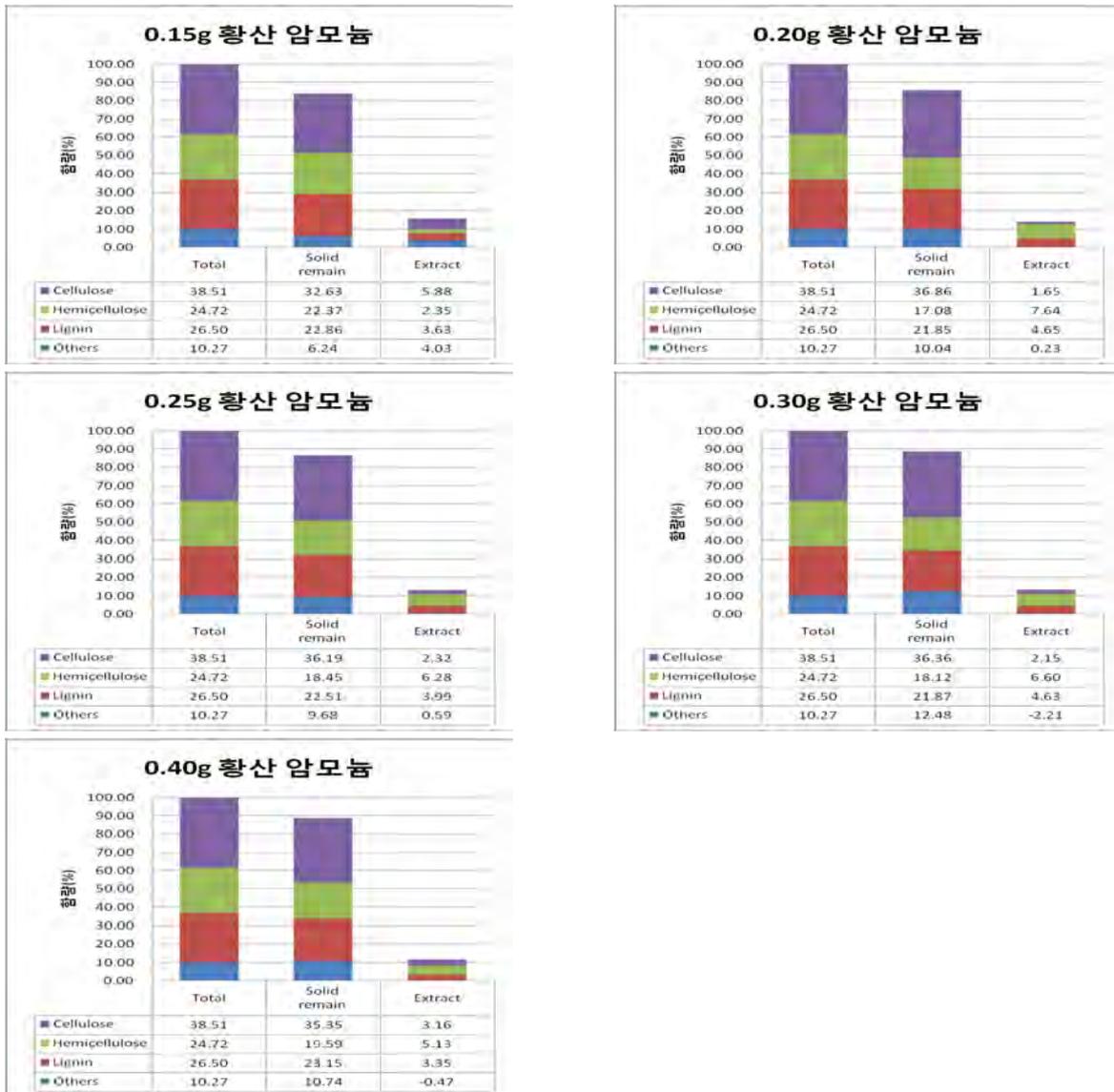


그림 3.5-16. 농도별 전처리 후 고체성분 분석

(6) 탐색된 전처리 조건을 바탕으로 한 효소당화 및 발효실험

□ NaOH로 처리된 보릿짚과 묽은 황산으로 처리된 카사바 줄기의 최적 조건을 탐색하여 전처리한 후 효소 가수분해를 통해 당화를 시키고 당화화액을 발효하여 에탄올을 얻어 내는 실험을 수행하였다. 위의 선행연구를 통하여 다른 고체산이나 염기의 경우 헤미셀룰로스나 리그닌의 제거율이 높지 않아 적절한 전처리 방법이 아니라는 판단으로 NaOH와 산전처리 방법의 전처리 기질만을 사용하여 당화 및 발효 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 효소는 NOVO사에서 제공받은 Cellulase와 β -glucosidase를 사용하였으며, 효소는 카사바 줄기, 보릿짚 각각 20 FPU/g Cellulose, 40 FPU/g Cellulose를 첨가하였다. 투입된량은 효소 첨가량에 따른 효율적인 당화율을 나타낸 양을 선택하였다. 당화 과정을 거쳐 효모를 접종하여 발효실험을 진행하였다. 효모는 (주)창해에탄올에서 산업용으로 이용되고 있는 *Saccharomyces cerevisia* CHY 1011 효모를 사용하였다. 발효 결과 묽은 산으로 전처리가 된 카사바줄기는 7.55 g/L의 에탄올 생산량을 보였으며

NaOH로 처리된 보릿짚의 경우 13 g/L로 카사바 줄기보다 약 1.7배 높은 생산성을 보였다. 발효 비율 또한 카사바 줄기, 보릿짚이 각각 89.6%와 93.5%로 나타났다. 이는 NaOH를 이용한 전처리의 경우 발효 저해 물질이 거의 발생하지 않는 반면 산을 이용한 전처리의 경우 발효 저해 물질이 발생하기 때문이다. 지금까지의 실험결과는 다음 표 7에 정리 하였으며 발효 저해 물질에 관련해서는 차후 논의하고 발효물질 제거에 대한 더 많은 연구를 통해 이를 극복해 나가야 할 것이다.

표 3.5-7 다양한 전처리 방법을 사용한 카사바 줄기 및 보릿짚의 당화 및 발효 결과

Biomass		Cassava stem	Barley straw
Pretreatment type		Dilute acid	NaOH
Optimal condition	Temperature [°C]	177.3	129.0
	Time [min]	10.0	192
	Concentration	0.14M	12.60%
Biomass loading [%]		5	5
Enzyme Loading	Cellulase [FPU/g]	20	40
	β-glucosidase [CbU/g]	30	30
Enzymatic digestibility [%]		73	90
Max. ethanol conc.[g/L]		7.55	13
Ethanol yield [%of theoretical]		89.6	93.5

나. Lab-scale(바이오매스 25g 이하) 규모에서 전처리조건 탐색

(1) Ammonia fiber EXpansion (AFEX) process

□ 카사바와 보릿짚을 바이오매스로 적용하여 전처리를 수행하여 그 효과를 분석하였다. 먼저 기존의 나무 및 섬유질계 바이오매스와 달리 보릿짚의 주요 구성 성분을 보면 상대적으로 헤미셀룰로스(xylose)는 많이 함유되어 있으며, 동시에 리그닌 함유는 상대적으로 낮음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 전처리 과정에서 비교적 리그닌 제거는 편리하나, xylose 성분의 회수에는 보다 주의해야할 필요를 갖는다. 결과적으로 회분식 반응을 통하여 약산을 이용한 C5, C6의 회수율과 암모니아를 이용한 리그닌 제거율의 효율적인 공정 변수 (산 및 암모니아 농도, 반응시간, 반응온도)를 파악하고, 최대의 C5, C6 회수율을 확보할 수 있는 전략을 도출하고자 하였다. 암모니아수를 이용한 탈 리그닌 효능은 150 °C의 반응온도에서도 70%이상의 효율을 나타내었으며 140 °C의 범위에서도 충분한 리그닌 제거율을 확보할 수 있다는 결과를 아래 장치로부터 전처리하여 얻었으며 카사바 줄기의 암모니아수를 이용한 탈 리그닌 효과 또한 180 °C의 반응온도에서 약 45% 이상의 효율을 나타냈으며 160 °C의 범위에서도 충분한 리그닌 제거율을 확보할 수 있다는 결과를 얻었다.

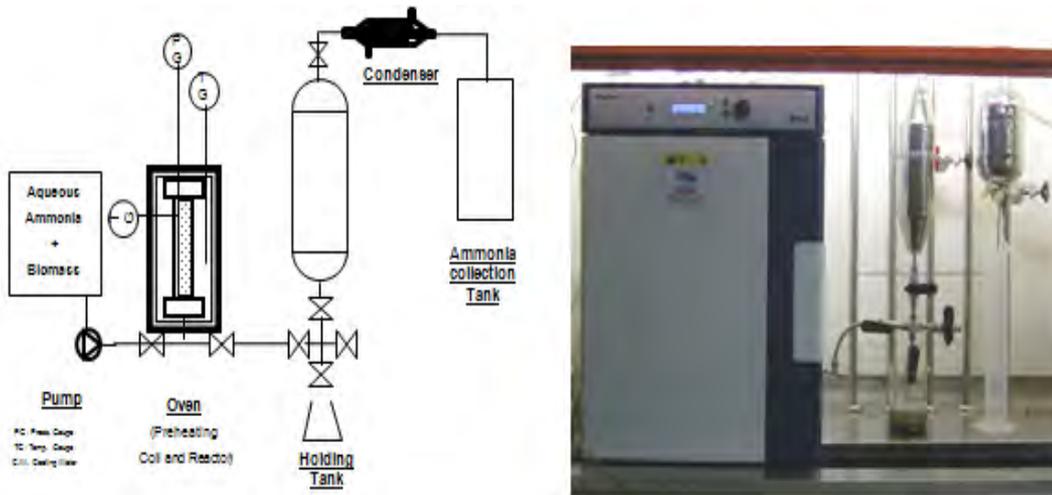


그림 3.5-17. Lab-scale(바이오매스 25 g 이하) 규모 장치

다. Scale-up에 의한 전처리공정 개발 및 바이오에탄올 생산

(1) Bench-Scale 회분식 전처리 반응기 설계 및 조건 설정 연구

- 선행되어진 연구를 바탕으로 전처리 반응기를 설계 및 제작하였다. 반응기는 (주)창해에탄올 이름을 따라 ChangHae Ethanol Multi EXplosion(CHEMEX)로 명명하였다. CHEMEX는 암모니아, 산뿐만 아니라 기타 유기용매를 사용할 수 있도록 스테인리스(SUS 316) 재질로 만들어 용매에 의한 부식을 최소화 하였다. 또한 폭쇄효과를 얻어내기 위하여 내압을 30 kg/cm^2 에서 교반이 가능하도록 하였으며 반응기 옆면에 히팅플레이트를 설치하여 $200 \text{ }^\circ\text{C}$ 까지 운전 가능하도록 설계하였다. 한편 CHEMEX는 스팀에 의한 가열이 가능하여 수분함량 및 전처리 용매의 농도를 일정하게 유지 할 수 있도록 하였다. 전처리된 바이오매스를 수집하는 회수 장치는 폭쇄효과를 최대화 하면서 차후 전처리 반응기의 용량을 증가시켜도 사용할 수 있도록 Cyclone 방식을 선택하였다.
- 선행 연구결과를 적용하여 보릿짚을 각각 암모니아 및 산 전처리를 하여 분석을 실시하였다. 반응조건은 선행되어진 연구결과로서 반응온도는 $150 \text{ }^\circ\text{C}$, 반응시간은 30 min으로 하여 암모니아 15%를 이용하여 반응을 실시하였다. 결과는 탈 리그닌의 효능은 좋은 것으로 나타났지만 셀룰로스의 잔류율이 32%로서 선행되어진 연구 보다 더 많은 셀룰로스의 손실이 있는 것으로 나타났다. 이는 암모니아의 폭쇄 효과 때문인 것으로 판단되어진다. 그리고 산 처리는 반응온도 $130 \text{ }^\circ\text{C}$, 반응시간 20 min으로 반응을 시켜 분석한 결과 선행되어진 연구결과를 비교하였을 때 C5의 회수율은 90%이상이며 C6의 회수율 또한 높게 나왔지만 HMF와 furfural이 분석되어져 과 반응이 일어난 것으로 보인다. 이는 폭쇄와 교반에 의한 영향인 것으로 판단되어진다. 따라서 4L 반응기를 이용하여 암모니아 전처리는 폭쇄효과를 감안한 최적반응 조건을 산전처리는 HMF와 furfural 생산이 되지 않는 조건을 찾아야 것으로 보이며 앞으로 50L급 규모의 반응기 설계 및 제작에 있어서는 이를 감안하여 설계 및 제작하여야 할 것으로 판단되었다.

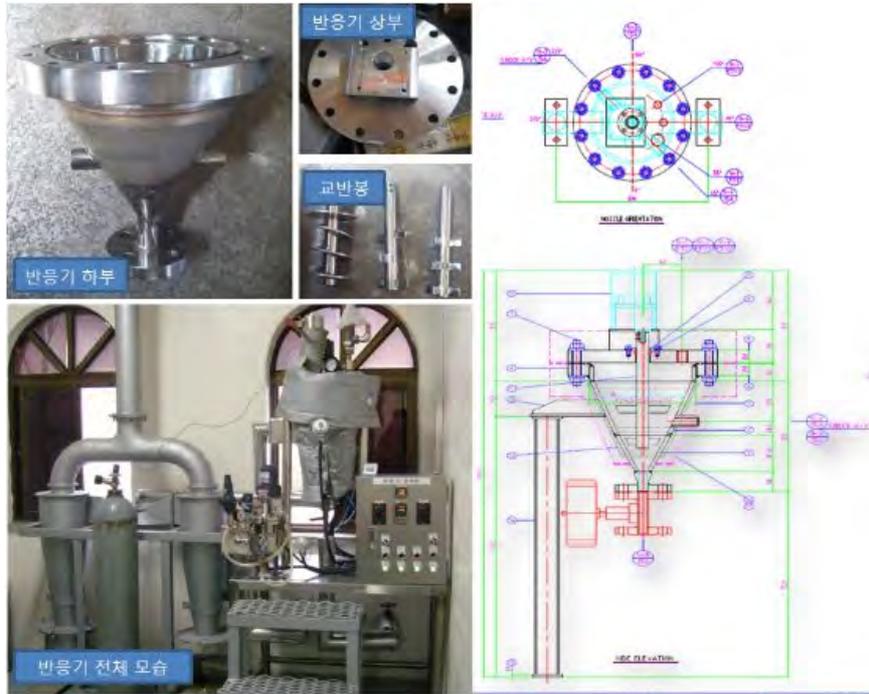


그림 3.5-18. 5L 반응기 제작관련 사진 및 설계도

CHEMEX(AFEX)	CHEMEX(Dilute Acid (DA))																																			
조건: 암모니아 농도-15%(v/v), 바이오매스 농도-13%(w/v) 반응시간-30분, 반응온도-150°C	조건: 산농도-1%(v/v), 바이오매스 농도-9%(w/v) 반응시간-20분, 반응온도-130°C																																			
Total Components (Absolute)																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>AFEX</th> <th>DA</th> <th>Un-treatment</th> <th>a-cellulose</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucose</td> <td>62.86</td> <td>48.46</td> <td>41.39</td> <td>81.83</td> </tr> <tr> <td>Xylose</td> <td>14.71</td> <td>1.09</td> <td>16.01</td> <td>12.26</td> </tr> <tr> <td>Lignin</td> <td>16.19</td> <td>45.73</td> <td>21.57</td> <td>4.05</td> </tr> <tr> <td>Ash</td> <td>2.84</td> <td>4.07</td> <td>8.64</td> <td>0.20</td> </tr> <tr> <td>Others</td> <td>3.20</td> <td>3.90</td> <td>10.44</td> <td>1.03</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>100</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>			AFEX	DA	Un-treatment	a-cellulose	Glucose	62.86	48.46	41.39	81.83	Xylose	14.71	1.09	16.01	12.26	Lignin	16.19	45.73	21.57	4.05	Ash	2.84	4.07	8.64	0.20	Others	3.20	3.90	10.44	1.03	Total	100	100	100	100
	AFEX	DA	Un-treatment	a-cellulose																																
Glucose	62.86	48.46	41.39	81.83																																
Xylose	14.71	1.09	16.01	12.26																																
Lignin	16.19	45.73	21.57	4.05																																
Ash	2.84	4.07	8.64	0.20																																
Others	3.20	3.90	10.44	1.03																																
Total	100	100	100	100																																
Total Components (Relative)																																				
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>AFEX</th> <th>DA</th> <th>Un-treatment</th> <th>a-cellulose</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucose</td> <td>32.23</td> <td>21.29</td> <td>41.39</td> <td>81.83</td> </tr> <tr> <td>Xylose</td> <td>7.55</td> <td>0.48</td> <td>16.01</td> <td>12.26</td> </tr> <tr> <td>Lignin</td> <td>1.46</td> <td>21.85</td> <td>21.57</td> <td>4.05</td> </tr> <tr> <td>Ash</td> <td>8.30</td> <td>1.79</td> <td>8.64</td> <td>0.20</td> </tr> <tr> <td>Others</td> <td>1.64</td> <td>1.71</td> <td>10.44</td> <td>1.03</td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>51.28</td> <td>43.93</td> <td>100</td> <td>100</td> </tr> </tbody> </table>			AFEX	DA	Un-treatment	a-cellulose	Glucose	32.23	21.29	41.39	81.83	Xylose	7.55	0.48	16.01	12.26	Lignin	1.46	21.85	21.57	4.05	Ash	8.30	1.79	8.64	0.20	Others	1.64	1.71	10.44	1.03	Total	51.28	43.93	100	100
	AFEX	DA	Un-treatment	a-cellulose																																
Glucose	32.23	21.29	41.39	81.83																																
Xylose	7.55	0.48	16.01	12.26																																
Lignin	1.46	21.85	21.57	4.05																																
Ash	8.30	1.79	8.64	0.20																																
Others	1.64	1.71	10.44	1.03																																
Total	51.28	43.93	100	100																																

그림 3.5-19. 다용도 폭쇄 반응기로 전처리된 보릿짚 성분분석

(2) 전처리 반응 후 발효저해 물질의 분석

□ 발효저해 물질인 HMF와 furfural의 농도는 바이오매스의 종류와 가수분해공정에 따라서 다르지만, 일반적으로 산을 이용한 고온의 전처리 공정을 이용할 경우에 온도가 높을수록, 반응시간이 길수록, pH가 낮을수록 생성될 확률이 높다고 알려져 있다. 산을 이용한 고온의 전처리 공정을 이용할 경우, HMF의 경우 전나무에서 최대 5.9 g/L, furfural의 경우 corn stover에서 최대 11 g/L로 보고되었으며 일반적으로 2 g/L 내외의 양으로 생성되는 것으로 알려져 있다. 발효과정 중 HMF와 furfural은 세포성장에 저해작용을 하며 15 g/L의 HMF와 6 g/L의 furfural에서는 효모성장이 이루어지지 않음을 보이고 있으며, 1.0 g/L HMF에 대해서 효모성장의 lag phase가 4시간 연장되고, 1.2 g/L HMF와 1.0 g/L furfural을 동시에 처리할 경우 24시간 연장된다고 보고된바 있다. 에탄올 수율 면에서는 2 g/L의 HMF 또는 furfural을 포함한 경우, 생산수율은 최대 12%, 생산성은 40~80%가 낮아진다고 알려져 있다. 섬유질계를 이용한 에탄올 생산에 있어서 최종 에탄올수율을 높이기 위해서는 전처리 과정 중 발생하는 HMF와 furfural 등의 부산물 발생을 최소화 가능한 전처리 공정의 도입 또는 전처리 후단공정에서 부산물질 제거가 필수적이라 하겠다.

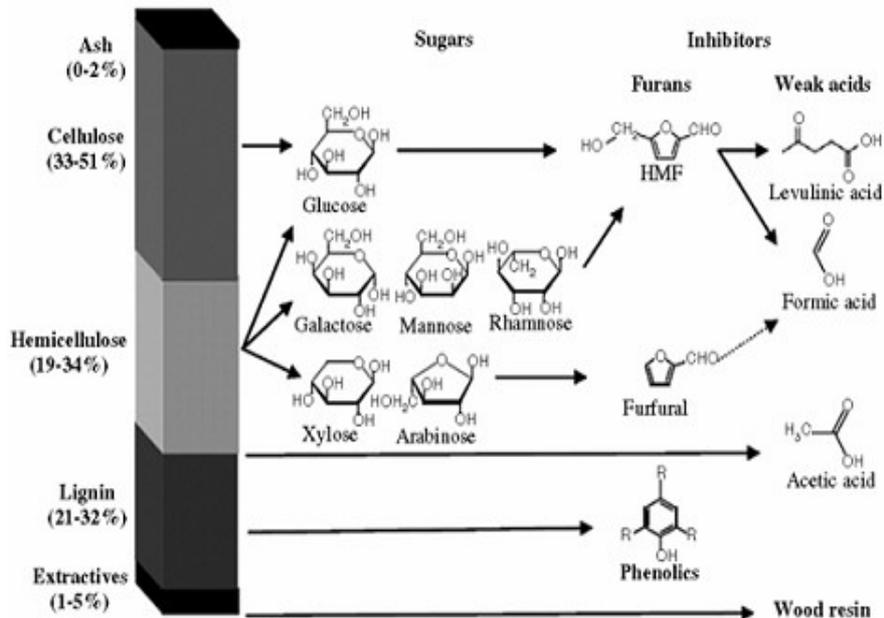


그림 3.5-20. 바이오매스의 가수분해에 의한 발효저해물질 생산 메커니즘

Inhibitor/concentration (g L ⁻¹)	<i>S. cerevisiae</i> strain	Inhibition ^a			Ref.
		Y _{EICH} ^b (%)	q _{EICH} ^c (%)	Growth (%)	
HMF	3.0	Tembec T1	10	40	69
	4.0	Tembec T1	12	45	69
	3.0	Y-1528	10	25	69
	4.0	Y-1528	11	40	69
	1.0	ATCC 211239			4
	3.8	ATCC 211239			16
	7.5	ATCC 211239			45
	15.0	ATCC 211239		100	40
Furfural	2.0	CBS 8066	10		70
	4.0	CBS 8066	40		70
	0.8	Tembec T1	20		69
	1.6	Tembec T1	27		69
	0.8	Y-1528	0		69
	1.6	Y-1528	25		69
	1.0	ATCC 211239			8
	3.0	ATCC 211239			24
	6.0	ATCC 211239		100	40
	12.0	ATCC 211239		100	40
	4.0	CBS 8066	60	93	41
	0.9	Baker's	18	28	21
	1.9	Baker's	34	64	21
	3.0	Baker's	59	73	21
	4.0	Baker's	70	73	21
5.0	Baker's	87	100	21	
HMF + Furfural	1.2 + 1.0	ATCC 211239			24
	2.0 + 2.0	CBS 8066	0	72	70

^a Percent of inhibition relative to reference fermentation in the absence of inhibitor(s).

^b Y_{EICH} ethanol yield from total fermentable sugars.

^c q_{EICH} specific ethanol productivity rate.

그림 3.5-21. HMF와 furfural이 효모성장과 에탄올 발효에 미치는 영향

□ 발효저해 물질인 HMF와 furfural은 LC를 이용하여 분석할 수 있으며 이는 Aminex HPX-87 H column으로 정량분석이 가능하다.

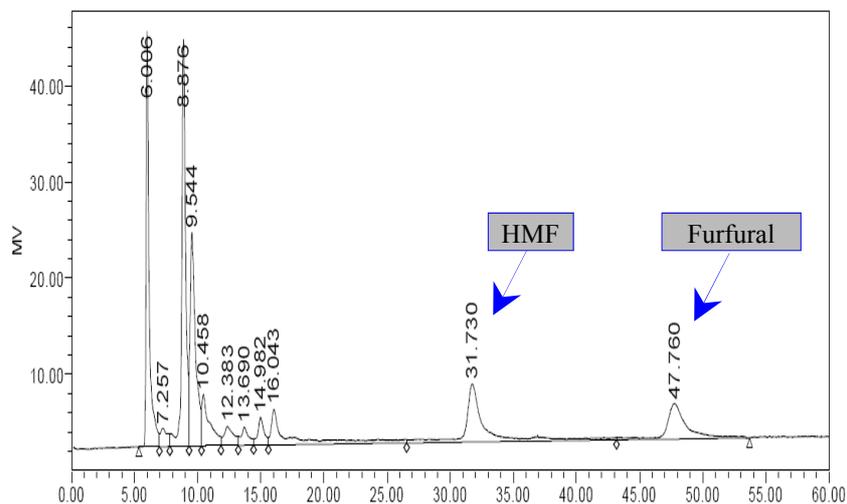


그림 3.5-22. HPLC Chromatograph

(3) 고농도 바이오매스(~20%) 당화/발효조를 이용한 발효

□ 섬유질계 바이오매스인 lignocellulose는 지구상에 가장 풍부한 재생가능 자원임에도 불구하고 바이오연료 및 소재생산에 사용이 못되었던 이유는 이를 이루고 있는 폴리머인 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 리그닌 중에서 리그닌의 선택적 제거가 어렵고, 셀룰로스와 헤미셀룰로스로부터 bio-refinery에 필요한 중간체인 당으로 전환시키는 효소당화 공정의 기술적 문제에 기인한다. 효소당화과정의 방해요소로 헤미셀룰로스와 셀룰로스를 감싸면서 외부의 화학/생물학적 공격으로부터 보호하는 리그닌에 의한 방어기작 및 셀룰로스와 헤미셀룰로스가 insoluble Sub-strate로서 친수성성질을 가진 cellulosic enzyme의 접근성이 낮아 반응속도와 수율이 낮은 점을 들 수 있다. 이러한 셀룰로스와 헤미셀룰로스 당화에 영향을 미치는 인자로는 리그닌의 조성, 셀룰로스의 결정화 정도, 바이오매스의 표면적 등 3가지 요소를 꼽을 수 있다. 이들 중 리그닌에 의한 보호기작을 저하하고 높은 당화율을 얻기 위해서는 물리/화학적 전처리 공정이 반드시 필요하다. 일반적으로 사용되는 약산전처리의 단점을 극복하고자 시도된 염기전처리는 탈 리그닌 효과는 탁월하나 탈 리그닌 후, 셀룰로스/헤미셀룰로스 결합체 분해를 위해 많은 양의 lignocellulosic enzyme이 필요한 단점을 가진다. 따라서 염기전처리의 경우 탈 리그닌 후 남은 고체는 높은 함량의 셀룰로스와 헤미셀룰로스 복합체로 존재함으로 cellulase, cellobiase, xylanase등의 효소 혼합최적화나 효과적인 물리적 당화방법을 개발하여 이를 통해 셀룰로스/헤미셀룰로스 복합체를 당화하는데 사용되어지는 효소의 양을 줄이거나 이를 고농도로 당화시킬 수 있는 방법이 필요하다.

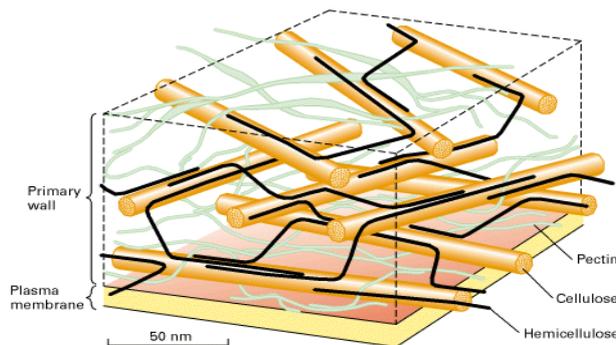


그림 3.5-23. 섬유질계 바이오매스의 구조



그림 3.5-24. 효소가수분해 과정

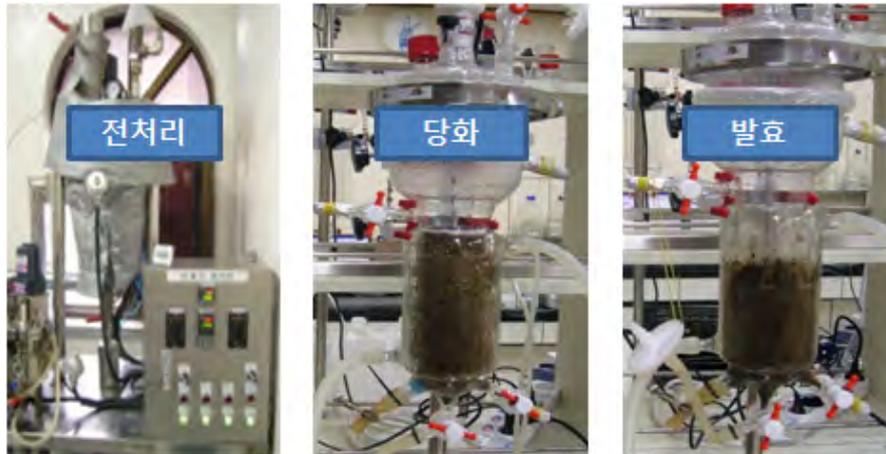


그림 3.5-25. 바이오매스 당화 및 Bench scale의 에탄올 생산 공정

(4) 전처리된 보릿짚으로부터 바이오에탄올 생산 (Bench-Scale)

- 전처리된 보릿짚을 사용하여 당화 및 발효 실험을 기질농도 20%로 하여 실시하였다. 기질농도가 높아짐에 따라 당화 시 기질이 수분을 흡수하여 혼합이 잘 이루어지지 않았으며 이를 해결하기 위해 물리적인 방법을 사용하여 인위적으로 혼합을 실시하였다. 이를 통해 얻어진 고농도 당화액(95.1g/L, 89.4%)을 이용하여 발효를 실시하였고 44.5g/L(91%)의 Ethanol을 얻을 수 있었다. 이는 친수성 성질을 갖는 효소의 특징으로서 물리적인 혼합을 하여도 기질농도를 최대 20%까지 사용할 수 없을 것으로 보인다. 그러나 에탄올 생산 공정 중 증류 공정을 감안한다면 고농도 바이오매스 당화를 통하여 에탄올 생산성을 높여야만 한다. 고농도 바이오매스의 당화를 위해서는 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 보인다.

표 3.5-8 AFEX 반응기를 이용한 전처리 보릿짚의 당화 및 발효

Barley straw		
Pretreatment type		AFEX
Pretreatment condition	Temperature [°C]	150
	Time [h]	0.5
	Ammonia Conc. [%]	15
Glucose conc. in biomass after pretreatment [%]		56.0
Biomass loading [%]		20
Enzyme loading	Cellulase [FPU/g]	40
	β-glucosidase [CbU/g]	30
Enzymatic digestibility [%]		89.4
Initial glucose conc. [g/L]		95.1
Max. ethanol conc. [g/L]		44.5
Ethanol yield [% of theoretical]		91.5

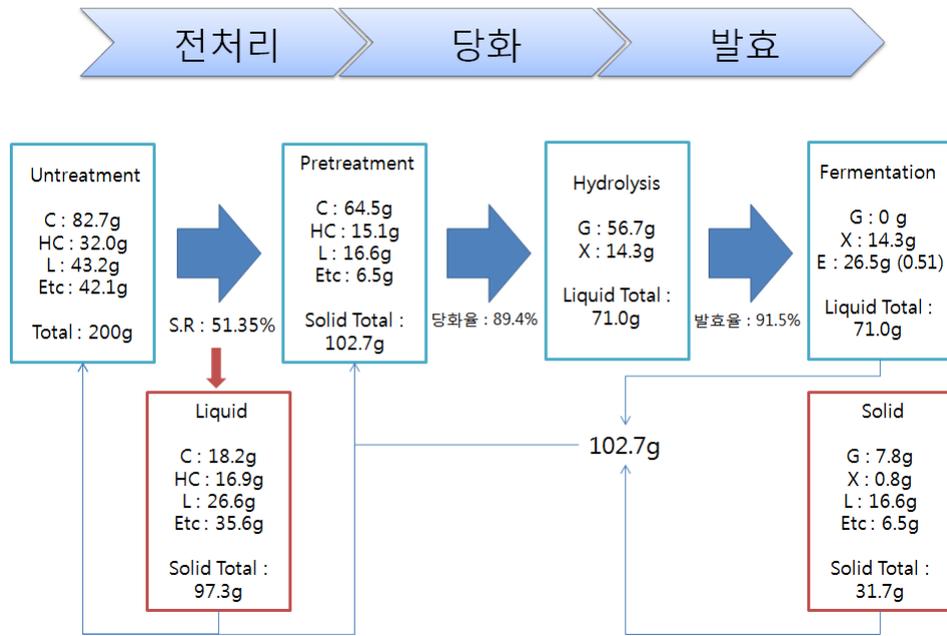


그림 3.5-26. 각 단계별 바이오매스 Mass-balance

(5) 5L Scale up 반응기에서 보릿짚 크기에 따른 바이오매스 전처리

□ 5L의 CHEMEX Bench plant에서 바이오 매스 크기에 따른 성능을 알아보기 위해 보릿짚을 크기별로 분쇄하여 전처리를 실시하였으며 전처리된 바이오매스를 통한 당화와 발효실험을 실시하였다. 실험설계 및 분석은 반응평면 분석을 통하여 실시하였다.

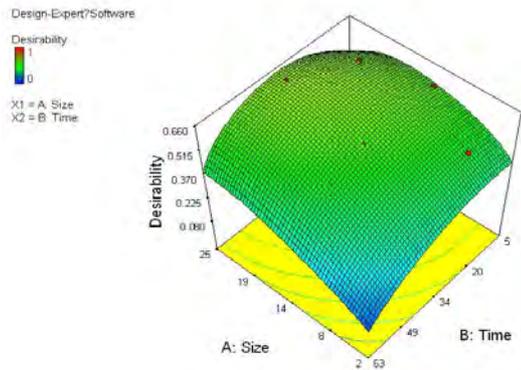
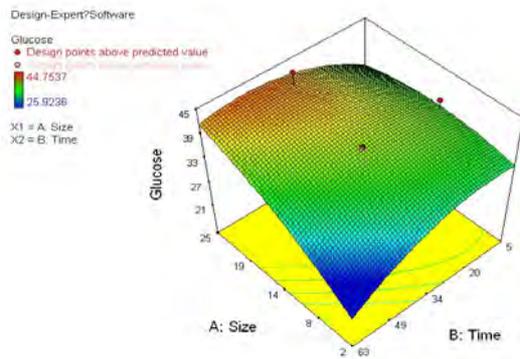
조건 - 암모니아 농도 : 15 wt %, 바이오매스 농도(S/L) : 1 / 6.6

80°C, 20min 교반, 반응온도 : 150°C, 반응시간 : 10~60min, 보릿짚 (2mm~25mm)

Select	Std	Run	Factor 1 A: Size mm	Factor 2 B: Time min	Response 1 Glucose %	Response 2 Lignin %	Response 3 S.R %	Response 4 Hydrolysis %	Response 5 Fermentation %
	1	11	5	15					
	2	6	20	15					
	3	4	5	55					
	4	10	20	55					
	5	1	2	35					
	6	3	23	35					
	7	8	13	7					
	8	9	13	63					
	9	7	13	35					
	10	2	13	35					
	11	5	13	35					

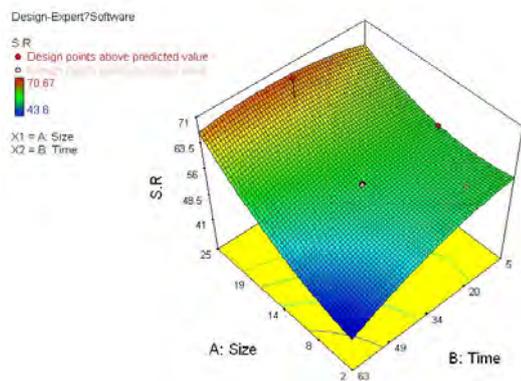
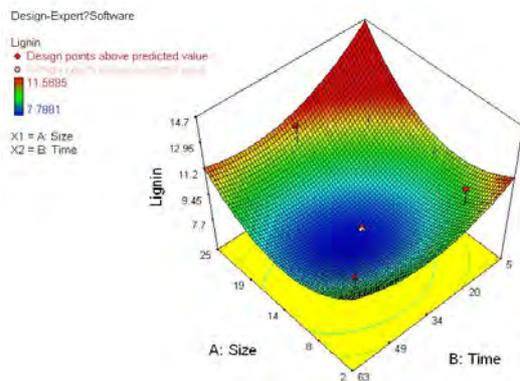
그림 3.5-27. AFEX 전처리 시 보릿짚의 크기 최적화를 위한 실험설계

□ 발효까지 거친 후 RSM 분석결과 모델의 신뢰도 70%로 낮기는 하지만 최적 조건이 보릿짚의 크기가 25mm이며 반응시간은 34min으로 보릿짚의 크기에 대한 영향은 그리 크지 않은 것으로 예측할 수 있다. 이러한 결과는 암모니아의 영향뿐만 아니라 물리적인 폭쇄 효과가 더해져 보릿짚의 크기가 전처리에 있어 크게 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.



Desirability

Glucose



Lignin

Solid remainder

그림 3.5-28. RSM 분석을 통한 보릿짚 크기 최적화

표 3.5-9 RSM 분석을 통한 보릿짚 크기 최적화

Variables	Barley straw
X ₁ :Size	25mm
X ₂ :Time	34min

(6) 50L Scale up 반응기 설계

□ Bench-scale 규모 5L 회분식 반응기를 이용하여 전처리를 한 바이오매스로 부터 바이오 에탄올을 생산하였다. 전처리 방법은 주로 암모니아 폭쇄법을 사용하였으며 바이오매스 크기에 따른 효율을 알아보았다. 실험이 진행되면서 다음과 같은 몇 가지 문제점이 발생하였다. 전처리 반응기의 바이오매스 투입구와 출구가 너무 좁아 바이오매스가 걸리는 현상이 발생하였다. 바이오매스의 크기가 작으면 별 문제가 되지 않지만 바이오매스 크기는 경제성에 크게 영향을 미친다. 즉 바이오매스 크기를 작게 하기 위해서는 분쇄 시 많은 에너지가 소모되기 때문이다. 또한 반응기 온도를 상승하는데 많은 시간이 걸렸다. 고압에서 견딜 수 있도록 하기 위해 반응기의 두께를 두껍게 제작하여 내부로의

열전달이 용이하지 않아 원하는 온도까지 도달하는데 많은 시간이 소모되었다. 이 또한 많은 에너지 손실을 의미한다. 이러한 문제를 해결하면서 좀 더 상업화에 다가 갈 수 있도록 50L 회분식 반응기를 설계하였다. 바이오매스의 입구와 출구는 기존 5L 회분식 반응기보다 각각 2.0, 1.7 배 증가 시켜 바이오매스의 걸림 현상이 없어지도록 하였다. 또한 온도 상승에 많은 시간이 소모되었던 문제는 반응기 외부에 스팀자켓을 만들어 순간적으로 온도 상승이 용이하도록 설계하여 반응온도 조절이 용이하도록 하였다. 더불어 전처리 용매를 펌프를 사용하여 이송할 수 있도록 하여 연속식 전처리 공정에 용이하도록 설계하였다.

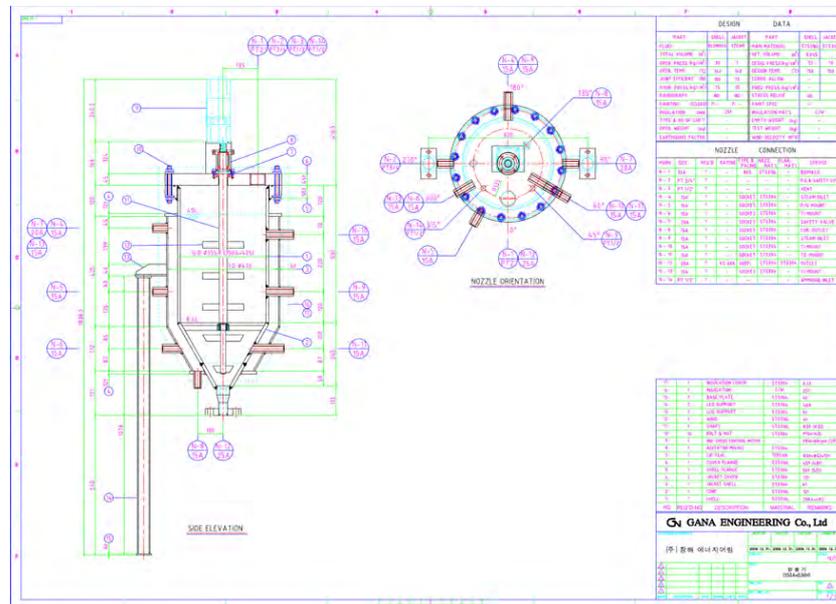


그림 3.5-29. 50L 전처리 반응기 설계도면

3. Bench-scale 전처리/당화 모듈 설계 및 제작

가. 반연속식 CHEMEX 공정 설계

(1) CHEMEX_50L 설계

□ Bench-scale 규모 5L 회분식 반응기를 이용하여 전처리를 한 바이오매스로부터 바이오에탄올을 생산하였다. 전처리 방법은 주로 암모니아 폭쇄법을 사용하였으며 바이오매스 크기에 따른 효율을 알아보았다. 실험이 진행되면서 다음과 같은 몇 가지 문제점이 발생하였다. 전처리 반응기의 바이오매스 투입구와 출구가 너무 좁아 바이오매스가 걸리는 현상이 발생하였다. 바이오매스의 크기가 작으면 별 문제가 되지 않지만 바이오매스 크기는 경제성에 크게 영향을 미친다. 즉 바이오매스 크기를 작게 하기 위해서는 분쇄 시 많은 에너지가 소모되기 때문이다. 또한 반응기 온도를 상승하는데 많은 시간이 걸렸다. 고압에서 견딜 수 있도록 하기 위해 반응기의 두께를 두껍게 제작하여 내부로의 열전달이 용이하지 않아 원하는 온도까지 도달하는데 많은 시간이 소모되었다. 이 또한 많은 에너지 손실을 의미한다. 이러한 문제를 해결하면서 좀 더 상업화에 다가 갈 수 있도록 50L 회분식 반응기를 설계하였다.

(2) CHEMEX_50L 제작

□ 설계 도면을 바탕으로 50L 전처리 반응기를 제작하였다. 하단 사진은 반응기 제작 과정을 보여주고 있다. 반응기 본체와 상단은 내약품성이 우수한 SUS 316L 재질을 사용하였다. 기존 5L 반응기는 온도상승을 위해 전기 열판을 사용하여 설정 온도까지 매우 오랜 시간이 소요되었다. 또한 반응기 상부의 바이오매스 투입구가 좁아서 바이오매스 투입에 문제가 있었으나 본 반응기는 반응기 외부에 스팀자켓을 설치하여 설정온도 도달시간을 최소화 하였으며 바이오매스 투입구를 기존 보다 2배 증가하여 투입에 용이하도록 제작하였다. 또한 기존 반응기의 출구 막힘 현상을 없애기 위하여 출입구를 기존대비 1.7배 증가하였다. 그 결과 설정 온도까지 상승하는데 걸리는 시간은 기존 2시간에서 1시간미만으로 단축하였으며 출구 부분을 증가로 인하여 바이오매스 입자의 크기를 3mm도 사용이 가능하여 분쇄 시 소요되는 에너지를 감소 할 수 있었다. 자세한 실험결과는 다시 기술 하도록 하겠다.



<50L 전처리 반응기 하단>



<50L 전처리 반응기 교반기>



<50L 전처리 반응기 설치 모습 1>



<50L 전처리 반응기 설치 모습 2>



<50L 전처리 반응기 설치 완료 모습>

그림 3.5-30. 50L 전처리 반응기 사진

(3) CHEMEX_50L 개조

□ 5L 전처리 반응기에서 50L 전처리 반응기로 규모를 확대하여 제작하였다. 50L 전처리 반응기를 이용하여 대용량(2~3 kg)의 바이오매스 전처리를 수행하였다. 암모니아 및 NaOH를 이용한 바이오매스 전처리는 매우 효율적으로 실험을 수행 할 수 있었다. 그러나 보다 친환경적인 바이오매스 전처리인 열수 처리를 위해서는 200 °C 이상의 고온을 필요로 한다. 또한 묽은 산을 이용한 전처리에서도 200 °C 이상의 열을 필요로 한다. 그러나 스팀을 이용한 50L 전처리 반응기는 한계온도가 150 °C 이다. 이는 본 연구소에서 사용하고 있는 스팀 용량의 한계 때문이다. 그래서 200 °C 이상의 온도에서도 실험이 가능 하도록 반응기 개조가 필요하였다. 열원은 열매체 보일러를 이용하였으며 펌프를 통하여 열매체가 순환 할 수 있도록 하였다.



<열매체 보일러>



<설치중인 열매체 보일러 및 펌프>



<설치 완료된 열매체 공정>



<설치 완료된 반응기 모습>

그림 3.5-31. CHEMEX_50L 개조 사진

(4) 전처리 성능 비교

□ CHEMEX_5L 반응기부터 CHEMEX_50L 전처리 반응기를 제작, 개조하였다. 그러나 반응기의 크기가 증가하고 열원이 달라짐에 따라 전처리된 바이오매스의 성분이 상이하게 되면 반응기 규모에 따라 최적의 전처리 조건을 다시 탐색해야만 한다. 그러면 바이오매스가 대량으로 소모되고 실험기간 또한 증가하게 된다. 그렇기 때문에 이를 확인해보기 위하여 각 반응기 별로 같은 조건에서 전처리를 하였다. 하단 표 3.5-10은 각 반응기 별 사양과 보릿짚을 이용하여 15% 암모니아 용액으로 전처리한 결과를 보여주고 있다.

표 3.5-10 각 반응기별 사양 및 전처리 결과 비교

		1차년도	2차년도	
Spec.	Max. volume [L]	5	50	4/50
	Working volume [L]	1~2	10~30	10~30
	Max. temp. [°C]	200	150	220
	Max. pressure [kg/cm ²]	30	30	30
	Heating source	Electricity	Steam	Heated oil
	Reach at max. temp. [min]	~ 120	~ 45	~ 55
전처리 조건: 10% 바이오매스, 15%암모니아 용액				
Pre-treatment	Temp. [°C]	150	150	150
	Time [min]	60	60	60
	Solid ratio [%]	51.28	56.07	55.03
	Glucose [%]	62.86	60.40	63.21
	Xylose [%]	14.71	13.66	14.88
	Lignin [%]	16.19	15.21	15.31
	Ash [%]	2.84	3.01	3.56

□ 실험은 보릿짚과 15% 암모니아 용액의 비율을 1:9로 하여 바이오매스 투입량을 10 w/v%로 조절하고 150°C에서 60분 동안 처리하였다. 그 결과 전처리 후 가장 중요한 성분인 글루코스의 결과 값은 모든 반응기에서 60% 이상을 보여주었으며 자일로스와 리그닌의 경우도 거의 비슷하게 나타났다. 이로써 반응기 크기와 열원이 달라지더라도 같은 조건에서 전처리를 하게 되면 동일한 결과가 나타남을 알 수 있었다.

(5) 반연속식 CHEMEX 공정 설계

□ Bench-scale 규모 5L 회분식 반응기부터 50L급 이상으로 규모를 증가시키면서 효율적인 전처리 반응기를 구축하였다. 그러나 공정의 규모가 커지고 상업화에 다가가기 위해서는 연속식 전처리 장비가 필요하다. 그러나 아직까지 연속식 장비를 구축 하는데 많은 어려움이 있다. 연속식 공정에 앞서 반연속식 공정을 구축하여 연속식 공정의 가능성을 타진해 보고 효율성을 알아보기 위해 반연속식 CHEMEX 공정을 설계 하였다.

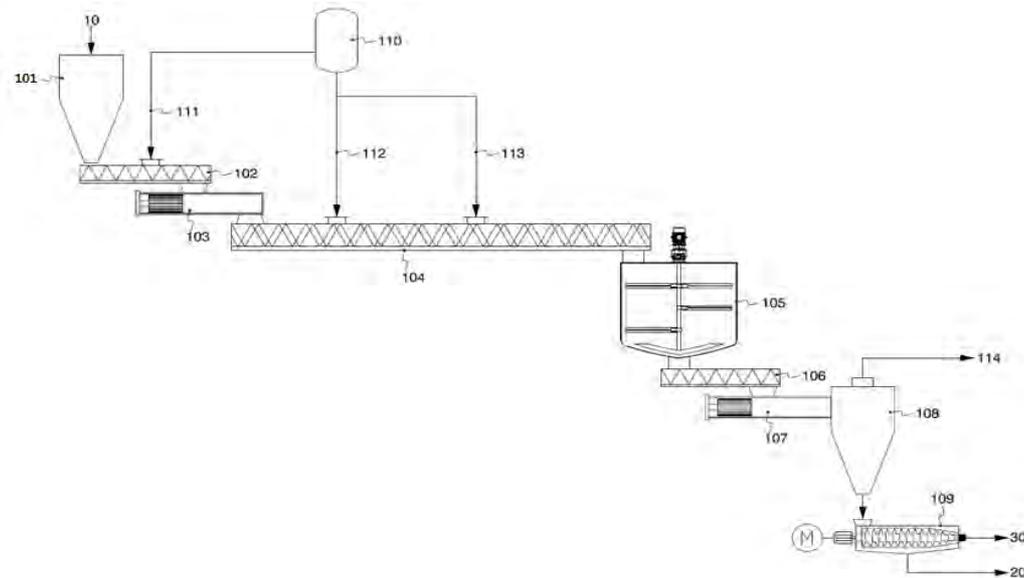


그림 3.5-32. 반연속식 CHEMEX 공정 구상도

- 본 반응기는 바이오매스 투입장치, 바이오매스 이송장치, 바이오매스를 체류시켜 전처리하는 장치로 구성되어 있다. 원료투입구를 통하여 바이오매스는 트윈스크류를 통하여 연속적으로 이송되면서 물리적인 교반 및 짓이김(Trampling)으로 회분식 및 일반 스크류에 비하여 높은 바이오매스농도의 전처리가 가능하다.
- 알칼리전처리는 산 및 열수처리에 비하여 긴 반응시간을 필요로 하기 때문에 반응에 필요한 공급할 수 있도록 체류조를 설계하였다. 또한 폭쇄효과를 위하여 수집 장치로는 회분식과 동일한 사이클론을 설계에 포함 하였다.
- 처리된 바이오매스는 스크류 프레스를 통해 고액 분리가 이루어진다. 그 후 세척조로 이송되어 전처리 용매를 씻어내고 다시 고액분리를 통하여 당화조로 이송된다. 반연속식 CHEMEX 공정을 구축하기 위해서는 아직 해결해야할 문제점이 많이 있지만 차 후 연구를 통하여 이를 해결해 나간다면 성공적으로 구축이 가능 할 것으로 사료된다.

나. 바이오매스별 CHEMEX 전처리 및 당화 효율 분석 / 당화·발효공정 구성 및 운전

(1) 바이오매스별 CHEMEX 전처리

- 50L급으로 제작된 CHEMEX_50L 전처리 반응기를 이용하여 바이오매스별로 전처리를 실시하였다. 1차년도 에는 5L급 전처리 반응기를 이용하여 보릿짚과 Cassava Stem을 암모니아, 묽은 산을 이용하여 전처리 하였으며, 그 중 보릿짚은 암모니아를 이용한 전처리가 효율적임을 알 수 있었다.
- Cassava Stem은 원료 확보 및 알칼리에 의한 전처리 효율이 낮아서 2차년도 에는 동남아시아 지역에서 대규모로 발생되는 Oil Palm Empty Fruit Bunches (OPEFB)와 보릿짚을 선정하여 회수에 유리한 NaOH를 이용하여 전처리 하고 전처리된 바이오매스를 이용하여 당화/발효 공정을 수행하였다.
- 먼저 CHEMEX_50L 반응기에 의한 전처리에 앞서 30ml 급 Lab-Scale 반응기로 표면분석법을 사용하여 최적 전처리 조건을 탐색하였다. 사용된 OPEFB는 말레이시아의

Global Bio-Diesel Sdn. Bhd.사에서 팜오일 생산 뒤 발생하는 부산물을 커터밀로 3mm 이하로 분쇄 한 것이다. 또한 효소는 NOVO사에서 제공한 셀룰레이즈(NS-50013)와 베타글루코시다이스(NS-50010)을 이용하였다.

표 3.5-11 보릿짚과 OPEFB 성분

Component[%]	보릿짚	OPEFB
Cellulose	35.55	32.74
Hemicellulose	20.74	21.42
Acid-insoluble lignin	19.54	23.55
Acid-soluble lignin	2.77	3.22
Ash	2.51	3.05
Etc.	18.89	16.02

표 3.5-12 Composition of NaOH-pretreated OPEFB, Recovery of glucose after pretreatment and enzymatic hydrolysis

Pretreatment conditions			Composition of solid fraction [g 100g ⁻¹ initial dry-biomass]			Total solid [g 100g ⁻¹ initial dry biomass]	Recovery of glucan after pretreatment [%]	Enzymatic digestibility [%]
Temp. [°C]	Time [min]	NaOH concentration [M]	Glucose [%]	Xylan [%]	Lignin [%]			
72.73	30	2	53.84	16.89	23.66	66.97	98.17	70.79
100	15	1	51.46	20.47	20.95	68.97	96.62	69.15
100	15	3	56.31	15.89	23.15	62.96	96.51	84.17
100	45	1	53.17	20.54	19.12	65.64	95.02	75.71
100	45	3	57.49	14.65	22.36	59.22	92.68	91.32
140	4.77	2	55.58	15.77	21.51	61.45	92.98	85.06
140	30	0.32	48.69	21.91	19.26	70.86	93.92	64.35
140	30	2	65.69	14.66	15.16	50.74	90.74	94.08
140	30	2	63.63	14.39	15.91	50.72	87.85	95.88
140	30	2	68.51	13.92	15.4	50.75	94.65	90.05
140	30	3.68	66.56	13.25	15.97	50.04	90.67	94.64
140	55.23	2	67.45	13.63	13.91	48.75	89.52	95.45
180	15	1	63.19	20.05	8.36	45.95	79.04	97.07
180	15	3	81.43	6.98	6.95	36.34	80.56	94.13
180	45	1	65.98	19.17	9.25	46.49	83.50	90.64
180	45	3	86.69	5.17	6.00	27.25	64.32	96.33
207.3	30	2	77.66	8.16	9.17	25.09	53.04	93.69

- OPEFB를 이용하여 최적의 전처리/당화 조건을 탐색하기 위해 반응온도 (100~180 °C), 반응시간(15~45분), NaOH 농도(1~3M)의 세 변수를 이용하여 표면 분석을 실시하였다. 또한 당화는 과량의 당화 효소를 투입하여 바이오매스 농도를 1%로 하여 50 °C에서 72시간 동안 효소 가수분해를 시켰다.
- 실험결과 온도가 높고 반응시간이 길고 NaOH 농도가 높아질수록 글루코스 성분이 증가하고 당화율 또한 높아지는 경향으로 분석 되었다. 전처리 효율이 높은 것으로 보일 수 있으나, 전처리 후 고형물 잔류비율을 살펴보면 글루코스 함량과 당화율과는 반대의 경향을 보이고 있다. 즉 실험의 가혹도(Severity)가 높을수록 리그닌 및 헤미셀룰로스의 유출량이 증가할 뿐만 아니라 셀룰로스 성분 또한 많이 손실됨을 알 수 있다.
- 그러므로 전처리 후 셀룰로스의 손실이 적으며 당화율이 높은 조건 탐색이 필수적이라는 판단으로 바이오매스 셀룰로스 성분이 당화 후 당으로 전환되는 비율이 필요하다. 이 비율은 Total Glucan Conversion Rate (TGCR)로 표기를 신규로 도입하였으며 아래 식을 따른다.

$$TGCR [\%] = \frac{S_p [\%] \times G_E [\%]}{B_L [\%] \times G_R [\%]} \times 100$$

S_p solid ratio after pretreatment
 G_E glucose concentration after enzymatic hydrolysis
 B_L pretreated biomass loading at enzymatic hydrolysis
 G_R raw biomass glucose concentration

- TGCR 비율로 최적의 전처리 조건과 당화 조건을 탐색하였다. 아래 그림 3.5-33은 표면 분석 후 최적 조건을 가시화하기 위해 나타낸 그림이다.

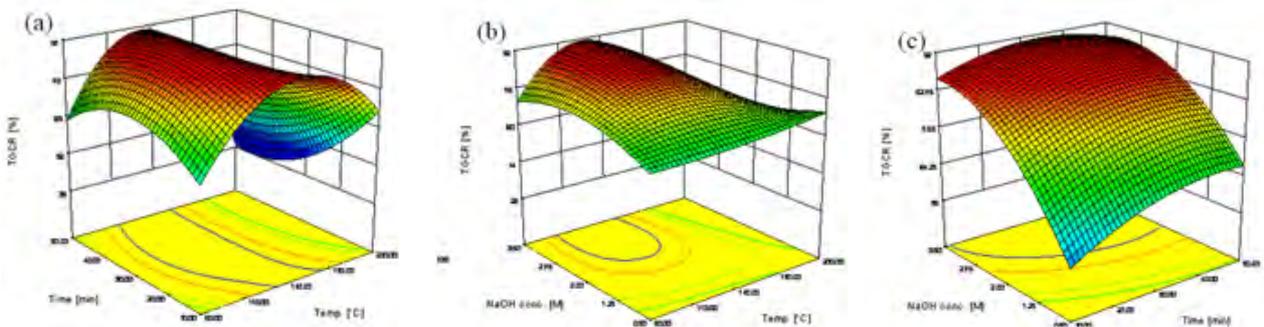


그림 3.5-33. Response surface plots show the effects of temperature and time (a); temperature and NaOH concentration ,(b); Time and NaOH concentration.

The value of the variable time was fixed at the optimal point

- 탐색된 최적의 전처리 조건을 바탕으로 분산 분석을 실시하였다. 각 요인과 인자들의 상호관계를 계산하였다. p값은 0.04 이하로 나타나 모델의 적합성을 보여주고 있으며 NaOH의 농도의 p값은 0.016으로 가장 작게 나타나 변수 중 가장 중요한 요인임을 보여주고 있다. 모사된 계산식은 다음과 같다.

$$Y_a = 84.72 - 5.89 X_1 + 1.89 X_2 + 7.54 X_3 - 2.93 X_1X_2 - 5.22 X_1X_3 - 1.82 X_2X_3 - 8.19 X_1^2 - 0.17X_2^2 - 3.40 X_3^2 - 1.39 X_1X_2X_3 - 2.69 X_1^2X_2 - 5.98 X_1^2X_3 + 4.08 X_1X_2^2$$

X_1 : temperature, X_2 : time, X_3 : NaOH concentration.

- 일반적으로 도식화된 식의 R²값이 0.75이상이면 적합하다고 평가되고 있다. 본 연구에서는 R²값은 0.978로 매우 높게 나와 식을 잘 모사하고 있음을 알 수 있었다.

표 3.5-13 Central composite design for the optimization of three variables in determining the total glucose conversion rate (TGCR) after enzymatic hydrolysis

Runs	X ₁	X ₂	X ₃	TGCR [%]
1	-1.68	0.00	0.00	69.49
2	-1.00	-1.00	-1.00	66.81
3	-1.00	-1.00	1.00	81.24
4	-1.00	1.00	-1.00	71.94
5	-1.00	1.00	1.00	84.64
6	0.00	-1.68	0.00	79.09
7	0.00	0.00	-1.68	60.43
8	0.00	0.00	0.00	85.36
9	0.00	0.00	0.00	84.24
10	0.00	0.00	0.00	85.23
11	0.00	0.00	1.68	85.81
12	0.00	1.68	0.00	85.45
13	1.00	-1.00	-1.00	76.73
14	1.00	-1.00	1.00	75.83
15	1.00	1.00	-1.00	75.69
16	1.00	1.00	1.00	61.95
17	1.68	0.00	0.00	49.69

X₁-Reaction temperature, X₂-Residual time, X₃-NaOH solution concentration

*Values indicate the mean of triplicate observations

- 이렇게 탐색된 최적의 전처리/당화 조건은 127.64 °C, 22.08분 2.89 M-NaOH 조건에서 TGCR 값은 89.61%로 계산되었다. 이 결과를 바탕으로 3회 검산 실험을 실시하여 평균 TGCR 값을 86.37%를 얻어냈다. 이 최적의 전처리 조건에서 전처리된 바이오매스는 당화/발효 실험에 사용되었다.

(2) 전처리후 당화 효율 분석

- 효소투입량 및 바이오매스 투입농도에 따른 최적의 당화율을 찾아내기 위해 당화실험을 실시하였다. 먼저 효소 투입량에 따른 당화율을 알아보기 위하여 바이오매스 농도를 1%로 하여 셀룰레이즈 5~70 FPU/g-Cellulose와 베타글루코시데이즈(셀룰레이즈 투입량의 30%)를 투입하여 50 °C, pH 5.0에서 당화를 진행하였다.

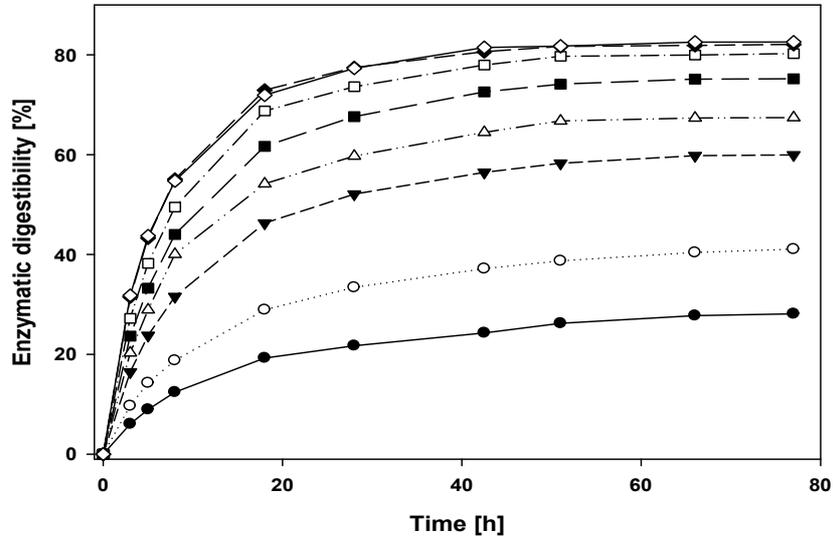


그림 3.5-34. Enzymatic digestibility of pretreated OPEFB at 1% (w/v) biomass loading with cellulase complex and β -glucosidase enzyme loadings of 5-70 FPU g^{-1} cellulose and 30% of cellulase, respectively <●5; ○10; ▼20; △30; ■40; □50; ◆60; ◇70 FPU g^{-1} cellulose>

□ 실험결과 효소투입량이 40 FPU까지 증가 할수록 당화율이 증가 하였으나, 50 FPU 이상에서는 당화율이 거의 증가 하지 않았다. 이는 효소가 과량으로 투입되어도 당화율은 소폭 증가에 그치기 때문에 적정 효소 투입량을 50 FPU/g-Cellulose로 설정하였다. 또한 바이오매스 농도에 따른 당화율을 탐색하기 위해 최적량의 셀룰레이즈와 베타글루코시데이즈를 첨가하고 바이오매스 농도를 1 ~ 30 w/v%로 하여 효소가수분해를 실시하였다.

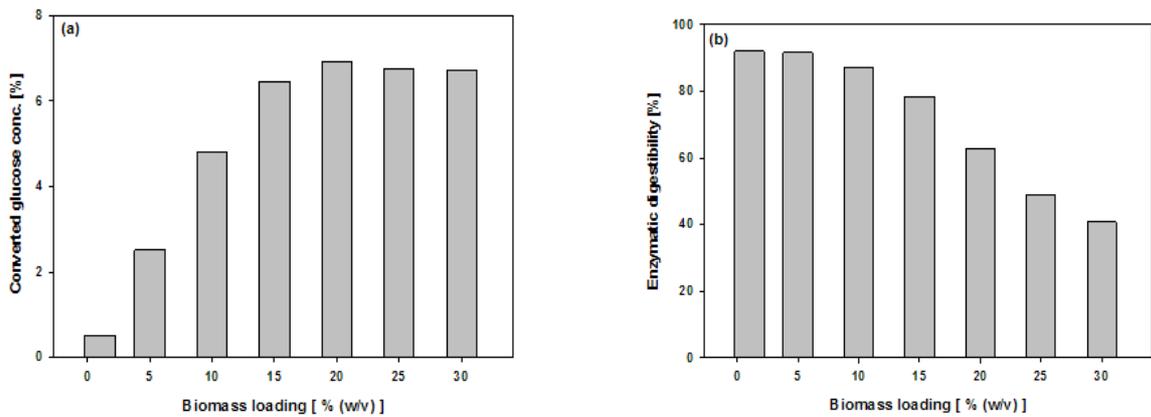


그림 3.5-35. Converted glucose concentration (a) and enzymatic digestibility (b) of pretreated OPEFB at 1~30 % (w/v) biomass loading with cellulase complex and β -glucosidase enzyme loadings of 50 FPU g^{-1} cellulose and 30% of cellulase, respectively

□ 그림 3.5-35 (a)는 바이오매스 농도에 따라 당화된 글루코스의 농도를 보여 주고 있으며 (b)는 당화율을 보여주고 있다. 그림에서 알 수 있듯이 바이오매스 농도가 증가 할수록 당 농도는 증가하는 당화율은 감소함을 알 수 있다. 이는 당화가 진행됨에 따라 당 농도가 높아져 효소가 저해를 받기 때문이다. 즉 생산물 저해를 받아 효소의 활성이 낮아지기 때문이다. 따라서 적정 바이오매스의 농도는 20 w/v %로 분석 되었다.

(3) 회분식 당화/발효에 따른 에탄올 생산량 탐색

□ 최적의 전처리 조건과 탐색된 당화 조건을 바탕으로 바이오매스로부터 에탄올을 생산하였다. 발효에 사용된 효모는 (주)창해에탄올에서 산업용 균주 *S. cerevisiae* CHY 1011이다. 당화시간에 따른 에탄올 생산량을 알아보기 위해 효소가수분해 시간을 0~48동안 50 °C, pH 5.0에서 수행 후 효모를 접종하였다. 이는 당화 시 효소가 생산되는 당에 의해 저해를 받기 때문에 적정 당화 시간을 탐색하면서 최적의 에탄올을 생산하기 위함이다. 발효는 32 °C에서 수행하였다. 그림 3.5-36은 당화 시간에 따른 에탄올 생산량을 나타낸 그림이다. 당화시간이 0시간일 경우 에탄올 생산량은 48.54 g/L로 당화 48시간보다 2.63g/L 가 더 높게 나타났으며 에탄올 생산 수율 86.62%로 48시간에 비해 5% 정도 높게 나타났다.

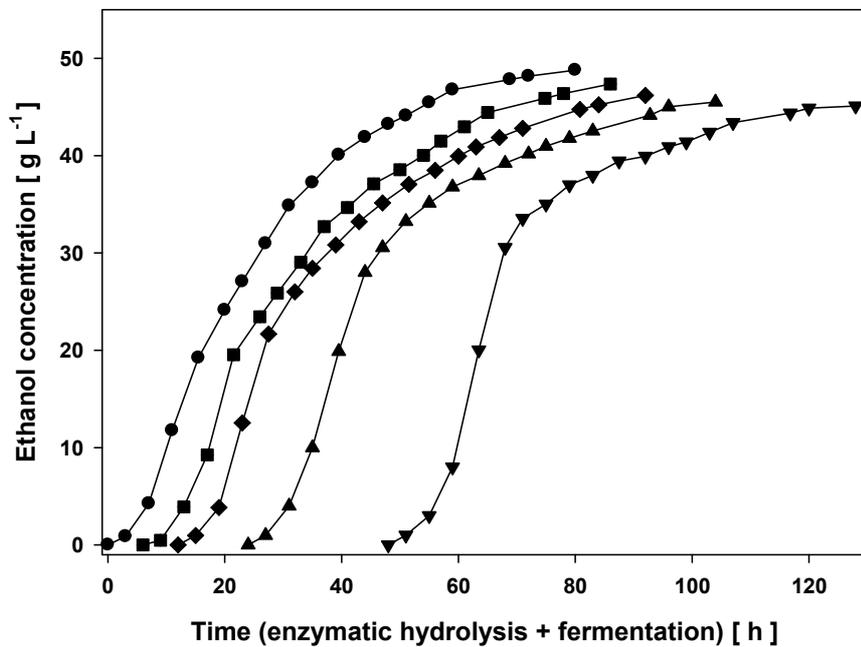


그림 3.5-36. Ethanol fermentation as a function of enzymatic hydrolysis time

● 0; ■6; ◆12; ▲24; ▼48 h of enzymatic hydrolysis time.

□ 그러나 이 결과는 지금까지 연구된 섬유질계 바이오에탄올 생산과 상이한 결과를 보여주고 있다. 섬유질계 에탄올을 생산하기 위해서는 효소 가수분해에 의해 셀룰로스가 글루코스로 전환되어야 하는데 효소활성의 최적온도는 50 °C 이므로 발효와 동시에 수행하는데 많은 문제가 있는 것으로 알려져 있기 때문이다. 즉 당화 0시간은 효소의 최적 활성온도가 아닌 효모의 최적 활성온도 32 °C 이기 때문에 효소가수분해가 거의 이루어 지지 않는 것으로 알려져 있으나 실제 결과는 32 °C에서도 당화가 잘 이루어지는 것으로 나타났다. 이는 앞선 당화에서도 언급하였듯이 생산물(glucose) 저해를 받지 않기 때문에 기인한 결과라 볼 수 있다. 즉 최적의 효소 활성온도는 아니지만 효소에 의해 생성된 글루코스는 효모에 의해 바로 소모되어 효소가 글루코스의 저해를 받지 않아 효소가 높은 활성을 유지 할 수 있기 때문이다.

- 지금까지 수행된 결과를 바탕으로 EFB로부터 바이오에탄올을 생산한 결과를 정리하였다. 그림 3.5-37은 동시당화발효 공정을 이용하여 EFB로부터 바이오에탄올을 생산한 물질수지를 나타내었다. EFB 3kg으로부터 410.48g의 바이오에탄올을 생산하였다. 이를 단위생산량으로 나타내면 136.83이 된다. 즉 EFB 1ton으로부터 170L 이상의 연료용 바이오에탄올을 생산할 수 있음을 의미한다.

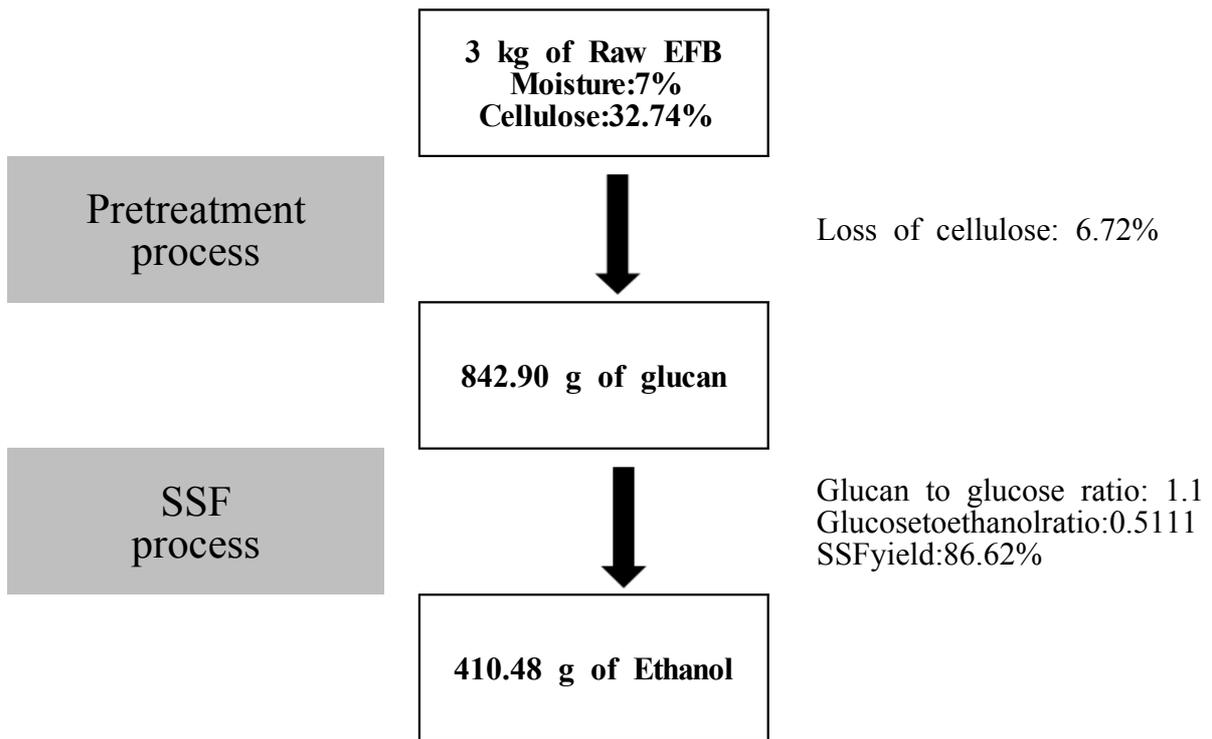


그림 3.5-37 동시당화발효 공정을 이용하여 EFB로부터 바이오에탄올을 생산한 물질수지

다. 전처리 후 이송/세척/탈수공정 구성 및 운전

(1) 이송 설비 탐색

- 전처리 방법에 따라 고형물을 사용하는 경우, 액상을 사용하는 경우 또는 고형물과 액상을 동시에 사용해야 하는 경우로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 주로 알칼리를 이용하여 전처리 하였으며, 이 경우 주로 고형물만을 사용하므로 고액을 분리하는 공정이 필요하다. 고액을 분리하는 공정으로는 원심분리, 벨트프레스, 스크류프레스 공정 등이 있다. 벨트프레스나 스크류프레스의 경우 함수율을 조정이 용이한 장점이 있어서 연속식당화공정 연계에 유리하다. 벨트프레스나 스크류프레스로 고형물을 분리하여 분리된 고형물은 다시 세척조로 투입되고 다시 프레스로 이송하여 고액 분리 후 고형물은 당화조로 이송하게 된다.

(2) 벨트프레스

□ 벨트프레스의 가능성을 타진해 보기 위해 제작용체인 (주)대성벨트프레스에서 전처리된 바이오매스를 이용하여 성능을 시험해 보았다. 시간당 40 kg을 처리 할 수 있으며 최종 수분농도를 80%로 유지 할 수 있었다. 하단 그림 3.5-38은 벨트프레스를 이용하여 실험하고 있는 모습이다.



<벨트프레스 전경>



<초기 투입되는 원료모습>



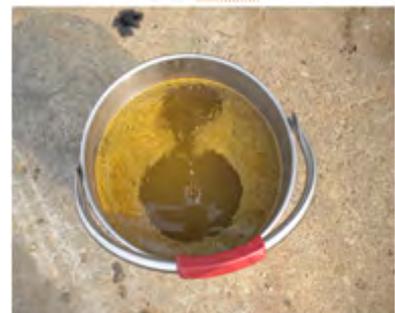
<수분이 제거되는 원료모습>



<수분이 제거된 원료모습>



<고액 분리 후 고형물>



<고액 분리 후 액상>

그림 3.5-38. 벨트프레스 사진

□ 그러나 고농도의 에탄올을 얻기 위해서는 수분함유량이 75% 이하로 줄여하는데 벨트프레스 특성상 80% 이하로 수분을 조절에 어려움이 있었다.

(3) 스크류 프레스

□ 벨트프레스 이외에 스크류프레스를 이용하여 탈수 및 이송장치를 고려하였다. 스크류 프레스의 (그림 3.5-39) 경우 시간당 50 kg을 처리 할 수 있으며 제작사에서 간이 Test를 진행한 결과 수분함유량을 70% 이하로 조절이 가능하였다. 비록 벨트프레스보다 고가이지만 고농도 바이오에탄올 생산을 위해서는 수분조절이 매우 중요하므로 스크류프레스를 이용한 탈수 및 이송공정을 선택하였다. 스크류프레스의 경우 현재 설치 중에 있으며 하단 사진은 설치된 스크류 프레스의 모습이다.

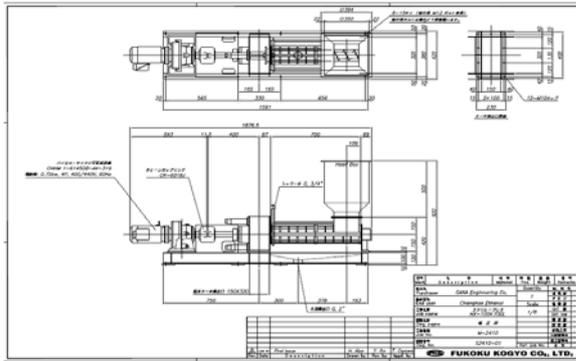
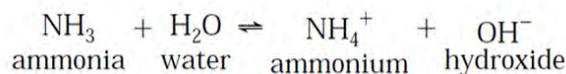


그림 3.5-39. 스크류프레스의 설계도와 사진

라. 유기용매 회수 공정

(1) 암모니아 회수의 문제점

- 전처리 공정으로 암모니아를 이용하여 폭쇄 시켜 바이오매스를 처리하는 방법이 많이 사용되고 있다. 그러나 공정이 대규모화되고 상업화하기 위해서는 암모니아를 회수 하는 공정이 필요하다.
- 암모니아 회수 방법에는 증류법, 탈기법, 이온교환법, 파과점 염소 처리법이 있다.
- 증류법(Distillation) : 온도가 상승하면 기상/유리 암모니아의 평형 pH가 낮아지는 원리를 이용하여 높은 pH의 용액에서 암모니아를 회수할 경우 사용되어지며, 잔류 암모니아는 황산을 추가하여 황산암모늄 형태로 회수한다.
- 탈기법(Air stripping) : NH₃-N을 1,000mg/ℓ 이상 함유하고 있는 용액에 NaOH 또는 석회 등 알칼리제를 투여하여 PH 12이상으로 조절하여 폐수 중의 암모니아를 유리시키고, 충전탑에서 순화 또는 holding pond의 교반에 의해 공기나 증기의 비 표면과 접촉시켜 기체 상태로 휘산시켜 제거하는 방법이다
- 이온교환법(Ion Exchange) : 천연 제올라이트(Clinoptilolite)가 많이 이용되며, 이 공정에서 제올라이트가 오염되는 것을 방지하기 위해 폐수를 여과 및 활성탄 흡착 처리한 후 제올라이트가 충전된 고정상 칼럼을 통과시킴으로써 이온교환이 이루어진다.
- 파과점 염소처리법(Breakpoint chlorination) : 높은 처리효율을 얻을 수 있고, 물리화학적 고도처리와 병행할 수 있는 장점이 있지만 원폐수의 암모니아 농도에 따라 처리비용이 결정되고, 슬러지 량이 증가하며, 총 용해성 고형물질과도 반응하게 되므로 운전비용이 많이 드는 문제점이 있다.



□ 전처리 후 암모니아는 기상과 액상으로 존재하게 된다. 기상으로 존재하고 있는 암모니아는 가스 포집법을 이용하여 회수 할 수 있으나 아직까지는 효율이 매우 낮다. 또한 액상으로 존재하는 암모니아는 상기 분자식과 같이 NH_4^+ 이온으로 액상에 존재하기 때문에 비점을 이용한 증류법으로는 회수에 한계가 있으며 아래 그림과 같은 NaOH 및 Lime을 공급하여 60 °C, pH 12 이상에서 NH_4^+ 를 NH_3 로 탈기되는 원리를 이용하여 회수가 가능하나 이 경우 다량의 알칼리 폐수가 발생하는 문제점을 가지고 있으며, 설비 시설이 매우 고가이며 에너지 또한 많이 소모되어 경제성에서 많이 뒤떨어진다.

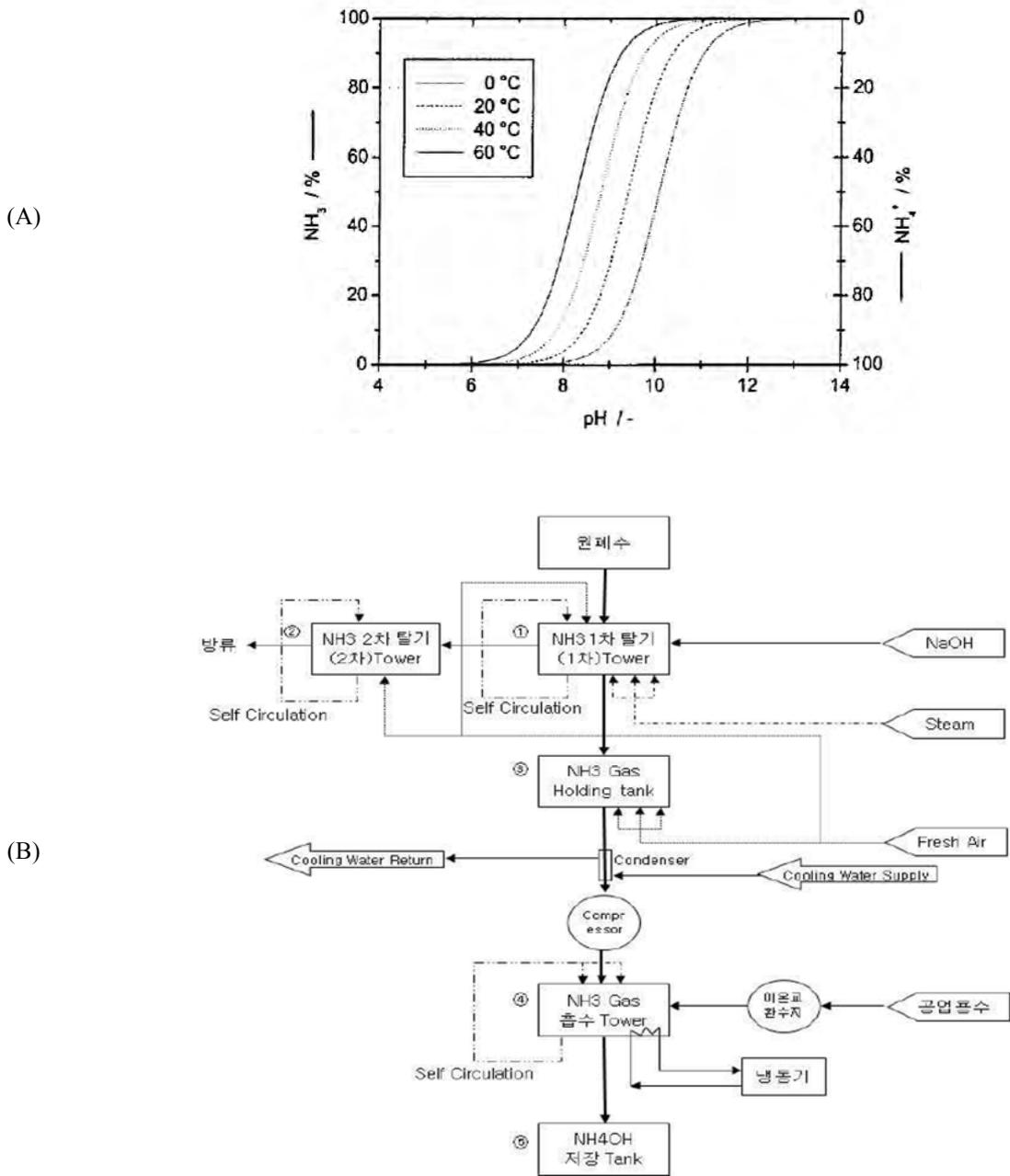


그림 3.5-40. Influence of pH and Temperature on the distribution of NH_3 and NH_4^+ in water (A)
 암모니아 탈기 공정도 (B)

(2) NaOH 회수

□ 알칼리 전처리 공정 중 암모니아를 이용하는 전처리 방법 이외에 NaOH를 이용하여 전처리하였다. 이 공정 또한 많이 사용되고 있는 전처리 방법으로 특히 초분류에 적합한 공정으로 대두 되고 있다. 일반적으로 1~4% 정도의 NaOH 수용액을 이용하여 바이오매스를 전처리 하며 처리 후 필터를 이용하여 회수가 가능하다. NaOH는 수용액상에서는 이온형태로 존재하므로 분자량이 매우 작아 선택적으로 Na와 OH이온만을 통과 시키면 리그닌등 고분자물질의 회수가 가능하기 때문이다. 하단 그림 3.5-41과 표 3.5-14는 NaOH를 회수하기 위해 실제 실험해본 사진과 결과이다. 바이오매스를 전처리한 후 NaOH를 회수하기 위하여 먼저 고형물을 분리하고 액상을 이용하여 필터링 하였다.



그림 41. NaOH 회수 간이 실험 장치

□ 필터는 정밀여과필터(Microfiltration), UF(Ultrafiltration)필터, RO(Reverse Osmosis)필터를 이용하였다. 분리 된 액상은 정밀여과필터와 UF필터는 통과하였으나 RO필터는 통과하지 못하고 막히는 현상이 발생하였다. UF필터와 RO필터의 공극차이가 크기 때문에 발생한 현상으로 판단되었다. 그리하여 UF필터와 RO필터 사이의 공극 크기의 중공사막(Hollow Fiber Membrane)을 이용해 보았다.

□ 중공사막의 공극 크기는 분자량 10K(0.005 μm)과 150K(0.03 μm)을 이용하였으며, 통과된 수용액은 UV와 중화 후 침전된 리그닌의 무게를 분석하여 회수율을 알아보았다. UV를 이용하기 위해 전처리된 NaOH 탈리액의 스펙트럼을 알아보았다. 340 nm에서 가장 큰 피크를 보였으며 이는 리그닌 성분으로 탐색되었으며, 황산으로 중화 후 침전된 리그닌 등의 고형물의 무게를 건조 후 분석 하였다.



그림 3.5-42. 중공사막을 이용한 회수 장치

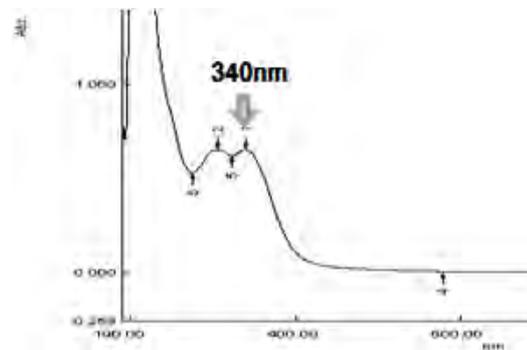


그림 3.5-43. NaOH 수용액의 스펙트럼

- 실험결과를 살펴보면 10K, 150K 모두 pH의 경우 크게 변화가 없는 것으로 보아 NaOH는 모두 통과한 것으로 판단되었다. 그러나 UV값을 살펴보면 리그닌 성분이 거의 동일하게 통과한 것으로 나타났다. 그러나 무게 측정값을 보면 10K의 경우 원폐수에 비해 40% 정도 무게가 감소한 것으로 나타났다. 이는 NaOH 경우 분자량이 작기 때문에 거의 통과한 것이고 10K보다 큰 성분은 어느 정도 제거되었음을 의미한다. 이는 10K 보다 작은 크기의 필터를 이용할 경우 더욱더 순수한 NaOH를 얻어낼 수 있음을 의미한다. 차 후 연구를 통하여 최적화된 필터공극의 크기를 찾아내고 회수된 NaOH 용액 전처리에 재이용하도록 하겠다.

표 3.5-14 중공사막 통과 후 수용액 변화 (UV 측정 및 무게변화)

Filter pore	pH	UV 측정 (상대값 %)	무게측정 (상대값 %)
10k	13.52	87.7	60.4
150k	13.53	87.4	81.5
원폐수	13.58	100	100

마. 고농도 당화기 설계 및 구성

(1) 고농도 당화기의 필요성

- 발효공정에서 에탄올 량의 증가는 증류에너지를 감소시킬 수 있으므로 매우 중요하다. 그렇기 때문에 고농도 에탄올은 섬유질계 에탄올 생산에서도 필연적으로 요구된다. 전분 질계에서는 고형물의 농도를 25 w/v% 이상으로 하여 에탄올을 일반적으로 8 - 10 w/w% 정도 생산한다. 섬유질계를 이용한 에탄올 발효에서 전처리된 바이오매스를 30 w/w% 가까이 사용해야만 7 w/w% 의 에탄올이 생산 가능하다. 또한 고농도 바이오매스는 에탄올 생산 시 물의 양을 감소 시켜 폐수 처리 비용을 절감 할 수 있다. 전처리된 섬유질계 바이오매스는 효소에 의해서 가수분해가 되어 액상으로 단당, 다당 등 발효 가능한 당으로 전환된다. 고형물의 양이 증가함에 따라 액상효소와 고형물의 혼합은 더욱 힘들어 진다. 바이오매스가 모두 한꺼번에 많은 양이 투입되면 교반은 매우 힘들어 지며 걸보기 점도 또한 상승하게 된다. 게다가 발효가 시작되고 이산화탄소가 발생하게 되어 기체-액체-고체의 다양한 상이 존재하게 되어 낮은 물질과 열전달, 낮은 당 수율, 낮은 에탄올 농도를 만들어낸다. 섬유질계를 이용한 반응기 설계는 교반능력, 낮은 에너지 소비, 효소와 효모의 낮은 스트레스가 매우 중요한 핵심 사항이다. 바이오에탄올 생산하기 위한 섬유질계 연구가 많이 수행되고 있지만 고농도 바이오매스를 투입하여 고 농도의 당화액 제조에 관련된 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 보릿짚을 이용하여 다양한 바이오매스와 효소 농도로 하여 당화 실험을 수행하였다. 전처리된 보릿짚은 실험의 정확성을 위해 세척 후 건조하여 사용하였다. 본 연구의 결과는 섬유질계 에탄올 생산에 있어 고농도 당화의 의 문제점과 이를 극복할 수 있는 중요한 자료로 활용 될 수 있을 것이다.

(2) 농도 당화기 설계

- 농도 바이오매스를 당화시키기 위해서는 2-stage 반응기를 구상하였다. 1차 반응기에서는 고농도 바이오매스 투입으로 인한 점도 상승으로 교반도를 교반할 수 있는 임펠러가 필요하다. 가수분해 효소에 의해 서서히 분해되어 점도가 낮아진 당화액은 2차 반응기로 넘어간 일정 체류시간동안 2차 효소가수분해가 이루어진다. 하단 그림 3.5-44는 당화조의 다양한 임펠러 형태를 나타내고 있다.



그림 3.5-44. 다양한 임펠러 형태

- 헬릭스형 임펠러의 당화속도가 가장 우수한 것으로 나타났으며 패들형 임펠러가 그 다음으로 분석되었다. 이러한 임펠러에 따른 당화 효율을 바탕으로 본 연구에서는 비대칭 일자형 교반기(본 보고서에는 나타내지 않음)를 제작하여 당화율 50%에 이르는 시간을 15시간 이내로 단축하였다.
- 하단 그림 3.5-45는 2단 당화조 구상도 이다. 앞에서 설명하였듯이 1번 당화조에서 1차 효소 가수분해를 통해 2차 당화조 넘어간 당화액은 후당화를 통하여 최대한 당화 수율을 높이고 그 다음 효모를 접종하여 발효를 통하여 에탄올을 생산한다.

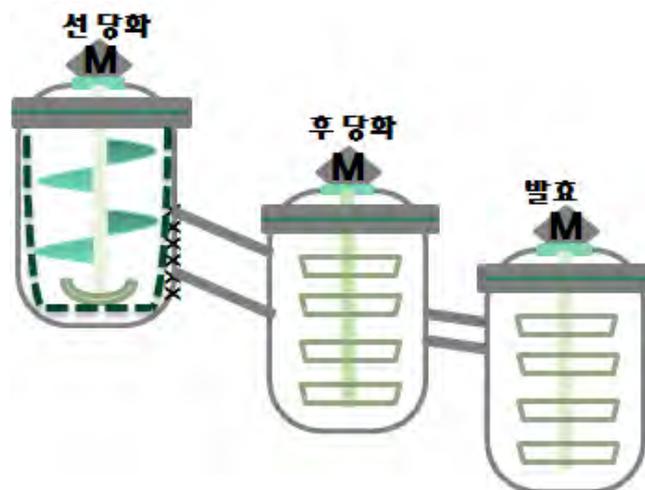


그림 3.5-45. 2단 당화조 구상도

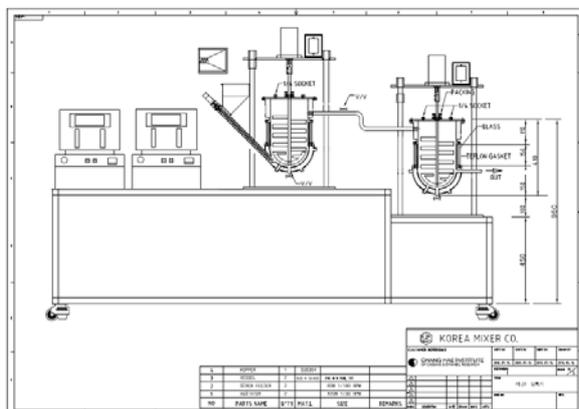
(3) 고농도 당화기를 이용한 당화액 제조

□ 2단 당화조를 제작하여 고농도 당화액을 제조하였다. 당화조 제작에 있어 pH 조절이 매우 중요하여 1차 반응기 하단에 pH 미터를 부착하였다. 그러나 바이오매스를 상부에서 투입하여 일정시간을 필요로 효소가수분해가 이루어지지 않고 2차 당화조로 넘어가는 현상이 발생하였다. 이를 해결하기 위해서 바이오매스를 하단에서 투입하는 방법을 선택하여 당화조 규모를 증가시켰다. 아래 그림 3.5-46은 2단 당화조의 설계도와 실제 제작된 사진이다.



그림 3.5-46. 2단 당화조 사진

□ 5L급으로 제작된 당화조는 1차 반응기 하단으로 피스톤에 의해 바이오매스가 투입되도록 하였다. 바이오매스가 하단으로 투입되어 일정시간 효소가수분해가 이루어지고 그 후 2차 당화조로 높이에 따른 차이로 인하여 이송된다. 아래 그림 3.5-47은 본 당화조를 이용하여 당화액을 제조한 실험결과 이다. 실험결과는 당화액 제조의 가능성을 타진해 본 것이며 앞으로 많은 연구를 통해 최적화가 필요할 것으로 사료된다.



<2단 당화조의 설계도>



<2단 당화조>

그림 3.5-47. Scale-up 2단 당화조 사진

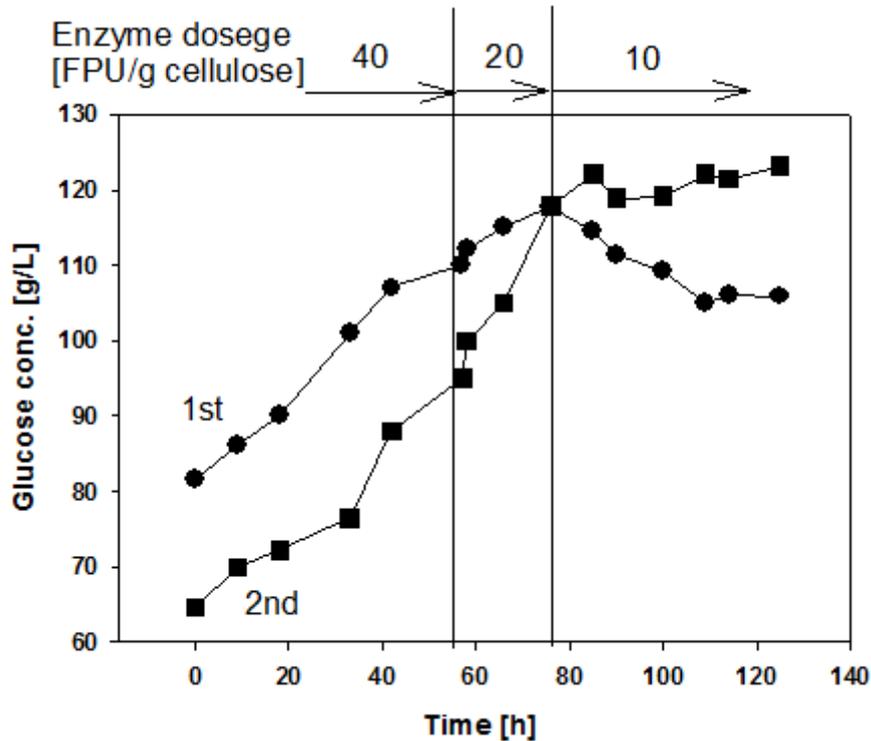


그림 3.5-48. 2단당화조를 이용한 당화액 제조 결과

- 초기 1차 당화조에 증류수를 pH센서가 보호될 정도로 채운 뒤 바이오매스 투입을 시작하였다. 분석이 시작된 0시간은 2차 당화조로 넘어간 시간을 기준으로 하였다. 바이오매스 투입은 25 w/v% 고형물 비율로 하여 24시간동안 0.4 kg이 투입되도록 하였다. 바이오매스 비율에 맞춰 가수분해 효소를 첨가하였다. 2N-황산과 0.5 N-NaOH를 이용하여 pH 5.0으로 조절하였다. 초기에는 효소가 과량으로 투입되어 1차 당화조에서 과하게 당화가 이루어져 오히려 2차 당화조(2차 당화조의 수분 흡입현상에 기인함)의 당 농도가 낮아지는 현상이 발생하였다. 그 후 효소 농도를 조절해 나감에 따라 1차 당화조에서 약 60% 당화가 일어나고 2차 당화조에서 80%당화가 일어나도록 체류시간과 효소 투입량을 조절하였다. 그 결과 120 g/L의 당화액을 24시간동안 360 ml 이상을 제조 하였다.

4. 연속식 전처리/당화/용매회수 모듈 설계 및 제작

가. CHEMET (ChangHae Ethanol Multi ExTruder) 공정 구성 및 운전

(1) CHEMET 제작

(가) Twine Screw Extruder 성능 Test

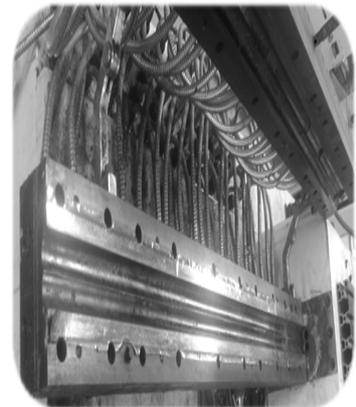
□ 선행 연구에서 Bench-scale 규모 5L 회분식 반응기부터 50L급으로 규모를 증가시키면서 효율적인 전처리 반응기를 구축하였다. 그러나 공정의 규모가 커지고 상업화에 다가가기 위해서는 연속식 전처리 공정이 필수적이다. 이에 본 연구에서는 Twine Screw Extruder (그림 3.5-49)를 이용하여 바이오매스를 전처리 가능성을 Test하였다.



Twin-Screw Extruder



용액 주입용 정량 펌프



Twin-Screw Barrel

그림 3.5-49. Twine Screw Extruder

□ Twin Screw Extruder(TSE)는 1937년에 처음으로 상업적으로 사용되기 시작하였으며, 1970년대부터 제지공정에서 연속식 펄핑용으로 개조되어 사용되고 있다. TSE는 구동축에 스크류를 조합하여 원료 특징에 맞는 조합으로 변경하여 사용이 가능하며 스크류는 아래 그림 3.5-50과 같이 이송, 혼합, 가압, 분산등 기능을 가지고 있으며 각자 독특한 형태를 지닌다.



그림 3.5-50 . Twine Screw Extruder

□ 기존 파일롯 규모의 전처리반응기는 싱글 스크류를 기반으로 설계/제작 되었으며, 운전 조건은 회분식 반응기와 유사하고 단지 체류 시간을 보정하기 위한 용도로 이용되었다. 하지만 1차년도 선행특허 조사 결과 대부분 적용 가능한 부분은 해외에서 특허를 보유하고 있고, 트윈은 아래 표와 같이 혼련 및 혼합 기능이 우수한 특징을 이용하고 기존 특허를 침해하지 않는 독자 기술을 개발 하였다.

표 3.5-15 . Single / Twine Screw Extruder 특성 비교

	Single	Twin
Conveying	Drag - 고체 : frictional drag - Melt : viscous drag	Positive displacement 강제적인 밀어줌
속도 profile	잘 정의 됨	복잡하고 정의하기 어려움
원료 feeding(호퍼)	Full filled	Starved feeding
용융 능력	약함	강함
혼련 능력	약함	우수
이송 능력	보통	우수 (intermeshing type)
Screw design	일체형	Modular type (조립식)
수지온도제어	보통	우수
체류시간분포	넓음	좁음 ~ 넓음
Wiping 기능	없음	Self wiping (intermeshing type)
용도 / 기능	용융	Compounding/mixing devolatilization, 반응압출(분해, 가교, 중합, graft)

□ 바이오매스용 스크류 설계를 위해서는 아래 그림과 같은 23지의 스크류 기존 인자를 계산하여야 한다. 기존 섬유화학공정에서 사용하는 스크류와는 달리 용매를 이송하여야 하기 때문에 바이오매스 및 전처리 용매 이송용 스크류를 표 3.5-51 과 같이 설계하였다.

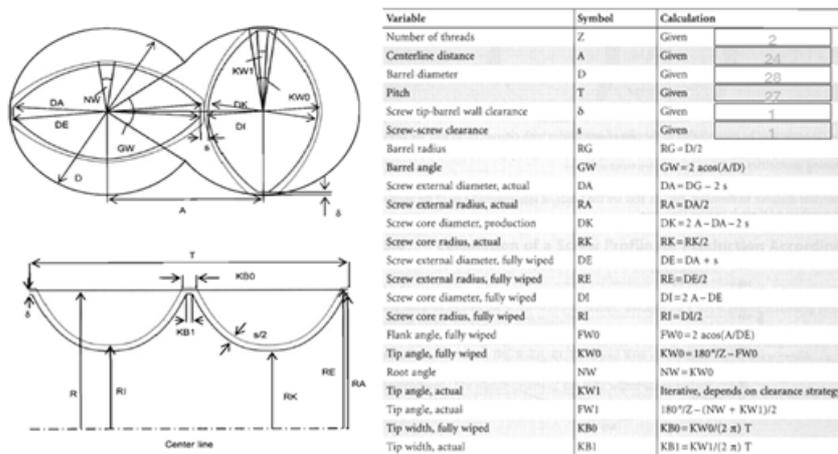


그림 3.5-51 . Twine Screw 설계 인자

□ 트윈 스크류는 공간을 대부분 사용하는 싱글 스크류와 다르게 동일한 회전속도에서 스크류 조합에 따라서 반응시간을 조절할 수 있다. 그림 3.5-52 는 일반적인 스크류 조합시 이송존에 서는 20%정도만 반응에 사용하고 혼합존에서 주요 반응기 일어나는 것을 설명한다. 따라서 바이오매스와 용매의 반응시간을 위한 스크류 조합으로 혼합존을 확대하여 스크류를 조합하였다.

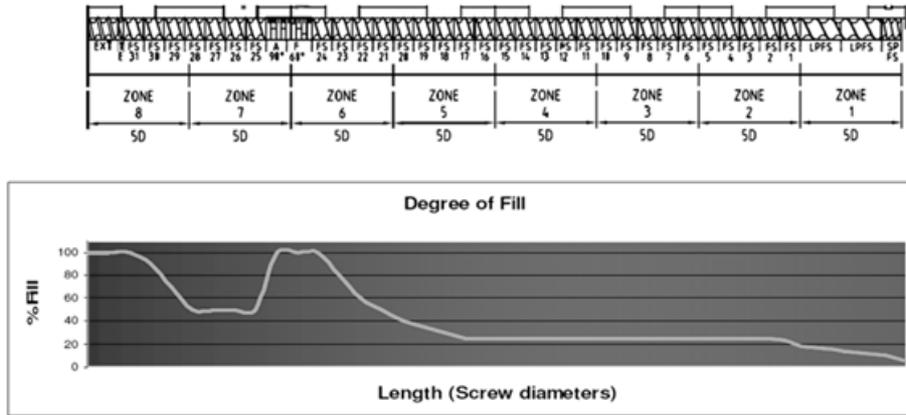


그림 3.5-52 . Screw 조합에 따른 일반적인 체류존

□ 전처리 조건은 그림 3.5-53에 나타내었다. 반응온도는 80~150 °C, 스크류 회전속도는 150~200 rpm으로 하였으며 바이오매스 투입량과 전처리 용액(0.5 M NaOH) 투입량은 각각 8.2 g/min, 40 ml/min 으로 고정하였다. 실험결과(표 3.5-16)를 살펴보면 반응온도가 증가 할수록 글루코스의 상대적 함량은 증가하는 것으로 나타나 Twine Screw Extruder의 연속식 전처리 가능성을 보여주었다. 그러나 본 연구에서 사용된 Twine Screw Extruder는 바이오매스 전처리용으로 제작된 것이 아니기 때문에 반응온도 유지 및 적정 스크류 회전속도의 유지가 어려워 보다 세부적인 실험은 수행 할 수가 없어 (주)창해에탄올에서는 바이오매스 전처리용 Twine Screw Extruder를 직접 제작하였다.

- 보릿짚 Test 조건

구분	온도(°C)	스크류 회전 (RPM)	전처리 용액 투입 (ml/min)	바이오매스 투입 (g/min)
1	80	200	40	8.2
2	80	200		8.2
3	100	150		8.2
4	150	200		8.2
5	150	200		8.2
6	150	200		8.2
7	150	200		8.2

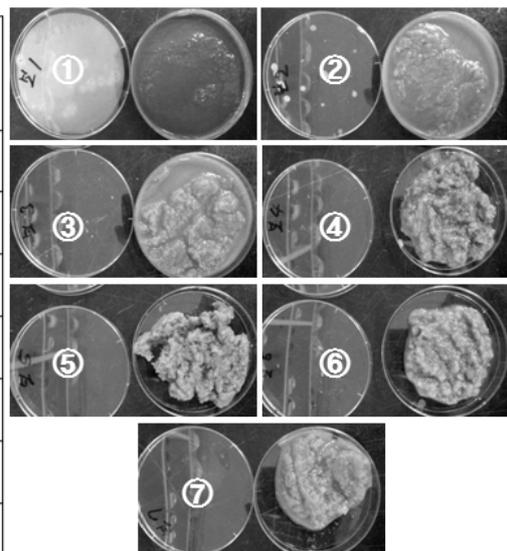


그림 3.5-53. Twine Screw Extruder Test 결과

표 3.5-16. 보릿짚 Test 결과

단위 : %

구분	Glucose	Xylose	Lignin	Ash	Moisture
1	48.91	21.16	20.34	1.73	3.54
2	54.58	19.98	13.59	2.09	2.91
3	54.09	19.94	15.75	0.41	2.06
4	53.92	20.40	15.00	0.95	1.75
5	53.37	20.24	14.64	0.95	2.00
6	54.67	19.63	15.13	0.97	3.30
7	58.93	20.46	14.49	0.42	4.58
Raw보릿짚	38.18	17.50	20.76	2.92	9.90

(나) CHEMET 공정 설계

□ 앞선 실험결과 Twine Screw Extruder의 가능성을 확인하였다. 이 결과를 토대로 본 연구에서는 연속식 전처리 반응기를 설계하여 공정 적용가능성을 타진해 보고 효율성을 알아보기 위해 2차 년도에 구상한 연속식 전처리 반응기(그림 3.5-53 (A))를 그림 3.5-53(B)와 같이 설계하였다.

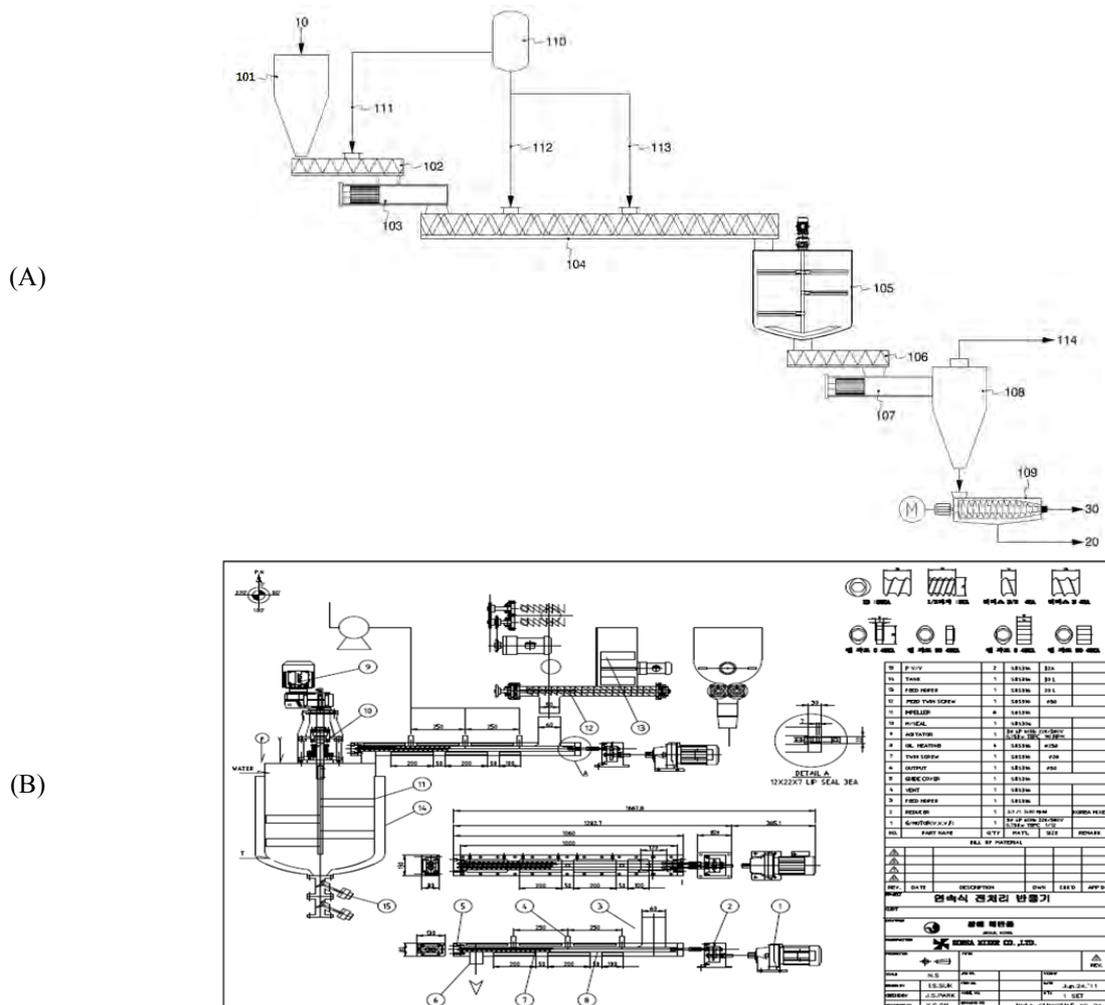
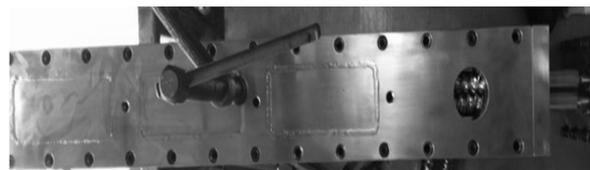


그림 3.5-51. Twine Screw Extruder 공정 구상도 (A) Twine Screw Extruder를 이용한 전처리 공정 설계도 (B)

- CHEMET(Chang Hae Ethanol Multi ExTruder) 반응기는 바이오매스 투입장치, 바이오매스 이송장치, 바이오매스를 체류시켜 전처리하는 장치로 구성되어 있다. 본 반응기의 명칭은 CHEMET 으로 하였다. 원료투입 장치에서 투입된 바이오매스는 트윈스크류를 통하여 연속적으로 이송되면서 물리적인 교반, 짓이김(Tramplng) 그리고 분산으로 회분식 및 일반 단일 스크류 공정에 비하여 높은 바이오매스농도의 전처리가 가능하다.
- 약알칼리 전처리 방법은 산 및 열수처리에 비하여 긴 반응시간을 필요로 하기 때문에 반응에 필요한 시간을 공급할 수 있도록 체류조를 설계하였다. 또한 폭쇄효과를 위하여 수집 장치로는 회분식과 동일한 사이클론을 설계에 포함 하였다. 체류조에서 사이클론 사이에는 피스톤 밸브를 설치하여 체류조의 압력 및 온도에 영향을 주지 않고 일정한 양이 배출되도록 설계하였다. 그 후 처리된 바이오매스는 스크류 프레스를 통해 고액 분리가 이루어진다. 그 후 세척과정에서 전처리 용매를 씻어내고 탈수과정에서 다시 고액분리를 통하여 Lab 규모 당화조를 이용하여 당화 및 발효를 진행하였다. 그림 3.5-54는 (주)창해에탄올에서 제작한 연속식 전처리 반응기의 제작과정 사진이다.



바이오매스 투입장치



전처리 반응기 본체



체류 탱크 및 사이클론



스크류프레스

그림 3.5-54. Twine Screw Extruder 연속식 전처리 반응기 제작과정

□ 그림 3.5-55는 (주)창해에탄올에서 제작한 연속식 전처리 반응기의 완성 사진과 HMI 사진이다. 이축 스크류를 이용한 CHEMET 장치는 바이오매스 1일 처리량이 10 kg이상으로 설계되었으며 상온에서부터 180 °C까지 운전가능하다. 반응기 투입장치를 통해 투입된 바이오매스는 반응기로 투입되어 이송부, 역이송부, 혼합부, 분산부, 고압배출부로 이루어진 이축 스크류를 통과하면서 전처리 용액과 혼합되어 처리된다. 처리된 바이오매스는 체류 탱크로 이송되어지고 이송되는 압력에 의해 일정 시간에 간격으로 열리는 피스톤 밸브를 통하여 싸이클론으로 배출되어 스크류 프레스로 이송된다. 스크류 프레스에서는 고액을 분리하여 차 후 공정에 사용된다.

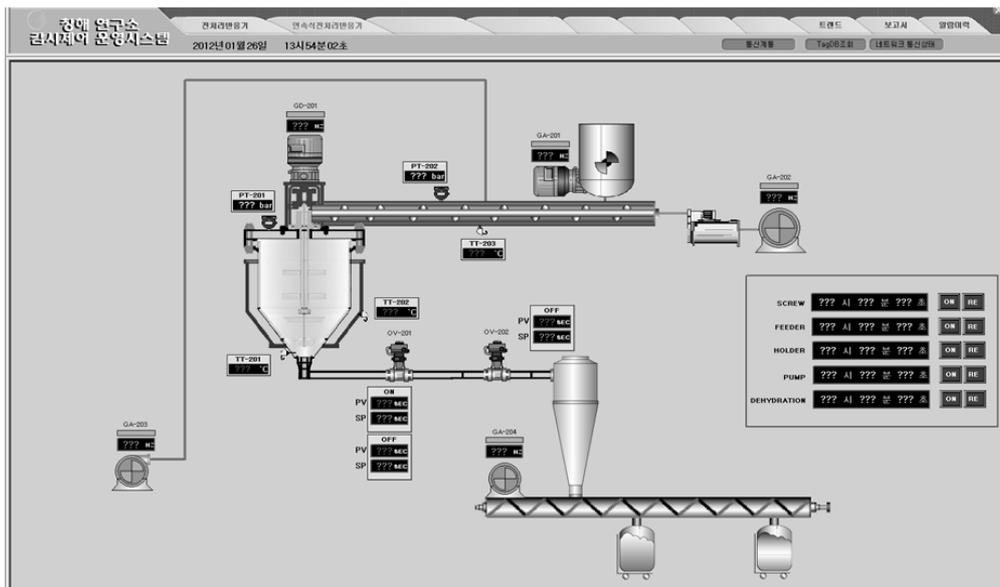
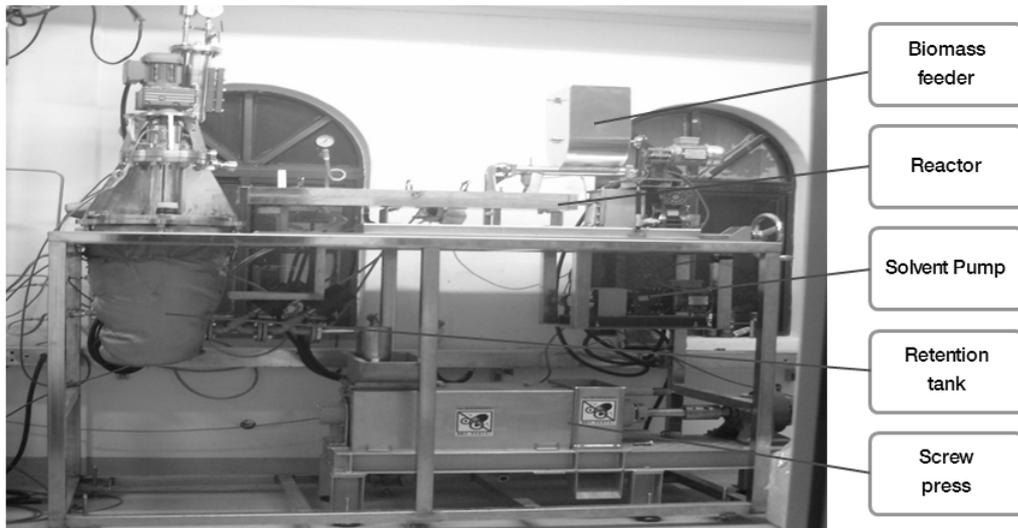


그림 3.5-55. CHEMET 반응기 제작 완료 사진 및 HMI 화면

(2) CHEMET을 이용한 최적 전처리조건 탐색

(가) 바이오매스 및 효소

□ 사용된 바이오매스는 호남농업연구센터(익산)에서 제공받은 보릿짚을 이용하였다. 보릿짚은 3 mm 이하로 분쇄하여 45 °C에서 12시간 이상 건조하여 수분량을 일정하게 유지하도록 하였다. 보릿짚의 성분은 표 3.5-17에 나타내었다. 섬유질계 바이오매스에서 발효성 당성분으로 전환 될 수 있는 셀룰로스와 헤미셀룰로스의 성분은 각각 35.65%, 16.86%로 나타났으며 리그닌은 22.36%를 나타내었다. 또한 에탄올을 생산하기 위해 사용된 당화효소는 노보자임사의 Cellic® CTec2 과 Cellic® HTec2를 사용하였으며 특징은 표 3.5-18에 나타내었다.

표 3.5-17 보릿짚 성분

Component	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
[%]	35.65	16.86	22.36

표 3.5-18 Cellic® CTec2 과 Cellic® HTec2의 특징

Product	Cellic® CTec2	Cellic® HTec2
Tech specifications /description	Cellulase complex for degradation of cellulose to fermentable sugars A blend of - Aggressive cellulases - High level of β-glucosidases - Hemicellulase	-Endoxylanase with high specificity toward soluble hemicellulose - Cellulase background
Features	- High conversion yield - Effective at high solids concentrations - Inhibitor tolerant - Compatible with multiple feedstocks and pretreatments - High concentration and stability	- Can improve cellulose hydrolysis when combined with CTec2 - Helps in case of mild acid or alkaline pretreatment - Converts hemicellulose to fermentable sugars
Benefits	- Up to 50% lower enzyme dosage - Lower operating and capital costs from optimization of process, e.g., higher total solids loading and higher ethanol titer - Enabling low ethanol cost - Increased process flexibility	- 20% lower enzyme usage cost - Enables higher ethanol yields - Provides increased flexibility for pretreatment technology

(나) 표면분석법 실험설계

□ 바이오매스로부터 효율적으로 에탄올을 생산하기 위하여 표면분석법을 이용하였으며 설계는 회전중심합성법을 이용하였다. 설비 가동 Test 결과 안정적인 기기가동을 위하여 바이오매스 투입량과 스크류 회전속도는 고정시키고, 실험변수는 반응온도(X_1), 전처리 용

액 농도(X₂), 시간당 전처리용액 투입량(X₃)로 정하였다. 각각의 변수는 상위(+2), 하위(-2)로 하여 5단계로 나누었다. 실험계획의 변수 범위는 표 3.5-19에 나타내었다. 회전중심합성법에 설계된 결과 값은 Design-Expert®, Version 7.1.3 프로그램에 의해 분석되었다.

표 3.5-19. 회전중심합성법에 의한 실험 변수 범위

실험변수 수준	X ₁ : 반응온도 [°C]	X ₂ : 전처리 용액 농도 [M]	X ₃ : 전처리 용액 투입량 [ml/min]
-2	50.0	0.0	72
-1	62.5	0.2	84
0	75.0	0.4	96
1	87.5	0.6	108
2	100.0	0.8	120

(다) 최적 전처리조건 탐색을 위한 연속식 전처리 및 선 동시당화발효

- 최적 전처리조건 탐색하기 위하여 보릿짚을 분당 12 g 투입하고 스크류의 회전 속도는 100 rpm으로 고정한 뒤 회전중심합성법에 의하여 전처리를 실시하였다. 또한 가장 효율적인 에탄올 생산성을 알아보기 위해 전처리된 바이오매스를 동시당화발효를 사용하였다. 실험방법은 전처리 후 건조된 10 g 바이오매스를 투입하고 당화효소 30 FPU/g cellulose를 첨가하여 전체 부피를 100 ml 가 되도록 Sodium citrate 버퍼를 첨가 한 뒤 효모(CHY 1011)를 전체 부피의 7% 접종하여 33 °C에서 150 rpm으로 48시간 교반하였다.
- 또한 연속식 전처리의 특성상 바이오매스의 짓이김 과정으로 인하여 바이오매스의 표면적이 증가 한다. 이러한 바이오매스 표면적을 탐색하기 위하여 염료(Congo red) 흡착법을 이용하였다. 염료 흡착법은 바이오매스가 전처리 과정에서 짓이김에 의해 표면적이 증가하면 셀룰로스의 표면적 또한 증가하는데 이러한 셀룰로스 표면에 염료를 흡착시켜 흡착된 염료량에 의해서 셀룰로스의 표면적을 알 수 있다. 실험은 전처리된 바이오매스 1 g 에 다양한 농도 (10~1000 ppm)의 염료용액을 20 ml 첨가하여 30 °C에서 150 rpm, 12시간 반응시킨 후 바이오매스에 흡착된 염료의 양을 광학 밀도로 분석하여 다음 식을 이용하여 표면적을 알아보았다.

$$\frac{1}{|A|} = \frac{1}{A_{max}} + \frac{1}{K_{ad} \cdot A_{max}} \frac{1}{|E|}$$

$$SSA = \frac{A_{max} \times N \times SA}{MW}$$

[E] : The solution concentration of congo red at adsorption equilibrium in mg/mL

[A] : The adsorbed amount of congo red on the cellulose surface in mg/g (that reached a maximum value equivalent to A_{max}, the maximum adsorbed amount)

K_{ad} : The equilibrium constant

N : Avogadro's constant

SA : The surface area of a single die molecule (1.73 nm²)

MW : The molecular weight (696 g/mole) of congo red

□ 전처리 후 성분분석과 표면적 분석 결과는 표 3.5-20에 나타내었다. 결과를 살펴보면 반응온도가 높아지고 NaOH의 농도가 높아짐에 따라 글루코스의 성분은 증가 하였다. 즉 가혹도가 높아질수록 글루코스의 함량이 증가하고 리그닌의 비율이 감소하였다. 그러나 회수된 글루코스의 함량을 살펴보면 가혹도가 증가할수록 낮아지는 경향을 보이고 있다. 즉 전처리 조건이 가혹할수록 글루코스 파괴되어 손실됨을 알 수 있다. 그러므로 전처리 후 글루코스의 함량만으로 전처리의 효율을 논하기는 어렵다. 그래서 효율적인 전처리 조건을 탐색하기 위해서는 각각의 전처리 조건에서 바이오매스로부터 생성된 에탄올 함량에 따라 전처리 효율성을 타진해야만 한다. 그래서 본 연구에서는 이를 위해 바이오매스로부터 생성 가능한 에탄올 비율의 개념을 도입하였다(Biomass To Ethanol Ratio; BTER). BTER의 결과는 표 3.5-21에 나타내었다.

표 3.5-20. 중심합성법에 의한 표면분석 결과

Temp. [°C]	NaOH [M]	Flow rate [ml/min]	NaOH [g/min]	Glucose [%]	Xylose [%]	Lignin [%]	Solid ratio [%]	Glucose recovery [%]	SSA [m ² /g]
50.0	0.4	96	1.54	51.96	22.96	16.34	59.74	78.37	147.08
62.5	0.2	84	0.67	48.05	24.84	19.50	73.62	89.31	142.37
62.5	0.2	108	0.86	49.38	24.17	16.98	68.49	85.39	151.38
62.5	0.6	84	2.02	57.17	21.12	14.93	54.08	78.06	140.51
62.5	0.6	108	2.59	56.58	20.02	13.55	50.41	72.01	151.54
75.0	0.0	96	0.00	44.77	22.83	20.82	77.78	87.92	72.02
75.0	0.4	72	1.15	53.49	23.06	14.38	61.83	83.50	133.04
75.0	0.4	96	1.54	55.51	22.27	13.95	57.85	81.08	143.72
75.0	0.4	120	1.92	55.85	21.19	13.87	54.24	76.47	155.78
75.0	0.8	96	3.07	62.39	17.46	12.81	44.75	70.48	146.73
87.5	0.2	84	0.67	47.44	22.95	16.98	68.15	81.62	142.67
87.5	0.2	108	0.86	46.64	21.81	16.41	67.94	79.99	151.79
87.5	0.6	84	2.02	60.29	20.55	14.78	51.58	78.51	140.12
87.5	0.6	108	2.59	59.95	18.99	13.13	48.32	73.13	150.88
100.0	0.4	96	1.54	55.66	21.68	10.63	57.10	80.23	142.91

$$BTER[\%] = \frac{S[\%] \times E[\%]}{G[\%] \times B[\%] \times K} \times 100$$

S: solid ratio after pretreatment
 E: ethanol concentration after fermentation
 G: glucose concentration before pretreatment
 B: pretreated biomass dosage
 K: ethanol constant; 0.5111

표 3.5-21 전처리 조건에 따른 BTER 결과

Temp. [°C]	NaOH [M]	Flow rate [mL/min]	NaOH [g/min]	Ethanol [g/L]	BTER [%]
50.0	0.4	96	1.54	19.44	57.37
62.5	0.2	84	0.67	12.10	43.99
62.5	0.2	108	0.86	16.33	55.25
62.5	0.6	84	2.02	22.39	59.82
62.5	0.6	108	2.59	24.24	60.36
75.0	0.0	96	0.00	9.68	37.19
75.0	0.4	72	1.15	23.30	71.17
75.0	0.4	96	1.54	23.94	68.41
75.0	0.4	120	1.92	25.46	68.22
75.0	0.8	96	3.07	29.06	64.23
87.5	0.2	84	0.67	17.91	60.31
87.5	0.2	108	0.86	19.59	65.74
87.5	0.6	84	2.02	27.62	70.38
87.5	0.6	108	2.59	27.99	66.80
100.0	0.4	96	1.54	24.52	69.17

□ 위 결과를 바탕으로 중심합성법에 의한 표면분석을 실시하였다. 분석결과는 표 3.5-22에 나타내었다.

표 3.5-22 BTER의 ANOVA 결과

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F
Model	1230.182	9	136.687	6.4581	0.0269
A-Temp.	283.9896	1	283.990	13.4178	0.0145
B-NaOH	463.9789	1	463.979	21.9218	0.0054
C-flow	3.743537	1	3.744	0.1769	0.6915
AB	12.03185	1	12.032	0.5685	0.4848
AC	12.34596	1	12.346	0.5833	0.4795
BC	48.6468	1	48.647	2.2984	0.1899

A ²	10.80859	1	10.809	0.5107	0.5068
B ²	188.753	1	188.753	8.9181	0.0306
C ²	4.245513	1	4.246	0.2006	0.6730
Residual	105.8259	5	21.165		
Cor Total	1336.008	14			

R²=0.9208; adj. R²=0.7782; d.f.=degree of freedom.

□ 분석 결과를 살펴보면 전체 Model의 P-value 값이 <0.0269로 나타나 분석이 잘되었음을 보여주고 있다. 그리고 BTER 값에 가장 큰 영향을 주는 변수는 P-value 값이 가장 낮은 NaOH 농도(0.0054)로 나타났고 그 뒤를 이어 반응온도의 P-value 값이 0.0145로 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 분석결과를 바탕으로 최종적인 BTER의 값은 다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

$$\text{BTER} = 66.02 + 4.21A + 5.39B + 0.48C - 1.23AB - 1.24AC - 2.47BC - 0.99A^2 - 4.13B^2 + 0.62C^2$$

(A: Temp. ; B: NaOH conc. ; C: flow rate)

□ 위 식에 의하여 가장 높은 BTER 값을 탐색하여보았다. R-square 값은 0.9208이고 adj. R-square 값은 0.7782로 매우 잘 모사함을 알 수 있다. 그림 3.5-56은 이 식을 시각화하기 위해 나타낸 그래프이다.

□ 탐색된 최적 전처리 조건을 바탕으로 재현성을 확인실험을 수행하였다. 실험방법은 반응 온도 87.5 °C, NaOH 용액 농도 0.6 M, 전처리 용액 투입량 84 ml/min, 바이오매스 투입량 12 g/min, 스크류 회전속도 100 rpm으로 전처리하였고 동시당화발효실험은 앞 실험과 동일하게 실시하였다. 실험의 정확도를 높이기 위하여 CHEMET 반응기를 6시간 동안 운전하여 얻은 바이오매스를 이용하였다. 그 결과는 표 3.5-23에 나타내었다. 최적조건에서 계산된 BTER 값은 73.12% 이었고 계산된 조건에서 최적조건의 재현성을 탐색해 본 결과 BTER 값은 72.55%로 매우 유사한 결과를 나타냈다. 이는 실험의 신빙성을 반증해준 결과라 할 수 있다.

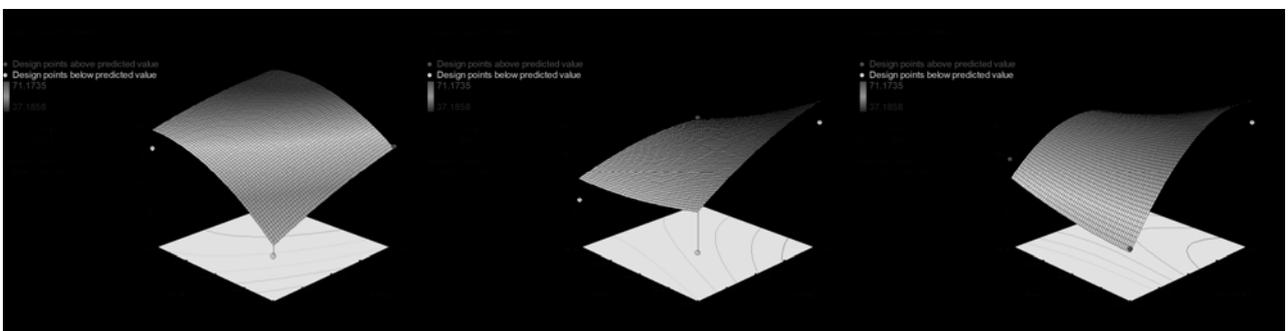


그림 3.5-56. 실험 변수의 효과에 대한 3차원 그래프

표 3.5-23. 최적 전처리 조건 및 재현성 결과

변수	값
Temp. [°C]	87.5
NaOH conc. [M]	0.6
Flow rate [ml/min]	84
BTER [%] (계산 값)	73.12
BTER [%] (실험 값)	72.55

(3) CHEMET를 이용한 바이오에탄올 생산

- 지금까지 BTER를 통하여 최적의 전처리 조건을 분석하였다. 그러나 보다 효율적이고 경제적인 공정을 위해서는 당화효소 사용량을 최소화 하고 가능한 고농도의 전처리 바이오매스를 투입하여 에탄올을 발효를 진행하여야만 발효 후 증류공정에서의 비용을 줄여야 한다. 이를 위해 본 연구에서는 효소 투입량 및 바이오매스 농도에 따른 에탄올 생산성을 탐색하여보았다. 효소 투입량에 따른 에탄올 생산성을 알아보기 위해서는 먼저 바이오매스 농도를 10%로 하여 효소 농도를 5~40 FPU/g cellulose 를 투입하여 동시당화 발효를 통해 가장 효율적인 효소 투입량을 분석하였다. 또한 이를 바탕으로 고농도의 에탄올 생산을 위해 바이오매스 농도를 1~30%로 하여 동시 당화 발효를 진행 하였다. 동시당화 발효공정은 앞에서 설명한 방법과 동일하게 실시하였다.
- 먼저 효소농도에 따른 에탄올 생산량의 결과(그림 3.5-57, 표 3.5-24)를 살펴보면 효소 투입량이 많을수록 당으로 많이 전환되어 에탄올 농도 또한 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 효소 투입량이 높아질수록 에탄올 생산량의 증가 폭은 감소하는 것으로 나타났다. 즉 효소 투입량 30 FPU/g cellulose 까지 에탄올 생산량이 증가 하였으나 그 이상에서는 거의 증가 하지 않았다. 또한 에탄올 전환율 역시 동일한 경향을 보여 주었다. 이는 당화 효소투입량이 높을 지라도 에탄올 생산에는 한계가 있음을 보여주고 있다. 본 연구에서는 가장 합리적인 당화효소 투입량 30 FPU/g cellulose 정도가 적정 수준이라 할 수 있다.

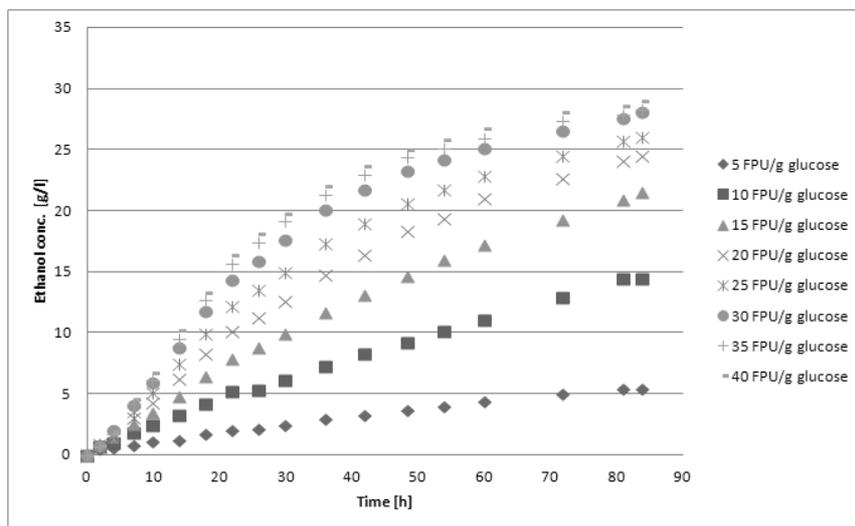


그림 3.5-57. 효소 투입량에 따른 에탄올 생산량 변화

표 3.5-24 효소투입량에 따른 에탄올 생산량 및 수율 변화

Enzyme dosage [FPU/g cellulose]	Ethanol [g/l]	Ethanol yield [%]
5	5.44	11.17
10	14.49	42.76
15	21.50	67.18
20	24.54	77.59
25	26.08	82.70
30	28.05	89.35
35	28.26	89.76
40	28.97	91.95

□ 이 결과를 바탕으로 바이오매스 농도에 따라 에탄올 생산량을 알아보았다(그림 3.5-58, 표 3.5-25). 바이오매스 농도가 증가 할수록 에탄올 생산량은 증가하였다. 그러나 바이오매스 농도가 20% 이상 에서는 에탄올 발효가 매우 느리게 진행되었으며 농도가 높아질 수록 진행 속도는 더욱도 느리게 나타났으며 26% 이상부터는 거의 발효가 진행되지 않았다. 또한 에탄올 수율을 살펴보면 바이오매스 1%에서는 36.57%로 매우 낮게 나타났다. 이는 바이오매스의 농도가 너무 낮아 발효가 제대로 진행되지 않은 것으로 사료된다. 그러나 5%에서 20% 까지는 에탄올 수율이 80% 전 후로 나타나 발효가 잘 진행되었음을 알 수 있었다. 또한 바이오매스농도 20% 초과부터는 에탄올 생산량뿐만 아니라 에탄올 수율이 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이는 바이오매스의 농도가 높아 당화효소가 활동할 수 있는 수분을 모두 흡수하여 효소가 활성을 잃어버렸기 때문인 것으로 판단된다. 즉 일반적인 당화 발효 장치를 통해서는 바이오매스 농도를 20%이상 증가시키기는 어렵다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 고농도 에탄올을 생산하기 위해서는 고농도 바이오매스를 투입하여 당화발효를 진행하기 위해서는 또 다른 바이오매스 투입장치가 필요하다. 이에 (주)창해에탄올 에서는 고농도 바이오매스를 투입하여 고농도 당화액 제조 장치를 제작하였으며 이 반응기에 대해서는 다음 절에서 설명하도록 하겠다.

표 3.5-25 바이오매스 투입량에 따른 에탄올 생산량 및 수율 변화

Biomass dosage [%]	Ethanol [g/l]	Ethanol yield [%]
1	3.07	36.57
5	14.32	86.51
10	28.41	92.88
15	40.32	89.87
20	46.00	77.36
23	30.12	42.89
26	13.25	15.03
28	10.95	11.05

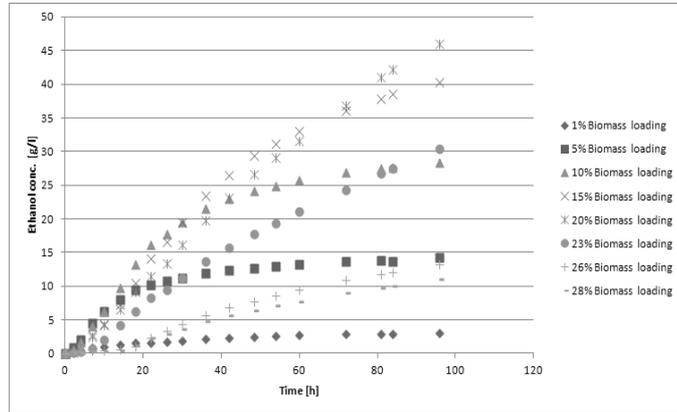


그림 3.5-58. 바이오매스 농도에 따른 에탄올 생산량 변화

□ 지금까지 실험한 내용을 물질수지를 이용하여 정리해보았다. 그림 3.5-59 보릿짚을 이용하여 동시당화발효 공정으로 바이오에탄올을 생산한 물질 수지 이다.

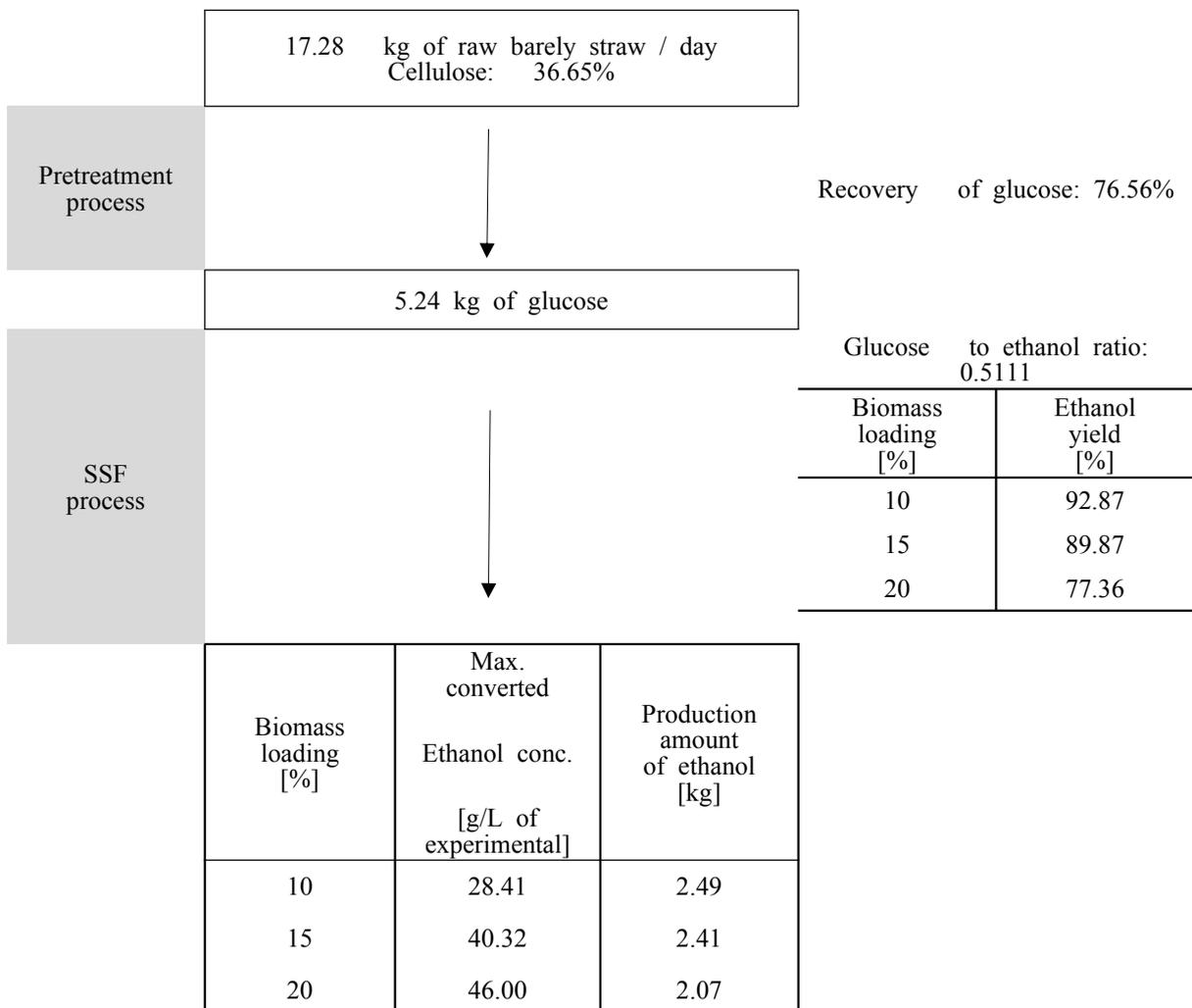


그림 3.5-59 보릿짚으로부터 동시당화발효 공정을 이용한 에탄올 생산의 물질수지

나. 연속식 당화장치 개조 및 운전

(1) 연속식 당화장치 개조

□ 선행연구를 통하여 5L 급으로 제작된 당화조는 1차 반응기 하단으로 피스톤에 의해 바이오매스가 투입되도록 하였다. 바이오매스가 하단으로 투입되어 일정시간동안 체류하여 효소가수분해가 이루어지고 그 후 2차 당화조로 높이에 따른 차이로 이송된다. 그 결과 글루코스 농도 120 g/L의 당화액을 시간당 15 ml을 제조 하였다. 그러나 바이오매스 투입이 피스톤 펌프에 의해 이루어지기 때문에 일정량이 투입되지 않았으며 1차 반응기에서 2차 당화조로 이송 시 당화액의 점도가 높아 막힘 현상이 발생하였다. 이를 해결하기 위해 바이오매스 투입을 스크류 투입장치로 개조하였고 1차 반응기에서 2차 반응기로 이송은 펌프를 이용하도록 개조 하였다. 그림 3.5-60은 당화장치 개조 전 과 개조 후의 모습이다.

개조 전



개조 후



그림 3.5-60. 바이오매스 연속투입 당화장치 개조 전·후 사진

□ 초기 1차 당화조에 증류수를 pH 센서가 보호될 정도로 채운 뒤 바이오매스 투입을 시작 하였다. 바이오매스 투입은 40 w/v% 고형물 비율로 하여 시간당 225 g이 투입되도록 하였다. 바이오매스 비율에 맞춰 당화 효소 30 FPU/g cellulose로 하여 첨가하였다. 1N-황산을 이용하여 pH 5.0으로 조절하였다. 실험 결과는 그림 3.5-61에 나타내었다.

□ 초기 1단 당화조에서는 급격히 당화가 일어났다. 그러나 당화액의 당 농도가 80 g/L 이상에서는 당 농도 증가 속도가 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 이는 당 농도가 증가함에 따라 당화효소가 기질의 저해를 받기 때문인 것으로 사료된다. 그 후 당 농도는 서서히 135 g/L 증가 하였으나 그 이후에는 매우 미비하게 증가 하였다. 최종적으로 1, 2차 당화조 모두 150 g/L 까지 증가하였으나 그 이후에는 거의 증가하지 않았다. 이때의 당 화율은 84.1%를 나타내었다.

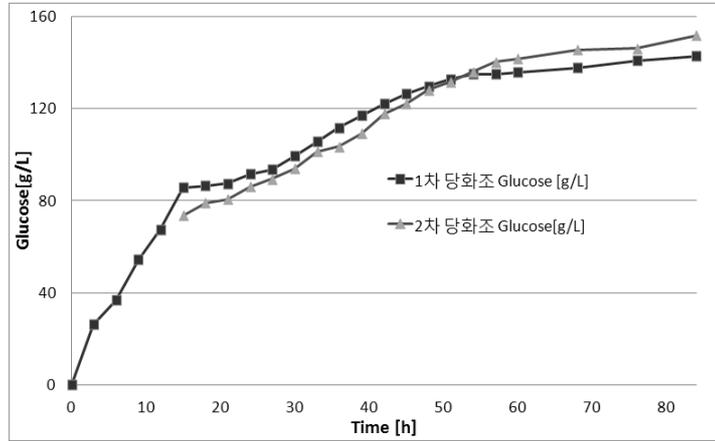


그림 3.5-61. 2단당화조를 이용한 당화액 제조 결과

- 실험결과 기존 당화조보다 1.25배 높은 당 함량을 얻을 수 있었으며 당화액 생산에 있어서 시간당 15 ml 에서 200 ml 이상으로 증진하였다. 이는 차 후 증류 공정에 있어서 당화액의 당농도를 높여 발효 후 에탄올 농도가 높아짐에 따라 증류비용이 절감되는 것을 감안하면 매우 효과적인 성과라 할 수 있다.

다. 유기용매 회수 및 재이용

(1) 유기용매 회수

- 전처리 용액을 재사용하여 경제성을 높이고 폐수처리량을 줄여 친환경적인 공정을 위해서 선행연구에서 중공사막 (분자량 10K (0.005 μ m) 와 150K (0.03 μ m))을 이용하여 NaOH 회수 하였다. 본 연구에서는 보다 더 다양한 크기의 필터를 이용하여 전처리 폐수에서 NaOH를 회수하여 보았다. 그림 3.5-62는 NaOH 회수를 위해 제작한 필터링 공정이다.



MF & UF 필터링 시스템



NF 필터링 시스템

그림 3.5-62. NaOH 회수 장치

- 실험은 먼저 MF & UF 필터링 시스템에서 1차 여과 한 뒤 NF 필터링 시스템에서 2차 여과를 하였다. 사용된 전처리 폐액은 1.5 M NaOH 용액으로 전처리한 후에 수집된 것이다. 실험 결과는 표 3.5-26에 나타내었다.

표 3.5-26 전처리 여과액의 NaOH 농도변화 및 고형물 함량변화

전처리 용액: NaOH 1.5M	NaOH농도 [M]	고형물함량 [%]
착즙액	1.28	16.68
착즙액 MF 50% 농축액	1.22	16.81
착즙액 MF 여과액	1.08	14.43
착즙액 UF 50% 농축액 (0.5 bar)	1.18	17.57
착즙액 UF 여과수 (0.5 bar)	1.05	13.33
착즙액NF여과수	0.98	10.89

□ 실험결과 전처리 후 NaOH의 농도는 1.5 M에서 1.28 M로 줄어 약 15% 감소한 것으로 나타났다. 이는 전처리 반응에서 바이오매스와 NaOH가 결합하여 고형물과 함께 제거되기 때문으로 판단된다. 또한 공극크기가 감소됨에 따라 NaOH의 농도도 줄어드는 것으로 나타났다. 이와 더불어 고형물의 함량 또한 16.68%에서 10.89%로 줄어드는 것으로 나타났다.

(2) 유기용매 재사용

□ 전처리 용액의 재사용 가능성을 알아보기 위하여 역새를 이용하여 전처리를 실시하였다. 역새의 전처리 조건은 선행연구에서 얻은 1.5 M NaOH 전처리용액, 반응온도 150 °C, 반응시간 30 min으로 하였다. 바이오매스 3 kg을 투입하고 전처리 용액 15L를 첨가하여 회분식으로 전처리를 실시하였다. 1차 전처리 후 유압 프레스를 이용하여 고형물과 액상을 분리 하였다. 초기 전처리 용액은 15L를 사용하였으나 고액분리 후에는 10 L가 얻어졌다. 2차 전처리는 바이오매스 3 kg에 1차 전처리 후 얻어진 10L 전처리 용액과 5L NaOH 용액을 첨가하여 최종 농도가 1.5 M이 되도록 하여 1차 전처리와 동일한 조건에서 전처리를 실시하였다. 동일 방법으로 계속해서 전처리를 실시하여 전처리 용액의 재사용 가능성을 탐색하였다. 전처리 후 성분분석 결과는 표 3.5-27에 나타내었다. 실험결과 전처리 용액의 사용 빈도가 높아짐에 따라 글루코스의 함량은 낮아지고 자일로스의 함량과 리그닌은 높아지는 것으로 나타났다. 이는 전처리 반응에서 바이오매스로부터 용출된 리그닌 및 여러 가지 불순물의 농도가 증가하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 6차 까지 재사용하였음에도 불구하고 1차 글루코스 대비 85%의 효율을 보여주었다. 이는 NaOH의 재사용 가능성이 매우 높음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

표 3.5-27 재사용 회수에 따른 성분분석 결과

#	Glucose [%]	Xylose [%]	리그닌 [%]
1	74.05	11.53	9.49
2	70.63	16.96	9.98
3	64.06	19.09	11.38
4	62.95	20.52	11.87
5	63.76	21.77	12.15
6	62.47	23.93	13.04
Raw 역새	43.53	19.05	22.68

- 또한 전처리 후 에탄올 생산성을 알아보았다. 실험 조건은 바이오매스 농도를 22%로 하여 당화효소 50 FPU/g cellulose를 첨가하여 동시당화발효 공정으로 33 °C에서 120 rpm으로 72시간동안 진행하였다. 실험결과는 표 3.5-28에 나타내었다.

표 3.5-28. NaOH 재사용 횟수에 따른 에탄올 생산 농도 및 발효비율

NaOH 재사용 횟수	FPU [g/cellulose]	바이오 농도[%]	최종에탄올 농도 [g/L]	발효비율 [%]
1	50	22.00	65.76	78.98
2			59.77	75.26
3			56.42	78.32
4			52.72	74.48
5			48.51	67.67
6			51.15	72.82

- 실험결과를 살펴보면 전처리 용액의 재사용 빈도가 높아질수록 최종 에탄올의 농도는 감소하는 경향을 보이고 있다. 그러나 발효비율을 살펴보면 4회까지는 75% 정도의 효율을 보이고 있다. 이는 당화율과 에탄올 전환 비율을 고려해 보면 매우 효율적인 결과라 할 수 있다. 즉 NaOH를 이용한 전처리 공정에서 재사용의 가능성은 매우 높게 나타났다고 할 수 있다. 더불어 앞선 NaOH 회수 공정을 이용하여 계속해서 재사용 한다면 매우 경제적인 바이오에탄올 생산 공정이 가능함 알 수 있다.

라. 결론

- 지금까지 바이오매스로부터 효율적인 에탄올 생산을 위해 전처리부터 발효까지의 결과를 알아보았다. (주)창해에탄올에서 제작한 전처리 반응기는 국내 최초로 제작된 연속식 반응기라는 점에서 의미가 있고 이는 대규모 바이오에탄올을 생산하여 상업화에 근접했음을 보여주는 결과라 할 수 있다. 더불어 고농도 에탄올을 생산하기 위해 제작된 당화장치인 고농도의 바이오매스를 투입하여 고농도의 당화액을 연속으로 생산 가능하다는 점에 이 또한 바이오에탄올 상업화에 접근했음을 보여주는 결과라 할 수 있다. 마지막으로 전처리 용액을 사용하고 그 폐액을 재사용 할 수 있도록 회수하는 공정 또한 생산 단가를 줄여 경제성을 높여 주었으며 폐수 발생량을 최소화 하여 친환경적인 바이오에탄올 생산의 가능성을 보여 주었다. 결론적으로 (주)창해에탄올에서 제작한 연속식 전처리 반응기 및 당화장치 그리고 전처리 용액 회수장치는 바이오에탄올 상업화가 머지않음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

5. 동시 당화발효 모듈 도입 및 통합공정 설비 시운전을 통한 개선

가. 동시당화발효 공정 개발

(1) 전처리 공정

- 선행연구에서 연속식 전처리 반응기인 CHEMET_10 (ChangHae Ethanol Multi ExTruder) (그림 3.5-63) 을 이용하여 바이오매스의 최적 전처리 조건을 탐색하였다. 주로 사용된 바이오매스는 보릿짚과 억새이다. 최적 전처리 조건 및 성분변화는 표 3.5-29에 나타내었으며 전처리 전 후의 성분변화는 표 3.5-30에 나타내었다.



그림 3.5-63. 연속식 전처리 장치 CHEMET_10

표 3.5-29 보릿짚 및 억새의 최적 전처리조건

변수	보릿짚	억새
Temp.[°C]	87.5	95
NaOH conc.[M]	0.6	0.4
Flow rate [ml/min]	84	120
Screw speed [rpm]	100 (고정)	80

- 보릿짚의 경우 실험변수를 3가지로 하여 스크류 속도는 100 rpm으로 고정하여 실험을 수행하였으며 전처리시 바이오매스는 12 g/min의 속도로 투입되었다. 한편 억새는 실험변수를 4가지로 수행하였으며 바이오매스 투입속도는 15 g/min 이었다. 보릿짚과 억새의 바이오매스 투입속도가 다른 것은 분쇄 후 바이오매스의 겉보기 비중차이 때문이다.

표 3.5-30. 전처리 전 후의 성분변화

Component	보릿짚 [%]		억새 [%]	
	전처리 전	전처리 후	전처리 전	전처리 후
Cellulose	35.65	60.29	43.00	57.70
Hemicellulose	16.86	20.55	14.69	17.69
Lignin	22.36	14.78	24.31	12.99

□ 위 조건에서 전처리된 바이오매스는 탈수 → 세척 → 탈수 과정을 거쳐 수분 60 ~ 70 %의 상태로 동시당화발효 공정에 사용되었다.

(2) 연속식 투입을 통한 동시당화발효

□ 선행연구에서 그림 3.5-64의 연속식 투입 동시당화발효 장치를 이용하여 보릿짚으로부터 150 g/L의 당화액을 생산하여 84.1%의 당화율을 얻어냈다.



그림 3.5-64. 연속식 투입 동시당화발효 장치

□ 위 연속식 공급장치를 이용하여 전처리된 바이오매스를 100 g/h의 속도로 투입하였다. 이때 바이오매스의 수분 농도는 60%로 전처리 후 탈수된 바이오매스를 바로 이용하였다. 반응기 특성상 pH를 정확히 측정하기 위해서 1.5 L의 증류수를 투입하였다. 그 후 바이오매스를 투입하면서 황산(0.5M)을 이용하여 pH를 5.0로 조절하였다. 또한 당화효소인 Cellic® CTec II 와 Cellic® HTec II 를 4:1의 비율로 혼합한 뒤 30 FPU/g cellulose 가 되도록 투입하였다. 또한 동시당화발효를 위해 YPD배지에서 자란 효모를 150 ml를 투입하여 최종적으로 바이오매스의 농도가 25%가 되도록 조절하였다. 아래 그림 3.5-65은 연속식 동시당화발효 공정의 흐름을 나타내었다.

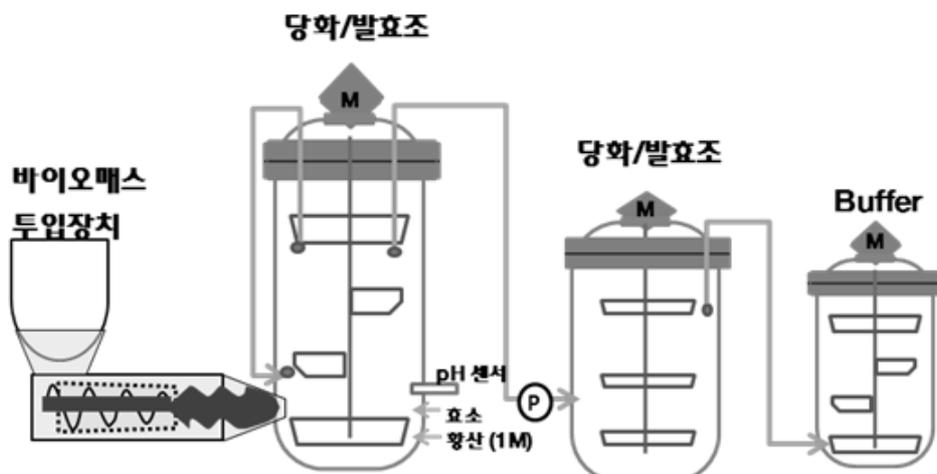


그림 3.5-65. 연속식 동시당화발효 공정

- 위 공정을 이용하여 보릿짚 및 역새를 이용하여 동시당화발효를 수행하였다.

(가) 보릿짚을 이용한 연속식 동시당화발효

- 보릿짚을 이용하여 동시당화발효 실험을 수행하였다. 그림 3.5-66은 연속식 동시당화발효 실험결과와 회분식 발효 실험결과를 비교한 그래프이다. 에탄올 생산그래프를 보면 초기에는 서서히 증가하다 10시간 이후 급격히 증가하는 것을 알 수 있다. 그러나 30시간 이후에는 바이오매스가 투입되어 효소에 의해 당으로 전환되는 양과 에탄올로 전환되는 양이 거의 평형을 이루고 있음을 알 수 있다. 그래서 32시간에서 2번 발효조로 이송을 시작하였다. 2번 발효조의 경우 60시간까지는 서서히 에탄올 농도가 증가되다 그 이후에는 평형상태를 이루고 있음을 알 수다.
- 결론적으로 1차 발효조는 40시간 이후 65 g/L의 에탄올 농도를 계속해서 유지하고 있고 2차 발효조는 60시간 이후 77 g/L의 에탄올 농도를 보이고 있다. 회분식 결과는 바이오매스의 농도가 20%일 때 100시간 발효하여 45 g/L의 에탄올 농도를 보이고 있다. 이 결과를 비교해 보면 연속식 동시당화발효가 회분식 동시당화발효 공정에 비해(에탄올 농도 1.7배 상승, 발효시간 40시간 단축) 매우 효율적임을 알 수 있다.

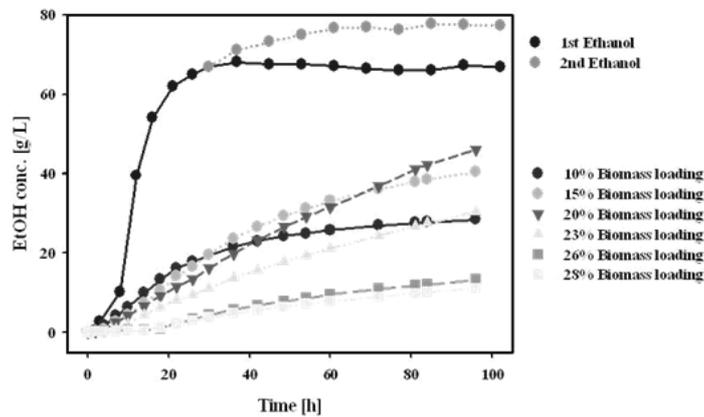


그림 3.5-66. 보릿짚을 이용한 연속식 동시당화발효

(나) 억새를 이용한 연속식 동시당화발효

- 보릿짚과 동일한 조건으로 억새를 이용하여 연속식으로 동시당화발효 실험을 수행하였다. 그 결과는 그림 3.5-67와 같다.

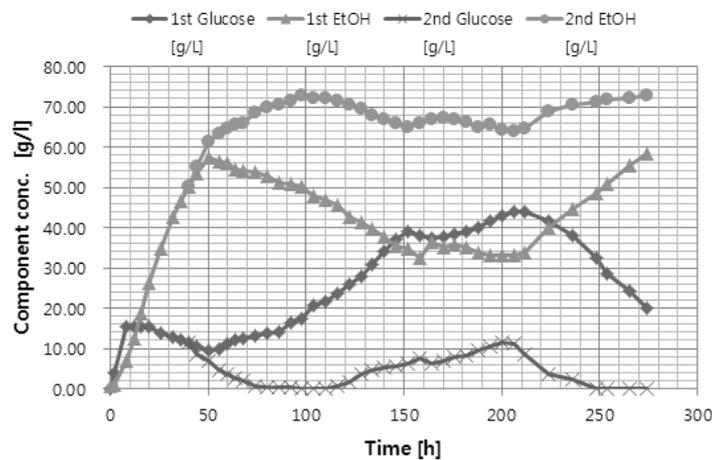


그림 3.5-67. 억새를 이용한 연속식 동시당화발효

- 초기에는 글루코스 및 에탄올 농도가 증가하였다. 글루코스의 증가는 효소 보관액으로 기인한 것과 바이오매스가 투입됨에 따라 당화효소에 의해 당으로 전환되었기 때문이다. 에탄올의 증가는 글루코스의 증가에 따라 병행하여 증가한 것으로 보인다. 그러나 8시간 이후부터 20시간 까지 글루코스의 평형상태가 되었다. 즉 바이오매스가 투입되는 속도보다 당화효소의 기작이 빠르다는 것을 의미한다.
- 그 동안 효모는 적응기를 거쳐 20시간 이후에는 빠르게 글루코스를 소비하여 에탄올을 생산하기 시작하여 당화 속도보다 에탄올 생산속도가 더욱 빨라진 것을 알 수 있었다. 50시간이 되었을 때 1번 반응기에서 2번 반응기로 이송하기 시작하였다. 이송은 1번 반응기 상단에서 2번 반응기 하단으로 하였다. 2번 반응기는 단순히 체류시간을 증가하기 위해 사용되었다. 50시간 이후 1번 반응기의 글루코스 농도는 증가하기 시작하였으며 에탄올 농도는 점차적으로 감소하였다.
- 이와 대조적으로 120시간까지 2번 반응기는 1번 반응기로부터 이송된 글루코스를 모두 소비하여 에탄올로 전환시켰다. 그러나 120시간 이후에는 2번 반응기 역시 글루코스가 증가하면서 에탄올 농도 또한 감소하기 시작하였다. 이 현상의 원인은 효모의 유실 때문이라 추정되어 152시간부터 바이오매스 투입량을 70%로 감소시켰다. 그 후 글루코스의 농도가 감소하는 경향을 보이다 잠시 후 증가하였다. 효모의 유실만이 원인 이었다라면 투입량을 감소 시켰을 때 어느 정도 평형상태가 나타나 주었어야 하나 그 시간이 매우 짧았던 것을 보면 효모의 유실뿐만 아니라 다른 이유가 있는 듯하다.
- 따라서 206시간부터는 투입을 중지하고 글루코스과 에탄올의 추이를 지켜보았다. 투입 중지 후 글루코스의 농도는 감소하고 에탄올 농도는 증가하였다. 그러나 반응 초기와 비교해보면 그 속도는 매우 느리게 나타났다. 아래 그림 3.5-68에서 비 성장 속도를 알아보았다. 반응초기는 1.14였지만 투입 중지 후에는 0.336으로 약 1/3로 감소하였다. 이는 효모가 유실되었거나 영양원 부족으로 인해 활성이 약해진 것으로 사료되었다. 이를 검증하기 위해 활성이 저해된 발효액 500 ml에 표 3.5-31과 같은 영양원을 투입하고 추이를 지켜보았다.

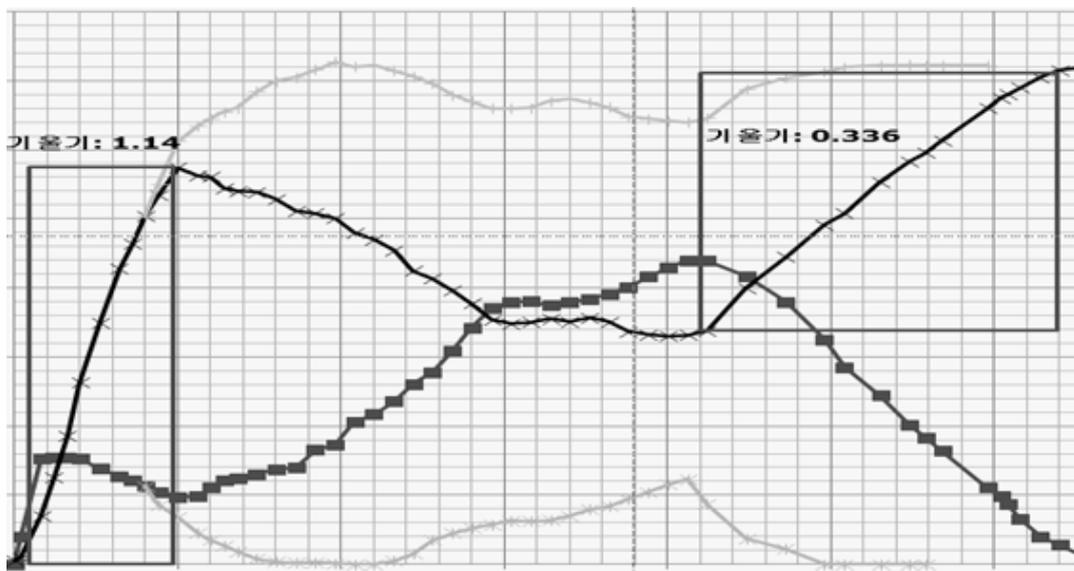


그림 3.5-68. 효모의 상대적 비성장속도

표 3.5-31 활성이 저해된 발효액에 투입된 영양원

구 분	영양원
1	YPD 50ml
2	YPD 20ml + 증류수 30ml
3	YP 50ml
4	증류수 50ml

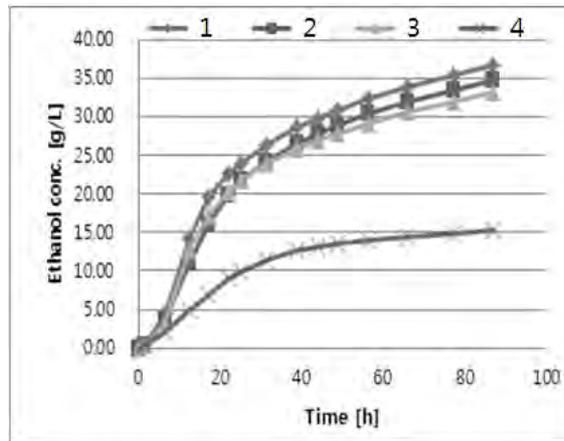


그림 3.5-69. 영양원에 따른 에탄올 생산성 추이

- 영양원을 첨가한 후 에탄올 생산 변화는 그림 3.5-69에 나타내었다. 실험결과를 살펴보면 1번 실험구가 가장 빠르고 많은 양의 에탄올을 생산하였다. 2번과 3번의 경우를 비교해 보면 초반에는 3번 실험구가 빨랐으나 후반에는 2번 실험구의 발효 속도가 더 빠르게 진행되었다. 이는 3번 실험구에는 초기 효모가 일부 투입되어 효모 개체 수 증가로 인하여 발효가 빠르게 진행되었으나 나중에는 영양원이 더 많이 투입된 2번 실험구가 더 발효가 원활 하게 진행되었기 때문으로 사료된다.
- 그러나 4번의 경우 발효 속도도 매우 느리고 에탄올 생산량도 매우 낮게 나타냈다. 이를 검증하기 위해 기존 연속식 동시 당화발효와 비교(그림 3.5-70)하였다. 왼쪽의 경우 영양 원 1, 2, 3 이고 오른쪽은 4번이다.

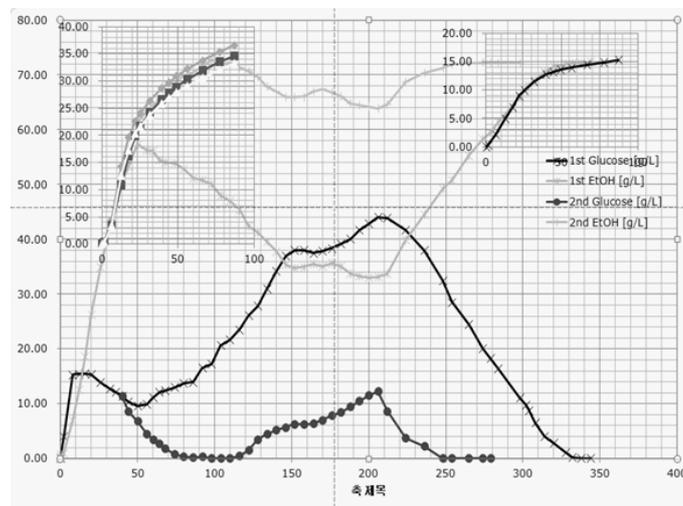


그림 3.5-70. 에탄올 생산 곡선 비교

- 본 비교는 상대적이다. 연속식 동시당화발효 초기속도와 실험구 1, 2, 3의 속도는 거의 비슷하게 나타났으며 연속식 동시당화발효 후반 발효 속도와 실험구 4번과 거의 동일하게 나타났다. 이는 영양원 부족으로 인한 현상임을 반증해 주는 결과라 할 수 있다.
- 연속식 배양 공정은 배양조건을 항상 일정한 정상상태로 유지할 수 있는 장점이 있기 때문에 적은노동력으로 높은 생산성을 유지할 수 있는 장점이 있지만, 다른 균주의 오염 및 균주 변이에 취약하다. 안정적인 연속식 공정을 위해서는 균주 성장에 필요한 미량 성분 및 균체의 유실 등의 관리가 필요하며, 생성물농도 및 배양액 조건에 따라서 최대 성장 및 발효조건이 다른 균주는 적절한 조건을 관리하기 위하여 다단계 배양조가 필요하다.
- 또한 연속식 배양공정중에 반복유가식 배양은 일정량의 균주 성장 및 발효가 완료된 배지를 남겨 균주의 성장과 발효 단계를 구분하여 운전할 수 있는 장점이 있어서 완전 연속식 공정적용이 어려울 경우 많이 사용되고 있다. 하지만, 영양원의 사용은 상용화급 공정계획을 수립할 때 부원료비용이 많이 소요되기 때문에 저가의 영양원별과 농도별 실험이 필요하다.

(다) 역새를 이용한 연속식 반복유가식 동시당화발효

- 연속식 동시당화의 역새의 경우 현재 효모의 유실 및 활성저해 등이 문제가 되어 실제 공정에 적용이 어려울 것으로 사료된다. 이에 반복유가식 동시당화 발효 공정(그림 3.5-71)을 실시하였다.

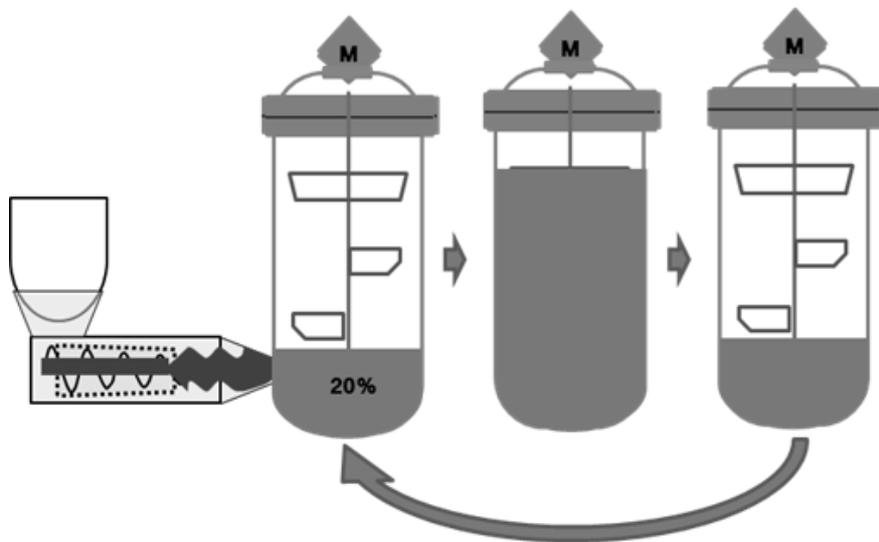


그림 3.5-71. 반복유가식 동시당화발효 공정 구상도

- 초기 공정은 연속식 동시당화발효 공정과 동일하게 실시하였다. 1번 반응기를 채우고 나서 20%를 남기고 2번 반응조로 이송하였다. 이 과정을 5회 반복하였다. 실험결과(그림 3.5-70)는 다음과 같다. 1회 때는 초기 pH 조절을 위해 1.5L의 증류수를 채우고 시작하여 초기 글루코스와 에탄올의 농도(주모 제외)는 0g/L 이었다. 36시간 동안 1번 반응기에서 반응시킨 뒤 20% 남기고 2번 반응기로 이송하였다. 이때 1번 반응기의 글루코스와 에탄올의 농도는 13.93, 42.65 g/L 이었다. 이송 후 영양원을 첨가하였다. 영양원 조성은 Urea-0.5 g/L, K₂HPO₄-1 g/L, MgSO₄ 7H₂O-0.05 g/L로 최소 영양원을 공급하였다.

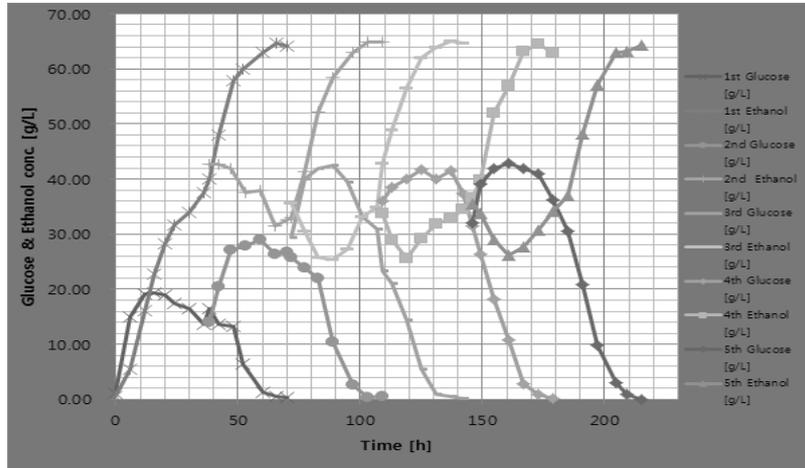


그림 3.5-72. 연속식 동시당화발효 공정결과

□ 이 후 50시간까지 글루코스는 약 30 g/L 까지 증가하다 80시간 이후 급격히 감소하기 시작하였다. 72시간에서 2번 반응기 1회 발효액을 버퍼로 이송시킨 뒤 2회 1번 발효액을 2번 반응기로 이송하였다. 이때 1번 반응기의 글루코스과 에탄올의 농도는 29.31, 35.64 g/L 이었다. 이런 식 으로 반복하여 3회 때의 1번 반응기의 글루코스과 에탄올의 농도는 35.93, 33.72 g/L 이었다. 전 회차와 비교하여 글루코스 농도는 증가 하였고 에탄올의 농도는 감소하였다. 그러나 이 후에는 거의 동일하게 유지되었다. 2회 와 3회 때의 농도차이는 반응시작 시 증류수를 1.5L 투입한 뒤 시작하였기 때문인 것으로 사료 된다. 이로써 영양원을 투입해 주면 반복유가식 동시당화발효는 문제없이 진행됨을 알 수 있었으며 실제 공정에 적용이 가능함을 알 수 있었다.

나. 발효액에서 자일로스 회수

□ 에탄올 발효 후 발효액에는 다량의 자일로스가 혼합되어 있어서 에탄올 발효가 아닌 다른 물질발효에 사용가능한 C5계열 발효성당인 자일로스가 20 g/L정도 혼합되어 있다. 발효액을 3,500G에서 30분간 원심분리후 상등액을 원액으로 하여 UF여과 (Ultra Filtration), NF여과 (Nano Filtration), R/O 여과 (Revers Osmosis), 증발농축기(Evaporation)를 이용하여 농축하였다. 자일로스 회수 및 농축 실험결과는 표 3.5-32에 나타내었다.



그림 3.5-73. 여과 사진 (UF, NF, 여과액)

표 3.5-32 자일로스 회수 실험 결과

	UF	NF	R/O	Evaporation
원 액 (g/L)	20.378			
여 액 (g/L)	21.12	17.55	-	-
농축액 (g/L)	21.81	20.01	87.01	100.20

다. 효소 샘플 분석

□ 주관기관인 고려대에서 배양 및 농축한 효소 샘플을 제공 받아 NREL 표준 분석방법으로 효소를 분석하였으며, 당화효소의 분석만으로는 에탄올 및 당화공정 적용 가능성을 판단하기 어려우므로 바이오매스 농도 및 효소 역가별 당화실험 진행하였다. 효소 샘플은 배양액을 여과한 여과액과, 배양액 10L를 단백질 침전법으로 2L로 5배 농축한 농축액등 2구를 제공 받았으며, 고려대 분석 결과를 토대로 노보자임사 CTecII와 비교당화실험을 진행 하였다. 효소 샘플 분석 결과는 표 3.5-33에 나타내었으며, 발효실험 결과는 표 3.5-34에 나타내었다.

표 3.5-33 샘플 분석 결과

	희석비율	희석액 FPU/mL	최종 FPU/mL
Cellic® CTec 2	200	0.77	153.60
농축액	2	0.33	0.65
배양액(여과액)	1	0.29	0.29

□ 효소샘플 분석결과 효소역가가 낮아서 바이오매스농도를 5%이하에서 당화실험을 진행하였으며, 30 FPU에서 당화율은 큰 차이를 보이지 않았으나, 6.5 FPU(바이오매스 5%) 에서 당화율에 큰 차이를 보였다. 이는 효소 조성 영향이 큰 것으로 판단되기 때문에 효소 조성 분석이 필요하다고 판단되어진다.

표 3.5-34 비교당화실험 결과

	Biomass 3%, 30 FPU/g glucose			Biomass 5%, 6.5 FPU/g glucose		
	최종 pH	Glucose 농도 (g/L)	당화율(%)	최종 pH	Glucose 농도 (g/L)	당화율(%)
CTec 2	4.84	17.99	95.19	4.91	25.40	80.63
제공샘플 (농축액)	4.93	15.18	87.88	4.85	8.48	29.10

라. 바이오에탄올 생산 설비 개조 및 개발

(1) CHEMET_10 바이오매스 투입기

□ 선행연구를 통하여 CHEMET(ChangHae Ethanol Multi ExTruder)_10을 제작하였다. 그러나 바이오매스 투입에 있어서 바이오매스 보관통이 작아서 수시로 바이오매스를 투입해야 한다는 단점이 있었다. 또한 투입할 때 마다 무게를 측정하고 종료 후 남아 있는 무게를 측정하여 바이오매스 투입량을 계산하였다. 하지만, 잔류량이 일정하지 않아 시간당 투입된 바이오매스량 계산에 오차가 발생하여 바이오매스 톤당 생산량 계산에 오차 요인으로 작용하였다. 이러한 불편을 줄이기 위해 보관통을 확대하고 바이오매스 피더에 로드셀을 장착하여 투입된 바이오매스의 무게를 가시화 하였다. 아래 보이는 그림 3.5-74는 바이오매스 투입기 변경 전·후의 사진이다.

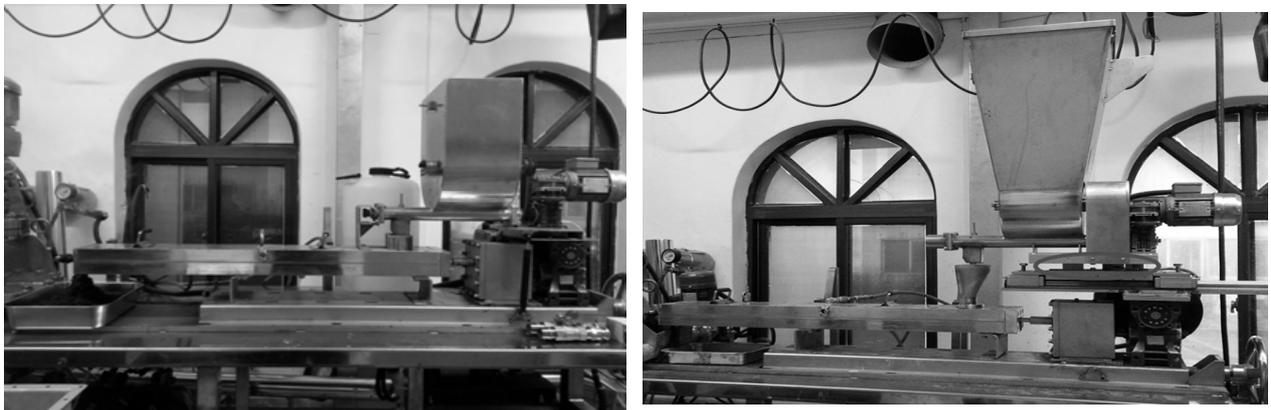


그림 3.5-74. CHEMET_10 호퍼 사진 (변경 전: 좌 개조 후: 우)

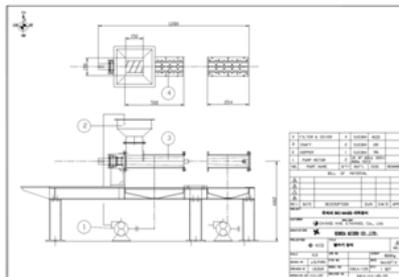
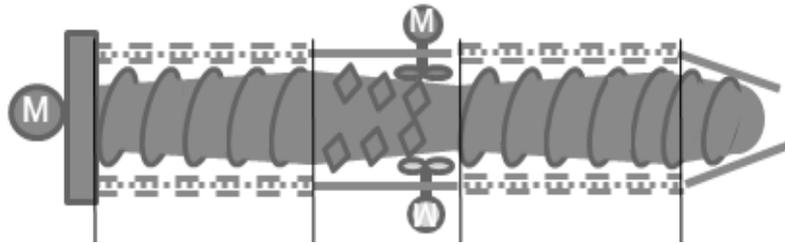
□ 개조 후 투입기 바이오매스 보관통(호퍼)은 20L에서 50L로 증가하였으며 아래 사진의 동그라미 부분이 로드셀이 장착된 모습이다.

(2) 고액분리, 세척, 탈수, 공급 장치 개발 및 이송 스크류 설치

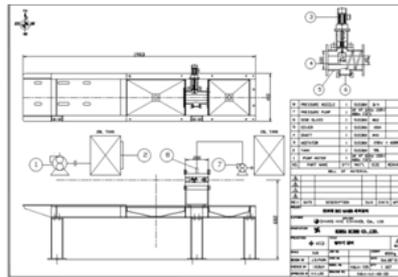
□ 연속식 전처리 반응기(CHEMET_10)를 이용하여 바이오매스를 알칼리방법으로 전처리한 후 다음 공정인 당화 및 발효에 이용하기 위해서는 세척 및 탈수 공정이 필요하다. 지금까지는 전처리된 바이오매스를 수집하여 스크류프레스를 이용하여 고액 분리 과정을 거친 후 고형물만을 수집하여 다시 세척수를 첨가하여 세척 후 다시 스크류프레스를 이용하여 탈수하였다. 이 경우 바이오매스를 다음공정에 이용하기까지 많은 시간과 노동력이 소모되어 대규모 공정에서는 적용이 곤란하다. 이에 더 효율적인 공정을 위해 전처리 후 탈수, 세척, 탈수, 공급을 빠르게 진행할 수 있는 세척, 탈수, 공급 장치(CHESAF, Chang Hae Ethanol Scant reAgent Feeder)_100을 개발하였다. ‘100’은 CHESAF의 스크류의 최대 직경을 의미한다.

□ CHESAF_100은 고액분리부, 세척부, 탈수부, 공급부의 4가지로 구성된다. CHEMET_10에서 배출된 전처리된 바이오매스는 다량의 전처리 용액을 함유하고 있어 고액분리부에서 고형물과 액상을 분리하여 세척부로 이송된다. 이송된 바이오매스는 세척부에서 세척한 뒤 다시 탈수부로 이송되어 바이오매스의 수분을 최소화한다. 최종적으로 배출되는 바이오매스의 수분은 60%로 여건에 따라 조절이 가능하다. 이 후 바이오매스는 당화·발효 공

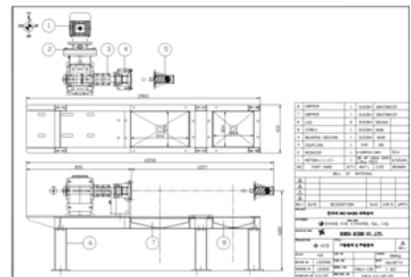
정에 사용된다. 위 모든 공정은 컴퓨터와 연계하여 조절이 가능하도록 하였다. 그림 3.5-75는 전처리 후 탈수, 세척, 탈수, 공급 설비 (CHESAF_100)의 개념도와 설계도면을 나타내었다. 그림 3.5-76은 CHESAF_100의 제작 중 모습과 전처리 후 폐용액 회수 및 재사용 공정에 적용이 가능하도록 하는 진공드럼필터 및 액세서리의 모습을 나타내었다.



탈수 설비

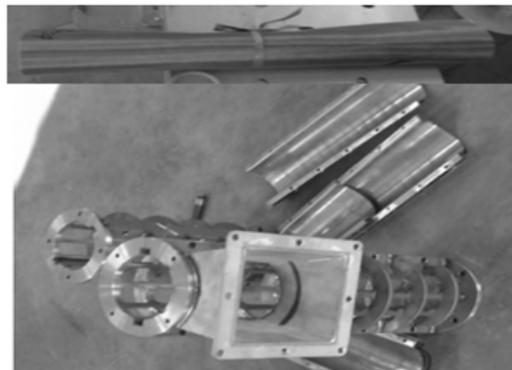


세척 설비

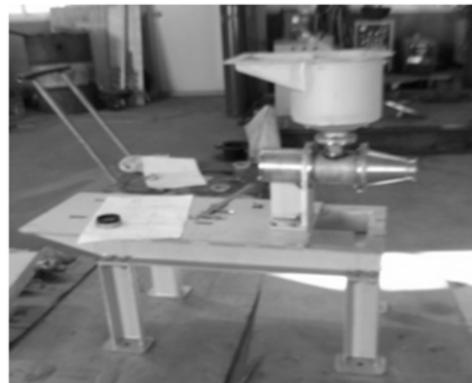


공급 설비

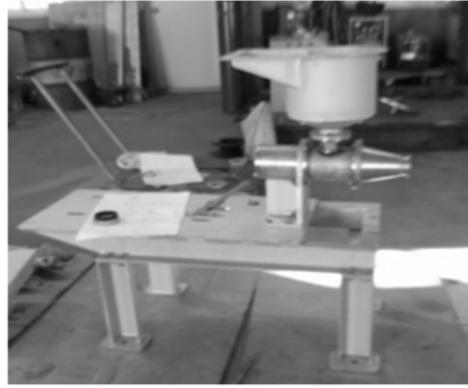
그림 3.5-75. CHESAF_100 개념도(상), 설계도면(하)



탈수설비 제작 중인 사진



세척설비 제작 중인 사진



공급설비 제작 중인 사진

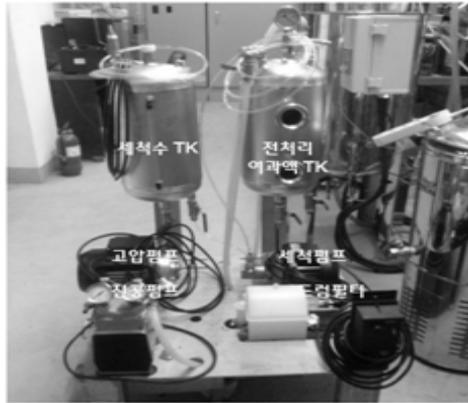


그림 3.5-76. 제작중인 설비 및 액세서리 사진

- 또한 전처리후 탈수, 세척, 탈수, 공급 설비 (CHESAF_100)의 설비는 제어장치를 이용하여 HMI(Human Machine Interface)를 설치하여 조작을 용이하게 하였다. 그림 3.5-77는 제어판넬 및 HMI 시스템 구성 화면이다.

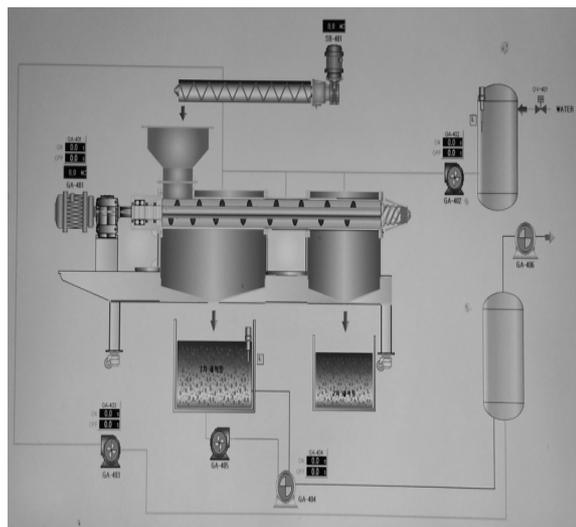
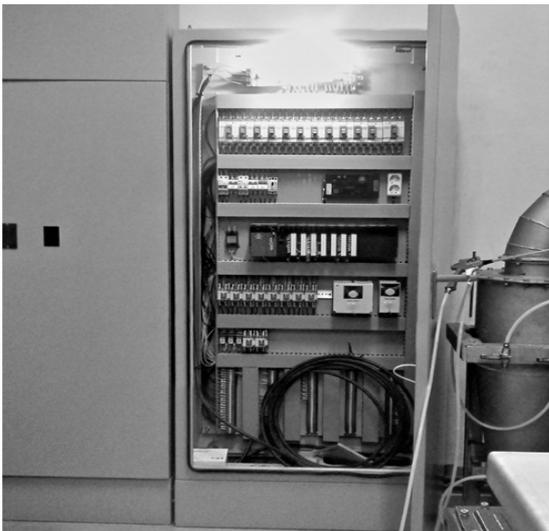


그림 3.5-77. 제어 판넬 및 HMI

- 한편, CHEMET_10에 의해 전처리된 바이오매스를 CHESAF_100으로 이송하기 위해서는 이송스크류가 필요하다. 전처리된 바이오매스가 직접 CHESAF_100의 호퍼로 투입되면 가장 이상적이나 여건상 이송 스크류가 필요하여 설치하였다. CHEMET_10과 CHESAF_100 사이의 이송 스크류 설치 모습은 그림 3.5-78에 나타내었다.

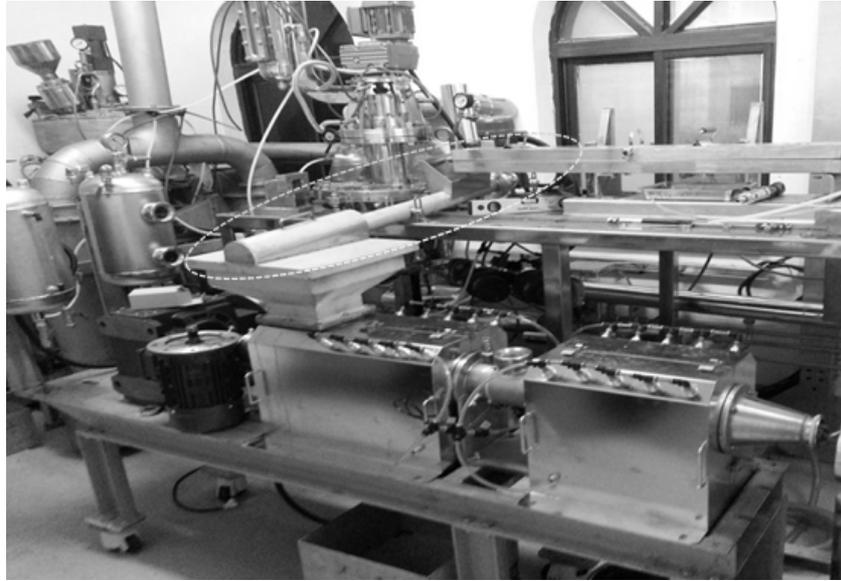
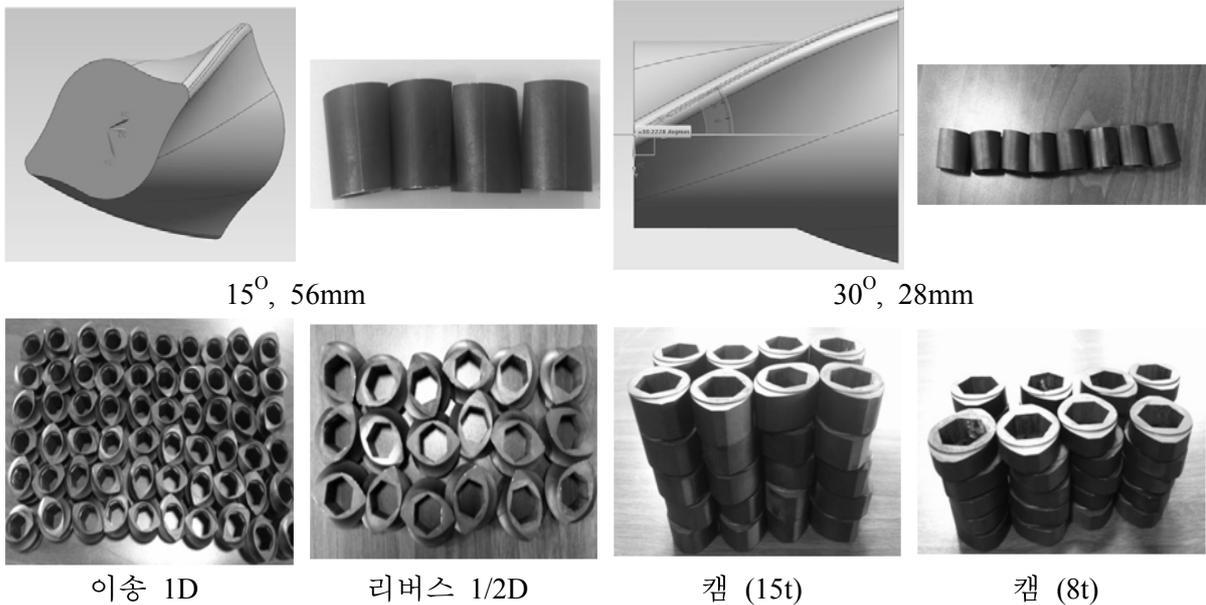


그림 3.5-78. CHEMET_10과 CHESAF_100 연계 사진

(3) 신규 스크류 제작

□ 기존에 연속식 전처리 반응기(CHEMET_10, Twin-screw Extruder)에 사용하는 트윈스크류는 강도 및 내화학성을 위하여 경질크롬도금을 사용하였다. 경질크롬도금은 높은 내마모, 윤회성, 내열성, 내식성, 이형성을 필요로 하는 곳에 사용되며, 장식성 및 내약품성을 요구하는 부품에 적용하지만 크롬도금은 소재의 표면 상태에 상당히 민감하게 석출되기 때문에 요철부위에는 도금이 적정 두께의 크롬도금의 균일전착성이 어려워 장기간 사용 시 스크류 끝단부위에서 도금이 벗겨지면서 스크류의 마모가 급속히 진행되었다.



15°, 56mm

30°, 28mm

이송 1D

리버스 1/2D

캠 (15t)

캠 (8t)

그림 3.5-79. 신규 스크류 제작 사진

□ 강도 및 내화학성이 요구되는 설비에 사용되는 염욕질화공정을 선정하여 신규 스크류를 제작하였다. 염욕질화는 강(steel), 주철(castiron), 그리고 소결재료(sintered ironmaterial)로 만

들어진 공작물의 피로강도 뿐만 아니라 마모와 부식에 대한 저항력을 키우기 위하여 사용되며, 염색질화법은 동등하거나 더 우수한 품질과 매우 우수한 경제성으로 인하여 케이스 하드닝(case hardening)과 크롬 도금(chrome plating)등의 다른 표면 처리과정에 대한 대안으로 많이 이용 되고 있다. 이외 이송스크류와 확산을 위한 캠의 장점을 모두 갖춘 터빈형 스크류를 신규제작 하였으며, 제작한 트윈스크류는 그림 3.5-79에 나타내었다.

(4) 바이오에탄올 통합공정 설비를 이용한 역새로부터의 바이오에탄올 생산

□ 그림 3.5-80은 바이오에탄올 통합공정의 사진과 HMI 화면 구성의 모습이다. 이 장치를 이용하여 역새로부터 바이오에탄올을 생산하였다. 그림 3.5-81는 역새로부터 바이오에탄올을 생산한 결과 그래프이다. 초기 글루코스와 에탄올 농도 모두 급격히 증가하는 경향을 보이고 있다. 그러나 30시간 이후 에탄올 생산속도가 정체되고 있음을 알 수 있다. 이는 효모가 바이오매스에 남아 있는 전처리 용매에 의해 저해를 받기 때문인 것으로 사료 된다. 이 후 적응기를 거친 효모는 다시 45시간 이후부터 급격히 에탄올을 생산하고 있음을 알 수 있었다. 더불어 글루코스 농도는 감소하는 모습을 보이고 있다. 자일로스 농도는 바이오매스 투입 농도와 거의 비례하여 증가하다 투입 완료 후 약간 더 증가하다 평형을 이루는 모습을 보이고 있다.

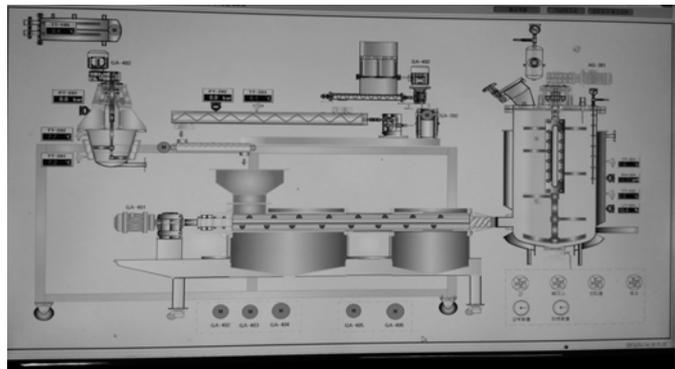
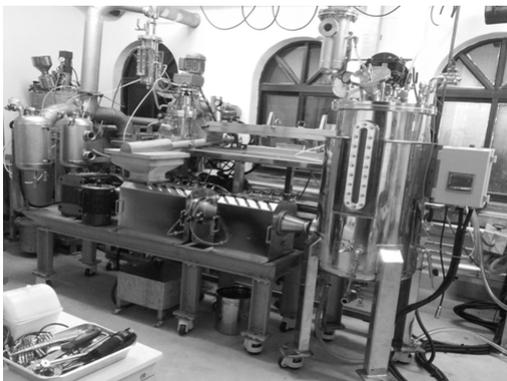


그림 3.5-80. 바이오에탄올 통합공정 설비 및 HMI 화면

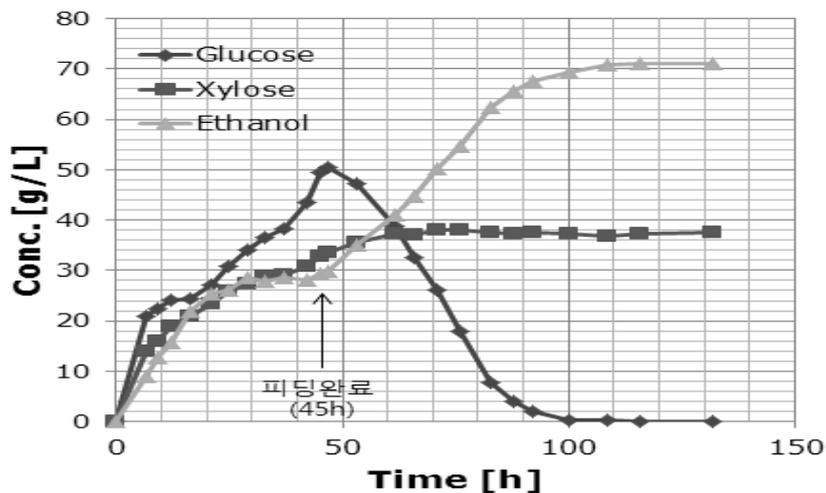


그림 3.5-81. 시간에 따른 글루코스, 자일로스, 에탄올 농도 변화

□ 또한 표 3.5-35는 억새로부터 생산된 바이오에탄올 결과를 나타내었다. 억새 21 kg(건조 중량기준)으로 65.5 g/L 에탄올을 51L 생산하였다. 이 때 최종 바이오매스의 농도는 25.2%였으며 에탄올 전환율은 85%였다. 이 결과는 바탕으로 억새 1 ton을 사용하여 바이오에탄올을 생산하면 200L 이상의 바이오에탄올 생산이 가능하다. 결론적으로 본 연구는 섬유질계 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산의 상업화 가능성을 더욱 증진 시켰다고 할 수 있다.

표 3.5-35 억새로부터 생산된 바이오에탄올

총 소요 바이오매스 [kg]	전처리된 바이오매스 [kg]	Solid ratio [%]	최종 EtOH [g/L]	최종 바이오매스 농도 [%]
23.42	10.70	51.46	65.5	25.2

□ 이를 바탕으로 바이오에탄올 통합공정을 그림 3.5-82과 같이 모듈화 할 예정이며 (증류 및 탈수 제외) 5차년 도는 이를 이용하여 장시간 가동 하도록 하겠다.

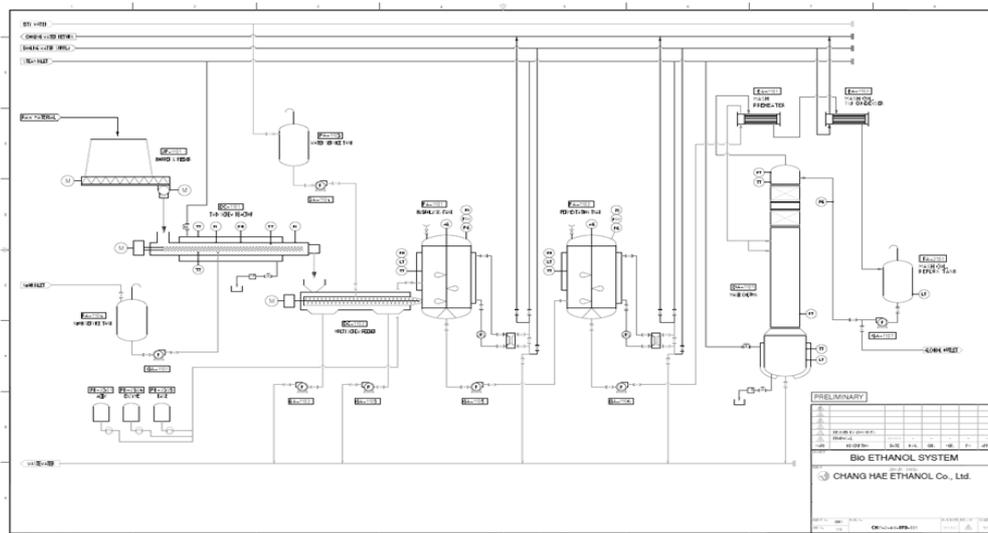


그림 3.5-82. 바이오에탄올 통합공정 모듈화 설비 도면

6. 통합공정 가동 및 바이오에탄올 생산

가. 경제성 향상을 위한 전처리 용매 재사용과 고농도 바이오에탄올 생산

(1) 전처리 용매를 재사용한 전처리

□ 선행연구에서 연속식 전처리 반응기인 CHEMET_10(ChangHae Ethanol Multi ExTruder)을 이용하여 바이오매스의 최적 전처리 조건을 탐색하였다. 또한 이를 이용하여 다양한 공정으로 최적의 발효 조건을 탐색하였다. 본 연구에서는 기존의 최적조건에서 전처리된 바이오매스(역새)를 이용하여 경제적인 바이오에탄올 생산을 위해 전처리 용매를 재사용하였다. 전처리 조건은 표 3.5-36에 나타내었다.

표 3.5-36 역새의 최적 전처리조건

변수	역새
Temp.[°C]	95
NaOH conc.[M]	0.72
Flow rate [ml/min]	90
Screw speed [rpm]	80
Biomass feeding rate [g/min]	18

□ 전처리 용매를 재사용하기 위해 전처리된 바이오매스의 고액분리를 위해 유압프레스를 사용하였다. 1차 고액분리 후 다시 세척수를 첨가하여 전처리된 바이오매스를 세척하여 다시 고액분리를 하였다. 이렇게 해서 분리된 여액은 NaOH를 추가하여 전처리에 재사용되었다. 또한 고형물은 별도의 건조 과정 없이 다음 공정에 사용되었다. 그림 3.5-83은 전처리용매 재사용의 흐름도이다.

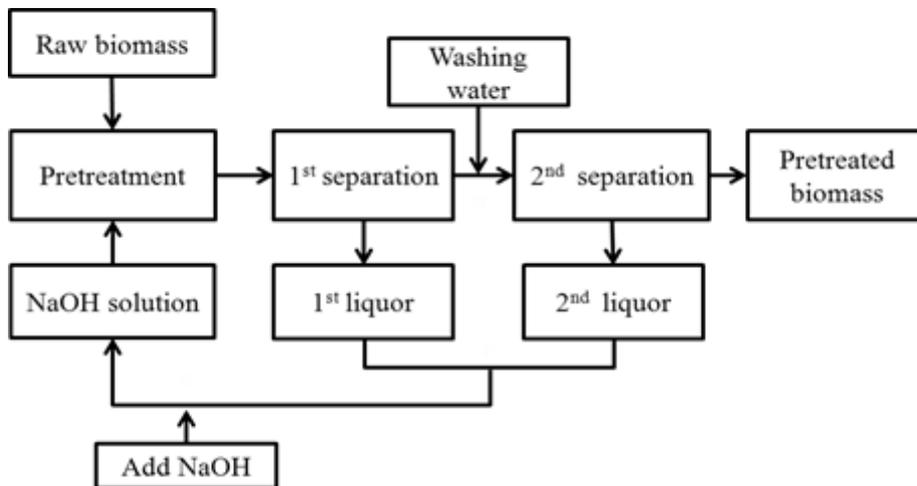


그림 3.5-83. 전처리용매 재사용 흐름도

□ 좀 더 구체적인 재사용에 대하여 표 3.5-37에 정리 하였다. 바이오매스 전처리를 위해 초기 201.6 g의 NaOH를 첨가하여 0.72 M NaOH 전처리 용액 7L를 제조하였다. 총 70분간 전처리한 다음 1차 고액분리 후 0.49 M NaOH용액 3.5L를 수집하였다. 그 후 세척액 3.5L를 추가하여 바이오매스를 세척 한 다음 다시 고액 분리하여 0.17 M NaOH용액 3.5L를 수집하였다. 탈수된 용액에 부족한 NaOH 109.3 g을 추가하여 다시 0.72 M NaOH 용액 7L를 제조하여 전처리 공정에 다시 사용하였다. 이와 같은 방법으로 총 6회 전처리를 수행하였다.

표 3.5-37 고액분리 후 전처리 용매의 변화와 전처리 용매의 회수율 및 추가 투입된 NaOH

	Liquid after 1 st separation		Liquid after 2 nd separation		Recovery ratio of NaOH solvent [%]	Added NaOH solvent [g]	Total volume [L]
	NaOH solution conc. [M]	NaOH solution volume [L]	NaOH solution conc. [M]	NaOH solution volume [L]			
0	-	-	-	-	-	201.60	
1 st	0.49		0.17		45.92	109.03	
2 nd	0.48		0.17		45.28	110.32	
3 rd	0.47		0.16		43.47	113.96	7.00
4 th	0.48	3.50	0.16	3.50	44.17	112.56	
5 th	0.49		0.17		46.11	108.64	
6 th	0.49		0.17		45.69	109.48	
avr.	0.48	-	0.17	-	45.11	110.67	-

□ 평균적으로 45.11% NaOH를 회수 하였으며 6회 동안 거의 비슷한 수준을 보여주고 있다. 그러나 전처리 용매를 재사용하여 전처리 효율이 낮아진다면 재사용의 의미는 사라진다. 용매 재사용 후 전처리 효율을 알아보기 위해 BTER (Biomass To Ethanol Ratio)을 측정하였다. BTER측정 방법은 다음과 같다. BTER측정을 위해서 전처리하여 건조한 바이오매스 10 g에 효소 30 FPU/g cellulose를 추가하여 총 부피를 100 ml로 하여 동시당화발효를 진행하였다. 사용된 주모는 *Saccharomyces cerevisiae* CHY 1011 이며 총 부피의 7%를 투입하였다. 효소의 pH 조절을 위해 0.05 M sodium citrate 완충용액을 사용하였고 32 °C로 유지하면서 120 rpm으로 교반을 시켰다.

$$BTER [\%] = \frac{S[\%] \times E[\%]}{(G_R[\%] + K_1) \times B_S[\%] \times K_2} \times 100$$

S: Solid ratio after pretreatment,

K₁:Glucan-to-glucose constant (0.9)

E: Ethanol concentration after fermentation

B_S: Biomass dosage with SSF

G_R: Glucan concentration of the raw biomass

K₂:Ethanol constant (0.51)

□ 표 3.5-38은 용매를 재사용하여 전처리한 후 성분과 BTER을 나타내었다. 초기 글루칸 농도는 56.75%이었으며 용매 1차 재사용 후 55.31%, 2차 재사용 후 55.35%를 나타내었다. 그러나 그 이후는 거의 동일한 결과를 보이고 있다. 그리고 자일란과 리그닌, 고형물 비율 또한 거의 비슷한 경향을 보여주고 있어 용매 재사용이 전처리에 크게 영향을 끼치지 않음을 알 수 있다. 더불어 BTER 또한 거의 동일하게 나타나 전처리 용매 재사용의 효율성을 반증하고 있음을 알 수 있다.

표 3.5-38 전처리 후 성분변화 및 고형물 비율, BTER

No.	Composition of biomass after pretreatment			Solid recovery [%]	Biomass conc. [%]	Ethanol [%]	BTER [%]
	Glucan [%]	Xylan [%]	Lignin [%]				
1	56.75	14.77	13.69	57.96	9.60	2.52	69.41
2	55.31	15.12	14.02	60.08	9.65	2.41	68.45
3	55.35	15.84	14.56	60.01	9.63	2.39	67.94
4	54.86	15.75	14.23	59.08	9.55	2.44	68.86
5	55.19	15.60	14.75	60.89	9.60	2.41	69.73
6	55.59	15.02	14.52	59.42	9.67	2.48	69.521
avr.	55.51	15.35	14.29	59.57	9.62	2.44	69.00
Raw	38.60	14.39	25.32	-			

(2) 고농도 바이오에탄올 생산을 위한 동시당화발효 공정



그림 3.5-84. 고농도 바이오에탄올 생산을 위한 동시당화발효 공정

□ 경제적인 관점에서 고농도 바이오에탄올 생산을 증류 비용을 낮출 수 있다는 점에서 매우 큰 의미가 있다. 그러나 고농도 바이오에탄올 생산을 위해 바이오매스를 고농도로 투입하게 되면 바이오매스의 수분흡수와 점도 상승으로 인하여 교반이 매우 어려워진다. 고농도 바이오에탄올 생산하기 위해서는 발효 탱크 안의 고형물의 농도를 서서히 증가시켜야만 한다. 이를 위해 본 연구에서는 발효 탱크 하단에서 투입할 수 있는 스크류 피더를 사용하여 바이오매스를 연속적으로 투입하면서 바이오매스의 농도를 증가시켰다. 이때 투입되는 전처리된 바이오매스의 수분은 약 60%이며 바이오매스의 투입속도는 80~150 g/h 로 조절하였다. 이는 바이오매스가 서서히 투입되면서 효소 및 효모의 활성을 극대화 할 수 있도록 하기 위하여 투입속도가 조절 되었다. 효소의 최적 활성 pH를 위해 1.0 M 황산 용액을 투입하여 pH를 조절하였으며 효소는 30 FPU/g Cellulose를 투입하였다. 그리고 초기에는 pH의 원활한 조절을 위해 멸균수 1L를 첨가하여 최종적으로 5L가 되도록 조절하여 바이오매스의 최종 농도가 약 25%가 되도록 하였다. SSF 공정의 온도는 32 °C로 유지하였으며 교반은 90 rpm하여 총 96 시간동안 진행하였다. 그림 3.5-82는 고농도 바이오에탄올 생산을 위한 동시당화발효 공정 장치이다. 실험결과는 그림 3.5-85에 나타내었다.

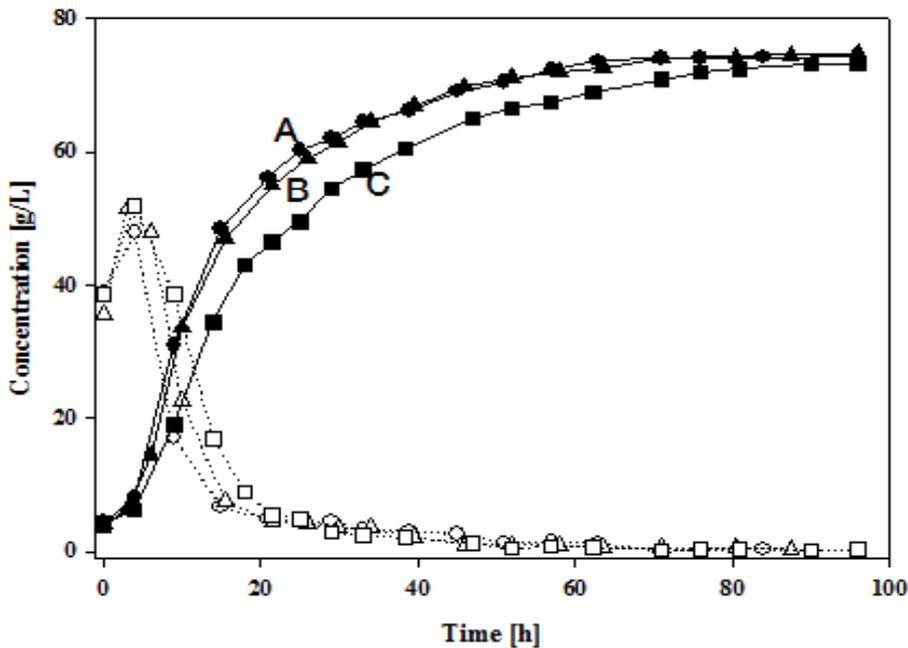


그림 3.5-85. 바이오매스 투입속도에 따른 글루코스 및 에탄올 농도 변화
(A:○-glucose; ●-ethanol), (B:△-glucose; ●-ethanol), (C:□-glucose; ■-ethanol)

□ 그림 3.5-85을 살펴보면 A와 B는 거의 동일한 경향을 보여주나 C는 에탄올 생산 농도가 낮을 뿐만 아니라 발효시간 또한 더 긴 것으로 나타났다. C 경우 효소 및 효모의 대사 작용보다 기질 투입속도가 더욱 빨라 기질저해를 받기 때문인 것으로 사료된다. 또한 초기 글루코스의 농도가 40 g/L 인 것을 효소의 보관액과 주모의 당에서 기인한 것이다. 당 농도가 초기에는 효소 작용에 의해 빠르게 증가하나 시간에 지남에 따라 효모의 활성도가 높아져 당 농도가 감소며 에탄올이 생산된다. 이는 적절한 바이오매스 투입이 기질

저해를 줄일 수 있는 방법 중의 하나이며 최적의 동시당화발효 조건의 충분조건임을 의미한다. 표 3.5-39는 바이오매스 투입속도에 따른 에탄올 생산을 보여주고 있다. A, B의 경우 발효 속도, 에탄올 농도가 거의 비슷하나 C의 경우 기질저해로 인하여 효율이 낮음을 알 수 있다. 투입속도에 의해 발효 속도 및 에탄올 농도가 조절됨으로 이는 경제성에 있어서 매우 중요한 요소임을 알 수 있으며 이로부터 당화 발효조의 용량 및 수량이 결정 된다.

표 3.5-39. 바이오매스 투입속도에 따른 에탄올 생산성

Type	Biomass feeding rate [g/h]	Biomass feeding time [h]	Biomass feeding ratio [%]	Maximum ethanol conc. [g/L]	Final ethanol conc. [g/L]	Ethanol yield [%]	Productivity [g/L·h]
A	80	40.00	1.60	74.40	68.49	89.33	1.37
B	100	32.00	2.00	74.50	68.59	89.46	1.36
C	150	21.30	3.00	73.20	67.49	88.03	1.05

□ 위에서 언급한바와 같이 고농도 바이오매스를 이용하여 동시당화발효를 수행하여야 후속 공정인 증류·탈수의 비용을 절감시킬 수 있다. 이를 위하여 본 연구에서는 고농도의 바이오매스를 효율적으로 당화·발효를 시키기 위하여 교반기 형태에 관하여 연구를 수행하였다. 그림 3.5-86에서는 일반형의 날개를 일정한 각도로 기울어진 형태로 개조하여 제작한 Angled type I, II, III를 보여주고 있다.

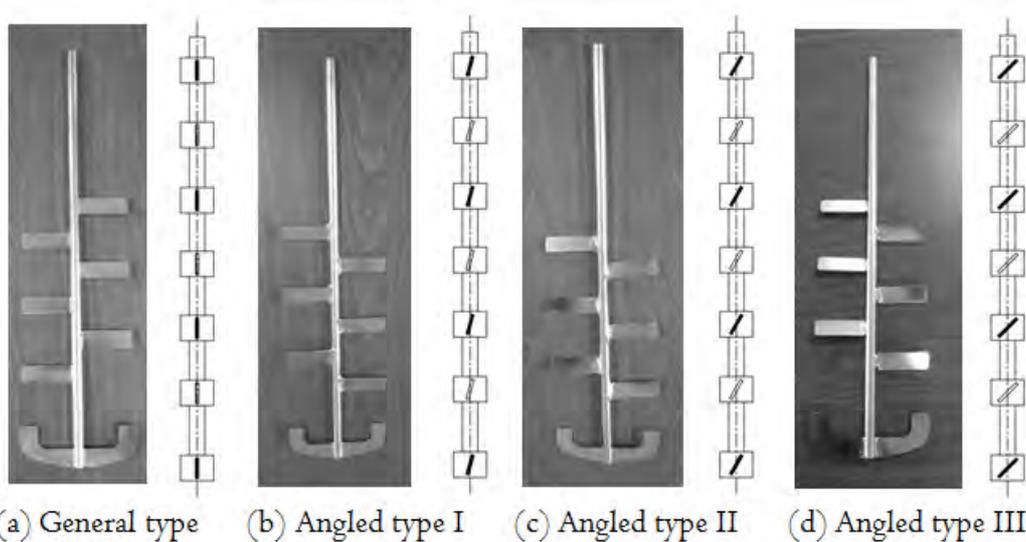


그림 3.5-86. 일반형의 날개를 일정한 각도로 기울어지게 제작한 임펠러

- 이러한 임펠러는 반응기의 상·하부의 교반이 일반형태의 임펠러보다 잘 되어, 고농도의 바이오매스가 보다 쉽게 당화·발효를 할 수 있다. 본 실험은 수분함량이 45%인 바이오매스를 시간당 187.5 g씩 8시간을 공급해주었으며, 이와 동시에 30 FPU/g cellulose의 효소를 공급해주었다. 그리고 sodium citrate buffer를 이용하여 pH 4.8을 유지해 주었고 바이오매스의 공급이 끝나면 7% 주모를 이식해주었다.
- 그림 3.5-87는 교반기 형태에 따른 바이오매스로부터 생산된 글루코오스와 에탄올의 농도 변화를 나타내고 있다. 그림에서와 같이 일반형 교반기를 사용하였을 경우 66.9 g/L의 에탄올을 생산하였으며 이때 에탄올 전환율은 84.8%이다. Angled type II를 이용하였을 경우, 73.5 g/L (92.8%)의 에탄올을 생산하였지만 Angled type I과 II는 71.7 g/L (90.6), 70.3 g/L (88.8%)의 에탄올을 생산하였다. 이러한 결과를 토대로 일반형의 교반기보다 Angled type의 교반기를 사용하였을 경우, 에탄올 생산 효율이 개선되었음을 확인할 수 있었다. 교반기의 날개가 회전하면서 바이오매스를 상·하부로 이동시켜 효소나 주모가 바이오매스와 잘 반응이 일어날 수 있게 도와주는 역할을 함으로써 이런 결과를 얻을 수 있었다.

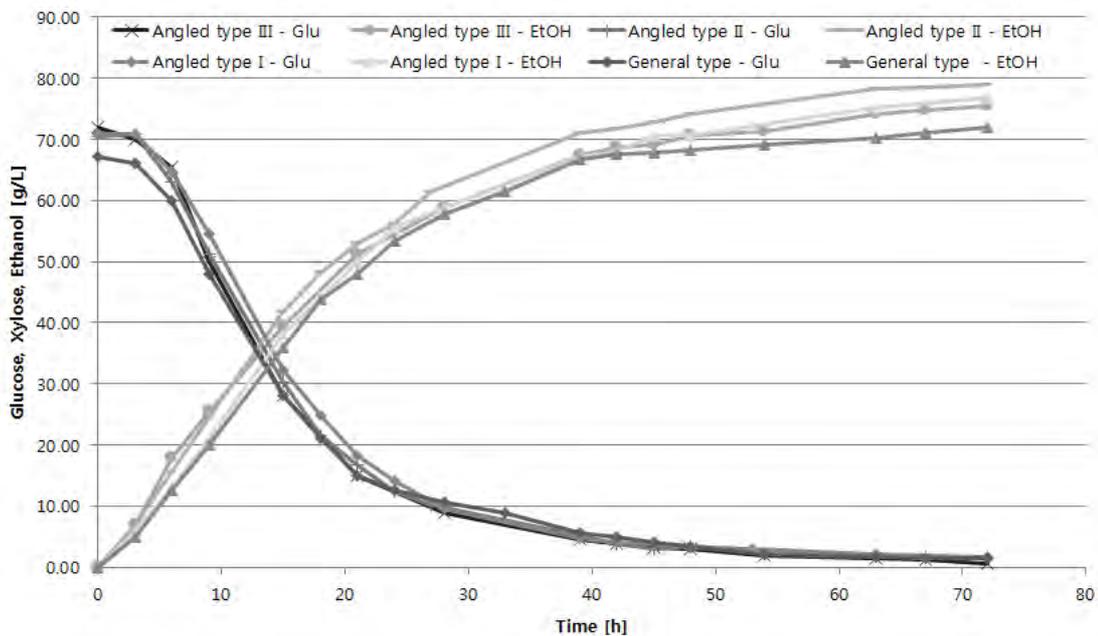


그림 3.5-87. 교반기 형태에 따른 글루코오스 및 에탄올 농도 변화

나. 바이오에탄올 통합공정

(1) 용매재사용의 한계점 타진

- 전처리 용매의 한계점을 알아보기 위해 상기 “전처리 용매를 재사용한 전처리”에서 제시한 방법과 동일한 방법으로 전처리 횟수를 증가하여 실험을 수행하였다. 실험결과는 표 3.5-40에 나타내었다.

표 3.5-40. 전처리 용액 재사용에 따른 성분변화

재사용 회수 [#]	NaOH Conc. [M]	추가 NaOH [g]	Solid Ratio [%]	Glucose [%]	Xylose [%]	Lignin [%]
0	0.72	194.30	52.09	63.80	22.47	14.34
1	0.31	110.42	52.48	60.71	25.08	14.25
2	0.31	110.28	52.91	59.24	25.75	17.69
3	0.31	110.15	54.00	59.74	25.94	17.05
4	0.32	109.88	55.07	58.04	25.90	17.59
5	0.32	109.61	54.82	59.11	26.09	17.11
6	0.32	109.88	57.02	56.44	25.61	17.79
7	0.32	109.34	56.07	55.11	25.32	17.85
8	0.32	109.08	54.64	57.06	25.63	18.59
9	0.32	109.88	54.66	56.88	25.66	18.82
10	0.32	109.34	55.36	57.86	26.01	18.27
11	0.32	109.88	57.20	56.26	25.73	19.29

- 총 11회 용매를 재사용 하여 전처리하였다. 표 3.5-40를 살펴보면 초기 글루코스 농도는 63.8%였으나 재사용 횟수가 증가함에 따라 점차 감소하여 6회 부터는 50% 중후반대의 수치를 기록하면서 유지하는 것으로 나타났다. 글루코스 농도가 감소함에 따라 에탄올 생산량 또한 감소 하지만 폐수처리비용을 생각한다면 용매재사용은 크게 경제적으로 이득이 됨을 알 수 있다.

(2) 용매재사용을 위한 드럼필터 제작

- 선행연구에서 통합공정을 위해 CHESAF (Chang Hae Ethanol Scant reAgent Feeder)를 제작하였다. 그러나 용매 재사용을 위해서는 CHESAF 하단으로 배출되는 여액을 필터링하여 사용해야만 한다. 이를 위해 본 연구에서는 드럼 필터(그림 3.5-88)를 제작하였다.

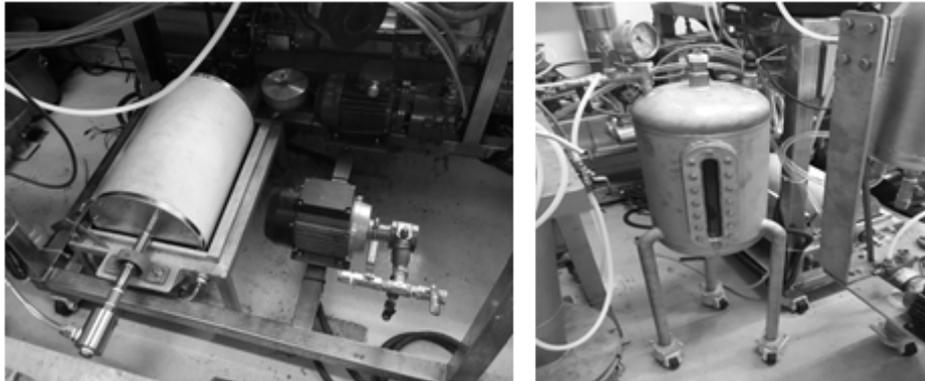
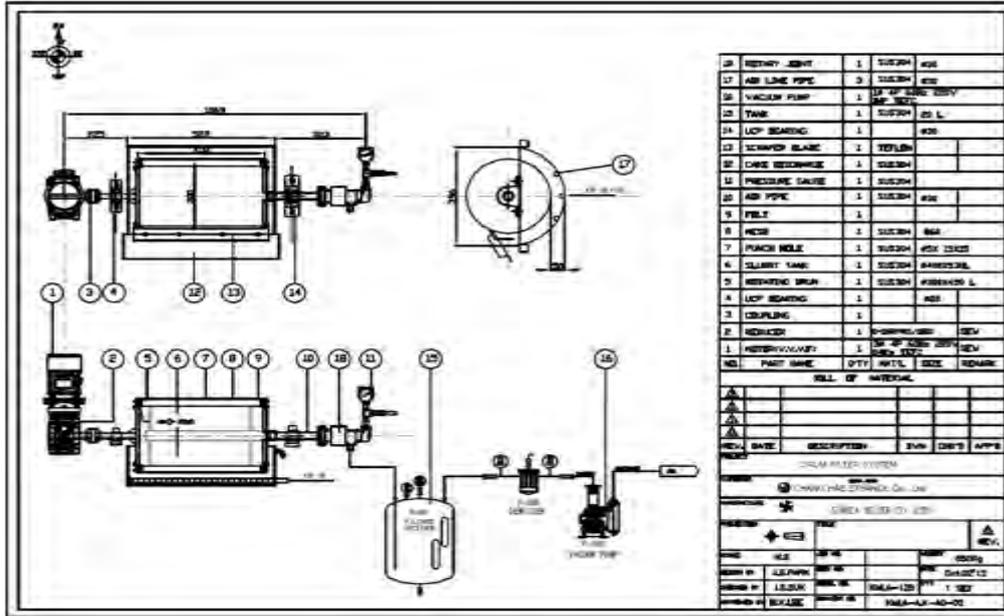


그림 3.5-88. 드럼필터 제작

(3) 전처리 장치 배럴 개조

□ 본 연구에서는 CHEMET를 이용하여 연속식으로 전처리 공정을 수행하였다. 장치 특성상 일정부위의 배럴에서 마모현상이 발생하였다. 이를 해결하기 위해 배럴을 분리하여 제작하였다. 배럴을 분리하게 되면 마모된 부분만 교체가 가능하므로 유지보수에 매우 용이하게 된다. 그림 3.5-89는 전처리 장치의 분리형 배럴의 모습이다. 또한 배럴을 분리하여 끝단에는 냉각수를 투입하여 전처용매의 기화를 최소화하여 용매 재사용하는데 용이하도록 제작하였다.

(4) 용매 재사용이 가능한 바이오에탄올 통합공정

□ 바이오매스 투입에서부터 바이오에탄올 생산까지의 공정을 통합하였다. CHEMET을 연속식으로 전처리된 바이오매스는 이송 스크류를 타고 CHESAF로 이송되어 당화발효탱크로 투입된다. 당화발효 탱크에서는 효소 및 주모가 투입되고 황산을 이용하여 효소의 최적 활성 pH를 조절한다. 한편 CHESAF 에서는 탈수된 여액은 드럼필터를 통하여 고액 분리되고 분리된 액체는 부족한 NaOH를 첨가하여 다시 전처리 용매로 사용하고 고형물은 다시 CHESAF로 투입하여 바이오매스 손실을 최소화 하였다. 그림 3.5-90은 용매재사용이 가능한 바이오에탄올 생산 통합 공정이다.

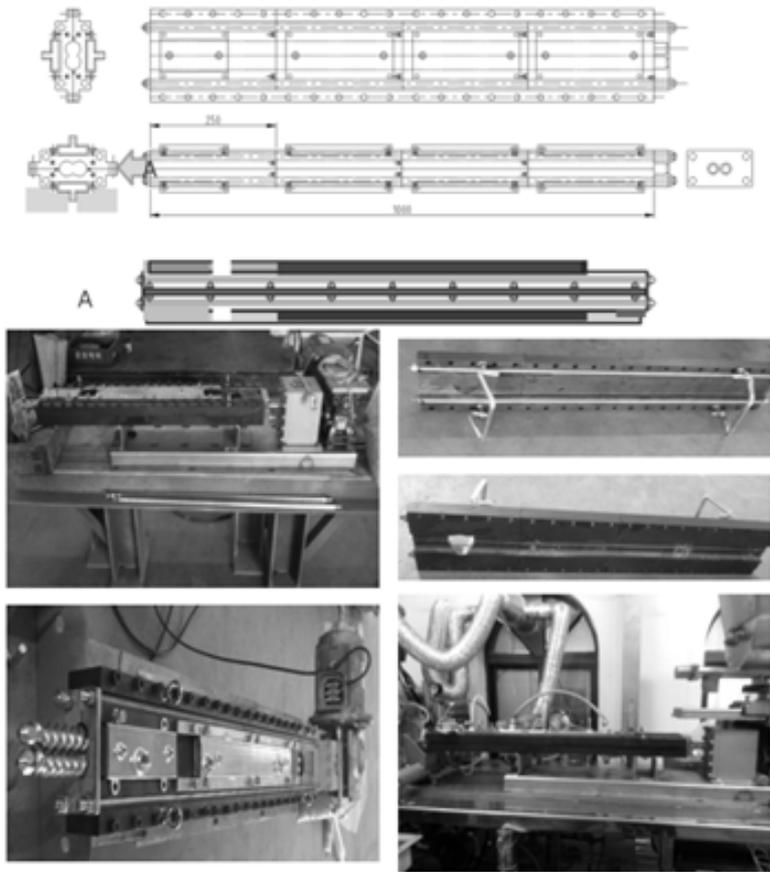


그림 3.5-89. 전처리 장치 배럴 개조

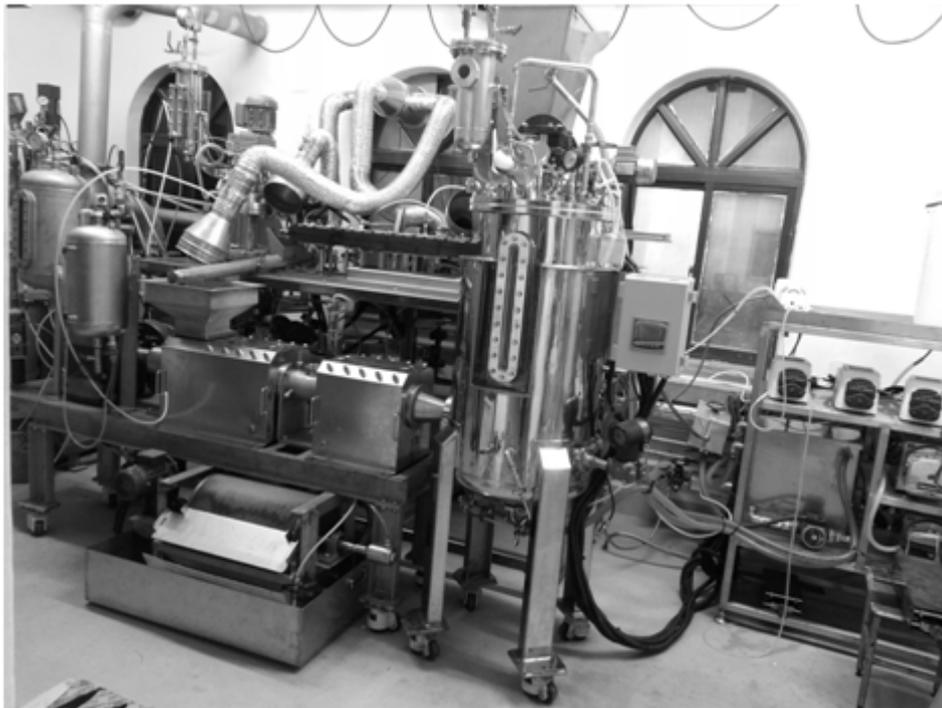
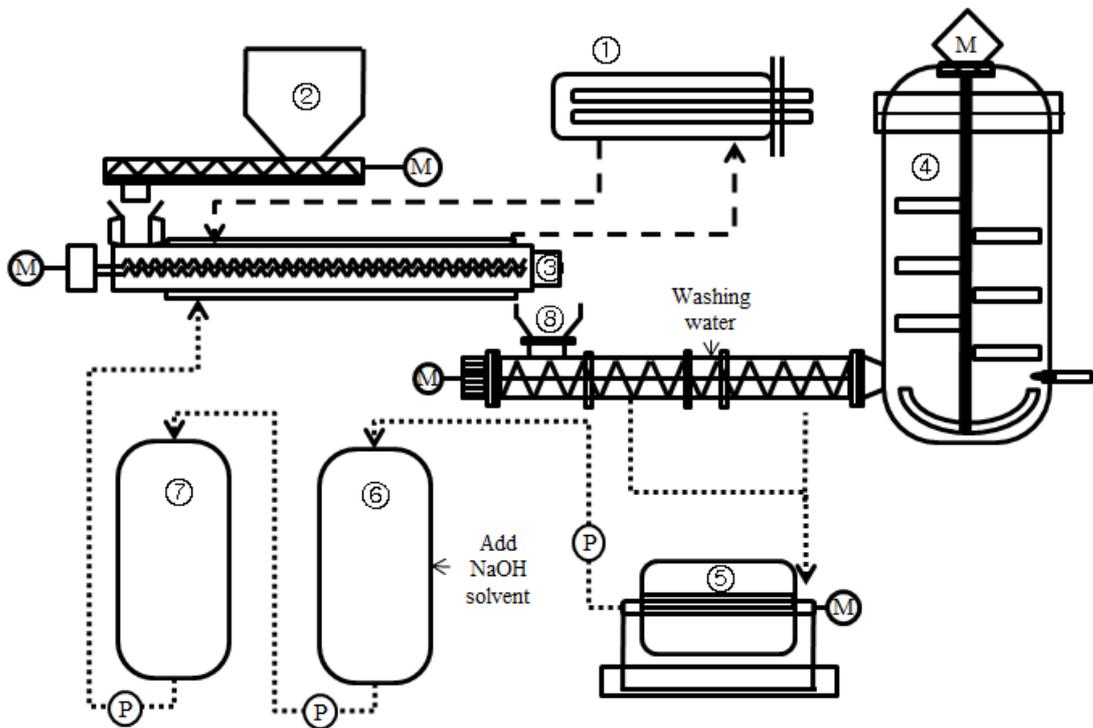


그림 3.5-90. 용매재사용이 가능한 바이오에탄올 생산 통합 공정

다. 바이오에탄올 통합공정으로부터 바이오 에탄올 생산

(1) 용매 재사용공정을 이용한 이 가능한 바이오에탄올 통합공정

□ 통합공정을 이용하여 역새로부터 바이오에탄올을 생산하였다. 전처리 방법과 조건은 앞 절에서 기술한 것과 동일하게 수행하였다. 초기 전처리용액은 0.72 M NaOH 용액을 30L 제조하였다. 전처리를 진행하면서 CHESAF에서 분리된 NaOH 용액이 15L가 되면 부족한 NaOH 시약을 첨가하여 전처리에 재사용 하였다. 한편 당화발효탱크로 바이오매스를 투입하기 전에 스팀을 이용하여 105 °C에서 30분간 살균하였다. pH 조절은 3 M 황산 용액을 사용하였으며 pH 5로 조절하였다. 또한 원활한 pH 측정을 위하여 초기 발효탱크에 14L 공정수를 첨가하였다. 효소 투입량은 30 FPU/g cellulose로 조절하였고 주모는 총 부피(60L)의 약 7%인 4L를 첨가 하였다. 전처리는 24시간동안 진행되었으며 당화발효공정은 전처리 시간을 포함하여 총 72시간 동안 진행되었다. 당화발효조의 조건은 기존 실험과 동일하게 진행하였다. 통합공정의 흐름도는 그림 3.5-91에 나타내었다. 또한 표 3.5-41에는 통합공정을 이용한 전처리 용매 재사용 및 전처리 후 성분변화를 나타내었다.



① Oil heater ② Raw Biomass Feeder ③ Twin-screw reactor ④SSF T/K
 ⑤ Drum filter ⑥ 1st NaOH Solution T/K ⑦2nd NaOH Solution T/K ⑧ CHESAF

그림 3.5-91. 통합공정의 흐름도

표 3.5-41 통합공정을 이용한 전처리 용매 재사용 및 전처리 후 성분변화

	Reuse of pretreatment solution			Composition of biomass after pretreatment			
	NaOH [M]	NaOH [g]	Volume [L]	Glucan [%]	Xylan [%]	Lignin [%]	Solid recovery [%]
초기	0.72	864	30	55.19	13.48	15.15	56.28
1차 재사용	0.268	271.2	15	51.74	14.80	15.00	55.55
2차 재사용	0.3065	248.1	15	50.67	14.99	17.32	57.44
3차 재사용	0.29	258	15	50.53	15.05	17.21	56.39
4차 재사용	0.275	267	15	53.02	17.16	15.59	55.86
5차 재사용	0.275	267	15	52.61	16.79	15.54	55.14
Avr.				52.29	15.38	15.97	56.11
Raw Miscanthus				38.6	16.54	25.32	-

□ 표 3.5-41을 살펴보면 초기 글루칸의 농도는 55.19%이고 이후에는 낮아져 약 50% 초반대를 보여주고 있다. 이는 기존 실험결과와 거의 동일한 결과를 보여주고 있다. 한편 그림 3.5-92과 표 3.5-42은 동시당화발효공정의 결과를 보여주고 있다. 그림 3.5-92를 살펴보면 초기 에탄올 농도는 급격하게 증가하다 20시간 이후에는 서서히 증가하며 약 50시간 이후에는 거의 증가하지 않았다. 글루코스의 경우는 에탄올과 정반대로 나타났다. 자일로스의 경우 효모가 대사하지 못하기 때문에 효소의 작용에 의해 서서히 증가하다 50시간 이후에는 거의 증가하지 않는 것으로 나타났다.

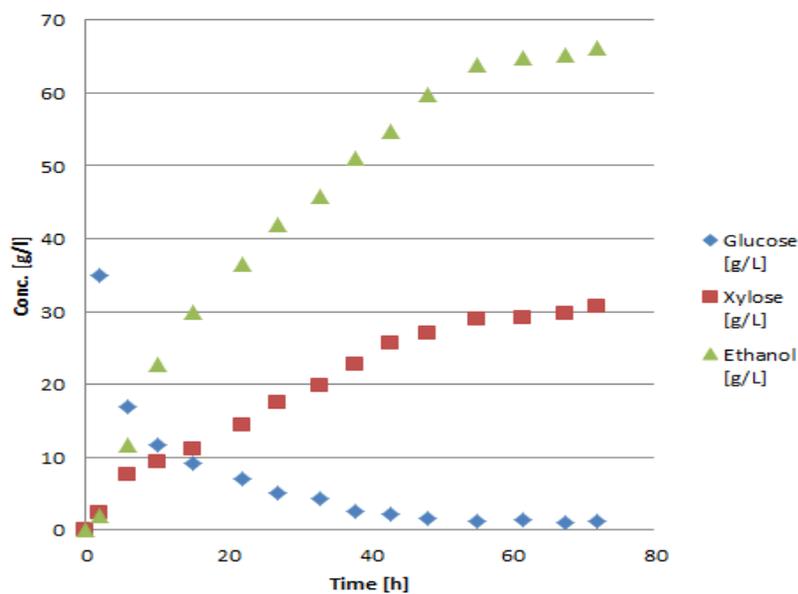


그림 3.5-92. 통합공정을 이용한 동시당화발효 결과

표 3.5-42 통합공정을 이용한 억새로부터 바이오에탄올 생산 결과

초기 물 [ml]	14,000
주모[ml]	4,000
효소[ml]	1,500
전처리후 젖은 바이오매스 [g]	38,000
산 (3M H2SO4) [ml]	2,500
전처리 후 건조 바이오매스 [g]	13,300
전체 부피 [ml]	60,000
바이오매스 농도 [%]	22.17
이론에탄올농도 [g/L] (주모 및 효소 제외)	68
최종에탄올농도 [g/L]	66
에탄올 농도 [g/L] (주모 및 효소 제외)	60
전환율 [%]	88

□ 표 3.5-42을 살펴보면 최종 에탄올 농도는 66 g/L 로 고농도의 에탄올을 생산하였다. 그러나 이 농도에는 효소 및 주모에서 기인한 에탄올이 포함된 것이므로 이를 제외하고 순수 바이오매스로부터 전환된 에탄올은 60 g/L이며 이때의 전환율은 88%로 매우 높은 효율을 보여주고 있다. 지금까지 전처리 용매를 재사용하여 통합공정을 이용하여 억새로부터 바이오에탄올을 생산하였다. 에탄올 농도 및 전환율을 살펴보면 기존 연구보다 높은 수치임을 알 수 있으며 이는 상업화의 가능성이 높음을 보여주는 결과라 할 수 있다.

(2) 바이오에탄올 통합공정 (물질수지)

□ 통합공정을 이용하여 억새로부터 바이오에탄올을 생산한 결과를 바탕으로 물질 수지를 작성하였다. 그림 3.5-93는 물질수지의 흐름도를 나타내고 있으며, 표 3.5-43에 결과를 정리 하였다.

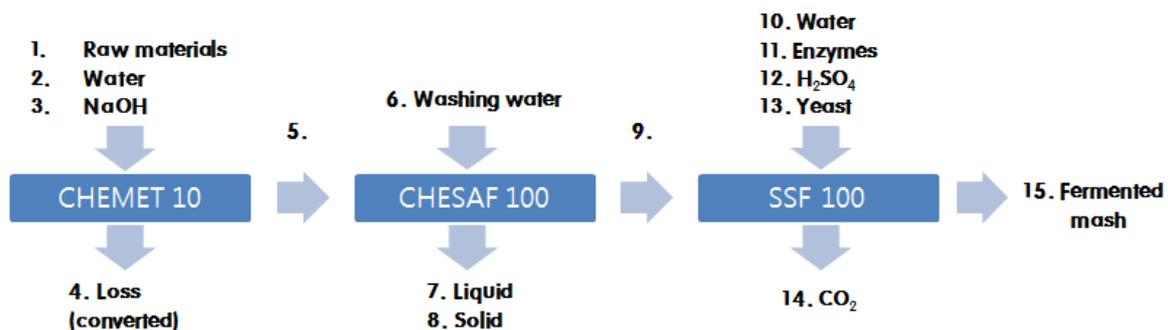


그림 3.5-93. 물질수지 흐름도

표 3.5-43 물질수지 (역새로부터 바이오에탄올 생산)

Component	Unit	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Total flow	kg	25.92	87.80	2.20	8.79	107.13	43.90	107.17	0.73	43.14	14.00	1.50	2.50	4.00	4.00	61.14
Cellulose	kg	9.01			1.37	7.63			0.28	7.35						0.74
Xylan	kg	4.54			2.45	2.09			0.14	1.95						0.20
Lignin	kg	5.91			3.40	2.51			0.18	2.32						2.32
Other	kg	3.88			1.57	2.31			0.12	1.90				0.12		4.73
Water	kg	2.59	87.80			90.39	43.90	106.00		28.04	14.00		1.76	3.48		47.28
Glucose	kg									8.17		0.30		0.40		0.06
Xylose	kg									2.24						1.83
NaOH	kg			2.20		2.20		1.17		0.47						
H2SO4	kg												0.74			
Enzymes	kg											1.20				
EtOH	kg															3.98

□ 물질 수지는 Raw 역새를 24시간 동안 투입하여 전처리하고 총 72시간 동안 동시당화발효 결과를 바탕으로 작성하였다. 초기 역새는 수분 10%를 함유하고 있다. 붉은 색 표기는 추정에 의한 수치로 실험상 알 수 없는 부분이다. 또한 드림필터 안에 폐수가 남아 있어 폐수량 또한 유추한 결과이다. 물질 수지를 바탕으로 역새 24 kg으로 바이오에탄올 3.98 kg을 생산하였다. 이를 다시 바이오매스로부터 바이오에탄올 전환율로 살펴보면 건조기준으로 단위 바이오매스당 0.18의 바이오에탄올이 생산됨을 알 수 있다.

□ 통합공정 가동은 장기운전에 의한 설비안정성 Test 보다는 선정된 주요 바이오매스(역새, 보릿짚, EFB 등)에 따른 최적 운전 조건 및 다양한 당화 발효 가동조건(당화후 발효, 동시당화발효, 반복유가식 발효 등)에 대한 연구를 주로 진행하였으며, 향후 데모플랜트급에서 15일 이상 진행하여 장기가동에 의한 설비 안정성 검토가 필요하다고 판단된다.

(3) 연료용 바이오에탄올 생산

□ 지금까지 역새를 이용하여 바이오에탄올을 생산하였다. 그러나 이를 연료용으로 사용하기 위해서는 에탄올 함량이 99.5%(v/v) 이상이 되어야 한다. 본 연구를 바탕으로 생산된 바이오에탄올을 자사에서 보유하고 있는 증류 및 탈수 설비를 이용하여 연료용 바이오에탄올을 생산하였다. 그림 3.5-94는 역새로부터 바이오연료를 생산하기 위한 공정의 중간 및 최종 산물을 사진으로 나타내었다. 또한 그림 3.5-95는 한국석유관리원에서 발급받은 최종 바이오에탄올의 시험성적서이다.

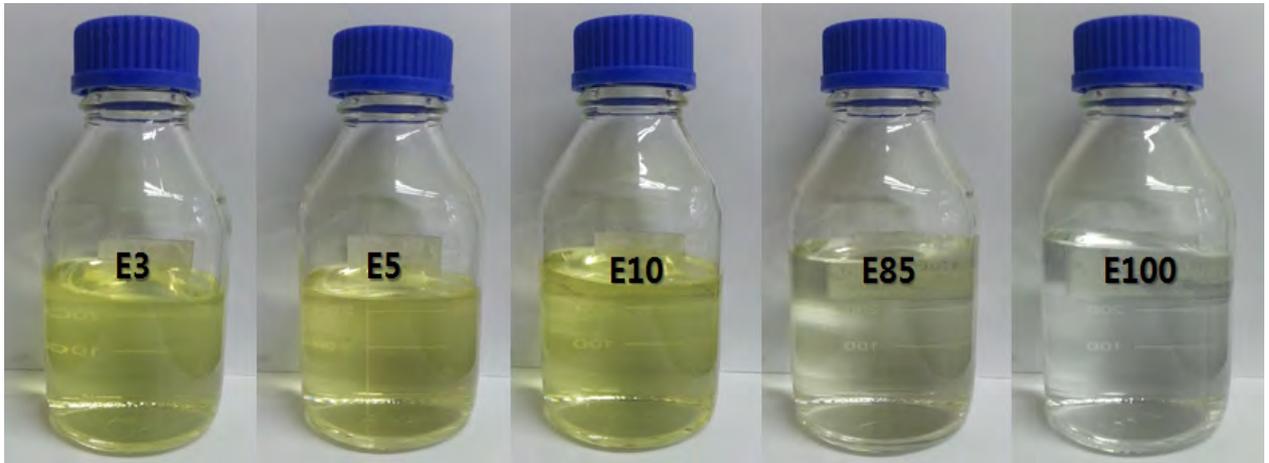
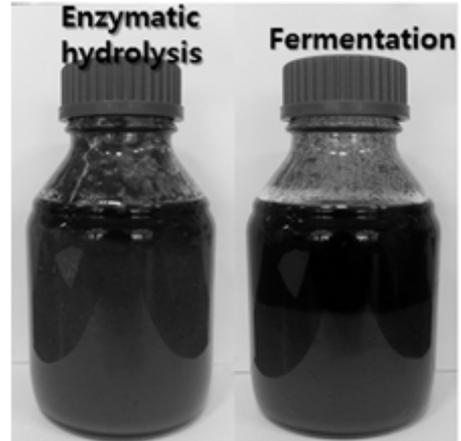
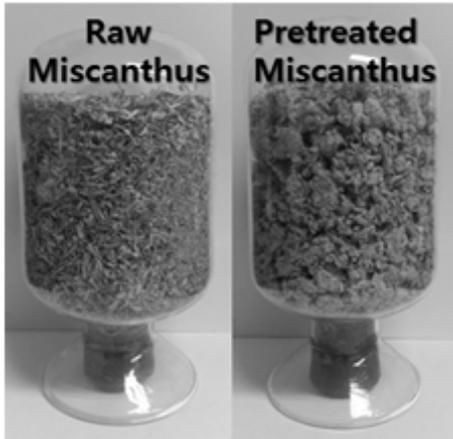


그림. 3.5-94. 연료용 바이오에탄올 생산의 중간 및 최종 산물 사진

한국 KSI-010

K Petro Korea Institute of Petroleum Management Technology R&D Center
 20, Cuk 207, 603 & 609, 33, Sang-Nung 2, G/L, Ochang-ma, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do, Korea
 Account Manager: Tel: +82-281-7000 Fax: +82-281-7007
 Mail: kspetro@kpi.or.kr www.kpi.or.kr

Certificate of Test

Report No.: TSC2013-0003 Report NO.: TSC2013-02MR
 Receipt Date: 4th January 2013 Page: 1 of 1
 Company/Client: CHANGHAT/Seo Sang Gook Date Reported: 22th January 2013
 Address: 340 Fabok-dong 2-gil, Daejeon-gu, Jeonju-si, Jeonbuk, Korea Use of Report: Research development

Test Item	Unit	Result	Test Method
Octane (RON)	-	over 100	KS M 2019 2006
Distillation	10 %	78.2	ASTM D 86 2010
	50 %	78.4	
	90 %	78.5	
	End point	79.3	
Reflux	11.0 %	0.4	
Oxidation Stability	min	over 480	KS M 2042 2003
Density (15 °C)	kg/m ³	798.3	KS M 2002 2011
Lead	g/L	less than 0.002	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry
Fluorobenzene	g/L	0.000.8	Spectrometry
Water & Sediment	mg/L	less than 0.005	KS M 2115 1996
Copper Strip Corrosion (at 50 °C)	-	1	KS M 2054 2007
Washed Exhaust Gas	mg/100mL	less than 1	KS M 2041 2011
Sulfur	mg/kg	less than 1	KS M 2017 2003
Chloride content (MTHB)	mg/kg	less than 0.01	
Ethanol content	mg/kg	99.99	KS K 2036-2 2008
Methanol content	mg/kg	less than 0.01	

22th January 2013
 Director, Korea Institute of Petroleum Management Technology R&D

1. This certificate is issued for the unrefined sample to a client and a user will guarantee the quality of the whole sample.
 2. Service: Korea Institute of Petroleum Management Technology R&D Center

그림 3.5-95. 연료용 바이오에탄올 시험성적서

(4) 바이오에탄올 통합공정 설비의 Scale-up

- CHEMET(전처리 반응기) 및 CHESAF(당화조 투입장치)의 스케일업은 아래 수식과 같은 일반적인 스크류의 스케일업 공식에 따라서 적용이 가능한 것으로 알려져 있다. 아래 수식은 동일 조합의 스크류에서 스크류의 이송가능부피와 바이오매스 처리량이 비례하기 때문에 스크류 및 베럴의 직경을 2.15배 증가시키면 10배의 바이오매스를 처리할 수 있다.

Scale-up calculation

$$\text{kg/hr}_{\text{prod}} = \text{kg/hr}_{\text{lab}} * \left(\frac{D_{\text{prod}}}{D_{\text{lab}}} \right)^3$$

- 국내 E3(바이오에탄올 혼합비율 3%)공급을 위해서는 총 300,000Kl의 바이오에탄올이 필요하고 이중 10%를 이번 연구 결과의 통합공정으로 대체시 바이오매스를 1일 500톤을 처리 할 수 있는 직경 500mm의 트윈스크류 3기가 필요하다. 통합공정 제작에 필요한 연구결과를 (주)창해에탄올에서 기술실시계약(자체 실시)를 통하여 동일 설비에서 처리량을 증가시키기 위해서는 혼합 및 고압존의 스크류를 개량하여 스크류 회전속도를 올리는 연구가 추가로 진행할 예정이다.
- 그림 3.5-96는 해외 Extruder 전문 제작사(coperion werner & Pfleiderer)에서 제작한 2단 twin screw extruder 설비로 바이오매스 전처리에 적합한 스크류 및 유틸리티를 보완 후 상용화급 설비 제작이 가능성을 보여 주고 있다.



그림 3.5-96. 상용화규모 Twin-screw extruder

(5) 바이오에탄올 통합공정 설비의 상용화 설계도면

- 섬유질계 바이오에탄올 상용화를 위해서는 상용화설비 이전 단계인 데모플랜트의 설비 제작 및 가동 데이터를 토대로 경제성 분석을 진행하여야 한다. 데모플랜트의 설비는 설비제작을 위한 원천 기술 및 특허를 보유한 기관에서 추진되어야 하며, 규모는 1일 10톤 이상의 바이오매스를 이용하여 1일 2KL이상 바이오에탄올 생산 설비를 제작하고 최종 바이오에탄올의 연료 적합성 분석 및 경제성 분석을 진행하여야 한다. 또한 장기가동에 의한 설비 안정성 검토를 위하여 15일 이상 연속운전 및 기기 마모도 분석이 필요하다.
- 상용화급 설비의 경제성 확보를 위하여 전처리 및 증류후 발생하는 폐액처리 설비와 일 정량 이상의 효소를 생산할 수 있는 설비 등을 포함하여야 한다. 통합공정 제작 및 운전 결과를 토대로 데모플랜트급 설비의 규격 및 처리량은 표 3.5-44에 표기 하였다.

표. 3.5-44. 데모플랜트급 규모 주요 설비 규격 및 처리량

No	Service	Q'ty	DEMONSTRATION PLANT		Remark
			Capacity	Main Dimension(mm)	
1	분쇄기	1	1000kg/hr	W2,270 * L2,660L * H3,200	
2	바이오매스 호퍼	1	30kL	W1,300 * L1,150 * H1,150	
3	바이오매스 공급기	1	500kg/hr	∅500 * 900	
4	전처리 반응기	1	5,000kg/hr	∅200 * 6,000	
5	당화조 공급기	1	5,000kg/hr	∅350 * 5,000	
6	당화조	1	4,000L	∅1,500 * 2,300	
7	발효조	1	10,000L	∅2,250 * 2,600	
8	완충조	1	4,000L	∅1,700 * 1,900	
9	용매 저장조	1	12,500L	∅2,250 * 3,254	
10	폐액 조장조	1	100,000L	∅5,000 * 5,000	
11	고액분리기	1	50,000L/hr	∅2,000 * 4,000	
12	탈수액탱크	1	10,000L	∅2,200 * 2,700	
13	원심분리여액탱크	1	10,000L	∅2,200 * 2,700	
14	용매 회수탱크	1	100,000L	∅5,000 * 5,007	
15	증류탑	1	1,500L	∅400 * 19,972	
16	“	1	2,000L	∅318 * 26,493	
17	탈수탑	1	1kL	∅500 * 3,000	

- 섬유질계 바이오매스인 억새를 바탕으로 바이오에탄올을 생산하였다. 물질수지에서 알 수 있듯이 하루에 24 kg의 바이오매스를 전처리하여 3.98 kg의 바이오에탄올을 생산할 수 있음을 알 수 있다. 이는 섬유질계 바이오에탄올 생산이 상업화가 머지않았음을 보여주는 결과라 할 수 있겠다. 이를 바탕으로 증류 탈수 공정을 거치면 연료용 바이오에탄올이 생산된다. 연료용 바이오에탄올 상용화급 설계도면을 그림 3.5-97에 나타내었다. 이는 상업화에 한발 더 다가간 결과라 할 수 있겠다. 앞으로 해결해야할 과제 (고가의 효소 가격, 바이오매스 원료 생산 및 운반, 상용화급 공정 Test 등)들이 남아 있지만 단 기간 내에 바이오에탄올을 주입한 자동차가 달릴 수 있을 것으로 판단된다.

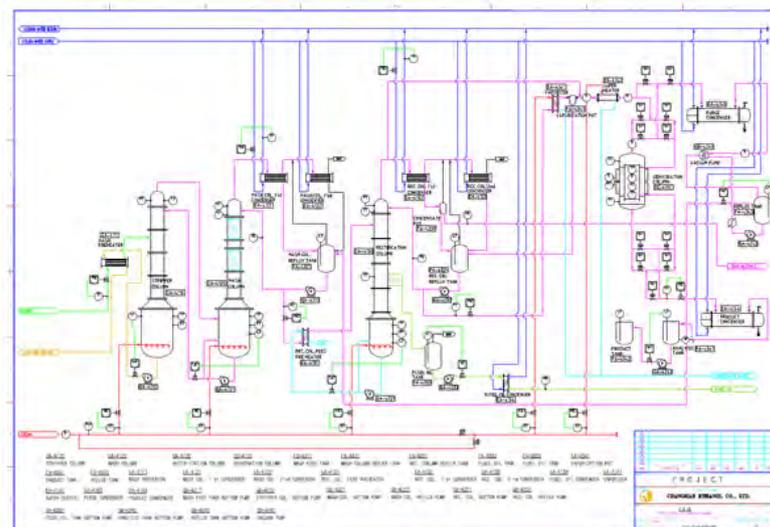
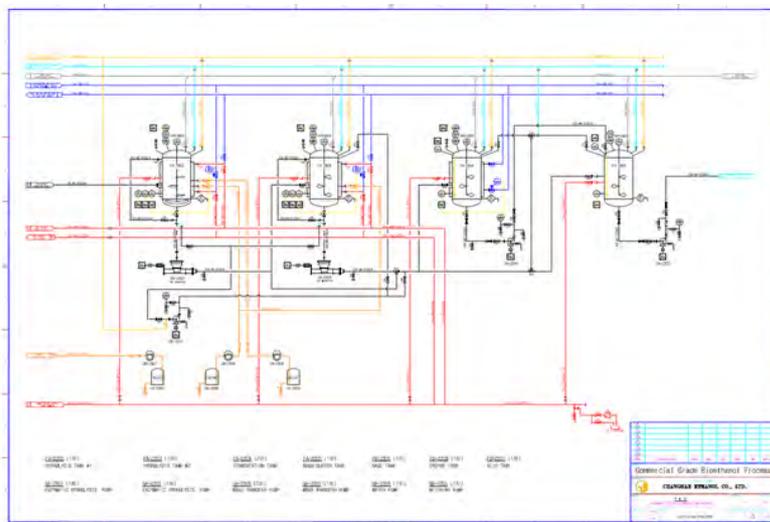
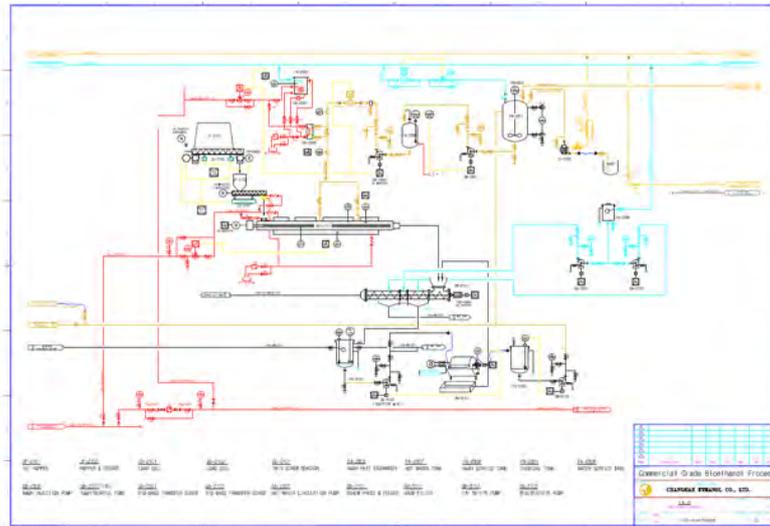


그림 3.5-96. 섬유질계 바이오매스이용 sugar-platform 공정 설계도

통합공정 장비 가동 매뉴얼

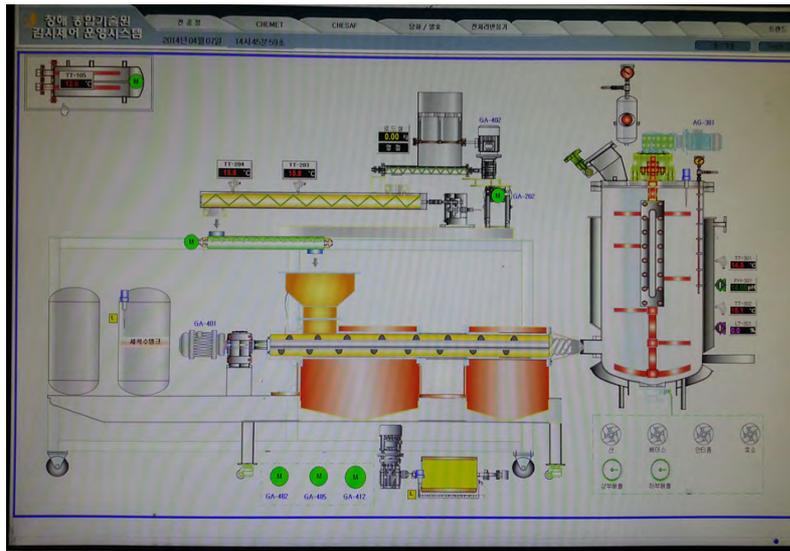
1. 전처리 운전 전 정비사항

- 1) 유틸리티 확인 및 메인 밸브 점검
 - 상수도, 공정용수, 에어, 스팀 점검
 - *에어- 메인 밸브 확인
 - *열매체 확인
 - *스팀- 메인 밸브 확인, CHEMET 라인 확인 (별도)
 - *주모 확인

- 2) 바이오매스 확인
 - 바이오매스 호퍼 확인

- 3) NaOH 점검
 - 용매 탱크 용량 확인

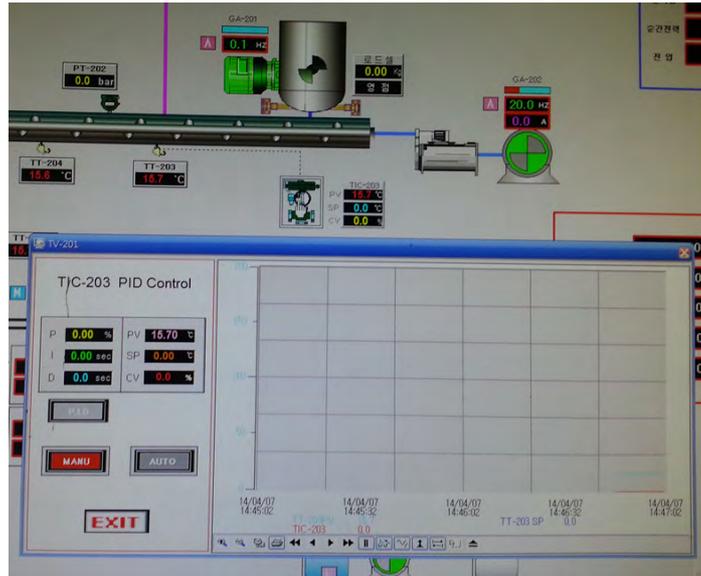
- 4) 당화조 점검
 - * 멸균상태 점검: 100 °C, 30 min
 - * pH 조절액 점검 (2~3 M 황산용액)



[통합공정 HMI 화면]

2. 전처리 및 당화발효 운전

1) 트윈스크류 장치 승온 (TIC-203밸브, 95 °C)

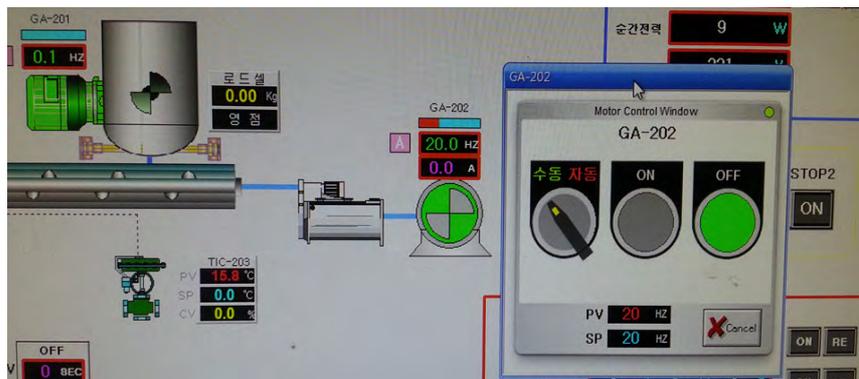


2) 냉각수 투입

* 전처리 배출부 용매 기화 방지

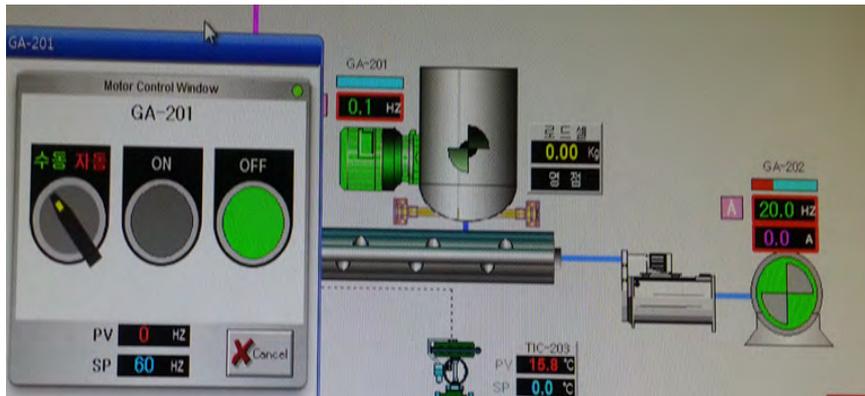
3) 전처리 장치 스크류 가동

* 가동하고자하는 Hz을 입력



4) 바이오매스 원료 투입

* 투입 전 전처리 장치온도, 용매 레벨 확인



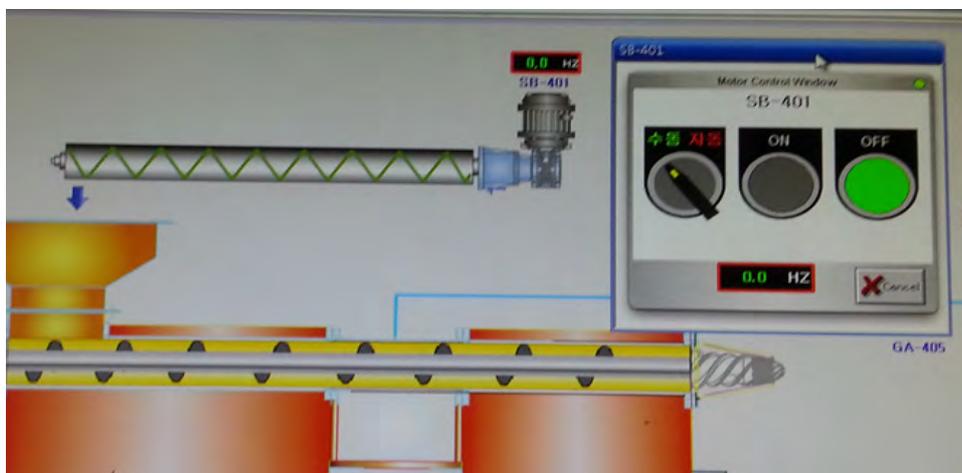
5) NaOH 투입

펌프(GA-203)를 이용하여 유량 조절



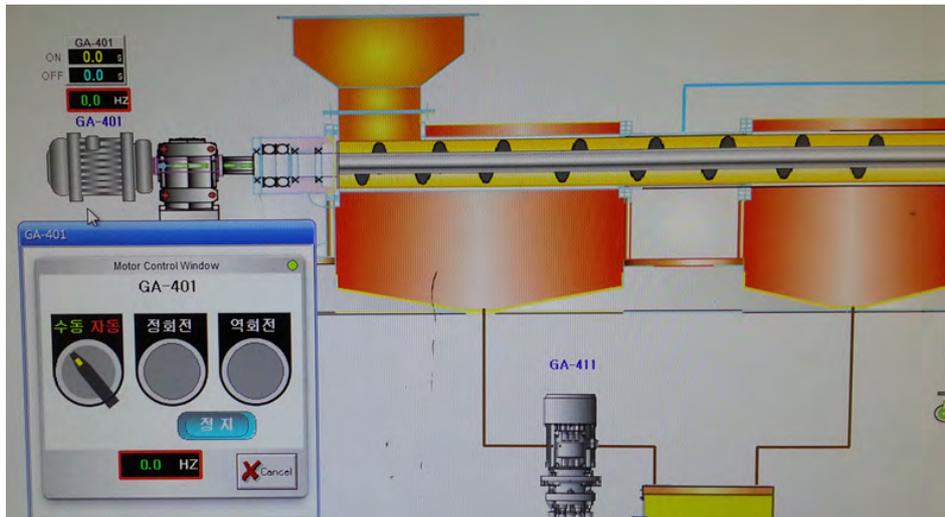
6) 이송 스크류 가동

CHEMET 과 CHESAF 연결



7) CHESAF (GA-401) 가동

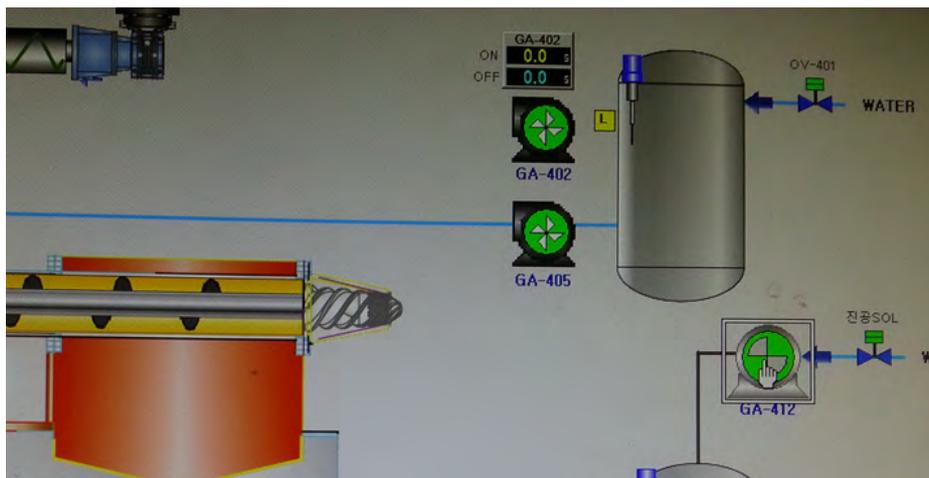
*초기에는 바이오매스 실이 형성 될 수 있도록 저속으로 가동 할 것 (1 ~ 2 rpm)



8) CHESAF 정상가동 확인

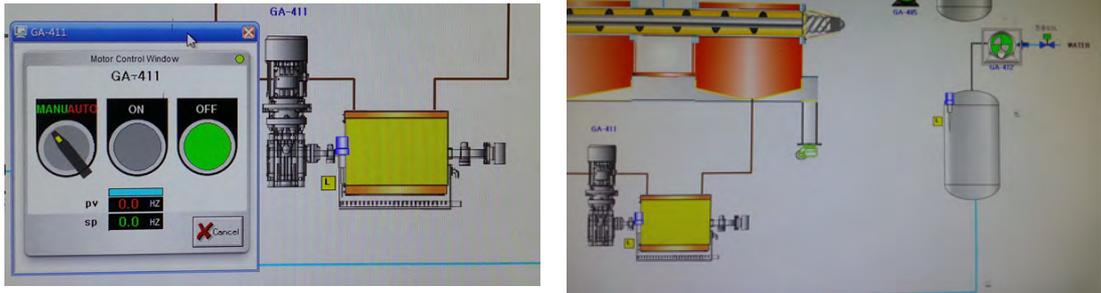
당화기 투입장치 전처리된 바이오매스 배출 확인

- * 성분분석 실시 -> 전처리 효율 측정용
- * 세척수 공급 (GA-405) -> OV-401 자동 시 레벨에 의해 자동급수
- * 배출 고형물 수분 측정 (수분 농도 65 ~ 70%)



9) 드럼필터 가동

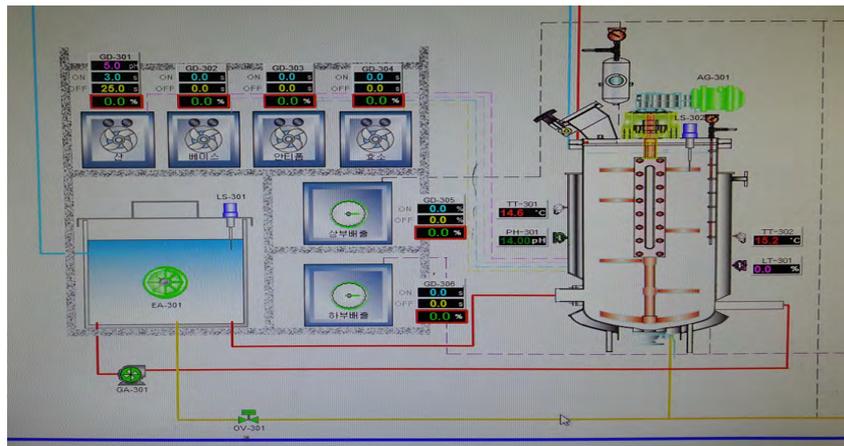
드럼필터를 회전시키고 진공 SOL 밸브를 자동으로 조절
 그 후 진공펌프 (GA-412)를 가동
 용매수집탱크에 용매 수집 --> 전처리 용매 재사용시 사용



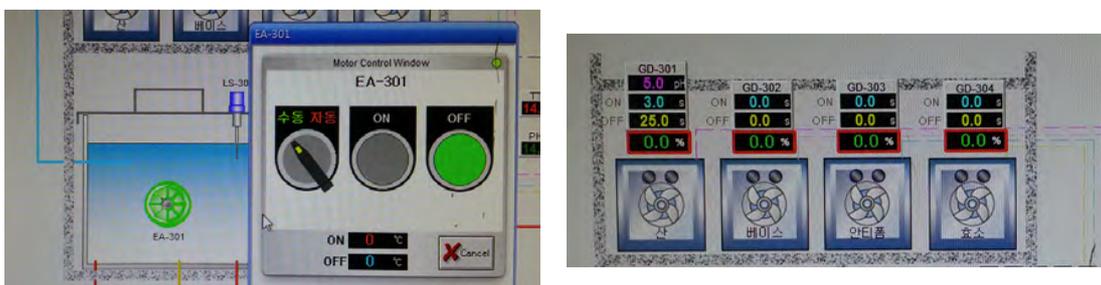
10) CHESAF 와 당화발효조 연결 및 당화발효조 점검

당화조에 일정 공정수 투입 (pH 미터 보호 및 측정)
 효소 및 pH 조절 펌프 연결 확인
 2차 멸균 (100 °C, 15분), 교반기 가동
 당화발효조 점검사항

- pH 센서 확인 (검정선 확인)
- 펌프 유량 및 용액 확인 (pH 조절액 및 효소 확인)



11) 당화 발효조 온도 조절 및 pH 조절, 효소 투입



3. 전처리 운전정지

- 1) 바이오매스 원료투입 중지
- 2) NaOH 용매 공급중지
- 3) 트윈스크류 가동 중지(용매 중지 후 1~2분 후)
- 4) 탈수장치 가동중지(압출기 중지 후 1~2분 후)
- 5) 탈수장치 세척수 공급중지
- 6) 드럼필터 가동 중지 및 진공펌프 가동 중지
- 7) 전처리기 PID 설정 값 실온으로 입력 후 매뉴얼로 전환

4. 일반 가동 순서 요약

- ① 전처리 바이오매스용 Twin Screw가 조합된 샤프트를 결합한다.
- ② CHEMET(Twin Screw reactor) 컨트롤 밸브를 95 °C로 설정한다.
- ③ 바이오매스를 호퍼에 투입한다.
- ④ 호퍼를 가동 시킨다.
- ⑤ 용매공급 펌프를 가동한다.
- ⑥ 트윈스크류에 바이오매스를 공급 30초 후 용매를 공급한다.
- ⑦ 당화조 공급 장치를 가동시킨다.
(셀링 형성을 확인 후 당화발효조에 연결한다.)
- ⑧ 당화조 효소, Acid 펌프를 가동한다.
- ⑨ 드럼필터를 가동한다.
- ⑩ 미리 배양한 주모를 공급한다.

유지 관리 매뉴얼

1. 점검 사항

1.1. 상시 점검

1.1.1. 전처리 설비의 사용 전 점검 사항으로 반드시 확인하여 가동 중 발생할 수 있는 문제를 사전에 확인하여야 한다.

요 건 (Requirements)	Results	Remarks
1. 사용 전 점검		
- Vessel 의 내 외부는 청결한가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- Main Air 의 공급 압력이 5bar이상을 유지하는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- Steam 공급 압력이 2bar 이상을 유지하는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 전기 제어반 내에서의 이상 소음은 없는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- Server PC 의 HMI S/W 는 정상적으로 구동 중인가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 사용 하려는 설비에 관련된 전기스위치는 모두 투입 되어 있는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- Sensor Port 에 사용하려고 하는 Sensor는 모두 부착되어 있는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 드레인 라인 및 Steam 트랩은 정상적으로 작동 되는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 모터의 속도제어는 잘 이루어지는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 각각의 자동밸브를 수동 조작하였을 때 작동의 이상은 없는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
2.사용 중 점검		
- 모터의 속도제어는 잘 이루어지는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 펌프는 제대로 작동하고 있는가?	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	

1.2. 정기 점검

1.2.1. Fermenter의 정기점검 사항으로 반드시 확인하여 공정 중 문제가 발생할 수 있는 문제를 사전에 확인하여야 한다.

요 건 (Requirements)	Checking Cycle	Results	Remarks
1. 모터 및 감속기			
- MOTOR 회전 시 소음은 크지 않은가?	분기 1회	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 감속기 외부에 누유는 없는가?	사용전	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 감속기 회전 시 소음은 크지 않은가?	분기 1회	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
2. SEAL 및 MAGNETIC DRIVE			
- SEAL의 누수는 없는가?	사용전	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- SEAL 회전 시 소음은 없는가?	사용전	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
3. 스크류			
- 스크류는 마모되지 않았는가?	사용전	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	
- 스크류 날개 부분이 휘지 않았는가?	사용전	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No	

6절 컴퓨터 소프트웨어를 활용한 공정모사와 경제성 평가

1. 다양한 화학용매 적용을 통한 전처리 공정

가. 경제성분석

□ 목재나 볏짚 등과 같은 농업 부산물로부터 에탄올 발효에 필요한 단당류를 얻기 위해서는 당화 과정을 용이하게 해 주는 전처리 과정이 필수적이다. 기존의 전처리 방법으로는 희석 산 처리법 (weak acid), 저온 암모니아 침지법 (SAA), 암모니아 폭쇄 (AFEX), 염기-산 이단 전처리 (ammonia-acid pretreatment) 과 같은 방법들이 있으며 세부 반응조건은 아래와 같다. 이들 중 pilot 규모 공정에 적용되고 있는 대표적인 공정은 NREL 약산과 DuPont의 암모니아 공정으로 본 경제성 분석에서 AA공정과 비교를 위한 모델공정으로 삼았다.

표 3.6-1 다양한 바이오배스의 전처리 방법

Technologies and representative reaction conditions for biomass preparation by pretreatment considered in this project					
Pretreatment technology	Chemicals used	Temperatuer, °C	Pressure, atm absolute	Reaction times, min	Concentrations of solids, wt.%
Dilute sulfuric acid-cocurrent	0.5-3.0% sulfuric acid	130 - 200	3 - 15	2 - 30	10 - 40
Flowthrough pretreatment	0.0-0.1% sulfuric acid	190 - 200	20 - 24	12 - 24	2 - 4
pH controlled water pretreatment	water or stillage	160 - 190	6 - 14	10 - 30	5 - 30
AFEX/FIBEX	100% (1:1) anhydrous ammonia	70 - 90	15 - 20	<5	60 - 90
ARP	10-15 wt.% ammonia	150 - 170	9 - 17	10 - 20	15 - 30
Lime	0.05-0.15g Ca(OH) ₂ /g biomass	70 - 130	1 - 6	1 - 6 h	5 - 20
Lime+air	0.05-0.15g Ca(OH) ₂ /g biomass	25 - 60	1	2 weeks - 2 months	10 - 20

□ 새로운 전처리 공정 개발에 앞서, 앞서 언급한 공정들을 통해 생산되는 결과물의 최종 생산가 예측과 생산가 분석을 통해 어떤 부분이 생산가 상승에 기여도가 높은지 등을 확인할 필요가 있다. 경제성 평가를 위해 전산 모사기의 사용이 필수적이다. 공정의 전산 모사에 사용되는 전산 모사기로는 Aspen Plus® (이하 아스펜) 와 SuperPro Designer® (이하 슈퍼프로)와 같은 소프트웨어가 대표적이다. 아스펜의 경우 오래 동안 엔지니어링 현장에서 그 정확성이 검증되었으나 사용이 지나치게 복잡하고 회분식 공정 모사에서의 불편함이 보고되기도 하였다. 반면, 슈퍼프로의 경우 아스펜과 같은 다양한 열역학 상태 방정식이나 물질 데이터를 제공하고 있지 않고 있으나 기본적인 열역학 및 물질 데이터를

포함하고 있으며 필요에 따라 데이터를 추가할 수 있어 그 사용 방법이 무척 간단하다. 특히, 회분식 공정 모사용 모델을 비교적 충실히 제공하고 있어, 생물 공정을 모사하고 경제성을 평가하는데 널리 사용되고 있다. 본 연구에서는 혐기성 용매와 산성용액을 순차적으로 이용하여 효과적으로 lignin과 hemicellulose를 제거하여 당회수율을 높이고 에너지 비용이 낮은 융합 공정을 제안하고 슈퍼프로 전산 모사기를 이용해 경제성 평가를 수행하여 기존 방법에 대한 경쟁력을 확인하고자 한다. 기존 방법과의 비교를 위해서는 현재 상업화규모에 진입한 공정 또는 상업화 규모에서 경제성 분석이 이루어진 공정이 모델로 필요하다. 목질계 바이오매스를 이용한 에탄올 생산의 경우, pilot 및 demonstration 공정 규모로 생산 설비가 없어 구체적인 설비/운영비에 대한 데이터를 얻기가 힘들어 경제성 분석 및 생산가 분석 자료를 수집하기가 어려운 점이 있다. 이러한 이유로 pilot 및 demonstration 규모 공정이 운영되고 있어 설비/운영비 비교가 용이하며 재료비용 및 생산가 측면에서 여러 가지 신뢰할 만한 정보의 축적이 많은 에탄올 생산 공정을 기준으로 슈퍼프로를 이용한 모사를 진행하기로 했다.

• **Numerical simulator**

- - Easy estimation of mass balance and unit process condition
- - Prediction of possible hazardous situation
- - Easy cost analysis and sensitivity analysis

• **Writing our own codes vs. Commercial software**

	Writing our own codes	Commercial software
기본구조	programming language	Easy-to-use
용도	Invention of new types of units	Previously established units
Physical & chemical properties	Full information	Abundant DB
Mathematical models for unit operations	Full knowledge	Support of various model
비용 및 활용도	Cheap and flexible	Expensive and inflexible
비교	SuperPro Designer	Aspen Plus PRO/II (DYNSIM)

그림 3.6-1. 경제성 분석 tool

□ 본 경제성 분석에서는 논문, NREL, DOE에서 정기적으로 발표하는 자료들, 주관과 협동 기관에서 실험실 규모에서 얻은 실험값들을 입력 값으로 사용하였다. 슈퍼프로를 이용한 경제성 분석을 통해 에너지비용 등을 포함한 운영비용 및 전처리/당화/발효 공정 설비 비용 예측을 통해 여러 가지 전처리 공정을 비교하여 경쟁력 있는 전처리 공정을 선별 작업을 진행하였다.

- 에탄올 생산 공정 모사를 위해 plant 규모 50~60 MGY (Million Gallon per Year)규모를 기준으로 하여 '00년과 '07년 NREL SOT (State of Technology model), 논문 및 실험에서 확보한 전처리/당화/발효 공정 값을 입력하였다. 이때 사용 된 주요 공정 값은 바이오매스 투입량, 용수 및 전처리용매 사용량, 고체성분, 반응조건, 전처리율, 효소사용량, 효소 당화율 및 발효율 등이다. 개별 전처리공정에 사용 된 공정 값과 함께 50 MGY를 기준으로 모든 공정에 공통적으로 적용 된 값들을 정리하였다.

표 3.6-2 전처리 공정변수 및 공정별 실험값

전처리방법	Weak Acid	SAA	AFEX	A-A
Solid	40%	10%	25%	10%
Solvent	1% 황산	15%암수	15%암수	15%암수+3%황산
반응온도	190 °C	60 °C	95 °C	130 °C
반응시간	5분	20 시간	20분	40분
당화 SL	20%	20%	20%	20%
C6 당화율	95%	90%	95%	98%
C5 당화율	80%	80%	85%	78%
발효 SL	20%	20%	20%	20%
C6 발효율	95%	95%	95%	100%
C5 발효율	85%	90%	85%	60%

표 3.6-3 슈퍼프로를 이용한 모사에 사용된 바이오에탄올 상업화 공정규모 및 공정변수

에탄올 생산량	50-60 MGY
바이오매스 가격 (Rice straw)	\$ 60/ton
효소 가격	\$ 5/kg
효소 첨가량	1% (w/w cellulose +hemicellulose)
효소당화 반응기 size	1 Mgal
발효기 size	1 Mgal

- 이러한 전체공정에 대한 모사는 각 공정의 상대적 비교가 가능할 뿐만 아니라 개별 공정 중 개선효과가 큰 공정 선별이 가능한 등 많은 유용성이 있다고 하겠다. 따라서 본 보고에서는 각 전처리 방법에 따른 전처리 및 당화 공정의 운영비용, 설비가격, 에탄올 생산가 비교에 중점을 두도록 하겠다. 보다 정확한 공정비용 계산을 위해 화학물질의 회수부분까지 고려하여 경제성분석을 수행하여 기존 상업화공정을 최대한 모사하도록 노력하였다. 슈퍼프로를 이용한 에탄올 생산 전공정에 대한 경제성 분석을 수행하였으나, 본 과제

에서는 파쇄/전처리/당화 과정까지를 포함한 에탄올 생산에 필요한 당생산 공정까지. 제한하여 경제성 분석을 진행하였다하였으며, 이에 따른 공정 흐름도는 다음과 같다.

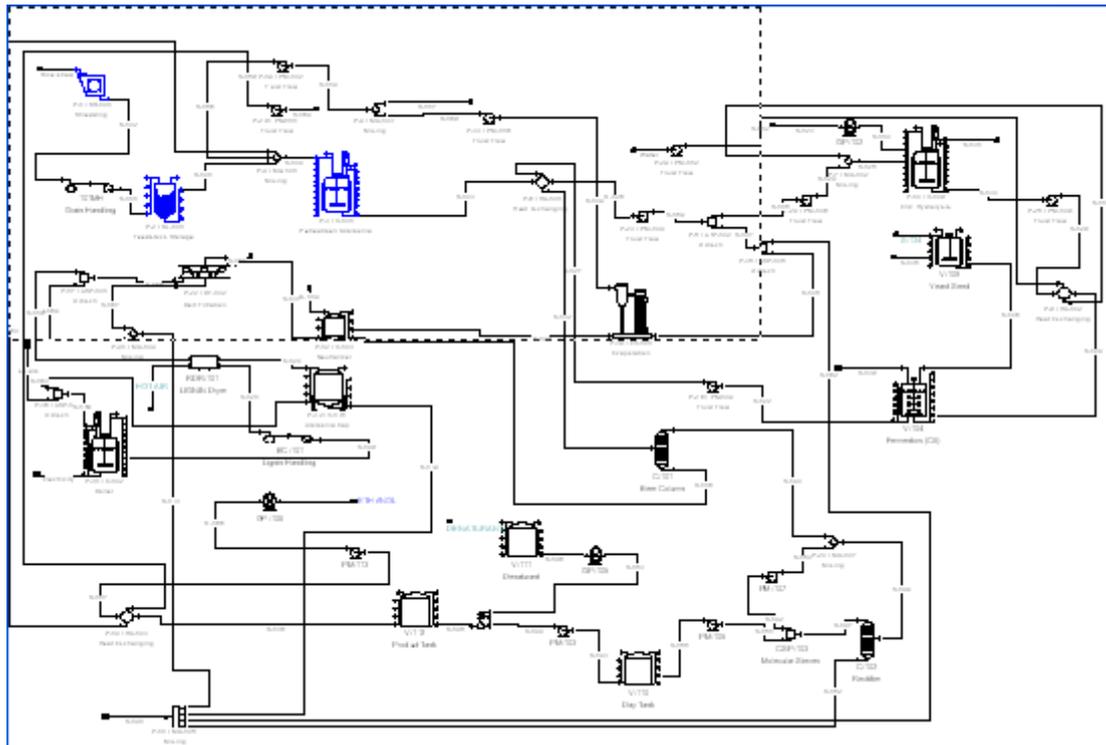


그림 3.6-2. 바이오매스를 이용한 전처리/당화/발효/증류 공정도

나. 파쇄 및 전처리 공정

- 본 모사에 기준으로 사용 된 55 MGY 에탄올 plant는 미국에서 상업화공정의 기준으로 사용되는 규모로 corn stover 또는 볏짚 등의 바이오매스를 시간 당 75 - 100 ton을 처리 할 수 있는 규모이다. 이때 도입되는 바이오매스는 파쇄과정을 거쳐 전처리 용액 (산 또는 염기)과 일정량의 물이 혼합되어 전처리 반응기에 도입된다. 이때, 고체비율은 공정에 따라 10~40 % 변위를 가진다. 실험에 사용 된 볏짚은 고체분석 결과 cellulose 39.5%, hemicellulose 24.4%, 비발효성 성분 36.1 %를 확인하였다.
- 전처리 공정은 바이오매스에 산 또는 염기를 처리하여 고온/고압 상태를 부여해 고체성분 내에 cellulose를 최대한 잔류 시키는 동시에 목적에 따라 lignin 또는 hemicellulose를 선택적으로 분별하는 과정이다. 이를 위해 전처리 용액의 농도, 전처리 온도 및 반응시간의 최적화가 이루어 져야 되며 각 공정별 최적화 조건은 batch 실험 및 0.225 L 침출 반응기에서 얻은 최적 조건 값을 사용하였다. 본 경제성 분석의 reference로 사용 된 NREL 약산 전처리는 190 -220 °C 고온조건에서 묽은 황산을 이용한 짧은 전처리로 운전비용이 저렴한 장점을 지니나 고온/약산 조건하에서 발효부산물질 생산이 많은 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하고자 저온 전처리인 SAA, AA에서 실험하여 그 모사결과를 NREL 약산 전처리와 비교하였다. 전처리율은 NREL SOT와 자체실험을 통해 얻은값을 이용하였다.

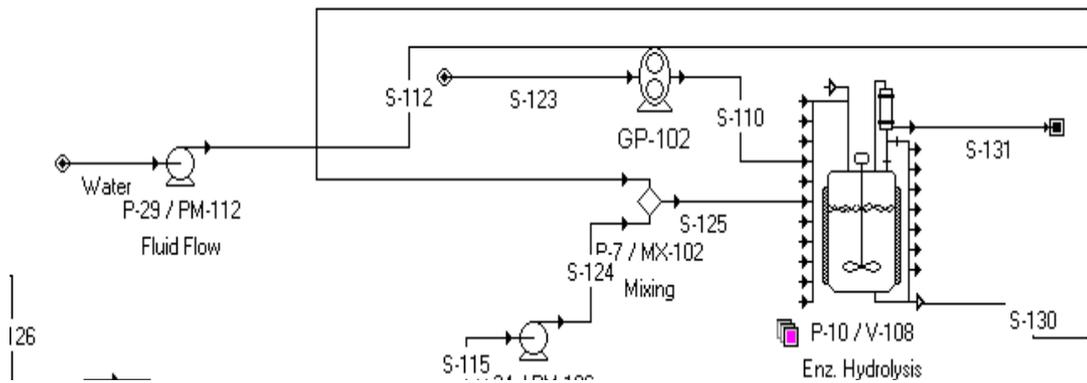


그림 3.6-3. 파쇄 및 전처리 공정 모식도

다. 효소당화

□ 두 번째 반응기에서는 전처리과정에서 생산된 고체성분에 대한 효소 가수분해가 수행된다. 당화를 위한 반응기는 산업화 공정에서 일반적으로 사용되는 1,000,000 gal 규모의 반응기를 이용하였으며 생산된 전처리 결과물을 멸균시킨 후, 50 °C에서 48시간을 기준으로 200 rpm 교반조건 하에서 당화를 진행하였다. 반면, 약산전처리의 경우 NREL '07년 SOT에 따르면 일반적인 당화온도인 50 °C 보다 높은 65 °C에서 36시간 당화를 수행하였다. 당화율은 전처리 종류 및 조건에 따라 결정되며 각 전처리 공정별 C5와 C6 당화율은 문헌 보고값 및 자체 실험값을 사용하였다.

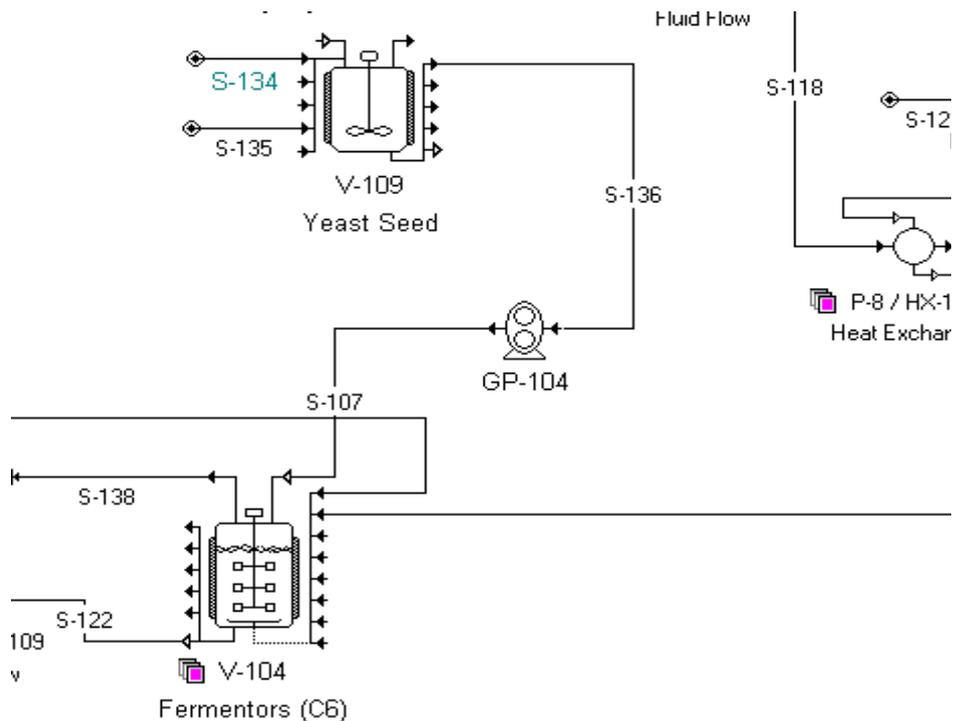


그림 3.6-4. 효소당화 공정 모식도

라. 전처리 용매

□ 전처리 공정에서 첫 번째 입력 흐름은 바이오매스의 유입이며 다음은 전처리용매의 유입이다. 각 공정마다 첨가되는 바이오매스의 양은 에탄올 수율에 따라 85 -100 ton/hr로 변화하며 이에 따라 전처리용매의 종류와 유입속도는 바이오매스 투입량 및 공정별로 차이가 있다. 본 실험에 포함 된 3가지 공정 이외에 물 흐름법과 pH 제어법을 포함하여 전처리 용매 사용량을 정리하였다. 표에서 보는 바와 같이 NREL 약산 전처리의 경우 첨가되는 용매의 양이 가장 적은 것으로 나타나 전처리 과정에서 낮은 에너지 사용량과 후처리 공정에서 운영비가 낮을 것으로 예상된다. 침출공정인 AA와 ARP의 경우, 바이오매스 대비 최대 19배의 용매가 필요하여 높은 에너지와 후처리 비용이 예상되었다. AA와 SAA의 경우 바이오매스 중량대비 9배의 용매를 사용함으로 NREL 전처리에 비해 용매 및 에너지 비용이 증가할 것으로 예측되었다.

표 3.6-4 전처리 공정별 용매종류 및 사용량

전처리 공정	용매	회분당 투입량 (벧짚 1 ton 기준)
NREL 약산 전처리	0.5-3% 황산	1500 - 9000 L
SAA	15% 암모니아	9000 L
AA	15% 암모니아+3% 황산	9000 L 암모니아 + 9000 L 황산
pH controlled water	water	2000 - 19000 L
ARP	10-15% 암모니아	9000 - 18000 L
Lime	10% lime	4000 - 19000 L

다음은 각 전처리 용매의 질량당 예상가를 정리하였다. 자료는 슈퍼프로 전산 모사에서 제공하는 값을 기본적으로 사용하였으며 필요에 따라 가격정보 사이트 (www.purchasing.com)를 참조하여 최신 가격을 사용하였다. 지역과 시점에 따라 용매의 가격이 다를 수 있지만, 각 전처리 방법에 따른 상대 평가가 목적이므로 이 값으로 유효한 평가가 가능하다. 전처리/당화/발열과정에서 가열과 냉각을 위해서는 전기 및 스팀을 이용한 가열과 용수를 이용한 냉각이 필요하다. 다음 표는 경제성분석에 사용 된 열전달 매체의 단위당 가격을 정리한 것이다.

표 3.6-5 전처리 용매 및 첨가제의 가격

용매 및 첨가제	가격 (\$/ton)
황산 용액 (99.5 %)	60
Cellulase	5000
수산화나트륨 용액 (32 %)	100
무수 암모니아	350
암모니아 용액	200
소석회	50
Octane	720

표 3.6-6 열 전달 매체의 가격

열전달 매체	단위당 가격 (\$/ton)
고압 증기 (242°C)	20
일반 증기 (152°C)	12
냉각수 (25°C)	0.05

마. 전처리/당화 공정 모사결과

□ 본 과제의 범위는 목질계 바이오매스를 이용하여 전처리와 당화공정을 이용한 발효당 생산을 통한 에탄올 생산이므로 위에서 나열한 전처리/당화/발효의 전 공정 중, 당생산과 관련된 전처리와 당화공정을 중심으로 슈퍼프로를 이용하여 NREL 약산전처리, SAA AA의 경제성 분석을 시도하였다. 본 경제성분석에 포함 된 파쇄/전처리/당화공정 모식도는 아래와 같다.

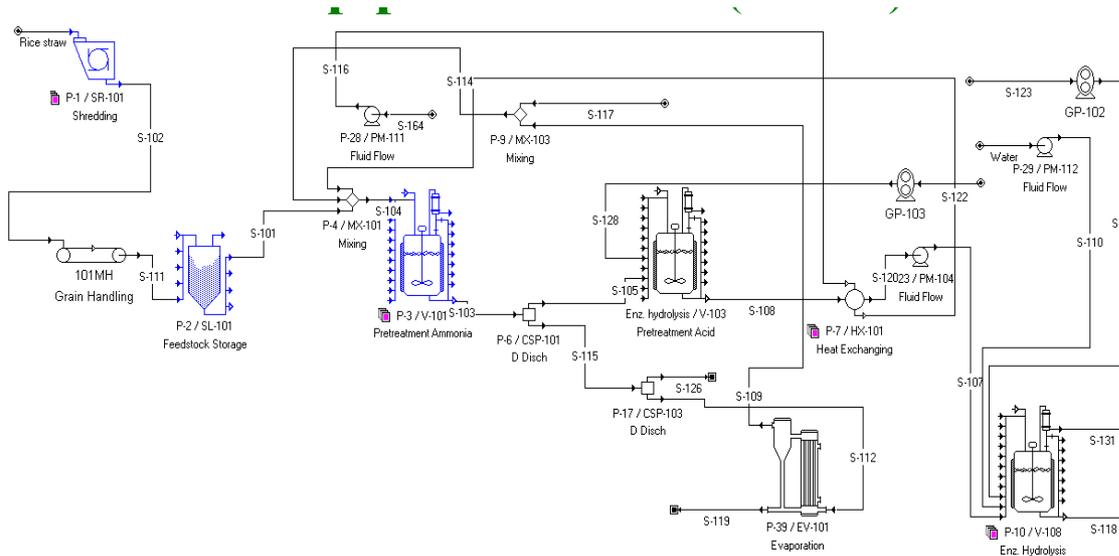


그림 3.6-5. 바이오매스를 이용한 전처리와 당화공정도

□ 상업화 공정의 경우 시간당 100 ton의 바이오매스가 파쇄 되어 전처리 반응기로 유입되는 과정에서 용수와 함께 전처리용매와 혼합된다. 이때 용매 혼합량은 설비의 size와 에너지 비용을 결정하게 된다. NREL 약산 전처리의 경우, 바이오매스 loading이 40%로 가장 높아 용매 사용이 최소화 된 공정으로 나타났으며, SAA의 경우 암모니아 침지에 사용되는 용매의 양이 바이오매스에 비해 9배 정도임을 알 수 있었다. 용매와 혼합된 바이오매스는 고온/고압 과정의 전처리를 거쳐 효소당화가 용이한 형태의 전처리 결과물로 생산된다. 이때 산성용매의 경우 다량의 xylose를 함유하고 있는데, xylose는 전처리액의 발효부산물 농도에 따라 발효 가능성이 결정된다. 전처리 과정에서 생산된 고체결과물은 다음 단계인 당화조로 이동된다. 이때 필요에 따라 냉각이 이루어지며 열교환기를 거쳐 열을 회수한다. 당화조로 옮겨진 전처리 결과물은 효소당화과정에 의해 C5인 xylose와 C6인 glucose로 전환되어 다음 공정인 발효조로 이동된다. 당화를 거쳐 나온 당 생산을 비교했을 때, cellulose의 분해산물인 glucose의 경우 AA 공정의 생산량이 제일 높았다. 이는 염기와 산의 순차적 전처리로 생산되는 고체잔류물의 cellulose 함량이 높았던 점과 전처리 후 별도의 세척과정 없이 전처리 결과물을 당화에 사용될 수 있으므로 추가 세척으로 당손실이 불가피한 기타공정에 비해 glucose 생산량이 높았다고 예상할 수 있다. Xylose의 경우 고온에서 산으로 처리한 NREL 약산 전처리의 생산량이 가장 낮았다. 이는 고온/고압에서 산의 가수분해 작용에 의해 많은 양의 hemicellulose가 xylose로 분해되어 액상으로 이동하여 유실됐기 때문이다. Glucose와 xylose를 합한 발효당 총량의 경우

염기를 이용한 전처리 인 SAA와 AA의 생산량이 많음을 알 수 있었다. 결과를 통해 염기를 이용한 전처리가 당회수율 부분에서 약산을 이용한 전처리에 비해 유리함을 알 수 있었으며 발효과정에서 보다 높은 알코올 생산이 가능하리라 예측되었다.

표 3.6-7 전처리/당화 공정에 의한 C5, C6 생산량

	NREL 약산	SAA	AA
볏짚 투입량 (Ton/hr)	100	100	100
Glucose 생산량 (Ton/hr)	27.5	27.8	30.3
Xylose 생산량 (Ton/hr)	7.2	13.6	12.0

- 상업화 규모 plant 설립에 예상되는 비용을 비교할 때, 공정이 간단한 NREL 약산 전처리의 설비비용이 가장 낮은 것으로 나타났다. NREL 전처리의 경우 약산을 이용하여 짧은 시간 전처리를 수행함으로써 반응기 규모가 작고 약산회수를 위한 장치가 필요 없어 설비비용이 감소된다. 반면 SAA와 AA의 경우 생산되는 lignin 제거를 위한 세척공정이 필요하고 암모니아 회수장치 등과 같은 고가의 설비투자에 추가비용이 발생함으로써 NREL 약산 전처리에 비해 상대적으로 높은 설비비용이 발생하였다. 설비비용에 많은 비중을 차지하는 주요 설비구매비용을 감안했을 때, NREL 전처리와 AA가 낮았으며 SAA는 NREL 약산 전처리에 비해 설비비가 40% 가량 높은 것으로 나타났다.
- 운영비의 경우 설비와 관련 된 운영비 부분에서 공정이 간단한 반응시간이 짧은 NREL 약산 전처리와 AA가 비용이 낮은 것으로 보였다. SAA는 가장 저온에서 공정이 운전 됨으로 운영비 중에서 utility비용이 다른 공정에 비해 낮은 것으로 나타났다. AA의 경우 반응온도가 SAA보다 높은 130 °C이며 복합공정으로 인한 공정의 복잡성으로 인해 소모되는 에너지 비용이 상대적으로 높아 운영비가 높은 것으로 나타났다. 전체적인 운영비용을 비교할 때, NREL 전처리가 재료비와 설비관련 운영비가 낮아 운영비용 면에서 가장 유리한 전처리로 판단되었다. 하지만 NREL 약산 전처리의 경우 설비투자와 운영비용이 낮은 장점이 있으나 다른 전처리에 비해 C5 회수율이 낮아 발효당의 양이 상대적으로 적어 에탄올 생산을 통한 수입이 감소되는 문제를 예상할 수 있었다.

표 3.6-8 전처리/당화공정 주요 설비비용 (\$M)

	NREL 약산	SAA	AA
설비 구매 (\$M/yr)	16.4	22.5	16.7
설치 비용 (\$M/yr)	13.2	15.9	13.4
Engineering+construction (\$M/yr)	36.2	48.3	36.8
Capital cost (\$M/yr)	123.9	163.6	127.1

표 3.6-9 전처리/당화과정 운전비용 (\$M)

	NREL 약산	SAA	AA
Raw materials (\$M/yr)	47.5	71.9	57.5
Labor-dependent (\$M/yr)	0.5	0.7	0.7
Facility-dependent (\$M/yr)	20.7	27.7	21.1
Utilities (\$M/yr)	30.4	13.1	37.0
Total (\$M/yr)	99.2	113.6	116.4

- 전처리/당화 과정에 사용되는 벃짚의 경우 수집비용을 포함한 구입비용을 \$60/ton으로 예측하여 모사에 사용하였으며 모든 전처리 공정에 사용되는 벃짚은 상업화 공정인 55 MGY 에탄올 생산 규모를 기준할 때 25% 에탄올 수율 기준으로 때 바이오매스 구입에 \$34,291,582가 필요함을 알 수 있으며 전처리/당화에 투입되는 재료비의 45~55%를 차지함을 알 수 있다. 바이오매스 전처리를 위해 투입되는 용매는 염기전처리의 경우 암모니아용액과 산처리의 경우 황산이 사용된다. 특히 NREL 전처리의 경우 투입되는 황산의 비용이 저렴하고 황산을 0.5~3%로 희석하여 사용함으로 전처리 용매 구입에 사용되는 비용이 가장 저렴한 것을 알 수 있었다. 반면 AA의 경우, 2단 전처리를 위해 염기와 산이 모두 사용되며 특히 염기침출 후 산을 첨가하여 순차적 전처리를 수행함으로 산처리의 효과를 보기 위해 더 많은 산을 투입되어 용매비용이 증가함을 알 수 있다. 당화과정에서 첨가되는 효소는 cellulase와 hemicellulase 유입량 대비 2%로 조정하여 사용하였다. SAA의 경우 염기 전처리에 의해 연간 효소비용이 \$32,000,000이 소요되어 NREL 약산 전처리에 비해 150% 비용이 증가함을 보였다. 이는 바이오매스 구입비용과 비슷한 액수로 전체 재료비의 40-50% 가량을 차지한다. SAA의 경우 전처리 과정 중 암모니아용액에 의해 lignin이 제거되고 많은 양의 cellulose-hemicellulose 복합체가 잔류하며 복합체 당화를 위해 많은 양의 효소가 소모됨을 알 수 있었다. 전체 재료비 구조를 살펴 볼 때, NREL 전처리와 AA가 용매의 비용과 효소사용량이 낮은 장점을 보였다.
- AA는 NREL 약산전처리에 비해 당 생산량이 20%가량 높은 것으로 나타났으나 용수사용량이 많아 운전비용이 NREL 약산 전처리에 비해 20% 정도 높게 예측되었다. 향후, AA 전처리가 보다 높은 경쟁력을 가지기 위해서는 용수사용량을 최소화하고 당화시간을 줄이는 공정개선이 필요함을 알 수 있었다. 슈퍼프로를 이용한 바이오매스 전처리/당화 공정의 경제성분석 tool을 확보하였으며 다양한 전처리 공정의 경제성 분석을 통해 비용감소, 당 생산 증가 및 바이오알코올 수율 향상기술 제시가 가능하며 개발공정의 우수성의 객관화가 가능하겠다.

사. 섬유소계 에탄올생산 전체공정 모사결과

- 위에서 벃짚을 이용한 전처리/당화과정의 경제성 평가를 위해 슈퍼프로를 이용하여 설비비용, 운전비용, 당 생산량 등을 예측하고 전처리 공정별 비교를 수행하였다. 전처리/당화 공정에 국한하여 수행된 경제성 분석결과 설비와 운전비용 등에서 NREL 전처리가 다른 전처리에 비해 비교우위에 있음을 알 수 있었다. 하지만 NREL 약산 전처리의 경우, 낮은 당 생산성으로 인해 에탄올 수율 감소가 예상되고 이는 생산가 상승으로 이어질 수 있

어, 보다 신뢰성 있는 경제성 분석을 위해서는 최종산물 생산까지 포함하는 전체 공정에 대한 경제성 평가가 필요할 것으로 판단되었다.

- 전처리/당화/발효/정제의 전 과정을 포함한 경제성 분석 수행을 위해서는 각 공정별 공정 변수 확보가 선행되어야 한다. 공정변수는 보고서, 논문, 특허, 실험을 통해 수집이 가능한데, 목질계를 이용한 에탄올 생산의 경우에 각 공정에 대한 pilot 규모의 공정변수 확보가 어렵고 목질계 당화액을 이용한 에탄올생산 실험데이터가 부족하여 전 공정의 경제성 분석에 어려움이 있었다. 이에 반해 에탄올의 경우, NREL 및 DOE에서 약산전처리를 이용한 pilot 규모 에탄올 생산과 관련 된 전체 공정에 대한 경제성 분석 자료를 정기적으로 발표된다. 이를 기반으로 다양한 전처리를 이용한 목질계 바이오에탄올 생산 공정에 대한 경제성 분석 수행이 에탄올에 비해 용이하다. 전처리 공정은 에탄올과 에탄올 생산 공정에서 공통되는 부분으로 경쟁력 있는 에탄올 생산을 위한 전처리 공정 선정을 위해 에탄올을 기반의 경제성 분석이 충분히 적용 될 수 있다고 판단된다.
- 슈퍼프로를 이용한 SAA와 AA공정의 경제성 분석에 앞서 슈퍼프로를 이용한 경제성 예측이 유효하며 신뢰성이 있는지 검증 할 필요성이 있다. 이를 위해 NREL에서 2000년과 2007년에 발표 한 SOT와 Bruce dale 등의 논문에서 공정 값을 수집하여 슈퍼프로를 이용한 경제성 분석을 수행하였다. 슈퍼프로를 통해 얻은 결과 값을 다시 SOT와 비교하여 경제성 분석의 유효성을 검증하였다. '00년과 '07년에 발표 된 SOT인 NREL (SOT)와 SOT 실험값들을 슈퍼프로에 입력하여 얻은 결과인 NREL을 비교하였다. 동일한 규모의 에탄올 생산 공정에서 전처리/당화/발효율을 동일하게 입력했을 때 21.2와 21.1%의 매우 근접한 수율을 확인할 수 있었다. 에탄올 생산가를 비교할 때 NREL 예측 값과 슈퍼프로를 이용한 예측 값에 5% 정도의 차이가 있었다. 전체적으로 에탄올 생산량, 생산가, 판매 수익 및 운영비용은 큰 오차 없이 예측할 수 있었으므로 슈퍼프로가 비교적 정확하게 에탄올가격을 예측할 수 있다는 결론을 얻었다. 나아가 슈퍼프로를 이용한 SAA와 AA 에탄올 생산 공정의 예측에도 유용하게 쓰일 수 있다고 판단되었다. 슈퍼프로로 예측한 3개의 공정 간의 에탄올 생산가를 비교했을 때, AA를 이용한 전처리의 생산가가 \$2.36/gal로 가장 낮은 것으로 나타났으며 약산 전처리의 경우 낮은 설비와 운영비에도 불구하고 당수율이 낮은 이유로 생산가 \$2.44/gal을 보였다. SAA의 경우 에탄올 생산가가 \$2.53/gal로 비교대상 가운데 가장 높은 것으로 보였다. 이는 용수사용량이 많고 대용량의 전처리 반응기가 필요하여 전처리/당화설비 비용이 높았기 때문이라 판단된다. AA의 경우, 130 °C 저온에서 40분간 반응을 진행시킴으로 반응기 규모를 줄일 수 있어 설비/운전비용 감소가 가능하며 당 생산량이 높아 향후 상업화에 적합한 후보로 판단된다.
- 에탄올 생산가를 낮추기 위해서는 바이오매스 수집, 전처리, 당화, 발효 전 과정에서 비용저감과 최적화가 수행 돼야한다. 기존의 전처리율 또는 당화율을 기준으로 하여 우수한 전처리 공정을 선별하기보다 전체공정을 통합한 경제성 분석을 통해 생산되는 산물의 생산가를 기준으로 전처리공정을 비교하는 것이 보다 정확하다고 판단된다. 바이오알코올 생산에 있어 보다 신뢰성 있는 경제성 예측을 위하여 NREL, DOE 및 선진사에서 발표하는 최신 공정 값을 입수하고 실험을 통해 다양한 실험값들을 확보하여 경제성 분석에 사용했을 때 보다 정확하고 유용한 경제성 분석이 가능하리라 생각된다. 또한 이러한 경제성 분석은 새로이 도입되는 공정의 경제성을 판단하고 pilot 규모의 실험에 앞서 향후 경제성 확보의 가능성을 타진하는 등 여러 가지 면에서 유용하게 사용될 수 있다.

2. NaOH 재순환 연속 전처리 (twin extrusion) 공정

가. 경제성 평가

□ 바이오매스 (EFB)를 이용한 에탄올 생산의 경제성을 평가하기 위해서는 섬유소계 에탄올 생산 공정에 투입되는 바이오매스의 원가, 전처리 비용, 당화, 발효 및 분리/정제 비용을 상업용 규모에 맞추어서 원가를 산정하여 비교 검토하여야 한다. 본 연구에서는 단위 공정의 효율 및 경제성 평가에 유용하게 적용되는 프로그램인 SuperPro Designer (Intelligen, Inc.)을 사용하여 현재까지 본 연구에서 얻어진 결과를 50 M gal. 상용화 규모의 에탄올 생산 공정에 적용하여 생산 비용을 모사하였다.

나. 전처리 특성

□ 섬유소계 바이오매스(EFB)를 (주)창해에탄올에서 적용한 extrusion 전처리 공정에 적용할 경우, 바이오매스를 연속으로 투입가능하며, 특히 적용된 NaOH수용액은 리그닌을 효율적으로 액상으로 분별 가능하다. 또한 반응기내의 적절한 체류시간을 활용하여 전처리된 바이오매스는 효소 당화에 높은 효율성을 나타내었다.

		NREL	창해
전처리 조건	반응온도 °C	190	95
	용매 (wt %)	1.6	1.0
	Solid loading: solid/liquor (%)	30	16
전처리 결과	Cellulose → glucan (%)	81	90
	Waste liquor (%)	90	-
	Hemicellulose → xylan (%)	65	50
	Waste liquor Recycle (%)	8.8	80
당화	당화&발효 시간 (hr)	168	72
	Glucose recovery (%)	89.5	
	Xylose recovery (%)	75	
발효	Glucose → Ethanol (%)	85	90
	Xylose → Ethanol (%)	75	
	MESP (\$/gal)	2.36	2.67

그림 3.6-6. 전처리 공정 비교 (NREL; dilute acid) vs (창해; NaOH extrusion)

다. 에탄올 생산가 예측

□ 1절 경제성 분석 서론과 배경을 통하여 언급된 경제성 분석 방법을 통하여 최종적으로 에탄올 생산가를 분석하였다. NaOH용매를 이용하여 extrusion반응을 통한 전처리 공정을 기준으로 전 공정을 평가하였으며, 최종 에탄올 생산 가능 가격은 \$ 2.67/gal 으로 평가되었다. 이러한 예측 가격은 2011년 NREL의 약산공정을 기준으로 평가된 \$ 2.36/gal 보다 낮은 수준으로 확인되나 아래와 같이 평가 과정에서 예측되는 요소인자를 고려할 경우, 실질적으로 scale-up할 때 필요한 고려 사항을 효과적으로 구축할 수 있겠다.

표 3.6-10 전처리/당화 운전 비용

	NREL 약산 (corn stover)	SAA (EFB)	AA (rice straw)
Raw materials (\$M/yr)	47.5	50	71.9
Labor-dependent (\$M/yr)	0.5	0.5	0.7
Facility-dependent (\$M/yr)	20.7	19.3	33.6
Utilities (\$M/yr)	30.4	34.4	37.0
Total (\$M/yr)	99.2	104.2	143.2

표 3.6-11 전처리/당화 설비 비용

	NREL 약산	창해	AA
설비 구매 (\$M/yr)	16.4	17.8	16.7
설치 비용 (\$M/yr)	13.2	13.0	13.4
Engineering+construction (\$M/yr)	36.2	36.9	36.8
Capital cost (\$M/yr)	123.9	125.7	127.1

표 3.6-12 당 생산량 및 에탄올 생산가

	NREL 약산	창해	AA
벧짚 투입량 (ton/hr)	100	100	100
Glucose 생산량 (ton/hr)	27.5	22.1	20.3
Xylose 생산량 (ton/hr)	7.2	7.0	7.0
에탄올 생산가 (\$/gal)	2.44	2.67	2.98

- 전처리 공정별 예상 에탄올 생산비용에 영향을 끼친 민감도 부분을 보면, 적용된 바이오매스의 글루칸, 자일란의 전환 수율 그리고 최종 당 생산율, 전처리 공정을 통하여 얻어지는 고형분의 회수율 등은 만족한 수준이었다. 그러나 전체적으로 적용된 전처리 공정에서의 낮은 리그닌의 회수율 그리고 extrusion 반응을 유도하기위한 scale의 한계성이 문제점으로 확인할 수 있었다. 또한 전처리 공정 후 필수적으로 적용되어야 할 효소 당화를 위한 투입 효소의 가격이 불확실하여 전 공정의 효율적인 경제성 평가의 중요한 민감인자로 파악되었다. 이러한 일련의 경제성 평가는 최종 생산물인 에탄올의 생산가격을 예측할 수 있을 뿐만 아니라, 경제성 평가 도구를 활용하는 과정에서 도출되는 여러 인자들의 상호 관계를 해석하여, 전처리, 당화 및 발효/정제 각 단위 공정의 최적화를 유도할 수 있겠다.
- 이러한 지표들을 활용하여 효율적인 전처리 공정을 확립하기 위해서는 대량의 바이오매스를 지속적으로 처리 가능한 extrusion 반응기의 효율적인 설계와 운전 및 설비비용 산출을 위한보다 많은 물성치를 확보하여 적용할 경우, 전 공정의 효율적인 경제성 평가가 가능하겠다.

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절 연차별 연구개발목표의 달성도

1. 1차년도 연구개발의 목표 및 수행 내용 (2009. 04. 10 ~ 2010. 04. 09)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2009)	제 1 세부 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	• 바이오매스 전처리 산물 및 저해인자 분석 및 제거	100	• 바이오매스별 전처리 산물 및 저해인자 분석 및 제거를 통한 고효율 당화공정 확립 • 고효율 당화공정 확립을 위한 공정변수 분석
		• 바이오매스 종류 및 특성에 따른 복합처리공정 개발	100	• 통계학적 분석방법을 통한 섬유소 분해효소들의 영향 인자 분석
	제 2 세부 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	• 고효성 섬유소분해효소 생산 균주 • 선별 및 신규 섬유소분해효소 발굴	100	• 특수환경 유래 미생물 탐색 • 선별한 균주의 효소 분비량 측정 • 섬유소분해효소의 분비가 많은 균주의 선별 • 균주의 동시배양 실험
	제 3 세부 고활성 당화효소 개발을 통한 저비용 당화공정 개발	• 새로운 섬유소 • 분해효소 발굴	100	• 본 1차년도 연구에서 개발되어진 바이오마커를 이용한 새로운 셀룰라아제의 탐색 • 각 셀룰라아제를 생산하는 미생물의 genomic DNA 및 cDNA를 확보하여 이를 cloning • 형질전환을 위한 유전자 고발현 시스템의 구축 및 숙주 미생물에 적합한 형질전환방법의 개발
		• 고효성 섬유소 • 분해효소의 개량	100	• SHIPREC (sequence homology independent protein recombination)을 통한 생체의 유전자 재조합 방법 구축 -candidates: clostridium cellulovorans EngD + Thermobifida fusca Cel5b clostridium cellulovorans EngD + Alicyclobacillus acidocaldarius Celb
		• 고효성 섬유소분해효소의 대량 생산 • 및 당화효율 검증	100	• 선별되어진 당화효소의 대량 생산을 위한 균주의 탐색 및 이의 발현 및 당화효소 최적화 • 균주에서의 알코올 발효 유도 및 최적화 • 미니 셀룰로솜의 복합체 형성 분석

1차 년도 (2009)	제 1 협동 신규 섬유소 분해효소 발굴 및 개량	<ul style="list-style-type: none"> 신규 섬유소 분해효소 발굴 	100	<ul style="list-style-type: none"> 효율적 탐색기법 개발
	제 2 협동 국내 바이오매스의 종류별 특성 분석 및 선정	<ul style="list-style-type: none"> 국내 바이오매스의 평가 및 선정 	100	<ul style="list-style-type: none"> 미국 NREL 기준 분석방법을 기준으로 바이오매스의 성분 분석 방법을 하여 바이오매스 선정
		<ul style="list-style-type: none"> 선정된 바이오매스의 전처리 기술 적용 및 개선 최적 전처리 공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> 산을 이용한 회분식 공정 개발 암모니아를 이용한 SAA, ARP 공정 개발 선정된 바이오매스의 전처리 실시
	제 3 협동 바이오매스 당화를 위한 생물학적 전처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> 진균 유전체 분석 및 cDNA library 합성을 통해 다양한 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해효소의 cloning 메타게놈 library의 합성 및 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. parasitica</i> 균주의 유전체분석 및 ligninase 유전자 확인
				<ul style="list-style-type: none"> <i>C. parasitica</i> 균주로부터 laccase 유전자의 고발현 및 분리정제
				<ul style="list-style-type: none"> <i>P. chrysosporium</i> 균주로부터 헤미셀룰로스 분해용 endo-xylanase 유전자의 2중 확인 및 cloning 완료
				<ul style="list-style-type: none"> <i>P. chrysosporium</i>의 유전체 분석 및 cDNA library 합성
				<ul style="list-style-type: none"> cDNA library 합성 및 ligninase 8종 cloning 완료
		<ul style="list-style-type: none"> Bioimaging 분석을 통한 리그노셀룰로스계 농업폐자원의 물리/화학적 전처리 과정의 특성 규명 	100	<ul style="list-style-type: none"> 보릿짚의 최적 화학적 전처리 조건 확립 보릿짚의 화학적 전처리 과정을 통해 와해된 LCC 구조의 영상확인
		제 4 협동 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 전처리 및 당화공정시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> 선행 기술 조사 	100
	<ul style="list-style-type: none"> 주요 바이오매스 자원 선정 		100	<ul style="list-style-type: none"> 보릿짚/cassava stem 선정
	<ul style="list-style-type: none"> 바이오매스 성분 분석 방법 및 전처리 조건별 효율 분석 		100	<ul style="list-style-type: none"> NREL 기준에 기초한 분석법 설정 리그닌제거율등에의한 전처리효율분석
<ul style="list-style-type: none"> 복합식 ARP 구축 및 운전 조건 설정 	100		<ul style="list-style-type: none"> 25g Sclae 복합식 ARP/AFEX 공정 운전 및 조건 설정 	
<ul style="list-style-type: none"> 2차 Scale-up 복합식 ARP 설계 및 구축 	100		<ul style="list-style-type: none"> 250g Scale CHEMEX 공정 설정 및 효율 분석 	
<ul style="list-style-type: none"> 고농도 당화 / 발효 및 저해 분석 	100		<ul style="list-style-type: none"> 전처리후 고농도 당화기 설정 및 발효 저해요인 분석 	

2. 2차년도 연구개발의 목표 및 수행 내용 (2010. 04. 10 ~ 2011. 04. 09)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2010)	제 1 세부 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 전처리 산물 및 저해인자 분석 및 제거 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스별 전처리 산물 및 저해인자 분석 및 제거를 통한 고효율 당화공정 확립 • 고효율 당화공정 확립을 위한 공정변수 분석
		<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 종류 및 특성에 따른 복합처리공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 통계학적 분석방법을 통한 섬유소 분해효소들의 영향 인자 분석
	제 2 세부 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 고효율 섬유소분해효소 생산 균주 • 선별 및 신규 섬유소분해효소 발굴 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 특수환경 유래 미생물 탐색 • 선별한 균주의 효소 분비량 측정 • 섬유소분해효소의 분비가 많은 균주의 선별 • 균주의 동시배양 실험
	제 3 세부 고활성 당화효소 개발을 통한 저비용 당화공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 새로운 섬유소 • 분해효소 발굴 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 본 1차년도 연구에서 개발되어진 바이오마커를 이용한 새로운 셀룰라아제의 탐색 • 각 셀룰라아제를 생산하는 미생물의 genomic DNA 및 cDNA를 확보하여 이를 cloning • 형질전환을 위한 유전자 고발현 시스템의 구축 및 숙주 미생물에 적합한 형질전환방법의 개발
		<ul style="list-style-type: none"> • 고효율 섬유소 • 분해효소의 개량 	100	<ul style="list-style-type: none"> • SHIPREC (sequence homology independent protein recombination)을 통한 생체의 유전자 재조합 방법 구축 -candidates: clostridium cellulovorans EngD + Thermobifida fusca Cel5b clostridium cellulovorans EngD + Alicyclobacillus acidocaldarius Celb
		<ul style="list-style-type: none"> • 고효율 섬유소분해효소의 대량 생산 • 및 당화효율 검증 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 선별되어진 당화효소의 대량 생산을 위한 균주의 탐색 및 이의 발현 및 당화효소 최적화 • 균주에서의 알코올 발효 유도 및 최적화 • 미니 셀룰로좀의 복합체 형성 분석

2차 년도 (2010)	제 1 협동 신규 섬유소 분해 효소 발굴 및 개량	<ul style="list-style-type: none"> 신규섬유소분해효소발굴 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고활성효소 탐색 효소 생산조건 최적화 효소 특성 조사
	제 2 협동 전처리공정 평가 및 비교 분석	<ul style="list-style-type: none"> 바이오매스 전처리 수준 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 바이오매스를 이용하여 기질별 전처리 특성 파악
		<ul style="list-style-type: none"> 당화수율 최대화 및 독성물질 최소화를 위한 전처리 공정 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> 기존공정 대비 독성물질 저감을 위한 공정 확립
	제 3 협동 바이오매스의 당화를 위한 생물학적 전처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> 효모 <i>S.cerevisiae</i> 또는 <i>P.pastoris</i> 발현체계를 이용한 리그닌 분해효소의 고발현 효모 <i>S.cerevisiae</i> 또는 <i>P.pastoris</i> 발현체계를 이용한 헤미셀룰로스 분해효소의 고발현 발현된 효소의 분리정제, 특성확인 및 assay 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> <i>C. parasitica</i> 균주로부터 확인된 laccase 유전자의 고발현 유도 및 분리정제 Laccase 유전자의 고발현 및 lignin 분해 assay 조건 확립 효모 균주로 부터 endo-xylanase 및 xylose reductase 유전자의 고발현 <i>P. chrysosporium</i>에서 분리된 리그닌 분해효소의 고발현 효모에서 생산된 리그닌 분해효소의 분리정제 및 특성확인 생산된 리그닌분해효소의 리그닌 분해 assay 조건 확인
		<ul style="list-style-type: none"> 리그노셀룰로스계 농업부산물의 Bio imaging 분석을 통한 효소적 전처리 과정의 특성 확인 	100	<ul style="list-style-type: none"> 바이오매스 종류별 화학적 전처리 과정 및 효소적 처리과정에서 LCC 구조 와해 과정의 monitoring
	제 4 협동 섬유질계 바이오매스로부 터 바이오에탄올 통합 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> 고농도 당화기 설계 및 구성 	100	<ul style="list-style-type: none"> 고농도 연속식 당화기 제작 (5L 2단) 연속식 당화 효율 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 바이오매스 전처리 및 당화 효율 분석 	100	<ul style="list-style-type: none"> 바이오매스 성분분석(전처리 전,후) 효소 농도에 따른 당화율 및 바이오매스 농도에 따른 당화율 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 전처리후 이송/세척/탈수공정 구성 및 운전 	100	<ul style="list-style-type: none"> 탈수공정 탐색 스크류프레스 제작 및 설치
		<ul style="list-style-type: none"> 유기용매 회수 공정 구성 및 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> NaOH 회수율 분석
		<ul style="list-style-type: none"> 발효공정 구성 및 운전 	100	<ul style="list-style-type: none"> 회분식 발효 당화 시간에 따른 발효 분석
<ul style="list-style-type: none"> 반연속식 CHEMEX 공정 설계 		100	<ul style="list-style-type: none"> CHEMEX_50L 공정 제작 및 개조 대규모 전처리를 위한 반연속식 CHEMEX 공정 설계 	

3. 3차년도 연구개발의 목표 및 수행 내용 (2011. 04. 10 ~ 2012. 04. 09)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2011)	제 1 세부 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 당화공정 시스템 개발	• 바이오매스 종류별 고효율/저비용 당화공정 확립 및 당화안정성 개선	100	• 저해인자 제거를 위한 공정 최적화 • 섬유분해효소의 효소고정화를 위한 공정변수 분석
		• 바이오매스 종류 및 특성에 따른 복합처리공정 개발	100	• 고효율 당화공정 확립을 위한 공정변수 분석
	제 2 세부 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	• 신규섬유소 분해효소 발굴을 위한 선별균주의 섬유소분해효소 활성도 측정과 당화능 강화를 위한 방법 모색	100	• 보유한 다수균주의 효소 분비량 측정 • 동시배양을 통한 당화능 향상 • 효소카테일을 통한 당화능 향상 • 신개념 탐색기법 개발
		• 신규 섬유소분해효소 발굴	100	• 특수환경 유래 미생물 탐색
	제 3 세부 고활성 당화효소 개발을 통한 저비용 당화공정 개발	• 새로운 섬유소 • 분해효소 발굴	100	• 본 1차년도 연구에서 개발되어진 바이오마커를 이용한 새로운 셀룰라아제의 탐색 • 탐색되어진 새로운 셀룰라아제의 대중균에서의 발현, 정제를 통하여 특성 및 활성 확인 • 각 셀룰라아제를 생산하는 미생물의 genomic DNA 및 cDNA를 확보하여 이를 cloning • 형질전환을 위한 유전자 고발현 시스템의 구축 및 숙주 미생물에 적합한 형질전환방법의 개발
		• 고활성 섬유소 • 분해효소의 개량	100	• SHIPREC을 통한 생체의 유전자 재조합 방법 구축 candidates: clostridium cellulovorans EngD + Thermobifida fusca Cel5b • clostridium cellulovorans EngD + Alicyclobacillus acidocaldarius Celb • 개발되어진 돌연변이체의 대장균 발현 벡터에의 구축, 발현, 정제를 통한 특성 및 활성 증대 확인
		• 고활성 섬유소분해효소의 대량 생산 • 및 당화효율 검증	100	• 선별되어진 당화효소의 대량 생산을 위한 균주의 탐색 및 이의 발현 및 당화효소 최적화 • 균주에서의 알코올 발효 유도 및 최적화 • 미니 셀룰로좀의 복합체 형성 분석 • 다양한 바이오매스를 이용한 당화 및 에탄올 생산 증대 효과의 확인

3차 년도 (2011)	제 1 협동 국내 바이오매스의 종류별 특성 분석 및 선정	<ul style="list-style-type: none"> • 독성물질 최소화 및 당화 수율 최대화를 위한 전처리 공정 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 기존공정대비 독성물질 저감을 위한 전처리 조건 탐색 • 당화수율 최적화를 위한 • 전처리 조건 탐색
		<ul style="list-style-type: none"> • 효소 당화 공정에 최적화된 전처리 공정 제시 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 최적화된 전처리 및 당화공정을 이용하여 당화 수율 최대화
	제 2 협동 바이오매스의 당화를 위한 생물학적 전처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> • 효모 <i>S.cerevisiae</i> 또는 <i>P.pastoris</i> 발현체계를 이용한 리그닌 분해효소의 고발현 • 발현된 효소의 분리정제, 특성확인 및 assay 조건 확립 • 최적 리그닌 분해조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • <i>P. chrysosporium</i> 균주로부터 분리된 리그닌 분해 관련 유전자의 고발현, 분리정제 및 특성확인 • Lignin peroxidase LG5 유전자의 고발현, 분리정제 및 lignin 분해 조건 확립 • Lignin peroxidase LG6 유전자의 고발현, 분리정제 및 리그닌 분해 조건 확립 • <i>P. chrysosporium</i>에서 분리된 Acetyl xylan esterase의 고발현, 분리정제 및 특성확인 • Acetyl xylan esterase를 이용한 peracetic acid의 생산 및 전처리 특성 확인 • 생산된 리그닌분해효소의 조합을 통한 최적 리그닌 분해 조건 확립
		<ul style="list-style-type: none"> • Bioimaging 분석을 통한 리그노셀룰로오스계 농업폐자원의 생물화학적 전처리 과정의 특성 규명 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 보릿짚 및 뽕나무 바이오매스의 화학적 전처리 과정 및 효소적 처리과정에서 LCC 구조 와해 과정의 monitoring
		<ul style="list-style-type: none"> • 유기용매 회수 및 재이용 	100	<ul style="list-style-type: none"> • NaOH를 이용하여 전처리한 용액 재사용 • 재사용을 위한 필터링 시스템 개발
	제 3 협동 섬유질계 바이오매스로부터 바이오에탄올 통합 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 반연속식 CHEMEX 공정 구성 및 운전 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 전처리 공정 설계 및 제작
		<ul style="list-style-type: none"> • 동시당화발효 운전 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 당화공정 개발
		<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 공정 구성 및 운전 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 전처리 공정 모듈화 및 최적 운전 조건 성립

4. 4차년도 연구개발의 목표 및 수행 내용 (2012. 04. 10 ~ 2013. 04. 09)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4차 년도 (2012)	제 1 세부 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 당화공정 시스템 개발	• 바이오매스 종류 및 특성에 따른 복합처리공정 개발	100	• 각종 전처리 공정의 최적화 • 저해인자 제거에 관한 연구
		• 바이오매스 종류별 고효율/저비용 당화공정 확립 및 당화안정성 개선	100	• 당화공정의 통계학적 최적화 • 섬유분해효소의 효소고정화공정의 최적화 • 발굴된 cellulase 활성 측정 및 활용
	제 2 세부 신규 섬유소 분해 효소 발굴 및 개량	• 섬유소분해효소 개량	100	• 각 균주별 효소분비 최적조건 탐색 • 당화능 증진을 위한 효소카테일 생산 • 신규 고효성 균주 탐색 • 효소 활성 개량 • 고효성 cellulase • 돌연변이 균주 선별 • 당화효율 검증
	제 3 세부 고활성 당화효소 개발을 통한 저비용 당화공정 개발	• 새로운 섬유소 분해효소 당화효소 복합체 형성 원리 분석	100	• 바이오 마커를 통한 혐기성 균주 유래 셀룰로솜에서 유래한 당화효소 탐색 및 특성분석 • 다양한 환경에서 존재하는 혐기성 셀룰로솜 형성 균주 탐색 및 고활성 당화효소 탐지 • 곰팡이 유래 고효성 당화효소의 분리 및 동정 • 고효성 당화효소의 특성분석 및 유전자 정보 분석
		• 고효성 섬유소 분해효소의 개량	100	• SHIPREC (sequence homology independent protein recombination)을 통한 생체외 유전자 재조합 방법 구축 • 내열성 균주와의 sequencing 분석을 통한 돌연변이체 확보 및 내열성 증대 확인
		• 고효성 섬유소분해효소의 대량 생산 및 당화효율 증대	100	• 선별된 박테리아 및 곰팡이 유래 고활성 당화효소의 대량 생산을 위한 호스트 균주 최적화 및 이의 발현 증대 구현 • 균주에서의 알코올 발효 유도 및 생산량 증대를 통한 발현 효능 증명 • 대량생산을 위한 단백질 발현 시스템 개량 및 개발

4차 년도 (2012)	제 1 협동 효소 당화공정에 최적화된 전처리 공정 제시	<ul style="list-style-type: none"> • 독성물질 최소화 및 당화 수율 최대화를 위한 전처리 공정 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 기존공정대비 독성물질 저감을 위한 전처리 조건 탐색 • 당화수율 최적화를 위한 • 전처리 조건 탐색
		<ul style="list-style-type: none"> • 효소 당화 공정에 최적화된 전처리 공정 제시 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 최적화된 전처리 및 당화공정을 이용하여 당화 수율 최대화
	제 2 협동 바이오매스의 당 화를 위한 생물 학적 전처리 기 술개발	<ul style="list-style-type: none"> • 효모 <i>S.cerevisiae</i> 또는 <i>P.pastoris</i> 발현체계를 이용한 헤미셀룰로스 분해효소의 고발현 • 발현된 효소의 분리정제, 특성확인 및 assay 조건 확립 • 최적 헤미셀룰로스 분해조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • <i>C. parasitica</i> 균주로부터 확인된 헤미셀룰로스 분해 유전자의 고발현 유도 및 분리정제 • arabinannase 발현 및 분리정제 • Xylosidase 발현 및 분리정제 • 신규 acetyl xylan esterase 분리정제 • 효모에서 생산된 헤미셀룰로스 분해효소의 특성확인 및 • 생산된 헤미셀룰로스 분해효소를 이용한 효소카테일 제조 및 최적 당화과정 조건 확인
		<ul style="list-style-type: none"> • Bioimaging 분석을 통한 리그노셀룰로스계 농업폐자원의 생물화학적 전처리 과정의 특성 규명 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 보릿짚 및 뽕나무 바이오매스의 화학적 전처리 과정 및 효소적 처리과정에서 LCC 구조 와해 과정의 monitoring
	제 3 협동 섬유질계 바이오매스로부 터 바이오에탄올 통합 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 전처리, 동시당화 발효 연계 공정 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 전처리바이오매스 세척/탈수/공급 공정 개발을 통한 전처리 및 동시당화발효 공정 연계
		<ul style="list-style-type: none"> • 연속식 동시당화발효 공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 연속식바이오매스 공급을 통한 연속식 동시 당화발효 공정 구축

5. 5차년도 연구개발의 목표 및 수행 내용 (2013. 04. 10 ~ 2014. 04. 09)

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
5차 년도 (2013)	제 1 세부 다양한 바이오매스 활용을 위한 고효율/저비용 당화공정 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 종류 및 특성에 따른 복합 처리공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 각종 전처리 공정의 최적화 • 바이오매스 전처리 후 그 효과를 분광학적 분석으로 평가하는 방법을 개발
		<ul style="list-style-type: none"> • 발굴·개발된 미생물자원 으로부터 당화효소 생산 • 고효율 저비용 연속당화공정 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 개발된 섬유소분해효소 생산균주를 연구실 규모(5L) 발효기에서 배양조건 최적화 • 고정화된 β-glucosidase 이용한 저비용 당화공정 도입 및 연속당화공정 개발
	제 2 세부 신규 섬유소 분해 효소 발굴 및 개량	<ul style="list-style-type: none"> • 섬유소분해효소 생산기술개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • Genome shuffling에 의한 균주 효소 생산능 향상 및 배지·배양조건 최적화에 의한 효소 생산성 증대 • 최적조건 탐색을 통한 생산성증대 • 효소캐테일을 통한 당화능 증대 • 신규 섬유소분해효소 생산균주 발굴
	제 3 세부 고활성 당화효소 개발을 통한 저비용 당화공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 유용 생물자원 (Rumen, Faeces)으로부터 발굴한 섬유소 분해효소 특성분석 및 이용성증대 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오마커 개발을 통한 분해 균주 및 유용 분해효소 발굴 • 바이오마커 및 특성분석 및 효율성 증대 • 곰팡이 균주로부터 발굴한 섬유소 분해효소 특성분석 • 동정한 고효성 당화효소부터 바이오매스 당화효율 분석 진행
		<ul style="list-style-type: none"> • Heterologous 단백질의 호스트 내 대량생산을 위한 단백질 발현 시스템 개량 및 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 동정한 당화 효소 단백질의 호스트의 발현 시스템 개량 및 대량생산 구현 • Target 단백질에 적합한 특정 Transporter 조절 생리 활성의 저해 없이 단백질의 분비과정 증대
		<ul style="list-style-type: none"> • 고효성 섬유소분해효소 생산 호스트의 다양화 및 Flexible Biomass Utilizing System의 구축 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 세포표면에의 효소 복합체 부착을 통한 바이오매스 이용성 증대 구현 • 5탄당 바이오매스의 활용성 증대를 위한 Pichia에서의 효소 복합체 생산 및 세포 부착을 통한 에탄올 생산성 증대 • 고온에서 최적의 활성을 가지는 Kluyveromyces를 호스트로 하여 당화효소 발현 및 내열성 균주 확보

5차 년도 (2013)	제 1 협동 바이오매스 활용을 위한 전처리 및 당화공정 시스템 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 연속 전처리 공정 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스의 연속 전처리
		<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 전처리공정의 물질수지 및 경제성평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 전처리 공정의 물질수지 • 전처리 공정의 경제성평가
	제 2 협동 바이오매스의 당화를 위한 생물학적 전처리 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 리그닌 및 헤미셀룰로스 분해효소를 이용한 최적 분해 조건 확립 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 리그닌 분해 효소 콕테일의 최적 조합 및 활성조건 확립 • 바이오매스 종류별 리그닌 분해 콕테일의 적용 및 최적조건 확립 • 바이오매스 종류별 열화학적 및 효소적 전처리과정의 최적 조건 및 특성 확인
		<ul style="list-style-type: none"> • 콕테일별 리그노셀룰로스에 농업부산물의 효소적 전처리 과정의 특성 확인 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스 종류별 최적의 LCC 구조 와해조건의 확립
	제 3 협동 섬유질계 바이오매스로부터 바이오에탄올 통합 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 동시당화발효 공정 최적화 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오매스별 전처리조건 / 동시당화발효 공정 연속운전 및 최적화
		<ul style="list-style-type: none"> • 통합 공정 모듈화 및 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> • 바이오에탄올 단위 생산공정 연계 및 모듈화 • 효소콕테일을 통한 통합공정 운전 및 에너지사용량 분석 (경제성평가) • 실증규모 설비 도면 및 물질수지 작성

2절 관련분야의 기술발전 기여도

1. 기술 준비도(TRL)의 단계별 상세정의

구분	단계	정의	세부 설명
기초연구 단계	1	기초 이론/실험	-기초이론 정립 단계
	2	실용 목적의 아이디어, 특허 등 개념 정립	-기술개발 개념 정립 및 아이디어에 대한 특허 출원 단계
실험 단계	3	실험실 규모의 기본성능 검증	-실험실 환경에서 실험 또는 전산 시뮬레이션을 통해 기본성능이 검증될 수 있는 단계 -개발하려는 부품/시스템의 기본 설계도면을 확보하는 단계
	4	실험실 규모의 소재/부품/시스템 핵심성능 평가	-시험샘플을 제작하여 핵심성능에 대한 평가가 완료된 단계 -3단계에서 도출된 다양한 결과 중에서 최적의 결과를 선택하려는 단계 -컴퓨터 모사가 가능한 경우 최적화를 완료하는 단계 -의약품 등 바이오 분야의 경우 목표 물질이 도출된 것을 의미
시작품 단계	5	확정된 소재/부품/시스템 시작품 제작 및 성능 평가	-확정된 소재/부품/시스템의 실험실 시작품 제작 및 성능 평가가 완료된 단계 개발 대상의 생산을 고려하여 설계하나 실제 제작한 시작품 샘플은 1~수개 미만인 단계 -경제성을 고려하지 않고 기술의 핵심성능으로만 볼 때, 실제로 판매가 될 수 있는 정도로 목표 성능을 달성한 단계 -의약품은 GMP(Good Manufacturing Practice, 제조품질관리기준) 파일럿 설비를 구축
	6	파일럿 규모 시작품 제작 및 성능 평가	-파일럿 규모(복수 개 ~ 양산규모의 1/10 정도)의 시작품 제작 및 평가가 완료된 단계 -파일럿 규모 생산품에 대해 생산량, 생산용량, 수율, 불량률 등 제시 -파일럿 생산을 위한 대규모 투자가 동반되는 단계 -생산기업이 수요기업 적용환경에 유사하게 자체 현장테스트를 실시하여 목표 성능을 만족시킨 단계 -성능 평가 결과에 대해 가능하면 공인인증 기관의 성적서를 확보 -의약품의 경우 비임상 시험기준인 GLP(Good Laboratory Practice, 동물실험규범)기관에서 전임상시험을 완료하는 단계
제품화 단계	7	신뢰성평가 및 수요기업 평가	-실제 환경에서 성능 검증이 이루어지는 단계 -부품 및 소재개발의 경우 수요업체에서 직접 파일럿 시작품을 현장 평가(성능 뿐만 아니라 신뢰성에 대해서도 평가) -의약품의 경우 임상 2상 및 3상 시험 승인 -가능하면 KOLAS 인증기관 등의 신뢰성 평가 결과 제출
	8	시제품 인증 및 표준화	-표준화 및 인허가 취득 단계 -조선 기자재의 경우 선급기관 인증, 의약품의 경우 식약청의 품목허가
사업화	9	사업화	-본격적인 양산 및 사업화 단계 -6-시그마 등 품질관리가 중요한 단계



※ 참조 : 산업원천 전략기술별 TRL 평가지표, 한국산업기술평가관리원 (2009.12)

2. 본 연구결과별 기술적 수준 및 발전도

핵심 기술	TRL 기술 수준			세부설명
	국내	해외	달성	
화학적 전처리 기술	5	6	5	화학적 전처리공정은 화학물질(산, 알카리)을 촉매로 하여 고온(150℃ 이상), 고압(1kg/cm ² 이상)의 가혹적인 조건에서 진행됨. 그러나 본 연구에서는 경제성 확보 및 상용화를 위해서 연속식 물리화학적 전처리 방법을 고안하였으며, 저온(100℃ 이하) 및 상압 조건에서 연속적인 전처리가 가능한 공정 및 설비를 개발하여 특허 등록함.
생물학적 전처리 기술	1	3	3	현재 전 세계적으로 생물학적 전처리 기술은 기초연구 및 실험 단계이며, 본 연구진에서는 리그닌 분해효소를 이용한 전처리 부산물 제거능의 확인과 헤미셀룰로오스 효소카테일 구성을 통한 헤미셀룰로오스 분해조건을 구축하여 생물학적 전처리 가능성을 확인하였음.
섬유소 분해효소 발굴 및 생산	3	9	4	본 연구에서 발굴한 섬유소분해효소 생산균주는 상용화된 효소 중 가장 유명한 celluclast 1.5L(노보자임社) 보다 높은 효소 활성과 당화 효율을 달성하였음.
유전조작에 의한 효소 활성 증진 기술	2	7	4	다수의 당화효소를 발굴하고 호스트에 도입함으로써 재조합 균주를 구축하였음. 또한 호스트 내에 도입한 균주의 우수한 활성을 확인함으로써 시작품 및 제품화 단계를 위한 균주 제작을 완료하였음.
저해인자 제거 기술	-	2	3	전처리 과정에서 발생하는 저해물질은 주로 washing과정을 통해 제거되지만, 다량의 폐수가 발생함. 본 연구진은 용매의 분배계수를 활용하여 특정 저해 물질만 선택적으로 제거하는 기술의 가능성을 확인하였음.
고정화된 섬유소분해 효소를 활용한 당화 공정	-	2	3	값 비싼 효소를 재사용하기 위하여 본 연구진은 효소 고정화 기술을 도입하였고, 실제 전처리된 바이오매스 당화 공정에 활용하여 평가하였음. 현재, 전 세계적으로 효소 고정화 기술은 고가의 담체 제작비용, 효소활성의 저하, 반응 후 선택적인 담체 분리법 등 해결 과제가 있음. 본 연구진은 위 문제들의 해결 기술을 개발하여 특허 출원 및 등록하였음.
동시당화 발효 기술	3	4	5	미생물로부터 고농도 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 고농도 기질(바이오매스) 투입이 필수적이나 바이오매스 특성상 고농도로 당화 및 발효가 매우 어려움. 본 연구에서는 고농도 바이오에탄올 생산을 위해 전처리된 바이오매스를 연속식으로 투입할 수 있는 장치 및 이를 이용한 동시당화발효 공정을 개발하여 특허 출원 하였음.
용매 재사용 기술	3	4	5	전처리 후 발생하는 폐용매는 화학물질 및 리그닌 등 폐수처리가 어려운 물질을 다량 함유함. 전처리에 사용되는 화학물질의 사용량을 저감하고 폐수발생을 줄이기 위하여 용매 재사용방법을 개발 하였고, 통합공정에 적용하여 전처리 용매의 비용을 절감하고 폐수 발생량을 현저하게 감소시켜 경제성을 크게 향상 시켰음.
통합공정에서 에탄올 생산 기술	5	6	5	전처리 공정과 당화 발효 공정은 현재 많은 연구가 진행되고 있으며, 국내외 연속식 섬유질계 전처리 특허는 대부분 싱글스크류 형태임. 발효관련 단위공정으로는 세계적인 기술 수준에 도달 하였으나, 전처리 공정에서 당화 및 발효 공정으로 넘어가는 공정의 연구가 미비한 실정임. 본 연구에서는 이를 해결하기 위해 전처리 후 탈수/세척/탈수/반응기 투입이 한 장치에서 이루어지는 설비를 개발하여 통합공정에 도입하였으며, 실제 바이오에탄올을 생산하였음. 본 설비 및 공정은 특허등록 되었음.

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1절 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타 (학술발표)
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종수 중입신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	1						5	1	
	달성	2						3		13
2차년도	목표	3					5	5	3	
	달성	4	1					7	2	24
3차년도	목표	3					2	10	1	
	달성	5	1				29	15	1	14
4차년도	목표	4	1				5	9	1	
	달성	7	4				19	14		41
5차년도	목표	6						9		
	달성	3	6				34	8		33
계	목표	17	1				12	38	6	
	달성	21	12				82	47	3	125

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	2				
	달성	2				

2절 연구개발 성과 현황

1. 수상현황

□ 본 연구과제는 미래창조과학부 2012년도 국가연구개발 우수성과 100선에 당선되어 2013년 8월 28일 수상 및 에너지 환경 분야 사례집 116p에 게재되었음.



농업 폐기물로부터 고부가가치 생산물 원료인 당을 효율적으로 생산하는 기술 개발

농업 폐기물로부터 당 생산 시스템 구축

연구개발의 핵심은 바로 이것

바이오에탄스의 특장 전처리 - 당화 공정의 개발이 필요했다

그간 연구진은 우리나라에서 발생하는 다양한 농업 부산물과 폐기되고 있는 바이오에탄스를 10종류 이상 확보하여 그 성분들을 분석해왔다. 이러한 바이오에탄스들은 섬유소(셀룰로오스), 헤미셀룰로오스, 리그닌이 함유되어 있는데, 섬유소를 저분자 당 형태로 만들기 위해서는 전처리 과정이 필수적이다. 연구진은 적은 비용으로 높은 효율을 기대할 수 있는 화학적 전처리 방법을 신개념으로, 수질한 바이오에탄스를 산 또는 알칼리 용해로 전처리하는 실험을 진행하였다. 기초실험을 토대로 대량의 바이오에탄스 전처리를 할 수 있도록 장치를 설계하게 되었고, 연속적으로 바이오에탄스를 전처리하는 Continuous Twin Screw-driven Reactor (CSTR)를 개발하였다. 이 장치로부터 전처리된 바이오에탄스를 당화반응 시켰을 때 높은 효율로 당도를 얻을 수 있었다.

연속 공정을 적용한 바이오에탄스의 대량 생산 가능

그 동안의 기초 데이터와 경험을 바탕으로 6방향해제반응에서는 국내 최초로 연속식 전처리 반응장치(CHEM-F)를 제작하였으며, 연속적으로 고농도의 액상 당을 생산하는 장치 역시 개발하였다. 이 장치의 바이오에탄스 1일 처리 용량은 100kg 이상이다. 연속식 당화장치는 시간당 생산량의 증가와 동시에 액상 당의 농도를 높여줄 수 있기 때문에 고농도의 바이오에탄스를 생산이 가능하다. 연속식 전처리 반응장치와 동시에 당화 공정까지 개발은 섬유질계 바이오에탄스로부터 에탄올 생산의 상업화에 근접하였다고 판단할 수 있다.

116

연구개발 우수성과 사례집

116

Real Story

수업에서 배우는 바이오에탄스를 보다

바이오에탄스 산업이 활성화되면 농업 부산물 및 사료용 곡물 부산물 등 다양한 농산물 원료를 효율적으로 생산할 수 있는 바이오에탄스 산업이 활성화될 것이다. 바이오에탄스 산업은 높은 당도를 가진 바이오에탄스를 생산하는 데 필요한 전처리 공정을 개발하는 데 중점을 둔다. 연구진은 연속적으로 바이오에탄스를 전처리하는 실험을 진행하였다. 기초실험을 토대로 대량의 바이오에탄스 전처리를 할 수 있도록 장치를 설계하게 되었고, 연속적으로 바이오에탄스를 전처리하는 실험을 진행하였다. 이 장치로부터 전처리된 바이오에탄스를 당화반응 시켰을 때 높은 효율로 당도를 얻을 수 있었다.

앞으로 이렇게 달라집니다

당의 효율적 생산을 통한 다양한 효과 기대

제비용의 발효가 가능한 당을 생산할 수 있게 되면, 세계 일부 수준의 발효기술을 보유한 국내 기술에 의해 바이오에탄스를 비롯하여 여러 가지 다양한 바이오에탄스 생산기술의 실용화가 가능하다. 또 바이오에탄스용 에탄올 사용에 따른 온실가스 감축에 기여(바이오 에탄올로 대체 시 휘발유 사용 대비 80~90% 온실가스 감축효과)할 것으로 전망된다.

국내 최초의 연속식 전처리 및 당화 반응기의 개발

그 동안의 연구 결과를 바탕으로 6방향해제반응에서는 국내 최초로 연속식 전처리 및 당화 반응을 제작하여 섬유질계 바이오에탄스로부터 에탄올 생산의 상업화를 눈앞에 두고 있다. 무엇보다 농가에서 버려지는 볏짚, 고추대 등 다양한 부산물이 부가가치 상품으로 전락되어 부수입으로도 활용 할 수 있어 새로운 농가소득원 확보에 기여한다는 평가를 받고 있다.

□ 본 연구과제의 참여기업 (주)창해에탄올 연구소 김을 팀장은 한국공학한림원에서 수여하는 2020년 미래 100대 기술과 주역으로 당선되어 2013년 12월 수상하였음.



- 1. 조선대학교 환경공학과 학사
진북대학교 생물공정공학과 석사
- 2. (주)창해에탄올 종합기술원 (13년)
비식용바이오메스 전처리/당화/발효 (8년)
- 3. 비식용 바이오메스를 이용한 바이오 연료 생산 기술은 식량 자원으로 사용되지 않은 바이오메스를 기반으로 생활에 필요한 연료 및 화학원료를 생산이 가능하다. 원천기술 개발(전처리, 당화, 발효, 정제 등)이 완료되어 대부분 상업화를 위한 실증 규모의 연구가 진행 중에 있으며, 용매 및 부산물 활용 기술이 통합된 설비 구축을 통하여 경제성 확보에 대한 연구를 진행 중에 있다.
- 4. 바이오기술을 활용한 연료와 산업 소재의 생산은 재생 가능한 바이오메스로부터 생활에 필수적인 연료 및 물질을 생산함으로써 기존 석유 화학 제품을 대체할 수 있으며, 석유화학 중심의 현재 산업구조를 바이오메스 중심의 산업 구조로 변경하여 원료 생산(1차 산업), 가공(2차 산업)등 산업계 전반에 광범위한 파급 효과를 가지고 있다.
또한 지속 가능한 원료인 바이오메스에서 일상에 필요한 모든 제품을 생산이 가능하기 때문에 기존 화학 산업을 친환경적이면서도 지속적으로 성장 가능한 산업으로 변화시킬 수 있을 것이라 기대되고 있다.

2. 논문게재 현황

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.) Page	국내 외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Pretreatment of rice straw by proton beam irradiation for efficient enzyme digestibility	김성봉	김승욱 (제1세부)	김준석, 이종호, 강성우, 박철환	Applied Biochemistry and Biotechnology	164, 1183-1191	국외	SCI
2011	Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation	김성봉	김승욱 (제1세부)	이자현, 오경근, 이상준, 이진영, 김준석	Biotechnology and Bioprocess Engineering	16, 725-732	국내	SCIE
2012	Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment	김성봉	김승욱 (제1세부)	이상준, 장은지, 한성욱, 박철환	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	18, 183-187	국내	SCIE
2012	Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of beta glucosidase with cellobiose and glucose	정유리	김승욱 (제1세부)	신현용, 송윤석, 김성봉	Journal of Industrial and Engineering Chemistry	18, 702-706	국내	SCIE
2012	Production of cellulases and β -glucosidase in <i>Trichoderma reesei</i> mutated by proton beam irradiation	정유리	김승욱 (제1세부)	신현용, 유하영, 엄용순	Korean Journal of Chemical Engineering	29, 925-930	국내	SCIE
2012	Efficient immobilization technique for enhancement of cellobiose dehydrogenase activity on silica gel	김은지	김승욱 (제1세부)	송윤석, 최한석, 유하영, 강성우, 송광호, 한성욱	Biotechnology and Bioprocess Engineering	17, 55-59	국내	SCIE
2013	Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase	송윤석	김승욱 (제1세부)	이희욱, 박철환	Food Chemistry	136, 689-694	국외	SCI
2013	Reutilization of carbon sources through sugar recovery from waste rice straw	김성봉	김승욱 (제1세부)	김은지, 유하영, 강민수, 강성우, 박철환, 김준석	Renewable Energy	53, 43-48	국외	SCI
2013	Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase	송윤석	김승욱 (제1세부)	이희욱, 박철환	Carbohydrate Research	369, 1-5	국외	SCI
2013	Rapid analysis of barley straw before and after dilute sulfuric acid pretreatment by photoluminescence	김성봉	김승욱 (제1세부)	최춘식, 이자현, 이상준, 안동준, 박철환, 김준석	Bioresource Technology	146, 789-793	국외	SCI
2013	Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia	김성봉	김승욱 (제1세부)	이상준, 이주훈, 정유리, 김준석, 양영순, 박철환	Biotechnology for Biofuels	6, 109	국외	SCIE
2011	Tolerance of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds	이하원	박철환 (제1세부)	조대행, 김용환, 신수정, 김성봉, 한성욱, 이진원, 김승욱	Biotechnology and Bioprocess Engineering	16, 755-760	국내	SCIE
2010	Diversity of fungi in creosote-treated crosstie wastes and their resistance to polycyclic aromatic hydrocarbons	김민지	김재진 (제2세부)	이황휘, 최용석, 김규혁, 허나운, 이상준, 임영운, 이성석	Antonie van Leeuwenhoek	97, 377-387	국외	SCI
2011	Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 2. Genus <i>Penicillium</i>	장영선	김재진 (제2세부)	허나운, 이재정, 이진성, 김규혁	HOLZFORSCHUNG	65(2), 265-270	국외	SCI
2011	Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 1. Genus <i>Trichoderma</i>	허나운	김재진 (제2세부)	장영선, 이재정, 김규혁	HOLZFORSCHUNG	65(2), 257-263	국외	SCI
2011	Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes	이영민	김재진 (제2세부)	이한별	Journal of Microbiological Methods	86(1), 124-127	국외	SCI
2012	Screening for xylanase and β -xylosidase production from wood-inhabiting <i>Penicillium</i> strains for potential use in biotechnological applications	이재정	김재진 (제2세부)	장영선, 이한별, 이상준	HOLZFORSCHUNG	66, 267-271	국외	SCI
2011	Rice Straw-decomposing fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes	이상준	김재진 (제2세부)	장영선, 이영민, 이한별	Journal of Microbiology and Biotechnology	21, 1322-1329	국외	SCIE
2012	Phylogenetic analysis and discoloration characteristics of major molds inhabiting woods. Part 3. Genus <i>Cladosporium</i>	이영민	김재진 (제2세부)	장영선, 김규혁	HOLZFORSCHUNG	66, 537-541	국외	SCI
2012	Phylogenetic analysis of the genus <i>Fusarium</i> and their antifungal activity against wood-decay and sapstain fungi	이영민	김재진 (제2세부)	홍주현, 이한별, 안병준, 김규혁	HOLZFORSCHUNG	67, 473-478	국외	SCI
2013	Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods. Part 4. Genus <i>Alternaria</i>	이영민	김재진 (제2세부)	이한별, 장영선, 조이랑, 김규혁	HOLZFORSCHUNG	68, 247-251	국외	SCI

2011	Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation	Van Hanh Vu	김근 (제2세부)	팜투안안	한국균학회	39(1), 20-25	국내	학진 등재
2012	Improvement of cellulase activity using error-prone rolling circle amplification and site-directed mutagenesis	Van Hanh Vu	김근 (제2세부)	-	Journal of Microbiology Biotechnology	22(5), 607-613	국내	SCIE
2009	Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> engineered for the production of <i>Clostridium cellulovorans</i> endoglucanase and <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> β -glucosidase	전유진	한성욱 (제3세부)	현정은, 이성은, 박병수, 김승욱, 이진원	FEMS Microbiology Letters	301(1), 130-136	국외	SCI
2010	Enhancement of the thermostability and activity of mesophilic <i>Clostridium cellulovorans</i> EngD by in vitro DNA recombination with <i>Clostridium thermocellum</i> CelE	이재영	한성욱 (제3세부)	유경욱, 김승욱	Journal of Bioscience and Bioengineering	109(4), 331-336	국외	SCI
2011	A cellulolytic complex from <i>Clostridium cellulovorans</i> consisting of mannanase B and endoglucanase E has synergistic effects on galactomannan degradation	전상덕	한성욱 (제3세부)	유경욱, 김승욱	Applied Microbiology and Biotechnology	90(2), 565-572	국외	SCI
2011	The processive endoglucanase EngZ is active in crystalline cellulose degradation as a cellulosomal subunit	전상덕	한성욱 (제3세부)	유경욱, 김승욱	New Biotechnology	29(3), 365-371	국외	SCI
2012	Improvement of ethanol yield from glycerol via conversion of pyruvate to ethanol in metabolically engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	유경욱	한성욱 (제3세부)	정주, 바줄리, 김승욱, 박철환	Applied Biochemistry and Biotechnology	166, 856-865	국외	SCI
2012	Analysis of selective, high protein-protein binding interaction of cohesin-dockerin complex using biosensing methods	전상덕	한성욱 (제3세부)	이지은, 김수정, 김승욱	Biosensors and Bioelectronics	35(1), 382-389	국외	SCI
2012	Increased ethanol production from glycerol by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strains with enhanced stress tolerance from the overexpression of SAGA complex components	유경욱	한성욱 (제3세부)	정주, Ahmad Bazli Ramzi, 최세훈, 김승욱, 박철환	Enzyme and Microbial Technology	51(4), 237-243	국외	SCI
2013	Development of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain for increasing the accumulation of triacylglycerol as a microbial oil feedstock for biodiesel production using glycerol as a substrate	유경욱	한성욱 (제3세부)	정주, Ahmad Bazli Ramzi, 최세훈, 김승욱, 박철환	Biotechnology and bioengineering	110(1), 343-347	국외	SCI
2011	바이오에탄올 생산을 위한 암모니아수에 의해 전처리된 볏짚의 효소당화 특성	박용철	김준석 (제1협동)	-	Korean Chemical Engineering Research	49(4), 470-474	국내	학진 등재
2012	염기 용매를 이용한 보리짚의 전처리 특성 Characterization of pretreatment for Barley straw	김경섭	김준석 (제1협동)	-	Korean Chemical Engineering Research	50(1), 18-24	국내	학진 등재
2012	Fractionation of barley straw with dilute sulfuric acid for improving hemicellulose recovery	원경연	오경근 (제1협동)	엄병환, 김승욱	Korean Journal of Chemical Engineering	29(5), 614-620	국내	SCIE
2012	Comparison of bioethanol production of simultaneous saccharification & fermentation and separation hydrolysis & fermentation with cellulose rich Barley Straw	원경연	오경근 (제1협동)	김영수	Korean Journal of Chemical Engineering	29(10), 1341-1346	국내	SCIE
2012	Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR)	엄병환	오경근 (제1협동)	최창호	Bioresource Technology	130, 38-44	국외	SCI
2013	Optimization of levulinic acid production from <i>Gelidium amansii</i>	강민수	김준석 (제1협동)	김승욱, 김진우, 김태현	Renewable Energy	53, 173-179	국외	SCIE
2013	Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rape straw	최창호	오경근 (제1협동)	김준석	Biomass and Bioenergy	54, 211-218	국외	SCIE
2011	Heterologous expression of Endo-1,4-beta-XylanaseC from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in <i>Pichia pastoris</i>	Nguyen Duc Huy	박승문 (제2협동)	김승욱	Journal of Bioscience and Bioengineering	111(6), 654-657	국외	SCI

2012	Heterologous expression of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> glyoxal oxidase and its application for the coupled reaction with manganese peroxidase to decolorize malachite green	손유림	박승문 (제2협동)	김현영, Saravana Kumar, Jing Jing Xu,	Mycobiology	40(4), 258-262	국내	SCOP US
2012	Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase containing a carbohydrate binding module from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nguyen Duc Huy	박승문 (제2협동)	Saravana Kumar, 김대혁	Journal of Bioscience and Bioengineering	115(5), 507-513	국외	SCI
2013	Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> and its synergistic action with endo-xylanase	Nguyen Duc Huy	박승문 (제2협동)	Saravana Kumar, 최윤이, 김대혁	Bioprocess and Biosystems Engineering	36(6), 677-685	국외	SCI
2013	Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nguyen Duc Huy	박승문 (제2협동)	Palvannan Thayumanavan, 권태호	Journal of Bioscience and Bioengineering	116(2), 152-159	국외	SCI
2013	Manganese Peroxidase H4 Isozyme Mediated Degradation and Detoxification of Triarylmethane Dye Malachite Green: Optimization of Decolorization by Response Surface Methodology	Saravana Kumar	박승문 (제2협동)	Palvannan Thayumanavan, 김대혁	Applied Biochemistry and Biotechnology	171, 1178-1193	국외	SCI
2013	Efficient transformation of phenyl urea herbicide chloroxuron bylaccase immobilized on zein polyurethane nanofiber	Palvannan Thayumanavan	박승문 (제2협동)	티야가라잔, 유니탄, 정남진, 김대혁	Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic	99, 156-162	국외	SCI
2011	High efficiency bioethanol production from OPEFB using pilot pretreatment reactor	한민희	최기욱 (제3협동)	김윤, 김승욱	Journal of Chemical Technology and Biotechnology	86(12), 1527-1534	국외	SCI
2011	Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CHFY0321.	문세권	최기욱 (제3협동)	김승욱	Journal of Biotechnology	157, 584-589	국외	SCI
2012	Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast <i>Kluyveromyces marxianus</i> CHY1612.	강현우	최기욱 (제3협동)	김윤, 김승욱	Bioprocess Biosystem Engineering	35, 115-122	국외	SCI
2013	High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor	한민희	최기욱 (제3협동)	강경업, 김윤	Process Biochemistry	48, 488-495	국외	SCI
2014	Pretreatment solution recycling and high-concentration output for economical production of bioethanol	한민희	최기욱 (제3협동)	문세권	Bioprocess Biosystem Engineering	DOI 10.1007/s0044 9-014-1198-1	국외	SCI

3. 특허 현황

특허 출원				
출원연도	특허명	출원인(책임자)	출원국	출원번호
2010	전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	10-2010-0127213
2012	바이오매스의 광 발광 분석 방법	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	10-2012-0137613
2013	한약재 찌꺼기로부터 발효성 당의 제조방법	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	10-2013-0007615
2013	자일로스로부터 세팔로스포린 C 생산	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	10-2013-0059069
2009	바이오 에탄올 생산능이 향상된 제조합 벡터 및 그 형질 전환체	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2009-0049985
2009	섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 유전자가 삽입된 제조합 벡터, 그 제조합벡터를 포함하는 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2009-0102756
2010	바이오 에탄올 생산 향상용 글리세롤 생산 유전자 결손 변이체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2010-0035853
2011	바이오 에탄올 생산 향상용 피루브산 탈카르복실산 효소와 알코올 탈수소화 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2011-0003479
2011	클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규 만난아제와 갈락토만난 분해를 위한 셀룰로좀 복합체 활용	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2011-0018070
2013	클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 포함하는 셀룰로좀 복합체 및 그의 용도	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	10-2013-0016334
2012	신규 곰팡이 레시토포라 속 YP363 균주 및 이를 이용한 내열성 섬유소분해 효소 생산방법	수원대학교 산학협력단 (김근)	대한민국	10-2012-0004169
2012	곰팡이 페니실리움 옥살리쿰 KL1 균주 및 이를 이용한 목질섬유소분해효소 생산 방법	수원대학교 산학협력단 (김근)	대한민국	10-2012-0050223
2011	백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산을 위한 제조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2011-0013220
2011	백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산을 위한 제조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2011-0013223
2011	백색부후균 파네로케이트 크리소스포리움 BKM-F-1767 유래의 망간 퍼옥시다제 코딩 유전자 및 그의 발현방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2011-0076647
2011	과아세트산 생산 방법 및 과아세트산 생산용 아세틸 자일란 에스터라제	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2011-0118777
2013	백색 부후균 유래의 제조합 자일로시다아제/아라비노퓨라노시다아제 다기능 효소의 고생산 방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2013-0012708
2013	백색 부후균 유래의 탄수화물 결합 모듈을 갖는 제조합 아세틸 자일란 에스터라아제 다기능 효소의 고생산 방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2013-0013785
2013	백색 부후균 유래의 고온 안정성을 갖는 제조합 아라비난나제 효소의 고생산 방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	10-2013-0018159
2011	발효성 당의 제조용 장치 및 이를 이용한 발효성 당의 제조 방법	(주) 창해 에탄올	대한민국	10-2011-0009191
2014	고농도발효성의 제조장치 이를 이용한 고농도 발효성당 제조방법 그리고 이를 이용하여 제조된 바이오화합물질	(주) 창해 에탄올	대한민국	10-2014-0021469

특허 등록				
등록연도	특허명	등록인(책임자)	등록국	등록번호
2010	전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	제10-1240611
2012	바이오매스의 광 발광 분석 방법	고려대학교 산학협력단 (김승욱)	대한민국	제10-1401998
2010	바이오 에탄올 생산능이 향상된 재조합 벡터 및 그 형질 전환체	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	제10-0969328
2012	섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 유전자가 삽입된 재조합 벡터, 그 재조합벡터를 포함하는 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	제10-1120359
2013	바이오 에탄올 생산 향상용 피루브산 탈카르복실산 효소와 알코올 탈수소화 효소를 코딩하는 유전자가 도입된 형질전환체 및 그 균주를 이용한 에탄올 생성방법	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	제10-1262999
2013	클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규 만난아제와 갈락토만난 분해를 위한 셀룰로좀 복합체 활용	고려대학교 산학협력단 (한성욱)	대한민국	제10-1252801
2013	백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산을 위한 재조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	제10-1235422
2013	백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산을 위한 재조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	제10-1235406
2013	백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산을 위한 재조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	제10-1235528
2013	과아세트산 생산방법 및 과아세트산 생산용 아세틸자일란 에스테라제	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	제10-1311007
2013	백색부후균 파네로케이트 크리스스포리움 BKM-F-1767 유래의 망간퍼옥시다제 코딩유전자의 발현방법	전북대학교 산학협력단 (박승문)	대한민국	제10-1297827
2013	발효성 당의 제조용 장치 및 이를 이용한 발효성 당의 제조방법	(주) 창해 에탄올	대한민국	제10-1261560

4. 유전자원 등록 현황

가. 미생물 기탁

기탁일자	미생물 명칭	기탁자	수탁 기관	미생물 수탁번호
2011.12.27	<i>Lecythophora</i> sp. YP 3-6-3	김 근 (제2세부)	국립 농업과학원 농업유전자원센터	KACC93143P
2012.04.30	<i>Penicillium oxalicum</i> KL1	김 근 (제2세부)	국립 농업과학원 농업유전자원센터	KACC93151
2012.09.13	<i>Bacillus methylotrophicus</i> B25	김 근 (제2세부)	국립 농업과학원 농업유전자원센터	KACC91743
2012.12.10	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> B44	김 근 (제2세부)	한국 생명공학연구원 미생물자원센터	KCTC29161
2013.10.21	<i>Penicillium citrinum</i>	김 근 (제2세부)	한국 생명공학연구원 미생물자원센터	KCTC 46042
2013.11.22	<i>Aspergillus oryzae</i>	김 근 (제2세부)	한국 생명공학연구원 미생물자원센터	KCTC 46199
2014.01.17	<i>Aspergillus niger</i>	김 근 (제2세부)	한국 생명공학연구원 미생물자원센터	KCTC 46204

나. 유전자원 등록

번호	미생물명칭		등록기관	유전자원 등록번호			Histone
	종명	ID		ITS	ACT	TEF	
1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1384	GenBank	JN033485	JN033512	JN033540	
2	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1385	GenBank	JN033484	JN033511	JN033539	
3	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1420	GenBank	JN033483	JN033510	JN033538	
4	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1516	GenBank	JN033479	JN033506	JN033534	
5	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1545	GenBank	JN033478	JN033505	JN033533	
6	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1580	GenBank	JN033477	JN033504	JN033532	
7	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1699	GenBank	JN033473	JN033500	JN033528	
8	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC1701	GenBank	JN033471	JN033498	JN033526	
9	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC3006	GenBank	JN033465	JN033492	JN033520	
10	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	KUC3076	GenBank	JN033463	JN033490	JN033518	
11	<i>Cladosporium perangustum</i>	KUC1462	GenBank	JN033481	JN033508	JN033536	
12	<i>Cladosporium perangustum</i>	KUC1767	GenBank	JN033468	JN033495	JN033523	
13	<i>Cladosporium perangustum</i>	KUC5085	GenBank	JN033460	JN033487	JN033515	
14	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	KUC1671	GenBank	JN033475	JN033502	JN033530	
15	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	KUC1700	GenBank	JN033472	JN033499	JN033527	
16	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	KUC4095	GenBank	JN033462	JN033489	JN033517	
17	<i>Cladosporium ramotenellum</i>	KUC3027	GenBank	JN033464	JN033491	JN033519	
18	<i>Cladosporium rectoides</i>	KUC1421	GenBank	JN033482	JN033509	JN033537	
19	<i>Cladosporium rectoides</i>	KUC1515	GenBank	JN033480	JN033507	JN033535	
20	<i>Cladosporium rectoides</i>	KUC1667	GenBank	JN033476	JN033503	JN033531	
21	<i>Cladosporium rectoides</i>	KUC5009	GenBank	JN033461	JN033488	JN033516	
22	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KUC1698	GenBank	JN033474	JN033501	JN033529	
23	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KUC1736	GenBank	JN033470	JN033497	JN033525	
24	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	KUC1903	GenBank	JN033466	JN033493	JN033521	
25	<i>Cladosporium</i> sp.1	KUC1299	GenBank	JN033459	-	JN033514	
26	<i>Cladosporium</i> sp.2	KUC1766	GenBank	JN033469	JN033496	JN033522	
27	<i>Cladosporium</i> sp.2	KUC1773	GenBank	JN033467	JN033494	JN033524	
28	<i>Cladosporium</i> sp.3	KUC3009	GenBank	JN033458	JN033486	JN033513	
29	<i>Fusarium solani</i>	KUC1464	GenBank			JX277035	
30	<i>Fusarium solani</i>	KUC1590	GenBank			JX277036	
31	<i>Fusarium solani</i>	KUC1463	GenBank			JX277037	
32	<i>Fusarium tricinctum</i> speciescomplex	KUC5105	GenBank			JX277038	
33	<i>Fusarium tricinctum</i> speciescomplex	KUC5104	GenBank			JX277039	
34	<i>Fusarium commune</i>	KUC5199	GenBank			JX277040	
35	<i>Fusarium oxysporum</i>	KUC5243	GenBank			JX277041	
36	<i>Fusarium oxysporum</i>	KUC5245	GenBank			JX277042	
37	<i>Fusarium fujikuroi</i>	KUC5195	GenBank			JX277043	
38	<i>Fusarium concentricum</i>	KUC5244	GenBank			JX277044	
39	<i>Fusarium asiaticum</i>	KUC5013	GenBank			JX277047	
40	<i>Fusarium asiaticum</i>	KUC5185	GenBank			JX277048	
41	<i>Fusarium armeniacum</i>	KUC5051	GenBank			JX277049	
42	<i>Fusarium armeniacum</i>	KUC5053	GenBank			JX277050	
43	<i>Fusarium armeniacum</i>	KUC5050	GenBank			JX277051	
44	<i>Fusarium armeniacum</i>	KUC5052	GenBank			JX277052	
45	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1369	GenBank	KF051224			KF051247
46	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1410	GenBank	KF051225			KF051248
47	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1514	GenBank	KF051226			KF051249

48	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1543	GenBank	KF051227			KF051250
49	<i>Alternaria alternatas.l.</i>	KUC1572	GenBank	KF051228			KF051251
50	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1573	GenBank	KF051229			KF051252
51	<i>Alternaria alternatas.l.</i>	KUC1574	GenBank	KF051230			KF051253
52	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1576	GenBank	KF051231			KF051254
53	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC1901	GenBank	KF051232			KF051255
54	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC3071	GenBank	KF051233			KF051256
55	<i>Alternaria alternatas.l.</i>	KUC3072	GenBank	KF051234			KF051257
56	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC4035	GenBank				KF051258
57	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC4059	GenBank	KF051235			KF051259
58	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5001	GenBank	KF051236			KF051260
59	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5002	GenBank	KF051237			KF051261
60	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5003	GenBank	KF051238			KF051262
61	<i>Alternaria alternatas.l.</i>	KUC5004	GenBank	KF051239			KF051263
62	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5005	GenBank	KF051240			KF051264
63	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5071	GenBank	KF051241			KF051265
64	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5072	GenBank	KF051242			KF051266
65	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5074	GenBank	KF051243			KF051267
66	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5117	GenBank	KF051244			KF051268
67	<i>Alternaria tenuissima</i>	KUC5143	GenBank	KF051245			KF051269
68	<i>Alternaria alternatas.l.</i>	KUC5206	GenBank	KF051246			KF051270
69	<i>Heterobasidion orientale</i>		GenBank	KF218828			
70	<i>Heterobasidion ecrustosum</i>		GenBank	KF218829			
71	<i>Heterobasidion ecrustosum</i>		GenBank	KF218830			
72	<i>Heterobasidion ecrustosum</i>		GenBank	KF218831			
73	<i>Heterobasidion ecrustosum</i>		GenBank	KF218832			
74	<i>Heterobasidion orientale</i>		GenBank	KF218833			
75	<i>Heterobasidion ecrustosum</i>		GenBank	KF218834			

5. 학술발표 현황

연번	발표일	발표제목	발표자	학술회의명	국내 국외	개최장소	발표 내용
1	2009. 04.09	Optimization of Bioethanol production from sodium hydroxide pretreated balreystraw using response surface methodology	전형진, 최 기욱*	2009 한국생물공학회 춘계학술발 표대회	국내	대전컨벤션 센터, 대전	포스터 발표
2	2009. 04.23	The optimum of enzymatic hydrolysis from pretreated rice straw by soaking in aqueous ammonia process	박용철, 김준석*	한국화학공학회 2009년 봄 총회 및 학술대회	국내	광주김대중 컨벤션센터	포스터 발표
3	2009. 05.03	The optimum of enzymatic hydrolysis from pretreated rice straw by aqueous ammonia	박용철, 김준석*	31st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	San Francisco, USA	포스터 발표
4	2009. 05.03	Optimization of dilute acid hydrolysis of Rapeseed straw as a pretreatment for conversion to ethanol	정태수, 오경근*	31st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	San Francisco, USA	포스터 발표
5	2009. 10.21	Optimization of dilute acid pretreatment of Rapeseed straw for the bioethanol production using Secerity index	정태수, 오경근*	한국화학공학회 2009년 가을 총회 및 학술대회	국내	일산 KINTEX, 경기도	포스터 발표
6	2009. 10.21	Biomass pretreatment by alkaline solution for production of bioethanol	박용철, 김준석*	한국화학공학회 2009년 가을 총회 및 학술대회	국내	일산 KINTEX, 경기도	포스터 발표
7	2009. 10.21	The pretreatment Characteristic of Pampas grass by Ammonia percolation	강민수, 김준석*	한국화학공학회 2009년 가을 총회 및 학술대회	국내	일산 KINTEX, 경기도	포스터 발표
8	2009. 10.21	The pretreatment by Soaking in Aqueous Ammonia for Pampasgrass	서지호, 김준석*	한국화학공학회 2009년 가을 총회 및 학술대회	국내	일산 KINTEX, 경기도	포스터 발표
9	2009. 11.15	Fungal Diversity and Assessment of Cellulolytic and Xylanolytic Enzymes Activities on Rice Straws	이상준, 김재진*	Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium	국외	타이완	포스터 발표
10	2009. 11.15	Characterization of an Unknown Basidiomycete Isolated from Rice Straws	이상준, 김재진*	Asian Mycological Congress 2009 & 11th International Marine and Freshwater Mycology Symposium	국외	타이완	포스터 발표
11	2010. 01.20	Isolation of Microorganisms producing cellulases and analysis of their plant cell wall-degrading activities	임영훈, 김근*	2010 한국미생물 생명공학회	국내	경주	포스터 발표
12	2010. 03.11	Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by rice straw associated fungi	이상준, 김재진*	Korean society of wood science and technology annual meeting	국내	창원컨벤션 센터	포스터 발표
13	2010. 03.11	Biodiversity of fungi associated with yellow poplar and their enzymatic characteristics	이재정, 김재진*	Korean society of wood science and technology annual meeting	국내	창원컨벤션 센터	포스터 발표
14	2010. 04.15	Isolation of a microbial strain hyper-producing cellulases and xylanase, and fermentation optimization for the enzyme production	김근	Society for industrial microbiology	국외	Seattle, 미국	포스터 발표
15	2010. 04.15	Cloning of an endo-1, 4-beta-xylanase A from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> and its expression in <i>Pichia pastoris</i>	Nguyen Duc Huy, 박승문*	2010년 한국생물공학회	국내	인천 송도 컨벤션센터	포스터 발표
16	2010. 04.15	Cloning of an endo-1, 4-beta-xylanase C from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> and its expression in <i>Pichia pastoris</i>	박승문	2010년 한국생물공학회	국내	인천 송도 컨벤션센터	포스터 발표
17	2010. 04.15	Expression and purification of lignin peroxidase isoenzymes from the wood degrading basidiomycetes <i>Phanerochaete chrysosporium</i> in <i>Pichia pastoris</i> heterologous system	Saravana Kumar, 박승문*	2010년 한국생물공학회	국내	인천 송도 컨벤션센터	포스터 발표

18	2010. 04.15	Fungal cellulase production from various lignocellulosic substrates	임영훈, 김근*	2010년 한국생물공학회	국내	인천 송도 컨벤션센터	포스터 발표
19	2010. 04.15	Isolation of fungal strains producing cellulase, xylanase, and pectinase	임영훈, 김근*	2010년 한국생물공학회	국내	인천 송도 컨벤션센터	포스터 발표
20	2010. 04.19	Optimization of bioethanol production from NaOH-pretreated barley straw using response surface methodology	최기욱	32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Hiltonclear waterbeach, Tampa, USA	포스터 발표
21	2010. 04.20	Proton beam irradiation pretreatment of biomass and saccharification	김성봉, 김승욱*	32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Hiltonclear waterbeach, Tampa, USA	포스터 발표
22	2010. 04.20	Pretreatment of Miscanthus using acid and aqueous ammonia process/percolation	박용철, 김준석*	32nd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Hiltonclear waterbeach, Tampa, USA	포스터 발표
23	2010. 05.13	Two new <i>Penicillium</i> species isolated from woods in Korea	장영선, 김재진*	2010년도 춘계 학술대회 및 임시총회	국내	대전	포스터 발표
24	2010. 06.17	Optimization of dilute acid pretreatment conditions of Rapeseed straw with combined severity index	정태수, 오경근*	한국화학공학회 2010년도 춘계 학술대회	국내	광주김대중 컨벤션센터	포스터 발표
25	2010. 06.17	Dilute-acid pretreatment of Rapeseed straw using the Combined severity	정태수, 오경근*	2010 한국신재생에너지학회	국내	목포 신안 비치호텔	구두발표
26	2010. 06.17	Combined severity를 이용한 유채대의 볏은 산전처리	정태수, 오경근*	2010 한국신재생에너지학회	국내	목포 신안 비치호텔	포스터 발표
27	2010. 06.24	Expression and Characterization of Cellulosomal Enzyme EngZ of Cellulolytic System in <i>Clostridium cellulovorans</i>	전상덕, 한성욱*	2010년도 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내	서울	포스터 발표
28	2010. 06.24	High-yield cellulase production by a fungal strain on barley straw	임영훈, 김근*	2010년도 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내	서울	포스터 발표
29	2010. 06.28	Cellulosic Ethanol Fermentation Using Recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Engineered for Assembly of Mini-cellulosomes on the <i>Saccharomyce cerevisiae</i> Cell Surface by TypeI and TypeII cohesin-docker in Interaction	한성욱	11th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms	국외	호주, 멜버른	포스터 발표
30	2010. 08.01	Fungal diversity of the genus <i>Penicillium</i> from woods and their characteristics of extracellular enzymes	장영선, 김재진*	9th International Mycological Congress	국외	영국	포스터 발표
31	2010. 09.14	Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation	김성봉, 김승욱*	IBS2010	국외	Riminipalac congressi, Italy	포스터 발표
32	2010. 11.15	Saccharificati on of lignin removed rice straw and utilization of proton beam irradiation for efficient enzyme digestibility	김성봉, 김승욱*	ISLCT2010	국내	제주도	포스터 발표
33	2010. 11.19	Sugar recovery from rice straw by using dilute acid pretreatment	김성봉, 김승욱*	한국청정기술학회	국내	충남대학교, 대전	포스터 발표
34	2010. 11.20	Fungal strain improvement for cellulase production using repeated and sequential mutagenesis	김근	YABEC 2011 (17th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community	국외	Yuanze University, 대만	포스터 발표
35	2010. 11.20	Development of Functional Agarolytic Nano-Complex via Cohesin-Docker in Interaction of <i>Clostridium cellulovorans</i> Cellulosome System for Efficient Hydrolysis of Marine Biomass	현정은, 한성욱*	YABEC 2011 (17th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community	국외	Yuanze University, 대만	포스터 발표
36	2011. 04.14	Hydrolysis of Carrageenan with Aid of Functional Agarolytic Complex Comprising Recombinant Scaffolding Protein and Carrageenase by Recombinant <i>Escherichia coli</i>	현정은, 한성욱*	2011년도 한국생물공학회 춘계 학술발표대회	국내	제주도	포스터 발표

37	2011.04.21	Isolation and enzymatic properties of thermophilic fungi from compost	이환별, 김재진*	Korean society of wood science and technology annual meeting	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
38	2011.04.21	Enzymatic characteristics of wood-degrading basidiomycetes	이환휘, 김재진*	Korean society of wood science and technology annual meeting	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
39	2011.05.02	Consolidated Bioprocessing of Recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> for Production of Bioethanol from Pretreated Barley Straw	한성욱	33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Seattle, USA	포스터 발표
40	2011.05.02	Characteristics of eucalyptus pretreatment by alkaline solutions	박용철, 김준석*	33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Seattle, USA	포스터 발표
41	2011.05.02	Pretreatment and hydrolysis of rice straw by dilute acid	강민수, 김준석*	33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Seattle, USA	포스터 발표
42	2011.05.02	Two stage Pretreatment of Rapeseed straw with Sodium hydroxide and Sulfuric acid	최창호, 오경근*	33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	Seattle, USA	포스터 발표
43	2011.06.23	Screening and selection of fungal strains hyper-producing endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase, filterpaperase, xylanase, and pectinase	임영훈, 김근*	2011 International Symposium & Annual Meeting Translational Research in Microbiology and Biotechnology	국내	경주	포스터 발표
44	2011.06.23	Contribution of Novel Type Dockerin Module in EndoglucanaseG to Assembly into Cellulolytic Complex from <i>Clostridium cellulovorans</i>	이지은, 한성욱*	2011 International Symposium & Annual Meeting Translational Research in Microbiology and Biotechnology	국내	경주	포스터 발표
45	2011.06.28	Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes	이영민, 김재진*	4th FEMS Congress of European Microbiologists	국외	스위스	포스터 발표
46	2011.07.05	Synergistic Amino Acid Production from Cellulosic Substrate Using Recombinant <i>Coryne bacterium glutamicum</i> Engineered for Producing Minicellulosome	현정은, 한성욱*	ASM 2011 Annual Scientific Meeting	국외	호주, Hobart	포스터 발표
47	2011.10.26	Correlation between cellulosic biomass pretreatment and enzymatic saccharification	박용철, 김준석*	한국화학공학회 2011년도 가을총회 및 학술대회	국내	송도컨벤시아	포스터 발표
48	2011.11.19	Pretreatment of lignocellulosic biomass by alkaline solutions	박용철, 김준석*	Asia-Pacific Forum on Renewable Energy 2011	국내	Busan grand hotel	포스터 발표
49	2012.02.26	Optimization of Sodium Hydroxide Pretreatment of Canola Agricultural Residues for Fermentable Sugar Production using Statistical Method	유하영, 김승욱*	2012 International proceedings of chemical, biological and environmental engineering(Future environment and energy)	국외	Quality Hotel Singapore	구두발표
50	2012.02.26	Furfural production from Miscanthus by one step pyrolysis	김성봉, 김승욱*	2012 International proceedings of chemical, biological and environmental engineering(Future environment and energy)	국외	Quality Hotel Singapore	구두발표
51	2012.04.11	Twin-screw Extrusion Pretreatment for the Efficient Enzymatic hydrolysis	최기욱	2012 KSBB spring symposium	국내	창원컨벤션센터	포스터 발표
52	2012.04.11	Consolidated Bioprocessing for Bioethanol production from Hemicellulosic Substrate Using Recombinant <i>Pichia pastoris</i> Consist of Functional Hemicellulolytic Complex	김영인, 한성욱*	2012 KSBB spring symposium	국내	창원컨벤션센터	포스터 발표
53	2012.04.12	Cellulolytic enzymes production by co-cultivation of <i>Trichoderma</i> spp. using various biomass	이환별, 김재진*	Korean society of wood science and technology annual meeting	국내	대구	포스터 발표
54	2012.04.24	Production of various bioproducts through biomass utilization	김승욱	바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄	국내	광주김대중컨벤션센터	구두발표
55	2012.04.24	Optimization of dilute acid pretreatment of Korean Miscanthus by statistical method and fermentable sugar production for ethanol fermentation	유하영, 김승욱*	바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표

56	2012. 04.24	Statistical study and optimization of aqueous ammonia pretreatment on hemi cellulose removed rice straw	김성봉, 김승욱*	바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄	국내	광주김대중 컨벤션센터	포스터 발표
57	2012. 04.25	Heterologous expression and characterization of acetyl xylan esterase 2 from <i>Phanerochate chrysosporium</i>	Nguyen Duc Huy, 박승문*	바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄	국내	광주김대중 컨벤션센터	포스터 발표
58	2012. 04.25	Decolorization of malachite green by the coupled reaction with recombinant glyoxal oxidase and manganese peroxidase	손유림, 박승문*	바이오에너지 코리아 컨퍼런스 2012 국제심포지엄	국내	광주김대중 컨벤션센터	포스터 발표
59	2012. 04.25	Unique binding affinity between novel dockerin in EngG and cohesin modules in scaffolding protein from <i>Clostridium cellulovorans</i>	전상덕, 한성욱*	2012년 한국화학공학회 춘계학술대회	국내	제주도	포스터 발표
60	2012. 04.26	Phylogenetic analysis of the genus <i>Fusarium</i> and their Antifungal activity against decay and sapstain fungi	이영민, 김재진*	2012년도 춘계학술대회 및 임시총회	국내	대명리조트 변산	포스터 발표
61	2012. 04.27	Pretreatment by acid and alkaline solutions for Jerusalem artichoke residue	박용철, 김준석*	한국화학공학회 2012년도 봄총회 및 학술대회	국내	제주국제컨벤션센터	포스터 발표
62	2012. 04.27	Characterization of Alkaline pretreatment of Empty fruit bunch for enzymatic hydrolysis	강민수, 김준석*	한국화학공학회 2012년도 봄총회 및 학술대회	국내	제주국제컨벤션센터	포스터 발표
63	2012. 04.30	Sodium carbonate and sodium hydroxide pretreatment for efficient enzymatic saccharification of EFB	강민수, 김준석*	34th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals	국외	New Orleans, USA	포스터 발표
64	2012. 06.18	Improvement of Enzymatic Digestibility for Empty Fruit Bunch by Alkaline Pretreatment	강민수, 김준석*	20th European Biomass Conference and Exhibition	국외	Milano, Italy	포스터 발표
65	2012. 06.18	Pretreatment of Jerusalem Artichoke Residue by Percolation Method Using Acid and Alkaline Solutions	박용철, 김준석*	20th European Biomass Conference and Exhibition	국외	Milano, Italy	포스터 발표
66	2012. 06.18	Optimization the pretreatment of Rape straw using Extrusion Processing for Enhancing Enzymatic Digestibility	최창호, 오경근*	20th European Biomass Conference and Exhibition	국외	Milano, Italy	포스터 발표
67	2012. 07.01	Assembly of EndoglucanaseG into Cellulosome from <i>Clostridium cellulovorans</i> via an Unknown Dmain Exhibited Unique cohesin: Docker in Interaction	전상덕, 한성욱*	ASM 2012 Annual Scientific Meeting and Exhibition	국외	호주 Brisbane	포스터 발표
68	2012. 08.12	Sugar production from abandoned textile by enzymatic saccharification and application to ethanol fermentation	유하영, 김승욱*	Society for industrial microbiology and biotechnology	국외	미국, 워싱턴DC	포스터 발표
69	2012. 09.13	Bioethanol Production with Continuous SSF Process from NaOH Pretreated Barley Straw	한미희, 최기욱*	The 6th World Bioenergy Symposium	국외	Beijing, China	포스터 발표
70	2012. 09.16	Alkaline pretreatment of efficient enzymatic saccharification of EFB	강민수, 김준석*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
71	2012. 09.16	Pretreatment of percolation process for Jerusalem artichoke residue	박용철, 김준석*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
72	2012. 09.16	Effect of dilute acid pretreatment on the xylose production from empty fruit bunch	홍진영, 오경근*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
73	2012. 09.16	Dilute Acid Pretreatment Severity on the Conversion of Agricultural Biomass to Fermentable Sugars	이지예, 오경근*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
74	2012. 09.16	High-yield cellulase production by a new <i>Penicillium</i> sp. isolate on rice straw	임영훈, 김근*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
75	2012. 09.16	A cellulase from newly isolated <i>Penicillium</i> sp. KL1 production and application to enzymatic saccharification process.	유하영, 김승욱*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
76	2012. 09.16	Development of industrial yeast strains expressing mini-cellulosomes for biofuel production from various natural cellulosic biomasses	현정은, 한성욱*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표

77	2012. 09.16	Role of tryptophan in family 3 cellulose binding module of family 9 endoglucanaseH from <i>Clostridium cellulovorans</i> on thermostability	김수정, 한성욱*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
78	2012. 09.16	Re-established cohesin binding affinity of docker in mutant from <i>Clostridium cellulovorans</i> via iteration of selective binding recognition	전상덕, 한성욱*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
79	2012. 09.16	Degradation of diazo, triphenyl methane and anthracene derivativedyes by recombinant magnese peroxidase of <i>phanerochaete chrysosporium</i> expressed in <i>Phichia pastoris</i> and its effect of decolorization with different redox mediators	Saravana kumar, 박승문*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
80	2012. 09.16	Characterization of a novel thermostable endo-arabinanase from <i>phanerochaete chrysosporium</i> and its biomass degradation on the synergitic with xylanase	nguyenDuc Huy, 박승문*	15th International Biotechnology Symposium and Exhibition	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
81	2012. 09.20	Characterization of pretreatment to ethanol production from barley straw	한민희, 최기욱*	2012 한국생물공학회 추계 학술대회	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
82	2012. 09.20	Characterization of a recombinant putative xylosidase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Nguyen Duc Huy, 박승문*	2012 한국생물공학회 추계 학술대회	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
83	2012. 09.20	Effective degradation and detoxification of triphenyl methanedy, Malachite green by manganese peroxidase isozyme H4 from of <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Saravanakumar, 박승문*	2012 한국생물공학회 추계 학술대회	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
84	2012. 10.09	Researches on Various Bioproducts and Biomass Utilization in Bioprocess Engineering Laboratory (BPEL)	김승욱	The 1st KU and GIEC Joint Symposium on Lignocellulosic Biofuel	국내	서울	구두발표
85	2012. 10.24	Pretreatment of Jerusalem artichoke residue by percolation process using aqueous ammonia and sulfuric acid	박용철, 김준석*	한국화학공학회 2012년도 가을총회 및 학술대회	국내	BEXCO, 부산	포스터 발표
86	2012. 10.24	Hot Liquid Water(HLW) pretreatment od Empty fruit bunch for improvement of enzymatic digestibility	강민수, 김준석*	한국화학공학회 2012년도 가을총회 및 학술대회	국내	BEXCO, 부산	포스터 발표
87	2012. 11.26	Pretreatment process of lignocellulosic biomass by alkaline solution for fermentable sugar production	박용철, 김준석*	Asia-Pacific Forum on Renewable Energy 2012	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
88	2012. 11.26	Two-stage hot water pretreatment of empty fruit bunch for improvement of enzymatic digestibility	강민수, 김준석*	Asia-Pacific Forum on Renewable Energy 2012	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
89	2012. 11.26	Cephalosporin C Production by <i>Acremonium Chrysogenum</i> M35 using xylose as a carbon source from dilute acid pretreated barley straw	김성봉, 김승욱*	Asia-Pacific Forum on Renewable Energy 2012	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
90	2013. 01.17	Dilute Acid Pretreatment of Miscanthus and enzymatic saccharification	서영준, 김승욱*	The 4th Regional AFOB Symposium 2013	국외	태국	포스터 발표
91	2013. 03.07	Challenges in biofuel cell: Enzymatic fuel cell	이희욱, 김승욱*	2013 Annual Conference of theInstitute of Biological Engineering	국외	미국	구두발표

92	2013. 03.26	Direct Biofuel Conversion from Biomass with Simultaneous Consumption of Pentose and Hexose Sugars by Minicellulosome Containing Xylanase and Cellulase in <i>Pichia pastoris</i>	현정은, 한성욱*	Bioenergy and Biorefinery Conference Southeast Asia 2013	국외	Singapore	포스터 발표
93	2013. 04.10	Acidic and alkaline pretreatment of medicinal herb waste for sugar production	유하영, 김승욱*	한국생물공학회 2013 춘계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
94	2013. 04.10	Biosynthesis of peracetic acid production by immobilized acetyl xylan esterase	서영준, 김승욱*	한국생물공학회 2013 춘계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
95	2013. 04.10	Production of cellulase by <i>Penicillium</i> sp. KL2 in a batch fermentor	정다운, 김승욱*	한국생물공학회 2013 춘계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
96	2013. 04.24	High efficiency bioethanol production from Miscanthus in bench-scale	한민희, 최기욱*	2013 한국화학공학회 춘계학술대회	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표
97	2013. 05.18	Engineering of Protein Complexes Based on Clostridium Cellulosome Systems for Biological Pretreatment and Synergistic Hydrolysis of Lignocellulose	현정은, 한성욱*	ASM General Meeting 2013	국외	Denver, Colorado	포스터 발표
98	2013. 05.23	Phylogenetic analysis of the genus Alternaria inhabiting woods in Korea	이영민, 김재진*	KSM 한국균학회 2013년도 춘계 학술대회 및 임시총회	국내	대전	포스터 발표
99	2013. 05.30	Pretreatment of sawdust using continuous twin screw-driven reactor (CTSR) with dilute acid for ethanol production	홍진영, 오경근*	한국신재생에너지학회 2013 춘계 학술대회	국내	여수엠블호텔	포스터 발표
100	2013. 06.16	Optimization the process variables for fractionation of empty fruit bunch by a continuous twin screw-driven reactor (CTSR) for xylose rich hydrolysate	오경근	10th World congress on industrial biotechnology	국외	Montreal, Canada	포스터 발표
101	2013. 08.07	Biodiesel production from instant noodle waste	양효광, 김승욱*	2013 YABEC	국외	중국	포스터 발표
102	2013. 08.19	Screening of basidiomycetes extracts for antifungal potential against Alternaria tenuissima isolated from woods in Korea	이영민, 김재진*	Asian Mycological Congress 2013	국제	베이징	포스터 발표
103	2013. 08.25	Summary of Korea-ASEAN Science and Technology Cooperation Project and Researches on Various Bioproducts and Biomass Utilization in Bioprocess Engineering Laboratory(BPEL)	김승욱	The 7th Korea-Thailand-Indonesia Joint Symposium on Biomass Utilization and Renewable Energy	국외	태국	포스터 발표
104	2013. 09.03	Application to enzymatic fuel cells	김승욱	The 3rd KU and GIEC joint symposium on lignocellulosic biofuel	국내	서울	구두발표
105	2013. 10.16	Bioethanol Production for Enhancing Economic Efficiency: Focus on Reuse of Pretreatment Solution and High Concentrated Bioethanol	한민희, 최기욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
106	2013. 10.16	Development of bioethanol production from high concentration biomass	강경엽, 최기욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
107	2013. 10.16	Effect of Glucose Concentration in Enzyme-based Fuel Cell	김동섭, 김승욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
108	2013. 10.16	Extraction of phenols and furans from the Waste Hydrolysates of Dilute Acid Pretreatment of Barley Straw to Obtain Fermentable xylose	김성봉, 김승욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
109	2013. 10.16	Microbial Production of 2,3-BDO by <i>Enterobacter aerogenes</i> for Utilizing Sugars Derived from Biomass	이상준, 김승욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표

110	2013. 10.16	Development of Acetyl Xylan Esterase Supporter using Graphite Oxide for Peracetic Acid Production	이지현, 김승욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
111	2013. 10.16	Characterization of cellobiose dehydrogenase from a <i>Pichia stipitis</i> .	최한석, 김승욱*	한국생물공학회 2013 추계 학술 발표 대회 및 국제 심포지엄	국내	부산	포스터 발표
112	2013. 10.17	Optimization of Hemicellulose Saccharification by Recombinant Hemicellulase Cocktail in the Water Soluble Wheat Arabinoxylan and pretreated Barley Straw	nguyenDucHuy, 박승문 *	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	국내	서울	포스터 발표
113	2013. 10.17	Characterization of the Carbohydrate Binding Module of Endo-b-1,4-mannase from <i>Phanerochaete chrysosporium</i> on Bacterial Nano Cellulose	nguyenDucHuy, 박승문*	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	국내	서울	포스터 발표
114	2013. 10.17	Optimal Immobilization of Acetyl Xylan Esterase Isolated from <i>Aspergillus ficuum</i> on Fe3O4-chitosan Nanoparticles	사라마나 쿠마르, 박승문*	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	국내	서울	포스터 발표
115	2013. 10.17	Optimization of cellulase production by morphological control of <i>Trichoderma harzianum</i> KUC1716	이한별, 김재진*	2013 한국미생물학회연합 국제학술대회	국내	서울	포스터 발표
116	2013. 10.23	Characteristics of SSF by SAA Pretreatment from Rice straw	장서윤, 김준석*	한국화학공학회 2013년도 가을 총회 및 학술대회	국내	EXCO, Daegu	포스터 발표
117	2013. 11.04	Two stage sequential pretreatment of empty fruit bunch (EFB) for improvement of enzymatic hydrolysis	김동영, 오경근*	Asia-Pacific Forum on Renewable Energy 2013	국내	그랜드호텔, 제주	포스터 발표
118	2013. 11.12	CephalosporinC production from xylose by <i>Acremonium chrysogenum</i> M35	김성봉, 유하영, 김준석, 김승욱	Bioenergy Korea Confetnece & The 9th KSMB Annual Meeting International Symposium 2013	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
119	2013. 11.12	Bioethanol production by simultaneous ssaccharification and fermentation from instant noodle waste	양효광, 김승욱*	Bioenergy Korea Confetnece & The 9th KSMB Annual Meeting International Symposium 2013	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
120	2013. 11.12	Enzymatic Production of Fatty Acid Methyl Ester from Vegetable Oil	오석현, 박철환*	Bioenergy Korea Confetnece & The 9th KSMB Annual Meeting International Symposium 2013	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
121	2013. 11.12	Optimization of Alkaline and Acid pretreatment of Korean Miscanthus by Statistical Method for Sugar Production	유하영, 김승욱*	Bioenergy Korea Confetnece & The 9th KSMB Annual Meeting International Symposium 2013	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
122	2013. 11.12	Development of Activated Carbon as a Novel Supporter for Two Types of Lipase Immobilization	이지현, 김승욱*	Bioenergy Korea Confetnece & The 9th KSMB Annual Meeting International Symposium 2013	국내	롯데호텔, 제주도	포스터 발표
123	2013. 12.15	Development of a Immobilized Enzyme-based Biosensor by Using Docker in Cohesin Interaction of Cellulosome	현정은, 한성욱*	Asian Congress on Biotechnology 2013	국외	New Delhi, India	포스터 발표
124	2013. 12.15	Modularization of bioethanol production from lignocellulosic biomass	강경엽, 최기욱*	Asian Congress on Biotechnology 2013	국외	New Delhi, India	포스터 발표
125	2013. 04.24	Characteristics of Simultaneous Saccharification and Fermentation of Pretreated Rice Straw by Soaking in Aqueous Ammonia	장서윤, 김준석*	한국화학공학회 2013년도 봄 총회 및 학술대회	국내	광주김대중컨벤션센터	포스터 발표

6. 기술실시 현황

□ 1. 물질이전 계약: 2014. 03. 31 프로티젠 *Penicillium brasilianum* KUEB6

물질이전계약서 (Material Transfer Agreement)

1. 계약 당사자

"고려대학교 산학협력단 (서울 성북구 안암로 145, 이하 "갑"이라 함), 연구책임자, 회공생명공학과 김승욱 교수)과 프로티젠 (주소: 경기도 화성시 동답읍 삼천병마로 857-5), 이하 "을"이라 함)은 2014년 03월 31일(이하 "계약유효일"이라 함)로 다음과 같이 물질이전계약(이하 "본 계약"이라 함)을 체결한다."

2. 계약 내용

제 1 조 (목적)

갑은 첨부 A 에 기재된 물질(이하 "물질")을 보유하고 있으며, 을은 물질을 사용하여 "연구"를 진행하고자 하고, 갑은 을의 연구를 위하여 물질을 을에게 제공하기를 동의하므로 갑과 을의 상호 합의하에 본 계약을 체결한다.

제 2 조 (용어의 정의)

본 계약에 있어서, 하기 용어들은 하기에 정의된 의미를 갖는 것으로 해석한다.

(1) "물질"이라 함은, 갑으로부터 을에게 제공되는 미생물자원 (*Penicillium brasilianum* KUEB6)으로서, 첨부 A 에 기재된 물질뿐만 아니라, 그 자손 및 비변형 유도체를 포함한다.

본 계약서는 "갑"과 "을"이 서명 날인하여 "갑"과 "을"이 각각 1 통씩 보관한다.

2014. 03. 31

【갑】 고려대학교 산학협력단
단 장 김 상 식 (인)

연구책임자 김 승 욱 (인)

담당자: 이 정 진
연락처: 02-3290-5838

【을】 프로티젠
대 표 강 성 우 (인)

담당자: 강 성 우
연락처: 010-7396-2605

□ 2. 물질이전 계약: 2014. 03. 31 프로티젠 *Penicillium brasilianum* KUEB15

물질이전계약서 (Material Transfer Agreement)

1. 계약 당사자

"고려대학교 산학협력단 (서울 성북구 안암로 145, 이하 "갑"이라 함; 연구책임자, 화공생명공학과 김승욱 교수)과 프로티젠 (주소: 경기도 화성시 동담읍 삼천병마로 857-5), 이하 "을"이라 함)은 2014 년 03 월 31 일자(이하 "계약유효일"이라 함)로 다음과 같이 물질이전계약 (이하 "본 계약"이라 함)을 체결한다."

2. 계약 내용

제 1 조 (목 적)

갑은 첨부 A 에 기재된 물질(이하 "물질")을 보유하고 있으며, 을은 물질을 사용하여 "연구"를 진행하고자 하고, 갑은 을의 연구를 위하여 물질을 을에게 제공하기를 동의하므로 갑과 을의 상호 합의하에 본 계약을 체결한다.

제 2 조 (용어의 정의)

본 계약에 있어서, 하기 용어들은 하기에 정의된 의미를 갖는 것으로 해석한다.

(1) "물질"이라 함은, 갑으로부터 을에게 제공되는 미생물자원 (*Penicillium brasilianum* KUEB15) 으로서, 첨부 A 에 기재된 물질뿐만 아니라, 그 자손 및 비변형 유도체를 포함한다.

본 계약서는 "갑"과 "을"이 서명 날인하여 "갑"과 "을"이 각각 1 통씩 보관한다.

2014. 03. 31.

【갑】 고려대학교 산학협력단

단 장 김 상 식 (인)

연구책임자 김 승 욱 (인)

담당자: 이 정 진

연락처: 02-3290-5838

【을】 프로티젠

대 표 강 성 우 (인)

담당자: 강 성 우

연락처: 010-7396-2605

3절 연구개발 성과활용 계획

1. 핵심 기술별 주요 성과의 요약

핵심 기술	성과물	세부설명
화학적 전처리 기술	[논문] Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation	국내에서 발생한 농산 부산물 보리짚을 에탄올 발효에 활용하기 위하여 묽은 황산으로 전처리를 수행함. 전처리 조건들 중 반응시간, 온도, 묽은 황산의 농도를 최적화하여 당화 효율이 증진되었으며, 바이오매스 무게 당 생산 가능한 바이오에탄올 이론적 생산량이 향상됨.
	[논문] Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment	묽은 황산으로 벚짚을 전처리함으로써 효소 가수분해 시 기질과 효소의 접근성을 향상시켜 당화 효율을 높였음. 이번 연구는 전처리 조건을 통계학적인 방법으로 최적화하여 당 회수율을 약 90%까지 향상 시켰음.
	[논문] Reutilization of carbon sources through sugar recovery from waste rice straw	벚짚은 미생물 발효 배지의 탄소원으로 이용되어 섬유소 분해효소를 생산하였음. 본 연구는 효소생산 후 배지의 주요 잔여물인 벚짚 분해물 등을 활용하여 발효에 이용 가능한 당을 효과적으로 회수한 연구임.
	[논문] Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia	벚짚에서 글루코오스를 효과적으로 회수하기 위해 2단 전처리 공정을 도입하였음. 알칼리 용매로 암모니아수를 이용하여 벚짚의 리그닌을 침출 시켰고, 산 용매로 묽은 황산을 이용하여 벚짚의 헤미셀룰로오스를 침출시켜 주로 셀룰로오스만 선택적으로 고체상에 남도록 하였음. 이를 당화시킨 결과 90% 이상의 당 전환율을 보였음.
	[논문] 바이오에탄올 생산을 위한 암모니아수에 의해 전처리된 벚짚의 효소당화 특성	암모니아수는 전처리 시약으로 목질계 재료에 대해 효과적인 팽윤 시약이며 탄수화물과 리그닌과의 반응에 높은 선택도를 가지고 있고, 높은 휘발성으로 쉽게 회수하고 재사용이 가능. 섬유소계 바이오매스의 주요 성분인 리그닌과 그 부산물은 미생물에 독성물질로 작용하며 효소당화에 저해물질로 작용함. 바이오 에탄올 생산을 위한 미생물 활동과 효소 당화효율을 향상시키기 위해서는 리그닌의 함유량을 낮춰야 하는데, 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실도 최소화할 수 있음. 저에너지 공정인 침지 전처리 공정으로 바이오매스의 전처리를 수행하는 연구로써 벚짚, 보리짚 등 바이오매스에 대하여 연구를 수행함.
	[논문] 염기 용매를 이용한 보리짚의 전처리 특성	암모니아수는 전처리 시약으로 목질계 재료에 대해 효과적인 팽윤 시약이며 탄수화물과 리그닌과의 반응에 높은 선택도를 가지고 있고, 높은 휘발성으로 쉽게 회수하고 재사용이 가능. 섬유소계 바이오매스의 주요 성분인 리그닌과 그 부산물은 미생물에 독성물질로 작용하며 효소당화에 저해물질로 작용함. 바이오 에탄올 생산을 위한 미생물 활동과 효소 당화효율을 향상시키기 위해서는 리그닌의 함유량을 낮춰야 하는데, 낮은 온도에서 암모니아수에 의한 침지는 당화 효율을 증가시키고 헤미셀룰로오스 손실도 최소화할 수 있음. 저에너지 공정인 침지 전처리 공정으로 바이오매스의 전처리를 수행하는 연구로써 벚짚, 보리짚 등 바이오매스에 대하여 연구를 수행함.
	[논문] Fractionation of barley straw with dilute sulfuric acid for improving hemi-cellulose recovery	묽은 황산에 의한 바이오매스의 처리는 널리 섬유소계 물질의 전처리와 가수분해에 사용됨. 140 ~ 190 °C에서 묽은 산(0.5 ~ 1.0% 황산)에 의한 전처리는 헤미셀룰로오스를 효과적으로 제거하고 분해된 헤미셀룰로오스 구성당의 회수율도 높을 뿐만 아니라 셀룰로오스의 당화 수율도 크게 증가시켜주는 효과적인 전처리 방법임. 전처리에 가장 큰 저해물질로 생각되고 있는 리그닌의 분해 정도는 작지만 헤미셀룰로오스의 효과적인 분해를 통해 유해 기공을 확장하고 이는 효소의 접근성을 증가시켜주게 됨. 묽은 황산 전처리의 장점으로는 높은 반응속도, 낮은 산 소비 그리고 상대적으로 낮은 황산 비용을 들 수 있음. 본 연구에서는 농업부산물인 보리짚을 묽은 황산 전처리 공정에 적용함.

	[논문] Comparison of bioethanol production of simultaneous saccharification & fermentation and separation hydrolysis & fermentation with cellulose rich Barley Straw	묵은 황산으로 전처리된 보리짚의 활용을 목적으로 수행한 연구로 헤미셀룰로오스의 회수와 전처리된 바이오매스의 동시당화발효와 분리당화발효를 연구하여 논문을 출판함.
	[논문] Chemicals effect on the enzymatic digestibility of rape straw over the thermo-mechanical pretreatment using a continuous twin screw-driven reactor (CTSR)	연속반응기에서 수행할 때 산 처리는 상대적으로 짧은 체류 시간을 요구함. 묵은 황산 전처리는 부분적으로 헤미셀룰로오스의 분해를 통해 섬유질의 내부 표면적을 확대시키고, 리그닌도 전처리 전의 온전한 상태가 아닌 상당부분 분해가 이루어져 효소의 접근성은 더욱 크게 증가하며 셀룰로오스의 효소 소화가 좀 더 용이하게 만들고 결정성을 감소시킴. 연속 전처리 공정에 대해 제시하기 위해 유체대에 대한 연구를 screw-driven reactor (extruder) 공정을 통해 수행함. 이러한 연구는 기존의 회분식 전처리 공정의 스케일 업을 위해 설계하였음. 전처리가 수행된 유체대를 통해 특성을 확인하였고, 효소당화와 동시당화발효 연구를 수행함.
	[논문] Evaluation the efficacy of extrusion pretreatment via enzymatic digestibility and simultaneous saccharification & fermentation with rape straw	
	[특허] 바이오매스의 광 발광 분석 방법	바이오매스 내 자일란 성분의 특성을 분광학(spectroscopy) 적인 분석, 특히 광 발광의 형광을 통해 전처리 전과 후의 차이를 측정 및 해석하여 전처리의 효과를 입증하는 방법을 개발하여 지식재산권을 출원하였음.
생물학적 전처리 기술	[논문] Heterologous expression of Endo-1,4-beta-XylanaseC from Phanerochaete chrysosporium in Pichia pastoris	헤미셀룰로오스 분해에 반드시 필요한 endo type의 xylanase 효소를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 xylan의 효소적 분해 특성을 밝혔음.
	[논문] Cloning and characterization of a novel bifunctional acetyl xylan esterase containing a carbohydrate binding module from Phanerochaete chrysosporium	헤미셀룰로오스의 xylan 분해 과정에 저해성 인자로 작용하는 acetyl group을 선택적으로 제거하는 효소인 Acetyl xylan esterase를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 효소적 분해 특성을 밝혔으며 AXE 효소 전처리시 xylan 분해효율이 증가함을 확인함.
	[논문] Cloning and characterization of a thermostable endo-arabinanase from Phanerochaete chrysosporium and its synergistic action with endo-xylanase	헤미셀룰로오스는 xylan backbone 외에도 arabinose 등의 다양한 당이 결합된 형태로 구성되어 있어 xylanase 외에도 이들 arabinase 같은 보조 효소가 필요함. 본 논문에서는 arabinan을 분해하는 효소인 endo-arabinanase를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 효소적 분해 특성을 밝혔으며 xylanase와의 상승 효과를 검증하였음.
	[논문] Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabino furanosidase from Phanerochaete chrysosporium	헤미셀룰로오스 분해에는 endo-type의 xylanase 효소 뿐만 아니라 exo-type의 xylan 분해효소가 필요하여 이들 효소를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 xylanase와의 효소적 공동분해 특성을 밝혔음.
	[논문] Manganese Peroxidase H4 Isozyme Mediated Degradation and Detoxification of Triarylmethane Dye Malachite Green: Optimization of Decolorization by Response Surface Methodology	리그닌을 분해하는 효소는 크게 lignin peroxidase, Mn peroxidase 및 laccase 등이 있는데 백색부후균으로부터 Mn peroxidase isoenzyme을 cloning 하고 효모에서 고발현 시켜 분리정제 한 뒤 리그닌 유사물질을 대상으로하여 분해적 특성을 밝혔음.
	[특허] 백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산을 위한 재조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 A 대량생산방법	헤미셀룰로오스 분해에 반드시 필요한 endo type의 xylanase A 효소를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 xylan의 효소적 분해 특성을 밝히고 이들 효소의 대량 생산방법에 대해 지식재산권을 출원하고 등록함.

	[특허] 백색부후균 유래의 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산을 위한 재조합 발현벡터 및 이를 이용한 엔도-1,4-베타 자일라나제 C 대량생산방법	헤미셀룰로오스 분해에 반드시 필요한 endo type의 xylanase C 효소를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 xylan의 효소적 분해 특성을 밝히고 이들 효소의 대량 생산방법에 대해 지식재산권을 출원하고 등록함.
	[특허] 과아세트산 생산방법 및 과아세트산 생산용 아세틸자일란 에스터라제	헤미셀룰로오스의 xylan 분해 과정에 저해성 인자로 작용하는 acetyl group을 선택적으로 제거하는 효소인 Acetyl xylan esterase를 Aspergillus로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제하고, 이를 과아세트산의 생산방법에 응용하여 지식재산권을 출원함.
	[특허] 백색부후균 파네로케이트 크리소스포리움 BKM-F-1767 유래의 망간퍼옥시다제 코딩유전자의 발현방법	리그닌을 분해하는 효소는 크게 lignin peroxidase, Mn peroxidase 및 laccase 등이 있는데 이들 효소는 이중발현 방법으로는 대량생산이 어려운 효소임에도 불구하고, MnPH4 유전자를 백색부후균으로부터 cloning 하고 효모에서 고발현시키는 방법에 대해 지식재산권을 출원함.
	[특허] 과아세트산 생산 방법 및 과아세트산 생산용 아세틸 자일란 에스터라제	헤미셀룰로오스의 xylan 분해 과정에 저해성 인자로 작용하는 acetyl group을 선택적으로 제거하는 효소인 Acetyl xylan esterase를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시킨 뒤 분리정제 하여 효소적 분해 특성을 밝혔으며 AXE 효소를 이용해서 과아세트산의 생산방법에 대한 지식재산권을 출원함.
	[특허] 백색 부후균 유래의 재조합 자일로시다아제/아라비노푸라노시다아제 다기능 효소의 고생산 방법	헤미셀룰로오스의 xylan backbone 외의 arabinose 등을 분해하는 효소인 endo-arabinanase를 백색부후균 으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시켜 고생산하는 방법에 대한 지식재산권을 출원함.
	[특허] 백색 부후균 유래의 탄수화물 결합 모듈을 갖는 재조합 아세틸 자일란 에스터라아제 다기능 효소의 고생산 방법	헤미셀룰로오스의 xylan 분해 과정에 저해성 인자로 작용하는 acetyl group을 선택적으로 제거하는 효소인 Acetyl xylan esterase를 백색부후균으로부터 신규로 cloning하고 효모에 대량 발현시켜 고생산 방법에 대한 지식재산권을 출원함.
	[특허] 백색 부후균 유래의 고온 안정성을 갖는 재조합 아라비난나제 효소의 고생산 방법	헤미셀룰로오스의 xylan backbone 외의 arabinose 등을 분해하는 효소인 endo-arabinanase를 백색부후균으로부터 cloning하고 효모에 대량 발현시켜 고생산하는 방법에 대한 지식재산권을 출원함.
섬유소 분해 효소 발굴 및 생산	[논문] Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 1. Genus Trichoderma	국내 자생 섬유소분해효소 생산 균주 중에서 고효율성 섬유소분해효소를 생산한다고 알려진 Trichoderma species에 대한 분류학적 정보 제공.
	[논문] Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods and their discoloration characteristics. Part 2. Genus Penicillium	국내 자생 섬유소분해효소 생산 균주 중에서 고효율성 섬유소분해효소를 생산한다고 알려진 Penicillium species에 대한 분류학적 정보 제공.
	[논문] Phylogenetic analysis and discoloration characteristics of major molds inhabiting woods. Part 3. Genus Cladosporium	국내 자생 섬유소분해효소 생산 균주 중에서 고효율성 섬유소분해효소를 생산한다고 알려진 Cladosporium species에 대한 분류학적 정보 제공.
	[논문] Phylogenetic analysis of major molds inhabiting woods. Part 4. Genus Alternaria	국내 자생 섬유소분해효소 생산 균주 중에서 고효율성 섬유소분해효소를 생산한다고 알려진 Alternaria species에 대한 분류학적 정보 제공.

	[논문] Screening for xylanase and β -xylosidase production from wood-inhabiting <i>Penicillium</i> strains for potential use in biotechnological applications	목재로부터 분리된 여러 종의 <i>Penicillium</i> 균주를 이용하여 xylanase 및 β -xylosidase 효소 활성을 측정하였음. 이를 통하여 우수한 xylanase 및 β -xylosidase 생산균주를 선별하였으며, 생명공학 응용분야에서의 사용가능성을 재고
	[논문] Rice Straw-decomposing fungi and their cellulolytic and xylanolytic enzymes	벼짚으로부터 다양한 곰팡이를 분리하여 그들의 cellulose 분해효소 및 xylan 분해효소 활성을 측정하였음. 이를 통하여 높은 효소활성을 분비하는 곰팡이를 선별.
	[논문] Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes	lignocellulose를 분해하는 효소의 활성을 측정하기 위해 기존에 사용되었던 방법을 축소화한 활성측정법을 개발하였음. 뿐만 아니라 효소생산을 위한 곰팡이 배양 규모도 축소화 함. 이를 통하여 배지 양 절감, 필요한 효소샘플 및 시료 양 절감, 그리고 활성측정 시간 단축을 이루어 냄.
	[논문] Phylogenetic analysis of the genus <i>Fusarium</i> and their antifungal activity against wood-decay and sapstain fungi	국내 자생 섬유소분해효소 생산 균주 중에서 고효성 섬유소분해효소를 생산한다고 알려진 <i>Fusarium</i> species에 대한 분류학적 정보 제공.
	[논문] Diversity of fungi in creosote-treated crossite wastes and their resistance to polycyclic aromatic hydrocarbons	특수 환경에서 성장하는 국내자생 담자균류의 분류학적 정보와 방향족 화합물을 분해하는 능력에 대한 정보를 제공하므로써 목질계 섬유소에서 리그닌의 분해의 잠재성이 큰 균주에 대한 정보 제공.
	[논문] Improvement of fungal cellulase production by mutation and optimization of solid state fermentation	고체배지에서 섬유소 분해 효소 생산 최적화를 진행하여 기존의 액상배양보다 더 많은 효소 생산방법을 확립함.
	[논문] Improvement of cellulase activity using error-prone rolling circle amplification and site-directed mutagenesis	섬유소 분해효소 생산 균주 개발을 하기 위해 site-directed mutagenesis 방법을 이용하여 돌연변이 균주를 제작하여 효소 생산이 증진된 균주를 제작함.
유전 조작에 의한 효소 활성 증진 기술	[논문] Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i> engineered for the production of <i>Clostridium cellulovorans</i> endoglucanase and <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> β -glucosidase	yeast 내에서 endoglucanase와 beta-glucosidase를 도입하여 셀룰레이즈 활성을 측정하였음. 이를 통하여 yeast 내 셀룰레이즈 도입 시스템을 구축함.
	[논문] Enhancement of the thermostability and activity of mesophilic <i>Clostridium cellulovorans</i> EngD by in vitro DNA recombination with <i>Clostridium thermocellum</i> CeIE	<i>Clostridium cellulovorans</i> 에 존재하는 Endoglucanase를 이용하여 효소의 열 안정성을 높임. DNA suffling 방법을 이용하여 열 안정성 이 높은 효소를 확보하고 이의 활성과 열 안정성을 측정함으로써 효소 안정성 증대 방법을 확립함.
	[논문] A cellulolytic complex from <i>Clostridium cellulovorans</i> consisting of mannanase B and endoglucanase E has synergistic effects on galactomannan degradation	개발한 코히신 마커를 이용하여 <i>Clostridium cellulovorans</i> 안에 존재하는 헤미셀룰레이즈 중 하나인 만난아제를 발굴함. 활성을 측정하고 다른 당화효소와 콕테일을 형성하여 활성 증대를 확인하였음. 이를 통하여 코히신 마커로 개발한 첫 당화효소에 대한 특성분석이 이루어 졌음.

	<p>[논문] The processive endoglucanase EngZ is active in crystalline cellulose degradation as a cellulosomal subunit</p>	<p>개발한 코히신 마커를 이용하여 Clostridium cellulovorans 안에 존재하는 셀룰레이즈를 탐지함. 엔도글루카나아제 효소는 비결정성 셀룰로오스에도 높은 활성을 보이는 효소임. 이를 통하여 코히신 마커로 발굴한 유용 당화효소에 대한 특성 분석을 진행하였고, 바이오 마커 이용하여 유용효소를 찾아 낼 수 있는 방법을 증명하였음.</p>
	<p>[논문] Analysis of selective, high protein-protein binding interaction of cohesin-dockerin complex using biosensing methods</p>	<p>코히신 마커의 효소 분석을 위한 결합 능력을 분석함. 단백질-효소간 결합능력이 다른 결합에 비하여 특이적이고 강한 결합력이 있는 것을 확인하였음.</p>
	<p>[특허] 바이오 에탄올 생산능이 향상된 재조합 벡터 및 그 형질 전환체</p>	<p>yeast 내 당화 효소를 도입하여 셀룰로오스를 분해하여 에탄올로 전환하는 기술을 개발함. 이를 통하여 yeast 균주 내 효소를 도입하여 활성을 증대된 것을 확인함.</p>
	<p>[특허] 섬유소를 효과적으로 분해할 수 있는 유전자가 삽입된 재조합 벡터, 그 재조합 벡터를 포함하는 형질전환체 및 그 형질전환체를 이용한 에탄올 생산방법</p>	<p>yeast 내 당화효소를 도입할 수 있는 재조합 벡터를 제조하고 효소를 생산할 수 있는 유전자를 도입하여 셀룰로오스를 직접적으로 분해할 수 있는 균주 및 생산 시스템을 개발함.</p>
	<p>[특허] 클로스트리디움 셀룰로보란스로부터 분리된 신규 만난아제와 갈락토만난 분해를 위한 셀룰로좀 복합체 활용</p>	<p>개발한 코히신 마커를 이용하여 Clostridium cellulovorans 안에 존재하는 헤미셀룰레이즈중 하나인 만난아제를 발굴함. 활성을 측정하고 다른 당화효소와 카테일을 형성하여 활성 증대를 확인하였음. 이를 통하여 코히신 마커로 개발한 첫 당화효소에 대한 특성분석이 이루어 졌음.</p>
	<p>[특허] 클로스트리디움 셀룰로보란스 유래 엔도글루카나아제를 포함하는 셀룰로좀 복합체 및 그의 용도</p>	<p>개발한 코히신 마커를 이용하여 Clostridium cellulovorans 안에 존재하는 셀룰레이즈를 탐지함. 엔도글루카나아제 효소와 다른 당화효소와의 카테일 형성을 통하여 셀룰로오스 분해 상승효과를 증명함. 이를 통하여 코히신 마커로 발굴한 유용 당화효소에 대한 특성분석을 진행하였고, 바이오 마커 이용하여 유용효소를 찾아 낼 수 있는 방법을 증명하였음.</p>
<p>고정화된 섬유소 분해 효소를 활용한 당화 공정</p>	<p>[논문] Production of cellulases and β-glucosidase in Trichoderma reesei mutated by proton beam irradiation</p>	<p>Trichoderma reesei 균주를 proton beam irradiation 방법으로 돌연변이를 유도하였고, 활성이 증진된 섬유소분해효소 생산 능력을 가지게 되었음.</p>
	<p>[논문] Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of beta glucosidase with cellobiose and glucose</p>	<p>섬유소 분해 효소 중 저분자 형태인 cellobiose를 선택적으로 분해하는 beta-glucosidase 효소를 담체인 실리카겔에 고정화 하였음. 고정화 효율을 높이기 위해 효소의 활성 부위를 보호하면서 고정화 시키는 전처리 과정을 연구하였음.</p>
	<p>[논문] Efficient immobilization technique for enhancement of cellobiose dehydrogenase activity on silica gel</p>	<p>Phanerochaete chrysosporium ATCC 32629 균주로부터 cellobiose dehydrogenase 효소를 생산하였고, 이를 재사용 하기 위하여 실리카겔에 고정화 하였음.</p>
	<p>[특허] 전처리를 통한 베타-글루코시다아제의 고정화 방법</p>	<p>beta-glucosidase 효소를 실리카겔을 담체로 하여 고정화 하였음. 본 지식재산권은 효소를 고정화하는 방법에서 효소의 활성부위를 보호하는 방법을 고안하였고, 실험을 통해 향상된 효과를 증명하였음. 활성부위를 보호하는 처리 과정 및 방법을 ‘전처리’라 지칭하였음.</p>

동시 당화 발효 기술	[논문] High efficiency bioethanol production from OPEFB using pilot pretreatment reactor	50L 규모의 회분식 전처리 반응기를 제작하였고, 팜나무 부산물을 전처리하여 바이오에탄올 생산함. 본 연구에서는 최적 전처리 조건을 표면 분석법으로 탐색하여 효율적으로 바이오에탄올을 생산하였음.
	[논문] Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by Saccharomyces cerevisiae CHFY0321.	고에탄올 생산성 및 고응집성 효모를 이용한 연속식 공정 적용. 슬러지가 포함된 카사바 액화액을 이용한 연속식 동시당화발효 조건을 확립함.
	[특허] 고농도발효성의 제조장치 이를 이용한 고농도 발효성당 제조방법 그리고 이를 이용하여 제조된 바이오화학물질	바이오매스 및 용매를 투입하여 상기 바이오매스를 전처리하는 이축 스크류 반응기; 상기 전처리된 바이오매스로부터 상기 용매를 제거하는 제1 탈수부, 상기 용매가 제거된 바이오매스를 물로 세척하는 세척부, 상기 세척된 바이오매스로부터 물을 제거하는 제2 탈수부, 그리고 상기 물이 제거된 바이오매스를 공급하는 당화기 연결 공급부를 포함하는 당화기 원료 공급기; 및 상기 공급된 바이오매스를 당화시키는 당화기를 포함하는 고농도 발효성당의 제조 장치, 이를 이용한 고농도 발효성당의 제조 방법, 그리고, 이를 이용하여 제조된 바이오 연료 및 바이오 화학물질이 제공.
용매 재사용 기술	[논문] Pretreatment solution recycling and high-concentration output for economical production of bioethanol	연속식 전처리 반응기 (10kg/day)를 제작하여 역새로부터 바이오에탄올 생산함, 폐수처리비용을 최소화하기 위한 전처리 용매 재사용 공정개발, 연속식 투입기가 부착된 당화 발효조 개발
통합공 정에서 에탄올 생산 기술	[논문] Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast Kluyveromyces marxianus CHY1612.	섬유질계 에탄올 발효에 있어 당화 및 발효 효율을 높이기 위한 내열성 효모 균주 개발 내열성 효모를 이용한 온도변환 동시당화발효 공정적용 및 SSF 효율향상
	[논문] High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor	연속식 전처리 반응기 (10kg/day)를 제작하여 보리짚으로부터 바이오에탄올 생산함. 표면분석법을 이용하여 최적 전처리 조건 탐색.
	[특허] 발효성 당의 제조용 장치 및 이를 이용한 발효성 당의 제조방법	바이오매스 및 용매를 포함하는 원료를 투입하여 혼합물을 얻는 공급기; 상기 혼합물을 반응시켜 반응물을 얻는 반응기; 상기 반응물로부터 고형물과, 상기 용매를 포함하는 탈리액으로 분리하는 고액 분리기; 상기 탈리액과 하기 여과기에서 여과된 순환액으로부터 리그닌 및 상기 용매를 포함하는 농축액으로 침전시키는 침전기; 상기 탈리액 및 상기 농축액에 포함된 상기 용매와 상기 순환액으로 분리하고, 하나의 여과기를 포함하는 용매 분리기; 상기 농축액에 포함된 상기 리그닌을 분리하는 리그닌 분리기; 및 상기 고형물로부터 발효성 당을 얻고, 반패들형 교반기를 포함하는 당화기와 당화 발효기를 포함하는 연속식 당화 발효기를 포함하는 발효성 당의 제조용 장치, 그리고 이를 이용한 발효성 당의 제조 방법.

2. 연구개발 성과의 활용 계획

- 본 연구 과제로부터 도출된 성과는 SCI급 게재 논문 46편, 비SCI급 게재 논문 3편, 특허 출원 21건, 특허등록 12건, 유전자원 등록 82건 외 124건 이상의 국내외 학술발표 성과가 있으며, 기술실시 성과 2건(물질이전) 이 있음. 또한 본 연구과제는 미래창조과학부 2012년도 국가연구개발 우수성과 100선에 당선되어 2013년 8월 28일 수상 및 에너지 환경 분야 사례집 116p에 게재되었으며, 참여기업 (주)창해에탄올 연구소 김윤 팀장은 한국공학한림원에서 수여하는 2020년 미래 100대 기술과 주역으로 당선되어 2013년 12월 수상함.
- 지난 5년간 연구로부터 다수의 지적재산권을 확보해 왔으며, 아직 투고되어 심사 중인 논문이 6편 있음. 앞으로 출원 및 준비 중인 특허를 국제 출원할 계획이며, 지속적인 지적재산권 확보와 국제적인 학술교류를 통해 관련 기술을 꾸준히 확보할 예정임.
- 본 연구 과제를 진행하는 동안 상당량의 국내 자생 섬유소분해균주의 분류학적, 생리학적, 효소학적 정보를 획득하여 일련의 과정에 따라 분류하였음. 이러한 유용 정보는 섬유소분해효소 생산균주를 이용하는 다양한 산업의 기초정보로 제공하여 활용할 예정임.
- 바이오에너지 산업의 한 부분인 효소 생산 분야에서 높은 비용을 차지하던 외국 균주의 수입에 대한 부담을 덜어 국내 산업의 경쟁력을 확보할 수 있음.
- 다수의 당화효소를 발굴하고 호스트에 도입함으로써 효소생산 균주를 구축하였음. 당화효소 생산 균주를 통하여 대량 생산을 진행하고 활성 증진을 통하여 효소생산 공정을 구축할 수 있음.
- *P. oxalicum* KL1 (특허등록완료) 균주로부터 당화효소 시제품을 제작하여 여러 상용플랜트 설비에서 당화 실험을 진행할 예정임. 이를 통하여 산업효소를 생산한다면, 2세대 바이오매스 당화공정에 단가를 최소화 할 수 있음.
- 바이오매스의 전처리 과정은 여러 종류의 물리 화학적 방법들이 제시되고 있으나 전처리 부산물의 detoxification이나 중화과정 및 동시당화발효의 개념에 적합하기 위해서는 생물학적 전처리과정이 대안으로 제시되고 있음. 본 연구에서는 리그닌 및 헤미셀룰로오스 분해에 활용 될 다양한 분해효소를 cloning하고 효모에서 고발현 시켜 특성화함으로써 생물학적 전처리과정의 가능성을 확인하였으며, 특히 헤미셀룰로오스 당화과정에 효소적 조건을 확보하여 친환경 당화과정의 전 공정을 구축하였으므로 바이오매스 유래의 당화과정 및 발효성 당의 생산으로 인한 바이오매스의 이용률 향상에 크게 기여할 것으로 사료됨.
- 본 과제에서 도출된 통합공정 관련 특허는 연속식 전처리 및 당화조 공급 설비(10-1261560)와 당화조 구성(10-2014-0021469) 에 관한 내용으로 기존의 연속식 전처리반응 대비 반응 온도 및 압력을 낮추고 트윈스크류를 이용한 전처리로 원천기술을 확보하였으며, 상용화급 설비 제작 시 예상되는 당화기 문제를 해결하기 위하여 1단 액화반응기와 2단 당화기로 분리하였음. 공정 운전 조건 및 설비 형태가 해외 기술과 다른 독자적인 기술 확보로 해외기술의존도 및 수입 대체효과와 원천기술 및 설비 수출에 의한 해외시장 진출이 가능함.
- 농작, 임산 폐기물 등이 포함된 2세대 바이오매스의 활용을 통하여 폐기물 처리 효과를 얻는 동시에 바이오연료 생산을 통하여 화석연료 의존도를 줄이고 원유의 수입량 감소에 일조를 할 수 있음. 본 과제로부터 도출된 고효율 고효율 당화균주 개발 핵심기술과 연

속 전처리 당화 발효 통합공정을 바탕으로 수출 시장을 모색할 수 있고, 해외 공장 설립 및 현지 생산전략화는 국내 원료 및 자원 부족의 불리한 조건을 극복할 수 있음. 값싼 리그노셀룰로오스계 바이오매스 원료로부터 저비용의 발효성 당을 생산하여 국내 발효공업 및 화학소재 산업의 경쟁력을 증대하는데 기여할 것으로 기대함.

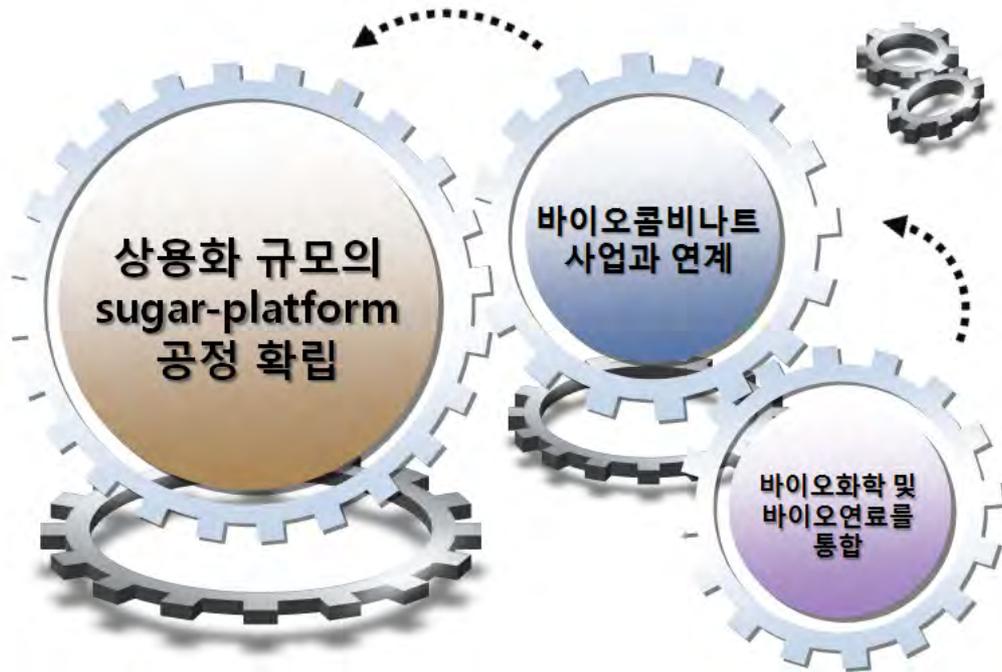


그림 5-1. 연구 성과의 과학기술적 활용 계획



그림 5-2. 연구 성과의 산업적 활용 계획

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1절 국제 동향

- 국제에너지기구(IEA)는 세계 바이오연료 소비가 2010년까지는 연평균 16%의 높은 증가세를 지속한 후 2010~15년 중에는 5%, 2030년까지 세계 바이오연료 소비는 연평균 7%의 증가 전망.
- 최근, 바이오 에탄올에 대한 새로운 기술 개발과 함께 지속가능한 새로운 원료의 개발과 확보 및 생산수율 향상을 위한 공정개선 등에도 주력하는 추세임.
- 전분질계(옥수수 등) 및 당질계(사탕수수 등) 바이오매스 유래 바이오에탄올의 경우 미국과 브라질을 중심으로 상용화됨.
- 미국의 경우 바이오에탄올 원료인 옥수수의 생산성 향상과 바이오에탄올 생산 공정의 개선을 통해 경제성을 높이는 연구 수행.
- 바이오 부탄올은 종래의 바이오 에탄올 보다 연소 효율이 높고 가솔린과의 혼합성이 뛰어나 고농도로 첨가할 수 있으며, 엔진을 보정할 필요가 없는 것이 특징임. 또한 증기압이 낮아 기존의 가솔린 공급/유통경로에 사용이 가능함.
- 바이오에탄올 세계 최대 생산국은 미국과 브라질이며, 최근 유럽, 중국등의 빠른 성장으로 바이오에탄올 시장 증가 추세임. 미국은 ‘20년까지 자국 석유 소비량의 20%를 바이오에탄올로 대체 예정. 브라질은 플렉스카(FFV: Flexible Fuel Vehicle) 도입과 정책지원을 통해 바이오에탄올 소비 증대 가속화 ‘에너지 독립’ 선언.

2절 바이오에탄올 생산 기술 및 plant 보유 회사

1. Abengoa Bioenergy

- Abengoa Bioenergy는 바이오매스를 이용하여 수송용 연료뿐만 아니라 Biochemical 개발에 관하여 세계적인 선도자이다. Abengoa Bioenergy는 미국, 유럽, 브라질에 14개의 바이오에탄올 설비를 소유하고 있으면 연간 3.2×10^6 kl를 생산하고 있다.

		
<p><u>PILOT FACILITY</u> 위치 : York, NE, USA 원료 : 밀짚, 옥수수대 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 15.14 kl/year (4000 GPY) 개요 : 2007년 9월에 완공하여 Bioethanol을 생산함.</p>	<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Salamanca, Spain 원료 : 밀짚, 보릿짚 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 4,921 kl/year (1.3 MGY) 개요 : 2009년에 완공하여 Bioethanol을 생산함.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Hugoton, KS, USA 원료 : 농업 잔여물, 특정 에너지 작물, 목초 생산품 : Bioethanol, 20 MW 전기 생산 능력 : 94,635 kl/year (25 MGY) 개요 : - 2011년에 공사를 시작. - 효소 당화 기술 적용. - 하루에 건조 Biomass 1,100 ton 이용. - 2013년 12월 완공.</p>

2. American Process

- American Process Inc.는 1994년에 산림 생산품 산업을 컨설팅하는 회사로 미국 Atlanta에 설립하였다. 2005년부터 Biomass를 전환하여 Biofuel/Biochemical의 생산에 사용되는 섬유질계 당을 생산하는 기술을 개발하고 있다. American Process는 현재 Green Power+와 AVAP 등의 섬유질계 특허권을 소유하고 있다.

가. Green Power + Technology

- GREEN POWER+는 Biomass Power Plant와 같은 장소에 배치하는 섬유질계 기술이다. Hemicellulose는 선택적으로 추출되고 단당류로 당화되고, 당들은 발효공정을 거쳐 바이오에탄올로 전환된다. Green Power+는 Hemicellulose를 고부가가치 상품 (Bioethanol, Biochemical) 으로 전환할 수 있는 공정이다.



COMMERCIAL FACILITY

위치 : Alpena, MI, USA
 원료 : 혼합 견목 (Hardwood)
 생산품 : Bioethanol, Potassium acetate
 생산 능력 : 각 2,649 kl/year (700,000 GPY)
 개요 :
 - 2011년 4월에 공사 시작
 - Decorative Panels International (DPI) hardboard manufacturing facility와 같은 장소에 배치되어 있다.
 - commissioning occurred in June 2012.
 - 현재 가동 상태에 있다.

나. AVAP

□ AVAP는 SO₂와 Ethanol을 이용하여 어떠한 바이오매스도 Cellulose, Hemicellulose, Lignin으로 분리하는 개발된 적이 없는 기술이다. Cellulose와 Hemicellulose는 당으로 전환되고 이러한 당들은 고순도이며 후속 공정을 통해 Biochemical과 Biofuel을 생산되고 Lignin은 보일러에서 태워진다.



AVAP DEMONSTRATION FACILITY

위치 : Thomaston, GA, USA
 원료 : 다양한 바이오매스 (10 ton/day 이상)
 생산품 : Cellulosic sugars, Ethanol, Cellulose
 생산 능력 : Ethanol 1,135 kl/year 이상 (300,000 GPY)
 개요 :
 - 2013년 1분기에 가동 예정.
 - 당을 Biofuel/Biochemical/Biomaterial로 전환할 수 있는 공정을 지님.
 - AVAPCO는 American Process Inc.와 제휴.
 - AVAPCO는 2011년에 American Process가 개발한 AVAP 기술을 상업화하기 위해 설립.

3. Beta Renewables

□ Beta Renewables은 Gruppo Mossi & Ghisolfi와 TPG의 Chemtex 부서로부터 형성된 350만 달러 공동 벤처 기업이다. M&G 그룹은 세계적으로 공정 개발과 Plant 상업화에서 성공한 회사이다. PROESA™ cellulosic biorefining 기술을 개발하기 위해 200만 달러 이상을 투자하였다.

		
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Rivalta, Italy 원료 : 다양한 비식량 섬유질계 Biomass 생산품 : Bioethanol, Biochemical 생산 능력 : 1 ton/day 개요 : 2009년부터 가동 중.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Crescentino, Italy 원료 : 밀짚, 벧짚, 바가스, 옥수수대, 포플러, Arundo Donax 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 75,708 kl/year (20 MGY) 개요 : - 2012년에 4분기에 가동 예정. - 세계에서 첫 번째 상업화한 Bioethanol Plant. - PROESA 기술 이용.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Sampson County, NC, USA 원료 : 에너지 작물 생산품 : Bioethanol, Biochemical 생산 능력 : 75,708 kl/year (20 MGY) 개요 : - Chemtex PROESA 기술을 이용한 Project Alpha. - Bioamss Crop Assistance Program (BCAP)에서 390만 달러를 받음. - 지역 바이오매스 생산자를 위해 매년 450만 달러 이상의 추가적인 수익이 예상됨.</p>

4. BluFire Renewables

□ BlueFire는 섬유질계 바이오매스를 재생 가능한 연료 등으로 전환할 수 있는 Arkenol 기술을 효율적으로 이용하기 위해 설립되었다. BlueFire는 농업·산림 잔류물, 도시 고형 폐기물, 에너지 작물 같은 유기물을 Biofuel 및 Biochemical 등으로 전환시킬 수 있는 기술의 북미 전용실시권을 가지고 있다. 또한 BlueFire는 Cellulose를 Biochemical이나 다른 생산품을 생산할 수 있는 당으로 전환할 수 있는 SucreSource를 가동하고 있다.



DEMONSTRATION FACILITY

위치 : Anaheim, CA, USA

원료 : 나무, 제지산업 폐기물, MSW, 바가스

생산품 : 섬유질계 당

생산 능력 : 90 kg/day (200 lbs/day)

개요 :

- 당을 바이오제품으로 전환하는 공정을 개발하는 회사에 판매하기 위한 섬유질계 당 생산에 대한 파일럿 테스트 완료.

COMMERCIAL FACILITY

위치 : Fulton, MS, USA

현재 상황 : 공장부지 준비 완료. 공장 건설에 대해 미국 에너지성에서 \$ 87.5MM 보조금 수령.

원료 : 산림 잔여물 및 다른 섬유질계 폐기물

생산품 : Cellulosic Ethanol, 석고, Lignin and Protein Cream

생산 능력 : 71,922 kl/year (19 MGY)

개요 :

- 건설에 필요한 허가는 받음.
- 모든 원료와 생산품에 대한 장기 계약 완료.
- Turn-key EPC 계약 완료.

5. Clariant

□ 스위스 Basel에 본사를 두고 있는 Clariant는 80억 달러의 연간 매출액과 세계적으로 22,000명의 근로자가 일하는 특수 화학 물질 회사이다. Clariant는 100개가 넘는 그룹회사와 미국을 포함한 44개국에 생산 공장을 가지고 있다. Clariant Biotech and Renewables Center는 독일 Munich와 Straubing에 기반을 두고 있으며, 오직 신재생 에너지 기술 개발과 상업화에 중점을 두고 있다.

		
<p>RESEARCH FACILITY 위치 : Munich, Germany 원료 : 다양한 섬유질계 바이오매스 생산품 : Bioethanol, Cellulosic Sugars, Biochemicals 생산 능력 : 2 ton/year 개요 : 여러 종류의 섬유질계 원료에 관해 Sunliquid[®] 기술을 테스트 및 개발을 하기 위해 활용된 설비.</p>	<p>DEMONSTRATION FACILITY 위치 : Straubing, Germany 원료 : 1단계 - 농업 잔류물, 2단계 - 에너지 작물 생산품 : Bioethanol, Cellulosic Sugars, Biochemicals 생산 능력 : 1,249 kl/year (330,000 GPY) 개요 : - 2012년 7월 12일에 Bioethanol 생산. - Sunliquid[®] 데모 플랜트는 다수의 섬유질계 바이오매스로부터 Bioethanol을 생산. - 원료별 특정 효소 공정의 기술적 및 경제적 이점에 대한 실험. (현지 공정에서 통합적인 효소 생산, 원 포트 반응으로 C5와 C6의 동시발효, 에너지 절약적인 에탄올 분리 및 정제 공정)</p>	<p>CLARIANT COMMERCIAL STRATEGY 현재 상황 : 미국, 유럽, 브라질, 캐나다 등에 첫 번째 상업화 Sunliquid 생산 공장 위치 선정 중. 원료 : 농업 잔류물 생산품 : Bioethanol, Cellulosic Sugars, Biochemicals 생산 능력 : 원료에 따라 68,137-227,124 kl/year (18-60 MGY)</p>

6. Enerkem

□ 캐나다 Montreal에 본사를 두고 있는 Enerkem은 미국과 캐나다에 140여명의 직원을 두고 있다. Enerkem은 열화학적 전환 기술을 이용하여 MSW로부터 연간 37,854 kl의 Biofuel 및 Biochemical을 생산할 수 있는 설비를 지을 예정이다. 데모 플랜트는 2000년에 기초를 세우고 2003년에 이들의 기술을 실험하기 시작하였다.

		
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Westbury, QC, Canada 원료 : 낡은 전신주, MSW 생산품 : 합성가스, Biomethanol (2011), Bioethanol (2012) 생산 능력 : 4,921 kl/year (1.3 MGY) 개요 : - 세계에서 낡은 전신주 (다양한 물질이 섞여져 있음)를 이용하여 Bioethanol과 Biomethanol을 생산한 첫 번째 설비. - 전신주를 나무로 재활용 할 수 있는 제재소를 가지고 있어 재활용되지 않는 전신주 부분을 이용할 수 있음. - 2009년에 합성가스를 생산하기 시작하였고, 2011년에는 Biomethanol, 2012년에는 Bioethanol을 생산.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Edmonton, AB, Canada 현재 상황 : 2013년 3분기에 1단계 완공 원료 : MSW 생산품 : 합성가스, Biomethanol, Acetates, Bioethanol 생산 능력 : 37,854 kl/year (10 MGY) 개요 : - 재활용할 수 없는 도시 고체 폐기물을 이용하여 다음 세대 Biofuel을 생산할 수 있는 공장을 짓고 가동하기 위해 Edmonton시와 25년 간 계약을 함. - 도시 고체 폐기물을 Biofuel로 전환시키기 위해 대도시와 생산자 간의 세계적으로 첫 번째로 이루어진 주요한 제휴임. - 미국의 RFS에 맞는 Biofuel을 생산할 예정이고 Edmonton은 생활 폐기물 전환율 90%로 증가시킬 수 있음.</p>	<p><u>USA COMMERCIAL STRATEGY</u> 연간 37,854 kl를 생산할 수 있는 설비를 설치하기 위해 미국 12개의 가능한 지역을 확인 함. 1st PROJECT : Pontotoc, MS, USA 원료 : MSW, 나무 잔여물 생산품 : 합성가스, Biomethanol, Acetates, Bioethanol 현재 상황 : 개발 중</p>

7. Fiberight

- Fiberight은 Virginia, Maryland, Iowa에서 현재 가동 중에 있으며, 2007년에 설립한 비공개 회사이다. 정제된 MSW와 폐섬유 펄프로 후속 공정을 거쳐 섬유질계 Biofuel을 만들 수 있는 당을 전환하는 특허 받은 기술을 적용시켰다. Fiberight은 210년에 Iowa에 세운 공장에서 Bioethanol의 상업화 규모로 생산할 수 있는지를 실증하였다. 쓰레기 처리 비용이 많이 들거나 매립지가 제한된 인구가 밀집한 도시에서 프로토타입 상업화 규모 공장의 빠른 확장을 목표로 하고 있다.



REFERENCE COMMERCIAL FACILITY

위치 : Lawrenceville, VA, USA
 원료 : MSW, 상업 폐기물, 에너지 작물
 생산품 : Bioethanol/biofuels, Cellulosic Sugars, Biochemical
 생산 능력 : 3,785 kl/year (1 MGY)
 개요 :
 - 2007년까지 핵심 사업 및 기술을 실험함.
 - 2011년에 MSW-to-Biofuel 상업화 공장 설립에 대한 정보를 얻기 위한 규모로 확장.
 - 2012년에 20명 이상의 종업원과 가동 시작.

COMMERCIAL FACILITY

위치 : Blairstown, IA, USA
 현재 상황 : 기존 시설을 2013년까지 수정
 원료 : MSW, 비식용 폐기물
 생산품 : Bioethanol, Biochemical
 생산 능력 : 22,712 kl/year (6 MGY)
 개요 :
 - 하루에 1,000 ton 이상의 MSW를 공급받을 수 있는 48 km 이내에 있는 고전 방식의 옥수수 에탄올 공장을 이용.

8. Fulcrum BioEnergy

□ Fulcrum BioEnergy는 California주의 Pleasanton에 본사를 두고 있으며 2007년에 설립되었다. North Carolina의 Durham에서 합성 가스를 Ethanol로 전환할 수 있는 데모급 설비를 가동 중이다. Fulcrum은 Sierra BioFuels Plant라는 상업화 규모 Biofuel 설비에 관한 공사가 이미 시작하였다. 이 설비는 MSW를 Ethanol로 전환하는 설비이며 Nevada주의 Reno 근처에 위치해 있다.



PROCESS DEMONSTRATION FACILITY

위치 : Durham, NC, USA
 원료 : 합성가스
 생산품 : Ethanol
 생산 능력 : 상업화 규모의 공장에서 사용되는 운전 조건하에서 촉매로 꽉 들어찬 실제 크기의 관형 반응기를 가동하고 있음.
 개요 :
 - PDU는 합성가스를 에탄올로 전환.
 - 2번째 과정에서 Fulcrum의 waste-to-ethanol 공정임.
 - PDU는 3년 6개월 동안에 20,000 시간 이상 가동.

COMMERCIAL FACILITY

위치 : McCarran, Storey County, NV, USA
 현재 상황 : 첫 공사 현장 작업 완료.USDA 대출 보증이 끝나게 되면 공사 시작 예정.
 원료 : MSW
 생산품 : 고급 에탄올
 생산 능력 : 37,854 kl/year (10 MGY)
 개요 :
 - Nevada주의 Reno의 동쪽으로 약 32 km 떨어진 Tahoe-Rno Industrial Center에 위치해에 있는 Sierra는 미국에서 세워지는 이러한 종류의 첫 번째 프로젝트 중에 하나이다.
 - 저 탄소, 재생 가능한 수송용 연료를 연간 약 37,854 kl 생산할 수 있도록 설계되어 있고, 존재하는 상업화 시스템과 새롭고 혁신적인 기술이 융합된 프로젝트 임.

9. Inbicon

□ Inbicon은 1990년대 후반에 선구적인 바이오매스 전환 기술을 시작하였다. 스팀, 효소, 효모를 사용하여, Inbicon은 목질계 섬유소 (Lignocellulose, e.g. 밀짚, 옥수수대, 에너지 작물)를 Bioethanol뿐만 아니라 Biochemical에 이용되는 재생 가능한 리그닌, 산업용 당밀 등으로 전환하였다. Inbicon은 덴마크에서 근로자가 6,000명, 수익이 98억 달러 (2011)인 가장 큰 에너지 회사인 Dong Energy의 계열사이다. DONG Energy는 세계적으로 승인된 Inbicon 기술을 개발하고 상업화하기 위해 10,000만 달러 이상 투자를 하였다.

		
<p>DEMONSTRATION FACILITY</p>	<p>COMMERCIAL FACILITY</p>	<p>USA COMMERCIAL</p>
<p>위치 : Kalundborg, Denmark 원료 : 밀짚 생산품 : Bioethanol, 전기 생산 능력 : 5,678 kl/year (1.5 MGY) Bioethanol, 11,400 ton 리그닌 연료용 펠릿, 13,900 ton 당밀 개요 : - 전체적으로 가동 중. - 초과된 증기를 이용하는 인접 발전소와 통합. - 98개의 주유소에서 E5로 블렌딩하여 판매. - Danish 발전소에서 석탄 대체물로 리그닌 펠릿 이용. - 당밀은 바이오가스 생산에 이용.</p>	<p>위치 : Maabjerg, Denmark 현재 상황 : 설계·제작 및 인허가 중 원료 : 밀짚 (50 ton/h) 생산품 : Bioethanol, Biogas, 전기, 비료, 고체 연료 생산 능력 : 75,708 kl/year (20 MGY) Bioethanol, 1.7 BCF Biogas, 25,000 가구가 사용할 수 있는 전기, 565,000 ton/year 비료, 56,000 ton/year 고체 Biofuel 개요 : - Jutland 북서쪽의 30만평 위에 6개의 Danish 기술들을 통합. - 연간 밀짚 400,000 ton, 가축 폐기물 770,000 ton 이용.</p>	<p>STRATEGY 위치 : Spiritwood, ND, USA 현재 상황 : 설계·제작 및 인허가 중 원료 : 밀짚 (25 ton/h) 생산품 : Bioethanol, Biogas, 전기, 산업용 당밀 생산 능력 : 37,854 kl/year (10+ MGY) Bioethanol, 83,000 ton/year Pellet, 94,000 ton/year 산업용 당밀 개요 : - Project of Great River Energy - North Dakota주의 Spritwood Staion CHP 공장 인근에 위치. - 1단계 : Dry mill을 이용한 에탄올 공장 - 2단계 : 밀짚을 이용한 섬유질계 에탄올 생산 (Inbicon Biomass Refinery 기술 이용) - North Dakota Utilization Commission (APUC)와 Dakota Industrial commission-Renewable Energy Council과 협력.</p>

10. INEOS Bio

□ NEOS Bio는 다양한 Biomass로부터 고급 Biofuel과 전력을 생산하는 Bioenergy 회사이다. 전 세계 지역사회를 위해 쓰레기 처리 방법을 대신할 수 있는 기술을 제공하고 있다. INEOS Bio는 INEOS에서 글로벌 비즈니스 중 하나이다.



RESEARCH AND DEVELOPMENT

FACILITY

위치 : Fayetteville, AR, USA
 원료 & 생산품 : 합성 가스, Ethanol 등.
 생산 능력 : 1.5 ton/day
 개요 :
 - INEOS Bio의 특허 기술을 실험, 증명, 최적화를 위해 통합된 파일럿 플랜트.
 - 상업화하기 위한 중요한 과정에 있음.
 - 상업화 및 승인 설비와 병행하며 파일럿 플랜트를 계속 가동.

COMMERCIAL FACILITY

위치 : Vero Beach, FL, USA
 현재 상황 : Commissioning Stage
 원료 : 식물 및 정원 폐기물, MSW
 생산품 : Bioethanol, 전력
 생산 능력 : 30,283 kl/year (8 MGY)
 Bioethanol, 6MW 전력
 개요 :
 - Indian River County 쓰레기 매립지와 인접.
 - 장기적으로 여유로운 원료 공급이 가능.

11. IOGEN

□ Iogen은 1970년대 후반부터, 425만 달러 이상을 섬유질계 에탄올 기술 개발에 투자를 하였다. 이 중 75만 달러 이상은 Ottawa에 데모급 플랜트에 투자되었다. 투자자들에는 Royal/Dutch Shell, Golman Sachs, Petro Canada, Volkswagen 등이 포함되어있다. Ottawa에 기반을 두고 지금까지 2,081 kl 이상의 Bioethanol을 생산하였고 250개 이상의 특허를 가지고 있다. 또한, 섬유소 분해 효소를 만드는 사업도 하고 있다.

Year	Ethanol		Cumulative Production		Year	Ethanol		Cumulative Production	
	Liters	Gallons	Liters	Gallons		Liters	Gallons	Liters	Gallons
2005	129,547	34,223	219,418	57,964	2009	581,042	153,495	1,026,394	271,145
2006	16,811	4,441	236,229	62,405	2010	508,781	134,406	1,535,175	405,550
2007	2,598	686	238,827	63,091	2011	371,606	98,168	1,906,781	503,718
2008	206,525	54,558	445,352	117,650	2012*	219,090	57,877	2,125,871	561,595

*2012년 7월 31일까지 계산

	
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Ottawa, ON, Canada 원료 : 곡물 짚, 바가스, 옥수수대, 목초 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 3,785 kl/year (1 MGY) 개요 : - 모든 주요 단위 공정들이 통합된 설비. - 2005년 에탄올을 생산하기 시작. - R&D로부터 기술 개발과 통합된 24×7 공정의 습득으로 인한 정기적 개선 및 개발.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Piracicaba, Sau Paulo, Brazil 현재 상황 : 개발 및 설계 작업 원료 : 바가스 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 계획 중 개요 : - 세계에서 가장 큰 사탕수수 에탄올 생산자인 Raizen Group은 브라질에 상업화 Bioethanol 프로젝트를 개발하기 위해서 Iogen Energy에 초기에 투자를 함. - Sau Paulo의 Piracicaba에 있는 Raizen의 Costa Pinto 설비와 같은 장소에 위치하게 될 바가스를 이용한 에탄올 생산 설비의 선후 디자인과 관련된 개발 및 설계비용임.</p>

12. KiOR

□ KiOR은 바이오매스 자원을 Biofuel로 전환할 수 있는 특별한 두 단계의 특허 기술을 개발하는 차세대 재생 가능한 연료 회사이다. KiOR의 섬유질계 Biofuel은 현존하는 유통망을 사용하여 수송될 수 있으며 오늘날 도로위에 있는 자동차에 사용하기에 적합하다. KiOR은 수입되는 석유에 대한 의존도를 완화하기 위해 노력하고 있으며, 온실가스 배출을 줄이고 농촌 전체에 걸쳐 고급 일거리와 경제적 이익을 창조하고 있다.

		
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Pasadena, TX, USA 원료 : 산림 폐기물 생산품 : Bioethanol, R&D와 사업 개발의 목적을 위한 Biodiesel 생산 능력 : 2.4 kl/day (15 barrel/day) 개요 : - 하루에 2.4 kl이상의 Biocrude oil을 생산. - 약 100명의 직원 (Ph.D. 30명)이 근무하는 연구소와 같은 장소에 위치함.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Columbus, MS, USA 현재 상황 : 가동 준비가 갖춰짐. 원료 : 산림 폐기물 생산품 : Bioethanol, Biodiesel 생산 능력 : 49,210 kl/year (13 MGY) 개요 : - 213만 달러가 투자됨. - 전체 생산 라인을 가동하였을 경우에 25,000대의 자동차에 사용될 수 있는 연료를 충분히 생산할 수 있음.</p>	<p><u>2ND COMMERCIAL PROJECT UNDER DEVELOPMENT</u> 위치 : Natchez, MS, USA 원료 : 산림 폐기물 생산품 : Bioethanol, Biodiesel 생산 능력 : 151,416 kl/year (40 MGY) 개요 : - 350만 달러가 투자됨. - 생산 및 배송을 위해 물류 허브로서 역할을 주력으로한 상업화 프로젝트. - 2013년 초에 공사를 시작.</p>

13. LanzaTech

- 2005년에 설립된 Lanza Tech는 완전히 통합된 지속가능한 Biofuel과 Biochemical 플랫폼을 제공하고 있으며 이는 사용 가능한 폐자원을 이용하여 Bioethanol 같은 Biofuel이나 2,3-Butanediol 같은 Biochemical을 생산할 수 있다. 2008년 이후에는 뉴질랜드에 폐가스를 이용하여 연간 56.78 kl를 생산할 수 있는 공장을 가동 중이며, 중국 상하이에서는 연간 378.54 kl를 생산할 수 있는 데모급 공장을 가동 중 이다. LanzaTech는 미국 Chicago에 본사를 두고 있으며 뉴질랜드, 중국, 인도에 지사를 가지고 있다.

		
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치: Shanghai, China 원료 : Baosteel Steel에서 나오는 일산화탄소 (CO) 생산품 : Ethanol 생산 능력 : 378.54 kl/year (100,000 GPY) 개요 : - 연간 113,562 kl (30 MGY)을 생산할 수 있는 상업화 설비의 전단계 임.</p>	<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Caofeidian, China 원료 : Capital Steel에서 나오는 일산화탄소 (CO) 생산품 : Ethanol 생산 능력 : 378.54 kl/year (100,000 GPY) 개요 : - 전체적으로 통합된 데모급 설비. - Capital Steel은 상업화 규모의 LanzaTech의 설비를 구입할 예정.</p>	<p><u>COMMERCIAL FACILITY</u> 위치 : Soperton, GA, USA 현재 상황 : 개발 중 원료 : 지역 산림 작업에서 나오는 폐바이오매스 생산품: Bioethanol, Biochemical, 항공 연료 생산 능력 : 15,141 kl/year (4 MGY) 개요 : - 2014년에 생산을 시작할 예정.</p>

14. Mascoma

□ 2005년에 설립된 Mascoma는 풍부한 바이오매스를 Bioethanol이나 Biochemical로 낮은 단가로 전환하기 위한 혁신적이고 실용 가능한 기술을 개발하는 신재생에너지회사이다. Consolidated BioProcessing (CBP) 기술 특허 플랫폼을 사용하여, 생산 단가를 줄이고 Biofuel이나 Biochemical의 생산성을 증가시키기 위해 Mascoma는 효모와 다른 미생물들을 개발하였다. 새로운 기술을 평가하고 대규모의 공정 실증을 수행하기 위해 New York주의 Rome에 데모급 설비를 가동하고 있다. 또한 New Hampshire주의 Lebanon에서 R&D 연구소를 운영 중이고, Massachusetts주의 Waltham과 캐나다 Toronto에서 사무실을 가지고 있다.

	
<p><u>DEMONSTRATION FACILITY</u> 위치 : Rome, NY, USA 원료 : 다양한 바이오매스 생산품 : Bioethanol, Biochemical 생산 능력 : 757 kl/year (200,000 GPY) 개요 : - 2007년도 12월에 기공식을 가짐. - 2008년 6월에 첫 발효를 시작함. - 현재 15명의 직원이 가동 중. - Hardwood CBP 미생물을 이용하여 1,000 시간 유효성 검사 완료.</p>	<p><u>COMMERCIAL PROJECT</u> 위치 : Kinross, MI, USA 현재 상황 : 마지막 설계 작업 및 자금 확보 원료 : 목재 펄프, 우드칩 생산품 : Bioethanol 생산 능력 : 75,708 kl/year (20 MGY) 개요 : - CBP 기술 특허를 이용하여 1년에 Bioethanol 75,708 kl을 생산할 수 있는 첫 번째 설비임. - 공장 241 km 반경이내에 있는 Michigan 주로부터 공급받을 수 있는 목재 펄프 원료에 대한 계약을 함.</p>

15. POET-DSM

□ POET-DSM Advanced Biofuels은 Royal DSM과 POET, LLC 사이에 50대 50 합작 회사이다. South Dakota주의 Sioux Fall에 위치한 합작 회사는 옥수수 잔류물을 Bioethanol로 전환하는 기술 특허를 이용한다. Project LIBERTY라고 불리는 POET-DSM의 첫 번째 상업화 규모 공장은 연간 75,708 kl의 Bioethanol을 생산할 것이다. 이 공장을 기반으로 POET-DSM은 옥수수 잔류물을 Bioethanol로 전환시키는 통합된 기술 패키지를 세계적으로 허가를 받을 계획이다.



DEMONSTRATION FACILITY

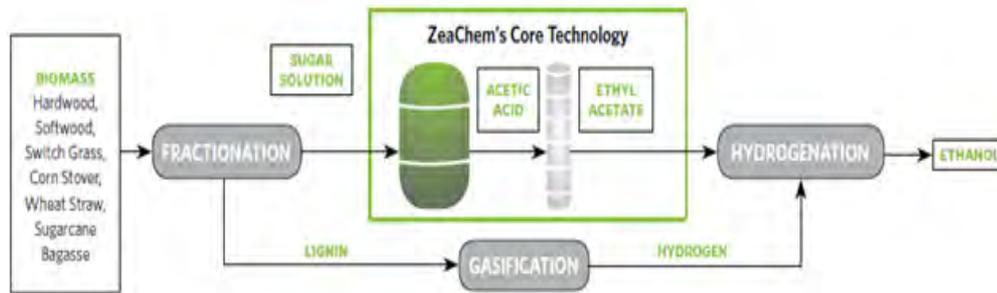
위치 : Scotland, SD, USA
 원료 : 옥수수 잔류물
 생산품 : Bioethanol, Biogas
 생산 능력 : 757 kl/year (200,000 GPY)
 개요 :
 - 상업화 규모의 생산을 위해 공정을 개발하기에 중요한 POET의 파일럿/데모 Bioethanol 설비.
 - Project LIBERTY를 위해 Iowa 농장에서 원료를 공급을 돕기로 함.

COMMERCIAL FACILITY

위치 : Emmetsburg, IA, USA
 현재 상황 : 공사 중
 원료 : 옥수수 잔류물
 생산품 : Bioethanol, Biogas
 생산 능력 : 75,708 kl/year (20 MGY), 추 후 94,635 kl/year로 확장할 예정.
 개요 :
 - POET 1세대 Ethanol 공장 인근에 위치.
 - 26,931평 바이오매스 저장 창고 완공.
 - 2013년 4분기에 Bioethanol 공장 완공 예정.
 - 연간 285,000 ton의 바이오매스 수확을 목표로 농장과 계약을 계속 추진 중.

16. ZeaChem

□ 2002년에 설립된 ZeaChem Inc.는 Colorado주의 Lakewood에 본사가 위치해 있다. Menlo Park에 R&D 연구소를 운영 중이고, Oregon주 Boardman에서 연간 946 kl의 Bioethanol을 생산하고 있다. ZeaChem은 고급 Biofuel 및 Biochemical의 섬유질계 Biorefinery 플랫폼을 개발하고 있다.



DEMONSTRATION FACILITY

위치 : Boardman, OR, USA

원료 : 포플라 나무, 밀짚

생산품 : Bioethanol, Biochemical

생산 능력 : 946 kl/year (250,000 GPY)

개요 :

- 1 단계 : 페인트 및 광택제에 사용되는 고부가가치 Biochemical
- 2 단계 : Bioethanol 및 Biochemical (2012)
- 3 단계 : 섬유질계 제트 연료유 및 디젤 (2013)



COMMERCIAL FACILITY

위치 : Boardman, OR, USA

현재 상황 : USDA 조건부 대출 보증을 받음.

원료 : 포플라 나무, 밀짚

생산품 : Bioethanol, Biochemical

생산 능력 : 94,635 kl/year 이상 (25+ MGY)

개요 :

- ZeaChem 데모 플랜트와 인접한 장소에 위치.
- Greenwood Resources와 지역 농장으로부터 필요한 원료 100%를 공급받기로 계약.

제 7장 연구시설·장비 현황

연구시설·장비명	금액 (천원)	구매일자	연구시설·장비 활용용도	설치장소	NTIS 등록번호
고농도 연속식 당화기	39,500	2010-11-07	섬유질 바이오매스용 연속식 당화 / 발효 장치	(주)창해에탄올	NFEC-2011-01-133175
연속식 CHEMEX 전처리 장치	70,000	2011-11-18	섬유질계 바이오매스 전역식 전처리 장치	(주)창해에탄올	NFEC-2012-04-161505
50L CHEMEX 탈수설비	59,500	2011-03-10	섬유질계바이오매스 전처리후 탈수장치	(주)창해에탄올	NFEC-2013-03-176923
전처리바이오매스 탈수 장치	40,000	2012-12-28	전처리 바이오매스 고액 분리 및 세척 후 탈수 장치	(주)창해에탄올	NFEC-2014-02-185767

제 8장 참고문헌

1. BIOMASS RESEARCH & DEVELOPMENT (<http://www.biomassboard.gov/board/board.html>)
2. BIOTECHNOLOGY INDUSTRY ORGANIZATION 1225 EYE STREET, NW, SUITE 400 WASHINGTON, DC 20005 (202) 962-9200
3. Brosse N, Sannigrahi P, Ragauska A (2009) Pretreatment of *Miscanthus x giganteus* using the Ethanol Organosolv Process for ethanol production. *Ind Eng Chem Res* 48: 8328-8334
4. Brownell HH, Yu EKC, Saddler JN (1986) Steam explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content, and pressure drop. *Biotechnol Bioeng* 792-801
5. Dale BE, Henk LL, Shiang M (1985) Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia fiber explosion. *Dev Ind Microb* 223-233
6. Green Car Congress, Energy, technologies, issues and policies for sustainable mobility.
7. Han M, Kang KE, Kim Y, Choi GW (2013) High efficiency bioethanol production from barley straw using a continuous pretreatment reactor. *Process Biochem* 48(3):488-495
8. Han M, Kim Y, Kim SW, Choi GW (2011) High efficiency bioethanol production from OPEFB using pilot pretreatment reactor. *J Chem Technol Biotechnol* 86(12):1527-1534
9. Han M, Kim Y, Koo B, Choi GW (2011) Bioethanol production by *Miscanthus* as a lignocellulosic biomass: Focus on high efficiency conversion to glucose and ethanol. *Bioresources* 6(2):1939-1953
10. Hsu TA (2010) Pretreatment of biomass, In Wyman CE (ed) *Handbook on Bioethanol Production and Utilization (Applied Energy Technology Series)*. Taylor & Francis Publishers, Washington DC, pp 179-212
11. Kang KE, Han M, Moon SE, Kang HW, Cha YL, Choi GW (2013) Optimization of alkali-extrusion pretreatment with twin-screw for bioethanol production from Fuel 109:520-526.
12. Kim TH, Lee YY (2005), Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Appl Biochem Biotechnol* 124:1119-1131
13. Lamsal B, Brijwani K, Alavi S (2010) Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. *Biomass and Bioenerg* 34(12):1703-1710
14. Lee SH, Inoue S, Teramoto Y, Tanaka N, Endo T (2010) Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process II - Effect of hot-compressed water treatment. *Biores Technol* 101 (24):9645-9649
15. Lee SH, Teramoto Y, Tanaka N, Endo T (2009) Enzymatic saccharification of woody biomass micro/nanofibrillated by continuous extrusion process I - Effect of additives with cellulose affinity. *Biores Technol* 100 (1):275-279
16. Li H, Li C, Sang T, Xu J (2013) Pretreatment on *Miscanthus lutarioriparius* by liquid hot water for efficient ethanol production. *Biotechnol Biofuels* 6:76
17. Madson PW (2009) Ethanol distillation: The fundamentals, in *The alcohol Textbook*, ed Ingledew WM, Kelsall DR, Austin GD and Kluspies C. Nottingham University Publishers, Nottingham, pp 292-297

18. National Renewable Energy Laboratory, Standard Biomass Analytical Procedures.
http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html
19. Samson R, Mani S, Boddey R, Sokhansanj S, Quesada D, Urquiaga S, Reis V, Lem CH (2005) The potential of C4 perennial grasses for developing a global bioheat industry. *Crit Rev Plant Sci* 24:461-495
20. Scordia D, Salvatore L, Thomas WJ (2013) Effectiveness of dilute oxalic acid pretreatment of *Miscanthus × giganteus* biomass for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 59:540-548
21. Tan L, Tang YQ, Nishimura H, Takei S, Morimura S, Kida K (2013) Efficient production of bioethanol from corn stover by pretreatment with a combination of sulfuric acid and sodium hydroxide. *Prep Biochem Biotechnol* 43(7):682-695
22. Bansal N., Tewari R., Soni R., Soni S. K. 2012. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management*. 32:1341-1346
23. Cheng Y, Song X, Qin Y, and Qu Y (2009) Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10. *J. Appl. Microbiol.* 107:1837-1846
24. Chung YC, Bakalinsky A, Penner MH (2005) Enzymatic saccharification and fermentation of xylose-optimized dilute acid-treated lignocellulosics. *Appl Biochem Biotechnol.* 121-124:947-961
25. Dhillon GS, Oberoi HS, Kaur S (2011) Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Ind Crops Prod.* 34:1160-1167
26. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59:257-268
27. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press
28. Jose L, Rodriguez J, Reyes F, Perez-Leblic MI (1990) Effect of beta-glucanases on *Penicillium oxalicum* cell wall fractions. *FEMS Microbiol Lett.* 58(3):233-239
29. Kim B, Tai AM, Kim SB, Somasundaram P, Goodfellow M (2000) *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endo-xylanase-producing streptomycete. *Int J. Syst Evol Microbiol.* 50(2):505-509
30. Kurtzman CP, Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large-subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:331 - 371
31. Kim SB, Kim SW (2011) Dilute acid pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16:725-732
32. Liming X and Xueliang S (2004) High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corncob residue. *Bioresour. Technol.* 91:259-262
33. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry.* 31:426-428
34. Kim SB, Kim SW (2013) Reutilization of carbon sources through sugar recovery from waste rice straw. *Renewable Energy* 53:43-48

35. Song YS, Kim SW (2013) Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase.. Carbohydrate Research 369:1-5
36. O'Donnell, K (1993) Fusarium and its near relatives. In The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics, pp:225-233. Edited by D. R. Reynolds & J. W. Taylor. Wallingford, UK: CAB International
37. SAUE-3.510 in submerged fermentation. Biomass Bioenergy. 33(4):581-588
38. Ramesh CK, Richa S, Hena D, Som D, Arvind G (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. Curr. Microbiol. 57:503-507
39. Liu D, Zhang R, Yang X, Wu H, Xu D, Tang Z, Shen Q (2011) Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. Int. Biodeterior. Biodegradation. 65:717-725
40. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SK, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491
41. Sohail M, Siddiqi R, Ahmad A and Khan SA (2009) Cellulase production from *Aspergillus niger* MS82 effect of temperature and pH. New Biotechnol. 25:437-441
42. Theodorou MK, Bazin MJ, Trinci APJ (1980) Cellulose degradation in a structured ecosystem which is analogous to soli. Transaction of the British Mycological Society. 75:432-454
43. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic acids Res. 22:4673-4680
44. Yin L, Cui F, Liu Z, Xu Y, Zhao H (2007) Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology. Enzyme Microb. Technol. 45(5):1381-1388
45. Zhou X, Wei Y, Zhu H, Wang Z, Lin J, Liu L, and Tang K (2008) Protoplast formation, regeneration and transformation from the taxol-producing fungus *Ozonium* sp. Afr. J. Biotechnol. 7(12):2017-2024
46. Bailey MJ, Biely P, Poutanen K (1992) Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. J. Biotechnol. 23:257-270
47. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59:257-268
48. Juhász T, Szengyel Z, Réczey K, Siika-Aho M, Viikari L (2005) Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochem. 40:3519-3525
49. Lee YM, Lee H, Kim GH, Kim JJ (2011) Miniaturized enzyme production and development of micro-assays for cellulolytic and xylanolytic enzymes. J. Microbiol. Methods 86:124-127
50. Weber C, Farwick A, Benisch F, Brat D, Dietz H, Subtil T, Boles E (2010) Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels, Appl Microbiol Biotechnol, 87:1303-1315

51. Raman B, Pan C, Hurst GB, Rodriguez M, McKeown CK, Lankford PK, Samatova NF, Mielenz JR (2009) Impact of pretreated Switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis, PLoS One, 4 e5271
52. Fontes CM, Gilbert HJ (2010) Cellulosomes: highly efficient nanomachines designed to deconstruct plant cell wall complex carbohydrates, Annu Rev Biochem, 79:655-681
53. Cho W, Jeon SD, Shim HJ, Doi RH, Han SO (2010) Cellulosomic profiling produced by *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources explored by the cohesin marker, J Biotechnol, 145:233-239
54. Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, J Ind Microbiol Biotechnol, 35:377-391
55. Kim SB, Kim SW (2011) Pretreatment of rice straw by proton beam irradiation for efficient enzyme digestibility. Applied Biochemistry and Biotechnology 164:1183-1191
56. Kim SB, Kim SW (2012) Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment.. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 18:183-187
57. Song YS, Kim SW (2013) Batch and continuous synthesis of lactulose from whey lactose by immobilized β -galactosidase. Food Chemistry 136:689-694
58. Kim SB, Kim SW (2013) Rapid analysis of barley straw before and after dilute sulfuric acid pretreatment by photoluminescence. Bioresource Technology 146:789-793
59. Lee HW, Park C (2011) Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. Biotechnology and Bioprocess Engineering 16:755-760
60. Kim SB, Kim SW (2013) Pretreatment of rice straw with combined process using dilute sulfuric acid and aqueous ammonia. Biotechnology for Biofuels 6:109
61. Jung YR, Kim SW (2012) Enhancement of immobilized enzyme activity by pretreatment of beta glucosidase with cellobiose and glucose. Journal of Industrial and Engineering Chemistry 18:702-70
62. Jung YR, Kim SW (2012) Production of cellulases and β -glucosidase in *Trichoderma reesei* mutated by proton beam irradiation. Korean Journal of Chemical Engineering 29:925-930
63. Kim EJ, Kim SW (2012) Efficient immobilization technique for enhancement of cellobiose dehydrogenase activity on silica gel. Biotechnology and Bioprocess Engineering 17:55-59
64. Mandels M, Medeiros JE, Andreotti RE, Bissett FH (1981) Enzymatic hydrolysis of cellulose; evaluation of cellulase culture filtrates under use condition. Biotechnol. Bioeng. 23:2009-2026
65. Muthezhilan R, Ashok R, and Jayalakshmi S (2007) Production and optimization of thermostable alkaline xylanase by *Penicillium oxalicum* in solid state fermentation. Afr J Microbiol Res. 020-028
66. Xiao Z, Storms R, Tsang A (2004) Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. Biotechnol. Bioeng. 88:832-837
67. Xu F, Jin H, Li H, Tao L, Wang J, Lv J, Chen S (2012) Genome shuffling of *Trichoderma viride* for enhanced cellulase production. Ann Microbiol. 62:509-515

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.