

## 유기성 폐기물을 이용한 연료용 알코올의 생산

김병천 · 박재연 · 엄영순 · 상병인 · 정윤철

한국과학기술연구원 환경기술연구단

### Bio-alcohol Production from Organic Waste

Byung-Chun Kim · Jae-Yeon Park · Young-Soon Um · Byoung-In Sang · Yun-Chul Chung

Center for Environmental Technology Research, Korea Institute of Science and Technology

#### 1. 서론

지구상에서 13 테라와트의 에너지가 사용되고 있으며 이 중 80%가 화석연료로부터 생산되고 있다.<sup>1)</sup> 이는 인류의 생존을 위해서는 화석연료의 지속적인 공급과 사용이 필수불가결한 요소 중의 하나일 수 있음을 보여주는 것이다. 그러나 화석연료는 점차 매장량의 한계를 드러내고 있으며 화석연료의 연소 시 발생하는 지구온난화 가스로 인한 생태계 교란과 기후변화는 안정된 생활을 위해 화석연료를 사용하는 인류를 위협하고 있다. 이러한 위협으로부터 벗어나 지속 가능한 인류의 발전이 영속되기 위해 필요한 기술의 개발이 시급한 실정이다. 현재 화석연료에서 얻고 있는 에너지를 탄소중립적 에너지원으로부터 생산하여 활용하는 기술이 하나의 해결방안이 될 수 있을 것이다.

탄소중립적인 에너지원으로 관심을 받고 있는 것이 바이오매스로부터 에너지를 생산하는 기술이다. 경제성 있는 에너지를 확보하기 위해서는 원료로 사용되는 바이오매스의 특성, 확보방안과 더불어 원가가 매우 중요한 고려 대상이다. 국내에서 가용 가능한 바이오매스로는 농산림부산물, 목재류, 유기성 슬러지, 음식물류 폐기물 등이며, 볏짚, 왕겨 등의 농부산물은 연간 14,161천 톤이 발생되고 임목벌채, 숲가꾸기사업 등으로 인해 발생하는 산림부산물은 연간 7,030천 톤으로 추정되는데 이를 바이오에탄올의 원료로 사용할 경우 약 420만 kL의 바이오에탄올을 생산할 수 있을 것으로 추정된다. 또한 국내에서 생산되는 옥수수, 고구마, 감자와 같은 전분질계 바이오매스를 모두 바이오에탄올의 원료로 사용할 경우 약 17만 kL의 에탄올을 생산할 수 있을 것으로 추정된다. 그러나 이러한 바이오매스는 현재 높은 원가로 인해 시장 경쟁력을 가지는 바이오수송연료를 생산하기 어렵다. 발생량이 많고 원가에 대한 부담을 최소화할 수 있는 바이오매스로 고려할 수 있는 것이 음식물류 폐기물과 유기성 슬러지이다. 이 중 음식물류 폐기물은 하루 1,200톤/일이 발생하며 다른 폐기물과

분리되어 수거되는(분리수거율 96% 이상) 높은 유기물 함량과 당화과정을 감소화할 수 있는 좋은 바이오매스이다. 또한 현재 국내에서 생산되는 전분질계를 모두 바이오에탄올로 생산하는 경우보다 많은 양의 바이오에탄올인 19만 kL 이상을 현재의 발효기술로 생산이 가능하다. 따라서 본 논문에서는 유기성 폐기물에서의 연료용 알코올생산에 대한 관련기술과 전망을 기술하고자 한다.

#### 2. 수송용 바이오 연료의 생산 현황

2000년 초반 고유가가 시작된 이후로 전 세계적으로 수송용 바이오연료 생산이 폭발적으로 급증하고 있다. 수송용 바이오연료 중에서도 상업적 발효 공정이 개발된 바이오에탄올 생산이 급증하였는데, 국제적으로 미국, 브라질, 캐나다, 스웨덴 등에서 바이오에탄올을 자동차 연료로서 사용되고 있으며, 중국, 호주, 일본 등에서도 적극적으로 에탄올 사용을 도입하고 확대하는 움직임을 보이고 있다.<sup>2)</sup> 2005년 에탄올의 총생산량은 460억 리터이며 각국 생산현황은 미국과 브라질이 167억과 166억 리터로 전체의 약 72%를 점하고 있으며 다음으로 중국이 38억 리터, 인도가 17억 리터, 러시아가 7.5억 리터, EU 각국의 합계는 30억 리터, 일본은 1.1억 리터이다. 2012년에는 바이오에탄올 생산량이 650억 리터로 현재의 1.7배로 증가될 것으로 예상된다(Fig. 1).

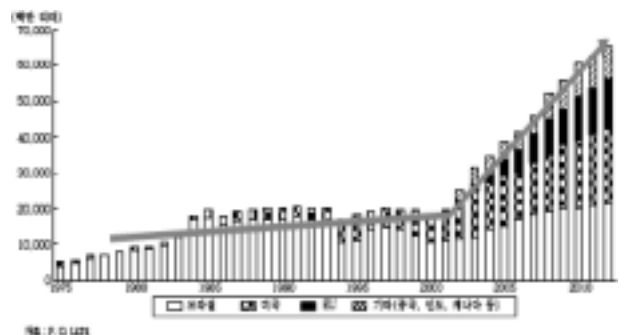


Fig. 1. Global ethanol production(source: LG 주간경제, 2006, 3. 24).

E-mail: biosang@me.com

Tel: 02-958-6751

Fax: 02-958-5839

바이오매스(biomass)로부터 생물학적 공정에 의해 생산되어지는 수소용 액체 바이오연료로는 바이오에탄올과 바이오부탄올이 있다. 이러한 수소용 바이오연료는 식용 작물(당질계 또는 전분질계)로부터 현재 상용화되어 생산되어지고 있는 1세대 바이오연료와, 식용으로 사용이 불가능한 섬유소계 또는 목질계 바이오매스로, 유기성 폐기물 등으로부터 생산되는 2세대 바이오연료로 나눌 수 있다.

바이오에탄올 생산은 사탕수수, 옥수수, 사탕무와 밀 등 당질계 및 전분질계 식용 작물로부터 생산될 수 있으며, 현재 가동중인 모든 상용화된 공정은 이러한 원료를 사용하고 있다. 미국의 경우 옥수수전분을 원료로 하여 바이오에탄올을 생산하고 있으며 브라질의 경우 사탕수수를 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 있다. 하지만, 상당수의 인류가 식량난에 허덕이고 있고 특히 경작면적이 적은 우리나라에서 식량자원을 에너지원으로 이용하는 것은 적절하지 못하며, 앞으로 급속하게 증가하게 될 수소용 에탄올의 수요량을 충족시키기 위해서는 안정적인 바이오에너지 원료원이 될 수 있는 비식용 바이오매스를 활용한 에탄올을 생성하는 것이 필요하다.

DuPont과 BP는 재조합 대장균을 이용하여 사탕수수와 같은 당류를 이용한 생물학적 부탄올 생산공정을 최근 개발하여 주목을 받고 있다.<sup>3)</sup> 바이오 부탄올 사용시 장점은 종래의 바이오 에탄올보다 연소 효율이 높고 가솔린과의 혼합성이 뛰어나 고농도로 첨가할 수 있으며, 엔진을 보정할 필요가 없는 것이 특징이다. 또한 증기압이 낮음으로 인해 기존의 가솔린 공급과 유통 경로 사용이 가능하다. 하지만, 현재 개발된 바이오 부탄올 생산 공정 또한 식용 작물을 원료로 사용하기 때문에 농부산물, 산림부산물과 같은 비식용계 바이오매스를 이용한 생산이 요구되어진다.

2세대 바이오연료는 1세대 바이오연료와는 달리 식량 문제와 연계되지 않아서 원료 수급 안정성이 우수하고, 유기성 폐기물을 에너지로 사용할 수 있다는 일석이조의 효과가 있는 등 여러 장점이 있으므로 세계 각 국에서 관심을 가지고 연구에 투자하고 있다. 미국에서는 2007년 목질계 바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 상용 공정을 개발하

기 위해 6개의 회사에 4년간 395백만 달러를 투자하였다.<sup>4)</sup> 이들 공장들이 성공적으로 가동할 경우 미국은 2012년경 연 130백만 갤런의 바이오에탄올을 생산할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한 전폭적인 국가적 지원을 통해 미국은 2030년까지 2004년 사용되어진 총 수소연료량의 30%(약 60 billion gallons)를 에탄올로 대체할 계획을 진행 중에 있다. 캐나나는 폐목, 밀짚 등으로부터 에탄올 생산을 하기 위한 공장을 건설 중에 있고, 일본은 2030년까지 E10을 실현할 목표로 모든 휘발유 사용 신차에 E10 연료를 사용할 것을 법제화하였고, 에탄올 수요를 충족시키기 위해 브라질 및 동남아시아와 활발한 협력을 진행 중에 있다.

미국의 경우 생산되어지는 모든 옥수수 전량을 바이오에탄올 생산 원료로 사용하더라도 미국 휘발유 수요의 20%만 대체 가능하다. 즉, 늘어나는 수소용 바이오연료 수요를 충족하기 위해서는 목질계 바이오매스 및 유기성 폐기물을 이용한 바이오연료 생산이 필수적이다. 하지만, 섬유소계 또는 목질계 바이오매스를 원료로 사용하기 위해서는 전처리와 당화 과정이 선행되어야 하는데, 여기에서 효과적인 전처리 기술 개발과 전처리시 생성되는 미생물 성장 저해 물질 제거 기술 등이 요구되어진다.<sup>5)</sup> 또한, 유기성 폐기물을 이용한 에탄올 생산은 식용 작물로부터의 에탄올 생산보다 기술 개발이 어렵고, 생산 수율도 떨어지는 등 여러 공정 인자들이 개선되어야 경제적 바이오연료 생산이 가능하다.<sup>6,7)</sup>

### 3. 연료용 알코올 생산 기술

#### 3.1. 전처리 공정

경제적인 바이오 알코올 생산을 위한 원료로써 연구되어진 것은 음식물 류 폐기물,<sup>8,9)</sup> 주정 및 식품 등의 중저농도 유기성 폐기물 및 슬러지 및 도시폐수 및 폐기물 슬러지,<sup>10~12)</sup> 축산 폐수<sup>13)</sup> 등의 고농도 유기성 폐기물 등이 있다. 이러한 유기성 폐기물을 발효기질로 이용하기 위해서는 가수분해과정을 통한 당화 과정이 필수적이다. Fig. 2에 바이오매스로부터 에탄올을 생산하는 전체 공정의 개요를 보였다.

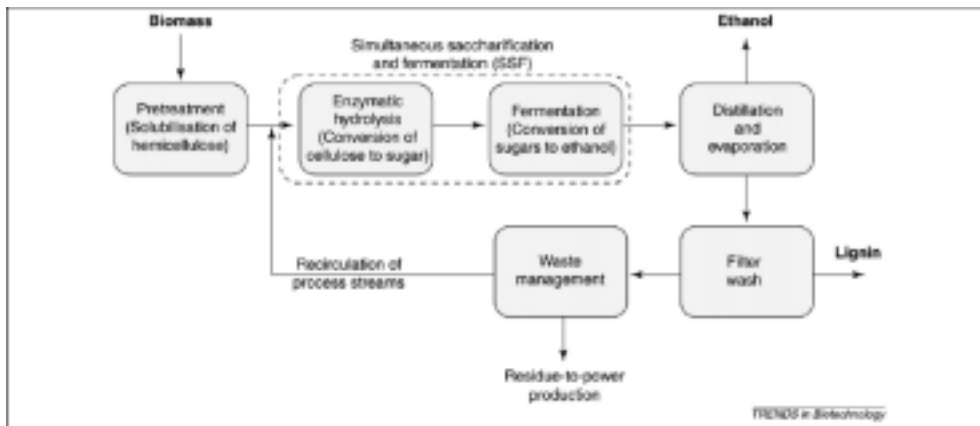


Fig. 2. Schematic flowsheet for the conversion of biomass to ethanol.<sup>14)</sup>

전처리 공정은 후단의 당화공정 및 발효공정의 효율 및 반응시간단축에 크게 기여하게 된다. 전처리 공정은 알코올의 생산 기질인 전분질계, 목질계, 당질계 처리의 모든 공정에서 이용되며, 특히 목질계 바이오매스의 경우에는 필수불가결한 공정이다.

이러한 전처리기술들은 급격한 발전을 이루고 있으며, 기질의 특성에 따라 적용방법이 다르다. 기술개발 초기에는 바이오매스 크기의 감소가 대부분이었으나, 최근에는 바이오매스의 구조 및 특성들을 변환시키는 기술개발들이 주를 이루고 있다. 전처리기술은 크게 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 나누어지며, 이러한 방법들 중 기질의 특성과 처리효율에 따라서 전처리 기술들을 병합하여 사용하기도 한다.

이러한 전처리 기술은 반드시 다음과 같은 특성을 갖고 있어야 한다.

- 1) 당의 생성을 직접적으로 높이거나 이후의 효소 분해에 의하여 당의 생산 수율을 높일 수 있어야 한다.
- 2) 탄수화물의 분해는 가능한 지양한다.
- 3) 이후의 분해나 발효공정에 해가 되는 분해산물의 생성은 가능한 피해야 한다.
- 4) 경제성이 있어야 한다.<sup>15)</sup>

현재 이러한 전처리 기술의 낮은 당화 효율 및 높은 처리 비용을 해결하는 것은 화학공정에 비하여 비싼 연료용 알코올 공정의 생산비용 저감을 위하여 극복해야 할 중요한 요건중의 하나이다.<sup>16)</sup> 또한 현재의 연료용 알코올 생산공정이 모두 전분질계 및 당질계를 바탕으로 하는 공정이고 목질계를 바탕으로 하는 공정이 나오지 않는 중요한 이유도 또한 리그노 셀룰로스를 처리하여 높은 당화효율을 얻을 수 있는 효율적인 전처리 공정의 부재라고 할 수 있다.<sup>14)</sup>

### 3.1.1. 전처리 공정의 종류

#### 1) 물리적처리

바이오매스내에 존재하는 셀룰로스 결정들은 칩핑(chipping), 분쇄(grinding) 그리고 제분(milling)과 같은 방법을 이용하여 분쇄될 수 있다.<sup>15)</sup> 일반적으로 chipping을 이용할 경우 바이오매스의 사이즈는 10~30 mm, 제분 또는 분쇄를 이용할 경우에는 0.2~2 mm 정도의 사이즈로 되며, 특히 Vibratory ball milling을 이용할 경우 일반적인 ball milling보다 더 작은 사이즈로 분쇄가 가능하며 이후의 분해 과정에도 보다 효율적인 것으로 알려져 있다.<sup>17)</sup> 그러나 이러한 기계적 전처리 기술들은 장시간의 운전, 과도한 에너지 소모 및 고가의 기계장치 등을 필요로 하여 비용 증가의 단점이 있다.

열분해(pyrolysis) 또한 목질계 바이오매스의 전처리법으로 사용되어져 왔다. 약 300℃ 이상의 온도에서 바이오매스가 분해되면서 가스생성물과 차르(char)를 생성하게 되는 방법으로,<sup>18)</sup> 낮은 온도에서는 반응속도가 늦어지고, 휘발성물질의 생성량이 줄어들게 된다. 목은산처리와 열분해 방법을 병합하는 경우에는 셀룰로스에서 환원당으로의 전

환율이 약 80~85%로써 병합되지 않은 방법에 비해 50% 이상의 효율을 올릴 수 있다.<sup>19)</sup>

#### 2) 물리화학적방법

증기처리법(Steam explosion)은 목질계 바이오매스의 처리방법에서 널리 사용되고 있는 방법이다.<sup>20)</sup> 이 방법은 고압의 포화 증기를 이용하여 바이오매스를 분해하는 방법으로 일반적으로는 160~260℃의 온도와 0.69~4.83 MPa의 압력에서 수분간 반응한 후 압력을 낮추어서 팽창 분해에 의하여 바이오매스를 처리하게 된다. 이 방법은 헤미셀룰로스(hemicellulose)의 분해와 리그닌의 변형을 통해서 셀룰로스(cellulose)의 가용화율을 극대화 시킨다. 증기처리방법은 에너지 소모량이 낮으며, 일반적으로 기계적인 처리방법은 증기처리방법에 비해 약 70% 이상의 에너지가 더 소모되는 것으로 알려져 있다.<sup>21)</sup> 이와 같은 장점에 비해 증기처리법의 단점은 이후의 미생물 공정에 유해한 물질이 발생할 수 있다는 것이며 이러한 물질 및 헤미셀룰로우스 제거를 위한 세척 공정이 필요하다.<sup>20)</sup>

Nakamura 등은 다양한 성상을 가진 모델 가정 음식물류 폐기물로부터 에탄올 생산을 위해 증기처리법 전처리 기술에 대해 연구하였다.<sup>22)</sup> 증기에 노출된 음식물류 폐기물은 높은 추출율과 낮은 점도를 나타내어 쉽게 미생물과 효소의 접촉이 용이하여 음식물류 폐기물로부터 에탄올 생산을 증진시켰다.

Ammonia fiber explosion(AFEX)는 고온과 고압을 이용한다는 점에서 증기처리법과 유사하지만, 건조 바이오매스에 암모니아를 주입하여, 반응시킨다는 점이 다르다. AFEX 전처리 방법은 일반적으로 목질계 바이오매스에서 주로 사용하며, 폐지, 밀대, 생활폐기물 등의 다양한 원료에 대한 연구가 진행되었다.<sup>23~26)</sup>

AFEX 처리는 리그닌 함유율이 높은 바이오매스(신분: 18~30% 리그닌, 포플러나무: 25% 리그닌 함유)에서는 효과적이지 않으며, 이러한 바이오매스를 AFEX로 처리할 경우 약 40~50%의 가용화 효율을 나타낸다.<sup>20)</sup> 암모니아 사용에 따른 환경오염에 대한 문제점이나 비용문제로 인해 처리된 암모니아는 회수하여 재사용하여야 하며, 이러한 회수 공정은 AFEX처리공정에 추가된다. 암모니아는 200℃ 이상에서 증기화되므로, 암모니아가 잔류하고 있는 바이오매스에 200℃ 이상의 온도로 증발시키게 되면, 잔류 암모니아를 추출할 수 있다. AFEX공정의 장점은 이후의 발효 공정에 해로운 물질을 발생하지 않는다는 것이며 따라서 물을 이용한 세척 공정이 추가로 필요하지는 않는다.<sup>23,27)</sup>

CO<sub>2</sub> 처리법(CO<sub>2</sub> explosion)은 앞서 언급한 스팀, 암모니아 처리 방법과 유사하지만, CO<sub>2</sub>를 사용한다는 점에서 다르다. 이 방법은 카르보닉산을 생성하여 높은 분해효율을 얻을 수 있다고 생각되어 지고 있다. Dale와 Moreira에 따르면 알파파 나무(alfafa)에 이러한 방법을 적용하여 효소가수분해 하는 경우에 24시간 동안 75%의 이론적 포도당

전환율을 보였으며, 이러한 전환율은 앞선 기술방법인 스팀처리나 AFEX 처리법과 비교하면 낮은 전환율이지만, 전처리 없는 효소 처리만을 사용한 경우보다는 높은 전환율을 나타내었다고 보고하였다.<sup>28)</sup>

3) 화학적 방법

오존처리방법(Ozonolysis)은 리그닌과 헤미셀룰로스 등 다양한 화합물들을 분해 가능하며, 밀대, 사탕수수당분찌거기(bagasse), 건초, 땅콩, 소나무, 목화대, 포플러, 톱밥 등의 바이오매스의 처리에 대한 연구가 보고되었다.<sup>29-32)</sup> 오존분해방법은 뛰어난 리그닌 제거효율과 독성잔류물을 생성하지 않고, 상온, 상압에서 사용가능하다는 장점이 있으나,<sup>32)</sup> 헤미셀룰로우스의 처리효율은 낮고 셀룰로우스에는 거의 작용하지 않는다는 것이 단점이며 대량의 오존사용에 따른 비용부담의 단점도 있다.<sup>15)</sup>

황산이나 염산과 같은 강산을 사용하는 산처리(acid hydrolysis) 경우에 바이오매스의 가용화 효율은 높으나, 강산자체의 독성과 부식으로 인한 반응기의 독성 및 부식방지공정 설치에 따른 추가비용이 문제가 되며 경제적인 공정을 위하여 사용한 산을 회수해야 된다는 단점이 있다.<sup>33)</sup> 하지만 묽은 산을 이용하는 경우에는 이러한 문제점을 절감시키고 셀룰로스의 가용화 효율을 높게 하여 공정에 적합하다고 보고되고 있다.<sup>34)</sup> 이러한 산처리는 자일로우스(xylose) 분해에 비해 자일란(xylan)의 용해 속도를 증가시킨다는 보고가 있으며 묽은 산을 이용할 경우 자일로우스로의 전환율이 높다는 보고가 있었다.<sup>35)</sup> 목질계 바이오매스의 경우 총 탄수화물량에 대해 자일란이 높은 함유량을 차지하고 있기 때문이다.<sup>36)</sup> 묽은산처리 방법은 셀룰로우스의 가용화효율은 높으나 일반적인 증기처리나 AFEX와 같은 물리적인 전처리 방법에 비해 높은 비용을 수반한다고 알려져 있으며 이후의 효소 및 발효 공정을 위하여 중화공정이 필요하다.<sup>15)</sup>

알칼리 처리는 그 효율이 리그닌 함량에 따라 크게 달라지며 그 분해 메카니즘은 자일란 헤미셀룰로우스와 다른 구성성분들 간의 에스테르결합을 saponification하는 것으로 알려져 있다.<sup>19,20)</sup> 희석된 수산화 나트륨처리는 바이오매스의 팽창을 유도하며 이로 인한 내부표면적의 증가, 결정화도의 감소, 리그닌과 탄수화물의 구조적 결합 분리 그리고 리그닌구조의 분열 등을 유발하게 된다.<sup>19)</sup>

일반적으로 염기처리는 셀룰로스의 분해도를 향상시키는 것으로 알려져 왔으나 경제성과 이에 수반된 회수의 어려움으로 인하여 연료나 화학물질의 생산에는 적합하지 않은 것으로 알려져 왔다.<sup>37)</sup> 그러나 암모니아를 이용한 방법의 경우는 최근에 암모니아의 휘발성을 이용한 회수방법으로 인하여 셀룰로스 처리에 효과적인 것으로 나타나 있다.<sup>38)</sup> 이 외에 유기용매를 사용하는 공정도 있으나 후단의 효소 및 발효 미생물 공정과의 결합에 저해를 주는 이유로 최근에는 연구가 되지 않고 있다.

4) 생물학적처리(Biological pretreatment)

생물학적처리는 미생물을 이용하여 바이오매스의 리그닌과 헤미셀룰로스를 분해하는 방법이다. Brown rot는 셀룰로스를 주로 처리하며, white와 soft rot는 리그닌과 셀룰로스를 처리한다.<sup>19,39)</sup> White rot fungus는 대부분 담자균(basidiomycete)에 의해 리그닌 바이오매스를 처리하게 되며, Hatakki와 Uusi-Rauva는 *Pleurotus ostreatus*를 이용하여 곡물대를 기질로써 이용하여 처리한 결과 환원당으로 약 35%의 전환율을 나타내었다.<sup>40)</sup> 그리고 *Phanerochaete sordida* 37과 *Pycnoporus cinnabarinus* 115 두 개의 미생물은 서로 유사한 전환율을 나타낸다고 알려져 있다. Bermuda grass를 바이오매스로 이용하여 *Ceriporiopsis subvermispora*와 *Cyathus stercoreus*의 두가지 미생물을 이용하여 처리한 결과 각각 29~32, 63~77%의 전환율을 나타낸 결과가 보고되었다.<sup>40)</sup> 이러한 생물학적 처리의 원리를 *P. chrysosporium*종을 예로 들면, 미생물이 리그닌분해효소인 리그닌 페록시다아제(lignin peroxidase)와 망간 페록시다아제(manganese peroxidase)를 분비하여 체외에서 바이오매스를 분해하게 되며, 이를 탄소원과 질소원으로 사용하게 된다.<sup>41)</sup> 이러한 효소이외에도 polyphenol oxidases, laccases, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing 그리고 quinone-reducing 효소들이 리그닌을 분해하게 된다.<sup>42)</sup> 생물학적처리는 적은 에너지소모량과 상온 상압의 조건에서 사용가능하다는 장점이 있지만, 대부분의 가용화 처리효율은 매우 낮으며 대부분의 당이 아직도 저중합체로 나오는 단점이 있다.<sup>43)</sup>

이와 같은 전처리 공정은 그 우수성을 몇가지의 방법에 의하여 비교될 수 있는데 먼저 효소에 의한 고체물질 분해능은 소화정도(digestibility) 를 나타내는 지표로 사용할 수 있으며 액상 발효를 통하여 발효 미생물에 대한 잠재적 독성물질의 존재 정도를 알 수 있으며 이는 동시 당화 발효 공정(Simultaneous saccharification and fermentation : SSF) 를 통해서도 측정 할 수 있다. 그러나 이러한 비교 방법은 전처리 물질의 세척유무 및 전처리 물질의 농도, 사용 효소의 농도 등에 따라 달라질 수 있기 때문에 방법간 비교에 있어서 주의를 요한다.<sup>14)</sup>

현재까지의 공정에서 분해 및 효소 반응촉진 촉매와 같이 사용되는 증기처리 방법이 가장 상업화에 근접되어 있다.<sup>14)</sup> 이들은 현재 여러군데의 파일롯 규모의 공정에서 시험가동되고 있다. 그러나 근본적으로 다른 원료들은 다른 전처리를 요구하고 있으며 각각을 만족시킬 일반적인 방법은 없다. AFEX, 습식산화, LHW(liquid hot water) 처리법 등이 농업작물 부산물에 성공적으로 적용되었으며 증기처리법이 목질류나 농업작물 부산물에 모두 좋은 전환율을 보이고 있다.<sup>44-46)</sup>

3.1.2. 당화공정(Saccharification)

당화공정은 바이오매스가 포함하고 있는 고분자 탄수화물(polysaccharide)을 저분자 당류(mono-saccharide)로 전환하는 과정이다. 이러한 공정을 통해 바이오매스는 에탄올

발효 미생물들이 기질로써 이용할 수 있는 단당류로 전환되며, 일반적으로 효소를 이용하여 처리하게 된다. 효소를 사용하는 이점 중 하나는 대개 특정한 반응에 대하여만 촉매작용을 하므로 분해 생성물, 부산물 등의 생성이 적다는 것이다. 둘째로는 생물공정은 상온, 상압 반응에 부식성이 없으므로 시설비가 적게 들며 반응되지 않는 성분(바이오매스의 경우 리그린 등)은 변환없이 배출되므로 다른 용도로 쓸 수 있다는 점이며, 마지막으로, 생물공정은 새로운 공정 및 기술 개발이 계속되고 있으므로 공정 개선 및 경제성 제고가 용이하다는 것이다.

셀룰라아제(cellulose)는 복합효소이며, endoglucanase(EG: EC 3.2.1.4), exoglucanase(cellobiohydrolase 혹은 CBH: EC 3.2.1.91) 및  $\beta$ -glucosidase(EC3.2.1.21) 등의 3가지 효소로 구성되어 있으며, 이들 효소는 기질의 활동도 특성에 따라 각각 CMCase, avicelase 및 PNPCase로 구분되기도 한다.<sup>47)</sup>

이러한 셀룰라아제의 가수분해 단계는 먼저 1) endoglucanase 효소가 셀룰로오스 섬유의 연결고리들을 분해한 후 2) exoglucanase 또는 cellobiohydrolase가 연결고리가 포함하고 있는 셀로바이오스(cellobiose) 결합들을 제거하고, 3)  $\beta$ -glucosidase가 셀로바이오스에서 포도당으로 전환시키는 과정을 거치게 된다.<sup>48)</sup> 셀룰라아제 중 헤미셀룰로스를 분해하는 효소들은 glucuronidase, acetylesterase, xylanase,  $\beta$ -xylosidase, galactomannanase 그리고 glucomannanase들이 있다.<sup>49)</sup>

이러한 효소가수분해를 사용하는 경우에는 효소의 사용량에 따른 공정의 비용이 높아지므로 반응기의 고품잔재물에 포함되어 있는 효소를 재사용하기 위해 회수를 해야 하며, Ramos 등에 따르면 상업용 효소인 Celluclast와 Novozym의 혼합액의 사용에서, 5단계의 회수공정을 이용하여 recycling에 성공한 바 있다.<sup>50)</sup>

셀룰라아제의 활성도는 셀로바이오스에 의해 저해되며, 이러한 inhibition을 막기 위해서 효소의 농도를 높게 사용한다거나,  $\beta$ -glucosidase를 첨가하거나, 반응기에 분리막(Ultrafiltration:UF)을 연결하여 당을 제거하는 방법들을 사용하였으나, 최근에는 simultaneous saccharification and fermentation(SSF) 공정을 사용하여 이러한 문제점을 해결하고 있다.<sup>51,52)</sup>

현재 바이오 에탄올 생산 공정에 있어서 비용 절감은 원료와 셀룰라아제 효소 가격으로부터 크게 감소시킬 수 있으며 경제적인 셀룰라아제 효소의 생산은 주된 이슈중의 하나이다.

## 3.2. 에탄올 생산

### 3.2.1. 에탄올 발효 공정

일반적인 자당(sucrose)나 전분(starch)를 기본으로 하는 공정과 비교하여 유기성폐기물을 이용하는 공정은 여러 가지 당분의 혼합물이 전처리 및 분해과정에서 나온 발효저해물질(저분자 유기산, 푸란 유도체, 페놀 및 무기물)등과 공존하고 있어서 에탄올 생산 공정에서 주의를 요한다.<sup>53)</sup>

에탄올 발효는 분리당화발효공정(separate hydrolysis and fermentation, SHF)과 동시당화발효공정(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)로 나누어지게 된다.

분리당화발효공정은 당화공정(saccharification)과 에탄올 발효(ethanol fermentation)공정을 각각 다른 반응기에서 수행하는 것으로 당화과정과 발효과정 각각에 반응하는 효소와 에탄올발효미생물에 최적의 조건에서 반응시킬 수 있다는 장점이 있다. 하지만 분리당화발효공정은 당화공정과 발효공정을 따로 하여 당화공정에서의 셀룰라아제의 중간생성물과 최종생성물인 셀로바이오스와 포도당의 반응기내에 축적됨에 따라 효소의 활성도에 inhibition에 따른 문제로 인해 반응이 종결된다는 단점이 있다. 이를 위해서는 셀로바이오스를 분해하는  $\beta$ -glucosidase를 추가적으로 주입하는 방법과 효소의 농도를 높게 하는 방법, 그리고 반응기에 분리막을 설치하여 glucose를 제거하는 방법들을 사용하였으나, 이는 공정의 비용이 비싸기 때문에 경제적이지 않다.

하지만, 동시당화공정은 당화공정과 발효공정을 동시에 함으로써 효소가 바이오매스를 당화시켜 단당류가 생성되면, 에탄올 발효미생물이 생성된 당을 사용하여 에탄올을 생산하게 되어 반응기에 글루코오스의 축적을 최소화 할 수 있다. 동시당화발효공정과 이상발효공정을 비교하였을 때 이점들은 1) 셀룰라아제의 활성도가 저해되지 않으므로 효율이 증가하며, 2) 효소사용량이 낮고, 3) 최종산물로의 전환 효율이 높으며, 4) 생산된 글루코오스를 바로 에탄올로 전환되기 때문에 이에 따른 멸균의 필요도가 적고, 5) 반응시간이 짧으며 그리고 6) 한 개의 반응기를 사용하기 때문에 반응기의 사이즈가 작아진다는 것들이 있다.

그러나, 동시당화발효공정의 경우 몇 가지 문제점들을 수반하게 된다. 첫 번째로는 온도에 따른 문제점으로써, 당화효소와 에탄올생산미생물의 최적온도가 다르다는 점이다. 당화효소의 경우 45~50℃의 온도에서 최적의 활성도를 나타내며, 에탄올생산미생물의 경우 30℃에서 최적의 활성도를 나타내므로, 온도제어에 따른 공정의 문제점을 수반하게 된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 동시당화발효공정의 온도를 약 38℃로 하여 당화와 발효의 반응에 관여하는 효소 및 미생물에 저해가 없도록 하여 *T. reesei*와 *S. cerevisiae*를 이용하여 연구가 진행되었으며, Ballesteros<sup>54)</sup> 등에 따르면 *Kluyveromyces marxianus*와 *K. fragilis*를 이용하여 약 42℃에서 실험하여 0.5 g ethanol/g cellulose를 생산한 결과도 보고되어 지고 있다. 이러한 온도에 대한 문제점의 해결책 중 하나으로써 에탄올생산미생물의 형질을 개량하여 고온내성 에탄올생산미생물을 만드는 연구가 시도되었다.<sup>55)</sup>

두 번째 문제점으로는 생산되는 에탄올로 인해 에탄올생산미생물과 당화효소의 활성도에 저해를 준다는 점이다. 이러한 문제는 생산되는 반응기에서 바로 분리(separation)하는 방법으로 처리 가능하며, 이러한 방법은 에탄올 추출과도 연계된다. 몇 가지 방법들이 공정에서 사용되고 있

으며, 그 중의 하나의 방법으로 gas stripping 방법이 있다. 이는 공정에 지속적으로 가스를 주입하여, 휘발성이 높은 에탄올을 반응기 밖으로 추출 후 콘덴서를 연결하여 이를 포집하는 방법으로 이를 이용하여 에탄올을 반응기에서 분리하여, 미생물 및 효소의 활성도에 저해를 없애도록 한다. 또한 효소 및 에탄올생산 미생물에 에탄올 내성 형질을 개량시키는 연구와 고가의 효소 사용량 절감과 고농도의 에탄올 생산을 위해 당화 및 발효를 동시에 수행할 수 있는 재조합미생물 등을 획득하기 위해 선진국에서는 지속적인 연구가 수행되어 지고 있다.

또한 리그노 셀룰로스 물질들 특히 단단한 나무나 곡물류의 미가공 물질들의 경우는 약 5~20%의 오탄당 자일로스(xylose) 및 아라비노스(arabinose)를 함유하고 있는데 이들은 대부분의 발효 공장에서 사용중인 일반 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해 발효로 에탄올로 변하지는 않는다. 지금까지 자일로스는 가장 풍부한 오탄당이기에 때문에 이 자일로스를 발효시킬 수 있는 균주의 개량도 중요한 연구테마 이다.<sup>56,57)</sup>

또한 유기성 폐기물 그 중에서도 가정이나 식당으로부터 배출된 음식물류 폐기물의 경우 각각 약 3.86% 및 4.84% 정도의 고 염분을 함유하고 있는데<sup>58)</sup> 일반적으로 염분은 *S. cerevisiae*의 성장 저해, 기질 소모 및 에탄올 생산을 저하 등을 야기시키는 에탄올 발효의 저해 인자로 잘 알려져 있다.<sup>59)</sup> Trainotti 등은 포도당 및 맥아당(maltose) 배지에서 염분 농도의 증가는 *S. cerevisiae*의 성장을 급격히 저하시켰고 맥아당의 경우 0.7 M NaCl 농도에서 에탄올 생산율이 현저히 낮았다고 보고하고 있다.<sup>60)</sup> 또한 이러한 염분의 영향을 극복하기 위해 에탄올 생산 균주에 대한 유전자 조작 기법 등이 사용되고 있다.<sup>61)</sup>

3.2.2. 에탄올발효 미생물

에탄올발효에 이용되기 위한 균주의 특성으로는 1) 바이오매스당 에탄올의 전환율이 높고, 2) 효소가수분해의 고온에 따라서, 높은 온도의 저항성을 가지고 있어야 하며, 3) 에탄올에 대한 내성이 강하고, 4) 낮은 pH에 대한 내성도 있어야 한다.

현재 에탄올 생산에 쓰이고 있는 미생물은 효모뿐이며, 효모는 선택적으로 에탄올을 생산하므로, 부산물이 적어 발효 후의 에탄올 회수가 편리하고, 세포의 사이즈가 박테리아보다 커서 취급이 용이하다. *Clostridium thermosaccharolyticum*, *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Pachysolen tannophilus* 효모들의 경우에는 일반적인 효모가 발효를 하지 못하는 5탄당(pentose)의 이용이 가능하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이들의 박테리아는 6탄당(hexose)도 이용하고, 발효온도가 높아 생산된 에탄올이 계속 증발되므로, 최종산물인 에탄올에 의해 발효가 억제되는 것을 막을 수 있어, 앞으로의 에탄올발효에서 효모에 대체될 가능성이 크다, 그러나 현재까지 연구된 미생물들은 불필요한 부산물의 생산이 너무 많고, 생산되는 에탄올의 농도 또한 낮다.

또 박테리아인 *Zymomonas mobilis*가 에탄올발효균주로서 연구 되고 있다.<sup>62)</sup> Gram-음성균인 *Zymomonas*는 열대 지방에서는 술의 제조에 사용된 적도 있으며, 특수한 대사경로를 통해 글루코오스 1분자로부터 2분자의 에탄올을 생산하여, 같은 양의 포도당에서 에탄올을 효모보다 약 5~10% 더 높은 수율로 생산한다. 차후 바이오에탄올의 대량생산에 있어서 생산속도가 빠른 미생물의 형질개량에 있어서도 효모보다 유전적으로 변화시키기가 수월하여, *Zymomonas*의 에탄올 내성을 증가시키는 연구가 진행 중에 있다.

효모들 중에서는 *Saccharomyces cerevisiae*, *S. ellypsoides*, *S. uvarum*, *S. fragilis*, *Schizosaccharomyces pombe* 등이 에탄올 생산에 선택되어 지고 있다. 또한 리그노셀룰로스의 중요 성분 중 하나인 자일로스(xylose)를 분해하는 효모인 *Pachysolen tannophilus*, *P. stipitis*와 *Candida shehatae* 등이 활발히 연구되어졌다.<sup>63~66)</sup>

3.2.3. 유기성 폐기물을 이용한 에탄올 생산 연구

유기성 폐기물을 이용한 연구는 현재까지 농부산물, 축산농가의 가축분뇨, 도시 하수 슬러지나 생물 유래 고형물 등을 이용한 연구들이 되어 왔으며 다음 Table 1에 각 폐기물들의 성분을 표시하였다.<sup>16)</sup>

1) 유기성 폐기물에 대한 전처리 연구

Carleton University의 연구그룹은 농부산물 및 도시 하수, 축산 분뇨를 대상으로 일반적인 실험실 규모에서의 분해 연구를 중점적으로 발전시켰다. Henderson 등은 염기를 이용한 리그닌 제거에 대해서 보고하면서 농부산물에서 염기 처리가 셀룰로오스 성분(NHP : non hydrolysable product)을 리그닌과 헤미 셀룰로오스(HP : hydrolysable product)으로 부터 분리시키는데 유용하다는 것을 발표하였다.<sup>68)</sup> 사탕수수당분찌꺼기(bagasse)와 옥수수대를 이용한 실험에서 0.5 N KOH를 이용하여 두번의 사이클을 70°C에서 실험한 결과 각각 70% NHP와 50%의 NHP의 효율을 얻을 수 있었다.

Table 1. Fiber, cellulose, hemicelluloses and lignin content in cattle, swine and poultry manure<sup>67)</sup>

	Total fiber (%DBM)	Hemicellulose (%DBM)	Cellulose (%DBM)	Lignin (%DBM)
Cattle manure				
Dairy	52.6	12.2	27.4	13.0
Beef	51.5	17.4	21.9	12.2
Feedlot	41.7	21.4	14.2	6.1
Swine manure				
Nursery	39.2	21.9	13.2	4.1
Grower	40.8	20.5	13.9	6.4
Finisher	39.1	20.4	13.3	5.4
Poultry manure				
Chick starter	31.7	18.3	8.5	4.9
Pullet grower	36.4	21.5	7.7	7.2
17-40 weeks	34.5	20.2	12.0	2.3
Post-molt	31.2	16.4	10.7	4.1

이러한 염기 처리는 돼지 분뇨에도 적용하였는데 Levy 등과 Champagne 등은 산을 이용한 처리가 돼지 분뇨에서 중금속의 제거에 효과적이라는 것을 밝혔다.<sup>69~71)</sup> 비록 고농도의 염산(1.0 N) 처리가 중금속 제거에는 유리하였지만 0.1 N의 염산을 이용하는 것이 NHP 및 HP의 분리에는 유리하였다. 0.1 N의 HCl과 0.5 N의 KOH 용액을 이용할 경우의 분리율은 NHP가 61%, HP가 11.5%에 달하였다. 이 중 NHP는 62.4%의 휘발성 유기물 및 60.1%의 탄소 함량을 보였으며 HP는 45.5%의 질소 함량을 보였다.

2) 농부산물을 이용한 바이오에탄올 공정의 타당성

Li와 Champagne는 농부산물을 이용한 에탄올 공정의 타당성 연구에서 곡물 부산물을 효소를 이용하여 제거한 결과 높은 포도당 생산 효율을 얻을 수 있었다.<sup>72,73)</sup> KOH로 처리된 옥수수대(corn stover)와 사탕수수 당분찌꺼기(bagasse)를 이용하여 40°C에서 효소를 이용하여 처리한 결과 24시간 동안 각각 65.4%와 51.1%의 포도당 전환율을 얻을 수 있었다. 이 논문은 섬유소 처리에 대하여 전처리 공정을 각 원료별로 특화 시킬 경우 그 전환 효율을 보다 높일 수 있을 것으로 결론을 내렸다. 또한 분해 공정의 효율은 효소의 투입을 반응 초기 및 중간에 투입하는 것이 초기에 모든 양을 사용하는 것 보다 높다는 것을 보였다. 다른 논문들도 이와 유사한 결론을 내리고 있다.<sup>74~77)</sup> 또한 미국에서 옥수수대를 이용하여 실행된 광범위하고 정량적인 비교를 통한 연구를 통하여 현재의 여러 가지 전처리 공정을 통한 후 효소분해공정을 거친 후의 포도당 전환율은 전처리 공정에 관계없이 모두 90% 정도로 비슷하였으며 이는 옥수수대가 매우 분해되기 쉬운 부산물이라는 것을 보여주고 있다.<sup>14)</sup>

현재의 기술에서 판단해 볼 때 농부산물 유래 셀룰로오스 유기물은 건조 톤 당 약 300 L의 규모로 전환될 수 있다는 것이 보여졌다. 또한 현재 진행중인 리그노 셀룰로오스에 대한 기술의 발달 및 개개 부산물에 대한 전처리 공정을 최적화 할 경우 그 처리 효율은 보다 높아질 것으로 생각되어 진다.<sup>14)</sup>

3) 축산 분뇨를 이용한 바이오에탄올 공정의 타당성

Washington state university의 연구그룹들은 축산 분뇨를 이용한 유용 물질 생산에 대하여 연구를 진행하고 있다.<sup>67,78,79)</sup> Chen 등은 바이오 에탄올 공정에 축산분뇨를 적용하여 그 타당성을 타진하여 보았다.<sup>67)</sup> 젖소, 육류용 소 및 가축들의 분뇨에서 섬유성 물질의 비율은 각각 52.6, 51.5와 41.7%로 분석되었으며 이러한 섬유물질들은 단당류로 변형 될 수 있는 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스의 주된 공급원으로 작용한다. 각 가축별로 사료에 사용되는 섬유물질의 조성비가 다르며 각 종별 소화 정도도 다르기 때문에 분뇨의 조성은 종별로 매우 다르다. 일반적으로 소에서 나오는 분뇨는 다른 가축에 비하여 섬유성분이 높기에 이를 바이오 에탄올생산 원료로 사용할 수 있는 가능

성이 높으나 이러한 분뇨의 경우는 곡물부산물들에 비하여 복잡한 조성 및 높은 단백질 함유량으로 인한 발효 공정 저해의 가능성 때문에 그 적용이 대단히 복잡하고 어렵다.

이 연구그룹은 축산 분뇨내의 리그노 셀룰로오스를 분해당화하는 공정을 개발하였다. 젖소의 경우는 3% 황산을 110°C에서 1시간 동안 처리할 경우 헤미 셀룰로오스가 아라비노스(arabinose), 갈락토오스(galactose), 자일로스(xylose)로 완전히 분해가 되는 것을 보고하였다. 이후의 효소 분해공정에 있어서의 최적 조건도 46°C, pH 4.8에서 13FPU cellulose/g substrate와 5IU beta-glucosidase/g substrate로 결정하였다. 입자크기에 대한 영향에서 전처리에서 입자의 크기를 590 μm로 줄일 경우 높은 포도당 전환율을 얻을 수 있었으나 이후 입자 크기를 더 줄이는 것은 전환율에 큰 영향이 없었으며 이것은 Li와 Champagne의 결론과도 동일하였다.<sup>72,73)</sup> 또한 계면활성제의 투여는 전환율을 20% 증가시키는 결과도 같이 얻었다. 평균적으로 38.2%의 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 성분을 갖고 있는 축산 분뇨를 이용할 경우의 포도당 전환율은 11.3 g/100 g manure이며 이는 29.6%의 발효가능 당의 전환율과 동일하다.

어린 가금류의 분뇨를 이용한 연구에서는 건조 및 분쇄와 이후 KOH와 효소를 이용한 방법이 효과적인 것으로 나타났다.<sup>72,73)</sup> 그러나 KOH처리를 통하여 약 10배의 전환율 향상을 보인 곡물 부산물을 이용한 공정과 비교할 때 KOH를 처리했음에도 10.2%까지 밖에 나오지 않는 포도당 전환율은(처리전 7.1%) 매우 다른 결과를 보여주고 있으며 가금류의 분뇨의 경우는 그 구조가 부서졌음에도 불구하고 효소 처리에 적절한 표면 접근성이 확보되지 않았을 가능성이 높은 것으로 보였다. 전환율 향상을 위하여 효소 처리 전에 건조과정을 추가할 경우에는 13.9%까지 전환율이 높아졌으며 이는 70°C에서 건조에서의 일부 유기물의 분해 혹은 건조과정에서 유발된 효소의 접근표면 증가라고 해석 될 수 있다. 또한 KOH 처리 및 분쇄과정까지 전처리에 포함 시킬 경우는 분쇄과정에 의한 효소의 접근면의 증가로 27.6%까지 전환율이 높아졌다. Fig. 3에 가금류 분뇨 처리도를 보였다.

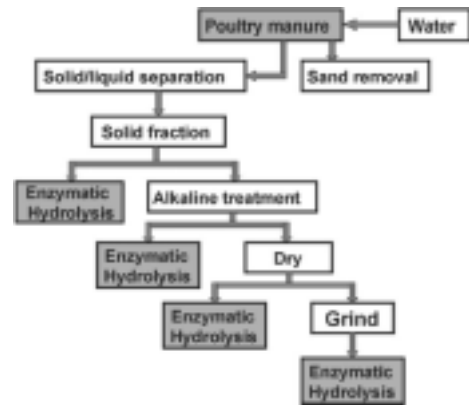


Fig. 3. Pre-treatment of poultry manure cellulosic material fibers.<sup>16)</sup>

돼지 분뇨를 이용한 연구결과는 아직 발표되지 않고 있으나 34.4%의 셀룰로오스 및 헤미 셀룰로오스 성분을 기준으로 할 때 위와 비슷한 정도의 전환율을 기대할 수 있다.

4) 도시 슬러지 및 바이오솔리드(biosolids)을 이용한 바이오 에탄올 생산 공정의 타당성

도시 슬러지 및 고형물의 셀룰로오스 성분은 대부분은 주로 폐지로부터 유래한다. 이러한 슬러지이용 공정에서 포도당 전환을 위한 효소처리 전에 셀룰로오스 성분을 분리하는 것은 전체 효율 정가에서 매우 중요한 과정이다. 일차 도시 슬러지(일차 침전 처리만을 거친 것) 및 이차 슬러지(생물학적 처리 공정을 거친 것)과 고형물(biosolids : 일차 슬러지의 고형화물)를 비교하여 보았을 때 일차 도시 슬러지를 이용한 것이 포도당 생산 효율이 가장 좋았으며 여러가지 전처리를 한 결과 다음 그림에서 보듯이 HCl 처리를 쫓은 상태의 기질에 적용한 결과 처리전보다 약 11.5%가 높은 42.6%의 전환율을 얻을 수 있었다(셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 함유량 대비).<sup>72,73)</sup> 이러한 결과는 산처리에 의하여 슬러지에 포함된 중금속이 제거되어 효소에 의한 처리효율이 높아진 것으로 생각되어지며, HCl 처리 및 KOH처리를 동시에 할 경우 전환율은 셀룰로스 헤미셀룰로스 함유량 대비 쫓은 기질 기준 54.2%, 건조기질 기준 37.0%까지 높아졌다. 또한 이러한 쫓은 기질의 우수한 전환율은 가금류 분뇨를 이용할 경우와는 상반되는 결과인데 이는 두 기질에서의 효소 접근성이 다름을 암시하고 있다. 또한 일차 슬러지 이외에 이차 슬러지 및 바이오솔리드를 이용한 공정에 대한 지속적인 연구 및 최적조건을 찾는 연구는 더 필요하며 이를 정량화 하는 작업이 시급한 실정이다.

Table 2에 이런 폐 유기물로부터 전환 가능한 당의 양을 캐나다에서 발생하는 유기물에 대하여 분석한 표를 보였다.

3.2.4. 파일럿 플랜트 운전 및 경제성 평가

셀룰로스를 바탕으로 하는 바이오에탄올 공정이 보여준 것은 믿을 만한 경제성 평가를 위해서는 실험실 수준의 실험 결과가 파일럿 스케일의 반응기에서 확인되어야 한다는 것을 보여준다.<sup>14,80)</sup> 또한 이들 연구는 공정 통합에 의해 필요 공정의 수를 줄이고, 에너지 사용을 줄이며, 스팀 재사용 등으로 물의 사용 및 폐수의 발생억제를 통하여 얻을 수 있는 잇점의 가능성에 대해서도 보여주고 있다. 현재 Iogen Corp.<sup>81)</sup>의 시범 플랜트가 리그노 셀룰로오스로부터 효소분해 공정을 이용하여 에탄올을 생산하는 유일한 운전 공정이다. 이 공정은 하루 약 40톤의 밀, 귀리, 보리대를 처리할 수 있으며 년생산 3백만 리터의 에탄올을 생산 할 수 있다. Abengoa Bioenergy<sup>82)</sup> 또한 미국 요크에 전분 및 셀룰로오스와 헤미 셀룰로오스로부터(주로 옥수수대) 바이오에탄올 및 고단백질 사료를 생산하는 파일럿 규모의 공장을 짓고 있다. 또한 동사는 살라만카(Salamanca)에 곡물로부터 현재 연 195백만 리터 규모의 바이오에탄올을 생산하는 공장과 연계하여 연 5백만 리터 규모의 전시 공정을 지었다. 이 공정으로부터는 주로 밀대를 이용하여 생산을 하고 있다. 스웨덴에서는 이단계의 산처리와 효소공정처리를 결합한 연질목질로부터 에탄올을 생산하는 공정이 2004년 중반부터 가동중에 있으며 연 하루 최고 2톤의 처리 용량을 갖고 있다.<sup>83)</sup> 이러한 파일럿 규모의 공정에서 실제 생산 규모의 공정을 만들기 위한 노력이 지금도 계속되고 있으며 이를 위하여 발전소와의 연계를 통한 공정의 수립과도 같은 시도도 진행 되고 있다.<sup>14)</sup>

3.2. 부탄올의 생산

에탄올 생성과 더불어 부탄올의 생성에 대한 연구가 최근 들어 다시 주목 받고 있다. 연료로서 부탄올은 에탄올에 비해 높은 에너지를 가지고, 낮은 함수율을 가지며, 기존의 자동차의 엔진의 수정 없이 바로 상용할 수 있는 등

Table 2. Potential fermentable sugar production from Canadian waste biomass generated in 2001<sup>16)</sup>

	Hemicellulose + cellulose(%DBM)	Average hemicelluloses + cellulose(%DBM)	Total recoverable biomass(Mt/year)	Average recoverable delignified substrate(Mt/year)	Potential fermentable sugar production(Mt/year)
Cattle manure					
Dairy	39.6				
Beef	39.3	38.2	34	13.0	3.8
Feedlot	35.6				
Swine manure					
Nursery	35.1				
Grower	34.4	34.4	22	7.6	2.1
Finisher	33.7				
Poultry manure					
Chick starter	26.8				
Pullet grower	29.2				
17-40 weeks	32.2	28.8	2	0.6	0.16
Post-molt	27.1				
Sludges and Biosolids	76.8	76.8	0.4	0.3	0.16
Total				21.5	6.22



의 장점이 있어서,<sup>84)</sup> 디젤과 등유의 대체물로 부탄올의 필요성이 제기되고 있고, 부탄올의 휘발유 대체제로서의 우수성에 관한 사실이 보고되고 있다.<sup>85)</sup> 미생물에 의한 부탄올 발효는 2007년 미국의 DuPont사와 영국의 BP사에서 연료 생산을 위한 부탄올의 발효의 시작을 공고하면서 더 많은 관심을 받고 있다.<sup>86,87)</sup> 바이오부탄올은 주로 *Clostridium* 속 균주의 혐기성 발효의 최종 산물로 생산되며 특히 용매 생성 단계를 가지는 *Clostrida*인 *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, 그리고 *Clostridium saccharobutylicum* 에 의한 부탄올 생성연구가 진행되고 있다.<sup>88,89)</sup>

부탄올의 생성은 유기산 생성 단계와 용매 생성 단계로 나누어지는 대사경로에 의해 이루어진다. 가장 잘 알려진 부탄올 생성균인 *C. acetobutylicum*의 발효 대사경로는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 균의 생육단계에 따라서 유기산 생성 단계에서는 butyrate, acetate, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> 등이 주로 생성되고, ethanol, acetoin, lactate가 배양조건에 따라 소량 생성된다. 이러한 대사산물의 구성은 대수증식기를 지나면서 용매 생성 단계로 변화하여 분비된 유기산들이 흡수되어 부탄올과 아세톤으로 전환된다(Fig. 5).

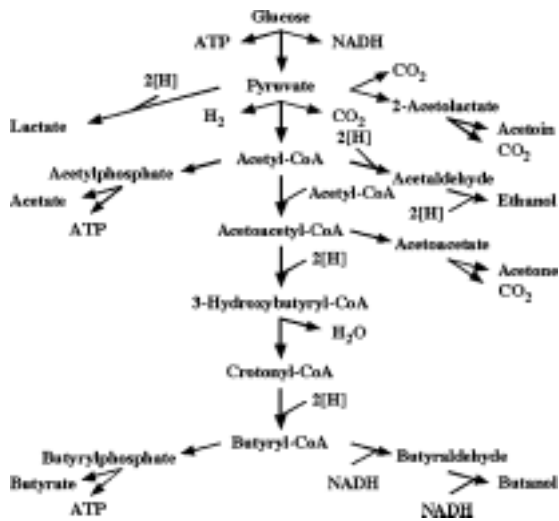


Fig. 4. Fermentation pathways employed by *Clostridium acetobutylicum*.<sup>88)</sup>

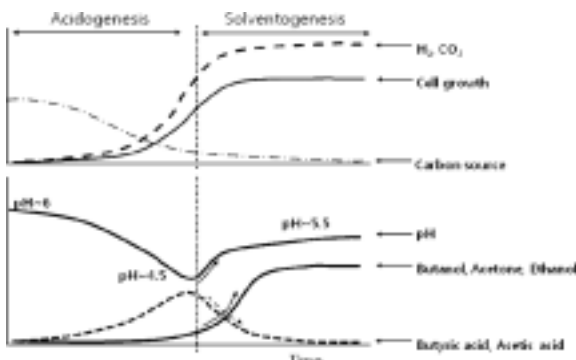


Fig. 5. Shift of metabolites in *Clostridium* sp. from acidogenesis to solventogenesis.

발효에 의한 부탄올 생산은 화석원료로부터 부탄올이 값싸게 만들어지기 전에는 많은 나라에서 시도되었다.<sup>90)</sup> 옥수수 유청과 당밀을 이용한 부탄올 생성에서의 경제성에 관한 연구에서, 바이오 부탄올의 증류에 의한 회수는 석유 화학 경로에 비해 경제성이 없으므로 나타났지만, 균주 개량으로 부탄올 생산성이 향상된 *C. beijerinckii* BA101 이나 *C. acetobutylicum* P260을 사용하여 가수분해된 농업부산물의 발효 연구에서 농업 부산물이나 폐기물로부터 부탄올의 상업적 생성가능성이 조금씩 개선되었다.<sup>91-93)</sup>

바이오부탄올 가격은 발효에 사용되는 기질 가격에 직접적인 영향을 받음으로 인해,<sup>94)</sup> 유기성 폐기물을 이용한 부탄올 생성연구가 꾸준히 진행되고 있다. 1990년대 오스트리아에서 폐기된 토마토를 이용한 연속 발효를 통하여 부탄올 생산의 경제적 가능성을 증명하였다.<sup>95)</sup> Qureshi 등은 밀짚의 가수분해에 의해 부탄올 생산성이 214%로 증가됨을 보고하는 등 다양한 폐자원을 이용한 부탄올 생성연구를 수행하여 과수원 폐기물, 곡물 섬유질, 밀짚 등의 농업 유래의 폐유기물을 이용한 부탄올 생성을 보고하였다.<sup>96-98)</sup> 또한 소련에서는 폐농산물 유래의 lignocellulose의 가수분해 산물이 포함된 기질을 이용한 부탄올 생산 연구가 진행 중이다.<sup>99)</sup>

섬유소가 많은 농업부산물은 용매 생성 단계를 가지는 *Clostrida*에 의해 잘 분해 되지 않는다. 농업부산물을 이용한 부탄올 생성을 위해서는 전처리와 가수분해로 유기물의 분해가 선행되어야 하는데 이러한 전처리 과정에서 미생물 생육저해 물질이 생성되게 된다. Ferulic acid와 p-coumaric acid 같은 *Clostridia* 생육 저해 물질이 부탄올 생성에 미치는 영향과 제거에 관한 연구도 진행 중이다.<sup>100,101)</sup>

본 연구팀에서는 *C. acetobutylicum* 824을 이용한 부탄올 생성 및 추출연구에서 연속추출에 의해 부탄올의 생성이 증가됨을 증명하였다.<sup>102)</sup> 또한 *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4을 이용하여 음식물류 폐기물로부터 부탄올 생성연구를 진행하고 있다. 효소로 전 처리한 음식물류 폐기물의 경우 발효에 의해 28.5 g butanol/100 g hexose 부탄올 생성을 확인할 수 있었다.<sup>103)</sup>

DuPont와 BP같은 세계 주요 기업이 바이오 부탄올에 투자하는 현시점에서, 당이나 전분 등을 이용한 부탄올 생산이 상업 발효로 시작되겠지만, 궁극적으로는 경제성 측면에서 농업폐기물이나 음식물폐기물 같은 유기성 폐기물이 부탄올 발효의 기질로 이용될 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Goldemberg, J. and Johansson, T. B., "World Energy Assessment Overview: 2004 Update," New York: United Nations Development Programme(2004).
2. Goldemberg, J., "Ethanol for a sustainable energy future," *Science*, **315**, 808~810(2007).
3. Lee, S. Y., Park, J. H., Jang, S. H., Nielsen, L. K., Kim, J., Jung, K. S., "Fermentative butanol production

- by *Clostridia*,” *Biotechnol. Bioeng.*, **101**(2) 209~228(2008).
4. Service, R. F., “Cellulosic ethanol: Biofuel researchers prepare to reap a new harvest,” *Science*, **315**, 1488~1491(2007).
  5. Himmel, M. E., Ding, S.-Y., Johnson, D. K., Adney, W. S., Nimlos, M. R., John, W., Brady, J. W., Foust, T. D., “Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production,” *Science*, **315**, 804~807(2007).
  6. Wyman, C. E., “What is(and is not) vital to advancing cellulosic ethanol,” *Trends in Biotechnol.*, **25**(4) 153~157(2007).
  7. Chung, C.-H., “Cellulosic ethanol production,” *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **23**(1), 1~7(2008)
  8. 한효정, 리홍신, 김성준 “음식물 쓰레기 동시당화 발효에 의한 에탄올 생산,” *한국생물공학회지*, **21**(6), 474~478(2006).
  9. 문희천, 김구환, 이진경, 김동기, 박익범, 허종원 “음식물쓰레기의 효소 당화 및 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC7을 이용한 에탄올 발효,” *경기도보건환경연구원보*, pp. 105~114(2006).
  10. Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C., and Nakamura, Y., “Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*,” *Biochem. Eng. J.*, **42**, 314~319(2008).
  11. Marques, S., Alves, L., Roseiro, J. C., and Girio, F. M., “Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*,” *Biomass Bioenergy*, **32**, 400~406(2008).
  12. Tang, Y. Q., Koike, Y., Liu, K., An, M.-Z., Morimura, S., Wu, X.-L., and Kida, K., “Ethanol production from kitchen waste using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7,” *Biomass Bioenergy*, **32**, 1037~1045(2008).
  13. Oleskowicz-Popiel, P., Lisiecki, P., Holm-Nielsen, J. B., Thomsen, A. B., and Thomsen, M. H., “Ethanol production from maize silage as lignocellulosic biomass in anaerobically digested and wet-oxidized manure,” *Bioresour. Technol.*, **99**, 5327~5334(2008).
  14. Hahn-Hägerdal, B., M. Galbe, M. F., Gorwa-Grauslund, Lide’n G., and G. Zacchi “Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today,” *Trends. Biotechnol.*, **24**(12), 549~556(2006).
  15. Sun, Y. and Cheng, J., “Hydrolysis of lignocellulosic material for ethanol production: a review,” *Bioresour. Technol.*, **83**, 1~11(2002).
  16. Champagne, P., “Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues: A Canadian perspective Feasibility of producing bio-ethanol from waste residues in Canada,” *Resour. Conserv. Recycling*, **50**, 211~230(2007).
  17. Millet, M. A., Baker, A. J., and Scatter, L. D., “Physical and chemical pretreatment for enhancing cellulose saccharification,” *Biotechnol. Bioeng.*, **6**, 125~153(1976).
  18. Shafizadeh, F. and Bradbury, A. G. W., “Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures,” *J. Appl. Polym. Sci.*, **23**, 1431~1442(1979).
  19. Fan, L. T., Gharpuray, M. M., and Lee, Y. H., *Cellulose hydrolysis biotechnology monographs*, Berlin: Springer; p. 57(1987).
  20. McMillan, J. D., “Pretreatment of lignocelluloses biomass,” In: Himmel, M. E., Baker, J. O., Overend, R. P., Eds. *Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol*, Washington, DC: American Chemical Society Symposium; pp. 292~324(1994).
  21. Holtzapple, M. T., Humphrey, A. E., and Taylor, J. D., “Energy requirement for the size reduction of poplar and aspen wood,” *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 207~210(1989).
  22. Nakamura, Y. and Sawada, T., “Ethanol production from artificial domestic household waste solubilized by steam explosion,” *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **8**, 205~209(2003).
  23. Mes-Hartree, M., Dale, B. E., and Craig, W. K., “Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 462~468(1988).
  24. Holtzapple, M. T., Lundeen, J. E., and Sturgis, R., “Pretreatment of lignocellulosic municipal solid waste by ammonia fiber explosion(AFEX),” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34/35**, 5~21(1992).
  25. Reshamwala, S., Shawky B. T., and Dale, B. E., “Ethanol production from enzymatic hydrolysis of AFEX-treated coastal Bermuda grass and switchgrass,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **51/52**, 43~55(1995).
  26. Tengerdy, R. P., and Nagy, J. G., “Increasing the feed value of forestry waste by ammonia freeze explosion treatment,” *Biol. Wastes*, **25**, 149~153(1988).
  27. Dale, B. E., Henk, L. L., and Shiang, M., “Fermentation of lignocellulosic materials treated by ammonia freeze-explosion,” *Dev. Ind. Microbiol.*, **26**, 223~233(1984).
  28. Dale, B. E. and Moreira, M. J., “A freeze-explosion technique for increasing cellulose hydrolysis,” *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 31~43(1982).
  29. Ben-Ghedalia, D. and Miron, J., “The effect of combined chemical and enzyme treatment on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw,” *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 823~831(1981).
  30. Neely, W. C., “Factors affecting the pretreatment of biomass with gaseous ozone,” *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 59~65(1984).
  31. Ben-Ghedalia, D. and Shefet, G., “Chemical treatments for increasing the digestibility of cotton straw,” *J. Agric. Sci.*, **100**, 393~400(1983).

32. Vidal, P. F. and Molinier, J., "Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust," *Biomass*, **16**, 1~17(1988).
33. Sivers, M. V. and Zacchi, G., "A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine," *Bioresour. Technol.*, **51**, 43~52(1995).
34. Esteghlalian, A., Hashimoto, A. G., Fenske, J. J., and Penner, M. H., "Modeling and optimization of the dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass," *Bioresour. Technol.*, **59**(2/3), 129~136(1997).
35. Lloyed, T. A. and Wyman, C. E., "Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids," *Bioresour. Technol.*, **96**, 1967~1977(2005).
36. Hinman, N. D., Schell, D. J., Riley, C. J., Bergeron, P. W., and Walter, P. J., "Preliminary estimation of the cost of ethanol production for SSF technology," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **34/35**, 639~649(1992).
37. Hsu, T. A., "Pretreatment of biomass," In: Wyman, C. E., Ed. *Handbook on bioethanol production and utilization*, Applied Energy Technology Series. Washington, DC: Taylor & Francis(1996).
38. Wyman, C. E., Dale, B. E., Elander, R. T., Holtzapple, M., Ladisch, M. R., and Lee, Y. Y., "Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies," *Bioresour. Technol.*, **96**, 1959~1966(2005).
39. Schurz, J. and Ghose, T. K., Eds. *Bioconversion of cellulosic substances into energy chemicals and microbial protein symposium proceedings*, p. 37(1978).
40. Hatakka, A. I. and Uusi-Rauva, A. K., "Degradation of <sup>14</sup>C-labelled poplar wood lignin by selected white-rot fungi," *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 235~242(1983).
41. Boominathan, K. and Reddy, C. A., "cAMP-mediated differential regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*," *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A* **89**(12), 5586~5590(1992).
42. Blanchette, R. A., "Delignification by wood-decay fungi," *Annu. Rev. Phytopathol.*, **29**, 381~398(1991).
43. Heitz, M., Capek-Menard, E., Korberle, P. G., Gange, J., Chornet, E., and Overend, R. P., "Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology," *Bioresour. Technol.*, **25**, 23~32(1991).
44. Gollapalli, L. E., Dale, B. E., and Rivers, D. M., "Predicting digestibility of ammonia fiber explosion(AFEX)-treated rice straw," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **98-100**, 23~35(2002).
45. Varga, E., Szengyel Z., and Réczey, K., "Chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **98-100**, 73~87(2002).
46. van Walsum, G. P., Allen, S. G., Spencer, M. J., Laser, M. S., Antal M. J., and Lynd, L. R., "Conversion of lignocellulosics pretreated with liquid hot water to ethanol," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **57-58**, 157~170(1996).
47. Wood, T. M. and Saddler, J. N., "Increasing the availability of cellulose in biomass material," *Meth. Enzymol.*, **160**, 3~11(1988).
48. Coughlan, M. P., Ljungdahl, L. G., "Comparative biochemistry of fungal and bacterial cellulolytic enzyme system," In: Aubert, J. P., Beguin, P., Millet, J., Eds. *Biochemistry and genetics of cellulose degradation*. London: Academic Press, pp. 11~30(1988).
49. Duff, S. J. B. and Murray, W. D., "Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review," *Bioresour. Technol.*, **55**, 1~33(1996).
50. Ramos, J. P., Breuil, C., and Saddler, J. N., "The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma cellulases*," *Enzyme. Microb. Technol.*, **15**, 19~25(1993).
51. Saxena, A., Garg, S. K., and Verma, J., "Simultaneous saccharification and fermentation of waste newspaper to ethanol," *Bioresour. Technol.*, **39**, 13~15(1992).
52. Zheng, Y. Z., Lin, H. M., and Tsao, G. T., "Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion," *Biotechnol. Prog.*, **14**, 890~896(1998).
53. Larsson, S. Quintana-Sáinz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.-O., and Jönsson, L.J., "Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **84-86**, 617~632(2000).
54. Ballesteros, I., Ballesteros, M., Cabanas, A., Carrasco, J., Martin, C., and Negro, M. J., "Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation(SSF) of cellulose to ethanol," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28/29**, 307~315(1991).
55. Hacking, A. J., Taylor, I. W. F., and Hanas, C. M., "Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 361~363(1984).
56. Dien, B. S., Cotta, M. A., and Jeffries, T. W., "Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 258~266(2003).
57. Jeffries, T. W., "Engineering yeasts for xylose metabolism," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **17**, 1~7(2006).
58. 김남천, 장병만, "삼중염을 이용한 음식물쓰레기 퇴비의 염분(NaCl) 분해 방법," *유기물자원화*, **12**(3), 86~94(2004).
59. Mahmoud, K. T., Tarek, M. E-N., and Osama, H. S., "Ethanol from lactose in salted cheese whey by recom-

- binant *Saccharomyces cerevisiae*,” *Z. Lebensm Unters Forsch*, **208**, 60~64(1999).
60. Trainotti, N. and Stambuk, B. U., “NaCl stress inhibits maltose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnol. Lett.*, **23**, 1703~1704(2001).
  61. Hollatz, C. and Stambuk, B. U., “Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* maltose fermentation by cold temperature and CSF1,” *Brazil. J. Microbiol.*, **34**(1), 99~101(2003).
  62. Zhang, M., Eddy, C., Daenda, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S. K., “Metabolic engineering of a pentose pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*,” *Science*, **267**, 240~243(1995).
  63. Bolen, P. L., Bietz, J. A., and Detroy, R. W., “Aldose reductase in the yeast *Pachysolen tannophilus*: purification, characterization, and N-terminal sequence,” *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 129~148(1985).
  64. Ho, N. W. Y., Lin, F. P., Huang, S., Andrews, P. C., and Tsao, G. T., “Purification, characterization and N-terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*,” *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **12**, 33~39(1990).
  65. Verduyn, C., Jzn, J. F., Van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A., “Multiple forms of xylose reductase in *Pachysolen tannophilus* CBS 4044,” *FEMS Microbiol. Lett.*, **30**, 313~317(1985a).
  66. Verduyn, C., Van Kleef, R., Frank, J. J., Schreuder, H., Van Dijken, J. P., and Scheffers, W. A., “Properties of the NAD(P)Hdependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*,” *Biochem. J.*, **226**, 669~677(1985b).
  67. Henderson, B., Champagne, P., and Tudoret, M. J., “Chemical separation of cellulose from lignin in sugarcane bagasse,” In: *Eighth Specialty Conf.: Environment & Sustainable Engineering & 31st Annual CSCE Congress Proc.*; p. ENK-283(2003).
  68. Levy, T., Champagne, P., Tudoret, M. J., and Dinel, H., “Bio-chemical integrated recycling of hog manure,” In: *Eighth Spec. Conf.: Environment & Sustainable Engineering & 31st Annual CSCE Congress Proc.*; p. ENK~284(2003a).
  69. Levy, T., Champagne, P., Tudoret, M. J., and Dinel, H., “Feasibility study on the recovery of commodity chemicals & agriproducts from hog manure,” In: *18th Int. Conf. Solid Waste Technology & Management*(2003b).
  70. Champagne, P., Levy, T., and Tudoret, M. J., “Recovery of value-added products from hog manure-a feasibility study,” *J. Solid. Waste. Technol. Manage.*, **31**(3), 147~157(2005).
  71. Li, C. and Champagne, P., “Feasibility of using waste materials as feedstocks for ethanol production,” *Int. J. Solid. Waste. Technol. Manage.*, **31**(2), 93~101(2005a).
  72. Li, C. and Champagne, P., “Enzymatic hydrolysis of cellulose from various waste sources and their feasibility as feedstocks for ethanol production,” In: *20th International Conference on Solid Waste Technology and Management*(2005b).
  73. Kim, S. and Dale, B. E., “Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues,” *Biomass Bioenergy*, **26**, 361~375(2004).
  74. Cuzens, J. C. and Miller, J. R., “Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production,” *Renewable Energy*, **10**, 285~290(1997).
  75. Zayed, G. and Meyer, O., “The single-batch bioconversion of wheat straw to ethanol employing the fungus *Trichoderma viride* and the yeast *Pachysolen tannophilus*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 551~555(1996).
  76. Rivers, D. B. and Emert, G. H., “Factors affecting the enzymatic hydrolysis of bagasse and rice straw,” *Biol. Wastes*, **26**, 85~95(1988).
  77. Wen, Z., Liao, W., and Chen, S., “Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production,” *Biores. Technol.*, **91**, 31~39(2004).
  78. Chen, S., Liao, W., Liu, C., Wen, Z., Kincaid, R. L., and Harrison, J. H., “Use of animal manure as feedstock for bio-products,” In: *Proceedings of Ninth International Animal, Agricultural and Food Processing Wastes Symposium*, p. 50~57(2003).
  79. Chen, S., Liao, W., Liu, C., Wen, Z., Kincaid, R. L., and Harrison, J. H., “Value-added chemicals animal manures,” Northwest Bioproducts Research Institute Technical Report. US Department of Energy Contract DE-AC06-76RLO 1830, pp. 135(2004).
  80. Aden, A., Ruth, M., Ibsen, K., Jechura, J., Neeves, K., Sheehan, J., Wallace, B., Montague, L., Slayton, A., and Lukas J., “Lignocellulosic biomass to ethanol processing design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover,” National Renewable Energy Laboratory Technical Report NREL/TP-510-32438(2002)(<http://www.nrel.gov/docs/fy02osti/32438.pdf>).
  81. <http://www.iogen.ca/>.
  82. <http://www.abengoabioenergy.com>.
  83. <http://www.etek.se>.
  84. Dürre, P., “Biobutanol: an attractive biofuel,” *Biotechnol. J.*, **2**, 1525~1534(2007).
  85. Schwarz, W. H. and Gapes, J. R., “Butanol-rediscovering a renewable fuel,” *BioWorld Europe 01-2006*, 16~19(2006).
  86. Antoni, D., Zverlov, V. V., and Schwarz, W. H., “Biofuels from microbes,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 23~35(2007).

87. [http://www2.dupont.com/Biofuels/en\\_US/](http://www2.dupont.com/Biofuels/en_US/).
88. Dürre, P., "Fermentative butanol production: bulk chemical and biofuel," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1125**, 353~362(2008).
89. Kosaka, T., Nakayama, S., Nakaya, K., Yoshino, S., and Furukawa, K., "Characterization of the sol operon in butanol-hyperproducing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4 and its degeneration mechanism," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 58~68(2007).
90. Gapes, J. R., "The economics of acetone-butanol fermentation: theoretical and market considerations," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 27~32(2000).
91. Ezeji, T. C., Qureshi, N., Karcher, P., and Blaschek, H. P., "Butanol production from corn," In *Alcoholic Fuels: Fuels for Today and Tomorrow*, Minter, S.D. Ed., New York, NY: Taylor & Francis, pp. 99~122(2006).
92. Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P., "Industrially relevant fermentations," In *Handbook on Clostridia*, Durre P. Ed., Boca Raton, Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 797~812(2005).
93. Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P., "Bio-production of butanol from biomass: from genes to bioreactors," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**, 220~227(2007).
94. Qureshi, N. and Blaschek, H. P., "Economics of butanol fermentation using hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101," *Trans. IChemE.*, **78**, 139~144(2000).
95. Nimcevic, D. and Gapes, J. R., "The acetone-butanol fermentation in pilot plant and pre-industrial scale," *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 15~20(2000).
96. Qureshi, N. and Blaschek, H. P., "Butanol production from agricultural biomass," In *Food Biotechnology*, Shetty, K., Pometto, A., Paliyath, G. Eds., Boca Raton, FL: Taylor & Francis Group plc, pp. 525~551(2005).
97. Qureshi, N., Ebener, J., Ezeji, T. C., Dien, B., Cotta, M. A., and Blaschek, H. P., "Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101. Part I: Use of acid and enzyme hydrolysed corn fiber," *Bioresour. Technol.*, **99**, 5915~5922(2008).
98. Qureshi, N., Saha, B. C., Hughes, S. R., and Cotta, M. A., "Production of acetone butanol(AB) from agricultural residues using *Clostridium acetobutylicum* in batch reactors coupled with product recovery," *Ninth International Workshop and Conference on the Regulation of Metabolism, Genetics and Development of the Solvent and Acid Forming Clostridia*, Rice University, Houston, pp. 18~21(2006).
99. Zverlov, V. V., Berezina, O., Velikodvorskaya, G. A., and Schwarz, W. H., "Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71**, 587~597(2006).
100. Ezeji, T. C., Qureshi, N., and Blaschek, H. P., "Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation," *Biotechnol. Bioeng.*, **97**, 1460~1469(2007).
101. Ezeji, T. and Blaschek, H. P., "Fermentation of dried distillers' grains and solubles(DDGS) hydrolysates to solvents and value-added products by solventogenic clostridia," *Bioresour. Technol.*, **99**, 5232~5242(2008).
102. Lee, S. M., Cho, M. O., Chung, Y. C., Sang, B. I., and Um, Y. S., "Continuous Butanol Production Using Suspended and Immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate," *Energy & fuels*, **22**, 3459~3464(2008).
103. Lee, Y.-J., Sang, B.-I., and Um, Y. S., "Biobutanol production from food waste by *Clostridium* strains," *Renewable Energy 2008*, Pusan, Korea, in press.