

## 셀룰로식 (cellulosic) 에탄올 생산

† 정 장 호

미국 루이지애나주립대학교 농산물연구센터 Audubon당연구소

(접수 : 2007. 9. 1., 게재승인 : 2008. 1. 31.)

## Cellulosic Ethanol Production

Chang-Ho Chung†

Audubon Sugar Institute, Louisiana State University Agricultural Center,  
3845 Highway 75, St. Gabriel, Louisiana 70776, U.S.A.

(Received : 2007. 9. 1., Accepted : 2008. 1. 31.)

The world demand of ethanol as an alternative fuel for gasoline is increasing rapidly because of high oil price and global climate change. Most of ethanol is currently produced from corn grain or sugars in sugarcane and sugar beet. Because these sources compete with foods and animal feed and are not expected to be enough for future demand of ethanol. Thus, cellulosic ethanol from agricultural residues or wood has to be commercialized in near future. Typical cellulosic ethanol production consists of pretreatment, enzyme hydrolysis, fermentation and product separation. This paper reviews the principles and status of each step and discusses issues for cellulosic ethanol production.

**Key Words** : Cellulose, hemicellulose, lignin, cellulosic ethanol

### 서 론

1970년대 첫 국제 오일쇼크 이후 바이오 에너지, 바이오 물질을 생산할 수 있는 자연 탄소자원인 바이오매스 (biomass)로부터 대체에너지를 얻으려는 연구가 시작되었다. 바이오매스는 대개 식물자원으로 농업부산물이나 임산물 등이 이에 속한다. 이후 오일가격이 안정되고 경제적 측면에서 그 활용 가치가 낮아짐에 따라 지속적인 연구가 이루어 지지 못하였다. 최근 수년간 중국, 인도, 그리고 브라질을 대표하는 개발도상국들의 에너지 수요 확대가 다시 국제유가를 급등시켰고 이후 2007년 하반기 현재까지 배럴 당 \$ 70이상의 고유가를 지속하고 있다. 국제 에너지 수요가 2050년에는 현재보다 50%까지 증대될 것으로 예상됨에 따라 1970년대와 같이 다시 유가가 하락하는 일은 앞으로 없을 것으로 보인다. 이런 추세라면 고유가의 지속에도 화석연료 사용은 점차 확대될 것이고 이에 따라 지구대기의 이산화탄소 배출량 또한 크게 증가할 것이며 이는 지구온난화를 가속시

킬 것이다. 이에 대처하기 위해 선진국 8개 정상들은 지난 2005년 7월에 지구온난화에 대한 국제사회의 우려에 동조하여 지구온난화의 주요원인인 온실가스를 줄일 수 있는 획기적인 방법들을 모색하기로 합의하였다. 이러한 국제적 추세는 화석연료를 대체할 자연자원으로부터 대체 에너지 연구개발에 대한 관심을 다시 고조시키고 있다. 현재는 미국과 유럽을 중심으로 바이오매스로부터 대체 에너지를 생산하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이러한 대체에너지 중 바이오 연료로 통용되는 바이오에탄올이 그 중심에 있다. 바이오 에탄올이란 일반적으로 식물을 원료물질로 하여 생산되는 에탄올을 말한다. 바이오에탄올은 크게 전분이나 설탕에서 생산되는 에탄올과 바이오매스로부터 생산되는 셀룰로식 에탄올로 구분될 수 있다. 현재 세계에 공급되는 대부분의 에탄올은 사탕수수나 사탕무로부터 얻어진 설탕이나 옥수수 전분으로부터 생산되고 있다. 이들 원료물질의 경우 가축사료나 식품에도 사용되기 때문에 에너지생산을 위한 이들 원료물질의 이용은 결국 물가를 올리는 효과가 있을뿐더러 이들 설탕과 전분자원으로는 궁극적으로 전 세계가 필요로 하는 에탄올 수요량을 충족시킬 수 없다. 예를 들면, 미국의 경우 2030년까지 2004년에 사용된 미국 전체 수송연료의 30% (약 60 billion gallons of ethanol, 2271억 리터)을 에탄올로 대체하겠다는 계획을 발표하였다. 미국 에너지국 (U.S. Department of Energy)의 추정치로는 이 2271억 리터 중 20-33% 정도

† Corresponding Author : Audubon Sugar Institute, Louisiana State University Agricultural Center, 3845 Highway 75, St. Gabriel, Louisiana 70776, U.S.A.

Tel : +1-225-642-0135, Fax : +1-225-642-8790

E-mail : cchung@agcenter.lsu.edu

의 수량은 옥수수전분으로부터 충당할 수 있을 것으로 예상하고 있으나 나머지 잔여분의 경우는 바이오매스에서 생산되는 셀룰로식 에탄올이 아니면 계획목표 달성이 어렵다고 보고 있다. 유럽의 경우도 2010년까지 석유관련 및 디젤 수송 연료의 5.75%를 바이오에탄올이나 바이오디젤과 같은 자연 재생연료로 확대하겠다는 계획을 수립해 놓고 있다. 미국이나 유럽에서 볼 수 있듯이 셀룰로식 에탄올 생산에 대한 그 중요성은 점차 증대되고 있다. 하지만 현재까지 셀룰로식 에탄올생산이 전분계 또는 설탕으로부터의 에탄올생산보다 그 경제성이 낮고 기술개발이 어렵고 생산 수율도 떨어지는 등 여러 개선되어야 할 부분들이 존재한다. 따라서 본 총설은 셀룰로식 에탄올생산에 대한 전반적인 내용을 미국을 중심으로 살펴보았으며 셀룰로식 에탄올생산의 원리, 방법과 기술 개발 시 고려되어야 할 점들을 기술하여 국내 관련 연구자의 셀룰로식 에탄올생산에 대한 이해를 돕고자 하였다.

**바이오매스 (Biomass) 구성물질**

식물 바이오매스는 오래전부터 에탄올생산을 위한 값싼 당 제공물질로 생각되어져 왔다. 식물세포벽의 기본성분은 식물고분자 탄수화물인 셀룰로스, 헤미셀룰로스라 폐늘계 중합체인 리그닌이 주 성분을 이루고 있으며 기타 식물단백질, 회분 등으로 구성되어 있다(Table 1. 참조). 식물은 보통 식물의 종류에 따라 1차 세포벽 (primary cell wall)과 2차 세포벽 (secondary cell wall)을 가질 수 있다. 1차 세포벽은 수천의 포도당 사슬이 수소결합으로 이루어진 셀룰로스가 헤미셀룰스, 기타 식물세포벽 물질과 그물망 같이 엮여져 있다. 일반 식물의 경우 셀룰로스는 셀룰로스 합성 효소인 cellulose syntase에 의하여 합성되며 β-1,4의 당 결합

으로 이루어진 수천의 포도당이 연결된 직경 3-6 나노미터의 사슬이 36개까지 뭉쳐 만들어진 미세섬유구조 (microfibril)를 하고 있다(1, 2). 이들 셀룰로스는 5탄당인 xylose가 주를 이루고 낮은 함량의 arabinose (5탄당)와 6탄당인 mannose, galactose로 이루어진 헤미셀룰로스라 연결되어 있다(Fig. 1 참조). 쉽게 이해하기 위해서는 셀룰로스는 건물구조 내의 철근과 같은 역할을 하여 식물세포벽을 지탱하는 역할을 한다고 생각할 수 있고 이러한 셀룰로스 철근들을 그물처럼 엮어주고 있는 철사들을 헤미셀룰로스라 비교할 수 있겠다. 이 헤미셀룰로스는 또한 2차 세포벽에서 리그닌과 공유결합을 이루어 세포벽을 견고하고 튼튼하게 하는데 이러한 결합들의 생성방법과 역할들은 아직 자세히 밝혀지지 않고 있다. 식물종류에 따라 세포성장이 끝난 1차 세포벽 안쪽으로 다시 2차 세포벽을 생성하기도 하며 그 중간은 보통 펙틴이 풍부한 물질로 채워져 있다. 이러한 세포벽들에 포함되어 있는 리그닌은 식물세포의 식물 탄수화물을 중형으로 결합하며 공간을 채우고 식물 구조를 견고하게 한다. 동시에 수분이나 다른 외부의 생물학적 공격을 막아내는 방어물질로 셀룰로식 에탄올 생산과정 중 효소분해를 방해하기도 한다. 여러 종류의 식물종류의 구성비가 Table 2에 예시되었다. 이러한 구성성분들로 이루어진 식물체의 결합구조는 복잡하고 분해하기 어렵기 때문에 현재까지도 식물체로부터 식물 고분자 탄수화물인 셀룰로스, 헤미셀룰로스를 분해해서 발효가 가능한 단당으로 까지 분해할 수 있는 경제적 기술개발이 지체되고 있기도 하다. 따라서 식물구조에 대한 합성경로의 이해나 화학적 결합 형태 등의 광범위한 분자학적 이해가 병행되어야 효율적인 방법으로 식물탄수화물 고분자인 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 분리, 분해하여 에탄올을 생산할 수 있는 방법을 찾을 수 있을 것이다.

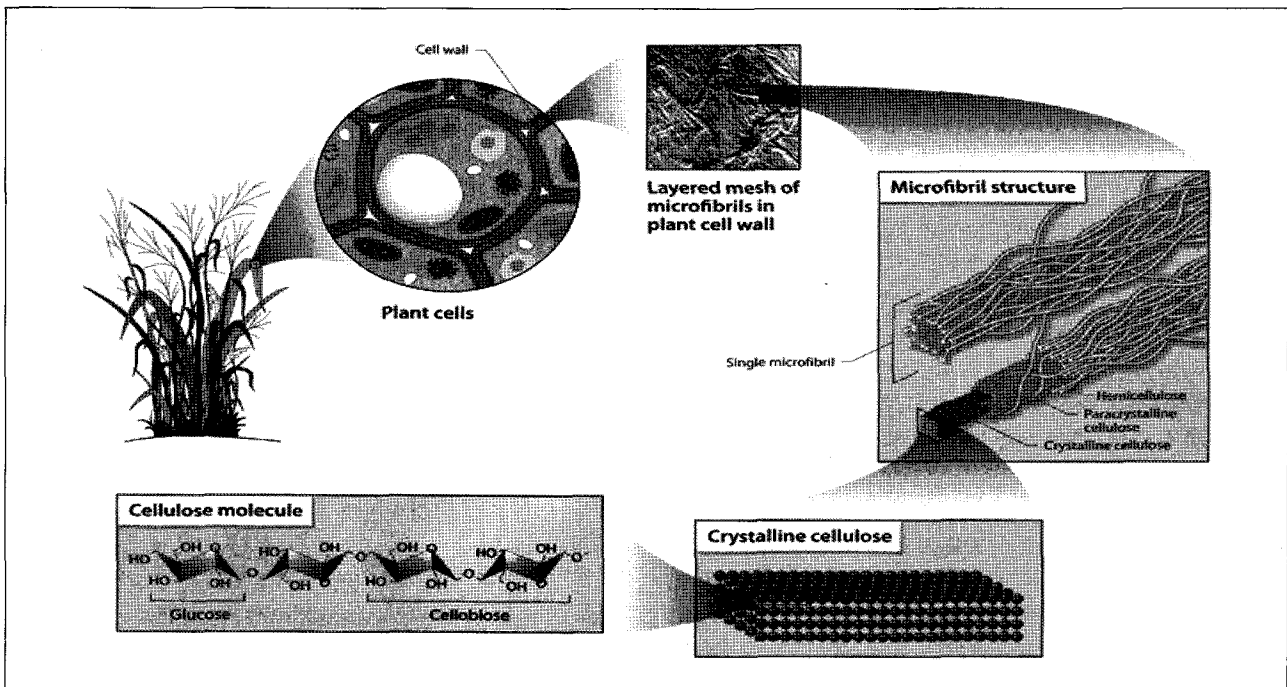


Figure 1. Cellulose structure (adapted from <http://genomicsgtl.energy.gov/benefits/cellulosicethanol.shtml>, accessed in Aug 2007).

**Table 1.** Major components of biomass and its properties

구성물질 (Component)	특 성 (Properties)	중합도 (Degree of polymerization)
셀룰로스 (cellulose)	포도당 중합체, β-1,4 결합되어 선형 microfibril을 이루고 선형구조가 다시 수소결합을 가진 결정구조	300 - 15,000
헤미셀룰로스 (hemicellulose)	xylose이 주요성분이며 이외 소량의 arabinose, mannose, galactose 등도 포함, 분지형 (branched) 구조	70 - 200
리그닌 (lignin)	Coniferyl, coumaryl, sinapyl 알 톨의 중합체로 복잡한 구조를 가진 polyphenolic 물질	

**Table 2.** Composition of lignocellulosic feedstocks (3, 4)

	Percent (% , dry weight)		
	Cellulose (glucan)	Hemicellulose (xylan)	Lignin
Corn fiber*	14.3	16.8	8.4
Corn cob	45.0	35.0	12.0
Corn stover	37.5	22.4	17.6
Rice straw	35.0	25.0	12.0
Wheat straw	38.2	21.2	23.4
Sugarcane bagasse	40.0	24.0	25.0
Switchgrass	31.0	20.4	17.6
Coastal burmuda grass	25.0	35.0	6.0
Pine wood	46.4	8.8	29.4
Popular	49.9	17.4	18.1
Office paper	68.6	12.4	11.3

\* 20% 전분을 포함하고 있음.

**셀룰로식 (cellulosic) 에탄올 생산과정**

바이오매스로 부터 셀룰로식 에탄올을 생산하는 생물학적 방법은 석유정제과정에 비교될 수 있는 바이오정제과정을 통해 생산될 수 있다. 이는 식물구조내의 고분자 물질들, 즉 셀룰로스, 헤미셀룰로스, 그리고 리그닌을 어떻게 효율적으로 분리될 수 있도록 하는 전처리 과정, 분리된 탄수화물 고분자 물질인 셀룰로스와 헤미셀룰로스로부터 화학적 또는 효소분해를 통해 발효가 가능한 단당으로 전환하는 당화과정, 알코올 발효효모나 다른 미생물을 이용하여 생성된 단당들을 에탄올로 전환하는 발효과정, 생산된 에탄올을 증류하여 판매가 가능한 에탄올로 만들어 내는 분리정제과정으로 나누어진다. 이러한 셀룰로식 에탄올 생산 공정은 상업적 이득을 가져올 수 있도록 설계 되어야 하며 현재까지는 전분이나 설탕으로부터 생산되는 에탄올의 생산단가에 미치지 못하고 있는 실정이다(Table 3. 참조). 이는 초기 시설비용이 비싸고, 여러 생산단계를 거쳐야하는 공정의 복잡성과 높은 노동력, 그리고 낮은 수율 때문이다. 미국의 경우, 대대적인 연구지원과 세계 혜택을 통해 2012년까지 셀룰로식 에탄올을 전분계 에탄올과 경쟁이 가능하도록 만들기 위한 계획을 세워놓고 이에 대한 지원들을 진행하고 있다.

**Table 3.** Comparisons of ethanol from starch vs. cellulotics (5)

	전분계 에탄올	cellulosic 에탄올
에탄올 *겔린당 초기시설비용	US \$ 1.25-1.50	\$ 4.30-5.44
공정의 복잡성	간단함	복잡함
에탄올 겔린당 효소비용	US \$ 0.03	\$ 0.30-0.50
부산물	단백질과 기름	전기 (연소를 통한)
공정에 쓰이는 에너지	천연가스와 전기	연소를 통해 자족가능
에탄올 최종 농도 (% , w/v)	14-20	4
발효시간 (일)	2	5-7
공정투입 노동력의 필요강도	낮음	높음
에탄올 겔린생산당 처리비용	US \$ 1.10	대략 전분계 보다 2배
건조톤당 생산가능 에탄올량 (단위 : 겔린)	98	70-80
원료물질 수송비용	낮음	높음

\* 1 겔린 = 3.875 liter.

**전처리과정 (pretreatment)**

이미 설명한 바와 같이 식물인 바이오매스의 구조가 견고하기 때문에 처리가 되지 않은 상태로는 셀룰로스나 헤미셀룰로스가 존재하는 식물구조내로 분해효소가 침투하기 힘들고 이들 물질들을 분해하기 또한 어렵다. 따라서 이들 결합구조를 약하게 하는 방법이 필요한데 이를 셀룰로식 에탄올 생산을 위한 전처리 (pretreatment) 과정이라 한다. 이상적인 전처리 방법은 리그닌을 분해하여 함량을 줄이고 분리가 쉽고 셀룰로스와 헤미셀룰로스는 파괴 없이 전처리과정을 거쳐 효소분해가 쉽도록 만들 수 있도록 하여야 한다. 이러한 전처리과정은 셀룰로식 에탄올 생산에 있어 가장 비용이 많이 드는 과정중의 하나로 현재 약 미국 통화기준으로 대략 cellulose 에탄올 1 겔린당 30센트 정도의 비용이 드는 것으로 보고되고 있다. 전처리의 종류에는 강산을 희석하여 고온 처리하는 방법에서부터 강알칼리를 사용하는 방법에 이르기까지 매우 다양하다. 일반적 전처리 방법을 종류대로 분류한다면 화학적 방법, 물리적 방법과 두 방법이 혼합된 방법, 생화학적 방법 등으로 구분할 수 있으나 그 경계가 분명하지 않을 수도 있다.

**물리적 방법**

물리적 전처리 방법에는 chipping, grinding, shearing 그리고 milling과 같은 여러 종류의 기계적 분쇄법이 있는데 이 방법은 식물물질의 크기를 줄이는 동시에 효소가 반응할 수 있는 표면적을 넓히는 목적이 있다(6). 이러한 방법들은 어느 정도 셀룰로스의 결정구조를 파괴하기도 하지만 처리비용이 비싸고 다른 방법의 도움이 없이는 리그닌이나 헤미셀룰로스를 효과적으로 분리하거나 차후 효소분해가 증대되도록 구조를 변화시키지 어려운 단점이 있다.

**화학적 방법**

산처리법: 바이오매스 전처리법 중 가장 많이 사용되는 방법으로 인산, 황산, 염산, peracetic, nitric 산등 여러 종류의 산 처리법들이 제안되기도 하였으나 일반적으로 공업적으로 값싼 농축 황산을 희석하여 고온에서 처리하는 황산희석법이 현재로는 가장 경제성이 높고 공정이 간단한 방법으로 거론

되고 있다(7). 일반적으로 이 처리법은 산을 바이오매스와 섞어 고온(보통 160-220°C 사이)으로 수조에서 수분에 걸쳐 반응하게 하는 것이다. 희석된 황산을 바이오매스와 섞게 되면 헤미셀룰로스의 경우 산분해에 의하여 xylose와 같은 단당으로 분해되며 경우에 따라 furfural물질까지 분해되기도 하는데 이 방법으로 공업용 furfural들을 제조하기도 한다(8). 하지만 이렇게 생성된 furfural 화합물들이 효소와 미생물의 활성저해물질들이기 때문에 셀룰로식 에탄올 제조에는 바람직하지 않다. 산을 이용한 전처리 방법은 일반적으로 헤미셀룰로스의 함량을 낮추고 처리강도가 심하게 되면 셀룰로스의 함량까지도 낮추는 단점을 또한 가지고 있다. 위에서 언급하였듯이 효소반응과 발효저해물질들을 생성하기 때문에 차후 calcium hydroxide와 같은 알칼리 물질을 이용하여 효소활성 물질들을 제거하고 중화하는 과정을 거쳐야 한다.

**알카리법 :** 알카리처리법의 경우는 보통 산처리법 보다 낮은 온도에서 실행되며 심지어 실온에서도 수행되기도 하는데 수 시간에서 수일에 걸치는 반응시간이 필요하다. Sodium, potassium, calcium, ammonium hydroxide 등 여러 종류의 알칼리들이 사용되었으며 이중 Sodium hydroxide가 가장 많이 사용되었다. 알카리의 경우는 우선 리그닌을 제거하는데 효과적이고 헤미셀룰로스의 아세틸기나 uronic과 같은 잔가지도 제거함으로 남은 헤미셀룰로스와 셀룰로스의 효소분해가 쉽다는 장점이 있으나 산처리방법에 비하여 높은 농도의 약품을 요구하고 처리비용도 비싸다는 단점을 갖고 있다. 이중 가격이 저렴한 calcium hydroxide의 경우, 바이오매스의 한 종류인 사탕수수대를 실온에서 8일 정도 처리하였을 때 효소분해능이 20%에서 72%까지 증대한다는 보고도 있다(9). 암모니아의 경우도 다량의 액체 암모니아를 바이오매스와 섞어 상대적으로 낮은 온도(80-120°C 사이)에서 고압으로 반응시킨 후 대기압으로 폭발시키는 방법(10)과 액체 암모니아를 순환시키며 바이오매스에 반응시키는 방법(11)도 제안되기도 하였다. 이러한 암모니아 방법은 리그닌과 반응하여 리그닌을 분해하고 리그닌과 탄수화물 결합부위를 절단함으로 효소가 식물구조 내에서 반응하기 쉽게 만들지만 사용되는 암모니아의 공급가격이 너무 높아 매우 높은 재활용이 담보되지 않을 경우 경제성이 낮은 단점이 있다.

**산화법 :** 과산화수소(12)나 오존(13)와 같은 강산화제를 이용하여 리그닌을 분해하여 효소반응의 효율을 크게 하는 방법으로 일반적으로 처리비용이 높다

#### 물리, 화학적 방법

물을 이용한 전처리 방법에는 증기폭발법(steam explosion)과 액체열수법(liquid hot water)이 있다. 우선 이 두 방법은 산이나 알카리와 같은 화학약품을 사용하지 않아 비용이 저렴하고 처리 후 중화과정이 필요하지 않다는 장점이 있다. 하지만 일반적으로 고온고압의 반응조건이 필요하고 반응이후 헤미셀룰로스의 감소가 크고 효소저해물질이 생성되는 단점을 가지고 있다. 증기폭발법은 바이오매스를 담은 반응조에 고압의 증기를 넣어 일정시간 반응시킨 후 대기압 상태로 노출시켜 폭발과 동시에 전처리된 바이오매스를 회수하는 방법이다. 이 방법은 헤미셀룰로스의 분해를 증대시킨다.

이는 헤미셀룰로스에 포함된 아세틸기가 유리되면서 생성되는 아세트산과 고온에서 물 자체가 산 역할을 함에 따라 산 처리와 같은 역할을 하기 때문이다(14). 액체열수법은 고압을 이용하여 고온(140-230°C)에서도 증기상태가 아닌 물을 액체상태로 유지하여 물 유체를 이용하여 바이오매스와 순방향(current), 역방향(count current) 또는 바이오매스를 통과(flow through)하여 전처리를 하는 방법이다.

#### 생물학적 방법

생화학적 전처리 방법은 갈색, 흰색 곰팡이를 직접 바이오매스에서 자라게 하여 이용하거나 이러한 미생물로부터 얻어진 Phenol oxidase, laccases, 과산화수소 생성효소 등과 같은 리그닌분해효소들을 이용하여 바이오매스를 처리하는 방법이다. 낮은 에너지 비용과 친환경적이라는 장점이 있으나 처리기간이 상당히 길다는 단점이 있다(15).

#### 당화과정 (saccharification)

바이오매스를 구성하고 있는 결정구조의 셀룰로스, 이와 공유결합된 헤미셀룰로스 그리고 리그닌이 전처리과정을 거쳐 그 구조가 흐트러지게 되면 이후 효소를 이용한 탄수화물 고분자 물질인 셀룰로스와 헤미셀룰로스를 분해시키는 당화(saccharification)과정을 거치게 된다. 산에 의하여 당화를 이루기도 하지만 실효성이 낮아 현재는 효소를 이용하는 방법이 많이 사용되고 있다. 복잡한 결합구조를 보다 효과적으로 분해하기 위해서는 많은 셀룰로스나 헤미셀룰로스 분해효소가 필요하다. 셀룰로스 분해효소의 경우는 종류에 따라 크게 3가지 군으로 나누어지며 각 군에는 다시 여러 종류의 효소들이 포함되어 있다. 셀룰로스의  $\beta$ -1,4 결합의 내부를 무작위로 분리하는 endo형(endoglucanase, EC 3.2.1.4), 셀룰로스의 선형말단으로부터 포도당 두 분자가 결합된 형태의 cellobiose나 cello-올리고당 형태로 분리하는 exo형(exoglucanases, EC 3.2.1.91), cellobiose를 두 분자의 각각의 포도당으로 분해하는  $\beta$ -glucosidase로 나눌 수 있다(16). 헤미셀룰로스 분해효소 경우에는 xylanase(EC 3.2.1.8.)와  $\beta$ -xylosidase(EC 3.2.1.37) 그리고 다양한 결합지 분해효소인  $\alpha$ -1-arabinofuranosidases(EC 3.2.1.55),  $\alpha$ -glucuronidases(EC 3.2.1.139), acetyl xylan esterases(EC 3.1.1.72), ferulic acid esterases(EC 3.1.1.73)과  $\alpha$ -galactosidase(EC 3.2.1.22) 등이 포함된다(17). 일반적으로 공급되고 있는 상용화된 공업용 효소제품에는 각 종류에 따라 다르기는 하지만 보통 이러한 효소들이 혼재된 형태로 공급되고 있으며 셀룰로식 에탄올 생산과정 중 전처리과정과 함께 가장 생산비용이 많이 드는 것이 효소비용이다. 하지만 최근 미국 정부의 지속적인 연구 지원을 통하여 Novozyme사나 Genencor사의 경우 그 생산비용을 5배에서 10배 이상으로 현저히 줄여 셀룰로식 에탄올 생산에 사용할 수 있는 보다 값싸고 효율이 높은 효소제품을 공급할 수 있다고 발표한 바 있다. 효소반응이 진행되게 되면 최종산물인 cellobiose, 포도당과 xylose 등이 축적되게 되고 이들 최종산물들에 의하여 셀룰로스 분해효소나 헤미셀룰로스 분해효소들이 활성저해를 받게 된다. 이러한 저해작용을 줄이기 위해 사용되는 방법이 당화(saccharification)와 발효(fermentation)를 동시에 하는 방법

(SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation)을 사용하기도 한다. 하지만 보통 상용화된 셀룰로스 분해효소들의 최적 온도가 50°C 부근이고 발효에 사용되는 대표적인 알콜효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 생육최적온도는 30°C 정도이어서 이 방법을 사용하게 되면 발효과정의 알콜발효 미생물의 생육최적온도로 온도를 낮추어야 하기 때문에 어느 정도의 효소활성 감소를 미리 감안하여야 한다. 일반적으로 당화과정의 속도나 효율은 전처리과정에서 얼마나 효과적으로 바이오매스의 결합구조를 와해시켜 효소가 복합탄수화물을 쉽게 처리하게 만드느냐에 따라 결정되며 전처리 과정이 효율적인 경우 12시간내에 70-90%의 고분자 탄수화물인 셀룰로스를 단당의 형태인 포도당으로 분해할 수 있다는 연구(18)도 있으나 일반적으로 2일에서 5일 정도의 시간이 필요하기도 하다. 미래의 셀룰로식 에탄올 공정은 비용절감을 이루기 위해 당화과정과 발효과정이 결합하는 과정으로 진행될 것이고 당화시간 또한 단축시키는 방향으로 진행될 것이다. 이러한 시도들 중 발효과정 중에 참여할 미생물의 균체표면이나 외부 분비를 통하여 당화과정에 필요한 셀룰로스 분해효소를 생산하게 하는 방법이 있는데 이는 클로닝을 이용하여 유전공학적으로 셀룰로스를 분해할 수 있는 분해효소 유전자들을 발효미생물 안에서 발현시키는 방법이 그것이다(19). 이럴 경우 효소의 첨가를 줄이거나 없앨 수 있기 때문에 처리비용을 획기적으로 줄일 수 있게 된다. 하지만 발현된 효소들의 활성이 높지 않은 실정이다. 이외에도 분자생물학적으로 아예 셀룰로스 분해효소 유전자를 식물자체의 세포벽에 내재시킨 식물을 개발하여 셀룰로스 분해효소를 발현시킬 수 있는 유도물질을 이용하여 원하는 시기에 당화를 이루는 방법들도 생각해 볼 수 있다(20).

### 발효과정 (fermentation)

당화과정을 거쳐 고분자 탄수화물인 셀룰로스와 헤미셀룰로스는 포도당과 xylose와 같은 단당의 형태로 분해되게 된다. 이들 단당들은 효모와 다른 미생물들에 의하여 에탄올로 전환되는 발효과정을 거친다. 미생물을 이용한 당 발효는 이미 주류산업이나 공업용 알콜 생산 산업에서 사용되고 있는 당에서 에탄올로의 전환과 같은 일반적인 방법을 이용한다. 다만 바이오매스에 포함된 셀룰로스 구성물질 6탄당인 포도당과 헤미셀룰로스의 주요 5탄당인 xylose를 동시에 높은 수율로 에탄올까지 전환하는 야생미생물이 현재까지 존재하지 않기 때문에, 유전자조작을 통하여 이를 이루려는 연구들이 진행되고 있다. 대표적인 예로 5탄당 발효에 관여하는 효소 (xylose reductase, xylitol dehydrogenase)의 유전자들을 *Pichia* 속에서 분리하여 *Saccharomyces cerevisiae*나 *Zymomonas mobilis* 발현시키거나 *Zymomonas mobilis*로부터 에탄올 증대를 위해 pyruvate decarboxylase나 alcohol dehydrogenase 효소의 유전자를 대장균에 발현시키는 방법(21)등이 그것이다. 이러한 연구들은 나름대로 성과를 이루고 있다. 일례로 미생물내의 산화환원에 관여하는 NADPH와 NAD<sup>+</sup>가 효과적으로 활용될 수 없는 불균형을 개선하기 위하여 NADPH의 생산을 증대시키는 NADP<sup>+</sup>-dependant D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 유전자를 집어넣거나 NADH에 더 높은 활성을 보이도록 xylose reductase 유전자 돌연변이를 이용하는 방법이 시도된

경우이다. 이런 산화환원반응의 불균형을 피하기 위해 또 다른 방법으로 xylose isomerase를 이용하여 대사산물인 xylitol에 저해를 줄이도록 aldose reductase를 제거하는 방법등도 시도되었다. 하지만 경우에 따라 유전자 조합균들이 에탄올에 대한 내성이 낮다든지, 전처리과정에서 생산되는 아세트산, 리그닌분해물, fufural 화합물과 같은 발효저해물질에 약하거나 또는 발효에 걸리는 시간이 긴 것과 같은 아직도 개선해야 할 점들이 많이 남아있다.

### 분별증류과정 (separation/ distillation)

증류과정은 끓는점이 각기 다른 화학물질들을 가열하여 낮은 온도에서 끓는 화학물질을 먼저 증기화 하고 이를 응축시켜 혼합물을 분리해내는 과정이다. 에탄올발효 용액내의 에탄올이 물에 비해 끓는점이 낮으므로 증류과정을 통해 에탄올을 분리해 낼 수 있다. 일반적으로 증류과정에 사용되는 에너지 경제성을 담보하기 위해서는 적어도 최종발효단계의 에탄올 농도가 4% (w/v) 이상이 되어야 한다고 알려져 있다(22, 23). 에탄올 농도를 높이기 위해서는 헤미셀룰로스에서 유래한 당들의 에탄올전환이 필요하다. 예를 들어 이를 포함시키지 않을 경우 바이오매스가 약 40%의 셀룰로스를 포함하고 있다고 가정하면 초기당화과정에 바이오매스의 농도가 권장기준으로 약 20% 이상을 포함하여야 하고 당화수율과 발효효율이 90% 이상을 유지하여야 한다. 이러한 수준의 효율은 초기 당화과정에 10% 이상의 바이오매스를 포함할 경우 유리수가 적어 교반이 쉽지 않고, 바이오매스 자체의 효소분해 수율도 높지 않아 쉽게 도달할 수 있는 목표가 아니다. 하지만 헤미셀룰로스를 이용하게 되면 초기 발효할 수 있는 당 농도가 높아지게 되므로 결과적으로 에탄올의 농도를 높일 수 있어 증류과정의 에너지 경제성을 가질 수 있는 에탄올 생산을 기대할 수 있다. 이외에 고려하여야 할 점으로는 증류과정에 도달하는 바이오매스 발효용액에는 전분이나 설탕을 이용한 에탄올 생산과정에 비하여 상대적으로 회분의 함량이 높기 때문에 파이프 내에 침전물이 남을 수 있는데 이 물질이 파이프 내면 벽에 쌓이게 되면 열전달을 방해하여 궁극적으로 공정수율을 낮추게 됨으로 증류를 시작하기 전에 이를 낮추기 위한 노력이 필요하다. 에탄올의 경우 96% (v/v)까지는 증류과정을 통해 생산될 수 있으나 그 이상의 농도의 에탄올 생산을 원할 경우는 molecular sieve나 벤젠과 같은 분리첨가제 (material separation agent)를 사용하여 더 높은 농도로 올릴 수 있다.

### 요 약

비록 전 세계적으로 많은 수의 소규모 시범 셀룰로식 에탄올 생산연구가 보고되고 있으며 셀룰로식 에탄올 생산을 위한 많은 연구들이 진행되고 있지만 현재까지 전분계나 설탕계 에탄올과 경쟁할 수 있을 정도의 경제적 생산이 가능한 상용화된 셀룰로식 에탄올 생산시설은 현재까지 보고된 바 없다. 또한 일부 환경경제학자들은 옥수수 작물자체가 수확기 까지 많은 양의 수분과 에너지를 필요로 하고 매년 토양을 침출시키는 작물이어서 환경적인 문제점

을 불러 올 수 있다는 점, 이후 옥수수 바이오매스로부터 에탄올을 생산할 때까지 들어가는 에너지의 양이 높다는 점 등을 지적하며 옥수수로 부터의 에탄올대량생산에 신중해야 한다는 의견도 있다(24). 하지만 가까운 장래에 석유를 대체할 액체연료 중 에탄올이 가장 적합하다는 미국이나 유럽의 목표에 따라 옥수수 줄기나 잎을 이용한 셀룰로식 에탄올 생산계획은 계속해서 추진될 것으로 보이며 상용화도 미국정부의 계획대로라면 수년 내에 이루어 질 것으로 보인다. 셀룰로식 에탄올의 상용화를 위해서는 여러 점들을 고려하여야 한다. 첫째로, 분자 및 유전자 수준까지의 식물에 대한 이해가 필요하다. 왜냐하면 이러한 지식의 바탕에서 바이오매스를 효과적으로 정제할 수 있는 방안들이 가능하기 때문이다. 이를 위해서는 셀룰로스보다 상대적으로 덜 알려진 식물체 내에서의 리그닌 함성경로 및 결합구조나 헤미셀룰로스의 합성 및 리그닌과의 결합관계 등에 대한 연구가 더욱 필요하다. 둘째로는 셀룰로식 에탄올생산의 상용화를 위해서는 화석연료의 수요를 대체할 수 있는 작물의 개발과 수확작물을 처리하여 공장이나 공업단지까지 경제적으로 수송할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 현재 거론되고 있는 셀룰로식 에탄올공장의 생산규모를 연간 1억 내지 1억 8천만 리터 정도의 규모로 생각하고 연간 250-300일 작업 기준으로 생각한다면 적어도 하루 2000톤 정도의 biomass를 처리하여야 됨으로 이 정도의 바이오매스가 지속적이고, 경제적으로 공급되어야 한다. 미국의 경우, 옥수수작물이 셀룰로식 에탄올 생산을 위해 가장 적합한 원료물질로 거론되고 있다. 이는 현재 옥수수 열매는 전분이나 에탄올 생산을 위해 공장으로 수송되지만 엄청난 양의 잎과 줄기는 밭에 남겨져 있기 때문이다. 이들 corn stover로 통칭되는 식물원료 물질이 바이오매스 중 연간 생산량이 가장 많은 1억 건조 톤 이상으로 현재로도 공급이 가능하고 잠재적으로는 10억 톤까지도 생산될 수 있다고 전망하기 때문이다. 따라서 미국의 경우 셀룰로식 에탄올의 생산은 corn stover의 이용이 불가피해 보인다. 더불어 톱밥이나 임업부산물의 경우는 현재 3800만 건조 톤 정도의 공급이 가능하며 미래 3억 7000만 건조 톤이 공급될 수 있을 것으로 예상하고 있다 (25). 하지만 이러한 자원은 부피가 크고 무게가 가벼워 수송밀도가 낮아 고밀도 형태로 운송할 수 있는 방법이 모색되어야 한다. 또한 원료물질을 처리 시설까지 운반하는 운송비를 줄일 수 있는 다른 방법들도 모색되어야 한다. 셋째로는 바이오매스의 구조를 당화과정과 발효과정에 적합하게 변환시킬 수 있는 경제성 있는 전처리 방법의 개발이 필수적이다. 이상적 전처리 방법은 리그닌을 효과적으로 분리해내 이를 이용한 공정에 필요한 에너지로 사용하거나 차후 부가가치가 높은 물질의 원료로 사용할 수 있게 하여야 한다. 또한 헤미셀룰로스나 셀룰로스의 손실을 최소화하여 차후 이들 식물탄수화물을 이용한 에탄올 생산을 극대화할 수 있는 방법이어야 하며 이와 함께 경제성을 담보하여야 한다. 이러한 전처리방법의 개발은 현재까지 개발된 여러 전처리 방법들의 장단점들을 파악하고 이를 극복할 수 있는 방법들을 모색하는 노력으로 가능할 수 있겠다. 마지막으로 5탄당과 6탄당을 동시에 발효할 수 있는 미생물 균주의 개발이나 효소비용을 획기적으로 줄일 수 있는 생산

방법이 개발 되어야 하겠다. 이는 셀룰로식 에탄올이 90% 이상의 높은 수율과 시간당 1.5-2.5 g/L의 생산성을 보이고 있는 전분이나 설탕으로부터 생산되는 에탄올과 경쟁력을 갖기 위한 필수적인 요소이기 때문이다.

## REFERENCES

- Somerville, C., Bauer, S., Brininstool, G., Facette, M., Hamann, T., Milne, J., Osborne, E., Paredes, A., Persson, S., Raab, T., Vorwerk, S., and H. Youngs (2004), Towards a systems approach to understanding plant cell walls, *Science* **306**, 2206-2011.
- Rose, J. and A. B. Bennett (1999), Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening, *Trends Plant Sci.* **4**, 176-83.
- B. C. Saha (2003), Hemicellulose bioconversion, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 279-291.
- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapple, M., and M. Ladisch (2005), Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresour. Technol.* **96**, 673-686.
- C. Keith (2006), Economic Issues related to biofuels; a written testimony for field hearing (Aug. 26, 2006), U.S. Senate committee on agriculture, rural development, and related agencies.
- Millet, M. A., Baker, A. J., and L. D. Satter (1976), Pretreatments to enhance chemical, enzymic and microbiological attack of cellulosic materials, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **6**, 125-153.
- Jacobsen, S. E. and C. E. Wyman (1999), Hemicellulose and cellulose hydrolysis models for application to current and novel pretreatment processes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 81-96.
- K. J. Zeitsch (2000), In: the chemistry and technology of furfural and its many by-products, Sugar Series, **13**, Elsevier, New York, U.S.A.
- M. J. Playne (1984), Increased digestibility of bagasse by pretreatment with alkalis and steam explosion, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 426-433.
- B. E. Dale (1982), Method for increasing the reactivity and digestibility of cellulose with ammonia. US patent 4600590.
- Kim, T. H., Kim, J. S., Sunwoo, C. S., and Y. Y. Lee (2003), Pretreatment of corn stover by Ammonia Recycle Percolation Process, *Bioresour. Technol.* **90**, 39-47.
- A. M. Azzam (1989), Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *J. Environ. Sci. Health. B.* **24**, 421-433.
- Vidal, P. E., and J. Molinier (1988), Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust, *Biomass* **19**, 1-17.
- Weil, J. R., Sarikaya, A., Rau, S.-L., Goetz, J., Ladisch, C. M., Brewer, M., Hendrickson, R., and M. R. Ladisch (1997), Pretreatment of yellow poplar sawdust by pressure cooking in water, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **68**, 21-40.
- Sun, Y., and J. Cheng (2002), Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* **83**, 1-11.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and I. S. Pretorius (2002), Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 506-577.
- Pitson, S. M., Seviour, R. J., and B. M. McDougall (1993), Noncellulolytic fungal glucanases: their physiology and regulation, *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 178-192.
- O'Dwyer, J., Zhu, L., and M. Holtzapple (2005), Fundamental factors affecting enzymatic reactivity, 27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals 2005, Denver.
- McBride, J., Lynd, L. R., den Haan, R., Zietsman, J., van Rooyen, R., Rose, S. H., La Grange, D., W. H. van Zyl (2005), Evaluation

- of cellulase system components expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and implications for consolidated bioprocessing, 27th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals 2005, Denver.
20. Ragauskas, A., Williams, C., Davison, B., Britovsek, G., Cairney, J., Eckert, C., Frederick Jr., W., Hallett, J., Leak, D., Liotta, C., Mielenz, J., Murphy, R., Templer, R., and T. Tschaplinski (2006), The path forward for biofuels and biomaterials, *Science* **311**, 484-489.
  21. Ohta, K., Beall, D.S., Mejia, J. P., Shanmugam, K. T., and L. O. Ingram (1991), Genetic improvement of *E. coli* for ethanol production, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 893-900.
  22. Katzen, R., Madson, P. W., and G.D. Moon (1999), Alcohol distillation-The fundamentals. In: Jacques, K. A., Lyons, T. P., Kelsall, D. R., (Eds) The alcohol textbook, pp 103-125, Nottingham University Press, Nottingham.
  23. Wingren, A., Galbe, M., and G. Zacchi (2003), Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks, *Biotechnol. Prog.* **19**, 1109-1117.
  24. Pimental, D., and T. W. Patzek (2005), Ethanol production using corn, switchgrass, and wood; Biodiesel production using soybean and sunflower, *Natural Resources Research* **14**, 65 -76.
  25. U.S. Department of Energy (June 2006), Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol, a D.O.E. report, pp. 1-205, Available at <http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/b2bworkshop.shtml>, accessed in Aug 2007.