

KAERI/CM-1345/2010

바이오매스의 upstream 최적화 및 셀룰로오스
가수분해기술 개발

Optimization of upstram and development of cellulose
hydrolysis process for cellulosic bio-ethanol production

KAERI

전남대학교

한국원자력연구원

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2009년도 “방사선을 이용한 식물성 바이오매스 전처리 기술 및 효율적 당화공정기술 개발” 과제의 위탁과제 “바이오매스의 upstream 최적화 및 셀룰로오스 가수분해기술 개발”의 연차보고서로 제출합니다.

2010. 10. 25

과 제 명 : 바이오매스의
upstream 최적화
및 셀룰로오스
가수분해기술
개발

과제책임자 : 배 현 중

참 여 자 : 위 승 곤
김 수 배
신 유 정
이 주 희

요 약 문

I. 제 목

바이오매스의 upstream 최적화 및 셀룰로오스 가수분해기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

셀룰로오스계 바이오매스는 지구상에 매우 풍부한 부존자원이며 순환형 재생자원으로서 화석연료의 대체에너지 생산을 할 수 있는 자원으로 주목받고 있다. 목질계 바이오매스는 근래에 연료용 에탄올 생산에 관한 연구의 대부분을 차지하고 있다. 셀룰로오스계 바이오매스로부터 바이오연료 생산을 위해서는 시료 전처리, 당화, 발효, 정제의 과정이 요구되어진다. 셀룰로오스계 바이오매스는 70% 이상의 당 성분으로 구성된 높은 에너지 저장량에도 불구하고 구성 당이 다당류의 고분자 형태로 존재하며 리그닌이라는 난분해성 물질이 함유되어 저분자의 단당류를 얻기 위한 가수분해가 매우 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 고분자 다당류의 저분자화, 리그닌의 제거, 반응 표면의 증가는 전처리를 통해 이루어질 수 있다.

지금까지 알려진 바이오매스의 전처리 방법은 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 크게 분류할 수 있다. 그러나 일반적으로 물리적 방법은 에너지 소비가 많아 경제성이 떨어지고 리그닌의 제거가 거의 이루어지지 않아 잔존 리그닌에 의해 당화 효율의 감소 및 발효 저해 현상이 발생한다. 화학적 방법은 화학약품의 사용으로 인한 안전성 문제, 화학약품과 가수분해 부산물의 결합에 의한 유해성 물질의 생성 등으로 인한 환경오염 유발, 고비용의 시설비와 운용자금이 소모된다는 문제점과 화학약품을 이용한 가수분해시 당화 및 발효저해 물질이 주로 헤미셀룰로오스와 리그닌으로부터 생성되는 문제점을 가지고 있다. 따라서 환경 문제를 발생시키지 않고 저에너지로 당화 수율을 높일 수 있는 효과적인 전처리 방법의 개발이 필요하다.

이러한 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 새롭게 주목받고 있는 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에너지의 생산 방법은 비화학적 전처리방법의 개발과 효소를 이용한 생물학적 공정을 적용하는 방법이다. 효소가수분해 방법은 실온에서 셀룰로오스를 환경오염 없이 특이적으로 분해 할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 효소가수분해 효율이 낮아 고분해능의 효소 개발과 저비용으로 효소를 대량생산할 수 있는 기술 개발이 절실히 요청되고 있는 실정이다.

본 연구팀은 대상 바이오매스의 화학적 구조적 특성을 밝히고 이에 적합한 전처리 기술개발과 바이오매스 분해능이 탁월한 미생물을 선발하고 이로부터 우수한 새로운 섬유소 분해효소를 분리하여 10개 이상의 신규 유전자 확보하고자 한다. 또한 이렇게 생산된 효소를 사용하여 당화 효율성 테스트 및 검증을 통해 응용 기술 적용성 검토를 수행할 예정이다.



Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2009)	<p>섬유소바이오매스의 분해력이 우수한 미생물 선발 및 고효율 섬유소 분해효소 발굴</p>	<ul style="list-style-type: none"> o. 섬유소 바이오매스에 대한 분해능이 탁월한 미생물을 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 국내외 우수 섬유소분해 미생물 선발 o. 선발된 미생물로부터 다양한 섬유소분해효소 분리 및 특성조사 <ul style="list-style-type: none"> - 선발된 미생물로부터 섬유소분해효소를 분리 및 특성 조사하여 가장 활성이 좋은 미생물 선발 o. 섬유소분해효소 관련 신규 유전자 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 선별된 섬유소분해효소 중 cellulase, xylanase 등 고효율도 효소유전자 클로닝 - 섬유소분해능이 우수한 신규 유전자원 10개 확보 o. 특정효소들 간의 유전자 재조합을 통한 효소 활성 및 안정성 증대 <ul style="list-style-type: none"> - 섬유소 분해 효소의 활성 유지 및 안정성 증대를 위한 유전자 변형

IV. 연구개발결과

섬유소 바이오매스 분해력이 우수한 미생물을 선발하기 위하여 국내외 여러장소에서 75종류 이상의 샘플을 미생물 screening 하였고, 소나무를 탄소원으로 한 Czapack dox 배지에서 14일동안 배양하여 미생물 활성 테스트를 실시하였다. 이때 기질별 활성 테스트를 위하여 Xylan, CMC, Watman paper 기질을 사용하였으며 약 14일 동안 1 L 배양기에서 배양하여 각각의 기질에 대한 활성도를 측정하였다. 이 결과로부터 8종류 우수한 미생물을 선택적으로 선발하였다. 이들 미생물로부터 RT-PCR과 Race PCR cloning 방법을 통하여 새로운 10의 셀룰로오스 분해 유전자를 발굴하였다 (표 1). 신규 유전로서 유전정보와 특성이 밝혀진 유전자들은 GenBank(NCBI)에 등록하기 위하여 등록을 진행 중이다 (Bank1395910 HQ383922; Bank1395929 HQ383923).

특정 효소들의 유전자 재조합을 통한 활성 및 안정성 증진을 위한 실험은 Cloning한 유전자에 amino acid를 변형시키거나, cellulose binding domain을 fusion 시켜 재조합효소 생산 실험을 실시하고 있다. 효소활성에 대한 여러 실험을 위해 Affinity chromatography와 이온변화 chromatography 방법을 이용하여 효소정제를 실시하였고 SDS-Page방법에 의해 정제가 확인된 재조합 cellulase 효소를 이용하여 기질별 효소활성을 측정하고 있다. Cellobiohydrolase 효소의 기질에 대한 활성도는 cellulose binding domain이 5'에 부착되었을 때 insoluble Avicel 기질에 대하여 활성이 증진됨을 확인할 수 있었다. 이와 더불어 최적온도와 적정 pH에 대한 실험은 현재 수행중이며 위 실험을 보완한 새로운 cellulose binding domain을 cloning하여 보다 더 fusion enzyme의 효율을 끌어올릴 예정이다.

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

1. 섬유소 분해능이 우수한 신규 유전자의 발굴을 통해 독자적인 섬유소 분해능이 우수한 효소를 자체 생산할 수 있는 기반을 마련하였고 활성의 안정성을 증대시키기 위한 재조합 효소의 생산을 할 수 있게 되었다.
2. 새롭게 확보한 미생물 및 섬유소 분해 효소는 효소 대량 생산 시스템 구축과 대량 생산된 효소를 이용한 식물 바이오매스로부터 효소가수분해를 통한 당생산에 적용하여 생산 효율을 증대시킴과 동시에 생산단가를 줄여 섬유소 바이오매스를 이용한 바이오에너지 생산에 활용되어질 수 있을 것이다.
3. 이러한 연구 결과는 섬유소 바이오매스로부터 효소가수분해를 통한 바이오에탄올 대량생산과 같은 차세대 대체에너지 개발에 기여할 것이다.



KAERI

SUMMARY

I. Project Title

Optimization of upstream and development of cellulose hydrolysis process for cellulosic bio-ethanol production

II. Objective and Importance of the Project

Professor Bae's proposed research was aimed primarily at screening of cellulolytic microorganism for degrading lignocellulosic biomass and gene cloning, sequencing and characterization of new cell wall degrading cellulase genes.

III. Scope and Contents of Project

In order to search for more efficient lignocellulose degrading microorganism, we screened various microorganisms from decayed biomass.

Identification and verification of new cell wall degrading cellulase for application cellulose bioconversion process.

Identification and characterization of novel genes involved in cellulose degradation.

IV. Result of Project

To find good microorganism candidates for lignocellulose degrading, 75

decayed samples from different areas were assayed in triplicate and analyzed. For cloning new cell wall degrading enzymes, we selected microorganisms because it have very good lignocellulose degradation ability. From that microorganisms, we have apparently cloned a new cellulase genes. We are applying the new cloned cellulase genes to characterize in lignocellulose degradation that are most important to cellulosic biofuels production.

V. Proposal for Applications

From above experiment and information we will make new form of cellulase enzyme cocktail to effective cellulose degradation. These new cellulase enzyme screening and cloning process will be validated experimentally and will developed enzymatic lignocellulose bioconversion. Also we expect to generate an extensive and deep idea for enzymatic plant cell wall degrading model.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	1
Chapter 2. State of arts	3
Chapter 3. The contents and results of the research	4
Section 1. Research contents and methods.....	4
Section 2. Results and disscussions.....	5
Chapter 4. Objective of R & D and possible contribution.....	11
Chapter 5. Application	12
Chapter 6. References	13

목 차

제 1 장 서론	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	3
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	4
제 1 절 연구내용 및 방법	4
제 2 절 연구결과 및 고찰	5
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	11
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	12
제 6 장 참고문헌	13

제 1 장 서론

세계적으로 화석연료의 사용으로 인한 환경오염과 화석연료 고갈로 새로운 대체 에너지의 필요성이 대두되고 있다. 대체 에너지로 주목 받는 에너지는 태양에너지, 풍력, 수력, 수소에너지, 바이오에너지 등이 있다. 이중 바이오에너지의 중요한 부분을 차지하는 바이오에탄올은 최근 화석연료를 대체 할 수 있는 신재생 대체에너지로 주목 받으면서 많은 연구가 진행되고 있다. 현재 산업적으로 생산되는 바이오에탄올은 미국에서 옥수수를 이용한 바이오에탄올과 브라질에서 사탕수수를 이용한 바이오에탄올 생산이 세계 바이오에탄올 생산량의 대부분을 차지하고 있다. 하지만 옥수수와 사탕수수를 이용한 바이오에탄올 생산은 사료, 곡물, 식량 가격의 폭등을 불러왔고, 그로인해 비싼 곡물을 살 수 없는 빈곤 국가에서는 기아로 인해 죽는 아 이들이 발생하여 심각한 사회문제를 초래하게 되었다.

이러한 문제점을 해결하기 위해 식량이 아닌 다른 자원을 이용하여 바이오에탄올을 생산하는 방법이 세계적으로 진행되고 있다. 그중의 하나는 식물의 셀룰로오스를 이용하여 바이오 에탄올을 생산하는 방법이다. 지금까지 고분자의 셀룰로오스 결합체인 섬유소계 바이오매스를 단당의 포도당으로 바꾸는 전처리 방법으로 증기 폭쇄법(이 외, 1994), 알칼리 처리법(Silverstein et al., 2007), 이산화황 처리법(von Sivers and Zacchi, 1995), Organosolv 처리법(Mabee et al., 2006), 과산화수소 처리법(Azzam, 1989), 초임계 처리법(서현범 외, 2008), 약산처리법(Esteghlalian et al., 1997), 암모니아 동결 폭쇄법(Murnen et al., 2007) 등 수많은 방법들이 연구되어 왔다. 그러나 일반적으로 물리적 방법은 에너지 소비가 많아 경제성이 떨어지며(Cadoche and Lopez, 1989), 화학적 방법은 화학약품의 사용으로 인한 안전성 문제, 화학약품과 가수분해 부산물과의 결합에 의해 유해성 물질의 생성으로 인한 환경오염 유발, 고비용의 시설비와 운용자금이 소모된다는 문제점과 효모성장에 해로운 부산물이 발생하는 것으로 알려져 있다(von Sivers and Zacchi, 1995). 화학약품을 이용한 가수분해시 당화 및 발효저해 물질이 주로 헤미셀룰로오스와 리그닌으로부터 생성되어진다(Larsson et al., 1999). 따라서 환경 문제를 발생시키지 않고 저에너지로 당화 수율을 높일 수 있는 효과적인 전처리 방법의 개발이 필요하다.

이러한 문제점을 해결할 수 있는 방안으로 새롭게 주목받고 있는 섬유소계 바이오매스로부터 바이오에너지의 생산 방법은 효소를 이용한 생물학적 공정을 이용하는 방법이다. 효소가수분해 방법은 셀룰로오스를 환경오염 없이 분해 할 수 있다는 장점을 가지고 있지만, 효소가수분해 효율이 낮아 고분해능의 효소 개발과 경제성

을 갖추기 위한 방안으로 저비용의 효소를 대량생산 기술 개발이 이루어져야 산업화할 수 있는 실정이다. 따라서 본 연구팀은 섬유소 분해능이 우수한 미생물 및 효소를 발굴하고 효소의 활성을 증대시키는 한편 대상 바이오매스의 최적화된 전처리 및 당화 공정기술을 개발하고자 한다.

이러한 연구 개발을 통해 BT, NT, ET 기술의 융합에 의한 기술 개발과 1차산업인 농업을 생명, 에너지 산업으로 탈바꿈시킴으로서 새로운 고부가가치 산업 영역을 개발하는 성과를 기대할 수 있다. 특히 바이오매스 전처리용 효소제 및 전처리공정에 대한 수요가 폭발적으로 늘어날 것으로 기대되어 지적재산권의 획득 후 상업화를 기대할 수 있다.



제 2 장 국내외 기술개발 현황

우리나라의 바이오에탄올 생산기술개발은 1990년대 초에서 2002년까지 산업자원의 지원으로 일정부분 이루어졌지만 국제 유가의 안정세에 따라 기술개발이 지속적으로 이루어지지 못하고 있으며, 현재 국내 대학 및 국가연구소에서 일부 명맥을 잇고 있는 수준이다. 전남대학교 공과대학 양갑승 교수팀 (본 연구팀 포함)이 미국 텍사스대학 나노테크연구소와 함께 에너지 저장 및 전환 효율을 혁신하기 위한 나노소재의 설계 및 공정개발과 바이오에탄올 생산이라는 연구테마로 공동연구를 수행하고 있다. 서울시립대와 한국생명공학연구원의 공동연구로 고구마를 이용한 바이오에탄올 생산 연구를 진행 중이다. 국내의 경우 아직은 미진하나 2011년 총에너지의 5%를 신재생에너지로의 보급을 목표로 약 677억원의 연구비를 투입할 예정이다.

현재까지 상용화에 이른 섬유소계 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산기술은 전무하다. 미국의 경우 2000년대 초기부터 장기적이고 집중적인 연구투자가 이루어지고 있으며 2012년경에 섬유소계 에탄올의 상용화가 가능할 것으로 전망하고 있다. 2007년 부시 대통령은 연두교서에서 2017년까지 가솔린의 20%를 바이오 연료로 전환하기로 천명하였으며, 이중 15%를 바이오에탄올로 대체하기 위해 연간 1,320억 리터(350억 갤런)의 에탄올이 필요하며, 바이오에탄올 중 870억 리터(230억 갤런)는 섬유소계 바이오매스를, 나머지는 전분계 옥수수를 원료로 이용하여 바이오에탄올을 생산할 것으로 계획하고 있다. 캐나다, 독일과 스웨덴 등에서도 이러한 연구가 수행중이며 특히 캐나다의 Iogene사는 밀짚의 cellulose를 대상으로 direct evolution이라는 효소 생산 시스템을 활용하여 바이오 에탄올을 생산하고 있으며 2002년 오타와에 밀짚 셀룰로오스를 활용한 파일릿트 공정을 건설하여 운행 중에 있다. 일본의 경우는 석유대체에너지 연구위원회가 목질계 biomass의 이용과 생산에 대한 중요성을 역설하였으며, 2004년 오사카에 목재 폐재를 이용한 파이롯트 공장을 건설하는 등 연구 개발에 지속적인 투자를 하고 있다. 중국, 인도 등에서도 바이오에탄올의 연구 및 보급을 적극적으로 검토하고 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용 및 방법

1) 공시재료 및 미생물 선별

섬유소 바이오매스 분해력이 우수한 미생물을 선별하기 위하여 국내의 광주광역시 일대와 베트남, 대만 등 국외에서 균에 의해 분해된 나무 및 낙엽 등에서 시료를 50개를 채취한 후 CMC배지에 평판도말하고 배양한 후 균주 선별을 congo red방법을 이용하여 셀룰레이즈를 분해하는 균만을 선별하고 순수분리하여 본 실험에 사용하였다.

2) 선별된 미생물로부터 다양한 섬유소분해효소 분리 및 특성조사

선별된 미생물로부터 섬유소 분해효소를 분리 및 특성 조사하여 가장 활성이 좋은 미생물 선별하였다. 이를 위해 avicel을 탄소원으로 한 Czapack-dox 배지에서 활성테스트를 한 후 CMC, Xylan, Filter paper 등의 각각 다른 기질에 균주를 배양하여 활성을 측정하였다.

3) 섬유소분해효소 관련 신규 유전자 확보

선별된 섬유소분해효소 중 cellulase, xylanase 등 고활성도를 가진 효소유전자를 클로닝하였다. 섬유소 분해능이 우수한 것으로 선별된 미생물의 동정을 위해 18s rDNA 서열을 분석하였다. 이들 미생물로부터 RT-PCR과 Race PCR cloning 방법을 통하여 새로운 14의 셀룰로오스 분해 유전자를 발굴하였다.

4) 특정효소들 간의 유전자 재조합을 통한 효소 활성 및 안정성 증대

섬유소 분해 효소의 활성 유지 및 안정성 증대를 위한 유전자 변형을 실시하였다. 특정 효소들간 유전자 재조합을 통한 활성 및 안정성 증진을 위한 실험은 Cloning한 유전자에 cellulose binding domain을 fusion 시켜 fusion recombinant cellulase를 실험을 실시하였다. Cellobiohydrolase의 Fusion construction 제작 후 제작된 DNA construct를 이용하여 *E. coli*와 효모를 이용한 발현테스트를 실시하였고 발현된 재조합 단백질의 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 대한 여러 실험을 위해 Affinity chromatography와 이온변화 chromatography 방법을 이용하여 효소정제를 실시하였고 SDS-Page 방법에 의해 정제가 확인된 재조합 cellulase 효소를 이용하여 기질별 효소활성을 측정하였다.

제 2 절 연구결과 및 고찰

1) 섬유소바이오매스의 분해력이 우수한 미생물 선발 및 고효성 섬유소분해효소 발굴 (신규미생물 및 효소 10건 이상 확보)

섬유소 바이오매스 분해력이 우수한 미생물을 선발하기 위하여 국내외 여러 장소에서 균에 의해 분해된 나무 및 낙엽 등에서 미생물 시료를 50개를 채취 하였다. 75 종류 이상의 샘플을 미생물 screening 하였고, 소나무를 탄소원으로 한 Czapack dox 배지에서 14일 동안 배양하여 미생물 활성 테스트를 실시하였다 (그림 1). 미생물의 활성 테스트를 효과적으로 단기간에 할 수 있는 micro assay 방법을 이용한 활성 실험을 하였다 (그림 2).

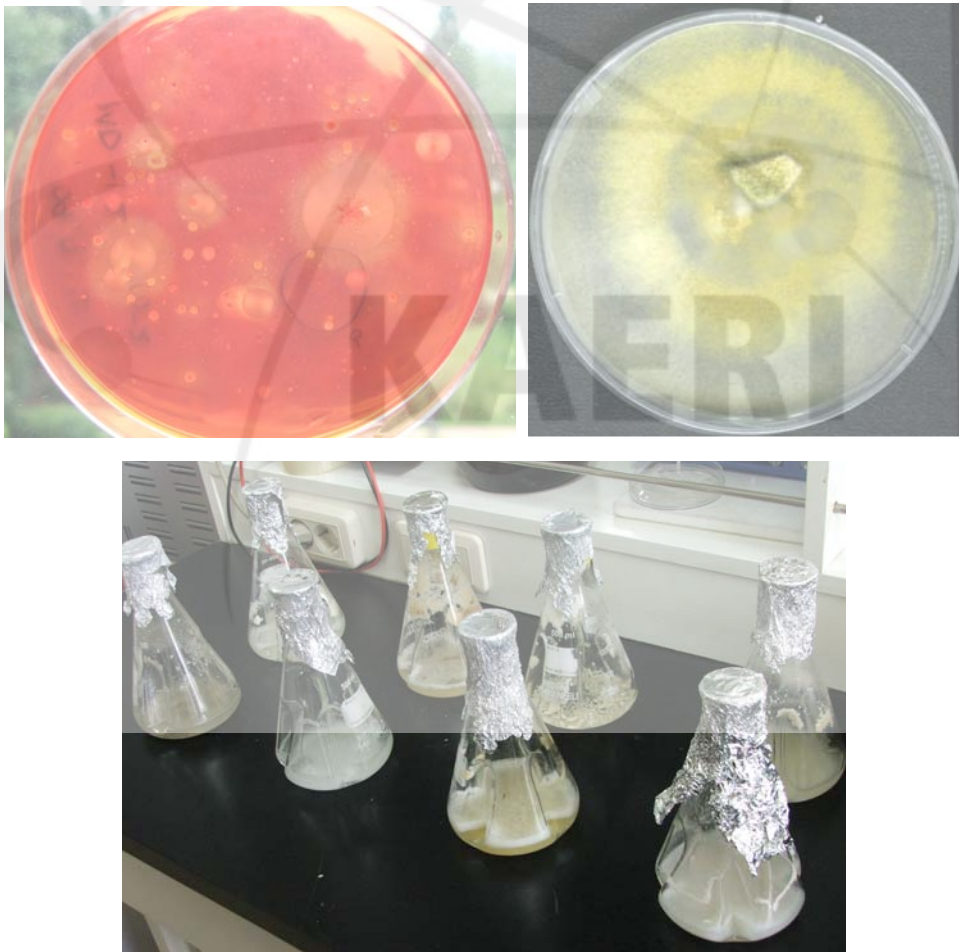


그림 1. 섬유소 분해 우수 균사 선발을 위한 균사 배양 과정

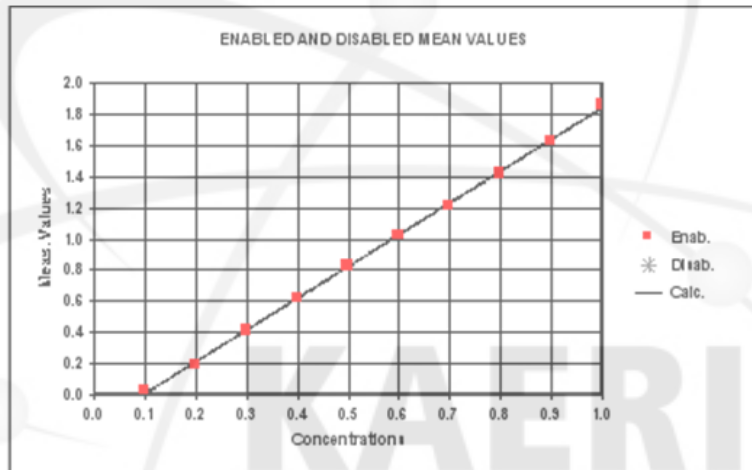
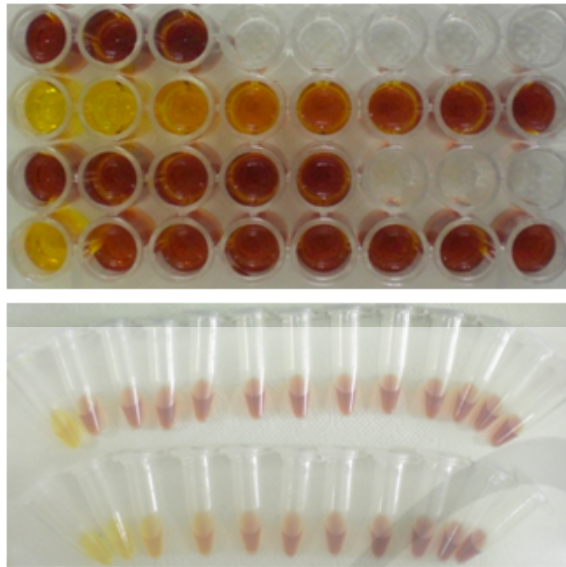


그림 2. micro assay 방법을 이용한 활성 미생물 screening 활성 test

2) 선발된 미생물로부터 다양한 섬유소분해효소 분리 및 특성조사

선발된 미생물의 활성 테스트는 기질을 Xylan, CMC, Watman paper를 사용하였으며 약 14일 동안 1 L 배양기에서 배양하여 각각의 기질에 대한 활성도를 측정하였다. 이 결과로부터 8종류 우수한 미생물을 선택적으로 선발하였다 (그림 3). 선발된 미생물은 기질에 따라 최대 활성과 활성시기가 다르게 나타났다.

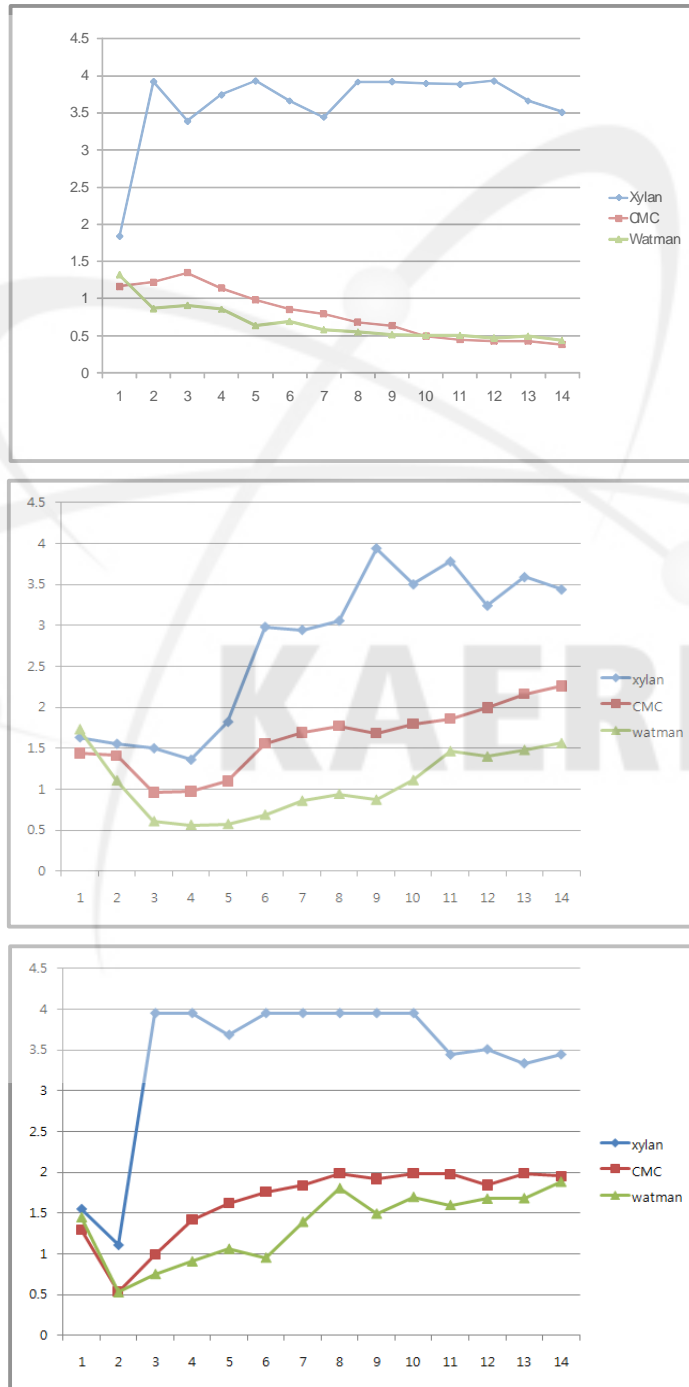


그림 3. 섬유소 분해능이 우수한 미생물의 기질별 활성 측정 결과

3) 섬유소분해효소 관련 신규 유전자 확보

섬유소 분해능이 우수한 것으로 선발된 미생물의 동정을 위해 18s rDNA 서열을 분석하였다. 이들 미생물로부터 RT-PCR과 Race PCR cloning 방법을 통하여 새로운 10의 셀룰로오스 분해 유전자를 발굴하였다 (표 1). 신규 유전로서 유전정보와 특성이 밝혀진 유전자들은 GenBank(NCBI)에 등록하기 위하여 등록을 진행 중이다 (Bank1395910 HQ383922; Bank1395929 HQ383923).

표1. 확보된 섬유소분해 미생물 및 셀룰로오스 분해 유전자

균주	유전자	사이즈	유사균주	유사성
LSB	CBH1	1344bp	<i>Cryphonectria parasitica</i>	78%
LSB	CBH2	1461bp	<i>Chaetomium globosum</i>	67%
<i>Penicillium</i> sp. LYG0704	Arabinofuranosidase	1008bp	<i>Neosartorya fischeri</i>	76%
<i>Penicillium</i> sp. LYG0704	CBH1	1368bp	<i>Talaromyces emersonii</i>	72%
<i>Penicillium</i> sp. LYG0704	CBH2	1206bp	<i>Neosartorya fischeri</i>	80%
<i>Penicillium</i> sp. LYG0706	Xylanase	695bp	<i>Penicillium marneffeii</i>	75%
<i>Reticulitermes speratus</i>	xylanase 26	648bp	<i>Reticulitermes speratus</i>	82%
<i>Reticulitermes speratus</i>	xylanase 47	665bp	<i>Reticulitermes speratus</i>	85%
<i>Monochamus alternatus</i>	endo-glucanase	975bp	<i>Psacothaea hilaris</i>	62%
<i>Psacothaea hilaris</i>	endo-glucanase	714bp	<i>Apriona germari</i>	78%

이렇게 발굴된 유전자들은 현재 효모 발현벡터를 구축하여 그 특성을 분석하고 있으며, 특성이 밝혀진 *Penicillium* sp. LYG0704 Arabinofuranosidase와 *Penicillium* sp. LYG0706 Xylanase 유전자 서열 정보는 다음과 같다.

(a) 염기서열 (Arabinofuranosidase)

```
atgcactcccagcctcgtgaaagctgctggccctcggctcttgcggccacggttgcgcccggccttgcgacatctacgcctcgg
gcaatacgcctgtgttgcgcgcacagtacgacacgcgcctgtacgacgacttctcgggccccctttaccaggtgaccgtagt
gatggcactactgctgatatctcgcgcagtcggccggggcgtggcagatgcttcggcgcaggattccttctcgcgataacacaa
cctgtgttatcagcattatctacgaccagtctggcaataacaatcacctcacggatgcgcccctggaggagctgccagcggctct
ggcctaacggctacgataatctagcaacggcgcacagatgccctattacgttgaatgggcagaaggcgtacggagttctttaa
acccaacacagactaccgctgcaacacggcgcactggaactgccacaggtgatgatccagaggcatgtacgctgtgcttgatg
gcacacactataataccggctgctgcttcgactatggtaacgctgagaccagtagcaccgacactggtaatggccacatggaggc
```

catctactttggcaccggcgatggctctggcccggtaccggcgctggcgatggccctggatcatggccgatctggagaacgg
 gctgttctcgggtcaggatcccatcaacaaccagggagaccctcaatcacctggcgctttgtgactgctattgcaagggtcaacc
 aggcaactgggcgatccgcggggtgacgctactaatggtgatctgtcgactactacaacgggtgctgccctgatggaggatat
 gatcctatgagtaaggagggtgccatcatcctgggcattggtggcgataacagcgacagcggccagggtaccttctacgaaggt
 gtcgatgactcgggcttcccttcggatgataccgagaacgggtgcaagtaacatcgctcgccgcgatgacgacgtcttag

(b) 염기서열 (Xylanase)

atggttgcctttcaacccttttgtcacttcttctacatagcagcgtctcttctgctgcacctgcaaaccctgagaccaagaagatgtt
 gatctcgaagcccggccctcatgacttcttctagagctgacaatgctctcggccgtcgtgctccataaactatgaccaggac
 tataacctgacaacacagtgcgttactctccaacgagcaccgggttctccgtgaactggagcaactctcaagattcgttgggga
 gttggatggcagactggaactaccagccccattaccttgggtggctccttctccgctcgccctgggaagcgggaactggcctcctcc
 gtatacggctggaccaccgaccctcgtcgagtactatgttatcgaaaacgcctgaacctccgagcagggcaccatcaagg
 gcacttttacaagtgatgggtccacgtataacctgaggagaaccagcgtgtaacgagccctcgattgtcggtaccgagctttta
 accagtatactccattcgcaactcgccgaggagcagcgggtactgttactattgagaatcatttcaaggagtgggagcctgggg
 ctggattgggcacgttcaattaccaggtcattgctgtgagggatggagtagcagtgttctgcttcgagactgttagcaactag

4) 특정효소들 간의 유전자 재조합을 통한 효소 활성 및 안정성 증대

특정 효소들간 유전자 재조합을 통한 활성 및 안정성 증진을 위한 실험은 Cloning한 유전자에 cellulose binding domain을 fusion 시켜 fusion recombinant cellulase를 실험을 실시하였다. 여기에 사용된 fusion construction은 그림 4에 나타나있다.

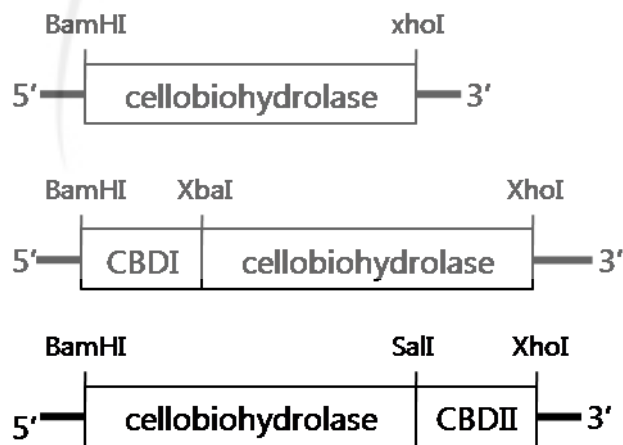


그림 4. cellobiohydrolase의 fusion Construction

상기에 제작된 DNA construct를 이용하여 *E. coli*와 효모를 이용한 발현테스트

를 실시하였고 발현된 재조합 단백질의 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 대한 여러 실험을 위해 Affinity chromatography와 이온변화 chromatography 방법을 이용하여 효소정제를 실시하였고 SDS-Page방법에 의해 정제가 확인된 재조합 cellulase 효소를 이용하여 기질별 효소활성을 측정하였다 (표 2). Cellobiohydrolase 효소의 기질에 대한 활성도는 cellulose binding domain이 5'에 부착되었을 때 insoluble Avicel 기질에 대하여 활성이 증진됨을 확인할 수 있었다.

표 2. Specific activity (U mg⁻¹)of recombinant cellulase

Enzyme	CMC	Avicel
CBH	0	0.1
CBDI-CBH	0	0.15
CBH-CBDII	0.1	0.2

상기 실험과 더불어 최적온도와 적정 pH에 대한 실험은 현재 수행중이며 위 실험을 보완한 새로운 cellulose binding domain을 cloning하여 보다 더 fusion enzyme의 효율을 끌어올릴 예정이다.

KAERI

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

연구내용	달성도(%)
섬유소 바이오매스에 대한 분해능이 탁월한 미생물을 선발	100
선발된 미생물로부터 다양한 섬유소분해효소 분리 및 특성조사	100
섬유소분해효소 관련 신규 유전자 확보	100
특정효소 유전자에 대한 유전자 재조합을 통한 효소 활성 및 안정성 증대	90

1. 섬유소 분해능이 우수한 신규 미생물 및 효소, 유전자원 확보로 인한 셀룰로오스 분해, 당화 수율 증대를 통해 바이오에너지 생산 효율을 증대시키고, 신규 유전자를 확보하였다.
2. 새롭게 확보된 미생물의 기질별(셀룰로오스, 자일로오스) 맞춤형 효소를 생산 기반을 마련하여, 산업적 이용에 기반을 마련하였다.
3. 이렇게 확보된 셀룰로오스 분해능이 우수한 효소의 대량 생산을 통해 셀룰로오스 당화 효율 증대와 효소가수분해에 의한 바이오연료 생산의 가격 경쟁력을 확보할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 셀룰로오스 분해 능이 우수한 균주로부터 신규 유전자를 확보하여 유전자 염기서열 정보와 특성이 밝혀진 유전자를 GenBank에 등록하기 위하여 등록을 신청하였다 (Bankit1380969 HQ141568/Bankit1381003 HQ141569). 이러한 확보된 유전자는 국내외적으로 미생물 자원 확보 및 특허 등의 지적재산권 비용의 지불을 하지 않아도 되고, 효소 생산의 산업화를 통해 수익을 창출할 수 있을 것이다.
2. 특정효소 유전자에 대한 유전자 재조합을 통한 효소 활성 및 안정성 증대를 통해 효소의 활용 범위 및 조건을 확대시키고, 산업화와 연계할 수 있을 것이다.
3. 셀룰로오스를 효소 가수분해를 통해 당 생산 및 이를 이용한 바이오연료 생산에 필요한 기술 축적과 함께 지적재산권 확보를 이룰 수 있을 것이다.



KAERI

제 6 장 참고문헌

1. 이영우, 홍종준, 이진석, 박순철, 조재경, 이준표. 1994. 목질계 바이오매스의 전처리 및 효소당화 연구. 한국화학공학. 32:36-41.
2. 서현범, 한재건, 최원석, 이오규, 이수민, 최석환, 이현용, 정경환. 2008. 초임계수 처리로 가수분해된 목질계 바이오매스를 이용한 바이오 에탄올 생산. 한국생물공학. 23:494-498.
3. Azzam, A. 1989. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 24:421-433.
4. Esteghlalian, A., A. Hashimoto, J. Fenske, and M. Penner. 1997. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. *Bioresource technology*. 59:129-136.
5. Mabee, W., D. Gregg, C. Arato, A. Berlin, R. Bura, N. Gilkes, O. Mirochnik, X. Pan, E. Kendall Pye, and J. Saddler. 2006. Updates on softwood-to-ethanol process development. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129:55-70.
6. Murnen, H., V. Balan, S. Chundawat, B. Bals, L. Sousa, and B. Dale. 2007. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of miscanthus x giganteus to fermentable sugars. *Biotechnology progress*. 23:846-850.
7. Silverstein, R., Y. Chen, R. Sharma-Shivappa, M. Boyette, and J. Osborne. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource technology*. 98:3000-3011.
8. von Sivers, M., and G. Zacchi. 1995. A techno-economical comparison of three

processes for the production of ethanol from pine. Bioresource technology.
51:43-52.



서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호		표준보고서번호	INIS 주제코드	
	KAERI/CM-1345/2010				
제목 / 부제	방사선을 이용한 식물성 바이오매스 전처리 기술 및 효율적 당화공정기술 개발/바이오매스의 upstream 최적화 및 셀룰로오스 가수분해기술 개발				
연구책임자 및 부서명	배현중 (전남대학교 바이오에너지연구소)				
연구자 및 부서명	위승곤, 김수배, 신유정, 이주희 (바이오에너지연구소)				
출판지	대전	발행기관	한국원자력연구원	발행년	2010
페이지	16 p.	도표	있음(○), 없음()	크기	21x29.7Cm.
참고사항					
공개여부	공개(○), 비공개()		보고서종류	위탁보고서	
비밀여부	대외비(), — 급비밀				
연구수행기관	전남대학교		계약번호	해당없음	
초록 (15-20줄내외)	<p>본 연구는 바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스의 upstream 최적화 및 셀룰로오스 가수분해기술 개발을 목표로 한다. 이를 위한 연구개발의 범위는 1) 섬유소바이오매스의 분해력이 우수한 미생물을 찾기 위하여 분해된 식물성 바이오매스로부터 다양한 미생물을 스크리닝, 2) 셀룰로오스 생물변환과정 적용을 위한 새로운 세포벽 분해 섬유소분해효소의 동정 및 확인, 3) 셀룰로오스 분해에 관여하는 신규 유전자원 동정 및 특성 규명을 포함한다. 섬유소 바이오매스 분해력이 우수한 미생물 후보를 선별하기 위하여 다른 지역으로 부터 75종류의 샘플을 분석하였다. 신규 세포벽 분해 효소 클로닝을 위하여 리그노셀룰로오스 분해력이 우수한 미생물을 선별하였다. 그 미생물로부터 신규 섬유소분해 효소 유전자를 클로닝하였다(10종류). 섬유소 분해능이 우수한 섬유소분해효소 유전자는 섬유소 바이오에너지 생산에 활용되어질 수 있을 것이다.</p>				
주제명키워드 (10단어내외)	생물변환, 바이오에탄올, 섬유소분해효소, 세포벽, 미생물, 유전자, 분해				

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.	INIS Subject Code
		KAERI/CM-1345/2010			
Title/ Subtitle		The development of effective pretreatment and sacharrification techniques for lignocellulosic biomass using radiation/Optimization of upstram and development of cellulose hydrolysis process for cellulosic bio-ethanol production			
Project Manager and Department		Hyun Jong Bae (Bio-Energy Research Institute, Chonnam National University)			
Researcher and Department		Seung Gon Wi, Su Bae Kim, You Jung Shin, Ju Hui Yi, (Bio-Energy Research Institute, Chonnam National University)			
Publication Place	Deajeon	Publisher	KAERI	Publication Date	2010
Page	16 p.	Ill. & Tab.	Yes(<input type="radio"/>), No (<input type="radio"/>)	Size	21x29.7Cm.
Note					
Open	Open(<input type="radio"/>), Closed (<input type="radio"/>)				
Classified	Restricted(<input type="checkbox"/>), ___Class Document		Report Type	Commission Report	
Performing Org.	Chonnam National University		Contract No.		
Abstract (15-20 Lines)		<p>The purpose of this project is optimization of upstram and development of cellulose hydrolysis process for cellulosic bio-ethanol production. Research scope includes 1) screening of various microorganisms from decayed biomass in order to search for more efficient lignocellulose degrading microorganism, 2) identification and verification of new cell wall degrading cellulase for application cellulose bioconversion process, and 3) identification and characterization of novel genes involved in cellulose degradation. To find good microorganism candidates for lignocellulose degrading, 75 decayed samples from different areas were assayed in triplicate and analyzed. For cloning new cell wall degrading enzymes, we selected microorganisms because it have very good lignocellulose degradation ability. From that microorganisms, we have apparently cloned a new cellulase genes (10 genes). We are applying the new cloned cellulase genes to characterize in lignocellulsoe degradation that are most important to cellulosic biofuels production.</p>			
Subject Keywords (About 10 words)		bioconversion, bio-ethanol, cellulase, cell wall, microorganisms, gene, degradation			