

셀룰로솜(cellulosome)을 통한 효과적인 바이오매스(Biomass)의 대체에너지화



한 성 옥
고려대학교 생명과학부
생명공학원
samhan@korea.ac.kr

서론

전세계적으로 화석 연료의 과다 사용에 따른 자원 고갈 및 환경오염에 대한 우려가 증가함에 따라 자연과 공존하며 안정적이고 지속적으로 에너지를 생산하는 신재생 대체에너지 개념이 화두가 되고 있다. 특히 선진국을 중심으로 환경오염 및 온난화 문제 해결을 위해 화석 연료의 사용에 대한 규제를 강화하고 환경친화적 신재생 에너지의 보급을 확산하려는 정책이 입안되고 있다. 이런 가운데 지구상에서 가장 풍부하고 고갈 없이 재생이 가능한 식물자원으로 대표되는 목질자원 리그노셀룰로오스(lignocelluloses)가 가장 주목을 받고 있다(그림 1). 리그노셀룰로오스는 난분해성 방향족 중합체인 리그닌(lignin)과 탄수화물인 셀룰로오스(cellulose) 및 헤미셀룰로오스(hemicellulose)의 복합체로, 좁은 의미의 바이오매스(biomass)로 불린다(Perlack *et al.*, 2005). 이러한 바이오매스로부터 생산되는 알콜, 디젤, 수소 같은 각종 수용연료를 총칭하여 일반적으로 바이오에너지(bioenergy)라 한다.

최근 휘발유 소비자 가격이 갤런당 2.9달러를 넘는 미국의 경우 휘발유 생산비용이 2.2달러를 상회하게 되면서 기존 휘발유에 대해 바이오에너지 특히 바이오에탄올(bioethanol)이 가격 경쟁력을 갖게 되었다. 현재 휘발유 가격이 리터당 1,600원에 달하는 국내의 사정을 고려한다면 휘발유의 생산비용이 갤런당 2.3달러 수준으로 미국과 유사하지만 수입 원유에 대한 의존도가 미국에 비해 훨씬 높은 국내의 경우 대체 연료 보급의 일환으로 바이오 연료 생산 및 확대를 위한 연구에 보다 적극적으로 나서야 할 시점이다. 특히 국가에너지의 97% 이상을 해외에 의존하고 있으며 유사시 에너지 공급라인을 보장하기 어려운 우리나라의 입장에서는 향후 에너지 안정 확보 및 자립 달성, 더 나아가 첨단생명과학기술을 확보한 연구인력을 기반으로 하는 원천기술획득을 통해 대외수출도 가능함으로 바이오매스와 같은 천연 자원으로부터의 재생에너지 생산기술개발은 반드시 추진되어야 한다. 이런 관점에서 볼 때 매우 미약한 대응이지만 현재 정부가 기후변화협약 등 국제 환경변화에 대응하고 에너지 안보를 확보하기 위하여 현재 1.4%의 신재생에너지 비율을 2011년까지 5%로 대폭 확대할 예정이다.

다양한 신재생에너지원 중 바이오에너지는 여타의 재생에너지와는 다른 장점이 있다. 바이오에너지는 무형의 에너지(열, 전기 등)를 생산하는 다른 재생에너지(풍력, 태양열 등)와는 달리 기계 액체 고체 같은 형태를 갖는 에너지(메탄, 수소, 알콜, 바이오디젤, 고체연료 등)를 생산하므로 그 결과 에너지 저장성 및 이동성이 매우 높다. 바이오에너지는 또한 그 원료가 식물체인 각종 농업 및 환경 폐기물이기 때문에 지구온난화의 주범으로 지목되는 온실가스의 하나인 이산화탄소(CO₂)를 증가시키지 않는데 이는

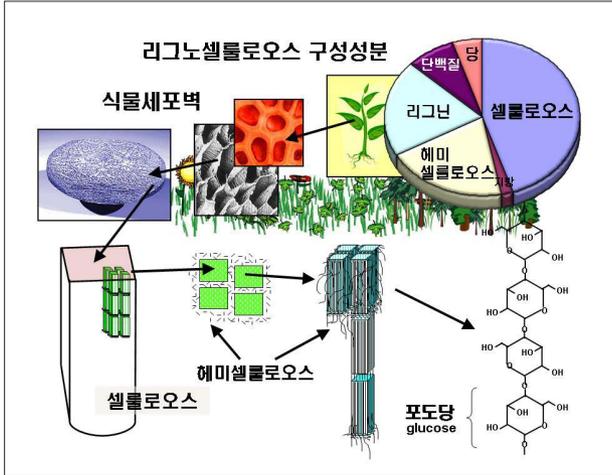
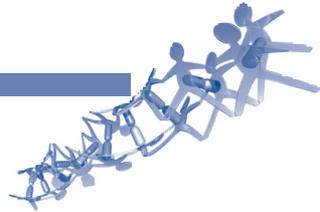


그림 1. 목질계 바이오매스 구성성분

사용시 발생하는 이산화탄소가 식물이 성장할 때 흡수되어 대기 중 CO₂ 농도 증가에 기여하지 않는 CO₂-neutral 에너지이기 때문이다 (그림 2). 또한 바이오에너지는 석탄, 석유 같은 화석연료와는 달리 중금속 및 다른 유해물질을 포함하고 있지 않으며, 각종 식물성 쓰레기를 줄이는 효과가 있고, 기존의 자동차 엔진에 휘발유와 함께 혼합하여 사용할 수 있는 장점이 있다 (Ragauskas et al., 2006; Schubert, 2006). 이들 바이오에너지 중 현재 전세계적으로 제일 비중을 많이 차지하는 것이 바이오매스로부터 생산되는 바이오에탄올이다. 현재 선진국 특히 미국에서 이용되고 있는 수송용 연료 에탄올은 모두 옥수수로부터 생산되는데, 바이오에탄올과 구별하여 옥수수에탄올 (corn ethanol)이라 불린다. 그런데 이 '옥수수에탄올'은 옥수수 열매의 전분 (starch)을 주 원료로 사용하며 발효과정 (ethanol fermentation process)을 통해 에탄올을 생산하는 것으로 이때 쓰이는 옥수수는 식용 원료로 그 원자재의 높은 비용 때문에 생산비용이 높아 본격적인 연료로서의 생산에 있어 경제적인 타당성문제를 극복해야 하는 문제가 있다 (DOE US: Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: a joint research Agenda, DOE/SC-0095. U.S. Department of Energy Office of Science and Office of Energy Efficiency and Renewable Energy; 2006).

이를 극복하기 위해 목질계 바이오매스를 통한 바이오에탄올생산에 대한 연구가 최근에 본격적으로 진행되고 있다 (표1). 식물체의 주된 구성원인 목질계 바이오매스 리그노셀룰로오스로부터 생

표1. 목질계 바이오에탄올의 에너지화의 목표와 기대효과*

요소	현재	중간기	장기
생산량 (억 리터)	150	760	1140 - 7570
화석연료	2%	10%	15 - 100%
대체비율			
CO ₂ 감소율	1.8%	9%	14 - 90%
원재료	전분 (에너지수득율 14%이하)	목질계 폐기물	목질계 에너지 작물 (에너지수득율37%이상)
공정	전분발효: 소량의 목질계 공정	강산성 화학물을 이용한 전처리 공정에서 효소분해로 전환; 셀룰라아제효소이용	효소만을 이용한 전처리공정: 셀룰라아제 및 다수의 글리코실 가수분해효소 (glycosyl hydrolase) 사용

*위 표는 미국 정부 산하 에너지부에서 발간한 보고서를 근거로 작성함 (DOE US: GTL Roadmap: Systems Biology for Energy and Environment, U.S. Department of Energy Office of Science, 2006)

물제품을 생산하는 공정을 간단히 설명하면 다음과 같다. 옥수수와 같은 곡류에 존재하는 탄수화물인 녹말과 같이 셀룰로오스도 포도당으로 구성되어 있는 탄수화물이나, 셀룰로오스는 녹말보다 포도당으로의 분해가 매우 어렵다. 아울러 지구상 천연 물질 중 가장 난분해성 물질 중 하나인 리그닌 (lignin)과 결합되어 있어, 이를 효과적으로 당화하기 위해서는 여러 가지 물리, 화학적 방법을 이용한 전처리 (pretreatment) 공정이 필요하다. 그러한 전처리 공정을 거친 후, 섬유소 분해효소 셀룰라아제 (cellulase)를 이용하여 당화를 시키면 포도당을 얻을 수 있다. 생산된 포도당을 미생물을 이용한 발효를 통해 에탄올을 얻을 수 있다.

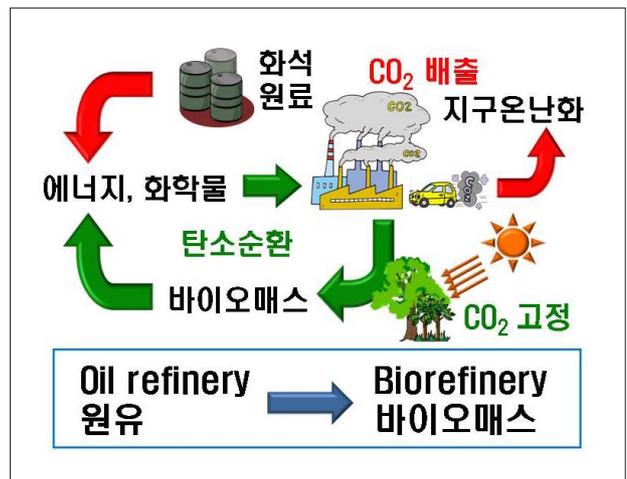
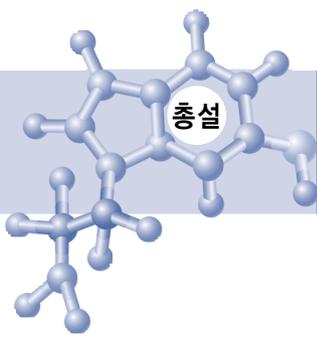


그림 2. 바이오에너지 순환



전분의 당화외는 달리 효과적 전처리 공정이 없이는 20% 미만의 효소적 당화 수율밖에 가져다 주지 못하는 리그노셀룰로오스로 구성된 목질계 바이오매스는 반드시 전처리공정을 거쳐야 하는데 이 과정에서 많은 비용이 소요된다. 목질계 바이오매스는 열화학 물리적처리를 통한 전처리공정에서 헤미셀룰로오스가 가수분해되어 제거되고 최종적으로 생성된 셀룰로오스는 효소에 분해되기 쉬운 비결정질 (amorphous) 상태로 바뀐다. 이러한 비결정질 셀룰로오스는 셀룰라아제에 의해 효소적 가수분해를 통해 포도당으로 전환된다. 현재 바이오에탄올 공정의 상업화의 최대 장애는 바로 셀룰라아제로 대표되는 섬유소 분해효소의 높은 가격이다. 현재는 바이오에탄올의 전체 생산가의 1/3을 바로 셀룰라아제 비용이 차지하고 있다. 따라서, 바이오에탄올 공정의 성공적 산업화에는 경제적으로 저렴하고 생산적으로 효율적인 섬유소 분해효소의 개발이 필수적이다.

전통적인 목질계 바이오매스의 생물학적 변환 기술

기본적으로 자연상태의 유기물질을 포함한 바이오매스의 분해는 혐기적인 (anaerobic) 생물학적 과정을 통해 메탄 (methane)과 이산화탄소로 분리된다. 자연상태의 혐기성 분해과정에는 여러 종류의 미생물 집단이 관여하는데 이들은 다당류 (polysaccharides) 인 목질계 바이오매스를 발효가 가능한 당으로 만들고 그 외 미생물 집단은 이 생성된 당을 통해 메탄과 이산화탄소를 만든다. 하지만 이 같은 혼합 발효 공정은 대규모로 조성되어 유지하기 매우 어렵다. 특별히 공학적으로 목질계 바이오매스는 가수분해를 통해 발효가 가능한 당으로 전환되는 공정에 아직까지 여러 가지 기술적 한계를 보이고 있다. 생물학적으로 분해 할 수 있는 중합체 (polymer) 중 가장 비중이 높은 셀룰로오스는 구조적으로 리그닌이나 헤미셀룰로오스로 둘러싸여 있다. 리그닌의 경우 매우 단단한 3차원구조의 중합체로 구성되어 호기적인 조건하에서 일부의 진균 중 백색부후곰팡이 (white rot fungi)에서 리그닌을 분해하는 현상이 보고되고 있다 (Martinez *et al.*, 2005).

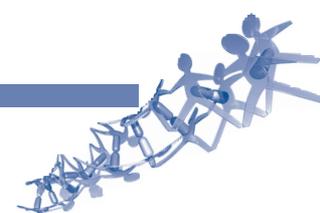
목질계 바이오매스를 분해하는 전통적인 기술에서 중합체 원자계의 전처리공정은 가장 근본적인 목질계 바이오매스 성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 가수분해를 증진시켜주는데, 이 전처리 공정에는 중합체의 기질 입자 크기를 축소시키는 물리적 공정, 열-화학 처리공정 그리고 특정한 혼합효소 (enzyme cocktail) 처

리공정이 있다. 이때 최종적으로 사용하는 분해효소의 역할이 매우 중요하므로, 바이오매스의 생물학적 분해에서 제일 중요한 과정은 목질계 바이오매스 분해효소를 생산하는 균주를 동정하는 것과 가수분해 효소 체계를 연구하고 개발하는 것이다. 왜냐하면 미생물이 세포 밖으로 생산하는 가수분해 효소 (extracellular hydrolytic enzyme)인 셀룰라아제는 전처리공정을 거친 목질계 바이오매스 분해에 매우 효과적이기 때문이다.

기존의 보편적인 방법으로 미생물을 통한 셀룰라아제 생산은 그 특이적 활성보다는 생산량에 치중해 다량의 셀룰라아제를 생성하는 균주를 분리 (isolation)하고 개발하여 유전자 변형 균주를 통해 셀룰라아제 생산량을 극대화하는데 치중했다. 가장 대표적인 사례로 진균류인 *Trichoderma reesei*를 이용한 셀룰라아제 개발인데, 현재 가장 산업적인 단계까지 개발하고 활용하고 있다 (Keränen & Penttilä, 1995). 그러나 이 같은 호기성 진균주의 경우 복합체를 이루지 않고 각각의 독립된 셀룰라아제를 생성하는데 이 경우 각 분해효소가 셀룰로오스를 근간으로 하는 바이오매스를 완전 분해하지 못하고 반드시 여러 단계의 전처리 과정을 거쳐 생성된 비결정질 섬유소를 사용해야 하는 단점이 있어 이 부가비용으로 인해 경제적인 면에서도 채산성이 떨어진다고 볼 수 있다. 이를 극복하기 위해 최근에는 유전자 조작이 간편하고 바이오매스 분해 효율이 높은 혐기성 세균을 이용한 '거대 세포외 셀룰라아제 효소 복합체' (large extracellular enzyme complexes) '셀룰로솜' (cellulosome)을 이용한 바이오매스 분해에 대한 연구가 주목을 받고 있다.

효소 소단위체의 바이오매스 분해 효율을 극대화 시키는 효소복합체 셀룰로솜

셀룰로솜은 *Clostridium* (Lamed *et al.*, 1983), *Acetivibrio* (Ding *et al.*, 1999), *Bacteroides* (Ding *et al.*, 2000) 그리고 *Ruminococcus*같은 혐기성 세균이 생성하는데, 이 세포외 효소 복합체의 개념은 처음 고온성 혐기 세균인 *Clostridium thermocellum*의 셀룰라아제 시스템에 의해 처음 제안되었다 (Bayer *et al.*, 1985). *Clostridium*의 다른 종들 중 중온성 혐기 세균인 *C. cellulovorans* (Shoseyov & Doi, 1990; Sleat *et al.*, 1984)과 *C. cellulolyticum* (Belaich *et al.*, 1997)도 분해 효율이 높은 셀룰로솜을 생성해 목질계 리그노셀룰로오스를 분해하는 세균이다. 이



들 혐기성 세균에서 셀룰로솜 조합체 (cellulosomal complex)의 기본적인 구조는 하나의 cellulose-binding module(CBM)을 가지고 있는 기본골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)가 주축이 되어 catalytic module을 가진 9개의 셀룰라아제 혹은 헤미셀룰라아제의 효소 소단위체 (enzyme subunits)들이 합쳐져서 이루어진다 (그림 3). 그 조합체의 분자량은 대략 1 MDa 정도 되는 비교적 큰 구조이다. 이 구조를 이루기 위해 기본골격소단위체에 있는 9개의 cohesin module이 강력하게 각각의 효소 소단위체에 있는 dockerin module에 단백질간의 상호 작용 (protein-protein interaction)에 의해 결합하게 된다. 이와는 매우 다르게 호기성 세균의 경우 각각의 분해효소는 catalytic module과 CBM을 모두 가지고 있으며 dockerin module이 존재하지 않아 복합체를 형성하지 않고 개별적으로 기질에 반응한다.

셀룰로솜은 지난 수년간 생화학적인 방법으로 유전자와 단백질 구조가 연구 되었다. 하지만 여러 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제 (hemicellulase: xylanase, mannanase, pectate lyase 등)가 결합해서 이루어지는 복합체인 셀룰로솜은 그 조합 (assembly)의 생성요인이 매우 중요한 부분임에도 그 구조의 결정요인과 이에 관계되는 조절자의 연구는 매우 미흡한 상태이다. 특별히 그 조절 유도체 (inducer)에 의해 특이적인 셀룰로솜 소집단 (cellulosomal subpopulation)이 형성되므로 조절자 (regulator)와 유도체에 대한 연구는 매우 중요하며, 이를 토대로 그 구조 (cellulosomal assembly)를 개선해 만든 고효율성 변형체 셀룰로솜 개발이 가능해 졌다.

*C. cellulovorans*의 셀룰로솜에 관여하는 유전자 및 전사 (transcripts)구조는 크기 두 구조로 나눌 수 있다. 기본골격소단위

체를 만드는 CbpA (cellulose binding protein A)가 리더 유전자로 있는 *cbpA* cluster와 *cbpA* cluster에 속하지 않은 유전자들이다. *cbpA* cluster중 *cbpA-exgS-engH-engK*는 조절인자의 변화에 따라 전사의 길이와 구조를 달리한다. (주: cellulosomal subunits coding for the scaffolding protein CbpA; the exoglucanase ExgS; the endoglucanases EngH & EngK) 예를 들어 에너지원으로 쉽게 변이될 수 있는 수용성 당인 cellobiose의 경우 *cbpA-exgS*와 같은 주요 유전자만 발현하고 대부분의 다른 셀룰라아제 유전자의 발현은 억제되는 것을 볼 수 있다. *cbpA* cluster에 속하지 않은 유전자도 *cbpA* 유전자의 발현과 비슷한 유형의 조절 형태를 보이는데 이와는 다르게 헤미셀룰라아제에 속하는 xylanase (*xynA* and *xynB*)와 pectate lyase (*pelA*) 유전자는 각각 헤미셀룰로오스인 xylan이나 pectin이 주요 탄소 및 에너지원 (sole carbon & energy source) 일 때에만 발현하는 특이적 현상을 보였다 (Han *et al.*, 2003a). 셀룰로솜 유전자들은 보고된 대부분의 sigma factor가 6^A 로 프로모터상에 비슷한 염기서열을 갖고 있다. 이와 맞물려 셀룰로솜을 이루는 이 유전자들은 생장곡선 (growth curve)상에서도 비슷한 조절형태를 보이며 이는 *cbpA-exgS* 및 *engE* (cellulosomal subunits coding for the endoglucanases EngE) 등 주요 효소 소단위체를 중심으로 동일한 패턴의 발현양상을 보이며 매우 안정적이고 세포 생장에 필수적인 유전자의 특이성을 보인다. 이는 또한 에너지원에 따라 전사체의 유도와 억제를 세균의 생장과 맞물려 긴밀하게 함으로 에너지를 효율적으로 이용하는 현상을 보여 준다 (Doi *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2003b).

유전자 전사체 연구의 분석을 통해 *C. cellulovorans*의 셀룰로솜의 조절양상을 보면 특정한 구성성분을 가지고 있는 바이오매스에 대해 가장 효과적인 분해를 할 수 있는 선별된 효소 소단위체를 구성하고 이로 인해 셀룰로솜 소집단 (cellulosomal subpopulation)이 생성된다는 예측을 할 수 있었다 (Han *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2003b). 이를 뒷받침하기 위해 proteomics 분석 연구를 진행하여, 액체 배지의 상청액 (supernatant)에 있는 효소를 분리 정제하고 최적화하여 순도 높은 효소를 얻은 후, 이 순수 분리한 효소를 two-dimensional (2-D) gel electrophoresis 로 다시 분리하고 각 spot의 단백질 중 cellulosomal enzyme subunits의 단백질서열을 mass spectrometry analysis을 통해 해석해 각 효소를 동정하고 포지션화 했다. 2D proteomics 결과를 통해 각 효소는 유도

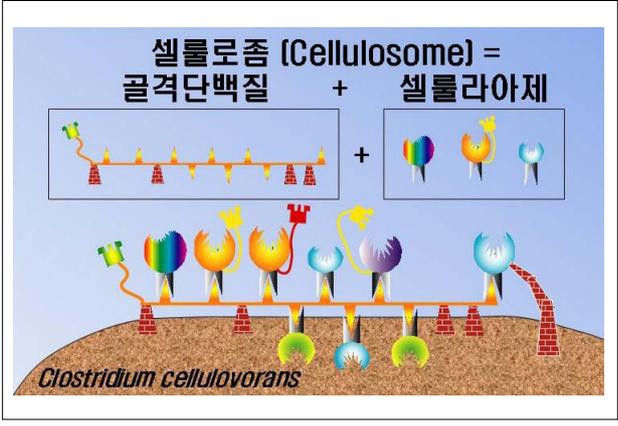
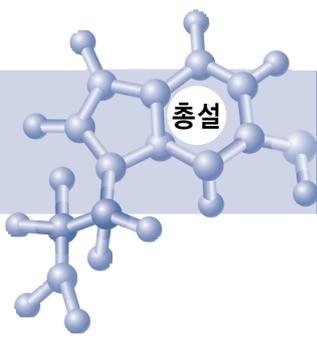


그림 3. 셀룰로솜 구조



와 억제조절형태에서 배지에 있는 탄소원 (carbon source) 즉 에너지원에 가장 큰 영향을 받는다는 사실을 확인했다 (Han *et al.*, 2004a; Han *et al.*, 2005a). 또한 이는 효소 활성도 (enzyme activity)에도 동일하게 영향을 미쳐서 분해하기 힘든 셀룰로오스를 주 에너지원으로 사용한 배지에서 분리한 셀룰로솜이 가장 큰 활성도를 나타냈으며 실제 바이오매스인 옥수수섬유소 (corn fiber)와 인공적으로 혼합성분을 만든 배지에서 가장 다양하고 높은 유도발현 (induced expression)을 보였고 활성도 또한 높았다. 이는 각 헤미셀룰라아제와 셀룰라아제 효소 소단위체들이 상호 보완적인 역할을 하고 셀룰로솜과 非셀룰로솜 역시 바이오매스 분해에 대해 높은 상호상승작용 (synergy effect)을 나타낸다는 사실을 증명했다 (Han *et al.*, 2004a). 이는 또한 유전자전사를 통해 본 조절유형의 결과와 매우 유사한 결과로 transcripts 분석실험과 proteomics 분석에서 셀룰로솜의 조절 수준이 동일하다는 증거이다 (Han *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2004a).

*C. thermocellum*의 셀룰로솜의 경우 주어진 에너지원인 바이오매스의 구성성분 (주: 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 구성비율)과 상관없이 셀룰로솜의 구조가 임의로 결정된다고 보고되었다 (Bayer *et al.*, 2007). 그러나 이와 다르게 *C. cellulovorans*의 경우 에너지원으로 쓰이는 바이오매스의 구성 성분에 따라 셀룰로솜의 구성도 매우 특이하게 조절되는 결과를 얻었다. 이 결과는 임의적인 효소의 혼합이나 인공적인 셀룰로솜을 만들어 산업화시킬 경우 주어진 공급원료 (feedstock)에 따라 특이적인 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제의 구성이 필요하다는 근거를 마련했다 (Han *et al.*, 2005a; Koukikolo *et al.*, 2005). 또한 각 바이오매스의 탄소원 및 에너지원 (sole carbon & energy source) 성분에 따라 디자인된 셀룰로솜을 만들어 활성도를 극대화할 수 있다는 장점을 *C. cellulovorans*은 가지고 있다. 이 결과를 토대로 고도로 디자인된 변형제 셀룰로솜을 개발해 실용화함으로써 목질계 바이오매스 변환의 극적 향상을 불러일으킬 것으로 기대된다.

미래형 목질계 바이오매스의 생물학적 전환공정

셀룰라아제 복합체인 셀룰로솜은 에너지원이 풍족하지 않은 열악한 상황에서 최소한의 바이오매스 에너지원으로 최대한의 대사 에너지를 만들어 내야 하는 혐기성 세균의 특이적 환경 적응 현상으로 생성된 것으로 생존에 직접적으로 관련된 미생물의 성장, 대

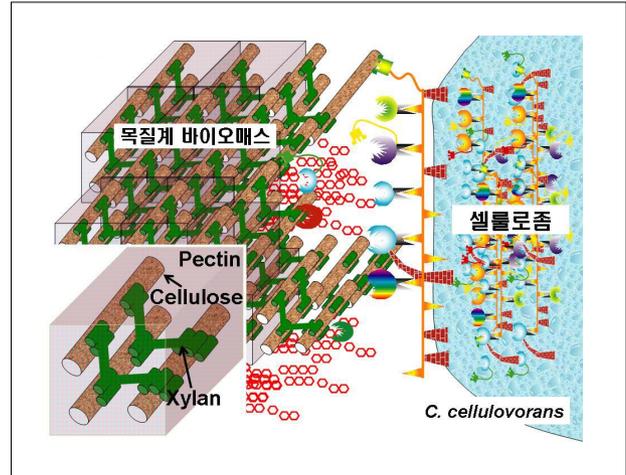


그림 4. 셀룰로솜 구성과 바이오매스 성분

사 및 발달에 매우 중요한 효소이다. 이는 또한 세균이 가지고 있는 고도로 발달한 조절원리 (regulatory mechanism)로 가장 필요한 시기에 가장 효과적인 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제 효소 소단위체 (enzyme subunits)를 조합해 목표하는 섬유소 탄소 에너지를 공격하는 매우 중요한 미생물의 성장 전략 중의 하나이다 (그림 4). 이 같이 바이오매스 분해에 있어 셀룰로솜의 중요성으로 인해, 지난 20년 동안 셀룰로솜의 구조의 생화학적 연구가 진행되었지만 아직 우리가 알고 있는 정보는 극히 빈약한 실정이고, 특별히 셀룰로솜의 조합 (cellulosomal assembly)에 관여하는 조절인자 (regulatory factor)나 조절자 (regulator) 그리고 조절 원리는 그 중요성에 비해 연구된 성과가 극히 미비한 상태이다. 미약하지만 효과적인 바이오매스 분해를 위한 셀룰로솜 복합체의 조절연구와 그 연구를 토대로 인공적으로 디자인한 재조합체 (recombinant) 셀룰로솜의 연구는 최근 관련 연구를 통해 가능성을 제시했고, 사전연구를 통해 매우 긍정적인 결과를 얻었다.

전통적인 생물학적 바이오매스 분해 연구는 대부분의 경우 분해 효소 셀룰라아제 혹은 헤미셀룰라아제의 생산량 극대화에 초점을 맞춘 연구가 진행 중이고 그 효소와 바이오매스를 주원료로 당을 생성하고 이를 이용한 다음단계의 생물공정을 거쳐 바이오연료나 화학합성물을 얻는데 주력하고 있다. 그러나 이상적인 미생물의 바이오매스 분해와 바이오에너지 생성 연구는 한 기주 내의 미생물이 만들어 내는 효소 활성도가 높고 안정적인 복합효소를 통해 효과적인 바이오매스 분해하여 당화시키고, 그로 인해 생성된

당을 동일한 미생물이 에너지원으로 이용하여 발효과정을 거쳐 최종 바이오에너지를 생성하는데 있다. 이와 아울러 전체 생물공정 중 생성되는 잉여 부산물에 대한 저항력을 가진 균주 개발도 중요한 요소이다. 또한 바이오매스의 전처리과정을 줄일 수 있는 효과적인 복합효소인 셀룰로솜의 기능, 조절, 발현 유전자 연구와 각기 다른 바이오매스 원재료의 성분을 고려한 디자인 셀룰로솜 복합효소 개발, 그리고 이 효소의 원활한 생성을 조절하는 유전자의 조절 혹은 다른 기주에 주입시키는 기술개발, 원치 않는 독성 부산물을 만드는 유전자 변이체 연구가 최우선이 되어야 한다. 저자는 이 복합효소가 바이오매스 성분에 따라 복합효소의 구조와 셀룰라아제 단위분해효소 (cellulase enzyme subunit)의 구성비를 달리하며 이를 조절하는 조절자가 존재한다는 사실을 증명했다 (Han *et al.*, 2003a; Han *et al.*, 2004a; Han *et al.*, 2005a). 또한 이들 조절인자를 응용할 경우 가장 효과적인 복합효소성분을 인공적으로 만들 수 있다는 근간을 제공했다. 또한 바이오매스 분해를 통한 당의 이화 생성물을 통해 negative control을 받고 있다는 사실을 증명하고 그에 관여하는 조절인자와 조절자에 대한 연구를 통해 그 요인을 제거하고 up regulation을 유도하는 방법론을 제시한바 있다. 이를 통해 최종 바이오에너지의 생산량을 촉진하고 방해 물질을 제어 할 수 있는 방법을 찾고 있다. 이 유도조절 시스템은 단순히 *C. cellulovorans*뿐 아니라 다른 세균의 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제 유전자에도 적용되리라 생각된다.

현재 연구가 진행중인 재조합체 소형 셀룰로솜 (designer recombinant mini-cellulosome)은 각기 다른 기주로 생체내 (*in vivo*) 상태에서 발현 할 수 있도록 하는 기술이 시도 되고 있고, 그 효소 발현량의 증가와 활성도를 높이는 연구를 계속하고 있다 (Arai *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2004). 이는 기본적으로 *C. cellulovorans*의 재조합 미니 셀룰로솜을 다른 기주 (대장균 및 *Bacillus* 등)에 도입해 발현 (expression) 시킨다 (그림 5). 셀룰로솜의 세포 외 생산은 배지의 상등액을 수확해 단백질을 정제하는 방법으로 비교적 절차가 매우 쉽고 단백질분해효소 (protease)의 영향을 적게 받으며 열이나 산도 (pH)등의 물리적인 충격이 적어 손상되지 않는 효소 (intact protein)로 정제 할 수 있다. 또한 다른 기주에도 적용할 수 있게 관련 vector와 기술적인 면을 최적화 했다. 예를 들어 헤미셀룰라아제 (xylanase)인 XynB와 non-cellulosomal enzyme (endoglucanase)인 EngO는 각각 대장균에 성공적으로 발현시켰고 그 효소의 intact protein양과 효소의

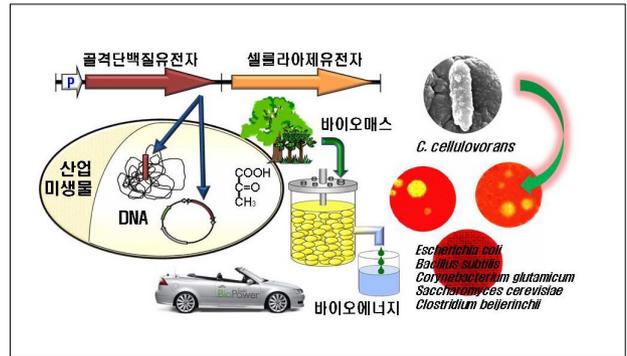


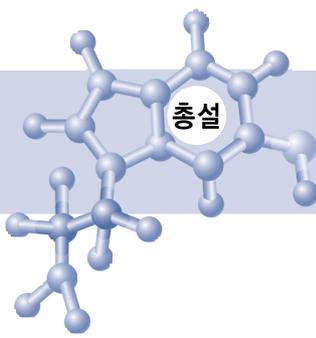
그림 5. 셀룰로솜 도입한 바이오에너지 생산 균주

활성도가 매우 안정적으로 높은 것을 확인했다 (Han *et al.*, 2004b; Han *et al.*, 2005b). 또한 에탄올발효를 위한 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)와 고부가 플랫폼 화합물 (C3, C4, C5) 생산을 위한 산업세균 *Corynebacterium glutamicum* (Han *et al.*, 2007; Vertes *et al.*, 2006)을 기주로해 재조합 미니셀룰로솜을 도입하는 연구가 저자를 통해 진행중이다.

셀룰로솜을 탑재한 슈퍼균주 그리고 친환경 바이오정유 산업 (Biorefinery)

바이오에너지 창출을 위한 슈퍼균주 연구의 목적은 원재료의 경제적 손실이 전혀 없는 바이오매스와 이를 주 에너지 원으로 이용하는 미생물의 상호작용을 극대화 하여 인간이 필요로 하는 친환경 청정에너지를 창출하는데 있다. 예를 들어 셀룰로솜을 도입한 재조합 효모 (yeast)나 *Clostridium beijerinckii* (Ezeji *et al.*, 2007)는 바이오매스를 에너지원으로 각각 액체 연료인 바이오에탄올과 부탄올을 생산한다. *C. glutamicum*을 도입균주로 한 실험에서는 이 미생물의 대사공학을 이용해 플랫폼 화합물 전구체를 생성하고 그 중 유기산 (organic acid: succinate)을 주원료로 생분해성 플라스틱의 일종인 PBS (PolyButylene Succinate)를 생산해 석유화학제품에서 파생되는 기존의 제품들을 대체하는 역할을 한다 (Okino *et al.*, 2005).

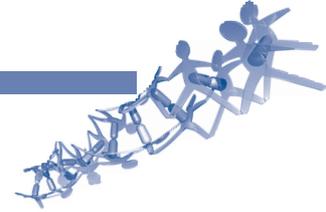
이 연구의 또 다른 중요성은 대체 에너지 개발을 통한 환경회복에 있다. 바이오매스는 농작물과 나무, 농업산 폐기물, 수초, 동물의 배설물, 도시 쓰레기, 그리고 여타의 폐기물에서 추출된 재생 가능한 유기 물질로 이는 모두 지구 온난화와 환경오염에 매우 깊



속이 관련 되어 있다. 현재 전 산업의 주 에너지원인 화석연료는 전 세계적인 남용과 그 매장량의 감소로 인한 국제유가변동은 매우 심각한 경제, 사회적 이슈로 전 세계 모든 나라에 영향을 주고 있다. 바이오에너지 연구는 글로벌 환경 문제와 대체에너지 개발이라는 극명한 과제를 위한 해결 방편의 초석으로 환경 폐기물중의 가장 비중을 차지하는 바이오매스를 이용한 에너지 창출을 위한 근본적이고 효과적인 환경 친화적 연구를 수행하는 것을 목표로 하고 있다.

인용문헌

- Arai, T., Matsuoka, S., Cho, H.-Y., Yukawa, H., Inui, M., Wong, S.-L. & Doi, R. H. (2007). Synthesis of *Clostridium cellulovorans* minicellulosomes by intercellular complementation. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1456–1460.
- Bayer, E. A., Setter, E. & Lamed, R. (1985). Organization and distribution of the cellulosome in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol* **163**, 552–559.
- Bayer, E. A., Lamed, R. & Himmel, M. E. (2007). The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Cur Opin Biotechnol* **18**, 237–245.
- Belaich, J. P., Tardif, C., Belaich, A. & Gaudin, C. (1997). The cellulolytic system of *Clostridium cellulolyticum*. *J Biotechnol* **57**, 3–14.
- Cho, H.-Y., Yukawa, H., Inui, M., Doi, R. H. & Wong, S.-L. (2004). Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5704–5707.
- Ding, S.-Y., Bayer, E. A., Steiner, D., Shoham, Y. & Lamed, R. (1999). A novel cellulosomal scaffoldin from *Acetivibrio cellulolyticus* that contains a family 9 glycosyl hydrolase. *J Bacteriol* **181**, 6720–6729.
- Ding, S.-Y., Bayer, E. A., Steiner, D., Shoham, Y. & Lamed, R. (2000). A scaffoldin of the *Bacteroides cellulosolvans* cellulosome that contains 11 type II cohesins. *J Bacteriol* **182**, 4915–4925.
- Doi, R. H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y. & Han, S. O. (2003). Cellulosomes from mesophilic bacteria. *J Bacteriol* **185**, 5907–5914.
- Ezeji, T., Qureshi, N. & Blaschek, H. P. (2007). Butanol production from agricultural residues: Impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng* **97**, 1460–1469.
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2003a). Regulation of expression of cellulosomal cellulase and hemicellulase genes in *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol* **185**, 6067–6075.
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2003b). Transcription of *Clostridium cellulovorans* cellulosomal cellulase and hemicellulase genes. *J Bacteriol* **185**, 2520–2527.
- Han, S. O., Cho, H. Y., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2004a). Regulation of expression of cellulosomes and noncellulosomal (hemi)cellulolytic enzymes in *Clostridium cellulovorans* during growth on different carbon sources. *J Bacteriol* **186**, 4218–4227.
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2004b). Isolation and expression of the *xynB* gene and its product XynB, a consistent component of the *Clostridium cellulovorans* cellulosome. *J Bacteriol* **186**, 8347–8355.
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2005a). Effect of carbon source on the cellulosomal subpopulations of *Clostridium cellulovorans*. *Microbiology* **151**, 1491–1497.
- Han, S. O., Yukawa, H., Inui, M. & Doi, R. H. (2005b). Molecular cloning and transcriptional and expression analysis of *engO*, encoding a new noncellulosomal family 9 enzyme, from *Clostridium cellulovorans*. *J Bacteriol* **187**, 4884–4889.
- Han, S. O., Inui, M. & Yukawa, H. (2007). Expression of *Corynebacterium glutamicum* glycolytic genes varies with carbon source and growth phase. *Microbiology* **153**, 2190–2202.
- Keranen, S. & Penttila, M. (1995). Production of recombinant



proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Current Opinion in Biotechnology* **6**, 534–537.

Koukiekolo, R., Cho, H.-Y., Kosugi, A., Inui, M., Yukawa, H. & Doi, R. H. (2005). Degradation of corn fiber by *Clostridium cellulovorans* cellulases and hemicellulases and contribution of scaffolding protein CbpA. *Appl Environ Microbiol* **71**, 3504–3511.

Lamed, R., Setter, E. & Bayer, E. A. (1983). Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol* **156**, 828–836.

Martinez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M. J., Gutierrez, A. & del Rio, J. C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *Int Microbiol* **8**, 195–204.

Okino, S., Inui, M. & Yukawa, H. (2005). Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 26.

Perlack, R. D., Wright, L. L., Turhollow, A. F., Graham, R. L., Stokes, B. J. & Erbach, D. C. (2005). Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproduct industry: the technical feasibility of a billion-ton annual supply. In *A Joint Study Sponsored by the US Department of Energy and the US Department of Agriculture: Oak Ridge TN: Oak Ridge National Laboratory.*

Ragauskas, A. J., Williams, C. K., Davison, B. H. & other authors (2006). The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science* **311**, 484–489.

Schubert, C. (2006). Can biofuels finally take center stage? *Nat Biotech* **24**, 777–784.

Shoseyov, O. & Doi, R. H. (1990). Essential 170-kDa subunit for degradation of crystalline cellulose by *Clostridium cellulovorans* cellulase. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 2192–2195.

Sleat, R., Mah, R. A. & Robinson, R. (1984). Isolation and characterization of an anaerobic, cellulolytic bacterium, *Clostridium cellulovorans* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **48**, 88–93.

Vertes, A. A., Inui, M. & Yukawa, H. (2006). Implementing biofuels on a global scale. *Nat Biotech* **24**, 761–764.