

## 목질바이오매스의 효소 당화 기술에 관한 연구 동향

김영숙<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>국민대학교 삼림과학대학

### A Research Trend of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass : A Literature Review

Yeong-Suk Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Forest Science, Kookmin University, Seoul 136-702

**ABSTRACT** : The high costs for ethanol production with lignocellulosic biomass as a second generation energy materials currently deter commercialization of lignocellulosic biomass, especially wood biomass which is considered as the most recalcitrant material for enzymatic hydrolysis mainly due to the high lignified structure and the nature of the lignin component. Therefore, overcoming recalcitrance of lignocellulosic biomass for converting carbohydrates into sugar that can subsequently be converted into biobased fuels and biobased products is the primary technical and economic challenge for bioconversion process. This study was mainly reviewed on the research trend of the enhancement of enzymatic hydrolysis for lignocellulosic biomass after pretreatment in bioethanol production process.

**Keywords** : Bioethanol, Enzymatic Hydrolysis, Lignocellulosic biomass, Cellulase, Surfactants

#### 서 론

기후 변화 협약 이행 및 온실가스 감축을 위한 화석 연료의 대체연료 모색 노력으로 인해 세계 바이오 에탄올 생산량은 2000년 이후 연평균 20%대의 증가율을 보여 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 2008년 말에는 약 512억 L/년, 2012년에는 약 820억 L/년에 이를 것으로 전망하고 있다. (MarketResearchAnalyst.com, 2008). 미국과 EU 등 선진국은 향후 2017~2030년까지 휘발유 소비의 20%~30%를 줄이고 바이오 연료 사용을 확대하겠다고 발표 하였으며, 미국은 물론, 브라질도 현재 11개의 전용 생산시설을 24개로 늘리는 등 바이오에탄올 생산시설의 확대되고 있는 상황이다(EERE, 2008). 특히 최근까지 세계적으로 바이오매스 에탄올 생산에는 주로 옥수수나 사탕수수 같은 전분계 곡물을 원료로 해왔고 생산 기술이 그런 원료에 적합하게 개발되어 왔다. 그러나 제2세대 에너지 원료로 목질계 바이오매

스가 부상되고 이를 원료로 한 에탄올 생산공정 개발이 활발하게 전개되고 있는 상황(Kim and Gorman, 2007)에서 국내의 독자적 기술개발의 필요성이 매우 크다고 할 수 있다. 더욱이 우리나라는 국토면적의 64%가 산림이고 산림에서 생산 가능한 목질바이오매스를 비롯하여 생활 폐재, 벃짚과 같은 농 폐기물등 목질자원의 에너지화 기술은 국내외적으로 매우 중요성이 크다고 할 수 있다.

목질계바이오매스는 그 재료가 갖는 화학적 조직학적 특성상 Cellulose, Hemicellulose, Lignin과 같은 화학적 조성분이 상호 매우 견고하게 결합되어 있고, cellulose의 결정성과 같은 요소가 강하게 당화반응에 영향하므로 인해 에너지나 화학원료를 위한 공정이 쉽지 않은 것으로 알려져 있다. Cellulose의 효소 당화는 전체 반응에서 많은 영향인자들 간의 복잡한 반응이 요구되며 특히 문제가 되는 영향인자들은 cellulose의 중합도나 결정화도, 반응 시 기질의 크기 및 효소가 접근할 기질 표면적 크기나 리그닌 분포, 전처

\* Corresponding author: (E-mail) yskim@kookmin.ac.kr

※ 본 연구는 국민대학교 교내 연구비(2008) 지원에 의해 수행되었음.

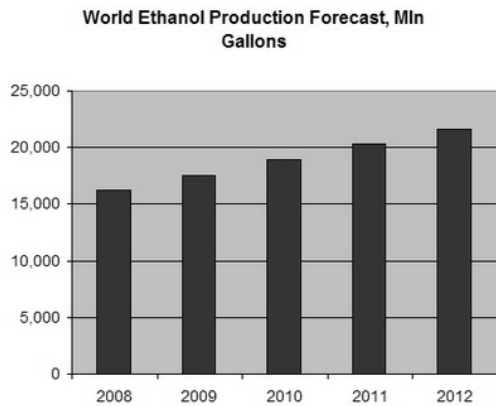


Fig. 1. world's ethanol production forecast 2008-2012, MarketResearchAnalyst.com

리과정에서 생산되는 효소활성 억제 물질 생산 등으로 거론되고 있다(Phillip et al, 1981; Fan et al, 1980; Fan et al, 1981; Grethlein et al, 1984; Rivers and Emert, 1988). 한편 cellulose 효소 당화에 영향을 미치는 인자로는 endo-glucanase (EG), cellobiogydrase(CBH),  $\beta$ -glucosidase(BGL)와 같은 여러 cellulase 상호 간의 상승작용, 기질에 대한 효소 흡착성 등이 연구되고 있다(Henrissat et al, 198; Nidetzky et al, 1994). 목질계 바이오매스로부터 에너지 원료를 얻어내기 위해서는 우선 상술한 영향인자들에 대한 세심한 연구를 통해 해결방안을 모색한 공정이 도출되어야 효율성을 갖출 것으로 평가되고 있다. 이러한 이유로 목질바이오매스는 효소 당화성을 증진시키기 위한 전처리, 단당류를 얻기 위한 당화처리, 단당류(육탄당, 오탄당)를 발효시키는 기술 등이 전분계 원료에 비해 복잡한 생산 공정과 비용이 소요되어 상용화에 어려움을 가지고 있는 것이 사실이다(Sassner et al, 2008).

이 같은 상황에서 본 총설에서는 목질계 바이오매스를 원료로 한 바이오에탄올 생산 중 특히 효소 당화공정에 집중된 문헌연구를 통하여 목질바이오매스 기질특성과 효소 당화성과의 관계, 이를 극복하기 위한 기술 개발 등 최근 연구동향에 대해 조사하였다.

### 목질바이오매스로부터 에탄올 생산과 당화과정

목질계바이오매스를 원료로 에탄올을 생산하기 위해서는 다음의 4가지 과정을 거쳐야 하는 것으로 알려져 있다. (1)전처리를 통해 lignocellulose 다발을 해체해서 효소가 cellulose나 hemicellulose 고분자에 접근할 수 있어야 하고,

(2)cellulose나 hemicellulose와 같은 고분자가 가수분해되어 단당류로 전환되어야 한다. (3)가수분해에서 획득한 단당류를 미생물로 발효시키고, (4) 발효에서 생성된 에탄올을 정류하고 탈수공정을 거쳐 순수한 에탄올을 획득할 수 있다.

목질계 cellulose나 hemicellulose와 같은 고분자를 가수분해하여 발효공정에 투입 가능한 단당류로 전환하는 당화공정은 일반적으로 산 당화와 효소당화 방법이 가장 널리 알려져 있다. Cellulose 당화에서 산당화가 고온에 낮은 pH가 요구되면서 설비 부식 우려, 낮은 당화수율, 발효 억제 물질 발생 등의 단점이 있는 반면에 효소 당화는 비교적マイル드한 조건에서 반응이 가능하다는 장점과 높은 당화수율에 발효 억제 물질 발생의 우려가 없다는 특징이 있다(Ogier et al., 1999; Lee et al., 1999; Taherzadeh 1999; Wyman, 1996). 그러나 효소 당화는 불과 수 분만에 가수분해 반응이 끝나는 산 당화에 비해 당화반응 시간이 매우 길어서 수일간의 시간이 소요되는 문제점이 있어 실제 상업화에 어려움이 있다(Taherzadeh et al., 1997; Tengborg et al., 2001).

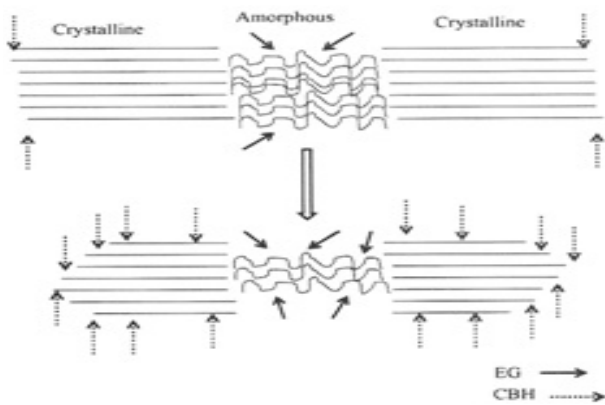
### 목질바이오매스 효소 당화 메카니즘

cellulose와 hemicellulose의 효소 당화에는 매우 특이적인 cellulase와 hemicellulase 효소(glycosylhydrolases)가 관여하는데 이들 효소 그룹에는 적어도 15개 단백질과 (family) 및 아과(subfamily)가 존재한다(Rabinovich et al., 2002). 이들 그룹의 효소 중에서 적어도 주요 3종의 cellulase 효소들이 상호 상승작용을 하며 cellulose 고분자로부터 최종 단당(sugar)로 전환시키는 것으로 알려져 있다(wyman, 1996). 이 과정에 필요한 주요 효소군은 Table 1에 나타난 바와 같이, endoglucanase(1,4- $\beta$ -D-glucan glucanohydrolase, EG), exoglucanase(1,4- $\beta$ -D-glucan cellobiohydrolase, CBH),  $\beta$ -glucosidase(1,4- $\beta$ -D-glucoside glucohydrolase, BGL)등이다(Maija et al., 2003; Henrissat et al., 1989).

1980년대 이전, 목질계 cellulose의 효소 당화 메카니즘은 하나의 효소적 관점에서 비결정성 영역이 먼저 반응하여 분해되고 그 후에 결정영역이 가수분해되는 순차적 효소반응으로 인식되었다(Khanal et al, 2010). 그러나 그 이후, 비결정영역과 결정영역이 함께 가수분해되는 동시형 메카니즘이 받아들여지고 있다(Marsden, 1985). 후자의 경우, 비결정성 cellulose는 EG에 의해 cello-oligomers가 생성되고,

**Table 1.** Major cellulase enzyme systems, their specificity, and end products (re.f. Maija et al., 2003).

Action	Endo	Exo	Exo
Trivial names	Cellulase, Endoglucanase	Cellobiohydrolase	Cellobiase
Systematic names	1,4-β-D-glucan-4-glucanohydrolase	1,4-β-D-glucan-cellobio-hydrolase	β-Glucosidase
Substrate	Cellulose, 1,3-1,4-β-glucans	Cellulose, 1,3-1,4-β-glucans	β-Glucosidase
Bonds Hydrolyzed	1,4-β	1,4-β	1,4-β, 1,3-β, 1,6-β
Reaction products	1,4-β-dextrins, mixed 1,3-1,4-β-dextrins	Cellobiose	Glucose



**Fig. 2.** Schematic of cellulose structure and its degradation by cellulase enzyme system. CBH: cellobiohydrolase (--->), and EG: endoglucanase (→) (Ref. Maija et al., 2003).

이들 cello-oligomers는 β-glucosidases에 의해 glucose와 cellobiose를 생산한다. 동시에 결정성 cellulose는 CBH와 EG가 공동으로 작용하여 cellobiose를 생성하며, 생성된 cellobiose들은 다시 cellobiase에 의해서 분해되어 glucose가 생산되는 이론이다(Marsden, 1985, Rabinovich et al, 2002). 즉, EG는 결정화도가 낮은 섬유를 분해하여 free 말단기를 생성하고, CBH는 free 말단기로부터 cellobiose units을 분리해 냄으로써 당 chain을 분해하게 된다. 그때 생성된 cellobiose는 BGL에 의해 glucose로 분해된다. Hemicellulose는 서로 다른 당 units을 함유하고 있기 때문에 이들의 분해 효소들은 더욱 복잡하다. Endo-1,4-β-D-xylanases, exo-1,4-β-D-xylosidases, endo-1,4-β-D-mannanases, β-mannosidases, acetyl xylan esterases, α-glucuronidases, α-L-arabinofuranosidases, 및 α-galactosidases가 hemicellulose분해에 관여하는 효소들이다(Jorgensen et al, 2003). Zhang and Lynd(2004)는 가수분해되지 않고 잔유하는 cellulose에 물리/화학적 성상의 변화가 발생하는 가설을 기존의 효소 당화 이론에 덧붙였다. 즉, 효소 활동에 동시에 발생하는 다음의 3가지 물리화학적 과정을 제안하였다. 첫째, 잔유 cellulose의 물리

화학적 성상의 변화, 둘째, cellulose 표면에서 용해된 중간 생성물(oligomers)을 방출하는 1차 당화, 셋째, 1차 당화 산물보다 작은 분자의 중간생성물(oligomers)과 최종산물(glucose)을 방출하는 2차 당화이다(Zhang and Lynd, 2004). 여기에서 가수분해 과정의 물리적 변화라 함은 비결정영역에 발생하는 cellulose의 팽윤(swelling), 분열(segmentation) 및 층분리(destratification)등을 말하고 이로 인한 효소접근 공간 확대를 의미한다. 화학적 변화는 EG효소의 비결정영역에서 분해된 고분자의 free 말단기 증가와 동시에 free 말단기를 지닌 cellobiose의 exoglucanase에 의한 분해로 인한 free 말단기 감소를 의미한다. 또한 유사한 효소 당화 기구에 대해 Gupta and Lee(2009)는 아비셀, 여과지, cotton, 비결정성 cellulose등의 순수한 섬유소기질을 사용한 실험에서 EG가 고체상 cellulose로부터 다양한 중합도의 다당류를 생성시키고, exoglucanase가 이보다 낮은 중합도의 oligomer로 전환, BGL이 낮은 중합도의 oligomer를 단당으로 분해하는데 기여하는 효소 당화 이론을 제안하였다(Gupta and Lee, 2009).

### 목질계 cellulose의 효소 당화성에 영향 인자

#### 목질바이오매스 특성과 관련된 인자

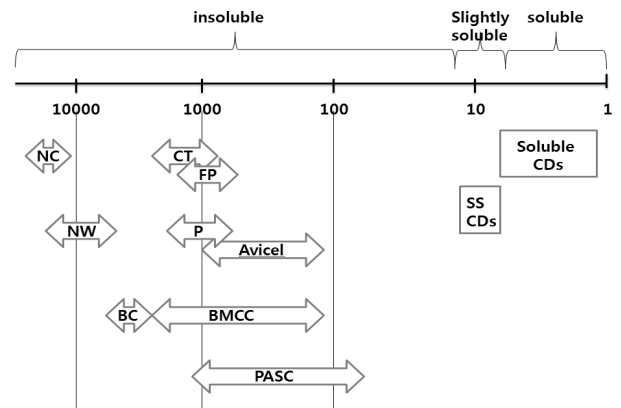
목질계 cellulose의 당화에 영향을 미치는 가장 중요한 인자로서 바이오매스의 물리적 화학적 특징을 들 수 있다. 구체적으로는 목질계 cellulose의 구성성분 및 구성비율, 이들의 견고한 구조, 배열특성 및 치환기 그룹, cellulose의 결정성과 중합도, 기질의 파티클 크기, 표면적 및 공극용적, 기질 투입농도 등을 들 수 있다. 이들 주요 인자에 대한 내용을 구체적으로 서술하면 다음과 같다.

목질계 바이오매스는 Cellulose(30-50%), hemicellulose (20-35%), lignin(10- 25%), 추출물과 미량의 무기물로 구성되어 있다. Cellulose 또는 β-1-4-glucan은 2000~27,000

개의 glucose잔기의 cellobiose 단위로 이루어진 고분자로서 상호 수소결합(hydrogen bond) 또는 반데르발스 결합(van der Waals interaction)으로 형성되어 있다. 이들 체인은 폭이 3~4 nm, 길이가 약 36개 정도인 ‘Elementary fibrils’를 형성하고, Elementary fibrils들의 보다 큰 집단이 ‘microfibrils’를 이루고 microfibrils다발이 macrofibrils을 구성한다고 볼 수 있다. cellulose의 외측을 싸고 있는 형태로 존재하는 hemicellulose는 cellulose와는 달리 복수의 단당, 즉 xylose, arabinose, mannose 등으로 이루어진 측쇄구조를 갖는 다당체로 cellulose가 분해되기에 앞서 분해가능성이 높은 구성성분이다. 이들 cellulose와 hemicellulose 고분자들을 lignin이 덮어 싸고 있는데 이러한 구조가 cellulose의 효소 당화성을 저해하는 것으로 알려져 있다(Taherzadeh and Karimi, 2007). 리그닌의 제거가 효소 당화율을 증대시킨 결과가 보고되고 있다(Khanal et al., 2010)

이들 Cellulose는 구조상 비결정 영역(amorphous region)과 결정 영역(crystalline region)이 존재하는데 결정 영역은 매우 정형화된 불용성 구조이므로 효소에 의해 잘 분해되지 않는 특성을 보인다(Delmer and Amor, 1995; Morohoshi 1991; Coughlan, 1990). Fungal cellulases로 당화했을 때 비결정영역은 결정영역에 비해 3-30배 빠른 당화속도를 나타내 결정영역과 비결정영역의 당화성의 차가 극명하게 차이가 남을 보고하였다(Lynd et al., 2002). Al-Zuhair(2007)도 *Aspergillus niger* 유래 cellulase를 사용한 실험에서 결정화도가 높은 목재 shavings이 비결정성 CMC에 비해 짧은 시간에도 불구하고 환원당이 적은 값을 나타낸다는 결과를 제시하였다. 일부 결정화도의 측정의 문제와 관련 당화성과의 관계에 불명확한 부분이 있다고 소개(Mansfield et al., 1999, Zhang and Lynd, 2004)되고 있으나 일반적으로 기질의 결정화도 증가와 당화산물 생산과는 반비례적 관계에 있다는 것이 통념으로 해석되고 있다(Taherzadeh and Karimi, 2007).

cellulose의 중합도(Degree of polymerization, DP)는 cellulase 효소가 작용 할 섬유상 고분자 말단과 내부 β-glucoside 결합 수를 나타내는 것이고, cellulose 용해성은 내부 분자 간 수소 결합 때문에 DP가 증가 할수록 명백하게 감소한다. 그래서 2-6개 정도의 DP를 가지는 Cellodextrins은 물에 용해되고, 7-13정도의 DP를 가지는 경우에는 열수(hot-water)에는 용해되나 cellulose로 불리우는 DP=30이상이 되면 고분자로서의 구조와 특성을 지니게 된다(Klemm et al., 1998, Pereira et al., 1988) 따라서 중합도가 큰



**Fig. 3.** Typical DP values of cellulose and soluble cellodextrins. NC, natural cotton; NW, natural wood; P, pulp; CT, cotton linter; FP, filter paper (ref. Zhang & Lynd, 2004)

cellulose의 경우 많은 효소작용이 요구된다고 할 수 있다. 각종 섬유소 물질의 중합도에 대한 비교 그림을 Fig. 3에 나타내었다.

목질 바이오매스 cellulose는 cellulase 효소가 결합할 수 있도록 당화 공정 전에 충분한 표면적을 확보해야 한다. cellulase 효소와 잘 조합되어야 할 기질 파티클의 3차원 구조는 β-glucoside결합들에 효소 접근 여부가 효소 당화에서는 매우 중요한 요건이 된다. 따라서 기질의 내·외부 표면적의 크기나 공극용적이 효소 접근에 영향을 주고 효소 접근성은 그대로 당화에 영향을 주게 된다(Zhang and Lynd, 2004). 내부 표면적 및 효소접근성은 SAXS(Small angle X-ray scattering), mercury porosimetry, 수증기 흡착법, Simons' staining 법, Immuno-electron microscopy 등에 의해 측정될 수 있다(Esteghlalian et al., 2001, Donohoe et al., 2009). 목질바이오매스 기질의 섬유벽에 분포하는 다양한 크기의 공극을 측정하고 효소 분자의 접근성과의 관계를 연구한 보고에서 cellulases의 접근성은 접근 가능한 공극 직경과 비례적 관계에 있음을 소개하였다(Mansfield et al., 1999). 라디에타소나무에서 전처리로 공극들의 형태에서 표면적을 증가시킬 경우 효소 당화성이 증가되고, 침엽수와 활엽수사이에 공극 용적과 당화성에서 유의적 차가 인정되었음을 보고됨으로서 공극 용적 증가가 당화성 증가에 영향을 미친다는 것이 증명되었다(Wong et al., 1988). 침엽수와 활엽수의 공극과 당화성에 대해서 또 다른 연구에서 White pine의 공극 용적이 혼합 활엽수 그것의 절반정도에 미치지 못할 때 효율적 당화가 진행되지 못하였고, 전처리 공정에서 탈리된 hemicellulose나 lignin가 재배치되면서

섬유벽의 작은 공극을 막아버리는 현상이 활엽수에 비해 많음을 보고하였다(Grethlein et al., 1984). Yoshida 등 (2008)은 기질의 파티클을 ballmill에 의해 355-63  $\mu\text{m}$  크기로 조정하고 효소 당화 실험을 실행한 결과, 기질의 입자가 작아지면서 결정화도가 감소했는데 이와 함께 당화율이 증가하였음을 보고한 바 있고, 이와 유사한 보고들이 파티클 크기 감소가 효소 흡착과 반응성을 증대시킴을 뒷받침하고 있다 (Pedersen, M. and A. S. Meyer. 2009; Kim et al., 1992; Pedersen and Meyer, 2009).

Cellulose 효소 당화성에 영향을 주는 또 다른 요소로서 기질의 질과 농도를 들 수 있다(Sun and Cheng, 2002, Roche et al., 2009). 기질농도가 높아지면 기질과 효소의 혼합과 기질 이동에 문제가 발생한다. Marsden 등(1985)은 최대 효소당화를 위해 흡착 가능한 단백질에 비례하는 최적의 cellulose 농도가 존재하고, 비결정 영역의 당화율은 최적 cellulose 농도 이상에서는 기질농도에 영향을 받지 않으나, 결정영역은 최적 cellulose 농도 이상에서 기질농도와 당화율이 반비례적 관계에 있음을 보고하였다.

#### 당화 효소와 관련된 인자

목질바이오매스 cellulose의 효소 당화에서 이용되는 효소는 전향의 당화 메카니즘에서 서술된 바와 같이 여러 종류의 cellulase가 혼합된 카테일이 효과가 큰 것으로 알려져 있어 상용화를 위한 개별 cellulase 및 혼합시스템 개발 연구가 활발한 한 것으로 소개되고 있다(Khanal et al., 2010; Kumar and Wyman, 2009c; Mansfield et al., 1999). 그 예로 cellulase 효소들은 최근에 *Trichoderma reesei*, *Penicillium funiculosum*, 그리고 *Aspergillus niger*와 같은 균류를 이용한 실증형이나 상용화 규모로 생산되고 있다. 이 외에도 cellulase를 생산하는 진균류나 *Acidothermus cellulolyticus*, *Micro monospora bispora*, *Bacillus sp.*, *Cytophaga sp.*, *Streptomyces stercorarium* 과 *Clostridium thermocellum*, 그리고 *Ruminococcus albus* 등의 박테리아에서 생산되는 효소들이 이용될 수 있다. 그러나 이들이 모두 완전한 cellulose 가수분해 성능을 갖기 위해서는 전술한 바와 같이 고효율 cellulase에다 다양한 종류의 cellulase간 조합이 적절하게 이루어져야 한다(Henrissat et al. 1985, 1989). *Trichoderma* 유래 상용화효소가 매우 성공적 cellulase로 알려져 있는데 이들 효소는 효소당화조건에서 매우 안정적이고 화학적 억제인자에 대한 저항성이 큰 장점이 있으나

최적조건에서 BGL의 활성이 매우 낮은 단점을 가지고 있다. 이러한 효소 당화성을 개선하기 위하여 *Trichoderma cellulase*에 여분의 BGL을 첨가함으로써 매우 개선된 당화 효과를 나타낸 연구들도 다수 있다(Hari Krishna et al, 2001, Itoh et al, 2003, Ortega et al, 2001, Tengborg et al, 2001, Wyman, 1996). 덴마크 기업인 Novozyme이나 Genecor와 같은 기업에서 최근에 경쟁력 있는 수준으로 효소 가격을 낮추었다고는 하지만 아직도 각국이 에너지 기술의 국산화 등의 목적을 위해 고역가의 저가 효소개발이 이슈가 되고 있는 것이 사실이다.

효소 당화에서 또 다른 문제점은 초기 가수 분해되어 방출되는 oligomer나 단당들이 반응 후기의 당 가수분해를 저해한다는 것이다(Eklund and Zacchi, 1995, Krishun and Chodary, 2000, Kadar et al, 2004, Linde et al, 2007). Shen 과 Wang(2004)은 중간 당화 산물이나 최종 산물인 단당류에 의한 cellulose 당화 억제 기구로서 cellulase 효소와 기질의 흡착물 형성을 제시하였다. 2007년 Peri et al. 는 당화액에 cellobiose와 glucose 첨가 실험을 통해 효소와 기질의 흡착물 형성을 증명함으로써 당화 중간 생성물과 최종 산물의 억제 이론을 명확히 하였다. cellulose 당화에 glucose를 30% 첨가했을 때 당화 억제율은 40%, cellobiose는 이보다 낮은 농도를 투입했음에도 당화 억제율이 50%에 이르러 cellobiose의 억제가 더 크다는 것이 밝혀진 바 있다 (Lee et al.,1980, Sun & Cheng, 2002). 이를 극복하기 위해 가수분해 산물인 단당들이 동일 반응기내에 존재하는 발효 균주에 의해 발효되도록 하는 동시당화발효(SSF)가 개발되었으나 당화공정과 발효공정의 최적조건이 상이한 문제점이 있어 당화와 발효를 별도로 진행하는 방식이 고려되는 상황임으로 개선이 요구되는 부분이라 할 수 있다(Wyman, 1996). Lee(1997)와 Wyman(1996)은 또 *Trichoderma* 효소가 기질의 cellulose와 lignin에 흡착됨으로써 효소활성이 감소되고, scaling-up한 효소 생산 과정에서 균주배양액내 산소전달 때문에 효소활성 저하 및 mixing의 문제점을 지적하였다.

당화에 투입되는 효소 첨가도 당화율에 미치는 영향이 큰 것으로 알려져 있다. 근래 상용효소에서는 기질 1 g당 5~35 FPU 농도가 일반적이는데 효소 첨가량이 많을 수록 어느 수준까지의 당화율은 증가하지만 효소사용 증가로 인한 고비용의 문제점을 지적하고 이에 대한 당화 기술의 향상 방안이 요구됨을 강조하였다(Taherzadeh and Karimi, 2007).

## 목질계 cellulose의 효소 당화성 증진 기술

### 전처리에 의한 효소 당화성 향상

목질계 cellulose의 효소 당화는 전술한 바와 같이 목질 바이오매스 특성상 어떠한 전처리가 없이는 천연 cellulose가 단당으로 전환하는데 상당한 시간이 소요되는 특징을 나타낸다. 따라서 목질계 바이오매스 cellulose의 효소 당화율을 높이기 위해서는 반드시 전처리가 필요하다는 것이 강조되고 있다(Kumar and Wyman, 2009a; Taherzaden and Karimi, 2007; Wyman et al., 2009; Dadi et al., 2006; Jeoh et al., 2007; Galbe and Zacchi, 2002). 목질바이오매스의 전처리는 목질계 바이오매스를 이루고 있는 microfibrils이나 macrofibrils의 결정구조를 해체하여 cellulose와 hemicelluloses 등의 고분자사슬을 당화 효소의 접근이 가능하도록 방출시키는 공정이라 할 수 있다(Galbe and Zacchi, 2002). 전처리공정은 탄수화물이 손실되거나 붕괴되지 않도록 해야 하고, 후속 당화 및 발효 공정에 부정적인 영향을 주는 억제 물질 생산 등을 피해야 효율적 전처리 효과에 달성할 수 있다. 전처리과정이 잘 되면 명백하게 효율적인 가격을 가질 수 있다고 보고하고 있다(Sun and Cheng, 2002). 효과적인 전처리를 위해서 다양한 전처리 방법이 구사되고 있다. 물리적 전처리는 분쇄, 스팀 폭쇄(Chum et al., 1985; Ballesteros et al, 2004) 및 수열화 과정(Negro et al., 2003)을 통해 파티클 크기, 표면적, cellulose의 결정성과 같은 바이오매스의 물리적 특성을 개조하는 것이 목적이라 할 수 있다(Mosier et al., 2005, McMillan, 1994, Wyman 1996). 이와 같은 물리적 전처리에 산이나 알카리, 유기용매와 같은 화학약품을 이용하는 것, 그리고 생물적 전처리 등은 바이오매스 기질의 화학적 구조를 변화시키고자 하는 노력이라 볼 수 있다. 수열처리나 열수 증기(LHW, Liquid Hot Water) 전처리는 오래된 방법 중 하나인데 이들은 자가 당화에 의해 전처리 효과를 가지고 화학약품 사용이 없는 것인 장점이라 할 수 있다. 따라서 Hemicelluloses가 대부분 용액에 용해되기 때문에 불용인 cellulosic fraction과 분리될 수 있고, pH, 온도, 시간 등의 조정으로 효소당화의 최적 전처리가 가능한 방법이다(Mosier et al, 2005a, Mosier et al., 2005c, Wyman, 1996). LHW 전처리에 의해 당화효소가 cellulose 기질에 접근하기 좋도록 표면적을 확장하는 미세공극 형성과 미세구조에 변화를 초래함으로써 인해 당화성이 높아지는 것으로 보고되었다(Zeng et al., 2007). Zeng

등은 (2007)은 corn stover에 어떤 전처리도 없이 입자크기를 425-710  $\mu\text{m}$ 에서 53-75  $\mu\text{m}$ 로 미립자화 했을 때 효소당화성이 1.5배 증가함을 보고하여 기질크기가 효소 당화성에 직접적 영향인자임을 증명하였다.

일반적으로 물리적 화학적 전처리를 적당하게 조합하여 이용되는 것이 보통이다. 바이오매스의 입자를 약간 거칠게 또는 중간정도로 분쇄하고 산 또는 알카리 전처리를 실시하여 목질바이오매스 구성성분인 hemicellulose와 리그닌을 탈리시키면서 효소 당화성을 증진시키는 효과 상승을 목표로 하는 방법이다. 또한 열수처리에서는 압력을 400 psig, 온도 250  $^{\circ}\text{C}$ 까지 상승시켜 hemicelluloses를 용해하고자 하는데 이렇게 고온고압 조건에서 O-acetyl기 분열과 uronic acid 치환으로 인해 acetic acid와 유기산들이 발생하게 된다(Mosier et al., 2005). 전처리에 사용되는 산들은 cello-oligosaccharides 형성과 제거에 촉매작용을 돕게 하고, 거기에다 cello-oligosaccharides의 당화가 더해져 단당으로 전환되어 당화 효소와 발효 균주에 저해 역할을 하는 aldehydes로 분해되는 상황까지 만든다(Sun and Cheng, 2002). 전처리에 많이 사용되는 산은 황산과 염산이 많이 쓰이는데 이들은 hemicelluloses를 가수분해하여 xylose나 다른 당들을 생성케 하고, 반응이 더 진행하여 xylose를 furfural로 분해해 버리는 특성이 있다. 산 전처리에서는 이들 발효 저해를 초래하는 부산물 발생 방지 기술 개발등의 연구가 필요한 부분이라 할 수 있다. 또한 전처리 후속 효소당화과정에 세척과정을 거쳐 pH를 중화시켜야하는 번거로움에 대해서도 대안에 대해서도 연구가 필요하다(Mes-Hartree and Saddler, 1983).

전처리 공정 중 당 분해는 반응시간에 상당히 의존적이어서 대부분의 산 처리나 자가 가수분해 과정에서는 단시간에 높은 온도를 도입하는 방법을 취한다. 산 전처리에서 후속 당화공정에 영향을 미치는 희석의 두 가지 종류가 있다. 바이오매스의 높은 농도(10-40% w/w)에 저온(<160  $^{\circ}\text{C}$ ) 전처리, 낮은 농도(<10% w/w)에 고온(>160  $^{\circ}\text{C}$ ) 전처리가 그것인데 일반적으로 고온과 짧은 반응시간이 hemicellulose 및 cellulose 당화성이 높게 만든다(Khanal et al., 2010). 또 다른 화학 전처리에 lime이나 ammonia와 같은 알카리를 이용하는 공정이 있는데 이는 리그닌을 용해하고 lignin-carbohydrates 결합을 분해하거나 해중합을 일으키는 역할을 한다. AFEX는 암모니아를 사용한 스팀 폭쇄 전처리인데 이는 액상의 암모니아를 90-100  $^{\circ}\text{C}$ 에서 약 30분 정도 노출된 후 압력을 제거하는 방법인데 전처리 후 당화나 발효

공정에 억제작용을 하는 부산물이 발생하지 않는 특성이 있다. 그러나 계열된 리그닌 Phenolic조각들과 다른 세포벽 추출물들이 바이오매스 표면에 재배치될 수 있는 가능성이 있으므로 물 세척 등의 공정이 필요할 수도 있다(Balan et al., 2009; Chundawat et al., 2007; Selig et al., 2007; Holtzapfle et al., 1991). AFEX 전처리가 스위치그래스와 같은 바이오매스에는 효소 당화에 좋은 효과를 나타내지만 리그닌 함량이 많은 침엽수나 활엽수에는 전처리 효과가 불충분 할 수 있다고 보고되었다. 더욱이 AFEX 처리는 희석산 전처리와 대조적으로 hemicelluloses를 용해 할 수 없는 특징을 가졌다(또 다른 한편으로는 암모니아 재사용이 가능함으로 환경적으로 비용적 측면에서 장점을 가질 수 있는 특징이 있다.(Chundawat et al., 2007, Eggeman and Elander, 2005, Sun and Cheng, 2002, Wyman, 1996).

유기용매를 이용한 전처리는 리그닌제거에 150-200°C 용매를 이용하는 방법으로 에탄올이나 메탄올 등 저비점의 특성을 가지는 용매가 주로 사용된다(Chum et al., 1985). 유기용매 전처리는 hemicelluloses가 가수분해 되면서 발생한 acetyl 그룹으로부터 얻어지 acetic 산과 유기용매가 함께 작용하게 된다. 유기용매이용의 장점은 pure한 상태의 리그닌이 얻어지면서 용해된 리그닌이 저분자라 부산물 회수가 가능하다 것이다(Katzen et al, 1995, Sun and CHeng, 2002). 이 전처리에서 oxalic, salicylic, acetylsalicylic acid 등이 촉매제로 사용될 수 있으나 온도가 185°C 이상으로 고온인 경우에는 이들의 첨가가 불필요하다. 이 경우 사용된 용매는 이후의 효소당화나 발효공정에서 억제작용을 함으로 용매를 완전히 휘산시켜 제거해야하는 단점이 있다.

이상과 같이 물리화학적 전처리, 화학전처리, 생물적 전처리 등의 기술이 널리 시도되고 있으나 아직 그 어떤 전처리 방법도 기술적, 경제적 관점에서 상용화 할 수 있는 전처리 방법이 구축되어 있지 않아 연구 개발이 필요한 것으로 고찰되었다(Taherzaden and Karimi, 2007). 또한 Hemicellulose와 리그닌 제거가 목질계 바이오매스 효소 당화를 보다 쉽고 저 비용으로 만들어 주는 방법이긴 한데, furfural과 같은 화학 반응의 부산물 발생으로 주요한 효소 시스템에 불리하게 작용하는 단점을 가질 수 있으므로 바이오매스 특성에 따라 적정 전처리를 선택해야 한다.

#### 당화 증진 물질을 이용한 효소 당화성 향상

목질계 cellulose의 생물적 전환기술의 상용화에는 상술

된 바와 같이 바이오매스 원료의 전처리공정의 비용과 효소 당화에 요구되는 당화효소 가격으로 인한 비용 상승이 장애 요소로 작용하고 있다. 효소 당화공정에서 차지하는 효소비용이 거의 50%에 이르기 때문에 효소사용량을 줄이거나 효소단가를 낮추는 등의기술이 요구된다(Galbe and Zacchi, 2002). 그러나 고역가의 효소 개발이나 효소 단가를 낮추기 위해 유전공학기술을 이용하는 등의 많은 노력을 하고 있지만 실제로는 쉽지 않은 것으로 고찰되고 있다(Tu et al., 2007, Mabee and Saddler, 2005). 전처리한 침엽수와 같이 리그닌 함유가 많은 기질에서는 보다 많은 량의 효소 첨가가 요구되는 것으로 보고되고 있으므로 효소비용을 낮추기 위해서는 바이오매스 성질도 중요한 인자로 작용한다고 볼 수 있다(Tu et al., 2007). 또한 상술한 전처리의 경우에도 전처리 공정을 통한 리그닌 제거가 효소당화성에 긍정적일 수도 있으나, 부정적 역할을 할 수도 있기 때문에 이 장애를 극복할 수 있는 기술이 요구된다. 바이오매스 기질의 성질을 개선하고 효소작용에 억제가 없도록 하기 위한 방법 중의 하나로 계면활성제와 같은 물질을 이용하는 것이다(Eriksson et al., 2002). 특히 이 같은 종류의 물질을 당화액에 첨가했을 때 목질계 cellulose의 표면 특성이 개조될 수 있고 이것이 효소 당화성 향상에 기여한다는 보고들이 있다(Kumar and Wyman, 2009b; Tu et al., 2009; Rastegari et al., 2009; Tu et al., 2009; Rayne and Mazza, 2007; Alkasrawi et al., 2003; Borjesson et al., 2007; Kim et al., 2006a; Park et al., 2002). 양이온성, 음이온성, 비이온성 등 다양한 종류의 계면활성제가 시험되었는데 그 중에서 Sorbitan polyethoxylases의 지방산 에스테르와 같은 비이온성물질과 polyethylene glyco과 같은 고분자가 1이 가장 효과적인 것으로 보고되었다(Mizutani et al., 2002). 이들이 효과를 나타내는 것은 이들 계면활성제가 특히 리그닌에 비생산적으로 흡착하여 당화효소가 비활성화되는 것을 억제하기 때문인 것으로 증명하였다(Eriksson et al., 2002). 그리고 효소당화에 긍정적으로 작용하는 계면활성제의 효력은 1주일 정도 유지되는 것으로 밝혀졌다. 특히 비이온성 계면활성제 첨가가 효소당화성을 향상시키는 메커니즘에 대한 연구에서 Park 등(2002)은 친수성으로 수식된 고분자를 사용하여 효소와의 흡착성을 시험한 연구에서 비이온성 계면활성제의 HLB(Hydrophilic lipophilic balance)가 높을수록 효소 당화성이 증가 하는 현상을 증명하였다. 친수성으로 수식된 고분자의 효과가 비이온성 계면활성제의 그것과 유사하다는 의미이다. 즉, 목질계 cellulose 섬유표면의

리그닌과 소수성의 상호작용을 통해 결합된 계면활성제의 소수성 부분과 계면활성제의 친수성 head 그룹이 cellulase가 리그닌에 비생산적으로 결합되는 것을 막아주는 역할을 한다는 것이다. 비이온성 계면활성제의 친수성 부분은 짧은 ethylene oxide결합으로 구성되어 있다. 이 EO체인을 가지는 계면활성제의 흡착은 첫째, 기질표면의 소수성 반응기가 계면활성제로 점령되어 효소가 흡착되는 것을 막아주고, 둘째, 기질 표면에 흡착된 ethylene oxide chain이 차지하는 용적으로 인해 효소흡착을 감소시켜주는 역할을 하는 것으로 설명된다. 효소 당화성 향상을 위해 BSA 단백질을 첨가하는 연구들이 있는데 BSA가 리그닌 표면에 비특이적 결합으로 실제 cellulase가 비생산적으로 리그닌에 흡착하는 것을 감소시키는 역할을 한다는 원리이다(Yang et al., 2006). BSA는 fatty acids의 결합을 위한 소수성기를 가지고 있어 쉽게 소수성 표면에 흡착될 수 있는 특성(Haynes and Norde, 1994)을 지니며 비이온성 계면활성제와 유사한 작용을 하는 것으로 소개되고 있다.

Henrissat(1994)은 cellulase와 cellulose와의 상호작용에 대한 리뷰에서 효소 단백질의 catalytic domain, cellulose-binding domains, domain의 multiple combination 등 cellulase structure와 기질과의 작용에 대해 소개하였다. 모든 *T. reesei* cellulases(Cel12A제외) 도메인에는 표면에 소수성의 아미노산을 가지고, Cel7A의 CBD(Cellulose binding domain)는 표면에 세 개의 tyrosines이 노출되어 있는 특성이 있어, 이 잔사들은 cellulose 표면에 적절한 특이적 작용을 하도록 위치해 있다는 이론이다(Kraulis et al., 1989; Reinikainen et al., 1992). 또한 Cel7A의 촉매 도메인(Catalytic domain)은 활성 site 터널 입구에 노출 tryptophan을 가지는 것으로 알려져 있다(Divne et al., 1998). 그러나 효소단백질이 가지는 소수성 잔사들의 존재는 리그닌 표면에 비특이적 흡착을 유도하는 가능성이 큰 것으로 해석된다. 리그닌 표면에 효소의 비특이적 흡착은 무처리 목재보다는 전처리 기질에서 보다 강하게 나타나는데 그 이유는 전처리로 인해 리그닌의 표면노출이 더 많아졌기 때문인 것으로 고찰되었다. 이러한 현상은 순수한 cellulase보다 전처리한 목재에서 계면활성제의 효과가 더 크게 나타난 결과가 제시되어 리그닌 제어 역할이 증명되었다(Eriksson et al., 2002).

Eriksson et al.(2002)은 양이온성 계면활성제의 경우 HLB가 낮아 비이온성보다 낮은 당화증가율을 보였다고 보고하였다. 그러나 음이온성물질의 경우에는 높은 HLB에도 불구하고 당화성에 낮은 효과를 보이는 결과를 나타냈는데

이는 음이온성 물질에 의한 단백질 변성이 원인인 것으로 고찰하였다. Polyethylene glycol(PEG)의 당화 증진효과에 대해서도 여러 개의 논문에서 보고 되었는데, PEG가 기질 표면에 흡착하여 표면에 입체적 고분자층을 형성하여 리그닌 표면으로부터 효소단백질을 거부하는 입체적 공간을 확보함으로써 효과를 발생하는 것으로 해석되었다(Malmsten and Alstine, 1996; Malmsten et al., 1998). 음이온성 계면활성제(Nielsen et al., 2005)에서는 계면활성제의 흡착으로 리그닌 표면의 음이온 charges는 음이온을 띠는 효소에 binding이 방해되고, 대조적으로 양이온성 계면활성제는 효소의 리그닌 결합을 증가시킴으로서 계면활성제 종류 및 효소 표면 특성에 따라 리그닌 저해 제어 및 효소 활성 증대 효과가 상이한 것으로 분석되고 있다.

계면활성제의 당화성에 미치는 영향에 대한 초기 연구에서는 계면활성제가 당화 중에 효소 변성을 방지하여 효소 안정성을 증가시키고, 기질의 구조에 작용하여 효소의 기질 접근을 더 용이하게 만드는 것으로 해석되었으나 현재에 이르러 많은 연구에서 전술한 바와 같은 메카니즘으로 작용하는 것으로 간주되고 있다. 그러나 계면활성제가 경우에 따라서는 *D. clausenii*와 같은 발효균주의 활성을 억제할 수도 있다는 보고(Wu and Ju, 1998)가 있어 계면활성제 선택이 그 후 영향성을 고려하여 신중하게 이용되어야 함이 강조되고 있다. 또한 비이온성 계면활성제의 경우 낮은 담점(cloud point, 14°C)를 가짐으로 당화 완료 후 이점을 이용하여 당화 여액과의 분리를 통해 재사용할 수 있는 가능성이 있어 이들 물질 적용 기술 개발이 더 필요함이 강조되었다(Eriksson et al. 2002).

## 기 타

Cellulase 효소 비용을 절감할 수 있는 방법 중의 하나가 효소의 재사용(Recycle)이다. 목질바이오매스의 효소당화에 사용하고 당화액에 잔유하는 유리 효소들은 재사용이 가능하다. 그러나 리그닌 함량이 많은 기질의 당화 여액에서 회수된 당화 효소들은 새로운 기질에 두 번째로 사용될 때는 당화능이 떨어지는 현상이 나타나는데 이유는 많은 리그닌 축적에 기인하는 것으로 알려져 있다(Tu et al., 2007a). 리그닌 함량이 많은 목재를 원료로 사용하는 경우에는 전처리 후 탈리된 리그닌의 효소와의 흡착으로 재사용 시 당화성이 저하되는 현상에 대한 연구보고들이 다수 있다(Lee et al., 1995, Lu et al., 2002, Tu et al., 2007b).그래서 당화



잔사로부터 cellulase 를 탈착하여 다른 물질과 결합으로부터 효소를 분리 하여야 재사용해야 할 수 있고, 이 때 분리 기술의 개발 필요성이 큰 것으로 보고되고 있다.

## 결 론

목질계 바이오매스를 원료로 한 바이오에탄올 생산 중 특히 효소 당화공정에 집중한 문헌연구를 통하여 목질바이오매스 기질특성과 효소 당화성과의 관계, 이를 극복하기 위한 기술 개발 등 최근 연구동향에 대해 조사하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

cellulose와 hemicellulose의 효소 당화에는 매우 특징적인 cellulase 와 hemicellulase 효소(glycosylhydrolases)가 관여하는데 이들 효소 그룹에는 적어도 3종(EG, CBH, BGL)의 cellulase 효소들이 상호 상승작용을 하며, cellulase 고분자로부터 최종 단당(sugar)으로 전환시키며, 비결정영역과 결정영역이 함께 가수분해되는 동시형 메카니즘이 받아들여지고 있다.

목질계 cellulose의 효소 당화에 영향을 주는 중요한 인자로서 목질자체의 특성면에서는 목질계 바이오매스의 구성 성분 및 구성비율, 이들의 견고한 구조, 배열특성 및 치환기 그룹, cellulose의 결정성과 중합도, 기질의 파티클 크기, 표면적 및 공극용적, 기질투입농도 등이고, 효소와 관련된 인자로는 cellulase를 구성하는 각 효소의 cellulose 분해 활성, cellulase의 적절한 조합, 초기 가수 분해 산물인 oligomer 나 단당류의 후기 당 가수분해 저해 현상, 효소와 리그닌 성분과의 흡착문제에 의한 당화효율 저하 등으로 요약되었다.

목질계 cellulose의 효소 당화율을 높이기 위해 크게 물리적 화학적 생물학적 방법에 의한 전처리가 광범위하게 시도되고 있으며 이로 인한 효소 당화성 제고 효과는 명백하나 공정상 소모되는 에너지 소모, 화학약품 사용문제, 후속 공정에서의 영향을 부산물 생성 등으로 아직 시장에서 만족할 만한 수준에 이르지 못하는 것으로 조사되었다. 또한 목질바이오매스 기질의 효소 당화율을 향상시키기 위한 계면활성제 사용은 비이온성, 음이온성, 양이온성, 단백질, 고분자 등의 다양한 물질이 연구되고 있는데 그 중에서 비이온성 계면활성제가 목질계 cellulose 당화성 증진에는 가장 좋은 효과를 나타내는 것으로 결론 지었다. 이들 계면활성제와 cellulose 기질, 그리고 효소과의 상호작용은 기질의 종류, 도입된 전처리 방법, 효소 종류등에 따라 상이함으로 바이오매스와 효소에 적절한 계면활성제 선택이 강조되었다.

## 인용문헌

Kim YS, T. Gorman, 2007. Biomass energy in the USA: A literature review (III)- bioethanol production from biomass and feedstock supply. Mokchae Konghak 35: 1-10.

Alkasrawi, M., T. Eriksson, J. Borjesson, A. Wingren, M. Galbe, F. Tjerneld, and G. Zacchi. 2003. The effect of tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood of ethanol, Enzyme microb. Tech. 33(1): 71-78.

Balan, V., L. D. C. Sousa, S. P. S. Chundawat, and D. Marshall, L. N. arma and C. K. Chambliss, B. E. Dale. 2009. Enzymatic digestibility and pretreatment degradation products of AFEX-treated hardwoods (*Populus nigra*), Biotechnol. Prog., 25: 365 - 375.

Ballesteros, M., J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, and I. Ballesteros. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875, Process biochem. 39(12): 1843-1848.

Borjesson, J., R. Peterson, F. Tjerneld. 2007 Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition, Enzyme microb. Tech., 40: 754-762.

Chen Chengci, 2008. Biomass for ethanol and cropping systems for bioenergy, Montana State university, [http://www.harvestcleanenergy.org/conference/HCE5/H\\_CE5\\_PPTs/Chen.pdf](http://www.harvestcleanenergy.org/conference/HCE5/H_CE5_PPTs/Chen.pdf).

Chum, H. L., L. J. Douglas, D. A. Feinberg and H. A. Schroeder. 1985. Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose, Solar energy research institute, Golden, Colorado.

Chundawat, S. P., B. Venkatesh, and B. E. Dale. 2007. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreatment and enzymatic digestibility, Biotechnol. Bioeng. 96(2): 219-231.

Coughlan, M. P. 1990. Cellulose degradation by fungi, p.1-35. In W. M. Fogarty and C. T. Kelly(ed.), Microbial enzymes and biotechnology, 2nd ed., Elsevier Applied Science, London, UK.

Dadi, A. P., S. Varanasi, C. A. schall. 2006. Enhancement of cellulose saccharification kinetics using an ionic liquid pretreatment step. Biotechnol. Bioeng. 95(5): 904-910.

Delmer, D. P., and Y. Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. Plant cell 7(7): 987-1000.

Divne, C., J. Stahlberg, T. T. Teeri, T.A. Jones. 1998. High-resolution crystal structures reveal how a cellulose chain is bound in the 50 Å long tunnel of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. J. Mol. Biol. 275: 309-325.

Donohoe, B. S., M. J. Selig, S. Viamajala, T. B. Vinzant, W. S. Adeny, M. E. Himmel. 2009. Detecting cellulase penetration into corn stover cell walls by immuno-electron microscopy, Biotechnology and bioengineering, 103(3): 480-489.

EERE,2008. Biomass multi-year program plan, U.S.Department of Energy.

Eriksson, T., J. Borjesson, F. Tjerneld. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Enzyme and microbial technology 31: 353-364.

Eggeman, T. and R. T. Elander. 2005. Process and economic analysis

- of pretreatment technologies, *Bioresour Technol.* 96(18): 2019-2025.
- Eklund, R. and G. Zacchi. 1995. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme microb. Tech.* 17(3): 255-259.
- Eriksson, T., J. Borjesson, and F. Tjerneld. 2002. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme microb. Tech.* 31: 353-364.
- Esteghlalian, A. R., M. Bilodeau, S. D. Mansfield, and J. N. Saddler. 2001. Do enzymatic hydrolyzability and simons' stain reflect the changes in the accessibility of lignocellulosic substrates to cellulase enzymes?, *Biotechnology Progress* 17(6): 1049 - 1054.
- Fan, L. T., Y. -H. Lee, D. H. Beardmore. 1980. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: effect of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 22: 177-199.
- Fan, L. T., Y. -H. Lee, D. R. Beardmore. 1981. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 419-424.
- Galbe, M. and G. Zacchi. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(6): 618-628.
- Grethlein, H. E., D. C. Allen, A. O. Converse. 1984. A comparative study of the enzymatic hydrolysis of acid-pretreated white pine and mixed hardwood, *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1498-1505.
- Gupta, R., and Y. Y. Lee. 2009. Mechanism of cellulase reaction on pure cellulosic substrates, *Biotechnol. Bioeng.* 102(6): 1570-1581.
- Hari Krishna, S, and G. V. Chowdary. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresour Technol.* 77(2): 193-196.
- Haynes C. A., W. Norde. 1994. Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloid Surface B.* 2: 517-566.
- Henrissat, B., H. Driguez, C. Viet, M. Schulein. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Biotechnology* 3: 722-726.
- Henrissat, B., M. Claeyssens, P. Tomme, L. Lemesle, and J. P. Mornon. 1989. Cellulase families revealed by hydrophobic cluster analysis. *Gene* 81: 83-95.
- Henrissat, B.. 1994. Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose* 1: 169-196.
- Holtzapple, M. T., J. H. Jun, G. Ashok, S. L. Patibandla, and B. E. Dale. 1991. The ammonia freeze explosion (AFEX) process - A practical lignocellulose pretreatment, *Appl. Biochem. Biotech.* 28-9: 59-74.
- Itoh, H., M. Wada, Y. Honda, M. Kuwahara, and T. Watanabe. 2003. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi. *J. Biotechnol.* 103: 273-280.
- Jeoh, T., C. I. Ishizawa, M. F. Davis, M. E. Himmel, W. S. Andey, D. K. Johnson. 2007. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol. Bioeng.* 98: 112-122.
- Jorgensen, H., J. P. Kutter, and L. Olsson. 2003. Separation and quantification of cellulases and hemicellulases by capillary electrophoresis. *Anal. Biochem.* 317(1): 85-93.
- Kadar, Z., Z. Szengyel, K. Reczey. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crop. Prod.* 20: 103-110.
- Katzen, R., P. W. Madson, and D. A. Monceaux. 1995. Use of cellulosic feedstocks for alcohol production, in the alcohols textbook, Nottingham University Press. 37-46.
- Khanal, S. K., R.Y. Surampalli, T. C. Zhang, B.P. Lamsal, R.D. Tyagi, and C. M. Kao. 2010. Bioenergy and biofuel from biowastes and biomass, 203, 205, ASCE
- Kim, D. W., T. S. Kim, Y. K. Jeong, J. K. Lee. 1992. Adsorption kinetics and behaviors of cellulase components on microcrystalline cellulose. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 461-466.
- Kim, S. B., H. J. Kim, and J. C. Kim. 2006a. Enhancement of the enzymatic digestibility of waste newspaper using tween, *Appl. Biochem. Biotech.* 133(1): 41-57.
- Klemm, D., B. Philipp, T. Heinze, U. Heinze, W. Wagenknecht. 1998. Comprehensive cellulose chemistry. I. Fundamentals and analytical methods, Weinheim, Wiley-VCH.
- Kraulis P. J., G. M. Clore, T. A. Jones, G. Pettersson, J. K. C. Knowles, A Gronenborn, A. M. 1989. Determination of the three-dimensional solution structure of the C-terminal domain of cellobiohydrazinase I from *Trichoderma reesei*: A study using nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing. *Biochemistry.* 28: 7241-7257.
- Kumar, R., C. E. Wyman. 2009a. Access of cellulase to cellulose and lignin for poplar solids produced by leading pretreatment technologies, *Biotechnol. Prog.* 25: 807-819.
- Kumar, R., C. E. Wyman. 2009b. Effect of additives on the digestibility of corn stover solids following pretreatment by leading technologies, *Biotechnology and Bioeng.* 102(6): 1544-1557.
- Kumar, R., C. E. Wyman. 2009c. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress* 25(2): 302 - 314.
- Lee, D., A. H. C. YU, J. N. Saddler. 1995. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of cellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 45: 328-336.
- Lee, J. 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *J. Bioethanol.* 56(1): 1-24.
- Lee, Y. Y., P. Iyer, and R. W. Torget. 1999. Dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65: 93-115.
- Linde, M., M. Galbe, and G. Zacchi. 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barely straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme Microb. Tech.* 40(5): 1100-1107.
- Lu, Y. P., B. Yang, D. Gregg, J. N. Saddler, S. D. Mansfield. 2002. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98: 641-654.
- Lynd, L. R., P. J. Wemier, W. H. van Zyl, I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3): 506 - 577.
- Mabee W. E., and J. N. Saddler. 2005. IEA bioenergy task 39

- liquid biofuels from biomass-progress in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic. Technology Report. [http://www.valbiom.be/uploadPDF/Progress in Enzymatic hydrolysis.pdf](http://www.valbiom.be/uploadPDF/Progress%20in%20Enzymatic%20hydrolysis.pdf).
- Maija, T., N. Mar-Leena, L. Markus, & V. Lisa. 2003. Cellulases in food processing, Handbook of Food Enzymology, New York, Marcel Dekker.
- Malmsten M. and J. M. Alstine. 1996. Adsorption of poly(ethylene glycol) amphiphiles to form coatings which inhibit desorption. *J. Colloid Interf. Sci.* 177: 502-512.
- Malmsten M., K. Emoto and J. M. Alstine. 1998. Effect of chain density on inhibition of protein adsorption by poly(ethylene glycol)-based coatings. *J. Colloid Interf. Sci.* 2020: 507-517.
- MarketResearchAnalyst.com, 2008. World's ethanol production forecast 2008-2012.
- Mansfield, S. D., C. Mooney, and J. N. Saddler. 1999. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Bioethanol. Prog.* 15: 804-816.
- Marsden, W. L., P. P. Gray, and M. Mandels. 1985. Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *Critical Reviews in Biotechnology* 3(3): 235-276.
- McMillan, J. D. 1994. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, ACS Symposium Series*, pp 292-324.
- Mes-Hartree, M., and J. N. Saddler. 1983. The nature of inhibitory materials present in pretreated lignocellulosic substrates which inhibit the enzymic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Lett.* 5(8): 531-536.
- Mizutani, C., K. Sethumdhavan, P. Howley, and N. Bertoniere. 2002. Effect of a nonionic surfactant on *Trichoderma* cellulase treatments of regenerated cellulose and cotton yarns. *Cellulose* 9(1): 83-89.
- Mosier, N. S., R. Hendrickson, M. Brewer, N. Ho, M. Sedlak, R. Dreshel, G. Welch, B. S. Dien, A. Aden, and M. R. Ladisch. 2005c. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production, *Appl. Biochem. Biotech.* 125(2): 77-97.
- Mosier, N., R. Hendrickson, N. HO, M. Sedlak, and M. R. Ladisch. 2005a. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresour. Technol.* 96(18): 1986-1993.
- Mosiera, N., C. Wyman, B. Dalec, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapfel, and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 96(6): 673-686.
- Negro, M. J., P. Manzanares, I. Ballesteros, J. M. Oliva, A. Cabanas and M. Ballesteros. 2003. Hydrothermal pretreatment conditions to enhance ethanol production from poplar biomass. *Appl. Biochem. Biotech.* 105-108: 87-100.
- Nidetzky, B., W. Steiner, M. Hyan, M. Claeysens. 1994. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochem. J.* 298: 705-710.
- Nielsen, A. D., L. Arleth, P. Westh. 2005. Analysis of protein-surfactant interactions—a titration calorimetric and fluorescence spectroscopic investigation of interactions between humicola insolens cutinase and an anionic surfactant. *Biochimica et biophysica Acta* 1752: 124-132.
- Ogier, J. C., D. Ballerini, J. P. Leygue, L. Rigal, and J. Pourquie. 1999. "Ethanol production from lignocellulosic biomass," *Oil & gas science and technology / revue de l'Institut Français du Pétrole.* 54(1): 67-94.
- Ortega, N., M. D. Busto, and M. Perez-Mateos. 2001. Kinetics of cellulose saccharification by *Trichoderma reesei* cellulases. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 47(1): 7-14.
- Park, J. -W., K. Park, H. Song, H. Shin. 2002. Saccharification and adsorption characteristics of modified cellulase with hydrophilic/hydrophobic copolymers. *Journal of Biotechnology* 93: 203-208.
- Pedersen, M. and A. S. Meyer. 2009. Influence of substrate particle size and wet oxidation on physical surface structures and enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biotechnol. Prog.* 25: 399-408.
- Pereria, A. N., M. Mobedshahi, M. R. Ladisch. 1988. Preparation of cellodextrins. *Methods Enzymol.* 160: 26-43.
- Peri, S., S. Karra, Y. Y. Lee, and M. N. Karim. 2007. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress* 23: 626-637.
- Phillip, B., D. C. Dan, H. P. Fink. 1981. Acid and enzymatic hydrolysis on cellulose in relation to its physical. *Proceedings of the international symposium on wood and pulping chemistry: stockholm, sweden*, 4: 79-83.
- Rabinovich, M. L., M. S. Melnick, and A. V. Bolobova. 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (moscow)* 67(8): 850-871.
- Rastegari, A. A., A. -K. Borbar, A. T. -Kafrani. 2009. Interaction of cellulase with cationic surfactants: Using surfactant membrane selective electrodes and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces* 73: 132-139.
- Rayne, S., and G. Mazza. 2007. *Trichoderma reesei* derived cellulase activity in three N,N-dimethylethanolammonium alkylcarboxylate ionic liquids, [hdl:10101/npre.632.1](http://hdl:10101/npre.632.1).
- Reinikainen T, L. Ruohonen, T. Nevanen, L. Laaksonen, P. Kraulis, and T. A. Jones. 1992. Investigation of the function of mutated cellulose binding domains of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein* 14: 475-482.
- Rivers, D. B., G. H. Emert. 1988. Factors affecting the enzymatic hydrolysis of municipal solid waste components. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 278-281.
- Roche, C. M., C. J. Dibble, J. S. Knutsen, J. J. Stickel, M. W. Liberatore. 2009. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnol Bioeng* 104(2): 290-300.
- Sassner P., M. Galbe, G. Zacchi, 2008. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy* 32: 422-430.
- Selig, M. J., S. Viamajala, S. R. Decker, M. P. Tucker, M. E. Himmel, and T. B. Vinzant. 2007. Deposition of lignin droplets produced during dilute acid pretreatment of maize stems retards enzymatic hydrolysis of cellulose. *Biotechnol. Prog.* 23: 1333-1339.
- Shen, Y., and L. M. Wang. 2004. Kinetics of the cellulase catalyzed hydrolysis of cellulose fibers. *Textile Research Journal* 74(6):

- 539-545.
- Sun, Y. and J. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresource Technol.* 83(1): 1-11.
- Taherzadeh, M. J. 1999. Ethanol from lignocellulose: Physiological effects of inhibitors and fermentation strategies, chemical reaction engineering, chalmers University of technology, Goteborg, sweden.
- Taherzadeh, M. J., and K. Karimi. 2007. Enzyme-based hydrolysis progresses for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources* 2(4): 707-738.
- Tengborg, C., M. Galbe, and G. Zacchi. 2001. Influence of enzyme loading and physical parameters on the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Biotechnol. Prog.* 17(1): 110-117.
- Thaerzadeh, M. J., R. Eklund, L. Gustafsson, C. Niklasson, and G. Liden. 1997. Characterization and fermentation of dilute-acid hydrolyzates from wood. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 36(11): 4659-4665.
- Tu, M., R. P. Chandra, and J. N. Saddler. 2007a. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnology Progress* 23(2): 398-406.
- Tu, M., R. P. Chandra, and J. N. Saddler. 2007b. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnol. Prog.* 23: 1130-1137.
- Tu, M., X. Zhang, and M. Paice, P. McFalane, and J. N. Saddler. 2009. Effect of surfactants on separate hydrolysis fermentation and simultaneous saccharification fermentation of pretreated lodgepole pine. *Biotechnol. Prog.* 25: 1122-1129.
- Wong, K. K. Y., K. F. Deverell, K. L. Mackie, T. A. Clark, L. A. Donaldson. 1988. The relationship between fiber porosity and cellulose digestibility in steam-exploded *Pinus radiata*. *Biotechnol. Bioeng.* 31: 447-456.
- Wu, J., and L. K. Ju. 1998. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition. *Biotechnol. Prog.* 649-652.
- Wyman, C. E. 1996. *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Washington, DC, Taylor & Francis.
- Wyman, C. E., B. E. Dale, R. T. Elander, M. Holtzapple, M. R. Ladisch, Y. Y. Lee, C. Mitchinson, H. N. Saddler. 2009. Comparative sugar recovery and fermentation date following pretreatment of poplar wood by leading technologies. *Biotechnology Progress* 25: 333-339.
- Yang, B., C. E. Wyman. 2006. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnology and Bioengineering* 94(4): 611-617.
- Yoshida, M., Y. Liu, S. Uchida, K. Kawarada, Y. Ukagami, H. chinose, S. Kaneko, K. Fukuda. 2008. Effects of cellulose crystallinity, hemicellulose, and lignin on the enzymatic hydrolysis of miscanthus sinensis to monosaccharides. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 72(3): 805-810.
- Zeng, M., N. S. Mosier, C. P. Huang, D. M. Sherman, and M. R. Ladisch. 2007. Microscopic examination of changes of plant cell structure in corn stover due to hot water pretreatment and enzymatic hydrolysis. *Biotechnol. Bioeng.* 97(2): 265-278.
- Zhang, Y. -H. P., and L. R. Lynd. 2004. Towards and aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: non-complexed cellulose systems. *Biotechnology and Bioengineering* 88: 797-824.
- Zhang, Y. -H. P., D. J. Schell, J. D. McMillan. 2007. Methodological analysis for determination of enzymatic digestibility of cellulosic materials. *Biotechnology and Bioengineering* 96(1): 188-194.
- Zhang, Y. -H. P., L. R. Lynd. 2004. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase system. *Biotechnol Bioeng.* 88(7):797-824.
- Zhu, Z., N. Sathitsuksanoh, T. Vinzant, D. J. Schell, J. D. McMillan, Y. -H. P. Zhang. 2009. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fraction: enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnol. Bioeng.* 103: 715-724.
- Zuhai, S. A. 2008. The effect of crystallinity of cellulose on the rate of reducing sugars production by heterogeneous enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology* 99: 4078-4085.

(Received December 00, 2010; Accepted August 0, 2010)