

## 총 설

# 산업 BT: 생물 자원의 생물 변환에 의한 연료, 화학원료 및 고분자의 생산

이선구 · 박성훈<sup>†</sup>

부산대학교 화학생명공학과, 환경기술 · 산업개발연구소  
609-735 부산시 금정구 장전동 산 30  
(2005년 12월 22일 접수, 2006년 2월 1일 채택)

## Industrial Biotechnology: Bioconversion of Biomass to Fuel, Chemical Feedstock and Polymers

Sun-Gu Lee and Sunghoon Park<sup>†</sup>

Department of Chemical and Biochemical Engineering and Institute of Environmental Technology and Industry,  
Pusan National University, 30, Jangjeon-dong, Geumjeong-gu, Busan 609-735, Korea  
(Received 22 December 2005; accepted 1 February 2006)

## 요 약

우리 인류가 이룩한 산업의 발전은 화석원료에 기반을 두고 있다. 현재 인류가 사용하고 있는 대부분의 정밀 화학 제품, 의약품, 각종 화학 소재, 플라스틱, 연료 등은 화석원료 특히 석유를 원료로 생산되고 있다. 그러나 석유는 수요의 지속적 증가와 매장량의 한계 때문에 최근 그 가격이 급격히 상승하고 있으며 이로 인해 세계 경제의 발전이 크게 위협받고 있다. 또한, 화석연료나 화석원료 이용하는 화학제품의 제조공정은 지구온난화 가스 및 폐기물을 대량생산하여 인류에게 심각한 환경문제를 야기하고 있다. 이에 바이오매스를 원료로 사용하는 새로운 생물화학공정, 즉 산업 BT의 필요성이 대두되었다. 산업 BT는 바이오 에탄올, 바이오 수소 등의 대체 연료, 글리세롤, 젖산, 아세트, 부탄올, 프로피온산 및 각종 아미노산 등을 포함한 대체원료, 미생물이 생산하는 PHA 등의 바이오폴리머의 생산에 활용될 수 있으며, 궁극적으로 기존 화석원료 기반의 산업구조를 환경친화형 바이오 기반 구조로 대체할 것으로 기대되고 있다.

**Abstract** – The production of various commodity chemicals including fine chemicals, pharmaceuticals, bulk chemicals, plastics, and fuels is based on fossil resources such as petroleum. However, the limited reserves and ever-increasing demand of petroleum lead to the rapid elevation of its price. In addition, the traditional chemical processes using petroleum as a raw material have been imposing a serious environmental burden to our planet including global warming. These problems can be alleviated substantially by employing biological raw materials and bioconversion processes. Industrial biotechnology is expected to significantly complement or replace the current petroleum-based industry and to play an important role in bringing about so-called ‘bio-based society’.

**Key words:** Industrial Biotechnology, Biomass, Bioconversion, Chemical Feedstock, Bio-fuel

## 1. 서 론

20세기 초 원유가 본격적으로 사용되기 전 대부분의 화학산업은 석탄이나 바이오매스에 의존하여 왔다(Fig. 1). 20세기 중반부터 석유를 중심으로 한 화학산업은 크게 발달하게 되었는데 정밀 화학제품(fine chemicals), 의약품(pharmaceutical chemicals), 범용 화학제품(bulk chemicals), 플라스틱 및 연료에 이르는 다양한 제품들이 석유로부터 생산되게 되었다. 그러나 화석원료로 대표되는 석유, 가스 및 석탄은 그 자원의 한정성으로 인하여 가격이 지속적으로 상승하고 있으며, 이의 원활한 확보를 위한 국가 간 경쟁이 가열되고 있다

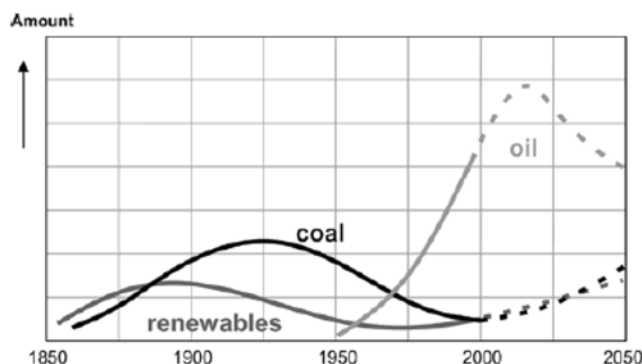


Fig. 1. Trend in feedstock of chemical industry.

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: parksh@pusan.ac.kr

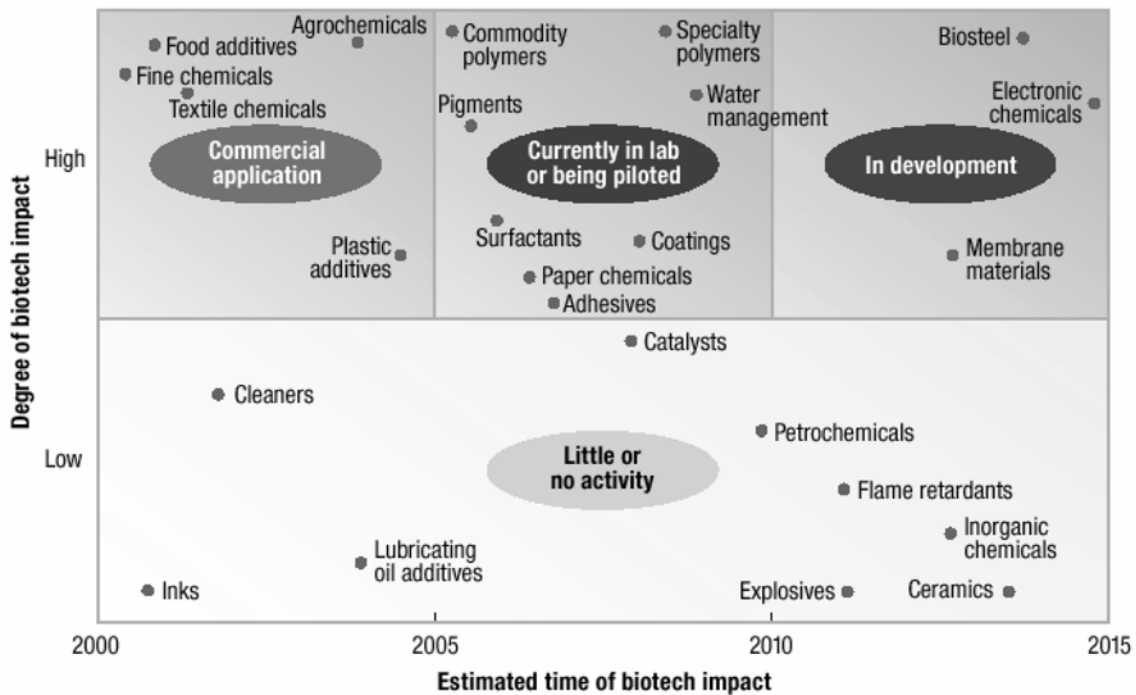


Fig. 2. Various chemical products related with industrial biotechnology.

. 더욱이 화석원료로부터 생산되는 화학제품들은 제조공정에서 부산물로 지구온난화 gas와 폐기물을 대량 발생시켜 인류에게 심각한 환경 위기를 초래하고 있으며, 이는 기존의 화학 산업을 급격히 위축시키는 요인이 되고 있다. 따라서 화석원료에 기반을 둔 화학 공정을 대체할 수 있는, 즉 화석원료의 소비와 인류에게 유해한 폐기물의 생산을 최소화할 수 있는 바이오매스를 원료로 사용하는 환경친화적인 새로운 생물화학공정의 개발이 필요하다[1-5].

산업 BT(white biotechnology 또는 industrial biotechnology)는 생물공학 기술의 산업생산에 이용하는 기술로서, 정밀화학, 의약품 뿐만 아니라 고분자, 신소재, 범용 화학제품 그리고 에너지의 생산에 까지 이용되고 있다(Fig. 2). 생물 공학 기술을 이용하는 산업 BT는 원료로써 재생 가능한 바이오매스인 각종 동식물, 농업에서 나온 부산물 및 폐기물, 음식물쓰레기, 생체에 기초한 산업 폐기물, 바이오 연료 생산을 목적으로 재배된 작물 등을 이용한다. 또한, 생산 공정에서 생축매를 사용하므로 오염과 에너지 소모가 적은 청정기술이다. 그뿐만 아니라 생화학, 미생물학, 유전체학, 단백질학, 생물정보학, 공정공학 등의 학문의 발전에 힘입어 의약품 관련 BT(red BT), 농업 관련 BT(green BT)에 이어 BT의 제3의 물결을 주도할 것으로 기대되고 있다[6-7]. 이에 따라 미국, 유럽, 일본 등 세계 각국은 장기적이고 종합적인 대체에너지 및 바이오매스 유래 화학제품 생산을 위한 정책을 수립하고 있으며 산업 BT 관련 연구개발 및 상업화를 적극 지원하고 있다. 예를 들면 미국에서는 바이오매스를 출발물질로 하여 각종 화학소재와 에너지를 생산하려는 bio-refinery(생물유래 및 생물공정 활용)에 대한 연구개발을 DOE와 USDA를 중심으로 지원(연간 \$ 80 million 규모)하고 있으며, 일본은 2004년 이후 경제산업성이 바이오프로세스 실용화 개발사업 및 바이오매스 플라스틱 활용 실증사업에 연 26억 엔을 지원하고 있다[8]. 산업 BT를 red BT(의약), green BT(농업)와 구별하여 white BT로 표현하여 쓰기

시작한 유럽은 생물 산업체의 모임인 유럽생물산업연합(EuropaBio)을 중심으로 지원정책을 수립 중에 있다[8]. 또한, 독일, 네덜란드, 영국 등 유럽 각국은 개별 국가별로 지원정책을 수립하고 있다.

McKinsey 보고서에 따르면 현재 약 5%의 화학제품이 산업 BT를 활용한 생물공정으로 생산되고 있다. 그러나 그 비중은 급격히 증가하고 있으며 2010년경에는 약 10~20%(금액으로는 2,800억 달러), 그리고 2050년경에는 약 50%에 이를 것으로 예상되고 있다 [8]. 특히 정밀 화학분야에서는 2010년까지 총생산물의 60%를 산업 BT가 담당할 것으로 예상된다[8]. 산업 BT와 직접 관련이 있는 산업분야는 화학·플라스틱·종이·섬유·식품·제약 등 매우 다양하며, 이미 DuPont, Monsanto, Cargill, Dow, Genencor, Maxygen, Diversa, DSM 등 기업들이 젯산, 프로판디올, 구연산, 숙신산, 각종 아미노산, 비타민, 향생제, 다당류, 미생물 농약, 생리활성물질 등을 생산하고 있다 [1]. 이들 기존 제품을 포함하여 앞으로 산업 BT에 의해 생산될 제품을 특성에 따라 분류하면 크게 4가지, 즉 바이오 에탄올, 바이오 수소 등의 대체 연료(biofuels), 글리세롤, 젯산, 아세톤, 부탄올, 프로피온산, 부틸산, 부탄디올, 프로판디올, 구연산, 숙신산, 각종 아미노산 등을 포함한 대체원료(chemical feedstock), 향생제, 다당류, 미생물 농약, 생리활성물질 등과 각종 생축매 전환반응 생산제품 그리고 바이오 식품소재를 포함한 특수기능물질(performance chemicals), 미생물의 1차 대사산물로 얻어지는 유기산을 원료로 만들어지는 각종 고분자 물질과 미생물이 생산하는 PHA 등의 바이오폴리머(biopolymer) 등이다. 이들 제품군 중 특히 대체원료는 동물, 식물, 미생물 등 생물체의 유기물을 총 망라하는 바이오매스를 이용하여 화학공정으로 얻던 원료물질을 바이오 공정으로 대신하여 얻는 것이다. 본 논문에서는 생물자원(biomass)을 이용한 대체 원료 생산 및 대체 연료, 바이오폴리머 생산을 위한 생물 공학 기술과 제품의 현황 및 발전 가능성에 대하여 살펴보고자 한다.

## 2. 생물 전환 기술

대부분의 화학공정은 고온 고압에서 작용하는 화학촉매에 의존하며 때때로 유기용매를 필요로 한다. 또한, 화학촉매공정의 최적화는 시간과 노력이 많이 소요되며 비용이 높다. 화학공정에 이용되는 출발물질과 중간 혹은 최종생산물들은 인간의 건강을 위해하며 환경에 나쁜 영향을 주는 경우가 많다. 또한, 에너지를 많이 사용하며 각종 부산물도 다량 발생시킨다. 이에 비해 미생물을 이용한 화학물질의 생산은 에너지 소모가 적고, 환경친화적이라는 장점이 있다. 그러나 미생물의 생산능력은 기존의 화학공정과 비교할 때 속도가 수백 배에서 열위인 경우가 많고 원하는 물질 이외에도 많은 부산물을 생산하므로 생산물의 분리·정제에 많은 어려움을 야기한다. 이를 개선하기 위하여 효율적인 생산 공정이나 분리공정의 개발이 시도되어 왔다. 그러나 이 방법들이 공정의 경제성을 향상시키는데 어느 정도 도움이 되었지만 균주의 대사특성 자체를 조작하는 것이 아니므로 한계가 있었다. 특히 최근에는 공정 및 분리기술이 기술의 성숙화 단계를 지나 안정화 단계에 다다랐으므로 이의 개선을 통한 생산능의 향상은 크게 기대하기 힘든 실정이다. 따라서 생촉매의 획기적 개선, 즉 미생물의 대사회로를 조작함으로써 균주의 생산능 및 특성을 근본적으로 개선하는 새로운 특성을 갖는 신기능 효소의 발굴이나 대사공학기술 그리고 신개념의 생물공정기술이 관심을 끌고 있다.

대사공학 기술은 생명체 내부에서 일어나는 에너지와 물질의 흐름, 그리고 정보의 제어 등 복잡한 시스템을 해석하고 이를 생촉매 개량에 응용하는 기술이다. 구체적으로 분자수준, 세포수준, 조직세포 수준 및 생명체 전체 수준의 모델을 개발하고 이에 대한 전산모사 시스템을 개발하며 이를 기존 대사산물의 생산성 확대, 부가산물의 생성억제, 신규 대사산물의 생산 등과 관련을 짓는다. 이 기술은 유전체 이후 시대(post-genome era)의 대표적 생명과학기술로써 생체 구성성분을 총체적으로 접근하여 분석하고 생체 내 분자 간의 상호작용 또는 네트워크를 규명하는 새로운 길을 열고 있다. 즉, 세포의 정보, 구조, 기능 및 조절의 중요한 역할을 하는 생체물질인 DNA, 단백질 또는 대사물질을 총괄적으로 다루는 '게노믹스(genomics)', '프로테오믹스(proteomics)' 및 '메타볼로믹스(metabolomics)' 등 발전하고 있는 새로운 학문과 기술을 통합한다. 따라서 이 기술은 생명현상의 이해를 촉진할 뿐 아니라, 질병진단 및 신약개발 그리고 생체물질 생산 및 응용의 가능성을 한 단계 더 높여주고 있다. 대사공학적으로 개량된 균주들은 화학(정밀화학물질, 범용화학물질), 의약·의료(광학활성 의약품, 신규항생제), 환경(난분해성 화합물 분해, 생분해성 고분자), 농업(질소고정화, 해충내성) 등 거의 모든 분야에 광범위하게 응용되고 있다.

효소 공학(enzyme engineering) 기술은 미생물, 환경유전자, 유전체정보로부터 바이오촉매로 활용이 가능한 효소자원을 발굴하고 이를 대량 발현 생산하는 기술이다. 또한, 새로운 효소나 기존의 효소를 방향분자진화(directed evolution) 등의 기법을 사용하여 최적화하며 생물촉매에 적합한 안정성 및 기능성을 확보하는 기술이다. 최근 화학공정과의 경쟁이나 융합의 중요성이 부각되면서 화학공정에 알맞은 고온 고압의 조건을 잘 견디는 효소가 많은 관심을 끌고 있으며, 이를 개발하는데 활용될 수 있는 많은 기술이 각광을 받고 있다. 효소공학기술은 크게 신기능 바이오 촉매 자원의 발굴기술, 단백질 생산성 향상기술, 단백질 진화기술 등으로 나눌 수 있다. 이중

신기능 바이오촉매자원의 발굴기술은 미생물, 식물, 동물 등 유전체 정보를 기반으로 생물정보학적 방법에 의한 유용유전자원의 탐색, 배양이 어려운 미생물에서 유래하는 신기능 바이오촉매 자원의 확보, 그리고 이들 효소에서 기능의 규명 등이 포함된다. 또한, 단백질 발현조절 및 생산성 향상기술에는 유용 생물촉매의 경제적 대량 생산을 위한 고효율 발현기술, 효모 등 미생물 표면발현기술, 분비 발현기술, 항시적 발현 또는 발현 제어기술 등이 관심을 끌고 있다. 한편, 바이오촉매 분자진화/단백질공학기술은 바이오소재 효소생산의 기능을 개량하여 고기능 생물촉매를 개발하기 위한 것으로 *in silico* 단백질 분석, 분자진화기술을 포함하며 다기능 모델 단백질을 비롯하여 비자연 인공효소의 제작과 생체분자의 'lego형' 조립 및 디자인을 통한 신기능 바이오분자의 개발이 포함된다. 마지막으로 바이오촉매 이용 신화학기술은 glycosylation, PEGylation 등 단백질의 화학적 수식기법을 이용하여 기질특이성, 안정성을 개선하는 것으로 불용성 및 수용성 담체에 효소를 고정화하여 반응성 및 물리화학적 안정성을 개선하는 것을 포함한다.

생물 공정 기술(bioprocess technology)은 바이오매스 원료의 전처리, 생물반응, 분리, 정제 등과 연관된 공정기술을 의미한다. 또한, 새로운 효소나 미생물의 개발 혹은 대사공학 기술과 모델링 기술의 적용을 위한 새로운 공정의 개발과 공정의 개선을 포함한다. 즉, 새로운 생물촉매 기술의 활용과 최적화, 혁신적인 발효 및 친환경 분리정제 공정을 포함하는 다운스트림 공정기술, biorefinery 기술, 친환경/경제적 산업생산 공정을 위한 산업 BT의 적용기술, 산업 BT의 기술적/경제적 평가기술 등을 포함한다. 이러한 공정 기술은 생물 촉매기술의 진보와 밀접한 연관이 있다. 일반적으로 새로운 생물 촉매가 개발되면 항상 이를 효율적으로 사용하기 위한 공정기술의 개발이 필요하게 된다. 최근에는 특정 환경 및 극한 환경에서의 신규 효소와 미생물의 확보, 미생물 유전체학과 생물정보학의 핵심 기술과의 접목, 그리고 새로운 산물의 생산과 수율을 높이기 위한 대사공학 기술의 활용(특정 산물 생산에 대한 mechanism 규명) 등을 통해 새로운 생물촉매가 속속 개발되고 있다. 또한, 생물촉매 개량 기술(protein engineering, enzyme immobilization, gene shuffling, directed evolution 등)과 효소 고정화 기술의 발전에 따라 적절한 반응기 기술의 발전이 요구되고 있다. 한편, 혁신적인 발효 및 다운스트림 공정기술에서는 생물반응기의 성능 향상을 위한 변수의 최적화 및 향상된 생물반응기의 디자인 적용, 효율적 회수 및 정제공정의 확립, 마이크로 반응계에서 라세믹 스위치 기술 등이 공정기술에서 관심을 끌고 있다. Biorefinery 기술은 일반적으로 바이오매스 원료의 전처리와 당전환, 유용 대사산물의 생산 등을 모두 포함한다. 바이오매스의 취급과 공정 적용, 생물반응기에서의 발효(효율적 전환반응을 위하여 화학공정을 일부 포함하는), 최종산물의 회수와 정제기술 등 요소 기술이 중요할 뿐 아니라 이들을 종합적으로 고려하는 integrated biorefinery 기술이 중요하다. 다시 말하여 biorefinery가 경제성을 가지려면 효율적인 다단계 통합 공정 개발이 중요하며 친환경/경제적 전환을 위한 화학적 및 생물학적 연계 전환 시스템 개발이 필수적이다. 마지막으로 산업 BT의 기술적 경제적 평가기술은 재생 가능한 자원에서부터 화학원료 물질을 생물공학적으로 생산하는 공정, 전통적인 화학적 생산공정을 대체할 수 있는 생물학적 생산공정 등의 평가를 주 대상으로 한다. 그 내용에 있어서는 방법론의 개발이 필요하고 특히 환경적인 관점 그리고 경제적인 관점에서의 접근 방안 마련이 중요하다.

### 3. 생물 전환 기술을 이용한 생산 제품

기본적으로 모든 화학제품은 바이오매스와 생물전환 기술을 이용하여 생산할 수 있다. 화학산업에서 생산되는 제품은 매우 다양하다. 현재 전 세계적으로 생산되는 화학제품은 연간 300 million 톤이 넘으며 금액으로는 USD 10조 달러를 상회한다고 알려져 있다. 이러한 화학제품들은 크게 세 가지로 분류할 수 있는데, 제품별 연간 생산량을 기준으로 볼 때 이들은 (1) 범용화학물질(bulk, commodity chemicals, >100만 톤/년), (2) specialty chemicals(>10만 톤/년), (3) 정밀화학제품(<10만 톤/년) 등이다. 생산량을 감안할 때 화학산업에서 에너지나 원료사용량의 절감에 가장 크게 기여할 수 있는 것은 범용 화학물질을 생물공정으로 생산하는 것이다. 그러나 범용 화학물질은 가격이 매우 낮으므로 경제적인 측면에서는 생물공정이 경쟁력을 갖기가 쉽지 않다. 정확한 산정은 쉽지 않지만 생물공정이 경쟁력을 가지려면 제품가격이 kg 당 약 US\$ 2가 되어야 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 석유가격이 지속적으로 증가하고 있으므로 제품의 최저가격(kg 당 약 US\$ 2) 또한 변할 것으로 예상된다. 미래에 어떤 제품이 재생가능 원료로부터 생산될 수 있는가 하는 것은 가격에 의해 결정될 것이다. 바이오매스로부터 생물 전환 기술을 이용하여 생산할 수 있는 화학제품의 계통도는 Fig. 3과 같으며, 본 논문에서는 이를 바이오 연료, 대체 화학 연료, 바이오 고분자 순으로 살펴보고자 한다.

#### 3-1. 바이오 연료(biofuel)

바이오 연료(biofuel)는 자연계에 있는 바이오매스(biomass)로부터 만들어지는 지속가능한 에너지를 말한다. 바이오매스는 동물, 식물, 미생물 등 생물체의 유기물을 총망라하는 것으로 각종 동식물을 비롯하여 농업에서 나온 부산물 및 폐기물, 음식물쓰레기, 생물체에 기초한 산업 폐기물, 바이오 연료 생산을 목적으로 재배된 작물(에너지 작물) 등 그 종류가 다양하다[8]. 바이오매스는 물리, 화학, 생물학적 기술들이 적용되어 고체, 액체, 기체 상태의 바이오 연료로 전환될 수 있다. 바이오 연료의 가격은 크게 두 가지 요인, 즉 원료물질의 가격과 전환공정의 비용으로 결정된다. 원유에서 연료를 만드는 공정은 현재 원료물질의 가격이 전환공정의 비용보다 현저히 높은 경우에 해당된다. 반면, 바이오연료의 경우 전환공정의 가격비중이 현저히 높다. 따라서 공정에서의 효율성 향상과 비용저

감을 가져올 수 있다면 최종제품 가격에 미치는 영향은 바이오 연료가 훨씬 크다. 현재 원료물질의 가격만 놓고 본다면 옥수수는 원유의 3분의 1 수준이며 대표적 셀룰로오스물질인 corn stover는 약 10분의 1 수준이다. 따라서 바이오 연료가 기존의 석유연료와 경쟁력을 가지려면 공정비용을 낮추기 위한 연구개발이 필요하고 또한 바이오 연료 생산과정에서 나오는 부산물을 고부가가치 제품으로 개발하는 노력이 필요하다.

EU에서는 수송부문(transport sector)에서 바이오 연료의 사용에 대해 목표치를 설정하였는데 이는 2005년에 2%, 2010년에 5.75%이다. 현재 전체 이산화탄소 배출량 중에서 28%가 수송부문에 기인하며 1990년부터 2010년 사이에 증가하게 될 이산화탄소 배출량의 90%가 역시 수송부문에 기인한다고 예상되고 있다. 따라서 수송용 연료부문에 화석원료를 대체하는 수단이 강구되지 않으면 교토의정서를 준수하기가 어려울 전망이다. 미국의 경우 에너지 수입은 대규모 무역적자의 원인이 되고 있다. 원유 및 석유화학제품의 수입량은 1일 1,000만 배럴이 넘으며 수송연료를 위한 수입량만 해도 US\$ 600억을 상회한다. 현재 미국의 석유 해외의존도는 60%가 넘으며 미국은 이를 경제적인 이슈뿐 아니라 국가안보의 차원에서 심각하게 받아들이고 있다. 따라서 유럽, 미국 등을 포함하는 세계 여러 나라는 바이오 연료의 개발과 사용에 국가적인 노력을 기울이고 있다. 바이오 연료의 대표적인 예로는 메탄올(methanol), 바이오에탄올(bioethanol), 바이오디젤(biodiesel), 바이오가스(biohydrogen, methane), 기타 고형 연료 등을 들 수 있다. 이들은 모두 전력생산이나 수송수단의 연료로 쓰일 수 있지만, 현재까지는 바이오 에탄올과 바이오디젤의 상업화가 가장 활발하다.

##### 3-1-1. 바이오에탄올

바이오에탄올은 가솔린 대체 연료, 첨가제 그리고 연료전지의 연료로 사용되고 있다[18-20]. 또한, 에탄올은 ETBT(ethyl tertiary butyl ether) 생산의 원료로 사용되고 있다. 현재 에탄올의 최대 생산국은 미국과 브라질인데 각각 미국은 옥수수 전분을 주원료로 사용하고 있으며 생산량은 연간 6 million m<sup>3</sup>이고, 브라질은 사탕수수를 주원료로 사용하고 있으며 생산량은 연간 15 million m<sup>3</sup>이다. 유럽은 2003년 생산량이 약 45만 톤으로 추정되며 최대생산국은 스웨덴, 프랑스 등으로 알려져 있다. 이들 국가에는 에탄올이 포함된 자동차용 연료의 공급시스템이 전국적으로 잘 갖추어져 있다.

각종 농산물을 원료로 하여 에탄올을 생산할 경우 지구온난화가스 방출량은 현저히 감소한다. 셀룰로오스를 원료로 에탄올을 생산하면 지구온난화가스 방출이 저감된다. 화석연료와 비교할 때 셀룰로오스기반 에탄올은 이산화탄소 방출량을 약 75~90% 저감하게 되는데 이는 곡물을 원료로 한 에탄올 생산에 비교하여 현저히 높은 수치이다. 이러한 환경적인 이익과 아울러 바이오에탄올의 생산은 지역과 지방의 발전을 촉진시키며 또한 새로운 일자리를 창출하는 요인이 된다. 셀룰로오스물질은 에탄올 생산의 원료물질로 사용할 경우 리그닌이 주 부산물로 생산된다. 리그닌은 열이나 전기를 생산하는 고체연료로 사용할 수 있으며 재(ash)가 거의 발생하지 않는다는 장점이 있다. 현재 셀룰로오스를 원료로 한 에탄올 생산가격은 리터당 40센트 수준으로 알려져 있으며 앞으로 목표치는 대략 리터당 20센트 혹은 배럴당 25달러 수준이다. 당이나 전분을 발효(fermentation)하여 에탄올을 생산하는 것은 매우 오래된 기술이다. 그러나 아직까지도 사용되는 에탄올의 상당부분은 석유화학공업의

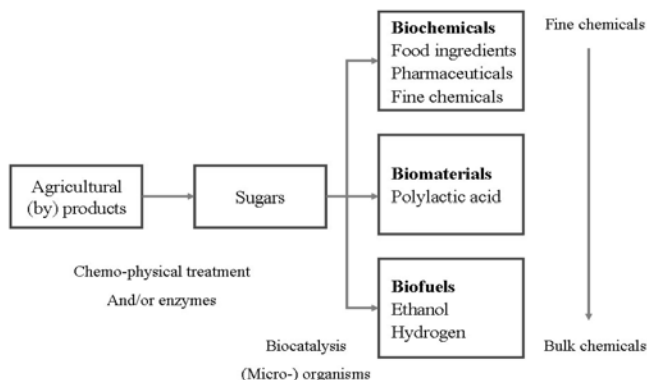


Fig. 3. Schematic diagram for the production of chemical feed stock from renewable resources.

Table 1. Fatty acid composition of various bio-oils

Fatty acid Fat or Oil	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0 C22:0	C20:1 C22:1	Other
Yellow grease				1	23	1	10	50	15				
Tallow	--	--	0.2	2~3	25~30	2~3	21~26	39~42	2	--	0.4~1	0.3	0.5
Lard	--	--	--	1	25~30	2~5	12~16	41~51	4~22	--	-	2~3	0.2
Butter	1~2	2~3	1~4	8~13	25~32	2~5	25~32	22~29	3	--	0.4~2	2~1.5	1~2
Coconut	5~9	4~10	44~51	13~18	7~10	--	1~4	5~8	1~3	--	--	--	--
Palm kernal	2~4	3~7	45~52	14~19	6~9	0~1	1~3	10~18	1~2	--	1~2	--	--
Palm	--	--	--	1~6	32~47	--	1~6	40~52	2~11	--	--	--	--
Safflower	--	--	--	--	5.2	--	2.2	76.3	16.2	--	--	--	--
Peanut	--	--	--	0.5	6~11	1~2	3~6	39~66	17~38	--	5~10	--	--
Cotton seed	--	--	--	0~3	17~23	--	1~3	23~41	34~55	--	--	2~3	--
Corn	--	--	--	0~2	8~10	1~2	1~4	30~50	34~56	--	--	0~2	--
Sunflower	--	--	--	--	6.0	--	4.2	18.7	69.3	0.3	1.4	--	--
Soybean	--	--	--	0.3	7~11	0~1	3~6	22~34	50~60	2~10	5~10	--	--
Rapeseed	--	--	--	--	2~5	0.2	1~2	10~15	10~20	5~10	.9	50~60	--
Linseed	--	--	--	0.2	5~9	--	0~1	9~29	8~29	45~67	--	--	--
Tung	--	--	--	--	--	--	--	4~13	8~15	72~88	--	--	--

산물인 ethylene의 수첨반응 (hydration reaction)에 의해 생산되고 있다. 2000년대 초반까지 바이오매스로부터 bioethanol의 생산은 석유를 원료로 이용한 화학공학적인 방법에 비해 경제적이었지 않았다. 따라서 bioethanol 사용은 환경적 측면에서 장점, 즉 에탄올은 휘발유보다 CO 배출량은 57%, 탄화수소 및 NOx 배출량은 각각 64%, 13% 감소시킨다는 점이 주로 부각되어 왔다. 그러나 앞으로 화석연료의 가격상승과 생물공학적인 공정의 진보에 따른 바이오 에탄올 생산성 향상에 힘입어 경제적 이유가 보다 중요한 요인으로 부각될 전망이다. 그러나 이 경우에도 바이오에탄올의 경제성은 석유가격의 변동에 크게 영향을 받을 전망이다. 브라질은 에탄올 발효에 관한 한 선도적인 위치에 있다. 많은 석유수입국은 바이오매스를 이용한 대체연료의 개발에 관심을 가지면서 브라질의 예를 벤치마킹하고 있다. BC International, Amoco, Arkenol 등을 포함 Williams Bio-Energy, Badger State Ethanol, Glacial Lakes Energy, Midwest Grain Processors, ADM, Ethxx 등 다수의 기업이 지역기반의 공급라인과 독특한 에탄올 생산기술을 바탕으로 시장 확대와 가격 우위 확보를 위해 활발한 움직임을 보이고 있다[8].

### 3-1-2. 바이오디젤

바이오디젤은 동식물의 지방 또는 재생유지로부터 알킬 에스테르화 공정을 거쳐 만들어진다. 디젤 엔진의 연료로서 기존의 디젤유 대신 쓰일 뿐만 아니라 독특한 윤활성 때문에 기존 디젤유의 첨가제로도 쓰인다. 바이오디젤의 원료로는 유채씨, 해바라기씨, 대두 등과 같이 다량의 식물성 기름(vegetable oil)을 함유하는 종자나, 쌀기름과 같이 각종 곡·식물 가공처리 과정에서 발생하는 부산물 기름 혹은 폐식용유 등이 쓰이고 있다. Table 1은 바이오 디젤 생산에 사용될 수 있는 각종 바이오 오일의 원료별 지방산 분포 특성을 보여준다. 미국은 건강상의 이유로 저지방 육류를 선호함에 따라 닭고기, 돼지고기 등에서 인위적으로 기름을 제거하게 되며, 이때 발생한 다량의 동물성 기름을 바이오 디젤의 원료로 이용하기도 한다. 바이오디젤은 기존의 디젤엔진의 구조 변화없이 그대로 쓸 수 있다는 특징이 있으며, 바이오디젤의 생산과정에서 바이오디젤 이외에 글리세린과 비료로 사용 가능한 성분들이 함께 생산되어 활용 폭이 넓다.

바이오디젤의 생산은 비교적 단순한 화학반응에 의해 이루어진다. 한 분자의 triglyceride는 세 분자의 메탄올과 반응하여 세 분자의 지방산 메틸 에스테르와 한 분자의 글리세롤을 생산하는데 이때 생성되는 알킬에스테르가 바이오디젤로 사용 된다(Fig. 4). 바이오디젤 생산 공정의 특성은 전이 에스테르화반응의 반응 수율이 매우 높아야 한다는데 있다. 대체로 바이오디젤이 기존 디젤유의 대체 연료로 사용되기 위해서는 글리세롤 함량은 0.24% 미만이어야 하는데, 만일 원료로서 분자량 885.46의 triolein이 사용된다면, 글리세롤의 분자량이 92.10 이므로 글리세롤 함량이 0.24% 미만이면 되려면 97.7% 이상의 높은 반응 수율(트랜스에스테르화 반응)이 요구됨을 알 수 있다. 그러나 전이에스테르화 반응에서 물이 존재할 경우 오일의 가수분해를 통해 지방산이 형성되고, 이 지방산은 촉매로 사용된 KOH와의 반응을 통해 비누화 반응을 일으키게 되어 촉매를 소모하게 된다. 이로 인해 전이에스테르화 반응이 지연되고 비누화된 지방산은 쉽게 젤화되어 반응수율이 감소할 수 있으므로 반응물 내의 수분제거 및 유지가 매우 중요하다. 가장 일반적으로 사용되는 일차 알코올은 메탄올이나, 에탄올, 이소프로판올, 부틸알콜 등도 이용될 수 있다. 바이오디젤 생산의 원료로서 알코올 품질의 가장 중요한 점은 수분함량이며, 저가 알코올들은 흡습성이 높아 보

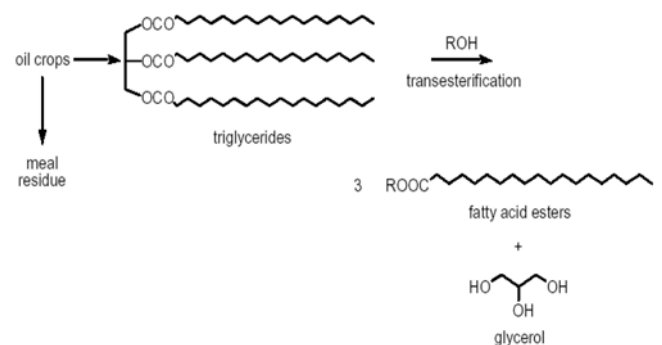


Fig. 4. Production of biodiesel by transesterification reaction of bio-oils.

관상에 주의하여야 한다. 에탄올은 메탄올 대비 가격이 3~4배 정도 높고, 물과 azeotrope를 형성하므로 메탄올에 비하여 정제가 어렵다. 따라서 높은 독성에도 메탄올이 일반적으로 바이오디젤 생산에 사용된다. 바이오오일의 트랜스에스테르 반응 장치의 종류로는 회분식 반응기와 연속식 반응기가 사용된다. 일반적으로 연속공정의 경우 98% 이상의 높은 반응 수율이 보고되고 있다. 또한, 초임계 유체를 사용한 무촉매 공정도 개발되었는데 초임계 조건에서 알코올은 super-acid의 성질을 띠게 되어 별도의 촉매 없이 수 분내에 트랜스에스테르반응을 완결할 수 있다고 알려진다. 그러나 높은 장치비 및 에너지 소비가 많은 점, 장치의 스케일-업의 문제점이 해결되어야 할 것으로 보인다. 전 세계 바이오디젤 생산량의 95%를 유럽이 차지하고 있으며, 연산 200만 톤 규모로 시장이 형성되어 있다. 프랑스(33만 톤), 독일(38만 톤), 영국, 이태리(20만 톤)에서 활발히 공장건설이 추진되고 있다. 오스트리아, 벨기에, 스웨덴에서도 바이오디젤의 사용이 증가되고 있으며 2010년까지는 현재의 3배로 성장할 것이 예측되고 있다. 현재 국제적인 생산업체는 Diester Industrie (프랑스 회사로 전 유럽 시장의 24% 점유), Novaol(Eridania Beghin-Say Group의 자회사로 17~20% 점유)이 있다. 또한, Oelmühle Hamburg사는 ADM의 자회사로 독일에서 가장 큰 생산업체이며 전 EU의 16%를 점유하고 있다. 미국에서는 아직까지 초기 단계에 있고 약 400대의 차량이 바이오디젤을 사용하고 있다. 그러나 미국에서 바이오디젤에 대한 세금 감면의 혜택이 주어지면 앞으로 10년 후에 연산 3~7백만 톤의 수요가 있을 것으로 전망되고 있다. 이러한 시장 증가의 요인으로서는 에너지 수급의 안정성 확보, 온실 가스의 감축, 오염배출(입자, 일산화탄소, 황화합물 등)의 감소, 지역경제의 활성화, 원유와 천연가스 가격의 상승 등을 들 수 있다. 북미에서는 Dow사의 자회사인 Dow Haltermann Custom Processing (DHCP)사가 바이오디젤을 판매하고, World Energy사와 공동으로 Houston에서 생산하여 공급하고 있다.

### 3-2. 대체 화학 원료(alternative chemical feedstocks)

미국 에너지성(US DOE)은 2004년 8월 미래의 대체 화학물질의 목록을 발표하였다. 먼저 300개 이상의 후보군을 선정하고, 이에 대해 다시 석유화학 모델, 화학적 자료, 시장 데이터, 성질, 효율성 등을 반복적으로 검토한 후 30개의 잠재적인 후보군 선정하였다[8]. 또한, 30개의 잠재적인 후보군 중에 이들 물질과 유도체들의 시장성과 합성방법의 기술적인 복잡성에 대해 검토한 후 생물학적이거나 화학적인 변형을 통해 당으로부터 생산되어질 수 있는 12개의 기본 요소(Building block)를 최종적으로 선정하였다. 이들은 보통 12개

의 top value-added chemicals로 불리며 대체화학원료를 논할 때 가장 보편적으로 인용되고 있다. Table 2는 이들 물질을 탄소수에 따라 정리한 결과를 보여준다.

현재 biotech을 이용하여 생산되는 대체 화학원료는 그 수가 제한되어있다. Ethanol(12.6 million ton/year)과 구연산(750,000 ton/year)을 제외하면 몇 종류의 아미노산(L-lysine, L-glutamine)이 연간 10만 톤 규모로 생산되고 있으며 유기산(acetic, itaconic, lactic acid)이 연간 1만 톤 규모 그리고 비타민(B2, B12)과 항생제들이 연간 약 1000톤 규모로 생산되고 있을 뿐이다. 본 논문에서는 중요한 building block 화합물 중 3-hydroxypropionic acid, di-acid, itaconic acid의 생물공학적 생산과 이들의 유도체, 시장 기능성 등을 살펴보고자 한다.

#### 3-2-1. 3-하이드록시프로피오닉산(3-Hydroxy propionic acid: 3-HPA)

3-hydroxy propionic acid(3-HPA)는 포도당으로부터 이론상 100% 수율로 얻을 수 있는 핵심중간체이다. 발효에 의해 생산된 3-HPA는 화학적 방법으로 1,3 프로판디올, 아크릴산, 아크릴산아크릴아마이드, 아크릴로니트릴 등 산업적으로 중요한 다양한 물질로 유도될 수 있다(Fig. 5)[23]. Cargill사는 자사의 핵심제품으로 3-HPA를 개발하고 있으며 최근 여러 미생물로부터 3-HPA 생산에 관계된 유전자들을 클로닝하고 재조합 미생물을 만들어 미생물을 이용한 3-HPA 생산이 가능하도록 하였다[24]. 3-HPA는 전통적인 화학적 방법으로는 생산하기가 어렵고 따라서 지금까지 시장에서 중요한 역할을 할 수 없었다. 그러나 이의 생물학적 생산은 코팅, 접착제, 수처리, 개인용품 등을 생산하는 새로운 시장을 창출하게 될 전망이다. Cargill사가 개발한 대사경로에 기초하여 Codexis사는 전분을 원료로 3-HPA의 생산성을 향상시키기 위한 새로운 기술들을 연구하고 있다[8].

#### 3-2-2. 1,3-프로판디올(1,3-Propanediol: 1,3-PD)

PD는 polytrimethyleneterephthalate(PTT)의 원료로 쓰인다. PTT는 나일론과 비슷한 물성을 갖는 새로운 고분자로서 카펫(corterra)이나 특수기능성 섬유재료(sorona)의 제조에 사용된다. 뿐만 아니라, 페인트 산업에서 용도가 많은 폴리에스터 수지의 제조에 새로운 장을 열고 있다고 알려진다. PD는 미생물에 의해서 글리세롤에 의해서 생산될 수 있다. 글리세롤은 앞서 기술한 바이오 오일로부터 바이오디젤을 생산하는 공정에서 부산물로 생산된다. 바이오디젤의 시장이 증가함에 따라 글리세롤의 가격이 폭락할 것으로 예상되는데 독일의 경우 글리세롤 가격이 바이오디젤 생산에 의해 절반 이하로

Table 2. Potential chemical building blocks identified by DOE, USA as key feedstocks in future biorefineries

Carbon #	Building block	Carbon #	Building block
3	3-Hydroxy propionic acid	5	Itaconic acid
	Glycerol		Levulinic acid
4	3-Hydroxybutyrolacton		Xylitol/Arabitol
	Aspartic acid	6	2,5-Furan dicarboxylic acid
	1,4 Diacids (succinic, fumaric, malic acids)		Glucaric acid
5	Glutamic acid		Sorbitol

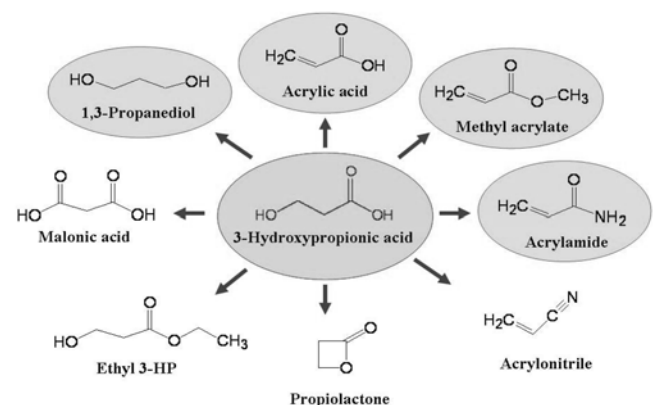
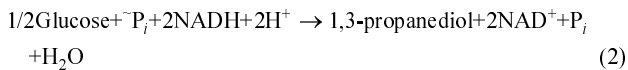
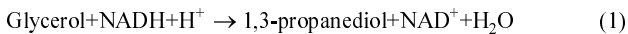


Fig. 5. Derivatives of 3-hydroxypropionic acid.

하락한 예가 보고되고 있다. 따라서 바이오디젤 제조과정에서 나오는 글리세롤은 PD생산의 매력적인 원료물질이다. 글리세롤을 원료로 하는 PD생산공정은 기술적으로 많은 발전이 있었다. 새로운 미생물의 발굴과 공정개선(pH-controlled 유가식배양)을 통하여 높은 최종농도 100 g/L가 달성되었다고 보고된 바 있다. 또한, 고정화 세포를 사용할 경우 현탁 배양 생산성 2~4 g PD/L/h을 30 g PD/L/h 수준으로 증가시킬 수 있다고 보고되었다. 더구나 고정화 세포의 경우 바이오디젤을 제조하고 나오는 값싼 글리세롤을 원료로 사용할 수 있다는 장점이 있다. 현재 대표적인 화학공정은 Shell사의 ethyleneoxide공정과 Degussa사의 acroleine 공정인데 생산가격은 각각 1,400 \$/ton 과 1,550 \$/ton 이라고 알려진다. 이에 비해 글리세롤을 이용하는 생물학적 공정은 글리세롤 가격에 많은 영향을 받는데 만일 바이오 디젤의 부산물로 글리세롤의 가격이 0 \$가 된다면 글리세롤을 이용하는 생물학적 공정의 PD 생산가격은 약 1,050 \$/ton이 될 전망이다.

또 다른 원료 물질로는 포도당을 들 수 있다. 자연에는 본래 포도당을 직접 발효하여 PD를 생산하는 미생물이 존재하지 않으므로 복합미생물을 사용하는 것이 필수적으로 알려졌다. 그러나 최근 DuPont과 Genencor사는 대사공학기술을 이용하여 하나의 미생물로부터 포도당을 이용하여 PD를 높은 수율로 생산하는 기술을 개발하였다. 즉, 효모가 포도당을 글리세롤로 전환하며 또한 특정 세균종류는 글리세롤을 1,3-propanediol로 전환한다는 사실에 착안하여 두 가지 기능을 모두 갖는 미생물을 개발하였다. 미생물 입장에서 볼 때, 포도당으로부터 1,3-propanediol을 만들 경우 (2) 고 에너지 그룹인 인산 결합을 요구하기 때문에 글리세롤로부터 혐기적인 조건에서 1,3-propanediol을 합성하는 경우 (1)에 비하여 불리한 조건이다.



그러나 이 프로젝트가 시작될 당시 포도당 원료가격이 글리세롤에 비하여 경제성이 있었기 때문에 연구자들은 (2)번 공정을 선택하였다. 기술적인 측면에서 생촉매로 개발하려고 결정한 대장균의 일종인 *E. coli* K12는 아주 적은 양의 글리세롤만을 만들 수 있었고, 전혀 1,3-propanediol을 합성할 수 없었다. 따라서 다음 두 가지 사항, 첫째, Dihydroxyacetone phosphate(DHAP)가 1,3-propanediol의 주된 탄소공급원이기 때문에 이를 활용하여 1,3-propanediol로의 전환능력을 증가시키는 것과, 둘째, 효율적인 인산화 및 산화환원력을 공급해주는 것 등을 중점적으로 고려하게 되었다. Fig. 6은 최종적으로 개발된 생촉매에서의 대사흐름을 보여주고 있다. DHAP를 글리세롤로 전환하기 위하여 필요한 두 가지 효소인 DAR1(glycerol 3-phosphate dehydrogenase)와 GPP2(glycerol 3-phosphate phosphatase) 유전자는 *Saccharomyces cerevisiae*로부터 얻었다. 또한, 생성된 글리세롤을 3-hydroxypropionaldehyde로 전환하기 위하여 glycerol dehydratase(*dhaB1-3*)는 *K. pneumoniae*로부터 획득하였으며 이 과정에서 과거에 기능이 밝혀지지 않았던 산화환원효소(*vghD*)가 3-hydroxypropionaldehyde를 매우 효과적으로 1,3-propanediol로 전환하는 것을 발견하였다. 이렇게 개발된 대장균은 농도 135 g/L, 생산성 3.5 g/L/h 그리고 포도당으로부터의 질량 수율은 약 51%로 PD를 생산할 수 있었다. 포도당으로부터의 PD 생산은 산업 BT를 이용한 범용 화학물질의 생산에 있어서 하나의 이정표로 간주될 정도

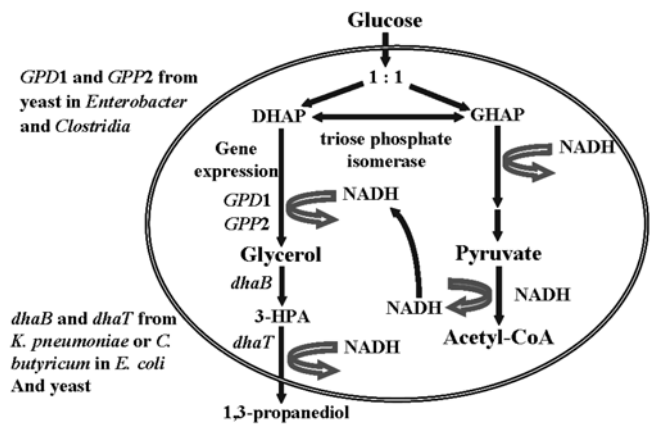


Fig. 6. Metabolic pathway from glucose to 1,3-propanediol in the recombinant *E. coli* developed by Genencor and DuPont.

로 유명한 공정이다. 이 공정에 의한 PD의 생산가는 약 1,300 \$/ton으로 Shell사의 ethylene oxide 공정과 비슷하다고 알려졌다. 현재 듀폰사는 이렇게 생산된 PD와 TPA를 중합시켜 폴리에스터를 합성하였으며 이를 Sorona™라는 이름으로 판매하고 있다.

### 3-2-3. 1,4-Diacids(succinic, fumaric, malic acids)

크랩스 경로로부터 C4 지방산 과생산을 위한 발효에 의해 생산 가능한 1,4- Diacids는 THF, BDO, GBL 족, 피롤리딘은 족 등의 용매 및 고분자로 유도될 수 있는 유용한 중간체이다. 특히 숙신산(succinic acid)(Fig. 7)의 경우 maleic anhydride를 대체할 수 있는 중간체로써 연간 270,000 t의 시장성을 갖는 것으로 평가된다[25, 26, 27]. 숙신산의 경우 포도당과 CO<sub>2</sub>로부터 혐기성 미생물을 이용하여 생산이 가능하며, 생산성 향상을 위하여 숙신산 과다생산 미생물의 유전체 서열 및 대사 네트워크가 연구되었다 [17]. 현재까지 새로운 공정 및 회수 기술의 발달에 의해 농도 110 g/L 까지 생산이 가능하며 생산규모기준으로 연간 75,000톤의 경우 US 0.55 \$/kg, 그리고 연간 5,000톤의 경우 US 2.2 \$/kg 이하로 생산이 가능하다고 알려졌다. 그러나 석유화학 유래 제품과의 경쟁에서 우위에 서려면 가격을 kg 당 \$ 0.50 이하로 더 낮출 필요가 있다고 알려진다 [1, 8].

### 3-2-4. 이타콘산(Itaconic acid)

이타콘산은 아크릴산 또는 메타크릴산의 유도체로 이들을 대체할

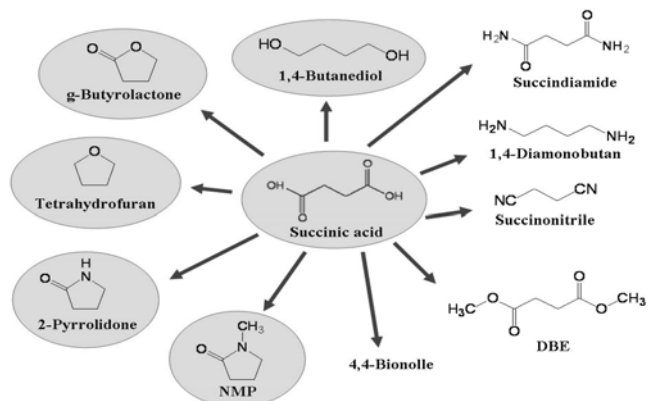


Fig. 7. Derivatives of succinic acid.

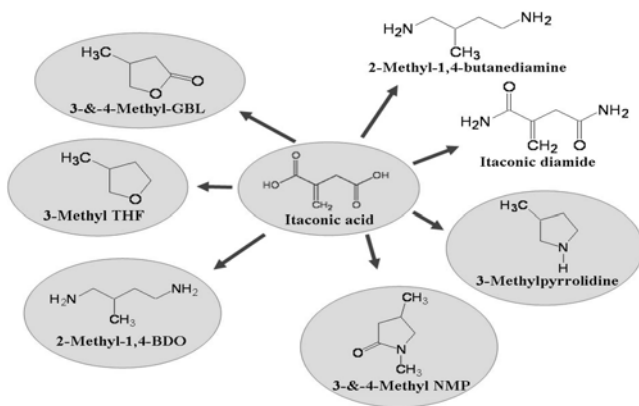


Fig. 8. Derivatives of itaconic acid.

수 있는 원료로 사용된다(Fig. 8). 또한 분자 내에 존재하는 이중 결합으로 인해 고분자 중합을 위한 단량체로 사용될 수 있다. 예를 들면 styrene-butadiene lattice의 Co-monomer로 사용되어 물성 향상을 가져오는데 사용되고 있다[1]. 또한 이타콘산은 코팅제, 접착제, 충전제, 합성 유리를 다양한 제품의 제조에 사용될 수 있다. 이타콘산의 시장은 연간 10,000~15,000 t로 평가되고 있으며, 대부분 폴리머 산업에 관련되어 있다. 향후 새로운 시장으로 의약 및 농업분야가 유망한데 주로 생리활성물질의 제조원료로 사용될 것이 기대된다. 이타콘산의 생산성은 균주에 따라 큰 차이가 나며 좋은 균주를 스크리닝 하는 것이 매우 중요하다고 알려져 있다. 일반적으로 *Aspergillus*와 같은 호기성 곰팡이를 이용한 당 발효에 의해 생산이 가능하며, 생산성이 좋은 신규 분리 균주인 *Aspergillus terreus* LU-02B의 경우 78 g/L 까지 이타콘산이 생산되었다고 보고된바 있다 [28, 29].

### 3-2-5. 기타

위에서 언급한 네 가지 기본 요소 외에도 여러 가지 대체 원료 물질들이 연구되고 있다. 예를 들어 글리세롤(glycerol)의 경우 산화반응에 의해 PLA 유사형 및 글리세릭산으로, 수소화분해반응에 의해 폴리프로필렌 글리콜 및 1,3-프로판디올로, 중합에 의해 가지형 폴리에스테르 등으로 유도될 수 있으며, 이들은 부동액 및 섬유 시장에 사용된다. 또한 아직까지 생물 공학적 생산방법이 확립되지 않았으나 3-Hydroxybutyrolacton(3-HBL)은 퓨란, 피롤리도브, 테트라하이드로퓨란과 유사한 아미노산 등의 전구체로써 거대 시장을 조성할 수 있는 기본요소로 평가되고 있다.

### 3-3. Biopolymer

바이오폴리머(biopolymer)란 생물학적 작용을 통하여 합성되어지는 고분자 물질로 정의되며 다음과 같은 중요한 특징을 갖는다. 첫째, 생분해성(biodegradable)으로 환경에 노출되었을 경우 미생물의 작용에 의하여 분해되어 환경에 축적되지 않는다. 둘째, 상당수의 바이오폴리머는 인체에 삽입되었을 경우에도 인체 세포 및 조직에 거부반응을 나타내지 않는 생체 적합성(biocompatible)이 있다. 셋째, 상당수의 바이오폴리머는 생물학적 전환반응을 통하여 합성될 수 있으며, 이러한 생물전환반응은 기존 유기화학반응에 비하여 환경친화형이란 장점이 있다. 마지막으로 상당수의 바이오폴리머는 단량체가 재생 가능한 탄소화물에서 생물학적 전환반응을 통하여 생산된다. 따라서 이러한 바이오폴리머는 환경에 부담을 주지 않으면서

서 지속적으로 생산이 가능하다는 특징이 있다.

바이오폴리머는 유래나 제조법에 따라 천연바이오폴리머, 미생물 생산 바이오폴리머, 그리고 생화학 합성 바이오폴리머로 나눌 수 있다. 이중 천연바이오폴리머는 식물이나 해조류에 의하여 합성되어 축적되는 고분자 물질이고, 미생물 생산 바이오폴리머는 폴리에스테르의 일종인 폴리하이드록시알카노네이트(Polyhydroxyalkanoate, PHA)와 같이 미생물 체내에 축적되는 고분자이다. 또한 생화학 합성 바이오폴리머는 미생물에 의하여 생산되어진 단량체를 화학적인 공정을 통하여 중합해서 만들거나 혹은 석유에서 유래한 단량체를 효소와 같은 생촉매를 이용하여 중합하여 제조한 고분자 물질이다. 본 논문에서는 미생물 생산 바이오폴리머와 생화학 합성 바이오폴리머에 대해 살펴보고자 한다.

#### 3-3-1. 미생물 생산 바이오폴리머

미생물은 여러 종류의 수용성 혹은 불용성 다당류를 생산하는데 이들은 범용 소재보다는 식품소재와 같은 특수용도로 이용되고 있다. 이들 미생물 생산 바이오폴리머는 자연계에서 미생물이 균체 외로 방출한 효소에 의해 분해되고 분해 생성물이 미생물에 의해 재화되기 때문에 완전히 소멸되는 생분해성 고분자이다. 많은 미생물이 폴리에스테르 계열의 고분자를 체내에 축적하며, 대표적인 것은 PHA이다. PHA는 풍부한 탄소원 존재하에 미생물이 성장할 때 생성되는 미생물의 세포내 저장물질이다. PHA는 폴리프로피오네이트를 주사슬로 하고 3위치에 치환기를 함유한 구조를 가지고 있는데, 단량체의 R기가 메틸인 Poly(3-hydroxybutyrate)(P(3HB))가 가장 흔히 발견되며 실험실에서 배지조성을 조절함에 따라 다양한 종류의 R기를 함유한 PHA가 합성되기도 한다(Fig. 9). 현재 PHB, PHB-PHV copolymer 등 다양한 탄소수를 가지는 공중합체가 생산되고 있다(Table 3). PHA는 열가소성이 우수하여 필름, 섬유 등으로 용융가공이 가능하기 때문에 현재 사용되는 범용 고분자, 특히 폴리

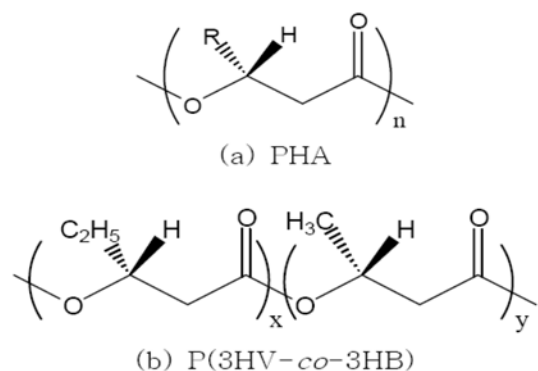




Fig. 9. Structure of PHA produced by microorganisms.

Table 3. Derivatives of PHA

Polyhydroxyalkanoate	Side Chain
Polyhydroxybutyrate (PHB)	-CH <sub>3</sub>
Polyhydroxyvalerate (PHV)	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
PHBV (Biopol)	-CH <sub>3</sub> and -CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
PHBHx (Kaneka)	-CH <sub>3</sub> and -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
PHBO (Nodax™)	-CH <sub>3</sub> and -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>3</sub>
PHBod	-CH <sub>3</sub> and -(CH <sub>2</sub> ) <sub>14</sub> CH <sub>3</sub>



Table 4. Various applications of PHA

Market	Applications
	Polymer Performance Improvers PLA Cellulosics Starch Synthetic Biodegradable Polyesters
	Fibers and Nonwovens Textiles Wipes Personal Hygiene Products Filtration Products Carpets
	Adhesives Hot Melts Pressure Sensitives Tie Layers Heat Seal Resins
	Film (including multi-layer) Barrier Layers Packaging Agricultural Mulch Film Trash Bags Lawn and Leaf Bags
	Functional Specialties Controlled Release Binders for Metal & Ceramic Powder
	Molding Resins Consumer Disposables Containers Appliances Toys Automotive
	Coatings Water Resistant Paper and Board Coatings Architectural Paints Wood Products
	Other

프로필렌을 대체할 수 있을 것으로 기대되고 있다[30]. PHA의 경우 유리전이온도는  $-16\sim-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  그리고 용융점은  $176\sim180\text{ }^{\circ}\text{C}$  정도이며 일부 결정형구조를 가지고 있다. PHA는 다양한 분자량으로 생산될 수 있는데 이중 저분자량의 PHA는 사출성형과 용해분사에 적합하며 중간분자량의 PHA는 방사섬유에 적합하다고 알려져 있다. 특히 분자량 600,000정도의 PHA는 용해수지, 주조필름의 제조에 적절하며 분자량 700,000정도의 PHA는 분사필름과 성형에 적절하다고 알려진다. 경도와 강도 그리고 불투명도를 증가시키기 위하여 탄산칼슘, 활석, 운모등과 혼합하여 사용하는 것이 가능하며, 또한 기능성 충전제로서 색깔을 띄게 하거나 충격에 강한 고무로 만들기 위해서 염료나 카본블랙을 첨가할 수 있다.

상업화와 관련하여 2030년 까지는 생산되는 PHA의 70%가 포장 재료로 사용될 것이 예측된다(Table 4). PHA의 판매가격은 kg당 \$ 10~12 로서 다른 바이오 폴리머에 비하여 가격이 높은 편이다. 원료비용과 가공비가 높고 생산량이 적기 때문인데 PHA 최종 제품가격 중 원료가격이 약 40~50%에 달한다고 알려진다. 따라서 저가의 탄소원을 이용할 경우 2030년까지 PHA의 생산가격을 kg당 \$ 1.5 이하로 낮출 수 있을 것으로 예측된다. 현재 PHA의 주요 사업화 현황은 다음과 같다. 1980년 ICI(영국)에서 최초로 PHBV(P(3HB-co-

3HV)) 발효 합성에 성공하였음을 발표하였으며, 이를 Biopol이라는 상품명으로 발매하였다. 이 후 영국 ICI는 관련 기술을 미국 Monsanto에 이전하였으나, 2000년에 몬산토는 관련사업 일체를 미국 Metabolix사에 이전하였다. Metabolix는 kg당 생산비를 \$ 3 (USD) 이하로 낮추기 위하여 대사공학적인 기법을 적용하였고, 또한 대량생산을 위하여 다국적 화학회사인 독일 BASF, 영국 BP 등과 전략적 제휴를 체결한 상태이다. 한편 미국 P&G는 다양한 PHA에 관한 물질특허를 보유하고 있다. 특히 biopol이 가진 물성상의 단점을 크게 개선한 PHBO(상품명 Nodax)와 같은 고분자가 주목을 받고 있으며 현재 파일롯에서 Nodax를 연간 10톤 정도를 생산하여 시험 적용하는 것으로 알려져 있다. 일본의 Mitsubishi Gas 화학은 Biogreen이라는 상품명으로 PHA를 10톤 규모로 생산하고 있고 중국의 Tianan Biologic Material도 연간 1,000 톤 정도의 대규모 생산 공장을 운영하고 있다고 알려져 있다. PHA가 목표로 하는 시장이 범용 고분자 시장이므로 향후 경제성과 다양한 물성치만 맞출 수 있으면 세계시장은 30조~40조원 정도에 이를 것으로 예측되고 있다. 한국의 경우 1990년대 초 고려합섬, 제일합섬등에서 상용화 연구를 수행한 바 있으나 중단된 상태이며, 현재는 (주)카이로바이오에서 상용화를 추진하고 있다. PHA관련 국내기술은 국제경쟁력

을 확보하고 있는데 일례로 KAIST 이상엽 교수팀에서 PHA 합성 유전자를 포함한 재조합 대장균을 제작하고 대사공학을 이용한 고효율 생산에 성공한 바 있다[31].

### 3-3-2. 생화학합성 바이오폴리머

생화학합성 바이오폴리머는 미생물이 생산하는 대사물질을 단량체로 사용하여 화학적인 중합 공정으로 생산하는 고분자 물질이나 단량체는 석유에서 유래하더라도 효소와 같은 생촉매를 통해 중합·생산되는 환경친화적 고분자 물질로 정의된다. 전자의 대표적인 사례는 폴리락타산을 들 수 있고 후자의 대표적인 예로는 폐놀계 고분자, 아미노산계 고분자, 실리콘계 고분자 등을 들 수 있다.

Poly(lactic acid)(PLA)는 전분 폴리머에 이어 상업적으로 생산되는 두 번째 바이오계 폴리머로서, lactic acid(젖산, 유산)의 중합에 의해 생산되는 지방족 폴리에스테르이다. PLA는 물리적 특성 및 기계적 특성이 우수하여, 석유화학계 열가소성 폴리머의 대체물로 떠오르고 있다. PLA는 일찍이 체내분해성 의료용 소재로 개발되어 왔다. 단량체인 Lactic acid는 2-히드록시프로피온 산으로 비대칭의 탄소 원자를 갖는 가장 간단한 형태의 히드록시카르복실 산이다. 젖산은 당(글루코오스, 락토오스, 전분, 당밀)의 혐기성 발효에 의해 생성되며, 미생물의 종류에 따라 L(+)-lactic acid 혹은 D(-)-lactic acid가 생성된다. 젖산의 원료로는 당, 당밀, 사탕수수 즙, 유장, 쌀 전분, 밀 전분이나 감자 전분과 같이 6탄당으로 쉽게 분해되는 물질이 사용된다. 젖산은 D(-)형과 L(+)형의 입체 이성질체를 가지므로 젖산의 광학적 순도에 따라 PLA의 용점과 강도가 좌우된다. 순수한 L-PLA 또는 D-PLA는 결정성 및 용점이 높으나 혼합된 DL-PLA는 무정형이며 강도가 낮다. PLA의 가격은 원료인 젖산의 생산가와 직결되어 있으므로 최근에는 벳짚이나 잡곡, 옥수수 대 등의 농업 폐기물과 같이 쉽게 얻을 수 있는 목초 바이오매스나 초분 바이오매스를 이용하려는 연구가 진행 중이다. 또한 저렴한 치즈 부산물, 감자 칩 부산물을 탄소원으로 이용하려는 연구도 진행되고 지속되고 있다. 젖산은 석유화학 원료(아세틸렌이나 에틸렌)로부터 화학적 합성에 의해서도 생산할 수도 있다. 석유화학 유래 젖산은 라세믹 화합물로 무정형의 비결정성 성질을 가지며, 생물학적으로 분해 가능한 접착제로 이용된다. 젖산에 대한 시장의 수요는 증가추세에 있으며 향후 발효법에 의한 젖산이 시장을 지배할 것으로 예측된다.

젖산을 중합하여 PLA를 합성하는 방법으로는 락티드를 경유하는 간접적 방법과 축중합에 의한 직접적 합성법이 있다. 간접적 방법은 락티드의 환개열 중합법(RPO)을 이용하는 연속식 공정이다. 먼저 수용성 젖산을 응축시켜 저분자량(5 kDa 이하)의 pre-LA를 만들고, 이의 축중합 온도를 높이고 압력을 저하시켜 lactide 이성질체를 만들고, 유기금속 촉매(tin octoate)를 이용한 분자 내 고리화 반응과 환개열 반응(RPO)으로 고분자량(100 kDa 이상)의 PLA를 제조한다(Fig. 10).

PLA의 용도는 포장용, 섬유, 직물, 수송재료 및 전자 재료용 등 매우 다양하다. 현재 생산되는 PLA는 약 75%가 포장용으로 이용되고 있으나, 향후 그 용도가 다양해질 것으로 기대된다. 포장재료의 경우 PLA는 투명성, 기계적 성질, 수분 투과도 등이 우수하여 빵 등의 음식물 포장 재료로 널리 이용된다. 또한 인쇄성이 좋아 다양한 색의 프린트가 가능하며, 알코올 저항성이 있으므로 향기나 향료품 포장에도 쓰일 수 있다. 그러나 계면 활성제의 포장에서는 응력 과열의 문제점을 가지고 있다. 농업 분야에서는 작물 재배용의

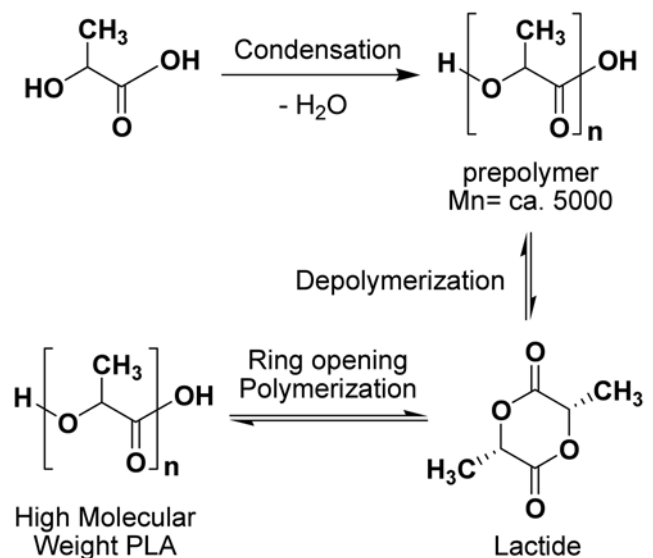


Fig. 10. Polymerization of lactic acid.

뿌리 덮개와 시트 등의 용도로 이용할 수 있고, 수송 분야에서는 카펫이나 깔개 등의 자동차 인테리어용으로 많이 사용되고 있으나, 아직 외장용으로 사용되지는 않고 있다. 섬유 분야에서는 의류용이 가능하므로 폴리에스테르나 면직물을 대체할 것으로 보고 있다. 전자 분야에서는 컴팩트 디스크 용으로 이용될 수 있다. 전분의 젖산 전환수율을 기준으로 계산할 경우 컴팩트디스크 1개의 제조에 약 85개의 옥수수 낱알이 필요하다. 따라서, 이론적으로 1개의 옥수수로 10개의 디스크를 만들 수 있다. 또한 PLA는 CD의 플라스틱 케이스나 필름 케이스로도 이용되며 화염 저항성이 있으므로 가구 분야와 주방 분야에서도 이용성이 넓다.

PLA가 상업화된 것은 1980년대 후반 및 1990년대 초 Dupont, Chronopol, Cargill 등이 이를 개발하면서 부터이다. 그 후 lactic acid이나 lactic acid의 dimer 형태인 락티드(lactide)를 monomer로 이용할 수 있게 되었다. 여러 회사들 중 Cargill사는 “옥수수로부터 고가의 플라스틱 생산”을 목표로 1980년대 중반부터 가장 적극적인 연구개발을 진행하여 왔다. 1997년 Cargill사는 Dow Chemical과 공동으로 Cargill Dow Polymers사(CDP사)를 설립하여 연 6,000톤/년 규모의 파일롯트 공장을 설립하였고, 2001년 말에는 3,000천 억원을 투자하여 연간 14만 톤 규모의 PLA 제조 플랜트를 건설하였다. 그 결과 \$3~4/kg의 비교적 저렴한 가격으로 PLA를 공급할 수 있게 되었고 본격적인 PLA시장이 열리게 되었다. 그러나 경제적인 여건으로 인하여 공장가동률을 2004년 현재 약 30% 이하로 알려져 있고 최근(2005년) CDP사의 Dow 지분을 모두 Cargill사가 인수하였다. 또한 Chronopol사의 경우 PLA를 1996년 말부터 생산하고 있는데 주 용도는 포장재라고 알려진다. 한편 일본의 경우 시마즈사, 미쯔이 화학사 등이 PLA의 상업화에 앞장서고 있다. 미쯔이 화학사는 90년대 초반부터 용매환류 상태에서 lactic acid로부터 직접 축합법으로 고분자량 PLA를 제조하는 기술을 개발하여 500톤 규모의 파일롯트 공장을 운영하고 있다. 또한 일본 시마즈사는 개환 중합을 이용한 PLA의 제조 플랜트를 연 300톤 규모로 1994년 8월부터 가동시켰는데 2003년에 도요타 자동차가 이를 인수하여 자동차 내장용 플라스틱을 개발하고 있다. 최근 미쯔이 화학사는 미국 CDP사의

PLA를 일본에 독점으로 공급하기로 계약하였다. 일본의 미쓰비시, 가네보 합섬, 유니타카, 구라레이 등의 회사들은 PLA를 직접 생산하는 대신 CDP사의 PLA를 소재로 이용하여 압출, 방사, 연신, 사출 등의 2차 가공에 주력하고 있다. 주로 투명하고 기계적 물성이 뛰어난 섬유, 필름, 용기, 컴퓨터 본체, 전자 포장재 등을 활발히 개발하고 있다. 국내의 경우 한일 합작회사인 도레이세한이 일본 모회사인 도레이와 연결하여 PLA 시장에 진입 계획에 있고, KIST의 김영하 박사팀을 중심으로 의료용 PLA에 대하여 연구 중에 있다.

PLA는 2004년 현재 판매가격은 kg당 \$ 4.09 정도이다. 대량 생산이 되면 kg당 \$ 2.6 까지 낮아질 수 있다고 알려진다. 대표적인 포장재인 PLA 필름은 kg당 \$ 6.6~7.2로 셀로판 필름의 가격과 비슷하나, kg당 \$ 1.8~3.0인 PP 필름 가격의 3배 정도이다. PLA의 최종 가격은 주로 lactic acid 단량체를 만드는 초기 발효 공정의 효율에 달려있다. 원료인 lactic acid의 가격이 PLA 제품가격의 40~50%를 점하고 있으므로 향후 lactic acid의 발효 생산가격을 석유화학 기본 연료인 에틸렌 수준으로 떨어뜨리기 위한 연구개발이 진행되고 있다. 벨기에의 Galactic Laboratories의 전망에 의하면 2008년에 PLA는 390,000 톤/년이 생산되며 단가는 \$ 1.74/kg 그리고 시장 성장률은 15% 정도이다. PLA의 용도와 판매량은 유가와 밀접한 관계가 있는데 유가가 \$ 50 이상으로 올라갈 경우 PLA는 식품용기 등으로 많은 수요를 가지고 있는 PET에 대하여 가격 경쟁력이 있을 것이라고 예측되고 있다.

PLA와 함께 폴리글리콜릭산(polyglycolic acid, PGA)도 각광을 받는 생화학합성 폴리머이다. PGA는 아주 단순한 구조단위(-O-CH<sub>2</sub>-CO-)를 갖는 지방족 폴리에스테르로 생체 내에서 흡수/분해되는 특성 때문에 PLA와 더불어 의료용 재료 및 플라스틱 재료로써 활발한 연구가 진행되고 있다. 글리콜산으로부터 합성된 폴리글리콜산은 수술용 생체흡수성 봉합사로 실용화되었고, 생체 내에서 가수분해되어 신진대사 경로에 도입되어 최종적으로는 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O로 체외로 배출되는 것으로 알려졌다.

#### 4. 결 언

여러 BT 분야 중 의약품, 농업관련 생명공학기술들은 일반에 잘 알려져 있다. 반면 산업생산에 활용되는 산업 BT의 경우 그 중요성과 내용이 아직 잘 알려져 있지 않지만, 여러 BT 분야 중 가장 크고, 가장 장기간의 영향력을 가진 분야이다. 이미 잘 알려진 기존의 산업 BT 분야(치즈, 항생제, 포도주 등의 생산) 외에 유전자조작기술, 유전체이용기술, 대사공학기술 등의 발달로 산업적으로 유용한 생체매를 생산하는 일이 기술적으로 가능해졌으며 이를 바탕으로 산업 전반에 질적인 변화가 큰 흐름으로 다가오고 있다. 산업 BT는 온실효과 감소, 석유자원대체 등을 통해 새로운 부가 가치를 만드는 경쟁력 있는 산업으로 떠오를 것이며, 특히 석유자원의 가격이 지속적으로 상승함에 따라 재생 가능한 바이오매스를 이용한 산업의 생산물 경쟁력이 점차 증가할 것으로 예상된다.

#### 감 사

본 연구는 해양수산부 Sea Grant(2005-35), Brain Korea 21와 Brain Busan 21의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Willke, T. and Vorlop, K. D., "Industrial Bioconversion of Renewable Resources as an Alternative to Conventional Chemistry," *Appl Microbiol Biotechnol.*, **66**, 131-142(2004).
- Aristidou, A. and Penttila, M., "Metabolic Engineering Applications to Renewable Resource Utilization," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **11**, 187-198(2000).
- Wilke, D., "Chemicals from Biotechnology: Molecular Plant Genetics will Challenge the Chemical and the Fermentation Industry," *Appl Microbiol Biotechnol.*, **52**, 135-145(1999).
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B. and Buhler, B., "The Use of Enzymes in the Chemical Industry in Europe," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13**, 359-366(2002).
- Thomas, S. M., DiCosimo, R. and Nagarajan, V., "Biocatalysis: Applications and Potentials for the Chemical Industry," *Trends Biotechnol.*, **20**, 238-242(2002).
- Lorenz, P. and Zinke, H., "White Biotechnology: Differences in US and EU Approaches?," *Trends Biotechnol.*, **23**, 570-574(2005).
- Miller, J. A. and Jr, Nagarajan, V., "The Impact of Biotechnology on the Chemical Industry in the 21st Century," *Trends Biotechnol.*, **18**, 190-191(2000).
- Ministry of Commerce, Industry and Energy, "Industrial Biotechnology: Current Status and National Policy for its Promotion," (2005).
- Ingram, L. O., Gomez, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P. and York, S. W., "Metabolic Engineering of Bacteria for Ethanol Production," *Biotechnol. Bioeng.*, **58**, 204-214(1998).
- Robinson, C., "The Genetics of Industrial Microorganisms: the First Half Century," *Trends Biotechnol.*, **17**, 178-181(1999).
- Willem, M. de Vos, Hugenholtz, J., "Engineering Metabolic Highways in Lactococci and Other Lactic Acid Bacteria," *Trends Biotechnol.*, **22**, 72-79(2004).
- Palsson, B. O., "In silico Biotechnology. Era of Reconstruction and Interrogation," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 50-51(2004).
- Zhang, Y. X., Perry, K., Vinci, V. A., Powell, K., Stemmer, W. P. and Cardayre, S. B., "Genome Shuffling Leads to Rapid Phenotypic Improvement in Bacteria," *Nature*, **415**, 644-646(2002).
- Bae, K. H. and Kim, J. S., "Human Zinc Fingers as Building Blocks in the Construction of Artificial Transcription Factors," *Nat. Biotechnol.*, **21**, 275-280(2003).
- Park, S. J., Lee, S. Y., Cho, J., Kim, T. Y., Lee, J. W., Park, J. H. and Han, M.-J., "Global Physiological Understanding and Metabolic Engineering of Microorganisms Based on Omics Studies," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **68**, 567-579(2005).
- Lee, S. Y., Lee, D.-Y. and Kim, T. Y., "Systems Biotechnology for Strain Improvement," *Trends Biotechnol.*, **23**, 349-358(2005).
- Hong, S. H., Kim, J. S., Lee, S. Y., In, Y. H., Choi, S. S., Rih, J. K., Kim, C. H., Jeong, H., Hur, C. G. and Kim, J. J., "The Genome Sequence of the Capnophilic Rumen Bacterium *Mannheimia succiniciproducens*," *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1275-1281(2004).
- Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., "Acetone Butanol Ethanol (ABE) Production from Concentrated Substrate: Reduction in Substrate Inhibition by Fed-batch Technique and pRoduct Inhibition by Gas Stripping," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 653-658(2004).

19. Lawford, H. G. and Rousseau, J. D., "Cellulosic Fuel Ethanol: Alternative Fermentation Process Designs with Wild-type and Recombinant *Zymomonas mobilis*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **105-108**, 457-469(2003).
20. Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L., "Fuel Ethanol Production From Lignocellulose: a Challenge for Metabolic Engineering and Process Integration," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 17-34(2001).
21. Crabbe, E., Nolasco-Hipolito, C., Kobayashi, G., Sonomoto, K. and Ishizaki, A., "Biodiesel Production from Crude Palm oil and Evaluation of Butanol Extraction and Fuel Properties," *Process Biochem.*, **37**, 65-71(2001).
22. Fukuda, H., Kondo, A. and Noda, H., "Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils," *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 405-416 (2001).
23. Zvosec, R., "3-Hydroxypropionic acid—a new Intermediate Platform," [http://www.nrel.gov/biotech\\_symposium/docs/abst5-03.doc](http://www.nrel.gov/biotech_symposium/docs/abst5-03.doc)(2003).
24. Cargill, "Cargill and Codexis Launch Research Collaboration to Develop Industrial Bioproducts Platform," Press release, [http://www.cargill.com/today/releases/2003/03\\_05\\_19codexis.htm](http://www.cargill.com/today/releases/2003/03_05_19codexis.htm)(2003).
25. Zeikus, J. G., Jain, M. K. and Elankovan, P., "Biotechnology of Succinic Acid Production and Markets for Derived Industrial Products," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 545-552(1999).
26. Wee, Y. J., Yun, J. S., Kang, K. H. and Ryu, H. W., "Continuous Production of Succinic Acid by a Fumarate-reducing Bacterium Immobilized in a Hollow-fiber Bioreactor," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **98**, 1093-1104(2002).
27. Lee, S. Y. and Hong, S. H., "Engineering of *Escherichia coli* Central Metabolic Pathways for the Production of Succinic Acid," *Biol. Syst. Eng.*, **830**, 30-38(2002).
28. Willke, T., Welter, K. and Vorlop, K. D., "Biotechnological Production of Itaconic Acid From Sugar," *Zuckerindustrie*, **126**, 444-447(2001).
29. Willke, T. and Vorlop, K. D., "Biotechnological Production of Itaconic Acid," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 289-295(2001).
30. Lee, S. Y., Hong, S. H., Lee, S. H. and Park, S. J., "Fermentative Production of Chemicals That Can Be Used for Polymer Synthesis," *Macromol. Biosci.*, **4**, 157-164(2004).
31. Lee, S. Y., Wong, H. H., Choi, J., Lee, S. H., Lee, S. C. and Han, C. S., "Production of Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoates by High Cell Density Cultivation of *Pseudomonas putida* Under Phosphorus Limitation," *Biotechnol. Bioeng.*, **68**, 466-470(2000).
32. Park, S. J., Choi, J.-I. and Lee, S. Y., "Engineering of *Escherichia coli* Fatty Acid Metabolism for the Production of Polyhydroxyalkanoates," *Enzyme Microb. Technol.*, **36**, 579-588(2005).
33. Duda, A. and Penczek, S., "Polylactide [poly(lactic acid)]: Synthesis, Properties and Applications," *Polymer*, **48**, 16-27(2003).