

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0018757 (43) 공개일자 2014년02월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 7/10 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(21) 출원번호	10-2012-0085426	(72) 발명자 김성구 부산 남구 용호로 38-17, 207동 1702호 (용호동, 일신남2차아파트)
(22) 출원일자	2012년08월03일	김민지 부산광역시 수영구 연수로315번길 16 (망미동, 더 샵파크리치) 101동 2205호 (뒷면에 계속)
심사청구일자	2012년08월03일	(74) 대리인 김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행

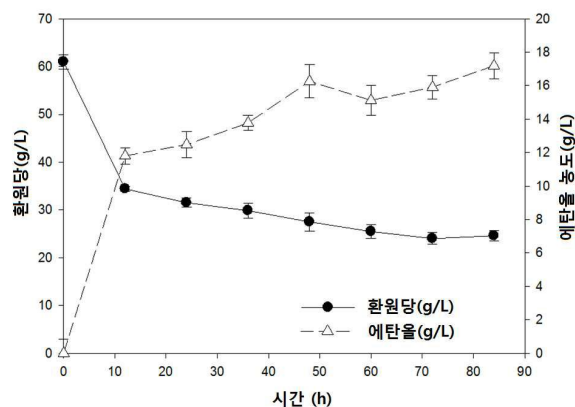
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 발효균주를 이용한 파래로부터 에탄올을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 파래로부터 바이오 연료를 생산하는 방법을 제공하기 위하여, 파래를 가수분해 촉매 및 가수분해 효소로 처리하여 단당체를 수득하는, 당화과정; 및 상기 단당체를 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)로 발효시키는 발효단계를 포함하는, 바이오 에탄올 제조 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이해라

부산 금정구 가마실로 65-2, 강산마을 B동 201호
(부곡동)

라채훈

부산광역시 사하구 다대낙조2길 100 (다대동 롯데
캐슬) 212동 1503호

김혜진

부산광역시 수영구 무학로33번길 51 (광안동, 동림
리라맨션) 205호

김나경

부산광역시 남구 용호1동 LG메트로 4차아파트 212
동 1202호

조혜영

부산광역시 북구 양달로 80-11 (화명동, 코오롱아
파트) 105-303

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2012-0051

부처명 국토해양부

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양바이오에너지 생산기술개발(바이오 알콜)

기 여 율 1/1

주관기관 국토해양부

연구기간 2011.11.07 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

파래를 가수분해 촉매 및 가수분해 효소로 처리하여 단당체를 수득하는, 당화과정; 및

상기 단당체를 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)로 발효시키는 발효단계를 포함하는, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가수분해 촉매는 산인, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가수분해 촉매는 파래 1 중량부를 기준으로 18~75mM 중량부를 첨가하는, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 4

제4항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 산은 황산, 구연산, 무수황산, 염산, 아세트산, 또는 아스코르빅산인, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 가수분해 효소는 비스코자임 L 및 셀룰클라스트 1.5L로 이루어진 군으로부터 선택되는, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 당화과정은 파래에 가수분해 촉매를 첨가하여 100~150℃ 에서 0.5~2시간 동안 가열한 후, 가수분해 효소를 첨가하여 35~45℃ 에서 18~36시간 동안 반응시키는, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

가수분해 촉매를 첨가하여 가열한 후, 중화시키는 단계를 더 포함하는, 바이오 에탄올 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 발효단계는 25~35℃ 온도에서, 150~300 rpm 교반속도로 60~100시간 동안 수행되는, 바이오 에탄올 제조방법.

명세서

기술분야

본 발명은 바이오매스로 해조류를 이용하여 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 발효균주를 이용하여 파래로부터 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 화석연료의 과다 사용으로 지구 온난화 및 환경오염 등의 문제가 발생하여 세계 각국은 새로운 재생 가능한 에너지원 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 주요 에너지는 여전히 석유, 석탄 그리고 천연가스로부터 공급 되고 있다. 이러한 상황에서 바이오 에너지(bioenergy)는 급등하는 유가로 인한 경제문제와 화석연료의 사용으로부터 발생하는 환경문제를 줄일 수 있는 대안으로 대두되고 있다.
- [0003] 해조류는 제3세대 바이오매스로 바이오 에너지 생산에 유용하고 많은 이점이 있다. 성장이 빠르고 제 2세대 바이오매스인 목질계처럼 분해하기 힘든 리그닌이 존재하지 않으며, 옥수수 및 식용작물인 제1세대 바이오매스가 아니므로 식량문제도 발생하지 않는다. 특히 파래(*Enteromorpha intestinalis*)는 거대 녹조류로서 조간대에 넓게 분포하며, 일당 12.7%의 빠른 성장률을 나타내며, 또한 많은 양의 폴리사카라이드를 포함하고 있어 이들 다당류가 분해되면 글루코오스(glucose), 자일로오스(xylose), 갈락토오스(galactose), 글루크로닉산(glucronic acid) 그리고 람노오스(rhamnose)와 같은 다양한 단당류가 생성된다.
- [0004] 에탄올 발효균주으로써 일반적으로 발효효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 에탄올 생산에서 많이 사용되고 있다. 이 균주는 대부분 주류생산에 사용되는 에탄올 생산균주이며, 글루코오스, 갈락토오스 등과 같은 육탄당을 이용한다. 그러나 오타당과 같은 자일로오스는 이용할 수 없어 에탄올로 전환할 수 없다. 이에 반해 다른 효모인 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)는 육탄당과 오타당을 섭취 가능하여 에탄올로 전환할 수 있지만, 비교적 낮은 에탄올을 생산율을 가진다. 에탄올 생산에 관련된 발효효모들의 대사경로는 해당작용(glycolysis)과 관련 있으며, 한 분자의 포도당은 2분자의 피루베이트(pyruvate)를 생산한다. 혐기 상태에서 한 피루베이트에서 에탄올과 이산화탄소(CO₂)를 발생시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 그러나 이러한 해조류를 바이오매스로 이용하는 바이오연료의 제조방법에 있어서, 가장 큰 문제는 낮은 바이오연료의 생산 효율과 해조류 재배 및 수송이다. 바이오연료를 생산하기 위하여 필요한 수십억 톤의 해조류가 필요하기 때문에, 바이오 연료의 생산을 가로막는 가장 큰 문제는 효율성 증대와 함께 재배기술의 개량에 초점이 맞추어 지고 있다.
- [0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 성장물이 우수한 파래를 이용하여, 상기 파래로부터 수득한 다당류를 단당류로 분해시키는 당화 단계 및 상기 단당류를 발효시켜 에탄올로 변환시키는 발효단계를 최적화시킴으로써, 파래로부터 에탄올을 생산하는 최적화된 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, 파래를 가수분해 촉매 및 가수분해 효소로 처리하여 단당체를 수득하는, 당화과정; 및 상기 단당체를 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)로 발효시키는 발효단계를 포함하는, 바이오 에탄올 제조방법이 제공된다.
- [0008] 상기 제조방법에 있어서, 상기 가수분해 촉매는 산일 수 있으며, 상기 산은 황산, 구연산, 무수황산, 염산, 아세트산, 또는 아스코르빅산일 수 있다. 또한, 상기 가수분해 촉매는 파래 1 중량부를 기준으로 18mM~75mM 중량부를 첨가할 수 있다.
- [0009] 상기 제조방법에 있어서, 상기 가수분해 효소는 비스코자임 L 및 셀룰클라스트 1.5L로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 상기 효소를 함께 사용할 수 있다.
- [0010] 상기 제조방법에 있어서, 상기 당화과정은 파래에 가수분해 촉매를 첨가하여 100~150℃ 에서 0.5~2시간 동안 가열한 후, 가수분해 효소를 첨가하여 35~45℃ 에서 18~36시간 동안 반응시킬 수 있다.
- [0011] 또한, 가수분해 촉매를 첨가하여 가열한 후, 중화시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0012] 상기 제조방법에 있어서, 상기 발효단계는 25~35℃ 온도에서, 150~200 rpm 교반속도로 60~100시간 동안 수행될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 에탄올 제조방법은 산 가수분해촉매, 효소 및 발효 균주를 이용하는 것을

특징으로 하고 있으며, 상기 발효균주는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)을 이용하였다. 하기 실험예를 통하여, 파래에 산 및 효소를 처리하여 단당류를 생산하는 조건을 최적화하였다. 그 후, 상기 생산된 단당류를 사카로마이세스 세레비지에 또는 피치아 스티피티스를 이용하여 30 ℃에서 발효시켰을 때, 약 94시간에서 에탄올 생산량이 가장 크게 증가하는 것을 확인함으로써, 각 단계별로 최적화된 처리 조건을 확립하였다.

[0014] 본 발명의 다른 관점에 따르면, 상술한 제조방법에 의하여 제조된 에탄올이 제공된다.

발명의 효과

[0015] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 파래로부터 에탄올을 생산하는 최적화된 제조방법을 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가수분해 촉매를 이용한 환원당의 염도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 가수분해 효소를 이용한 환원당 생산결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 사카로마이세스 세레비지에 균주를 이용하여 파래로부터 수득한 단당류를 에탄올로 발효시킨 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 피치아 스티피티스 균주를 이용하여 파래로부터 수득한 단당류를 에탄올로 발효시킨 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.

[0018] 본 문서에서 사용되는 “사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)”와 “피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)”는 해조류를 발효시켜, 바이오 연료를 생산하는 기술에 적용되는 일반적인 균주로 알려져 있다. 종래 한국 공개특허 2010-0117189에서도 분쇄된 해조류를 상기 균주에 의하여 발효시키는 단계를 포함하는 제조방법이 공개된 바 있다. 본 발명자는 파래로부터 에탄올을 생산하는 단계에 있어서, 가수분해 촉매, 효소 및 발효균주를 이용하는 단계를 최적화시킴으로써, 에탄올 생산량을 증가시키는 방법을 제공하고자 하였다. 하기 실시예를 통하여 각 단계를 최적화시킨 결과, 파래를 가수분해 촉매 및 가수분해 효소로 처리하여 단당체를 수득한 후, 상기 단당체를 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*)로 발효시키는 발효단계를 수행하였을 때, 에탄올 생산량이 증가될 수 있음을 입증하였다.

[0019] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 도면에 도시된 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 도면에 도시된 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[0020] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가수분해 촉매를 이용한 환원당의 염도를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 본 발명자는 파래분말 농도 및 처리하는 가수분해 촉매의 농도에 따라 환원당의 생산량을 확인하였다. 이후, 상기 단당류를 균주에 의하여 발효시켜야하므로, 균주의 발효를 저해시킬 수 있는 염도를 확인함으로써, 가수분해 촉매 처리 조건을 최적화시키고자 하였다. 가수분해 촉매를 처리하고, 환원시킨 시료의 염도를 측정한 결과, 55 % ~ 70 %으로 효모의 발효에 저해가 일어나지 않았다. 그러나 파래분말 15%(w/v) 이상일 때, 중화한 후에는 염도가 100 % 넘어서 에탄올 생산이 가능하지 않았다. 발효 전, 가수분해 촉매를 이용하는 당화단계는 13%(w/v) 슬러리에 75 mM 황산을 첨가하여 121℃에서 60분간 열처리하는 것이 최적화된 조건임을 입증하였다.

[0021] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 가수분해 효소를 이용한 환원당 생산결과를 나타내는 그래프이다. 본 발명의 일 실시예에 따른 제조방법을 최적화하기 위하여, 파래에 가수분해 촉매인 산을 첨가하여 당화시킨 후, 여기에 가수분해 효소인 비스코자임 L, 셀룰클라스트 1.5L 또는 비스코자임 L과 셀룰클라스트 1.5L을 함께 처리하였다. 그 결과, 가수분해 효소를 처리하는 단계에 있어서, 셀룰클라스트 1.5L과 비스코자임 L을 함께 처리하였을

때에 환원당이 가장 많이 생산되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통하여 가수분해 효소 처리는 효소분해 단계는 산 전처리를 수행한 뒤 pH 4.8로 중화한 후 셀룰라스트 1.5L과 비스코자임 L을 동시에 첨가하여 40℃에서 24 시간 반응을 수행하는 것을 최적화된 단계로 설정하였다.

[0022] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 사카로마이세스 세레비지에 균주를 이용하여 파래로부터 수득한 단당류를 에탄올로 발효시킨 결과를 나타낸 그래프이다. 본 발명의 일 실시예를 통하여 확립된 가수분해 촉매(산) 및 효소(비스코자임 L 또는 셀룰라스트 1.5L)를 파래에 처리하는 최적화된 당화과정을 통하여 수득된 단당류를 상기 사카로마이세스 세레비지에 균주로 발효시켰다. 상기 발효는 30℃, 190 rpm으로 84시간 배양하였으며, 사카로마이세스 세레비지에는 36 g/L의 환원당을 소비하여 17 g/L의 에탄올을 생산하는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 피치아 스티피티스 균주를 이용하여 파래로부터 수득한 단당류를 에탄올로 발효시킨 결과를 나타낸 그래프이다. 본 발명의 일 실시예를 통하여 확립된 가수분해 촉매(산) 및 효소(비스코자임 L 또는 셀룰라스트 1.5L)를 파래에 처리하는 최적화된 당화과정을 통하여 수득된 단당류를 상기 피치아 스티피티스 균주로 발효시켰다. 상기 발효는 30℃, 190 rpm으로 84시간 배양하였으며, 26 g/L의 환원당을 소비하여 13 g/L의 에탄올을 생산하였다. 이러한 결과는 종래의 해조류를 이용한 에탄올 제조방법에 비하여 에탄올 생산효율이 약 3~4배 정도 우수한 것으로, 산업상으로 활용 가능성이 높음을 입증하는 것이다.

[0024] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0025] 실시예 1: 파래분말의 제조

[0026] 본 실험에서는 에탄올 발효를 위한 기질로 파래를 사용하였으며, 전라남도 완도에서 시험 채배한 것을 사용하였다. 자연 건조한 파래를 분쇄기로 갈아서 입자 크기가 200 μm 이하의 파래분말을 사용하였다.

[0027] 건조된 파래 성분 분석한 결과 수분이 5.81%, 회분 17.51%, 지방 2.51%, 단백질 35.07%, 탄수화물이 39.1% 나타났다.

[0028] 실시예 2: 효모배양

[0029] 발효균주는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) KCTC 1126와 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) KCTC 7228를 사용하였다. 멸균된 YPD 배양액(glucose 20.0 g/L, peptone 20.0 g/L, yeast extract 10.0 g/L)을 사용하여 시험관에 첫번째 종균배양을 하였고, 100ml 플라스크에서 배양액 30ml로 하여 종균 배양액 5%(v/v) 접종하였다.

[0030] 실험예 1: 당화단계

[0031] 바이오매스로 파래를 이용하는 에탄올 생산방법에 있어서, 파래를 단당류로 전처리하는 단계를 최적화하기 위한 조건을 확립하고자, 가수분해 촉매 및 가수분해 효소를 파래에 처리하는 조건에 따른 환원당의 생산율을 측정하였다.

[0032] 1-1: 가수분해 촉매를 이용한 당화단계

[0033] 가수분해 촉매를 이용한 당화단계에 있어서, 가수분해 촉매로는 황산(H_2SO_4)을 이용하였다. 상기 실시예 1에서 1차 증류수에 황산 18, 37, 56, 75 mM 농도가 되도록 황산을 첨가하고, 분쇄한 파래분말을 10%(w/v), 13%(w/v), 15%(w/v)으로 황산 용매에 녹인 후 121℃에서 60분간 열처리 하였다. 상기 열처리 후, 10N 수산화나트륨(NaOH)을 이용하여 pH 4.8로 중화를 하였다. 그 후, 파래 당화액 내 환원당은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 방법으로 575 nm 에서 흡광도를 통하여 측정하였다.

[0034] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 황산농도가 증가할수록 환원당이 증가하는 것을 보였으며, 특히 75mM 황산의 10%(w/v)와 13%(w/v) 슬러리에서 39 g/L와 40 g/L의 환원당이 생성이 되었다. 효소 당화에서 좀 더 많은 당을 얻기 위해 13%(w/v)의 파래분말을 선택하였다.

표 1

[0035]

가열 산 가수분해 후 환원당(g/L) 함량

과래분말 (%, w/v)	H ₂ SO ₄ 농도(mM)	환원당(g/L)
10	18	8.54
	37	15.17
	56	23.02
	75	39.11
13	18	9.33
	37	8.20
	56	21.05
	75	40.19
15	18	6.09
	37	8.89
	56	22.92
	75	18.85

[0036]

또한, 염도가 발효균주의 저해제로 될 수 있으므로, 해조류인 과래를 이용하여 에탄올 생산을 하기 위해서는 염도도 고려되어야 한다. 이에, 상기 가열 산 가수분해 실험 통해 수득한 시료 20 μ l를 염도계(Salinity Refractometer)를 이용하여, 염도를 측정하였다. 상기 표 1의 과래분말 농도별, 황산처리 농도에 따른 각 시료의 염분을 염분을 측정한 결과 대부분 55 % ~ 70 %으로 효모의 발효에 저해가 일어나지 않았다. 그러나 과래분말 15%(w/v) 이상일 때, 중화를 한 후에는 염도가 100 % 넘어서 에탄올 생산이 가능하지 않았다(도 1 참조).

[0037]

상기 결과를 종합하여, 과래를 이용한 에탄올 발효를 하기 전 전처리는 13%(w/v) 슬러리에 75 mM 황산을 첨가하여 121℃에서 60분간 열처리하는 조건으로 설정하였다.

[0038]

1-2: 가수분해 효소를 이용한 당화단계

[0039]

상기 실험예 1-2의 결과로부터 선별된 과래 13%(w/v)에 황산 75 mM을 첨가하여 산 가수분해된 시료에 효소를 첨가하여 효소가수분해를 수행하였다.

[0040]

이때 효소로 노보자임코리아㈜에서 판매되는 셀룰클라스트 1.5L(Celluclast 1.5L)와 비스코자임 L(Viscozyme L)을 이용하였으며, 상기 산 가수분해된 과래용액 250 ml에 셀룰클라스트 1.5L, 비스코자임 L 또는 셀룰클라스트 1.5L+비스코자임 L을 처리하고, 40℃에서 84시간 동안 130 rpm으로 교반수조(water bath shaker)에서 배양하였다. 이때, 상기 셀룰클라스트 1.5L은 1%(v/v)로, 비스코자임 L은 1%(v/v)로 처리하였다. 그 후, 배양액을 130 rpm에서 84 시간동안 원심분리하여 상등액만 취해 환원당 및 염도를 분석을 하였다. 셀룰클라스트 1.5L의 활성은 1%(v/v) 사용했을 때 8.4 FPU/ml이고 비스코자임 L의 활성은 1%(v/v) 사용했을 때 1.2 EGU/ml이었다.

[0041]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 비스코자임 L을 단독으로 처리하였을 때는 환원당이 약 40 g/L로 거의 변화가 없었고, 셀룰클라스트 1.5L을 단독 처리하였을 때 환원당이 39 g/L에서 55 g/L로 약 16 g/L로 증가하였다. 그리고 셀룰클라스트 1.5L과 비스코자임 L을 함께 처리했을 때는 42 g/L에서 61 g/L로 19 g/L의 환원당이 증가하였다.

[0042]

과래는 녹조류로서, 세포벽에 셀룰로오스와 자일란을 포함하고 있다. 셀룰로오스는 효소 셀룰레이즈(cellulase)로 쉽게 글루코오스로 전환이 되지만, 완전하게 분해되지 못하고 이당류인 셀룰비오스가 생성되기도 한다. 비스코자임 L은 아라비네이즈(arabanase), 셀룰레이즈(cellulase), 베타-글루카네이즈(beta-glucanase), 헤미셀룰레이즈(hemicellulose), 자일라네이즈(xylanase)를 포함하고 있다. 그러므로 복합효소인 비스코자임 L을 함께 처리하였을 때, 환원당이 증가하는 결과가 나타날 수 있었다.

[0043]

상기 결과를 기반으로, 효소분해 단계는 산 전처리를 수행한 뒤 pH 4.8로 중화한 후 셀룰클라스트 1.5L과 비스코자임 L을 동시에 첨가하여 40℃에서 24시간 반응을 수행하는 것을 최적화된 단계로 설정하였다.

[0044]

실험예 2: 발효균주를 이용한 에탄올 생산

[0045]

상기 실험예 1을 통하여 최적화된 당화조건에 따라, 과래 분말에 산 가수분해 및 효소 가수분해를 수행하였으며, 산 가수분해 후, 10N 수산화나트륨을 사용하여 pH 4.8로 중화시켰다. 상기 당화단계 이후, 상기 실시예 2에서 배양한 0.42 g dcw/L의 사카로마이세스 세레비시아와 0.38 g dcw/L의 피치아 스티피티스를 접종하

여 발효를 수행하였다. 발효시 세포성장을 위해 효모 추출물 5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 7.5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.75g/L, K_2HPO_4 3.5g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1g/L를 첨가하였다. 접종 후 30℃, 190 rpm으로 84시간 배양하였으며, 시료를 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 한 후 상층액을 HPLC(Agilent 1100 Series, Agilent, Inc., USA)로 에탄올 농도를 분석하였다. HPLC 검출기는 Agilent G1362A refractive index detector(RID)를 사용하였으며, 컬럼은 Biorad Aminex HPX-87H column(300 X 7.8 mm)을 사용하였다. 컬럼의 온도는 65℃로 하였고 이동상은 5 mM 황산을 사용하였으며, 유속은 0.6 ml/min로 하여 각 시료를 40분간 분석하였다.

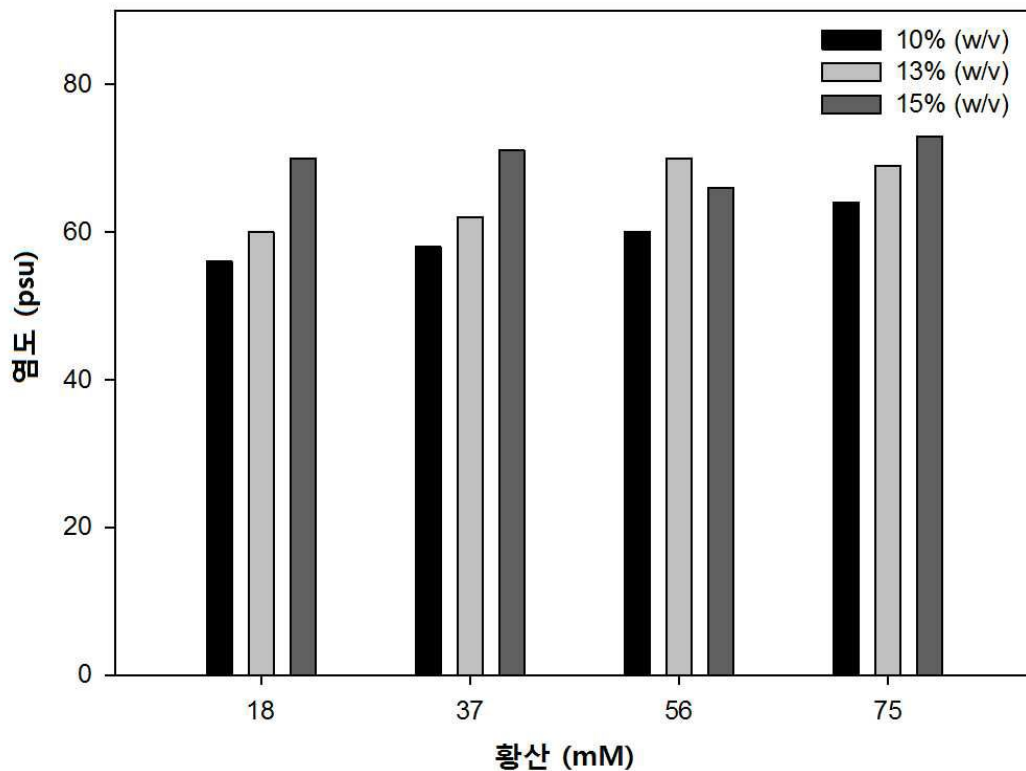
[0046] 그 결과, 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지에는 36 g/L의 환원당을 소비하여 17 g/L의 에탄올을 생산하였으며(도 3), 피치아 스티피티스를 이용하여 발효한 결과 26 g/L의 환원당을 소비하여 13 g/L의 에탄올을 생산하였다(도 4). 총 탄수화물로부터 이론적 에탄올 전환 수율의 측면에서 보면, 사카로마이세스 세레비지에의 경우 66%로 나타났고, 피치아 스티피티스는 52%으로 나타났다.

[0047] 즉, 상기 결과는 파래로부터 에탄올을 생산하기 위한 제조방법을 최적화한 것으로서, 상기 당화 단계를 통하여 파래로부터 수득된 단당류를 사카로마이세스 세레비지에 또는 피치아 스티피티스 균주를 이용하여 발효를 수행하였을 때, 에탄올의 생산성이 우수함을 입증하는 것이다.

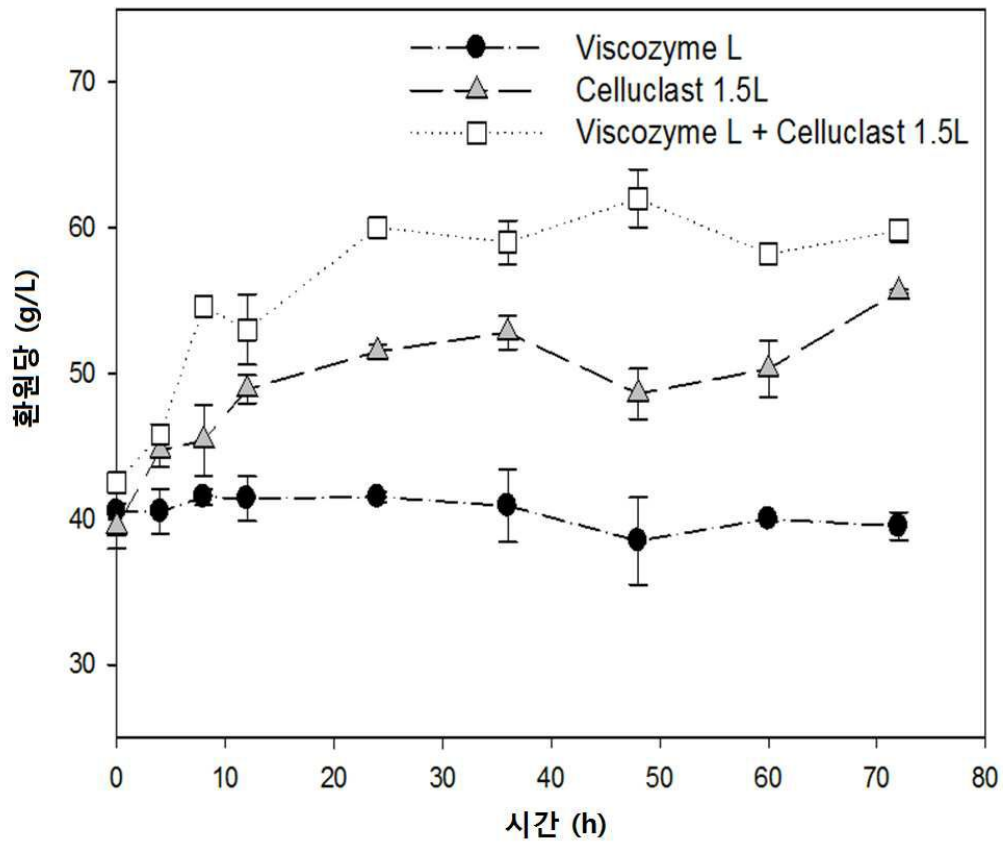
[0048] 본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

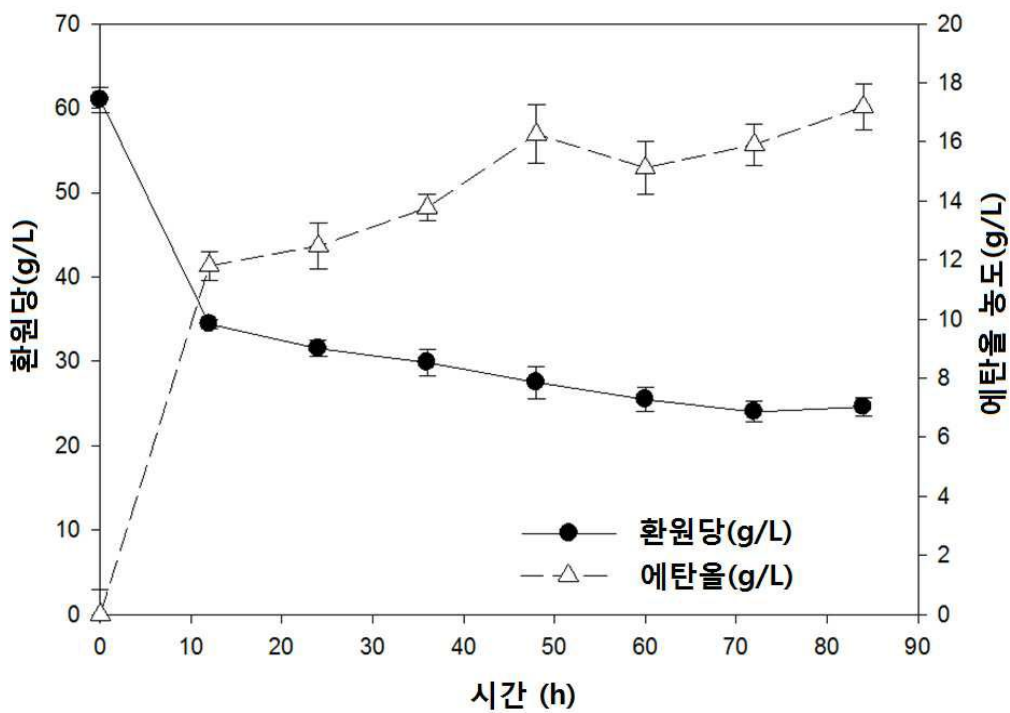
도면1



도면2



도면3



도면4

