(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0057270
(43) 공개일자 2013년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/10 (2006.01) *C12N 1/16* (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01) *C12R 1/865* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0123100
(22) 출원일자 2011년11월23일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
최인걸
서울특별시 동작구 남부순환로263길 34 (사당동)
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

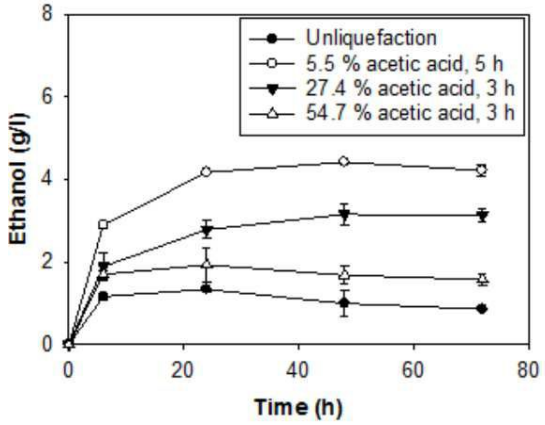
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **홍조류 한천의 효소적 당화 및 이를 이용한 에탄올 발효**

(57) 요 약

발명은 홍조류 한천(agar)을 효과적으로 당화하여 바이오 에탄올 생산을 하기 위해서 유기산을 이용하여 한천을 용해시킨 후 한천 분해 효소와 발효 미생물을 이용하여 당화와 발효를 시켜서 에탄올을 생산하는 것으로, 보다 상세하게는 유기산인 아세트산으로 전처리 후 사카로퍼거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)와 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor* A3)의 아가레이즈(Agarase)와 NABH를 이용하여 당화하고, 그 당화물을 발효 균주인 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisia D5A)를 통해 발효하여 에탄올을 생산하는 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

김희택

서울특별시 마포구 성미산로5길 50-7, 202호 (성산동, 조광아트빌)

이세영

경기도 의왕시 오전동 엘지아파트 103동 1502호

특허청구의 범위

청구항 1

아가중합체를 초산으로 처리하여 액화하고, 상기 액화된 아가중합체를 아가레이즈들과 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 당화하고, 그 당화 생성물을 발효균주를 통해 발효하여 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 액화 과정은 5.5%~ 54.7 % 초산 하에서 1시간에서 5시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 바이오에탄올을 생산 공정은 5.5%~ 27.4 % 초산 하에서 3시간에서 5시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 당화와 에탄올 발효는 동시에 수행되는 것을 특징으로 하는 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 아가레이즈와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 각각 Aga16B (EMBL id: ABD80437), DagA (EMBL id: CAB61795), Aga50D (EMBL id: ADB81904), 및 NABH (EMBL id: ABD81917)으로 구성된 군으로부터 선택된 효소인 것을 특징으로 하는 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 발효 균주는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)인 것을 특징으로 하는 바이오에탄올을 생산하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 홍조류 한천(agar)을 효과적으로 당화하여 바이오 에탄올 생산을 하기 위해서 유기산을 이용하여 한천을 용해시킨 후 한천 분해 효소와 발효 미생물을 이용하여 당화와 발효를 시켜서 에탄올을 생산하는 것으로, 보다 상세하게는 유기산인 아세트산으로 전처리 후 사카로퍼거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)와 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor* A3)의 아가레이즈(Agarase)와 NABH를 이용하여 당화하고, 그 당화물을 발효 균주인 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae* D5A)를 통해 발효하여 에탄올을 생산하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 석유가격 상승과 고갈 및 이산화탄소 배출에 따른 온난화가 유발되고 있어 대체 에너지에 대한 수요가 증가하고 있다. 대표적인 대체에너지 중 하나로 바이오에탄올이 각광받고 있으나 원료원으로 당질, 전분 등 식량으로 이용가능한 원료에 제한되어 식량난을 유발한다는 지적을 받고 있다. 따라서 그에 따른 대안으로 해조류가 각광받기 시작하고 있다.

[0003] 한국은 삼면이 바다로 이루어져 있어 해조류를 쉽게 구할 수 있다. 해조류에는 천연 다당체인 아가가 존재하며 이것은 식품, 제약, 화장품, 기타 여러 산업에 폭넓게 이용할 수 있다. 해조류의 연간 생산량은 10년 기준 914,715 M/T (우뭇가사리 : 3,716 M/T)으로서 비교적 쉽게 구할 수 있으나 활용률에서는 저조한 실정이다.(fs.fips.go.kr, 2010, 통계청 사회통계국 농어업생산통계과)

[0004] 해조류를 구성하는 아가는 아가로스(70%)와 아가로펙틴(30%)으로 구성되어있는데 아가로스는 단당류인 D-갈락토스 (D-galactose)와 3,6-안하이드로-L-갈락토스 (3,6-anhydro-L-galactose)가 α-1,3-글리코사이드 결합(α-1,3-glycosidic bond)을 기본단위로 하여 β-1,4-글리코사이드 결합(β-1,4- glycosidic bond)으로 이루어진 선형적인 다당류이다. 아가로펙틴은 아가로스와 같은 기본구조를 가지고 있으나 부분적으로 황산기, 피루빅산(pyruvic acid), 글루쿠로닉산(glucuronic acid) 등의 치환기를 가지는 것으로 보고되어 있다.(Duckwort.M, Yaphe, W. 1971 Carbohydr. Res. 16: 435-445)

[0005] 아가로스를 분해하였을 때 생성되는 네오아가로 올리고당은 미생물의 성장을 저해하고 전분 등의 분해속도를 늦추고 식품의 칼로리를 낮출 수 있다. 또한 immune system에도 긍정적인 영향을 미친다고 알려져 있다.(Nomura, K., Naitoh, Y., Muramatsu, S., Yoshizawa, Y., Tsunehiro, J., Fukui, F., Itoh, M. 1997 Biosci. Biotechnol. Biochem. 62: 1190-1195) 특히 네오아가로바이오스는 미백 및 보습효과가 있은 것으로 알려져 있고(Kobayashi, R., Takisada, M., Suzuki, T., Kirimura, K., Usami, S. 1997 Biosci. Biotechnol. Biochem. 61: 162-163). 또한 prebiotics effect도 있어서 산업적으로 이용가치가 높다.(Hu, B., Gong, Q. H., Wang, Y., Ma, Y. M., Li, J. B., Yu, W. G. 2006 Anaerobe 12: 260-266). 따라서 neoagarobiose와 neoagaro-oligosaccharide의 생산은 산업적으로 가치가 높기 때문에 대규모 생산을 위한 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0006] 아가로스를 분해하는 방법은 크게 화학적인 방법과 효소적인 방법이 있다. 아가로스를 화학적으로 분해하는 방법의 경우 비교적 쉽게 할 수 있어 이것에 대한 연구가 많이 이루어져 있다. 하지만 이와 같은 방법은 여러가지 제한사항이 발생하는 문제점을 갖고 있다. 낮은 중합도를 갖는 작은 올리고사카라이드를 선택적으로 생산하는 것은 매우 어렵다.(Jingbao L., Feng H., Xinzhi L., Xiaoyan F., cuiping M., Yan C., Wengong Y. 2007 Carbohydr. Res. 342: 1030-1033). 알카리 처리나 산처리의 경우는 상당한 양의 오염물질을 배출하기 때문에 중화시키기 위해 많은 비용이 소모된다.(Pickering, T. D., Sladden, V. H., Furneaux, R. H., Hemmingson, J. A., Redfearn, P. 1993 J. Appl. Phycol. 5: 85-91)

[0007] 또한 산 가수 분해법은 온도에 영향없이 한천 올리고당을 대량 생산할 수 있으나, 황산이나 염산을 사용하는 경우 올로고당의 갈변 문제, 식용가능한 식품 첨가물로서의 부적합성 및 분해시 부산물이 다량 생성되는 단점이 있다. 산 가수 분해법의 일예로는, 국내 공개특허공보 제2002-9735호의 식용 초산을 이용한 한천 올리고당의 제조방법이 있다.

[0008] 효소적인 분해 방법은 해양 미생물이 생산하는 아가레이즈를 이용하여 연구가 진행되고 있다. 아가라제를 생산하는 미생물 예컨대 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주(Ha, J. C., G. T. Kim, S. K. Kim, T. K. Oh, J. H. Yu, and I. S. Kong. 1997. Biotechnol. Appl. Biochem. 26:1-6), 알테로모나스(*Alteromonas*) 속 균주(Potin, P., C. Richard, C. Rochas, and B. Kloareg. 1993. Eur. J. Biochem. 214:599-607), 아가리보란스(*Agarivorans*) 속 균주(Ohta, Y., Y. Hatada, S. Ito, and K. Horikoshi. 2005. Biotechnol. Appl. Biochem. 41:183-191), 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*) 속 균주(Belas, R. 1989. J. Bacteriol. 171:602-605), 마이크로실라(*Microsilla*) 속 균주(Zhong, Z., A. Toukdarian, D. Helinski, V. Knauf, S. Sykes, J. E. Wilkinson, C. O'Bryne, T. Shea, C. DeLoughery, and R. Caspi. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67:5771-5779) 및 비브리오(*Vibrio*) 속 균주(Aoki, T., T. Araki, and M. Kitamikado. 1990. Eur. J. Biochem. 187:461-465)을 이용할 수 있다.

[0009] 아가레이즈에는 알파 아가레이즈와 베타 아가레이즈가 있는데 알파 아가레이는 아가로스의 결합 중 알파 결합을 끊어 아가로올리고당을 만들고 베타 아가레이즈는 베타 결합을 끊어 네오아가로올리고당을 생성한다.(Araki C. 1959 Pergamon Press London, pp 15-30). 다당류로 구성된 바이오매스를 고온에서 화학적으로 전처리 할 경우 퍼퓨럴(furfural), HMF(하이드록시메틸퍼퓨럴) 등의 독성이 있는 알데하이드가 다량 생성되고(Boussaid, A., Robinson, J., Cai, Y.j., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 1999. Biotechnol. Bioeng. 64: 284.289; Lohmeier-Vogel, E., Sopher, C., Lee, H., 1998. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 20: 75-81) 화학반응의 특성상 중합도(degree of polymerization, DP)가 무작위로 된 단당류 및 올리고가 산물로 얻어진다. 한편 효소적인 방법의 경우는 일반적으로 반응부산물의 생성없이 선택적으로 특정 DP의 올리고당을 생성하기 때문에 정제에 대한 비용이 적게 들고 또한 생물학적인 분해 방법이기 때문에 식품, 화장품 등을 제조하는데 화학적 처리에 비해 비교적 안전하게 이용할 수 있고 친환경적이라는 장점을 갖는다. 하지만 단독 효소처리로서는 많은 양이 필요하며 20% 이상의 효율을 보이기 힘들다는 단점을 갖고 있다.

[0010] 따라서 효과적인 당화 및 바이오 연료 생산을 위해서 화학적인 방법과 효소적인 방법의 적절한 조화가 필요하다. 화학적인 방법의 단점인 오염물질 발생을 최소화하면서도 과분해가 일어나지 않는 촉매의 선정이 중

요하며, 효소 사용에 대한 경제성을 제고하여 친환경적이면서도 효율적이고 경제적인 공정 개발이 필요한 실정이다

[0011] 한편, 곡물로부터 바이오연료를 생산하려는 프로그램은 최근 식품 가격의 상승과 곡물 제조과정에서 투자되는 에너지 및 토지 사용의 측면에서 덜 환경친화적적이라는 점이라는 비난을 받고 있다.

[0012] 조류(Algae)는 바이오연료 작물 중 오랫동안 주목받지 못하였다. 미국 에너지부(US Department of Energy; DOE)는 1978 년에서 1996 년까지 해양 종 프로그램 하에서 조류 연료에 대한 연구 자금을 제공하였지만 예를 들어 바이오에탄올에 대한 공급원료로 옥수수를 사용하는 것과 같은 다른 프로그램으로 원료를 바꾸었다.

[0013] 그러나 조류는 옥수수와 같은 다른 바이오매스 원료보다 보다 환경친화적인 몇 가지 장점을 가지는 것으로 알려졌다. 그들은 옥수수 등과 비교하여 경작되는 토지 면적 당 더 많은 연료를 생산하거나 염분때문에 통상적인 농업에 적합하지 않은 토지에서도 성장할 수 있다. 뉴 헴프셔 대학의 마이클 브릭(Michael Briggs)의 주장에 의하면, 북 아메리카 사막은 미국 운송 연료의 모든 수요를 충족시킬 수 있는 조류 지(algae pond)에 대한 충분한 토지 이상을 제공할 수 있다고 한다. 최근 고유가와 중국 및 인도 등 신흥개발국에서의 에너지 요구의 증대 등으로 대체 에너지에 대한 관심이 다시 증가하기 시작하고 있다. 2006년 6월에는 Solix Biofuels라는 회사는 콜로라도에 현존하는 발전소에 연결되어 사용될 수 있는 미생물 조류 생물반응장치 기술을 개발하였고, 최근에는 그러한 반응장치에 최적의 조류 종을 발견하고 그 공정을 최적화하는 공정에 관련되었다. 미국 에너지부는 10년 전에 조류로부터 바이오연료 계획을 포기하였지만 최근에 조류로부터 바이오 연료의 전망은 놀랍게 회귀하고 있다.(Current Biology Vol 18 No 2, R46). 한국에서도 최근에 홍조류를 포함하는 해양바이오매스로부터 바이오연료를 생산하는 기술을 개발하기 위하여 해양바이오연료를 정부주도 신성장동력사업 22개 중에 포함시켜 집중적으로 투자하고자 한다(신성장동력 비전과 발전전략 브리핑 참고자료, 2008. 9. 22, 지식경제부 신성장동력기획단).

[0014] 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제10-2011-0016638호는 해조류 유래 갈락탄을 이용한 대체연료의 제조방법에 관한 것으로, 해조류에서 다당류 물질인 갈락탄을 추출하는 출발물질제조단계;상기 갈락탄을 이용하여, 촉매전환반응을 통해 바이오연료를 제조하는 반응단계를 포함하는 해조류 유래 갈락탄을 이용한 대체연료의 제조방법이 기재되어 있고,

[0015] 다른 관련 선행특허로 대한민국 특허공개번호 제1020100040438 호는 '신규한 아가레이즈 및 이를 이용한 아가로스로부터 아가로올리고사카라이드의 효소적 생산방법'에 관한 것으로 아가레이즈 및 이를 이용한 아가로스로부터 아가로올리고사카라이드의 효소적 생산에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 해양 미생물 사카로파거스 데그라단스로부터 유래한 아가레이즈 및 이를 이용한 한천으로부터 이당류의 효소적 생산이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로 본 발명의 목적은 조류 바이오 매스(biomass) 또는 아가중합체(agar polymer)를 이용하여 효율적인 당화 및 바이오 연료를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 화학적 촉매에 의한 과분해 및 오염물질 배출, 효소적 방법의 비경제성과 같은 단점을 극복하기 위해 저해제 생산을 억제하고 효소적인 반응성을 증가시키는 공정을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 아가중합체를 초산으로 처리하여 액화하고, 상기 액화된 아가중합체를 아가레이즈들과 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 당화하고, 그 당화 생성물을 발효균주를 통해 발효하여 바이오에탄올을 생산하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 액화 과정은 5.5%~ 54.7 % 초산 하에서 1시간에서 5시간 동안 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니하고,

[0020] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 바이오에탄올을 생산 공정은 5.5%~ 27.4 % 초산 하에서 3시간에서 5시간 동안 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 당화와 에탄올 발효는 동시에 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지

아니한다.

[0022] 또 본 발명의 다른 일 구현예에 있어서, 상기 아가레이즈와 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소는 각각 Aga16B (EMBL id: ABD80437), DagA (EMBL id: CAB61795), Aga50D (EMBL id: ADB81904), 및 NABH (EMBL id: ABD81917)으로 구성된 군으로부터 선택된 효소인 것이 바람직하며, 상기 발효 균주는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에서는 유기산을 이용한 전처리를 통해 용해된 해조류 바이오매스나 아가중합체를 아가레이즈들과 알파-네오아가로바이오스 가수분해효소를 이용하여 당화하고 그를 통해 발효균주를 통해 바이오에탄올을 생산하는 기술을 보고하고 있다. 특히, 앞서 서술한 바와 같이 최근 해조류 바이오매스를 이용한 바이오 에너지 생산에 각광받고 있으나, 현재까지 보고된 화학적 공정에 의한 바이오 연료 생산에 국한되어있다. 이와 같은 방법은 AHG의 과분해 현상과 오염물질 배출등과 같은 비경제적인 부분들이 존재하는 한계를 지니고 있다. 하지만, 본 발명에서 보고하는 통합공정을 통해서 AHG의 과분해 현상이 없을 뿐만 아니라 유기산의 사용에 따른 독성 및 오염물질이 적기 때문에 경제적인 바이오연료 생산 공정 확립이 가능하다. 또한 해양바이오매스로 부터 고부가가치의 단당류인 AHG를 생산하는 공정에도 적용 가능하기 때문에, 향후 이 물질의 대량 생산에 적용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 자연적인 베타아가레이즈 시스템에 근거한 자연적 아가로즈 분해경로(왼쪽)와 본 공정에 적용된 화학적 액화과정과 효소적 당화 공정을 결합한 합성 아가로즈 분해경로(오른쪽) Aga16B와 DagA는 엔도 타입의 베타 아가레이즈 원이고, Aga50D는 엑소 타입 베타아가레이즈 투이다. NABH는 네오아가로바이오스나 네오아가로올리고당으로부터 AHG를 생산하는 당쇄분해효소이다. 자연적 경로에서 속도결정단계는 Aga16B와 DagA에 의해서 탄수화물을 올리고당으로 분해하는 과정이다. 본 공정에서 이 결정단계에 화학적 공정을 추가하여 효소반응을 촉진시켰다.

도 2는 시간에 따른 아가로즈와 두가지 효소(Aga16B, DagA)의 분해산물에 대한 사이즈 배제 크로마토그래피 결과이며,

도 3은 시간에 따른 아세트산에 의해 액화된 아가로즈와 두가지 효소(Aga16B, DagA)의 분해산물에 대한 사이즈 배제 크로마토그래피 결과이며,

도 4는 액화된 아가로즈의 TLC 크로마토그램으로, 각각의 표시된 숫자는 액화된 조건을 의미하는데, 1 - 3 : 5.5 % (w/v) 아세트산을 이용하여 3, 4, 5시간 동안 처리, 4 - 6 : 27.4 % (w/v) 아세트산을 이용하여 1, 2, 3시간 동안 처리, 7 - 9 : 54.7 % (w/v) 아세트산을 이용하여 1, 2, 3시간 동안 처리한 것이다. Gal은 표준물질로 이용된 D-Galactose를 의미한다.

도 5는 다른 화학적 액화 조건에서 효소적 당화률에 대한 비교. 효소적 당화는 5.5 % (w/v)의 액화된 기질을 사용하여 pH 7, 30도에서 96시간동안 반응시켰다.(a) 5.5 % (w/v) 아세트산을 이용하여 3, 4, 5시간 반응한 기질 이용, (b) 27.4 % (w/v) 아세트산을 이용하여 1, 2, 3시간 반응한 기질 이용, (c) 54.7 % (w/v) 아세트산을 이용하여 1, 2, 3시간 반응한 기질을 이용하여 효소적 당화를 시간별로 본 것이다.

도 6은 화학적 액화액를 이용하여 SSF를 통한 에탄올 생산. 5.5, 27.4, 54.7 % (w/v) 아세트산으로 액화시킨 아가로즐 72 h동안 발효하였다. 컨트롤로는 아가로즈가 사용되었다. SSF 테스트를 위해 3%의 액화된 아가로즈를 마이크로호기적 조건에서 아가로즈 분해 효소(DagA, Aga16B, Aga50D와 NABH)와 발효균주인 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae D5A*)를 이용하여 72시간 동안 30도, 150rpm에서 발효하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 목적으로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되지 아니한다

[0026] 실시예 1: 합성 아가로즈 분해경로 개발

[0027] 도면 1에서와 같이 자연적인 아가로즈 분해경로는 베타아가레이즈 원에 의해 네오아가로올리고당이 생성되고 이

분해산물은 엑소 타입 베타아가레이즈에 의해 네오아가로바이오스로 분해된다. 최종적으로 네오아가로바이오스는 NABH에 의해서 갈락토오즈와 AHG로 분해된다. 이와 같은 자연적인 아가로즈 분해경로에서 베타아가레이즈의 작용에는 많은 양의 효소가 필요하고 많은 시간이 걸리는데 비해, 적은 수율을 보인다. 따라서 이와 같은 문제점을 해결하고자 속도결정단계인 베타아가레이즈 원에 앞서 반응속도를 향상하고자 화학적 액화를 시켜서 새로운 합성 아가로즈 분해경로를 만들었다.

[0028] 실시예 2: 재조합 아가분해효소의 발현 및 정제

[0029] 효소적 당화공정 개발에는 많은 양의 효소가 필요하기 때문에 사카로퍼거스 데그레단스(*Saccharophagus degradans*) 유래 Aga16B, Aga50D 아가레이즈와 스트렙토마이세스 코엘리컬러(*Streptomyces coelicolor* A3) 유래 DagA 아가레이즈를 클로닝하였다.

[0030] 네 종류의 효소, Aga16B (EMBL id: ABD80437), DagA (EMBL id: CAB61795), Aga50D (EMBL id: ADB81904), 및 NABH (EMBL id: ABD81917)를 클로닝하였다. 지노믹 DNA를 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 추출하였다. 타겟 유전자를 시그널 서열을 제거하기 위하여 고안된 프라이머를 사용하여 증폭하였다. 발현에 사용된 프라이머는 다음과 같다; Aga16B-N, 5'CTAAGCGTGAACTTATCTAG3' Aga16B-C, 5'CTAAGCGTGAACTTATCTAG3' DagA-N, 5'GATTGGGACGGAATTCCTGT -3' DagA-C, 5' ACTGCCACCATTACCTGGG -3' Aga50D-N, 5'-ATGTTATTCGATTTTGAAAACGATCAAG - 3' Aga50D-C, 5'- TTTGCTGCCTAGCCTTTCGG - 3' NABH-N, 5'-AGCGATTCAAAAGTAAATAAAAAATTGAG - 3' NABH-C, 5'- TACTGCTCCGGAATCGCCTG- 3'. 각 증폭된 유전자 절편을 변형된 pET21a 벡터(Lee, J., Kim, S.H., 2009. Protein Expr. Purif. 63)에 클로닝하고, *E. coli* BL21 (DE3)에서 발현하였다. 그 세포들을 50 μg/ml ampicillin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 함유하는 Luria-Bertani (LB; BD, Sparks, MD, USA) 상에서 미드-로그 상까지 배양하였다. 효소의 과량발현은 16℃에서 12시간 동안 isopropyl-βD-galactopyranoside (IPTG; Glycosynth, Warrington, UK)로 유도하였다.

[0031] Aga16B와 DagA는 엔도 타입 베타 아가레이즈 원(endo-type beta agarase I)으로 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose)와 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose)를 주로 생산하고 Aga50D는 엑소 타입 베타아가레이즈(exo-type beta agarase)로서 네오아가로바이오스(neoagarobiose)만을 생산한다. 이와 같이 생산된 네오아가로올리고당은 NABH에 의해 갈락토오즈와 AHG로 분해된다. 생산된 모든 효소는 one-step affinity 크로마토그래피로 90% 이상의 순도로 정제되며 1L *E.coli*에서 생산시 대략 20mg의 DagA, 5mg의 Aga16B, 50mg의 Aga50D와 30mg의 NABH를 생산하였다.

[0032] 실시예 3: 재조합 아가레이즈들의 반응 특성

[0033] 베타 아가레이즈는 주로 GH16, 50과 86의 세 가지 종류의 GH(glycoside hydrolase) 그룹에 포함된다. 자연적인 아가분해시스템은 여러 분해 단계에 여러 아가레이즈가 관여하여 다양한 중합도의 산물을 생산한다. 따라서 효소적 당화공정을 디자인하기 위해서는 최소 두가지 이상의 효소가 필요하다. 본 공정에 사용된 아가레이즈 중 Aga16B와 DagA의 경우 특성이 일부분만 밝혀져 있기 때문에 효소 가수분해패턴을 아가로즈와 용해시킨 아가로즈를 이용하여 확인하였다.

[0034] 가수분해 패턴은 크기배제크로마토그래피(Size exclusion chromatography)를 이용하여 측정하였다. 도면 2에서 보는것과 같이 DagA는 아가로즈를 분해하여 중합도가 4인 산물을 주된 산물, DP2와 DP6을 부산물로 생산하고, Aga16는 DP4를 주산물, DP6를 부산물로 생산한다. 반면에, 용해시킨 아가로즈의 경우에는 주된 산물은 동일하지만, DP3, 5와 같이 일반적인 베타 아가레이즈 시스템에서 생산되지 않는 중합도의 산물이 생산되었다(도면 3). 이와 같은 특이한 중합도의 산물이 생성된 것은 산처리시 알파결합이 끊기고 베타아가레이즈에 의해서는 베타결합이 끊기기 때문에 이와 같은 현상이 발생한 것이다.

[0035] 실시예 4: 아가로즈의 화학적 용해

[0036] 과분해를 억제하고 효과적인 당화를 위해 약산을 이용하여 아가로즈를 화학적 용해하였다. 약산을 이용하여 비교적 온순한 조건에서 아가로즈를 산처리를 해야만 산에 약한 AHG를 보호할 수 있다. 또한, 약산을 통해 아가로즈를 천천히 일반적으로 알려지 화학적 처리 조건 보다 낮은 온도에서 처리하여 작은 중합도의 아가로올리고당이 아닌 큰 중합도를 갖지만 용해가 잘되는 아가로올리고당을 생산하는데 주안점을 두었다. 이를 위해 사용된

조건과 중화 전후의 용해도의 변화는 다음 표 1과 같다.

[0037] 부연하면, 교반 수조(Biofree, Seoul, Korea)에서 산 촉매를 포함하는 10 ml의 반응 혼합액(15 % (w/v)의 아가로스)내의 1.5g 아가로스로 시작하였다 . 반응 을 다른 조건에서 수행한 후, 샘플들을 적당한 양의 1 ~ 10 M 수산화 나트륨으로 pH 7.0으로 중화하였다. 처리된 샘플의 전체 부피는 증류수로 27.5 ml로 조정하였고 이것은 5.5% (w/v)의 아가로스(liquefied)에 해당한다. 그 중화된 샘플은 중화 과정 동안에 형성된 초산 나트륨을 포함한다.

표 1

Conditions	Liquefying conditions	Before neutralization (%, w/w)	After neutralization (%, w/w)
1	5.5 % (w/v) acetic acid, 3 h	28.8 ± 3.0	25.4 ± 4.0
2	5.5 % (w/v) acetic acid, 4 h	67.0 ± 4.0	49.7 ± 3.9
3	5.5 % (w/v) acetic acid, 5 h	77.2 ± 6.0	57.2 ± 4.8
4	27.4 % (w/v) acetic acid, 1 h	14.7 ± 0.8	23.2 ± 1.1
5	27.4 % (w/v) acetic acid, 2 h	64.3 ± 4.3	63.5 ± 4.4
6	27.4 % (w/v) acetic acid, 3 h	97.0 ± 1.6	87.4 ± 3.9
7	54.7 % (w/v) acetic acid, 1 h	62.6 ± 2.0	33.3 ± 2.9
8	54.7 % (w/v) acetic acid, 2 h	92.5 ± 2.8	91.2 ± 3.9
9	54.7 % (w/v) acetic acid, 3 h	97.4 ± 1.3	95.6 ± 2.2

[0038] At fixed condition; 80°C, 150 rpm

[0039] 표 1에서 보는 것과 같이 14.7부터 97.4%(w/w)의 용해도를 보였다. 시간이 증가함에 따라, 용해도가 급격하게 증가하였다. 사용된 촉매의 농도 역시 용해도를 증가하였으며, 54.7%(w/w)의 아세트산을 이용하여 아가로즈를 80도에서 3시간 처리하였을 때 95.6%(w/w) 아가로즈가 용해가 되었다. 이 결과는 도표 2, 3, 4의 TLC와 HPLC의 프로파일과도 일치된다.용해된 아가로즈의 평균 중합도는 32이고 최소 중합도는 4였다. 또한 HMF와 furfural과 같은 발효 저해제가 검출되지 않았다.

[0040] 실시예 5: 액화된 아가로즈의 효소적 당화

[0041] 액화된 아가로올리고당은 평균 DP가 32이고 최소 DP가 4이다. 이와 같은 액화된 아가로즈를 발효가능한 단당으로 전화하기 위한 효소적 당화공정을 적용하였다(도면 5). 액화된 아가로즈는 4가지 효소(Aga16B, DagA, Aga50D와 NABH)로 30도에서 96시간 동안 반응시켰다 (도 4).

[0042] 부연하면, 효소 반응은 초산 나트륨 염을 포함하는 그 액화된 아가로스 (5.5 % (w/v)을 포함하는 100㎕ 반응 혼합액에서 수행되었다. 그 반응 혼합액을 1.7 nmol의 Aga16B, 3.4 nmol의 DagA, 13.3 nmol의 Aga50D 및 13.6 nmol의 NABH로 배양하였다. 그 효소 반응은 여러 시간 지점에서 샘플링하고 그 반응은 수조에서 5분간 가열하여 중지시켰다.

[0043] 산촉매에 의해 액화된 아가로즈의 효소적 가수분해는 48에서 72 시간만에 완료가 되었고 가장 높은 당화률은 27.4%(w/v)의 아세트산으로 80도에서 3 시간 동안 처리한 액화아가로즈에서 7 시간 동안 반응시 79.1 5.4 % (w/w)가 나왔다. 당화률은 액화된 정도에 결정적인 영향을 주는 산 농도에는 영향을 받지 않았다. 예를 들면,

54.7%(w/v)의 아세트산을 80도에서 2시간 동안 처리한 샘플의 당화률과 27.4%(w/v)의 아세트산으로 80도에서 2시간동안 처리한 샘플의 당화률이 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이것은 아가로즈의 액화된 정도가 당화률과는 상관관계가 낮음을 의미한다. 이와 같은 결과는 높은 염 조건에서 효소의 구조적 혹은 안정성의 변화에 기인한다고 볼 수 있다.

[0044] 실시예 6: 액화된 아가로즈의 동시 당화와 발효(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

[0045] 본 공정에서 생산된 당화물이 발효공정에 적용이 되는지 확인하기 위해서 SSF를 수행하였다. SSF는 다음과 같은 세가지 조건의 액화된 아가로즈를 가지고 수행하였다; 1) 5.5 % (w/v)의 아세트산, 80도, 5시간, 2) 27.4 % (w/v)의 아세트산, 80도, 3시간, 3) 54.7 % (w/v)의 아세트산, 80도, 3시간(도면 6).

[0046] 부연하면, *Saccharomyces cerevisiae* D5A (ATCC 200062)를 발효 균주로 사용하였으며, SSF는 3.0 % (w/v) 화학적으로 액화된 아가로스를 함유하는 배지에서 30℃에서 72시간 동안 혐기적으로 수행하였다. 에탄올 농도는 DB-WAXetr 컬럼(30 m x0.25 mm x 0.25 ㎛, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)을 사용하고 flame ionization detector (Agilent 7890, Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA)를 가지는 가스 크로마토그래피로 측정하였다. 에탄올 수율은 아래 방정식에서 나타낸 NREL LAP-008 프로토콜로 계산하였다.

$$\text{Ethanol yield (\% of theoretical maxium)} = \frac{\text{Ethanol produced (g) by SSF}}{\text{Initial agarose (g)} \times f_F \times f_H \times f_E} \times 100$$

[0047]

[0048] 여기서,

[0049] Initial agarose = 3 % (w/v)의 액화 또는 비액화된 아가로스,

[0050] f_F = 0.53 (아가로스에서 D-갈락토스 분획)

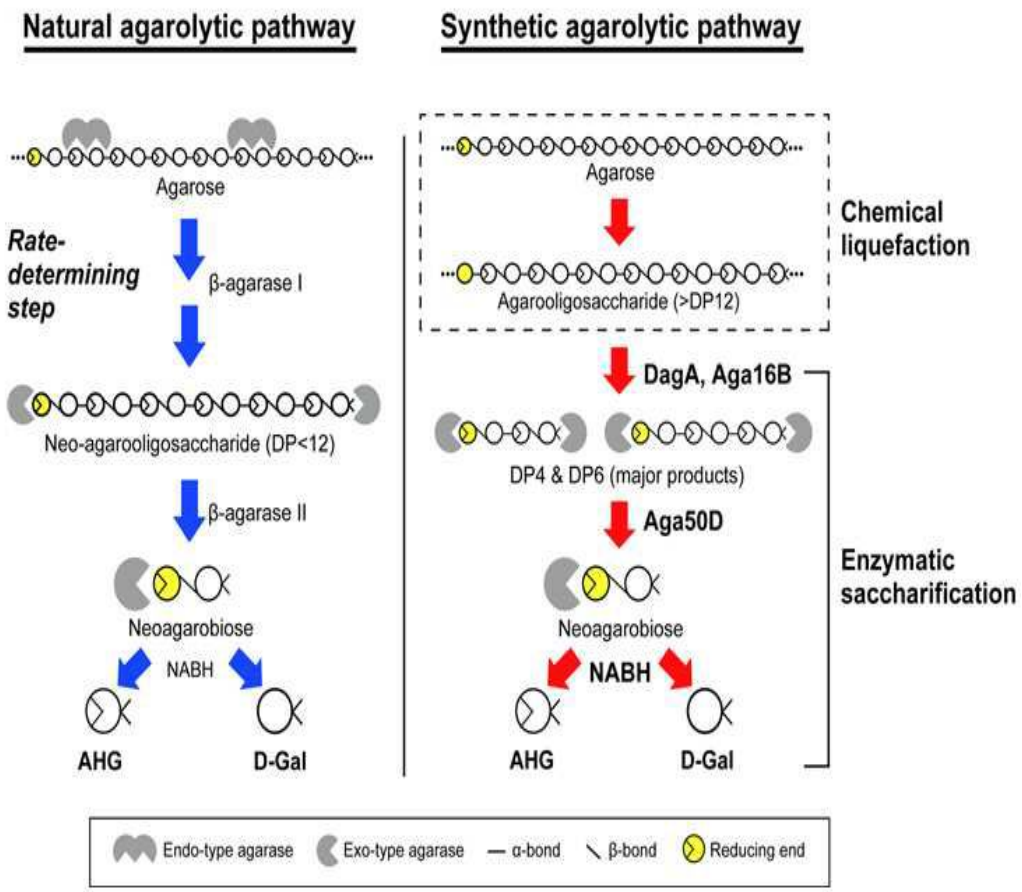
[0051] f_H = 1.1 (평균 가수분해 전환 인자; mean value of 180/162 (in D-galactose, MW: 180) + 162/148 (in AHG, MW: 162))

[0052] f_E = 0.51 (에탄올 전환 인자)

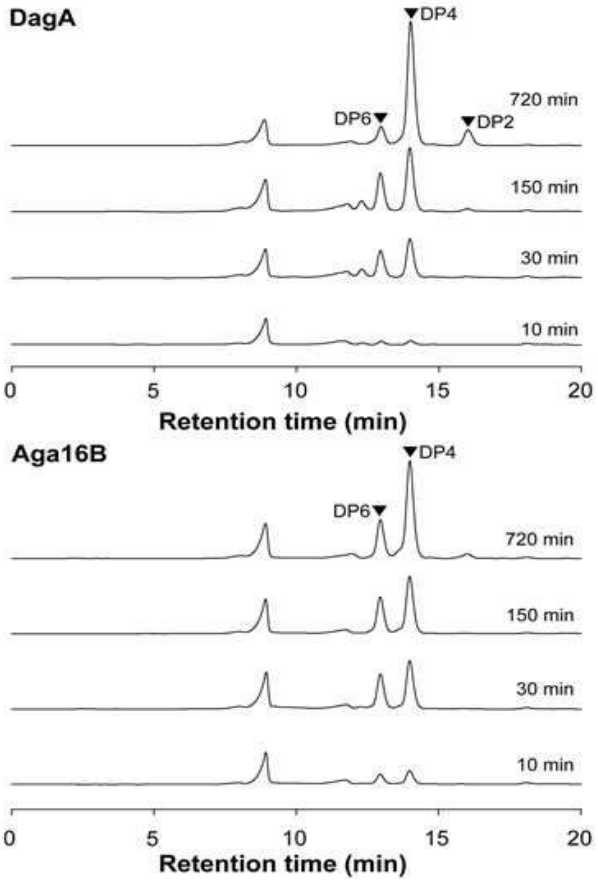
[0053] SSF 결과, 5.5%(w/v)의 아세트산을 이용하여 80도에서 5시간의 액화된 아가로즈를 이용하였을 때 최고의 에탄올 생산량(4.4g/l)을 얻었고 이것은 갈락토오즈 기준으로 이론적 최대 수율은 49.3%였다. 반면에 화학적 처리를 하지 않은 아가로즈를 기준을 하였을때 1.3g/l의 에탄올을 얻었고 이것은 갈락토오즈 기준으로 이론적최대 수율은 14.6%였다. 최대 생산량 기준으로 액화시킨 아가로즈에서 화학적액화를 시키지 않은 아가로즈 보다 3.4배의 최대생산량을 얻었다.

도면

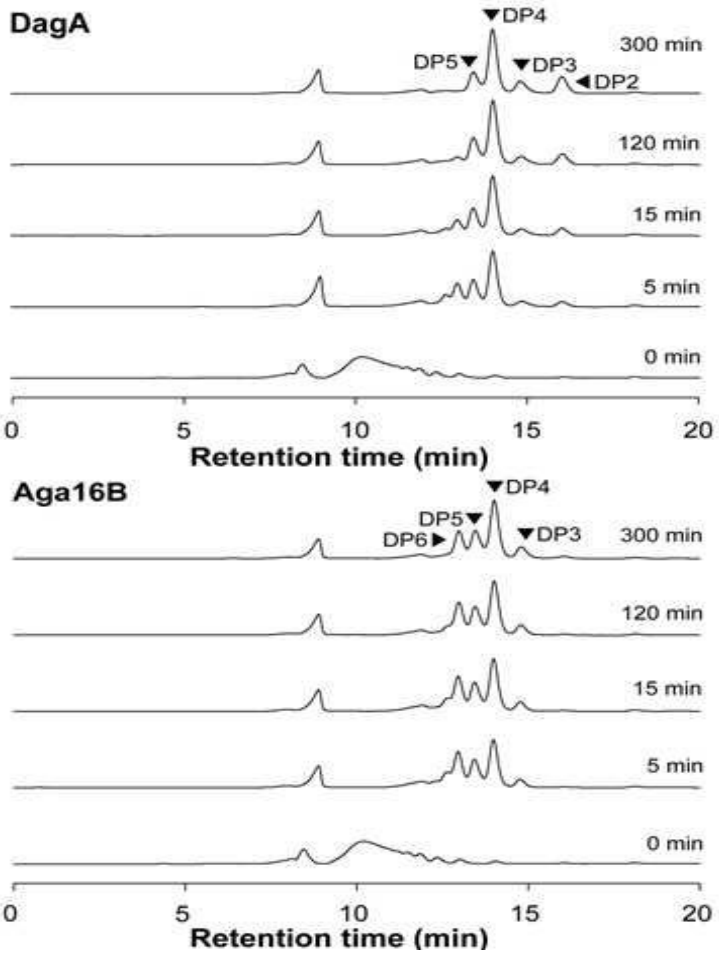
도면1


Natural agarolytic pathway
Synthetic agarolytic pathway
Agarose
Rate-determining step
β-agarase I
Neo-agarooligosaccharide (DP<12)
β-agarase II
Neoagarobiose
NABH
AHG
D-Gal
Agarose
Agarooligosaccharide (>DP12)
Chemical liquefaction
DagA, Aga16B
DP4 & DP6 (major products)
Aga50D
Neoagarobiose
NABH
AHG
D-Gal
Enzymatic saccharification
Endo-type agarase
Exo-type agarase
α-bond
β-bond
Reducing end

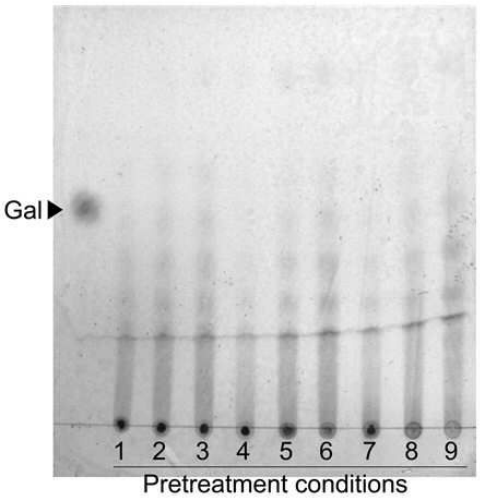
도면2


DagA
DP4
DP6
DP2
720 min
150 min
30 min
10 min
0
5
10
15
20
Retention time (min)
Aga16B
DP4
DP6
720 min
150 min
30 min
10 min
0
5
10
15
20
Retention time (min)

도면3

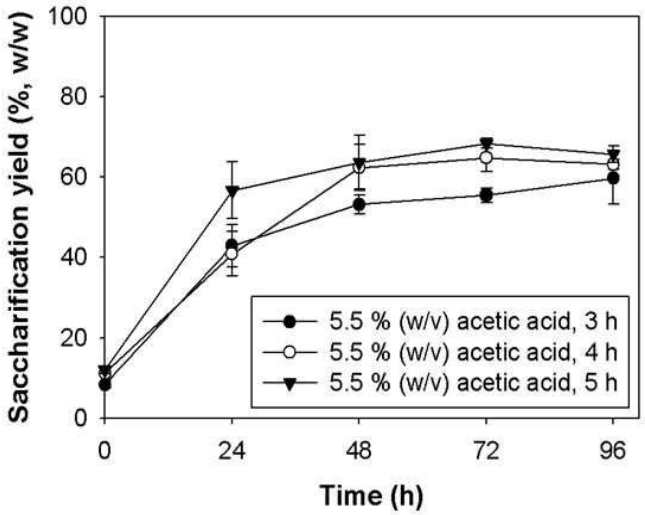

DagA
DP4
DP5
DP3
DP2
300 min
120 min
15 min
5 min
0 min
0
5
10
15
20
Retention time (min)
Aga16B
DP4
DP5
DP6
DP3
300 min
120 min
15 min
5 min
0 min
0
5
10
15
20
Retention time (min)

도면4


Gal
1 2 3 4 5 6 7 8 9
Pretreatment conditions

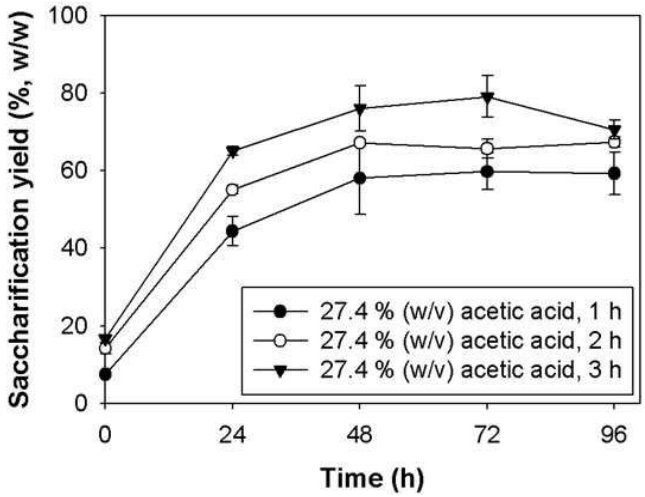
도면5a

(a)

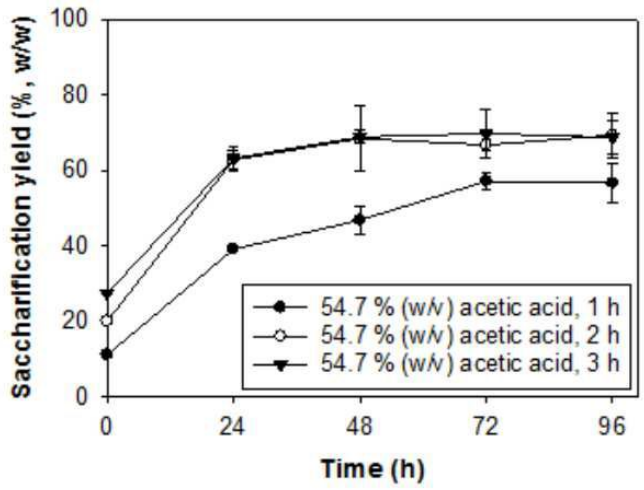

Saccharification yield (%, w/w)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (h)
5.5 % (w/v) acetic acid, 3 h
5.5 % (w/v) acetic acid, 4 h
5.5 % (w/v) acetic acid, 5 h

도면5b

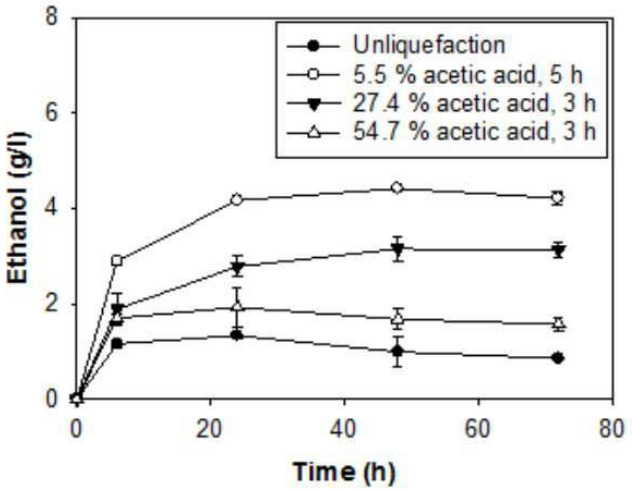
(b)


Saccharification yield (%, w/w)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (h)
27.4 % (w/v) acetic acid, 1 h
27.4 % (w/v) acetic acid, 2 h
27.4 % (w/v) acetic acid, 3 h

도면5c


Saccharification yield (%, w/w)
100
80
60
40
20
0
0
24
48
72
96
Time (h)
54.7 % (w/v) acetic acid, 1 h
54.7 % (w/v) acetic acid, 2 h
54.7 % (w/v) acetic acid, 3 h

도면6


Ethanol (g/l)
8
6
4
2
0
0
20
40
60
80
Time (h)
Unliquefaction
5.5 % acetic acid, 5 h
27.4 % acetic acid, 3 h
54.7 % acetic acid, 3 h