



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0123301
(43) 공개일자 2014년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/00 (2006.01) C07H 1/08 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040453
(22) 출원일자 2013년04월12일
심사청구일자 2013년04월12일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
이인화
광주 남구 노대실로 33, 505동 1201호 (노대동, 송화마을휴먼시아5단지아파트)
김주일
광주 서구 내방로 430, 3동 506호 (농성동, 삼익아파트)
이주현
광주 북구 매곡로 93, 103동 1901호 (매곡동, 매곡동대주피오레아파트)
(74) 대리인
이원희

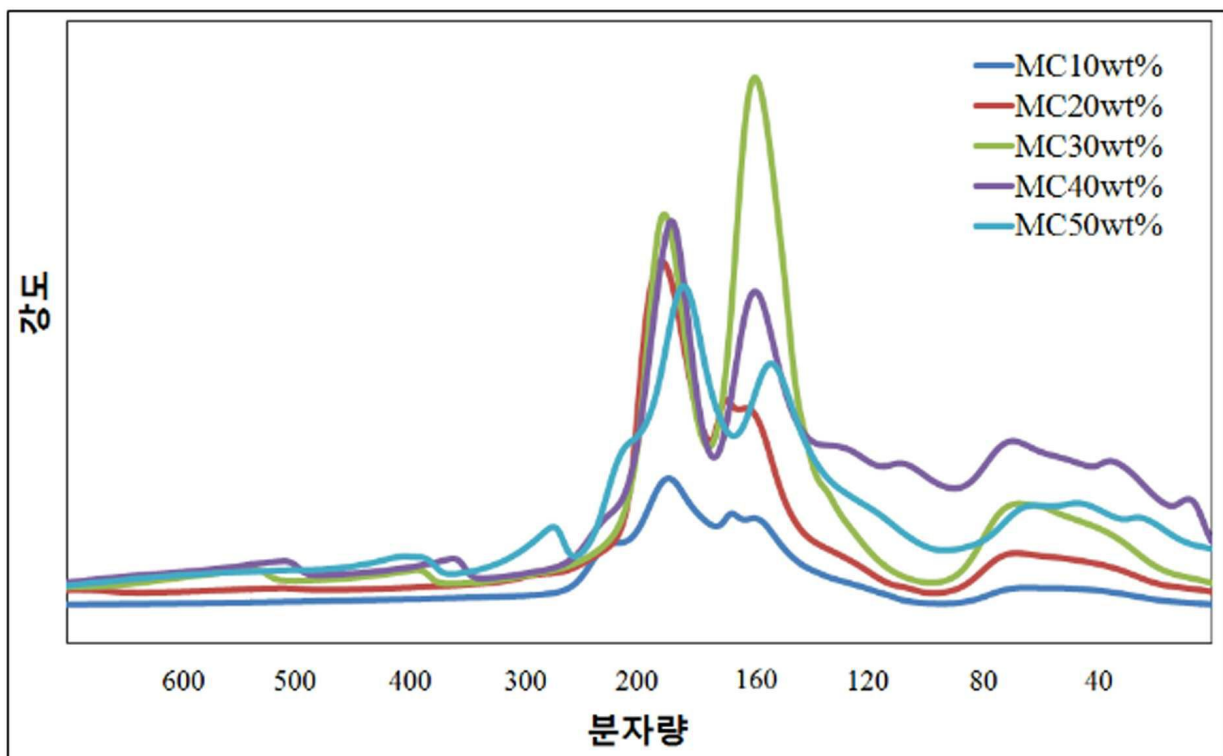
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 라디칼 개시제 및 금속촉매 반응에 의한 셀룰로오스 또는 알지네이트의 당화물질의 제조 방법

(57) 요약

다당류 고분자의 특징인 글루코시딕 결합(glycosidic bonds)을 포함하는 고분자 셀룰로오스 또는 알지네이트 수용성 고분자 셀룰로오스를 라디칼 개시제 및 금속 촉매로 선택적으로 분해시키기 위하여 반응 단계별로 온도를 조절하여 라디칼 분해반응을 수행하여 글루코오스 또는 자일로오스를 포함하는 다당류와 유기산이 생성시키고 당화물질과 유기산을 분리하고 분리된 당화물질에 라디칼 소거제 투입하여 라디칼을 제거하고 라디칼이 소거된 당화물질을 미생물로 발효하여 에탄올 원료로 사용하거나 기타 용도로 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도17



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011401010090

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국에너지 기술평가원

연구사업명 고급 에너지 정책연계/융복합 트랙

연구과제명 기후변화대응 온실가스감축기술 전문리더양성 고급트랙

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.01 ~ 2012.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 혼합물을 10℃ 내지 50℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 단계;
- 3) 상기 단계 2)의 반응물을 50℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 단계;
- 4) 상기 단계 3)의 생성물을 증류하여 휘발성분과 비휘발성분을 분리하는 단계; 및
- 5) 상기 단계 4)의 분리된 비휘발성분에 라디칼 소거제를 첨가하여 라디칼을 제거시켜서 당화물질을 제조하는 단계를 포함하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 셀룰로오스는 리그닌을 포함하는 셀룰로오스 또는 리그닌 포함하지 않는 비수용성 목질계 셀룰로오스이고, 알지네이트는 홍조류, 갈조류 및 청조류로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 해양 생물체에서 추출한 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 셀룰로오스는 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC), 메틸셀룰로오스(MC), 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC), 하이드록시프로필 셀룰로오스(HPC) 및 하이드록시에틸 셀룰로오스(HEC)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 셀룰로오스 또는 알지네이트는 혼합물의 총중량에 대하여 1 내지 90 중량%인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 셀룰로오스 또는 알지네이트는 다당류, 소다 및 산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 첨가하여 가수분해된 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 라디칼 개시제는 과산화수소, 오존, 과황산칼륨 및 과황산암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 라디칼 개시제는 혼합물의 총중량에 대해 0.1 내지 50 중량부로 첨가하는 것

을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)에서 금속 촉매는 철, 구리, 니켈, 바나듐, 크롬 및 망간으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 전이금속, 또는 백금, 로듐, 팔라듐, 금 및 루테튬으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 귀금속염인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)에서 금속 촉매는 황산제이철, 황산구리, 염화은, 암모늄바나데이트 및 염화백금으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)에서 금속 촉매는 혼합물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 3.0 중량부로 첨가하는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 혼합물을 20℃ 내지 40℃에서 15 시간 내지 30 시간 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 12

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 반응물을 100℃ 내지 200℃로 10분 내지 10 시간 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 13

제 1항에 있어서, 상기 단계 5)의 라디칼 소거제는 하이드로퀴논(1, 4-C₆H₄(OH)₂), 아스코브린산(C₆H₈O₆, (5R)-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one), 카테콜(C₆H₆O₂, Benzene-1,2-diol), thiamine chloride(C₁₂H₁₇N₄ClN₄OS, 2-[3-[(4-Amino-2-methyl pyrimidin-5-yl) methyl]-4-methyl-thiazol-5-yl] ethanol) 및 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 14

제 1항에 있어서, 상기 단계 5)의 당화물질은 분자량이 1 내지 200 kDa인 저분자인 것을 특징하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, 상기 단계 5)의 당화물질은 글루코오스(Glucose) 또는 자일로오스(Xylose)인 것을 특징으로

하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법.

청구항 16

제 1항의 방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질.

청구항 17

제 16항에서 제조된 당화물질에 발효 미생물을 첨가하여 발효시켜 에탄올을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 제조방법.

청구항 18

제 16항의 당화물질을 포함하는 동물 사료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수용성 셀룰로오스 또는 알지네이트에 라디칼 반응 개시제로 과산화수소 및 금속 촉매로 철로 혼합하여 수용액상에서 라디칼 촉매 반응에 의한 저분자화 및 이의 결과로부터 얻어지는 글루코오스 및 자일로오스 등의 당화물질의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 화석연료 사용증가에 따른 온실가스(CO₂)의 발생은 지구 온난화 문제를 초래하면서 세계는 친환경적인 에너지를 개발하는데 노력하고 있다. 또한, 화석연료의 고갈로 인한 유가 불안정과 에너지 안보 위협의 해소를 위한 새로운 에너지원의 개발이 중요한 문제로 부각되고 있다.

[0003] 바이오매스는 현대사회의 에너지 수요에 기여할 수 있는 재생 가능 에너지의 원천이며 생물체를 기반으로 한 에너지원 및 자원을 의미하는 것으로 나무, 곡물, 식물, 가축분뇨, 농작물 및 각종 음식물 쓰레기 등이 이에 포함된다(삼성경제연구소, 2006, 「바이오 연료의 합리적 도입 방안」). 이러한 바이오매스는 지구상에서 1년간 약 1,550억 ton이 발생되어 석유의 매장량과 비슷한 수준으로 추정되고 있다. 나무나 풀 혹은 보리짚 따위의 셀룰로오스를 포함하고 있는 바이오매스 물질을 분해하여, 그것으로부터 새로운 대체에너지를 얻으려는 연구는 많은 사람들에게 의하여 수행되고 있다.

[0004] 목질계 바이오매스는 기본적으로 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스라는 복합당과 리그닌이란 고분자 물질이 복잡하고도 단단한 형태로 결합되어 있다. 헤미셀룰로오스는 비결정성 구조를 가지고 있으며, 단당류들의 결합이 상대적으로 약해 열화학적 방법으로 쉽게 가수분해되는 반면, 셀룰로오스는 단당류들의 결합도 매우 강한데다 결정성 구조까지 가져 분해되기 어렵다. 리그닌은 효소나 미생물에 의한 이 당의 분해를 더더욱 어렵게 만든다. 사실 이러한 독특한 견고성은 자연이 외부의 공격으로부터 식물을 보호하기 위해 선택한 식물 진화의 산물이다. 이런 물질을 이용해서 연료를 만들고자 하면 필연적으로 저분자화를 거쳐 당화라는 에너지가 많이 수반되는 과정을 거쳐야 한다(한국환경정책평가연구원, 2007, 「바이오연료(바이오디젤, 바이오에탄올)의 환경 경제성 분석 및 보급 확대방안 연구」).

[0005] 셀룰로오스로부터 바이오에탄올 생산하는 공정은 크게 전처리, 당화, 발효의 세 단계로 나뉜다. 전처리 단계에서는 복잡하고 단단한 구조를 가지고 있는 리그닌으로부터 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 효과적으로 분리하는 것을 목적으로 한다. 분리된 셀룰로오스는 당화과정에서 미생물에 의해 대표적인 단당류인 글루코오스로 가수분해되고, 글루코오스가 발효되면 에탄올이 생산된다. 각각을 자세히 살펴보면, 전처리 단계의 목표는 단단하고 복잡한 구조체적인 특성을 가지고 있는 셀룰로오스를 다른 성분으로부터 분리한 후 당화과정에서 미생물들이

효과적으로 이용할 수 있도록 하는 것이다. 따라서, 먼저 셀룰로오스를 다른 성분으로부터 분리한 후 입자 크기를 줄이고 표면적을 넓혀 셀룰로오스의 결정도를 줄이는 과정이 포함되어야 한다. 전처리 공정은 대개 물리적인 방법과 화학적인 방법이 사용된다. 전처리 과정을 효율은 당화 효율과도 직결되는 문제이기 때문에 현재 전처리 효율과 속도를 높이기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 목질계 바이오매스가 전처리 과정을 거쳐 그 구조가 호트리지게 되면 이후에는 미생물이 활약을 펼치는 당화공정을 거치게 된다(미래농정연구원, 2005. 「산업용 원료(바이오에너지)로 사용가능한 농작물의 경제성 분석 및 정책적 지원방안 연구」).

[0006] 현재 당화과정은 주로 미생물에 의해 분해되어 단당류 형태인 글루코오스로 전환되는 기술이 주류를 이루고 있다. 셀룰로오스는 글루코오스와 글루코오스가 상대적으로 매우 단단한 β -1,4 결합으로 이어져 있고 이를 분해하는 데는 셀룰레이즈라 불리는 셀룰로오스 분해효소가 사용된다. 각 단계마다 다른 효소가 사용되는데 셀룰로오스를 덩어리 덩어리 잘라 큰 덩어리로 만드는 엔도글루카네이즈와 이를 다시 글루코오스 두세 개의 중합체로 자르는 엑소글루카네이즈 그리고 이를 다시 글루코오스로 자르는 β -글루코시데이즈가 있다. 이러한 분해반응은 주로 소나 양과 같은 반추동물의 위장 내에서 일어나는 것으로 알려져 있으며 현재 기술로는 목질계 바이오에탄올 생산에 있어서 가장 느리고 어려운 과정에 속한다(삼성경제연구소, 2006. 「바이오 연료의 합리적 도입 방안」).

[0007] 분자량이 큰 셀룰로오스를 물리적, 화학적, 생물학적, 그리고 광화학적 방법 등을 사용하여 분자량 조절을 위한 대표적인 방법으로는 물리적 방법, 생물학적 방법, 화학적 방법, 광학적 방법 등이 있다. 셀룰로오스를 저분자화 할 때 물리적 방법의 대표적인 방법으로는 초음파(ultrasound) 방법이나 microwave를 이용한 방법이 있다. 초음파를 이용하는 방법은 특별한 후처리 공정이 필요하지 않고 상온에서 공정이 가능하며 제조된 반응물의 분자량 분산도가 매우 좁은 값을 얻을 수 있다는 장점이 있다. 하지만 대량 반응이 어렵고 반응 효율이 낮아 대량 생산에는 적합하지 않는 단점이 있다. 생물학적인 방법은 갈색, 흰색 곰팡이를 직접 바이오매스에서 자라게 하여 이용하거나 이러한 미생물로부터 얻어진 Phenol oxidase, laccases, 과산화수소 생성효소 등과 같은 리그닌 분해효소들을 이용하는 방법 최근에 많이 사용되고 있다. 하지만 효소를 이용한 생물학적 방법은 저분자화 반응이 완료된 후 효소의 제거가 어려우며, 효소 자체의 안정성도 문제가 있고 또한 반응 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 즉, 분자량의 조절이 어렵고 분해효소의 잔류 가능성 때문에 생물학적인 분자량 조절 방법은 응용 분야가 제한적이고 산업분야에서는 적합하지 못한 것으로 사료된다.

[0008] 해조류로부터 얻어지는 기능성 다당류인 알지네이트는 음식의 첨가물, 공업용 증점제, 그리고 바이오 분야까지 매우 폭 넓은 사용 범위를 가지고 있다. 하지만, 사용 분야에 따라 요구되는 특별한 물리적·화학적 성질이 있어서 실질적으로 사용되는 양은 매우 제한적이다.

[0009] 셀룰로오스와 알지네이트와 같은 광합성에 의하여 생산된 바이오 고분자의 경우 분자량이 300kDa 이상으로 유지되는 고분자이며, 분자량이 200 kDa 이상일 경우 중량부로 5% 이상이 되면 팽윤에 의하여 용액의 점도가 급격히 높아져 용해시키기 어려우며 미생물 반응 등에 사용하는데 한계가 있어 가공하기가 매우 어렵다. 이러한 높은 점도는 고분자가 물을 흡수하면서 체적이 급격히 커지지만 분자량 또한 커지기 때문에 용액 속에서 서로 엉켜있는 구조의 형태가 된다. 이러한 높은 점도는 고분자가 저분자화 되면 낮아지게 된다. 따라서 고분자의 저분자화는 용액의 점도를 낮추어 유동성을 높여주는 효과가 있다. 또한, 셀룰로오스와 알지네이트는 고분자일 때보다 저분자화 될 때 그들이 갖는 관능기의 노출이 증가되면서 기능성이 더욱 향상되는 것으로 알려져 있다.

[0010] 일반적으로 셀룰로오스는 베타 포도당을 구성하는 1번 탄소에 결합된 -OH와 또 다른 베타 포도당 분자의 4번 탄소에 결합된 -OH가 반응하여 물이 빠져나가면서 글루코시드 결합이 형성되고, 계속 같은 방법으로 수많은 베타 포도당이 연결되어 있는 고분자를 말한다(도 1 참조).

[0011] 두 개의 베타 포도당이 연결되어 형성된 이당류 분자를 셀로비오스(cellobiose)라고 부른다. 셀로비오스는 계속해서 수천 수만 개의 베타 포도당과 결합하고, 글루코시드 결합이 계속되면 셀룰로오스가 만들어진다. 일반적으로 셀룰로오스는 글루코오스($C_6H_{10}O_5$)를 반복 단위로 한 결정성이 큰 선형의 축합 고분자로 각 단량체에 존재하는 -OH 그룹 사이의 수소결합으로 인한 단단한 고분자 사슬로 이루어져 있으며 그 결합방식으로 인해 일반 유기

용매에는 잘 녹지 않는다. 따라서 셀룰로오스를 가수분해하여 물에 용해될 수 있도록 만든 것이 수용성 셀룰로오스이며 치환기의 종류에 따라 여러 물질로 구분된다(도 2 참조).

[0012] 알지네이트는 [도 3]에서 보는 것과 같이 β -D-mannuronate [M] 와 α -L-guluronate [G] 가 1-4 β -글루코시딕(glycosidic) 결합으로 이루어지는 hetero polysaccharide의 형태로 존재한다(도 3 참조).

[0013] 상기와 같은 셀룰로오스 및 알지네이트는 글루코오스 단당류가 반복적으로 연결되어 있기 때문에 1-4 β -글루코시딕(glycosidic) 결합의 1-4결합을 끊어 주면 이당류 또는 단당류를 얻을 수 있다. 이러한 결합을 끊기 위해서는 강력한 화학적 에너지가 필요한데 너무 큰 에너지는 단당체를 파괴하여 포도당형태의 단당류를 얻을 수 없게 된다. 따라서 고분자를 결합을 끊어 포도당 형태의 단당류를 제조하기 위해서는 강력한 에너지를 갖으면서도 1-4 β -글루코시딕 결합을 선택적으로 잘라낼 수 있는 반응이 요구된다.

[0014] 이에 본 발명자들은, 상기의 문제점을 해결하고자 식물의 광합성으로부터 만들어진 고분자의 셀룰로오스와 알지네이트를 저분자 형태의 당화물질로 제조하는 방법을 연구할 연구하던 중, 셀룰로오스 또는 알지네이트에 과산화수소 및 철을 혼합하여 상온에서 1차 라디칼 분해 반응을 시키고, 고온에서 2차 라디칼 분해 반응을 시킨 후에 라디칼 소거제를 첨가하면 글루코오스 또는 자일로오스를 포함하는 당화물질이 생성되었으며, 상기 당화물질에 미생물을 첨가하여 발효되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명의 목적은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질에 발효 미생물을 첨가하여 발효시켜 에탄올을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 포함하는 동물 사료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0020] 1) 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합하는 단계;
- [0021] 2) 상기 단계 1)의 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 단계;
- [0022] 3) 상기 단계 2)의 반응물을 100℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 단계;
- [0023] 4) 상기 단계 3)의 생성물을 증류하여 휘발성분과 비휘발성분을 분리하는 단계; 및
- [0024] 5) 상기 단계 4)의 분리된 비휘발성분에 라디칼 소거제를 첨가하여 라디칼을 제거시켜서 당화물질을 제조하는 단계를 포함하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 제공한다.

- [0026] 또한, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질에 발효 미생물을 첨가하여 발효시켜 에탄올을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [0027] 아울러, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 포함하는 동물 사료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 의한 제조방법은 바이오메스 중에서 분자량이 크고 글루코시딕 결합(glycosidic bonds)로 결합된 셀룰로오스, 알지네이트 또는 다당류로부터 높은 수율로 바이오 알코올의 제조가 가능하므로 종래 바이오 에탄올의 생산이 옥수수 또는 사탕수수와 같은 곡물로부터 탈피하게 함으로써 곡물 수급안정에 기여할 뿐만 아니라, 본 발명에서는 바이오 알코올의 제조시, 생산 원료를 산림과 해양으로부터 공급받음으로써 생산에 필요한 경작면적이 넓어 경제적 측면에서도 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 셀룰로오스 고분자의 분자구조를 나타낸 그림이다.
- 도 2는 수용성 셀룰로오스의 치환기에 따른 분자구조식을 나타낸 그림이다.
- 도 3은 알지네이트 고분자의 단량체 분자구조 및 고분자 연결구조를 나타낸 그림이다.
- 도 4는 메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도에 따른 25℃에서 24시간 방치 후 성분 변화를 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도에 따른 150℃에서 2차 당화과정 처리한 후 성분을 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 메틸셀룰로오스를 고분자 영역의 분자량에 따른 표준물질 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 메틸셀룰로오스를 저분자 영역의 분자량에 따른 표준물질 분석 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 메틸셀룰로오스 당화과정에 따른 분자량 및 성분 변화를 표시한 그림이다.
- (1) 고분자 메틸셀룰로오스 (2) 25℃ 과산화수소 및 철 금속 촉매 반응 후
- (3) 1차 당화과정을 거쳐 150℃로 가열함 물질의 휘발성 응축물 및 비휘발성분 잔유물
- 도 9는 글루코오스의 농도 변화에 따른 검량선을 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 글루코오스의 농도 변화에 따른 당화처리한 물질의 분자량변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질인지를 확인한 그래프이다.
- 도 11는 자일로오스의 농도 변화에 따른 검량선을 나타낸 그래프이다.
- 도 12는 자일로오스의 농도 변화에 따른 당화처리한 물질의 분자량변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질인지를 확인한 그래프이다.
- 도 13은 글루코오스 및 자일로오스의 혼합물의 농도 변화에 따른 당화처리한 물질의 분자량변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질인지를 확인한 그래프이다.
- 도 14는 락토오스의 농도 변화에 따른 검량선을 나타낸 그래프이다.
- 도 15는 락토오스의 농도 변화에 따른 당화처리한 물질의 분자량변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질인지를 확인한 그래프이다.
- 도 16은 메틸셀룰로오스 25℃ 당화 과정 후의 분자량 분포를 확인한 그래프이다.
- 도 17은 메틸셀룰로오스 150℃ 당화 과정 후의 분자량 분포를 확인한 그래프이다.

도 18은 글루코오스 표준물질, 메틸셀룰로오스 당화물질을 고온 당화 과정을 나타낸 그림이다.

도 19는 본 발명에 따른 당화물질에 맥주 발효균을 접종하여 배양한 배양액의 광투과도의 상대적인 비율을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법을 제공한다:
- [0032] 1) 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합하는 단계;
- [0033] 2) 상기 단계 1)의 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 단계;
- [0034] 3) 상기 단계 2)의 반응물을 100℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 단계;
- [0035] 4) 상기 단계 3)의 생성물을 증류하여 휘발성분과 비휘발성분을 분리하는 단계; 및
- [0036] 5) 상기 단계 4)의 분리된 비휘발성분에 라디칼 소거제를 첨가하여 라디칼을 제거시켜서 당화물질을 제조하는 단계.
- [0037] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 1)은 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합하는 단계이다.
- [0038] 상기 셀룰로오스(cellulose)는 가수분해된 수용성 고분자 셀룰로오스 또는 공업적으로 제조된 수용성 고분자 셀룰로오스인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 상기 셀룰로오스 또는 알지네이트의 분자량은 300 kDa 내지 1000 KDa인 고분자인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0040] 상기 셀룰로오스는 리그닌을 포함하는 셀룰로오스 또는 리그닌 포함하지 않는 비수용성 목질계 셀룰로오스이고, 알지네이트는 홍조류, 갈조류 및 청조류로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 해양 생물체에서 추출한 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0041] 상기 셀룰로오스는 카르복시메틸 셀룰로오스(CMC), 메틸셀룰로오스(MC), 하이드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), 하이드록시 프로필 메틸 셀룰로오스(HPMC), 하이드록시프로필 셀룰로오스(HPC) 및 하이드록시에틸 셀룰로오스(HEC)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직 하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0042] 상기 셀룰로오스 또는 알지네이트는 혼합물의 총중량에 대하여 1 내지 90 중량%인 것이 바람직하고,
- [0043] 상기 셀룰로오스 또는 알지네이트는 다당류, 소다 및 산으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 첨가하여 가수분해된 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0044] 상기 라디칼 개시제는 과산화수소, 오존, 과황산칼륨 및 과황산암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0045] 상기 라디칼 개시제는 혼합물의 총중량에 대해 0.1 내지 50 중량부로 첨가하는 것이 바람직하고,
- [0046] 상기 범위를 벗어나는 경우, 0.1 중량부 미만으로 사용시, 글리세린의 분해가 어려운 단점이 있다.
- [0047] 본 발명의 수용성 고분자 셀룰로오스는 분자량이 크고 글루코시딕 결합(glycosidic bonds)로 결합되어 있기 때문에 용이하게 분해되지 않으나, 본 발명의 과산화수소와 오존 등은 금속이온과 반응하여 발생하는 OH 라디칼의 강력한 산화력으로서 유기물을 산화시키므로 본 발명에서는 라디칼 반응을 일으키는 과산화수소 또는 오존과 같은 라디칼 생성제를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0048] 상기 금속 촉매는 철, 구리, 니켈, 바나듐, 크롬 및 망간으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 전이금속, 또는 백금, 로듐, 팔라듐, 금 및 루테튬으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 귀금속염인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0049] 상기 금속 촉매는 황산제이철, 황산구리, 염화은, 암모늄바나데이트 및 염화백금으로 이루어지는 군으로부터 선

택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

- [0050] 상기 금속 촉매는 혼합물의 총 중량에 대하여 0.001 내지 3.0 중량부로 첨가하는 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0051] 상기 범위를 벗어나는 경우, 0.0001 중량부 미만으로 첨가시, 라디칼 개시제의 활성이 저하되는 문제점이 있고, 3.0 중량부를 초과하여 첨가시, 라디칼 개시제의 활성이 빠르게 일어나, 당화 물질의 수율이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0052] 일반적으로 라디칼 반응은 금속이온에 의하여 반응속도가 증가하는데 이는 금속이온의 촉매작용에 의하여 반응 활성화에너지가 감소하는 효과와 금속이온의 전자 이동경로로서 산화 환원 반응을 촉진하는 역할에 기인한다.
- [0053] 상기 혼합물을 20℃ 내지 40℃에서 15 시간 내지 30 시간 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 것이 바람직하고, 20℃ 내지 30℃에서 20 시간 내지 25 시간 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0054] 상기 범위를 벗어나는 경우, 20℃ 및 15 시간 미만 이내일 경우, 라디칼 분해 반응 속도가 저하되는 문제점이 있고, 40℃ 및 30 시간 초과일 경우, 라디칼 분해 반응 속도가 너무 빠르게 일어나, 당화 물질의 수율이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 2)는 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합한 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시키는 단계이다.
- [0056] 상기 반응물을 100℃ 내지 200℃로 10분 내지 10 시간 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 것이 바람직하고, 130℃ 내지 160℃로 4 시간 내지 8 시간 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 것이 보다 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0057] 상기 범위를 벗어나는 경우, 100℃ 및 10분 미만 이내일 경우, 단당류와 유기산을 생성이 저하되는 문제점이 있고, 200℃ 및 10 시간 초과일 경우, 단당류와 유기산을 생성이 너무 빠르게 일어나, 당화 물질의 수율이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0058] 상기 단계는 1차 당화과정으로 다당류로 존재하던 물질이 완전히 다당류 및 이당류로 전환되었다.
- [0059] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 3)은 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합한 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시킨 반응물을 100℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성시키는 단계이다.
- [0060] 상기 단계는 2차 당화과정으로 당화를 보다 완전하게 증가시키고 유기산을 제거하여 순수한 당류를 얻을 수 있다.
- [0061] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 4)는 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합한 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시킨 반응물을 100℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성된 생성물을 증류하여 휘발성 분과 비휘발성분을 분리하는 단계이다.
- [0062] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 5)는 셀룰로오스(cellulose) 또는 알지네이트(alginate)를 물에 용해시켜 제조한 수용액에 라디칼 개시제 및 금속 촉매를 혼합한 혼합물을 10℃ 내지 40℃에서 방치하여 라디칼 분해 반응을 시킨 반응물을 100℃ 내지 300℃로 가열하여 단당류와 유기산을 생성된 생성물을 증류하여 휘발성 분과 비휘발성분을 분리하여 분리된 비휘발성분에 라디칼 소거제를 첨가하여 라디칼을 제거시켜서 당화물질을 제조하는 단계이다.
- [0063] 상기 라디칼 소거제는 라디칼을 흡수하여 휘발성 물질의 생성을 억제시킨다.

- [0064] 상기 라디칼 소거제는 하이드로퀴논(1, 4-C₆H₄(OH)₂), 아스코브린산(C₆H₈O₆, (5R)-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one), 카테콜(C₆H₆O₂, Benzene-1,2-diol), thiamine chloride(C₁₂H₁₇N₄ClN₄OS, 2-[3-[(4-Amino-2-methyl pyrimidin-5-yl) methyl]-4-methyl-thiazol-5-yl] ethanol) 및 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이나, 이에 한정하지 않는다.
- [0065] 상기 당화물질은 분자량이 1 내지 200 kDa인 저분자이다.
- [0066] 상기 당화물질은 글루코오스(Glucose) 또는 자일로오스(Xylose)인 것이나, 이에 한정하지 않는다.
- [0067] 또한, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 제공한다.
- [0068] 또한, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질에 발효 미생물을 첨가하여 발효시켜 에탄올을 제조하는 단계를 포함하는 바이오 에탄올의 제조방법을 제공한다.
- [0069] 아울러, 본 발명은 셀룰로오스 또는 알지네이트로부터 당화물질의 제조방법으로 제조된 라디칼이 소거된 당화물질을 포함하는 동물 사료용 조성물을 제공한다.
- [0070] 본 발명에서는 셀룰로오스 또는 알지네이트에 반응 개시제로 과산화수소 및 금속 촉매로 철을 혼합하여 상온에서 1차 라디칼 분해 반응을 시키고, 고온에서 2차 라디칼 분해 반응을 시킨 후에 라디칼 소거제를 첨가하면 글루코오스 또는 자일로오스를 포함하는 당화물질을 얻는 것을 목적으로 하며, 상기 당화물질에 미생물을 첨가하여 발효되므로 이를 이용하여 수율이 높은 바이오 에탄올 생산할 수 있다.
- [0071] 구체적으로, 다당류 고분자의 파괴는 과산화수소와 오존 등은 금속이온과 반응하여 발생하는 OH의 강력한 산화력으로서 유기물을 산화시키는 반응을 이용하는 것이다. 과산화수소는 일반적으로 약한 산성 상태로 공급되는데 이는 pH 6 이상에서는 분해가 많이 일어나고 pH가 상승함에 따라 분해속도가 증가하기 때문이다. 과산화수소의 주로 산화 반응에 사용되는데 흔히 발생기 산소 또는 활성을 가진 산소가 분자 안에 있기 때문이라고 생각하기 쉬우나 실제로 과산화수소의 분자 속에 두 산소 원자는 구별할만한 특이한 성질을 가지 않는다. 과산화수소와 오존의 반응성이 우수한 이유는 분자 속의 O-O 결합력이 약하기 때문이다. 그리고 유기화합물과의 반응에서는 무기화합물과의 반응과는 달리 약한 산화제로 작용한다. 과산화수소와 오존은 금속 촉매가 존재하면 O-O결합이 파괴되어 라디칼이 생성되므로 활성화되어 여러 물질을 산화 분해시킨다. 반응 경로와 생성되는 물질의 종류는 반응물의 조성과 특성에 따라 매우 다르며, 반응 pH와 사용된 촉매에 따라 같은 유기물이라 하여도 다른 결과를 나타내는 다양한 반응을 일으킨다. 특히 과산화수소는 비교적 독성이 없고, 취급이 용이하며 산화반응 중에 생성되는 부산물은 독성이 매우 낮기 때문에 환경적 측면에서 안전하다고 볼 수 있다. 또한 자연 분해되면 물과 산소로 되어 다른 산화제에 비하여 환경적 측면에서 안전하고, 사용이 간편하며, 선택적인 산화반응을 하는 장점을 가지고 있다. 과산화수소의 성질을 살펴보면, 산성용액에서 다음의 평형반응이 정방향으로만 진행되기 때문에 과산화 수소는 매우 안정하다.
- [0072]
$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{HOO}^- + \text{H}_2\text{O} \quad \text{-----} \quad (1)$$
- [0073] 더욱 과산화수소가 수소이온과 반응하여 옥소늄이 생성된다.
- [0074]
$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{HOOH}_2^+ \quad \text{-----} \quad (2)$$
- [0075] 이들 옥소늄 이온은 과산화수소 분자를 친전자성(electrophilic character)으로 만들어 과산화수소의 안정성을 높여준다. 용액 속에 산, 알코올 또는 케톤 같은 과산화 수소보다 더 친핵성(nucleophile) 물질들이 존재하면 양성자결합(protonation)이 이루어져 새로운 친전자성 중간체가 생성되고 이들은 다시 과산화 수소와 반응하게 되므로 과산화수소의 소모량을 증가시킨다.
- [0076] 알칼리 용액에서 과산화수소는 OH⁻와 반응하여 HO₂⁻ (perhydroxyl ion)를 생성한다.

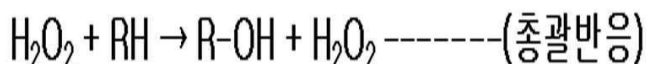
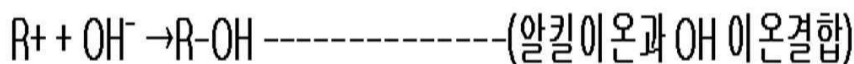
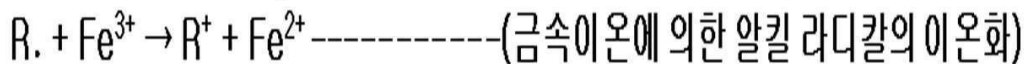
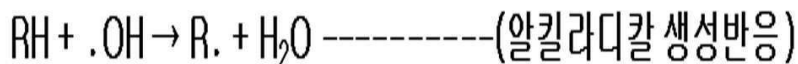
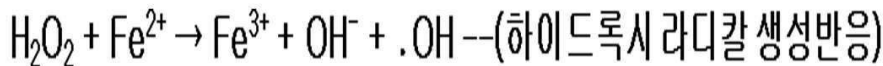
[0077] $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{HOO}^- + \text{H}_2\text{O}$ $\text{pk}=16.6$ (20°C) ----- (3)

[0078] 이 평형반응은 알칼리성이 증가할수록 진행되고, HOO^- 은 OH^- 보다 200배 이상으로 반응성이 우수하기 때문에 과산화 수소의 분해반응이 일어난다.

[0079] $\text{HOO}^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}^- + \text{O}_2$ ----- (4)

[0080] 그러므로 알칼리 용액에서 HOO^- 가 공격할 수 있는 유기물이 존재하면 위의 반응들의 경쟁적으로 일어나므로 과산화수소의 분해가 촉진된다. 한편 과산화수소는 산성이나 중성상태에서 낮은 산화 상태의 금속 이온이 존재할 때 자유 라디칼을 생성시키는 특성을 갖는다. 과산화수소가 활성화되면 OH^- 및 HO_2 이 형성되고 이들의 산화환원 전위는 2.8V로 매우 높아 친전자성 유기물을 산화 분해를 시킬 수 있다.

[0081] 셀룰로오스 또는 알지네이트는 분자량이 크고 글루코시딕 결합(glycosidic bonds)로 결합되어 있기 때문에 용이하게 분해되지 않는다. 이러한 고분자를 분해하기 위해서는 강력한 화학반응을 요구하는데 본 발명에서는 라디칼 반응을 일으키는 과산화수소 또는 오존과 같은 라디칼 생성제를 사용하고 라디칼의 생성과 높은 에너지를 갖는 화학종을 생산하는 역할로서 금속이온을 도입한다. 라디칼의 생성은 철 및 구리, 바나듐, 니켈, 마그네슘과 같은 전이금속 류와 은, 백금, 로듐, 팔라듐과 같은 귀금속염의 첨가에 의해 가속화된다. 라디칼 반응은 고분자 사슬을 파괴하는 동시에 알코올이 생성하는데 기여한다. 예를 들어 하기 화학반응식에서와 같이 과산화수소를 라디칼 개시제로 사용하였을 때 OH 라디칼이 생성되고 셀룰로오스 및 알지네이트의 고분자 사슬을 공격하여 알킬라디칼을 생성시키며 이는 OH^- 이온과 반응하여 알코올이 생성되는 것이다. 또한, OH^- 은 유기물과의 반응에서 친전자성을 가지므로 다당류중에 전자 공여체 그룹을 가진 화합물과의 반응이 훨씬 빨리 진행된다.



[0082]

[0083] <실시예 1> 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트로부터 당화 물질의 제조

[0084] <1-1> 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트 용액의 제조

[0085] Shin-Etsu Chemical에서 제조한 등급 SM-15, 분자량 40,000 내지 180,000, 분자식 $(\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5)_x$ 의 메틸셀룰로오스 (Methyl cellulose, Shin-Etsu Chemical 또는 Junsei에서 제조한 등급 EP, 분자량 446,400, $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6)_n$ 의 알제네이트(pristine sodium alginate) 270 ml를 사용하였다.

[0086] <1-2> 황산제이철 수용액의 제조

[0087] 상기 실시예 <1-1>의 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트 용액에 첨가할 0.0387몰(Mole) 황산제이철($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$)(쇼와화학주식회사)의 첨가량을 계산하기 위하여 황산제이철의 분자량 400 g/몰 곱하기 0.0387몰을 한 후 황산제이철의 밀도 3.097 g/cm³ 곱하기 황산제이철의 순도 0.8한 것으로 나눈 결과 6.3 ml이 요구되는 것을 확인하였

다. 이에 따라, 황산제이철 15.48 g을 1 L의 물에 녹인 후 6.3 ml을 취하여 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트 용액 270 ml에 첨가하였다.

[0089] <1-3> 과산화수소 수용액의 제조

[0090] 상기 실시예 <1-2>의 황산제이철을 첨가한 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트 용액에 첨가할 0.387몰(Mole) 30% 과산화수소(Hydrogen peroxide, H_2O_2 , 대정화금)의 첨가량을 계산하기 위하여 과산화수소의 분자량 34 g/몰 곱하기 0.387몰을 한 후 과산화수소의 밀도 1.463 g/cm^3 곱하기 과산화수소의 순도 0.3한 것으로 나눈 결과 30 ml이 요구되는 것을 확인하였다. 이때, 황산제이철(0.0387몰)은 과산화수소(0.387몰)와 1:10의 비율로 제조하였다.

[0091] <1-4> 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트를 이용한 당화 물질의 제조

[0092] 하기 [표 1]에서와 같이 메틸셀룰로오스 10% 내지 50% 중량 농도를 제조하기 위하여 25℃에서 메틸셀룰로오스 100 g과 증류수 900 mL를 혼합하면서 30% 과산화수소(H_2O_2)를 순차적으로 30분 간격으로 5회로 나누어 투입하고 여기에 황산제이철 $Fe_2(SO_4)_3$ 를 같은 비율로 나누어 순차적으로 투입하고 24시간 방치하였다.

표 1

메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도별 25℃에서 1차 당화 과정 투입 시약량 및 처리조건

메틸셀룰로오스 10 중량%	MC 100g + D.W 900mL + H_2O_2 111.2mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 23.3mL → 25℃에서 24시간 방치
메틸셀룰로오스 20 중량%	MC 200g + D.W 800mL + H_2O_2 111.2mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 23.3mL → 25℃에서 24시간 방치
메틸셀룰로오스 30 중량%	MC 300g + D.W 700mL + H_2O_2 242.2mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 51.6mL → 25℃에서 24시간 방치
메틸셀룰로오스 40 중량%	MC 400g + D.W 600mL + H_2O_2 555.5mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 116.5mL → 25℃에서 24시간 방치
메틸셀룰로오스 50 중량%	MC 500g + D.W 500mL + H_2O_2 777.7mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 163.1mL → 25℃에서 24시간 방치

[0094] <1-5> 회전식진공증류기에서 메틸셀룰로오스 또는 알제네이트를 이용한 당화 물질의 제조

[0095] 하기 [표 2]에서와 같이 상기 실시예 <1-4>에서 제조한 메틸셀룰로오스 10 중량% 내지 50 중량%를 25℃에서 처리한 물질을 회분식 반응기에 200 ml 투입하고 150℃에서 6시간 반응한 후 반응한 물질을 회전증발농축기에서 휘발 성분을 제거하였다. 상기 회전식진공증류기의 제조사는 부치(BUCHI)이고 모델명은 하기 [표 3]에 기재하였다.

표 2

메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도별 150℃에서 2차 당화 과정 처리조건

메틸셀룰로오스 10 중량%	MC 100g + D.W 900mL + H_2O_2 111.2mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 23.3mL → 24시간 상온방치 후 회분식반응기(Batch reactor)에서 150℃, 6시간 반응 후 회전증발농축기(Rotary Evaporator)에서 300mbar 감압하에서 잔유물 분
메틸셀룰로오스 20 중량%	MC 200g + D.W 800mL + H_2O_2 111.2mL + $Fe_2(SO_4)_3$ 23.3mL 24시간 상온방치 후 회분식반응기(Batch reactor)에서 150℃, 6시간 반응 후 회전증발농축기(Rotary Evaporator)에서 300mbar 감압하에서 잔유물 분석

메틸셀룰로오스 30 중량%	MC 300g + D.W 700mL + H ₂ O ₂ 242.2mL + Fe ₂ (SO ₄) ₃ 51.6mL →24시간 상온방치 후 회분식반응기(Batch reactor)에서 150℃, 6시간 반응 후 회전증발농축기(Rotary Evaporator)에서 300mbar 감압하에서 잔유물 분석
메틸셀룰로오스 40 중량%	MC 400g + D.W 600mL + H ₂ O ₂ 555.5mL + Fe ₂ (SO ₄) ₃ 116.5mL 24시간 상온방치 후 회분식반응기(Batch reactor)에서 150℃, 6시간 반응 후 회전증발농축기(Rotary Evaporator)에서 300mbar 감압하에서 잔유물 분석
메틸셀룰로오스 50 중량%	MC 500g + D.W 500mL + H ₂ O ₂ 777.7mL + Fe ₂ (SO ₄) ₃ 163.1mL 24시간 상온방치 후 회분식반응기(Batch reactor)에서 150℃, 6시간 반응 후 회전증발농축기(Rotary Evaporator)에서 300mbar 감압하에서 잔유물 분석

표 3

[0097]

Vacuum Controller(진공제어기)	BUCHI V-800
Rotavapor(농축장치)	BUCHI R-250
Heating Bath(온수조)	BUCHI B-490
Vacuum Pump(진공펌프)	BUCHI V-500
Constant Temperature Circulator(냉각장치)	Cole Parmer사

[0098]

<실험예 1> 메틸셀룰로오스 저온 당화 과정에 따른 성분 분석

[0099]

상기 실시예 <1-4>에서와 같이 메틸셀룰로오스 10 중량% 내지 50 중량%를 대상으로 과산화수소 및 철이온 존재 하에서 25℃로 하루 동안 방치하여 충분히 당화과정을 거친 물질을 분석하기 위하여 가스크로마토그래피질량분석기(gas chromatography mass spectrometry, GCMS)로 측정하였다.

[0100]

구체적으로, 가스크로마토그래피질량분석기는 시마즈(SHIMADZU)사의 모델명 GC-2010 및 GCMS-QP2010 plus였다. 컬럼 오븐 온도(Column Oven Temperature)는 80℃, 주입부 온도(Injection Temperature)는 220℃, 분열 비율(Split Ratio)은 100 : 1로 하여 총 측정 시간을 21분으로 하였다. 컬럼은 DB-5ms(methylpolysiloxane) Column(30m * 0.25mm * 0.25μm)를 이용하여 초기 온도 80℃에서 분당 10℃씩 240℃까지 승온하였고 마지막 유지 시간을 5분을 주어 총 측정 시간을 21분으로 하였다. 극성이 강한 당화물질을 효과적으로 분석하기 위하여 동결 건조한 시료에 TMS(N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane, Sigma-Aldrich)를 치환하여 분석하였다.

[0101]

그 결과, 메틸셀룰로오스 10 중량% 내지 50 중량%를 대상으로 과산화수소 및 철이온 존재하에서 25℃로 하루 동안 방치하면 하기 [표 4]에서와 같이 초산, 숙신산 및 글루코오스가 주생성물인 것을 확인하였다(도 4).

표 4

[0102]

메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도에 따른 25℃에서 24시간 방치 후 GC-MS 분석 결과

생성물질	Area(%)				
	메틸셀룰로오스 10 중량%	메틸셀룰로오스 20 중량%	메틸셀룰로오스 30 중량%	메틸셀룰로오스 40 중량%	메틸셀룰로오스 50 중량%
아세트산 (Acetic acid)	36.45	44.5	35.15	34.36	32.82
에탄이산 (Ethanedioic acid)	7.68	9.25	7.81	5.11	5.02
프로판 산 (Propanoic acid)	7.7	5.44	5.63	6.54	7.33
숙신산 (Succinic acid)	13.36	3.26	16.64	25.9	23.34
피라노오스 (Pyranose)	22.76	18.7	23.34	19.35	21.13
D-Ribose		3.73			

[0103] <실험예 2> 메틸셀룰로오스 고온 당화 과정에 따른 성분 분석

[0104] 상기 실시예 <1-5>에서와 같이 메틸셀룰로오스 10 중량% 내지 50 중량%를 대상으로 과산화수소 및 철이온 존재 하에서 25℃에서 처리한 물질을 150℃에서 2차 당화 과정을 거친 물질을 분석하기 위하여 가스크로마토그래피질량분석기(gas chromatography mass spectrometry, GCMS)로 측정하였다.

[0105] 구체적으로, 가스크로마토그래피질량분석기는 시마즈(SHIMADZU)사의 모델명 GC-2010 및 GCMS-QP2010 plus였다. 컬럼 오븐 온도(Column Oven Temperature)는 80℃, 주입부 온도(Injection Temperature)는 220℃, 분열 비율(Split Ratio)은 100:1로 하여 총 측정 시간을 21분으로 하였다. 컬럼은 DB-5ms(methylpolysiloxane) Column (30m * 0.25mm * 0.25μm)를 이용하여 초기 온도 80℃에서 분당 10℃씩 240℃까지 승온하였고 마지막 유지 시간을 5분을 주어 총 측정 시간을 21분으로 하였다. 극성이 강한 당화물질을 효과적으로 분석하기 위하여 동결 건조한 시료에 TMS(N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane, Sigma-Aldrich)를 치환하여 분석하였다.

[0106] 그 결과, 150℃에서 2차 당화과정을 거치면서 피라노오스 글루코오스가 77% 내지 85% 까지 증가하였으며 메틸셀룰로오스 20% 중량농도에서 가장 높은 85%의 농도를 보였다. 그 외에도 마누론산(Mannuronic acid)가 10% 내지 15% 생성되었다. 초산은 2.5%에서 7.5%로 메틸셀룰로오스 농도가 증가하면서 농도가 증가하였지만 25℃ 반응보다는 90%이하로 감소한 농도이다. 이러한 실험결과는 1차 당화과정에서 다당류로 존재하던 물질이 완전히 단당류 및 이당류로 전환되었고 초산 및 유기산이 증발농축기에 의하여 제거 되어진 결과이다. 따라서 당화를 보다 완전히 증가시키고 유기산을 제거하기 위해서는 150℃ 내외로 가열한 후 증류에 의하여 유기산을 제거하여 순수한 당류를 얻었다(도 5).

표 5

[0107] 메틸셀룰로오스(MC)의 중량농도별 150℃에서 2차 당화과정 처리 후 GC-MS 분석 결과

생성물질	구성비(%)				
	메틸셀룰로오스 10 중량%	메틸셀룰로오스 20 중량%	메틸셀룰로오스 30 중량%	메틸셀룰로오스 40 중량%	메틸셀룰로오스 50 중량%
피라노오스 D- 글루코스 (Pyranose D-glucose)	81.6	85.04	77.04	70.0	58.7
마누론산 (Mannuronic acid)	12.0	15.6	-	10.3	1.53
D-글루코스 (D-glucose)	-	-	10.87	-	-
아세트산 (Acetic acid)	2.55	4.62	4.44	6.25	7.45
탈로로스 (Talose)	-	-	-	-	10.19
글루콘산 (Gluconic acid)	-	-	-	0.43	8.97
프로판 산 (Propanoic acid)	1.2	1.3	2.27	2.13	2.81
프라노오스 (Furanose)	0.82	-	-	-	-
숙신산 (Succinic acid)	0.29	0.43	0.99	3.96	5.84

[0108] <실험예 3> 메틸셀룰로오스 당화과정에 따른 분자량 변화 분석

[0109] 메틸셀룰로오스를 과산화수소 및 철이온 존재 하에서 상온 반응에서 당화에 의한 생성물의 고분자 및 저분자 영역의 분자량 변화를 살펴보기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC, SHIMADZU)로 따른 표준 물질을 분석하였다.

[0110] 구체적으로, 비휘발성 성분 또는 열적으로 불안정한 물질을 쉽게 분리하기 위하여 사용된 고효율 액체 크로마토그래피 분석 장비는 SHIMADZU사의 UFLC를 사용하였다. 겔침투크로마토그래프(GPC)(미국, Waters Co.)를 사용하여 셀룰로오스 유도체의 평균분자량 및 다분산도를 측정하였으며, 저분자량 영역은 컬럼으로 Shodex Asahipak, GF-310 HQ R208052를 사용하고 고분자 영역은 Shodex Asahipak, GF-7M HQ H203203를 사용하였다. 즉, 셀룰로오스 유도체 용액을 0.1 %(w/v)로 희석하여 100 μ L 씩 시료 주입기로 컬럼에 주입한 후, 용매펌프를 이용하여 0.1 mol 질산나트륨 수용액을 용출속도 1.0 mL/min으로 조절하여 용출시켰다. 이동상과 셀룰로오스 유도체 용액은 0.45 μ m 막여과기(미국, Milipore Inc.)를 이용하여 여과한 후 사용하였으며, 용출피크는 굴절률 검출기(Shimadzu RI Detector: RID-10A)로 검출하였다. 분자량 표준품은 7.8×10^5 내지 5.9×10^3 분자량 범위의 일본 Showa Denko Co.의 Shodex standard P-82(pullulan)를 사용하였다. 당화물질을 분석할 때 하이드로퀴논을 0.5% 주입하여 라디칼을 소거한 후 분석하였는데 이는 분석시 라디칼의 반응을 억제하여 반응이 끝난 시점을 유지하였다.

[0111] 그 결과, 메틸셀룰로오스 중량농도 10%를 물에 용해시켰을 때 평균분자량은 3×10^6 달톤으로 분석되었다. 여기에 과산화수소 및 철이온 존재 하에서 25 $^{\circ}$ C반응에서 당화에 의한 생성물의 평균 분자량은 261 Da(달톤)으로 변화하여 완전한 저분자화가 이루어진 것으로 나타났으며 이러한 평균 분자량 값은 포도당과 같은 단당류가 갖는 분자량으로 볼 수 있다.

[0112] 따라서, 상기 <실험예 1>에서 분석한 물질들의 성분과 분자량이 잘 일치하는 것을 알 수 있다. 이러한 당화물질을 회분식 반응기에 넣고 150 $^{\circ}$ C에서 4시간 반응시키고 휘발성분을 제거한 잔유물의 경우 평균 분자량은 187이며 다양한 피크가 나타난 것으로 보아 포도당 및 유기산에 의한 피크이며 이들 물질의 평균 분자량인 것으로 확인하였다(도 6 및 도 7).

표 6

[0113] 고분자 영역의 분자량에 따른 표준물질 분석 결과

	시간(분)	분자량
1	10.874	805,000
2	11.504	366,000
3	12.147	210,000
4	12.838	113,000
5	13.614	48,800
6	14.470	21,700
7	15.366	10,000
8	15.978	6,000
9	17.441	1,320
10	18.359	342

표 7

[0114] 저분자 영역의 분자량에 따른 표준물질 분석 결과

	시간(분)	분자량
1	13.120	21,700
2	14.484	10,000
3	15.400	6,000
4	17.834	1,320

[0115] <실험예 4> 메틸셀룰로오스 농도별 분자량 변화 분석

[0116] <4-1> 글루코오스의 검량선 작성

[0117] 25℃에서 메틸셀룰로오스 중량 농도별 당화 처리한 물질과 150℃에서 당화처리한 물질에 대하여 분자량 변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질에 기인하는지 확인하기 위하여 글루코오스를 농도별로 제조하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 젤 투과(gel permeation) 컬럼을 이용하여 글루코오스의 검량선을 작성하여 하기 [표 8]에 나타내었다(도 9 및 도 10).

표 8

[0118] D-(+)-글루코오스의 검량선

시료	농도(g/L)	면적	분자량
표준 1	0.1 g/L	79,553	241
표준 2	0.2 g/L	95,251	266
표준 3	0.5 g/L	380,988	235
표준 4	1.0 g/L	840,661	242

[0119] <4-2> 자일로오스의 검량선 작성

[0120] 25℃에서 메틸셀룰로오스 중량 농도별 당화 처리한 물질과 150℃에서 당화처리한 물질에 대하여 분자량 변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질에 기인하는지 확인하기 위하여 자일로오스를 농도별로 제조하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 젤 투과(gel permeation) 컬럼을 이용하여 자일로오스의 검량선을 작성하여 하기 [표 9]에 나타내었다(도 11 및 도 12).

표 9

[0121] 자일로오스의 검량선

시료	농도(g/L)	면적	분자량
표준 1	0.1 g/L	72,004	209
표준 2	0.3g/L	218,077	208
표준 3	0.5 g/L	362,856	202
표준 4	0.7g/L	505,967	201
표준 5	1.0 g/L	736,415	202

[0122] <4-3> 글루코오스 및 자일로오스 혼합물의 검량선 작성

[0123] 25℃에서 메틸셀룰로오스 중량 농도별 당화 처리한 물질과 150℃에서 당화처리한 물질에 대하여 분자량 변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질에 기인하는지 확인하기 위하여 글루코오스 및 자일로오스 혼합물을 농도별로 제조하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 젤 투과(gel permeation) 컬럼을 이용하여 글루코오스 및 자일로오스 혼합물의 검량선을 작성하여 하기 [표 10]에 나타내었다(도 13).

표 10

[0124] 글루코오스와 자일로오스의 혼합물 검량선

시료	농도(g/L)	면적	분자량
글루코오스(Glucose)	0.1 g/L	79,553	241
	0.5 g/L	380,988	235
	1.0 g/L	840,661	242
자일로오스(Xylose)	0.1 g/L	72,004	209
	0.5 g/L	362,856	202
	1.0 g/L	736,415	202

[0125] <4-4> 락토오스의 검량선 작성

[0126] 25℃에서 메틸셀룰로오스 중량 농도별 당화 처리한 물질과 150℃에서 당화처리한 물질에 대하여 분자량 변화를 측정하고 각각의 피크가 어떤 물질에 기인하는지 확인하기 위하여 락토오스를 농도별로 제조하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 젤 투과(gel permeation) 컬럼을 이용하여 락토오스의 검량선을 작성하여 하기 [표 11]에 나타내었다(도 14 및 도 15).

표 11

[0127] 락토오스의 검량선

시료	농도(g/L)	면적	분자량
표준 1	1 g/L	770,249	264
표준 2	3g/L	2,277,723	285
표준 3	5 g/L	3,979,399	285

[0128] <4-5> 저온 당화과정을 거친 제조물의 분자량 분석

[0129] 25℃ 당화과정을 거친 제조물을 분석하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC) 젤 투과법을 이용하여 분자량을 분석하였다.

[0130] 구체적으로, 25℃에서 반응하고 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 굴절률 검출기(RI Detector)를 장착하여 젤 투과(gel permeation) 컬럼으로 분자량을 분석하였다.

[0131] 구체적으로, 25℃에서 메틸셀룰로오스와 증류수를 혼합하면서 30% 과산화수소(H₂O₂)를 순차적으로 투입하고 여기에 황산제이철 Fe₂(SO₄)₃를 같은 비율로 나누어 순차적으로 투입하고 24-48시간 동안 방치하였다. 24 내지 48시간 동안 25℃에서 반응한 용액을 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 굴절률 검출기(RI Detector)를 장착하여 젤 투과(gel permeation) 컬럼으로 분자량을 분석하였다.

[0132] 그 결과, 하기 [표 12]과 같은 25℃ 당화 처리과정에서 제조한 물질에 대하여 분자량 별로 분석을 실시한 결과를 나타내었다. 메틸셀룰로오스(MC) 10 중량%의 수평균분자량은 484, 20 중량%는 367, 30중량%는 700, 40 중량%는 413, 50 중량%는 525로 분석이 되었다. 머무름 시간 22 내지 28분 사이, 머무름 시간 30 내지 36분 사이에서 각각의 크고 작은 피크가 나타나는데 이는 아직 고분자인 셀룰로오스가 분해되지 않은 상태로 머무름 시간 22 내지 28분 사이에 나타난 피크의 분자량은 약 2500 내지 1500이며, 머무름 시간 30 내지 36분 사이에 나타난 피크의 분자량은 약 1000 내지 500 정도이다. 약 40분의 머무름 시간에는 분자량이 250 내지 100으로 자일로오스나 글루코오스 등의 단당류나 퓨라노오스, 피라노오스류의 물질들이 미량 검출되었고, 그 외에 유기산과 상대적으로 단당류 및 다당류보다 질량이 큰 물질들이 분석되었다(도 16).

표 12

[0133] 메틸셀룰로오스의 25℃ 당화 과정 후 분자량 분포

	머무름시간 (분)	23	24	25	27	29	32	40	합계
MC 10중량%	분율	-	-	6.9%	0.5%	0.5%	84.8%	7.2%	100%
	분자량	-	-	1,626	1,185	910	526	183	-
MC 20중량%	분율	2.2%	22.7%	-	-	2.3%	50.6%	22.2%	100%
	분자량	2,375	1,941	-	-	1,023	633	181	-
MC 30중량%	분율	16.2%	-	7.9%	-	29.9%	33.2%	12.8%	100%
	분자량	2,075	-	1,622	-	1,058	729	219	-
MC 40중량%	분율	0.7%	11.9%	-	14.0%	0.4%	43.3%	29.8%	100%
	분자량	2,338	1,966	-	1,148	961	647	212	-

MC	분율	12.0%	-	9.2%	25.8%	5.5%	28.6%	18.9%	100%
50중량%	분자량	2,032	-	1,497	1,123	898	677	206	-

[0134] <4-6> 고온 당화과정을 거친 제조물의 분자량 분석

[0135] 25℃ 당화과정을 거친 제조물을 분석하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC) 젤 침투법을 이용하여 분자량을 분석하였다.

[0136] 구체적으로, 25℃에서 반응하고 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 굴절률 검출기(RI Detector)를 장착하여 젤 투과 컬럼으로 분자량을 분석하였다.

[0137] 구체적으로, 25℃에서 메틸셀룰로오스와 증류수를 혼합하면서 30% 과산화수소(H₂O₂)를 순차적으로 투입하고 여기에 황산제이철 Fe₂(SO₄)₃를 같은 비율로 나누어 순차적으로 투입하고 24-48시간 동안 방치하였다.

[0138] 25℃에서 반응 후 회분식반응기에서 150℃로 6시간 당화처리 과정을 거친 메틸셀룰로오스(MC)를 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 굴절률 검출기(RI Detector)를 장착하여 젤 투과(gel permeation) 컬럼으로 분자량을 분석하였다.

[0139] 그 결과, 하기 [표 13]과 같은 150℃ 당화 처리과정에서 제조한 물질에 대하여 분자량 별로 분석을 실시한 결과를 나타내었다. 메틸셀룰로오스(MC) 10 중량%의 수평균분자량은 160, 20 중량%는 161, 30 중량%는 152, 40 중량%는 133, 50 중량%는 99으로 분석이 되었다. 또한, 각각의 물질이 당화과정을 거쳐서 생성되는 물질들을 보면 외부표준법에 의해 분석한 결과 머무름 시간 40 내지 44분에서 주로 피크가 나타나며, 이 피크들의 분자량은 약 250 내지 100으로 락토오스, 자일로오스, 글루코오스 등 단당, 이당, 다당 종류의 물질들로 분석되었다. 이러한 결과로부터 1차 및 2차 당화과정을 통하여 단당류가 생성됨을 확인하였다(도 17).

표 13

[0140] 메틸셀룰로오스의 150℃ 당화 처리 후 분자량 분포

	머무름시간 (분)	33	36	39	40	41	42	44	44	합계
MC	분율	-	-	9.1%	40.9%	11.3%	26.1%	-	12.7%	100%
10중량%	분자량	-	-	245	207	179	154	-	80	-
MC	분율	-	-	-	50.2%	11.9%	25.1%	-	12.8%	100%
20중량%	분자량	-	-	-	212	182	157	-	81	-
MC	분율	1.4%	0.7%	-	30.9%	-	51.6%	-	15.5%	100%
30중량%	분자량	612	391	-	213	-	162	-	81	-
MC	분율	2.2%	1.2%	-	29.1%	-	34.8%	7.8%	24.9%	100%
40중량%	분자량	598	365	-	211	-	156	114	80	-
MC	분율	-	-	4.0%	45.4%	-	34.3%	-	16.3%	100%
50중량%	분자량	-	-	285	206	-	152	-	76	-

[0141] <실험예 5> 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)의 저분자화 분석

[0142] 반응시간에 따른 카르복시메틸셀룰로오스의 저분자화에 따른 분자량과 점도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 회분반응기를 이용하여 측정하였다.

[0143] 구체적으로, 중량비로 카르복시메틸셀룰로오스 10%를 물에 녹인 수용액 270 mL와 황산제이철(Fe₂(SO₄)₃) 6.3 mL, 과산화수소(H₂O₂) 30 mL을 회분식반응기의 반응용기에 넣 150℃에서 반응시켰다.

[0144] 그 결과, 반응 개시 후 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 및 3.0 시간으로 변화시키면서 반응시킨 결과 반응 전 800 kDa의 고분자 카르복시메틸셀룰로오스의 분자량이 반응 시작 0.5 시간 만에 15.9 kDa으로 급속도로 저분자화가 진행되었고 에탄올이 생성되었으며 용액의 점도도 55.4cP에서 14.3cP로 급격히 감소하였다. 하기 [표 1

4]에 나타낸 바와 같이 고분자의 분해반응이 반응시간 30분 후에 90%이상 진행됨을 의미하며 분해된 카르복시메틸셀룰로오스로부터 에탄올과 같은 저분자 당화 물질이 생성되었으며, 반응시작 2시간 이후에는 점도 변화 및 분자량의 없는 것으로 보아 고분자 분해반응은 종결되었다.

표 14

[0145] 카르복시메틸셀룰로오스의 반응시간에 따른 점도 및 분자량의 변화

반응시간(시간)	0	0.25	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3	3.5
점도 (cP)	55.4	25.3	14.3	10.8	5.2	0.53	0.35	0.35	0.35
분자량(kDa)	800	20	15.9	9.8	1	0.1	0.1	0.1	0.1

[0146] <실험예 6> 알지네이트의 당화 과정 분석

[0147] 알지네이트에 과산화 수소와 금속촉매를 넣어 당화 물질 생성 과정을 분석하였다.

[0148] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서와 같이 알지네이트 10% 중량농도를 수용액 270mL와 과산화수소 30% 100mL에 0.387몰/리터의 황산제이철 20mL를 첨가하면서 용해시킨 후 24시간 방치후 회분식 반응용기에 넣고 반응온도는 150℃로 6시간 반응시키면서 분자량을 측정하였다. 반응 시간을 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 시간으로 변화시키면서 반응시켰다.

[0149] 그 결과, 하기 [표 15]에 나타난 바와 같이 반응 전 450 kDa의 고분자 알지네이트의 분자량이 반응 시작 0.5 시간 만에 15.9 kDa으로 급속도로 저분자화가 진행되었고, 3 시간 만에 2.4 kDa정도까지 완만하게 진행됨을 확인할 수 있었다.

표 15

[0150]

	과산화수소(30%) 투입량	시간(hr)	분자량 (kDa)	점도 (cP)	수율(%)
알지네이트 시료	-	-	450	6.44	
과산화수소 투입량	10	0.5	116	1.9	64
	20	0.5	114	1.9	78
	30	0.5	100	1.7	84
	30	1	1.3	1.2	93
	30	2	0.1	0.93	96

[0151] <실험예 7> 라디칼 소거물질 투입에 의한 라디칼 소거 유무 실험

[0152] 라디칼 소거물질 투입에 의한 라디칼 소거 유무를 확인하기 위하여 당화물질에 라디칼 소거제를 투입하여 온도에 따라 반응을 분석하였다.

[0153] 구체적으로, 하이드로퀴논($1, 4-C_6H_4(OH)_2$), 아스코브린산($C_6H_8O_6$, (5R)-[(1S)-1,2 -dihydroxyethyl] -3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one), 카테콜($C_6H_6O_2$, Benzene- 1,2-diol), thiamine chloride($C_{12}H_{17}N_4ClN_4OS$, 2-[3-[(4-Amino-2-methyl pyrimidin-5-yl) methyl] -4-methyl-thiazol-5-yl] ethanol), DPPH (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl)등을 1차 및 2차 당화물질에 대하여 0.1%에서 5%까지 투입하여 용해시킨 후 회전증발농축기를 이용하여 반응온도 90 내지 150℃까지 변화시키면서 반응 유무를 관찰하였다.

[0154] 그 결과, 라디칼 소거제를 투입한 경우 휘발성 물질이 생성되지 않았다. 이는 라디칼이 라디칼 소거제에 의하여 흡수되어 더 이상의 라디칼 반응을 진행하지 않은 결과 때문이다. 또한, DPPH의 경우 라디칼 존재하에서는 용액이 보라색을 유지하고 라디칼이 소거된 후에는 무색으로 변하기 때문에 라디칼 소거 반응을 육안으로 확인하거나 자외선-가시광선 분광흡수계(UV-VISIBLE)를 이용하여 520 nm 부근의 흡수 영역 대 유무로 라디칼의 제거 여부를 확인할 수 있다.

[0155] <실험예 8> 라디칼이 소거된 당화물질에 대한 균주 성장실험

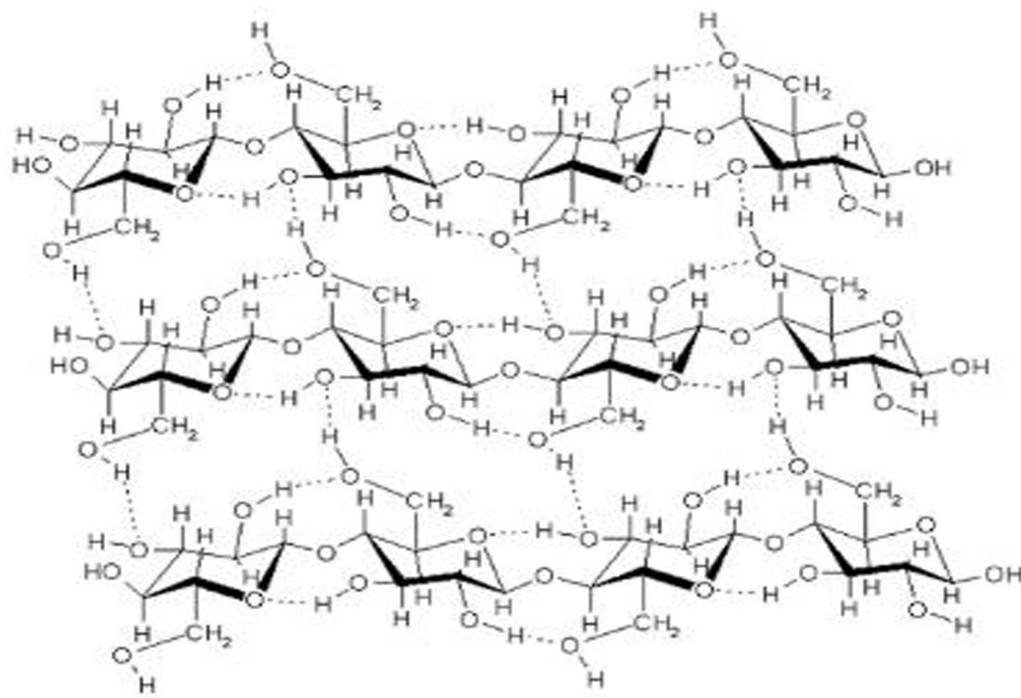
[0156] 메틸셀룰로오스가 라디칼 촉매반응에 의하여 분해된 후 미생물의 성장 유무 관찰을 통한 발효 가능성을 실험하였다.

[0157] 구체적으로, 기존의 미네랄 배지(Mineral Medium) 조성에 들어있는 글루코오스 표준물질과 메틸셀룰로오스 중량 농도 20%를 상온에서 저분자화된 것과 이 저분자화 된 것을 다시 회분식 반응기에서 온도를 높여 반응 한 후 회진 증류기에서 응축분을 제외한 잔류물을 균수측정장치(Bioscreen C)를 이용하여 균을 배양시켜 비교하였다. 기존의 배지조성에 맞게 글루코오스와 메틸셀룰로오스는 최종 함량은 0.4%로 동일하게 유지하였다. 아직 라디칼이 남아있는 메틸셀룰로오스 반응물은 라디칼 소거제인 아스코르빈산을 메틸셀룰로오스 함량 대비 5%를 첨가하였고 라디칼이 소거된 후 *saccharomyces cerevisiae*(맥주발효균)을 접종하고 25℃에서 2일 동안 배양하였다.

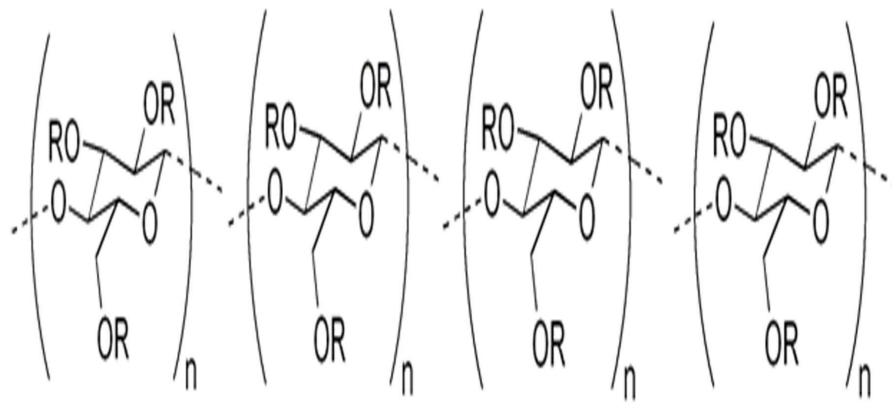
[0158] 그 결과, 균 배양 결과 기존 배지 조성에 있는 글루코오스와 비슷하게 메틸셀룰로오스 반응물도 균이 성장함을 확인하여 당화물질이 발효된 것을 확인하였다(도 18 및 도 19).

도면

도면1

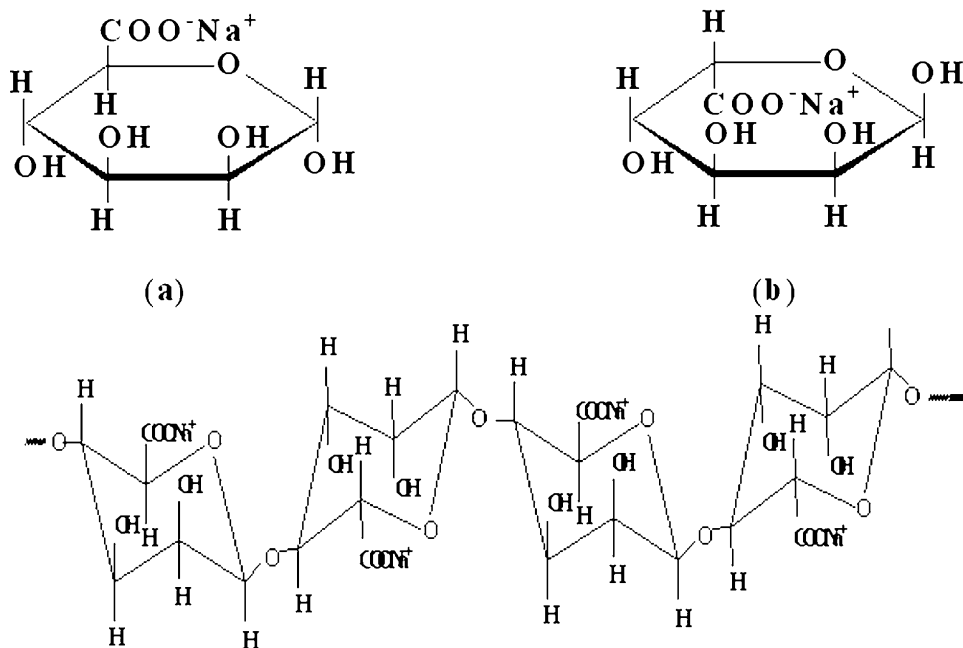


도면2



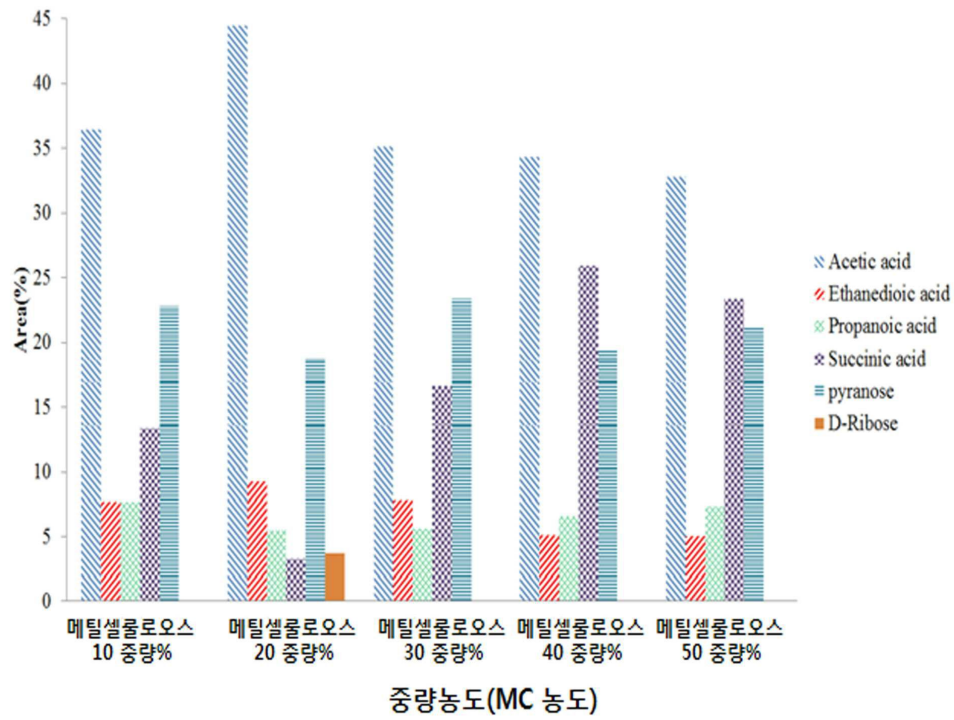
$R = H \text{ or } CH_3$ $R = H \text{ or } CH_2CO_2H$ $R = H \text{ or } CH_2CH_2OH$ $R = H \text{ or } CH_2CH(OH)CH_3$
 Methyl cellulose carboxyl methyl cellulose(CMC) Ethyl cellulose Hydroxypropyl cellulose

도면3

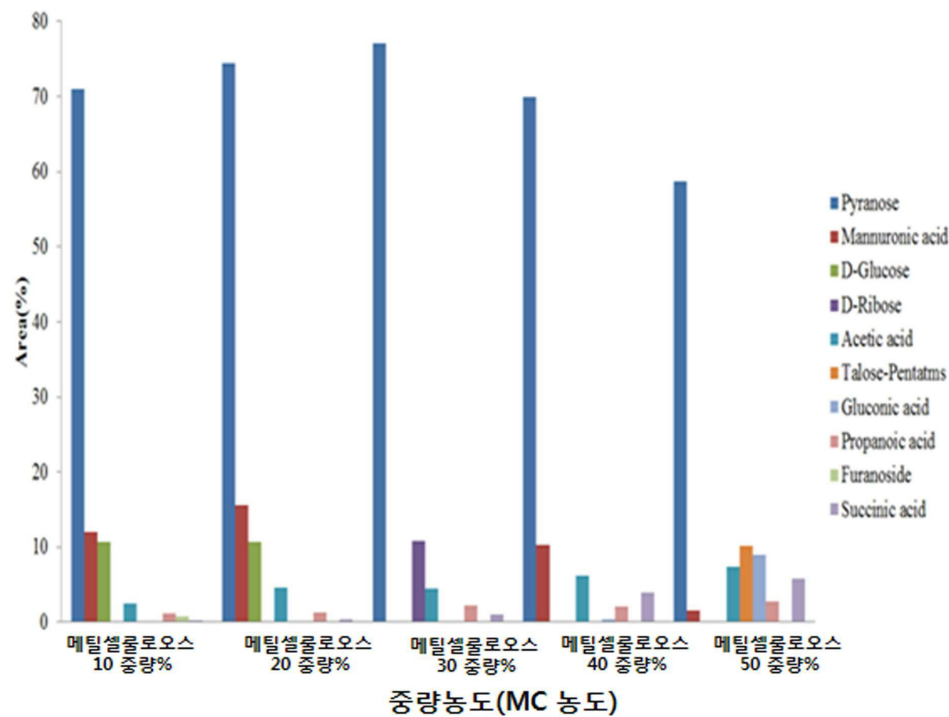


(a) β -D-mannuronate [M] , (b) α -L-guluronate [G]

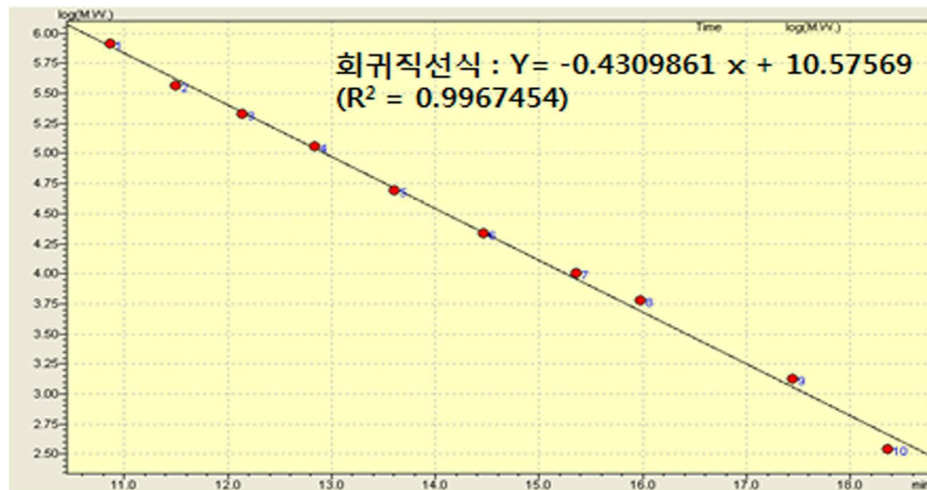
도면4



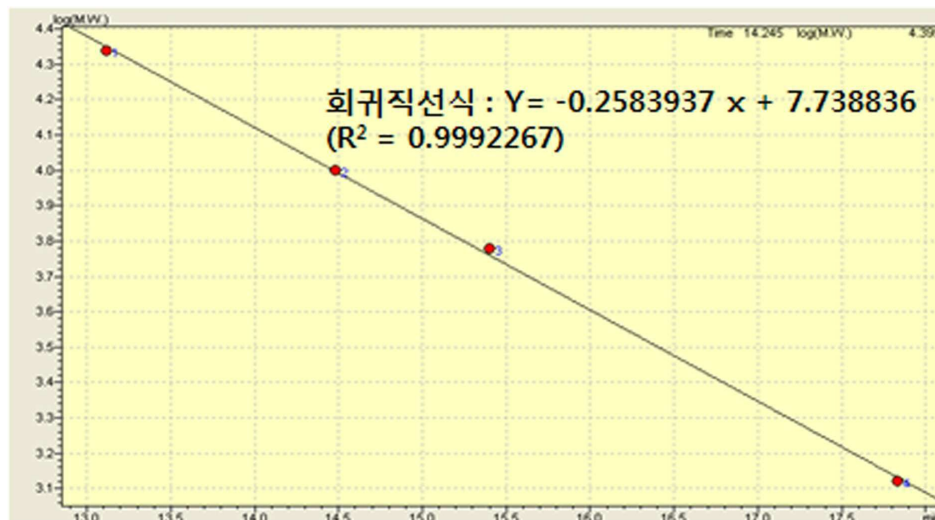
도면5



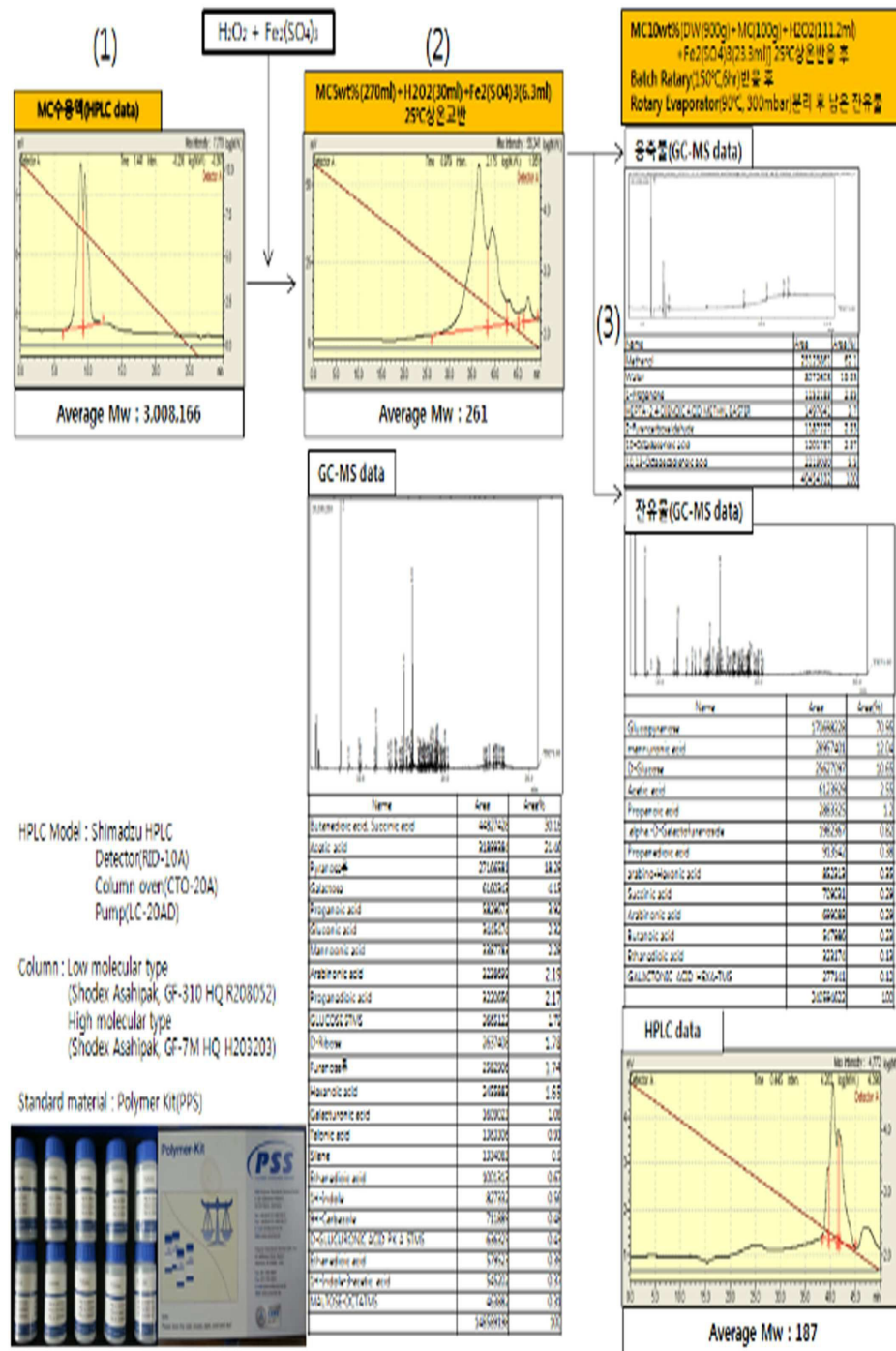
도면6



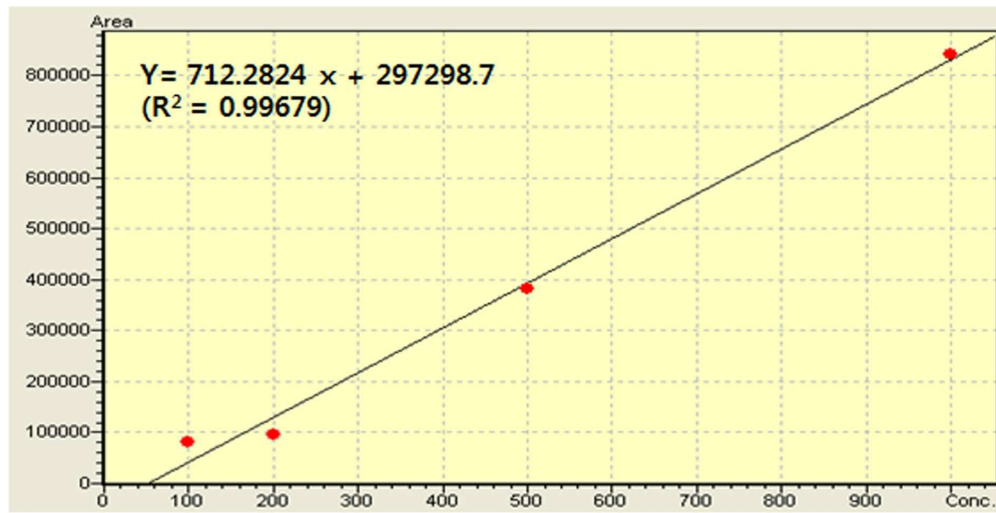
도면7



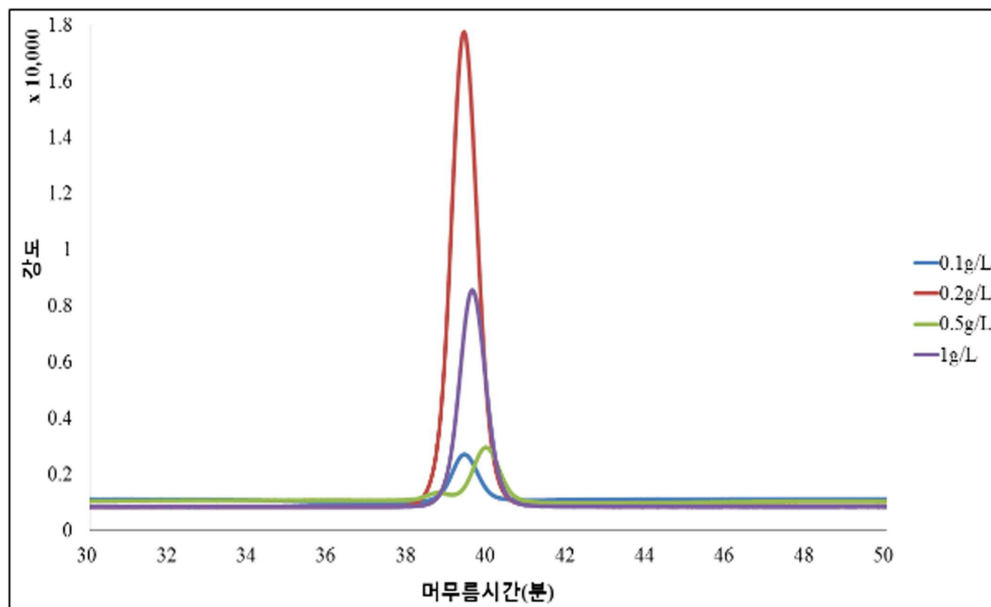
도면8



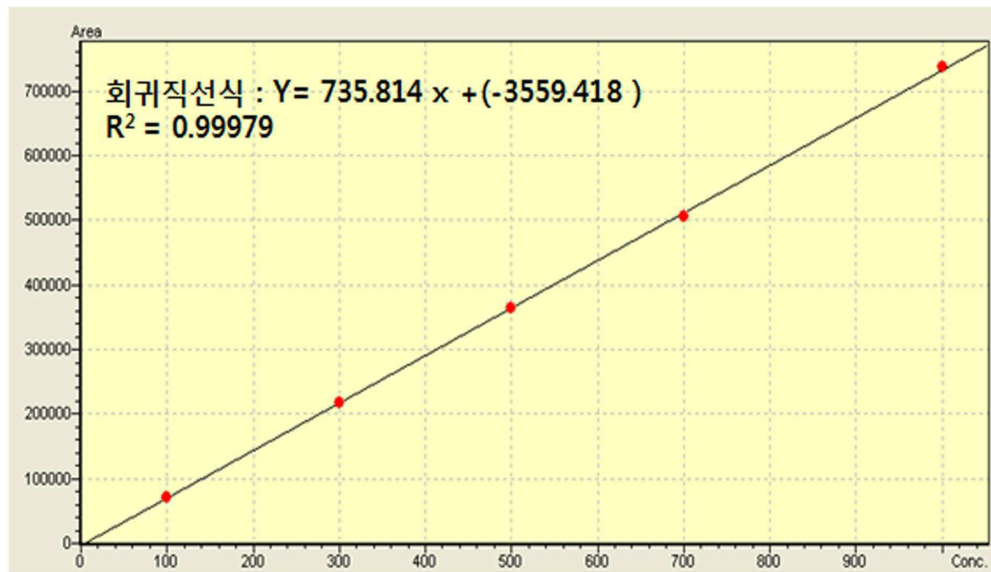
도면9



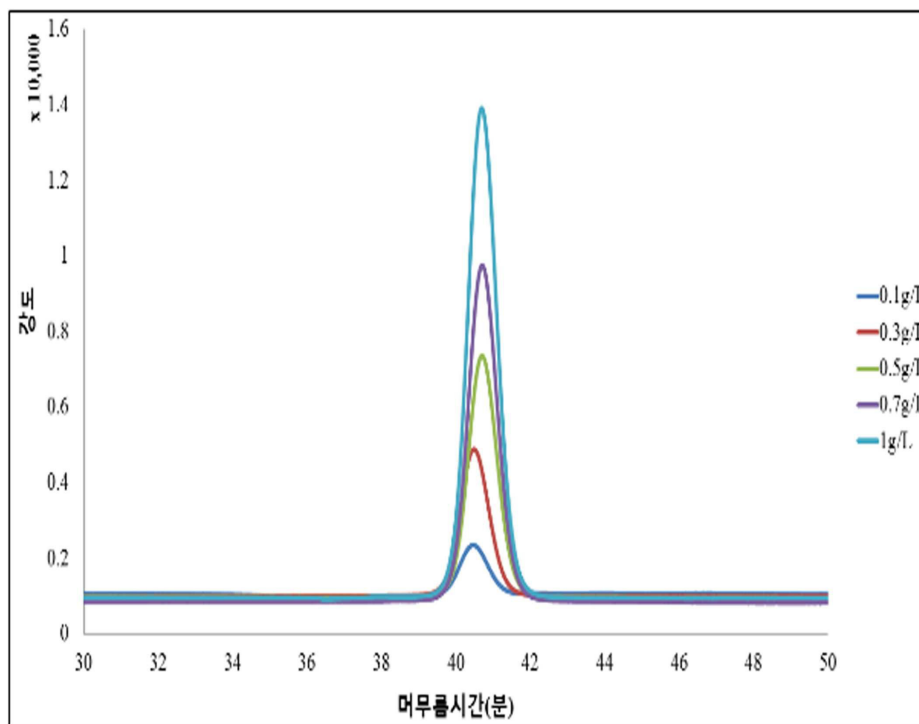
도면10



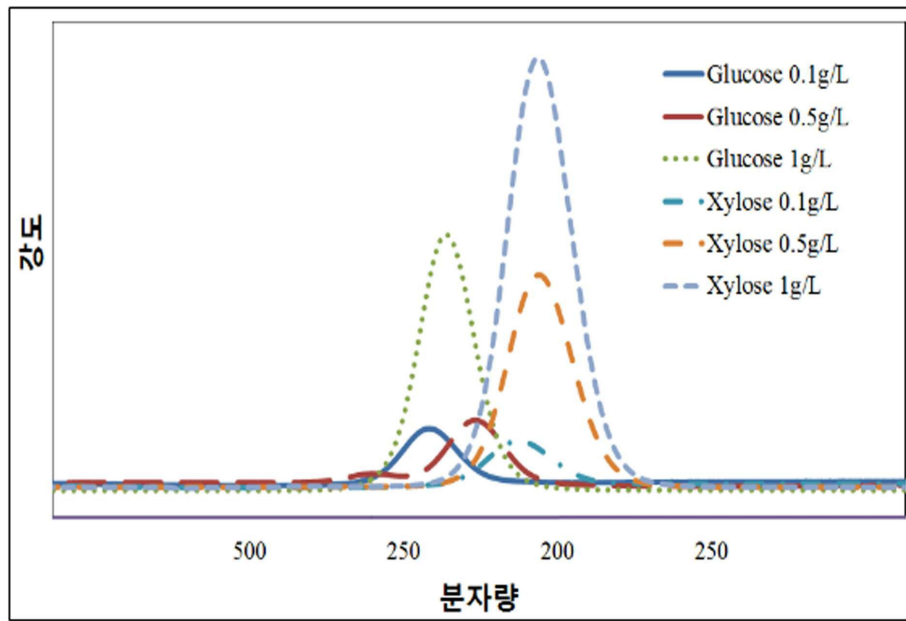
도면11



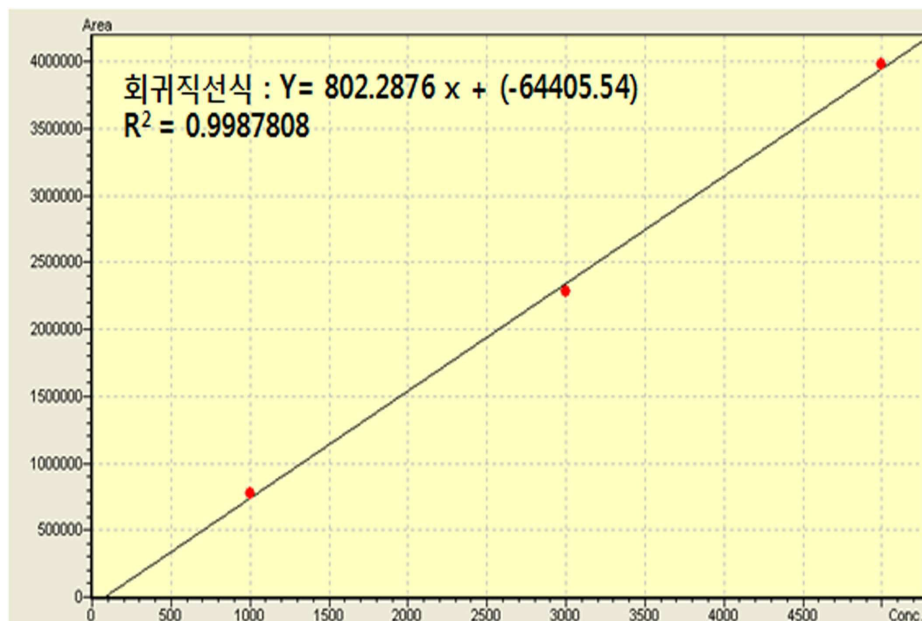
도면12



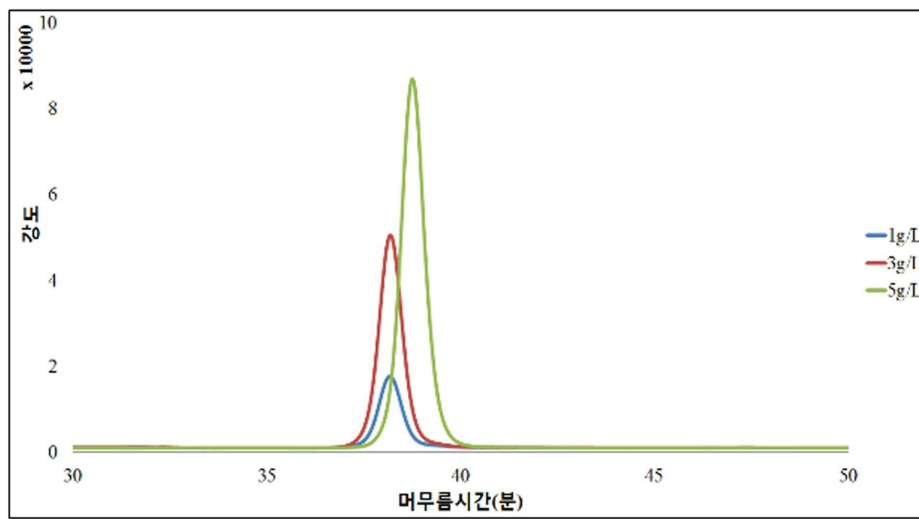
도면13



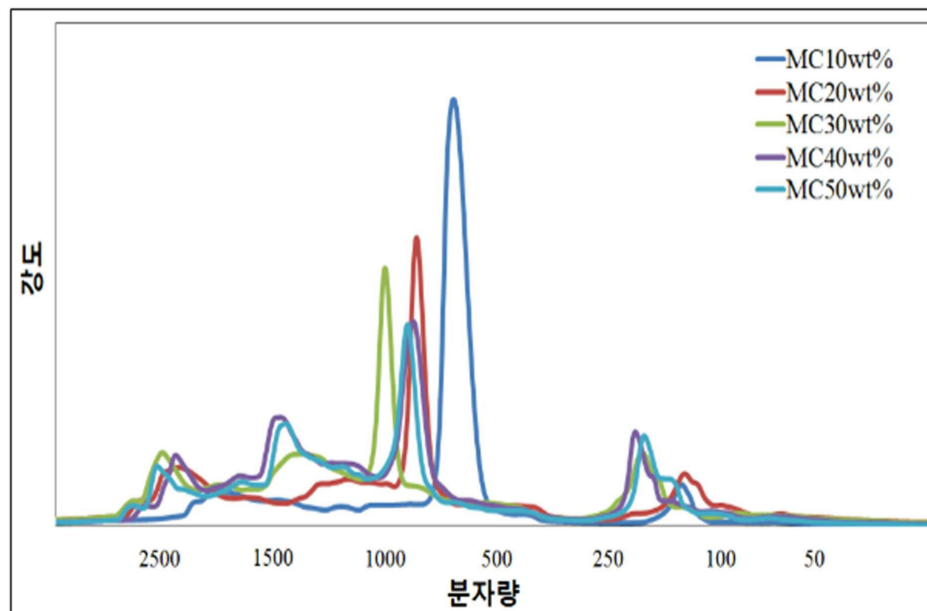
도면14



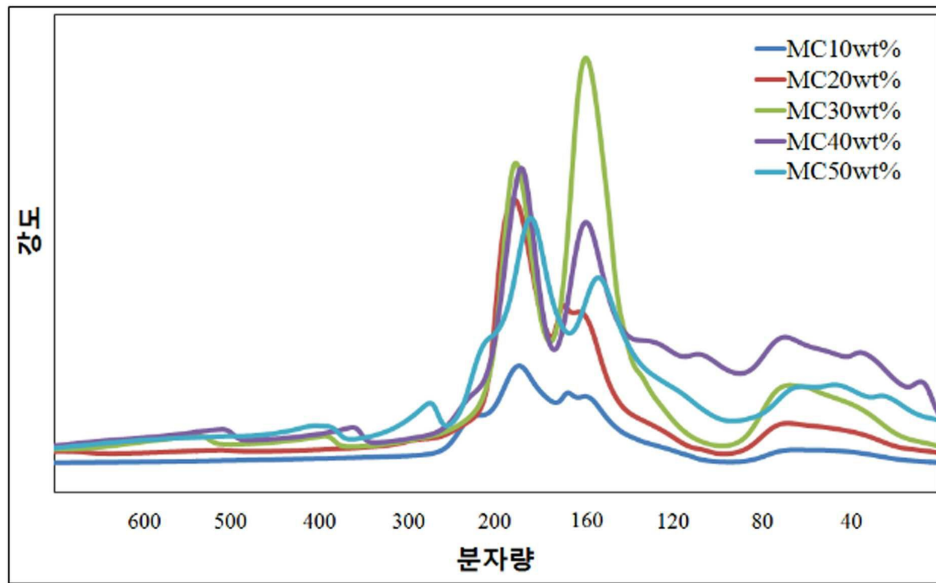
도면15



도면16



도면17



도면18

Mineral Medium	
M9 salt solution (10X)	10mL 첨가
1M MgSO ₄	0.1mL 첨가
1M CaCl ₂	0.03mL 첨가
biotin (1mg/mL)	0.1mL 첨가
thiamin (1mg/mL)	0.1mL 첨가
trace elements solution (100X)	1mL 첨가
① 20% glucose (0.4%)	2mL

↓ mineral medium에 ①, ②, ③을 각각 넣어 100mL 삼각플라스크에 제조 ↓ Ascorbic acid 0.1g 첨가 ↓ Saccharomyces cerevisiae (막주발효균) 접종	
---	--

① 20% glucose	2mL		① ~ ③이 780μL + saccharomyces cerevisiae 20μL ↓ 에핀노드튜브에서 혼합 ↓ 플레이트에 각각 200μL씩 주입 ↓ Bioscreen C (균수측정장치)에 넣고 25°C에서 2일 동안 배양
② MC 20wt% (MC 200g + DW 800mL + H ₂ O) 111.1mL + Fe ₂ (SO ₄) ₃ 23.3 mL → 상온반응	2g	Ascorbic acid 0.1g	
③ MC 20wt% (MC 200g + DW 800mL + H ₂ O) 111.1mL + Fe ₂ (SO ₄) ₃ 23.3 mL → 상온반응 → Batch reactor 150°C, 6hr → Rotary Evaporator 90°C, 30 0mbar 진류물	2g	Ascorbic acid 0.1g	

도면19

