



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0000917
(43) 공개일자 2018년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 19/02 (2006.01) C07H 1/08 (2006.01)

C12P 19/20 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 19/02 (2013.01)

C07H 1/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0079206

(22) 출원일자 2016년06월24일

심사청구일자 2016년06월24일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

한인섭

서울특별시 서초구 효령로45길 7, 501호(서초동, 서초동아아파트)

김승리

경상남도 양산시 하북면 신평5길 6, 나동 908호(초원아파트)

(74) 대리인

위병갑

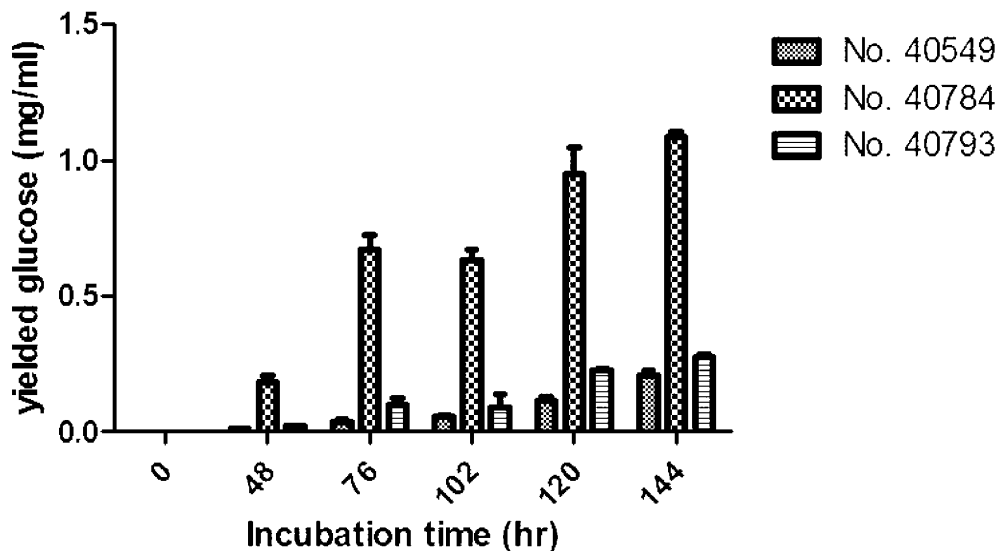
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 배추 폐기물로부터 포도당을 생산하는 방법 및 포도당을 포함하는 미세조류 배양액

(57) 요약

본 발명은 배추 폐기물로부터 포도당을 생산하는 방법 및 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 수득한 효소 가수분해물을 포함하는 미세조류의 바이오디젤 생산용 배양액에 대한 것으로, 구체적으로는 *Trichoderma harzianum*으로부터 유래된 셀룰라아제(cellulase)를 이용하여 배추 폐기물을 효소 가수분해함으로써 포도당을 생산하여, 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산 비용을 크게 절감할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/20 (2013.01)

C12P 7/649 (2013.01)

C12Y 302/01004 (2013.01)

Y02E 50/13 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

배추 폐기물을 분쇄한 후 황산을 처리하는 단계; 및

상기 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 효소 가수분해하는 단계

를 포함하는 포도당의 생산 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 황산은 0.2~0.6%의 농도로 처리하는 것인, 포도당의 생산 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 셀룰라아제는 *Trichoderma harzianum*를 25~30℃, 100~150 rpm 및 pH 6~7의 조건 하에서 배양하여 수득한 것인, 포도당의 생산 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 셀룰라아제의 활성도는 0.3~0.5 FPU/ml인 것인, 포도당의 생산 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 셀룰라아제는 0.15~0.4 FPU/ml의 투입량으로 처리되는 것인, 포도당의 생산 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 효소 가수분해는 pH 5 및 40~50℃의 온도 범위에서 실시되는 것인, 포도당의 생산 방법.

청구항 7

황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 수득한 효소 가수분해물을 포함하는 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 효소 가수분해물은 포도당을 포함하는 것인, 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 배양액은 상기 포도당을 20%(v/v) 이하의 농도로 포함하는 것인, 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액.

청구항 10

제 7 항의 바이오디젤 생산용 배양액 내에서 미세조류를 배양한 후 배양액으로부터 지질과 지방산을 추출 및 분리하는 것을 포함하는, 바이오디젤의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배추 폐기물로부터 포도당을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 포도당을 포함하는 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액에 대한 것으로, 구체적으로는 *Trichoderma harzianum*으로부터 유래된 셀룰라아제(cellulase)를 이용하여 배추 폐기물을 효소 가수분해함으로써 포도당을 생산하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 석유 연료는 오래전부터 고갈이라는 경고를 받아왔다. 고갈될 석유연료를 대신할 수 있는 것이 바이오 연료이다. 특히 미세조류를 통해 생산되는 바이오 연료는 연료사용으로 배출되는 온실가스인 이산화탄소배출량을 저감할 수 있어 지구온난화의 가속화를 저지할 수 있으며 생산과 유통에 들어가는 비용을 절감할 수 있어 많은 연구가 진행되고 있다.

[0003] 바이오 연료는 미생물의 당 발효를 통해 생산된다. 자연으로부터 당 생산은 바이오 연료 생산 비용을 절감할 수 있어 리그노셀룰로스성 바이오매스의 셀룰로오스의 효소분해를 통해 당을 생산하는 방법이 세계적으로 통용되고 있다. 하지만, 대부분의 리그노셀룰로스성 바이오매스는 효소분해가 어려운 리그닌, 헤미셀룰로오스, 셀룰로오스가 복합적 구성을 이루고 있으므로 단순한 방법으로는 효율적으로 바이오 연료를 생산하기 어렵다. 이에 따라, 바이오매스의 전 처리 과정, 효소처리, 그리고 당 발효과정을 필요로 한다.

[0004] 바이오매스의 전 처리 과정은 회석 산, 알칼리, 과산화수소 등 다양한 방법이 존재한다. 그 중 회석 산을 이용한 방법은 소량의 산이 사용되기 때문에 공정 시 비용이 저렴하고 전 처리에 효과적이다. 특히, 회석 산 전 처리로 H_2SO_4 는 상업적으로 다양한 바이오매스에 이용되고 있다.

[0005] 효소처리 과정은 셀룰로오스를 분해하기 위해 β -glucosidase, endo-1,4- β -glucanase, exo-1,4- β -glucanase와 같은 3가지 셀룰라아제(cellulase)가 반드시 필요하다. Endo-1,4- β -glucanase는 셀룰로오스의 β -1,4-결합을 무차별적으로 cellobiose 단위로 가수분해한다. Exo-1,4- β -glucanase의 경우 endo와 비슷하나 셀룰로오스의 비환원성 말단부위를 인지해 cellobiose 단위로 가수분해한다. 이렇게 생성된 cellobiose와 다른 수용성 cello-oligosaccharide는 β -glucosidase에 의해 포도당으로 분해된다. 이러한 효소들은 곰팡이나 박테리아와 같은 미생물로부터 분비된다.

[0006] 미세조류는 바이오연료 생산에 있어서 가장 효율적이다. 대부분의 미세조류는 무기탄소와 유기탄소원을 통해 지방을 합성할 수 있다. 지방의 구성은 미세조류의 종에 따라 다르다. 미세조류의 지방은 중성지방과 극성 지방질로 나뉜다. 그 중 중성지방인 트리글리세리드는 바이오디젤을 생산하는데 있어 가장 주요한 지방이다. 미세조류는 이 트리글리세리드를 생산하기 위해 acetyl coenzyme A를 필요로 한다. 이는 무기탄소나 유기탄소원으로부터 형성된다. 특히, *Chlorella protothecoides*는 포도당, 아세테이트 또는 포도당과 같은 유기원이 제공되는 종속 영양조건에서 높은 바이오매스 함량과 지방을 세포 내에 저장하는 것으로 알려졌다. 하지만 포도당의 배양액 첨가는 배양액의 전체비용의 80%를 차지하기 때문에 산업적으로 미세조류 배양액으로부터 바이오디젤 생산비용을 낮출 필요가 있다.

[0007] 현재 세계적으로 많이 사용되는 바이오 연료는 에탄올로 옥수수, 밀, 쌀, 사탕수수 등의 리그노셀룰로스성 바이오매스로부터 당화과정을 통해 미생물발효로 생산되고 있다. 하지만 이들 모두 작물이기 때문에 연료생산에 이용됨에 따라 식량난 문제를 야기한다. 그러나 폐기 농산물의 활용은 이와 같은 문제에서 벗어날 수 있을 뿐 아니라 환경적인 면에서도 장점을 가지고 있다. 본 발명에서는 바이오디젤 생산 비용 절감에 초점을 두어 폐기농산물인 배추의 당화과정을 통해 바이오디젤 생산용 *C. protothecoides*의 배양액에 첨가될 당 생성 공정을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제2012-0036883호

(특허문헌 0002) 2. 한국등록특허 제1554874호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 배추 폐기물로부터 포도당을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 수득한 효소 가수분해물을 포함하는 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액 및 이를 이용하는 바이오디젤 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 배추 폐기물을 분쇄한 후 황산을 처리하는 단계; 및 상기 황산-처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 유래된 셀룰라아제를 처리하여 효소 가수분해하는 단계를 포함하는 포도당의 생산 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 황산은 0.2~0.6%의 농도로 배추 폐기물을 처리할 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 셀룰라아제는 *Trichoderma harzianum*를 25~30℃, 100~150 rpm 및 pH 6~7의 조건 하에서 배양하여 수득될 수 있다. 상기 셀룰라아제의 활성도는 0.3~0.5 FPU/ml일 수 있으며, 상기 셀룰라아제는 0.15~0.4 FPU/ml의 투입량으로 황산-처리된 배추 폐기물에 처리될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 효소 가수분해는 pH 5 및 40~50℃의 온도 범위에서 실시될 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 수득한 효소 가수분해물을 포함하는 바이오디젤 생산용 미세조류 배양액을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미세조류는 바이오디젤 생산에 사용되는 것이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 미세조류는 *Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Stigeoclonium* spp. 또는 *Dunaliella* spp.를 포함할 수 있으며, 예를 들어, *Chlorella protothecoides*일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 효소 가수분해물은 포도당일 수 있으며, 상기 포도당은 상기 배양액 내에 20%(v/v) 이하의 농도로 포함될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 바이오디젤 생산용 배양액 내에서 미세조류를 배양한 후 배양액으로부터 지질과 지방산을 추출 및 분리하는 것을 포함하는, 바이오디젤의 생산 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미세조류는 바이오디젤 생산에 사용되는 것이라면 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 미세조류는 *Chlorella* spp., *Scenedesmus* spp., *Stigeoclonium* spp. 또는 *Dunaliella* spp.를 포함할 수 있으며, 예를 들어, *Chlorella protothecoides*일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 국내에서 다량으로 배출되는 배추 폐기물을 사용하여 바이오디젤의 생산을 위해 공급되는 포도당을 생산할 수 있어, 바이오디젤의 생산 비용을 1/2 정도까지 크게 절감할 수 있으며, 포도당 생산을 위한 조건을 최적화함으로써 포도당의 생산량을 증가시킬 수 있다. 또한, 본 발명에서는 *Trichoderma harzianum*로부터 셀룰라아제를 생산하여 사용함으로써, 상업적으로 시판되는 혼합효소에 비해 거의 1/10 수준으로 공정 비용을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서 3 종의 *Trichoderma harzianum* 균주로부터 유래된 셀룰라아제의 시간에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서 최적 조건에서 배양된 *Trichoderma harzianum*으로부터 유래된 셀룰라아제의 시간에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서 pH에 따른 *Trichoderma harzianum*으로부터의 (A) 셀룰라아제의 생산 농도 및 (B) 셀룰라아제의 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추의 다양한 전처리에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 배추에 전처리되는 황산의 농도에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추에 전처리되는 황산의 농도에 따른 *Chlorella protothecoides*의 성장률을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추의 황산 전처리시 온도에 따른 포도당의 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추의 황산 전처리시 pH에 따른 포도당의 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추의 황산 전처리 후 세척 유무에 따른 포도당의 생산 수율을 나타낸 것으로, (A) 종래의 가수분해 효소 콕테일 및 (B) 본 발명에 따른 셀룰로오스를 처리한 후의 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서 *Chlorella protothecoides*의 배양시 온도에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서 *Chlorella protothecoides*의 배양시 셀룰라아제의 투입량에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추의 함량에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 있어서 시판 셀룰라아제 및 본 발명의 셀룰라아제의 (A) 배양액 내의 총 포도당 생산량 및 (B) 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 있어서 포도당 함량에 따른 *Chlorella protothecoides* 성장률을 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 있어서 배추 및 다른 바이오매스로부터의 셀룰로오스에 따른 포도당 생산 수율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 배추 폐기물을 분쇄한 후 황산을 처리하는 단계; 및 상기 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 유래된 셀룰라아제를 처리하여 효소 가수분해하는 단계를 포함하는 포도당의 생산 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 방법에서, 배추의 황산 처리 단계의 조건을 최적화함으로써 포도당의 생산 수율을 증가시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 황산은 0.2~0.6%의 농도로 배추 폐기물을 처리할 수 있으며, 바람직하게는, 0.25%~0.5%, 가장 바람직하게는 0.5%의 농도이다.
- [0024] 상기 셀룰라아제는 *Trichoderma harzianum*를 25~30℃, 100~150 rpm 및 pH 6~7의 조건 하에서 배양하여 수득할 수 있으며, 28℃, 130 rpm, pH 6의 조건에서 배양했을 때 약 0.3~0.5 FPU/ml, 바람직하게는 약 0.4 FPU/ml의 높은 활성도를 갖는 셀룰라아제를 수득할 수 있다. 상기 셀룰라아제는 상업적으로 시판되는 혼합효소에 비해 거의 1/10 수준 공정 비용으로 생산될 수 있다. 상기 셀룰라아제는 0.15~0.4 FPU/ml의 투입량으로 황산 처리된 배추 폐기물에 처리될 수 있으며, 바람직하게는 0.24 FPU/ml의 투입량으로 처리될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 효소 가수분해를 위한 최적 조건은 pH 5 및 40~50℃의 온도 범위이며, 바람직하게는 45℃의 온도에서 실시될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 황산 처리된 배추 폐기물에 *Trichoderma harzianum*으로부터 수득된 셀룰라아제를 처리하여 수득한 효소 가수분해물을 포함하는 미세조류, 예를 들어, *Chlorella protothecoides*의 바이오디젤 생산용 배양액을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 효소 가수분해물은 포도당일 수 있다. 상기 포도당은 상기 배양액 내에 20%(v/v) 이하의 농도로 포함될 수 있으며, 20% 초과시 상기 미세조류의 성장을 저해시킬 수 있다.
- [0028] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명

하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0029] <실시예 1>

[0030] T. harzianum로부터의 셀룰라아제 생산

[0031] T. harzianum (KACC 40549, 40784, 40793)은 국내 농업유전자원 정보센터로부터 분양받았다. 스탁 배양은 MYG 배지(0.2% 맥아 추출물, 0.2% 효모 추출물, 2% 포도당 및 2% 아가), 28℃에서 계대 배양하였다. MYG 아가 플레이트에서 7일간 배양된 T. harzianum 를 0.02% tween 80으로 spore를 수거했다. 모아진 spore는 cell counting 을 하였다. 곰팡이 셀룰라아제 생산을 위해 Mandel's 배지(Carbon 10 g · L⁻¹, Peptone 1.0 g · L⁻¹, Urea 0.3 g · L⁻¹, Tween 80 2.0 ml, Antifoam 2.0 ml, (NH₄)₂SO₄ 1.4 g · L⁻¹, KH₂PO₄ 2.0 g · L⁻¹ CaCl 0.3 g · L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g · L⁻¹, Fe₂SO₄ · 7H₂O 0.005 g · L⁻¹, MnSO₄ · 7H₂O 0.0016 g · L⁻¹ ZnSO₄ · 7H₂O 0.0014 g · L⁻¹, CoCl₂ · 7H₂O 0.002 g · L⁻¹)를 이용했다. 수거된 spore는 Mandel's 배지에 3*10⁵ spores/ml로 접종하였다. 각 균주는 28℃, 130 rpm에서 배양하였다. 배양 후, 4℃에 보관하여 사용했다.

[0032] T. harzianum으로부터 산출된 셀룰라아제 활성도는 Filter paper assay를 통해 측정되었다. 1 X 6 cm 의 paper(wattman no.1)를 1.5 ml 튜브에 넣은 후, pH 5.0의 50 mM 아세트산나트륨 1 ml와 곰팡이 셀룰라아제 0.5 ml를 넣었다. 그 후, 수조에서 50℃, 1시간 동안 반응시켰다. 다음으로, 15분간 끓여준 후 5분간 식혀주었다. 곰팡이 셀룰로오스에 의해 paper로부터 산출된 포도당은 glucose kit(sigma GAGO 20)로 분석하였으며 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0033] 상기 ATCC no. 40549, 40784 및 40793의 T. harzianum으로부터 생산된 셀룰라아제의 효소활성도를 측정하였다. 균주들은 6일간 배양되었고 매일 배양액의 효소 활성도를 측정한 결과 ATCC no. 40784 균주가 가장 높았다(도 1).

[0035] <실시예 2>

[0036] 셀룰라아제의 최적 활성도를 위한 조건 결정

[0037] T. harzianum ATCC no. 40784 균주에서 분비되는 셀룰라아제 활성도의 최적 적정 배양시간과 pH를 조사하였다. 우선 Mandel's 배지에서 28℃, 130 rpm, 6일간 배양하였을 때 5일째에 가장 높은 활성도를 보였다(도 2). 또한, 동일한 조건에서 배양하였을 때 효소의 농도는 pH 6에서 높았으나(도 3의 A) 활성도는 pH 7에서 가장 높은 것을 확인했다(도 3의 B). 이때 T. harzianum으로부터 분비된 효소의 활성도는 평균 약 0.4 FPU/ml를 보였다.

[0039] <실시예 3>

[0040] 배추의 전처리 조건의 결정

[0041] 배추는 일반 상점에서 구입하였다. 배추를 씻어 흙을 제거한 후, 잎 표면의 물기를 실온에서 약 2시간 정도 건조하였다. 건조된 배추는 혼합기를 통해 갈아주었다. 갈린 배추는 사용 전까지 20℃에 보관하였다.

[0042] 여러 가지 전 처리 방법 중 적합한 것을 선택하기 위하여 황산(H₂SO₄), 과산화수소(PAA), 과산화수소와 황산(PAA + H₂SO₄), 인산과 황산(PO₄ + H₂SO₄)을 배추에 처리하였다. 그 결과 황산을 처리하였을 때 포도당 산출량이 가장 높았다(도 4). 산 처리 이외에도 알칼리 방법을 처리해 보았을 때 황산보다 포도당 산출량이 낮았다.

[0044] <실시예 4>

[0045] 황산의 처리 농도 결정

[0046] 배추의 리그닌 제거 및 조직의 팽창을 위한 적절한 황산처리 농도를 조사하였다.

[0047] 배추의 전 처리를 위해 황산(catalog B3010-1250, Junsei)을 사용했다. 건조배추가 약 5 %인 갈린 배추에 황산

을 첨가하였다. 첨가농도를 선택하기 위해 배추에 황산 0%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1%로 넣어준 후 50℃에서 40 분간 고온·고압 처리하였다. 처리 효율을 알아보기 위해 황산 처리된 배추에 산업적으로 판매되는 효소(sigma C2730 1 FPU/ml, sigma C6105 3.5 FPU/ml)를 45℃, 130 rpm 에서 2일간 처리하였다. 그 후 glucose kit(sigma GAGO 20)를 통해 포도당 산출량을 측정하였다. 그 결과 효소를 통한 포도당의 산출량은 0.5%로 처리해준 것이 포도당 함량이 가장 높았으며 0.25%가 두 번째로 포도당 함량이 높았다(도 5).

[0048] C. protothecoides가 황산 전처리 과정에서 영향을 받는지를 확인하였다. 배지에 각각 0%, 0.25%, 0.5% 농도로 황산을 처리하여 C. protothecoides를 배양하여 흡광도 측정을 한 결과 대조군과 황산을 처리한 그룹간의 차이가 크지 않음을 확인하였다(도 6).

[0049] 황산 전 처리 과정에서의 최적 온도를 조사하였다. T. harzianum으로부터 분비된 효소는 0.16 FPU/ml가 첨가되었으며 130 rpm에서 2일간 가수분해가 진행되었다. 그 결과 배추에 황산처리 후 50℃에서 반응시키는 것이 포도당 산출량에 가장 큰 효과를 보였다(도 7).

[0051] <실시예 5>

[0052] 배추 세척에 따른 포도당 생산 수율 평가

[0053] 산 처리된 배추를 효소 가수분해에 앞서, 산 처리 시 배추즙의 산과 산부산물인 효소 가수분해에 주는 영향에 대해 조사했다. 0.25% 산 처리된 배추를 각각 걸러진 배추 양(g)의 0 배, 1.5 배, 3 배의 증류수를 넣어 세척하였다. 그 후, Sigma cocktail 효소와 곰팡이 효소를 50℃, 130 rpm에서 2일간 처리하였다. 그 결과 두 그룹 모두 증류수를 넣어 세척을 가했을 때 세척을 하지 않은 그룹에 비해 포도당 산출량이 낮았다(도 9). 이는 세척하며 배추를 정제하는 과정에서 포도당의 손실이 있었을 것으로 예상됐다.

[0055] <실시예 6>

[0056] 포도당의 생산 조건 결정

[0057] Manderl's 배지에서 pH 7, 28℃, 130 rpm에서 5일간 길러진 ATCC no. 40784 균주의 셀룰라아제의 최적 pH, 온도, 효소투입량을 조사하였다. 그 결과 pH 5에서 포도당 산출량이 가장 높았다(도 8). 40, 45, 50℃의 온도에서 효소활성도를 2일간 측정한 결과 45℃와 50℃가 비슷함을 볼 수 있었다. 때문에 45℃를 효소 적합 온도로 정하였다(도 10). T. harzianum으로부터 분비된 효소 0.4 FPU/ml를 0.08, 0.16, 0.24 그리고 0.32 FPU/ml 로 투여하였을 때 0.24 FPU/ml를 처리하는 것이 가장 효율이 높았다(도 11).

[0058] 효소의 최적 활성도 조건을 맞춘 후, 배추의 함량에 따른 포도당 산출량을 조사하였다. 배추를 곱게 간 후의 건조 중량은 갈린 배추 약 5%를 1.7%, 2.8%, 3.9%, 5.0%로 희석하여 사용했다. 그 결과 5.0%의 배추에서 포도당 산출도가 가장 높았다(도 12).

[0060] <실시예 7>

[0061] 포도당의 생산

[0062] 산 처리된 배추는 pH 5.0으로 맞춘 후, 전체농도가 50 mM 아세트이트가 되도록 맞추었다. 멸균 후 산 처리된 배추 산물에 T. harzianum으로부터 분비된 효소를 처리하였다. 효소와 반응전 1 ml의 시료를 채취하여 -20℃에 보관하였다. 효소반응은 50℃, 130 rpm, 3일간 반응시켰다. 반응 후, 1 ml의 시료를 채취하여 효소반응 전 시료와 함께 glucose kit(sigma GAGO 20)를 통해 포도당 산출량을 측정하였다.

[0064] <실시예 8>

[0065] T. harzianum으로 부터 분비된 효소와 상업용 효소의 활성도 비교

[0066] ATCC no. 40784 균주의 배양액에서 직접 얻어진 섬유소 분해효소(Cellulase 0.4 FPU/ml)와 상업용 혼합효소(sigma C2730 0.013 FPU/ml, sigma C6105 0.046 FPU/ml)의 활성도를 비교해보았다. 0.25% 황산이 처리된 배추에 각각의 효소를 0.16 FPU/ml가 되도록 처리한 후, 45℃, 130 rpm에서 4일간 포도당 양을 측정하였다. 포도당

산출량으로 비교 결과 상업용 혼합효소의 활성도가 약 2배 가량 높았다(도 13). 하지만 공정비용을 고려해보았을 때 상업용 혼합효소의 경우 1 g의 포도당을 생산하기 위해 약 800원의 비용이 발생하는 반면 T. harzianum으로부터 분비된 효소의 경우 약 90원에 불과하였다(표 1). 이를 통해 T. harzianum으로부터 분비된 효소를 사용하는 것이 활성도와 공정비용을 고려하였을 때 적합한 것을 알 수 있었다.

표 1

Cost comparison between commercial and secreted fungal cellulase					
		FPU/ml	Cost for hydrolysis (won/L)	yielded glucose (g/L)	Cos for glucose yield (won/g)
Commercial cellulase cocktail	cellulase from <i>Trichoderma reesei</i> ATCC 26921	868	3121.56	3.86	808.69
	Cellulobiase from <i>Aspergillus niger</i>	290			
Secreted enzymes from T. harzianum culture media	Mandel's media	0.4	177.9	1.98	89.85

<실시예 9>

C. protothecoides의 배양

C. protothecoides는 PB5 배지(NaNO_3 2.94 mM, K_2HPO_4 0.43 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM, KH_2PO_4 1.29 mM, NaCl 0.43 mM, Yeast extract 0.50 %, HEPES 10 mM, Vitamin B12 0.1 μM , Biotin 0.1 μM , Thiamine 6.5 μM), 26°C에서 계대 배양하였다.

실시예 7과 같이 배추로부터 산출된 당은 PB5 배양액에 20, 40, 60, 그리고 80% (V/V)으로 첨가하였다. 당량은 2%로 맞추어 주었으며 조류를 3×10^6 algae/ml로 접종하였다. 접종된 미세조류는 26°C, 130 rpm에서 배양이 되었으며 성장도를 보기 위해 24시간마다 시료를 채취하여 glucose kit(sigma GAGO 20)를 통해 잔류 포도당량을 측정하였다.

배추로부터 생산된 당을 미세조류 배양액에 0, 20, 40, 60 그리고 80% (V/V)으로 첨가했다. C. protothecoides는 5일간 26°C, 130 rpm하여 미세조류의 성장을 조사하였다. 1일마다 시료를 채취하여 배추 당을 20%로 첨가하였을 때는 성장에 영향을 주지 않았지만 그 이상의 농도에서는 C. protothecoides의 성장에 심각한 저해가 있는 것을 관찰하였다(도 14).

<실시예 10>

다양한 바이오매스를 이용한 포도당 생산

다른 종류의 바이오매스(팜유 추출 후 찌꺼기, 볏짚, 찻잎)를 사용하여 개발한 공정을 통해 당 생성을 조사하였다. 볏짚, 찻잎, 팜 찌꺼기를 분쇄기로 갈아준 후, 5%의 바이오매스를 0.5 % H_2SO_4 로 전 처리하였다. 그 후 T. harzianum으로부터 분비된 효소를 0.24 FPU/ml를 넣고 45°C, 130rpm에서 반응시켰다. 24시간마다 시°C를 채취하여 glucose kit(sigma GAGO 20)를 통해 잔류 포도당 양을 측정하였다.

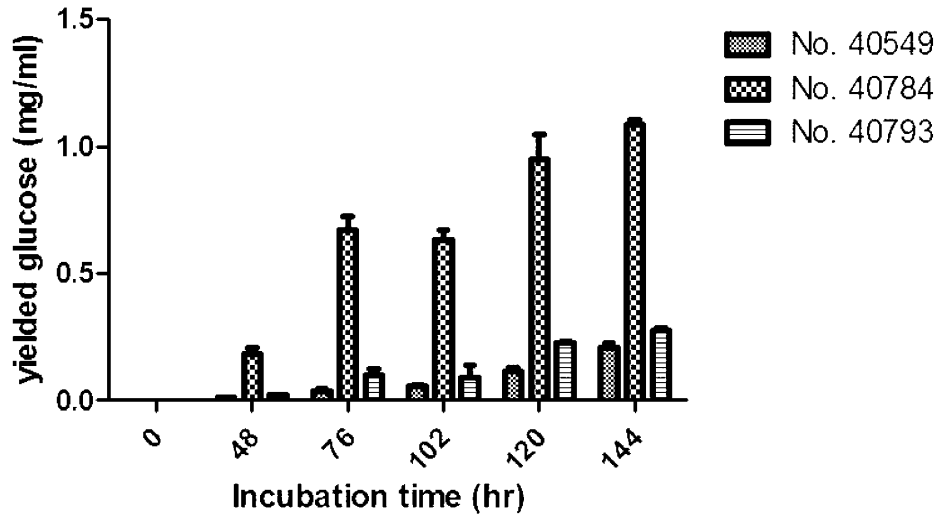
결과로서, 볏짚이 당 생성이 약 4 mg/ml로 높은 것을 볼 수 있다(도 15). 하지만 배추자체가 가진 당이 많기 때문에 전체 생성된 당의 총량은 배추가 볏짚에 비해서 2배 가량 높은 것을 볼 수 있었다(도 15).

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통

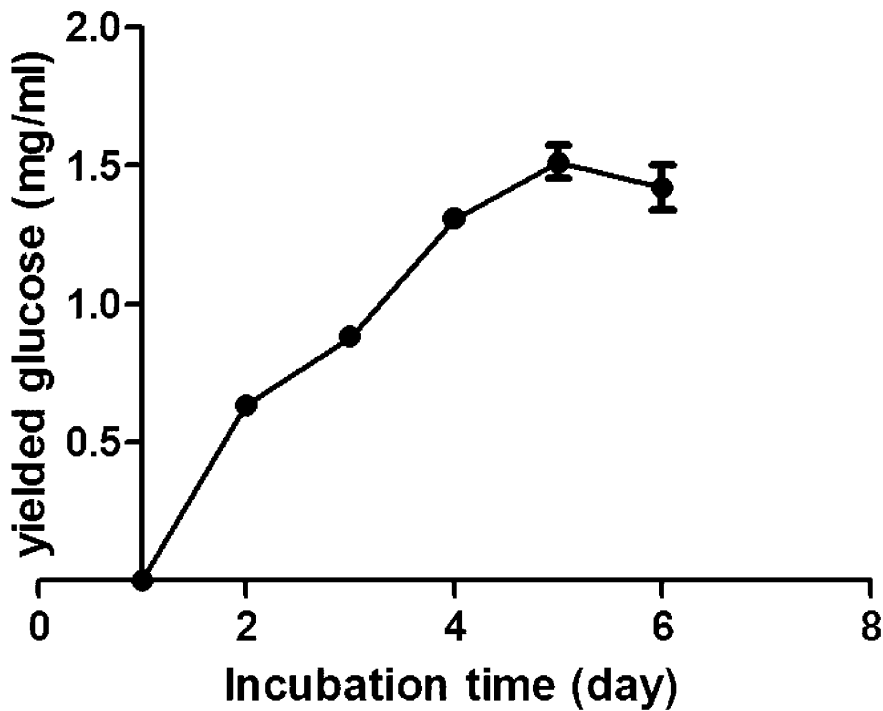
상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

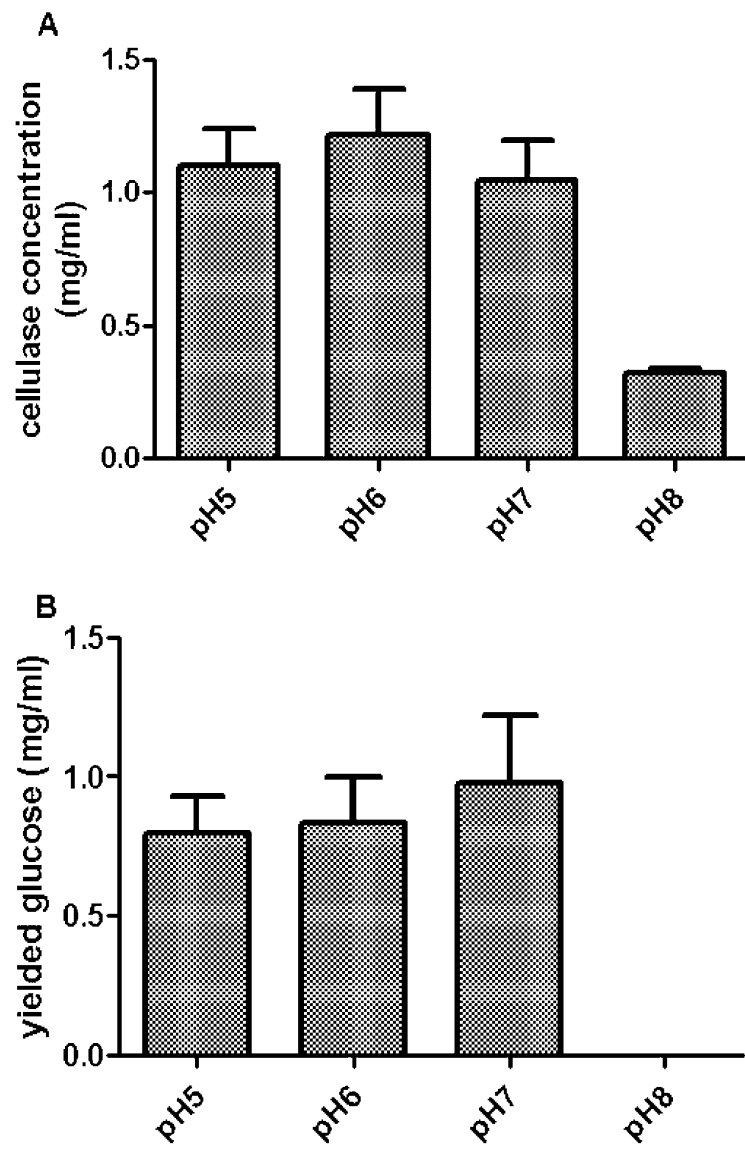
도면1



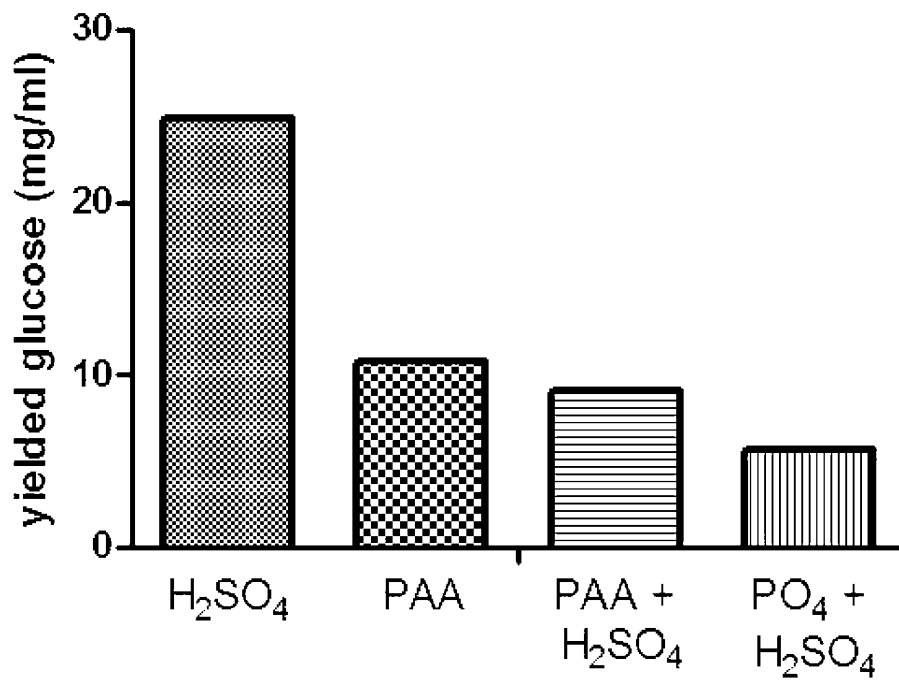
도면2



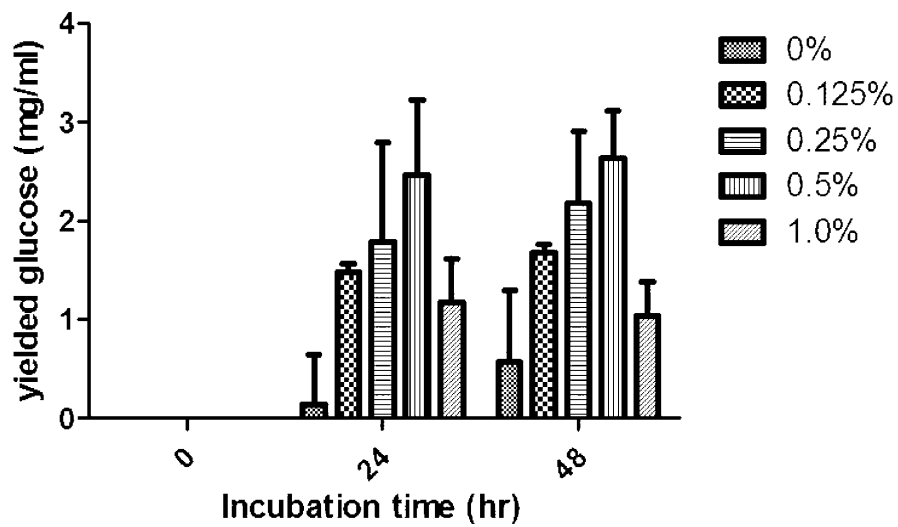
도면3



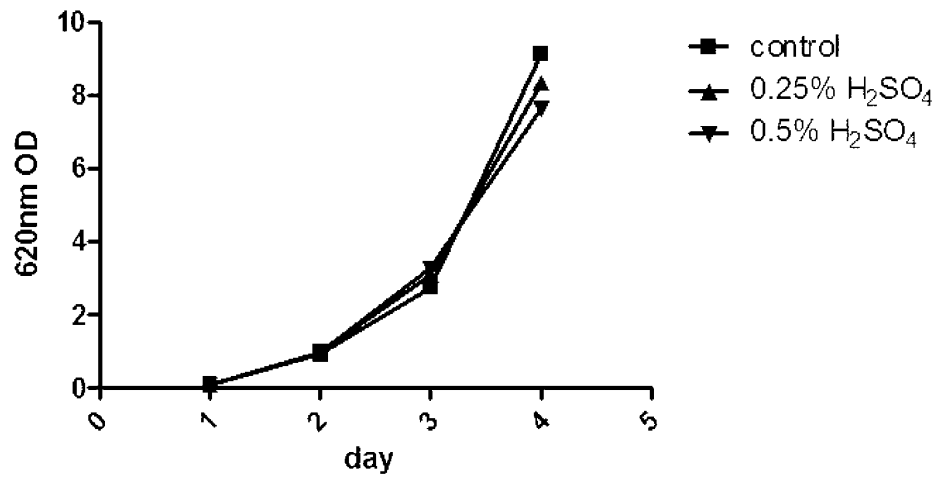
도면4



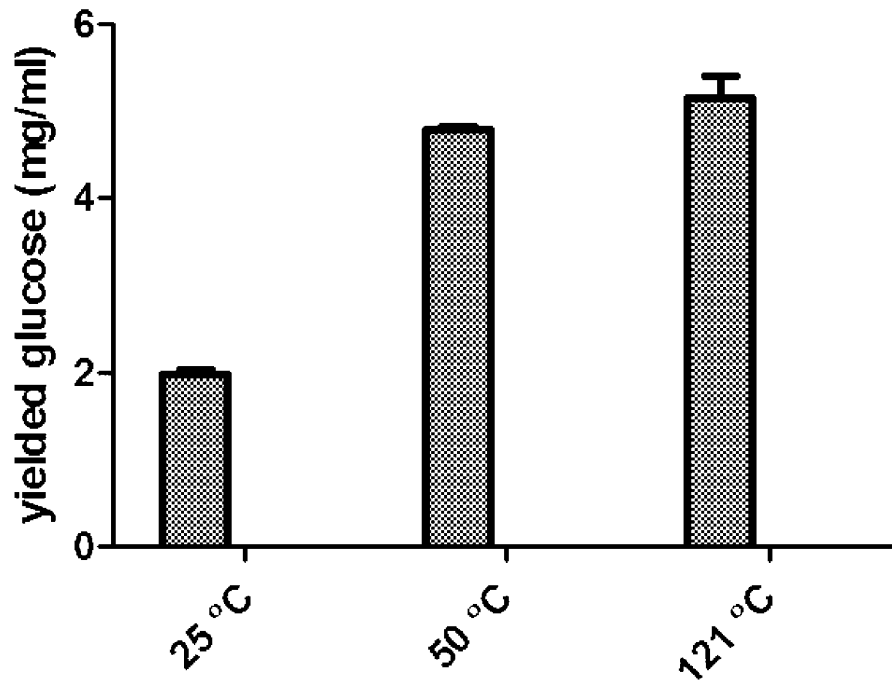
도면5



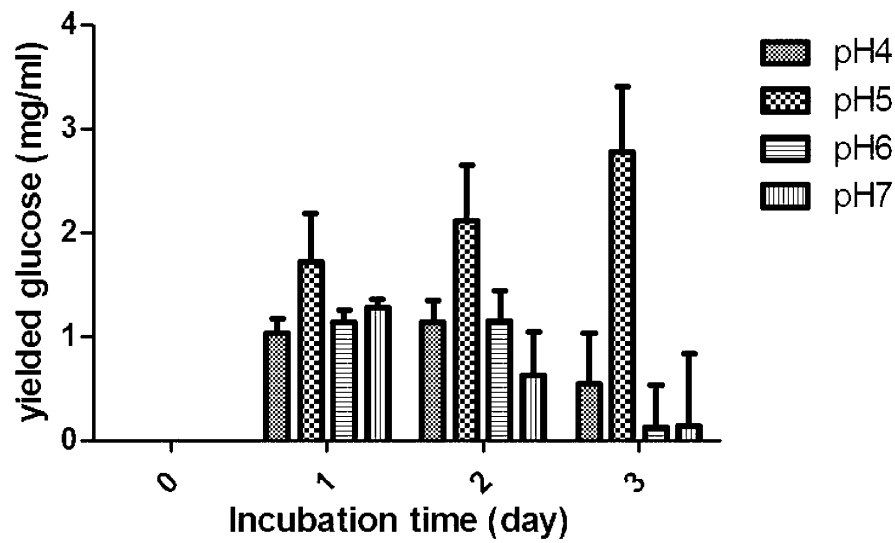
도면6



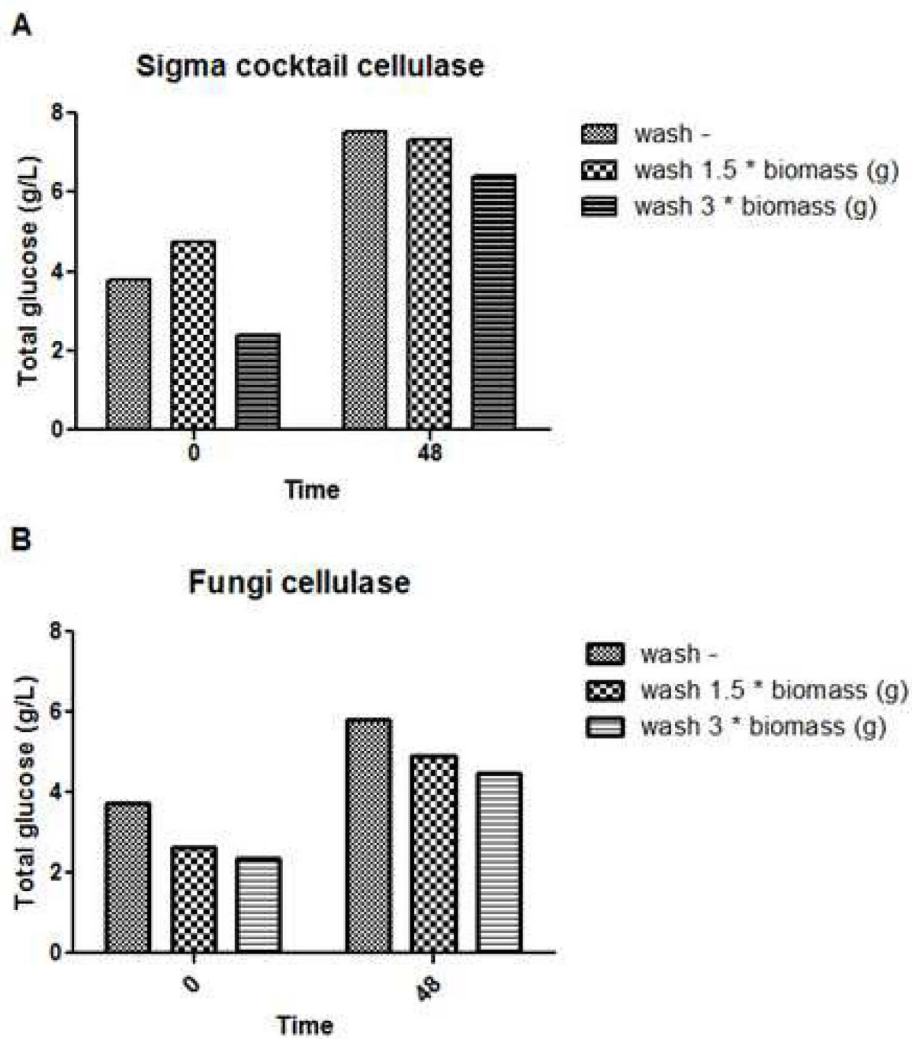
도면7



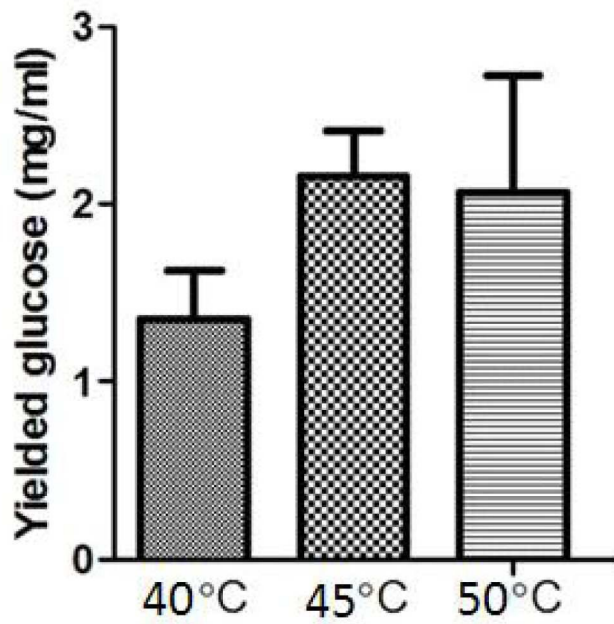
도면8



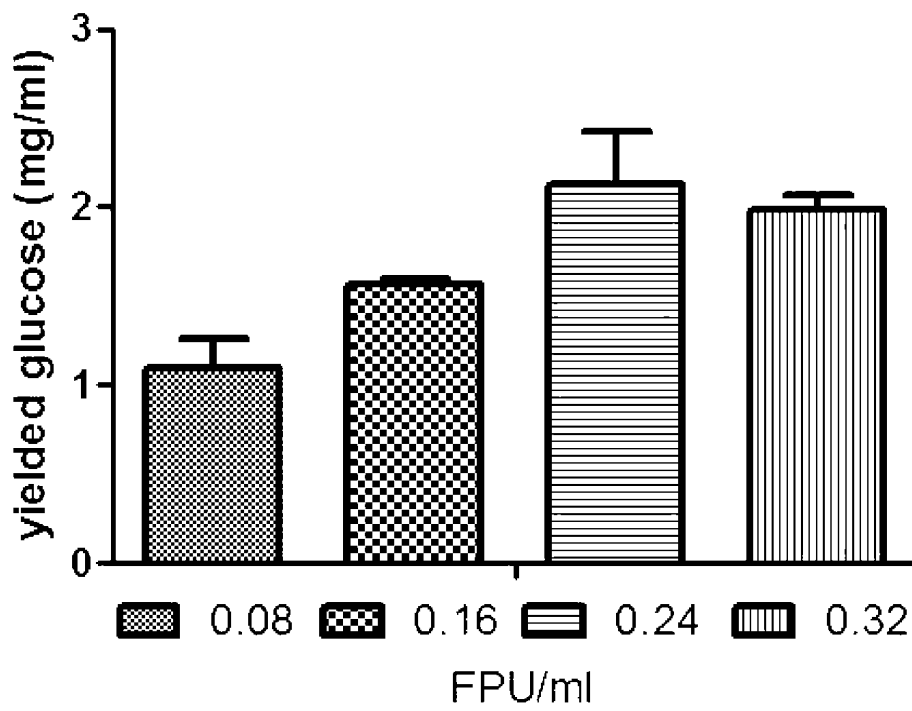
도면9



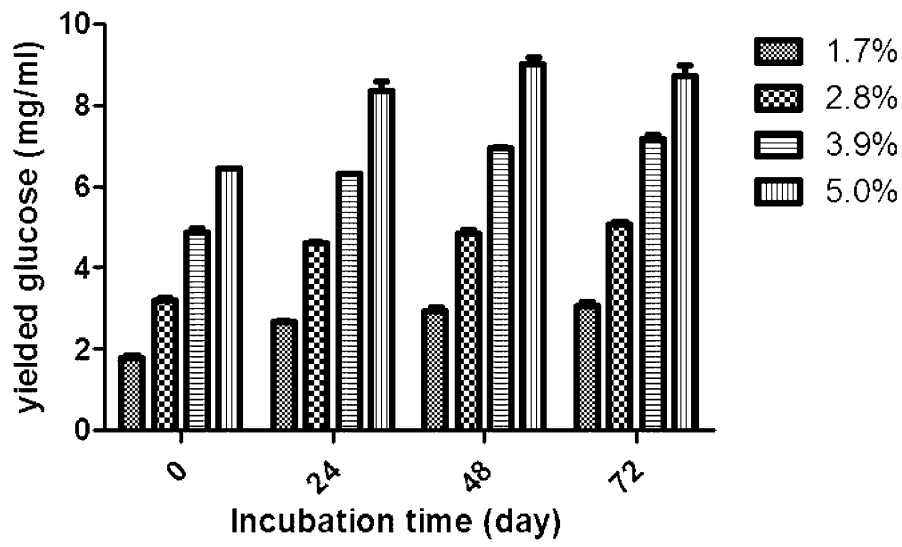
도면10



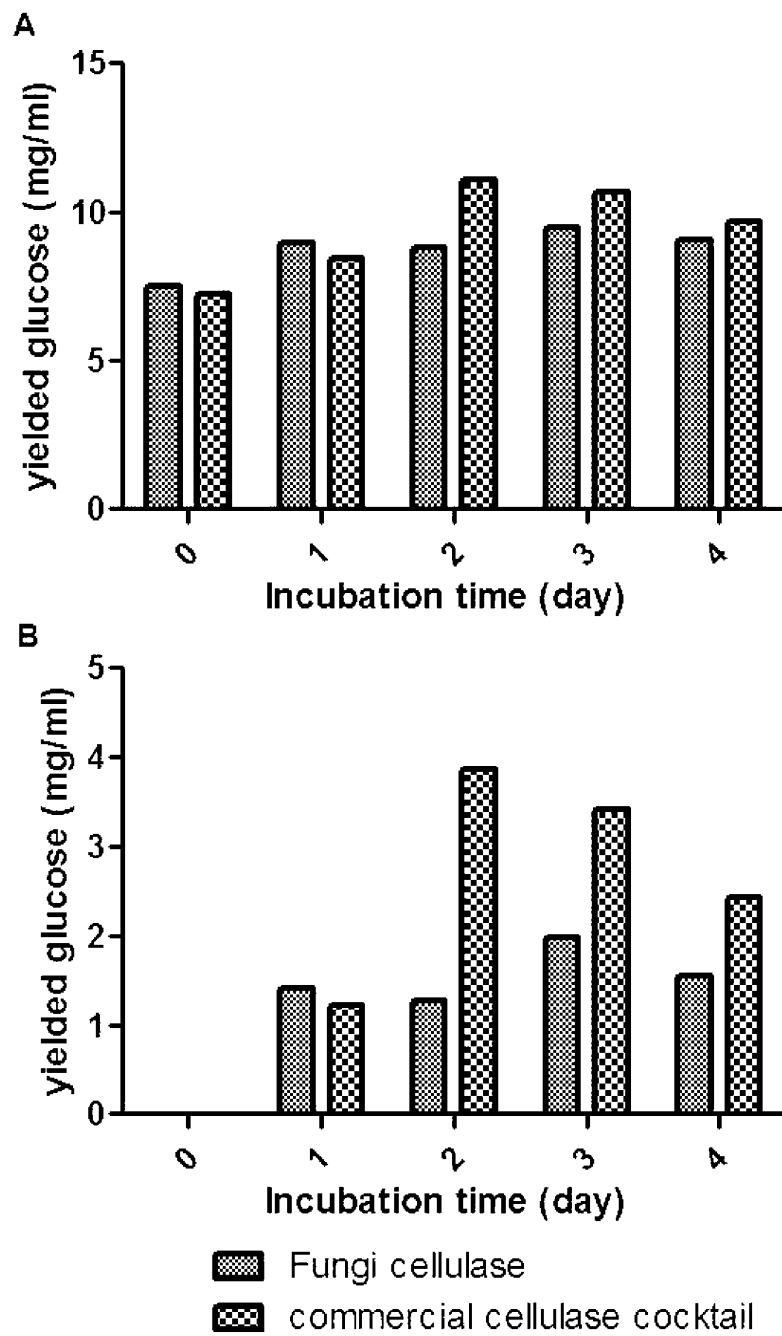
도면11



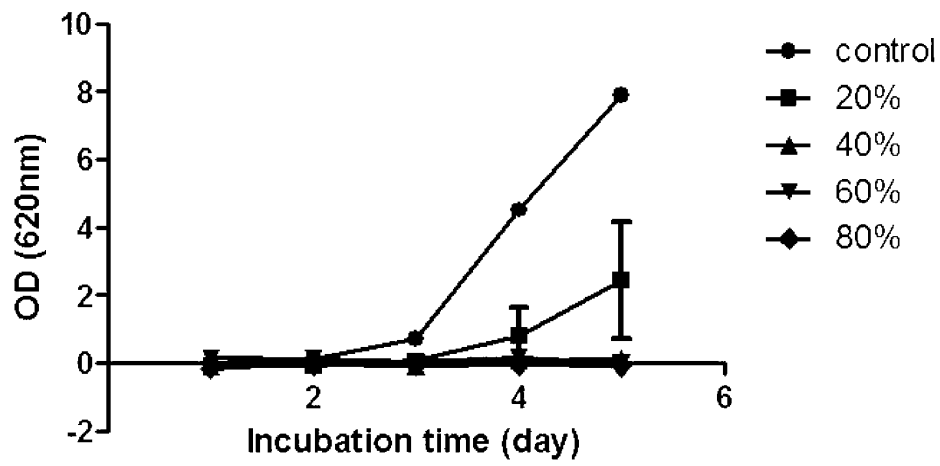
도면12



도면13



도면14



도면15

