

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0066488 (43) 공개일자 2014년06월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 7/10 (2006.01) C08B 1/00 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2012-0133771	(72) 발명자 김경현 서울 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)	
(22) 출원일자 2012년11월23일 심사청구일자 2012년11월23일	(74) 대리인 특허법인다나	

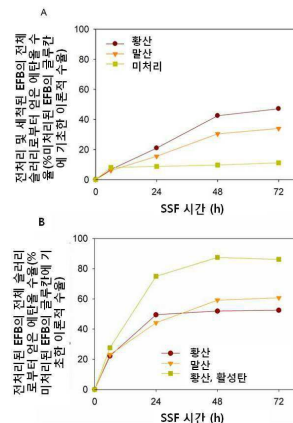
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 전체 전처리물 발효법을 이용하여 목질계 바이오매스에서 에탄올을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 전체 전처리물 발효법을 이용하여 목질계 바이오매스에서 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고체 액체 분리과정 없이 전처리 된 목질계 바이오매스의 전체 슬러리를 발효에 사용하여 우수한 생산 수율로 에탄올을 생산할 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0031353

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌프론티어

발 연구과제명 화학 및 단백질축매 융합시스템을 통한 생물진화형 목질계 바이오매스의 탈구조화 기술개

기 여 율 1/1

주관기관 (재)차세대바이오매스연구단

연구기간 2011.08.22 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

황산 및 말산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 목질계 바이오매스에 전처리하는 단계;

암모니아수 또는 암모니아수와 활성탄을 이용하여 상기 전처리 된 목질계 바이오매스를 중화하는 단계; 및

상기 단계에서 얻은 전체 슬러리에 대해 효소 가수분해 및 동시당화발효를 수행하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

목질계 바이오매스는 기름 약자의 트렁크, 빈 과일 다발 또는 잎을 포함하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

황산 또는 말산의 농도는 0.5 내지 2%(w/v)인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

전처리는 130 내지 190℃의 온도에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 600초의 유지 시간 동안 실시되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

전처리 단계는 목질계 바이오매스에 0.5 내지 2%(w/v)의 황산을 처리하고 170 내지 190℃의 온도에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 120초의 유지 시간 동안 실시하는 것인 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

전처리 단계는 목질계 바이오매스에 0.5 내지 2%(w/v)의 말산을 처리하고 170 내지 190℃의 온도에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 600초의 유지 시간 동안 실시하는 것인 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

암모니아수의 농도는 2 내지 28%(w/w)인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

중화 단계는 황산으로 전처리 된 목질계 바이오매스에 2 내지 28%(w/w)의 암모니아수와 활성탄을 처리하는 것인 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

중화 단계는 말산으로 전처리 된 목질계 바이오매스에 2 내지 28%(w/w)의 암모니아수를 처리하는 것인 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

효소 가수분해 전 활성탄을 제거하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

활성탄은 여과를 통해 제거하는 것인 방법.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 고체 액체 분리과정 없이 전처리 된 목질계 바이오매스의 전체 슬러리를 발효에 사용하여 우수한 생산 수율로 에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기름 야자 빈 과실 다발(bunch)은 야자 기름 추출 과정에 있어 생산되는 주요한 부산물 중의 하나이고, 바이오 에탄올 생산을 위해 가장 풍부한 리그노셀룰로스 바이오매스로 간주된다. 예를 들어 기름 야자 나무의 신선한 과실 다발(fresh fruit bunch)은 인도네시아에서 약 2천 6백만 톤, 말레이시아에서 약 2천만 톤이 생산되고 있다(Bardant *et al.*, *Int J Environ Bioenerg*, 3(3), 193-200, 2012; Daud & Law, *Bioresources*, 6(1), 901-917, 2011). 빈 과실 다발의 주요 당으로 35%-50%의 글루코스와 10%-20%의 자일로스를 함유하고, 이는 신선한 과실 다발의 에탄올 생산 공정에 대한 잠재성을 보여주는 증거이다(Jung *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(20), 9806-9809, 2011; Millati *et al.*, *Agric J*, 6(2), 54-59, 2011). 하지만 빈 과실 다발은 현재 자가분해를 위해 연못에 버려지거나, 전력 생산 혹은 비료에의 사용을 위해 태워지고 있다(Alkhatib *et al.*, *Afr J Biotechnol*, 10(81), 18811-18815, 2011; Millati *et al.*, *Agric J*, 6(2), 54-59, 2011). 따라서, 신선한 과실 다발에 대한 바이오 에탄올 및 발효 가능한 당의 생산에 대한 산업적인 이용이 필요한 실정이다.

[0003] 빈 과실 다발을 이용하여 에탄올 생산에 대한 체계적인 접근법으로 현재까지 보고된 기술은 수용성 암모니아 침지법에 적용하여 에탄올 생산을 위한 평가에 한한다(Jung *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(20), 9806-9809,

2011). 이 연구에서 빈 과실 다발은 상대적으로 높은 리그닌 함유량을 보이고, 암모니아 침지법이 바이오매스의 리그닌을 효율적으로 제거한다는 정보에 근거하여 연구가 진행되었었다(Kim & Lee, *Appl Biochem Biotechnol*, 137-140(1-12), 81-92, 2007; Ko *et al.*, *Bioresour Technol*, 100(19), 4374-4380, 2009). 하지만, 50%에 이르는 리그닌 제거율에도 불구하고, 전처리된 빈 과실 다발을 이용한 효소적 당화율은 이론적 최대 글루코스 수율의 45% 보다 적었다(Jung *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(20), 9806-9809, 2011). 빈 과실 다발의 저항성은 스팀 및 수산화 나트륨 전처리 법을 이용하여 전처리 후 낮은 당화율을 보고한 다른 논문에서도 확인된다(Shamsudin *et al.*, *Biomass Bioenergy*, 36, 280-288, 2012; Sudiyani *et al.*, *Menara Perkebunan*, 78(2), 70-74, 2010).

[0004] 리그노셀룰로스 바이오매스로부터 에탄올 생산하는 공정은 3 주요 단계로 이루어진다. 전처리, 효소당화, 그리고 에탄올 발효가 그것이다(Lynd *et al.*, *Curr Opin Biotechnol*, 16(5), 577-583, 2005). 그 중, 전처리와 당화 단계는 셀룰로스를 이용한 발효가능한 당으로의 전환 공정에 있어 장애물이 된다(Lynd *et al.*, *Nat Biotechnol*, 26(2), 169-172, 2008). 강산과 알칼리를 이용한 화학적 전처리는 리그노셀룰로스 바이오매스로부터의 에탄올 생산을 위한 주된 기술로 간주된다(Garlock *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(24), 11063-11071, 2011; Kim *et al.*, *Bioresour Technol*, 96(11), 1249-1255, 2005; Ko *et al.*, *Bioresour Technol*, 100(19), 4374-4380, 2009).

[0005] 일반적으로 리그노셀룰로스 바이오매스의 산 또는 알칼리 전처리에서, 상당한 양의 당은 헤미셀룰로스 및 셀룰로스로부터 전처리된 바이오매스 슬러리에 액상으로 해리된다(Kim *et al.*, *Bioresour Technol*, 96(11), 1249-1255, 2005; Ko *et al.*, *Bioresour Technol*, 100(19), 4374-4380, 2009). 전처리된 슬러리의 액상에 존재하는 모든 당을 이용하고, 분리 공정에서의 비용을 줄이기 위해, 전처리된 바이오매스의 전체 슬러리를 이용하는 것은 필수적이다. 지금까지 대부분의 전처리 연구는 전처리된 고체 바이오매스의 효소적 당화법이나(Kim *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(24), 11089-11096, 2011; Pallapolu *et al.*, *Bioresour Technol*, 102(24), 11115-11120, 2011; Selig, 2008. Laboratory Analytical Procedure: Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO.) 전처리 후에 얻어진 가수분해액의 발효에 초점을 맞추었다(Lau *et al.*, *Biotechnol Biofuels*, 3, 1-10, 2010; Zaldivar *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 68(5), 524-530, 2000). 반면 전처리된 리그노셀룰로스의 전체 슬러리를 이용한 효소적 당화 및 에탄올 발효 공정은 단지 몇 그룹에서만 연구되었다(Dutta *et al.*, *Biotechnol Prog*, 26(1), 64-72, 2010; Tengborg *et al.*, *Enzyme Microb Technol*, 28(9-10), 835-844, 2001; Tomas-Pejo *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 100(6), 1122-1131, 2008). 하지만, 고온에서 산과 알칼리를 전처리 촉매로 사용하였을 경우, 카르복실산, 당 분해 생성물, 폐놀성 혼합물, 혹은 무기염 등의 발효 미생물에 저해 작용을 하는 물질들의 생산은 필수적이다(Klinke *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, 66(1), 10-26, 2004). 따라서, 이온성 액체, 곰팡이 혹은 전자 빔 등과 같은 대체적인 전처리 공정이 현재 연구 중이나, 아직 상업화하기는 취약한 상태이다(Bak *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 104(3), 471-482, 2009; Bak *et al.*, *Bioresour Technol*, 100(3), 1285-1290, 2009; Shill *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 108(3), 511-520, 2011).

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 미국 공개특허 제2012-0028325호
(특허문헌 0002) 2. 미국 공개특허 제2012-0220005호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Bak *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 104(3), 471-482, 2009
(비특허문헌 0002) 2. Bak *et al.*, *Bioresour Technol*, 100(3), 1285-1290, 2009
(비특허문헌 0003) 3. Shill *et al.*, *Biotechnol Bioeng*, 108(3), 511-520, 2011

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 전처리된 리그노셀룰로스 바이오매스의 전체 슬러리를 발효에 참여시켜 생산 수율이 우수한 에탄올을 제조하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 황산 및 말산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 목질계 바이오매스에 전처리하는 단계; 암모니아수 또는 암모니아수와 활성탄을 이용하여 상기 전처리 된 목질계 바이오매스를 중화하는 단계; 및 상기 단계에서 얻은 전체 슬러리에 대해 효소 가수분해 및 동시당화발효를 수행하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명은 기름 야자 고체 폐기물에 묶은 산을 사용하여 전처리하고, 암모니아 및 활성탄을 이용하여 중화시켜 전체 슬러리를 이용한 동시 당화 발효를 통해 현저히 우수한 바이오에탄올 생산 수율을 얻는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 100g의 빈 과실 다발에서 산전처리 후 생성된 환원당 양에 대한 온도의 영향을 조사한 결과이다.
 도 2는 100g의 빈 과실 다발에서 산전처리 후 생성된 환원당 양에 대한 시간의 영향을 조사한 결과이다.
 도 3은 100g의 빈 과실 다발에서 산전처리 후 생성된 환원당 양에 대한 농도의 영향을 조사한 결과이다.
 도 4는 산 전처리 후 세척된 다발을 이용한 효소적 당화율을 비교한 결과이다.
 도 5는 산 전처리의 동시 당화 에탄올 발효에 대한 영향을 조사한 결과이다.
 도 6은 중화된 산의 효모에 대한 영향을 조사한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0013] 본 발명은 황산 및 말산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 목질계 바이오매스에 전처리하는 단계; 암모니아수 또는 암모니아수와 활성탄을 이용하여 상기 전처리 된 목질계 바이오매스를 중화하는 단계; 및 상기 단계에서 얻은 전체 슬러리에 대해 효소 가수분해 및 동시당화발효를 수행하는 단계를 포함하는 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명의 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법은 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하기 위해 전처리 과정에서 묶은 산을 처리하고, 암모니아수를 처리하여 중화시키며, 활성탄을 사용하여 전처리 시 발생한 저해물질을 제거한 후 전체 슬러리를 효소 가수분해 및 동시당화 발효에 참여시켜 에탄올의 생산 수율을 현저히 개선한 것을 특징으로 한다.
- [0015] 특히 목질계 바이오매스로 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 리그닌으로 구성된 기름 야자의 고체 폐기물, 즉, 트렁크, 빈 과실 다발 또는 잎을 사용할 수 있다. 보다 구체적으로, 리그닌 함량이 상대적으로 높은 빈 과실 다발을 사용하여 리그닌을 효과적으로 제거하고, 효소적 당화율을 높임과 동시에 고체/액체 분리 공정 없이 전체 슬러리를 사용함으로써 전체적인 공정을 단순화하고, 특히 묶은 산으로 전처리 시 말산을 사용할 경우, 활성탄을 이용한 저해물질 제거 과정을 별도로 실시할 필요가 없어 공정을 더욱 단순화할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 목질계 바이오매스에서 에탄올을 제조하는 방법을 단계별로 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

- [0017] 우선, 제1단계는 묽은 산을 이용하여 목질계 바이오매스를 전처리한다.
- [0018] 상기 묽은 산으로 0.5 내지 2%(w/v) 농도의 황산 또는 말산을 단독 또는 2종 사용할 수 있다.
- [0019] 산 처리 조건은 130 내지 190℃의 온도에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 600초의 유지 시간 동안 실시될 수 있다. 상기 유지 시간은 별도로 실시하지 않거나, 0 초과 600초 이하로 실시할 수 있다는 의미이다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 묽은 산으로 전처리 시 시험 온도 즉, 130 내지 190℃에서 온도가 증가함에 따라 환원당이 증가하였다. 또한, 상기 온도에서 600초 이하로 전처리를 유지하는 경우, 황산 처리 시 120초 이상에서는 환원당이 다소 감소하였고, 말산 처리 시 유지시간의 증가에 대한 환원당의 감소는 두드러지지 않았다.
- [0021] 산 전처리를 하지 않은 경우, 100g의 다발로부터 5.5g의 환원당이 생성된 반면, 1%의 황산 또는 말산의 전처리에서는 각각 14.7g과 16.0g의 환원당을 나타냈다.
- [0022] 또한, 산의 농도는 0.5 내지 2.0%(w/v)의 농도, 보다 구체적으로 약 1%(w/v)의 농도에서 최대의 환원당을 얻을 수 있었다.
- [0023] 따라서, 황산 처리의 경우 170 내지 190℃에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 120초의 유지 시간 동안 최대의 환원당을 얻을 수 있었다.
- [0024] 말산 처리의 경우에는 170 내지 190℃에서 2분 내지 3분의 증가 시간 후, 0 내지 600초의 유지 시간 동안 최대의 환원당을 얻을 수 있었다.
- [0025] 제2단계는 암모니아수 또는 암모니아수와 활성탄을 이용하여 상기 단계에서 전처리 된 목질계 바이오매스를 중화 및 조정하는 것이다.
- [0026] 상기 암모니아수는 묽은 산으로 전처리 된 목질계 바이오매스의 중화를 목적으로 사용되며 전체 슬러리의 pH를 4.6 내지 5.0 로 조정하는 것이 좋다. 상기 범위는 높은 효소 활성 유지 및 발효 미생물의 생장을 위함이다.
- [0027] 상기 암모니아수의 농도는 2 내지 28%(w/w)인 것이 좋다. 보다 구체적으로 약 28%(w/w)인 것이 좋다.
- [0028] 상기 활성탄은 화학적 전처리에서 발생한 저해물질을 제거하기 위해 사용할 수 있다. 예컨대, 묽은 황산으로 전처리할 경우, 아세트산과 푸르푸랄이 생성되어 발효 저해를 통해 에탄올 생산이 저해될 수 있으며, 활성탄은 이러한 발효 저해물질을 흡착시켜 발효 전 전체 슬러리 내 저해물질을 제거하는 것이다. 반면, 말산으로 전처리하는 경우 이러한 저해물질을 적게 생성하므로 활성탄을 이용하여 저해물질을 제거하는 과정을 생략할 수 있다.
- [0029] 따라서, 전처리 된 목질계 바이오매스는 황산으로 전처리되는 경우 2 내지 28%(w/w)의 암모니아수와 활성탄을 처리하여 중화하는 것이 좋고, 말산으로 전처리되는 경우 2 내지 28%(w/w)의 암모니아수만을 처리해도 충분하다.
- [0030] 활성탄은 석탄, 사탕수수 찌꺼기, 해초, 갈탄, 토탄, 벚집, 톱밥, 야자열매 껍질 등의 원료를 고온(약 1000℃)으로 탄화하고, 수증기 등으로 그 일부를 활성화 한 것으로서, 다수의 미세공이 서로 연락된 내부구조를 갖는 탄소물질이다. 활성탄의 가장 큰 특색은 흡착(Adsorption)이다. 흡착이란 주위의 기체 또는 액체를 다공질인 활성탄의 내부로 빨아들여 그 구멍 내부의 농도가 표면(계면)의 농도보다 짙은 상태에서 안정화(흡착평형)하는 성질을 지니고 있다. 상기 활성탄은 분말 활성탄을 사용할 수 있고, 입경은 0.1 내지 1.0 cm일 수 있다.
- [0031] 상기 활성탄을 효소 가수분해 및 동시당화 발효 전 제거될 수 있다.
- [0032] 상기 활성탄의 제거는 여과를 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 제3단계는 상기 단계에서 얻은 전체 슬러리에 대해 효소 가수분해 및 당화발효를 실시하여 에탄올을 제조하는 것이다.
- [0034] 상기 효소 가수분해에 사용되는 효소는 셀룰라제(cellulase), α-아밀라제(α-amylase), 글루코아밀라제(glucoamylase), 엔도글루카나제(endoglucanase), 자일라나제(xylanase), 베타-글루코시다제, α-아가라제(α-agarase), β-아가라제 I, β-아가라제 II, β-갈락토시다제(galactosidase), 네오아가로바이오스(neoagarobiose), 네오아가로테트라오스(neoagarotetraose), 네오아가로헥사오스(neoagarohexaose), α-네오아가로바이오스 하이드로라제(neoagrobiose hydrolase) 또는 이들의 혼합물 또는 복합체 등을 들 수 있으나, 이에

특별히 제한하는 것은 아니다.

- [0035] 발효 미생물로 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 크렙시엘라 옥시토카(*Klebsiella oxytoca*) P2, 브레타노마이세스 커스터시(*Brettanomyces curstersii*), 사카로마이세스 우브즈룬(*Saccharomyces uvzrun*), 캔디다 브래시카에(*Candida brassicae*), 벤트리컬리(*Sarcina ventriculi*), 자이모모나스 모빌리스(*Zymomonas mobilis*), 클루이베로마이세스 마르시아누스(*Kluyveromyces marxianus*) IMB3, 클로스트리듐 아세토부틸리쿰(*Clostridium acetobutylicum*), 클로스트리듐 베이저린키이(*Clostridium beijerinckii*), 클루이베로마이세스 프레이리시(*Kluyveromyces fragilis*), 브레타노마이세스 커스터시이(*Brettanomyces custersii*), 클로스트리듐 아루란티부틸리쿰(*Clostridium aurantibutylicum*) 및 클로스트리듐 테타노모프(*Clostridium tetanomorphum*) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0036] 상기 발효 공정 조건은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어, 초기 글루코스 농도 2 내지 30%(w/v)에서, 25 내지 37℃의 온도, 4.0 내지 8.0의 pH 조건으로 100 내지 250 rpm의 속도로 교반하면서 반응을 수행할 수 있다.
- [0037] 한편, 상기 당화과정과 발효과정은 각각 별도의 반응기에서 수행하는 분리 당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 공정으로 수행될 수도 있고, 하나의 반응기에서 당화와 발효를 동시에 수행하는 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 공정으로 수행될 수도 있다. 동시당화발효 공정에서는 당화과정에서 글루코오스가 생성되자마자 효모가 발효과정에 의해 글루코스를 바로 제거하고 반응기 내에 당의 축적을 최소화할 수 있으므로, 분리 당화발효 공정에서 나타나는 최종 생성물의 억제작용을 방지할 수 있고 효소의 가수분해 반응을 향상시킬 수 있다. 또한, 설비비용 저감과 낮은 효소 투입량에 의한 비용절감을 할 수 있고, 반응기 내에 에탄올이 존재하므로 오염문제를 감소시킬 수 있다. 바람직하게는 동시당화발효가 좋다.
- [0038] 필요에 따라, 당업자는 기타 추가단계 및/또는 공정을 수행할 수 있는 바, 예를 들어, 상기 발효과정에 의해 수득한 발효액을 당업계에 공지된 방법에 따라, 정제하는 정제과정을 등을 들 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 최적조건에서 전처리 및 증류수로 세척 후 회수된 기름 야자 빈 과일 다발을 이용하여 당화율을 측정하였을 때, 황산 전처리의 경우가 말산 전처리의 경우보다 더 높은 당화율을 나타냈다. 셀룰라제 및 베타-글루코시다아제를 황산 또는 말산 전처리된 다발에 적용 시 당화율은 각각 이론적 최대 글루코스 수율의 88.5%와 60.9%를 나타냈다.
- [0040] 종래의 암모니아수 침지법을 이용하여 전처리된 빈 과일 다발의 이전 당화 결과에 따르면 더 높은 효소의 사용에도 불구하고, 약 40%의 당화율을 나타낸 바 본 발명의 묽은 산 처리는 암모니아수 침지법보다 더 높은 당화율을 보여준다 할 것이다.
- [0041] 또한, 황산 또는 말산을 이용하여 전처리 후 세척된 다발로부터 초기 바이오매스에 포함된 글루칸 대비 각각 47.1%와 34.0%의 에탄올 수율이 나타났다.
- [0042] 말산의 경우, 전체 슬러리를 이용한 발효를 위해 암모니아로 pH를 조정하였고, 이는 고체만을 이용한 경우보다 79%의 증가를 보였으며, 액체 부분에 포함된 당과 말산을 이용한 전처리에 존재하는 적은 양의 저해물질 때문인 것으로 사료된다.
- [0043] 반면, 황산의 경우, 암모니아로 pH를 조정한 후, 활성탄을 이용하여 저해물질을 제거하였다. 이로부터, 발효액 내에 존재하던 아세트산과 푸르푸랄의 농도는 각각 2.0g/L와 0.9g/L에서 1.3g/L와 0.1g/L로 줄었다. 이 후의 발효공정을 통해 87.5%의 최대 에탄올 수율을 나타냈다.
- [0044] 또한, 효모에 대한 중화된 산의 저해효과를 실험한 결과, 실험 범위(0% 내지 2%) 내에서, 황산의 경우 저해성을 보였으나, 말산의 경우 저해현상이 나타나지 않았다. 이를 통해, 황산 전처리된 경우의 전체 슬러리의 발효에서 에탄올 수율이 낮은 원인은 아세트산과 푸르푸랄 이외에 중화된 산의 영향도 있는 것으로 보인다.
- [0045] 이와 같이 본 발명의 기름 야자의 빈 과일 다발의 묽은 산 전처리를 통해 당화 및 발효 효율을 증가시키고, 전체 슬러리의 발효에서 저해물질의 효과를 규명하였으며, 활성탄의 적용을 통하여 최종 수율을 향상시켰다. 이는 이전의 다른 발명들과 비교하였을 때, 빈 과일 다발의 발효효율을 증가시켰을 뿐만 아니라, 가수분해물과 전처리된 고체를 한꺼번에 이용함으로써, 고체상 및 액체상의 분리 공정을 줄였고, 전체 슬러리에 대한 이용 가능성을 보여주는 것이다.
- [0046] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예

에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [0047] <실시에 1> 기름 야자 빈 과실 다발에 대한 묶은 산 전처리
- [0048] 기름 야자 빈 과실 다발(Oil Palm Empty Fruit Bunches)은 Tropical Chase(Kuala Lumpur, Malaysia)로부터 제공받은 후 고속 회전 절삭기(MF 10, IKA, Staufen, Germany)를 사용하여 125-706 μm (25-120 mesh) 범위로 절단하였다. 원료의 건조중량 기준으로 39.2%(w/w)의 글루칸, 17.4%의 자일란, 2.5%의 갈락탄, 4.5%의 아라비난, 31.8%의 리그닌, 및 2.8%의 회분이 있다.
- [0049] 묶은 산 전처리를 위해, 황산(Daejung chemicals & Metals, Gyeonggi-do, Korea)과 말산 (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)을 원하는 농도로 희석하여 사용하였다. 100-mL의 용기에 2g의 건조된 다발을 20mL의 산 용액에 침지한 후 미니 열 반응기에서 1200 와트, 3분의 증가시간을 고정하고, 온도 조건, 유지시간, 산 농도 등을 다양하게 하여 실험하였다.
- [0050] 전처리의 완결 후, 전처리 된 슬러리를 여과포(22-25 μm , Calbiochem, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 여과하여 불용성 고체를 회수하였다. 그 후 전처리 된 불용성 고체를 세척액의 pH가 6~7이 될 때까지 약 1L의 증류수로 세척하였다. 그 세척된 고체를 3일 이상 45℃에서 진공 건조 오븐에서 건조하였고, 건조된 고체의 전체 고품 함량을 결정하기 위하여 건조된 고체의 대표적인 샘플을 105℃ 건조오븐에서 세 번 반복 밤새 탈수하였다.
- [0051] 실험 온도 조건은 130℃, 150℃, 170℃, 190℃이고, 산 농도는 각각 1%(w/v)의 황산과 말산을 사용하였으며, 전처리 시간은 약 10%(w/v)의 고체 로딩을 통해 3분의 증가시간 및 90초의 유지시간으로 하여 미니 열 처리 반응기에서 실시하였다(도 1). 또한, 시간 조건은 190℃의 온도와 1%의 농도를 이용하여 3분의 증가시간 이외에 0 내지 600초의 유지시간이 시험되었다(도 2). 마지막으로 산 농도 조건은 190℃의 온도와 3분의 증가시간 및 0초의 유지시간을 고정하고, 0 내지 2%의 농도를 이용하여 테스트하였다 (도 3). 환원당량은 DNS 법을 이용하여 측정하였다.
- [0052] 온도 조건을 실험한 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 온도를 150℃에서 170℃로 증가를 하는 동안, 환원당량은 황산과 말산에서 각각 7.0, 6.9에서 11.2, 11.0g/100g EFB로 증가하였다. 최고 환원당량을 보인 190℃의 온도를 최적으로 하여 이하 실험을 진행하였다.
- [0053] 시간 조건을 실험한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 유지시간이 증가하는 동안, 환원당량은 계속하여 감소되었다. 특히 황산에서는 120초의 유지시간 이후부터 99% 신뢰수준에서 유의적으로 감소하였고, 말산에서는 30초부터 유의적으로 감소하기 시작하였다. 황산은 말산과 달리 글루코스의 분해를 촉진시키기 때문이다. 따라서 3분의 증가시간 (190℃까지 올리는 데 필요한 최소시간) 이외의 반응시간은 불필요하다고 간주된다.
- [0054] 산 농도 조건을 실험한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 산 촉매가 없을 경우, 환원당량은 5.5g/100g EFB를 나타냈다. 반면, 1%의 산을 이용한 경우 황산과 말산에서 각각 최대 14.7 혹은 16.0g/100g EFB를 보여주었다. 0.5%의 낮은 산농도에서 말산은 황산보다 낮은 pKa 값 때문에, 낮은 환원당량을 나타냈고, 그 이외의 모든 농도에서 13.0g/100g EFB 이상의 값을 보여주었다.
- [0055] 최적의 조건으로, 황산과 말산에서 모두, 190℃, 3분 증가시간, 0초 유지시간, 1%(w/v) 농도를 선정하여, 이하 실험을 진행하였다.
- [0056] <실시에 2> 전처리 된 다발의 효소적 당화율
- [0057] 전처리 효과를 평가하기 위하여, 빈 과실 다발의 세척된 불용성 고체를 15, 30, 60FPU의 셀룰라아제/g-글루칸과 같은 첨가량의 Celluclast 1.5L와 Novozyme 188(Novozymes, Bagsvaerd, Denmark) 및 1%(w/v) 글루칸 첨가로 효소 가수분해를 수행하였다. 0.05M 구연산나트륨 완충용액(pH 4.8) 내의 황산 및 말산 전처리 후 세척된 다발을 포함하는 반응 혼합물을 48시간 동안 50℃, 170rpm에서 교반하면서 교반 배양기에서 배양하였다. 포도당의 이론적 최대 수율로 나타내는 효소 당화율은 효소 가수분해에 사용된 초기 바이오매스 내의 전체 포도당(g)에서 가수분해에 의하여 생성된 포도당(g)의 비율로서 결정된다 (도 4).
- [0058] 도 4에 나타난 바와 같이, 효소적 가수분해는 최적 조건(190℃, 3분 증가시간, (A) 1% 황산 및 (B) 1% 말산)에서 전처리된 후 증류수를 이용하여 세척된 다발을 이용하여 진행되었고, HPLC를 이용하여 당화율을 측정 및 계산한 결과, 황산과 말산에서 각각 88.5%와 60.9%의 당화율을 보여주었다. 이전 실험에서, 암모니아 침지법을 이

용하여 전처리 된 EFB의 당화율은 150 FPU의 효소를 이용하였을 때 약 40%를 보여주었다.

- [0059] <실시예 3> 중화 및 활성탄 처리 후 동시당화발효
- [0060] 전처리된 빈 과실 다발의 전체 슬러리 발효를 위하여, 28%(w/w)의 암모니아를 이용하여 pH를 4.8로 조정하였다.
- [0061] 화학적 전처리에서 발생한 저해물질을 제거하기 위하여 사용된 활성탄(Daejung chemicals & Metals, Gyeonggi-do, Korea)은 물로 세척된 후, 0.4M 염산(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 평형화하였고, 다시 물로 세척된 후 실온에서 건조하였다.
- [0062] 그 후 빈 과실 다발의 액상 부분에 고체 대 액체 비율 1:10으로 첨가하여 1시간 동안 반응시켰고, 사용된 활성탄은 여과포를 사용하여 제거하였다.
- [0063] 전처리된 다발의 발효능을 조사하기 위하여, 동시당화발효 실험을 수행하였다. 발효 배지는 0.05M 구연산 완충용액(pH 4.8), 1%(w/v) 효모 추출물 및 2%(w/v) 펩톤으로 구성되었다.
- [0064] 전체 100mL의 배지를 최종 글루칸 농도 3%(w/v)를 가지는 산 전처리되고 세척된 다발, 최종 기질농도 6%(w/v)의 산 전처리되고 중화된 전체슬러리 다발, 및 산 전처리되고 중화된 후 활성탄 처리된 다발을 이용하여 미세 호기 조건 및 발효 중 생성된 이산화탄소를 제거하기 위하여 바늘로 관통된 실리콘 마개를 장착한 250-mL 플라스크에 첨가하였다. 그리고 1% 효모 추출물 및 2% 펩톤 배지에서 미리 성장한 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) D₅A (ATCC 200062)를 이용하여 발효를 진행하였다(도 5).
- [0065] 동시당화발효는 (도 5A) 전처리 후 세척된 다발, (도 5B) 전처리 후 중화된 전체 슬러리 다발 및 전처리 후 중화 및 활성탄 처리된 전체 슬러리 다발을 이용하여 진행되었다. 도 5A는 최종 농도 3%의 글루칸 기준, 도 5B는 최종 농도 6%의 다발 기준으로 에탄올 수율이 평가되었다. 발효 배지는 30FPU/g 글루칸과 30CBU/g 글루칸의 효소와 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) D₅A를 이용하여 30℃, pH4.8에서 72시간 동안 진행되었다. 에탄올 수율은 전처리 되기 전 EFB에 존재하는 글루칸 농도를 기준으로 측정되었다.
- [0066] 도 5에 나타난 바와 같이, 전처리 후 세척된 EFB를 이용하여 72 시간의 발효 이후 얻어진 에탄올 농도는 비처리, 황산처리, 말산처리 EFB에서 각각, 11.2%, 47.1%, 34.0%를 보여주었다.
- [0067] 전체 슬러리를 이용하여 발효를 진행하였을 때, 황산과 말산처리 된 EFB 전체 슬러리로부터 약 60%, 50%의 에탄올 수율이 나타났고, 말산에서는 가수분해액의 유입으로 인하여 전체 에탄올 수율이 증가하였으나, 황산에서는 저해물질 등으로 인한 영향 때문에 수율에 변화가 없었다. 따라서, 황산 전처리 된 전체 슬러리를 활성탄을 처리하였고, 이를 통해, 주요한 저해물질인 아세트산과 푸르푸랄 등의 농도가 2.0, 0.9g/L에서 1.3, 0.1g/L로 감소함을 확인하였다. 87.5%의 에탄올 수율이 황산 전처리 후 활성탄 처리한 전체 슬러리로부터 나타났다.
- [0068] <실시예 4> 중화된 산의 효모 성장에 대한 영향
- [0069] 효모의 성장에 대한 중화된 산의 영향을 확인하기 위하여 1% 효모 추출물 및 2% 펩톤과 5%의 글루코스를 포함한 100mL의 배지에서 다양한 농도의 산이 시험되었다. 0.5M의 구연산나트륨 완충용액을 이용하여 최종 pH는 4.8로 조정하였다. 28%(w/w)의 암모니아수가 배지에 첨가되었고, 30℃, 200rpm으로 48시간 동안 배양 테스트가 진행되었고, 세포의 성장 밀도는 Mark Microplate 흡광도미터계를 이용하여 600nm에서 측정되었다(도 6).
- [0070] 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) D₅A의 중화된 산에 대한 영향을 비교하기 위하여 다양한 농도의 (도 6A) 황산과 (도 6B) 말산이 배지에 첨가되었다. 동시당화발효와 같은 조건에서 실험이 수행되었다.
- [0071] 도 6에 나타난 바와 같이, 실험 범위(0% 내지 2%) 내에서, 황산의 경우 저해성을 보였으나, 말산의 경우 저해현상이 나타나지 않았다. 이를 통해, 황산 전처리된 경우의 전체 슬러리의 발효에서 에탄올 수율이 낮은 원인은 아세트산과 푸르푸랄 이외에 중화된 산의 영향도 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0072] <실시예 5> 조성 분석
- [0073] 산 전처리 또는 미처리된 바이오매스의 조성 분석을 위하여, 탄수화물 및 산성 불용성 리그닌에 대한 NREL 방법

(Sluiter A 등, 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass 및 Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples)을 사용하였다. 바이오매스의 수분 함량은 NREL 방법(Sluiter A 등, 2008. Determination of total solids in biomass and total dissolved solids in liquid process samples)에 기초하여 측정하였다. 탄수화물 조성 분석에서 당 함량 및 효소 소화능력은 Pb^{2+} 를 가지는 이온 교환 컬럼(SP0810; Showa Denko KK, Kawasaki, Japan)을 사용하여 결정하였고, 당 검출은 시차굴절검출기로 수행하였다. 아세트산, 푸르푸랄, 히드록시메틸푸르푸랄 등의 저해물질 측정을 위하여 H^+ 를 가지는 컬럼(HPX87H; Biorad, Hercules, CA, USA)를 이용하였고, 역시 시차굴절검출기로 수행하였다. 모든 분석은 3회 반복 수행하였다.

표 1

[0074]

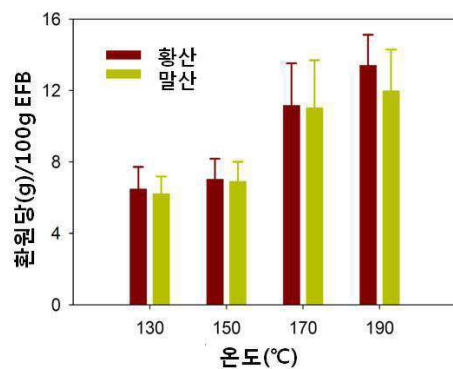
전처리된 전체 슬러리 및 이의 발효액 내 당 및 억제물질의 농도

발효액 내 억제물질의 농도 (g/L)	황산		말산
	중화	활성탄 처리 및 중화	중화
글루코스	2.4 ± 0.4	2.0 ± 0.3	0.9 ± 0.1
아세트산	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
글리세롤	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.0
푸르푸랄	0.9 ± 0.0	0.1 ± 0.1	ND ^b
하이드록시메틸푸르푸랄	ND ^b	ND ^b	ND ^b
레불린산	ND ^b	ND ^b	ND ^b
포름산	ND ^b	ND ^b	ND ^b

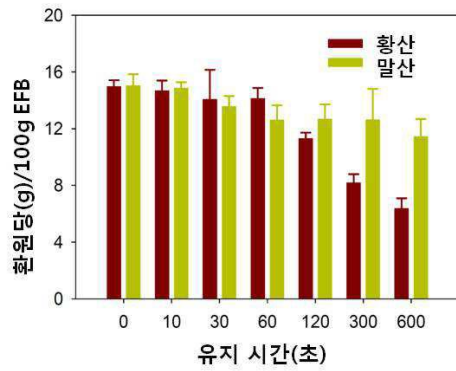
실험 데이터는 평균±표준편차로 표시함.
b: HPLC에서 검출되지 않음을 의미함.

도면

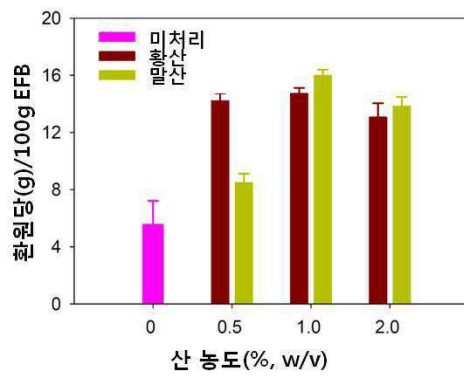
도면1



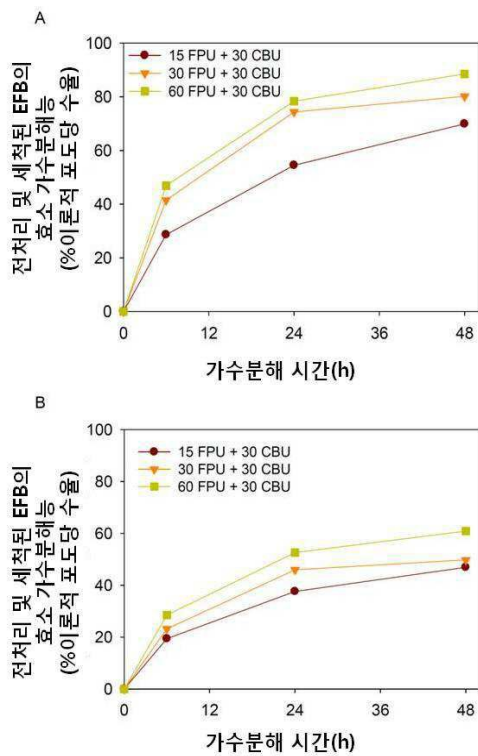
도면2



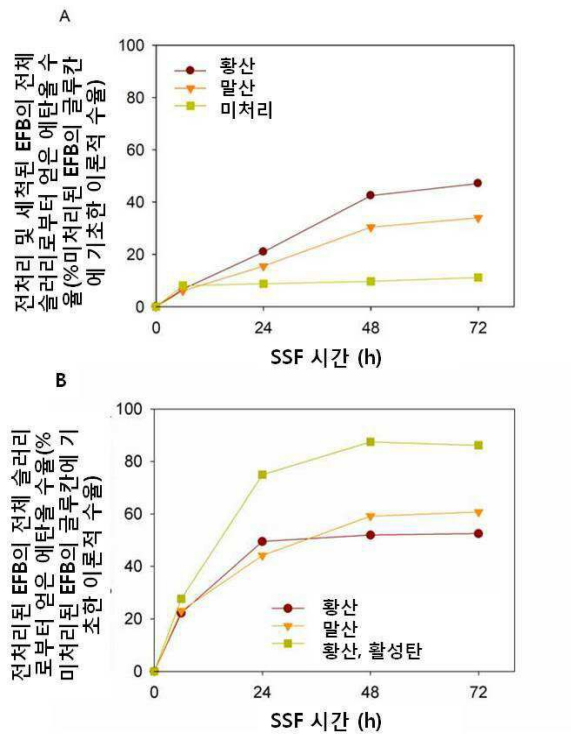
도면3



도면4



도면5



도면6

