



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0044954
(43) 공개일자 2019년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2018.01) C12P 1/02 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
C12P 7/16 (2006.01) C12R 1/80 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
C12P 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0137603
(22) 출원일자 2017년10월23일
심사청구일자 2017년10월23일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
윤경표
대구광역시 수성구 청호로69길 30, 201동 106호
(황금동, 가든하이츠2차아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 16 항

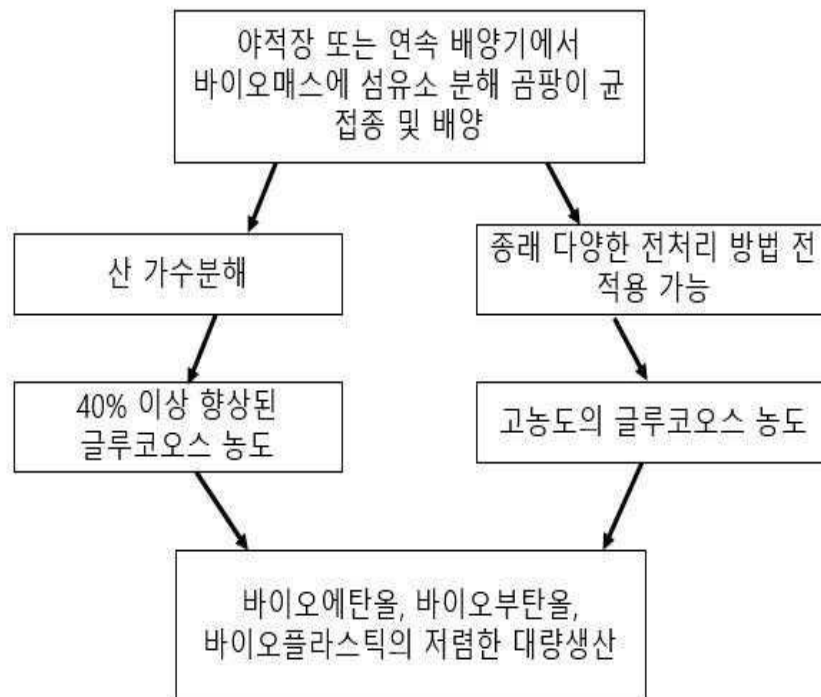
(54) 발명의 명칭 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산을 위한 바이오매스의 전처리 및 당화 방법

(57) 요약

본 발명은 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산을 위한 바이오매스의 전처리 및 당화 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 물리·화학적 전처리에 앞서 바이오매스를 신규한 섬유소 분해 곰팡이인 KPYBE10로 배양처리하면, 낮은 황산 농도, 낮은 온도, 짧은 시간, 적은 양의 당화효소를 사용하여도 동일한 글루코오스 농

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



도를 지닌 당화액의 제조가 가능하며, 또한, 본 발명의 물리·화학적 조건은 푸르푸랄, 하이드로메틸 푸르푸랄 등과 같은 발효저해물질의 발생을 감소시켜 제독과정이 필요 없는 부수적인 효과가 있다.

본 발명의 산 가수분해를 사용하는 전처리법은 종래의 제2세대 바이오에탄올 직접생산비용 중 53%로 반 이상을 차지하는 전처리·당화 비용과 고압증기·전기비용을 대폭 절감시킬 수 있으며, 상기 방법으로 제조된 저비용 당화액은 제2세대 바이오연료 및 바이오플라스틱 생산을 위한 공업발효용 미생물 배지로 사용될 수 있어, 상업적 규모의 생산을 조속히 실현시킬 수 있는 저렴하고 친환경적인 새로운 방법이다.

(52) CPC특허분류

C12P 19/02 (2013.01)

C12P 7/06 (2013.01)

C12P 7/16 (2013.01)

C12P 2201/00 (2013.01)

C12R 1/80 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

토양으로부터 채취한 페니실리움 속(Penicillium species) 미생물로서, 가혹 조건에서 생존가능하는 것을 특징으로 하는 섬유소 분해 곰팡이.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 가혹 조건은 40 내지 50℃의 온도에서 처리하는 것을 특징으로 하는 섬유소 분해 곰팡이.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 섬유소 분해 곰팡이는 KCTC13356BP로 기탁된 것을 특징으로 하는 섬유소 분해 곰팡이.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 섬유소 분해 곰팡이는 바이오매스의 당화 효율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 섬유소 분해 곰팡이.

청구항 5

(a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; 및

(b) 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 살포하여 배양하는 단계;

를 포함하는, 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 (b) 단계의 물, 황산용액 또는 바이오매스는 멸균 처리 없이 사용이 가능하며, 추가 영양성분의 투입 없이 배양하는 것을 특징으로 하는, 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 바이오연료는 바이오에탄올 또는 바이오부탄올인 것을 특징으로 하는, 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법은,

(a) 바이오매스를 분쇄하는 단계;

(b) 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 접종하여 배양하는 단계;

(c) 상기 배양된 배양물에 산을 처리하여 가수분해하는 단계;

(d) 상기 가수분해 후 얻은 결과물을 고상 및 액상으로 분리하는 단계;

(e) 상기 고상에 셀룰로오스 분해 효소를 처리하여 6탄당 당화액을 수득하거나 상기 액상에 중화제를 처리하여 5탄당 당화액을 수득하는 단계;

(f) 상기 6탄당 당화액, 5탄당 당화액 또는 이의 혼합 당화액에 바이오연료 발효 미생물을 접종하고 배양하여

바이오연료 발효액을 제조하는 단계; 및

(g) 상기 발효액을 증류하여 농축된 바이오연료를 제조하는 단계;

를 포함하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법은,

(a) 바이오매스를 분쇄하는 단계;

(b) 제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 따른 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 접종하여 배양하는 단계;

(c) 상기 배양된 배양물에 산을 처리하여 가수분해하는 단계;

(d) 상기 가수분해 후 얻은 결과물을 고상 및 액상으로 분리하는 단계;

(e) 상기 고상에 셀룰로오스 분해 효소를 처리하여 6탄당 당화액을 수득하고 상기 액상에 중화제를 처리하여 5탄당 당화액을 수득하는 단계; 및

(f) 상기 6탄당 및 5탄당 혼합 당화액에 바이오플라스틱 합성 재료를 생성하는 균주를 접종하고 배양하여 바이오플라스틱을 제조하는 단계;

를 포함하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 10

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 섬유소 분해 곰팡이는 KCTC13356BP로 수탁된 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 11

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 섬유소 분해 곰팡이는 페니실리움 속(Penicillium species) 미생물인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 12

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 바이오매스는 옥수수대(corn stover), 옥수수속(corn cobs), 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 사탕무 찌꺼기, 벳짚, 왕겨, 밀짚, 갈대, 해바라기 줄기, 스위치그라스(switchgrass), 유채대, 폐목재, 톱밥, 잔디, 면(cotton), 아마(flax) 및 과일껍질 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 13

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 (a) 단계 이후, 분쇄된 바이오매스를 한 변의 길이가 0.25 내지 10 mm인 그물망에 통과시키는 단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 14

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 (b) 단계는 40 내지 50℃의 온도 조건 시, 섬유소 분해 곰팡이를 물에 현탁하여 분쇄된 바이오매스에 접종하고, 3 내지 14일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 15

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 (b) 단계는 40℃ 미만의 온도 조건 시, 섬유소 분해 곰팡이를 0.1 내지 0.2%(w/v) 황산 용액에 현탁하여 분쇄된 바이오매스에 접종하고, 3 내지 14일 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

청구항 16

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 (c) 단계의 가수분해는 0.1 내지 10%(w/v)의 산성 용액으로 130 내지 300℃의 온도 조건에서 30 내지 90분 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 제2세대 바이오연료인 목질계(lignocellulosic) 바이오매스 및 신규 섬유소 분해 곰팡이를 이용하여 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산을 위한 간단하고 비용절감 효과가 큰 바이오매스 전처리 및 40% 이상의 당화 효율 향상 당화법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 수송용 바이오에탄올 및 바이오디젤은 미국과 브라질에서 상용화 중이며, 10% 바이오에탄올을 함유한 휘발유(BE10) 또한 유럽의 주유소 등에서 쉽게 구입이 가능하다. 그러나 옥수수, 밀, 사탕수수 등과 같은 식량자원을 발효하여 각국 정부의 지원 하에 제1세대 바이오에탄올을 생산하는 현재의 상용화된 방식은 식량부족 사태를 더욱 심화시키는 문제점이 있어, 옥수수대, 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 벚짳, 밀짳, 갈대, 스위치그라스(switchgrass), 과일껍질, 사탕무우 찌꺼기, 폐목재 톱밥 등과 같은 저렴한 농임산 부산물인 비식량 자원을 이용한 제2세대 바이오에탄올(cellulosic bioethanol)의 경제적 생산 및 상용화가 시급한 실정이다.

[0003] 상기 농임산 부산물은 셀룰로오스(섬유소) 38-45%, 헤미셀룰로오스(반섬유소) 22-40%, 리그닌 5-25%로 구성되어 있다. 지구상에 가장 많이 존재하는 유기물인 섬유소는 포도당이 수 천개 연결된 구조로서, 이를 당화·발효하여 바이오에탄올로 전환하여 운송용 연료로 사용하려는 노력이 지속되고 있다. 그러나 당화를 위한 여러 기술들이 존재함에도 불구하고, 아직 경제적인 전처리 공정이 입증되지 않아 상업적 생산을 실현하지 못하고 있다. 미국, 캐나다, 유럽, 일본, 중국 등에서 옥수수대, 밀짳 등의 농산 부산물을 원료로 하여 산 가수분해(acid hydrolysis) 전처리 방법으로 제2세대 바이오에탄올 생산 시험 공장이 가동 중이나 전처리·당화에 소비되는 시간 및 비용을 대폭 절감할 수 있는 전처리 공정의 발전이 느리게 진행되어 아직 상용화와는 거리가 있는 실정이다.

[0004] 제2세대 바이오에탄올 생산 공정을 제1세대 바이오에탄올 생산 공정과 비교해 보면, 제2세대 바이오에탄올 생산 공정에는 저렴한 농산 부산물 구입 및 취급 공정과 전처리·당화 공정이 추가되며, 나머지 후속 공정(발효, 정제 등)은 제1세대 바이오에탄올 생산 공정과 동일하다. 따라서 제2세대 바이오에탄올의 직접 생산 비용은 고가의 식량자원 대신에 저렴한 옥수수대나 사탕수수 찌꺼기 등을 이용하여 상대적으로 매우 저렴하나 전처리·당화 공정이 가격 상승의 요인이 되어 전처리·당화 비용절감과 소요시간이 단축되는 새로운 개념의 전처리·당화 공정 개발이 절실하게 필요한 시점이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 국제 공개특허 제 2017010789호 (2017.01.19 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 신규 섬유소 분해 곰팡이 및 상기 신규 섬유소 분해 곰팡이를 이용한 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산을 위한 간단하고 비용절감 효과 큰 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 토양으로부터 채취한 페니실리움 속(Penicillium species) 미생물로서, 가혹 조건에서 생존가능하는 것을 특징으로 하는 신규 섬유소 분해 곰팡이를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; 및 (b) 상기 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 살포하여 배양하는 단계;를 포함하는, 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 물리·화학적 전처리에 앞서 바이오매스를 신규한 섬유소 분해 곰팡이인 KPYBE10로 배양처리하면, 낮은 황산 농도, 낮은 온도, 짧은 시간, 적은 양의 당화효소를 사용하여도 동일한 글루코오스 농도를 지닌 당화액의 제조가 가능하며, 또한, 본 발명의 물리·화학적 조건은 푸르푸탈, 하이드로메틸 푸르푸탈 등과 같은 발효저해물질의 발생을 감소시켜 제독과정이 필요 없는 부수적인 효과가 있다.

[0010] 본 발명의 산 가수분해를 사용하는 전처리법은 종래의 제2세대 바이오에탄올 직접생산비용 중 53%로 반 이상을 차지하는 전처리·당화 비용과 고압증기·전기비용을 대폭 절감시킬 수 있으며, 상기 방법으로 제조된 저비용 당화액은 제2세대 바이오연료 및 바이오플라스틱 생산을 위한 공업발효용 미생물 배지로 사용될 수 있어, 상업적 규모의 생산을 조속히 실현시킬 수 있는 저렴하고 친환경적인 새로운 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 목적제 바이오매스 및 신규 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10을 이용한 바이오매스 전처리 및 당화 효율 향상방법의 개념도를 나타낸 것이다.

도 2는 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 이용한 A) 제2세대 바이오에탄올 및 B) 바이오플라스틱의 제조 공정을 단계 별로 나타낸 것이다.

도 3은 KPYBE10의 분생자두와 분생자를 현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 것이다.

도 4는 옥수수대 분말이 첨가된 배지를 멸균처리하고, KPYBE10을 접종한 다음 다양한 배양 온도(28℃, 21℃, 18℃, 15℃)에서 A) 일주일 또는 B) 한달 배양 후, KPYBE10의 생육 활성을 비교한 것이다.

도 5는 톱밥이 첨가된 배지를 멸균처리하고, KPYBE10을 접종한 다음 다양한 배양 온도(28℃, 21℃, 18℃, 15℃)에서 A) 일주일 또는 B) 한달 배양 후, KPYBE10의 생육 활성을 비교한 것이다.

도 6은 옥수수대 분말이 첨가된 배지를 멸균처리하지 않고, KPYBE10을 접종한 다음 다양한 온도(28℃, 35℃, 40℃)에서 일주일 배양 후, 바이오매스에 존재하는 내성적 균주의 생육 억제를 확인한 것이다.

도 7은 멸균처리 하지 않은 옥수수대 분말이 첨가된 배지에 0.1% 또는 0.2%의 황산 용액을 첨가하고, KPYBE10을 접종한 다음 28℃에서 7일 동안 배양 후, 잡균의 생육 억제를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 발명자는 신규한 섬유소 분해 곰팡이인 KPYBE10을 바이오매스에 직접 배양처리하여 총 전처리 비용, 소요 시간 및 당화효소 구입비용을 대폭 절감시키고, 당화결과 생성되는 글루코오스의 농도를 대폭 증가시켜 당화 효율을 증대시키는 효과를 가지는 바이오매스 전처리 및 당화 방법을 제공함으로써, 제2세대 바이오에탄올, 바이오부탄올, 바이오플라스틱 등의 산업화에 적용이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 토양으로부터 채취한 페니실리움 속(Penicillium species) 미생물로서, 가혹 조건에서 생존가능하는 것을 특징으로 하는 섬유소 분해 곰팡이를 제공한다.

[0015] 상기 가혹 조건은 40 내지 50℃의 온도에서 처리하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0016] 상기 섬유소 분해 곰팡이는 KCTC13356BP로 기탁된 것으로, 바이오매스의 당화 효율을 향상시킬 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; 및 (b) 상기 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 살포하여 배양하는 단계;를 포함하는, 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법을 제공한다.

[0019] 상기 (b) 단계의 물, 황산용액 또는 바이오매스는 멸균 처리 없이 사용이 가능하며, 추가 영양성분의 투입 없이

신규한 섬유소 분해 곰팡이인 KPYBE10을 상기 바이오매스에서 배양할 수 있다.

[0020] 상기 바이오연료는 바이오에탄올 또는 바이오부탄올일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0022] 상기 바이오연료 또는 바이오플라스틱 생산용 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상 방법은 초반에 동일한 단계(a 내지 e 단계)로 이루어진다.

[0023] 상기 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법은, 바이오연료의 경우, (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; (b) 상기 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 접종하여 배양하는 단계; (c) 상기 배양된 배양물에 산을 처리하여 가수분해하는 단계; (d) 상기 가수분해 후 얻은 결과물을 고상 및 액상으로 분리하는 단계; (e) 상기 고상에 셀룰로오스 분해 효소를 처리하여 6탄당 당화액을 수득하거나 상기 액상에 중화제를 처리하여 5탄당 당화액을 수득하는 단계; (f) 상기 6탄당 당화액, 5탄당 당화액 또는 이의 혼합 당화액에 바이오연료 발효 미생물을 접종하고 배양하여 바이오연료 발효액을 제조하는 단계; 및 (g) 상기 발효액을 증류하여 농축된 바이오연료를 제조하는 단계;를 포함한다.

[0024] 더욱 상세하게는, 상기 (f) 단계에서 6탄당 당화액은 6탄당 발효균주(효모 등)를 이용하여 에탄올 발효하고, 5탄당 당화액은 5탄당 발효균주[피키아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 파키솔렌 타노필러스(*Pachysolen tannophilus*), 칸디다 셰하타(*Candida shehata*) 등]를 이용하여 에탄올 발효하거나 6탄당 당화액과 상기 5탄당 당화액을 혼합한 혼합물을 동시에 발효시키는 균주(유전자 재조합 *Zymomonas mobilis*, 유전자 재조합 대장균 등)를 사용하여 동시 발효할 수 있다. 또한, 바이오부탄올의 경우에는 상기 6탄당 당화액과 5탄당 당화액의 혼합물에 크로스트리디움(*Clostridium*)을 접종하여 발효할 수 있다.

[0026] 상기 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법은, 바이오플라스틱의 경우, (a) 바이오매스를 분쇄하는 단계; (b) 상기 섬유소 분해 곰팡이를 물 또는 황산용액에 현탁한 혼합액을 상기 분쇄된 바이오매스에 접종하여 배양하는 단계; (c) 상기 배양된 배양물에 산을 처리하여 가수분해하는 단계; (d) 상기 가수분해 후 얻은 결과물을 고상 및 액상으로 분리하는 단계; (e) 상기 고상에 셀룰로오스 분해 효소를 처리하여 6탄당 당화액을 수득하고 상기 액상에 중화제를 처리하여 5탄당 당화액을 수득하는 단계; 및 (f) 상기 6탄당 및 5탄당 혼합 당화액에 바이오플라스틱 합성 재료를 생성하는 균주를 접종하고 배양하여 바이오플라스틱을 제조하는 단계;를 포함하는 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법을 제공한다.

[0027] 상세하게는, 상기 (f) 단계에서 6탄당 당화액 및 5탄당 혼합 당화액은 바이오플라스틱의 합성 재료가 되는, 하이드록시 발러레이트(hydroxy valerate), 하이드록시부티레이트(hydroxy butyrate) 등을 합성하는 알칼리제네스 유티로퍼스(*Alcaligenes eutrophus*)와 같은 균주를 접종하고 배양할 수 있어, 상기 배양물은 공업용 발효배지로 사용이 가능하다.

[0029] 상기 섬유소 분해 곰팡이는 KCTC13356BP로 수탁된 것으로, 페니실리움 속(*Penicillium species*) 미생물이다.

[0030] 상기 바이오매스는 옥수수대(corn stover), 옥수수속(corn cobs), 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 사탕무우 찌꺼기, 벧짚, 왕겨, 밀짚, 갈대, 해바라기 줄기, 스위치그라스(switchgrass), 유채대, 폐목재, 톱밥, 잔디, 면(cotten), 아마(flax) 및 과일껍질 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0031] 상기 (a) 단계 이후, 분쇄된 바이오매스를 한 번의 길이가 0.25 내지 10 mm인 그물망에 통과시키는 단계;를 더 포함할 수 있다.

[0032] 상기 (b) 단계는 40 내지 50℃의 온도 조건 시, 섬유소 분해 곰팡이를 물에 현탁하여 분쇄된 바이오매스에 접종하고, 3 내지 14일 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0033] 상기 (b) 단계는 40℃ 미만의 온도 조건 시, 섬유소 분해 곰팡이를 0.1 내지 0.2%(w/v) 황산 용액에 현탁하여 분쇄된 바이오매스에 접종하고, 3 내지 14일 동안 배양할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다. 이후, 전처리 반응 시에는 미리 추가한 황산의 양 만큼 황산을 적게 사용한다.

[0034] 상기 (b) 단계에서 섬유소 분해 곰팡이의 접종량은 5일 안에 바이오매스 전체에서 활발히 증식될 수 있도록 충분한 양의 포자를 살포하는 것을 특징으로 한다. 살포용 종균조제는 전처리에 사용할 바이오매스의 규모에 따라

다단계(5-10 단계) 종균배양법을 사용하는 것으로 다음 접종에 사용할 바이오매스의 양을 순차적으로 10-50 배씩 증대시켜 종균배양하여 충분한 개수의 포자종균을 형성시킨 후 포자가 형성된 바이오매스를 물(공업용수, 40℃에서 배양시는 멸균수가 필요 없음)에 현탁하여 바이오매스 야적장에 살포한다.

[0035] 상기 (c) 단계의 가수분해는 0.1 내지 10%(w/v)의 산성 용액으로 130 내지 300℃의 온도 조건에서 30 내지 90분 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0037] 도 1은 본 발명의 목질계 바이오매스 및 신규 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10을 이용한 바이오매스의 전처리 및 당화 효율 향상방법의 개념도를 나타낸 것이다.

[0038] 본 발명의 바이오매스 전처리 및 당화 효율 향상방법은 추가적인 기기설치의 필요 없이 바이오매스 야적장에서 목질계 바이오매스에 KPYBE10의 포자종균을 접종 한 후, 40℃에서 5-7일 배양함으로써 더욱 온화한 전처리 조건을 사용할 수 있고, 그 후 셀룰라제를 처리하면 글루코오스 농도를 40% 이상 증대시킬 수 있다. 이는 목질계 바이오매스로부터 같은 양의 당을 얻기 위하여 더욱 더 온화한 물리·화학적 조건(낮은 전처리 압력, 낮은 온도, 짧은 시간, 낮은 황산 농도)과 더 적은 양의 셀룰라제를 사용할 수 있다는 것을 의미하며, 제2세대 바이오연료 및 바이오플라스틱의 저렴한 대량 생산 및 상업화의 실현을 앞 당길수 있는 방법을 제공한다.

[0039] 또한, 본 발명은 목질계 바이오매스의 모든 물리·화학·생물학적 전처리법 [산 가수분해(acid hydrolysis), 증기 폭쇄(steam explosion), 오르가노솔브(organosolv), 아황산염 전처리(sulfite pretreatment), SO₂-에탄올-물(AVAP®) 분획(SO₂-ethanol-water(AVAP®) fractionation), 알칼리성 습식 산화 및 오존 전처리(alkaline wet oxidation and ozone pretreatment), 암모니아 폭쇄(ammonia fiber explosion; APEX), 암모니아 재순환 침출법(ammonia recycle percolation; ARP), 석회(lime), 음파(sonication), 방사(irradiation), 고온·고압법, 생물학적 전처리법 등]에 앞서서 바이오매스 야적장에서 매우 저렴하게 실시할 수 있는 당화 효율 향상방법을 제공하여, 제2세대 바이오에탄올, 제2세대 바이오부탄올 및 바이오플라스틱(lignocellulosic biodegradable bioplastic) 생산비용을 대폭 절감시킬 수 있어, 이들 산업의 실증적 실현을 가능하게 하는 방법을 제공한다.

[0041] 도 2는 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 이용한 A) 제2세대 바이오에탄올 및 B) 바이오플라스틱의 제조 공정을 단계 별로 나타낸 것이다.

[0042] S100은 바이오매스 투입 단계로, 본 발명의 공급 원료로 이용되는 바이오매스는 다양한 농산 부산물을 포함하는데, 바람직하게는, 옥수수대(corn stover), 옥수수속(corn cobs), 사탕수수 찌꺼기(bagasse), 사탕무우 찌꺼기, 벧짚, 왕겨, 밀짚, 갈대, 스위치그라스(switchgrass), 유채대, 폐목재, 톱밥, 잔디, 면(cotton), 아마(flax), 또는 과일껍질이고, 보다 바람직하게는 옥수수대, 옥수수속, 사탕수수 찌꺼기, 사탕무우 찌꺼기, 벧짚, 밀짚, 갈대, 스위치그라스, 목재, 톱밥, 또는 과일껍질이며, 가장 바람직하게는 옥수수대, 옥수수속, 사탕수수 찌꺼기, 사탕무우 찌꺼기, 벧짚, 밀짚, 갈대, 스위치그라스, 톱밥일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0043] S110은 바이오매스 분쇄 단계로, 본 발명에서 바이오매스를 분쇄하는 공정은 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 물리적으로 잘게 부수는 예컨대, 전단(shearing), 밀링(milling) 또는 그라인딩 방법을 포함하고, 밀, 나이프 커터 또는 믹서기(blender)를 이용하여 바이오매스를 분쇄할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상술한 단계 이후에 분쇄된 바이오매스를 한 변의 길이가 0.25-10 mm인 그물 망에 통과시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 보다 바람직하게는 그물망의 한 변의 길이는 0.25-3 mm이고, 가장 바람직하게는 0.25-1 mm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.

[0045] S120은 살수기로 섬유소 분해 미생물 균주를 현탁 살수하는 단계로, 상기 섬유소 분해 미생물 균주로는 셀룰라제를 분비하는 모든 미생물[곰팡이: 아스페르길루스(Aspergillus), 푸사리움(Fusarium), 휴미콜라(Humicola), 멜라노카르푸스(Melanocarpus), 페니실리움(Penicillium), 트리코데르마(Trichoderma); 세균: 에시도써무스(Acidothermus), 알칼리게네스(Alcaligenes), 아녹시바실러스(Anoxybacillus), 바실러스(Bacillus), 셀룰로모나스(Cellulomonas), 켈비브리오(Cellvibrio), 클로스트리듐(Clostridium), 사이토파가(Cytophaga), 마이크로비스포라(Microbispora), 노카르디옵시스(Nocardiosis), 슈도모나스(Pseudomonas), 로도써무스(Rhodothermus), 스트렙토미세스(Streptomyces), 써모모노스포라(Thermomonospora) 등]의 사용이 가능하나 본 발명의 신규한 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10 균주를 사용 시, 저렴한 비용으로 친환경적인 목질계 바이오매스 당

화 효율 향상방법을 제공한다.

- [0046] S130은 야적장에서 바이오매스 및 KPYBE10를 혼합 배양하는 단계로, 필요 시 수분유지를 위하여 물을 상부에서 추가로 살포하며, 위에는 비닐 보온 방수포를 덮어서 수분증발을 방지하고 온도 유지를 돕는다. 또한, 겨울 등의 계절적인 요인을 고려하여 야적장 바닥에 열 배관 형태로 약간의 열을 공급한다.
- [0047] 도면부호 10은 바이오매스 및 곰팡이의 혼합 연속 배양실로, 상기 장치는 계절적인 요인 등으로 야적장의 온도가 15℃ 이하로 유지되어 상기 곰팡이의 적절한 생육속도가 저하될 때 또는 최소한의 야적장 면적을 사용하면서 KPYBE10 배양처리 속도를 증가시킬 필요성이 있을 때 사용할 수 있는 단열재로 보온되는 단순 구조의 연속 혼합 배양실이다. 상부로부터 파쇄 후 0.25-2 mm 망으로 체질한 바이오매스를 연속적으로 투입하고, 천장에 있는 살수기(S120)를 이용하여 40℃ 배양 시에는 물에 현탁한 포자중균을 살수하고, 25-35℃ 배양 시에는 잡균의 생육을 저해하기 위하여 0.1~0.2% 황산 용액에 현탁한 포자중균을 살수하며, 배양실 내부에 설치되어 있는 교반기로 주기적으로 혼합해 주면서, 5-7일 채류시간 후에 하부 바닥으로부터 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 연속적으로 채취하여 후속 공정인 전처리·당화공정에 사용한다. 0.1~0.2% 황산 용액에 중균포자를 현탁한 경우, 전처리 반응 시에는 미리 추가한 황산의 양 만큼 황산을 적게 사용한다.
- [0048] S140은 바이오매스의 산 가수분해 단계로, 분쇄된 바이오매스를 가수분해하기 위해서 이용되는 산은 당업계에 공지된 다양한 산을 포함하나, 바람직하게는 황산, 염산, 질산, 아세트산, 포름산 또는 인산이고, 보다 바람직하게는 황산, 염산 또는 질산이며, 가장 바람직하게는 황산일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0049] 본 발명의 다른 바람직한 구현 예에 따르면, 가수분해는 황산의 농도 0.1-80%(w/v), 온도 60-250℃에서 20-240분 동안 수행하고, 보다 바람직하게는 황산의 농도 0.1-5%(w/v), 온도 100-200℃에서 30-120분 동안 수행하며, 가장 바람직하게는 황산의 농도 0.5%(w/v), 온도 140-160℃에서 20-60분 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0050] 상기 공정에 사용된 저농도 황산(H_2SO_4)을 탄산칼슘($CaCO_3$) 또는 소석회[$Ca(OH)_2$]로 중화하면 석고($CaSO_4$)가 형성되어 전량 친환경 석고보드를 만드는 원료로 사용할 수 있다. 또한, 비교적 낮은 온도와 짧은 처리 시간은 전처리에 필요한 총 에너지 비용을 절감시킬 수 있어, 경제적인 바이오에탄올 생산을 가능하게 한다.
- [0051] S150은 전처리 결과물을 액상 및 고상으로 분리하는 단계로, 고액 분리 필터로서 고체(S)와 액체(L)를 분리한다. 고체는 육탄당(포도당)이 주성분인 섬유소이고, 액체는 오탄당(Xylose)이 주성분이다.
- [0052] S160은 당화조에서 고상에 셀룰라제를 처리하여 육탄당 당화액을 수득하는 단계로, 첨가된 셀룰라제에 의하여 섬유소의 당화가 일어나 포도당이 형성된다.
- [0053] S170은 육탄당 발효조에서 육탄당 당화액이 에탄올 생성 발효 균주에 의하여 에탄올로 발효되는 단계이다.
- [0054] S180은 원심분리기에서 당화가 일어나고 남은 섬유소 리그닌 등의 고형 물질을 에탄올을 함유하는 액체와 분리하는 단계이다. 고형물질은 가축사료로 사용하거나 태워서 발전용으로 또는 고압증기를 발생시켜 공장 내에서 사용하며 남은 것은 주변 공장에 판매한다.
- [0055] S190은 오탄당 발효조에서 상기 S150의 액상을 탄산칼슘($CaCO_3$) 또는 소석회[$Ca(OH)_2$]로 중화시켜 생성된 오탄당 당화액이 에탄올 생성 발효 균주에 의하여 에탄올로 발효되는 단계이다.
- [0056] S200은 오탄당 발효액으로부터 원심분리기로 중화 과정 후 생성된 석고($CaSO_4$, gypsum)와 다른 고형물질들을 분리하는 단계이다. 상기 석고를 분리하여 친환경 석고보드(gypsum board) 제조용으로 사용이 가능하다.
- [0057] S210은 증류 장치를 이용한 증류 단계로서 통상적 증류와 분자채(molecular sieve)를 통하여 99.9%의 바이오에탄올을 제조한다.
- [0058] 도면부호 20은 99.9%의 바이오에탄올 저장고이다.
- [0059] S220은 육탄당 당화액과 오탄당 당화액의 혼합발효조로서 바이오플라스틱의 합성 재료가 되는, 하이드록시 발러레이트(hydroxy valerate), 하이드록시부티레이트(hydroxy butyrate) 등을 합성하는 알칼리제네스 유트로퍼스(Alcaligenes eutrophus)와 같은 균주를 접종하고 배양하는 단계로, 상기 배양물은 공업용 발효배지로 사용이 가능하다.
- [0061] 종래 방법들 중에는 분해하기 힘든 목재를 바이오에탄올 생산용 바이오매스로 사용하기 위하여 바이오매스에 목

재 부후균류[파네로케테 크리소스포리움(*Phanerochaete chrysosporium*; 백색 부후균), 디코미투스 스쿠알렌스(*Dichomitus squalens*), 표고버섯, 팽나무버섯, 느타리버섯 등]을 배양하는 방법이 있다. 상기 방법 중 파네로케테 크리소스포리움 및 디코미투스 스쿠알렌스를 사용하는 방법(한국특허 10-1055623)은 상기 목재 부후균류를 고가의 영양성분(글루코오스 3~5 g/L, 효모 추출물 3~10 g/L, KH_2PO_4 2.25~11 g/L 등)과 당화효소(셀룰라제 5%(v/v))들이 일정 농도로 유지되는 바이오매스 충전탑 형식의 전처리조에 긴 전처리 기간(10~30일) 동안 바이오매스와 혼합 배양하여 부분 당화를 시킨 다음, 상기 당화액을 베타-글루코시다제가 담체에 고정되어 있는 효소 당화조에 보내어 추가로 당화시켜 생성된 당화액을 바이오에탄올 발효배지로 사용하는 방법이다.

[0063] 상기 방법은 통상적인 물리·화학적 전처리 과정 없이 바이오매스를 셀룰라제 및 다양한 영양소와 함께 충전탑에 충전시켜 백색 부후균을 생육시킬 때 느리게 일어나는 백색 부후균의 생물학적 당화 과정에 의존하는 것을 특징으로 하며, 하루에 적어도 수천~수만 리터의 제2세대 바이오에탄올을 생산해야하는 산업적 규모를 고려할 때 (1) 최대 30일로 매우 긴 전처리 기간을 필요로 하고, (2) 수백~수천 리터 용량의 충전탑 형식의 전처리조와 효소 당화조에서 글루코오스, 효모 추출물, 인산, 비타민 등의 영양소와 셀룰라제 효소를 높은 농도로 일정하게 유지시키는데 많은 비용이 필요하며, (3) 잡균의 오염으로 인하여 상기 영양성분이 소모될 시에는 오염방지와 영양분의 농도 유지를 위하여 더 많은 비용을 필요로 하므로, 상기 방법을 이용한 제2세대 바이오에탄올 생산은 생산량이 적을 뿐만 아니라 원가 상승에 대한 비용 부담이 발생하여, 규모의 경제를 고려할 때 산업적 규모의 상용화에는 적합하지 않을 수 있다.

[0065] 한편, 본 발명은 옥수수대, 벼짚, 톱밥 등에서 쉽게 생육하는 KPYBE10 포자종균을 물에 현탁하여 야적장에서 분쇄된 바이오매스에 살수하고 비닐 보온 방수포를 5~7일 동안 덮어두는 것으로 충분하다. 본 발명에 따르면 (1) 어떠한 영양소도 추가적으로 투입할 필요가 없고, (2) 곰팡이가 생육하는데 필요한 최소한의 수분유지를 위하여 필요 시, 물만 추가적으로 소량 살수하며, (3) 계절적인 요인 등으로 온도가 40℃ 이하로 유지될 때, 야적장 바닥에 열 배관을 설치하여 배양온도를 40℃로 유지하는 것만으로도 충분하며, (4) 40℃ 이하에서 KPYBE10를 배양하여 잡균의 생육을 저해할 필요가 있을 때에는 0.1~0.2%(w/v) 황산 용액에 포자종균을 현탁하여 살수 및 배양하고 전처리 반응 시에는 바이오매스에 미리 살수한 황산만큼 적게 사용하면 되는 간편한 방법을 제공한다.

[0067] 또한, 야적장에서 실시하는 것 외에 도 2의 도면부호 10과 같이, 간단한 구조의 바이오매스 및 곰팡이 혼합 연속 배양실을 사용할 수 있다. 상기 배양실은 상부로부터 파쇄 후 0.25~2 mm 망으로 체질한 바이오매스를 연속적으로 투입하고, 천장에 있는 살수기(S120)를 이용하여 물 또는 0.1~0.2% 황산 용액에 현탁된 포자종균을 살수하고, 배양실 안에 있는 설치되어 있는 교반기로 주기적으로 혼합해 주면서, 40℃(물에 현탁) 또는 25~35℃(0.1~0.2% 황산 용액에 현탁)에서 5~7일 배양 후, 하부 바닥으로부터 KPYBE10로 배양처리된 바이오매스를 연속적으로 채취하여 후속 공정인 전처리·당화공정을 연속적으로 가능하게 한다. 이는 계절적인 요인 등으로 야적장의 온도가 15℃ 이하로 유지되어 상기 곰팡이의 생육속도가 저하될 때 또는 최소한의 야적장 면적을 사용하면서 곰팡이 배양 처리 속도를 증가시킬 필요성이 있을 때 사용할 수 있는 단순 구조의 저렴한 혼합 배양실이다.

[0069] 상기와 같이, 본 발명은 바이오매스에서 곰팡이를 배양하는데 비용이 매우 적게 들며, 한 번에 수~수십톤을 야적장 또는 혼합 연속 배양실에서 신속하게 처리할 수 있는 장점이 있다. 이는 단순함과 편리성, 신속성과 경제성을 의미하며, 제2세대 바이오연료 상용화의 조속한 실현을 가능하게 한다.

[0071] 또한, 본 발명은 기존의 산 가수분해 전처리 방법보다 더 낮은 황산 농도, 더 낮은 온도, 더 짧은 시간, 더 적은 양의 셀룰라제를 사용함에도 불구하고 40% 이상 글루코오스 농도를 증가시켜 수~수십톤의 바이오매스를 한꺼번에 처리할 수 있는 새로운 방법을 제공한다.

[0073] 종래의 전처리법들 중 미국, 캐나다, 유럽, 중국 등의 시험공장에서 많이 사용하는 방법은 황산을 이용하는 산

가수분해 전처리법이다. 이때 많은 경우, 고온(200℃ 이상), 고압(10 기압 이상)의 조건을 사용한다. 또한, 1% 황산으로 150℃에서 1차 전처리 후, 다시 190℃에서 2차 전처리하는 이중 전처리법(한국 공개 특허 10-2016-01211991)이 있으며, 고온(~400℃), 고압(~300 기압) 조건을 사용하여 특수 고온·고압 반응기를 필요로 하며, 고에너지 비용 및 고가 시설비용이 발생하여 대량 생산이 어려운 고온·고압 전처리법(국제 공개 특허 WO 2011/016591 A1)이 있다. 이에 더하여, 초음파 발생기 등의 고가 기기를 필요로 하는 산 가수분해 전처리법(미국특허 US 8,278,080 B2) 등 여러 방법이 있으나, 고가 장비의 사용, 높은 전처리 비용, 긴 처리 시간, 고액의 셀룰라제 구입 비용, 낮은 당화 효율 등의 이유로 상업화에는 아직 도달하지 못하고 있다.

[0075] 종래 문헌(Bioresource Technology. 2005. 96: 2019-2025)에 의하면 산 가수분해를 사용하는 전처리법의 경우, 제2세대 바이오에탄올 직접생산비용(바이오매스 구입 및 취급, 전처리·당화, 발효, 정제, 폐수처리, 저장, 고압증기 및 전기, 기타 공공요금 등의 총합계) 중 전처리·당화 비용이 20%, 고압증기·전기비용이 33%에 해당되며, 상기 두 항목의 총합은 53%가 되어 전체 직접생산비용중 반 이상을 차지하는 것으로 보고된 바 있다. 한편, 본 발명은 전체 직접생산비용중 반 이상을 차지하는 상기 비용을 절감시킬 수 있는 방법을 제공한다.

[0077] 또한, 본 발명은 바이오매스 야적장에서 KPYBE10을 집중배양 후, 낮은 황산 농도(0.5%)와 낮은 온도(150℃)에서 전처리하고 고체(섬유소)를 분리하여 당화 효소 처리 시, 40% 이상 더 높은 글루코오스 농도를 얻을 수 있는 간편한 방법으로, 황산 사용량의 절감과 전처리 총 에너지 비용의 절감 효과가 있으며, 셀룰라제 구입 비용을 대폭 절감시킬 수 것을 특징으로 하는 새로운 방법이다. 또한, 본 발명은 푸르푸랄(furfural), 하이드로메틸 푸르푸랄(hydromethyl furfural; HMF)과 같은 발효저해물질이 저해 농도 이상으로 발생되지 않는 낮은 전처리 온도를 사용하므로 제독과정이 필요하지 않다.

[0079] 따라서, 본 발명은 전처리·당화 비용과 고압증기·전기비용을 대폭 절감시킬 수 있어 미국, 캐나다, 유럽, 중국 등 세계 여러 곳의 산 가수분해 전처리법을 사용하는 제2세대 바이오에탄올 시험공장에서 사용 시, 직접생산 비용을 대폭 절감시켜 상업적 생산으로의 전환을 가능하게 한다.

[0081] 또한, 본 발명에 사용된 황산을 탄산칼슘(CaCO_3) 또는 소석회[$\text{Ca}(\text{OH})_2$]로 중화시켜 생성되는 석고(CaSO_4)를 친환경 석고보드 원료로 사용할 수 있다. 현재 지구 온난화 방지를 위한 석탄발전의 감소 추세로 화력발전 석탄재로부터의 배연 탈황 석고보드 생산이 위축되고, 인광석을 가공해 비료를 만들고 남은 부산물로부터 생산되는 인산 부산 석고보드는 라돈 방출량이 높아 폐암의 발생우려가 있다. 그러나 본 발명의 부산물로 생성되는 석고는 이러한 문제점 없이 친환경 석고보드의 원료로 저렴하게 재활용될 수 있다. 또한, 에탄올 발효 후에 잔존하는 고형 잔재물은 가축사료로 사용하거나 태워서 전기발전용과 스팀발생용으로 자체적으로 사용이 가능하며 남은 것은 판매도 가능하다.

[0083] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0085] 실시예 1 : 신규한 섬유소 분해 미생물의 분리

[0086] 본 발명에서는 식물 세포벽의 섬유소를 분해하여 당화 효율을 증대시킬 수 있는 미생물을 순수 분리하기 위해, 경북, 경남 전라도 지역의 강변 및 갯벌 등에서 토양시료를 채취하였다.

[0087] 채취한 토양시료를 1 g 씩 정량하여 100 ml의 멸균수에 넣은 다음 충분히 현탁시키고, 10^2 , 10^3 으로 희석한 후, CMC(carboxymethyl cellulose) 한천배지[증류수 1L 당 CMC 5 g, 펩톤 5 g, KH_2PO_4 5 g, 효모 추출물 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, 한천 15 g, pH 7.0]에 도달한 다음 28℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후, 각각의 콜로니를 새로운 CMC 한천배지에서 도달한 다음 28℃에서 3일간 순수 배양한 것을 대상으로 0.5% 콩고 레드(congo red)

시약을 1 ml을 첨가하고 30분 방치한 후 버리고, 다시 1M NaCl을 첨가하여 5분 동안 방치한 후 충분히 적신 다음 비교적 큰 황색환(yellow halo zone)이 나타난 균주들을 선별하였다.

[0089] 실시예 2 : 신규한 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10의 순수배양 및 동정

CMC 한천배지에서 순수 분리된 미생물들로부터 특별한 영양분의 추가 없이 바이오매스에서 잘 생육하는 미생물 균주를 분리하기 위해, 자연 건조된 옥수수대를 믹서기로 파쇄하여 1 mm 망으로 체질한 후, 10 g 씩 정량하여 150 x 25 mm의 유리 페트리 디쉬(petri dish)에 넣고 증류수 40 ml를 첨가하였다. 그 후, 상기 미생물 균주들을 접종하고 48℃에서 일주일간 배양하였다. 농후 배양된 하나의 진균 균주를 최종적으로 선별하고, 새로운 옥수수대 분말 페트리 디쉬의 중앙에 접종하여 순수 분리하였으며, 선정된 균주는 멸균된 바늘로 채취하여 옥수수대 분말 30 g과 증류수 20 ml가 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 접종한 다음 실리 스톱퍼(sili stopper)로 막아 호기성 조건을 유지시키며 48℃에서 일주일간 배양하였다. 그 후, 4℃에서 보관하여 보존 균주로 활용하였다. 상기 균주는 KPYBE10이라 명명하였으며, 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC13356BP로 기탁하였다.

신규한 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10 균주는, 상기와 동일한 방법으로 파쇄하여 1 mm 망으로 체질한 옥수수대 분말, 톱밥, 벧짚의 페트리 디쉬에서 회녹색의 집락을 형성하였고, CMC 한천배지를 이용하여 48℃에서 7일간 배양 시, 솜모양의 평탄형 백색 집락을 형성하였으며, 도 3과 같이, 현미경으로 관찰한 원주형 분생자두와 구형의 표면이 매끈한 분생자의 형성 등의 특징에 기초하여 페니실리움 종(Penicillium sp.) 수준까지 동정하였다.

[0093] 실시예 3 : 신규한 섬유소 분해 곰팡이 KPYBE10의 최적 배양 온도

KPYBE10의 군사 생육 최적 온도를 확인하기 위해, 100 mm의 페트리 디쉬로 만든 CMC 한천배지 중앙에 소독된 바늘로 KPYBE10을 접종한 후, 다양한 온도(15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 40℃, 45℃, 48℃, 50℃)에서 배양하고, 형성된 집락이 배지를 완전히 덮는데 소요되는 시간을 측정하여 KPYBE10의 생육 활성을 분석하였다.

그 결과, 20~25℃에서는 6일, 30~45℃에서는 3~4일, 48℃에서는 5일, 50℃에서는 7일이 소요되었으며, 15℃에서는 빠른 생육을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 KPYBE10은 30~45℃ 범위의 온도에서 최적의 생육을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

바이오매스에서 온도의 변화에 따른 KPYBE10 생육 속도의 변화를 확인하기 위해, 상기와 동일한 방법으로 파쇄하여 1 mm 망으로 체질한 옥수수대 분말, 톱밥, 벧짚을 각각 30g 씩 정량하여 증류수 20 ml가 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 멸균처리한 다음, 배지 중앙에 소독된 바늘로 KPYBE10을 접종하고, 일주일과 한달 동안 야적장의 예상 온도인 28℃, 21℃, 18℃, 15℃에서 배양하였다.

그 결과, 도 4A(옥수수대 분말) 및 도 5A(톱밥)를 참조하여 보면, 28℃에서 일주일 동안 배양한 경우, 옥수수대 분말 및 톱밥 바이오매스 전 표면, 속, 아랫부분까지 왕성하게 생육한 KPYBE10 군사체가 관찰되었다. 21℃의 경우, 바이오매스 전 표면의 약 60% 면적에서 KPYBE10 군사체가 관찰되었고, 18℃의 경우, 바이오매스 전 표면의 약 5% 면적에서 KPYBE10 군사체가 관찰되었으며, 15℃의 경우에는 KPYBE10의 생육이 전혀 관찰되지 않았다. (벧짚은 유사결과로 미제재)

이후 계속 배양하여 한달 동안 배양한 결과, 도 4B(옥수수대 분말) 및 도 5B(톱밥)를 참조하여 보면, 28℃와 21℃의 경우에는 옥수수대 분말 및 톱밥 바이오매스 전 표면, 속, 아랫부분에서 왕성하게 생육한 KPYBE10 군사체가 관찰되었고, 18℃의 경우, 바이오매스 전 표면의 약 70~80%의 면적에서 KPYBE10 군사체가 관찰되었으며, 15℃의 경우, 바이오매스 전 표면의 약 50~60%의 면적에서 KPYBE10 군사체가 관찰되었다. (벧짚은 유사결과로 미제재)

상기 결과는 야적장에서 바이오매스를 KPYBE10로 배양 시, 28℃에서 일주일 동안 배양해야 함을 보여주며, 상기 온도 조건을 위해, 비닐 보온 방수포를 덮어주거나 겨울 등의 계절적인 요인을 고려하여 야적장 바닥에 열 배관 형태로 약간의 열을 공급해주는 방법을 필요로 할 수 있다. 또한, 최소한의 야적장 면적을 사용하면서 곰팡이 처리 속도를 증가시킬 필요성이 있을 때, 도 2의 도면부호 10과 같이, 단열재로 보온되는 단순 구조의 저렴한 혼합 연속 배양실을 사용할 수 있다.

[0102]

[0103]

본 발명에서는 바이오매스를 멸균처리를 하지 않고 파쇄처리한 후, 바로 KPYBE10를 멸균처리되지 않은 물(공업용수)에 현탁하여 살수하는 방법으로 접종배양한다. 따라서 바이오매스에 내생적으로 존재하는 균류의 생육을 억제하는 온도를 확인하기 위해, 멸균처리되지 않은 옥수수대 분말 3g 정량하여 100 ml 삼각플라스크에 첨가하고, 멸균처리되지 않은 수돗물을 15 ml 첨가한 다음 28℃, 35℃, 40℃에서 10일 동안 배양하였다.

[0104]

그 결과, 도 6을 참조하여 보면, 28℃와 35℃에서 배양한 경우, 바이오매스에 내생적으로 존재하였던 검은 곰팡이와 흰 곰팡이가 생육한 반면, 40℃에서 배양한 경우, 바이오매스에 내생적으로 존재하는 오염 곰팡이의 생육이 관찰되지 않아 40℃가 내생적 오염 곰팡이의 생육을 억제 하는 온도임을 확인하였다.

[0106]

25℃-35℃에서 배양 시, 잡균의 생육이 관찰되어 잡균의 생육을 억제하고 KPYBE10만의 생육 효율을 향상시키기 위하여 황산의 사용 가능성을 검토하였다. 멸균처리되지 않은 옥수수대 분말 10g 정량하여 150 x 25 mm 유리 페트리 디쉬에 첨가하고, 0.1% 또는 0.2%의 황산 용액 40 ml를 첨가한 다음 KPYBE10을 접종하고 28℃에서 배양하였다.

[0107]

그 결과, 도 7을 참조하여 보면, 물에 현탁하고 배양한 경우, 전체 표면을 덮는데 7일이 소요되었으며, 황산 용액을 첨가하고 배양한 경우에는 9일이 소요되는 것을 확인하였다. 또한, 0.1% 및 0.2% 황산 용액은 효과적으로 잡균류의 생육을 억제하였으며, KPYBE10 균주의 생육에는 큰 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0109]

실시예 4 : 바이오매스에서 KPYBE10의 배양

[0110]

충분한 포자중균을 조제하여 바이오매스에 접종하기 위해, 옥수수대 분말 3 g을 100 ml 삼각 플라스크에 첨가하고, 영양액($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, CaCl_2 0.075 g/L, NaNO_3 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, KCl 1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, 효모 추출물 1 g/L, 맥아 추출물 1 g/L, 펩톤 1 g/L)을 증류수로 20배 희석한 용액 20 ml를 첨가한 다음, 소독된 바늘로 KPYBE10를 접종하고, 28℃에서 3-4일간 농후배양하였다. 그 후, 배양물 전체를 5 L의 물에 현탁하여 옥수수대 분말을 10 g 씩 넣은 150 x 25 mm 유리 페트리 디쉬 72개에 각각 60 ml씩 첨가하고, 40℃에서 일주일 동안 배양하였다. 바이오매스와 현탁용 물은 멸균된 것을 사용하지 않았으므로 잡균의 증식을 억제하기 위하여 40℃에서 배양하였다.

[0112]

실시예 5 : 바이오매스의 전처리 및 당화

[0113]

상기와 같이 KPYBE10로 배양된 옥수수대 분말 바이오매스를 산 가수분해(acid hydrolysis) 전처리하기 위하여, 4 L 플라스크에 첨가하고, 다양한 농도의 황산 희석액[0.2%(w/v), 0.5%(w/v), 1.0%(w/v)]을 800 ml 첨가하여 혼합한 다음, 140℃ 또는 150℃에 1시간 전처리하였다. 전처리된 바이오매스를 고체와 액체로 분리하기 위하여 진공필터를 사용하였고, 고체물은 수분함량을 측정한 후, 물과 NaOH를 첨가하여 총 고체물 7%(pH 5.0)의 슬러리를 제조하였다. 상기 슬러리를 142.8 g씩 정량하여 250 ml 삼각 플라스크에 첨가하였다.

[0114]

당화(saccharification)를 위한 셀룰라제(cellulase)는 Novozyme 사(Bagsvard, Denmark)의 Cellic® CTec2 및 Cellic® HTec2 효소를 (주)엔자임텍으로부터 구입하였다. 삼각 플라스크에 Cellic® CTec2 1 ml, 또는 Cellic® CTec2와 Cellic® HTec2를 각각 1 ml씩 첨가하고, 100 rpm의 속도로 천천히 교반하면서 50℃에서 당화반응을 수행하였다.

[0115]

각각의 삼각 플라스크에는 AAB 형태의 번호가 주어졌고, AA가 홀수인 경우(01, 03, 05, 07, 09, 11)에는 Cellic® CTec2만 1 ml를 첨가하였고, AA가 짝수인 경우(02, 04, 06, 08, 10, 12)에는 Cellic® CTec2과 Cellic® HTec2를 각각 1ml 씩 동량 첨가하였다. BB는 당화시간(3, 5, 7, 9일)을 나타낸다.

[0116]

상기와 같이, 3-9일간의 당화수행 후, 5 ml 씩 채취하고 원심분리하여 고상과 액상으로 분리하였으며, 포도당을 함유한 액상은 구멍 크기가 0.2 μm 인 HPLC용 멤브레인 필터로 여과한 다음 HPLC 분석에 이용하였다. 글루코오스, 에탄올, 푸르푸랄(furfural) 및 자일로스(xylose)를 정량하기 위하여 HPLC(Waters 2690, USA)에서 Aminex HPX-87-H 컬럼(300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD, USA)을 이용하여 65℃에서 5 mmol 황산을 0.5 ml/분의 유속

으로 RI 검출기(refractive index detector)로 측정하였다.

[0117] 에탄올 발효를 위해서는 효소처리된 시료 1 kg을 고속원심분리기(Supra 22K, 한일)와 A2505-6N 로터(한일)를 사용하여 8,000 rpm에서 15분간 회전시킴으로써, 고상과 액상으로 분리하였으며, 포도당을 함유한 액상은 0.2 μ m 구멍 크기의 필터가 장착된 142 mm 프레스 필터레이션 홀더를 사용하여 여과를 하고, 글루코즈 분석 키트(GAHK-20, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 글루코오스 농도를 측정한 다음, 밀봉하여 발효 시까지 냉장고에 보관하였다.

표 1

H ₂ SO ₄ % ^a	- ^b KPYBE10 treatment		+ ^c KPYBE10 treatment			
	140°C ^d	Glucose ^e (g/l)	140°C	Glucose (g/l)	150°C	Glucose (g/l)
0.2%	0103	15.47	0703	14.92		
	0105	16.98	0705	17.91		
	0107	16.91	0707	17.98		
	0109	17.28	0709	18.13		
	0203	20.01	0803	22.89		
	0205	21.89	0805	23.36		
	0207	21.92	0807	23.39		
	0209	21.67	0809	23.41		
0.5%	0303	21.92	0903	27.49	1303	29.59
	0305	25.10	0905	31.40	1305	34.11
	0307	25.11	0907	30.85	1307	33.40
	0309	24.99	0909	31.70	1309	34.24
	0403	26.17	1003	33.10	1403	36.11
	0405	28.75	1005	33.82	1405	37.38
	0407	29.08	1007	38.59	1407	41.29
	0409	29.08	1009	38.37	1409	41.00
1.0%	0503	31.62	1103	33.50	1503	35.41
	0505	33.35	1105	36.09	1505	39.02
	0507	33.66	1107	36.42	1507	39.72
	0509	33.46	1109	35.60	1509	39.15
	0603	35.57	1203	39.30	1603	42.33
	0605	36.42	1205	42.17	1605	44.43
	0607	36.63	1207	42.91	1607	45.05
	0609	36.79	1209	42.43	1609	44.52

[0119]

[0120] a: 전처리 황산 농도

[0121] b: KPYBE10 배양처리 실시 안함

[0122] c: KPYBE10 배양처리 실시함

[0123] d: 전처리 온도

[0124] e: 당화 후 글루코오스 농도

[0126] 상기 표 1을 참조하여 보면, 당화시간이 글루코오스의 농도에 미치는 영향을 분석한 결과, Cellic® CTec2 단독 사용 시, 5일까지 글루코오스의 농도가 증가하는 경향을 보였으나 그 이후에는 증가 속도가 미미한 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 최적 당화일수가 5일이라는 것을 의미하며, 같은 방법으로 Cellic® CTec2와 Cellic® HTec2를 병용 사용 시, 최적 당화일수가 7일인 것을 확인하였다.

- [0128] 전처리시 사용하는 황산 농도가 당화에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 16.98 g/L(0105), 25.10 g/L(0305) 및 33.35 g/L(0505)와 17.91 g/L(0705), 31.40 g/L(0905), 및 36.09 g/L(1105)를 비교한 결과, 1.0%(w/v) 황산으로 전처리하였 때 얻는 글루코오스의 농도는 0.2%(w/v) 황산으로 전처리했을 때 보다 2배 이상 높은 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 전처리시 황산 농도가 증가함에 따라 당화 효율이 향상되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0130] 바이오매스를 KPYBE10으로 배양처리할 때, 두 가지 황산 농도(0.5%, 1%) 및 두 가지 온도(140℃, 150℃)에서 전처리하고, 당화효소로 CTec2 단독 사용 시, 글루코오스 농도에 미치는 영향을 분석하였다.
- [0131] KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 0.5% 황산/140℃/1시간/CTec2 조건으로 전처리·당화 수행한 경우, 글루코오스 농도가 25.10 g/L(0305)였으며, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하여 상기와 동일한 조건에서 전처리·당화 수행한 경우, 31.40 g/L(0905)로 글루코오스 농도가 25% 증가하였고, 동일한 조건에서 전처리 온도만 150℃로 10℃ 상승시킨 경우, 34.11 g/L(1305)로 글루코오스 농도가 36% 대폭 증가한 것을 확인하였다.
- [0132] 또한, KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 1% 황산/140℃/1시간/CTec2 조건으로 전처리·당화 수행한 경우, 글루코오스 농도가 33.35 g/L(0505)였으며, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하여 상기와 동일한 조건에서 전처리·당화 수행한 경우, 36.09 g/L(1105)로 글루코오스 농도가 8.2% 증가하였고, 전처리 온도만 150℃로 10℃ 상승시킨 경우, 39.02 g/L(1505)로 글루코오스 농도가 17% 증가하였다. 또한, 0.2% 황산으로 전처리 한 경우에도 KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 사용시, 글루코오스 농도가 증가한 것을 확인하였다.
- [0133] 상기 실험 결과로부터 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하면 0.5% 황산 사용 조건에서 최고 36% 이상의 글루코오스 농도 상승 효과를 나타내었다. 즉, 본 발명은 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용함으로써 동량의 당화효소를 사용하면서도 당화 효율을 대폭 증가시킬 수 있는 방법을 제공한다.
- [0134] 또한, 1% 황산을 사용하였을 때, 글루코오스 농도가 33.35 g/L(0505)였으며, 0.5% 황산을 사용하였을 때, 글루코오스 농도가 34.11 g/L(1305)로 글루코오스 농도가 유사하다는 것은 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하면 적은 양의 황산을 사용하여도 유사한 글루코오스 농도를 얻을 수 있다는 것을 의미한다. 즉, 본 발명은 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용함으로써 황산 사용량을 반으로 대폭 절감하면서 당화 효율을 유사하게 유지시킬 수 있는 방법을 제공한다.
- [0136] 다음은 바이오매스를 KPYBE10으로 배양처리할 때, 두 가지 황산농도(0.5%, 1.0%)에서 CTec2 단독 사용과 CTec2 & HTec2 병용 사용 시, 글루코오스 농도에 미치는 영향을 분석하였다.
- [0137] KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 0.5% 황산/140℃/1시간/CTec2 & HTec2 조건으로 전처리·당화 수행한 경우, 글루코오스 농도가 29.08 g/L(0407)였으며, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 상기와 동일한 조건에서 전처리·당화 수행한 경우, CTec2 단독 사용한 경우에 31.40 g/L(0905)로 CTec2 단독 사용에도 불구하고 글루코오스 농도가 오히려 8% 높았고. 또한, 전처리 온도만 150℃로 10℃ 상승시킨 경우, 34.11 g/L(1305)로 글루코오스 농도가 17.3% 증가하였다.
- [0138] 상기 결과로부터, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하면 CTec2와 HTec2를 함께 사용하지 않고, CTec2만 단독 사용하여도 더 높은 당화 효율을 얻을 수 있음을 확인하였다.
- [0140] 또한, KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 1.0% 황산/140℃/1시간/CTec2 & HTec2 조건으로 전처리·당화 수행한 경우, 글루코오스 농도가 36.63 g/L(0607)였으며, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 상기와 동일한 조건에서 전처리·당화 수행한 경우, CTec2 단독 사용한 경우인 36.42 g/L(1107)로 유사하였다. 또한, 전처리 온도만 150℃로 10℃ 상승시킨 경우, CTec2 단독 사용한 경우에 39.72 g/L(1507)로 글루코오스 농도가 8.4% 증가하였다.
- [0141] 상기 결과로부터, KPYBE10으로 배양처리되지 않고, CTec2 & HTec2 병용 사용의 경우보다 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하면 CTec2 단독 사용하여도 더 높은 당화 효율을 얻을 수 있으며, 효소 구입 비용을 대폭 절약할 수 있음을 확인하였다. 즉, 본 발명은 CTec2 보다 구입 가격이 2.5배 비싼 HTec2를 병용 사용하지 않

고도 상대적으로 매우 저렴한 CTec2만을 단독 사용하여 유사한 혹은 더 높은 당화 효율을 얻을 수 있는 방법을 제공하며, 당화효소 총 구입비용을 반 이상 절감할 수 있는 방법을 제공한다.

[0143] 다음은 KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 CTec2와 HTec2로 병용 사용 시, 글루코오스 농도에 미치는 영향을 분석하였다.

[0144] KPYBE10으로 배양처리되지 않은 바이오매스를 0.5% 황산/140℃/1시간/CTec2 & HTec2 조건으로 전처리·당화 수행한 경우, 글루코오스 농도가 29.08 g/L(0407) 였으며, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하여 150℃에서 전처리한 경우, 41.29 g/L(1407)로 글루코오스 농도가 42% 증가하였다.

[0145] 상기 결과로부터, KPYBE10으로 배양처리된 바이오매스를 사용하면 당화 효율을 매우 크게 증가시킬 수 있으며, 두 가지 효소의 사용량을 대폭 줄여도 여전히 유사한 당화 효율을 얻을 수 있음을 확인하였다. 즉, 본 발명은 상기 두 가지 당화 효소의 사용량을 동시에 대폭 절감하면서도 유사한 당화 효율을 얻을 수 있는 방법을 제공한다.

[0147] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0148] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0149]

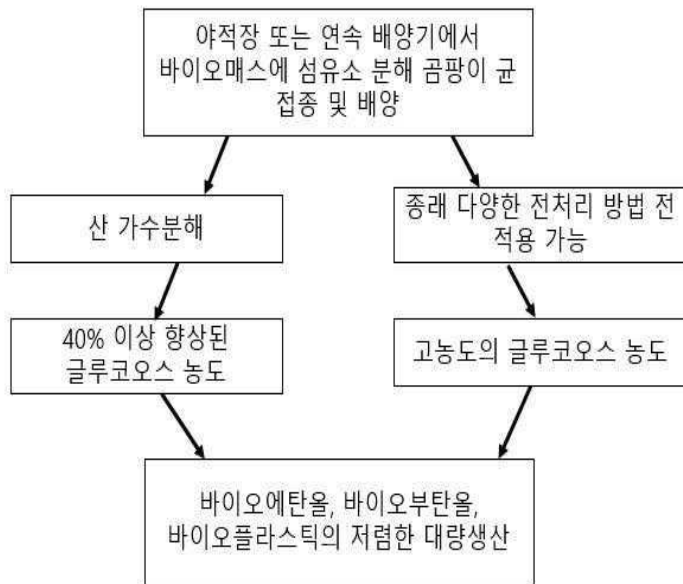
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13356BP

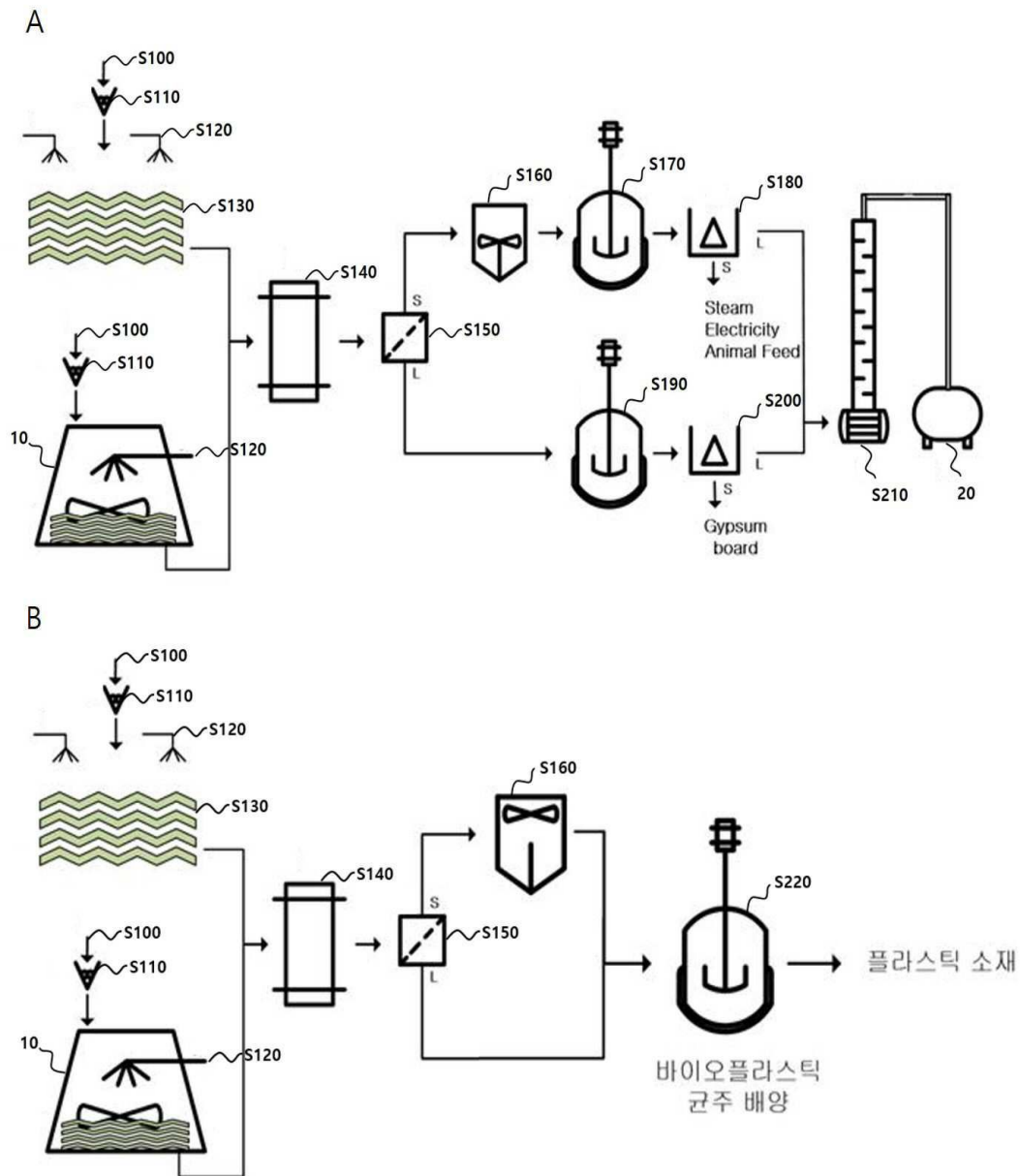
수탁일자 : 20170920

도면

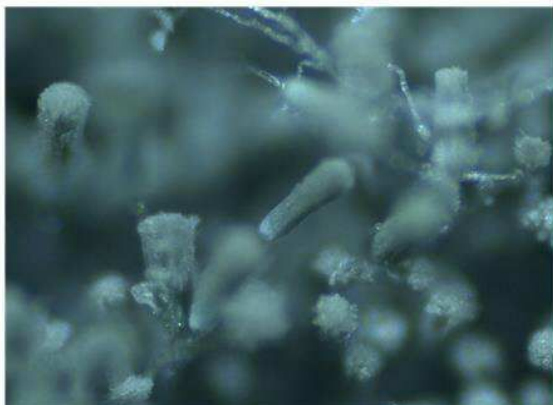
도면1



도면2



도면3



도면4

A



B



도면5

A



B



도면6



도면7

