



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월12일
(11) 등록번호 10-1777513
(24) 등록일자 2017년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/08 (2006.01) C12P 7/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/08 (2013.01)
C12P 7/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0056930
(22) 출원일자 2016년05월10일
심사청구일자 2016년05월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR101096183 B1*
KR1020130041894 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
김성구
부산광역시 남구 오륙도로 85, 102동 2303호 (용
호동, 오륙도에스케이뷰아파트)
라채훈
부산광역시 수영구 남천동로 46, 삼익타워 8동
301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 3 항

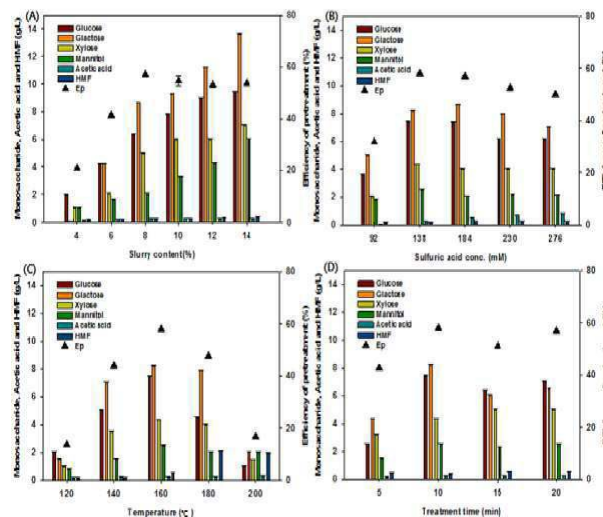
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 폐해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 해조류로부터 고수율의 바이오에탄올을 생산하기 위한 신규한 방법에 관한 것으로서, 높은 수율을 가능하게 하는 특정 조건들을 갖춘 해조류 슬러리의 초고온 산 가수분해 단계, 효소 당화 단계, 효모의 순치 배양 단계 및 순치된 효모를 이용한 에탄올 발효 단계를 통한 바이오에탄올 생산 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명에 따른 바이오에탄올 생산 방법에 따른 경우, 버려지는 폐해조류도 최적의 방법을 통해 고수율의 바이오에탄올을 수득할 수 있어 폐해조류의 효과적인 재활용이 가능하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자 선우인영 부산광역시 북구 화명신도시로 39, 714동 2902호	권정은 부산광역시 해운대구 해운대로469번가길 91, 102동 903호(우이동, 센텀마리나 아파트)
--	--

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A1A2059095
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(구)기본연구지원사업
연구과제명	해조류 바이오에탄올 생산을 위한 대사공학적 연구_2015 여대학(원)생 팀제 연구지원_심화

연구팀

기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2013.11.01 ~ 2016.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 홍조류 26 중량%, 갈조류 46 중량% 및 녹조류 28중량%로 이루어진 해조류 슬러리를 92 ~ 276 mM 농도의 황산으로 120 ~ 200℃에서 5 ~ 20분 동안 초고온 산 가수분해하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)의 가수분해물에 비스코자임(Viscozyme) L 을 첨가하여 당화시키는 단계;
- (c) 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) 를 갈락토스 및 자일로스를 각각 40 g/L 농도로 포함하는 배지에 배양하고, 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*)를 40 g/L 농도의 만니톨을 포함하는 배지에 배양하여 각각 순치하는 단계; 및
- (d) 상기 단계 (b)에서 효소 당화된 당화물에 상기 단계 (c)에서 순치된 피치아 스티피티스 및 피치아 안고포레를 3:1의 중량비로 첨가하여 공배양하는 단계를 포함하는, 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 해조류 슬러리의 농도는 4 ~ 14% (w/v)이며, 상기 초고온 산 가수분해 단계는 92 ~ 276 mM 농도의 황산으로 120 ~ 200℃에서 5 ~ 20분 동안 초고온 산 가수분해하는 것을 특징으로 하는 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

단계 (b)에서 당화된 당화물은 글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose) 및 만니톨(mannitol)을 함유하는 것을 특징으로 하는 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 신규한 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 폐해조류를 포함하는 해조류 슬러리를 원료로 하여 초고온 산 가수분해, 효소 당화 및 순치된 효모를 이용한 에탄올 발효 단계를 통해 높은 수득 효율을 가진 바이오에탄올을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 자원고갈에 대한 우려 및 지구 온난화와 같은 환경오염 문제가 전 세계적으로 심각한 문제로 대두 됨에 따라, 신 재생 대체에너지에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 대체에너지 개발의 일환으로, 바이오매스 자원으로 부터 바이오 연료, 특히 바이오에탄올을 생산하는 기술이 가장 주목을 받고 있다.
- [0003] 바이오에탄올의 원료가 되는 물질인 바이오매스는 크게 당질계(사탕수수, 사탕무 등), 전분질계(옥수수, 감자 등) 등을 포함하는 제 1세대와, 리그노셀룰로오스(lignocelluloses) 성분을 포함하는 목질계(나무, 폐지 등)로 이루어진 제 2대로 나뉘어진다. 그러나 제 1세대인 곡물계는 식품 및 가축 사료와의 경쟁, 재배 면적의 포화 등의 문제가 있으며, 제 2세대인 목질계의 경우, 리그닌을 제거하기 위해 복잡하고 고비용의 전처리 과정을 거쳐야 한다는 단점 등이 있어, 바이오에탄올 생산을 위한 원료 공급이 용이하지 못한 문제점이 있다.
- [0004] 이에 최근에는 제 3세대 바이오에탄올 연료로서, 해조류를 이용한 바이오 연료의 개발이 주목을 받고 있다. 해조류는 생육이 빠르고, 바다의 깊이에 따라 상층에 녹조류, 중층에 갈조류, 하층에 홍조류가 주로 자라기 때문에 복합 배양을 통해 육상 바이오매스에 비해 낮은 토지이용률과 높은 생산성을 가진다. 또한 해조류는 목질계 바이오매스에서 가지는 난분해성 리그닌이 없기 때문에 탈 리그닌(delignification) 과정이 필요하지 않고 분해하기 쉬운 장점이 있다.
- [0005] 더군다나, 우리나라는 매년 태풍으로 인해 9,654 톤의 해조류가 (2012년 기준, 매년 10%씩 증가) 해안가에 밀려온다. 이러한 해안가의 해조류들은 부패로 인한 악취, 환경오염, 선박 동력부위 사고와 같은 악영향을 야기한다. 따라서 폐해조류는 반드시 제거되어야 하나, 폐해조류의 폐기를 위한 인력 및 많은 비용으로 인해 골칫거리가 되고 있다. 따라서, 이러한 폐해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 기술은 폐해조류 처리와 동시에 이익을 창출하는 친환경적 선진 기술이라 할 수 있다. 이에 최근 해조류를 바이오매스로 삼아 바이오에탄올을 생산하는 방법에 대한 기술들이 점차 개발되고 있다. 구체적으로, 해조류를 포함하는 원료로부터 전처리 공정 또는 당화 공정을 통해 발효당을 제조하는 공정에 대한 기술(한국공개공보 제2012-0079905호), 해조류를 나노분쇄한 후 고효율 당화를 위해 물만을 이용하여 전처리 하는 방법(한국등록공보 제1213989호) 등에 대한 선행기술이 존재한다.
- [0006] 그러나 해조류는 수분함량이 80% 이상으로 높고, 염분 농도가 건조중량의 20~30%를 차지하며, 구성하는 단백질(10~15%)과 지방(1~5%)의 함량이 높다. 또한, 건조중량의 25~50%를 차지하는 탄수화물 조성도 육지 식물과 큰 차이를 보여, 해조류에 적합한 전처리 방법, 당화 방법 및 발효 방법에 대한 연구가 좀 더 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허공보 제2012-0079905호
(특허문헌 0002) 2. 한국등록공보 제1213989호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 해조류, 특히 버려진 폐해조류를 이용하여 높은 효율로 바이오에탄올을 제조할 수 있는 방법에 대한 여러 조건들을 규명하고 이를 조합함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 해조류 슬러리를 원료로 하여 특정 조건의 초고온 산 가수분해 단계, 효소 당화 단계, 효모의 선택 및 순치배양 단계 및 에탄올 발효 유도 단계를 포함하는 바이오에탄올을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 해조류 슬러리를 92 ~ 276 mM 농도의 황산으로 120 ~ 200℃에서 5 ~ 20분 동안 초고온 산 가수분해하는 단계, 상기 해조류 슬러리의 가수분해물에 효소 혼합물을 첨가하여 효소 당화를 시키는 단계, 상기 효소 당화된 가수분해물에 존재하는 단당류를 이용 가능한 효모의 선

택 및 단당류에 순치된 효모를 배양하는 단계; 및 상기 배양된 효모를 다양한 비율로 혼합 배양하여 효소 당화된 가수분해물에 첨가해 에탄올 발효를 유도하는 단계를 포함하는 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법을 제공한다.

- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해조류는 홍조류, 갈조류 및 녹조류로 구성될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해조류는 홍조류, 갈조류 및 녹조류로 구성된 군에서 선택된 둘 이상으로 구성된 폐해조류일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해조류는 적조류, 갈조류, 녹조류가 $26 \pm 2\%$, $46 \pm 2\%$, $28 \pm 2\%$ 비율로 혼합될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 해조류 슬러리의 농도는 4 ~ 14% (w/v) 이며, 상기 초고온 산 가수분해 단계는 92 ~ 276 (mM) 농도의 황산으로 120 ~ 200℃에서 5분 또는 20분 동안 초고온 산 가수분해하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소 혼합물은 탄수화물 분해효소가 둘 이상 혼합될 수 있으며, 탄수화물 분해효소는 프로모자임(Promozyme), 셀룰라스트(Celluclast), 말토게나제(Maltogenase), 비스코자임(Viscozyme), 테르마밀(Termamyl), 텍스트로자임(Dextrozyme), 울트라플로(Ultraflo) 및 AMG 일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소 혼합물은 셀룰라스트(Celluclast) 및 비스코자임(Viscozyme) 효소가 같은 효소역가량으로 혼합되어 있을 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소 혼합물은 셀룰라스트(Celluclast) 및 비스코자임(Viscozyme) 효소가 16 unit/ml 씩 혼합되어 있을 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소 당화된 반응물에 존재하는 단당류는 글루코스(glucose), 프락토스(fructose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose), 만니톨(mannitol), 람노스(rhamnose), 푸코스(fucose), 만뉴론산(mannuronic acid) 또는 글루쿠론산(glucuronic acid) 일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소 당화된 반응물에 존재하는 단당류는 갈락토스(galactose) 또는 만니톨(mannitol) 일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효모는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*), 클루이베로마이세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 및 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 캔디다 루시타니에(*Candida lusitaniae*) 일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배양된 효모는 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*)를 각각 40 g/L 농도의 갈락토스와 자일로스를 포함하는 배지에 배양한 것이거나, 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*)를 40 g/L 농도의 만니톨을 포함하는 배지에 배양한 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 에탄올 발효를 유도하는 단계는 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*) 및 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*) 효모를 공배양 할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 홍조류, 갈조류 및 녹조류는 홍조류 26 ± 2 중량% 대 갈조류 46 ± 2 중량% 대 녹조류 28 ± 2 중량%의 비로 사용되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명은 폐해조류를 비롯한 해조류 슬러리를 원료로 하여 특정 조건을 가진 초고온 산 가수분해 단계, 효소 당화 단계 및 순치된 효모를 이용한 에탄올 발효 단계를 통해 바이오에탄올을 생산하는 방법에 관한 것으로, 우월한 바이오에탄올 생산 수율을 제공한다는 효과가 있다. 따라서, 본 발명에 따른 바이오에탄올 생산 방법에 따른 경우, 버려지는 폐해조류도 최적의 방법을 통해 고수율의 바이오에탄올을 수득할 수 있는바, 폐해조류의 효과적인 재활용 및 경제적 이득을 가져다 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 슬러리 농도, 황산 농도, 처리 온도 및 시간에 전처리 효율(Ep)을 나타낸 그래프이다. (A) 슬러리농도 (B) 황산농도 (C) 처리 온도 (D)처리 시간

도 2는 혼합된 폐해조류에서의 효소 당화 효과를 나타낸 그래프로서, 다양한 효소의 16 unit/ml 농도에서의 효소 당화 효과이다.

도 3는 다양한 당에서 *P. angophorae*, *P. stipitis*, *S. cerevisiae* 효모의 발효 정도를 나타낸 그래프이다.

도 4는 다양한 갈락토스·자일로스 및 만니톨 농도에서 (A) *P. stipitis*, (B) *P. angophorae* 효모의 성장 정도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 효모를 다양한 비율로 혼합배양하여 폐해조류의 가수분해에 따른 바이오에탄올 생산 정도를 (A) 96 시간발효 (B) 72시간 후 단당류, 바이오에탄올 농도 및 수율 계수(Y_{EtOH})를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하기 위한 방법으로서, 해조류 슬러리의 초고온 산 가수분해 단계, 효소 당화 단계, 효모의 선택, 순치 배양단계 및 순치된 효모를 이용한 에탄올 발효 단계를 통한 바이오에탄올 생산 방법에 있어, 바이오에탄올 생산 수율에 영향을 주는 여러 조건들을 규명하고 고 수율을 가능하게 하는 조건들을 갖춘 생산방법을 제공한다.

[0027] 따라서, 본 발명은 (1) 해조류 슬러리를 초고온 산 가수분해하는 단계, (2) 상기 해조류 슬러리의 가수분해물에 효소 혼합물을 첨가하여 효소 당화를 시키는 단계, (3) 상기 효소 당화된 가수분해물에 존재하는 단당류에 효모를 배양 및 순치하는 (yeast adaptation) 단계; 및 (4) 상기 배양된 효모를 다양한 비율로 혼합 후 효소 당화된 가수분해물에 첨가하여 에탄올 발효를 유도하는 단계를 포함하는 해조류로부터 바이오에탄올을 생산하는 방법을 제공한다.

[0028] 1. 초고온 산 가수분해 (Hyper Thermal Acid Hydrolysis) 단계

[0029] 본 발명에 따른 바이오에탄올 생산에 있어, 원료가 되는 해조류(seaweed, sea algae)는 대형조류(macroalgae)인 홍조류, 갈조류 및 녹조류 일 수 있으며, 미세조류(microalgae)인 클로렐라, 스피루리나 등 일 수 있다. 특히, 본 발명의 해조류는 해안 등에 떠밀려온 폐해조류의 경우도 포함한다. 또한, 이에 제한은 없으나, 일 구체예로서 홍조류, 갈조류 및 녹조류로 구성된 군에서 선택된 둘 이상으로 혼합된 해조류 일 수 있고, 더 나아가 홍조류, 갈조류 및 녹조류로 구성된 것 일 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는, 부산 광안리 해변에 떠밀려온 폐해조류를 원료로 사용하여 바이오에탄올을 제조하였고, 구체적으로는 홍조류, 갈조류, 녹조류가 $26 \pm 2\%$, $46 \pm 2\%$, $28 \pm 2\%$ 의 비율로 혼합되어 있는 해조류 었다.

[0030] 한편, 본 발명에 따른 초고온 산 가수분해 과정은 해조류 슬러리에 120~200℃ 온도의 열(heat)과 산(acid)을 가하여 해조류를 가수분해하는 방법이다. 본 발명자들은 초고온 산 가수분해 과정에서 바이오에탄올 생산 수율에 영향을 줄 수 있는 4가지 인자(슬러리 농도, 황산 농도, 처리시간 및 온도)를 결정하고, 이들의 최적 조건을 밝혀내었다. 우선, 가수분해의 출발물이 되는 해조류 슬러리에서 슬러리 농도는 8% (w/v)을 넘기지 않는 것이 바람직했으며, 가장 바람직하게는 8% (w/v) 이다. 또한, 본 실시예에서는 황산(H_2SO_4)을 가지고 실험을 하였는데, 138 ~ 276 (mM) 농도의 황산이 바람직하였으며, 더욱 바람직하게는 138 ~ 184 mM 었고, 가장 바람직하게는 138 mM 이다. 또한, 처리시간과 관련하여, 10 ~ 20분이 바람직하며, 보다 바람직하게는 10분으로 처리하는 것이 가장 바람직할 것이다(도 1 참조).

[0031] 2. 효소 당화(Enzymatic Saccharification) 단계

[0032] 상기 초고온 산 가수분해를 거친 해조류 슬러리의 가수분해물은 효소 혼합물을 첨가하여 효소 당화를 시키게 된다. 효소 당화는 발효(fermentation) 전에 단당류(monosaccharide)의 농도를 높이기 위해 수행된다.

[0033] 상기 가수분해물에 첨가하는 효소 혼합물은 탄수화물 분해효소가 둘 이상 혼합된 것을 말하며, 이에 제한되지는 않으나 탄수화물 분해효소는 프로모자임(Promozyme), 셀룰라스트(Celluclast), 말토게나제(Maltogenase), 비스코자임(Viscozyme), 테르마밀(Termamyl), 텍스트로자임(Dextrozyme), 울트라플로(Ultraflo) 및 AMG 일 수 있으며, 상기 효소들은 동량으로 혼합되는 것이 바람직하다. 일구체예로서, 효소 혼합물은 셀룰라스트(Celluclast) 및 비스코자임(Viscozyme) 혼합물을 들 수 있으며, 본 발명의 일실시예에 따르면, 비스코자임 효소를 16 unit/ml 첨가하는 것이 바람직하다(도 2 참조).

[0034] 3. 효모의 선택 및 순치 배양 단계

- [0035] 본 발명은 효모를 이용한 에탄올 발효를 이용하여 바이오에탄올을 생산하는바, 에탄올 발효 단계에 앞서 고수율 획득을 위한 효모의 순치 단계를 수행한다. 상기 효소 당화 단계로 발생한 해조류 슬러리 가수분해물의 반응물에는 여러가지 단당류들이 생성되어 있다. 따라서 효과적인 바이오에탄올 생성을 위해서는, 반응물에 존재하는 단당류들을 에너지원으로 소모하여 에탄올을 생성하는 효모균을 선별하여야 한다.
- [0036] 해조류 슬러리의 효소 당화된 가수분해물에 존재하는 단당류는 글루코스(glucose), 프락토스(fructose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose), 만니톨(mannitol), 람노스(rhamnose), 푸코스(fucose), 만뉴론산(mannuronic acid) 또는 글루쿠론산(glucuronic acid) 등을 들 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 이들 중 효모에 순치해야 하는 단당류를 선별한다.
- [0037] 또한, 상기 단당류에 순치시킬 효모는 이에 제한되지는 않으나, 피치아 스티피티스(*Pichia stipitis*), 피치아 안고포레(*Pichia angophorae*), 클루베로마이세스 막시아누스(*Kluyveromyces marxianus*), 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*) 및 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 캔디다 루시타니에(*Candida lusitanae*) 일 수 있다. 더불어, 에탄올 수율 극대화를 위해 효소 당화된 가수분해물에 존재하는 단당류의 주요 구성에 따라 사용하거나 순치할 효모가 둘 이상 일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실시예에 따르면, 폐해조류의 효소 당화된 반응물에 존재하는 단당류 중 가장 많이 포함되어 있는 단당류는 글루코스, 갈락토스, 자일로스 및 만니톨이었다. 이에, 본 발명자들은 사용할 효모로 글루코스, 갈락토스 및 자일로스를 소모하는 *P. stipitis* 및 글루코스와 만니톨을 소모하는 *P. angophorae*를 선택하였다.
- [0039] 상기 실시예에서와 같이, 글루코스, 갈락토스, 자일로스 및 만니톨은 에탄올 발효를 위한 단당류이다. 하지만, 글루코스는 두 효모 모두에게 가장 선호되는 단당류이고, 반면에 갈락토오스, 자일로스 및 만니톨은 두 효모의 에탄올 발효에서 전부 소비되지는 않는다. 즉, 가수분해물에서 글루코스는 갈락토스, 자일로스 및 만니톨 흡수를 억제하여, 에탄올 생산 수율을 감소시킨다.
- [0040] 이와 같이, 전 처리된 해조류에서 여러개의 단당류들은 단당류의 흡수를 위한 당 전달 단백질 또는 당 분해에 필수적인 효소 합성 억제를 통해 효모의 당 흡수를 방해하게 된다. 따라서, 효모의 당 흡수를 최대한으로 증가시켜 에탄올 생산능력을 강화시키기 위해서는 특정 단당류에 대한 효모의 순치 과정이 요구된다.
- [0041] 이에, 본 발명의 일실시예에서는 *P. stipitis* 를 고농도의 갈락토스 및 자일로스에 순치시키고자 하였으며, 글루코스와 만니톨을 소모하는 *P. angophorae* 를 고농도의 만니톨에 순치시키고자 하였다. 그 결과, *P. stipitis* 는 각각 40 g/L 농도의 갈락토스 및 자일로스를 포함하는 배지에 배양시키고, *P. angophorae* 는 40 g/L 농도의 만니톨을 포함하는 배지에 배양시키는 것이 바람직하다(도 3, 4 참조).
- [0042] **4. 에탄올 발효(Fermentation) 단계**
- [0043] 특정 단당류에 효모를 순치하여 배양시킨 이후, 본격적인 에탄올 생산을 위한 발효 단계를 진행한다. 전 단계에서 순치된 효모를 효소 당화된 해조류 슬러리 가수분해물에 첨가하여 에탄올 발효를 유도한다. 이때, 둘 이상의 효모를 특정 단당류에 순치했을 경우, 함께 공배양 하는 것이 바람직하다. 이에 본 발명의 실시예에서도, *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 효모를 공배양 하였고, 그 결과 높은 에탄올 수율과 짧은 발효시간을 확인할 수 있었다(도 5 참조).
- [0044] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0045] **<실시예 1> 해조류 원료 준비**
- [0046] 2015년 5월 한국에 태풍 Dolphin이 강타한 후 부산 광안리 해변에 떠밀려온 폐해조류를 수집하여 사용하였다. 폐해조류 바이오매스는 햇빛 또는 열풍으로 건조한 후 햄머밀(hammer mill)을 통해 분쇄하였다. 바이오매스 파우더는 전처리에 앞서 355 μm (45-mesh) 체에 걸렀다.
- [0047] 바이오매스의 구성은 부산의 부경대학교의 Feed and Foods Nutrition Research Center에서 AOAC 방법을 통해 확인하였는데, 본 실시예에 사용된 폐해조류는 10종의 적조류, 갈조류, 녹조류로 구성되어 있으며, 적조류(홍조류) 26 $\pm$ 2%, 갈조류 46 $\pm$ 2% 및 녹조류를 28 $\pm$ 2% 함량비로 사용하였다. 적조류는 *Grateloupia elliptica*, *Ahnfeltiopsis flabelliformis* 및 *Hypnea spinella*의 3종류의 구성되어 있다. 갈조류는 *Sargassum fulvellum*, *Hizikia fusiformis*, *Undaria pinnatifida*의 3종류로 구성되어 있다. 녹조류는 *Ulva pertusa*로 구성되어 있다. 폐해조류 혼합물은 41.03% 탄수화물, 7.31% 조섬유, 0.85% 조지질, 26.42% 조회분 및 14% 조단백질을 포함한다.

본 실시예에서 사용된 폐해조류의 탄수화물 함량은 총 탄수화물의 48.34%였으며, 건조한 고체 기초(basis)에서 셀룰로오스로서 조섬유(crude fiber)를 포함하는 것이다.

[0048] <실시예 2> 초고온 산 가수분해 (Hyper Thermal Acid Hydrolysis) 단계

[0049] 250 mL 삼각플라스크(Erlenmeyer flask)에서 다양한 슬러리양(4 ~ 14% (w/v)), 황산(sulfuric acid) 농도 (92~276 mM) 전처리 온도 (120~200℃) 및 전처리 시간(5 ~ 20분)을 가진 폐해조류 샘플 100mL를 전처리하였다. 이후 HPLC로 단당류(monosaccharides) 양을 측정하기 위해, 슬러리를 수산화나트륨으로 pH 5.0로 조정하였다. 열적 가수분해 전처리 효율(E_p)은 하기 수학적 식 1과 같이 계산하였다.

수학적 식 1

$$E_p (\%) = \frac{\Delta S_{mono}}{TC} \times 100$$

[0051] 상기 수학적 식 1에서, ΔS_{mono} 는 열적 가수분해 전처리 동안 갈락토스, 자일로스 및 글루코스 증가량(g/L), TC 는 폐해조류 바이오매스에서의 총 탄수화물 양(g/L)을 나타낸다.

[0052] 우선 폐 조류 슬러리의 다양한 함량은 4~14% (w/v) 였다. 높은 슬러리 함량은 많은 단당류를 생산한다. 그러나 슬러리 함량이 8%를 넘는 경우 전처리 효율(E_p)이 감소했다. 그러므로 총 탄수화물과 가수분해물의 상관관계라고 여겨지는 E_p 를 살펴봤을 때, 8% (v/v) 슬러리 함량이 최적 함량임을 알 수 있다.

[0053] 92 ~ 276 mM 의 다양한 H_2SO_4 농도에서 효과가 나타났다. 산 농도 138 mM과 184 mM은 유사한 E_p 를 가졌다. 그러나 184 mM 이상에서 발효 저해물질인 Acetic acid 농도가 증가했다. 그러므로 138 mM에서 가장 최적의 58% E_p 를 가지는 것으로 확인되었다.

[0054] 다양한 처리온도는 120 ~ 200℃였다. E_p 는 160℃까지 증가를 하였다. 그러나 160℃ 이상의 온도에서는 E_p 의 감소와 발효 저해물질인 HMF 농도가 증가했다. 그러므로 최적의 전처리 온도는 160℃가 적당하다.

[0055] 처리시간의 효과는 5 ~ 20분 동안 나타났다. 10분 및 20분의 E_p 는 유사한 경향을 나타냈다. 그러나 에너지 소비를 고려했을 때, 최적의 초고온 산 가수분해 시간은 10분이 적당하다.

[0056] <실시예 3> 효소 당화(Saccharification) 단계

[0057] 최적의 효소 당화 조건을 찾기 위해 다양한 효소 및 효소 단위에 따른 실험을 수행하였다. 폐해조류의 효소 당화를 위한 최적의 조건은 알아보기 위해, 초고온 산 가수분해 전처리를 거친 80 g/L 폐해조류 슬러리를 가지고, 48시간 동안 150 rpm, pH 5.0, 45℃에서 Celluclast 1.5 L (854 unit/mL, Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)와 Viscozyme L (121 unit/mL, Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)의 두 효소를 가지고 실험하였다. 48시간 이후, 효소를 통한 가수분해물의 글루코스 농도는 HPLC에 의해 측정하였다.

[0058] 상기 실험 결과, 단일 효소와 그들의 혼합물(Celluclast 1.5 L 및 Viscozyme L)의 효과는 도 2에 나타내었다. Celluclast 1.5 L를 처리할 때와 두 효소를 혼합(1:1)하여 처리하였을 때 보다 Viscozyme L을 사용하였을 때가 단당류의 함량이 더 높았다. Viscozyme L의 구성성분인 cellulase, hemicellulase가 효율적으로 혼합 폐 조류를 당화 하였다. 따라서 Viscozyme L의 16 units/mL이 전 처리한 폐 조류 슬러리의 효소 당화로 인해 34 g/L의 단당류 농도를 얻을 수 있다.

[0059] <실시예 4> 효모의 선택 및 순치 배양 단계

[0060] 상기 실시예에서와 같이 폐 조류 슬러리의 가수분해물은 글루코스(glucose), 갈락토스(galactose), 자일로스(xylose)와 만니톨(mannitol)을 포함한다. 따라서 본 발명자들은 에탄올 생산을 위해, 글루코스, 갈락토스 및 자일로스를 이용하여 에탄올을 생산하는 효모로 *Pichia stipitis* (KCTC 7228)를, 글루코스와 만니톨을 사용해 에탄올을 만드는 효모로 *Pichia angophorae* (KCTC 17574)를 선택하였다(도 3 참고).

[0061] 갈락토스·자일로스 또는 만니톨의 다양한 농도에 대한 효모의 순치 효과를 알아내기 위해, 우선 야생형(wild-

type)의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae*는 YPD 아가(Agar) 플레이트(10 g/L 효모 추출물, 20 g/L 펩톤, 20 g/L 글루코스, 5 g/L 아가)에서 30℃ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 효모들을 20~120 g/L 범위의 갈락토스·자일로스 또는 만니톨의 다양한 농도를 가지는 YPGX(10 g/L 효모 추출물, 20 g/L 펩톤 및 다양한 농도의 갈락토스·자일로스 (동량 혼합)) 배지나 YPM(10 g/L 효모 추출물, 20 g/L 펩톤 및 다양한 농도의 만니톨) 배지에서 30℃, 150 rpm 조건에서 30시간 동안 배양하였다. 배양 시간에 따라, 배양된 효모주들은 흡광도(optical density, OD₆₀₀)를 이용하여 건조된 세포 중량을 결정하기 위해 표본조사 하였다.

[0062] *P. stipitis* 및 *P. angophorae*의 세포 성장에 있어 갈락토오스·자일로스와 만니톨에의 순치(adapted)를 YPGX(효모 추출물, 펩톤, 갈락토스·자일로스(동량 혼합)) 및 YPM(효모 추출물, 펩톤, 만니톨) 배지에서 다양한 당 농도를 이용하여 측정한 결과는 도 4와 같다.

[0063] *P. stipitis*의 성장을 측정하기 위해 YPGX 배지에 갈락토오스·자일로스(각각 20 ~ 60 g/L)를 동량으로 혼합하여 첨가하였을 때, 도 4(A)에서와 같이, 40 g/L 및 60 g/L의 YPGX 배지에서 모두 8.4 dcw g/L의 높은 성장 속도를 보였다. 또한, YPM 배지에는 만니톨(40 ~ 120 g/L)을 첨가하고 *P. angophorae*의 성장을 관찰하였다. 그 결과 도 4(B)에서와 같이, 40 g/L 만니톨 농도를 가진 YPM 배지에서 효모 농도가 4.8 g dcw g/L 까지 이르렀다. 그리하여, 각각 40 g/L 갈락토오스와 자일로스를 가진 YPGX 배지가 *P. stipitis*의, 40 g/L 만니톨의 YPM 배지가 *P. angophora*의 성장을 위한 각각의 최적 배지로 선택되었다.

[0064] <실시예 5> *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 균주에 의한 에탄올 발효 단계

[0065] 본 실시예에 따른 발효는 100 mL 작업부피(working volume)를 가진 250 mL 삼각플라스크에서 수행하였다. 순치된 효모 (adapted yeast) 및 이의 혼합물들은 전처리 및 효소 당화 이후, 가수분해물이 되도록 0.35 g dcw/L 세포 농도로 접종되었다. 이후 발효는 144시간 동안 30℃, 150 rpm에서 수행되었으며, 샘플들은 주기적으로 분석되었다. 바이오에탄올 수율(Y_{EtOH})에 대한 계산식은 하기 수학적 식 2와 같다.

수학적 식 2

$$Y = \frac{[EtOH]_{max}}{[Sugar]_{ini}}$$

[0066]

[0067] 상기 수학적 식 2에서, [EtOH]_{max} 는 발효 동안 달성된 최고의 에탄올 농도(g/L)이며, [sugar]_{ini} 은 발효 시작시 총 최초 당 농도(g/L) 이다.

[0068] 에탄올을 생산을 위해 폐해조류 슬러리의 8% (w/v) 슬러리 함량과 함께 초고온 산 가수분해 및 글루코스, 갈락토오스, 자일로스 또는 만니톨에 대한 효소적 가수분해를 수행하였다. 순치된 *P. stipitis* 및 *P. angophorae*에 의해 수행된 발효는 도 5에 나타내었다. 순치된 *S. cerevisiae* 및 *P. angophorae*의 공동 배양을 통해 폐해조류 가수 분해물로부터 에탄올로 모든 당(글루코스, 갈락토스 및 만니톨)이 전환되는 혼합된 당의 발효를 보여준다. 일반적으로 *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 는 글루코스, 갈락토스 및 자일로스, 글루코스 및 만니톨 모두를 각각 사용할 수 있다.

[0069] 우선, 다양한 비율의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae*에 의해 96 시간동안 수행된 발효는 도 5(A)에 나타내었다. 다양한 비율 중 3:1의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae*의 경우 가장 높은 16 g/L 에탄올을 생산하였고, 0:4, 즉 *P. angophorae*로만 생산하였을 때 가장 낮은 7 g/L의 에탄올이 생산되었다. 모든 에탄올 발효과정은 72 시간에 가장 높은 에탄올을 생산하였다. 따라서 72 시간의 에탄올 생산정도를 도 5(B)에 나타내었다. 72시간의 에탄올 발효 후 *P. angophorae* (0:4) 는 가장 낮은 양의 당당을 소모하였다. 만니톨과 글루코스로부터 에탄올을 생산한다고 알려진 *P. angophorae*는 갈락토스와 자일로스 16 g/L를 남긴 채 7 g/L의 에탄올을 생산하였고, Y_{EtOH}는 0.22이었다. 1:3, 2:2, 4:0의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 비율도 당당을 모두 소모하지 못했다.

[0070] 반면에, 순치된 3:1의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae* 의 경우 모든 당당류를 흡수하였다. 34 g/L의 글루코스, 갈락토스, 자일로스 및 만니톨은 3:1의 *P. stipitis* 및 *P. angophorae*의 비율의 효모에 모두 소모되어 16 g/L의 에탄올을 생산하며, Y_{EtOH}는 0.47로 단일 및 다른 비율의 효모보다 생산율이 높은 것을 확인하였다.

[0071] 상기 본 실시예에 따른 분석방법과 관련하여, 세포 성장은 OD₆₀₀에서 UV-vis 분광광도계를 이용해 측정했으며,

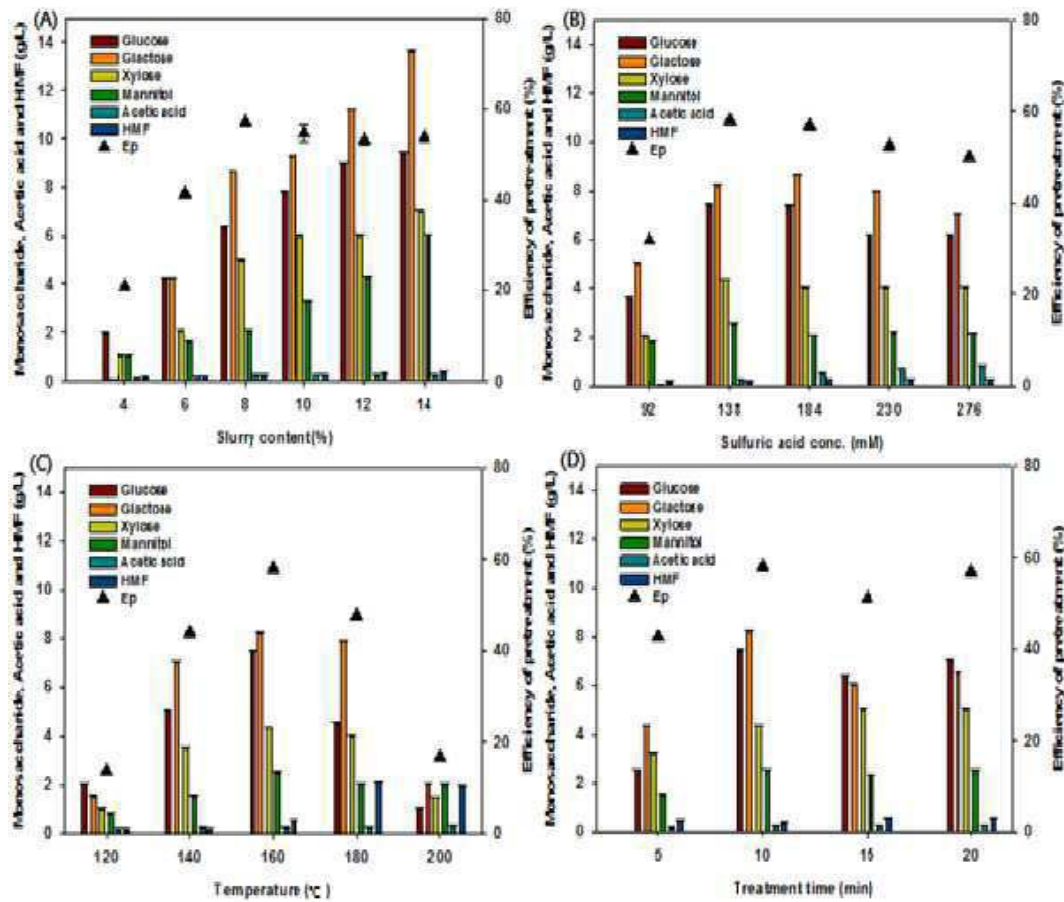
이를 건조 세포 중량(DCW)으로 표준 곡선을 이용하여 전환하였다. 글루코스, 갈락토스, 자일로스, 만니톨, HMF, 아세트산 및 알콜 농도는 RID(refractive index detector)가 장착된 HPLC(Agilent 1100 Series, Agilent Inc, Santa Clara, CA, USA)로 측정하였다. Bio-Rad Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm)은 여과되고 가스가 제거된(filtered and degassed) 5 mM H₂SO₄ 를 이동상(eluent)로 사용했고, 유속이 0.6 mL/min, 온도가 65℃ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 조건에서 수행하였다. 발효 샘플들은 14,240 x g에서 10분간 원심분리 하였고, 상등액은 분석 전에 0.2 μm 필터에서 처리하였다.

[0072]

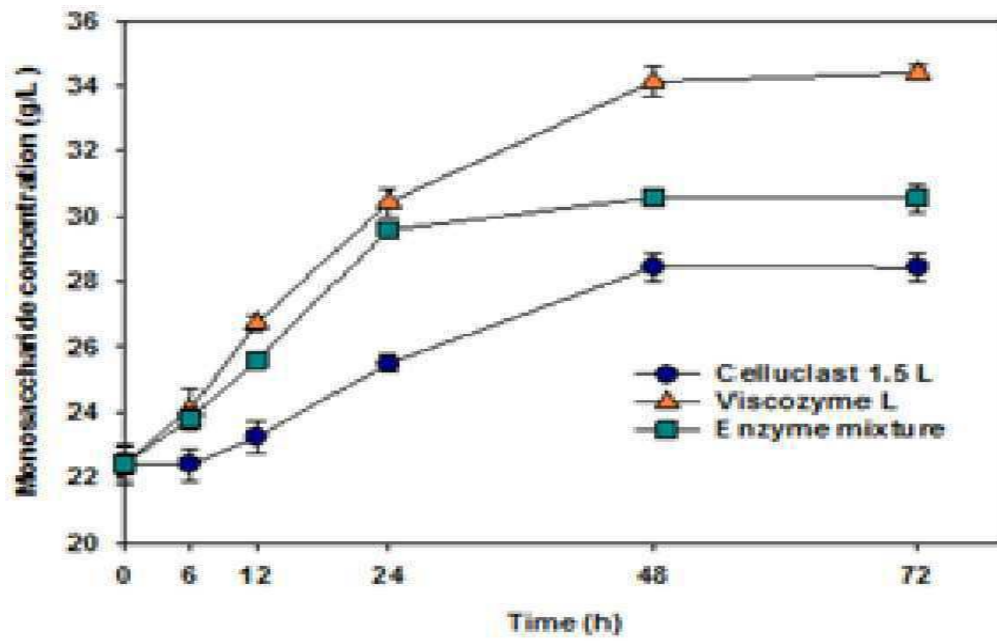
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

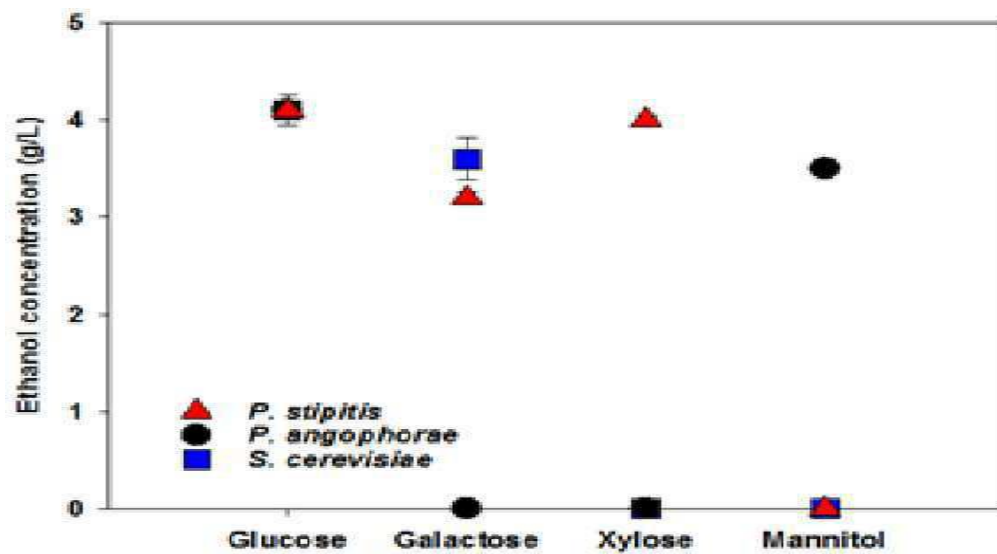
도면1



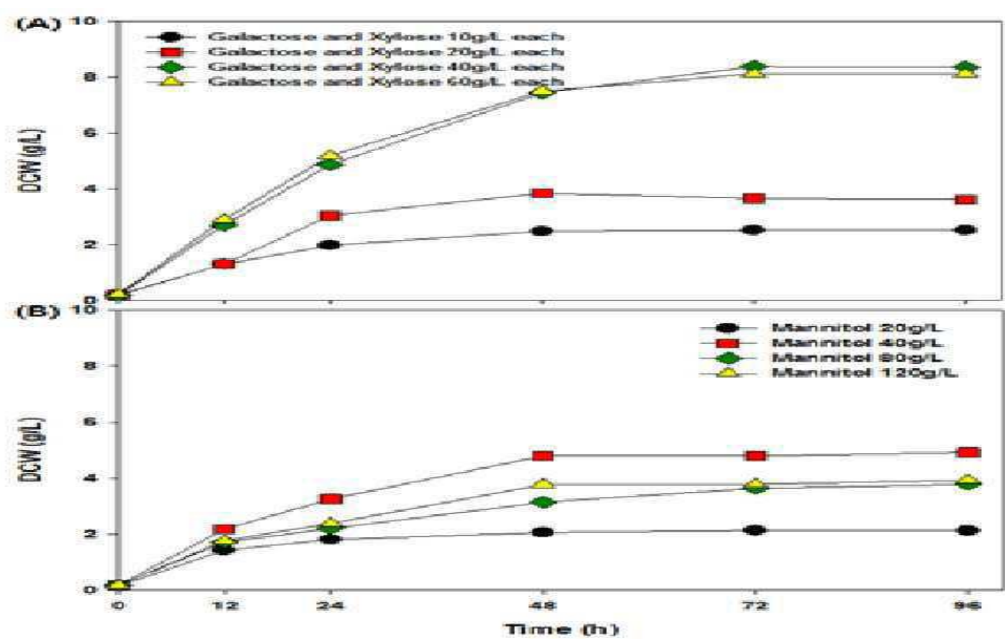
도면2



도면3



도면4



도면5

