



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0128904  
(43) 공개일자 2020년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12P 19/02 (2013.01)

C12P 2201/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0053026

(22) 출원일자 2019년05월07일

심사청구일자 2019년05월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경현

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호(서초동, 삼풍아파트)

양정우

서울특별시 강북구 삼양로74길 8, 103동 101호(미아동, 경남아너스빌)

김재균

서울특별시 동대문구 약령시로 5-1, 509호(제기동)

(74) 대리인

특허법인다나

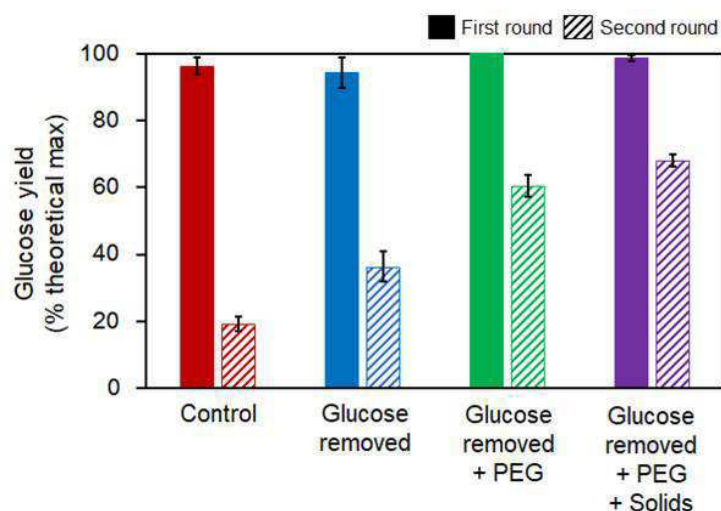
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 섬유소계 바이오매스의 고농도 당화와 셀룰라아제 재활용

(57) 요약

본 발명은 섬유소계 바이오매스의 고농도 당화와 셀룰라아제 재활용에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 섬유소계 바이오매스의 1차 고농도 당화에 사용된 셀룰라아제를 회수하여 글루코오스를 제거하고, 2차 고농도 당화에 재활용하고, 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용함으로써 섬유소계 바이오매스의 당화율을 개선하여 기존 당화 공정보다 용이하고 효율적인 당 생산 공정을 구축하는 효과를 제공한다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                           |
|-------------|-------------------------------------------|
| 과제고유번호      | K_G011004967405                           |
| 부처명         | 산업통상자원부                                   |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국산업기술평가관리원                               |
| 연구사업명       | 바이오화학산업화촉진기술개발사업                          |
| 연구과제명       | 산업 미생물 발효에 적합한 고농도 바이오슈가 제조 및 공통 활용 기술 개발 |
| 기 여 율       | 1/1                                       |
| 과제수행기관명     | 고려대학교 산학협력단                               |
| 연구기간        | 2018.08.01 ~ 2019.09.30                   |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

전처리된 섬유평균 바이오매스, 당화 효소 및 폴리에틸렌글리콜을 함유한 혼합물로 1차 당화를 수행하고, 1차 당화 산물을 고형분과 당화 효소-함유 액상 분획으로 분리하는 단계;

상기 당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스를 제거하는 단계; 및

1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유평균 바이오매스를 기질로 하고, 글루코오스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획을 이용하여 2차 당화를 수행하는 단계를 포함하는 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

섬유평균 바이오매스는 벚짚, 거대억새, 사탕수수부산물, 옥수수부산물, 스위치그라스, 포플라, 팜 공과방 (Empty fruit bunches, EFB), 참나무, 또는 에너지작물 중 어느 하나인, 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

전처리된 섬유평균 바이오매스는 열수 전처리를 거친 후 세척 및 고액분리단계를 거친 것인, 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

열수 전처리는 섬유평균 바이오매스 및 물을 1:10 내지 15 (w/v)의 비율로 혼합하고, 180 내지 210℃ 에서 10 내지 20분 동안 가열하는 것인, 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

당화 효소는 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

폴리에틸렌글리콜은 중량평균분자량이 4,000 내지 8,000인, 섬유평균 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 청구항 7

제1항에 있어서,

1차 당화는 반응 혼합물 100 mL에 대해 섬유소계 바이오매스 20 내지 40% (w/v)를 기질로 하여, 섬유소계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 셀룰라아제 10 내지 60 FPU 및 폴리에틸렌글리콜 31.2 내지 62.5 mg/g glucan를 혼합하여 pH 4 내지 6, 45 내지 55℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 24시간 내지 80시간 동안 수행하는 것인, 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 청구항 8

제1항에 있어서,

1차 당화 산물을 고형분과 당화 효소-함유 액상 분획으로 분리하는 단계는 1차 당화 산물에 대해 여과법을 수행하는 것인, 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 청구항 9

제1항에 있어서,

당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스를 제거하는 단계는 5 내지 10 kDa 한외여과막을 사용하여 당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스-함유 한외여과물을 분리하는 것인, 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 청구항 10

제1항에 있어서,

1차 당화 산물에서 분리한 고형분은 전처리된 섬유소계 바이오매스의 총 중량에 대해 33 내지 100% (w/w)로 포함되는, 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 청구항 11

제1항에 있어서,

2차 당화는 반응 혼합물 100 mL에 대해 1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유소계 바이오매스를 혼합한 20 내지 40% (w/v)의 기질과 글루코오스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획 50 내지 72.5 mL를 pH 4 내지 6, 45 내지 55℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 24시간 내지 80시간 동안 반응시키는 것인, 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 섬유소계 바이오매스의 고농도 당화와 셀룰라아제 재활용에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 화석연료에 대한 과도한 사용과 높은 의존도는 전 지구적인 환경 문제로 야기하였으며, 이로 인해 기존의 화석 연료를 대체할 수 있는 재생 가능한 에너지원의 탐색이 시급한 실정이다. 특히 우리나라는 화석 연료에 대한 에너지 의존도가 높고 그 대부분을 해외에서 수입하기 때문에 바이오매스(biomass)와 같은 재생 에너지원에 대한

탐색의 중요성은 매우 높다고 할 수 있다.

[0004] 화석 연료 대체 자원으로서의 바이오매스는 주로 농산물 및 임산물 등에서 유래한 전분계 바이오매스와 리그노셀룰로오스(lignocellulose)계의 식물 유기체를 의미하며, 광합성을 통해 이산화탄소를 재활용한다는 점에서 탄소 중립에 가깝다고 할 수 있다. 이 중에서도 2세대 바이오매스인 리그노셀룰로오스는 주로 초본계(농부산물 등) 및 목질계(임산물 등)로 구분이 되며, 지구상에서 가장 풍부하며 저렴하고 높은 탄수화물 함량을 가지고 있어 중요한 자원으로 주목받고 있다. 이러한 리그노셀룰로오스 중 펄프 공과방(EFBs)은 열대지방에서 주로 생산되는 임산부산물로서 높은 탄수화물 함량(최대 60%)과 풍부한 생산량 때문에 바이오케미컬과 바이오연료의 생산에 적합한 바이오매스로 여겨진다.

[0005] 리그노셀룰로오스 기반 바이오매스로부터 화학소재 및 연료를 생산하는 공정은 크게 바이오매스의 전처리, 효소 당화, 발효 및 분리 공정으로 나눌 수 있다. 그러나 현재까지 바이오매스 기반의 공정은 경제적 측면에서 많은 제한이 있다. 특히, 효소 당화 공정은 전체 공정의 병목 단계(bottleneck step)로서, 전체 공정가의 20-25% 정도를 차지한다. 따라서 효소투입량 절감을 위한 기술개발이 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있는 실정이며, 대표적인 예로는 셀룰라아제 기능향상을 위한 단백질공학, 다양한 셀룰라아제의 최적 조합, 효소 보조제의 이용, 그리고 셀룰라아제의 재활용 등이 있다. 이 중 셀룰라아제의 재활용은 공정기반 기술이며 적용이 간단하다는 장점이 있다. 그러나 현재까지의 연구는 주로 저농도 효소 당화(low-solids enzymatic hydrolysis)를 위한 셀룰라아제의 재활용 연구에만 집중되어 있는 실정이다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Qin, Y.Q. et al. 2008. J. Biotechnol. 135, 190-195.  
 (비특허문헌 0002) Steele, B. et al. 2005. Appl. Biochem. Biotechnol. 121-124, 901-910.  
 (비특허문헌 0003) Gomes, D. et al. 2015. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99, 4131-4143.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 섬유소계 바이오매스의 당화 효소인 셀룰라아제를 1차 고농도 당화에 사용한 후 회수하여 2차 고농도 당화에 사용함으로써 섬유소계 바이오매스의 당화율을 개선하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전처리된 섬유소계 바이오매스, 당화 효소 및 폴리에틸렌글리콜을 함유한 혼합물로 1차 당화를 수행하고, 1차 당화 산물을 고형분과 당화 효소-함유 액상 분획으로 분리하는 단계; 상기 당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스를 제거하는 단계; 및 1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유소계 바이오매스를 기질로 하고, 글루코오스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획을 이용하여 2차 당화를 수행하는 단계를 포함하는 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명은 섬유소계 바이오매스의 1차 고농도 당화에 사용된 셀룰라아제를 회수하여 글루코오스를 제거하고, 2차 고농도 당화에 재활용하고, 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용함으로써 섬유소계 바이오매스의 당화율을 개선하여 기존 당화 공정보다 용이하고 효율적인 당 생산 공정을 구축하는 효과를 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 기질의 농도별 EFBs의 당화율 변화를 나타낸 것으로, (a)는 30% (w/v), (b)는 25%, (c)는 20%의 기질 농도별 EFBs의 당화율이며, 당화에 사용된 셀룰라아제 농도는 10~60 FPU/g glucan의 Cellic CTec3가 사용되었다. 당화 조건은 pH4.8, 50℃, 200rpm에서 수행하였다. 실험 데이터는 3반복 실험에서 얻은 평균±표준편차로 표시하였다.
- 도 2는 고농도 당화 후 회수된 셀룰라아제 재활용을 이용한 3번의 연속적 당화 공정에서 글루코오스 변화량(a) 및 당화율 변화(b)를 나타낸 것이다. 당화는 20% (w/v)의 고형분, 40 및 60 FPU Cellic CTec3/g glucan를 20 mL의 반응 혼합물을 pH4.8, 50℃, 200rpm에서 수행하였다. 실험 데이터는 평균±표준편차로 표시하였다. 2차 및 3차 당화를 위한 셀룰라아제 재활용을 위해, 1차 당화 후 얻은 액상 분획을 소듐 시트레이트 버퍼(50mM, pH 4.8)와 함께 새로운 전처리된 EFBs에 첨가하였다. 실험 데이터는 3반복 실험에서 얻은 평균±표준편차로 표시하였다.
- 도 3은 고농도 당화 후 회수된 셀룰라아제 재활용에 따른 당화율 제한 요인 분석 결과를 나타낸 것으로, (a)는 초기 글루코오스 농도에 의한 당화율 저해 결과, (b)는 48시간 당화 과정 중 당화 효소들의 활성 저해, (c)는 EFBs 기질과 효소 단백질의 흡착을 증가, (d)는 도 3c에서 시간대별로 획득된 상등액의 SDS-PAGE 분석 결과이다 (FPU=셀룰라아제; CMCase=엔도-글루카나아제(endo-glucanase); BG=베타-글루코시다아제(beta-glucosidase)). 실험 데이터는 3반복 실험에서 얻은 평균±표준편차로 표시하였다. FPU, filter paper unit; BG,  $\beta$ -glucosidase; CMCase, carboxymethyl cellulase; M, protein marker.
- 도 4는 고농도 당화 후 회수된 셀룰라아제 재활용에 따른 당화율 제한 요인 해결을 통한 당화율 변화를 나타낸 것이다. 실험 데이터는 3반복 실험에서 얻은 평균±표준편차로 표시하였다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0016] 리그노셀룰로오스의 효율적 당화를 위한 필수조건은 고농도 기질을 낮은 효소량으로 높은 당화 수율을 획득하는 것이다. 이를 위하여 셀룰라아제의 회수 및 재활용은 매우 효과적인 방법일 수 있으나, 글루코오스에 의한 생성물 저해효과(product inhibition), 1차 당화 후 효소의 활성 저해, 당화 잔류 고형분에 효소의 비특이적 흡착 등의 문제로 실현이 어려운 점이 있다. 따라서, 본 발명자들은 열수 전처리된 팜 공과방(Empty Fruit Bunches, EFBs)의 고농도 당화에 가장 적합한 셀룰라아제 재활용 방법을 이용하여 고농도 기질에서의 당화율을 극대화시키는 연구를 수행하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 전처리된 섬유소계 바이오매스, 당화 효소 및 폴리에틸렌글리콜을 함유한 혼합물로 1차 당화를 수행하고, 1차 당화 산물을 고형분과 당화 효소-함유 액상 분획으로 분리하는 단계; 상기 당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스를 제거하는 단계; 및 1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유소계 바이오매스를 기질로 하고, 글루코오스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획을 이용하여 2차 당화를 수행하는 단계를 포함하는 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법을 단계별로 설명하면 다음과 같다.
- [0019] 제1단계는 섬유소계 바이오매스의 전처리, 전처리된 섬유소계 바이오매스의 1차 당화 및 1차 당화 산물로부터 당화 효소-함유 액상 분획을 분리하는 것이다.
- [0020] 상기 용어 "섬유소계 또는 리그노셀룰로오스계 바이오매스"는 사실상 환경 친화적 기준에서 에너지에 이용 가능한 소정의 식물 유래의 유기물(목재 혹은 비목재)을 의미한다. 예를 들어, 볏짚, 거대억새, 사탕수수부산물, 옥수수부산물, 스위치그라스, 포플라, 팜 공과방(Empty fruit bunches, EFB), 참나무, 또는 에너지작물 등의 초본계, 목질계 바이오매스를 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 섬유소계 바이오매스로 팜 공과방(Empty fruit bunches, EFB)을 사용할 수 있고, 수 mm 이하의 입자 크기를 갖도록 분쇄하여 사용할 수 있다.
- [0022] 또한, 용어 "바이오매스의 전처리"는 바이오매스 내 구성성분들 간의 결합 상태 등을 변화시켜 단당으로 분해되기 용이한 형태를 만드는 것을 의미한다. 예를 들어, 구성성분들의 화학적 결합, 배치, 또는 입체 형태를 변화시켜 비당부분을 제거하고 조직을 성기계 만들어 후단의 효소당화를 용이하게 하는 것을 포함한다. 또한, 분자

구조의 변화, 바이오매스 내 구성성분의 산화, 평균 분자량의 변화, 평균 결정화도의 변화, 표면적의 변화, 중합도의 변화, 다공도의 변화, 분지화도의 변화, 그래프트화, 결정 영역 크기의 변화, 또는 전체 영역 크기의 변화를 포함할 수 있다.

- [0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 전처리로 열수 전처리를 수행할 수 있고, 예컨대, 팜 공과방 및 물을 1:10 내지 15 (w/v)의 비율로 혼합하고, 180 내지 210℃에서 10분 내지 20분 동안 가열하여 열수 전처리할 수 있다. 상기 열수 전처리는 섬유소계 바이오매스의 종류에 따라 적절히 채택하여 사용하면 되므로 특별히 제한하지는 않는다.
- [0024] 상기 열수 전처리 후 물로 세척 및 고액분리단계를 거쳐 고형분을 수득할 수 있다.
- [0025] 상기 고액분리단계는 원심분리를 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0026] 또한, 전처리된 섬유소계 바이오매스의 당화에 적합한 당화 효소로 셀룰라아제 및/또는 헤미셀룰라아제를 사용할 수 있다. 상기 당화 효소는 바이오매스를 가수분해시켜 당을 생산하는 효소를 총칭하며, 당화 효소를 생산하는 미생물로부터 분리 정제하거나, 유전공학적 재조합 기술을 통해 재조합 미생물 또는 인공적인 화학적 합성법을 통해 생산 및 분리하거나, 상용화 제품을 제한 없이 채택할 수 있다.
- [0027] 상기 셀룰라아제는 섬유소계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 10 내지 60 FPU, 더 구체적으로 40 내지 60 FPU의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도가 10 FPU 미만인 경우, 바이오매스의 불용성으로 인하여 최종 포도당 수율이 현저히 낮아지게 되고, 상기 농도가 60 FPU를 초과하는 경우, 전체 바이오매스 이용 공정의 20% 이상을 차지하고 있는 효소비용으로 인하여 전체 공정의 상용화 가능성이 어려워진다.
- [0028] 또한, 당화 효소의 활성을 장기간 유지하고, 당화 효소의 리그닌, 셀룰로오스 등과의 비특이적 흡착을 저해하기 위해 폴리에틸렌글리콜을 사용할 수 있다.
- [0029] 상기 폴리에틸렌글리콜은 중량평균분자량이 4,000 내지 8,000, 더 구체적으로, 6,000 내지 8,000, 보다 구체적으로, 8,000인 것을 사용할 수 있다.
- [0030] 상기 폴리에틸렌글리콜은 섬유소계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 15.6 내지 62.5 mg, 더 구체적으로, 31.2 내지 62.5 mg, 보다 구체적으로, 62.5 mg의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도가 15.6 mg 미만인 경우, 최종 포도당 당화 수율 낮아질 수 있고, 상기 농도가 62.5 mg를 초과하는 경우, 불필요하게 폴리에틸렌글리콜이 추가된다.
- [0031] 상기 섬유소계 바이오매스는 1차 당화에 사용되는 반응 혼합물 100 mL에 대해 20 내지 40% (w/v)의 농도로 포함될 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 기질의 분해율이 현저히 저하될 수 있다.
- [0032] 바람직하게는, 상기 1차 당화는 반응 혼합물 100 mL에 대해 섬유소계 바이오매스 20 내지 40% (w/v)를 기질로 하여, 섬유소계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 셀룰라아제 10 내지 60 FPU 및 폴리에틸렌글리콜 31.2 내지 62.5 mg/g glucan을 혼합하여 수행할 수 있다.
- [0033] 상기 1차 당화는 pH 4 내지 6, 45 내지 55℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 24시간 내지 80시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 또한, 상기 1차 당화는 바이오매스와 효소의 적절한 혼합을 위해 100 내지 500 rpm, 더 구체적으로, 150 내지 300 rpm, 보다 구체적으로, 150 내지 250 rpm의 회전 속도에서 교반하면서 수행될 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 1차 당화 산물로부터 고형분과 당화 효소-함유 액상 분획으로 분리하는 것은 여과법을 통해 수행할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법에 있어서, 제2단계는 상기 당화 효소-함유 액상 분획에서 글루코오스를 제거하는 것이다.
- [0037] 1차 당화 산물을 여과하면 불용성의 고형분과 당화 효소를 함유하는 액상 분획으로 분리되며, 액상 분획은 당화 효소를 함유하고 있다. 5 내지 10 kDa 한외여과막을 사용하여 액상 분획 중의 글루코오스 및 당화 효소를 분리함으로써, 글루코오스를 함유한 한외여과물을 당화 효소-함유 액상 분획으로부터 분리할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 섬유소계 바이오매스의 당화율 개선 방법에 있어서, 제3단계는 글루코오스가 제거된 액상 분획을 재 활용하여 2차 당화를 수행하는 것이다.
- [0039] 상기 2차 당화는 1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유소계 바이오매스를 기질로 하고, 글루코오

스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획을 이용하여 수행한다.

- [0040] 상기 2차 당화에 사용하는 1차 당화 산물에서 분리한 고형분은 전처리된 섬유소계 바이오매스의 총 중량에 대해 33 내지 100% (w/w)로 포함될 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우 바이오매스의 불용성으로 인하여 최종 포도당 수율이 현저히 낮아지게 될 수 있다.
- [0041] 상기 2차 당화는 반응 혼합물 100 mL에 대해 1차 당화 산물에서 분리한 고형분 및 전처리된 섬유소계 바이오매스를 혼합한 20 내지 40% (w/v)의 기질과 글루코오스가 제거된 당화 효소-함유 액상 분획 50 내지 72.5 mL를 pH 4 내지 6, 45 내지 55℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 24시간 내지 80시간 동안 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 1차 당화 후 분리된 액상 분획에서 글루코오스를 제거하여 2차 당화에 재사용하는 제1조건, 제1조건과 함께 PEG를 1차 당화 전에 투입하는 제2조건, 제2조건과 함께 1차 당화에서 얻은 고형분의 33% (w/w)를 2차 당화에 투입하는 제3조건을 통해 이들 조건이 없는 대조군의 19.3%의 당화율이 1차 처리 후 36.3%, 2차 처리 후 60.4%, 그리고 3차 처리 후 68%의 크게 증가하였으며, 당화율이 최대 3.5배 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0043] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0044] <실시예 1> 열수 전처리 및 성분 분석
- [0045] 기질인 EFBs는 고린도 그룹(Korindo, Jakarta, Indonesia)에서 제공받았다. 먼저 EFBs를 850 $\mu$ m의 입자 크기를 갖도록 분쇄한 뒤, 30L 규모의 반응기를 이용하여 물을 촉매로 190℃에서 15분간 고체/액체 비율 1:11.5(w/v)의 농도에서 전처리 하였다. 개략적인 방법은 다음과 같다. 800g의 팜 공과방과 16L의 탈염수(deionized water)를 이용하여 50℃에서 16시간 침지시킨 뒤, 원심분리로 여분의 물을 제거하였다. 그 뒤, 침지된 EFBs는 반응 용기로 옮긴 후 최종 부피가 10L가 되도록 탈염수를 넣어준 뒤 190℃에서 15분간 전처리하였다. 전처리된 EFBs는 초미세공 필터(6 $\mu$ m 이하)로 거른 뒤 원심분리로 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 EFBs는 동결건조 처리 후 -20℃에서 보관하였다. 전처리된 또는 원시료인 EFBs는 NREL(Laboratory Analytical Procedure (LAP) of National Renewable Energy Laboratory; Golden, CO)(Sluiter et al., 2005, Laboratory Analytical Procedure: Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory, NREL/TP-510-42622, Golden, CO.) 표준분석법에 의거하여 구성성분들을 분석하였다.
- [0046] 2단계 산 가수분해 후, Aminex HPX-87H 컬럼(Bio-Rad, Hercules, CA)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC; Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldronn, Germany)를 사용하여 액상 분획 중 당의 함량을 측정하였다. 액상 분획 중의 산-용해성 리그닌 함량은 분광 광도계(xMark, Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 205 nm에서 측정하였다. 산-불용성 리그닌 함량을 측정하기 위해 액상 분획을 여과하고 575℃의 퍼네이스에서 3시간 동안 인큐베이션 한 다음, 산-불용성 리그닌을 칭량하여 총 바이오매스의 백분율(%)로 표현하였다. 재의 함량을 측정하기 위해, EFBs를 575℃의 퍼네이스에서 24시간 동안 인큐베이션 한 다음, 총 바이오매스의 백분율(%)로 표현하였다. 전처리 후 불용성 바이오매스의 각 성분의 회수율(%)은 전처리 전 및 후 회수된 고형분 및 바이오매스 조성의 총 건중량(wt)을 비교하여 측정하였다.
- [0047] 표 1에 나타난 바와 같이, 전처리 전 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 함량은 각각 37.1 wt%, 24.7 wt%, 22.2 wt%였으며, 전처리 후 함량은 55.4 wt%, 7.6 wt%, 31.1 wt%로 측정되었다. 열수 전처리의 전형적인 특징인 헤미셀룰로오스의 급격한 감소(69.2%)가 확인되었으며, 당화의 주된 기질인 셀룰로오스의 회수율은 98.0%로써 상기의 열수 전처리가 매우 효과적임을 확인하였다.

**표 1**

[0048] 팜 공과방(empty fruit bunches, EFBs)의 열수 전처리 전(左) 및 후(右)의 성분 비교

| 주요성분       | 구성요소 (전체 고형분의 %) |                |
|------------|------------------|----------------|
|            | 원 시료             | 전처리 후          |
| 셀룰로오스      | 37.4 $\pm$ 0.6   | 54.7 $\pm$ 1.2 |
| 헤미셀룰로오스    | 23.9 $\pm$ 0.4   | 12.0 $\pm$ 0.3 |
| 산-불용해성 리그닌 | 21.1 $\pm$ 0.3   | 30.7 $\pm$ 0.7 |
| 산-용해성 리그닌  | 0.1 $\pm$ 0.0    | 0.1 $\pm$ 0.0  |
| 아세틸 그룹     | 5.9 $\pm$ 0.1    | 측정 안됨          |
| 재          | 1.3 $\pm$ 0.0    | 0.8 $\pm$ 0.0  |

|                                                            |            |      |
|------------------------------------------------------------|------------|------|
| 열수 추출물                                                     | 10.6 ± 0.4 | 적용불가 |
| 에탄올 추출물                                                    | 4.8 ± 0.2  | 적용불가 |
| 실험결과치는 평균±표준편차로 표시됨.<br>전처리와 물 세척 후의 고형분 회수율은 67.0%(w/w)임. |            |      |

[0049] <실시예 2> 고농도 효소 당화

[0050] 열수 전처리된 EFBs의 당화는 NREL 표준방법에 의거하여 실시하였다. 기질은 20~30%(w/v)(=4~6g EFBs/20mL)의 농도로 상기 실시예 1과 같이 열수 전처리된 EFBs으로 하였으며 셀룰라아제는 상업용 효소인 Cellic CTec3(노보자임사, 191.6 FPU/mL)를 10-60 FPU/g glucan의 농도로 이용하여 당화율 및 생성된 글루코오스 농도의 변화를 확인하였다. 당화 반응은 20mL 반응부피에서 온도 50℃, pH 4.8(50 mM 소듐 시트레이트 버퍼 이용), 200rpm, 72시간 동안 실시하였다. 당화 중 방출된 글루코오스는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여(Shodex SP0810 컬럼 이용) 분석 및 정량하였다. 글루코오스 수율(당화율)(%)은 유입 글루칸의 총량으로부터 방출되는 이론적 최대 글루코오스의 백분율로 표현하였다.

[0051] 도 1a에 도시된 바와 같이, 30%(w/v)의 기질 당화에서는 60 FPU/g glucan의 효소를 이용하여 72시간 후 최대 당화율 91.7%를 얻을 수 있었다. 또한, 30% EFBs 고형분 로딩 시, 당화에 의한 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스의 액화는 당화 초기(24h)에는 다른 EFBs 고형분 로딩에 비해 약간 느린 것 같았다. 예컨대, 10 FPU의 Cellic CTec3/g glucan을 이용한 가수분해산물의 액상 분획은 36h 후에도 회수할 수 없었다. 액화는 바이오매스 고형분 및 엔도-글루카나아제 간의 유변학적 거동에 영향을 줄 수 있으므로 효율적인 고농도 당화를 위한 핵심 요소 중 하나일 수 있다.

[0052] 또한, 25%의 기질 당화 시에는 30% 고형분 로딩에 비해 액화는 더 빨랐고, 20, 40, 60 FPU/g glucan의 효소를 이용하여 72시간 후 각각 79.3%, 98.1%, 100.0%의 당화율을 얻을 수 있었다(도 1b).

[0053] 그에 반해, 20%의 기질 당화에서는 40 및 60 FPU/g glucan의 효소를 이용하여 단지 48시간 이후 각각 91.8%, 100.1% 당화율을 얻을 수 있었다(도 1c).

[0054] 셀룰라아제 로딩 중 가장 낮은 셀룰라아제 로딩인 10 FPU/g glucan은 경제적으로 가장 구현 가능한 셀룰라아제 로딩인 것으로 알려져 있다. 그러나 상기 결과로부터 10 FPU/g glucan에서는 20%, 25% 및 30%의 기질 로딩에서 단지 56.1%, 62.2%, 및 67.3%의 당화율을 얻었다. 이들 당화율은 고농도의 기질 로딩에서 셀룰라아제 재활용의 효과를 관찰하기에는 너무 낮은 것으로 보이므로, 최종적으로 효소의 재활용 시점, 기질농도, 당화율 등을 경제적인 관점을 고려하여 20%(w/v)의 기질, 40과 60 FPU/g glucan 효소농도, 및 48시간 당화반응을 셀룰라아제 회수 및 재사용 조건으로 선택하였다.

[0055] <실시예 3> 고농도 당화를 위한 셀룰라아제 회수 및 재활용

[0056] 셀룰라아제 재활용이 열수 전처리된 EFBs의 당화 시 구현가능한지 시험하기 위해 48시간 1차 당화 후 EFBs 가수분해산물의 액상 분획을 회수하고, 전처리된 EFBs의 2차 및 3차 당화에 재활용하였다. 반응 조건은 실시예 2와 모두 동일하다. 단, 20%(w/v)의 EFBs 기질, 40 또는 60 FPU/g glucan의 효소 이용, 48시간 당화 후 고형분과 잔여 셀룰라아제가 포함된 액상을 여과법(filtration, 0.2μm 폴리테트라설펜 멤브레인 필터(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 이용)를 이용하여 분리 후 11.6±0.6 mL의 여과물을 얻었다. 액상을 다시 새로운(fresh) 20% EFBs 기질의 고농도 당화에 이용하였다.

[0057] 도 2a-b에 도시된 바와 같이, 48시간의 1차 당화 후 40과 60 FPU/g glucan 효소를 이용하여 각각 96.7%와 98.3%의 당화율을 획득할 수 있었으며, 이는 각각 생산된 글루코오스 농도 119.3g/L와 123.6g/L에 해당되었다. 1차 당화 후 가수분해산물을 여과하여 11.6±0.6 mL의 여과물을 얻었다. 이는 가수분해 반응물의 초기 액상 부피의 72.5%에 해당한다. 1차 당화에서 회수된 액상을 전처리된 EFBs에 부가하여 수행한 2차 당화에서는 당화율이 각각 19.3%와 20.5%로 측정되었으며, 2차 당화에서 회수된 액상을 이용한 3차 당화에서는 당화율이 최대 5.0% 이하로 측정되었다(도 2b).

[0058] 이와 같이, 이러한 낮은 당화율로 비추어 볼 때 셀룰라아제 로딩량을 40 FPU에서 60 FPU/g glucan까지 증가하여도 셀룰라아제 재활용 효율에는 영향을 주지 않아 현재의 실험조건으로 셀룰라아제를 회수 및 재사용하는 것은 불가하다고 판단하였다. 그리하여 이러한 실험조건을 개선하고자 효소 재활용 방법을 이용한 고농도 당화의 제한요인을 분석하였다.

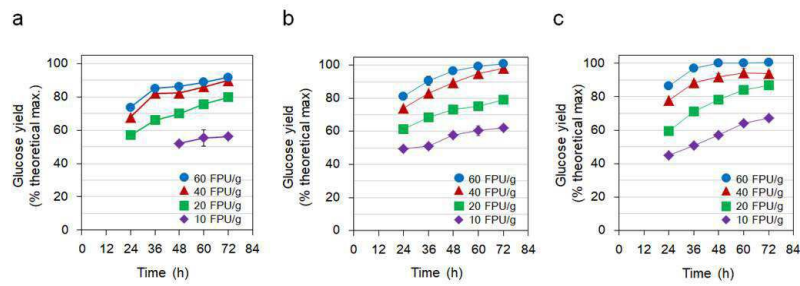
- [0059] <실시예 4> 고농도 EFBs 당화 시 셀룰라아제 재활용 제한요인 분석
- [0060] (1) 글루코오스에 의한 효소의 생성물 저해
- [0061] 1차 EFBs의 고농도 당화 후 생성된 글루코오스의 잔량이 85.0g/L임을 감안하면 1차 당화 후 회수된 액상을 이용한 2차 당화에 있어서 글루코오스에 의한 생성물 저해효과(product inhibition)를 예측할 수 있다. 이를 증명하기 위하여 당화초기에 0~108 g/L의 글루코오스를 투입하여 당화를 실시하였다.
- [0062] 도 3a에 나타난 바와 같이, 당화율이 100.0%에서 60.9%로 글루코오스 농도가 증가할수록 당화율이 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다. 이러한 감소는 셀룰라아제에 대한 생성물 저해로 인한 것일 수 있다. 그러므로 2차 당화 전에 1차 가수분해산물의 액상 분획의 여과물로부터 초기 글루코오스 농도(85 g/L)를 줄일 필요가 있다.
- [0063] (2) 당화 후 효소의 활성 손실
- [0064] 리그노셀룰로오스에 대한 일반적인 당화 조건인 pH4.8, 50℃의 조건에서 Cellic CTec3에서 트리코더마 리세이(*Trichoderma reesei*) 유래의 베타-글루코시다아제는 리그닌에 결합하여 베타-글루코시다아제 활성이 현저히 손실되었다. 베타-글루코시다아제의 활성 손실은 글루코오스를 적게 생성시킴으로써 셀로바이오스의 축적을 유도할 수 있다. 따라서, Cellic CTec3에서 베타-글루코시다아제의 활성 손실은 셀룰라아제 재활용 시 제한 요인 중 하나로 가정하였고, 베타-글루코시다아제 활성은 1차 당화 후 모니터링 하였다. 또한, 총 셀룰라아제 및 CMCase의 활성 역시 모니터링 하였다. 특히 엔도-글루카나아제(CMCase)는 고농도 당화의 액화 시 중요한 역할을 한다.
- [0065] 효소 활성을 조사하기 위해, 48h 동안 당화 후, 가수분해산물의 액상 분획으로부터 잔류하는 당을 5 L의 소듐 시트레이트 버퍼(50 mM, pH 4.8) 중의 10 kDa의 분자 컷오프를 갖는 투석막(SnakeSkin, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA)을 사용하여 4℃에서 4h 동안 완전히 제거하였다. 그리고 나서, 액상 분획의 효소 활성 및 단백질 농도를 측정하였다.
- [0066] 효소 반응물에서 총 셀룰라아제 활성은 NREL의 LAP에 따라 측정된 filter paper unit(FPU)/mL로 표현하였다. 간단히 말해, 희석된 시료 접촉 효소 0.5 mL를 필터 페이퍼 스트립(Whatman No. 1, Whatman, Maidstone, UK) 50 mg 및 소듐 시트레이트 버퍼 1.0 mL와 50℃에서 60분 동안 인큐베이션 하였다. 효소 반응은 3.0 mL의 3,5-Dinitrosalicylic acid(DNS) 제제를 95℃에서 5분간 첨가하여 중단시켰다. 그런 다음, 마이크로플레이트 분광광도계(xMark)를 사용하여 방출된 글루코오스를 환원당으로서 540 nm에서 측정하였다. 셀룰라아제의 1 유닛(FPU/mL)은 60분간 2.0mg의 글루코오스를 방출하는 효소의 양으로 정의되었다.
- [0067] 효소 반응물 중의 카복시메틸 셀룰라아제(CMCase) 활성은 희석된 시료 접촉 효소의 0.5 mL를 2% (w/v) 카복시메틸 셀룰로오스(CMC; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 1 mL과 50℃에서 10분간 인큐베이션하여 측정하였다. 효소 반응은 DNS 제제를 첨가하여 중단시키고, 방출된 글루코오스의 함량은 30분간 0.5 mg의 글루코오스를 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.
- [0068] 효소 반응물 중의  $\beta$ -글루코시다아제(BG) 활성은 Grover, A.K. 등(Biochim. Biophys. Acta 482, 98-108, 1977)에 기재된 대로 측정하였다. 간단히 말해, 0.5 mL의 희석된 시료 접촉 효소를 2 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG; Carl Roth, Karlsruhe, Germany) 1 mL과 50℃에서 10분간 인큐베이션하여 측정하였다. 효소 반응은 2 mL의 1M 소듐 카보네이트를 첨가하여 중단시켰다. 효소 반응 동안 pNPG로부터 방출된 *p*-nitrophenol의 양을 410 nm에서 측정하였다.  $\beta$ -글루코시다아제의 1 효소 유닛은 분당 1  $\mu$ mol의 *p*-nitrophenol을 방출하는 효소의 양으로 정의하였다.
- [0069] 단백질 농도는 비신코닌산 단백질 키트(Thermo Scientific, Rockford, IL)를 사용하여 측정하였다.
- [0070] 도 3b에 나타난 바와 같이, 48시간 이후 모든 효소에서 초기 100% 활성 대비 20% 미만의 활성이 있는 것으로 나타났다. 그 중 BG의 활성은 당화 24h 후 1.1%만 가지고 있는 것으로 나타나 가장 큰 활성 손실이 나타나는 것으로 판단되었다. BG의 심각한 활성 손실은 높은 리그닌 함량(즉, 37.6%)을 갖는 스트림-전처리된 EFBs와 Cellic CTec2의 당화에서 보고된 것과 유사하여 이러한 손실은  $\beta$ -글루코시다아제의 리그닌과의 비특이적 결합에서 기인한 것으로 보인다. 총 셀룰라아제 및 CMCase 활성의 경우, 1차 24h 당화 후 각각 6.8% 및 19.2%를 보유하고 있었다. 엔도글루카나아제 활성 보다 총 셀룰라아제 활성의 손실이 더 큰데, 이는 셀로바이오스로부터 주로 글루코오스를 생산하는  $\beta$ -글루코시다아제의 현저한 활성 손실에서 기인한 것으로 보인다.
- [0071] (3) 바이오매스의 불용성 고형분과 효소 단백질의 결합
- [0072]  $\beta$ -글루코시다아제의 리그닌과의 비특이적 결합에서 나타난 바와 같이, 당화 후 효소의 현저한 손실은 주로 리그

닌을 포함하여 전처리된 EFBs의 불용성 고형분과 효소의 비특이적 결합으로 인한 것으로 가정하였다. 이러한 가정이 타당한지 확인하기 위해, 전처리된 EFBs와 Cellic CTec3의 단백질 흡착을 모니터링 하였다. 특히, 실시예 2와 같이 20%(w/v)의 EFBs, 40 FPU의 Cellic CTec3/g glucan 및 소듐 시트레이트 버퍼(50 mM, pH 4.8)의 결합 혼합물 1mL을 4℃에서 인큐베이션 하였다.

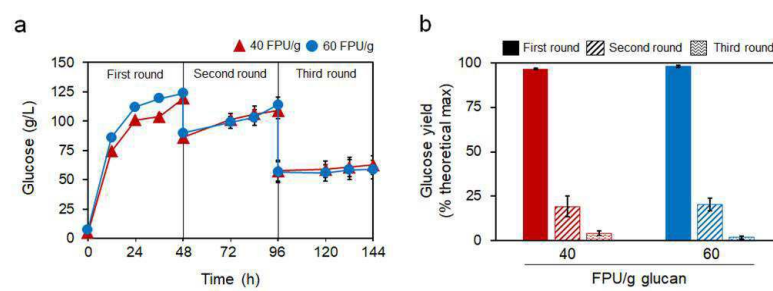
- [0073] 그 결과, 반응 15분만에 총 단백질량의 50%가 열수 전처리된 EFBs에 흡착됨을 확인하였고(도 3c), 회수된 단백질에 대한 SDS-PAGE 분석을 통해 육안으로 확인하였다(도 3d). 이들 결과로부터, Cellic CTec3의 대부분의 효소 단백질은 즉시 전처리된 EFBs에 결합하고, 효소 단백질의 비특이적 결합은 당화 후 효소 활성 손실의 주요 원인 일 수 있음을 알 수 있었다.
- [0074] 그리하여, 최종적으로 열수전처리 EFBs의 고농도 당화를 위한 셀룰라아제 재활용 시 세 가지의 제한요인을 확인할 수 있었으며 이를 극복하기 위한 방법을 모색하였다.
- [0075] <실시예 5> 고농도 당화의 제한요인 해결을 통한 셀룰라아제 회수 및 재활용 결과
- [0076] (1) 셀룰라아제 재활용에 대한 글루코오스의 분리 효과
- [0077] 글루코오스에 의한 효소의 생성물 억제를 완화하기 위해, 1차 당화 후 및 2차 당화 전 EFGs 가수분해산물의 액상 분획으로부터 글루코오스를 제거할 필요가 있다. 이를 위해, 10 kDa 한외여과막을 이용하여 1차 당화 후 액상 분획 중의 글루코오스 및 효소를 분리하고, 글루코오스를 함유한 한외여과물을 셀룰라아제-함유 분획으로부터 분리하였다.
- [0078] 2차 당화를 위해 한외여과를 사용하지 않고 액상 분획에서 한외여과-분리된 효소 분획으로 전환할 때, 당화율은 19.3%에서 36.3%로 1.9배 증가하였다(도 4).
- [0079] (2) 셀룰라아제 재활용에 대한 폴리에틸렌 글리콜의 효과
- [0080] β-글루코시다아제의 리그닌과의 비특이적 결합으로 인한 β-글루코시다아제 활성의 현저한 손실을 완화하기 위해, 62.5 mg의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 8000/g glucan을 전처리된 EFBs의 1차 당화 전에 첨가하였다.
- [0081] PEG를 첨가한 결과, 2차 당화로부터 당화율은 60.4%로 PEG가 없이 수행한 2차 당화의 당화율보다 3.1배 더 높았다(즉, 19.3%)(도 4). 따라서, PEG의 첨가는 새로운 셀룰라아제뿐만 아니라 재활용된 셀룰라아제를 이용하여 전처리된 EFBs의 당화율을 효과적으로 증가시켰다. 당화 시 PEG의 효과는 전처리된 리그노셀룰로오스의 불용성 고형분과의 셀룰라아제의 비특이적 결합을 감소시키는 것이다.
- [0082] (3) 셀룰라아제 재활용에 대해 결합된 효소를 포함하는 사용된 고형분 분획의 재사용의 효과
- [0083] 상술한 바와 같이 셀룰라아제 재활용 시 글루코오스의 분리 및 PEG 첨가로 인해 2차 당화 시 당화율은 3.1배 증가하였다. 1차 당화에서 잔류 고형분에 결합된 효소의 재사용을 추가로 증가시키기 위해, 1차 당화로부터 사용된 고형분의 33.0%를 2차 당화에 직접 적용하였다.
- [0084] 한편, 사용된 고형분의 33.3% 이상(7.9g 중 2.6g)을 당화에 사용하였을 때, 고농도에서 높은 점도로 인해 액화가 거의 관찰되지 않았다. 2차 당화 후, 당화율은 68.0%로, 고형분 분획의 재사용없이 글루코오스 제거 및 PEG 첨가한 경우에 비해 7.6% 더 높았다(도 4).
- [0085] 종합적으로, 1차 당화 후 분리된 액상에서 글루코오스를 제거하여 2차 당화에 재사용하는 제1조건, 제1조건과 함께 PEG를 1차 당화 전에 투입하는 제2조건, 제2조건과 함께 1차 당화에서 얻은 고형분의 33% (w/w)를 2차 당화에 투입하는 제3조건을 통해 이들 조건이 없는 대조군의 19.3%의 당화율이 1차 처리 후 36.3%, 2차 처리 후 60.4%, 그리고 3차 처리 후 68%로 매우 증가하였으며, 당화율이 최대 3.5배 증가함을 확인할 수 있었다.

## 도면

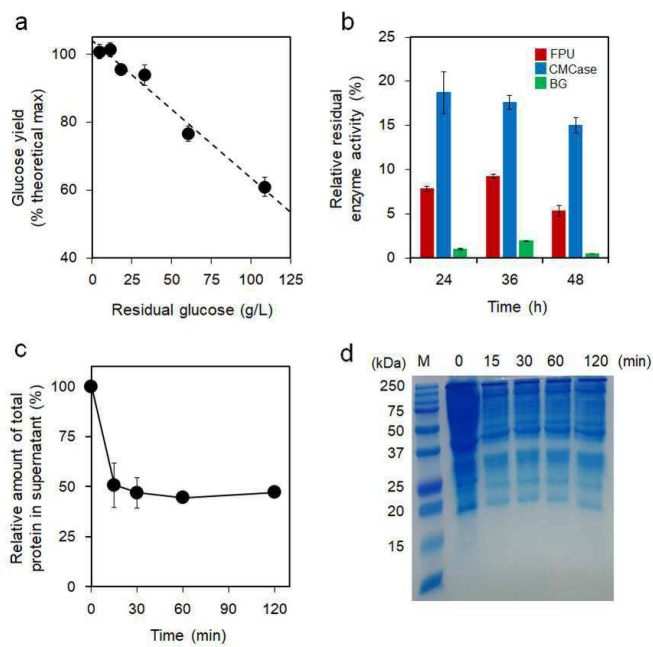
### 도면1



### 도면2



### 도면3



도면4

