(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0089597
(43) 공개일자 2018년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/02 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
C08L 71/02 (2006.01) *C12N 9/42* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/02 (2013.01)
C08B 37/0003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0013692
(22) 출원일자 2017년01월31일
심사청구일자 2017년01월31일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200 18동 805호 (서초동,삼풍아파트)
양정우
서울특별시 강북구 삼양로79길 27-17 B동 101호 (수유동,강북타운)
(74) 대리인
특허법인다나

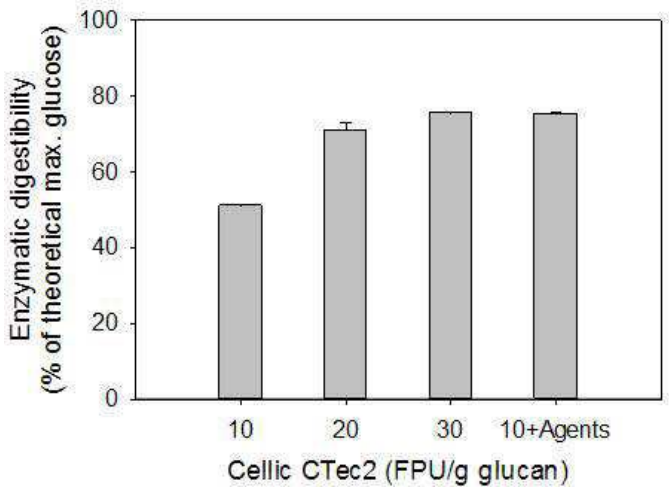
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물 및 이를 이용한 당화율 개선 방법**

(57) 요 약

본 발명은 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물 및 이를 이용한 당화율 개선 방법에 관한 것으로, 열수 전처리 된 셀룰로오스계 바이오매스에 대해 당화 효소로 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제를 사용하고, 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 리그노셀룰로오스의 당화율을 개선하는 효과를 제공한다.

대 표 도 - 도5a



(52) CPC특허분류
C08L 71/02 (2013.01)
C12N 9/2437 (2013.01)
C12P 2201/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 G01201507010059
부처명 한국산업기술평가관리원
연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오화학산업화촉진기술개발사업
연구과제명 [RCMS]산업 미생물 발효에 적합한 고농도 바이오슈가 제조 및 공통 활용 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.07.01 ~ 2016.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

셀룰라아제; 헤미셀룰라아제; 및 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

셀룰라아제는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 10 내지 30 FPU의 농도로 포함되는, 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

헤미셀룰라아제는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 2.7 내지 10.6 mg/g glucan의 농도로 포함되는, 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

폴리에틸렌글리콜은 중량평균분자량이 4,000 내지 8,000인, 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

폴리에틸렌글리콜은 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 15.6 내지 62.5 mg/g glucan의 농도로 포함되는, 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

셀룰로오스계 바이오매스는 볏짚, 거대억새, 사탕수수부산물, 옥수수부산물, 스위치그라스, 포플라, 팜 공과방(Empty fruit bunches, EFB), 참나무, 또는 에너지작물 중 어느 하나인, 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물.

청구항 7

셀룰로오스계 바이오매스에 대해 제1항의 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물을 사용하여 당화하는 단계를 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

청구항 9

제7항에 있어서,

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

청구항 10

제9항에 있어서,

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

청구항 11

제7항에 있어서,

당화는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1 내지 12% (w/v)에 대하여 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 셀룰라아제 10 내지 12.5 FPU, 헤미셀룰라아제 2.7 내지 5.3 mg/g glucan 및 폴리에틸렌글리콜 31.2 내지 62.5 mg/g glucan을 혼합하여 수행하는, 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

당화는 pH 4 내지 6, 45 내지 55℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 50시간 내지 80시간 동안 수행하는 것인, 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율 개선 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제 및 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율을 개선하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물 및 이를 이용한 당화율 개선 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 과도한 화석 연료 자원 개발 및 사용이 전 지구적인 환경 문제를 야기하고 있는 가운데, 기존의 화석 연료를 대체하기 위한 친환경적 재생 에너지원에 대한 탐색이 시급한 실정이다. 특히 우리나라는 화석 연료에 대한 에너지 의존도가 85%로 높고 그 대부분을 외국에서 수입하기 때문에 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) 등의 식물 유기체를 의미하며, 광합성을 통해 이산화탄소를 재활용한다는 점에서 탄소 중립에 가깝다고 할 수 있다. 이 중에서도 2세대 바이오매스인 리그노셀룰로오스는 주로 임산물(초본계, 목질계)과 농부산물로서 지구상에서 가장 흔한 탄수화물이라는 점에서 주목 받고 있다. 또한, 전분계 바이오매스에 비하여 식량 자원을 소모한다는 윤리적 차원에서의 문제점도 없다는 장점이 있다. 이러한 리그노셀룰로오스중 팜 공과방(EFB)은 열대지방에서 주로 생산되는 임산부산물로서 높은 탄수화물 함량(최대 60%)과 풍부한 생산량 때문에 바이오케미컬과 바이오연료의 생산에 적합한 바이오매스로 여겨진다.

[0005] 리그노셀룰로오스 기반 바이오매스로부터 소재 및 연료를 생산하는 공정은 바이오매스의 전처리, 효소 당화, 발효 공정으로 나눌 수 있다. 특히, 효소 당화 공정은 전체 공정의 병목 단계(bottleneck step)로서, 전체 공정가의 20-25% 정도를 차지한다. 따라서 효소 생산 비용 및 효소투입량 절감을 위한 기술개발이 전 세계적으로 활발히 이루어지고 있는 실정이며, 대표적인 예로, 세계적인 효소 회사인 덴마크의 노보자임사(Novozymes)는 효소 개발을 통해서 에탄올 1갤런을 생산하는 데 필요한 효소비용 0.5달러를 2015년까지 0.3달러까지 줄이려는 노력을 기울이고 있다.

[0006] 최근에는 효소 비용 절감노력의 일환으로 보조 단백질(accessory protein) 혹은 보조제(accessory agent)의 탐색 및 개발이 중요한 부분으로 인식되고 있다. 각종 당화 보조제는 셀룰로오스를 효소의 접근성이 높은 형태로 변화시키거나 효소의 안정성을 높여주는 효과, 또는 점도를 낮춰주어 셀룰라아제의 활동을 돕는 역할을 한다. 보조제의 첨가로 당화효소 투입량을 2배 정도 감소시킬 수 있다면, 전체 공정비용이 1.7-1.9배 정도 절감이 가능하다는 보고가 있다. 실제로 노보자임사(Novozymes)에서는 당화 시너지 단백질을 첨가한 상업용 효소 칵테일인 Cellic CTec2을 개발하여 당전환율을 높이면서 필요한 총 효소량 절감을 위한 노력을 기울이고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Koppram, R. et al. Trends Biotechnol, vol.32, pp.46-53 (2014)

(비특허문헌 0002) Cara, C. et al. Proc Biochem, vol.42, pp.1003-1009 (2007)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 셀룰로오스계 바이오매스의 당화 효소로 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제를 사용하고, 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 고농도의 리그노셀룰로오스의 당화율을 개선하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물 및 이를 이용한 당화율 개선 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 셀룰라아제; 헤미셀룰라아제; 및 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 셀룰로오스계 바이오매스에 대해 상기 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물을 사용하여 당화하는 단계를 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율 개선 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 셀룰로오스계 바이오매스의 당화 효소로 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제를 사용하고, 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용하여 고농도의 리그노셀룰로오스의 당화율을 개선하며, 상기 세포벽 분해효소의 사용량을 감소시켰다는 점에서 기존 당화 공정보다 용이하고 효율적인 당 생산 공정을 구축하는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 다양한 농도의 셀룰라아제 첨가에 따른 열수 전처리된 팜 공과방의 당화율 변화를 나타낸 것이다.

도 2는 다양한 농도의 헤미셀룰라아제의 첨가에 따른 열수 전처리된 팜 공과방의 당화율 변화를 나타낸 것이다.

도 3은 폴리에틸렌글리콜의 첨가에 따른 열수 전처리된 팜 공과방의 당화율 변화를 나타낸 것이다.

도 4는 기질의 농도별 셀룰라아제, 헤미셀룰라아제 및 폴리에틸렌글리콜의 첨가에 의한 팜 공과방의 당화율 변화를 나타낸 것으로, (a)는 10 FPU/g glucan의 셀룰라아제(Cellic CTec2)만 이용 시 기질의 농도에 따른 당화율 변화, (b)는 셀룰라아제에 헤미셀룰라아제인 Cellic HTec2(2.7 mg/g glucan)를 추가한 경우 기질의 농도에 따른 당화율 변화, (c)는 셀룰라아제에 폴리에틸렌글리콜(62.5 mg/g glucan)을 추가한 경우 기질의 농도에 따른 당화율 변화, (d)는 셀룰라아제에 헤미셀룰라아제 및 폴리에틸렌글리콜을 추가한 경우 기질의 농도에 따른 당화율 변화이다.

도 5a는 저농도 기질(1.8%, w/v)에서 셀룰라아제 또는 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제/폴리에틸렌글리콜 사용에 의한 팜 공과방의 당화율 상승 및 단백질 절감효과, 도 5b는 고농도 기질(21.7%, w/v)에서 셀룰라아제 또는 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제/폴리에틸렌글리콜 사용에 의한 팜 공과방의 당화율 상승 및 단백질 절감효과를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0018] 본 발명은 셀룰라아제; 헤미셀룰라아제; 및 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 또한 셀룰로오스계 바이오매스에 대해 상기 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물을 사용하여 당화하는 단계를 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스의 당화율 개선 방법을 제공한다.

[0020] 리그노셀룰로오스의 당화에서 주의할 것들은 전처리법에 따른 기질의 특성에 따라 최적으로 조합된 효소를 사용해야 한다는 점과 당화 공정비용 상에서 큰 비중을 차지하는 효소의 사용량을 가능한 한 최소한으로 해야 한다는 점 등이 있다.

[0021] 본 발명은 전처리한 셀룰로오스계 바이오매스의 당화에 적합한 당화 효소로 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제를, 당전환 효율을 높일 수 있는 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용하고, 최적 당화 조건을 확립함으로써 고농도의 기질에서의 당화율을 극대화시키는 것을 특징으로 한다.

[0022] 용어, "바이오매스"는 에탄올, 탄화수소류, 가솔린, 천연가스, 메테인, 바이오디젤 및 수소 가스 등의 에너지, 전기, 플라스틱, 중합체, 영양분(인간 및 동물), 단백질, 생체분자, 약제(인간 및 가축), 비료 혹은 기타 산물을 생산하는 생산 시스템에서 이용될 수 있는 유기성분의 임의의 재료 혹은 이들 재료의 조합을 의미한다.

[0023] 용어 "셀룰로오스계 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.

[0024] 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 성기게 만들어 후단의 효소당화를 용이하게 하는 것을 포함한다. 또한, 분자구조의 변화, 바이오매스 내 구성성분의 산화, 평균 분자량의 변화, 평균 결정화도의 변화, 표면적의 변화, 중합도의 변화, 다공도의 변화, 분지화도의 변화, 그라프트화, 결정 영역 크기의 변화, 또는 전체 영역 크기의 변화를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 셀룰로스계 바이오매스로 팜 공과방(Empty fruit bunches, EFB)을 사용할 수 있고, 수 mm 이하의 입자 크기를 갖도록 분쇄하여 사용할 수 있다.

[0026] 또한, 전처리로, 열수 전처리를 수행할 수 있고, 예컨대, 팜 공과방 및 물을 1:10-15 (w/v)의 비율로 혼합하고,

180 내지 210℃에서 10분 내지 20분 동안 가열하여 열수 전처리할 수 있다. 상기 열수 전처리는 셀룰로스계 바이오매스의 종류에 따라 적절히 채택하여 사용하면 되므로 특별히 제한하지는 않는다.

[0027] 상기 열수 전처리 후 물로 세척 및 고액분리단계를 거쳐 고형분을 수득할 수 있다.

[0028] 상기 고액분리단계는 원심분리를 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 다음으로, 셀룰로스계 바이오매스의 고형분과 셀룰라아제; 헤미셀룰라아제; 및 폴리에틸렌글리콜을 포함하는 셀룰로오스계 바이오매스 당화용 조성물을 반응기에 제공하여 당화를 수행할 수 있다.

[0030] 본 발명은 당화 효소로 셀룰라아제 및 헤미셀룰라아제를 사용한다. 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.

[0031] 상기 셀룰라아제는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 10 내지 30 FPU, 더 구체적으로 10 내지 12.5 FPU, 보다 구체적으로, 10 FPU의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도가 10 FPU 미만인 경우, 바이오매스의 불용성으로 인하여 최종 포도당 수율이 현저히 낮아지게 되고, 상기 농도가 30 FPU를 초과하는 경우, 전체 바이오매스 이용 공정의 20% 이상을 차지하고 있는 효소비용으로 인하여 전체 공정의 상용화 가능성이 어려워진다.

[0032] 또한, 상기 헤미셀룰라아제는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 2.7 내지 10.6 mg, 더 구체적으로, 2.7 내지 5.3 mg, 보다 구체적으로, 2.7 mg의 농도로 포함될 수 있다. 상기 농도가 2.7 mg 미만인 경우, 바이오매스의 불용성으로 인하여 최종 포도당 수율이 현저히 낮아지게 되고, 상기 농도가 10.6 mg를 초과하는 경우, 전체 바이오매스 이용 공정의 20% 이상을 차지하고 있는 효소비용으로 인하여 전체 공정의 상용화 가능성이 없어지게 된다.

[0033] 또한, 당화 효소의 활성을 장기간 유지하고, 리그닌, 셀룰로오스 등과의 반응을 통해 당전환율을 높이는 보조제로 폴리에틸렌글리콜을 사용할 수 있다.

[0034] 상기 폴리에틸렌글리콜은 중량평균분자량이 4,000 내지 8,000, 더 구체적으로, 6,000 내지 8,000, 보다 구체적으로, 8,000인 것을 사용할 수 있다.

[0035] 상기 폴리에틸렌글리콜은 셀룰로오스계 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.

[0036] 상기 셀룰로오스계 바이오매스는 글루칸의 농도를 기준으로 하여 당화 시 기질로 사용하며, 글루칸 1%(w/v)는 0.1 g glucan/10 mL을 의미한다. 따라서, 바람직하게는, 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸은 1 내지 12%(w/v), 더 구체적으로, 3 내지 12%(w/v), 보다 구체적으로, 9 내지 12%(w/v)의 농도로 사용할 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 기질의 분해율이 현저히 저하될 수 있다.

[0037] 바람직하게는, 상기 당화는 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1 내지 12%(w/v)에 대하여 셀룰로오스계 바이오매스 내 글루칸 1g 당 셀룰라아제 10 내지 12.5 FPU, 헤미셀룰라아제 2.7 내지 5.3 mg 및 폴리에틸렌글리콜 31.2 내지 62.5 mg를 혼합하여 수행할 수 있다.

[0038] 상기 당화는 pH 4 내지 6, 45 내지 55 ℃, 150 내지 250 rpm의 조건에서 50시간 내지 80시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또한, 상기 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.

[0040] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0041] **<실시예 1> 열수 전처리 및 성분 분석**

[0042] 기질인 팜 공과방은 850 ㎛의 입자 크기를 갖도록 분쇄한 뒤, 30L 규모의 반응기를 이용하여 물을 촉매로 190℃에서 15분간 고체/액체 비율 1:11.5 (w/v)의 농도에서 전처리하였다. 개략적인 방법은 다음과 같다. 800g의 팜 공과방과 16L 의 탈염수(deionized water)를 이용하여 50℃에서 오버나이트 한 뒤, 원심분리로 여분의 물을 제

거하였다. 침지된 팜 공과방은 반응 용기로 옮긴 뒤 총 부피가 10L가 되도록 탈염수를 넣어준 뒤 190℃에서 15분간 전처리하였다. 전처리된 팜 공과방은 초미세공 필터(6 ㎛ 이하)로 거른 뒤 원심분리로 물기를 제거하였다. 물기를 제거한 팜 공과방은 동결건조 처리 후 -20℃에서 보관하였다. 전처리된 또는 원시료인 팜 공과방은 NREL 표준분석법에 의거하여 구성성분들을 분석하였다 (표 1). 전처리전 글루칸, 헤미셀룰로오스, 리그닌의 함량은 각각 37.1 wt%, 24.7 wt%, 22.2 wt%였으며, 전처리후 함량은 55.4 wt%, 7.6 wt%, 31.1 wt%로 측정되었다. 열수 전처리의 전형적인 특징인 헤미셀룰로오스의 급격한 감소가 확인되었으며, 전처리후 고형분내의 당화의 주된 기질인 글루칸의 회수율은 100%임을 확인하였다.

표 1

팜 공과방의 열수전처리 전(左), 후(右)의 성분 비교

주요성분	구성요소 (전체 고형분의 %, w/w)[a]	
	원시료	전처리후
글루칸	37.1 ± 0.1	55.4 ± 0.5
헤미셀룰로오스	24.7 ± 0.1	7.6 ± 0.2
리그닌	22.2 ± 0.2	31.1 ± 0.5
재	1.3 ± 0.0	0.8 ± 0.0
A: 실험결과치는 평균 ± 표준편차로 표시됨. 전처리와 물 세척 후의 고형분 회수율은 69%(w/w)임.		

[0043]

[0045] **<실시예 2> 상용효소의 적정 농도 결정**

[0046] 열수 전처리된 팜 공과방의 당화는 NREL 표준방법에 의거하여 실시하였다. 기질은 1%(w/v) glucan(=0.1 g glucan/10mL)의 농도로 상기 실시예 1과 같이 열수 전처리된 팜 공과방으로 하였으며 셀룰라아제는 상업용 효소인 Cellic CTec2를 10-30 FPU/g glucan의 농도로 이용하여 당화율의 추이를 확인하였다. 당화 반응은 10mL 반응부피에서 온도 50℃, pH 4.8(50 mM sodium citrate 버퍼 이용), 200rpm, 72시간 동안 실시하였다. 효소반응의 산물은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여(Aminex HPX-87H 컬럼 이용)분석 및 정량하였다.

[0047] 도 1에 나타난 바와 같이, 효소 농도 10, 20, 30 FPU/g glucan 이용 시 당화율이 51.1%, 70.7%, 75.4%으로 상승함을 확인하였다. 그러나, 상업적인 접근이 가능한 경제성을 고려하였을 때, 10 FPU의 Cellic CTec2 농도를 기반으로 보조제 이용 당화율을 높이는 것이 적정하다고 판단하였다.

[0049] **<실시예 3> 헤미셀룰라아제의 농도별 첨가가 당화율에 미치는 영향**

[0050] 반응 조건은 실시예 2와 모두 동일하다. 단, 헤미셀룰라아제의 농도 최적화를 위하여 Cellic HTec2(0-120mg/g glucan)와 실시예 2에서 결정한 셀룰라아제의 농도 10 FPU/g glucan을 조합하여 실험하였다.

[0051] 도 2에 나타난 바와 같이, Cellic HTec2의 단백질 농도가 증가함으로써 당화율이 급격히 증가됨을 확인하였다. 그러나, 10 FPU/g glucan의 Cellic CTec2의 단백질 농도가 18.7mg/g glucan임을 감안한다면, 당화율의 상승으로만 Cellic HTec2의 농도를 결정하기가 어렵다. 가령, 60mg의 Cellic HTec2 농도에서 당화율은 최대에 이른다(76.3%). 그리하여, 단백질당 당화율 상승폭이 가장 크면서 경제성 있는 농도인 2.7 mg/g glucan의 Cellic HTec2 농도를 최적값으로 결정하였다. 한편 단백질당 당화율 상승폭은 Cellic HTec2의 농도가 각각 2.7 mg, 5.3 mg, 10.6 mg/g glucan일때 각각 16.2%, 23.2%, 32.6% 였다.

[0053] **<실시예 4> 폴리에틸렌글리콜의 농도별 첨가가 당화율에 대한 영향**

[0054] 폴리에틸렌글리콜의 효과 실험 조건은 폴리에틸렌글리콜 8000을 당화 보조제로 첨가한 것 외에는 실시예 2와 모두 동일하다. 폴리에틸렌글리콜 농도 최적화를 위하여 다양한 농도(0-250 mg/g glucan)에서 실험하였다.

[0055] 도 3에 나타난 바와 같이, 최대 당화율(64.6%)을 얻을 수 있는 최소 농도인 62.5 mg/g glucan으로 최적값을 결정하였다.

[0057] **<실시예 5> 팜 공과방 농도별 당화 보조제 조합의 효과**

[0058] 상기 적용한 모든 당화 보조제인 헤미셀룰라아제(2.7 mg/g gluan)와 폴리에틸렌글리콜 8000(62.5 mg/g glucan)를 모두 이용하여 당화 실험을 진행하였다. 반응 조건은 실시예 2와 모두 동일하다. 단, 각 실시예 3과 실시예 4에서 결정된 각각의 보조제의 최적 농도들을 적용하였고, 기질 농도에 따른 반응을 보기 위해 5개의 팜 공과방 기질 농도 조건(1.8, 5.4, 10.8, 16.3, 21.7%(w/v)의 기질은 1-12%(w/v)의 글루칸 함량에 해당)에서 당화를 실시하였다(도 4, 표 2).

[0059] 그 결과, 1.8%의 낮은 기질 농도에서 보조제 첨가에 의한 당화율은 75.2%로, 보조제가 없었을 때 당화율인 51.1%에 비하여 47.2% 당화율이 상승함을 확인하였다. 이러한 효과는 기질의 농도가 높아질수록 더욱더 뚜렷하게 나타났는데, 고농도 당화조건(15% 이상 기질)이라고 할 수 있는 16.3%와 21.7%의 기질에서는 보조제를 첨가하였을 때, 75.4%, 72.5%의 당화율로 보조제가 없을 때 당화율과 비교하여 최대 50.1%의 당화율이 상승함을 확인하였다.

표 2

기질 농도별 보조첨가제 이용시 당화율의 변화

[0060]

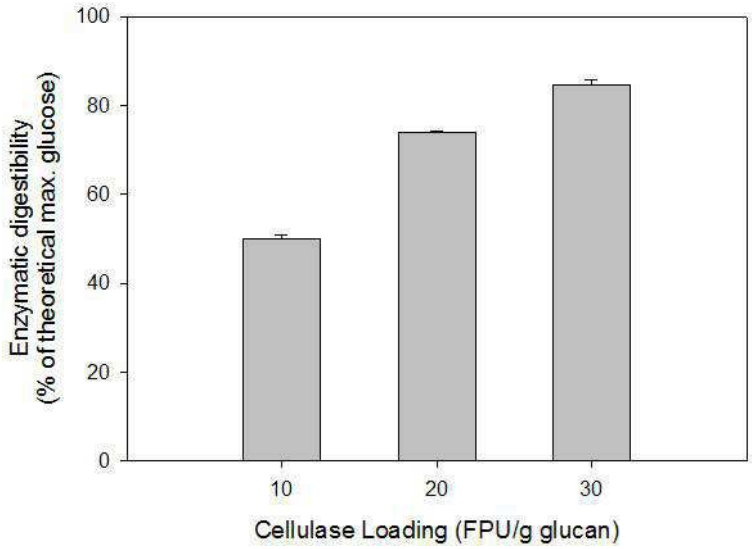
기질농도 (%, w/v)	당화율 (포도당 수율,%)			
	CT 단독	CT 및 HT	CT 및 PEG	CT, HT 및 PEG
1.8	51.1 ± 0.1	60.7 ± 1.2	64.7 ± 0.4	75.2 ± 0.3
5.4	60.1 ± 0.1	65.6 ± 0.6	74.2 ± 0.2	78.3 ± 0.6
10.8	57.6 ± 0.4	62.0 ± 0.0	75.1 ± 0.3	78.1 ± 0.5
16.3	52.8 ± 0.5	56.0 ± 0.1	72.2 ± 0.2	75.4 ± 0.1
21.7	48.3 ± 0.7	47.6 ± 1.4	66.2 ± 0.2	72.5 ± 2.5
CT, 셀룰라아제(Cellic Ctec2); HT, Cellic HTec2(헤미셀룰라아제); PEG, 폴리에틸렌글리콜 8000				

[0061] 끝으로, 저농도(1.8%(w/v) 기질은 1%(w/v)의 글루칸 함량에 해당)와 고농도 기질(21.7%(w/v) 기질은 12%(w/v)의 글루칸 함량에 해당)에서의 첨가제 효과를 비교하기 위하여 Cellic CTec2의 농도를 최대 30 FPU로 높여서 당화를 실시한 후 10 FPU 기반 첨가제(2.7 mg/g glucan의 Cellic HTec2 및 62.5 mg/g glucan의 PEG 8000)를 추가한 당화율과 같이 비교하여 보았다.

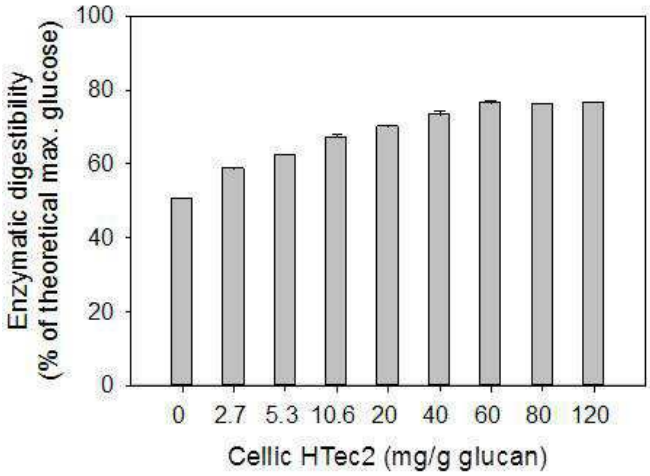
[0062] 그 결과, 저농도(1.8% 기질) 당화에서는 10 FPU 기반 보조제의 첨가(21.4 mg 총 단백질량) 당화율이 셀룰라아제만 30 FPU(56.1mg 총 단백질량)효소 사용시 당화율과 거의 같은 것을 확인하였으며(75.5 vs. 75.3%), 총 사용 단백질은 약 62% 절감되었다 (도 5a). 또한 고농도(21.7% 기질) 당화에서는 동일 조건에서 당화율은 보조제를 이용할 경우 72.5%였으며, 30 FPU 효소이용 당화율은 65.4%로 단백질 절감효과와 더불어 당화율 상승효과(약 15%)도 있었다 (도 5b).

도면

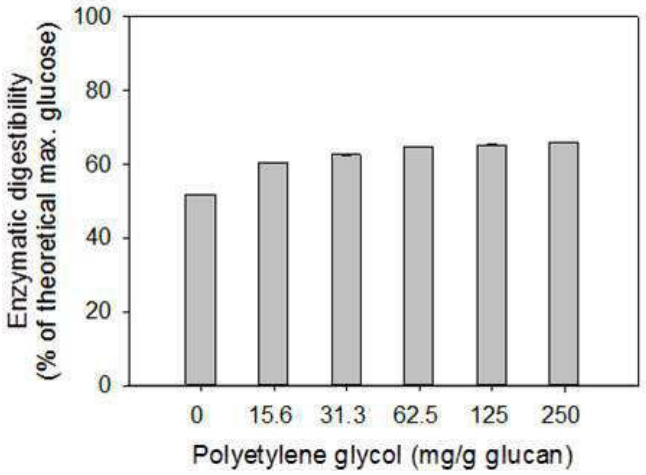
도면1


Enzymatic digestibility
(% of theoretical max. glucose)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
Cellulase Loading (FPU/g glucan)

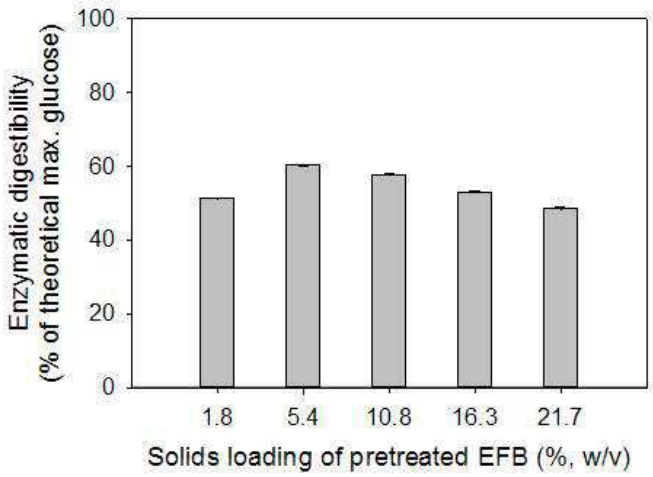
도면2


Enzymatic digestibility
(% of theoretical max. glucose)
100
80
60
40
20
0
0
2.7
5.3
10.6
20
40
60
80
120
Cellic HTec2 (mg/g glucan)

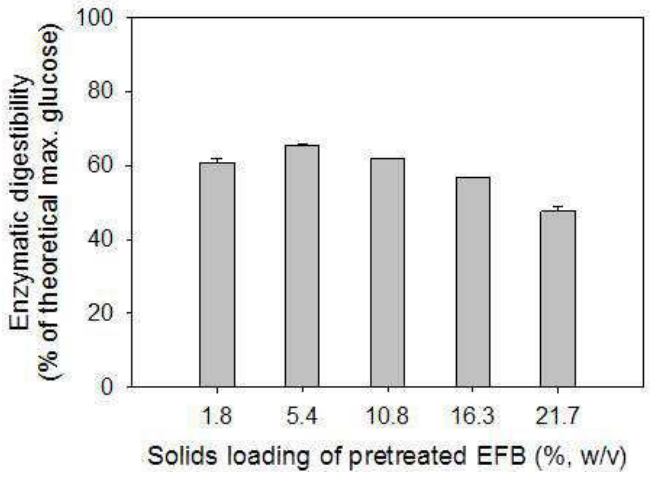
도면3



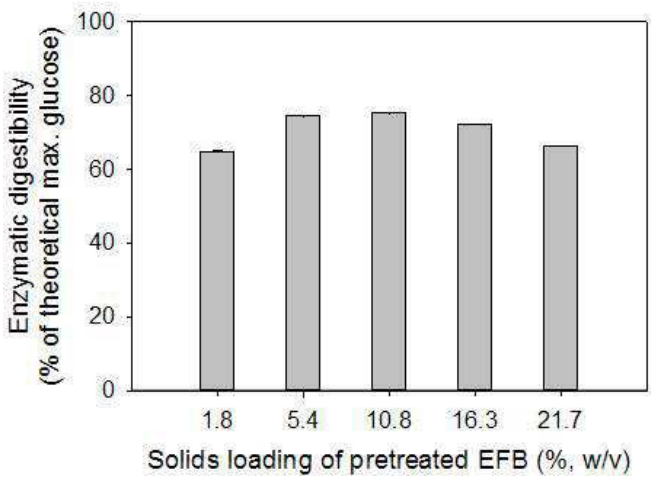
도면4a



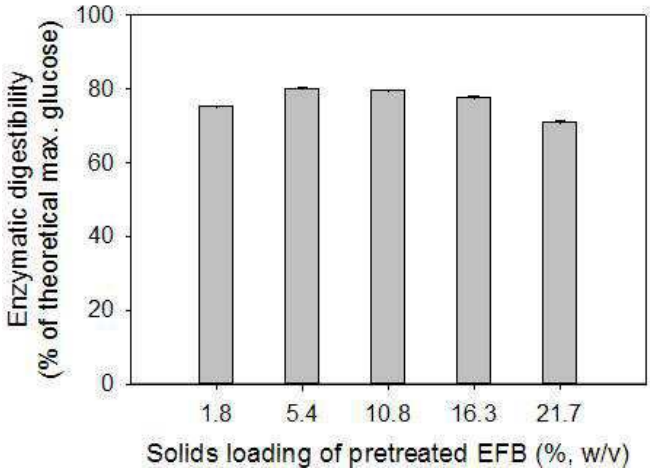
도면4b



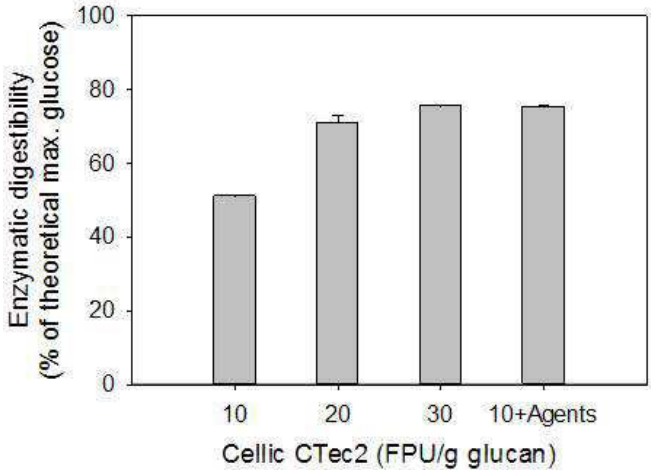
도면4c



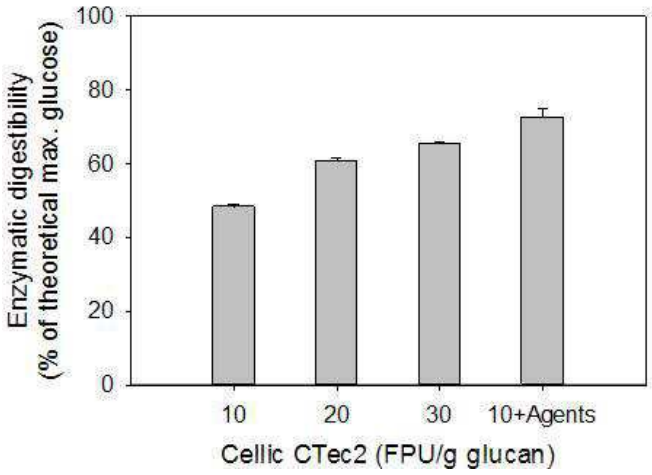
도면4d



도면5a



도면5b


Enzymatic digestibility
(% of theoretical max. glucose)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
10+Agents
Cellic CTec2 (FPU/g glucan)