(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0125260
(43) 공개일자 2016년10월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/06 (2006.01) *C12P 1/02* (2006.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/06 (2013.01)
C12P 1/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0056209
(22) 출원일자 2015년04월21일
심사청구일자 2015년04월21일

(71) 출원인
건국대학교 산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이정걸
서울특별시 광진구 능동로 50, A동 2401호 (자양동, 이튼타워리버2차)
강윤찬
서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가, 고려대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
한양특허법인

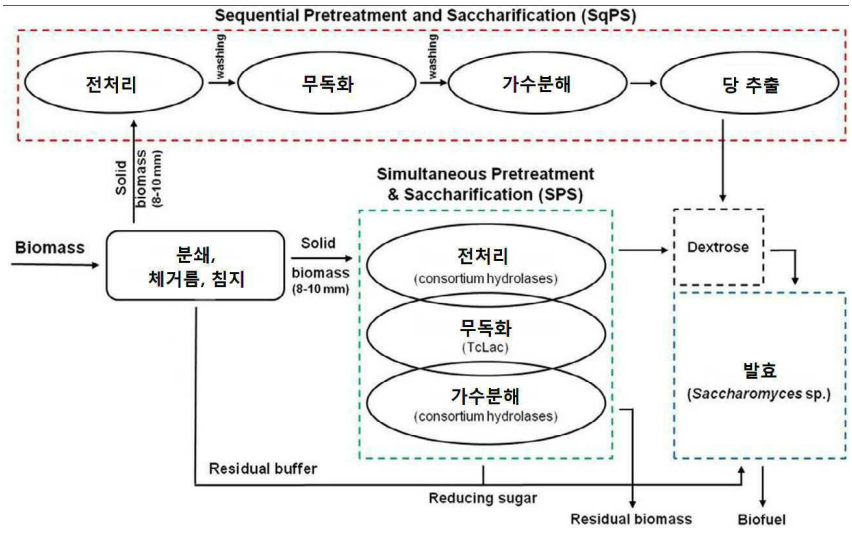
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **곰팡이 컨소시엄을 이용한 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법과 이를 이용한 바이오연료의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 목질계 바이오매스로부터 높은 당화수율로 당화물을 수득하는 바이오연료를 제조하는 방법에 관한 것으로, 바이오매스를 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스를 버퍼에 침지시키는 제 1 단계, 및 곰팡이 컨소시엄을 배양하여 생산된 효소를 이용하여 상기 침지된 바이오매스를 동시에 전처리 및 당화시켜 당화물을 제조하는 제 2 단계를 포함하여, 또한 상기 제 2 단계에서 라카아제(laccase)를 생산하는 균주를 함께 배양하여 생산된 라카아제(laccase)를 통해 독성물질이 감소 또는 제거되는 무독화과정을 더 포함하여 동시 전처리 및 당화(simultaneous pretreatment and saccharification, SPS) 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Y 110/03002 (2013.01)
C12R 1/865 (2013.01)
(72) 발명자
소라브 디만
대한민국 143-701 서울 광진구 능동로 120, A동 1418호 (화양동, 건국대학교 공학관)
이정임
대한민국 143-926 서울 광진구 능동로16길 38-5, B101호 (화양동)
라마크리시난 란지타
대한민국 143-701 서울 광진구 능동로 120, A동 1418호 (화양동, 건국대학교 공학관)
싱델 수잔 찬드라
대한민국 143-701 서울 광진구 능동로 120, A동 1418호 (화양동, 건국대학교 공학관)

명 세 서

청구범위

청구항 1

바이오매스를 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스를 침지시키는 제 1 단계; 및

배양 배지에 곰팡이 컨소시엄을 접종시켜 배양하여 생산된 효소로 상기 침지된 바이오매스를 동시에 전처리 및 당화시켜 당화물을 제조하는 제 2 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 단계는 라카아제(laccase)를 생산하는 균주를 함께 배양하여 생산된 라카아제(laccase)를 통해 독성물질이 감소 또는 제거되는 무독화과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제 2 단계는 계면활성제를 추가로 첨가하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 및 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween-80) 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 곰팡이 컨소시엄은 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*을 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 6

제 6 항에 있어서, 상기 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*은 1:2의 중량비(w/w)로 혼합되어 배양 배지에 접종하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 곰팡이 컨소시엄은 20 내지 30℃의 온도, 배양 배지의 pH가 4 내지 6.5로 배양되는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 곰팡이 컨소시엄은 배양 배지의 교반속도가 50 내지 300 RPM으로 36 내지 48시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 효소는 셀룰라아제(cellulase), 자일라나아제(xylanase), 엔도글루카나아제(endoglucanase, EG), 베타-글루코시다아제(β-glucosidase, BGL), 및 셀로바이오하이드롤아제(cellobiohydrolase, CBH) 중에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 당화물을 발효시키는 단계를 포함하며,

상기 발효는 상기 제조된 당화물에 발효 균주를 접종하고 배양하는 것을 특징으로 하는 바이오연료의 제조방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 발효 균주는 효모로 *Saccharomyces cerevisiae*인 것을 특징으로 하는 바이오연료의 제조방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 발효 균주는 35℃ 온도에서 90 내지 110 RPM의 속도로 교반하며 pH5에서 48시간 동안 배양되는 것을 특징으로 하는 바이오연료의 제조방법.

청구항 13

Pholiota adiposa 및 *Armillaria gemina*를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 조성물은 라이카아제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 조성물은 계면활성제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 및 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween-80) 중에서 선택되는 것을 특징으로 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

청구항 17

제 13 항에 있어서, 상기 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*는 1:2의 비율로 혼합되어 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

청구항 18

제 13 항 내지 제16항 중 어느 한 항의 조성물 및 발효 균주를 유효성분으로 포함하는 바이오연료 제조용 조성물.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 발효 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*인 것을 특징으로 하는 바이오연료 제조용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 곰팡이 컨소시엄을 이용한 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법과 이를 이용한 바이오연료의 제조방법 및 그 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 화석연료의 고갈, 전 세계적인 CO_2 절감노력으로 인해 신재생 에너지, 그 중에서도 바이오매스를 이용한 에너지 생산에 대한 관심이 높아지고 있다. 다양한 바이오매스 자원 중에서도 목질계 바이오매스(lignocellulosic

biomass)는 부존량이 가장 크고, 식량과도 무관해 윤리적인 문제에서도 자유로운 장점이 있다. 이에 목질계 자원인 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 이용한 제 2 세대 바이오 유용산물의 생산 및 개발이 연구되고 있다.

[0003] 목질계 바이오매스는 크게 리그닌(lignin)과 탄수화물인 셀룰로오스(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose)로 구성된다.

[0004] 리그닌은 메톡실화된 쿠마릴 알코올(p-coumacyl alcohol), 코니퍼릴 알코올(coniferylalcohol), 시나필 알코올(synapyl alcohol) 등이 중합되어 있는 다량의 방향족 화합물을 포함한 거대한 분자량의 중합체로서, 자연계에 존재하는 천연화합물 중 가장 분해가 어려운 물질로 간주되고 있으며, 셀룰로오스는 포도당이 ㅆ-1,4 결합으로 연결된 다당류로, 직선구조를 가져 안정된 형태를 이루기 때문에 물리적, 화학적 구조가 튼튼한 것으로 알려져 있다. 헤미셀룰로오스는 셀룰로오스보다 당의 중합도(degree of polymerization)가 낮은 다당체로 주로 5탄당인 자일로스의 중합체인 자일란(xylan)으로 구성되어 있으며, 그 외에도 5탄당인 아라비노스와 6탄당인 만노오스, 갈락토오스, 포도당 등의 중합체로 구성되어 있다.

[0005] 목질계 바이오매스를 이용한 바이오연료의 생산에는 전처리(pretreatment), 당화(saccharification), 발효공정(fermentation)이 필요하다. 이중 전처리 공정은 효소 가수분해 반응 속도와 수율을 향상시킬 수 있도록 하는 공정을 통칭하며, 난분해성 방향족 중합체인 리그닌(lignin), 셀룰로오스(cellulose) 및 헤미셀룰로오스(hemicellulose)의 복합체를 분해하여 결정화도를 감소시켜 효소의 접근성을 높이고 바이오매스의 비표면적을 증가시켜 유효 효소의 양을 증가시키는 것으로, 전처리 공정의 효율 정도에 따라 바이오 연료의 생산비용이 결정되므로 전처리 공정은 바이오매스로부터 바이오 연료를 생산하는데 중요한 요소 중의 하나이다.

[0006] 이러한 목질계 바이오매스의 발효성을 촉진하기 위한 전처리 및 당화공정에는 물리적, 화학적 및 효소를 이용한 방법 등이 있으며, 이는 바이오매스 물질로부터 미생물이 이용할 수 있는 유용한 발효성 당화물로 5탄당이나 6탄당의 단당류를 수득하기 위하여 가수분해(hydrolysis) 과정이 필요하며, 섬유소의 함량을 증가시키고 미세섬유의 결정성을 감소시켜 리그닌은 전형적으로 투과화되고, 헤미셀룰로오스는 단위면적당 셀룰로오스 가수분해 효소의 접근과 흡착률을 높임으로서 반응성을 증가시키고 가수분해 능력을 증가시킨다.

[0007] 물리적인 전처리는 볼 분쇄(ball mill), 초음파 분해, 균질화 등이 있고, 바이오매스 물질의 입자 크기를 감소시켜 비표면적을 증가시키고, 셀룰로오스의 중합도(degree of polymerization)를 감소시킨다. 그러나 에너지 소비량이 많이 적합하지 않다는 단점이 있다.

[0008] 그리고 화학적인 전처리는 산과 염기를 사용한 가수분해이며, 바이오매스의 전처리에서 일반적으로 사용한다. 그러나 이 방법의 경우 모두 단당류만 생성되는 것이 아니라, 미생물의 성장에 심각한 영향을 줄 수 있는 푸르푸랄(furfural), 바닐린(vanillin), 페룰산(ferulic acid), 쿠마릭산(coumaric acid) 등으로 약산, 퓨란 유도체, 페놀계 화합물 등 독성물질을 유발하게 되어 이후에 발효공정의 효율을 저감시키는 큰 영향을 준다. 따라서 발효공정에 들어가는 전단계로 기질 중 저해물질을 제거하는 무독화공정이 필요하다.

[0009] [선행 특허 문헌]

[0010] 한국등록특허 제10-1497225호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 앞서 기술된 바와 같이 일반적인 전처리와 당화공정에서는 독성물질 등을 제거하기 위한 세척과정이 추가로 요구되며, 이와 같은 세척과정에서는 다량의 물을 사용되므로 이로 인한 환경오염 및 에너지 소비가 뒤따르게 된다. 또한 세척과정에서 원료로 사용되는 바이오매스가 유실되는 경우가 많이 실제 에너지 효율이 떨어진다는 문제가 있다. 따라서 목질계 바이오매스에서의 효과적이고, 친환경적인 전처리 및 당화공정 개발이 요구되고 있다.

[0012] 상기의 문제를 해결하기 위해서 본 발명의 주된 목적은 바이오매스의 손실을 줄이여 당화수율을 향상시키는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 동시 전처리 및 당화 방법을 통해 바이오매스로부터 얻은 당화물을 발효 균주로 발효하여 효율적, 경제적 및 친환경적으로 바이오연료를 생산할 수 있는 바이오연료의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동시 전처리 및 당화 방법에서 바이오매스로부터 당화물을 얻을 수 있는 곰팡이 컨소시엄을 유효성분으로 함유하는 동시 전처리 및 당화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 바이오연료 제조방법에서 바이오매스로부터 얻은 당화물을 발효시키는 발효 균주를 유효성분으로 함유하는 바이오연료 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법은 바이오매스를 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스를 버퍼에 침지시키는 제 1 단계, 및 배양 배지에 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)을 접종시켜 배양하여 생산된 효소로 상기 침지된 바이오매스를 동시에 전처리 및 당화하여 당화물을 제조하는 제 2 단계를 포함한다.

[0017] 상기 제 2 단계는 라카아제(laccase)를 생산하는 균주를 배양하여 생산된 라카아제를 통해 독성물질이 감소 또는 제거되는 무독화 과정을 더 포함될 수 있으며, 여기서 상기 라카아제(laccase)를 생산하는 균주는 *Tyromyces chioneus*이다.

[0018] 또한, 상기 제 2 단계는 계면활성제를 추가로 첨가할 수 있으며, 이러한 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 및 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween-80) 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0019] 상기 곰팡이 컨소시엄은 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*을 포함할 수 있으며, 여기서 상기 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*는 1:2의 중량 비(w/w)로 혼합되어 배양 배지에서 두 균주의 양은 10%(v/v) 이하로 접종될 수 있다.

[0020] 상기 곰팡이 컨소시엄은 배양 시간은 36 내지 48시간, 배양 온도는 20 내지 30℃, 배양 배지의 pH는 4 내지 6.5, 교반속도가 50 내지 300 RPM인 배양 조건에서 배양된다.

[0021] 그리고 상기 효소는 셀룰라아제(cellulase), 자일라나아제(xylanase), 엔도글루카나아제(endoglucanase, EG), 베타-글루코시다아제(β-glucosidase, BGL), 및 셀로바이오하이드롤아제(cellobiohydrolase, CBH) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함한다.

[0022] 본 발명의 바이오연료의 제조방법은 전술된 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법에 의해 제조된 당화물을 발효시키는 단계를 포함하며, 이와 같은 발효는 상기 제조된 당화물에 발효 균주를 접종하고 배양하여 발효시키는 바이오연료의 제조방법을 제공한다.

[0023] 상기 발효 균주는 효모로 *Saccharomyces cerevisiae*이며, 이와 같은 상기 발효 균주의 배양시간은 48시간, 배양 온도는 35℃, 배양 배지의 pH가 5이고, 교반속도가 90 내지 110 RPM인 배양조건에서 배양된다.

[0024] 본 발명의 바이오연료 동시 전처리 및 당화용 조성물은 바이오매스로부터 당화물을 제조하는 배양 배지에서 곰팡이 컨소시엄으로 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*을 포함할 수 있으며, 여기에 라이카아제를 생성하는 균주인 *Tyromyces chioneus*를 더 포함할 수 있고, 또한 계면활성제를 더 포함할 수 있다.

[0025] 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 및 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween-80) 중에서 선택되는 어느 하나이다.

[0026] 또한, 상기 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*는 1:2의 비율로 혼합되고 배양 배지에서 두 균주의 양이 10%(v/v)이하로 포함한다.

[0027] 본 발명의 바이오연료 제조용 조성물은 바이오매스로부터 생성된 당화물을 발효시키는 효모로 *Saccharomyces cerevisiae*를 포함하고, 상기 *Saccharomyces cerevisiae*는 배양 배지에 2%(v/v)의 양으로 포함한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산되는 효소는 종래 당화효소보다 우수한 당화수율로 바이오매스로부터 당화물을 제조할 수 있는 효과가 있다.

[0029] 또한, 동시에 전처리 및 당화 공정이 수행되고, 이와 함께 바이오매스의 분해에서 생성될 수 있는 독성물질에서 특히, 페놀계 화합물의 독성을 생물학적 처리 공정으로 라카아제(laccase)를 통해 감소 또는 제거할 수 있다.

[0030] 따라서 전처리 및 당화 공정 중간에 세척과정이 생략이 가능하므로 이는 무독화 공정의 복잡성과 당 손실을 극복 할 수 있을 뿐만 아니라 신속하고 경제적이고 친환경적으로 바이오매스로부터 바이오연료를 생산될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 동시 전처리 및 당화 방법과 바이오연료의 제조방법에 대한 순서도이다.

도 2는 본 발명의 곰팡이 컨소시엄에서 *Pholiota adiposa*의 계통분류학적 관계를 나타내는 모식도이다.

도 3은 본 발명의 곰팡이 컨소시엄에서 *Armillaria gemina*의 계통분류학적 관계를 나타내는 모식도이다.

도 4는 본 발명의 라카아제(lacasse) 생성 균주인 *Tyromyces chioneus*의 계통분류학적 관계를 나타내는 모식도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예로 pH의 농도에 따른 효소 생산의 측정 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예로 RPM 속도에 따른 효소 생산의 측정 결과 이다.

도 7 내지 도 9는 본 발명의 일 실시예에서 pH에 따른 총 페놀 함량의 변화량을 측정한 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예로 계면활성제에 따른 당화수율(%)의 변화를 나타낸 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 볏짚에서 원자력전자현미경(AFM)의 측정 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 버드나무에서 원자력전자현미경(AFM)의 측정 결과이다.

도 13는 본 발명의 일 실시예로 발효공정에 의한 총 환원당 양(g/L) 및 바이오에탄올 생성량(g/L)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명은 다음의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명하나, 본 발명의 실시예에 한정된 것은 아니다.

[0033] 본 발명은 독성 부산물의 발생과 바이오매스의 손실을 줄이고 당화수율을 향상시킬 수 있는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법으로, 도 1에 도시된 바와 같이, 바이오매스를 분쇄하고 분쇄된 바이오매스를 침지하는 제 1 단계, 및 배양 배지에 곰팡이 컨소시엄을 배양하여 생산된 효소를 이용하여 상기 침지된 바이오매스를 전처리 및 당화가 동시에 진행되는 제 2 단계를 포함하며, 상기 제 2 단계에서 전처리된 바이오매스 또는 상기 당화된 바이오매스는 독성물질을 포함하며, 라카아제(laccase)를 통해 상기 독성물질이 감소 또는 제거되는 무독화 과정을 더 포함한다.

[0034] 상기 바이오매스는 식물에서 유래된 것이며, 바람직하게는 목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)로 버드나무(willow), 볏짚(rice straw)을 포함할 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 그리고 본 발명의 실시예에서는 바이오매스 물질로써 버드나무와 볏짚이 사용되며, 버드나무로는 실락스 코레엔시스(*Salix koreensis*)종을, 볏짚으로는 오리사 사티바 엘(*Oryza sativa L.*) 종이 사용된다.

[0035] 본 발명의 일 실시예 따른 상기 제 1 단계에서 분쇄는 버드나무(Salix koreensis)의 경우에는 해머밀(hammer mill)을 사용하여 분쇄하고, 체가름기(sieve shaker)로 8 내지 10 mm정도의 크기로 분쇄되어 나온 버드나무 칩(chip)은 원판분쇄(disk milling)하여, 15 mm 이상과 6 mm 미만의 칩을 분리하여, 최종적으로 두께가 2 내지 6 mm 정도로 분쇄시키고, 볏짚(*Oryza sativa L.*)의 경우에는 5 cm 정도 길이로 잘라 4 mm 정도 크기로 분쇄시킬 수 있다.

[0036] 그리고 상기 분쇄된 고체 바이오매스와 버퍼(buffer) 용액을 1:15의 (w/v)비율로 혼합하여 침지시키는 고체 바이오매스의 물리적 처리를 할 수 있다. 이때, 상기 버퍼는 0.1 몰농도(M)의 아세트산나트륨 버퍼로 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)에서 생산되는 효소의 최적화를 위해 바람직하게 pH5인 아세트산나트륨 버퍼를 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따른 제 2 단계는 동시 전처리 및 당화(simultaneous pretreatment and saccharification, SPS) 방법으로 생물학적으로 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)을 이용한다.

[0038] 본 발명에서는 목질계 바이오매스의 복합 매트릭스(matrix)인 리그닌(lignin)과 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 분해하는 고활성 효소의 생산은 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)으로 균주들을 복합 이

용하여 동시 전처리 및 당화 과정이 진행되어 당화물을 제조할 수 있다.

[0039] 한편, 상기 곰팡이 컨소시엄에 대한 균주의 동정(strain identification) 실험 방법 다음과 같다.

[0040] 효소를 생산하는 균주를 분리하기 위해 균주를 2% 카르복시메칠셀룰로오스(carboxymethylcellulose, CMC)가 포함된 고체 한천배지(agar plate)에 도말한 후, 3일간 배양하였다. 상기 고체 한천배지에 균주의 콜로니가 형성된 후 0.1% 콩고레드 시약으로 염색하고 1 M의 염화나트륨으로 탈색하여 그 콜로리 주위에 섬유소 분해환이 생성된 균들을 선별하는 레드 한천배지(red agar plate) 방법을 사용하여, 효소를 생산하는 균주를 분리한다.

[0041] 분리된 균주의 동정을 위하여 ribisomal DNA의 internal transcribed spacer(ITS rDNA)를 이용한 염기서열 분석방법을 통해 균주를 동정하고, 상기 균주의 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA를 서열 번호 1 및 서열번호 2의 프라이머(primer)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)를 수행하여 780-bp와 592-bp 두 가지의 증폭절(amplicon)을 갖는 유전자를 증폭할 수 있다.

[0042] <서열 번호 1>

[0043] pITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3'

[0044] <서열 번호 2>

[0045] pITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATGC-3'

[0046] 또한, 종별 유연관계 분석은 염기서열을 DNAstar의 MegAlign software(Madison, WI, USA)를 이용하여 계통발생나무(phylogenetic tree)를 작성하고 종별 유전적 근연관계를 비교할 수 있다.

[0047] 상기 선발된 균주의 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 염기서열의 유사종과 유연관계를 BLAST로 검색하여 각 곰팡이를 동정 분석한 결과로 GenBank의 기탁번호가 각각 JF719544와 JF7825075로 도 2와 도 3에 도시된 바와 같이 계통 분류학적 위치가*Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*의 균주이며, 또한 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 각각 기탁번호(accession number)가 11187P와 11186P임을 알 수 있다.

[0048] 또한, 이와 같은 방법으로 라카아제(laccase)를 생산하는 균주는 0.2%의 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))를 첨가한 고체 한천배지에서 배양하여 분리하고, 앞서 기술한 균주의 동정 방법과 동일하게 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA 염기서열을 증폭하여 분석한 결과, 도 4에 도시된 바와 같이 *Tyromyces chioneus* 균주(KCCM 기탁번호는 KFCC11873P)와 99%의 가장 높은 유사성을 보임을 알 수 있다.

[0049] 이와 같은 서로 다른 균주가 복합된 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)인 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*에서 생산되는 효소로는 셀룰라아제(cellulase), 자일라나아제(xylanase), 엔도글루카나아제(endoglucanase, EG), 베타-글루코시다아제(β-glucosidase, BGL), 및 셀로바이오하이드롤아제(cellobiohydrolase, CBH) 중에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0050] 이와 같은 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산되는 복합 효소의 활성 측정은 카르복시메칠셀룰로오스(carboxymethylcellulose, CMC), p-니트로페닐 글루코시드(p-nitrophenyl glucoside, pNPG), p-니트로페닐 셀로바이오시드(p-nitrophenyl cellobioside, pNPC)을 기질로 하여 DNS(dinitroxalicylic acid)법을 이용하여 상기 기술된 효소의 활성을 측정할 수 있다. 여기서, 효소활성의 단위 1 unit은 1mL에서 분당 1μmol의 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의할 수 있다.

[0051] 효소 생산을 위한 최적의 배양조건으로 표 1과 표 2에 나타난 바와 같이, 배양 배지에서 다양한 종류의 탄소원 및 질소원에 따라 효소 활성의 차이가 나타남을 알 수 있다. 여기서 배양조건은 25 ℃ 온도, pH 5.0 및 100 RPM으로 10일 동안 배양하였으며, 곰팡이 컨소시엄의 두 균주 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*는 1:1의 비율로 배양한다.

[0052] 그 결과 표 1에서 탄소원으로 Cellulose와 Avicel에서 높은 효소 생산을 보임을 알 수 있고, 일반적으로 적정한 효소의 활성은 0.6 FPU/mL 내지 0.8 FPU/mL으로 여기서 밀기울(what bran)은 곡물을 생산하고 남은 잔여물로서 비용적인 부분에서 경제성이 있으며, 적정한 효소 생산의 탄소원으로 사용될 수 있다.

[0053] 또 한, 표 2에서와 같이 질소원에 따른 효소 활성 정도를 나타낸 결과에서 펩톤(pepton)은 적정한 효소 생산의 질소원으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

표 1

[0054]

탄소원	FPU (U/mL)	단백질 양 (mg/mL)	pH
Glucose	0.63	0.82	4.89
Maltose	0.42	0.84	4.72
Sucrose	0.44	0.86	4.89
Cellulose	0.98	0.98	4.92
Carboxy methylcellulose	0.84	0.91	4.93
Avicel	0.76	0.96	4.84
Rice straw	0.54	0.79	4.89
Wheat bran	0.68	0.86	4.89

표 2

[0055]

질소원	FPU (U/mL)	단백질 양 (mg/mL)	pH
Yeast extract(YE)	0.54	0.79	4.82
Pepton(P)	0.87	0.96	4.79
Corn steep solid(CSS)	0.54	0.68	4.86
YE+P	0.76	0.72	4.89
YE+CSS	0.52	0.79	4.72
KNO_3	0.41	0.66	4.56
NH_4Cl	0.43	0.66	4.83

[0056] 그리고 곰팡이 컨소시엄에서 각 균주의 비율에 따른 리그노셀룰라아제(lignocellulase)와 같은 효소 활성의 영향을 살펴본다. 여기서, 배지는 밀기울(wheat bran) 20 g/L, 펩톤(peptone) 15 g/L, yeast extract 9 g/L, KH_2PO_4 15 g/L, K_2HPO_4 15 g/L, $MgSO_4$ 3g/L, KNO_3 1 g/L, inositol 0.02 g/L, thiamine hydrochloride pentahydrate 0.02 g/L 을 포함한 조성으로 배양된다.

[0057] 그 결과 표 3에 나타난 바와 같이 곰팡이 컨소시엄에서 두 종류의 균주의 혼합 비율에서 가장 최적의 균주의 혼합 비율은 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*가 1:2의 비율로 혼합되었을 경우 높은 효소 활성을 나타내는 것을 알 수 있고, 이 때, 배지 부피에서 두 균주에 대한 총 접종물의 양은 10%(v/v) 이하가 되도록 한다.

표 3

[0058]

Pholiota adiposa	*Armillaria gemina*	FPU(U/mL)
1	1	0.71±0.08
1	2	0.86±0.09
1	3	0.78±0.09
2	1	0.64±0.08
2	3	0.79±0.07
3	1	0.72±0.08
3	2	0.68±0.07

[0059] 본 발명의 곰팡이 컨소시엄의 효소 활성 조건으로 온도, pH 및 RPM(rotation per minute)의 영향에 대하여 최적의 효소 활성을 검토할 수 있다.

[0060] 곰팡이 컨소시엄의 두 균주 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*를 1:2로 혼합하고 탄소원으로 밀기울(wheat bran)이 첨가되고 pH5인 배지에서 100 RPM의 속도로 10일 동안 배양하여, 곰팡이 컨소시엄의 배양 온도에 따른 효소 활성 결과는 아래 표 4와 같으며, 그 결과 효소 활성의 최적 온도는 22.5℃ 임을 알 수 있다.

표 4

[0061]

Temperature(℃)	FPU(U/mL)	Protein(mg/mL)
20	0.88 ± 0.09	1.02±0.08
22.5	1.11 ± 0.12	1.22±0.15
25	0.94 ± 0.08	1.15±0.11
27.5	0.72 ± 0.08	0.85±0.10
30	0.58 ± 0.06	0.72±0.08

[0062] 도 5와 도 6은 각각 효소 활성의 최적 pH 농도와 최적 RPM 속도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 도시된 그래프에서 '○'는 효소활성(FPU/mL)을 나타내고 '●'는 단백질 양(mg/mL)을 나타낸다.

[0063] 도 5는 곰팡이 컨소시엄의 두 균주 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*를 1:2로 혼합하고 탄소원으로 밀기울(wheat bran)이 첨가된 배지에서 22.5±0.5℃의 온도, 100 RPM의 속도로 10일 동안 배양하며, pH 농도의 변화에 따른 최적의 효소 활성 조건으로 pH 4.0 내지 pH6.5에서의 효소 활성을 측정하고, 그 결과 pH4.5에서 효소 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있다.

[0064] 또한, 도 6은 효소 생산의 최적 RPM 속도를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 곰팡이 컨소시엄의 두 균주 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*를 1:2로 혼합하고 탄소원으로 밀기울(wheat bran)이 첨가된 배지에서 22.5±0.5℃의 온도, pH4.5로 10일 동안 배양하며, 50 RPM 내지 300 RPM 범위 중에서 200 RPM이 효소 활성이 가장 높음을 확인 할 수 있다.

[0065] 그러므로, 곰팡이 컨소시엄에서 효소 활성의 조건을 검토한 결과 효소 활성의 최적 온도는 22.5 ℃, pH는 4.5, 교반 속도는 200 RPM이고, 배양 배지에서 질소원으로 펩톤(peptone)을, 탄소원으로 밀기울(wheat bran)이 공급되었을 경우 효소는 2.57 U/ml로 높은 효소 활성을 보임을 알 수 있다.

[0066] 그리고 이와 같은 최적의 효소 활성 조건에서 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산되는 각 효소의 활성은 자일라나아제(xylanase)의 경우 1870 ± 252 U/mL, 엔도글루카나아제(EG)는 176 ± 23 U/mL, 셀로바이오하이드롤아제(CBH)는 44 ± 5 U/mL, 베타-글루코시다아제(β-glucosidase, BGL) 39 ± 5 U/mL으로 2.57 ± 0.5의 FPU(filter paper activity unit)으로 나타남을 알 수 있다.

[0067] 바이오매스를 가수분해하는 당화(saccharification)는 바이오매스 물질로부터 바이오연료를 생산하기 위한 발효 공정 전단계로 셀룰로오스를 에탄올 발효가 가능한 글루코오스(glucose)와 같은 단당류 및 이당류로 전환하는 공정이다.

[0068] 일 실시예에 따른 동시 전처리 및 당화에서 당화 반응의 활성 측정방법은 당화 반응 후에 상기 곰팡이 컨소시엄에서 생산된 효소를 90℃ 이하로 1분 동안 열충격(heat shock)을 가해 효소를 변성시켜 냉각한 후, 4000rpm으로 30분 동안 원심분리하여, 상등액 상에서 유리된 환원당(reducing sugar)인 당화물을 얻어 이를 통해 당화수율이 측정된다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에 따른 당화과정에서 기질과 효소량에 의한 당화수율(%)의 변화는 30 ℃의 온도, pH 5에서 36시간 동안 90 내지 110 RPM으로 혼합하면서 당화를 실시하여 당화수율(%)의 변화를 측정결과는 아래 표 5에 나타낸 바와 같다.

표 5

[0070]

효소양 (FPU/g-기질)	기질 종류	환원당 (mg/g-기질)	당화수율 (%)
5	RS	212±19	42.4±3.2
5	W	65.0±7.4	13.9±1.5
7.5	RS	276±22	55.2±4.2
7.5	W	119±12	25.5±3.1
10	RS	313±24	62.6±6.6
10	W	158±17	33.8±3.3
12.5	RS	315±29	63.1±6.2
12.5	W	191±19	40.9±4.3
15	W	251±23	53.7±5.2

20	W	254±24	54.4±4.9
10	Raw RS	64.2±5.3	12.8±2.1
15	Raw W	66.4±6.1	14.1±2.2
10	알칼리 전처리 RS	377±25	75.4±7.1
15	알칼리 전처리 W	301±23	64.5±6.6

[0071] 상기 표 5에서 기질의 종류는 RS : 침지된 볏짚, W : 침지된 버드나무, Raw RS : 가공되지 않은 볏짚, Raw RS : 가공되지 않은 버드나무, 전처리 RS : 전처리된 볏짚, 전처리 W : 전처리된 버드나무, 알칼리 전처리 RS : 알칼리 매개 순차적 전처리 및 당화 방법(SqPS)을 거친 볏짚, 알칼리 전처리 W: 알칼리 매개 순차적 전처리 및 당화 방법(SqPS)을 거친 버드나무를 의미한다.

[0072] 표 5에서 도시된 바와 같이 본 발명의 동시 전처리 및 당화(SPS)에서 곰팡이 컨소시엄에서 생산되는 효소의 농도를 5 내지 20 FPU/g-기질 범위에서 살펴본 결과 10 FPU/g-기질의 농도에서 좋은 당화수율(%)을 보이나, 낮은 농도(5 및 7.5 FPU)와 15 FPU/g-기질 이상의 농도에서는 낮은 당화수율(%)을 보임을 알 수 있다.

[0073] 표 6 및 표 7은 당화과정에서 배양시간과 배양온도에 따른 당화수율(%)의 변화를 나타낸 것이다. 표에서 동일하게 바이오매스(기질)로서 RS는 볏짚이고, W는 버드나무를 의미한다.

[0074] 아래 표 6는 배양시간에 따른 당화수율을 나타낸 것으로 각각의 기질에서 36시간과 48시간의 배양시간의 경우, 높은 당화수율(%)을 보이는 것을 알 수 있다.

표 6

[0075]

배양 시간(시)	기질 종류	환원당 (mg/g-기질)	당화수율(%)
12	RS	176 ± 16	35.2 ± 3.6
12	W	109 ± 6	23.3 ± 2.6
24	RS	245 ± 14	49.1 ± 5.1
24	W	176 ± 13	37.7 ± 4.1
36	RS	313 ± 24	62.6 ± 5.9
36	W	251 ± 23	53.7 ± 5.1
48	RS	315 ± 25	63.1 ± 6.4
48	W	255 ± 21	54.6 ± 5.5

[0076] 아래 표 7은 온도에 따른 당화수율의 변화로 효소의 농도는 20 FPU/g-기질 및 30 FPU/g-기질, pH는 5.0, 100 ± 10 RPM의 속도로 36시간 동안 배양한 결과로, 서로 다른 두 개의 기질로 볏짚(RW)에서는 생산되는 환원당의 양은 337 ± 30mg/g-기질이고, 당화수율(%)은 67.4 ± 6.6%이고, 또 다른 기질인 버드나무(W)에서 환원당의 양은 270 ± 22 mg/g-기질이고, 당화수율 57.1 ± 5.3%으로 35℃의 온도에서 가장 높은 당화수율(%)을 보이는 것을 알 수 있다.

표 7

[0077]

온도(℃)	기질 종류	환원당 (mg/g-기질)	당화수율(%)
25	RS	242 ± 22	48.4 ± 5.2
25	W	174 ± 15	37.2 ± 3.9
30	RS	313 ± 23	62.6 ± 6.6
30	W	251 ± 23	53.7 ± 5.2
35	RS	337 ± 30	67.4 ± 6.6
35	W	270 ± 22	57.1 ± 5.3
40	RS	285 ± 24	57.6 ± 5.4
40	W	229 ± 20	49.1 ± 4.5

[0078] 리그노셀룰로오스(lignocellulose) 분해산물 중에서 일반적으로 알려져 있는 독성물질을 크게 두 분류로 나누면 페놀계 화합물과 비페놀계 화합물로 나눌 수 있으며, 상기 페놀계 화합물에는 페룰산(ferulic acid), 쿠마릭산

(coumaric acid), 히드록시벤조산(hydroxybenzoic acid), 시링알데하이드(syringaldehyde), 바닐린(vanillin) 등으로 대부분 리그닌의 가수분해 산물이다.

[0079] 본 발명에 따른 무독화(detoxification)는 동시 전처리 및 당화 단계에서 생산되는 전술된 바와 같은 페놀계 화합물의 독성물질을 생물학적 방법으로 감소 또는 제거하는 반응이며, 일 실시예로 라카아제(laccase)를 생산하는 균주로 *Tyromyces chioneus*를 배지에 접종하고 30℃에서 150 RPM(revolution per minute)의 속도로 4 시간 동안 진탕배양 하여, 건조 중량 1g의 바이오매스를 50 mM 버퍼 25 mL에 침지시킨 바이오매스에 TcLac('TcLac'은 라카아제(laccase)를 생산하는 균주를 명칭한다.)에서 생산된 라카아제는 10 U/mL가 함유되도록 하여 무독화 할 수 있다.

[0080] 일반적으로 라카아제(Laccase)는 기질(substrate)에 대한 특이성이 낮아 폴리페놀(polyphenol), 메톡시-치환 페놀(methoxy-substituted phenol), 다이아민(diamine) 등 자연계에 광범위하게 분포된 페놀성 물질을 산화시킬 수 있다. 또한 균류에서 생산되는 라카아제는 리그닌(lignin)의 분해에도 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0081] 그러므로 TcLac은 라카아제(Laccase)의 생산을 통해 바이오매스로부터 유래된 페놀성 화합물등을 산화시켜 제거하는 무독화뿐만 아니라 바이오매스의 전처리에 이용될 수 있으며, 또한, 이와 같은 본 발명의 TcLac은 곰팡이 컨소시엄과 함께 첨가될 수 있다.

[0082] 이러한 TcLac의 무독화 반응에 의한 당화물에 포함된 총 페놀 함량의 변화량은 Folin-Cilcalteu 방법으로 측정되며, 이는 Folin-Cilcalteu 시약이 당화물에 포함된 페놀계 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하여 측정하며 그 결과는 도 7 내지 9에 나타난 바와 같다.

[0083] 도시된 바와 같이 일 실시예에 따른 무독화 과정에서 침지된 바이오매스에 15 U/mL의 TcLac을 처리하고 이러한 반응물에서 각각 pH 농도가 각각 4, 4.5, 5로 pH 농도에 따른 총 페놀 함량의 변화량을 측정하며, 볏짚의 총 페놀 함량(●), 동시 전처리 및 당화(SPS)과정 후에 볏짚의 총 페놀 함량(○), 버드나무의 총 페놀 함량(▼), 동시 전처리 및 당화(SPS)과정 후에 버드나무의 총 페놀 함량(△)을 배양시간에 따라 비교하여 나타낸 그래프로써, 그 결과 pH4.5에서 총 페놀 함량이 버드나무는 32.6%, 볏짚은 49.8% 정도로 감소됨을 알 수 있었다.

[0084] 본 발명에 있어서 계면활성제는 가수분해 반응을 하는 당화과정에서의 기질의 반응성을 향상시키는 촉매로 사용하며, 바람직한 계면활성제로 비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant)를 사용할 수 있고, 예를 들어 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 및 폴리옥시에틸렌소르비탄모노올레이트(polyoxyethylene sorbitan monooleate, Tween-80)를 사용할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 상기 비이온성 계면활성제로는 Sigma??Aldrich사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용한다.

[0085] 도 10은 본 별명의 일 실시예에 따른 계면활성제 사용에 따른 당화수율의 변화를 나타낸 것으로 모든 측정 시료에서 볏집과 버드나무는 침지 과정을 한 것이며, 무독화 과정을 거치지 않았다. 여기서 계면활성제는 Tween-20 및 Tween-80으로 0.5 내지 3.0%(v/v)으로 첨가될 수 있다.

[0086] 도시된 바와 같이 막대그래프로 도식하였으며, 여기서 각 막대그래프의 색깔별로 나타내는 의미는 순서대로 검은색은 볏집과 Tween-20, 밝은 회색은 볏집과 Tween-80, 어두운 회색은 버드나무와 Tween-20, 흰색은 버드나무와 Tween-80을 함께 사용한 결과를 나타낸다.

[0087] 그 결과 Tween-20을 2% (v/v)로 첨가하였을 경우 이는 당화수율(%)이 대조군(control)보다 볏짚과 버드나무에서 각각 19.9%와 19.8% 정도 유의하게 상승되며, 가장 높은 당화수율을 보임을 알 수 있다. 따라서 바람직하게 계면활성제는 Tween-20을 2.0 %(v/v)로 첨가될 수 있으며, 이때 당화수율은 74.2±7.1 % 정도로 나타난다. 이때, 계면활성제 함량이 0.5 %(v/v)와 1 %(v/v)일 경우에는 효소의 작용을 방해하는 물질로 인해 바이오매스에 대한 당화수율이 감소되고, 반대로 계면활성제가 2 %(v/v)초과되어 첨가되는 경우 효소의 촉매 반응을 방해하여 당화수율이 감소될 수 있다.

[0088] 또한, 상기 표 5에서 나타난 바와 같이 알칼리 매개 순차적 전처리 및 당화 방법(SqPS)에서의 볏짚과 버드나무의 최종 당화 수율이 각각 75.4 ± 7.1%과 64.5 ± 6.6% 정도의 당화수율을 나타내고, 이는 계면활성제로 Tween-20을 2%(v/v) 정도 첨가하였을 경우의 당화수율인 74.2±7.1 %와 유사함을 알 수 있다. 그리고 동시 전처리 및 당화 방법(SPS)에서의 볏짚과 버드나무의 당화수율이 각각 83.3%와 70.7%정도로 비교예인 순차적 전처리 및 당화 방법(SqPS) 보다 각각 약 10.4% 와 9.61% 정도 더 높게 당화수율이 향상되었음을 알 수 있다.

[0089] 본 발명은 상기 무독화 단계에 의해 독성이 감소된 당화물을 발효시키는 단계를 포함하며, 바이오 연료의 제조

방법을 제공한다.

[0090] 도 11 및 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 물리적 처리와 라카아제(lacasse)를 사용한 무독화 과정에 따른 바이오매스 표면 특성의 변화를 나타낸 것으로 원자력현미경을 통해 관찰할 수 있다.

[0091] 원자력현미경(atomic force microscopy, AFM)를 이용하여, 미세한 AFM 탐침(probe)으로 바이오매스의 표면에 접촉시키고, 탐침에 연결된 캔틸레버(cantilever)의 휘어짐을 통해 시료 표면의 형상으로 거침정도를 측정할 수 있다. 여기서 캔틸레버(stiffer cantilever)의 힘의 상수는 k=42 N/m이고, 캔틸레버 빔(cantilever beam)의 굴곡 모드(flexural mode)로, 평균 약 300 kHz의 공진 주파수를 갖는다.

[0092] 도 11 및 도 12에서 도시된 바와 같이 크게 세 가지의 과정으로 나눠 바이오매스의 표면 조도를 측정하였으며, 1(raw RS 또는 raw willow)은 아무것도 처리하지 않은 바이오매스, 2(RS 또는 W)는 침지 과정 후의 바이오매스, 3(DRS 또는 DW)은 라카아제(lacasse)를 사용한 무독화 과정 후의 바이오매스로, 도 10은 바이오매스로 볏짚을, 도 11는 바이오매스로 버드나무를 사용한 것이다.

[0093] 또한, a는 3차원적 표면 분석, b는 평균 표면 조도(average surface roughness, ASR), c는 암시야 표면 분석(dark field surface analysis)를 나타낸 것이다.

[0094] 그 결과 아래 표 8에 나타난 바와 같이 모든 시료에서 10077.5 μm^2으로 동일한 면적으로 측정되고, 평균 표면 조도(average surface roughness, ASR; um^2)에 따른 평균 거칠기(roughness)는 아무것도 처리하지 않은 raw RS 시료에서 0.257mv 정도였지만, 침지 후인 RS에서는 5.51 mw로 증가하였으며, 무독화과정 후에서는 6.41 mv로 더 증가되며, 또한 이로 인해 제곱 평균 표면 조도(root mean square)와 10점 평균 조도(Ten point height)에서도 아무것도 처리하지 않은 시료에 비해 침지 과정 후와 무독화 과정 후에서 그 값이 증가됨을 알 수 있다.

[0095] 이와 비슷한 결과로 또 다른 바이오매스인 버드나무에서도 평균 표면 조도가 증가됨을 알 수 있고 볏짚에서보다 버드나무의 평균 표면 조도(ASR)의 정도가 낮게 나타났다. 이는 버드나무가 자연에서 나무상태로 리그닌(lignin)함량이 높고 셀룰로오스(cellulose)와 헤미셀룰로오스(hemicellucose)가 더욱더 단단히 밀집되어 있기 때문이다.

표 8

[0096]

시료 종류	총 면적 (μm^2)	평균 조도 (mv)	Root mean square(mv)	Ten point height(mv)
raw RS	10077.5	0.257	3.78	1.52
RS	10077.5	5.51	6.85	73.2
DRS	10077.5	6.41	7.14	76.2
raw willow	10077.5	0.312	4.12	2.24
W	10077.5	4.68	6.93	74.2
DW	10077.5	5.96	7.02	75.3

[0097] 표 8에서 raw RS는 아무것도 처리하지 않은 볏짚, RS는 침지 과정 후의 볏짚, DRS는 무독화 과정 후의 볏짚, raw willow는 아무것도 처리하지 않은 버드나무, W는 침지 과정 후의 버드나무, DW는 무독화 과정 후의 볏짚을 나타낸 것이다.

[0098] 따라서 본 발명의 동시 전처리 및 당화(SPS) 과정으로 인하여 곰팡이 컨소시엄의 리그노셀룰라제(lignocellulases)와 TcLac의 라이카제의 영향으로 효과적으로 이 분해가 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[0099] 한편, 본 발명의 비교예로 순차적으로 전처리와 당화가 진행되는 순차적 전처리 및 당화(sequential pretreatment and saccharification, SqPS) 과정은 도 1에 도시된 바와 같이, 분쇄시켜 침지된 바이오매스로부터 순차적으로 전처리(pretreatment), 무독화(detoxification), 가수분해(hydrolysis)가 진행되며 각 공정에서 다음 공정으로 진행되기 전에 세척(washing) 과정이 진행 되며, 이러한 순처적 전처리 및 당화(SqPS)에서 전처리는 0.1 %w/v 수산화나트륨 용액을 사용하여 85 ℃의 온도로 진행된다.

[0100] 본 발명에 의해 독성을 제거된 당화물은 효모 등 바이오 알코올을 생산할 수 있는 모든 미생물을 이용한 발효에 적용할 수 있으며, 이를 통해 바이오 화학물질 또는 바이오 연료를 제조할 수 있다.

[0101] 본 발명의 일 실시예에 따른 발효(fermentation) 단계는 동시 전처리 및 당화 단계를 통해 얻어진 독성물질이

감소 또는 제거된 당화물에 에탄올 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*(ATCC 32167 효모)를 배지에 2 % v/v의 양으로 접종하여 35℃온도에서 90 내지 110 RPM으로 교반하면서 48 시간 배양하여 발효시킬 수 있다.

[0102] 본 가수분해물(당화물)의 발효를 위한 배지 조건은 효모추출물(yeast extract) 5g/L, 황산암모늄($(NH_4)_2SO_4$) 10g/L, 인화칼륨(KH_2PO_4) 4.5 g/L, 황산마그네슘 7수화물($MgSO_4 \circ 7H_2O$) 1.0 g/L이 포함되고 pH가 5.0인 배지에서 발효하며, 이때 pH는 1 N의 염산(HCl)이나 1 N의 수산화나트륨(NaOH)을 통해 맞춰줄 수 있다.

[0103] 배양이 끝난 배지를 15분 동안 7500㎍의 속도로 원심분리하여, 상층액만을 획득하고, 상기 상층액에서 당화물의 소비량과 바이오에탄올 생성량을 측정할 수 있다.

[0104] 본 발명의 일 실시예에 따른 발효 수율로 바이오매스로부터 생성된 바이오에탄올은 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector, FID)를 통하여 정량분석을 실시한다. 여기서 불꽃 이온화 검출기의 측정방법은 헬륨(He) 기체를 운반기체로 하여 공기와 수소를 사용하였으며, 개시온도를 80℃로 유지하고, 190℃까지 승온한 후, 10분간 유지하여 측정을 실시하여, 바이오에탄올의 농도(g/L)를 측정한다.

[0105] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 발효 수율 결과를 나타낸 그래프로 활용된 총 환원당의 양(g/L)와 생성된 바이오에탄올의 양(g/L)를 나타내며, 여기서 순차적 전처리 및 당화(SqPS)에 의한 환원당의 양(●), 동시 전처리 및 당화(SPS)에 의한 환원당의 양(○), 순차적 전처리 및 당화(SqPS)에 의한 바이오에탄올의 양(△), 동시 전처리 및 당화(SPS)에 의한 바이오에탄올의 양(▲)을 배양시간에 따라 비교하여 나타낸 것이다.

[0106] 도시된 바와 같이 볏짚에서 바이오에탄올은 시간당 약 0.52 g/L/h의 생성 양으로 최종 바이오에탄올의 생성량은 10.2 g/L로 나타났으며, 이는 비교예인 순차적 전처리 및 당화(SqPS) 보다 본 발명의 동시 전처리 및 당화(SPS) 방법을 통해 당이 바이오에탄올로 전환하는 당 전환 효율(sugar conversion %)이 72.4%로 높은 당 전환 효율을 보임을 알 수 있다.

[0107] 일반적으로 전처리와 당화가 분리되어 순차적으로 진행되는 방법에서 1 kg의 기질일 경우, 다음 단계로 진행될 때마다 세척공정이 필요하며, 이때 보통 50L 정도의 깨끗한 물이 세척공정에 필요하다. 그러나 본 발명은 이러한 세척공정이 요구되지 않고, 동시에 진행될 수 있으므로 신속하고 경제적 및 친환경적으로 바이오매스로부터 바이오연료를 생산될 수 있다.

수탁번호

[0108]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11186P

수탁일자 : 20110420

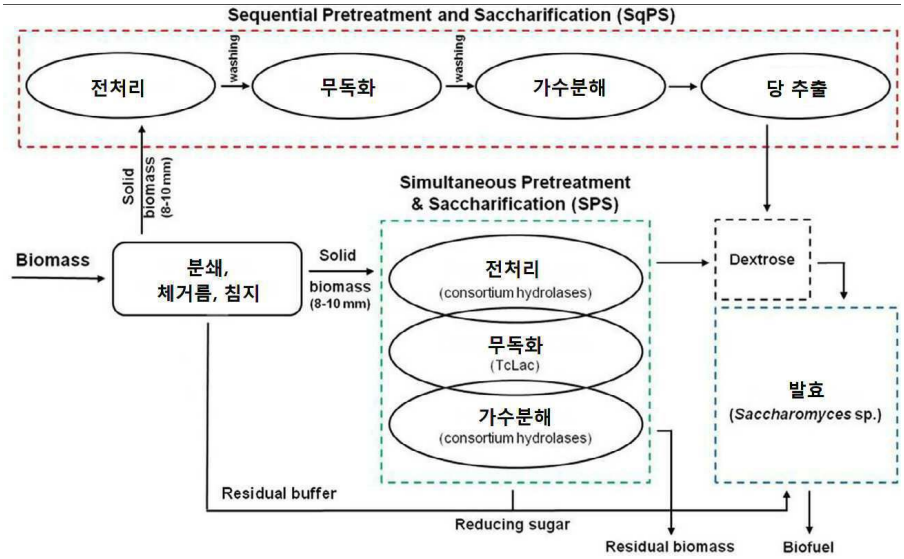
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11187P

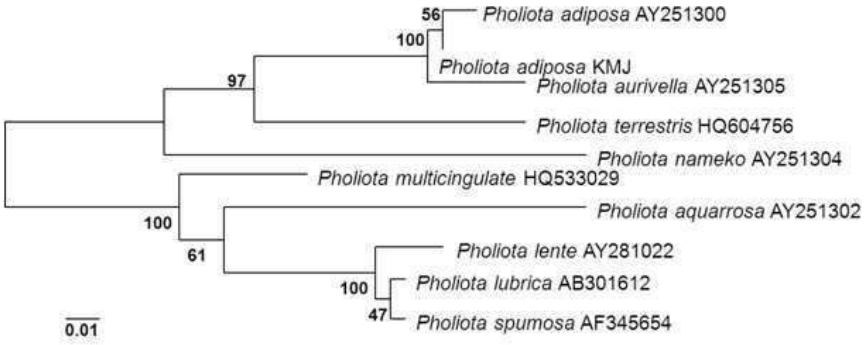
수탁일자 : 20110420

도면

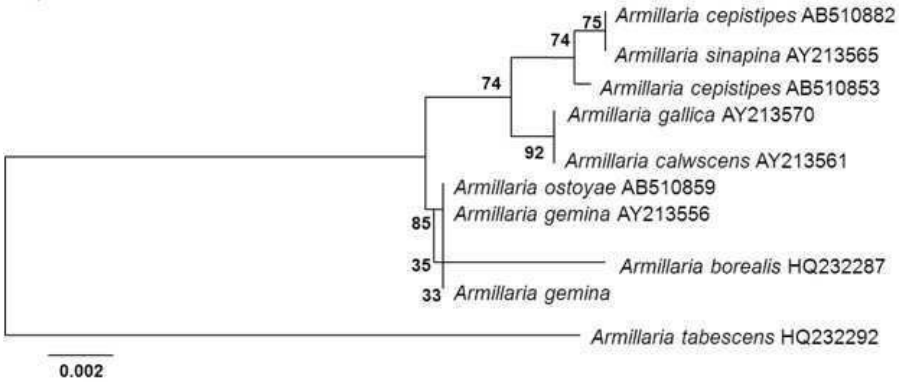
도면1



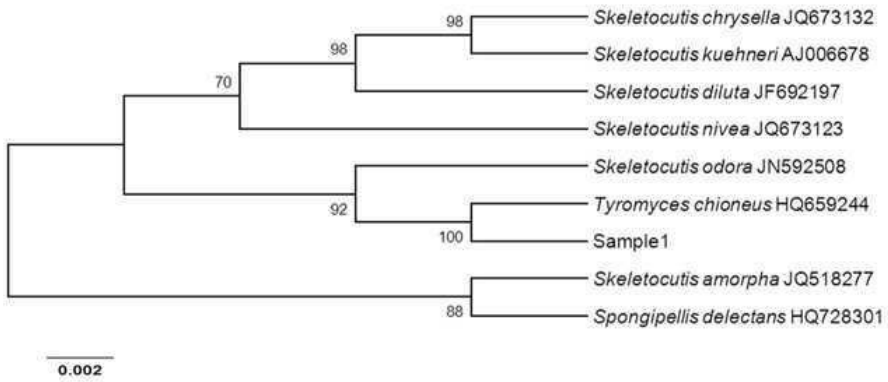
도면2



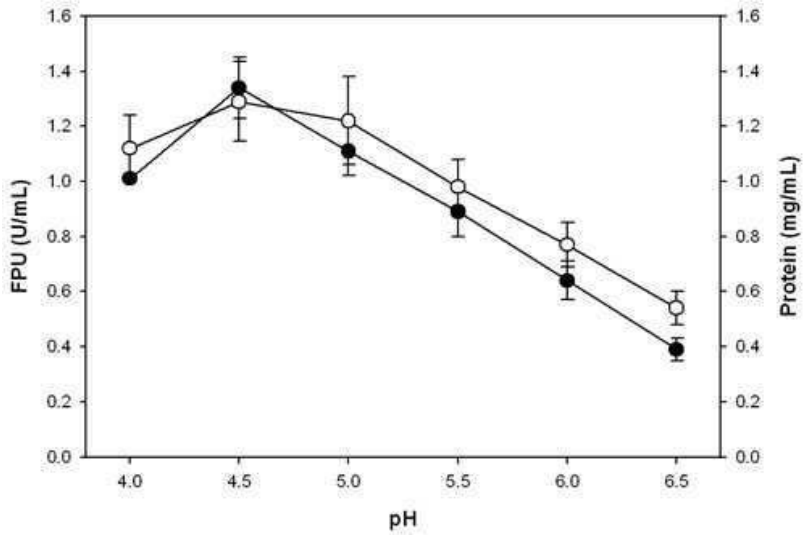
도면3



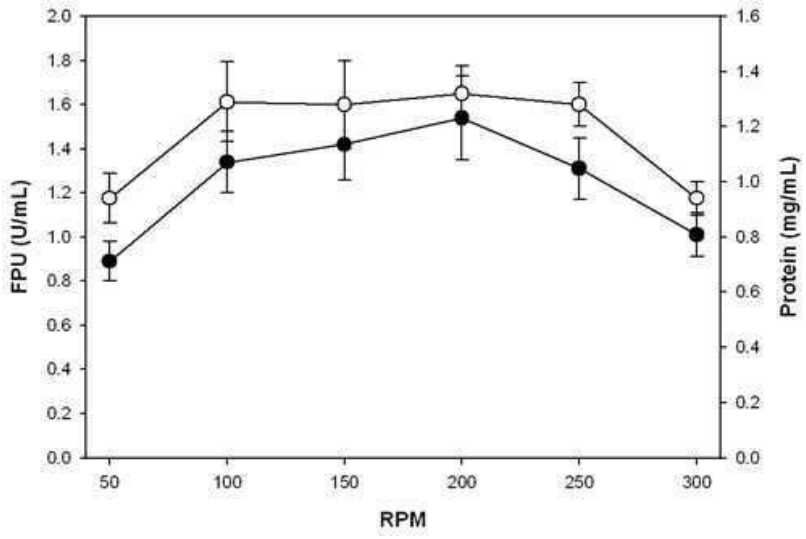
도면4


98
98
70
92
100
88
Skeletocutis chrysella JQ673132
Skeletocutis kuehneri AJ006678
Skeletocutis diluta JF692197
Skeletocutis nivea JQ673123
Skeletocutis odora JN592508
Tyromyces chioneus HQ659244
Sample1
Skeletocutis amorpha JQ518277
Spongipellis delectans HQ728301
0.002

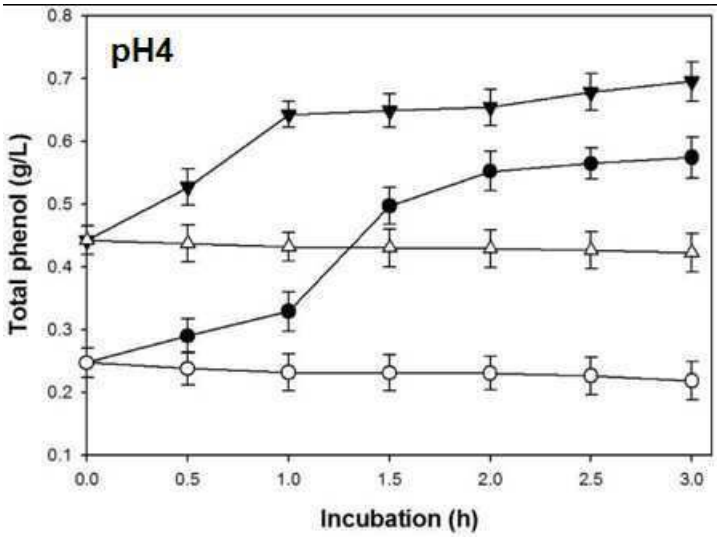
도면5


FPU (U/mL)
Protein (mg/mL)
pH
4.0
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5

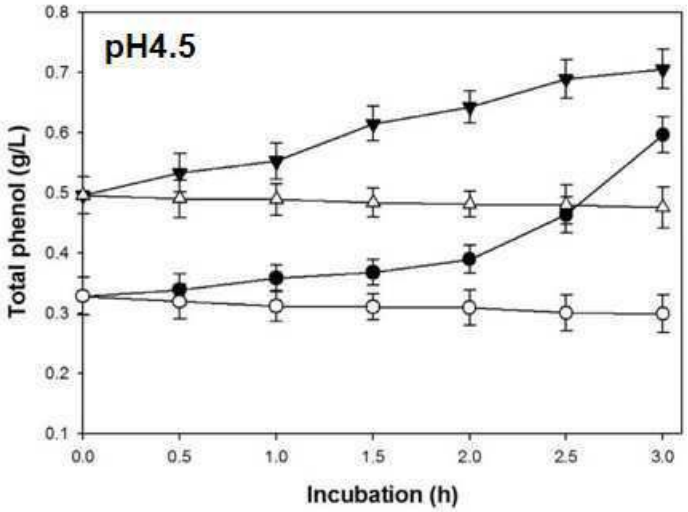
도면6


FPU (U/mL)
Protein (mg/mL)
RPM
50
100
150
200
250
300

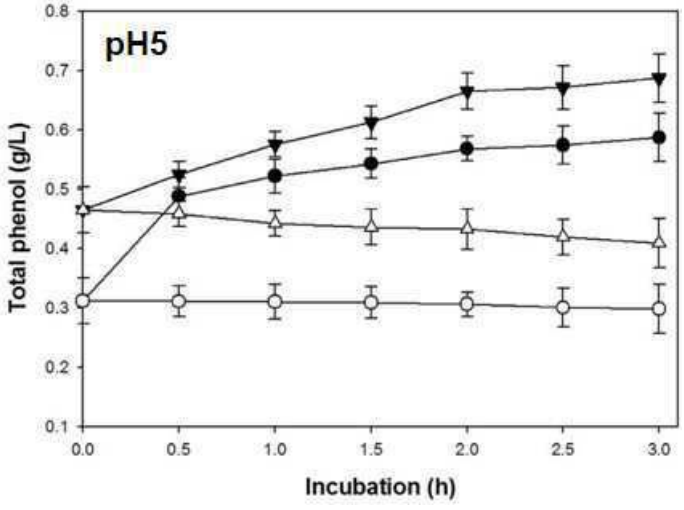
도면7


pH4
Total phenol (g/L)
Incubation (h)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

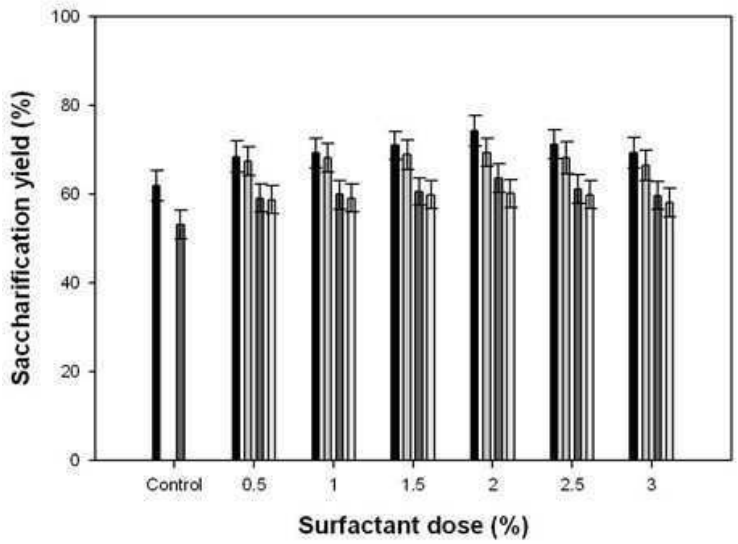
도면8


pH4.5
Total phenol (g/L)
Incubation (h)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

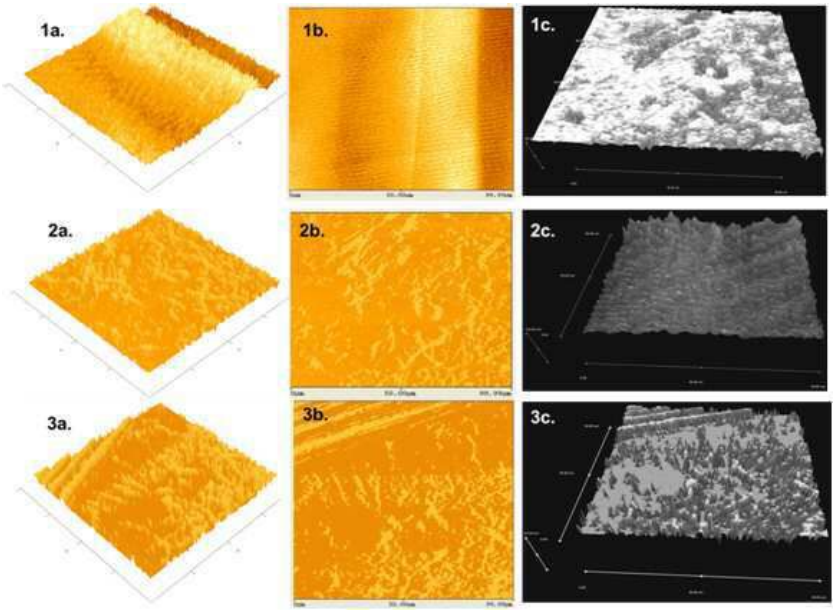
도면9


pH5
Total phenol (g/L)
Incubation (h)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0

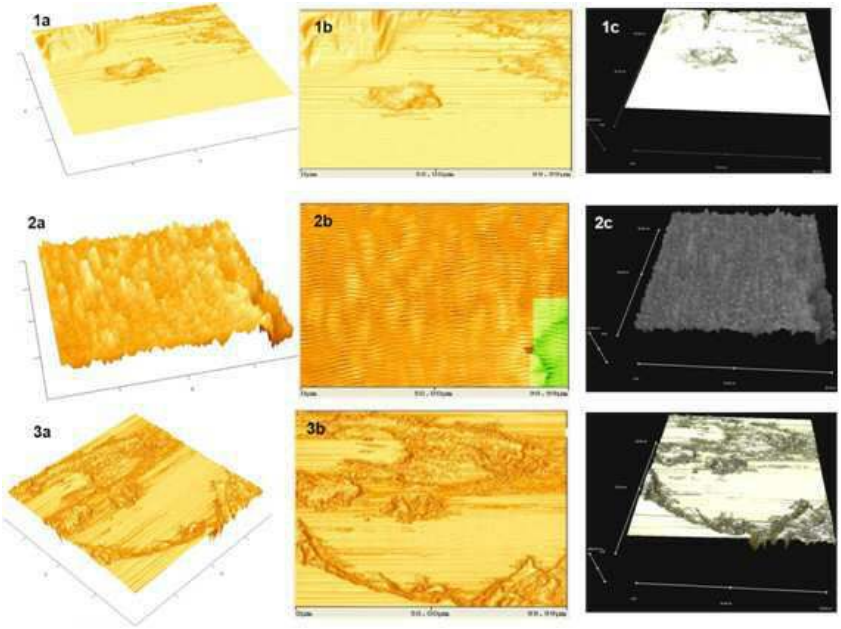
도면10


Saccharification yield (%)
100
80
60
40
20
0
Control
0.5
1
1.5
2
2.5
3
Surfactant dose (%)

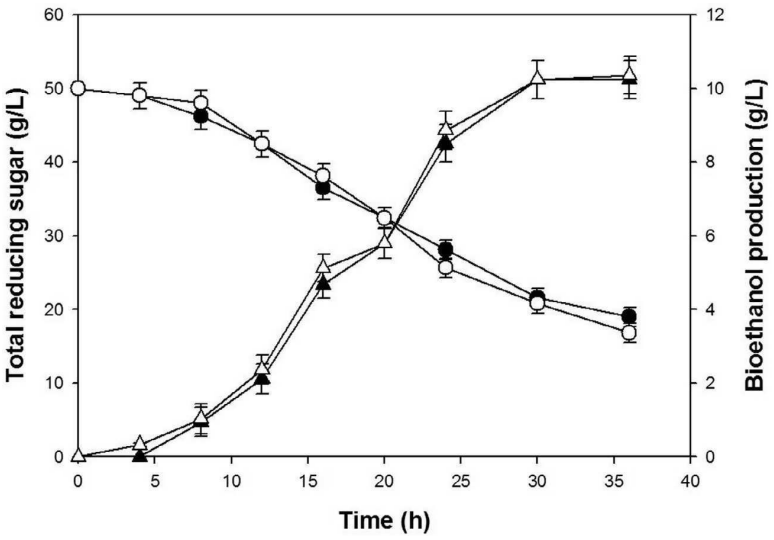
도면11


1a.
1b.
1c.
2a.
2b.
2c.
3a.
3b.
3c.

도면12



도면13



서 열 목 록

<110> Konkuk University Industrial Cooperation Corp

Korea University Research and Business Foundation

<120> A SIMULTANEOUS PRETREATMENT AND SACCHARIFICATION OF BIOMASS USING A FUNGAL CONSORTIUM AND MANUFACTURING METHOD OF BIOFUEL

<130> HY150342

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tccgtaggtg aacctgccg 19

<210

> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tcctccgctt attgatatgc 20