(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0005388
(43) 공개일자 2019년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/06 (2006.01) *C12N 11/00* (2006.01)
C12P 39/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/06 (2013.01)
C12N 11/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0085943
(22) 출원일자 2017년07월06일
심사청구일자 2018년07월04일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
주우홍
경상남도 창원시 의창구 도계로 69, 1층(도계동)
최혜정
경상남도 창원시 의창구 동읍 죽동길45번길 11
신경연
경상남도 김해시 율하1로 130, 908동 701호(율하동, 율현마을 이편한세상 9단지)
(74) 대리인
김순웅

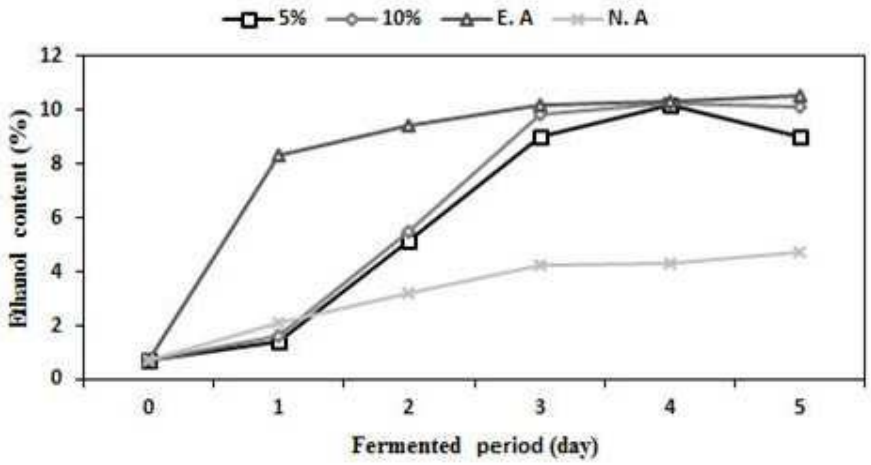
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **바이오캡슐을 이용한 동시당화발효 공정을 통한 바이오에탄올의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 동시당화발효 공정을 통한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것으로, 당화효소 분비 균주인 *Monascus purpureus* KACC 42430 및 알코올 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07을 함께 공고정화시켜 형성된 바이오캡슐을 이용하여 바이오에탄올을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효에 의한 바이오에탄올의 제조방법은 당화효소를 통한 당화 후 발효균주를 넣어 발효하는 현장의 바이오에탄올 생산 방법과 달리 재사용이 가능하며, 당화가 지속적으로 일어나 알코올 수율을 더 높일 수 있는 효과가 있다. 이에 에탄올 생산에 필요한 공업용수, 당화효소, 시간 및 에너지를 절약하여 에탄올 생산비를 감축시키고, 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12P 39/00 (2013.01)
C12Y 302/01001 (2013.01)
C12Y 302/01003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345258991
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 산학협력선도대학(LINC)육성사업
연구과제명 연속-동시당화발효를 위한 균주 고정화 기술 및 배양 조건 최적화
기 여 율 1/1
주관기관 창원대학교 산학협력단
연구기간 2016.07.01 ~ 2016.12.16

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 공고정화시켜 바이오캡슐을 제조하는 단계; 및

(b) 상기 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 동시당화발효하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 당화효소 분비 균주는 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속 균주, 리조푸스(*Rhizopus*) 속 균주, 페니실리움(*Penicillium*) 속 균주 및 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430으로 구성되는 군으로부터 선택되는 균주인 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 당화효소 분비 균주는 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430인 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 알코올 발효 균주는 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 또는 자이모모나스(*Zymomonas*) 속 균주인 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐은 배지에 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 접종하여 25 내지 30℃ 에서 5일 내지 9일간 배양하여 제조되는 것인, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐의 크기는 3 ㎜ 내지 10 ㎜ 인, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐은 100 내지 150 rpm에서 균주를 배양하여 제조된 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 동시당화발효는 25 내지 30℃ 에서 100 내지 150 rpm으로 진탕배양하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 바이오캡슐은 재사용 가능한 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 동시당화발효를 1회 내지 5회 반복하는 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올의 제조방법.

청구항 11

모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 균주가 공고정화된 바이오캡슐을 포함하는, 바이오에탄올 제조를 위한 동시당화발효용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 바이오캡슐은 재사용 가능한 것을 특징으로 하는, 바이오에탄올 제조를 위한 동시당화발효용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동시당화발효 공정을 통한 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것으로, 당화효소 분비 균주인 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430(*Monascus purpureus* KACC 42430) 및 알코올 발효 균주인 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 (*Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07)을 함께 공고정화 시켜 형성된 바이오캡슐을 이용하여 바이오에탄올을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 현재 전 세계 에너지 수요의 약 80%를 차지하고 있는 화석연료는 화석연료의 매장량이 한정되어 있어서 에너지 안보의 문제가 있고, 화석연료를 연소할 때에 발생하는 이산화탄소 등 온실가스의 배출로 인하여 지구온난화 등 기후 변화의 위협이라는 환경적인 문제를 포함한 다양한 문제를 유발시켜, 전 세계적으로 화석연료의 사용량을 감축하기 위한 논의가 활발하게 이루어지고 있다.

[0004] 이러한 문제를 해결하기 위해 비 석유계 원료를 활용한 대체에너지 개발의 필요성이 대두되고 있으며, 그 중 탄수화물의 당화와 당의 발효를 거쳐 생산되는 바이오에탄올은 열 발생량이 높고 연소 시 방출되는 독성 화합물이 적어 화석연료를 대신할 획기적인 대체에너지로 주목받고 있다.

[0005] 전통적으로 에탄올 발효란 과당과 같은 당분이 효모에 의하여 이산화탄소와 에탄올로 분해하여 이루어지는 발효를 의미한다. 주정발효라고도 하며 예전부터 인류가 음료나 빵을 제조하기 위한 자연현상이다. 에탄올 발효를 이용하여 전분질로부터 에탄올을 제조하기 위한 공정이 산업적으로 이용되어 왔다. 통상적으로 상기 에탄올 제조 공정은 전분질의 전처리, 당화, 발효 및 정제공정으로 실시되며, 보다 구체적으로는 전처리 공정에서는 전분질의 호화 및 액화반응이 진행되고, 당화공정은 당화효소를 이용하여 수행하며, 상기 발효공정은 당화된 전분질의 발효와 당화되지 못한 전분질의 당화를 수행하는 단계로 효모세포, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하여 수행하고, 상기 발효공정에서 수득한 에탄올을 정제공정을 통하여 고순도의 에탄올로 제조된다.

[0006] 바이오에탄올은 주로 타피오카 및 쌀 등 전분질 원료를 이용하여 생산되며, 크게 전분질 원료 분쇄, 증자(액화), 당화, 발효, 증류 과정으로 이루어진다. 분쇄는 전처리 공정에서 증자, 발효가 용이하도록 전분질 원료를 파쇄하는 공정이며, 증자는 라인 믹서에서 믹싱(원료, 물, 액화효소) 된 슬러리를 생증기로 가열하는 것을 말하

며, 고분자의 전분을 저분자의 덱스트린(dextrin)으로 분해(아밀로오스와 아밀로팩틴)하여 당화조에서 당화효소의 작용을 용이하게 할 뿐만 아니라 원료에 부착되어 있는 잡균을 살균해준다. 당화는 증자과정에서 전분이 호화되면 α-amylase에 의해 덱스트린으로 분해(액화과정)된 맥아즙(mash)을 당화조에 수송하여 조효소 및 액상의 당화효소를 첨가하여 당화시킨 다음 발효조로 이송하는 것이며, 발효 공정은 당화효소에 의해 당화된 발효성 당분을 미리 배양된 주모조(효모 *Saccharomyces cerevisiae*)와 합병하여 생성된 글루코오스를 에탄올과 CO_2로 약 100~120시간 발효시키는 것이다. 이러한 복잡한 공정의 전분 용액화 및 당화를 위해 상업적 효소를 이용한 전처리 과정은 에탄올 발효에 관여하는 효모의 전분 분해력 결여에 의한 것으로, 이로 인해 알코올 생산 비용이 상대적으로 높다.

[0007] 이에 최근에는 재생 가능하며 저렴한 미세조류, 산업 폐액 및 음식폐기물 등을 자원으로 이용하거나 동시당화발효 (Synchronous saccharification and fermentation, SSF)를 통한 바이오에탄올 생산에 대한 연구가 이루어지고 있다. 동시당화발효는 기존의 공정과 달리 당화효소를 분비하는 미생물과 발효 미생물을 혼합하여 당화공정과 발효공정을 동시에 수행하는 것으로, 곰팡이에 의해 생성된 글루코스가 효모에 의해 빠르게 에탄올로 전환되어 글루코스에 의한 전분의 효소적 가수분해에 대한 저해 작용을 최대한 줄이며 동시에 설비비용을 절감시킴으로써 공정의 효율을 향상시킬 수 있다.

[0008] 한편, 미생물들은 작은 알갱이(pellet), 응집체(flocs), 미소구(microsphere), 균사체(mycelium) 및 바이오필름(biofilm) 등의 응집 형태로 특별한 조건에서 자연적으로 고정화되거나 인위적으로 고정화될 수 있다. 또한 일부 미생물들은 외부 비활성 운반체를 이용하거나, 외부 운반체 또는 화학결합 없이 자발적으로 유연한 바이오캡슐을 형성하여 함께 고정화될 수 있다. 이러한 고정화 또는 공고정화는 세포에 한정된 미세 환경을 제공함으로써 생물 촉매의 활성을 향상시키고 재사용이 가능하게 하여, 연속 공정의 개발이 필요한 에탄올 산업 및 식품산업 등에 전반적으로 이용되고 있다.

[0009] 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효는 상업적 효소를 이용한 당화발효와 비슷한 수준의 에탄올을 생산하며, 에탄올 생산에 필요한 공업용수, 당화효소, 시간 및 에너지를 절약하여 에탄올 생산비를 감축시킬 수 있다. 또한 당화효소 분비 균주가 항생 물질 생성 균주일 경우 장내세균에 의한 오염을 방지할 수 있으며, 에탄올 공정 외에 와인 발효, 치즈 발효와 같은 다양한 발효공정 적용 및 기반기술로 사용 가능하다. 즉, 상기 바이오 에탄올은 연료용, 음료용으로 사용될 뿐만 아니라, 의약품, 화장품 및 공업용 원료 등의 많은 용도로 사용되고 있어, 해마다 그 생산량이 증가되고 있으며, 이 때문에 보다 값싸고 생산성이 높은 에탄올 제조 기술의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에, 본 발명자들은 당화효소 분비균주인 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 (*Monascus purpureus* KACC 42430) 및 알코올 발효 균주인 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 (*Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07)을 이용하여 형성한 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 당화공정과 발효공정을 동시에 수행하면 공정의 효율이 향상됨을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서, 본 발명의 목적은 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 동시당화발효하는 바이오에탄올의 제조방법 및 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 균주가 공고정화된 바이오캡슐을 포함하는, 바이오에탄올 제조를 위한 동시당화발효용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 공고정화시켜 바이오캡슐을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 동시당화발효하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 균주가 공고정화된 바이오캡슐을 포함하는, 바이오에탄올 제조를 위한 동시당화발효용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 바이오에탄올의 제조방법은 당화효소 분비 균주인 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 에탄올 발효 균주인 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07을 함께 공고정화시켜 형성된 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 동시당화발효 시키는 것을 특징으로 하며, 당화효소를 통한 당화 후 발효균주를 넣어 발효하는 현장의 바이오에탄올 생산 방법과 달리 본 발명의 바이오캡슐은 재사용이 가능하고, 당화가 지속적으로 일어나 알코올 수율을 더 높일 수 있는 효과가 있다. 이에 에탄올 생산에 필요한 공업용수, 당화효소, 시간 및 에너지를 절약하여 에탄올 생산비를 감축시키고, 산업적으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430의 당화효소 활성을 나타낸 도이다.

도 2는 형성된 바이오캡슐(a) 및 이를 확대한 모습(b)을 나타낸 도이다.

도 3은 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효시 글루코스(glucose) 함량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효시 에탄올 함량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 바이오캡슐을 이용한 연속-동시당화발효시 글루코스 함량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 바이오캡슐을 이용한 연속-동시당화발효시 에탄올 함량을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0021] 본 발명은 (a) 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 공고정화 시켜 바이오캡슐을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 동시당화발효하는 단계를 포함하는, 바이오에탄올의 제조방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 바이오에탄올의 제조방법은 당화효소를 통한 당화 후 발효균주를 넣어 발효하는 현장의 바이오에탄올 생산 방법을 통해 생성된 에탄올 수율과 비슷하며, 당화효소를 이용한 당화는 한정된 당화만 일어나는 반면, 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효는 자원이 풍부할 경우 당화가 지속적으로 일어나 알코올 수율을 더 높일 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, '바이오캡슐'은 당화에 필요한 균류와 에탄올 발효에 필요한 효모를 함께 배양하여 공고정화된 결과 형성되는 알갱이(pellet)를 말한다. 미생물은 인위적인 방법으로 고정화하면 미생물의 대사나 생존능력에 있어서 큰 변화가 생길 수 있으나, 몇몇 미생물은 작은 알갱이(pellets), 응집체(flocs), 미소구(microsphere), 균사체(mycelia), 생물막(biofilm)의 응집 형태로 특별한 조건에서 자연적으로 고정될 수 있으며 이 경우 세포대사의 변화는 없을 것으로 추정된다. 그러므로 본 발명과 같이 당화에 필요한 균류와 에탄올 발효에 필요한 효모를 함께 고정화 및 공고정화시켜 바이오캡슐을 형성하고 이를 곡물자원에 처리하여 동시당화발효를 진행하면 기존의 발효공정보다 공정시간이 단축되고 공정의 효율이 향상되는 등 공정효율 제고가 가능하다.

[0024] 본 발명에 있어서, '공고정화'는 효모가 자라지 못하는 환경에서 곰팡이만 생육하게 함으로써 곰팡이가 형성하는 알갱이(pellet) 사이에 효모가 들어가 고정화되는 원리를 이용하는 것이다. 본 발명에 있어서 사용된 글루콘산(gluconic acid)은 곰팡이 균주가 주로 사용하는 영양원이며, 효모는 이용하지 못한다. 효모는 한 세대까지만 성장할 수 있으므로, 효모는 곰팡이가 형성한 알갱이 사이로 들어가 곰팡이 균주의 균사에 엮어 공고정화된다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 당화효소 분비 균주는 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속 균주, 리조푸스(*Rhizopus*) 속 균주, 페니실리움 속 균주 및 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430으로 구성되는 군으로부터 선택되는 균주일 수 있고, 바람직하게는 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 알코올 발효 균주는 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 또는 자이모모나스(*Zymomonas*) 속 균주일 수 있고, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07일 수 있다. 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 자낭균류에 속하는 대표적인 효모이다. 빵효모(baker's yeast)나

맥주효모(brewery yeast)를 비롯하여, 양조에 사용하는 효모의 대부분은 이 종의 근연이다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 0.1 M PBS (pH 7)에 녹인 10 ml의 yeast nitrogen base medium without amino acids (YNB)와 90 ml의 글루콘산 (5g/l)을 첨가하여 제조한 배지에 접종하여 바이오캡슐을 제조할 수 있다.

[0028] 상기 바이오캡슐은 상기 배지에 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 포자를 접종하여 형성되므로 제작이 간단하며, 이에 따른 시간 절약 및 공정 간소화가 가능하다.

[0029] 상기 균주들은 상기 배지에 4 × 10^5 내지 5 × 10^7 cell/ml 의 농도로 접종할 수 있으며, 바람직하게는 5 × 10^5 내지 4 × 10^7 cell/ml 로 접종할 수 있다.

[0030] 상기 당화효소 분비 균주들이 분비하는 당화효소는 α-아밀라아제(α-amylase) 및 글루코아밀라아제(glucoamylase)로 이루어지는 것이 바람직하다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐은 일반적인 진균류의 배양온도를 고려할 때 배지에 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 접종하여 공고정화를 위해 25 내지 30℃ 에서 배양할 수 있고, 바람직하게는 28 내지 30℃ 에서 배양할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐은 배지에 당화효소 분비 균주 및 알코올 발효 균주를 접종하여 25 내지 30℃ 에서 5일 내지 9일간 배양할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐의 크기는 3 mm 내지 10 mm일 수 있고, 바람직하게는 3mm 내지 8mm일 수 있다.

[0034] 동시당화발효 및 연속-동시당화발효를 수행하기 위해서는 형성된 바이오캡슐이 재이용 및 보관이 편리하며, 효소에 의한 당화가 활발하게 일어나기 위해 시료와의 접촉이 원활하도록 고정화된 형태가 크고 수적으로도 많이 형성되며, 다양한 당화효소의 활성을 가지는 것이 중요하다. 본 발명의 바이오캡슐의 크기는 크기가 크며, 수적으로 많이 형성될 뿐만 아니라 당화효소의 활성이 높아 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07는 동시당화발효를 위한 균주로 적합하게 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 바이오캡슐은 100 내지 150 rpm에서 균주를 배양하여 제조된 것일 수 있고, 바람직하게는 110 내지 130 rpm에서 균주를 배양하여 제조된 것일 수 있다. Rpm이 느릴수록 공고정화된 곰팡이와 효모의 크기가 크고, 바닥에 침전되는 곰팡이와 효모의 수가 많아지며, rpm이 빠를수록 공고정화된 곰팡이와 효모의 크기가 작고, 크기가 작을수록 경도가 강함을 확인하였다. 따라서 공고정화된 곰팡이와 효모의 크기 및 경도를 고려할 때 바람직한 110 내지 130 rpm에서 균주를 배양하여 바이오캡슐을 제조할 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서, 상기 바이오캡슐을 곡물에 처리하여 당화 및 발효하는 단계는 동시에 수행된다.

[0037] 상기 (b) 단계의 동시당화발효는 25 내지 30℃ 에서 100 내지 150 rpm으로 진탕배양하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 28 내지 30℃ 에서 100 내지 130 rpm으로 진탕배양하여 수행될 수 있다.

[0038] 본 발명의 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효는 4일 만에 10% 대의 에탄올을 생성할 수 있고, 이는 실제 공장에서 생산하고 있는 에탄올 수율과 비슷하여 현장에 직접 적용할 수 있다.

[0039] 필요에 따라, 당업자는 기타 추가단계 및/또는 공정을 수행할 수 있는 바, 예를 들어, 상기 발효과정에 의해 수득한 발효액을 당업계에 공지된 방법에 따라, 정제하는 정제과정 등을 들 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 바이오캡슐은 재사용이 가능한 것을 특징으로 한다. 그에 따라 효모의 전배양 시간을 줄일 수 있고 공업용수, 당화효소도 절약할 수 있다. 또한, 한번 형성한 바이오캡슐은 몇 번이고 재사용이 가능하므로 바이오캡슐 형성시간도 절약할 수 있다.

[0041] 따라서, 본 발명은 상기 (b) 단계의 동시당화발효를 1회 내지 5회 반복하는 것을 특징으로 하여, 연속-동시당화발효를 통해 바이오에탄올 제조가 가능하다. 본 발명에 따른 바이오캡슐은 당화효소와는 달리 재사용이 가능하여, 에탄올 생산에 필요한 공업용수, 당화효소, 시간 및 에너지를 절약하여 에탄올 생산비를 감축시킬 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 모나스쿠스 퍼퍼루스 KACC 42430 및 사카로마이세스 세레비지에 IFO-M-07 균주가 공고정화된 바이오캡슐을 포함하는, 바이오에탄올 제조를 위한 동시당화발효용 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 조성물의 제조방법에 대한 설명은 위의 기재와 중복되므로 기재를 생략한다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 바이오캡슐은 재사용 가능한 것을 특징으로 한다.

[0045] 상기 바이오캡슐을 이용하면 곰팡이 균주와 효모가 공고정화되어 보관 및 연속 사용이 가능하여 효모의 전배양 작업을 줄일 수 있고 당화공정과 발효공정을 함께 함으로써 에너지 및 전배양 비용을 줄일 수 있는 장점이 있다. 또한, 곰팡이가 분비하는 당화효소와 효모의 발효에 의해 동시당화에탄올 발효가 가능하며, 이에 당화효소의 사용을 줄일 수 있어 전처리 비용을 감축시킬 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1. 사용균주 및 당화효소 조사**

[0050] **1.1 사용 균주 및 실험 재료**

[0051] *Monascus purpureus* KACC 42430은 농업유전자원정보센터(Korean Agricultureal Culutre Collection, KACC)에서 분양받아 당화효소 분비 균주로 사용하였으며, *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07은 일본 종균협회(Institute of Fermentation, Osaka, Japan)에서 분양되는 균주로, 알코올 발효 균주로 사용하였다. 균주 배양을 위해 potato dextrose agar(PDA)는 MB cell(Korea)에서 구입하였으며, 클로람페니콜(chloramphenicol)은 Fluka Chemie AG(Switzerland)에서 구입하였다. 효소 활성 실험에 사용한 전분(starch)은 Samchun chemical(Korea)에서, 3,5-dinitrosalicylic(DNS) 및 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite)은 Sigma(USA)로부터 구입하였다. 균주 배양에는 회전식진탕기(Tex-Genie 2, Scientific industries, USA)를 사용하였으며, 당화 효소 활성 측정에 사용된 기기는 원심분리기(MICRO-12, Hanil, Korea), 분광광도계(UV-1601. Shimadzu, Japan), 항온수조(NTT-300, Eyela, Japan) 등이 사용되었다.

[0053] **1.2 당화효소 조사**

[0054] *Monascus purpureus* KACC 42430을 전분 배지 (starch 10 g/l, beef extract 3g/l)에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였으며, 배양액은 18,000 × g에서 5분간 원심분리하여 잔여 전분 및 균사와 상등액을 분리하였으며, 상등액을 α-amylase 및 glucoamylase 효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다. 0.02 ml의 상등액에 0.18 ml의 증류수를 첨가하여 30 mM phosphate buffered saline (PBS, pH 6)에 녹인 0.2 ml의 전분 (1 g/l)을 첨가하고 30℃에서 20분간 반응시켜 α-amylase 활성을 측정하였다. 한편 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)에 녹인 0.2 ml의 전분 (1 g/l)을 첨가하여 50℃에서 20분간 반응시켜 glucoamylase 활성을 측정하였다. 효소활성은 유리된 환원당을 DNS method로 정량하여 확인하였으며, 각 효소의 활성 1 unit은 1분당 1 μM의 포도당을 만드는데 필요한 효소량으로 정의하였다. 결과를 도 1에 나타내었다.

[0055] 도 1에 나타낸 바와 같이, α-amylase는 57.73 U/ml, glucoamylase는 71.85 U/ml로 나타남을 확인하였다.

[0057] **실시예 2. 바이오캡슐 형성**

[0058] 당화효소 분비 균주와 알코올 발효 균주가 함께 고정된 바이오캡슐을 형성하기 위해 각각 0.1 M PBS (pH 7)에 녹인 10 ml의 yeast nitrogen base medium without amino acids (YNB)와 90 ml의 글루콘산(gluconic acid) (5g/l)을 첨가하여 제조한 배지에 4 × 10^6 cell/ml의 농도로 조절한 *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07과 *Monascus purpureus* KACC 42430의 포자를 접종하여 120 rpm에서 28℃로 7일간 배양하였다. 결과를 도 2에 나타내었다.

[0059] 도 2의 a에 나타낸 바와 같이, 바이오캡슐(pellet)이 형성되었다. 도 2의 b에 나타낸 바와 같이, 형성된 바이오캡슐은 5.2 mm 크기임을 확인하였다. 본 실시예에서 형성된 바이오캡슐과 같이 고정화된 형태가 큰 바이오캡슐은 시료와의 접촉이 원활하여 효소에 의한 당화가 활발하게 일어나 동시당화발효 및 연속-동시당화발효에 유용하다. 이하 동시당화발효실험에 제조된 바이오캡슐을 이용하였다.

[0061] **실시예 3. 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효**

[0062] **3.1 실험재료 및 실험기기**

[0063] 동시당화발효를 위한 원료로는 주정 생성 공정에 사용하고 있는 곡물자원(타피오카 39%, 현미 43%, 쇄미 10%, 백미 4%, 보리 4% 등)을 이용하였다. 동시당화발효를 위하여 회전식진탕기(Tex-Genei 2, Scientific industries, USA)를 사용하였으며, 글루코스(glucose) 함량 측정에는 원심분리기(MICRO-12, Hanil, Korea), 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하였다.

[0064] 형성된 바이오캡슐을 곡물자원에 5% 및 10%(v/v) 첨가하여 28℃에서 100 rpm으로 진탕배양한 후 24시간 마다 1 ml의 샘플을 10,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 이용하여 글루코스 함량을 측정하였다. 대조군으로는 곡물자원에 조효소 및 saczyme을 첨가하여 당화시킨 후 대수증식기의 *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07을 6% 첨가하여 33℃에서 정치배양한 것(E.A) 및 곡물자원을 당화시키지 않고 대수증식기의 *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07을 6% 첨가하여 33℃에서 정치배양한 것(N. A)을 사용하였다.

[0066] **3.2 글루코스 함량 조사**

[0067] 글루코스 함량은 DNS method로 측정하였으며, 0.4 ml의 샘플에 0.4 ml의 DNS regent (0.63% 3,5-dinitrosalicylic acid, 18.2% 로셀염(Rochelle salt), 0.5% 페놀(phenol), 0.5% 메타중아황산나트륨, 2.14% 수산화나트륨)를 첨가한 후, 95℃의 끓는물에서 5분간 반응시키고 찬물로 냉각시켜 흡광도 575 nm에서 측정하여 정량하였다. 결과를 도 3에 나타내었다.

[0068] 도 3에 나타낸 바와 같이, 바이오캡슐을 5% 및 10% 첨가한 경우 글루코스 함량이 감소하다 다소 증가하는 시기(2일에서 3일 사이)가 관찰되었다. 이로써 당화효소 첨가 없이도 바이오캡슐로 당화가 계속 이루어지고 있음을 확인하였다. 반면 당화효소를 이용하여 당화 후 발효한 경우(E.A) 글루코스 함량이 초기에 급격하게 감소하였으며, 증가하는 시기가 관찰되지 않았다. 또한 당화를 수행하지 않고 발효만 한 경우도 글루코스 함량이 지속적으로 감소됨을 확인하였다(N.A).

[0070] **3.3 에탄올 함량 조사**

[0071] 에탄올 함량은 1 ml의 샘플에 1 ml의 tri-n-butylphosphate를 첨가하여 30분간 볼텍싱(vortexing) 후, 0.5 ml의 상층액과 0.5 ml의 dichromate regent (0.34 M 중크롬산 칼륨, 5 M 황산)를 혼합하여 30분간 볼텍싱 한 후, 200 μl를 96-웰에 분주하여 570 nm로 마이크로플레이트 리더에서 측정하였다. 결과를 도 4에 나타내었다.

[0072] 도 4에 나타낸 바와 같이, 5일간 바이오캡슐을 이용하여 동시당화발효한 결과, 바이오캡슐을 5% 첨가한 경우 9.04%의 에탄올이 생성되었으며, 10% 첨가한 경우 에탄올 농도는 10.13% 임을 확인하였다. 당화효소로 당화 후 발효한 경우(E.A) 초기에 에탄올 농도가 급격하게 증가되었으며, 10.51%의 에탄올이 생성되었다. 반면에 당화를 수행하지 않고 발효만 한 경우(N.A) 4.76%의 에탄올이 생성되었다. 이에 바이오캡슐을 이용하여 동시당화발효한 결과는 당화효소를 이용하여 당화 후 발효를 실시한 결과와 비슷한 수율의 에탄올이 생성되며, 적은 양으로도 에탄올 수율이 높음을 확인하였다.

[0074] **실시예 4. 바이오캡슐을 이용한 연속-동시당화발효**

[0075] 연속-동시당화발효를 위한 원료로는 주정 생성 공정에 사용하고 있는 곡물자원(타피오카 39%, 현미 43%, 쇄미 10%, 백미 4%, 보리 4% 등)을 이용하였다. 연속-동시당화발효를 위하여 회전식진탕기(Tex-Genei 2, Scientific industries, USA)를 사용하였으며, 글루코스 함량 및 에탄올 측정에는 원심분리기(MICRO-12, Hanil, Korea), 분광광도계 (UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하였다.

[0076] 형성된 바이오캡슐을 곡물자원에 10% 첨가하여 28℃에서 100 rpm으로 진탕배양한 후 24시간 마다 1 ml의 샘플을 10,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 이용하여 글루코스 함량 및 에탄올 함량을 측정하였다. 5일간 동시당화발효에 사용된 바이오캡슐은 0.1 M PBS (pH 7)로 세척 후 0.1 M PBS (pH 7)에 보관하였으며, 이를 이용하여 위와 같은 조건으로 2차, 3차 동시당화발효를 수행하는 연속-동시당화발효를 진행하였다. 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

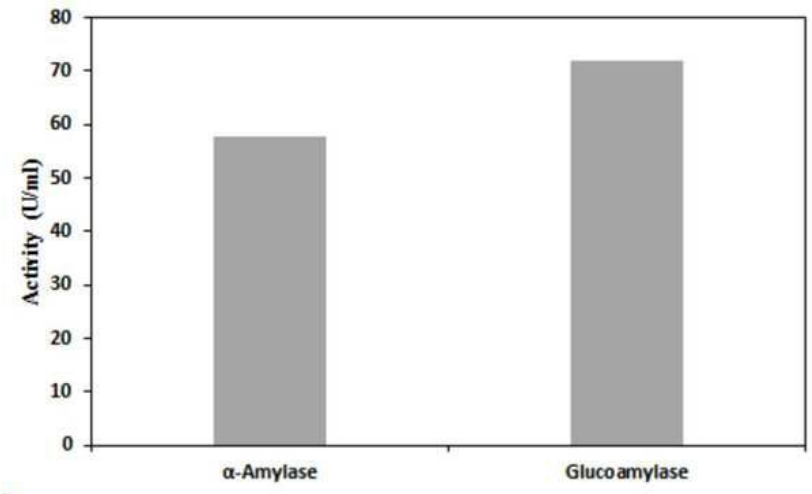
[0077] 도 5에 나타낸 바와 같이, 사용횟수에 상관없이 글루코스 함량이 대체로 감소하는 경향이 나타났으며, 다소 증가하는 시기도 관찰되었다. 한편, 글루코스 함량은 발효 5일째 기준으로 1차 사용시 14.45 mg/ml, 2차 사용시 28.42 mg/ml, 3차 사용시 38.24 mg/ml로 바이오캡슐의 사용 횟수가 증가함에 따라 동시당화발효가 활발해짐을 확인하였다. 반면, 도 6에 나타낸 바와 같이, 바이오캡슐의 사용 횟수가 증가함에 따라 에탄올 수율은 1차 사용시 에탄올 농도가 10.13%, 2차 사용시 에탄올 농도가 8.65%, 3차 사용시 에탄올 농도가 8.09%로 약간 낮아짐을 확인하였다.

[0078] 상기 결과를 통해, 당화효소 분비 균주인 *Monascus purpureus* KACC 42430과 에탄올 발효 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* IFO-M-07을 함께 공고정화시켜 바이오캡슐을 형성하여 동시당화발효를 수행한 결과, 10% 정도의 산업적 적용 가능한 수준의 에탄올이 생성되고, 당화효소를 이용한 당화는 한정된 당화만 일어나는 반면, 본 실시예와 같은 바이오캡슐을 이용한 동시당화발효는 자원이 풍부할 경우 당화가 지속적으로 일어나 알코올 수율을 더 높일 수 있어 산업적으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한 바이오캡슐은 사용횟수가 증가할수록 에탄올 수율이 다소 낮아지지만 당화효소와는 달리 재사용이 가능하므로, 에탄올 생산에 필요한 공업용수, 당화효소, 시간 및 에너지를 절약하여 에탄올 생산비를 감축시킬 수 있음을 확인하였다.

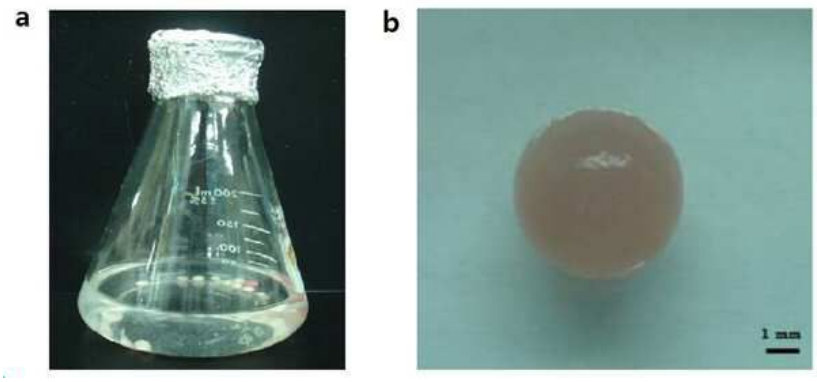
[0080] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

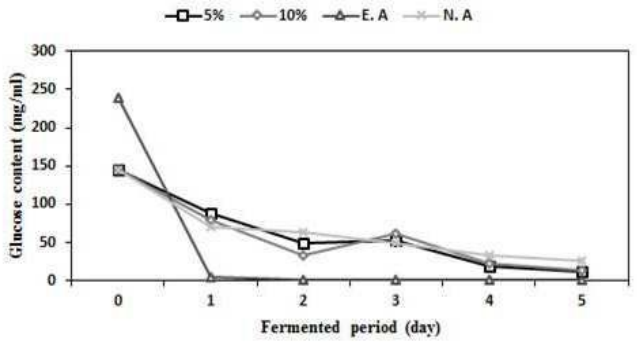
도면1



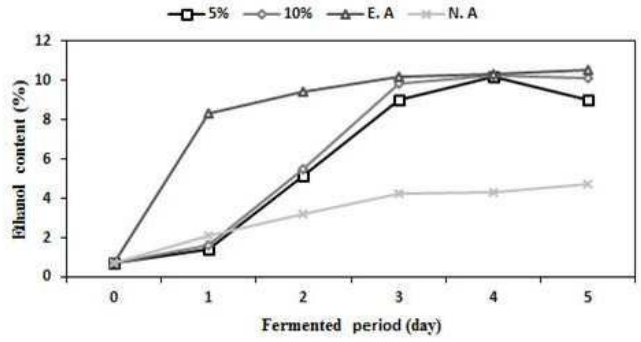
도면2



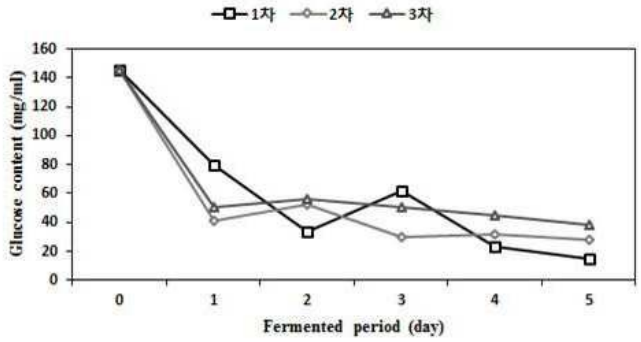
도면3


5%
10%
E. A
N. A
Glucose content (mg/ml)
300
250
200
150
100
50
0
0
1
2
3
4
5
Fermented period (day)

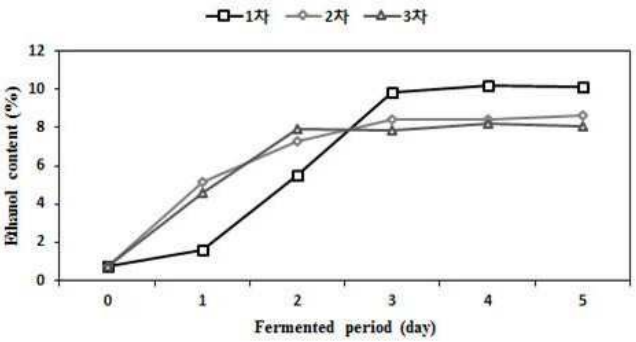
도면4


5%
10%
E. A
N. A
Ethanol content (%)
12
10
8
6
4
2
0
0
1
2
3
4
5
Fermented period (day)

도면5


1차
2차
3차
Glucose content (mg/ml)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
Fermented period (day)

도면6


1차
2차
3차
Ethanol content (%)
Fermented period (day)
0
2
4
6
8
10
12
0
1
2
3
4
5