



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월21일

(11) 등록번호 10-1519886

(24) 등록일자 2015년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12P 19/04 (2006.01) C12P 7/06 (2006.01)
 C12P 7/56 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0119951

(22) 출원일자 2013년10월08일

심사청구일자 2013년10월08일

(65) 공개번호 10-2015-0042309

(43) 공개일자 2015년04월21일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100123093 A*

Bioresource Technology. 2013, Vol.146,
 pp.35-43*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김진철

대전 유성구 가정로 63, 102동 1505호 (신성동,
 럭키하나아파트)

최용호

대전 유성구 가정로 63, 105동 801호 (신성동, 럭
 키하나아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 한지혜

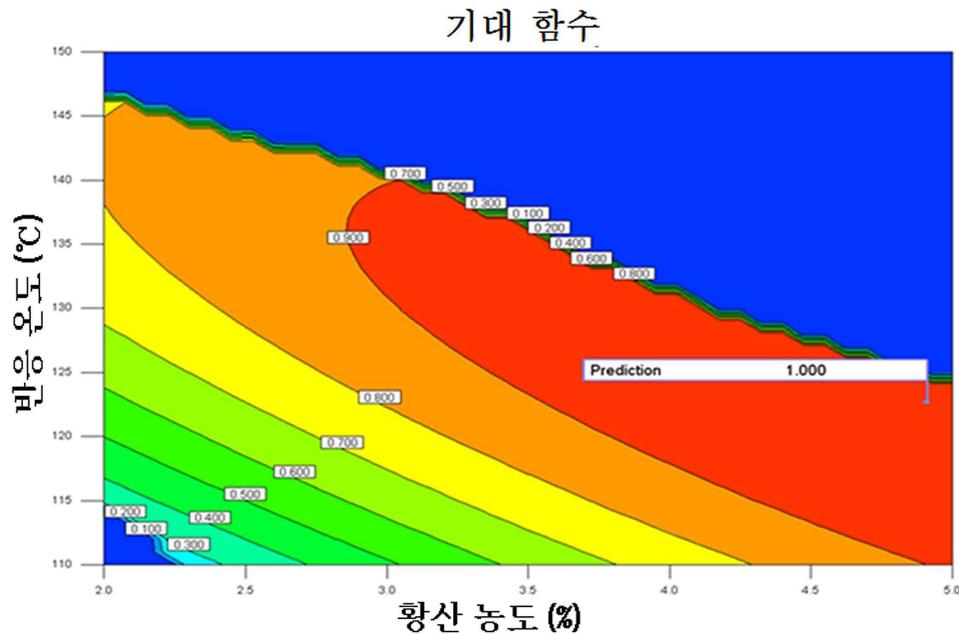
(54) 발명의 명칭 **올금 폐기물을 바이오매스로 하는 당의 생산 방법, 및 발효를 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법**

(57) 요약

본 발명은 올금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 바이오매스로 하는 당의 생산 방법, 및 발효를 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법에 관한 것으로, 올금 폐기물에 황산을 가해 고온에서 산 가수분해(acid hydrolysis)하여 올금 폐기물 가수분해물을 제조하는 당화(saccharification) 또는, 상기 올금 폐기물 가수분해물에 락토바실러스 속

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



(*Lactobacillus* sp.) 균주 또는 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)를 첨가하는 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정은 울금 폐기물 가수분해물 내의 초기 환원당의 농도를 최대로 함과 동시에, 가수분해 부산물의 농도는 최소화하여 발효 균주의 성장에 영향을 미치지 않아 고농도의 당, 젖산 또는 에탄올을 생산하므로, 상기 울금 폐기물 가수분해물은 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정을 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법에 효과적으로 적용하여 사용될 수 있다.

(72) 발명자

최경자

대전 유성구 엑스포로 448, 208동 1403호 (전민동, 엑스포아파트)

응우웬 마이 쑹

대전시 유성구 신성동 19

장경수

대전 유성구 장대로71번길 34, 107동 1003호 (장대동, 장대푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-1304-B0

부처명 산업기술연구회

연구관리전문기관 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 천연물 기반 그린바이오 작물보호소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

1) 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*) 200 g/l 에 황산을 3 내지 5% 농도로 첨가하고, 온도는 110 내지 150℃ 및 시간은 40 내지 65분 동안 산 가수분해(acid hydrolysis)하여 당을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물로서 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural) 1800 ml, 질소원으로서 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 대두박(soybean meal; SM), 옥수수 침전액(corn steep liquor; CSL), 쇠고기 추출물(beef extract), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 황산 암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 및 스킵밀크(skim milk)로 이루어진 균으로부터 하나 이상을 포함하고, 젖산(lactic acid) 발효 균주로서 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104) 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)를 첨가하여 pH 6.0, 34 내지 37℃ 및 60시간 동안 발효를 수행하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 산물에서 젖산을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법.

청구항 3

1) 울금 폐기물 200 g/l 에 황산을 3 내지 5% 농도로 첨가하고, 110 내지 150℃ 및 40 내지 65분 동안 산 가수분해하여 당을 생산하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물로서 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural), 질소원으로서 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 대두박(soybean meal; SM), 옥수수 침전액(corn steep liquor; CSL), 쇠고기 추출물(beef extract), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 황산 암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 및 스킵밀크(skim milk)로 이루어진 균으로부터 하나 이상을 포함하고 에탄올(ethanol) 발효 균주로서 사카로마이세스 세레비지아에 KCTC 7017(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7017)를 첨가하여 pH 6.2, 30℃ 및 60시간 동안 발효를 수행하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 산물에서 에탄올을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 에탄올의 생산 방법.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 단계 1)의 황산의 농도는 4.91%인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 5

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 단계 1)의 온도는 122.68℃인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 6

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 단계 1)의 시간은 59.23분인 것을 특징으로 하는 생산 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 바이오매스로 하는 당의 최적 생산 방법, 및 발효를 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 울금은 땅속줄기(rhizomatous) 또는 초본(herbaceous) 식물작물로서, 식물학적으로 커큐마 롱가(*Curcuma longa*)로도 불린다. 울금의 뿌리줄기(rhizomes) 또는 지하경(underground stems)은 고대(antiquity)부터 조미료(condiments), 염색료 및 다양한 의학 분야에서 방향성 흥분제(aromatic stimulant)로 사용되어 왔다. 또한, 울금은 인도 및 동남아시아에서 매우 중요한 향신료로 사용된다. 2007년 인도에서 생산된 울금의 양은 약 900,000 톤으로, 세계 울금 생산량의 78%가 인도에서 생산되며, 이는 세계 수출액 비율의 60%를 차지하는 것으로 보고된다.

[0003] 울금의 조성에서, 다가페놀 색소(polyphenolic pigments)인 커큐미노이드(Curcuminoid)는 울금의 조성 중 2 내지 8%를 차지하며, 울금 내의 천연 커큐미노이드는 인간에서 항산화(antioxidant), 항관절염(antiarthritic), 항돌연변이(antimutagenic), 항종양(antitumor), 항-종양 촉진(anti-tumor promotion), 항혈전(fantithrombotic), 해독(antivenom), 항세균(antibacterial), 항진균(antifungal), 항바이러스(antiviral), 살선충(nematocidal), 최담약(choleretic) 및 항-간독성(anti-hepatotoxic) 활성과 같은 다양한 생리학적 활성을 나타내는 것으로 보고된 바 있다(Prasad and Aggarwal, 2011).

[0004] 울금 폐기물은 커큐미노이드 생산 공정에서 발생하는 부산물이며, 전분을 주로 포함하는, 높은 다당류 조성을 함유하고 있다. 커큐미노이드 분리 공정에서, 올레오레진(oleoresin)은 아세톤(acetone), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 클로로포름(chloroform), 메탄올(methanol) 또는 에탄올(ethanol)과 같은 유기용매 또는 10% 에탄올이 포함된 초임계(supercritical) 이산화탄소에 의해서 추출된다. 총 추출 수율은 용매, 바이오매스(material) 및 분리 조건에 따라 15.45 내지 21.55%(g 추출물/g 바이오매스)이며, 폐기 폐기물은 78.45 내지 84.55% (w/w)이다(Revathy et al., 2011). 울금은 60 내지 70% 탄수화물, 2 내지 7% 섬유질, 3 내지 7% 무기물 질 및 6 내지 8% 단백질로 구성되며, 이는 커큐미노이드 추출 공정 후 폐기물에 남아있게 된다(Balakrishnan, 2007).

[0005] 현재 사용되고 있는 에탄올 및 젖산은 일반적으로 당 또는 전분-기반의 원재료로부터 일차적으로 생산된다. 전 세계적으로 늘어나는 식량 수요에 따라 증가하는 작물 재배지에 대한 면적 수요에 관계없이 미래 에너지 및 화학적 자원으로서 효과적으로 사용될 수 있는 농공업 잔유물로부터 에탄올 및 젖산의 대규모 생산이 요구되고 있

다(Abdel-Rahman et al., 2011, 2013; Gallezot, 2011).

[0006] 농산업 잔유물에 존재하는 탄수화물이 발효당으로 사용되기 위하여는 산 또는 효소 촉매를 통한 가수분해 과정이 필요하다. 상기 가수분해를 통해 생산된 가수분해물은 생물공학 산물을 생산하기 위한 발효 공정의 기질로서 사용될 수 있다. 효소 촉매를 이용한 가수분해와 비교하여, 산 가수분해는 젤라틴화 공정(gelatinization step)이 요구되지 않고 짧은 반응 시간 내에 반응이 종결되며, 고가의 효소보다 저렴한 단가의 산 촉매를 사용한다는 장점을 가진다.

[0007] 그러나, 산 가수분해의 고온 및 높은 산 농도 조건으로 인하여, 생산된 당은 퓨란(furan)으로부터 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural)과 같은 두 가지의 유도체로 분해되어 포도당 용액 내에 잔존할 수 있으며, 상기 부산물은 발효 공정 중에서 미생물의 성장에 대한 억제제(inhibitor)로 작용할 수 있다. 따라서, 산 가수분해를 통한 당화 과정은 발효 공정 전에 상기 부산물을 제거하기 위한 추가 공정이 요구되며(Guerra-Rodriguez et al., 2012), 이를 극복하기 위해 HMF 및 푸르푸랄의 생산을 최소화하면서 목적하는 당의 생산량을 최대로 수득하기 위한 가수분해 반응의 최적 조건에 대한 연구가 계속되고 있다.

[0008] 현재 산업적으로 발효 공정의 기질로 사용되기 위한 바이오매스로는 농산업용 잔여물(agroindustrial residues) 또는 밀짚(wheat straw), 목화 줄기(cotton stalk), 사탕수수 바가스(sugarcane Bagasse), 옥수수 대(corn stover), 옥수수 이삭(corn cob), 쌀겨(rice bran), 스위츠 글라스(switch grass), 견목 줄기(hardwoods stems), 연목 줄기(softwood stems) 및 녹조류(green microalga)와 같은 리그노셀룰로오스 바이오매스(lignocellulosic biomass)가 있으나, 상기 바이오매스는 주로 탄수화물 중합체(셀룰로오스, 헤미셀룰로오스) 및 리그닌(lignin)과 같은 방향족 중합체로 구성되어 있어, 화학 및 생물학적 가수 분해로 인한 환원당으로의 분해가 어렵거나 분해된 후 미생물에 의한 발효 기질로 사용되기 어렵다는 단점을 가진다(Mosier et al., 2005; Okano et al., 2010).

[0009] 이와 달리, 울금 잔유물의 탄수화물은 높은 전분 함유량을 나타냄과 동시에 낮은 섬유질(fiber) 또는 리그닌-조성을 포함하므로, 이를 이용한 당화(saccharification) 및 추후 발효(fermentation)를 통한 에탄올(ethanol), 젖산(lactic acid) 및 숙신산(succinic acid)과 같은 최종-산물의 생산이 가능할 뿐만 아니라, 헤미셀룰로오스 및 리그닌을 제거하는 전처리 과정이 요구되지 않아 에탄올 및 젖산의 대규모 생산을 위한 바이오매스로서 기대되고 있다.

[0010] 따라서, 본 발명자들은 울금 폐기물로부터 젖산 및 에탄올을 효율적으로 생산하는 공정을 개발하기 위해 노력한 결과, 울금 폐기물에 고온에서 황산을 가해 당화하는 산 가수분해의 최적 조건을 확인하였으며, 상기 최적 조건을 통해 수득한 울금 폐기물 가수분해물에 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104), 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600) 또는 사카로마이세스 세레비시아에 KCTC 7017(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7017)를 첨가하여 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정을 수행한 결과, 상기 분리 당화 및 발효를 통해 울금 폐기물로부터 L-젖산, D-젖산 또는 에탄올을 효과적으로 생산할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 바이오매스로 하는 당의 최적 생산 방법, 및 발효를 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0013] 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 산 가수분해(acid hydrolysis)하여 당화(saccharification)하는 단계를

포함하는 울금 폐기물로부터 당의 생산 방법을 제공한다.

- [0014] 또한, 본 발명은
- [0015] 1) 울금 폐기물을 산 가수분해하여 당을 생산하는 단계;
- [0016] 2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물, 질소원 및 젖산(lactic acid) 발효 균주를 첨가하여 발효를 수행하는 단계;
- [0017] 3) 상기 단계 2)의 산물에서 젖산을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.
- [0018] 아울러, 본 발명은
- [0019] 1) 울금 폐기물을 산 가수분해하여 당을 생산하는 단계;
- [0020] 2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물, 질소원 및 에탄올(ethanol) 발효 균주를 첨가하여 발효를 수행하는 단계;
- [0021] 3) 상기 단계 2)의 산물에서 에탄올을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 에탄올의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 울금 폐기물에 황산을 가해 고온에서 산 가수분해를 하여 울금 폐기물 가수분해물을 제조하는 당화(saccharification) 또는, 상기 울금 폐기물 가수분해물에 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.) 균주 또는 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)를 첨가하는 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정은 울금 폐기물로부터 고농도의 당, 젖산 또는 에탄올을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)의 산 가수분해 조건을 최적화하기 위해 환원당 수율(reducing sugar yield)에 대한 독립 변수(independent variables)가 미치는 효과를 확인한 반응표면곡선(Response surfaces plot)을 나타낸다;
- 도 1a는 황산(sulfuric acid)의 농도 및 반응 온도의 효과를 나타내며;
- 도 1b는 황산의 농도 및 반응 시간의 효과를 나타내고; 및
- 도 1c는 반응 온도 및 반응 시간의 효과를 나타낸다.
- 도 2은 울금 폐기물의 산 가수분해 조건을 최적화하기 위해 산 가수분해 부산물의 농도에 대한 독립 변수가 미치는 효과를 확인한 반응표면곡선을 나타낸다;
- 도 2a는 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF)의 생산에 대한 황산의 농도 및 반응 온도의 효과를 나타내며; 및
- 도 2b는 푸르푸랄(furfural)의 생산에 대한 황산의 농도 및 반응 온도의 효과를 나타낸다.
- 도 3은 환원당 수율의 최대화(maximization), 및 HMF 및 푸르푸랄 농도를 각각 4 g/l 및 1 g/l로 설정한 기대함수(Desirability function)의 등고선도(contour plots)를 나타낸다.
- 도 4는 최적 조건에서 울금 폐기물의 산 가수분해를 통한 당 생산의 확인을 나타낸다.
- 도 5는 울금 폐기물 가수분해물로부터 L-젖산을 생산하기 위한 발효 공정을 나타낸다;
- 도 5a는 울금 폐기물 가수분해물로부터 L-젖산을 생산하기 위한 발효 공정에서 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104)의 성장곡선 및 L-젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 보이는 그래프를 나타내며; 및
- 도 5b는 울금 폐기물 가수분해물로부터 L. 파라카제이 LA104를 통한 발효의 L-젖산 생산 효과를 보이는 그래프

를 나타낸다.

도 6은 울금 폐기물 가수분해물로부터 D-젖산을 생산하기 위한 발효 공정을 나타낸다;

도 6a는 울금 폐기물 가수분해물로부터 D-젖산을 생산하기 위한 발효 공정에서 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600)의 성장곡선 및 D-젖산의 광학적 순수도를 보이는 그래프를 나타내며; 및

도 6b는 울금 폐기물 가수분해물로부터 L. 코리니포르미스 ATCC25600를 통한 발효의 D-젖산 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

도 7은 울금 폐기물 가수분해물로부터 에탄올을 생산하기 위한 발효 공정을 나타낸다;

도 7a는 울금 폐기물 가수분해물로부터 에탄올을 생산하기 위한 발효 공정에서 사카로마이세스 세레비지아에 KCTC 7017(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7017)의 성장곡선, 에탄올 수율 및 환원당 전환율을 보이는 그래프를 나타내며; 및

도 7b는 울금 폐기물 가수분해물로부터 S. 세레비지아에 KCTC 7017을 통한 발효의 에탄올 생산 효과를 보이는 그래프를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025]

본 발명은 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*)을 산 가수분해(acid hydrolysis)하여 당화(saccharification)하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 당의 생산 방법을 제공한다.

[0026]

또한, 본 발명은

[0027]

1) 울금 폐기물을 산 가수분해하여 당을 생산하는 단계;

[0028]

2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물, 질소원 및 젖산(lactic acid) 발효 균주를 첨가하여 발효를 수행하는 단계;

[0029]

3) 상기 단계 2)의 산물에서 젖산을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 젖산의 생산 방법을 제공한다.

[0030]

아울러, 본 발명은

[0031]

1) 울금 폐기물을 산 가수분해하여 당을 생산하는 단계;

[0032]

2) 상기 단계 1)의 산 가수분해한 울금 폐기물 가수분해물, 질소원 및 에탄올(ethanol) 발효 균주를 첨가하여 발효를 수행하는 단계;

[0033]

3) 상기 단계 2)의 산물에서 에탄올을 수득하는 단계를 포함하는 울금 폐기물로부터 에탄올의 생산 방법을 제공한다.

[0034]

상기 산은 황산, 질산 및 염산과 같은 균일계 무기산, 또는 앰버리스트(Amberlyst), 나피온(Nafion), 다우엑스(Dowex), 나피온-실리카 복합물(Nafion-Silica Composite) 및 제올라이트(Zeolite)와 같은 불균일계 무기산을 포함하는 당업계에 산 가수분해의 촉매로 공지된 모든 산촉매인 것이 바람직하고, 구체적으로는 황산, 질산 및 염산과 같은 균일계 무기산인 것이 더욱 바람직하며, 보다 구체적으로는 황산인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0035]

상기 산은 반응 조성의 2 내지 7%(v/v)로 포함되는 것이 바람직하고, 구체적으로 3 내지 5%(v/v)로 포함되는 것이 더욱 바람직하며, 보다 구체적으로 4.91%(v/v)로 포함되는 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 산 가수분해의 촉매에 있어서, 2%(v/v) 미만 황산 농도에서는 가수분해 촉매가 잘 나타나지 않으며, 7%(v/v) 초과 황산 농도에서는 생산된 환원당이 강한 산성 환경에서 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 또는 푸르푸랄(furfural)로 분해되며, 상기 분해된 HMF는 다시 분해되어 포름산

(formic acid) 및 레블린산(levulinic acid)을 형성하여 환원당의 수율이 감소하므로 효과적이지 않다.

- [0036] 상기 산 가수분해의 반응 온도는 90 내지 170℃인 것이 바람직하고, 구체적으로 110 내지 150℃인 것이 더욱 바람직하며, 보다 구체적으로 122.68℃인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 산 가수분해의 반응 온도에 있어서, 90℃ 미만의 온도에서는 산 가수분해가 잘 촉매되지 않으며, 170℃ 초과인 높은 온도에서는 강한 산성 환경과 더불어 생산된 환원당이 HMF 또는 푸르푸랄로 분해되며, 상기 분해된 HMF는 다시 분해되어 포름산 및 레블린산을 형성하여 환원당의 수율이 감소하므로 효과적이지 않다.
- [0037] 상기 산 가수분해의 반응 시간은 20 내지 120 분인 것이 바람직하고, 구체적으로 40 내지 65 분인 것이 더욱 바람직하며, 보다 구체적으로 59.23 분인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 산 가수분해의 반응 시간에 있어서, 낮은 산 농도에서 산 가수분해의 반응 시간은 증가될 수 있으나, 높은 산 농도에서 산 가수분해의 반응 시간은 감소하는 것이 바람직하며, 구체적으로 본 발명의 산 농도 및 반응 온도의 조건일 때, 20 분 미만의 반응 시간에서는 충분한 산 가수분해가 이루어지지 않으며, 120 분 초과인 반응 시간에서는 생산된 환원당의 불안정을 야기하므로 효과적이지 않다.
- [0038] 상기 산 가수분해에서 생산되는 부산물은 약산(weak acids), 퓨란 유도체(furan derivatives) 또는 페놀 화합물(phenol compounds)일 수 있으며, 구체적으로 퓨란 유도체일 수 있으며, 더욱 구체적으로는 HMF 또는 푸르푸랄일 수 있다. 본 발명의 울금 폐기물은 바이오 매스 내에 리그닌(lignin)이 없거나 매우 낮은 함량 수준을 나타내므로, 상기 울금 폐기물의 산 가수분해물에서 HMF 또는 푸르푸랄의 가수분해 부산물이 생성될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 울금으로부터 커큐미노이드(curcuminoid)를 추출한 후의 부산물인 울금 폐기물을 수득한 다음, 상기 울금 폐기물을 산 가수분해하는 최적 조건을 확인하기 위하여 황산의 농도, 반응 온도 및 반응 시간을 3 개의 독립변수로 하여 17 가지의 조건에서 산 가수분해를 수행한 후, 중심 합성 계획법(central composite design, CCD) 및 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)을 수행하여 분석한 결과, 3.5%(v/v) 황산 농도, 130℃ 반응 온도 및 107.040 분 반응 시간의 조건에서 최대 환원당(reducing sugar) 수율을 나타내는 것을 확인하였다(표 1 내지 표 4 참조).
- [0040] 또한, 본 발명자들은 최대의 환원당 수율을 수득함과 동시에 산 가수분해의 부산물인 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural)의 농도를 최소화하는 최적의 산 가수분해 조건을 확인하기 위하여 반응 표면 분석(response surface methodology, RSM)을 수행한 결과, 황산의 농도 및 반응 온도는 중간 수준의 온도에서 높은 황산 농도의 조건일 때 환원당의 수율이 증가하며(도 1 참조), 높은 황산의 농도 및 반응 온도에서 푸르푸랄의 농도가 상승하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0041] 또한, 본 발명자들은 최대의 환원당 수율을 수득함과 동시에 산 가수분해의 부산물인 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural)의 농도를 최소화하는 최적의 산 가수분해 조건을 확인하기 위하여 기대 함수의 등고선도(contour plots)를 확인한 결과, 울금 폐기물의 산 가수분해 반응에 대한 최적의 조건으로 4.91%의 황산 농도, 122.68℃의 반응 온도 및 59.23 분의 반응 시간을 선정하였다(도 3 참조). 상기 선정한 조건에서 실제로 반응을 수행한 결과, 최종 환원당 수율, HMF 농도 및 푸르푸랄 농도는 각각 72.43%, 2.59 g/l 및 0.79 g/l 인 것을 확인하였다(도 4 참조).
- [0042] 따라서, 본 발명의 울금 폐기물 산 가수분해에서 산 촉매로서 4.91%의 황산을 포함하는 조성을 122.68℃의 반응 온도에서 59.23 분 동안 반응하여 울금 폐기물 가수분해물을 제조하였을 때 높은 환원당 수율과 동시에 부산물인 HMF 및 푸르푸랄의 낮은 생산량을 나타내므로, 상기 울금 폐기물 가수분해물은 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 당의 생산 방법, 및 발효를 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법에 적용하여 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 상기 젖산 발효 균주는 락토코커스속(*Lactococcus* sp.), 락토바실러스속(*Lactobacillus* sp.), 스트렙토코커스속(*Streptococcus* sp.), 류코노스톡속(*Leuconostoc* sp.), 페디오코커스속(*Pediococcus* sp.), 에로코커스속(*Aerococcus* sp.), 카노박테리움속(*Carnobacterium* sp.), 엔테로코커스속(*Enterococcus* sp.), 오에노코커스속(*Oenococcus* sp.), 테트라제노코커스속(*Tetragenococcus* sp.), 바고코커스속(*Vagococcus* sp.), 와이셀라속(*Weissella* sp.) 및 리조푸스속(*Rhizopus* sp.)을 포함하는 당업계 발효를 통하여 젖산을 생산하는 것으로 공지된 모든 균주인 것이 바람직하고, 락토바실러스속 균주인 것이 보다 바람직하며, 구체적으로 락토바실러스 파리카제이 LA104 또는 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0044] 상기 에탄올 발효 균주는 사카로마이세스속(*Saccharomyces* sp.), 클루이베로마이세스속(*Kluyveromyces* sp.), 캔디다속(*Candida* sp.), 디베리오마이세스속(*Debaryomyces* sp.), 한세놀라속(*Hansenula* sp.), 피키아속(*Pichia* sp.), 스킴조사카로마이세스속(*Schizosaccharomyces* sp.), 야로이야속(*Yarrowia* sp.), 사카로마이콕시스속(*Saccharomyopsis* sp.), 슈완니오마이세스속(*Schwanniomyces* sp.) 및 아르술라속(*Arxula* sp.)을 포함하는 당 업계에 발효를 통하여 에탄올을 생산하는 것으로 공지된 모든 균주인 것이 바람직하고, 구체적으로 사카로마이세스속 균주인 것이 더욱 바람직하며, 보다 구체적으로 사카로마이세스 세레비지아에 KCTC 7017(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7017)인 것이 가장 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 질소원으로 효모 추출물(yeast extract), 펩톤(peptone), 대두박(soybean meal; SM), 옥수수 침전액(corn steep liquor; CSL), 쇠고기 추출물(beef extract), 카제인 가수분해물(casein hydrolysate), 황산 암모늄(ammonium sulfate), 요소(urea), 엿기름(malt sprouts) 및 스킴밀크(skim milk)로 이루어진 균으로부터 하나 또는 그 이상을 포함하는 것이 바람직하며, 구체적으로 효모 추출물 및 펩톤 중 어느 하나 또는 둘 다를 포함하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 또다른 구체적인 실시예에 있어서, 본 발명자들은 최적화된 조건 하에서 제조한 울금 폐기물 산 가수분해물로부터 젖산을 생산하기 위하여, 배지에 상기 울금 폐기물 산 가수분해물, 질소원을 L. 파라카제이 LA104 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주와 함께 첨가하여 발효 공정을 수행한 결과, 초기 배지 내의 HMF 및 푸르푸탈에 의한 균주의 성장 및 젖산의 발효가 지연 이후로부터 효과적인 젖산의 생산이 유도되어(도 5a 및 도 6a 참조), 발효 개시 후 40 시간 후에 L. 파라카제이 LA 104 균주는 115.36 g/l의 L-젖산을 생산하여 시간당 2.88 g/l의 L-젖산 생산성을 나타내며(도 5b 참조), 발효 개시 후 44 시간 후에 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 113.92 g/l의 D-젖산을 생산하여 시간당 2.59 g/l의 D-젖산 생산성을 나타내는 것을 확인하였다(도 6b 참조).
- [0047] 또한, 본 발명자들은 최적화된 조건 하에서 제조한 울금 폐기물 산 가수분해물로부터 에탄올을 생산하기 위하여, 배지에 상기 울금 폐기물 산 가수분해물, 질소원을 S. 세레비지아에 KCTC 7017 균주와 함께 첨가하여 발효 공정을 수행한 결과, 초기 배지 내의 HMF 및 푸르푸탈에 상기 균주가 적응하여 탈독 단계를 거치지 않고 균주의 성장 및 에탄올의 발효가 개시되었으며(도 7a 참조), 발효 개시 후 40 시간 후의 배지 내 생성된 에탄올의 농도, 에탄올 수율, 에탄올 생산성 및 환원당 전환율은 각각 55.03 g/l, 30.27%, 시간당 1.38 g/l 및 42.79%를 나타내는 것을 확인하였다(도 7b 참조).
- [0048] 따라서, 본 발명의 울금 폐기물 산 가수분해에서 산 촉매로서 4.91%의 황산을 포함하는 조성을 122.68℃의 반응 온도에서 59.23 분 동안 반응하여 제조한 울금 폐기물 가수분해물을 젖산 또는 에탄올 발효 균주에 첨가하여 발효 공정을 수행하였을 때 높은 젖산 및 에탄올의 수율 및 생산성을 나타내므로, 상기 울금 폐기물 가수분해물은 울금 폐기물을 바이오매스로 하는 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정을 통한 젖산 및 에탄올의 생산 방법에 적용하여 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0050] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0051] <실시예 1> 울금 폐기물(waste *Curcuma longa*; WCL)의 제조
- [0052] 본 발명에서 젖산(lactic acid) 또는 에탄올(ethanol)을 생산하기 위한 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정의 바이오매스로 사용하기 위해, 커큐미노이드(curcuminoid) 생산의 부산물(by-product)인 울금 폐기물을 제조하였다.
- [0053] 구체적으로, 약 1200 톤 재료물질/연 크기의 커큐미노이드 추출물 발효조(pilot)(베트남 공업대학 식물화학과, 하노이, 베트남)에 총 1000 kg의 울금 분말(turmeric powder)과 함께 에틸 아세테이트(ethyl acetate)를 첨가하고, 환류식 장치(reflux apparatus)를 이용해 8 시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 에틸 아세테이트 층을 수득하여 커큐미노이드를 결정화 및 정제하였고, 울금 폐기물은 2.5 기압의 수증기를 이용해 에틸 아세테이트를 제거한 후 2 일간 햇빛에서 건조하여 수득하였으며, 사용 전까지 비닐팩에 담아 4℃에서 보관하였다.

[0054] <실시예 2> 울금 폐기물의 산 가수분해(acid hydrolysis)를 위한 최적 조건의 확인

[0055] <2-1> 울금 폐기물의 산 가수분해 조건 최적화

[0056] 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젓산 또는 에탄올을 생산하는 SHF 공정에서 울금 폐기물을 산 가수분해하기 위한 최적 조건을 확인하기 위하여, 중심 합성 계획법(central composite design, CCD) 및 분산분석(Analysis of variance, ANOVA)을 수행하였다.

[0057] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 수득한 울금 폐기물을 M20 유니버설 밀(M20 Universal mill; 제품 번호: IKA160360X, IKA 사, 독일)로 갈아 200 g/l 수준으로 제조한 후, 50 ml 병에 상기 제조한 시료 30 ml를 첨가하여 와이즈서큐 퍼지 조절 시스템(Wisecircu fuzzy control system)에서 산 가수분해를 수행하였다. 모든 실험디자인 및 반응 조건은 하기 [표 1]과 같다. 반응 후, 반응 조성을 수득하여 탄산칼슘(CaCO₃)을 첨가하여 중화하고, 8000 rpm에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 수득하였고, 2 μm 멤브레인 필터로 여과한 다음, 공지된 방법에 따라 상기 상층액에 포함된 환원당(reducing sugar, RS)의 농도를 측정하여 하기 [수학식 1]을 사용하여 환원당의 수율(yield)을 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012). 생성된 5-하이드록시메틸푸르푸랄(5-hydroxymethylfurfural, HMF) 및 푸르푸랄(furfural)의 농도는 상기 상층액을 스페리소브 C18 컬럼(Sphaerisorb C18 column, 250 mm×4.6 mm, 입자 크기 5 μm; 밀리포어 사, 미국) 및 다이오드 분석 검출기(diode array detector)를 장착한 워터스 996 PDA 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Waters 996 PDA HPLC system, 워터스 사, 미국)에 주입하여 HPLC 분석을 수행하여 확인하였다. HPLC 분석을 위한 이동상 용매로 100% 물(용매 A) 및 100% 메탄올(methanol, 용매 B)를 하기와 같은 선형 기울기 농도구배(linear gradient) 조건에서 0.6 ml/분의 유속으로 사용하였다; 0 내지 10 분: 2 내지 25% 용매 B; 10 내지 15 분: 25 내지 60% 용매 B; 15 내지 20 분: 60 내지 100% 용매 B; 및 20 내지 30 분: 100% 용매 B. HPLC 분석 후, 머무름 시간(retention time)이 16.5 분 및 20.5 분의 피크(peak) 면적으로 HMF 및 푸르푸랄의 농도를 정량 분석하였다. 모든 실험은 동일한 과정을 3 회 반복 수행하였으며, 평균값을 분석에 사용하였다.

[0058] 산 가수분해 조건을 최적화하기 위한 3 개의 독립변수(independent variable)로 산의 농도(% , v/v), 반응 온도(°C) 및 반응 시간(분)을 선정하고, 소프트웨어 디자인-엑스퍼트(software Design-expert, 버전 8.0.7.1; 스탠-이즈 사, 미국)을 사용하여 하기 [표 1]와 같이 5 개의 수준에 따라서 입력값을 부여하고 17 가지의 조건에서 각각 산 가수분해를 수행하는 중심 합성 계획법을 수행하였다. 측정된 값은 하기 [수학식 2]로 나타나는 2차 다항식을 사용하여 종속변수 및 독립변수 사이의 상관관계를 확인하였고, 반응함수(response fuction)를 사용하여 ANOVA 분석을 수행하였다.

【표 1】

울금 폐기물의 산 가수분해를 위한 독립 변수 및 종속 변수에 대한 중심 합성 설계

실험 번호 (Run order)	독립 변수(independent variables)*						종속 변수(dependent variables)**					
	코드 변수(Code variables)			실제 변수(Actual variables)			실제 값(Actual value)			예상 값(Predicted value)		
	X ₁	X ₂	X ₃	S	T	T	Y	H	F	Y	H	F
1	-1.000	-1.000	-1.000	2.00	110.00	40.00	23.76	0.20	0.07	24.39	-0.19	0.23
2	1.000	-1.000	-1.000	5.00	110.00	40.00	62.48	1.22	0.25	62.71	1.70	0.22
3	-1.000	1.000	-1.000	2.00	150.00	40.00	59.17	3.21	0.64	59.01	3.83	0.63
4	1.000	1.000	-1.000	5.00	150.00	40.00	51.02	5.42	2.45	51.01	5.88	2.31
5	-1.000	-1.000	1.000	2.00	110.00	90.00	33.83	0.34	0.14	36.09	0.40	0.31
6	1.000	-1.000	1.000	5.00	110.00	90.00	65.65	2.17	0.52	68.05	2.07	0.56
7	-1.000	1.000	1.000	2.00	150.00	90.00	53.35	5.95	0.98	55.35	6.00	1.04
8	1.000	1.000	1.000	5.00	150.00	90.00	39.38	6.91	3.12	41.00	7.82	2.98
9	-1.682	0.000	0.000	0.98	130.00	65.00	46.91	0.53	0.43	45.18	0.59	0.21
10	1.682	0.000	0.000	6.02	130.00	65.00	66.78	4.50	1.86	65.34	3.71	1.83
11	0.000	-1.682	0.000	3.50	96.36	65.00	31.46	0.19	0.06	29.26	0.41	-0.13
12	0.000	1.682	0.000	3.50	163.64	65.00	36.59	9.59	2.10	35.62	8.63	2.24
13	0.000	0.000	-1.682	3.50	130.00	22.96	63.13	2.96	0.65	63.80	2.52	0.68
14	0.000	0.000	1.682	3.50	130.00	107.04	69.07	4.93	1.37	65.22	4.64	1.31
15	0.000	0.000	0.000	3.50	130.00	65.00	68.16	3.02	0.76	67.82	3.10	0.82
16	0.000	0.000	0.000	3.50	130.00	65.00	67.78	3.33	0.92	67.82	3.10	0.82
17	0.000	0.000	0.000	3.50	130.00	65.00	66.97	2.82	0.77	67.82	3.10	0.82

[0059] * S: 황산 농도(% , v/v); T: 반응 온도(°C); 및 M: 반응 시간(분).

[0060]

[0061] ** Y: 환원당 수율(%); H: HMF 농도(g/l); 및 F: 푸르푸랄 농도(g/l).

수학식 1

[0062]
$$\text{환원당 수율(\%)} = \frac{\text{반응 조성 내의 환원당 농도(g)}}{\text{초기 울금 폐기물 농도(g)}} \times 100$$

수학식 2

[0063]
$$Y = a_0 + \sum a_i X_i + \sum a_{ij} X_i X_j + \sum a_{ii} X_i^2$$

[0064] Y: 종속 변수인 예상 반응 값(predicted response); a_0 : 오프셋 용어(off set term, 상수); a_i : 선형 계수(linear coefficients); $a_{ij}(i \neq j)$: 교차 산물 계수(cross product coefficients); a_{ii} : 이차 계수(quadratic coefficients); 및 X_i : 독립 변수를 나타낸다.

[0065] 그 결과, 하기 [수학식 3] 내지 [수학식 5], 상기 [표 1] 및 하기 [표 2] 내지 [표 4]에서 나타난 바와 같이 당 수율, HMF 생산 농도 및 푸르푸랄 생산 농도를 예상하는 2차 다항식(second order polynomial)을 [수학식 3] 내지 [수학식 5]로 확인하였다(수학식 3 내지 수학식 5).

수학식 3

[0066]
$$\text{환원당 수율(\%)} = 67.82 + 5.99 X_1 + 1.89 X_2 + 0.42 X_3 - 11.58 X_1 X_2 - 1.59 X_1 X_3 - 3.84 X_2 X_3 - 4.44 X_1^2 - 12.51 X_2^2 - 1.17 X_3^2$$

수학식 4

[0067]
$$\text{HMF 농도} = 3.10 + 0.93 X_1 + 2.44 X_2 + 0.63 X_3 + 0.040 X_1 X_2 - 0.055 X_1 X_3 + 0.39 X_2 X_3 - 0.34 X_1^2 + 0.50 X_2^2 + 0.17 X_3^2$$

수학식 5

[0068]
$$\text{푸르푸랄 농도} = 0.82 + 0.48 X_1 + 0.70 X_2 + 0.19 X_3 + 0.42 X_1 X_2 + 0.065 X_1 X_3 + 0.082 X_2 X_3 + 0.071 X_1^2 + 0.085 X_2^2 + 0.061 X_3^2$$

[0069] 또한, 울금 폐기물의 산 가수분해를 위한 3 개의 독립변수에 대한 17 가지의 조건 중 3.5%(v/v) 황산 농도, 130 °C 반응 온도 및 107.040 분 반응 시간의 조건인 14 번 실험에서 가장 높은 환원당 수율을 취득하는 것을 확인하였다(표 1). X_1 및 X_2 독립 변수인 황산 농도 및 반응 온도는 강하게 양성의 선형 효과(linear effect)를 나타내나, X_3 독립 변수인 반응 시간은 선형 효과를 나타내지 않으므로 환원당의 수율에 대해 황산의 농도 및 반응 온도가 직접적인 영향을 나타내는 것을 확인하였다.

[0070] 아울러, 2차 회귀모델(quadratic regression model)의 ANOVA 분석에서 환원당 수율에 대해 276.7646의 F-값을 나타내고, P-값 > F-값이 0.0001로서 매우 높은 유의성을 나타내는 것을 확인하였다(표 2 내지 4). 상기 회귀 모델의 결정 계수(coefficient of determination, R^2)는 0.9838로, 이는 산 가수분해 반응 내에서 변화의 98.38%가 상기 모델에 의한 결과임을 확인하였으며, 결정 계수 및 예상되는 결정 계수가 보정 결정 계수와 근접하여 상기 모델에서 예측한 예상값 및 실제 값은 유의적인 관계를 나타내는 것을 확인하였다(표 2 내지 표 4).

표 2

[0071]

종속변수인 환원당 수율에 대한 ANOVA 분석

자료 (Source)	계수 추정 (Coefficient estimate)	표준 오차 (Standard error)	제곱 합 (Sum of squares)	자유도 (Degree of Freedom; df)	평균 제곱 (Mean Squares)	F-값 (F-Value)	p-값 (p-Value)
절편	67.82	0.69	10853.770000	9	1205.974000	276.764600	< 0.0001
X ₁	5.99	0.33	1471.202000	1	1471.202000	337.632900	< 0.0001
X ₂	1.89	0.33	146.470500	1	146.470500	33.614170	< 0.0001
X ₃	0.42	0.33	7.284673	1	7.284673	1.671793	0.2033
X ₁ X ₂	-11.58	0.43	3218.777000	1	3218.777000	738.691800	< 0.0001
X ₁ X ₃	-1.59	0.43	60.674400	1	60.674400	13.924450	0.0006
X ₂ X ₃	-3.84	0.43	353.740800	1	353.740800	81.181600	< 0.0001
X ₁ ²	-4.44	0.36	666.718600	1	666.718600	153.008300	< 0.0001
X ₂ ²	-12.51	0.36	5290.755000	1	5290.755000	1214.200000	< 0.0001
X ₃ ²	-1.17	0.36	46.127560	1	46.127560	10.586020	0.0023
잔차 (Residual)			178.650000	41	4.360000		
적합성 결여 (Lack of Fit)			132.520000	5	26.503990	20.682240	< 0.0001
순수 오차 (Pure error)			46.130000	36	1.280000		
수정된 총값 (Corrected total)			11032.420000	50			

표준 유도(Standard derivation): 2.09;
 결정 계수(R-squared): 0.9838; 보정 결정 계수(adjusted R-squared): 0.9803;
 예상되는 결정 계수(predicted R-squared) 0.9741; 및 적절 정밀도(adequate precision): 47.243.

표 3

[0072]

종속변수인 HMF 농도에 대한 ANOVA 분석

자료	계수 추정	표준 오차	제곱 합	자유도	평균 제곱	F-값	p-값
절편	3.10	0.20	318.3246	9	35.369400	96.269230	< 0.0001
X ₁	0.93	0.09	35.3300	1	35.331160	96.165150	< 0.0001
X ₂	2.44	0.09	244.8900	1	244.893600	666.557100	< 0.0001
X ₃	0.63	0.09	16.3800	1	16.380830	44.585720	< 0.0001
X ₁ X ₂	0.04	0.12	0.0400	1	0.037604	0.102352	0.7507
X ₁ X ₃	-0.05	0.12	0.0700	1	0.071504	0.194622	0.6614
X ₂ X ₃	0.39	0.12	3.7200	1	3.720938	10.127730	0.0028
X ₁ ²	-0.34	0.10	3.8100	1	3.807866	10.364340	0.0025
X ₂ ²	0.50	0.10	8.5400	1	8.535583	23.232350	< 0.0001
X ₃ ²	0.17	0.10	0.9700	1	0.971043	2.643007	0.1117
잔차			15.0600	41	0.367401		

적합성 결여			11.0828	5	2.216567	20.046330	< 0.0001
순수 오차			3.9806	36	0.110572		
수정된 총값			333.3880	50			
표준 유도: 0.61; 결정 계수: 0.9548; 보정 결정 계수: 0.9449; 예상되는 결정 계수 0.9291; 및 적절 정밀도: 32.874.							

표 4

중속변수인 푸르푸랄 농도에 대한 ANOVA 분석

자료	계수 측정	표준 오차	제공 합	자유도	평균 제공	F-값	p-값
절편	0.82	0.06	36.170540	9	4.018949371	126.812600	< 0.0001
X ₁	0.48	0.03	9.474507	1	9.474507022	298.955500	< 0.0001
X ₂	0.70	0.03	20.341810	1	20.341811910	641.858900	< 0.0001
X ₃	0.19	0.03	1.431950	1	1.431949915	45.183280	< 0.0001
X ₁ X ₂	0.42	0.04	4.309538	1	4.309537500	135.981700	< 0.0001
X ₁ X ₃	0.07	0.04	0.102704	1	0.102704167	3.240694	0.0792
X ₂ X ₃	0.08	0.04	0.161704	1	0.161704167	5.102360	0.0293
X ₁ ²	0.07	0.03	0.168614	1	0.168614163	5.320396	0.0262
X ₂ ²	0.09	0.03	0.246311	1	0.246310924	7.772014	0.0080
X ₃ ²	0.06	0.03	0.126592	1	0.126591736	3.994434	0.0523
잔차			1.299373	41	0.031692032		
적합성 결여			0.729684	5	0.145936883	9.222100	< 0.0001
순수 오차			0.569689	36	0.015824691		
수정된 총값			37.469920	50			
표준 유도: 0.18; 결정 계수: 0.9653; 보정 결정 계수: 0.9577; 예상되는 결정 계수 0.9495; 및 적절 정밀도: 39.382.							

[0073]

[0074]

<2-2> 울금 폐기물의 산 가수분해 조건의 관계 확인

[0075]

울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젖산 또는 에탄올을 생산하는 SHF 공정에서 울금 폐기물을 산 가수분해하기 위한 최적 조건을 확인하기 위하여, 울금 폐기물의 산 가수분해에서 환원당 수율에 대한 황산 농도, 반응 온도 및 반응 시간 사이의 관계를 분석하는 반응 표면 분석(response surface methodology, RSM)을 수행하여 최적의 조건을 확인하였다.

[0076]

구체적으로, 상기 실시예 <2-1>에서 취득한 중심 합성 계획법 및 ANOVA 분석의 결과를 소프트웨어 디자인-엑스퍼트(버전 8.0.7.1; 스탯-이즈 사, 미국)을 사용하여 반응표면도(response surface)를 구하여 환원당 수율, HMF 농도 및 푸르푸랄 농도에 대한 황산의 농도 및 반응 온도, 황산의 농도 및 반응 시간, 및 반응 온도 및 반응 시간 사이의 관계를 분석하였다. 또한, 소프트웨어 디자인-엑스퍼트(버전 8.0.7.1; 스탯-이즈 사, 미국)을 사용하여 최대 환원당 수율과 함께 4 g/l 이하의 HMF 농도 및 1 g/l 이하의 푸르푸랄 농도로 설정한 기대 함수(desirability function)의 등고선도(contour plots)를 구하였고, 상기 등고선도에서 울금 폐기물의 산 가수분해에서 최대 환원당 수율을 나타내면서 HMF 및 푸르푸랄이 낮게 생산되는 최적의 조건을 확인하였다.

[0077]

그 결과, 도 1 내지 도 3에서 나타내는 바와 같이 효과적인 환원당 수율을 취득하기 위하여 중간 수준의 온도(intermediate temperature)에서 높은 황산 농도의 조건을 선호하나, 온도가 상승함에 따라 환원당의 수율이 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였으며(도 1A), 황산의 농도가 낮을 때 긴 반응 시간을 선호하나, 황산의 농도가 상승함에 따라 가수분해 반응 조성 내의 수소 이온 활성이 증가되어 짧은 반응 시간에서 효과적인 환원

당 수율을 수득할 수 있음을 확인하였고(도 1B), 반응 시간의 길이와 관계없이 반응 온도가 상승함에 따라 환원당의 수율이 초기에는 상승하나 시간이 지나면서 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다(도 1C).

[0078] 또한, 황산의 농도 및 반응 온도는 HMF 농도에 영향을 미치지 않으나(도 2A), 높은 황산의 농도 및 반응 온도에서 푸르푸랄의 농도가 상승하는 경향을 나타내는 것을 확인하였다(도 2B).

[0079] 아울러, 기대 함수의 등고선도에서 환원당의 수율을 최대화하면서 HMF 및 푸르푸랄의 농도를 최소화하기 위한 제한(constraints)에 기초한 39 가지 조건을 확인하였고, 이 중에서 울금 폐기물의 산 가수분해 반응에 대한 최적의 조건으로 4.91%의 황산 농도(입력 변수: 0.940), 122.68°C의 반응 온도(입력 변수: 0.367) 및 59.23 분의 반응 시간(입력 변수 0.231)을 선정하였으며, 상기 조건에서 예상되는 결과는 71% 환원당 수율, 2.75 g/l HMF 농도 및 0.892 g/l 푸르푸랄 농도로 나타나는 것을 확인하였다(도 3).

[0080] <2-3> 최적 조건에서 울금 폐기물의 산 가수분해를 통한 당의 생산 확인

[0081] 울금 폐기물을 바이오매스로 하여 젖산 또는 에탄올을 생산하는 SHF 공정에서 울금 폐기물을 산 가수분해하기 위한 최적 조건을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-2>에서 선정한 최적 조건에서 울금 폐기물의 산 가수분해를 수행하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 수득한 울금 폐기물을 M20 유니버설 밀(M20 Universal mill; 제품 번호: IKA160360X, IKA 사, 독일)로 갈아 200 g/l 수준 황산을 가하여 4.91%로 조절하였다. 상기 조절한 시료 1.5 l를 취하여 2 l 병에 첨가한 다음, 122.68°C의 반응 온도를 유지하는 와이즈서큐 퍼지 조절 시스템(Wisecircu fuzzy control system)에서 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 분 동안 산 가수분해를 수행하였다. 가수분해 후, 서로 다른 시간 동안 반응한 각각의 시료에 대하여 상기 실시예 <2-1>과 동일한 방법으로 환원당 수율, HMF 농도 및 푸르푸랄의 농도를 확인하였고, 공지된 방법에 따라 포도당의 농도를 측정하여 포도당의 수율을 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012).

[0083] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이 50 분 및 60 분의 반응 시간에서 가장 최적인 것으로 나타났으며, 50 분의 반응 시간에서 최종 환원당 수율, HMF 농도 및 푸르푸랄 농도는 각각 72.43%, 2.59 g/l 및 0.79 g/l 인 것을 확인하였다(도 4).

[0084] <실시예 3> 울금 폐기물 가수분해물로부터 젖산(lactic acid)의 발효

[0085] <3-1> 젖산 생산 균주의 종배양(seed culture)

[0086] 호모발효성(homofermentative) L-젖산을 생산하는 균주로 알려진 락토바실러스 파라카제이 LA104(*Lactobacillus paracasei* LA104; L. 파라카제이 LA104) 균주 및 호모발효성(homofermentative) D-젖산을 생산하는 균주로 알려진 락토바실러스 코리니포르미스 ATCC 25600(*Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600; L. 코리니포르미스 ATCC25600) 균주를 사용한 젖산 발효 공정(Nguyen, C.M. et. al, Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012; Nguyen, C.M. et. al, Biotechnol. Lett. 34, 2235-2240, 2012)을 수행하기 위해, 상기 두 균주를 종배양 수준에서 배양하였다.

[0087] 구체적으로, 하기 [표 5]의 조성으로 배지 1 또는 2를 제조한 후, 200 ml를 각각 500 ml 에를렌마이어 플라스크(Erlenmeyer flasks)에 첨가한 다음, 배지 1에 L. 파라카제이 LA104(기탁 균주번호: KCTC 11883BP)를 접종하여 150 rpm, 37°C에서 24 시간 동안 종배양하였고, 배지 2에 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 접종하여 150 rpm, 34°C에서 24 시간 동안 종배양하였다.

표 5

[0088] 울금 폐기물의 가수분해물로부터 젖산의 발효를 위한 L. 파라카제이 LA 104 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 종배양 배지의 조성

	배지 1	배지 2
포도당(glucose)	20	20
효모 추출물(yeast extract; YE)	10	10
펩톤(peptone; Pep)	10	10
황산마그네슘(MgSO ₄)	0.2	0.05

제 1 인산칼륨(KH ₂ PO ₄)	1.5	
제 2 인산칼륨(K ₂ HPO ₄)	1.5	2
초산나트륨(sodium acetate)	1.5	5
황산망간 수화물(MnSO ₄ ·H ₂ O)	0.05	0.2
구연산 삼암모늄(triammonium citrate)		2
트윈80(Tween 80)	1	1

[0089] * 상기 조성은 증류수 1 l 에 첨가하는 중량(g)을 나타낸다.

[0090] * 상기 조성에서 포도당, 효모 추출물, 펩톤은 유기염이며, 황산마그네슘, 제 1 인산칼륨, 제 2 인산칼륨, 초산 나트륨, 황산망간 수화물, 구연산 삼암모늄, 트윈 80은 무기염(mineral salts)이다.

[0091] <3-2> 울금 폐기물 가수분해물로부터 L- 또는 D-젖산의 발효

[0092] 울금 폐기물 가수분해물로부터 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정을 통해 젖산을 생산하기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 최적화된 조건 하에서 제조한 울금 폐기물 가수분해물을 바이오매스로 하여 L- 또는 D-젖산을 생산하기 위한 발효 공정을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 1 l 의 증류수에 상기 <실시예 2>에서 제조한 울금 폐기물의 가수분해물 1800 ml, 효모 추출물 (Yeast extract, YE) 10 g, 펩톤(peptone, Pep) 10 g을 첨가하고 121℃에서 21 분 동안 멸균하여 배지 3을 2 l 의 작업량(working-volume)으로 제조하여 7 l 규모의 자 발효기에 첨가하였다. 그런 다음, 상기 실시예 <3-1>과 동일한 방법으로 종배양한 L. 파라카제이 LA 104 균주 또는 L. 코리니포르미스 ATCC 25600를 포함하는 배지 200 ml을 상기 배지 3에 접종하여 젖산 발효를 개시하였다. L. 파라카제이 LA 104 균주는 37℃에서 150 rpm 으로 교반하고, L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 34℃에서 150 rpm으로 교반하였다. 배지의 pH는 28%(w/v) 암모니아 수용액(NH₄OH)을 자동으로 첨가하여 pH 6.0으로 유지하였으며, 용존 산소를 0.5 ppm으로 유지하기 위해 발효기 내로 질소 가스를 주입하면서 총 60 시간 배양하였으며, 4 시간 간격으로 배지를 수득하여 즉시 100℃의 끓는 물을 포함하는 수조에 5 분간 담가 효소 활성을 중지한 후, 자이로젠 1730MR 온도-조절 마이크로원심 분리기(temperature-controlled microcentrifuge)를 사용해 37℃에서 5720 ×g로 20 분 동안 원심 분리하여 상등액을 수득하였고, 공지된 방법에 따라 배지에 포함된 환원당의 잔여량, 젖산의 생산량, 환원당의 전환율(conversion), 젖산의 수율 및 젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012). 즉시 100℃의 끓는 물을 포함하는 수조에 5 분간 담가 효소 활성을 중지한 후, 자이로젠 1730MR 온도-조절 마이크로원심 분리기(temperature-controlled microcentrifuge)를 사용해 37℃에서 5720 ×g로 20 분 동안 원심 분리하여 상등액을 수득하였고, 공지된 방법에 따라 배지에 포함된 환원당의 잔여량, 젖산의 생산량, 환원당의 전환율(conversion), 젖산의 수율(yield) 및 젖산의 광학적 순수도(optical purity)를 확인하였다(Nguyen, C.M. et. al., Bioresour. Technol. 110, 552-559, 2012). 젖산의 수율은 하기 [수학식 6]로 계산하여 나타내었으며, 균주의 생장은 희석 도말 평판법(dilution spread plate method)을 따라 수득한 배지를 10⁻⁵ 내지 10⁻⁸로 희석하여 MRS(Man, Rogosa and Sharpe) 한천 배지 위에 도말하여 배양한 후, 집락 형성 단위(colony-forming units; CFU)를 계수하여 수득한 배지의 1 ml 당 CFU 수를 Log10을 사용하여 나타내었다.

수학식 6

$$\text{젖산 수율}(\%) = \frac{\text{생산된 젖산}(g)}{\text{원재료}(g)} \times 100$$

[0094]

[0095]

그 결과, 도 5 및 도 6에서 나타난 바와 같이 초기 농도로서 129 g/l 환원당, 110 g/l 포도당, 2.33 g/l HMF, 0.71 g/l 푸르푸랄을 포함하는 울금 폐기물의 가수분해물을 바이오매스로 하여 L- 및 D-젖산을 발효하였을 때, L. 파라카제이 LA 104 균주 및 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주 모두 HMF 및 푸르푸랄과 같은 균주 생장에 영향을 미치는 화합물 또는 배지 내의 높은 포도당 및 환원당의 농도에 의해 배양 개시 후 4 시간 동안 균주의 성장 및 젖산의 발효가 지연되었으나, 균주의 생장이 지수 성장기(log phase)로 접어들면서 급격하게 증

가하여 60 시간 후에 배지 내에 10 g/l의 환원당이 남아있는 것을 확인하였다(도 5a 및 도 6a).

[0096] 또한, 발효 개시 후 40 시간 후에 L. 파라카제이 LA 104 균주는 115.36 g/l의 L-젖산을 생산하여 시간당 2.88 g/l의 L-젖산 생산성을 나타내며(도 5b), 발효 개시 후 44 시간 후에 L. 코리니포르미스 ATCC 25600 균주는 113.92 g/l의 D-젖산을 생산하여 시간당 2.59 g/l의 D-젖산 생산성을 나타내는 것을 확인하였다(도 6b).

[0097] <실시예 4> 울금 폐기물 가수분해물로부터 에탄올의 발효

[0098] <4-1> 에탄올 생산 균주의 종배양

[0099] 에탄올 발효 균주를 사용하여 울금 폐기물 가수분해물로부터 에탄올 발효 공정을 수행하기 위해, 사카로마이세스 세레비지아에 KCTC 7017(*Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7017, S. 세레비지아에 KCTC 7017)을 종배양 수준에서 배양하였다.

[0100] 구체적으로, 포도당 20 g/l, YE 20 g/l 및 펩톤 10 g/l의 조성을 포함하는 배지를 제조한 후, 200 ml를 500 ml 에rlenmeyer 플라스크(Erlenmeyer flasks)에 첨가한 다음, S. 세레비지아에 KCTC 7017(한국생명공학연구원 미생물자원센터 입수)을 접종하여 150 rpm, 30°C에서 24 시간 동안 종배양하였다.

[0101] <4-2> 울금 폐기물 가수분해물로부터 에탄올의 발효

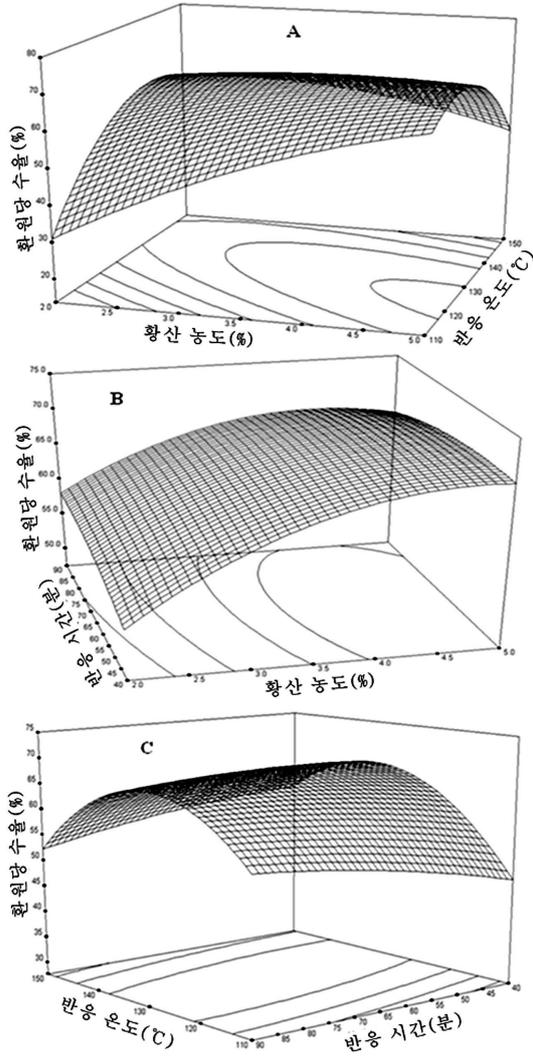
[0102] 울금 폐기물 가수분해물로부터 분리 당화 및 발효(separate hydrolysis and fermentation; SHF) 공정을 통해 에탄올을 생산하기 위하여, 상기 <실시예 2>에서 최적화된 조건 하에서 제조한 울금 폐기물 가수분해물을 바이오메스로 하여 에탄올을 생산하기 위한 발효 공정을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 1 l의 증류수에 상기 <실시예 3-2>에서 제조한 배지 3에 상기 실시예 <4-1>과 동일한 방법으로 종배양한 S. 세레비지아에 KCTC 7017을 포함하는 배지 200 ml를 상기 배지 3에 접종하여 에탄올 발효를 개시한 후 30°C에서 150 rpm으로 교반하였다. 발효 개시 초기의 배지의 pH는 6.2이고, 발효 공정으로 생산된 이산화탄소가 외부로 유출되거나 발효기 내로 산소가 유입되는 것을 방지하기 위하여 한 개의 기체관으로 연결하여 용존 산소를 0.5 ppm으로 유지하기 위한 질소 가스를 주입하면서 총 60 시간 배양하였으며, 4 시간 간격으로 배지를 수득하여 즉시 100°C의 끓는 물을 포함하는 수조에 5 분간 담가 효소 활성을 중지한 후, 자이로젠 1730MR 온도-조절 마이크로원심 분리기(temperature-controlled microcentrifuge)를 사용해 37°C에서 5720 ×g로 20 분 동안 원심 분리하여 상등액을 수득하였고, 상기 실시예 <3-2>와 동일한 방법을 수행하여 환원당의 잔여량, 환원당의 전환율 및 균주의 성장을 확인하였다. 생산된 에탄올의 농도는 효소 키트(K-ETOH 01/11; 메가자임 사, 아일랜드)를 사용하여 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라서 확인하였다.

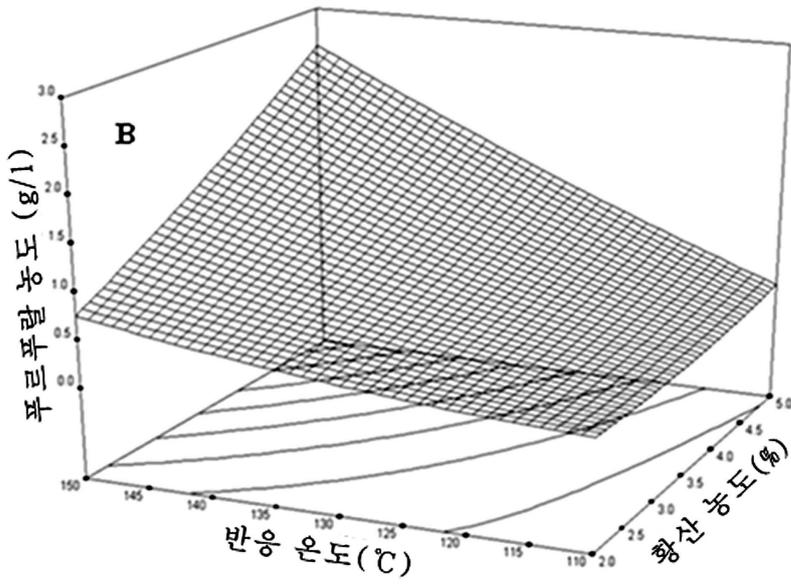
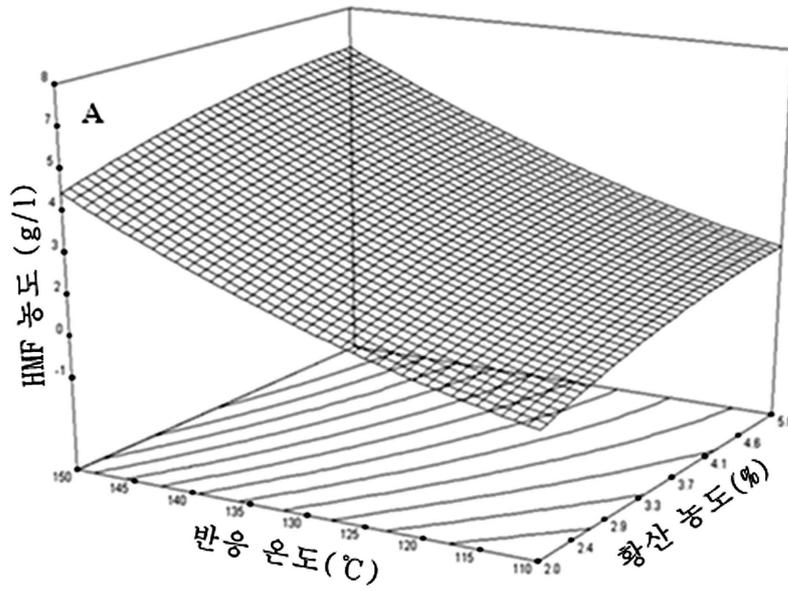
[0104] 그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이 S. 세레비지아에 KCTC 7017은s 탈독 단계를 거치지 않은 울금 폐기물 가수분해물에 효과적으로 적응하여(도 7a), 발효 개시 후 40 시간 후의 배지 내 생성된 에탄올의 농도, 에탄올 수율, 에탄올 생산성 및 환원당 전환율은 각각 55.03 g/l, 30.27%, 시간당 1.38 g/l 및 42.79%를 나타내는 것을 확인하였다(도 7b).

도면

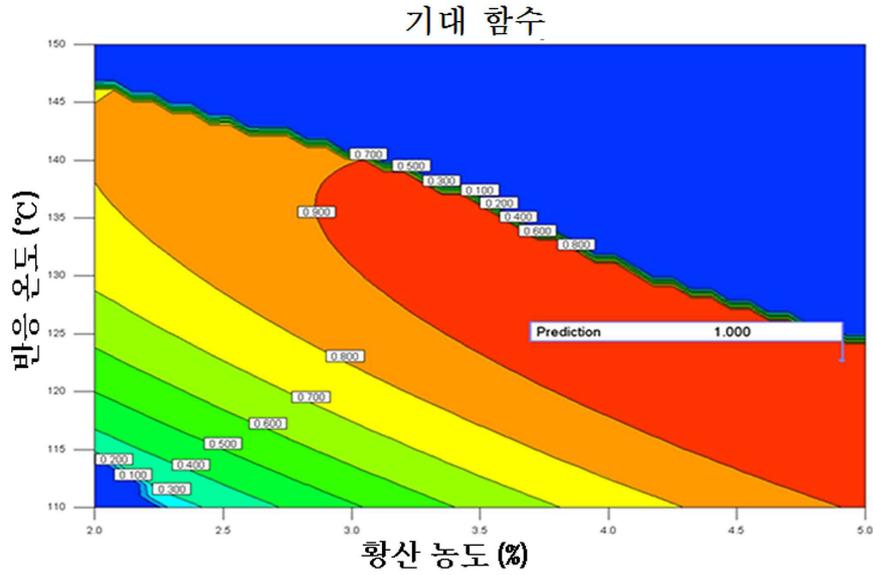
도면1



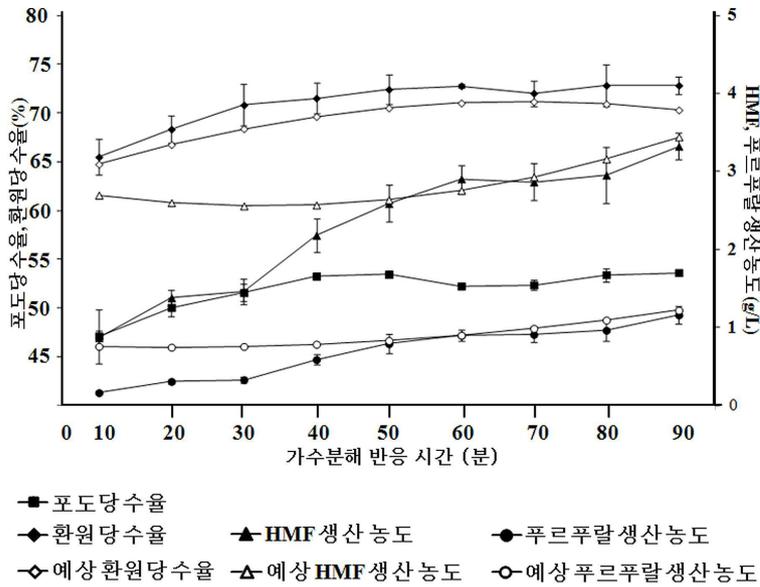
도면2



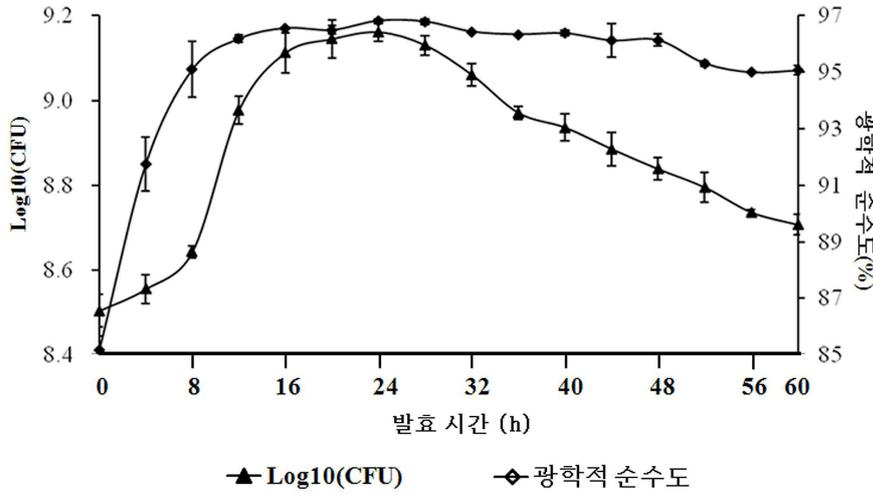
도면3



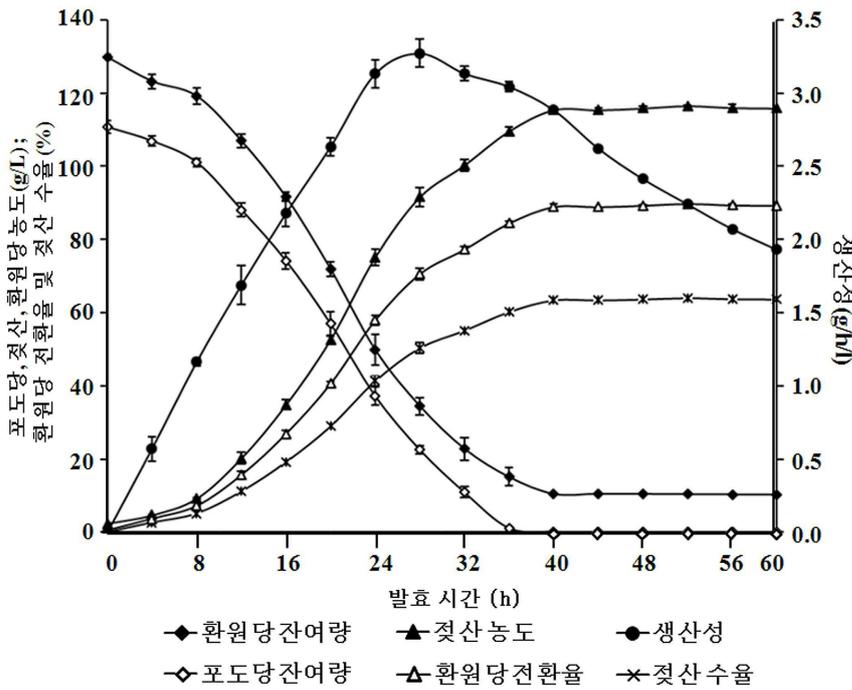
도면4



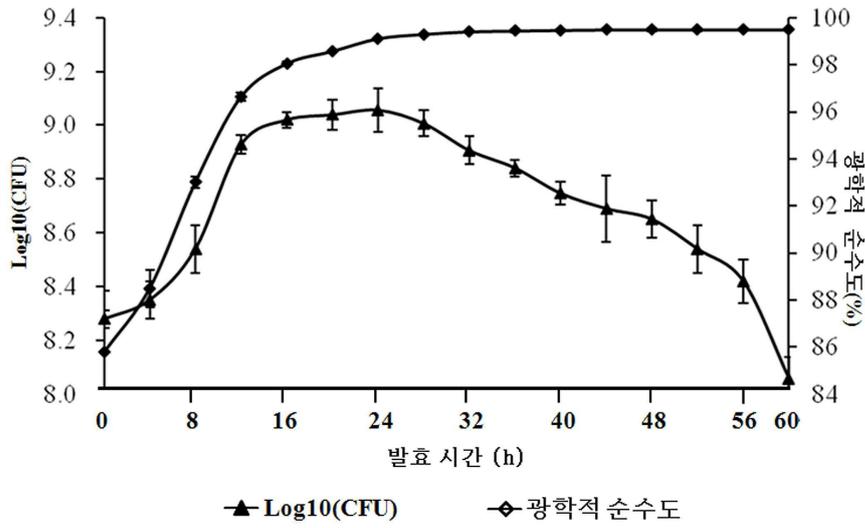
도면5a



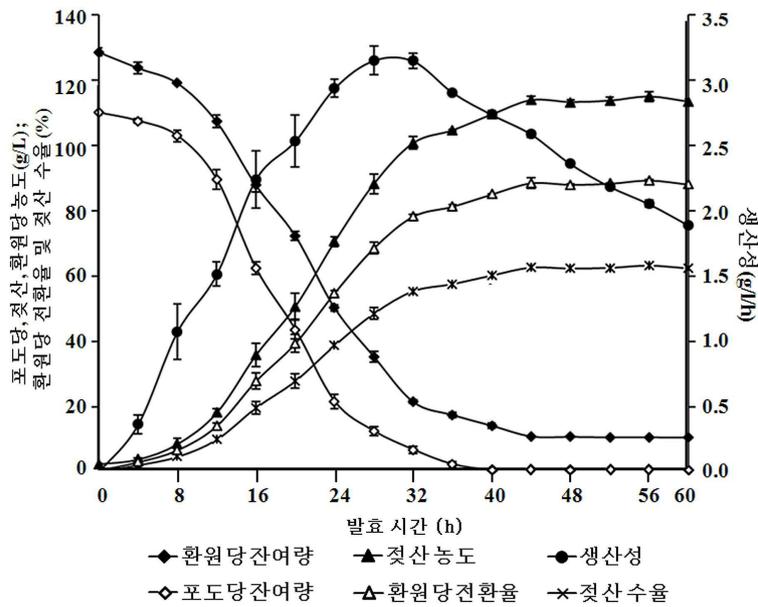
도면5b



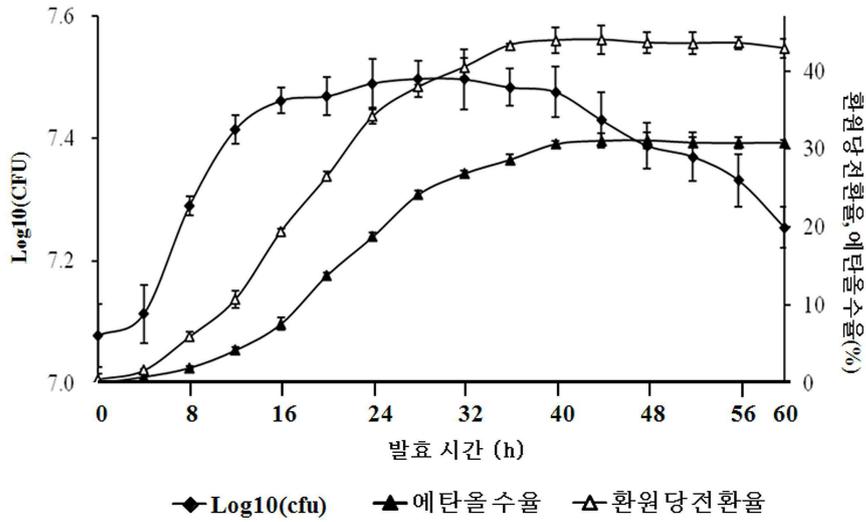
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

