(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월08일
(11) 등록번호 10-1448209
(24) 등록일자 2014년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2006.01) *C12P 7/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0098287
(22) 출원일자 2012년09월05일
심사청구일자 2013년08월07일
(65) 공개번호 10-2014-0031676
(43) 공개일자 2014년03월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110027021 A
KR1020100131208 A
KR1020030027902 A
KR1019910009161 B1
전체 청구항 수 : 총 4 항

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
김철호
대전광역시 유성구 과학로 125
서정우
대전광역시 유성구 과학로 125
김승범
대전광역시 유성구 과학로 125
(74) 대리인
이처영

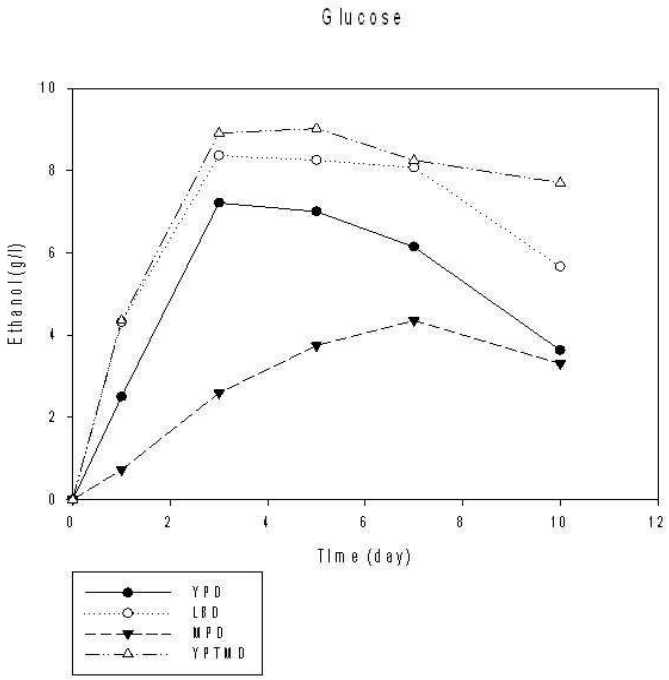
심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 **신규 당화효소 생성 미생물 및 이를 이용한 에탄올의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 목질계 바이오매스에서 당화와 발효를 동시에 수행하는 능력을 가지는 신규 균주 및 상기 균주를 이용하여 목질계 바이오매스를 이용하여 당화와 에탄올 발효를 단일 공정으로 수행하는 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 섬유소계 자원으로부터 당분의 추가 투입과 효모의 추가 투입 없이 동시 당화 발효시켜 간단하고 경제적으로 바이오 에탄올을 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010T100100690
부처명 지식경제부
연구관리전문기관 한국에너지기술평가원
연구사업명 에너지기술개발사업
연구과제명 팜(Palm)오일산업부산물활용바이오에너지생산기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2011.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

Trichoderma asperellum KRIBB-KCH (KCTC12231BP) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1의 18S rRNA 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 카르복시메틸셀룰로즈 함유 배지에서 당화와 발효를 동시에 수행하여 에탄올을 생산하는 능력을 가지는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 당화와 에탄올 발효를 단일공정으로 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오 에탄올의 제조방법:

(a) 카르복시메틸셀룰로즈를 함유하는 바이오매스 배지에서 *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP)를 배양하여, 당화와 발효를 수행하 여 에탄올을 생산하는 단계; 및

(b) 상기 생산된 에탄올을 회수하는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 목질계 바이오매스에서 당화와 발효를 동시에 수행하는 능력을 가지는 신규 균주 및 상기 균주를 이용하여 목질계 바이오매스를 이용하여 당화와 에탄올 발효를 단일 공정으로 수행하는 바이오에탄올의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 석탄, 석유, 천연가스 등의 화석연료는 현재 널리 이용되고 있지만, 이들은 수십 년 내에 고갈될 것으로 예측되며, 온실가스등의 환경문제를 야기하는 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 원자력, 태양열, 풍력 등을 이용하는 방안이 연구되고 있지만, 이들로부터 생산되는 에너지는 전력에너지로써, 수송용 연료로는 적합하지 못하다. 따라서, 수송용 연료로 이용될 수 있는 가장 현실적인 대체 에너지로써 바이오 연료가 거론되고 있다.

[0003] 바이오연료는 바이오매스(biomass)를 원료로 하여 얻어지는 에너지를 통칭하는 것으로서, 직접 연소, 알코올 발효, 메탄 발효 등을 통해 얻어진다. 미국에서 옥수수로부터 연료용 에탄올을 생산한 것으로 시초로 하여, 현재는 브라질을 비롯한 세계 각국에서 많은 양의 연료용 에탄올을 생산하고 있다. 바이오 에탄올은 기존 에너지 체계와 호환이 용이한 에너지다. 바이오 에탄올은 재생 가능한 에너지라는 점, 배출되는 탄소량이 적어 온실가스를 저감시킨다는 점, 대기오염을 감소시킨다는 점에서 청정 에너지로써의 가치를 인정받고 있으며, 상용되고 있는 휘발유와 혼합해서 사용할 수 있으므로 기존의 주유시설을 그대로 활용할 수 있다는 장점이 있다.

[0004] 바이오 에탄올과 휘발유의 혼합연료는 혼합비율에 따라 E10, E20, E100 등으로 구분되는데, 전 세계적으로 바이

오 에탄올 10%를 함유한 E10 휘발유가 널리 사용되고 있으며, 바이오 연료가 발달한 브라질의 경우 22%~25% 정도의 혼합을 의무화 하고 있다.

[0005] 바이오 에탄올 생산에 이용되는 기질은 크게 옥수수, 밀, 보리, 감자, 고구마 등의 전분질계 및 사탕수수, 사탕무 등의 당질계로 구분할 수 있는데 이들은 화석연료를 대체할 수 있기에는 그 양이 제한적이며, 인간이 식량으로 사용할 수 있는 당질계 또는 전분질계 원료를 사용하므로 식량을 에너지원으로 사용한다는 문제뿐만 아니라, 앞으로 식량 수요가 늘어날 경우 원료 수급 문제가 발생할 수 있으며, 경제적인 측면에서도 곡물을 사용하는 것은 원료비용 측면에서 문제가 된다.

[0006] 또한 목질계는 도시 폐기물 형태의 폐목재나 삼림 곳곳에 흩어져 있는 임산 부산물을 원료로 이용할 수 있으며, 식량으로서 활용가치가 없어 원료 수급의 안정성은 확보될 수 있으나, 공정상 반드시 수반되어야 하는 리그닌 제거 전처리 공정으로 인한 공정비 상승과 함께, 목질계 셀룰로오스 기질의 특징인 수소결합으로 이루어진 crystalline 구조로 인해 당화 수율이 낮아 경제성이 낮은 단점이 있다. 즉, 목질계를 바이오매스로 이용할 경우, 원료비는 약 30%를 차지하지만 전처리 및 당화 공정 그리고 cellulase 효소생산에 약 60% 이상의 비용이 소요된다.

[0007] 바이오 에탄올의 원가 절감을 위하여 펄프제조나 식품가공 후에 부산물로 나오는 탄수화물을 지닌 아황산 펄프 폐액 및 유장은 현재 에탄올을 공업적으로 생산하는 데 사용되고 있다. 하지만 식품부산물이나 폐자원을 이용하여 에탄올을 생산하더라도 복잡한 전처리 공정 그리고 당화 및 발효 공정을 거쳐야 하는 문제점은 여전히 존재한다.

[0008] 따라서, 단일 미생물군집을 이용하여 셀룰레이즈의 생산과 셀룰로오스의 분해, 발효를 한 공정으로 해결하는 통합적 단일 생물공정 (Consolidated bioprocessing, CBP)이 가장 획기적으로 에탄올 생산 비용을 감소시킬 수 있는 방법으로 주목을 받고 있다 (Na, *JB et.al.*, *Korean Chem. Eng. Res.*, 46, 858, 2008).

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 토양시료로부터 셀룰레이즈를 생산하는 균주인 *Trichoderma asperellum*을 분리하고, 이를 이용하여 섬유소계 영양원인 셀로비오스를 첨가한 배지에서 당화효소 생산과 에탄올 생산을 동시에 수행하여 바이오에탄올을 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 단일 미생물군집을 이용하여 셀룰레이즈의 생산과 셀룰로오스의 분해, 발효를 한 공정으로 해결하는 통합적 단일 생물공정 (Consolidated bioprocessing, CBP)을 개발하여 바이오 에탄올의 생산비용 및 분리비용을 줄이는 방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 통합적 단일 생물공정의 개발에 적용이 가능한 신규 당화효소 활성 생산 미생물과 이를 이용한 섬유소계 자원으로부터 에탄올을 생산하여 바이오 에탄올의 생산원가를 절감하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP)균주를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, (a) 카르복시메틸셀룰로즈 함유 바이오매스를 함유하는 배지에서 *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP)를 배양하여, 당화와 발효를 수행하여 에탄올을 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생산된 에탄올을 회수하는 단계를 포함하는 당화와 에탄올 발효를 단일공정으로 수행하는 것을 특징으로 하는 바이오 에탄올의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 섬유소계 자원으로부터 당분의 추가 투입과 효모의 추가 투입 없이 동시당화 발효시켜 간단하고 경제적으로 바이오 에탄올을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1는 18S rRNA 염기서열의 상동성 분석을 통한 Phylogenic tree를 나타낸 것이다.

도 2는 신규 당화효소 생산 미생물에 의해 포도당으로부터 에탄올 생성을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 3는 신규 당화효소 생산 미생물에 의해 셀로비오스로부터 에탄올 생성을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

도 4은 신규 당화효소 생산 미생물의 대사산물을 액체크로마토그래피로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는 신규 당화효소 활성 미생물을 분리하였고 이를 이용하여 포도당 및 셀로비오스로 부터 에탄올 생산할 수 있다는 것을 확인하고자 하였다.

[0017] 본 발명에서는, 토양시료로부터 카르복시메틸셀룰로즈를 첨가한 배지에서 당화효소 활성을 보유한 미생물 균주를 분리 및 동정한 후 선별한 균주의 에탄올 생산 능력을 조사한 결과, 포도당을 이용하여 에탄올이 생성됨을 확인할 수 있었다.

[0018] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP) 균주에 관한 것이다.

[0019] 본 발명의 일 양태에서는, 토양시료로부터 당화효소 활성을 보유한 미생물 균주를 분리하고 선별된 미생물 균주의 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과, *Trichoderma asperellum*과 99% 상동성을 나타내어 *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP) 로 명명하였으며, 18S rRNA의 염기서열은 서열번호 1에 나타내었다.

[0020] 상기 분리 균주를 YPD (Yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l) 배지에서 배양하여 선별한 균주의 에탄올 생산 능력을 조사한 결과, 포도당을 이용하여 에탄올이 생성되며 상기 에탄올의 생산수율은 질소원의 종류에 따라 다소 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다.

[0021] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 카르복시메틸셀룰로즈 함유 바이오매스를 함유하는 배지에서 *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP)를 배양하여, 당화와 발효를 수행하여 에탄올을 생산하는 단계; 및 (b) 상기 생산된 에탄올을 수득하는 단계를 포함하는 단일균주를 이용하는 단일공정 수행의 제조방법 의한 바이오 에탄올 생산방법에 관한 것이다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에서는, 상기 *Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP) 균주를 이용하여 섬유소계 영양원인 셀로비오스를 첨가한 배지에서 당화효소 생산과 에탄올 생산을 동시에 수행하여 바이오 에탄올을 생산하는 것을 확인하였다.

[0023] 본 발명에서는 또한 선별한 균주의 섬유소계 영양원을 활용한 에탄올 생산 능력을 조사한 결과, 탄소원으로 포도당 대신에 섬유소계 영양원인 셀로비오스 (20 g/l)를 첨가한 배지에서 에탄올이 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, YP 배지에서 포도당과 거의 유사한 수준으로 에탄올의 생성이 관찰되었지만, 생성 시기는 포도당에 비해 2일 가량 늦은 것으로 나타났는데, 당화효소의 생산과 당화 과정에 시간이 소요되기 때문인 것으로 예측하였다.

[0024] 따라서, 본 발명에서는 셀룰로오스계 바이오매스로부터 바이오 에탄올을 생산하는 공정에 필수적으로 필요로 하는 전처리 공정 없이 바이오 에탄올 발효를 수행할 수 있으며, 또한 당화에 필요한 미생물 균주나 효소의 첨가 없이 *Trichoderma*속 균주를 이용하여, 셀룰레이즈 생산 및 에탄올 생산을 단일균주를 이용하여 단일공정으로 바이오 에탄올 발효를 수행할 수 있는 장점이 있다.

[0025] 본 발명에 의해 생산 전 에탄올은 발효액으로부터 공비증류, 추출증류, 압력 스윙 흡착공정 등의 통상의 방법으로 회수할 수 있다.

[0026] [실시예]

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0028] **실시예 1: 당화 효소 (Celluase) 생산 미생물 균주의 선별과 동정**

[0029] 토양시료로부터 카르복시메틸셀룰로즈를 첨가한 배지에서 당화효소 활성을 보유한 미생물 균주를 분리하였다. 당화효소 활성 분석을 위해 선별된 균주를 Basal 배지 (표 1및 표 2)를 이용하여 30℃에서 150 rpm으로 7일간 배양하였다. 배양액을 원심분리 (4,500 rpm)하여, 상등액을 회수하고, 상등액에 함유된 단백질의 양과 섬유소 기질 당화효소 활성을 분석하였다. 사용 기질로는 카르복시메틸셀룰로즈, 크실란, 아비셀, 필터 페이퍼, 셀로비오스를 이용하였으며, 각각의 기질이 0.2% 농도로 첨가된 50 mM sodium acetate 버퍼 (pH 5.0)에 배양 상등액의 단백질 10 ㎍을 넣고 50℃에서 6 시간 동안 진탕 반응 (100 rpm)하여 DNS법과 HPLC 분석법으로 생성된 환원당의 양을 측정하였다 (표 3).

표 1

[0030] 당화효소 생산용 배지 조성 (일반 배지)

Component	Weight (g/l)
Glucose	3
$(NH_4)_2SO_4$	1.4
KH_2PO_4	2
$CaCl_2.2H_2O$	0.3
$MgSO_4.7H_2O$	0.3
Peptone	1
Yeast extract	0.5
tween 80	1
trace element solution	1 ml (0.1%)

표 2

[0031] Trace element solution: 50mM tartrate-Na buffer (pH 4.0)

Component	Weight (g/L)
H_3BO_3	6
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	26
$FeCl_3 \circ 6H_2O$	100
$CuSo_4.5H_2O$	40
$MnCl_2 \circ 4H_2O$	8
$ZnCl_2$	200

표 3

[0032] 당화효소활성

섬유소 기질	효소활성 (U/ml)
Filter paper	0.060
Cellobiose	0.254
Caboxymethylcellulose	0.037
Xylan	0.018

[0033] 선별된 미생물(*Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP)) 균주의 18S rRNA 염기서열을 분석한 결과, 곰팡이 *Trichoderma asperellum*과 99% 상동성을 보이는 것으로 확인되었다 (도 1).

[0034] **실시예 2: 선별 미생물을 이용한 포도당으로부터 에탄올 생산**

[0035] 선별한 균주(*Trichoderma asperellum* KRIBB-KCH (KCTC12231BP))의 에탄올 생산 능력을 조사하였다. 분리 균주를 YPD (Yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l) 배지에서 배양한 결과, 도 2에 보인 바와 포도당을 이용하여 에탄올이 생성되는 것을 확인하였다. 에탄올의 생산수율은 질소원의 종류에 따라 다소 차이가 나는 것으로 나타났으며, 효모 추출물, 펩톤, 크립톤, 맥아 추출물은 모두 함유하는 배지에서 높은 에탄올 생산을 나타내었다(도 2).

[0036] YP: yeast extract 10 g/l, peptone 20 g/l

[0037] LB: trypone 10 g/l, yeast extract 5 g/l, NaCl 10 g/l

[0038] MP: malt extract 20 g/l, peptone 1 g/l

[0039] YPTM: yeast extract 5 g/l, peptone 10 g/l, tryptone 5 g/l,

[0040] malt extract 5 g/l

[0041] **실시예 3: 섬유소 영양원으로부터 에탄올 생산**

[0042] 선별한 균주의 섬유소계 영양원을 활용한 에탄올 생산 능력을 조사하였다. 도 3에서 나타낸바와 같이 탄소원으로 포도당 대신에 섬유소계 영양원인 셀로비오스 (20 g/l)를 첨가한 배지에서 에탄올을 생성하는 것을 확인할 수 있었다. YP 배지에서 포도당과 거의 유사한 수준으로 에탄올의 생성이 관찰되었지만, 생성 시기는 포도당에 비해 2일 가량 늦은 것으로 나타났는데, 당화효소의 생산과 당화 과정에 시간이 소요되기 때문인 것으로 사료된다.

[0043] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0044]

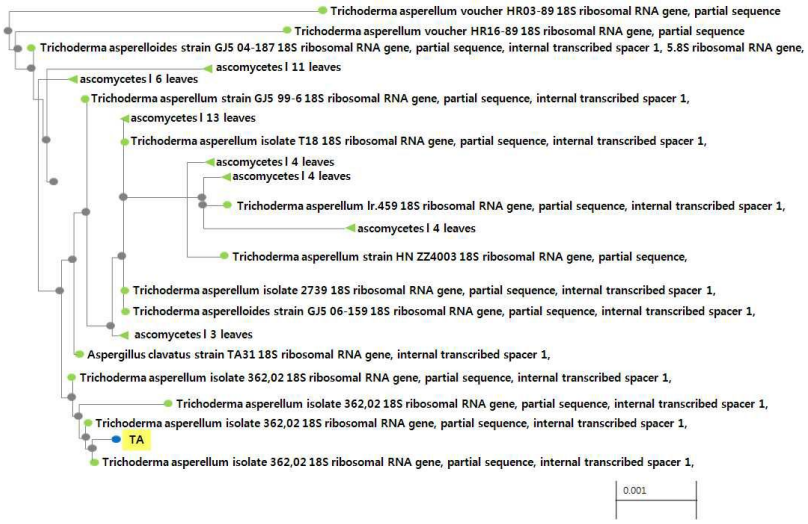
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12231BP

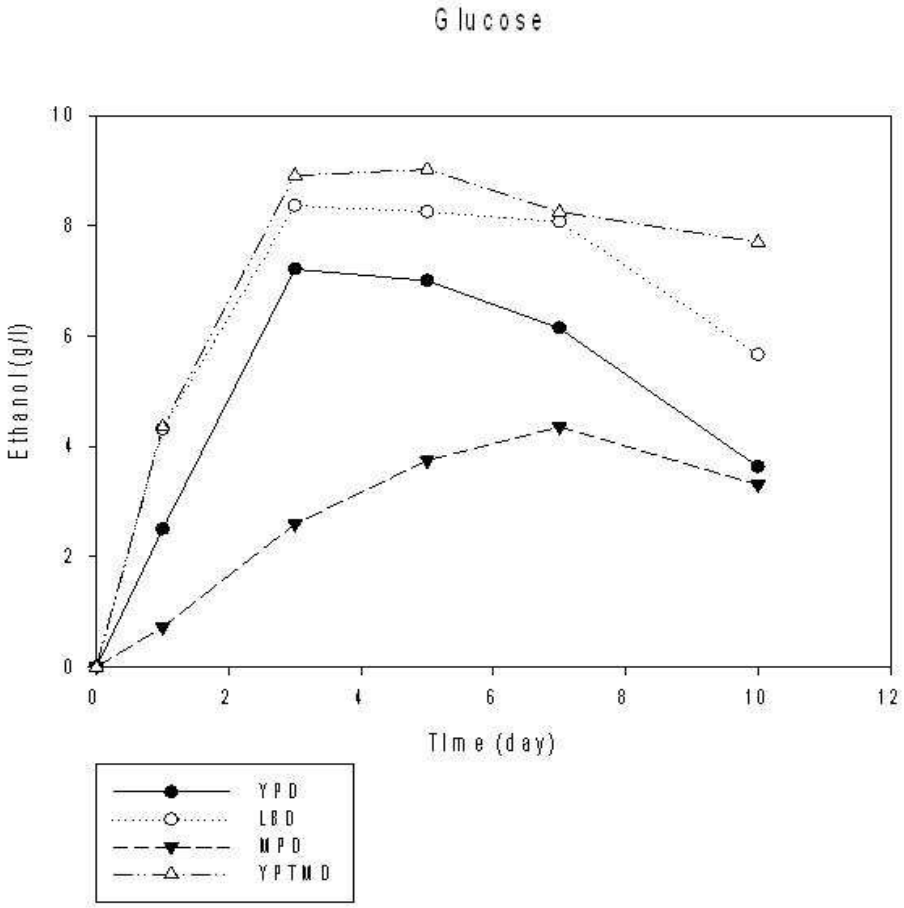
수탁일자 : 20120704

도면

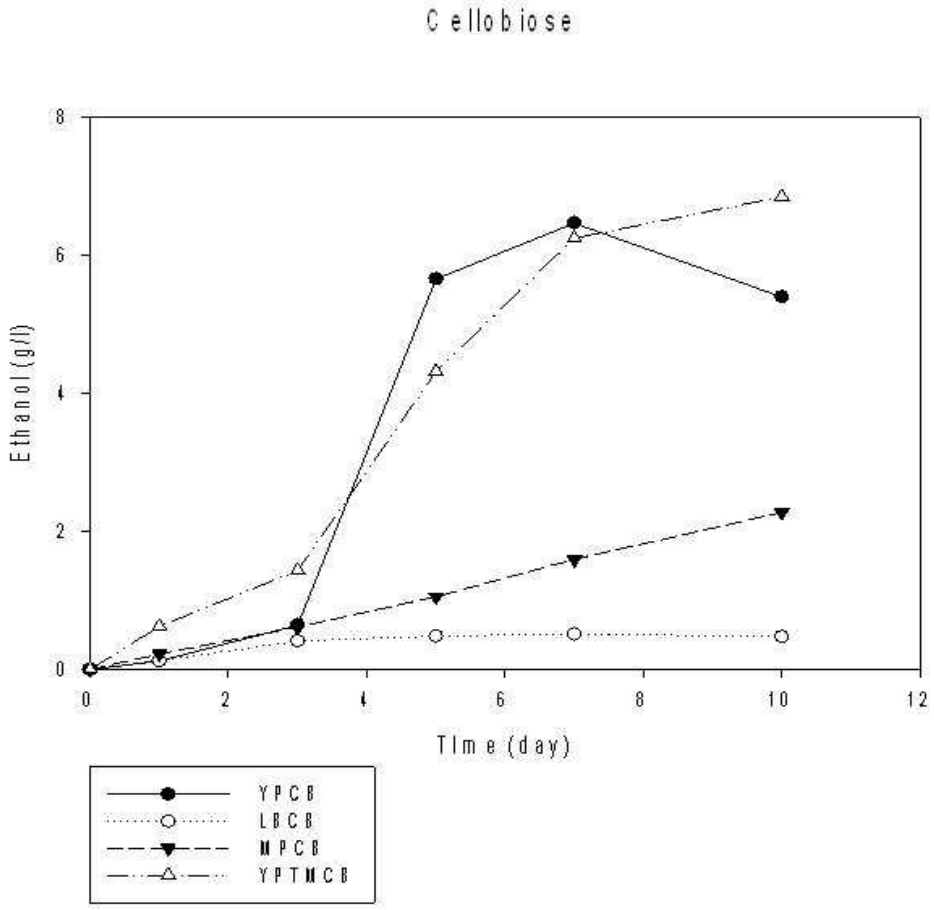
도면1


Trichoderma asperellum voucher HR03-89 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Trichoderma asperellum voucher HR16-89 18S ribosomal RNA gene, partial sequence
Trichoderma asperelloides strain GJ5 04-187 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,
ascomycetes l 11 leaves
ascomycetes l 6 leaves
Trichoderma asperellum strain GJ5 99-6 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
ascomycetes l 13 leaves
Trichoderma asperellum isolate T18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
ascomycetes l 4 leaves
ascomycetes l 4 leaves
Trichoderma asperellum lr.459 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
ascomycetes l 4 leaves
Trichoderma asperellum strain HN ZZ4003 18S ribosomal RNA gene, partial sequence,
Trichoderma asperellum isolate 2739 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
Trichoderma asperelloides strain GJ5 06-159 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
ascomycetes l 3 leaves
Aspergillus clavatus strain TA31 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1,
Trichoderma asperellum isolate 362,02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
Trichoderma asperellum isolate 362,02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
Trichoderma asperellum isolate 362,02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
TA
Trichoderma asperellum isolate 362,02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1,
0.001

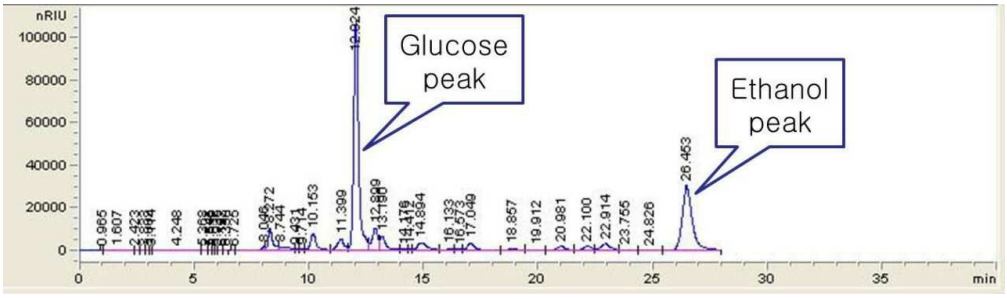
도면2


Glucose
Ethanol(g/l)
Time(day)
0
2
4
6
8
10
12
YPD
LBD
MPD
YPTMD

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> Novel Microorganism Producing Cellulase and Method for Preparing Ethanol Using the Same

<130> P12-B109

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 590

<212> DNA

<213> Trichoderma asperellum

<400> 1

tccgtagggg gacctgcgga gggatcatta ccgagtttac aactcccaaa cccaatgtga 60

acgttaccaa actgttgcct cggcggggtc acgccccggg tgcgtcgcag ccccggaacc 120

aggcgcccgc cggaggaacc aaccaaactc tttctgtagt cccctcgcgg acgtatttct 180

tacagctctg agcaaaaatt caaaatgaat caaaactttc aacaacggat ctcttggttc 240

tggcatcgat gaagaacgca gcgaaatgcg ataagtaatg tgaattgcag aattcagtga 300

atcatcgaat ctttgaacgc acattgcgcc cgccagtatt ctggcgggca tgcctgtccg 360

agcgtcattt caaccctcga acccctccgg gggatcggcg ttggggatcg ggacccctca 420

cacgggtgcc ggccccgaaa tacagtggcg gtctcgccgc agcctctcct gcgcagtagt 480

ttgcacaact cgcaccggga gcgcggcgcg tccacgtccg taaaacaccc aactttctga 540

aatgttgacc tcggatcagg taggaatacc cgctgaactt aagcatatca 590