



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0091168
 (43) 공개일자 2007년09월07일

(51) Int. Cl.
 C12M 1/02 (2006.01) C12M 1/00 (2006.01)
 C12M 1/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2007-7014781
 (22) 출원일자 2007년06월28일
 심사청구일자 없음
 번역문제출일자 2007년06월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/IB2005/003308
 국제출원일자 2005년11월07일
 (87) 국제공개번호 WO 2006/056838
 국제공개일자 2006년06월01일
 (30) 우선권주장
 PA 2004 01854 2004년11월29일 덴마크(DK)

(71) 출원인
 엘삼 엔지니어링 에이/에스
 덴마크 디케이-7000 프레드리시아 크라프트베르크
 스페이취 53
 코벤하른스 유니벌스테
 덴마크 디케이-1870 프레드릭스베르그 씨 불로스
 베이취 17
 (72) 발명자
 펠비, 클라우스
 덴마크 디케이-3670 백소 소슴 스코방스베이취 17
 라르센, 얀
 덴마크 디케이-5690 톰메툼 오스테르브로 28
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 양영준, 양영환

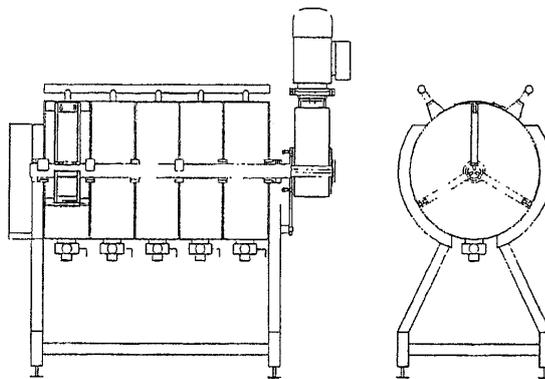
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 높은 건조물 (DM) 함량을 갖는 바이오매스의 효소적 가수분해

(57) 요약

본 발명은 상대적으로 높은 건조물 함량을 갖는 폴리스카라이드 함유 바이오매스의 액화 및 사카린화 방법에 관한 것이다. 본 발명은 효소적 가수분해를, 바이오매스에 기계적 힘 (1차적으로 전단력 및 과열력)을 가하는 것을 보장하기 위해 중력의 법칙에 의존하는 유형의 혼합과 병행한다. 또한, 본 발명은 그러한 가공된 바이오매스의 추가적인 이용, 예를 들어 바이오-에탄올, 바이오-가스로의 후속적인 발효, 식품 및 사료를 위한 특수 탄수화물, 및 플라스틱 및 화학 물질로의 가공을 위한 탄소 공급원료의 추가적인 이용에 관한 것이다.

대표도 - 도1



5-챔버 가수분해 반응기의 횡단면도 (왼쪽) 및 종단면도 (오른쪽)

(72) 발명자

요르겐센, 헨닝

덴마크 디케이-2820 겐토프테 1. 반게베 비가데 82

비베-페데르센, 야콥

덴마크 디케이-7190 빌룬드 그레네베이취 9

특허청구의 범위

청구항 1

20% 초과와 건조물 함량을 갖는 폴리사카라이드 함유 바이오매스 (biomass)를

- a) 효소적 가수분해시키고,
- b) 바이오매스의 기계적 가공 및/또는 분해를 제공하는 중력 기반 유형의 혼합기에 의해 혼합하는 것을 특징으로 하는, 상기 바이오매스의 액화 및 사카린화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 함유 바이오매스가, 예를 들어 옥수수대 (corn stover), 바가스 (bagasse), 줄기 (straw) (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채 및 수수로부터의 줄기), 덩이줄기 (tuber) (예를 들어, 사탕무, 감자), 곡물 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채, 수수로부터의 곡물)로 구성된 농작물; 연목 (예를 들어, 피너스 실베스트리스 (*Pinus sylvestris*), 피너스 라디아타 (*Pinus radiata*)), 경목 (예를 들어, 살릭스 에스피피. (*Salix spp.*), 유칼립투스 에스피피. (*Eucalyptus spp.*))으로 구성된 목재; 또는 도시 고체 폐기물, 폐지, 바이오가스 (biogas)의 가공으로부터의 섬유 분획물, 비료 및 유사한 바이오매스로부터 유래된 리그노셀룰로스성 바이오매스인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 함유 바이오매스가 전분, 예를 들어 전분 함유 곡류 또는 정제 전분인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리사카라이드 함유 바이오매스가, 예를 들어 옥수수대, 줄기 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채 및 수수로부터의 줄기), 덩이줄기 (예를 들어, 사탕무, 감자), 곡물 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채, 수수로부터의 곡물)로 구성된 농작물, 연목 (예를 들어, 피너스 실베스트리스 (*Pinus sylvestris*), 피너스 라디아타 (*Pinus radiata*)), 경목 (예를 들어, 살릭스 에스피피. (*Salix spp.*), 유칼립투스 에스피피. (*Eucalyptus spp.*))으로 구성된 목재, 도시 고체 폐기물, 폐지 및 유사한 바이오매스로부터 유래된 리그노셀룰로스성 바이오매스와 전분 (예를 들어, 전분 함유 곡류 또는 정제 전분)의 혼합물인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 건조물 함량이 25 내지 80%인 방법.

청구항 6

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 20% (w/w) 이상의 리그노셀룰로스성 바이오매스가 26 mm 초과와 섬유 크기를 갖는 것인 방법.

청구항 7

제1항, 제2항 및 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 리그노셀룰로스성 바이오매스를 110 내지 250°C에서 가열 전처리시킨 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 효소적 가수분해가 탄수화물 분해 효소를 비롯한 가수분해 효소와 산화 효소의 조합으로 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제1항, 제3항 및 제4항에 있어서, 전분 함유 곡류의 효소적 가수분해가 가수분해 효소와 단백질분해 효소의 조

함으로 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 효소적 가수분해가 0 내지 105℃에서 수행되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 혼합이 자유 낙하 혼합기, 예컨대 드럼 (drum) 혼합기, 텀블 (tumble) 혼합기 또는 유사한 혼합 장치에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 효소적 가수분해에 대한 처리 시간이 0 내지 72시간인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 배치식, 유가식 (fed-batch), 연속식 또는 유사한 공정으로 수행되는 방법.

청구항 14

에탄올의 제조 방법에 있어서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 물질의 용도.

청구항 15

락트산의 제조 방법에 있어서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 물질의 용도.

청구항 16

바이오-가스의 제조 방법에 있어서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 물질의 용도.

청구항 17

사료의 제조 방법에 있어서, 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조되는 물질의 용도.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 높은 건조물 함량을 갖고, 바람직하게는 큰 평균 크기의 입자 및 섬유를 갖는 폴리사카라이드 함유 바이오매스 (biomass)의 액화 및 사카린화 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 그러한 가공된 바이오매스의 추가적인 이용, 예를 들어 바이오-에탄올 (bio-ethanol)로의 후속적인 발효, 식품 및 사료를 위한 특수 탄수화물, 및 플라스틱 및 화학 물질로의 가공을 위한 탄소 공급원료의 추가적인 이용에 관한 것이다.

배경기술

<2> 무수한 산업적 및 농업적 공정, 예를 들어 도시 작업, 식품 및 사료 가공 및 조림 (forestry)은 바이오매스, 폐기물 및 중합체성 당 함유 부산물 (예를 들어, 전분, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 형태임)을 발생시킨다. 농업 및 화학 산업, 및 공공 단체들은 그러한 바이오매스를 보다 높은 가치의 물질로 전환시키기 위한 공정을 개발하는데 상당한 관심을 갖고 있다. 따라서, 예를 들어 그러한 바이오매스는 미생물 및/또는 가수분해 효소를 사용하여 바이오-에탄올, 바이오가스 (biogas) 또는 화학 물질로 잠재적으로 전환될 수 있다. 그러나, 현재 공지된 대부분의 공정은 그들의 높은 제조 비용 및 높은 에너지 요구량 및 이에 따른 본질적으로 불확실한 경제적 실행 가능성때문에 대규모의 상업적 실시예에 아직 도달하지 못하였다.

<3> 식품 및 사료로서 중요한 것 이외에도, 바이오매스로부터의 탄수화물은 수많은 산업적 공정을 위한 공급원료로서 사용될 수 있다. 중합체 형태의 잘 알려진 제품은 셀룰로스가 주요 성분인 종이다. 그러나, 올리고머 및 단량체로 가공되는 경우, 탄수화물은 수많은 산업적 공정을 위한 중요한 공급원료이다. 상세하게 기재될 바와 같이, 그들은 수많은 미생물적 공정에 필수적일 뿐 아니라, 예를 들어 식품 및 사료용 특수 탄수화물 (예를 들

어, 트레할로스 (trehalose))로의 효소적 가공을 위한 공급원료로서 사용될 수 있다. 또한, 탄수화물 올리고머 및 단량체는 플라스틱 및 유기 화학 물질로의 가공을 위해 석유 화학 물질을 대체할 수 있다. 또한, 탄수화물은 촉매적 수소화에서 수소 담체로서 사용될 수 있다.

- <4> 이에 따라, 저-비용 및 풍부한 자원의 가공된 탄수화물이 산업적 가공을 위해 이용가능하게 될 수 있는 경우, 그것은 상당한 경제적 잠재력을 가질 것이 명백하다.
- <5> 전분은 식물에 있어서 가장 보편적인 저장 탄수화물이고, 종별로 물리적 특성 및 크기가 뚜렷하게 다른 과립의 형태로 존재한다. 전분 과립은 일반적으로 동일한 분자내의 수소 결합 및 여타 이웃 분자와의 수소 결합 형성으로 인해 물 및 가수분해 효소에 의한 침투에 상당한 저항성이 있다. 그러나, 이들 분자내- 및 분자간-수소 결합은 현탁액의 온도가 올라가면 약해질 수 있다. 전분의 수성 현탁액이 가열되는 경우, 수소 결합은 약해지고, 물은 흡수되며, 전분 과립은 팽창된다. 이러한 과정은 통상적으로 젤라틴화로 불려지는데, 이는 형성된 용액이 높은 점성의 젤라틴성 점조성 (consistency)을 갖기 때문이다. 화학적으로, 전분은 글루코스의 천연 중합체이고, 일반적으로 실온에서 물 중에 불용성이지만 분산성이 있고, 셀룰로스와 유사한 반복 단위로 구성되어 있고, 셀룰로스가 β -1,4-글루코시드 결합으로 서로 연결된 것과는 반대로, α -1,4 및 α -1,6-글루코시드 결합으로 서로 연결되어 있다. 상기 단위는 아밀로스로 불려지는 직쇄 성분, 또는 아밀로펙틴으로 불려지는 분지쇄 성분을 형성한다. 대부분의 식물 종자, 곡류 및 덩이줄기는 약 20 내지 25%의 아밀로스를 함유한다. 그러나 어떤 것, 예를 들어 완두 전분은 60%의 아밀로스를 갖고, 옥수수의 특정 종은 80%의 아밀로스를 갖는다. 왁스성 곡류 종류, 예컨대 쌀은 낮은 아밀로스 함량을 갖는다.
- <6> 전분과는 별개로, 식물 바이오매스에 있어서 3가지 주요 구성요소는 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 리그닌이다 (이들은 통상적으로 포괄적 용어인 리그노셀룰로스로 지칭됨). 포괄적 용어로서의 폴리사카라이드 함유 바이오매스에는 전분 및 리그노셀룰로스성 바이오매스가 포함된다.
- <7> 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 리그닌은 상이한 식물 및 각 식물의 상이한 부분에 다양한 양으로 존재하고, 그들은 식물의 구조적 골격을 형성하기 위해 친밀하게 회합되어 있다.
- <8> 셀룰로스는 전적으로 β -1,4-글루코시드 결합에 의해 서로 연결된 D-글루코스로 구성되고 10,000 이하의 중합도를 갖는 호모폴리사카라이드이다. 셀룰로스의 선형 구조는 분자내- 및 분자간-수소 결합의 형성을 가능하게 하고, 이것으로 인해 셀룰로스 쇄가 미세원섬유 (micro fibril)로 응집된다. 정렬도가 높은 미세원섬유내 부위는 결정질이라고 하고, 정렬도가 낮은 부위는 무정형이라고 한다. 미세원섬유는 원섬유로 어셈블링되며, 원섬유가 이후에 셀룰로스 섬유를 형성한다. 미세원섬유성 배열과 함께 셀룰로스의 부분적인 결정질 구조는 셀룰로스에 높은 인장강도를 부여하고, 그것은 셀룰로스가 대부분의 용매에 불용성이도록 만들고, 미생물에 의한 분해, 즉 효소적 가수분해에 대한 셀룰로스의 저항성에 부분적으로 관여한다.
- <9> 헤미셀룰로스는 D-글루코스, D-갈락토스, D-만노스, D-크실로스, L-아라비노스, D-글루쿠론산 및 4-O-메틸-D-글루쿠론산과 같은 수많은 단량체 잔기로 구성된 복잡한 불균질 폴리사카라이드이다. 헤미셀룰로스는 200 미만의 중합도를 갖고, 측쇄를 가지며, 아세틸화될 수 있다. 전나무, 소나무 및 가문비나무 (spruce)와 같은 연목에서는 갈락토글루코만난 및 아라비노-4-O-메틸-글루쿠로녹실란이 주요 헤미셀룰로스 분획물이다. 자작나무, 포플러나무, 사시나무 또는 오크나무 (oak)와 같은 경목에서는 4-O-아세틸-4-메틸-글루쿠로녹실란 및 글루코만난이 헤미셀룰로스의 주요 구성요소이다. 벼, 밀, 귀리 및 스위치 그래스 (switch grass)와 같은 벼과 식물은 주로 글루쿠로노아라비녹실란으로 구성된 헤미셀룰로스를 갖는다.
- <10> 리그닌은 페닐 프로판 단위의 중합에 의해 형성된 복합 망상체이고, 그것은 리그노셀룰로스에서의 가장 풍부한 비-폴리사카라이드 분획물을 구성한다. 리그닌에서의 3가지 단량체는 p-쿠마릴 알콜, 코니페릴 알콜 및 시나필 알콜이고, 그들은 아릴글리세릴- β -아릴 에테르 결합을 통하여 가장 빈번하게 결합한다. 리그닌은 헤미셀룰로스와 결합하여 이를 둘러싸서, 미생물적 및 화학적 분해에 대한 보호를 제공한다.
- <11> 상기에 명시된 바와 같이, 가공된 바이오매스는 미생물 및/또는 가수분해 효소를 사용하여 화학 물질 또는 바이오-에탄올로 잠재적으로 전환될 수 있거나, 또는 가공된 바이오매스로부터의 탄수화물은 수많은 산업적 공정 (예를 들어, 식품 및 사료를 위한 특수 탄수화물로의 효소적 가공)을 위한 공급원료, 또는 플라스틱 및 유기 화학 물질의 제조에 있어서의 석유 화학 물질의 대체품으로서 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 바이오매스에서의 탄수화물의 가공은 비-탄수화물 성분의 분리 및 분별과 병행될 수 있다. 본 발명에 따른 방법은 바이오-에탄올 제조 방법의 통합된 부분으로 이용하는 것이 특히 바람직하다.
- <12> 폴리사카라이드 함유 바이오매스로부터의 바이오-에탄올 제조는, 1) 전처리, 2) 폴리사카라이드의 발효가능한

탄수화물로의 가수분해, 및 3) 탄수화물의 발효의 3단계로 나누어질 수 있다.

- <13> 전처리된 폴리사카라이드의 후속적인 가수분해 (예를 들어, 효소적 가수분해)가 식물 물질의 다른 보호 구조 (예를 들어, 리그닌)의 파괴를 요구하는 경우에 필요하다. 여러 전처리 기술이 공지되어 있다. 곡물 및 곡류에 대하여, 이러한 전처리는 표면을 접근가능하게 하기 위한 간단한 건식 제분의 형태일 수 있으나, 리그노셀룰로스성 바이오매스에 대하여는, 열적 및/또는 화학적 과정 또한 요구된다. 예를 들어, 정제 전분으로 구성된 폴리사카라이드 함유 바이오매스는 효소적 가공 전에 상기 전처리 방법을 요구하지 않는다. 전처리-공정은 산성 가수분해, 증기 폭발 (steam explosion), 산화, 알칼리 또는 에탄올 등으로의 추출을 기반으로 할 수 있다. 전처리 기술의 통상적인 특징은, 가능한 첨가된 반응물의 작용과 함께 100°C 초과 온도에서 발생하는 식물 물질의 연화 및 이완을 이용한다는 것이다.
- <14> 전처리 이후에, 바이오-에탄올 또는 여타 생화학 물질의 제조를 위한 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 이용에서의 다음 단계는 분리된 전분, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스를 발효가능한 당으로 가수분해시키는 것이다. 효소적으로 수행되었을 경우, 이것은 상이한 작용 방식을 갖는 수많은 상이한 효소를 요구한다. 이 효소는 외부에서 첨가될 수 있거나, 또는 바이오매스 상에서 증식하는 미생물이 그러한 효소를 제공할 수 있다.
- <15> 셀룰로스는 탄수화물 분해성 셀룰라제에 의해 글루코스로 가수분해된다. 셀룰로스 분해성 시스템 (cellulolytic system)에 대한 유력한 견해에 따르면, 셀룰라제를 하기의 세 부류로 나눈다. 엑소-1,4-β-D-글루카나제 또는 셀로비오히드롤라제 (CBH) (EC 3.2.1.91) (셀로비오스 단위를 셀룰로스 쇠의 말단으로부터 절단함); 엔도-1,4-β-D-글루카나제 (EG) (EC 3.2.1.4) (셀룰로스 쇠에서 무작위적으로 내부 β-1,4-글루코시드 결합을 가수분해함); 1,4-β-D-글루코시다제 (EC 3.2.1.21) (셀로비오스를 글루코스로 가수분해하고, 또한 셀로올리고사카라이드로부터 글루코스 단위를 절단함).
- <16> 헤미셀룰로스에서의 상이한 당은 헤미셀룰라제에 의해 분리된다. 헤미셀룰로스 분해성 시스템은 헤미셀룰로스의 이종성 (heterologous nature) 때문에 셀룰로스 분해성 시스템보다 더 복잡하다. 상기 시스템은 특히, 엔도-1,4-β-D-크실라나제 (EC 3.2.1.8) (크실란 쇠에서의 내부 결합을 가수분해함); 1,4-β-D-크실로시다제 (EC 3.2.1.37) (비-환원 말단으로부터 크실로올리고사카라이드를 공격하여 크실로스를 분리함); 엔도-1,4-β-D-만나나제 (EC 3.2.1.78), (내부 결합을 절단함); 1,4-β-D-만노시다제 (EC 3.2.1.25) (만노올리고사카라이드를 만노스로 절단함)를 포함한다. 측기는 α-D-갈락토시다제 (EC 3.2.1.22), α-L-아라비노푸라노시다제 (EC 3.2.1.55), α-D-글루쿠로니다제 (EC 3.2.1.139), 신나모일 에스테라제 (EC 3.1.1.-), 아세틸 크실란 에스테라제 (EC 3.1.1.6) 및 페룰로일 에스테라제 (EC 3.1.1.73)와 같은 수많은 효소에 의해 제거된다.
- <17> 전분 가수분해에서의 사용을 위한 가장 중요한 효소는 알파-아밀라제 (1,4-α-D-글루칸 글루카노히드롤라제) (EC 3.2.1.1)이다. 이들은 1,4-α-D-글루코시드 결합을 절단하는 엔도-작용 히드롤라제이고, 1,6-알파-D-글루코시드 분기점을 우회할 수 있으나, 가수분해할 수는 없다. 그러나, 엑소-작용 글리코아밀라제, 예컨대 베타-아밀라제 (EC 3.2.1.2) 및 풀룰라나제는 (EC 3.2.1.41) 또한 전분 가수분해에 사용될 수 있다. 전분 가수분해의 결과는 1차적으로 글루코스, 말토스, 말토트리오스, α-덱스트린, 및 다양한 양의 올리고사카라이드이다. 전분계 가수분해물이 발효에 사용되는 경우, 단백질분해 효소를 첨가하는 것이 유리할 수 있다. 그러한 효소는 미생물의 응집 (flocculation)을 방지할 수 있고, 미생물이 이용가능한 아미노산을 생성할 수 있다.
- <18> 리그노셀룰로스성 바이오매스의 전처리 및 효소적 가수분해와 함께, 산화 효소의 사용이 전체 가수분해, 및 예를 들어 후속적인 발효에 이용되는 미생물의 생존률에 대해 긍정적인 효과를 가질 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 효과에 대한 근거는 산화 효소에 의해 유발되는 리그닌과 여타 페놀계 억제제의 산화적 가교이다. 통상적으로, 락카제 (EC 1.10.3.2) 또는 피옥시다제 (EC 1.11.1.7)는 외부에서 첨가하여 이용되거나, 또는 적용된 미생물에 락카제 유전자를 도입시킴으로써 이용된다.
- <19> 바이오매스의 효소적 가수분해는 이전에 기재되었다. 그러나, 리그노셀룰로스성 바이오매스의 경우에는, 1 인치 (25.4 mm) 미만의 평균 크기를 갖는 입자 및 섬유로 구성되고, 또한 상대적으로 낮은 건조물 함량, 즉 20% (w/w) 미만의 건조물 함량을 갖는 물질만이 그러한 방법에 의해 성공적으로 가수분해되었다.
- <20> US4409329에는 고체 셀룰로스 물질의 당으로의 가수분해가 기재되어 있고, 여기에서는 30 내지 80% (w/w)의 셀룰로스를 함유하는 3 내지 20%의 (w/w) 고체 사료의 과립성 슬러리를 셀룰라제 효소 복합체로 처리함으로써, 셀룰로스를 간단한 당으로 가수분해시킨다. 고체 셀룰로스-함유 투입 원료는 직경 0.01 내지 1 인치 (0.0254 내지 25.4 mm)의 평균 입자 크기를 갖는다. 천공 날개가 혼합에 사용된다.
- <21> US2002117167A에는 적어도 일부의 헤미셀룰로스를 가용화시키고, 가용화된 헤미셀룰로스를 가수분해시켜 하나

이상의 모노사카라이드를 제조하는 것을 포함하는, 바이오매스 물질에서의 헤미셀룰로스의 효소적 가수분해가 기재되어 있다. 이용된 바이오매스는 바람직하게는 원료 물질 또는 전처리된 물질의 수성 슬러리이다. 바이오매스 물질은 헤미셀룰로스를 포함하는 임의의 셀룰로스성 물질일 수 있다. 상기 방법은 곡류 섬유 (예컨대, 옥수수, 밀, 쌀, 귀리 또는 보리)의 사용시에 특히 유효하다고 기재되어 있다.

<22> US2004005674A에는 리그노셀룰로스의 효소적 가수분해 방법이 기재되어 있다. 리그노셀룰로스의 당으로의 분해는 리그노셀룰로스를 하나 이상의 보조 효소 및 하나 이상의 셀룰라제와 접촉시키는 것을 포함한다. 리그노셀룰로스성 물질은 분쇄되고 (물질의 평균 섬유 크기는 더 구체화되지 않음), 낮은 건조물 함량 (10 ml의 효소 용액 중 0.2 g의 분쇄된 스토버 (stover) 물질)을 갖는다.

<23> <발명의 요약>

<24> 본 발명은 상대적으로 높은 건조물 함량, 바람직하게는 20% 초과 건조물 함량을 갖고, 바람직하게는 20% (w/w) 이상의 바이오매스가 26 내지 70 mm 내에 범위하는 섬유 및 입자 크기의 분포를 갖는, 바람직하게는 상대적으로 큰 섬유 및 입자로 구성된 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 액화 및 사카린화 방법에 관한 것이다. 또한, 상기 방법은 전분, 정제 전분, 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 리그닌으로 1차적으로 구성된 폴리사카라이드 함유 바이오매스, 예를 들어 곡류 또는 밀 줄기 (straw)의 액화 및 사카린화에 특히 적합하다. 리그노셀룰로스성 바이오매스의 경우에, 이들은 바람직하게는 110 내지 250°C의 온도에서 1 내지 60분 동안에 셀룰로스의 효소로의 접근성을 확보하고, 동시에 전처리된 바이오매스에서의 발효 억제제의 제한된 함량을 확보하는 방식으로 전처리된다. 본 발명은 탄수화물 분해 효소를 비롯한 가수분해 효소와 산화 효소의 조합에 기반한 효소적 가수분해를, 기계적 힘 (1차적으로 전단력 및 파열력)을 바이오매스에 적용하는 것을 보장하는 중력의 원칙에 의존하는 소정 유형의 혼합과 병행한다. 바람직한 유형의 혼합은, 예를 들어 자유 낙하 혼합기, 예컨대 드럼 혼합기, 텀블 혼합기 또는 유사한 혼합 장치에서 이루어진다.

발명의 상세한 설명

<25> 농축된 당 용액의 제조는 개선된 부피 생산성 및 하류 (down stream) 가공의 감소된 비용 때문에 후속적인 발효 또는 여타 미생물적 공정에 유익하다. 바이오-에탄올 제조의 경우에서, 발효 배양액이 4% 초과 에탄올을 함유하는 경우, 증류를 위한 에너지 요구량이 유의하게 감소된다 (Galbe and Zacchi, 2002). 이것은 8% 초과 당 농도를 요구하며, 상기 당 농도는 대부분 유형의 리그노셀룰로스성 바이오매스에 대해 20% 초과 건조물 함량과 상응한다. 즉, 높은 건조물 함량, 바람직하게는 20% 초과 건조물 함량을 갖는 폴리사카라이드-함유 바이오매스를, 에탄올의 증류에 적합한 바이오-에탄올-함유 발효 배양액을 후속적으로 제조할 수 있게 하기 위하여 효소적 가수분해시키는 것이 바람직하다.

<26> 본 발명의 방법은 통상적으로 30 내지 50%의 효소적 가수분해도를 제공한다. 그러나, 최적화된 조건하에서는 훨씬 더 높은 효소적 가수분해도가 얻어질 수 있다. 따라서, 액화 및 사카린화된 바이오매스는 상대적으로 다량의 글루코스, 크실로스, 셀로비오스, 리그닌, 비-분해된 셀룰로스 및 헤미셀룰로스를 함유하며, 또한 추가적인 가공, 즉 발효 공정 (에탄올, 락트산 등)에 적합한 활성 효소도 함유할 것이다. 또한, 액화된 바이오매스는 기화, 수소화, 유기 합성, 또는 바이오가스 및 사료의 제조에 적합할 것이다.

<27> 폴리사카라이드 함유 바이오매스가 리그노셀룰로스성인 경우, 전처리는 리그노셀룰로스성 물질의 구조가 효소에 더욱 접근가능하도록 해주는 것을 보장해야 하고, 동시에 유해한 억제성 부산물, 예컨대 아세트산, 푸르푸랄 및 히드록시메틸 푸르푸랄의 농도를 실질적으로 낮게 유지되도록 보장해야 한다. 이를 달성하기 위한 여러 전략이 존재하고, 그들 모두는 리그노셀룰로스성 물질을 110 내지 250°C의 온도에서 1 내지 60분 동안, 예를 들어 하기와 같은 처리를 한다는 것을 내포한다.

<28> * 온수 추출

<29> * 억제성 물질이 형성되기 전에 용해된 물질을 제거시키는 다단계 묽은 산 가수분해

<30> * 상대적으로 낮은 엄격 조건에서의 묽은 산 가수분해

<31> * 알칼리성 습식 산화

<32> * 증기 폭발

<33> * 후속적인 해독 작용을 수반한 대부분의 임의의 전처리

<34> 본 발명에 따른 폴리사카라이드 함유 바이오매스로는 중합체성 당을 함유하는 임의의 물질 (예를 들어, 전분,

및 정제 전분, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스의 형태)이 포함된다. 20% 초과 건조물 함량을 갖는 바이오매스가 바람직하다.

- <35> 본 발명에 따른 효소적 가수분해 및 혼합을 위한 적절한 유형의 바이오매스로는, 예컨대 하기의 농작물로부터 유래된 바이오매스가 포함될 수 있다.
- <36> * 전분 (예를 들어, 전분 함유 곡류 및 정제 전분)
- <37> * 옥수수대 (corn stover)
- <38> * 바가스 (bagasse)
- <39> * 줄기 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채, 수수로부터의 줄기)
- <40> * 연목 (예를 들어, 피너스 실베스트리스 (*Pinus sylvestris*), 피너스 라디아타 (*Pinus radiata*))
- <41> * 경목 (예를 들어, 살릭스 에스피피. (*Salix spp.*), 유칼립투스 에스피피. (*Eucalyptus spp.*))
- <42> * 덩이줄기 (tuber) (예를 들어, 사탕무, 감자)
- <43> * 곡물 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채, 수수 및 옥수수로부터의 곡물)
- <44> * 폐지, 바이오가스 가공으로부터의 섬유 분획물, 비료, 야자 오일 가공으로부터의 잔류물, 도시 고체 폐기물, 또는 유사한 건조물 함량을 갖는 유사한 것들
- <45> 폴리사카라이드 함유 바이오매스가 리그노셀룰로스성인 경우, 이 물질은 전처리 전에 20% (w/w)의 바이오매스가 바람직하게는 26 내지 70 mm 내에 범위하는 조각들로 잘려질 수 있다. 전처리된 물질은 혼합 장치에 들어가기 전에 바람직하게는 20% 초과 건조물 함량을 갖는다. 탄수화물을 바이오매스로부터 분리하는 것 이외에도, 전처리 공정은 바이오매스를 멸균시키고, 부분적으로 용해시키고, 동시에 리그닌 분획물로부터 염화칼륨을 씻어낸다.
- <46> 본 발명에 따른 방법에서 수행되는 혼합은 적어도 4가지의 목적으로 기능한다.
- <47> 제1 목적으로는, 폴리사카라이드 함유 바이오매스 (기질)가 대부분의 경우에 불용성이거나 난용성이기 때문에 사용된 효소와 상기 바이오매스의 근접 접촉을 보장한다.
- <48> 제2 목적으로는, 혼합 도중에 물질상에서 수행되는 기계적 작업은 보다 큰 바이오매스 섬유와 입자를 떼어 놓는데 도움을 주고, 이에 따라 물질의 표면적을 증가시키는데 도움을 줄 것이다. 이것은 예를 들어, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스의 사용된 효소로의 접근가능성을 증가시킬 것이다. 물질상의 기계적 작업을 더 증가시키기 위하여, 강철 볼 (steel ball)이나 물질과 충돌하는 유사한 수단이 드럼에 첨가될 수 있다.
- <49> 제3 목적으로는, 물질의 혼합은, 예를 들어 셀룰라제 효소, 특히 셀로비오히드롤라제를 억제할 수 있는 높은 셀로비오스 농도의 국소 축적을 방지한다 (당업자에게 잘 알려진 바와 같음).
- <50> 제4 목적으로, 셀룰라제 효소의 중요한 특성은 효소 성능 상에서의 셀룰로스 결합 도메인 (CBD)의 작용이다. CBD는 셀룰로스 분해 효소의 기능적 부분이다. CBD는 불용성 기질 표면 (셀룰로스) 상에 수용성 효소의 접촉을 가능하게 한다. CBD에 의해 제공되는 셀룰로스 및 효소간의 근접 회합은 효소의 촉매적 속도 및 안정성을 증진시킨다. 셀룰로스를 가수분해하기 위하여, 효소는 셀룰로스 쇄 상의 CBD의 위치를 변화시켜야 한다. 기계적 작용, 즉 혼합은 CBD의 이동을 위해 중요하고, 따라서 셀룰로스 쇄를 따라 효소가 효소적 작용을 하는데 중요하다고 여겨진다.
- <51> 상기 이외에도, 바이오매스의 효소적 가수분해가 발효 산업에 사용된 것과 유사하게 중앙에 위치한 임펠러 축상에 장착된 임펠러 (예를 들어, 러쉬톤 (Rushton) 터빈 또는 인테믹 (Intemig) 임펠러)를 갖춘 교반-탱크형 반응기에서 전통적으로 수행되어 왔다는 것을 주목해야 한다. 이러한 장치 때문에, 높은 점도의 용액, 매우 점착성인 용액, 또는 매우 건조한 물질의 용액은 효율적으로 교반될 수 없고, 매우 열악하게 혼합되거나 혼합되지 않는 구역이 유발될 것이다. 또한, 그러한 용액의 교반은 매우 큰 에너지 투입을 요하고, 이는 공정 경제에 불리하다. 폴리사카라이드 함유 바이오매스를 취급하는 경우, 이전에는 대략 20%까지의 상한치로 제한되었다. 본 발명에 따른 중력에 기반한 혼합 원칙은 이러한 문제를 극복하고, 80% 이하, 바람직하게는 20 내지 50%의 건조물 함량을 갖는 폴리사카라이드 함유 바이오매스에 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 중력 혼합의 원칙은 쉽게 규모를 확장시킬 수 있고, 정제 전분 이외에도 80% 이상까지의 셀룰로스를 함유하는 모든 종류의 바이오

매스에 적용될 수 있다.

- <52> 효소적 가수분해에 전통적으로 사용된 통상적인 교반-탱크형 반응기와는 달리, 중력 기반의 혼합 원칙, 즉 드럼 혼합기, 바이오매스를 들어올리는 회전 축을 갖는 혼합기, 또는 자유 낙하 원칙을 이용하는 유사한 혼합 장치는, 동시에 훨씬 적은 동력 투입량으로도 높은 건조물 함량에 대해 효율적인 혼합을 가능하게 하고, 또한 물질과 드럼 사이의 전단력 및 과열력, 및 낙하 물질과 드럼의 바닥 사이의 충격으로부터 발생된 힘을 비롯한 중력의 힘을 통하여 기계적 가공/분해를 수행하고, 동시에 효소 성능에 대한 셀룰로스 결합 도메인 (CBD)의 작용에 긍정적인 영향을 미친다.
- <53> 비-혼화성 식물 물질, 예를 들어 상대적으로 높은 건조물 함량 및 평균적으로 큰 섬유 및 입자 크기를 갖는 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 가공이 고체-상태 발효 또는 생물 반응기 (여기서, 텀블 유형 혼합기가 블렌딩에 사용됨 (Giovannozzi et al. 2002))로부터 공지되었지만, 본 발명의 원칙은 전용 액화/사카린화 공정 또는 바이오-에탄올 발효 공정에서 이전에 수행된 적이 없다.
- <54> 본 발명은 상대적으로 높은 건조물 함량, 예를 들어 20 내지 80%, 바람직하게는 20 내지 50%의 건조물 함량에서의 바이오매스의 가공 방법을 제공한다. 또한, 본 발명에 따른 방법은, 예를 들어 발효기에서의 최종 생성물의 직접 사용을 가능하게 하는 효율적인 액화 및 사카린화를 보장한다.
- <55> 전분, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 또는 그들의 부분들을 글루코스, 크실로스 및 셀로비오스로 전환시키는 것을 수행할 수 있는 효소는 천연 형태, 또는 그러한 효소의 축적을 유도하는 미생물의 형태로 바이오매스에 첨가된다. 바이오매스의 pH 및 온도는 적용된 효소의 최적-pH 및 최적 온도를 참조하여 조정된다.
- <56> 효소 로딩에 따라, 바이오매스는 3 내지 24시간 내에 잔류하는 큰 섬유 및 입자가 전혀 없거나 소량만 있는 액체로 액화 및 사카린화될 것이다. 가수분해 및 액화 도중 입자의 주어진 시간에 글루코스 대사성 미생물을 첨가하면, 억제성 효소 생성물이 이에 의해 제거되기 때문에 효소적 가수분해도를 증진시킬 수 있다.
- <57> 본 발명에 따른 방법은 하기의 바람직한 기술적 파라미터를 이용하여 수행될 수 있다.
- <58> * 건조물 함량: 20 내지 80%, 바람직하게는 25 내지 70%, 보다 바람직하게는 25 내지 60%, 보다 더욱 바람직하게는 25 내지 50% 또는 25 내지 40%, 가장 바람직하게는 25 내지 35%
- <59> * 리그노셀룰로스성 바이오매스의 섬유 및 입자 크기의 분포: 0 내지 150 mm, 바람직하게는 5 내지 125 mm, 보다 바람직하게는 10 내지 100 mm, 보다 더욱 바람직하게는 15 내지 90 mm 또는 20 내지 80 mm, 가장 바람직하게는 26 내지 70 mm. 바람직한 섬유 및 입자 크기의 분포는 20% (w/w) 이상의 리그노셀룰로스성 바이오매스가 바람직한 구간 내에 있는 것으로 정의된다.
- <60> 폴리사카라이드 함유 바이오매스가 리그노셀룰로스성인 경우, 예를 들어 온수 추출에 의해 전처리되어야 한다. 수열 (hydro thermal) 전처리가 선택되는 경우, 하기의 기술적 데이터가 바람직하다.
- <61> * 전처리 온도: 110 내지 250℃, 바람직하게는 120 내지 240℃, 보다 바람직하게는 130 내지 230℃, 보다 바람직하게는 140 내지 220℃, 보다 바람직하게는 150 내지 210℃, 보다 바람직하게는 160 내지 200℃, 보다 더욱 바람직하게는 170 내지 200℃, 가장 바람직하게는 180 내지 200℃
- <62> * 전처리 시간: 1 내지 60분, 바람직하게는 2 내지 55분, 보다 바람직하게는 3 내지 50분, 보다 바람직하게는 4 내지 45분, 보다 바람직하게는 5 내지 40분, 보다 바람직하게는 5 내지 35분, 보다 바람직하게는 5 내지 30분, 보다 바람직하게는 5 내지 25분, 보다 바람직하게는 5 내지 20분, 가장 바람직하게는 5 내지 15분
- <63> * 20% (w/w) 이상의 전처리 후 건조물 함량.
- <64> 중력 혼합기에서의 폴리사카라이드 함유 바이오매스의 효소적 처리:
- <65> 바이오매스를 들어올리는 수평으로 위치한 교반기 축이 있는 반응기의 형태로 자유 낙하 혼합 개념에 기초한 용기가 사용되거나, 또는 유사한 혼합 장치가 사용되는 경우, 하기의 기술적 데이터가 바람직하다.
- <66> * 회전 속도: 0 내지 30 rpm, 바람직하게는 0 내지 20 rpm, 보다 바람직하게는 0 내지 15 rpm, 보다 더욱 바람직하게는 0 내지 10 rpm, 가장 바람직하게는 0 내지 5 rpm.
- <67> * 주기적으로 회전 방향을 교대하는 회전.
- <68> * 사전에 정해진 간격으로의 회전.

- <69> 최적 회전 속도는 용기의 부피에 따라 결정될 것이고, 따라서 바람직한 회전 속도는 공정이 상대적으로 작은 용기에서 수행될 경우에 상대적으로 높을 수 있고, 반면에 공정이 상대적으로 큰 용기에서 수행될 경우에 회전 속도가 상대적으로 낮을 수 있다.
- <70> * 리그노셀룰로스성 바이오매스에 대한 효소:
 - <71> - 셀로비아제 (예를 들어, 노보짐 188 (Novozym 188))
 - <72> - 셀룰라제 (예를 들어, 셀루클라스트 1.5 FG L (Celluclast 1.5 FG L))
- <73> * DM 1 g 기준의 여과지 단위 (FPU)로 효소 로딩. 1 FPU는 당업자에게 잘 알려진 특정 조건 하에서 와트만 (Whatmann) # 1 여과지 상에서 1 μmol/분으로 글루코시드 결합을 가수분해하는데 필요한 효소의 양에 해당한다. 그러나, 효소적 활성은, 원칙적으로 원하는 효소적 활성을 유도하는 미생물을 첨가하는 것을 비롯한 임의의 가능한 형태로 공급될 수 있다 (건조물 1 g 당 0.001 내지 15 FPU, 바람직하게는 건조물 1 g 당 0.01 내지 10 FPU, 보다 바람직하게는 건조물 1 g 당 0.1 내지 8 FPU, 보다 바람직하게는 건조물 1 g 당 1 내지 7 FPU, 가장 바람직하게는 1 g 당 6 FPU 미만에 상응함).
- <74> * 전분 함유 바이오매스에 대한 효소:
 - <75> - 전분의 가공에서의 효소: 알파-아밀라제 및 글루코아밀라제.
- <76> * 효소적 가수분해에 대한 처리 시간: 0 내지 72시간, 바람직하게는 1 내지 60시간, 보다 바람직하게는 2 내지 48시간, 보다 바람직하게는 3 내지 24시간, 예컨대 4 내지 24시간, 예컨대 6 내지 24시간, 예컨대 8 내지 24시간, 예컨대 10 내지 24시간, 예컨대 12 내지 24시간, 예컨대 18 내지 24시간, 또는 22시간.
- <77> * 효소적 가수분해에 대한 온도. 적용된 효소적 활성의 최적 온도를 참조하여 조정함: 0 내지 105°C, 바람직하게는 10 내지 100°C, 보다 바람직하게는 15 내지 90°C, 보다 바람직하게는 20 내지 80°C, 보다 바람직하게는 25 내지 70°C, 가장 바람직하게는 30 내지 70°C, 예컨대 40 내지 45°C, 또는 실온.
- <78> * 바이오매스의 pH. 적용된 효소적 활성의 최적 pH를 참조하여 조정함: 3 내지 12, 예컨대 5 내지 10, 예컨대 6 내지 9, 예컨대 7 내지 8, 바람직하게는 4 내지 11.
- <79> * 효소적 처리는 배치식, 유가식 (fed-batch) 또는 연속식 공정으로 수행될 수 있다.

실시예

- <80> 실시예 1: 실험실 규모에서의 효소적 가수분해
- <81> 건조 중량 25 g (= 전처리된 줄기 67.0 g)에 상응하는 대략 40 mm의 평균 크기를 갖는 압축된 전처리 밀 줄기 (180 내지 200°C에서 5 내지 10분 동안 향류 물 추출, 물 및 건조물 유량 비율 - 5:1)를 플라스틱 백에 넣었다. 노보짐 188 0.75 mL, 셀루클라스트 1.5 FG L 3.75 mL 및 50 mM 시트르산나트륨 완충액 11.9 mL (pH 5.0)를 혼합하고, 상기 줄기 상에 분무하였다. 이것으로 30%의 최종 건조물 함량이 얻어졌다. 효소 로딩은 DM 1 g 당 10 여과지 단위 (FPU)에 상응하였다.
- <82> 혼합기는 물질의 적절한 혼합을 보장하기 위해 장축을 따라 5개의 내부 리브(rib)를 갖춘 드럼 (길이 1.0 m 및 직경 0.78 m)으로 구성되었다. 드럼은 수평축을 따라 26 rpm의 속도로 회전하였다. 물질의 혼합/가수분해를 실온에서 18 내지 24시간 동안 수행하였다. 이것으로 잔류하는 큰 섬유가 전혀 없는 진한 페이스트가 얻어졌다. 동일한 효소 로딩을 하였지만 혼합은 하지 않은 대조군 백 (control bag)에서는 줄기 분해의 징후가 나타나지 않았다.
- <83> 24시간 동안의 효소적 가수분해 후에, 생성된 물질의 일부 (건조물 29 g에 상응하는 양)를 청색 마개의 보틀 (bottle)에서 15%의 건조물로 희석시키고, 효모 (제빵용 효모; De Danske Spritfabrikker)를 첨가하였다. 보틀을 에어 록 (air lock)에 의해 밀폐시키고, 30°C에서 500 rpm으로 교반하면서 72시간 동안 놓아두었다. 생성된 액체는 에탄올 33 g/L, 크실로스 10 g/L를 함유하였다. 어떠한 글루코스도 검출되지 않았고, 이것은 효모가 가수분해 도중에 생성된 모든 글루코스를 이용할 수 있다는 것을 나타내었다. 글루코스 1 g당 에탄올 0.5 g을 수득한다고 가정하면, 이것은 원래 셀룰로스의 70%의 전환에 해당하였다.
- <84> 실시예 2: 파일럿 (pilot) 규모에서의 효소적 가수분해
- <85> DW 7 kg (= 전처리된 줄기 20 kg)에 상응하는 대략 40 mm의 평균 크기를 갖는 압축된 전처리 밀 줄기 (180 내지

200℃에서 5 내지 10분 동안 향류 물 추출에 의해 전처리됨, 물 및 건조물 유량 비율 - 5:1)를, 수평축을 약 10도 기울인 통상적인 회전식 시멘트 혼합기에 넣었다. 상기 혼합기는 물질의 혼합을 보장하기 위해 장축을 따라 2개의 내부 리브를 갖추었다. 혼합기로부터의 증발을 막기 위해 뚜껑을 개구부에 장착하였다. 혼합기 드럼은 수평축을 따라 29 rpm의 속도로 회전하였다.

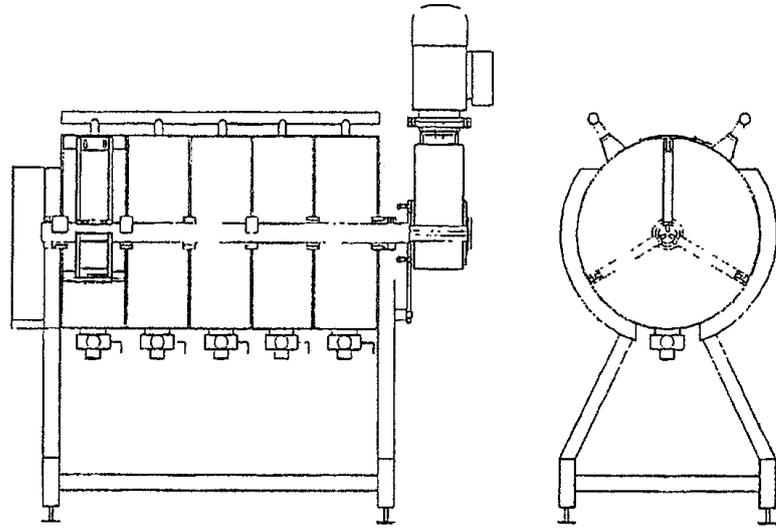
- <86> 셀룰라스트 1.5 FG L 200 내지 1150 mL 및 노보짐 188 40 내지 225 mL를 줄기에 첨가하였다. 이것으로 30%의 최종 건조물 함량이 얻어졌다. 효소 로딩은 DM 1 g 당 3 내지 15 FPU에 상응하였다. 탄산나트륨을 첨가함으로써 pH를 4.8 내지 5.0으로 조정하였다.
- <87> 시멘트 혼합기를 팬 (fan) 가열기를 사용하여 40 내지 45℃로 가열하였다. 물질의 혼합/가수분해를 22시간 동안 수행하였다. 효소 로딩에 따라, 잔류하는 큰 섬유가 전혀 없는, 점성이 더 높거나 낮은 액체가 얻어졌다. 대략 3 내지 5시간에 전처리된 줄기가 페이스트로 분해되었다. 혼합 5 내지 24시간 이후에, 페이스트가 점성 액체로 변하였다. 동일한 효소 로딩을 사용하였지만, 160℃에서만 전처리된 밀 줄기 또는 전처리만 된 밀 줄기를 사용한 대조군 실험에서는 줄기 액화의 어떠한 징후도 나타나지 않았다.
- <88> 동시에 일어나는 사카린화 및 발효를, DM 1 g 당 10 내지 15 FPU의 효소 로딩을 사용하여 40 내지 45℃에서 가수분해 24시간 이후에 시멘트 혼합기에 효모를 첨가함으로써 수행하였다. 온도를 35℃ 아래로 냉각되게 하고, 압축된 효모 (제빵용 효모; De Danske Spritfabrikker)를 줄기의 초기 건조물에 기준하여 대략 1% (w/w)의 농도로 첨가하였다. 사카린화 및 발효를 25℃에서 48시간 동안 계속하였다.
- <89> 생성된 물질을 2500 rpm에서 15분 동안 원심분리하였다. 상층액을 0.45 μm 필터를 통해 여과시키고, HPLC 상에서 당에 대해 분석하였다. DM 1 g 당 15 FPU의 효소 로딩에서, 상층액은 가수분해 24시간 이후에 글루코스 70 g/L, 크실로스 30 g/L를 함유하였다. 이것은 줄기에서 원래 존재하던 헤미셀룰로스 및 셀룰로스의 50% 가수분해에 상응하였다. DM 1 g 당 10 FPU의 효소 로딩을 사용한 동시에 일어나는 사카린화 및 발효로 에탄올 42 g/L 및 크실로스 30 g/L이 얻어졌다.
- <90> 실시예 3: 액화, 가수분해 및 발효
- <91> 가수분해 반응기는 20% DM이 넘는 고체 농축물을 액화 및 가수분해시키는 실험을 수행하기 위해 고안되었다 (도 1). 이 반응기는 5개의 분리된 챔버 (각각 폭 20 cm 및 직경 60 cm)로 나누어진 수평으로 위치한 드럼으로 구성되었다. 각 챔버에 3개의 노 (paddler)가 장착된 수평 회전축을 혼합/교반에 사용하였다. 1.1 kW 용량의 모터를 구동용으로 사용하였고, 회전 속도는 2.5 내지 16.5 rpm의 범위 내에서 조정 가능하였다. 회전의 방향은 1분에 2회 시계 및 반시계 방향으로 이동하게 프로그램하였다. 바깥쪽의 물이 충전된 가열 재킷 (heating jacket)은 80℃ 이하의 온도의 제어를 가능하게 하였다.
- <92> 챔버를 대략 40 mm의 평균 크기를 갖는 압축된 전처리 밀 줄기 (180 내지 200℃에서 5 내지 10분 동안 향류 물 추출에 의해 전처리됨, 물 및 건조물 유량 비율 - 5:1) 및 물로 채워, 20 내지 40 %의 초기 DM 함량을 생성하였다. 5:1 비율의 셀룰라스트 1.5 FG L 및 노보짐 188을 첨가하여 DM 1 g 당 7 FPU의 효소 로딩을 생성하였다. 50℃ 및 pH 4.8 내지 5.0에서 액화 및 가수분해를 수행하였다. 혼합 속도는 6.6 rpm이었다. 동시에 일어나는 사카린화 및 발효 (SSF) 실험을, 액화 및 가수분해 8시간 이후에, 그리고 초기 DM 1 kg 당 15 g의 압축된 제빵용 효모 (De Danske Spritfabrikker)를 첨가한 후에 온도를 32℃로 낮춰서 수행하였다.
- <93> 액화 및 가수분해는 40% DM 이하의 초기 DM 함량을 사용하여 가능하였다 (도 2 및 3). 초기 40% DM을 사용하여, 96시간 후에 80 g/kg의 글루코스 농도에 도달하는 것이 가능하였다. 또한, SSF로서 공정을 수행하는 것이 가능하였고 (도 3), 이에 의해 글루코스 축적에 의해 유도되는 셀룰라제의 생성물 역제를 감소시켰다. 통상의 제빵용 효모를 사용하여 40% 이하의 초기 DM 함량을 갖는 가수분해물을 발효시키는 것이 가능하였다. 완전하지는 않은 혐기성 조건 하에서, 에탄올의 수율은 20, 25, 30, 35 및 40% DM에서 이론상 얻을 수 있는 수율의 각각 80, 79, 76, 73 및 68%이었다.
- <94> 실시예 4: 전 (whole) 작물 액화, 사카린화 및 발효
- <95> 리그노셀룰로스성 및 전분 함유 바이오매스는 중력 혼합기, 및 셀룰라제, 헤미셀룰라제 및 아밀라제의 혼합물을 동시에 사용하여 가공될 수 있다. 리그노셀룰로스성 바이오매스는, 예를 들어 옥수수대, 줄기 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채 및 수수로부터의 줄기), 덩이줄기 (예를 들어, 사탕무, 감자), 곡물 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 유채, 수수로부터의 곡물)로 구성된 농작물; 예를 들어 피너스 실베스트리스 (*Pinus sylvestris*), 피너스 라디아타 (*Pinus radiata*)와 같은 연목, 및 예를 들어 살릭스 에스피퍼 (*Salix spp.*), 유칼립투스 에스피퍼 (*Eucalyptus spp.*)와 같은 경목으로 구성된 목재; 도시 고체 폐기물, 폐지

및 유사한 바이오매스로부터 유래될 수 있다.

- <96> 실시예 3에 기재된 가수분해 반응기를 실험에 사용하였다. 밀 줄기 (1차적으로 리그노셀룰로스 공급원)를 180 내지 200℃에서 5 내지 10분 동안 향류 물 추출을 사용하여 전처리하였다 (물 및 건조물 유량 비율 - 5:1). 밀 곡류 (1차적으로 전분 공급원)를 콩스킬데 롤러 밀 (Kongskilde roller mill)을 사용하여 건식 제분하였다. 밀 곡류 및 대략 40 mm의 평균 크기를 갖는 전처리된 줄기를 건조량 기준으로 1:1 비율로 혼합하였다. 물을 첨가함으로써 DM을 30 내지 40%로 조정하였다. 셀룰라스트 1.5 FG L 및 노보짐 188을 5:1 비율로 첨가하여 줄기의 DM 1 g 당 7 FPU의 효소 로딩을 생성하였다. 전분의 가수분해는 밀 곡류 1 kg 당 3.5 g의 로딩에서 차가운 매쉬 (mash) 효소 NS50033 (노보자임스 에이/에스 (Novozymes A/S), Bagsværd, Denmark)를 사용하여 수행되었다. 액화 및 가수분해는 50℃ 및 pH 4.8 내지 5.0에서 수행되었다. 8시간 후에, 온도를 34℃로 낮추고, 초기 DM 1 kg 당 15 g의 압축된 제빵용 효모 (De Danske Spritfabrikker)를 첨가하였다. 단지 30% DM의 줄기를 사용한 실험을 동등하게 수행하였다.
- <97> 줄기와 곡류의 혼합으로 줄기 단독을 적용한 것과 비교하여 액화 및 가수분해 단계에서 글루코스의 빠른 초기 축적이 얻어졌다 (도 4). 액화 및 SSF 96시간 후에, 에탄올 농도는 단독 기질로서의 밀 줄기만을 사용한 경우에 41 g/kg이었다 (도 4). 줄기와 곡류의 혼합 실험에서, 에탄올 농도는 68 g/kg에 도달하였다.
- <98> 실시예 5: 전분 또는 전분 함유 물질의 저온 액화
- <99> 또한, 본 발명에 따른 방법은 정제 전분 또는 전분 함유 물질 (예를 들어, 사탕무, 감자, 곡물 (예를 들어, 벼, 밀, 호밀, 귀리, 보리, 호밀, 수수로부터 유래))의 저온 가공에 적용될 수 있다. 실시예 4에 따라, 곡류의 가열 전처리는 전분의 액화 및 가수분해에 필요하지 않다. 반면에, 건식 제분을 일반적으로 전분 함유 곡류의 전처리에 사용하였다. 20 내지 60%의 건조물 함량을 갖는 건식 제분된 곡류를 중력 혼합기에 로딩하였다. 차가운 매쉬 효소 NS50033 (노보자임스 에이/에스, Bagsværd, Denmark) 또는 알파-아밀라제 및 글루코아밀라제를 동시에 첨가하였다. 이후에, 전분의 완전 액화 및 사카린화가 단일 용기 공정으로 가능하였다. 효소적 가수분해 공정 도중의 온도 및 pH 범위는 효소에 의해 정해질 수 있고, 온도는 25 내지 60℃, 바람직하게는 40 내지 55℃의 범위에 있을 것이고, pH는 3 내지 12, 바람직하게는 3 내지 8의 범위에 있을 것이다.
- <100> 상기 공정을 SSF와 병행할 수 있다.
- <101> <인용 문헌>
- <102> [Galbe, M., Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:618-628].
- <103> [Giovannozzi-Sermanni, G., D'Annibale, A., Perani, C., Porri, A., Falesiedi, G. (2002). Solid-state bioreactors for the sustainability].
- <104> <http://www.unitus.it/dipartimenti/dabac/progetti/ssbioreactors/solidstatebioreactor.htm>
- <105> [Gregg, D., Saddler, J.N. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol: Process flow-sheet development. Biomass Bioenerg. 9:287-302].
- <106> [Mais, U., Esteghalalian, A.R., Saddler, J.N. (2002). Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. Appl. Biochem. Biotechnol. 98-100:463-472].
- <107> US4409329
- <108> US2002117167A
- <109> US2004005674A

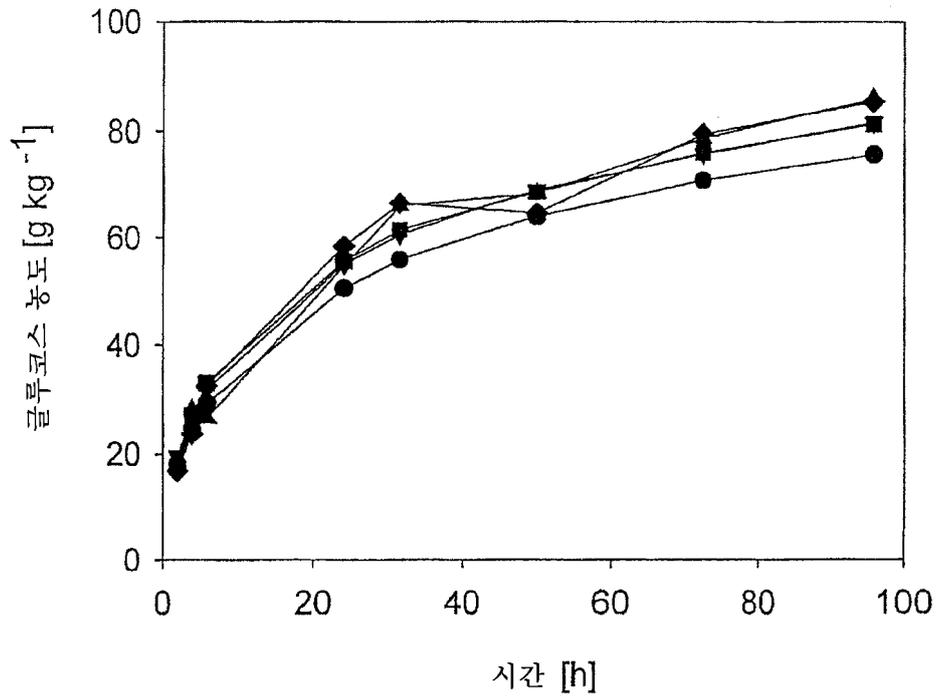
도면

도면1



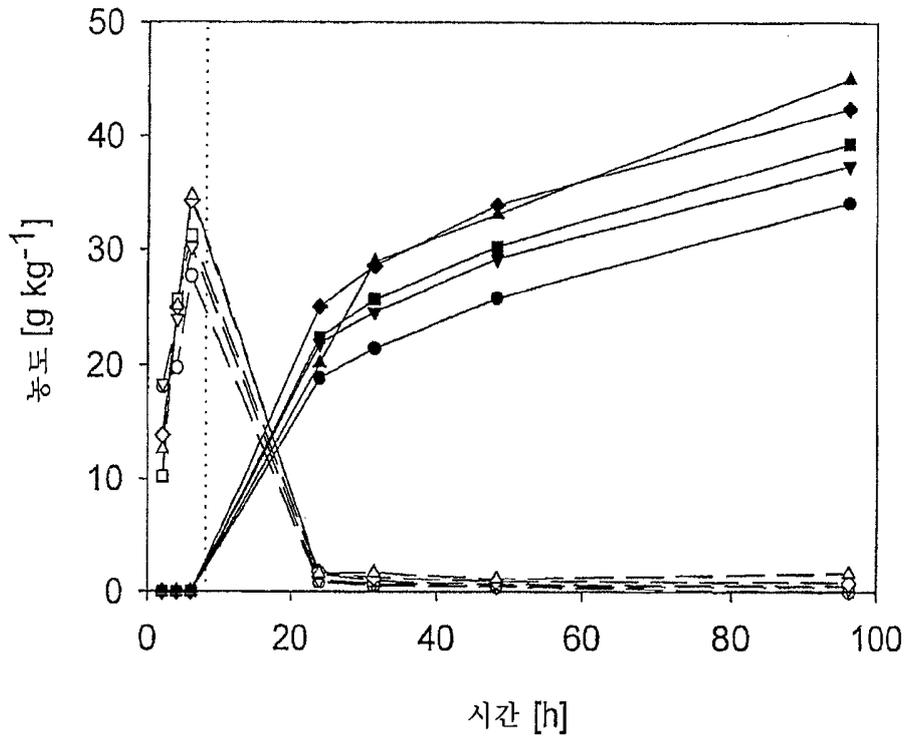
5-챔버 가수분해 반응기의 횡단면도 (왼쪽) 및 종단면도 (오른쪽)

도면2



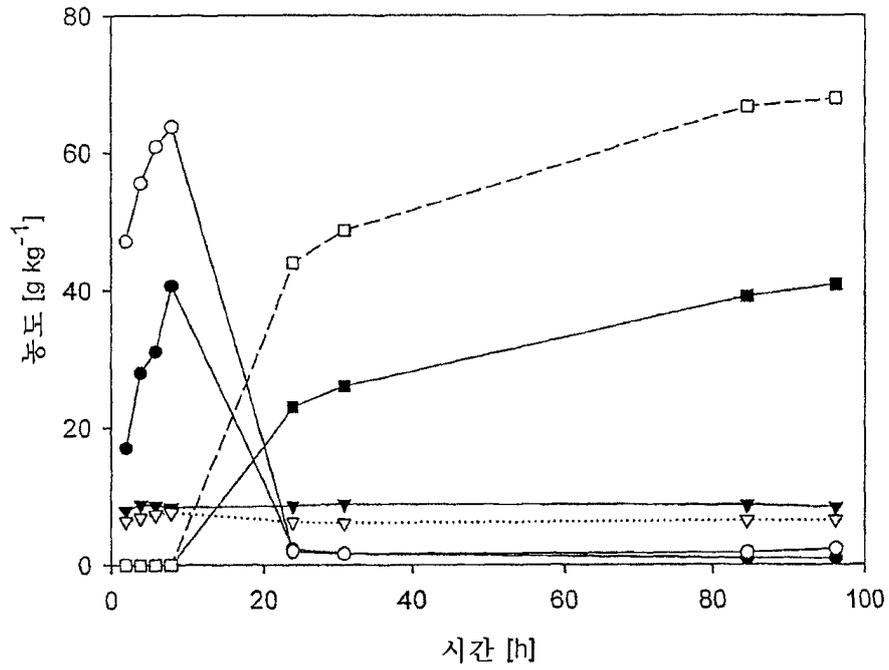
7 FPU (g DM)⁻¹의 효소 로딩을 사용한 20% (●), 25% (▼), 30% (■), 35% (◆) 및 40% (▲)의 건조물 함량에서의 전처리된 밀 줄기의 액화 및 가수분해 도중의 글루코스의 농도

도면3



7 FPU (g DM)⁻¹의 효소 로딩을 사용한 20% (●), 25% (▼), 30% (■), 35% (◆) 및 40% (▲)의 건조물 함량에서의 전처리된 밀 줄기의 액화, 가수분해 및 발효 도중의 글루코스 (무색) 및 에탄올 (흑색)의 농도. 효모는 8시간 후에 첨가함 (점선).

도면4



전처리된 밀 줄기 (흑색), 및 전처리된 밀 줄기 와 밀 곡류의 혼합물 (무색)의 액화 및 발효 도중의 글루코스(●), 크실로스(▼) 및 에탄올(■)의 농도. 효모는 액화 및 가수분해 8시간 이후에 첨가함.