

기술명 : 2차 바이오매스 기질을 이용한 라카아제의 무독화 활성 증진 방법

IPC : C12P 19/02|C12P 19/12|C12N 9/02

발명자 : 건국대학교 이정걸

요 약

본 발명은 라카아제를 이용한 바이오매스의 무독화 공정에서, p-쿠마르산과 같은 천연 중개자를 함유하는 2차 바이오매스 기질을 소량 첨가하여 라카아제의 무독화 활성을 증진시키는 방법 및 이를 포함한 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 공정(SPS)에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 저가의 2차 바이오매스 기질을 소량 추가함으로써, 2차 기질 내 포함된 천연 중개자(mediator)에 의해, 바이오매스의 분해에서 생성될 수 있는 독성물질을 제거하는 라카아제의 무독화 활성이 증진되며, 사용되는 2차 기질은 환경 독성이 낮으므로, 추가적인 세척 과정을 필요로 하지 않으며, 정제 없이 그대로 사용되므로 비용이 저렴하면서 환경 독성이 적어, 경제적이고 친환경적이고, 동시 전처리 및 당화(PS) 공정에 적용할 수 있어, 신속하고 경제적이고 친환경적으로 바이오매스로부터 당화물을 우수한 당화 수율로 생산할 수 있다. - 도4

청구범위

청구항 1

전처리 공정 또는 당화 공정 중에 바이오매스에서 생성되는 독성 물질을 라카아제로 감소시키는 무독화 과정에 있어서, 상기 바이오매스와는 상이하며 천연 중개자(mediator)로서 p-쿠마르산(p-coumaric acid)을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 첨가하여 라카아제에 중개자를 보충하는 단계를 포함하며, 상기 2차 바이오매스 기질은 밀기울로서, p-쿠마르산이 1.5mM로 공급되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 라카아제의 무독화 활성을 증진시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 2차 바이오매스 기질은 상기 바이오매스 기질의 중량 대비 0.098% 이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 라카아제의 무독화 활성을 증진시키는 방법.

청구항 3

바이오매스와, 상기 바이오매스와는 상이하며 p-쿠마르산을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 혼합하여 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스들을 침지시키는 제 1 단계; 및 배양 배지에 리그노셀룰라아제를 생산하는 곰팡이 컨소시엄을 접종시켜 배양하여 생산된 효소 혼합물 및 라카아제(laccase)로 상기 침지된 바이오매스 혼합물을 동시에 전처리 및 당화시켜 당화물을 제조하는 제 2 단계;를 포함하며, 상기 2차 바이오매스 기질은 밀기울로서, p-쿠마르산이 1.5mM로 공급되도록 첨가하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 2차 바이오매스 기질은 상기 바이오매스 기질의 중량 대비 0.098% 이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 곰팡이 컨소시엄은 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*의 혼합물인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 당화는 pH 5.0, 35°C에서 90 내지 110 RPM의 속도로 교반하며, 36 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 제 2 단계는 보호제로서 계면활성제를 추가로 첨가하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)인 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법.

청구항 9

Pholiota adiposa 및 *Armillaria gemina*의 곰팡이 컨소시엄, 라카아제, 및 p-쿠마르산을 포함하는 2차 바이오 매스 기질을 유효성분으로 포함하며, 상기 2차 바이오매스 기질은 밀기울이며, p-쿠마르산이 1.5mM로 공급되도록, 1차 바이오매스 기질의 중량 대비 0.098%로 포함되는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물. 청구항 10 제 9항에 있어서, 상기 조성물은 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)인 계면활성제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물.

기술 분야

본 발명은 라카아제를 이용한 바이오매스의 무독화 공정에서, p-쿠마르산과 같은 천연 중개자를 함유하는 2차 바이오매스 기질을 소량 첨가하여 라카아제의 무독화 활성을 증진시키는 방법 및 이를 포함한 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 공정(SPS)에 관한 것이다.

배경 기술

화석연료의 고갈, 전 세계적인 CO 절감노력으로 인해 신재생 에너지, 그 중에서도 바이오매스를 이용한 에너지 생산에 대한 관심이 높아지고 있다. 바이오매스(Biomass)는 식물성 원료를 이용하여 바이오연료 및 전기, 열 등을 생산하는 신재생 에너지로서 환경 친화성, 경제성 및 기술적 타당성면에서 가능한 대안으로 각광받고 있다. 상기 바이오매스 자원 중에서도 목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)는 부존량이 가장 크고, 식량과도 무관해 윤리적인 문제에서도 자유로운 장점이 있다. 이에 목질계 자원인 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 이용한 제 2 세대 바이오 유용산물의 생산 및 개발이 연구되고 있다. 목질계 바이오매스를 이용한 바이오연료의 생산에는 일반적으로 전처리(pretreatment), 당화 (saccharification), 발효공정(fermentation)이 필요하다. 이중 전처리 공정은 효소 가수분해 반응 속도와 수율을

향상시킬 수 있도록 하는 공정을 통칭하며, 난분해성 방향족 중합체인 리그닌(lignin), 셀룰로오스 (cellulose) 및 헤미셀룰로오스(hemicellulose)의 복합체를 분해하여 결정화도를 감소시켜 효소의 접근성을 높이고 바이오매스의 비표면적을 증가시켜 유효 효소의 양을 증가시키는 것으로, 전처리 공정의 효율 정도에 따라 바이오 연료의 생산비용이 결정되므로 상기 전처리 공정은 바이오매스로부터 바이오 연료를 생산하는데 중요한 요소 중의 하나이다. 이러한 목질계 바이오매스의 발효성을 촉진하기 위한 전처리 공정에는 물리적, 화학적 방법이 있으며, 이는 바이오매스 물질로부터 미생물이 이용할 수 있는 유용한 발효성 당화물로 5탄당이나 6탄당의 단당류를 수득하기 위하여 가수분해(hydrolysis) 과정이 필요하다. 그러나 목질계 바이오매스의 가수분해 전처리나 당화 중에 페놀계 화합물 등 독성물질이 유발되는데, 이들 독성 물질은 미생물의 생장 및 발효를 저해하여, 이후에 발효공정의 효율을 저감시키므로 유기산 및 알코올의 생산 효율이 저하되는 문제점이 있다. 그러므로, 가수분해 전처리 및 당화 후에 발생된 독성 물질을 제거하는 무독화 공정이 필요하다. 한편, 종래에는 도 1에 나타난 바와 같이, 전처리와 당화가 분리되어 순차적으로 진행되는 순차적 전처리 및 당화 공정(Sequential Pretreatment and Saccharification; SqPS)을 주로 이용하였는데, 이런 경우 다음 단계로 진행될 때마다 세척 과정이 필요하며, 이와 같은 세척 과정에서 원료로 사용되는 바이오매스가 유실되는 경우가 많아 실제 에너지 효율이 낮아지고, 사용된 다량의 물에 의한 폐수 발생으로 인해 환경 오염의 가능성, 독성 유출 발생을 야기하며, 이로 인해 공정 비용이 상승되는 문제가 있다. 따라서, 이러한 문제점들을 극복할 수 있는 단순하지만 효율적인 시스템의 개발이 요구되고 있다. 상기 문제점을 해결하기 위한 대안으로 본 발명자는 대한민국 특허출원 제2015-0056209호에서 전처리와 당화를 동시에 수행하는 동시 전처리 및 당화 공정(Simultaneous Pretreatment and Saccharification; 이하 SPS) 방법 론을 제안한 바 있다. 상기 SPS 공정은 배양 배지에 곰팡이 컨소시엄을 접종시켜 생산된 효소로 침지된 바이오매스를 동시에 전처리 및 당화시키고, 바이오매스의 분해에서 생성될 수 있는 독성 물질, 특히 페놀계 화합물의 독성은 라카아제(laccase)를 통해 감소함으로써, 순차식 전처리 및 당화 공정(SqPS)의 중간에 포함되는 세척공정을 생략할 수 있어, 상기 세척 공정에 의한 바이오매스의 손실을 줄이고 당화 수율을 향상시킬 수 있다. 하지만, 상기 라카아제 단독 사용으로는 만족할만한 무독화 활성을 나타내지 못하기 때문에, 효소의 기질 특이성을 넓히기 위해, 중개자(mediator)의 역할이 중요하다. 유기적 중개자의 사용은 라카아제의 산화 환원 전위를 향상시키고, 따라서 촉매작용 속도를 향상시킨다. 이에, 라카아제-중개자 시스템(Laccase mediator system, LMS)을 통한 라카아제의 독성 제거 활성 증진 연구가 진행되고 있다[U. Fillat and M. B. Roncero, Biochem. Eng. J., 2009, 4, 193-198.] . 그러나, 지금까지 모든 시판되는 중개자는 매우 환경독성이 높아 환경친화적 반응에 적합하지 않았다. 또한, 1-히드록시벤자트리아졸과 같은 유기적 시판 중개자를 적용한 후 매우 반응성이 큰 자유 라디칼 종이 생성되었고, 어떠한 잔여 농도의 자유 라디칼도 이후 최종 단계에서 사용되는 가수분해 효소를 변성시키는 데에 충분하므로, 생성된 자유 라디칼의 제거를 위해 최종 가수분해 후 간헐적 세척이 필요했다. 증류수로의 광범위한 세척의 필요성은 공정의 전체 비용을 증가시키고, 또한 많은 환경독성 유출물을 생성한다. 또한, 이러한 세척 단계만으로 잔여 중개자를 완전히 제거하지 못하는 문제가 있었다. 따라서 목질계 바이오매스에서 효율적이고, 경제적이고, 친환경적인 전처리 및 당화 공정 개발이 요구되고 있다. 이에, 본 발명자들은 효율적이고, 경제적이고, 친환경적인 라카아제의 무독화 활성 증진 방법을 위하여 연구하던 중, 라카아제에 천연 중개자를 가진 저가의 2차 바이오매스 기질을 소량 첨가하는 방법이 라카아제에 천연 중개

자를 공급함으로써 라카아제의 무독화 활성을 높일 수 있을 뿐만 아니라, 상기 2차 바이오매스 기질은 정제 없이 그대로 사용되므로 비용이 저렴하면서 환경 독성이 적어, 경제적이고 친환경적인 방법임을 알아내고 본 발명을 완성하였다.

해결하려는 과제

따라서 본 발명의 목적은 전처리 공정 또는 당화 공정 중에 바이오매스에서 생성되는 독성 물질을 라카아제로 감소시키는 무독화 과정에 있어서, 친환경적으로 독성 제거 효율을 향상시키고 동시에 당의 손실을 없게 하고 처리비용을 최소화하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 상기 무독화 과정의 독성 제거 효율이 향상되어, 당화 수율 역시 향상된 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법을 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 바이오매스로부터 당화물을 얻을 수 있는, 독성 제거 효율이 향상된 동시 전처리 및 당화용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 전처리 공정 또는 당화 공정 중에 바이오매스에서 생성되는 독성 물질을 라카아제로 감소시키는 무독화 과정에 있어서, 대상 바이오매스와는 상이하며 천연 중개자(mediator)로서 p-쿠마르산을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 소량 첨가하여 라카아제에 중개자를 보충하는 단계를 포함하는 경 제적이며 친환경적으로 라카아제의 무독화 활성을 증진시키는 방법을 제공한다. 또한, 바람직하게는 상기 2차 바이오매스 기질은 밀기울(wheat bran), 왕겨 및 양버들나무(*Populus nigra*.)로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 2차 바이오매스 기질의 첨가량은 p-쿠마르산이 1.5 mM이 공급될 수 있는 양일 수 있다. 또한, 본 발명은 바이오매스와, 상기 바이오매스와는 상이하며 p-쿠마르산을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 혼합하여 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스들을 침지시키는 제 1 단계; 및 배양 배지에 리그노셀룰라아제를 생산하는 곰팡이 컨소시엄을 접종시켜 배양하여 생산된 효소 혼합물 및 라카아제(laccase)로 상기 침지된 바이오매스 혼합물을 동시에 전처리 및 당화시켜 당화물을 제조하는 제 2 단계;를 포함하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법을 제공한다. 또한, 바람직하게는 상기 2차 바이오매스 기질의 혼합량은 p-쿠마르산이 1.5 mM이 공급될 수 있는 양일 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 곰팡이 컨소시엄은 *Pholiota adiposa*와 *Armillaria gemina*의 혼합물일 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 당화는 pH 5.0, 35°C에서 90 내지 110 RPM의 속도로 교반하면서 36시간 동안 수행될 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 제 2 단계는 보호제로서 계면활성제를 추가로 첨가할 수 있다. 또한, 바람직하게는 상기 계면활성제는 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20) 일 수 있다. 또한, 본 발명은 바이오매스로부터 당화물을 제조하는 배양 배지에 *Pholiota adiposa* 및 *Armillaria gemina*의 곰팡이 컨소시엄, 라카아제, 및 p-쿠마르산을 포함하는 2차 바이오매스 기질을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물을 제공한다. 또한, 바람직하게는 상기 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물은 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)의 계면활성제를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

본 발명에 따르면, 목적제 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 공정시, 상기 바이오매스와 다

른, 저가의 2차 바이오매스 기질을 소량 추가함으로써, 2차 기질 내 포함된 천연 중개자(mediator)에 의해, 바이오매스의 분해에서 생성될 수 있는 독성물질을 제거하는 라카아제의 무독화 활성이 증진된다. 또한, 사용되는 2차 기질은 환경 독성이 낮으므로, 추가적인 세척 과정을 필요로 하지 않으며, 정제 없이 그대로 사용되므로 비용이 저렴하면서 환경 독성이 적어, 경제적이고 친환경적이다. 따라서, 본 발명에 따른 무독화 방법은 동시 전처리 및 당화(SPS) 공정에 적용할 수 있어, 신속하고 경제적이고 친환경적으로 바이오매스로부터 당화물을 우수한 당화 수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 동시 전처리 및 당화 방법(SPS) 및 종래 기술의 순차적 전처리 및 당화 방법(SqPS)의 모식도이다. 도 2는 본 발명의 일 실험예에 있어서, 라카아제(10 U/g-기질)를 포함하거나 포함하지 않은 배지에서 벧झ을 처리할 때, 침지된 벧झ(CRS)으로부터 유래된 페놀 화합물의 pH에 따른 가용화 정도를 나타내는 그래프이다(대조군 (●); pH 4.0 (○); pH 4.5 (▼); pH 5.0 (△); 및 pH 5.5 (■)). 도 3은 본 발명의 일 실험예에 있어서, 라카아제를 포함하는 배지에서 벧झ을 처리할 때, 침지된 벧झ으로부터 유래된 페놀 화합물의 pH 4.5에서 라카아제 투여량에 따른 가용화 정도를 나타내는 그래프이다((5 U/g-기질 (●); 10 U/g-기질 (○); 15 U/g-기질 (▼); 20 U/g-기질 (△)). 도 4는 본 발명의 일 실험예에 있어서, 라카아제를 포함하는 배지에서 벧झ을 처리할 때, 중개자(mediator)의 첨가에 따른 침지된 벧झ으로부터 유래된 페놀 화합물의 가용화 정도를 나타내는 그래프이다(대조군 (●); HBT (○); AS (▼); pCA (△); 및 SA (■)). 도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 벧झ의 무독화 및 당화 전후의 형태를 투과전자현미경으로 분석한 사진이다((a) 무독화 공정 전, (b) 무독화 공정 후, (c) 무독화 공정을 포함한 동시 전처리 및 당화 (SPS) 반응 후)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 따른 라카아제의 무독화 활성 증진 방법은 전처리 공정 또는 당화 공정 중에 바이오매스에서 생성되는 독성 물질을 라카아제로 감소시키는 무독화 과정에 있어서, 대상 바이오매스와는 상이하며 천연 중개자(mediator)로서 p-쿠마르산을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 소량 첨가하여 라카아제에 중개자를 보충하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다. 리그닌 산화 효소는 그들의 넓은 기질 특이성 및 더 낮은 산화 환원 전위에 대하여 잘 알려져 있다. 유기적 중개자의 사용은 리그닌 산화 효소의 산화 환원 전위를 향상시키고, 따라서 촉매작용 속도를 향상시킨다. 그러나, 모든 시판되는 중개자는 매우 환경 독성이 높으므로, 환경친화적 반응에 적합하지 않았고, 천연 중개자 역시 TcLac의 무독화 퍼텐셜을 상승시켰으나(도 4 참조), 시판되는 매우 비싼 천연 중개자의 적용은 반응혼합물로부터 이들의 잔여 농축물을 제거하기 위한 독립적인 세척 단계를 필요로 하였다. 상기 잔여 천연 중개자가 제거되지 않은 경우, 전체 당화 수율은 급격히 감소되었는데(표 1 참조), 이런 감소는 중개자의 작용 중에 발생한 자유 라디칼 때문이었다. 이런 자유 라디칼의 전체 농도는 매우 높았고, 상기 라디칼은 매우 반응성이 높은 종이며, 이들은 이후 가수분해 단계에서 사용되는 효소를 쉽게 변성시킬 수 있으므로, 세척 단계가 필요하였다. 증류수로의 광범위한 세척의 필요성은 공정의 전체 비용을 증가시키고, 많은 환경독성 유출물을 생성하며, 이러한 세척 단계만으로는 잔여 중개자를 완전히 제거하지 못하였다. 이에, 본 발명자들은 시판 천연 중개자의 적용과 관련된 모든 문제점들은 해결하기 위해, 1차 기질과 다른 2차 바이

오매스 기질로부터 상기 중개자를 제공하는 것을 고려해 보았다. 식물 및 농업 잔여물들은 그들의 구성성분 구조 물질로서 다양한 페놀 화합물을 함유하는 것으로 알려져 있고[B.S. Donohoe, P.N. Ciesielski, T.B. Vinzant *Methods Mol Biol.*, 2012, 908, 31-47], 거의 모든 이용가능한 중개자들 또한 자연에서 페놀성이므로, 다양한 농업-잔여 물질은 중개자 보급을 위해 활용될 수 있다. 이때, 상기 2차 바이오매스 기질은 천연 중개자(mediator)로서 p-쿠마르산을 함유하는 것이 바람직한데, 1-HBT, p-쿠마르산(pCA), AS, SA 등의 다양한 천연 중개자를 대상으로 한 TcLac의 무독화 퍼텐셜 시험에서 상기 p-쿠마르산은 1-HBT 다음으로 TcLac의 무독화 퍼텐셜을 증가시켰으며(도 4 참조), 식물 유래이기 때문에 환경 독성도 적은 편에 속하며, 저해 퍼텐셜 시험 결과 p-쿠마르산이 유의한 저해의 유발 없이 TcLac 활성을 향상시킴에 있어서 효과적인 것으로 나타났기 때문이다(표 3 참조). 1-HBT의 경우에는 환경 독성이 크기 때문에 친환경 관점에서 사용을 배제하였다. 이러한 p-쿠마르산을 함유하는 상기 2차 바이오매스 기질은 밀기울, 왕겨, *Populus nigra* 등을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 밀기울을 사용할 수 있다. 이때, 상기 2차 바이오매스 기질의 첨가량은 p-쿠마르산이 1.5 mM이 공급될 수 있는 양인 것이 바람직한데, 만일 p-쿠마르산의 공급량이 상기 범위 미만이면 TcLac의 무독화 퍼텐셜 증가 효과가 관찰되지 않고, 상기 범위를 초과하면 잔여 중개자의 제거가 어려워 당화 수율을 급격히 저하시키는 문제가 있다. 본 발명은 바이오매스 공정 기술로서 경제적 및 친환경적으로 독성이 적은 물질 또는 무독성물을 방출하는 것을 최대 목적으로 하며, 이에 본 발명에 따르면 환경 독성이 적고, 저가의 가공하지 않은 2차 바이오매스 기질을 첨가함으로써, 부가적인 세척 단계가 필요하지 않고, 따라서 세척 단계에 따른 잠재적인 폐수 처리를 위한 공정 비용 및 합성된 유기적 화합물질의 비용 등이 필요하지 않아 전체적인 공정 비용을 낮출 수 있고, 친환경적이며, 상기 2차 바이오매스에서 방출된 천연 중개자는 라카아제의 무독화 활성을 증가시키므로, 가수분해 효소의 변형이 감소되어, 그 결과 당화 수율을 향상시킬 수 있다. 또한, 동일한 용기 내에서의 전처리 및 당화 수행은 공정을 더 용이하게 하고, 에너지 소모를 줄이며, 잔여 바이오매스의 처리를 쉽게 만들 수 있으므로, 상기 2차 바이오매스 기질을 이용한 무독화 공정을 동시 전처리 및 당화 (SPS) 방법에 포함시킬 수 있다. 본 발명에 따른 SPS 방법은 독성 부산물의 발생과 바이오매스의 손실을 줄이고 당화수율을 향상시킬 수 있는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법으로서, 바이오매스와, 상기 바이오매스와는 상이하며 p-쿠마르산을 함유하는 2차 바이오매스 기질을 혼합하여 분쇄하고, 분쇄된 바이오매스들을 침지시키는 제 1 단계; 및 배양 배지에 리그노셀룰라아제를 생산하는 곰팡이 컨소시엄을 접종시켜 배양하여 생산된 효소 혼합물 및 라카아제(laccase)로 상기 침지된 바이오매스 혼합물을 동시에 전처리 및 당화시켜 당화물을 제조하는 제 2 단계;를 포함한다. 본 발명에 따른 제 1 단계에 있어서, 상기 바이오매스는 식물에서 유래된 것이며, 바람직하게는 목질계 바이오매스(lignocellulosic biomass)로서 버드나무(willow), 볏짚(rice straw) 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한하는 것은 아니다. 본 발명의 실시예에서는 바이오매스 물질로서 오리사 사티바 엘(*Oryza sativa* L.) 종의 볏짚이 사용되었다. 상기 제 1 단계에서 바이오매스의 분쇄는 당업계에서 사용되는 방법을 사용할 수 있으며, 볏짚(*Oryza sativa* L.)의 경우에는 5 cm 정도 길이로 잘라 4 mm 정도 크기로 분쇄시킬 수 있다. 2차 바이오매스 기질로는 p-쿠마르산을 함유하는 밀기울, 왕겨, *Populus nigra* 등을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 밀기울을 사용할 수 있으며, 이때, 상기 2차 바이오매스 기질의 혼합량은 p-쿠마르산이 1.5 mM이 공급될 수 있는 소량만 있어도 충분하다. 이후, 분쇄된 고체 바이오매스들은 버퍼(buffer) 용액과 1:15의 (w/v)비율로 혼합하여 침

지시키는 물리적 처리를 할 수 있다. 이때, 상기 버퍼는 0.1 몰농도(M)의 아세트산나트륨 버퍼로 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)에서 생산되는 효소의 최적화를 위해 바람직하게 pH 5.0인 아세트산나트륨 버퍼를 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 제 2 단계는 동시 전처리 및 당화(simultaneous pretreatment and saccharification, SPS) 공정으로, 효소적 수단을 통한 기질 변형 및 가수분해의 단일 조합된 단계를 통해 바이오매스 물질의 셀룰로오스를 에탄올 발효가 가능한 글루코오스(glucose)와 같은 단당류 및 이당류로 전환하는 공정이다. 상기 SPS 공정은 도 1에 나타난 바와 같이, 전처리(pretreatment), 무독화(detoxification), 가수분해(hydrolysis)가 효소에 의해 동시 수행되므로, 독성 부산물의 발생과 바이오매스의 손실을 줄이고 당화수율을 높이기 위해, 가수분해를 위한 효소 활성 및 무독화를 위한 효소 활성을 높이는 것이 매우 중요하다. 먼저, 목질계 바이오매스의 가수분해를 위한 효소 활성 증가를 위해 복합 매트릭스(matrix)인 리그닌(lignin)과 리그노셀룰로오스(lignocellulose)를 분해하는 고효율 효소의 생산이 요구되며, 이는 생물학적으로 곰팡이 컨소시엄(fungal consortium)의 형태로 균주들을 복합하여 사용함으로써 성취될 수 있다. 상기 곰팡이 컨소시엄으로는 *Pholiota adiposa*(PA) 및 *Armillaria gemina* (AG)의 혼합물을 사용할 수 있다. 상기 AG의 엔도글루카나제(Endoglucanase (EG; 65 kDa))는 글리코사이드 가수분해효소(glycoside hydrolase (GH)) 패밀리 61에 속해 있으며, 이는 카복시메틸 셀룰로오스(CMC)에 대하여 보고된 촉매 효율 중 가장 높은 값(k/K , 3590 mg ml⁻¹ s⁻¹)을 나타내고, PA의 β -글루코니다제(BGL)는 기질로서 p-니트로페닐 글루코피라노사이드(nitrophenyl glucopyranoside, pNPG) 및 셀로비오스 모두에 대해 보고된 V_{max} 중 최고값을 나타내므로, 두 진균성 배양액의 조합은 리그노셀룰로오스성 바이오매스의 효소적 당화에 시너지 효과를 제공할 수 있다. 실험 결과, PA 및 AG 배양액의 시너지 상호작용은 개별적인 AG (1.72 FPU/ml) 및 PA (1.25 FPU/ml)에 의해 생산된 것보다 2.1-3.0배 더 높은 활성(2.57 FPU/ml)을 나타내었다. 곰팡이 컨소시엄으로부터 최적화된 효소 생산은 문헌[S. S. Jagtap, S. S. Dhiman, T.-S. Kim, I.-W. Kim 및 J.-K. Lee, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98, 661-669.; 및 S. S. Jagtap, S. S. Dhiman, M. Jeya, Y. C. Kang, J.-H. Choi 및 J.-K. Lee, Biores. Technol., 2012, 120, 264-272]에 보고된 물리적 파라미터 값을 이용할 수 있으며, 구체적으로, 25 °C, pH 5.0에서 질소원으로서 펩톤을 사용하는 7리터 자 발효인(jar fermenter)으로부터 수득될 수 있다. 상기 최적화 효소 생산 조건에서, 곰팡이 컨소시엄으로부터의 조추출물은 자일라나아제(xylanase): 1,870 \pm 250 U/ml, 엔도글루카나아제(endoglucanase, EG): 176 \pm 23 U/ml, 셀로바이오하이드롤라아제(cellobiohydrolase, CBH) : 44 \pm 5 U/ml, 베타-글루코시다아제(β -glucosidase, BGL) : 39 \pm 5 U/ml, 및 FPU(Filter Paper Unit): 2.6 \pm 0.5를 나타내었다. 본 발명에 따른 SPS 공정에 있어서, 바이오매스로 볏짚을 사용할 경우, 상기 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산된 효소의 최적 투여량은 20 FPU/g-기질이었는데, 이보다 더 낮은 투여량은 유의한 양의 환원당을 생산하지 못하고, 이보다 더 높은 투여량은 최종 당화수율의 향상 증가에 큰 영향을 미치지 못한다(표 5 참조). 본 발명에 따른 무독화(detoxification)는 동시 전처리 및 당화 단계에서 생산되는 전술된 바와 같은 폐놀계 화합물의 독성물질을 생물학적 방법으로 감소 또는 제거하는 반응이며, 일 실시예로 라카아제(laccase)를 생산하는 균주로 *Tyromyces chioneus*를 배지에 접종하고 30°C에서 150 RPM(revolution per minute)의 속도로 4 시간 동안 진탕배양하여, 건조 중량 1g의 바이오매스를 50 mM 버퍼 25 mL에 침지시킨 바이오매스에 TcLac('TcLac'은 라카아제(laccase)를 생산하는 균주를 명칭한다.)에서 생산된 라카아제는 15 U/mL가 함유되도록 하여 무독화할

수 있다. 일반적으로 라카아제(Laccase)는 기질(substrate)에 대한 특이성이 낮아 폴리페놀(polyphenol), 메톡시-치환 페놀(methoxy-substituted phenol), 다이아민(diamine) 등 자연계에 광범위하게 분포된 페놀성 물질을 산화시킬 수 있다. 또한 균류에서 생산되는 라카아제는 리그닌(lignin)의 분해에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 TcLac은 라카아제의 생산을 통해 바이오매스로부터 유래된 페놀성 화합물등을 산화시켜 제거하는 무독 화뿐만 아니라 바이오매스의 전처리에 이용될 수 있으므로, 곰팡이 컨소시엄과 함께 첨가될 수 있다. 이때, 2차 바이오매스 기질이 함께 첨가됨으로써, 상기 2차 바이오매스에서 방출된 천연 중개자가 라카아제의 무독화 활성을 증가시키므로, 가수분해 효소의 변형이 감소되어, 그 결과 당화 수율을 향상시킬 수 있다. 상기 2차 바이오매스 기질은 환경 독성이 적고, 저가이며 가공하지 않은 상태로 사용할 수 있으므로, 친환경적이며, 경제적이다. 상기 2차 바이오매스 기질은 p-쿠마르산이 1.5 mM이 공급될 수 있는 소량만 있어도 상기 라카아제의 무독화 활성을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 있어서, 당화 공정은 pH 5.0, 35 °C에서 90 내지 110 RPM의 속도로 교반하며 36시간 동안 수행될 수 있다. 구체적으로, pH에 있어서, 당화 공정은 pH 5.0에서 수행하는 것이 바람직한데, 왜냐하면 PA 및 AG에 의해 분비된 리그노셀룰로오스성 효소 및 TcLac에 있어서 최적 pH이기 때문이다. 반응 온도에 있어서, 침지된 벧짚(CRS)에 대하여 35 °C에서, 곰팡이 컨소시엄 조 효소는 36 시간 동안 74%의 상대 활성(FPU 단위)을 유지하였고, 이는 기질의 가수분해를 수행하는데 충분히 안정하다. 또한, 이 온도 범위의 사용은 바이오연료 생산을 위한 동시 발효 공정 또한 통합될 수 있기 때문에 유리하다. 교반 속도에 있어서, 에너지를 절약하기 위해 100 ± 10 RPM의 중간 교반을 사용하는 것이 바람직하다. RPM이 150 또는 200 RPM으로 증가함에 따라 당화 수율은 단지 0.8% 또는 1.3%밖에 증가하지 않으므로, 이는 RPM은 기질에 대하여 최종 당화 수율(SY)(%)에 영향을 미치는 중요한 인자는 아님을 시사한다. 반응 시간에 있어서, 36 시간인 것이 바람직한데, 이보다 더 긴 배양 시간은 가수분해 효소의 비활성화를 유도 할 수 있다. 또한, 상기 제 2 단계는 계면활성제를 추가로 첨가할 수 있다. 상기 계면활성제는 열충격에 대한 저항 및 저해 물질에 대하여 보호하는 역할을 하고, 리그닌 표면으로부터 셀룰라아제 효소의 탈착을 용이하게 하며[S. S. Jagtap, S. S. Dhiman, T.-S. Kim, I.-W. Kim 및 J.-K. Lee, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2014, 98, 661-669.] , 또한 매우 반응성 자유 라디칼에 의해 야기된 저해 작용을 막는 데 도움을 주는 것으로 예상된다. 바람직한 계면활성제로는 비이온성 계면활성제(non-ionic surfactant)를 사용할 수 있고, 예를 들어 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트(polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)를 사용할 수 있다. 또한, 본 발명은 바이오매스로부터 당화물을 제조하는 배양 배지에 *Pholiota adiposa* 및 *Armillaria gemina*의 곰팡이 컨소시엄, 라카아제, 및 p-쿠마르산을 포함하는 2차 바이오매스 기질을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물을 제공한다. 상기 바이오매스의 동시 전처리 및 당화용 조성물은 추가적으로 폴리옥시에틸렌소르비탄모노라우레이트 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Tween-20)의 계면활성제를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 전술한 바이오매스의 동시 전처리 및 당화 방법에 사용되는 조성물로서, 양 발명의 공 통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다. 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명 하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자 에게 있어서 자명할 것이다. <실시예 1> 2차 바이오매스 기질을 첨가한 벧짚의 동시 전처리 및 당화(SPS) 공정

(1) 바이오매스의 침지 바이오매스 시료를 화이젠(주)(대전, 한국)에서 입수하였다. 가수분해를 위한 1차 바이오매스 기질로서 벳짚 (*Oryza sativa* L.)을 사용하였고, 다음 공정까지 4°C에서 보관하였다. 활성화를 위해, 상기 벳짚을 완충 용액과 1:45 비율(w/v)로 혼합하여 75°C의 온도에서 65일 동안 보관하였다. (2) 곰팡이 컨소시엄으로부터 리그노셀룰라아제 효소 혼합물의 제조 *Pholiota adiposa*(PA) 및 *Armillaria gemina*(AG)의 곰팡이 컨소시엄의 농축된 배양액의 조 추출물을 리그노셀룰라아제 효소 혼합물로 사용하였다. 곰팡이 컨소시엄으로부터 최적화된 효소 생산은 25 °C 및 pH 5.0에서 수득되었다. 최적화 효소 생산 조건에서, 곰팡이 컨소시엄으로부터의 조 추출물은 또한 자일라나제(xylanase): 1,870±250 U/ml, 엔도글루카나아제(EG): 176±23 U/ml, 셀로바이오하이드롤라아제(CBH) : 44±5 U/ml, 베타-글루코시다아제(β -glucosidase, BGL) : 39± 5 U/ml, 및 FPU(filter paper activity unit): 2.6±0.5를 나타내었다. (3) 라카아제의 제조 *Tyromyces chioneus*를 배지에 접종하고 30 °C에서 150 RPM의 속도로 4시간 동안 진탕배양한 배양액의 조 추출물을 통해 라카아제(TcLac)를 제조하였다. (4) 라카아제의 천연 중개자 공급원으로서의 2차 바이오매스 기질 준비 2차 바이오매스 기질로서 천연 p-쿠마르산을 함유한 밀기울(wheat bran; WB)을 상술한 1차 바이오매스 기질과 동일하게 완충 용액에 침지시켰다. 침지된 밀기울을 이후 천연 중개자 공급원으로서 SPS 공정에 사용하였다. (5) 동시 전처리 및 당화(SPS) 공정을 통한 당화액의 제조 밀기울로부터 천연 중개자인 p-쿠마르산(pCA)의 최적 농도(1.5 mM)를 제공하기 위해, 9.8 mg의 침지된 2차 기질 (밀기울)을 10 g의 침지된 1차 기질(벳짚)과 혼합한 후, 반응조에 넣고, 곰팡이 컨소시엄으로부터 제조된 리그노셀룰라아제 혼합물 20 FPU/g-기질, 라카아제 15 U/ml를 넣은 후 35 °C, pH 5.0에서 100 RPM의 중간 교반으로 36시간 동안 교반시키면서 당화 반응을 수행하였다. 당화 수율(SY)(%)은 67.3±7.4%이었다. SPS 공정에서, 일부 당 내용물은 1차 및 2차 바이오매스의 침지 상태 동안 걸려져 나왔으나, 상기 침지 단계 동안 어떠한 화학물질 또는 오염물도 없기 때문에 상 추출법을 이용하여 쉽게 회수되었다. 따라서, 벳짚의 잔여물 내에 존재하는 당의 양(48 mg/g-기질) 및 밀기울의 잔여물 내에 존재하는 당의 양(29 mg/g-기질)과 SPS를 통해 얻은 당화 수율(%)을 함께 고려하면, 침지된 벳짚으로부터 얻은 최종 당화 수율(%)은 84.3%이었다. <비교예> 벳짚의 순차적 전처리 및 당화 (SqPS) 공정을 통한 당화액의 제조 (1) 알칼리 전처리 단계 10 g의 1차 기질(벳짚)을 버퍼에 1:45 비율(w/v)로 혼합하여 침지시켜 75°C 온도에서 65일 보관하였다. 이후, 상기 침지된 기질을 알칼리 (NaOH; 0.2% w/v)로 전처리하였다. 전처리 후에 기질을 물로 세척하여 생성된 독성들을 일부 제거하였다. 상기 세척 단계에 의해 폐수가 발생하였다. (2) 당화 단계 반응조에 전처리된 벳짚을 넣고, 2차 바이오매스 첨가를 제외하고, 실시예와 동일한 방법으로 당화를 수행하였다. 구체적으로 곰팡이 컨소시엄으로부터 제조된 리그노셀룰라아제 혼합물 20 FPU/g-기질, 라카아제 15 U/ml를 넣은 후 35 °C, pH 5.0에서 100 RPM의 중간 교반으로 36시간 동안 교반시키면서 당화 반응을 수행하였다. 당화 수율(SY)(%)은 71.4±7.6%이었다. 그러나, 실시예에 비해 2배 이상의 폐수가 발생하였다. 종래 전처리와 당화가 분리되어 순차적으로 진행되는 방법에서는 1 kg의 기질일 경우, 다음 단계로 진행될 때마다 다 세척공정이 필요하며, 이때 보통 50L 정도의 깨끗한 물이 세척공정에 필요하다. 그러나 본 발명은 이러한 세척공정이 요구되지 않고, 동시에 진행될 수 있으며, 당화 수율 또는 종래 방법에 필적하므로 신속하고 경제적 및 친환경적으로 바이오매스로부터 바이오연료를 생산될 수 있다. <실험예 1> 라카아제의 무독화 활성 최적화 본 발명에 따른 SPS 공정에 있어서, 라카아제(TcLac)의 무독화 과정으로 인해 당화 수율을 증가시킬 수 있다. 따라서 상기 라카아제의 무독화 활성의 최적화를 위하여 다음

과 같이 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 측정하였다. 구체적으로, Lee et al.,(2012)에 의해 제안된 방법론[K.-M. Lee, D. Kalyani, M. K. Tiwari, T.-S. Kim, S.S. Dhiman, J.-K. Lee 및 I.-W. Kim, Biores. Technol., 2012, 123, 636-645]에 따라 5 U/ml의 라카제를 사용한 회전식 진동기(150 rpm)에서 중개자를 사용하거나 사용하지 않고 30°C에서 4시간 동안 예비적 분석이 수행되었다. 시료를 주기적으로 취하여 폴린-치오칼토(Folin-Ciocalteu) 법[V. L. Singleton 및 J. A. Ross, Am. J. Enol. Viticult., 1965, 16, 144-158]에 따라 상청액의 전체 페놀양을 분석하였다. 결과들을 1리터의 액체상 당 카테콜 등가물(catechol equivalents, CE)의 그래프로 표시하였다. (1) pH에 따른 라카아제의 무독화 활성의 영향 4.0-5.5의 상이한 pH에서 10 U/ml의 고정된 투여량의 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 측정하였다. 또한 TcLac 없이 페놀의 가용화를 체크하였으며, 이는 대조군으로서 고려되었다. 측정 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2는 라카아제(10 U/ml)를 포함하거나 포함하지 않은 배지에서 볏짚을 처리할 때, 침지된 볏짚(CRS)으로부터 유래된 페놀 화합물의 가용화 정도를 나타내는 그래프이다(대조군 (●); pH 4.0 (○); pH 4.5 (▼); pH 5.0 (△); 및 pH 5.5 (■)). 상기 페놀 화합물의 가용화 정도가 높을수록 라카아제의 무독화 퍼텐셜이 높은 것으로 판단된다. 도 2에 나타난 바와 같이, pH가 4.0에서 4.5로 증가함에 따라 반응 혼합물로부터 페놀 화합물의 용해도는 증가 하였으나, pH 5.0 및 5.5 에서는 현저한 제독이 관찰되지 않았다. 따라서 상기 바이오매스의 제독을 위한 최적 pH로서 pH 4.5가 선택되었다. 10 U/ml의 TcLac를 가지고 침지된 볏짚(CRS)에 대하여 얻어진 최대 제독 수준은 49.7%였다. (2) 투여량(ED)에 따른 라카아제의 무독화 활성의 영향 최적화된 pH 4.5에서 투여량(5-20 U/ml)에 따른 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 측정하였다. 측정 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 침지된 볏짚으로부터 유래된 페놀 화합물의 pH 4.5에서 라카아제 투여량에 따른 가용화 정도를 나타내는 그래프이다((5 U/ml (●); 10 U/ml (○); 15 U/ml (▼); 20 U/ml (△)). 도 3에 나타난 바와 같이, 라카아제 투여량이 5에서 15 U/ml로 증가함에 따라 반응 혼합물로부터 페놀 화합물의 용해도는 증가하였으나, 20 U/ml에서는 현저한 제독이 관찰되지 않았다. 따라서 상기 바이오매스의 제독을 위한 최적 투여량으로서 15 U/ml가 선택되었다. 따라서, 라카아제를 사용한 무독화 과정에서, pH 4.5에서 15 U/ml일 때 라카아제의 무독화 활성이 최적화 된 것 을 알 수 있다. 이와 같은 최적 조건에서 무독화된 볏짚을 20 FPU/g-기질의 투여량의 곰팡이 컨소시엄을 이용하여 효소적 가수 분해를 진행했을 때, 54.6%의 당화 수율이 관찰되었고, 이는 무독화 과정을 수행하지 않은 볏짚에 비해 55% 더 높은 값으로 나타났다. (3) 중개자의 종류에 따른 라카아제의 무독화 활성의 영향 TcLac (15 U/g-기질)이 pH 4.5에서 1.5 mM 농도의 1-히드록시벤자트리아졸(1-hydroxybenzotriazole; HBT)(○), 아세토시린곤(acetosyringone; AS)(▼), 파라-쿠마르산(para-coumaric acid; pCA)(△), 및 시링알데히드 (syringaldehyde; SA)(■)와 함께 사용되었다. 대조군 반응(●)을 어떠한 중개자 없이 15 U/ml의 TcLac를 가지고 수행하였다. 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 측정하여, 측정 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에 나타난 바와 같이, 중개자들은 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 현저히 증가시키며, 1-HBT, pCA, AS, SA의 순서로 TcLac의 무독화 퍼텐셜을 상승시킴을 알 수 있다. 그러나 1-HBT는 환경 독성이 높기 때문에(표 4 참조), 식물로부터 나온 천연 중개자이면서 TcLac의 무독화 퍼텐셜의 상승 효과가 큰 p-쿠마르산(pCA)과 아세토시린곤 (AS)을 이후 실험에 사용하였다. 바이오매스의 형태학의 추가적인 제독 영향성을 투과전자현미경을 이용하여 관찰하여 도 5에 나타내었으며, 도 5에 나타난 바와 같이, 원료 물질의 순수 구조(a)와 비교하여, 제독 후(b) 전체 구조는 변형되며, 당화 후(c) 완전히 변형되어 바이오매스로부터 구성물질 및 당이 방출됨을 알

수 있었다. 더 높은 농도(> 1.5 mM)의 중개자는 시험되지 않았는데, 왜냐하면 독립된 세척 단계를 거친 후에도 잔여 중개자의 제거가 어려웠기 때문이다. <실험에 2> 중개자의 선정 (1) 중개자의 종류에 따른 바이오매스의 당화 수율 측정 선택된 중개자의 적합성을 측정하기 위해, p-쿠마르산(pCA) 또는 아세트시린곤(AS)을 첨가한 후, 고정된 투여량 (20 FPU/g-기질)의 복합체 효소로 당화를 수행하여 당화 수율을 측정하여 표 1에 나타내었다. 그러나, 표 1에 나타낸 바와 같이, 천연 중개자들이 라카아제의 무독화 퍼텐셜을 증가시킨다 하더라도, SPS 공정에 적용하기에는 부적합한 것으로 나타났다. 표 1에 나타낸 바와 같이, 천연 중개자들은 무독화 반응 후, 잔여 농축물을 제거하기 위한 독립적인 세척 단계를 필요로 함을 알 수 있으며, 무독화 반응 후 세척을 하지 않은 경우, 전체 당화 수율이 급격히 감소되었다. 당화 수율(%)의 이런 역제는 중개자의 작용 중에 발생한 자유 라디칼 때문이었다. 이런 자유 라디칼의 전체 농도는 매우 높았고, 상기 라디칼은 매우 반응성이 높은 종이며, 이들은 이후 가수분해 단계에서 사용되는 효소를 쉽게 변성시킬 수 있다. 증류수로의 광범위한 세척의 필요성은 공정의 전체 비용을 증가시키고, 또한 많은 환경독성 유출물을 생성한다. 또한 이러한 세척 단계만으로는 잔여 중개자를 완전히 제거하지 못한다. (2) 천연 중개자의 원료로서 2차 기질의 평가 시판 중개자의 적용과 관련된 세척 공정의 필요성에 대한 문제를 극복하기 위해 중개자 보급을 위한 2차 바이오 매스 기질의 활용에 대한 평가를 수행하였다. 구체적으로, 생산 연도를 통한 그들의 이용가능성 및 비용 경제성을 기준으로 7종의 상이한 2차 기질들 즉, 밀기울(wheat bran), 왕겨 및 양버들나무(*Populus nigra*.), 버드나무(*Salix koreensis*), 라디아타 소나무(*Pinus radiata*), 쌀겨 및 팜 핵(palm kernel)이 선택되었다. 상기 2차 기질 내의 중개자 유사 화합물의 규명 및 정량화를 위해 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하였다. 구체적으로, 상기 2차 기질을 침지시킨 후, 침지된 2차 기질을 TcLac (20 U/g-기질)로 대규모로 처리하여 초과된 농도의 원치않는 페놀 화합물(PC)을 제거하였다. 이동상으로서 물:아세트니트릴 (85:15)을 C TSKgel CDS-80TS 컬럼 (4.6 mm×25 cm)에서 35°C에서 0.4 ml/min 유속을 사용하는 Dionex HPLC를 수행하였고, UV 검출기(220 nm)를 사용하여 검출하였다. 표준 화합물 및 추출된 화합물의 피크를 기준으로 각 예상가능한 중개자의 농도를 측정하였다. 이후, 2차 기질로부터 유래된 모든 관찰된 페놀 화합물에 대한 저해 상수 값(K)을 TcLac에 대하여(표 2) 및 곰팡이 컨소시엄 효소들에 대하여(표 3) 측정하였다. 구체적으로, 20 U/ml의 TcLac와 1.5 mM 농도의 각 표준 중개자를 사용하여 K 값을 측정하였고, 시료들은 35°C에서 4 시간 동안 배양되었다. 기질로서 2,6-DMP를 사용하여 잔여 TcLac 활성을 측정하였다. 마찬가지로 1.5 mM의 각 표준 중개자와 20 FPU/ml의 효소를 35°C에서 36 시간 동안 배양한 후, 표준 절차를 이용하여 진균 복합체의 각 촉매적 소단위에 대한 K값을 계산하였다. 곰팡이 컨소시엄 효소 쪽으로의 각 중개자의 저해 반응은 동일한 중개자에 의한 라카제 활성의 저해보다 더욱 중요한데, 상기 곰팡이 컨소시엄 효소가 바이오매스의 최종 당화 수율을 책임지기 때문이다. 곰팡이 컨소시엄 효소에 대한 K 값을 기준으로(표 3), SPS을 위한 2차 기질에 의해 공급될 수 있는 가능한 NM으로서 pCA 및 SA이 선택되었다. 그러나 저해 퍼텐셜 결과는 pCA가 유의한 저해의 유발 없이 TcLac 활성을 향상시킴에 있어서 더욱 효과적인 것으로 확인되었다. 모든 7종의 시험된 2차 기질 물질 (μg/g 기질 단위의 pCA) 중에 밀기울 (2), 왕겨 (0.8) 및 양버들나무 (*Populus nigra*.) (1.2), 버드나무(*Salix koreensis*), 라디아타 소나무(*Pinus radiata*), 쌀겨 및 팜 핵(palm kernel)이었고, 밀기울(WB)이 가장 높은 농도의 pCA를 함유하는 것으로 나타났기 때문에 당화 실험을 위한 2차 기질로 선택되었다. 벧짚 내에는 pCA가 없음이 이전 실험에 의해 확인되었다 [K.-M. Lee, D. Kalyani, M.

K. Tiwari, T.-S. Kim, S.S. Dhiman, J.-K. Lee 및 I.-W. Kim, *Biores. Technol.*, 2012, 123, 636-645]. (3) 환경 독성 분석 본 발명에 따른 당화 공정에 있어서, 천연 중개자의 환경 독성을 알아보기 위하여 하기와 같은 독성 테스트를 수행하였다. 구체적으로, 침지, 알칼리 전처리, 및, 중개자가 첨가된 제독 공정 후 방출된 폐수의 Microtox 시험 결과를 프 로그래밍 워크시트에 입력하였고, 상이한 시료의 색 차이가 완화된도록 수정하였다. 또한 각 시료에 대하여 5 및 15-분 배양 후 급성 독성의 단위(TOU)를 계산하였다. 각 동결건조된 세균 시료의 민감도를 기준 물질로서 황산 아연($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)을 이용하여 실험실에서 정기적으로 체크하였다. 그 결과를 표 4에 나타내었다. 별도의 화학적 전처리 후 발생된 폐수 및 침지 후 씻은 물의 환경 독성을 측정하여 비교한 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 SPS 공정은 화학적 전처리를 하지 않으므로, 환경 독성에 있어서 침지로부터 얻은 폐수에 의해 141%의 TOU를 나타내는 반면, 화학적 전처리를 사용하는 종래의 SqPS 공정은 284% TOU를 나타내었다. 따라서, 본 발명에 따른 SPS 공정은 종래의 SqPS 공정으로부터 발생된 폐수보다 2배 적은 환경독성을 나타 내을 알 수 있으며, 따라서 친환경적인 공정임을 알 수 있다. 또한, 중개자의 환경 독성 분석 결과, 표 4에 나타난 바와 같이 2차 기질인 밀기울로부터 추출된 p-쿠마르산의 환경 독성이 가장 낮은 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명은 환경 독성이 낮은 2차 바이오매스 기질을 사용함으로써 저비용 및 친환경적으로 라카아제의 무독화 활성을 증가시켜, SPS 공정에서 당화 수율을 효과적으로 증가시킬 수 있다. <실험예 3> 곰팡이 컨소시엄 효소 투여량의 최적화 본 발명에 따른 SPS 공정에 있어서, 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산된 효소의 최적 투여량을 결정하기 위해, 고 정화된 TcLac의 최적화된 농도 (15 U/ml) 및 10 내지 40 FPU/g-기질로 곰팡이 컨소시엄 효소 투여량을 변화시켜 벚짚의 당화 공정을 수행한 후, 당화 수율을 측정하여 하기 표 5에 나타내었다. 그 결과, 상기 곰팡이 컨소시엄으로부터 생산된 효소의 최적 투여량은 20 FPU/g-기질이었는데, 이보다 더 낮은 투여량(10 내지 15 FPU)은 유의한 양의 환원당을 생산하지 못하고, 이보다 더 높은 투여량(30 FPU/g-기질 초과)은 최종 당화 수율의 향상 증가에 큰 영향을 미치지 못했다. 더 낮은 ED들의 효소적 각테일은 느슨해진 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스 내용물을 공격하지 못해 더 낮은 당화 수율(%)를 나타내었다. 그러나, 침전된 벚짚에 대하여 30 FPU/g-기질보다 높은 ED는 심지어 ED의 선형 증가에 따라서도 최종 당화 수율 (%)에 어떠한 현저한 향상도 주지 못했다. 기질 포화가 아마도 ED의 선형적 증가에 따른 최종 SY(%)의 미미한 향상에 대한 이유인 것 같다. 1차 기질로서 침전된 벚짚에 대하여, 20 FPU/g-기질이 최적 투여량(ED)였고, 그 결과 36 시간의 배양 후에 CRS의 그램당 228 ± 22 mg의 환원당(RS)의 방출이 일어남을 확인하였다. 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통 상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고 려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.