



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월25일
(11) 등록번호 10-2080494
(24) 등록일자 2020년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/02 (2006.01) *A61K 31/7004* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *C12P 19/14* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 19/02 (2013.01)
A61K 31/7004 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0096799
(22) 출원일자 2018년08월20일
심사청구일자 2018년08월20일

(56) 선행기술조사문헌
KR1020130057270 A*
Renewable Energy, Vol. 66, pp. 596-604 (2014.02.04.)*
Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 97, pp. 2961-2970 (2013.06.08.)*
Green and Sustainable Chemistry, Vol. 4, pp. 190-201 (2014.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)

(72) 발명자
정육진
경기도 성남시 분당구 내정로 186 파크타운대림아파트 102동 1306호
크리스틴 라모스
경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 제2공학관8805호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 13 항

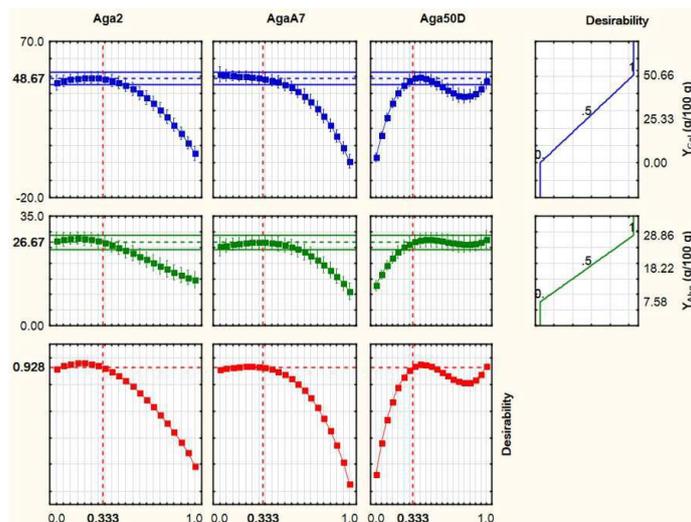
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 **이온성 액체 전처리를 이용한 한천에서 단당류를 생산하는 방법 및 이의 응용**

(57) 요약

본 발명은 이온성 액체 전처리를 이용한 한천에서 단당류를 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 우뚝가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체(Ionic liquids)로 전처리 하고, 상기 전처리물에 아가로스스(agarose) 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해시킬 경우, 한천에서 단당류(D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스)를 고수율로 생산할 수 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

A61K 8/60 (2013.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C12P 19/14 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

이원근

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교

(72) 발명자

그레이스 니소라

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 제2
 공학관8805호

테클라 브라한

경기도 용인시 처인구 명지로 116 명지대학교 제2
 공학관8805호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093816
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 대학중점연구소지원사업
 연구과제명 에너지환경융합기술연구소(3단계)-바이오매스기반 바이오화학제품 생산공정 요소기술 개발
 기 여 율 10/100
 주관기관 명지대학교
 연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015H1D3A1062172
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 해외우수신진연구자유치사업
 연구과제명 폐바이오매스 유래 탄수화물의 효율적 활용 기술을 이용한바이오에너지/화학제품 생산용
 생합성 공정기술 개발
 기 여 율 20/100
 주관기관 명지대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1C1B1013252
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 신진연구자지원사업
 연구과제명 제조합 미생물 균주를 이용한 C5 xylose 기반 C2 및 C4 플랫폼 케미컬 생산 기술 개발
 기 여 율 20/100
 주관기관 명지대학교
 연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1D1A1B07043993
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업
 연구과제명 우뭇가사리로부터 고부가가치 아가단당류의 단일반응 생산을 위한 나노 그래핀 및 타이로
 시네이즈기반 신규 아가레이스 고정화 효소 이용 기술 개발
 기 여 율 50/100
 주관기관 명지대학교
 연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

우뭇가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체인 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc)로 60 내지 90℃에서 10 내지 20시간 동안 전처리하는 제1 단계;

상기 제1 단계의 전처리물에 아가로오스 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해 시키는 제2 단계; 및

D-갈락토오스 및 3,6-엔하이드로-L-갈락토오스를 회수하는 제3 단계; 포함하는,

D-갈락토오스 및 3,6-엔하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

우뭇가사리과 해조류는 우뭇가사리(*Gelidium amansii*)인,

D-갈락토오스 및 3,6-엔하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제2 단계에서의 아가로오스 당화 효소 혼합물은 서열번호 1의 염기서열로 표시된 *Cellulophaga omnivescoria* 유래의 Aga2 효소, 서열번호 2의 염기서열로 표시된 *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. 유래의 AgaA7 효소 및 서열번호 3의 염기서열로 표시된 *Saccharophagus degradan* 유래의 Aga50D 효소를 혼합한 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-엔하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소는 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 wt%로 혼합된 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-엔하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2 단계에서의 효소 혼합물의 효소 가수 분해 조건은 80 내지 120 U/g⁻¹ 농도의 효소 혼합물을 12 내지 48

시간 동안 처리하는 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제2 단계의 D-갈락토오스의 수율과 효소 혼합물의 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소 사이에는 하기의 관계식 1이 성립하는 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

[관계식 1]

$$Y_{Gal} = 5.5x_1 + 0.89x_2 + 47.2x_3 + 99.1x_1x_3 + 88.6x_2x_3 + 268.6x_1x_2x_3 - 191.4x_1x_2(x_1 - x_2) + 305.9x_1x_3(x_1 - x_3)$$

상기 관계식 1에서 Y_{Gal} : D-갈락토오스 생산량(%), X_1 : Aga2, X_2 : AgaA7, X_3 : Aga50D 이다.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제2 단계의 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 수율과 효소 혼합물의 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소 사이에는 하기의 관계식 2가 성립하는 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법.

[관계식 2]

$$Y_{Alg} = 14.6x_1 + 11x_2 + 27.6x_3 + 16.8x_1x_3 + 31.7x_2x_3 + 96x_1x_2x_3 - 55.2x_1x_2(x_1 - x_2) + 57.1x_1x_3(x_1 - x_3)$$

상기 관계식 2에서 Y_{Alg} : 3,6-언하이드로-L-갈락토오스 생산량(%), X_1 : Aga2, X_2 : AgaA7, X_3 : Aga50D 이다.

청구항 10

우뭇가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체인 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc)로 60 내지 90℃에서 10 내지 20시간 동안 전처리하는 제1 단계;

상기 제1 단계의 전처리물에 아가로오스 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해 시키는 제2 단계; 및

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 회수하는 제3 단계; 포함하는,

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 제2 단계의 당화 효소 혼합물은 서열번호 1 내지 3의 염기서열로 표시되는 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소를 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 중량%로 혼합된 것인,

D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법.

청구항 12

이온성 액체인 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc);
아가로오스 분해 활성이 있고, 서열번호 1 내지 3의 서열로 표시되는 아가로오스 당화 효소 혼합물; 및
알파-네오아가로바이오스 가수분해 효소;를 포함하는,
아가로오스 당화용 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

제12항에 있어서,
상기 아가로오스 당화 효소 혼합물은 서열번호 1의 염기서열로 표시된 *Cellulophaga omnivescoria* 유래의 Aga2 효소, 서열번호 2의 염기서열로 표시된 *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. 유래의 AgaA7 효소 및 서열번호 3의 염기서열로 표시된 *Saccharophagus degradan* 유래의 Aga50D 효소를 혼합한 것인,
아가로오스 당화용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소는 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 중량%로 혼합된 것인,
아가로오스 당화용 조성물.

청구항 16

제12항에 있어서,
상기 아가로오스 당화 효소 혼합물은 아가로오스를 D-갈락토오스 및 네오아가로바이오스로 분해하는 것인,
아가로오스 당화용 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이온성 액체 전처리를 이용한 한천에서 단당류를 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 우뚝가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체(Ionic liquids)로 전처리 하고, 상기 전처리물에 아가로오스(agarose) 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해 시켜 D-갈락토오스(D-galactose) 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 회수하는 단계를 포함하는 한천에서 단당류(D-갈락토오스 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스)를 생산하는 방법, 및 단당류의 생산 수율을 개선하는 방법, 한천에서 단당류를 생산하기 위한 아가로오스(agarose) 당화용 조성물, 및 상기 방법으로부터 생산된 단당류를 포함하는 화장료 조성물 또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 3 세대 바이오매스로 제시된 해양 거대 해조류(marine macroalgae, 해조류)는 그 이점으로 인해 연료와 화학 물질을 생산하기 위한 유망한 재생 가능한 자원으로 간주되어 왔다. 해조류는 (1) 재배에 있어 식량 작물과 경쟁하지 않고, (2) 농경지와 담수가 필요하지 않으며, (3) 단위 면적당 생산성이 높을 뿐만 아니라, (4) 리그닌(lignin)과 헤미셀룰로오스(hemicellulose)의 함량이 적다는 이점이 있다[Jeong et al. 2011, Kim et al. 2012, Lee et al. 2015, Alkotaini et al. 2017]. 해조류는 색소에 따라 크게 녹색 조류(Chlorophyceae 및 Streptomyce), 홍조류(Rhodophyceae), 갈조류(Phaeophyceae) 및 황록색 조류(Xanthophyceae)로 분류된다[Sutari et al. 2015]. 해조류 중 *Gelidium amansii*(우뚝가사리; 한천)를 포함하고 있는 홍조류는 최근에 높은 탄수화물 함량 때문에 가장 풍부한 종의 하나로 주목을 받고 있다[Jang et al. 2012 & Alkotaini et al. 2017]. *Gelidium amansii*의 세포벽의 주요 탄수화물인 한천(agar)은 주로 중성 아가로오스(agarose)와 적은 양의 하전된 아가로펙틴(agarpectin)으로 구성되어 있다[Yun et al., 2016]. 아가로오스는 등물 함량의 D-galactose(D-Gal) 및 3,6-anhydro-L-galactose(3,6-L-AHG)로 구성된 선형 폴리사카라이드이며, β-1,4- 및 α-1,3- 글리코시드 결합이 번갈아 가며 연결되어 있다[Yun et al., 2016; Yun et al., 2017b]. 또한, *Gelidium amansii*는 β-1,4가 연결된 D-glucose (D-Glu) 단위의 선형 사슬을 미량 포함한다. 에탄올에 의한 D-Gal 또는 D-Glu의 발효는 재생 가능한 바이오 매스 공급 원료로서 *G. amansii*를 이용하기 위해 시도되었다[Yun et al., 2017b]. 그러나 효율적인 대사 경로의 부재로 인한 에탄올의 낮은 수율은 3,6-L-AHG의 발효에 경제적이지 못하다[Yun et al., 2017b].

[0004] 또다른 측면을 고려하면, NAOs, Neogarobiose(NAB) 및 3,6-L-AHG와 같은 아가로오스 유래의 당은 항생제, 항염증제, 프리바이오틱스, 피부 등의 생리 활성 때문에 경제적 가치가 높으며, 이는 미백 및 보습, 의료, 제약 및 화장품 산업에 적용이 가능하다[Yun et al., 2017b]. 아가로오스 유래 당의 생체 활성은 아마도 비 환원 말단의 3,6-L-AHG에 의한 것으로 알려져 있으며, 자유 3,6-L-AHG는 NAOS에 비해 더 높은 생리 활성을 나타내는데, 이는 자유 3,6-L-AHG가 더 높은 중합도를 갖기 때문이다[Kim et al., 2017; Yun et al., 2017b]. 예를 들어, 3,6-L-AHG는 RAW264.7 세포에서 아질산염 생성을 억제함으로써 높은 항염증 활성을 나타내고, 카라기난의 단량체 당 성분인 D-Gal, NAB 및 3,6-D-AHG과 비교하였을 때, B16F10 흑색 종 세포에서 멜라닌 생성을 억제함으로써 시험 관내에서 현저하게 높은 미백 활성을 나타내었다(심지어 가장 널리 사용되는 화합물인 알부틴보다 높았다)[Yun et al., 2013]. Kim et al. (2017) 연구에서는 3,6-L-AHG가 아가로올리고당(AOS) 및 NAOS에 비해 쥐 B16 흑색종 세포 및 인간 표피 멜라닌 세포에서 가장 우수한 미백 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 또한 3,6-L-AHG를 이용하여 항우식성(충치예방) 활성을 평가한 결과, 젖산 발효 능력으로 인해 치아 우식을 일으키는 일차 미생물인 *Streptococcus mutans* 및 미생물에 의한 젖산 생산(10g/L⁻¹)이 완전히 억제되었으며, 반면에 *Streptococcus mutans*의 성장은 여전히 가장 널리 사용되는 상업용 항진균제 중 하나인 자일리톨의 존재 하에서 훨씬 높은 농도로 나타났다(i.e., 40 g.L-1 [Yun et al., 2017a]. 따라서, 3,6-L-AHG를 바이오 연료로 사용하기 위해서는 홍조류로부터 3,6-L-AHG를 효율적으로 생산하는 것이 매우 필요하다.

[0005] 현재까지, 한천 / 아가로오스를 단량체당(D-Gal 및 3,6-L-AHG)으로 생산하는 방법으로서 (1) 산 가수 분해, (2) 효소 가수 분해 및 (3) 회석 / 약산 / 열 예비 가수 분해와 후 효소적 가수 분해 방법과 같은 세 가지 방법이 알려져 있다. 화학 가수 분해(산 가수 분해)는 간단하고 저렴하며 신속한 기술로 알려져 있으나[Yun et al. 2016], 다운스트림 공정 전에 중화가 필요하고 중화염을 제거해야 한다는 공정상의 번거로움이 있으며[Lee et

al. 2015], 이러한 공정은 산에서 불안정한 3,6-L-AHG를 5-HMF로 분해시키기 때문에[Yun et al., 2016], 고가의 부식 방지 장비를 필요로 한다[Behera et al., 2014]. 산 가수 분해에 비해 완전 효소 가수 분해는 에너지 소비가 적고 반응 조건이 까다롭지 않고(생리적 pH, 온도 및 압력), 3,6-L-AHG를 분해시키지 않으며, 특수한 부식 방지 장치가 필요하지 않다. 또한, 수득된 가수 분해물은 다운스트림 공정에 있어 독성이 적다[Li et al., 2014; Jambo et al., 2016]. 그러나, 물에서의 아가로오스의 낮은 용해도로 인해 당의 역가 및 수율은 매우 낮아 효소 접근성을 감소시키고[Alkotaini et al., 2017; Yun et al., 2016], 사용되는 효소의 비용은 매우 비싸다[Jambo et al., 2016]. 약산의 결합 또는 열처리 전처리 후 효소화된 당화는 단량체 당의 수율을 향상시키지만, 약산 또는 열 예비 가수 분해의 사용은 효소의 난분해성 아가로트리오스를 부산물로 생성시키고, 3,6-L-AHG를 5-HMF로 분해되는 것은 불가피하다[Alkotaini et al., 2017; Yun et al., 2016].

[0006] 생물학적 기능을 보존하기 위해서는 분해되지 않은 3,6-L-AHG를 선택적으로 생산해야 한다. 이러한 맥락에서, *G. amansii*는 효소 가수 분해와 결합된 비 유도체화 용매로서 이온성 액체(ionic liquids, ILs)를 사용함으로써 효과적으로 전처리 될 수 있다. 이온성 액체는 높은 용매력을 갖고[Badgujar & Bhanage, 2015], 증기압이 거의 없기 때문에[Zhang et al. 2016], 이온성 액체는 *G. amansii*로부터 다당류를 용해시킬 수 있으며, 전처리 비용을 줄이기 위하여 이온성 액체를 쉽게 분리하고 재순환시키기 위해 이온성 액체를 충분한 압력 하에 높은 온도에서 증류할 수 있다. 게다가, 재생된 해조류(이온성 액체에 용해 된 후)는 무정형이어서 처리되지 않거나 희석된 H₂SO₄ 산이 처리된 해조류에 비해 효소 부하량을 줄임으로써 효소 비용을 최소화할 수 있다[Wang et al., 2013]. 지금까지 효소 가수 분해 전 홍조류의 전처리를 위해 이온성 액체를 적용하고 평가하는 어떠한 노력도 없었다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 이온성 액체를 이용하여 우뚝가사리과(Gelidium) 해조류를 전처리 한 다음, 일정한 비율로 혼합된 아가로오스 당화 효소 혼합물을 첨가하여 우뚝가사리과 해조류를 효소 가수 분해시킬 경우, D-갈락토오스(galactose) 및 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-2018-0003252 A

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Alkotaini, B., Han, N.S. & Kim, B.S. (2017). Applied Microbiol Biotechnology, 101(4) 1573-1580.
- (비특허문헌 0002) Ang, T. N., Ngoh, G. C., Chua, A. S. M., & Lee, M. G. (2012). Biotechnology for Biofuels, 5.
- (비특허문헌 0003) Badgujar, K. C., & Bhanage, B. M. (2015). Bioresource Technology, 178, 2?18.
- (비특허문헌 0004) Castro, M. C., Arce, A., Soto, A., & Rodriguez, H. (2015). Industrial and Engineering Chemistry Research, 54, 9605?9614.
- (비특허문헌 0005) Fort, D. A., Remsing, R. C., Swatloski, R. P., Moyna, P., Moyna, G., & Rogers, R. D. (2007). Green Chem., 9, 63?69.
- (비특허문헌 0006) Gereniu, C. R. N., Saravana, P. S., & Chun, B. S. (2018). Separation and Purification Technology, 196, 309?317.
- (비특허문헌 0007) Gogoi, G., & Hazarika, S. (2017). Separation and Purification Technology, 173, 113?120.
- (비특허문헌 0008) Gomaa, M., Hifney, A. F., Fawzy, M. A., & Abdel-Gawad, K. M. (2017). Marine Biotechnology, 19, 592?600.

- (비특허문헌 0009) Jeong, T. S., Kim, Y. S., & Oh, K. K. (2011). *Bioresource Technology*, 102, 10529?10534.
- (비특허문헌 0010) Karatzos, S. K., Edey, L. A., & Doherty, W. O. S. (2012). *Biotechnology for Biofuels*, 5.
- (비특허문헌 0011) Kim, H. T., Lee, S., Kim, K. H., & Choi, I. G. (2012). *Bioresource Technology*, 107, 301?306.
- (비특허문헌 0012) Kim, H. T., Lee, S., Lee, D., Kim, H. S., Bang, W. G., Kim, K. H., & Choi, I. G. (2010). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 227?234.
- (비특허문헌 0013) Kim, J. H., Yun, E. J., Yu, S., Kim, K. H., & Kang, N. J. (2017). *Marine Drugs*, 15(10).
- (비특허문헌 0014) Kim, S. W., Kim, Y. W., Hong, C. H., Lyo, I. W., Lim, H. D., Kim, G. J., & Shin, H. J. (2018). *Algal Research*, 31, 517?524.
- (비특허문헌 0015) Kumar, S.; Gupta, R.; Kumar, G.; Sahoo, D.; Kuhad, R. C., (2013). *Technol.*, 135 150-156.
- (비특허문헌 0016) Lee, C. H., Yun, E. J., Kim, H. T., Choi, I. G., & Kim, K. H. (2015). *Process Biochemistry*, 50, 1629?1633.
- (비특허문헌 0017) Malihan, L. B., Mittal, N., Nisola, G. M., Weldemhret, T. G., Kim, H., & Chung, W. J. (2017). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 92, 1290?1297.
- (비특허문헌 0018) Malihan, L. B., Nisola, G. M., Mittal, N., Lee, S.-P., Seo, J. G., Kim, H., & Chung, W.-J. (2016). *RSC Adv.*, 6, 33901?33909.
- (비특허문헌 0019) Malihan, L. B., Nisola, G. M., Mittal, N., Seo, J. G., & Chung, W. J. (2014) *Renewable Energy*, 66, 596?604.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 우뚝가사리과 해조류(한천)으로부터 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 높은 수율로 생산할 수 있는 이온성 액체 전처리를 이용한 한천에서 단당류의 생산 방법 및 이의 생산 수율을 개선하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 이온성 액체 전처리를 이용한 한천에서 단당류를 높은 수율로 생산하기 위한 아가로오스(agarose) 당화용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 단당류의 생산 방법에 따라 생산된 단당류를 포함하는 화장료 조성물 또는 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은,
- [0016] 우뚝가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체 전처리하는 제1 단계;
- [0017] 상기 제1 단계의 전처리물에 아가로오스 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해 시키는 제2 단계; 및
- [0018] D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 회수하는 제3 단계; 포함하는,
- [0019] D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법을 제공한다.
- [0020] 3세대 바이오매스로 제시되고 있는 해조류, 특히 홍조류는 높은 탄수화물의 함량 때문에 주목 받고 있다. 홍조류인 우뚝가사리과 *G. amansii* 세포벽 탄수화물인 한천(agar)는 D-갈락토오스 (D-galactose; D-Gal) 및 3,6-언

하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose; 3,6-L-AHG)로 구성된 선형 폴리사카라이드이다. 특히, 아가로오스 유래의 당인 3,6-L-AHG는 미백, 항염, 보습 등과 같은 다양한 생체 활성을 가지고 있기 때문에 홍조류로부터 3,6-L-AHG를 효율적으로 다량 생산할 수 있다면 제약 및 화장품 산업에 이용함에 있어 유용할 것이다.

- [0021] 일반적으로 한천 또는 아가로오스를 단량체 당으로 생산하기 위한 가장 적합한 방법으로 '효소 가수 분해' 방법이 알려져 있으나, 온전한 3,6-L-AHG의 생산이 어렵다는 단점이 있다. 또한, 탄수화물이 풍부한 *G. amansii*를 바이오 연료 및 바이오 기반 화학 물질로 효과적으로 전환하기 위해서는 전처리 단계가 필수 조건이며, 이 과정은 일반적으로 산 또는 염기와 같은 환경적으로 유해한 화학 물질을 사용하여 수행되므로 전처리 용매로서 적합하지 못하다. 이에, 본 발명자들은 홍조류를 전처리 용매로서 이온성 액체를 이용하고, 효소 가수 분해에 이용되는 효소들을 일정한 비율로 혼합한 당화 효소 혼합물을 이용하여 효소 가수 분해 할 경우, D-gal 및 3,6-L-AHG를 높은 수율로 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0022] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제1 단계의 이온성 액체는 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc), 부틸메틸이미다졸리움 클로라이드(BMIMCl), 및 에틸메틸이미다졸리움 클로라이드(EMIMCl)로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 이온성 액체를 이용하여 해조류를 전처리할 수 있으며, 바람직하게는 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc)를 이용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 다양한 이온성 용액을 이용하여 해조류의 용해도를 확인한 결과, 이온성 액체의 용해도는 [Bmim] Ac가 가장 높은 것을 확인 하였다. 이러한 결과는, 해조류를 효소 가수 분해 시키기에 앞서 [Bmim] Ac와 같은 이온성 액체로 전처리할 경우, 이온성 액체에 의해 해조류를 용해시킴으로써 효소 가수 분해 단계에서 가수 분해를 더욱 효율적으로 진행할 수 있음을 시사한다(실시예 1 및 표 2 참조).
- [0024] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제1 단계에서 이온성 액체의 전처리 조건은 30 내지 90℃에서 1 내지 24시간 처리할 수 있으며, 바람직하게는 60 내지 90℃에서 10 내지 20시간 처리하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 온도 및 체류 시간이 해조류의 용해에 미치는 영향을 확인한 결과, 이온성 액체를 전처리하는 온도가 증가함에 따라, 체류 시간이 길어짐에 따라 용해도가 증가하는 것을 확인하였다(실시예 2 및 도 4 참조). 이러한 결과를 통해 해조류에 이온성 액체를 처리하는 조건을 확립하였다.
- [0026] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 우뚝가사리과 해조류는 우뚝가사리(*Gelidium amansii*)인 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제2 단계에서의 아가로오스 당화 효소 혼합물은 서열번호 1의 염기서열로 표시된 *Cellulophaga omnivescoria* 유래의 Aga2 효소, 서열번호 2의 염기서열로 표시된 *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. 유래의 AgaA7 효소 및 서열번호 3의 염기서열로 표시된 *Saccharophagus degradan* 유래의 Aga50D 효소를 혼합한 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소는 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 중량%로 혼합할 수 있으며, 바람직하게는 33 : 33 : 33 wt%로 혼합하는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 최적의 효소 제제가 33.3 % Aga2, 33.3 % AgaA7 및 33.3 % Aga50D일 경우, D-Gal 및 3,6-L-AHG의 수율이 각각 48.67 % 및 26.67로 최대 함량을 나타내는 것을 확인하였다(표 3 및 도 15 참조).
- [0030] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제2 단계에서의 효소 혼합물의 효소 가수 분해 조건은 80 내지 120 U/g-1 농도의 효소 혼합물을 12 내지 48시간 동안 처리할 수 있으며, 바람직하게는 100 U/g⁻¹ 농도의 효소 혼합물을 48시간 동안 처리하는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 효소 각테일 최적화 조건을 확인한 결과, 효소 100 U/g⁻¹을 48 시간 동안 사용하여 가수 분해 반응을 수행 한 경우, D-Gal의 경우 56.5 %, 3,6-L-AHG의 경우 33.7 %로 극대화된 것을 확인하였다(실시예 7 및 도 16 참조).
- [0032] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제2 단계의 D-갈락토오스(D-galactose)의 수율과 효소 혼합물의 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소 사이에는 하기의 관계식 1이 성립하는 것을 특징으로 한다.

[0033] [관계식 1]

$$Y_{Gal} = 5.5x_1 + 0.89x_2 + 47.2x_3 + 99.1x_1x_3 + 88.6x_2x_3 + 268.6x_1x_2x_3 - 191.4x_1x_2(x_1 - x_2) + 305.9x_1x_3(x_1 - x_3)$$

[0034]

[0035] 상기 관계식 1에서 Y_{Gal} : D-갈락토오스(D-galactose) 생산량(%), X_1 : Aga2, X_2 : AgaA7, X_3 : Aga50D 이다.

[0036] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 있어서, 상기 제2 단계의 3,6-언하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)의 수율과 효소 혼합물의 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소 사이에는 하기의 관계식 2가 성립하는 것을 특징으로 한다.

[0037] [관계식 2]

$$Y_{Ahg} = 14.6x_1 + 11x_2 + 27.6x_3 + 16.8x_1x_3 + 31.7x_2x_3 + 96x_1x_2x_3 - 55.2x_1x_2(x_1 - x_2) + 57.1x_1x_3(x_1 - x_3)$$

[0038]

[0039] 상기 관계식 2에서 Y_{Ahg} : 3,6-언하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose) 생산량(%), X_1 : Aga2, X_2 : AgaA7, X_3 : Aga50D 이다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 결정의 회귀 계수 (r^2)와 F- 테스트 (ANOVA)를 사용하여 상기 관계식이 실제 값의 적절한 근사값을 제공 할 수 있는지 여부를 확인한 결과, 상관 계수 (r^2)는 D-Gal에 대해서는 0.99, 3,6-L-AHG에 대해서는 0.95로 나타났다(표 4 참조). 이러한 결과는, D-Gal과 3,6-L-AHG의 예측 값과 관측 값이 서로 가깝다는 것을 나타내므로, 상기 관계식은 5 % 미만의 오차 범위 내에서 D-Gal과 3,6-L-AHG의 수율을 예측할 수 있음을 시사한다.

[0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은,

[0042] 우뚝가사리과(Gelidium) 해조류를 이온성 액체로 전처리하는 제1 단계;

[0043] 상기 제1 단계의 전처리물에 아가로오스 당화 효소 혼합물을 첨가하여 효소 가수 분해 시키는 제2 단계; 및

[0044] D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 회수하는 제3 단계; 포함하는, D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 수율을 개선하는 방법에 있어서, 상기 제2 단계의 당화 효소 혼합물은 서열번호 1 내지 3의 염기서열로 표시되는 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소를 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 중량%로 혼합된 것을 특징으로 한다.

[0046] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은,

[0047] 이온성 액체(Ionic liquids);

[0048] 아가로오스 분해 활성이 있고, 서열번호 1 내지 3의 서열로 표시되는 아가로오스 당화 효소 혼합물; 및

[0049] 알파-네오아가로바이오스 가수분해 효소;를 포함하는, 아가로오스(agarose) 당화용 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명의 아가로오스(agarose) 당화용 조성물에 있어서, 상기 이온성 액체는 부틸메틸이미다졸리움 아세테이트(BMIMAc), 부틸메틸이미다졸리움 클로라이드(BMIMCl), 및 에틸메틸이미다졸리움 클로라이드(EMIMCl)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0051] 본 발명의 아가로오스(agarose) 당화용 조성물에 있어서, 상기 아가로오스 당화 효소 혼합물은 서열번호 1의 염기서열로 표시된 *Cellulophaga omnivescoria* 유래의 Aga2 효소, 서열번호 2의 염기서열로 표시된 *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. 유래의 AgaA7 효소 및 서열번호 3의 염기서열로 표시된 *Saccharophagus degradan* 유래의 Aga50D 효소를 혼합한 것을 특징으로 한다.

[0052] 본 발명의 아가로오스(agarose) 당화용 조성물에 있어서, 상기 Aga2 효소, AgaA7 효소 및 Aga50D 효소는 효소 혼합물 총 중량 대비 15 ~ 35 : 15 ~ 35 : 30 ~ 70 중량%로 혼합된 것을 특징으로 한다.

[0053] 본 발명의 아가로오스(agarose) 당화용 조성물에 있어서, 상기 아가로오스 당화 효소 혼합물은 아가로오스를 D-

갈락토오스 및 네오아가로바이오스로 분해하는 것을 특징으로 한다.

- [0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은, 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 따라 생산된 D-갈락토오스 또는 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부 미백용인 것을 특징으로 한다.
- [0056] 본 발명의 화장료 조성물에 있어서, 상기 화장료 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 제형을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은, 본 발명의 D-갈락토오스 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스의 생산 방법에 따라 생산된 D-갈락토오스 또는 3,6-언하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 약학적 조성물은 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물인 것을 특징으로 한다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 상기 약학적 조성물은 액제, 크림, 연고, 밀크, 로션, 및 에어로졸 형태로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 제형을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0060] 발명에 따른 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 염증성 질환 예방 또는 치료제는 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.01 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나, 상기한 투여량은 예시하기 위한 일예에 불과하며 상기 범위에 한정되진 않는다.
- [0061] 또한, 본 발명의 D-갈락토오스 또는 3,6-언하이드로-L-갈락토오스는 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0063] 전술한 바와 같이, 우뭇가사리과 해조류(한천)를 전처리 용매로서 이온성 액체를 이용하여 전처리하고, 최적화된 조성으로 구성된 당화 당화 효소 혼합물을 처리하여 효소 가수 분해할 경우, D-갈락토오스(D-galactose) 및 3,6-언하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 높은 수율로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0065] 도 1은 *G. amansii*의 이온성 액체 전처리 및 효소 당화의 가수 분해 메커니즘을 도식화한 것이다.
- 도 2는 심플렉스 - 센트로이드 및 혼합물의 조성을 나타내는 도면이다.
- 도 3은 이온성 액체의 TGA 곡선을 나타내는 도면이다([Emim] Cl은 268℃, [Bmim] Cl은 264℃, [Bmim] Ac는 217℃이다).
- 도 4는 바이오매스 용해 (a), 재생 (b) 및 바이오매스 손실(c)에 있어서 온도 및 시간의 영향을 나타내는 도면이다.
- 도 5는 역용매 첨가 후, 침전된 고체의 수율을 나타내는 도면이다.
- 도 6은 이온성 액체가 처리되지 않은 *G. amansii*(a), 재생된 바이오매스(b) 및 시판 아가로오스(c)의 FTIR 스펙트럼 분석 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 7은 다양한 이온성 액체에 용해된 *G. amansii* 및 다양한 역용매를 이용하여 재생된 바이오 매스의 XRD 패턴을 나타내는 도면이다.
- 도 8은 밀링 (A) 및 [Bmim] Ac 처리 (B)하였을 때의 *G. amansii*의 SEM 이미지를 나타낸다.
- 도 9는 [Bmim] Ac의 복구 및 재사용에 따른 수율을 나타내는 도면이다.
- 도 10은 재활용된 [Bmim] Ac의 IR 스펙트럼을 분석한 결과이다.
- 도 11은 재활용된 [Bmim] Ac의 1H NMR을 분석한 결과이다.

도 12는 재활용된 [Bmim] Ac의 13C NMR을 분석한 결과이다.

도 13은 이온성 액체로 전처리된 *G. amansii*를 40℃에서 50U/g⁻¹의 Aga2-AgaA7-Aga50D 및 40℃에서 2.5 U/g⁻¹의 AhgI로 가수분해하여 생성된 D-갈락토오스 (a & b) 및 3,6-AHG (c & d) 수율에 대한 반응 표면 및 윤곽 플롯을 나타내는 도면이다.

도 14는 D-Gal (a) 및 3,6-L-AHG(b) 수율에 미치는 요인의 영향 정도를 확인하기 위한 파레토분석차트를 나타내는 도면이다.

도 15는 예측 변수와 Y_{Gal}과 Y_{AhgI}에 대한 바람직한 변수의 프로파일을 나타내는 도면이다. 수직 및 수평 점선은 각각 최적 효소 분율 및 최대 예상 설탕 수확량 값을 나타낸다.

도 16은 D-Gal 및 3,6-L-AHG 수율에 미치는 효소 적재 및 반응 시간의 영향을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0068] **준비예: *G. amansii* 및 용매의 준비**

[0069] *Gelidium amansii*는 한국 목포 산정동산 천연 식품(http://808.or.kr)에서 구입 하였다. 염분을 제거하기 위해, 생 바이오매스를 탈이온수로 여러 번 세척했다. 해조류는 40℃의 오븐에서 건조시켜 수분을 10% 이하로 유지시킨 다음, 크기는 해머 밀(Hammer mill)을 사용하여 150µm 미만으로 준비하여 실온에서 보관했다. 수분 함량은 매 사용 전에 중량 측정으로 측정하였다.

[0070] 탄수화물, 지질, 리그닌, 단백질, 수분 및 회분과 같은 *G. amansii*의 성분 분석은 아래 실험예에 기재된 바와 같이 진행하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0072]

Component (% dry weight)	Wt % (dry basis)
Carbohydrates	
Glucose	16.88±0.78
Galactose3,6-anhydro-L-galactose	27.67±0.58
	24.49±2.55
Lignin	
Acid Soluble	3.82±0.06
Acid Insoluble	4.08±0.40
Others	23.06±ND

[0073] 상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, *G. amansii*의 총 탄수화물은 69.04(D-Glu와 같은 셀룰로오스 16.88, D-Gal 및 3,6-L-AHG와 같은 아가로오스), 리그닌 7.9 및 기타 (회분, 지질, 단백질 등)을 함유한다. 본 발명에서 도출한 상기 값은 이전 연구에서 보고된 값과 일치했다[Malihan et al. 2014]. *G. amansii*는 상대적으로 높은 아가로오스 함량을 가지고 있어 3,6-L-AHG 및 D-Gal로의 효소적 당화를 위한 재료로서 우수하다.

[0074] 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 아세테이트[Bmim]Ac(95%) 이온성 액체는 시그마-올드리치에서 구매하였으며, 1-에틸-3-메틸이미다졸리움 클로라이드[Emim]Cl(98%) 및 1-부틸-3-메틸이미다졸리움 클로라이드[Bmim]Cl(> 98%)은 아크로즈에서 구매하였다. 에탄올(99.8%)은 아크로즈에서 구매하였고, 아세톤(>95%)은 시그마-올드리치에서 구매하였으며, 메탄올(99.9%) 및 디메틸설폭사이드(DMSO)는 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific)에서 구입하였다. 모든 이온성 액체는 사용 전에 진공 오븐 건조되었고, 사용하지 않을 때는 데시케이터에 보관하였다.

[0076] **실시예 1: 이온성 액체의 전처리, 재생 및 역용매의 스크리닝**

[0077] 바이오 매스의 이온성 액체 처리에서 이온성 액체는 고온에서 쉽게 열분해 되므로, 이온성 액체 처리에 앞서 이온성 액체의 안정한 온도 범위를 결정하기 위해 열 중량 분석(thermogravimetric analysis, TGA)이 수행되었으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0078] 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있듯이 C1 기반의 이온성 액체는 Ac 기반의 이온성 액체보다 더 높은 Tonset를 나타내므로, 열 안정성이 더 높음을 보여준다.

[0080] *G. amansii* 용해 및 용해된 물질의 재생은 17.5 mg/mm^{ol}⁻¹ 이온성 액체에 로딩된 *G. amansii* 현탁액은 적절한 양으로 건조된 *G. amansii* 및 이온성 액체를 혼합하여 준비하였다. 그 다음, 혼합물을 오일조에 넣고 24 시간 동안 연속적으로 교반하면서 (약 700 rpm) 100 °C로 가열 하였다. DMSO(약 2 mL)를 첨가 한 후, 2500 rpm (Hanil, Centrifuge / Baekma 2559, MMF-300)에서 10분 동안 원심 분리하여 용해를 중결시켰다. DMSO는 용해된 물질의 침전을 일으키지 않고, 추가적인 바이오매스를 용해시키지 않는 점도 감소기로 작용한다. 용해와 원심 분리는 용기 사이의 이동으로 인한 혼합물의 손실을 피하기 위해 단일 원심 튜브에서 수행되었다. 원심분리 후, 상청액을 제거하고 펠렛을 DMSO(3x2mL) 및 탈이온수 (3x5mL)로 세척하여 바이오매스 매트릭스 내에 흡착 또는 포획된 모든 가용성 물질 및 이온성 액체를 제거하였다. 불택성 및 원심 분리가 각 세척 단계에 포함된다. 잔류물은 용해되지 않은 고체의 중량을 분석하기 위해 일정한 중량이 달성될 때까지 105 ± 5 °C에서 오븐 (JSR, 진공 오븐 1 / 백마 2505, 진공 오븐 (JSR))에서 건조시켰다. 액체에 용해된 *G. amansii*의 농도, C_G(액상에 용해된 *G. amansii*의 총량) 및 각 이온성 액체에 용해된 초기 바이오 매스의 퍼센트, Bio.Diss(이온성 액체에 용해된 초기 바이오매스)%(w/w⁻¹)는 하기 식 1 및 2에 따라 계산하였다.

[0081] [식 1]

$$C_G (\%) = \left(\frac{m_G - m_{res}}{m_{IL} + m_G - m_{res}} \right) \times 100$$

[0082]

[0083] [식 2]

$$\text{Bio.Diss} (\%) = \left(1 - \frac{m_{res}}{m_G} \right) \times 100$$

[0084]

[0085] 상기 식 1 및 2에서, m_G는 초기의(시작) *G. amansii* 질량(g), m_{res}는 용해되지 않은 잔여 물의 질량(g), m_{IL}은 이온성 액체(IL)(g)의 질량이다.

[0087] 이온성 액체 용해 시험은 상기와 같은 문제점을 해소하기 위해 장기 체류 시간 (24 h) 단계를 100°C에서 수행되었으며, 그 결과(용출 데이터)를 표 2에 나타내었다.

표 2

이온성 액체(IL)	[Emim]Cl	[Bmim]Cl	[Bmim]Ac
β-value ^a	0.861	0.908	1.13
η (mPa.s) ^b	27	68	15
C _G (%) ^c	5.9	4.7	8.0
Bio.Diss (%) ^d	53 ± 1.5	50 ± 1.3	99 ± 0.4
Undissolved residue (%)	47 ± 2.0	50 ± 1.0	1 ± 0.0
YRG (%) ^e	46 ± 3.0	36 ± 2.0	48 ± 2.0
Loss (%)	7 ± 4.0	14 ± 1.0	52 ± 2.0
Fraction	0.13	0.28	0.53
Loss/Bio.Diss			

[0090] a β-value - H-bond viscosity

[0091] b η - viscosity; Viscosity of the ILs @100°C taken from Badgujar et al.(2015).

[0092] c CG - amount of *G. amansii* dissolved in the liquor

[0093] d Bio.Diss - initial biomass dissolved in IL

[0094] e YRG - yield of regenerated *G. amansii*

[0096] 이온성 액체에 용해된 *G. amansii*의 농도를 용해되지 않은 고체의 중량과 비교, 측정하여 확인하였다(식 1). 혼합물에 첨가된 초기 바이오매스의 중량 백분율을 기준으로하여 표기된 각 이온성 액체에 용해된 바이오매스를 계산하였다(식 2).

[0097] 이미다졸리움 양이온에 대한 알킬 측쇄 길이의 효과는 [Emim][Cl] vs [Bmim][Cl]을 비교함으로써 조사되었다. 더 낮은 양이온을 갖는 [Emim]⁺가 다량의 *G. amansii*를 용해하였다. 이는 바이오매스 매트릭스에 대한 낮은 양이온의 향상된 이온 이동도 때문일 것으로 보인다. 음이온의 효과는 [Bmim] Cl과 [Bmim] Ac를 비교하였으며 [Bmim] Ac는 우수한 용매로 확인되었다(표 2).

[0098] 이온성 액체에서의 바이오매스의 용해 메커니즘은 세포벽의 탄수화물(셀룰로오스, 아가로 오스 등)의 수산기와 이온성 액체의 음이온 및 양이온과 결합함으로써, 분자 및 분자 내 수소 원자 사이의 전자 공여체-수용체(electron donor-acceptor, EDA) 복합체의 형성을 통해 세포벽 강성 및 결정성을 담당하는 분자간 및 분자 내 H-결합의 붕괴로 인한 것으로 여겨진다. 탄수화물의 수산기와 H-결합을 형성하는 이온성 액체의 능력은 음이온의 H-결합 염기도(β)에 의존한다. [Bmim] Ac는 [Emim] Cl 및 [Bmim] Cl과 비교하여 우수한 용해 성능을 나타내는, [Ac]는 음이온에서 유래된 높은 β 값(표 2)을 보유하고 있다.

[0099] 음이온의 β 값 뿐만 아니라, 이온성 액체에서의 바이오매스의 용해도는 이온성 액체의 점도에 의해 크게 영향을 받고, 점성이 적은 이온성 액체는 물질 전달 현상을 촉진하여 용해 과정을 촉진한다 [Badgujar et al., 2015]. 선택된 작동 온도(100 °C)에서 이온성 액체의 점도는 다음과 같은 순서를 따른다: [Bmim] Ac < [Emim] Cl < [Bmim] Cl (표 2), 이는 관찰된 이온성 액체의 용해 능력과 일치한다(표 2).

[0100] 원심 분리 및 세척 단계 후에 얻은 IL/DMSO 용액에 물:아세톤(1:1 v/v⁻¹)을 과량(약 30 mL) 첨가하여 용해된 *G. amansii*의 재생성을 확인하였다. 혼합물을 격렬히 볼텍싱하고 4 °C에서 15 분 동안 13,000 rpm (Gyrozen, Refrigerated microcentrifuge, Gyrozen 1730 MR)에서 원심 분리 하였다. 재생된 *G. amansii*의 수율을 중량 측정을 이용하여 확인하기 위하여, 침전물을 액체가 무색이 될 때까지 여러 차례 탈 이온수로 세척하고 -53°C에서 24 시간 동안 동결 건조(LABCONCO, Freeze dry system, 7754010)하였다. 고체 손실 퍼센트는 하기 식 3 및 식 4에 따라 계산하였으며, 그 결과를 상기 표 2에 나타내었다.

[0101] [식 3]

$$YRG (\%) = \left(\frac{m_{YRG}}{m_G} \right) \times 100$$

[0102]

[0103] [식 4]

$$Loss (\%) = \left(1 - \frac{m_{YRG} + m_{res}}{m_G} \right) \times 100$$

[0104]

[0105] 상기 식 3 및 식 4에서, m_{YRG} 는 침전된 *G. amansii*의 질량(mg)을 나타낸다.

[0107] 다양한 용해 온도 및 체류 시간이 이전의 경우에 사용되었고, 물, 아세톤, 메탄올 또는 에탄올이 후자의 경우에 재생 방지 용매로서 사용되는 것을 제외하고는, 용해 속도 및 역용매 스크리닝 실험이 유사한 방식으로 수행되었다.

[0108] 표 2에서 알 수 있듯이, 일부 바이오매스는 용해 및 침전 과정에서 손실되었는데, 특히 더 많은 바이오매스가 용해되었을 때 그러했다. 이것은 *G. amansii*에 존재하는 휘발성 화합물(추출 물질을 포함한 생체 물질이 사용

되었음), 세척 중에 손실된 바이오매스 및 이온성 액체/역용매 혼합물에 남아있는 바이오 매스와 같은 여러 가지 이유로 볼 수 있다. 역용매의 낮은 성능은 모든 용해된 고체를 완전히 침전시키지 못하였다.

[0110] **실�험예 2: 용해 온도 및 시간의 최적화**

[0111] 온도와 체류 시간이 *G. amansii* 용해 및 재생에 미치는 영향을 30°C 내지 90°C까지의 온도, 및 1 시간 내지 24 시간을 변화시켜 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0112] 그 결과, 도 4에서 확인할 수 있듯이, *G. amansii* 용해 및 회수의 정도는 온도가 증가함에 따라 증가하였다. 이 현상은 바이오매스 매트릭스 내의 수소 결합에 대한 온도의 불안정화 효과에 기인 할 수 있다. 유사하게, 설정된 온도에서보다 긴 체류 시간은 높은 용해 및 회수 효율을 나타내었다. 전처리 시간이 길어지면서 바이오매스 매트릭스 내로의 이온성 액체 침투가 개선되어 *G. amansii*의 용해 및 용해된 바이오매스 폴리머(주로 아가로오스와 셀룰로오스)의 추출이 증가한다.

[0113] 또한, 용해도가 90°C 일 때 높은 용해 효율과 재생된 바이오매스 수확량이 높아졌으나(도 4a 및 4b), 이 온도에서 높은 바이오 매스 손실이 또한 높았다(도 4c). 체류 시간이 90°C에서 12 시간에서 24 시간으로 연장되었을 때, 용존 고형물(88.32 ~ 89.23 % w/w⁻¹)과 침전된 고형 수율 (42.0 ~ 50.33 % w/w⁻¹)이 약간 증가되는 것이 관찰되었으며, 체류 시간을 12 시간 이상으로 연장 할 때 상당한 이점이 있는 것을 확인할 수 있다. 따라서 추가 분석을 위한 전처리 실험은 *G. amansii*를 [Bmim]Ac에 90 °C에서 12 시간 동안 녹여 수행 하였다.

[0115] **실시예 3: 역용매의 효과**

[0116] 이온성 액체는 바이오매스 용해를 위한 유용한 용매이지만, 고가이며, 가수 분해 효소를 유해하게 파괴하는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 이온성 액체는 비용을 줄이고 잠재적인 효소 불활성화를 최소화하기 위해 바이오매스 용해 후 제거되어야 한다. 바이오 매스로부터 이온성 액체를 제거하기 위해, 탄수화물 및 이온성 액체 사이의 수소 결합 형성을 위해 경쟁하는 역용매가 첨가된다. *G. amansii*의 이온성 액체 전처리가 대규모로 실행 가능해야 한다면, 회수된 고형물을 증가시키는 것이 중요하다. 따라서, [Bmim] Ac에 용해된 *G. amansii* 탄수화물의 회수를 위해 4 가지 역용매, 물, 아세톤, 에탄올 및 메탄올을 조사 하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. *G. amansii*의 용해(17.5 mg/mmol 이온성 액체의 바이오매스 로딩)는 90°C에서 12 시간 동안 수행되었으며, 실험은 두 번에 걸쳐 수행되었다.

[0117] 그 결과, 도 5에서 확인할 수 있듯이 메탄올이 역용매로 사용될 때 가장 높은 침전된 고체(67.19 % w/w⁻¹)의 수율을 나타내었다. 또한, 메탄올을 역용매로 사용하는 것이 유용한데, 그 이유는 약간의 낮은 끓는 온도(64.7 °C)를 갖기 때문에 증류로 이온성 액체를 회수하는 동안 더 많은 에너지를 절약할 수 있고, 다른 것들보다 지속 가능성이 더 높다. 따라서, 메탄올은 추가적인 실험을 위한 역용매로 선택하였다.

[0119] **실시예 4: 재생된 *G. amansii*의 구조적 특성**

[0120] 천연 *G. amansii* 및 재생된 아가로오스의 FT-IR 스펙트럼들을 기록하고, 상업적으로 이용되는 아가로오스와 비교하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0121] 도 6에서 확인할 수 있듯이, 회수된 *G. amansii*의 IR 밴드는 시판 아가로오스에서 발견되는 특징적인 IR 밴드와 유사하다. 구체적으로, 3340 cm⁻¹(수산기의 신축 밴드), 1035 cm⁻¹(글리코시드 결합의 C-O-C 가교의 진동) 및 925 cm⁻¹ (3,6-anhydroglactose 단위의 COC 가교의 진동)에서 검출된 흡수 밴드는 IR 스펙트럼은 아가로오스와 관련이 있다. 이것은 재생된 바이오매스가 더 높은 아가로오스 함량을 가지고 있다는 것을 나타내며, 이는 구성 분석과 일치한다. 전처리 하지 않은 *G. amansii*와 비교하였을 때, 이온성 액체가 처리된 *G. amansii*의 O-H 스트레칭 밴드가 약간 더 높은 웨이브로 이동되는 것을 확인할 수 있는데, 이는 재생된 바이오매스의 분자간 H-결합이 [Bmim] Ac에 용해 된 후에 약해짐을 나타낸다. 또한 상업용 아가로오스와 재생된 바이오매스의 유사한 스펙트럼은 이온성 액체 용해 및 재생 과정에서 화학적 변형이 없었음을 나타내며, [Bmim] Ac는 비유도체화 용매임을 나타낸다.

[0122] 미처리, 용해 및 재생된 *G. amansii*의 XRD 패턴을 도 7에 나타내었다. 도 7에서 확인할 수 있듯이, 미처리 *G. amansii*의 회절 패턴은 18.5° 2θ 근처에 하나의 정렬된 구조를 나타내었는데, 이것은 아가로오스를 의미하는 특징적인 피크이며, 셀룰로오스 I(결정상)의 (002)에 상응하는 피크가 22° 2θ 및 30° 2θ 부근에서 작고 샤프하게 나타났다. 반면에, 이온성 액체가 처리된 *G. amansii*의 경우, 18.5° 및 30° 2θ의 피크는 사라지고, 22° 2θ

의 피크는 셀룰로오스 II (비정질상)의 전형적인 회절 피크인 $20^{\circ} 2\theta$ 로 시프트 되었다. 이러한 변화는 바이오 매스 골격 내의 분자간 H-결합 및 분자내 H-결합이 이온성 액체 전처리시 파괴되어 이온성 액체 전처리 동안 바이오 매스의 부분 탈결정화를 유발한다는 것을 나타낸다. 즉, 이온성 액체가 처리된 바이오매스는 결정질이 적고 가수 분해 동안 물과 효소 촉매가 침투되기 쉬어진다.

[0123] 또한, [Emim] Cl 처리 후 얻은 재생된 바이오 매스는 [Bmim] Cl (260.05 counts) 및 [Bmim] Ac (279.14 counts)를 사용하여 얻은 결과와 비교하여 $20^{\circ} 2\theta$ (222.15 counts)에서 낮은 회절 피크 강도를 보였다(도 7a). 재생된 고체의 결정성에 대한 역용매의 효과와 관련하여 피크 강도는 (193.97 counts) < (197.17 counts) < ethanol (322.93 counts) < methanol (326.13 counts)(그림 7b) 순이었다. $20^{\circ} 2\theta$ 에서 회절 피크 강도와 회수된 고체 물질의 수율 사이의 완벽한 선형 관계가 관찰되었다. 물을 이용하여 재생한 바이오매스는 다른 회수 샘플 중에서 가장 낮은 피크 강도를 보였다. 물을 사용하여 침전된 고형물은 아마 아가로오스가 물에 약간 용해되기 때문에 젤라틴이 되고, 동결 건조 중 물 분자가 승화되면 에어로젤과 같은 다공성 재생 바이오 매스가 남을 수 있다. 이것은 결정화도가 매우 낮을 수 있지만, 물을 침전 용매로 사용하는 재생된 바이오매스 수율은 에탄올과 메탄올을 사용하여 얻은 것보다 매우 낮다(도 5).

[0124] 또한, SEM 분석은 구조적 및 형태학적 변화를 관찰하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8은 원료 및 [Bmim] Ac 처리된 *G. amansii*의 SEM 이미지를 나타낸다. 처리되지 않은 *G. amansii*는 고밀도, 단단하고 규칙적인 구조를 나타내었으며, 이는 효소 가수 분해와 비교하였을 때 전혀 다른 구조를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 이와 대조적으로, 이온성 액체가 처리된 샘플의 표면은 라멜라 구조의 붕괴 때문에 매스 점유가 무작위로 형성하게 배치되어 있다. 이러한 결과는 [Bmim] Ac 전처리가 가수 분해 동안 효소 접근성을 잠재적으로 증가시킬 수 있는 *G. amansii*의 세포벽을 변형시키고 궁극적으로 당의 수율을 높인다는 것을 시사한다.

[0126] **실시예 5: [Bmim]Ac의 회수 및 재사용**

[0127] DMSO를 제거하기 위해서는 고비점(189℃)에서 에너지 집약적인 증발 공정이 필요하기 때문에 DMSO를 첨가하지 않고 이온성 액체 회수 및 재사용성 테스트를 수행했다. *G. amansii* 로딩은 IL-biomass 용액의 높은 점도에 의해 부과된 한계를 극복하기 위하여 반으로 줄였고($8.75 \text{ mg/mmol}^{-1}$ 이온성 액체), 원심 분리를 통해 시료의 온도를 $\sim 90^{\circ} \text{C}$ 로 유지하여 용해되지 않은 바이오매스 분획을 효과적으로 펠렛화하였다. 용해된 바이오매스의 재생 및 세척 단계 동안에 수집된 역용매/이온성 용액을 60°C 에서 회전 증발기를 통해 진공 증류하여 역용매인 메탄올과 물을 제거하였다. 재생된 바이오매스 및 회수된 이온성 액체의 양에 따른 공정 효율을 확인한 결과를 도 9에 나타내었다.

[0128] 그 결과, 도 9에서 확인할 수 있듯이, 재생된 바이오매스 수율 및 이온성 액체 회수율은 5회 사이클 후에 68.8에서 $60.07 \% \text{ w/w}^{-1}$ 로, 및 97.0에서 $88.9 \% \text{ w/w}^{-1}$ 로 각각 감소했다.

[0129] 또한, 재사용된 [Bmim] Ac는 FT-IR, $^1\text{H NMR}$ 및 $^{13}\text{C NMR}$ 을 사용하여 특성 분석 하였다. 구체적으로, 본래 *G. amansii* 및 재생된 아가로스가 풍부한 물질은 FT-IR, 분말 X선 회절(XRD) 및 환경 주사 전자 현미경 (E-SEM)으로 특성화하여 이온성 액체 전처리 효과를 평가 하였다. FT-IR은 Cary 630 FT-IR 분광계를 이용하여 $450\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ 범위에서 ATR (attenuated total reflectance) 셀을 사용하여 기록하였다. XRD 패턴은 0.02° 의 스텝 사이즈와 Cu-K α 방사선 하에서 3° 에서 60° 까지의 $4^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 스캔 속도를 사용하여 Bruker AXS D8 초점 X선 회절 측정기를 사용하여 기록하였다. ESEM 분석은 15.0 kV 가속 전압에서 작동되는 FEI XL-30 FEG 장비를 사용하여 수행하였으며, 그 결과를 도 10 내지 도 12에 나타내었다.

[0130] 그 결과, 도 10 내지 도 12에서 확인할 수 있듯이, 초기 및 재사용된 [Bmim] Ac의 IR, $^1\text{H NMR}$ 및 $^{13}\text{C NMR}$ 스펙트럼은 동일하며, 5회 재사용 후의 이온성 액체의 화학 구조도 변화가 없음을 확인하였다.

[0132] **실시예 6: 효소의 생산, 재조합 효소의 발현 및 특성 규명**

[0133] *Cellulophaga omnivescoria* W5C 유래의 aga2 유전자, *Pseudoalteromonas hodoensis* sp. Nov 유래의 agaA7 유전자, *Saccharophagus degradans* 2-40 유래의 aga50D 유전자 및 *Cellulophaga omnivescoria* W5C 유래의 ahgI 유전자 각각을 암호화하는 재조합 균주인 *E. coli* BL21(pET28a-Aga2), *E. coli* BL21 (pET28a-AgaA7), *E. coli* BL21 (pET28a-Aga50D) 및 *E. coli* BL21 (pET28a-AhgI)는 이전에 본 발명자들의 연구실에서 제작하였다. 효소의 과발현 및 정제는 문헌 [Ramos et al. 2018]에 기재된 방법을 참고하였다. 간략하게 설명하자면, 각각의 플라스

미드를 갖는 대장균 균주를 배양 OD 600nm가 0.4-0.6에 도달할 때까지 50 μg mL⁻¹ 카나마이신을 함유하는 Luria-Bertani 배지에서 성장시켰다. 그 후 0.1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 재조합 단백질의 발현을 유도하고 20 °C에서 배양 하였다. 재조합 단백질 발현을 유도한지 16 시간 후, 세포를 4 °C에서 30 분 동안 6000 rpm (Hanil, 고속 냉각 원심 분리기, supra 21K)에서 세포 배양액을 원심 분리하여 수확 하였다. 세포 펠렛을 LEW 완충액 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)에 재현탁시키고 1 mg/mL⁻¹의 리소자임을 첨가 하였다. 현탁액을 4 °C에서 30 분 동안 배양 하였다. 세포를 5분(진폭 10 %, 버스트 10 초, 냉각 10 초) 동안 초음파 처리 (BRANSON, Digital sonifier, Branson 450)하여 균질화시켰다. 조세포 추출물은 13,000 rpm, 4 °C에서 10 분간 원심 분리하여 얻었다. Protino®Ni-TED 사전 충전 컬럼 친화성 크로마토그래피 (Macherey-Nagel, BMS, Korea)를 사용하여 단백질을 정제 하였다. 정제는 제조자의 프로토콜에 따라 수행 하였다. 정제된 효소의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준 단백질로 사용하여 Bradford 단백질 분석 키트 (Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 정량화하였다.

[0134] β- 아가레이즈 I(Aga2 및 AgaA7) 및 β-아가레이즈 II(Aga50D)의 최적 조성은 이온성 액체가 처리된 *G. amansii*에서 아가로오스를 각각의 단량체 당으로 효과적으로 해중합(중합의 역반응)시키기 위하여 통계적 혼합물 설계 접근법을 사용하여 맞춤화 하였다. 도 2에 도시된 심플렉스 - 센트로이드 설계에 따라 실험을 수행 한 후에 얻어진 설탕 수율을 하기 표 3에 나타낸다. 결과는 두 개의 독립적인 실험을 진행하였고, 거의 모든 경우에서 결과가 일치하였다.

표 3

[0136]

entry	AhgI (U · g ⁻¹ solid)	x variable (Loading fraction of enzymes)			Y variable (% yield of sugars)	
		Aga2 (X ₁)	AgaA7 (X ₂)	Aga50D (X ₃)	D-Gal (Y _{Gal})	3,6-L-AHG (Y _{Ahg})
1	2.50	1.00	0.00	0.00	4.62	14.44
2	2.50	0.00	1.00	0.00	0.00	7.58
3	2.50	0.00	0.00	1.00	46.61	27.97
4	2.50	0.50	0.50	0.00	4.05	13.12
5	2.50	0.50	0.00	0.50	45.25	24.95
6	2.50	0.00	0.50	0.50	46.17	27.88
7	2.50	0.67	0.17	0.17	32.71	18.92
8	2.50	0.17	0.67	0.17	39.89	24.49
9	2.50	0.17	0.17	0.67	45.62	28.86
10	2.50	0.33	0.33	0.33	47.76	25.91
11	2.50	1.00	0.00	0.00	4.63	14.13
12	2.50	0.00	1.00	0.00	0.00	13.76
13	2.50	0.00	0.00	1.00	47.31	26.97
14	2.50	0.50	0.50	0.00	4.05	12.81
15	2.50	0.50	0.00	0.50	50.65	25.30
16	2.50	0.00	0.50	0.50	45.29	26.21
17	2.50	0.67	0.17	0.17	42.99	23.61
18	2.50	0.17	0.67	0.17	37.98	22.82
19	2.50	0.17	0.17	0.67	39.85	25.37
20	2.50	0.33	0.33	0.33	45.41	25.98

[0137] Statsoft Inc.(Tulsa, Oklahoma, USA)의 Statistica® 10.0 소프트웨어를 사용하여 다양한 Scheffé 표준 다항식 모델(다항식은 모델의 혼합 제약 조건을 통합 함)에 맞게 테스트되었으며, 관찰된 반응 변수(D-Gal 및 3,6-L-AHG의 수율) 및 독립 변수(Aga2, AgaA7 및 Aga50D의 로딩 분율)사이의 관계를 설명하는 적절한 수학적 모델을 선택하였다. 그 중, 하기 식 6에 나타난 식이 완전한 입방 모델에서 가장 우수한 결과를 나타내었다.

[0139] [식 6]

$$Y_{Gal / Ahg} = \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum_{i < j}^3 \delta_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) + \sum \sum \sum_{i < j < k}^3 \beta_{ijk} x_i x_j x_k$$

[0141] 상기 식 6에서 $Y_{Gal/Ahg}$ 는 D-Gal 또는 3,6-L-AHG 수율을 나타내고, X_i 은 코팅된 독립 변수, $\sum_i X_i=1$ 및 $0 \leq x_i \leq 1$ 의 조성 제한 조건을 갖는 혼합물에서 효소 성분의 비율이다. 매개 변수 β_i 는 선형 계수이며, 구성 요소 i 가 설탕 생산량에 미치는 선형 효과를 나타낸다. 이 매개 변수 β_{ij} 는 2 차 계수이며 혼합물의 i 와 j 성분이 동시에 존재할 때 발생하는 2 진 상호 작용 효과($\beta_{ij}>0$ 인 경우 상승 효과, $\beta_{ij}<0$ 인 경우 반대 효과)를 나타내며, δ_{ij} 는 모델의 매개 변수이다. 마지막으로, 매개 변수 β_{ijk} 는 3 차 계수이며, 세 가지 효소 구성 요소가 동시에 존재하는 결과로 삼항 상호 작용 효과를 계량화한다(시너지 효과 $\beta_{ijk}>0$ 또는 $\beta_{ijk}<0$ 인 경우 상반 작용). 수정된 입방 모델에 대한 실험 데이터의 곡선 피팅 (중요하지 않은 ($p > 0.05$) 및 앨리어스 모델 용어 제거 후)은 D-Gal(식 7) 및 3,6-L-AHG (식 8)를 위한 다음 상관 식을 제공한다.

[0143] [식 7]

$$Y_{Gal} = 5.5x_1 + 0.89x_2 + 47.2x_3 + 99.1x_1x_3 + 88.6x_2x_3 + 268.6x_1x_2x_3 - 191.4x_1x_2(x_1 - x_2) + 305.9x_1x_3(x_1 - x_3)$$

[0145] [식 8]

$$Y_{Ahg} = 14.6x_1 + 11x_2 + 27.6x_3 + 16.8x_1x_3 + 31.7x_2x_3 + 96x_1x_2x_3 - 55.2x_1x_2(x_1 - x_2) + 57.1x_1x_3(x_1 - x_3)$$

[0147] 결정의 회귀 계수 (r^2)와 F- 테스트 (ANOVA)를 사용하여 적합 모델이 실제 값의 적절한 근사값을 제공 할 수 있는지 여부를 확인하였다. 상관 계수 (r^2)는 95 % 유의 수준에서, D-Gal에 대해서는 0.99, 3,6-L-AHG에 대해서는 0.95로 나타났다 (표 4). 이것은 D-Gal과 3,6-L-AHG 항복 반응 변수의 변동성의 약 99 %와 95 %가 각각 모델에 의해 설명 될 수 있음을 나타내며, 예측 값과 관측 값이 서로 가깝다는 것을 나타낸다. 따라서 모델은 5 % 미만의 오차로 연구 범위 내에서 D-Gal과 3,6-L-AHG의 수율을 예측할 수 있다.

표 4

Response	Soruce	SS	df	MS	F-value	p-value
Galactose yield(Y_{Gal})	Model	7423.64	7	1060.51	126.46	0.0000*
	Total Error	100.64	12	8.39		
	Lack of Fit	25.99	2	12.99	1.74	0.2245**
	Pure Error	74.65	10	7.47		
	Total	7524.27	19	396.01		
	r^2	0.99				
	Adj	0.98				
	F _c -Value	2.91				
3,6-AHG yield(Y_{Ahg})	Model	746.99	7	106.71	29.91	0.0000*
	Total Error	42.82	12	3.5680		
	Lack of Fit	3.17	2	1.5852	0.3998	0.6807**
	Pure Error	39.65	10	3.9646		
	Total	789.81	19	41.5687		
	r^2	0.95				
	Adj	0.91				
	F _c -Value	2.91				

[0150] 개발된 모델과 표면의 곡률 모양의 중요성은 모델의 ANOVA로부터의 가설 테스트를 통해 확인하였다. 귀무 가설

(Ho)은 요인들이 반응 변수에 유의한 영향을 미치지 않는다는 것을 설명한다(모델 방정식의 모든 계수 추정치는 0 임). 반면에 대안 가설 (H1)은 요인들이 반응 변수에 유의한 영향을 미친다는 것을 상기시킨다(하나 또는 모든 계수는 0.05 미만의 p- 값에서 0이 아니다).

[0151] 표 5에서 볼 수 있듯이, 계산된 F 값은 두 반응에 대한 Fc 값보다 몇 배 더 컸다. 이는 요인의 영향이 우연에 의한 것일 가능성이 매우 낮고 예상되는 요소 효과가 더 높을 것이라는 가능성을 보여주므로, 귀무 가설을 부정할 수 있다. 더욱이, 적합성의 결여는 두 반응 모두에서 유의하지 않았으며, 식 7과 식 8은 실험 데이터를 예측하는 데 이용하였다.

[0152] 상기 방정식으로부터 생성된 효소 성분의 함수로서 반응에 대한 3D 표면 및 2D 삼원항의 플롯을 도 13에 나타내었다. 정삼각형의 각 모서리는 각 인자(개별 효소)를 나타내며, 삼각형 안의 각 점은 혼합된 성분의 다른 부분을 나타내며 삼각형의 중심은 혼합물의 동일한 부분을 나타낸다. 설탕 생산량 값은 짙은 녹색 (낮은 값)에서 진한 빨간색 (높은 값)까지 색상 척도로 표시된다. 단일 인자의 효과를 고려할 때, Aga50D의 두 가지 당 (D-Gal 및 3,6-L-AHG) 모두 최대 수확량이 얻어졌지만, Aga2 또는 AgaA7만으로는 낮은 당 함량을 산출했다. 이 결과는 식 7 및 8에서 $\beta 1$ 과 $\beta 2$ 에 비해 $\beta 3$ 계수의 높은 값과 일치한다.

[0153] 또한, Aga2 (x1) 및 Aga50D (x3), 또는 AgaA7 (x2) 및 Aga50D (x3)를 갖는 삼각형의 변 방향으로 위치하는 영역에서 높은 설탕 수율이 관찰되었으며, 이는 또한 적합 방정식에서 $\beta 13$ 및 $\beta 23$ 의 높은 계수 값으로부터 명백하다. 이것은 이온성 액체가 처리된 *G. amansii*의 가수 분해에 대한 엔도타입 β -아가레이즈 I 효소(Aga2 또는 AgaA7)와 엑소타입 β -아가레이즈 II(Aga50D) 효소 사이의 강한 상호 작용을 나타낸다. 한편, 엔도타입 β -아가레이즈 I 효소 (Aga2 및 AgaA7) 사이에는 어떠한 상호 작용 효과도 관찰되지 않았다. D-Gal의 경우 268.6, 3,6-L-AHG의 경우 96에 해당하는 $\beta 123$ 의 계수 값이 가장 높은 세 가지 효소의 삼원 혼합물에서도 매우 높은 당 함량이 관찰되었다.

[0154] 설탕 수확량에 대한 요인의 영향 정도에 대한 양적 측정을 제공하는 파레토분석차트 (Student 's t-test의 그래픽 표현)를 도 14에 나타내었다. 차트에서 볼 수 있듯이, D-Gal에 대한 AgaA7 (x2)를 제외한 개별 효소, Aga2 * AgaA7, 3 원 효소 혼합물 및 기타 고차원 상호 작용을 제외한 이원 효소 혼합물은 당 생산량에 유의한 영향을 미쳤다($p < 0.05$). AgaA7 (x2)만이 D-Gal의 수율에 영향을 미치지 않지만, 일단 다른 효소와 결합하면 상당한 상승 작용이 관찰되었다. Aga50D(x3)는 다른 효소에 비해 설탕 수확량에 큰 영향을 미치며, 이는 반응 변수의 수학적 모델 계수 및 플롯에서 관찰 된 결과와 일치한 것을 확인하였다.

[0155] 도 13의 응답 표면의 모양을 확인한 결과, D-Gal과 3-6-L-AHG의 최대 생산량이 서로 가깝지 않다는 것을 보여주며, 이는 두 가지 당의 최대 생산량을 제공하는 특정 지역을 시각적으로 찾는 것이 어렵다는 것을 의미한다. 따라서 최적의 생산성을 확인하기 위하여, desirability function (D) 방법을 이용한 다중 응답 최적화를 수행하였다. 도 15에 나타난 결과는, 두 반응에 대한 최적의 효소 제제가 33.3 % Aga2, 33.3 % AgaA7 및 33.3 % Aga50D를 함유해야 함을 나타내고 있으며, D-Gal 및 3,6-L-AHG의 예측 수율은 각각 48.67 % 및 26.67 %였다. 최대로 결합된 바람직한 값은 0.928로 확인되었는데, 이것은 제안된 최적화 목표의 92.28 %가 충족되었음을 의미한다.

[0156] 실험적으로 확인된 설탕 수확량(D-Gal과 46-L-AHG 각각 46.58 ± 1.66 과 25.95 ± 0.05 %, 표 4 참조)은 평균 예측 오차가 5% 미만인 예측치에 매우 가깝다.

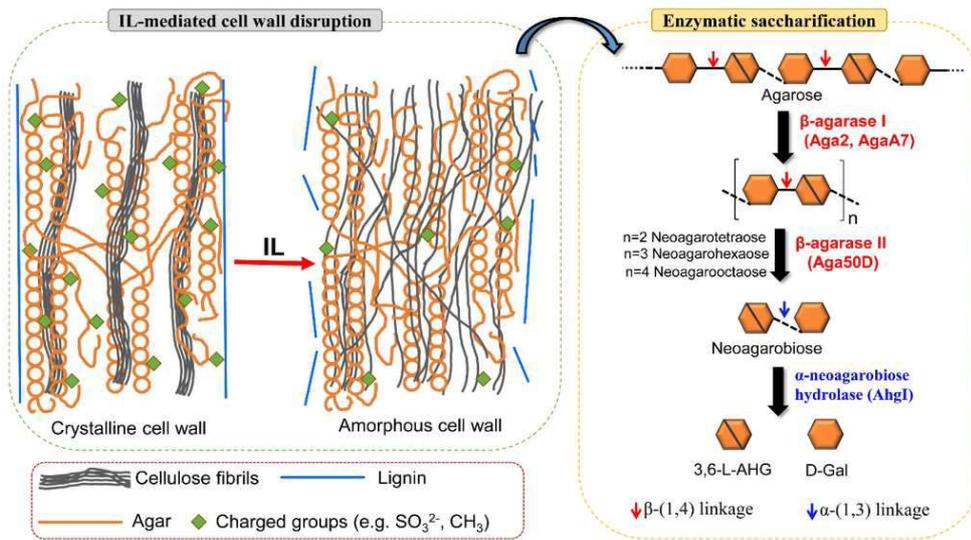
[0157] **실시예 7: 시간 경과 및 효소 선량 반응 분석**

[0158] 효소 콕테일 최적화는 고정 총 효소 부하 (50 U/g^{-1}) 및 고정 반응 시간 (48 h)에서 수행되었다. 최적화된 효소 혼합물이 당 수율을 증가시킬 수 있는지를 결정하기 위해, 3 회의 반응 시간 (6, 12 및 48)에서 높은(100 U/g^{-1}) 또는 낮은 (15 U/g^{-1}) 효소를 사용하여 당화 반응을 수행 하였다.

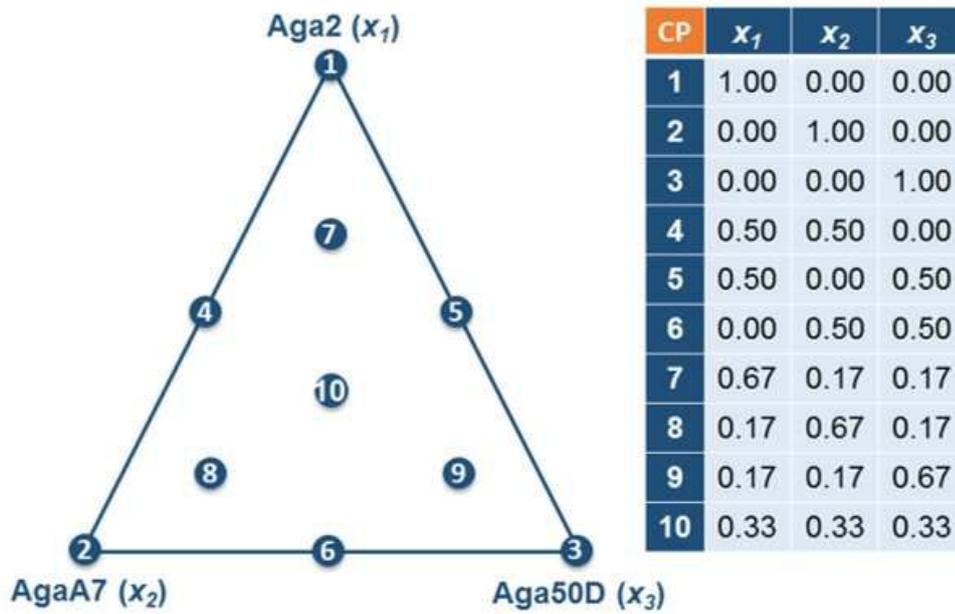
[0159] 그 결과, 도 16에서 확인할 수 있듯이 설탕 수율은 효소 100 U/g^{-1} 을 48 시간 동안 사용하여 가수 분해 반응을 수행 한 경우, D-Gal의 경우 56.5 %, 3,6-L-AHG의 경우 33.7 %로 극대화되었다.

도면

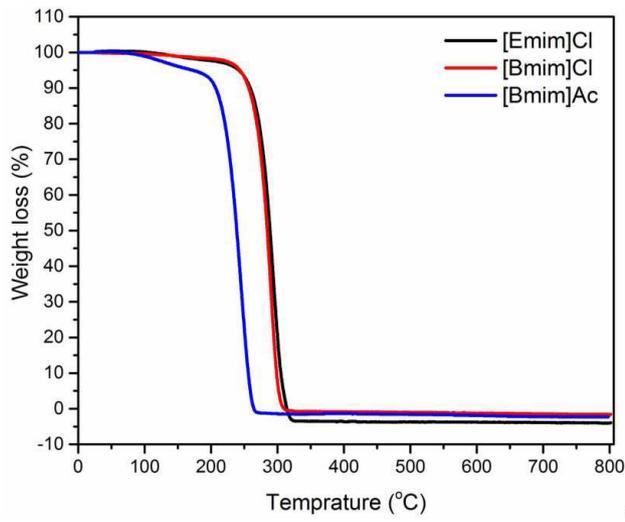
도면1



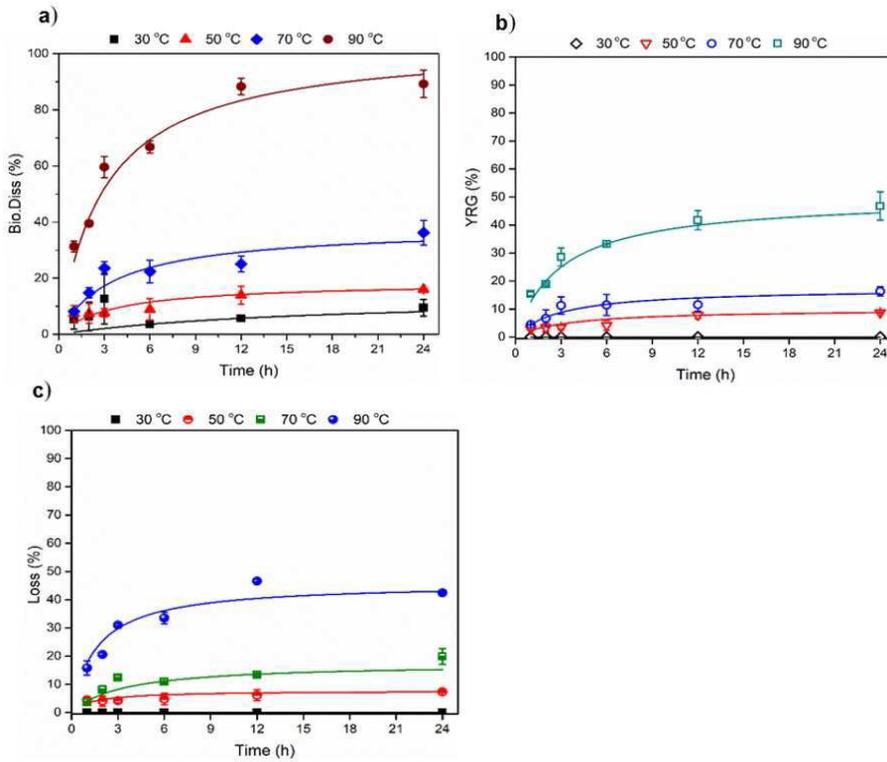
도면2



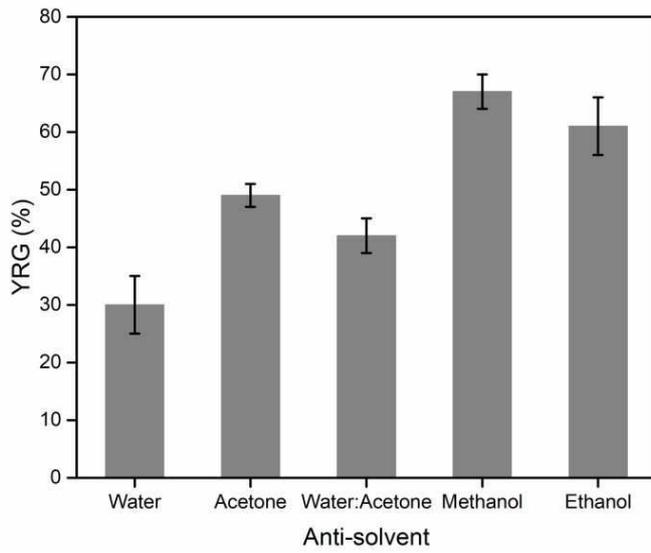
도면3



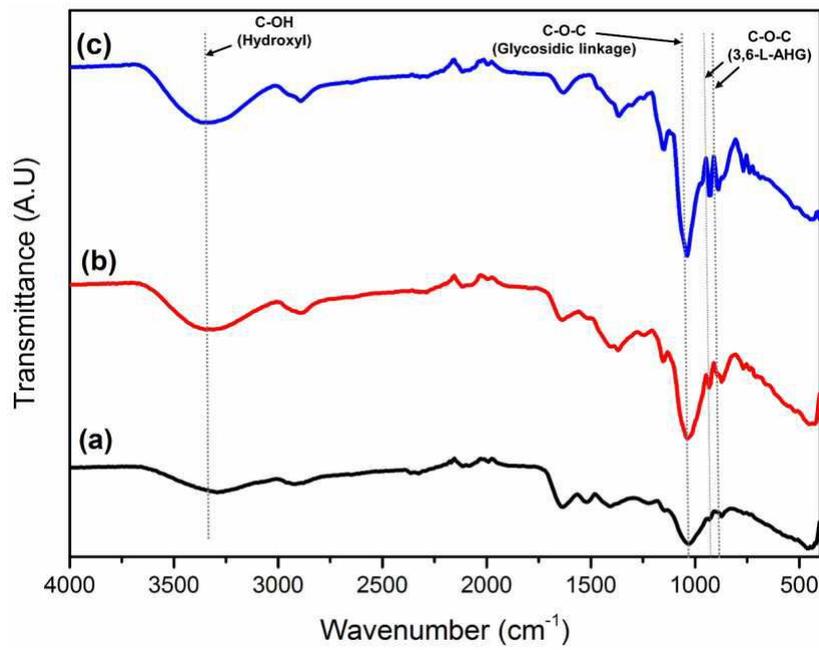
도면4



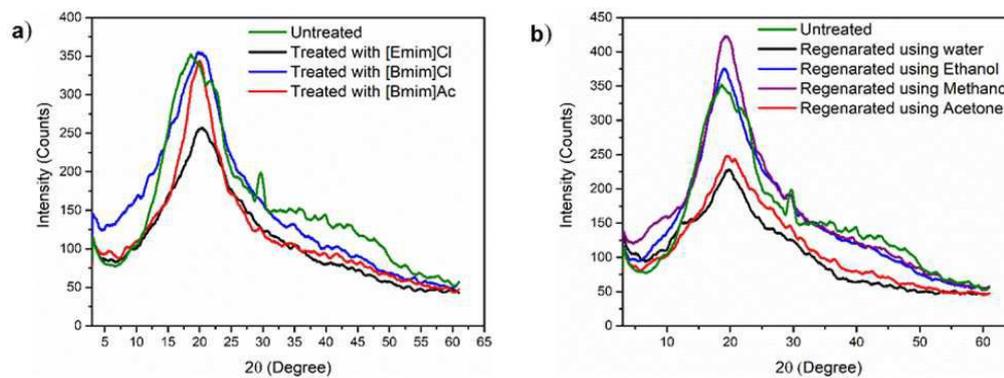
도면5



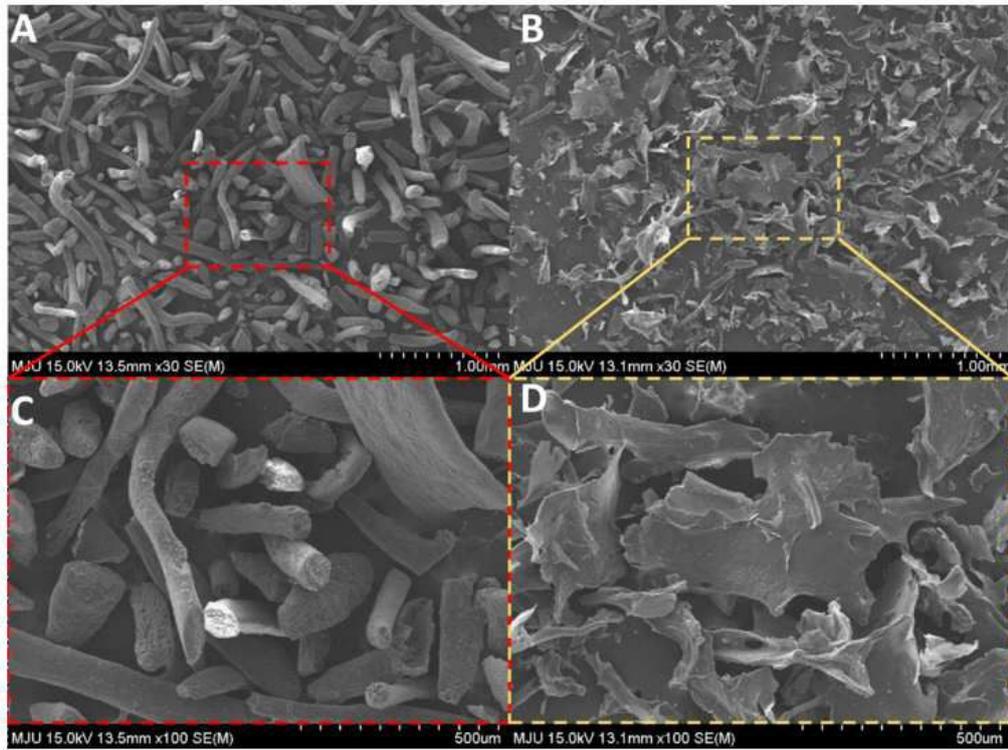
도면6



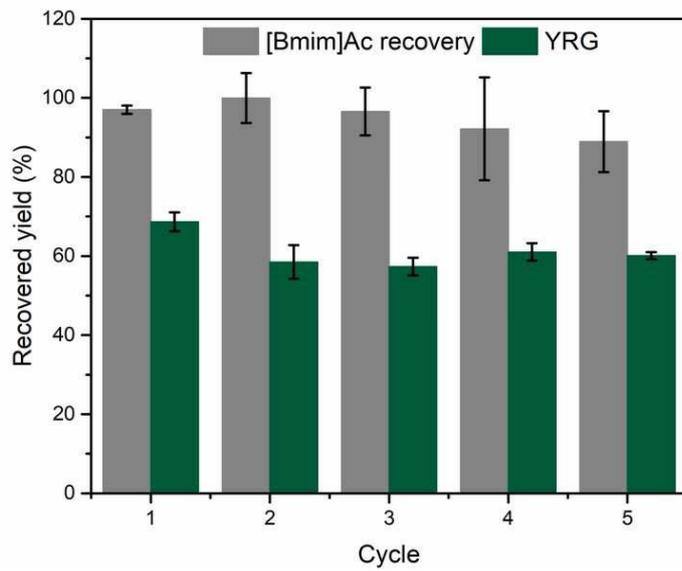
도면7



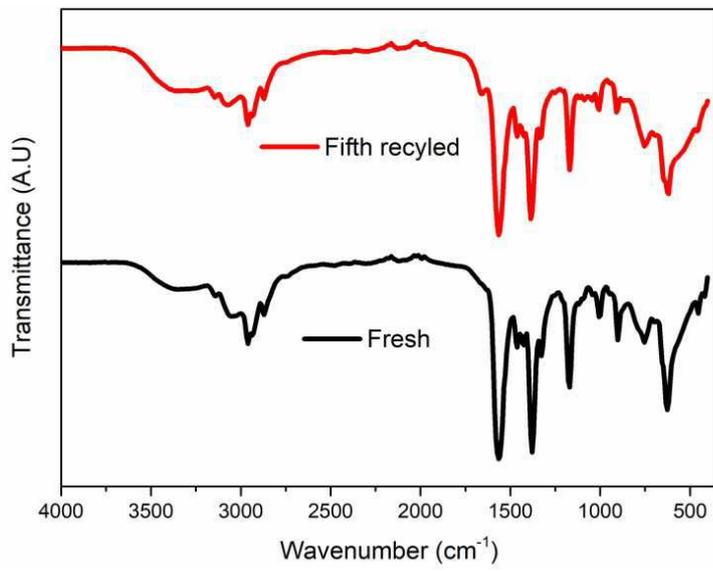
도면8



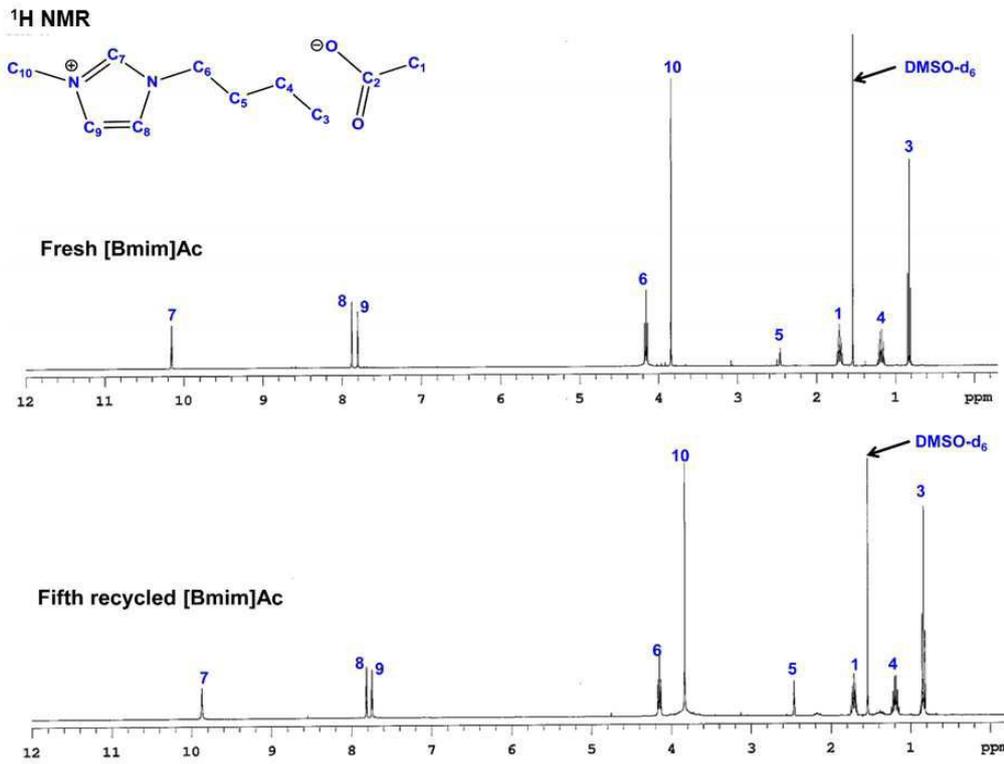
도면9



도면10

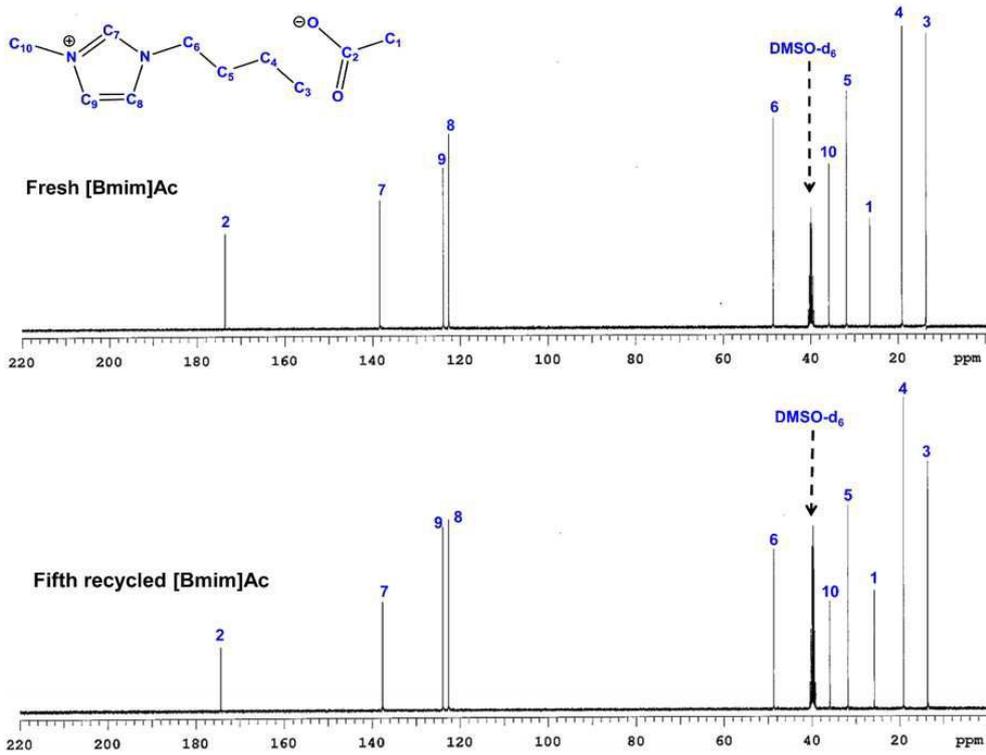


도면11

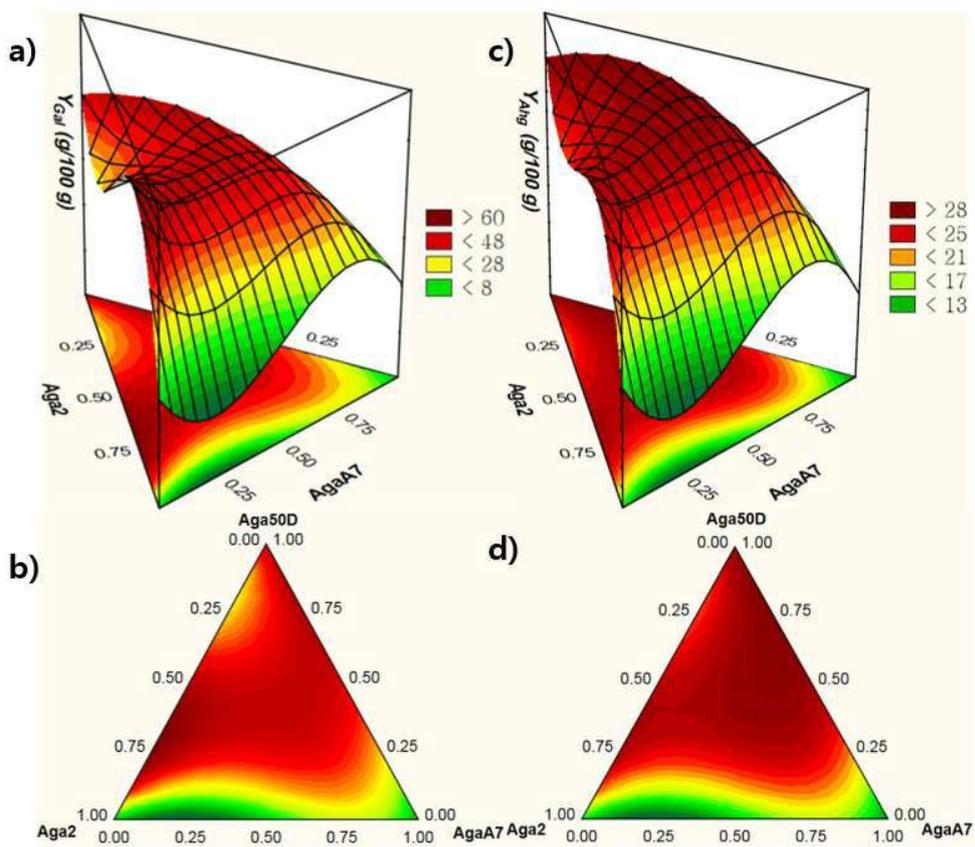


도면12

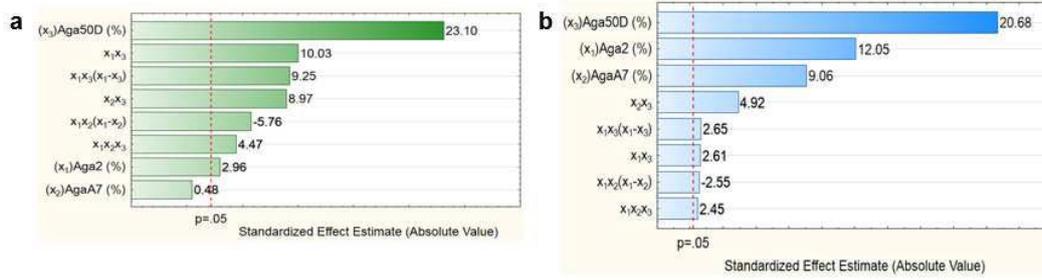
¹³C NMR



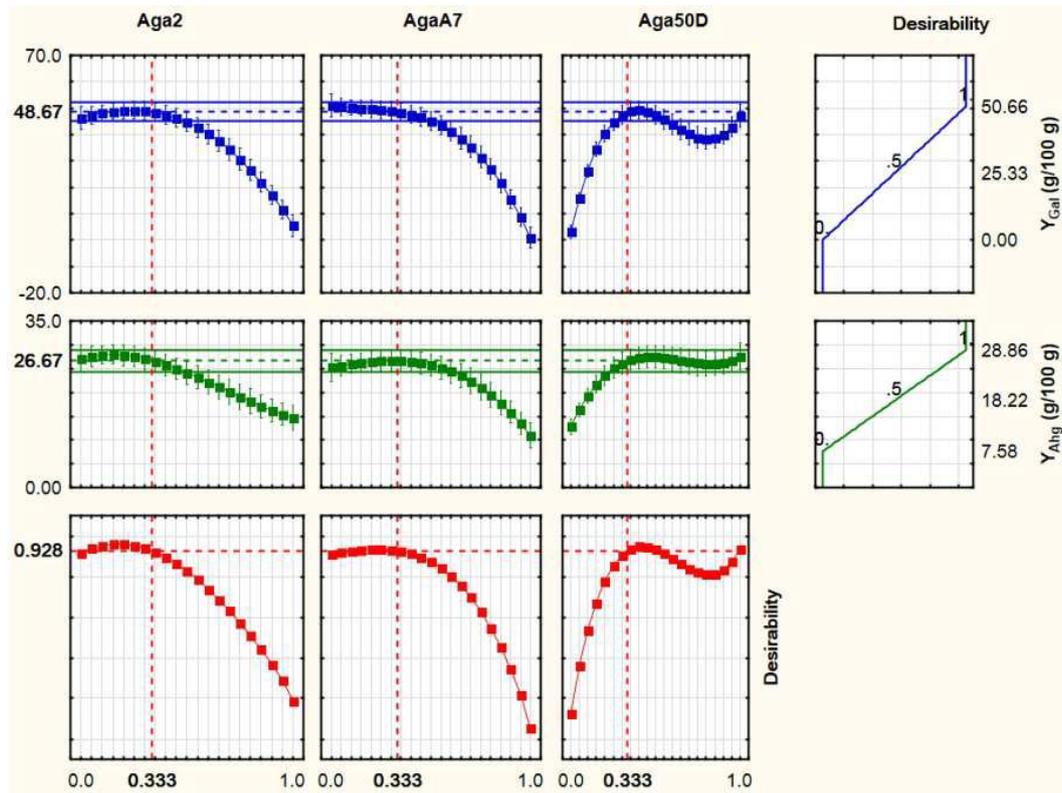
도면13



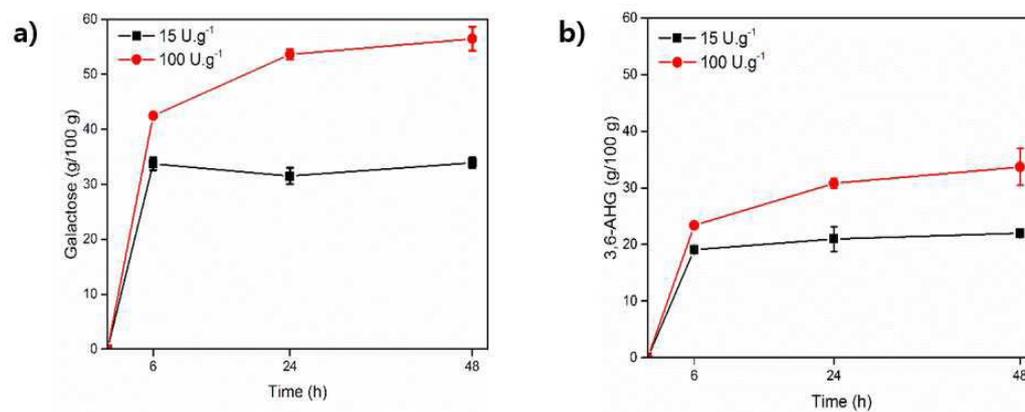
도면14



도면15



도면16



서열목록

<110> MYONGJI UNIVERSITY INDUSTRY AND ACADEMIA COOPERATION FOUNDATION
 <120> Method for producing monomeric sugars using pretreatment of agar
 by ionic liquid and application thereof
 <130> P17-0033
 <160> 3
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 810
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of AgaA7
 <400> 1
 gctgattgga gcccttttag tattccagca caagcaggcg caggtaaaag ctggcagtta 60
 caaagtgttt cagatgagtt taactacatt gcacaaccta ataataaacc agctgctttt 120

 aataatcgtt ggaacgcatic ttatataaat gcctggctag gtcctggcga tacagaattt 180
 agcgtggcc actcatatac aactggcggg gcgcttggtc tgcaagcaac cgaaaaagca 240
 ggtacgaaca aagtctctc aggtattatt tcttctaaag caacctttac ttaccacctta 300
 tacctagagg cgatggtaaa accaacaac aacactatgg caaatgctgt atggatgctt 360
 agtgcgtgatt ctaccecaaga aatcgatgct atggagtcac atggtagcga ccgaattggc 420
 caagagtggg ttgaccaacg tatgcatggt agtcatcacg tatttattcg agaccattt 480
 caagattacc agccaaagga cgctggctct tgggtttaca acaacggaga aacataccgc 540

 aataaatttc gtagatatgg agtacattgg aaggatgcgt ggaatttaga ttactatata 600
 gatggtgttt tggttcgaag tgtctctggc ccaaatatta ttgatcctga aaactatact 660
 aacggaacag gcttaaacaa gcctatgcac ataatactgg atatggaaca tcagccatgg 720
 cgagacgtta agcctaagc atctgagctt gcagatccca ataaaagtat attttgggta 780
 gattggatac gagtttataa agcccagtaa 810
 <210> 2
 <211> 2382
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence of Aga50D

<400> 2

atgggtgcaa ttggaggctc cgtgaaaata aatatctctt ttatcccact tttgttatt	60
tccgcttcaa tttttattgg cgcggtgaat tcaagtaagc ttgaatcggg tntagactca	120
aataatattt cgcccgttat gttattcgat ttgaaaacg atcaagtccc ttcaaatatt	180
cattttttaa atgcgcgtgc aagtatagaa acctataccg gtataaatgg cgagccgagt	240
aaagggttaa agttggcgat gcagtccaag cagcacagtt ataactggcct tgccattgtg	300
ccagagcagc ctigggattg gagcgagttt acctctgcta gcttgtattt cgatatagtc	360
agtgttggcg atcattccac acaattttat ttagatgtta ccgaccaaaa tggcgccgtg	420
tttaccgca gtattgatat tccagtgggt aaaatgcaat cgtactacgc caagttaagc	480
ggtcacgatt tagaagtgcc cgatagtgga gacgttaacg atttaaacct cgctctggc	540
ttgcttcta acccgcctac atggacatct gacgataggc agtttgtttg gatgtgggga	600
gtgaaaaatt tagatttgc gggcattgct aaaatatcgc taagtgtgca aagcgcaatg	660
cacgataaaa cagttattat cgataaatat cgtattcaac ccaaccgcc gcaagatgaa	720
aacttccttg tcggtttggg agacgagttt ggccaaaacg ccaaagttga ttacaagggt	780
aaaatccata gtttagaaga attgcatgca gcgcgcgatg tggaactggc cgagcttgat	840
ggcaagccaa tgcctagtcg ctctaagttt ggcggttggg tggccggccc caagctaaaa	900
gtacaggggt actttcgac agaaaaaatt aacggtaaat ggatgctagt agaccagaa	960
gggtaccctt actttgctac gggtttagac attattgcc tatctaattc atctaccatg	1020
actggttacg attacgatca agctactgtt gctcagcgt ctgccgacga tgtaaacct	1080
gaagactcaa aaggtttaat ggcaagtgc gaaaaatcat ttgctacgcg ccacctagca	1140
tcgccaacac gagcggcaat gtttaactgg ttgccagatt acgatcacc tctcgcaat	1200
cattataact accgtcgtc tgcgcattcc ggeccactga aacgcggtga agcctacagc	1260
ttctacagt ccaaccttga gcgtaaac ggtgaaactt acccggttc ttacttggat	1320
aagtggcgcg aagtaacggg agacagaatg ctaaaactggg gctttacctc gctaggcaac	1380
tggactgacc cagcatatta cgacaacaat cgcataccgt ttttcgcaa tggttgggta	1440
ataggggatt taaaaccgt atctagcggf gcggattttt ggggcgcaat gccagatgta	1500
ttcgaccag aatttaaagt gcgcgctatg gaaacggcac gcgtggttc agaagaatt	1560
aaaaatagcc ctigtgctg aggggtatit atcgataacg aaaaagctt cggtcgcccc	1620
gattccgata aggcgcaata cggatttccc attcataccc tcggtcgccc aagcgaaggt	1680
gtgcctacta ggcaggcgtt tagtaagctg cttaaagcca aatacaaac tatagccgcg	1740
ttaaacaatg cctgggggtt aaagcttagt tcttgggctg agtttgattt gggcgtagat	1800

gtaaaagcgc tgccggtaac cgatactctg cgcgcagatt actcaatgtt actttcggcc 1860
 tatgcggacc aatattttaa ggtggtacac ggcgcggttg aacattacat gccgaaccac 1920
 ttgtatttag gcgcacgctt tcctgattgg ggaatgcca tggaggtagt gaaagctgcc 1980
 gcaaaatagc ccgatgtggt tagctataat tcctacaaag agggcttgcc taagcagaag 2040
 tgggcttttt tagcagagct agataagccg agtataatcg gtgagtttca cataggtgct 2100

atggatcacg gttcgtatca ccccgttta attcacgctg cgtcgcaggc cgatagaggt 2160
 gaaatgtaca aagattatat gcaatcggta attgataacc cctacttcgt aggcgcgcac 2220
 tggttccagt atatggattc gccattaacg ggcagagctt atgatggtga aaactacaat 2280
 gtgggttttg tggatgttac cgacacgccg taccaagaaa tggaggatgc agcaaaagaa 2340
 gtaaatgcga aaatatacac cgaaaggcta ggcagcaaat aa 2382

<210> 3

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence of AgA2

<400> 3

atgatgaaat ttaatgtagc aatagtactc ttattgtttt atgtagtgtc ttgtagtgat 60
 aatgaatcta cagataaac tacagatgaa gaggtaatag aaacaccaga aatcccaact 120
 gaagaaccag aagaagaacc agaagtaact tggaaaacca tacctgtgcc agcagaagca 180
 ggagaaggta atgtttggga gtttcaaat atgtcagaca gttttgatta tgaagcagag 240
 gccgctaata aaggagcaga atttgatgcc aaatggaccg atttttatca taaccaatgg 300
 tctggaccgg gattaacaga atggaaaaga gaccattctt tagttaaaga tggttattta 360
 caaatggttg ctagtagagt accaaattct aataaaattc atttaggttg tataacctca 420

aaagaacaag tagtttacc ggtgtatata gaggcgtatg taaaaattgc aaatactacg 480
 ctagcatcag atgtttggct ttttaagctca gatgatactc aggagataga cattgtagag 540
 gcttacggag caagctactc agagttagca caggcagacc aaacttggtg tgcagaacgt 600
 attcatttaa gtcatcatat gtttattaga gaacctttc aagattacca accaacagat 660
 gcaggtagtt ggtataaaga tgaggttggg acattatgga gagaagattt tcatagagta 720
 ggagtgtact ggagagatcc atttcattta gattattata taaacggaga gttggttaaga 780
 acaacctctg ggcagaaaat gatagacct aataattatg cagatggtaa aggtttaagt 840

aaacctatgg atataattat taatgcagag gatcaaacat ggagatcaga taaaaatatt 900

acaccatctg atgcagaatt ggctaataaa gaaaataata catttaaagt agattggatt	960
cgtatTTTTA aaccggttaa agcagattaa	990