

전분질계 바이오매스의 동시당화발효 조건 최적화

나중분 · 김준석[†]

경기대학교 화학공학과
443-760 수원시 영통구 의의동 산94-6
(2008년 4월 14일 접수, 2008년 4월 21일 2008)

The Optimum Condition of SSF to Ethanol Production from Starch Biomass

Jong Bon Na and Jun Seok Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea
(Received 14 April 2008; accepted 21 April 2008)

요 약

분리 당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)는 당화와 발효공정을 따로 수행하는 방법으로 최종 생성물인 글루코오스에 의해 억제 영향을 받기 때문에 반응에 진행됨에 따라 축적된 글루코오스의 농도가 높아지면 반응이 종결되는 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 효소의 양을 늘리는 방법이 있지만, 효소의 생산비용이 비싸기 때문에 경제적인 방법이 될 수 없다. 이러한 분리 당화발효 공정의 단점을 극복하기 위해서 동시당화발효 공정(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)은 하나의 반응기에서 당화와 발효를 동시에 수행한다. 동시당화발효 공정에서는 당화과정에서 글루코오스가 생성되자마자 효모가 발효과정을 통해 글루코오스를 바로 제거하기 때문에 반응기내에서 당의 축적을 최소화할 수 있다. 따라서 동시당화발효 공정은 최종 생성물의 억제 작용을 방지할 수 있고, 효소의 가수분해 반응을 향상시킬 수 있다. 본 연구에서는 동시당화발효에서 에탄올의 수율에 관여하는 조건들(pH, 반응온도, 효소 투입량, 반응시간)의 최적 조건을 찾는 연구를 수행하였다. 기질로는 감자전분을 사용하였고, 효소는 glucoamylase, 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*가 각각 사용되었다. 동시당화발효의 최적의 조건은 pH 4, 온도 38로 나타났다. 최적의 조건으로 감자전분을 동시당화발효하였을 때 반응 18시간 후에 에탄올은 최대 수율 86%에 도달하였다.

Abstract – The Simultaneous Saccharification and Fermentation(SSF) of ethanol production from potato starch studied with respect to growth pH, temperature, substrate concentration. The glucoamylase and *Saccharomyces cerevisiae* have a capacity to carry out a single stage SSF process for ethanol production. The characteristics, termed as starch hydrolysis, accumulation of glucose, ethanol production and biomass formation, were affected with variation in pH, temperature and starch concentration. The maximum ethanol concentration of 12.9g/l was obtained using a starch concentration 30g/l, which represent an ethanol yield of 86%. The optimum conditions for the maximum ethanol yield were found to be a temperature of 38, pH of 4.0 and fermentation time of 18hr. Thus by using the control composite design, it is possible to determine the accurate values of the fermentation parameters where maximum production of ethanol occurs.

Key words: SSF, Potato Starch, Hydrolysis, Ethanol

1. 서 론

화석연료의 과도한 소비에 따른 지구 온난화 및 계속되고 있는 고유가에 따라 석유를 대체할 수 있는 새로운 에너지로서 바이오에탄올의 보급의 필요성이 크게 높아지고 있다. 바이오에탄올은 당질계, 전분질계 또는 섬유소계 바이오매스를 원료로 하여 생물공정에 의해 생산된다. 일반적으로 바이오에탄올의 생산 공정에서는 사탕수수, 옥수수, 사탕무, 보리, 나무 또는 볏짚 등이 바이오매스로 사용된다. 바이오 에탄올을 생산하는 공정은 바이오매스의 탄수화물

을 글루코오스로 전환하고, 전환된 글루코오스를 발효한다는 점에서 와인 또는 맥주의 생산 공정과 비슷하다. 바이오에탄올은 화석연료와 달리 재생 가능한 원료로 얻어지며, 가솔린과 비교했을 때 carbon monoxide와 같은 오염물질을 배출하지 않아 환경 친화적인 연료이고, 온실가스의 양을 감소할 수 있다는 다양한 특성을 갖고 있다[1-4].

사탕수수는 바이오에탄올의 원료로 주로 사용된다. 특히 브라질은 전체 수송연료의 70% 이상을 바이오연료와 휘발유를 혼합한 연료를 사용한다. 바이오에탄올을 연료첨가제로 휘발유와 혼합하여 사용할 경우에 휘발유만을 사용하였을 경우 보다 이산화탄소의 배출량이 크게 줄어들었다. 브라질에서는 바이오에탄올 연료로서 사용

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jskim84@kyonggi.ac.kr

하는 것이 이미 일반화 되어있으며, 원료로 사용되는 사탕수수를 대량생산하고 있다. 다른 나라에서도 사탕수수로부터 바이오에탄올을 생산하는 시도를 꾸준히 해오고 있으나 사탕수수의 비용이 증가하면서 다른 바이오매스로부터 바이오에탄올을 대량생산 할 수 있는 기술을 개발하고 있다. 현재 주요 국가들은 벼, 갈대, 감, 나무등과 같은 주요 농작물을 사용한 에탄올 발효를 연구 중에 있다. 하지만 농작물의 수요가 증가함에 따라 농작물의 가격이 상승하여 농작물을 이용한 바이오에탄올의 생산에 문제점이 되고 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 첫째, 더 저렴한 바이오매스의 개발이 필요하다. 둘째로 높은 에탄올 생산성을 갖는 효율적인 공정의 개발이 필요하다[5].

전분과 목질계 섬유소는 최근에 바이오에탄올을 생산하기 위한 원료로 주목 받고 있다. 특히 감자전분은 인도와 같은 열대지방에서 주요 농작물로 재배된다. 감자전분은 아밀로즈 27%와 아밀로펙틴 73%으로 구성되어 있으며, 이는 α -amylase, β -amylase or glucoamylase에 의해 글루코스로 분해된다[6-8].

현재 상황에서는 쉽게 당화와 발효가 되는 재생 가능한 바이오매스를 찾는 것이 필요하다. 목질계 섬유소는 리그닌 성분 때문에 쉽게 가수분해 되지 않기 때문에 공정의 어려움이 있어 아직 효율적인 기술의 개발이 필요한 실정이다. 전분은 효소에 의해서 쉽게 가수분해되며, 효소들은 미생물에 의해서 생산된다. 전분은 비교적 저렴한 바이오 원료로서 바이오에탄올을 생산하기 위한 원료로서 경쟁력이 있다.

일반적으로 전분으로부터 바이오에탄올을 생산하는 공정은 세 가지 단계가 있다; α -amylase, β -amylase or glucoamylase에 의한 전분의 액화단계, 효소에 의해 액화된 전분의 당화단계를 거쳐, *Saccharomyces cerevisiae*를 효모로 하여 발효하는 단계가 있다[9].

이러한 공정을 하나의 공정으로 만든 공정을 동시당화발효라고 한다. 동시당화발효의 장점은 여러 공정으로 나누어진 공정을 하나의 반응기에서 하나의 공정으로 생산이 가능 한 점이다[10]. 그리고 당화를 통해 생산된 글루코오스는 생산될 때 동시에 *Saccharomyces cerevisiae*에 의해서 에탄올로 바로 전환되므로 당화율을 증가시키고 결과적으로 생산성의 증가와 반응기의 부피의 감소, 전체 비용의 감소의 효과를 가져온다. 반면, 동시당화발효의 단점으로는 당화와 발효의 반응의 최적조건이 달라서 동시당화발효를 했을 경우에 최적조건을 찾는 것에 어려움이 있다. 일반적으로 알려진 바에 의하면 당화시에는 높은 온도에서 당화율이 높게 나타나는데 발효 공정에서는 높은 온도에서는 미생물의 성장에 영향을 주어서 좋은 조건이 아니다[11-13].

따라서 이번 연구의 목적은 효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 효소 glucoamylase를 이용하여 전분을 동시당화발효 하여 동시당화발효공정의 효율성을 평가하고, 이때 바이오에탄올의 생산을 최대로 하기 위한 최적 조건을 찾는 것이다.

2. 실험

2-1. 재료

본 연구에서 바이오원료로 사용된 전분은 DUKSAN PURE CHEMICALS 사의 파우더 형태의 감자전분을 사용하였으며, 효소로 쓰인 α -amylase는 *Bacillus amyloliquefaciens*으로 SIGMA-ALDRICH 사의 제품을 사용하였다. 또 사용된 glucoamylase는 (주)창해에탄올로부터 얻은 SGA(solid glucoamylase)를 사용하였다.

전분의 발효공정에서 효모로 사용된 *Saccharomyces cerevisiae* DKIC 413은 발효배지에 접종되기 전에 활성화 시켜 접종하였다. 발효배지로 YPD 배지가 사용되었고, YPD배지의 구성은 yeast extract 2(w/v.%), peptone 2(w/v.%), dextrose 3(w/v.%) 이었다. YPD배지 150 mL를 Erlenmeyer flask에 넣고 S.C를 접종하여 온도 37°C에서 150 rpm으로 34시간 동안 shaking incubator에서 반응시킨다.

2-2. 효소 가수분해

파우더 형태의 감자전분을 각각 물속에 1, 2 그리고 3%(w/v.)의 농도로 녹아있는 용액을 효소 α -amylase 또는 glucoamylase로 가수분해 시켰다. 본 실험에서는 농도 1, 2 그리고 3%(w/v.)의 감자전분 100 mL를 가지고 250 ml의 Erlenmeyer flask상에서 실험하였다. 감자전분은 121°C에서 15분간 autoclave하여 액화시킨다. 액화된 감자전분은 효소 α -amylase 또는 glucoamylase를 접종하여 shaking incubator에서 짧은 시간 안에 글루코오스로 가수분해 된다[14].

pH의 조건은 sodium phosphate-citrate buffer를 이용해서 조절하였고, 온도와 효소의 농도도 변화시켜 각각 실험 하였다.

2-3. 발효

본 실험에서 사용된 발효공정에서 발효 배지의 구성성분은 다음과 같다. Hydrolysed starch 3%(w/v.), yeast extract 0.15%(w/v.), NH_4Cl 0.25%(w/v.), K_2HPO_4 0.55%(w/v.), NaCl 0.10%(w/v.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%(w/v.), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15%(w/v), CITRICACID 0.30%(w/v.) 이었다. 발효의 기질로서 2-2의 방법으로 생산된 가수분해된 전분을 사용하였다[15].

위의 배지는 121에서 1시간 동안 autoclave하여 멸균시킨 후에 *Saccharomyces cerevisiae*를 접종하여 150 rpm으로 shaking incubator에서 48시간 동안 반응시켰다.

2-3. 동시당화발효

동시당화발효 배지의 구성은 다음과 같다. Yeast extract 0.15%(w/v.), NH_4Cl 0.25%(w/v.), K_2HPO_4 0.55%(w/v.), NaCl 0.10%(w/v.), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%(w/v.), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.15%(w/v), CITRICACID 0.30%(w/v.), 감자전분 3.0%(w/v.) 이었다. 당화과정을 거치지 않은 상태의 감자전분을 넣고 121°C에서 1시간 동안 autoclave하여 멸균시킨 후에 효소 glucoamylase와 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 동시에 넣고 150 rpm으로 shaking incubator에서 72시간 동안 반응시켰다. 조건을 달리하여 반복실험 하였다.

2-4. 분석방법

본 실험에서 사용된 감자전분의 구성과 글루코오스의 함량은 NREL Chemical Analysis and Testing Standard Procedure 방법을 사용하여 얻었다. 당화공정을 거쳐 생산된 글루코오스 및 동시당화발효를 거쳐 생산된 에탄올의 농도는 HPLC(Waters Co., USA)를 사용하여 분석하였다. 이때 사용된 Column은 Aminex HPX-87H (bio red)이고 Waters 410의 RI detector를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 감자전분의 당화

감자전분의 최적 당화공정 조건을 파악하기 위해, pH, 온도, 효소

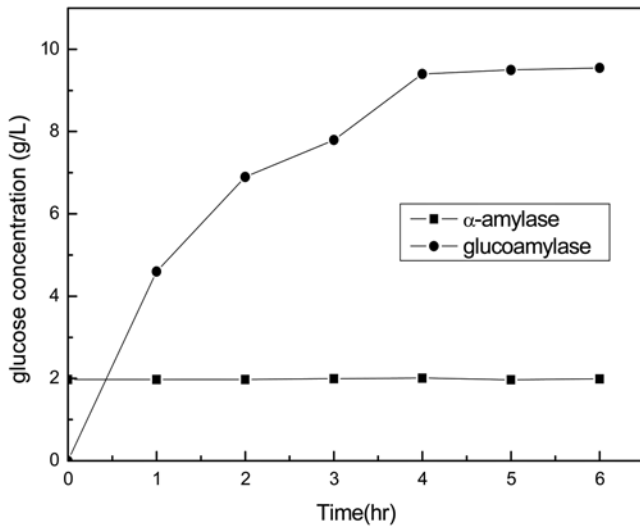


Fig. 1. Enzyme hydrolysis of potato starch with glucoamylase and α -amylase.

투입량에 대하여 실험을 수행하였다.

Fig. 1은 α -amylase와 (주)창해에탄올에서 제공받은 glucoamylase 효소에 대한 감자 전분의 당화력을 분석한 결과이다. 동일한 조건에서 효소를 α -amylase와 glucoamylase를 적용한 결과 glucoamylase에 의한 당화력은 빠른 시간의 반응 속도를 나타내었다. α -amylase를 사용하였을 경우, 감자전분을 10 g/L 반응시켰을 때 글루코오스는 1.9 g/L의 농도가 생성되고, 동일한 조건에서 glucoamylase를 사용하였을 때는 9.5 g/L의 글루코오스가 생산되었다. α -amylase를 사용하였을 때 보다 glucoamylase를 사용하였을 때 글루코오스의 생산성이 더 좋았다. α -amylase는 전분과 같은 글루코오스의 고분자 형태의 α -1,4 linkages를 분해한다. 하지만 branched polysaccharides의 α -1,6 linkage는 분해하지 못한다. Glucoamylase는 글루코오스 polysaccharide chains의 α -1,4 linkages를 끝에서부터 분해하고 α -1,6 linkage도 분해할 수 있다. 따라서 glucoamylase는 충분한 양으로 일정시간 동안 반응시킬 경우에 전분의 거의 대부분을 글루코오스로 분해할 수 있었다. 또한 본 실험에서 사용된 glucoamylase는 (주)창해에탄올로부터 제공받은 상업용으로 사용되는 효소로 α -amylase의 역가를 포함하는 것으로 판단된다. 결과적으로 본 실험에서는 glucoamylase만으로도 전분을 글루코오스로 가수분해시키기에 충분했다.

Fig. 2는 전분의 당화 공정에서 pH가 미치는 영향에 대해 나타낸 그래프이다. 동일조건에서 효소로 glucoamylase를 사용하여 pH를 달리하여 감자 전분을 당화하였다. pH는 sodium phosphate-citrate buffer를 사용하여 조절하였고, 각각 pH 3.86, 4.83, 5.56, 7.03에서 실험하였다. 반응 후 1시간마다 글루코오스의 농도를 분석하였다. 감자전분 10 g/L를 당화했을 때 pH 5.56에서 생성된 글루코오스의 농도가 9.9 g/L로 가장 높게 나타났다. 하지만 그림에서도 볼 수 있듯이 pH 3.86에서 pH 7.03의 범위 내에서는 생산된 글루코오스의 농도에 크게 영향을 주지 않았다. 이러한 결과는 효소로 사용된 glucoamylase가 비교적 pH의 영향을 크게 받지 않기 때문에 동시 당화발효의 pH적용 범위는 에탄올 생산을 위한 발효 조건에 쉽게 적용 가능하겠다.

Fig. 3은 감자전분의 당화공정에서 온도가 미치는 영향에 대해 나

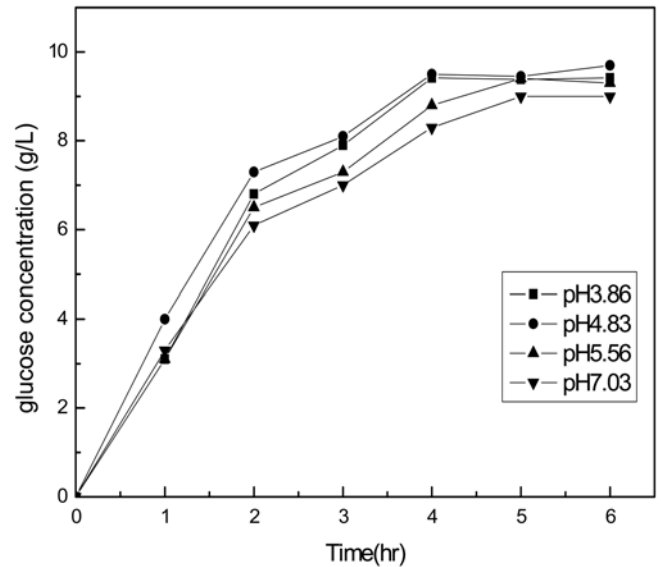


Fig. 2. Enzyme hydrolysis of potato starch by glucoamylase with various pH conditions.

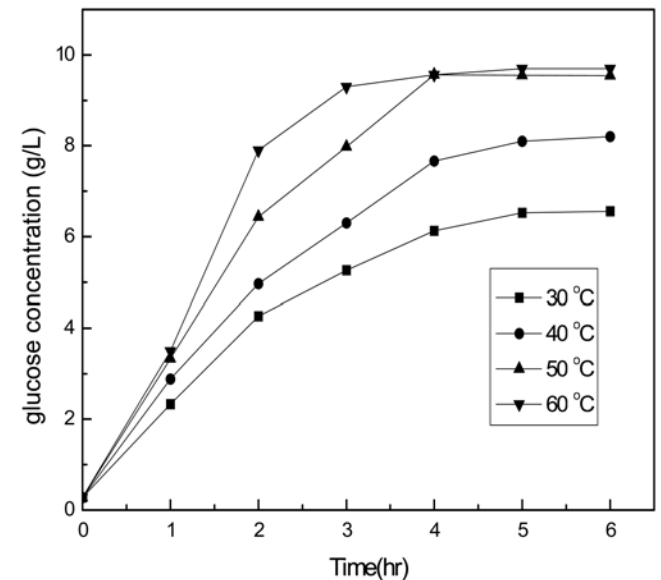


Fig. 3. Enzyme hydrolysis of potato starch by glucoamylase with various temperature conditions.

타낸 그래프이다. 감자전분의 당화공정에서 온도가 미치는 영향을 알아보기 위해 온도 30, 40, 50, 60 °C에서 각각 실험하였다. 온도의 영향은 당화공정의 온도가 증가하면 할수록 반응 속도뿐만 아니라 당화 수율도 증가하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 대부분 에탄올 생산을 위해 적용되는 S.C. 균주의 최적 발효 온도 조건인 30 °C과 상이하여 동시당화 발효 공정을 위해서는 적절한 반응 온도를 선택하는 것이 필요하겠다. Fig. 4는 효소의 투입 농도를 다르게 하였을 때 감자전분의 당화공정에 미치는 영향에 대한 그래프이다. Glucoamylase를 0.1%(w/v)접종하였을 때 글루코오스는 최대 9.5 g/L가 생산되었다. 하지만 0.1%(w/v) 이상 증가시켰을 경우에는 글루코오스의 농도가 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 효소의 농도는 0.1%(w/v)가 최적의 조건으로 나타났다.

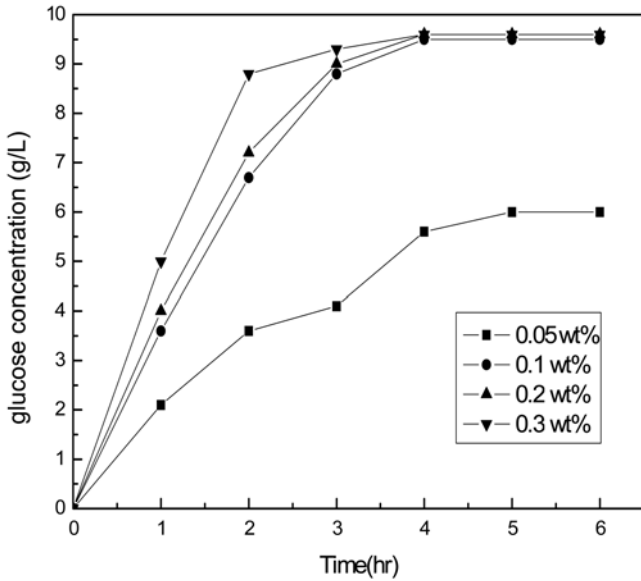


Fig. 4. Enzyme hydrolysis of potato starch with various initial loading of glucoamylase.

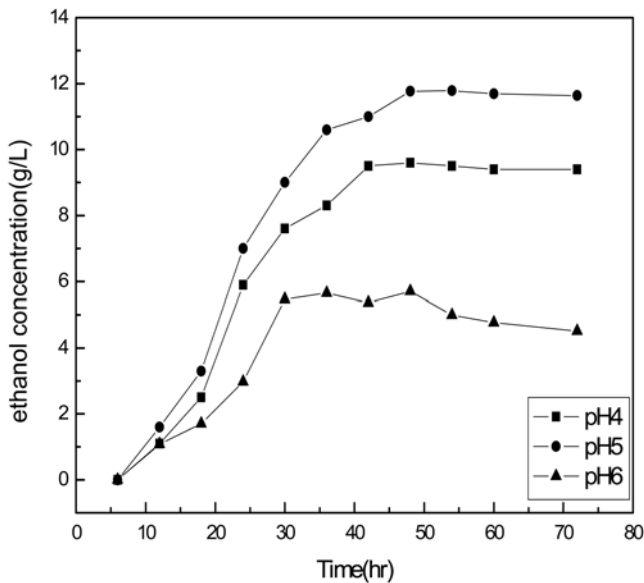


Fig. 5. Ethanol production from potato starch hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* DKIC 413 with various pH conditions.

3-2. 감자전분의 동시당화발효

동시당화발효 공정에서 pH의 변화가 에탄올 생산에 미치는 영향에 대해 실험하였다. Fig. 5은 pH를 4.0~6.0의 범위에서 변화시켰을 때 에탄올의 생산을 나타낸 결과이다. pH는 sodium phosphate-citrate buffer를 사용하여 조절하였다. pH를 4로 하여 동시당화발효하였을 경우 30 g/L의 감자전분을 반응시켰을 때 12 g/L의 에탄올이 생산되었다. 이때 에탄올은 반응 후 15~25시간 사이에 생산되었다. pH가 5일 경우 동일조건에서 11 g/L가 생산되었다. pH를 6으로 했을 경우 에탄올의 농도가 급격하게 감소하였다. 결과적으로 감자전분의 동시당화발효시에 최적의 pH의 조건은 pH4~5인 것으로 나타났다.

동시당화발효 공정에서 온도의 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 온도 38 °C, 45 °C 그리고 55 °C에서 각각 실험하여 Fig. 6에 나타

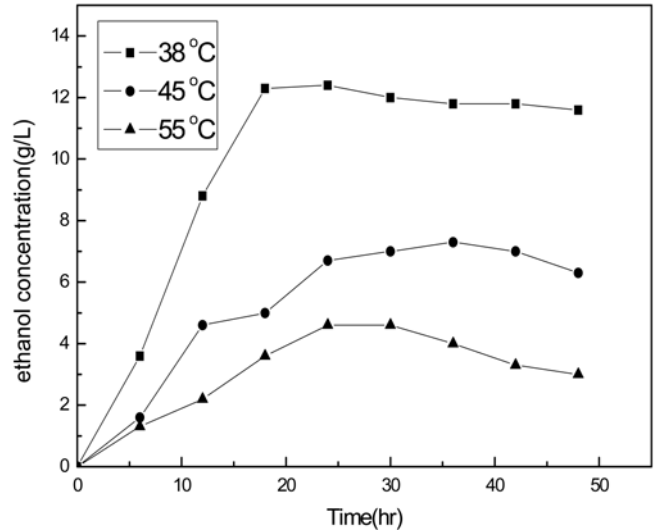


Fig. 6. Ethanol production from potato starch hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* DKIC 413 with various temperature conditions at pH 5.

내었다. 온도를 55 °C에서 38 °C로 감소하면 에탄올의 농도는 점차 증가하는 경향을 나타내었다. 온도 38 °C에서 실험하였을 때 감자전분 30 g/L를 반응시켜 12 g/L의 에탄올을 생산하였다. 이때 에탄올은 반응 후 18시간에 최대 에탄올 농도에 도달하였다. 온도 45 °C에서 실험한 결과 동일조건에서 에탄올은 12 g/L가 생산되었고 반응 후 54시간이 지난 후에 최대 에탄올의 농도에 도달하였다. 온도 55 °C에서 동시당화발효 한 결과 에탄올은 생산되지 않았다. 이것은 효모 *Saccharomyces cerevisiae*가 높은 온도에서는 활성하지 못하기 때문으로 생각된다.

4. 결 론

본 연구에서는 감자전분을 바이오원료로 하여 효소로 glucoamylase와 효모로 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 동시당화 발효 하였을 때 공정의 실용성을 평가하고 최적의 조건을 찾는 실험을 하였다. 효소 glucoamylase는 바이오원료로 사용된 감자전분을 90% 이상 가수분해 하여 글루코오스를 생산할 수 있었다. 결과적으로, 감자전분을 사용하여 동시당화발효할 경우에 온도의 최적조건은 38 °C이며, pH는 4 정도로 나타났다. 이때 주목할 점은 반응 후 18시간에 최대농도에 도달하였다는 점으로, 에탄올의 수율은 86%였다.

감 사

본 연구는 2006학년도 경기대학교 학술연구비(2006-052) 지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Ahn, D. and Chang, H. N., "Liquefaction and Saccharification of Starch Using α -amylase and Immobilized Glucoamylase," *Microbiol. Biotechnol.*, **19**(5), 497-503(1991).
- Ratnam, B. V. V., Rao, M. N., Rao, M. D. and Ayyanna, C., "Optimization of Fermentation Conditions for the Production of

- Ethanol from Sago Starch Using Response Surface Methodology," *J. Microbiol. Biotech.*, **19**, 523-526(2003).
3. Birol, G., Onsan, Z. I., Kirdar, B. and Oliver, S. G., "Ethanol Production and Fermentation Characteristics of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Grown on Starch," *Enzym. Microbiol. Technol.*, **22**, 672-677(1998).
 4. Zhao, H., Kwak, J. H., Zhang, C., Brown, H. M., Arey, B. W. and Johnathan, E. H., "Studying Cellulose Fiber Structure by SEM, XRD, NMR and Acid Hydrolysis," *Carbohydr. Sci. Direct.*, **68**, 235-241(2006).
 5. Shigechi, H., Koh, J., Fujita, Y., Matsumoto, T., Bito, T., Ueda, M., Satoh, E., Fukuda, H. and Kondo, A., "Direct Production of Ethanol from Raw Corn Starch via Fermentation by Use of Novel Surface-Engineered Yeast Strain Codisplaying Glucoamylase and α -Amylase," *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(8), 5037-5040 (2004).
 6. Chen, H. and Jin, S., "Effect of Ethanol and Yeast on Cellulose Activity and Hydrolysis of Crystalline Cellulose," *Enzym. Microbiol. Technol.*, **39**, 1430-1432(2006).
 7. Eksteen, J. M., Rensburg, P. V., Cordero, R. R. and Petorius, I., "Starch Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Expressing the α -Amylase and Glucoamylase Genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomyces copisifibuligera*," *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 639-646(2003).
 8. Huang, L. P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J., "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Potato Starch Waste Water to Lactic Acid by *Rhizopusoryzae* and *Rhizopus*," *Biochem. Engineer. J.*, **23**, 265-276(2005).
 9. Polakovic, M. and Bryjak, J., "Modelling of Potato Starch Saccharification by an *Aspergillusniger* Glucoamylase," *Biochem. Engineer. J.*, **18**, 57-63(2004).
 10. Kim, N. and Kim, J. S., "Acetic Acid Production from Cellulosic Biomass by Simultaneous Saccharification and Fermentation," *Theories Applicat. Chem. Eng.*, **10**(2), 1546-1549(2004).
 11. Aggrawal, N. K., Nigam, P., Singh, D. and Yadav, B. S., "Process Optimization for the Production of Sugar for the Bioethanol Industry from Tapioca, a Non-Convention Source of Starch," *J. Microbiol. Biotech.*, **17**, 738-787(2001).
 12. Mukerjea, R., Slocum, G., Mukerjea, R. and Robyt, J. F., "Significant Differences in the Activities of α -amylase in the Absence and Presence of Polyethylene Glycol Assayed on Eight Starches Solubilized by Two Methods," *Carbohydr. Research*, **341**, 2049-2054(2006).
 13. Kim, S. and Dale, B., "Global Potential Bioethanol Production from Wasted Crops and Crop Residues," *Biomass. Bioener.*, **26**, 361-375(2004).
 14. Heitmann, T., Wenzig, E. and Mersmann, A., "Characterization of Three Different Potato Starches and Kinetics of Their Enzymatic Hydrolysis by an α -Amylase," *Enzym. Microbiol. Technol.*, **20**, 259-267(1997).
 15. Murai, T., Yoshino, T., Ueda, T., Haranoya, I., Ashikari, T., Hajime, S., Yoshizumi, A., Tanaka, A., "Evaluation of the Function of Arming Yeast Displaying Glucoamylase on Its Cell Surface by Direct Fermentation of Corn to Ethanol," *J. Ferment. Bioengineer.*, **86**(6), 569-572(1998).