

## 고효율 바이오 에탄올 생산을 위한 당화효소 개발 및 동시당화발효 공정 연구

† 최 기 욱 · 한 민 희 · 김 울

(주)창해에탄올 창해연구소

(접수 : 2008. 6. 9., 게재승인 : 2008. 12. 18.)

## Development of Glucoamylase & Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for High-yield Bioethanol

Gi-Wook Choi<sup>†</sup>, Minhee Han, and Yule Kim

CHANGHAE Institute of Cassava and Ethanol Research, CHANGHAE ETHANOL CO., LTD.

829, 3-Ga Palbok-dong Dujinku, Jeonju 561-203, Korea

(Received : 2008. 6. 9., Accepted : 2008. 12. 18.)

The bioethanol for use as a liquid fuel by fermentation of renewable biomass as an alternative to petroleum is important from the viewpoint of global environmental protection. Recently, many scientists have attempted to increase the productivity of bioethanol process by developing specific microorganism as well as optimizing the process conditions. In the present study, which is based on our previous investigation on the pretreatment process, the productivity of bioethanol obtained from simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process was compared between various domestic materials including barley, brown rice, corn and sweet potato. Additionally, Solid glucoamylase (SGA; developed in Changhae Co.), from modified strain with UV, was used. The result was compared to commercial glucoamylase (GA). It was observed that the fermentation rate was increased together with the yield which can be derived from the final ethanol concentration. Especially, in the case of brown rice, compared to the experimental results using GA, the final ethanol concentration was 1.25 times higher and 18.4 g/L of the yield was increased. Also, the time required for reaching 95% of the maximum ethanol concentration is significantly reduced, which is approximately 36 hours, compared to 88 hours using GA. It means that SGA has excellent saccharogenic power.

**Key Words** : bioethanol, simultaneous saccharification & fermentation (SSF), glucoamylase, fermentation

### 서 론

화석연료의 사용은 개발 한계성 및 고갈, 자연·생활 환경의 파괴 (지구온난화, 오존층감소) 등과 같은 심각한 문제를 지니고 있다. 최근 이를 극복하기 위해 화석연료를 대체할 수 있는 청정에너지 개발이 급격히 대두 되고 있으며, 우리나라도 OECD 가입에 따른 환경규약에 따라 2010년까지 에너지원의 5% 이상을 환경 친화적 신·재생에너지원으로 대체해야 한다. 이 중에서 바이오에탄올은 열 발생량이 높고 연소 생성물 면에서나

경제적인 면에서 석유를 대체할 수 있는 연료 중의 하나로 주목 받고 있다(1-4).

현재 화석연료와 함께 바이오에탄올을 수송연료로 사용하고 있는 미주지역 (특히 미국과 브라질)은 지역적 특성을 살려 발효원료로써 옥수수, 수수 등 전분질계와 사탕수수, 사탕무 등 당질계 기질을 주로 사용하고 있다(5). 우리나라에서도 국내산 농작물을이용한 바이오 에탄올 생산 연구가 활발히 진행 중에 있으나 지역과 계절에 따라 재배 형태, 품목, 조성이 다른 농산물은 전처리 조건 및 에탄올 생산 공정에 따라 생산효율이 달라지므로 고효율의 에탄올을 생산하는데 많은 어려움이 있다(6-8). 그렇기 때문에 이번 연구에서는 쌀보리, 현미, 옥수수, 절간의 국내산 원료를 바탕으로 각각의 원료의 최적의 전처리 조건을 탐색하여 원료별 특성을 파악하였다.

한편, 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 일반적으로 전처리 (호화와  $\alpha$ -amylase에 의한 전분의 액화)공정, glucoamylase에

† Corresponding Author : CHANGHAE Institute of Cassava and Ethanol Research CHANGHAE ETHANOL CO., LTD. Jeonju, 561-203, Korea

Tel : +82-63-214-7800, Fax : +82-63-214-7805

E-mail : changrd@chethanol.com

의한 액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효 과정을 거친다. 본 연구에서는 고효율 에탄올 생산을 위해 최적화된 전처리 조건을 바탕으로 당화와 발효공정을 동시에 수행하여 공정이 간소화 시키면서 당화효소 투입량을 감소하여 전체 공정비용을 절감하는 동시당화발효 공정 (S.S.F.: Simultaneous Saccharification Fermentation)을 이용하여 에탄올을 생산하였다(Fig. 1). 더불어 고효율의 에탄올을 생산하기 위하여 기존 당화효소를 변이 하여 SGA (Solid glucoamylase)를 개발하여 에탄올 생산량과 수율의 변화를 알아보았다.

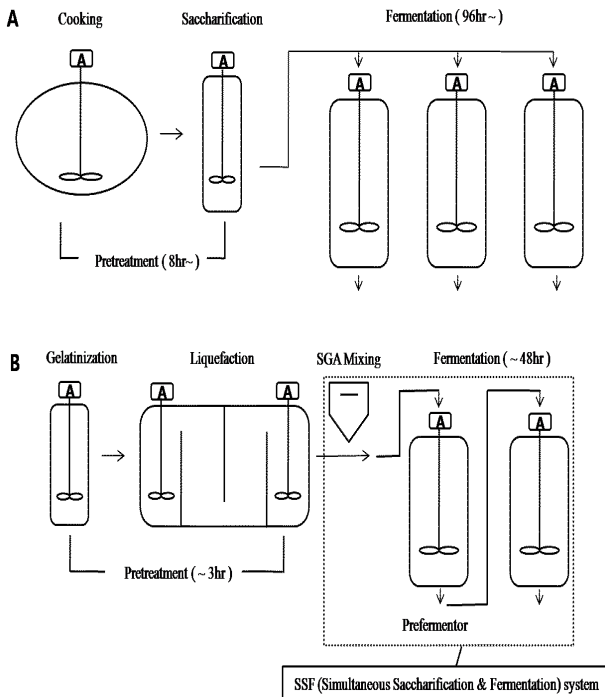


Figure 1. Flow chart of old process (A) and SSF process (B).

## 재료 및 방법

### 사용된 재료 및 균주

사용된 원료는 음료용 에탄올 생산에 사용되고 있는 국내산 현미, 쌀보리, 옥수수, 절간고구마를 1 mm 이하로 분쇄하여 이용하였다. 전분 액화에 사용된 효소는 *Bacillus licheniformis*에서 생산된  $\alpha$ -amylase인 Termamyl 120 L (Novozyme)을 사용하였고, 당화에는 glucoamylase (GA)인 Spirizyme plus (Novozyme)와 Solid-glucoamylase (SGA (Changhae))를 이용하였다.

발효공정에 사용된 균주는 현재 (주)창해에탄올에서 음료용 에탄올 생산에 이용되고 있는 산업용 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* CHY 1011 (KCTC11250BP)를 YPD배지 (2.5 g/L yeast extract, 2.5 g/L peptone, 100 g/L glucose, 0.25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1 g/L  $K_2HPO_4$ )에서 30°C로 24시간 배양 후 사용하였다.

### SGA 개발

본 연구에서는 낮은 온도 (35°C) 에서도 활성이 높은 glucoamylase를 개발하기 위하여 glucoamylase 생성능이 우수한 균주인 *Aspergillus usamii mut. Shiro-usamii* (KCTC 6954)를 PDA (Difco)배지에

접종하여 30°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균주의 포자 부분만을 채취하여 UV-mutation 통하여 변이주를 생성하였다. 이 변이균주를 다시 PDA 평판배지에 도말하여 32°C에서 72시간 배양 하였다. 그 후 당화력 측정(9)을 위해 GA (1.0 g/kg)와 SGA (6.0 g/kg)를 35°C와 30°C에서 24시간 당화시켜 유출된 Glucose [g/L] 함량을 측정하였다. SGA의 투입량이 GA보다 많은 이유는 두 당화효소의 활성을 같게 하기 위해서이다.

### 전분가 분석 및 전처리 공정

각 원료의 전분함량을 알아보기 위하여 산당화법과 Osmometer의 변형된 효소당화법 I (GA), 효소당화법 II (SGA)로 생성된 환원당을 HPLC로 분석하여 전분가 (starch value)를 계산하였다(10). 호화도 측정을 위해서 Schoch의 방법(11)에 의해 현미, 쌀보리, 옥수수, 절간고구마 원료들을 각각 0.1 w/v%로 혼합액을 제조하여 50~95°C까지 5°C 간격으로 5분간 유지 후 UV Spectrometer (UV-1650PC, Shimadzu)를 이용하여 625 nm에서 광투과도를 측정하였다.

또한 액화도를 측정하기 위해서 각각의 원료 160 g에 증류수 550 mL를 가한 후  $\alpha$ -amylase를 0.2~0.8 g/kg (효소/원료)로 투입하였다. 그리고  $\alpha$ -amylase 적정온도인 90°C에서 105°C까지 5°C 간격으로 1시간과 2시간 동안 각각 액화 시켰다. 액화가 진행됨에 따라 전체 부피와 액층의 부피를 백분율로 계산하여 액화율을 측정하였다.

### 발효실험 및 분석

각각의 원료 160 g에 증류수 550 mL 첨가하여 탐색된 최적의 호화, 액화 전처리 공정을 거친 후 35°C로 냉각 한 다음, 종균 배양액 55 mL 접종 시킨 후 당화 효소인 GA와 SGA를 첨가하여 동시당화발효 조건으로 35°C에서 발효시켰다.

발효의 진행 정도를 알아보기 위하여 배양액 내의 에탄올 함량과 잔당 (RDS, residual direct reducing sugar)성분을 분석하였다. 에탄올 함량은 배양액 50 mL를 간이 증류를 하여 얻은 증류액을 gas chromatography (Agilent)를 이용하여 분석하였다. 사용된 column은 Supelco 6.6% CARBOWAX 20 M이고, detector는 FID이다. Internal standard로는 isopropanol을 사용하였고, carrier gas로는 질소를 사용하였다. Injector, oven, detector의 온도는 각각 200°C, 100°C, 250°C 이었고, 운전 조건은 100°C에서 1분, 12 °C/min으로 120°C까지 승온 시킨 후 20 °C/min으로 200°C까지 승온 시켜 3분간 유지하였다.

전분가와 잔당의 함량은 HPLC를 이용하였으며 분석에 사용된 컬럼은 RS pack KC-811 (8 mm I.D.×300 mm)을 사용하였고 이동상은 1 mL/min 유속으로 0.25 v/v%  $H_2SO_4$ 용액을 사용하였다. 검출기는 Refractive Index Detector (Waters 2414)을 사용한다.

## 결과 및 고찰

### 전분가 분석 및 최적 전처리 조건

전분가-모든 원료에서 산당화법, 효소당화법 II (SGA), 효소당화법 I (GA) 순서로 전분가가 높게 측정되었다(Table 1). 이는 대부분의 곡류는 ribose등 효모에 의하여 에탄올로 전환될 수 없는 비발효성 당을 많이 함유하고 있기 때문에 원료에 포함된

모든 환원당을 측정하는 산당화법의 전분가가 높게 측정되기 때문이다. 또한 공정에서 사용하는 효소종류에 따라 섬유질이나 지방 또는 단백질에 결합되어 있는 전분의 분해 정도가 다르기 때문에 당화효소 (GA, SGA)를 직접 이용한 효소당화법으로 원료 전분가를 분석할 필요가 있다.

현미의 경우 산당화와 효소당화에서 모두 다른 원료 보다 높은 전분가를 나타내었다. 한편 쌀보리의 경우는 두 분석법에 의한 전분가가 가장 큰 차이를 나타내었는데, 이는 섬유질이나 지방 구조 등에 포함된 전분의 당화 여부 및 비발효성 당인 **glucan**과 **pentosan**을 많이 포함하고 있는 기질 특성 때문이다.

전처리 (호화와 액화)-전분질 원료로부터 알콜을 생산하기 위해서는 전분입자를 파괴하여 효소가 전분을 분해 할 수 있도록 하는 전처리가 필요하다. 이 전처리에는 많은 에너지가 소모되므로 최적의 전처리 조건을 탐색하여 에너지를 효율적으로 사용해야 한다.

호화도 측정을 위해 원료 현탁액의 온도를 서서히 증가하면 전분입자의 결정형 구조가 무정형으로 바뀌면서 투명도가 급격히 증가하는 현상이 나타났다. 바로 이 시점을 호화 개시점이라 할 수 있다. 이러한 호화점을 측정하는 이유는 증류공정에서 회수되는 고온수를 다시 호화공정의 공정수로 재사용하여 에너지 비용을 절감하기 위해서이다. 그러나 호화 개시 온도이상으로 온도를 높이면 전분입자가 쪼개져 불충분한 액화로 인한 오염 및 최종산물인 에탄올 수율 저하가 발생 할 수 있으므로 호화 개시점 이하로 온도를 조절하는 것이 필수적이다.

또한 최적 액화 조건을 탐색하기 위하여 온도, 시간 그리고  $\alpha$ -amylase양의 변화에 따른 액화율을 알아보았다. 액화가 진행됨에 따라서 각 원료의 전분 고형물이 액체 상태로 전이되는 원리를 응용하였다.

전처리 결과를 살펴보면 모든 원료가 상이 하게 나타났다. 호화 개시의 온도의 경우 쌀보리와 현미는 절간과 옥수수에 비해 낮게 측정되었다. 이는 쌀보리나 현미의 전분구조가 다른 원료에 비해 수분침투가 용이 하기 때문이다. 또한 액화조건에서도 현미와 옥수수는 100℃ 이상에서 급격히 액화가 진행되어 온도에 의해서 액화율이 크게 영향을 받는 것으로 나타났으며, 절간 고구마는 온도 보다는 반응 (체류) 시간의 차이가 액화율에 크게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 각각 원료의 전처리 최적조건은 Table 1에 나타내었다.

**Table 1.** Starch value and optimal pretreatment condition as each material

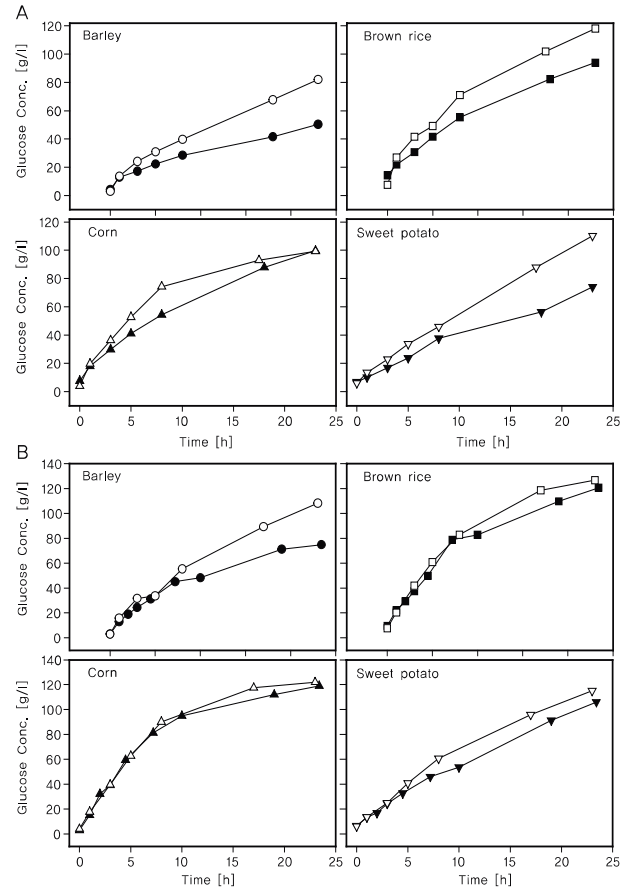
		Barley	Brown rice	Corn	Sweet potato
Starch value [%]	Acid	61.93	68.1	65.59	65.44
	GA	55.05	65.65	63.58	61.87
	SGA	56.78	67.14	64.12	62.75
Gelatimization	Initial Temp. [°C]	55	60	65	65
	Temp. [°C]	95	100	100	95
Liquefaction	Residual Time [h]	1	1	2	2
	$\alpha$ -amylase Conc. [w/w %]	0.08	0.08	0.06	0.06

**당화력 측정**

서두에서도 언급 하였지만 동시당화발효공정은 전처리와 발효 공정을 통합함으로써 비용의 감소를 기대 할 수 있다. 뿐만 아니라 지속적으로 생산되는 포도당이 발효 균주에 의해 에탄올로 전환

됨으로써 기질 저해를 막을 수 있다. 이러한 공정을 적용하기 위해서는 당화 효소가 낮은 온도에서도 활성을 가져야 한다는 전제 조건이 필요하다.

GA와 SGA의 차이를 알아보기 위하여 30℃와 35℃에서 24시간 당화시켜 유출된 glucose의 농도변화를 각 원료별로 나타내었다(Fig. 2 30℃ (A), 35℃ (B)).



**Figure 2.** Time course of released glucose concentration. (A : 30℃ B : 35℃ ; ● : GA, ○ : SGA)

그 결과 30℃와 35℃ 모두 SGA의 glucose가 많이 용출된 것을 확인 할 수 있어 SGA의 당화력이 GA보다 더욱 우수함을 입증해 주었다. 또한 30℃ 보다 35℃에서도 glucose의 농도가 더욱 높게 나타났다. 이는 당화력이 온도에 크게 의존하여 온도를 더욱 올리게 되면 당화력이 증가 할 것으로 보이나 35℃ 이상으로 온도를 올리게 되면 발효균주의 활성 영향을 미쳐 에탄올 수율이 크게 낮아지므로 더 이상 높은 온도의 실험은 수행하지 않았다.

**에탄올 발효**

최적의 전처리 결과를 바탕으로 현미, 쌀보리, 옥수수, 절간 고구마를 동시당화발효 공정으로 에탄올을 생산성(Fig. 3(A))과 시간에 따른 잔당의 함량변화(Fig. 3(B))를 원료별로 비교해 보았다. Fig. 3(A)를 보면 전체적으로 SGA가 GA보다 최대 에탄올 농도가 높은 것으로 나타났고 에탄올 생산 속도 또한 빠르게 나타났다. 옥수수의 경우 최대 에탄올 농도는 SGA가 81.00 g/L, GA가 80.70 g/L로 가장 적은 차이를 나타냈음에도 불구하고 발효 속도

면에서는 SGA가 더욱 빠른 것으로 나타났다. 또한 Fig. 3(B)는 glucose의 농도변화를 각 원료별로 나타내어 기질의 소모량과 에탄올 생성량의 관계를 알아보았다. 모든 원료에서 SGA가 GA보다 glucose가 더욱 빠르게 소모되는 것을 알 수 있었으며 축적량 또한 적은 것으로 나타났다. 이로써 당화효소의 차이가 생산성과 생산 수율에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있으며 UV-mutation을 통해 선별된 SGA가 보다 더 우수한 당화 효소라는 것을 입증해 주었다.

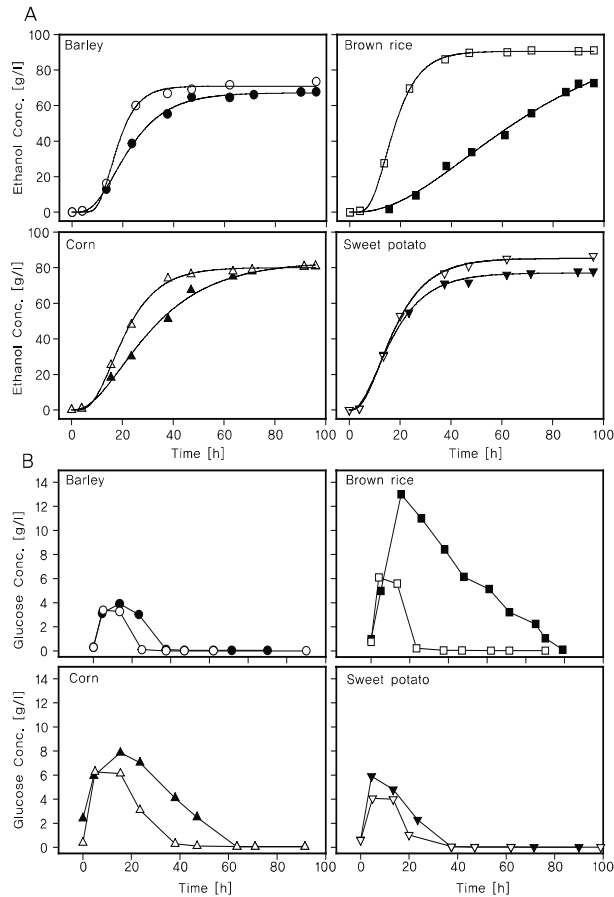


Figure 3. Time course of ethanol concentration (A : - is fitted curve) and residual glucose concentration (B). (● : GA, ○ : SGA)

한편, 시간에 따른 에탄올 생성량을 알아보기 위하여 실험 데이터를 SigmaPlot 2002-Flying Raichu von 8.02 프로그램을 사용하여 추세선을 그려보았다. 사용된 식 (1)은 다음과 같고 변수들은 Table 2에 나타내었다.

$$y = a(1 - e^{-bx})^c \quad (1)$$

Table 2. Parameters of fitted curve using SigmaPlot 2002-Flying Raichu von 8.02

Parameter	Barley		Brown rice		Corn		Sweet potato	
	GA	SGA	GA	SGA	GA	SGA	GA	SGA
a	67.15	70.88	84.00	90.5	80.32	80.08	77.04	85.26
b	0.09	0.18	0.02	0.14	0.05	0.10	0.09	0.10
c	4.48	1.56	2.75	7.36	2.68	5.08	2.78	3.22
R <sup>2</sup>	0.998	0.999	0.996	0.999	0.997	0.999	0.998	0.999

R<sup>2</sup>값은 모두 0.996이상으로 식 (1)은 실험데이터를 매우 정확하게 묘사할 수 있었다. 이 식을 바탕으로 각 원료의 최대 에탄올 생성량의 95% 도달 시간을 계산한 결과 현미의 경우 GA는 88.11시간, SGA는 35.98시간으로 SGA를 사용하였을 경우 52.13시간을 단축 할 수 있었다. 더불어 에탄올 생산속도를 비교해 보면 평균적으로 SGA는 1.91 g/L/h이고 GA는 1.19 g/L/h로 약 1.6배 가량 빠르게 나타났다. 이는 새롭게 만들어진 SGA의 당화력이 기존의 당화효소보다 월등히 훌륭하다는 것을 다시 한번 입증 해 준 결과이다. 에탄올 최대 농도 및 에탄올 생산성은 Table 3에 정리하였다.

Table 3. Summarized by ethanol concentration, yield and productivity

	Glucoamylase	Barley	Brown rice	Corn	Sweet potato
Max. Ethanol Conc. [g/L]	GA	67.80	72.60	80.70	78.00
	SGA	73.50	91.00	81.00	86.00
Ethanol yield, Y <sub>ps</sub> [g/g]	GA	0.44	0.40	0.46	0.44
	SGA	0.44	0.47	0.46	0.48
Ethanol yield [% of theoretical]	GA	85.75	78.81	90.54	86.73
	SGA	86.64	91.63	90.67	94.12
Time [h of reaching 95% of the max. ethanol [conc.]	GA	52.31	88.11	68.54	45.08
	SGA	38.91	35.98	47.69	44.87
Fermentation rate [g/L/h]	GA	1.23	0.78	1.12	1.64
	SGA	1.79	2.40	1.61	1.82

### 요 약

화석연료의 사용은 개발 한계성 및 고갈 그리고 지구온난화 등과 같은 심각한 문제를 지니고 있어 이를 극복하기 위해 환경 친화적이고 재생 가능한 바이오에탄올이 대두 되고 있다. 현재, 공정의 최적화와 미생물 개발을 통한 생산 단가를 낮추기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 본 연구에서는 쌀보리, 현미, 옥수수, 절간의 국내산 원료를 바탕으로 각각의 원료의 최적의 전처리 조건을 탐색하여 원료별 특성을 파악하여 동시당화공정발효를 이용하여 에탄올을 생산하였다. 또한 에탄올 생산성과 수율을 높이기 위하여 당화효소를 UV-mutation을 통해 개발한 SGA와 기존의 당화효소인 GA를 비교하였다. 그 결과 모든 원료에서 SGA가 GA보다 우수한 당화력을 나타내어 에탄올의 생산성과 수율을 향상 시켰다. 특히 가장 큰 차이를 보인 현미의 경우 에탄올 최대 농도가 1.25배 증가하여 18.4 g/L가 향상되었다. 또한 최대 농도의 95%도달시간을 비교해 본 결과 GA는 88시간, SGA는 35.98시간을 기록하였다. 이는 SGA의 당화력이 매우 우수함을 입증해준 결과라 할 수 있다.

### 감 사

본 연구는 농촌진흥청 [과제고유번호-20080101-036-039-001-02-00]의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

### REFERENCES

1. Sheehan, J. et al. (1998), An overview of biodiesel and petroleum

- diesel life cycles, *A report by US Department of Agriculture and Energy* 1-35.
2. Ture, S., D. Uzun, and I. E. Ture (1997), The potential use of sweet sorghum as a non polluting source of energy, *Energy*. **22**, 17-19.
  3. Kadam, K. L. (2002), Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India, *Proceedings of the South African Sugar Technology* **75**, 358-362.
  4. Brandt, D., In S, S, sofer, and O. R. Zaborski (ed.) (1981), Ethanol production by fermentation, Biomass conversion process for energy and fuel, Plenum Press, New York, 357-373.
  5. Song, B. L. (1994), Modelling of cellulose simultaneous saccharification and fermentation process and application to ethanol production, Seoul National University.
  6. Sheehan, J. et al. (2004), Energy and Environmental aspects of using corn stover for fuel ethanol, *Journal of Industrial Ecology*. **7**(4), 117-146.
  7. Harro V. B. and M. A. Curran (2007), A review of assessments conducted on bio-ethanol as a transportation fuel from a net energy, greenhouse gas, and environmental life cycle perspective, *Journal of Cleaner Production*. **15**, 607-619.
  8. Lee, Y. S., W. G. Lee, B. G. Park, Y. K. Chang, and H. N. Chang (1995), Ethanol production from tapioca hydrolysate by batch and continuous cell retention cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **10**, 598-603.
  9. Whitaker J. R. (1994), In principles of enzymology for the food science, Dekker Press, New York, 287.
  10. Weber A. L., P. Tsai, and K. D. Wittrup (1993), Microencapsulation selection for isolation of yeast mutants with increased secretion of *Aspergillus awamori* glucoamylase, *Biotechnol. and Bioeng.* **42**(3), 351-356.
  11. Song, E., M. S. Shin, and Y. H. Hong (1987), Physicochemical properties of sweet potato (*Ipomoea batatas*) starch by heat-moisture treatment, *J. Kor. Agri. Chem. Society*. **30**(3), 242-249.