

라이밀 자체 효소를 이용한 바이오에탄올 생산

† 최 기 욱 · 김 울 · 문 세 권

(주)창해에탄올 창해연구소

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

Bioethanol Production using Endogenous Triticale Enzyme

Gi-Wook Choi[†], Yule Kim, and Se-Kwon Moon

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

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

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

The objectives of this study were to develop the economical process for bioethanol production from domestic triticale and investigate optimal fermentation conditions such as temperature, time, and enzyme concentration used to pre-treatment process. Triticale mash, containing 148 g of total sugar per 1 L of mash, was fermented with *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011 at 33°C. Fermentation of mash supplemented with enzyme was completed within 48-60 hours, and the ethanol yield was 410.9 L/tonne of dry base. On the other hand, fermentation of mash without enzyme addition was completed within 36-48 hours, but the ethanol yield was 342.2 L/tonne of dry base. For optimal bioethanol production from triticale, viscosity reduction enzyme was added in the pre-treatment process, and the fermentation rate of triticale was 92.0-94.2%. In addition, the results showed that bioethanol production of triticale by low-temperature pre-treatment would provide higher ethanol production efficiency and lower operating costs.

Key Words : bioethanol, triticale, low-temperature pre-treatment

서 론

최근 들어 개발도상국들의 급격한 에너지 수요 증가로 인하여 국제 유가 및 대체에너지 자원인 바이오에탄올의 가격 상승을 초래하였으며, 이로 인하여 바이오에탄올의 주요 생산 원료인 밀이나 옥수수 등의 곡물 가격 상승으로 이어지고 있다. 또한 현재 바이오에탄올 생산의 주요 원료인 밀이나 옥수수 등의 주요 곡물들은 식품 및 가축 사료용으로 사용되어지고 있기 때문에 그 가격은 계속 상승할 것으로 예상되어지며 바이오에탄올 생산을 위한 보다 저렴한 대체 원료에 대한 연구가 필요하다. 호밀 또는 라이밀 등은 기존 에탄올 생산 원료에 비해 저렴하기 때문에 이에 대한 관심이 증대되고 있다(1-4).

라이밀에 관한 연구는 1875년 Wilson의 밀과 호밀의 속간 잡종에서 나온 불임식물체의 보고로 시작되었으며(5), 해외의 경우 곡물 및 건초의 수확량이 많은 라이밀의 재배가 1995년도 이후 급격히 증가하고 있다(6). 우리나라의 경우 라이밀은 가물

및 추위에 내성이 있어 동절기 사료용 작물로 수확량 및 사료 가치 증진 등의 연구가 계속 진행 중에 있으나, 에탄올 발효에 관한 연구는 미비한 실정이다(7-10).

라이밀은 pentosan 및 α -amylase 저해작용을 야기하는 단백질을 함유하고 있어 기존 에탄올 생산 공정에 적용하기 위해서는 점도 문제를 해결해야하는 단점이 있지만(11-12), 라이밀 자체에 함유되어 있는 효소 (α -amylase, β -amylase)(13-16)를 이용한 저온 전처리 공정 도입으로 에탄올 발효에 소요되는 효소 투입량 및 전처리 공정에 소요되는 에너지 비용을 감소시킬 수 있다. 라이밀로 에탄올을 생산할 때 약 20% 이상을 차지(17)하는 전처리 에너지 비용을 라이밀 자체 효소와 저온 전처리 공정을 이용함으로써 공정에 소요되는 에너지 사용량을 감소시킬 수 있다(18). 본 연구에서는 라이밀의 특성을 이용하여 전처리 공정 조건을 최적화하고 최적화된 전처리 공정을 이용한 라이밀의 에탄올 발효 특성을 비교하였다.

재료 및 방법

사용된 재료

본 실험에 사용된 라이밀 (신영라이밀)은 농촌진흥청 작물과학 원으로부터 공급받아 1 mm 이하로 분쇄 (STRAUB 4E, USA)

[†] Corresponding Author : Changhae Institute of Cassava & Ethanol Research, Changhae Ethanol Co., Ltd., 829, 3-Ga Palbok-dong, Dukjin-ku, Jeonju, 561-203, Korea.

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

E-mail : changrd@chethanol.com

하여 사용하였다. 원료 점도 저하에 사용된 효소는 *Trichoderma* 에서 생산된 cellulase, xylanase, β -glucanase, α -amylase가 함유된 Viscoferm (Novozyme)을 사용하였다.

당화 공정에 사용된 당화효소는 glucoamylase 생성능이 좋은 *Aspergillus usamii* mut. *shiro-usamii* KCTC 6954를 UV 변이 처리 후 밀기울에서 배양하여 얻어진 solid glucoamylase (SGA)를 사용하였다.

사용된 균주

발효공정에 사용된 균주는 (주)창해에탄올에서 분리한 고생산성 에탄올 균주인 *S. cerevisiae* CHY1011 (KCTC 11250BP)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)에 배양하여 사용하였다.

전분가 분석

산당화법과 Osmometer의 변형된 효소당화법(19)으로 생성된 환원당을 HPLC로 분석하여 전분가 (starch value)를 측정하였다.

산당화법; 1 mm 이하로 분쇄된 원료 2 g을 정확히 칭량하여 증류수 120 mL와 1.4 N HCl 100 mL를 가하여 95°C 상압에서 2.5시간 동안 가수분해하여 NaOH로 중화 시킨 다음 500 mL로 mass-up하여 HPLC로 분석하였다.

효소당화법; 분쇄된 원료 분말 5 g을 칭량하여 증류수 100 mL과 점도 저하 효소 0.6 g/Kg을 넣어 60°C에서 2시간 전처리하였다. 전처리된 라이밀은 0.1 N HCl로 pH를 4.5로 조절한 후 SGA를 10 g/Kg 첨가하여 18시간 당화 후 1 L로 mass-up하여 HPLC로 분석하였다.

전처리 조건

1 mm 이하로 분쇄된 라이밀 분말 100 g에 수돗물을 각각 425 mL, 400 mL, 375 mL, 350 mL를 가한 후 Viscoferm 첨가구 (0.06 g/kg)와 무첨가구를 효소활성의 적정온도인 60°C에서 1-4시간 동안 각각 전처리하여 점도 및 액화도를 측정하였다.

점도 및 액화도 측정

전처리 진행 정도는 점도 측정을 통해 확인할 수 있었으며, 점도 측정은 점도계 (Brook filed LVF, USA)로 60°C에서 측정하여 centipoise (cP)로 나타내었다. 액화도 측정은 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 (Hanil SUPRA 22K, Korea)하여 전체 부피와 액층의 부피를 백분율로 환산하여 측정하였다.

발효조건

회분식 발효는 5 L 발효조 (BIOFLO IIC, New Brunswick, USA)를 이용하였다. 라이밀과 증류수를 혼합하여 잠균증식 억제제를 위하여 H_2SO_4 로 pH를 4.5로 조절한 후 점도 저하 효소와 당화 효소를 투입하여 60°C에서 전처리 공정을 진행하였다. 그 후 33°C로 냉각하여 YPD 배지에서 24시간 배양 (30°C)한 종균 배양액을 7% 접종하여 33°C에서 60 rpm으로 교반하여 발효를 진행하였다.

분석방법

당과 유기산은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 당 분석은 RSpack KC-811 (8 mm I.D. x 300 mm) column을 사용하여 Refractive Index Detector (Waters 2414, USA)를 이용하였고, 유기산 분석은

Dual λ Absorbance Detector (Waters 2487, USA)로 215 nm 파장에서 측정하였다. 이동상으로 4.5 mM H_2SO_4 를 1.0 mL/min으로 사용하였고, column 온도는 60°C조건에서 분석하였다.

에탄올 함량은 배양액 50 mL를 간이 증류를 하여 얻은 증류액을 gas chromatography (4890, Agilent, USA)를 이용하여 분석하였다. 사용된 column은 Supelco 6.6% CARBOWAX 20 M이고, 검출기는 FID를 사용하였다. 내부 표준물질로 isopropanol을 사용하였고, carrier gas는 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 후 20°C/min으로 200°C까지 승온시켜 3분간 유지하였다.

효소수는 배양액을 10^5 - 10^7 까지 희석하여 YPD Agar배지 (2.5 g/L yeast extract, 2.5 g/L peptone, 10 g/L glucose, 0.25 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L K_2HPO_4 , 20 g/L Agar)에 희석액 50 μ L를 도말하여 32°C에서 72시간 배양 후 CFU (colony forming unit)를 계수하였다.

결과 및 고찰

원료의 전분가

라이밀의 발효율 및 에탄올 수율을 계산하기 위한 전분가는 산당화법과 효소당화법에 의해 각각 67.48%, 65.69% (dry base)이었으며, 두 분석법의 차이는 섬유질이나 지방 구조 등에 포함 된 전분의 당화 여부 및 비발효성 당인 glucan과 pentosan을 많이 포함하고 있는 기질 특성 때문이다(13).

전처리 최적조건

전처리 조건을 탐색하기 위하여 온도, 시간 그리고 효소 첨가량의 변화에 따른 점도 및 액화도를 알아보았다. 액화가 진행됨에 따라서 각 원료의 전분 고형물이 액체 상태로 전이되는 원리를 이용하여 전체 부피 중 액체량을 측정하여 액화도를 나타내었다. Fig. 1과 2의 x축은 효소농도, 시간, y축은 점도 및 액화도, z축은 급수비율로 하여 3차원 그래프로 나타내었다. 효소를 첨가하지 않는 시험구 중 급수비율 425%를 제외한 모든 시험구의 점도가 1,000 cP 이상으로 라이밀 자체에 함유되어 있는 효소를 이용한 에탄올 생산 공정 적용은 불가능하였으며, 효소를 첨가한 시험구 중 급수비율 375%에서 1시간 전처리시 비전분 탄수화물이 점도 저하 효소의 효소활성으로 분해되어 점도가 860 cP에서 460 cP로 저하되었으며, 전처리 초기의 높은 점도는 점도 저하 효소의 처리로 해결할 수 있었다.

Table 1. Optimal condition of pre-treatment process for bioethanol production from triticale

	Optimal condition
Triticale	1 Ton
Water	3.75 KL
Viscoferm	0.06 Kg
SGA	2.0 Kg
H_2SO_4	1.4 L
Temperature	60°C
Time	2 h

점도 저하 효소를 첨가한 시험구 중 점도가 400 cP 이하인 조건은 급수비율 350% 4시간, 375% 2시간, 400% 2시간, 425% 1시간이었고 (320-360 cP)(Fig. 1), 이때 액화도는 54-58% 이었다(Fig. 2). 라이밀을 이용한 바이오에탄올 생산은 설비 규모 및 최종 에탄올 농도를 고려하여 최적 전처리 조건은 Table 1과 같음을 알 수 있었다.

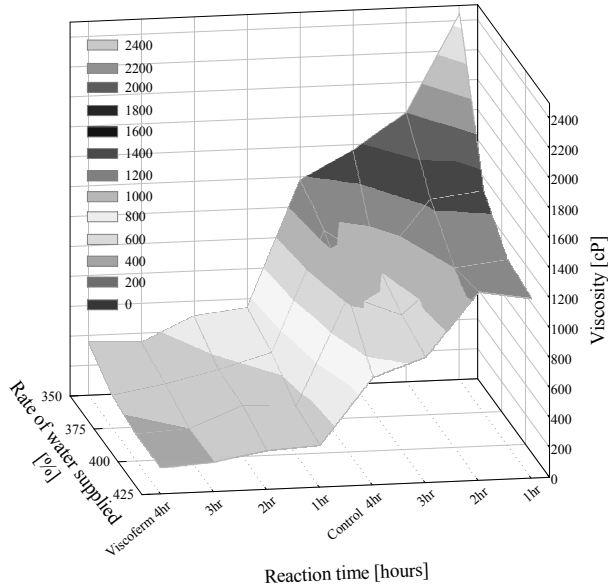


Figure 1. Effect of various temperature, enzyme concentration and reaction time on Viscosity of triticale.

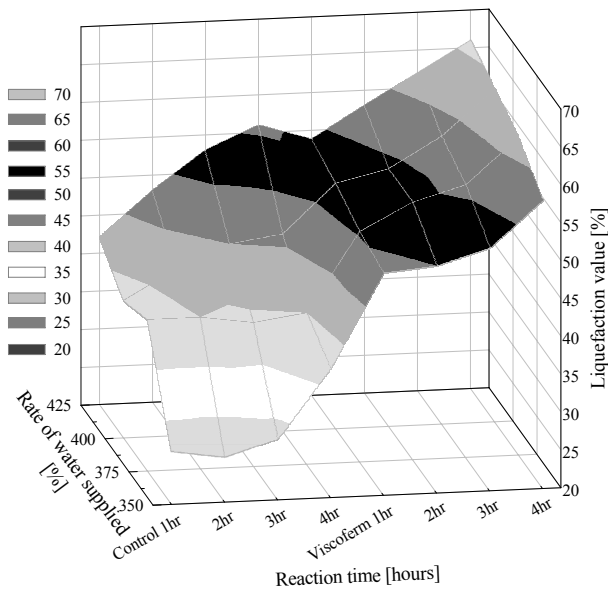


Figure 2. Effect of various temperature, enzyme concentration and reaction time on liquefaction value of triticale.

에탄올 발효

라이밀을 이용한 바이오에탄올 생산의 최적 조건을 탐색하기 위해 최적 전처리 조건 (Table 1)과 점도 저하 효소 첨가량 (0 g/Kg, 0.06 g/Kg) 및 SGA 첨가량 (0 g/Kg, 1 g/Kg, 2 g/Kg)을 달리 하여 에탄올 발효를 비교하여 보았다. 모든 발효 초기 총당 함량은 148±2.0 g/L이었으며, 72시간 경과 후 잔류 총당 함량은

각각 28.8±2.0 g/L, 18.6±2.4 g/L, 13.3±1.8 g/L로 효소 첨가량에 따라 당소모량이 증가하였다(Fig. 3). 발효 초기 당조성은 dextrin 88.7-97.5 g/L, maltose 17.5-40.4 g/L, glucose 14.9-33.2 g/L 이었으며, 특히, SGA 무첨가구에서는 β-amylase에 의한 maltose의 생성량이 40.4 g/L로 glucose (14.9 g/L)보다 많았으며, SGA 2 g/Kg 첨가구가 무첨가구에 비하여 dextrin 분해 (1.25-0.91 g/L · h) 및 에탄올 생성 (0.94-0.79 g/L · h)이 빠르게 진행되었다. 또한, 라이밀을 이용한 에탄올 발효의 경우 2-3% 정도 (2.9-4.4 g/L)의 글리세롤이 생성됨을 확인할 수 있었다(Table 2, 3, 4).

Table 2. Carbohydrate composition, glycerol and ethanol concentration in triticale fermentation without enzyme addition

hours	Dextrins ^a [g/L]	Maltose [g/L]	Glucose [g/L]	Glycerol [g/L]	Ethanol [g/L]
0	88.7±1.5	40.4±0.8	14.9±1.2	0.0	0.0
12	81.5±1.6	15.2±0.8	0.2±0.1	1.1±0.2	22.5±2.3
24	56.5±2.7	1.1±0.9	0.6±0.1	2.5±0.3	42.8±4.2
36	31.2±3.4	1.3±0.4	0.7±0.1	2.8±0.5	54.6±0.5
48	28.5±1.8	1.4±0.5	0.1±0.1	2.9±0.4	56.5±1.0
60	24.3±2.6	1.3±0.4	0.1±0.1	2.9±0.4	56.9±1.2
72	23.1±1.1	1.1±0.1	0.6±0.4	2.9±0.2	57.1±0.3

^aDextrins include maltotriose, maltopentaose, and other saccharides of higher mol wt.

Table 3. Carbohydrate composition, glycerol and ethanol concentration in Triticale fermentation with enzyme addition (Viscoform 0.06 g/triticale Kg + SGA 1 g/triticale Kg)

hours	Dextrins ^a [g/L]	Maltose [g/L]	Glucose [g/L]	Glycerol [g/L]	Ethanol [g/L]
0	92.0±2.5	30.6±1.5	24.3±2.2	0.0	0.0
12	74.3±1.7	11.5±1.9	8.4±1.1	1.2±0.2	25.0±1.8
24	53.6±4.1	2.9±0.4	0.5±0.1	2.2±0.1	45.1±2.8
36	31.5±2.6	1.7±0.2	0.4±0.1	2.5±0.4	56.3±1.8
48	19.2±1.5	1.4±0.1	0.2±0.1	3.4±0.2	62.1±2.4
60	16.0±0.8	1.3±0.2	0.1±0.1	3.8±0.4	63.9±1.5
72	12.8±0.6	1.3±0.1	0.1±0.1	4.0±0.4	64.2±1.0

^aDextrins include maltotriose, maltopentaose, and other saccharides of higher mol wt.

Table 4. Carbohydrate composition, glycerol and ethanol concentration in Triticale fermentation with enzyme (Viscoform 0.06 g/triticale Kg + SGA 2 g/triticale Kg)

hours	Dextrins ^a [g/L]	Maltose [g/L]	Glucose [g/L]	Glycerol [g/L]	Ethanol [g/L]
0	97.5±3.4	17.5±2.5	33.2±3.4	0.0	0.0
12	71.7±3.8	8.2±2.0	12.5±2.1	1.3±0.1	25.5±1.2
24	47.1±4.1	1.7±1.0	0.3±0.1	2.3±0.1	47.3±2.1
36	28.6±2.1	1.4±0.6	0.3±0.1	2.7±0.2	59.5±1.8
48	15.8±2.3	1.4±0.4	0.1±0.1	3.7±0.1	63.4±1.1
60	9.3±1.0	1.3±0.2	0.1±0.1	4.0±0.2	66.8±1.7
72	7.6±0.7	1.5±0.4	0.1±0.1	4.4±0.1	67.4±1.4

^aDextrins include maltotriose, maltopentaose, and other saccharides of higher mol wt.

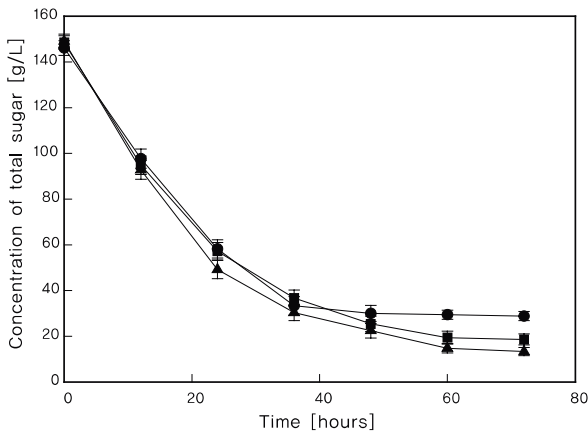


Figure 3. Utilization of total sugar in bioethanol fermentation from triticale. (●: Control, ■: Viscoferm 0.06 g/material Kg+SGA 1 g/material Kg, ▲: Viscoferm 0.06 g/material Kg + SGA 2 g/material Kg)

발효는 7%의 효모 배양액 (효모수 60×10^6 cell/mL)을 접종하여 발효를 진행하였으며, 발효 12시간 경과 후 효모수는 $87.5-110 \times 10^6$ cell/mL로 접종 직후 효모수 (40×10^5 cell/mL)의 20-28배로 증가하였다. 발효가 진행되면서 효소 첨가구는 무첨가구 보다 25-60% 가량 높은 균체 농도 유지하였는데, 발효 초기의 glucose 농도가 효모 증식에 영향을 준 것으로 판단되어진다(Fig. 4).

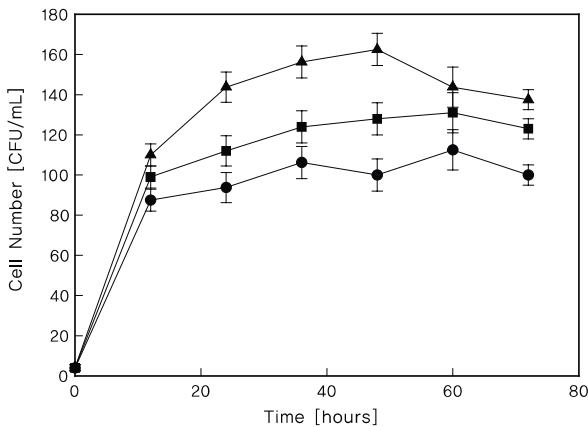


Figure 4. Yeast cell numbers during fermentation of triticale. (●: Control, ■: Viscoferm 0.06 g/material Kg + SGA 1 g/material Kg, ▲: Viscoferm 0.06 g/material Kg + SGA 2 g/material Kg)

72시간 경과된 발효액을 간이 증류 후 에탄올 함량을 측정하여 원료무게 당 에탄올 수득량을 계산하였다. 에탄올 함량은 효소를 첨가하지 않을 경우 효소 첨가구의 85%정도 생성되었으며, 효소 무첨가시 라이밀 톤당 에탄올 생산량은 342.2 L (dry base)로 최적 전처리 (410.9 L)조건 83% 수준이었다. 또한, 최종 에탄올 농도의 95%가 생성되는 시점은 효소 첨가구의 경우 48시간 내외 이었으나, 무첨가구는 36시간 이었으며, 이와 같은 현상은 라이밀내의 β -amylase의 활성이 36시간 이후 저하되기 때문으로 판단되어진다(Table 5).

유기산 생성균의 성장 방지를 위하여 전처리 전 pH를 4.5로 조정하였으나, 전처리과정이 진행되는 동안 단백질 등의 완충작용으로 pH가 5.2-5.3으로 상승하였고, 발효가 진행되면서 효모에 의해 생성된 유기산으로 인하여 최종적인 pH는 모든 분석구에서 4.2-4.3으로 일정한 결과를 보였다.

Table 5. Results of bioethanol fermentation from triticale

		Control	Viscoferm 0.06g + SGA 1g/triticale Kg	Viscoferm 0.06g + SGA 2g/triticale Kg
Ethanol yield	Dry base	342.2	389.7	410.9
	Moisture 10%	308.3	351.1	370.2
Fermentation rate [%]		71.1	80.9	85.4
Fermentation Efficiency [% theoretical]		92.0	93.5	94.2
Ethanol yield [g/g]		0.391	0.432	0.452

요 약

국내산 라이밀을 이용한 바이오에탄올 생산을 위해 저온 전처리 공정을 도입하여 에탄올 생산성을 비교하였다. 라이밀의 경우 원료 특성상 증자 공정에서 점도 문제가 발생하는데, 이를 해결하기 위해 최적 전처리 조건을 탐색하였으며 이에 따른 에탄올 생산성을 비교하였다. 저온 조건과 점도 저하 효소를 사용함으로써 점도에 따른 발효 저해 현상 해결하였고 전처리 공정에 소요되는 전처리 공정비를 절감할 수 있었다. 또한 pH 조절 (pH 4.5) 후 살균 처리 없이 바로 발효가 가능함을 확인할 수 있었다. 발효 초기 총당 함량은 148 ± 2.0 g/L이었으며, 발효 72시간 이후 에탄올 생성 농도는 67.4 ± 1.4 g/L, 톤당 에탄올 생산량은 410.9 L (dry base)로 효소 무첨가구보다 에탄올 농도와 톤당 수득량이 각각 15%, 20% 이상 증가하였다.

이와 같은 결과는 기존의 에탄올생산 공정과 비교하여 전처리 공정에 소요되는 시간을 30-50% 이상 줄일 수 있으며, 저온 공정에 따른 에너지 사용 절감 및 초기 시설 투자비를 줄일 수 있어 바이오에탄올 생산을 위한 대체 원료로 충분한 가능성을 보여 주었다.

감 사

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

REFERENCES

- Bai F. W., W. A. Anderson, and M. Moo-Young (2008), Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks, *Biotechnol. Adv.* **26**, 89-105.
- http://www.doe.gov/bridge/ (2008).
- Kadam K. L. (2002), Environmental benefits on a life cycle basis of using bagasse-derived ethanol as a gasoline oxygenate in India, *Environ. Policy.* **30**, 371-384.
- Wang S., K. C. Thomas, W. M. Ingledew, K. Sosulski, and F. W. Sosulski (1999), Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process. Biochem.* **34**, 421-428.
- Mergoum, M. (2004), Triticale improvement and production, In *FAO Plant Production and Protection Paper 179*, Ammar K., M. Mergoum, and S. Rajaram pl-10, FAO of The United Nations, Rome.

6. FAO (2003), FAOstat, FAO statistical database agriculture.
7. Park, K. G. and K. M. Yoon (1995), Effect of pretreatment condition on callus formation in triticale anther culture, *Korean J. Breed.* **28**, 39-43.
8. Kim, S. H. and H. J. Lee (1994), Growth and yield of forage crops affected by soil texture in upland diverted from paddy field, *Korean J. Crop. Sci.* **39**, 577-584.
9. Yun, S. G., A. Kazuo, C. H. Cho, and Y. Taiki (1996), Varietal classification of spring-triticale cultivars by agronomic and feed component traits, *Korean J. Breed.* **28**, 373-378.
10. Yun, S. G. and A. Kazuo (1998), Effect of planting dates and nitrogen fertilization rates on the forage yield and feeding value of introduced triticale, *Korean J. Grass. Sci.* **18**, 113-122.
11. Elza I. I., F. Flavio, and M. L. Franco (1994), Purification and partial characterization of two proteinaceous α -amylase inhibitors from triticale, *J. Food. Biochem.* **18**, 83-102.
12. Burgos H., B. Rosas, W. Ramirez, B. Carbonell, and M. Cinco (1999), Identification of alpha-amylase inhibitors in triticale grain, *J. Sci. Food. Agric.* **79**, 1671-1675.
13. <http://www.novozymes.com/> (2008).
14. Pomeranz, Y., B. A. Burkhart, and L. C. Moon (1970), Triticale in malting and brewing, In *Proc. Annual Meeting*, American Society Brewing Chemists, pp40-46.
15. Kolkunova, G. K., B. M. Maksimchuk, N. M. Moslova, and E. I. Vendernikova (1983), Processing triticale into flour, In *Proc. 7th Cereal and Bread Cong.*, Elsevier, Amsterdam. pp415-418.
16. Saini, H. S. and R. J. Henry (1989), Fractionation and evaluation of triticale pentosans: comparison with wheat and rye. *Cereal. Chem.* **66**, 11-14.
17. Sosulski, K., S. Wang, W. M. Ingledew, F. W. Sosulski, and J. Tang (1997), Preprocessed barley, rye and triticale as a feedstock for an integrated fuel ethanol-feedlot plant. *Appl. Biochem. Biotech.* **63-65**, 59-70.
18. Nowak, J., K. Szambelan, H. Miettinen, W. Nowak, and Z. Czarniecki (2008), Effect of the corn grain storage method on saccharification and ethanol fermentation yield, *ACTA Sci. Pol.* **7**, 19-27.
19. Wittrup, K. D., A. L. Weber, and P. Tsai (1993), Microencapsulation selection for isolation of yeast mutants with increased secretion of *Aspergillus awamori* glucoamylase, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 351-356.