

단수수 착즙액으로부터 에탄올 생산을 위한 반응표면분석법을 이용한 효모 발효조건 최적화

차영록*, 박유리, 김종곤, 최용환, 문윤호, 박선태, 안기홍, 구본철, 박광근

Optimization of Fermentation Conditions for the Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* using Response Surface Methodolgy

Young-Lok Cha*, Yu Ri Park, Jung Kon Kim, Yong-Hwan Choi, Youn-Ho Moon,
Surn-Teh Bark, Gi Hong An, Bon-Cheol Koo and Kwang-Geun Park

Abstract

Optimization of initial total sugar concentration of sweet sorghum juice, aeration time and aeration rate on ethanol production was performed by response surface methodology (RSM). The optimum conditions for ethanol production from concentrated sweet sorghum juice were determined as follows: initial total sugar concentration, 21.2 Brix; aeration time, 7.66h; aeration rate, 1.22 vvm. At the optimum conditions, the maximum ethanol yield was predicted to be 91.65% by model prediction. Similarly, 92.98% of ethanol yield was obtained by verification experiment using optimum conditions after 48 h of fermentation. This result was in agreement with the model prediction.

Key words

Sweet Sorghum juice(단수수착즙액), *Saccharomyces cerevisiae*(효모균), Ethanol fermentation(에탄올 발효), Response surface methodolgy(RSM, 반응표면분석법)

(접수일 2011. 11. 11, 수정일 2011. 12. 15, 게재확정일 2011. 12. 20)

* 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터

■ E-mail : biocha@korea.kr ■ Tel : (061)450-0131 ■ Fax : (061)453-0085

1. 서론

최근 브라질, 미국을 중심으로 1세대 바이오에탄올 생산이 본격적으로 이루어지고 있으며 생산량 또한 급격히 증가하고 있다. 미국의 경우 옥수수가 에탄올 생산을 위한 주 원료이며

2008년 에탄올생산량이 34억리터로 2007년 24.6억리터보다 38%가 증가하였다.⁽¹⁾ 신재생연료협회(RFA, www.ethanolrfa.org) 보고에 따르면 2010년 세계 바이오에탄올 생산량은 86.9억리터이며 이중 57.5%에 해당하는 50억리터를 미국에서 생산하고 있다. 최근 국내에서도 바이오에탄올 생산 연구가 활발히

진행되고 있는데, 사탕수수 등 재배기간이 긴 작물을 재배하기 어려운 우리나라 기후 특성상 1세대 바이오에탄올 작물로서 단수수가 유망하다.

단수수(*Sorghum bicolor* {L.} Moench)는 1년생의 화본과 C₄식물로서 바이오매스 생산량이 많고 당 함량이 높아 에탄올 생산에 유리한 작물이다.^(2,3) 단수수는 건조한 기후에서도 잘 자라며 환경적응성이 높아 우리나라에서 쉽게 재배할 수 있다. 단수수는 사탕수수에 비해 수분 요구량이 적고⁽⁴⁾ 재배기간이 3~4개월로 짧아 우리나라에서는 주로 5월 파종하여 10월에 수확한다. 단수수 착즙액의 주요 성분은 glucose, fructose 그리고 sucrose이며 당도는 평균적으로 10~20Brix이다.⁽⁵⁾

바이오에탄올 생산을 위해서는 단수수착즙액을 대량으로 생산하여 이를 발효기질로 이용해야 한다. 그러나 단수수착즙액은 상온에서 쉽게 오염되므로 농축하여 보관하였다가 필요시 발효에 이용해야 한다. 일반적으로 효모 발효를 통한 에탄올 생산을 위해서는 초기 당농도 및 질소원농도, 발효온도, pH, 접종량 등 발효공정 변수들을 최적화해야 최대의 에탄올을 생산할 수 있다. 특히 효모 미생물은 알코올 발효공정에서 기질의 농도가 너무 높을 때 성장에 제한을 받으므로 농축한 단수수 착즙액으로부터 효율적인 발효를 위해서는 당농도의 최적화가 선행되어야 한다. 또한 효모발효에서 통기조건이 알코올 생산에 영향을 미치므로⁽⁶⁾ 본 연구에서는 단수수 농축액의 농도, 산소공급량 및 산소공급시간을 최적화하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 단수수 재료

본 연구에서 사용한 단수수 착즙액은 한국산 무안재래종을 착즙하여 사용하였다. 2009년 전남 무안 소재 바이오에너지 작물센터 시험포장에 5월 파종하여 10월에 줄기를 수확하였다. 수확한 줄기는 잎과 이삭을 제거하고 생줄기를 롤밀형 착즙기(Roller Juice extractor, (주)리엠코리아 Korea)로 착즙하였다. 착즙액은 진공 로터리농축기(Rotavapor R-124, BUCHI, switzerland)를 사용하여 55~65Brix로 농축한 후 실험에 사용하기 전까지 -5°C로 냉동 보관하였으며 실험시 적정농도로 희석하여 사용하였다.

2.2 균주 및 배지조성

본 연구에 사용된 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011 이고 (주)창해에탄올 창해연구소에서 분양받았다. 발효를 위한 종균준비는 yeast extract 5g/L, peptone 5g/L, glucose 10g/L의 배지를 사용하여 33°C에서 8시간 액체배양하고 이 중 10%를 다시 집중하여 12시간동안 2차 액체배양하여 균주의 활성을 유지시켰다.

2.3 발효

농축한 단수수 착즙액은 고압멸균기로 121°C, 15분 멸균하여 발효기질로 사용하였으며, Table 1의 구성에 따라 단수수 농도를 조절 한 후 5L 생물반응기(Fermentec사 Korea)에 발효액 2L를 넣고 발효를 수행하였다. 이때 종균은 10%를 접종하였다. 공급산소는 0.2µm 필터로 여과하여 생물반응기에 주입하였으며 발효를 위한 온도, pH, 및 교반속도는 각각 33°C, pH 5.0, 150RPM이었다.

2.4 분석방법

단수수 착즙 원액에 포함된 당류는 주로 glucose, fructose, sucrose이다. 당분석은 High Performance Liquid Chromatography (Waters HPLC, USA)를 이용하였으며 Carbohydrate Column (Waters사, USA)으로 40°C에서 물질을 분리하였다. 이때 사용한 이동상은 83% acetonitrile이며 유속은 1.4mL/min 이었다. 검출기는 Refractive Index Detector(Waters RID 2410, USA)를 사용하여 40°C에서 검출하였다. 모든 시료는 14,000RPM에서 10분간 원심분리하고 상등액을 0.2µm syringe filter로 여과하여 사용하였다.

단수수 발효액내의 에탄올 농도는 Gas chromatography

Table 1. Experimental range and levels of the independent variables

Factors	Symbol	Coded labels				
		-2	-1	0	1	2
Total sugar(Brix)	X ₁	5	15	25	35	45
Aeration time(h)	X ₂	0	2	4	6	8
Aeration rate(vvm)	X ₃	0.25	0.5	0.75	1.0	1.25

(Agilent 6890N, USA)로 측정하였고 분석 컬럼은 HP-INNOWX 19091N-213(Agilent사, USA)이며, 검출기는 Flame ionization detector(FID, Agilent사, USA)를 사용하였다. 분석조건은 주입구와 검출구의 온도는 각 210°C이며, 오븐온도는 180°C 이었고, carrier gas는 He을 사용하여 15mL/min의 유속으로 공급하였다.

2.5 실험설계 및 통계분석

반응표면분석법(RSM)은 강력한 수학 모델링 기법으로 몇 번의 실험만으로 다중 공정변수들을 최적화할 수 있는 통계적 방법이다.^(7,8)

본 연구에서는 반응표면분석법의 중심합성계획법(CCD)을 이용하여 효모발효 공정의 당농도, 산소공급시간 및 산소공급량을 최적화하였고, Table 1에 실험 인자(X_i)와 코드화된 레벨 및 실험범위를 나타내었다.

통계처리를 위해 각각의 독립변수들은 식 (1)에 따라 코드화 하였다.

$$x_i = \frac{X_i - X_o}{\Delta x} \quad i = 1, 2, \dots, k \quad (1)$$

x_i 와 X_i 는 각각 실험인자의 코드화된 값과 실제값이며, X_o 는 중앙점에서의 X_i 값이고 ΔX 는 단계 변경값이다. 일반적인 반응표면모델은 아래 식 (2)와 같이 2차 다항식으로 표현한다.

$$Y = b_o + \sum_{i=1}^k b_i X_i + \sum_{i=1}^k b_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} b_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (2)$$

Y 는 반응표면분석모델에 의해 예측된 값이고, X_i, X_j 는 예측값 Y 에 영향을 미치는 입력변수이며 b_o 는 상수계수, $b_i (i = 1, 2, 3, \dots, k)$ 는 선형항의 계수, b_{ii} 는 2차항의 계수, b_{ij} 는 i, j 의 상호관계항의 계수이다. 반응표면 2차 다항식 모델은 Design Expert ver.8 software package를 이용하여 예측값을 계산하였다.^(9,10)

3. 결과 및 고찰

3.1 에탄올 수율 및 회귀모델분석

에탄올 발효조건 최적화를 위해 19가지 조건의 발효 실험을 수행하였고, Table 2에 변수 X_1, X_2, X_3 에 대한 실험설계와 설계조건에 따라 발효실험을 수행하고 얻은 발효수율 결과를 나타내었다. Table 2의 에탄올수율은 식 (3)에 따라 계산하였다.

$$\text{에탄올수율 (\%)} = \frac{\text{실험 에탄올 생산량}}{\text{이론 에탄올 생산량}} \times 100 \quad (3)$$

발효수율 결과를 반응표면분석법(RSM)의 중심합성계획법(CCD)에 적용하여 에탄올 수율을 최적화하고 모델식을 아래 식 (4)으로 나타내었다.

Table 2. Central composite design conditions and experimental ethanol yield

Run number	X_1	X_2	X_3	Experimental ethanol yield (%)
1	-1	-1	-1	79.93
2	1	-1	-1	45.74
3	-1	1	-1	78.40
4	1	1	-1	44.66
5	-1	-1	1	81.18
6	1	-1	1	47.44
7	-1	1	1	84.23
8	1	1	1	48.16
9	-2	0	0	84.52
10	2	0	0	6.44
11	0	-2	0	82.04
12	0	2	0	87.94
13	0	0	-2	87.96
14	0	0	2	86.36
15	0	0	0	85.02
16	0	0	0	91.26
17	0	0	0	75.65
18	0	0	0	79.53
19	0	0	0	77.99

Table 3. Analysis of variance(ANOVA) for the RSM for ethanol production

source	Sum of squares (SS)	degree of freedom (df)	mean squares (MS)	F-value	p value Prob>F
model	8113,962	9	901,551	10,956	0,0007
X ₁	5398,773	1	5398,773	65,609	<0,0001
X ₂	10,499	1	10,499	0,129	0,7292
X ₃	5,156	1	5,156	0,063	0,808
X ₁ X ₂	0,444	1	0,444	0,005	0,9431
X ₁ X ₃	0,433	1	0,433	0,005	0,9437
X ₂ X ₃	5,083	1	5,083	0,062	0,8093
X ₁ ²	2372,107	1	2372,107	28,827	0,0005
X ₂ ²	0,398	1	0,398	0,005	0,9461
X ₃ ²	4,000	1	4,000	0,049	0,8304
residual	740,589	9	82,288		
lack of Fit	583,187	5	116,637	2,964	0,1573
pure error	157,402	4	39,351		
cor total	8854,551	18			

$$Y = 79.48 - 18.37X_1 + 0.81X_2 + 0.57X_3 - 0.24X_1X_2 - 0.23X_1X_3 + 0.8X_2X_3 - 10.01X_1^2 - 0.13X_2^2 + 0.41X_3^2 \quad (4)$$

Y는 에탄올수율 예측값이고 X₁, X₂, X₃는 각각 총당농도(Brix), 산소공급시간(h), 산소공급량(vvm)의 코드화된 값이다.

2차 반응표면반응모델의 결과에 대한 분산분석(ANOVA)을 Table 3에 나타내었다. 본 연구에서 얻어진 모델의 p-value 값은 0.0007이었으며, 이것은 유의수준 0.05보다 낮아서 유의한 계수의 상관관계를 나타내므로 유의성이 인정되었다.⁽¹¹⁾ 독립변수 중 초기 총 당(X₁)의 p-value는 0.0001이하로 에탄올생산에 가장 큰 영향을 미치는 인자이다.

2차 회귀모델에서 R²값은 실험값과 모델예측값 사이의 신뢰도를 나타내며 본 모델식은 R²값과 보정된 R²값이 각각 0.916과 0.833로 유의성이 인정되었다.

3.2 반응표면분석 및 발효조건 최적화

Fig. 1은 에탄올 수율에 대한 모델 예측값과 실험값이 선형 비례적으로 일치함을 나타내고 있다. Fig. 2와 Fig. 3은 초기 당 농도와 산소 공급시간 및 산소 공급량이 에탄올수율에 미치는 영향을 3차원으로 나타내고 있다. 당 농도와 산소 공급시간

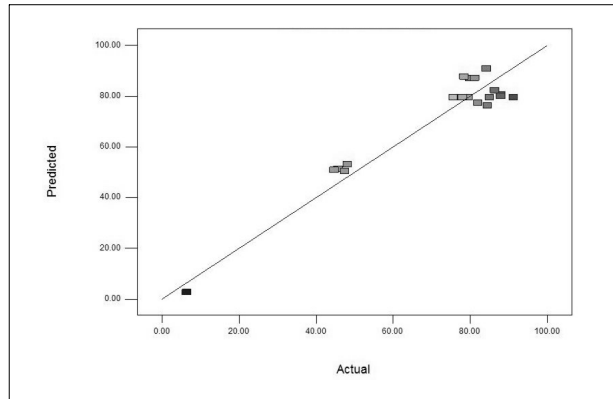


Fig. 1 Relationship with experimental and predicted value(%) on ethanol yield of sweet sorghum juice fermentation

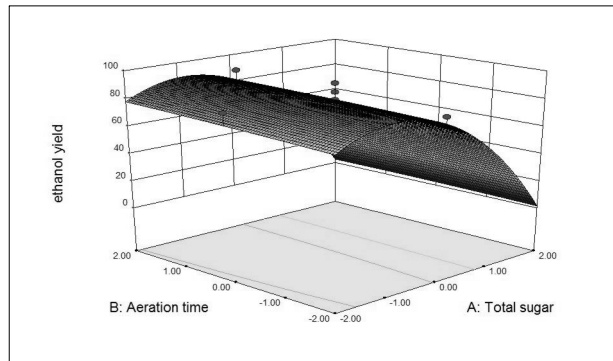


Fig. 2 Interaction effect of the initial total sugar concentration and supplement time of aeration on ethanol yield

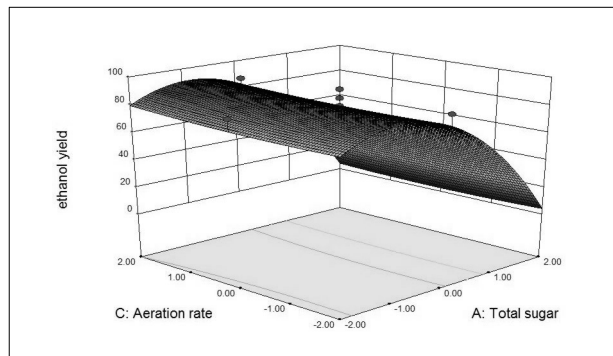


Fig. 3 Interaction effect of the initial total sugar concentration and supplement rate of aeration on ethanol yield

및 산소 공급량은 코드화된 값이며 에탄올 수율은 퍼센트 단위이다. 주로 초기 당 농도가 에탄올 생산에 많은 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있으며, 당 농도는 코드값 2(45Brix)에 가까울수록 발효율이 낮으며 -1(15Brix) 전후에서 가장 높은 발효율을

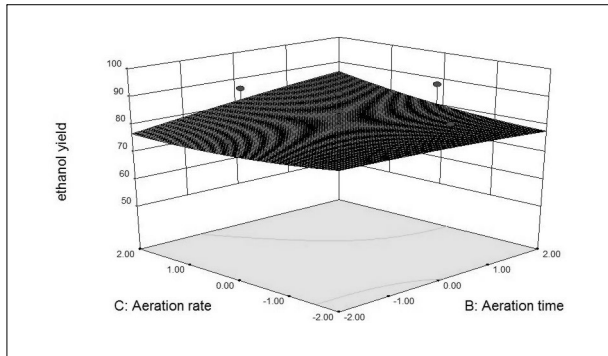


Fig. 4 Interaction effect of the aeration time and aeration rate on ethanol yield

나타내었고 -2(5Brix) 근처에서는 다시 발효율이 낮아졌다.

Fig. 4는 에탄올 발효수율에 대한 산소 공급시간과 산소 공급량의 관계를 나타낸 것이다. 코드값 -2(산소 공급시간 0h과 산소 공급량 0.25vvm)일 때 에탄올 수율이 75~80%정도였으며 코드값 2(산소 공급시간 8h과 산소 공급량 1.25vvm)근처로 갈수록 에탄올 수율이 상승하였다. 이는 산소 공급이 에탄올 발효에 영향을 미치고 있음을 나타내는 것이다. 각 독립변수들의 최적조건은 총 당농도 - 0.38(21.2Brix), 산소 공급시간과 산소 공급량이 각각 1.83(7.66h), 1.87(1.22vvm)이다. 이 조건에서 최대 에탄올 수율은 91.65%이다.

본 연구에서는 단수수 착즙액을 농축한 고농도의 단수수액을 최대 발효 가능한 당 농도를 탐색하여 에탄올 생산 효율을 최적화하였다. 또한 효모는 당을 소화하여 균체를 성장시킬 뿐만 아니라 동시에 에탄올과 이산화탄소를 생산하므로 배지 내 산소량에 따라 에탄올 생산량에 영향을 미치는 것으로 확인하였다. 위와 같은 결과로부터 초기 당 농도와 산소 공급조건을 최적화하여 단수수 착즙액을 이용한 에탄올 생산성이 향상됨을 알 수 있었다.

3.3 모델 검증

수학적 모델링에 의해 최적화한 예측값은 실제 실험을 수행하여 농축된 단수수 착즙액의 초기 당 농도와 산소 공급조건을 확인해야 한다.

예측된 최대 에탄올 수율의 모델의 타당성을 확인하기 위해 유효성 검증 실험을 실시하였다. 발효실험은 최적화실험에 사용한 조건과 동일한 조건에서 72시간동안 수행하였다.

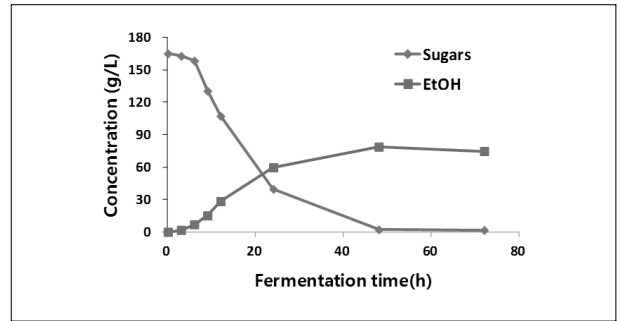


Fig. 5 Sugar consumption and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011

또한 반응표면분석법에 의해 도출한 최적 변수조건을 사용하였으며, 초기 당농도는 21.2Brix(166g/L), 산소공급시간은 7.66h 및 산소 공급량은 1.22vvm이었다. Fig. 5는 발효시간에 따른 당 소비 및 에탄올 생산량을 나타낸다. 48시간 이내에 발효는 완료되었으며 이때 에탄올 수율은 92.98%이었다. 이 값은 모델값 91.65%과 유사하므로 RSM 모델의 3가지 독립변수의 최적조건이 유의함을 확인하였다. 본 연구결과를 기반으로 향후 추가적인 발효공정조건이(발효온도, pH, 발효배지, 접종량 등) 최적화되면 국내산 당질원료인 단수수 착즙액 이용 기반의 바이오에탄올 공정 확립에 기여할 것으로 예상된다.

4. 결론

효모발효 균주를 이용하여 농축한 단수수착즙액으로부터 에탄올 생산을 위한 발효조건을 반응표면분석법(RSM)으로 성공적으로 최적화하였다. 모델최적화는 RSM의 중심합성계획기법(CCD)을 적용하여 2차 다항식 모델에 19가지 조건으로 실험한 에탄올 수율결과를 도입하여 회귀계수 및 독립변수를 최적화하였다.

에탄올 발효는 5L 생물반응기에서 수행하였으며, 발효조건은 33°C, 150RPM, pH 5.0 그리고 산소공급은 압축공기를 0.2µm 필터로 여과하여 반응기에 주입되며 모든 변수들은 HMI 시스템으로 제어하였다. 최적 발효조건은 초기당농도 21.2Brix이며 산소공급시간과 산소공급량은 각각 7.66시간, 1.22vvm이었다. 그리고 최적조건에 해당되는 에탄올 수율 예측값은 91.65%였다. 예측값을 뒷받침하는 확인실험에서 48시간 발효시 92.98%의 에탄올 수율을 얻었다.

References

- [1] Xiaorong Wu, Scott Staggenborg, Johathan L. Propheter, William L. Rooney, Jianming Yu, Donghai Wang, 2010, "Features of sweet sorghum juice and their performance in ethanol fermentation", *Industrial Crops and Products*, Vol. 31, pp. 164–170.
- [2] Ronghou Liu, Jinxia Li, Fei Shen, 2008, "Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation", *Renewable Energy*, Vol. 33, pp. 1130–1135.
- [3] Billa Eilla, Dimitris P Koullas, Bernard Monties, Emmanuel G Koukios, 1997, "Structure and composition of sweet sorghum stalk components", *Industrial Crops & Productions* Vol. 6, pp. 297–302.
- [4] Jianliang Yu, Xu Zhang and Tianwei Tan, 2008, "Ethanol production by solid state fermentation of sweet sorghum using thermotolerant strain", *Fuel Processing Technology*, Vol. 89, pp. 1056–1059.
- [5] S. Prasad, Anoop Singh, N. Jain, and H. C. Joshi, 2007, "Ethanol Production from sweet sorghum for Utilization as Automotive Fuel in India", *Energy & Fuels*, Vol. 21, pp. 2415–2420.
- [6] S. Alfenore, X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uribelarrea, G. Goma, G. Molina Jouve, S.E. Guillaet, 2003, "Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process", *Appl. Microbiol Biotechnol*, Vol. 63, pp. 537–542.
- [7] Ezhumalai Sasikumar, Thangavelu Viruthagiri, 2008, "Optimization of Process Conditions Using Response Surface Methodology(RSM) for Ethanol Production from Pretreated Sugarcane Bagasse: Kinetic and Modeling", *Bioenergy Research*, Vol. 1, pp. 239–247.
- [8] Ramesh Balusu, Ramamohan R. Paduru, S. K. Kuravi, G. Seenaya, G. Reddy, 2005, "Optimization of critical medium components using response surface methodology for ethanol production from cellulosic biomass by *Clostridium thermocellum* SS19", *Process Biochemistry*, Vol. 40, No. 9, pp. 3025–3030.
- [9] Senthilkumar SR, Ashokkumar B, Chandra Raj K, Gunasekaran P, 2005, "Optimization of medium composition for alkali-stable xylanase production by *Aspergillus fischeri* Fxn 1 in solid-state fermentation using central composite rotary design", *Bioresource Technology*, Vol. 96, pp. 1380–1386.
- [10] Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, Vijay Kumar E. Sing, 2006, "Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen source to replace peptone and yeast extract optimization by RSM", *Biochemistry*, Vol. 41, pp. 465–472.
- [11] Petros Katapodis, Vassiliki Christakopoulou, Dimitris Kakos, Paul Christakopoulos, 2007, "Optimization of xylanase production by *Chaetomium thermophilum* in wheat straw using response surface methodology", *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 35, pp. 136–141.

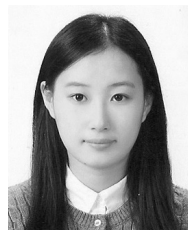
차영록



1990년 전남대학교 공업화학과 공학사
 1992년 전남대학교 공업화학과 공학석사
 2005년 독일 하노버대학교 화학과 이학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 농업연구사
 (E-mail : biocha@korea.kr)

박유리



2009년 조선대학교 환경공학과 공학사
 2011년 조선대학교 환경공학과 공학석사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 석사연구원
 (E-mail : yuri0219@daum.net)

김 중 곤



1998년 조선대학교 환경학과 이학사
2001년 조선대학교 환경학과 이학석사
2007년 조선대학교 생물소재학과 공학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 박사후연구원
(E-mail : kjk9207@korea.kr)

최 용 환



1985년 방승통신대학교 농학과 농학사
1987년 서울대학교 농학과 농학석사
2003년 건국대학교 농학과 농학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 농업연구관
(E-mail : victorcyh@korea.kr)

문 윤 호



1987년 전남대학교 농화학과 농학사
1992년 전남대학교 농화학과 농학석사
2004년 전남대학교 농화학과 농학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 농업연구사
(E-mail : yhmoon@korea.kr)

박 선 태



2001년 건국대학교 환경공학과 공학사
2011년 전남대학교 바이오에너지 및 바이오소재
협동과정 공학석사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 농업연구사
(E-mail : oushiza@korea.kr)

안 기 흥



2001년 순천대학교 농화학과 농학사
2003년 일본 큐슈대학교 생물자원환경과과
농학석사
2008년 일본 홋카이도대학교 생물자원생산학과
농학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 박사후연구원
(E-mail : agiho@korea.kr)

구 본 철



1984년 건국대학교 농학과 농학사
1987년 건국대학교 농학과 농학석사
2000년 건국대학교 농학과 농학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 농업연구관
(E-mail : koobc@korea.kr)

박 광 근



1982년 강원대학교 농학과 농학사
1985년 강원대학교 농학과 농학석사
1995년 강원대학교 농학과 농학박사

현재 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물센터 소장(농업연구관)
(E-mail : parkkg@korea.kr)