

## 보리를 이용한 고효율 바이오에탄올 생산 연구

전형진<sup>1</sup> · 고경모<sup>1</sup> · 김 신<sup>2,†</sup> · 정준성<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>창해에탄올 종합기술원, <sup>2</sup>한국석유관리원 석유기술연구소

### A Study on the High-efficient Bioethanol Production Using Barley

HYUNGJIN JEON<sup>1</sup>, KYOUNG-MO GO<sup>1</sup>, SHIN KIM<sup>2,†</sup>, JUN-SEONG JEONG<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Advanced Institute of Technology, Changhae Ethanol Co., Ltd., 15 Wonmanseong-ro, Deokjin-gu, Jeonju 54854, Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Petroleum Technology, Korea Petroleum Quality and Distribution Authority, 33 Yangcheong 3-gil, Ochang-eup, Cheongwon-gu, Cheongju 28115, Korea

†Corresponding author :  
Junpapapa@naver.com  
Shinnara@kpetro.or.kr

Received 20 October, 2017  
Revised 4 December, 2017  
Accepted 29 December, 2017

**Abstract >>** This study investigated the high-efficient process for bioethanol from barley by various condition. First, higher concentrations of ethanol could be produced without loss of yield by using reducing water consumption. This is because it could prevent to increase viscosity despite reducing water consumption. Second, the ethanol yield could be improved by using reducing particle size of biomass (increase of enzyme reactive surface). Third, The addition of protease could have a considerable effect on yield of fermentation, which provides nutrients to the yeast. This results showed that bioethanol production would provide efficient ethanol production and lower production costs.

**Key words :** Bioethanol(바이오에탄올), Barley(보리), Particle size(입도), Protease(프로테아제)

## 1. 서론

수송용 에너지부분에서 액체연료는 매우 중요한 에너지원으로 대부분 현재 가솔린과 디젤이 사용되고 있지만 화석연료의 유한성, 환경오염 등으로 대체에너지의 필요성이 점점 대두되고 있다. 이에 바이오에탄올은 가솔린을 대체할 수 있는 에너지원으로서 가치를 인정받아 사용하는 국가가 꾸준히 증가하고 있다<sup>1-3)</sup>.

현재 바이오에탄올을 수송용 연료로 사용하는

대표적인 국가는 미국과 브라질로서 지역 및 기후적인 특성을 살려 미국에서는 옥수수, 수수와 같은 전분질계 바이오매스를 에탄올 생산 원료, 브라질에서는 사탕수수 기반의 당질계 바이오매스를 기질로서 사용하고 있다. 이 외에도 동남아 등지에서도 카사바 등을 이용하여 바이오에탄올을 수송용 에너지로 사용하는 국가가 점점 증가하고 있다<sup>4,5)</sup>.

자국의 풍부한 바이오매스를 이용하여 바이오에탄올을 보급하고 있는 해외 사례와 달리 우리

나라의 경우에는 다양한 국내 바이오매스를 이용한 바이오에탄올 생산을 위한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 노동집약적인 원료 생산의 특성으로 바이오매스의 확보에 대한 어려움 때문에 바이오에탄올의 생산과 상용화에 대한 현실적인 부담이 많은 것이 사실이다. 국내에서의 바이오에탄올의 사용을 위해서는 일부 물량에 대한 바이오매스 및 에탄올 수입은 불가피하지만 국내산 바이오매스 사용이 병행되어야 수입 의존도 탈피, 에너지 안보 강화, 농촌 경제 활성화, 환경적 이점 등을 지니기 때문에 바이오에탄올의 연료로서의 사용에 대한 의미를 가질 수 있다<sup>6,7)</sup>.

우리나라의 음용 에탄올 생산은 국산 원료인 재고현미를 주원료로 사용되고 있지만 이는 식량 자원과의 경합으로 인해 상당한 위험성을 가지고 있으며 이를 보완할 수 있는 바이오매스의 발굴이 중요하다. 이에 본 연구에서는 식량자원과의 경합을 줄이며 최근 재배 면적이 급감하고 있는 동계작물인 보리에 주목하였고 이를 이용하여 효과적인 에탄올 생산 기술에 대한 연구를 실시하였다. 보리의 경우에는 1990년대 연간 20만톤 이상의 생산량이 가격경쟁력 상실, 수요 급감에 따라 2016년에는 10만톤에 그치고 있는 실정이다. 만약 바이오에탄올 생산용으로 국산 보리를 이용한다면 수요 증가로 인해 겨울철 유희농지에 보리를 다시 재배하게 되어 1990년대 수준인 20만톤 이상의 생산이 가능할 것으로 예상되며 기존 소비용 10만톤을 제외하고도 10만톤의 보리를 바이오에탄올 생산용 바이오매스로 활용할 수 있을 것으로 예상된다. 10만톤의 보리는 바이오에탄올을 약 4만 KL생산이 가능한 수량으로 E3 사용시 국내 필요량 30만 KL의 13%를 공급할 수 있을 것이다. 국내의 유희농지는 전국적으로 16만 ha 수준(2009년)이며 이 중 20%만 활용하여도 약 12만톤의(1 ha당 4톤 생산) 보리를 추가적으로 확보할 수 있기에 불가능한 수치는 아닐 것이다. 2012년에 폐지된 정부의 보리 수매 방식이 아닌 바이오에탄올 생산업체 등 민간 기업의 바이오매스 확보

를 위해 구매할 것이기에 수확시설 및 저장시설의 확충 및 지원이 자연스럽게 이루어져 국내 경제 활성화와 농가 소득의 증대에 크게 기여할 수 있을 것이다<sup>8-11)</sup>.

본 연구에서는 바이오에탄올 생산용으로서의 가능성이 있는 국산 바이오매스인 보리를 기질로 이용하여 바이오에탄올을 생산하고 생산성 증대 및 수율 상승을 위한 방법에 대한 다양한 실험을 진행하였다.

## 2. 실험

### 2.1 실험 재료

본 연구에 사용된 바이오매스는 ㈜창해에탄올에 음용 에탄올 생산용으로 입고되고 있는 보리(2016년 수확)를 분쇄하여 이용하였다. 전분의 액화에 사용된 효소는 Novozyme사의  $\alpha$ -amylase를 이용하였고, 당화효소는 Solid-glucoamylase(이오엔자임)을 이용하였다. 추가적으로 점도 개선을 위해 Novozymes사의  $\beta$ -glucosidase를 이용하였으며, 효모의 free amino nitrogen (FAN) 공급을 위해 사용된 Protease는 Novozymes사의 제품을 이용하였다. 발효공정에 사용된 효모는 현재 ㈜창해에탄올에서 음용용 에탄올 생산에 이용되고 있는 산업용 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* CHY 1011 (KCTC11250BP)를 YPD배지 (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 100 g/L glucose)에서 33°C에서 24시간 배양 후 사용하였다.

### 2.2 실험 방법

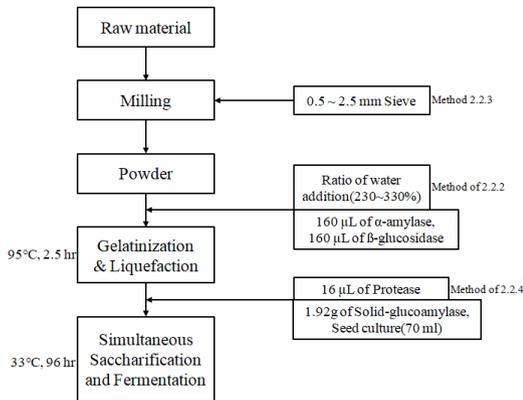
#### 2.2.1 원료의 분쇄 및 전분가 분석

본 실험에 사용된 보리는 분쇄기(PC-7-F, 성장기계)를 이용하여 미분화를 실시하였으며, 분쇄입도는 각각 2.5 mm, 2.0 mm, 1.5 mm, 1.0 mm, 0.5 mm의 Sieve를 통해 조절하였다.

전분가의 분석은 산당화법과 효소당화법을 이용하여 생성된 환원당을 분석하였다. 산당화법은

**Table 1.** Condition of Fermentation test

Test name	Condition
Ratio of water addition	Control of water addition (350% - 250%)
Particle size of raw material	0.5 mm - 2.5 mm
Addition of protease	0.005%



**Fig. 1.** Schematic diagram of experimental procedure and condition.

1 mm 이하로 분쇄된 원료 2 g, 증류수 120 mL, 5% HCl 100 mL를 500 mL 삼각플라스크에 혼합한 후 95°C 상압에서 2.5시간 가수분해 후 NaOH로 중화하고 증류수를 첨가하여 500 mL로 mass-up하여 HPLC로 분석하였다. 효소당화법은 분쇄된 원료 5 g을 증류수 100 mL와 α-amylase SC 50 µL를 첨가한 후 95°C에서 2.5시간 호화 및 액화 후 60°C로 냉각하여 0.1N HCl로 pH를 4.5로 조절한 후 Solid-glucoamylase를 0.6 g을 첨가한 후 18시간 당화 후 1 L로 mass-up하여 HPLC로 분석하였다.

**2.2.2 급수비별 발효실험**

1.5 mm Sieve에서 분쇄된 보리 320 g에 Table 1과 같이 증류수를 조절하여 가한 후 160 µL의 α-amylase와 160 µL의 β-glucosidase를 첨가하여 95°C에서 2.5시간 호화, 액화한 후 33°C로 냉각하여 1.92 g의 Solid-glucoamylase를 첨가하고 종균 배양액 70 mL를 접종시킨 후 96 시간 동안 동시당

화발효를 진행하였다(Fig. 1).

**2.2.3 원료 분체 입도별 발효 실험**

각각 2.5 mm, 2.0 mm, 1.5 mm, 1.0 mm, 0.5 mm로 분쇄된 보리 320 g과 증류수 928 mL를 혼합한 후 160 µL의 α-amylase와 160 µL의 β-glucosidase를 첨가하여 95°C에서 2.5시간 호화, 액화한 후 33°C로 냉각하여 1.92 g의 Solid-glucoamylase를 첨가하고 종균 배양액 70 mL를 접종시킨 후 96 시간 동안 동시당화발효를 진행하였다(Fig. 1).

**2.2.4 Protease 첨가 발효 실험**

1.5 mm Sieve에서 분쇄된 보리 320 g에 Table 1과 같이 증류수를 조절하여 가한 후 160 µL의 α-amylase와 160 µL의 β-glucosidase를 첨가하여 95°C에서 2.5시간 호화, 액화 한 후 33°C로 냉각하여 1.92g의 Solid-glucoamylase와 protease 16 µL를 첨가하고 종균 배양액 70 mL를 접종시킨 후 96시간 동안 동시당화발효를 진행하였다(Fig. 1).

**2.2.5 분석 방법**

발효 실험에서 생성된 당, 유기산 및 에탄올의 분석은 발효액을 Sampling하여 Syringe filter (0.2 µm)를 이용하여 여과한 후 high performance liquid chromatography (HPLC; waters)를 이용하여 분석하였다. Column은 Bio-rad사의 Aminex HPX-87H column을 사용하였으며 oven temperature는 60°C, detector temperature는 40°C로 설정하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1 보리 전분가 분석**

Table 2는 산당화법과 효소당화법에 의해 분석된 보리의 전분 함량 결과를 나타내었다. 분석 결과 효소당화법보다 산당화법에 의해 측정된 전분가가 4.4% 높게 분석되었다. 이는 효소당화법은 효소에 의해 발효가 가능한 환원당만이 측정되지

**Table 2.** Starch value of rew material (Barley)

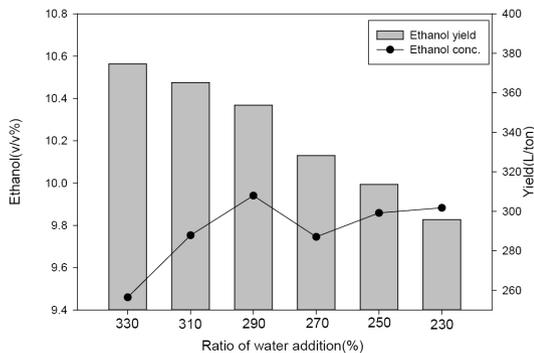
Methods	Acid hydrolysis	Enzymatic hydrolysis
Starch value (%)	64.8	60.4

만 산당화의 경우에는 원료에 포함된 모든 환원 당이 분석되기 때문이다. 보리의 경우는 맥강에 함유된 섬유질이나 비발효성 당인  $\beta$ -glucan 등의 존재로 기인되는 기질의 특성 때문이다.

### 3.2 급수비별 발효 실험

에탄올 생산 공정에서 초기 호화 및 액화에 사용되는 용수를 저감할 수 있다면 높은 에탄올 농도 발효액의 상승을 통한 단위 설비 당 생산성 향상과 증기, 전기, 용수 등 사용되는 유틸리티의 저감으로 생산비용을 줄일 수 있는 장점이 있다. 이에 본 실험에서는 보리의 급수비에 따른 에탄올 농도 변화 및 에탄올 생산수율을 비교하였다.

Fig. 2는 급수비 조건별 에탄올 농도와 생산수율을 나타낸 그래프이다. 먼저 국내 상용화 급수 조건인 330% (원료 대비)보다 급수비를 줄이게 되면 에탄올 농도가 높아지는 경향이 보였으나 에탄올 생산 수율이 저하되는 현상이 나타났다. 이는 보리에 함유된 섬유질이나  $\beta$ -glucan 성분 때문에 점도 상승 현상이 발생되어 효소 및 균주의 활성도 저하되어 문제가 발생되었다. 이러한 현



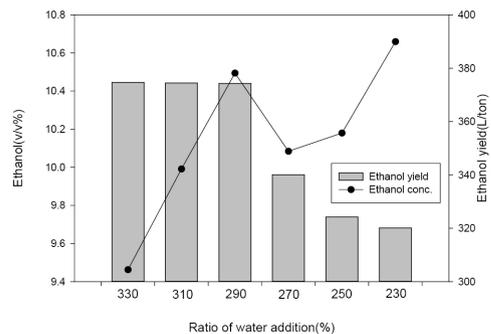
**Fig. 2.** Final ethanol concentration and ethanol yield in ratio of water addition(no beta-glucosidase)

상을 방지하기 위해서는 보리에 함유된 섬유질이나  $\beta$ -glucan 성분을 분해하여 점도 문제를 해결해야 급수비를 낮출 수 있을 거라 판단하고  $\beta$ -glucanase를 첨가한 조건으로 실험을 진행하였으며 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

분석 결과 급수율이 290% (원료대비)까지는 에탄올 농도가 상승(9.46→10.49 v/v%)하는 동시에 Blank인 330% 급수 조건의 에탄올 생산수율(374 L/ton)을 유지하여 앞선 실험에서 발생된 문제를 해결할 수 있었다. 다만 270% 급수비 조건부터는 에탄올의 농도 저하와 동시에 에탄올 생산수율이 급격하게 낮아지는 경향을 보여 290% 내외의 조건으로 급수비를 조절하는 것이 가장 좋은 조건인 것으로 분석되었다. Table 2에서 볼 수 있듯이 급수비가 270% 조건 이하부터 효모의 활성도가 급격히 저하되어 에탄올로 전환되지 못하고 잔류된 당이 급격하게 높아진 것을 확인할 수 있었다.

### 3.3 원료 분쇄 입도별 발효 실험

에탄올 생산 공정에서 원료의 전처리를 위해 일반적으로 분쇄 공정이 이루어진다. 분쇄 공정에서는 바이오매스를 미분화로 충분한 표면적 확보를 통해 효소의 효율적인 반응을 이끌어 낼 수 있다. 이를 통해 원료에서 에탄올의 생산수율을 극대화할 수 있다면 에탄올의 생산 비용의 저감을 기대할 수 있을 것이다. 이에 본 실험에서는



**Fig. 3.** Final ethanol concentration and ethanol yield in ratio of water addition(beta-glucosidase)

**Table 3.** Comparison of residual sugar(RDS-Residual direct sugar, RTS-Residual Total sugar)

Ratio of water addition (%)	330%	310%	290%	270%	250%	230%
RDS (%)	0.08	0.08	0.09	1.48	1.63	1.89
RTS (%)	0.25	0.26	0.28	1.91	2.04	2.41

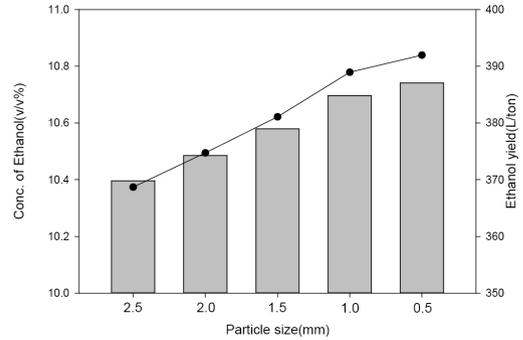
원료의 입도별로 에탄올 농도에 따른 생산수율 변화를 분석하였다.

분석 결과 분체의 입도가 작을수록 에탄올 농도가 상승되어 에탄올 생산 수율이 상승되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 0.5 mm의 분체를 이용하여 발효시 10.84 v/v%로 분석되어 2.5 mm의 분체를 이용한 발효 결과인 10.37 v/v%보다 0.47 v/v% 높게 분석됨에 따라 에탄올 생산수율 측면에서 369.79 L/ton에서 387.05 L/ton으로 보리 1 ton당 17.26 L의 에탄올을 더 생산할 수 있는 것으로 분석되었다. 이는 분쇄 공정의 목적은 전술하였듯이 효소에 의한 가수분해시 효소의 반응표면적을 넓히기 위함이라고 하였는데 이는 실험 결과에서 보듯이 분체의 입도가 작을수록 효소에 의한 가수분해능이 개선되어 입도가 큰 분체에서는 분해되지 못한 당이 효모가 발효에 이용할 수 있도록 환원당으로 분해가 가능하여 에탄올로 전환한 것으로 판단된다(Table 3).

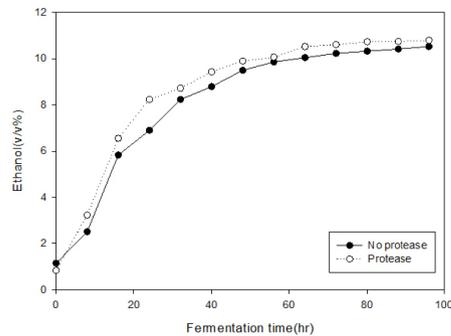
### 3.4 Protease 첨가 발효 실험

에탄올 발효 균주인 효모의 생육조건을 위한 영양원으로는 FAN, mineral, vitamin 등 여러 가지가 있지만 FAN은 효모가 개체를 증식하고 유지하며 에탄올 발효시 매우 중요한 질소 영양원이다. 카사바를 사용하는 상업화 공정에서는 FAN을 공급하기 위해 인위적으로 UREA나 인산암모늄을 첨가하여 운영하고 있다. 하지만 보리에는 원료 자체에 매우 풍부한 protein이 존재하고 있어 본 실험에서는 protein 분해 효소인 protease 첨가에 따른 에탄올 생산수율 변화를 분석하였다.

Fig. 5는 protease의 첨가에 유무에 따라 발효



**Fig. 4.** Final ethanol concentration and ethanol yield in particle size conditions



**Fig. 5.** Time course of ethanol concentration.

**Table 4.** Results of ethanol concentration, organic acid concentration and yield

	No protease	Protease
Ethanol (v/v%)	10.52	10.79
Yield (L/ton)	375.15	385.04
Lactic acid (g/L)	3.52	1.48
Acetic acid (g/L)	0.95	0.35

시간별로 에탄올 농도 추세를 나타낸 것이다. 분석 결과 protease의 첨가로 인해 에탄올의 농도도 높게 분석되었으며 발효 속도도 개선된 것을 확인할 수 있었다. 최종 분석된 에탄올 농도를 비교하면 protease 첨가로 0.27 v/v%의 에탄올 농도 상승으로 10 L/ton의 에탄올 생산수율 효과가 나타난 것으로 분석되었다(Table 4). 먼저 발효 속도 측면에서 protein의 분해로 인해 효모가 이용할 수 있는 FAN으로 전환되어 발효 초기 효모의 개체 수 증가 속도에 긍정적인 효과로 인해 에탄올 발

효 속도에 영향을 준 것으로 판단되며, 에탄올 농도 및 수율 상승 측면에서는 protease 첨가로 인해 효모의 생육 조건이 강화됨에 따라 타 오염원에 의한 유기산 발효를 억제하고 목적 산물이 에탄올로의 전환이 원활히 이루어졌기 때문이다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 연료용 바이오에탄올 생산용으로서의 국내산 바이오매스인 보리를 이용하여 바이오에탄올 생산하고 생산성 증대 및 생산수율 향상을 위해 다양한 조건으로 실험을 실시하였고 이를 통해 얻은 결론은 다음과 같다.

1) 사용되는 용수의 저감 가능성 모색을 위해 투입 바이오매스 대비 급수비를 다양한 조건으로 발효 실험을 실시한 결과  $\beta$ -glucosidase를 통해 보리에 함유된  $\beta$ -glucan의 분해로 급수량을 줄이더라도 점도 상승현상 억제로 인한 효소 및 균주 활성도 저하를 방지할 수 있었다. 그 결과 현재 상용화 규모에서 사용되는 급수비인 330%를 290%까지 줄이더라도 에탄올 수율 변화 측면에서는 큰 차이가 없는 것으로 분석되어 현재보다 고농도의 에탄올 발효액 생산이 가능한 것으로 판단된다. 이는 용수, steam, 전기, 수처리 비용의 저감으로 에탄올 생산 비용 저감 효과, 단위 설비 당 더 많은 에탄올 생산이 가능하여 생산성 향상이 기대되며, 초기 투자비의 저감도 기대할 수 있다.

2) 분체의 입도 크기별로 발효 실험을 실시한 결과 분체의 입도가 미분화될수록 에탄올의 생산수율이 상승되어 생산 비용 저감이 가능한 것으로 분석되었다. 이는 초기 원료의 전처리 공정인 분쇄 공정에 미분화할수록 이후 호화, 액화 및 당화 공정에서 사용되는 효소의 반응표면적 향상으로 인한 가수분해능 개선으로 에탄올 생산수율이 개선될 것으로 판단된다.

3) 효모의 질소원 공급을 위한 protease 첨가 test를 진행한 결과 효모의 개체수 증식 및 생육 조건 개선으로 발효 속도 및 에탄올 생산수율에

서 긍정적인 효과가 나타났고, 오염에 의한 유기산 농도 상승을 억제하는 효과도 있는 것으로 분석되었다.

본 연구에서는 단위 공정별로 보리에 대한 에탄올 생산 가능성을 탐색할 수 있었으나 향후 바이오에탄올 보급을 위해서 본 연구 결과를 바탕으로 구체적이고 통합적인 연구를 통해 공정으로의 적용 가능성을 판단하고 최적화 연구의 진행이 필요할 것으로 판단된다.

#### 후 기

본 연구는 2017년 산업통상자원부 에너지기술개발사업의 지원으로 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다(‘E3급 수송용 바이오연료의 국내 적용성 향상을 위한 기술개발, No. 2016010092160).

#### References

1. S. Ture, D. Uzum, and I. E. Ture, "The potential use of sweet sorghum as a non polluting source of energy", *Energy*, Vol. 22, 1997, pp. 17-19.
2. K. L. Kadam, "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*, Vol. 75, 2002, pp. 358-362.
3. G. W. Choi, M. H. Han, and Y. Kim, "Study on Optimizing Pretreatment & Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for High-efficiency Bioethanol", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 23, 2008, pp. 276-280.
4. G. W. Choi, Y. Kim, and S. K. Moon, "Bioethanol Production using Endogenous Triticale Enzyme", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 23, 2008, pp. 504-508.
5. G. W. Choi, M. H. Han, and Y. Kim, "Development of Glucoamylase & Simultaneous Saccharification and Fermentation Process for High-yield Bioethanol", *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 23, 2008, pp. 499-503.
6. S. K. Moon, S. W. Kim, and G. W. Choi, "Simultaneous saccharification and continuous fermentation of sludge-containing mash for bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* CHFY0321", *Journal of Biotechnology*, Vol. 157, 2012, pp. 584-589.
7. G. W. Choi, H. W. Kang, Y. R. Kim, and B. W. Chung,

- “Comparison of Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* CHY1077 and *Zymomonas mobilis* CHZ2501 from Starch Feedstocks”, *Korean Chem. Eng. Res.*, Vol. 46, 2008, pp. 977-982.
8. J. Sheehan, A. Aden, K. Paustian, J. Brenner, M. Walsh, and R. Nelson, “Energy and Environmental Aspects of Using Corn Stover for Fuel Ethanol”, *Journal of Biotechnology*, Vol. 7, 2003, pp. 117-146.
  9. H. J. Jeon, B. O. Lee, K. W. Kang, J. S. Jeong, B. W. Chung, and G. W. Choi, “Production of Bioethanol by using Beverage Waste”, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 26, 2011, pp. 417-421.
  10. Y. N. Choi, “Status Biomass and Bioethanol”, *Korea Alcohol Liquor Industry Association*, 2013, pp. 31-45.
  11. D. Johnston and A. McAloon, “Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production”, *Bioresource Technology.*, Vol. 154. 2014, pp. 18-25.