

단수수 착즙액이용 배양종균의 바이오에탄올 생산 특성 연구

차영록[†] · 문윤호 · 유경단 · 이지은 · 최인성 · 송연상 · 이정보

¹농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소
(2016년 11월 15일 접수; 2016년 11월 17일 수정; 2016년 11월 18일 채택)

Characteristics of bioethanol production using sweet sorghum juice as a medium of the seed culture

Young-Lok Cha[†] · Youn-Ho Moon · Gyeong-Dan Yu · Ji-Eun Lee
In-Seung Choi · Yeon-Sang Song · Kyeong-Bo Lee

*Bioenergy Crop Research Institute, National Institute of Crop Science, RDA
199, Muan-ro, Muan, Jeonnam, 58545, Rep. of Korea*

(Received November 15, 2016; Revised November 17, 2016; Accepted November 18, 2016)

요약 : 단수수 [*Sorghum bicolor* (L)]는 당류가 풍부한 사탕수수, 사탕무와 같은 주요 바이오연료 작물 중의 하나이다. 단수수 착즙액은 단수수 줄기를 압착하여 추출하며 주요 성분은 glucose와 fructose 그리고 sucrose로 구성되어 있다. 에탄올은 효모발효공정을 통하여 단수수 착즙액으로부터 쉽게 생산할 수 있다. 단수수 착즙액은 당류 뿐만 아니라 질소나 인산과 같은 다양한 무기영양원도 함유하고 있어 종균 배지로 활용성이 높다. 상업적인 에탄올 생산 공정에서 종균배양은 중요한 발효공정 중의 하나이며 공정비용 절감을 위해 최적화된 배지가 필수적이다. 본 연구에서는 섬유질계 바이오에탄올 생산을 위한 종균의 배지로서 단수수 착즙액의 특성을 평가하였다. 단수수착즙액의 발효기질 적합성을 평가하기 위해 YPD 및 역새 당화액을 비교하여 실험하였으며, YPD배지 중 yeast extract 와 peptone은 각각 5 g/L의 농도로 사용하였다. 각각의 기질들은 당 농도가 2%, 5%, 10%가 함유되도록 제조하여 발효를 통한 균체농도를 측정하였다. 그 결과 YPD와 단수수착즙액을 배지로 사용하였을 때 발효 24시간 후에 최대 2.5×10^8 CFU/mL 이상의 균체농도를 나타내었다. 결과적으로 단수수착즙액은 12시간 발효 후에 1.0×10^8 CFU/mL 균체를 생산하여 섬유질계 바이오에탄올 생산을 위한 종균 배지로서 YPD를 대체하여 사용할 수 있음을 확인하였다.

주제어 : 단수수착즙액, 배양배지, 발효당, 발효, 섬유질계 바이오에탄올

Abstract : Sweet sorghum [*Sorghum bicolor* (L)] is one of the major crops for biofuels such as sugarcane and sugar beet which raw materials rich in saccharide. Sweet sorghum juice was extracted from the stem. It's composed of fermentable sugars such as glucose, fructose and sucrose. Ethanol from the extracted sweet sorghum juice can be easily produced by yeast fermentation process. Sweet sorghum juice is consisted of not only sugars but also various

[†]Corresponding author
(E-mail: biocha@korea.kr)

nutrients like nitrogen and phosphate. For commercial production of bioethanol, seed culture is one of the important parts of fermentation, so that optimal culture medium should be selected for the reduction of processing costs.

In this study, sweet sorghum juice was estimated as a culture medium for seed culture of cellulosic bioethanol. For the comparison of cultures with various substrates, it used YPD including each 5 g/L yeast extract and peptone, sweet sorghum juice and hydrolyzed *Miscanthus* was taken part in the culture with 2%, 5% and 10% sugar conditions. Based on media of YPD and sweet sorghum juice, cell-mass concentration was obtained maximum more than 2.5×10^8 CFU/mL after 24 h of cultivation. Consequently sweet sorghum juice is suitable for the cell culture with more than 1.0×10^8 CFU/mL after 12 h of cultivation. This can be used as a culture medium for the cellulosic bioethanol industry.

Keywords : Sweet sorghum juice, culture medium, fermentable sugar, fermentation, cellulosic bioethanol

1. 서론

전 세계적으로 지구온난화 방지를 위해 화석연료를 신재생에너지로 대체하려는 노력이 활발히 진행되고 있다[1,2]. 특히 수송용 연료를 대체할 수 있는 연료 중에서 바이오에탄올은 휘발유를 대체할 수 있으며 브라질에서는 1970년대 오일 파동 이후 사탕수수를 이용한 바이오에탄올 상용화에 성공하여 에탄올이 25%가량 함유된 휘발유를 일반적으로 사용하고 있으며 에탄올만 100% 사용하는 자동차도 상당부분 차지하고 있다[3].

바이오에너지작물로서 국내 재배가 용이하고 많은 수량을 확보할 수 있는 단수수는 C_4 작물[4]로서 당을 착즙하여 1세대 바이오에탄올 생산에 사용하고 착즙 부산물인 벼개스도 2세대 바이오에탄올 생산에 사용할 수 있어 유용하다[5].

최근 2세대 바이오에탄올 상용화를 위한 연구가 집중되고 있으며, 단수수의 경우 착즙액을 이용한 바이오에탄올 생산기술 개발[1] 뿐만 아니라 단수수 벼개스를 경제적이고 효율적으로 전처리하는 연구[6~8]와 당화 및 발효에 관한 공정기술 개발[9~10]이 많은 진전을 보이고 있다. 또한 상용화를 위한 파일럿 규모의 공정연구도 선진국을 중심으로 활발히 진행되고 있다[11,12]. 국내 바이오에탄올 상용화를 위해 선행되어야 할 단수수 연구는 바이오에너지용으로 활성이 가능한 우수한 품종을 선발하고 착즙액 및 벼개스를 이용할 수 있는 기술 개발이다. 단수수벼개스를 2세대 바이오에탄올 생산용으로 이용하기 위해서는

효율적인 전처리공정 기술 개발이 필요하며 현재 알카리 전처리[12]를 효율적으로 수행할 수 있는 최적화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[13~14].

본 연구에서는 국내 환경에서 잘 자라며 바이오매스 수량이 많은 우수 단수수 품종으로부터 착즙액을 생산하여 발효종균용 배지로 이용함으로써 1세대와 2세대를 융합한 바이오에탄올 생산기술 기반 구축에 기여하고자 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에 사용된 단수수는 농촌진흥청 국립식량과학원 바이오에너지작물연구소에서 2013년 재배된 재래 품종이며 단수수 착즙액 시료는 단수수의 잎과 종실부위를 제거한 줄기를 물리 압착형 착즙기(remark, south korea)를 이용하여 추출하였다. 추출한 착즙액은 감압농축기(전남 생물산업진흥원 식품산업연구원)를 이용하여 70brix로 농축하여 냉장(1~3°C) 보관하고 발효실험에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다.

2.2. 에탄올 발효 실험

효모균주는 (주)창해에탄올 종합기술원에서 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae* CHY1011을 사용하였으며, 종균배양은 YPD배지를 사용하여 agar plate에서 2회 계대배양하고, 액상배양은 1

차 계대배양 12시간, 2차 10시간 배양 후 에탄올 발효공정의 종균으로 사용하였다. 이때 배양조건은 33°C, 150RPM이며 배양 유효용적은 총 발효 부피의 10% 이었으며, 실제 접종량은 7% 이었다. 에탄올 생산을 위한 발효는 단수수착즙액의 발효효능을 검증하기 위해 YPD배지와 액체 당화액을 대조군으로 사용하였다. 단수수 착즙액의 농도는 glucose, fructose, sucrose를 합한 총당을 배지의 당농도로 사용하였고, YPD 조성은 yeast extract(BD, Bacto)와 peptone(BD, Bacto)을 각각 5g/L 그리고 dextrose(sigma aldrich)는 실험 조건에 따라 농도별로 사용하였다. 액체 당화액은 액체를 NaOH 수용액으로 가수분해하고 Celic CTec 2(Novozymes, Denmark)를 사용하여 당화액으로 제조하여 사용하였다[14].

발효실험에 사용한 생물반응기는 Fermentec사의 5L용 발효기와 70L 및 700L용 파일럿규모의 바이오에탄올 생산 공정 시스템을 이용하였다. 운전조건은 5L 발효기는 교반속도 150rpm, 70L 발효기는 100rpm 및 700L 발효기는 800rpm 이었으며, 모든 발효공정은 발효온도 33°C, pH 5.0으로 동일하게 조정하였다.

2.3. 당 및 에탄올 성분분석

당 함량분석을 위해서 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)를 사용하였으며, 성분분리를 위해 carbohydrate column (Waters사)을 사용하고 컬럼온도는 40°C, 이동상은 83% acetonitrile를 사용하였다. 이때 이동상의 유속은 1.4ml/min이었으며 분석데이터는 Refractor Index Detector (Water사)를 사용하여 온도 40°C에서 검출하였다.

발효를 통해 생산된 에탄올 분석은 GC-FID (Agilent 6980N)을 사용하였으며, 컬럼은 HP-Innowax 19091N-213(Agilent)이었고, 헬륨을 이동상으로 이용하여 분리하였다.

2.4. 바이오에탄올 생산 공정

본 연구에서 목표로 하는 바이오에탄올 생산 공정 시스템은 그림 1에 도식하였으며, 1세대 바이오매스인 단수수와 2세대 바이오매스인 역새를 동시에 이용하여 바이오에탄올을 사용하는 하이브리드형 생산시스템이다. 세부적으로는 1세대 바이오매스인 단수수 착즙액을 발효균주 종균배양용 배지로 이용하고 2세대 바이오매스인 역새는 알칼리 가수분해 및 효소당화를 통해 발효당을 제조하고 발효기질로 이용하는 것이다[15]. 그림 1에 나타낸 바와 같이 단수수 착즙액은 종균배양공정을 거쳐 고액분리 후 액상은 증류공정으로 이송하고 슬러리상태의 균체는 회수하여 에탄올 발효공정으로 이송되도록 구성하였다.

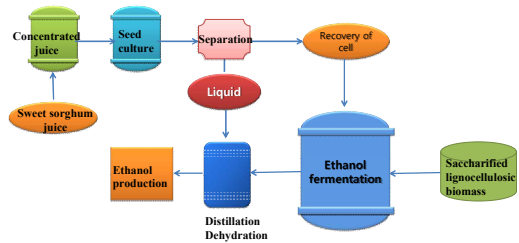


Fig.1. Hybrid fermentation process using 1th and 2nd generation biomass

3. 결과 및 고찰

3.1. 단수수 착즙액의 특성 평가

단수수 착즙액을 발효배지로 사용하기 위해 이 화학적 성분조성을 조사하였으며, Table 1에는 착즙액에 존재하는 당 및 총 질소함량 그리고 pH와 염도를 나타내었다. 총 당농도는 122.7g/L이며 이당류인 sucrose가 100g/L로 가장 많고 glucose와 fructose는 각각 11.4g/L, 11.3g/L가 함유되어 있었다. 총 질소함량은 0.05%였으며, 산도는 pH 5.0, EC는 0.7% 이었다.

Table 1. Sugars, N, pH and EC compositions of sweet sorghum juice

Composition	Glucose (g/L)	Fructose (g/L)	Sucrose (g/L)	Total Nitrogen (%)	pH	EC(%)*
Concentration	11.4	11.3	100.0	0.05	5.0	0.7

*EC : Electric conductivity(salinity)

단수수 착즙액에 함유된 이온 성분은 Table 2에서 나타낸 바와 같이 PO₄-P가 146.93 mg/L로 가장 많았으며, NO₃-N 과 NH₄⁺-N는 각각 109.63, 11.19 mg/L 이었다.

Table 2. Ionic compositions of sweet sorghum juice

Composition	PO ₄ -P	NO ₃ -N	NH ₄ ⁺ -N
Concentration (mg/L)	146.93	109.63	11.19

효모 발효를 위해서는 다량의 당류 뿐만 아니라 미량의 미네랄 영양원이 필요하여 Table 3과 같이 미네랄 성분을 조사하였다. 대표적으로 칼슘 237.46mg/kg, 인산 181.84mg/kg, 마그네슘 137.33mg/kg이 함유되어 있으며 칼륨의 경우 4,429.2mg/kg으로 가장 많이 함유되어 있었다.

일반적으로 실험실 수준의 효모배양을 할 때는 YPD 배지, 즉 dextrose를 탄소원으로 사용하고 yeast extract 와 peptone을 기타 영양원으로 이용한다. 본 연구에서는 이와 같은 YPD 배지를 대체하기 위해 먼저 단수수 착즙액의 배지 조성을 YP와 비교해 보았다. Table 4에 나타낸 YP는 각각 yeast extract(BD, Bacto) 와 peptone(BD, Bacto)이며, 발효실험에서 YP를 각각 5g/L씩을 투입하므로 이 두 영양원에 포함된 성분들을 합하여 total YP로 표시하고 단수수 착즙액과 총

질소 및 인산의 농도를 비교하였다. 배지 1L에 함유된 총 질소함량은 YP배지의 경우 1.32g/L이며, 단수수 착즙액은 0.5g/L이며, 인산 함량은 각각 0.38, 0.18g/L 였다.

3.2. 단수수 착즙액과 YPD배지를 이용한 에탄올 발효율 비교

단수수 착즙액을 배지로 이용하여 효모발효를 하였을 때 당 소비 및 에탄올 생산량이 YPD배지를 사용했을 때와 어느 정도 차이가 있는지 파악하기 위해 발효 실험을 수행하였다. 종균은 액상으로 2회 계대배양하였고, 두 번째 종균은 모두 10시간씩 배양하여 전체 발효부피의 7%를 접종하였다. 본 발효는 총 부피를 1L로 5L 용량의 생물반응기(fermentec사, FNT-ST-M05)에서 수행하였으며, 발효조건은 발효온도 33°C, pH 5.0, 교반속도 150rpm이었다. 발효시간은 48시간이었으며 발효결과는 그림 2에 나타내었다.

실험결과 당소비 패턴은 12시간 경과 후 YPD 배지를 사용하였을 때 단수수착즙액 배지보다 약간 빨랐지만, 전체적인 당 소비속도는 비슷하였으며 24시간 발효시 발효가 완료되었다. 에탄올 생산량의 경우도 48시간 발효 후 YPD배지에서는 60g/L이었고 단수수착즙액 배지에서는 59.5g/L로서 큰 차이를 보이지 않았다. 결과적으로 단수수착즙액을 배지로 사용했을 때 발효율은 85%로서 YPD배지를 사용하였을 때와 차이가 없었다.

Table 3. Mineral compositions of sweet sorghum juice

Composition	Fe	Zn	P	Ca	Mg	Na	K
Concentration (mg/kg)	5.5	1.0	181.8	237.5	137.3	13.5	4429.2

Table 4. Mineral compositions of sweet sorghum juice

Compositions	Yeast extract (5g/L)	Peptone (5g/L)	Total YP	Sweet sorghum juice
Total Nitrogen (g/L-medium)	0.55	0.77	1.32	0.50
Phosphate (g/L-medium)	0.16	0.02	0.38	0.18

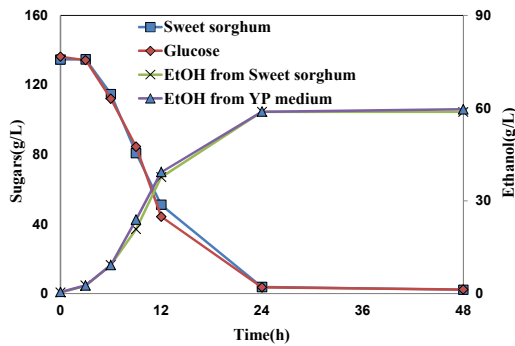


Fig. 2. Profile of sugar consumption and ethanol production

3.3 발효 기질의 종류별 발효균주의 균체 농도 비교

본 연구에는 YPD배지와 단수수 착즙액 및 익새 당화액을 영양원으로 배양하였을 때 균체의 농도를 당 농도 2, 5, 10% 조건에서 비교하였다.

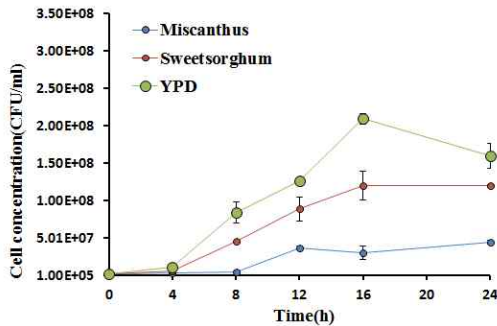


Fig. 3. Yeast culture with 2% of sugar concentration

그림 3~5는 당농도 2, 5, 10% 일 때 배지별 발효시간에 따른 균체 농도를 나타낸 것이다. 그림 3에 나타낸 바와 같이 YPD배지와 단수수 착즙액은 발효 16시간 경과 후 균체 농도가 각각 1.5×10^8 CFU/mL과 1.0×10^8 CFU/mL이었지만 익새 당화액의 경우는 5.0×10^7 CFU/mL을 넘지 못하였다. 당농도가 5% 일 때는 YPD배지가 가장 빠른 속도로 균체농도가 증가하였고 단수수착즙액은 천천히 증가하였지만 발효 24시간 후에는 균체농도가 2.5×10^8 CFU/mL으로 동일한 수준임을 확인 할 수 있었다(그림 4). 그러나 익새 당화액의 경우는 당농도 2% 일 때와 같이 5.0×10^7 CFU/mL을 넘지 못하였다. 당농도가 10%

일 때는 YPD 배지의 균체농도는 3.0×10^9 CFU/mL 까지 증가하였으며 단수수 착즙액은 1.3×10^9 CFU/mL 정도로서 YPD배지보다는 낮았지만 에탄올 발효의 종균배지로는 충분한 균체 농도를 나타내었다.

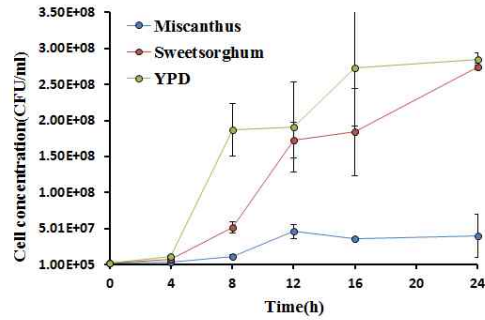


Fig. 4. Yeast culture with 5% of sugar concentration

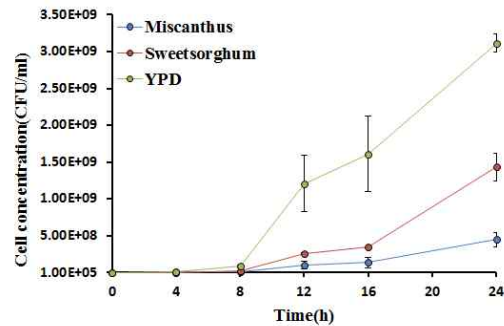


Fig. 5. Yeast culture with 10% of sugar concentration

결론적으로 당농도별 및 배지 종류별 균체농도는 단수수 착즙액의 경우 당농도 5% 이상, 배양 시간 12시간 이상이면 에탄올 발효에 필요한 균체농도 1.0×10^8 CFU/mL 이상을 획득할 수 있어 종균배지로 사용이 가능함을 확인하였다. 특히 익새 당화액의 경우 종균배지로 사용하려면 배양 시간이 24시간 이상 필요하며 장시간의 체류시간으로 인해 균주의 활성이 떨어지고 사멸하기 때문에 종균으로 사용하기에 적합하지 못하였다.

3.4 파일럿 규모의 에탄올 발효

2세대 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 발효에 필요한 영양원으로 발효당과 발효종균이 중요

한 역할을 한다. 일반적으로 발효종균은 총 발효 부피의 5~10%를 접종하기 때문에 상업적인 규모에서는 종균배양에 필요한 배지도 대용량에 해당한다. 전통적으로 옥수수과 같은 1세대 바이오에탄올은 전분 당화 후 발효공정을 통해 에탄올을 생산할 수 있지만 역새와 같은 바이오매스로 2세대 바이오에탄올을 생산하기 위해서는 바이오매스를 가수분해 및 효소당화를 통해 발효당을 만들어야 한다. 이렇게 만든 발효당은 미생물 발효를 저해하는 유기산 등으로 인해 발효효율이 낮은 편이다. 단수수착즙액을 종균배양의 배지로 사용하여 700L 발효조에서 발효 유효부피 300L 규모에서 실험한 결과를 그림 6에 나타내었다. 그림 6의 A는 단수수착즙액을 종균배양 배지로 사용한 것이고 B는 YPD를 배지로 사용한 발효 결과이다. 발효 36시간이 경과될 때까지 당 소비 및 에탄올 생산량이 YPD배지가 우수하였으나, 발효 48시간에서는 동등한 수준의 에탄올 생산량을 나타내었다.

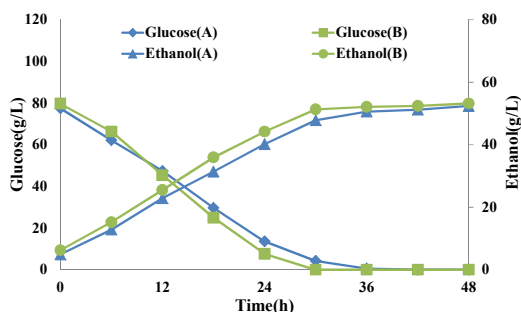


Fig. 6. Ethanol fermentation with seed culture including sweet sorghum(A) and YPD(B) at the pilot scale fermentation system

결론적으로 단수수착즙액을 발효종균으로 사용함으로써 종균배양을 위한 배지가격을 효과적으로 낮출 수 있으며, 동시에 1세대 바이오에탄올 원료인 단수수와 2세대 바이오매스를 혼합한 형태의 공정을 구성할 수 있음을 확인하였다.

4. 결론

단수수착즙액을 효모발효의 배지로 사용하기 위해서 당성분 및 무기영양원을 분석한 결과 당

성분은 glucose, fructose, sucrose를 모두 합하여 평균적으로 120g/L이상이었으며, 무기영양원의 함량은 실험실 수준에서 사용하는 yeast extract(5g/L) 와 peptone(5g/L) 보다는 적었지만 효모발효결과 발효율 85% 이상으로 YP를 대체할 수 있음을 확인하였다. 또한 균체농도는 단수수 착즙액의 당농도가 5% 일 때, 배양 12시간 후 균체농도가 1.0×10^8 CFU/mL 이상으로 에탄올 발효를 위한 배지로서 사용하기에 충분한 조건임을 파악하였다. 실제로 700리터 파일럿규모의 발효조에서 역새 당화액을 이용하여 발효를 실시하였으며 이때 효모종균 배양은 단수수착즙액을 배지로 사용하였을 때 YPD 배지와 동등한 수준의 발효 결과를 얻을 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 연구사업(과제번호: PJ00929803)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

1. R. Liu, J. Li, and Fei Shen, Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation, *Renew. Energy*, **33**, 1130-1135(2008).
2. Y. L. Zhao, A. Dolat, Y. Steinberger, X. Wang, A. Osman, and G. H. Xie, Biomass yield and changes in chemical composition of sweet sorghum cultivars grown for biofuel, *Field Crop. Res.*, **111**, 55-64(2009).
3. J. H. Lee, and H. J. Rheem, Overview of the Bioethanol and Gasohol as a Fuel for Vehicle, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **29(3)**, 516-530(2012).
4. E. Billa, D. P. Koullas, B. Monties, and E. G. Koukios, Structure and composition of sweet sorghum stalk components, *Ind. Crop. Prod.*, **6**, 297-302(1997).
5. B. Z. Li, V. Balan, Y. J. Yuan, and B. E. Dale, Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to

- ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment, *Bioresour. Technol.*, **101**, 1285–1292(2010).
6. B. Sipos, J. Reczey, Z. Somorai, Z. Kadar, D. Dienes, and K. Reczey, Sweet Sorghum as Feedstock for Ethanol Production: Enzymatic Hydrolysis of Steam-Pretreated Bagasse, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **153**, 151–162(2009).
 7. J. Yu, T. Zhang, J. Zhong, X. Zhang, and T. Tan, Biorefinery of sweet sorghum stem, *Biotechnol. Adv.*, **30**, 811–816(2012).
 8. J. Li, S. Li, B. Han, M. Yu, G. Li, and Y. Jiang, A novel cost-effective technology to convert sucrose and homocelluloses in sweet sorghum stalks into ethanol, *Biotechnol. Biofuels*, **6**, 174(2013).
 9. L. Laopaiboon, P. Thanonkeo, P. Jaisil, and P. Laopaiboon, Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 1497–1501(2007).
 10. I. Dogaris, S. Karapati, D. Mamma, E. Kalogeris, and D. Kekos, Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production, *Bioresour. Technol.*, **100**, 6543–6549(2009).
 11. B. Andrzejewski, G. Eggleston, R. Powell, Pilot Plant clarification of sweet sorghum juice and evaporation of raw and clarified juices, *Ind. Crop. Prod.*, **49**, 648–658 (2013).
 12. J. H. Lee, J. k. Kim, E. S. Yim, C. S. Chung, and H. J. Rheem, Overview of the Biomass as a Renewable Energy, *J. Korean Oil Chem. Soc.*, **29(4)**, 638–652(2012).
 13. D. A. Salvi, G. M. Aita, D. Robert, and V. Bazan, Ethanol production from sorghum by a dilute ammonia pretreatment, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 27–34(2010).
 14. M. Wang, J. Wang, J.X. Tan, J.F. Sun, and J.L. Mou, Optimization of Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice Using Response Surface Methodology, *Energy Sources Part A-Recovery Util. Environ. Eff.*, **33**, 1139–1146(2011).
 15. X. Mei, R. Liu, F. Shen, and H. Wu, Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Ethanol from Stalk Juice of Sweet Sorghum by Immobilized Yeast Using Response Surface Methodology, *Energy Fuels*, **23(1)**, 487–491(2009).
 16. Y. L. Cha, J. W. Yang, Y. R. Park, G. H. An, J. W. Ahn, Y. H. Moon, Y. M. Yoon, G. D. You, I. H. Choi, Continuous alkaline pretreatment of *Miscanthus sacchariflorus* using a bench-scale single screw reactor, *Bioresour. Technol.*, **181**, 338–344(2015).
 17. Y. L. Cha, J. W. Yang, S. I. Seo, G. H. An, Y. H. Moon, G. D. You, J. E. Lee, J. W. Ahn, K. B. Lee, Alkaline twin-screw extrusion pretreatment of *Miscanthus* with recycled black liquor at the pilot scale, *Fuel*, **164**, 322–328(2016).