

## 無蒸煮熟분법에 의한 알코올生産

朴官和 · 吳秉夏 · 洪承緒 · 李啓瑚

서울大學校 農科大學 食品工學科

(1984년 9월 3일 수리)

### Production of Alcohol from Starch without Cooking

Kwan-Hwa Park, Byung-Ha Oh, Seung-Suh Hong and Ke-Ho Lee

Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Seoul National Univ.,  
Suwon, Korea

#### Abstract

Ethanol fermentation of chemically gelatinized starch and uncooked raw starch was tested with various starchy materials.

Starches were gelatinized by 5.4% NaOH and neutralized by sulfuric acid. The patterns of CO<sub>2</sub> evolving and the ethanol yield for the chemically gelatinized starch resemble those obtained with thermally gelatinized starch.

The alcoholic fermentation of raw starch was carried out by the simultaneous saccharification-fermentation using a commercial glucoamylase and yeast. Ethanol yield from uncooked rice starch fermentation was highly comparable to that from cooked one. CO<sub>2</sub> evolving rates of the uncooked starches of corn, barley, tapioca and sweet potato were lower than those of the cooked starches. However, the final ethanol yields were similar or slightly lower, depending on the types of starch.

#### 서 론

Biomass로부터 알코올을 생산하는 데에는 섬유소물질과 전분질물질을 원료로 이용하게 되는데 섬유소물질은 효소작용을 받기가 어려워 알코올 수득률이 낮으므로 이용이 어려운 편이다.

그러나 전분질은 amylase 및 glucoamylase의 작용에 의하여 glucose로의 전환이 용이하다.

전분을 발효시켜 에탄올을 생산하는 공정은 전

분의 증자, 액화, 당화 및 발효등으로 구분되는데 이중 전분의 증자는 전분을 열에 의하여 호화시켜 액화 및 당화효소의 작용을 용이하게 하는 공정으로 막대한 에너지가 필요하며 알코올 생산에 드는 총 에너지의 30%를 차지한다.

이와같이 증자에 소비되는 에너지를 절약하기 위하여 여러가지 방법이 연구되고 있다.

전분은 가열 이외에도 상온에서 알칼리용액이나 formic acid, dimethyl sulfoxide등과 같은 화학제를 가하면 호화된다는 사실이 알려져 있다.<sup>1,2,3)</sup>

\* 이 논문은 韓國學術振興財團의 1984년도 연구비지원에 의해 연구되었음.

Leach<sup>4)</sup>는 생전분의 호화정도가 물, 알칼리, 및 전분의양에 의해 좌우되며 전분입자당 흡수되는 알칼리양이 어느 한계량에 도달하면 호화가 일어나며 이때의 농도를 임계 알칼리농도라고 하였다. 또한 감자, 옥수수등 전분의 종류에 따라 임계 알칼리농도는 다르다고 보고하였다. 전분의 알칼리 호화기작에 대해서도 많은 연구<sup>5),6)</sup>가 진행되고 있으나 전분질을 알칼리로 호화시킨 후 에탄올을 생산하는 방법에 대하여는 일부에서만 보고되어 있고<sup>7)</sup> 사용된 원료전분도 극히 제한되어 있다.

한편 생전분을 호화시키지 않고 효소를 이용하여 직접 당화하여 에탄올을 생산하는 방법이 연구되고 있다. Ueda<sup>8),9),10),12)</sup> 등은 Rhizopus가 생산하는 glucoamylase가 생전분을 분해하여 glucose로 전환시키는데 유리하며 곡물전분이 구경(球莖)전분보다 쉽게 당화된다고 보고하였다. 배 무등<sup>13)</sup>은 Aspergillus shirousami가 분비하는 당화효소를 이용하여 cassava생전분으로 부터 에탄올생산의 가능성에 대하여 연구하였다. 또한 쌀, 고구마, 타피오카질의 생전분에 산을 처리한 후 효소를 작용시켜 증자 전분질의 당화율보다 높은 당화율을 얻었다<sup>14)</sup>. 그러나 생전분에서 효소를 이용한 에탄올의 생산에는 전분의 종류에 따라 그 수율이 달라질 것으로 예상되며 이들에 대한 체계적인 연구가 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 쌀, 보리, 감자, 고구마, 타피오카등의 전분을 알칼리호화시킨 후 에탄올 생산가능성을 연구하고 또한 당화효소를 생전분에 직접 처리하여 에탄올을 생산하므로써 증자과정을 생략하는 공정을 연구하고 전분의 종류에 따른 본 방법의 가능성을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 시약

감자전분은 和光會社(일본), 옥수수전분과 고구마전분은 신일포도당(주)제조전분을 사용하였고 타피오카전분은 정제전분 또는 국내 주정공장에서 사용되는 칩을 60메쉬이하로 분쇄하였고 쌀과 보리전분은 시장에서 구입하여 60메쉬이하로 분쇄하여 사용하였다.

$\alpha$ -amylase, glucoamylase 및 pullulanase는 NOVO회사 (Denmark)제품 Termamyl 120L, AMG 300L 및 Promozyme 500L등을 각각 사용하였다.

효모는 Saccharomyces cerevisiae IFO 7056을 사

용했다.

### 2. 효소역가 측정

1% 감자전분 1ml에 효소액 1ml를 가하고 40°C에서 10분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 glucose-DNS 방법<sup>15)</sup>으로 측정하였다. 효소역가 1unit는 반응액 1ml당 1분간에 1mg의 포도당을 생성하는 효소량으로 정했다.

### 3. 전분의 액화 및 당화

#### 가) 가열호화

① 화학적 호화법의 비교구로 적용한 가열호화는 적당량의 전분을 0.05M phosphate buffer (pH 6.0)에 넣고  $\alpha$ -amylase 36 units를 첨가하여 95°C에서 10분간 호화 및 액화를 동시에 행하였다. 당화는 액화액을 45°C로 냉각시킨 후 45units의 glucoamylase를 가하여 3시간동안 처리하였다.

② 효소법에서 비교구로 이용한 전분의 가열액화는 일정량의 전분에 0.1M acetate buffer (pH 4.0) 10ml와 증류수 35ml를 가하여 전분현탁액을 만든 다음  $\alpha$ -amylase 0.3ml를 첨가하고 95°C에서 10분간 호화 및 액화를 행하였다.

#### 나) 알칼리호화

적당량의 전분에 0.45M NaOH용액을 가하고 교반하면서 상온에서 호화시키고 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액과 0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액을 사용하여 중화시켰다. 최종농도를 가열호화와 동일하게 한 다음 60°C에서  $\alpha$ -amylase를 넣고 30분간 액화시킨 후 45°C에서 3시간 당화시켰다.

### 4. 에탄올 발효

#### 가) 화학적 호화법

MY배지에서 24시간 배양시킨 효모를 당화액에 10%(v/v)접종하고 30°C에서 발효를 행하였다. 감자, 옥수수 및 고구마전분의 경우에는 효모추출액 및 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 각각 0.1g씩 추가로 첨가하고 발효를 행하였다.

#### 나) 효소법

생전분액 45ml에 효모생육용으로 효모추출액 0.1g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1g을 첨가한 후 glucoamylase 0.1ml 및 MY배지에서 24시간 배양한 효모 5ml를 첨가하고 30°C에서 당화 및 발효를 동시에 행하였으며 수시로 교반하였다. 대조구로는 액화가 끝난 전분액을 생전분액과 동량 사용하였다.

5. 에탄올 정량 및 CO<sub>2</sub>발생량 측정

AOAC Dichromate Oxidation방법<sup>16)</sup>에 따라 에탄올 정량을 행하였고 CO<sub>2</sub>발생량은 Warburg's manometer와 발효관을 써서 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 화학적 소화

1) NaOH농도에 따른 소화정도

1% 전분현탁액 (pH 5.0)에 NaOH의 농도를 달리하여 처리한 후 glucoamylase에 의한 분해속도를 측정하였다. Fig. 1에서와 같이 농도 0.01M까지는 생전분 분해속도와 비슷하여 전혀 호화가 일어나지 않음을 알 수 있었고 0.2M이상에서는 가열호화된 전분과 반응속도가 비슷하였다.

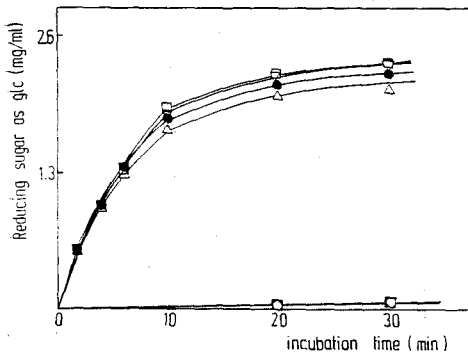


Fig. 1. Influence of NaOH concentration on gelatinization of starch. The degree of gelatinization was measured by enzymatic hydrolysis rate.

○—○ raw starch: ●—● gelatinized by heat: ■—■ gelatinized by 0.04M NaOH:  
 △—△ gelatinized by 0.10M NaOH:  
 □—□ gelatinized by 0.13 NaOH: ▽—▽ gelatinized by 0.20 NaOH

즉 NaOH의 농도가 일정량에 이른 후에 전분의 호화가 일어남을 시사하고 있다. 이는 Leach등에 의한 일계 알칼리농도가 존재한다는 보고와 잘 일치하고 있다<sup>4)</sup>.

2) 중화생성물(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)의 영향

전분을 NaOH로 호화시킨 후 중화시키면 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 생성되므로 이에 의한 효소의 저해작용 여부를 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 α-amylase는 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>농도 12%까지 반응속도에 영향을 받지

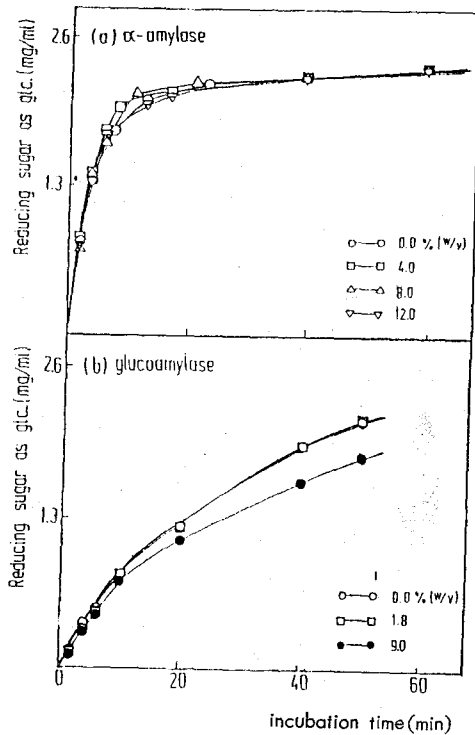


Fig. 2. Effect of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on the enzyme activity

않았고 glucoamylase는 9.1% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에서 약간의 저해를 받았다.

본 실험과 같은 조건에서는 약 2%의 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 생성되므로 효소의 반응에서는 전혀 영향을 받지 않는 것으로 생각된다.

한편 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 효모의 발효능에 미치는 영향을 보기위하여 1%의 glucose용액에 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도를 달리하여 첨가하고 효모의 발효능을 CO<sub>2</sub>의 발생량으로 비교하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 8.0%

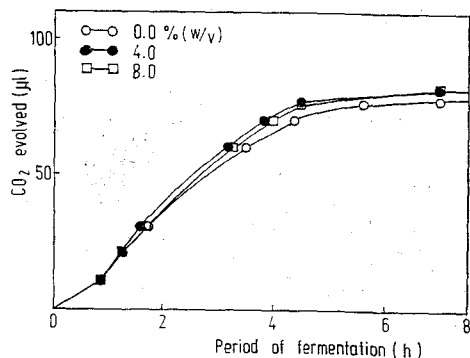


Fig. 3. Effect of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on ethanol fermentability of yeast

**Table 1.** Comparison of alcoholic fermentation between chemical and thermal gelatinization

Starchy material	CO <sub>2</sub> evolved (g)		Ethanol content(%, v/v)		Ethanol yield(%)	
	NaOH <sup>a</sup>	heat <sup>b</sup>	NaOH	heat	NaOH	heat
potato	4.96	4.96	12.45	12.35	84	84
corn	4.04	4.23	9.25	9.56	85	89
rice	4.43	4.42	10.90	10.75	—	—
barley	4.29	4.29	9.60	9.60	—	—
tapioca	4.37	4.39	10.10	10.15	—	—
sweet potato	4.35	4.33	9.98	9.91	—	—

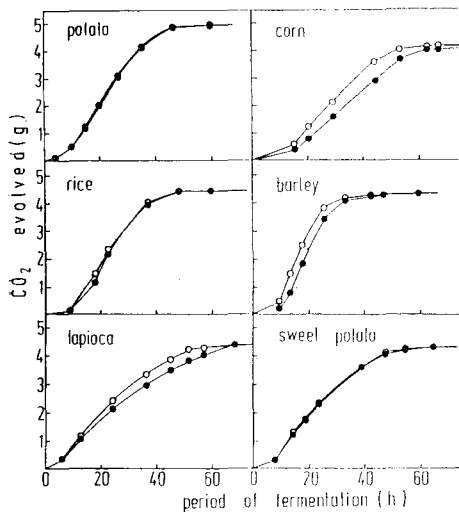
a. starch was gelatinized by NaOH solution

b. starch was gelatinized by heating

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>농도까지 효모발효능의 저해가 없음을 알 수 있다.

3) 전분질의 에탄올 생산성

각종 전분을 알칼리로 호화시킨 후 발효시켜 CO<sub>2</sub>의 발생량을 시간별로 측정하고 가열호화한 방법과 비교하여 Fig. 4에 나타내었으며 최종 에탄올함량을 정량한 결과는 Table 1에 수록하였다.



**Fig. 4.** Alcohol fermentation of starchy materials.

○—○ simultaneously cooked and liquefied at 95°C

●—● gelatinized by NaOH

감자전분의 CO<sub>2</sub>발생량은 초기부터 60시간 발효되는 동안 거의 동일하였다. 감자전분 이외에 이와 유사한 경향을 보이는 전분은 쌀 및 고구마전분으로 CO<sub>2</sub>발생속도와 최종 CO<sub>2</sub>발생량이 가열호화전분의 경우와 일치하였다. 위의 사실로 미루어 보아 알칼리호화에 에탄올발효에 사용되지 못하는 전분중간생성물은 생성되지 않는 것으로 생각된다.

옥수수전분은 가열호화전분에 비하여 CO<sub>2</sub>의 발생속도도 현저히 떨어지고 최종 CO<sub>2</sub>발생량도 적다. 타피오카 및 보리전분은 CO<sub>2</sub>발생속도는 약간 떨어지나 최종 CO<sub>2</sub>발생량은 거의 일치하고 있다.

이와같이 전분의 종류에 따라 다른 경향을 보이는 것은 상온에서 호화된 후 중화시킬 때 일어나는 노화현상때문이라고 여겨진다. 즉 amylose의 함량이 높은 옥수수전분은 노화속도가 빠르므로 호화시킨 후 중화과정에서 호화된 전분이 노화되면서 효소의 작용을 불리하게 한다고 생각된다. 반면 amylose 함량이 비교적 높지않은 전분의 경우에는 노화정도가 심하지 않아 효소의 작용을 용이하게 받기 때문에 CO<sub>2</sub>의 발생 속도가 비슷하다고 생각된다.

2. 효소에 의한 생전분 분해

생전분으로 부터 에탄올을 직접 생산하기 위하여 20% 농도의 생전분을 동시에 당화 및 발효시키면서 CO<sub>2</sub>발생량을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Table 2에는 최종 CO<sub>2</sub>발생량과 에탄올함량을 수록하였다. 옥수수전분에서는 생전분의 발효속도가 현저히 느리고 최종 에탄올함량도 8.5%로 호화시킨 전분(10.52%)에 비하여 발효율이 떨어졌다. 또한 타피오카, 보리 및 고구마전분에서는 초기의 발효속도는 늦으나 최종 CO<sub>2</sub>발생량 및 에탄올함량은 8.44%~10.43%로 가열호화시킨 전분에 접근하고 있다. 그러나 쌀전분의 경우에는 초기의 발효속도도 거의 비슷하며 45시간 이후에는 CO<sub>2</sub>생성량이 가열호화시킨 전분과 동일하며 최종 에탄올함량도 10.41%로 거의 같음을 알 수 있다.

생전분 분해 및 발효에 영향을 미치는 인자는 효소제의 종류<sup>8,17)</sup> 및 원료전분의 종류<sup>18)</sup> 즉 구조적인 차이라고 알려져 있다. 전분입자가 작을 수록

Table 2. Comparison of alcoholic fermentation between cooked and uncooked starch

Starchy material	CO <sub>2</sub> evolved(g)		Ethanol content(% v/v)		Ethanol yield(%)	
	cooked <sup>a</sup>	uncooked <sup>b</sup>	cooked	uncooked	cooked	uncooked
rice	4.72	4.72	10.35	10.41	—	—
barley	4.09	3.94	9.17	8.44	—	—
corn	4.95	3.71	10.52	8.50	93.2	69.9
tapioca	5.01	4.68	10.51	10.35	94.4	88.1
potato	5.00	2.34	10.72	6.27	—	—
sweet potato	4.70	4.52	10.57	10.43	—	—

a. starch was liquefied by heat and  $\alpha$ -amylase

b. uncooked starch was itself used

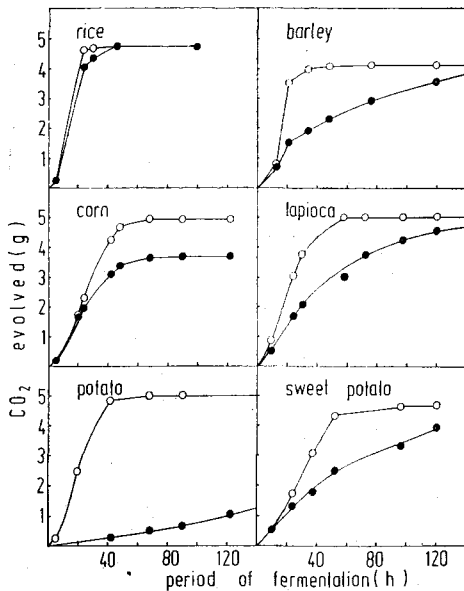


Fig. 5. Alcohol fermentation of starchy materials

○—○ simultaneously cooked and liquefied at 95°C  
●—● uncooked

발효율이 높고 모양은 다각형 (polygonal)의 것이 매끈한 면을 가진 원형의 것보다 효율적으로 당화 및 발효된다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서 나타난 전분간의 발효율 차이는 전분입자의 크기와 모양의 차이에 의한 것으로 보인다.

Akiyama<sup>19)</sup> 등은 쌀의 생전분으로 부터 청주를 제조할 수 있는 가능성을 제시하였는데 청주제조과정중에 쌀전분의 효소적 분해가 양호하다고 보고하였다. 이는 본 실험에서 얻은 결과와 잘 일치하고 있으나 실제 청주제조에 응용하기 위해서는 잡

균의 오염문제, 효과적인 효소제의 조합등 해결해야 할 문제들이 남아있다.

Ueda 등은 생옥수수전분의 발효율이 호화옥수수전분에 비하여 떨어진다고 밝혔는데 이는 본 실험의 경우와 유사한 결과이다. 감자전분은 생전분의 발효정도가 현저히 저하되고 있는데 이는 앞에서 설명한 전분의 구조적인 차이 이외에 다른 전분에 비해 다량으로 존재한다고 알려져 있는 인산염에 의해 효소작용이 입체적 장애를 받기 때문인 것으로 생각된다. 전분의 구조와 호화와의 관계 및 전분분해효소의 작용을 종합적으로 연구한다면 증가 없이도 전분의 발효율을 상당한 수준까지 높일 수 있을 것으로 기대된다.

쌀 및 보리와 같은 곡류전분에서는 생전분의 효소적인 분해, 감자 및 옥수수전분등에 있어서는 알칼리처리와 중화과정중의 노화방지에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다. 그의 쌀, 보리와 같은 곡류전분은 생전분을 효소로 당화시킬 때의 합리적인 공정등의 개선책이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

열에 의한 호화전분을 사용하는 에탄올 발효공정에서 증가과정을 생략하기 위한 방법으로 알칼리호화 및 생전분으로 부터 직접 발효시키는 가능성을 여러가지 전분종류에 따라 검토하였다.

5.4% NaOH를 사용하여 전분을 호화시키고 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>용액을 사용하여 중화시켰다. 이어 상법에 따라 에탄올 발효를 시킨 결과 CO<sub>2</sub>발생속도에 있어서는 화학적 호화방법에 비해 약간 떨어지나 최종 에탄올함량은 동일하였다.

한편 생전분에 당화효소와 효모를 첨가하고 동시 당화, 발효시켰을때 쌀의 생전분은 가열화회시킨 전분과 CO<sub>2</sub>생성속도 및 최종 에탄올함량이 거의 비슷하였다. 옥수수, 보리, 타피오카 및 고구마등의 생전분은 초기의 CO<sub>2</sub>생성속도가 늦었고 발효종료에 걸리는 시간은 길었으나 최종 에탄올함량은 종류에 따라 비슷하거나 약간 떨어졌다. 감자생전분은 분해, 발효시 초기의 CO<sub>2</sub>발생속도와 발효율이 현저히 낮았다.

참 고 문 헌

1. Chua, J.W. and Fukui N.: J. Ferment. Technol., 62 : 123(1984).
2. Ueda, S. and Koba, Y.: J. Ferment. Technol., 58 : 237(1980).
3. Ueda, S. and Zenin, C.T., Monteiro, D.A., Park, Y.K.: Biotechnol. Bioeng., 23 : 291(1981).
4. Leach, H.W., Schoch, T.J. and Chessman, E.F.: Stärke, 13 : 200(1961).
5. Oosten, B.J. and Roosendaal: Starch/Stärke, 34 : 233(1982).
6. Oosten, B.J. and Breda: Starch/Stärke, 31 : 228(1979).
7. 秋山裕一 · 態谷知營子 : 日特許公報. 昭57 : 12990(1982)
8. Saha, B.C. and Ueda, S.: J. Ferment. Technol., 61 : 67(1983).
9. Tsujisaka, Y. and Fukumoto, J.: Nature, 181 : 770(1958).
10. Nishi, K.: Proc. Symb. on Amylase: p. 33(1969).
11. Ueda, S. and Kano, S.: Stärke, 27 : 123(1975)
12. Takahashi, T., Tsuchida, Y. and Irie, M.: J. Biochem., 84 : 1183(1978).
13. 裴武 · 李在汶 : 韓國産業微生物學會誌, 11 : 181(1983).
14. 이상열 · 신용철 · 이석희 · 박성숙 · 김형수 · 변시명 : 주류공업, 4 : 19(1984).
15. Miller, G.L.: Anal. Chem., 13 : 426(1959).
16. Horwitz, W. (ed): Official method of Analysis, 13th ed. Association of Official Chemists, Washington, D.C. (1980).
17. Ueda, S. and Saha, B.C.: Stärke, 32 : 420(1980).
18. 不破英次 : 澱粉科學, 29 : 99(1982).
19. 秋山裕一 : 澱粉科學, 29 : 85(1982).