

고온·고압하에서 압출시킨 Tapioca 전분을 이용한 알코올 발효법에 관한 연구

문항식·권호정·오평수*

태평양화학(주) 기술연구소 발효공학 연구실

Studies on the Alcohol Fermentation with Extruded Tapioca Starch

Moon, Hang-Sik, Ho-Joeng Kwon and Pyong-Su O*

Department of Fermentation Technology, Pacific R/D center, Suwon 449-900, Korea

Several methods to produce ethanol from tapioca starch were examined. Among four methods tested, alcohol fermentation with extruded tapioca starch was the most effective, which alcohol yield was 460.5l/ton. After 69hours reaction with *Rhizopus* sp. glucoamylase, 108.7mg/ml of reducing sugar were produced from extruded tapioca and 43.8mg/ml from raw tapioca starch. In alcohol fermentation with extruded tapioca, the high concentration of alcohol at early stage prevented bacterial contamination and the fermentation rate was increased due to the high saccharifying power of glucoamylase on the extruded starch, but extrusion temperature had no influence on the fermentability. Scanning electron microscopy showed that the extrusion process changed the structure of tapioca starch granule to more susceptible form to glucoamylase attack than the raw starch. And glucoamylase of *Rhizopus* sp. had stronger digestion activity on both extruded tapioca and raw tapioca starch than that of *Aspergillus usamii*.

서 론

전분질 원료를 사용하여 alcohol을 생산하기 위해서 현재까지는 멸균에 의한 오염방지과 전분입자에 액화 및 당화 효소의 작용을 용이하게 하기 위한 증자 공정이 선행되고 있다. 하지만 이는 energy가 많이 소모되고, 증자 과정중 비발효성 당이 생성되며(1), 신분의 호화에 의한 부피증가로 인해 고농도의 사입이 어려우므로(2) 근자에는 무증자법에 의한 alcohol 발효에 관한 연구가 활발히 진행 중이다(1~7). 그러나 무증자 alcohol 발효는 당화 속도가 느리고 당화 수율도 낮을 뿐 아니라 멸균과정이 생략되므로 오염문제에 대한 대책 등이 강구되어야 한다(2).

전분질 원료를 증자하지 않고 ethanol을 생산하기 위해서는 생전분을 효율적으로 분해할 수 있는 glucoamylase가 있어야 하는데 이를 생산하는 미생은 미흡할 뿐만 아니라 쌀보리나(2, 4) 옥수수(1)

Rhizopus niveus(10), *Rhizopus* sp.(15), *Endomycopsis fibuligera*(5) 등이 알려져 있으며 이들이 분비하는 효소를 사용하여 전분질 원료로서 쌀보리를(2, 4) 비롯한 옥수수(1), 고구마(5, 10, 11), 쌀(9), sorghum(6) 등을 재료로 하여 무증자 alcohol 발효에 성공한 것으로 보고되었다. 그러나 국내에서 alcohol 생산을 위해 쌀보리와 더불어 주정 원료로 많이 사용되는 tapioca를 이용한 alcohol 발효에 관한 연구물로는 *Aspergillus niger*(8), *Rhizopus oryzae*(9), 와 같은 곡류전분과는 달리 tapioca를 이용한 무증자 alcohol 발효는 증자에 비해 오히려 수율이 더 낮았다. 따라서 본 연구에서는 tapioca를 이용한 alcohol 발효에 있어서 적절한 glucoamylase를 선정함과 아울러 증자에 필요한 고energy를 소모하지 않고 발효 속도와 alcohol 수율을 증대시키기 위한 전처리 방법으로 고온 고압하에서 전분입자의 구조변형을 일으키는 extrusion(12, 13) 과정을 도입하였다. 즉,

Key words: Extruded tapioca starch, *Rhizopus* sp., glucoamylase

*Corresponding author

extrusion 과정을 거친 extruded tapioca를 이용한 alcohol 발효와 생tapioca의 증자 및 무증자 alcohol 발효를 비교하고 이들을 효율적으로 당화시키는 효소를 선정함으로써 tapioca 전분질 원료를 이용한 최적의 alcohol 발효방법을 모색하였다.

재료 및 방법

전분질 원료

현재 주정공장에서 사용중인 분쇄한 tapioca chip을 사용하였으며 이를 고려대학교 식품공학과 식품재료공학 실험실에서 extrusion하여 그 extrudate를 마쇄하지 않고 실험에 사용하였다. 이때 사용한 extruder 및 작동 조건은 Table 1에 나타내었다.

사용 효소

액화 효소는 Termamyl 120 L(Novo Industrias, Denmark)과 *Bacillus subtilis*에서 생산된 α -amylase를 사용하였고 당화 효소는 본 연구실에서 분리, 보관 중인 *Rhizopus* sp.와 *Aspergillus usamii*에서 생산된 glucoamylase를 사용하였으며 이들 glucoamylase의 activity는 오 등의(4) 방법으로 측정하였을 때 각각 15,000 units/g, 49,000 units/g 이었다.

전분의 효소분해

생 tapioca chip 50g 과 tapioca chip extrudate (extruded at 120°C) 50g에 각각 증류수 300 ml를 가하고 *Rhizopus* sp. 또는 *Aspergillus usamii*의 glucoamylase 10 ml (2,250 units)씩 첨가한 후 오염 방지를 위해 toluene 1 ml와 80% benzalkonium chloride 0.4 ml를 넣고 30°C에서 반응시켰다. 경과

Table 1. Composition of tapioca used for alcohol fermentation and operating conditions for extrusion processing of tapioca

Starch content of tapioca: 67.5%
Initial moisture content of tapioca: 12-14%
Size of tapioca: 10-20 mesh
Extruder: High shear cooking extruder with single screw*
Feed rate: 200 g/min
Screw rotation rate: 120 rpm
Barrel temperature: 80-135°C

*The extruder was manufactured by Department of Food Technology, Korea University

시간 별로 약 10 ml씩 취하여 Whatman No.2로 여과한 후 여액의 환원당을 DNS법으로(14) 측정함으로써 반응시간에 따른 전분 분해력을 비교하였다.

전분입자의 성상

생tapioca chip과 extrudate의 전분입자는 scanning electron microscope를 사용하여 효소반응 시간에 따른 입자구조의 변화를 비교, 관찰하였다.

효모

*Saccharomyces cerevisiae*를 malt extract broth에 접종하여 30°C에서 20~24 시간 진탕배양(120 strokes/min)하였다. 배양 후 균수는 Thoma haemocytometer를 이용하여 측정된 결과 2~4×10⁸/ ml였다.

증자, 무증자 및 저온 증자법에 의한 alcohol 발효

증자법에 의한 alcohol 발효는 원료로서 tapioca chip을 사용하고 yeast 사용량이 40 ml인 것을 제외하고는 오 등의(4) 방법과 동일한 방법으로 실시하였다. 발효 후의 alcohol 함량은 내용물을 증류하여 alcoholic hydrometer로 측정하였다. 무증자 전분의 alcohol 발효는 증자와는 달리 당화 및 발효를 단일 과정으로 진행하였으며 그 과정은 Fig.1에 도식화하였다. 저온 증자는 전처리 과정에서 황산으로 pH를 조절하는 것을 생략하고 *Bacillus subtilis* α -amylase 5 ml (2,400 units)를 첨가하여 70°C에서 1시간 액화시킨 것 이외에는 무증자의 경우와 동일한 방법으로 실시하였다.

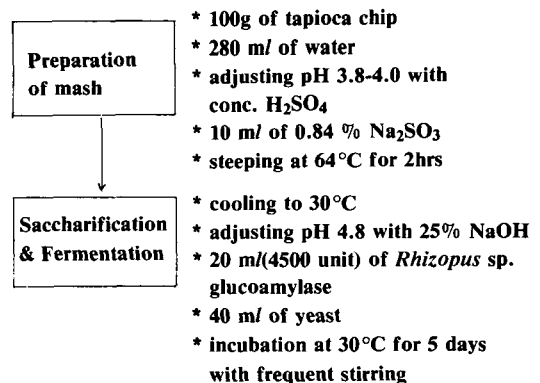


Fig. 1. Schematic diagram for the alcohol fermentation of tapioca chip without cooking

Extruded tapioca의 alcohol 발효

1l 발효병에 extrudate 50g과 증류수 140 ml, 0.84% Na₂SO₃ 5ml를 넣고 *Rhizopus* sp.의 glucoamylase 10 ml(2,250 units)와 yeast 20 ml를 가하여 30°C에서 4일간 발효시켰다.

Alcohol yield와 fermentation efficiency

발효 완료 후 alcohol yield는 tapioca 원료 1 ton으로부터 얻을 수 있는 95% ethanol의 liter 수로 표시하였으며 이때 증류시 발생하는 손실을 2%로 계산하였다. 한편 fermentation efficiency는 Matsumoto 등의(1) 방법에 따라 이론적인 alcohol 생성량에 대한 실제값의 비율로서 나타내었다.

결과 및 고찰

방법의 차이에 따른 alcohol 발효

Tapioca chip으로 전처리된 달리하여 alcohol 발효를 행한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. CO₂ 발생량이 증자방법의 경우는 발효 1일째는 11.8g이고 2일에는 29.4g으로써 무증자 방법의 7.0g, 14.9g과 비교해 볼 때 초기 발효속도가 매우 빠름을 알 수 있었다. 또한 발효 5일 후에 증자법에 의해서는 33.1g의 CO₂가 생성되었으나 무증자에서는 27.9g에 미치지 않아 무증자법이 증자법에 비해 발효효율이 더 높은 쌀보리의 경우와는(4) 반대 결과를 나타내었다. 다만 전처리로서 *Bacillus subtilis* α-amylase를 첨가하여 70°C에서 1시간 액화시킨 저온 증자법으로 무증자에 비해서는 초기 발효속도와 발효효율을 크게 증

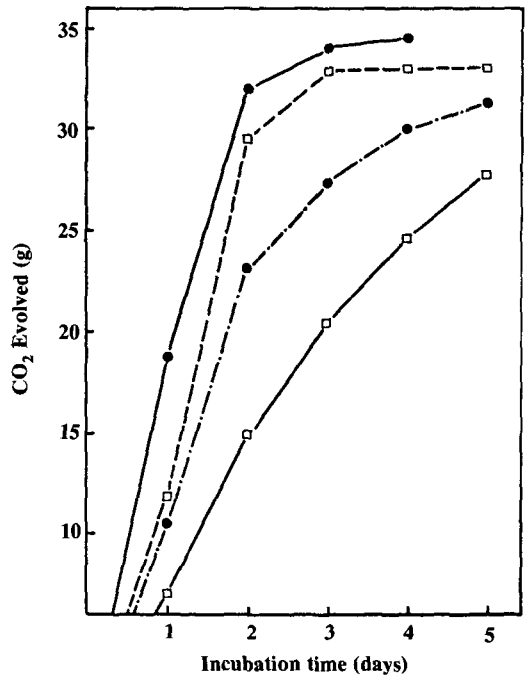


Fig. 2. Time course of alcohol fermentation of tapioca chip by four different methods.

100 g of material was used in every case.

- : uncooking
- : low-temperature cooking
- : cooking
- : fermentation using extrudate

가시킬 수 있었으나 증자법에는 미치지 못하였다. 이는 *Rhizopus* sp. glucoamylase가 효율적으로 작용할 수 없는 tapioca chip 생전분 구조의 특이성 때문

Table 2. Comparison of fermentation data among cooking, uncooking, low-temperature cooking and fermentation using extrudate.*

	Cooking	Uncooking	L.T.C.**	Extrudate
Volume (ml)	463	424	425	413
pH	4.70	4.05	4.10	4.63
Alcohol content (v/v, %) ¹⁾	9.76	9.12	10.13	11.39
Alcohol yield (l/ton) ²⁾	441.4	374.1	419.3	460.5
Fermentation efficiency (% ³⁾	88.6	75.1	84.1	92.4

* 100 g of material was used in every case.

In the case of extrudate, the results were obtained after 4 days fermentation and 5 days in the others.

** Low-temperature cooking

1) Alcohol content was determined with an alcoholic hydrometer after distillation.

2) Alcohol yield = (Mash volume × alcohol content - Volume of yeast inoculated × alcohol content of the yeast) × 0.98 / 0.95 × 1000 / weight of tapioca used(g)

3) Fermentation efficiency = (Mash vol. × alcohol content - Vol. of yeast inoculated × alcohol content of the yeast) / (Weight of tapioca used × Total sugars in tapioca × 0.6439) × 100

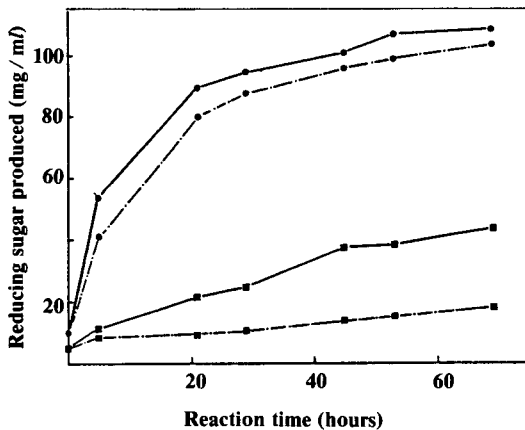


Fig. 3. Time course of raw and extruded starch digestion by *Rhizopus sp.* and *Aspergillus usamii* glucoamylase preparations (2250 units).

In this experiment materials used were tapioca chip and its extrudate extruded at 120°C.

- : *Rhizopus sp.*, extrudate.
- : *Rhizopus sp.*, raw starch.
- : *Aspergillus usamii*, extrudate.
- : *Aspergillus usamii*, raw starch.

이라고 판단된다. 이러한 점을 고려하여 고온 고압 하에서 단시간 내에 전분의 입자구조를 변화시킬 수 있는 extrusion 과정을 거친 tapioca chip extrudate로 alcohol 발효를 실시한 결과 발효 1일째에 18.8g, 발효 4일에 34.6g의 CO₂가 발생해 증자법에 비해서도 월등히 초기 발효속도가 빨랐으며 발효시간도 단축되었다.

Extrudate를 이용한 alcohol 발효는 4일째에, 증자, 저온증자 및 무증자 발효는 5일째 발효를 완료시켜 발효성적을 비교한 결과는 Table 2에 나타내었다. CO₂ 발생량으로부터 예상할 수 있는 바와 같이 extrudate로 alcohol 발효 했을 경우 발효효율이 92.4%, alcohol 수율 460.5 l/ton으로써 374.1 l/ton인 무증자법과 419.3 l/ton인 저온 증자법은 물론 441.4 l/ton인 증자법에 비해서도 약 20 l/ton 높은 수율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 tapioca chip을 extrusion시켰을 때 증자 과정에서와 같은 전분구조의 파괴와 동시에 gelatinization과 dextrinization이 일어나(12) glucoamylase의 작용을 쉽게 받을 수 있었을 뿐 아니라 고온 고압하에서 단시간 내에 일어나는 과정이므로 비발효성 당의 생성도 적었기 때문이라고 생각된다.

전분의 효소분해

생 tapioca chip과 tapioca chip extrudate에 *Rhizopus sp.* glucoamylase와 *Aspergillus usamii* glucoamylase를 처리하여 전분의 분해능을 비교한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. *Rhizopus sp.* glucoamylase를 처리했을 경우 생tapioca chip은 초기 환원당 5 mg/ml에서 반응 5시간 후에 11.3 mg/ml에 불과했으나 extrudate는 초기 9.8 mg/ml에서 5시간 후에 54.2 mg/ml에 달하였고 69시간 후에는 각각 43.8, 108.7 mg/ml으로써 extrudate가 생전분에 비해 훨씬 glucoamylase에 의해 분해되기 쉽다는 것을 알 수 있었으며 이와 같은 결과는 *Aspergillus usamii* glucoamylase에 의해서도 비슷한 양상으로 나타났다. 이 결과로 볼 때 tapioca chip의 extrudate로 alcohol 발효했을 경우 단시간 내에 전분이 glucose로 분해되어 yeast가 이용할 수 있는 발효성 당량이 증가하고 따라서 발효 초기에 alcohol 함량이 높아지므로 특히 공업적 규모의 무증자 alcohol 발효에서 문제가 되는 bacteria의 오염을 크게 방지함과 동시에 발효시간도 단축되는 것이라고 생각된다(Fig. 2 참고).

한편, 생tapioca chip과 extrudate 모두 *Aspergillus usamii* glucoamylase보다 *Rhizopus sp.* glucoamylase에 의해서 더 잘 분해되었으며 특히 생tapioca chip으로는 반응 69시간 후에 *Rhizopus sp.* glucoamylase에 의해서 43.8 mg/ml, *Aspergillus usamii* glucoamylase에 의해서 18 mg/ml의 환원당이 생성되어 생전분에 대한 분해력은 *Rhizopus sp.* glucoamylase가 훨씬 더 높은 것으로 나타났다.

전분입자의 구조

생 tapioca chip과 tapioca chip extrudate에 *Rhizopus sp.* glucoamylase를 처리하여 입자의 구조 변화를 scanning electron microscope로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 생tapioca chip의 전분입자는 대부분 둥글거나 다각형의 형태를 유지하다가 효소의 작용으로 균열이 생기거나 다소 파괴된 반면 extrudate는 extrusion에 의해 완전히 전분입자가 파괴되어 표면적이 증가한 형태를 나타내었다. 이와 같은 전분입자 구조의 차이 때문에 extrudate가 효소에 의해 쉽게 분해될 수 있으며 그로 인해 alcohol 발효시에 초기 발효속도가 빠르고 발효효율도 높은 것으로 생각된다.

Extrusion 온도에 따른 alcohol 발효

Tapioca chip은 extruder의 barrel 온도가 80~120°C일 때 extrusion되었다. 각 온도에서 extrusion된 extrudate를 이용하여 alcohol 발효를 행한 결과 alcohol 수율로 볼 때 462.6~465.6 l/ ton으로서 extrusion 온도가 alcohol 발효에 미치는 영향은 크지 않은 것으로 나타났다(Table 3).

Glucoamylase 농도의 영향

Fig. 5는 tapioca chip extrudate에 *Rhizopus* sp. glucoamylase의 처리량을 달리하여 alcohol 발효한 결과이다. 원료 g당 50 units까지는 효소 처리량이

증가함에 따라 alcohol 수율이 증가하여 서로 비례 관계를 나타내었다. 한편, 원료 g당 20 units 사용하였을 때 458.7 l/ ton의 alcohol 수율을 나타내어 원료 g당 22.4 units로 441.4 l/ ton의 수율을 보인 증자방법에 비해서도 17 l/ ton 이상 더 높은 수율을 나타냄으로써 extrudate를 이용하는 것이 ethanol 생산에 훨씬 더 효과적임을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때 tapioca 전분질 원료로부터 alcohol을 생산할 경우 전처리 과정으로서 tapioca의 전분 원료를 extrusion 하고 *Rhizopus* sp. glucoamylase를 사용하는 것이 기존의 여러 방법들보다 energy 절감과 alcohol 수율 면에서 가장 효과

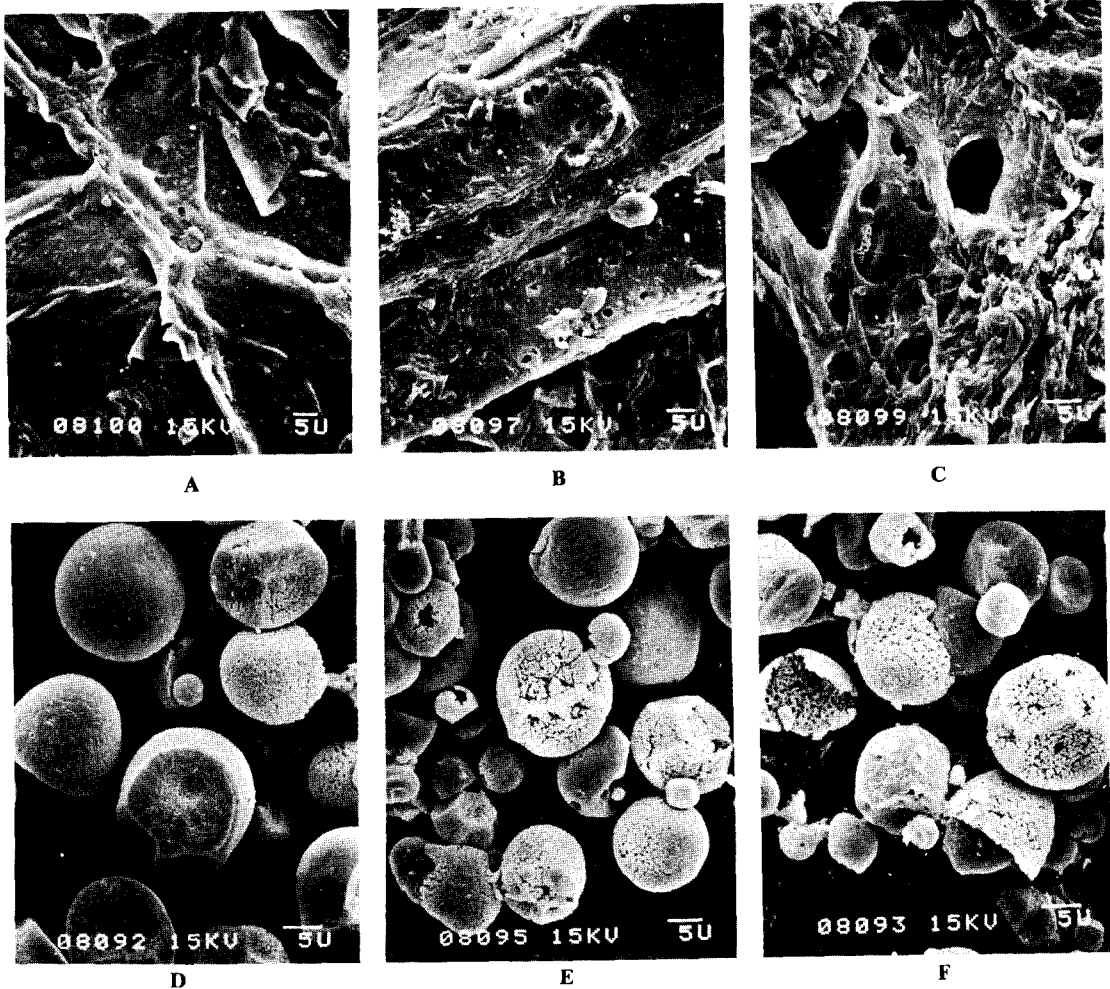


Fig. 4. Scanning electron microscopes of raw and extruded starch granules of tapioca chip at various reaction time with *Rhizopus* sp. glucoamylase.

A, B, C: Extruded tapioca chip reacted for 5, 10, 20 hrs, respectively.
 D, E, F: Raw tapioca chip reacted for 5, 10, 20 hrs, respectively.

Table 3. Effect of extrusion temperature on fermentation using the extrudate from tapioca chip.

Extrusion temperature(°C)	Volume (ml)	pH	Alcohol (v/v, %)	Yield (l/ton)	Fermentation efficiency(%)
80	210	4.94	11.25	462.6	92.8
95	210	4.76	11.32	465.6	93.4
100	210	4.76	11.25	462.6	92.8
105	209	4.76	11.34	464.2	93.1
110	210	4.74	11.28	463.9	93.1
120	210	4.72	11.25	462.6	92.8

적이며 발효시간도 단축시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이는 tapioca의 전분입자가 extrusion의 고온 고압과정을 거치는 동안 tapioca에 부착된 오염균이 사멸될 뿐 아니라 gelatinization과 dextrinization이 일어나 전분구조가 glucoamylase의 작용을 받기 쉽도록 변화되므로 초기 alcohol 생성량이 증가되고 따라서 세균 오염방지와 아울러 발효시간이 단축되는 효과가 있기 때문이라고 생각된다.

요 약

Tapioca 전분으로부터 ethanol을 생산하기 위한 여러 방법을 비교한 결과 extrudate를 이용하는 것이 460.5 l/ton의 alcohol 수율을 보여 가장 효과적이었다. *Rhizopus* sp. glucoamylase로 69시간 반응시켰을 때 extrudate로부터는 108.7 mg/ml, 생 tapioca chip에서는 43.8 mg/ml의 환원당이 생성되어 생전분보다 extrudate에 대한 glucoamylase의 분해력과 분해속도가 월등함을 알 수 있었다.

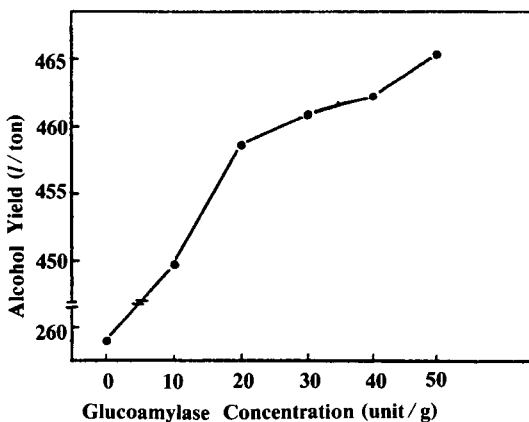


Fig. 5. Effect of *Rhizopus* sp. glucoamylase concentration on alcohol fermentation of tapioca chip extrudate extruded at 125°C.

Extrudate를 이용한 alcohol 발효를 수행한 결과 발효 초기에 alcohol 농도가 높아져 세균 오염방지 및 발효시간을 단축시키는 효과를 얻을 수 있었으나 extrusion 온도가 alcohol 발효에 미치는 영향은 크지 않았다. Glucoamylase가 생 tapioca 보다는 extrudate에 더 용이하게 작용할 수 있는 것은 전분입자의 구조적 차이 때문임을 전자현미경으로 확인하였으며 extrudate와 생전분에 대한 분해력은 *Rhizopus* sp. glucoamylase가 *Aspergillus usami* glucoamylase보다 높았다.

참고문헌

1. Matsumoto, N., O. Fukushi, M. Miyanaga, K. Kakiyama, E. Nakajima and H. Yoshizumi: *Agric. Biol. Chem.*, **46**(6), 1549 (1982).
2. 조구형, 이상호, 이용현: 한국 산업미생물학회지, **15**(3), 196(1987).
3. Fujio, Y., P. Suyanadana, P. Attasampunna and S. Ueda: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 315 (1984).
4. 오평수, 차두중, 서항원: 한국 산업미생물학회지, **14**(5), 415(1986).
5. Saha, B.C. and S. Ueda: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1181 (1983).
6. Thammaratwasik, P., Y. Koba and S. Ueda: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1122 (1986).
7. 한면수, 정동효: 한국 식품과학회지, **17**(4), 258(1985).
8. Ueda, S., C.T. Zenin, D.A. Monteiro and Park, Y.K.: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 291 (1981).
9. 김찬조, 오만진, 이종수: 한국 산업미생물학회지, **13**(4), 329(1985).
10. Svendsby, O., K. Kakutani, Y. Matsumura, M. Iizuka and T. Yamamoto: *J. Ferment. Technol.*, **59**(6), 485 (1981).
11. Matsuoka, H., Y. Koba and S. Ueda: *J. Ferment.*

- Technol.*, **60**(6), 599 (1982).
12. Gomes, M.H., and J.M. Aguilera: *J. Food Sci.*, **48**, 378 (1983).
 13. Taranto, M.V., G.F. Cegla and K.C. Rhee: *J. Food Sci.*, **43**, 973 (1978).
 14. Melius, P.: *J. Chem. Educ.*, **48**, 765 (1971).
 15. 오성훈, 권호정, 오평수 : 한국 산업미생물학회지, **15**(6), 408(1987).

(Received May 9, 1988)