

쌀보리를 기질로 한 알콜발효의 최적 액화효소

남기두* · 김운식 · 최명호 · 박 완

일산실업(주), ¹경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Optimum Liquefying Enzyme of an Alcohol Fermentation Using Naked Barley as a Substrate. Nam Ki Du*, Woon-Sik Kim, Myung-Ho Choi and Wan Park¹. Il San Trading Co., Ltd, Pusan 608-044, Korea, ¹Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University, Deagu 702-701, Korea - Various treatments of naked barley with commercial liquefying enzymes have been employed to reduce high viscosity of naked barley in cooking as a raw material for alcohol production and to increase alcohol yield. The enzyme BAN used for cooking and liquefaction of naked barley was able to make a reduction of one third of viscosity and to enhance alcohol yield of 4 l/Ton of raw material than the T120L was. Of course, alcohol yield depended in part on the applied saccharifying enzymes. The low temperature cooking of naked barley with BAN was favorable compared with high temperature cooking for both of reducing viscosity (210 vs. 237 cp) and final alcohol yield (Yp/so; 0.397 vs. 0.395 g/g) in industrial scale.

우리나라 주정제조 원료의 약 35%를 차지하는 쌀보리는 그 가격이 cassava에 비해 수배나 비싼데도 불구하고 국가 농업 정책상 주정공장에서는 사용하지 않을 수 없는 실정이다. 그러면서도 다른 원료에 비해 단백질 및 난분해 비발효성의 glucan과 pentosan(1)의 함량이 높아 증자 mash의 고점도 원인이 되고, 이로 인해 증자 및 냉각 에너지의 증가에 따른 증자 효율의 저하, 잡균의 오염 등으로 최종 발효수율이 떨어지는 형편이다. 알콜 발효수율은 증자, 액화 및 당화과정을 거쳐 만들어지는 발효 mash의 점도 및 발효성 당농도에 의해 크게 영향을 받게 된다. 따라서 이들 공정에서 사용되는 액화 및 당화효소의 선택은 알콜 발효수율과 직결되므로 철저한 예비 실험과 품질 검사를 통해 원료 특성에 맞는 효소의 경제적인 사용량을 결정하는 것이 매우 중요하다. 이와 함께 고온성 또는 강력한 알콜 발효균주의 선별(2-6), mash내 발효환경 조건(7-9) 등에 관한 지속적인 연구를 통해 수율 증가와 함께 생산 원가를 절감할 수 있는 방안을 찾아야 할 것이다. 쌀보리는 주로 고온 증자에 의해 발효 mash를 조제하고 있는데 이는 증자에 소요되는 에너지가 증가할 뿐만 아니라 증자 후 높은 현열을 갖고 있는 mash의 냉각에 많은 에너지가 소비되고 냉각 시간이 길어져 알콜 생산성이 낮아지므로 가능하다면 저온 증자 공정으로 쌀보리의 높은 점성을 떨어뜨릴 수 있는 액화 및 당화효소의 선택 또는 개발이 매우 중요한 관리 요인으로 대두하게 된다.

이번 연구에서는 쌀보리를 기질로 저온 및 고온 증자에 의한 알콜 발효(10-12)를 행할 경우 산업 규모에서도 생산수율을 올릴 수 있는 액화 효소를 검토하고자

했다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양

실험실 규모 실험에는 건조효모(*Saccharomyces cerevisiae*, 상품명: Fermiol, Gist-brocade) 3g을 증류수 100 ml로 현탁하여 접종 starter로서 사용하였고, 산업 규모 실험에서는 YPD 배지(증류수 1l에 200 g potato extract, 30 g Difco yeast extract, 15 g glucose, 15 g sucrose, 15 g agar를 넣고 pH 5.6으로 조절)에 계대배양한 당 연구실의 *Saccharomyces cerevisiae* IFO 1-84를 주발효 mash와 동일한 원료로서 총당 10% 농도로 조절된 배지에서 대수기(6×10^7 cells/ml 이상)까지 호기적 조건으로 배양한 후 사용하였다.

원료

주정 제조용으로 입고된 쌀보리 및 쌀을 2 mm 분쇄망(screen)을 사용한 분쇄기(hammer mill)로 미분쇄하여 사용하였으며 원료의 전분함량은 산가수분해법으로 각각 66.73% 및 75.71%였다(Table 1).

사용효소

액화효소는 내열성 alpha-amylase인 Termamyl 120L (T120L)과 *Bacillus subtilis*가 생산하는 BAN 240L (BAN)을 사용하였고, 당화효소는 국산 정제효소(Refined enzyme, RE, 태평양화학), 조효소제(Crude enzyme, CE, 배한산업), amylase와 protease가 혼합되어 있는 San-super 240L 및 비발효성 당인 cellobiose를 분해할 수 있는 *Aspergillus niger* 기원인 cellobiase(NZ 188)를 사용하였고, 사용 효소의 역가분석은 전보(12)에

*Corresponding author.

Key words: Alcohol fermentation, naked barley, liquefying enzyme, cooking

따랐으며 역가 분석결과는 Table 2와 같다.

Mash 제조 및 알콜발효

실험실 규모 실험은 쌀보리의 미분쇄 가루 750 g을 수도물로 3 kg 되게 정확히 단후 현탁시켜 pH를 확인하고(pH 5.6) alpha-amylase인 T120L 또는 BAN을 각각 0.2 g/kg starch, 0.1 g/kg starch를 넣고 heating mantle에서 분당 1°C 상승 속도로 가온하여 T120L인 경우는 90°C에서 10분간, BAN인 경우는 75°C에서 30분간 증자 및 액화를 한 후 58°C까지 냉각하여 당화효소제를

Table 3과 같이 투입한 다음, 1시간 동안 잘 당화하여 250 ml Erlenmyer flask에 150 g씩 정확히 분주하고 미리 현탁시켜 준비한 starter 5 ml를 접종하여 magnetic bar를 flask에 넣고 incubator 내의 block agitator 상에서 300 rpm으로 연속 교반하면서 32°C에서 발효시켰다.

Table 2. The activity of enzymes used in this study.

Enzyme	Activity	Remarks
Termamyl 120L	138300 u/g	NOVO, Denmark
BAN 240L	103400 u/g	NOVO, Denmark
Refined enzyme(RE)	24200 u/g	Pacific Chemical Co., LTD. Korea
Crude enzyme(CE)	3434 u/g	Baehan Co., LTD. Korea
Cellobiase(NZ188)	250 CbU/g	NOVO, Denmark
San super 240L(S)	12960 u/g	NOVO, Denmark
AMG	13500 u/g	NOVO, Denmark

The activity was assayed according to the Il San and NOVO methods (12).

Table 1. Comparison of starch value by the methods of hydrolysis.

Hydrolysis Raw material	Acid	Enzyme ¹⁾	
		T120L	BAN
Naked barley	66.73%	56.49%	57.49%
Rice	75.71%	73.30%	74.44%

¹⁾ Starch value was measured by IL SAN assay modified with the NOVO file (EF871124.1/Jec-BHN/Vol) as shown in Fig. 1.

Table 3. Effect of liquefying and saccharifying enzymes on the alcohol productivity from naked barley in lab scale.

Class.	Alpha-amylase (g/kg)	Saccharifying enzyme (g/kg)	RS ¹⁾	Evolved CO ₂ (g)	Yp/so ²⁾ (g/g)	Yield ³⁾ (l/Ton)
A	T120L 0.2	RE+CE 0.36+5	ND ⁴⁾	10.50	0.395	388.4
B	T120L 0.2	San-super(S) 1	"	9.66	0.364	358.0
C	T120L 0.2	S+NZ188 1+0.18	"	10.01	0.377	369.7
D	BAN 0.1	RE+CE 0.36+5	"	10.60	0.399	392.3
E	BAN 0.1	San-super(S) 1	"	10.22	0.385	378.6
F	BAN 0.1	S+NZ188 1+0.18	"	10.33	0.389	383.5

¹⁾ Retrograded starch

²⁾ Yp/So was expressed as the conversion yield of glucose to ethanol.

³⁾ Yield was calculated as follows: Y (95% EtOH, l/Ton, raw material) = SV (%) × 0.7154 × FR (%) × 10/0.95

⁴⁾ ND: Not detected

Table 4. Kinetic data obtained from alcohol fermentation in the 117 m³ fermentors using T120L and BAN as liquefying enzymes at the cooking step in large scale production.

Raw material	Class	Dosage ¹⁾ (kg/Ton)	TS ²⁾ (%)	Viscosity ³⁾ Centi poise (70/40°C)	Alcohol (%)	Yp/so ⁴⁾ (g/g)
Naked barley	T120L	0.127	18.18	647/47	9.03	0.394
Naked barley	BAN	0.058	18.56	237/36	9.25	0.395
Naked barley	BAN (LTC) ⁵⁾	0.109	18.54	210/33	9.27	0.397
Rice	T120L	0.127	18.09	<30	10.14	0.445
Rice	BAN (LTC)	0.055	17.34	<30	9.71	0.444

¹⁾ Alpha-amylase dosage/Raw material

²⁾ TS: Total sugar

³⁾ The mash viscosity was checked at 70°C and 40°C, respectively.

⁴⁾ As in the Table 3.

⁵⁾ The mash was prepared by the Low temperature cooking (LTC) at 90°C for 120 min.

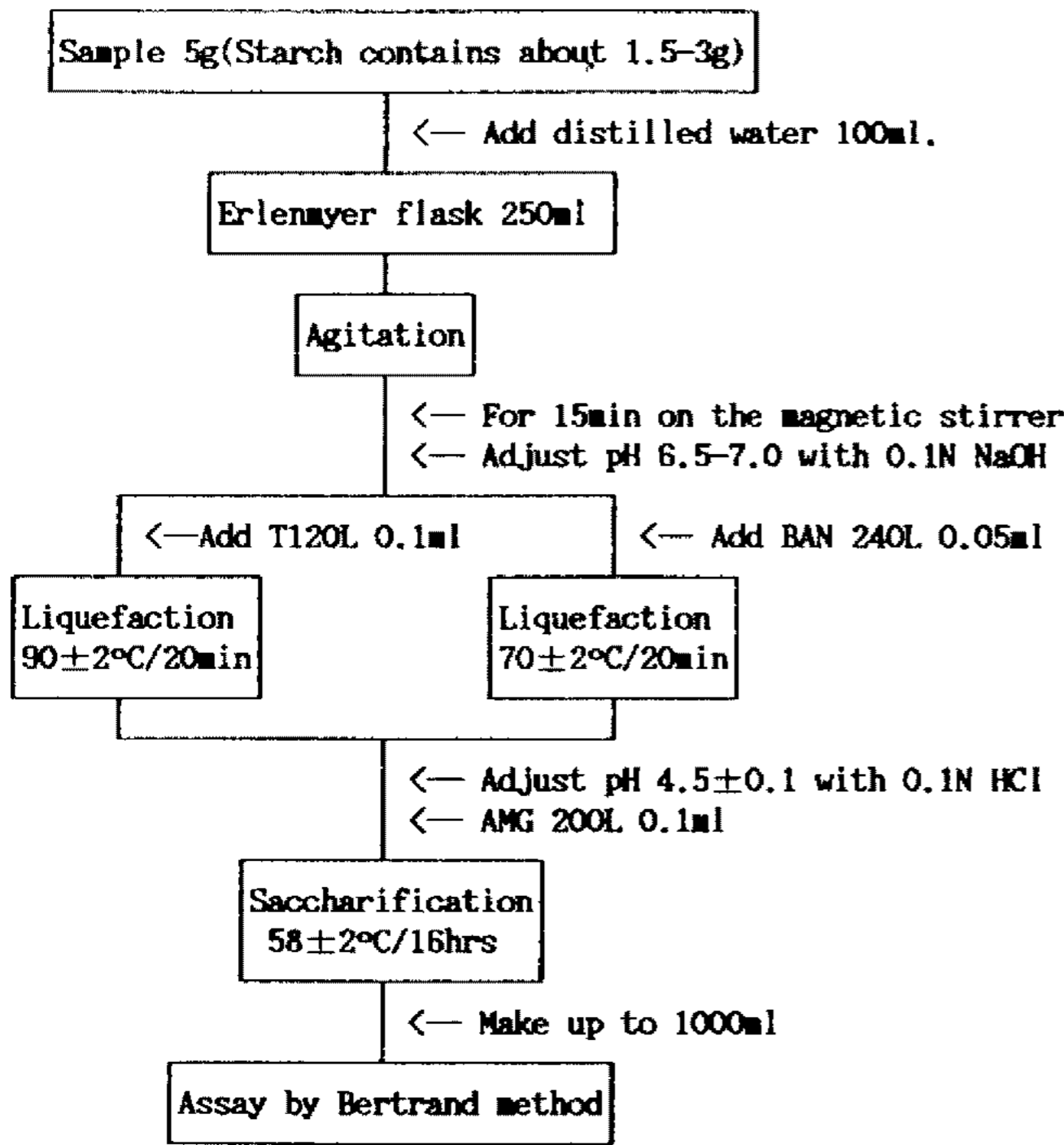


Fig. 1. Procedure of enzymatic hydrolysis for determination of starch value.

산업 규모 실험은 회분식 발효공정에서 Table 4와 같이 액화효소 종류와 사용량을 달리하여 고온 및 저온증자법(12)으로 조제된 발효 mash를 발효조에 이송하여 58°C까지 냉각한 후 당화효소제는 정제 RE 및 조효소제 CE를 각각 0.36 g/kg starch, 5 g/kg starch를 넣고 1시간 당화한 다음 이어서 33°C까지 냉각하여 미리 배양된 효모를 발효 mash에 10%를 접종하여 알콜발효를 수행하였다.

전분가 분석

산가수분해법 또는 Osmometer의 분석법(13)을 약간 수정한 변법(Fig. 1)으로 액화효소 T120L과 BAN에 따라 최적 액화온도 90°C 및 70°C에서 20분간 액화시킨 다음, 당화효소 AMG(1.4-alpha-D-glucanglucohydrolase, EC 3.2.1.3)로서 58°C에서 16시간 동안 당화시켜 생성된 환원당을 Bertrand법으로 정량하여 전분가를 환산하였다.

분석 방법

액화 및 당화과정중의 mash의 점도 측정은 점도계 (Model : Hakke VT-180 viscometer, Germany, VT-02, Orion viscometer, Japan)로 측정하였고, 에탄올 농도, 효모농도는 전보(14)에 준하여 분석하였고, 노화전분은 NOVO 분석법(15)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

가수분해 방법에 따른 전분가 비교

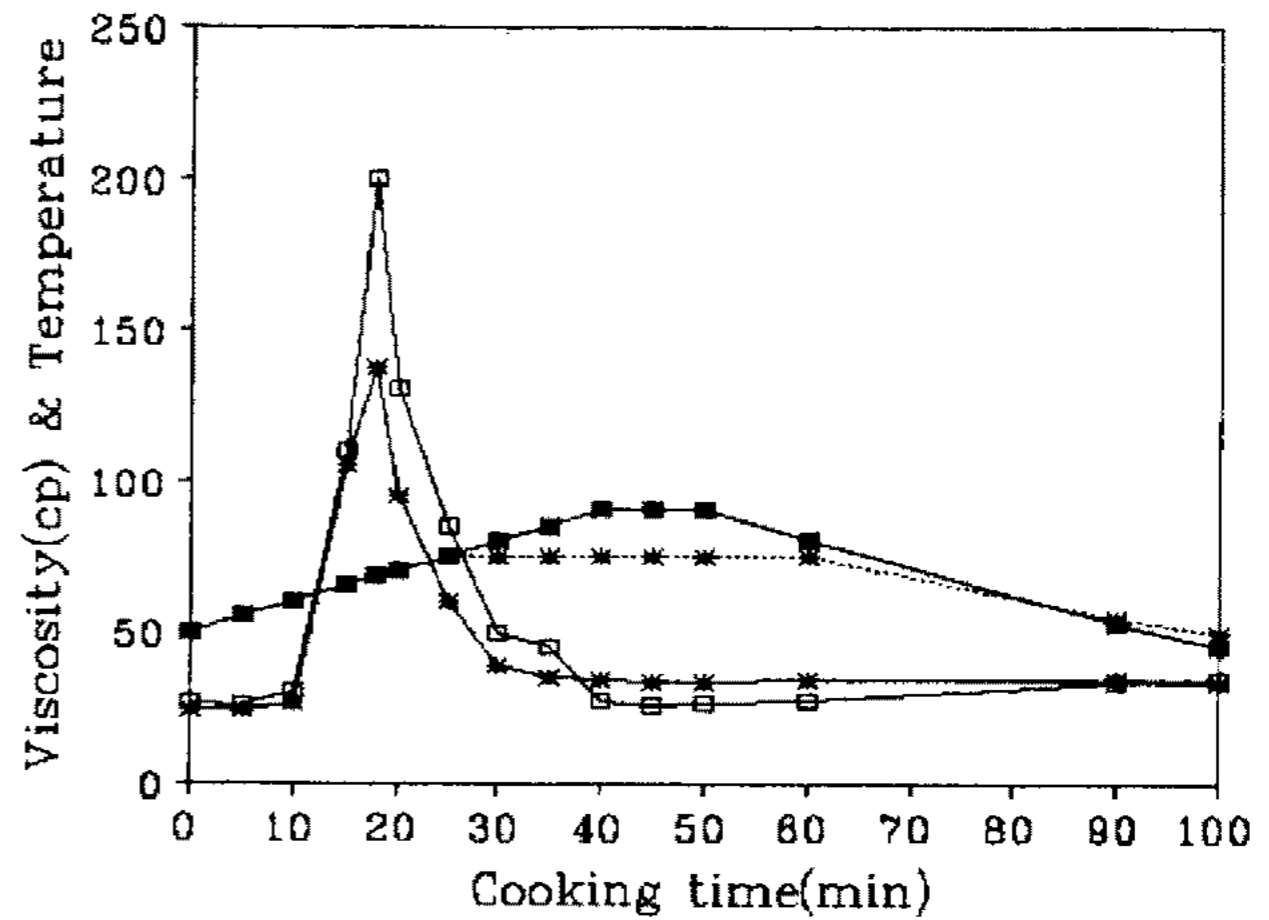


Fig. 2. Profiles of viscosity of naked barley and temperature at cooking stage in lab scale test.

T120L (0.2 g/kg of starch) or BAN (0.1 g/kg of starch) was added to the 3 kg of slurry containing 25% naked barley, and the mixtures were heated from 25°C to 90°C (for T120L) or 75°C (for BAN) at 1°C per minute and held there for 10 min (T120L) or 30 min (BAN) and then cooled to 33°C for alcohol fermentation.

■ T120L, temp BAN, temp -*- BAN, viscosity □ T120L, viscosity

알콜발효 기질(mash)의 최적 사입농도 결정 및 이론 예상 수득량을 계산하여 작업표준을 설정하기 위해서는 주정원료의 정확한 전분가를 분석하는 것이 필수적이다. 이에 따라 생산 현장에서는 현재 산가수분해법에 의해 원료 전분가를 분석하고 있으나 이보다는 현장작업 조건과 동일하게 효소가수분해에 의해 생성된 환원당을 분석하여 환산하는 것이 바람직하게 생각되어 동일한 시료를 산가수분해 및 효소가수분해로 비교분석한 결과는 Table 1과 같다. 쌀보리와 쌀 두가지 모두 산가수분해법으로 분석한 전분가가 효소가수분해법에 의한 것보다 높게 나타났으며, 쌀의 경우는 산가수분해법이나 효소가수분해법에 의한 측정치가 큰 차이를 보이지 않았으나 쌀보리의 경우는 약 10% 정도의 차이를 보이고 있다. 이는 amylase에 의해 분해되지 않는 비발효성당인 glucan, pentosan을 많이 함유하고 있는 쌀보리의 기질 특성(1)으로 생각된다. 효소 가수분해의 경우 사용한 액화효소의 종류에 따라 값이 다르게 나왔다. 현재 대부분의 주정공장에서 사용하고 있는 T120L보다 BAN을 사용했을 경우 기질의 종류에 관계없이 약 1% 정도 높게 나타났으며 이 증가한 환원당은 발효수율에 직접적인 영향을 미치게 된다. 즉 1%의 환원당 증가는 기질 kg당 0.6439l의 알콜증가를 가져오게 된다.

쌀보리 기질 증자시 액화효소에 따른 점도의 비교

원료 건물량(dry substances) 25%의 기질에 액화효소 T120L(0.2 g/kg starch) 또는 BAN(0.1 g/kg starch)을 넣어 온도를 분당 1°C로 상승시키면서 쌀보리의 점도를 연속 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 두 효소 모두 60°C

에서 부터 점도가 급격히 상승하기 시작하여 65°C에서 최고 점도를 나타냈는데 BAN은 147 centi poise(cp), T120L은 200 cp를 기록한 후 급격히 감소하기 시작하여 75°C에서 30분간(BAN), 90°C에서 10분간(T120L) 유지 후 냉각시키면 BAN은 35 cp, T120L은 27 cp까지 떨어졌다. 또 산업 규모의 알콜발효실험에서도 쌀보리의 증자시 점도의 감소효과는 역시 BAN이 T120L보다 훨씬 뛰어났다(Table 4). 고농도 증자시 T120L의 경우 70°C 때의 점도가 647 cp인데 비하여 BAN의 경우 237 cp까지 현저하게 떨어짐을 알 수 있었다. 특히 BAN을 사용한 저온증자의 경우는 고온증자 보다 점도감소 효과가 더 나은 결과를 보여주고 있다. 따라서 쌀보리의 증자액화공정에는 기존의 대부분의 생산현장에서 T120L을 사용한 고온증자 보다 BAN을 사용하여 저온증자를 하게 되면 저점도 액화력으로 인해 증자과정중의 가열 에너지 및 교반소요동력의 절약, 증자액화 후 기질의 현열이 고온증자에 비해 낮아 냉각시간 및 냉각 에너지를 줄일 수 있으며, 액화효율의 증가로 slurry가 잘 균질화되어 오염원인이 되는 덩어리 형성을 막을 수 있을 뿐만 아니라 고농도 사입도 가능할 것이다. 쌀보리는 비발효성 5탄당의 β -glucan, lignin, hemicellulose, 다량의 조단백질등이 고점도의 원인으로 추정되고 있는데 이러한 기질특성(1)이 여러 액화효소에 대한 거동을 달리하는 한 요인으로 생각된다.

한편 쌀을 기질로 한 경우는 증자방법이나 액화효소의 종류에 상관없이 약 30 cp 정도의 아주 낮은 점도를 나타냄을 알 수 있었다.

알콜발효 수율에 미치는 액화 및 당화효소의 영향

쌀보리의 액화시 BAN이 T120L에 비해 점도저하 효과가 뛰어났는데, 이들에 의한 액화기질을 사용하여 알콜발효성적을 실험실 규모에서 비교해 보았다. 이때 당화효소의 영향도 함께 검토하였다. 같은 종류의 당화효소를 사용한 경우의 성적을 비교해 보면 BAN으로 액화한 기질이 T120L로 액화한 기질 보다 알콜발효수율이 모두 다 높게 나옴을 알 수 있다(Table 3).

쌀보리를 기질로 알콜 발효를 할 경우 T120L 대신 BAN을 사용하면 증자액화공정의 효율성은 물론 최종 발효수득량도 높일 수 있음을 알 수 있다. 그리고 당화효소에 의해서도 발효수율이 많은 영향을 받았는데 San-super 240L(NOVO, Denmark) 단독 사용(Table 3의 B, E)보다는 cellobiase NZ188(NOVO, Denmark)을 함께 사용했을 때(C, F) 수율이 증가하였으나 국산 정제효소 RE와 조효소 CE를 사용한 경우의 수율이(A, D) 훨씬 높게 나타났다. 이 실험에서 증자과정중에 생성된 노화전분과 발효되지 않고 남은 잔류 환원당은 검출되지 않았다.

산업 규모 알콜발효

산업 규모의 발효시 알콜발효 성적에 미치는 액화효소의 영향을 알아보기 위하여 쌀과 쌀보리를 고온(HTC, 120°C/60 min) 및 저온증자(LTC, 90°C/120 min) 법으로 증자(10)하면서 BAN 또는 T120L로 각각 액화하고 당화는 정제효소 RE와 조효소 CE를 함께 사용하여 발효기질을 조제하여 알콜발효를 수행한 결과는 Table 4와 같다.

쌀보리의 경우 BAN을 이용하여 증자한 기질은 T120L에 비해 점도의 저하효과가 뛰어났으며 최종 발효수율도 약간 나은 경향이였으며, 특히 BAN을 이용한 저온증자의 경우 고온증자에 비해 발효수율의 증가를 볼 수 있다. 이로써 실험실 규모에서 뿐만 아니라 산업 규모의 발효성적에서도 BAN의 효용성을 인정할 수 있어 현장에서 산업 규모 생산에 그대로 적용할 수 있으리라 생각한다.

쌀의 경우는 T120L을 사용해도 기질의 점도는 전혀 문제가 되지 않았으며 알콜발효수율에도 BAN의 경우에 비해 약간 나은 듯 하였으며 위와 같은 조건하에서 쌀보리의 발효수율은 쌀에 대해 약 89%까지 올릴 수 있었다.

요 약

증자시 높은 점성이 문제되는 쌀보리를 기질로 알콜발효를 행할 경우, 기질의 점성문제를 해결하여 발효조건을 개선하면서 생산수율을 올릴 수 있는 상업용 액화효소를 검토하였다. 쌀보리 증자액화시 BAN을 사용한 경우 기질의 점도는 T120L의 1/3 정도로 떨어졌으며 최종 알콜수율도 T120L에 비해 원료 Ton 당 4l 정도 더 높게 나왔다. 알콜의 수율은 사용한 당화효소의 종류에 의해서도 영향을 받았다. 산업 규모에서 BAN을 사용한 쌀보리의 저온증자가 가능하였으며 고온증자에 비해 알콜수율도 388.4에서 390.4 l/Ton으로 약간 증가하였다. 또 이때 사용한 기질의 전분가를 분석하였는데, 산가수분해 및 효소가수분해법에 의한 쌀의 전분가 분석치는 큰 차이를 보이지 않았으나 쌀보리의 경우는 효소가수분해법에 의한 값이 산가수분해법에 비해 10% 정도 낮게 나타났다. 이때 BAN은 T120L에 비해 전분가가 약 1% 높게 나왔다.

참고문헌

1. NOVO Industri A/S. 1986. *Industrial application III*. F-860973.
2. Sohn, H.Y. and J.H. Seu. 1994. Screening and characterization of thermotolerant alcohol fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4: 215-221.
3. Sohn, H.Y., W. Park, I. Jin, and J.H. Seu. 1994. The fermentation characteristics of newly selected thermotolerant yeasts at high temperature. *J. Microbiol. Biote-*

- chnol.* **4**: 222-229.
4. Ryu, B.H., K.D. Nam, H.S. Kim, D.S. Kim, Y.A. Ji and S.J. Jung. 1988. Screening of thermotolerant yeast strain for ethanol fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 265-269.
 5. Saito, K., K. Moriya, H. Shimoi, S. Sato, M. Tadenuma, and K. Yoshizawa. 1987. Isolation of yeasts producing alcohol from beet molasses. *J. Brew. Soc. Japan.* **82**: 439-443.
 6. Gotoh, K., M. Ueda, T. Nakamura, S Hara and K. Yoshizawa. 1986. The ethanol-tolerant sake yeasts from sake moromi mash in KE-Sake Brewery. *J. Brew. Soc. Japan.* **81**: 198-193.
 7. Chen, C. and K.A. McDonald. 1990. Oscillatory behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in nitrogen levels. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 19-27.
 8. Chen, C., M.C. Dale and M.R. Okos. 1990. Minimal nutritional requirements for immobilized yeast. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 993-1001.
 9. Jones, R.P., N. Pamment and P.F. Greenfield. 1981. Effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry.* April/May. 42-49.
 10. Ryu, B.H., W.S. Kim, M.H. Choi, K.D. Nam, and M.S. Ha. 1986. Large scale of ethanol fermentation from sweet potato cooked at low and high temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**: 233-237.
 11. Matsumoto, N., H. Yoshizumi, S. Miyata and S. Inoue. 1985. Development of the noncooking and low temperature cooking system for alcoholic fermentation of grains. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **59**: 291-299.
 12. Ryu B.H. and K.D. Nam. 1987. Large scale alcohol fermentation with cassava slices at low temperature. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 75-79.
 13. NOVO Industri A/S, Laboratory procedure for enzymatic determination of starchby Osmometer, EF-871 124.1/Jec-BHN/VOL.
 14. Nam, Ki-Du, I.K. Lee, H.H. Cho, M.H. Choi and W.S. Kim. 1992. Continous ethanol fermentation using starchy raw material in pilot scale multi-stage CSTR. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **20**: 324-328.
 15. NOVO Technical Service II. 1984. The determination of apparent and retrograded starch. F-845601.

(Received 15 September 1995)