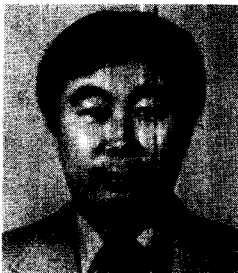


I. 서 론

주정생산공정의 기술혁신을 위한 새로운 무증자 당화법의 제언



李 龍 賢

(경북대학교 유전공학과 교수·공박)

■ 목 차 ■

- I. 서 론
- II. 무증자전분의 구조적 양상이 효소작용에 미치는 영향
- III. 분쇄미찰 무증자전분질 효소당화 반응계
- IV. 쌀보리의 무증자 효소당화
- V. 순수전분의 무증자 효소당화
- VI. 분쇄미찰효소반응계의 생전분 효소당화촉진 메카니즘
- VII. 무증자 당화액과 부분당화 전분액의 알코올 발효성
- VIII. 결 론
- IX. 참고문헌

전분의 효소당화는 주정생산공정의 첫단계로서 알코올 발효의 속도와 수율은 이 단계에 크게 좌우되게 되며 따라서 알코올 생산가에 미치는 영향이 매우 크다. 현재의 주정공업은 종래의 음료용 알코올 생산을 목표로 하는 이외에도 재생자원인 전분질을 당화 발효시켜 얻어지는 알코올을 수송용 대체에너지로 이용하고자 하는 연구도 활발하며 이런 추세에 맞추어 새로운 발효공정기술이 속속 개발되고 있다. 주정공업은 종래의 알코올 생산법을 탈피하여 경제성과 에너지효율이 높은 기술혁신적인 새로운 공정을 개발 도입하여야 할 시점에 있다^{1,2)}.

전분의 당화공정도 개선이 요구되는 분야라 할 수 있다. 현재 국내 주정생산 공업의 경우 전분질 당화에는 증자법이 활용되고 있으며 그 대요는 생산회사에 따라 약간의 차이는 있으나 먼저 전분질원료에 내열성 액화효소를 혼합한 후 증기를 주입하여 100~120°C에서 수십분간 증자한다. 이때 전분질은 액화효소의 작용으로 부분적으로 분해되어 점도가 낮은 가용성 전분으로 호화된다. 호화된 전분은 냉각후 다시 당화효소를 첨가하여 60~70°C에서 수시간 내지 12시간 정도로 반응시켜 발효가 용이한 단당류로 완전 또는 부분당화시켜 발효기질로 활용하고 있다. 부분당화된 전분의 경우에는 알코올 발효와 동시에 당화가 진행되어 발효기질로 완전 이용하게 된다.

이와같은 전분질 증자는 많은 증자결과 특수한 시설을 필요로 하여 전분질을 원료로 하여 알코올을 생산 할 경우 소요에너지의 30%정도가 원료 전분질의 증자 액화에 소요되고 있는 실정이다³⁾. 또한 증자법은 에너지 소모형 공정일 뿐만 아니라 전분을 고농도로 투입할 수 없는 결점이 있다. 즉 전분질을 증자 호화시키면 전분입자가 팽윤되어 다량의 수분을 흡수하게 되며, 고농도로

전분을 첨가하면 풀과 같이 점도가 높은 상태가 된다. 이와같은 고점도 전분액은 교반 뿐만아니라 효소당화가 어렵게 된다. 따라서 전분을 어느 농도 이상으로 첨가 할 수 없게 되며 자연히 당 농도가 낮게 된다.

원료전분질의 증자공정에 수반되는 위와같은 결점때문에 생전분질 또는 생전분을 증자하지 않고 생전분 그대로 당화시키는 무증자 당화법이 많은 관심의 대상이 되고 있다. 무증자 당화법은 증자에 필요한 열에너지를 절감 할 수 있고 또 호화에 의한 팽윤과 점도 증가등 전분질의 물리적 상태변화를 수반하지 않으므로 전분질을 고농도로 첨가시켜 당화를 진행할 수 있는 장점이 있다. 그러나 증자법에 비해서 당화속도가 느리고 수율이 낮아 이에 대한 개선이 요구되고 있다.

현재 무증자당화 및 발효에 관한 연구는 주로 역가가 높은 생전분 분해효소의 개발^{4~8)}, 생전분 분해와 당화를 동시에 행할 수 있는 균주선별 및 동시 발효법 개발^{9~12)}, 산/알칼리 또는 알코올 전처리를 통해 전분질의 구조적 양상을 변화시켜 당화를 촉진시키고자하는 시도^{13,14)}등을 들 수 있다. 이상의 연구는 현재 상당한 성과를 얻고 있으나 아직도 당화속도 및 수율이 낮아 그 공정의 실용화 단계에는 이르지 못하고 있다.

본인등은 지금까지 수행된 무증자 당화법과는 상이한 새로운 기술혁신적 무증자생전분 효소당화법을 개발 보고 한 바 있다^{15~18)}. 그 대요는 무증자 전분질을 효소당화시키는 과정에서 유리, 플라스틱, 테프론과 같은 구상 등 여러가지 모양의 고흥분쇄마찰매체(attribution-milling media)를 첨가하여 젖은 상태에서 마찰교반시켜 가면서 무증자액화 및 당화를 행하는 방법이다. 이 경우 젖은상태의 생전분질은 분쇄마찰매체의 기계적 충격과 효소의 상호보완 작용으로 그 구조가 급속히 파괴되어 효소분해를 쉽게 받을 수 있는 상태로 전환됨으로써 효소당화가 촉진되는데 이는 지금까지 연구된 바 없는 새로운 전분의 무

증자 당화방법이라 할 수 있다.

본 논문은 이와같은 분쇄마찰매체반응계의 구성, 생전분질과 순수생전분의 분쇄마찰매체 반응계를 활용한 효소당화, 효소당화 촉진기작(mechanism)과 생성당의 조성, 분쇄마찰반응계에서 부분당화 시킨 무증자 전분 당화액의 알코올 발효성에 관하여 논술함으로써 새로운 기술혁신적 알코올 발효공정의 가능성을 제시하고자 한다.

II. 무증자 전분의 구조적 양상이 효소작용에 미치는 영향

무증자 상태의 전분 또는 전분질의 효소당화의 특징은 기질이 물에 녹지 않고 입자상의 고체상태로 효소작용을 받게 됨에 있다. 이와같은 이상효소반응계(heterogeneous enzyme reaction system)의 효소당화는 기질인 전분질 입자의 구조적 양상에 크게 좌우된다. 중요한 구조적 양상으로는 전분입자의 가용표면적(accessible surface area), 경도(hardness), 그리고 전분 이외의 기타 성분의 함량(content of extraneous compounds)등을 들 수 있다. 이 중에서도 가용표면적은 전분의 무증자 당화에 영향을 주는 가장 중요한 구조적 양상이라 할 수 있다. 왜냐하면 생전분의 당화는 효소분자와 물리적 접촉이 가능한 전분입자의 표면에서 이루어지며 가용표면적이 넓을수록 전분과 효소의 접촉 기회가 커지게 된다. 가용표면은 전분입자의 크기는 물론 전분입자 내부의 미세공(micro pore)의 분포에 따라 변하게 된다.

또한 전분입자의 경도도 중요한 구조적 양상으로 판단되며 이는 생전분입자 표면에 흡착된 효소의 당화작용의 용이도와 밀접한 관계에 있다. 전분입자의 경도는 미세결정구조(microcrystalline structure)와 아밀로 펙틴(amylopectin)의 함량, 그리고 전분의 팽윤도(degree of swelling)에 의하여 결정된다.

이상과 같은 두가지 구조적 양상 이외에도 전분질의 경우에는 전분이외의 기타성분, 예컨대 단백질, 지질, 섬유소 등의 함량도 효소당화에 영향을 주는 중요 요소이다.

전분의 가열 증자는 전분입자를 호화 팽윤시켜 효소와 접촉 할 수 있는 가용 표면적을 증대시키고, 전분입자의 구조를 이완시켜 경도를 감소시켜 보다 쉽게 효소당화를 받을 수 있도록 하며, 전분질의 경우는 전분과 기타성분을 분리시켜 효소작용을 용이하게 받을 수 있도록 전분입자의 구조를 전환시키는 일종의 전처리 과정으로 이해할 수 있다.

무증자상태의 전분 또는 전분질의 효소 작용을 현저히 촉진시키기 위해서는 전분입자를 적절한 방법으로 처리하여 가용표면적을 증대시키고, 결정구조를 파괴시켜 경도를 감소시키든지, 전분과 기타성분간의 결합을 이완시키는 등 전분입자의 구조적 양상을 효소작용이 용이하도록 적절히 변형시키는 것이 요망된다.

III. 분쇄마찰 무증자전분질 효소 당화 반응계

분쇄마찰매체(atrition-milling media) 함유 효소반응계란 생전분 또는 생전분질의 효소당화시 생전분-효소-완충용액의 혼합 현탁액에 유리, 플라스틱, 또는 테프론과 같은 고형매체를 첨가하여 젖은 상태에서 분쇄마찰 효과를 주면서 액화와 당화를 동시에 행하는 반응계를 말한다. Figure 1은 분쇄마찰매체 반응계에서 생전분의 효소당화 과정을 미시적인 각도에서 모형화 한 것이다.

위 그림은 전분입자, 전분입자에 부착되어 있지 않은 전분분해효소, 전분입자와 결합되어 있는 효소-전분의 복합체, 그리고 분쇄마찰매체인 유리구를 상대적인 크기로 나타내었다. 이와같이 반응계에서 분쇄마찰매체인 유리구의 기계적운동은 생전분입자를 분쇄 또는 마찰시켜 효소당

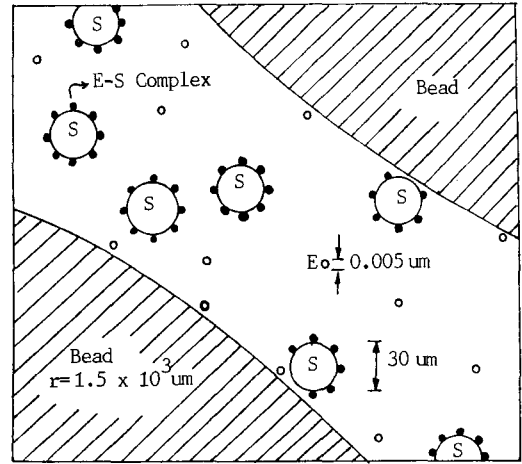


Fig. 1. Schematic model on enzymatic hydrolysis of uncooked starch in an agitated bead reaction system, S is starch, E is enzyme.

화를 용이하게 받을 수 있는 상태로 전분구조를 변형시켜 효소당화를 현저히 촉진시키게 된다.

분쇄마찰매체 함유반응계에서 생전분의 효소당화가 촉진되는 기작(mechanism)으로는 다음과 같은 몇가지로 유추해 볼 수 있다. 즉 분쇄마찰매체의 물리적 충격으로 전분의 미세결정구조(microcrystalline structure)가 파괴되어 효소당화작용을 쉽게 받게되는 경우, 물리적 충격으로 전분의 입자에 균열이 생기고 그 틈으로 물분자가 스며들어 전분입자가 팽윤되어 효소당화를 쉽게 받게 되는 경우, 분쇄마찰매체에 의하여 전분입자가 쪼개져 작은 입자로 붕괴(fragmentation)되어 효소와 접촉 할 수 있는 표면적이 증대되고 이에 따라 효소작용이 촉진되는 경우이다.

분쇄마찰매체함유 효소반응 장치는 통자체를 회전시키는 tumbling drum type 장치, impeller를 이용하여 분쇄마찰매체를 교반시키는 agitated bead bioattritor 등 여러가지가 있으나 이 중 impeller를 이용한 agitated bead reaction system을 도시하면 Figure 2와 같다.

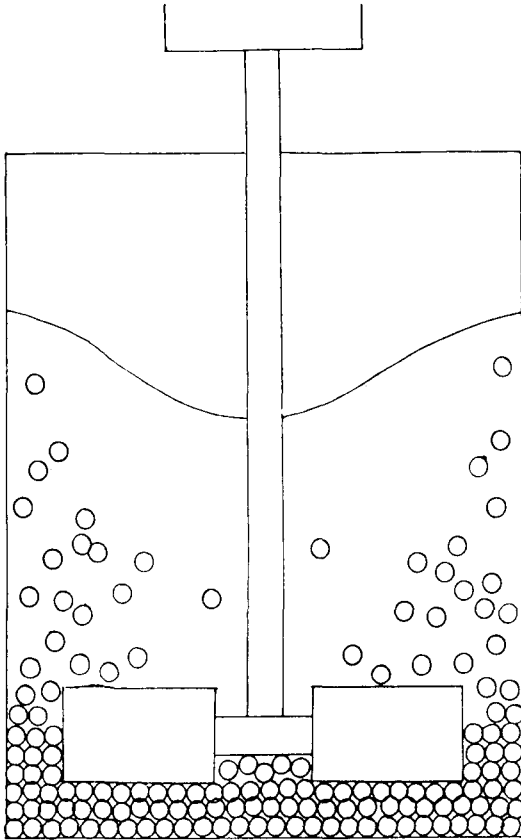


Fig. 2. Schematic diagram of an agitated bead bioreactor.

상기 장치의 경우는 회전축에 부착된 impeller로 생전분-효소-완충용액-분쇄마찰매체의 혼합 현탁액을 교반하여 줌으로써 분쇄 및 마찰효과를 주어 효소당화를 촉진시키게 되며 첨가 유리구의 반응액 중에서의 상대적 높이도 아울러 표시하고 있다.

분쇄마찰매체로는 유리구 이외에도 폴리아세탈, 테프론구도 사용하였으며, 그 물리적 특성은 Table 1 과 같다.

IV. 쌀보리의 무증자 효소당화

1. 쌀보리의 분쇄마찰매체 반응계를 활용한 무증자 당화와 일반 증자당화의 비교

Figure 3은 쌀보리 분말을 분쇄마찰매체로 직경 3mm의 유리구를 첨가하여 50℃에서 진폭 4cm의 회전운동으로 250rpm 속도로 교반하면서 무증자 당화시킨 결과, 분쇄마찰매체 첨가없이 무증자 당화시킨 결과, 그리고 주정공업에서 활용되고 있는 증자법으로 당화시킨 결과를 생성된 포도

Table 1. Characteristics of the Milling Media

Characteristics Kinds of Bead	Density g/mL	Particle Size mm	Void Space Dimensionless
Glass	2.54	3	0.370
Polyacetal	1.43	3~4	0.378
Teflon	2.17	3~4	0.348

당의 농도변화를 기준으로 비교하고 있다¹⁵⁾. 또한 쌀보리에 함유된 전당을 기준으로 한 포도당의 수율도 아울러 표시하였다. 본 실험에서 사용한

쌀보리와 첨가한 액화 및 당화효소의 첨가량은 현재 주정공업에서 증자당화시 사용하는 양과 유사한 수준으로 사용하였다.

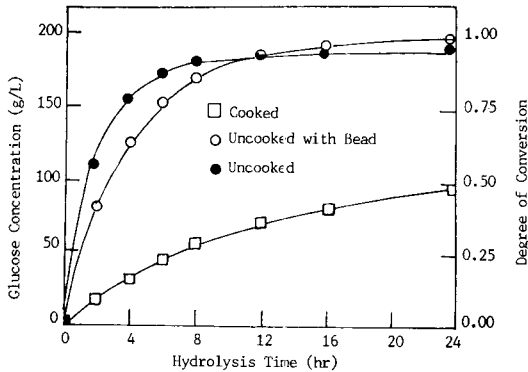


Fig. 3. Comparison of saccharification of naked barley; cooked, uncooked with attrition-milling media, and uncooked without media.

분쇄마찰매체를 첨가하지 않은 쌀보리의 무증자 당화군은 그 분해속도 뿐만 아니라 분해율이 매우 낮아 24시간 경과후에도 쌀보리에 함유된 전당의 약 50%만이 분해되고 있어 무증자 당화를 시킬 경우의 한계성을 잘 나타내고 있다. 반면, 분쇄마찰매체를 첨가한 군에서는 무증자 쌀보리의 분해속도 및 수율이 현저히 증가하여 대조적으로 증자군과 비교된다. 포도당 생성량을 비교하여 보면 반응초기 수시간은 증자군이 다소 우세하였으나, 분쇄마찰매체를 활용한 무증자군의 경우는 포도당 생성량이 급속히 증가하여 증자군과의 차이는 점차 축소되고 8시간 후에는 증자군과 유사하였으며 그 후로는 증자군을 능가하고 있다. 증자군의 포도당 함량이 반응초에 높은 것은 액화반응시 생성된 포도당의 일부도 기여하고 있기 때문이다. 증자군의 경우 액화에 소요되는 시간은 고려하지 않고 당화효소 첨가시를 반응개시 시간으로 하였으므로 액화에 필요한 1시간 전후의 소요시간을 더하여 비교할 경우 두 비교군사이의 차이는 더욱 축소되며, 단당류인 포도당 생산에 분쇄마찰매체함유 무증자법은 매우 효율적임을 예시하고 있다. 24시간 후의 생성 포도당 농도는 240g/L 수준에 이르렀

다. 이는 쌀보리에 함유된 전당의 96% 수준으로서 약 87%수준인 증자군을 능가하고 있다. 쌀보리에 함유된 전당을 기준으로한 96%의 당수율은 매우 높은 수치로써 산업화했을 경우 매우 중요한 경제적 의의를 갖는다. 이는 쌀보리에 함유된 전분질만으로는 이상과 같은 높은 당수율을 얻을 수 없음을 감안한다면 전분질 이외의 섬유소, 조섬유소 등 다른 탄수화물도 일부 분해되지 않나 유추된다. 이 높은 당수율은 반응속도의 현저한 증가현상과 더불어 마찰매체를 활용한 무증자 당화법의 중요한 장점으로 간주된다.

2. 무증자 당화조건의 검토

전분질의 당화는 주로 endo형인 액화효소와 exo형인 당화효소의 상호보완작용으로 이루어진다. 적절한 효소의 혼합비율을 결정하고자 산업용 효소를 현재 주정공업에서 전분질당화에 첨가하고 있는 양인, 전분질 현탁액 1L당 1.5mL(22,000 IU)의 액화효소 및 당화효소 1mL(11,000IU) 합계 2.5mL를 첨가하고 단지 혼합비만을 변화시키면서 당화시킨 결과 액화와 당화효소의 혼합비율이 4:6되는 비율에서 가장 우수한 결과를 얻었다. 또한 첨가량을 달리하면서 실험한 결과는 현 주정공업에서 쓰고 있는 수준의 효소첨가로도 충분한 당화를 시킬 수 있었다¹⁵⁾.

분쇄마찰매체의 최적 첨가량은 쌀보리와 유리구의 혼합 중량비가 1:2일때 가장 좋은 결과를 보였으며 그 이상에서는 오히려 역효과를 나타내었다. 교반강도는 250rpm에서 가장 높은 당화율을 보였는데 이 교반조건하에서는 일부 유리구가 상부에 부유하였을 뿐 대부분의 유리구는 반응장치 하부에 가라앉은 상태로 움직였다. 분쇄마찰매체의 종류별 영향도 검토하였으며 같은 체적의 매체를 사용하였을 경우 유리구, 테프론구, 그리고 폴리아세탈구의 순으로 비중이 큰

분쇄마찰매체가 효과적이었다. 그러나 각 군 사이에는 큰 차이가 없어 비중이 가벼운 매체로도 좋은 당화촉진 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

3. 쌀보리의 고농도 당화

마찰반응계에서 전분질의 고농도 당화를 실험하기 위하여 쌀보리 농도를 22.5, 30, 그리고 37.5% (w/v)으로 증가시켜 각각 당화를 실시한 결과는 Figure 4와 같다¹⁵⁾.

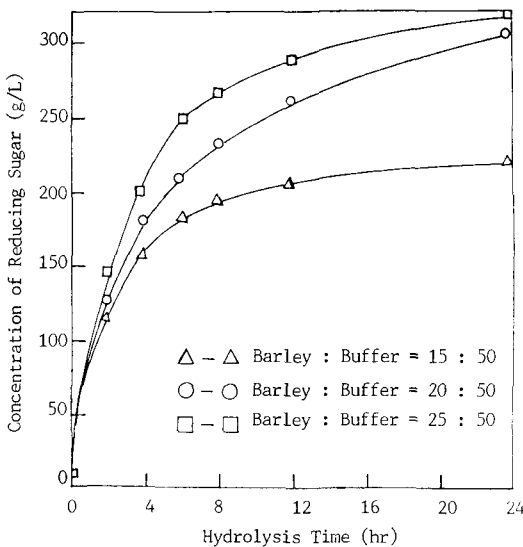


Fig. 4. Extent of hydrolysis of uncooked naked barley at different concentrations.

기질 농도가 증가함에 따라 당화시간이 다소 연장되었다. 그러나 37.5%의 경우에도 12시간 후 약 80% 수준의 당화가 이루어지며 24시간 후에는 95% 이상이 당화되었으며 최종 당 농도는 310g/L 수준에 이르렀다. 위와같은 기질 농도는 현 주정공업에서 쓰고 있는 비율의 두배에 해당되는 농도로서, 고농도의 전분질도 높은 수율로 당화시킬 수 있음을 나타내었다. 교반조건의 향상,

효소 첨가량의 증가, 회분식 전분질 투입방법 도입등 당화조건을 최적화 함으로써 보다 단시간내에 고효율 당화가 가능하리라 예상된다. 뿐만아니라 원료 전분질의 물리적 상태에 따라, 예컨대 옥수수 전분과 같이 보수성이 낮은 전분질의 경우에는 더 높은 농도에서도 당화가 가능하다고 본다. 이와같은 고농도 당화는 생성된 당의 농축에 필요한 경비를 절감할 수 있을 뿐만아니라 반응장치의 규모를 축소시킬 수 있어 그 경제적 의의가 매우 크게 된다.

4. 다른 전분질의 무증자 당화

다른 전분질에 대하여서도 마찰매체를 활용하여 무증자 상태로 당화시킬 수 있는지의 여부를 검토하기 위하여 옥수수 분말, 감자 분말을 기질로하여 마찰상태 하에서 무증자 당화를 시킨 결과는 Figure 5와 같다¹⁵⁾.

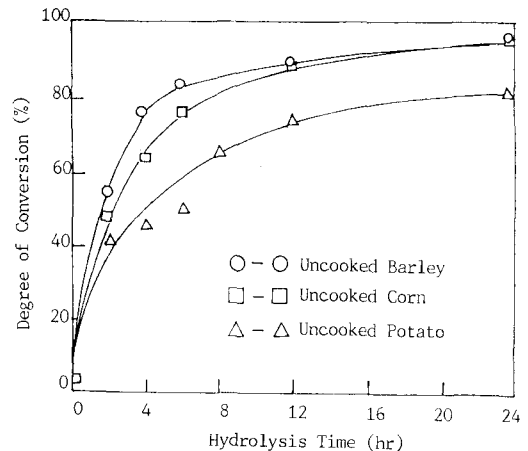


Fig. 5. Comparison of the progress of saccharification of uncooked barley, corn, and potato in an attrition-coupled reaction system.

실험기질 중 24시간 후의 쌀보리 당화수율은 0.96으로 가장 높았으며, 옥수수는 0.9, 감자의

경우 수율이 비교적 낮아 0.84정도였다. 감자의 당화수율이 낮은 이유는 감자 전분질의 현탁액은 주어진 농도에서 다른 전분질에 비해 점도가 높아 분쇄마찰매체의 기계적 운동을 저해함으로써 마찰매체에 의한 분쇄 및 마찰효과를 경감시킴에 있다고 유추되며 이는 전분질 입자의 구조적 특성과도 연관된다. 전분질 종류에 따라 분쇄마찰매체의 종류, 첨가량과 교반강도를 변화시키고, 또 각 전분질에 적절한 분쇄효소를 검색·대체 사용한다면 전분질의 종류에 관계없이도 높은 효율로 무증자 당화를 할 수 있으리라 예상된다.

V. 순수전분의 무증자 효소당화

1. 옥수수 전분(Corn Starch)의 고농도 당화

분쇄마찰 반응계에서 전분의 무증자 효소당화법의 중요한 장점중의 하나는 증자하지 않으므로 전분의 팽윤이 일어나지 않아 전분을 증자법에 비교하여 고농도로 첨가하여 당화시킬 수 있는데 있다. 분쇄마찰 반응계를 활용할 경우 효율적으로 당화가 가능한 최고의 전분 농도를 검토하기 위하여 옥수수 전분을 22.5, 39, 45% (w/v)의 고농도로 첨가하여 무증자 효소당화를 행하였다. Figure 6은 각 전분농도에서의 포도당 생성량을 경시적으로 비교하고 있으며, Figure 7은 생성된 포도당을 전분 첨가량을 기준으로 하여 수율로 환산한 결과이다¹⁶⁾. 또한 옥수수 전분 22.5% (w/v)를 증자법으로 액화한 후 다시 당화효소를 첨가하여 당화시켜 그 결과를 무증자군과 비교하였다.

옥수수 전분 농도가 22.5% (w/v)의 경우 반응 초기에는 무증자군이 다소 열세하였으나 4시간 후에 증자군과 유사한 수준에 도달하였다. 전분 농도를 증가시켜 39% (w/v)로 하였을 경우에는 8시간 경과후 무증자 전분의 75%가 당화되

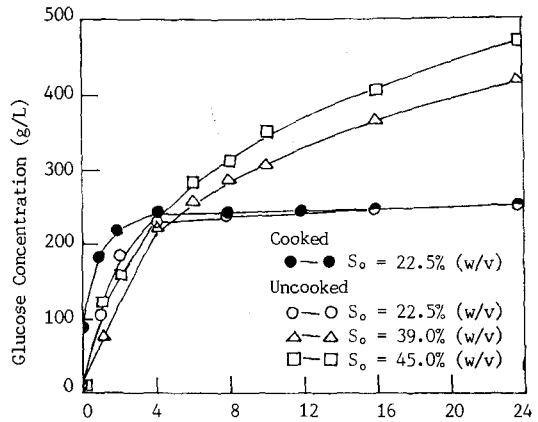


Fig. 6. Sacchrification of uncooked corn starch at high slurry concentration in an attrition coupled reaction system at 50°C.

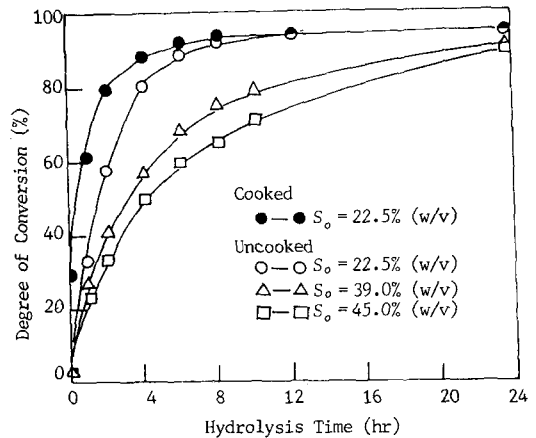


Fig. 7. Degree of conversion of uncooked corn starch at various slurry concentration in an attrition coupled reaction system.

었고 24시간 후에는 92% 당화되었다. 전분 첨가량을 더욱 증가시켜 기질농도가 45% (w/v)라는 초 고농도에서 당화시켰을 경우는 반응초기 당화수율이 다소 감소하여 8시간 경과후 65% 그리고 24시간 이후에는 90% (w/v)의 당화율을 나타내었다. 이와같이 초 고농도에서 반응초기 당화율이 다소 떨어지는 이유는 이와같은 높은 기질농도에서는 유동성 수분이 대부분 전분입자에

흡수되어 전분 현탁액이 교반되기 어려운 진한 반죽상태로 변하여 마찰매체에 의한 마찰이나 분쇄와 같은 기계적 운동이 저하되며 당화촉진 효과를 감소시키는데 기인한다. 따라서 옥수수 전분의 농도가 39% (w/v) 수준이 무리없이 고농도 당화를 행할 수 있는 최고농도라 판단된다. 이때 생성된 환원당 농도는 8시간후 325g/L였고, 24시간후에는 425g/L라는 매우 높은 농도를 얻을 수 있었다.

2. Fed-Batch식 당화

45% (w/v)와 같은 초 고농도의 경우 생전분을 반응초기에 전량 첨가하여 당화시킬 경우는 유동성 수분이 대부분 전분에 흡수되어 현탁액이 반죽상태로 변하여 전분에 대한 분쇄마찰 효과가 현저히 감소하게 된다. 이 결점을 극복하기 위하여 옥수수 전분을 반응초기에 전량 투입하지 않고 당화가 일부 진행된 후 분할하여 첨가하는 fed-batch식 기질 첨가법을 실험하여 시료를 일시에 첨가하는 batch식 기질 첨가법과 비교한 결과는 Figure 8과 같다¹⁶⁾.

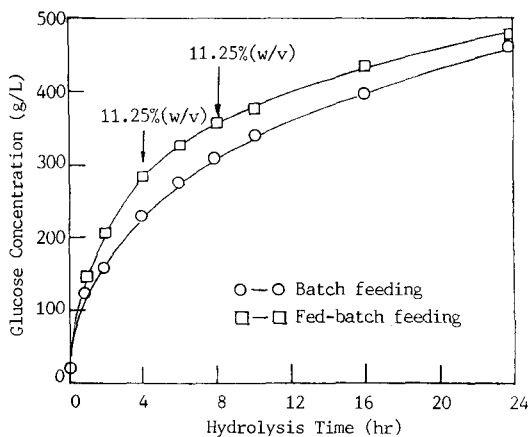


Fig. 8. Comparison of batch and fed-batch feeding of uncooked starch at high concentration of 45% (w/v) : initial 22.5% (w/v), the second and third feeding (11.25%) after 4 and 8 hrs, respectively.

예상대로 fed-batch식 기질 첨가법은 batch식 기질 첨가법에 비하여 좋은 결과를 보였다. 당화개시 8시간 후의 당화율을 비교하여 보면 batch식 기질 첨가의 경우는 약 65%가 당화됨에 비하여 fed-batch식 기질 첨가의 경우에는 75%가 당화되었다. 24시간경과 후에는 fed-batch식 기질 첨가법의 당화율은 94%의 수준에 이르렀고 이때 포도당의 농도는 460g/L라는 높은 수준에 이르렀다. 이와같은 fed-batch식 기질 첨가법이 batch식 기질 첨가법에 비하여 당화율이 증가한 이유는 fed-batch법의 경우 전분 현탁액의 점도에 직접적 영향을 주는 잔여 전분농도가 batch식 기질 첨가법에 비하여 낮기 때문에 유리구의 분쇄마찰 효과가 크게 되는데 기인된다고 생각된다. Fed-batch식 전분투여는 전분-효소 현탁액의 유동성을 유지하면서 충분한 분쇄마찰 효과를 주면서 고농도 무증자 당화를 행할 수 있는 효율적 당화방법임을 알 수 있다.

3. 생성당의 조성

이성화당(HFCS) 제조에는 고순도의 포도당을 필요로 하며 주정생산을 포함한 발효기질로 사용할 경우에도 포도당이 가장 바람직한 형태의 단당류라 할 수 있다. 통상의 전분분해 방법인 증자법과는 달리 분쇄마찰매체 함유 반응계에서의 무증자 당화는 유리구에 의한 물리적 충격효과를 주어 당화를 촉진시키게 되므로 그 당화액의 조성이 일반적으로 수행되는 증자법과 다소 상이할 수도 있다. 만일 당화액의 조성이 다르거나 기계적 충격으로 변형된 형태의 당류가 생성될 경우는 이성화당 및 주정발효의 기질로 이용하기 어려울 뿐만 아니라 주정발효시 미생물들의 다른 대사경로를 거쳐 불필요한 생성물이 생성될 수 있는 문제가 야기될 수도 있다. 따라서 이성화당 제조와 발효기질로서 적합한 조성을 갖고 있는지는 여부는 산업화에 매우 중요한 요소가 된다. 분

쇄마찰매체 함유반응계에서 생성되는 당화액의 특성을 검토하기 위하여 증자균, 분쇄마찰매체 첨가균, 그리고 매체를 첨가하지 않은 비교균 등으로 구별하여 당화시키고 각균의 시료를 경시적으로 HPLC를 이용하여 당조성을 분석한 결과는 Figure 9와 같다¹⁶⁾.

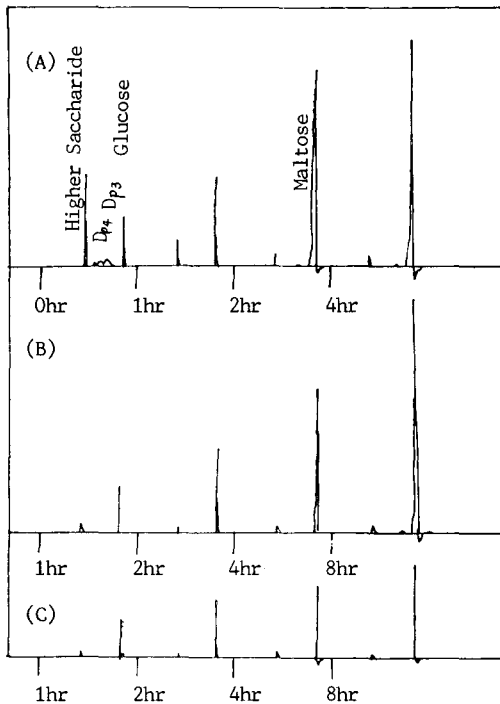


Fig. 9. The comparison of HPLC patterns of hydrolysate of cooked corn starch(A), uncooked with bead(B) and uncooked without bead as control(C) at 22.5% (w/v).

Figure 9(A)는 증자법으로 액화시킨 전분 액화액(0시간)과 전분 액화액에 당화효소를 첨가하여 당화시킨 후 1시간, 2시간, 4시간 경과후의 생성당의 분포도이다. 액화 전분액의 당 조성은 대부분 higher saccharide로 존재하였으며 소량의 maltose, maltotriose(DP₃), maltotetraose(DP₄)로 구성되었다. 포도당도 상당량 액화 과정중 생성

됨을 알 수 있다. 당화효소 첨가 후 1시간 후에는 maltotriose, maltotetraose가 감소되고 higher saccharide도 약 60% 정도 감소하였다. 반응 4시간 후에는 당화가 거의 종결되었다. 그러나 일부 존재하는 higher saccharide는 그 이후에도 소량으로나마 계속 감소되어 감을 알 수 있다. Figure 9(B)는 무증자 유리구 첨가균의 경시적 HPLC pattern이다. 생성된 당은 반응 초기부터 대부분 포도당으로서 증자균과 비교하여 상이 하였다. Higher saccharide양은 반응개시 시간이나 반응 종료에도 변화가 없음을 알 수 있으며, 생성된 당은 대부분 포도당으로 직접 전환되었다. 반응은 8시간 전후하여 대부분의 당화작용이 종료됨을 알 수 있다. Figure 9(C)는 유리구를 첨가하지 않은 무증자 당화균의 pattern이다. 당 조성은 유리구 첨가균과 유사하였으나 당화율은 매우 저조하였으며, 증자균과 유리구 첨가균을 비교해 볼 때 증자균의 경우 포도당의 생산은 빠른 시간내에 생성되지만 higher saccharide의 감소가 늦어 적어도 액화 후 4시간 이상이 경과되어야만 무증자 유리구 첨가균의 higher saccharide의 농도와 같아졌다. 반응 종료후 당화액의 조성은 양균 공히 4.5% higher saccharide와 0.7% maltose 그리고 94%가 포도당으로 똑같았다. 유리구 첨가균과 유리구 첨가하지 않은 균을 비교할 때 당생성 pattern은 유사하였으나 당화율은 현저한 차이가 있었다. 분쇄마찰 반응계에서의 생성되는 무증자 당화액은 증자법으로 생산한 당분과 비교하여 그 조성이 유사하였고 다른 불순물의 생성은 감지되지 않아 이성화당이나 주정발효의 기질로서 적절한 조성을 갖고 있다고 판단된다.

4. 분쇄마찰매체의 물리적 충격하에서의 전분 분해효소의 안정성

분쇄마찰매체를 첨가하여 교반하면서 무증자 전분을 효소당화시킬 경우에는 분쇄 또는 마찰과

같은 기계적 운동이 수반되며 이에 따른 효소의 실활이 예상된다. 따라서 분쇄마찰과 같은 shearing 상태하에서 사용된 전분 분해효소의 안정성을 검토 하였다. 먼저 당화효소 Diazyme L-30 D와 액화효소 Taka Therm L-34D의 혼합효소를 0.05M citrate buffer(pH 3.8)에 8.8mL/L가 되도록 희석시킨 후 효소 안정제인 Ca^{++} 을 20ppm 첨가 하였다. 상기용액에 직경 3mm인 유리구를 600g/L 혼합한 후 항온진탕장치에서 진폭 3cm 회전운동으로 280rpm의 속도로 50°C에서 교반하면서 분쇄마찰매체를 첨가한 군과 첨가하지 않은 control군의 효소역가의 변화를 측정하여 효소의 안정성을 비교 검토하여 보았다. 혼합한 효소의 활성도 변화를 비교한 결과는 Figure 10과 같다¹⁶⁾.

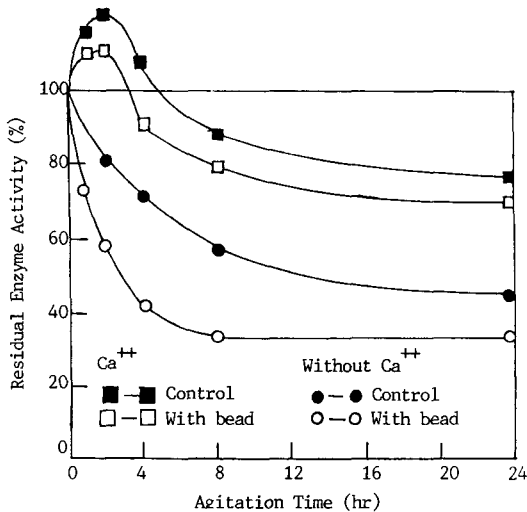


Fig. 10. Deactivation of mixed enzyme by the mechanical shearing of attrition-milling media; enzyme content 8.8mL/L, 600g bead/L, 280 RPM, pH 3.8, and 50°C.

상기 혼합효소는 control의 경우에는 24시간 경과 후 약 20% 정도 실활되었으며 분쇄마찰매체 첨가군은 control에 비해 더 실활되었다. 그러나 그 차이는 매우 근소하여 약 5~8% 수준으로서

분쇄마찰매체의 기계적 운동이 효소실활에 미치는 영향은 예상과는 달리 매우 적어 본 연구에 사용하고있는 분쇄마찰조건 하에서는 매우 안정함을 보여주고 있다.

Ca^{++} 은 전분분해 효소의 안정제로서 매우 중요하며, 특히 분쇄마찰 상태하에 있는 효소는 물리적 충격에 의한 효소실활이 수반되는데 효소의 안정성에 미치는 Ca^{++} 의 영향을 검토하고자 상기 혼합효소에 20ppm의 Ca^{++} 를 첨가한 군과 첨가하지 않은 군의 효소실활 정도도 Figure 10에 아울러 표시하였다. Ca^{++} 은 전분분해 효소를 크게 안정화시켰을 뿐만 아니라 활성화 시켰다. 특히 Ca^{++} 을 첨가하지 않은 경우에는 효소는 분쇄마찰매체의 물리적 충격에 불안정하여 8시간 경과후 약 70% 정도가 실활되었다. 반면 Ca^{++} 을 첨가한 경우에는 8시간 경과 후 약 10% 정도만이 실활되어 Ca^{++} 은 효소를 물리적 충격에 잘 적용할 수 있는 분자구조로 변형함을 알 수 있다. 이는 무중자 전분의 분쇄마찰매체 반응계를 활용한 당화에는 Ca^{++} 과 같은 효소 안정제의 역할이 매우 중요함을 나타내고 있다.

VI. 분쇄마찰효소 반응계의 생전분 효소당화 촉진 메카니즘

분쇄마찰매체에 의한 무중자 생전분의 효소당화 촉진기작(mechanism)을 전분의 구조적 측면을 중심으로 규명하여 보았다¹⁷⁾. 효소를 첨가하지 않고 단지 생전분만을 당화촉진 효과를 줄 수 있는 수준으로 분쇄마찰매체로 교반시킬 경우에는 생전분의 미세결정구조(microcrystalline structure)파괴는 물론 전분입자의 붕괴(fragmentation) 현상도 관찰되지 않았다. 생전분 입자구조 변화의 중요한 특징은 입자구조의 팽윤(swelling) 현상으로써 팽윤된 전분은 보수능력이 2.5배 정도까지 증가되었다. 이와같은 기계적 충격에 의한 전분입자의 팽윤현상은 가열호화에 의한 α -전

분화에 따른 팽윤현상과는 아주 다른기작(mechanism)이었다. 생전분을 장시간 bead-milling으로 전처리 하여 팽윤시킨 생전분은 당화가 촉진되었으나 유리구와 효소를 동시에 첨가시킨 경우의 당화속도와 수율에 미치지 못하였다.

반면 효소를 첨가하여 분쇄마찰 반응계에서 무증자 전분을 당화시킬 경우에는 생전분은 2시간 전후하여 수 많은 입자로 붕괴(fragmentation)되었으며, 생전분의 당화촉진 기작(mechanism)은 분쇄마찰매체에 의하여 전분입자가 균열팽윤되고 이 팽윤된 생전분은 보다 쉽게 효소작용을 받아 침식되며 이 침식된 전분입자는 분쇄마찰매체에 의하여 더욱 가속적으로 붕괴(fragmentation)되어 효소작용이 촉진된다고 판단된다. 옥수수, 감자, 고구마 등 각종 생전분은 그 종류에 따라 분쇄마찰 반응계를 활용한 무증자 당화에 많은 차이가 있었으며 이는 전분입자의 구조와 연관된다고 판단된다.

VII. 무증자당화액과 부분당화 전분액의 알코올 발효성

분쇄마찰 반응계에서 부분 또는 완전 당화시킨 무증자 전분 당화액의 알코올 발효성을 쌀보리를 원료로 하여 검토하였다¹⁸⁾. 분쇄마찰매체 반응계를 이용한 쌀보리 무증자 효소당화의 경우는 앞에서 설명한 바와 같이 8~12시간 후에 대부분의 전분질이 분해되어 당화가 종결된다. 그러나 전분질을 12시간과 같은 장시간 동안 분쇄마찰 상태로 처리하여 완전 당화시키지 않고 짧은 시간 동안 부분적으로 당화시킨 전분질을 발효기질로 사용할 수 있다면 교반에 소모되는 에너지를 절감할 수 있게된다. 부분당화된 전분질은 분쇄마찰매체의 물리적 충격으로 전분입자구조가 팽윤되고 작은 입자로 분쇄되어 있어 발효조건에서도 당화가 용이하게 진행될 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 적절한 생전분질의 부분당화시간을

검토하기 위하여 무증자 쌀보리를 0, 1, 2, 4, 8 그리고 16시간 동안 분쇄마찰매체 반응계에서 전처리하여 부분 또는 완전당화시킨 후 이를 다시 발효에 적합한 온도(30°C)로 낮추고 분쇄마찰매체의 교반없이 서서히 흔들어주면서 계속 당화시켜 생성당을 측정 한 결과는 Figure 11과 같다.

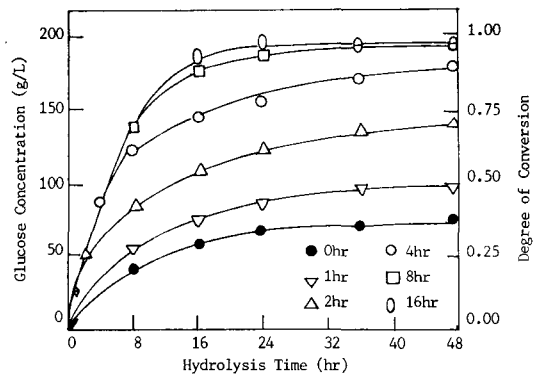


Fig. 11. Saccharification of partially saccharified uncooked barley in bead-milling system for various times under the fermentation condition.

분쇄마찰매체로 교반하지 않은 무증자 쌀보리(0시간)는 발효 조건하에서 계속 당화시킬 경우 48시간 경과 후에도 40% 정도만이 당화되었다. 그러나 분쇄마찰 상태에서 부분당화시킨 생전분은 bead milling시간이 길수록 발효 조건인 30°C에서도 당화가 쉽게 이루어졌다. 1시간 이내의 bead milling효과는 Figure 11에서와 같이 bead milling을 하지 않은 군의 당화율과 비교하여 큰 차이가 없었다. 반면 2시간 이상 bead milling하여 부분당화시킨 전분질은 발효조건에서도 당화가 비교적 용이하게 진행되었다. 그러나 2시간동안 부분당화한 군의 경우는 48시간 후에도 당화가 완결되지 않아 이를 발효기질로 사용하기에는 부적당하다고 판단된다. 4시간 이상 bead mi-

lling한 균들은 발효조건하에서 48시간 경과 후 당화가 거의 종결되었으며, 발효기질로 적합한 생전분의 부분당화시간은 적어도 4시간 이상임을 알 수 있었다.

위에서 관찰한 바와 같이 부분당화된 전분질은 구조적인 변형으로 인하여 발효 조건에서도 당화가 용이하여 이를 직접 알코올 발효기질로 사용이 가능하다. Figure 12는 부분당화 시간이 다른 전분질의 발효성을 증자법으로 완전 당화시킨 당화액의 발효성과 비교하고 있다.

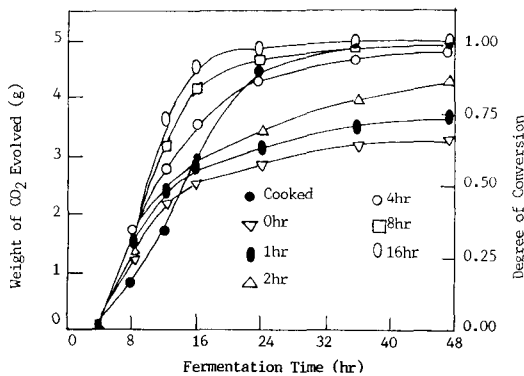


Fig. 12. Fermentability of completely or partially saccharified uncooked barley in an attrition-coupled system for various times.

Figure 12에서와 같이 대부분의 무증자균은 초기 발효속도가 증자균에 비하여 빨랐다. 특히 분쇄마찰매체 함유반응계에서 8시간 이상 당화시킨 무증자 전분 당화액의 경우는 초기 발효속도 뿐만 아니라 최종 알코올 수율도 증자법의 수준보다 우수하였으며, 발효는 20~24시간 경과 후 종결되어 증자법의 32시간에 비하여 발효 시간이 단축되었다.

반면, 이 반응계에서 2시간 이하 처리군의 경우에는 초기 발효는 신속히 진행되었으나 최종 알코올 수율이 낮아 실용화 하기에는 부적합하

다고 사료된다. 4시간 부분당화시킨 전분액의 경우는 초기 발효 속도는 증자법에 비하여 빨랐으나 후반 발효 속도가 다소 감소되었으며, 알코올 수율은 24시간 경과 후 증자균과 유사하게 되었다. 분쇄마찰매체 반응계에서 4시간 동안 부분당화시킨 전분액을 발효기질로 사용하였을 때 발효 기간별로 전분, 포도당, 알코올 농도의 변화를 도시하면 Figure 13과 같다.

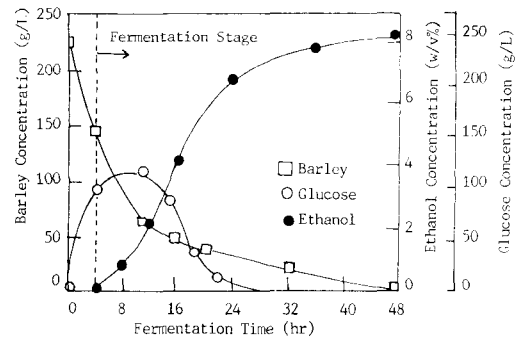


Fig. 13. Concentration profile of starch, glucose, ethanol during fermentation of 4hr partially-saccharified uncooked barley in a bead-milling system.

생전분의 당화는 12시간 이내에 가장 활발히 진행되었으며, 전체 전분의 약 80%가 당화되었다. 또한 당화 개시 후 12시간까지는 당화 속도가 발효 속도보다 빠르기 때문에 발효액중의 포도당 농도가 계속 증가하고 있다. 발효개시 6~8시간 이후 발효 속도가 점차 빨라져서 알코올 농도가 급격히 증가하였으며, 발효액중의 잔류 포도당이 계속 감소하다가 24시간 이후에는 거의 소멸되었다. 그 이후에는 포도당의 축적이 없어 전분이 당화되는 즉시 알코올로 전환됨을 알 수 있으며 24시간 이후의 발효 속도는 당화 속도에 의하여 주로 결정됨을 알 수 있다.

VIII. 결 론

전분질의 무증자 당화는 증자당화에 비하여 많은 장점이 있으나 당화속도와 당화율이 낮아 개선이 요구되고 있다. 무증자 전분질의 당화를 촉진시키기 위해 전분질과 효소의 현탁액에 분쇄마찰 매체를 첨가하여 분쇄마찰 효과를 주면서 생전분을 무증자 효소당화시키는 새로운 당화법을 소개하였다. 쌀보리를 원료로 하여 실험한 결과 증자법에 유사한 당화속도를 얻었으며, 당화율은 증자법을 능가하였다. 뿐만 아니라 38% (w/v)의 고농도에서도 당화가 가능하여 고농도 당화액을 얻었다. 분쇄마찰매체는 유리구를 사용하였으나 비중이 가벼운 폴리아세탈과 테프론 구로도 우수한 당화촉진 효과를 얻었다.

옥수수전분도 39% (w/v)와 같은 높은 전분농도에서도 효율적 당화가 가능하였으며, 8시간 후 75%, 24시간 후에는 92% 이상 분해되었고 이때 당 농도는 425g/L였다. 생성당 조성을 HPLC로 분석한 결과 증자법의 경우와 조성이 유사하였으며 이성화당 제조나 주정발효의 기질로 적합한 특성을 가졌다. 분쇄마찰매체의 shearing에 의한 효소실활을 검토한 바 본 연구에서 사용한 정도의 교반강도 하에서는 비교적 안정하였다. 당화 촉진기작(mechanism)도 아울러 검토하였다.

분쇄마찰매체 반응계를 이용 부분 또는 완전 당화시킨 무증자 전분 당화액의 발효기질로서의 적합 여부를 쌀보리 전분을 원료로 하여 검토하였다. 무증자 전분의 완전 당화액을 기질로 알코올 발효시킨 결과 초기 발효속도 뿐만 아니라 최종 발효수율도 증자법으로 당화시킨 액에 비하여 우수하였다. 분쇄마찰매체 반응계에서 4시간 정도 부분 당화시킨 무증자 전분은 입자가 구조적으로 팽윤되어 있었고 또한 미세한 입자로 분쇄된 상태로 변형되어 있어 발효조건인 30°C에서도 쉽게 당화가 진행되었다. 생전분질을 분

쇄마찰매체 반응계를 활용하여 당화를 촉진시키고 동시에 발효를 행하는 무증자 동시 당화-발효법을 시도하였으나 발효속도 및 수율이 저조하였다. 이는 당화 온도가 낮아 당화가 저해될 뿐만 아니라 분쇄마찰매체에 의하여 효모가 사멸되는데 주로 기인하였다. 분쇄마찰매체의 물리적 충격은 오염균인 세균류를 사멸시키는 효과는 적었으나 일단 물리적 충격을 받은 오염균은 발효 과정중 증식이 현저히 억제되었으며, 무증자 전분을 기질로 알코올 발효시킬 때 일어나는 오염문제를 경감시킬 수 있는 가능성을 제시하였다.

분쇄마찰매체를 활용한 전분질의 무증자 당화는 지금까지 시도되지 않은 새로운 전분질 무증자 당화법으로서 산업화를 위해서는 분해조건의 최적화, 최소의 에너지 소모로 최대의 당화 촉진 효과를 얻을 수 있는 고효율 장치의 개발, 그리고 새로운 당화공정의 경제성에 대한 평가가 요망된다.

IX. 참고문헌

1. 이용현 : 유전공학 2(4), 12(1984).
2. Maiorella, B., C. R. Wilke, H. W. Blanch : *Adv. in Biochem. Eng.* (Fiechter, A., ed.) Springer-Verlag, Berlin, Vol. 20, 43(1981).
3. Hunt, V. D. : *The Gasohol Handbook*, Industrial Press, Inc., New York, (1981).
4. Park, Y. K., B. C. Rivera : *Biotechnol. Bioeng.* 24, 495(1982).
5. Fujio, Y., P. Suyanada, P. S. Attasampunna, S. Ueda : *Biotechnol. Bioeng.* 26, 315(1984).
6. Svendsby, O., K. Kakutani, Y. Matsumura, M. Itazuka, and T. Yamamoto : *J. Ferment. Technol.*, 59, 485(1985).
7. 오평수, 차두중, 서항원 : 산업미생물학회지 14(5), 415(1986).

8. 오성권, 권호정, 오평수 : 산업미생물학회지 15(6), 408(1987).
9. Ueda, S., Y. Koba : *J. Ferment. Technol.*, 58(3), 237(1980).
10. Matsuoka, H., Y. Koba, S. Ueda : *J. Ferment. Technol.*, 60(6), 599(1982).
11. 배무, 이재문 : 산업미생물학회지 11(3), 181 (1983).
12. 배무, 이재문 : 산업미생물학회지 12(4), 261 (1984).
13. 이상열, 신용철, 이석희, 박성숙, 김형수, 변시명 : 한국식품과학회지 16(4), 463(1984).
14. 박관화, 오병하, 이계호 : 한국농화학회지 27 (1), 52(1984).
15. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지 14(1), 29 (1986).
16. 이용현, 조구형 : 산업미생물학회지 14(5), 399(1986).
17. 조구형, 이용현 : 산업미생물학회지 14(5), 407(1986).
18. 조구형, 이상호, 이용현 : 산업미생물학회지 15(3), 196(1987).