무증자 알콜발효를 위한 생전분 분해 효소의 개발 동향과 주류공업에의 이용방향

신 용 철
(경상대 자연과학대학
미생물학과 교수)

■ 목 차 ■

Ⅰ. 서론
Ⅱ. 생전분 분해효소제의 개발
1. 국외의 생전분 분해 아밀라제의 개발
2. 국내의 생전분 분해 아밀라제의 개발
3. 생전분 분해를 도와주는 기타 효소류
Ⅲ. 생전분의 구조와 효소작용과의 관계
Ⅳ. 생전분 분해 효소제를 이용한 알콜발효
Ⅴ. 주류공업에서의 이용 방향
Ⅵ. 참고 문헌

Ⅰ. 서 론

아밀라제는 역사적으로 아주 오랜 옛날부터 사용되어지던 효소이며 이 효소에 관한 연구도 1883년 Payen과 Persoz가 맥아의 아밀라제를 분리하면서 부터 시작되어 그 역사가 매우 깊다. 이러한 아밀라제의 오랜 역사에 일대 변혁이 일어났는데 그것은 생전분 분해력이 강한 아밀라제의 발견이다. 생전분 분해 아밀라제는 기존의 호화전분에 작용하는 아밀라제와는 달리 생전분에 흡착하는 능력이 있고 특히 전분립(Starch granule)을 분해하는 능력이 뛰어나다. 이 연구는 1943년 일본의 上田등에 의해서 시작되었으며 1973년 오일쇼크 이후로 그 중요성이 크게 인식되기 시작했다.

알콜은 새로운 대체에너지로 개발해 보고자 하는 연구팀에서나 증자공정 없이 알콜음료를 생산하고자 하는 주류업계에서는 알콜 발효에 있어서 전분질 원료의 증자에 드는 에너지를 절감하기 위해서 무증자 전분질 원료의 당화, 발효 연구가 필요하게 되었던 것이다.

이러한 연구의 핵심은 생전분을 효과적으로 분해할 수 있는 생전분 분해효소제의 개발에 있다. 上田등의 선구자적인 연구이래로 지금까지 여러종류의 생전분 분해 아밀라제가 연구되어 왔다.

본 논문에서는 생전분은 분해하기 위한 아밀라제와 기타 효소류의 개발 및 이 효소제를 이용한 알콜발효 연구의 현황을 살펴보고 우리 주정공업에서의 이용 방향을 검토해 보고자 한다.

Ⅱ. 생전분 분해 효소제의 개발

1. 국외의 생전분 분해 아밀라제의 개발

생전분 분해 효소제에 관한 연구는 국외의 경우 거의 일본에서 진행되어 왔으므로 일본의

연구개발 현황을 살펴보고자 한다. 지금까지 연구되어 온 주요한 아밀라제를 정리해 보면 표1과 같다. 생전분을 분해하는 글루코아밀라제는 Aspergillus awamori, Rhizopus sp., Endomycopsis fibligera, R. niveus, chalara paradoxa, Aspergillus sp. K-27, R. delemar 등과 같은 곰팡이가 분비하는 것들이 분해활성이 높은 것으로 나타났다. α-아밀라제와 β-아밀라제는 Streptococcus bovis, Bacillus polymixa, B. circulans F-2등과 같은 세균이 분비하는 것들이 생전분 분해 활성이 높은 것으로 보고 되었다. 지금까지 보고된 많은 생전분 분해 아밀라제 중에서 A. awamori, Rhizopus sp., B. circulans F-2, chalara paradoxa, Aspergillus sp. K-27등이 분비하는 아밀라제가 집중적으로 연구되어 왔기 때문에 이들을 중심으로 고찰하고자 한다.

Table 1. Some characteristics of raw Starch Hydrolyzing amylases developed in Japan.

Origin	Amylase type	optimum temperature (℃)	optimum pH	Temperature Stability (℃)	pH Stability	References
Aspergillus awamori	gluco-	-	3.5	-	-	1,2,3,4,5
Rhizopus sp.	gluco-	40	4.5	20-45	3.5-6.0	6,22,23
Streptococcus bovis	α-	50	5.6	45	5.0-7.0	7
Bacillus polymyxa	β-	-	7.0-8.0	-	5.0-8.0	34
Bacillus circulans F-2	α-	60	6.0-6.5	-	6.5-12.0	8,9,32,33
Endomycopsis fibligera	gluco-	-	4.5	-	-	10,11
Rhizopus niveus	gluco-	-	4.0-6.0	-	-	12
Chalara paradoxa	gluco-	45	5.0	45	4.5-7.5	13,14,15
Aspergillus sp. K-27	gluco-	55	4.2-5.9	55	4.0-7.1	16,17,24,25,26
Bacillus sp. No. 2718	β-	55	-	50	-	18,19

上田등은 1945년 고구마를 사용한 생전분 알콜발효 연구를 처음으로 수행하였다. 이 연구에서 흑국균의 아밀라제가 다른 황국균이나 맥아보다 생전분 분해력이 크고 내산성인 것을 발견하고 흑국균의 아밀라제를 사용하는 경우 생전분 발효시 잡균의 오염을 막을 수 있어 무증자 알콜발효에 적당한 것으로 생각했다(1, 2). 흑국 아밀라제가 생전분을 잘 분해하기 위해서는 생전분이 고체이기 때문에 아밀라제가 전분립에 빈번히 충돌하지 않으면 안된다. 따라서 생전분 분해 효소는 전분립에 대한 흡착력이 커야 하는데 흑국 아밀라제를 조사해 본 결과 pH3.6에서 흡착력이 최대였으며 동시에 생전분 분해력도 최대였다. 上田등은 흑국균에서 생전분에 흡착력이 있는 글루코아밀라제 I과 생전분에 흡착력이 없는 글루코아밀라제 II가 있음을 발견하였고, 글루코아밀라제 I에 α-아밀라제를 첨가하는 경우 생전분 분해능이 2-3배 증가되는 것으로 나타났다(21). 또한 흑국균의 글루코아밀라제 I은 glycogen의 β-limit dextrin을 완전히 분해하였지만 글루코아밀라제 II는 약 40%밖에 분해하지 못했다. 이 결과로 글루코아밀라제 I은 자신이 debranching amylase 활성이 있는 것으로 결론지었다(5).

일본의 산토리 발효(주)의 Kunisaki와 Matsumoto 등은 각종 미생물의 당화소제를 무증자 알콜발효법에 적용했을때 표2와 같은 결과를 얻었다(22). Rhizopus sp. 기원의 효소제를 사용하는 경우 발효종료액의 pH가 4.83, 생성 알콜 농도가 14.3%(v/v), 발효효율이 87.8%로서 대단히 좋은 결과를 얻었다. Rhizopus sp.의 당화효소제는 호화전분과 생전분 기질에 대한 최적 반응 pH는 각각 5.0과 4.5였다. 또한 호화전분과 생전분에 대한 효소의 pH 안정성

Table 2. Comparision of fermentation results with various kinds of saccharifying enzyme preparations.

Enzyme prepartion	Enzyme quantity*	Final			Fermentation efficiency
		pH	T.A.**	Alc.	
Rhizopus sp.	4.0	4.83	3.0㎖	14.3%	87.8%
Aspergillus sp.	4.2	4.78	3.2	12.5%	76.7
Bacillus sp.	5.3	4.27	6.2	9.8	61.4
Endomycopsis sp.	3.9	4.25	5.7	8.6	51.4

* Units of saccharifying power assayed by the method of JIS K 700 per one gram of maize.

** Total acidity.

은 pH 3.5-6.0사이에서 나타났다. 호화전분과 생전분에 대한 최적 반응온도는 각각 55℃와 40℃부근이었고 20~45℃사이에서 열안정성을 보였다. 이러한 효소적 성질은 전분질원료의 동시 당화 발효에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료되었다. 동시 당화, 발효를 하는 경우 발효조내의 알콜농도가 효소제의 활성에 미치는 영향을 살펴보면 그림 1, 2와 같다. 그림에서 보듯이 전분질 기질이 존재하는 경우 상당한 알콜농도 하에서도 Rhizopus sp. 효소제의 활성이 유지되었으나, 전분기질이 존재하

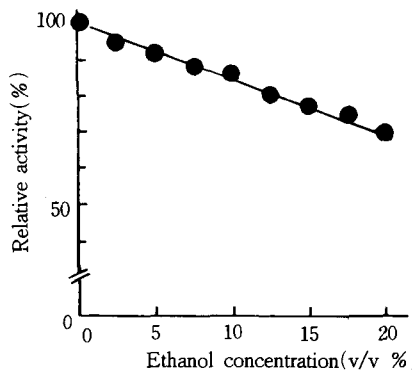

Fig. 1. Effect of ethanol concentration on raw starch digestibility of glucoamylase preparation from *Rhizopus* sp. in existence of substrate.

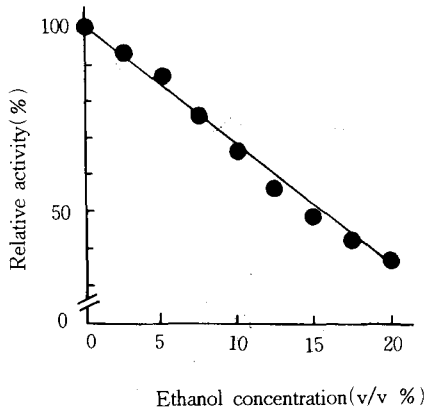

Fig. 2. Effect of ethanol concentration on raw starch digestibility of glucoamylase preparation from *Rhizopus* sp. in the absence of substrate.

지 않을 경우 다소 급격히 효소활성이 떨어지는 것으로 나타났다. 무증자 발효의 경우 전분의 사입농도가 높아도 상관없으나 최종적으로 만들어질 알콜농도를 고려할 때 알콜농도가 14~15%(v/v) 생성될 수 있는 정도의 전분원료를 사용하는 것이 당화효소제의 불활성화를 막고 효율적으로 이용할 수 있는 방법인 것으로 판단되고 있다. Rhizopus sp. 효소제는 포도당 농도가 2% 이상이 되면 생전분이나 호화전분에 대한 분해능력이 급격히 떨어지는 것으로 나타났으며 생전분에 작용하는 경우 4%이상의 포도당 농도에서 초기활성의 20~30%가 유지되었다. 따라서 Rhizopus sp. 효소제를 사용하는 경우 효모량을 조절하여 알콜생성 속도를 조절할 필요가 있다고 판단된다. Rhizopus sp. 배양액을 유안분획 후 DEAE-sephadex A-50 chromatography를 수행하면 F1, F2, F3, F4의 활성분획을 얻을 수 있다. 이 분획을 이용해서 연구해 본 결과 생전분 분해에는 글루코아밀라제 이외에도 α-아밀라제, 셀루라제, 프로테아제 등이 관여하여 생전분 분해능을 높이는 것으로 나타났다(23).

Table 3. Digestibilities of various kinds of raw starches with crude enzyme.

Sources	Initial velocity (μmol Glc/min/ml)	Activity ratio (Gel./Raw)
Potato	0.409(72*)	12.2
Sweet potato	0.425(75)	11.7
Wheat	0.476(83)	10.5
Tapioca	0.518(91)	9.7
Corn	0.571(100)	8.8

* Relative Vaiue

흑국균이나 Rhizopus sp.의 효소제가 연구된 이후로 비교적 최근에 생전분 분해력이 강한 Aspergillus sp. K−27균주와 chalasa paradoxa의 두 곰팡이가 분리되었다. Aspergillus sp. K−27 균주는 표3에서 보는 바와 같이 옥수수 생전분을 100%로 하였을때 감자 생전분에 대하여 72%의 분해력을 보였다. 지금까지의 연구를 보면 곡류전분은 비교적 잘 분해되지만 감자, 카사바 전분등은 분해하기 어려운 것으로 나타났다. Aspergillus sp. K−27 균주가 생산하는 글루코아밀라제는 쌀, 옥수수 등의 곡

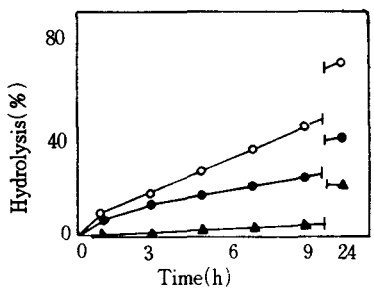

Fig. 3. Hydrolysis of raw corn starch with purified glucoamylases.

Conditions, see Fig. 3.

Key:O, *Aspergillus* sp. K−27, ●, *R. delemar* GILL; ▲, *A. niger*.

류전분 뿐만아니라 감자, 고구마, 카사바 등의 생전분도 잘 분해하는 것이 특징이다. 그림3은 Aspergillus sp. K−27의 효소제와 R. delemar, A. niger의 효소제와 생전분 분해력을 비교한 것인데 두 효소제에 비해서 분해력이 큰 것으로 나타났다. 기존의 A. niger(27), A. oryzal(28), Rhizopus sp.(29,30), A. awamori(31)등이 생산하는 효소제에는 생전분 분해력이 큰 효소와 약한 효소가 분명하게 존재하는데 그 이유는 곰팡이가 분비하는 프로테아제에 의해서 글루코아밀라제가 부분적으로 분해가 일어나거나, 혹은 α−글루코시다제에 의해서 효소에 붙어있는 당부위가 잘려나가므로써 생전분 분해력이 약한 것들이 생기기 때문인 것으로 보고 있다. 따라서 곰팡이 배양액에 일반적으로 존재하는 프로테아제는 생전분 분해력의 저하를 가져오는 원인이 되고 있다. Aspergillus sp. K−27 균주는 배양액 중에 산성 프로테아제 활성이 거의 없어 다른 곰팡이 효소제보다 생전분 분해력이 큰 것으로 생각되고 있다. 이 효소제를 이용하여 옥수수 전분을 500μm이하로 분쇄하고 전당 농도 20%로 사입하여 무증자 알콜 발효를 하였다. 조효소액을 중량비로서 대당 0.1%를 가하고 32℃에서 20시간 예비당화후 효모를 첨가하여 발효하였는데 85시간 후에 알콜 농도 11.9%(v/v), 발효효율이 90%에 이르렀다. 예비 당화 과정을 없애는 경우 0.2%이상의 효소가 소모되었다. 또 70℃에서 30분, 혹은 57℃에서 60분 저온 증자를 하는 경우 0.06%의 효소제가 필요하였다. 이상의 결과를 토대로 보면 Aspergillus sp. K−27 균주가 분비하는 당화효소제는 전분질 원료의 저온증자, 혹은 무증자 당화, 발효에 유용한 효소라고 판단된다(16, 17, 24, 25, 26).

최근에 Sago palm에서 분리한 chalasa paradoxa의 당화효소제는 현재까지 개발된 기존의 어느 효소보다 호화 전분 분해력에 대한 생전분 분해력이 크다는 장점이 있다. 표4에서 보는 바와 같이 Rhizopus sp.나 A. niger의 효소

제가 생전분 분해력/호화전분 분해력이 3.3-10.5% 사이에 있는데 반해서 chalasa paradoxa 효소제는 26.0%라는 월등히 생전분 분해력이 높은 것으로 나타났다(13-15).

Table 4. Ratio of raw starch digesting activity to gelatinized starch-saccharifying activity.

	Glucose*(μg)		Ratio(%)
	Gel.**	Raw***	Raw/Gel.
Chalara	595	155	26.0
Rhizopus 1	675	71	10.5
Rhizopus 2	400	17	4.2
Asp. niger	570	19	3.3

* Amount of glucose released by the enzyme(about 0.2IU/ml) action or 15min at 40℃

** Gelatinized soluble starch as a substrate.

*** Raw corn starch as a substrate Raw starch digestivity is defined as

$$\frac{\text{Activity for raw starch}}{\text{Activity for gelatinized starch}} \times 100$$

지금까지 생전분을 분해하는 글루코아밀라제에 대하여 살펴보았다. α-아밀라제와 β-아밀라제로서 생전분을 강력하게 분해하는 것으로는 B. circulans F-2 균주가 분해하는 α-아밀라제와 Bacillus sp. No 2718 균주가 분비하는 β-아밀라제가 있다. B. circulans F-2 균주가 분비하는 α-아밀라제는 그림4에서 보는 바와 같이 분해하기 어려운 것으로 알려진 감자전분을 비롯하여 Sago, nagima등의 분해력이 뛰어난 것으로 나타났다(8,9,30,33).

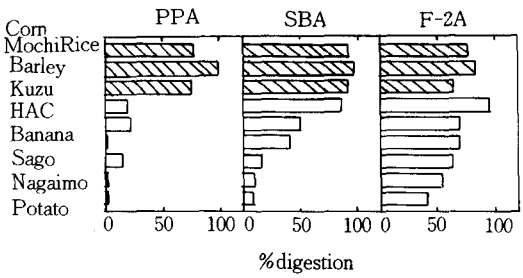

Fig. 4. Comparison of digestive activities of *Bacillus circulans* F-2 amylase(F-2A), porcine pancreatic α-amylase(PPA) and *Streptococcus bovis* α-amylase(SBA) toward starch granules of various origines.

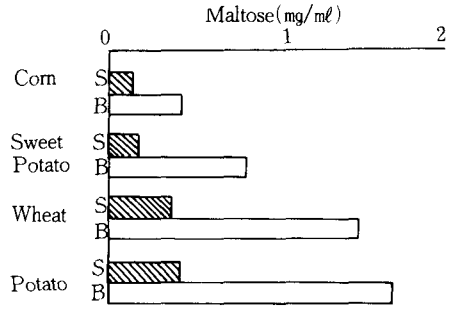

Fig 5. Digestion of various raw starches at 50℃ for 60min with β-amylases. B. Bacterial No. 2718 β-amylase; S, soy-bean β-amylase.

Bacillus sp. No 2718이 분비하는 β-아밀라제는 그림5에서 보는 바와 같이 감자 생전분을 잘 분비하는 것으로 보고되었다(18,19). 따라서 이들 α-, β-아밀라제를 곰팡이 기원의 글루코아밀라제와 함께 사용하면 분해하기 어려운 감자, 카사바 등의 생전분을 효과적으로 당화, 발효할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 국내의 생전분 분해 아밀라제 개발

국내에서도 생전분 분해효소의 개발에 관한 연구가 진행되고 있다. 정등(35-37)은 동경대에서 개발한 B. circulans F-2 균주의 α-아밀라제를 연구 보고 하였다. 또한 이들은 R. oryzal의 두가지 형태의 글루코아밀라제를 분리하여 생전분 분해 실험을 수행한 바 있다(38-40). Streptomyces sp. 4M-2가 분비하는 생전분 분해 α-아밀라제를 보고 하였는데 분자량이 102KD이고 감자 생전분을 잘 분해하였

다(41). 태평양화학(주) 기술연구소에서는 쌀보리 전분 당화효소를 Screening하며 Rhizopus sp. No. 281 균주가 생전분 분해력이 뛰어난 것으로 보고 하였으며(42), 옥수수 전분 당화효소로는 A. niger No. 55가 분해력이 큰 것으로 보고 하였다(43). 정등(44)은 A. usamii IAM 2185가 다른 Aspergillus속의 균주보다 생전분 분해 글루코아밀라제 활성이 높은 것으로 보고 하였다. 박등(45)은 Bacillus sp.를 토양에서 분리하여 생전분 분해 연구를 하였고, 배한산업(주)의 배등(46)은 Rhizopus Koji를 이용하여 탁주제조용 알콜 발효를 수행하였는데 알콜 함량이 높고 쌀의 생취가 나는 탁주를 제조할 수 있었다.

국내에서도 생전분 분해력이 큰 미생물의 Screening과 효소에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 아직까지 각 분리균주간의 생전분 분해력의 실질적인 비교와 효소의 생산성, 주류공업에의 이용가능성 등이 검토되지 못하고 있는 아쉬움이 있다. 차후에 생전분 분해 효소제의 개발에 체계적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

3. 생전분 분해를 도와주는 기타 효소류

생전분을 분해하는 아밀라제 이외에도 전분립의 분해를 도와주는 효소들이 있다. Tobias (47)등은 카사바전분 당화에 셀루라제를 첨가하였을때 당의 생성 속도가 증가되었고 당화액의 점도를 감소시킬 수 있었다고 한다. Svendsby 등(48)은 pectin depolymerase가, Ueda등(49)은 흑국균 Koji속에 있는 xylanase와 cellulase가, Yamamoto등(50)은 protease와 pectin depolymerase가 생전분의 당화와 발효를 촉진시켰다고 보고하였다. 이러한 효소들은 전분입자의 세포벽 성분을 분해하거나 입자내에 존재하는 고분자 물질들을 분해하여 당화액의 점도를 감소시키므로써 당화, 발효 속도를 가속시킨 것으로 생각되고 있다.

Ⅲ. 생전분의 구조와 효소작용과의 관계

생전분립의 효소에 의한 분해성을 이해하기 위해서는 표5에서 보는 바와 같이 전분립의 특성과 효소의 특성을 함께 고찰하여야 한다(51, 52). 일반적으로 땅속 뿌리와 같은 지하전분은 곡물과 같은 지상전분보다 효소작용을 받기 어려운 것으로 알려져 있다. 그러나 고구마 전분립의 경우는 지하에서 생성되지만 대단히 분해

Table 5. Some properties of various starch granules.

	2_{max} of starch-iodine coinplex (nm)	Blue valuc 680nm	Relative susccpribility of starch granules to pancreacin		Photopastegrams		Patterns
			Duration of reaction (5hr)	(24hr)	X-ray diffraction diagram	Initial pasting temperature (℃)	
Red corn	590	0.330	109	105	A	55	2
Rice	570	0.224	106	100	A	64	2
Wheat	600	0.334	106	100	A	52	2
Normal corn	592	0.308	100	100	A	60	2
Taro	595	0.257	109	96	A	65	1
Sweet potato	612	0.517	85	92	C_A	60	1
Kuzu	600	0.356	60	78	C_A	65	2
Chestnuts	605	0.422	47	74	C	60	1
Chines yam (round type)	614	0.488	36	55	C	62	1
Lotus	595	0.378	36	51	C_B	57	1
Gingko	606	0.434	29	50	A	68	1
High-amylose corn	600	0.719	36	43	B		
Lily	606	0.526	26	42	B	58	1
Banana(green)	596	0.497	14	31	C	70	1
Banana(8 days)	590	0.404	12	30	C	70	1
Chinese yam (long type)	600	0.390	10	28	C	64	1
Potato	600	0.489	3	7	B	64	1

가 잘 되는가 하면, amylose-extender의 (ae) 유전자를 갖는 고아밀로즈 옥수수, 바나나, 밤, 은행의 전분립과 같은 경우는 지상에서 생성되지만 분해가 어려운 것도 있다. 이러한 분

해성의 차이는 전분립을 호화시키면 나타나지 않아(53, 54), 전분립의 구조, 특히 입자의 표면 구조가 효소에 의한 분해에 있어서 난이도를 결정하는 중요한 인자인 것으로 생각되고 있다. 이 경우 표면을 포함한 전분립을 구성하는 전분분자의 구조 혹은 전분 분자의 배열의 차이가 중요한 것으로 생각되지만 이것만으로 효소에 의한 전분립의 분해성 차이를 완전히 설명할 수는 없다. 더구나 전분분자, 특히 아밀로펙틴 분자를 구성하는 글루코스 잔기의 6번 혹은 3번 위치에 결합해 있는 인산기가 효소작용을 방해하는 것으로 알려져 있기도 하고 지방산 또는 인지질을 가지고 있는 전분 분자의 경우 이 측쇄가 효소작용을 방해하는 것으로 알려졌다.

한편, 효소의 특성에서 보면 정도의 차이는 있지만 모든 α-아밀라제는 전분립을 분해한다(52). 또한 글루코아밀라제로 전분립을 잘 분해하는 것으로 보고 되어있다. 식물 기원의 β-아밀라제는 전분립을 분해할 수 없지만 미생물 기원의 β-아밀라제는 전분립을 분해하는 것으로 알려졌다. 포스포리파제의 경우는 전분립을 분해하지 않지만 감자를 비롯한 모든 식물의 전분조직에 존재한다는 사실은 생전분 분해에 있어서 중요한 역할이 있을 것으로 생각된다. 생전분 분해 글루코아밀라제를 연구해 보면 생전분 분해 활성이 높은 분획과 낮은 분획이 발견되는데 생전분 분해 활성이 높은 분획에 protease를 처리하면 호화전분에 대한 분해력의 차이는 없으나 생전분 분해력이 소실된다(56). 이런 결과를 종합해 보면 생전분 분해 효소는 활성부위(catalytic site)와 생전분 결합부위(starch granule-binding site)의 2개의 Domain을 가지고 있는 것으로 결론지어진다. α-아밀라제에 있어서도 위와같은 성질이 발견되고 있다. 같은 α-아밀라제로 분류되는 효소라도 동일한 전분립에 작용시켰을때 분해

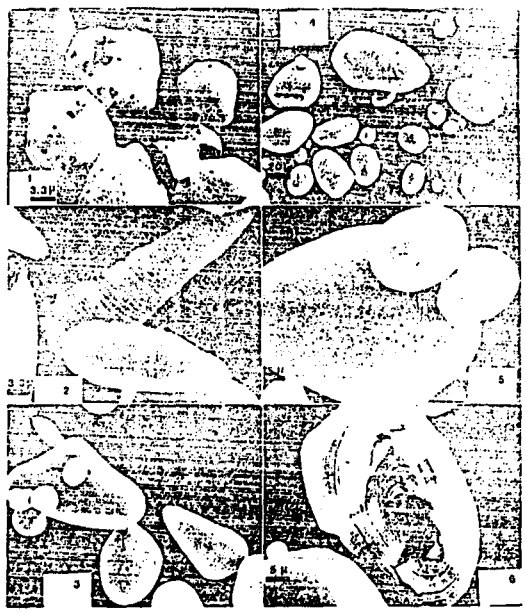

그림6. 1. 판크레아틴으로 분해시킨 옥수수 전분립의 주사전자현미경 사진
2. 판크레아틴으로 분해시킨 바나나 전분립의 주사전자현미경 사진
3. 썩은 감자부위에서 분리한 전분립의 주사전자현미경 사진
4~6. Maltogenic α-amylase로 분해시킨 감자전분립의 주사전자현미경 사진 4 : 분해율, 22%, 5 : 분해율, 26%, 6 : 분해율, 49%

정도가 다르다. 이것 역시 효소가 전분립에 흡착하는 성질이 다르기 때문으로 보고 있다(55). 감자 전분립에 α-아밀라제를 작용시켰을때 효소의 종류에 따라 분해 정도가 다른 것은 당연하지만, 시차주사현미경(SEM)으로 관찰해 보면 전분립의 표면 혹은 내부로 분해되어 가는 양상에 있어서도 매우 상이한 점이 발견된다. 비교적 효소로 분해되기 쉬운 옥수수 전분립의 경우에는 판크레아틴을 작용시키고 SEM으로 관찰해 보면 그림6-1과 같이 입자의 표면에 많은 구멍이 생기고 반응 시간이 진

행됨에 따라 구멍의 수 및 크기가 증가하였고 전분립의 중심쪽으로 분해가 진행되었으며 곧 입자 내부구조가 보이고 입자가 파괴되는 양상을 보였다. 효소 분해가 어려운 감자, 옥수수, 바나나 등의 전분립에 판크레아틴을 작용시켰을때 표면에 약간의 부혼이 생기는 정도이고, 입자의 형태나 상태 등에 있어서 효소를 처리하지 않은 것과 별 차이를 보이지 않았다. 그러나 다량의 판크레아틴을 사용하면 전분립에 부분적인 분해가 일어나고 표면에 호(縞)가 관찰된다고 보고 되고 있다(51, 57). 이와 같이 감자 전분립은 분해되기 어려운 전분의 하나인데, 앞에서 기술한 바와 같이 썩은 감자에서 분리한 B. circulans F-2의 α-아밀라제는 다른 α-아밀라제에 비해서 감자 전분을 잘 분해하였다. 분해 후 남은 전분립을 SEM으로 관찰해 보면 전분립의 장축에 대하여 수직으로 침식이 일어나 규칙적인 호상을 표면에서 발견할 수 있다.

이러한 분해 패턴은 썩은 감자 전분립이나 발아 전분립에서 동일하게 관찰할 수 있어 이 α-아밀라제가 감자전분을 분해시켰을때 나타나는 특징적인 패턴으로 생각된다. 그러나 NOVO사의 Norman등(58)이 개발한, 전분에 작용해서 주로 말호스를 생성하는 α-아밀라제도 감자전분을 잘 분해하는데 이 경우는 그림6-4에서 보는 바와 같이 전분립 표면구조에 있어서 앞의 경우와는 다른 분해 양상을 보였다(59). 이러한 결과는 같은 감자전분에 작용하더라도 작용하는 효소의 종류에 따라서 전분립을 분해할 양상이 다르다는 것을 보여주고 있다.

Ⅳ. 생전분 분해 효소제를 이용한 알콜 발효

알콜 제조 공정은 원료 전분질 원료의 특징, 제품품질 등에 있어서 차이는 있으나 기본적인 분쇄, 증자, 당화, 발효로 이루어진 발효 공정, 알콜 회수하는 증류 공정, 증류 잔액에서 유용 물질을 효율적으로 회수, 상품화하는 부산물 처리공정의 3대 공정으로 이루어져 있다. 에너지 절감 공정의 개발을 중심으로 그 변천을 개괄해 보고 마지막으로 무증자 알콜발효 개발현황을 살펴 보고자 한다.

1. 회분식 고온 증자법

곡류 원료 중에서 옥수수에서 알콜을 제조하는 경우에는 당화 발효에 앞서 140~180℃에 이르는 고온으로 증자하는 것이 공업규모의 알콜 발효에 있어 고수율 알콜을 얻는데 필수적인 것으로 알려져 있다. 고온으로 증자하는 것은 전분의 액화 뿐만 아니라 당화 효율을 높이고, 발효조내의 유해 미생물을 살균하여 발효수율을 높이게 된다. 그러나 한편으로는 고가의 고온 고압용 설비가 필요하고 또 고농도 삽입의 경우 전분이 호화함에 따라서 점도가 급격히 상승해 사입이 어렵기 때문에 고농도 당화, 발효가 불가능한 등의 결점이 있다. 그림 7은 공업규모의 증자공정을 나타낸 것이다. 옥수수분쇄물, 사입수, 맥아를 넣고 약 138℃까지 가열하고 이 온도를 25~30분간 유지한 후 냉각해 당화, 발효공정으로 넘어간다. 그러나 이러한 회분식 증자법에는 한 batch당 3시간

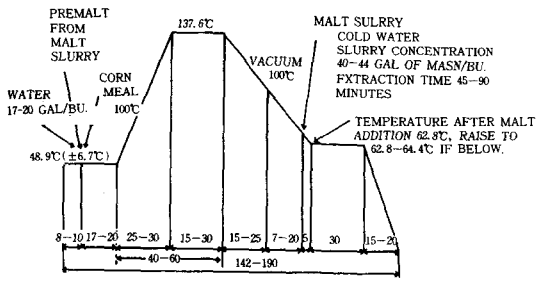

Fig. 7. Batch pressure cooking of corn and milo mashes.

소요되고, 반응액을 균일하게 증자하기 어려움이 있고, 여기에 에너지 효율이 나쁜점 등의 결점이 있어 공업규모의 곡류 알콜 발효에서 저생산성의 주된 원인이 되고 있다.

2. 연속식 고온 증자법

Unger등(60)은 1944년 연속고온증자, 순간당화법이라고 말하는 새로운 기술의 공업화에 성공했다. 그림8은 그 연속고온증자법의 공정도를 나타낸 것이다. 분쇄한 원료는 예비증자기(pre-cooker)내로 물과 증류잔액을 혼합한 사입수에 섞어 Slurry로 만들고 증기를 넣어 약간 예열한 후에 증자관에서 180℃로 1~3분 유지한 다음 flash cooler에서 소정의 온도로 냉각한다. 이때 증자에 쓰였던 에너지의 일부가 회수하도록 설계되어 있어 종래의 회분식 증자장치에 비해서 에너지면에서 경제적이다. 약 63℃로 냉각한 후에 맥아 Slurry가 주입되고 1~2분간 당화시킨 후 냉각하고 발효공정으로 넘어간다. 이 연속증자법이 공업규모로 기술이

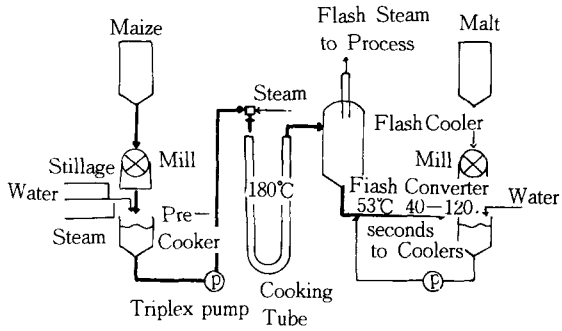

Fig. 8. The outline of flow diagram of continuous cooking system.

확립된 것은 근년의 알콜발효 공업의 기술혁신 중에서도 뛰어난 것으로 이것을 이용하여 곡류를 원료로 한 알콜발효 공업은 생산성이 비약적으로 향상되었다.

3. 저온증자법

Yoshizumi등(61)은 1974년 곡류 전분의 호화온도보다 낮은 온도에서 증자한 후 당화, 발효하는 저온 증자법의 공업화를 이루었다. 그림9는 옥수수를 주원료로 하고 미생물기원의 액화

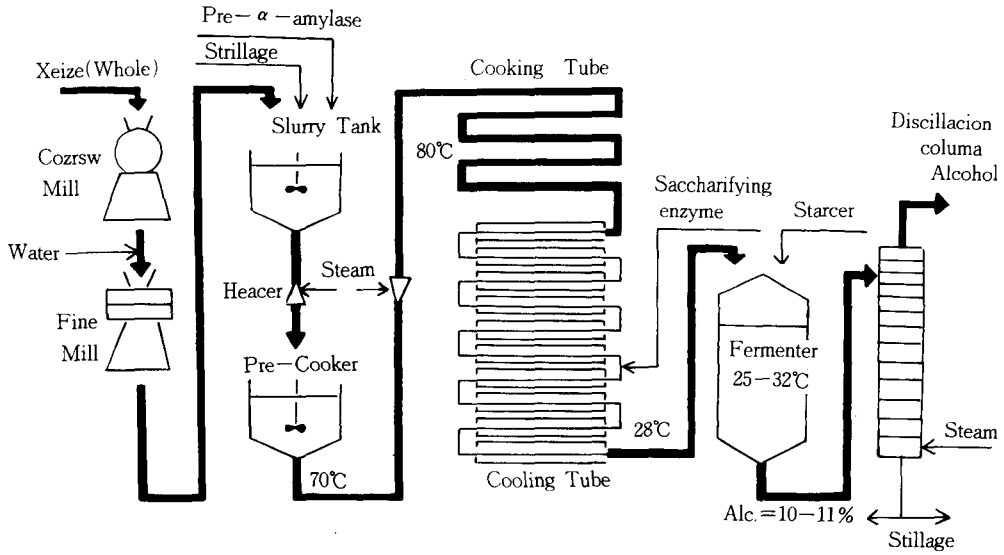

Fig. 9. Flow diagram of alcohol production from grain by LTC* system.
LTC* : low temperature cooking.

체, 당화제를 효소제로 하여 회고 80℃까지 가열하는 저온증자법의 공업화 규모의 flow-diagram을 나타낸 것이다. 저온증자법의 경우는 가열에 의한 slurry 점도의 상승을 완화하기 위해서 증자전에 첨가한 액화제가 완전히 실활되지 않아 증자, 냉각의 전 공정에 효소활성을 유지할 수 있어 고온증자법의 경우와는 달리 냉각시 다시 α-아밀라제를 첨가할 필요성이 없다. 80℃에서의 증자유지 시간은 고온증자법과 같이 5분으로 한다.

4. 무증자 발효법

그림10은 Matsumoto등이 개발한 공업규모의 무증자알콜발효 공정의 개략을 나타낸 것이다(22). 옥수수를 건식분해기로 분쇄하고 사입수를 중량비로 1 : 2로 넣어 현탁시키고 이와 동시에 당화효소제를 첨가하여 교반하고 다음에 발효탱크로 이동시키고 26~32℃에서 96시간 발효시킨후 증류공정으로 넘어간다. 알콜은 발효개시 24시간에 8%, 48시간후에 12.9%가 생성되었다. 발효액중의 잔존 직접환원당은 사입종료시 1.4%존재하지만 발효가 진행되면서 급격히 감소하여 24시간 후 약 0.2%의 낮은 농

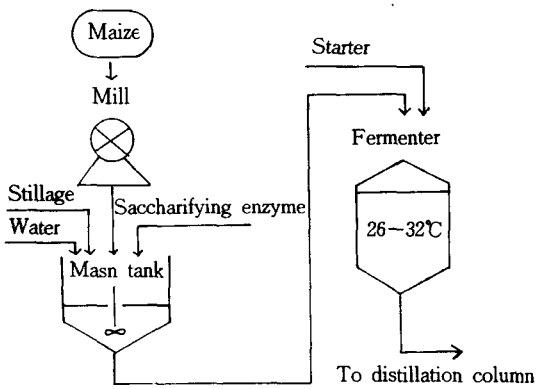

Fig. 10. Flow diagram of the noncooking fermentation system for use on an industrial scale.

Capacities : mill, 6tons/hr ; mash tank, 5 kl ; fermenter, 140kl.

도가 계속 유지된다. 효모수는 사입 종료시 최고수에 달하고 그 후에 거의 그대로 유지된다. 세균수의 변화를 보면 사입개시에서는 10^3/mℓ이었던 것이 발효가 진행됨에 따라 24시간 후에 최고 10^7/mℓ가 되고 그 후로 감소되어 발효종료시 4×10^5/mℓ이 된다. 공업규모의 무증자 발효법에 의해서 생성된 발효액을 분석해 보면 표6과 같다. pH는 4.8, 적정산도는 3.3mℓ이고, 잡균오염현상이 나타나는 것을 보여준다. 생성알콜 농도는 14.5%(v/v)이고 발효효율은 88.5%로 나타났다. 종래 발효법에 따르면 발효효율은 87~88%로서 무증자 알콜발효법의 88.5% 발효효율은 양호한 것으로 판단된다.

上田등이 개발한 흑국균의 아밀라제는 생전분 분해능이 뛰어나나 호화전분 분해능에 비해서 1/20에 지나지 않는다. 따라서 맥주, 소주와 같이 당화후 발효하는 기존의 공정에 적용될 경우 효소량이 20~30배 더 필요하므로 경제적이지 못하다. 그러나 청주제조와 같이 당화 발효를 동시에 병행하는 방법을 생각했다. 즉, 흑국 아밀라제의 생전분 분해 pH가 3.5부근의 산성영역이기 때문에 오염을 막을 수 있고 또 생전분 분해로 생기는 글루코스를 효모가 바로 이용해 알콜로 전환시키기 때문에 잡

Table 6 Analysis of the mash after fermentation by noncoking system on an industrial scale.

Volume	112.5kl
pH	4.8
Total acidity	3.3ml
Alcohol	14.5v/v%
Residual total sugars	1.57% as glucose
Residual direct reducing sugars	0.16 w/v% as glucose
Viable yeast	6.5×10^7 cells/ml
Bacterial number	3.5×10^5 cells/ml
Fermentation efficiency	88.5%

균 오염을 억제할 수 있어 무증자 알콜발효가 안전하게 진행될 것으로 생각된다. 500mℓ 삼각 플라스크를 사용하여 생고구마 분쇄물 60g, 물 60mℓ, 흑국균의 효소추출액 6g을 혼합하고, 여기에 9.6N H_2SO_4 1.2mℓ를 가하여 pH를 3.5로 조정하였다. 다음에 45~50℃에서 1시간 보온 후 30℃에서 알콜효모 5mℓ를 첨가하여 발효하였다. 발효 9일째 최종 6.8%(v/v)의 알콜과 잔존당 0.20%, 발효효율 84.0%를 보였다. 증자 발효를 하는 경우 고구마의 증자 모로미의 점도가 높아 고농도 사입이 불가능해 6.0%(v/v)의 알콜 농도를 얻을 수 밖에 없는 형편이다.

무증자 알콜발효 방법으로 알콜음료를 제조할 목적으로 모로미의 반량을 액체국으로 채우고 쌀, 옥수수전분을 발효한 결과 발효 10일째 약 14%(v/v)의 알콜이 생겼으며 향은 老酒와 유사했다(62). 그러나 액체국의 양이 모로미의 반이나 들어가 공업화하기는 어려웠다. 복강(福岡)의 森永酒造(주)에서는 1968년 4kℓ 미강의 무증자 발콜발효를 수행하여 발효 7일에서 17%(v/v)알콜을 생성했다. 그러나 이러한 방법을 이용한 소주 제조는 경제성이 있으나 소주에 생강취가 약간 난다는 이유로 시행후 3년만에 중지됐다.

上田등(6)은 무증자 발효법으로써 아밀라제와 효모를 재이용하는 무증자 발효법과 감압증류법을 사용하였다. 옥수수 전분에 흑국균 글루코아밀라제, 효모를 넣고 pH를 3.5로 하고, 30℃에서 24시간 발효하여 약 10%의 알콜을 무증자 조건하에서 생성하였다. 이것을 30~40℃에서 감압증류하여 증류잔액에 남아있는 글루코아밀라제와 효모를 재활용하였다. 그림은 이런 원리를 이용하여 처음 사용한 글루코아밀라제와 효모를 이용하여 20일간 반 연속적으로 발효하여 매일 10%(v/v)의 알콜을 얻을 수 있었다.

한편 석유대체 에너지로써 알콜을 생산하기 위해서 일본 도요다 재단의 지원으로 上田등은 브라질에서 카사바의 무증자 알콜발효 연구를 수행하였다. 카사바는 생고구마보다 전분함량이 높아 30~50%에 이르는 것으로 알려졌다. 카사바를 글루코아밀라제로 당화하여 발효일수 5일째 10~12%(v/v) 알콜을 얻어 80~90%의 발효효율을 얻을 수 있었다. 이때 사용한 흑국균의 글루코아밀라제에는 식물 조직분해효소 활성이 포함되어 있는 것으로 판명되었다(49). 카사바는 브라질에서 주식으로 하는 것으로 현재 부족분을 인근 국가에서 수입하고 있는 실정이라 카사바 증산에 따라서 알콜생산 가능성이 달려있다고 보겠다. 앞에서 기술한 대로 上田등은 생전분 분해효소 연구로서 Rhizopus sp.의 생전분분해 연구를 수행하였는데 Asp. niger보다 분해활성이 2.5배 강력한 것으로 나타났다. 이 경우 최적 pH가 4.5부근이기 때문에 아황산칼륨을 0.02~0.05% 첨가하여 잡균의 오염을 막고자 하였다. 알콜 발효도 잘 되어 흑국균의 글루코아밀라제 경우보다 약 1/3 양으로 발효할 수 있었다(63). 또한 Rhizopus sp.는 글루코아밀라제, α-아밀라제 생산외에도 알콜발효능이 있어 효모를 첨가하지 않고도 발효할 수 있는것이 밝혀졌다.(64) 알콜 발효능이 약하기 때문에 발효력의 증강이 요구되고 있다.

이외에도 전분질 원료의 무증자 알콜발효에 있어서 山本등은 생고구마를 원료로 하였고(48), 熊谷은 백미를(65), 林田등은 옥수수원료를(66) 사용해서 소기의 성과를 거두었고, 松元등은 Rhizopus sp.의 글루코아밀라제를 사용해서 옥수수전분의 무증자 알콜발효를 약 110kℓ stainless steel tank를 이용하여 공업화에 성공한 바 있다(22).

이상에서 간단히 소개한 무증자 알콜발효법은 공업규모로 그 기술이 확립되어 증자에 소

요되는 에너지를 절감할 수 있고 동시에 사입 공정에서 냉각수가 불필요하게 되었다. 곡류의 물현탄액을 고온하에서 처리하게 되면 특징적으로 가열취가 생기는데 반해서 무증자 발효의 경우는 증자공정이 없으므로 방향성이 풍부한 장점을 가진 알콜 혹은 주류를 제조할 수 있다고 사료된다.

V. 주류공업에서의 이용방향

생전분 분해 효소제를 이용한 무증자 전분의 당화와 알콜 발효 현황을 살펴보았다. 지금까지 많은 효소제가 개발되었으나 생전분 분해 활성이 낮아 호화전분을 분해하는데 드는 효소량에 비해서 적게는 3~5배, 많게는 20~30배의 효소량을 사용해야 하는 실정이다. 더구나, 감자, 카사바, 고구마 등의 지하전분립을 생전분 분해 효소만으로 분해하기는 더 어려운 실정이다. 이러한 현실을 고려해 볼때 곡류전분 원료의 당화, 발효에 생전분 분해효소제를 사용하는 것이 공업화 가능성이 가장 높은 것으로 생각된다. 표8에서 보는 바와 같이 최근 우리나라의 주정 원료의 이용 상황을 살펴보면, 쌀보리, 겉보리, 수침양곡과 같은 곡류전분 원료가 202,702.5(M/T)이 매년 사용되어지고 있다. 우리나라에서는 이러한 곡류전분의 무증자 알콜발효를 위해서 집중적으로 연구하게 되면 머지 않은 장래에 성공하리라 생각된다.

표 7. 우리나라 주정원료 사용상황표

시기 / 원료명	1989년	1990년			합 계
	4/4분기	1/4분기	2/4분기	3/4분기	
절감 (M/T)	848.220	29,055.644	19,565.18	6,561.315	56,030.360
쌀보리 (M/T)	20,410.035	51,101.801	66,472.721	42,237.795	180,222.352
겉보리 (M/T)	3,337.970	–	4,776	10,427.394	18,541.364
타피오카 (M/T)	53,551.995	13,271.218	6,816.642	32,044.031	105,683.886
수침양곡 (M/T)	3,938.779	–	–	–	3,938.779
생감 (M/T)	19,507.350	–	–	–	19,507.350

그러나 절감, 타피오카, 생감의 경우 생전분 분해 효소만으로는 공업적인 분해가 현재로서는 어려운 것으로 보인다. 이들 전분질 원료들이 우리나라에서 주정발효 원료로 사용되어지고 있는 양을 보면 매년 181,221.6(M/T)정도로써 상당한 양에 이르고 있다. 이러한 전분질 원료를 분해하기 위해서는 특수한 생전분 분해 효소제의 개발은 물론이거니와, 전분질 원료를 경제적으로 전처리하므로써 분해를 용이하게 하는 전처리 방법의 개발도 필요한 것으로 생각된다. 저자 등은 전분질 원료를 낮은 농도의 산이나 알카리로 침지하여 전분질 원료의 구조적 변이를 유도할 수 있었고, 이렇게 전처리된 전분을 효율적으로 당화, 발효할 수 있었다(67, 68, 69). 특히 알카리로 전처리하는 경우 호화전분과 동일한 전분의 구조적 변화를 일으킬 수 있었으나 점도의 증가가 문제가 되었다. 현재 저자등은 낮은 농도의 알카리로 전처리한 전분질 원료를 분해하기 위해서 알카리 조건에서 작용하는 아밀라제 연구를 수행하여 상당한 효과를 거두고 있다(70).

무증자 알콜 발효 연구가 구내외에서 집중적으로 연구되고 있다. 생전분을 분해할 수 있는 강력한 효소제가 속속 개발되고 있으며 생전분의 분해 기작도 점점 밝혀져 가고 있다. 아직은 대규모의 무증자 알콜 발효가 이루어지지 않고 있으나 가까운 장래에 곡류전분의 경제적인 무증자 알콜 발효법이 개발될 것으로 보이며, 감자, 절감, 카사바 등과 같이 분해되기 어려운 전분질 원료들도 전처리 방법의 개발과 강력한 분해효소제의 개발로 무증자 알콜발효

에 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 무엇보다도 학계의 지속적인 연구와 주류업계의 적극적인 산업화 노력에 무증자 알콜발효의 실현이 달려있다고 하겠다.

Ⅵ. 참고문헌

1. 山崎何惠, 上田誠之助. 農化, 24, 181(1951)
2. 上田誠之助. 農化, 31, 898(1957)
3. 上田誠之助. 農化, 32, 648(1958)
4. S. Ueda. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn., 21, 284(1957)
5. S. Ueda. Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn., 21, 379(1957)
6. S. Ueda and Y. Koba. J. Ferment. Technol., 58, 237(1980)
7. K. Mizokami, M. Kozaki, and I. K. Kitahara. 澱粉科學, 25, 132(1978)
8. 谷口肇. 澱粉科學, 33, 59(1986)
9. H. Taniguchi and Y. Maruyama. 澱粉科學, 32, 142(1985)
10. B. C. Saha and S. Ueda. Biotechnol. Bioeng., 25, 1181(1983)
11. S. Ueda and B. C. Saha. Enzyme Microb. Technol., 5, 186(1983)
12. B. C. Saha and S. Ueda J. Ferment. Technol., 61, 67(1983)
13. K. Kainuma, H. Ishigami, and S. Kobayashi. 澱粉科學, 32, 136(1985)
14. H. Ishigami. 澱粉科學, 34, 66(1987)
15. H. Ishigami, H. Hashimoto, and K. Kainuma. 澱粉科學, 32, 189(1985)
16. J. Abe, F. W. Bergmann, K. Obata, and S. Hizukuri. 澱粉科學, 32, 128(1985)
17. M. Yamamoto, S. Ushiro, N. Nakamura, and S. Hizukuri. 澱粉科學, 35, 235(1988)
18. S. Miyoshi, M. Higashihara, and S. Okada. 澱粉科學, 33, 238(1986)
19. M. Higashihara, S. Miyoshi, and S. Okada. 澱粉科學, 34, 106(1987)
20. J. Abe and S. Hizukuri. 澱粉科學, 35, 43(1988)
21. S. Ueda. Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem., Tokyo and Kyoto, p. 491(1958)
22. N. Matsumoto, O. Fukushi, M. Miyanaga, K. Kakihara, E. Nakajima, and H. Yoshizumi. Agric. Biol. Chem., 46, 1549(1982)
23. S. Kumisaki and N. Matsumoto. 澱粉科學, 32, 152(1985)
24. F. W. Bergmann, J. Abe, and S. Hizukuri. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27 443(1988)
25. J. Abe, F. W. Bergmann, K. Obata, and S. Hizukuri. Appl. Microbiol. Biotechnol., 27, 447(1988)
26. J. Abe, K. Nakajima, H. Nagano, and S. Hizukuri. Carbohydr. Res., 175, 85(1988)
27. B. Svensson, K. Larsen, and A. Gunnarsson. Eur. J. Biochem., 154, 497(1986)
28. T. Mitsue, B. C. Saha, and S. Ueda. J. Appl. Biochem., 1, 410(1979)
29. T. Takahashi. K. Kato, Y. Ikegami, and M. Irie. J. Biochem., 98, 663(1985)
30. S. Ueda and S. Kano. Starke, 27, 123(1975)
31. S. Hayashida and E. Yoshino. Agric. Biol. Chem., 42, 2093(1975)
32. H. Taniguchi, F. Odashima, M.

Igarashi, Y. Marugama, and M. Nakamura, Agrie Biol. Chem., 46, 2107 (1982)

33. H. Taniguchi, M. J. Chung, N. Yoshigi, and Y. Maruyama. Agric. Boil. Chem., 47, 511(1983)
34. S. Murao, K. Ohyama, and M. Arai. Agric. Biol. Chem., 43, 719(1979)
35. M. J. Chung, H. Taniguchi, and Y. Maruyama. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 9, 185(1981)
36. M. J. Chung, H. Taniguchi,, Y. Maruyama, and M. J. Lee. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 10, 123 (1982)
37. M. J. Chung, H. Taniguchi, Y. Maruyama, M. J. Lee, and J. H. Jeong. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 10, 259(1982)
38. W. N. Hou and M. J. Chung. Korean J. Food Sci. Technol., 16, 322(1984)
39. W. N. Hou and M. J. chung. Korean J. Food Sci. Technol., 16, 392(1984)
40. W. N. Hou and M. J. Chung. Korean J. Food Sci. Technol., 16, 398(1984)
41. S−H. Choi, C−J. Kim, M−J. Oh, and J−S. Lee. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 17, 136(1989)
42. S−H. Oh, H−J. Kwon, and P−S. O. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 15, 408(1987)
43. S−H. Oh, and P−S. O. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18, 547(1990)
44. M−J. Chung, W−N. Hou, J−H. Jeng, and Hajime Taniguchi. Kor. J. Apll. Microbiol. Biotech., 18, 251(1990)
45. I. Park, I. Nam, S−O. Kho, G−N. Kim, and K−S. Suh. Kor. J. Apll. Microbiol. Biotech., 18, 244(1990)
46. S−K. Shoon, Y−H. Rho, H−J. Kim, and S−M. Bae. Kor. J. Apll. Microbiol. Biotechnol, 18, 506(1990)
47. J. B. Tobias, D. Menezes, T. Arakaki, P. R. Delamo, and A. M. Sales. Biotechnol. Bioeg, 20, 555(1978)
48. O. Svendsby, K. Kakutani, Y. Matsumra, M. Iizuka, and T. Yamamoto. J. Ferment. Technol., 59, 485(1981)
49. S. Ueda, C. T. Zenin, D. A. Monteiro, and Y. K. Park. Biotechnol. Bioeng., 23, 291(1981)
50. T. Yamamoto, M. Mashimoto, H. Kawasaki, and T. Kubota. 澱粉科學, 34, 93(1987)
51. H. Fuwa, Y. Sugimoto, T. Takaya, and Z. Nikuni. Corbohydr. Res., 70, 233 (1979)
52. H. Fuwa, T. Takaya and Y. Sugimoto. in Mechanisms of Sacchanide Polymerization and Depolymerizatin, J. J. Marshall, ed., Academic press, New York, p. 73(1980)
53. H. Fuwa, M. Nakajima, A. Hamada, and D. V. Glover. Cereal Chem., 54, 230(1977)
54. H. Fuwa, D. V. Glover, Y. Sugimoto, R. Nishimura, and M. Tanaka. Starch, 30, 367(1978)
55. Y. Koba, B. C. Saha, and S. Ueda. J. Jpn Soc. Starch. Sci 33, 199(1986)
56. 林田晋榮. 澱粉科學, 32, 177(1985)
57. 不破英次, 杉本温美. 電子顯微鏡, 19, 200 (1985)

58. H. Outtrup and B. E. Norman. Starch, 36, 405(1984)
59. H. Fuwa. 澱粉科學, 34, 89(1987)
60. E. D. Unger, H. F. Willkie, and H. C. Blankmeyer. Trans. Am. Inst. Chem. Eng., 40, 421(1944)
61. H. Yoshizumi, N. Matsumoto, and O. Fukushi. U. S. Patent, 4092434(1978)
62. 上田誠之助, 古賀偉郎. 醱協, 23, 133 (1965)
63. H. Matsuoka, Y. Koba, and S. Ueda. J. Ferment. Technol., 60, 599(1982)
64. Y. Fujio, M. Ogata, and S. Ueda. Biotechnol. Bioeng., 27, 1270(1985)
65. 態谷之榮子, 宮入正法, 黃正財, 鈴木逸郎, 田中利雄, 秋山裕一, 醱工, 60, 77(1982)
66. S. Hayashida, Kohta, Pq Flor, N. Nanri and I Miyahara, Argric. Riol Chem. 46, 1947 (1982)
67. S. Y. Lee, Y. C. Shin, S. H. Lee, S. S. Pank, H. S. Kim, and S. M. Byun, Korean J. Food Sci. Technol., 16, 463 (1984)
68. S. Y. Lee, Y. C. Shin, S. H. Kim, and S. M. Byun. J. Ferment. Technol., 63, 51(1985)
69. Y. C. Shin, S. Y. Lee, Y. K. Choe, H. S. Kim, and S. M. Byun. Biotechnol. Bioeng., 28, 627(1986)
70. Y. C. Shin, T. U. Kim, S. Y. Lee, and S. M. Byun. Korean J. Food Sci. Technol., submitted(1991)

호화사치 외제자랑 집안망신 나라망신