

酒精生産에 關한 最近의 研究現況

曹 哉 銑

(慶熙大學校 産業大學 敎授·農博)

I. 머리말

古來로부터 飲用해 오던 술이 工業的으로 大量生産되고 그 製造技術이 확립된 것은 이미 50여년전의 일이다. 그후 糖化技術의 改善, 菌株의 改良, 酵素의 利用, 醱酵工程의 改善, 그리고 酒精原料의 多様化 등을 達成해 가면서 현재에 이르고 있다. 특히 酵素의 利用技術은 30餘年前에 이미 확립되었고 液化 및 糖化工程에서도 微生物대신 효소를 사용하게 되었다. 또한 酵素의 固定化 및 菌體의 固定化로 連續反應 system의 導入에 關해서도 最近 10年間 눈부신 研究結果가 報告되고 있다.

지난 1, 2次 石油波動 以後 農産資源이 豊富한 브라질과 같은 나라들에서는 飲用 이외에 代贖에너지로 酒精을 利用하려는 시도가 이루어지고 있다. 그러자면 보다 값싼 원료를 사용하고 획기적인 공정개선으로 생산원가를 절감하지 않으면 안된다. 최근에 이러한 취지 아래 많은 연구가 활발하게 진행되고 있어서 이들에 대하여 살펴보고자 한다.

II. 糖化技術

1. 固定化 酵素에 依한 連續糖化

섬유 고형물을 제거한 cassava의 dextrin용액은 어느 정도의 濁度를 가지고 있지만 原因物質은 침전하지 않고 안정하며 또한 總糖

18.2%의 cassava용액에는 0.10%의 K^+ 이 함유되어 있으므로 이 용액에 고정화 효소를 적용하는 경우 탁도의 원인이 되는 고분자 물질 때문에 多孔性担體의 사용은 pore내의 沈着等의 장애로 좋지 않다. 또 陰이온·交換體에 의한 固定化法은 고농도의 K^+ 때문에 적용할 수 없어서 미세한 担體의 表面에 결합시킨 고정화 효소 또는 gel type의 고정화 효소의 이용이 적합할 것으로 생각되어 放射線 架橋反應을 이용하여 gel包括法으로 glucoamylase를 고정화하였다.⁽¹⁾ 이것을 homogenizer로 분쇄후 水洗하여 內徑 15mm의 컬럼에 충전하고 여기에 미리 액화한 총당농도 16.8%의 cassava 액을 18.5ml/h의 유속으로 통과시켜 45℃에서 분해율을 시험한 결과는 그림 1과 같다.

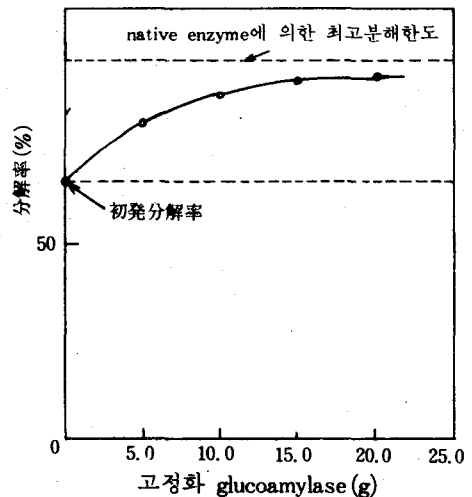


그림 1. Cassava전분 용액의 분해곡선

그림에서 보는바와 같이 cassava 용액의 산 당화에 의한 總糖을 100이라 하면 고정화하지 않은 당화효소의 경우 최고 분해율은 97.0이다. 고정화 효소 gel 20g을 사용한 경우에는 92.5 였고 최종적으로 native 효소와 같은 분해율에 도달하기 위해서는 60g의 고정화 효소 gel이 필요하다.

한편 연속당화 반응에 있어서 안정성을 실험하기 위해서 그림 1에서와 같은 조건으로 반응시키되 미생물 오염방지를 위해서 반응장치 전체를 45~46°C로 유지된 chromato chamber내에 두고 시험한 결과 45°C에서는 9 일간 안정하였다.

이상의 결과로 보아 고정화 당화효소를 cassava 용액의 당화에 적용이 가능하지만 실 용화를 위해서는 압력손실이 많은 gel type 보다도 多孔性 担体가 column식의 반응을 일으키는 데 적합하다. 그러기 위해서는 淸澄 cassava 전분 용액을 조제하지 않으면 안되고 따라서 淸淨효소의 검토가 필요하다. 또 고농도의 K⁺을 위해서 음이온 교환체를 쓰는 고정화 법이 사용되지 않고 공유결합법 또는 gel 包括法에 의한 고정화법을 검토하지 않으면 안된다. 이때 조제된 고정화당화효소의 열안정성으로 보아 45°C에서 연속당화를 고려해야 하며 이 조건에서는 미생물 오염이 큰 문제가 되므로 적절한 대책이 필요하다.

2. 無蒸煮 糖化

일반적으로 전분질 원료의 경우 蒸煮, 液化 및 糖化공정을 거치며 이에 소요되는 에너지는 전체 에타놀 생산을 위해 소요되는 에너지의 30%를 차지하므로 이러한 소요에너지 절약을 위해서 無蒸煮 糖化를 위한 일련의 연구를 행한바 있다.

그림 2에서 보는바와 같이 黑麴 amylose가 黃麴 amylose나 麥芽 amylose에 비하여 生澱粉을 잘 분해하는 것을 알 수 있다.⁽²⁾ 그러나

생전분 분해활성의 최적 pH가 3.5로서 산성영역이므로 黑麴 amylose를 사용하여 생전분의 당화를 시도하였다.⁽³⁾

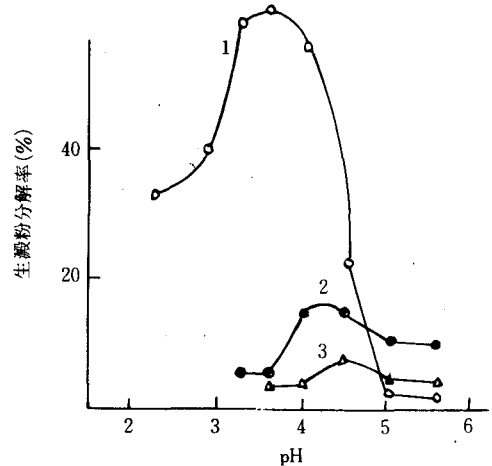


그림 2. 각종 amylose에 의한 고구마 생전분의 분해³⁾

1 : 黑麴 amylose, 2 : 黃麴 amylose, 3. 麥芽 amylose

* 생전분 1g, 효소액 20ml, 1/10 HCl-Na-citrate 20ml, 물, 120ml, toluol 소량, 30°C 1일 1회교반, 40시간 반응.

生전분을 분해하는 것은 생전분 흡착성의 glucoamylase I로서 이것은 amylopectin 만으로 구성된 찹쌀전분이나 찰옥수수전분을 완전히 glucose로 분해하며 이 효소는 amylopectin의 α -1.4-glucoside결합 이외에 α -1.6-glucoside결합도 분해하는 amylose이다. 생전분 非흡착성의 gluco amylose II는 amylopectin의 α -1.4-결합 切断能에 비해 α -1.6-glucoside결합 절단능이 현저히 약하다. glucoamylase I은 glucoamylase II와 달라서 생전분 분해력이 강하고 그림 3에서 보는바와 같이 glucoamylase I에 α -amylase나 전분 debranching enzyme (isoamylase)을 가하면 glucoamylase I의 생전분 분해력이 數倍로 증가한다. 이러한 현상은 glucoamylase I에

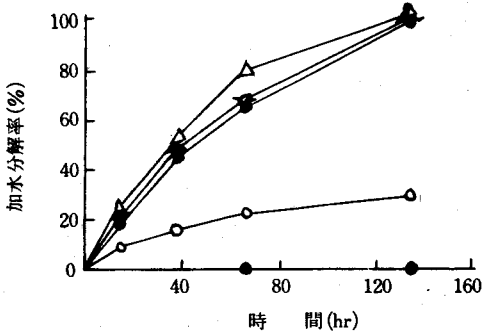


그림 3. Glucoamylase에 의한 찹옥수수 생전분 분해에 미치는 isoamylase 또는 amylase의 영향³⁾

-△- : G-1, α-A, I, -○- : G-1, α-A,
 -⊙- : G-1, I, ○ : G-1,
 -●- : α-A 또는 I

G-1 : glucoamylase I (0.44unit), α-A : α-amylase (20unit) I : isoamylase (50unit)

의한 糊化전분의 분해시에는 보이지 않는다.

황국균의 amylase系에도 glucoamylase I이 존재하는 것을 밝혔지만 황국균의 amylase系는 거의가 α-amylase로 glucoamylase I은 흑국균에 비해 약 1/10에 불과하며, 黑麴

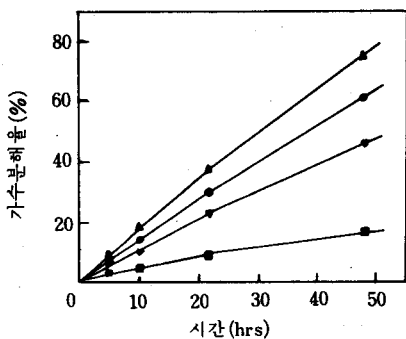


그림 4. 각종 생전분의 黑麴 amylase에 의한 분해³⁾

Ca 5g 생전분, 5ml 0.5M-citrate-HCl, pH3.5, 15ml 탈이온수, 5ml의 1% 흑국, 5.6unit/ml, 40°C

▲ : 옥수수전분 ● 카사바전분 ▼ 고구마전분
 ■ 감자 전분

amylase는 β-amylase가 생전분을 분해하기 어렵기 때문이다. 일반적으로 cassava 생전분은 黑麴 amylase에 의해서 분해되기 어려운데 각종 전분의 분해정도는 그림 4와 같다.

다음 *Asp. awamori* NRRL 3112와 *Asp. niger*를 사용하여 麴을 만들어 cassava 전분의 당화에 사용하였다. 120g의 cassava 분쇄물에 麴 10g(*Asp. awamori*의 경우 1,040 u, *Asp. niger*의 경우 576u)을 사용하였고 glucoamylase의 경우에는 3,510u를 가하였다. 麴의 경우에는 하루밤 담근 후에 半泥狀의 덩이 액상으로 되고 첨가 amylase양도 麴의 경우 glucoamylase의 경우에 비해서 약 1/5~1/3로 그 양이 적은데도 불구하고 발효日數는 5일로서 glucoamylase의 경우와 같았다. 이와 같이 약간의 amylase양으로 에타놀 발효가 원활하게 진행된 것은 麴中에도 存在하고 glucoamylase製劑中에는 없었던 조직붕괴활성에 의한 것인듯하다. 발효중의 점도변화는 그림 5와 같다. 麴과 glucoamylase 製劑의 hemicellulase활성과 cellulase활성을 비교시 前者가 hemicellulase활성이 훨씬 높았다. 그

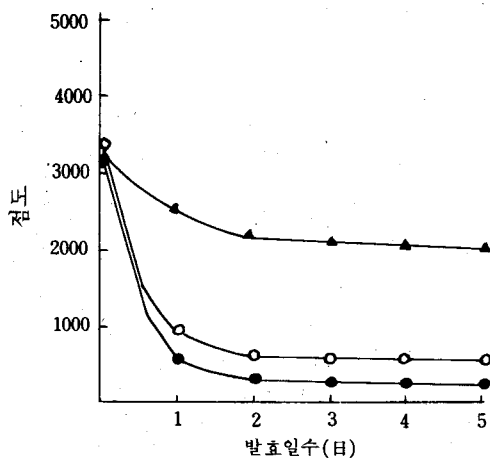


그림 5. 시간경과에 따른 발효액의 점도변화³⁾

▲ : glucoamylase, -○- : *Asp. awamori* 麴
 -●- : *Asp. niger* 麴

밖에도 pectinase의 효과를 살펴본 결과 발효 일수가 단축되고 에타놀수율도 상승하는 것으로 보아 黑麹을 사용한 無蒸餾에타놀 발효시 glucoamylase와 α -amylase 이외에도 조직을 붕괴할 필요가 있으며 그 역할은 hemicellulase나 pectinase에 의한 것으로 생각된다.

지구상에는 벚짳 3억톤, 밀짳 3.5억톤 그리고 보리, 라이맥 및 연백등의 짳이 2.5억톤으로 총 9억톤의 짳이 생산되고 있다.⁽³⁾ 벚짳에서 lignin을 제거하면 약 50%의 holo-cellulose (cellulose와 hemicellulose)를 얻을 수 있고 이것을 당화용으로 이용한다(그림 6).

표 1. Cellulose 자원의 산당화법과 효소당화법의 비교⁽⁵⁾

산당화	효소당화
1. 耐酸性, 耐熱性, 耐圧性장치 필요 Scholler법 (0.4~0.8% 황산, 170~190°C, 8~10기압, 12~24시간) Bergius법 (40% 염산, 상온, 상압, 8시간, 당농도 28~40등) 고농도의 당액을 얻을 수 있으나 酸의 回收 再利用이 不可能 2. 단시간에 당화되나 미생물 생육을 저해하는 물질이 생성되거나 당이 다시 분해될 염려가 있다. lignin을 함유한채로 당화하므로 사입량이 적어진다. 3. 산당화법의 조업은 위험성이 많고 또 고도의 기술과 많은 투자가 필요하다.	1. 간단한 설비로 15~20%의 당액을 얻을 2. cellulase의 적온 45~50°C에서 당화됨 3. cellulase의 회수 재이용 가능 4. 생성된 당이 다시 분해될 염려가 없어 발효저해 물질이 생성되지 않음 5. 당화용 cellulose자원으로 cellulase생산가능 6. 脫 lignin cellulose 자원을 사용하므로 당화조에 많은 양을 사입할 수 있다.

3. 纖維質 原料의 酵素糖化

자원의 활용에 관한 1970년대의 많은 연구는 Malachowski의 小冊字⁽⁴⁾에 잘 수록되어 있다.

많은 학자들이 cellulase에 관한 연구를 행하였던바 생산되는 cellulase가 CMCase 만이 강력하거나 (*Asp. niger*), cellulase를 소량 분비하거나 (*Myrothecium verrucaria*) 하여 *Trichoderma*만이 관심을 끌게되었다. 즉 이 곰팡이는 avicelase, CMCase 및 cellobiase (β -glucosidase)를 함유한다. 한국을 포함한 동양제국에서는 벚짳을 활용한 연구를 많이 하였다. 물론 산가수 분해에 의해서도 당화할 수 있지만 표 1에서 보는바와 같이 발전도상의 나라들에서는 cellulose자원에 대해서 산당화법을 적용하는 것은 부적당하다.

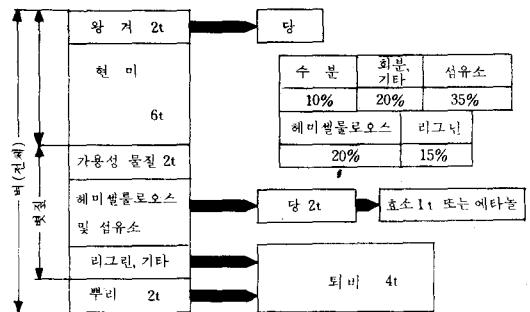


그림 6. 벚짳의 성분과 이용⁽⁵⁾

일반적으로 사료용 효모 생산등을 위해서는 기질농도가 10%라도 되지만 주정생산을 위해서는 기질농도를 높여야 되는바 최고 25% 까지 가능하며 이때 효소劑 농도는 2.5%가 필요하다. 그러나 섬유질 자원은 용적을 많이

차지하므로 정제된 효소보다는 추출액이나 그 농축액을 사용하는것이 오히려 경제적이다. 한편 실험실적으로는 cellulose잔사를 제거한

당화액중의 cellulase를 膜濾過에 의해서 비교적 쉽게 회수하여 재이용한다. 또 cellulase 활성은 당화나, 알콜발효후에도 거의 잔존하

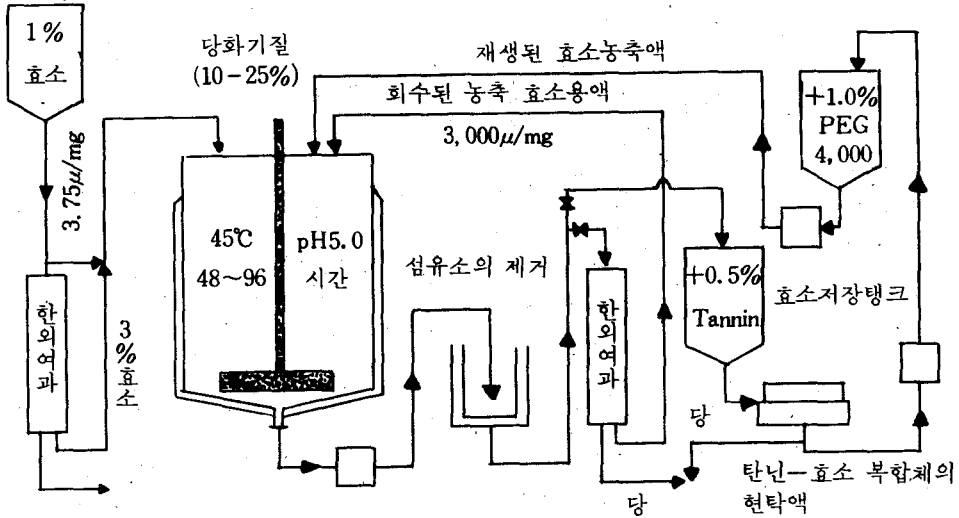


그림 7. 농축 및 회수된 *Trichoderma viride* cellulase에 의한 섬유소의 당화⁵⁾

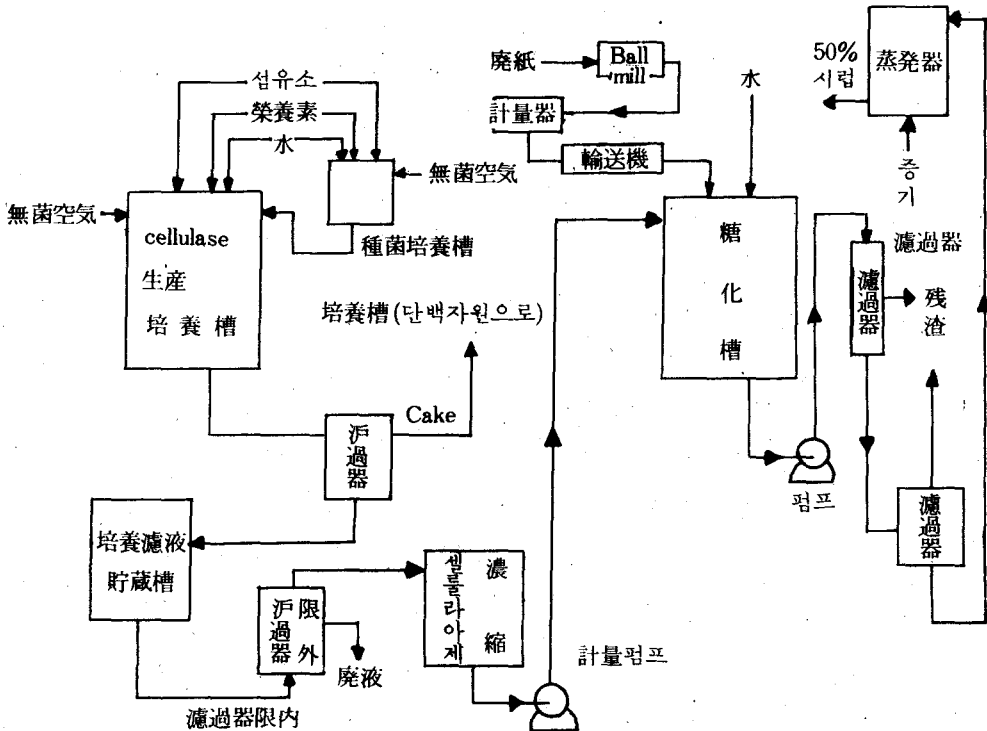


그림 8. Cellulose의 효소당화 pilot plant(미국군 Natick연구소)⁶⁾

고 있으나 이러한 액에 소량의 탄닌산을 가하여 cellulase와 불용성 침전을 만들어 회수한다. 다음 묽은 propylene glycol 4000액에 넣으면 cellulase가 유리하므로 재이용이 가능하다(그림 7).

한편 미육균 Natick연구소의 cellulose 의 효소당화 pilot plant에서 cellulase와 cellulose의 당화에 관해서 많이 연구되었다⁶⁾ (그림 8) 즉, 원료는 廢紙類를 사용하되 먼저 ball mill로 분쇄후 중균을 배양하여 cellulase 를 생산하고 배양액을 한회여과기로 농축하여 냉동탱크 중에 저장한다. 당화는 pH 4.8, 50°C 에서 행하는데 回分式의 경우 기질농도 10~15%, 24시간후 환원당 농도 1.5~5.5%의 당액을 얻을 수 있다. 연속식의 경우 기질농도 15%, 24시간 후에 3%, 48시간에서 4.7%의 당액을 각각 얻는다. 이것을 증발기에서 50%의 syrup으로 농축한다. 미국에는 이러한 공정의 공장이 건설되어 가동중에 있다고 한다.

이런 일을 위해서는 균주의 유전적 개량에 의해서 보다 좋은 효소를 얻을 수 없는바 0.05~0.1% Na-desoxycholate를 함유하는 desoxycholate乳糖寒天培地에 *Trichoderma viride*

를 배양하여 활성이 강한 변이주를 얻었고^{7,8)} Natick연구소와 Rutgers 대학에서는 그림 9와 같은 방법으로 *T. reesei*균주의 유전학적 개량을 시도하였다⁹⁻¹²⁾

III. 酒精醱酵 技術

1. 固定化 酵母에 依한 酒精醱酵

브라질에서는 cane sugar를 원료로 한 주정발효공정에서 효모의 回收, 再利用 system이 이미 실용화 되었다. 이 system을 채용하므로써 종래의 회분식 발효시 96시간에 비해서 대략 12~15시간으로 발효시간을 단축하였다.

최근에는 주정발효를 탱크에서 보다 固定化 酵母에 依해서 column식의 반응으로 연속적으로 할 수 있는 방법이 검토되고 있다. 즉, 효모를 gel상의 물질에 의해서 包括固定化하고 column에 충전후 당액을 통과시켜 반응을 하도록 한다. 효모의 고정화법은 担体에 흡착 고정화시키는 방법과 gel包括에 의한 방법이 있다. 担体吸着法에 관해서는 *Saccharomyces carlsbergensis*를 多孔性 glass 또는 PVC에 흡착시키고 이것을 column에 충전후 맥아즙을 통과시켜서 에타놀을 생산한바 있다.¹³⁾

Navarro와 Durand는 *S. carlsbergensis*를 多孔性 glass beads에 흡착시켜 固定化한 경우 에타놀 생성속도는 0.255~0.270 μ mol/min·mg 菌体로서 유리균체보다 5.7~6.0배 상승하였다 한다.¹⁴⁾ 또 Ghose와 Bandyopadhyay는 表 2와 같이 각종 担体에 대한 菌体保持량을 밝혔다.¹⁵⁾ 즉, 이들중 carrier A가 우수하여 이것을 사용한 연속교반·반응장치(Continuous Stirred Tank Reactor, CSTR)에 依한 연속발효를 행하였다. 이 경우 체류시간 6시간의 조건에서 96.6%의 발효성 당류가 소비되고 겨우 0.6%의 발효성 당류가 유출액중에 보

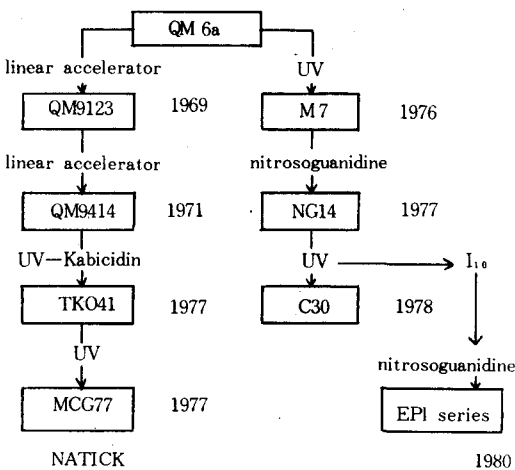


그림 9. *Trichoderma reesei* 균주의 유전학적 개량⁹⁻¹²⁾

였다. 배양액중 환원당 197g/l의 경우 에타놀 생성량은 93ml였다

표 2. 担体の 菌体(*S. cerevisiae*)保持量¹⁵⁾

担 体	菌体保持量 (1)	菌体保持量 (2)
Carrier A **	380	20.7
Carrier B **	242	18.5
Porous brickets	20	12.5
Rasching ring (8~10mm o.d.)	17	8.7
Rashing ring (5~7 mm o.d.)	14.5	7.25
PVC-flake, 1cm diam, 1cm length	253.0	5.3

*. **: 특허품, (1): mg건조균체/g담체, (2): g 건조균체/ℓ반응기

체류시간 2.86시간으로 연속발효하는 경우 30℃에서 75시간 극히 안정한 에타놀 생산능을 보였다. 그러나 流出液中에는 15~16g/ℓ의 효모를 함유하였다. 그밖의 예는 표 3 과 같다.

흡착법 이외에 1977년 Kierstan과 Bucke는 알긴산칼슘을 써서 gel抱括法으로 효모를 고정화하였다.¹⁶⁾ 즉, 체류시간을 약 10시간으로 연속발효시 수율 90%, 효모의 half-life 250시간이었다.

한편 일본의 Wada 등¹⁷⁾은 주정발효전에 前倍養을 이미 완료한 효모균체를 gel 1ml당 5.6×10^9 이 균일하게 분포하도록 첨가하여 *k-carrageenan*으로 고정화하는 방법과 전배양을 행하지 않은 種酵母를 gel ml당 3.5×10^8 되게 조정하여 고정화한 것을 10% glucose, 0.15% 효모엑기스, 0.25% NH_4Cl , 0.55% K_2HPO_4 , 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% NaCl , 0.001% CaCl_2 및 0.3% 시트르산(pH 5.0)으로 된 완전 배지중에서 60시간 배양하고 gel내에서의 균수를 4.8×10^8 까지 증대시키는 방법을 연구하였다.¹⁷⁾ 이들은 표 4에서 보는 바와 같이 固定化 증식효모에서는 生菌數 단위

表 3. 固 定 化 酵 母

酵 母	固 定 化 法	原 料	滯留時間 (時間)	生 産 性	에타놀 濃 度 (g/ℓ)	操 作 安 定 性 (日)	文 献
<i>S. carlsbergensis</i>	多孔性유리球吸着	glucose	-	-	-	-	14
<i>S. cerevisiae</i>	carrier A 吸着	糖 蜜	2.85	24.9 (g/l·hr)	71.1	>75	15
<i>S. cerevisiae</i>	polyvinyl chloride chip 吸着	glucose	7	-	120	-	13
<i>S. cerevisiae</i>	Ca-alginate gel 包括	glucose	10	-	約40	10 (半減期)	16
<i>S. cerevisiae</i>	k-Carrageenan 包括	glucose	-	(mg/hr·ml gel)	-	>30	17
<i>S. carlsbergensis</i>	k-Carrageenan 包括	glucose	1	56 (mg/hr·ml gel)	50	>80	18
<i>Saccharomyces</i> sp.	k-Carrageenan 包括	糖 蜜	2.8	50 (g/l·hr)	110	>180	19
<i>S. cerevisiae</i>	Al-alginate gel 包括	糖 蜜	4.2	-	80	>17	20
<i>S. cerevisiae</i>	gelatin glutaraldehyde 処理 Rasching ring 吸着	glucose	-	7.4 (g/l·hr)	15.3	-	21
<i>S. cerevisiae</i>	Ca-alginate gel 包括	cellobiose (β-glucosidase를 동시 에 고정화)	-	-	22	>30	22

당 에타놀 생산능은 고정화시키지 않은것과 거의 같았지만 전배양 종료후의 효모를 균일하게 분포시킨 固定化 효모 gel은 상기의 경우보다 1/3로 ethanol생산능이 저하되었다. 또 고정화 증식효모 gel중의 효모분포 상태를 전자현미경으로 관찰결과 濃密한 酵母의 層이 表面가까이 형성된것을 확인하였다. 고정화증식효모의 column은 30일 이상 안정상태하에서 에타놀을 생산하고 생산능은 50mg/ml gel/시간 이었다.

서도 행하여 화학공학적인 측면으로부터의 해석이 진전중에 있다.¹²²⁾

2. Solid phase ethanol fermentation

종래 사탕수수나 사탕무우로부터 에타놀 생산의 경우에는 착즙하여 에타놀 발효를 행하는 liquid phase fermentation이었으나 착즙 조작에 막대한 에너지가 소비되므로 이 조작을 생략하고 solid phase fermentation을 행

표 4. 고정화 증식효모의 에타놀 생산능¹⁷⁾

	생 균 수 (ml당),	生産能 (mg/ml/h)	고정화겔의생산능*	생산능/생균수**
未處理 효모	4.3×10^8	3.6		0.87
	4.8×10^9	43.2		0.90
고정화 증식효모	5.4×10^9		50.0	0.92
증식완료후의 효모를 균	5.6×10^8		18.7	0.33
일하게 한 고정화 효모	1.8×10^{10}		21.2	0.12

* mg/ml배지/ml겔/h, ** mg/10⁸ 효모/h

한편 고정화증식 효모를 사용하여 고농도 당액으로부터 고농도의 ethanol생산을 시도하였다.¹¹⁸⁾ 즉, *Sac. cerevisiae*를 써서 당농도를 단계적으로 증가시켜 효모를 적응시키면 25%의 당농도에서도 충분히 에타놀 생산능을 발휘하며 이때 에타놀 농도는 114mg/ml, 잔당 12mg/ml였고 에타놀 수율은 이론치의 96%였다. carrageenan gel에 고정화 한 경우 에타놀 축적능이 좋은 것은 carrageenan이 에타놀을 배척하여 배양외액에 비해서 gel중의 에타놀 농도가 낮아져서 생성물에 의한 발효 저해가 일어나기 어렵게 되기 때문이다. chibata¹¹⁹⁾ 등은 고정화 증식효모를 써서 당밀을 원료로 한 에타놀연속 발효를 행하여 체류시간 2시간에서 110mg/ml의 에타놀을 6개월이상 안정하게 생산하였다.

또한 고정화증식 효모에 의한 에타놀연속 발효 system의 실험은 pilot plant 규모에

하였다. 즉, 사탕수수 chip을 온수를 가해서 발효시키고 발효가 끝나면 다시 신선한 chip을 첨가하여 발효시키므로써 에타놀 농도를 4.5~5.5W/V%로 높인다. 이렇게 하면 chip 중 99%의 sucrose가 에타놀로 전환된다. 착즙을 사용하는 경우 인산암모니아나 인산칼륨 등을 첨가해야 하는 반면 이때 효모의 영양원으로 다른것을 첨가하지 않아도 된다.¹²³⁾ 이 방법은 초기투자가 적고 에타놀 수율이 좋아 생산비가 l당 5 센트 절약되었다 한다.

한편 사탕무우 분쇄물에 10w/w% 효모현탁액을 혼합하고 30°C에서 효모농도(2~9g/kg)에 따라 7~15시간 발효시킨 결과 착즙의 경우보다 4시간 이상이 단축되었고 발효수율은 85~90%로 발효액에는 9.5% 에타놀이 함유된 고급 알콜을 생성하였다. 발효穗의 살균 및 영양분 첨가도 필요없고 다만 pH를 4.5로 조절하였다.¹²⁴⁾ (그림 10)

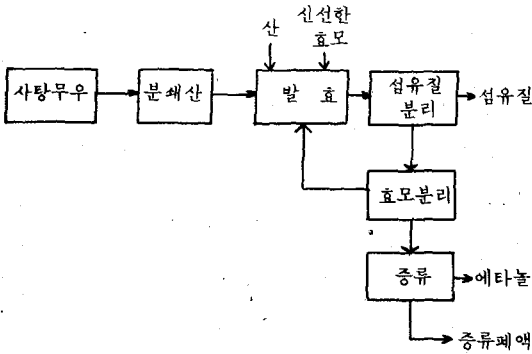


그림 10. 사탕무우를 원료로한 Solid phase fermentation²⁴⁾

또한 白米와 같은 전분질 원료를 사용한 solid phase fermentation의 경우 黑麹菌의 麴 10% 추출액 70ml, 물 10ml, 白米粉 30g, 酒母(Sac. sake의 泥状효모액 0.8g), 3ml N/5 HCl 3ml의 조건으로 30°C에서 발효시킨 결과 9일 후에 ethanol 13.6%, 殘全糖 0.9g, 발효수율 83.0% 였다.²⁵⁾

또 香味改良을 목적으로 Asp. awamori를 특수 배지에 배양한 액체국을 사용하여 白米粉 30g, 국균함유 효소액 80ml, 酒母(Sac. sake泥状효모), pH3.6, 30°C, 24시간 배양한 결과 5일 경과후에 14.6V%의 에타놀을 얻었고 향미도 개선되었다 한다.²⁶⁾

Cassava에 glucoamylase와 신선한 압착빵 효모를 사용하여 30°C 5일간 배양시 에타놀 수율이 좋았고 이때 CN함량이 많을 수록 좋았다 한다.²⁷⁾

옥수수 전분에 비슷한 실험을 한 결과는 그림 11과 같고 소비된 양만큼 전분을 다시 첨가하여 배양하는 반연속 무증자 에타놀 발효를 시행한 결과 3회이상 첨가시에는 발효속도가 급격히 감소되었다.²⁸⁾ 또 정치배양한 경우 20회(20일)에 달하는 반연속 에타놀 발효에도 1회 透析효모로 충분하였다. Cassava의 경우 사용하는 효모를 通氣培養한것 보다 정치배양한 것은 18일간 반 연속식으로 에타놀 발효를 행할때 1회투석한 것으로 충분하

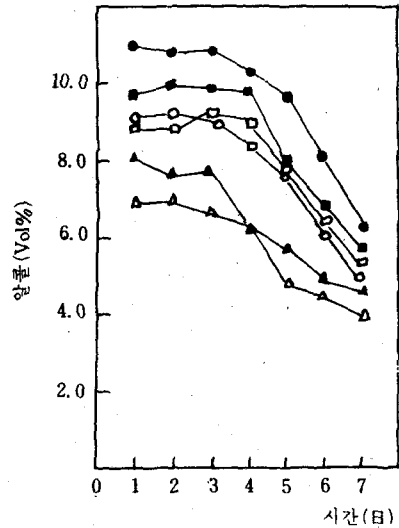


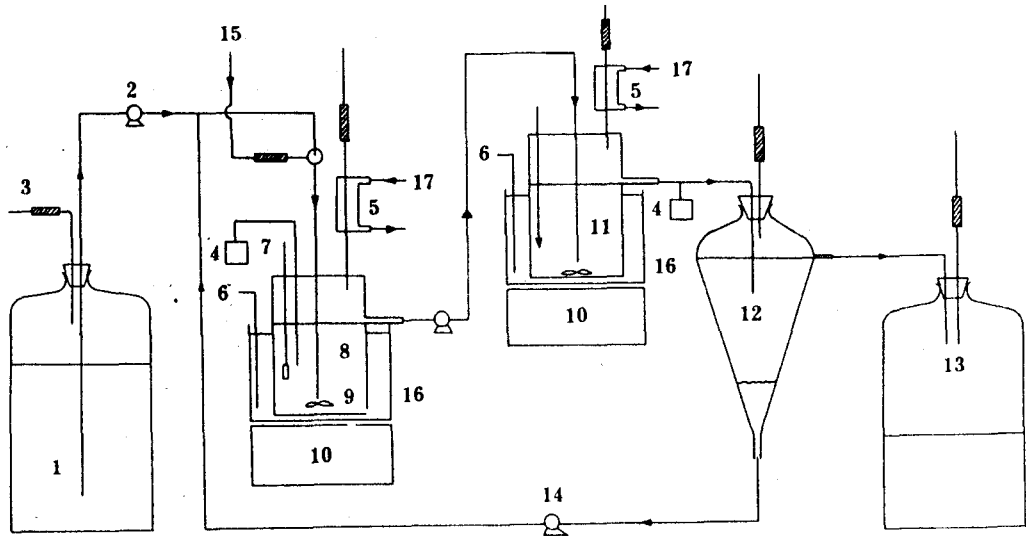
그림 11. 옥수수 전분의 농도가 주정발효에 미치는 영향²⁸⁾

△, ▲, 20%, ●, ○, 30%, □, ■, 40%
△, ○, □: 정치배양, ▲, ●, ■: 진탕배양

였으나 옥수수의 경우보다 에타놀 생성율이 좋지 않고 Pseudomonas sp가 생산하는 debranching isoamylase를 첨가할 때 그 효과가 현저히 상승하여 옥수수의 경우와 비슷하였다.

3. 菌体循環式 Ethanol 連続醱酵

발효법에 의한 ethanol 생산에서 생산비를 줄이기 위해서 比生産속도가 높고 고농도의 기질이나 ethanol에 저해를 받지 않는 균주로서 Saccharomyces uvarum ATCC 26602가 우수한 균주로 선발되었는바²⁹⁾ 이 균주는 凝集性이 크고 따라서 발효가 끝난 다음 쉽게 분리회수되어 재 사용이 가능하며 그리하여 그림 12와 같이 균체를 순환시키면서 연속식으로 발효가 가능하다. 즉, 20ℓ들이 배지 저장탱크에 당도 40%의 培地는 流速을 조절하면서 1,8ℓ들이 1차 발효조에서 통기 발효시킨다. 이때 발효 온도는 35±0.5°C 이고 공기 유속은 0.12vvm으로 한다. 1차발효가 끝나



- | | | |
|-----------|----------------------|-------------------|
| 1. 원료저장 | 7. 온도계 | 13. 제품 저장 |
| 2. 맥동식 펌프 | 8. 제 1 발효조 | 14. Cassette pump |
| 3. 공기 여과기 | 9. Magnetic spin bar | 15. 압축공기 |
| 4. 시료채취병 | 10. Magnetic stirrer | 16. Water bath |
| 5. 냉각기 | 11. 제 2 발효조 | 17. 냉수 |
| 6. 가열기 | 12. 효분리기 | |

그림 12. Two Stage 발효³⁰⁾

면 맥동식 펌프로 2차 발효조로 보내서 공기를 공급하지 않고 혐기적으로 발효시키며 이것은 분리조에 들어가 효모는 응집침강되므로 이것을 1차 발효조로 다시 보내서 연속적으로 반응을 진행시킨다.³¹⁾ *S. uvarum* ATCC 26602를 사용하고 당밀을 원료로하여 이러한 실험을 한 결과 순환을 시키지 않을 경우 1차 발효에서 2.6%, 2차 발효에서 4.5%의 에타놀이 생겼는데 이것은 균체 농도가 1.0g/l로서 비교적 낮았기 때문이며 따라서 균체를 재순환시켜 그 농도를 2.1g/l로 하였을 때는 에타놀 생산이 다소 증가하여 1차 발효시 4.0%, 2차 발효시에는 5.8%였다. 이것은 당밀의 점도가 높고 발효殘糖이 균체 분리기 내에 계속발효되어 생성되는 CO₂가 균체 침강을 방해하여 순환되는 균체 농도를 저해하기 때문에 효과가 별로 없었다. 그래서 초기 균체 농도를 20g/l 높여서 실험한 결과는 그

림 13과 같다. 즉, 균체 농도는 큰 변화가 없었으며 총 14.5시간 발효시 1차 발효에 6.4~6.8%, 2차 발효시 8.4~9.0%의 에타놀이 생산되어 수율은 이론치의 88.1~94.4%였고 최종 발효액내의 잉여당은 0.2% 미만이었다.

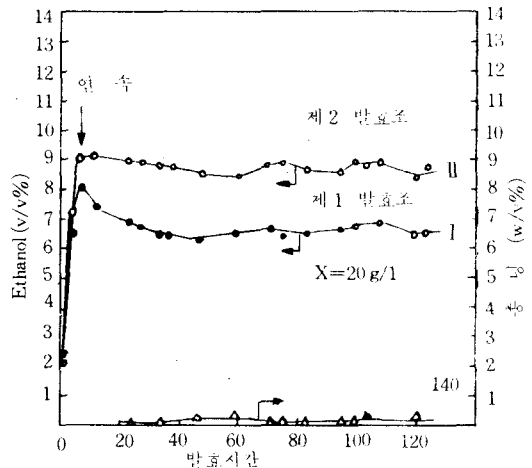


그림 13. 균체 recycle을 이용한 연속 발효³⁰⁾

4. 세균에 의한 에타놀 발효

효모이외에도 *Pseudomonas saccharophila* 나 *Zymomonas mobilis* 등의 세균에 의해서 에타놀 발효가 진행된다는 것이 이미 알려졌고 그 대사경로는 그림 14에서 볼 수 있드시 EMP 경로를 거치지 않고 Entner-Doudoroff

경로를 거친다는 것이 밝혀졌다.⁽³¹⁾ 에타놀 생산세균에 관하여는 이미 1931년부터 실험을 계속 하였던 바 1979년 Rogers의 보고에 의하면 에타놀 생산이 1.9mol을 넘어서서 이론치의 96~97%로서 에타놀 생성속도는 前者가 5.67g/g/h 이고 후자는 0.67g/g/h였다.⁽³³⁾

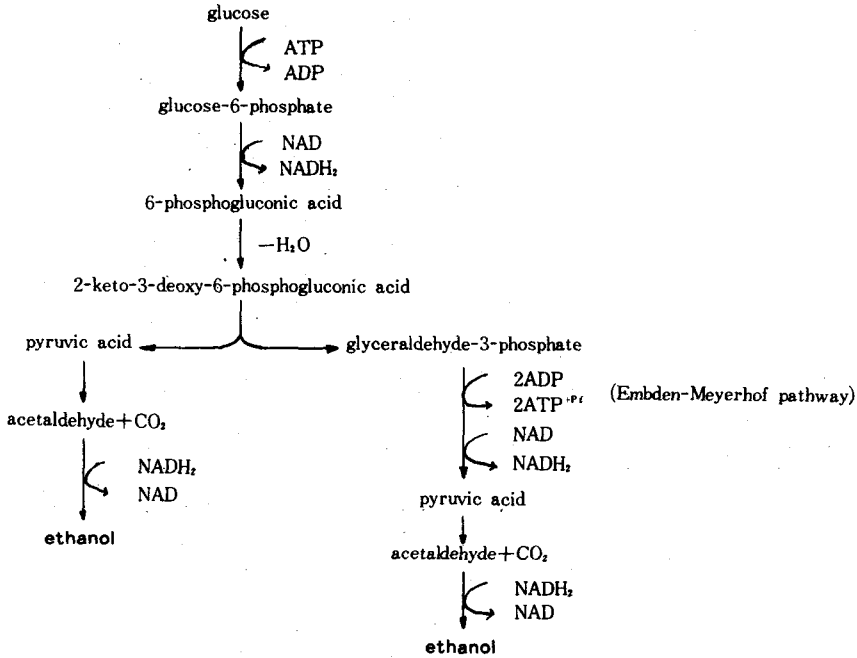


그림 14. *Z. mobilis*의 에타놀 발효기구⁽³¹⁾.

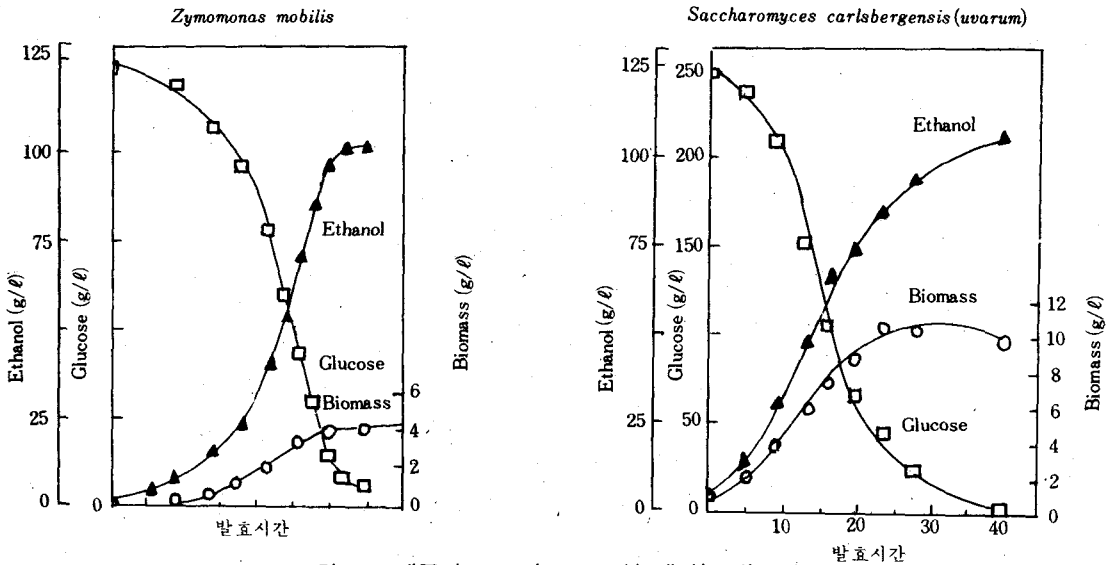


그림 15. 세균과 효모의 Batch식 에타놀 발효⁽³²⁾.

표 5. 효모와 세균의 에타놀 발효(회분식)³³

	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
糖濃度(%)	10	10
比増殖率 μ (h ⁻¹)	0.43	0.35
ethanol生成速度g/g/h	5.67	0.67
glucose代謝速度g/g/h	10.5	1.75

균체의 比増殖率(μ)은 糖濃度 10%에서 *S. cerevisiae* 0.35h⁻¹, *Z. mobilis* 0.43h⁻¹ 이고 에타놀 수율은 이론치의 98%였으며 당농도가

높으면 μ 가 적어지나 그와 비례하여 균체와 에타놀 생성속도도 느려진다. 兩者 모두 최고치에 달하는 데에는 당농도 10%와 20%에서 後者는 前者의 약 2 배의 시간(30시간)이 요한다. *Z. mobilis*의 에타놀 耐性은 효모에 비해서 좋은 편은 아니었다.³⁴

*Z. mobilis*에 의한 연속발효를 검토한 결과는 그림 16, 17과 같다.³⁵

즉, 당농도 10%의 경우에는 회석율(D. R) 0.13h⁻¹ 이하에서는 당이 거의 완전히 소비된 상태로서 에타놀 농도 49g/l 을 유지하여 정상상태가 성립하였다. 15% 이상의 경우에는 그림 16과 같이 D. R. 0.05h⁻¹ 이상의 전역에 걸쳐서 殘糖이 30g/l 이하가 되지 않고 20% 의

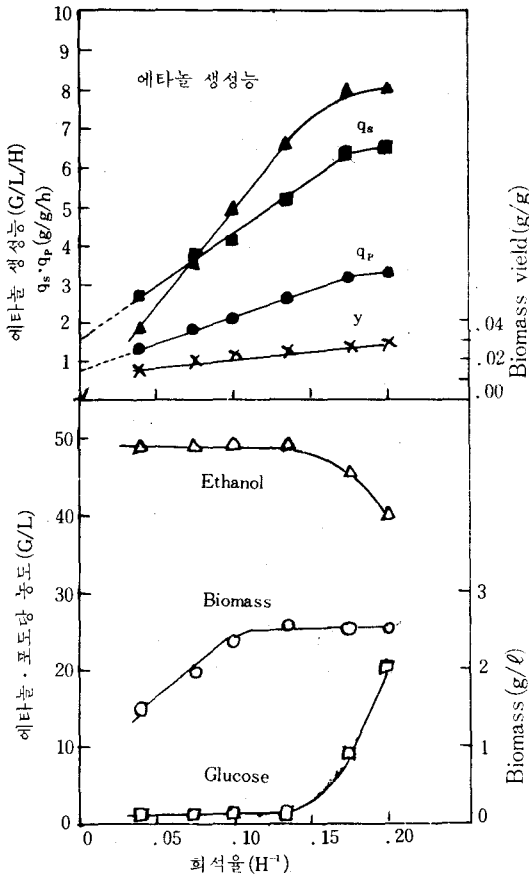


그림 16. *Zymomonas mobilis*에 의한 에타놀 연속 발효³³⁾

(glucose 100~250g/l, 효모 ext. 10g/l, KH₂PO₄ 1g/l, (NH₄)₂SO₄ · 7H₂O 0.5g/l, pH 5, 배양온도 30°C, 당농도 10%)

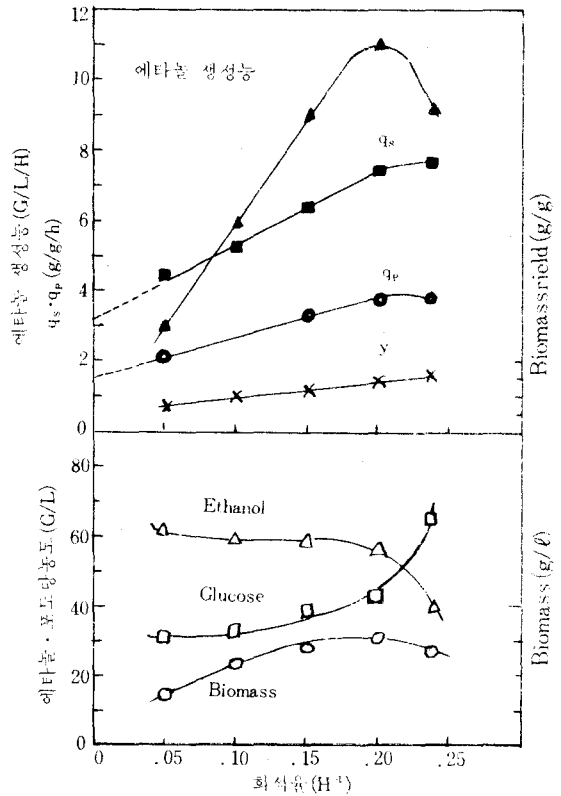


그림 17. *Z. mobilis*에 의한 에타놀 연속발효³³⁾ (당농도 15%)

경우에도 마찬가지였다. 이때 에타놀 농도는 60g/l가 되나 그 균(*Z. mobilis* ATCC 10988)은 에타놀 농도 50g/l에서 생육이 저해되므로 위의 결과는 이런 영향을 받은것 같다. 그러나 균주중에는 70~80g/l의 에타놀 농도에서 생육저해를 일으키지 않는것도 있다. 그래서 배지 실험을 통해서 *Z. mobilis*가 필요로 하는 유일한 생육인자는 panthotenic acid⁽³⁶⁾ 인데 이 비타민의 결핍은 균체 생성량과 생성속도에는 영향을 미치지만 단위균체량에는 영향을 미치지 않는다고 한다.⁽³⁶⁾

또한 균체 농도를 높이기 위하여 당농도 100g/l, 효모엑기스 5g/l, 유출액으로부터 균체의 분리는 연속적으로 milipore filter (염화비닐 0.6 μ m)를 사용하여 행한후 菌體를 재사용하는 실험을 행한바 있다.⁽³⁷⁾ 즉, 균체의 recycle은 低菌體농도에서부터 시작하여 점차 희석율을 높여 D. R이 2.0h⁻¹에는 40g/l의 균체농도에 달했다. 이것은 recycle시키지 않는 경우보다 약 15배의 농도이다. D. R이 2.7h⁻¹시는 균체농도가 38g/l, 에타놀 농도는 44.5g/l/h였다.

요컨대 *Z. mobilis*은 혐기적으로만 증식하고 catalase를 가지는 통성혐기성균이다. 그러나 이 균은 好氣培養에 의해서 균체 생성량을 증가시키지 않고 증식율을 높이지도 않는다 호기배양에 있어서도 상당량의 에타놀이 축적되고 일부의 에타놀은 산화되어 초산으로 된다. 이는 균체증식을 위해서 일시통기를 할 필요가 없고 균체 고농도 연속배양에 있어서 recycle균체의 활성을 유지하기 위한 미량의 공기 공급을 행할 필요도 없다.

이들 실험결과는 아직 실험실적이며 공업적인 주정생산 가능성을 주고 있는바 먼저 sucrose발효속도가 비교적 느리고 levan이 생성되는 문제점이 있다. 또 전분질을 糖으로 糖化時 多少의 阻害現象도 일으키므로⁽³⁸⁾ 계속해서 균주개량을 해야하고 菌體의 分離技術과

recycle의 공업적인 설계도 확립해야 한다.

지금까지 발효온도를 높이는 연구에서 고온인 37℃⁽³⁸⁾ 또 그보다 높은 온도에서도 가능하다고 하지만 온도를 높일수록 에타놀 생성속도를 높이고 증류비용을 낮추어야 할것이다.

한편 세균을 섬유소에 작용시켜 발효시키거나 다른 균을 혼합배양하므로써 에타놀 발효를 시험한 바 있다.

*Clostridium thermocellum*이 그 대표적인 균으로 cellulose, cellobiose, glucose, fructose, mannitol을 발효하고 최적 pH 6.4~7.4이며 주 발효 생성물은 아세트산, 에타놀, 젖산 등이었다.⁽³⁹⁾ 이와같이 에타놀 이외에 부산물이 문제이지만 균주개량에 의해서 에타놀에 내성이 있고 그의 생성량이 큰 균주를 얻고 있다.^(40, 41) 또 *C. thermohydrosulfuricum*과 혼합 배양으로 E-OH/HAC비율 10배 이상 높여 에타놀 생성량을 현저히 높였다. *C. thermocellum*은 hemicellulose를 분해하나 pentose는 발효하지 않으므로 pentose 발효성의 *C. thermosaccharolyticum*과 혼합배양하여 cellulose와 hemicellulose를 함께 에타놀 발효원료로 시도한바 있다.⁽⁴¹⁾

어떻든 섬유질 원료의 에타놀 발효는 원료의 물리적, 화학적 처리 즉, 원료의 미분쇄나 알칼리 처리가 선행되어야 한다.

IV. 에타놀의 分離技術

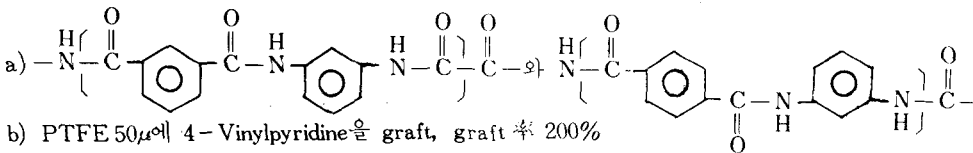
醱酵에 의해서 생성된 에타놀을 분리 정제하는데에는 증류시설과 연료비등 많은 비용이 소요되므로 이러한 증류 방법을 쓰지 않고 高分子膜을 이용하여 물리적으로 水-알콜의 분리를 시도한 연구들이 이루어 졌는바 이들을 요약하면 표 6과 같다.

Cellulose acetate막에 水-에타놀 증기 혼합물의 용해·확산의 경우 단일성분의 증기에 비해서 감소한다. 이것은 물과 메타놀의 친화

표 6. 水-알콜 혼합계 및 非혼합계의 막투과성 (25°)

膜	分離法	溶 液 A B	알콜농도	分離係數 α (A/B)	B의排 除率*	透過速度	文献
Cellulose acetate	逆浸透 (17.5氣圧)	水 에타놀	200ppm	—	20%	—	42
"	逆浸透 (100氣圧)	水 —	—	—	—	0.01 kg/m ² ·hr·atm	43
"	逆浸透 (100氣圧)	— 에타놀	—	—	—	0.005 "	43
Polyethyleneimino-toluene -2,4-diisocyanate	逆浸透 (飽和MgSO ₄)	水 에타놀	10%	—	35%	1.36 kg/m ² ·hr	44
"	逆浸透 (飽和MgSO ₄)	水 에타놀	20%	—	35%	13.32 "	44
"	"	水 —	—	—	—	8.04 "	44
Polyamide ^a	逆浸透 (17.5氣圧)	水 에타놀	90~500ppm	—	40%	0.082 kg/m ² ·hr·atm	45
"	"	水 에타놀	90~500ppm	—	19%	0.086 "	45
Cellulose acetate	Pervaporation	水 에타놀	55%	8.5	—	1.95 kg/m ² ·hr	46
Ptfe-P4VP ^b	"	水 —	—	—	—	0.29 "	47
"	"	水 에타놀	—	—	—	0.60 "	47
PTFE-PVP ^c	"	水 —	—	—	—	0.56 "	47
"	"	— 에타놀	—	—	—	2.18 "	47
"	"	— 에타놀	—	—	—	0.74 "	47
PTFE-PVP ^d	"	水 에타놀	95.6 (共沸)	2.9	—	2.20 "	48
PTFE-PVP ^d	"	水 에타놀	71.8 (共沸)	6.4	—	1.70 "	48

*排除率=供給液中의 濃度-透過液中의 濃度 / 供給液中의 濃度의 共重合體



b) PTFE 50 μ 에 4-Vinylpyridine을 graft, graft率 200%

c) PTFE 50 μ 에 N-Vinylpyrrolidone을 graft, graft율 38%

d) Teflon12 μ 에 N-Vinylpyrrolidone을 graft, graft율 92%

성에 의하며 같은 현상이 水-에타놀 간에도 존재할것으로 생각된다. Nylon-6의 막중에도 水-알콜은 cluster를 만들고 있다고 보고되어 있다.⁴⁹⁾ 이것이 水-알콜분리를 방해한다. 표6에서 고분자막을 쓴 결과는 모두 물이 알콜보다 투과성이 크기 때문에 투과액중의 물의 비율이 크다. graft 고분자막에는 투과계수의 하나의 인자인 용해도 계수를 보면 Poly tet-

ra fluoro ethylene-Poly vinyl pyrrolidone (PTFE-PVP)에서는 물-에타놀, poly-tetra fluoro ethylene poly tetra vinyl-pyridine (PTFE-P4VP)에서는 ethanal > 水이고, 확산계수는 에타놀의 편이 크다. 이들의 결과로 보아 P4VP의 막이 水-에타놀 분리에 적합한 것으로 생각된다. 그러나 구멍의 크기가 아주 작을 때 어느정도, 水-알콜의 분리가

인정되고 이 경우에는 알콜의 투과성이 더크다.

고분자막중을 저분자가 확산해가는 영역은 고분자가 점유되지 않은 공간이다. 막이 고분자로 점유되어 있는 부분을 고분자의 용적 분율(V_2)로 나타낼때 ethanol의 투과계수의 관계가 poly vinyl alcohol막 등으로 연구되어있다.⁵⁰⁾ 이 결과는 표 7에 표시한 바와 같다.

표 7. 高分子의 容積分率과 에타놀의 透過係數⁵⁰⁾

膜	容積分率 (V_2)	에타놀의 透過係數 cm^2/sec
Poly vinyl alcohol	0.228	3.61×10^{-7}
"	0.303	24.2×10^{-7}
"	0.519	4.99×10^{-7}
"	0.592	6.08×10^{-7}
Cellulose acetate	0.33	22×10^{-7}
Milipo e RA	0.12	64.2×10^{-7}

Polyvinyl alcohol이나 cellulose acetate도 非混合系에서는 V_2 가 유사하면 거의 같은 투과계수를 나타낸다.

限外 여과막의 경우 단위시간과 단위면적당 액체의 투과량 J_v 는 膜面側의 압력차 ΔP , 액체의 점도 η , 막의 두께(구멍의 길이) ℓ 間에는 다음과 같은 관계가 성립한다.

$$J_v = \frac{P\Delta P}{\eta \cdot \ell} \quad \text{또는} \quad J_v = \frac{R\Delta P}{\eta}$$

여기서 P는 투과계수, R은 투과속도이다.

그밖에 알칼리 용액에서의 polyvinyl alcohol막⁵¹⁾ 이온 교환막을 사용한 전기 침투에 의한 水-알콜의 투과성에 관해서 연구한바 있다.⁵²⁾

이상에서 실험한 결과도 큰 성과를 얻지는 못하였다. 최근 그림 18과 같이 막에 고주파를 주어 水-알콜의 cluster를 절단하여 알콜의 선택투과를 시도한바 있다.⁵⁴⁾ 즉 막에 에너지를 부여하므로써 친화성에 바탕을 둔 水-알콜 결합을 파괴하여 막중의 확산을 용이하게 하는 系의 개발이 권장될 것이다.

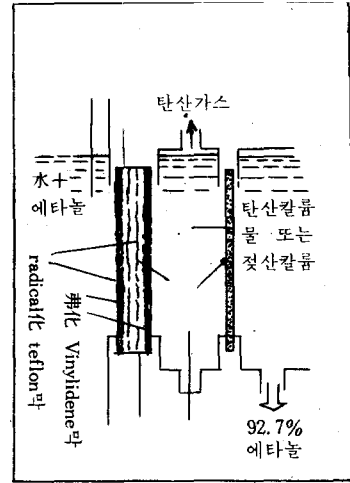


그림 18. 다공질 불소 함유 고분자막에 의한 水-알콜의 분리⁵⁴⁾

V. 맺음말

이상으로 에타놀 생산을 위한 당화, 에타놀 발효 및 에타놀의 분리에 관한 최근의 연구를 단편적으로 요약하였다. 이러한 연구들은 대체에너지용으로 사용할 때 생산비 절감을 도모하기 위한 것으로서 아직도 실험적인 규모를 벗어나지 못하고 있으며 따라서 실용화를 위한 연구가 이루어져야 할 것이다.

필자의 短見으로 適切한 引用이 되지 못한 것이 많을줄 믿고 참고문헌은 再引用이라도 원래의 인용문헌을 수록하였으므로 그것을 참고하기 바란다.

(참고문헌)

1. Maeda, H., *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1571 (1975)
2. Ueda, S.; *Proceedings of Int'l Sym. on enzyme chemistry, Tokyo and Kyoto*, 491 (1957)
3. Ueda, S.; *Raw starch digestion by mold glucoamylase and debranching enzymes*

- in mechanism of saccharides polymerization and depolymerization (ed. J. J. Marshall), Academic Press, (1980)
4. M. J. Malachowski; Cellulose Conversion Handbook, C. E. I., Berkley, California (1980)
 5. 外山信男, 小川喜八郎, 外山英男; Cellulose 資源の酵素糖化と alcohol 醱酵, 醱酵と工業, 39(9) 812(1981)
 6. R. K. Andren and J. M. Nystrom; AIChE Symposium series 72, No. 158, 91(1977)
 7. M. Mandels, D. Sternberg and R. E. Andreatti; Growth and cellulase production by *Trichoderma*, A manuscript prepared for SITRA Sym. on Enzymatic Hydrolysis of cellulose, Helsinki, Finland, Mar. 12-14(1975)
 8. M. Mandels and J. Weber; The production of cellulases; Advances in Chemistry series 95, Cellulases and their Applications, R. F. Gould (Ed) ACS publications, Washington D. C. 391(1969)
 9. B. J. Gallo, *et al*; Cellulase production by a new mutant strain of *Trichoderma reesei* MCG 77, *Biotech and Bioeng.* Sym. No. 8, 99(1978)
 10. B. S. Montencourt and D. E. Eveleigh; Hypercellulolytic mutants and their role in saccharification, Proc. 2nd Annual Fuels from biomass Symp, Rensselaer Polytechnic Inst. Troy, N. Y. 613(1978)
 11. B. S. Montencourt, T. J. Kelleher, D. E. Eveleigh and L. G. Petterson; Biochemical nature of cellulases from mutants of *Trichoderma reesei*, *Biotech. and Bioeng. Symp.* No. 10, 15(1980)
 12. S. M. Cusky, *et al*; Screening for β -glucosidase mutants of *Trichoderma reesei* with resistance to end product inhibition, developments in Industrial Microbiology, 21, 471(1980)
 13. Corrieu, G., *et al*; 5th Int'l Ferm. Symp., 294(1976)
 14. Navarro, J. M. and Durand, G., *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4, 243(1977)
 15. Ghose, T. K. and K. K. Bandyopadhyay; *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1489(1980)
 16. Kierstan, M. and Bucke, C; *Biotechnol. and Bioeng.*, 1489(1980)
 17. Wada, M., Kato, J. and Chibata, I; *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 275(1980)
 18. Wada, M., Kato, J. and Chibata, I; *ibide* 11, 67(1981)
 19. I. Chibata; The 2nd German-Japanese Workshop on enzyme technology, Abstr. 39(1980)
 20. 福島達外: 日本醱酵工学会 大会要旨集, 133(1980)
 21. Sitton, O. C. and Gaddy, J. L.; *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1735(1980)
 22. Hägerdal, B; *Acta Chem. Scand.*, B 34, 611(1980)
 23. C. Rolz, Sherryl de Cabrera and R. Garcia; *Biotech. Bioeng.* 21, 2347(1979)
 24. K. D. Kirby and C. J. Mardon; Research and development workshop on "Fuel ethanol" Feb. 4-5. Canberra, Australia (1980), Proc. IV Int'l. Symp. on alcohol fuels, Oct. 5-8 Guaruga, Brazil(1980)
 25. 山崎何恵, 上田誠之助, 島田豊明; 醱協, 21, 83(1963)
 26. 上田誠之, 古偉郎; 醱協, 23, 37(1965)
 27. S. Ueda, *et al.*; *Biotech. Bioeng.*, 23, 291(1981)

28. S. Ueda and Y. Koba; *J. Ferm. Technol.*, **58**, 237(1980)
29. Rose, D.; *Process Biochem.*, **11**, 10(1976)
30. 金益煥 · 金炳弘 · 閔泰益 : 糖蜜의 菌体循環式 에타놀 연속발효, 한국산업미생물학회지, **10** (2), 155(1982)
31. M. Gibbs and R. D. DeMoss; *J. Biol. Chem.*, **207**, 689(1954)
32. P. L. Rogers, K. J. Lee and D. E. Tribe; *Biotechnology Letters*, **1**, 165(1979)
33. B. H. Lavers, *et al*; Vith Int'l Ferm. Symp. London, Ontario(1980)
34. 太田一良外 : 日本農芸化学会, 1980年大会
35. K. J. Lee, D. E. Tribe and P. L. Rogers; *Biotechnol. Letters*, **1**, 421(1979)
36. J. P. Belaich and P. Simonpietre; *J. Gen. Microbiol.*, **70**, 179(1972)
37. P. L. Rogers, K. J. Lee and D. E. Tribe; *Process Biochem.*, Aug/Sep, 7(1980)
38. L. Viikari, P. Nybergh and M. Linko; Vith Int'l Ferm. Sym London, Ontario(1980)
39. N. J. Patn and J. K. Alexander; *J. Bact.*, **105**, 226(1971)
40. S. D. Wang; M. S. Thesis, MIT(1978)
41. G. C. Avgerinos, H. Y. Fang, I. Biocic and D. I. C. Wang, Vith Intl Ferm, Symp. London, Ontario(1980)
42. T. Matsuura, A. G. Baxter, and S. Sourirajan; *Ind, Eng. Chem, Process Des, Dev*, **16**, 82(1977)
43. H. Nomure *et al*; *J. Applied Polymer Sci*, **24**, 119(1979)
44. R. Seevers and M. Deinjer; *J. Physical Chem*, **80**, 761(1976)
45. T. Matsuura, P. Blais, J. M. Dickson and S. Sourirajan; *J. Applied Polymer Sci*, **18**, 3671(1974)
46. R. C. Bining and R. J. Lee; U. S. Patent 2953, (502 Sep, 20, 1960)
47. P. Aptel, J. Cuny, J. Jojeqonicz, G. Marel and J. Neel; *J. Applied Polymer Sci.*, **18**, 365(1974)
48. P. Aptel, N. Cunallard, J. Cuny and, J. Neel; *J. Membrane Sci.*, **2**, 271(1976)
49. G. Skirrow and K. R. Young; *Polymer*, **15**, 771(1974)
50. M. W. Osterhoudt; *J. Physical Chem*, **78**, 408(1974)
51. T. Uragam, and M. Sugihara; *Angrew Makromol, Chem.* **57**, 123(1977)
52. R. Kumer; *J. Membrane Sci*, **5**, 51(1979)
53. K. Singh and R. Kumer; *ibide*, **5**, 275(1975)
54. 田村正平; 日化学秋季年会(1980)

좋은상품 범용거래 신용사회 바탕된다