

無蒸煮糖化(Solid Phase Fermentation)

本文은 日本「발효와 공업」지 Vol. 39. No. 9. p. 10

上田 誠之助

~17을 발췌하여 번역한 것임 -편집자-

(九州大学農学部, Ueda Seinosuke)

I. 緒 言

第2次 世界大戰後, 石炭에 이어 石油가 에너지의 大半을 차지해 이들 化石에너지에 依存하는 것이 當然한 것으로 생각되어 왔다. 그런데 1973년의 第1次 오일쇼크, 또다시 最近의 第2次 오일쇼크의 經驗을 體驗하고 비로서 에너지源으로서 石油에 依存해도 좋은가 하는 疑問이 생기기 시작했다. 50年 後에는 洞竭할 것인 石油, 戰時物資로서 언제 어느때 그 供給이 끊어질지 모를 石油, 年年 그 價格이 高騰해 1980年代 末期에는 1 배럴당 100弗로 現在의 3 배의 價格까지도 될 것이라는 石油, 이렇게 將來性에 있어서 不安全要素가 많은 石油에너지에서 無盡藏인 太陽에너지로 사람들은 눈을 돌리게 된 것이다.

太陽에너지에 依하여 限定없이 生産되는 바이오매스를 利用한 에너지 生産에 사람들의 注意가 集中하고 있다. 그 中에도 바이오매스의 에타놀 生産이 特히 손쉬운 課題로서 脚光을 받고 있다. 農産資源이 豊富한 나라는 그 나라 特有의 農産物에서의 에타놀 生産에 依해 石油에너지의 代替를 시도하고 있다. 브라질에 있어서는 主로 甘蔗搾汁 및 糖蜜에서 年間 380萬kl 에 達하는 에타놀 生産(將來는 카사바에서의 에타놀 生産도 計劃하고 있다), 美國에 있어서의 옥수수로부터의 에타놀 生産, 뉴질랜드에 있어서의 飼料用甜菜(fodder beet)에서의 에타놀 生産 등이 그 例이다. 東南아시아에서도 카사바에서의 에타놀 生産이 計劃되고 있다. 이러한 경우 에너지源으로서의 에타놀 生産인 이

上 如何히 最少의 生産에너지로 多量の 에타놀을 生産하느냐가 問題로 된다. 그러므로 炭素源을 澱粉質原料에서 求한다면 糖質原料에 比하여 必然적으로 多量の 生産에너지가 必要해진다. 왜냐하면 糖質原料의 경우에는 孝母는 糖을 直接 에타놀로 轉換할 수 있으나 澱粉의 경우에는 한번 加熱해서 糊化澱粉으로 만든後 아미라제로 澱粉의 液化, 糖化를 시켜 醱酵性糖을 구루코스나 말토스로 바꿔 가지고 비로소 酵母에 依하여 에타놀로 轉換시키기 때문인 것이다.

一般적으로 澱粉質原料의 境遇 그의 蒸煮, 液化, 糖化에 必要한 에너지 量은 에타놀 生産에 必要한 에너지 量의 約30%로 알려져 있다. 그러므로 蒸煮에너지를 節約하고자 澱粉質原料의 無蒸煮에타놀 醱酵인 solid phase fermentation을 試圖하는 것이다.

II. Solid Phase Fermentation

固体培地, 例를 들면 쌀이나 小麥에 糸狀菌을 繁殖시켜 만든 麹은 日本, 中国, 韓國, 泰國等 東洋의 獨特한 手法과 産物로, C.W. Hesseltine은 이 固体培養法을 solid state fermentation이라 命名하고 많은 例를 紹介함과 동시에 그 自身도 이 手法을 써서 아후라트기신 등의 生産을 하고 있다. 榻榻米 木質培地로 버섯栽培, 蒸煮大豆에 納豆菌을 繁殖시키는 納豆製造도 solid state fermentation의 카테고리에 들 것으로 생각된다.

한편, Kirby and Mardon은 solid phase

fermentation인 醱酵은 micro attack, usually by fungi, on solid moist particles라고 定義하고 있어 solid state fermentation과 同一한 定義로 보이거나 Kirby等の 研究対象에서 생각하면 solid phase fermentation은 오히려 半流動的 固体醪의 醱酵로 淸酒醪, 간장, 된장등의 醱酵가 이 中에 들어가지 않을런지.

從來, 甘蔗나 甜菜에서의 에타놀 生産의 境遇 搾汁을 採取해서 그것을 에타놀 醱酵시키는 liquid phase fermentation이었으나 搾汁 操作에 莫大한 에너지를 消費하므로 Kirby 等은 甜菜에서의 에타놀 醱酵에 있어 省에너지를 指向하여 搾汁操作을 省略하고 甜菜칩의 에타놀 醱酵 即 solid phase fermentation을 하고 있다.

이 澱粉質原料에서의 無蒸餾에타놀 醱酵도 省에너지를 指向한 solid phase fermentation이므로 이 兩者에 對하여 좀더 詳細하게 紹介해 보자.

III. 糖質原料를 使用한 Solid Phase Fermentation.

甜菜나 甘蔗에서의 에타놀 生産을 할때 前述한 바와 같이 從來에는 이러한 原料를 磨碎하여 压榨, 다시 殘渣에 물을주어 糖分의 抽出, 压榨으로 적어도 3回 以上의 压榨, 抽出이 必要하여 이에드는 에너지가 크며 压榨, 抽出 裝置가 高價였다. 1979年 과테말라의 Polz 等은 甘蔗의 solid phase fermentation을 500ml 플러스크 實驗의 스케일로 하였다.

甘蔗칩에 温水를 加하고 酵母로 醱酵시킬뿐이나 甘蔗組織에서의 蔗糖의 抽出이 液中的 糖類가 에타놀로 바뀌는 것으로 蔗糖의 濃度 勾配가 커지며 促進된다. 醱酵終了液에 다시 新鮮한 甘蔗칩을 添加, 에타놀 醱酵를 시켜 에타놀의 濃度を 4.5~5.5W/V%로 높인다. 甘蔗칩中的 蔗糖의 99%가 에타놀로 轉換된다. 其他의 長點으로 酵母의 營養源을 아무것도 添加

하지 않아도 괜찮은 點이다. 甘蔗搾汁醱酵에서는 磷酸암모니아, 磷酸가리등의 添加가 必要한 것이나 이 solid phase fermentation process를 그들은 EXFERM process로 부르고 있다. 이 方法이라면 初期投資가 적고 에타놀 收率이 높으며 結果적으로 生産코스트는 5¢/l가 싸게 되는 것으로 되어 있다. 한편 甜菜를 使用하는 solid phase fermentation에 對하여는 1980年의 오스트리아의 Kirby and Mardon의 研究가 있다. 그들은 100ml~2l의 스케일로 實驗을 하고 있다. 粉碎한 甜菜에서의 蔗糖抽出은 어려우며 熱水抽出을 回分的으로 하면 數回의 回分抽出로는 蔗糖의 抽出은 充分치 못하였다. Bauer refiner로 甜菜를 直径 3mm 쯤의 粒子로 細斷하여, 팔푸로하여 途中 한번 加水하여 두번 压榨로라에 걸면 糖分回收率 65%로 最高回收率을 얻었다. 거기서 3mm 直径의 거칠은 팔푸와 1mm 直径의 고운 팔푸를 써서 solid phase fermentation의 比較를 해 보았다. 粉碎程度의 差, 加水의 影響 80℃ 予熱의 效果 各種濃度의 페쿠치나제, 세루라제의 添加效果가 調査되었는데 물도 酵素도 添加하지 않은 無處理區가 最高 에타놀 收率을 올려 粉碎程度의 差도 醱酵收率에는 거의 影響을 주지 않았다. 시트의 酵母도 乾燥 빵 酵母라도 新鮮 压榨 빵 酵母라도 좋았다. 醱酵프로세스의

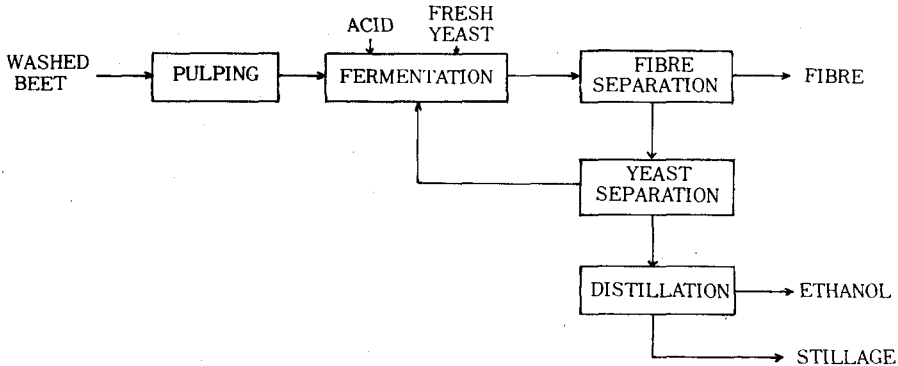
〈表1〉 酵母濃度의 關數로서의 醱酵時間

基 質	酵母濃度 (g/kg)	醱酵 時間(h)	
		最終收率* 95%까지	最終收率 99%까지
搾 汁	2	17	19
거칠게 磨碎한 甜菜	2	13½	15
"	3	12	13½
"	6	9½	11
"	9	7½	9

*最終收率은 理論收率의 約 90%

예를 든다면 다음과 같다. 거칠게 이긴甜菜 팔푸는 stiff consistency를 지녀 余剩水分도 안나오는 状態였다. 10W/W%의 酵母懸濁液을 팔푸에 混合하여 30℃로 醱酵시켰다. 팔푸

Research Organization의 頭文字를 따서 CSTRO process로 命名했다. 그들은 또한 廢纖維成分 蒸留廢液에서의 메탄醱酵를 試圖하고 있다.



〈圖1〉甜菜를 사용한 solid phase fermentation의 후로시트

는 醱酵플라스크中에 堆積된 状態로 攪拌은 全然 안 했다. 醱酵時間은 〈表1〉에서 보는 바와 같이 酵母濃度の 関數이었다.

또한 이 表에서도 밝혀진 바와같이 팔푸의 醱酵時間은 搾汁의 경우보다 현저히 短縮된 것을 알 수 있다. 에타놀 收率은 85~90%로 醱酵液에는 9.5%의 에타놀이 含有되어 高級알콜을 찾아 볼 수 없었다. 甜菜膠의 殺菌, 營養分의 添加도 必要없으며 단지 pH가 酵母 添加前에 pH 4.5로 調節되었다.

新鮮한 甜菜팔푸에서 搾汁을 짜내면 불과 65%의 回收率로 蔗糖이 얻어 지는데 지나지 않는 二段式 spring loaded roll(고무코팅)을 써서 醱酵 팔푸를 压榨하면 途中에 1회 12%의 물을 加하였을 뿐으로 生成에타놀의 95%가 回收 되었다. 酵母는 에타놀 含有 压榨汁에서 遠心分離에 依해 容易하게 回收되어 新鮮酵母와 같이 다음 回分醱酵에 使用된다. 甜菜팔푸의 solid phase fermentation의 후로시트를 나타내면 圖1과 같다. 이 方法은 그들의 研究所 Commonwealth Scientific and Industrial

IV. 澱分質原料를 사용한 無蒸煮 Solid Phase Fermentation

黑麴아미라제가 黃麴아미라제나 麥芽아미라제에 比하여 生澱粉을 잘 分解할 수 있는 것을 찾아냈으며 圖2에서 보는 바와같이 그 生澱粉分解活性의 至適 pH가 3.5로 酸性領域에 있으므로 黑麴아미라제를 使用해서 生澱粉의 無蒸煮에타놀 醱酵를 試驗했다.

1. 黑麴아미라제

黑麴아미라제가 왜 生澱粉을 強力히 分解할 수 있는가의 解明을 해보려했다. 그 結果 生澱粉分解의 主役은 生澱粉吸着性의 구루코아미라제 I로서 이 아미라제는 아미로페쿠친 만으로 된 “참쌀澱粉”이나 “찰옥수수澱粉”을 거의 完全히 구루코스로 分解할 수 있기 때문에 구루코아미라제 I은 아미로페쿠친의 α -1, 4-구루코시드 結合外 α -1, 6-구루코시드도 結合도 分解할 수 있는 아미라제이다. 生澱粉非 吸着性의 구루코아미라제 II는 아미로페쿠친의 α -1, 4-구루코시드 結合切斷能에 比해 α -1, 6-

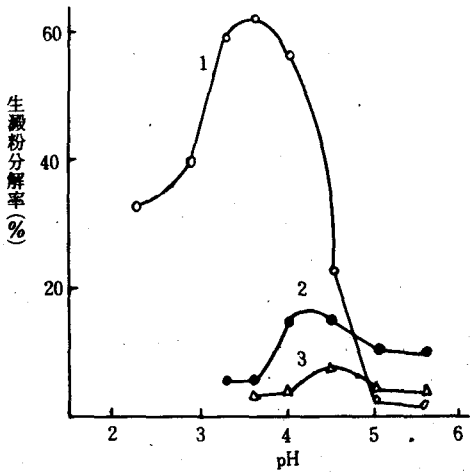


圖2 各種 아미라제에 의한 生澱粉(甘藷) 分解

曲線 1 ; 黑麹 아미라제, 曲線 2 ; 黃麹아미라제,
 曲線 3 ; 麥芽 아미라제 (40時間)

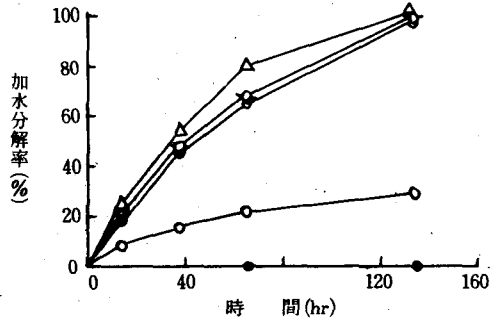
〈 生澱粉分解試驗法 〉

生澱粉 1g, 酵素液 20ml, 1/10M 塩酸-구연산 소
 다·緩衝液 20ml, 水 120ml, 트리올 少量, 30℃
 에서 反應시킨다. 1日 1回 攪拌

*各種 酵素源의 糊化澱粉糖化力을 대략 一定케
 하여 使用.

구루코시드 結合切断能이 顯著히 弱하다. 구
 루코아미라제 I 은 구루코아미라제 II 와 달라 生
 澱粉을 強하게 分解하며 또한 興味있는 것은
 圖 3 에서 보는 바와같이 구루코아미라제 I 에
 α -아미라제나 澱粉까지 자르기 (技切) 酵素 (이
 소 아미라제) 를 加하면 구루코아미라제 I 의 生
 澱粉分解力의 數倍로 增強되는 것이다. 이러한
 現象은 구루코아미라제 I 에 依한 糊化澱粉의
 分解에 있어서는 볼 수 없는 現象이었다.

또한 거미줄곰팡이 黃麹菌의 아미라제系에
 도 구루코 아미라제 I 이 存在하는 것을 밝혔
 으나 黃麹菌의 아미라제系는 거의가 α -아미
 라제로 구루코 아미라제 I 은 黑麹菌의 경우 약
 10分之 1 의 微量으로 이 事實에서 黑麹아미라
 제系가 黃麹아미라제系보다 生澱粉을 強하게
 分解할 수 있다는 것을 理解할 것이다. 麥芽아
 미라제系가 生澱粉 分解力이 弱한 것은 β -아
 미라제가 生澱粉을 거의 分解할 수 없고 α -



〈圖 3〉 구루코 아미라제에 의한 찰옥수수 生澱粉
 分解에 대한 이소아미라제 또는 아미라제의
 影響

- △ : 구루코 아미라제 I (0.44單位), α -아
 미라제 (20單位), 이소아미라제 (50單位)
- (with dot) : 구루코 아미라제 I (0.44單位), α -아미
 라제 (20單位)
- ⊙ : 구루코 아미라제 I (0.44單位), 이소 아
 미라제 (50單位)
- : 구루코 아미라제 I (0.44單位), 单独
- : α -아미라제 (20單位) 또는 이소아미라제
 (50單位) 单独

아미라제에 若干 生澱粉 分解力이 있는데 지나
 지 않기 때문이다.

거미줄 곰팡이의 아미라제系에는 黑麹菌에
 相當하는 구루코 아미라제 I 을 거의 黑麹菌과
 同量을 含有하고 있어 生澱粉을 容易하게 分解
 할 수 있다 단지 그 至適pH가 약 4.5로 黑麹
 아미라제의 경우의 pH 3.5보다 약간 中性域
 에 있으므로 澱粉質原料의 無蒸煮에타놀 醱酵
 에 있어서는 雜菌汚染防止란 見地에서 黑麹아
 미라제의 使用이 바람직하다.

2. 白米의 無蒸煮에타놀 醱酵

a. 黑麹의 使用

最近飼料米生産의 可能性이 벌써부터 話題
 로 돼 있으나 이것을 原料로 한 에너지 生産
 即 에타놀 生産이 생각되고 있다. 筆者等은 별

써 約 16年前에 黑麴아미라제를 써서 白米의 無蒸煮에타눌 醱酵를 報告하고 있어 紹介한다. 最近 態谷등에 의하여도數種의 酵素劑를 併用한 白米의 無蒸煮에타눌 醱酵가 發表되고있다.

黑麴아미라제에 의해 穀類의 生澱粉 (例를 들면 옥수수)은 地下莖의 生澱粉 (例를 들면 馬鈴薯, 甘藷)보다 分解되기 쉽다. 其中에도 쌀의 生澱粉은 分解되기 쉽다. 그러므로 筆者 등은 우선 黑麴아미라제를 使用한 白米의 無蒸煮 에타눌 醱酵를 試圖했다. 白米에는 約 1割 搗減한 것을 使用했다. 白米의 불밀에서의 粉碎時間을 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 時間으로 바꿨다. 그 境遇 粒度分布를 <表2>에 나타냈다. 醱酵醪의 組成은 黑麴菌의 麴寒天斜면培地에서 1日 金耳接種하고 30℃로 4日間 振盪培養한다. 振盪培養液은 10% 鹽酸으로 pH 3.6으로 調節하여 酵素液으로서 使用했다. 菌體含有 酵素液을 그대로 또는 菌體除去酵素液 또는 菌體含有酵素液을 물로 2倍로 稀積한것 각각 80ml, 白米粉 30g, 酒母(10°보링 麴汁 5ml로 30℃, 24時間 培養으로 얻은 *Saccharomyces sake*의 泥狀 酵母)를 加한 醪의 pH를 3.6으로 調節하고 30℃에서 糖化 醱酵를 시켰다. 醱酵日數 9日에 에타눌 13.6V/% 殘全糖 0.9g, 醱酵步合 83.0%의 成績을 얻었다. 白米粉의 粉碎時間 比較에서는 不密에서의 0.5時間의 粉碎로 充分하였다 態谷 등의 報告에는 白米의 粉碎는 必要치 않다는 것이다.

<表2> 粉碎時間과 白米粒子の 크기

粉碎時間 粒子の 크기	重 量 %				
	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
10 μ 以下	47	67	74	65	60
10~20 μ	21	19	15	34	37
20~50 μ	19	14	11	1	3*
50~100 μ	4	0	0	0	0
100 μ 以上	9*	0	0	0	0

* 9% 中 約80%는 1mm徑의 篩上에 남는 거의 無傷의 米粒으로 이것은 醱酵原料로는 하지 않았다.

醱酵溫度의 影響을 살펴보면 30℃와 24℃와는 醱酵日數, 生成에타눌 量은 거의 같으나 室溫(6~14℃)의 糖化, 醱酵에서는 醱酵日數도 30

日로 約 3倍나 長게 걸려 殘全糖도 1.18g로 많고 生米澱粉의 糖化가 不完全하다는 것이 判明됐다. 香味란 點에서 麴寒天에서오는 苦味 臭氣가 強해 問題가 되지 않았으나 에너지源으로서의 에타눌 生産에는 白米의 無蒸煮에타눌 醱酵는 適當한 것으로 생각된다.

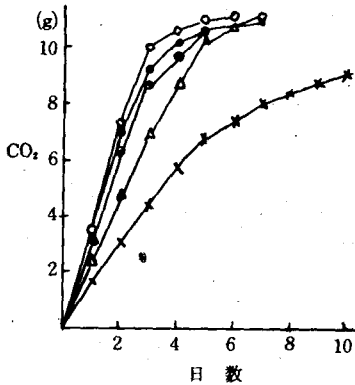
b. 液体麴의 使用

에타눌 醱酵液의 香味改良의 目的으로 麴寒天 대신 液体麴을 使用했다. 液体麴用培地로 馬鈴薯澱粉 3%, 酢酸암모늄 1.1%, K_2HPO_4 0.3%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1% $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.07%, $NaCl$ 0.05% 구루코스 0.1%의 組成인 培地를 使用했다. 이 培地를 殺菌後 *Aspergillus awamori* 河内株의 麴寒天斜면培地에서 1日 金耳接種하고 30℃로 4日間 振盪培養한다. 振盪培養液은 10% 鹽酸으로 pH 3.6으로 調節하여 酵素液으로서 使用했다. 菌體含有 酵素液을 그대로 또는 菌體除去酵素液 또는 菌體含有酵素液을 물로 2倍로 稀積한것 각각 80ml, 白米粉 30g, 酒母(10°보링 麴汁 5ml로 30℃, 24時間 培養으로 얻은 *Saccharomyces sake*의 泥狀 酵母)를 加한 醪의 pH를 3.6으로 調節하고 30℃에서 糖化 醱酵를 시켰다. <表3>에서 보는 바와 같이 液体麴全量仕入에서는 불과 5日의 醱酵日數로 14.6V/%의 에타눌이 生成됐다. 液体麴半量仕入에서도 醱酵日數 8日로, 10% 麴寒天抽出液의 경우 醱酵日數 7~10日인데 비

<表3> 液体麴仕込의 醱酵醪의 分析

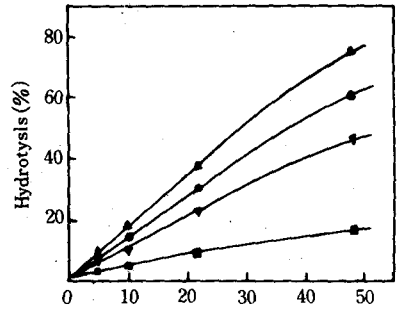
區 分	液 體 麴 全 量	液 體 麴 半 量	液 體 麴 全 量
醱 酵 日 數	5	7	8
에타눌(V%)	14.6	14.6	14.4
殘全糖(%)	1.00	1.09	1.47
殘直糖(%)	痕跡	痕跡	痕跡
酸 度	6.0	5.8	6.0
pH	3.8	3.8	3.8
醱酵步合(%)	90.4	90.4	89.1

하여 液体糊의 아미라제 活性이 強力한 것을 알았다. 어쨌든 黑麹菌의 液体糊을 使用함으로써 白米粉은 無蒸煮에타눌 醱酵로 容易하게 에타눌로 轉換되는 것을 알았다. 또다시 液体糊의 組成을 檢討하여 酢酸암모늄대신 脱脂大豆를 使用 馬鈴薯澱粉과 脱脂大豆의 濃度を 여러가지로 바꿔 比較檢討했다. 圖4에서 보는 바와같이 培地 100ml中 液粉 3g과 脱脂大豆 1g의 경우 以外에는 5~6日에 醱酵가 終了돼 14.5V/% 前後의 에타눌을 얻었다. 馬鈴薯澱粉 1g과 脱脂大豆 1g으로 調製된 液体糊을 使用하여 白米粉을 20℃에서 糖化, 醱酵시키면 醱酵日數 18日에 15V/%의 에타눌이 生成되며 香味에 있어 若干 나은 편이었다. 白米粉대신 白糖을 澱粉源으로 使用했을 경우도 黑麹菌의 液体糊使用으로 無蒸煮로 容易하게 10~12V/% 에타눌이 醱酵日數 8~10日로 生成되었다. 以上の 實驗에서 飼料米가 될 경우 이제부터는 에타눌 生成은 無蒸煮米로서의 糖化醱酵로 될 수 있을 것으로 생각된다.



〈圖4〉 脱脂大豆의 檢討

- 澱粉3g: 脱脂大豆3g
- △—△ 澱粉1g: 脱脂大豆1g
- " 3g: " 2g
- ×—× " 3g: " 1g
- ◎—◎ " 2g: " 2g



〈圖5〉 各種生澱粉의 黑麹 아미라제에 의한 分解

The mixture of 0.5g of raw starch, 5ml of 0.5M citrate-HCl buffer (pH3.5), 15ml of deionized water and 5ml of 1% black-koji (ca. 5.6units/ml) was incubated at 40°C. One milliliter aliquots were analyzed for produced glucose by the micro-Bertrand method. Symbols; ▲, corn starch; ●, cassava starch; ▼, sweet potato starch; and ■, potato starch.

3. 카사바의 無蒸煮에타눌 醱酵

브라질이나 東南아시아에 있어 카사바에서의 에타눌 生産을 바라고 있다. 이 경우에도 에너지源으로서의 에타눌 生産이므로 省에너지 方式인 黑麹아미라제를 쓰는 카사바의 無蒸煮에타눌 醱酵가 바람직하다. 그러나 一般的으로 고구마의 生澱粉은 黑麹아미라제로 分解가 잘 안되므로 穀類澱粉의 代表로서의 옥수수 澱粉, 고구마 澱粉으로서 馬鈴薯, 甘藷, 카사바를 써서 黑麹아미라제에 의한 糖化의 難易를 比較했다. 圖5에서 보는 바와같이 카사바 生澱粉은 甘藷의 生澱粉보다 分解되기 쉬우며 옥수수의 生澱粉보다 약간 分解되기 어려운 程度였다.

a. 4種의 카사바의 無蒸煮에타눌 醱酵

카사바는 貯藏性이 나빠 캐낸다음 室温에서 2~3日 지나면 곰팡이가 생겨 腐敗한다. (一部自己消化인지?) 그리하여 筆者는 現地 即 브라질 칸비나스 大學에서 共同實驗을 했다. 多幸히도 칸비나스 大學近郊 國立農事試驗場이

〈表 4〉 各種 카사바의 아미라제製劑를 使用한 無蒸煮, 알콜醱酵

Variety of cassava	Total reducing sugars (g)		CO ₂ formed (g)	ETOH formed (g)	Theoretical ETOH production (g)	ETOH yield (g)
	before fermentation	after fermentation				
SRT-59 SRT-AIPIM	34.20	1.71	17.30	16.54	16.60	99.6
BRAVO	35.64	1.33	17.40	15.01	17.42	86.2
SRT-TAQU-ARI	42.93	1.33	18.45	17.50	21.26	82.3
IAC-12.829	40.86	1.52	19.95	19.57	20.10	97.4

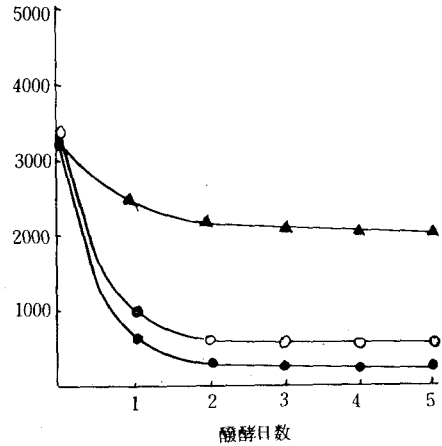
※ The amounts of commercial amyloglucosidase were 1g (equivalent to 1170 units) in a 500ml Erlenmeyer flask.

있어 改良品種 4種의 카사바에 對하여 無蒸煮에 塔날 醱酵을 시켜 그 結果를 比較檢討했다.

카사바를 水洗하여 細片으로 切斷하고 거기다 重量으로 半分量의 물을 加하여 外링부렌다로 카사바를 磨碎하여 磨碎物 180g(카사바 120g, 물 60ml 相當) 10v/v% 硫酸 3.5~4.0ml(醱의 pH를 3.5로 調節하기 위하여), 15% 新鮮压榨 醱母菌體懸濁液 4ml, 10% 구루코아미라제 製劑 4ml를 500ml 三角플라스크에 넣고 醱酵 栓을 막고 30℃에서 醱酵시켰다. 醱酵은 5日에 終了하고 그 醱酵成積을 〈表 4〉에 나타냈다. 이 表에서 밝혀진 바와같이 良好한 醱酵成積을 나타냈다. 시안 含量은 SRT-AIPIM BRAVO 21.7ppm, IAC-12.82g가 20.9ppm으로 시안 含量이 높은 것이 에타날 收率이 좋은 것 같으나 여기에 對하여는 再檢討가 必要하다.

b. 麴菌과 구루코아미라제 製劑의 比較

이어서 黑麴菌 *Aspergillus awamori* HRR-L 3112와 *Asp. niger* (Kyushu Univ.)를 使用하여 麴菌을 만들어 카사바의 糖化에 使用했다. 120g의 카사바의 搗碎物에 麴菌 10g(*Asp. awamori*의 경우 1.040u, *Asp niger*의 경우 576u)를 使用했다. 구루코 아미라제 製劑의 경우 3,510u가 加해졌다.



〈圖 6〉 醱粘度の 時間經過와의 關係

- ▲— 구루코아미라제製劑
- *Asp. awamori* 麴
- *Asp. niger* 麴

麴菌의 경우에는 仕込後 하루밤에 半泥狀의 醱가 液狀으로 變化하고 添加 아미라제 量도 麴菌의 경우 구루코 아미라제 製劑의 경우에 比해 約 1/6~1/3로 적은대도 불구하고 醱酵日數는 5日로 구루코 아미라제 製劑의 경우와 同一하였다. 이와 같이 근소한 아미라제 量으로 에타날 醱酵가 円滑히 進行한 것은 麴菌中에 存在하여 구루코 아미라제 製劑中에서는 찾아 볼 수 없었던 감자 組織崩壞活性에 의한

것이 컸다고 생각된다. 醱酵中の 醪의 粘度变化를 圖 6 에 나타냈다. 여기서 麴麴과 구루코아미라제 製劑인 헤미세루라제 活性과 세루라제 活性을 比較하였든바 麴麴의 헤미세라루제 活性이 구루코아미라제 製劑인 그것보다 顯著하게 강한 것이 判明됐다.

(表 5) 키시란 및 셀룰로즈 兩分解酵素의 全活性

酵 素 的 種 類	키시란 分解活性 (單位)	셀룰로즈 分解活性 (單位)
<i>Aspergillus niger</i> 麹 200g	176,000	14,000
<i>Aspergillus awamori</i> 麹 200g	170,000	14,000
구루코아미라제 製劑 10g	28,000	28,000

그래서 다음에 구루코아미라제 製劑로써 市販의 세루라제劑, 페쿠치나제劑의 添加效果를 살폈다. 세루라제劑, 페쿠치나제劑의 添加로 醱酵日數가 적어도 2日은 短縮할 수 있었다. 또 에타놀 收率도 上昇하는 것이 表 6 에서 밝혀지고 있다. 이 세루라제 標品에는 페쿠치나제 헤미세루라제 兩活性이 다같이 높았다. 以上과 같이 생감자와 黑麹을 쓴 無蒸煮 에타놀 醱酵에 있어서는 구루코아미라제, α-아미라제 外에 생감자의 組織을 崩壞하는 活性이 必要한 것이 判明됐다. 그러나 생감자 組織崩壞活性이 헤미세루라제에 起因하는 것인지, 페쿠치나제에 의한 것인지, 兩者의 組合에 起因하는

것인지, 그 以外의 因子에 의한 것인지는 精査中이다.

4. 옥수수 澱粉 카사바澱粉을 사용한 半連續的 無蒸煮 에타놀 醱酵

省資源, 省에너지의 立場에서 아미라제 醱母를 循環해서 사용하고 澱粉은 加熱糊化 시키지 아니하고 에타놀 醱酵에 供하였다.

a. 옥수수 澱粉의 濃度檢討

反應液 50ml에 外 20%, 30%, 40%가 되도록 옥수수 生澱粉을 添加했다. 反應液에는 구루코아미라제 製劑(Glucuzyme GNL-2000, 2800u 天野)와 新鮮压榨 醱母 0.5g을 含有하고 pH를 3.5로 調節하고 30℃에서 醱酵시킨다 約 1日에 生成된 約 10V% 前後의 에타놀을 減壓蒸留(30~40℃)로 採取하고 새로이 消費 澱粉相當量의 옥수수 澱粉을 添加, 물을 加하여 原容으로 만드는 同時에 酸으로 pH를 3.5로 調節하여 醱酵를 再開한다. 圖 7 에서 보는 바와 같이 淸천히 攪拌하면서 醱酵시키면, 30% 옥수수 澱粉懸濁液에서는 当初 3回쯤은 每日 11V% 前後의 에타놀이 生産되었다. 그런데 4回째쯤부터는 醱酵速度가 떨어져 그 後에는 急速히 醱酵速度가 低下됨이 認定되었다. 澱粉濃度로서는 30%가 좋은것을 알았지만 무엇보다 3回以後, 醱酵速度가 急速히 低下

(表 6) 세루라제劑 또는 페쿠치나제劑의 影響

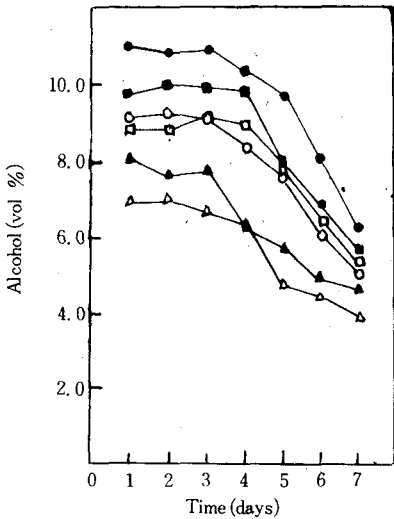
酵 素 的 種 類	구루코아미라제 活性	에타놀 (V%)		에타놀收率 (%)
		6日目	8日目	8日目
구루코아미라제劑* 单独	2,800	7.2	7.5	88.2
구루코아미라제劑+세루라제劑** (0.05%)	2,970	7.9	7.9	92.9
구루코아미라제劑+페쿠치나제劑*** (0.05%)	2,814	7.8	7.8	91.8
(0.10%)	2,828	7.8	7.8	91.8
(0.50%)	2,940	7.9	7.9	92.9
<i>Asp. niger</i> No. 20 麹	700	7.4	7.5	88.2

* 天野 Glucuzyme GNL-2000 ** 阪急 Cellulosin AF-10 *** 天野 Pectinase G

되는 가의 究明에도 들어갔다.

b. 透析 또는 곰팡이 菌體의 添加效果

以上과 같이 3~4회의 半連續醱酵로 에타놀 生成 速度가 急速히 떨어지는 것은 酵母에 의해 生産되는 低分子物質(有機酸, 烴油, 알데하이드類)에 의한 것이 아닌가 생각되어 醱酵膠를 減壓留後 水道水에 처하여 하루밤 透析하든지 減壓蒸留殘液에 黑麹菌의 振盪培養菌을 投入하여 以下 對照와 같이 處理하여 醱酵를 계속하였든 바 圖8에서 보는 바와같이 約 20日間에 걸쳐 半連續的으로 옥수수 澱粉의 無蒸煮에타놀 醱酵를 계속 할 수 있었다.



〈圖7〉 에타놀生産에 있어 옥수수澱粉의 濃度와 影響

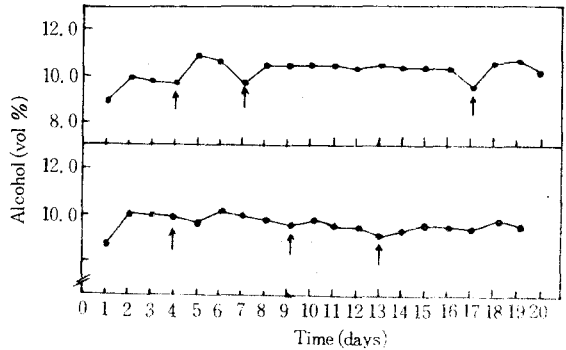
△와 ▲ 20%, ○과 ● 30%, □와 ■ 40%
 백색표시는 靜置, 黒색 표시는 振盪

c. 靜置培養酵母에 의한 醱酵

上述한 實驗은 新鮮压榨酵母를 使用한 所謂通氣培養酵母에 의한 實驗이었으나 이 實驗에 있어서는 이 酵母를 靜置培養하여 얻은 菌體를 半連續的 無蒸煮에타놀 醱酵에 供하였다. 靜置酵母의 경우는 20回(約 20日間)에 걸쳐 半連續無蒸煮에타놀 醱酵기간중 불과 1回의 透析로 充分하였다.

d. 카사바 澱粉을 使用한 無蒸煮에타놀 醱酵

이 경우에도 通氣培養酵母와 靜置培養酵母와를 比較했다. 18日에 걸친 半連續에타놀 醱酵기간에 通氣培養酵母의 경우 2回의 透析를 必要로 하였으나 靜置培養酵母의 경우는 1回의 透析로 充分하였다. 또 옥수수澱粉으로는 每日의 에타놀 生成이 10V% 前後인데 카사바 澱粉의 경우는 8~9V%로 若干 낮았다.

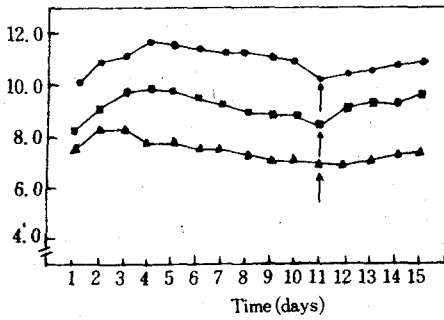


〈圖8〉 半連續醱酵에 있어 醱酵膠透析(A)와 菌糸添加(B)의 影響

- (A) 에타놀 生産性이 減少한 4日째 되는데 醱酵膠透析 코라겐膜에 넣어 水道水에 처하여 透析했다.
- (B) *Aspergillus awamori* var. *kawachi*를 麹汁을 써서 로타리세카로 培養, 約 3g의 溫潤菌體를 4日째, 9日째, 13日째에 加했다.

e. 카사바澱粉의 無蒸煮에타놀 醱酵에 있어 이소아미라제의 影響

細菌 *Pseudomonas* sp.가 生産하는 澱粉가 지 자르기(技切) 酵素(이소아미라제)는 가지 자르기 活性의 至適 pH가 3.0~3.5에 있으므로 黑麹아미라제를 使用한 生澱粉의 無蒸煮에타놀 醱酵에 있어 이소아미라제 添加의 影響을 調査했다. 圖9에서 보는 바와같이 이소아미라제의 添加效果는 顯著하며 카사바 澱粉으로도 10V% 以上の 에타놀이 每日 生産되었다.



〈圖 9〉 카사바 澱粉의 半連續醱酵에 있어 이소아미라제의 影響

■ 아미라제 (5,600單位), ▲ 아미라제 (2,800單位) + 이소아미라제 (45,000單位)

● 아미라제 (5,600單位) + 이소아미라제 (45,000單位)

↑ 透析処理

5, 7, 8, 9는 *J. Ferment. Technol.*, 53, 237 (1980)에서 轉載 許可制

V. 맺음말

甘蔗나 甜菜等 糖質原料를 使用한 省에너지의 에타놀 醱酵法으로 solid phase fermentation의 研究가 과테말라나 오스트라리아에서 되어 쌀, 옥수수, 카사바 등의 澱粉質原料를 使用한 省에너지의 에타놀 醱酵法으로서, 無蒸煮澱粉의 solid phase fermentation의 研究가 筆者等の 研究室에서 되었기 때문에 각각 紹介하였다. 将来 많은 澱粉質原料에 의한 에타놀 醱酵法은 이 無蒸煮法으로 바뀌는 것이 아닐까.

参 考 文 献

1. 山崎何恵, 上田誠之助, 島田豊明 : 21, 83 (1963)
2. 上田誠之助, 古賀偉郎 : 醸協, 23, 37 (1965)
3. S. Ueda and Y. Koba : *J. Ferment. Technol.*, 58, 237 (1980)
4. S. Ueda, C. T. Zenin, D. A. Monteiro and Y. K. Park : *Biotech. Bioeng.*, 23, 291 (1981)
5. C. W. Hesseltine : *Process Biochem.*, July/August 24 (1977); November 29 (1977)
6. K. D. Kirby and C. J. Mardon : Reserch and Development Workshop on "Fuel Ethanol." Feb. 4~5 Canberra, Australia (1980), Proc. IV Internat. Sympos. on Alcohol Fuels. Oct. 5~8 Guaruga, Brazil (1980)
7. C. Rolz, Sheryl de Cabrera and R. Garcia : *Biotech. Bioeng.*, 21, 2347 (1979)
8. S. Ueda : Proc. Internat. Sympos. on Enzyme Chem. Tokyo and Kyoto 491 (1957)
9. S. Ueda : Raw Starch Digestion by Mold Glucoamylase and Debranching Enzymes in "Mechanisms of Saccharide Polymerization and Depolymerization." (ed. J. J. Marshall) Academic Press (1980)
10. 熊谷知栄子, 鈴木逸郎, 黄正財, 宮入正法, 田中利雄, 秋山裕一 : 日醱酵工大会講演要旨集 4 (1980)

너와나의 주인정신 나라크고 나도 크다