

## 에탄올 醱酵에서 澱粉質無蒸煮糖化의 가능성 연구

裴 武\*·李在汶

(1983년 6 월 4 일 수리)

\*梨花女子大學校 自然科學大學  
韓國科學技術院 應用微生物研究室

## Saccharification of Raw Starch in Ethanol Fermentation

\*Moo Bae and Jae Moon Lee

\*College of Natural Science

Ewha Women's University, Seoul

Applied Microbiology Lab., KAIST, Seoul Korea

(Received June 4, 1983)

The possibility of the ethanol fermentation from raw cassava starch without cooking was investigated. Saccharification yield in the simultaneous saccharification-fermentation (SSF) system was compared with that in saccharification of raw cassava starch, using glucoamylase of *Aspergillus shirousmi*. Although the saccharification yield of raw cassava starch with 10 folds of the enzyme was 60% compared to cooked cassava starch, higher saccharification could be obtained by SSF. This result is maybe due to the elimination of end product inhibition in saccharification of raw starch by glucoamylase. Final ethanol yield from raw cassava starch was about 88% under the condition of 30°C, 120 rpm shaking after 3 days in the SSF system.

澱粉質은 오래 전부터 酒類 製造의 原料로 사용되어 왔으며 현재 대체에너지의 하나인 연료용 ethanol 生産의 原料로 木質, 糖質과 함께 주목받고 있다. 이중 資源의 풍부성 및 기술축적에 비하여 볼 때 澱粉質 原料가 가장 가능성이 높으나 澱粉質에서의 ethanol 醱酵 生産은 아직 그 生産費用이 合成法에 비하여 더 크기 때문에 실현되지 못하고 있다.

澱粉質에서 ethanol의 醱酵 生産은 粉碎, 蒸煮, 液化, 糖化 및 醱酵과 蒸溜 工程으로 그 過程이 복잡하고 蒸煮 및 蒸溜 工程에 많은 에너지가 소비된다.

경제적인 ethanol의 醱酵 生産 方法으로 그동안 酸糖化法<sup>2)</sup>, 固定化 酵素에 의한 糖化法<sup>3)</sup>, 急熱 및 急冷에 의한 糖化法<sup>4)</sup>, ultrasonication 이나 fine milling에 의한 物理的 前處理 方法<sup>5)</sup> 등 많은 연구가 있었으나 아직 실용화되지 못하고 있다. 최근 黑麴菌에서 生産되는 糖化酵素를 이용하여 澱粉을 蒸煮 工程 없이 직접 ethanol을 醱酵 生産한 연구가 있다<sup>7)</sup>. 이러한 無蒸煮 糖化 方法은 熱에 의한 前處理 過程이 필요 없기 때문에 많은 에너지를 절약할 수 있다<sup>8)</sup>.

본 研究에서는 *Aspergillus shirousami*가 生産하는 糖化酵素를 이용하여 cassava를 澱粉 原料로 한 無蒸煮 糖化를 실시하고, 同時 糖化-醱酵에 의한 生澱粉의 ethanol 醱酵 生産의 可能性을 研究하였기에 보고하고자 한다.

### 實驗材料 및 方法

#### 使用菌株

Glucoamylase 生産菌으로 본 研究室에서 보존 중인 *Aspergillus shirousami* 27을, ethanol 醱酵 酵母로 *Saccharomyces cerevisial* Y-51을 사용하였다.

#### 酵素生産

生澱粉 原料로는 cassava root를 2시간 ball mill로 粉碎하여 40mesh 정도의 분말로 만들어 사용하였다. 이 澱粉 原料의 澱粉 含量은 acid-hydrolysis<sup>9)</sup>에 의하여 glucose로 환산하여 68%이었다. 蒸煮澱粉은 粉碎한 生澱粉을 1:4 로 물에 희석하여 121°C로 20분 處理한 것을 사용하였다.

#### 澱粉質의 糖化

Glucosylase生産菌인 *Aspergillus shirousami* 27을 potato-dextrose agar slant에서 胞子를生産하고 생리식염수를 가하여 胞子數가  $3 \times 10^7$ /ml 되도록 현탁액을 만들어서 보관하였다. 따로 밀기울 100g에 물 80ml, 진한염산 1.6ml을 가하여 잘 섞고 250ml플라스크에 10g씩 주입하고 멸균한 후 胞子 현탁액 1ml씩 접종하여 30°C에서 3일간 培養하였다. 生産된 koji 10g에 물 100ml를 가하여 室溫에서 3시간 침지시켜 酵素液을 만들었다.

澱粉質을 1 : 4의 비율로 0.1M acetate buffer (pH4.6)에 현탁시키고 추출한 酵素를 가하여 60°C에서 糖化시켰다.

#### 酵母의 前培養

Malt-dextrose agar (malt extract 15g, dextrose 10g, agar 15g per liter, pH4.5) slant에서 30°C, 3일간 培養한 酵母를 4°C에 보관하고, 동일한 조성의 液体培地에 접종하여 30°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 이때 菌체농도는  $4 \times 10^8$  cells/ml였다.

#### 同時糖化-醱酵

同時糖化-醱酵는 *S. ueda*의 方法<sup>7</sup>에 의하여 실험하였다. 즉 250ml의 삼각플라스크에 粉碎한 cassava 原料 10g을 40ml의 물에 현탁시키고 황산을 가하여 pH4.0으로 조절한 후 酵素液 5ml, 24시간 培養한 酵母菌液 5ml을 가하였다. 유리관이 연결된 고무마개로 플라스크를 막고 유리관 한쪽 끝을 진한 황산을 넣은 cap tube에 연결하고 전체를 30°C에서 120rpm으로 incubation하면서 일정 시간 간격으로 전체 무게의 감소를 측정하였다. 이 실험장치에서는 CO<sub>2</sub>는 공기중으로 배출되고 수증기는 황산에 흡수되므로 전체 무게의 감소는 生成된 CO<sub>2</sub>의 양에 해당된다.

#### 糖化酵素의 活性度 測定

酵素 活性度는 *S. ueda*의 方法<sup>7</sup>에 의하여 1% soluble starch 5ml, 0.1N acetate buffer (pH4.0) 1ml, H<sub>2</sub>O 1ml에 酵素液 1ml을 가하여 40°C에서 10분간 반응시킨후 glucose가 1mg/ml 生成되는데 필요한 酵素의 양을 1 unit로 하였다.

#### 分析法

Glucose의 양은 PGO法 (Peroxidase-Glucose Oxidase-0-Paraanisidine, Sigma kit 510-A)으로 定量하였다. Ethanol의 양은 1/8inch, 1m의 porapak Q column을 부착한 Varian 3700 gas chromatogr

aph를 사용하여 분석하였다. 시료 1ml와 2.5% m-HPO<sub>3</sub>용액 1ml를 혼합하여 10분간 정치한 후 원심분리하여 상등액중의 ethanol 함량을 FI detector를 사용하여 定量하였다. Carrier gas는 N<sub>2</sub> column 온도는 150°C로 행하였다.

## 結果 및 考察

### 糖化酵素의 調製

*Aspergillus shirousami* 27을 밀기울 고체배지에 培養하여 추출한 酵素液을 ethanol로 분별 침전시킨 결과 Table 1과 같다. 1kg의 밀기울 배지에서 얻은 酵素液을 50~60%의 ethanol로 침전하여 건조한 酵素를 본 실험에 사용하였다. 이러한 方法으로 얻은 酵素의 특성을 조사한 결과 pH 4.0-5.0, 60°C-70°C에서 가장 活性이 높았고 60°C에서 3시간 처리하여도 活性의 손실이 거의 없었다.

Table 1. EtOH Precipitation of *Asp. shirousami* Glucosylase

EtOH conc	Precipitated enzyme activity (%)
25%	14.8
50%	17.8
60%	78.6
70%	78.6

### 生澱粉의 糖化

Cassava, 고구마, 옥수수 生澱粉을 糖化시킨 결과 Fig. 1과 같다. Cassava 澱粉의 경우 고구마 澱粉이나 옥수수 澱粉에 비해 糖化率이 높았으며 옥수수 澱粉이 가장 낮았다.

Cassava의 生澱粉을 원료로 하여 蒸煮한 澱粉과 비교하여 糖化시킨 결과 生澱粉의 糖化는 蒸煮한 澱粉에 비하여 10배의 酵素를 가하였어도 糖化率이 약 60%밖에 미치지 않았다. 蒸煮한 澱粉의 경우 초기의 반응속도가 느린 것은 반응물의 점성이 높기 때문이었다.

### Cassava生澱粉의 同時糖化-醱酵

蒸煮하지 않은 生澱粉에 糖化酵素와 酵母를 가하고 30°C에서 同時糖化-醱酵하여 蒸煮한 澱粉의 경우와 비교하였다. Fig. 3에서 蒸煮한 澱粉에 비해 生澱粉의 경우 10배 이상의 酵素를 가하였어도 醱酵速度가 느렸지만, 醱酵率은 生澱粉

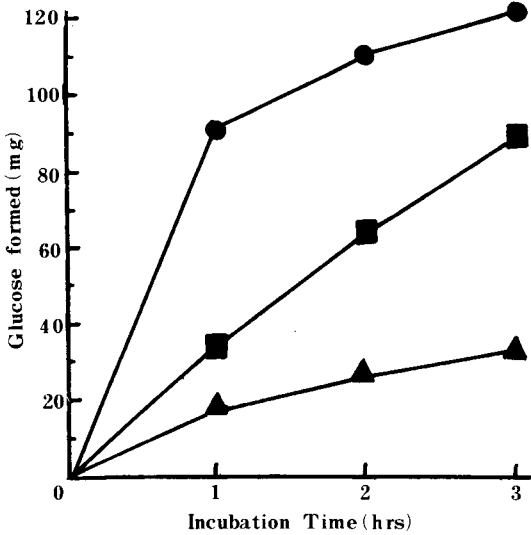


Fig. 1. Saccharification of Various Starch by Glucoamylase of *A. Shirousami* 27.

Each starch 0.5g was suspended in 5ml 0.1M acetate buffer pH4.0 and incubated at 60°C after 9 units of glucoamylase added.

에 당화효소 180units를 가했을때 蒸煮한 澱粉에 90units가한 경우와 비슷하였다. 이 결과는 單純糖化에 비해 糖化率이 크게 증가한 것을 뜻하며, 蒸煮하지 않은 生澱粉을 同時糖化-醱酵를 이용하여 ethanol 醱酵가 可能함을 나타낸 것이다. 同時糖化-醱酵에서 糖化率의 증가는 糖化生成物

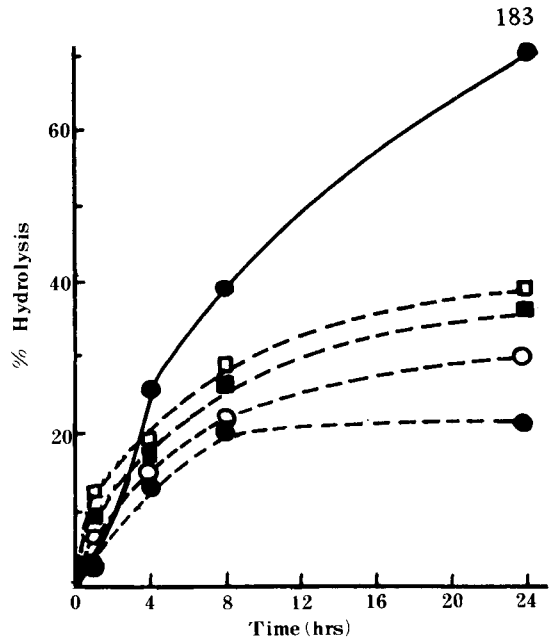


Fig. 2. Saccharification of Cooked(-) and Raw (---) Cassava Starch by Glucoamylase of *A. Shirousami* 27

Cassava 2g was suspended in 8ml 0.1M acetate buffer pH4.0, and incubated at 60°C with shaking after various amounts of enzyme was added

●● and ●● 1.8 units  
○○ 3.6 units  
■■ 9 units  
□□ 18 units

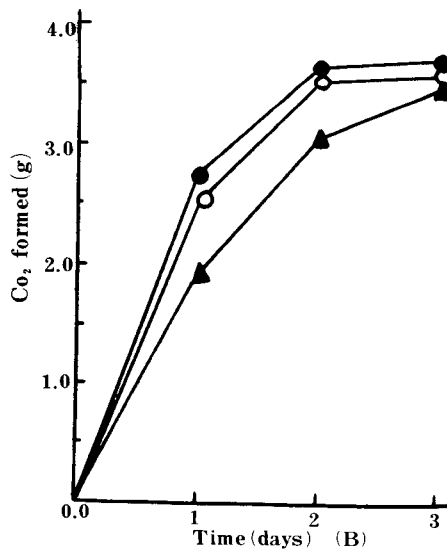
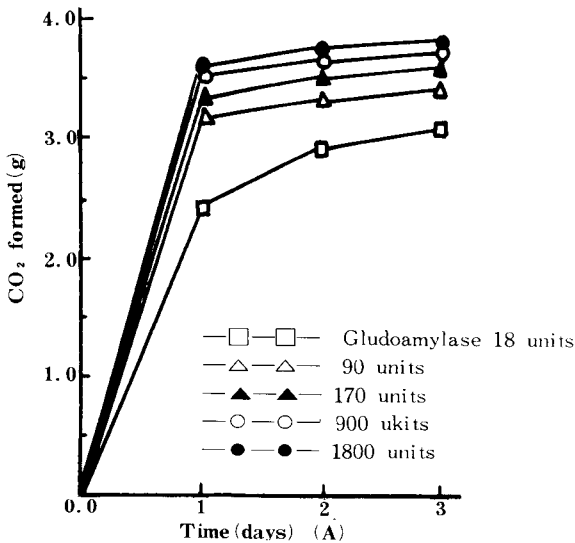


Fig. 3. SSF of Cooked (A) and Raw (B) Cassava Starch

10g Cassava was suspended in 40ml H<sub>2</sub>O and adjusted to pH4.0, and incubated at 30°C with shaking of 120rpm for 3days after various amounts of enzyme and yeast added.

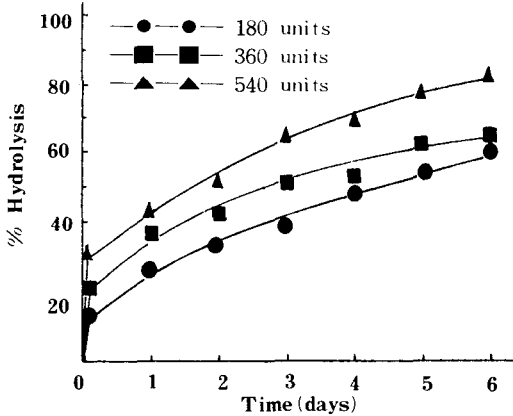


Fig. 4. Saccharification of Raw Cassava Starch by Glucoamylase of *A. Shirousami* 27 at 30°C

인 glucose의 醱酵에 의한 제거로 end-product inhibition 효과의 감소와, 醱酵溫度에서 酵素의 安定性 때문인 것으로 생각된다.

醱酵溫度에서의 糖化

Cassava 生澱粉을 醱酵溫度인 30°C에서 糖化한 결과 Fig. 4와 같다. 同時糖化-醱酵에서와 같은 양의 酵素를 가하였을 때 6일 까지도 糖化가 계속 진행되며 그때의 糖化率은 60%였다 酵素의 양을 2배 이상 증가하였을 때 糖化率은 80%까지 증가하는 것을 알 수 있었다.

CO<sub>2</sub>와 ethanol의 生成關係

Cassava 生澱粉 原料의 同時糖化-醱酵에서 生成되는 CO<sub>2</sub>와 ethanol의 양을 측정한 결과 Fig. 5에서 ethanol 生成量은 CO<sub>2</sub>生成量에 비례하여

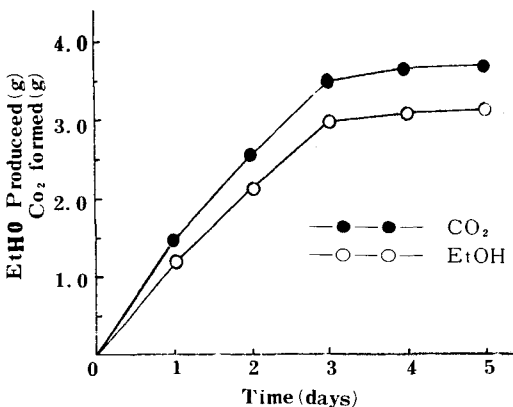


Fig. 5. Relationship between CO<sub>2</sub> formed and EtOH Produced in SSF of Raw Cassava Starch

약 87%에 해당되었다. 이것은 알코올 醱酵代謝 외에 다른 代謝과정에서 CO<sub>2</sub>가 生成되기 때문이었다.

Cassava生澱粉에서의 ethanol 生成量

Cassava 生澱粉의 同時糖化-醱酵에 의한 ethanol 生成量 및 수율을 蒸餾한 澱粉과 비교하여 계산하였다(Table 2). 그 結果 蒸餾하지 않은 生澱粉에서 ethanol을 이론치의 87%까지 生産하며 蒸餾한 澱粉에 비해 91% 정도이었다.

生澱粉 糖化에 있어서 더욱 강한 生澱粉 분해력 균주 및 효모균 그리고 條件의 最適化 연구가 검토중에 있으며 糖化酵素의 酵素學的 研究가 과제로 남아있다.

Table 2. Conversion of Cassava Starch to EtOH by *A. shirousami* 27 Glucoamylase and *S. cerevisiae*

	Amount of enzyme added (units)	CO <sub>2</sub> formed (g)	EtOH formed (g)	EtOH yield (%)
Cooked cassava	18	3.05	2.65	75.3
	90	3.35	2.91	83.7
	180	3.60	3.13	89.0
	900	3.70	3.22	91.6
	1800	3.75	3.26	92.7
Raw Cassava starch	180	3.45	3.00	85.3
	900	3.50	3.05	86.7
	1800	3.55	3.09	87.9

요 약

蒸餾하지 않은 Cassava의 生澱粉의 ethanol 醱酵生産을 위하여 *Aspergillus shirousami*가 生産하는 糖化酵素를 이용하여 單純糖化 및 同時糖化-醱酵을 하였다.

Cassava 生澱粉의 糖化率은 蒸餾한 것에 비해 30% 정도였으며 10배의 酵素를 가하여도 60%밖에 안되었으나, 同時糖化-醱酵에서는 糖化率이 크게 증가하여 ethanol 生成量이 蒸餾한 澱粉에 비해 90% 이상이 되었다.

참고문헌

1. Azhar, A., Hamdy, H. K.: *Biotechnol. Bioeng.* 23, 879 (1981)

2. de Menezes, T. J. B.: *Process Biochem*, **13** (9) 24 (1978)
3. Azhar, A., Hamdy, M. K.: *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1297 (1981)
4. Adam, S., Mieczow, B., Tadeusz, P.: *Starch Staerke*, **31** (4), 129 (1979)
5. Marinchemko, V. A., Kislaya, L. V.: *Fermenth. spirit. Prom. St.* **8**, 29 (1978)
6. Ueda, S., Kobai, Y.: *J. Ferment. Technol.* **58**, 237 (1980)
7. Ueda, S., Zenin, C. T., Monteiro, P. A., Park, Y. K., *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 291 (1981)
8. N. Kosaric, D. C. M. Ng, I. Russel, and G. S. Stewart: *Ethanol Production by Fermentation An Alternative Liquid Fuel in Advances in Applied Microbiology*, vol **26**, 147 (1980)
9. R. J. Kartchner and B. Theurer; *J. Agric Food Chem.* **29**, 8 (1981)