

산업적 효소생산 및 응용기술



오 평 수
<(주)태평양 이사>

■ 目 次 ■

- I. 서 론
- II. 본 론
 - 1. 효소생산 및 이용현황
 - 2. 기술동향
 - 3. 국내 생산효소
 - 4. 효소 응용기술
- III. 결 론

I. 서 론

효소생산 및 응용기술은 최근 Biotechnology 분야의 기술향상에 힘입어 상당한 관심이 기울어져 왔다.

효소의 공업적 생산 및 응용은 1894년경 일본의 Takamine에 의한 의약품 소화효소제인 Takadiastase를 *Aspergillus oryzae*를 가지고 생산한 것을 기점으로 하여 일본에는 Sankyu, 미국에는 Miles, 볼란서에서는 Rapidase를 독일에는 Kalle 회사들이 효소제품을 생산, 판매하기 시작하였다. 초기의 효소제는 주로 섬유공업에서 호발용으로 사용되는 α -Amylase로 *Bacillus subtilis*를 밀기울 고체배양 혹은 액체배양으로 생산하였다. 그후 효소의 산업적 생산이 활발화 되면서 물엿 및 포도당 제조용 효소인 α -Amylase, Glucoamylase(1959), 세제용 효소인 A-alkaline Protease(1971) 등의 산업적 수요가 증가하였다.

이때의 효소생산 및 응용기술을 보면 어떤 반응에 효소를 이용하려는 발상을 하고 그 목적에 적합한 성질을 가진 효소의 생산기원을 탐색, 미생물의 개량, 육종배양조건, 제제화 조건등의 효소생산 기술의 연구와 효소의 기질로 되는 원료의 성질을 검토하여 효소 작용상의 특성을 잘 활용하는 응용의 연구가 이루어졌다. 한편 아미노산, 과당의 생산에 특이할 만한 것으로 알려진 고정화 효소를 사용한 연속반응이 1970년도에 실용화 되어 Bioreactor, Biosensor등의 개념이 생기게 되었으며, 그 이용가치도 한층 빛나게 되었다.

현재에 이르러 유전자 공학 및 단백질 구조 연구 등의 생화학적 기초연구의 성과를 이용하여 효소 단백질의 질적인 변화를 유도함으로써 특정 목적에 적합한 효소의 생산 및 응용 기술이 전개되고 있다.

국내 효소공업은 외국에서와 마찬가지로 알콜 발효공업에서 전분질 원료를 분해할 목적으로 사용되는 효소와 제약업계의 소화효소제 생산으로부터

시작되었다고 볼 수 있다. 1960년대에 의약용 효소제를 사용하기 위하여 *Aspergillus oryzae*를 밑기울 고체배양 하므로써 Amylase와 Protease가 생산되기 시작하였다. 알콜발효공업에 이용되는 효소들은 1970년도 이전에는 이 효소들을 사용하는 업체가 주로 *Aspergillus usarii*, *A. shirousarii*, *A. awamori*등을 배양하여 그 배양물을 그대로 사용하였고 몇몇 군소업체가 이들 균주들을 배양하여 배양물을 그대로 건조시켜 분곡, 곡자 등의 상품명으로 판매하여 왔다. 1973년도에 이르러 국내에서 알콜공업에 이용되는 당화 효소인 *Rhizopus*의 Glucoamylase를 제대로 생산하는 생산시설을 갖춘 공업적 규모의 공장에서 생산되기 시작하였다. 이와 함께 효소 생산균주의 검색 및 개량방법 등에 관한 연구가 본격적으로 이루어 졌다고 볼 수 있다.

그러나 국내에서 사용하는 효소들은 다른 제품을 만들기 위한 원료로서 사용되고 선진국들이 생산하는 효소들의 수입이 자유로웠기 때문에 이들 외국 효소들과의 경쟁에서 효소 생산자원인 우량균주 획득 문제 등 여러가지 어려운 점이 발생하였다. 효소 생산에 있어서 가장 큰 비중을 차지하는 것은 우량균주의 확보로서 이는 무한한 자원에서, 보다 좋은 균주를 선별해야 하고 이를 계속 개량해야 한다. 즉 경쟁사보다 항상 우수한 균주를 확보하고 있어야 하는 것이다. 그 밖에도 여러 문제들이 있지만 본 내용에는 국내 산업적 효소생산 및 응용현황을 중심으로 하여 기술 하고자 한다.

II. 본 론

1. 효소 생산 및 이용 현황

1-1. 세계 현황

세계 효소 사용량은 약 10억볼로써 추정되며 공업용 효소가 약 65%, 의약용 효소가 27%, 연구용

효소가 4%, 진단용 효소가 4%의 비율로 시장을 구성하고 있다. 공업용 효소의 가장 큰 비율을 점하고 있는 효소는 세제용 효소로 Alkaline Protease가 주종이고, 그 외 Cellulase, Lipase, α -Amylase등이 약 34%를 차지한다.

또한 전분질 관련 효소로는 Glucose Isomerase, Glucoamylase, α -Amylase, β -Amylase 등이 약 27%를 차지하고 있고 그의 유제품 관련공업에서는 약 16%를 점유하고 있다.

전분질 관련 효소 이용성의 동향을 보면 1976년 이후 Glucose Isomerase의 고정화 및 연속반응에 의한 과당 생산이 이루어 지면서 관련 효소인 내열성 α -Amylase, Glucoamylase, Immobilized Glucose Isomerase등 효소 사용량이 증가되어 왔으나 최근에는 효소 제품가격 경쟁 등으로 효소제품 생산량은 증가하나 생산금액의 증가는 근소한 것으로 보인다. 그 외로 전분당 수율 및 제품질을 향상 시키기 위해 Isoamylase, Pullulanase, 미생물의 β -Amylase, β -Glucanase등의 생산이 요구되고 있다.

세제용 효소에 있어서는 1971년 이후 Alkaline Protease가 세제에 사용이 시작되므로써 효소 첨가 세제의 생산량이 계속 증가되어 왔다.

최근에는 Alkaline Gellulase, Lipase등이 첨가되므로 이들 효소의 사용량도 증가될 것으로 보인다.

유제품 제조용 효소들에 있어서는 동물 Rennet를 대체 할 미생물 Milk clotting enzyme과 유당분해 효소인 Lactase도 더욱 개발될 것으로 보인다. 그 외 유지 제품가공용 Lipase, 생전분 분해효소용 Amylase 등도 생산이 필요시 되고 있다.

세계 효소생산에 있어서 효소생산 회사들의 생산금액 분포를 보면 Novo Nordisk's(덴마크) 40%, International Biosynthetics(폴란드) 20%, Miles(미국) 10%, Finnish Sugar(핀란드) 5% 등으로 대기업에 편중되었으나, 점차 중소기업제품들의 생

산량이 증가되는 추세에 있다.

1-2. 국내 이용현황

효소분류에 의하면 효소종류는 2천 종류 이상이 되는데 이중 공업용효소로 사용되는 것은 20종류 정도이며 특이성이 다른것을 고려하면 약 50종류 정도 된다. 이들 효소들은 국내 산업이 필요로 할 때에는 수입이 가능한 것으로 되어있기 때문에 국내주류 즉, 탁주, 주정, 고량주 용 효소를 제외하고는 거의 자유롭게 수입이 되어왔다. 1993년도의 효소 종류별로 구분된 효소제제들의 수입량을 보면 약 1200만불로 계속 수입량이 증가되는 추세를 나타내고 있다.

국내 주류공업 중에서 탁주, 고량주는 주로 분곡, 곡자 형태의 효소제를 사용하여 왔고 지금도 분곡, 곡자와 국내생산인 Glucoamylase를 병용하여 사용하고 있다. 주정생산에는 1970년대 이전에는 액화과정은 산처리 공정, 당화공정은 분곡 혹은 Glucoamylase를 혼합 사용하여 당화 시킨 후 알콜 발효가 이루어져 왔으나 현재에는 액화 공정에 α -Amylase를 사용하고 있다. 이 분야에 사용되는 효소량은 금액으로 환산하면 약 30억원 정도로 추정된다.

전분당 제조공업에서는 물엿, 포도당, 과당 등의 생산을 목적으로 효소들이 사용되어 왔다. 이런 전분액화 공정에 사용되는 α -Amylase에는 70~80°C에 적합한 효소와 95~100°C에 적합한 효소가 있는데 작업공정에 맞게 사용되고 있다. 당화에는 *Aspergillus niger*의 Glucoamylase가 사용되고 있고 과당제조에는 Immobilized glucose isomerase가 사용되고 있다. 이 공업에는 70~80°C로 사용되는 α -Amylase를 제외하고는 전부 외국 효소제품에 의존하고 있다. 이 공업에 사용되는 효소량은 약 60억원 정도로 추정된다.

세제공업에서는 효소첨가 세제가 1980년대 이후부터 국내 생산되므로써 세제용 Alkaline protease

의 사용량이 급격히 증가되었다. 현재에 있어서 Alkaline protease외에 Alkaline cellulase, Lipase 첨가제품이 증가될 것으로 보인다. 이들 효소들은 전부 외국 효소제품으로 수입되고 있으며 수입량은 약 60억원 정도로 추정된다.

제빵, 제과공업에서 사용되는 Amylase, Protease, 어류, 육류 가공에 사용되는 Protease는 국내에서 생산된 효소들이 대부분이고, 섬유공업의 α -Amylase, 피혁공업의 Protease는 국내에서 생산되는 효소제와 외국에서 수입되는 효소제가 경쟁적으로 사용되고 있다. 동물 급원인 Rennet는 유제품 가공용으로, Pancreatin은 의약품료용으로 모두 외국에서 수입되며 식물 급원인 Papain은 맥주 공업에서, Bromelain은 고기 연육소 혹은 의약품료로써 또한 외국에서 수입되는 효소들이다. 의약품료인 소염효소제 Serratiopeptidase는 전부 국내 생산제품이며 소화 효소제인 Amylase, Protease, Cellulase, Hemicellulase는 국내 혹은 수입제품이 경쟁적으로 사용되고 있다.

이와같은 현재 국내에서 산업적으로 사용되는 원료용 효소제품량은 약 300억원 정도로 추정되는데, 국내에서 생산되는 효소들을 산업적으로 이용하려면 사용업체에 유리하게끔 가격 및 제품질 등을 고려하여 가격, 품질면에서 외국제품 보다 경쟁적으로 우월해야 공업적인 제품생산 및 판매가 이루어 질 수 있다고 본다.

1-3. 국내 생산 현황

효소생산은 1970년도를 기점으로하여 그 이전에는 주류공업용 효소들은 주로 밀기울, 쌀 등 고체 배양에 의한 당화용 *Aspergillus usarii*, *A. shiroyamii*, *A. awamorii*등의 배양물이 그대로 혹은 건조된 Amylase 제품들 이었고 제약업계에 사용되는 소화 효소제로써 *Aspergillus oryzae*의 Amylase와 Protease가 다소 생산되었다. 피혁가공에서는 *Bacillus protease*가 밀기울 고체배양 건

조물로 사용하였고, 전분 액화용으로도 *Bacillus α-Amylase*의 밀기울 고체배양 건조물로 사용되었다. 1973년도에 주정용 당화효소 생산을 목적으로 하여 배양, 정제 및 실험실을 갖춘 공업적 규모의 효소생산 공장이 설립되기 시작하였으며, 이와 함께 공업적으로 효소생산 및 이용기술에 대한 연구가 이루어 졌다고 볼 수 있다.

국내에서 생산되는 효소들로는 *Rhizopus Glucoamylase*, *Aspergillus oryzae α-Amylase*, *Aspergillus oryzae Protease*, *Aspergillus niger Pectinase* 등이 밀기울 고체배양에서 추출, 정제공정을 거쳐 생산되고 있으며 *Bacillus α-Amylase*, *Bacillus Protease*, *Trichoderma Cellulase*는 액체배양에 의해 정제공정을 거친 정제 제품으로 생산이 되기 시작했다. 최근에는 의약품 소염효소제인 *Serratiapeptidase*가 생산되고 있다. 현재 국내 효소생산 회사들이 생산하는 원료용 효소 제품량은 약 120억원으로 추정되고 있고 현재 수입 효소를 대체하기 위하여 많은 연구와 개발이 이루어 지고 있다.

2. 기술동향

효소의 공업적 생산은 다른 발효 공업과 마찬가지로 효소생산 급원의 검색, 선별공정, 균주의 개량공정, 배양기술, 제제화 기술 및 효소의 응용산업을 고려한 효소이용 기술 등이 필요하며, 효소의 공업적 생산은 먼저 실험적인 pilot생산공정을 거쳐 생산된 표준효소제제를 제조하여 실험을 거친 후에 이루어지게 된다. 여기서 고려해야 할 점으로는 효소이용 공업적인 측면에서 유리한 제품이여야 한다.

즉 기존 효소제품일 경우에는 효소제품가격이 유리해야 하고 품질 등 경쟁적으로 우수 해야 할 것이다. 신규 효소제품일 경우에는 효소이용 측면에서 더욱 잇점이 있어야 할 것으로 본다. 따라서 이

런 여건들을 고려하여 각 단계별 국내 효소공업의 기술 측면을 설명코져 한다.

2-1. 생산균주 검색, 선별 및 개량

효소 생산회사에서는 공업적 생산에 필요로 하는 미생물들을 여러 방면에서 검색, 선별하는 공정이 이루어지고 있으나 외국과 같이 꾸준히 이루어지고 있지는 않는 것 같다. 또한 균주개량 공정도 변이법, 유전조작법 등이 적용되고 있으나 아직도 변이법이 주종인 것 같다. 최근 기업, 학계등이 균주개발에 많은 연구를 하고 있지만 산업적 생산균주로 적용시킨 경우는 미미한 것 같다.

2-2. 배양기술

미생물 배양을 위한 국내 시설은 외국시설을 도입 혹은 국내시설 개선등으로 고체배양이나 액체배양 시설은 외국과 거의 동일한 시설 형태를 갖추었다고 볼 수 있다. 그러나 배양시설 개선 및 활용면에서 더욱 기술이 축적되어야 한다고 본다.

미생물 배양조건들은 생산되는 효소 종류에 따라 계속 검토가 이루어져야 할 것이며 배양에 필요한 특이한 원료 구입문제 등이 있을 수 있으나, 배양 기술은 점점 축적되고 있으므로 앞으로 거의 외국과 비슷할 것으로 보인다.

2-3. 정제기술

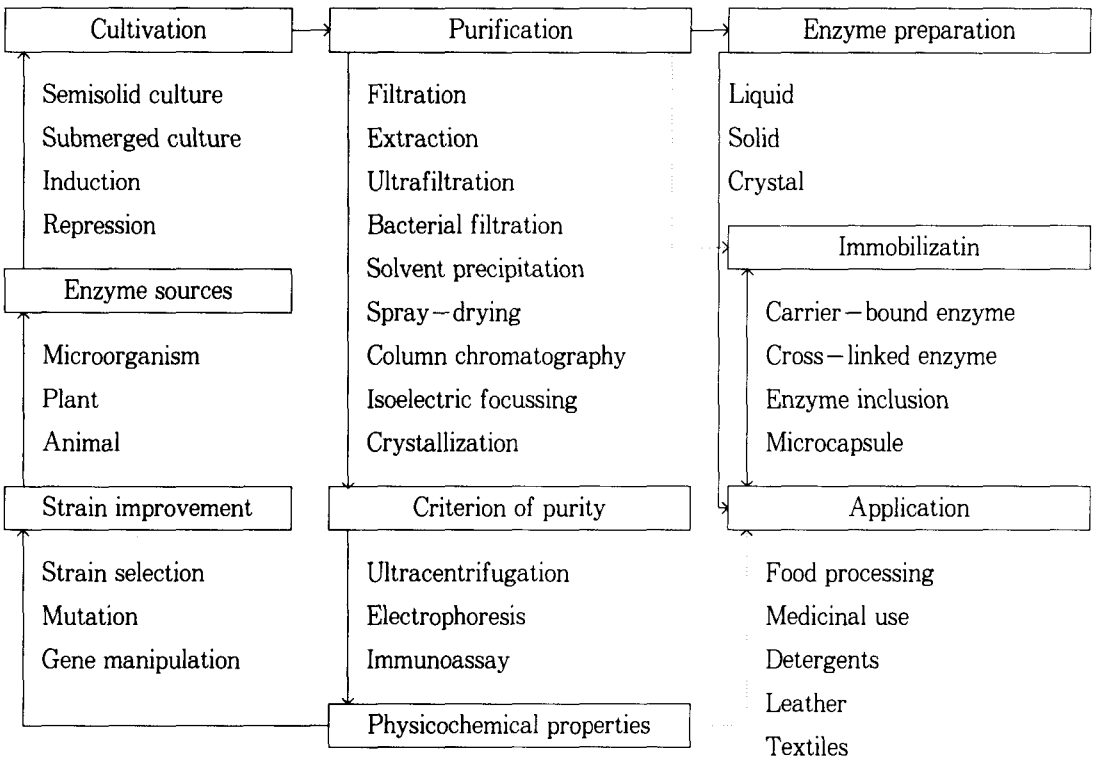
효소제품 정제에는 배양물의 전처리, 여과, 농축, 불순물 제거를 위한 유기용매 Fraction, Column Chromatography, 결정화, 분자 크기별 막통과 및 제균 시설들이 외국과 거의 동일하게 갖추어졌다고 볼 수 있으며 효소정제에 관한 산업적 응용연구도 기업측면에서 활발히 진행되고 있다. 그러나 아직도 기계 및 시설의 활용, 새로운 기술 정보등이 미흡한 것으로 보인다.

2-4. 제제화 기술

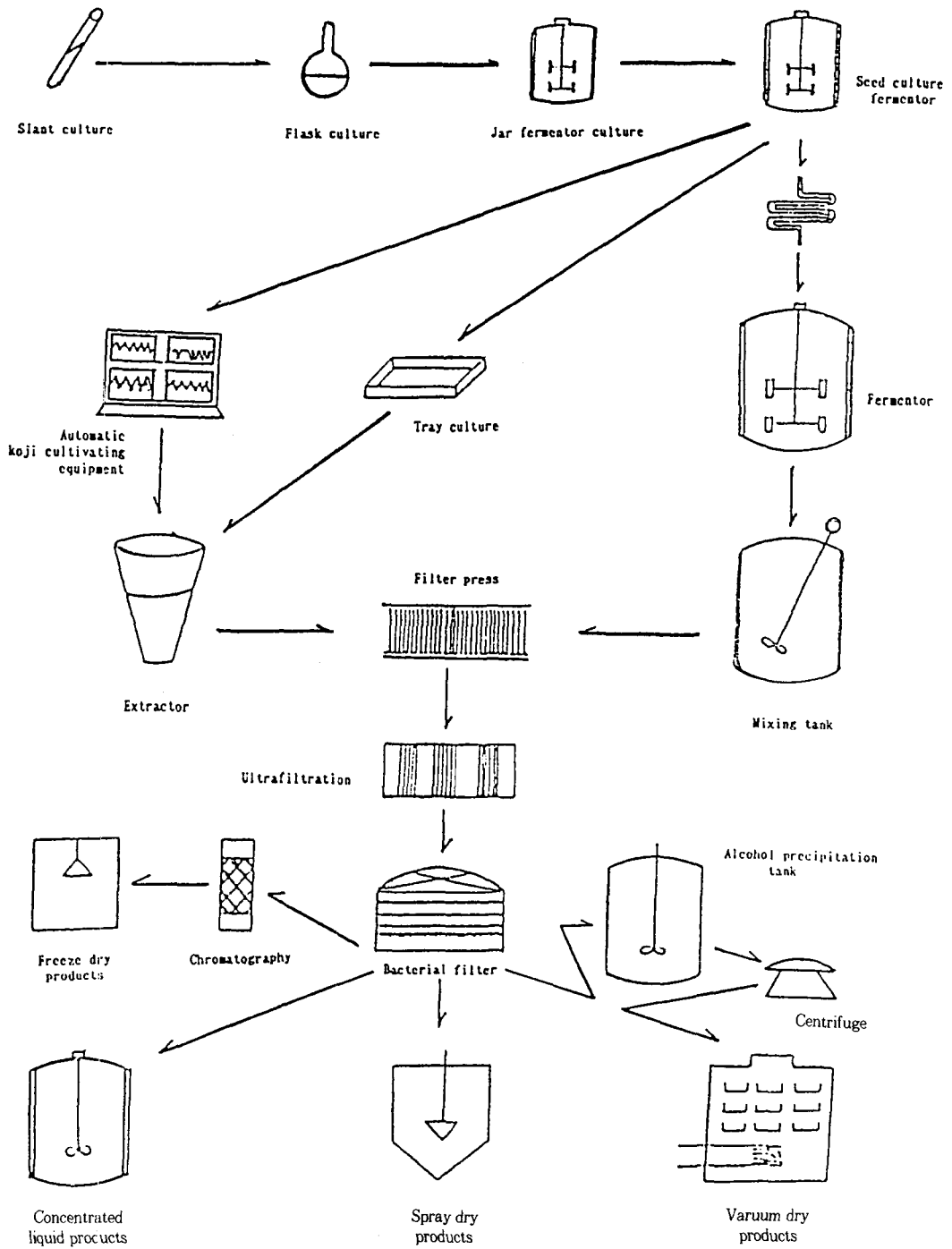
세계 효소제품들의 형태를 보면 액상, 분말, 고정화, 결정화, 과립제품 등으로되어 있다. 이들 제품들은 제품사용 용도에 따라 효소제제화가 이루어지고 있다. 효소액상 제품은 사용 측면에서 볼때 사용상 편리하지만 생산 측면에서 보면 효소 안정성을 고려하여 효소 안정제 등의 검토가 필요하다. 공업용 효소제품 들은 거의 액상 제품들로 생산되고 있다. 분말제품은 보관상에는 안정하나 사용 할 때 분지되는 경우가 있다. 과립제품은 효소를 원료로한 제품을 제제화할때, 제제화된 제품의 보관이나 사용을 유리하게 한 제품으로 세계에 사용되는 Alkaline Protease는 전부 과립형태이다. 고정화된

제품은 연속, 장기적으로 사용을 목적으로한 제품으로 Glucose Isomerase는 전부 고정화된 제품이다. 결정화 제품인 경우 특이한 사용목적으로 사용되는 효소들로 의약품료 효소로 볼 수 있다.

이와 같은 효소제제들은 기본적으로 효소 활성화, 효소안정제, 효소이용 측면에서의 경제성 등을 고려하여 제제화 되어야 한다. 그림 1, 2는 위와 같은 여러가지 생산기술을 토대로 하여 산업적 효소생산 과정 및 공정을 나타낸 것으로 외국 효소제품과 경쟁하기 위해서는 필요한 시설, 원료, 효소의 물리 화학적 성질 등의 다각적인 연구, 개발이 필요할 것으로 보인다.



[그림 1] Production of Enzymes



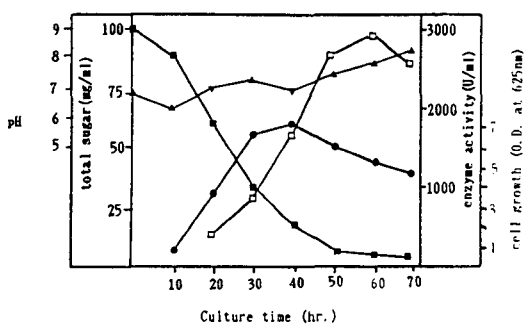
[그림 2] Processing of industrial extracellular enzymes

3. 국내 생산 효소

3-1. 당질관련효소

1) 내열성 α -Amylase(Thermostable α -amylase)

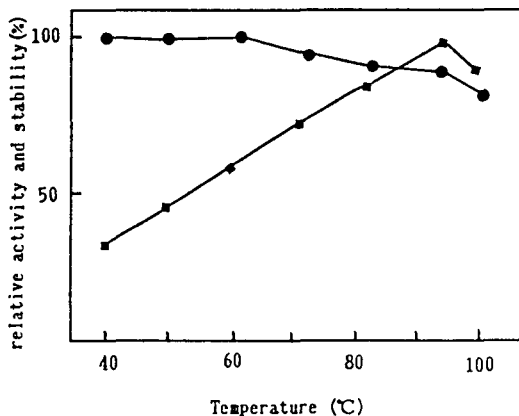
내열성 α -Amylase는 물엿, 포도당 제조시 전분의 α -1, 4 결합을 분해하여 텍스트린을 생성시켜 전분을 액화(Liquefaction)시킬 때 사용하는 효소로 특히 80°C 이상의 고온에서 작용함으로써 고온에서 액화공정이 이루어지는 생산에 적합하다. 대부분의 내열성 α -Amylase는 세균성으로 그림 3은 Bacillus sp. No. 32H417을 30L Jar fermentor로 배양했을 때의 결과이며, 그림 4와 5는 제제화된 α -Amylase의 효소 특성을 그림으로 표시하였다. 내열성 α -Amylase는 점차 그 상용량이 증대되고 있으며 이는 효소처리시 95~100°C를 유지하여 전분노화에 의해 효소분해 저해작용을 방지하는 효과가 있으며 전분당공업에 쓰이는 효소는 25~30%가 내열성 액화효소인 점을 감안하면 더욱 그 중요성이 높으며 현재 각연구기관 및 기업에서 활발히 연구되고 있다. 또한 당질관련분야 이외



[그림 3] Time course of α -Amylase production in a jar fermentor.

Bacillus sp. No. 32H417 were cultivated in submerged culture medium at 30°C using 30 l jar

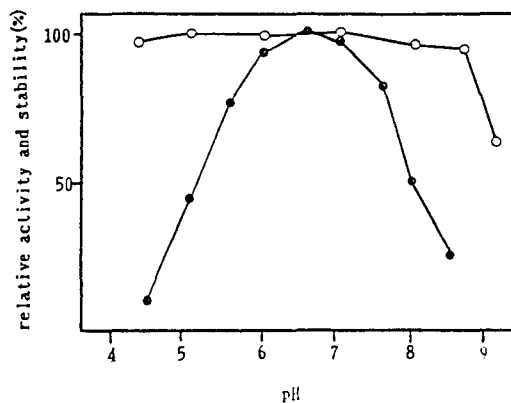
fermentor. total sugar ; ■, cell growth ; ●, pH ; ▲, enzyme activity ; □



[그림 4] Effect of temperature on α -Amylase activity and stability.

Enzymes was diluted with 0.01M acetate buffer(pH6.0) containing 4mM CaCl₂.

Symbols ; Relative activity ; ■, Stability ; ●



[그림 5] Effect of pH α -Amylase activity and stability.

Symbols ; Relative activity ; ●, Stability ; ○

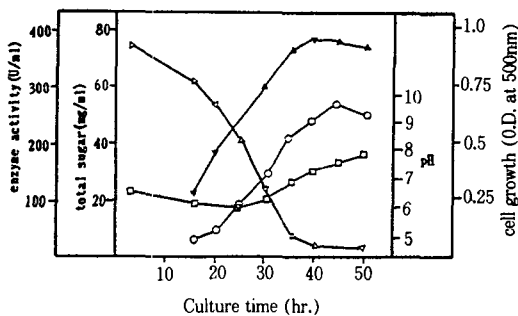
에도 제지, 섬유공업 등 고온에서 작업이 이루어지는 공정에서 광범위하게 사용되고 있다.

2) 이성화 효소(Glucose Isomerase)

과당은 자연계에서 존재하는 당류중 감미가 가장

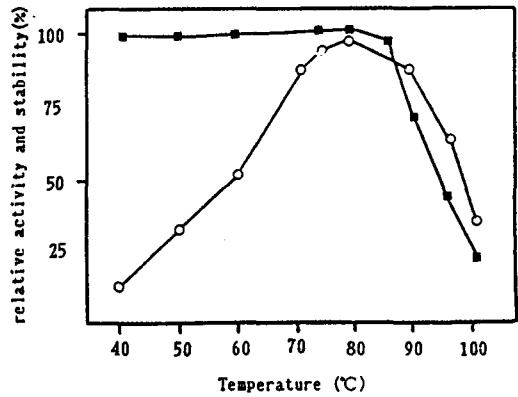
강한 것으로 빙과, 청량음료와 과일통조림 등의 제조시 설탕보다 우수한 특성을 나타내고 있는데, 19세기말 알카리 이성화방법이 고안된 이후 1965년에 일본에서 Glucose Isomerase에 의해 이성화당을 제조하는 방법이 실용화되고 있으며, 현재는 이성화당을 산업적으로 대량생산하기 위한 방법으로 효소 고정화 방법에 대한 연구가 많이 진행되고 있다.

그림 6과 7, 8에 *Streptomyces* sp. SM 805를 산업적생산시 배양결과와 이때 제제화된 Glucose Isomerase의 효소 특성을 나타내었다. 고정화 효소로 이용하기 위해서는 첫째 안정성, 경제성, 둘째 저장, 수송, 충전의 편리성, 셋째 대형반응탑에 충전시 장시간 사용에 적합한 물성 및 연속 사용가능성, 넷째 용출성분이 적어야 하는 문제점이 있으나 열안전성이 좋고 연속 생산에 의한 경제성이 뛰어나며, 고정화에 의한 활성 감소가 작은 장점이 있다. 그러나 반응탑내의 잡균오염, 예비당화, 여과 공정 등의 별도 고정화 필요한 단점도 있다. 그림 9와 같이 Glucose Isomerase의 이성화반응은 여러 가지 요인에 의해 영향을 받고 있다.



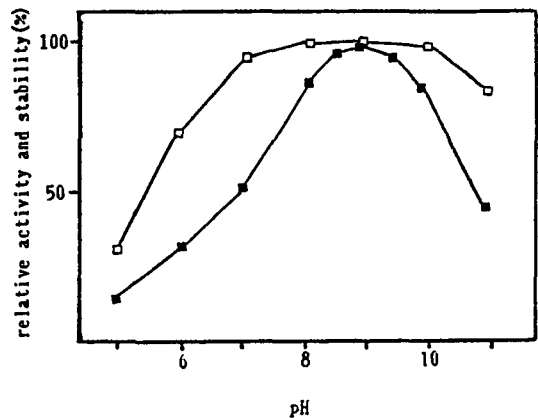
[그림 6] Time course of cultivation of strain SM 805 in a 30 l jar fermentor.

Streptomyces sp. SM 805 were cultivated in submerged culture medium at 30°C using 30 l jar fermentor. total sugar Δ , cell growth ; \square , pH ; \blacktriangle , enzyme activity ; \circ



[그림 7] Effect of temperature on Glucose Isomerase activity and stability.

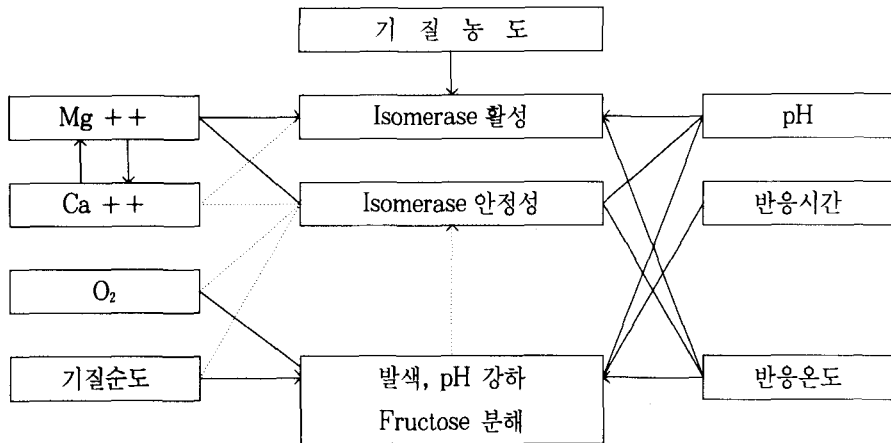
Enzymes was diluted with 0.01M acetate buffer (pH6.0) containing 4mM $CaCl_2$. Symbols ; Relative activity ; \circ , Stability ; \blacksquare



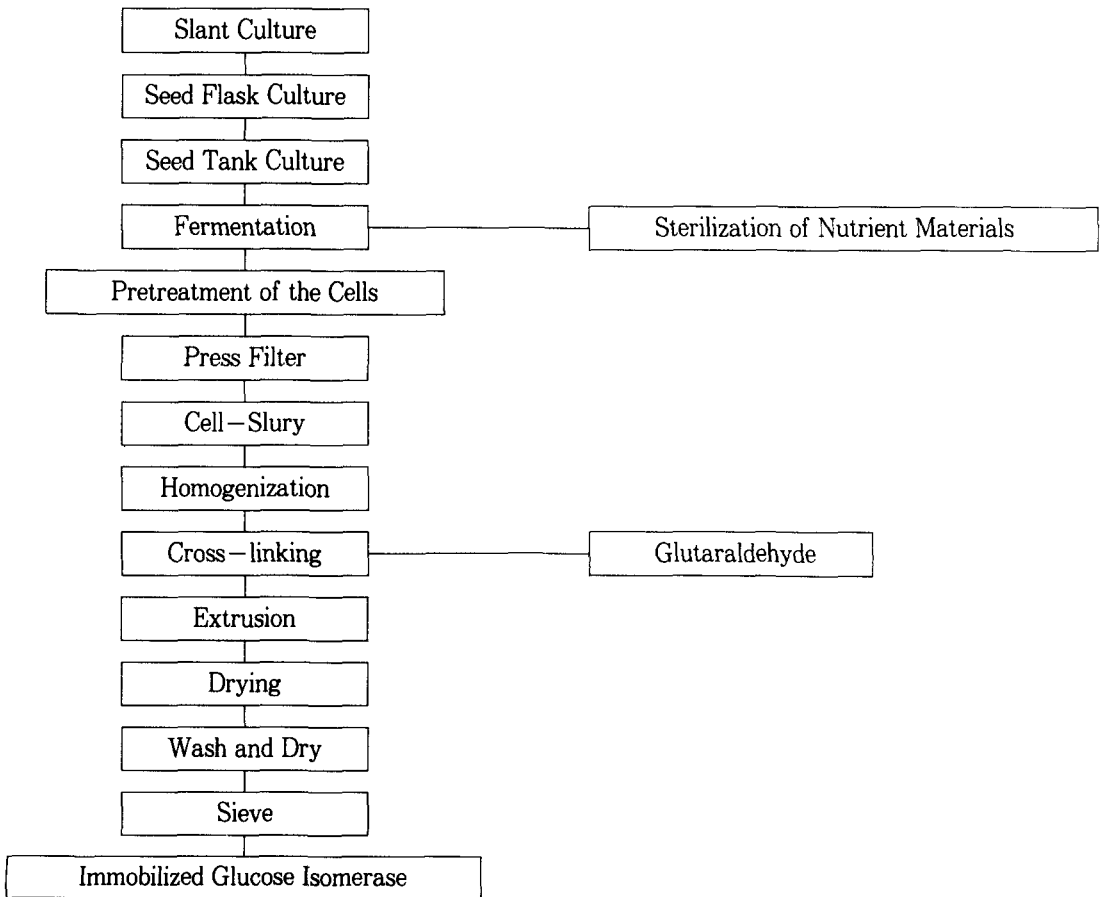
[그림 8] Effect of pH on Glucose Isomerase activity and stability.

Symbols ; Relative activity ; \blacksquare , Stability ; \square

그림 10은 Glucose Isomerase의 산업적 생산공정을 나타냈는데, 고정화 효소가 제 기능을 발휘하기 위해서는 제제화 과정 또한 매우 중요하여 이에 대한 연구가 국내, 외적으로 많이 진행되고 있다.



[그림 9] 효소이성화 반응의 중요인자(----- 저해)



[그림 10] The Production of Glucose Isomerase Preparation.

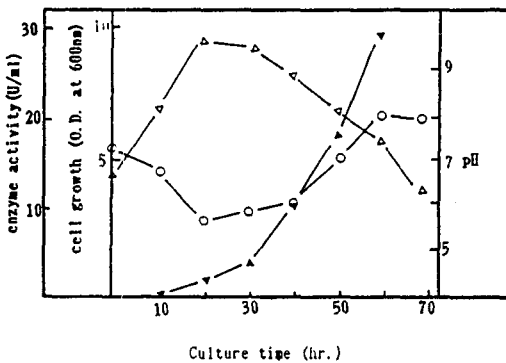
3) Cyclodextrin Glucanotransferase (CGTase)

Cyclodextrin Glucanotransferase(CGTase)는 전분에 작용하여 포도당 6-8개로부터 Cyclodextrin을 합성하거나, Cyclodextrin의 구조를 절단하여 적당한 수용체에 전이하거나, Cyclodextrin 자체에 다른 물질을 부가하는 작용이 있다.

그림 11, 12 및 13은 현재 공업적으로 생산되고 있는 *Bacillus sp. 37*의 30L Jar Fermentor 배양 결과와 제제화된 효소특성을 그림으로 나타냈다.

CGTase를 산업적으로 이용한 대표적인 예가 스테비아엽에서 추출한 천연 감미성분인 스테비아에 Glucose를 부가하여 그림 14와 같이 여러 종류의 α -Glucosylsteviol 배당체를 함유하는 구조를 가진 효소처리 스테비아를 생산하고 있다.

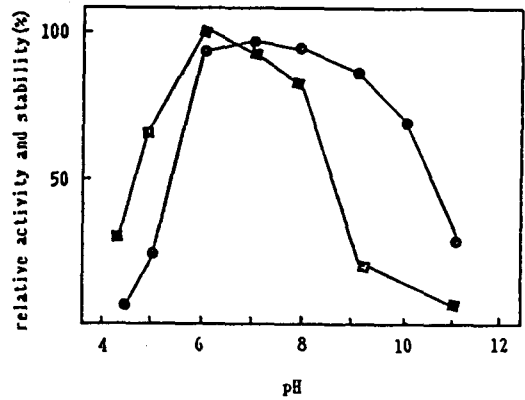
그림 15는 이와 관련된 효소반응을 나타냈으며, 그림 16은 Stevioside의 전이반응 상태를 HPLC로 분석한 결과로 효소전이된 스테비아는 대체 감미료로 사용되고 있는데, 설탕보다 감미도가 훨씬 높기 때문에 소주, 간장, 절임식품 및 스낵과자등



[그림 11] Time course of CGTase production in a 30 L jar fermentor *Bacillus sp. No. 37* were cultivated in submerged culture medium at 30°C using 30 L jar fermentor.

Symbols ; cell growth ; Δ , pH ; \circ , enzyme activity ; \blacktriangle

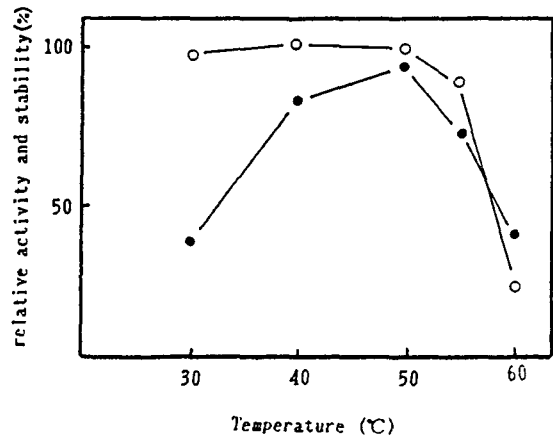
의 식품제조용으로 많이 사용되고 있다. 사카린에 대한 사용규제로 효소전이된 스테비아의 수요가 매년 급증하고 있다. 효소처리 스테비아는 전이반응에 사용되는 효소의 활성도, 기질의 농도 등에 따라 효소처리 스테비아의 생성율이 달라져 제조 기술에 대한 많은 연구가 필요하다고 생각된다.



[그림 12] Effect of pH on CGTase activity and stability.

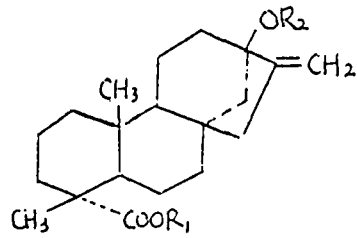
CGTase activity was measured at 45°C using phosphate buffer(pH6.0).

Symbols ; Relative activity ; \blacksquare , Stability ; \bullet



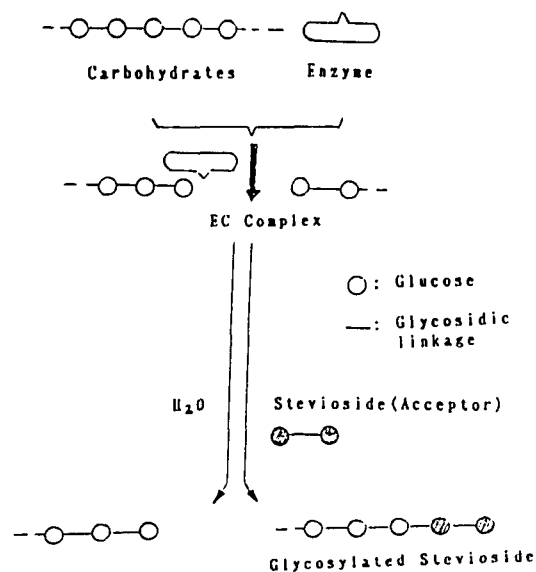
[그림 13] Effect of temperature on CGTase activity and stability.

Symbols ; Relative activity ; \bullet , Stability ; \circ

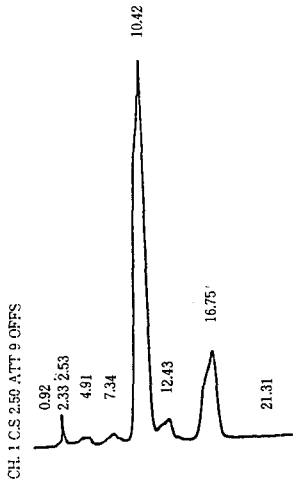


감미 성분	R1	R2	감미배수(설탕기준)
1) Steviobioside	H	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}$	설탕수준
2) Dulcoside-A	$\beta\text{-glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{rham}$	40~60배
3) Stevioside	$\beta\text{-glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}$	200~250배
4) Rebaudioside-C	$\beta\text{-glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{rham}^1\text{glc}$	40~60배
5) Rebaudioside-A	$\beta\text{-glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}^1\text{glc}$	250~300배
6) Rebaudioside-E	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}^1\text{glc}$	150~200배
7) Rebaudioside-D	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}$	$\beta\text{-glc}^2\text{-}^1\text{glc}^1\text{glc}$	100~150배

[그림 14] Stevia 감미물질의 화학구조 및 감미배수



[그림 15] Improvement of stevia sweetener by modification of enzyme technology.



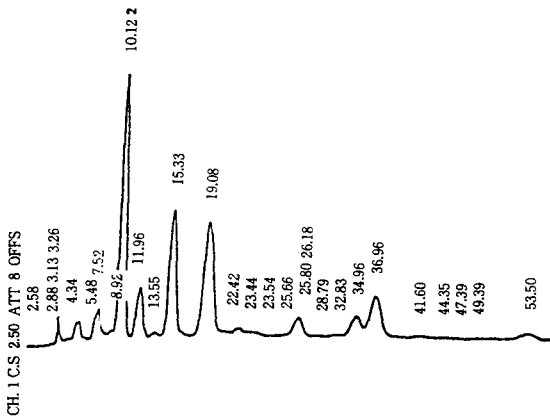
D-2508

METHOD: TAG: 2 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA: TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
1	0.92	13834	0.052	BB
2	2.33	38149	0.142	BU
3	2.53	319107	1.189	UB
4	4.91	344260	1.283	BB
5	7.34	531961	2.056	BU
6	10.42	19230460	72.007	UU
7	12.43	661756	2.465	TBB
8	16.75	5533790	20.690	UB
9	21.31	9426	0.026	BB
TOTAL				
PEAK REJ :		26842043	100.000	
		0		

Steviosides



METHOD: TAG: 1 CH: 1

FILE: 0 CALC-METHOD: AREA: TABLE: 0 CONC: AREA

NO.	RT	AREA	CONC	BC
10	2.58	14118	0.072	UU
11	2.88	12645	0.056	UU
12	3.13	40539	0.180	UU
13	3.26	199598	0.907	UU
14	4.34	112421	0.508	UU
15	5.48	593251	2.639	UU
17	7.52	898490	3.997	UU
18	8.92	184219	0.819	UU
19	10.12	4938678	21.969	UU
20	11.96	1281403	5.700	UU
21	13.35	274373	1.221	UU
22	15.35	3347584	14.891	UU
23	19.00	5239601	23.300	UU
24	22.42	127167	0.566	TBB
25	23.44	14352	0.064	TUU
26	25.54	69282	0.303	TBB
27	25.66	17416	0.077	UU
28	25.89	38472	0.156	UU
29	26.18	82779	0.368	UU
30	28.79	1394116	5.801	UU
32	32.03	279224	1.242	UU
33	34.96	513992	4.092	UU
34	36.94	2122121	9.449	UU
35	41.60	84678	0.359	TBB
36	44.25	13798	0.079	TBB
38	47.23	42741	0.191	UU
40	49.29	62614	0.283	UU
45	53.50	172984	0.769	BB
TOTAL				
PEAK REJ :		2249476	100.000	
		10000		

Glycosylated Steviosides

[그림 16] High performance Liquid Chromatogram.

3-2. 양조 공업용 효소

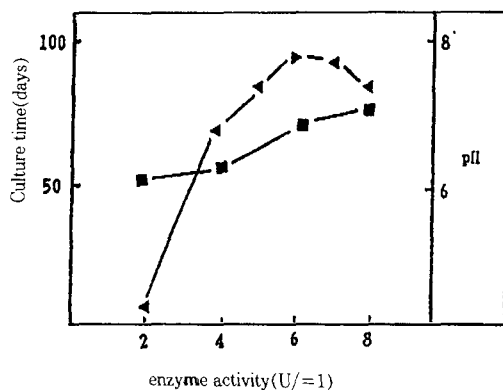
주정발효는 청주, 탁주, 소주의 제조를 위해 원료 전분, 단백질을 효소로 분해한 후 이스트 등을 이용하여 주정을 얻는데, 이에 관련된 효소는 전분 분해효소(α -Amylase, β -Amylase, Glucoamylase), 단백질분해효소(Endo-, Exopep-

tidase), 기타 Cellulase, Pectinase 등이 쓰이며, 알콜발효는 원료를 가압증자하여 효소제 혹은 Koji 균주배양물을 첨가하여 당화 및 효모첨가에 의한 발효방법으로 이루어 지고 있는데, 최근에 원료를 가압증자하지 않고 알콜을 발효하는 무증자발효법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 무증자 알

콜발효법은 가압증자법에 비해 작업공정이 간편하고 증자에너지 비용이 절감되며, Alcohol 농도가 높으므로 알콜 단위당 증류비용이 감소한다. 또 냉각수가 불필요하고 증자에 수반되는 소음, 노동 안정성 등의 문제를 해결할 수 있다. 제품으로 가열취가 없고 곡류 특유의 풍미가 존재하는 등 많은 장점이 있다. 그러나 무증자발효는 발효초기에 무증자효소의 작용에 의해 생전분 당화 활성과 포도당 생성량 및 효모의 발효속도 조절에 의한 잡균의 오염을 방지하는 일 등의 해결해야 할 문제점 또한 많이 내포하고 있다. 그림 17은 무증자 발효용 효소를 분비하는 *Rizopus* sp. No. 281의 Jar fermentor 배양결과를 나타냈으며, 표 1은 무증자 발효에 관계된 효소의 일반적인 효소력을 표로 나타냈다. 또한 그림 18은 무증자 알콜발효 과정을, 그림 19는 무증자공정을 알기 쉽게 도시하였다. 그림 20과 표 2는 실제 알콜발효 결과를 나타냈다.

현재 산업적으로 응용하기 위해 무증자용 효소를 분비하는 *Aspergillus* sp., *Chalara paradoxa* 등에 대한 연구외에도 그림 21과 같이 무증자용 식초발효공정에 대한 연구가 진행되고 있다. 하나 아직까

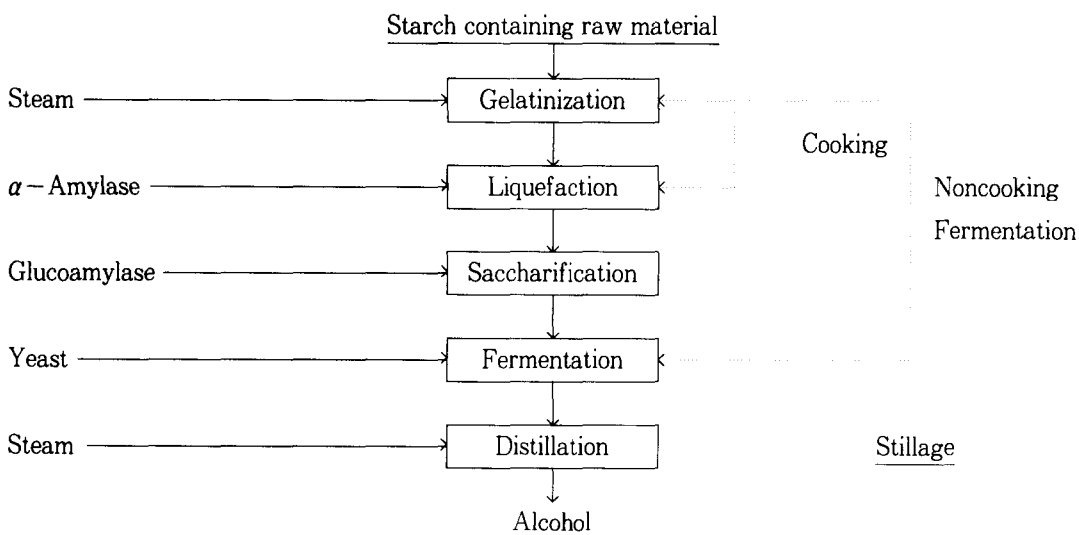
지 무증자에 의한 산업적 발효는 원료 분쇄조건, 효소조성, 효모 활성도 발효장치 등에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.



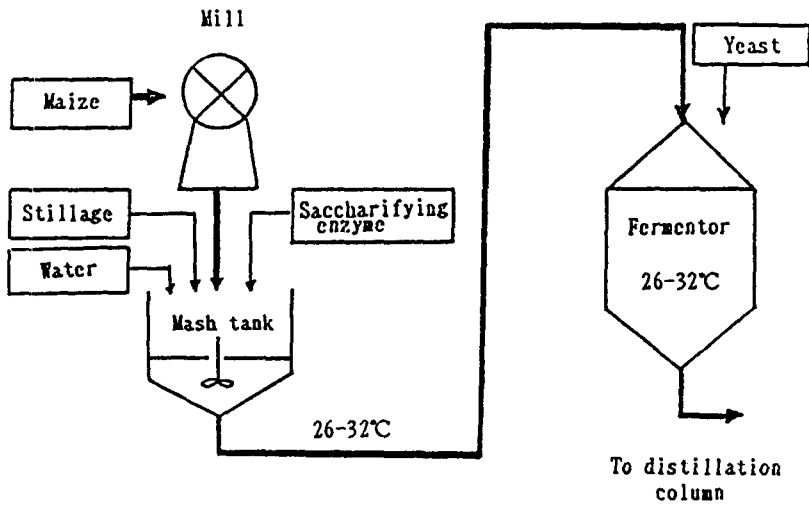
[그림 17] Time course of raw starch saccharifying enzyme production.

Rhizopus sp. No. 281 were cultivated in submerged culture medium at 35 °C using 30 L jar fermentor.

Symbols ; pH ; ■, enzyme activity ; ▲



[그림 18] Alcohol production(Main process stages)



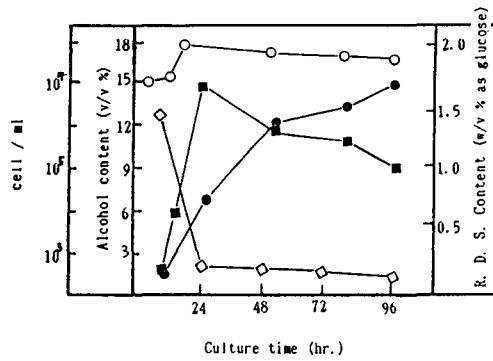
[그림 19] Flow diagram of the noncooking fermentation system.

[표 1] Enzyme Activities in the Saccharifying Enzyme Preparation

Enzymes	Activity(units/g)
Liquefying power	2000
Dextrinizing power	5450
Saccharifying power	2417
Protease Acid	3920
Neutral	1340
Alkaline	1130
Cellulase	580
Pectinase	95

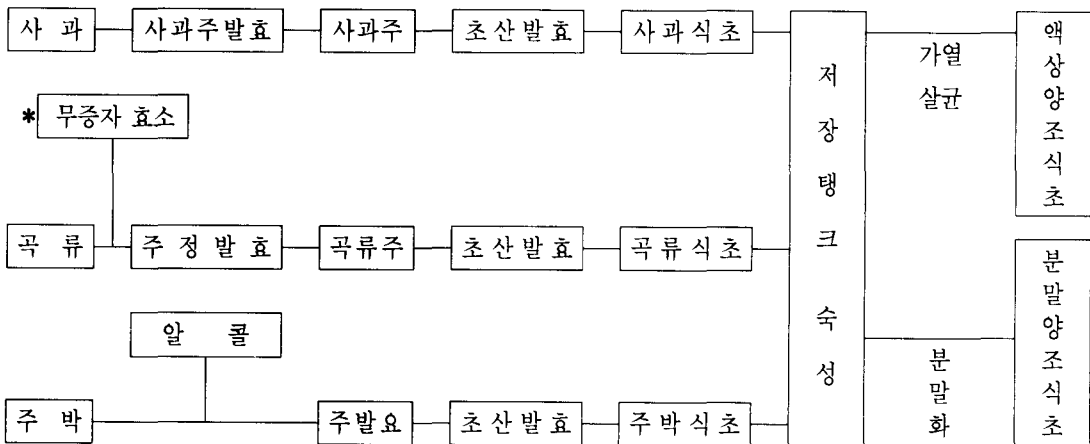
[표 2] Analysis of the Mash after Fermentation with the Noncooking System on an Industrial Scale

Volume	11.5kl
pH	4.8
Total acidity	3.3ml
Alcohol	14.5v/v%
Residual total sugars	1.57% as glucose
Residual direct reducing sugars	0.18w/v% as glucose
Viable yeast	6.5×10^7 cells/ml
Bacterial number	3.5×10^5 cells/ml
Fermentation efficiency	88.5%

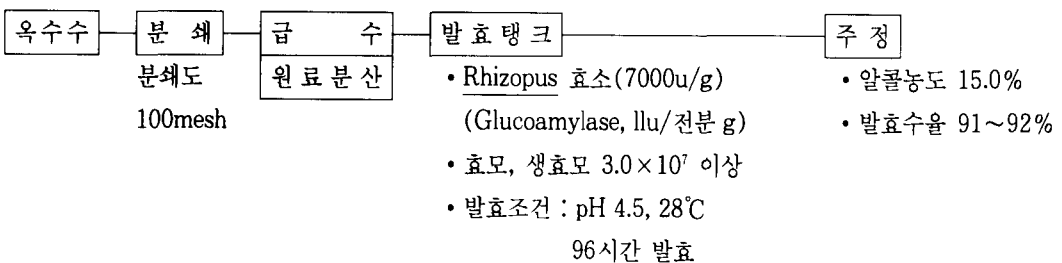


[그림 20] Changes of alcohol content, residual direct reducing sugar content, viable yeast population and bacterial number in the fermentor during mashing and fermentation with the noncooking system on an industrial scale.

Symbols ; yeast ; ●, bacteria ; ■, alcohol ; ○, residual direct reducing sugar content ; □



* 무증자 효소 응용한 주정 발효

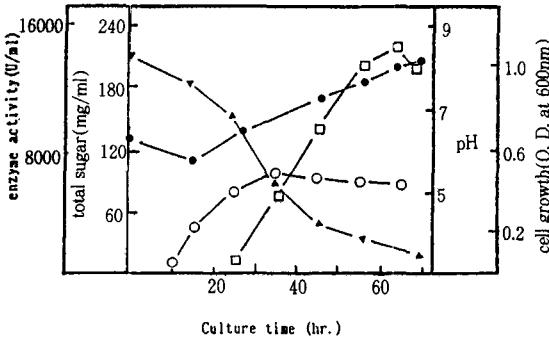


[그림 21] 무증자 효소에 의한 양조식초 생산

3-3. 세제용 효소

가정용세제에 Protease를 배합한 효소세제는 1971년에 효소를 넣은 세제가 효력이 있으며 사용 상 안정성에도 문제가 없음이 확인된 이후에 많은 효소세제가 생산되고 분말세제의 가장 중요한 영역을 차지하고 있다. 세탁물에 대한 세정원리는 효소로 인해 오염물이 분해되는 경우와 면섬유질의 비결정성 Cellulose분자의 극소일부분을 분해하여 Gel 구조를 파괴함에 의해 오염물을 빼내는 작용 등으로 구별할 수 있다. 따라서 세제용 효소로 사용되기 위해서는 Alkali 측에 작용이 강해야 하고 안정성이 높아야 하며, 합성세제의 Builder로 되는 물질이 존재하여도 안정적으로 활성이 유지되며, 광범위한 기질 특이성을 가져야 한다.

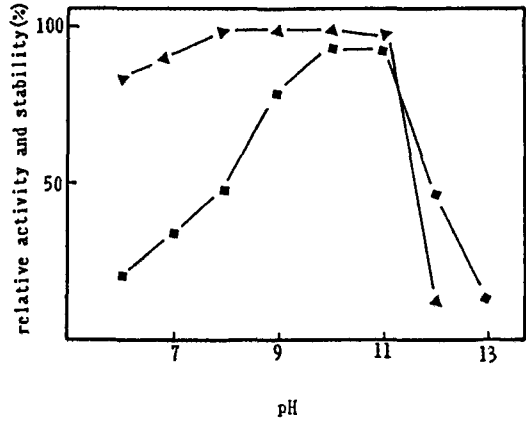
현재 전세계적으로 세제용 효소로 사용되고 있는 것중에 Alkaline Protease가 약 60% 이상을 점하고 있는데, 그림 22와 23, 24는 현재 산업적으로 생산되고 있는 Bacillus sp No. M-71의 Jar fer-



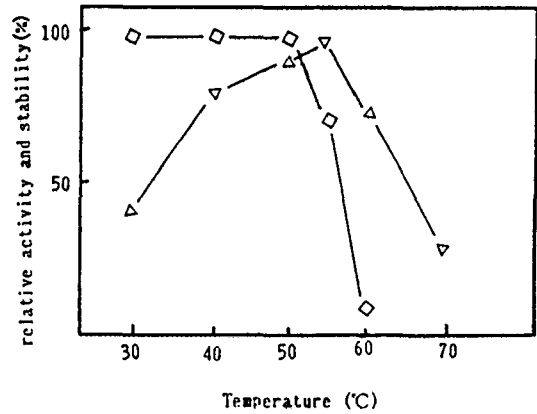
[그림 22] Time course of alkaline protease production in a 30 L jar fermentor.

Bacillus sp. No. M-71 were cultivated in submerged culture medium at 37°C using 30 L jar fermentor.

Symbols ; total sugar ▲, cell growth ; ○, pH ; ●, enzyme activity ; □

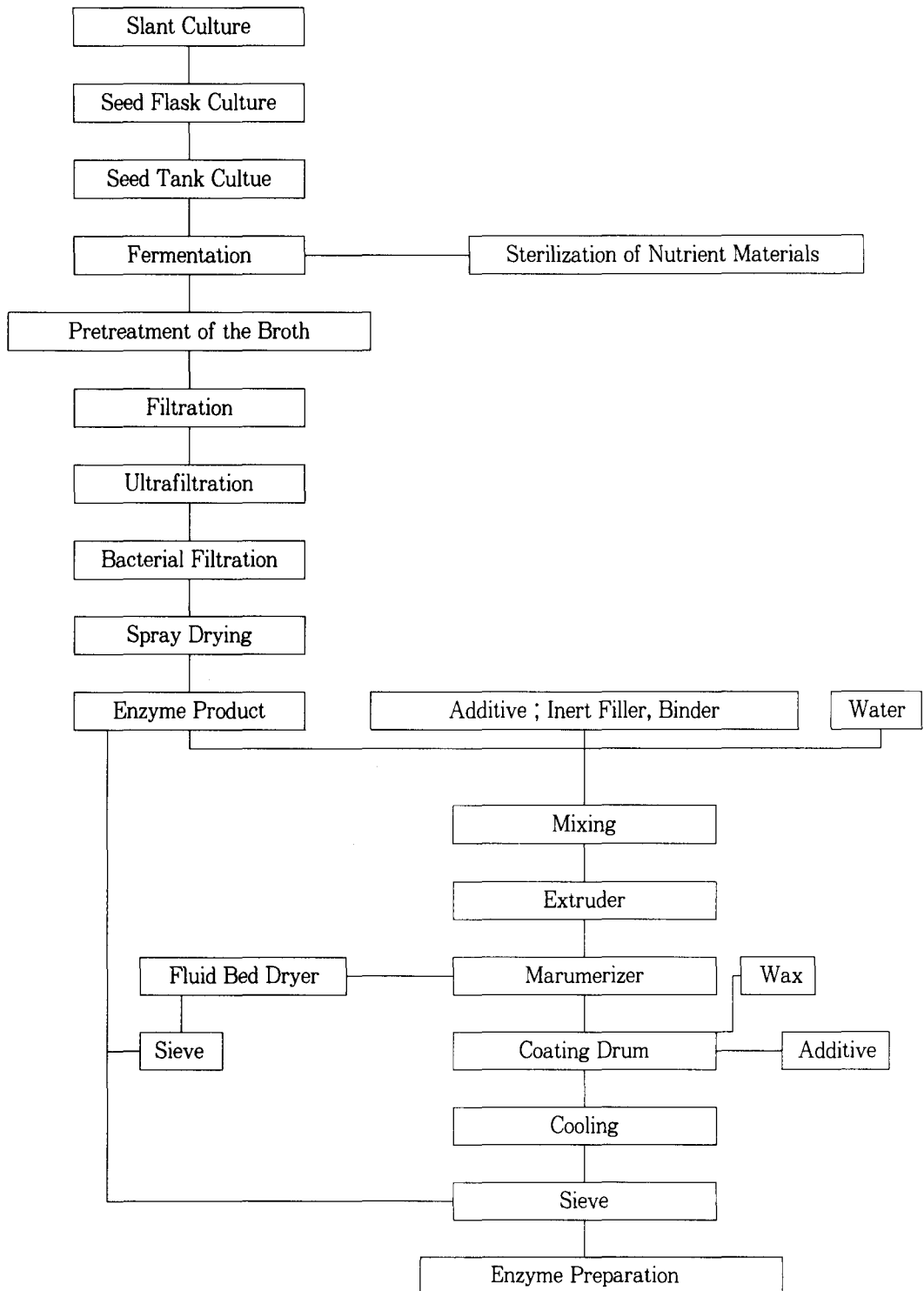


[그림 23] Effect of pH on alkaline protease activity and stability. Symbols ; Relative activity ; ■, Stability ; ▲



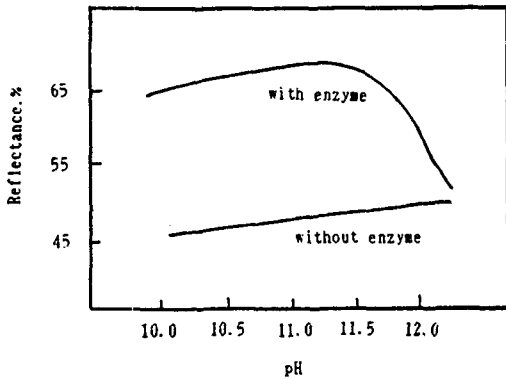
[그림 24] Effect of temperature on alkaline protease activity and stability. Symbols ; Relative activity ; △, Stability ; □

mentation 결과 및 제조된 효소의 특성을 그림으로 표시하였으며, 그림 25는 이 Alkaline Protease의 산업적 생산공정을 나타냈으며, 그림 26, 27은 효소가 첨가된 세제의 pH와 온도에 따른 세정효과를 예로 나타냈다. 현재 세제용 효소의 추세가 분진이 없고 이취가 없으며, 세제 혼합시 균일하게



[그림 25] The Production of Enzyme Preparation in the detergent Industry.

혼합되는 성형화된 상태를 요구하고 있고 성형시에도 효소역가가 안정적으로 유지될 수 있는 방법을 최적화하는 것이 세제용 효소의 상품화 관건으로 생각된다. 더불어 향후 세제용 효소는 의류의 오염이 기름에 의한, 무기류에 의한, 또는 단백질에 의한 오염 등 여러가지 오염물에 의해서 더럽혀질 수 있기 때문에 세제의 세정력을 높이기 위해 여러가지 오염물을 분해할 수 있는 효소에 대한 연구 외에도 효소와 계면활성제 등 일반화학성분 세제간의 역할 및 이에 대한 연구도 필요 할 것으로 생각된다.

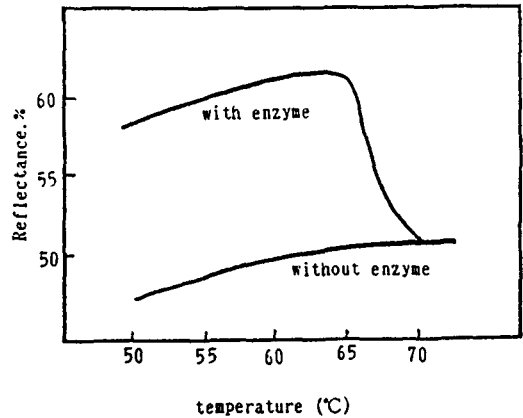


[그림 26] Effect of pH on detergency.

Washing machine : Terg-o-tometer
 Detergent dosage : 2g/l
 Enzyme : protease 0.3% w/w of detergent
 pH : variable Time : 10min

3-4. 소염 효소제

소염 효소제는 염증성 부종에 대한 억제 효과를 나타내는 효소제로 화학합성 소염제보다 그 시장은 크지 않으나 안정성이 높아 여러 염증 환자에 널리 이용되고 있으며, 그 유효성도 이미 잘 알려져 있다. 소염 효소제는 주로 단백질 분해 효소와 다당류분해효소가 있는데 단백질분해효소는 Trypsine, Chymotrypsin, Bromelain, Serratiopeptidase 등과



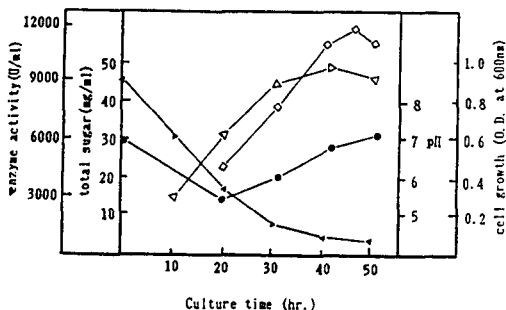
[그림 27] Effect of temperature(°C) on detergency.

Washing machine : Terg-o-tometer
 Detergent dosage : 2g/l
 Enzyme : protease 0.3% w/w of detergent
 pH : 11.0 Time : 10min

다당류분해효소로 Lysozyme등이 사용되고 있다. 그중 Serratiopeptidase가 가장 대표적으로 국내에서 생산되고 있는 의약품 효소중 약 40% 정도를 점하고 있고, 일본, 동남아 등으로 수출도 하고 있다. Serratiopeptidase는 수술, 외상 후의 소염, 염증, 종창, 혈종 등에 유효한 효과를 나타내며 항생물질과 병용할 때 물질의 조직 이행을 촉진하여 약효의 상승효과를 일으킨다. Serratiopeptidase의 개발, 생산방법은 액체배양에서 단위 생산성 높은 균주를 선별, 변이한 후 단위생산성이 높고 정제 및 분리에 알맞는 배지조성을 개발하고, 효소 단백질 획득을 위해 여과막 크기조절 및 염농도 조절에 의한 효소단백 침전 및 용해도 차이점 등을 이용하여 순도가 높고 안정성이 높은 효소제를 개발하여야 하는데, 그림 28과 29, 30은 (주) 태평양에서 생산, 제조되는 Serratia sp. SMNT-11의 Jar fermentation 결과 및 효소 특성을 그림으로 표시하였으며, 그림 31에 Serratiopeptidase의 산업적 생산

공정을 나타냈다.

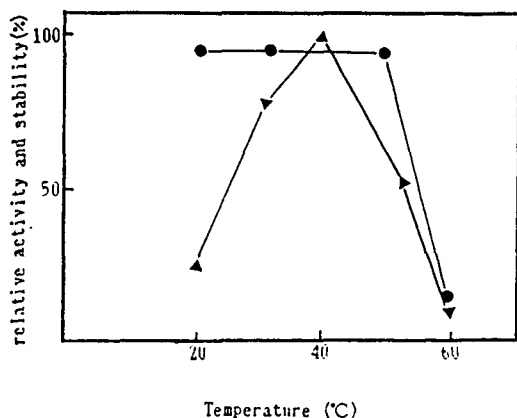
소염효소제 외에도 의약품효소제로 많이 이용되고 있는 소화효소제, 혈액 순환 효소제, 항종양 효소제, 임상분석용 효소제에 대한 생산 및 연구가 활발히 진행되고 있다.



[그림 28] Time courses of serratiopeptidase production in a 30 L jar fermentor.

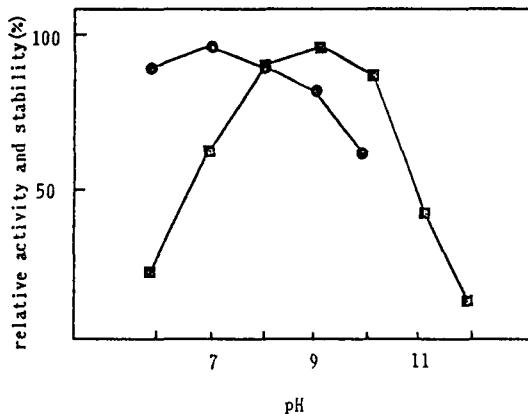
Serratia sp. SMNT-11 were cultivated in the main culture medium at 30°C using 30L jar fermentor.

Symbols ; total sugar ▲, cell growth ; □, pH ; ●, enzyme activity ; △



[그림 29] Effect of temperature on protease activity and stability

Enzyme activity was measured by the standard assay method Symbols ; Relative activity ; ▲, Stability ; ●

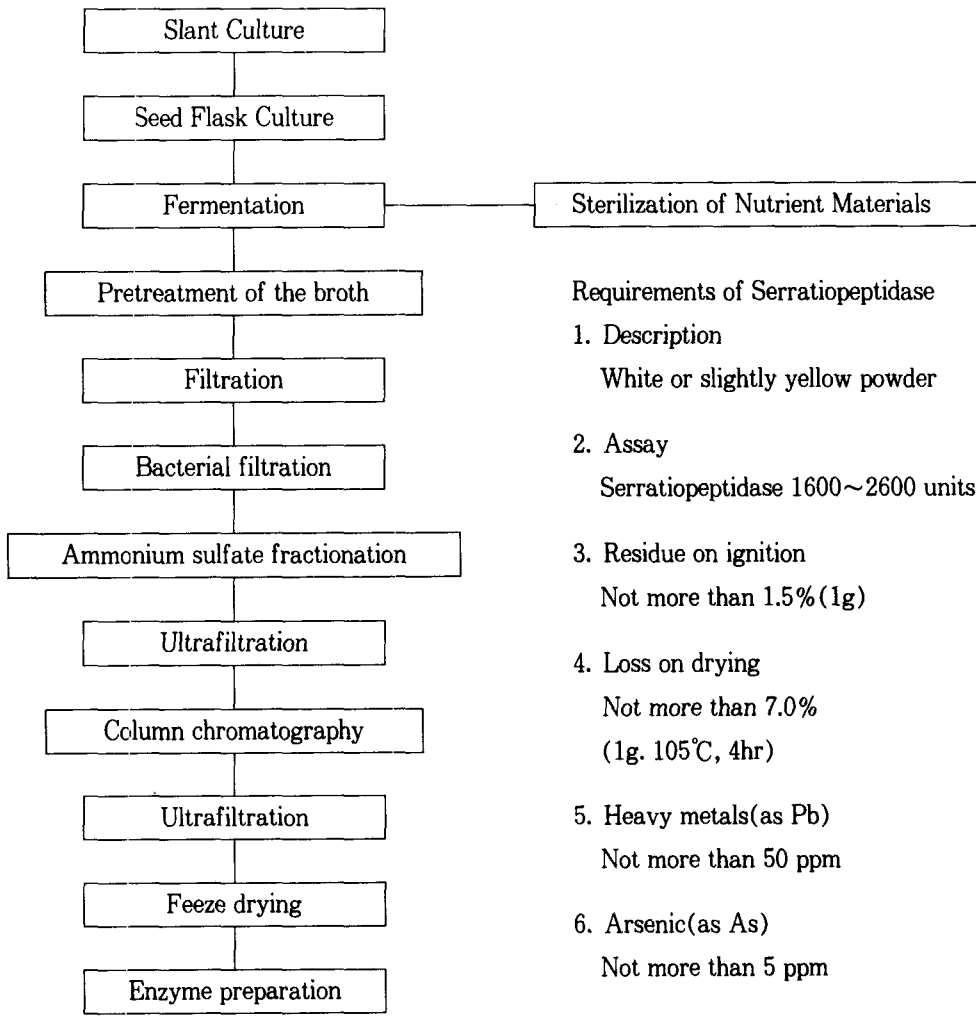


[그림 30] Effect of pH on protease activity and stability.

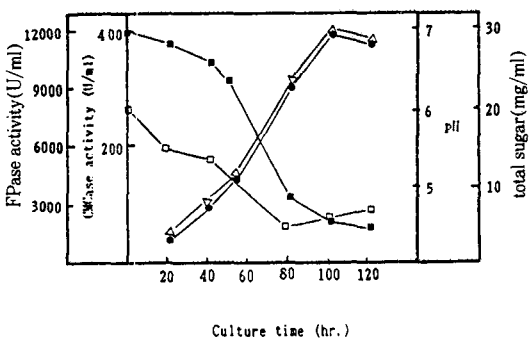
Symbols ; Relative activity ; ■, Stability ; ●

3-5. 섬유가공용 효소

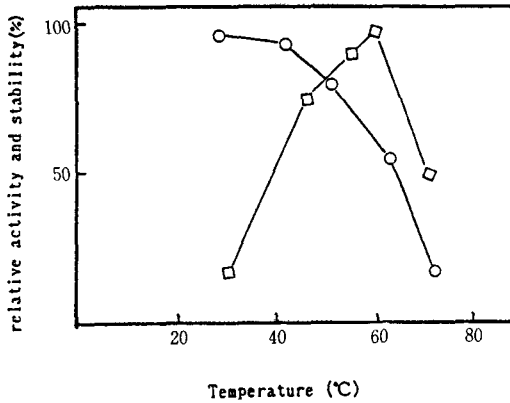
초기 섬유가공에 효소기술을 응용하는 분야는 Amylase의 직물용 호발제, Protease의 면 정련제로 이용이 대부분이었으나, 현재는 Cellulase를 이용하여 면직물을 유연하게 변화시켜 고급화 시키는 감량가공 처리공정이 보편화되어 섬유가공용 Cellulase의 수요가 증가하고 있다. 섬유가공용 Cellulase는 섬유소를 분해시켜 발효성 당으로 전환시켜주며, 점도의 감소와 식물기원 제품의 추출수율을 증가 시키는 목적으로 이용하고 있는데, 특히 청바지 가공에 있어서 균일한 탈색 및 유연성을 증가시켜주는 용도로 많이 사용되고 있다. 대부분의 섬유가 공용 Cellulase는 *Trichoderma*가 분비하는 효소를 이용하여 제조하는데, 그림 32와 33, 34는 *Trichoderma* sp. PFM-36균주의 배양결과 및 효소 특성의 일예를 그림 35는 섬유가공과 관련된 효소응용공정을 표시한 것으로 향후 섬유업계가 보다 고급화된 제품을 요구하는 추세로 섬유의 유연한 촉감, 방축성의 향상, 염색성의 증진을 도모하기 위해 효소제 처리에 대한 연구 및 실용화가 시급히 요구되고 있으며, Cellulase외에도 Protease에 의한 단백질인 Wool의 처리방법도 많이 검토되고 있다.



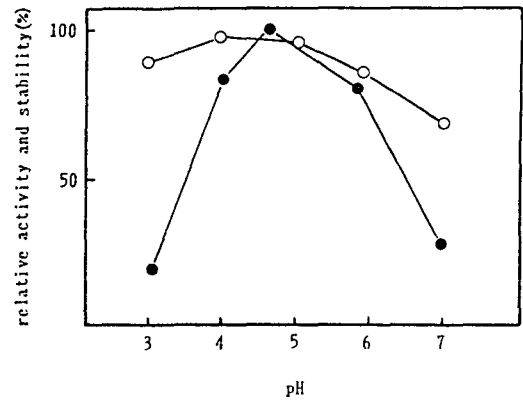
[그림 31] The production of proteolytic enzyme used in medicine



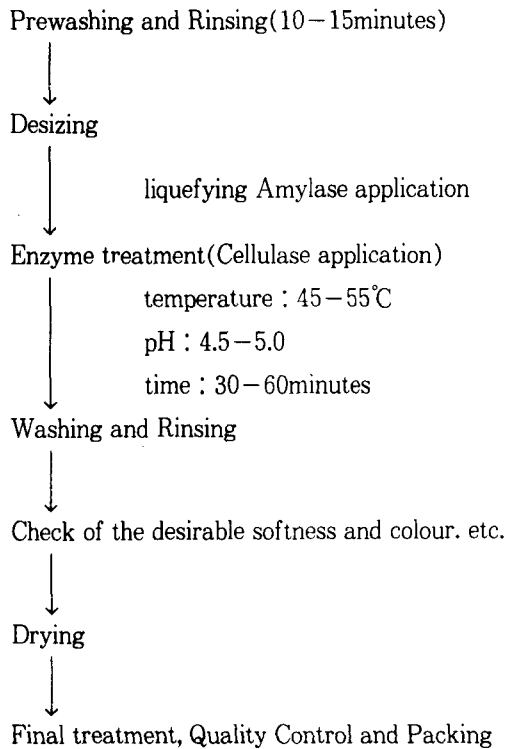
[그림 32] Time course of cellulase production in a 30 l jar fermentor. *Trichoderma* sp. PFM-36 were clutivated in submerged culture medium at 30°C using 30 L jar fermentor. Symbols ; total sugar ■, pH ; □, CMCase activity ; ●, FPase activity ; △



[그림 33] Effect of temperature on CMCase activity and stability from *Trichoderma* sp. PFM-36.
 Concentration of substrate ; 0.625%
 CMC, pH ; 4.5, reaction time ; 30min
 Symbols ; Relative activity ; □,
 Stability ; ○



[그림 34] Effect of pH on CMCase activity and stability.
 Symbols ; Relative activity ; ●,
 Stability ; ○



[그림 35] Finishing of Denim Garments.

4. 효소 응용 기술

국내 산업적 효소 응용산업을 구분하면 크게 당질 관련산업, 알콜발효 관련산업, 피혁가공, 섬유공업, 제약공업, 세제공업 등으로 나눌 수 있다. 이들 산업의 경우에는 효소 생산회사가 각 효소의 응용에 관한 기본 기술 정보를 제공하며 필요할 때는 기술까지 제공되는 경우가 있다. 또한 효소 관련 회사들이 자체 기술 축적 및 공정개선 노력과 생산회사의 기술 정보제공, 기술지원 등으로 효소 응용공정과 수준이 외국과 거의 동등한 단계에 이르렀다고 생각된다.

III. 결 론

국내 산업적 효소생산 및 응용 현황을 보면 효소의 산업적 생산 측면에서 상당한 연구와 개발이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

전술한 바와 같이 산업용 효소제품들은 거의 외국제품에 의존함으로써 국내 효소 생산회사들이 외국제품과 경쟁하기 위해서는 제품력이 우수한 제품을 생산해야 하며, 산업적으로 효소를 생산하기 위

해서는 기본적으로 국내에서 필요로하는 효소를 우선 생산해야 할 것이다. 또한 새로운 효소 제품의 개발에도 주력해야 할 것으로 생각된다. 표 3에 국내에서 우선적으로 생산이 이루어져야 할 효소들을 열거하였다.

현재에 있어서 산업적 효소이용 측면에서는 선진 국가에서 생산되는 효소제품을 자유롭게 수입 사용할 수 있는 것이며 보다 사용 입장에서 유리하게 선호할 수 있기 때문이다. 따라서 국내 효소생산 측면에서 기존 효소제품과 경쟁할 수 있는 제품품질, 제품가격이 유리한 효소제품을 생산해야 하고 또한 새로운 효소제품의 개발에도 주력해야 할 입장에 있는 것이다. 이런 관점에서 기업, 학계 모두 효소 생산 급원의 검색, 선별작업이 체계적으로 운영되어야 하고 효소 생산균주의 개량작업도 끊임없는 노력이 우선 선행되어야 할 것이다. 이리므로써 경쟁 우위에 있는 우수한 생산력을 가진 균주 확보가 이루어 질 수 있으며, 또한 새로운 효소개발에도 많은 노력이 있어야겠다. 더불어 연구실적 효소 개발이 공업적으로 생산 및 응용이 가능하도록 하기 위해서 기업, 학계 모두 분야별 공동협력이 필요할 것으로 생각된다.

[표 3] 국내산업적으로 생산이 요구되는 효소

구 분	효 소	용 도
전 분 질 관 련 효 소	Immobilized Glucose Isomerase	과당제조
	Heat stable α -Amylase	진분액화
	Heat, acid stable Glucoamylase	포도당생성
	Heat stable debranching enzymes	포도당생성촉진
	Strong digestive Amylase on the raw starch	진분액화, 당화
	β -Glucanase	주류공업
단 백 질 분 해 효 소	β -Amylase	맥아당제조
	Alkaline protease	식품가공, 세제용
지 방 분 해 효 소	Milk clotting enzyme	치즈제조
	Heat stable Lipase	유지가공, 세제용
섬 유 질 분 해 효 소	Alkaline cellulase	섬유가공, 세제용