

연료용 알콜 생산을 위한 타피오카 전분의 액화 및 당화

김 기 호 · †박 성 훈
부산대학교 화학공학과

Liquefaction and Saccharification of Tapioca Starch for Fuel Ethanol Production

Ki-Ho Kim and Sung-Hoon Park[†]

Department of Chemical Engineering,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

For fuel alcohol production, enzymatic liquefaction and saccharification of tapioca starch by α -amylase and glucoamylase were studied. The thermophilic α -amylase Termamyl produced from *Bacillus licheniformis* gave a better liquefaction than the relatively low temperature enzyme BAN from *B. subtilis*. Optimal temperature and pH with Termamyl were 90~95°C and 5.8, respectively. Minimal amount of Termamyl 240uc for a satisfactory liquefaction for a two-hour reaction was about 0.0125% (v/w) with respect to the mass of tapioca used. For saccharification experiments two enzymes, Novo AMG and Do-11 enzymes, were compared. The enzymatic activity of each enzyme was a little different depending on the substrate used and the latter was found to have a significant amount of α -amylase activity. With Novo AMG optimal temperature was about 58°C. The pH optimum was 4.3 with maltose, however, with tapioca, no difference was observed between pH 4.3 and 5.7 which is a natural, unadjusted pH of liquefied tapioca. For 85% of completion of saccharification, it was necessary to use 0.0625% (v/w) of Novo AMG 400L for tapioca and to run the reaction for more than 10 hr. Packed volume of solid particles in tapioca slurry remained at around 30% during liquefaction and saccharification. This indicates that the removal of the solid particle before fermentation is not economically feasible at all, even though the solid particles make it very difficult to operate the bioreactor in a continuous mode with cell-recycle.

서 론

1970년대 두 차례에 걸친 석유파동 이후 세계 각국은 화석연료인 석탄이나 석유의 고갈에 대비한 대체에너지 개발에 많은 관심을 갖게 되었다. 대체에너지 중 생물유래 에너지로는 메탄가스, 에탄올, 부

탄올 등이 있는데, 이중 에탄올은 휘발유를 대신하여 수송용 연료로 사용이 가능한 액체연료일 뿐 아니라, 대기오염을 줄일 수 있는 청정연료로 각광을 받고 있다. 이에 따라 브라질, 미국 등의 나라에서는 이미 자동차용 휘발유에 에탄올을 섞은 개스홀(gashol)을 사용하고 있으며, 자동차 연료의 산소함유 필요성이 증대됨에 따라 에탄올의 사용은 더욱 늘어날 전망이다 (1, 3). 한편 국내에서도 97년 이후

† Corresponding Author

개스홀을 시판하는 것을 목표로 여러 가지 준비가 진행 중이다.

전분을 연료로 할 경우 에탄올의 생산공정은 전분의 전처리, 발효, 정제 등으로 이루어진다. 에탄올 생산의 경제성을 높이려면 이들 각 개별공정이 최적화되어야 하고 또 이들 각 공정이 효율적으로 결합되어야 한다. 에탄올 생산비용 중 발효원료가 차지하는 비중은 특히 중요한데 경우에 따라 전체 생산가의 약 80%까지 될 수 있다고 알려져 있다. 현재 국내 주정회사에서는 쌀보리, 옥수수, 고구마 등의 식용 농산물과 수입원료인 타피오카(4) 등을 주로 사용하고 있다. 이중 타피오카는 가격이 타원료의 20~30%로 매우 저렴하지만 정부에서는 국내 곡물 생산능가를 보호하기 위해 이의 사용량을 규제하고 있다.

원료의 가격 다음으로 중요한 것은 전분의 전처리, 발효, 정제과정 등 생산공정에 소요되는 비용이다. 특히 연료용 알콜은 음료용 알콜과 달리 고생산성이 중요하므로 가능하면 이들 공정을 연속화하는 것이 필요하다. 이와 관련, 발효 및 정제공정은 국내 외적으로 그동안 많은 연구가 이루어져 왔다(2-11). 발효공정의 경우 단순 CSTR형 연속 반응기로부터 다단형 연속 반응기(8), 반응기내 세포농도를 증가시킬 수 있는 세포 재순환형 연속 반응기(9, 11), 고정화 효모를 이용하는 관형 반응기(2) 등이 연구된 바 있고, 정제공정의 경우는 근본적으로 석유의 증류와 그 원리가 동일하므로 에너지 효율을 높일 수 있는 증류탑의 설계와 운전이 오랫동안 연구되었다.

이에 비해 전분의 전처리 공정은 그다지 주목을 받지 못했다. 전처리 공정은 물에 녹지 않는 고분자 전분입자를 호화(gelatinization)시키고 저분자량으로 액화(liquefaction)시킨 다음, 계속하여 효모가 이용할 수 있는 단순한 당으로 변화(saccharification)시키는 단계로 구성된다(12-13). 식품공학 분야에서 전분의 물성변화, 액화나 당화효소의 성질 등을 연구해 오고 있으나 이는 주로 고가의 전분 원료에 국한되어 있고, 고 생산성, 연속 공정을 염두에 둔 값싼 전분 원료를 대상으로 한 체계적 연구는 매우 미미한 실정이다(14-15). 이에 본 연구에서는 경제적인 연료용 알콜의 생산공정을 개발하는 연구의 일부로 전분의 전처리 공정을 다루었다. 특히 연속 공정의 연구에 앞서 회분식 공정에서 효소의 종류, 사용량, 온도, pH 등 중요 운전변수들이 타피오카 전분의 액화 및 당화에 미치는 영향을 경시적으로 조사하

고, 고형분으로부터 용액 속으로 이동하는 당의 양을 정량적으로 파악하고자 하였다. 이를 통하여 회분식 액화 및 당화 공정을 최적화하고, 이 결과를 연속공정의 설계 및 운전에 이용하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

전분

건조된 타피오카를 분쇄기의 일종인 cutting mill로 갈아서 사용하였다. 입도는 직경 1mm 이상으로부터 300mesh 이하까지 다양하였으나 80% 이상 32mesh를 통과하였다. 수분 함량은 6~10%였고 전분의 함량은 건조 중량의 70~79%이었다.

효소

본 실험에는 두 가지 액화효소(α -amylase, α 1-4-D-Glucan glucanohydrolase; E.C.3.2.1.1)가 사용되었다. 첫번째 것은 *Bacillus licheniformis*에서 분리 정제된 내열성 효소로 105°C까지 높은 활성을 나타내며, 상품명 Termamyl로 시판되는 것이었다. Termamyl의 specific activity는 240KNU/g이었는데(Termamyl 240uc로 명명), 1KNU(Kilo Novo alpha-amylase Unit)는 37°C, pH5.6에서 시간당 5.26g의 전분(Merck, Amylum Soluble, Erg.B6)을 분해할 수 있는 효소의 양이다. 두번째 것은 *Bacillus subtilis*에서 분리된 효소로 70°C에서 최대 활성을 나타내는 상품명 BAN(Bacterial Amylase Novo)이었다. BAN의 specific activity는 240 KNU/g이었다. 두 효소는 모두 Novo사에서 구입하였다.

한편 본 실험에서 사용한 당화효소는 *Aspergillus niger* 및 *A. shiroussami* 유래의 fungal 1,4- α -D-glucan glucohydrolase (E.C.3.2.1.3.)였다. *A.niger* 유래의 효소는 상품명 AMG(Novo Nordisk사 제품)로서 specific activity는 400AGU/ml이었다. 1AGU(Novo Amyloglucosidase Unit)는 25°C, pH4.3에서 1분당 1 μ mol의 말토오스를 분해할 수 있는 효소의 양이다. *A. shiroussami* 유래의 당화효소는 국내 도일산업에서 생산하는 것으로 단백질 불순물을 포함하고 있으며 α - 및 β -amylase 활성도 다소 가지고 있다.

액화효소와 당화효소는 모두 액체 형태였다.

액화 및 당화실험

회분식 액화실험을 위해 1ℓ 짜리 사구플라스크를 반

응기로 사용하였고 온도는 항온수조로 조절하였다. 액화 반응기의 반응물 용량은 700~800ml로 타피오카와 160g에 증류수 640ml이었고, 이 경우 타피오카와 증류수를 합한 부피는 740ml이었다. pH는 별도로 조정하지 않았는데 대략 5.4~6.0으로 유지되었다.

액화반응은 먼저 반응기 내에 증류수를 넣고 원하는 온도에 도달하게 한 후 교반기로 계속 저어주면서 액화효소와 타피오카를 가능한 한 짧은 시간 내에 투입하여 시작되도록 하였다. 그후 2~3시간 동안 20~30분 간격으로 시료를 채취하여, 점도, packed volume, 총당의 분포 등을 측정하였다.

당화실험에서는 일정한 조건에서 액화시킨 타피오카 용액을 이용하였다. 사용된 반응기는 액화실험 때와 마찬가지로 1ℓ 짜리 사구플라스크였고 반응물 용량은 740ml이었다. 당화효소의 생성물이 단당류인 포도당이므로 여러 환원당 중 포도당의 농도만으로 당화속도를 조사하였다. pH 및 액화의 정도가 당화에 미치는 영향도 조사하였다.

각종 분석법

포도당

습식 분석법인 DNS법 (16) 및 glucose oxidase를 이용하는 포도당 분석 kit (영동glucose-E Kit)는 액화나 당화 실험 중 이당류나 다당류를 제외한 순수 포도당의 농도를 측정하는데 사용되었다. DNS법에서 표준곡선은 포도당 0.2g~1.0g/ℓ를 사용하여 구하였다.

전분의 총당은 시료의 pH를 진한 황산으로 2로 맞춘 후 끓는 물에서 2시간 동안 산 가수분해시켜서 DNS법으로 측정하였다 (14).

말토오스 및 말토트리오스의 분석 (17)

Aminex HPX-42C (300mm×7.8mm, BIO-RAD, USA) column이 부착된 HPLC(Varian, U.S.A.)를 사용하였으며, 검출기로는 RI-4 refractive index detector, 이동상으로 물을 사용(1ml/min)하였으며 column 온도는 85℃로 일정하게 유지해 주었다. 이때 말토오스 및 말토트리오스의 체류시간은 각각 7.2분, 6.4분이었고 포도당은 8.0분이었다.

액화과정 중의 당분석

액화가 진행되면서 타피오카 전분은 수용액 상으로 계속 용출된다. 액화의 진행 정도를 파악하기 위

해 수용액 상과 고형분 내의 총당을 분석할 필요가 있다. 그러나 용액 상이나 고형분 내에 존재하는 당은 포도당이 아닌 이당류 이상이므로 이를 완전히 당화시키는 것이 필요하다. 이를 위해 Termamyl과 AMG를 사용하였다. 분석은 다음과 같은 순서로 행하였다. 액화 반응기에서 취한 시료 10ml을 3000rpm에서 원심분리하여 수용액과 고형분(젤화된 부분 포함)으로 분리한다. 고형분은 그대로, 혹은 증류수로 두 차례 세척한 후 원래 시료의 두 배(20ml)가 되도록 증류수로 희석하고 상등액은 2ml을 취해 바로 증류수로 두 배 희석하여 4ml가 되게 한다. 고형분 용액 20ml에 Termamyl 24uc (Termamyl 240uc을 증류수로 10배 희석한 것)을 100 μ ℓ 가하여 90℃에서 30분간 액화시키고 이어서 AMG 20uc (AMG 400uc)을 증류수로 20배 희석한 것)을 200 μ ℓ 가하여 58℃에서 12시간 당화시킨다. 상등액도 AMG 10uc (AMG 400uc을 증류수로 40배 희석한 것)을 30 μ ℓ 가하여 당화시킨다. 당화된 용액은 적당히 희석한 후 DNS법으로 분석하였다.

점도 측정

액화 및 당화시에 각 온도와 시간별로 점도를 측정하였다. Brookfield 점도계 (Model LVT)가 사용되었다. 측정 시료의 양을 적게 하기 위해 small sample adaptor를 사용하였고 측정 온도는 별도의 언급이 없는 한 액화실험의 경우 액화실험 온도와 같게, 그리고 당화실험의 경우 당화실험 온도와 같게 유지하였다. 또한 전분이 호화될 때 비뉴우튼성 pseudoplastic 성질을 띠므로 spindle의 회전속도를 동일하게 (3 혹은 6rpm) 유지시켰다.

Packed Volume의 측정

눈금이 매겨진 10ml짜리 conical tube를 사용, 3000rpm에서 시료를 5분간 원심분리한 후 고형분의 양을 측정하였다. 액화시료의 경우 맨위의 맑은 수용액층과 유백색의 젤화된 부분(갈색의 고형분을 포함하여 편의상 젤 함량이라 부름), 그리고 짙은 갈색의 고형분(편의상 고형분이라 부름)으로 세층이 분리되는데, 젤 함량과 갈색의 고형분 양을 측정하였다. 온도에 따라 젤 함량이 달라질 수 있으므로 시료 채취 후 즉시 원심분리하였다.

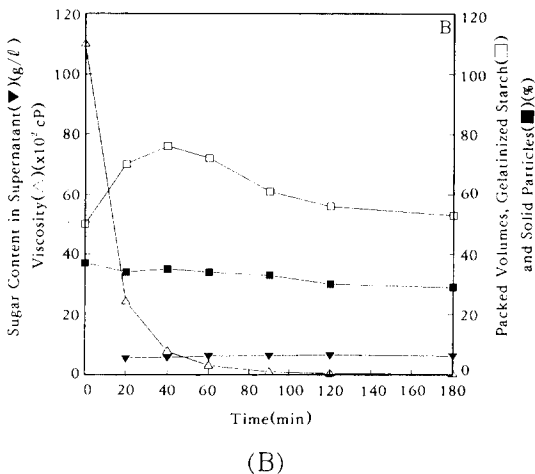
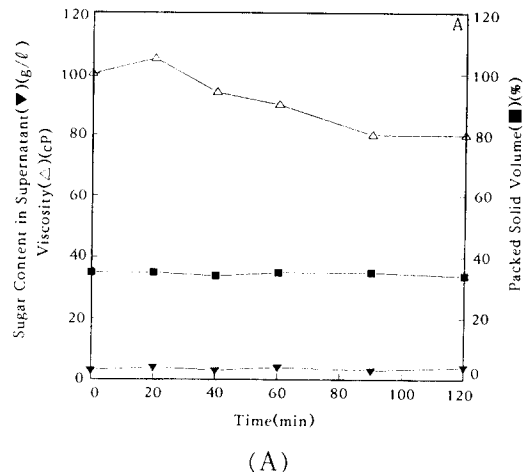


Fig. 1. Liquefaction of tapioca at 20°C(A) and 70°C (B) without α -amylase. Symbols are: (□), packed volume of gelatinized starch; (■), packed volume of solid particles; (▼), sugar content in supernatant; (△), viscosity.

결과 및 고찰

액화 기초실험

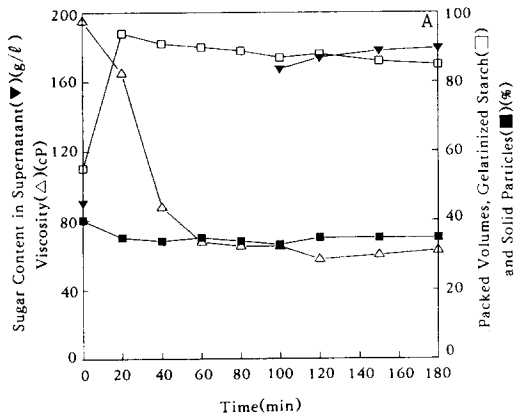
효소가 존재하지 않는 조건에서 타피오카 내의 당류가 얼마나 용액으로 용출되는지를 알아보기 위해 20°C 및 70°C에서 타피오카 슬러리만을 교반하면서 점도의 변화, packed volume의 변화, 당의 용출 등

을 조사하였다. Fig. 1 (A)에서 알 수 있는대로 20°C의 경우 액화와 전분입자의 팽윤이 거의 일어나지 않았다. 70°C에서는 점도가 초기에 매우 높았다가 40분까지 비교적 빨리 감소하고 그 이후 거의 일정한 수준을 유지한다. 또 고형분을 포함한 젤 함량 (packed volume of gelatinized starch)이 초기 약 90%에서 시작하여 50%에 이르기까지 계속 감소하였고 갈색의 고형분은 초기 약 38%에서 30%에 이르기까지 서서히 감소하였다. 또한 상등액 속의 당은 약 6.0g/ℓ로 거의 일정하였는데 이는 DNS법으로 분석한 타피오카 슬러리내의 총 당량 200g/ℓ에 비교할 때 매우 미미한 양이다. 따라서 70°C의 경우 전분의 팽윤 및 호화는 어느 정도 일어나지만 전분 분자의 분리 및 용액상으로의 분산은 거의 일어나지 않는다고 결론지을 수 있다.

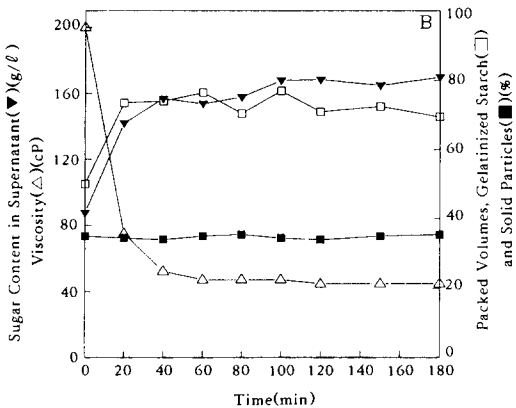
90°C에서도 동일한 실험을 행하였다 (결과는 보이지 않음). 이때는 호화가 급격히 일어나 용액의 점도가 매우 높았다. 따라서 교반의 어려움은 물론 시료 채취가 불가능하였다. 1시간 정도 교반하였을 때 점도가 다소 감소하여 시료 채취가 가능하였으나 원심분리시 고형분이 약 35%이고 그 윗부분은 모두 유백색 부분으로 관찰되었다. 이는 90°C 고온에서 타피오카 전분의 호화 및 팽윤이 급속히 진행됨을 보여주는 것이다.

저온 α -amylase, BAN을 이용한 액화 실험

Fig. 2는 BAN을 사용한 액화실험 결과이다. Panel A에서는 BAN 24 μ l, 200 μ l 가 사용되었고, B에서는 400 μ l 가 사용되었다. BAN은 70°C에서 최고 활성을 보여주므로 액화반응은 70°C에서 행하였다 (18). 두 경우 모두 전체적인 액화진행 상황은 비슷하다. 즉 점도는 초기에 급격히 하락하고 상등액 중의 당농도는 초기에 급격히 상승한 후 완만히 증가한다. 이에 비해 고형분의 함량은 약 38%를 계속 유지 한다. BAN을 사용한 액화반응의 가장 큰 특징은 젤 함량이 매우 높다는 것이다. 특히 200 μ l BAN이 사용된 경우 반응 시작후 약 90여 분간 이 값이 거의 100%에 가까워 상등액의 채취가 불가능하였고 따라서 상등액 내 당량을 측정할 수 없었다 (Panel A). 400 μ l 사용한 경우는 젤 함량이 다소 낮으나 여전히 전체 반응시간 동안 70% 내외의 값을 보여주었다. 이 결과 Fig. 1 (B), 즉 효소를 전혀 첨가하지 않은 경우와 비교하면, BAN의 활성에 의해 전분의 호화 및 분해가 촉진되었음을 알 수 있다. 그러나 전분이 상당량 유백색 겔로 존재하고 수용액



(A)



(B)

Fig. 2. Liquefaction of tapioca at 70°C with the bacterial α -amylase BAN 24uc, 200 μ l (A) and 400 μ l (B). Symbols are the same as in Fig.1.

상태로 바뀌지 않는 것을 보아 BAN은 전분입자들을 충분히 작은 분자량으로 분해하지 못함을 알 수 있다.

이러한 결과의 원인으로는 다음 두 가지가 추정된다. 첫째는 BAN이 타피오카라는 특정 전분질에 대해 활성이 좋지 않을 경우이고 둘째는 BAN의 효소 활성은 좋으나 타피오카의 호화가 충분히 일어나지 않아 전분을 거의 분해하지 못하는 경우이다. 이를 확인하기 위하여 먼저 정제된 시약급 전분을 사용

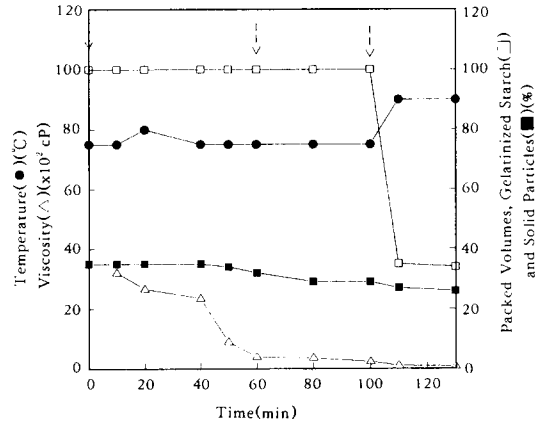
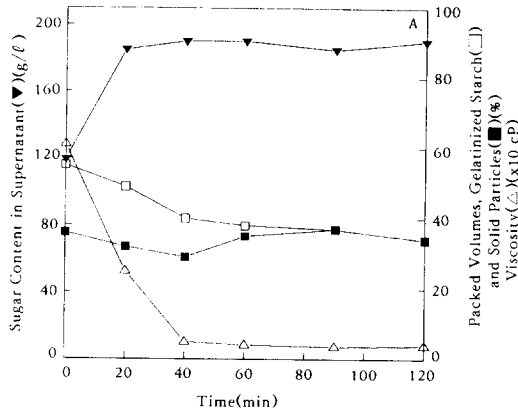
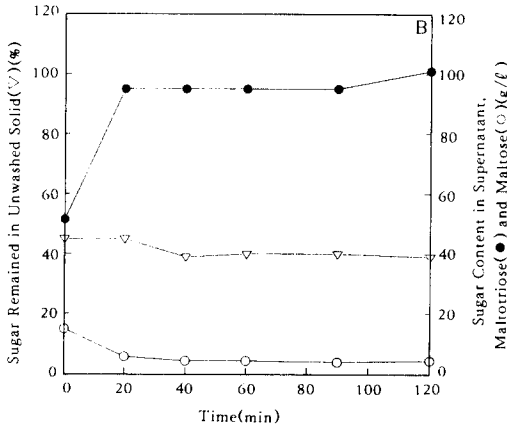


Fig. 3. Liquefaction of tapioca. 160 μ l of bacterial α -amylase BAN 24uc was added twice at time 0 and 60 min, and the thermostable α -amylase Termamyl 24uc, 160 μ l was added at 100 min, as indicated by arrows. Reaction temperature was maintained at 75°C until 100 min and raised to 90°C thereafter. Symbols are the same as in Fig.1 except for temperature (●).

BAN의 효소활성을 70°C에서 조사하였다. 효소활성은 매우 높았다. 두번째 가능성을 확인하기 위하여 반응온도를 약간 달리하여 액화반응을 시도하였다 (Fig. 3). 여기서는 타피오카의 호화가 70°C 부근에서 시작되고 BAN의 활성은 80°C까지 비교적 안정적으로 유지된다는 사실에 착안하여 액화온도를 약간 높게 75°C에서 80°C 사이로 유지하였다. Fig. 3에서 알 수 있는대로 70°C로 유지하였을 때 비해 초기 점도가 높게 관찰되었다. 또한 원심분리시 상등액 모두가 젤화된 유백색으로 나타나 전분의 호화가 급격히 진행되었음을 알 수 있었다. 그러나 액화가 급속히 진행될 때 관찰되는 맑은 상등액 부분이 원심분리시 나타나지 않았으므로 반응 1시간만에 BAN 24uc 160 μ l를 재차 투입하였다. 그러나 여전히 젤 함량이 100%로 변화가 없었고 이는 40분간 계속되었다. 반응시간 100분에 고온 효소인 Termamyl 24uc를 160 μ l 첨가하고 반응조의 온도를 90°C로 상승시켰다. Fig에서 알 수 있는대로 고형분 함량은 거의 변화가 없었으나 젤 함량은 급속히 감소, 약 35%에 도달하였다. 이유가 분명하지는 않으나 위의 결과들은 두번째 가능성, 즉 BAN이 타피오카 전분에는 별로 효과적이지 않다는 것을 뜻



(A)



(B)

Fig. 4. Liquefaction of tapioca at 90°C with the thermostable α -amylase Termamyl 24uc, 400 μ l. Symbols are the same as in Fig. 1. Additional symbols for sugar in Panel B are: (▽), % sugar remained in solid; (●), maltotriose in supernatant; (○), maltose in supernatant.

한다. 추후 이 부분은 보다 자세한 연구를 필요로 한다.

고온 α -amylase, Termamyl을 이용한 액화 실험

Fig. 4와 5는 고온 α -amylase인 Termamyl을 사용한 액화실험 결과를 보여준다. Fig. 4에서는 증류수 640 μ l을 90°C에서 교반하면서 시간 0에서 Ter-

mamyl 24uc 400 μ l 및 타피오카 160g을 넣었을 때 액화조의 거동을 보여준다. 초기 점도는 600cP로 매우 높았으나 액화의 진행 정도가 워낙 빨라 반응 초기부터 원심분리시 맑은 상등액이 상당량 관찰되었다. 젤 함량은 초기 55% 정도였으나 약 90분 후에는 완전히 소실되었다. 상등액 내에 당량도 급속히 증가하여 약 20분 경과후부터는 200g/l로 거의 일정하게 유지되었다. 시간 0에서의 값들은 이론적으로 볼 때 온도나 효소 첨가량에 관계없이 모두 일정하여야 하나 본 실험에서는 반응조에 들어간 타피오카가 균일하게 섞인 후 시간을 0으로 잡았으므로 그 값들이 모두 조금씩 다르다.

Fig. 4 (B)는 상등액과 고형분 (젤 부분 포함)을 분석한 것이다. 이중 고형분 속의 포도당은 고형분을 증류수로 세척하지 않고 상등액만 따라낸 후 액화 및 당화 과정을 거쳐 분석하였다. 이 값은 고형분 내에 액화되지 않고 존재하는 당과 부분적으로 액화는 되었지만 젤화되어 고형분에 붙어 있는 당의 합이다. 이 값이 약 40%나 된다는 것은 연속발효시 세포 재순환을 위해 액화 후 고형분을 용액분으로부터 제거하는 것이 경제적이지 않다는 뜻이다. 말토오스와 말토트리오스의 농도는 상등액을 HPLC로 분석한 값이다. 초기에는 말토오스가 15g/l 정도 존재하나 20분이 경과한 시간부터는 그 값이 반으로 줄어 약 8g/l 수준으로 유지되었다. 이에 비해 말토트리오스는 초기에 약 50g/l였으나 반응 20분부터는 약 100g/l로 유지되었다. 상등액에서 말토오스 이상의 당은 거의 관찰되지 않았고, 포도당도 그 양이 매우 작아 1g/l 미만이었다. 그러나 젤화된 부분에는 말토트리오스 이상의 올리고마들이 많이 존재할 것으로 추정된다.

Termamyl의 양을 100 μ l로 줄인 경우에 대해서도 동일한 실험을 행하였다 (결과는 보이지 않았음). Fig. 4와 비교할 때 젤 함량이 매우 높아 120분간 반응 후에도 거의 95%에 머물렀다. 특히 초기에 타피오카가 빨리 녹지 않아 교반에 많은 문제가 있었다. 이로 미루어 Termamyl 100 μ l는 효과적인 액화에는 부족한 양이라고 결론 지을 수 있었다.

타피오카를 넣기 전 증류수의 온도를 90°C를 유지하는 것은 급격한 호화에 이은 Termamyl의 활발한 활동으로 액화의 속도를 매우 빠르게 하지만 급격한 점도 상승과 이에 따른 불완전한 교반이 큰 문제였다. 따라서 Fig. 5에서는 초기 물 온도를 70°C로 하고 효소와 타피오카를 넣은 후 반응조가 들어 있는 수조의 온도를 90°C로 올려 초기의 급격한 점도 상

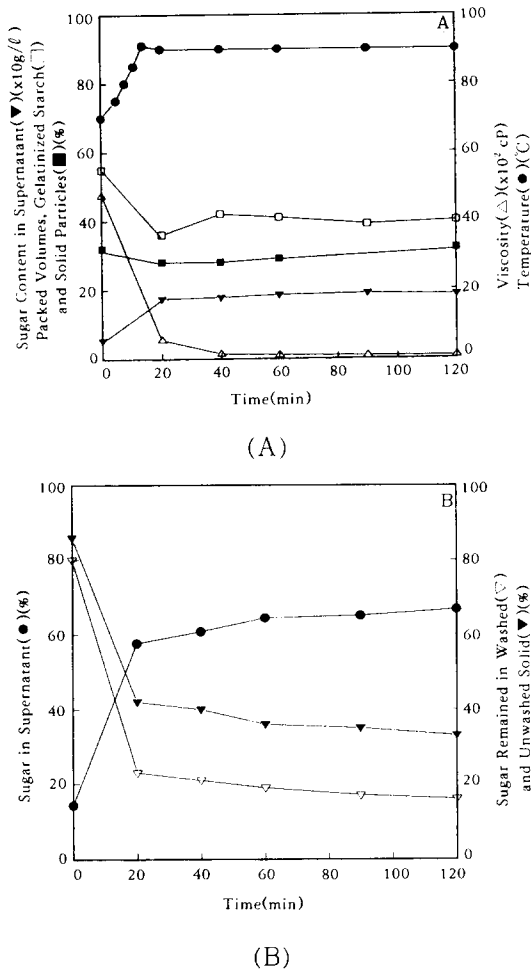


Fig. 5. Liquefaction of tapioca with thermostable α -amylase Termamyl 24uc, $200\mu\text{l}$. Reaction temperature (●), was initially 70°C and was increased to 90°C after the added tapioca was mixed well. (A) Time course profiles for sugar content, packed volumes, viscosity and temperature. Symbols are the same as in Fig.1. (B) Time course profiles for sugar contents. Symbols are: (●), sugar in supernatant (%); sugar remained in washed (▽) and unwashed (▼) solid (%).

음을 막고 교반을 좋게 하고자 하였다. Fig. 5는 Termamyl 24uc을 $200\mu\text{l}$ 첨가하였을 경우인데 온

도가 90°C 로 상승하는대는 약 15분이 소요되었음을 보여준다. 또한 초기 점도가 4500cP 정도로 앞의 Termamyl 24uc $400\mu\text{l}$ 보다 높은 것처럼 나타났으나 실제로는 교반이 훨씬 쉬웠다. 이에 따라 20분이 경과했을 때는 효소량을 두 배나 많이 넣은 $400\mu\text{l}$ 보다 점도의 감소가 보다 현저히 관찰되었다. 한편 젤화된 부분은 120분까지 계속 관찰되었는데 이 양을 앞의 경우와 비교하면 $100\mu\text{l}$ 때보다는 훨씬 적고 $400\mu\text{l}$ 때보다는 많은 양이다. Fig. 5(B)는 세척하지 않은 고형분 속의 당 잔류량을 보여준다. 약 35% 이상의 당이 존재하였다. 그러나 액화의 정도를 나타내는 세척한 고형분 내의 잔류 당량은 약 18%로 나타났다. 반면 용액 내로 용출된 당량은 최고 65% 정도인데 이는 상등액과 고형분을 분획하여 발효를 진행시키고자 할 때 액화 직후의 분획이 적절히 못함을 다시 한번 확인해 주는 결과이다. 또한 세척분과 미세척 고형분의 잔류 당량 차이로부터 미세척 고형분 내 (젤화된 부분 포함)에 존재하는 액화된 당의 양을 추정할 수 있는데 Fig. 5 (B)에 의하면 시간에 따라 약간의 변화가 있기는 하나 그 값도 최초에 넣어준 타피오카 총당량의 약 17% 정도로 상당히 많은 양이었다.

결론적으로 Termamyl은 타피오카의 액화에 매우 효과적이고, 적절한 양은 160g에 대해 최소 24uc짜리 $200\mu\text{l}$ 이상이었다. 이 양을 희석하지 않은 Termamyl 240uc로 환산하면 타피오카 사용량에 대해 0.0125% (v/w)이다 (추후 효소의 사용량을 언급할 때 “타피오카 사용량에 대해”라는 말과 (v/w)를 생략하고 간단히 %로만 표시한다). 또한 비록 90°C 가 전분의 호화를 촉진하고 Termamyl의 활동에 최적이긴 하더라도 점도나 교반효과를 생각하여 초기 온도를 약간 낮추어 액화조를 운전하는 것이 바람직하다는 것을 알 수 있었다.

온도와 pH가 액화에 미치는 영향

Fig. 6과 7은 온도와 pH가 액화에 미치는 영향을 보여준다. 300ml 삼각플라스크에서 Termamyl 240uc을 0.025% 첨가하여 1시간 액화시킨 결과이다. 온도 $70^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$ 범위에서 온도가 올라갈수록 액화가 더 많이 진행됨을 알 수 있다. 이는 Termamyl의 최고 활성이 90°C 이상의 높은 온도에서 나타나는 것(19)외에도 온도가 높을수록 타피오카의 호화가 충분히 진행되는 것과 관계가 있는 것으로 여겨진다. 100°C 에서는 반응액이 끓으며 거품이 많이 발생하였고, 액화가 잘 진행되지 않았다. 용

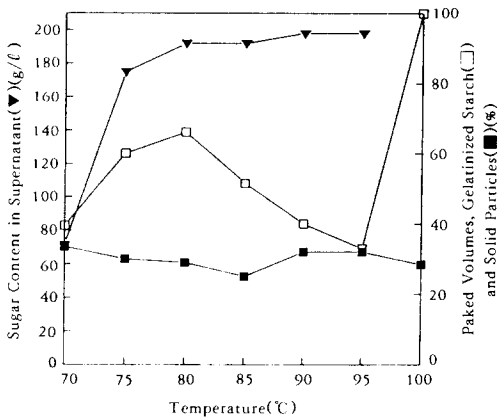


Fig. 6. Effect of temperature on liquefaction. Tapioca slurries were incubated in 300ml Erlenmeyer flasks at pH 5.8 for 1hr. Symbols are the same as in Fig. 1.

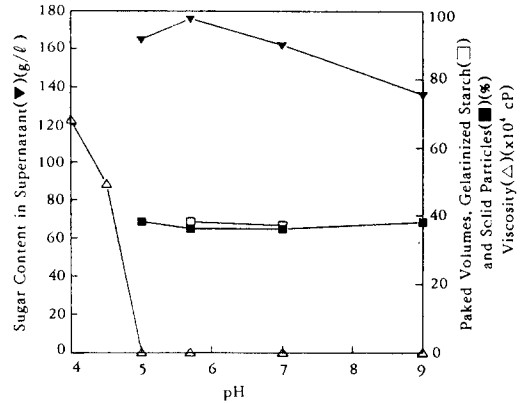


Fig. 7. Effect of pH on liquefaction. Tapioca slurries were incubated in 300ml Erlenmeyer flasks at 90°C for 1hr before analysis. Symbols are the same as in Fig. 1.

Table 1. Comparisons of two saccharifying enzymes, Novo AMG and Do-11 enzyme.

	Assay method	Novo AMG	Do-11 enzyme
α amylase activity	Substrate : starch(1%) Rxn time : 10 min Iodine method	1000 (mg starch disappeared)/ (ml enzyme · min)	3200 (mg starch disappeared)/ (ml enzyme · min)
	Amyloglucosidase activity		
Amyloglucosidase activity	Substrate : maltose(1%) Rxn time : 30 min Glucose oxidase(GO) method	165 (mg glucose formed)/ (ml enzyme · min)	140 (mg glucose formed)/ (ml enzyme · min)
	Substrate : starch(2.5%) Rxn time : 60 min Glucose oxidase(GO) method	4000 (mg glucose formed)/ (ml enzyme · min)	2500 (mg glucose formed)/ (ml enzyme · min)

액이 끓으면서 Termamyl을 급격히 실패시켰기 때문으로 추정된다. 한편 젤 함량은 80°C 부근에서 약 65%로 부분적인 최대값을 보이는데 이는 반응온도의 증가에 따라 전분의 소화속도는 급속히 증가하는 반면 Termamyl에 의한 분해속도는 보다 천천히 증가하기 때문으로 판단된다.

pH는 6 근처가 최적이었다 (Fig. 7). 타피오카를 물에 현탁시키면 대개 5.8~6의 pH가 얻어지므로 따로 pH를 조절할 필요가 없음을 알 수 있다. 한편 pH 4.5 이하에서는 전혀 액화가 일어나지 않고 원심분리시 맑은 상등액이 얻어지지 않았다. 타피오카

슬러리는 많은 오염균을 포함하고 있고 상온에서 24시간 이상 방치할 때 생성되는 유기산의 영향으로 pH가 5 이하로 급속히 떨어지므로, 연속운전을 위해 타피오카 슬러리를 장시간 방치하여야 할 경우 pH 하락에 특별한 주의가 필요하다고 하겠다.

효소의 첨가량 및 종류가 당화에 미치는 영향 타피오카 액화액을 이용하여 당화실험을 행하였다. 타피오카의 액화는 90°C에서 효소를 0.025% 첨가하여 2시간 동안 행하였다. Table 1은 Novo Nordisk사의 상품명 AMG와 국내 도일산업 당화효

소를 비교한 결과를 보여준다. 전분을 기질로 요오드법을 사용하여 α -amylase 활성을 측정하였을 때 Novo AMG는 약 1,000 (mg starch disappeared)/(ml enzyme · min)의 활성으로 Novo AMG보다 3 배 이상 높다.

한편 amyloglucosidase 활성은 말토오스와 전분을 기질로 각각 측정하였는데 말토오스를 사용할 때 보다는 전분을 기질로 사용할 때가 효소 활성이 20 배 이상 높게 관찰되었다. 이는 말토오스보다 전분이 amyloglucosidase의 훨씬 좋은 기질임을 보여준다. 각각의 기질에 대한 두 효소의 amyloglucosidase 역가를 비교하면 말토오스 기질일 때는 Novo : 도일이 약 1 : 0.85이고, 전분 기질일 때는 약 1 : 0.63이었다. 이는 두 효소간의 성질에 차이가 있음을 시사한다.

NOVO사 AMG를 이용한 실험

Fig. 8은 Novo AMG 400uc을 $25\mu\text{l}$ (0.0156%), $50\mu\text{l}$ (0.0313%), 그리고 $100\mu\text{l}$ (0.0625%) 첨가하였을 때 상등액 및 고형분에서 당의 변화를 보여준다. 당화온도는 모두 $58 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. 상등액 속의 당은 glucose oxidase법을 이용하여 포도당을 선택적으로 측정하였고, 고형분 속의 당은 고형분을 증류수로 두 번 세척하고 액화 및 당화처리를 충분히 한 후 DNS법으로 측정하였다. 그림에서 알 수 있는대로 세 경우 모두 반응 초기에는 상등액 내의 포도당 농도가 급격히 증가하나 대략 4시간을 전후해서 증가 속도가 현저히 감소한다. 이는 이미 잘 알려진 대로 고농도의 포도당이 당화 효소의 활성을 되먹임 방해 때문으로 여겨진다 (12-14). 또한 당화속도는 효소 첨가량의 증가에 따라 증가한다. 특히 $25\mu\text{l}$ 에서 $50\mu\text{l}$ 로 효소량을 변화시켰을 때 초기부터 당화속도가 크게 차이가 났다. 5시간을 기준으로 할 때 상등액 내 포도당의 농도가 $25\mu\text{l}$ 의 경우는 $27\text{g}/\ell$, $50\mu\text{l}$ 의 경우는 $60\text{g}/\ell$, 그리고 $100\mu\text{l}$ 의 경우는 $80\text{g}/\ell$ 로 각각 얻어졌다. 17시간을 기준으로 할 경우에도 $25\mu\text{l}$ 는 $75\text{g}/\ell$, $50\mu\text{l}$ 는 $105\text{g}/\ell$, 그리고 $100\mu\text{l}$ 는 $118\text{g}/\ell$ 로 차이가 현저 하였다. 그러나 40시간 이상 오랫동안 반응을 계속할 경우 최종 포도당 농도는 모두 $120 \sim 130\text{g}/\ell$ 범위에 도달했다. 전체적으로 액화실험 결과와 비교할 때 상등액 중의 최종 당량이 현저히 낮는데 그 이유는 당화실험에서는 당화반응 결과 생성된 포도당의 농도만을 glucose oxidase 법으로 측정하는데 반해, 액화실험에서는 타피오카 슬러리 상등액

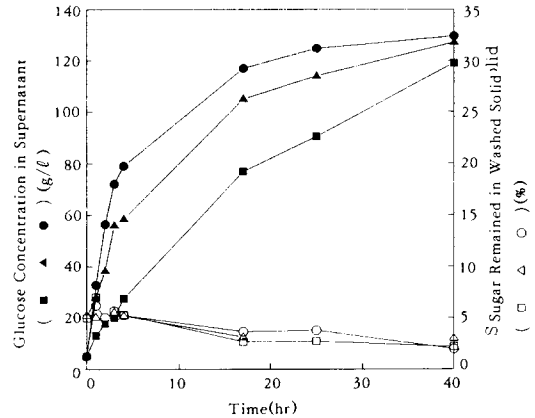


Fig. 8. Saccharification of liquefied tapioca solution with varied amount of Novo AMG 400 ℓ , $25\mu\text{l}$ (□, ■), $50\mu\text{l}$ (△, ▲), and $100\mu\text{l}$ (○, ●). Closed symbols denote glucose concentration in supernatant and open symbols sugar content in solid.

을 취하여 충분히 당화시킨 후 DNS법으로 총 환원당의 농도(포도당 당량)를 측정하였기 때문이다. 잘 알려진대로 여러 환원당들은 DNS시약에 대해 각각 specific absorbance가 다르고 타피오카 당화액 속에는 포도당 이외에도 여러 환원당이 존재한다.

Fig. 8은 고형분 내에 존재하는 당량도 보여준다. 효소 첨가량에 관계없이 모두 당화초기 6%의 수준에서 완만한 속도로 감소하여 40시간 반응 후 약 2%에 도달했다. 이에 비해 상등액 중의 포도당 농도는 급격히 증가하므로 대부분의 당은 액화 단계에서 이미 수용액 상이나 물에 쉽게 녹을 수 있는 형태로 변화하였음을 알 수 있다. 또한 packed volume은 효소 사용량에 관계없이 약 38~40%를 유지하였다. 이 값은 액화시 나타난 32~36%보다 높은 값인데, 타피오카 고형분이 수용액을 계속 흡수하여 그 부피가 증가하였다는 뜻이다. 그러나 고형분을 증류수로 두 차례 세척하고 건조시켜 무게를 측정한 결과 10ml 슬러리당 0.3~0.4g로 전체부피의 3~4%에 불과하였다. 이는 타피오카 고형분이 다공질 섬유로서 그 자신의 중량의 약 10배나 되는 많은 용액을 함유하고 있다는 뜻이다. 그리고 타피오카 고형분이 함유한 용액은 그 구성에 있어 상등액과 거의 동일하다는 뜻이다. 이러한 결과는 연속화 공정에서 타피오카 고형분을 제거하는데 큰 장애가 된다. 왜냐하면 연속발효의 효율을 증대시키기 위해

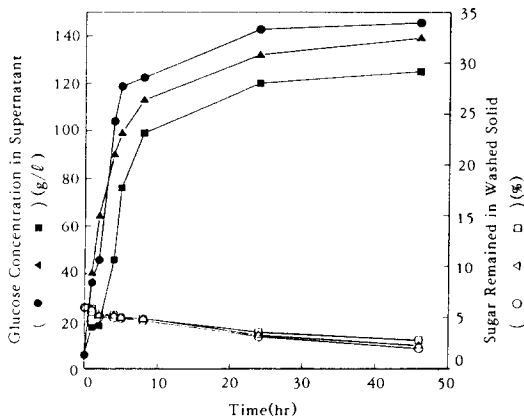


Fig. 9. Saccharification of liquefied tapioca solution with varied amount of Do-II enzyme, 75 μ l (□, ■), 50 μ l (△, ▲), and 100 μ l (○, ●). Closed symbols denote glucose concentrations in supernatant and open symbols sugar contents in solid.

원심분리 방법을 이용하여 고형분을 제거하면 고형분과 함께 30~40%의 당을 잃게 되기 때문이다.

도일 산업 당화효소를 이용한 실험

Fig. 9는 도일산업 당화효소를 75 μ l, 150 μ l, 300 μ l 첨가하여 경시적인 당화과정을 관찰한 것이다. 앞서 언급한 대로 전분이 기질일 때 glucoamylase 활성은 Novo AMG가 약 1.5배 높으므로 도일 당화효소 75 μ l 와 150 μ l 는 각각 Novo AMG 50 μ l 와 100 μ l 에 상응한다고 볼 수 있다. Fig. 9의 전체적인 경향은 앞서의 Fig. 8과 거의 일치하나 전반적으로 당화속도가 빠르다. 5시간 경과후 75 μ l 에서는 75g/l, 150 μ l 에서는 90g/l 로 같은 효소활성을 보이는 Novo AMG에 비해 각각 25% 및 13% 가량 증가된 당화속도를 보여준다. 시간이 지날수록 그리고 효소 첨가량이 증가할수록 두 효소간의 차이는 줄어들며, 일반적으로 많이 사용되는 농도와 반응 시간에서 두 효소의 차이는 상당히 주목할 만하다.

이러한 차이의 원인으로는, 첫째, 분석용으로 쓰이는 시약급 전분에 대해 얻은 효소활성이 타피오카 같은 공업용 전분에 그대로 적용되지 않을 가능성과, 둘째, 도일산업 당화효소 내에 glucoamylase 이외의 다른 효소들이 들어 있어서 당화속도를 보다 빠르게 했을 가능성 등이다. 첫번째 가능성은 앞서 언급한 Table 1의 당화효소간의 비교에서 어느 정도

뒷받침된다. 즉 효소활성 측정의 기질로 전분을 사용하면 효소용액 단위부피당 Novo AMG가 도일산업 당화효소에 비해 활성이 약 1.5배 가량 되지만 기질로 말토오스를 사용할 경우에는 Novo AMG가 단지 1.2배 정도밖에 되지 않는다는 사실이다. 타피오카 액화액 속에 다량의 oligomer가 들어 있는 것을 상기할 때, 실제 당화효소가 작용하는 기질은 전분보다 이당류인 말토오스에 더 가까웠다는 뜻이다.

한편 두번째 추정 원인도 즉 Table 1에 의해 어느 정도 뒷받침된다. 전분을 기질로 하여 α -amylase 활성을 측정하면 도일당화 효소가 Novo AMG에 비해 약 3.2배 높게 나타난다. 따라서 이러한 높은 α -amylase 활성이 비교적 중합도가 높은 oligomer나 전분을 분해하여 당화 속도를 빠르게 해 주었을 가능성이 있다. 도일 당화효소 α -amylase활성의 절대 크기는 3200 (mg starch disappeared)/(ml enz · min)로 이는 액화반응에 사용한 Termamyl과 비교해도 결코 작지 않은 값이다 (좀더 구체적으로 비교해 보면 타피오카의 액화를 위해 사용된 Termamyl 0.025% (v/w)는 분당 약 960mg의 starch를 액화할 수 있는 양이다. 이에 대해 도일 당화효소 75 μ l 에 포함된 α -amylase 활성은 분당 약 240mg의 starch를 액화할 수 있는 양으로, Termamyl 0.025% (v/w) 속에 들어 있는 활성의 약 25%에 이른다.). 그러나 보다 자세한 원인은 도일 당화효소의 완전한 분리정제와 효소 특성 규명을 필요로 한다.

Novo AMG와 비교하여 도일 당화효소도 매우 우수하였다. 그러나 장시간 상온 보존시 쉽게 변질되었으므로 (실험결과는 보이지 않음) 추후 실험에는 Novo AMG를 사용하였다.

온도와 pH가 당화에 미치는 영향

Novo AMG를 사용하여 온도와 pH가 당화에 미치는 영향을 조사하였다. 온도의 영향은 300ml 삼각플라스크를 사용하여 45 $^{\circ}$ C~70 $^{\circ}$ C 범위에서 5시간 진탕 후 조사하였다 (Fig. 10). 55~60 $^{\circ}$ C에서 제일 좋은 결과가 얻어졌다. 비록 짧은 시간 반응시 최대 활성은 75 $^{\circ}$ C 부근에서 얻어지지만 장시간 반응에 따른 효소의 실패때문에 55~60 $^{\circ}$ C가 최적의 결과를 보인 것으로 여겨진다 (20).

한편 말토오스를 기질로 사용할 때 최적 pH는 4.3 부근이므로 (20) 본 실험에서는 액화 후 pH를 4.3으로 조절한 경우와 조절하지 않은 경우 (pH 5.7)를 비교하였다. AMG 첨가량은 0.0313%였다. Fig. 11에 보인대로 pH 변화는 당화에 거의 영향을 주지

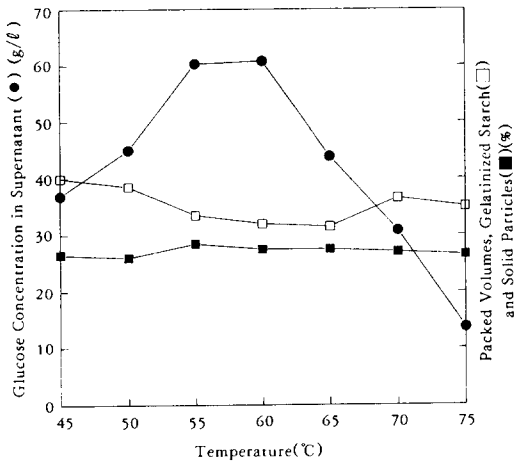


Fig. 10. Effect of temperature on saccharification of liquefied tapioca solution. The reaction was carried out in 300ml Erlenmeyer flasks for 5hr.

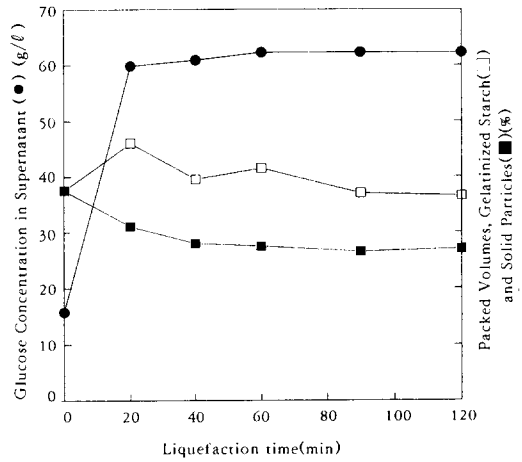


Fig. 12. Effect of liquefaction on saccharification. During liquefaction tapioca solution was taken at every 20 or 30 min, then incubated at 58°C with Novo AMG for 5hr.

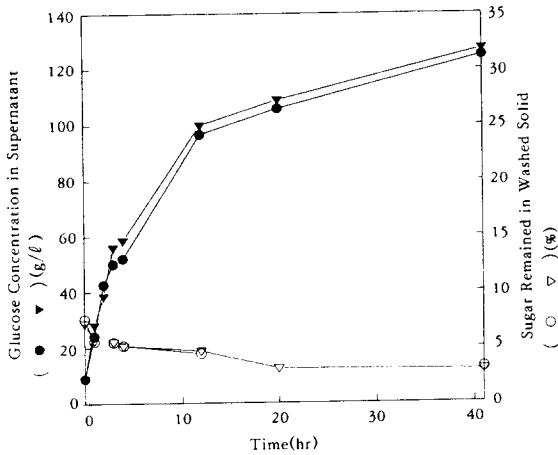


Fig. 11. Effect of pH on Saccharification of liquefied tapioca solution. Symbols are: (▽, ▼), pH 5.7; (○, ●), pH 4.3. Closed symbols denote glucose concentration in supernatant and open symbols sugar content in solid.

않았다. 이 결과는 기질의 종류에 따라 당화효소의 최적 pH가 바뀔 수 있음을 뜻한다. 또한 실제 공정에서 액화를 마친 후 별도의 pH 조절없이 당화공정을 진행해도 좋다는 뜻이다.

액화시간이 당화에 미치는 영향

앞서 효소 첨가량 실험에서도 언급하였듯이 고�형분 속의 불용성 전분은 액화과정 동안보다 작은 분자량의 당으로 분해되어 대부분 수용액 상으로 이동하고, 당화과정에서는 주로 젤이나 수용액 상에 존재하는 oligomer들이 포도당으로 전환된다. 따라서 액화시간이나 액화효소의 양이 충분치 못해 액화과정에서 고�형분 속의 전분이 충분히 수용액 상으로 이동하지 않으면, 당화 과정에서의 반응속도는 저하될 것이 예상된다. 본 실험에서는 액화 과정에서의 시간 변화가 다음 단계인 당화 과정에 어느 정도 영향을 미치는가 조사하였다.

타피오카 슬러리의 조성은 앞서의 실험들과 동일하였고, Termamyl은 0.025%가 사용되었다. t=0의 시료는 58°C에서 Termamyl과 AMG를 동시에 넣어 주었고 나머지는 타피오카 슬러리에 Termamyl을 넣고 액화 반응을 개시한 후 약 20~30분 간격으로 시료를 채취하여, Novo AMG 0.0313%를 첨가하여 58°C에서 5시간 반응시켰다. 그리고 상등액에 존재하는 포도당 농도를 glucose oxidase법으로 분석하였다. Fig. 12가 보여 주듯이 액화를 전혀 시키지 않은 경우(t=0)를 제외하고 20분 이상 액화반응을 시킨 경우 액화시간 증가에 따른 포도당 농도의 증가는 매우 완만하였다. 그러나 액화를 충

분히 시키지 않은 경우 5시간 당화반응 후에도 젤 함량과 고형분 함량이 여전히 높았다. 특히 Fig. 4 (A)에서는 약 90분 액화 후 젤 부분이 모두 소실되었지만 당화실험에서 다시 나타난 것은 당화조의 온도하락에 따른 것이다. 젤 함량이 높다는 것은 당화액 내에 존재하는 총 포도당의 양, 즉 발효조로 이송될 때 효모가 당장 이용할 수 있는 포도당의 양이 매우 낮다는 뜻이다. 따라서 Termamyl이 0.025 (v/w)% 사용되는 조건에서 액화시간은 최소한 80분 이상이 되어야 한다고 결론 지을 수 있었다.

요 약

액화 실험에서 BAN과 Termamyl을 비교할 때 전반적으로 Termamyl이 우수했으며 Termamyl을 0.00625%~0.025% 범위로 첨가하였을 때 첨가량 증가에 따른 액화반응 촉진이 뚜렷이 관찰되었다. Termamyl 240uc의 경우 타피오카에 대해 최소 0.0125 (v/w)% 이상이 필요하였고, 반응시간은 2시간 정도가 적당하였다. 최적온도는 90℃~95℃이었고 pH는 5.8 부근이 최적이었다. 반응초기 점도가 매우 높게 나타나는데 호화속도를 약간 줄이기 위해 초기 온도를 70℃ 정도로 낮추는 것이 좋았다.

당화실험에서는 Novo AMG 및 국내 도일 산업 당화효소 모두 액화된 타피오카 용액을 잘 당화시켰다. 그러나 Novo AMG와 도일 당화효소의 활성은 기질에 따라 약간씩 달랐다. 즉 이당류인 말토오스를 기질로 할 때는 Novo AMG의 단위 부피당 활성이 도일 당화효소의 약 1.2배이었으나, 전분을 기질로 할 때는 활성비가 1.5배였다. 경시적으로 볼 때 초기에는 당화속도가 빨랐고 포도당이 축적되는 후기에는 당화속도가 감소하였다. 당화의 최적온도는 약 55~60℃ 부근이었고 pH는 조절하지 않는 경우 (pH 5.7)와 조절한 경우 (pH 4.3)간에 차이가 없었다. 85% 이상의 당화를 위해서는 타피오카 사용량에 대해 Novo AMG 400uc을 기준으로 0.0625(v/w)% 이상, 그리고 10시간 이상의 반응시간이 필요하였다.

감 사

본 연구는 통상산업부 산하 에너지관리공단 부설 에너지 자원기술개발지원센터 및 일주 문화재단의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

또한 실험에 많은 도움을 주신 일산실업(주)의 남기두님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Novo File IB 237a-GB(1977), *Fuel Ethanol from Agriculture Crops-A review*.
2. H. Wayman, S. Chem, R. S. Parkekh and S. R. Parekh(1988), *Starch*, **40**, 270-275.
3. D. D. Spinder, C. E. Wyman and K. Grohman (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 189-195.
4. S. K. Garg and H. W. Doelle (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 948.
5. H. C. Chen and D. G. Mou (1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**, 367-372.
6. C. Lafforgue-Delorme, P. Delorme and G. Goma (1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 741-746.
7. D. M. Comberbach and J. D. Bu'Lock (1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 129-134.
8. K.-D. Nam, I.-K. Lee, H.-H. Cho, M.-H. Choi and W.-S. Kim (1992), *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 324-328.
9. C. W. Lee and H. N. Chang (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 1105.
10. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1978), *Biotechnol. Bioeng.*, 1421.
11. G. R. Cysewski and C. R. Wilke (1976), *Biotechnol. Bioeng.*, 1297.
12. D. H. Kim (1988), *식품화학*, 제7장 전분의 호화, 노화 및 호정화, pp. 287-313, 탐구당.
13. T. Galliard (1987), *Starch: Properties and Potential* (Critical Reports on Applied Chemistry Vol. 13), John Wiley & Sons, New York.
14. D. H. Ahn and H. N. Chang (1991), *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 497-503.
15. M. Bae and J. M. Lee (1983), *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 181-186.
16. G. L. Miller (1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426-428.
17. J. W. Yun, J. S. Noh, J. Y. Song and S. K. Song (1994), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 122-126.

18. Novo Enzyme Catalogue-BAN (1978), Novo Industries, Denmark.
19. Novo enzyme Catalogue-Use of Termamyl for Starch Liquefaction (1984), Novo Industries, Denmark.
20. Novo Nordisk Product Sheet (B02 OK-GB3000)-AMG(1990), Novo Nordisk A/S, Denmark.