



알코올 발효기술



남 기 두
(일산실업(주) 생산이사)

■ 목 차 ■

I. 서 론

II. 알코올 발효기술

1. 종효모 배양과 육종
2. 알코올 발효에 이용되는 효소
3. 원료 전분의 특성과 분쇄
4. 증자와 당화
5. 알코올 발효 및 생산성 평가
6. 알코올폐액의 처리기술

III. 맷음말 및 제언

I. 서 론

국내 알코올공업은 주류공업의 발전으로 요약할 수 있다. 특히 주정공업의 발전은 농업정책과 국민보건 차원에서 원료의 배정, 공동 주정판매 및 가격 고시제 등 제한적인 규제 하에서도 괄목할 만한 성장을 거듭해 왔다.

내년부터 주정수입 및 시장이 완전 자율화됨으로서 무한경쟁시대를 앞두고 있다. 경쟁력 우위를 확보하기 위해서는 주질 향상과 더불어 생산원가 절감이 필수적이다. 생산원가절감은 저렴하고 안정적인 원료수급이 중요한 핵심관리요인이다. 그 외 utility 및 효율적인 공정개선과 더불어 주질향상으로 주정시장 개방과 자유화에서 대응하는 것만이 유일한 생존전략이다. 따라서 주정산업의 무한경쟁시대를 맞아 품질 및 가격 경쟁력을 확보하기 위해서는 꾸준한 기술개발과 적절한 시설투자가 병행되어야 가능하다.

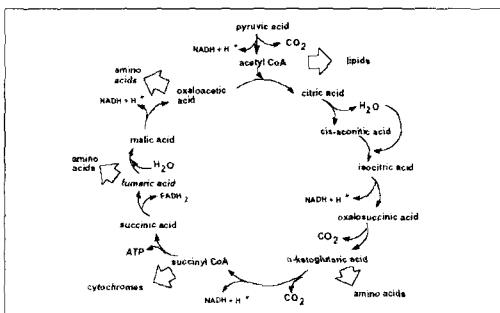
이제 주정산업의 자유화는 품질과 가격경쟁력에서 우위 확보 경쟁과 함께 신규 소비창출을 위하여 주류용 이외 산업용 및 기타 주정의 소비분야에도 관심을 가져야 할 때이다. 따라서 그동안 알코올 산업의 기술개발에 관련하여 전반적인 기술 현황을 review해 보고, 지속적

인 R&D투자에도 관심을 가져 우리나라 주정산업의 발전적 계기가 되기를 기대한다.

II. 알코올 발효기술

1. 종효모 배양과 육종

효모는 배양용 산업기질에 yeast를 호기적인 조건으로 배양시키면 효모가 TCA cycle[그림 1]을 통해 원료기질을 CO_2 와 H_2O 로 분해한다. 이때 유리되는 Energy로서 Cellmass가 증가하게 된다. 배지는 주모용 증자기에서 발효와 동일한 방법으로 증자를 하며, 증자조건은 TS¹⁾ 농도를 10~12%, 압력 증자($2\text{kg}/\text{cm}^2$)를 하는 것이 좋다. *S. cerevisiae*를 이식한 후 원료에 따라 20시간 전후 대수증식기에 도달하며 이때 균체농도는 $40\sim60\times10^6 \text{ cells}/\text{ml}$ ($0.26\text{mg DMS}/10^7\text{cells}$)에 상당한다.



[그림1] TCA회로에서 38 ATP가 생성된다

당사는 기술연구소에서 분리한 생산성이 우수한 균을 사용하고 있으며 균주개발에도 심혈을 기울이고 있다[그림 2]. 최근에는 유전자 조작을 통한 육종균종이 보고되고 있으며, 전분을 직접 발효할 수 있는 *S. diastaticus*는 당화효

소를 분비하여 당화효소를 사용하지 않고 전분을 일부 직접 알코올로 전환시킬 수 있으나 산업적으로 이용은 현재 불가능한 실정이다. 효모 외에 *Zymomonas mobilis*는 glucose를 절대 협기적 조건하에서 알코올로 신속히 발효시킬 수 있으며, 지금까지 가장 높은 알코올생산성을 얻었다고 보고되고 있다.



[그림2] 클린벤치에서 알코올발효 균주의 분리, 탐색 및 알코올 발효능력 검정용 Jar fermentor

효모는 알코올발효 능력이 있는 것과 없는 것으로 대별할 수 있다. 사용원료의 종류와 기질 농도에 따라 적절한 효모를 선택하여 사용해야 한다. 최근에는 유전자 조작으로 내알코올성, 내산성 등 산업균주의 개량을 시도하고 있다. Promoter-probe vector를 이용하여 promoter 활성을 가진 DNA 단편을 스크리닝하고 β -galactosidase, galactokinase 등의 reporter 유전자의 활성 측정계를 이용한 강력한 promoter를 선별하여 유전자의 발현을 올리고자 하는 시도가 이루어지고 있다. *Aspergillus oryzae*의 α -amylase와 glucoamylase 활성을 가진 효모 또는 esterase gene disruption에 의한 higher aroma 균주개발 등 육종이 시도되고 있다. 뿐만 아니라 섬유소 발효성 효모 개량 및

1) Total sugar : 총당, 산 및 효소당화법으로 분석

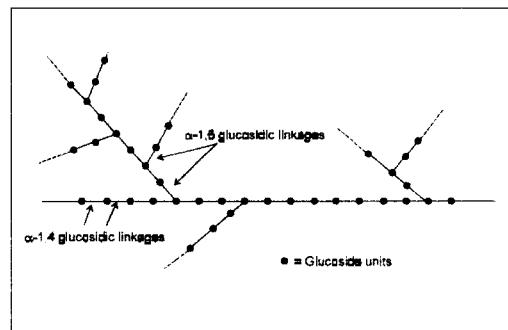
무증자 생전분 원료의 높은 생산성을 얻기 위하여 생전분을 직접 알코올로 전환할 수 있는 *S. diastaticus*의 육종, 즉 amylase나 glucoamylase를 생산할 수 있는 유전자 재조합 균주 개발이 진행되고 있다. 효모 외에 알코올 발효 능력을 가진 세균으로써 *Z. mobilis*가 있으며 이 균주는 glucose 1 mol 당 1 mol의 ATP를 생산하는 ED pathway²⁾를 경유하여 glucose를 절대 혐기적 조건하에서 알코올 생산속도가 빠른 특성을 가지고 있어 에너지 이용 효율뿐만 아니라 알코올생산성도 효모에 비하여 높다고 보고되고 있다. 그러나 호기적 조건하에서는 aldehyde와 acetic acid를 기질 내에 축적하여 균체의 성장과 알코올 생산성이 감소하므로 산소의 소비 및 전달율과 교반속도에 관련한 연구가 보고되고 있으나 *Saccharomyces*속 외에는 아직 상업적으로 이용되지 않고 있다. 효모는 발효 과정에서 기포를 많이 발생시키는 효모가 있는 반면 억제하는 효모에 대한 연구도 진행되고 있다.

당밀 등 당질원료를 이용하여 알코올발효를 할 경우에는 당화공정이 필요 없으며 주성분인 이당류를 직접 발효하는 균주를 사용한다. 또한 연속 알코올발효를 수행하거나 균체를 회수하여 재 사용하는 공정일 경우 수용성 총 고형분의 농도가 증가하여 발효조 내 삼투압이 회분식보다 높게 운전된다. 따라서 내삼투압 효모인 *Schizosaccharomyces pombe*가 이용되고 있다. 이외에도 다양한 biomass 전환 당액 중 5탄당은 효모가 분해 이용하지 못한다. 그러나 이성화 효소의 존재 하에서는 D-xylose로부터 많은 효모들이 알코올을 생산할 수 있으며 D-

xylose를 D-xylose isomerase로써 xylulose로 전환시키면 80%이상 알코올전환이 가능하다. *Pachysolen tanophilus*는 소량의 산소 존재 하에서 D-xylose를 발효하는데 산소가 부족하면 알코올 수율이 감소되는 반면에 xylitol의 수율은 증가한다는 것이 입증된 바 있고, 최근에 *Candida shehatae*, *Pichia stipitis*가 *P. tanophilus*보다 빠른 알코올 생산과 내알코올성이나 산소전달율에 의하여 알코올 생산 수율과 성장율이 영향을 받는다고 보고되고 있다. 그러나 5탄당의 알코올 발효균주는 산업적 기질농도(총당 약 20%)에 적용하기 까지는 극복해야 할 과제가 아직 많이 남아 있는 실정이다.

2. 알코올발효에 이용되는 효소

전분은 증자과정에서 단단한 입상구조가 붕괴되어 가수분해효소에 의하여 비활원당 말단에서부터 amylase 종류[그림 3]에 따라 포도당, 과당 또는 맥아당 등 발효성 당분으로 가수분해시킨다. 알코올 공업에 이용되고 있는 상업용 효소의 특성은 다음과 같다.



[그림3]Amylose와 amylopectin의 구조식

2)Entner-Doudoroff pathway

①액화효소 : endo type enzyme으로 전분의 긴 α -1,4 glucosidic linkage의 glucose chain에 무작위로 작용하여 저분자 물질 즉 oligodextrin으로 분해된다. 그러므로 slurry의 점도가 급격히 떨어지는데 이를 액화라 하며 이 효소를 액화효소(α -1, 4-glucan 4-glucanohydrolase)라 한다. 1980년 이후 내열성 액화효소가 개발 보급됨에 따라 알코올 발효 기술이 한 단계 발전하는 계기가 되었다.

②당화효소 : 당화형 효소로는 β -amylase와 glucoamylase가 상업적으로 이용되고 있다. β -amylase는 exo type enzyme으로 전분의 비환원성 말단에서부터 α -1,4 glucosidic linkage를 분해하여 maltose를 생산하나 α -1,6 glucosidic linkage에서 작용이 중지되어 limit dextrin을 생성한다. Glucoamylase 혹은 amyloglucosidase(AMG)도 exo type enzyme으로서 전분의 비환원성 말단에서부터 glucose단위로 분해하여 α -1,6 glucosidic linkage를 분해할 수 있으나 α -1,4 glucosidic linkage의 분해속도보다는 매우 느리고 온도에 매우 민감하여 60°C에서 불활성화 되기 시작하며 최적 pH는 4~4.5 범위이다.

이외에도 fungal amylase나 pullulanase 등이 이용되고 있는데 pullulanase는 debranching enzyme로서 α -1,6 glucosidic linkage를 분해할 수 있으므로 당화공정에 이용하면 glucose 수율 증가가 가능하다. 효소제는 α - 및 β -amylase, amyloglucosidase 등 당화형 효소 외에도 부수적으로 protease 등 미량 효소들이 포함되어 있다. 또한 배양 과정에 생산된 구연산 등 유기산류로 인한 높은 산도 때문에 알코올발효에 있어 잡균의 오염 방지 효과가 있어 종류식 소주 제조와 알코올발효 공정에 조효

소제(분국)가 많이 사용되고 있다[그림 4].



[그림4] 국내 주정발효용으로 공급되고 있는 조효소제

특히 알코올발효 초기 효모수가 대수기에 도달하는 24시간 전후에는 발효 mash의 pH가 4.0까지 떨어지는데 이때 조효소제는 탁월한 내산성 당화력을 보이고 있어 취급이 불편하고 투입할 때 오염 기회가 많음에도 불구하고 쌀보리나 겉보리 등 국산 원료의 주정발효 mash의 당화에 조효소제의 사용 비율이 높은 실정이다.

최근 미국 Alltech Inc.사에서는 옥수수피로 써 만든 조효소제(Rhizozyme)를 광범위하게 사용하고 있으며 이 효소제 사용으로 수율을 크게 향상시키고 있는 실정이다.

3. 원료 전분의 특성과 분쇄

전분은 식물의 중요한 저장 영양물질로서 원료에 따라 특유한 입상구조를 가지고 있으며 물과 열에 의하여 micellar 구조가 붕괴되며 amyloytic enzyme의 가수분해로 환원당을 획득할 수 있다. Amylase는 전분 가수분해를 촉매하거나 분해를 가속화하는 효소로서 amylase 작용기작을 이해하기 위해서는 전분의 구조적 특성을 이해하는 것이 중요하다. 전분은 glucose 분자가 α -1,4 glucosidic

linkage를 가진 linear polymer인 amylose (α -D-glucan)와 α -1,4 glucosidic chains에 약 5%의 α -1,6 glucosidic linkage를 가진 branched polymer인 amylopectin으로 구성되어 있으며, 분자량과 중합도는 전분을 함유하고 있는 원료에 따라 다르다.

전세계적으로 가장 풍부한 상업용 곡물은 옥수수이며 동남 아시아에서는 cassava가 중요한 전분 공급원이다. 옥수수 전분은 73% amylopectin과 27% amylose로 구성되어 있으나 찰옥수수의 경우 거의 대부분이 amylopectin이다. 식물계에서 가장 풍부한 biopolymer로서 glucan 외에 -1,4 glucosidic linkage인 cellulose는 에너지 및 재생산 가능한 탄소원으로서 가장 큰 이용 잠재력을 가지고 있다. 이 외에도 벚꽃, 밀집, 폐지, 톱밥 및 bagasse³⁾등은 대량 수거가 가능하여 공업적으로 이용 가능하여 현재 산 또는 효소적 가수분해를 통해 약 60%의 당전환율을 얻을 수 있으나 아직은 경제성이 없는 실정으로, 보다 경제적인 당 전환 방법과 강력한 효소 개발이 필요하다. 전분은 증자 혹은 가열에 의하여 starch granule이 amylosotic enzymes 등에 의하여 쉽게 이용될 수 있는 상태로 전환되는데 열처리되지 않은 것은 인간의 소화 기관에서도 소화 흡수율이 떨어지는 바와 마찬가지로 알코올발효에 있어서도 수율에 큰 영향을 미친다.

생전분 분해력이 강한 효소 또는 직접 알코올 발효를 할 수 있는 효모 개발이 시도되고 있으나 당화효소를 경제적인 수준까지 대체할 수 있는 우량 균주의 개발은 아직 미흡한 실정이다. 그러나 유전자 기법을 도입한 균주육종 연구가

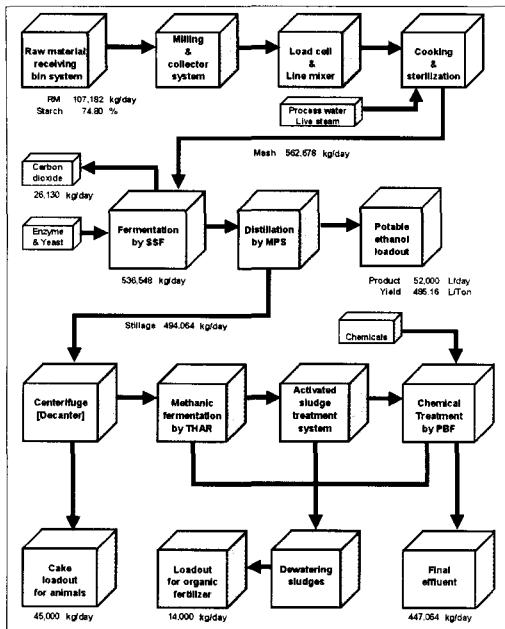
상당히 진행되어 당화효소 사용량의 일부 대체가 가능한 균주의 실용화가 예상된다.

목질계의 주성분은 40~55% cellulose, 24~35% hemicellulose, 18~25% lignin으로 구성되어 있어 cellulase가 작용하기 어려운 고차구조이다. 따라서 효율적인 발효성 당획득을 위한 전처리 방법으로서 고온에서 산가수분해법이 이용되고 있다. 이 공정에서는 효모 대사에 저해작용을 하는 바람직하지 않은 반응 부산물이 생성되는 반면 당회수율은 높다.

효소적 가수분해법은 분해율이 낮고 어려울 뿐만 아니라 효소가격 또한 비싸고, 이를 효소를 공정에 재 이용하기 어려운 단점이 있다. 그러나 고온고압(200°C/17kg/cm²)에서 폭쇄처리를 하면 대부분 수용성 hemicellulose와 methanol, 묽은 알칼리 용액에 가용성인 lignin으로 저분자화되어 cellulase 등 효소적 당화가 쉬운 상태로 전환된다. 또한 유전자 조작에 의하여 cellulose를 이용하는 *Clostridium acetobutylicum*의 cellulase gene을 *Escherichia coli*에서 발현을 시도하였으며, *C. thermocellum*, *C. stercorarium* 등은 cellulase 효소의 높은 활성과 안전성 때문에 많은 연구 대상이 되고 있다. 그리고 *C. thermocopriae* sp. nov. JT3-3가 생산하는 endo-cellulase, β -glucosidase 및 β -xylosidase의 특성, 내열성 협기성 균주가 생산하는 cellulase, 임계 탄산 가스에서 α -amylase와 glucoamylase에 의한 전분의 가수분해 등 많은 연구가 시도되고 있다.

알코올제조 공정은 원료의 분쇄, 증자, 당화, 발효, 증류 및 폐수처리 공정으로 구분할 수 있다[그림 5]. 분쇄는 원료의 전처리 공정으로서

3) 사탕수수의 착즙과정에서 부생되는 조선유질-연료 및 퇴비로서 사용됨



[그림5] 일산실업(주)부산주정공장의 Block diagram
 SSF simultaneous saccharification and alcohol fermentation
 MPS multi-pressure system for alcohol recovery
 THAR thermophilic hybrid anaerobic reactor for methanic fermentation
 PBF pregenerated bubble floatator for separation the flocculation

분쇄입도는 증자와 발효 효율에 영향을 미친다. 분쇄기의 종류는 roll-mill, impact grinder, hammer 형이 있는데 주정공장에서는 hammer mill 분쇄기를 사용하여 겉보리 작업시 screen은 $\Phi 2^6\text{mm}$, 그 외의 원료는 Φ

2^3mm 을 사용한다.

분쇄된 가루의 입도는 가능한 미분쇄하는 것이 효과적이다. 그러나 과도한 미분쇄는 많은 동력이 소요되므로 원료의 전분 특성에 따라 적당한 분쇄기의 망을 선택하는 것이 바람직하고, 대개 고른 분쇄 입도를 얻기 위하여 beater 혹은 shifter를 사용할 경우 분쇄기의 망은 원료에 관계없이 1.8~2.3mm의 동일한 것을 사용하여도 무방하다.

4. 증자와 당화

증자의 목적은 전분질원료의 경우 slurry를 가열하여 전분의 호화과정(수화→팽윤→전분입자 붕괴)을 통하여 당화효소의 작용이 용이하도록 하고 원료에 부착되어 있는 잡균을 살균하는데 있다. 이 과정을 통합하여 증자공정이라고 한다. 당질원료는 증자과정에서 이온성 무기물이 석출 또는 상호결합하여 안정화되므로 공정내 scale 형성이 방지된다.

이 증자공정에서 약 20~30%의 에너지가 소비되므로 에너지를 절감 차원에서 무증자, 저온 및 고온증자, line 또는 jet cooking, extrusion-cooking⁴⁾ 등이 개발되어 일부 실용화되고 있는 실정이다.

전분은 <표 1>과 같이 종류에 따라 고유한 호화와 전분입의 파괴온도를 가지고 있다. 그러므로

<표 1> 전분의 호화 및 파괴온도($^{\circ}\text{C}$)

원료명	보리	밀	쌀	고구마	타피오카
파괴온도	57.5~62.5	65~67.5	58.7~61.2	-	-
호화온도	80	80	80	65	63

4) $200^{\circ}\text{C}/30\sim45\text{ sec}$ 의 고온순간 노출시켜 저분자화-폭쇄처리공정

로 증자기에서 원료를 투입할 경우 사용원료의 호화온도보다 약 5°C 낮은 온도에서 원료를 투입하면 덩어리 형성을 방지할 수 있다. 또한 증자효율을 올리기 위하여 line mixer에 원료+급수+액화효소를 동시에 공급하여 mixed slurry 상으로 증자기에 투입하며 액화효소 종류에 따라 액화최적 작용 온도가 다르므로 주의해야 한다.

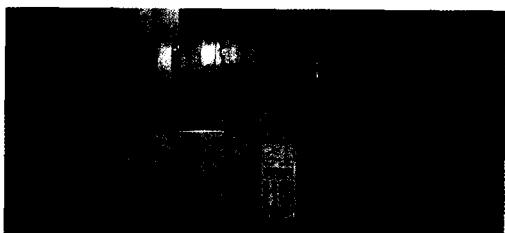
증자과정에서 전분은 micellar 구조가 파괴되고 수분을 흡수하여 팽윤(swelling) 호화(gelatinization)되어 α -amylase에 의해 dextrin으로 분해된 증자 mash를 당화조 또는 발효조에 수송하여 당화후 발효시킨다. 발효조에서 발효와 당화를 동시에 수행하는 동시 당화 발효법⁵⁾은 당화효소(국산 조효소와 액상 당화효소 등)를 이용하여 60°C 이하에서 효소를 투입 활성화 시킨 다음 냉각하여 전배양된 효모를 접종하여 발효를 한다.

증자한 기질로부터 발효성 당분을 얻기 위한 당화공정은 회분식 알코올 발효일 경우 SSF를 하거나 별도의 당화공정에서 당화시킨 다음 발효조에 2~3단으로 첨가하는 단사입 방법이 있다.

5. 알코올 발효 및 생산성 평가

알코올은 포도당, 과당, 맥아당 등 발효성 당류가 효모 또는 세균(*Z. mobilis*) 등에 의하여 EMP⁶⁾나 HMP⁷⁾ 대사과정을 거쳐 생성된다. 발효부산물인 고급 알코올(fusel oil), methanol

및 유기산류는 사용한 원료 기질과 균주, 증자방법과 온도 등 공정에 따라 생산량이 다양하므로 알코올발효에서는 가능한 발효부산물 생성량이 적은 균주를 사용하는 반면, 양조주 제조에서는 향미를 증진시킬 수 있는 균주의 개발이 관련 생물공학기술이 발전함과 동시에 우수한 분석장비의 보급으로 가능하게 되었다[그림 6].



[그림6] 최신분석장비인 Gas chromatography (Model HP 6890)

가. 발효부산물 생성

미생물의 대사활성물질과 오염된 미생물에 따라 알코올발효 및 증류과정에서 화학반응이 일어나 수백 종류의 유기화합물이 분리 동정되고 있다. Pyruvic acid가 decarboxylase 작용에 의하여 acetaldehyde와 탄산가스로 된다. 이 acetaldehyde는 ADH와 Co-enzyme-H₂(NADH)에 의하여 알코올이 생성된다. 또 acetaldehyde는 carboxylase의 산화작용(-2H)으로 di-acetyl이 생기고 이것이 환원(+2H)되면 2,3-butylene glycol이 생성된다.

원료의 겹질 성분에 많이 포함되어 있는 araban, galactan, pectin 성분 등은 당화효소나 조효소제에 혼재하고 있는 미량 효소인 protopectinase, pectinestrase의 작용으로

5) Simultaneous saccharification and alcohol fermentation, SSF : 동시당화알코올 발효

6) Embden-Meyerhof-Parnas

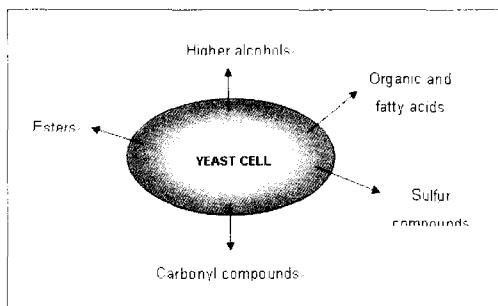
7) Hexose Monophosphate

methanol이 생성된다.

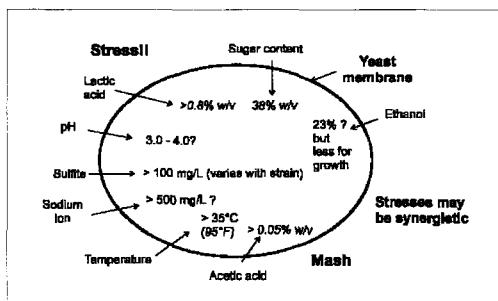
Fusel oil은 알코올발효 부산물로서 mash 중의 아미노산이 효모의 일반적인 자화이용 경로 외에 Ehrlich-Neubauer-Fromherz 분해 경로에 의하여 생성된 keto산이 환원적 탈탄산, 탈아미노화되어 생성되며, 이들 성분은 향미에 영향을 미친다. 예를 들면, leucine은 isoamyl alcohol, isoleucine은 activated amyl alcohol, tyrosine은 tyrosol, tryptophan은 tryptophol, valine은 isobutanol, threonine은 n-propanol, α -amino butyric acid는 n-propanol이 생성된다. 이때 특정 아미노산이 과잉으로 존재할 경우 고급 알코올의 생성 저해가 일어난다. Fusel oil은 알코올농도에 대해 평균 0.4%정도 생성되나 원료 중의 아미노산 함유량, 사용하는 효모의 종류 및 증자방법에 따라서도 다르고 에스테르 및 지방산 등도 소량 함유하고 있다. 고온증자(HTC)를 했을 경우 발효 mash 중에 Fusel oil 생성량은 약 0.48%, 저온증자(LTC)의 경우 0.64% 생성되었으며, Fusel oil은 n-propanol 24.6%, i-butanol 17.9%, i-amyl alcohol 53.7%이고, 성상은 황색에서 갈색으로 Crude Fusel oil의 비중은 약 0.83이나 사용 원료와 조성에 따라 약간씩 다르다.

발효 과정에서 glycerol, ester 등과 같은 VOC⁸⁾ 및 glutamic acid가 산화적 탈탄산 및 탈amino되면 succinic acid가 생성되며 이외에도 lactic acid, gluconic acid 등 유기산류가 생산된다[그림 7]. 이렇게 발효과정에서 생성된 부산물은 효모에 각종 스트레스 요인으로 작용한다. 따라서 이들 부산물의 스트레스 요

인[그림 8]을 제거하면 같은 균으로서 보다 높은 알코올 농도를 얻을 수 있는 기술이 개발되었다. 발효부산물은 연속발효조에서는 신선한 기질이 연속적으로 공급되므로 희석되는 효과가 있는 반면 회분식 발효조에서는 축적이 일어난다.



(그림7) 효모는 알코올 외에 유기산, 고급알코올, 에스테르, 황화합물등이 부산물로 생성된다



(그림8) 효모에 스트레스 요인으로 작용하는 발효부산물

나. 생산성 평가

효모는 협기적 조건 또는 기질농도가 5% Glucose 이상일 때는 알코올발효가 일어난다. 알코올발효는 협기적 해당과정을 거쳐 생성된 pyruvate가 alcohol dehydrogenase에 의해 알코올과 CO₂가 생성된다. 이때 품은 상승은 발효조 내부 냉각 coil 또는 외부 냉각장치로 적정 온도를 유지한다.

8) 휘발성 유기물질(Volatile organic compounds)

발효과정에서 잡균의 오염은 수율에 영향을 미치므로 발효조와 주모조의 살균이 중요한 관리 요인의 하나이다. 증자한 발효율을 밀폐식 발효조에 수송하는 과정에서 냉각은 안전사고와 직결되므로 철저한 관리가 요망된다. 특히 증기는 응축되면서 체적이 1,244배로 축소되어 진공이 형성될 수 있다.

알코올 발효공법에는 병행발효법과 단행발효법이 있다. 동시당화알코올발효법은 병행발효법으로서 별도의 당화공정을 두는 것보다 공정이 간단하고 이송 에너지가 덜 소요될 뿐 아니라 잡균의 오염 기회가 감소하는 장점이 있다. 반면에 발효 숙성기간은 단사입법에 비하여 접종된 효모가 대수기에 도달하는 시간만큼 숙성시간이 짧아지는 단점이 있다. 연속 알코올발효의 경우 발효조에 유입되는 mash의 당화율은 알코올 발효속도를 지배하므로 반드시 최적 당화조건의 확립이 필요하며 알코올생산성과 수율 향상은 당화율에 상당히 좌우된다. 따라서 생산성과 수율 향상을 위하여 발효기질에 skim milk, oils, fatty acid, chitin, xylan, ν -alumina, acetic acid, acetaldehyde 등의 첨가로 수율 증가를 시도하였고, Kida 등은 응집성 효모를 이용한 연속 알코올발효의 안정성에 있어 공기의 영향을 연구하는 등 효모의 우량 균주개발을 통한 원가절감을 하고자 많은 연구가 시도되어 왔다. 또한 생산원가 절감 차원에서 고농도 알코올의 연속발효에서 효모가 장시간 노출되면 점점 알코올생산성이 감소되어 높은 알코올농도 유지가 불가능하므로 이를 극복하기 위한 방안으로 고농도의 세포수를 유지하기 위한 다양한 bioreactor개발, 응집성 효

모를 이용한 속성발효가 시도되고 있다.

용존산소는 호흡계에 있어 전자의 최종 수용체로서 1차적으로 중요할 뿐만 아니라 속성발효에 있어서 효모의 생존율과도 밀접한 영향이 있다. 또한 회분식 공정을 대체하기 위한 high rate 공정으로서 단순 연속교반 발효조⁹⁾, series CSTR, tower fermentor, dialysis fermentor, cell immobilization, extractive fermentor, product recovery membrane fermentor, vacuum fermentor 등 bioreactor 개발에 관심이 집중되고 있는 추세이다.

대부분의 연구자들은 산업기질 대신 합성배지를 사용한 비교적 높은 생산성을 보고하고 있으나 발효조를 설계할 때 이용될 수 있는 생산성은 경제적인 알코올발효수율($Y_{P/S_0} = 80\%$ 이상)에서의 생산성이 필요하다. 산업적 규모의 회분식 알코올발효에서의 생산성은 원료기질에 따라 다르나 고구마는 고점도 특성 때문에 단독 사입보다는 혼합사입을 함으로서 생산성을 증가시킬 수가 있다.

연속 알코올발효의 장점은 정상상태에서 항상 최대 생산성을 얻을 수 있고 수주에서 수개 월 동안 장기간 연속운전이 가능하나 오염에 대한 위험이 많은 단점이 있다. 연속 알코올발효의 경우 공정의 설계 단계에서 이점을 충분히 고려해야 한다. 반면에 회분식 발효의 경우 발효조의 세척, 살균, 준비 등 대기 시간으로 인한 dead time이 많아 단위 생산량에 있어 발효조 용량이 증가하므로 생산성이 낮은 단점이 있다. 현재 산업화에 성공한 연속발효 공정은 대부분 multi-stage CSTR과 Biostil과 Melle-

9)Continuous stirred tank rector, CSTR

Boinot 공정 등이 있고, 효모를 재 순환하여 사용하고 있다. 또한 효과적인 알코올생산을 위하여 여러 가지 배양법으로 혼합배양, 고정화 또는 동시고정화, 미생물이나 효소를 부착하기 위해 membrane을 가진 배양 시스템 등 새로운 bioreactor가 개발되고 있다.

무증자 전분배지에 다당류¹⁰⁾를 생체촉매의 고정화 담체로 이용할 경우 기질과 생성알코올의 확산제한에 의해 효과적인 작용을 할 수 없는 것에 차안하여 이를 극복하고자 고안된 효소고정화 system의 생산성이 회분식 및 연속발효에서 각각 알코올농도가 20~37g/l에서 1.55~2.0g/l·h의 생산성¹¹⁾을 나타내고 있으나 경제적인 알코올농도보다 크게 낮아 증류공정에서 회수비용이 증가하므로 실효성이 낮다. 회분식이나 연속 알코올발효에 있어 알코올생산성은 알코올농도와 낮은 cell mass에 의해 제한을 받는데 연속발효에서 낮은 수율은 산소 부족에서 기인되는 경우가 많으므로 미세한 호기적 조건인 0.025 vvm에서 수행하였다. 그러나 Cysewski 등은 0.1 vvm에서 기질농도 10g/l에서 29g/l·h의 높은 생산성을 얻었으나 경제적인 알코올농도 이하에서 얻은 생산성은 의미가 없으며 공기 공급율이 0.125 vvm 이상에서는 점점 알코올생산성이 감소하였다고 한다. 따라서 여러 가지 산업기질에서 0.58~0.64g/l·h의 생산성을 얻었으나 발효조를 설계할 경우 다양한 원료를 사용한다면 최소 생산성을 기준으로 하여 발효조 용량을 결정해야 한다. 또한 multi-stage CSTR¹²⁾에서는 회분식에 비해 약

2배의 생산성을 얻어 실질적으로 약 50%의 발효조 용량을 줄일 수 있을 것으로 확인되었다. 그러나 알코올 생산에 있어 제조원가 중 원료가 차지하는 비중이 가장 높으므로 생산성을 기준한 발효조 설계에 있어 유의해야 한다. 즉, 원료의 수급과 가격, 생산환경, 초기투자비용 등을 고려하여 연속 또는 회분식 발효공정을 선택한 다음 적절한 발효조 용량을 결정하여야 한다.

6. 알코올폐액의 처리기술

알코올폐액은 고농도 유기물을 함유하고 있어 폐수처리 방법으로 증발농축법, 생물·화학적인 방법을 병행한 통합처리법, Pond에 폐액을 모아 액비로서 초기 및 원료 경작지에 환원하는 방법 등이 있다. 곡물원료의 알코올폐액을 건조시킨 주정박은 단미사료로써 가치가 있고, 생물학적으로 처리하면 메탄가스가 회수되어 대체에너지로도 경제적인 효과가 있다. 그러므로 알코올 폐액의 효과적인 처리방법은 생산환경과 공장입지조건에 따라서 결정되어야 한다. 여기서는 혐기 및 호기적인 생물학적 처리방법의 기술동향에 대하여 기술한다.

가. 혐기성 소화처리

주정폐액은 mash탑 가열 증기의 직접 또는 간접 가열 방식에 따라 다르나 주정 생산량의 10~15배 정도가 발생되며 고농도 유기성 폐액이므로 증발 농축하여 사료화하거나 혐기성 처리를 하면 발생되는 biogas인 methane은 대

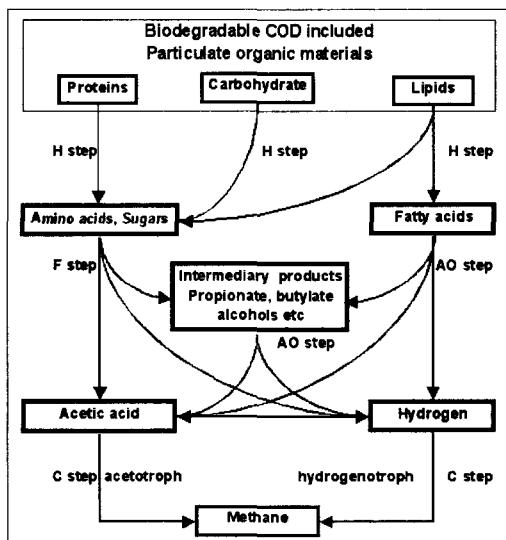
10)Dextran, agarose, carrageenan etc

11)Volumetric productivity : 단위 반응조 용량 및 시간 당 알코올 생산능력을 표시

12)일산실업(주) 부산주정공장에서 개발한 다단식 알코올 발효공정

체에너지로서 폐수처리 비용의 일부를 회수할 수 있어 주정폐액 처리에 효과적이다. 혐기성 처리는 공법에 따라 다소 차이는 있으나 활성污泥법에 비하여 슬러지 발생량이 적고, 운전이 용이할 뿐 아니라 운전 에너지 소비가 감소되는 등 장점 때문에 고농도 산업폐수의 1차 처리에 적당하다.

혐기성 분해기작은 폐액 중에 혐기적으로 분해 가능한 물질인 proteins, carbohydrates, lipids를 기질로 하여 발효성 미생물에 의하여 amino acids, sugars, fatty acids 등 organic monomer로 우선 가수분해된다. 이들 분해반응의 산물들은 acetate와 hydrogen 혹은 propionate나 butyrate 등 휘발성 유기산류를



(그림9) 유기물의 혐기적 분해 및 메탄 합성과정
H step hydrolysis of proteins, carbohydrates and lipids
F step fermentation
AO step anaerobic oxidation
C step conversion to methane by two distinct microbial system

거쳐 methane의 주 전구물질인 acetate와 hydrogen으로 전환되면 methanobacteriaceae에 의하여 methane이 생성된다. 따라서 혐기성 소화기작은 다단계의 생물반응[그림 9]으로 hydrolytic bacteria의 가수분해, fermentative acidogenic bacteria는 가수분해물을 기질로 하여 유기산을 생성하고, acidogenic bacteria는 유기산을 acetate, H₂, CO₂로 전환시킨다. 최종 단계에서 acetate를 이용하는 acetotroph과 H₂를 이용하여 methane을 생산하는 hydrogenotroph methanogens가 있고, 이균들은 정상상태에서 mixed ecosystem의 균형을 유지하고 있다. 특히 methane 생성균의 generation time은 반응조의 온도에 따라 다르나 35에서 3일, 10에서는 50일로 성장속도가 매우 느려 공정에서 균체의 유출로 인한 운전 실패를 가져올 수 있다. 최근에는 혐기성 반응조 내에 균체 고정을 목적으로 새로운 bioreactor가 연구 및 산업적으로 이용되고 있다. 또한 메탄균은 절대 혐기성 균으로 소량의 산소가 존재하여도 저해를 받으므로 균체의 생육을 조장시키기 위해서는 고도의 혐기적 조건을 유지하는 것이 필수 운전 요건이다.

최적 소화조 운전에 필요한 ORP⁽³⁾는 -520 ~ -530mV이나 -430mV까지는 메탄소화가 가능하고 -360mV에 이르면 메탄 생성이 완전히 중지된다. 따라서 소화조의 운전 인자로는 온도, HRT, pH, ORP 외에도 C : N : P = 500~700 : 5 : 0.6~1가 적당하고, 폐수 중에 과도한 황화합물이나 NH₄-가 존재하면 균체 증식과 생육을 저해할 수 있다. COD/SO₄비가 1.7~2.7 일 때 methane 생성균과 황화원균이 acetate

13) 산화환원전위(Oxidation-reduction potential)

와 H₂를 같은 전자 수용체로 이용함으로서 상호 경쟁적이며 황환원균이 acetate에 대해 친화성이 큰 것으로 보고되고 있다.

고농도 폐액이 발생되는 국내 주정공장 대부분은 메탄발효공법과 증발농축법에 의하여 주정폐액을 처리하고 있으나 주정폐액의 유기물 농도는 증류방법, 증자방법 및 분쇄입도 등에 따라 다르다. 따라서 고농도 주정폐액은 미립자상 물질이 많이 함유되어 있을 뿐만 아니라 다양한 원료 사용 특성 때문에 여러 가지 처리과정을 조합한 통합 폐수처리공법이 필요한 실정이다. 쌀보리, 곁보리 및 옥수수를 기질로 한 주정폐액의 경우 C/N비¹⁴⁾가 다른 원료에 비해 낮고 원료 특성상 미립자 물질이 특히 많아 이 원료를 단독으로 1~2주 이상 연속 사용하면 소화조에 유기산이 축적되면서 탄산가스 농도가 증가하고, pH 6 이하로 떨어짐과 동시에 소화조 액이 황갈색으로 변하는 문제가 발생하게 된다. 이 때는 가능한 소화조 부하를 감소시켜 주고 가성소다로써 pH 6.5이상 상승시켜 methane 균의 생육 및 활성화 환경을 조장시켜 주면 정상 발효로 유도가 가능하다. 메탄소화조에서 발생하는 메탄가스는 대체연료로서 총 소비 에너지의 14~20%를 대체할 수 있어 열다소비성 제조업체인 주정공장의 경우 1970년대 oil shock 이후 정부에서 보급을 권장한 바 있다. 뿐만 아니라 혐기성 소화공법은 다른 생물학적 처리방법보다 높은 처리부하, 낮은 영양 요구성, 산소공급 불필요, 대체에너지 회수,

낮은 운전비, sludge 발생량 감소 등의 장점을 많이 가지고 있다. 이와 같은 혐기성 처리의 장점 때문에 재래 혐기성 소화조의 단점을 보완한 공정으로서 짧은 HRT¹⁵⁾을 가진 UASB¹⁶⁾, AF¹⁷⁾, fluidized bed 등 새로운 처리공법에 관한 연구가 보고되고 있다. UASB공정의 장점은 혐기성 활성오니의 고농도 유지를 위한 충진제¹⁸⁾가 불필요한 점이다. 특히 high rate 공정에서는 오니의 체류기간이 수리학적 체류시간보다 길게 유지해야 하는데 UASB 공정에서는 미생물이 응집하여 침전성이 좋은 granule을 형성할 수 있는 장점이 있다. 또한 이 granule은 10~70%의 ash를 함유하고 있는데 대부분이 Ca²⁺이온으로서 methane 발효가 일어나는 alkaliphilic condition에서 calcium carbonate, calcium phosphate로 존재한다. 이들은 반응조의 균형이 깨어지면 결정화 또는 침전되어 반응조 내에 축적될 경우 working volume의 감소로 소화효율이 떨어질 수도 있다.

국내 주정공장은 곡물 등 단일 원료를 사용하는 외국과는 달리 다양한 원료 사용과 큰 입자상 물질인 조첨유질과 SS 성분을 decanter로 가능한 제거한 다음 소화조에 공급하는 것이 중요한 운전 요인이다. 그러나 methane gas 회수를 극대화하기 위하여 전처리를 하지 않고 소화조에 유입, 처리함으로서 충진제의 막힘 현상(blocking)이 발생하거나 침적물의 누적으로 working volume이 감소되어 소화조의 정상운전에 실패한 경험이 있다. 따라서 폐수 특성에

14) 폐액중의 Carbohydrates/Nitrogen)비

15) 체류시간(hydraulic retention time)

16) Upflow anaerobic sludge blanket

17) Anaerobic filter

18) 미생물이 부착할 수 있는 물질, 예. 다공성 혹은 표면적이 넓은 modular

맞는 media 선정이 중요하며 산업적으로 이용되는 충진제는 crossflow, tubullar, pall ring 등이 있다.

폐수의 SS 분리 목적으로 decanter가 많이 이용되었으나 최근에는 IAF¹⁹⁾, DAF²⁰⁾ 또는 microbubble를 이용한 superfroth 공정 등이 침전조 대체용으로 활용되고 있다. 이를 공정을 이용하여 폐액 중의 SS성분을 제거한 다음, 소화조 체류시간 이내에 생물학적으로 분해 가능한 미세입자 이하로 소화조에 유입 처리함으로서 안정된 소화 처리효율을 기대할 수 있을 뿐 아니라 소화조 용량과 초기 투자비용도 줄일 수 있다.

나. 호기성 처리 및 탈질과 탈인

활성오니법은 1913년 영국의 Arden과 Rockett에 의해 개발된 공법으로 기본적으로 폭기조와 침전조를 사용하는 공법이다. 이 처리공법은 유기성 폐수를 호기적 조건하에서 응집, 흡착, 산화분해, 침전작용에 의하여 제거하는 방법이다. 활성오니 변법으로서 1mm이하의 모래, GAC²¹⁾ 또는 polyurethane 등 인공소재를 이용한 유동상형 생물막처리법, 접촉폭기법, A/O²²⁾ 오니법 등이 있다. 또한 처리효율이 향상된 변법으로 장기폭기법, 단단 폭기법, SBR 등이 개발되어 실용화되고 있다. SBR²³⁾

은 활성오니 공정을 변형한 공법으로서 도시하수, 화학폐수, 담배, 식품, 제지, 유가공, 질소 함유 등 생물학적으로 처리 가능한 폐수 중에서 특히 질소와 인을 효과적으로 제거할 수 있는 공정이다. 이 공정의 장점은 저렴한 설치비용, 지속적인 처리 수질 보장, 부하 변동 대처가 용이하고, 이상적인 침강 분리 및 사상균 성장 억제, 약품 첨가없이 영양소 제거, 오니 반송장치가 불필요하고 비교적 적은 잉여 오니를 생성하는 공정이다.

이 공정의 반응조는 1~4개로 구성된 system 이 있다. 생물학적으로 영양소를 제거하기 위해서는 반드시 공정 중 한군데 이상에서 폭기하지 않는 무산소조를 두어야 한다. 공정에 따라 폭기/비폭기 지역의 구분과 미생물군 유지/순환방법이 다양하다. 이러한 생물학적 영양소 제거공정은 크게 3가지로 연속 유입형 활성오니 공정²⁴⁾, 운하형 공정²⁵⁾, 회분식 연속반응조형 공정²⁶⁾이 있다.

질소성분은 생물학적으로 질화(nitrification) 및 탈질(denitrification)과정을 거친다. 질화는 아질산화와 질산화로 구분된다. 질화균은 암모니아를 아질산으로 변화시키는 세균을 아질산균(*Nitrosomonas*), 아질산을 질산으로 변화시키는 세균을 질산균(*Nitrobacter*)으로 구분한다. 질화균은 아질산균과 질산균의 총칭으로 대

19)Induced air flotation, 공기부상법

20)Depressed air flotation, 가압부상법

21)Granular activated carbon, 활성탄 주입공법

22)Anaerobic–oxic, A/O

23)Sequencing batch reactor, 회분식반응조

24)Conventional continuous-flow BNR activated sludge process

25)Ditch type BNR activated sludge process

26)Sequencing batch reactor type BNR activated sludge process

부분 독립영양 세균으로 암모니아나 아질산의 산화로 에너지를 획득하고 탄산가스, 탄산 및 중탄산을 탄소원으로 하여 세포를 합성한다.

질화균의 비증식속도는 통성혐기성균의 40~60일에 비해 극히 낮기 때문에 오니일령(SRT)을 길게 하지 않으면 질화균이 유출되어 질화효율이 저하되므로 설계 및 조작인자로서 매우 중요하다. 질화작용에 있어 NH_4^+ -N 1 mg 당 7.1 mg의 알카리도가 소비된다. 완충능이 적은 폐수의 경우 알카리도를 보충하지 않으면 폭기조 pH가 산성으로 떨어져 처리효율이 낮아진다. 따라서 생물학적 처리공정에서 NO_2^- -N의 축적은 공정 운전상 처리효율과 직접적인 관련이 있으므로 중요한 관리 요인이다.

생물학적 탈질법은 에너지원의 획득법에 따라서 크게 Wuhrmann방식과 Bringmann방식이 있다. 전자는 탈질 반응조에 유기탄소원을 첨가하지 않고 질화처리수 중의 잔존 BOD와 내생 호흡으로 세포질을 이용, 탈질함으로운전 비용이 싼 반면 탈질조의 용량이 증가하고, 제거효율이 낮아 NO_3^- -N 30 mg/l 이상일 경우 실용성이 떨어진다. 후자는 탈질조에 유기 탄소원을 첨가하는 방법으로서 적은 용량의 탈질조에서 질소 제거효율이 높은 반면에 운전비용이 증가하는 경향이 있다. 유기탄소원은 주로 메탄올 등 분해가 용이한 알코올류를 첨가하여 질소를 제거할 수 있으나 과도한 알코올류 첨가는 방류수 BOD 농도가 증가할 우려가 있다. 특히 A/O법은 재래 활성오니법의 단점을 개선하여 인의 제거효율이 뛰어난 공법이다. 종래 활성오니법은 균체증식에 필요한 인만 이용함으로서 인 제거 효과가 거의 없었으나 활성오니의 생리

적 특성을 이용하면 협기적 상태 하에서는 균체내 축적된 인을 액 중에 방출하고 BOD 성분을 제거함으로서 액 중에는 인 농도가 증가되는 반면, 호기상태로 전환하면 습취한 BOD 성분을 분해함과 동시에 협기상태에서 방출한다. 이와 같이 활성오니 균은 균체 내에서 인을 poly phosphate 형태로 축적되는 특이성을 활용하여 잉여 오니를 배출함으로서 인을 효과적으로 제거할 수 있는 공법이다.

최근 독일에서는 EBPR공정²⁷⁾의 오니 중 인 함량이 약 7%에 이르며 주로 인지질, NAD, FAD, 핵산(DNA, RNA)으로서 대사와 생육을 위한 인, Mg^{2+} 과 K^+ 이 결합된 poly-phosphate 형태 또는 활성오니에 침전 혹은 흡착에 의한 물리화학적으로 고정된 3가지 형태로 존재한다고 보고하고 있다. 또한 부영양화의 원인 물질인 질소성분도 생물학적 질소 제거법으로 제거가 가능하다. 폭기조의 처리수 중에는 대부분 NH_4^+ 상태로 존재하므로 질화세균에 의하여 NO_3^- 를 거쳐 N_2 gas로 탈질시키거나 methanol, 주정제조 부산물인 불순주정 및 fusel oil를 무산소조에서 탄소원으로 공급하여 탈질과 탈인을 할 수 있다.

다. 오니의 분리 기술

생물학적 폐수처리 공정에서 제거되는 모든 유기물질은 최종적으로 미생물 균체로 전환되는데 이를 통상 활성오니라 하며 반응조 내 F/M비를 유지하고, 처리효율을 결정하는 운전 요인으로 매우 중요하다. 또한 잉여오니의 탈수 처리 기작에 대해서는 분명하지 않으나 오니의 solid surface에 biological polymer 존재가

27) Enhanced biological phosphorus removal

하나의 원인으로 생각된다. 이 extracellular polymer를 분리하기 위한 여러 방법이 개발되고 있는데 유기 및 무기 응집제에 의한 화학처리로 오니 탈수 특성을 개선할 수 있으나 응집 처리의 기작은 고려되지 않고 경험적으로 자주 사용되고 있다. 일반적으로 폐수 중에 있는 고형물질을 분리하기 위하여 침전조를 가장 많이 이용하고 있으나 침전조의 경우 낮은 표면부 때문에 시설에 필요한 부지면적과 용량이 매우 큰 반면, 부상조를 이용하면 약 1/10의 크기로서도 보다 효과적인 오니의 분리가 가능하다. 산업적으로 이용되고 있는 부상조를 소개한다.

①IAF : 500~10,000 μm 의 기포로서 고형분을 분리하는 이 기술은 1916년 광산업에서 금속을 분리하기 위하여 응용한 기술로서 비효율적이나 수질에 따라서는 매우 효과적인 분리방법이다.

②DAF : 60~80 psig의 압력공기와 물을 순환시키면 공기가 과포화 상태로 되며 폐수와 혼합시켜 대기압에 노출하면 용존공기가 기포로 되면서 부유물질에 부착하여 부상조 상부로 부상된다. 이 기술은 1950년대에 실용화되어 폐수처리 공정에 응용되고 있다.

③미세기포 부상분리법(EBF)²⁸⁾ : 최첨단 부상공학기술로 부상기술 역사상 최초로 부유성 고형물은 물론 물 속의 중금속, 탄화수소, 염료, 효소 등 용해성 불순물 등을 부가적으로 분리할 수 있는 혁신적 기술로서 고도폐수처리에 많이 응용되고 있다.

이 기술의 장점은 낮은 운전비와 최고의 부상효과로 폐수의 재이용이 가능하고, 작은 공간면적과 간단한 기계작동, 무해한 운전 환경

등 장점이 있다. 부상 스컴은 일반 침전조에서 제거되는 잉여오니 농도보다 2배 이상 농축이 가능하다. 이를 decanter, filter press, belt press 등으로 탈수 후 건조, 소각 또는 적절한 방법으로 처리하면 된다.

III. 맷음말 및 제언

우리나라에서는 알코올산업하면 주정공업을 연상한다. 이제 주정공업도 수입개방으로 산업용알코올의 수입이 확대될 것으로 예상되며 이 같은 시장의 변화가 주정산업의 발전적 계기가 되기를 기대한다.

아직 우리나라에서는 알코올의 용도에 따라 규격과 용어의 정의가 명확하지 않아 혼돈을 가져오고 있는 실정이다. 일반적으로 음용알코올(주정, Potable alcohol)은 희석식 소주나 Vodka 등 주류제조용으로 사용된다. 반면에 산업용 알코올(Industrial alcohol)이라 하면 공업용과 연료용(Power alcohol or Fuel alcohol)으로 구분할 수 있다. 산업용 알코올은 함수알코올을 변성시켜 공업용 원료로써 다양하게 이용되고 있고, 연료용 알코올은 다시 함수와 무수알코올로 구분된다. 함수 연료알코올은 주로 휘발유로써 변성시켜 유통되고 있고, 무수알코올은 용제 또는 molecular sieve로써 탈수하여 에탄올 함량이 99.6%이상인 것을 말한다. 이것을 휘발유에 혼합한 것이 자동차 연료인 가스홀이다. 그러므로 산업용 알코올이 수입되어 정제주정으로 전용되거나 식품류 등에 오용되어 국민보건을 위해 할 가능성이 있으므로 제도적인 장치를 마련하여 유통을 투명화

28)Enviro-bubble flotation

게 하는 것이 바람직하다.

또한 유한성의 석유 고갈에 대비하여 재생산 가능한 bioethanol의 경제적인 생산을 위한 기술개발에 관심을 갖는 한편 주정의 신규 수요창출 측면에서 가스홀이 실용화될 때까지 알코올 생산성과 경제성 제고에 노력이 요구된다. 따라서 경제성을 제고하기 위한 방안으로서 70년 이상 주정생산에서 축적된 기술을 바탕으로 주정원료 주산지(베트남, 태국, 캄보디아 등)에 알코올 공장을 건설하여 생산된 조주정을 국내에 반입하고 일부는 연료용 알코올로 현지에 공급하는 방안도 상정해 볼 수 있다. 이와 같은 공격적인 경영전략은 현지 산업화 및 세계적인 연료정책에 기여할 수 있을 뿐 아니라 알코올 수입자유화를 대비하는 적극적인 대응 방안의 하나로서 제언하고 싶다.

[참고문헌]

1. Cowling B. E. and Kirk T. K. 1976. Properties of Cellulose and Lignocellulosic Materials as Substrates for Enzymatic Conversion Processes. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 6. 95-123
2. Lee Y. Y., Lin C. M., Jonhson T. and Chambers R. P. 1978. Selective Hydrolysis of Hardwood Hemicellulose by Acids. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No.8. 75-88
3. Gibbons W. R. 1989. Batch and Continuous Solid-Phase Fermentation of Jerusalem Artichoke Tubers. *J. Ferment. Bioeng.* 67(4): 258-265
4. Kuwahara M., Sawada T., Asada Y., Tsunemoto S. and Nakamura Y. 1985. Explosion and Enzymatic Saccharification of Woods. *Hakkokogaku* 63(5): 433-438
5. Shima S., Kato J., Igarashi Y. and Komada T. 1991. Cloning and Expression of a Clostridium cellobioparum Cellulase Gene and its Excretion from Escherichia coli JM109. *J. Ferment. Bioeng.* 68(2): 75-78
6. Lee H. S., Ryu Y. W. and Kim C. 1994. Hydrolysis of Starch by-amylase and Glucoamylase in Supercritical Carbon Dioxide. *J. Microbiol. Biotechnol.* 4(3): 230-232
7. Thierry cachot and Marie-Noelle Pons. 1991. Improvement of Alcoholic Fermentation on Cane and Beet Molasses by Supplementation. *J. Ferment. Bioeng.* 71(1): 24-27
8. Kim. J. H., Yeo J. S. and Yoo Y. J. 1995. Improvement of Ethanol Yield by Addition of Acetic Acid and Acetaldehyde in Ethanol Fermentation. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 10(4): 370-373
9. Kita K., Asano S. I., Yamadaki M., Iwasaki K., Yamaguchi T. and Sonoda Y. 1990. Continuous High-Ethanol Fermentation from Cane Molasses by a Flocculating Yeast. *J. Ferment. Bioeng.* 69(1): 39-45
10. Nam, K. D., Choi M. H., Kim W. S., Kim H. S. and Ryu B. H. 1988. Simultaneous Saccharification and Alcohol Fermentation of Unheated Starch by Free, Immobilized and Coimmobilized Systems of Glucoamylase and *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *J. Ferment. Biotechnol.* 66: 427–432.
11. Tyagi R. D. and Ghose T. K. 1982. Studies on Immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. I. Analysis of Continuous Rapid Ethanol Fermentation in Immobilized Cell Reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 781–795
12. Ibragimova S. I., Koalov D. G., Kartasheva N. N., Suntsov N. I., Efremov B. D. and Benevolensky S. V. 1994. A Strategy for Construction of Industrial Strains of Distiller's Yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 46: 285–290
13. Hwang Y. I., Harashima S., and Oshima Y. 1989. Improvement and Application of a Promoter-Probe Vector Bearing the PHO5 Gene as the Indicator Marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.* 67(1): 1–7
14. 今日の話題. 1993. セルロース酵酇性酵母. 化學と生物. 28(12): 773–774
15. Whitney G. k., Murray C. R., Russell I. and Stewart G. G. 1985. Potential Cost Saving for Fuel Ethanol Production by Employing a Novel Hybrid Yeast Strain. *Biotechnol. Lett.* 7(5): 349–354
16. Yoshizumi H. 1987. グルコアミラゼ生産酵母の育種とでんぶん直接酇酵. 酿酇と工業. 45(6): 379–385
17. Tanaka, H., Ishigawa H., Osuga K. and Takagi Y. 1990. Fermentative Ability of *Zymomonas mobilis* under Various Oxygen Supply Conditions in Batch Culture. *J. Ferment. Bioeng.* 69(4): 234–239
18. Serjak W., Day W. R., Lanen V. Boruff C. S. 1953. Acrolein Production by Bacteria Found in Distillery Grain mashes. 14–20
19. 橋谷義孝. 1967. 酵母學. 岩波書店. 日本東京. 381–383
20. アルコール. 1967. 醸協. 62(11): 1196–1205
21. 장호남. 1990. 생물화학공학. 서울: 대영사
22. Stanbury P. F and Whitaker A. 1988. 酿酇工學の基礎. 日本國東京: 學會出版センター- 11–24
23. Nanba A., Nishizawa Y., Tsuchiya Y. and Nagai S. 1987. Kinetic Analysis for Batch Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 65(3): 277–283
24. 南波 章. 1988. 酒酇生産における計測と制御に関する研究. 酒酇工學. 66(2): 109–123
25. Fuwa H. 1987. Introduction–Degradation of Starch Granules. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 34(2): 89–92
26. Yamamoto T., Mashimoto M., Kawasaki H. and Kubota T. 1987. Alcohol Fermentation of Non-Cooked Cereal Grains by Applying Commercial Enzyme Preparations. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 34(2): 93–97
27. Ueda S. 1987. Invention of Novel Ethanol Fermentation of Starch Materials without Cooking and Its Development. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.* 34(2): 113–118

-
28. Yoshizumi H., Ashikari T., Nakamura N., Kunisaki S., Tanaka Y. Kiuchi N. and Shibano Y. 1987. Expression of Rhizopus Glucoamylase Gene in Yeast and Its Application. *J. Jpn. Soc. Sci.* 34(2): 148-154
29. 尾崎 淳一郎. 1986. アルコール ンドブツク. 日本工業協会 8版
30. Bories A. and Raynal J. 1988. Anaerobic Digestion of High-Strength Distillery Wastewater(Cane molasses Stillage) in a Fixed-Film Reactor. *Biological Wastes*. 2: 251-267
31. Gujer W. and Zehnder A. J. B. 1983. Conversion Processes in Anaerobic Digestion. *Wat. sci. Tech.* 15: 127-167
32. Stafford D. A., Wheatley B. I., Hughes D. E. 1979. Anaerobic Digestion. Applied Science Publishers Ltd., London. 15-33,
33. Robert P. G. Bowker. 1983. New Wastewater Treatment for Industrial Applications. *Envi. Proc.* 2: 235-242.
34. Young J. C. and Yang B. C. 1989. Design Consideration for Full-Scale Anaerobic Filter. *J. WPCF*. 61: 1576-1587.
35. Superfroth file. Total Solutions for Wastewater Treatment. Enviro-bubble Flotation, Inc.
36. Barnes D. and Bliss P. J. 1983. Biological Control of Nitrogen in Wastewater Treatment. E. & F. N. Spon. London New york.
37. Ketchum L. H., Irvine R. L., Breyfogle R. E. and Manning J. F. 1987. A Comparison of Biological and Chemical phosphorus Removals in Continuous and Sequencing Batch Reactors. *J. WPCF*. 59(1): 13-18
38. Norbat Jardan H. and Johannes P. 1996. Behavior of Waste Activated Sludge from Anhanced Biological Phosphorus Removal during Sludge Treatment. *Wast. Envi. Res.* 68: 965-973
39. Ryu, B. H., Nam K. D., Kim H. S., Kim D. S., Ji Y. A. and Jung S. J. 1988. Screening of Thermotolerant Yeast Strain for Ethanol Fermentation. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 16: 265-269
40. 남기두. 1997. 고온균주에 의한 연료용 알코올 발효. 주류공업. 17(3): 70-78
41. Matsumoto N., Fukushi O., Miyanaka M., Kakihara K., Nakajama E. and Yoshizumi H. 1982. Industrialization of a Noncooking System for Alcoholic Fermentation from Grains. *Agri. Biol. Chem.* 46(6): 1549-1982
42. Matsumoto N., Fukushi O. and Yoshizumi H. 1985. Small Scale Alcoholic Fermentation of Grains Heated at Low Temperature. *Nippon Nogeihagaku Kaishi*. 59(3): 265-269
43. Walling C(1975), Fenton's Reagent Revisited, *Acc. Chem. Res.*, 8, 125-131
44. Ronkainen P., Leppanen O. and Harju K. 1978. The Re-used of Stillage Water in the Mashing of Grain as a Means of Energy Conservation. *J. Inst. Berw.* 84: 115-117

-
45. Hoshino K., Taniguchi M., Marumoto H. and Fuji M. 1990. Continuous Ethanol Production from Raw Starch using a Reversibly Soluble-Autoprecipitating Amylase and Flocculating Yeast Cells. *J. Ferment. Bioeng.* 69(4): 228–233
46. Young, J. C. and Yang B. S. 1989. Design Considerations for Full-scale Anaerobic Filters. *J. WPCF*. 61: 1577–1585.
47. Silverio, C. M., P. G. Anglo, G. V. Montero, Ma. V. Pacheco, M. L. Alamis and Luis Jr. V. S. 1986. Anaerobic treatment of distillery slops using an upflow anaerobic filter reactor. *Proc. Biochem.* 21: 1200–1211.
48. Kida K. and Morimura S. 1995. Development of Effluent Treatment System of Shochu Distillery Wastewater. *J. Brew. Soc. Japan*. 90: 255–260.
49. Walling C. 1975. Fenton's Reagent Revisited. *Acc. Chem. Res.* 8: 125–131
50. Kim, I. T. and Yoon, T. I. 1999. The Combined Chemical and Biological Treatment of Dyeing Wastewater. *J. KSEE*. 21: 1439–1449

口乃心之門. 守口不密, 洩盡眞機.
意乃心之足. 防意不嚴, 走盡邪蹊.

입은 곧 마음의 문이다. 입 지키기를 엄밀히하지 않으면, 진정한 기밀(機密)이 다 새어 나가리라. 뜻은 곧 마음의 발이다. 뜻 막기를 엄격히 하지 않으면 비뚤 길로 달아나 버리리라.