

주정발효에 새로운 효소의 적용가능성 검토

I. 서론



조 훈 호

(일산산업(주)기술연구소 / 차장)

세계의 알코올 생산현황은 지난 수 년 동안 눈부신 성장을 보여 왔다. 최근 미국에서는 대체연료에 대한 정부의 지원정책과 기업의 투자가 확대되고 있는 실정이다. 금년도 미국 전체 에탄올생산량은 업계 추계 약 12,869,000 kl으로 지난해 약 10,976,500kl보다 약 17%가 증가될 것으로 전망하고 있다.

현재 미국에는 약 80여개 공장에서 알코올을 생산하고 있는 것으로 조사되었다. 세계최고의 농업식품 관련업체인 Cargill사는 연료용 알코올을 연간 136,260kl 생산체제를 구축하였다. 이와 같이 알코올생산량이 증가되는 대체연료 산업 환경변화에 따라 알코올 발효기술도 향상되고 있다. 미국의 대표적인 기업체로서 Alltech Inc.에서는 23% 고농도알코올 발효연구 및 산업화에 수년전부터 심혈을 기울이고 있었다.

이와 같은 연료 및 음용 알코올 발효기술의 발전 추세를 파악하고, 당사에서도 고농도 알코올 발효에 사용되는 각종 발효조성제인 건조효모, Amylase 등을 이용하여 음용 알코올 발효에 적용 가능성을 검토하였다. 이 결과를 보고하여 미국의 최근 알코올 발효 동

■ 목 차 ■

- I. 서론
- II. 새로운 효소의 적용 실험
 - 1. 실험방법
 - 2. 실험결과
- III. 결과 및 고찰
- IV. 참고문헌

[Table 1] Alltech Inc.에서 제공한 각종 효소의 용도와 특성

제품명	용도	특성 및 사용량	비고
High T	고온성 α -amylase	Termamyl	
Allcoholase I	α -amylase (pH5-7)		
Allcoholase II	액상당화효소	AMG	
Allyeast Superstart	건조효모 granule	1.86*10 ¹⁰ cells/g(생존율:80%±5%), 0.24g/l	프랑스산과 비슷
Yeast-Zyme 100	천연효모, 효소복합물(영양원)	저분자peptide물질로서 효모 주영양원(20ppm)	
Rhizozyme	비타민함유 복합효소제 (Rhizopus niveus)	조효소와 같은 제품 단독:0.04% vs. RM* 혼합:0.015% vs. RM	32-60℃
Lactoside 247	항세균물질(세균성)로서 세균오염감소원	1-2ppm	
Allpen	항생물질(penicillin기원)로서 오염감소원	1ppm	
Aminase 140	단백질분해효소인 protease	3-4ppm	

* RM : Raw Material

향 및 발효조성제 개발 현황에 대하여 관심을 가지는 계기가 되기를 기대한다.

II. 새로운 효소의 적용 실험

미국 Alltech Inc.에서는 23% 알코올발효를 위해 자체개발한 9종류의 제품이 있으며 각 제품의 용도와 특성은 [Table 1]과 같다.

본 실험에서는 건조효모인 Allyeast Superstart, 국내의 조효소와 비슷한 특성을

[Table 2] 당화효소의 역가와 기원 및 특성비교

Item	Activity	Origin	State	Maker's
CE(crude enzyme)	3,750U/g	Aspergillus usami	granule	한국효소(주)
LE(liquid enzyme)	22,000U/g	Aspergillus niger	liquid	Novo
Rhizozyme	9,000U/g	Rhizopus. sp	powder	Alltech
Allcoholase II	15,000U/g	spergillus niger	liquid	Alltech

지닌 Rhizozyme, 저분자 peptide로 구성된 영양원인 Yeast-Zyme 100, 단백질분해효소인 protease가 함유된 Aminase 140 등을 이용하였다. 당사 상법(Ilsan Lab Method 41-2)에 따라 lab. scale로 발효실험을 실시하였고, 실험에 사용된 당화효소의 역가와 특성은 [Table 2]와 같다.

(Ilsan Lab Method 41-2)

- i) Tapioca 원료(SV:76%) 250g을 취하여 약 64℃의 tap water로 1l mess up 한다.
- ii) α -Amylase(Termamyl 120L, NOVO, Denmark) 0.08g/l 와 Ammonium sulfate 0.1g/l (무기질소원 보충)를 넣고 잘 혼합한다.
- iii) 90℃ 까지 steam으로 가온 한 후 약 1 시간 액화작용을 시킨다.
- iv) Steam으로 102℃(0.2kg/cm²)에서 약 0.5시간 살균한다.
- v) 60℃까지 냉각

vi) 당화효소를 group 별로 투입하고 1시간 당화시킨다.

(Total sugar 분석 : bertrand's method 또는 NIR 분석법).

vii) 34℃까지 냉각

viii) 300ml Erlenmeyer flask에 당화가 끝난 mash를 240g(224ml)씩 분주한다. (Group당 3개).

ix) 분주된 300ml Erlenmeyer flask에 전배양된 주모 16ml(6.7%) 또는 dry yeast를 seeding 한다.

x) Mycell 관을 부착하여 33℃ incubator에서 발효시킨다.

X I) 발효시간별로 CO₂감량을 측정하고 120시간 발효시킨다.

X II) 발효가 종료되면 mash 중의 알코올 농도와 잔당(RTS) 등을 분석한다.

1. 실험방법

1) All yeast Superstart를 이용한 발효실험

[Table 3] 건조효모를 이용한 발효실험 조건

구 분	조 건	사용량(사입당*)	초기효모농도	생균수
A:Control	현장동일	7,216l	6*10 ⁶ cells/ml	
B:액체배양	Superstart를 액체배양 후 사용	36.9kg**	6*10 ⁶ cells/ml	1.86*10 ¹⁰
C:Superstart	권장량	27.6kg	4.5*10 ⁶ cells/ml	
D:Superstart	현장합병효모수의 10배	369kg	60*10 ⁶ cells/ml	
E:Fermiol	현장동일 효모수	25.4kg	6*10 ⁶ cells/ml	2.7*10 ¹⁰
F:Fermiol	현장합병효모수의 10배	254kg	60*10 ⁶ cells/ml	

* 사입당 : 사입용량 115,000l

**계산근거 : 7,216l (주모량)*1000ml/l *95*10⁶cells/ml=6.86*10¹⁴cells(총효모수)
 건조효모사용량 : 6.86*10¹⁴cells/1.86*10¹⁰cells/g=36,882g=36.9kg

건조효모인 Allyeast Superstart는 발효능력이 뛰어나고 알코올 내성이 높은 균주를 제 품화한 것으로 알려져 있다. 최근 미국과 유럽에서는 주로 종효모를 배양하는 대신 건조효모를 사용하고 있는 추세이다. 이 건조효모를 실험에 이용하였으며, 생균수와 총균수를 측정하여 생존율을 비교하였다. 대조군으로는 기존 발효균주(*S. cerevisiae* ISY 26)와 발효능을 비교하였으며, 동시에 제과·제빵 및 주류용 건조효모인 Fermiol (Enzyme-Biosystems, France)과 비교 실험하였다 [Table 3]

2) Rhizozyme을 이용한 발효실험

Rhizozyme은 우리나라의 조효소와 같은 제품으로서 *Rhizopus niveus*를 기원으로 하는 당화효소(amyloglucosidase)가 주성분이다. 이 효소는 side activity로서 α -amylase, protease 및 cellulase 등의 미량 보조효소와 vitamin류 등 영양원을 함유하고 있다. 이 효소를 이용한 발효실험의 조건은 [Table 4]와 같다.

3) Yeast-Zyme 100을 이용한 발효실험

Yeast-Zyme 100은 효소 및 효모복합물로서 효모증식의 주영양원으로 작용한다. 또한 효모

[Table 4] Rhizozyme을 이용한 발효실험 조건

구 분	조 건	기대효과	사용량(사입당)
A:Control	조효소 + AMG		
B:액상+Rhi*	AMG + Rhi	조효소대체	42kg(0.15%vs.RM**)
C:Control+Rhi	Rhi 추가	수율향상	42kg(0.15%vs.RM)
D:Rhi	Rhi 단독 권장량	대체가능성	11kg(0.04%vs.RM)
E:Rhi 과량	Rhi 단독 과량	대체가능성	60kg(동일역가)
F:Control+Rhi과량	Rhi 과량추가	수율향상	11kg(0.04%vs.RM)

* Rhi : Rhizozyme, ** RM : Raw Material(28,000kg/사입)

[Table 5] Yeast-Zyme 100을 이용한 발효실험 조건

구 분	조 건	기대효과	사용량(사입당)
A:Control	현장동일		-
B:Control+YZ	추가사용	초기발효 및 수율향상	2.5kg(20ppm)
C:Control+YZ*10	추가과량사용	수율향상	25kg(200ppm)

* YZ : Yeast-Zyme 100

[Table 6] Aminase 140을 이용한 발효실험 조건

구 분	조 건	기대효과	사용량(사입당)
A:Control	현장동일		-
B:Control+Aminase140	추가사용	초기발효 및 수율향상	0.5kg(4ppm)
C:Control+Aminase140*10	추가과량사용	수율향상	5kg(40ppm)

의 증식활성을 조장하여 대수증식기에 이르는 시간을 단축시킬 뿐 아니라 초기발효속도를 증가시키는 효과가 있다. Yeast-Zyme 100의 사용량에 따른 발효실험 조건은 Table 5와 같다.

4) Aminase 140을 이용한 발효실험

Aminase 140은 곰팡이성 protease로서 양조와 알코올산업에 주로 사용된다. Protease는 protein을 저분자의 alpha amino acid로 분해하여 효모의 증식과 발효수율을 증대하는 효과가 있다. Aminase 140의 사용량에 따른 발효실험 조건은 [Table 6]과 같다.

2. 실험 결과

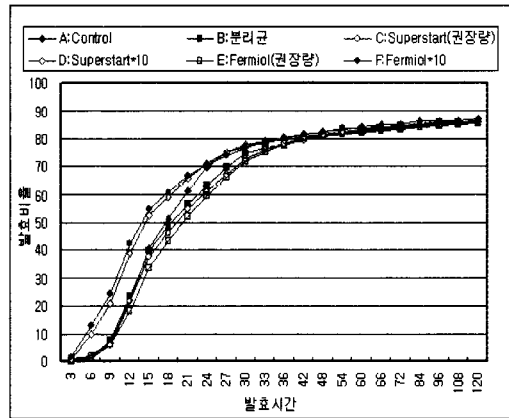
1) Allyeast Superstart를 이용한 발효실험

Allyeast Superstart는 건조효모로서 생균수는 약 1.86×10^{10} cells/g 이었으며, 총균수는

2.27×10^{10} cells/g, 생존율은 81.94% 이었다.

프랑스산 건조효모인 Fermiol의 생균수는 2.7×10^{10} cells/g이었다. 생존율은 약 84.4%로서 제과·제빵용 건조효모의 효모수가 조금 많은 것으로 나타났다.

<Fig. 1> Superstart 및 Fermiol등의 건조효모와 균주별 발효속도



[Table 7] 건조효모를 이용한 발효실험 결과

(단위 : %)

구 분	총 당	잔 당	알코올	발효비율	비 고
A	20.05	0.97	11.22	85.00	Control
B		1.15	11.05	83.71	Superstart 액체배양
C		1.20	11.02	83.50	Superstart 권장량
D		1.13	11.10	84.06	Superstart 과량
E		1.17	11.09	83.98	Fermiol 권장량
F		1.10	11.12	84.22	Fermiol 과량

[Table 8] Rhizozyme을 이용한 발효실험결과

(단위 : %)

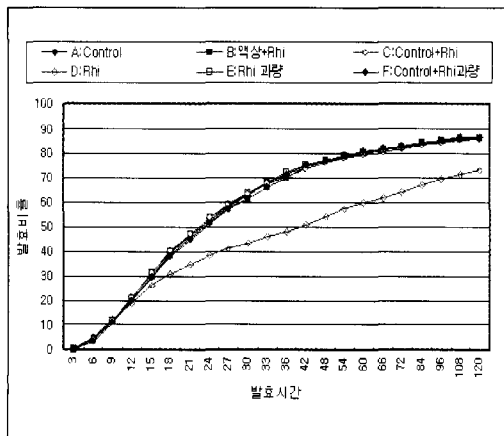
구 분	총 당	잔 당	알코올	발효비율	FAN(ppm)*	비 고
A	20.50	0.94	11.22	85.00	115	
B		1.06	11.16	84.55	114	액상과 Rhizozyme
C		1.09	11.15	84.47	121	Rhizozyme추가
D		3.91	10.26	77.73	124	Rhizozyme단독
E		1.06	11.11	84.17	128	Rhizozyme과량
F		1.05	11.18	84.70	122	Rhizozyme과량추가

*FAN은 당화작용 직후 분석한 값, 당화 전 FAN 농도는 107ppm.

발효실험결과 <Fig. 1> 및 [Table 7]과 같이 건조효모를 과량으로 사용했을 때 초기발효속도가 증가하였으나, 60시간이후에는 control과 거의 비슷하였다. 또한 권장량 및 동일 량을 사용한 시험군은 초기발효속도가 느렸으며 최종 발효수율도 낮은 것으로 나타났다.

2) Rhizozyme을 이용한 발효실험

Rhizozyme의 역가는 약 9,000U/g이었다. Rhizozyme을 첨가하여 실험한 결과 <Fig. 2>와 [Table 8]과 같이 시험구의 FAN(free <Fig. 2> Rhizozyme을 이용한 조건별 발효속도



amino nitrogen)은 조금 높았으나 큰 차이는 없었으며, Rhizozyme 단독으로 권장량을 사용한 D group이 발효수율과 발효속도가 가장 느렸다. 그 외는 거의 비슷하거나 조금 떨어지는 것으로 나타났다.

조효소를 대체한 B group의 경우 최종 발효 비율이 control 보다 약 0.5% 낮은 84.55%이었다. 수율향상을 위해 F group과 같이 과량을 사용하였으나 control보다 약 0.2% 낮은 84.70%로 나타났다.

이와 같이 회분식발효에서는 Rhizozyme 첨가에 의한 수율증가와 발효시간 단축 등은 기대할 수 없었다.

3) Yeast-Zyme100을 이용한 발효실험

Yeast-Zyme100을 이용한 발효실험은 control 군에 추가하여 실험하였으며, 당화직후 FAN의 함량은 control 220ppm, B group은 250ppm, C group은 260ppm인 것으로 분석되었다[Table 9]. 이와 같이 [Table 8]보다 Table 9와 10의 FAN 함량이 높은 것은 원료기질의 원산지 변경에 기인된 것이다.

발효속도는 <Fig. 3>과 같이 약 48시간 이전까지 Yeast-Zyme 100을 첨가한 group들

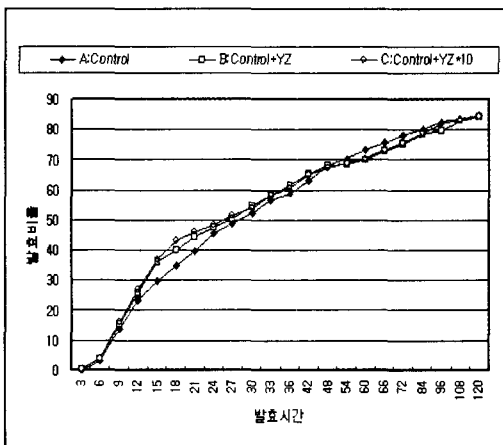
[Table 9] Yeast-Zyme 100을 이용한 발효실험

(단위 : %)

구 분	총 당	잔 당	알코올	발효비율	FAN(ppm)
A	20,50	0.90	11.21	84.93	220
B		1.15	11.16	84.55	250
C		0.99	11.18	84.70	260

*FAN은 당화작용 직후 분석한 값, 당화 전 FAN 농도는 200ppm.

<Fig. 3> Yeast-Zyme을 이용한 조건별 발효속도 비교

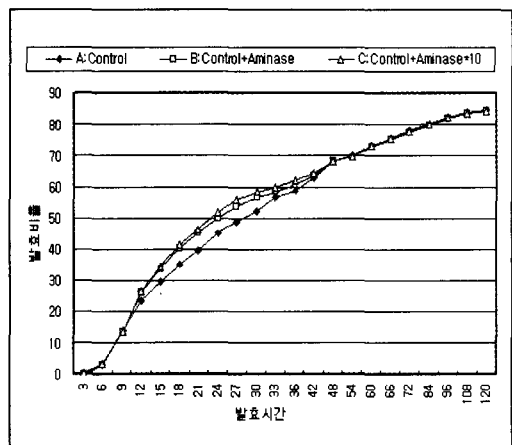


이 조금 빠른 것으로 나타났으나 60시간 이후에는 실험군 모두 비슷한 것으로 나타났다. 또한, 발효수율 및 잔당 등도 거의 비슷한 것으로 나타나 첨가에 따른 수율 증가는 없는 것으로 나타났다.

4) Aminase 140을 이용한 발효실험

Aminase 140을 이용한 발효실험은

<Fig. 4> Aminase 140을 이용한 조건별 발효속도 비교



control군에 추가로 사용하여 실험하였는데 당화 직후 FAN의 함량은 control은 220ppm, B group은 230ppm, C group은 250ppm인 것으로 분석되었다[Table 10]. 사용한 원료는 Vietnam산 tapioca로서 [Table 9]의 결과와 거의 비슷하였다. Aminase 140을 첨가한 group의 발효속도가 약 48시간까지는 control보다 조금 빨랐으나 그 후부터는

[Table 10] Aminase 140을 이용한 발효실험

(단위 : %)

구 분	총 당	잔 당	알코올	발효비율	FAN(ppm)
A	20,50	0.90	11.21	84.93	220
B		0.99	11.13	84.32	230
C		0.95	11.15	84.47	250

속도와 수율이 조금 느린 것으로 나타났다 <Fig. 4>. 발효수율 및 잔당도 control이 가장 양호한 것으로 나타나 회분식발효 조건에서는 내산성이 우수한 조효소의 기능이 입증되었다

III. 결과 및 고찰

Alltech Inc.에서 제공받은 발효조성제를 사용하여 속성발효와 수율증가 등을 검토하였다. 이들 효소는 미국의 알코올 산업현장에서 옥수수 원료로 할 때 수득율이 크게 증가된다고 보고 되고 있다. Rhizozyme이 소개되기 전까지는 정제당화효소를 사용하였으나 최근에는 사용원료 특성에 맞는 효소를 사용하고 있는 추세이다. 따라서 당사의 발효조건에서도 이 효소들의 응용이 가능한지를 검토해 보았다.

실험결과, 건조효모의 경우 과량 사용하였을 경우 속성발효는 유도되었으나 최종수율은 조금 떨어졌다. 우리나라 조효소 대신 Rhizozyme을 단독 사용하였을 경우 수율저하가 현저하였고, 액상당화효소인 Novo사의 AMG-E와 혼합하였을 경우도 수율은 조금 떨어지는 것으로 나타났다. 또한 효모 영양원으로서 저분자 peptide를 함유한 Yeast-Zyme100을 사용하였을 경우 초기발효속도는 빨랐으나 60시간 이후의 발효속도와 수율은 비슷한 것으로 나타났다. Aminase 140을 사용했을 경우에도 초기발효속도는 증가되었으나 최종발효수율은 조금 떨어지는 것으로 나타났다.

따라서 이번 실험 결과를 종합해 보면, Alltech Inc.으로부터 제공받은 효소들을 사

용했을 때 60시간 이하의 속성발효조건에서는 초기발효속도가 다소 빠른 것으로 나타났다. 그러나 회분식 장기발효공정에서는 그 효과를 기대할 수 없었다. 특히 우리나라는 원료의 수입의존도가 높아 생산성이 양호한 연속발효보다는 생산성이 낮더라도 최종 수득량을 올릴 수 있는 공정을 채택하는 것이 경제적이다.

그러므로 수득량에 초점을 맞출 경우 연속 발효보다 회분식발효가 알코올농도 증가에 따른 기질손실의 최소화 측면에서 유리하므로 우리나라의 회분식발효 공정에 이들 효소를 응용하기는 어려울 것으로 판단되었다.

Alltech Inc.에서는 최신 발효조성제를 이용하여 옥수수원료 톤당 수득량이 최고 370 ℓ 이나, 국내에서는 톤당 수득량이 최고 402 ℓ (anhydrated alcohol base)까지 생산되고 있다. 이렇게 수득량 차이가 심한 근본적인 원인은 주정박(DDGS, Distillers Dried Grains with Solubles)이 단미사료로써 상품 가치가 높기 때문에 국내와 같이 발효수율을 올리기 위해 장기 숙성을 하지 않는 것도 하나의 요인이다.

또한 미국 발효조성제의 주요 성분들은 국내의 조효소제에 side activity로서 α -amylase와 protease 및 cellulase 등의 미량 보조효소와 vitamin류 등 영양물질이 미량 함유되어 있다. 따라서 우리나라 조효소가 국산원료에 적합한 것과 같이 옥수수를 많이 사용하는 미국에서는 옥피를 주원료로 만든 Rhizozyme이 우리나라 조효소와 같은 효과를 보이는 것으로 사료되었다.

더구나 당사의 발효환경은 수십 년간의 축적된 경험과 발효지식을 바탕으로 현재의 최적 발효조건 마련되었으므로 회분식발효 공정

에서 숙성시간 단축보다 수율 증가가 필요하나 효과를 기대하기는 어려웠다. 그러나 생산성이 높은 공정의 채택은 초기투자비용 절감이 가능하고 고농도의 알코올을 얻을 수 있어 원가절감이 가능한 공정이라 할 수 있다. 이와 같은 목적을 달성하기 위하여 미국은 현재 23% 알코올발효에 대한 기술개발을 가속화되고 있는 것으로 파악되었으며, 우리도 고농도 알코올발효 기술개발에 지속적인 연구가 필요하다고 판단된다.

최근 유가가 45달러를 갱신하는 사상 초유의 석유가 고공행진은 국가 에너지 안보와 자립문제에 대하여 관심을 가지게 한다. 현재 우리나라 대체에너지 비율은 약 1.1%에 지나지 않는다. 그중에서도 생산량의 92%가 쓰레기 소각 등의 폐기물에너지인 반면 재생 biomass를 이용한 에너지비율이 3.7% 정도라는 자료를 볼 때 대체연료로써 알코올산업의 전망은 밝다고 생각된다.

IV. 참고문헌

1. K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall. The Alcohol Textbook(3th edition). Alltech Inc., pp49-87(1999)
2. Ryu B.H., Kim W.S., Nam K.D. and Kim H.S.. Impurities formed from ethanol fermentation process among different materials and it's effective separation in large scale. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 14, pp371-376 (1986)
3. 남기두. New Millenium 시대의 알코올 생산 기술동향. 주류산업. 21(2):31-42(2001)
4. 齊木 隆. アルコール ハントブック. 제 9판 (사)일본알코올협회(1997)
5. Laboratory Procedures : Alltech Laboratories Brewing Distilling Division 1-9 (Alltech inc., 2000)
6. 조훈호. 주정발효 환경분석을 통한 주질 개선방안 모색. 주류산업 21(1):67-74(2001)
7. Kim, Min-Soo and Keun Kim. Protoplast Fusion of Saccharomyces and Kluyveromyces to Develop Thermotolerant Ethanol-Producing Yeast Strains. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 28, No. 2, 80-86(2000)
8. 우리나라의 대체에너지 현황. 한국에너지 기술연구원 2001년 자료