

카사바전분의 무증자당화에 의한 에타놀발효에 관한 연구(II)

裴 武 · 李在汶

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과

*한국과학기술원 생물공학연구소

(1984년 10월 12일 수리)

Ethanol Fermentation of Raw Cassava Starch(II)

Moo Bae and *Jae Moon Lee

College of Natural Science, Ewha Women's University

*Division of Biological Science and Engineering, KAIST., Seoul, Korea

(Received October, 12, 1984)

The optimal condition of the ethanol fermentation from raw cassava starch by simultaneous saccharification - fermentation (SSF) was studied using glucoamylase from *Aspergillus* sp. and a yeast strain. The rate and yield of ethanol production were optimum at pH 3.6 with shaking. The fine milling treatment was effective for both saccharification and SSF of raw cassava starch. The presaccharification at 60°C for 1hr before SSF increased the rate and yield of ethanol production, as well. To increase the ethanol concentration after fermentation the substrate concentration could be increased up to 21% without the problem of viscosity. The use of high concentration ethanol tolerant yeast strains and high substrate concentration produced ethanol higher than 10%(W/V) after fermentation for 5 days.

前報⁽¹⁾에서 cassava의 生澱粉을 糖化酵素에 의해 無蒸煮 糖化하는 同時糖化-醱酵에서 醱酵 速度는 느리나 醱酵率이 높아 澱粉質의 蒸煮에 의한 前處理 과정없이 경제적으로 ethanol을 醱酵生産할 수 있는 가능성을 보고하였다.

본 연구에서는 同時糖化-醱酵法에 의하여 無蒸煮 cassava 澱粉의 糖化에 적합한 glucoamylase 生産菌 및 酵母菌을 選別하고, 醱酵速度 및 醱酵率 증가를 위한 여러조건을 검토하였기에 보고하는 바이다

材料 및 方法

使用菌株

本 研究室에서 보존중인 glucoamylase 生産菌 및 다수의 酵母菌과 ATCC 및 NCYC에서 구입한 菌株를 사용하였다.

基質의 前處理

前報⁽¹⁾에서 사용한 cassava 原料를 ball mill로 3 시간 milling하여 200mesh 정도로 한것을 fine milled cassava starch로 사용하였다.

同時糖化-醱酵

酵素의 生産, 酵母의 前培養 및 同時糖化-醱酵는 前報⁽¹⁾의 方法으로 하였다.

分析法

Glucose, starch 및 ethanol의 分析은 前報⁽¹⁾의 方法으로 하였다.

結果 및 考察

Glucoamylase 生産菌의 選別

본 연구실에서 분리 보존중이거나 ATCC에서 구입하여 보존중인 糖化酵素 生産菌중 cassava 生澱粉의 同時糖化-醱酵에 의한 ethanol 生産에 가장

Table 1. SSF of Raw Cassava Starch Using Glucoamylases of *Aspergilli*.

Strains	Enzyme activity (units/g koji)	CO ₂ formed (g)
<i>Asp. awamori</i> var. <i>fumeus</i> 1	26.9	7.72
<i>Asp. awamori</i> var. <i>fumeus</i> 1A	33.8	7.59
<i>Asp. awamori</i> var. <i>fumeus</i> 1B	28.1	7.41
<i>Asp. niger</i> NRRL337	50.0	6.95
<i>Asp. niger</i> schermanni IAM2059	13.8	5.60
<i>Asp. saitoi</i> sakakuchi IAM2210	15.0	6.98
<i>Asp. shioursami</i> 26	105.0	7.94
<i>Asp. niger</i>	75.0	7.71
<i>Asp. fumigatus</i>	16.3	1.69
<i>Asp. shioursami</i> 27	206.3	8.22
<i>Asp. shioursami</i> 28	187.5	7.94
<i>Asp. shioursami</i> 29	193.8	7.69
<i>Asp. shioursami</i> 30	143.8	7.96
<i>Asp. awamori</i> NRRL 3112	181.3	7.39
<i>Asp. foetidus</i> ATCC 14916	37.5	7.09
<i>Asp. niger</i> NRRL 3122	150.0	7.98
<i>Asp. foenicis</i> ATCC 13156	42.5	6.73
<i>Asp. foenicis</i> ATCC 13157	43.8	6.91

Raw cassava 20g was fermented by SSF method at 30°C for 5 days after 5 g koji was added

적합한 菌을 선별하기 위하여, 이들 菌의 koji를 생산하여 cassava 生澱粉을 原料로 同時糖化-醱酵을 하였다 (Table 1). 그 결과 본 연구실에서 보존중인 *Aspergillus shioursami* 27이 糖化酵素 生産량이 가장 많으면서 가장 높은 醱酵率을 나타내었다. 이 菌은 日本의 S, Ueda 등⁽²⁾이 사용한 *Asp. awamori* NRRL3112에 비하여 206 units/g koji로서 glucoamylase 활성이 높은 균임이 밝혀졌다.

粉碎處理의 효과

Cassava 原料를 ball mill로 곱게 분쇄하여 처리하지 않은 原料와 비교하여 同時糖化-醱酵을 한 결과 Fig 1과 같다.

처리한 경우 醱酵率이 약간 증가하였으며 醱酵速度는 10-15% 정도 증가하였다. 이것은 澱粉質 原料를 분쇄처리한 경우 糖化率 및 糖化速度가 증가하기 때문이다.³⁾

同時糖化-醱酵의 최적화 條件

Cassava 原料의 同時糖化-醱酵에서 교반효과를 실험한 결과 Fig 2와 같다. 이 결과에서 전혀 교반시키지 않은 경우 120rpm으로 교반시킨 경우에

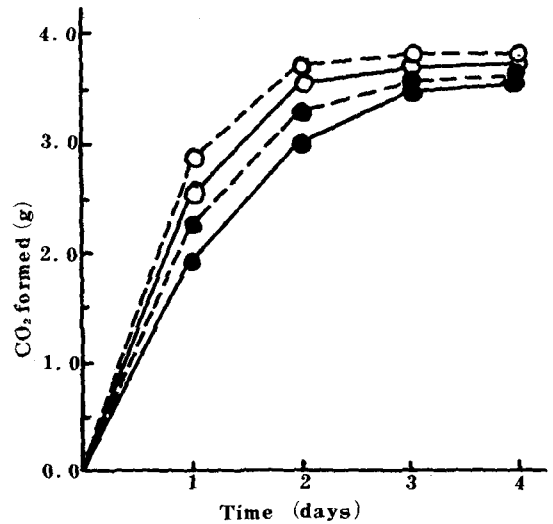


Fig 1. Fine Milling Effect on SSF of Raw Cassava starch.

Fine milled and untreated cassava 10g each was suspended in 40ml H₂O and adjusted to pH4.0, and incubated at 30°C with 120 rpm shaking after yeast strain, *S. cerevisiae*, Y-51 and glucoamylase of *A. shioursami* 27.

- ● - ● - Untreated, 180 units
- ● - ● - Fine milled, 180 units
- ○ - ○ - Untreated, 900 units
- ○ - ○ - Fine milled, 900 units

비해 醱酵速度가 50% 정도이고 醱酵率은 85% 정도로 낮은 것으로 나타났다. 이것은 교반에 의한 糖化酵素의 작용 증가 효과와 교반하지 않을 경우 原料가 침전되기 때문이다.

Cassava 生澱粉의 同時糖化-醱酵에서 최적 pH를 조사하기 위해 초기 醱酵液의 PH를 4.4에서 3.4까지 변화시키면서 실험한 결과는 Fig. 4와 같다. 일반적인 ethanol 醱酵의 최적 pH는 4.0~6.0도이지만 生澱粉의 醱酵에서는 다른 미생물의 오염을 막기 위하여 pH4.0 이하의 조건유지가 필요한데²⁾ 위 결과에서 pH3.6에서 최적 조건이 되어 이러한 미생물 오염문제를 막을 수 있다.

이상의 결과에서 生澱粉의 同時糖化-醱酵에서 가장 문제가 되는 것은 醱酵速度인데 이를 증가시키기 위해 醱母를 첨가하기전 60°C에서 前 糖化를 하였다 (Fig. 3). 그 결과 前糖化가 매우 효과적 이었는데 이것은 醱酵溫度인 30°C에서 糖化速度가 느리기 때문에 同時糖化-醱酵의 速度가 느린것임을 뜻한다.

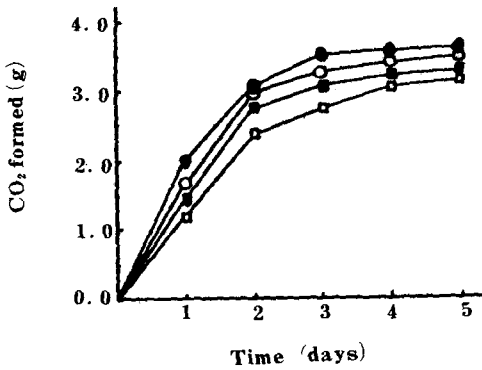


Fig 2. Shaking Effect on SSF of Raw Cassava Starch

The conditions of the experiment were those for Fig. 2 with 180 units of glucoamylase.

—□—□— static —■—■— 30 rpm
—○—○— 60 rpm —●—●— 120 rpm

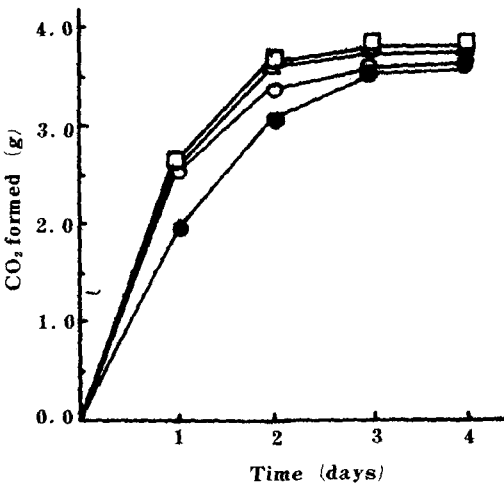


Fig 3. Presaccharification Effect on Raw Cassava Starch.

The conditions were those for Fig. 2 except presaccharification by 180 units of glucoamylase at 60°C for various time before addition of yeast strain, Y-51.

—●—●— control
—□—□— 1 hr presaccharification
—△—△— 2 hrs
—○—○— 3 hrs

澱粉濃度 증가에 따른 효과

Cassava의 ethanol 醱酵에서 原料의 濃度가 높을 경우 점성이 높기 때문에 호화 및 액화공정이 어려워서 原料濃度가 문제가 되나 生澱粉의 醱酵은 이러한 점성이 적기 때문에 그 濃度를 어느 정도 증가시킬 수 있다. 原料의 濃度를 30% 이상 증 糖의

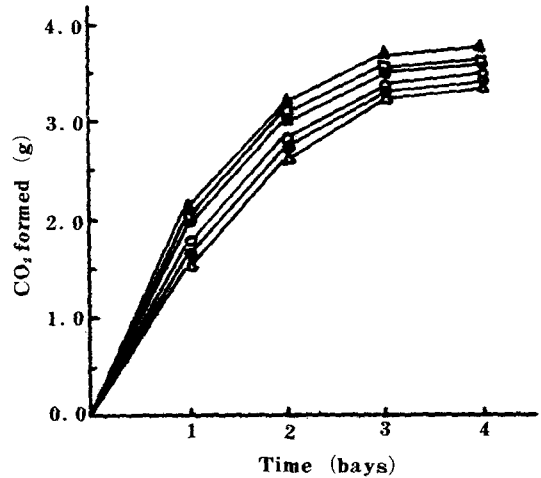


Fig. 4. pH Effect on SSF of Raw Cassava starch by Glucoamylase of *A. shirousami* 27 and *S. cerevisiae* Y-51.

—●—●— pH4.4 —○—○— pH4.2
—■—■— pH4.0 —□—□— pH3.8
—▲—▲— pH3.6 —△—△— pH3.4

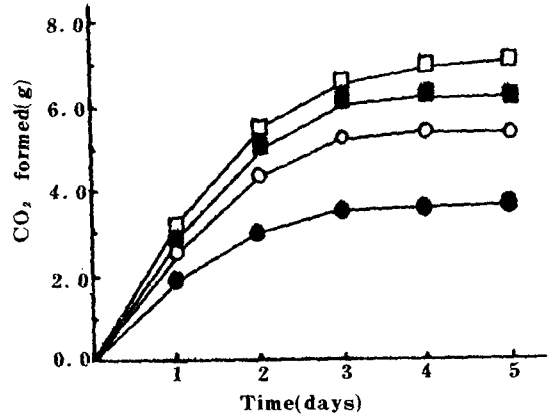


Fig. 5. Increased Concentration of Starch in SSF of Raw Cassava starch.

Various amounts of raw cassava was suspended in 40 ml H₂O and adjusted to pH 4.0, and fermented at 30°C with shaking at 120 rpm after addition of glucoamylase 180 units and yeast strain, Y-51.

—●—●— 10g cassava —○—○— 15 g
—■—■— 17.5g —□—□— 20 g

濃度를 21%까지 증가시키면서 同時糖化-醱酵한 결과는 Fig. 5와 같다. 그 결과 糖의 濃度를 증가 시킴에 따라 거의 정량적으로 CO₂ 생성의 증가를 보였는데 이것은 醱酵후 ethanol 생산 농도들 10% (W/V) 이상 올릴수 있음을 뜻하며(4) 蒸溜공정에 소비되는 에너지도 크게 절약할 수 있다.

Table 2. Screening of Yeasts for SSF of Raw Cassava Starch.

Strain	CO ₂ formed (g)	EtOH	
		g	% (W/V)
<i>S. carlsbergensis</i>	2.98	3.07	10.2
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 478	3.70	3.31	10.8
Sautherne yeast	3.55	3.20	10.7
General purpose yeast	3.51	3.16	10.5
Baking yeast	3.94	2.86	9.5
<i>S. cerevisiae</i> 7056	3.66	3.30	10.8
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 93	3.81	3.09	10.3
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 81	4.21	2.72	9.1
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 716	4.07	3.09	10.3
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 739	3.56	3.16	10.5
<i>S. cerevisiae</i> Y-51	3.98	3.09	10.3
<i>S. cerevisiae</i> Y-52	3.63	2.79	9.3

Raw cassava 10g was suspended in 20 ml H₂O and adjusted to pH 4.0 and fermented at 30°C for 5 days after 90 units of *A. shirousami* 27 glucoamylase and 3 ml of 24 hrs culture of each yeast were added.

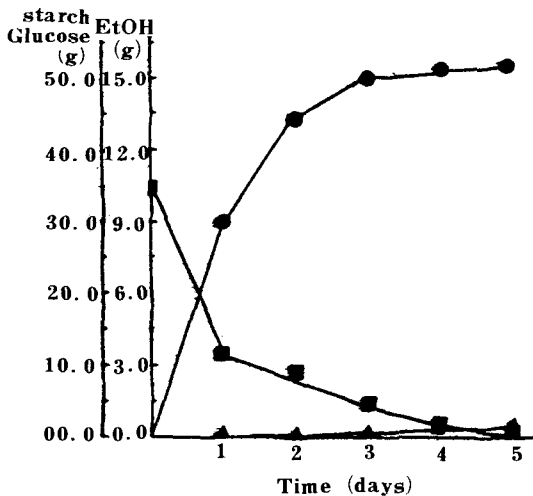


Fig. 6. Time-Course Observation of Composition of SSF of Raw Cassava Starch.

Cassava 20g was fermented at 30°C with shaking at 120 rpm after glucoamylase 360 units and yeast added.

—■—■— starch —●—●— EtOH
—▲—▲— glucose

酵母菌의 選別

蒸餾하지 않은 cassava 生澱粉의 同時糖化-醱酵에 효율적이면서 高濃度 ethanol 生産에 적당한 酵母菌을 選別하기 위해 본 연구실에 보존중인 酵母

菌을 실험하였다(Table 2). 그 결과 ethanol 耐性이 좋은 *S. cerevisiae* 7056 및 NCYC478 등이 ethanol 生産이 가장 높았으나 몇 株를 제외하고는 큰 차이가 없었다. *S. carlsbergensis*의 경우 CO₂ 生成량에 대한 ethanol 生成량은 이론치의 98.3%인데 이것은 이 菌株는 cassava 澱粉에서 거의 알코올 발효대사만 일어남을 뜻한다.

시간에 따른 醱酵液의 成分 변화

이상의 실험에서 蒸餾하지 않은 cassava 原料 33% 즉 25% 糖濃度에서 同時糖化-醱酵을 하는데, 약 5일간의 긴 시간이 필요한 것을 알았다. 긴 醱酵 시간을 줄이기 위해서 醱酵 시간에 따른 醱酵液 중의 성분변화를 조사하여 反應速度 決定 단계를 확인하였다. Fig. 6에서 澱粉質은 5일만에 거의 分解되었으며, 醱酵기간중 glucose의 축적이 없었다. 이것으로 澱粉의 糖化工程이 전체 同時糖化-醱酵에서 rate limiting step임을 알 수 있다.

要 約

蒸餾하지 않은 cassava 生澱粉의 ethanol 醱酵生産을 위한 同時糖化-醱酵의 最適條件을 검토하였다. 生澱粉의 分解力이 가장 좋은 糖化酵素의 選別에서는 *Asp. shirousami* 27이 가장 좋았으며 醱酵酵母는 菌株에 따라 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 同時糖化-醱酵은 pH 3.6에서 가장 높았으며 醱酵前 60°C에서 糖化酵素에 의한 前糖化和 醱酵時 교반등이 醱酵速度 및 醱酵率에 효과가 있었고, 粉碎처리도 효과가 있었다. cassava 生澱粉의 同時糖化-醱酵에서 5일간의 긴 醱酵 기간을 요구하는데 醱酵중 醱酵液의 成分 조사 결과 중간물인 glucose가 축적되지 않는 것으로 糖化工程이 速度決定段階임을 알 수 있다.

참고문헌

1. 裴武, 李在汶 : 한국산업미생물학회지 11권 3호 181~185 (1983)
2. Ueda, S, Zenin, C. T., Mo neiro, P. A., Park, Y. K. : *Biotechnol. Bioeng.* 23, 291 (1981)
3. Marinchemko, V. A., Kislaya, L. V. : *Ferment. Spirit. Prom St.* 8, 29 (1978)
4. 배무·이재문 한국산업미생물학회지 11권 3호 184p (1983) 문헌(1)의 Fig. 5 (CO₂ 생성과 EtOH 생성의 상관관계) 참조