

## $\alpha$ -아밀레이즈와 고정화된 글루코아밀레이즈를 이용한 전분의 액화 및 당화

안대희 · 장호남\*

생물공정연구센터, \*한국과학기술원 화학공학과

### Liquefaction and Saccharification of Starch Using $\alpha$ -Amylase and Immobilized Glucoamylase

Ahn, Dae-Hee and Ho-Nam Chang\*

Bioprocess Engineering Reserach Center and Department of Chemical Engineering  
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea

**Abstract** – The catalytic activities of immobilized glucoamylase in a packed bed column and a continuous stirred tank reactor have been compared. Rapid production of glucose from liquefied starch have been studied through the continuous liquefaction and saccharification using settling chamber. The immobilized glucoamylase with chitin gave the saccharification yield of 20% with the dextrin concentration of 100 g/l in a residence of 20 min. in a packed bed column. The half-life of immobilized glucoamylase with chitin was 19 days. The glucoamylase immobilized in chitin and encapsulated with Ca-alginate gave the saccharification yield of 6% with the dextrin concentration of 50 g/l in a residence of 20 min. in a packed bed column. The Ca-alginate encapsulated and chitin immobilized glucomylase had a half-life of 25 days, which is 6 day larger than that of the immobilized glucoamylase with chitin only. In continuous liquefaction and saccharification, the glucose yield was 17% for the liquefied starch with naked barley concentration of 50 g/l in a residence of 20 min.

바이오매스를 이용하여 에탄올을 만드는 공정 중 지금까지의 연구는 주로 에탄올 발효에 관한 것들이 대부분이고 발효의 전단계인 원료의 전처리, 바이오매스의 액화, 당화에 대한 연구는 미진한 편이다.

바이오매스인 전분을 포도당으로 만드는 당화법에는 여러 방법이 있다. 그 중 밀기울법, Amylo법이 있고, 이들 특징을 절충한 절충법이 개발되고, 다시 액체국의 개발에 의한 절충법의 개량액체국 주모법, 효소당화법(1) 등이 발전되어 왔다.

최근에는 무증자 당화(2-4) 및 동시당화 발효에 대한 연구(5), 산/알카리 전처리(6)를 통해 점분질의 구조적 양상을 변화시켜 당화를 촉진시키고자 하는 시도가 보고되었고, 한외여과 반응기를 사용하여 전

분을 당화시키는 연구(7)가 수행되었다.

본 연구에서는 당화효소인 글루코아밀레이즈를 고정화시켜 당화공정까지의 과정을 연속적으로 수행하여 산업원료로부터 알콜발효의 원료가 되는 포도당까지의 생산을 연속적으로 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용한 효소

Bacillis licheniformis의  $\alpha$ -amylase(E.C. 3.2.1.1; Termamyl 120L)와 Aspergillus niger의 amyloglucosidase(E.C. 3.2.1.3; AMG-300L)는 Novo Industry A/S Korea로부터 공급받았다.

이들 효소의 activity는 각각 120 KNU/g과 300 AUG/ml이다. One kilo Novo alpha-amylase Unit(1 KNU)는 pH 5.6, 온도 37°C에서 한 시간에 5.26 g/l의

**Key words:** liquefaction, saccharification, immobilization, continuous process

\*Corresponding author

전분을 분해할 수 있는 양이다. One Novo amyloglucosidase Unit(1 AGU)는 pH 4.3, 온도 25°C에서 분당 1  $\mu\text{mol}$  maltose를 분해할 수 있는 양이다.

### 사용한 전분원료

생전분 원료로는 산업원료인 쌀보리(전분함량 60%)를 분쇄하여 40 mesh를 통과한 분말을 사용하였다.

### 당화효소의 고정화 방법

당화효소인 AMG 1 ml를 분말형 chitin 5 g과 섞은 다음 1% glutaraldehyde를 충분량 가하고 실온에서 magnetic stirrer를 사용하여 잘 저어주면서 1시간 동안 방치한 후 증류수 및 3 mol NaCl과 0.1 mol acetate buffer(pH 4.8)를 사용하여 과량의 glutaraldehyde 및 고정화되지 않은 상태의 효소들을 세척 제거하여 고정화 효소를 준비하였다(10).

### Chitin에 고정화된 당화효소에 의한 당화실험

Chitin에 고정화시킨 당화효소를 사용하여, packed bed reactor에서 연속조업으로 dextrin의 당화 실험을 하였다. 실험조건은 다음과 같다. 반응온도는 60°C이고, pH는 4.8로 유지하였고 packed bed column에서의 dextrin의 체류시간은 20분으로 하였다. dextrin의 농도를 50 g/l에서부터 150 g/l까지 변화시켜 가면서 실험하였다.

### 고정화된 당화효소의 encapsulation 방법

Chitin에 고정화된 AMG에 2% Na-alginate 50 ml를 가하여 잘 혼합한 후 고정화 장치를 이용하여 평균 직경 1.8 mm의 bead들을 만들어  $\text{CaCl}_2$  용액에 넣어 4°C에서 24시간 방치하여 굳게 한 다음 사용하였다(11).

### Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소의 Kinetics

Chitin에 고정시킨 당화효소를 Ca-alginate로 encapsulation시킨 당화효소의 Kinetics는 recirculation fixed bed reactor를 사용하여 초기 반응속도에 미치는 유속의 영향을 고찰하고 반응속도가 유속의 영향을 받지 않는 영역에서 각각의 dextrin 농도에서의 반응속도실험을 통하여 Kinetic parameter인  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 구하였다.

### Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소에 의한 당화실험

Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소를 사용하여, packed bed column에서 연속조업으로 dextrin의 당화 실험을 하였다. 실험조건은 다음과 같다. 반응온도는 60°C이고, pH는 4.8로 유지하였고 packed bed reactor에서의 dextrin의 체류시간은 20분으로 하였다. dextrin의 농도를 50 g/l에서부터 150 g/l까지 변화시켜 가면서 실험하였다.

### 연속 액화, 당화실험

액화, 당화공정까지 연속화를 위해서 액화공정은 완전혼합반응기를 사용하였고, 당화공정은 Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소를 bead 형태로 하여 packed bed column에 넣어 사용하였다. 액화공정과 당화공정 사이에는 침강조를 사용하여 쌀보리의 고체성분을 제거하였다(Fig. 1).

여러가지 다른 농도의 쌀보리를 사용하여 실험한 액화, 당화의 실험조건은 다음과 같다. 액화공정인 완전 혼합반응기의 반응조건은 90°C, pH 6.0이고, 액화효소의 첨가량은 쌀보리의 양에 대해서 0.13%로 하여 사용하였다. 당화공정인 packed bed column의 반응조건은 60°C, pH 6.0이었고, 유속은 34 ml/min.으로 고정하였다. 쌀보리의 농도는 50 g/l, 75 g/l, 100 g/l, 150 g/l로 변화시켜 실험하였다.

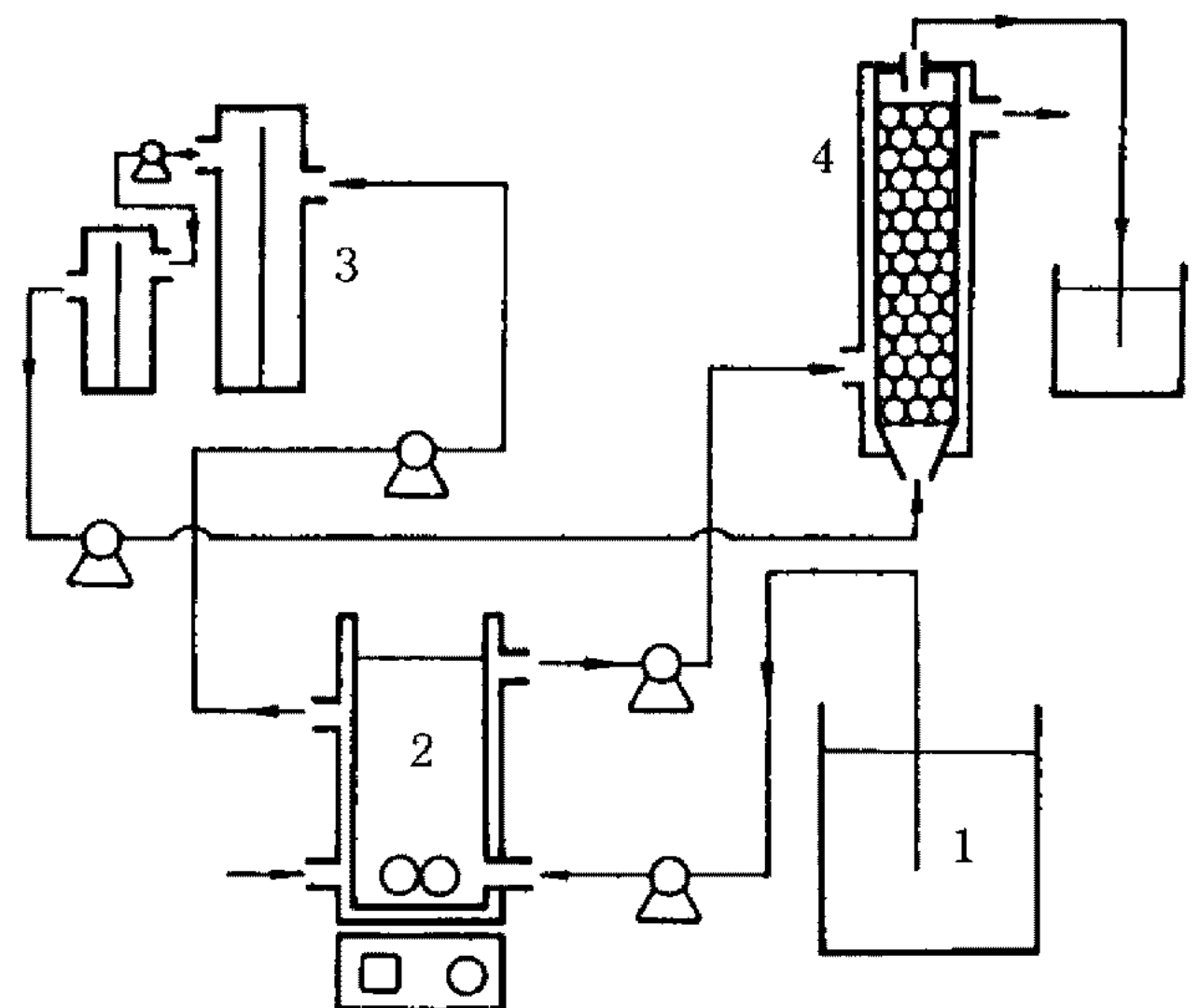


Fig. 1. Schematic diagram of experimental set up for the continuous liquefaction and saccharification.

Symbols: 1; reservoir, 2; continuous stirred tank reactor for liquefaction, 3; two stage settling chamber, 4; packed bed reactor for saccharification.

**환원당의 농도**

환원당 농도는 2,3-dinitrosalicylic acid(DNS)(8) 방법으로 정량하였다. 즉, 0.5~2.0 g/l의 당농도를 갖도록 시료를 적절히 희석하여 준비하고, 이 시료 0.5 ml와 DNS 시약 1 ml를 혼합하여 끓는 물에서 5분간 가열한 후 급냉한 다음 증류수 10 ml를 가하여 희석하고 분광광도계를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 0.5~2.0 g/l의 포도당 용액을 사용하여 구하였다.

**총당의 농도**

전분의 총당의 농도는 시료의 pH를 진한 황산을 사용하여 pH 1.5로 조정후 100°C에서 1시간 동안 가수분해시킨 후 생성된 환원당의 농도를 DNS법으로 정량하였다.

**포도당 분석**

포도당은 효소적인 방법인 PGO(peroxidase-glucose oxidase-o-paranisidine, Sigma kit 510-A)(9)법으로 선택적으로 정량하였다.

**결과 및 고찰**

**Chitin에 고정화된 당화효소에 의한 당화실험**

Chitin에 고정화시킨 당화효소를 사용하여, packed bed reactor에서 연속조업으로 dextrin의 당화 실험하였다. 실험조건은 다음과 같다. 반응온도는 60°C이고, pH는 4.8로 유지하였고 packed bed column에서의 dextrin의 체류시간은 20분으로 하였다. dextrin의

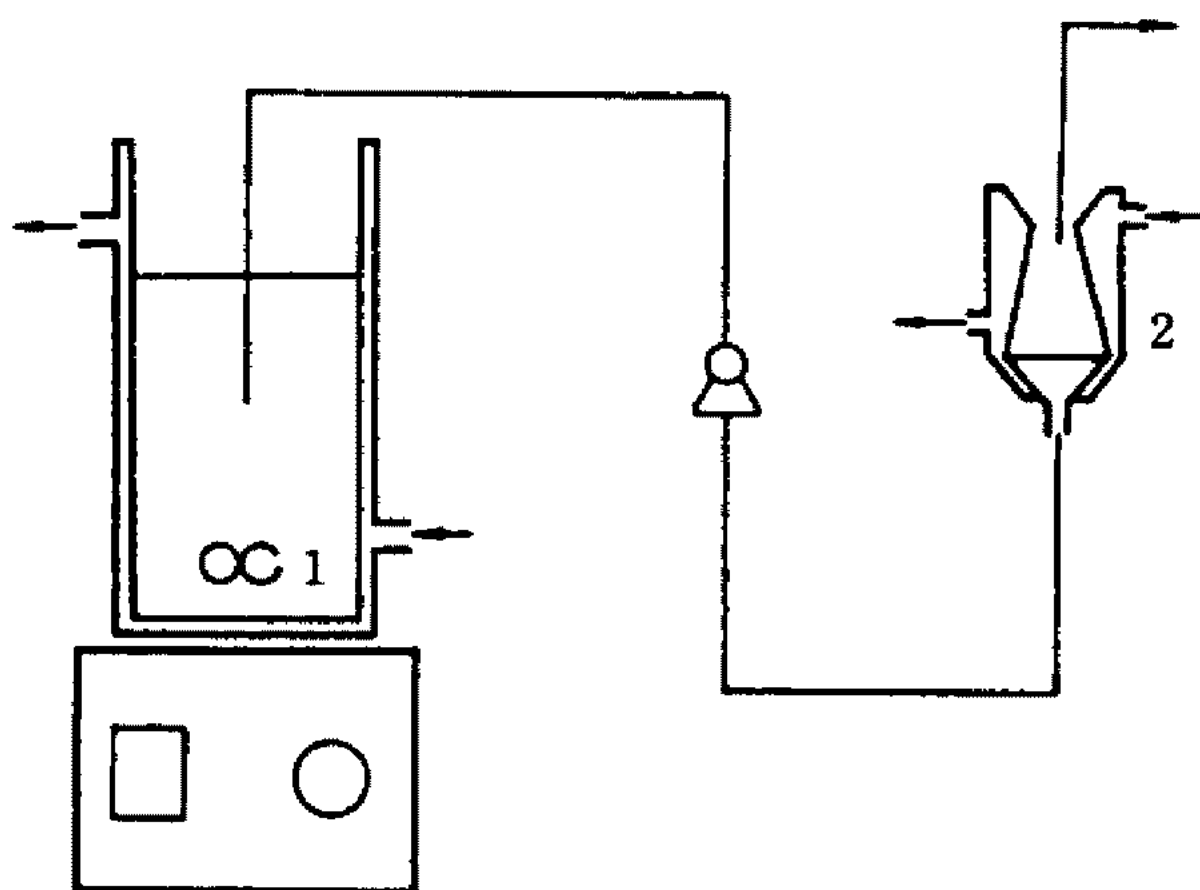


Fig. 2. Schematic diagram of experimental set up. Symbols: 1; stirred tank reactor, 2; enzyme immobilized packed bed reactor.

농도를 50 g/l에서부터 150 g/l까지 변화시켜 가면서 실험하였다(Fig. 2).

Dextrin의 농도가 50, 75, 100, 150 g/l일 때, 수율은 각각 13%, 18%, 20%, 17%를 나타내었고 생산성은 각각 17, 41, 66, 83 g/l·h를 나타내었다(Fig. 3). 이 결과는 동량의 glucoamylase를 사용하여 150 g/l의 Dextrin을 당화시켰을 때, 생산성이 194.4 g/l·h인데 대하여, Chitin에 고정화시켰을 때에 생산성이 83 g/l·h로 고정화하지 않은 것에 비하여 42.6%의 당화효율을 나타냈다. 이처럼 Chitin에 고정화시켜 사용하는 경우 당화효율이 떨어지는 것은 고정화시킬 때 효소가 일부 고정화되지 않은 것에 의한 것과 Chitin에 고정화됨으로 인해서 당화효소의 Activity가 떨어지는 것에 의한 것으로 볼 수 있다.

이 고정화 시스템의 operating stability를 고찰하였다. 반응온도 60°C에서, 10%의 dextrin을 사용하여 연속조업으로 이 고정화효소의 Activity를 측정하였다. 60°C, pH 4.8에서 이 고정화효소의 반감기는 19일이 었다(Fig. 4). 이 고정화 시스템은 고정화시키지 않고 사용했을 때보다 Activity는 떨어지나 operating stability는 우수한 것으로 나타났다.

**Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소의 Kinetics**

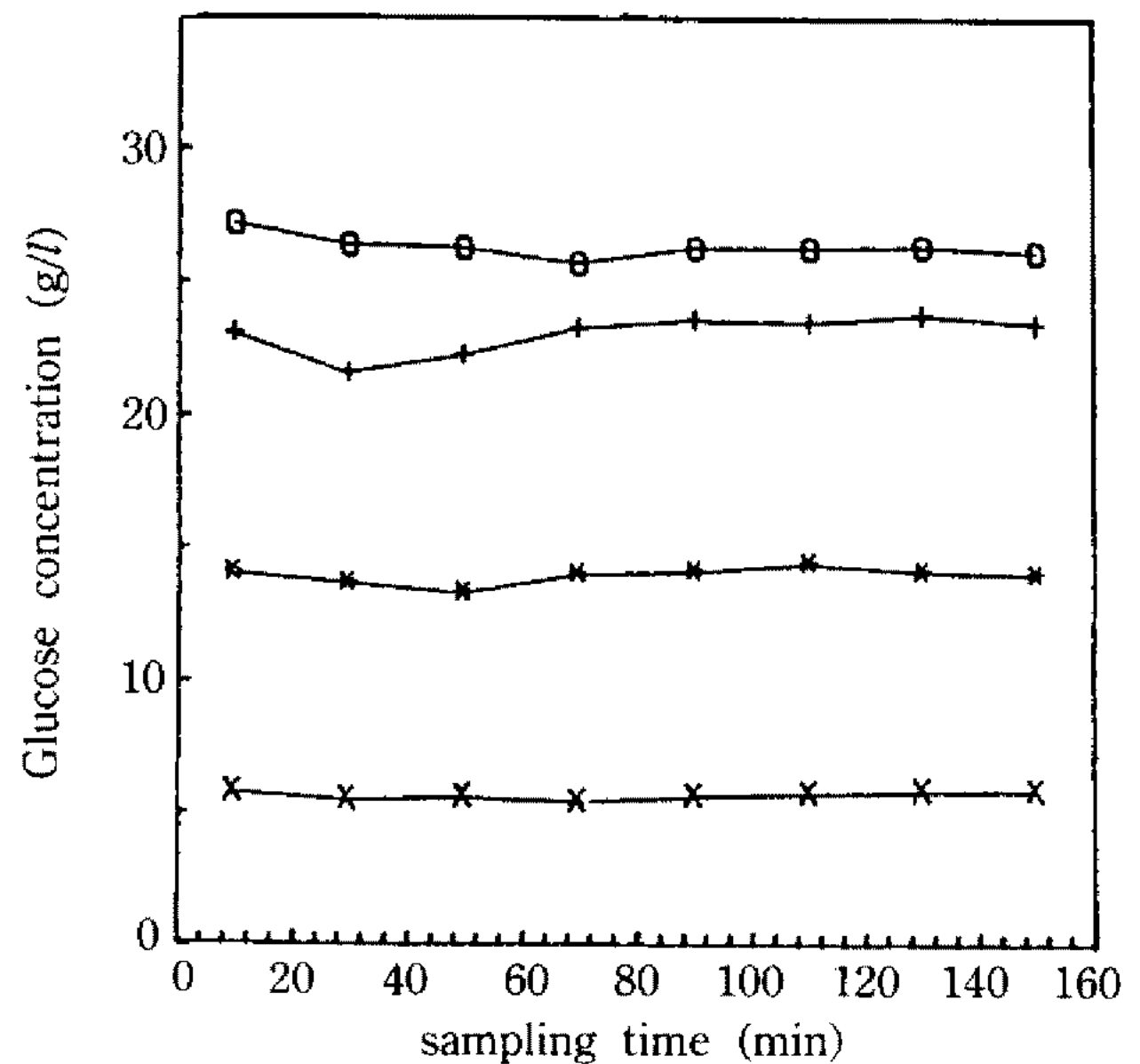
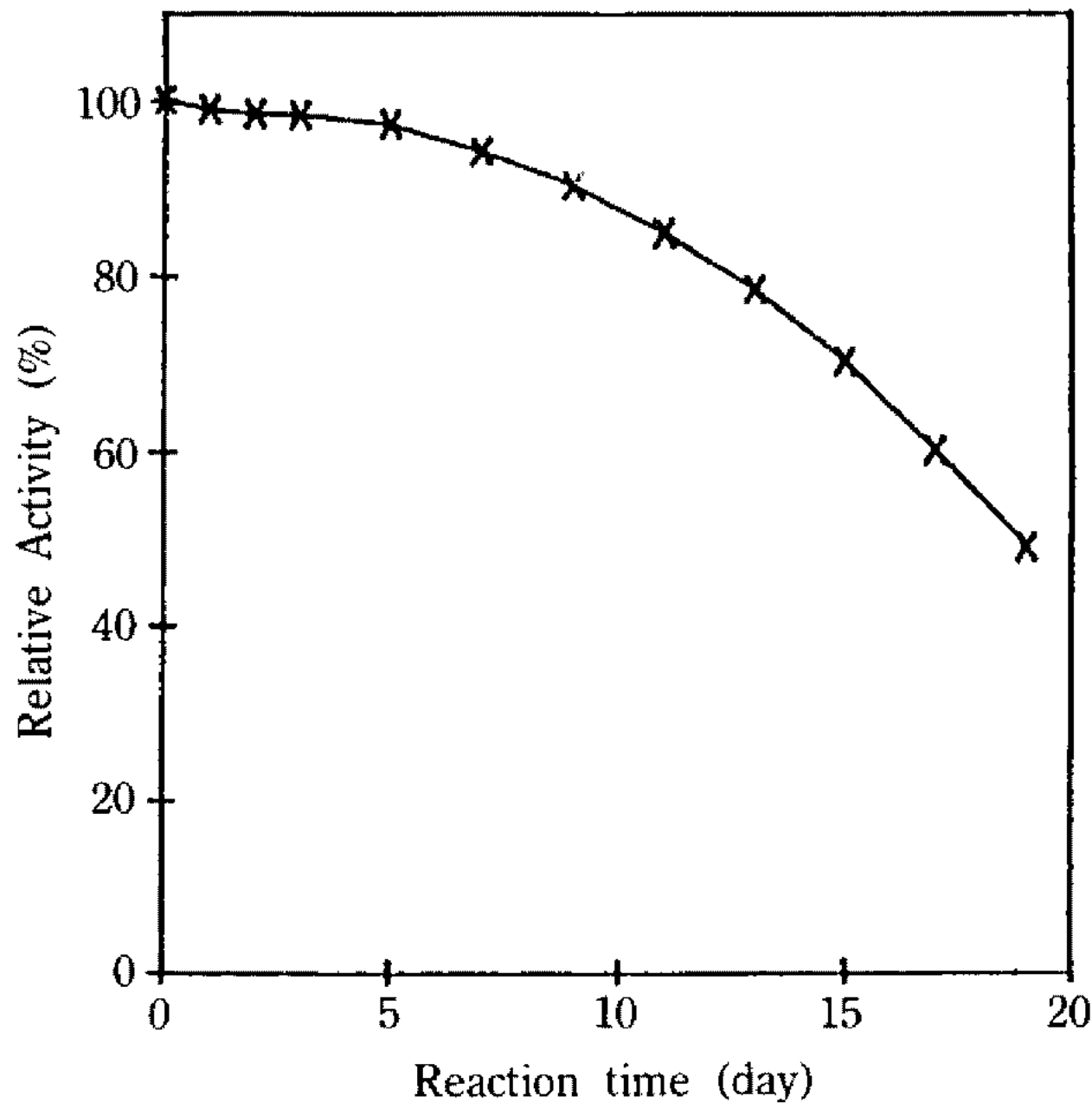
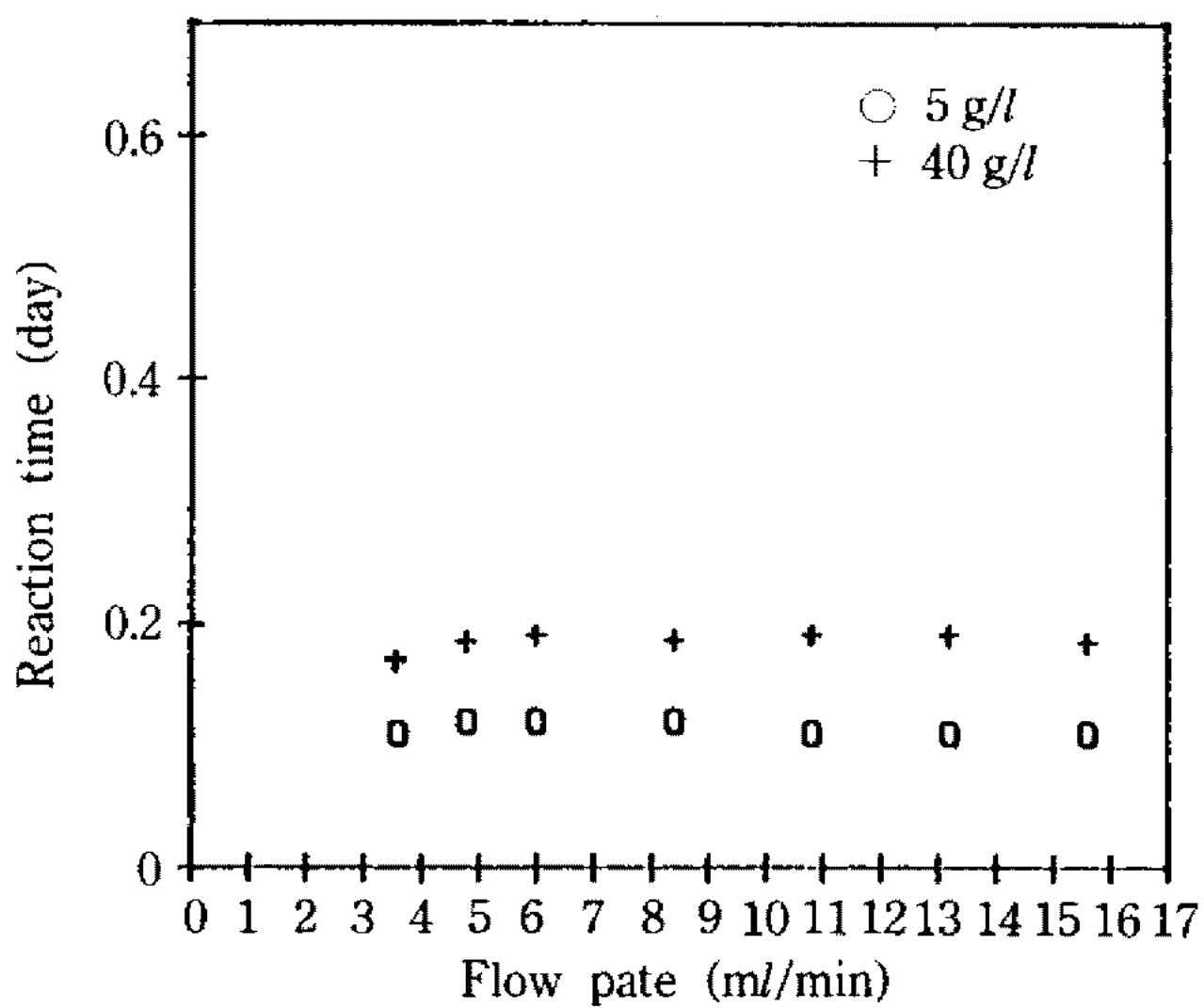


Fig. 3. Effect of dextrin concentration on the conversion of glucose. Substrate; dextrin, temperature; 60°C, pH; 4.8, residence time; 20 min. Symbols; × 50 g/l, \* 75 g/l, + 100 g/l, ○ 150 g/l.



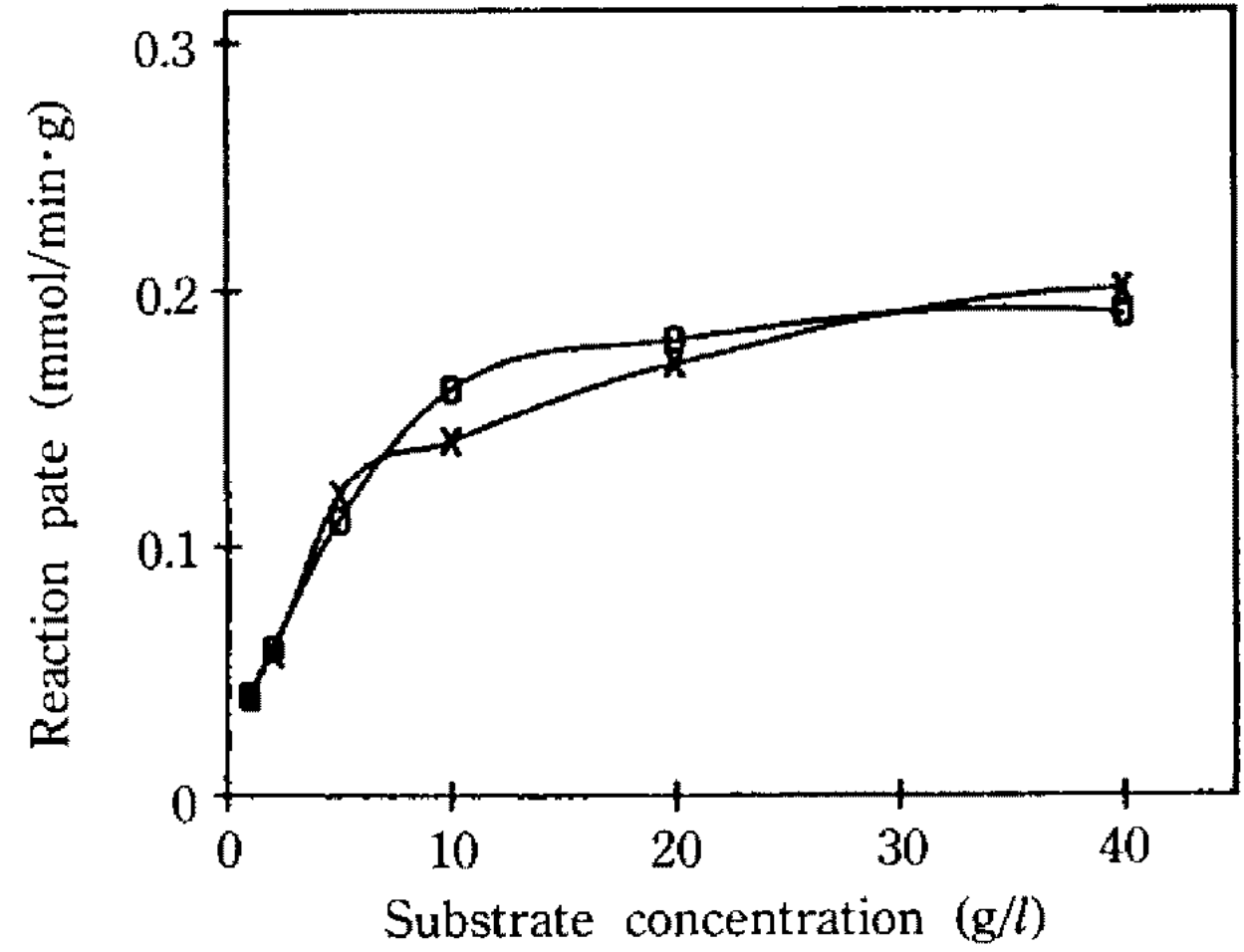
**Fig. 4. Operating stability of immobilized enzyme.** Substrate; 10% dextrin, temperature; 60°C.



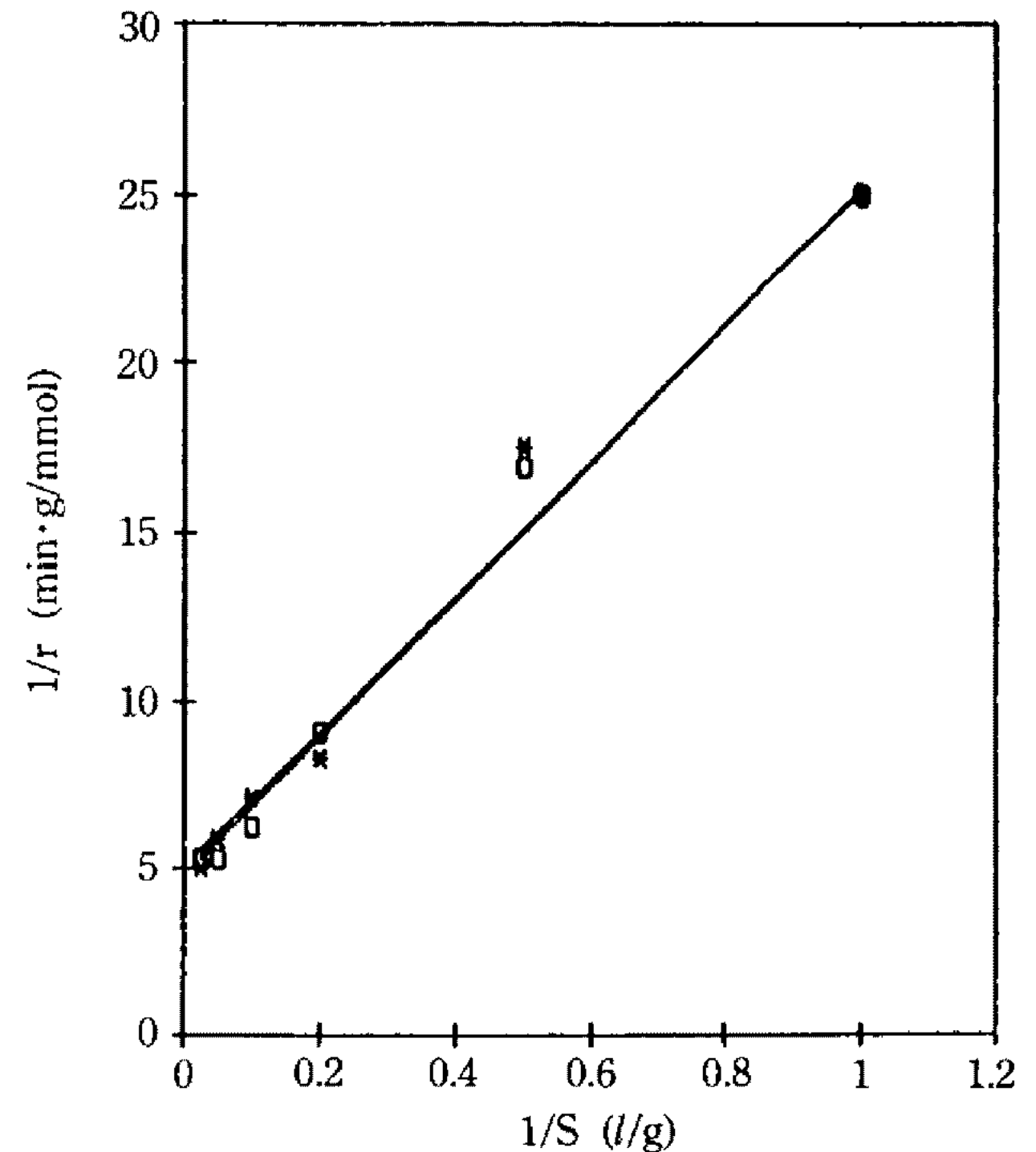
**Fig. 5. Effect of flow rate on the initial reaction rate in the recirculation fixed bed reactor.** Substrate; dextrin, temperature; 60°C, pH; 4.8.

Chitin에 고정시킨 당화효소를 Ca-alginate로 encapsulation시킨 당화효소의 kinetics는 recirculation fixed bed reactor를 사용하여 초기 반응속도에 미치는 유속의 영향을 고찰하고 반응속도가 유속의 영향을 받지 않는 영역에서 각각의 dextrin 농도에서의 반응속도 실험을 통하여 Kinetic parameter인  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 구하였다(Fig. 5, 6, 7).

초기 반응속도에 대한 유속의 영향에 대한 실험결과 유속 6.0 ml/min. 이상에서 반응속도가 유속의 영향을

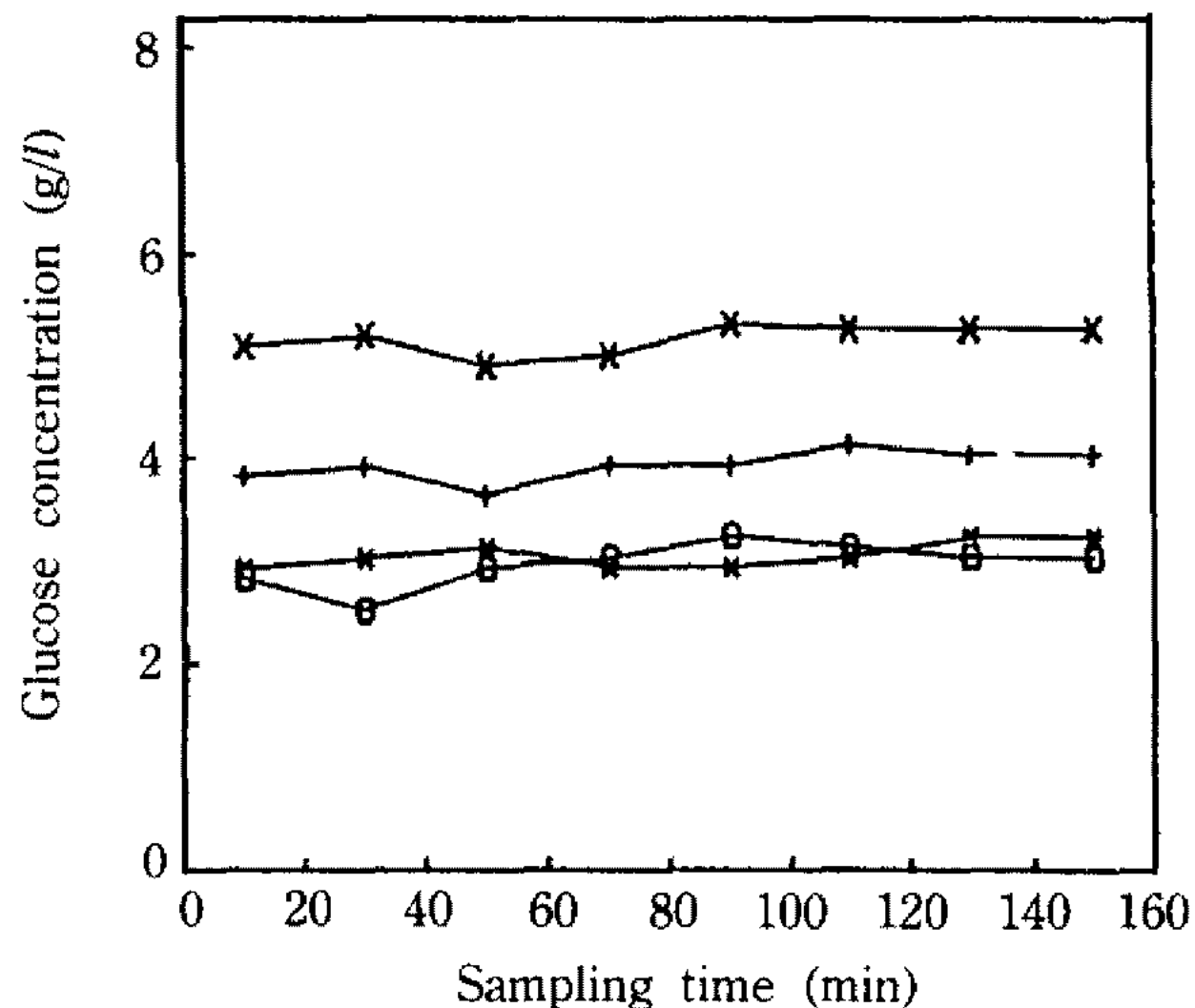


**Fig. 6. Effect of substrate concentration on the initial reaction rate in the recirculation reactor.** Substrate; dextrin, temperature; 60°C, pH; 4.8. Symbols: ○ 6.0 ml/min., × 15.6 ml/min..



**Fig. 7. Line-weaver Burk plot for the initial reaction rate in the recirculation reactor.** Flow rate at 6.0 ml/min.,  $V_{max}$ ; 0.212 mmol/min·g,  $K_m$ ; 6.06 g/l, flow rate at 15.6 ml/min,  $V_{max}$ ; 0.203 mmol/min·g,  $K_m$ ; 4.77 g/l. Symbols: ○ 6.0 ml/min., × 15.6 ml/min..

받지 않음을 알 수 있었다. 유속 6.0 ml/min.과 유속 15.6 ml/min.에서 각각의 기질농도에서의 반응속도를 구하였고, 이를 바탕으로 하여 Kinetic parameter인  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 구하였다. 유속이 6.0 ml/min.일 때,  $V_{max}$ 는 0.212 mmol/min·g이고  $K_m$ 은 6.06 g/l이었다.



**Fig. 8. Effect of dextrin concentration on the conversion of glucose in packed bed column of encapsulated immobilized enzyme.**

Substrate; dextrin, temperature; 60°C, pH; 4.8, residence time; 20 min. Symbols: ○ 50 g/l, \* 75 g/l, + 100 g/l, × 150 g/l.

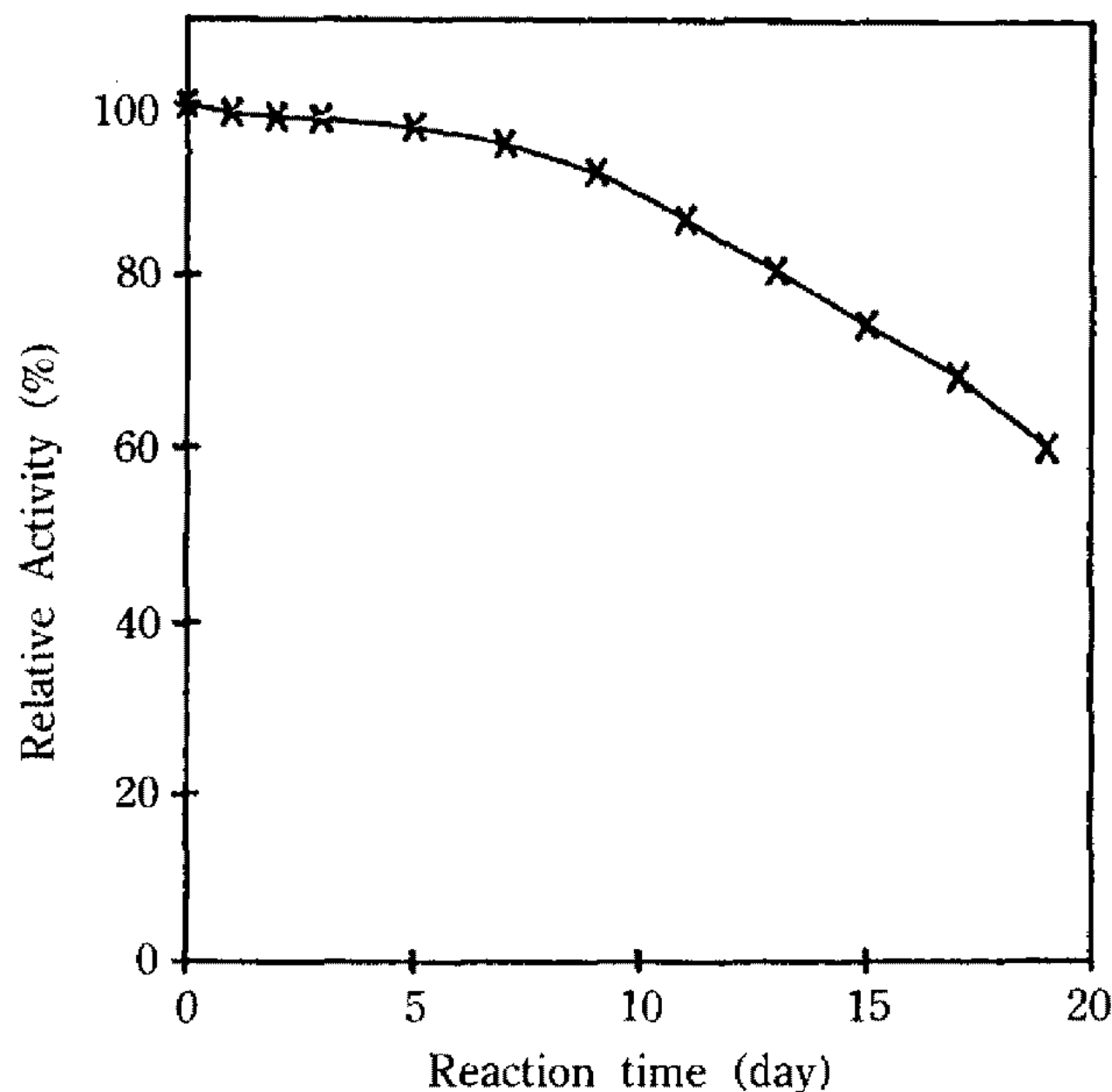
유속이 15.6 ml/min.일 때,  $V_{max}$ 는 0.203 mmol/min·g 이고  $K_m$ 은 4.77 g/l이었다.

**Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소에 의한 당화실험**

Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소를 사용하여, packed bed column에서 연속조업으로 dextrin의 당화실험을 하였다. 실험조건은 다음과 같다. 반응온도는 60°C이고, pH는 4.8로 유지하였고 packed bed reactor에서의 dextrin의 체류시간은 20분으로 하였다. dextrin의 농도를 50 g/l에서부터 150 g/l까지 변화시켜 가면서 실험하였다.

실험결과, dextrin의 농도가 50, 75, 100, 150 g/l일 때, 수율은 각각 6%, 4.3%, 4.1%를 나타냈고, 생산성은 각각 9.8, 9.9, 11, 15 g/l·h를 나타냈다(Fig. 8). 이 실험치에 대한 이론치는 다음과 같이 구하였다. Michaelis-Menten식을 Packed bed column에서의 물질 수지 식으로부터 나온  $dS = -V_p dt$ 에 대입하여 적분한 식  $S + K_m \ln S = S_0 + K_m \ln S_0 - V_m \rho dt$ 로부터 수율을 계산하면, dextrin의 농도가 50, 75, 100, 150 g/l일 때의 이론적인 수율은 각각 5.3%, 3.8%, 3.1%, 2.0%가 된다. 이때  $\rho$ 는 단위 반응기 부피당 고정화된 효소의 specific weight를 나타낸다.

이러한 실험결과는 당화효소를 Chitin에 고정화하



**Fig. 9. Operating stability of encapsulated immobilized enzyme.**

Substrate; 10% dextrin, temperature; 60°C.

여 150 g/l의 Dextrin을 당화시켰을 때, 생산성이 83 g·h인데 대하여, Ca-alginate에 고정화시켰을 때에 생산성이 15 g/l·h로 Chitin에 고정화하여 사용한 것에 비하여 18%의 당화효율을 나타냈다.

이 고정화 시스템의 operating stability를 고찰하였다. 반응온도 60°C에서, 10% dextrin을 기질로 하여 연속조업으로 이 고정화효소의 activity를 측정하였다. 60°C, pH 4.8에서 이 고정화효소의 반감기는 26일이었다. 이는 chitin에 고정화시킨 것에 비해 반감기가 6일 정도 더 길어진 것으로서 이렇게 반감기가 길어진 것은 효소를 encapsulation시킴으로써 mass transfer resistance가 증가되었기 때문인 것으로 생각된다 (Fig. 9).

이처럼 Chitin에 고정화시킨 당화효소를 Ca-alginate에 encapsulation해서 사용한 것은 당화율은 현저히 떨어지나 bead 형태로 만들어 쓸 수 있음으로 인하여 조업상의 안정성을 기할 수 있고 또한 operating stability가 높아지는 장점을 가지고 있다.

**연속 액화, 당화실험**

액화, 당화공정까지의 연속화를 위해서 액화공정은 완전혼합반응기를 사용하였고, 당화공정은 Ca-alginate에 encapsulation시킨 당화효소를 bead 형태로 하여 packed bed column에 넣어 사용하였다. 액화



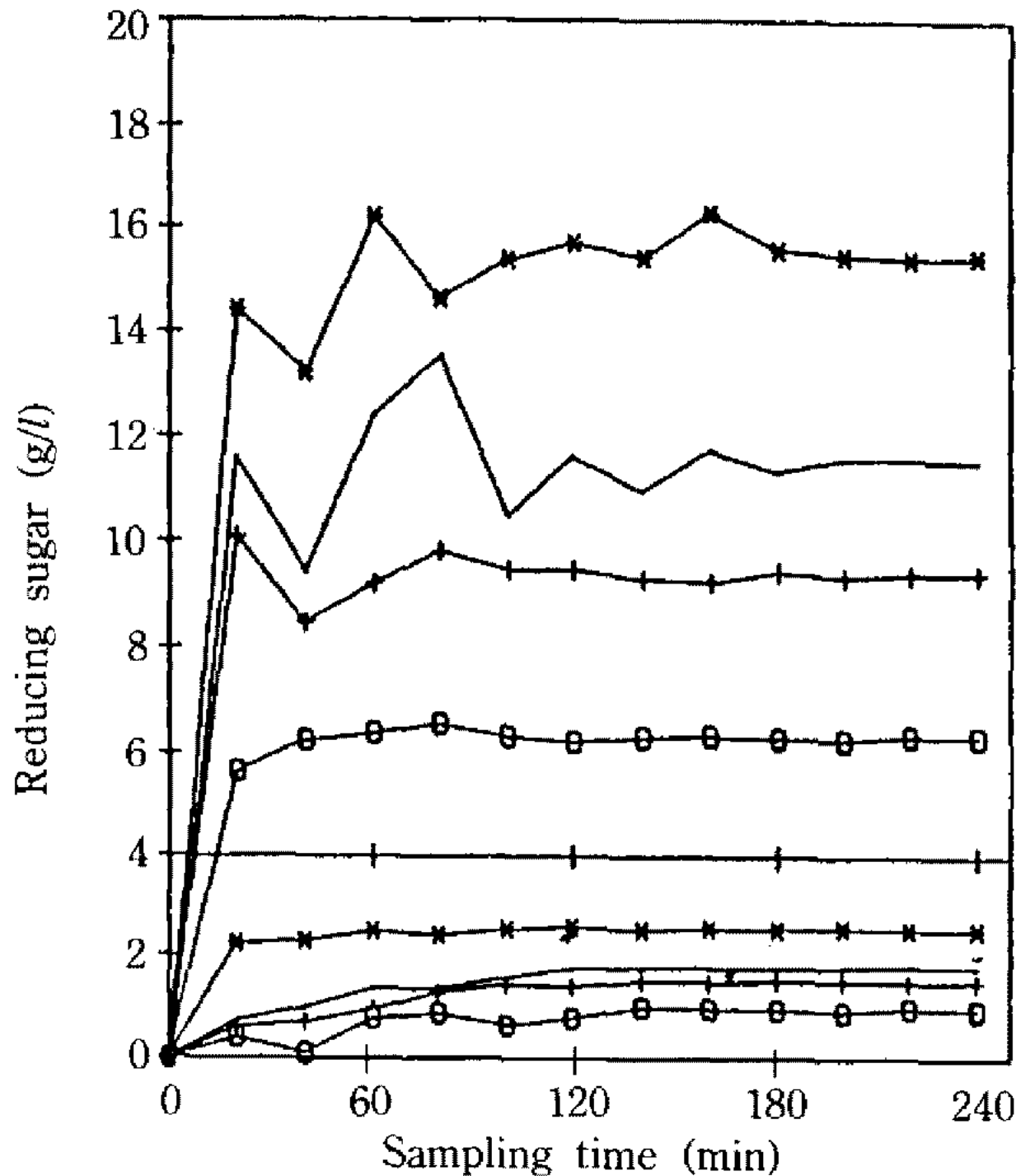


Fig. 10. Continuous liquefaction and saccharification. Substrate; naked barley, flow rate; 34 ml/min. liquefaction; 90°C, pH; 6.0, saccharification; 60°C. Symbols: ○ 50 g/l, + 75 g/l, ● 100 g/l, \* 150 g/l.

공정과 당화공정 사이에는 침강조를 사용하여 쌀보리의 고체성분을 제거하였다(Fig. 1).

여러가지 다른 농도의 쌀보리를 사용하여 실험한 액화, 당화의 실험조건은 다음과 같다. 액화공정인 완전 혼합 반응기의 반응조건은 90°C, pH 6.0이고, 액화효소의 첨가량은 쌀보리의 양에 대해서 0.13%로 하여 사용하였다. 당화공정인 packed bed column의 반응조건은 60°C, pH 6.0이었고, 유속은 34 ml/min.으로 고정하였다. 쌀보리의 농도는 50, 75, 100, 150 g/l로 변화시켜 실험하였다.

유속을 고정하여 사용한 이유는, 기질의 농도를 일정하게 하고 유속을 변화시키면서 실험할 경우 쌀보리가 slurry 상태이므로 pumping에 문제가 있어 실험결과의 변동이 심하게 나타나므로 유속을 일정하게 고정하여 사용하였다.

연속조업의 결과 6 내지 9 batch 정도 지났을 때 정상상태에 이르렀다(Fig. 10). 쌀보리의 농도가 50, 75, 100, 150 g/l일 때, 액화공정에서의 환원당의 생산성은 각각 25, 38, 40, 63 g/l·h를 나타냈고, 당화공정에서의 포도당의 생산성은 각각 4, 5, 7, 10.2 g/l·h를 나타냈고, 포도당의 수율은 각각 17%, 15%, 12

%, 16%를 나타냈다. 당화공정에서의 이론적인 수율은 각각 23%, 19%, 18%, 17.5%로써 실험치가 이론치보다 낮게 나타났다. 고농도하에서의 실험은 쌀보리의 점도로 인한 침강조에서의 고체 성분의 침강의 문제로 인하여 150 g/l 이상에서의 실험은 수행할 수 없었다.

위와 같은 액화, 당화 연속공정에 의한 방법은 당화효소를 고정화시킴에 따라서 효소의 activity는 떨어지나 효소의 일정한 activity가 유지될 때까지 계속해서 사용할 수 있는 방법으로 기존의 연구되고 있는 동시당화발효에 의한 에탄올 생산 방법에 비하여 당화효소의 지속적인 사용을 할 수 있다는 장점이 있다.

## 요 약

Packed bed column과 continuous stirred tank reactor에서 고정화된 glucoamylase의 catalytic activity를 비교하였다. Settling chamber를 이용한 연속 액화, 당화 공정을 사용하여 액화된 전분으로부터 포도당을 연속적으로 생산하였다. Chitin에 고정화된 glucoamylase에 의한 당화실험에 있어서는 dextrin의 농도가 100 g/l일 때, 체류시간 20분 동안 20%의 당화수율을 나타냈다. Chitin에 고정화된 glucoamylase의 반감기는 19일이었다. Ca-alginate에 encapsulated된 glucoamylase에 의한 당화실험에 있어서는 dextrin의 농도가 50 g/l일 때, 체류시간 20분 동안 6%의 당화수율을 나타냈다. Ca-alginate에 encapsulated된 glucoamylase의 반감기는 25일이었고, 이것은 chitin에 고정시킨 것에 비해 더 높은 operating stability를 나타내었다. 연속적인 액화, 당화 공정에서는 쌀보리의 농도가 50 g/l일 때, 체류시간 20분 동안 액화된 양에 대해서 17%의 수율을 나타냈다.

## 감사의 말

본 연구는 동력자원부 대체에너지 사업비 지원으로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 후지 테크노 시스템; 바이오매스부터의 연료·화학

- 원료의 개발기술자료집성, 159 (1984)
2. Bae, M. and J.M. Lee; *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 181 (1983)
  3. P.S. O, D.J. Cha, and H.W. Suh; *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 415 (1986)
  4. Y.H. Lee, K.H. Jo; *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 399 (1986)
  5. C.H. Kim, M.H. Han, and S.K. Lee; *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **15**, 55 (1987)
  6. H.S. Moon, H.J. Kwon, and P.S. O; *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 231 (1988)
  7. D. Darnoko, M. Cheryan, and W.E. Artz; *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, March, 11 (1989)
  8. Miller, G.L.; *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
  9. Sigma Cooperation; *Sigma Diagnostics Glucose Procedure No. 510*, Sigma (1984)
  10. Stanley, W.E., Waters, G.G., and Mercer, J.M.; *Biotech. Bioeng.*, **17**, 315 (1975).
  11. Martisen, A.; *Biotech. Bioeng.*, **33**, 79 (1989).

(Received June 28, 1991)