

주정폐액의 이용에 관한 연구

(제 1 보) 소맥분 주정폐액을 이용한 *Saccharomyces cerevisiae* 의 배양

유 주 현 · 오 두 환 · 양 용
(연세대학교 식품공학과)

Studies on the Utilization of Alcohol Distillers' Waste.

Part 1. Production of *Saccharomyces cerevisiae* Cells from Alcohol Distilled Waste of Wheat-flour.

Juhyun Yu, Doohwoan Oh, and Ryung Yang

(Dept. of Food Engineering, College of Science and Engineering, Yonsei University)

(Received April 30, 1974)

Abstract

The water pollution by waste water is one of the important issue and the short of animal feed is too, in Korea. So, this experiment is accomplished to treat alcohol distillers' waste by micro-organisms and planning to produce yeasts, which can be used as animal feed, pharmacy and condiments.

1. The raw material, alcohol distillers' waste, of this experiment consists of insoluble solids (residue) and filterate (supernatant). The residue contains 33.08% of crude protein, 19.96% of total sugar, and 2.06% of ash, respectively. On the other hand the filterate through the Toyo filter paper No. 5C, contains 2.48% of crude protein, 1.54% of reducing sugar, and 0.43% of ash, respectively.

2. Optimum pH of the basal medium for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 is 4.0. Optimum culture condition of this is as follows: when 0.43g of urea, 0.43g of potassium phosphate monobasic, and 0.21g of magnesium sulfate are added to the 100ml of basal medium.

Optimum temperature and optimum incubation time are 30°C and 24--28 hrs.

3. Under these conditions, the maximum yield of dry yeast is 1.38% to the medium.

4. The composition of dry yeast, produced under these conditions, is as follows: crude protein, 56.96%, lipid, 1.30%, total sugar, 6.53%, and ash 9.62%.

1. 서 론

미생물을 食用으로 利用하려는 생각은 제 1 차 세계대전중 독일에서의 식량부족 때문에 일어난 것이다. 당시 이 연구는 여러가지 사정에 의하여 실용화되지 않았으나, 전후 계속된 연구결과 기업화에 성공하였다. 실제 독일은 제 2 차 세계대전때

수천 ton 의 효모를 食用으로 공급하였다고 하며¹⁻³⁾ 현재는 독일, 미국, 일본, 대만 등에서도 일부의 효모가 食用, 약용, 사료용으로 공급되고 있다.

한편 인구의 급증에 의한 미래의 단백질자원 부족을 고려하여 석유탄화수소, whey 및 낙농폐액, 목재당화액, 아황산 pulp 폐액, 통조림공장 등의

페액을 탄소원으로 하고 저자의 질소원 및 무기염류를 부원료로 혼합하여 식용, 약용, 사료용효모를 생산하려는 연구가 많으며⁴⁻¹⁴⁾ 우리나라에서도 이러한 단백자원의 개발을 촉진진흥정책과 더불어 적극적으로 추진하고 있으며 단세포단백 생산에도 많은 연구를 하고 있다.^{15,16)}

본 연구에선 공장폐수중에 있는 탄소원을 주원료로 효모를 배양, 사료용 수입어분(1972년도 : 26,720 \$, 534 만 \$ 도입계획)¹⁷⁾과 수입효모(1973년도 9월까지 158 \$, 59,000 \$)¹⁸⁾를 대체하며 동시에 공장폐수의 처리에 목적을 두고 균체의 생산을 위한 최적배양조건을 구했다.

2. 실험재료 및 실험방법

1) 실험재료 및 균주

본 실험에 이용한 시료는, 소맥을 당화한 후 Ethyl alcohol 발효를 한 D회사의 증류페액이었다. 이 페액을 1kg/cm²에서 15분간 가압살균한 뒤 동양여주 No. 5C를 사용해서 여과한 결과, 여액부분은 환원당이 1.54%, 총질소 0.39%, 회분이 0.43%이었으며 105°C로 상압건조(12hrs)한 잔사에는 총당이 19.96%, 총질소가 5.29%, 회분이 2.06%이었다. (Table 1)

Table 1. Composition of Alcohol-waste (%)

Components	Filterate	Residue
Sugar	1.54*	19.96**
Total nitrogen (Crude protein)	0.39	5.29 (33.08)
Ash	0.43	2.06
pH	3.15	—

*Reducing sugar

**Total sugar

사용한 균주는 본 식품공학과에서 보존하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae* YF-1, *Saccharomyces cerevisiae* YF-2, *Saccharomyces cerevisiae* YF-3이었다.

2) 실험방법

a) 성분 분석

환원당은 Smogi 변법과 Bertrand 법으로 정량하였다. 총질소는 Macro Kjeldahl 법과 Micro Kjeldahl 법을 병용해서 정량하였으며, 회분은 직접회화법 지방은 Soxhlet 추출법으로 정량하였다.

b) 균의 배양법

배지 20 ml를 250 ml 삼각 flask에 일정량씩 넣

어 1 kg/cm²에서 15분간 살균한 다음, 균액을 접종하였다. 이것을 30°C로 조정된 배양실에서 24 hrs 동안 왕복진탕배양기 (진폭 : 7cm, 왕복수 140 osills/min)로 진탕배양하였다.

접종균액은 Hayduck 액¹⁹⁾에다 균을 배양하여서 사용하였다.

c) 균체의 생육 측정법

배양이 끝나면 배양액을 IEC Model HT Centrifuge로 5,000 rpm에서 15분간 원심분리한 뒤, 침전물을 일정량(90ml)의 살균생리식염수에다 현탁시켰다. 이 현탁액을 Hitachi Model 101 Spectrophotometer로 660 m μ 파장에서 O. D를 측정하여 균의 생육을 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

1) 실험결과

a) 균의 생육에 미치는 pH의 영향.

배지의 pH를 2~9 범위내의 각 pH로 조절한 다음 *Saccharomyces cerevisiae* YF-1(이하 YF-1), *Saccharomyces cerevisiae* YF-2(이하 YF-2), *Saccharomyces cerevisiae* YF-3(이하 YF-3)를 각, 배양하여, 이들 효모의 생육에 미치는 pH의 영향을 검토하였다. 그 결과 pH 2.0에서는 YF-1, YF-2, YF-3 모두 O. D(660 m μ)치가 0.12 이하로 거의 생육을 하지 않았으나 pH 3.0 부터는 균의 생육이 급격히 증가해서 YF-1에서는 pH 4.0, YF-2와 YF-3에서는 pH 5.0에서 가장 생육이 좋았으며, 그 이상의 pH에서는 균의 생육이 서서히 감소되었다. (Fig. 1)

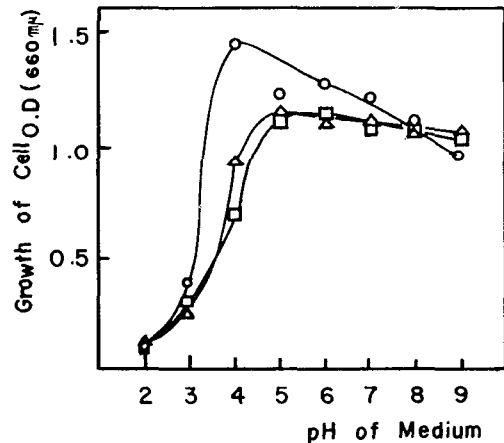


Fig. 1. Effect of pH on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1, YF-2, YF-3 (for 24 hrs, at 30°C) YF-1 : ○—○, YF-2 : □—□ YF-3 : △—△

따라서 이하의 실험에선 이들 셋 중에서 가장 생육이 좋았던 *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (pH 4.0)을 이용하였다.

b) 질소원 종류와 영향

기본배지에 NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 등의 질소원을 질소함량이 0.1% 되게 환산하여 첨가한 다음, 30°C에서 24시간 배양하여 그의 생육을 비교 검토하였다. (Fig. 2) 그 결과 질소화

NITROGEN SOURCE	0.1	0.2	0.3	0.4
NH_4NO_3	0.1	0.2	0.3	0.4
NH_4Cl	0.1	0.2	0.3	0.4
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$	0.1	0.2	0.3	0.4
NaNO_3	0.1	0.2	0.3	0.4
Control	0.1	0.2	0.3	0.4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.1	0.2	0.3	0.4
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.1	0.2	0.3	0.4
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.1	0.2	0.3	0.4
$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0.1	0.2	0.3	0.4

Fig. 2. Effect of Nitrogen Source on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (for 24 hrs, at 30°C)
Nitrogen concentration which added in the medium was 0.1%, respectively.

합물을 전혀 첨가하지 않았던 배지의 O.D(660m μ)는 0.1이었으며 NaNO_3 를 첨가한 것은 거의 생육치 않았다. 다른 질소원을 가한 것은 무첨가의 대조에 비해서 높았으며 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, NH_4Cl , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 의 순으로 생육이 좋았다.

그들 중에서 가장 생육이 좋았던 Urea와 NH_4Cl 을 택하여 질소원의 함량변화에 따라 생육을 비교해 본 결과, 질소함량이 0.2% 되게 배지에 가했을 때가 공히 생육의 최적농도이었다. 그 이상의 농도에서는 오히려 생육이 감소되었으며 Urea보다도 NH_4Cl 에서 이러한 경향이 현저하였다. (Fig. 3) 그러므로 Urea나 NH_4Cl 을 배지에 0.2% (질소함량 기준) 첨가함이 효과적으로 생각되었으므로, 이하에선 배지에 Urea를 질소원으로 첨가한 뒤 실험하였다.

c) P 및 K원의 영향

KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , K_3PO_4 의 3가지 인산염을

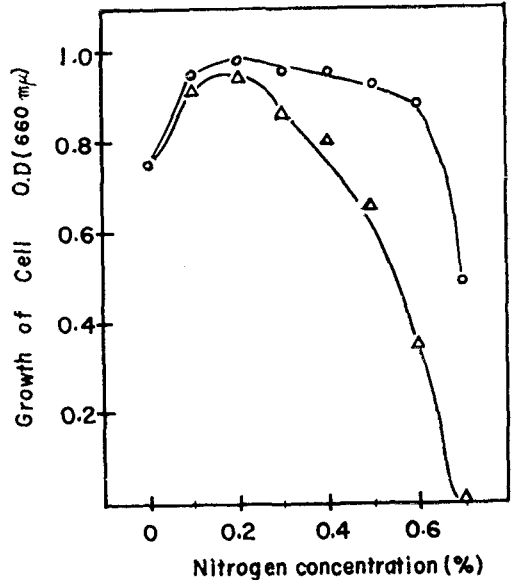


Fig. 3. Effect of Nitrogen Concentration on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (for 24 hrs, at 30°C)
 NH_4Cl : \triangle — \triangle
Urea : \circ — \circ

이용해서 균체의 생육에 미치는 P와 K원의 최적조건을 검토한 결과 KH_2PO_4 와 K_2HPO_4 를 사용했을 때에는 0.1% (P함량 기준), K_3PO_4 는 0.06%를 배지속에 가했을 때가 최적농도이었다. (Fig. 4)

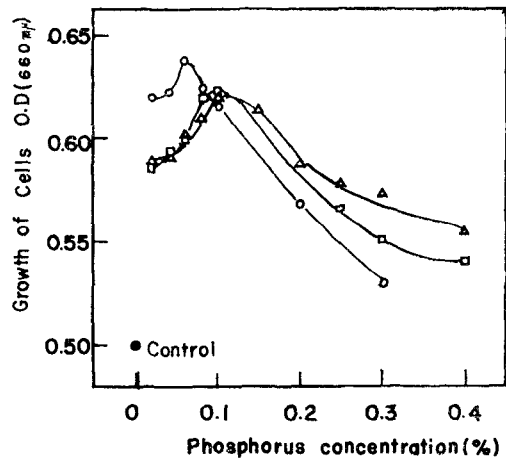


Fig. 4. Effect of Phosphorus Concentration on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (for 24 hrs, at 30°C)
 KH_2PO_4 : \triangle — \triangle K_2HPO_4 : \square — \square
 K_3PO_4 : \circ — \circ

이들 최적농도보다 고농도에서는 그의 농도에 비례해서 생육이 저하되었다. 이들 3가지 인산염 중에서 K_2HPO_4 와 K_3PO_4 는 KH_2PO_4 에 비해 생육량은 많았으나, 가격이 너무 비쌌으므로 이하에서

는 KH_2PO_4 를 P 원으로 0.1% (P 함량 기준) 되게 가한 뒤 검토하였다.

d) Mg 원의 영향

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 MgCl_2 를 이용해서 균의 생육에 미치는 Mg ion의 영향을 검토해 보았다. 배지중에 Mg의 농도를 0~0.15% 범위의 각 농도로 조절한 다음 YF-1을 배양한 결과, 생육에의 최적농도는 둘다 0.02% 이었으나 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 경우가 MgCl_2 보다 좀 더 좋았으며, 최적농도 이상에서는 역시 인산염에서와 같이 농도에 비례하여 생육이 억제되었다 (Fig. 5)

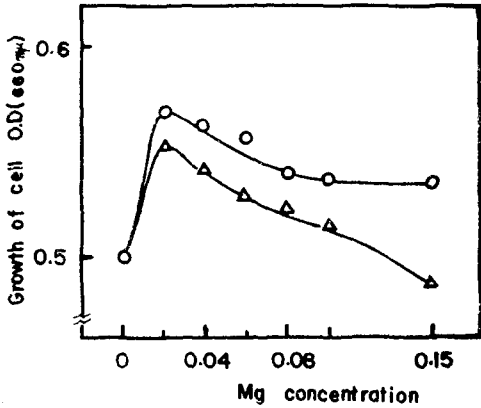


Fig. 5. Effect of Mg Concentration on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (for 24 hrs, at 30°C)

MgCl_2 : △—△
 MgSO_4 : ○—○

e) 배양온도의 영향

배지조성을 검토한 위의 연구결과를 기초로해서, 배지 100ml 당 Urea 0.428g, KH_2PO_4 0.439g, MgSO_4 0.21 g을 가하여 pH를 4.0으로 조절해 준뒤 25, 28, 30, 32, 35°C의 각 온도에서 배양하였다.

24시간 동안 배양한 다음, 생육에 있어서의 최적온도를 비교한 결과 30°C에서 생육이 가장 좋았으며, 그 이하의 온도와 그 이상의 온도에서는 균의 생육이 이에 비해서 감소하였다. (Fig. 6)

Table 2. Effect of Cell Concentration, in the seed, on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1

Cell concentration in culture med.	Growth of cell (O. D 660mμ)
1.5×10^5 cells/ml	0.02
2.5×10^5 "	0.26
5.0×10^5 "	0.41

after 12 hrs, at 30°C

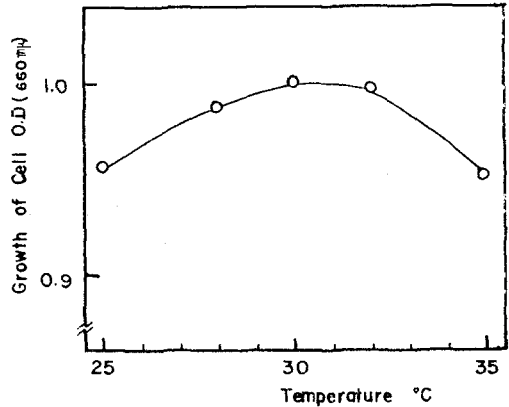


Fig. 6. Influence of Temperature on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (for 24 hrs)

f) 종균액 중의 세포수의 영향

종균액 중의 효모 세포수가 균의 생육에 미치는 효과를 보기 위하여, 세포의 농도를 달리한 종균액을 접종한 다음 30°C에서 12시간 배양한 결과 Table 2와 같았다.

종균의 농도가 배지 ml 당 1.5×10^5 cells 이하일 때에는 0.02로 효모의 생육이 없었으나 2.5×10^5 cells 에서는 0.26, 5×10^5 cells 에서는 0.41의 O. D (660mμ) 치를 보였다. 따라서 효모 YF-1의 배양을 위해서 1.5×10^5 cell/배지 ml 이상이 되게 접종하여야 한다는 것을 알았다.

g) 종균량과 생육곡선의 관계

앞의 결과에서 종균액중의 세포수에 따라 효모의 생육량이 변하는 결과를 나타내었으므로, 이곳에선 ① 0.4×10^8 cells, ② 0.8×10^8 cells, ③ 1.6×10^8 cells를 함유한 종균액 1 ml씩을 각 flask에 접종하여 배양하면서 경시적으로 효모의 생육량을 검토한 결과 어느것이나 준비기, 대수기, 정지기, 사멸기가 있었다. (Fig. 7) 정지기의 균의 최고 생육시간은 a)와 b)의 경우에선 28시간 되었을 때 이었고, c)의 경우에선 24시간 되었을 때 이었으며, 이때의 배양액 40 ml 당 건조효모(원심분리 한 다음 35°C서 24시간 진공 건조시켰을 때) ①에서는 450mg, ②에서는 520mg 이었다. ③에서는 550mg 으로서 건조효모의 양이 가장 많았으며 이량을 배지 100ml 당으로 환산하면 1.38g에 이른다.

h) 효모의 조성

앞의 연구 결과에서 얻어진 최적 배지조성에서 효모를 배양한 다음 이를 원심분리하여 균체를 회수하였다. 그 후 이를 35°C에서 24시간 동안 진공

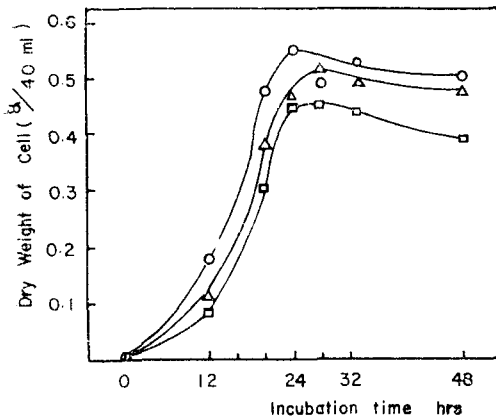


Fig. 7. Effect of Cell Concentration on the Growth Curve of *Saccharomyces cerevisiae* YF-1 (at 30°C)

Cell concentration of seed
 0.4×10^8 cells : □—□
 0.8×10^8 cells : △—△
 1.6×10^8 cells : ○—○

진조시킨 다음 일반성분을 분석하였다.

그 결과 Table 3 과 같이 조단백질이 56.0~57.0%, 지방 1.3%, 총당 6.5%, 회분이 9.6%이었다.

Table 3. Composition of Dry Yeast

Composition	(%)
Crude protein	56.96
Lipid	1.30
Total sugar	6.53
Ash	9.62

2) 고 찰

아황산 pulp 폐액 또는 목재당화액에는 Hexose 외에 Pentose 가 함유되어 있으며, Pentose 를 자화시키는 효모인 *Micotorula japonica* 또는 *Candida rigida* 등을 여기에 배양했을 때 좋은 결과를 얻었다는 보고가 있다.^{20~23)} 또한 생산된 균체의 양계시험 결과에서 *Micotorula japonica* 의 균체는 병아리의 식용을 증진시키고 그의 육성시험이 양호하다는 것을 보고하였다.²³⁾

Yamada 등은(1951년) 아황산 pulp 폐액으로부터 효모생산에 대하여 연구했으며²²⁾ 이를 사료에 첨가하여 판매하였다. 이때 효모는 對糖 65%의 균체를 생합성하고 그의 단백질 함량은 50~60%, 지방은 20~63% 정도이었으며, 균체의 종류에 따라 대당 소독량과 단백질이 다름을 보고하였다.

Peterson 등²⁴⁾ 은 13종의 목재를 이용해서 각종

당화액을 만든 뒤, 발효에 대하여 연구하였으며, Reister²⁵⁾는 고구마진분공장의 폐액을 Waldhof fermentor 를 사용해서 *Torulopsis utilis* 를 배양할 때 pH 5.0 부근의 pH 에서 생육이 좋았고 잡균의 오염이 없었으며, 이때 단백질 함량은 55%이었다고 했다. Ramage 등²⁶⁾은 통조림공장의 과실폐액인 배(pear)의 여액으로부터 사료효모의 제조가 가능함을 보고하였으며, Veldhuis 등²⁷⁾은 citrus 의 폐액 이용에 대하여, 그리고 Porges 등²⁸⁾은 lactose 의 자화력이 있는 효모를 사용, 낙동폐액을 이용한 효모배양에 대하여 연구하였다.

배양시의 영양 필요량은 당밀을 사용한 Read 등²⁹⁾에 의하면 95%의 dry yeast 100 lbs 당 ammonia 5.64 lbs, phosphorus 1.71 lbs 가 필요하다고 했다. 독일에서의 아황산 pulp 폐액으로부터 Waldhof fermentor 로 효모를 제조하였을 때에는 dry yeast 100 lbs 당 ammonia 8.7 lbs, phosphorus 1.29 lbs, Mg 0.37 lbs 를 필요로 하였다.³⁰⁾

프랑스 British Petroleum 사의 Champagne 등¹⁰⁾은 1963년 석유로부터 脫 paraffine 을 곁하여 공업적으로 배양하는 방법에 성공하였다. 이때 단백질의 함량은 건물량의 약 50~60% 로서 필수아미노산, Vitamin B group 이 포함되어 있다고 보고하였다.^{10,31)}

본 실험에서 얻은 효모균체를 상압건조 시켰을 때, 이의 조성은 조단백질 56~57%, 지방 1~2%, 6~7%, 총당회 9~10%분이 이었으며, 이러한 효모균체의 함량은 Grey³²⁾, Ingram³³⁾ Dunn³⁴⁾ 등의 보고와 비교했을 때 거의 비슷하다.

또 이러한 *Saccharomyces cerevisiae* 의 균체엔 건조물 100 g 당 3.0~33.5 mg 정도의 Vitamin 이 있으며, 그 외에도 5~10%의 핵산화합물이 균체 내에 함유되어 있다고 보고되어 있다.⁸⁾

한편 본 실험에 이용한 주정폐액 잔사의 건조물(105°C 상압건조)에는 19.96%의 총당, 33.08%의 조단백질, 2.06%의 회분이 함유되어 있어, 이의 이용에 대한 것도 연구과제라고 하겠다.

따라서 금후엔, 연속적소규모 공장배양에 대하여 계속 연구하여 폐수처리와 함께 사료용, 제약용, 핵산제조용 효모의 생산과 어분과 효모의 수입대체에 대해서 계속 연구하고자 한다.

4. 요 약

1) 폐액을 여과했을 때 잔사부분엔 조단백질 33.08%, 총당 19.96%, 회분 2.06% 이었으며, 여액 부분은 환원당 1.54%, 조단백질 2.48%, 회분이

0.43%이었으며 1kg/cm²에서 15분간 2차 살균한 결과 그의 pH가 3.15이었다.

2) 여액을 기본배지로 하여 flask 상에서 *Saccharomyces cerevisiae* YF-1의 최적배양조건을 구한 결과 배지 100ml 당 Urea 0.428g, KH₂PO₄ 0.439g, MgSO₄·5H₂O 0.21g을 첨가한 뒤 pH 4.0, 30°C에서 24~28시간 배양함이 가장 좋았다. 이때 배지 100ml 당 1.38g의 건조효모균체 (35°C에서 24시간 진공건조)를 얻을 수 있었다.

3) 건조효모의 조성은 조단백질 56.96%, 지방 1.30%, 탄수화물 6.53%, 회분 9.62%이었다.

본 연구는 문교부 학술연구조정비로 행한 것이다.

참 고 문 헌

1. Fink, H., and F. Just: *Biochem. Zeit.*, **300**, 84(1938)
2. Fink, H., and F. Just: *Biochem. Zeit.*, **303**, 234(1939)
3. Fink, H., and F. Just: *Biochem. Zeit.*, **312**, 312(1942)
4. C. G. Dunn: *Wallerstein Lab. Commun.*, **15**, 61(1952)
5. F. S. Thatcher: *Ann. Rev. Microbiol.*, **8**, 449 (1954)
6. 朝井勇宣編: 微生物工業, 朝倉書店(1956)
7. 友田宣孝, 坂口歌一郎, 山田正一, 朝井勇宣編: 微生物工業講座, **4**, 酵母利用工業, 共立出版 KK (1957)
8. 山田浩一: 食品工業微生物學, 光林書院(1971)
9. 植村定治郎, 相田浩: 醱酵と微生物Ⅲ, 朝倉書店 p. 37~42(1970)
10. Champagnat, A. C.: *Nature*, **197**, 13(1963)
11. Miller, T. L., Lie S., and Johnson M. J.: *Biotechnol. Bioeng.* **6**, 299(1965)
12. Takahashi J., Kawabata Y., and Yamada K.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 292(1965)
13. Takeda I., et al: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 796 (1969)
14. Arima K., et al: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 1004(1965)
15. Kwon, T. W., Mheen, T. I., Park, Y., and Pyun, Y. R.: *Kor. J. Food Sci. Tech.*, **2** 56-67 (1970)
16. Lee K. H., and Shin, H. K.: *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, **13**, 43(1970)
17. 무역통계연보: 국세청 (1973)
18. 축산편람: 농림부 축산국 (1972)
19. 食品工學實驗書: 京都大學農學部 食品工業教室編, 養賢堂版 p.11 (1971)
20. 山田和夫: 日農化, **19**, 800(1943)
21. 山口和夫: 茨大農學術報告 **5**, 65(1957)
22. Yamada, K. T. Ito., S. Handa, and A. Koyama: *J. Agr. Chem. Soc. Japen*, **25**, 173 (1951)
23. 三輪萬治: 日酸協誌 **17**, 535(1959)
24. Peterson, W. H., et al: *Ind. Eng. Chem.*, **37**, 30(1945)
25. C. O. Reister: *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 70 (1954)
26. Ramage, W. D., and J. H. Thompson: *Yeast Symposium Sponcere by Quartermaster Food and Container Inst. Milwawkee, Wis.* (1948)
27. Veldhuis, M. K.: *Proc. First Natl. Public Health Eng. Conf., Univ. of Florida*(1952)
28. Porges, N., Peinsky, J. B., and Jasewicz, L.: *J. Dairy Sci.*, **34**, 615(1950)
29. Read, F. O.: *Proc. 21th Cong. South Africa Sugar Tech. Assoc.* (1947)
30. Harris, E. F., et al: *Paper Trade J.*, **123**, 38(1946)
31. I. C. Bennet, J. C. Hondermarck, and J. R. Todd: *Hydrocarbon Processing*, **48**, 104(1969)
32. P. P. Grey: *Wallerstein Lab. Commun.*, **6**, 50(1943)
33. M. Ingram: *An Introduction to the Biology of Yeasts*, Sir Issac pitman and Sons Ltd (1955)