

農産廢資源의 飼料化에 關한 研究

第一報 밤송이의 前加水分解의 條件과 前加水分解液에 對한 酵母生産

柳洲鉉·梁 隆·洪允命·朴正吉*

延世大學校 食品工學科

Studies on the Feed Stuffs from the Agricultural Waste

Part 1. Condition of pre-hydrolysis from chestnut-bur and yeast production from pre-hydrolyzate

Juhyun Yu, Ryung Yang, Yun Myung Hong and Chung Kil Park.

Department of Food Engineering Yonsei University, Seoul.

Abstract

For the purpose of producing single cell protein out of an agricultural waste, chestnut-bur was hydrolyzed with 4% H_2SO_4 solution for 30 min under the steam pressure of $1.5kg/cm^2$, and 21% saccharification of the original carbon source was obtained. When *Candida tropicalis* was grown in the hydrolyzate the cell yield remained only 21% of the original sugar suggesting a necessity of further treatments.

緒 論

農産廢資源 또는 식품공업의 폐물에 미생물을 배양하여 식량또는 사료로 사용하고자 많은 研究가 되어왔으며 특히 1, 2차 세계대전중 식량부족을 느낀 독일과 목재자원이 풍부한 쓰런에서 많은 研究가 있었다¹⁾. Cellulose, hemicellulose를 효과적으로 分解하여 單糖類를 生成하는 化學物質로는 무기산을 들수있는데 이중 황산과 염산이 제일 좋다고 보고 되어있다²⁾. Julsingha³⁾는 질류를 化學적으로 처리하여 원료에 對하여 20%의 당화액을 얻었으며 여기서 질 1kg당 20%의 Ethyl alcohol을 얻었고 高田⁴⁾ 등은 왕겨를 황산으로 3회에 걸쳐 가압 가열하여 당화시켜 원료에 대하여 47%의 환원당을 얻어서 효모 22%를 얻었다. 일반적으로

황산으로 농산폐자원을 당화시킬때 저온에서 저농도로 一次당화한 후 二次당화시키면 hemicellulose의 손실을 막을수 있다고 알려져있다.⁵⁾ 우리나라에서도 볏짚을 황산으로 당화시켜 효모생산에 대하여 研究가 있었다.⁶⁾

그러나 아직 밤송이의 사료화에 대해서는 아무런 연구가 없었다. 本報에서는 밤송이를 저농도의 황산으로 加水分解하여 加水分解液에 영양사료 효모를 生産할 目的으로 研究하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

밤송이는 경기도 덕소군 덕소면 연세大學校林에서 수확한 것을 사용하였다.

2. 實驗方法

1) 밤송이의 처리

수집한 밤송이를 물로 씻어서 실온에서 건조시킨 다음 Cutting mill에서 40 mesh의 크기로 파쇄하여 시료로 사용하였다.

2) 수분, 회분의 定量法⁷⁾

상법에 따라서 重量法으로 定量하였다.

3) 조단백 定量法⁷⁾

Micro Kjeldahl 法으로 질소를 定量하고, 질소량에 6.25를 곱해서 조단백량으로 환산하였다.

4) Alcohol-Benzene 추출물 定量法⁸⁾

TAPPI Standard T 6m-59의 方法으로 측정하였다.

5) Lignin 定量法⁸⁾

TAPPI Standard T 13m-54의 方法으로 측정하였다.

6) 조섬유

시료 전량에서 상기의 양을 제한 것으로 하였다.

7) 밤송이의 전가수분해法

밤송이 0.5g을 250ml의 삼각 flask에 담고 황산농도를 0.1~20.0%범위에서 다르게 조절한 것을 솜타개를 하고 autoclave를 사용하여 0.5~1.5 kg/cm²의 증기압하에서 전가수분해를 한다.

그후 이를 여과하여 여액은 전가수분해로 生成된 당의 양을 분석하여 당화율로 환산한다.

8) Pentose 定量

Sakai⁹⁾의 비색 定量法을 利用하여 定量하였다.

9) 前加水分解液의 효모배양법

前加水分解液의 배지는 밤송이의 4% 황산액의 비율 1:18로 하여 1.5kg/cm² 증기압의 autoclave에서 30분동안 당화시켜 여과후 CaCO₃로 pH 6.8까지 中和한 다음 여과하여 分析한 결과 Pentose 함량은 1.03%, Total Nitrogen은 0.03%였다. 이액을 효모배양액으로하여 *Candida tropicalis*를 접종하였다. 배양된 균체량은 660m μ 의 파장에서 O.D. 측정법과 건조량의 측정법으로 환산하였다.

結果 및 考察

1. 밤송이의 一般成分

研究에 使用된 밤송이의 一般成分을 分析한 結

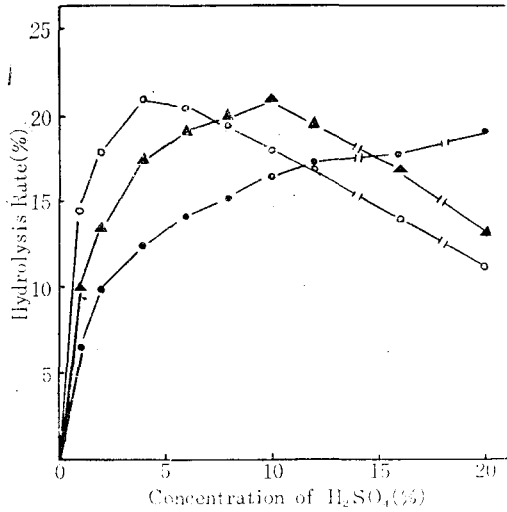


Fig. 1. Effect of H₂SO₄ Concentration and Pressure on the Prehydrolysis of Chestnut-bur

● : 0.5kg/cm²
▲ : 1.0kg/cm²
○ : 1.5kg/cm²

果, 水分 12.04%, Lignin 20.04%, 灰分 2.74%, 조단백 3.32%, 조섬유 56.46%이었다. (Table 1)

2. 밤송이의 산가수분해에 의한 당의 生産

1) 전가수분해에 의한 당의 生産

i) 황산농도와 압력의 영향

밤송이의 가수분해로 인한 당의 生産에 미치는 황산의 농도와 압력의 영향을 검토하기 위하여 밤송이 0.5g을 취하여 밤송이와 황산액의 비율 1:30으로하여 30분 동안 0.5, 1.0, 1.5kg/cm²의 증기압하에서 각각 加水分解한 다음 Pentose 量을 측정하여 환산한 당화율은 Fig. 1과 같다.

Pentose의 量은 0.5kg/cm²의 증기압하에서 황산농도를 다르게하여 加水分解시켰을때는 황산농도가 높아질수록 당화율이 증가하였다. 황산농도 20%에서 밤송이의 당화율은 19.3%였다. 1.0kg/cm² 증기압하에서는 황산농도 10%까지 높아질 때는 증가하고 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 이 압력하에서의 최적황산 농도는 10%이었고

Table 1. General Composition of Chestnut-bur

Unit : %

Composition Speciman	Moisture	Lignin	Ash	Alcohol-Benzene ext.	Crude Protein	Crude Cellulose
Chestnut-bur	12.04	20.03	2.74	5.41	3.32	56.46

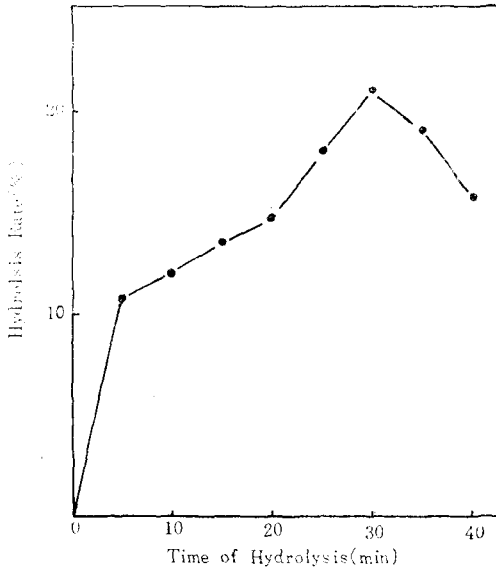


Fig. 2. Effect of Time on the Prehydrolysis of Chestnut-bur

그때 당화율은 21%였다. 1.5kg/cm²의 증기압하에서는 황산농도 4%까지는 산의 농도가 높은 것을 사용함에 따라 당화율도 증가하나 그 이상의 농도에서는 1.0kg/cm²의 증기압때와 같이 산의 농도가 높아짐에 따라 적어졌다. 1.5kg/cm²하에서는 최적황산농도는 4%이었으며 이때 밤송이 당화율은 21%였다. 이상의 결과를 비추어 볼때 가수분해의 최적조건은 증기압이 높을수록 산의 농도가 낮은 곳에 있음을 알 수 있다. 그러므로 전가수분해는 1.5kg/cm²에서 4% H₂SO₄을 사용하여 금후 실험에 利用하였다.

ii) 시간의 영향

밤송이의 가수분해에 미치는 加水分解시간의 영향을 알기 위하여 밤송이와 4% H₂SO₄액의 비를 1:30으로하여 1.5kg/cm² 증기압하에서 당화시간을 5~40분내에서 변화시켜 前加水分解한 다음 여과후 여액중의 Pentose 양을 측정하여 환산한 당화율은 Fig. 2와 같다. 당화율은 1.5kg/cm² 증기압하에서 4% H₂SO₄로 당화 시킬때 30분까지는 加水分解시간과 함께 증가하고 35분 이상에서는 오히려 감소하는 경향이 있다. 그러므로 이때 加水分解의 최적 시간은 30분이었으며 당화율은 21%이었다. 금후의 前加水分解는 30분 처리 하였다.

iii) 4% H₂SO₄의 첨가량의 영향

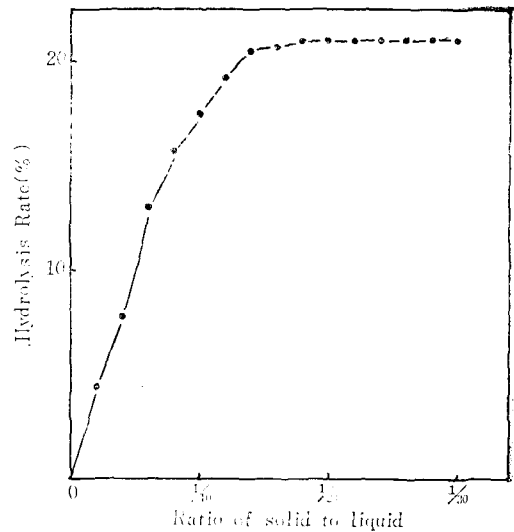


Fig. 3. Effect of Ratio of Liquid to Solid on the Prehydrolysis of Chestnut-bur

밤송이 가수분해에 對한 4% H₂SO₄의 용량의 영향을 알기 위하여 밤송이 0.5g에 4% H₂SO₄를 0.5~30ml 범위에서 각각 다른양을 가하여 前加水分解를 행한 후 여과하여 Pentose 양을 측정 환산한 당화율은 Fig 3과 같다. 당화율은 4% H₂SO₄을 18ml 까지 첨가하였을 때는 증가하였고 그이상의 용량을 가하였을 때는 아무런 변화가 없었다. 그러므로 전가수분해에 4% H₂SO₄의 첨가량을 밤송이 중량에 18배를 첨가하여 가수분해 하였을 때 최적 용량이 되며 이때 당화율은 21%을 얻을 수 있음을 알 수 있다.

3. 밤송이 加水分解에 對한 효모배양 조건

1) 前加水分解液에 對한 효모배양의 조건

i) pH의 영향

균의 生育에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH를 다르게 조절한 前加水分解液에 효모를 배양하여 O.D.를 측정한 結果는 Fig. 4와 같으며 pH 6에서 O.D. 0.095로 가장 높았으므로 금후 전가수분해 당화액의 효모배양에 대해서도 이것을 利用하였다.

ii) N-Source의 영향

균의 生育에 미치는 N-source의 영향을 검토하기 위하여 pH 6으로 조절한 당액 20ml에 ① NH₄Cl ② (NH₂)₂CO ③ (NH₄)₂SO₄ ④ NH₄H₂PO₄ ⑤ (NH₄)₂HPO₄ ⑥ (NH₄)₃PO₄·3H₂O를 각각 당화액에 對해서 질소원으로 0.3%씩 가하여 효모 *Candida*

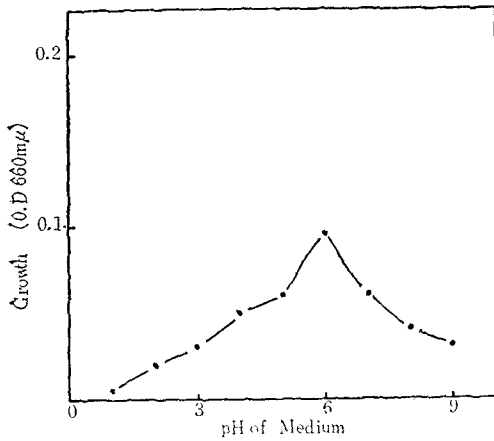


Fig. 4. Effect of pH on the Growth of *Candida tropicalis*

tropicalis 를 배양한 후 O.D. 를 측정한 결과는 Fig 5 와 같다. $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 와 NH_4Cl 은 다른 질소원보다 균체 생육에 좋은 질소원이었다.

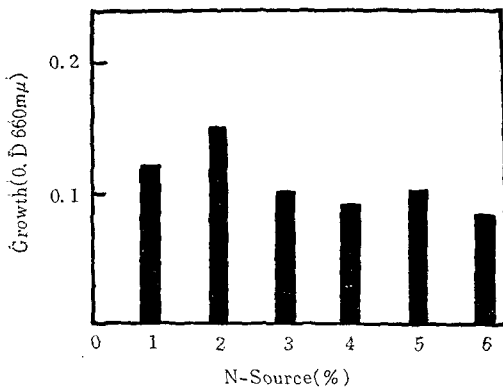


Fig. 5. Effect of N-sources on the Growth of *Candida tropicalis*

1; NH_4Cl , 2; $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 5; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 6; $(\text{NH}_4)_3\text{PO}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$

위 결과로 부터 질소량의 최적량을 측정하기 위하여 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 와 NH_4Cl 을 0.1~0.7% 까지 변화시켜서 효모를 배양 측정된 결과는 Fig. 6 과 같다.

$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 는 0.4% 까지 첨가할때는 균체량이 증가하였고 그 이상에서는 감소하였으며 NH_4Cl 에서도 역시 같았다. 그러나 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 를 0.4% 첨가

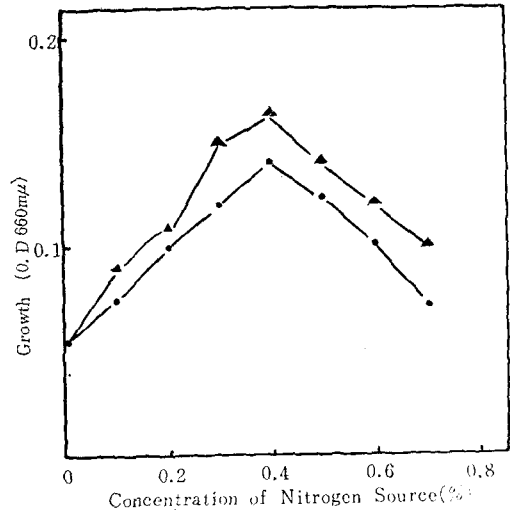


Fig. 6. Effect of Nitrogen Source on the Growth of *Candida tropicalis*

●; NH_4Cl
▲; $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$

하였을때 O.D. 는 0.16 이고 NH_4Cl 에서는 0.14 이었다. 이상의 결과를 비교해 볼때 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 가 NH_4Cl 보다 균의 생육에 더 좋은 질소원이므로 前加水分解液에 균체를 배양할 때는 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 를 0.4% 첨가하였다.

iii) K 과 P 의 영향

균의 생육에 미치는 K, P 의 영향을 알기 위하여 pH 6 으로 조절된 전가수분해액 20ml 에 0.4% $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0.1712g 加하여 배지로 한 후 K_3PO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 를 각각 0.02~0.12% 까지 변화시켜 加한후 O.D. 를 측정된 결과는 Fig. 7 과 같다. K_3PO_4 는 0.08% 까지 첨가하면 O.D. 가 증가하며 그 이상은 감소하고 0.08% 를 첨가하였을때 O.D. 0.195 로 最大이다. K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 는 0.1% 첨가량까지는 O.D. 가 증가하며 또한 이점에서 O.D. 0.190 와 0.185 로 最大의 균체생장을 이루고 있다. 이상의 결과를 종합해 보면 K_3PO_4 가 제일 좋았지만 價格을 비교해 보면 KH_2PO_4 가 값싸기 때문에 전가수분해액의 효모배양에는 KH_2PO_4 의 농도를 0.1% 로 하여 利用하였다.

iv) Mg-Source 의 영향

균의 생육에 미치는 Mg 의 영향을 검토하기 위하여 前加水分解液 20ml 에 $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1% 을 加한 후 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 을 첨가한 후 배양한 결과는 Fig. 8 과 같다. MgSO

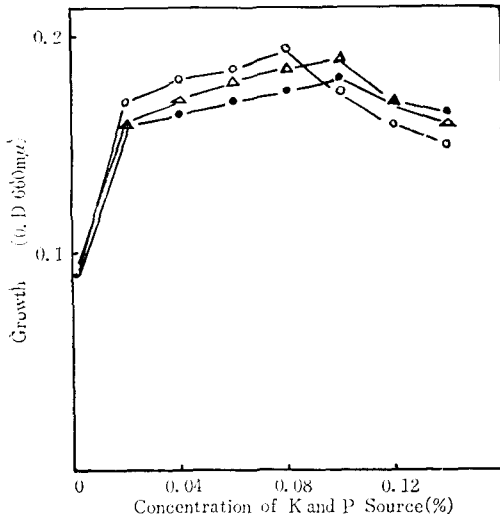


Fig. 7. Effect of K and P-Source on the Growth of *Candida tropicalis*
●; KH_2PO_4 ▲; K_2HPO_4 ○; K_3PO_4

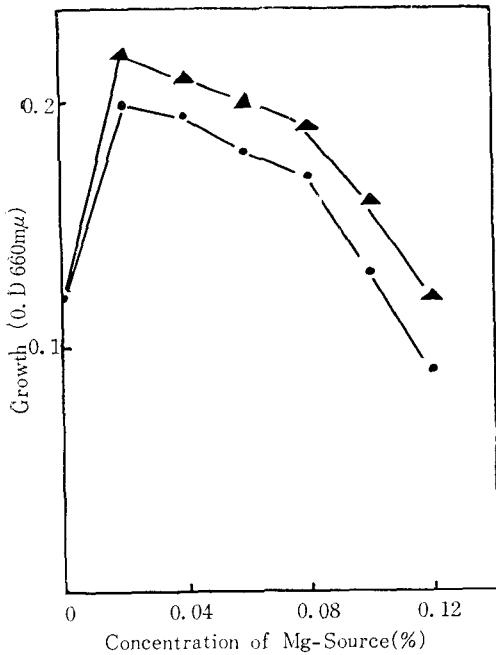


Fig. 8: Effect of Mg-Source on the Growth of *Candida tropicalis*
●; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ▲; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

$\cdot 7H_2O$ 와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 는 둘다 0.02% 첨가하였을 때 最大이고 그 이상에서는 감소하였다.

0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 일 때는 O.D. 0.22이며 Mg-

$Cl_2 \cdot 6H_2O$ 는 0.2 이므로 다음의 前加水分解 당액에 효모를 배양할 때는 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 利用하였다.

이상의 실험결과로부터 배지의 조성은 다음이 좋았다.

Sugar 1.03%, $(NH_2)_2CO$ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, pH 6 다음의 실험에서는 이것을 배지로 사용하였다.

v) 온도의 영향

균의 生育에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 앞에서 결정된 배지에 온도를 26~35°C 까지 변화시켜 배양한 후 O.D. 를 측정한 결과 Fig. 9 와 같았다. 30°C 일 때 O.D. 0.22로 最大이며 그 이하 또는 그 이상에서는 감소하였다. 그러므로 最 적온도는 30°C 를 利用하였다.

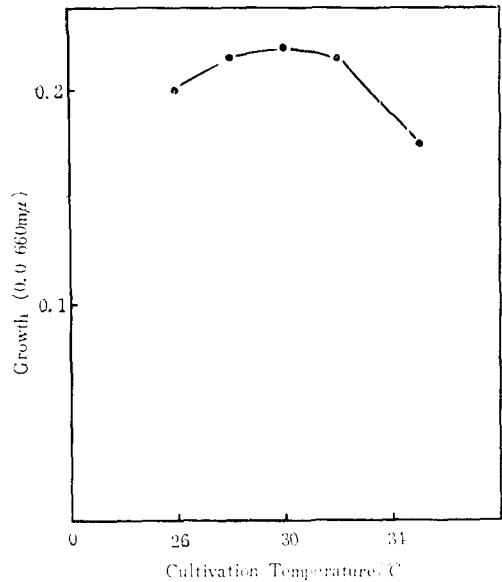


Fig. 9: Effect of Temperature on the Growth of *Candida tropicalis*

vi) 배양시간의 영향

균의 生育에 미치는 時間의 영향을 검토하기 위하여 4~48시간까지 변화시켜 O.D. 를 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 배양 8시간 후 부터는 대수기에 들어가고 16시간 후 부터는 정상기가 시작되었다. 그러나 32시간 부터는 동일한치를 보여 주었다. 그러므로 금후의 배양시간을 16시간으로 결정하였다.

vii) 균체의 수율측정

균체의 수율을 측정하기 위하여 전가수분해 당

Table 2 Yeast Production with Acid-hydrolyzate of Chestnut-bur

Speciman	Hydrolysis			Yeast cultivation		
	Pressure (kg/cm ²)	H ₂ SO ₄ (Conc. %)	Reducing Sugar/Chestnut-bur	Cell wt. /100ml	Cell wt. /Sugar	Cell wt. /Chestnut-bur
Chestnut-bur	1.5	4	21.03%	0.2189g	21.25%	4.48%

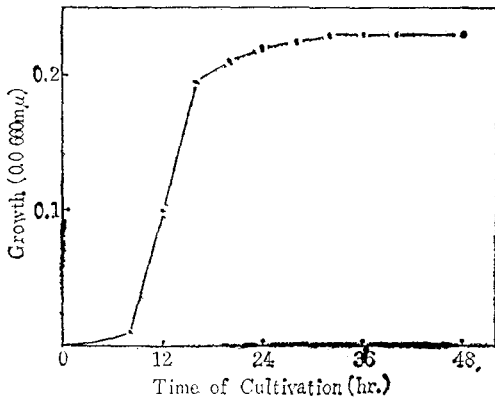


Fig. 10: Growth Curve of *Candida tropicalis*

액 100ml에 (NH₂)₂CO 0.4% KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, pH 6 으로 조절하여 30°C에서 32 시간 진탕배양한 다음 원심분리하여 균체 즉 침전물을 얻어 105°C oven에서 10시간 건조시켜 重量을 측정하 결과 Table 2 와 같다.

당액 100ml에 대해서 균체량은 0.2189g이며 Pentose 에 대해서 1g당 효모는 0.2125g, 밤송이 重量에 대한 수율은 4.48%이었다. 이상의 研究에서 당의 이용율이 낮은것은 일반적으로 잘 알려진 화학적 方法에 의하여 얻어지는 당액중에는 발효저해 물질인 Furfural 이 作用하기 때문인것으로 생각된다.

要 約

밤송이를 4% H₂SO₄ 용액으로 1.5kg/cm²에서 30

분간 전가수분해 시키면 원료에 대한 당화율은 21%을 얻었으며 生成된 당화액에 효모 *Candida tropicalis* 를 배양한 結果 당이용율은 20.5%에 불과하며 生成당에 대한 균체량의 비율은 21.25%을 얻을수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) L. E. Wise, E. C. Jahn: Wood Chemistry
- 2) 草間潤·石井忠雄: 工業化, 69, 3, (1966)
- 3) Julsingha, J. V.: Chem. Week blad., 37, 649 (1940)
- 4) 高田亮平·佐佐傳介: 日釀造學誌 20, 118(1942)
- 5) Hokkaido Prefecture: Japan patent 5249 (1963)
- 6) 배무, 김병홍, 이제준, 김수일, : 한국과학기술처 연구 개발보고서, R72-32 (1972)
- 7) 東京大學 農學部 農藝化學教室: 實驗農藝化學上卷 p. 112, 朝倉書店, 東京 (1967)
- 8) Technical Association of pulp and Paper Industry: TAPPI Standard Method, New York (1961)
- 9) 酒井愿夫: 農化, 30, 昭和 30
- 10) 小林, 田淵: 農化, 28, 171 (1954)
- 11) 三浦, 酒田: 木材化學, 丸善 (1948)
- 12) Jerome F. Saeman, Janet L.: Industrial and Eng. Chem., 7 (1945)
- 13) 柴崎一雄·麻生清: 日農化, 31, 昭和 32
- 14) Gutgerts, N.: Spirto-Vodochmaya Prom., 14, 52 (1937).