

# 農産廢資源의 飼料化에 關한 研究

## 第二報 밤송이의 後加水分解의 條件과 後加水分解液에 對한 酵母生産

朴正吉\* · 梁 隆 · 柳洲鉉

延世大學校 食品工學科

## Studies on the Feed Stuffs from the Agricultural Waste

### Part II Conditions of post-hydrolysis from chestnut-bur and yeast production from post-hydrolyzate.

Chung Kil Park, Ryung Yang and Juhyun Yu

Department of Food Engineering Yonsei University, Seoul.

#### Abstract

The pre-hydrolyzed residue of Chestnut-bur (1) was treated with 74%  $H_2SO_4$  solution at 30°C for 40 minutes. Then the solution was diluted to 5% with distilled water and kept for another 40 minutes under steam pressure of 1.5 kg/cm<sup>3</sup> to complete the post-hydrolyzation. In the resulting hydrolyzate, which showed 49.3% in saccharification rate, *Candida utilis* was grown and found that 62.5% of the reducing sugar had been converted to the yeast cells.

#### 緒 論

이미 第一報에서 밤송이를 前加水分解시킨 당화액에 효모배양이 가능함을 발표한 바 있다. 본 연구에서는 밤송이를 후가수분해시켜 生産된 당화액에 효모를 배양한 結果에 對하여 보고한다.

#### 材料 및 實驗方法

##### 1. 實驗材料

밤송이를 4%  $H_2SO_4$ 으로 前加水分解 시켜 여과한 후 남은 잔사를 상온에서 풍건하여 시료로 사용하였다.

##### 2. 實驗方法

###### 1). 後加水分解法

前加水分解가 끝난 밤송이 잔사를 황산농도 70~76% 범위에서 다른 농도로 조절한 황산용액으로 일정시간 침적, 교반한 후 다시 황산농도가 3~20%가 되도록 증류수를 가하여 희석시켜 0.5~1.5 kg/cm<sup>2</sup>의 증기압하에서 加熱하여 加水分解시켰다.

###### 2). Reducing sugar의 定量法

환원당의 定量法은 小林, 田淵에 의한 Somogyi 방법을 利用하였다.

밤송이의 後加水分解의 환원당 定量은 加水分解 후 여과액이 500ml가 되도록 증류수를 가한 후 이 중 50ml를 취하여  $CaCO_3$ 로 pH 6.8이 될 때까지 中和하여 여과한 후 여과액이 100ml가 되도록 증

류수를 加한다. 이중 10ml를 취하여 분석한후 換算하여 환원당을 定量하였다.

### 3). 後加水分解液의 효모배양법

효모배지는 後加水分解시킨 당화액 20ml를 250 ml 삼각 flask에 넣고 필요에 따라 적당량의 Yeast Food를 첨가한후 솜가개를 하여 1 kg/cm<sup>2</sup>의 증기압하에서 15분간 살균하여 냉각한 다음 *Candida utilis*를 접종하였다. 균체량은 660m $\mu$ 의 파장에서 O. D. 측정법과 건조량의 측정법으로 환산하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 후가수분해에 의한 당의 生産

#### 1). 황산농도와 압력의 영향

전 가수분해가 끝난 함수량이 8.7%인 밤송이 잔사를 후가수분해를 시킬때 당의 生産에 미치는 황산의 농도와 압력의 영향을 검토하기 위하여 밤송이 잔사 1g을 100ml 삼각 flask에 취하여 30°C에서 70~76% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24ml을 넣어 5분 간격으로 교반하여 40분간 침적시킨후 황산농도가 3~20%가 되도록 증류수를 加하여 희석하였다. 그후 0.5~1.5 kg/cm<sup>2</sup>로 증기압을 각각 변화시켜서 40분 동안 후가수분해시킨 다음 당화액을 여과하여 여과액중의 환원당을 定量하여 환산한결과 당화율은 Table 1과 같다. 70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 처리후 10%까지 희석시켰을때 저농도에서보다 고농도로 희석시키는 쪽이 환원당의 生成이 많다. 같은 희석농도에서는 처리한 증기압이 높아지면 당화율도 증가하게 된다. 15% 이상으로 희석하여 분해시키면 증기압 0.5~1kg/cm<sup>2</sup> 범위에서는 당화율이 증가하지만 1.5kg/cm<sup>2</sup>에서는 오히려 감소하는 경향이 있다. 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>으로 희석하여 1 kg/cm<sup>2</sup> 증기압으로 후가수분해하여 당화율54%을 얻을 수 있었다. 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>은 70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 거의 같은 공통성을 가졌으며 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>는 후가수분해 황산농도가 3~5%로 높아지면 당화

율도 증가하고 또한 증기압이 0.5~1.5kg/cm<sup>2</sup>의 범위에서 높아지면 역시 당화율이 증가하지만 희석 황산 농도가 10%이상이 되면 1 kg/cm<sup>2</sup>의 증기압에서 당화율이 좋았으며 후가수분해 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>일때 증기압은 1.5kg/cm<sup>2</sup>, 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>일때 1 kg/cm<sup>2</sup>의 증기압, 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>은 1 kg/cm<sup>2</sup>증기압하에서 똑같이 당화율 54%을 얻을 수 있는 것을 볼 수 있다. 76% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>처리 결과는 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>처리의 결과와 비슷하다. 후가수분해 황산농도 10%에서 1 kg/cm<sup>2</sup> 증기압과 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 kg/cm<sup>2</sup>에서 54%의 당화율이 얻어졌다. 이상의 결과를 비추어 보면 황산의 후가수분해 농도를 적게하고 증기압도 낮은편이 환원당의 生成이 많은 것을 알수있고 저농도는 이와 반대현상이 나타남을 볼 수 있다. 결과적으로 후가수분해에 있어서 농도와 압력의 최적조건은 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20ml을 加하여 40분 동안 침적시켜 후가수분해 산농도 5%로 희석시킨 다음 1.5kg/cm<sup>2</sup>의 증기압하에서 당화시키면 54%의 당화율을 얻을 수 있음을 알 수 있다. 후가수분해에서 당의 生成에 대한 금후의 실험은 이러한 조건을 이용하였다.

#### 2). 시간의 영향

밤송이의 후가수분해에 미치는 시간의 영향을 검토하기 위하여 전가수분해가 끝난 밤송이 잔사 1g을 100ml 삼각 flask에 취하여 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 24ml을 넣어 침적시키는 시간을 20, 40, 60분으로 하여 각각에 대하여 후가수분해 황산 농도를 모두 5%되게 한 후 20분 침적시킨 것은 20~60분, 40분 침적시킨 것은 10~70분, 60분 침적시킨 것은 20~60분 동안 1.5kg/cm<sup>2</sup> 증기압하에서 후가수분해를 시켜 환원당을 측정하여 환산한 당화율은 Table 2와 같다. 20분 침적한 것은 후가수분해 시간의 40분 처리가 높은 당화율을 보여 주었고 이때의 당화율은 44.5%이었다. 그이상 60분간 후가수분해 시킨 것은 오히려 당화율이 낮았다

Table 1: Effect of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Concentration and Pressure on the Primary and Secondary Hydrolysis of Chestnut-bur  
Unit : Hydrolysis rate (%)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Conc. (%)	3			5			10			15			20		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
70	17.5	39.7	47.1	19.7	41.6	50.4	33.9	44.9	49.3	41.6	49.3	44.9	50.4	54	41.6
72	30.7	41.6	49.3	32.9	44.9	50.4	39.7	48.2	48.2	46.0	50.4	44.9	52.6	54	38.3
74	31.8	46	50.4	35.0	49.3	54	44.9	52.6	49.3	46.0	54	44.9	54	54	36.1
76	30.7	42.7	49.3	33.9	46.0	52.6	41.6	50.4	48.2	44.9	50.4	41.6	49.3	49.3	36.1

40분 침적한 것은 후가수분해 시간이 10~40분까지는 처리시간이 길어지면 당화율이 증가하였으나 그 이상의 시간으로 처리할 때는 감소하였다. 후가수분해 시간이 40분일때 당화율은 54%을 얻을 수 있었다.

60분 침적한 것은 후가수분해 시간이 40분이 가장 좋았고 그 전후는 감소를 보여 주었는데 후가수분해 시간이 40분일 때 당화율은 52.5%였다.

이상의 결과로 후가수분해 시간은 언제나 40분이 가장 높은 것을 알 수 있으며 최적시간은 40분 침적시킨 후 후가수분해를 5% 황산으로 40분간 1.5kg/cm<sup>2</sup>의 증기압에서 가수분해 시키면 54%의 당화율이 얻어졌으므로 후가수분해 금후의 실험은 이러한 조건을 이용하였다.

3. 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 첨가용량의 영향  
영향 밤송이 후가수분해시 첨가한 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의

**Table 2:** Hydrolysis Rate of Sample of Chestnut-bur Subjected to Different Periods of Primary and Secondary Hydrolysis at 1.5kg/cm<sup>2</sup>

Time of primary Hydrolysis at 30°C with 74% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (min.)	Time of secondary Hydrolysis with 5% acid (min.)	Hydrolysis Rate (%)
20	20	31.8
	40	44.5
	60	41.3
40	10	22.2
	20	31.8
	30	52.5
	40	54.0
	50	52.5
	60	49.3
60	70	46.1
	20	50.8
	40	52.5
	60	49.3

영향을 알기 위하여 전가수분해가 끝난 밤송이 잔사 1g을 40ml Test tube에 취하여 밤송이와 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액과의 비율 1/1/2~1/24비 범위에서 다르게 하여 환원당을 측정하여 환산한 당화율은 Table 3와 같다. 당화율은 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>액의 비가 1:12까지는 황산액량비가 증가하면 할수록 많아졌는데 그이상 비에서는 변화가 없었다.

그러므로 후가수분해의 당생산은 밤송이와 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>액의 비율 1:2를 利用하였으며 이때의 당화율은 49.3%였다.

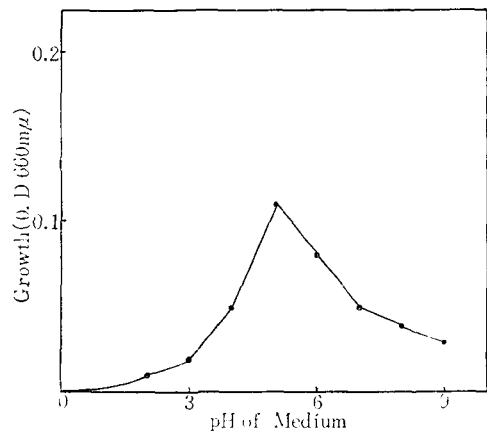
2. 밤송이 후가수분해액에 대한 효모배양 조건

1). pH의 영향

균의 生育에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH를 다르게 조절한 후 가수분해액에 효모를 배양하여 O.D를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체 수율의 최적 pH는 5로써 그때의 O.D 660mμ에서는 0.1이었기 때문에 후가수분해액의 효모배양은 pH 5를 利用하였다.

2). N-Source의 영향

균의 生育에 미치는 N-Source의 영향을 검토하기 위하여 pH 5로 조절한 당액에 ① NH<sub>4</sub>Cl ②



**Fig. 1:** Effect of pH on the Growth of *Candida utilis*

**Table 3:** Effect of Solid/Liquid Ratio on the Secondary Hydrolysis of Chestnut-bur  
Unit : Hydrolysis Ratio (%)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Conc. (%)	74									
	Solid/Liquid									
Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	1/1/2	1/1	1/2	1/3	1/4	1/8	1/12	1/16	1/20	1/24
1.5	22.2	38.9	49.3	50.8	50.8	52.5	54.0	54.0	54.0	54.0

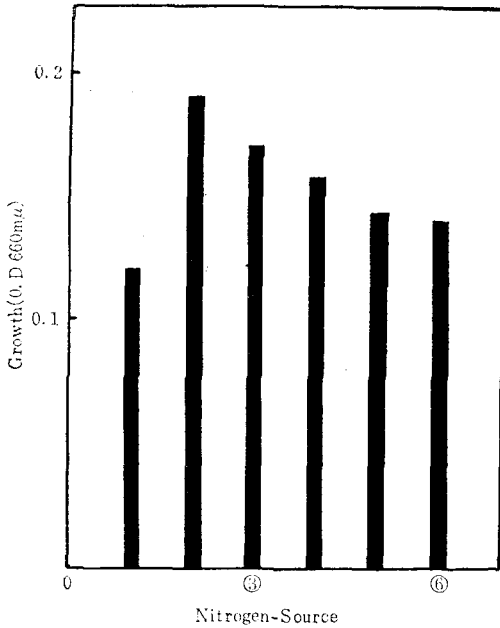


Fig. 2: Effect of Nitrogen Source on the Growth of *Candida utilis*

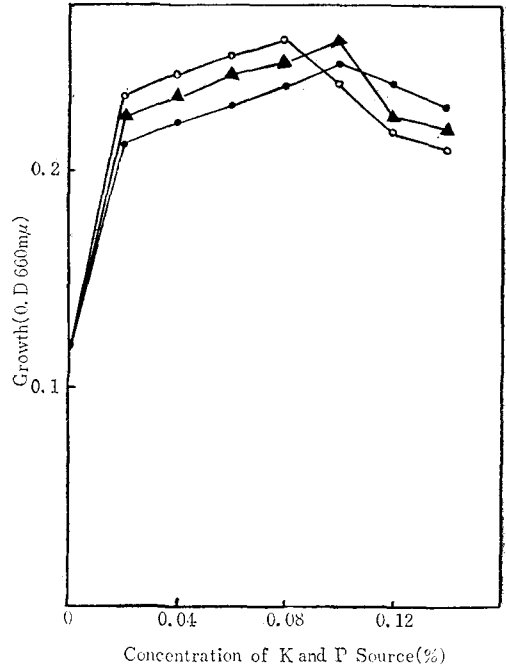


Fig. 4: Effect of K and P Source on the Growth of *Candida utilis*

● :  $K_3PO_4$  ▲ :  $K_2HPO_4$  ○ :  $KH_2PO_4$

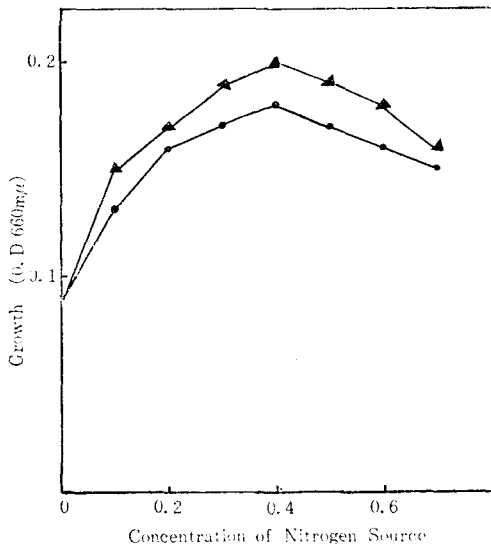


Fig. 3: Effect of Concentration of Nitrogen Sources on the Growth of *Candida utilis*

● :  $(NH_4)_2SO_4$  ▲ :  $(NH_2)_2CO$

$(NH_2)_2CO$  ③  $(NH_4)_2SO_4$  ④  $NH_4H_2PO_4$  ⑤  $(NH_4)_2HPO_4$  ⑥  $(NH_4)_3PO_4 \cdot 3H_2O$  를 각각 당화액에 대해서 질소원으로 0.3%씩 加하여 효모 *Candida utilis*

를 배양후 O.D. 를 측정한 結果는 Fig. 2 와 같다.

$(NH_2)_2CO$ 와  $(NH_4)_2SO_4$  는 다른 질소원보다 平均 生育에 좋은 질소원이었다.

다음은 위 結果로부터 질소량의 최적량을 측정하기 위하여  $(NH_2)_2CO$ 와  $(NH_4)_2SO_4$  을 0.1~0.7% 까지 변화시켜서 效果를 배양 O.D.를 측정한 結果는 Fig. 3 과 같다.  $(NH_2)_2CO$  는 0.4%까지 첨가할 때는 平均량이 증가하였고 그 이상에서는 감소를 초래하였으며  $(NH_4)_2SO_4$  도  $(NH_2)_2CO$  와 같았다. 그러나  $(NH_2)_2CO$  를 0.4% 첨가하였을 때 O.D. 0.2 이고  $(NH_4)_2SO_4$  을 0.4% 첨가하였을 때는 O.D. 0.18이다. 이상의 結果를 볼 때  $(NH_2)_2CO$  가  $(NH_4)_2SO_4$  보다 더 좋은 질소원이 된다. 다음의 연구에서는  $(NH_2)_2CO$  를 利用하였다.

### 3) K 과 P 의 영향

平均 生育에 미치는 K, P 의 영향을 검토하기 위하여 pH 5 로 조절한 20ml 의 후가수분해액에 0.4%  $(NH_2)_2CO$  를 加하여 배지로 한후 여기에  $K_3PO_4$ ,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$  를 각각 0.02~0.14% 까지 변화시켜 加한후 O.D.를 측정한 結果는 Fig. 4 와 같다.  $K_3PO_4$  0.08% 를 첨가할 때 O.D. 0.26,  $K_2HPO_4$  0.1% 이면 O.D. 0.255,  $KH_2PO_4$  0.1% 이면 O.D. 0.25 이

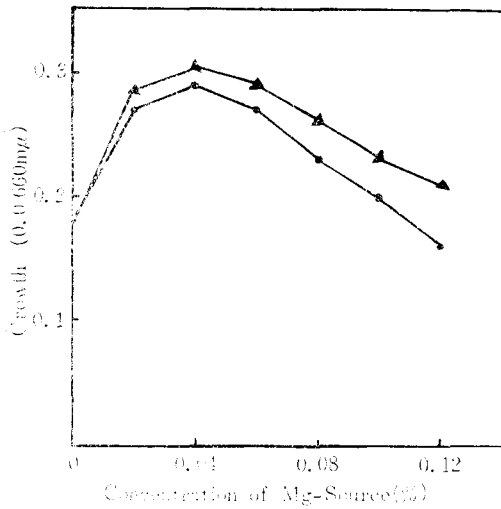


Fig. 5: Effect of Mg-Sources on the Growth of *Candida utilis*  
 ● : MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, ▲ : MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

다.

이상의 결과로써 K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 제일 균생육에 좋았지만 가격이 저렴한 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 택하여 이하의 실험에 利用하였다.

#### 4). Mg-Source의 영향

균의 생육에 미치는 Mg-Source의 영향을 검토하기 위하여 pH 5로 조절한후 가수분해액에 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 0.4%, K와 P-Source인 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%를 추가한 후 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O와 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O의 양을 다르게하여 첨가한 후 배양한 결과는 Fig. 5와 같다 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O나 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O를 0.04%첨가하였을 때 O.D 0.305와 0.29로 가장 좋은 값을 보여주었는데 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 균의 생육에 더 좋은 효과를 주었기 때문에 금후의 실험은 0.04% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 利用하였다. 이상의 실험으로 배지의 조성은 다음과 같이 함이 균의 생육에 좋았다. Sugar 1.02%, (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 0.4%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, Mg SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04%, pH 5.

#### 5) 온도의 영향

균의 생육에 온도가 미치는 영향을 검토하기 위하여 배지에 온도 26~35°C까지 변화시켜 배양한 후 O.D를 측정할 결과는 Fig. 6과 같다. 최적온도는 30°C였다. 그러므로 금후의 실험은 이것을 利用하였다.

#### 6). 배양시간의 영향

균의 생육에 미치는 시간의 영향을 검토하기 위하여 4~48시간까지 변화시켜 O.D.를 측정할 결

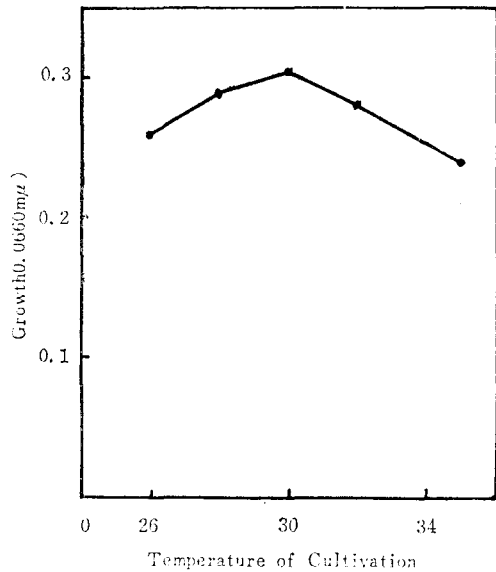


Fig. 6: Effect of Temperature on the Growth of *Candida utilis*

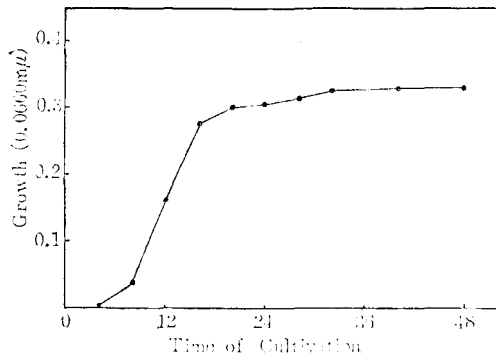


Fig. 7: Growth Curve of *Candida utilis*

과는 Fig. 7과 같다. 배양 8시간후 부터는 대수기에 들어가고 16시간후부터는 정상기가 시작되었다. 그러나 40시간부터는 동일한 O.D.를 보여 주었으므로 40시간을 배양 최적시간으로 결정하였다.

#### 7). 균체의 수율

위의 배양조건 검토에서 얻어진 최적 조건인 후 가수분해액 100ml에 (NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO 0.04%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.04%, pH 5로 조절하여 30°C에서 40시간 진탕배양하여 生成된 균체를 원심 분리하여 균체, 즉 침전물을 얻어 105°C oven에서 10시간 건조시켜 重量을 측정할 것은 Table 4

**Table 6:** Yeast Production with Acid-hydrolyzate of Chestnut-bur

Speciman	Hydrolysis			Yeast cultivation		
	Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Conc. %)	Reducing Sugar/ Chestnut-bur	Cell wt. / 100ml	Cell wt. / Sugar	Cell wt. / Chestnut-bur
Chestnut bur	1.5	74	49.3%	0.6372g	62.47%	31.23%

와 같다. 당액 100ml에 대해서 균체량은 0.6372g이며 생성된 당에 대한 비율은 62.47%이며 밤송이에 대한 비율은 31.23%였다.

한 결과 당이용율은 60%이며 생성된 균체의 重量은 환원당의 62.47%이었다.

### 要 約

전가수분해가 끝난 밤송이에 74% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 로 일차가수분해 시킨후 1.5kg/cm<sup>2</sup> 의 증기압하에서 40분간 가수분해 시킨 결과 원료에 대해서 49.3%의 당화율을 얻었으며 여기에 *Candida utilis* 를 배양  
1) 유주현 · 박정길 · 오두환 · 양용 · 홍윤명 : 산업

### 참 고 문 헌

- 미생물학회지, 19 (1975)  
 2) 草間潤 · 石井忠雄 : 工化, 6, 9 (1966)  
 3) 小田島 : 化学と工業 (21), (8) 1033 (1968)  
 4) 新しい木材化学(林総協編)  
 5) 小林 : 化学と生物, 7, (4) 246 (1969)