

農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究

(第 8 報) 纖維質單細胞蛋白質 生産의 試驗工場操業

高 永 燾 · 李 啓 準 · 裴 武

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

(1977년 9월 10일 수리)

Studies on Microbial Utilization of Agricultural Wastes

(Part 8) Pilot Plant Operation for the Production of
Cellulosic Single Cell Protein

Moo Bae · Kye Joon Lee and Yung Hee Kho

Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received Sept. 10, 1977)

ABSTRACT

The cultivation of *C. flavigena* KIST 321, capable of utilizing cellulosic resources, was carried out in a 500 L fermentor by the batch process and the productivities of cellulosic SCP have been investigated by establishing the optimal conditions and levels of cellulosic material and others as medium components.

The highest yield of the cell mass in the batch process was attained under the conditions at 30°C, pH 7.4, 0.4~0.6 VVM of aeration and at 130 rpm of agitation.

According to the material balance of cellulosic SCP production using the pretreated rice straw as a carbon source, more than 25 percent of rice straw on the base of drying weight was recovered in the form of cell mass.

서 론

人口증가에 의한 食糧資源의 부족현상은 세계도처에서 점차 증대되어 가고 있으며 멀지 않은 장래에 人類가 직면하게 될 단백질 부족 현상을 타개하기 위하여 새로운 단백질 자원을 개발해야 할 필요성이 절실히 요청되고 있다. 새로운 단백질자원으로서는 각종 발효 기질을 이용한 미생물 균체 단백질의 개발이 각광을 받고 있으며 특히 기질로서 막대하고 자원으로서는 계속성을 가진 섬유소원을 이용한 단세포단백질 생산을 위한 공업화 연구가 진

행 중에 있다. (1,2)

저자들은 섬유소 자원중 우리 나라에서 가장 양이 많은 벚짚, 보릿짚 등의 짚류를 이용하여 섬유소 단세포단백질을 생산하기 위하여 실험실적으로 수행한 결과(3~5)와 대량 생산시험을 위한 scale up 방법을 검토한 결과(6)를 보고한 바 있다. 또한 이들의 결과를 토대로 공업화를 위한 대량 생산시험으로 500 l 발효조를 이용한 시험공장 규모의 SCP 생산 연구를 하였으며, 생산된 균체 단백질 시제품의 동물사육시험을 수행하였는 바, (7) 본보에서는 그 결과의 일부인 시험공장조업을 행한 결과물 보고하고자 한다.

실험자료 및 방법

1. 사용균주

본 연구실에서 분리동정한 *Cellulomonas flavigena* KIST 321을 사용하였다. (2)

2. 볏짚의 전처리

볏짚의 분쇄, 알칼리 전처리 및 증화 등은 전보 (4)와 같이 하였다.

3. 배양장치

2단계의 중간배양을 위한 중간조로서 10 l 용량의 jar fermentor와 100 l 용량의 중간조를 사용하였으며 주발효조의 용량은 500 l 였다. Jar fermentor는 Marubishi Model MD 500이였고, 중간조 및 주발효조는 본 연구소 시험공장에 설치된 것으로서 표준형의 구조를 하고 있다.

4. 배양방법

C. flavigena KIST 321의 플라스크배양은 전보 (4)와 같이 하였으며 배양액 200 ml를 Table 1과 같은 조성을 한 배지 5 l에 접종, 34°C, pH 7.4, 교반속도 200 rpm, 통기량 0.6 VVM으로 배양하

Table 1. Medium Composition for Seed Culture in Jar Fermentor and Seed Tank.

Component	Jar Fermentor (working volume 5 l)	Seed Tank (working volume 50 l)
Rice straw	2.0%	2.0%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.4	0.4
KH ₂ PO ₄	0.1	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	0.01
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.01	0.01
NaCl	0.2	0.2
C. S. L.	0.02	0.02
Glucose	0.05	—
Peptone	0.01	—

였다. 다음 중간조 배양을 위한 균접종은 Fig. 1에서와 같이 log phase가 끝나는 30시간으로 하였다. Jar fermentor에서 균주의 초기 성장을 보다 왕성하게 하기 위하여 glucose와 peptone을 소량 첨가하였다. 다음 중간조에서는 Table 1과 같은 배지 조성을 하였으며 jar fermentor의 배양액 2~3 l를 50 l에 접종하였으며 배양조건은 scale up 실험시의 최적 조건인 pH 7.4, 온도 34°C, 교반량

200 rpm, 통기량 0.6 VVM에서 배양하였다. 중간조에서 주발효조의 배양을 위해서 Fig. 2에서와 같이 균체 생산량이 최대로 되는 배양 24시간을 균접종점으로 하였다. 중간조에서 배양이 끝난 배양

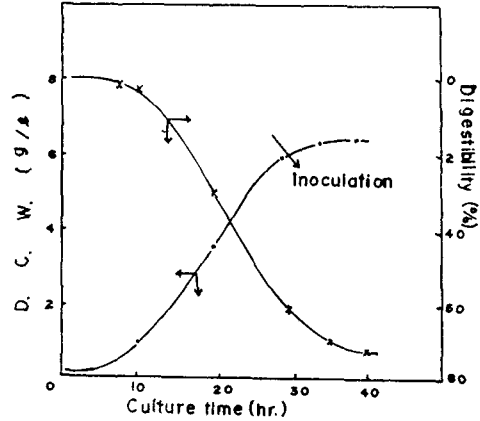


Fig. 1. Seed Culture for Cellulosic SCP Production in Jar Fermentor (5L).

Operating condition :

pH. 7.4 Temp. 34°C

Agl. 200 rpm Air. 0.5 VVM

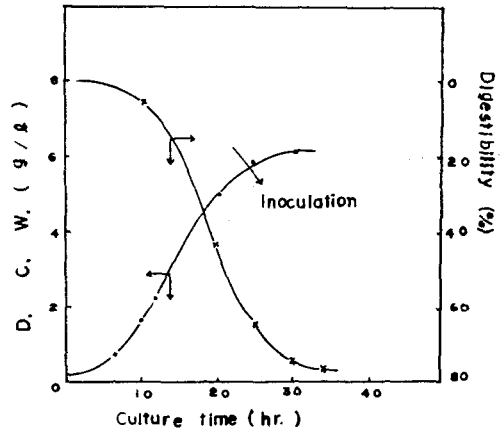


Fig. 2. Growth Curve of *C. flavigena* KIST 321 in Seed Tank (50 l).

Operating condition :

pH 7.4 Temp. 34°C

Agl. 200 rpm Air. 0.5 VVM

액 50 l를 주발효조의 발효배지 250 l에 접종하고 working volume 300 l로 하여 배양조건을 검토하였다. Jar fermentor와 중간조 및 주발효조에서

Table 2. Effect of Operating pH on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	pH	7.0	7.2	7.4	7.6	8.0
Length of runs (hrs.)		36	34	30	32	36
Percent rice straw digested		70.5	70.0	74.8	74.2	64.8
Log phase mass doubling time (hrs.)		6.3	5.8	5.2	5.5	5.8
Log phase growth rate constant (hr ⁻¹)		0.110	0.119	0.133	0.126	0.119
Max. cell density (g/l)		10.5	11.5	12.0	11.8	10.3
Volumetric production efficien		0.291	0.338	0.400	0.368	0.286

Medium composition : Rice straw 4.0%, (NH₄)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.15%, KH₂PO₄ 0.15%,
 M₈SO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, C. S. L. 0.02%
 Operating condition : Temp. : 34°C, Agi. : 130 rpm, Air. : 0.4 VVM

Table 3. Effect of Operating Temperature. evature on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	Temp. (°C)	30	32	34	36
Length of runs (hrs.)		38	34	32	35
Percent rice straw digested		68.7	73.8	75.2	72.8
Log phase mass doubling time (hrs.)		5.8	5.4	5.2	5.8
Log phase growth rate constant (hr ⁻¹)		0.119	0.128	0.133	0.119
Max. cell density (g/l)		10.8	11.7	12.1	11.8
Volumetric production efficiency		0.284	0.365	0.378	0.337

Medium composition : Rice straw 4.0%, (NH₄)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.15%, KH₂PO₄ 0.15%,
 MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, C. S. L. 0.02%
 Operating condition : pH : 7.4, Agi. : 130 rpm, Air. : 0.4 VVM

의 pH 조절은 28% NH₄OH 를 펌프로 자동주입하면서 일정하게 유지하였으며 회분배양법으로 배양하였다.

5. 균체의 회수방법

전보⁽⁶⁾에서 검토한 바와 같이 배양이 끝난 배양액을 Mixer/Settler Tank 에 넣어 상온에서 30분간 정치시켜 미분해된 벚짖과 잔사물을 가라 앉힌 후 상등액을 취하고 HCl 로 pH 3.0 으로 조정하여 두시간 동안 flocculation 을 일으킨 다음 sharples centrifuger 에서 80 l/hr 의 속도로 원심분리하여 균체를 취한 다음 drum dryer 에 의하여 건조하고 파쇄하여 제품으로 하였다.

6. 분석방법

전보⁽⁴⁾와 같이 균체량측정은 Kjeldahl digestion method 에 의해 protein level 을 정하여 정량하였고 기질 소비량은 기질 감소량으로 측정하였다.

실험결과 및 고찰

1. 배양조건

10 l 발효조를 이용한 scale up 실험⁽⁶⁾에서 배양 조건은 충분히 검토하였으나 시험공장의 주발효조는 용량 500 l 로서 10 l 발효조와는 다른 조건일 수 있기 때문에, 공장 규모의 배양을 위해 다시 검토해야 할 필요성이 있다.

1) pH 의 영향 : 최적 생육 pH 를 정하기 위하여 온도와 통기량은 scale up 실험시의 최적 조건인 34°C 와 0.4 VVM 으로 하고 교반량을 130 rpm 으로 하였을 때에 이에 따른 영향은 Table 2 와 같다. 배양 최적 pH 는 7.4 로서 10 l 발효조에 의한 결과와 일치하였으며 이때 log phase 의 mass doubling time 5.2 hr, 비증식속도 0.133 hr⁻¹ 였다.

2) 최적배양온도 : 시험공장 발효조에서의 최적 배양온도를 정하기 위하여 pH 7.4, 통기량 0.4 V VM, 교반량 130 rpm 으로 일정하게 두고 온도를 30~36°C 까지 변화시켜 배양한 결과는 Table 3 과 같다. 배양온도도 역시 scale up 실험때와 같이 34°C 가 비증식 0.133 hr⁻¹ 로서 최적임을 나타내고 있으며 기질소모율과 균체생산량이 우수함을 나타내었다.

3) 교반속도 및 통기량의 영향 : 본 연구에 사용된 시험공장 주발효조는 표준형의 구조를 갖고 있으며 6 blade turbine impeller 3개를 impeller 직경과 동일한 간격으로 shaft에 설치되어 있어 저속의 교반속도에서도 충분히 교반효과를 기할 수 있기 때문에 10 l 발효조와는 다른 조건이었다. 통기량과 교반속도는 용존산소와 밀접한 관계를 갖기 때문에 합리적인 배양관리를 위해서 매우 중요하다. pH와 온도를 최적조건에 두고 교반속도와 통기량을 각각 달리하였을 때의 결과는 Table 4와 같다. 교반속도 150 rpm 이상에서는 거품의 발생이 매우 심하였고, 전보⁽⁶⁾에서 같이 foam breaker에 의한 기계적 충격과 소포제(消泡劑)를 첨가하여 쉽사리 부서지지 않았다. 그런데 Table 4에서 보는 바와 같이 교반속도에 따른 차이는 인정할 수 없었으며 통기량은 0.4~0.6 VVM이 적정수준임을 알 수 있다. 따라서 효과적인 배양관리를 위하여서는 균체생육에 크게 영향을 미치지 않는 범위에서 최소량의 교반속도를 유지함이 중요하고 통기량 역시 과잉으로 유지하면 오염에 의한 위험성

과 공업적으로 바람직하지 못하기 때문에 0.4~0.6 VVM으로 유지하는 것이 바람직하다.

2. 최적 배지조성의 검토

본 연구에 사용된 공시 균주의 최적배지 조성에 대한 검토는 실험실적인 검토^(4,8)에서 충분히 검토하였다. 그러나 실험실적인 방법과 시험공장규모에서의 배지조성은 반드시 일치한다고는 볼 수 없으며 3단계의 중간 생산을 위해 10 l 발효조와 중간조에서 왕성하게 자란 종균을 주발효조에 옮겼을 때 함께 생성된 분해산물이 다시 영양원으로 이용될 수도 있으며, 발효시 생산되는 유기산을 중화하기 위하여 주입되는 NH₄OH에 의하여 생성되는 암모늄염은 질소원으로 이용 가능하기 때문에 질소원으로 사용된 (NH₄)₂SO₄의 사용량을 줄일 수 있다. 또한 공장규모의 대량 배양시 보다 경제적인 면을 충분히 고려하여 최소량의 배지성분을 선택하여 많은 양의 균체를 생산하여야 하기 때문에 지금까지 얻어진 실험실적인 결과를 종합하여 적정배지수준을 정하였다. 이때 사용된 미량원소는 전보⁽⁸⁾에서 실험한 것을 적정수준으로 하였다.

Table 4. Effect of Agitation and Aeration on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	Agi. (rpm)		130				0.6			
	Air. (VVM)		150	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	0.2	0.4
Length of run (hrs)	40	32	30	31	30		32	30		
Percent straw digested	68.2	72.5	75.2	73.0	75.2		74.2	74.8		
Log phase mass doubling time (hrs)	6.5	5.3	5.2	5.3	5.2		5.2	5.6		
Log phase growth rate constant (hr ⁻¹)	0.107	0.131	0.133	0.131	0.133		0.124	0.131		
Max. cell density (g/l)	10.3	11.8	12.0	11.5	11.8		11.4	11.8		
Volumetric production efficiency	0.258	0.369	0.400	0.370	0.939		0.356	0.393		

Operating condition : pH 7.4, Temp. 34°C

Table 5. Effect of the Concentration of Rice Straw on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	Rice straw (%)	2	3	4	5
Length of runs (hrs)		24	27	32	35
Percent straw digested		83.5	78.8	74.8	62.3
Log phase mass doubling time (hrs)		4.2	4.8	5.1	5.8
Log phase growth rate constant (hr ⁻¹)		0.165	0.144	0.136	0.119
Max. cell density (g/l)		6.7	9.3	11.4	12.3
VPE		0.279	0.344	0.356	0.351

Operating condition : pH 7.4, Agi. 130 rpm, Temp. 34°C, Air. 0.4 VVM

Basal medium : (NH₄)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.15%, KH₂PO₄ 0.15%, MgSO₄·7H₂O 0.01%,

CaCl₂·2H₂O 0.01%, C. S. L. 0.02%

Table 6. Effect of Nitrogen Sources and Concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	Experimental No.							
	16	18	19	20	21	22	23	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	0.4			0.05	0.1	0.2	0.8	
NaNO_3 (%)		0.52						
$(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (%)			0.18					
Length of run (hrs.)	32	30	34	48	40	34	30	
Percent straw digested	74.8	73.2	70.6	52.5	60.8	69.4	75.8	
Log phase mass doubling time (hrs.)	5.1	5.1	5.2	6.8	6.3	5.3	5.0	
Log phase growth rate constant (hr^{-1})	0.136	0.136	0.133	0.109	0.110	0.131	0.139	
Max. Cell density (g/l)	11.4	12.1	12.0	8.3	9.2	12.3	12.4	
VPE	0.356	0.403	0.352	0.173	0.230	0.361	0.413	

Operating condition : pH 7.4, Agi. 130 rpm, Temp. 34 °C, Air. 0.4 VVM

Basal medium : Rice straw 4%, K_2HPO_4 0.15%, KH_2PO_4 0.15%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, C. S. L. 0.02%

Table 7. Effect of Phosphate and NaCl Addition on Cellulosic SCP Production in 500 l Fermentor.

Parameter	Experimental No.									
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	
K_2HPO_4 (%)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.05	0.10	0.05	0.10	
KH_2PO_4 (%)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.05	0.05	0.05	0.10	0.10	
NaCl					0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	
Length of run (hrs.)	40	37	34	28	36	34	32	32	31	
Percent straw digested	50.4	62.9	69.4	76.0	63.5	65.6	70.6	71.2	73.6	
Log phase mass doubling time (hrs.)	8.6	5.8	5.3	5.1	5.8	5.6	5.2	5.1	5.1	
Log phase growth rate constant (hr^{-1})	0.081	0.019	0.131	0.136	0.119	0.124	0.133	0.136	0.136	
Max. cell density (g/l)	7.6	10.5	12.3	12.4	10.8	11.0	12.2	12.5	12.4	
VPE	0.190	0.284	0.362	0.443	0.300	0.324	0.381	0.390	0.400	

Operating condition : pH 7.4, Agi. 130 rpm, Temp. 34 °C, Air. 0.4 VVM

Basal medium : Rice straw 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01% C. S. L. 0.02%

1) **벼짚량** : 기질로서 사용된 벼짚의 사용량에 따른 영향은 Table 5와 같다 벼짚은 다른 기질과 달라 물에 불용성이므로 삼투압에 의한 생육 억제 작용은 없을 것이므로 벼짚의 양이 많으면 균체생산량이 증가할 것으로 생각되나 Table 5에서 보는 바와 같이 4% 이상에서는 균체생산량의 증가가 거의 없었으며 기질 소모율이 매우 나빴으며 이는 실험실적 결과⁽⁸⁾와 일치하였다. 따라서 기질로서 벼짚의 사용량은 4%가 적정 수준임을 알 수 있다.

2) **무기질소원의 영향** : 무기질소원의 종류 및 첨가한 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도별 영향을 살펴본 것은 Table 6과 같다. 이때 사용한 화합물에 따라 농도가 다른 것은 질소농도로 환산하였을 때 같은 농

도로 되도록 한 것이다. Table 6에서 보는 바와같이 질소원의 종류에 따른 차이는 없었으며 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 적정농도는 0.2%임을 알 수 있다. 이는 플라스크 배양시 0.4%가 적정수준이었으나 발효시 생성되는 유기산을 중화하기 위하여 주입되는 암모니아에 의하여 생성되는 암모늄염류가 다시 질소원으로 이용되고 있음을 의미한다.

3) **인산염 및 NaCl 첨가의 영향** : 본 연구에 사용된 공시균주가 인산염의 농도에 매우 민감하며 K_2HPO_4 및 KH_2PO_4 의 농도가 0.3% 수준에서 많은 균체를 얻을 수 있음을 보고한바 있다.⁽⁴⁾ 이러한 결과를 대량 배양시에 적용시키기 위하여 인산염으로서 K_2HPO_4 및 KH_2PO_4 의 농도에 따른 결과와 이들 인산염과 함께 NaCl을 첨가하여 배양하

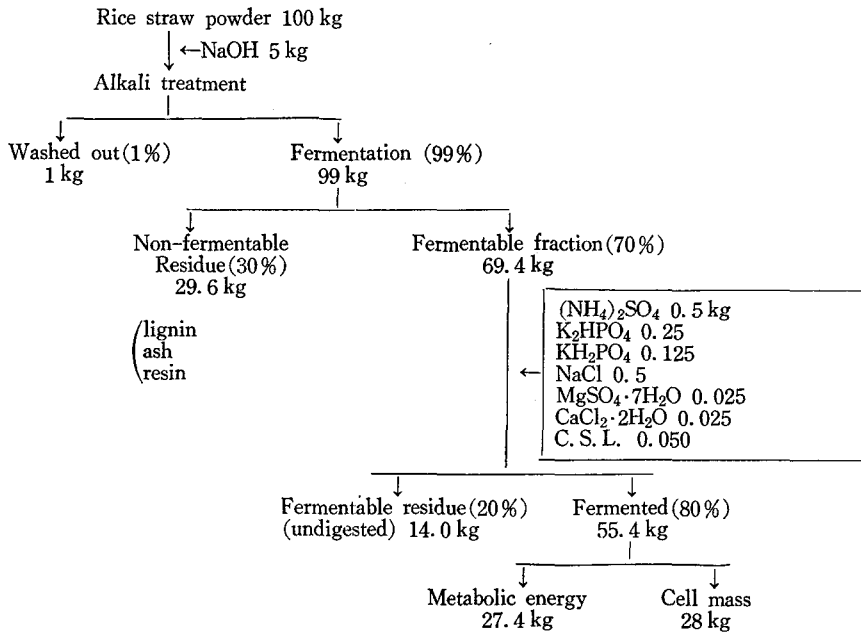


Fig. 3. Material Balance of Cellulosic SCP Production from Rice Straw.

였는바 그 결과는 Table 7 과 같다. 전보⁽⁴⁾에서와 같이 인산염의 적정수준은 0.3%였으나 NaCl 을 0.2% 수준으로 첨가하므로써 사용된 인산염의 농도를 0.15% 수준으로 하여도 균체량에 변화가 없음을 알 수 있다. 따라서 대량 배양시 보다 경제적인 면을 고려하여 매우 저렴한 NaCl 을 0.2% 수준으로 첨가하고 인산염의 농도를 0.3%에서 0.15%로 사용함이 유리하다는 결론을 얻을 수 있다.

3. 물질수지(Material balance)

볏짚 100 kg 을 분쇄한 후 알칼리 처리하여 기질로 사용하여 건조균체가 얻어질 때 까지의 물질균형을 살펴보면 Fig. 3 과 같다. 즉 볏짚을 알칼리처리하는 과정에서 1%정도의 작업상 손실이 있고 lignin, ash, (회분) 등 미생물이 이용할 수 없는 부분과 이를 제외한 부분이 발효과정을 거치는 동안 미분해된 부분과 함께 잔사로 남아있게 되며 미생물에 의하여 이용된 부분중 약 05%정도는 대사에너지로 사용되고 있음을 뜻한다. 결과적으로 볏짚 100 kg 에서 25~30 kg 의 균체가 생산되었는데 이는 볏짚 기질당 균체생산비율이 25~30%에 달하고 있음을 뜻한다. 석유를 기질로 하는 단세포단질생산의 경우는 균체수율이 대기질당 약 100% 정도임에 비하여 기질로서의 효율은 낮다고 보나 전술한 바와 같이 가격면에서 월등히 저렴하기 때문에 문제가 되지 않는다.

요 약

섬유소 단세포 단백질의 대량생산 시험을 위하여 pilot plant 규모의 시험공장 연구를 수행하였는바 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) 시험공장에서 균체생산을 위한 최적 조건은 pH 7.4, 온도 34°C, 교반량 130 rpm, 통기량 0.4~0.6 VVM 이었다.
- 2) 최적배양 조건에서 배지의 적정 수준은 기질로서 볏짚이 4%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.10%, NaCl 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, C. S. L. 0.02%였다.

참 고 문 헌

- 1) Bae, M., B. H. Kim and A. S. Yun : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 1(1), 31 (1973).
- 2) Bae, M. and B. H. Kim : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 2(1), 1 (1974).
- 3) Bae, M. and B. H. Kim : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 2(2), 79 (1974).
- 4) Bae, M., K. J. Lee and Y. H. Kho : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 4(3), 99 (1976).
- 5) Bae, M. and Y. H. Kyo : *Kor. J. Appl. Mi-*

- crobiol. Bioeng.*, 5(1), 18 (1977).
- 6) Bae, M., K.J. Lee and Y.H. Kho : *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 5(2), 30 (1977).
- 7) 배무, 고영희, 김출수, 이계준, 이남형 : KIST 보고서, BS E230-847-5, p.141 (1976).
- 8) 배무, 김병홍 : KIST 보고서, R-73-37 (1973).