

## 廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 關한 研究

(第7報) 억새풀을 基質로 한 纖維素 資化細菌의 培養

成洛葵 · 尹漢大 · 沈奇煥 · 李千洙

慶尙大學 食品加工學科

(1977년 9월 15일 수리)

## Studies on the Fermentative Utilization of Cellulosic Wastes

(Part 7) Culture of Cellulolytic Bacteria from *Miscanthus*

Nack-Kie Sung · Han-Dae Yon · Ki-Hwan Shim and Chun-Soo Lee

Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

(Received. Sept. 15, 1977)

### Abstract

Various kinds of native herbage grasses like *Miscanthus sinensis*, *Arundinella hirta*, *Cymbopogon geirngii*, *Themeda japonica* etc. are widely distributed in every Korean mountain.

So we investigated the availability of native grass, *Miscanthus sinensis* as a substrate for the production of S. C. P.

The results were obtained as follows.

- 1) At the alkali treatment, NaOH was the most effective with the exclusion of lignin, and pretreated *Miscanthus* with NaOH appeared to be a good substrate for the microbial growth.
- 2) When *Miscanthus* was treated with one to 10% NaOH, the microbial growth increased in proportion to the increased alkali concentration. Beyond 4% NaOH, a slight increase was observed.
- 3) Phosphoric acid, as a neutralizer, was the most effective in cell production after alkali treatment.
- 4) On the effect of incubation time, the productivity was best found at 60 hours, and the cell weight was 9.23 mg per 1 ml, and the microbial digestibility of substrate was 75.2%.

### 서 론

廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 관한 研究의 일환으로 저자들은 벼짚, 왕겨, 퉁밥등의 각종 農産廢資源에 대한 糖化條件, 醱酵基質로서의 適否 및 酵母生産에 관한 報告와 최근에는 纖維素를 직접 資化할 수 있는 細菌을 분리 鑒定하고 그 利用性을 報告한 바 있다<sup>(1,5,9)</sup>. 廢纖維資源으로 SCP를 생산할 경우 農産廢資源만으로는 계절적인 면

이라든지 원료의 공급량 등을 고려할 때 문제성이 있고 특히 국토의 약 70%가 山地이며 資源이 빈약한 우리나라로서는 다른 纖維素資源을 확보하는 것이 필요하다고 생각된다. 한편 慶北大學校 附設 韓國農村社會研究所<sup>(2)</sup>에서 실시한 嶺南地域畜産園地造成을 위한 資料調查에서 우리나라 산야에 널리 分布하고 있는 것 중 分布도가 높은 것은 새, 억새, 솔새, 잔디 및 매듭풀 등이며, 서울大學校 農科大學 附設 農業科學研究所<sup>(3)</sup>에서 실시한 草地 資源開發을 위한 調查에서도 自然草地에서는 새,

억새, 솔새, 개솔새, 잔디 등이 우점되어 있다고 발표하였으며 Kim<sup>(4)</sup>의 연구에 의하면 주요 야초 중 억새풀은 10a 당 年平均 9,226 kg의 收量을 얻을 수 있다고 밝혔다. 따라서 저자 등은 산야초중 비교적 분포도가 높은 억새풀을 산당화시켜 酵母生産을 하여 SCP기질로써 막대한 초자원의 이용 가능성을 밝힌 前報<sup>(5)</sup>를 토대로 하여 本報서는 억새풀을 알칼리 처리한 후 이것을 기질로 하여 섬유소 자화세균 배양에 관한 조건을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

實驗에 使用한 억새풀(*Miscanthus sinensis*)은 부근 野山에서 12월 경에 채취하였다.

### 2. 材料의 一般成分分析

水分과 灰分은 重量法으로 粗脂肪은 Soxhlet 추출법, 粗蛋白은 Mikrokjeldahl法<sup>(6)</sup>, 粗纖維는 A. O. A. C. 法<sup>(7)</sup>, lignin은 JIS法<sup>(8)</sup>으로 하였다.

### 3. 使用菌株 및 接種方法

前報<sup>(9)</sup>에서 同定한 *Cellulomonas*屬의 細菌을 供試菌으로 使用하였으며 菌接種時에는 Table 1에 있는 stock culture medium에 48시간 배양 후 菌液狀態로 定量的으로 接種하였다.

Table 1. Stock Culture Medium of Cellulose-Assimilating Bacteria.

Cellulose Power	10 g
MaNO <sub>3</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.14
K <sub>2</sub> HPC <sub>4</sub>	1.2
Yeast	0.02
Rotato extract*	1 l
pH	7.0~7.2

\* Potato extract

Boil 300 g of sliced potato with 500 ml of H<sub>2</sub>O until thoroughly cooked. Filter through cheese cloth, make up the volume to 1000 ml.

### 4. 基質의 前處理

억새풀을 miller로 분쇄하여 20 mesh screen을 통과시켜 使用하였으며 alkali 처리시 1 규정 농도

의 각종 alkali 용액 10배 (v/w)를 加하여 100°C에서 15分間 處理하였으며, 中和時에는 pH 10정도로 washing 한 후 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로서 최종 中和하였다.

### 5. 纖維質 資化細菌의 培養

Table 2의 培地를 使用하였으며 carbon source로서 前處理한 基質을 4% (w/v) 加한 酵母培地 500 ml를 500 ml容의 진탕 flask에 넣고 30°C로 調整된 진탕배양기(진탕폭 4 cm, 120 rpm)에서 배양하였다.

Table 2. Growth Medium for Cellulose-Assimilating Bacteria.

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0 "
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 "
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 "
CaCl <sub>2</sub>	0.1 "
Yeast extract	0.5 "
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	16.7 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.18 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.16 mg
E. D. T. A.	20.1 mg
Cellulosic substrate	40 g
Distilled water	1 l
pH	7.0~7.2

### 6. 基質 消費量 및 生菌數 測定

Han<sup>(10)</sup> 등의 方法으로 醱酵 후의 기질량을 測定하여 처음에 使用한 量과의 차이에서 消費량을 測定하였으며, 生菌數는 pour plate technique로 하였다.

### 7. 菌體量 測定法

菌體量은 Lowry<sup>(11)</sup>法으로 菌體中の 蛋白質을 定量하여 미리 준비한 표준곡선에서 菌體量으로 환산하여 Huang<sup>(12)</sup> 등의 方法으로 菌體를 測定하였다.

## 實驗結果 및 考察

### 1. 材料의 一般成分 分析

本 實驗에서 使用한 억새풀의 一般成分을 分析한 結果는 Table 3에서 보는 바와 같이 lignin이 15.06%, 섬유질은 40%以上으로 다른 山野草보다는 비교적 많으며 芻質보다는 적은 편이다.

### 2. 各種 alkali 처리의 효과

1 규정 농도의 各種 alkali를 原料에 대해 10배

**Table 3.** General Composition of Native Grass, *Miscanthus*.

unit : %

Composition	Moisture	Lignin	Ash	Crude protein	Crude fat.	Crude cellulose
<i>Miscanthus</i>	5.83	15.06	5.17	3.02	1.13	40.15

료를 첨가하고 100°C 에서 30분간 처리하였을 때 처리하지 않은 대조구의 lignin 함유를 調査한 결과는 Table 4 와 같다. Table 4 에서 처럼 NaOH 가 87.4%의 lignin 을 분해하여 가장 좋은 효과를 나타내었으며 다음으로는 NH<sub>4</sub>OH 가 좋았다. 한편 pulp 시 lignin 을 제거하기 위해 Kraft 법과 NaOH 처리법이 우수하다는 결론과 거의 일치하였다.

**Table 4.** Lignin Contents of *Miscanthus* Treated with Various Kinds of Alkalis.

Alkali	Lignin	Rate of degradation
Control	15.06%	—%
NaOH	1.9	87.4
NH <sub>4</sub> OH	9.01	40.2
Ca(OH) <sub>2</sub>	12.9	14.4
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	14.2	5.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.1	12.8

그리고 이들을 基質로 하여 *Cellulomonas flavigena* GFB24-1 을 培養하여 生成된 菌體量 및 基質消費량을 各各 調査한 결과는 Table 5 와 같다. Table 5 에서 처럼 NaOH 로 처리한 것이 가장 菌體增殖이 좋았으며 lignin 의 含量이 적을수록 菌體의 增殖이 좋았다.

**Table 5.** Cell Mass Productivity from *Miscanthus* with Various Kind of Alkalis.

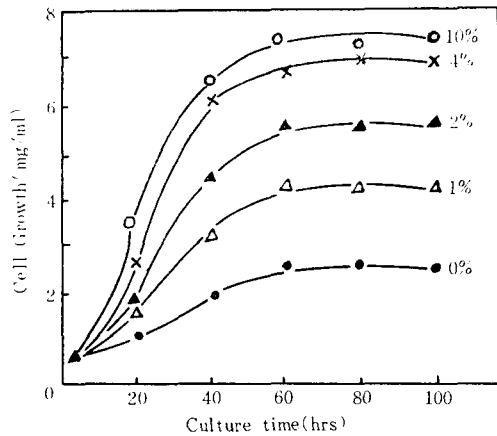
Alkali	Cell Mass produced (mg/ml)	Digestibility (%)
Control	2.5	19.4
NaOH	6.94	64.5
NH <sub>4</sub> OH	4.82	43.2
Ca(OH) <sub>2</sub>	4.37	39.8
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	3.95	35.7
NaHCO <sub>3</sub>	4.14	37.2

天然纖維質은 β-1,4-glucoside 의 結合으로 아주 짧은 chain 에서도 물에 불용성을 보이는 것으로 단순한 glucose anhydride chain 이 아니고 하나의

高分子의 polymer 로써 세포나 조직內에 존재하거나 lignin, hemicellulose, resin 등과 함께 구성되어 있다. 이러한 구조가 어떻게 다시 분해되는가를 이해한다는 것은 쉽지 않은 것이라 생각되며 몇몇 研究者들에 의하여 언급된 것이 있다<sup>(13,14,15)</sup>. 한편 Tarkow 와 Feist 氏에 의하면 알칼리처리를 하므로써 분자 상호간에 결합되어 있는 ester bond 에 saponification 이 일어나서 물에 의해서 일어나는 팽윤이상으로 높은 swelling 을 촉진시키며, 세포벽 구조내로 酵素 및 미생물의 침투를 용이하게 한다는 것을 밝힌바가 있다<sup>(16)</sup>. 실제로 藨等<sup>(17)</sup>이 芻稈을 알칼리처리 하였을때 NaOH 가 다른 알칼리에 비해서 가장 좋은 효과를 얻었으며, Han 等<sup>(18)</sup>도 suger cane bagasse 를 알칼리 처리하여 NaOH 가 가장 좋은 효과를 얻은 바가 있다.

**3. NaOH 의 濃度에 따른 處理效果**

上記의 結果에 따라 NaOH 를 0~10% 濃度別로 처리하여 水洗한 후 菌體增殖을 비교하였을 때 Fig. 1 과 같은 結果를 얻었다. Fig 1 에서 처럼 처리하지 않은 대조구에서는 菌體의 增殖이 별로 없었으나 NaOH 의 濃度を 증가시켜 처리함에 따라



**Fig. 1.** Growth of *Cellulomonas* on Alkali-treated *Miscanthus*. Substrate was Treated with Different Concentration of NaOH Solution for 15 mins. at 100°C.

菌體의 수율이 향상되었으며 4%이상의 농도에서는 커다란 증가를 보이지 않았다.

#### 4. 基質의 알칼리처리 후 中和劑의 영향

原料를 여러 종류의 알칼리로 처리한 結果 그중에서 NaOH가 다르 것보다 월등하게 처리효과가 좋았으며 그 농도에 있어서도 4%정도가 적당한 것으로 밝혀졌다. 그런데 알칼리처리 후 중화시어 물로서 세척할 때 여러가지 어려움이 있었으며 일단 처리 후 조절하는 과량의 알칼리를 물로 세척하여 pH를 10정도로 한 다음, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 첨가하여 中性으로 하여 균체를 배양한 結果는 Table 6과 같다. Table 6에서 처럼 alkali 처리 후 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 最終 中和시켰을 때가 가장 양호하여 培養液 1ml當 9.18mg을 얻었으며 물로 세척할 때 보다 收率이 향상되었다. 그런데 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 中和시켰을 때는 오히려 물로 세척한 것 보다 菌體增殖이 떨어졌는데 이것은 中和時 生成된 NaCl, NaHSO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 등의 鹽이 필요 이상 존재하므로써 菌體생육이 저해되는 것으로 생각된다. 한편 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 처리구에서 菌體量이 향상되었는데 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>의 일부는 菌의 生育에 필요한 무기영양원이 되며, 다른 한편으로는 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>에 의한 pH 완충작용이 있는 것으로 생각되며 이것은 연구 검토할 과제이다.

Table 6. Effect of Various Acids Neutralization after NaOH Treatment on Cellulosic SCP Production.

After NaOH treatment	Cell mass produced (mg/ml)	Digestibility (%)
Control	2.5	19.4
H <sub>2</sub> O washed	6.94	64.5
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> neut'zd	5.43	47.2
HCl "	5.01	43.6
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> "	9.18	74.8

#### 4. 經時的 培養에 따른 菌數, 菌體量 및 基質消費率의 상호관계

原料를 4% NaOH로 100°C에서 15分間 처리 후 다시 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>로 中和하여 이것을 基質로 4%되게 하여 經時的인 生菌數, 菌體量, 基質消費率의 상호관계를 調査한 結果는 Table 7과 같다. Table 7에서 처럼 菌의 生육은 60시간 정도 되었을 때 가장 많았으며 이때 培養液 1ml當 9.23mg의 건조균체를 얻었으며 基質消費率は 75.2%를 나타냈다.

한편 著者等이 前報에서 農産物副産物로 芻草, 왕겨, 톱밥, 그의 廢紙 등 廢纖維資源을 醱酵基質화하여 그 이용가능성을 보고한 바 있다. 앞으로 이러한 纖維素를 原料로 하여 SCP를 大量 生産할 때 우리나라 山野에 무수히 散在한 山野草도 原料가 될수 있을 것으로 생각된다.

Table 7. Result of Four Day Culture of Cell in a Medium Containing 4% Miscanthus as the Sole Carbon Source.

Time (hr)	Viable cells/ml	Cell mass produced (mg/ml)	Digestibility (%)
0	1.6×10 <sup>6</sup>	—	—
5	1.9×10 <sup>6</sup>	—	—
10	9.2×10 <sup>6</sup>	—	—
15	8.0×10 <sup>8</sup>	—	—
20	3.3×10 <sup>9</sup>	4.42	36.0
30	6.0×10 <sup>10</sup>	7.51	61.2
40	6.7×10 <sup>10</sup>	9.01	73.4
50	6.8×10 <sup>10</sup>	9.15	74.5
60	7.0×10 <sup>10</sup>	9.23	75.2
75	6.9×10 <sup>10</sup>	9.17	75.2
90	6.8×10 <sup>10</sup>	9.15	—

## 要 約

역새풀을 알칼리로 前處理한 다음 直接纖維素를 質化할 수 있는 細菌을 培養하여 SCP 生産의 最適條件을 檢討하고 몇 가지 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

1) 알칼리前 處理劑로써 NaOH가 가장 우수하였으며 87.4% lignin을 제거하였고 이것을 기질로하여 菌體를 培養하였을 때 收率이 높았다.

2) NaOH의 濃度別로 그 效果를 檢討하였을 때 4%의 濃度가 가장 적당하였다.

3) 알칼리 處理후 中和時 中和劑로서는 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>가 菌體收率에 가장 좋았다.

4) 經時的 培養時 菌體收率は 60시간에서 가장 좋았고 培養液 1ml當 9.23mg의 건조균체를 얻었으며 75.2%의 消化率을 나타내었다.

## 인 용 문 헌

- 1) N.K. Sung and J.K. Kim : Kor. Appl.

- Microbiol. Bioeng.*, 4(1) (1976).
- 2) 慶北大學校 附設 韓國農村社會研究所 : 3, 31 (1970).
  - 3) 農村振興廳 : 서울大學校 附設 農業科學研究所, 57 (1970).
  - 4) 金丙鎬 等 : 最新草地學, 先進文化社 (1976).
  - 5) N. K. Sung, D. H. Chung, and H. D. Yun., : *Gyeong Sang J. Inst., Agr. Resource, Util.*, 11 (1977).
  - 6) 京都大學農學部 食品工學教室編 : 食品工學實驗書(養賢堂版), 538 (1970).
  - 7) Association of Official Analyst Chemists : *Official Method of A. O. A. C.*, 297 (1970).
  - 8) 右田伸彦 等 : 木材化學(共立出版). 下, 49 (1968).
  - 9) N. K. Sung, and K. H. Shim : *Kor. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 5(1), 1 (1977).
  - 10) Han, Y. W. and V. R. Srinivasan : *Appl. Microbiol.*, 16, 1140 (1968).
  - 11) Lowry, O. H. et al : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
  - 12) Huang. T. L., Y. W. Han and C. D. Callihan : *J. Ferment. Technol.*, 49, 574 (1971).
  - 13) Cowling, E. B. : *U. S. Dept. Agr. Forest, Ser., Forest Prod.*, 2116, 12 (1958).
  - 14) Gascoigne. T. A., and Cascoigne. M. M. : *Biological Degradation of Cellulose*, Butterworth, London and Washington, D. C. (1960).
  - 15) King. K. W. : *Va. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.* 154, 15 (1961).
  - 16) H. Tarkow and W. C. Feist. : *Advance in Chem. Ser.*, 95, 197 (1969).
  - 17) M. Bae., B. H. Kim : *Kor. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 2(2), 79 (1974).
  - 18) Y. W. Han and C. D. Callihan : *Applied Microbiology* 27(1), 159 (1974).