

微生物을 이용한 酒精廢水處理工程에 관한 研究

任洪彬, 劉承坤, 李輔成
忠南大學校 工業教育大學 化學工學教育科
(1981년 6월 2일접수)

A Study on the Alcohol Distiller's Waste Treatment by Microorganisms

Hong Bin Yim, Seong Gon Yu and Bo Sung Rhee
Chungnam University, College of Industrial Education
Department of Chemical Engineering, Daejun, Korea
(Received June 2, 1981)

Abstract

Candida tropicalis was selected for its ability to utilize spent waste generated by the alcohol distillery using tapioca starch as a raw material.

Optimum pH and temperature on batch culture of the organism were 4.0 and 30°C. The growth of the organism was markedly increased when 0.2% of ammonium sulfate, 0.002% of potassium phosphate dibasic, and 0.04% of magnesium sulfate were supplemented to the filtrate. At these conditions, maximum specific growth rate and saturation constant were 1.0 hr⁻¹ and 4.4 g.l⁻¹, respectively.

At a dilution rate of 0.5hr⁻¹, a productivity of 1.84 g.l⁻¹. hr⁻¹ was obtained and about 70% of carbohydrate was assimilated. Protein content of dried cell was about 60%.

緒 論

酒精工場の 폐수는 많은 有機物과 높은 熱量때문에 그대로 放流하면 水源을 오염한다. 이 폐수의 BOD는 原料에 따라 다르나 일반적으로 15,000~30,000ppm에 달하여 固形物은 약 5~7% 정도이고 하루 술덧 처리량 1000石의 工場이라면 每日有機物 4~9 ton, 즉 단백질로서 0.5~1.1 ton, 過燻酸石灰 0.2ton, 황산카리 0.4~0.8ton 정도가 되어 이것은 人口 10만명의 都市의 가정에서 나오는 전체 下水量과 맞먹는 汚染物이 된다고 한다.⁽¹⁾ 酒精廢水를 미생물로 처리하면 폐수의 有機物을 제거하는 동시에 副産物로서 菌體를 얻을 수 있으며 이 菌體는 50% 이상의 단백질을 함유한 良質의

動物의 飼料나 肥料 등으로 利用될 수 있어 이에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.⁽²⁻⁵⁾

本研究는 微生物을 利用한 酒精廢水處理를 위하여 微生物菌體의 배양을 위한 最適배지 조성 및 배양조건과 處理效果를 밝히고 連續處理에 관한 資料를 제시하기 위하여 행하였다.

結果 및 考察

1. 材 料

실험에 사용한 廢水는 tapioca 전분을 당화하여 에틸알코올발효를 끝낸 후 폐기되는 D酒精工場の 증류폐액이다. 70~80°C로 배출되는 이 폐액의 pH는 약 4.0이며 100ml 중에 평균 5mg의 固形物을 포함하고 있으며, 이 固形物은 총당 49.96%,

조단백질 15.29%, 조지방 8.24%, 회분 6.35%의 組成을 가지고 있다. 連續培養에서는 폐액을 120°C에서 15分間 加壓殺菌한 후 원심분리한 상등액을 사용하였으며, 그 조성은 당분 1.504%, 조단백질 0.49%, 회분 0.13%이다.

실험에 사용한 菌株는 延世大學校 食品工學科에서 분양받은 것으로 원심분리한 주정폐액 상등액에 한천 3 wt%를 가하여 응고시킨 다음 평판배양하여 가장 生育이 우수하다고 판정되는 4株를 1次 선정하여 사용하였다.

2. 回分培養

250ml 들이 삼각플라스크에 폐액 20ml를 가지고 120°C에서 15분간 加壓살균한 후 시험菌株를 접종하여 30°C에서 24시간 前培養하였다. 이 前培養液 0.1ml를 本培地 20ml가 들어있는 250ml 삼각플라스크에 접종하여 조건을 달리하며 진탕배양 하였다.

3. 連續培養

본 실험에 사용한 連續培養장치의 기본도는 Fig. 1과 같다. 주정폐액의 상등액에 배지조성 검토에서 밝혀진 질소원과 무기염류를 첨가하고 30°C로 恒溫된 10l 들이 배지저장탱크에 담았다. 배지는 peristaltic pump를 사용하여 silicon rubber tube를 통하여 流速을 조절하면서 1l 들이 發효조에 공급하였다. 發효조에는 4개의 baffle이 부착되어 있고 배양액량은 200ml로 일정하게 유지하였으며, 배양액은 magnetic stirrer로 150rpm으로 교반하였다. 배양온도는 항온조를 이용하여 30±1°C로 유지하였으며, 공기는 소형압축기를 이용하여 0.5vvm으로 공급하였다. pH는 pH 자동조절기 (New

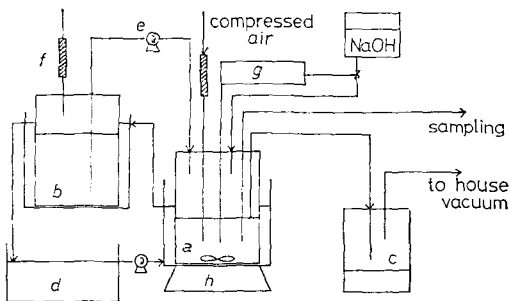


Fig. 1 Schematic Arrangement of the CSTR Operation.

① fermentor ② medium reservoir ③ effluent vessel ④ thermostat ⑤ variable speed peristaltic pump ⑥ air filter ⑦ pH controller ⑧ magnetic stirrer

Brunswick Scientific Co., Model pH-22)에 의하여 4.0±0.1로 조절하였다. 배양 중에 거품을 방지하기 위하여 消泡劑로 polypropyleneglycol-2000을 첨가하였다.

4. 菌體의 生育測定

플라스크에서 진탕배양한 배양액을 9,000 rpm에서 15分間 원심분리한 다음 침전된 군체를 다시 일정량의 생리식염수에 현탁시키어 이 현탁액의 탁도를 spectrophotometer (Hitachi, Model 10L)로 파장 660nm에서 측정하여 菌體量으로 환산하였다. 배양조건의 검토에서는 원래 주정폐액 (control)에서의 菌體生育을 100으로 하여 상대적인 生育을 비교하였다.

5. 成分分析

배양이 끝난 배양액을 원심분리하여 침전된 군체를 減壓건조한 다음 질소는 micro-kjeldahl法, 환원당은 Somogyi變法으로 分析하였으며, 粗지방은 ether로 추출하였고 灰分은 600°C에서 灰化시켜 측정하였다.

材料 및 方法

1. 菌株의 선정과 pH의 영향

250ml 삼각플라스크에 원료폐액 20ml를 각각 넣고 pH를 3~8의 범위로 조절하여 1次 선정된 *Candida tropicalis*, *C. utilis*, *C. utilis* 841과 *Saccharomyces cerevisiae*를 각각 접종하여 진탕배양하였다. Fig. 2를 보면 모든 菌株가 pH 4 즉 주정폐액 원래의 pH에서 가장 잘 生育하였음을 알 수 있으며, pH 4以下에서는 生育이 급격히 감소하였다. Menzinsky⁽⁶⁾는 효모의 경우 배지의 pH는 3.8

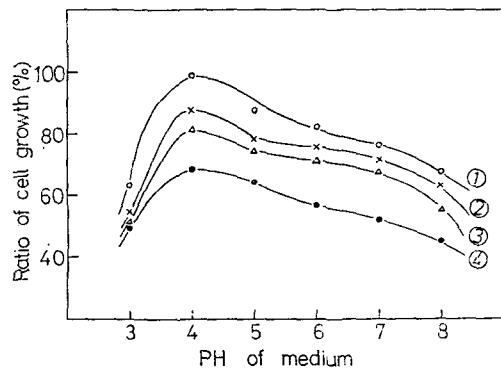


Fig. 2 Effect of pH on the Growth of Yeasts

① *Candida tropicalis* ② *Candida utilis* 841 ③ *Candida utilis* ④ *Saccharomyces cerevisiae*

~4.2가 좋다고 보고한바 있다.

실험에 사용한 4개의 菌株 中에서 *C. tropicalis*의 생육이 가장 우수하였으며, *S. cerevisiae*는 *C. tropicalis*에 비하여 약 30% 부족한 생육을 나타내었다. 그러나 Yu 등⁽⁴⁾의 보고에 의하면 위의 두 菌株를 1:1로 혼합배양하면 *C. tropicalis*의 단독 배양의 경우보다 약 10%가량 생육량이 증가한다고 하였다. 본실험에서는 *C. tropicalis*를 선정하여 실험하였다.

2. 질소 및 무기염류의 영향

(1) 질소원의 영향

주정폐액에 여러가지 질소원을 농도를 달리하여 첨가하여 질소원의 종류 및 농도가 균체생육에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

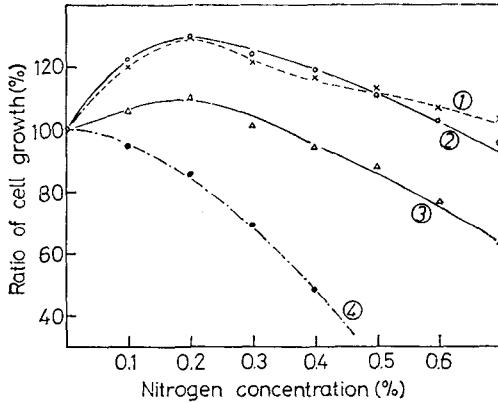


Fig. 3 Effect of Nitrogen Compounds on the Growth of *Candida tropicalis*

- ① $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ② NH_4Cl ③ $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$
④ NaNO_2

질소원으로 NH_4Cl 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 0.2% 첨가했을 때가 가장 양호하였으며 이는 다른 연구자들의 보고와 유사하며 Na_2NO_2 는 오히려 생육을 저해하였다.

(2) 무기염의 영향

여러가지 인산염의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 인산염의 종류에 관계없이 0.06wt%일 때 가장 좋은 생육을 보였으며 이는 Yu 등⁽⁴⁾의 결과와 같았다. 인산염 중에서는 K_2HPO_4 가 KH_2PO_4 보다는 약간 더 양호하였으나 Yu 등⁽⁴⁾은 KH_2PO_4 가 좋은 것으로 보고하였다.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2wt%, K_2HPO_4 0.06wt%를 첨가한 폐액에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 와 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 각각 농도를 달리하여 첨가하여 그 영향을 검토한 결과 Fig. 5와 같다. 마그네슘의 농도 0.04%에서 최대

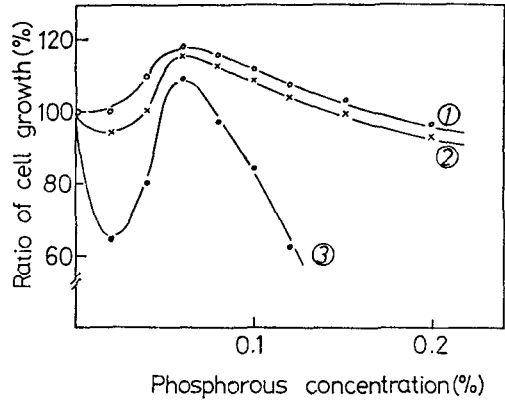


Fig. 4 Effect of Potassium and Phosphorous Concentration on the Growth of *Candida tropicalis*,

- ① K_2HPO_4 ② KH_2PO_4 ③ K_3PO_4

생육을 나타냈으며, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 와 K_2HPO_4 를 첨가했기 때문에 이때의 생육량은 아무것도 첨가하지 않은 원료폐액(control)의 생육량보다 약 40% 증가하였다. 한편 Oh 등⁽⁵⁾은 본실험 결과보다 약간 낮은 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 Mg 0.04%에서 가장 생육이 양호하였다고 보고한바 있다.

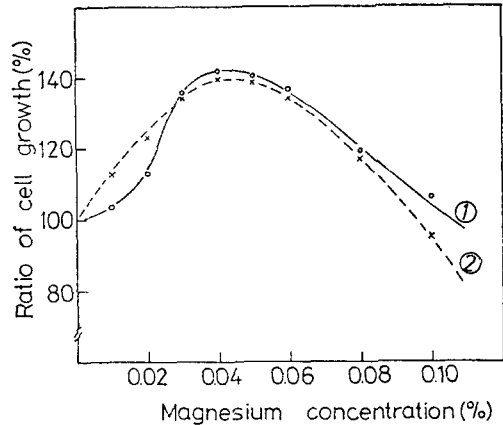


Fig. 5 Effect of Magnesium Concentration on the Growth of *Candida tropicalis*

- ① $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ② $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

3. 배양온도의 영향

원료주정폐액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, K_2HPO_4 0.06%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04%를 가하고 pH 4로 조절한 배지에 *C. tropicalis*를 접종하고 배양온도를 달리하여 24시간동안 진탕배양한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 균체의 생육최적온도는 30°C 이었으며 이 결과는 *S. cerevisiae*의 배양결과와도 같았다.⁽⁴⁾

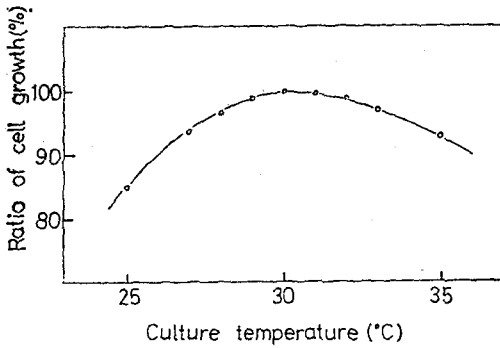


Fig. 6 Effect of Culture Temperature on the Growth of *Candida tropicalis*

4. 생육곡선

배양온도의 검토에서와 같은 배지조성으로 30°C에서 진탕배양하면서 배양시간에 대한 균체량을 측정하여 얻은 생육곡선이 Fig. 7의 (A)이다. Fig. 7의 곡선 (B)는 원료폐액에 배양했을 때의 생육곡선이다. Fig. 7의 (A)를 살펴보면 접종후 4시간부터 대수증식기가 시작되었으며, 12시간에 대수증식기의 말기에 도달하고 20시간에 증식이 거의 종료되었다. 대수증식기의 비증식속도는 1.0hr⁻¹이었으며 배지의 pH는 대수증식기에는 다소 감소하다가 24시간이후에는 다시 4.0으로 일정하게 유지되었는데 이는 첨가된 무기염의 완충효과인 것 같

다. 한편 원료폐액을 그대로 사용한 (B)의 경우 lag phase는 (A)에서와 같이 4시간이었으나 대수증식기의 비증식속도는 0.31hr⁻¹로서 (A)경우의 1/3에 지나지 않았으며 최종균체농도도 상당히 낮았다. 그리고 pH는 (A)의 경우와는 반대로 대수증식기가 되면서 상승하기 시작하여 36시간 이후에는 6.4로 일정하게 유지되었는데 이는 서서히 감소한다고 한 Oh 등⁽⁵⁾의 보고와 달랐다.

한편 기질의 농도를 달리하여 30°C에서 진탕배양하면서 초기 대수증식기에서 비증식속도 μ 를 각각 구하여 $1/\mu$ 에 대하여 기질농도의 역수 $1/s$ 를 그린 것이 Fig. 8이다. Fig. 8에서 알 수 있는 것처럼 직선이 얻어지므로 주정폐액에서 *C. tropicalis*의 생육은 다음의 Monod 모형에 따른다는 것을 알 수 있다.⁽⁷⁾

$$\mu = \mu_{max}S/(K_s+S)$$

Fig. 8로부터 $\mu_m=1.0hr^{-1}$, $K_s=4.4g/l$ 를 얻었다. 또한 각 기질농도에서 수율을 평균한 결과 평균수율 Y는 0.347이었다.

5. 連續培養

발효조에 200ml를 미리 희분배양하여 대수증식기의 말기에 도달했을 때 배지(기질농도 15g/l)를 공급하여 연속배양을 시작하였으며 유량은 희석율이 각각 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 및 0.7hr⁻¹이

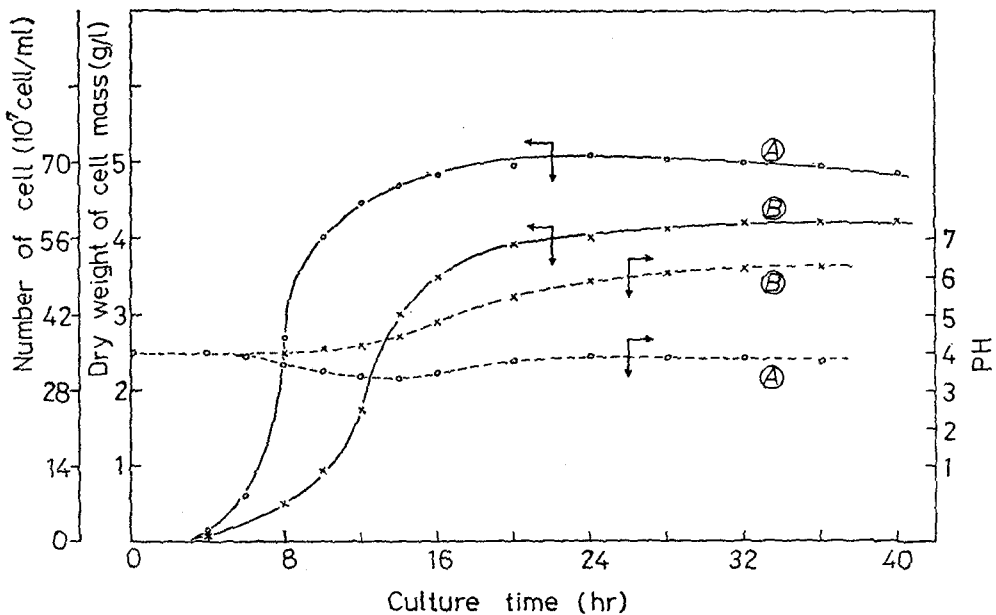


Fig. 7 Effect of Culture Time on Dry Weight of Cell Mass and pH Change at 30°C.
 (A) is added mineral sources, (B) not added.

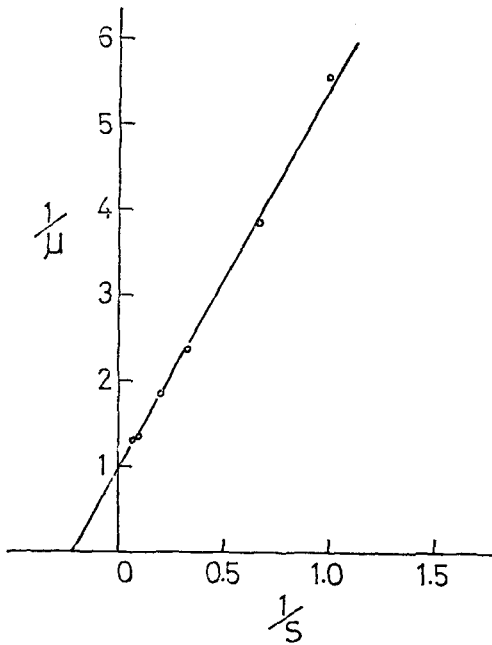


Fig. 8 Relationship between $\frac{1}{\mu}$ and $\frac{1}{S}$

되도록 조절하였다. 연속배양을 시작한 후 4시간까지는 최고 12% 정도의 균체량의 감소를 보이다가 10시간 이후부터 정상상태에 도달했다. 정상상태에 도달한 후 24시간 동안 더 정상상태를 유지하면서 4시간 간격으로 배양액을 채취하여 잔류당과 생성균체량을 분석하여 평균하였으며 회석율에 따른 이들의 영향을 圖示한 것이 Fig. 9이다. 實線은 $S_0=15\text{g/l}$, $\mu_m=1.0\text{hr}^{-1}$, $K_s=4.4\text{g/l}$, $Y_{x/s}=0.347$ 의 生育特性값을 사용하여 Monod Chemostat 모형에 따라 理論的으로 계산한 값이다. (7) 點은 實測植로서 두 값은 잘 일치하고 있다.

Fig. 9로부터 회석율 0.5hr^{-1} 에서 菌體농도 0.37g/l 이며, 菌體生成速度는 최대로서 $1.84\text{g/l}\cdot\text{hr}$ 를 나타내며, 그 이상의 회석율에서는 균체농도가 급격히 감소하고 잔류당의 농도가 상승하여 회석율 0.77hr^{-1} 에서 wash out이 생긴다는 것을 알 수 있다. 회석율 0.5hr^{-1} 에서 菌體生成速度는 최대이나 유출액 중에 잔류당의 농도가 초기농도의 약 30%에 상당하는 4.4g/l 이므로 잔류당의 농도를 더욱 감소시키기 위해서는 多段連續培養法을 개발하는 것이 필요하다.

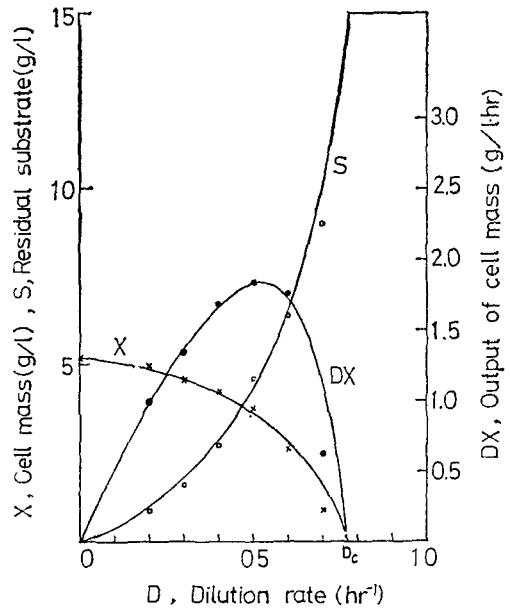


Fig. 9 Effect of Dilution Rate on Residual Substrate, Cell Mass, and Output of Cell Mass.

Solid curves are calculated using the values of $\mu_m=1.0\text{hr}^{-1}$, $Y_{x/s}=0.347$, $S_0=15\text{g/l}$, and $K_s=4.4\text{g/l}$. Points are experimental values.

6. 菌體의 成分

회분 및 연속배양한 乾燥菌體의 成分分析結果는 Table 1과 같다.

Table 1. Compositions of Distiller's Waste and Dry Cells (wt%)

	Distiller's Waste		Dry Cells	
	Supernatant	Solid	Batch culture	Continuous Culture
Total Sugar	1.504	49.96	6.10	6.54
Crude Protein	0.49	15.29	59.51	60.67
Crude Lipid	—	8.24	4.78	3.45
Ash	0.13	6.36	8.67	7.70

폐액과 균체성분을 직접 비교할 수는 없으나 폐액중의 당분의 대부분이 균체로 전환되어 단백질 함량이 약 60%인 良質의 菌體蛋白質을 얻게되며 이는 飼料로 충분히 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

結 論

Tapioca 전분을 당화하여 사용한 酒精蒸溜廢液에 *C. tropicalis* 를 배양하여 菌體를 생산하기 위한 最適培地組成과 生育條件을 검토하고 回分 및 連速培養을 하여 다음의 結論을 얻었다.

1. 酒精증류폐액을 가장 잘 資化하는 菌株는 *C. tropicalis* 로서 이 菌株의 最適 pH와 온도는 4.0 및 30°C 였다.

2. 질소원으로서는 (NH₄)SO₄ 0.2%, 무기염으로 K₂HPO₄ 0.06%, MgSO₄·7H₂O 0.04%를 보충하였을 때 효모의 生育이 현저히 향상되었다.

3. *C. tropicalis* 의 生育特性값은 $\mu_m=1.0\text{hr}^{-1}$, $K_s=4.4\text{g/l}$, $Y_{x/s}=0.347$ 이었다.

4. 연속배양 결과 희석율 0.5hr⁻¹에서 最大菌體生成速度 1.84g/l.hr 를 얻었으며, 희석율 0.773hr⁻¹에서 wash out 되었다.

5. 건조菌體의 단백질 함량은 약 60%였다.

參 考 文 獻

1. 정동효 : 발효와 미생물공학, 先進文化社, 서울, (1974)
2. 唐木, 西岡, 小西 : *J. Ferment, Technol.*, **26**, 173(1968)
3. 唐木 *et al*: *J. Ferment. Technol.*, **24**, 45L (1966)
4. Yu, J. H., D.H. Oh and R, Yang: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2**, 83(1974)
5. Oh, D.H., R. Yang and J.H. Yu: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4**, 71(1976)
6. Menzinsky, G. : *Arkiv. Kemi.*, **2**, 1(1950)
7. Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Millis: "Biochemical Engineering," University of Tokyo Press, p.95(1973)