

두부廢液의 組成 및 *Saccharomyces Cerevisiae*를 利用한 Alcohol 醱酵

崔 味 愛 · 崔 慶 浩
曉星女子大學校 食品營養學科
(1982년 2월 10일 수리)

Soybean Whey Composition and Alcohol Fermentation by Using *Saccharomyces Cerevisiae*

Mi Ae Choi and Kyoung HO Choi

Dept. Food Science and Nutrition, Hyoseung University.

(Received February 10, 1982)

Abstract

Alcohol fermentation was carried out by using the yeast (*S. cerevisiae*) and soybean whey as the sole carbon source. The whey was gained from waste after manufacturing of soybean curd.

The whey contained approximately one gram sugar per hundred milliliter and the sugar was consisted of a 65 per cent of reducing sugar. However, it showed a low protein content of 43mg per the same volume.

Ammonium sulfate showed the best effect on the generation of carbon dioxide among three kinds of tested nitrogen sources, potassium nitrate, urea and ammonium sulfate. Thus, fermentation was carried out with supplement of 2.0g ammonium sulfate to one liter of soybean whey.

During fermentation continued for 48 hours, the maximum amount of ethanol 1.86g was produced from one liter of soybean whey. The ethanol fermentation utilized 81 and 94% of its initial sugar and protein contents, respectively.

序 論

대豆로부터 만들어지는 두부는 8.6%에 달하는蛋白質을 함유(한국인 영양 권장량 FAO 한국협회, 1980年)하여 우리 나라에서는 오래 前부터 重要蛋白質供給源으로 利用되고 있으며 1979年의 國內大豆 소비량이 約 75萬톤¹⁾에 달하고 있는 것으로 미루어 그 生産量 또한 상당할 것으로 추정된다. 한편 두부 製造과정에서蛋白質을 침전시킨 後 放流되는 폐액 中에는 3~4%의 固形物이 함유되나 이 固形物의 約 50%가 炭水化合物이며 水溶性 糖類의 含量도 固形物의 25~30%에 달하는 것으로 報告²⁾되어 있다.

近間 有機物 含量이 많은 産業폐기물을 利用하여 有

用한 物質을 生産코저 하는 研究가 활발히 遂行되고 있으며 그 材料로서 이미 널리 利用되고 있는 廢糖漿 및 亞황산 펄프폐액 以外에도 cheese whey,^{3,4)} corn waste,⁵⁾ fruit waste,⁶⁾ alcohol類^{7,8)}, 심지어는 廢紙⁹⁾ 또는 人間의 生活廢水¹⁰⁾까지도 研究對象이 되고 있다.

그러나 産業폐기물을 利用코저 하는 近間의 動向에도 불구하고 두부를 食品으로 利用하는 地域은 우리나라를 위시하여 日本, 中國 等 數個國에 불과하므로 두부 폐액을 利用한 研究例는 比較的 僅少한 形편이다. 이런 観点에서 두부 폐액을 利用하여 ethanol을 生産하고 부수적으로 有機物 감소에 따른 폐액처리 效果를 얻음 目的으로 ethanol발효를 실시하고 ethanol 生産성 및 有機物減少의 程度를 檢討하였다.

材料 및 方法

1. 培 地

부산시 부전동에 있는 두부 제조 공장에서 두부 응고後 放流되는 廢液(whey)을 收去하여 固形物을 원심분리(9,000 r.p.m×10 min, 4°C)한 後 증기압 0.75 kg에서 10分間 加壓 살균하여 基礎培地로 하였다.

2. 菌 株

Alcohol 발효 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 를 사용하였으며 同 균주는 韓國菌株保存協會로부터 분양 받았다.

3. Whey 分析

1) 水 分

Whey 를 弱火로 加熱하여 濃縮한 後 105°C에서 恒量이 될 때까지 乾燥하고 desiccator 內에서 冷却한 後 秤量하였다.

2) 脂 質

水分 乾燥 後의 固形物 2g 을 원통형 여지에 담고 ether 를 용매로 하여 soxhlet 法으로 抽出하여 秤量하였다.

3) 蛋白質

Whey 에 TCA(trichloroacetic acid)를 加하여 高分子 物질을 침전시킨 後 遠心분리하여 침전을 분리하였다. 침전 中의 脂質을 50%의 ethyl ether 로 抽出하여 除去한 後 암모니아수로 蛋白質을 抽出하였다. 抽出液 中의 蛋白質은 Lowry 의 phenol 시약법¹³⁾으로 定量하였다.

4) 總 糖

Whey 를 酸 加水分解(0.6N HCl)한 後 Horiuchi 의 anthrone 黃酸法으로 定量하였다.

5) 灰 分

乾燥한 whey 를 600°C에서 灰化한 後 秤量하였다.

4. 菌體 培養 및 增殖度 測定

1) 培 養

① 種菌培養: 100 ml 삼각 flask 에 20 ml 의 whey 를 넣고 여기에 固體 斜面培地로부터 菌體 1白金耳를 接種하여 30°C에서 15~20時間 배양한 것을 種菌으로 하였다.

② 本培養: 500 ml 醱酵 flask 에 whey 100 ml 를 넣고 여기에 上記 種菌 배양액을 接種하여 濁도가 0.1 이 되도록 調整한 後 30°C에서 진탕 배양하였다.

2) 增殖度 測定

① 濁度: 배양액 一定量을 無菌箱內에서 取하고 이 배양액의 600 nm 에서의 吸光度를 測定하였으며 測定 에는 光電比色計(東京光電, 7A)를 使用하였다.

② 菌數: 培養液을 인산 완충액($\frac{1}{15}$ M, pH 7.0)으로 희석한 後 血球計算盤을 使用하여 현미경 下에서 計測 하였다.

3) 乾物重量

培養液 20 ml 中에 含有된 菌체를 遠心분리하여 集菌하고 이것을 얼음에 채운 증류수로 1回 세척한 後 60°C에서 豫備乾燥하고 105°C에서 恒量이 될 때까지 乾燥하여 秤量하였다.

5. 醱 酵

2l 용 발효 flask 에 whey 1,000 ml 를 넣고 여기에 種菌 배양액 100 ml 를 接種한 後 2時間동안 진탕배양 하였다. 以後 발효관을 장치하고 30°C에서 48時間 정 치배양하였다. 단, 발효에 使用한 whey 에는 200 mg/100 ml 의 농도로 黃酸암모늄을 질소源으로 添加하였다.

6. Gas 발생량 測定

Whey 200 ml 에 種菌 배양액 200 ml 를 接種하고 발효관을 설치한 後 30°C에서 정치배양하였으며 同 培養과정 中에 減少된 重量을 gas 발생량으로 하였다.

7. Alcohol 증류

Alcohol 증류법¹³⁾에 準하여 98°C에서 1次 증류하고 95°C에서 2次 증류하였으며 증류액의 alcohol 농도는 比重法¹⁴⁾으로 測定하였다.

結果 및 考察

1. whey 組成

Whey 는 Table 1 과 같이 100 ml 당 水分 98.07 g, 脂質 5 mg, 蛋白質 43 mg, 總糖 1.09 g, 灰分 1.61 g 을 含有하였으며 總糖中 還元糖 含量은 65±3%였다.

Table 1. Composition of soybean whey

Component	Content(g/100 ml)
Water	98.07
Lipid	trace
Protein	0.04
Sugar	1.09
Ash	1.61

Protein and sugar were analyzed according to the method of Lowry (phenol reagent) and Horiuchi (anthrone-sulfate) respectively.

還元糖의 비율이 높은 것은 alcohol 발효에 有利한 요소라 할 수 있으나 總糖含量이 約 1%로서 alcohol 발효에는 낮은 狀態이고 더우기 蛋白質 含量이 낮아서 다른 질소원의 첨가없이 발효가 어려울 것으로 판단된다. 即, alcohol 발효時에 必要한 C/N 의 比는 最少 10:1¹⁵⁾로 알려져 있으나 本 whey 에서는 100 ml 당 질소含量이 約 6.9 mg(蛋白質×16%)이며 還元糖은 모

두 glucose 로 간주했을 때 炭素含量이 約 280 mg(환원당×glucose 분자 中 탄소의 重量比)으로서 C/N의 比가 約 40 : 1에 相當하고 있으므로 발효를 위해서는 질소源을 添加할 必要가 있는 것으로 分析된다.

2. 菌體 增殖

菌體는 培養에 따라 經時的으로 增殖하여 Table 2와 같이 培養液의 濃度가 初期의 0.1에서부터 24시간에는 1.8, 48시간 3.0, 72시간 3.5로 增加하였고 總菌數도 24시간에는 2.3×10^6 個/ml, 48시간 1.6×10^7 個/ml, 72시간 2.2×10^7 個/ml로 增加하였다. 菌體의 乾物重量 또한 ml 당 각각 0.8 mg, 3.1 mg, 4.0 mg 으로서 비슷한 增加를 나타내었다.

Table 2. Growth of yeast cell in the soybean whey medium

Cultivation time(hour)	Turbidity	Cell No. (cells/ml)	Dry weight (mg/ml)
0	0.1	—	—
24	1.8	2.3×10^6	0.8
48	3.0	1.6×10^7	3.1
72	3.5	2.2×10^7	4.0

The cells were grown for designated time with shaking. Cell number indicates the mirosopic count.

한편 배양액의 탁도의 변화를 경시적으로 측정 한 결과는 Fig. 1과 같이 48시간까지 급속히 증가하였다. 以後 增加속도가 서서히 떨어지면서 72시간체에 가장 높은 탁도(約 3.5)를 나타내었고 이후 감소하였다.

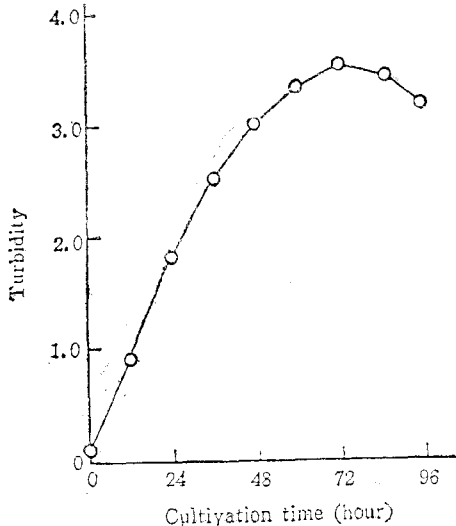


Fig. 1. Turbidimetric growth of *S. cerevisiae*. Turbidity of the cultural broth was measured at 660nm.

本 濁度 변화의 모양으로 볼 때 菌體의 增殖이 왕성

한 時期는 培養개시 後 48時間까지이며 24時間 부근이 代數증식 中期에 해당되고 있다. 따라서 種菌은 24時間 정도 배양한 것이 가장 좋을 것으로 판단된다.

3. 질소源 添加가 炭酸가스 發生에 미치는 영향

질소源으로서 酵母培養에 주로 利用되는 有機질소 1종(尿素) 및 무기질소 2종(황산암모늄, 질산칼륨)을 使用하였으며 添加量은 질소量을 기준으로 하여 요소 및 황산암모늄은 40 mg/100 ml, 질산칼륨은 20 mg/100 ml로 하였다. 그 결과 Table 3와 같이 48時間 배양期間中 질산칼륨이 75 mg/100 ml, 尿素가 190 mg/100 ml, 황산암모늄이 250 mg/100 ml의 炭酸가스를 發生하여 황산암모늄이 가장 큰 效果를 나타낸 反面에 질산칼륨은 對照區보다 오히려 낮은 가스 發生量을 나타내었다.

Table 3. Effect of nitrogen source addition on the generation of carbon dioxide

N-Source	Gas generation (mg/100ml)	Addition (g/100ml)
Control	170	—
KNO ₃	75	0.156
Urea	190	0.092
(NH ₄) ₂ SO ₄	290	0.200

The nitrogen sources were added to make the final nitrogen concentration 40 mg/100 ml (urea and ammonium sulfate) or 20 mg/100 ml (potassium nitrate).

上記 結果 가운데 酵母(*S. cerevisiae*)는 질산칼륨을 질소源으로 利用할 수 있음에도 불구하고 가스발생을

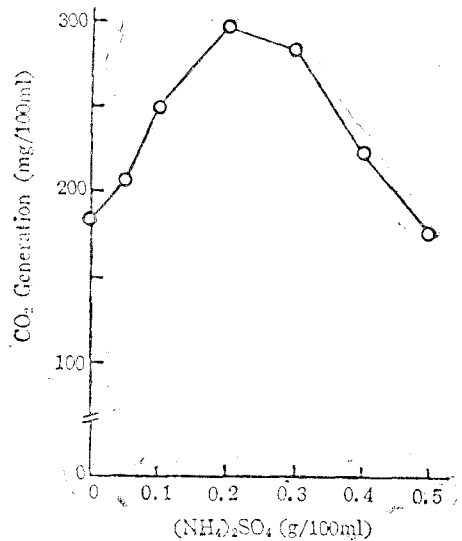


Fig. 2. Effect of ammonium sulfate addition on the generation of carbon dioxide. Cells were anaerobically cultivated for 48 hours.

저해하였음은 特異한 現狀이라 할 수 있겠다.

황산암모늄의 濃도가 탄산가스 발생에 미치는 영향을 검토한 결과는 Fig. 2와 같이 0.2 g/100 ml 농도에서 290 mg의 가장 높은 가스 발생을 나타내었고 以後 농도가 증가할수록 가스 발생량은 감소하였다.

4. Alcohol 醱酵

1) 醱酵경과

經時的인 탄산가스 발생 및 還元糖 소비율을 檢討한 결과 Fig. 3과 같이 48時間 동안에 총 194 mg/100 ml의 炭酸가스가 發生되었고 糖은 初期의 9.8 mg/ml로부터 約 1.9 mg/ml로 約 81%가 감소되었다. 糖은 특히 初期 12時間의 배양기간 中 급격한 감소를 나타내었으며 以後 時間當 糖소비율은 서서히 감소되었으며 가스 발생도 이에 同調되었다.

한편 培地에 잔존하는 蛋白質은 Table 4와 같이 48時間 동안에 단백질이 94%만큼이나 감소되었다.

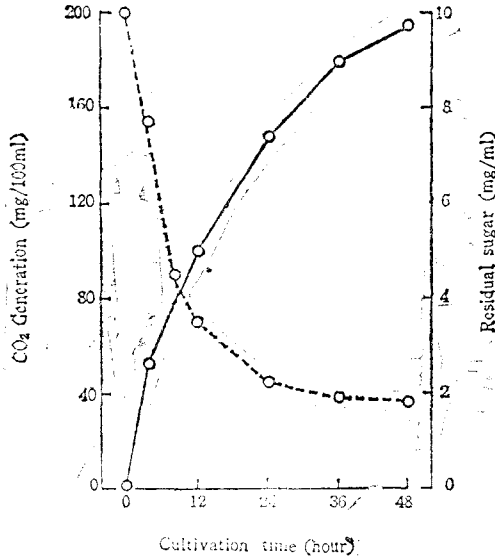


Fig. 3. Cultivation time curve of carbohydrate content and carbon dioxide generation by alcohol fermentation. Symbols represent o—o:CO₂ generation and o···o: content of residual sugar, respectively.

2) 生成量 및 收率

발효액 1 l로부터 생성된 alcohol을 2단 증류하여

Table 4. Changes in the content of protein and reducing sugar during fermentation.

Cultivation time (hour)	Protein (μg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)
0	439	9.84
48	25	1.86

Table 5. Productivity of ethanol estimated on the basis of two step distillation.

Distillation	Concentration (%)	Volume (ml)	Total weight (g/l)
One step	1.08	172	1.06
Two step	3.75	20	0.75

추출한 結果 Table 5와 같이 1단 증류에서 1.08%의 ethanol 172 ml가 回收되었고 2단 증류에서 3.75% ethanol 20 ml가 回收되었다. 이 回收량은 總 ethanol로 환산하였을 때 各各 1.86 g(2.28 ml), 0.75 g(0.92 ml)에 相當하는 量이나 2단 증류時의 증류효율이 約 40%에 그치고 있을 뿐만 아니라 Tabl 4의 糖 소비량으로부터 계산한 理論值 alcohol 生産量 4.08 g에 對하여 各各 45.6%, 18.4%의 낮은 收率이다.

이상의 結果로부터 두부 whey를 利用한 alcohol 발효는 낮은 收率때문에 經濟性은 희박하다고 할 수 있으나 總 糖 함량이 1%에 지나지 아니하는데도 불구하고 醱酵가 可能하였다는 點과 糖 및 蛋白質 감소 효과가 크다는 점에서 特異하다 하겠다.

要 約

폐액으로 방류되는 두부 폐수(whey)를 이용하여 alcohol 발효를 실시하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다. whey 中에 舍여된 환원당은 約 0.71%로서 이 糖을 利用하여 1當 最大 1.86 g의 ethanol이 生産되었으나 收率이 낮아서 經濟性은 희박하다. 그러나 발효에 의해서 단백질과 당이 각각 94%, 81%만큼이나 감소한 結果로 미루어 보아 두부 廢水中의 有機物을 alcohol 醱酵에 利用할 수 있음을 確認하였다.

文 獻

1. 이경원 : 世界大豆 生産과 利用現況, 食品科學, 14 (1), 4(1981)
2. 海老 根英雄 : 食品工業, 5(下), 21(1977)
3. Delaney, R.A.M., Kennedy, R. and Walley, B. D., *J. Sci. Food Agric.*, 26, 1177(1972)
4. Vananuvat, P. and Kinsella, J.E., *J. Food Sci.*, 40, 823(1975)
5. Rajagopal, M.V., *J. Food Technol.*, 12, 633 (1977)
6. Svettana, G.K., *for humans, Ann. Rev. Microbiol.*, 301(1978)
7. Bernard, J.A., Laskin, A.I. and Mccoy, C.J., *ceticus on ethanol, Appl. Microbiol.*, 25, 787 (1973)

8. Tokuya, H. and Takshi, H., *J. Agr. Biol. Chem* **32**, 1175(1968)
9. David, M.U., *Biotechnol. and Bioeng*, **XIII**, 77(1971)
10. Irgens, R.L. and Clarke, J.D., *J. Appl. Microbiol.*, **2**, 231(1976)
11. 副島 正美, 菅原 潔: 蛋白質の定量法, 東京大學出版會, 東京, 86(1971)
12. 福共 作感, 還元糖の定量法, 東京大學出版會, 東京, 47(1973)
13. 東大農化教室, 實驗農藝化學, 朝倉書店, 東京, 633(1971)
14. John, A.D., *Handbook of Chemistry*, McGraw-Hill Book Co., New York, 10(1973)