

절간고구마원료 주정폐액을 이용한 단세포단백질의 생산 및 폐액의 BOD 제거

이형춘, 구영조, 민병용, 이흥근*

농어촌개발공사 식품연구소

* 서울대학교 보건대학원

(1981년 12월 28일 수리)

Growth of Yeasts in Alcohol Distiller's Waste of Dried Sweet Potato for Single-cell Protein Production and BOD Reduction

Hyeong Choon Lee, Young Jo Koo, Byung Yong Min and Hong Keun Lee*

Agr. & Fish. Development Corp. Food Research Institute,

School of Public Health, Seoul National University*

(Received December 28, 1981)

Abstract

Torulopsis candida FRI YA-15, a selected yeast, was cultivated in alcohol distiller's waste-filtrate of dried sweet potato for microbial protein production and BOD reduction.

The General composition of waste-filtrate was BOD₅ 15700 ppm, COD 36800 ppm, reducing sugar 3300 ppm, total nitrogen 910 ppm, total solids 51800 ppm and ash 390 ppm. The pH of waste was 3.85.

The yield to the medium of *T. candida* cultivated in shake-flask at 25°C for 48 hrs was 3.38g/l and effectiveness in reducing BOD₅ and COD of waste was 38.9% and 31.8%, respectively.

In batch cultivation using 3 l—jar fermenter, maximum yield to the medium reached 3.2g/l after 28 hrs' cultivation under the condition of temperature 35°C, initial pH 4.0, aeration rate 2vvm, agitation speed 100rpm.

Dry yeast was composed of crude protein 47.98% and ash 5.23%.

서 론

주정증류폐액에 효모를 배양하여 단세포단백질을 생산한 연구는 松尾^{1)*}들과 唐木功^{2)*}이 폐당밀주정폐액에 *Candida* 속의 효모를 배양하여 공장규모의 연속생산에 이르는 연구를 한 것과, 柳^{3)*}들이 소맥분 주정폐액에 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Candida steatolytica*를 각각 단일배양한 후 혼합배양한 연구가 있다.

우리나라의 주정생산량은 해마다 증가하여 1981년 상반기 생산량은 386, 106D/M에 달하였

으며, 원료중 가장 큰 비중을 차지하는 것은 절간고구마이므로¹⁾¹⁾ 절간고구마원료주정폐액의 재이용 방법을 연구할 필요가 있다고 사료되었다.

재이용 방법으로서는 절간고구마주정폐액이 여과가 잘 되며¹⁾²⁾, 유기물 함량이 높고, pH가 효모의 생육에 적합한 pH인 것등을 고려할 때, 여액(濾液)을 효모의 배양기질로 이용할 수 있다고 생각되었다.

따라서 본 연구에서는 절간고구마주정 폐액의 여액으로부터 단세포단백질을 생산하는 동시에

폐액을 처리할 목적으로 균체생산량이 높고 BOD제거효율이 높은 우수효모를 선발하고, 선발된 효모의 배양조건을 검토한 후, 3ℓ-jar fermenter에 의한 통기배양을 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 시료는 P회사의 절간고구마원료주정폐액을 동양여지 No. 5C로 여과한 濾液이었다. 이 濾液을 15psi, 15분간 살균 후 각 항목에 대하여 분석한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. General Composition of Alcohol Distillers' Waste - filtrate through Toyo No. 5C Filter Paper

Components	Content	ppm
BOD ₅	15700	
COD	36800	
Reducing sugar	3300	
Total nitrogen	710	
Total solids	51800	
Ash	390	
Volatile solids*	51410	
pH	3.85	

*Total solids-Ash

사용한 균주는 농어촌개발공사 식품연구소에 보존중인 효모중에서 예비실험의 결과 폐액에 잘 적응하여 증식하는 *Torulopsis candida* FRI YA-15, *Saccharomyces cerevisiae* FRI E-2 및 *Shizosaccharomyces pombe* FRI E-5를 사용하였으며, 이 중 우수균주인 *T. Candida*를 전 실험을 통하여 사용하였다.

실험방법

균 배양법 : 진탕배양실험에서는 폐액을 250 ml 삼각플래스크에 50 ml씩 넣고 15psi, 15분간 살균 후, 24시간 배양한 starter culture 1 ml씩 접종하여 gyrotary shaker(New Brunswick model G2)로 200rpm에서 회전진탕배양하였다.

3ℓ-jar fermenter를 사용한 통기배양실험에서는 폐액 2ℓ를 jar에 넣고 15psi, 15분간 살균하여 균을 접종한 다음 36시간동안 배양하면서 4시간 간격으로 시료를 채취하여 분석하였다. 배양조건은 온도 35±1℃, 초기pH4.0, 통기량 2vvm, 교반속도 100rpm이었으며, 접종량은 폐액 50 ml를 250 ml 삼각플래스크에 넣고 균을 1 백금이 접종한 후 35℃로 24시간동안 200rpm에서 회전진탕배양한 것을 발효폐액에 대하여 10% (v/v)로 하였다. 3ℓ-jar fermenter는 실험실에서 제조한 것으로서, 온도조절장치 및 통기조절장치가 부착된 것을 사용하였다.

균의 생육 측정법 : 건조균체량은 배양액을 3000 rpm, 15분간 원심분리 후 균체를 멸균증류수로 2회 세척하여 105℃에서 함량이 될 때까지 건조시켜 측정하였다. 흡광도(Absorbanay)는 배양액을 원심분리 후 균체를 멸균생리식염수로 2회 세척하여 원래의 농도로 한 후 30배로 희석하여 Varian Techtron Spectrophotometer를 사용하여 660mm에서 측정하였다. 총균수는 배양액을 일정량의 멸균생리식염수로 희석한 후 Haemacytometer를 사용하여 측정하였다.

분석방법 : BOD, COD 및 DO (dissolved oxygen)는 Standard Methods¹³에 의하였다. 이때, 시료는 희석하여 측정하였으며, 균 배양액은 3000rpm, 15분간 원심분리 후 상등액에 대하여 측정하였다.

환원당은 Somogyi 방법¹⁴을 사용하였으며, 총 질소는 시료의 경우에는 Macro Kjeldahl¹⁵법을, 건조효모의 경우에는 Micro Kjeldahl¹⁶법을 사용하였다. 조회분은 직접회화법을 사용하였으며, Total Solids는 시료를 100~105℃에서 함량이 될 때까지 상압건조 후 측정하였다.

건조효모의 조성은 3ℓ-jar fermenter 배양 실험으로부터의 배양액을 3000rpm, 15분간 원심분리하여 균체를 회수한 후 40℃에서 24시간 감압건조하여 분석하였다.

결과 및 고찰

우수효모 선발

T. candida, *S. cerevisiae*, *S. pombe*를 각각 25°C로 48시간 진탕배양 후 건조균체량과 폐액의 BOD₅ 및 COD감소율을 측정하여 비교한 결과는 Table 2 및 Table 3과 같다. 실험결과 *T. candida*가 가장 우수한 것으로 나타났다. *T. candida*의 배양액에 대한 균체수율은 3.38 g/l였으며, 배양후 폐액의 BOD₅ 및 COD는 9600ppm 및 25100ppm으로 배양전에 비하여 각각 38.9%, 31.8% 감소하였다.

Table 2. Yields of Yeasts Grown on Alcohol Distiller's Waste-Filtrate

Yeast	pH*	Yield (Dry weight basis)	
		g/l	g/g Reducing sugar
<i>T. candida</i>	6.45	3.38	1.02
<i>S. cerevisiae</i>	6.25	2.50	0.76
<i>S. pombe</i>	6.30	2.47	0.75

*pH of medium after cultivation

Each strain was cultivated at 25°C for 48 hrs on a gyrotary shaker.

*T. candida*의 균체수율은 松尾,¹¹ 유¹⁸들의 결과에 비하여 약 3~4배 적은데, 그 이유는 절간고구마주정폐액은 당밀주정폐액이나 소맥분주정폐액에 비하여 환원당을 적게 함유하기 때문이라 사료된다. 그러나 *T. candida*의 환원당에 대한 균체수율은 1.02로써 松尾들,¹¹ 유¹⁸들의 결과보다 높으며, 당이용성은 좋은 것으로 나타났다.

BOD₅ 및 COD제거율은 본 실험의 결과와 松尾들,³¹ Shannon들,^{17,18} 및 吉澤淑¹⁹⁻²³들의 결

과를 종합하면, 폐액에 효모를 단독배양할 경우, BOD₅ 및 COD감소율은 20%에서 90%에 이르기까지 다양하다. 이것은 우선 폐액중의 이용가능기질의 함유%에 따라 제거율이 달라지고, 균주의 종류에 따라 서로 달라지며, 동일균주라하더라도 배양조건에 따라 서로 달라질 수 있기 때문이다.

이하의 실험에서는 우수효모로 선발된 *T. candida*를 사용하였다.

*Tonopsis candida*의 생육에 미치는 초기 pH의 영향

폐액의 초기pH를 2~9범위의 각pH로 조절하여 *T. candida*를 25°C로 24시간 진탕배양 후 pH별 배양액의 흡광도를 측정하여 비교한 결과는 Fig. 1와 같다. 균의 생육은 pH4.0에서 가장 좋았으며, pH2.0에서는 흡광도가 0.1이하로 거의 생육을 하지 않았고, pH5.0에서 생육이 급격히 감소한 후 pH가 높아짐에 따라 완만하게 감소하였다. 이와 같은 최적초기pH는 폐액의 pH와 거의 일치하므로 공장규모의 생산시에는 pH 조절 없이도 배양이 가능하다고 사료되었다. 균의 최적생육초기pH가 4.0으로 나타났으므로 이하의 실험에서는 폐액의 초기pH를 4.0으로 조절하여 사용하였다.

배양온도의 영향

균의 생육에 적합한 온도를 검토하기 위하여 25, 30, 35, 37, 40, 45°C의 각 온도에서 24시

Table 3. Effectiveness of Yeasts in Reducing BOD₅ and COD of Alcohol Distiller's Waste-filtrate

Yeast	BOD ₅ (ppm)	BOD ₅ Reduction (%)	COD (ppm)	COD Reduction (%)
	of waste* after cultivation		of waste* after cultivation	
<i>T. candida</i>	9600	38.9	25100	31.8
<i>S. cerevisiae</i>	10400	33.8	26900	26.9
<i>S. pombe</i>	11400	27.4	28600	22.3

*centrifuged at 3000 rpm for 15 minute

Each strain was cultivated at 25°C for 48 hrs on a gyrotary shaker.

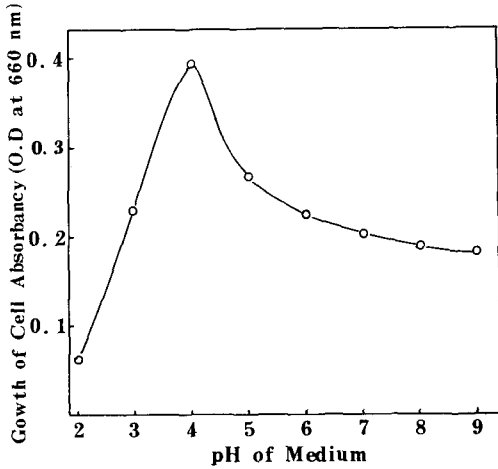


Fig. 1. Effect of Initial pH on Growth of *T. candida* (at 25°C, for 24 hrs)

간 진탕배양 후 온도별 배양액의 흡광도를 측정하여 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양온도 중 35°C에서 가장 생육이 좋았으며, 40°C 이상의 온도에서는 흡광도가 0.1이하로 거의 생육하지 않았다.

균의 생육최적온도가 35°C로 나타난것은 Loddler²⁴⁾의 결과와 부합하고 있다.

따라서 이하의 실험에서는 배양온도를 35°C로 하였다.

통기배양

Scale-up에 의한 영향을 알아보기 위하여 3ℓ-jar fermenter를 사용하여 36시간 배양하

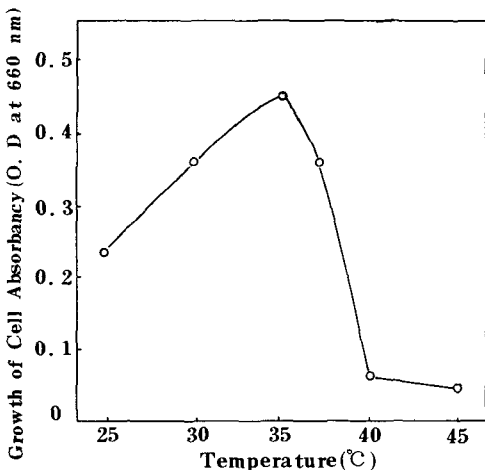


Fig. 2. Effect of Temperature on Growth of *T. candida* (at pH 4, for 24 hrs)

면서 pH, 건조균체량, 총균수 및 거품 높이에 대하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

실험결과 균의 생육은 배양 28시간 후에 최대가 되었으며 그 때의 배양액에 대한 균체수율은 3.2g/l로써 진탕배양 실험의 결과와 거의 일치하였다. 또한 log phase에서의 균의 specific growth rate는 0.217hr⁻¹였으며, biomass doubling time은 3.19hr였다.

pH는 배양중에 계속 증가하여 배양 28시간 후에 최대가 되어 6.8이 되었다. pH가 증가한 것은 효모가 증식하면서 배출한 대사물질 때문이라고 사료되며, 또한 최종pH가 7.0에 가깝게 변화하였으므로 폐액을 이용하여 단세포단백질을 생산하고난 2차폐액을 생물학적 폐수처리방법으로 처리할 경우 pH조정을 할 필요가 없다고 사료되었다.

배양중 거품의 발생정도와 증식의 관계를 알아보기 위하여 거품높이를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 거품높이는 효모가 stationary phase로 들어가기 직전에 최대가 되었는데, 이것은 Tomlinson²⁵⁾의 결과와 비교할 때, 거품의 최대발생시기는 효모의 호흡률이 최대가 되는 시기와 일치하는 것으로 사료되었다.

건조효모의 조성

균체의 영양가치를 판별하기 위하여 통기배양시 균체의 생육이 최대에 이른 28시간배양액으로부터 균체를 회수하여 조성을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다.

균체의 조단백질 함량은 47.98%로써 松尾⁵⁾, 유⁸⁾, Shannon¹⁷⁾, 정²⁶⁾의 결과와 비교할 때, 비교적 높은 것으로 나타났다.

앞으로는 비멸균배양실험을 통하여 개방식 배양방법으로 균체를 대량생산하는 연구와 더 나아가 주정생산공장에서 보유하고 있는 활성 슬러지처리조등을 그대로 이용한 생산방법이 연구되어야 할 것이다.

요 약

절간고구마원료주정폐액을 이용하여 단세포단백질을 생산함과 동시에 폐액의 BOD를 제거할

Table 4. Composition of Dry Yest

Composition	(%)
Crude protein*	47.98
Ash	5.23

*Total nitrogen×6.25

목적으로 우수효모를 선발하고, 선발된 효모의 배양조건을 검토한 후 3ℓ-jar fermenter에 의한 통기 배양을 한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

폐액을 여과한 濾液의 조성은 BOD, 15700 ppm, COD 36800ppm, 환원당 3300ppm, 총 질소710ppm, 고형물51800ppm, 조회분390ppm이었다.

우수효모로 선발된 *Torulopsis candida* FRI YA-15를 25℃에서 48시간 진탕배양하였을 때, 배양폐액에 대한 균체수율은 3.38g/l, BOD, 및 COD제거율은 각각 38.9%, 31.8%이었다.

*T. candida*의 최적생육초기pH는 4.0이었으며,

최적배양온도는 35℃였다.

설정된 초기pH 및 온도하에서 3ℓ-jar fermenter를 사용하여 통기량 2vvm, 교반속도 100 rpm으로 배양하였을 때, 배양 28시간후에 최대로 생육하였으며, 그 때 배양액에 대한 균체수율은 3.2g/l였다.

건조균체의 조단백질함량은 47.98%였다.

참 고 문 헌

- 1) 松尾次雄, 石川不二夫, 山中正美, 小西敬: 醱酵協會誌, 23, 320 (1965)
- 2) 松尾次雄, 石川不二夫, 山中正美, 西岡誠治, 小西敬: 醱酵協會誌, 23, 472 (1965)
- 3) 松尾次雄, 石川不二夫, 山中正美, 西岡誠治, 小西敬: 醱酵協會誌, 24, 67 (1966)
- 4) 松尾次雄, 石川不二夫, 山中正美, 西岡誠治, 唐木功, 小西敬: 醱酵協會誌, 24, 223 (1966)
- 5) 唐木功, 石川不二夫, 山中正美, 西岡誠治,

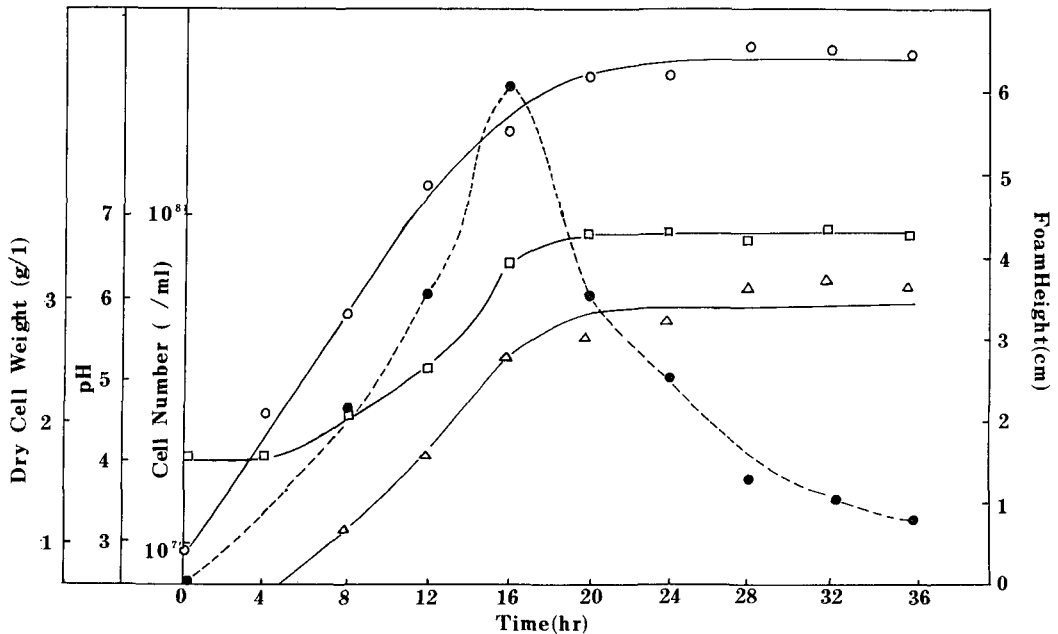


Fig. 3. Time Course of Yeast Cell Growth in 3 l-jar Fermenter under the Culture Conditions of Initial pH 4.0, Temperature 35℃, Aeration Rate 2vvm, Agitation Speed 100 rpm.

—○— Cell number —□— pH —△— Dry Cell Weight —●— Foam height

- 松尾次雄, 小西敬 : 醱酵協會誌, **24**, 457 (1966)
- 6) 唐木功, 西岡誠治, 小西敬 : 醱酵協會誌, **26**, 173 (1968)
- 7) 唐木功, 西岡誠治, 小西敬 : 醱酵協會誌, **26**, 263 (1968)
- 8) 유주현, 오두환, 양용 : 한국산업미생물학회지, **2**, 83 (1974)
- 9) 유주현, 오두환, 양용 : 한국산업미생물학회지, **4**, 13 (1976)
- 10) 유주현, 오두환, 양용 : 한국산업미생물학회지, **4**, 71 (1976)
- 11) 대한주류공업협회 : 주류공업, **1**, (1), 97~98 (1981)
- 12) 矢野式, 堀井和男, 尾崎淺一郎 : 醱酵協會誌, **27**, 135 (1969)
- 13) APHA, AWWA, WPCF : *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 13th ed, 218-499 (1971)
- 14) 鄭東孝, 張賢基, 金明燦, 朴商燾 : 最新食品分析法, 三中堂, 129 (1977)
- 15) AOAC : *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., 552-553 (1980)
- 16) AOAC : *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D. C., 858 (1980).
- 17) Shannon L. J. and K. E. Stevenson : *J. Food Sci.*, **40**, 826 (1975)
- 18) Shannon, L. J. and K. E. Stevenson : *J. Food Sci.*, **40**, 830 (1975)
- 19) 吉澤淑 : 醱酵と工業, **35(12)**, 1013, (1977)
- 20) 吉澤淑, 占藤恵, 馬土幸雄 : 日本農芸化学會誌, **73(11)**, 883 (1978)
- 21) 吉澤淑, 丹野一雄, 鈴木修, 中曾根克己, 小玉祐子 : 日本農芸化学會誌, **55(3)**, 221 (1981).
- 22) 吉澤淑, 丹野一雄, 鈴木修, 右藤恵 : 醸造協會誌, **73(12)**, 959 (1978)
- 23) 吉澤淑, 百瀬洋夫, 丹野一雄, 鈴木修 : **75(1)**, 64 (1980)
- 24) Lodder, J. : *The Yeasts*, 2nd ed., North-Holland Publishing Company, 1249 (1970).
- 25) Tomlinson, E. J. : *W. Research*, **10**, 367 (1976).
- 26) 정기택, 안형익 : 한국식품과학회지, **13(2)**, 91 (1981).