

식품가공공장 폐수의 미생물학적 처리 및 응용

—미생물 균체단백질 회수—

조성환 · 최종덕* · 이상열** · 기우경 · 김재욱***

경상대학교 식품공학과, *통영수산 전문대학, **경상대학교 생화학과, ***서울대학교 식품공학과

Utilization and Application of Microorganisms in Treating Food Processing Wastes

—Recovery of Mycelial Proteins—

Sung-Hwan Cho, Jong-Duck Choi*, Sang-Yeol Lee**,
Woo-Kyung Ki and Ze-Uook Kim***

Department of Food Technology, Gyeongsang Nat'l Univ., Chinju, Korea

* National Tongyong Fisheries Junior College, Choongmu, Korea

** Department of Biochemistry, Gyeongsang Nat'l Univ., Chinju, Korea

*** Department of Food Technology, Seoul National Univ., Suwon, Korea

Abstract

The rationale for the use of fungi in treating waste streams from food processing plants has been that of incorporating the dissolved and suspending nutrients into a macroscopic organism which can be filtered out readily. In order for a process using fungi to meet these objectives we examined a strain of fungi, *Aspergillus fumigatus*, which grew well on a variety of polysaccharide-containing materials and showed both efficient BOD removal and high quality protein recovery. In this experiment the fungal choice was based on the laboratory screening studies where the criteria used was BOD and COD reduction, growth response, mycelial yield, and the ability to compete with the natural flora. In the fermentation system used for the continuous culture of *Aspergillus fumigatus* the best combination of operating variables, inoculum ratio, temperature, initial pH, fermentation time and agitation rate was 5%(v/v), 35~40°C, pH 4.5~5.0, 2days and 150rpm, respectively. The fungus reduced BOD and COD to 94.0 and 90.4%, respectively and 3.15g of dry mycelium per liter of alcohol waste was harvested during 48hr of incubation time. The protein efficiency ratios for the control diet and the experimental diet containing the fungal protein were 3.42 ± 0.15 and 3.40 ± 0.43 , respectively.

서 론

식품이나 음료수를 생산하는 공장에서 방출되는 폐수는 주로 원료나 생산품중에서 폐품으로 버리는 찌꺼기, 세척수, 응축수 또는 냉각수, 생산공

정에 사용된 물, 청소용 사용된 물 때문에 생기며, 정도의 차이는 있을지라도 각종 유기물을 상당량 함유하고 있어 BOD(생화학적 산소요구량), COD(화학적 산소요구량), 용존고형물이나 부유고형물 함량이 대단히 높다. 따라서, 이러한 공장폐수가 다량 폐수로 흘러 나오기 때문에 국민보건과 자연환경 보호의 입장에서 폐수처리는 식품제조 공

1989년 10월 24일 수리

Corresponding author: S.W. Cho

정중에 반드시 거쳐야 할 과정으로 인식되고 있다. 현재, 통조림공장, 낙농제품공장, 양조공장, 과실가공공장, 각종 유기산 및 아미노산 제조공장 및 핵산, 항생물질 등의 발효공장에 이르기까지 활성 sludge법, Lagoon법, 살수관개법, methane 발효법 등의 폐수처리법으로 원폐수의 BOD를 감소시키기 위하여 막대한 경비와 노력을 경주하고 있다. 식품공장의 폐수중에는 단백질, 탄수화물, 지방질 등이 다량 함유되어 있으므로 미생물의 성장에 가장 중요한 N, P, C, H, S 등을 충분히 공급하여 주며 수온도 년중 25~30°C를 유지하므로, 폐수중에 미생물을 배양하여 환경오염 유기물질의 균체전환을 도모하는 생물학적 폐수처리법을 활용하기에 최적의 조건을 갖추고 있는 것이 식품공장폐수라고 생각한다. 식품가공공장에서 흘러나오는 폐수를 처리하는데 있어 곰팡이를 이용하는 이론적인 근거는 용해 또는 현탁되어 있는 폐수중의 유기성분을 곰팡이 균사체내에 이전시키고 여과하여 균체를 폐기처분함으로써 폐수를 정화시키는데 목적이 있다. 아울러, 본연구의 또다른 주요목적은 폐수중에서 배양된 곰팡이 균사체를 가축사료로 개발하는데 있다. 본 연구에서 이용되는 곰팡이 균주로서 식품가공공장폐수의 BOD를 낮은 수준으로 감소시킬 수 있고 폐기물 분해주기(wastes digestion cycle)가 짧으며, 폐수를 살균하지 않은 상태에서 온도, pH, 조성분의 비율, 영양수준 등의 환경변이에도 불구하고 주종의 미생물로서 생육 및 성장할 수 있으며 균사체는 쉽게 배양 분해혼합물(wastes digestion mixture)로부터 회수될 수 있으며 배양균사체는 독성이 없고 고농도의 단백질을 함유하고 소화율이 높은 균사체를 생산할 수 있는 곰팡이를 선발하였다. 따라서, 본 연구에서는 위와 같은 특성을 가진 곰팡이 균주를 선발, 배양하여 유기물 함량이 높은 식품가공공장의 폐수를 정화시킬 수 있음과 동시에 양질의 균체 단백질을 회수, 이용하는 기초연구를 실시하였다.

재료 및 방법

사용균주

1) 균주의 선발 및 동정

경남 일대의 지역 즉, 마산, 진주, 진해, 김해, 양산 등의 공업지대에서 채취한 식품가공공장의 폐수, 하천 및 토양 등의 분리용 시료를 생리식염

수에 현탁시키고 그 상등액을 희석하여 Difco yeast extract agar 평판 배지에 도말하고 30°C에서 배양하여 나타나는 colony를 동일한 배지에 사면 배양하였다. Difco yeast extract agar에서 균주를 분리한 후 포자를 충분히 형성시킨 다음, 살균수로 조제한 포자현탁액 0.5ml을 식품가공공장에서 수거한 각각의 공장폐수기질 50ml씩에 접종하였다. 한편, 포자를 형성하지 않는 곰팡이의 접종액은 포자현탁액의 경우와 동일한 부피의 살균수에 마쇄한 균체를 현탁시켜 조제하였다. 각 균주의 flask 내 배양은 5~10개의 flask를 사용하여 동일한 조건에서 진행하고 1분당 120 stroke의 진탕 속도로 교반하면서 30±2°C의 온도로 4일간 배양하였다. 배양이 끝난 각 균주의 균사체를 수거하여 50°C로 온도가 고정되고 통풍장치가 되어 있는 oven 내에서 3~5일간 건조시켰다. 이와 같은 방법으로 배양·건조된 각 균사체의 flask당 균체중량을 평량하는 동시에, 균체 단백질량을 정량하여 성장속도와 단백질의 형성속도가 우수한 균주를 본 실험의 사용균주로 선발하였다. 분리·선발된 균주는 potato dextrose 및 Czapek solution 한천 평판배양했을 때의 colony의 특징과 습식배양 및 사면배양했을 때의 형태적 특징을 검정한 후 Raper와 Fennell¹²⁾의 분류방법에 의하여 분리·동정하였다.

2) 선발균주의 보존 및 배양과 균체회수

선발된 균주는 potato dextrose agar (PDA) 사면배지에서 30°C로 7일간 배양하여 포자를 충분히 형성시킨 후 4°C 냉장고에 보관하여 두고 균의 생육 및 배양조건을 검토하는데 이용하였다. 한편, flask 배양에는 분리균주를 PDA 사면배지에서 30°C로 7일간 포자를 충분히 형성시킨 후 멸균 생리식염수 10ml을 가하고 백금이로 현탁액을 제조하여 종균으로 하였으며 배지량의 1%를 접종하였다. 연속배양을 위한 종배양은 potato dextrose broth에서 무균적으로 현탁액을 만들어 종균으로 사용하였으며 접종량은 배지량의 5%로 하였다. Flask 배양은 200ml 증식배지를 함유한 사면배지에서 준비한 종균을 2ml씩 접종하여 30°C 항온실에서 3일간 150rpm으로 진탕배양하였다. 예비실험을 거쳐 선발된 균주의 연속 배양실험은 New Brunswick의 Model BF-500을 사용하였는데, 본 발효로는 pH, 용존산소량 측정장치, antiform controller가 부착되어 있고 통기는 0.2µm cartridge filter를 사용하여 무균적으로 매분당 7.5

SLPM까지 공급할 수 있으며, 2개의 impeller가 부착되어 30에서 999rpm까지 교반가능한 10L의 발효조이다. 또한, 온도가 자동조절되며 공기배출시 수분증발을 막기 위하여 응축수를 순환시킬 수 있게 되어 있다. 균주의 연속배양은 Table 1과 같은 조건으로 실시하였다.

Table 1. Parameters of fermentor used for continuous culture of *Aspergillus fumigatus*

Fermentor volume	10 liter
Inoculum	Suspended soln. of <i>Asp. fumigatus</i>
Media	Alcohol wastewater
Operating pH	5.0~6.0
Operating temperature	30±0.5°C
Stirring speed	120rpm
Continuous culture	7days
Normal dilution rate	0.0833Lh ⁻¹ (2,000ml days ⁻¹)

일정기간 동안 폐수중에서 배양된 균주의 배양액은 cheese cloth로 거른 다음 배지의 성분을 제거하기 위하여 증류수로 3회 이상 세척하고 filter paper (Whatman No. 1)로 여과하여 회수된 균사체를 동결건조한 후 무게를 달고 분말로 냉장고에 보관하여 두면서 실험에 사용하였다. 또한, 배양물의 여과 용출액도 채취하여 배양기간중 폐수중의 화학성분 및 BOD, COD 측정시료로 하였다.

식품공장의 폐수분석

각종 식품가공공장에서 배설되는 폐수처리전의 원수를 부산 및 경남 지역의 11개소로부터 수거하여 일정기간 동안 미생물을 처리하여 처리하기 전후의 폐수중의 BOD, COD 및 무기, 유기화합물을 다음과 같은 과정에 의하여 분석하였다. 즉, 시료 폐수중의 단백질, 탄수화물, pH, 전고형물, 회분 등 일반성분은 AOAC법²⁾에 의하여 분석하였다. 무기성분의 분석을 위한 시료용액은 wet-ashing method³⁾에 의하여 제조하며 무기성분중 인(P)은 vanado molybdate method⁴⁾에 의하여 정량하고 나머지 무기질 성분은 atomic adsorption spectrophotometer(KL-151, U.S.A.)를 사용하여 별도로 작성한 standard curve로부터 시료액중의 함량을 구하였다. 한편, 식품공장 폐수의 biochemical oxygen demand (BOD) 측정은 BOD 영양원충 pillow를 사용하는 Hach 등⁵⁾의 방법에 준하였으

며 chemical oxygen demand(COD) 측정은 low range와 high range로 계산되는 Gibbs의 방법⁶⁾에 준하여 실시하였다.

배양균체의 성분분석

일정 기간동안 폐수중에서 배양한 균체를 회수하여 얻어진 균체를 동결건조한 후, 5°C 냉장고에 보관하여 두고 일반성분, 단백질 분석실험을 실시하였다.

1) 일반성분의 분석

시료중의 수분함량은 105°C 건조법으로, 총질소는 Ma와 Zuaga의 micro-Kjeldahl 방법으로⁷⁾, 회분은 회화정량법으로 실시하였고, 무기성분 중 인 성분은 vanado molybdate법⁴⁾에 의하여 정량하였으며, 탄수화물등의 정량은 A.O.A.C. 공정법⁸⁾에 따라 분석하였다.

2) 단백질의 분획

상기한 방법에 의하여 회수하고 동결건조시킨 균체는 Soxhlet 법으로 지방을 제거하고 Reitz mill (Reeves Pulley Company, Columbus, IN, U.S.A. 제품)로 분말화하고 다음 과정에서 보는 바와 같이 일정량의 추출용매로 탈지균체시료를 처리하여 단백질을 용출하고, 냉동건조하여 얻어진 추출물의 단백질 농도는 건물중으로 80~90%에 해당하였다. 시료중의 단백질 함량은 Bradford의 방법⁹⁾으로 측정하였으며, 단백질은 Osborne^{10,11)}, El-Negoumy^{12,13)}의 방법을 변형시켜 다음과 같이 분획·추출하였다. 수용성 단백질은 Devi¹⁴⁾의 방법에 따라 시료 3g을 정칭하여 용량 100ml 비이커에 넣고 2차 증류수 45ml를 가한 후, magnetic stirrer로 2시간 동안 교반, 추출하고 4,000xg에서 20분간 원심분리하여 얻어진 상등액과 2회 반복 추출하여 얻어진 상등액을 합친 후, 증류수에서 24시간 투석시킨 상등액을 동결건조하여 수용성 단백질로 하였다. 잔사는 Wilson 등¹⁵⁾의 방법에 따라 2-mercaptoethanol과 0.1M EDTA가 함유된 0.5M NaCl 용액 30ml를 가하여 증류수로서 24시간 투석시킨 후 상등액을 동결건조하여 염용성 단백질로 하였다. 또한, 잔사는 증류수로 세척한 후 Landry 등¹⁶⁾, Charbonnier 등의 방법¹⁶⁾에 따라 2% 2-mercaptoethanol을 함유한 50% propan-1-ol 용매로 3회 반복 교반하면서 추출하였다. 회전 증발기로써 alcohol을 제거한 다음 증류수에서 24시간 투석시킨 후, 상등액을 감압하에서 동결건조하여 알콜용해성 단백질로 하였다. 잔사는 다시

증류수로 세척한 후 Singh와 Sastry¹⁸⁻²⁰⁾의 방법에 따라 AUC 용매(3M urea와 acetic acid 용액)로 3회 반복하여 교반하면서 추출하였다. 원심분리한 상등액을 증류수에서 24시간 투석시킨 후, 동

결건조하여 알카리용해성 단백질로 하였고, 최후로 남은 잔사는 증류수로 세척 후 동결건조하여 최종잔사로 하였다(Fig. 1).

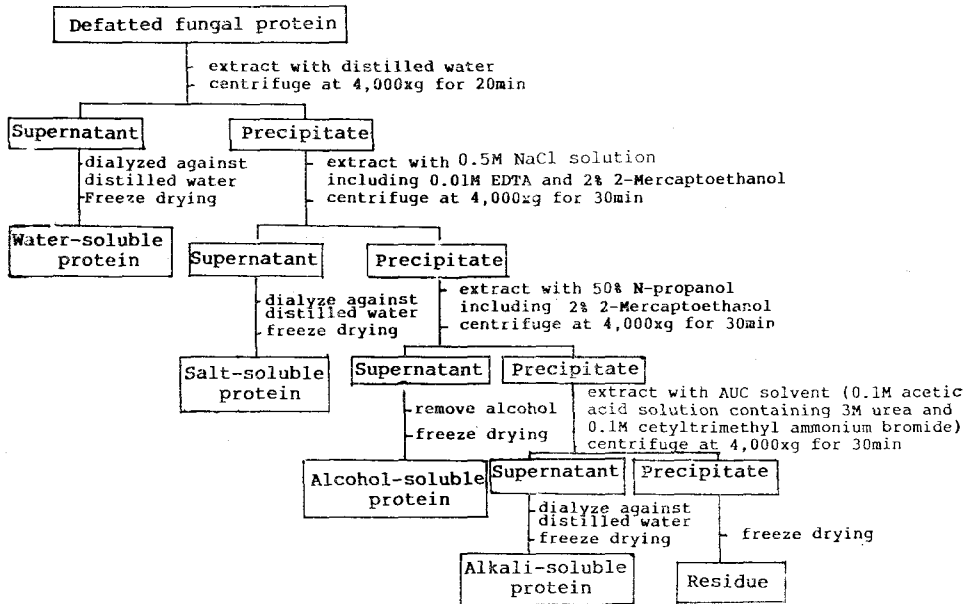


Fig. 1. Procedure for extraction and separation of fungal protein

3) 균체 단백질의 전기영동

균체 단백질에 대한 전기영동은 phast system electrophoresis kit technique file No. 110 (LKB 제품) 방법에 따라 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis kit로 실시하였다. SDS-PAGE에 대한 phast gel gradient media는 phast gel gradient 10~15와 8~25 그리고 phast gel SDS buffer strip으로 되어 있고 두개의 gel은 13mm stacking gel zone과 32mm gradient gel zone을 가지며, 두께는 대략 0.45mm이었다. Gel의 buffer system은 0.112M acetate (leading ion)와 0.112M Tris, pH 6.4이며, phast gel SDS buffer strip 내의 buffer system은 pH 7.5인 0.2M tricine(trailing ion), 0.2M Tris 및 0.55% SDS(analytical grade)로 하였다. Sample buffer로는 10 mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 용액을 사용하였으며, 시료처리는 시료용액에 시료의 양이 coomassie staining으로 측정하여 30mg protein/ μ l 정도 되도록 용해시키고, 2.5% SDS와 5.0% 2-mercaptoethanol을 가한 후 tracking dye가

anode buffer strip에 도달할 때까지 전기 영동하였다.

4) 단백질의 아미노산 조성

탈지한 균체 단백질, 각각의 용매에서 추출한 단백질과 일련으로 추출한 단백질 분말시료 각 10 mg을 취하여 분해용 시험관에 넣고 6N-HCl 10ml을 가한 후, 진공밀봉하여 100°C oven에서 24시간 가수분해시킨 다음 rotary evaporator로 염산을 증발 제거시킨 후, sodium citrate buffer(pH 2.2) 10ml에 희석한 다음 membrane filter(pore size 0.45 μ m)로써 여과하여 얻은 용액을 아미노산 자동분석기(LKB-4150, England)로서 아미노산 조성을 분석하였다. 또한 산분해에 의하여 파괴되기 쉬운 cysteine과 methionine을 측정하기 위하여 performic acid 산화법을 이용하였다.

실험동물을 이용한 사양실험

식품가공공장 폐수에서 분리, 배양하여 회수한 *Aspergillus fumigatus* 균체 단백질의 영양학적 가치를 검토하기 위하여 곰팡이 균체 단백질을 첨

가한 시험사료와 첨가하지 않은 대조사료를 이용하여 Pathak와 Seshadri의 실험방법에 따라서 다음과 같은 과정으로 사양실험을 실시하였다²¹⁾.

1) 건조균체의 조제

발효조내에서 배양된 균체덩어리를 수집하여 약 6시간 동안 물속에 침지하였다. 2~3층의 cheese cloth로 여과한 후 균체는 물로 여러번 세척하고 50°C 온도로 고정되어 있는 oven 내의 stainless-steel tray에 펼쳐 72시간 동안 완전히 건조하였다. 건조된 곰팡이는 80~100mesh 체로 분말화하여 사용전까지 밀폐된 공간중에 보관하였다.

2) 대조사료구와 균체단백질 첨가사료구의 식이 조제 방법

대조구 및 균체단백질 첨가구의 식이사료는 모두 15% 단백질 함량을 가지도록 하였으며 대조구의 조성은 Table 2와 같다. 균체단백질 첨가구의 식이사료는 Table 2와 같은 대조사료구의 조성 성분중 soybean flour 대신 건조한 곰팡이 균체단백질(dried fungal protein)을 30.0g을 첨가하고 나머지 조성성분은 대조사료구와 동일한 조성을 가지도록 조제하였다.

Table 2. Composition of control diet

Components	Composition
Wheat flour(30~40mesh)	15.0g
Soybean flour(100mesh)	25.0g
Dextrose	15.0g
DL-Methionine	0.5g
Cow's milk	25.0ml
Vitamin mixture ²²⁾	7.0ml
Paddy	50.0g

²²⁾ A 7.0ml amount of vitamin mixture contained: nicotinic acid 16.6mg; nicotinamide 16.5mg; D-panthenol 3.75mg; hydrochloride 0.5mg; riboflavin 2.5mg and sodium glycerophosphate 0.15g.

Fungal protein의 아미노산 중, 쥐 성장에 부족한 함유 황아미노산 수준을 증가시키기 위하여 methionine을 표준 쥐 사료단백질인 casein의 수준으로 보충첨가하였다. 대조구의 식이사료를 제조하는데 있어서 밀가루 15g, 콩가루 25g, dextrose 15g, methionine 0.5g을 stainless-steel pan 속에서 혼합하여 25ml의 우유와 충분한 양의 물을 가지고 죽 모양을 만들고 반고체 상태가 될 때까지 가열조리를 하고 냉각시킨 후 7ml의 비타민 용

액을 첨가하고 잘 혼합하였다. 이 시험상 식이는 150g 정도의 질량이 나갔으며 실험구 식이사료도 같은 방법으로 조제하였다. 대조구 식이가 만족스런 것인지 알기 위하여 이 실험에 사용된 20마리의 쥐를 이용하여 처음에 체중을 달고 5일 동안 대조구 식이사료를 제공하여 사육하였다. 5일후 10마리의 쥐는 시험구 식이로, 나머지 10마리는 대조구 식이사료로 사육하였다.

3) 실험동물의 선발 및 사육방법

대략 일정한 크기, 체중 및 연령(생후 2개월)을 가진 건강한 백쥐 20마리를 선발하여 두마리씩 10개군으로 나누어 10개의 다른 cage 속에 넣어 사양실험을 실시하였다. 같은 cage에 넣은 두마리의 시험쥐들은 모두 같은 성을 택하였다, Cage의 크기는 30.5×22.9×20.3cm이었다. 각 cage에 넣은 두마리 쥐중 한 마리는 강한 carbol fuchsin으로 등의 일부를 염색하여 균체단백 사료를 식이하여 사육하는 시험구로 표시하였고, 대조사료를 식이시켜 사육하는 쥐들에는 아무런 표시도 하지 않았다. 각 cage에는 100ml 물병과 15×15×1cm의 무명조각을 설치해 놓고, 사료는 작은 plastic plate에 넣어 공급하였다. 실온은 25°C, 습도는 65~75%로 유지하였다. 또한 대조구 group에만 5g의 버를 추가하여 식이케 하였다. 시료는 매일 아침 일찍 새로 조제하여 공급하였고, 물은 매일 교환해 주고 cage는 사료가 공급되기 전 청소해주었으며, 각 cage에 넣은 먼조각은 일주일에 한 번씩 바꾸어 주었다. 사료공급은 30일동안 계속하였으며, 실험쥐의 체중은 5일 간격으로 사료공급 직전 정기적으로 측정하였으며 실험쥐의 성장 및 사육상태를 기록하였다.

4) Protein efficiency ratio (PER)의 측정²³⁾

PER은 대조사료구, 곰팡이 균체단백사료 첨가구, 생균체단백 사료첨가구로 나누어 각 cage의 두마리 중 한 마리의 쥐를 각 사료 식이동물로 선정하여 10 cage에서 30일 동안 사양한 10마리의 쥐의 총단백질 흡수량에 대한 증가량을 측정하여 그 평균값을 각 사료구에 대한 PER 값으로 하였다. 이때 섭취된 사료는 매일 분석하고 체중변화량은 각 사료공급 직전과 사양말기에 측정하였다.

결과 및 고찰

식품가공 공장폐수 현황 조사

경남 일대의 지역, 즉 마산, 진주, 진해, 김해,

Table 3. Chemical analysis of industrial waste water(mg/L)

Waste water	BOD	COD	Nitrogen	Total sugar	Suspended solid	pH
Fruit canning	2,340	1,830	15	3,250	2,100	5.2
Fisheries	2,370	1,300	2,750	1,200	1,640	6.5
Molasses	330	730	—	2,020	650	4.8
Corn	1,500	2,400	48	1,200	210	4.5
Beer	1,500	1,700	1,500	1,820	1,300	5.2
Maggeoli	980	395	—	520	406	5.0
Potato	150	200	100	1,150	—	4.5
Malting	150	135	350	635	—	7.1
Whey	420	800	600	1,980	—	4.2
Pulp	1,500	1,800	—	—	1,620	4.3
Alcohol	7,450	12,250	2,784	3,450	11,750	5.4

양산 등의 공장지대에 위치하고 있는 식품가공공장(주정, 수산물, 낙농제품, 맥주, 당밀, 옥수수, 맥아, 과일통조림 공장 등) 11군데서 수거한 폐수를 분석한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 BOD 150~7,500mg/L, COD 135~12,250mg/L이었다. 따라서 본 실험에서는 이들 폐수중 BOD 7,450mg/L, COD 12,250mg/L이며, 총탄수화물 3,450mg/L, 총질소 3,015mg/L로 비교적 높은 값을 보이는 주정공장 폐수를 곰팡이 배양에 의한 실험 폐수로 사용하였다.

균주의 분리, 선발 및 동정

경남 일대 지역에 위치하고 있는 식품가공 공장의 폐수로부터 *Aspergillus* 속 15주, *Trichoderma* 속 5주, *Fusarium* 속 2주, *Gliocladium* 속 2주 기타 13주의 균주를 culture medium에서 분리하였다. 아울러, ATCC 및 대학연구소로부터 24주의 불완전균류(Fungi Imperfecti)를 분양받아 본 실험의 사용균주로서의 가능성을 시도하였다. 이들 분리균주와 분양받은 균주들 가운데서 폐수의 BOD 또는 COD 값을 최소로 감소시키며, 균체중 식물이 높고 균체중량과 균체단백 함량이 높은 균주를 선정하였다. 이 균주는 culture medium상에서 빠른 속도로 성장하고 기저균사층은 비교적 얇고 평편하며, 성장초기에는 백색이나 분생포자가 많이 형성되면 포자의 색이 녹색 내지 짙은 녹색을 띄고 배양기의 뒷면은 무색 내지 홍색을 띄었다(Fig. 2).

분생자 머리는 원통형이고 길이가 120~150 μ m,

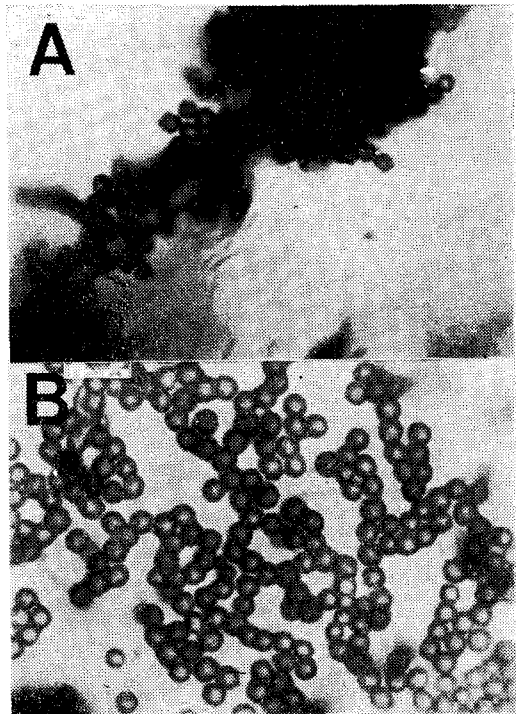


Fig. 2. Photographs of *Aspergillus fumigatus* selected on the culture medium.

A : Conidiophore and vesicle, B : Conidia

직경 35~60 μ m로 녹색 내지 짙은 녹색이고, 분생자병은 길이 150~300 μ m, 직경 2.5~7.5 μ m으로 담녹색이다. 분생자는 직경 2.4~3.0 μ m이고 구형으로 colony색은 짙은 녹색이었으며 sterigmata는 포자낭병축에 평행하여 열을 이루고 있으며,

vesicle 직경은 20~30 μ m이고 cleistothecia는 발견되지 않았다. 이상의 형태학적 특성과 생리학적 성질을 Raper 등의 분류법에 의하여 비교·검토한 결과, 본 실험에서 분리·선발된 균주는 *Aspergillus fumigatus*로 동정할 수 있었다(Table 4).

Table 4. Morphology and characteristics of isolated fungus cultured on the Czapek solution agar medium at 30°C for 7 days

Organ	Characteristics
Colonies	Size : 3~5cm Color : Greenish grey
Conidial head	Length : 120~150 μ m Wide : 35~60 μ m
Conidiophore	Length : 150~300 μ m Wide : 2.5~7.5 μ m
Conidia	Diameter : 2.4~3.0 μ m Form : Circular Color : Yellowish green

선발균주의 배양특성

선발균주의 발육적온은 35~40°C이었고, 최적 pH는 4.5~5.5로 비교적 높은 온도와 낮은 pH 영역에서 성장이 잘되는 것을 알 수 있었다. 질소원으로는 NH₄NO₃, urea 등이 균체증식율이 우수하였고, 통기·교반효과는 균체증식도에 크게 영향을 미쳤으며, 발효시 산소이용량은 10.5mg/min 이고, 폐수의 COD 감소량은 60mg/min으로 감소된 6 lb의 COD에 대하여 1 lb의 산소가 이용되는 것으로 나타났다. 기타 무기염류의 균체증식에 미치는 영향은 뚜렷하지 않았으나 폐수중에 함유되어 있는 무기질 함량은 균체성장 및 균체단백질 생합성에 충분한 함량으로 추정할 수 있었다.

미생물 처리전후의 주정공장 폐수성분 함량

진탕 flask에 폐수 100ml을 취하여 멸균한 후 일정용액으로 현탁시킨 선발균주의 포자현탁액을 접종하고 40°C에서 48시간 진탕배양하고 여과하여 같은 방법으로 여과처리한 본래의 공장폐수와 함께 분석시료로 하여 미생물처리 전후의 폐수성분 함량을 비교한 결과는 Table 5와 같다.

BOD와 COD 감소율은 각각 94%, 90.4%로서 미생물 처리에 의한 폐수정화 효과가 높게 나타났으며, 탄수화물 및 단백질이 90%에 상응하는 감소율을 보였다. 한편, 균사체는 48시간 동안 3,

Table 5. Reduction of the chemical components of alcohol waste by *Aspergillus fumigatus*

Analytical procedure	Before fungal treatment	After fungal digestion	% Reductions
COD	2,250	1,180	90.4
BOD	7,450	450	94.0
Carbohydrate	3,450	225	93.5
Protein	3,015	354	88.3
Nitrogen (Kjeldahl)	2,784	248	91.1
Total solid	11,750	2,370	79.8
Total Phos.	195	63	67.7
Ash	2,400	1,245	48.1
Mycelium	0	3,150	—

150mg/L의 균체 증식량을 보여 공장폐수유기물의 균체성분으로서의 전환이 활발하게 이루어졌음을 알 수 있다. Weiner와 Rhodes²²⁾는 Fungi와 *Streptomyces*에 의한 feedlot waste 발효에서 시험 균주중 *Fusarium oxysporum* 균주는 L당 10.3g으로 증식수율이 가장 높았으며 COD 감소율이 73~85%였으며, Hang 등²³⁾은 양조 폐수에서 *Asp. niger*를 배양하였을 때 당소비에 비교하여 건조균체의 수율은 약 57%로, L당 약 13g이었으며, 회수된 균체는 29%의 조단백질을 함유하여 동물의 사료로 이용이 가능하였고 BOD는 22,500에서 900으로 감소되어 약 96%의 감소율을 나타내었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 이들의 결과와 비교하여 균체증식수율은 다소 낮았지만 COD 감소율은 94.7%로 높게 나타나 식품가공공장 폐수정화에 효과가 있음을 알 수 있었다. 식품공장에서 곰팡이가 유리하게 사용되는 점은 많은 균체생성과 높은 영양가를 함유하고 있을 뿐만 아니라 폐수처리에서 BOD를 감소시킬 수 있는 능력에 있다고 생각된다. Tannenbaum²⁴⁾은 균류를 식품과 사료에 부과하였을 때 많은 균류의 영양성분이 효과가 있음을 지적하였고, Edlin 등²⁵⁾은 corn steep liquor에서 미생물 단백질 생산과 BOD 감소에 대하여, Church 등²⁶⁾은 옥수수과 완두콩 통조림 폐수에서 BOD를 감소시키기 위하여 불완전 균류의 사용을 검토하였고 Hang²⁷⁾은 Sauerkraut 폐수에 *C. utilis*를 접종하여 BOD를 감소시키고 동시에 yeast invertase를 생성한다고 보고하였다. 본 실험에서도 *A. fumigatus*에 의하여 주정공장 폐수의 BOD를 감소시킬 수 있으며 동시에 균체단

백질을 생산하여 식품과 사료로서 이용가능성과 경제적 가치를 가지고 있다고 생각된다.

연속배양장치에 의하여 증식시킨 균체성분의 분석

*Aspergillus fumigatus*의 flask 진탕배양은 회전진탕기 상에서 40°C로 24시간 배양하였으며, 배양액 200ml을 10L의 폐수배지에 접종, 40°C에서 자동적으로 pH가 5.0으로 조정되는 10L New Brunswick Labroferm Fermentor를 사용하여 교반속도 150rpm, air 2L/min의 조건하에서 5일간 연속배양시켰다. 배양이 끝난 배양액을 원심분리하여 얻어진 침전물을 냉동건조시켜 수거한 건조균체의 성분분석 결과는 Table 6과 같았다.

Table 6. Proximate analysis of fungal mycelium

Components	Composition (g/100g dry weight)
Total carbohydrate	36.5
Total nitrogen	45.8
Water-soluble-N	15.2
Nonprotein-N	25.3
Peptide-N	3.5
Lipid	2.9

한편, 탈지한 균체단백질을 추출용매별 분획으로 나누어 정량한 단백질 함량은 Table 7과 같았으며, 각 분획별 단백질을 Phast system TM 전기영동 장치(LKB 제품)로 분리하고 densitometer (Hoefer Scientific Instrument, U.S.A.)를 이용하여 분획별 구성단백질의 분자량 크기와 조성비를 구한 결과는 Fig. 3과 같았다.

즉, 용매별로 추출한 단백질을 종류수에서 투석한 후, 동결건조한 균체단백질의 중량비는 수용성 단백질 15.7%, 가염성 단백질 17.2%, 알콜용해성 단백질 21.5%, 알카리용해성 단백질 24.1%로써 알카리용해성 단백질의 성분비율이 가장 높았고 수용성 단백질의 비율이 가장 낮았다. Devi¹⁴⁾는 건조균체에 존재하는 단백질을 추출하는데 수용액이 가장 효과적이었으며 전체 단백질의 약 61%가 1회 추출로 가능하였고, 3회 추출로 거의 85%를 추출할 수 있었다고 보고한 바 있고, Omura와 Kosikowski²⁹⁾는 cassava 가수분해물에서 배양한 *Candida tropicalis*와 *C. utilis*의 단백질 추

Table 7. Nitrogen distribution of fungal protein harvested by the contineous digestion of alcohol waste water

Fraction	Composition ^{a)}
Water soluble protein	15.7
Salt soluble protein	17.2
Alcohol soluble protein	21.5
Alkali soluble protein	24.1
Residue	11.2
Non protein nitrogen	6.3
Total	96.0

^{a)} Compositions are expressed as a percentage of total protein.

출율은 71%와 68%였다고 보고하였다. 단백질의 용해성은 시료와 용액의 비율, 온도, 용매의 특성 등 여러 조건에 따라서 차이가 있었다. Solomons²⁹⁾는 nitrogen 화합물 중 93%가 Tris, EDTA, SLS, urea 혼합물로 추출이 가능하고 5% trichloacetic acid는 단지 용해성 단백질의 70%만이 침전되었다고 하였다. 본 실험에서도 추출율은 용매에 따라 다소 차이가 있었으며, 단백추출에 수용액이 유리함을 알 수 있었다.

균체단백질의 disc-gel 전기영동 패턴

탈지한 균체단백질을 추출용매별 분획으로 나누어 각 분획별 단백질을 phast system TM 전기영동 장치(LKB 제품)으로 분리하고, densitometer (Hoefer Scientific Instrument, U.S.A.)를 이용하여 분획별 구성단백질의 종류를 분자량 크기로 측정된 결과는 Fig. 3과 같다.

Drawert와 Bendar³⁰⁾는 7종의 *Saccharomyces*에서 추출한 수용성단백질에 전기영동의 patterns을 비교한 결과 의미있는 차이가 없었다고 보고하였는데 본 연구에서는 수용성 단백질에 5개의 band가 보였으며 이들의 분자량은 각각 80,000, 45,000, 40,000, 25,000, 15,000 dalton으로 나타났다. 염용성단백질은 5개의 band에서 분자량이 22,000~14,000 사이에, 알카리 용해성 단백질은 3개의 band에서 45,000~90,000 dalton 사이에 있음을 알 수 있었다. 이들의 결과는 gel 여과에 의한 단백질분자량 측정과 비교하여 다소 높은 값을 보였다.

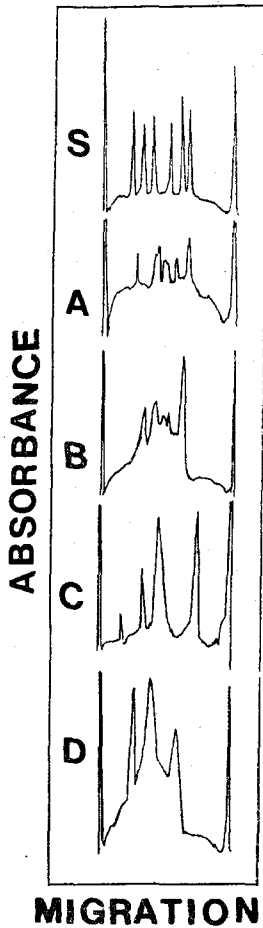


Fig. 3. Densitogram of each fraction from fungal protein.

S : The molecular weight of the standard proteins
 a : 92,500, b : 31,000, c : 45,000, d : 31,000,
 e : 21,000 and f : 14,400
 A : Water-soluble protein, B : Salt-soluble protein,
 C : Alcohol-soluble protein and D : Alkali-soluble protein

단백질의 아미노산 조성분석

균체단백 시료의 영양적 가치를 확인하기 위하여 아미노산 자동분석기에 의하여 구성아미노산 조성을 분석, 정량한 결과는 Table 8과 같다. 균체시료에서 검출된 아미노산은 모두 17종으로 이중 glutamic acid, aspartic acid, alanine, lysine, leucine, valine 등이 주요 구성아미노산임을 알 수 있으며, tryptophan을 제외한 필수아미노산 전체를 확인하였다.

Robache 등³¹⁾은 *Asp. niger* 균체단백질의 식품 효과에 관한 연구에서 아미노산 중 lysine, isoleucine, phenylalanine과 valine이 부족하였다고 보

Table 8. Amino acid composition of fungal protein obtained by the continuous digestion of alcohol waste water

Amino acid	Composition(weight %)
Aspartic acid	9.3
Threonine	6.6
Serine	5.2
Glutamic acid	11.5
Proline	4.1
Glycine	4.2
Alanine	4.6
Cystine	1.3
Valine	5.5
Methionine	1.9
Isoleucine	6.7
Leucine	8.7
Tyrosine	5.5
Phenylalanine	4.1
Histidine	2.8
Lysine	8.0
Arginine	5.6
Tryptophan	1.4

고하였고, Christias³²⁾는 4종의 곰팡이단백에 대한 단백질과 아미노산 검토에서 *Fusarium oxysporum*과 *Fusarium moniliforme*이 다른 곰팡이에 비하여 높은 함량을 나타내었고, 낮은 가격의 농업 또는 산업폐기물을 energy원으로 하여 미생물단백의 산업적 생산에 적절하다고 지적하였다. 본 실험에 사용된 균체단백질의 필수아미노산의 조성은 FAO 표준단백질과 비교하여 methionine이 낮은 편이었으나, 그밖의 성분은 높게 나타났다. 한편 일반적으로 식물성단백질에 부족한 lysine은 100g 중 밀가루 단백질이 1.9g, 대두단백질 6.8g, 땅콩단백질 3.0g보다 많은 8.0g을 함유하고 있었으며 다른 균체단백질이 평균치인 5.4g/100g보다 높게 나타났다.

균체단백 첨가사료를 식이사료로 하여 사양한 쥐의 체중변화

실험쥐에 알맞은 대조사료 선택방법에 대한 많은 실험결과가 있지만 본 실험에서 규격을 갖추어 조제한 식이사료는 만족스러운 것으로 입증되었다. 균체단백 첨가사료를 공급하기 전 5일 동안 대조사료를 먹인 모든 쥐들은 체중의 증가를

보였으며, 평균증가량은 1.64g이었다. 사료를 먹인 후 2~3일 동안 공급된 사료소비율이 20% 이하에 지나지 않았으나, 시간이 경과할수록 소비량이 증가하여 5일째 되는 날에는 80%에 달하였다. 대조구 사료로 5일간 사육한 후 각 cage에 1마리씩 10cage에 나누어 첫 10마리는 계속해서 대조구 사료를, 다른 10마리는 곰팡이 균체단백 첨가 사료를 식이사료로 하여 30일동안 사육하여 증가하는 체중의 변화를 실험한 결과는 Table 9와 같다.

Table 9. Body weight change of mice with control and experimental diets for 30 days

	Body weight gain			
	After 10days of feeding	After 15days of feeding	After 20days of feeding	After 30days of feeding
Control	+1.46	+3.20	+4.12	+4.25
Experimental	+0.42	+2.97	+3.96	+4.15

All weight changes are expressed in grams as the average increase of 10 mice.

단백 효율비(PER) 측정결과

Aspergillus fumigatus 균체단백질을 시험사료로 하여 30일 동안 얻어진 단백질효율비 측정값은 Table 10과 같다.

Table 10. Protein efficiency ratio of mice fed with control and experimental diet for 30days

Diet	PER
Control	3.42±0.15
Experimental	3.40±0.43

Table 10의 결과는 *Aspergillus fumigatus* 균체단백질이 실험쥐의 사료로 이용될 수 있음을 보여주고 있다. 즉, 30일의 사양말기에 실험사료를 공급받는 쥐들은 대조구사료를 식이한 쥐들의 체중증가와 비교할만한 정도로 체중 증가를 보여 새로운 사료에 잘 적응하는 것을 알 수 있었으며, fungal protein에 쉽게 적응하여 좋은 단백질 공급원으로 이용되었음을 보여 주었다. Fungal protein 사료군의 체중증가에 있어 차이를 보여주는 것은 주목할만한 일로써 대조사료구의 경우, 사양초기부터 체중이 점차적으로 증가해 온데 비하여 실험

사료를 식이한 쥐들은 처음에는 체중의 감소로 보이다가 점차적으로 증가하는 경향을 보여 실험 말기에는 대부분의 쥐들이 대조구에 상당한 체중을 소유하게 되었다. 이러한 경향은 대조사료와 실험사료에 대한 실험동물의 적응력의 차이에 기인한다고 볼 수 있다. 즉, 실험사료구 쥐들이 처음 4일 동안 대조사료를 식이하고 실험사료를 공급받게 되어 균체단백질이 가진 특유한 냄새 때문에 새로운 향미에 적응하는데 일정한 기간이 소요되기 때문이다. 곰팡이 균체단백질의 영양학적 특성은 체중증가량의 변화에서 보는 바와 같이 동물의 성장에 필요한 제반 주요성분들을 고루 함유하고 있는 것으로 나타났으며, 균체단백 사료를 식이한 쥐들의 단백질효율비는 Table 10에서와 같이 대조구에 비하여 큰 차이가 없었으며 고단백질 공급원으로써 대체효과가 큰 것을 보여주고 있다.

초 록

식품공장 폐수에는 각종 유기물을 다량 함유하고 있다. 이와 같은 식품공장 폐기물의 미생물학적 처리효과를 검토하는 동시에 폐수 중에서 배양된 곰팡이 균체단백질을 분리·회수함으로써 폐수처리비용을 절감하고, 단백질 함량이 높은 균체단백사료를 개발할 목적으로 식품공장 폐수의 BOD 및 COD를 낮은 수준으로 감소시키고 증식속도가 빠르며 균체수율이 높고 고농도의 단백질을 함유하며 소화율이 높은 균체를 생산할 수 있는 곰팡이로 *Aspergillus fumigatus*를 분리·선발하였고, 선발된 균주의 최적배양조건인 35~40°C, pH 4.0~4.5에서 pilot plant의 연속배양장치를 이용하여 주정공장 폐수를 기질로 하여 일정시간 동안 배양하여 폐수의 BOD, COD를 90% 이상 감소시켜 폐수정화를 도모할 수 있었으며 균체단백질을 기준 배합사료에 첨가하여 실시한 동물사양 시험 결과, 사양동물의 체중증가량과 단백질 이용율이 대조표준 시험구에 준할 수 있는 효과를 보여 주었다.

사 의

본 연구는 한국과학 재단의 연구비 지원으로 수행되었음을 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Raper, K.B. and Fennell, D.I.: In 'The *Aspergillus*' Robert E. Krieger Publishing Company Huntington, New York. pp.242~246(1973)
2. Association of Official Analytical Chemists: In 'Official and tentative methods of analysis,' 12th ed., AOAC Washington, D.C. (1972)
3. Robert, B. and Dorothy, D.B.: In 'Methods in Enzymology III,' pp.1002~1004, Academic Press, N.Y. (1971)
4. Snell, F.D. and Snell, C.T.: In 'Colorimetric Method of Analysis,' 3rd edition, p.3, Decker (1963)
5. Hach, C.C., Klien, R.L. and Gibbs, C.R.: In 'Introduction to Biochemical Oxygen Demand,' pp.4~11, Hach Company Loveland Colorado, U.S.A. (1987)
6. Gibbs, C.R.: In 'Introduction to Chemical Oxygen Demand,' pp.3~13, Hach Company Loveland Colorado, U.S.A. (1986)
7. Ma, T.S. and Zuaga, G.: Ind. Eng. Chem., 14 : 280(1941)
8. Association of Official Analytical Chemists: In 'Official and tentative methods of analysis,' 13th ed., AOAC Washington, D.C. (1980)
9. Bradford, M.M.: Anal. Biochem., 72 : 248 (1976)
10. Osborne, T.B.: J. Am. Chem. Soc., 19 : 525 (1907)
11. Osborne, T.B.: Carnegie Inst., Washington Publ., 84 : 1(1907)
12. El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Cereal Chem., 54(2) : 333(1977)
13. El-Negoumy, A.M., Newman, C.W. and Moss, B.R.: Cereal Chem., 56(5) : 468(1979)
14. Devi, M.A.: J. Agric. Food Chem., 29(3) : 522(1981)
15. Wilson, C.M., Shewry, P.R. and Mifflin, B.J.: Cereal Chem., 58(4) : 275(1981)
16. Landry, J., Paylis, J.W. and Fey, D.A.: J. Agric. Food Chem., 31(6) : 1317(1983)
17. Charbonnier, L., Terce-Laforgue, T. and Mosse, J.: J. Agric. Food Chem., 29(3) : 968(1981)
18. Singh, U. and Sastry, L.V.S.: J. Agric. Food Chem., 25(4) : 912(1977)
19. Singh, U. and Sastry, L.V.S.: Cereal Chem., 54(1) : 1(1977)
20. Singh, U. and Sastry, L.V.S.: J. Agric. Food Chem., 26(3) : 689(1978)
21. Pathak, S.G. and Seshadri, R.: Appl. Microbiol., 13(2) : 262(1965)
22. Weiner, B.A. and Rhodes, R.A.: Appl. Microbiol., 28(5) : 845(1974)
23. Hang, Y.D., Splittstoesser, D.F. and Woodmams, E.E.: Appl. Microbiol., 30(5) : 879 (1975)
24. Tannenbaum, S.R.: Food Technol., 25 : 962 (1971)
25. Badr Eldin., S.M., Atalla, M.M. and El-Hawaary, S.: Starch/Starke, 33(8) : 279 (1981)
26. Church, B.D., Erickson, E.E. and Widmer, C.M.: Food Technol., 27 : 36(1973)
27. Hang, Y.D.: J. Food Sci., 42(2) : 383(1977)
28. Omura, O.B. and Kosikowski, K.V.: Food Chem., 7(1) : 7(1981)
29. Solomons, G.L.: J. Sci. Food Agric., 24(3) : 637(1973)
30. Drawert, F. and Bendar, J.: J. Agric. Food Chem., 31(4) : 848(1983)
31. Robache, M., Billaud, C., and Adrian, J.: Science des Aliments, 1(3) : 427(1981)
32. Christias, C.: Appl. Microbiol., 29 : 250 (1975)