

알코올 발효공장의 폐수처리를 겸한 단세포지질의 생산

이 찬 용 · *김 중 관 · **이 계 호
대전대학교 미생물학과, 종근당(주)*
서울대학교 농업생명과학대학 식품공학과**

Production of Single Cell Lipid and Treatment of Wastewater from Alcohol Manufactory

Chan Yong Lee, *Chong Kwan Kim and **Ke Ho Lee

Dept. of Microbiology Taejon University, Chong Keun Dang Co.*
Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University**

ABSTRACT

In order to reduce BOD of wastewater from alcohol distillery manufactory, the production of single cell lipid was attempted. Among five yeast strains tested, *Rhodotorula glutinis* was most desirable for lipid production. Wastewater was treated with 2N NaOH and used as a medium. The optimum pH and temperature for lipid production were found to be 5.0 and 30°C, respectively. The addition of monobasic phosphate was good for cultivation of *Rhodotorula glutinis*. The C/N ratio was an important factor for lipid production and composition. The best C/N ratio was 50 for the production of single cell lipid. By cultivation *Rhodotorula glutinis* for 4 days, 4g/L of single cell lipid was harvested and BOD of wastewater reduced by 88.7%.

서 론

최근 커다란 사회문제로 대두되고 있는 환경오염, 특히 수질오염에 대한 관심이 집중되고 있으나 그에 대한 해결책은 미흡하며, 대다수의 공장들이 기술적으로 어렵고, 많은 비용이 소요되는 폐수처리를 완전하게 하지 않은 채로 몰래 하천에 방류함으로써 전 국민의 식수원의 오염을 가중시키고 있다(1-3).

특히 알코올 발효공장의 폐수는 알코올의 주원료인 타피오카를 발효하고 남은 것으로서 폐액 중에는 많은 유기물에 의한 높은 BOD(생물학적 산소요구량)농도를 가지고 있어서, 만일 이와 같은 고농도 폐액을 방류하게 되면 커다란 수질 오염의 문제를 야기하게 된다. 따라서 알코올 발효공장의 폐수는

물리적인 처리법과 화학적인 처리법으로는 불충분하며 반드시 생물학적인 처리방법을 사용하여야 한다(4).

선진국에서도 주정공장을 비롯한 식품가공공장의 폐수는 대개 생물학적인 처리에 의하여 정화하고 있는데(5, 6) 주정폐액을 미생물로 처리하게 되면 폐액중의 유기성분을 미생물이 흡수하여 자신의 생체 내 효소를 이용하여 성장에 필요한 에너지원으로 이용하고 또한 세포의 체구성 물질로 동화함으로써 폐액중의 유기물 및 BOD를 줄이게 된다. 동시에, 미생물의 균체성분을 대량으로 회수하여 동물의 사료에 첨가하는 단세포 단백질 등의 유용자원을 얻을 수 있으므로 일석이조의 경제적인 방법이 될 것이다(7, 8).

미생물을 이용한 유지의 생산은 동식물 유지의 대체 자원으로서의 가능성으로 인하여 1920년대 독일에서 연구가 시작되어 현재에 이르기까지 계속되어 왔으나 공정이 값싼 식물성 유지에 비하여 경제성이 떨어지기 때문에 공업적인 생산은 이루어지지 않고 있다.

그럼에도 불구하고 최근에는 미생물에 의한 단세포 유지(single cell lipid)에 대한 연구가 다시 활발하여지고 있다. 그 이유로는 전세계의 유지생산이 소수의 나라에 의하여 독점되고 있어 그 가격변동이 매우 크며, 생물공학 기술의 발달로 인하여 균주 개발에 따른 생산성이 높아졌기 때문이다. 또한 단세포 유지의 경우 사료용으로서의 수요가 크게 늘고 있는 추세에 따른 것이라 할 수 있겠다(9).

따라서 대부분의 유지 및 사료를 외국에서의 수입에 의존하고 있는 우리나라로서는 수질오염을 막을 수 있으며 동시에 지질의 생산을 꾀하는 연구는 폐자원의 재활용에 관한 측면에서도 그 중요성은 재삼 강조할 필요가 없으며, 최근의 커다란 사회문제인 환경오염의 방지책으로서의 효과뿐만 아니라 양질의 지방산의 공급도 가능할 것이다.

본 연구는 국내의 알코올 발효공장의 증류폐액을 탄소원으로 하여 효모를 이용한 단세포 지질의 생산을 위한 최적 발효조건 및 C/N비 등을 구하고, 단세포 지질의 생산을 통한 증류폐액을 일차처리함으로써 BOD를 감소시켜 폐수처리의 효율을 증가시키기 위한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

재료 및 사용균주

동남아에서 수입한 타피오카를 발효하여 알코올을 생산하는 두 주정회사(C사, P사)에서 발효 후에 증류하고 남은 증류 폐액을 수집하여 단세포 지질의 생산에 사용하였으며, 균주로서는 폐액에서 분리되는 효모들과 증류 폐액에서 잘 증식하는 것으로 알려진 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii* ATCC 6260, *Hansenula saturnus*, *Rhodotorula glutinis* IFO 1125, *Lipomyces starkeyi* NRRL Y-1388 등을 KCTC로부터 분양받아 주정폐액을 잘 이용하며, 단세포 지질의 생산성이 높은 균주를 선발하여 실험에 사용하였다.

폐액의 전처리

발효폐액중에 남아 있는 비발효성 당을 발효가능

한 당으로 분해하고, 동시에 단백질 성분을 침전시키기 위하여 2N HCl 또는 2N의 NaOH, Ca(OH)₂, KOH 등을 각각 5%(v/v) 처리하여 121℃에서 20분간 열처리를 한 후, pH를 5.0으로 조절하여 여과하였으며, 이를 배양액의 원료로 사용하여 각각의 산처리, 알칼리처리에 대한 단세포지질의 생산성을 비교하였다.

배양 방법 및 균체 회수

지질 생산균주는 YPD 사면배지에 접종하여 보관하며 사용하고, 종배양은 30℃에서 진탕배양하여, 40시간 후 종균으로 사용하였다. 본 배양은 500ml의 삼각 flask에 단세포지질 생산용 전처리액을 100ml 첨가하고, 5%의 종배양액을 접종하여 30℃에서 180RPM으로 진탕 배양하였다. 배양이 끝난 broth를 3000g에서 5분간 원심분리하여 3회 세척 후, 60℃의 vacuum oven에서, 50시간 감압 건조한 후 건조중량을 측정하였다.

분석 방법

발효공장 폐액의 수분 함량, 조단백질, 조지질, 회분, 환원당 및 전당의 분석은 상법(10)에 따라 하고, 세포내 지질의 추출 방법은 Kates 등의 수정된 방법(11)에 따라 chloroform:methanol의 2:1 혼합액을 사용하여 24시간 추출한 후 여과하고, 여액의 용매를 60℃에서 날려보낸 후 105℃에서 상압건조하여 total lipid로 하였다. 앞의 조지방을 Folch의 방법(12)에 따라 정제한 후 Metcalfe 등의 방법(13)에 따라 methyl ester를 만든 후, gas liquid chromatography를 이용하여 분석하였다. BOD, COD, TSS 등은 standard method(14)에 의하여 측정하였다.

결과 및 고찰

폐액의 수집 및 일반 성분분석

서울 및 경기도 일원의 주정발효공장(P사, C사)의 알코올 발효후의 증류폐액을 채취하여 실험에 사용하였으며, 양사 모두 태국산 타피오카를 전분질 원료로 사용하였다. 발효후의 증류폐액의 일반성분 분석결과는 Table 1과 같다. 두 회사의 증류폐액은 성분에 있어 큰 차이가 없었으며, 화학적 산소요구량(COD_{cr})이 십만을 넘어 이 폐액을 처리없이 혐기성 소화조나, 활성슬러지 과정으로 보내기는 어려움이 많으므로, 폐수의 일차처리로서, 고형물을 제거한

Table 1. Characteristics of alcoholic distillery wastewater.

contents(mg/L)	Sample C	Sample P
Reducing Sugar	13300	14200
Total Nitrogen	700	800
Crude lipid	1500	1450
Ash	5100	5300
TCOD	120,000	128,000
SCOD	52,000	56,000
BOD ₅	40,000	44,000
TSS	12,600	13,200
pH	4.10	4.05

후 효모배양을 시도하였다.

유지 생산 균주의 선발

주정폐액을 기질로 사용하여 배지의 pH를 5.0으로 조정후, 지질 생산능이 있는 효모들을 각각 접종하였다. 60시간 배양 후 균체량과 지질함량을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 균주의 생육정도는 *Candida guilliermondii*가 가장 우수하였으나 균체의 지질함량은 낮았다. *Lipomyces starkeyi*의 경우에는 지질함량은 높았으나 균체생산이 적어 총지질의 생산은 적었고, 실험에 사용된 다섯 가지의 효모 균주들중에서 *Rhodotorula glutinis*가 탄소원 단위무게당 지질의 생산능(fat coefficient)이 가장 좋은 결과를 나타내어 실험에 공시균주로 사용하였다.

Table 2. Single cell lipid production of five yeast strains.

Yeast strains	DCW(g/L)	Lipid(%)	Fat coefficient*
<i>Candida guilliermondii</i>	4.98	5.96	2.23
<i>Hansenula saturnus</i>	4.90	7.61	2.81
<i>Lipomyces starkeyi</i>	2.84	16.00	3.41
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2.99	19.31	4.35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.38	10.72	2.10

*g lipid/100g carbon source

폐액의 전처리 방법의 비교

주정폐액중에 잔존해 있는 전분형태의 당을 효모 균주가 이용할 수 있는 환원당의 형태로 분해시키고, 단백질을 침전시키기 위하여 2N NaOH, KOH, Ca(OH)₂, 및 HCl을 5% (v/v)씩 각각 처리하여

Table 3. Effect of pretreatments on single cell lipid production and cell growth.

pretreatments	DCW(g/L)	Lipid(%)	Fat coefficient
control	3.14	20.40	4.11
NaOH	3.22	23.17	5.80
KOH	3.34	20.42	4.50
Ca(OH) ₂	3.36	14.93	3.30
HCl	3.22	17.67	3.70

121℃에서 20분간 가열처리를 한 후 pH를 5.5로 조정하였다. 열처리가 끝난 폐액을 여과한 후 여액을 미생물의 배지원으로 사용하여 기선발균주인 *Rhodotorula glutinis*를 배양한 결과를 Table 3에 나타내었으며 처리하지 않은 대조구에 비하여 알칼리를 처리한 경우 균체량 및 지질함량이 높았다. 이러한 이유로서는 지질 생산 효모가 이용할 수 없는 다당류 등이 알칼리처리에 의하여, 지질생산균주가 이용가능한 이당류, 또는 단당류 등으로 분해되었기 때문이라 사료된다. 또한 알칼리 처리중에서는 NaOH의 처리가 가장 좋은 결과를 보였다.

배양온도의 영향

효모배양에 의한 단세포 지질생산의 최적조건을 구하기 위하여, 우선 배양온도를 달리하여 50시간 배양한 시료를 채취하여, 건조 균체량과 지질 함량을 분석하여 Fig. 1에 나타내었다. 30℃에서 균체량 3.8g/L, 지질 함량 27.6%로서 최대지질 생산을 보였으며, Steinberg 등(15), Rhim 등(16)의 최적 지질 생산온도 28℃, Enebo 등(17, 18)의 27℃에 비하여 최적 지질생산온도가 약간 고온임을 알 수 있다. 증류가 끝난 폐액의 온도가 고온임을 고려할 때 냉각이 보다 쉬워 산업적인 이용시 장점이 될 수 있을 것이다.

배양 초기 pH의 영향

배지의 초기 pH를 2.0에서 7.0까지 0.5 간격으로 조정후 공시균주 *Rhodotorula glutinis*를 배양하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. pH 3.0 이하에서는 균체의 성장이 거의 일어나지 않았으며 pH 5.0에서 건조 균체량이 최대를 보였다. 지질 함량은 pH 5.0에서 pH 5.5까지 큰 차이없이 최대값을 보였다. 이 결과는 Allen 등(19), Steinberg 등(15)의 실험과 유사한 결과를 보였다.

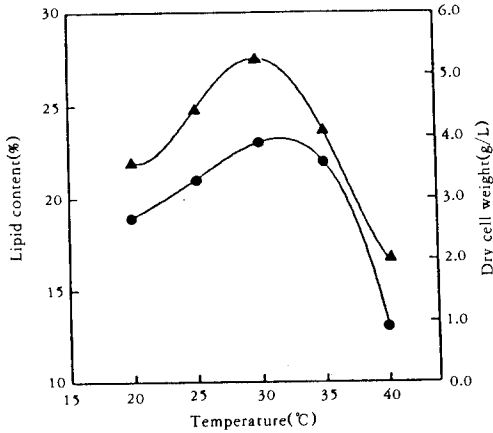


Fig. 1. Effects of cultural temperature on the growth and lipid content of *Rhodotorula glutinis*. The cell were incubated for 50hr and initial pH, shaking speed were 5.5, 180rpm, respectively.
Lipid content(▲), Dry cell weight(●).

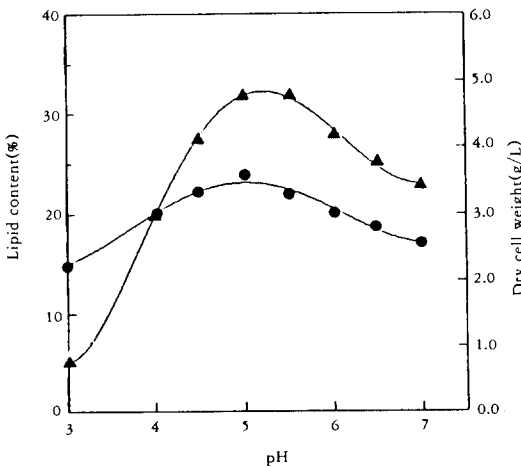


Fig. 2. Effects of initial pH on the cell growth and lipid content of *Rhodotorula glutinis*. The cell were incubated for 50hr at 30°C, shaking speed was 180rpm.
Lipid content(▲), Dry cell weight(●).

탄소원 대 질소원 비의 영향

증류폐액의 전처리액에 탄소원대 질소원의 비율을 달리하여 공시균주를 배양하여, 단세포지질의 함량

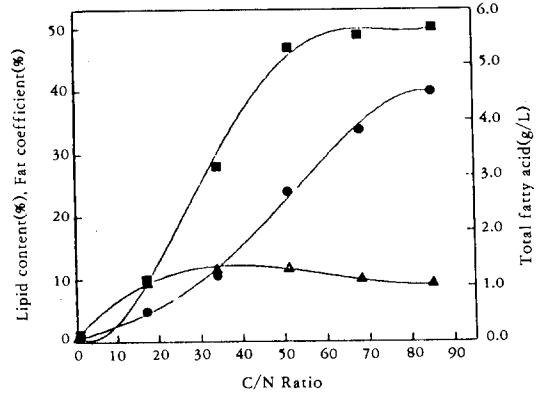


Fig. 3. Effects of C/N ratio on the fat coefficient and lipid content of *Rhodotorula glutinis*. The cell were incubated for 50hr at 30°C and initial pH, agitation speed were 5.5, 180rpm, respectively.
Lipid content(▲), Fat coefficient(●)
Total fatty acid(■).

과 총지방산량, 지질계수 등을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 전처리 증류폐액의 C/N비가 17이었으므로 탄소원으로 포도당을 첨가하여 C/N비를 증가시킨 조건에서 배양한 결과, C/N비가 약 50일 때 지질함량 및 지질계수 등이 최대를 보였으며, 탄소원의 농도가 커질수록 즉 C/N비가 커질수록 총지방산량은 커졌으나 균체 성분만이 증가하고 지방함량은 변화가 없었다. Nakagawa 등(20)도 *Rhodotorula*속 효모균주에 의한 최적유지생산을 보이는 C/N비가 40-50임을 발표한 바 있으며, Kim(21)의 결과는 C/N비가 48에서 최대지질계수를 보여 본 연구와 거의 일치되는 연구를 보였다.

Phosphate의 첨가효과

Phosphate는 효모의 지질합성에 필수적인 무기염의 하나로서 주정증류폐액을 전처리하고 pH를 조정 한 배지에 여러 종류의 인산염을 0.1%씩 각각 첨가하여 배지를 조제하고 공시균주인 *Rhodotorula glutinis*를 접종하여 배양한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 칼륨염과 나트륨염 모두 monobasic의 첨가가 균체량 및 지질 함량이 높았으며, 그 이유로 분자량에 따른 인의 첨가량이 상이한 데에서 기인하는 것으로 생각된다. 그러나 tribasic염의 첨가는 균체생산 및 지질생산 모두 저해를 받았다.

Table 4. Effect of phosphate sources on single cell lipid production and cell growth.

pretreatments	DCW(g/L)	Lipid(%)	Fat coefficient
control	3.22	24.17	4.80
KH ₂ PO ₄	3.75	34.98	8.52
K ₂ HPO ₄	3.39	30.30	6.65
K ₃ PO ₄	2.24	18.66	2.72
NaH ₂ PO ₄	3.73	34.58	8.37
Na ₂ HPO ₄	3.36	28.60	6.24
Na ₃ PO ₄	2.03	15.48	2.04

Table 5. Effect of C/N ratio on the fatty acid composition of single cell lipid.

Fatty acids	C/N ratio				
	17	34	51	68	75
Myristic acid	0.98	0.90	0.80	1.20	1.23
Palmitic acid	11.30	14.63	17.06	19.48	21.12
Palmitoleic acid	1.16	1.30	1.12	1.55	1.62
Unidentified	trace	0.35	trace	0.64	0.31
Stearic acid	5.37	5.76	6.55	7.28	6.60
Oleic acid	48.35	54.02	50.25	48.00	47.85
Linoleic acid	17.92	15.03	11.85	10.52	10.40
Linolenic acid	6.86	5.34	5.70	4.43	2.84
Arachidic acid	0.53	trace	0.50	0.63	0.48
Total fatty acid(g/L)	1.31	2.95	4.80	5.24	6.02
Fat coefficient	9.85	11.09	12.03	9.84	9.05

단세포 지질의 GLC 분석

이제까지 나타난 결과를 토대로 알코올 공장의 증류폐액을 알칼리로 전처리하고 pH를 5.5로 조정한 후 인산염을 첨가하고 탄소원대 질소원의 비를 달리 하여 배지를 조제한 다음, 공시균주를 접종하여 생산된 단세포 지질의 분석을 Varian gas liquid chromatography를 이용하여 분석한 결과를 Table 5에 나타내었다. *Rhodotorula glutinis*의 균체 지방산의 조성을 살펴보면 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, stearic acid 등이 나타났으며, 특히 필수지방산인 linoleic acid와 linolenic acid 등의 불포화 지방산의 구성비율이 높아 영양학적으로 상당히 유리한 장점으로 작용될 수 있다.

단세포 지질의 생산과 폐수처리효과

증류폐액의 일반 성분분석(Table 1)에 나타난 바

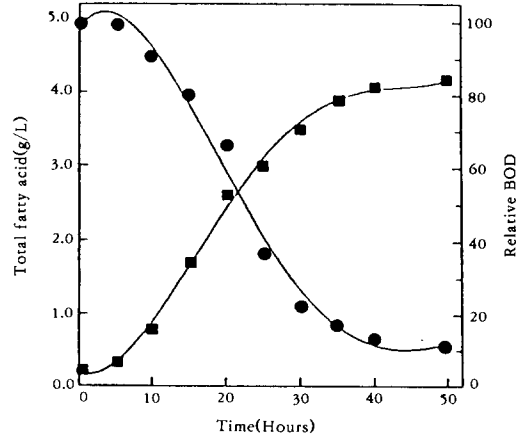


Fig. 4. BOD reduction and fatty acid production by *Rhodotorula glutinis* in the 51 jar fermentor. Initial BOD is 40,000ppm. The cell were incubated for 50hr at 30°C and C/N ratio, initial pH, agitation speed were 50, 5.5, 500rpm respectively. Aeration was 1vvm. Relative BOD(●), Total fatty acid(■).

와 같이 알코올 발효공장의 증류폐액은 BOD가 40,000ppm으로 매우 높은 값을 보이며 이를 무단 방류하였을 경우 심각한 수질오염을 초래하게 된다. 이 증류폐액을 효모에의 이용성을 높이기 위하여 전처리하고, pH 5.0, 30°C에서 무기인산과, 당을 추가로 첨가하여 C/N비를 50으로 하여 공시균주인 *Rhodotorula glutinis*를 배양하여 단세포지질의 생산을 시도하였다. Fig. 4와 같이 균체성장 35시간 후부터는 정지기에 도달하였으며 균체가 성장함에 따라 총지방산의 함량이 증가하고 그와 반비례하여 폐수의 BOD가 감소하여 50시간 배양이 끝난 후, BOD는 4,500ppm으로서 전체 생물학적 산소요구량의 88.7%가 제거된 것으로 나타나, 알코올 발효공장의 폐수처리를 위한 일차처리공정으로 사용 가능함을 보여주었다.

요 약

심각한 수질환경 오염을 억제하기 위하여 알코올 발효공정의 폐액을 미생물을 이용하여 BOD를 낮추고 동시에, 단세포 지질의 생산 공정을 개발하고자 하였다. 알코올 발효공장 두 곳의 폐액을 수집하여

그 조성 및 일반성분과 생물학적 산소 요구량(BOD), 화학적 산소요구량(COD) 등을 측정하였고, 폐액중에 생존하는 미생물들과 유지 함량이 높다고 알려진 효모 균주들을 배양하여 단세포 지질의 생산에 적합한 *Rhodotorula glutinis* 균주를 선발하였다. 알코올 발효 공장의 폐액을 기질로 사용하기 위하여, 전처리 조건을 실험한 결과 NaOH의 처리가 가장 우수하였다. 최대의 지질수율을 얻기 위한 최적 배양 조건을 구한 결과, 배양 온도 30℃, 초기 pH5.0이었고, 인산염의 첨가 효과가 있었다. 발효조를 이용한 단세포 지질 생산을 시도하여 기질 중에 탄소원대 질소원의 비에 따라 단세포 지방산 조성 및 함량에 차이가 있었으며, 탄소원 대 질소원의 비가 50에서 최대 지질계수를 나타내었다. 최종적으로 효모 배양에 의한 단세포 지질이 4g/L 생산되었고, 처리폐액의 BOD의 88.7%가 감소되었다.

감 사

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제(지방대학육성) 학술연구조성비에 의하여 연구되었으며 연구비 지원에 심심한 감사를 드립니다.

참고문헌

1. J. W. Diane Blum, Richard Hergenroeder, Gene F. Parkin, R. E. Speece(1986) *J. Water Pollution Control*, **58**, 122.
2. 환경보전, 환경 백서-대한민국 환경청(1988).
3. C. Retledge(1986) Lipids in "Biotechnology" ed. H. Pape and H. J. Rhem, vol. 4, pp. 184-214, Verlag-chemie.
4. W. S. Park, Y. J. Koo, D. H. Shin and B. Y. Min(1983) *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 123.
5. C. H. Park, Y. K. Kim, H. J. Yu and P. S. Oh (1991) *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 88.
6. S. H. Yoon, J. W. Rhim, S. Y. Choi, Dewey D. Y. Ryu and J. S. Rhee(1982) *J. Ferment. Technol.*, **60**, 243.
7. K. Lee and S. H. Yoon(1990) *Kor J. Appl Microbiol. Biotechnol.* **18**, 171.
8. S. H. Yoon and J. S. Rhee(1983) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**, 1281.
9. S. H. Yoon(1988) *Microorganism and Industry* **14**, 26.
10. D. W. Gruenwedel(1987) *Food Analysis*, Vol. 1-4, Dekker.
11. M. Kates(1972) *Techniques of Lipidology*, North-Holland Pub. Co.
12. J. Folch(1957) *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
13. L. D. Metcalfe and A. A. Schmitz(1961) *Anal. Chem.*, **33**, 363.
14. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater, APHA, AWWA WPCF, 16th Edition(1985).
15. M. P. Steinberg and Z. J. Ordal(1954) *J. Agric. Food Chem.*, **2**, 873.
16. J. W. Rhim(1980) M. S. Thesis, KAIST, KOREA.
17. L. Enebo, L. G. Anderson and H. Lundin (1946) *Arch. Biochem.* **11**, 383.
18. L. Enebo and H. Iwamoto(1966) *Acta Chem. Scandinavica*, **20**, 439.
19. L. A. Allen, M. F. Barnard and B. J. Hollis (1964) *Appl. Bacteriol.* **27**, 27.
20. Nakagawa(1985) *Bull. Univ. Osaka Pref. Ser. B21*, 175.
21. J. W. Kim(1982) M. S. Thesis, KyeongSang Univ., KOREA.