

두부공업폐수를 이용한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* P17의 균체생산

강성옥 · 조경덕 · 임왕진¹ · 조홍연² · 양한철*

고려대학교 식품공학과, ¹고려대학교 생물공학연구소, ²고려대학교 식량공학과

Production of Photosynthetic Bacterial Cells of *Rhodospirillum rubrum* P17 from Soybean Curd Waste Water

Kang, Seong-Og, Kyung-Duck Cho, Wang-Jin Lim¹,
Hong-Yon Cho² and Han-Chul Yang*

Dept. of Food Technology,

¹Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-075, Korea

²Dept. of Food Science and Industry, Korea University, Chochiwon 330-800, Korea

Abstract — *Rhodospirillum rubrum* P17 was used to investigate the potential for the treatment of soybean curd waste water and for the utilization of the biomass produced. The maximal biomass production and COD removal from the waste water were obtained at 30°C, pH 7.0 under 2,500 lux of illumination and 50 rpm of agitation. The initial COD level of the soybean curd waste water was 3,240 mg/l, and after 4 days of cultivation in batch culture, 3.46 g/l of cells was obtained and COD level of the waste water reduced to 150 mg/l (COD removal rate 95.4%). The biomass production of *R. rubrum* P17 was enhanced to 5.45 g/l by continuous feeding of the waste water. The cells of *R. rubrum* P17 grown on soybean curd waste water contained approximately 70% crude protein, and the protein consisted of appreciable amounts of essential amino acids comparable with those of chlorella and yeast protein.

고농도 유기폐수 중 식품공업폐수는 저분자 물질로 용이하게 분해될 수 있는 고분자 유기물질의 함량이 높고 일반적으로 안전성이 확보된 폐수이다(1). 특히 두부공업폐수에는 algae, 광합성세균 등의 자화율이 우수한 각종 유기산이 다량 함유되어 있을 뿐만 아니라 가용성 질소의 함량이 높아 균체생산용 대체기질로 이용될 수 있는 성상을 구비하고 있다(2). 광합성세균에 의한 두부공업폐수 처리는 이용 미생물이 단일균이고 폐수내는 미생물의 영양원이 풍부하기 때문에 직접 슬러지를 균체단백으로 자원화할 수 있음(3)에도 현재 활성슬러지법에 의해 처리됨으로써 잉여슬러지의 재처리에 어려움을 겪고 있다.

광합성세균 균체는 단백질 함량이 건조균체의 60% 이상 달하고 있을 뿐만 아니라 필수아미노산을 비롯한 고품질의 단백질을 함유하고 있다(4). Chlorella보다

우수한 단세포 단백질로서의 사료영양학적 가치 이외에도 균체 중에는 tetrapyrrole 생합성계의 중간대사산물과 최종산물들에 의한 질병방지(5, 6), 품질향상(7), 항바이러스(8) 및 항균(9) 등의 효과가 보고됨으로써 수산, 축산사료의 효용성을 높이 평가받고 있다. 한편 생균체는 수산사료로서 양식장의 정화(10), 치어의 생존율 향상(11) 등과 토양개선제로서 토양 유해미생물의 증식저해(12) 등이 보고되고 있다.

본 연구에서는 공업적인 광합성세균의 균체생산에 있어 중요한 요소인 저가의 대체기질 개발을 목적으로 두부폐수의 이용가능성과 동시에 광합성세균에 의한 두부공업폐수의 처리효과를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 대상폐수

본 연구에 사용된 균주는 전보(13)와 동일한 홍색 비유황 세균인 *Rhodospirillum rubrum* P17을 사용

Key words: Photosynthetic bacteria, soybean curd waste water

*Corresponding author

하였다. 균체생산을 위한 대상폐수는 F사의 두부공업 폐수로 4°C 이하에서 보관한 원폐수와 온도 37°C의 혐기적 압조건에서 hydraulic retention time(HRT)를 2일로 하여 폐수중의 유기물질을 분해시킨 전처리(유기산 생성)폐수를 각각 사용하였다.

균체량 측정

대상폐수에서 배양한 배양액 10 ml를 103~105°C에서 미리 건조시킨 유리섬유(Whatman, G/FB)를 사용하여 여과한 후 항량이 될 때까지 건조시킨 다음 방냉 후의 무게와 여과 전의 유리섬유 무게의 차이로 mixed liquor suspended solids(MLSS)를 측정하여 永井史郎(14) 등의 방법에 따라 건조 균체량으로 환산하였다.

배양방법

종배양은 전보(14)에서 사용한 합성배지에 *R. rubrum* P17를 2일 간격으로 수 회에 걸쳐 계대배양한 후 원심분리(4°C, 2,700×g, 15분)로 균체를 회수한 다음, 전보(13)에서 보고한 최적 생육조건인 초기 pH 6.8, 온도 30°C, 조도 2,500 lux의 혐기적 광조건하에서 24시간 정지배양하여 조제하였다. 한편 대상폐수에서의 종배양은 상기배양액 200 ml를 합성배지와 동일한 조건에서 1주일 동안 매일 새로운 폐수 100 ml씩을 갈아주면서 반연속적으로 배양함으로써 폐수에 적응시켰다.

Flask 배양은 250 ml 유리병에 폐수 200 ml를 취하고 고무마개와 aluminum cap으로 밀폐시켜 살균한 다음 멸균주사기로 종배양을 10%(v/v) 접종한 후 종배양과 동일한 배양조건에서 배양하였다.

발효조에서의 회분배양은 외부에 100 W 백열전구를 장치한 Jar fermentor(KFC SY-5L)를 사용하였으며 발효조 5l, 온도 30°C, 조도 2,500 lux 및 stirring 50 rpm의 배양조건에서 5일간 배양하였다.

유기배양은 초기 발효조 2l에서 균체의 증식이 대수기 중기에 이르기까지 회분배양한 후 0.5 ml/min으로 폐수를 정량공급하면서 회분배양과 동일한 조건으로 배양하였다.

유기산 분석

유기산 분석은 Gas chromatography(Shimadzu 14 A)를 사용하여 실시하였다. 채취한 시료를 17,700×g에서 5분간 원심분리한 후 상등액에 0.3 M oxalic acid를 첨가하여 최종농도 0.03 M로 분석하였다.

Flame ionization detector(FID)와 칼럼물질이 Carbo-pack B-DA 80/120 4% CW20M로 만들어진 3.2 mm ID×1.5 m의 유리칼럼을 사용, 시료 1 μl를 주입하여 분석하였다(15).

배양액의 COD_{cr} 및 BOD 측정

배양중인 폐수의 Chemical Oxygen Demand(COD) 및 Biochemical Oxygen Demand(BOD) 측정은 COD 및 BOD값에 영향을 줄 수 있는 배양액 중의 균체들을 제거하기 위하여 7,500×g에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 표준정량법(16)에 의거 측정하였다.

균체의 성분 분석

균체내의 아미노산 분석은 Kaiser(17) 등의 방법에 따라 아미노산 자동분석기(Biotronik LC 5001)를 사용하였고, 조단백질은 Kieldahl 방법(18)으로 정량하였다. 미량 금속이온은 상법에 따라 I.C.P.(Inductively Couple Plasma, Labtem)기기를 사용하여 분석하였으며 기타 일반성분 중 회분과 조섬유는 A.O.A.C법(19), 조지방은 Folch법(20)에 준하여 측정하였다.

결과 및 고찰

대상폐수의 선정 및 특성

사료용 광합성세균 *R. rubrum*의 균체생산을 위한 기질선정에 있어 전보(14)에서 보고한 바 있는 탄소원 중 자화율이 우수했던 acetic acid와 lactic acid의 함량이 높고 비교적 안전성이 확보된 식품공업폐수를 1차 대상기질로 검토하였다. Table 1은 고농도 유기 식품공업폐수의 하나인 두부공업폐수의 성상을 분석한 것으로 본 균주의 생육 최적 유기산들이 높게 함유되어 있었고 동시에 생물학적 분해 가능도의 기준인 COD/BOD값(0.95)과 BOD : N : P의 비율(100 : 6 : 4)이 미생물에 의한 폐수처리시 요구되는 조건(21)에 근접하고 있었다. 유기산의 농도를 증가시킬 목적으로 HRT 2일에서 혐기성 소화시킨 대상기질은 원폐수에 비해 propionic acid와 butyric acid가 각각 10배 정도 증가되었으나 자화도가 높은 lactic acid와 acetic acid의 함량증가는 크지 않으므로써 균체생산을 위한 산생성 단계가 요구되지는 않았다. 그러나 폐수처리의 지표인 TS, VS 및 SS는 혐기성 소화처리에 의해 각각 1/6, 1/5, 1/10씩 감소함으로써 높은 폐수처리 효과를 나타내었다. 대상폐수에는 미량금속인 Ca, Na, K 등의

Table 1. Environmental factors of soybean curd waste water

Factor	RW (mg/l)	PW (mg/l)	
Total Solids	3,470	600	
Volatile Solids	3,040	490	
Suspended Solids	550	30	
Biochemical Oxygen Demand	3,312	3,452	
Chemical Oxygen Demand	3,240	3,360	
Acetic acids	226	680	
Propionic acids	37	361	
Butyric acids	32	382	
Lactic acids	1,080	1,165	
Total Nitrogen	198.5	131.7	
Ammonia Nitrogen	2.3	17.3	
Total Phosphorus	133.0	142.9	
pH	4.2	6.4	
Calcium	22.3	Sodium 24.9	Potassium 24.9
Iron	0.82	Copper 0.11	Zinc 0.17
Manganese	0.04	Lead ND	Cadmium ND

RW: Raw waste water

PW: Pretreated waste water by HRT 2 day

ND: Not detected

함량이 높은 반면 유해 중금속인 Pb, Cd 등은 함유되지 않았다. 이상의 결과들은 원폐수 또는 산생성 폐수가 균체생산용 기질로서 적합할 뿐만 아니라 대상폐수의 폐수처리도 가능함을 제시해 주었다.

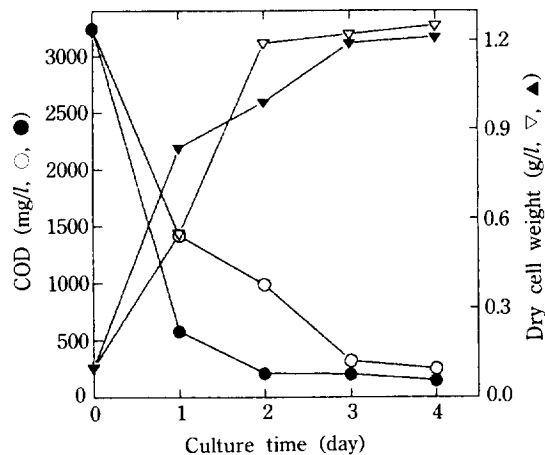
최적 균체생산 조건

원폐수를 기질로하여 통성혐기성 홍색 비유황 광합성세균인 본 균주를 혐기명 조건하에서 배양시 균의 생육에 영향을 주는 환경인자들을 검토하였다(Table 2). 그 결과 조정 pH 7.0, 배양온도 30°C, 조도 2,500 lux에서 최대 균체생산을 나타내었으며 특히 본 균주는 수중미생물임에도 20°C 이하에서 생육을 보임으로써 전형적인 내냉 중온균으로 분류되었다. 조도와 생육에 있어 2,500 lux 이상에서는 조도에 따른 큰 차이는 관찰되지 않았으나 균체의 침강을 억제하기 위한 교반은 요구되었다. 종균의 접종량은 2% 이상 접종시 대수기 후반 이후부터 비슷한 균체량을 보였지만 접종량 10%에서 유도기가 가장 짧아 생육이 빠르게 진행되었다.

원폐수와 전처리폐수에서의 균체 생산성 및 폐수

Table 2. Optimal culture conditions on growth of *Rhodospirillum rubrum* P17 in soybean curd waste water

Initial pH and adjusted	6.8, 7.0
Temperature	30°C
Light intensity	2,500 lux
Agitation	50~150 rpm
Inoculum size	10%
Culture time	4~5 days

**Fig. 1. Cell growth and COD removal in soybean curd waste water during cultivation.**

Cultivation was carried out as described in Materials and Methods.

○, ▽: Seed culture grown in synthetic medium

●, ▼: Seed culture grown in soybean curd waste water

처리 효과

Fig. 1은 대상폐수에 종균의 적응 필요성과 폐수처리조로부터 균체생산의 가능성을 검토하기 위해 합성배지 및 대상폐수에서 각각 조제한 종배양들에 대한 균체량 증가와 COD 감소를 비교한 것이다. 대상폐수에서 적응된 종배양의 특성은 합성배지의 종배양보다 균의 최대 생육에 이르는 시간은 요구되었지만 배양 4일 후의 균체량은 1.22 g/l로 거의 유사한 값을 나타내었다. 또한 배양초기의 높은 생육 및 COD 제거율과 최종 COD 제거율이 합성배지 종배양의 250 mg/l(처리율 92.4%)보다 150 mg/l(처리율 95.4%)로 우수한 결과를 보였다. 이는 실제 공업적인 균체생산에 있어 종배양 조제를 위한 추가적인 시설이 필요치 않고 반송 슬러지만으로도 균체생산과 폐수처리가 가능함을 알 수 있었다.

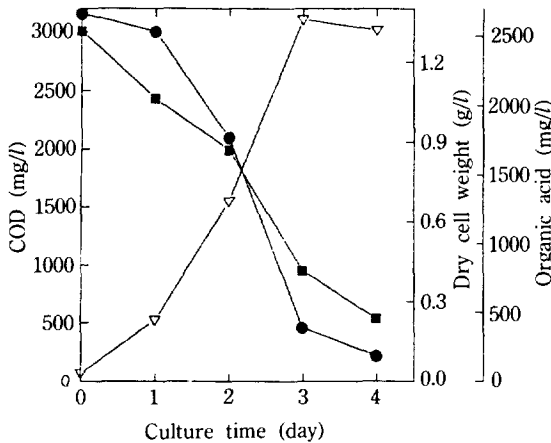


Fig. 2. Changes in growth, organic acids content and COD removal in pretreated soybean curd waste water by 2 days of HRT.

Cultivation was carried out as described in Materials and Methods with seed culture grown in soybean curd waste water.

●-●: COD, ▽-▽: D.C.W, ■-■: Organic acid

한편 혐기적 압조건, HRT 2일에서 전처리하여 유기산을 생성시킨 폐수를 기질로 대상폐수에서 적응시킨 종배양을 배양한 결과 89.6%의 COD 제거율과 1.32 g/l의 균체량을 보임으로써 원폐수에 비해 균체량은 다소 증가되었으나 낮은 COD 제거율을 나타내었다(Fig. 2). 이 결과가 산생성균들의 공존에 따른 현상인지의 여부를 규명하기 위하여 유기산생성폐수를 121°C에서 15분간 살균한 후 동일한 조건에서 배양하면서 균체량, COD 감소 및 유기산 자화율의 변화를 조사하였다. 그 결과 무살균한 산생성폐수에 비해 균의 생육도가 낮은 경향을 보였다(Data 제시하지 않음). 이상의 결과들은 원폐수를 혐기성 소화처리 또는 회석수처리 없이 반송 슬러지를 이용하여 폐수처리와 균체생산을 동시에 행할 수 있기 때문에 설비비 및 운영비 측면에서 경제성이 높음을 시사해 주었다.

균체생산을 위한 yeast extract의 첨가 효과

본 균주에 의한 두부공업 폐수처리는 비교적 우수한 처리능을 보였지만 균체생산 측면에서 공업적인 수준에 미치지 못함으로써 growth factor들을 함유한 yeast extract를 첨가하여 그 효과를 검토하였다. Fig. 3은 원폐수에 yeast extract 0.1%에서 0.3%까지 첨가했을 때 증가한 균체량 및 COD의 변화를 나타낸

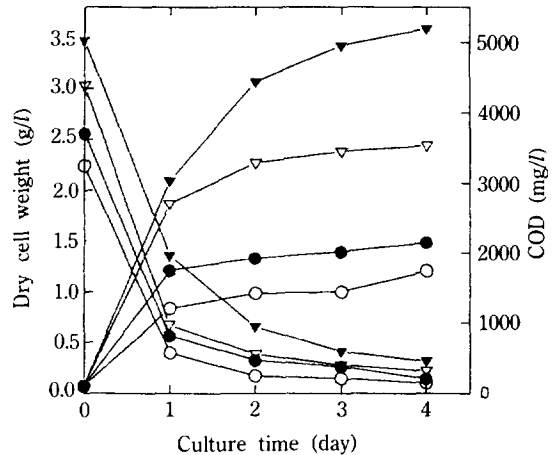


Fig. 3. Effect of yeast extract on cell mass production in soybean curd waste water.

Cultivation was carried out as described in Materials and Methods with seed culture grown in soybean curd waste water.

○-○: None, ●-●: 0.1%, ▽-▽: 0.2%, ▼-▼: 0.3%

것으로 무첨가시(1.21 g/l)에 비해 0.3% 첨가(3.46 g/l)에 의해 약 3배의 균체가 증산되었다. Yeast extract 첨가에 의한 처리수의 COD 문제는 첨가 초기에 약 2,000 mg/l를 증가시켰으나 최종 COD는 420 mg/l로 무첨가시보다 270 mg/l가 증가하였으며 이는 원폐수의 COD 3,260 mg/l의 8%에 해당하였다.

Jar fermentor를 이용한 균체생산

두부공업폐수를 기질로 한 균체생산에 있어 배양공정의 제어가 용이한 Jar fermentor를 이용하여 균체생산과 COD 제거율을 폐수처리조 운영시와 비교 검토코자 하였다(Fig. 4). Yeast extract 0.3% 함유 원폐수를 기질로 하여 배양조 2l에서 대수기 중기까지 회분배양한 후 기질을 0.5 ml/min과 0.25 ml/min의 속도로 정량공급하면서 유기배양한 결과 flask 배양시에 비해 각각 42.2%(4.92 g/l)와 57.5%(5.45 g/l)씩 균체생산량이 증가되었으며 COD 제거율 또한 92.1%와 96.4%의 양호한 결과를 나타내었다. 이들 균체량은 전보(13)에서 보고한 합성배지와 비교할 때 회분배양시 73.1%, 유기배양시 69.7%의 생산량에 상당함으로써 두부공업폐수가 광합성세균의 공업적인 균체생산에 있어 대체기질로 이용될 수 있음을 확인하였다. 또한 폐수처리조의 설계조건과 HRT 운영조건에 최적화에 따라 유기 배양식 균체생산이 실제 폐

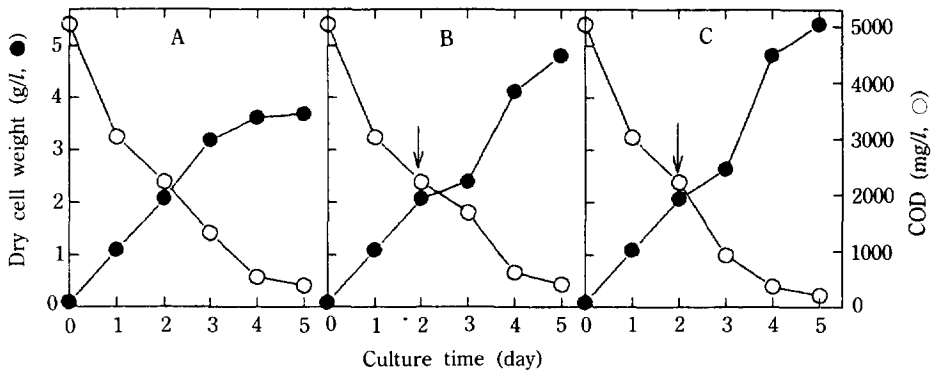


Fig. 4. Changes of cell production and COD removal during cultivation with different feeding systems.

Cultivation was carried out in soybean curd waste water supplemented with 0.3% yeast extract. Feeding of the waste water was started at the time indicated by arrows.

A: Batch, B: Fed-batch with flow rate of 0.5 ml/min, C: Fed-batch with flow rate of 0.25 ml/min

Table 3. Composition of general component in *Rhodospirillum rubrum* P17 (%)

Component	A	B
Crude protein(N×6.25)	67.1	70.7
Crude fat	9.2	8.8
Carbohydrates	16.3	14.6
Crude fiber	3.1	2.6
Ash	4.3	4.4

A: Cultivated in synthetic medium

B: Cultivated in soybean curd waste water

수처리와 동시에 가능함을 보여준 결과로 현재 반연 속식의 폐수처리 reactor에서 균체생산 실험을 수행 중에 있다.

균체의 성분 분석

본 균주를 전보의 합성배지(13)와 yeast extract 함유 원폐수에서 배양, 동결건조한 균체를 micro-kjedahl 방법에 의해 질소함량을 측정 후 조단백질의 함량으로 환산하였다. 그 결과 합성배지와 폐수에서 배양한 건조균체는 조단백질이 각각 67.1%와 70.7%의 높은 양을 함유하였고 건조균체의 아미노산 조성에 있어서도 본 균주는 필수아미노산의 함량이 높고 고른 조성을 보였으며 chlorella(4), yeast(4)와 유사한 경향을 나타내었다(Table 3, 4). 이상의 결과들은 두부 공업폐수를 대체기질로 이용시 단백질, 아미노산을 비롯한 균체의 성분들이 합성배지의 균체와 상이하지 않는점, 기존의 양어사료인 yeast, chlorella에 비해 사료로서의 가치가 높은 점 및 폐수를 이용함으로써

Table 4. Amino acids composition of *Rhodospirillum rubrum* P17 (mg/1 g dry cell weight)

Amino acid	Selected P17		Chlorella*	Yeast*
	A	B		
Lysine	27.7	36.2	27.1	37.6
Histidine	14.2	22.2	10.6	9.0
Arginine	35.4	39.4	32.4	25.0
Aspartic acid	69.0	74.0	47.4	31.1
Threonine	70.4	68.7	22.8	26.5
Serine	36.0	44.6	21.2	27.5
Glutamic acid	70.3	67.0	46.2	62.1
Glycine	32.7	51.6	22.8	21.8
Alanine	44.7	46.4	29.8	28.6
Valine	40.0	36.4	30.2	32.0
Isoleucine	26.5	34.4	24.4	26.3
Leucine	47.4	51.6	44.6	35.4
Tyrosine	19.1	10.6	9.6	13.0
Phenylalanine	32.2	29.5	26.5	22.0
Tryptophan	11.1	15.8	6.4	6.6
Methioine	15.8	14.7	2.7	5.1

A: Cultivated in synthetic medium

B: Cultivated in soybean curd waste water

*: Values cited by Kobayashi and Kurata(4)

균체생산의 원가절하와 폐수처리가 가능한 점 등에서 고농도 유기성 식품공업폐수의 새로운 처리공정 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

광합성 세균 *R. rubrum* P17의 균체생산을 위한

두부공업폐수의 이용가능성과 폐수처리 효과를 동시에 검토하였다. 원폐수에서의 최적 생육 환경인자들은 pH 7.0, 온도 30°C, 조도 2,500 lux, 50 rpm의 교반 등이었다. 두부공업폐수의 초기 COD는 3,240 mg/l로 나타났으며 회분배양 4일에 폐수의 COD는 150 mg/l로 감소하여 95.4%의 COD 제거율을 보였다. *R. rubrum* P17의 균체생산성은 유가배양에서 폐수의 연속 첨가에 의해 크게 증가하여 5.45 g/l의 최대 생산량을 보였다. 건조균체의 조단백질 함량은 약 70% 였고, 필수아미노산의 함량 및 조성이 클로렐라, 효모균체에 비해 손색이 없었다.

감사의 말

본 연구는 과학재단의 연구비(91-0204-10) 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 小林正泰. 1971. 食品工業廢水處理에서의 光合成細菌의 利用. 醱酵와 工業, 2下: 19-26.
- 土木工學會 衛生工學委員會. 1993. 環境微生物工學研究法. 松井三郎, 東京, 255-258.
- 小林正泰. 1978. 光合成細菌에 의한 高濃度有機廢水處理(PSB處理法). 醱酵와 工業, 36: 753-765.
- Kobayashi, M. and S.I. Kurata. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria process. *Biochemistry*, 13(9): 27-30.
- 田中 克太郎. 1977. 光合成細菌利用의 實用化에 관한 考察. 醱酵와 工業, 36: 842-848.
- Hirayama, O. 1968. Lipids and lipoprotein complex in photosynthetic tissue. *Arg. Biol. Chem.*, 32: 34-41.
- Lee, M.G., M. Kobayashi, and M. Yasumoto. 1990. Hypocholesterolemic effect phototrophic bacterial cells in rats. *J. Nutr. sci. Vitaminol.*, 36: 475-480.
- Siefert, E. and V.B. Koppenhagen. 1982. Studies on the vitamin B12 auxotrophy of *Rhodocyclops pupureus* and two other vitamin B12-requiring purple nonsulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, 132: 173-179.
- Hirotsani, H., H. Ohigashi, K. Koshimizu, and E. Takahashi. 1991. Inactivation of T5 phage by *cis*-vaccenic acid, and antiviral substance from *Rhodospseudomonas capsulata*, and by unsaturated fatty acids and related alcohols. *FEMS Microbiol. Lett.*, 77: 13-17.
- 狄珍吉. 1978. 養魚飼料로서의 光合成細菌의 利用. 醱酵와 工業, 36: 836-841.
- Kobayashi, M. 1976. Utilization and disposal of wastes by photosynthetic bacteria. In *Microbial Energy Conversion*, by Schlegle H.G., I. J.Barnea, and K.G. Erich Goltze (ed.), Pp. 443-453, Göttingen.
- Kobayashi, M. and M.Z. Haque. 1971. Contribution to nitrogen fixation and soil fertility by photosynthetic bacteria. T.A. Lie and E.G. Mulder, plant and soil, special vol., 443-456.
- 조경덕, 강성욱, 임왕진, 조홍연, 양한철. 1993. 유기 폐수처리용 종균체 생산을 위한 *Rhodospirillum rubrum* P17의 배양조건. 한국농화학회지, 36(6).
- 永井 史郎, 田井 梁, 天道 俊孝. 1977. 豆腐製造廢水の 活性汚泥處理에서의 汚泥의 變換率, 汚泥分解係數의 推算. 醱酵工學會誌, 55: 289-293.
- 김장석. 1991. 광합성세균 *Rhodocyclops geatinosus*에 의한 전분공업폐수 처리에 관한 연구. 고려대학교 대학원 석사학위논문, 14-16.
- Lenore, S.C., E.G. Arnold, R. Rhodes Trussell. 1989. Determination of organic constituent, part 5000. Pp. 5.1-5.16. In *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water*, 17th ed., American Public Health. New York.
- Kaiser, F.E., Gebrke, C.W., Zumwalt, R.W., and Kuo, K.C. 1974. Amino acid hydrolysis, ion-exchange cleanup, derivatization and quantitation by gas-liquid chromatography. *J. Chromatography*, 94: 113-121.
- A.A.C.C. 1983. Approved Methods 2, 46-14A, In *Methods of the AACC*. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- A.O.A.C. 1980. In *Official Method of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- William, C.W., 1972. In *Lipid Analysis*, 2nd ed., Pergamon Press, New York.
- Imhoff, K., W.J. Muller, D.K.B. Thistlethwayte. 1971. *Disposal of Sewage and other Water-Borne*. Butterworth and Co., London, 218-227.

(Received October 18, 1993)