ORIGINAL PAPER 원저

사탕무알콜증류폐액을 기질로 Candida rugosa 효모균체를 생산할 때 기질의 최적화와 COD감소에 대한 연구

이기영
호서대학교 자연과학부 식품생물공학전공
(2004년 8월 20일 접수, 2004년 9월 17일 채택)

Study on the Optimization of Substrate and COD-reduction in the Cultivation of Yeast Candida rugosa in Sugar Beet Stillages

Ki-Young Lee

Food & Biotechnology, Hoseo Unoversity, Asan, Chungnam, Korea

ABSTRACT

Sugar beet stillages were used as a substrate for the production of single cell protein by a thermotolerant yeast Candida rugosa. 3 Stillage substrates were nutritionally optimized for the better production of yeast biomass and for the reduction of COD. The addition of Phosphorus(P) was required for all stillages, but Nitrogen(N) only when the residual sugar remained. The addition of P increased the biomass production to 23-61%. The addition of N increased the biomass production only a little, but when added together with P increased to 90%. The COD decreased to 26-46% when P was added, but decreased to 85% when P was added together with N.

Key words: sugar beet stillage, yeast biomass, COD reduction, Candida rugosa

초 록

사탕무즙을 이용한 알콜생산에서 배출되는 증류폐액(sugar beet stillage)을 기질로 고온성 효모인 Candida rugosa를 이용해 단세포단백을 생산 할 때 기질의 최적화와 COD 감소를 연구하였다. 인의 첨가는 실험에 사용된 3가지 모든 시료기질에 꼭 필요한 것으로 나타났고 질소첨가는 기질의 잔당농도가 높을 경우에 필요하였다. 모든 시료에 있어서 인의 첨가는 생균생산율(Biomass production)을 23-61% 까지 크게 높였다. 이에 비해 질소의 첨가는 잔당함량이 높을 경우 생균생산율을 약간 상승시켰으나 질소와 함께 첨가할 경우 90%까지 크게 높였다. COD는 인의 첨가로 인해 26-46%까지 더 감소되었으며 질소와 함께 첨가할 경우 85%까지 크게 감소되었다.

주제어 : 증류폐액, Cabduda rugosa, COD 감소.

1. 서론

농업이나 산업체 폐기물에서 발생하는 유기성 오염물질이 점점 증가하고 있어 이러한 유기성 폐기물들을 유용한 자원으로 재활용하는 연구가 필요하다. 한편, 19세기 이후 세계 인구가 크게 증가하자 육류나 어류 및 난류 등 전통적으로 섭취해온 식품단백질원이 부족해짐에 따라 좀 더 혁신적이고 대안적인 단백질 자원의 개발이 요구되고 있다. 이 때문에 치즈폐수(Paraskevopoulou et al, 2003), 배추폐기물(Choi et al, 2002), 두유폐수(Cheung, 1997), 김치가공폐수(Choi, & Park, 1999), sugar cane bagasse(El-Nawwi & El-Kader, 1996), 새우가공폐수(Ferrer et al, 1996), 임산물 가공 폐수(Parajo et al, 1995)를 single cell protein(SCP)로 전환시키는 연구들이 관심을 끌고 있다.

이러한 유기오염물들 중의 하나로 알콜증류폐액이 있다. 알콜증류폐액은 보통 distillery alcohol slops, stillage, spent wash 또는 vinasse 라고 불리는데 사탕무, 사탕수수즙이나 감자, 고구마, 곡류 등을 이용한 전분당화액으로부터 알콜을 증발 회수하고 남는 폐수이다(Lee & Lee, 1998). 보통 알콜증류폐액은 알콜 1리터 생산에 10-15리터가 나오며 대체로 pH가 낮고 어두운 색깔을 띈, 유기오염도가 매우 높아 COD 값은 평균 60-70g에 달한다. 이러한 고농도유기오염물질은 지하수나 지표수의 오염원이 되며 오염부하가 매우 높아 폐수처리장에서의 직접 처리는 불가능하다. 따라서 대부분 다른 가정용 폐수등과 섞어 충분히 희석시켜 폐수처리장으로 보내는 방법이 사용된다. 그러나 stillage는 유기산, 단백질, 잔여당성분 등 미생물들이 이용할 수 있는 자화원이 많이 남아있어 이를 이용해 효모균체를 생산한다면 단백질과 비타민함량이 높은 좋은 사료원료로 이용할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 사탕무즙을 이용해 알콜을 증류해 회수한 후 나오는 고농도 유기성 폐수인 Sugar Beet Stillage(이하 SBS)를 기질로 이용해 C. rugosa를 종효모로 SCP를 생산하고자 기질의 최적화를 시도하고자 시도하였다. 미생물의 대사는 기질의 성분조성, pH값, 온도, 삼투압 및 산소공급 등 외부조건에 크게 좌우된다. 이 parameter 들은 세포막의 기능을 변화시켜 대사경로를 바꾸어 기질의 흡수나 유기산, 알콜 등 2차 대사물질의 생성, 효모의 형태에 영향을 준다. 효모가 증식하는 동안

[Table1] Chemical Composition and Physical Characteristics of the Sugar Beet Stillages*

Composition & Characteristics	SBS A	SBS B	SBS C	SBS C[10]
COD(g/l)	49.3	65.5	95.2	90.0
Dry matter, soluble(g/l)	60.1	83.6	103.7	94.2
pH	4.4	4.3	4.2	4.8
Protein(g/l)	14.7	18.1	34.4	35.0
Betain(g/l)	12.1	14.6	12.2	12.3
Carbohydrate(g/l)	6.1	7.6	26.1	22.2
Reducing sugar(g/l)	5.1	5.1	22.4	17.5
Titrable acid as lactate (g/l)	3.0	5.3	8.5	3.9
o-Phosphate(mg/l)	23	59	47	53
Free amino acid as glycine(g/l)	1.4	1.6	1.6	2.0
Ash(g/l)	12.1	19.4	18.0	18.2
Volatile acid(g/l)	3.0	5.3	8.5	3.9
Sulfite(mg/l)	0.8	0.9	77.8	0.0

*VLSF Berlin, SBS: Sugar Beet Stillage

대사경로를 잘 파악해야만 원하는 공정으로 원활하게 진행시킬 수 있다(Crueger and Crueger, 1984. Forage et al 1985). 본 연구에서는 C. rugosa를 종효모로 SBS A, B, C와 C^{10}을 기질로 48시간동안 진탕배양시킬 경우 생균효모균체 생산과 COD 감소율을 높이기 위해 기질의 영양물질조성과 process parameter의 최적화를 시도하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험재료

2.1.1 알콜증류폐액

알콜증류폐액은 VLSF Berlin에서 나온 서로 다른 SBS A, B, C 세 종류와 C를 65%고형분농도를 갖도록 증발농축시켜 보관한 뒤 다시 증류수로 희석해 고형분 농도가 10%가 되도록 복원시킨 C^{10}의 4가지를 이용하였다. 시료로 사용된 이들 4가지 시료의 화학적 성분조성과 물리적 특성은 [Table 1]과 같다.

2.1.2 균주

내열성 효모로 C. rugosa를 사용했고 이 효모는 동아프리카에서 분리되었다(Lee, 1996).

2.1.3 첨가 영양원

[Table 2], [Table 3] 참조.

2.2 실험방법

2.2.1 발효조건

[Table 2] Vitamin Mixture for the Study of Vitamin Requirement

Vitamin	Concentration(mg/l)
D-biotin	50
Niacine	10
Ca-pantothenate	6
Pyridoxine-HCl	40
Thiamine-HCl	30
Inositol	100

250 ml - Erlenmeyer flask에 각 SBS기질 100ml를 채워 멸균시킨 뒤 미리 배양기에서 키운 효모종균을 한 백금이 취해 접종한 뒤 분당 170회 진탕시키며 38oC에서 48시간동안 발효시켰다. 발효종료 후 mess flask 에서 부피를 측정한 뒤 발효도중 증발된 부피만큼 증류수를 다시 보충해준ㅌ 뒤 시료분석에 이용하였다.

2.2.2 시료분석

COD: 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand)은 DIN 38409법에 의해 Thermoreactor TR 105 (Merck, Darmstadt)를 이용해 측정했다. 표준시약(COD 200 mg/l)으로 potassium hydrogen phthalate 용액(0.17 g/l)을 이용하였다.

총단백질: Kieldahl 방법에 의해 측정한 뒤 질소계수 6.25를 곱해 조단백질로 나타냈다.

2.2.3 Biomass 무게 측정

배양액을 흔들어 골고루 섞이게 만든 뒤 10ml를 취해 1,000g에서 원심분리시켜 상액을 버린 후 105oC에서 하루 밤 건조시켜 방냉한 뒤 무게를 달아 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

효모는 균체의 원소조성에 따라 증식을 위해 섭취 가능한 다양한 영양원을 필요로 한다. 사탕무알콜증류폐액은 효모증식 기질로서 이러한 필수

[Table 3] Trace Element Mixture for the Study of Trace Element Requirement

Trace element(mg/l)	Concentration(mg/l)
H_3BO_3	2.0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.0
$MnSO_4\ 4H_2O$	1.0
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.5
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.5
NaJ	0.3
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.1

영양원들을 다 함유하고 있지는 않다. 각 SBS 시료들의 화학적 분석결과와 영양원보충 예비실험결과에 따르면 대체로 질소와 인이 모자라는 것으로 나타났다. SBS A, B, C와 C^{10}의 기질최적화를 위해 질소원(N)으로 요소(2.0 g/l, as nitrogen), 인원(P)으로 ortho-Phosphate(1.0 g/l as phosphate), Mg원으로 magnesium sulfate(1.0 g as magnesium)를 첨가하였다. 미량원소들은 [Table 2], 비타민들은 [Table 3]에 따라 첨가되었다. 각 원소의 첨가효과는 단일 혹은 각원소의 다양한 조합으로 시험해보았다. 이 실험결과 Mg, 미량원소와 비타민의 첨가는 모든 시료에 있어 효모균체생성과 COD-감소에 영향이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 인의 첨가는 모든 시료에 있어서 꼭 필요한 것으로 나타났고 질소첨가는 시료 C 와 C^{10}의 경우에 필요하였다. 질소와 인의 첨가 결과는 [Table 4]에 나타나있다.

모든 SBS 시료에 있어서 인의 첨가는 생균생산(Biomass production)을 23-61% 까지 크게 높였다. 이에 비해 질소의 첨가는 C와 C^{10} 에 있어서 약간의 상승효과를 보였으나 질소와 함께 첨가할 경우 90%까지 상승하였다. COD는 인의 첨가로 인해 26-46%까지 더 감소되었는데 질소와 함께 첨가할 경우 85%까지 더 크게 감소되었다. 시료C의 경우 인과 질소를 동시에 첨가할 경우 COD 감소가 38.4%에 이르렀다. 이 결과는 시료 A, B의 발효시 COD-감소율과 비슷하였다. C^{10} 시료는 약 10% 높은 값을 보여주었다. 이것은 시료 C^{10}은 원재료인 시료 C 에 함유돼있었던 sulfite가 없고 휘발성 산같은 효모의 성장을 저해하는 물질이 증발·소실되어 훨씬 적게 함유되어있기 때문인 것으로 보인다.

한편, 시료 A와 B에서 생산된 효모균체에 함유된 조단백질 함량은 C나 C^{10}의 경우보다 훨씬 높았으며 A와 B 엔 인을 C와 C^{10} 시료엔 질소를 첨가할 경우 약 10%정도 상승하였다. 기질에 P를 첨가하면 Y bmp/cod는 20%, Y cpp/cod 는 40%까지 증가하였다. 정량적인 P와 N의 요구량은 P값은 A, B, C에 있어서 0.4, 0.6, 0.8g/l, N의 경우 C^{10}은 0.5g/l 로 나타났다. 인의 첨가량이 감소할수록 생산된 균체의 조단백함량은 증가하였으나 생균생산량은 감소하였다. 이 결과는 여기서 이용된 효모종균이 증식함에 있어서 특정한 양의 인이 필요하지만 인의 함량이 적음에도 불구하고 가능하면 더

[Table 4] Influence of Nitrogen(N) and Phosphate(P) Addition on the Yeast Biomass Production and COD-reduction in the Sugar Beat Stillages by the Thermotolerant Yeast C. Rugosa

Stillage	Addition	pH	Biomass production (bmp, g/l)	Crude protein content (cpc, %)	Crude protein production (cpp, g/l)	COD-reduction (%)	Ybmp/cod	Ycpp/cod
A	0	8.6	4.52	32.8	1.48	30.0	0.31	0.10
	P	7.8	7.06	34.1	2.41	37.7	0.38	0.13
B	0	8.7	6.83	33.8	2.31	30.6	0.34	0.12
	P	8.0	9.60	35.5	3.41	39.2	0.38	0.13
C	0	7.0	9.55	28.5	2.72	25.8	0.39	0.11
	N	5.4	10.26	29.2	3.00	29.8	0.36	0.11
	P	7.4	12.34	28.8	3.55	30.1	0.43	0.12
	N, P	6.8	16.08	31.9	5.11	38.4	0.44	0.14
C^{10}	0	8.1	9.80	28.1	2.75	26.3	0.41	0.12
	N	7.0	11.20	29.1	3.26	31.7	0.39	0.11
	P	7.5	14.45	28.5	4.12	38.3	0.42	0.12
	N, P	8.5	18.53	31.6	5.86	48.6	0.42	0.13

[Table 5] Quantitative Determination of Phosphate(P) Requirement on the yeast Biomass Production and COD-reduction in the sugar beat Stillages by the Thermotolerant Yeast C. Rugosa

Stillage	Addition	pH	Biomass production (bmp, g/l)	Crude protein content (cpc, %)	Crude protein production (cpp, g/l)	COD-reduction (%)	Ybmp/cod	Ycpp/cod
A	1.0	8.4	6.61	37.1	2.45	36.1	0.37	0.14
	0.8	8.5	6.82	34.9	2.38	38.4	0.36	0.13
	0.6	8.6	7.02	35.0	2.46	38.4	0.37	0.13
	0.4	8.9	6.63	34.7	2.30	33.9	0.35	0.12
	0.2	9.0	5.62	39.0	2.19	31.8	0.34	0.13
	0.1	9.1	4.95	41.7	2.06	31.8	0.32	0.13
	0	8.6	4.45	33.0	1.47	29.5	0.31	0.10
B	1.0	8.0	9.29	36.7	3.41	40.0	0.36	0.13
	0.8	8.3	9.56	36.1	3.45	40.2	0.36	0.13
	0.6	8.7	9.10	37.1	3.38	39.7	0.35	0.13
	0.4	9.0	8.69	36.9	3.21	36.9	0.36	0.13
	0.2	9.0	7.53	35.9	2.84	35.9	0.32	0.12
	0.1	9.1	6.47	34.2	2.81	34.2	0.29	0.13
	0	8.3	6.26	29.7	2.19	29.7	0.33	0.12
C^{10} (+2g N/l)	1.0*	8.0	18.94	32.0	6.06	49.0	0.43	0.14
	0.8	8.3	18.83	32.5	6.12	49.3	0.42	0.14
	0.6	8.7	17.55	32.3	5.67	46.5	0.42	0.14
	0.4	9.0	15.39	34.6	5.32	43.2	0.40	0.14
	0.2	9.0	14.42	36.6	5.38	37.7	0.43	0.16
	0.1	9.1	13.81	35.7	4.93	35.3	0.43	0.16
	0	8.3	12.23	29.4	3.60	30.0	0.44	0.13
C^{10} (+1g N/l)	2.0**	7.7	17.97	32.6	5.86	47.8	0.42	0.14
	1.0	8.0	18.42	31.7	5.84	48.2	0.42	0.13
	0.5	7.9	18.67	31.8	5.94	49.1	0.42	0.13
	0.2	7.3	17.37	29.7	5.16	46.0	0.42	0.13
	0.1	7.1	15.98	29.2	4.67	44.3	0.42	0.12
	0	6.4	14.63	29.1	4.26	41.3	0.39	0.12

많은 질소를 자화시킬 수 있다는 것을 보여준다. 충분한 인이 존재하는 가운데 질소의 요구량을 정량하는 경우 질소함량이 감소할수록 조단백질 함량도 감소하였다.

[Table 5]에서 보듯이 C'^{10}의 Y bmp/cod는 A와 B의 경우보다 컸다. P의 첨가농도를 감소시키면 Y bmp/cod 값도 떨어졌지만 C'^{10}의 경우, 감소정도는 작은 편이었다. 여기에 반해 Ycpp/cod 값은 변동이 거의 없었다.

SBS를 기질로 효모를 증식시킬 때 주로 N 및 P와 종종 Mg의 첨가에 대한 여러 연구보고들이 있다(Wiley, 1954; Lin et al, 1973; Tauk, 1982; Cabib et al, 1983). Braun과 Huss(1981)에 따르면 SBS를 Kluyveromyces 효모로 발효시킬 경우 P, N, K와 Vitamin 등의 growth factor는 불필요했다. Macher(1966)는 SBS를 기질로 효모를 배양할 경우 N원을 첨가해서는 안 된다고 밝혔는데 그 이유는 효모가 유기질소원보다는 무기질소원을 더 쉽게 자화시키므로 기질속의 유기질소의 이용을 억제하기 때문이다. Johns(1965)에 의하면 효모는 무기질소원보다 아미노산의 자화를 더 선호한다. Lewis(1964)의 단백질 합성 연구에 따르면 합성과정이 1단계: glutamic acid 생합성, 2단계: 다른 아미노산의 준비, 3단계: 단백질의 합성으로 나뉘는데 1 단계에는 암모니아와 몇몇 아미노산이 참여하나 다른 아미노산들은 대부분 2단계에 참여해 amino acid pool에 저장돼 단백질 합성을 용이하게 만든다. 이 아미노산의 자화시스

템은 Harvorson 과 Spiegelen(1953)이 'amino acid pool'이란 개념으로 처음 제시되었다. 아미노산의 자화율은 glucose가 존재할 경우 더 향상되고(Eddy and Indige, 1962), K나 P가 부족할 경우 감소된다. K은 세포구성원소의 합성에 필요한 에너지 전달 과정에 필수적이고 mitochondria의 cell membrane에서 일어나는 물질전달에서도 중요한 역할을 한다. P는 에너지대사에 ATP합성 등 가장 필요한 원소이다. 효모를 이용한 SCP 생산시 최적 공정조건을 만들기 위한 영양물질의 첨가는 종효모보다는 기질조성에 더 크게 좌우되는 것으로 보인다. 본 실험에서 이용된 SBS 기질의 경우 인의 첨가는 필수적이고 질소의 첨가는 알콜발효가 완전히 일어나지 않아 잔여당의 함량이 높은 기질의 경우 필요하였다.

참고문헌

1. Braun & Huss, Anaerobic digestion of distillery effluents, Process Biochem. 17, pp 25-27 (1981)
2. Cabib, G., Silva, H. I., Giulietti. A. and Ertola, R., The use of sugar cane stillage for single cell protein production, J. Chem. Technol. Biotechnol. 33b, pp 21-28 (1983)
3. Cheung, P. C.-K., Chemical evaluation of some lesser-known edible mushroom mycel ia produced in submurged culture from soymilk waste. Food Chemistry 60, pp 61-67 (1997)
4. Choi, M. H. & Park. Y. H., Growth of Pithia guilliermandii A9, an osmotolerant yeast in waste brine generated from kimchi production, Bioresource Technology 70, pp 231- 26 (2002)
5. Crueger and Crueger, Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, R. Oldenburg Verlag Muenchen, Wien, pp 50-92 (1984)
6. Eddy and Indige, The dependance of amino acid transport in yeast on both energy supply and intra cellular potassium ions, Biochem. J. 82, pp 15-16 (1962)
7. El-Nawwi. S. A., & Anal Abd. El-Kader, Production of single cell protein and cellulase from sugarcane bagasses: effect of culture factors. Biomass and Bioenergy 11, pp 361-364 (1996)
8. Ferrer, J., Paez. G., Marmol. Z., Ramones. E., Garcia., H., & Forster, C.F., Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell production from the hydrolysate, Bioresource Technology 57, pp 55-60 (1996)
9. Forage, R. G., Harrison, D.E.F. and Pitt, D.E., Effect of environment on microbial activity in : Comprehensive Biotechnology, Moo-Young, M(eds), pp 251-279 (1985)
10. Harvorson H. O. and Spiegelman S., The effect of free amino acid pool on the induced synthesis of enzymes, J. Bact. 65, pp 496-504 (1953)
11. Johns D. Power, D.M. and Pierce., J.S., The absorption of aminoacids by culture yeasts, European Brewery Convention-Proceeding 10th congress-Stockholm, pp 182-194 (1965)
12. Lewis, J.M., Aspects of the nitrogen metabolism of brewer's yeast, Wall. Lab. Comm. 27, pp 337-334 (1964)
13. Lee, Ki-Young & Sung-Taek Lee, Continuous process for yeast biomass production from sugar beet stillage by

a novel strain of Candida rugosa and protein profile of the yeast, J. Cem. Tech. Biotechnol 66, pp 349-354 (1996)

14. Lin, S. F., Tsou, C.S. and Chen, W.C., Manufacture of fodder yeast from mollasses alcohol slops, Taiwan Sugar, Sept/Okt., pp 185-188 (1973)
15. Macher, L., Die Technologie der Futterheffefablikation, Alkohol Industrie 2, pp 51-54 (1966)
16. Parajo, J. C., Santos, V., Domingues, H., & Vaszques, M., Protein concentrates from yeast culrtured in wood hydrolysates, Food Chemistry 53, pp 157-163 (1995)
17. Paraskevopoulou, A., Athanasiadis, I., Kanellaki, M., Bekatorou, A., Blekas, G. and Kisseoglou,V., Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora, Food Research International 36, pp 431-438 (2003)
18. Tauk, S.M., Culture of Candida in vinasse and molasses: Effect of acid and salt addition on biomass and raw protein production, European J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16, pp 223-227 (1982)
19. Wiley, A.J., Food and feed yeast in: Industrial Fermentation 1, Underkoler, L. A. and Hickey, R.J.(eds) Chem. Pub. co. New York, p 307 (1954)