

탈지미강의 아임계수 가수분해 생성물을 배지로 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양

이홍식 · 이선옥* · 류제빈* · 김화용* · 이윤우*†

한국과학기술연구원 청정에너지연구센터
136-791 서울 성북구 화랑로14길 5
*서울대학교 화학생명공학부
151-742 서울 관악구 관악로 1

(2014년 7월 3일 접수, 2014년 9월 26일 수정본 접수, 2014년 10월 1일 채택)

Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* using Defatted Rice Bran Hydrolyzed in Near-critical Water as a Culture Medium

Hong-shik Lee, Seon-Oke Lee*, Jebin Ryu*, Hwayong Kim* and Youn-Woo Lee*†

Clean Energy Research Center, Korea Institute of Science and Technology, 5 Hwarang-ro 14-gil, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea

*School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, 1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

(Received 3 July 2014; Received in revised form 26 September 2014; accepted 1 October 2014)

요 약

아임계수를 이용하여 탈지미강의 가수분해를 실시하고, 결과로 얻어진 가수분해물이 배지로서 이용할 수 있는지 검토하기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양을 시도해보았다. 아임계수 가수분해 반응은 회분식 반응을 통해 이루어졌으며, 생성물에 포함된 전당, 이당류, 단당류의 함량, 총유기탄소 (TOC), 총질소 (TN), pH를 측정하였다. *Saccharomyces cerevisiae*의 성장 속도는 탁도 측정을 통해 확인하였다. 전당 수율, TOC, TN은 240 °C까지 온도에 따라 증가하다가 그 이상의 온도에서는 감소하였다. 240 °C 이상에서의 수율 감소는 유기산 생성에 기인한 것이고 이는 pH 변화를 통해 확인할 수 있었다. 포도당의 수율은 200 °C에서 최대였고 그 이상의 온도에서는 빠르게 감소하였다. 탈지미강 가수분해 물에서 배양된 *Saccharomyces cerevisiae*의 성장 속도는 일부 조건에서 상용 배지와 근접한 수준을 보였고, 성장 속도는 포도당의 함량과 상관 관계가 있었다.

Abstracts – The hydrolysis of defatted rice bran using near-critical water was performed, and the feasibility of consequent hydrolyzate as a growth medium was investigated by the cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. The near-critical water hydrolysis was carried out through a series of batch experiments, and the contents of total carbohydrates, disaccharides, and monosaccharides, total organic carbon (TOC), total nitrogen (TN), pH of products were measured. The growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* was measured with optical density. The yield of total carbohydrates, TOC, and TN increased with temperature below 240 °C, however, decreased above 240 °C. The decrease of yields above 240 °C was caused by the formation of organic acids, and it agreed with the change of pH of products. The yield of glucose was a maximum at 200 °C and it decreased dramatically at higher temperature. The growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in the hydrolyzate was similar with that in the commercial medium under certain conditions. The growth rate was correlated with the content of glucose in hydrolyzate.

Key words: Defatted Rice Bran, Hydrolysis, Near-critical Water, *Saccharomyces cerevisiae*

1. 서 론

쌀은 밀, 옥수수과 함께 세계 3대 주식 작물로서 아시아 지역을 비롯하여 광범위한 지역에서 채배, 소비되고 있다. 쌀은 대부분의 경우

백미의 형태로 소비되는데, 쌀을 백미로 도정하는 과정에서 왕겨, 미강 등의 부산물이 발생한다. 미강에는 탄수화물, 단백질, 지방뿐 아니라 비타민, 미네랄 등이 많이 포함되어 있어 영양원으로 유용하게 이용될 수 있고, 그 양도 풍부하지만 현재까지는 널리 이용되고 있지 않다. 최근 들어 미강에서 추출한 미강유를 식용유로서 이용하고 있으며, 또한 미강유를 추출하고 남은 부분인 탈지미강은 탄수화물을 많이 함유하고 있어 식용으로 뿐만 아니라 바이오매스로써도 이용될 수 있는 가능성이 열려 있다[1,2].

식물체의 조직을 이루는 탄수화물인 녹말, 셀룰로오스, 헤미셀룰

†To whom correspondence should be addressed.

E-mail: ywlee@snu.ac.kr

‡이 논문은 한양대학교 배성열 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다. This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

로오스 등은 주로 가수분해를 통해 단당류로 분해된 후 이용되게 된다. 이때 사용될 수 있는 가수분해 방법으로는 효소를 이용한 가수분해, 산, 염기 촉매를 이용한 가수분해, 아임계수를 이용한 가수분해 등이 있다. 효소를 이용한 가수분해는 공정이 환경친화적이라는 장점이 있으나 반응 속도가 제한적이고 효소의 가격이 비싸 경제성이 떨어지는 단점을 갖고 있다. 산이나 염기 촉매를 이용하는 경우 반응 속도는 빠르지만 반응기 부식 등의 염려가 있고 반응 후 중화 공정을 거쳐야한다는 문제점이 있다[3-6].

물은 상온에서 10^{-14} 의 이온곱상수를 갖는데 온도가 증가할수록 이 값이 증가해 250~300 °C 부근인 아임계수 영역에서 약 10^{-11} 의 최대 값을 갖게 된다. 따라서 아임계수 조건에서는 이온 반응의 속도가 크게 증가하게 되어 가수분해 등의 반응 매체로 이용할 수 있다. 또한 온도가 증가할수록 물의 극성이 감소하여 비극성 유기 물질과의 친화력이 높아지기 때문에 각종 유기 반응의 매체로 아임계수를 이용하는 것이 가능하다. 이러한 아임계수의 특성을 이용해 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 단백질 등의 가수분해가 효율적으로 이루어질 수 있다는 것이 앞선 많은 연구들을 통해 밝혀졌다. 아임계수 가수분해는 촉매를 사용하지 않기 때문에 공정이 간단해질 수 있고 반응 속도도 빠른 편이지만, 높은 온도로 인해 가수분해 이외의 부반응이 발생할 수 있어 높은 단당류 수율을 얻기 위해서는 반응 조건의 최적화가 중요하다[7,8].

본 연구에서는 아임계수 조건에서 탈지미강의 가수분해를 수행하여 단당류 및 부산물의 생성 양상을 살펴보고, 이를 통해 얻어진 생성물을 효모의 배양에 배지로 이용할 수 있는지 가능성을 살펴보았다.

2. 실험

2-1. 재료 및 시약

본 연구에 사용된 탈지미강은 (주)넥스트바이오로부터 제공받은 것으로, 초임계 이산화탄소 추출을 통해 지방을 제거한 것이다. 배양에 이용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 12491로, 한국 미생물보존센터에서 동결건조된 상태로 분양받았다. 배지로는 YM broth 액체 배지와 YM agar 고체 배지를 이용하였다.

2-2. 실험 장치 및 과정

탈지미강의 가수분해 실험은 스테인리스 강(Grade 316) 재질의 회분식 반응기와 용융염조를 이용해 진행하였다. 반응기 안에 탈지미강 0.63 g과 증류수 12.60 g을 넣고 밀폐한 후 목표 온도로 예열된 용융염조에 넣고 소정의 시간 동안 교반하여 반응을 진행하였다. 일정 반응 시간이 지난 후 반응기를 용융염조에서 꺼내어 상온까지 냉각하고 개봉한 후, 반응 생성물을 여과를 통해 수용액과 고체 잔여물로 분리하였다. 수용액 부분은 건조 오븐 안에서 수분을 제거한 후 무게를 측정해 수율을 계산하고 이후 분석 및 배양에 사용하였다.

종균 배양은 다음과 같은 과정으로 시행하였다. 분양받은 *S. cerevisiae*를 식염수 1 mL와 섞은 후 YM broth 배지와 YM agar 배지에 각각 0.2 mL씩 분주하여 배양하였다. 배양 과정을 3, 4회 반복해 계대배양하여 활성화시킨 후 본 배양에 사용하였다. 본 배양에서는 YM broth 배지와 탈지미강 가수분해물 수용액을 각각 사용하였다.

2-3. 분석 방법

탈지미강의 조성을 알아보기 위해 전당, 홀로셀룰로오스, 단백질,

수분, 회분의 함량을 측정하였다. 전당 측정은 염산 가수분해 후 페놀-황산법을 이용하여 시행하였고, 홀로셀룰로오스의 함량은 Pettersen[9]의 방법을 이용해 측정하였다. 단백질 함량은 Kjeldahl Protein/Nitrogen analyzer(Kjeltec Auto 1035/1038 System)를 이용해 측정하였고, 수분 및 회분은 각각 건조, 소성 후 무게 변화를 측정하여 계산하였다.

가수분해 생성물의 조성을 알아보기 위해서는 전당 및 당류의 함량, 총유기탄소(TOC), 총질소(TN), pH를 측정하였다. 전당 함량은 전술한 바와 같이 페놀-황산법을 이용하여 측정하였고, 각각의 당류의 함량은 HPLC(Agilent 1200 series)를 이용해 측정하였다. 분석 컬럼은 Shodex NH2P-50 4E(4.6×250 mm)를 사용하였고 검출기는 Refractive index detector를 사용하였다. TOC와 TN은 TOC/TN 분석기(Teledyne Tekmar, Apollo 9000)를 이용해 측정하였고, pH는 pH meter(HANNA Instruments, HI 9024)로 측정하였다.

*S. cerevisiae*의 성장 정도는 UV 흡광기(Evolution 201, Thermo Scientific)를 이용하여 660 nm 파장에서의 탁도를 측정하여 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 탈지미강의 조성

본 연구에 사용된 탈지미강의 조성을 분석한 결과, 전당 58.3%, 단백질 18.7%, 회분 14.5%, 수분 8.6%를 함유하고 있는 것으로 나타났다. 홀로셀룰로오스의 함량은 15.6%로 나타나 녹말 성분이 44% 정도인 것으로 추산된다.

3-2. 탈지미강의 가수분해

반응 온도 200~280 °C일 때 반응 시간에 따른 수용성 성분(WS) 수율의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 반응 온도가 200 °C일 때는 반응 시간이 지남에 따라 수율이 상승하는 경향을 보였지만, 반응 온도가 220 °C 이상이 되면 반응 시간에 따라 수율이 증가하다가 일정 시간 이후부터는 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한 반응 온도가 상승함에 따라 수율이 상승하다가 260 °C 이상이 되면 감소하는 경향도 확인할 수 있다. 이는 탈지미강 성분들이 반응 초기에는 분해되어 물에 녹는 화합물로 변화하지만, 온도가 너무 높거나 반응 시간이 길어질 경우에는 분해가 더 진행되어 기체 또는 물보다 비점이

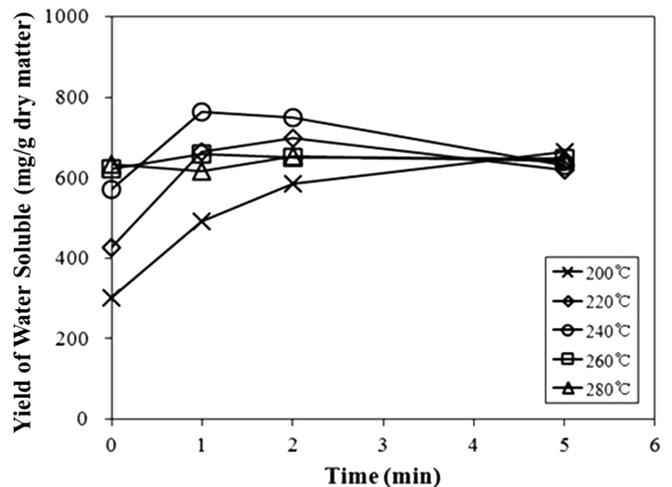


Fig. 1. Yield of water soluble at various temperatures.

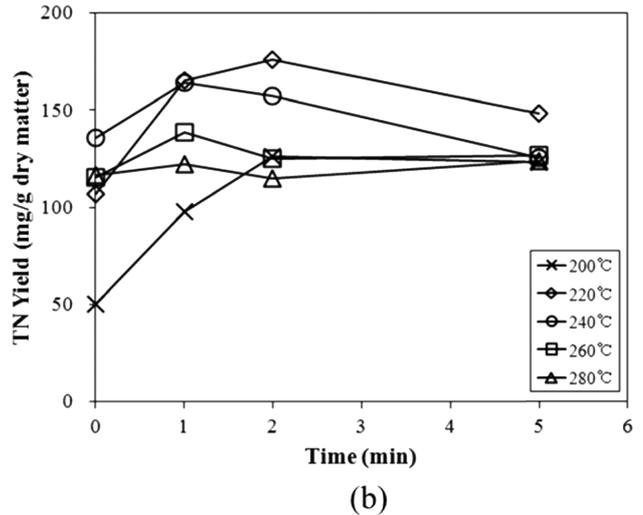
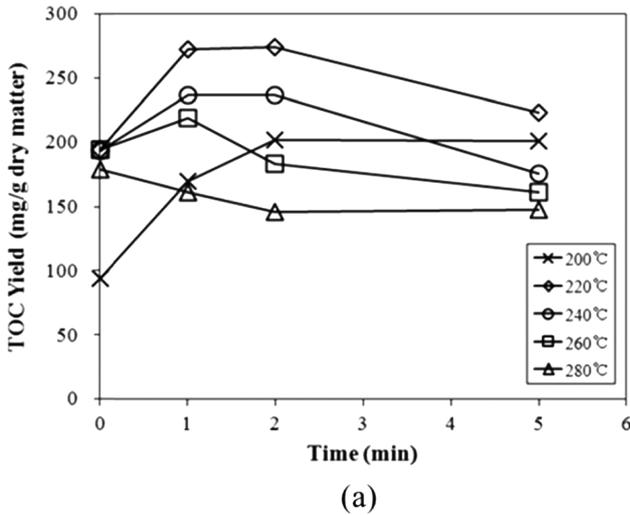


Fig. 2. Yield of TOC (a) and TN (b) at various temperatures.

낮은 물질로 변하여 반응 후 분리 과정에서 손실되었기 때문으로 추측할 수 있다.

Fig. 2에 반응 온도 및 반응 시간에 따른 TOC와 TN의 변화를 나타내었다. 앞서 보인 WS 수율의 변화와 마찬가지로 반응 온도 240°C까지는 수율이 상승하다가 그 이상의 온도에서는 감소하는 경향, 반응 시간이 길어지면 수율이 최고점을 보인 후 감소하는 경향을 보이고 있다. WS 수율과 비교했을 때 TOC는 약 30%, TN은 약 15% 내외의 수치를 보이는데, 탈지미강의 원 조성을 고려하면 질소의 함량이 다소 높게 나온 것이다.

Fig. 3에는 반응 온도 및 반응 시간에 따른 전당 수율의 변화를 보였다. 220°C 이하의 온도에서는 WS 수율, TOC, TN과 비슷한 경향을 보였으나, 240°C 이상에서는 반응 시간이 길어질수록 전당 수율이 크게 감소하였다. 이것은 탈지미강이 분해되어 생성된 당류가 240°C 이상의 높은 온도에 노출되면 더욱 분해가 진행되어 유기산으로 변화하기 때문으로, 이러한 현상은 앞선 다른 연구들에서도 보고된 바가 많다[5,6].

유기산의 생성 유무를 확인하기 위해 생성물 수용액의 pH를 측정 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 반응 온도가 높아질수록 pH가 낮아

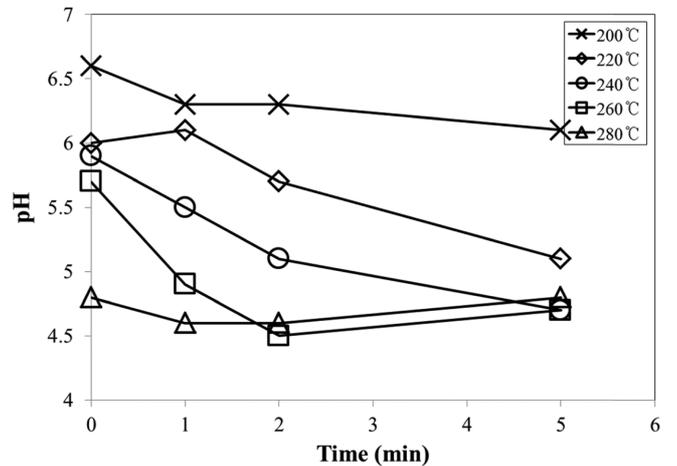


Fig. 4. Change of pH of water soluble at various temperatures.

지는 경향을 뚜렷이 확인할 수 있으며, Fig. 3에서 보인 전당 수율의 감소 경향과도 어느 정도 일치하는 것을 알 수 있었다. 따라서 전당 수율의 감소는 유기산 생성에 기인한다는 것이 타당한 추론이라는 것을 뒷받침할 수 있다.

반응 온도 및 반응 시간에 따른 이당류(맥아당(maltose), 자당 (sucrose))와 단당류(포도당(glucose), 과당(fructose))의 수율 변화를 Fig. 5와 Fig. 6에 나타내었다. 이당류의 경우 맥아당보다 자당의 함량이 훨씬 높게 나타났는데, 자당의 수율은 반응 초기에 크게 증가했다가 반응 시간이 1분 이상이 되면 대폭 감소하는 경향을 보였고, 맥아당도 비슷한 경향을 보였으나 감소폭이 좀더 완만하였다.

단당류의 경우 포도당과 과당 수율의 변화 경향이 거의 동일하였는데, 이것은 Fig. 5에 나타난 것처럼 자당(포도당+과당)의 양이 맥아당(포도당+포도당)의 양보다 월등히 많아 두 단당류의 수율이 자당의 분해 반응에 의해 대부분 결정되기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 두 단당류 모두 200°C에서는 반응 시간에 따라 수율이 계속 증가하였으나 220°C 이상에서는 반응 초기에만 수율이 증가했다가 반응 시간이 길어질수록 감소하는 경향을 보였다. 눈여겨볼 점은 220~240°C에서 포도당, 과당의 수율이 200°C에서보다 낮지만 Fig.

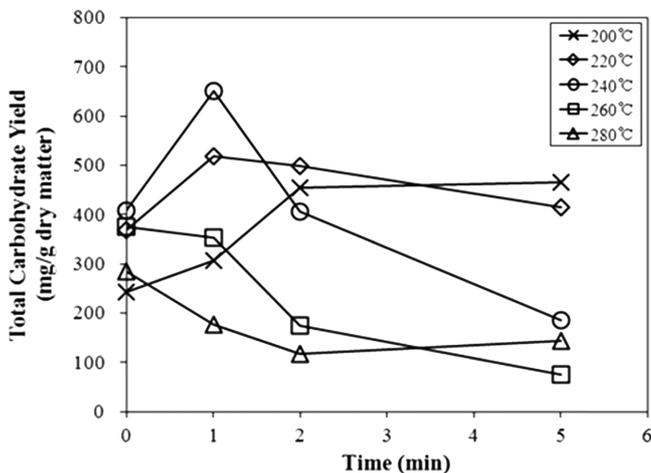


Fig. 3. Yield of total carbohydrate at various temperatures.

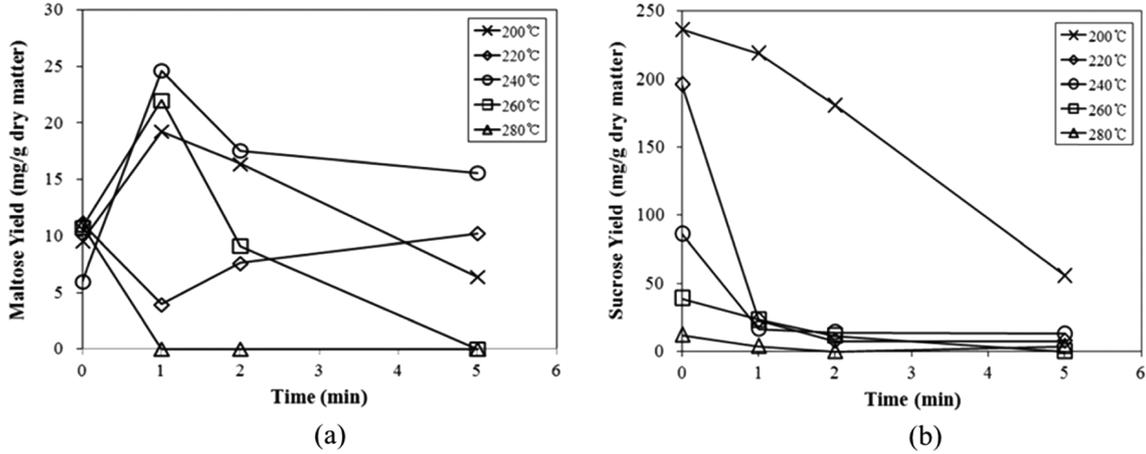


Fig. 5. Yield of (a) maltose and (b) sucrose at various temperatures.

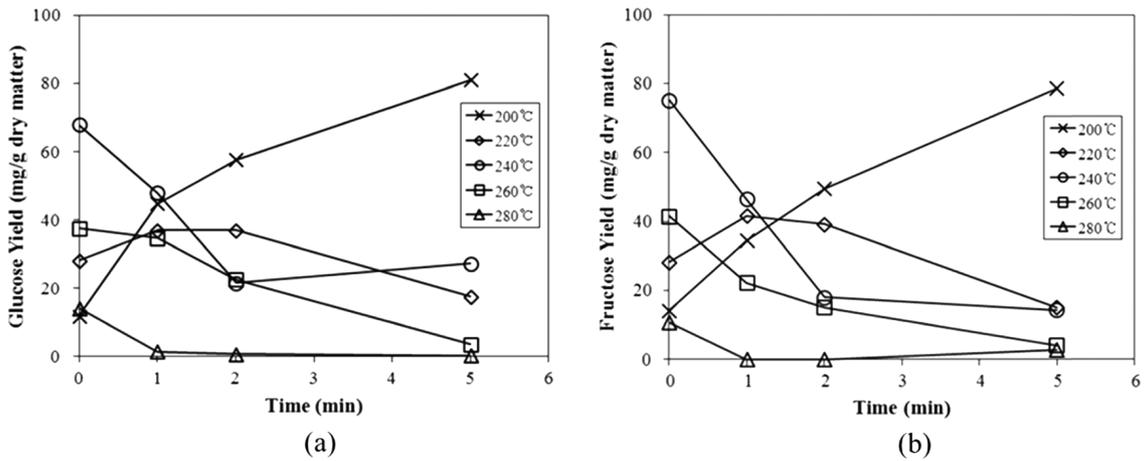


Fig. 6. Yield of (a) glucose and (b) fructose at various temperatures.

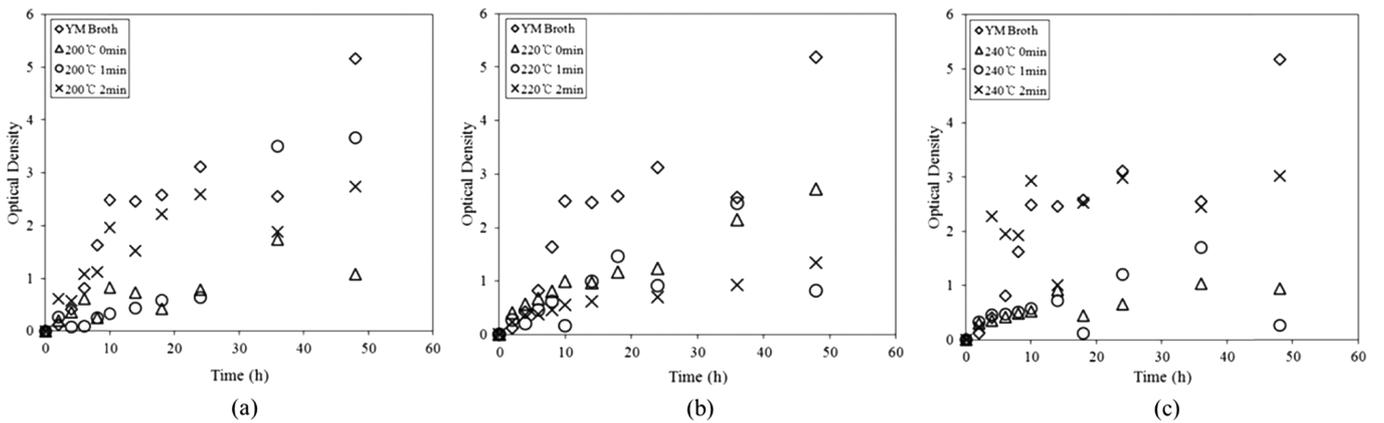


Fig. 7. The growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in the hydrolyzate obtained at (a) 200 °C, (b) 220 °C, and (c) 240 °C.

2에서 보듯이 전당의 수율은 더 높는데 이는 포도당, 과당 이외의 다른 당의 비중이 220~240°C에서 높다는 것을 의미한다. 이들 당은 녹말이 아닌 헤미셀룰로오스 성분에서 기인한 것으로 볼 수 있으며, 이를 통해 헤미셀룰로오스의 분해가 220 °C 이상에서 활발히 일어나기 시작한 것으로 추론할 수 있다.

이상의 결과들을 종합해보면, 반응 온도가 200 °C일 때는 녹말이 이당류나 단당류로 가수분해되는 반응이 주로 일어나고, 220 °C 이

상의 온도에서는 헤미셀룰로오스가 단당류로 분해되며, 260 °C 이상에서는 생성된 단당류가 유기산으로 변화하기 시작하는 것으로 추론할 수 있다.

3-3. 탈지미강 가수분해 생성물을 배지로 이용한 *Saccharomyces cerevisiae*의 배양

일반적으로 효모가 성장하기에 적당한 pH는 5~6 정도인 것으로

알려져있는데, Fig. 4의 결과를 보면 반응 온도 260 °C 이상에서 가수분해된 생성물은 pH가 5 이하이기 때문에 *S. cerevisiae*의 배양에 적합하지 않은 것으로 판단된다. 따라서 반응 온도 200~240 °C에서 얻어진 가수분해 생성물을 배지로 이용해 *S. cerevisiae*의 배양을 실시하였고 그 결과를 Fig. 7에 보였다.

200~220°C에서 얻어진 생성물을 이용한 배양에서는 포도당 수율의 변화와 대체로 일치하는 경향을 보였다. 즉, 포도당 수율이 가장 높았던 200 °C, 2분에서 *S. cerevisiae*의 성장 속도가 가장 높았고, YM broth 배지를 이용했을 때의 결과에 근접하는 수치를 보였다. 220 °C에서 얻은 생성물을 이용했을 때에는 대체로 저조한 성장 속도를 보였다. 특이한 점은 240 °C, 2분에서 얻은 생성물에서도 *S. cerevisiae*의 성장 속도가 높았다는 점이다. 이 경우 포도당의 수율은 낮았지만 전당 수율이나 TN이 높았다는 점이 성장에 도움을 줬을 것으로 추측할 수 있다.

4. 결 론

회분식 반응을 통해 아임계수에서 탈지미강의 가수분해를 수행하였고, 생성된 가수분해물을 배지로 이용하였을 때 *Saccharomyces cerevisiae*의 성장 양상을 관찰하였다. 탈지미강을 가수분해하여 높은 수율의 당을 얻을 수 있음을 확인하였고, 200 °C에서 가장 높은 포도당 및 과당 수율을 얻을 수 있었다. 전당 수율은 240 °C에서 가장 높았으며, 온도가 260 °C 이상으로 증가하면 당 수율이 감소하고 유기산이 생성되는 것을 확인하였다. 탈지미강의 가수분해로 얻은 생성물에서도 *Saccharomyces cerevisiae*의 성장 속도가 일정 반응 조건에서는 기존 상용 배지에 근접한 수준이 되는 것을 확인하였다. *Saccharomyces cerevisiae*의 성장 속도는 포도당 함량이 가장 큰 영향을 미치는 것으로 보이지만, 전당 함량이나 TN 등의 다른 요소도 복합적으로 작용하는 것으로 보인다. 본 연구를 통해 탈지미강의 가수

분해물이 미생물 배양용 배지로 활용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

References

1. Pourali, O., "Production of Valuable Materials from Rice Bran Biomass Using Subcritical Water," Ph. D. Dissertation, Osaka Prefecture University, Osaka, Japan(2010).
2. Saunders, R. M., "Rice Bran: Composition and Potential Food uses," *Food Rev. Int.*, **1**(3), 465-495(1985).
3. Woiciechowski, A. L., Nitsche, S., Pandey, A. and Soccol, C. R., "Acid and Enzymatic Hydrolysis to Recover Reducing Sugars From Cassava Bagasse: An Economic Study," *Braz. Arch. Biol. Techn.*, **45**(3), 393-400(2002).
4. Saha, B. C. and Cotta, M. A., "Ethanol Production from Alkaline Peroxide Pretreated Enzymatically Saccharified Wheat Straw," *Biotechnol. Prog.*, **22**, 449-453(2006).
5. Kim, T. H., "Sequential Hydrolysis of Hemicellulose and Lignin in Lignocellulosic Biomass by Two-stage Percolation Process Using Dilute Sulfuric Acid and Ammonium Hydroxide," *Korean J. Chem. Eng.*, **28**(11), 2156-2162(2011).
6. Kim, K. S. and Kim, J. S., "Characterization of Pretreatment for Barley straw by Alkaline Solutions," *Korean Chem. Eng. Res.*, **50**(1), 18-24(2012).
7. Toor, S. S., Rosendahl, L. and Rudolf, A., "Hydrothermal Liquefaction of Biomass: A Review of Subcritical Water Technologies," *Energy*, **36**, 2328-2342(2011).
8. Brunner, G., "Near Critical and Supercritical Water. Part I. Hydrolytic and Hydrothermal Processes," *J. Supercrit. Fluid*, **47**, 373-381(2009).
9. Pettersen, R. C., "The Chemical Composition of Wood," *Adv. Chem.*, **207**, 57-126(1984).