

農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究(第 3報)

알카리 전처리가 纖維素單細胞蛋白 生産에 미치는 영향

裴 武 · 金炳弘

韓國科學技術研究所 · 應用微生物研究室

Studies on the Microbial Utilization of Agricultural Wastes (Part 3)

Effects of Alkali Treatments of the Wastes on the Production of Cellulosic Single-Cell Protein

Moo Bae · Byung-Hong Kim

Applied Microbiology Lab., Korea Institute of Science and Technology Seoul, Korea

(Received April 25 1974)

ABSTRACT

Present experiments were designed to estimate the effects of pretreatments by various kinds of alkalis to the agricultural wastes such as cereal straws as the substrate on the production of cellulosic single-cell protein. Among the various kinds of alkalis NaOH was proved to be the most effective on improving the digestibility of cellulose by the bacteria isolated. NH_4OH which is inferior to NaOH in the effectiveness of treatment might have more economic advantage in the price, and the ammonium salt resulted from the neutralization can be used as the nitrogen source by bacteria. The treatment with higher concentration than 1 normality of NH_4OH didn't increase the productivity of cell mass. About five per cent of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in medium resulted from the neutralization didn't have any influence on the cell mass productivity. Furthermore, the cell mass productivity was higher in the case of neutralization than alkali free washing. The digestibility of straws was increased from 7.9% to 46.0% by NH_4OH treatment, and 6.3~6.45g of dry cell were obtained from 40g of NH_4OH treated straws. In the case of NaOH treatment, 8.6g of cell mass was obtained from 40g of substrate.

서 론

섬유소는 식물체 중에서 lignin 과 결합하여 lignocellulose 의 형태로 세포벽을 형성하고 있다. Lignin 은 polyphenol 의 중합체로 생물에 의해서 거의 분해를 받지않거나 분해속도가 대단히 늦어 섬유소와 이를 분해하는 cellulase 의 접촉을 방해하므로 천연상태의 식물체는 생물학적분해가 어렵다⁽¹⁾.

이러한 결점을 극복하여 초식동물의 사료로 사용하는 식물체의 장내세균에 의한 섬유소의 분해를 촉진하거나 식물체를 기질로 단세포단백을 생산할 때 섬유소의 이용을 높이기 위해 여러가지 전처리 방법이 고안되었다^(2~8)

이러한 방법 중 lignin 을 용해하여 제거하는 pulp 제조법의 일종인 Kraft 법과 NaOH 처리법이 가장 우수함이 여러 연구자들의 실험에서 볼 수 있다.

Kraft 법 혹은 NaOH 로 식물체를 일정한 시간

처리 후에 중성이 될 때까지 물로 세척해야 하므로 이 때 가용성 성분의 손실이 일어나며 세척에 많은 세척수가 필요하므로 비교적 고농도의 NaOH 용액을 분무하여 처리하고 유기산으로 중화하여 사료로 사용하고는 방법이 시도 되었다⁽⁸⁾.

이상의 방법은 NaOH로 처리할 경우 처리 비용이 높아 실제로 이용이 불가능하며 분무법으로는 처리 효과가 낮은 결점이 있다⁽⁹⁾.

본 연구에서는 농산폐자원을 기질로 전보⁽¹⁰⁾에서 분리 동정한 섬유소 소화세균을 배양하여 균체 단백을 생산하기 위해 기질을 암모니아 수로 처리하여 섬유소의 이용율을 높이는 한편 사용한 암모니아를 황산으로 중화하여 생성되는 암모늄 염을 질소원으로 사용하는 방법을 확립하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

전보에서 동정한 *Cellulomonas* 속 세균 5주와 *Sporocytophaga* 속 세균 1주를 공시균으로 사용하였다.

2. 사용 기질

경북 고령군 쌍림면 산 벚짚(아끼바종)과 경기도 파주군 조리면 산 밀짚 및 보릿짚을 기질로 사용하였다.

3. 기질의 전처리

Cutting mill로 분쇄하여 1mm screen을 통과시킨 기질 분말에 1꺺정 농도의 각종 알카리 10배 (v/w)을 가하여 실온에서 24시간 침지한 후 특별한 경우의에는 세척액이 중성이 될 때까지 세척하여 사용하였다.

이 때 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 는 1꺺정농도까지 녹지않으나 포화용액으로 처리하면 처리 도중 pH가 내려가므로 1꺺정농도에 해당하는 양을 사용하였다.

4. 섬유자화세균의 배양

전보⁽¹⁰⁾에서 사용한 보존용 배지에 사면배양한 공시균을 동일한 조성의 액체배지에서 30°C 3일간 진탕배양한 후 분리용 배지 중 여과지 대신 알카리 처리한 기질을 4% (w/v)가한 발효배지에서 30°C 5일간 진탕배양하였다.

암모니아 수를 황산으로 중화할 때는 NaCl과 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하지 않은 발효배지를 사용하였다.

5. 균체량 측정

기질로 사용한 벚짚 등 농산폐자원이 불용성이므로 균체량 측정의 일반적인 방법인 탁도법, 중

량법 등으로 이를 측정할 수 없으므로 Huang⁽¹¹⁾ 등의 방법으로 균체량을 측정하였다.

6. 기질 소비량 측정

Han⁽⁴⁾ 등의 방법으로 발효 후의 기질량을 측정하여 초기에 사용한 기질량과의 차에서 소비량을 계산하였다.

7. Lignin의 정량

TAPPI standard T 13m~54⁽¹²⁾의 방법으로 정량하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 각종 알카리 처리의 효과

각종 알카리로 처리한 벚짚과 대조구로 증류수에 침지한 벚짚의 lignin 및 회분 함량을 조사하고 (표 1) 이들을 기질로 분리균 *Cellulomonas fimi* KIST 124와 *C. aurogena* nov. species KIST 11을 배양하여 생성된 균체량 및 기질소비량을 각각 조사하였다. (표 2)

Table 1. Ash and Lignin Contents of Rice Straws Treated with Various Kinds of Alkalis.

Alkali	Lignin	Ash
Control	13.2%	9.6%
NaOH	1.1	3.2
NH_4OH	10.3	7.1
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	7.7	6.8
NaHCO_3	9.1	7.0
Na_2CO_3	11.9	8.4

concentration of alkalis; 1N'

표 1에서 보는 바와 같이 강 알카리인 NaOH는 섬유소의 효소학적 분해를 방해하는 lignin 및 회분을 각각 92.7%, 66.7%를 제거하였으며 NH_4OH , $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 및 NaHCO_3 는 30~40%의 lignin과 25~30%의 회분을 제거하였다. Na_2CO_3 는 lignin과 회분의 제거량이 가장 낮았다.

한편 균체생성량 및 기질소비량도 lignin 및 회분 제거량과 거의 비례하는 것으로 나타났다. (표 2)

이상의 결과에서 벚짚 등 농산폐자원을 기질로 세균단백을 생산할 때 NaOH로 처리하는 것이 가장 효과적인 것으로 나타 났으나 용액 1ℓ를 만드는 데 NH_4OH 가 0.60원인데 비해 NaOH는 7.33원으로 NaOH는 비경제적이며 (74.5.11. 매일경제신문 3면 가격참조) NH_4OH 는 다른 알카리와 달

Table 2. Cell Mass Productibility from Rice Straw Treated with Various Kind of Alkalies.

Alkali	<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11		<i>C. fimi</i> KIST 124	
	Substrate consumed	Cell mass produced	Substrate consumed	Cell mass produced
Control	0.4%	1.32g/l	7.9%	2.35g/l
NaOH	42.3	8.60	25.6	6.27
NH ₄ OH	29.2	5.94	19.1	4.34
Ca(OH) ₂	29.2	5.87	15.1	4.28
NaHCO ₃	28.7	5.43	13.9	3.71
Na ₂ CO ₃	22.5	5.56	15.2	4.18

리 처리 후 중화하여 질소원으로 사용할 수 있어 세척으로 유실되는 가용성 성분을 이용할 수 있는 잇점이 있어 전처리에 관한 한 NH₄OH 을 사용하는 것이 가장 적당하므로 이에 대한 실험을 계속 하였다.

2. NH₄OH 의 농도 및 처리 온도의 영향

1. 3. 5. 규정농도의 암모니아수로 실온 및 80°C

Table 3. Effects of Ammonium Hydroxide Concentration and Temperature on the Pretreatment of Rice Straw.

Temperature	Concentration of NH ₄ OH(N)	<i>C. fimi</i> KIST 124	<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11	<i>C. flavigena</i> KIST 321	<i>C. flavigena</i> KIST 31
Room Temp.	Control	2.15g/l*	2.65g/l	2.45g/l	1.20g/l
	1	5.70	5.45	5.70	5.00
	3	6.10	5.60	5.80	6.40
80°C	5	6.55	6.75	6.15	7.25
	1	6.30	6.30	5.95	6.65
	3	5.85	5.00	5.40	4.80
	5	5.10	5.60	5.25	4.15

*The effects were measured by the cell mass produced.

Table 4. Effects of Neutralization of Ammonium Hydroxide with Sulfuric Acid after Pretreatment of Straws on the Production of Cellulosic SCP.

Substrate	Washed with H ₂ O		Neutralized with H ₂ SO ₄	
	<i>C. flavigena</i> KIST 321	<i>C. aurogena</i> vno. species KIST 11	<i>C. flavigena</i> KIST 321	<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11
Rice straw	5.10g/l	4.75g/l	6.35g/l	6.35g/l
Barley straw	4.90	4.70	6.10	6.35
Wheat straw	5.75	5.20	6.45	6.15

및 균주에 관계 없이 황산으로 중화한 것에서 세척한 것보다 많은 균체를 생산하였다. 이는 암모니아 수의 중화로 생성된 5.3%의 (NH₄)₂SO₄ 에 의해서 분리한 섬유소자화세균은 생육에 저해를 받

에서 처리한 볏짚을 기질로 분리균 *Cellulomonas fimi* KIST 124, *C. aurogena* nov species KIST 11, *C. flavigena* KIST 321 및 *C. flavigena* KIST 31 을 배양하여 균체생성량을 측정하여 표 3 의 결과를 얻었다.

실온에서 처리할 경우 높은 농도의 암모니아 수로 처리한 볏짚에서 약간 많은 균체를 얻었으나 큰 차이를 보이지 않으며 80°C 로 처리한 경우는 농도가 낮을 수록 좋은 효과가 있음을 알수 있다.

3. NH₄OH 의 중화에 따른 효과

볏짚, 보릿짚 및 밀짚을 1 규정농도의 암모니아 수로 처리하고 1 규정농도의 황산으로 중화하였다. 중화한 후 NaCl 및 (NH₄)₂SO₄ 를 제한 배지 성분을 녹이고 물을 가하여 기질 농도가 4% 되도록 만든 배지에서 분리균 *Cellulomonas aurogena* nov. species KIST 11 및 *C. flavigena* KIST 321 을 배양하여 생성된 균체량을 암모니아수 처리 후 세척한 기질로 배양했을 때와 비교하였다.

표 4에서 보는 바와 같이 사용한 기질의 종류

지 않으며 알카리 처리후 세척으로 유실되는 유기물을 이용할 수 있음을 알 수 있다.

4. NH₄OH 로 처리한 볏짚을 기질로 한 섬유자화세균의 선별

분리 동정한 6주의 세균 중에서 암모니아수로 처리한 볏짚을 기질로 균체 단백을 생산할 때 가장 우수한 균을 선별하기 위해 6주의 세균을 배양한 결과 분리균 *C. aurogena* nov. species KIST 11과 *C. flavigena* KIST 321 이 가장 우수하였다. (표5) 이들은 40g의 기질 중 18g을 자화하여 6.3~6.45g의 균체를 생산하였다.

Table 5. Cell Productibility and Assimilation Rate of Rice Straw Treated with NH_4OH .

Strain	Cell mass(g/l)	Assimilation Rate (%)
<i>C. flmi</i> KIST 124	5.70	36.7
<i>C. aurgena</i> nov. species KIST 11	6.45	45.5
<i>C. flavigena</i> KIST 321	6.30	46.0
<i>C. flovigena</i> KIST 322	6.30	45.5
<i>C. gelida</i> KIST 12	3.70	33.6
<i>S. ellipospora</i> KIST 56	4.05	30.5

요 약

볏짚 등 농산폐자원을 섬유소자화세균의 기질로 사용하여 섬유소단세포단백을 생산할 때 섬유소의 분해성을 높이기 위해 각종 알칼리에 의한 전처리의 효과를 살펴 본 결과 NaOH가 가장 좋은 전체 처리제 이었으며 NH_4OH 는 NaOH보다 처리 효과는 낮으나 염가로 구입할 수 있고 처리 후 중화하여 미생물의 질소원으로 사용할 수 있어 경제적인 처리제로 나타났다.

NH_4OH 를 처리제로 사용할 경우 1규정 농도 이상의 용액으로 처리하거나 가열하여도 처리 효과가 증가하지않았다. 1규정농도의 NH_4OH 로 처리한 후 황산으로 중화하여 생성된 5.3%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 분리한 *Cellulomonas* 속 세균의 생육을 저해하지않았으며 세척으로 유실되는 유기물이 이용되는 것으로 나타났다.

1규정농도의 NH_4OH 로 처리한 볏짚의 분리균

Cellulomonas aurogena 및 *C. flavigena*에 의한 분해율은 기질농도 4%일 때 46%이었으며 이때 6.3~6.45g/l의 균체를 생산하였다.

참 고 문 헌

- Day, W. C., M. J. Pelczar and S. Gottlieb: *Arch. Biochem.* **23** 360 (1949).
- Chandra, S. and M. G. Jackson: *J. Agric. Sci.* **77** 5 (1971).
- Millet, M. A., A. J. Baker, W. C. Feist, R. W. Mellenberger and L. D. Satter: *J. Ani. Sci.* **31** 781 (1970).
- Han, Y. W. and V. R. Srinivasan: *Appl. Microbiol.* **16** 1140 (1968).
- Han, Y. W. and C. D. Callihan: *Appl. Microbiol.* **27** 159 (1974)
- Dekker, F. H. and G. N. Richards: *J. Sci. Fd. Agric.* **24** 375 (1973).
- Mellengerger, R. W., L. D. Satter, M. A. Millet and A. J. Baker: *J. Ani. Sci.* **32** 756 (1971).
- Donefer, E., I. O. A. Adelefe and T. A. O. C. Jones: *Adv. Chem. Ser. No. 95* "Cellulases and their Applications". (ed. R. F. Gould), Amer. Chem. Soc. Washington D. C. p. 328 (1949).
- Greenhelph, J. F. D., J. F. Carmona and E. A. Mehmed: *J. Sci. Fd. Agric.* **24** 494 (1973).
- M. Bae and B. H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **2** 1 (1974).
- Huang, T. L., Y. W. Han and C. D. Callihan: *J. Ferment. Technol.* (Japan) **49** 574 (1971).
- Technical Association of Pulp and Paper Industry: TAPPI Standard Method, New York (1961).