

酵母生産에 관한 研究(第一報)

고구마澱粉粕 酸糖化液을 利用한 酵母生産

梁漢喆, 崔瑢鎭, 成河珍

高麗大學校 農科大學 食品工學科

Studies on the Production of Yeast. (Part 1) Yeast Production from the Hydrolyzate of Sweet Potato Starch Cake as a Carbon Source

Han-Chul Yang, Yong-Jin Choi, Ha-Chin Sung

(Received May 8, 1974)

Abstract

Studies on the optimum conditions of acid hydrolysis of sweet potato starch cake and its utilization on the production of *Saccharomyces cerevisiae* as a carbon source were conducted and the results showed as follows:

1. The highest hydrolysis rate, 62.7% of the reducing sugar based on the weight of the dry matter, was obtained when the starch cake was hydrolyzed with 1.0% of hydrochloric acid at 2.0 kg/cm² for 30 minutes.
2. But the yeast grew most favorably on the hydrolyzate obtained by treating the starch cake with 0.5% of hydrochloric acid at 2.0 kg/cm² for 10 minutes. Reducing sugar content of hydrolyzate was 51.4%.
3. The optimum pH of the culture medium was 7.0, Cell growth reached to the maximum at 36 hours of cultivation time.
4. According to the vitamin requirement tests, Ca-pantothenate was found to be a promoting factor for the growth of the yeast cells.
5. "Gluten acid hydrolyzate" was most effective to the cell growth when added to the medium at the concentration of 0.1% as a nitrogen source.
6. *Sacch. cerevisiae* could assimilate the sugars in the hydrolyzate about 89.1%, and the yields of the yeast cells showed 23.2mg/ml of culture medium.

1. 緒 論

酵母生産의 基質로서 林産廢資源의 利用에 關해
서는 오래전부터 많은 研究¹⁻³⁾가 있었고 現在外國
에서는 完全工業化 되어있는 實情이며 農産廢資源

에 關해서도 食糧開發策의 일환으로 最近各國에서
活潑한 研究가 進行되고 있다, Dawson, P. R.,⁴⁾
들은 高구마 澱粉廢液으로부터, Reiser, C. O.,⁵⁾
Weaver, E. A.⁶⁾들은 감자 澱粉廢液, Veldhuis,
M. K.,⁷⁾ Ramage, E. A.⁸⁾들은 果實, Klatt, T.
J.,⁹⁾들은 땅콩加工廢液, Porges, N.,¹⁰⁾들은 낙농

廢液을 利用하였으며 高田¹¹⁾ 및 襄¹²⁾ 등은 芡의 黃酸糖化液을 炭素源으로, 酵母生産에 關한 研究를 報告하고 있다. 또한 室田^{13,14)} 등은 澱粉質 原料의 酸糖化液을 使用한 酵母生産에서 酸糖化 처리는 酵母증식에 필요한 營養源을 파괴하게 되어 酵母生産의 收量이 감소된다고 報告하였다.

現在國內에서 年間 約 3萬屯가량 生産되는 高구마澱粉의 副産物로서 3,000~4,000屯에 달하는 澱粉粕이 대부분 폐기되거나 그 일부가 發酵사로 製造時 基質로 使用되고 있을뿐임으로 本研究에서는 酵母生産의 炭素源으로 高구마澱粉粕의 利用가능에 對한 기초研究로 澱粉粕의 酸糖化條件과 炭素源으로 澱粉粕酸加水分解物을 利用 했을때의 培養條件 및 使用菌株의 營養要求性에 關하여 檢討하였다.

II. 實驗方法

1. 實驗材料

試料인 風乾 高구마澱粉粕은 全北 井邑 所在 芡 物産 의 것을 使用하였으며 그 一般成分은 Table 1과 같았다.

Table 1 General Composition of Sweet Potato Starch Cake.

Moisture	10.88%
Crude Protein	0.93%
Crude Fat	1.91%
Crude Fiber	13.85%
Nitrogen-free ex.	67.45%
Ash	4.98%

2. 澱粉粕의 一般成分 分析.

水分, 灰分, 粗脂肪, 粗纖維 등은 常法¹⁵⁾에 따라 定量하였으며 粗蛋白質은 Kjeldahl法¹⁶⁾으로 定量하였다.

3. 酸糖化

加水分解劑로 鹽酸과 黃酸을 各各 濃度別로 澱粉粕에 10倍(w/v)加하고 Autoclave에서 壓力 및 時間別로 加水分解시켰다.

4. 糖化率 測定

芨過, 中和한 糖化液 一定量을 取하여 Bertland法으로 還元糖을 定量한 다음 Glucose量으로 換算하여 原料에 對한 重量比를 %로 나타내었다.

5. 使用菌株 및 基本培地組成

高麗大學校 食品工學科 保存 *Saccharomyces cerevisiae*를 試驗菌株로 使用하였으며 培養基本培地組成은 Table 2와 같으며 完全培地組成은 基本培地에 Table 3에 表示된 Vitamin을 첨가한것이다.

Table 2 Composition of Basal Medium.

(NH ₄) ₂ SO ₄	4.7g
Casamino acid	5.0g
Inorganic salts;	
KH ₂ PO ₄	0.55g
KCl	0.425g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.125g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.125g
FeCl ₃	0.0025g
MnSO ₄	0.0025g
Buffer;	
Potassium citrate	5.0g
Citric acid	1.0g
Hydrolyzate*	1000ml
pH	7.0

* Concentration of Reducing Sugar 51.4%.

Table 3 Composition of Vitamin Mixture.

Thiamine	500 γ
Riboflavin	500 γ
Pyridoxine	500 γ
Biotin	5 γ
Ca-pantothenate	500 γ
Nicotinic acid	500 γ
p-Aminobenzoic acid	50 γ
Folic acid	5 γ
Inositol	25000 γ

* In 100ml of the Basal Medium

6. 接 種

保存菌을 malt-ex. 寒天斜面培地에 30°C, 24時間 培養한것을 種菌으로 使用하였으며 Vitamin要求性的 檢討時는 菌體 一白金耳를 殺菌生理食鹽水로 無菌의으로 三回洗滌한後 10ml의 無菌水에 懸탁하여 10⁶/ml 정도의 菌濃度로 接種하였다.

7. 培養方法 및 菌體增殖量測定

基本培地 50ml을 500ml 진탕培養 flask에 分注, 120°C에서 5分間 加壓殺菌後 菌體를 接種하고 30°C에서 48時間진탕 培養(120 r. p. m. 진폭 7cm)

하였다. 菌體增殖量은 610 m μ 에서의 Optical density로 表示하였다.

8. 乾燥菌體量

培養液을 3,000r. p. m.으로 10分間 遠心分離하여 分離한 菌體를 生理食鹽水로 2回, 無菌水로 1回 洗滌하고 105°C에서 3時間 乾燥秤量하여 乾燥菌體量으로 하였다.

III. 結果 및 考察

1. 糖化條件의 檢討.

加水分解劑로 鹽酸 및 黃酸을 使用해서 高구마澱粉粕을 糖化하여 Table 4와 같은 結果를 얻었으며 糖化率은 1%의 鹽酸으로 2.0kg/cm²의 壓力下에서 30分間 加水分解한 것이 糖化率 62.7%로 가

Table 4 Effect of the Variety of Acids and their Concentration, Pressure, and Time on the Hydrolysis of Sweet Potato Starch Cake.

Acids	Acid conc. (%)	1.0			1.5			2.0			2.5		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
HCl	0.1												15.5
	0.3		14.3	32.2		28.7	41.6	42.4	52.0	58.1	57.7	60.0	56.5
	0.5		27.9	41.4	39.6	41.3	46.6	51.4	57.3	61.1	60.2	60.1	59.1
	0.8	33.1	35.1	53.9	43.6	43.5	58.8	57.8	61.1	61.6	61.1	60.2	59.1
	1.0	39.8	44.1	54.2	56.2	59.5	60.4	60.7	62.6	62.7	61.5	60.4	57.1
H ₂ SO ₄	0.1												
	0.3			10.8			16.1		14.3	18.2	15.0	21.4	28.6
	0.5			25.3		22.1	25.0	20.8	25.6	39.3	29.1	44.5	49.0
	0.8		20.0	32.2	31.2	32.8	45.5	40.7	41.8	54.3	55.1	58.8	60.2
	1.0		21.7	35.0	41.4	43.2	51.1	45.4	47.8	58.9	57.1	56.4	56.3

Hydrolysis rate (%)
Solid Liquid ratio of 1/10

장높았으며 이보다높은 酸濃度 및 壓力條件에서는 生成된 還元糖이 再次 酸化分解¹⁷⁾하여 糖化率이 低下되는 것으로 생각된다. 高田¹¹⁾ 등은 木材나, 볏짚의 糖化에는 黃酸이 鹽酸에 比하여 더욱 効果的이라고 하였으나 本實驗에서는 같은 糖化條件下에서는 鹽酸이 黃酸에 比해보다 効果的이었다.

Table 5 Effect of Acid-Hydrolysis Conditions on the Growth of *Saccharomyces cerevisiae*.

Concentration of HCl (%)	Hydrolysis Time (min)		
	10	20	30
0.3	* 0.41	0.30	0.30
0.5	0.46	0.36	0.33
0.8	0.31	0.29	0.25
1.0	0.29	0.27	0.19

Hydrolyzed under 2.0kg/cm² Pressure.

*O. D. at 610m μ (after 48hrs incubation at 30°C with reciprocal shaking.)

2. 培養條件의 檢討

1) 炭素源으로서의 糖化液 選定

糖化率이 가장良好한 壓力條件 즉 2.0kg/cm²의 壓力下에서 酸濃度 및 加水分解時間을 달리한 各條件에서 얻어진 糖化液 50ml에 無機鹽을 添加하고 殺菌接種하여 30°C, 48時間 진탕培養한다음 菌體 增殖度를 調査하여본 結果 (Table 5,) 1.5%의 鹽酸濃度에서 10分間 加水分解한 糖化液을 使用하였을때 菌體增殖이 가장 良好하였다. Dudkin¹⁸⁾ 등은 酸糖化時 一般적으로 Pentose는 보다 쉽게 酸化分解되기 때문에 一定條件이상의 加水分解反應에서는 Hexose 量은 增加하나 Pentose의 量은 減少한다고 하였다. 또한 Machevitstaya¹⁹⁾는 糖化中の 酸化生成物인 furfural, formic acid 등은 微生物의 生育抑制效果를 나타낸다고 報告하고있어 上記 最適條件보다 높은 壓力 및 酸濃度에서 糖化率은 높음에反해 菌體增殖效果는 減少하는 것으로 생각된다.

2) 最適 pH 檢討

Initial pH를 各各 別리한培地에 試驗菌을 接種, 30°C, 48時間 진탕培養하여 菌의 生育度를 檢討한 結果는 Figure 1과 같이 Initial pH 7.0 일때 가

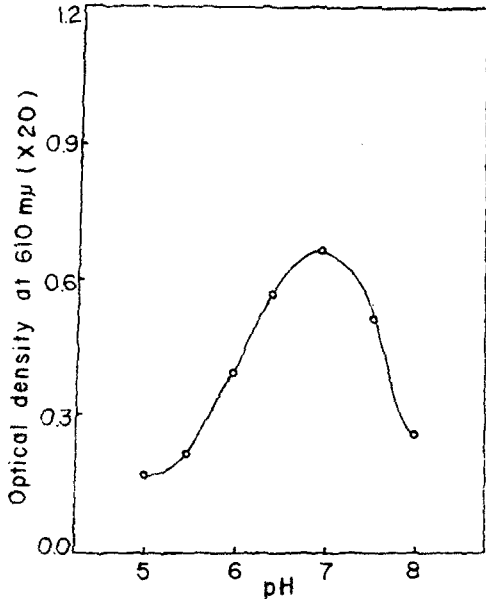


Fig. 1. Effect of initial pH on the cell growth

장 良好한 增殖效果를 나타내고있으며 이는 N-源으로 加한 Ammonium sulfate에 의한 培養中の pH 低下에 原因이있는것으로 생각된다.

3) 培養時間과 菌增殖과의 關係

Table 2와같은 組成의 基本培地 250ml을 120°C에서 5分間 加壓殺菌後 接種하고 30°C에서 72時間 진탕培養하여 培養時間의 經過에따른 菌體增殖量, 殘糖및 pH變化를 調査한結果(Fig. 2 참조) 菌體增殖은 36時間 前後에서 最高에 達하였으며 菌體에 의한 糖消費는 培養後 12時間 사이에서 가장 顯著하였고 pH역시 이期間에 顯저한 低下를 나타내었다.

4) Vitamin 要求性檢討

糖化液에 窒素源으로 casein hydrolysate와 Ammonium sulfate를 窒素로서 各各 0.1% 添加하고 Table 3과 같은組成의 Vitamin을 單獨添加 또는 完全培地에서 各Vitamin 一種씩을 除去한 Vitamin 缺乏培地에 試驗菌을 接種, 30°C, 36時間 培養하여 Vitamin 要求性を 檢討한結果 (Fig. 3, 4 참조) Casein hydrolysate를 窒素源으로 添加한경우 Ca-pantothenate는 菌增殖에 必須의 效果를 보이고 있으며 Pyridoxine은 添加效果는 뚜렷하지 않으나

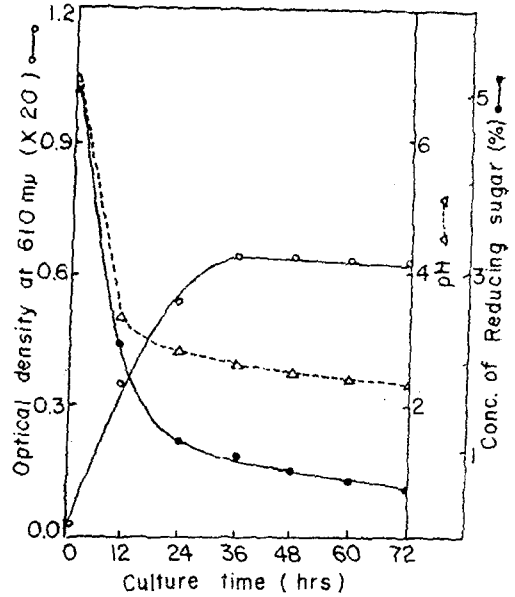


Fig. 2. Cell growth, Residual sugar and change of pH during the cultivation

除去時에는 菌增殖의 多少低下를 하였다. 酵母生産에 있어서 上記와 같은 Ca-pantothenate 要求性은 鈴木^{20,21)}, 小口²²⁾ 등의 研究結果와 잘一致되고 있다. 또한 Ammonium sulfate를 窒素源으로 使用時에도 Casein hydrolysate 경우와 비슷한 Vit-

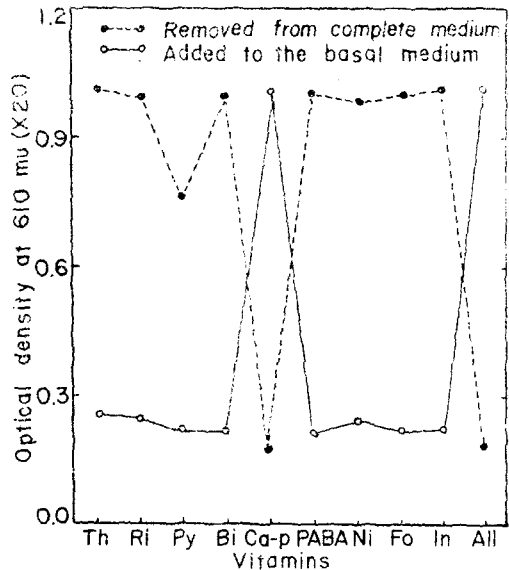


Fig. 3. Growth of *Sac. cerevisiae* in response to various vitamins in the Basal medium supplemented with casein amino acid as nitrogen source

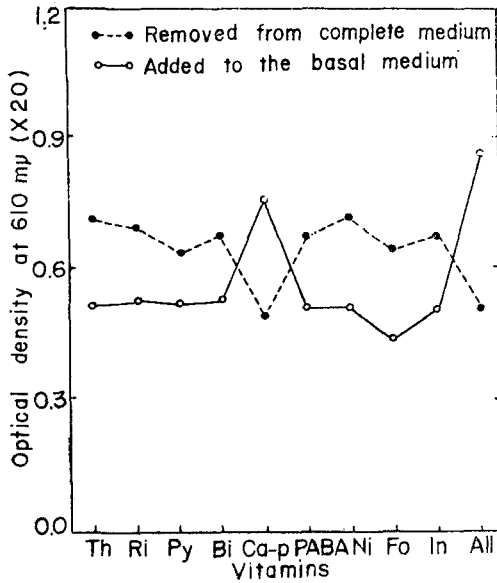


Fig. 4. Growth of *Sac. cerevisiae* in response to various vitamins in the Basal medium supplemented with ammonium sulfate as nitrogen source

amin 要求性を 보이고 있으나 一般的으로 Vitamin 에 對한 要求性は 훨씬 낮았다. 高橋^{23,24} 등에 依하면 N-源으로서 Casein hydrolysate 를 使用한 경우 Ca-pantothenate 의 현저한 發育促進效果는 L-Histidine 등과 같은 等定 Amino acid 에 依한 酵母 生育阻害에 對하여 Ca-pantothenate 가 회복 效果 를 나타내기 때문이라고 한다. 한편 酵母增殖에 있어서 가장 현저한 要求性を 나타내고 있는 Ca-pantothenate 의 添加濃度에 따른 菌體增殖效果는 Fig. 5 와 같았으며 Casein hydrolysate 의 경우는 0.4 μg/ml, Ammonium sulfate 경우에는 0.6 μg/ml 濃度前後에서 가장 效果의 이었다.

5) 各種窒素源의 增殖效果

0.5 μg/ml 의 Ca-pantothenate 를 添加한 基本培地에 窒素源으로 (NH₄)₂SO₄, CO(NH₂)₂, 味液, Casein hydrolysate 및 corn steep liquor 등을 窒素源으로서 0.1%씩 添加하고 30°C, 36時間 培養하여 N-源에 따른 酵母增殖效果를 檢討해본 結果 味液 이 가장 良好한 結果를 보였다. (Table 6,) 한편 味液의 添加濃度에 따른 增殖效果는 Fig. 6 과 같 으며 0.1% 濃度에서 가장 良好한 結果를 보였다.

6) 菌體 增殖量

Ca-pantothenate 0.5 μg/ml 및 N-源으로 味液을

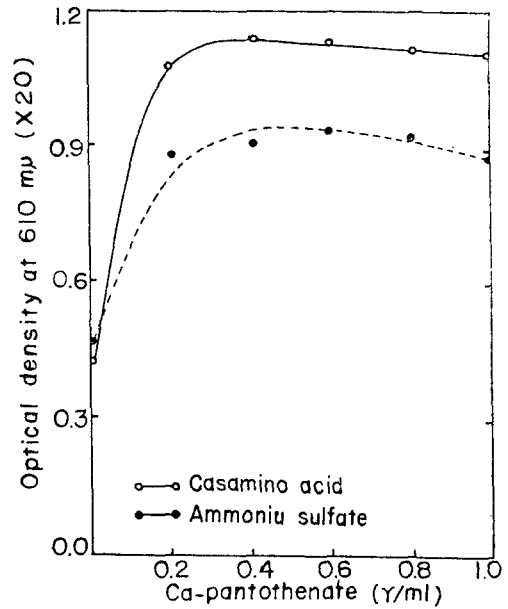


Fig. 5. Effect of Ca-pantotheate concentration on the cell growth

窒素源으로서 0.1% 添加한 基本培地 50ml 을 加壓殺菌(120°C, 5分)하고 試驗菌을 接種, 30°C 에서 36時間 培養, 同一條件에서 炭素源으로 糖化液對身 糖蜜, Glucose 를 使用하여 培養하였을 때의 菌體生産量을 比較檢討한 結果는 Table 7 과 같다.

Table 6 Effect of Nitrogen Sources on the Cell Growth.

Nitrogen Source	Cell Growth*
Ammonium sulfate	0.758
Urea	0.672
Gluten Acid-Hydrolyzate	1.170
Corn Steep Liquor	0.440
Casamino Acid	1.060

* O. D. at 610mμ

Nitrogen Sources were added to the Basal Medium at Concentration of 0.1% as Nitrogen.

炭素源으로 糖蜜 및 Glucose 를 使用時는 糖化液에 比해 酵母增殖에 따른 糖消費率은 높으나 對糖收率은 낮아 Glucose 의 경우 酵母生産量이 14.6mg/ml, 糖蜜의 경우 20.4mg/ml, 인데 反해 糖化液은 23.2mg/ml 로서 보다 良好한 結果를 보였다.

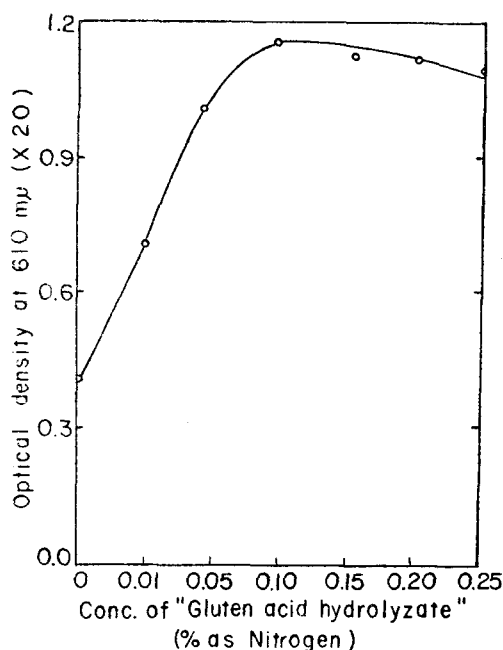


Fig. 6. Effect of "Gluten acid hydrolyzate" concentration on the cell growth

IV. 要 約

1. 코구마 澱粉粕의 酸糖化條件을 檢討하여본 結果 加水分解劑로는 鹽酸이 黃酸보다 效果의이였으며 鹽酸濃度 1%, 壓力 2.0kg/cm²에서 30分間 加水分解시켰을때 糖化率이 62.7%로서 가장 높았다.

2. 供試菌인 *S. cerevisiae* 培養의 最適糖化液으로는 鹽酸濃度 0.5%, 2.0kg/cm²의 壓力으로 10分間 糖化한 것으로서 이때 糖化率은 51.4%였다.

3. 試驗菌株의 增殖에 있어서 培地의 最適 Initial pH는 7.0이였으며 36時間 前後의 培養時間에

Table 7 Cell Yields of *Saccharomyces cerevisiae*.

Carbon sources	Reducing sugar concentration (%)	Sugar utilized/Total sugar (%)	Cell weight/Sugar (%)	Dry weight/1 ml/Broth (mg)
Sweet potato starch cake acid-hydrolyzate	5.1	39.1	50.1	23.2
Glucose	5.1	97.6	30.3	14.6
Molasses	5.1	92.1	43.4	20.4

서 菌體增殖이 最高에 達하였다.

4. 試驗菌株의 Vitamin 要求性を 檢討한 結果 Ca-pantothenate 만을 特異적으로 要求하였으며 有機態窒素源을 添加하였을때 더욱 현저한 要求性を 나타내었다.

5. N-源으로 味液을 窒素로서 0.1%添加하였을때 菌體增殖이 가장良好하였다.

6. 炭素源으로 糖化液을 使用하여 消費糖의 50.1%에 相當하는 23.2mg/ml의 菌體를 얻었음에 비해 Glucose 使用時는 14.6mg/ml, 糖蜜의 경우 20.4mg/ml의 菌體를 얻었다.

REFERENCES

- 1) 中村靜, 市野一磨; 釀酵工, 26. 1. (1948)
- 2) 岩田芳; 釀酵工, 28. 1. (1950)
- 3) 中村靜, 市野一磨; 釀酵工, 26. 3. (1948)
- 4) Dawson, P. R., Greathouse, L. H., and Gordon, W. O.; Yearbook of Agriculture, 199-200, Washington D. C., U. S. Government Printing Office. (1950-1951)
- 5) Reiser, C. O.; J. Agr. Food. Chem. 2. 70. (1954)
- 6) Weaver, E. A., Heisler E. G., Porges, N., McClennan, M. S., Tready, R. H., Howerton, W. W., and Cordon T. C.; U. S. Dept. Agr. Bur. Agr. Ind. Chem., Eastern Regional Research Lab., AIC-350 (1953)
- 7) Veldhuis, M. K.; Proc. First Natl. Public Health Engr. Conf., p. 24, Univ. of Florida, May 1952.
- 8) Ramage, W. D., and Thompson, J. H.; Yeast Symposium Sponsored by Quartermaster Food and Container Institute, Milwaukee, Wis., Nov. 8, 1948.
- 9) Klatt, T. J., Parker, E. D., Pomes, A. F. and Porges, N.; Oil and Soap. 22. 319. (1945)
- 10) Porges, N., Pepinsky, J. B., and Jasewicz, L.; J. Dairy Sci., 34. 615. (1951)
- 11) 高田亮平, 佐佐木博介; 日釀學誌, 20. 118 (1942)
- 12) M. Bae, B. H. Kim, and A. S. Yoon.; Korean J. Appld. Microbial. Bioeng. 1. 1. (1973)

- 13) 室田, 猿野, 阿野.; 醸酵工. 30. 4. (1952)
- 14) 室田, 猿野, 阿野.; 醸酵工. 30. 2. (1952)
- 15) 東京大學 農學部 農藝化學教室編.; 實驗農藝化學. 上卷. 112. (1967)
- 16) Association of Official Analytical Chemists 1970. Methods of Analysis of A. O. A. C. 11th. Ed. Association of Official Agricultural Chemists. Washing. ton. D. C.
- 17) 二國二郎.; 澱粉 Hand Book. 朝倉書店 p. 535 (1961)
- 18) Dudkin, M. S., N. G. Shikantova, N. S. N. S. Skomyakova and N. A. Leme.; Chem. Ab. 59. 8960h (1962)
- 19) Machevitstaya, S. G.; Chem. Ab. 33. 3517 (1938)
- 20) Yahiko Suzuki.; J. Agr. Chem. Soc. 35. 7. (1961)
- 21) Yahiko Suzuki.; J. Agr. Chem. Soc. 35. 7. (1961)
- 22) Tatsuro Yamaguchi.; J. Agr. Chem. Soc. 33. 7. (1959)
- 23) Mashiro Takahashi.; J. Agr. Chem. Soc. 28. 5. (1954)
- 24) Mashiro Takahashi.; J. Agr. Chem. Soc. 30. 3. (1956)