

廢纖維資源의 醱酵工學的 利用에 關한 研究

(第3報) 벚짚, 왕겨 및 전분박 糖化液을 이용한 酵母培養

成洛葵 沈奇煥 李千洙

慶尙大學

Studies on the Fermentative Utilization of Cellulosic Wastes

(part III) Production of Yeast from the Hydrolyzate of
Rice straw, Rice hull and Corn Starch Pulp.

Nack-kie Sung, Ki-Hwan Shim and Chun-Soo Lee

Gyeong-Sang National University, Jinju, Korea

(Received November. 15. 1976)

Abstract

Cultivation condition of yeast on the utilization of fermentable substrate from the cellulosic wastes such as rice hull, rice straw and corn starch cake was investigated. The results obtained were summarized as follows;

1. Corn starch cake was respectively added to rice hull and rice straw in order to increase sugar concentration in the hydrolyzate, and then hydrolyzed. As the result, concentration of sugar in hydrolyzed solution of rice hull was 9.12 %, in that of rice straw was 7.98 %.
2. It was found that calcium carbonate as a neutralizer was the most effective to prepare the culture broth of yeast.
3. An optimal growth of *Hansenula subpelliculosa* GFY-2 was observed in the medium prepared by adding 0.3 % of ammonium sulfate, 0.4 % of potassium phosphate dibasic, 0.02 % of magnesium sulfate, sodium chloride and calcium chloride to hydrolyzed sugar solution, respectively.
4. *Hansenula subpelliculosa* GFY-2 cultured in the substrate solution which of rice hull and rice straw added to corn starch cake was assimilated more than 90 % of sugar in the hydrolyzate within 48 hours. The yeast cells yielded in rice hull was 46.5 %, and that of rice straw 45.4 % to utilized sugars.

서 론

벚짚 등의 농산부산물, 톱밥 및 폐신문지 등의 폐기물에 대한 糖化方法 및 酵母生産에 관한 보고는 많이 발표되었으나⁽¹⁻⁹⁾ 당화방법에서 대체로 높은 증기압하에서 당화하여야 하므로 열손실, 관리,

당농도 등에 문제점이 있다 벚짚 및 왕겨를 황산으로 전처리하고 다시 묽은 황산으로 가수분해할 때 당액중의 당농도를 증가시킬 목적으로 전분박을 첨가한 다음 분해조건과 분해물을 사용한 효모배양 조건을 검토하여 몇가지 결과를 얻었기에 보고한다.

실험재료 및 방법

1. 實驗材料

왕겨 및 벧짚은 전보⁽¹⁾와 동일한 試料를 사용하였으며 전분박은 경남 사천군 남창전분회사 부산물인 옥수수 전분박을 사용하였다.

단, 벧짚과 옥수수 전분박은 20 mesh 이하로 분쇄하여 사용하였다.

2. 醱糖化法

왕겨는 60%, 벧짚은 10% 황산 (solid/liquid of 1/2)으로 3시간 water bath (40°C)에서 진탕 (50 rpm)한 다음 증류수를 가하여 酸의 농도를 2%로 조정후 전분박을 0~10배 까지 첨가하여 증기압 1 kg/cm²에서 30분간 糖化하였다.

3. 糖化率 測定

당화액을 여과하여 CaCO₃로 중화 (pH 6.0)시켜 환원당을 somogyi 法으로 定量하여 glucose로 환산하여 원료에 대한 重量比로 表示하였다.

4. 基質 및 基本培地

왕겨와 같은 방법으로 전처리한 것을 2%의 농도로 희석할 때 왕겨와 전분박을 1:4, 벧짚과 전분박을 5:1의 비율로 전분박을 첨가하여 1 kg/cm²의 증기압하에서 30분간 당화시켜 CaCO₃,

Ca(OH)₂, NaOH 등으로 중화, 여과하여 酵母培養 기질로 사용하였었다. 기본배지는 Table 1 과 같고 完全培地組成은 基本培地에 Table 2 에 表示된 vitamin 을 첨가하여 사용하였다.

5. 使用 菌株

사용균주는 본실험실에 보존하고 있는 섬유질당 화액을 비교적 잘 消化하는 *Hansenula subpelliculosa* GFY-2⁽¹⁰⁾ 를 사용하였다.

6. 酵母 培養法

培地 50 ml 를 500 ml 용 삼각후라스크에 넣고, 증기압 1 kg/cm²에서 30분간 살균한 다음 냉각하여 균을 一定量씩 接種한 다음, 30°C로 조정된 왕복진탕배양기 (진폭 4 cm, 90rpm)에서 48시간 배양하였다.

7. 菌體量 測定

1) 酵母 生育度

酵母의 生體量은 효모현탁액을 MPS 5000 Spectrophotometer (Shimadzu)로 660m μ 의 吸光度를 측정하여 비교하였다.

2) 乾燥 菌體量

培養液을 3000 rpm으로 10분간 원심분리하고 105°C에서 3시간 건조하여 恒量이 될때 까지 반복 평량하여 건조 균체량으로 하였다.

실험결과 및 고찰

1. 전분박을 첨가한 벧짚 및 왕겨의 산당화

가능한 저온에서 당화할 목적으로 高濃度의 황산으로 前處理하여 당화한 결과 당화율은 매우 높으나⁽¹⁾, 당화할 때 묽은 산으로 희석하여야 하므로 당액의 농도가 낮아서 비경제적일 것 같다. 따라서 당농도를 높이기 위하여 前처리한 다음 산농도가 2%액이 되도록 희석할 때 전분박을 첨가하여 당화시킨 결과는 Table 3 과 같다.

왕겨는 60% 황산으로 전처리한 다음 희석하여 당화하면 당액의 농도가 낮아 배양기질로서는 부적당하므로 효모생육에 적당한 당농도로 높이기 위하여 왕겨와 전분박의 비율을 1:10으로 하였을 때 당농도는 9.12%로 증가되었고 또한 벧짚은 비교적 묽은 10% 황산으로 前처리함으로써 상당량이 당화되기 때문에 벧짚과 전분박의 비율을 1:1로 하였을 때에도 당화액의 당농도가 7.98%까지 증가되었다.

2. 中和劑가 효모생육에 미치는 영향

당화액을 각종의 알카리로 중화 (pH 6)하여 효모를 배양하고 균체 생육도를 측정한 결과 (Table

Table 1. Composition of Basal Medium

(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 %
KH ₂ PO ₄	0.2 %
K ₂ HPO ₄	0.03%
NaCl	0.1 %
Hydrolyzate*	
pH	6.0

*:Concentration of reducing sugar: 4~5%

Table 2. Composition of Vitamin Mixture

Thiamine	100 μ g
Riboflavin	100 μ g
Ca-Pantothenate	100 μ g
Biotin	5 μ g
Pyridoxine	200 μ g
Nicotinic acid	200 μ g
Folic acid	5 μ g
Inositol	12,500 μ g

In 100ml of the basal medium

Table 3. Reducing Sugar of Hydrolized Solution on Hydrolysis of Cellulosic Wastes added to Corn Starch Cake.

Addition Ratio		0	1/5	2/5	3/5	4/5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Reducing sugar sugar solution	Rice hull	0.86					1.84	2.65	3.42	4.25	5.01	5.85	6.67	7.48	8.32	9.12
	Rice straw	2.99	4.23	5.38	6.47	7.68	7.98									

Pretreatment: In water bath at 40 °C for 3hrs solid/liquid of 1/2

Posttreatment: Dilute H₂SO₄ Concentration to 2 % acid solution at 1kg/cm² for 30 min.

Table 4. Effect of Neutralizer to the Hydrolysis of Cellulosic Wastes on the Growth *Han. subpelliculosa* GFY-2 (unit: O. D 660 m μ)

Neutralizing agent	Rice hull	Rice straw
NH ₄ OH	1.201	1.127
NaOH	0.959	0.898
CaCO ₃	1.237	1.116
Ca(OH) ₂	1.206	1.114
KOH	0.973	0.935

Corn starch cake/Rice hull: 4/1

Corn starch cake/Rice straw: 1/5

4) 효모생산량은 CaCO₃, Ca(OH)₂, NH₄OH 순으로 좋았다.

산당화액을 NH₄OH 로 중화시킨 것이 다른것에 비하여 효모의 생육도가 낮은것⁽²⁾은 (NH₄)₂SO₄가 0.6 % 함유되어 있는 기본배지에 NH₄OH 의 중화반응에 의하여 생성된 (NH₄)₂ SO₄ 의 농도가 증가하기 때문에 질소원의 농도가 과량함유된 원인이라 생각된다. 그러므로 기본배지중에 함유된 질소원의 일부를 NH₄OH 로 중화반응에서 생긴 산당화액중의 (NH₄)₂SO₄로 대응할수 있다면 경제적이라 생각된다.

3. 窒素源 첨가의 영향

NH₄OH 로 중화한 산당화액과 질소원을 제외한 기본배지를 혼합한 배지에 (NH₂)₂ CO, NH₄Cl 을 0~0.8 % 범위에서 각각 다른 농도로 첨가하여 30 °C 에서 48시간 진탕배양한 결과 (Fig. 1) 다른 연구자들에 의해 보고^(2,11,12)된 결과보다 비교적 질소원을 적게 요구하였다. 이것은 (NH₄)OH 로 중화한 분해당액을 첨가함으로써 분해액중에 함유되어 있는 질소원을 이용하기 때문이라 생각된다. *Candida utilis*⁽¹²⁾는 (NH₂)₂ CO 를 잘 소화하는데 본실험에서 사용한 *Hansenula subpelliculosa* GFY-2는 (NH₂)₂ CO 보다는 (NH₄)₂ SO₄ 를 잘 소화함

은 전보⁽²⁾의 결과와 같다. 여기서 볏짚보다는 왕겨가 질소원을 적게 요구하는 것은 전분박 첨가량의 차이 때문인 것 같다.

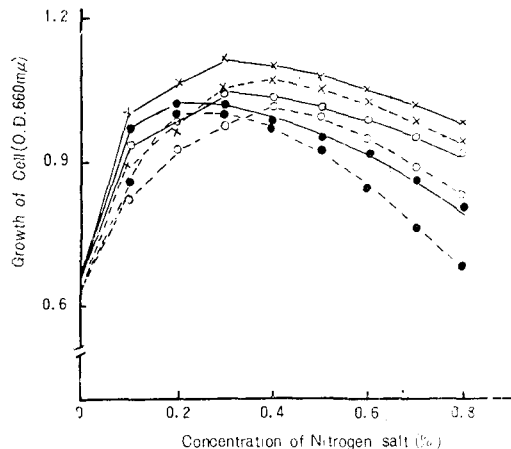


Fig 1. Effect of Nitrogen Salt Concentration on the Growth of *Han. Subpelliculosa* GFY-2
○ ; NH₄Cl ● ; (NH₂)₂CO, × ; (NH₄)₂ SO₄
— ; hydrolyzate of rice hull added to corn starch cake
... ; hydrolyzate of rice straw added to corn starch cake

4. 磷酸加里鹽첨가의 영향

인산가리염을 첨가하지 않은 기본배지에 KH₂ PO₄, K₂HPO₄ 를 농도별로 첨가하여 P와K의 효모생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같이 인산가리염을 전연첨가하지 않았을 때는 O. D. 660 m μ 가 0.48 정도인 것으로 보아 왕겨, 볏짚, 옥수수 전분박의 당화액에 함유하고 있는 인산가리염만으로는 부족함을 알 수 있다. 0.1 % 첨가함에 따라 생육도가 급격히 증가하였으며 0.4% 첨가하였을 때가 생육도가 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 서서히 감소하였다. ⁽¹¹⁻¹⁵⁾

KH₂PO₄ 보다는 K₂HPO₄ 가 효과적이었는데 이것

은 이미 보고된 바와 같다. (2,12)

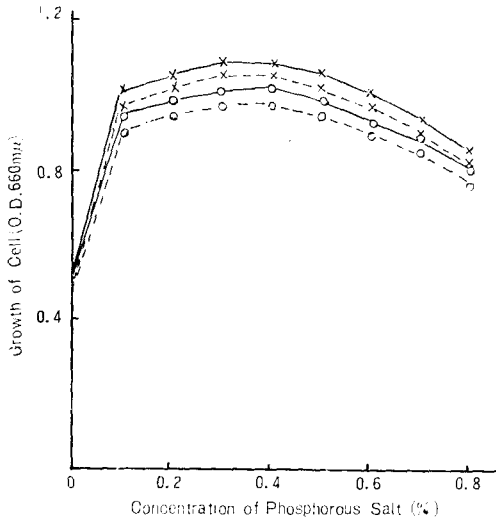


Fig 2. Effect of Phosphorous Salt Concentration on the Growth of *Han. subpelliculosa* GFY-2
 ○ ; O: KH_2PO_4 × ; X: K_2HPO_4
 — ; hydrolyzate of rice hull added to corn starch cake
 ... ; hydrolyzate of rice straw added to corn starch cake

5. 기타 無機鹽첨가의 영향

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl 의 농도를 0~0.08%의 범위로 조절하여 효모생육도를 실험한 결과는 Table 5와 같다. 중화제에 의한 Ca와 Na염의 증가를 고려하여 CaCl_2 를 첨가한 산당화액은 NaOH 로 중화하였으며 NaCl_2 을 첨가한 산당화액은 CaCO_3 로 중화한 것을 사용하였다.

Table 5에서 보는 바와 같이 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , NaCl 의 첨가량은 각각 0.02%로써 충분하였다. 상기 무기염은 적은 량으로서도 효모의 생육이 상당히 좋았다. 이 결과는 다른 연구자들의 연구결과 (2,12,16)와 유사한 경향을 나타냈다. 본실험에서 더욱 적은 량의 무기염을 요구한 것은 전보(1)에서 이미 보고한 바와 같이 왕겨, 벼짚의 당화액중에 함유되어 있는 무기염을 이용하기 때문이라 생각된다.

6. 各種 vitamin 첨가에 의한 영향

기본배지에 Table 2와 같은 vitamin을 單獨添加와 完全培地에 一種씩의 vitamin을 除外한培地에 *Han. subpelliculosa*를 접종하고 30°C에서 24시간 배양하여 vitamin 要求性を 檢討한 결과는 Fig. 3, 4와 같다.

鈴木는 빵효모 *Sac. cerevisiae*의 Vitamin 要求性を 실험하여 질소원으로서 Casein 分解物을 사용하였을 때는 Ca-pantothenate를 가장 많이 요구하였

Table 5. Effects of Inorganic Salt Concentration on the Growth of *Han. subpelliculosa*-GFY-2 (unit: O. D. 660 mμ)

Inorganic salt	Concentration (%) Hydrolyzate	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08
		$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Rice hull	0.898	1.198	1.201	1.187	1.150	1.098	1.008
	Rice straw	0.893	1.162	1.181	1.161	1.111	1.052	0.998	0.897	0.789
NaCl	Rice hull	0.871	1.168	1.240	1.232	1.221	1.180	1.175	1.130	1.041
	Rice straw	0.873	1.118	1.205	1.207	1.198	1.175	1.138	1.075	0.996
CaCl_2	Rice hull	0.931	1.198	1.243	1.238	1.207	1.187	1.138	1.080	0.953
	Rice straw	0.928	1.167	1.202	1.200	1.173	1.138	1.080	1.202	0.943

으며 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ 培地에서는 biotin요 구성이 強化되었다고 하였으며 (17,18) 또 梁等(19)은 고구마 전분박 분해물에 대하여 鈴木와 같은 방법으로 실험하여 다른 연구자와 거의 같은 결과를 얻었다. (19-23)

그러나 本實驗에서는 사용균주가 相異하고 基本培地의 질소원이 다르기 때문인지 Vitamin 要求성이 대체로 비슷하며 뚜렷하지 않았는데 이는 더욱더 연구해 볼 문제라 생각된다.

7. 培養時間에 의한 영향

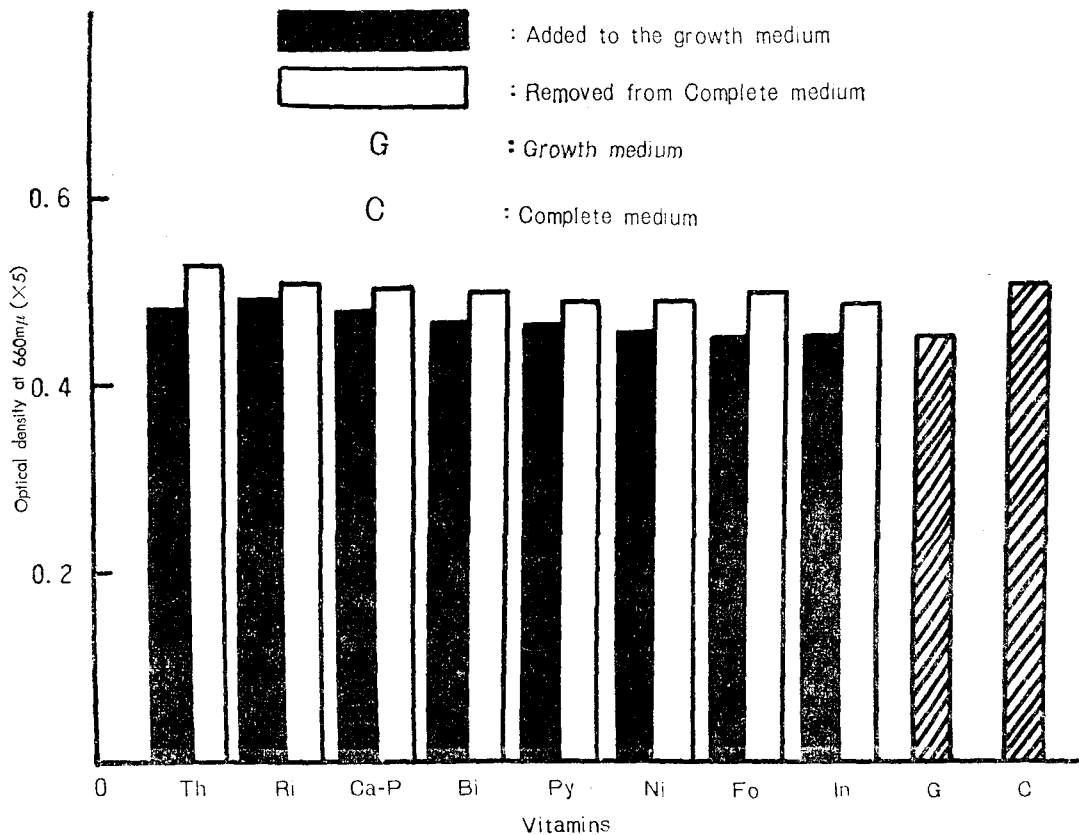


Fig 3. Effect of Various Vitamins on the Growth of *Han. subpellucosa* GFY-2 in the Sugar Solution of Rice Hull added Corn Starch Cake

Table 6. Cell Growth, Residual Sugar and Cell Weight during the Cultivation.

		Time (hr)						
Hydrolyzate		0	12	24	36	48	60	72
Rice hull added corn starch cake	Residual sugar (%)	4.32	4.08	2.16	1.05	0.63	0.48	0.29
	Optical density (660mμ)		0.410	0.924	1.202	1.456	1.476	1.484
	Cell weight (mg/100ml)		113.7	1077.5	1542.7	1988.2	2008.8	1997.6
Rice straw added corn starch cake	Residual sugar (%)	4.24	4.01	1.99	1.04	0.62	0.49	0.30
	Optical density (660mμ)		0.407	1.200	1.331	1.418	1.465	1.376
	Cell weight (mg/100ml)		124.8	1372.1	1652.9	1813.7	1924.9	1917.6

왕겨와 벧짚에 전분박을 첨가하여 경시적으로 배양, 효모의 생육도를 O.D.와 건조균체량으로 조사한 결과 (Table 6) 48시간 배양하였을 때 대부분의 당을 소비하였고 균체량도 급격히 증가 되었다.

8. 基質別 増殖量

전분박을 첨가한 왕겨와 벧짚의 당화액과 glucose와 maltose를 炭素源으로 한 基質에 소정의 무기염을 첨가하여 증기압 1 kg/cm²에서 5분간 살균 후 菌을 接種하고 30 °C에서 48시간 진탕배양하여 균체증식량을 비교 검토한 결과는 Table 7과 같다 전분박을 첨가한 왕겨 당화액과 벧짚 당화액의

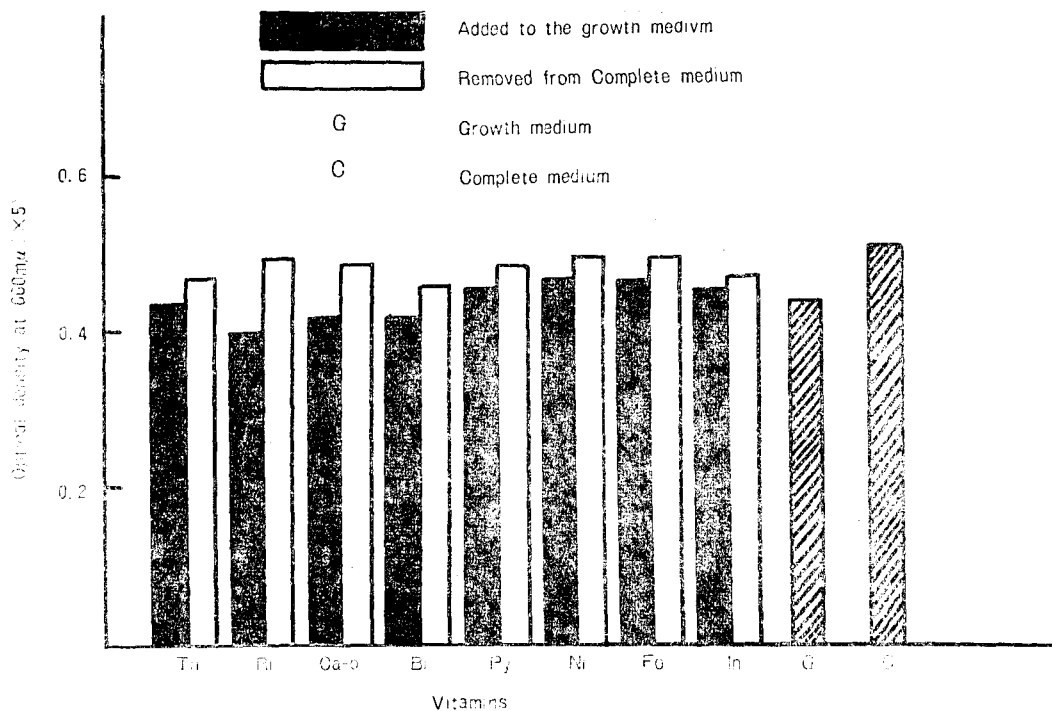


Fig 4. Effect of Various Vitamins on the Grow of *Han. subpelliculosa* GFY-2 in the Sugar Solution of Rice Straw added to Corn Starch Cake

Table 7. Cell Yields of *Han. subpelliculosa*-GFY-2

Carbon sources	Reducing Sugar conc. (%)	Sugar utilized total sugar (%)	Dry cell weight sugar (%)	Cell weight Hydrolyzate (%)
Rice hull added corn starch cake	4.0	91.2	46.5	22.0
Rice straw added corn starch cake	4.0	90.8	45.4	13.8
Glucose	4.0	85.4	27.8	
Maltose	4.0	87.8	28.7	

당소비율은 각각 91.2%, 90.8%였고 당에 대한收率은 각각 46.5%, 45.4%로써 glucose와 maltose의 당소비율과 당에 대한 수율보다 아주 높았다. 이 결과는 梁等⁽¹⁹⁾의 연구결과와 유사한데 진분박 왕겨, 벚짚의 당화액에 함유되어 있는 미생물생육에 필요한 각종의 영양원을 이용한 것으로 추리된

다.

요 약

진분박을 첨가한 왕겨 및 벚짚의 酸糖化液을 이 용하여 효모생육조건을 검토하여 다음과 같은 결

론을 얻었다.

1. 왕겨와 볏짚에 전분박을 첨가하여 당화시킴으로써 당화액의 당농도가 각각 9.12%, 7.98% 까지 증가 되었다.

2. 산당화액을 중화할 때 사용한 중화제로서는 CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NH_4OH 순으로 효모생육이 좋았다.

3. 당화액을 기질로 하여 무기영양요구성을 검토한 결과 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, K_2HPO_4 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, NaCl 0.02%, CaCl_2 0.02% 를 추가하였을 때 효모의 생육도가 가장 좋았다.

4. 전분박을 첨가한 왕겨와 볏짚의 당화액을 기질로 하여 효모를 배양하였을 때 48시간 이내에 각각 91.2% 90.8%의 당을 소화하였고 당에 대한 수율은 각각 46.5%, 45.4% 이었다.

참고 문헌

- (1) Sung, N.K. and J.K. Kim: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4** (1), 1 (1976)
- (2) Sung, N.K., M.C. Kim and K.H. Shim: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **4** (2), 51 (1976)
- (3) 高田亮平, 佐佐木博介: *日釀學誌* **20**, 118 (1942)
- (4) Julsingha, J.V.: *Chem. Week Blad.*, **37**, 649 (1940)
- (5) Gutgerts, N.: *Spisto-Vodochnya prom.*, **14**, 52 (1937)
- (6) Dudkin, M.S., N.G. Shkantova, N.S. Skornyakova. *Chem. Ab.*, **59**, 8960 (1962)
- (7) Hokaaido Prefecture: *Japan pat.* 5249 (1963)
- (8) Pepka, V.P., V.G. Panasyuk: *Khim. Tekhnol.*, **13**, 55 (1968)
- (9) Bae, M., B.H. Kim, A.S. Yoon: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **1** (1), 31 (1973)
- (10) Sung, N.K., J.H. Lee, H.D. Yun, and K.H. Shim: *Gyeong Sang, J. Inst. Agr. Resource, utl.*, **10**, 11 (1976)
- (11) Yu, J.H., D.H. Oh, et al: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2** (2), 83 (1974)
- (12) Yu, J.H., R. Yang, Y.M. Hong, and C. K. Park: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **3** (3), 141 (1975)
- (13) 友田直孝等: *酵母利用工業* (共立出版), 330 (1964)
- (14) Ju, D.K.: *Kor. Jour. Microbiol.*, **14**(1), (1976)
- (15) Lee, K.H. and J.H. Ha: *Korean Agr. Chem. Soc.*, **16** (1), (1973)
- (16) Kahng, H.W.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2** (3), 155 (1974)
- (17) Yahikosuzuki: *J. Agr. Chem. Soc.*, **35**(11), 648 (1961)
- (18) Yahikosuzuki: *J. Agr. Chem. Soc.*, **35**(7), 654 (1961)
- (19) Yang, H.C., Y.J. Choi, and H.C. Sung: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2** (2), 95 (1974)
- (20) Mashiro Takahashi: *J. Agr. Chem. Soc.*, **28** (5), (1954)
- (21) Mashiro Takahashi: *J. Agr. Chem. Soc.*, **30** (3), (1956)
- (22) Tatsuro Yamaguchi: *J. Agr. Chem. Soc.*, **28** (5), (1959)
- (23) 金浩植: *醱酵微生物學*(郷文社), 1153 (1973)