

## 農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究

(第六報) 纖維素單細胞蛋白 生産에서의 天然基質의 利用性

裴 武·高 永 燾

韓國科學技術研究所 應用微生物研究室

## Studies on Microbial Utilization of Agricultural Wastes

(Part IV) Cellulosic Waste Materials as Substrate on the Production  
of Cellulosic Single Cell Protein.

Moo Bae and Yung Hee Kho

Applied Microbiology Lab.

Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received March 8, 1977)

### Abstract

Experiments were carried out to pursue the availability and the feasibility of utilizable cellulosic materials as substrate for the production of cellulosic single cell protein. The results were obtained as follows.

1. Effects of carbohydrates as a sole carbon source on the growth of *Cellulomonas flavigena* KIST 321 were examined. The result showed that cellulose and xylose would be most utilizable for cell mass production.
2. Alkaline treated waste papers and clothes resulted in good growth of the organism than intact ones did. However the waste papers as substrate of cellulosic fermentation were not digestible, even if the material was treated with alkalis.
3. Rice straw, rape straw and panic grass appeared to be good substrates for the cell mass production.
4. Leaves were proved to be a good substrate for the cell mass production, but wood sawdust was hardly digested by merely alkaline treatment.
5. When cellulosic wastes as the substrate were examined into the concentration of alkaline solution, the result suggested that the best productivity of cell mass from cellulosic materials was obtained on treatment with 0.8~1.0% NaOH solution.
6. The productivity of cell mass was increased by washing out with water after alkaline treatment of newspaper, pine sawdust, lime sawdust and pine leaf.

### 서 론

광합성 작용에 의하여 매년 거대한량이 합성되는 섬유소 자원중 극히 일부가 이용되고 있을 뿐

대부분 폐기되고 있다. 이와같은 막대한 섬유소 자원을 보다 효율적으로 이용하기 위한 일련의 연구로서 저자들은 섬유소를 직접 이용할 수있는 자화세균을 분리동정하였고<sup>(2)</sup>, 기질로서 벗짚을 사용할 때 단세포 단백을 생산하는 조건을 보고한 바

있다(3,4)

섬유소 자원을 기질로 하여 단세포단백을 생산하기 위한 연구로서 Han 등(5,6)은 사탕수수 밭에서 섬유소 자화세균 *Cellulomonas* 속 균주를 분리하고 bagasse 를 기질로 하여  $\beta$ -glucosidase 생산균인 *Alkaligenes faecalis*와 혼합배양하여 SCP 생산을 위한 공업화 시험을 하였고, Bellamg 등(7)은 고온성 *Actinomycetes*속 균주로 sulfite mill의 폐섬유질을 기질로 하여 SCP를 생산하였고, Crawford 등(8)은 폐 신문지를 기질로 하였고, Peiterseu 등(9)은 보리짚 분말을 기질로 하였다. 폐 섬유소원을 산가수 분해하여 얻은 당화액에 효모를 배양하여 SCP를 생산한 것으로는 1940년 wood cellulosue 를 산처리하여 얻은 당화액에 효모를 배양한 것(10,11,12)을 시초로 하였으며, Julsingha(13)의 벧짚을 기질로 한 것, 高田 등(14)의 왕겨를 기질로 한 것이 있고 국내에서는 柳 등(15)의 밤송이를 기질로 한 것, 成 등(16)의 톱밥 및 폐 신문지를 기질로 한 보고가 있다 저자등도 벧짚, 보리짚, 밀짚등을 2~5%의 황산으로 당화하여 얻은 糖化液에 *Candida utilis* NCYC 707을 배양하여 소비당의 50~55% 균체를 생산할 수 있음을 보고하였다. (1)

본 연구에서는 기질로서 벧짚을 사용할 때의 여러가지 살펴본 처리조건을 토대로 하여 우리 주변에서 가장 많이 폐기되고 있는 각종 섬유소원을 수집하여 섬유소 단세포 단백 생산을 위한 기질화의 가능성을 검토 하였다,

## 材料 및 方法

### 1. 使用菌株

전보(2)에서 분리동정한 섬유소 자화세균 *Cellulomonas flavigena* KIST 321을 사용하였다.

### 2. 使用基質의 종류 및 處理方法

서울근교 농촌에서 벧짚, 보리짚, 밀짚, 채종대, 피, 옥수수의 수축, 땅콩껍질, 왕겨등을 임의로 취하고 시내 제재소에서 얻은 각종 나무의 톱밥, 주변 산야에서 임의로 채취한 각종 나무잎과 폐 신문지, 폐의류, 폐기된 솜(cotton)등 우리 주변에서 가장 흔한 섬유소원을 기질로 하였다.

상기 섬유소원을 cutting mill로서 분쇄하여 2~3mm 정도로 선별한 다음 ball mill에 의한 처리를 하고 알카리 처리와 중화등은 전보의 방법(4)에 의하여 행하였다.

## 3. 培養方法 및 分析方法

배양조건, 기질소비량 측정 및 균체량 측정 방법은 전보방법(4)에 의하여 행하였다.

## 實驗結果 및 考察

### 1. 炭素源의 종류에 따른 균체생산

섬유소원은 화학적인 면에서 보면 glucose단위가 직쇄상으로 이루어진 중합체로서  $\beta$ -1,4-glucoside 결합으로 이루어져 fiber 를 형성하고 있으며 fiber 사이에는 hemicellulose, lignin, gum, resin, mineral 등으로 구성되어 있다. 이와같이 섬유소원의 근간이 되는 glucose 와 hemicellulose 가 분해되어 미생물의 영양원이 되고, 사당류가 분해된 xylose, mannose, galactose, arabinose 등이 또한 영양원이 된다. 이러한 점에서 본 연구에 사용된 균주의 糖 이용성을 검토한다는 것은 중요한 의의를 갖는다.

Table 1. Protein Level and Cell Mass of *C. flavigena* KIST 321 grown in Medium Containing Various Carbon Sources.

Substrate	Protein level (g/l)	D. C. W. (g/l)
Bacto cellulose	1.94	3.40
Bacto cellobiose	0.54	1.50
CM Cellulose	1.26	2.28
Dextrin	0.84	1.56
Starch	0.45	1.96
Dextrose	0.85	2.32
Lactose	0.40	1.70
Maltose	0.52	1.70
Arabinose	0.36	1.88
Fructose	0.67	1.86
Saccharose	0.59	1.62
Xylose	1.82	3.90
Galactose	0.56	1.02
Rhamnose	0.75	1.06
Sorbose	0.48	0.92
Mannose	0.41	0.82
Sorbitol	0.84	1.61
Mannitol	0.80	1.78
Ribose	0.93	1.86
Na-acetate	0	0

*C. flavigena* KIST 321 was grown for 2 days in the basal medium containing each carbohydrate (2%) as a sole carbon source.

비교적 물에 잘 용해되는 상태의 탄소원을 유일한 탄소원 기질로 하였을 때의 균체생산량을 살펴본 결과는 Table 1과 같다.

본 실험에 사용한 공시균주는 발효중에 유기산을 생성하기 때문에 이것을 중화하기 위하여  $\text{CaCO}_3$  를 기본배지에 0.1% 첨가하였다. Table 1에서 나타나는 바와같이 glucose나 fructose등의 당류에서 cellulose보다 균체량이 적은 것은 배양액 중에 생성되는 유기산을 첨가된  $\text{CaCO}_3$  로서 충분히 중화시킬 수 없는 결과로 판단된다. 본 실험에 사용한 공시균주는 pH6.0이하에서 그 성장이 매우 늦어진 결과로 보인다. 5탄당인 xylose와 ribose에서 균체량의 증가가 많았는데 이는 질류에 많이 함유되어 있는 xylan을 이용할 수 있다는 사실과

일치되는 결과로 볼 수 있다.

## 2. 각종 폐지류(Waste papers)와 폐의류(Waste clothes)

각종 폐지류와 綿으로된 헌옷과 못쓰게 된 솜을 기질로 사용하였을 때의 균체생산 결과는 Table 2와 같다. 알카리 전처리하는 1% NaOH 용액을 기질의 10배량(v/w)을 사용하였고 기질은 4%로 하였으며 30°C에서 5일간 진탕배양 하였다. 여기서 bacto cellulose나 濾紙에서의 소화율이 비교적 낮게 나온 것은 기질로서의 사용량을 4%로 하였기 때문이다. 전체적으로 보아 알카리 전처리의 결과가 전처리하지 않았을 때의 결과보다 성적이 좋은 것은 발효 방해 물질로 알려진 lignin이 전혀 함유되

Table 2. Various Waste Paper and Clothes as Cellulosic Resource on the SCP Production.

Substrate	Treatment	Weight loss (%)		Protein level (g/l)	D. C. W. (g/l)
		after alkali treatment	after fermentation		
Bacto cellulose	no treated	—	32.1	2.40	4.25
	alkali treated	0	46.6	3.43	7.41
Filter paper	no treated	—	32.9	2.20	4.45
	alkali treated	0	43.5	3.43	7.90
Box paper	no treated	—	43.6	1.50	3.20
	alkali treated	1.3	52.1	4.39	9.15
Newspaper	no treated	—	7.2	0.10	0.25
	alkali treated	6.5	15.3	0.15	0.50
Punchhole Paper	no treated	—	11.7	0.65	1.90
	alkali treated	11.3	24.5	1.80	3.40
Waste book	no treated	—	8.6	0.15	0.46
	alkali treated	5.2	26.2	1.08	2.18
Waste clothes	no treated	—	15.2	0.30	0.70
	alkali treated	10.4	25.3	0.95	1.94
Waste cotton	no treated	—	20.5	1.15	2.40
	alkali treated	3.5	32.6	2.45	5.42

Alkali treatment : For 16 hrs. at room temp. in 10 times volume of 1% NaOH soln.

Neutralization : to pH 7.4 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$

Cultivation : *C. flavigena* KIST 321 was grown for 5 days at 30°C, 200rpm.

어 있지 않은 순수한 bacto cellulose나 濾紙에서도 같은 결과를 볼 수 있다. 따라서 알카리 전처리를 하면 ligno-cellulose complex의 cross linkage를 끊어주는 효과 외에도 cellulose 분자간의 carboxyl group과 saponification이 일어나며 동시에 swelling이 일어나는 현상으로 볼 수 있으며<sup>(17)</sup>, 특히 swelling 효과가 큰 것으로 볼 수 있다.

폐신문지를 기질로 하였을 때는 알카리 처리를 하였을 때도 알카리 처리를 하지 않았을 때와 같이 균체량의 수율이 매우 적은데 이는 신문지속에

들어 있는 잉크에 의한 영향과 신문지를 만들때 처리하는 약품의 영향이 아닌가 생각하며 punch hole paper와 현채등 다른 인쇄물도 거의 비슷한 현상으로 재검토가 필요하다. 헌옷이나 못쓰게 된 솜에서도 균체량의 증가가 적었는데 이것 역시 여러가지 이물질의 존재 때문이라고 본다.

## 3. 농산폐자원 및 종류

우리나라 농촌에서 가장 흔하게 볼 수 있는 각종 폐자원 및 부자원을 cutting mill로 粉碎된 상태

**Table 3.** Various Straws as Cellulosic Resources on SCP Production.

Substrate	Treatment	Weight loss (%)		Protein level (g/l)	D. C. W. (g/l)
		after alkali treatment	after fermentation		
Rice straw	Crushed	16.0	55.9	4.63	10.13
	Milled	20.5	62.7	5.80	12.20
Rice hull	C.	15.4	27.2	2.40	6.15
	M.	18.6	28.4	3.59	7.10
Barley straw	C.	22.6	24.6	3.34	7.51
	M.	25.3	23.6	4.20	8.93
Rape straw	C.	17.1	41.6	3.67	7.05
	M.	24.5	53.4	5.09	10.21
Miscanthus	C.	23.4	46.7	3.26	7.54
	M.	25.5	63.0	4.27	9.26
Millet straw	C.	33.3	35.0	3.67	8.70
	M.	37.6	71.1	4.81	9.46
Miscanthus purpurascens	C.	10.0	30.4	2.85	6.56
	M.	21.3	54.7	4.24	8.48
Bagasse	C.	16.8	50.4	3.58	8.46
	M.	16.6	22.8	4.54	9.20
Corn cob	C.	21.7	24.2	1.07	2.30
	M.	34.0	39.9	1.63	3.25
Peaunt hull	C.	15.7	35.3	1.01	2.20
	M.	15.4	36.5	2.01	4.75
Panic grass	C.	18.2	52.3	4.16	8.96
	M.	22.3	60.2	4.52	9.50

Treatment : Crushed by cutting mill. Ball milled after crushing

Cultivation : for 5 days, carbon source ; 4%

와 좁더 입자를 적게하여 물리적 처리효과도 아울러 살펴보고자 ball mill로 4~6시간 분쇄한 다음 알카리 처리하여 살펴본 결과는 Table 3과 같다.

粉碎된 상태보다 ball mill 처리한 상태가 좋은 것으로 보아 입자가 적을수록 미생물이 잘 이용할 수 있다는 것은 주지의 사실이나 물리적 처리에 의해서도 fiber 상태가 많이 부서졌음을 알 수 있다. 질료를 기질로 사용때 균체량 수율이 높은 것으로 보아 기질로서 이용성이 높다고 본다.

**4. 각종 나무의 톱밥(sawdusts) 및 잎류(leaves)**

제재소에서 막대하게 쏟아지는 톱밥을 균체생산을 위한 기질로서 사용할 수 있다면 기질처리시 분쇄과정이 생략되어 경제적으로 많은 잇점이 있다. 제재소에서 많이 나오는 톱밥을 나무의 종류별로 임의로 수집하였으며 나무잎은 주변 산야에서 임의로 채취하여 풍건시킨 다음 ball mill하여 기질로 사용하였다. 알카리 전처리 방법은 전과같

**Table 4.** Various Sawdusts and Leaves as Cellulosic Material on SCP Production.

Substrate	Protein level (g/l)	D. C. W. (g/l)
Sawdust		
Pine	0.14	0.42
Lime	0.98	1.96
Cedrela sinensis	0.20	0.51
Walnut	0.22	0.50
Newzealand pine	0.15	0.41
Leaf		
Acacia	2.81	4.80
Aspen	4.41	8.90
Pine	1.95	4.20
Popular	3.90	7.40

Cultured for 5 days.

았으며 이때의 결과는 Table 4와 같다.

나무의 톱밥을 기질로 하였을 때는 균체수율이

**Table 5.** Effect of Alkaline Treatment of Cellulosic Wastes on SCP Production.

Substrate	NaOH Conc. (%)	Protein level (g/l)				
		0.4	0.6	0.8	1.0	2.0
Rice straw		3.33	4.42	5.33	5.40	4.39
Barley straw		0.38	1.42	1.73	1.92	1.95
Rice hull		0.20	1.49	1.95	1.95	1.80
Corn cob		0.19	1.50	1.29	0.50	—
Peanut hull		0.20	1.80	3.71	3.38	1.25
Bagasse		1.89	2.48	4.50	4.71	3.21
Rape straw		1.63	3.78	3.78	4.02	1.20
Miscanthus		2.69	3.74	4.90	5.77	5.81
Millet straw		2.74	2.67	3.68	4.37	4.89
Miscanthus purpurascens		2.85	2.71	4.28	3.28	2.53
Wheat straw		3.10	3.95	4.71	4.90	4.52
Panic straw		3.31	3.90	3.52	3.03	3.23
Acacia leaf		4.52	3.40	3.50	3.33	2.38
Aspen leaf		3.90	3.52	4.28	5.14	2.47
Pine leaf		2.67	3.09	5.43	3.71	2.62
Poplar leaf		4.90	4.43	3.85	3.38	2.33

Stram : *C. flavigena* KIST 321

Treatment : Steaming for 30 min. at different concentration NaOH soln. with a volume by 10 times.

Neutralization : to pH 7.6 with  $H_3PO_4$

Culture : for days at 30°C, reciprocal

매우 적었는데 비해 일류를 기질로 하였을 때는 비교적 많은 편이었다. 이는 목질부 자체의 섬유 조직이 매우 단단할 뿐만 아니라 ligno-cellulose 복합체의 기계적 결합이 매우 강하고 resins, gums 등의 함량이 높기 때문인 것으로 생각되며 이들을 제거하여 사용함으로써 기질로서의 효율을 높힐 수가 있다는 사실로 추정된다.

### 5. 섬유소 폐자원의 알카리 전처리 조건

지금까지 기질로서 사용한 섬유소원을 알카리 전처리 할 때 알카리의 농도를 다르게 하여 기질마다 적당한 처리농도를 살피보기 위하여 0.4~2.0%의 NaOH 용액을 기질의 10배량(v/w)으로 하여 121°C에서 30분간 처리후  $H_3PO_4$ 로 pH 7.6으로 중화하고 기질량을 4%로 하였을 때의 결과는 Table 5와 같다.

전처리에 적당한 알카리농도는 기질마다 각각 약간씩 차이는 있으나 짚류(straws)는 0.8~1.0% 일 때가 좋았으며 잎류(leaves)는 0.4~0.6%일 때가 좋았다.

지금까지 살펴본 몇가지 기질중 균체수율이 매우 낮았던 기질중에서 신문지, 톱밥, 소나무잎을

알카리 처리후 수세하여 발효방해물질을 제거함으로써 기질로서의 효율을 높이기 위한 실험을 하였다. 기질을 1.0% NaOH용액 10배량(v/w)으로 121°C에서 30분간 처리한 다음 일부는  $H_3PO_4$ 로 중화하고 일부는 물로서 중성이될때 까지 세척하여 기질로 사용하였으며 중화시 생성되는 인산염의 농도를 갖도록 조정한 다음 배양한 결과는 Table 6과 같다. 이때 대조구로서 볏짚을 기질로 하였을 때의 결과를 보았는데 볏짚의 경우는 수세하였을 때가 수세하지 않았을 때보다 균체수율이 떨어졌다. 이것은 알카리 처리시 용출되어 나온것으로 보이는 균생육에 필요한 가용성성분이 함께 씻겨 내려간 결과로 보인다.

신문지, 소나무톱밥, 피나무톱밥 및 소나무잎이 기질로 사용되었을 때는 알카리 처리를水洗하지 않았을 때보다 약 2배량의 균체량이 많았는데 이것은 신문지의 경우 탈잉크에 의한 영향으로 추정되며, 소나무톱밥, 피나무톱밥, 소나무잎의 경우는 발효방해물질인 resins, gums 등이 제거되었기 때문인 것으로 추정된다.

**Table 6.** Effect of Washing after Alkali Treatment of Cellulosic Wastes on SCP Production.

Substrate	Washed			Not Washed		
	weight loss (%)	D. C. W. (g/l)	protein level (g/l)	weight loss (%)	D. C. W. (g/l)	protein level (g/l)
Rice straw	47.9	7.92	3.30	73.5	12.94	6.24
Newspaper	32.6	1.94	0.86	16.7	0.15	—
Pine sawdust	11.5	1.60	0.62	5.1	0.51	—
Lime sawdust	25.0	1.83	0.75	10.6	0.91	—
Pine leaf	28.0	3.06	1.23	16.0	1.53	0.60

Washing : with hot distilled water to neutralization.

### 要 約

섬유소자화세균 *Cellulomonas flavigena* KIST 321로 섬유소 단세포 단백을 생산하기 위하여 우리 주변에서 폐기되고 있는 各種 纖維素廢棄物을 수집하여 基質로서의 사용 가능성을 檢討하였는 바 그 結果를 요약하면 다음과 같다.

1. 糖類를 유일한 炭素源으로 하였을 때 cellulose와 xylose에서 균체량이 가장 많았다.

2. 廢紙類와 廢衣類를 기질로 하였을 때 알카리 전처리를 함으로써 알카리 전처리하지 않았을 때보다 균체량이 많았으며, 폐신문지와 같은 인쇄물에서는 균체량이 적었다.

3. 짚류(straws)를 기질로 하였을 때는 대체로 균체수율이 높았으며, 볏짚, 채종대, 피를 기질로 하였을 때 균체량이 많았다.

4. 木材類의 톱밥에서는 균체량이 적었으나 잎류(leaves)에서는 비교적 많았다.

5. 基質의 種類에 따라 전처리시 NaOH 농도를 다르게 하여 균체생산량을 조사하였다. NaOH 농도는 기질의 종류에 따라 최적농도가 달랐으나 짚류(straws)에서는 0.8~1.0%일때가 좋았고, 잎류(leaves)에서는 0.4~0.6%일때가 좋았다.

6. 各種基質을 알카리 처리후 세척하여 기질로 사용하였을 때 볏짚에서는 균체량이 감소하였으나 소나무 톱밥, 피나무 톱밥, 소나무잎, 폐신문지에서는 증가하였다.

### 참 고 문 헌

(1) Bae, M., B. H. Kim and A. S. Yoon: *Kor. J. Appl. Microbiol., Bioeng.*, 1 (1), 31 (1973).

(2) Bae, M. and B. H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 2 (1) 1 (1974).

(3) Bae, M. and B. H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 2 (2) 79 (1974).

(4) Bae, M., K. J. Lee and Y. H. Kho: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 4 (3) 99, (1976).

(5) Han, Y. W. and V. R. Srivasan: *Appl. Microbiol.* 16, 1140 (1968).

(6) Han, Y. W. and C. D. Calihan: *Appl. Microbiol.*, 27 159 (1974).

(7) Bellamy, W. D.: *Biotech., Bioeng.*, 14 869 (1974).

(8) Crawford, D. L. and E. McCoy: *Biotech. Bioeng.*, 14 150 (1972).

(9) Peitersen, N.: *Biotech. Bioeng.*, 17 361 (1975).

(10) Fink, H. and F. Just: *Biochem. Zeit.*, 300 84 (1938).

(11) Fink, H. and F. Just: *Biochem. Zeit.*, 303 234 (1939).

(12) Fink, H. and F. Just: *Biochem. Zeit.*, 312 (1942).

(13) Julsingha, J. V.: *Chem. Week blad.*, 37 649 (1940).

(14) 高田亮平, 佐佐傳介: *日釀造學誌*, 20 118 (1942).

(15) Juhyun, Y., Y. M. Hong and C. K. Park: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 3 135 (1975).

(16) Sung, N. K., M. C. Kim, K. H. Shim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 4 51 (1976).

(17) Tarkow, H. and W. C. Feist: *Advances in Chem. Ser.*, 95 197 (1969).