

農産廢資源의 微生物學的 利用에 關한 研究

(第四報) 基質處理時의 알칼이 · 산중화 條件에 對하여

李 啓準 · 高 永熹 · 裴 武
韓國科學技術研究室 · 應用微生物研究室

Studies on Microbial Utilization of Agricultural Wastes (Part 4)

Effect of Acid in Neutralization after Alkali Treatment of the Wastes on Cellulosic Single Cell Protein Production

Moo Bae, Kye Joon Lee and Yung Hee Kho

Applied Microbiology Lab.
Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea.
(Received June 30, 1976)

Abstract

Experiments were carried out to establish the effects of acids in neutralization after alkaline treatment of rice straw, with which cellulosic single cell protein can be produced by cellulose utilizing bacteria, *Cellulomonas flavigena* KIST 321, previously isolated by authors.

Following results were obtained.

1. Rice straw as carbon source was pretreated with 10 volumes of 1 normality of NH_4OH or NaOH ($\text{NaOH}/\text{substrate}$: 40%, and then washed with water or neutralized with H_3PO_4 , H_2SO_4 , HCl and CH_3COOH .

Among the above mentioned methods, neutralization with H_3PO_4 after alkaline treatment was proved to be the most effective on its digestibility and SCP production. Dry cell 12.28g/l and 78% digestibility were obtained.

2. When rice straw was treated with NaOH solution, the result suggested that the productivity of cell-mass was attained on treatment of rice straw with 6% of NaOH ($\text{NaOH}/\text{substrate}$ ratio) for 15~24hrs at room temperature.
3. When rice straw was treated with NaOH , a volume of water to substrate is adequate by two or three fold and the amount of NaOH can be economized up to 5% for the weight of rice straw.
4. The steaming of rice straw at 121°C for 30min. in alkaline treatment of rice straw gave the similar effectiveness to that at room temperature for 15~24hrs. and accelerated the sterilization of the substrate.
5. Finally, the level of inorganic phosphate in a medium was investigated. 11.2g of dry cell was produced at the concentration of 0.2%, phosphate (phosphorous level 0.04%) in medium even though treated rice straw was neutralized with HCl instead of H_3PO_4 , and 12.2g/l at the concentration of 0.3% phosphate (phosphorous 0.04%) on neutralization with H_2SO_4 .

서 론

을 생산하고자 하는 연구의 일환으로서 섬유소를
자화할 수 있는 세균을 분리 동정하여 보고 하였
섬유소 자원을 기질로 사용하여 단세포 단백질 고⁽¹⁾ 기질로서 벧짚을 사용할때 그 처리조건등을

보고하였다(2).

Lignin함유 섬유소질을 기질로 하여 심층배양법에 의해 섬유소 단세포 단백질(Cellulosic Single Cell protein)을 생산하고자 Han(3-4)등은 bagasse를 기질로 *Cellulomonas* 속 균주를 사용하여 단백질 함량 26%의 제품을 얻었고, Crawford(5,6)등은 폐신문지를 ball mill 처리하여 곰팡이인 *Myrothecium verrucaria*를 사용하여 단백질 함량 10%인 제품을 내열성 섬유소 분해능이 있는 *Actinomycete* 속 *Thermospora fusca* 균주로 sulfite mill의 폐섬유질로부터 30%의 단백질을 얻었다. 또한 Ericksson 등(7)은 신문용지 제지공장 부산물에 rot fungus인 *Sporotrichum*을 배양하여 6~14% 단백질을 얻었고 Peitersen 등(8-9)은 보리 및 분말에 *Trichoderma viride*와 *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* 등 yeast를 혼합배양하여 보리짚 70% 이상을 소화시켜 단백질 함량 21~26%인 제품을 얻었다. Lignocellulose를 기질로 사용한 이들 연구의 공통된 점은 배양기간이 길고 기질 소화율이 낮으며 따라서 균체생산량이 적고 또 균체와 기질의 분리가 어려운 점 등인데 이러한 현상을 기질의 처리조건에 따라 크게 영향을 받는다.

전분(2)에서는 농산폐자원을 기질로 사용함에 있어 수중의 알칼리로서 처리하여 사용한 결과 NaOH가 가장 뛰어난 처리제 이긴 하나, 실제 사용하기에는 경제적으로 맞지 않으므로 NH₄OH로서 처리하는 방법을 선택하였고 alkali처리시 유기물에 상당량 용해되므로 세척하는 것보다 산으로 중화하는 것이 바람직 하므로 H₂SO₄로 중화하면 생성된 (NH₄)₂SO₄가 질소원으로 사용될 수 있음을 보고하였다. 그러나 NaOH로서 처리시 그 조건을 좀더 검토할 여지가 있었고 H₂SO₄ 및 NaOH 이외의 산으로 중화하였을 때의 효과를 검토할 필요가 있으므로 NH₄OH 및 NaOH 처리후 세척한 것과 산으로 중화하였을 때의 효과를 측정하였다.

사용시의 처리조건 및 중화조건에 따라서 매우 효과적이고 경제적인 결과를 얻었으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

저자들이 분리 동정한 섬유소 분해균주인(1) *Cellulomonas flavigena* KIST 321을 사용하였다.

2. 使用基質의 前處理 및 中和方法

서울근교 농가에서 수집한 볏짚을 hammer mill

로 분쇄하여 2~3mm정도로 선별하여 사용하였다. NH₄OH는 1 규경 농도로, NaOH는 0.6~4.0%의 용액으로 상온에서 15~24시간 처리후 HCl, H₂SO₄, H₃PO₄로 중화하여 사용하였다.

3. 培養方法 및 分析方法

배양조건은 전보다 동일하게 하였으며 균체량 및 기질소비량 측정은 전보의 방법으로, 단백질 분석은 Huang(10)등의 방법대신 micro-Kjeldahl(11)법을 채택한 Fig 1의 방법대로 하였다.

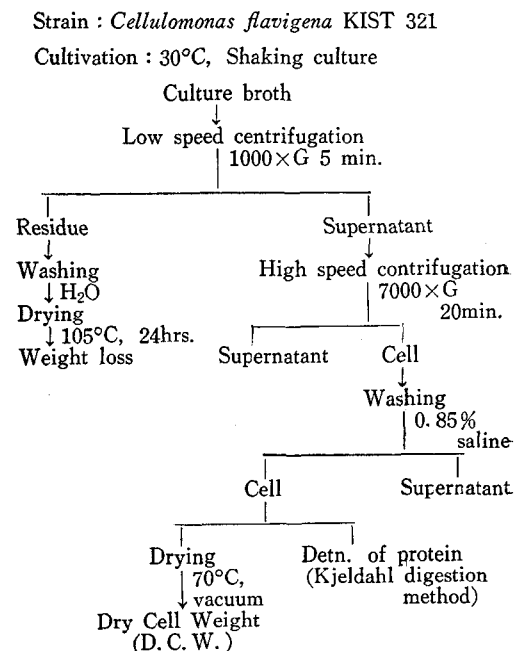


Fig 1. Procedure for Analysis.

實驗結果 및 考察

1. 기질의 알칼리 처리 후 중화제의 영향

전보에서 볏짚을 여러종류의 alkali로 처리하여 본 결과 NaOH가 가장 효과적이거나 경제성에 약간 검토의 여지가 있어 NH₄OH처리 후 H₂SO₄으로 중화하여 사용하는 것이 일차적으로 바람직하다고 하였다.

본 연구에서는 다른 수중의 alkali보다 처리효과가 좋았던 NH₄OH와 NaOH로서 처리할 경우 각종 산으로 중화 혹은 수세하여 사용할 때 균체량 및 기질소모량을 측정된 결과 Table 1과 같은 현저한 차이가 있음을 알았다. 즉, Ammonia 처리후 기질의 중화과정에서 물로서 세척하는 것보다는 H₂SO₄으로 중화하는 것이 바람직하다고 전보에서 보고하였으나 HCl로 중화하는 것도 세척보다는 좋으며

Table 1. Effects of Various Acids Neutralization after Alkaline Treatment on Cellulosic S. C. P. Production.

Rice straw treated			Cell mass produced (g/l)	Digestibility (%)	Yield (%)
Alkaline treatment	After alkaline treatment				
	Control		2.5	30.6	20.4
NaOH	H ₂ O	washed	6.4	47.2	33.9
	H ₂ SO ₄	neut'zd	4.6	59.2	19.4
	HCl	"	3.8	54.0	17.6
	H ₃ PO ₄	"	12.2	78.0	39.1
	CH ₃ COOH	"	4.2	48.0	21.8
NH ₄ OH	H ₂ O	washed	5.0	32.1	38.9
	H ₂ SO ₄	neut'zd	6.0	48.1	31.2
	HCl	"	5.1	31.5	40.5
	H ₃ PO ₄	"	8.8	51.6	42.6
	CH ₃ COOH	"	1.3	30.0	10.8

Strain used ; *C. flavigena* KIST 321

Alkaline treatment; at room temp. for 24hr. with a volume of in alkaline solution by 10 times Neutralization; to pH 7.6

Medium; Treated rice straw 4%, (NH₄)₂SO₄ 0.4%, K₂HPO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄ 7H₂O 0.01%, CaCl₂ 2H₂O 0.01%, Yeast ext. 0.05% and NaCl 0.3%

Culture ; cultured for 5 days.

특히 H₃PO₄로 중화할 때는 균체량 및 기질 소화율이 크게 증진되었으며 CH₃COOH로 중화할 경우는 오히려 무척리 벗질이하로 균체수율 및 기질소모량이 떨어졌다.

NaOH로 처리할 경우 H₃PO₄로 중화하는 것만이 수세하는 것보다 균체량 및 기질소비량이 증가되었으며 HCl이나 H₂SO₄ 및 CH₃COOH로 중화할 경우는 오히려 감소하였다. 이러한 결과의 원인은

좀더 상세히 규명되어야 겠으나 생성된 염의 영향일 것으로 생각 되어서며 H₃PO₄로 중화하는 것이 매우 효과적임을 알았다.

2. NaOH濃度 및 處理時間

4% NaOH 용액을 벗질량의 10배 (V/W) 량으로 처리한 경우 NaOH사용량은 벗질량에 비할 때 40%인 량이므로 그 사용량을 가능한한 줄이는 것이 소망스럽다.

Table 2. Effect of NaOH Concentration and Treating Period on Cellulosic S. C. P. Production.

Treatment	Dry Cell Weight (g/l)					Digestibility Rate (%)				
	Period (hr)					2	4	6	15	24
NaOH										
0.1 (%)			4.0	5.7	5.77			37.0	42.1	50.2
0.2			6.6	7.3	8.1			47.0	55.8	62.3
0.4			7.5	9.4	9.8			58.0	62.8	64.2
0.6		9.5	10.5	11.5	12.0		63.4	65.8	69.0	74.0
1.0	8.0	10.6	10.8	12.4		63.0	66.2	67.0	70.3	
2.0	10.4	12.0	12.4			75.4	77.1	77.8		

Strain; *C. flavigena* KIST 321

Treatment; at room temp. with a volume by 10 times

Neutralization; to pH 7.6 with in H₃PO₄ and Phosphate levels were equally adjusted to 0.092% as pure phosphor (P)

Medium; Treated rice straw; 4%, (NH₄)₂PO₄ 0.4%, MgSO₄ 7H₂O, 0.01%, CaCl₂ 2H₂O 0.01%, Yeast ext. 0.05%, K₂HPO₄ and KH₂PO₄ were added to 0.092% as pure phosphor (P)

Culture; cultured for 5 days

NaOH의 농도를 0.1%에서 2%까지 증가시키면서 처리시간을 2시간 24시간까지 처리한 뒤 H_3PO_4 로 중화하여 기질로 사용한 결과 Table 2와 같다. 이때 중화시에 생성되는 인산염의 함량을 일정히 하기 위하여 2%의 NaOH로 처리후 중화하는데 필요한 량의 H_3PO_4 를 각 처리구에 주입한 후 0.6% NaOH용액으로서 역중화 하였다. 0.6% NaOH 10배량으로 (NaOH/볏짚 = 6%) 15시간 처리하여 H_3PO_4 로 중화 후 사용하여도 40%로 사용할 때와 차이가 없음을 알았다.

알카리 처리효과는 lignocellulose의 xylan chain의 4-o-methylglucuronic acid의 ester결합에 Saponification 혹은 ammolysis에 의한 섬유소 조직이 팽윤되어 기질로서의 볏짚 소화율이 증진되는 것⁽¹²⁾으로 밀짚의 경우 NaOH 사용량이 기질대비 7%가 적정 수준으로 보고 되었다⁽¹³⁾. 본 실험의 결과로서 NaOH 사용량은 기질대비 6%로 사용하도록 하였다.

3. 磷酸鹽의 影響

0.6% NaOH용액을 볏짚에 10배량으로 처리하고 HCl, H_2SO_4 및 H_3PO_4 로 중화하여 기질로 사

용할 때 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 를 동량으로 첨가하여 배지내 phosphate의 농도를 변환시켜 배양한 뒤 균체량과 볏짚 소화율을 측정함으로써 인산염 농도의 영향을 검토하였다. Fig 2과 같이 NaOH로 처리 후 pH 7.6 되도록 H_3PO_4 로 중화한 후에 K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 의 첨가농도를 증가시켜 본 결과 균체량 및 소화율이 완만히 증가하여 중화시 사용한 H_3PO_4 0.16% K_2HPO_4 0.37%, KH_2PO_4 0.37% (인농도로서 0.2%)가 좋았으나 phosphate 농도가 증가에 따른 균체량의 증가는 완만하였다. H_2SO_4 로 중화하여 기질로 사용할 경우 phosphate의 농도는 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , 각 0.15%가 첨가되었을 때 (인농도로서 0.06%) 각각 가장 좋았고 HCl로 중화할 때는 K_2HPO_4 0.10%, KH_2PO_4 0.10% (인농도로서 0.04%)일 때가 좋았으나 H_2SO_4 나 H_3PO_4 보다는 낮았다.

볏짚 소화율은 전체적으로 phosphate의 농도가 증가함에 따라 계속 증가한 결과를 나타내어 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 를 각각 0.15% 첨가되면 전혀 첨가하지 않은 상태보다 2배나 증가되었다. 이러한 결과를 Table 1과 비교해서 고찰하면 K_2HPO_4 , 0.

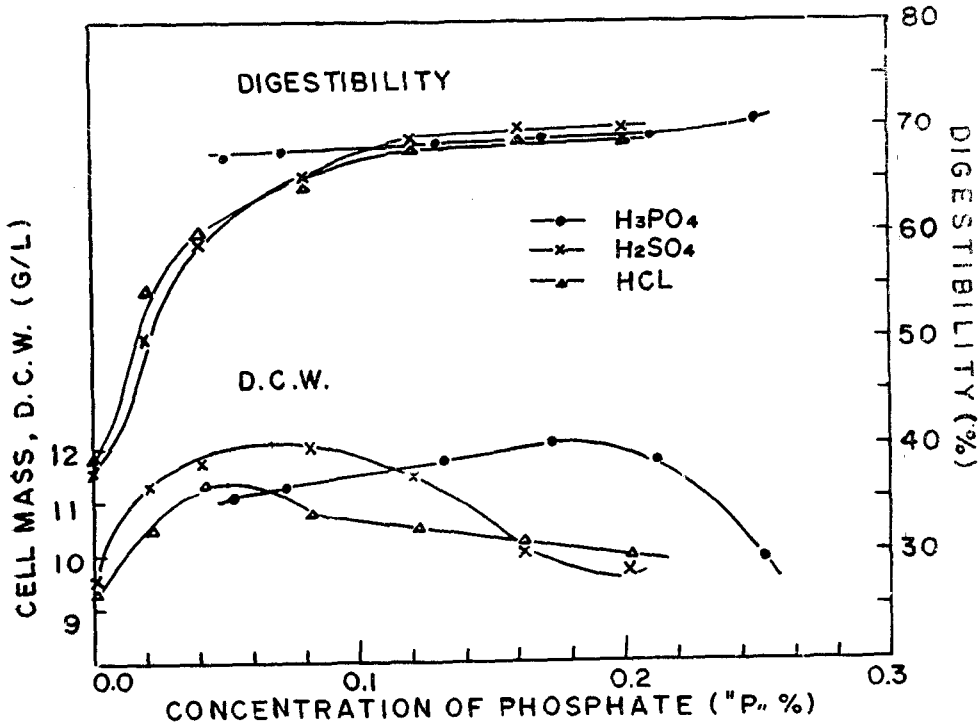


Fig 2. Effects of Various Acids Neutralization after NaOH Treatment and Phosphate Concentration on Cellulosic S.C.P. Production and Substrate Digestibility.

Rice straw treatment: 6% (NaOH/rice straw), 15hr, at ambient temp. and neut'zd to pH 7.6 with in various acids.

Phosphate concentration was controlled with K_2HPO_4 and KH_2PO_4 .

05%, KH_2PO_4 0.05%의 낮은 농도로 첨가한 상태에서 (phosphor 0.02%) 40% 고농도의 NaOH로서 처리후 HCl이나 H_2SO_4 로서 중화하여 기질로 사용하면 중화시 생성된 NaCl 0.6% 혹은 Na_2SO_4 가 1.8%정도나 생성되므로 이들의 영향을 동시에 받아 균체량이 3.8~4.6g/l정도 미치지 못하나 NaOH 사용량을 기질대비 6%로 낮춰 사용하므로 중화시 생성되는 염이 NaCl로 0.27%, Na_2SO_4 로 0.72% 이하로 낮아지면서 phosphate 농도를 0.5%에서 0.15% 증가시켜 주므로해서 균체량 11.80g/l까지 증가시킬 수가 있었다.

Table 1에서 NH_4OH 로서 처리 후 중화하여 사용할 경우도 H_2SO_4 로 중화할 때는 균체생산량이 6.0g/l인데 비해 H_3PO_4 로 중화할 경우 8.8g/l로 증가한 결과의 원인도 phosphate의 농도에 기인하

는 것으로 판단된다.

phosphate의 농도가 균체량 및 기질 소화율에 중요한 역할을 하는 원인은 배양후 배지의 pH를 조정하지 않는 상태에서 pH의 안정에 미치는 영향과 phosphoric acid가 cellulose에 swelling agent로서 사용되는 점으로 판단할 때 phosphate의 일정농도에서 enzyme susceptibility가 증가하는 것이 아닌가 생각되어 진다.

4. NaOH 사용량 및 수분량의影響

NaOH 사용량을 기질(볏짚) 대비 증장비로 1~6%로 변화시키면서 처리시의 수분량을 기질 중량의 (water/substrate) 1~10배량으로 각각 조정하여 상온에서 15시간 처리 후 H_3PO_4 로서 중화시킨 볏짚을 기질로 사용할 때의 균체량 및 기질 소비량을 측정할 결과 Table 3과 같다.

Table 3. Effects of NaOH and Water-to-Substrate Ratio in Rice straw Treatment on Cellulosic Single cell Protein Production.

Treatment condition		Dry cell weight (g/l)					Digestibility (%)				
NaOH	water	1	2	3	5	10	1	2	3	5	10
	substrate										
	1 (%)	4.8	6.3	6.0	5.6	5.3	33.6	35.4	35.8	31.5	30.3
	2	8.0	8.1	9.3	9.2	9.0	37.0	39.3	36.5	36.5	34.8
	3	9.0	10.1	10.2	9.6	9.7	42.5	43.6	47.9	44.5	39.6
	4	10.3	10.6	10.4	10.3	10.3	51.2	52.9	51.7	52.0	51.9
	5	11.2	12.4	12.2	12.1	10.5	61.8	63.1	61.1	60.0	61.6
	6	9.7	9.6	12.4	12.4	9.6	60.6	68.7	72.3	70.1	60.8

Strain; *C. flavigena* KIST 321

Treatment; 15hr. at room temp.

Neutralization; to pH 7.6 with in H_3PO_4

Medium; Treated rice straw 4%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.4%, K_2HPO_4 0.1% KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01% Yeastext. 0.05% and NaCl 0.3%,

Culture; Cultured for 5 days

water/substrate의 비율 2~3배량인 것이 전체적으로 좋았으나 2배의 용액으로서 볏짚에 처리할 경우는 풀고루 적시기가 약간 곤란하나 3배량의 용액으로 사용할 때는 균일하게 혼합할 수 있었다 이렇게 함으로써 NaOH 사용량은 기질대비 6%에서 5%까지 줄일 수 있었다.

5. 蒸煮効果

NaOH 처리시 증자과정을 동시에 수행하면 alkali 처리 효과도 증진되면서 멸균효과를 얻을 수 있으므로 121°C에서 증자하되 경제적인 면을 고려하여 최고 2시간 동안 처리후 H_3PO_4 로 중화한 볏짚을 사용한 결과 Table 4와 같다.

121°C에서 30분 처리하면 상온에서 15시간이상 처리한 것과 동일한 효과를 나타내는 것을 알았다. 이러한 결과는 상온에서 5~6%로 15시간이상 처리하는 대신 121°C에서 30분 처리함으로써 알카리 처리의 최대효과를 얻을수 있음을 알았다.

要 約

섬유소자화세균 (*Cellulomonas flavigena* KIST 321) 으로서 볏짚을 기질로 하여 단세포단백을 생산함에 있어 볏짚을 분쇄한 뒤 NH_4OH 및 NaOH 로서 처리하고 각종의 산으로 중화할 때의 균체의 생산성을 검토하였다.

Table 4. Effects of Steaming and Alkaline Treatment of Rice straw on Cellulosic Single Cell Protein Production.

Steaming time	Dry cell weight (g/l)	Digestibility (%)
0 min.	7.2	47.5
10	9.3	56.7
20	11.8	64.3
30	12.4	64.2
60	12.8	65.4
120	10.2	65.3

Strain used: *C. flavigena* KIST 321

Treatment: at room temp. with a volume by 10 times

Neutralization, medium and culture conditions; see Table 3.

1. 볏짚분말을 1 규정농도의 NaOH, NH₄OH 용액 10배량으로 처리한 뒤(기질대비 NaOH 사용량은 40%) 과잉의 알칼리를 수세 또는 H₃PO₄, H₂SO₄, HCl, CH₃COOH 등의 산으로 중화하여 기질로 사용한 결과 H₃PO₄로 중화하는 것이 가장 좋았으며 이때 균체생산량은 12.2811 기질소화량은 78%였다.

2. NH₄OH 처리보다는 NaOH 처리가 효과적이었으므로 NaOH 사용량을 기질대비 1~20%로 변경하여 처리후 H₃PO₄로 중화하여 사용한 결과 6%의 농도로 상온에서 15~24시가 처리함이 적당하였다.

3. NaOH 처리시 수분량은 물/볏짚비율이 2 내지 3이 적당하였고 NaOH/볏짚 비율은 6%에서 5% 정도로 줄일수 있었다.

4. 볏짚의 알칼리 처리시 121°C에서 30분간 처리하면 상온에서 15~24시간 처리효과와 동일한 효과를 얻을수 있으며 멸균효과도 기대할 수 있다.

5. 배지내의 인산염의 농도를 K₂HPO₄ 및 KH₂

PO₄ 동량으로 0.2~0.3%로 조절하면 HCl 및 H₂SO₄로 중화하여도 H₃PO₄로 중화할때와 동일한 결과를 얻었다. 즉 HCl로 중화할때는 인산염 농도를 0.2% (phosphorous 농도로 0.04%)로 조절하여 11.2g/l의 균체량을 얻었고 H₂SO₄로 중화할 때는 인산 농도를 0.3% (인농도 0.04%)로하여 12.2g/l의 균체량을 얻어 H₃PO₄로 중화할때 보다 경제적인 면에서 효과적임을 알았다.

참 고 문 헌

- (1) M. Bae and B.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2**, 1 (1974)
- (2) M. Bae and B.H. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **2**(2) 79 (1974)
- (3) Han Y.W. and V.R. Scrivivan: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1140 (1968)
- (4) Han Y.W. and C.D. C2llihan: *Appl. Microbiol.*, **27**, 159 (1974)
- (5) Crawford D.L. and E. McCoy: *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 150 (1972)
- (6) Crawford D.L. and E. McCoy, *Biotechnology and Bioengineering*, **13**, 77 (1971)
- (7) Eriksson, K.E. and K. Larsson: *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 327 (1975)
- (8) Peitersen, N.: *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 361 (1975)
- (9) Peitersen, N.: *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, 1291 (1975)
- (10) Huang, T.L., Y.W. Han and C.D. Calihan *J. Ferment Technol.*, **49**, 574 (1971)
- (11) Osamu, M. and D.B. Zilvermit: *Biochemistry*, **6**, 320~327 (1963)
- (12) Tarkow, H. and W.C. Feist.: *Advances in Chemistry*, **95**, 187
- (13) Wilson R.K and W.J. Pigden: *Can. J. Animal Sci.*, **44**, 122 (1964)