



사탕무 알콜증류폐액을 기질로 효모균체를 생산할 때 기질의 초기 pH와 배양온도가 균체생산량과 COD감소에 미치는 영향

이기영[†]

호서대학교 자연과학부 식품생물공학전공
(2005년 11월 14일 접수, 2005년 12월 12일 채택)

A Study on the Effect of Initial pH and Cultivation Temperature of Substrate on the Biomass Production and COD-reduction in the Yeast Cultivation in Sugar Beet Stillages

Ki Young Lee[†]

Food & Biotechnology, Hoseo University, Asan, Chungnam, Korea

ABSTRACT

Sugar beet stillages were used as a substrate for the production of single cell protein by the thermotolerant yeasts *Candida rugosa*, *Kluyveromyces marxianus* and *C. utilis*.

The biomass production increased in accordance with the increase of pH-value, but protein content decreased. *C. rugosa* showed the highest crude protein production as 3.68g/l and *C. utilis* 2.9g/l, *Kl. marxianus* 2.30g/l, respectively. The rate of COD reduction in stillage versus crude protein production of *C. rugosa* showed the highest value as 0.35~0.39g/l as a good strain for single cell protein production using sugar beet stillages.

Keywords : sugar beet stillage, yeast biomass, COD reduction, *Candida rugosa*, *Kl marxianus*, *C. utilis*

초 록

사탕무즙을 이용한 알콜생산에서 배출되는 증류폐액(sugar beet stillage)을 기질로 고온성 효모인 *Candida rugosa*, *Kl. marxianus*, *C. utilis*를 이용해 단세포단백질을 생산 할 때 균체 생산량 및 COD 감소를 연구하였다. pH가 높아짐에 따라 균체생산량은 증가했으나 단백질 함량은 오히려 감소하였다. 조단백질생산량은 3.68g/l로 *C. rugosa* 가 가장 높았고 이어서 *C. utilis*가 2.90g/l, *Kl. marxianus*가 2.30g/l로 나타났다. 감소한 증류폐액기질의 COD값에 대한 조단백질생산량비율도 *C. rugosa*가 0.35~0.39g/l를 나타내 가장 높은 값을 보여줌에 사탕무알콜증류폐액을 기질로 이용한 단세포 단백질 생산에 있어서 중

[†]Corresponding author (kylee@hoseo.ac.kr)

균으로서 우수성을 보여주었다.

핵심용어 : 사탕무알콜증류폐액, 효모균체, COD 감소, *Candida rugosa*, *Kl marxianus*, *C. utilis*

1. 서론

최근 농수산 가공이나 가정에서 발생하는 음식물 쓰레기등 유기성 폐기물질이 매년 증가하고 있다 (환경부, 2004). 도시화나 산업화가 확산되기 이전에는 소량으로 나오는 대부분의 유기성 폐기물들이 바로 퇴비나 동물사료로 이용되어 처리에 어려움이 없었다. 그러나 이제는 도시에서 매일 대량으로 방출되는 유기성 폐기물들을 매립이나 해양투기로 해결하기에는 한계가 있어 이들의 재활용에 대한 체계적인 자원화 연구가 필요하다. 더구나, 우리나라의 경우 축산농가에서 필요한 대부분의 사료를 수입에 의존하고 있으며 대형축사에서 한꺼번에 많은 수의 가축을 사육하다보니 각종 질병에 취약해 항생제가 다량으로 투여되고 있는 실정이다.

2001~2004년 항생제 판매실적과 외국자료를 토대로 작성한 '우리나라 축수산업의 항생제 오·남용 실태 정책보고서'에 따르면 국내 축수산업의 항생제 사용량은 연간 1,500t으로 축산품 생산량이 우리나라의 1.2배인 덴마크의 연간 사용량인 94t의 무려 16배로 생산량 대비 항생제 사용량이 세계 최고수준이다²⁾. 항생제 사용량은 가축별로 2001~2003년 평균 돼지 871,741kg, 닭 350,975kg, 수산물 192,699kg, 소 109,500kg순이었다. 투여 경로별로는 배합사료에 포함(54%), 농가 임의치료(40%), 수의사 처방(6%) 순이었다. 우리나라에서 일반적으로 행해지고 있는 항생제 사료배합, 농가 자가 투여는 규제망에서 벗어나 오·남용의 근원이 될 수 있다. 그러나 보통 선진국은 두 가지 사용법을 엄격히 금지하고 있다.

효모나 젖산균등 식품발효에 관여하는 미생물들은 동물의 장내미생물들의 증식과 건강증진에 매우 효과적이어서 사료에 생균첨가제(probiotics)로 이용되어왔다. 특히 유산균은 펩타이드 종류의 항균물질들을 생산해 유해균의 증식을 억제하고

장내세균으로서 동물의 건강을 증진시켜준다. 따라서 각종 영양성분이 많이 함유된 유기성 폐기물을 이용해 생균첨가제를 값싸게 생산한다면 매우 효율적인 재활용방법이 될 것이다. 이 때문에 음식물 침출수³⁾, 김치폐기물⁴⁾, 두유폐수⁵⁾, sugar cane bagasse⁶⁾, 새우가공폐수⁷⁾를 single cell protein(SCP)로 전환시키는 연구들이 진행되어 왔다.

본 연구에서는 사탕무즙을 이용해 생산한 알콜을 증류·회수한 후 남는 고농도 유기성 폐수인 Sugar Beet Stillage(이하 SBS)를 기질로 내열성 효모를 이용해 SCP를 생산하고자 기질의 최적화를 시도하였다. 알콜증류폐액(stillage, distillery alcohol slops)은 알콜 1리터 생산에 10~15리터가 나오며 대체로 pH가 낮고 색깔이 진하며, 유기오염도가 매우 높아 COD 값은 평균 60~70g/l에 달한다. 지하수나 지표수의 오염원이 되며 오염부하가 매우 높아 폐수처리장에서의 직접 처리가 불가능해 대부분 다른 가정용 폐수등과 섞어 충분히 희석시켜 폐수 처리장으로 보내는 방법이 사용된다. Stillage는 유기산, 단백질, 잔여당성분 등 미생물들이 이용할 수 있는 자화원이 많이 남아있어 이를 이용해 효모균체를 생산한다면 단백질과 비타민함량이 높은 좋은 사료원료로 이용할 수 있을 것이다⁸⁾.

각각 조성이 서로 다른 SBS A, B, C와 C¹⁰을 기질로 48시간동안 진탕배양시킬 경우 초기기질의 pH 값과 배양온도가 생균효모균체 생산과 COD 감소율에 미치는 영향을 조사하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험재료

2.1.1 알콜증류폐액

알콜증류폐액은 VLSF Berlin에서 나온 서로 다

른 SBS A, B, C 세 종류와 C를 65% 고형분 농도를 갖도록 증발농축시켜 보관한 뒤 다시 증류수로 희석해 고형분 농도가 10%가 되도록 복원시킨 C¹⁰의 4가지를 이용하였다. 시료로 사용된 이들 4가지 시료의 화학적 성분조성과 물리적 특성은 이미 발표된 바와 같다⁸⁾.

2.1.2 균주

발효용 효모로는 *C. rugosa*, *Kl. marxianus*, *C. utilis*를 사용했고 이 효모들은 동아프리카에서 분리되었다⁹⁾.

2.1.3 첨가 영양원

효모의 증식에 필요해 첨가한 비타민과 미량영양원의 첨가농도와 조성은 다음과 같다.

2.2 실험방법

2.2.1 발효조건

250ml-Erlenmeyer flask에 각 SBS기질

100ml를 채워 멸균시킨 뒤 미리 배양기에서 키운 호모종균을 한 백금이 취해 접종한 뒤 분당 170회 진탕시키며 38℃에서 48시간동안 발효시켰다. 발효종료 후 mass flask 에서 부피를 측정한다 뒤 발효도중 증발된 부피만큼 증류수를 다시 보충해준 뒤 시료분석에 이용하였다. 초기배양액의 pH값은 황산과 수산화나트륨으로 조정되었다.

2.2.2 시료분석

COD : 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand)은 DIN 38409법에 의해 Thermoreactor TR 105(Merck, Darmstadt)를 이용해 측정했다. 표준시약(COD 200mg/l)으로는 potassium hydrogen phthalate 용액(0.17g/l)을 이용하였다.

총단백질 : Kjeldahl 방법에 의해 측정한다 뒤 질소계수 6.25를 곱해 조단백질로 나타냈다.

2.2.3 Biomass 무게 측정

배양액을 흔들어 골고루 섞이게 만든 뒤 10ml를 취해 1,000g에서 원심분리시켜 상액을 버린 후

[Table1] Vitamin Mixture for the Study of Vitamin Requirement

Vitamin	Concentration (mg/l)
D-biotin	50
Niacine	10
Ca-pantothenate	6
Pyridoxine-HCl	40
Thiamine-HCl	30
Inositol	100

[Table2] Trace Element Mixture for the Study of Trace Element Requirement

Trace element (mg/l)	Concentration (mg/l)
H ₃ BO ₃	2.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
MnSO ₄ 4H ₂ O	1.0
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.5
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.5
NaJ	0.3
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1

105℃에서 하루 밤 건조시켜 방냉한 뒤 무게를 달아 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 초기 pH의 영향

배양액의 pH와 증식온도는 효모를 비롯한 미생물의 증식에 가장 중요한 요소이며 효소에 의해 조절되는 미생물의 신진대사과정에 영향을 미친다. [Table 3]은 초기 기질 SBS B의 pH가 *C. rugosa*, *Kl. marxianus*의 균체생산량과 기질의 COD의 감소율에 미치는 영향을 *C. utilis*와 비교해 보여준다. 대체로 초기기질의 pH값이 낮으면 발효후의 값도 낮게 나타났다. 젖산 등의 유기산이 자화되면서 수소이온농도가 떨어졌기 때문이다.

pH값이 3.5이하에서는 모든 효모들이 증식하지 않았다. pH 4.0에서는 *C. rugosa*, *Kl. marxianus*는 증식했지만 *C. utilis*는 증식하지 않았다. 낮은 pH 범위에서 모든 효모들은 상대적으로 적은 생균생산량을 보였지만 반면 균체단백질 함량은 높았다. 특히 *C. rugosa*는 대부분의 pH

조건에서 큰 차이없이 잘 증식했고 생균생산량이나 COD 감소율도 가장 높았다. 원래 기질의 pH인 4.3에서 생균생산량은 9.78g/l를 나타내 같은 pH에서 6.23으로 최고값을 보인 *Kl. marxianus*나 pH 5.0에서 7.02g/l로 최고값을 보인 *C. rugosa*보다도 훨씬 높았다. *Kl. marxianus*나 *C. utilis*는 pH. 4.0에서 상대적으로 낮은 균체생산량을 보여 pH가 낮아지면서 대사가 저해를 받는 것으로 생각되었다. 대체로 pH가 높아지면서 균체생산량은 증가했으나 단백질 함량은 오히려 감소하였다. 본연구의 목적인 조단백질생산량은 3.68g/l로 *C. rugosa*가 가장 높았고 이어서 *C. utilis*가 2.90g/l, *Kl. marxianus*가 2.30g/l를 보여주었다. 감소한 COD값에 대한 균체생산량($Y_{bmp/cod}$)이나 조단백질생산량($Y_{cpp/cod}$)도 *C. rugosa*가 각각 0.35~0.39와 0.13~0.14를 나타내 가장 높은 값을 보여주었다. Fiedler(1981)에 따르면 pH 4.5 이하의 조건에서 수소이온농도가 높아지면 기질에 포함된 독성물질인 부틸산등의 휘발성저급지방산이나 nitrite, sulfite, 중금속, 계면활성제, 메라닌 등이 대사저해를 촉진하는 것으로 보인다.

[Table 4] Influence of pH Value of Stillage B on the Yeast Biomass Production and COD-Reduction in the Sugar Beet Stillages by Some Yeast

Yeast strain	pH		bmp, g/l	cpc, %	cpp, g/l	COD-reduction (%)	$Y_{bmp/cod}$	$Y_{cpp/cod}$
	begin	final						
<i>C. rugosa</i>	4.0	7.5	9.02	38.7	3.49	37.7	0.37	0.14
	4.3	8.6	9.78	37.6	3.68	41.9	0.36	0.13
	4.5	7.5	9.29	38.0	3.53	40.1	0.35	0.13
	5.0	9.2	9.18	35.1	3.22	37.2	0.38	0.13
	5.5	9.3	8.93	34.8	3.11	35.3	0.39	0.13
<i>Kl. marxianus</i>	4.0	8.0	4.79	40.7	1.95	35.5	0.21	0.08
	4.3	7.5	6.23	37.5	2.30	39.0	0.24	0.09
	4.5	7.8	5.90	36.1	2.13	39.8	0.23	0.08
	5.0	8.9	6.06	36.1	2.19	36.6	0.25	0.09
	5.5	8.9	5.64	36.7	2.07	33.7	0.26	0.09
<i>C. utilis</i>	4.0	-	-	-	-	-	-	-
	4.3	6.0	4.82	51.6	2.48	23.2	0.32	0.16
	4.5	7.9	6.65	43.7	2.90	35.3	0.29	0.13
	5.0	8.9	7.02	40.9	2.87	37.7	0.28	0.12
	5.5	8.8	7.00	40.9	2.86	35.9	0.30	0.12

bmp(g/l) : Biomass production,
cpp(g/l) : Crude protein production,

cpc(%) : Crude protein content,
phosphate added(0.5 g/l) as ortho-phosphate

3.2 온도의 영향

효모증식에 있어서 온도의존성은 특히 경제성에 미치는 영향이 매우 큰 요소이다. 30, 35, 40, 42, 45°C에서 세 종류의 알콜증류폐액 기질에 내열성 효모인 *C. rugosa*와 *Kl. marxianus*를 증식시켰을 때 균체생성량과 COD-감소결과가 [Table 5]에 나타나있다. 배양온도가 40°C까지 높아지면서 균체생성량은 약간 감소하였는데 $Y_{bmp/cod}$ 와 $Y_{cpp/cod}$ 값도 동시에 낮아짐이 관찰되었으나 COD 값은 대체로 변화가 없었다. Snedecar와 Cooney(1974)도 보고했듯이 효모의 균체전환율은 배양온도에 역비례 하였다. 이것은 배양온도가 높아지면 효모의 maintenance energy는 높아지고 단백질과 핵산이 빨리 생성되면서 이 때문에 상대적으로 적은 에너지가 균체생성에 투입되기 때

문이다¹²⁾. 또 한편 40°C까지는 온도가 오르면서 증식속도가 빨라져 stationary phase가 길어지기 때문이다.

무엇보다도 높은 온도에서는 낮은 온도에서보다 효모세포가 쉽게 자가분해되어 효모회수율이 떨어진다. 이 결과 40°C에서 배양할 때 두 효모의 균체생산량은 감소했지만 COD 감소율은 크게 변함이 없었다. 42°C에서부터는 대사능력이 급격히 떨어지면서 균체생산량과 COD 감소율이 기질의 특성에 크게 좌우되는 것으로 생각되었다. 45°C에서는 알콜증류폐액 A에서 단지 *Kl. marxianus*만이 증식을 보여주었으며 기질 A에는 효모의 증식을 저해하는 휘발성산이나 sulfite가 비교적 적게 함유되어있었다⁸⁾. 배양온도가 높아짐에 따른 이러한 결과는 알콜증류폐액의 복잡한 조성에 기인된 것

[Table 5] Influence of Culture Temperature on the Yeast Biomass Production and COD-Reduction in the Sugar Beat Stillages by the Yeasts *C. Rugosa* and *Kl. Marxianus*

Temp (°C)	Yeast	Stillage	final pH	bmp(g/l)	cpc (%)	cpp (g/l)	COD-reduction(%)	$Y_{bmp/cod}$	$Y_{cpp/cod}$
30	<i>C. rugosa</i>	A	7.6	7.67	36.7	2.81	36.7	0.42	0.16
		B	7.9	9.84	39.6	3.90	38.5	0.39	0.16
		C ₁₀	8.6	19.73	32.3	6.37	47.8	0.46	0.15
	<i>Kl. marxianus</i>	A	6.8	5.90	35.0	2.07	35.0	0.34	0.12
		B	6.7	6.81	37.0	2.52	36.5	0.29	0.11
		C ₁₀	7.6	17.50	31.0	5.43	46.6	0.42	0.13
35	<i>C. rugosa</i>	A	8.1	7.33	35.9	2.63	38.8	0.38	0.14
		B	7.6	9.59	37.0	3.55	40.1	0.37	0.14
		C ₁₀	8.3	18.82	33.2	6.25	52.3	0.40	0.13
	<i>Kl. marxianus</i>	A	7.0	5.50	35.2	1.94	33.7	0.33	0.12
		B	6.6	6.25	36.6	2.29	36.8	0.26	0.10
		C ₁₀	7.4	16.75	32.3	5.41	46.5	0.40	0.13
40	<i>C. rugosa</i>	A	7.3	7.01	36.4	2.55	38.4	0.37	0.13
		B	7.5	9.42	35.4	3.33	39.8	0.36	0.13
		C ₁₀	7.7	17.17	31.9	5.89	49.0	0.39	0.12
	<i>Kl. marxianus</i>	A	7.2	4.60	36.2	1.67	35.4	0.26	0.10
		B	6.9	5.98	34.9	2.09	36.7	0.25	0.09
		C ₁₀	7.3	14.82	31.9	4.73	46.0	0.36	0.11
42	<i>C. rugosa</i>	A	7.4	5.16	35.5	1.54	27.3	0.38	0.14
		B	4.3	2.30	35.4	1.01	9.4	0.37	0.13
		C ₁₀	6.0	13.42	31.4	4.21	34.9	0.43	0.13
	<i>Kl. marxianus</i>	A	7.2	4.48	34.9	1.56	28.7	0.31	0.11
		B	6.3	4.83	35.3	1.71	24.9	0.30	0.11
		C ₁₀	7.5	12.00	31.4	3.77	38.0	0.35	0.11
45	<i>Kl. marxianus</i>	A	7.1	4.36	35.2	1.53	34.5	0.26	0.09

bmp(g/l) : Biomass production,
cpp(g/l) : Crude protein production,

cpc(%) : Crude protein content,
phosphate added(0.5 g/l) as ortho-phosphate

으로 보이며 특히 효모가 이용 가능한 기질과 동시에 증식을 억제하는 물질을 동시에 함유하고 있기 때문으로 생각된다. *Kl. marxianus*는 내열성과 동시에 *C. rugosa*와 견줄만한 COD제거 능력도 보여주었다. 두 효모균종의 조단백함량은 배양온도와 관계없이 기질에 따라 다르게 나타나 C¹⁰에서 낮고 A와 B에서 높게 나타났다.

4. 결론

미생물의 대사는 기질의 성분조성, pH값, 온도, 삼투압 및 산소공급 등 외부조건에 크게 좌우된다. 이 parameter들은 세포막의 기능을 변화시켜 대사경로를 바꾸어 기질의 흡수나 유기산, 알콜 등 2차 대사물질의 생성, 효모의 형태에 영향을 준다. 효모가 증식하는 동안 대사경로를 잘 파악해야만 원하는 공정으로 원활하게 진행시킬 수 있다¹³⁾. 본 실험결과 *C. rugosa*는 pH값이 낮은 배양조건에서도 잘 증식해 생균생산량, 단백질 생산량이 가장 높았고 또한 COD 감소율도 가장 높았다. 뿐만 아니라 40도 이상의 높은 온도에서도 비교적 잘 증식해 사탕무알콜증류폐액을 기질로 이용한 단세포단백질생산시 종균으로 알맞다고 사료되었다.

참고문헌

1. 환경부, 폐기물 종류별 발생현황 분석, 전국 폐기물 발생 및 처리현황, p. 5, (2004).
2. 한국 수의과학 검역원, 2005 정기국회 사회인권1분야정책보고서 I, 축수산 동물약품(항생제) 실태보고서, 축수산물 항생제 오남용 실태와 개선방향, p. 10, (2005).
3. Kim, DW, HW Jeong, KS Lee, HY Park and KY Lee, Study on the odor reduction of food waste leachate by some microorganisms J. Kor. Organic Resources Recycling Association. Vol. 13, No.2, pp. 91~97 (2005).
4. Choi, M. H. & Park. Y. H., Growth of *Pithia guilliermandii* A9, an

- osmotolerant yeast in waste brine generated from kimchi production, *Bioresource Technology* 70, pp. 231~236 (2002).
5. Cheung, P. C.-K., Chemical evaluation of some lesser-known edible mushroom mycelia produced in submerged culture from soymilk waste. *Food Chemistry* p. 60, pp. 61~67 (1997).
6. El-Nawwi. S. A., & Anal Abd. El-Kader, Production of single cell protein and cellulase from sugarcane bagasses: effect of culture factors. *Biomass and Bioenergy* 11, pp. 361~364 (1996).
7. Ferrer, J., Paez. G., Marmol. Z., Ramones. E., Garcia., H., & Forster, C.F., Acid hydrolysis of shrimp-shell wastes and the production of single cell production from the hydrolysate, *Bioresource Technology* p. 57, pp. 55~60 (1996).
8. Lee, Ki-Young, Study on the optimization of substrate and COD-reduction in the cultivation of yeast *Candida rugosa* in sugar beet stillages, J. Kor. Organic Resource Recycling Association Vol. 12, No.3, (2004).
9. Lee, Ki-Young & Sung-Taek Lee, Continuous process for yeast biomass production from sugar beet stillage by a novel strain of *Candida rugosa* and protein profile of the yeast, J. Cem. Tech. *Biotechnol* 66, pp. 349~354 (1996).
10. Fiedler, A., Untersuchung ueber hefehemmende Melasseinhaltsstoffe, Dissertation TU Berlin, D 83/FB 13, (1981).

11. Snedegar, B. and Cooney, C. L., Thermophilic mixed culture of bacteria utilizing methanol for growth, Appl. Microbiol. 27, pp. 1112~1117.
12. Forage, R. G., Harrison, D.E.F. and Pitt, D.E., Effect of environment on microbial activity in : Comprehensive Biotechnology, Moo-Young, M(eds), pp. 251~279 (1985).
13. Crueger, W, and Crueger, A., Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, R. Olden-burg Verlag Muenchen, Wien, pp. 50~92 (1984). 