

Research Note

## 옥수수 침지액의 효모발효를 통한 고효율 피틴 생산공정 개발

박은희 · 이종섭 · 박상재<sup>1</sup> · 이용진<sup>2</sup> · 김명동\*

강원대학교 식품생명공학과, <sup>1</sup>(주)에이지아이, <sup>2</sup>춘천바이오산업진흥원

### Development of an Efficient Phytin Production Process from Light Steep Water by Yeast Fermentation

Eun-Hee Park, Jong-Sub Lee, Sang-Jae Park<sup>1</sup>, Yong-Jin Lee<sup>2</sup>, and Myoung-Dong Kim\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

<sup>1</sup>AZI Co., Ltd.

<sup>2</sup>Chuncheon Bioindustry Foundation

#### Abstract

A simple method for improving the phytin production process by yeast fermentation of light steep water (LSW) of corn was developed in this study. The initial acidity of LSW was pH 4 because it contained 3% (w/v) lactic acid, and the pH increased to 7.5 after 33 h of yeast fermentation to produce phytin at a final concentration of 1.0% (w/v) without addition of Ca(OH)<sub>2</sub>. The phytin produced by yeast fermentation showed 12.3% (w/w) protein content, which corresponds to 28.9% of that obtained by neutralization of LSW. The settling rate of phytin produced by the yeast fermentation was 1.6 times faster than that with the neutralization method.

**Key words:** phytate, phytin, light steep water, lactic acid, yeast fermentation

## 서 론

피틴산(phytate)은 곡류를 비롯한 식물의 씨앗에 함유되어 있는 성분으로 식물에 있어 가장 풍부한 유기인 함유물질 중의 하나이다(Graf & Empson, 1987). 최근 피틴산의 기능성에 대하여 대장암 발병율의 저하, 항산화 작용, 지질의 과산화 억제, 면역증강효과 등에 관한 연구결과가 보고되고 있다(Graf & Empson, 1987; Graf & Eaton, 1990; Kakuta, 2008; Xu et al., 2008; Kumar et al., 2010; Suzuki & Hara, 2010). 피틴산을 다량으로 함유하고 있는 것으로서 옥수수 침지 폐액(corn steep liquor), 미강 등이 있으며, 이 중 미강 내 피틴산의 함량이 상대적으로 높은 것으로 알려져 있다(Raboy, 1997). 피틴은 피틴산의 염을 지칭하는 것으로서 주로 칼슘과 마그네슘염의 형태로 존재하며 식물의 씨앗 내 총 인 함량의 60-90%를 차지하는 것으로 알려져 있다(Lambrechts et al., 1992;

Ahn et al., 2000).

Corn steep liquor(CSL)는 옥수수전분을 제조하는 과정에서 옥수수를 아황산용액에 침지한 후 젖산발효를 통하여 얻어지는 액으로서 다량의 단백질과 전분질을 함유하고 있다(Yu et al., 2008). 침지와 발효 과정에서 옥수수에 함유된 피틴산은 용출되어 CSL에 포함된다. CSL은 제조과정 중 얻어진 농축된 상태이며 농축하기 전의 액은 light steep water(LSW)로 지칭한다. LSW에 함유된 젖산, 환원당 및 질소원들은 미생물의 영양원으로 이용될 수 있는 성분들이며(Rausch et al., 2003), 농축액인 CSL은 발효용 배지의 영양성분으로서 많이 사용되고 있다(Maddipati et al., 2011).

현재까지 보고된 피틴의 제조방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, CSL을 알칼리로 중화하거나 미강을 산으로 추출한 후 알칼리로 중화하여 침전시킨 후 석출하는 방법이 있다(Graf, 1983; Saad et al., 2011). 중화 후 침전된 피틴은 주로 여과 또는 원심분리법으로 회수하는데, 이 방법은 회수되는 침전의 크기가 미세하여 회수율이 낮은 단점이 있다(Akbarov et al., 1979). 또한 중화과정 중 다량의 단백질이 포함되어 침전되기 때문에 순도가 낮고 수분을 함유한 고형 물질의 형태로 얻어지기 때문에 공정 중 노즐의 막힘 현상 등의 문제점이 발생하여 제조공정을 복잡하

\*Corresponding author: Myoung-Dong Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
Tel: +82-33-250-6458; Fax: +82-33-241-0508  
E-mail: mdkim@kangwon.ac.kr  
Received June 27, 2012; revised August 6, 2012; accepted August 6, 2012

게 하는 단점이 있기 때문에 중화 및 침전을 통하여 피틴을 제조하는 기존 공정의 개선이 필요하다(Graf, 1983).

본 연구에서는 옥수수침지액인 LSW에 함유된 젖산을 효모발효를 통하여 제거하고 이로 인한 pH 상승으로 피틴의 침전을 유도하여 중화법을 사용하는 기존 공정보다 용이하고 효율이 높은 피틴 생산공정을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### LSW 전처리

본 연구에 사용된 LSW는 (주)삼양제넥스사(Daejeon, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. LSW 중의 불용성 고형분은 여과지(TY2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan)로 여과한 후 8000×g에서 20분간 원심분리하고 여과막(Nalgene, Rochester, NY, USA)으로 제거하여 효모배양용 배지로 사용하였다.

### 효모 균주

전처리 된 LSW의 발효에 사용된 효모는 실험실 균주인 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741(Cohen R & Engelberg D, 2007)를 사용하였다. 효모세포의 성장속도는 흡광광도계(GE Healthcare Bio-Science Corp., Uppsala, Sweden)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

### 피틴산 및 젖산농도 측정

발효액을 원심분리하여 효모균체를 제거한 후 발색법을 이용하여 피틴산의 농도를 측정하였다(Mohamed et al., 1986). 발효액(0.2 mL)은 4.6 mL의 증류수와 10 N 염산용액에 용해시킨 1% FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 용액 0.2 mL을 혼합하여 95°C에서 30분간 가열하고 상온에서 30분간 냉각시킨 후 830 nm에서 흡광도를 측정하여 피틴산의 농도를 측정하였다.

젖산농도는 HPLC(LC-20A Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다. Rezex ROA-Organic Acid H<sup>+</sup>(Phenomenex, Torrance, CA, USA) 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로 5 mM 황산용액을 0.6 mL/min의 유속으로 흘려주었다. 검출기는 굴절률 검출기(RID-6A, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하였다.

### 발효조건

효모는 전처리한 LSW 배지를 사용하여 30°C, 200 rpm 조건으로 진탕배양기(HB-201SF, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)를 이용하여 12 시간 동안 배양한 후 3 L의 배지가 포함되어 있는 발효기(KFC-5L, KoBiotech, Incheon, Korea)에 초기 세포농도 OD<sub>550nm</sub> = 2.5로 접종하였다. 통기조건은 1 vvm을 유지하였으며 용존 산소 농도는 조절하지 않았다.

### 중화법에 의한 피틴의 침전

Ca(OH)<sub>2</sub>를 이용한 Graf(1983)의 중화법을 이용하여 LSW 중에 함유된 피틴의 침전을 유도하였으며, 생산된 피틴의 농도는 Kutlukova et al.(1972)이 제시한 방법을 이용하여 측정하였다.

### 단백질 농도 측정

시료중의 단백질 농도는 Bradford법(Bradford, 1976)을 사용하여 측정하였으며, Bovine serum albumin(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 표준물질로 사용하였다.

### 금속이온 농도 및 침강속도 측정

피틴 중에 함유된 금속이온의 농도는 원자분광기(Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 측정하였고, 피틴의 침전속도는 시간에 따른 침전물의 높이를 측정하여 결정하였다.

### 현미경

실험실용 정립 현미경(BA310, Motic, Hong Kong, China)을 사용하여 발효과정 중의 효모 세포의 성장 및 피틴 침전을 관찰하였다.

### 통계분석

모든 실험은 3 회 반복하여 평균과 표준편차를 결정하였으며 실험값의 통계분석은 SPSS(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였다.

## 결과 및 고찰

전처리 된 LSW는 피틴산 1%(w/v), 젖산 3%(w/v)를 함유하고 있었으며 pH는 약 4 였다. 전처리한 LSW를 배지로 사용하여 *S. cerevisiae* BY4741를 배양하였을 때 배양 개시 후 약 30 시간 동안 젖산의 농도가 현저하게 감소하였으며 발효 종료 후 pH는 4에서 7.5 이상으로 증가하였다(Fig. 1). 이 때 LSW에 함유되어 있던 피틴산 침전으로 분리되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 발효에 의하여 생성된 피틴의 침전은 그 크기가 효모의 수배 혹은 수십 배에 달하였으며, 침전이나 원심분리를 통하여 회수 할 수 있을 것으로 판단되었다. 발효과정에서 효모의 최대 비성장속도는 0.17 h<sup>-1</sup>이었으며, 이는 YEPD 배지에서의 *S. cerevisiae* BY4741의 비성장속도(0.18 h<sup>-1</sup>)와 비슷한 수준이었다. 이러한 결과는 *S. cerevisiae* BY4741가 전배양 단계에서 LSW 배지성분에 대하여 충분한 적응과정을 거쳤기 때문으로 추정된다. 발효과정 동안 피틴산은 대부분 소진되었으며, 효모에 의한 젖산소모에 의하여 발효액의 pH가 상승함에 따라 불용성 침전의 형태로 전환된 것으로

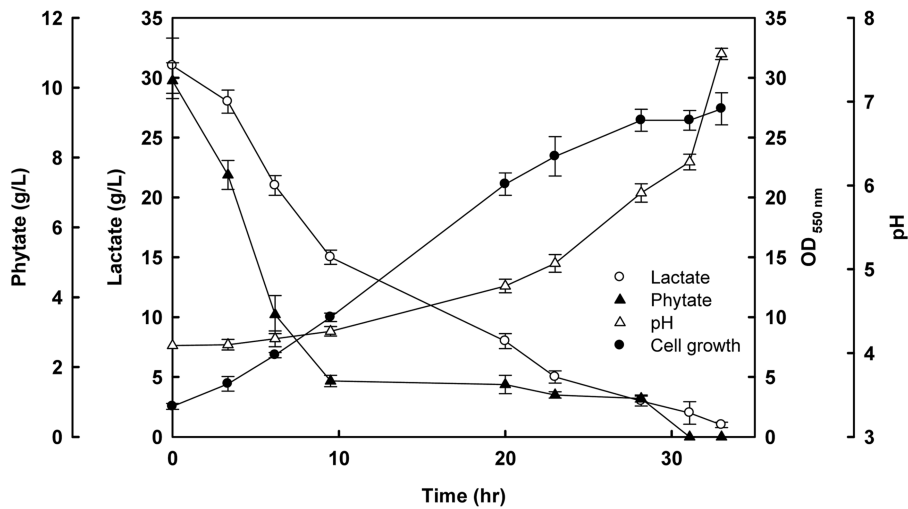


Fig. 1. Fermentation profiles of *S. cerevisiae* BY4741 grown in LSW at 30°C.

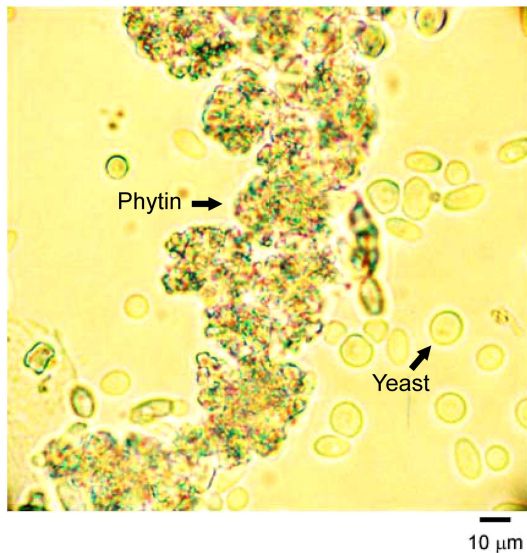


Fig. 2. Microscopic view of phytin formation by yeast fermentation of LSW.

판단된다. 효모는 생육과정에서 LSW에 함유된 환원당 및 젖산을 탄소원으로 사용하였으며, 옥수수 유래의 단백질 분해산물은 질소원으로 사용된 것으로 추정되었다. 약 33 시간의 효모발효에 의하여 LSW로부터 생성된 피틴의 농도는 1.0% (w/v)이었다.

효모발효에 의하여 생성된 피틴은 기존의  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 사

용하는 중화법에 의하여 생성된 피틴과 비교할 때 단백질의 함량 및 금속이온의 구성에 있어 유의적인 차이를 나타내었다(Table 1). 효모발효를 이용한 경우 피틴에 포함된 단백질의 함량이 12.3%(w/w)로 중화법(42.5%)과 비교하여 현저히 낮은 수준이었다.

회수된 피틴을 피틴산으로 정제하는 공정에서 단백질의 함량에 의하여 이온교환수지탑에 대한 이온교환수지간의 흡착세기, 운전속도 등의 여러 가지 단점들이 발생될 수 있기 때문에(Hídvégi & Lásztity, 2002), 피틴 중의 단백질 함량을 감소시키는 것은 피틴을 피틴산으로 정제하는 공정에서 매우 중요한 과정으로 전체적인 수율 측면에서 유리하게 작용할 것으로 판단되었다.

효모발효 및 중화법에 의하여 생성된 피틴 모두 금속함유량은 유의적인 차이가 없었으나 금속이온의 구성은 발효에 의하여 생성된 피틴의 경우 금속이온 중 마그네슘의 상대적인 함량이 93.3% 정도로 나타났으며,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 로 중화하여 얻은 피틴의 경우 칼슘이 주를 이루었고 마그네슘은 약 9.7%를 차지하는 것으로 나타났다. 발효법의 경우에 효모가 젖산을 포함한 유기산을 탄소원으로 소비하면서 pH가 상승하고, 이 과정에서 피틴산이 금속이온과 결합하여 피틴의 형태로 침전물을 형성하는데 옥수수에서 유래된 것으로 추정되는 마그네슘이 피틴산과 결합하여 불용성의 침전을 형성하는 것으로 판단된다. 중화법에 의하여 침전을 형성할 경우 첨가하는  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 가 우선적으로 피틴산과 반

Table 1. Contents of metal ion and protein in phytin produced by yeast fermentation and neutralization of LSW.

Method	Phytin* (% w/v)	Protein* (% w/v)	Relative metal ion content (%)			
			$\text{Na}^+$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
Fermentation	1.0±0.02	12.3±0.92	0.5±0.01	5.1±0.38	93.3±2.02	1.1±0.01
Neutralization	1.0±0.01	42.5±3.88	0.5±0.03	89.5±1.25	9.7±0.75	0.3±0.01

\*Data were obtained after 33 h of yeast fermentation of pretreated LSW.

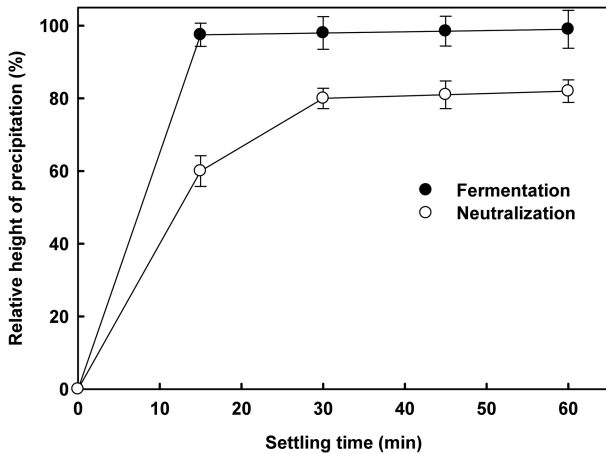


Fig. 3. Comparison of settling rate of phytin produced by neutralization with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and yeast fermentation of LSW.

응하여 침전을 형성하므로 LSW에 존재하는 마그네슘이 침전의 형성에 기여하는 확률이 감소한 것으로 판단된다.

CSL 또는 LSW에서 피틴을 분리·회수하는 방법은 현재 까지 주로 알칼리를 이용하는 중화법이 사용되어 왔다 (Graf, 1983). 이 방법은 피틴 침전의 형성과정에서 단백질이 포함되어 순도가 저하되며, 생성된 침전의 미세함으로 인해 회수가 용이하지 못한 단점이 있다(Akbarov et al., 1979). 따라서 침전을 회수한 액을 사료 등으로 재사용하는 것이 용이하지 못하나 본 연구에서 개발된 피틴 회수 공정에서 생산되는 여액은 사료 등으로 사용하는데 보다 용이할 것으로 판단된다. LSW는 농축되는 과정에서 단백질간의 응집, 갈변 현상 등으로 인하여 단백질, 금속성분 및 유리당 등의 조성차이가 발생하는데, 이러한 변화는 CSL을 영양성분으로 첨가하는 발효공정에서 불리한 조건으로 작용(Rausch et al., 2003)할 수 있으므로 LSW를 발효공정의 배지로 이용하는 것이 더 적합할 것으로 판단된다.

기존의 중화법과 본 연구의 효모발효에 의하여 생성된 피틴의 침전 속도 차이를 Fig. 3에 나타내었다. 효모발효에 의하여 생성된 피틴 침전은 중화법에 의하여 얻어진 피틴 침전에 비하여 약 1.6 배 빠른 침전속도를 보였다. 미강 또는 CSL을 원료로 사용하여 중화 후 얻어진 피틴 침전은 너무 미세하여 여과방법에 의하여 회수하는 것이 용이하지 않다(Park, 2006). 그러나 본 연구에서 효모 발효에 의하여 생성된 피틴 침전은 Fig. 2와 같이 비교적 큰 입자로 침전되기 때문에 자연 침전 또는 원심분리를 통하여 용이하게 회수가 가능할 것으로 판단되었다. 또한 발효에 의하여 생성된 피틴을 회수하고 남은 LSW는 효모를 다량으로 함유하고 있으며, 발효과정에서 신맛을 내는 젖산이 대부분 제거된 상태이므로 사료 첨가물로서의 이용가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 LSW를 이용한 피틴의 생산과정에서 기존의 알칼리 중화법의 단점을 극복하고자 효모발효에 의한 자연 침전법으로 피틴을 회수하는 공정을 개발하였다. LSW에 함유되는 약 3%(w/v)의 젖산은 약 33 시간의 효모 발효에 의하여 소모되고 pH가 7.5 정도로 상승함에 따라 LSW에 함유된 피틴산이 기존의 중화법에 사용되는  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 의 투입 없이 피틴으로 침전되어 분리되었다. LSW의 효모발효에 의하여 생성된 피틴의 농도는 약 1.0%(w/v)였으며, 단백질함량은 12.3%(w/w)로서 중화법으로 생산된 피틴보다 현저히 낮은 수준이었다. 또한 효모 발효에 의하여 생성된 피틴은 중화법으로 생성된 피틴보다 약 1.6 배 빠른 침전속도를 나타내었다.

## 감사의 글

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(No. 2011-0003791) 및 지식경제부와 한국산업기술진흥원의 지역산업기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구 결과입니다.

## 참고문헌

- Ahn YT, Kim GB, In YM, Jeong SG, Ham JS, Kim DW, Lee KU, Kim SK, Kim HU. 2000. A study on the production medium of lactic acid bacterial cells by using corn steep liquor. Korean J. Food Sci. An. Resour. 20: 181-191.
- Akbarov RR, Mukhamedova KS, Akamov ST. 1979. Method for obtaining phytin from rice middlings. Chem. Nat. Compd. 15: 469-471.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Cohen R, Engelberg D. 2007. Commonly used *Saccharomyces cerevisiae* strains (e.g. BY4741, W303) are growth sensitive on synthetic complete medium due to poor leucine uptake. FEMS Microbiol. Lett. 273: 239-243.
- Graf E. 1983. Applications of phytic acid. J. Am. Oil. Chem. Soc. 60: 1861-1867.
- Graf E, Eaton JW. 1990. Antioxidant functions of phytic acid. Free Radic. Biol. Med. 8: 61-69.
- Graf E, Empson KL. 1987. Phytic acid: A natural antioxidant. J. Biol. Chem. 262: 11647-11650.
- Hidvégi M, Lásztity R. 2002. Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. Period. Polytech. Chem. Eng. 46: 59-64.
- Kakuta I. 2008. Enhancement of the non-specific immunodefense activity of fish by oral administration of ferulic acid, gamma-oryzanol and phytic acid derived from rice bran. Aquac. Sci. 56: 105-111.
- Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K. 2010. Dietary roles

- of phytate and phytase in human nutrition: A review. *Food Chem.* 120: 945-959.
- Kutlukova US, Babakhodzhaeva SA, Madzhidov A. 1972. A polarographic method of determining phytin. *Pharm. Chem. J.* 6: 57-59.
- Lambrechts C, Bone H, Moulin G, Galzy P. 1992. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* 14: 61-66.
- Maddipati P, Atiyeh HK, Bellmer DD, Huhnke RL. 2011. Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Biore-source Technol.* 102: 6494-6501.
- Mohamed AI, Perera AJ, Hafez YS. 1986. New chromophore for phytic acid determination. *Cereal Chem.* 63: 475-478.
- Park SH, Sung JK, Lee SY, Park JH, Lee JY, Jang BC, Lee KS, Song BH, Kim TW. 2006. Early growth, carbohydrate and phytic acid contents of germinating rice seeds under NaCl stress. *Korean J. Crop Sci.* 51: 137-141.
- Raboy V. 1997. Accumulation and storage of phosphate and minerals. In: Larkin BA, Vasil IK (eds) *Cellular and molecular biology of plant seed development*. Kluwer Publishers, Netherlands pp. 441-477.
- Rausch KD, Thompson CI, Belyea RL, Tumbleson ME. 2003. Characterization of light gluten and light steep water from a corn wet milling plant. *Biore-source Technol.* 90: 49-54.
- Saad N, Esa NM, Ithnin H, Shafie NH. 2011. Optimization of optimum condition for phytic acid extraction from rice bran. *Afr. J. Plant Sci.* 5: 168-175.
- Suzuki T, Hara H. 2010. Phytate hydrolysate induces circumferential F-actin ring formation at cell-cell contacts by a Rho-associated kinase-dependent mechanism in colorectal cancer HT-29 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 1807-18.
- Xu Q, Kanthasamy AG, Reddy MB. 2008. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. *Toxicology* 245: 101-108.
- Yu L, Lei T, Ren X, Pri X, Feng Y. 2008. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rham-nosus* CGMCC 1466. *Biochem. Eng. J.* 39: 496-502.