



## ORIGINAL PAPER

원저

### 남은 음식물로 호기적 액상효모발효를 이용한 생균사료를 생산할 때 생균수에 대한 교반 속도의 영향

유성진, 유승용, 이기영

호서대학교 자연과학부 식품가공학전공

## Influence of Agitation Speed on Cell Growth in the Aerobic Yeast Fermentation of Pulverized Liquid Food Wastes for Probiotic Feed Production

Sung-Jin Yu, Seung-Yeung Yu, Ki-Young Lee

Food Technology, Division of Natural Science, Hoseo University, Sechurli 29,  
Asan, Chungnam, 336-795, Korea

### ABSTRACT

The influence of agitation speed on the yeast growth was investigated in the production of probiotic feed from pulverized liquified food wastes by aerobic fermentation. A yeast *Kluyvermyces marxianus* was selected through a preliminary screening. The yeast was cultured by 2liter jar fermenter in 10% solid(w/v) substrate of liquified food waste at 35 °C with each different agitation speed of 500, 900 and 1200 rpm. For the acceleration of enzyme excretion mixed culture with *Aspergillus oryzae* was also attempted and the results were compared to those of single culture. As results the viable cell number was increased by increasing agitation speed. But it showed highest value in 900rpm and then decreased in 1200rpm. The mixed culture increased amylase activity and growth rate, but did not seem to enhance the highest viable cell count in the final fermentation stage.

### 초 록

곰팡이 액화시킨 음식물 찌꺼기를 기질로 생균사료를 생산하기 위한 효모의 호기적 액상발효에 있어서 효모 증식에 대한 교반속도의 영향을 연구하였다. screening을 통해 선택한 효모인 *Kluyvermyces marxianus*를 종균으로 2liter jar fermenter를 이용하여 호기적 조건에서 곰팡이 분쇄해 10% 고형분 함량을 갖는 기질에 교반속도를 500rpm, 900rpm, 1200rpm를 다르게 조정하여 35°C에서 증식시켰다. 효모의 증식을 촉진시키기 위하여 고분자물질을 분해하는 효소를 분비하는 곰팡이 *Aspergillus oryzae*와 혼합발효를 실시하여 단독발효와 비교하였다. 발효결과 교반속도가 증가할수록 생균수도 높아져 400rpm에서보다는 900rpm에서 높은 생균수를 보였으나 1200rpm에서는 오히려 감소하였다. 혼합발효는 amylase의 역가를 높여주어 증식속도를 높여 주나 발효종료 단계에서 최고 생균수를 증가시켜주지는 않는 것으로 나타났다.

## 1. 서론

1991년 이후, 쓰레기 감량 및 재활용 정책에 의해 남은 음식물 발생량이 감소해왔다. 그러나 최근 다시 증가하는 경향으로 돌아섰고 이의 적절한 처리 문제는 아직도 심각한 사회 문제로 대두되고 있는 실정이다<sup>1)</sup>. 이와 같이 버려지는 자원으로서는 음식물쓰레기형태로 나타나게 되는 식품손실량은 연간 4,832천톤, 1일 발생량은 13,239톤에 이른다. 또한 이러한 식품손실량중 64%가 가정에서 발생하며, 36.0%가 음식점, 집단급식소등 외식에서 손실되는 것으로 나타났다. 이를 금액으로 환산하면 가정식에서 6조 2,797억원, 외식에서 8조 4,679억원으로 총 14조7,476억원이 음식물 쓰레기로 낭비된다<sup>2)</sup>.

환경부 폐기물 관리법 내에는 2005년부터 음식물 쓰레기의 직매립을 금지하는 조항을 두고 있어, 전국의 지자체들은 음식물 쓰레기의 적절한 처리법을 선택하기 위해 고심해 오고 있다<sup>3)</sup>. 이러한 문제의 해결을 위해 최근에는 음식물 쓰레기의 자원화가 적극 추진되고 있다. 1999년 남은 음식물 발생량은 11,230 ton/day이며, 재활용율은 34.4% (3,680ton/day)였다. 이 중 사료로서 재활용이 이루어지는 비율은 62%정도이다<sup>4)</sup>. 그러나 이러한 해결책들도 최근 광우병 파동으로 인하여, 음식물 쓰레기의 소사료이용이 전면 금지되면서 그 동안 건립된 사료화 시설들의 가동이 중단되어 지자체들은 다시 음식물 쓰레기 대란에 직면하게 되었다. 따라서 본 논문에서는 남은 음식물을 직접 사료원료로 이용하지 않고 균체생산을 위한 원료기질로 이용한 생균사료를 생산하고자 시도하였다.

장내 미생물 균총의 균형을 개선시키는 생균제제인 probiotics는 장내환경에 유용한 효모, 유산균, 고초균등의 생균 농도를 높여 가축의 장내환경을 개선해준다. 특히 균체 단백질(SCP)은 미생물을 식용이나 가축사료용 단백질원으로 이용하기 위해서 생산되기도 한다. 미생물 균체는 단백질뿐만 아니라 비타민, 지질 등의 함량이 높고 특히 필수아미노산이 골고루 분포되어있어 영양적 가치가 크다<sup>5)</sup>. 식용이나 사료용 미생물로는 세균보다는 효모나 곰팡이가 이용되었으나 단세포 단백질 생산에는 주로 효모가 이용되어 왔다. 이것은 효모가 곰팡이에 비하여 작은 단세포이므

로 대사활성이 높고 성장속도가 빠르기 때문이다. 효모는 반추위 섬유소 분해 세균을 증가시켜 사료효율을 높여주고 병원성 대장균등의 해로운 균수를 감소시키며 가축의 체중을 증가시키거나 우유나 계란의 생산성을 높여주므로 효모발효를 이용하면 남은 음식물을 품질 좋은 사료로 만들 수 있다.

본 연구에서는 효모증식용 기질로 남은 음식물을 이용한 발효사료를 생산함에 있어서 가능한 한 유용한 효모 생균 농도를 높이고자 강제적 통기를 이용한 호기적 발효를 시도하였다. 그리고, 발효조의 교반속도가 생균수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 발효시 교반속도를 다르게 조정하여 생균수, 효소활성 등을 측정, 비교하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 실험재료

#### 2.1.1 남은 음식물

본 실험에서 사용된 남은 음식물은 호서대학교내 학생식당(1일 2000명 이용)에서 배출되는 남은 음식물을 일정기간 수거하여 물기를 제거하였고 1차 분쇄과정을 거친 후, 균일하게 섞은 다음 -70℃에 냉동 저장하였다. 저장 시료를 본 실험에 사용할 경우는 2차 분쇄(DIAX 900이용)하여 잘게 분쇄한 후 고형분 함량을 조정하여 121℃에서 15분 동안 멸균처리 시킨 후 시료로서 사용하였다.

#### 2.1.2 종균

##### 1) *Kluyvermyces marxianus*

액체 발효 종균으로 이용시 YM 액체 배지에 첨가하여 35℃에서 2일간 전배양하여 남은 음식물의 5%(v/w)에 해당하는 균주 배양액을 더해 줌으로써 음식물찌거기의 호기적 액상 발효의 종균제로 사용하였다.

##### 2) *Aspergillus oryzae*

광범위한 pH, 삼투압 및 온도에서도 잘 자라는 호기성 곰팡이로서<sup>6)</sup> 전분과 단백질 등의 고분자를 분해하는 효소를 생산한다. 한국유전자은행에서 분양받아 YM배지에 첨가하여 30℃에서 2일간 전배양하여 남

[Table 1] Conditions for aerobic liquid fermentation of food waste

Condition microorganism	Temperature(°C)	Agitation Speed(rpm)	Aeration rate(v.v.m)
<i>Kl. marxianus</i>	35	900	1.5
<i>Kl. marxianus</i> + <i>Asp. or. yzae</i>	30	900	1.5

v.v.m : volume per volume & minutes  
rpm : revolutions per minute

은 음식물의 5%(v/w)에 해당하는 균주 배양액을 더해 줌으로써 음식물 찌꺼기의 호기적 액상발효의 중균제로 사용하였다.

## 2.2 발효조건

균주는 2일간 전배양하여 남은 음식물 발효에 중균제로 사용하였으며 호기적 발효를 위하여 jar fermenter(한국발효기, 2liter 용량)를 이용하였으며 발효기의 운전 조건은 [Table 1]와 같다.

## 2.3 시료분석

### 2.3.1 Amylase 활성측정

효소력 측정에 사용되는 효소액은 시료 10g에 증류수 200ml 첨가, 밀봉하여 실온에서 4시간 진탕하여 10000×g로 원심분리후 여과지(Whatman No 41.)를 통과한 여과액을 사용하였다<sup>7)</sup>.

#### 1) α-Amylase activity

α-amylase를 측정하기 위하여 1% 전분 용액(0.02M phosphate buffer, pH 6.9) 1ml를 기질로 사용하였다. 기질에 효소액 1ml를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응 후, 1M 초산 10ml를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 3% KI에 용해된 0.05N iodine을 녹인 용액 50μl 첨가하여 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정후 blank OD값

의 10%를 감소시키는 것을 1 unit로 하여 시료 1g으로 환산한 후 표시하였다<sup>8)</sup>.

#### 2) β-Amylase activity

0.5% soluble starch(0.4M acetic acid buffer, pH 4.8<sup>9)</sup>) 1ml 을 기질로 사용하여 미리 조제한 효소액 1ml과 혼합 후 30°C에서 30분간 반응시킨다. 반응 후 dinitrosalicylic acid reagent 3ml 첨가시켜 90°C에서 10분 동안 발색시킨다. 발색을 시킨후 Rochell salt 1ml을 첨가하여 10분 동안 색깔을 고정시킨 후 535nm에서 흡광도 측정하여 maltose를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 표준곡선을 작성한 후 효소액 1ml이 1mg의 maltose를 유리시킬 때의 효소량을 1unit로 하여 시료 1g으로 환산시킨 후 표시하였다<sup>7)</sup>.

#### 3) Glucoamylase activity 측정

Glucoamylase의 활성은 β-amylase와 동일한 방법으로 실시한 후 glucose를 이용하여 표준곡선을 작성한 후 효소액 1ml이 1mg의 glucose를 유리시킬 때의 효소량을 1unit로 하여 시료 1g으로 환산시킨 후 표시하였다<sup>7)</sup>.

## 2.4 생균수 측정

본 실험에서는 생균수 측정을 위하여 단계적 희석법을 이용하여 도달하는 평판도말배양법을 이용하였다. 배지의 성분 및 배양온도는 [Table 2]와 같다.

[Table 2] Composition of media and incubation temperature

Media	Composition	incubation temperature
YM	3g Yeast extract, 3g Malt extract, 10g glucose, 5g Peptone, 15g Agar per liter	<i>Kl. marxianus</i> 35°C
		<i>Kl. marxianus</i> + <i>Asp. oryzae</i> 30°C

[Table 3] Conditions for the aerobic liquid fermentation of food waste

	Agitation(r.p.m)			Temperature(°C)	Aeration(v.v.m)
<i>Kl. marxianus</i>	500	900	1200	35	1.2
<i>Kl. marxianus</i> + <i>Asp. oryzae</i>				30	

2.5 발효에 대한 교반속도의 영향

발효는 동일한 반응조 내에서도 위치에 따라 다르게 일어나므로 산소공급이 원활하고 균일하게 발효가 이루어지기 위해서는 교반이 필수적이다. 너무 빠른 교반은 온도를 저하시키거나 필요이상의 동력소모를 초래하므로 적절한 교반 횟수의 결정은 중요하다<sup>10)</sup>. 따라서 본 실험에서는 교반속도를 다르게 조정하여 생균수와 효소활성을 측정하였으며 실험에 사용된 발효조의 조건은 [Table 3]과 같다.

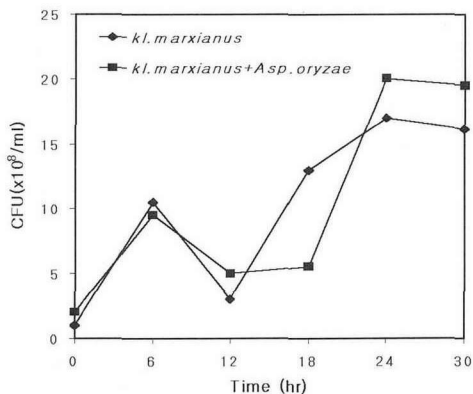
3. 결과 및 고찰

3.1 교반속도에 따른 균수의 변화

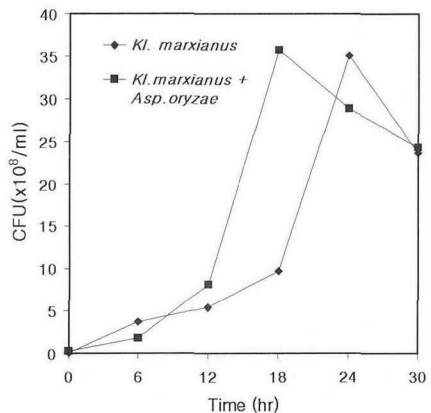
발효시 균의 증식에 영향을 미치는 인자로는 교반속도, 공기주입량, 온도, 희석율을 들 수 있다. 본 실험에서는 batch식 발효에 있어서 교반속도가 효모의 증식에 미치는 영향을 조사하였다. 교반속도는 각각 500rpm, 900rpm, 1200rpm으로 변화시켜 발효시켰다. 비교적 낮은 500rpm의 경우(Fig. 1), 발효개시

후 생균수가 증가하다가 다시 감소하는 전형적인 diauxy 현상을 나타냈다. *Kl. marxianus*로 효모만 단독 발효시킨 경우 발효개시 24시간 후 생균수는  $1.6 \times 10^8$ /ml 에 이르렀고 곰팡이인 *Asp oryzae*와 혼합하여 발효를 진행한 균에서는 최대 균수  $2.0 \times 10^9$ /ml를 나타내었다. 교반수를 좀더 증가시킨 900rpm에서는 효모단독발효의 경우보다 혼합발효에서 증식속도가 빠르게 나타났다. 혼합발효의 경우 이미 발효 개시 17시간 경과 후 최대균수  $3.6 \times 10^9$ /ml를 나타냈고 효모단독발효의 경우 24시간 경과후에나 최대균수  $3.5 \times 10^9$ /ml 에 도달하였다(Fig.2).

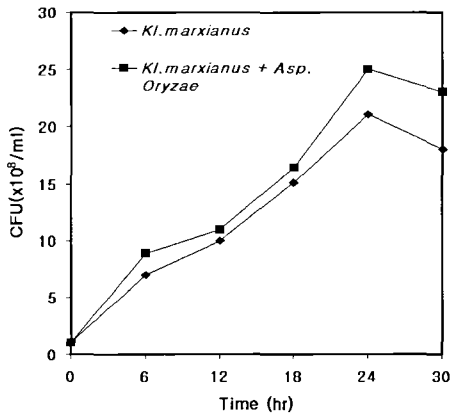
(Fig. 3)은 교반속도를 1200rpm으로 발효를 진행했을 경우 균의 증식을 나타낸 것이다. 발효개시후 24시간이 경과한 후에 최대균수  $2.5 \times 10^9$ /ml을 나타내 교반속도를 500rpm의 경우보다는 높게 나타났으나, 900rpm의 경우보다는 오히려 낮았다. 교반속도가 낮은 500rpm에서 발효가 진행된 경우는 미생물 증식에 필요한 산소 공급이 충분이 이루어지지 못했기 때문이 아닌가 생각되었다. 그러나 교반속도가 1200rpm



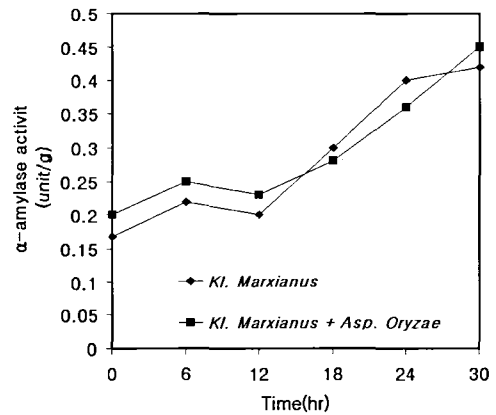
[Fig. 1] Change of viable cell count of *Kl. marxianus* during the aerobic liquid fermentation of food waste at the agitation speed of 500rph



[Fig. 2] Change of viable cell count of *Kl. marxianus* during the aerobic liquid fermentation of food waste at the agitation speed of 900rpm



(Fig. 3) Change of viable cell count of *Kl. marxianus* during the aerobic liquid fermentation of food waste at the agitation speed of 1200rpm



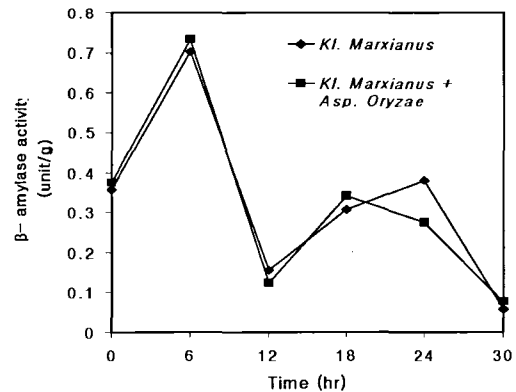
(Fig. 4) Change of  $\alpha$ -amylase activity during the food waste liquid fermentation in 900rpm

의 경우는 오히려 교반속도 900rpm보다 낮은 생균수를 보였다. Seyed Abbas Shoojaosadati<sup>10)</sup>에 따르면 교반속도가 지나치게 높은 경우엔 높은 전단력이 미생물의 세포벽을 파괴하기 때문에 균의 성장을 저해할 수 있다고 한다. 따라서 최적의 발효를 위해서는 미생물과 발효물의 상태에 따라서 교반속도를 적당히 조절할 경우 높은 생균수를 얻을 수 있을 것으로 생각되었다.

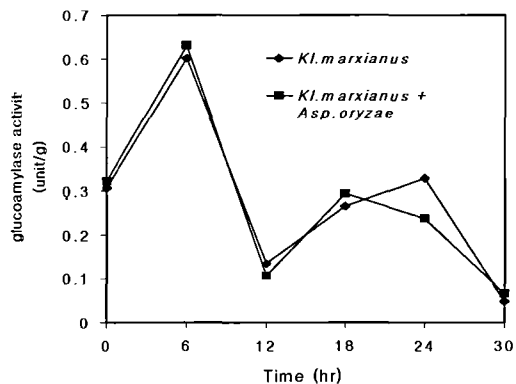
### 3.2 교반속도에 따른 효소활성의 변화

교반속도 변화에 따른 효소의 역가를 관찰하였다 (Fig. 4-6). 전반적으로 시간이 경과함에 따라서  $\alpha$ -amylase의 역가는 증가하는 경향을 나타내었으며  $\beta$ -amylase와 glucoamylase의 역가는 오히려 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.  $\alpha$ -amylase의 역가는 대체로 혼합발효에서 높게 나타났고 이것은 *Asp. oryzae*가 상대적으로 많은 양의  $\alpha$ -amylase를 분비하기 때문으로 생각되었다. 또한  $\beta$ -amylase와 glucoamylase의 경우는 시간이 경과함에 따라서 감소하였는데 이것은  $\beta$ -amylase의 경우 발효가 진행됨에 따라서 pH가 4.0 부근으로 감소하기 때문에 활성이 약해지기 때문으로 사료되었다.

*Kl. marxianus* 단독발효의 경우 교반속도 900rpm일 때  $\alpha$ -amylase는 0.17unit/g 이었던 것이 발효시작 30시간이 경과된 후에는 0.40unit/g으로 증가되었다. *Asp. oryzae*와의 혼합발효의 경우는



(Fig. 5) Change of  $\beta$ -amylase activity during the aerobic liquid fermentation of food waste at the agitation speed of 900rpm



(Fig. 6) Change of glucoamylase activity during the aerobic liquid fermentation of food waste at the agitation speed of 900rpm

초기에 0.2에서 증가하여 12시간 경에 약간 감소하였다가 다시 증가하여 30시간 후에는 0.45unit/g으로 측정되었다.

#### 4. 결론

분쇄한 음식물 쓰레기를 기질로 *Kl. marxianus* 효모를 종균으로 이용한 생균사료를 생산하기 위해 호기적으로 액상발효시킬 경우 교반속도는 산소와 영양물질전달에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각되었다. 본 실험 결과 교반속도가 증가함에 따라 효모의 증식 속도도 빨라지고 이에 따라 효소들의 역가도 상승하였으나 1,000rpm 이상의 지나친 교반은 미생물들에게 스트레스를 주어 오히려 증식속도를 하락시켜 에너지 낭비만을 초래하는 것으로 보였다. 또한 전분이나 단백질 등의 고분자 물질을 분해하는 효소를 다량 분비하는 식용 곰팡이인 *Asp. oryzae*를 혼합하여 발효시킨 결과 효모의 증식속도를 증가시켜 최고 생균수에 이르는 시간을 단축시켜 주었으나 발효종기에서 생산수율을 결정짓는 총 생균수는 의미있게 증가시켜주지 못했다. *Asp. oryzae*와의 혼합발효가 기질의 이용도를 확장시켜 수율을 높여주지는 못했으나 결과적으로 생산시간을 단축시켜 생산성증가를 가져와 남은 음식물을 기질로 생균효모사료를 생산할 경우 생산비용을 감축시켜 줄 것으로 사료되었다.

#### 참고문헌

1. 고재영. 새천년 남은 음식물의 감량 및 재활용 정책, 남은 음식물 사료화 심포지엄. 23-33, 2000.
2. 한국식품개발연구원, 음식물로 버려지는 식량자원의 경제적 가치산정에 관한 연구, 2001.12.

3. 이기영. 위생적 경제적 최적화를 위한 남은 음식물의 발효공정, 남은 음식물 사료화 심포지엄, 119-129, 2000.
4. 환경부 폐기물자원국. 2000음식물쓰레기 감량 및 자원화 업무 추진계획, 폐기물 자원화 제8권 1호, 6-15, 2000.
5. 이기영, 이성택, 양익배, 양재경. 효모를 이용한 음식물 찌꺼기의 처리 및 사료자원화, 한국유기성폐자원학회, 춘계술대회, 46-56, 1998.
6. 신형태, 정기환. 발효를 이용한 잔반의 사료자원화에 관한 연구, 한국유기성폐자원학회 추계학술대회, 32-34, 1997.
7. 박종연, 오훈일. 재래식 고추장 메주 숙성중 미생물과 효소력의 변화. 한국식품과학회지. 28(1) 56-62, 1995.
8. 김중만, 신미경, 황호선, 김형태. 간절인이 무우 Cube의 ascorbic acid 함량,  $\alpha$ -amylase 활성, 양념류 침투성, 생균수에 미치는 영향, 한국식품과학회지, 22(4), 492-495, 1990.
9. Perrin, D. D., and Boyd Dempsey. Buffers for pH and Meral Ion Control. London : Science Paperbacks, 1979.
10. 윤하연, 유기영, 박후원, 김갑수, 유명진. 음식물쓰레기 호기성 퇴비화 시설의 설계변수 및 운전조건 도출에 관한 연구, 한국폐기물학회지, 11(3), 377-387, 1994.
11. Seyed Abbas Shojaosadati, Rasoul Khalilzadeh hamid Reza Sanaei. Optimization of SCP production from sugar beet stillage, Proceedings of the Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference'97, 522-528, 1997. ☎