

음식물쓰레기를 이용한 젖산 생산의 최적화

이 백 석 · 윤 현 희 · 김 은 기

¹경원대학교 화학공학과, 인하대학교 공과대학 생물공학과
(접수 : 2001. 3. 23., 게재승인 : 2001. 4. 19.)

Optimization of Lactic Acid Production from Kitchen Refuses

Baek-Seok Lee, Hyun-Hee Yoon¹, and Eun-Ki Kim[†]

¹Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Kyunggi 461-70
Institute of Biotechnology, Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received : 2001. 3. 23., Accepted : 2001. 4. 19.)

Statistical experimental design methods were employed to select the cultivation factors influencing lactic acid production during the fermentation of kitchen refuses. Working volume and pH swings were identified as the main factors affecting lactic acid production. Optimum pH swing was pH 7.8 and working volume was 125 mL in a 250 mL flask. Under optimum condition, lactic acid was produced at 21.8 g/L, which was 6.2 times higher than produced during uncontrolled fermentation.

Key Words : lactic acid, kitchen refuses, optimization, experimental design

서 론

우리나라에서 발생하는 음식물쓰레기는 1998년 현재 연간 430만 톤에 이르고 있으며 수분함량이 높아 소각처리시 과도한 비용이 소요되어 처리의 대부분을 매립에 의존하고 있다. 또한 이로 인한 침출수 발생과 악취 등 2차 오염 및 매립지 부족으로 문제가 야기되고 있어 이의 효율적인 처리가 시급하다(1).

현재 음식물쓰레기 처리방안으로는 매립, 소각 및 혐기성 소화외에 사료화·퇴비화 등 단순재활용에 의존하고 있다. 그러나 혐기성 소화는 음식물쓰레기를 메탄으로 전환시키는 방법이며 처리시간이 길고 많은 양의 소화처리 슬러지가 발생하는 단점이 있다(2). 또한 사료화의 경우 음식물쓰레기 내의 이쑤시개, 은박지, 비닐포장 등의 이물질이 포함되어 있어 안심할 수 없고 사료로서 영양가가 균형을 이루지 못하는 단점이 있다. 또한 최근에는 광우병 파동으로 인하여 음식물쓰레기 내의 동물성 물질을 사료화하는 것에 문제점이 야기되고 있다. 퇴비화의 경우 음식물쓰레기내의 높은 염분 농도에 의한 작물의 성장장애가 초래되는 문제가 발생한다(1,2).

따라서 음식물쓰레기의 대부분을 차지하는 유기물을 이용하여 이를 부가가치가 있는 물질로 전환하는 효과적인 재

활용방안이 필요하다 하겠다. 현재 효과적인 재활용방안으로 음식물쓰레기로부터 초산 또는 프로피온산을 생산한 후 Ca와 Mg를 첨가하여 합성한, 부식성이 낮은 제설제 (calcium magnesium salt of organic acids ; CMO)의 생산이 제안되었다(3).

한편 젖산은 음식물쓰레기에 우점종으로 존재하는 *Lactobacillus* sp.에 의해 생산되는데 이를 이용하여 생분해성 플라스틱의 한 종류인 polylactide의 합성이 가능하다(4-6). 젖산의 생산에 관해서는 많은 문헌이 있으나(7-11,16,18-19) 음식물쓰레기를 사용하는 것에 대해서는 별로 많지 않다(12-14). 고형물이 포함된 액상반응의 경우, 특히 배지 성분이 알려지지 않은 음식물쓰레기 경우에는 젖산 생산의 영향인자를 찾는 것은 쉬운 일이 아니다. 이렇게 많은 인자가 관여하는 복합공정을 최적화하는 데는 통계학적 실험방법을 사용하면 비교적 쉽게 최적의 조건을 찾을 수 있다(15-19). 따라서 본 연구에서는 음식물쓰레기의 저비용 자원화방법으로 음식물쓰레기를 직접 발효할 때 젖산의 생산에 증가 효과가 큰 인자의 선정과 최적화를 Plackett-Burman design과 2 factor central composite design 등 통계학적 실험방법을 이용하여 수행하였으며 이를 통해 젖산의 생산수율을 6.2배 증가시킬 수 있었다.

재료 및 방법

음식물쓰레기

실험에 이용된 음식물쓰레기는 인천광역시 남구 용현동에 위치한 대학 식당(연일 800 여명 이용)에서 일주일간 점심시간 음식물쓰레기를 동량 수거하였다. 음식물쓰레기는 밥찌거

[†]Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-7514, Fax : +82-32-875-0827
E-mail : ekkim@inha.ac.kr

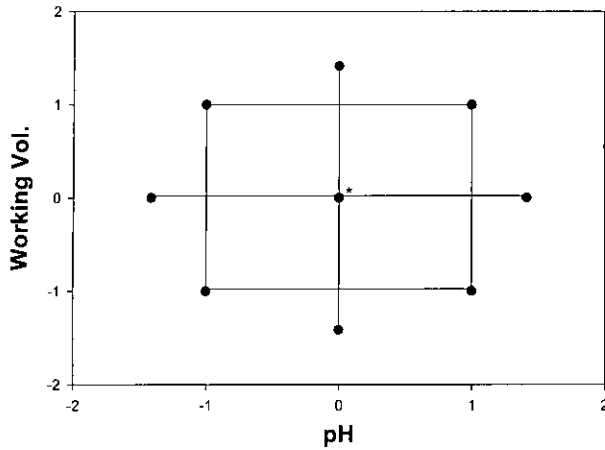


Figure 1. Central composite design for optimization of 2 factors for the production of lactic acid in kitchen refuses fermentation.

* ; Center point consists of 6 runs of flasks cultured at (pH 7.0, 150 mL working volume) by independent flask cultivation. (Working vol., (mL) -1.414; 50, -1; 80, 0; 150, 1; 220, 1.414; 250) (pH, -1.414; 4.2, -1; 5.0, 0; 7.0, 1; 9.0, 1.414; 9.8)

기, 채소류, 생선 및 육류 등이 혼합되어 있으며 과도한 수분을 제거하기 위해 10시간 침강 후 침전물을 사용하였다. 회수된 음식물쓰레기를 분쇄시켜 동일하게 혼합하여 -20℃에 보관 후 사용하였다.

발효조건

본 연구에서는 음식물쓰레기 발효를 위해 250 mL Erlenmeyer flask를 이용하였고 회전식 진탕 배양기를 사용하여 발효실험을 수행하였다(30℃, 150 rpm). 젖산균을 인위적으로 접종하지 않고 기존의 음식물쓰레기내의 미생물을 이용하였다. 음식물쓰레기 시료의 건조중량은 20% (w/v)였고 음식물쓰레기는 동량의 증류수와 혼합한 후 배양하였다. pH 변동의 방법은 배양도중 생산되는 초산, 프로피온산 및 젖산 등에 의해 pH가 감소함에 따라 젖산균의 성장이 둔화되기 때문에 젖산균을 우점균으로 유지하기 위해 12시간마다 25% ammonia water solution으로 pH 7로 조절하였다(13).

실험설계 및 통계 분석

젖산 생산에 증가 효과가 있는 배양인자를 선정하기 위해 많은 후보 인자들 중에서 하나 또는 두 개의 가장 중요한 인자를 선정하는데 유용한 Plackett-Burman design을 사용하였다. Plackett-Burman design은 각 인자들을 고위, 중위 및 저위 수준으로 분포시킨 후 실험결과에 대한 각 인자들의 양성 또는 음성효과의 크기를 계산하여 주요인자를 선정하는 실험계획법이다(16-17). 그러나 Plackett-Burman design의 경우 각 인자들간의 상호작용을 측정할 수 없어 선정된 인자를 최적화하기 위해 인자 사이의 상호작용이 고려된 2 factor central composite design을 사용하였다(Figure 1). 2 factor central composite design은 Plackett-Burman design에 의해 선정된 2개의 주요인자를 각각 다섯 단계로 나눠 두 인자간의 상호작용을 확인하고 최적점을 찾는 실험계획법이다(20). 주요인자와 회귀계수는 각 실험에서 젖산 생산량을 기준으로 계산하

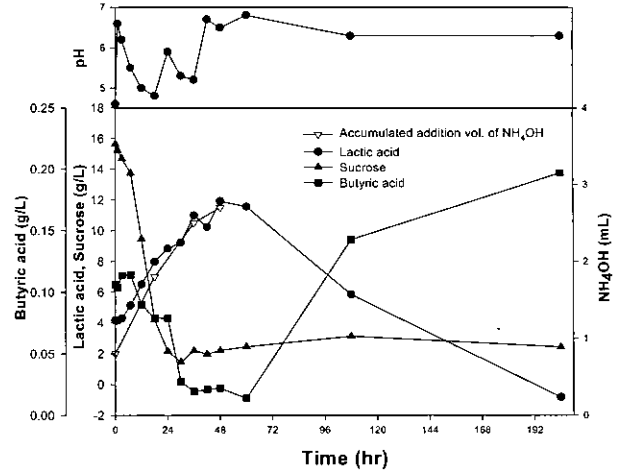


Figure 2. Time course of production of organic acids.

였으며 통계학적 해석과 최적 농도의 계산은 MINITAB® software (Minitab Co., Windows version 10.5, USA)를 사용하였다.

분석방법

젖산, 초산, 프로피온산, 부틸산 및 설탕은 HPLC (GBC, LC1110, Australia) 및 UV/VIS detector (GBC, LC1200, Australia)를 사용하여 210 nm에서 검출하였으며 Bio-Rad Aminex HPX-87H ion exclusion column (300 × 7.8 mm)을 사용하였다. 용매는 황산 (0.005 M)을 사용하였으며, 유속은 0.4 mL/min으로 하여 측정하였다.

결과 및 고찰

젖산 생산

먼저 젖산 생산의 경향을 조사하고 최적화 실험시 배양시간을 결정하기 위해서 유기산 생산 경향을 조사하였다. 젖산이 생성됨에 따라 pH가 낮아지면 젖산균의 성장속도가 느려지므로 pH를 7로 변환시키는 방법, 소위 'pH 변동 (pH swing)' 결과, 젖산균의 농도가 증가하였다는 보고에 따라 pH 변동을 시도한 상태로 젖산의 생성 경향을 조사하였다(13). Figure 2에서 보듯이 배양 후 12시간마다 배양액을 pH 7로 조절한 경우 음식물쓰레기 내의 sucrose가 감소함에 따라 젖산의 생산량이 증가하였다. 음식물쓰레기내의 모든 당 성분을 정량할 수는 없었지만 대표적인 sucrose를 측정함으로써 배양과정 중 당의 감소경향을 파악할 수 있었다. 젖산은 60시간까지 측정되었으나 그 이후 젖산은 소비되고 부틸산이 급격히 증가하였다. 또한 미량의 초산도 발효 말기에 급격히 증가하였다(data not shown). 따라서 음식물쓰레기를 이용하여 젖산을 생산시 최적 발효시간을 60시간으로 정하였다.

주요영향인자 선정

젖산 생산시 관여하는 인자로 알려진 온도, 효모 추출물 첨가, 초기 pH(19, 21) 등의 효과를 알아보기 위해 Plackett-Burman design을 수행한 결과 젖산 생산에 양성효과를 보인

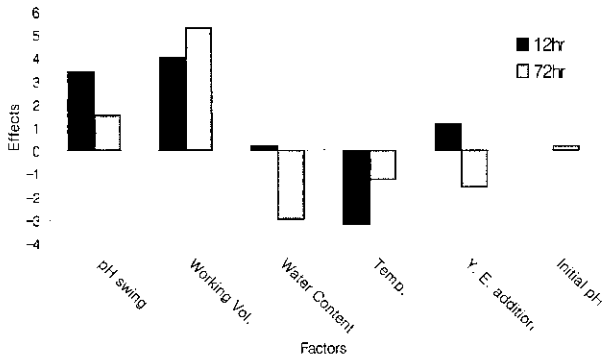


Figure 3. Effects of experimental factors on lactic acid production.

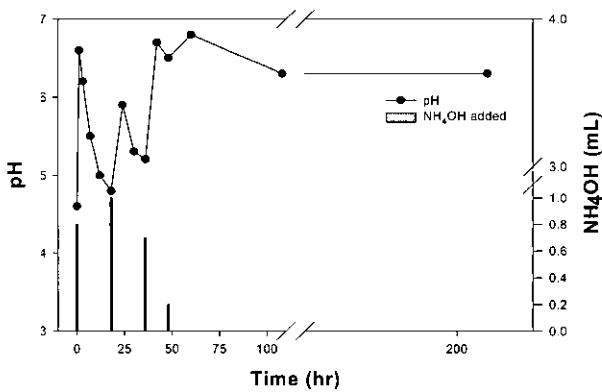


Figure 4. pH profile and addition volume of ammonia water solution.

인지는 pH 변동과 배양액부피였다(Figure 3). 음식물쓰레기 내의 젖산 생산균주의 우점종화를 돕는 것으로 알려진(13) pH 변동은 배양 초기에 증가효과가 컸으며 배양액부피는 배양 후반에 젖산 생산에 대한 증가효과가 크게 나타났다. 또한 초기 pH를 변화시키는 것은 미미한 증가효과를 보였고 복합영양원인 효모 추출물은 초기에 세포생장에 도움을 주어 젖산 생산에 증가효과를 보인 것으로 사료된다(19). 한편 발효액의 유동성 증진을 위하여 고려된 수분량의 변화는 발효 후기로 갈수록 감소효과가 크게 나타났다. 이는 수분량의 증가에 따른 세포농도의 희석과 삼투압의 변화가 원인이라 판단되며(22) 발효온도 변화는 발효 초기, 후기 모두 감소효과가 크게 나타났다.

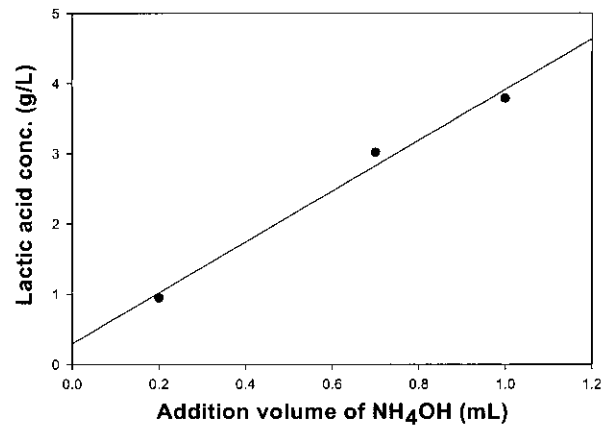


Figure 5. Relationship of lactic acid production and addition volume of NH_4OH water solution ($r^2=0.99$).

젖산 생산과 NH_4OH 첨가량의 상관관계

젖산이 생산됨에 따라 발효액의 pH는 감소하였다. 따라서 젖산의 생산량이 증가할수록 pH 변동을 위해 더 많은 양의 25% ammonia 수용액이 필요하였다. 또한 12시간 간격으로 생산되는 젖산 양과 pH 7 조절을 위해 투입하는 25% ammonia 수용액은 높은 선형관계를($r^2=0.99$) 보였다(Figure 4,5). 따라서 적절한 발효액의 희석을 통하여 ammonia 수용액을 이용한 적정법으로도 젖산의 정량이 가능하리라 사료된다.

젖산 생산 최적화

pH 변동과 배양액부피는 젖산 생산에 있어 두 인자간의 상관관계가 있는지 확인하였다. Table 2에서 보듯이 pH 변동과 배양액의 부피는 서로 연관이 있는 것으로 나타났다. 배양액의 부피가 적을수록 음식물쓰레기의 교반이 용이해지고 공기의 공급이 증가하며 이는 pH의 변동과 함께 젖산생산에 영향을 줄 수 있다. 그러나 배양액의 부피가 감소함에 따라 과도한 공기의 공급은 발효상태가 호기성 반응으로 전환되어 주요 최종산물로 초산이 생산됨에 따라 발효액내의 pH가 감소하고 오히려 젖산의 생산량이 감소한다(13,23). 따라서 본 연구에서는 pH, 배양액부피의 상호관련성을 고려하여 최적화 함수를 구하기 위해 인자간의 상호작용이 고려된 실험설계법인 2 factor central composite design을 사용하였다(Table 2, Figure 6). 발효 60시간 후 이 방법에 의해 생산된 젖산의 2차

Table 1. Plackett-Burman design for the production of lactic acid in kitchen refuses fermentation.

Factor	Real value of factor		Combinations										
	'-' value	'+' value	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pH swing ¹	no control	control	+	+	+	-	+	-	-	-	0	0	0
Working Vol.	50 mL	200mL	-	+	+	+	-	+	+	-	0	0	0
Water addition (%) ²	100	200	-	-	+	+	+	-	-	-	0	0	0
Temp.	30°C	38°C	+	-	-	+	+	+	-	-	0	0	0
Yeast extract	0	0.5%(w/w)	-	+	-	-	+	+	+	-	0	0	0
Initial pH	no titration	7	+	-	+	-	-	+	+	-	0	0	0

¹ '+', '-' and '0' levels indicate the higher, lower and medium levels, respectively, of a factor in that combination.

² pH control : NH_4OH was added to control the pH at every 12 h.

³ D.stilled water was added 100%~200% volume of the sample. Dry weight of the sample was 20% of the weight of sample.

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) for 2nd polynomial regression.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	5	108.756	108.756	21.7512	0.82	0.570
Linear	2	19.878	19.878	9.9390	0.38	0.699
Square	2	75.266	75.266	37.6328	1.43	0.302
Interaction	1	13.612	13.612	13.6124	0.52	0.496
Residual Error	7	184.719	184.719	26.3885		
Lack-of-Fit	3	183.892	183.892	61.2975	296.46	0.000
Pure Error	4	0.827	0.827	0.2068		
Total	12	293.475				

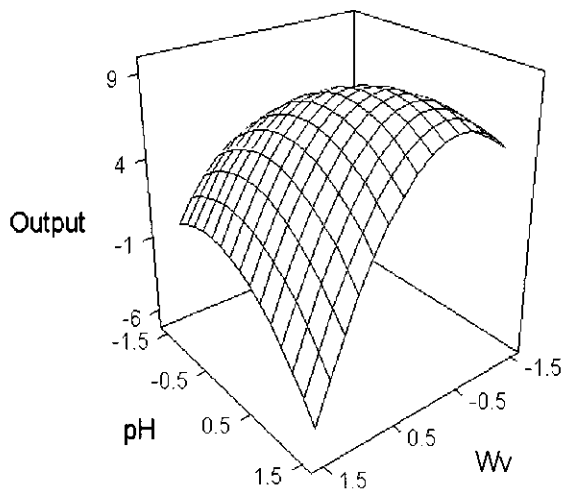


Figure 6. Effects of pH and working volume(Wv) on the lactic acid(output) production. (Working vol., (mL) -1.414; 50, -1; 80, 0; 150, 1; 220, 1.414; 250) (pH, -1.414; 4.2, -1; 5.0, 0; 7.0, 1; 9.0, 1.414; 9.8)

회귀 다항식은 식 1과 같은 결과를 보였다.

$$\text{Lac} = 8.30 + 0.53\text{pH} - 1.49\text{Wv} - 1.50\text{pH}^2 - 3.10\text{Wv}^2 - 1.84\text{pH} \cdot \text{Wv} \quad (1)$$

Lac ; lactic acid concentration (g/L), Wv ; working volume (mL/250 mL), pH ; pH of culture broth after NH₄OH addition

식 1을 표현한 Figure 6과 같이 젖산 생산량은 pH 변동과 배양액부피에 민감하게 반응하고 서로 상호 관련성을 보여주고 있고 최적 조건이 존재하는 것을 알 수 있다. 각각의 최적 농도는 $\partial \text{Lac} / \partial \text{pH} = \partial \text{Lac} / \partial \text{Wv} = 0$ 을 동시에 만족시키는 pH, Wv의 값에서 구하였고 발효 60시간 후 두 인자의 최적 점은 각각 pH 7.8과 125 mL이었다.

최적 조건에서 발효한 경우 발효액의 pH를 변동하지 않고 발효액량을 150 mL로 유지한 경우보다 젖산 생산량이 21.8 g/L로 6.2배 증가하였다(Figure 7).

이는 배양조건에 아무런 고려 없이 직접 음식물쓰레기를 발효시킨 경우보다 pH 변동과 배양액의 부피에 대한 조절을 한 경우, 상당량의 젖산 증가를 얻을 수 있다는 결과를 보여 주고 있다. 여기에서 사용한 통계학적 방법은 여러 개의 인자 중에서 가장 영향을 많이 주는 인자를 선정하고 그 인자

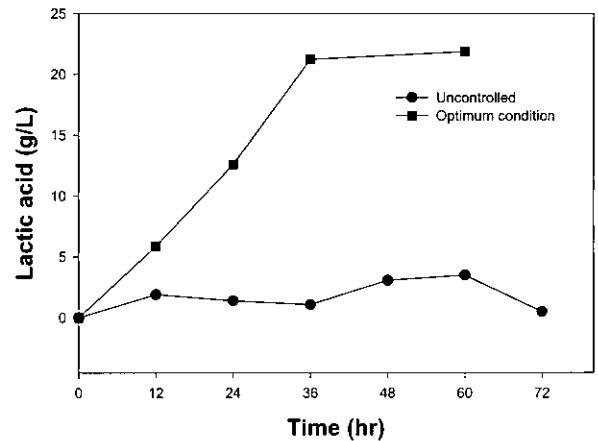


Figure 7. Production of lactic acid under optimum condition. No control; Initial pH was 4.2 and no pH control was performed. Optimum condition; pH 7.8, working volume 125 mL.

사이에 상호작용이 있는기를 알 수 있고 또한 최적운전인자들을 선택할 수 있는 간단하고도 효과적인 방법이라 할 수 있다.

본 실험을 통해서 앞으로 음식물쓰레기를 이용하여 젖산을 생산할 경우 고려해야할 주요인자를 제시하고 배양공정의 최적화를 통하여 젖산 생산량을 높일 수 있음을 보여주었다.

요 약

통계학적 실험법을 통해서 음식물쓰레기 발효에서 젖산생산에 영향을 주는 중요한 인자들을 선택하였다. 젖산 생산에 관여하는 주요인자는 pH 변동과 배양액부피였다. 두 인자의 최적화를 위하여 central composite design을 이용한 결과 두 인자의 최적점은 각각 발효 60시간 후 pH 7.8과 125 mL이었다. 최적조건에서 발효한 경우 발효액의 pH를 변동하지 않고 발효액량을 150 mL로 유지한 경우보다 젖산 생산량이 6.2배 증가하였다. 이 결과를 통하여 젖산생산시 관여하는 주요인자를 제시하고 이 최적화방법을 통해서 추후 음식물쓰레기에서 젖산을 생산하는 경우의 기초자료를 제공할 수 있었다.

감 사

본 연구는 인하대 '2000 교내특성화연구비'에 의하여 수행

되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, P. K., S. C. Park, C. B. Shon, M. H. Kim, and T. K. Oh (1998), Changes of microbiological distribution in food waste for animal feed, *Korean J. Vet. Clin. Med.* **15**, 156-161.
- Sawayama, S., S. Inoue, K. Tsukahara, T. Yagishita, T. Minowa, and T. Ogi (1999), Anaerobic treatment of liquidized organic wastes, *Renewable Energy*, **16**, 1094-1097.
- Choi, C. H. (1999), Technology for manufacturing CMO ϵ s road deicers using organic acids from food wastes, KR 10-0235935.
- Hiltunen, K., J. V. Seppälä, and M. Härkönen (1997), Lactic acid based poly(ester-urethanes): Use of hydroxyl terminated prepolymer in urethane synthesis, *J. Appl. Polym. Sci.* **63**, 1091-1100.
- Hiltunen, K., J. V. Seppälä, and M. Härkönen (1997), Lactic acid based poly(ester-urethane)s: The effects of different polymerization conditions on the polymer structure and properties, *J. Appl. Polym. Sci.* **64**, 865-873.
- Ishigaki, T., W. Sugano, M. Ike, Y. Kawagoshi, I. Fukunaga, and M. Fujita (2000), Abundance of polymers degrading microorganisms in sea-based solid waste disposal site, *J. Basic Microbiol.* **40**, 177-186.
- Amrane, A. and T. Prigent (1997), Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey: Influence of peptidic nitrogen deficiency, *J. Biotechnol.* **55**, 1-8.
- Bruno-Bárcena, J. M., A. L. Ragout, P. R. Córdoba, and F. Siñeriz (1997), Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 316-324.
- Schmidt, S. and N. Padukone (1997), Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 10-14.
- Senthuran, A., V. Senthuran, B. Mattiasson, and R. Kaul (1997), Lactic acid fermentation in recycle batch reactor using immobilized *Lactobacillus casei*, *Biotechnol. and Bioeng.* **55**, 841-853.
- Zakaria, Z., G. M. Hall, and G. Shama (1998), Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery, *Process Biochem.* **33**, 1-6.
- Loh, C. W., A. Fakhru'l-Razi, M. A. Hassen, and M. I. A. Karim (1999), Production of organic acids from kitchen wastes, *Artif. cells blood substit. immobil. biotechnol.* **27**, 455-459.
- Shirai, Y. (1998), Lactic acid production from kitchen refuses, Proc. YABEC 1998, Taiwan, 47-48.
- Zhou, S. D., T. A. McCaskey, and J. Broder (1996), Evaluation of nitrogen supplements for bioconversion of municipal solid waste to lactic acid. *Appl. Biochem. and Biotechnol.* **57/58**, 517-524.
- Kim, E. K., D. C. Irwin, L. P. Walka, and D. B. Wilson (1998), Optimization of six-cellulase mixture by the experimental design method, *Biotechnol. Bioeng.* **58**, 494-501.
- Krishnan, S., S. G. Prapulla, D. Rajalakshmi, M. C. Misra, and N. G. Karanth (1998), Screening and selection of media components for lactic acid production using Plackett-Burman design, *Bioprocess Eng.* **19**, 61-65.
- Rama, M. R. P., G. Reddy, and G. Seenayya (1999), Production of thermostable β -amylase and pullulanase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: Screening of nutrients using Plackett-Burman design, *Bioprocess Eng.* **21**, 175-179.
- Annadurai, G., R. Y. Sheeja, S. Mathalai Balan, T. Murugesan, and V. R. Srinivasamoorthy (1999), Factorial design of experiments in the determination of adsorption equilibrium constants for basic methylene blue using biopolymer, *Bioprocess Eng.* **20**, 37-43.
- Lawford, H. G. and J. D. Rousseau (1998), Conditions that promote production of lactic acid by *Zymomonas mobilis* in batch and continuous culture, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **70-72**, 173-185.
- Haaland, P. D. (1989), Experimental design in biotechnology, p19-35. Marcel Dekker, New York.
- Xavier, S. and B. K. Lonsane (1994), Sugar-cane pressmud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid-state fermentation system, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 291-295.
- Poirier, I., P. A. Maréchal, C. Evrard, and P. gervais (1998), *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**, 704-709.
- Fu, W. and A. P. Mathews (1999), Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen, *Biochem. Eng. J.* **3**, 163-170.