



남은 음식물의 습식효모배양에서 영양물질첨가가 효모증식에 미치는 영향

이기영, 유성진, 채희정

호서대학교 자연과학부 식품가공학과
(2000년 10월 16일 접수, 2001년 1월 9일 채택)

Influence of Nutrient Addition in the Liquid Yeast Fermentation of Pulverized Food Wastes

Ki-Young Lee, Sung-Jin Yu, Hee-Jung Chae

Food Technology, Natural Science, Hoseo University

ABSTRACT

For the production of probiotic feed enriched with viable yeasts, aerobic liquid culture of *Kluyveromyces marxianus* was attempted in pulverized residual food wastes. After the preliminary shaking culture results, the liquid food wastes was added with urea(0.5g/ l), o-phosphate(0.4g/ l), molasses(4g/ l), and yeast extract (1g/ l), and the fermentation was carried out in 2-litre jar fermenter. In 12 hours of aerobic mixed culture with *Aspersillus oryzae*, viable cell count of the yeast reached to the number of $1.4 \times 10^{10}/ l$ in the cultured medium.

초 록

남은 음식물을 갈아 액상으로 만든 기질을 이용하여 생효모를 함유한 생균제제사료(probiotics)를 생산하기 위해 효모의 호기적 액상발효를 시도하였다. 기질의 영양조성의 최적화를 위해 미리 진탕배양한 결과를 토대로 액상의 남은 음식물 기질에 우레아(0.5g/l), 당밀(4g/l), 0-phosphate(0.4g/l), yeast extract(1g/l)를 첨가하여 2리터 용량의 발효기를 이용하여 *Kluyveromyces marxianus*와 *Aspersillus. oryzae*를 접종하여 통기발효시킨 결과 12시간 내에 $1.4 \times 10^{10}/liter$ 의 생균효모농도를 얻을 수 있었다.

1. 서론

음식물 쓰레기의 매립장 반입금지가 2002년부터 수도권권을 중심으로 실시되어, 2005년에는 전국으로 확대되므로 전국의 지자체들은 음식물 쓰레기의 처리에 매우 고심하고 있다. 이에 대한 최선의 대책으로서 남은 음식물을 자원으로 재활용하기 위한 퇴비화, 사료화 시설들이 다투어 건립되고 있다. 그러나 퇴비화는 음식물의 염도가 높아 토양이나 작물의 생

육에 문제점들을 유발시켜 그 이용이 제한되므로 남은 음식물의 사료화 사업이 주목받고 있다¹⁾. 그러나 수거나 운반도중에 발생할 수 있는 오염으로 인한 각종 병원성 미생물의 증식이나 이들이 생성하는 독소가 가축의 대량 폐사를 초래할 수 있으므로 이러한 가능성을 없애는 공정의 개발이 시급한 형편이다. 이러한 연구의 일환으로 된장이나 막걸리 등의 발효식품생산에 이용되는 유용미생물들을 균주로 활용한

남은 음식물의 발효 사료화가 연구되어왔다^{2, 3)}.

특히 포유동물의 장내 미생물 균총의 균형을 개선시키는 생균제제인 probiotics로서 유용한 효모, 유산균, 고초균 등을 균주로 이용하여 습식발효시키면 생균농도가 높아지면서 혐기적으로 유기산과 알콜발효가 일어나 유해미생물들의 증식이 차단되어 보존성이 생기면서 동시에 사료로서의 가치를 높일 수 있다.

야생 동물들은 어미와 환경으로부터 장내 정상 균총을 빠르게 구성하지만, 인간에 의해서 오랫동안 길들여진 가축들은 어미와 접촉하는 것이 제한되고, 인공 사료를 섭취하며, 인위적인 환경 조건에 처해지는 경향이 있기 때문에 질병에 저항하는 정상적인 장내 균총을 구성하지 못하므로 면역 결핍 현상을 나타내어 조그만 충격에도 쉽게 사망에까지 이르게 된다. 그러나 이러한 문제들은 probiotics로서 사용 가능한 여러 균종을 사료에 첨가함으로써 예방할 수 있다⁴⁾.

한편 유기물질을 완전 균체 자원화시키는 방법으로는 단세포 단백질(SCP, Single Cell Protein) 생산법이 있다. 배 등⁵⁾은 가축분뇨를 이용하여 SCP 생산 균주를 분리하였으며, 이 등^{6, 7, 8)}은 *Candida rugosa*를 이용하여 쌀보리 알콜발효 증류폐액으로부터 균체 단백질을 생산을 하였다. 또한 Seyed Abbas Shojaosadati 등⁹⁾은 사탕수수 폐액을 이용하여 SCP를 생산하기 위한 최적 조건을 연구하였다. 단세포 단백질은 세균, 효모, 곰팡이, 조류 등의 미생물을 식용이나 가축사료용 단백질원으로 이용하기 위해 생산된다. 미생물 균체는 단백질뿐만 아니라 비타민, 지질 등의 함량이 높고 특히 필수아미노산이 골고루 분포되어있어 영양적 가치가 크다¹⁰⁾. 식용이나 사료용 미생물로는 세균보다는 효모나 곰팡이가 이용되었고 단세포 단백질 생산에는 주로 효모가 이용되어 왔다. 이것은 효모가 곰팡이에 비하여 작은 세포이므로 대사활성이 높고 성장속도가 빠르기 때문이다. 그 뿐만 아니라 효모는

아주 낮은 pH나 온도, 낮은 수분활성도에서도 잘 증식하며 매우 혐기적인 조건에서도 증식을 유지하거나 발효를 일으키고, 높은 삼투압에도 잘 견디므로 염분이나 유기산 또는 당의 농도가 높거나, 유기성 고형분을 포함하는 남은 음식물의 발효에 효율적으로 이용될 수 있다. 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.

음식물 쓰레기는 그 성분의 불균질성과 이에 관련된 미생물의 복잡한 구성으로 인하여 체계적인 조사, 분석에 매우 큰 어려움이 있으며, 현재까지 음식물 쓰레기 발효와 관련된 미생물의 변화와 우량균 주입가 효과에 대한 미생물학적 연구는 매우 제한적으로 이루어진 실정이다^{11, 12, 13)}.

본 연구에서는 남은 음식물을 기질로 이용한 습식 발효사료를 생산함에 있어서 가능한 한 효모 생균의 농도를 높이고자 강제적 통기를 이용한 호기적 액상 발효를 시도하였다. 특히 효모의 증식을 촉진할 수 있는 영양원으로서 질소원인 urea, 탄소원인 당밀, 인원으로 o-phosphate와 증식 촉진제인 yeast extract를 각각 농도별로 첨가하여 이들이 생균수의 증가에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 이들을 모두 적량 첨가하여 최적 영양상태에서 효모를 증식시켜 생균수의 증대를 시도하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 남은 음식물 시료

호서대학교 학생식당에서 배출되는 음식물 찌꺼기를 1주일 동안 매일 수거하여 혼합한 뒤 물기를 제거하였다. 물기가 제거된 시료를 분쇄기(동아산업, 오스카 DA502)로 1차 분쇄한 뒤 -70℃에서

[Table 1] The chemical composition of residual food waste(dry basis).

composition	Water content (%)	Crude protein (%)	Reducing sugar (%)	Crude lipid (%)	Crude fiber (%)	Carbohydrate (%)	Crude ash (%)
content	86	19	7.6	8.22	11.63	41	9.03

냉동·저장하였으며 실험에 사용할 때에는 2차 분쇄하여(DIAX 900) 시료로 이용하였다. 이 시료의 조성은 다음과 같다.

2.2 미생물 균주 및 종균제 제조

2.2.1 *Kluyvermyces marxianus*

아프리카에서 분리한 내열성 알콜발효효모로서 YM 액체 배지에 첨가하여 35℃에서 2일간 전배양하여 남은 음식물의 5%(v/v)에 해당하는 균주 배양액을 첨가해 줌으로써 남은 음식물의 호기적 액상 발효 종균으로 사용하였다.

2.2.2 *Aspergillus oryzae*

한국유전자은행에서 분양받아 계대배양하여 사용하였다. YM배지에 첨가하여 30℃에서 2일간 전배양하여 남은 음식물의 5%(v/v)에 해당하는 균주 배양액을 첨가해 줌으로써 남은 음식물의 호기적 액상 발효 종균으로 사용하였다.

2.3 urea, yeast extract, 당밀, o-phosphate 첨가효과실험

*Kl. marxianus*를 종균제(5%(w/v))로 하여 액상의 남은 음식물 기질 500ml 에 효모의 증식을 촉진시킬 수 있는 영양원으로 urea, 당밀, o-

phosphate와 yeast extract를 각각 농도별로 첨가하여 35℃에서 30시간 진탕배양법을 이용하여 호기적 배양시킨 뒤 생균수를 측정하였다.

2.4 영양적 최적조건에서의 발효

연구 결과에 따라 각 영양소들을 적량 첨가해 준 뒤 Jar fermenter(2liter, 한국발효기)에서 배양하였으며 배양조건은 [Table 2]와 같다.

2.5 생균수 측정

6시간마다 1ml 의 시료를 취한 뒤 단계별로 희석한 후, 희석액 0.1ml 을 YM 배지에 도달하는 평판도말배양법을 이용하였다. 배지의 성분 및 배양온도는 [Table 3]과 같다.

3. 결과 및 고찰

3.1 기질의 영양최적화를 위한 molasses, o-phosphate 및 yeast extract의 첨가효과

질소원으로 urea, 인(phosphate)원으로 o-phosphate, 탄소원으로 환원당과 미네랄을 함유하고있는 molasses, 그리고 질소 및 종합 영양원인 yeast extract를 첨가하여 생균수의 증가에 미치는 효과를 관찰하였다. urea, o-phosphate, 당

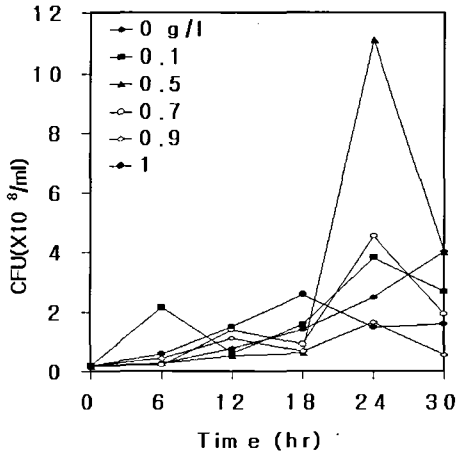
[Table 2] Conditions for aerobic liquid fermentation of food waste

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. oryzae</i>	30	900	1.5

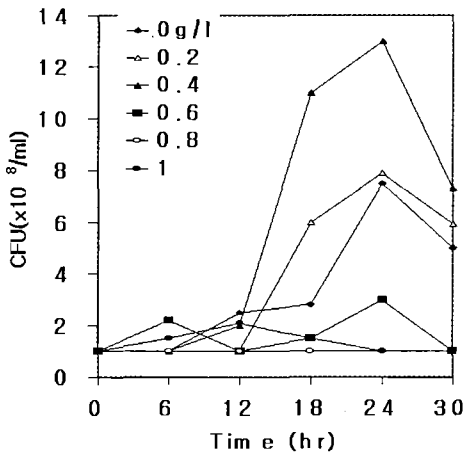
v.v.m : volume per volume & minutes rpm : revolutions per minute

[Table 3] 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℃
		<i>Kl. marxianus</i> + <i>Asp. oryzae</i>	30℃



(Fig. 1) Change of viable cell count of the yeast *Kl.marxiana* by the addition of urea during aerobic cultivation in the pulverized liquid food waste.



(Fig. 2) Change of viable cell count of the yeast *Kl. marxiana* by the addition of o-phosphate during the aerobic cultivation in the pulverized liquid food waste.

밀, yeast extract를 농도별로 1 리터의 남은 음식물 배지에 첨가하여 30시간 동안 진탕배양기를 이용하여 35°C에서 배양하였다.

효모에 의해 쉽게 이용될 수 있는 형태의 질소원인 urea를 농도별로 0, 0.1, 0.5, 0.7, 0.9, 1.0 g/l로 첨가하여 배양하여 매 6시간마다 생균수를 검

사한 결과는 (Fig. 1)에 나타나있다.

urea 0.5g/l 첨가 시료에서 24시간 배양 후 살아있는 효모농도가 1.1×10^9 /ml를 나타내 가장 높은 생균수를 기록하였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하였다. 그러나 배양개시 후 30시간 후엔 균의 사멸이 빨리 일어나서 처음부터 생균농도가 서서히 증가한 무첨가 시료와 거의 같은 농도를 보였다. 이 결과를 보면 남은 음식물 기질엔 효모배양에 필요한 질소원은 부족하지 않은 것으로 보이나 효모의 단백질 분해효소의 역가가 크지 않아 포함된 질소원의 이용에 좀 더 시간이 걸리는 것으로 사료된다. 그러나 urea 첨가 농도가 과량일 경우엔 오히려 효모의 생육이 억제되므로 쉽게 흡수될 수 있는 질소원으로서 urea의 첨가는 좀 더 신중을 기해야 할 것으로 생각된다.

o-phosphate를 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 1.0 g/l 농도로 첨가하여 생균농도를 비교한 결과는 (Fig. 2)와 같다.

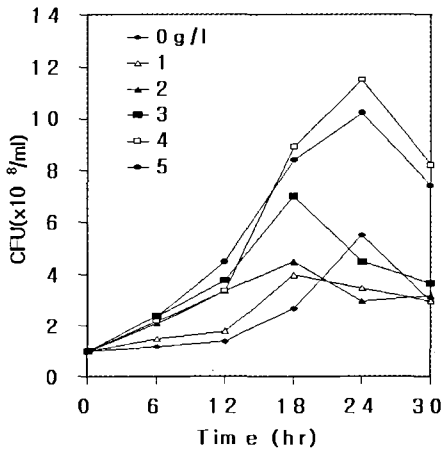
0.4g/l 시료의 경우 발효를 시작한지 24시간 이후 생균농도가 최대 1.3×10^9 /ml을 나타내었다. 그러나 0.6g/l 이상을 첨가하였을 경우 오히려 균의 성장을 저해하는 것으로 나타났다. 이 결과를 보면 남은 음식물엔 인이 약간 부족한 것으로 나타나 적량 첨가시 거의 70-80%까지 생균농도가 증가할 것으로 보이나 역시 urea와 마찬가지로 과량을 첨가할 경우엔 생육을 저해하므로 적정 첨가량을 정해서 사용하여야 할 것이다.

환원당을 다량 함유한 주요 탄소원이자 각종 비타민이나 미네랄을 함유한 당밀을 남은 음식물 기질에 0, 1, 2, 3, 4, 5g/l 첨가하여 발효시킨 결과가 (Fig. 3)에 나타나있다.

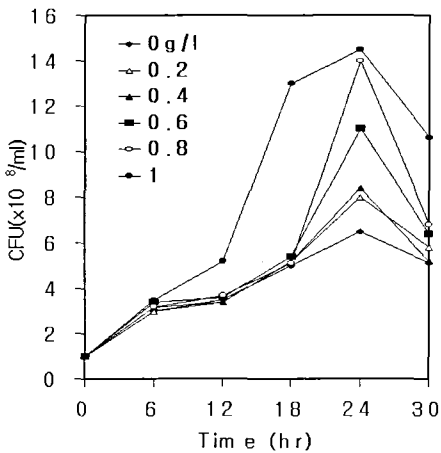
4g/l를 첨가한 시료의 경우 초기에 1.0×10^8 /ml이었던 균수가 urea 첨가시료와는 달리 발효를 시작한 초기부터 균의 증가를 보여 24시간 후에 최대 균수인 1.1×10^9 /ml로 증가되었다.

5g/l 시료의 경우는 약간 감소하여 4g/l가 적량인 것으로 판단되었다. 당밀을 첨가한 결과 무첨가 시료군보다 2배이상의 생효모 농도의 증가를 보여주어 당밀이 탄소원으로서 매우 우수한 결과를 보여주었다.

또한 효모의 생균농도를 효과적으로 증가시킬 수



[Fig. 3] Change of viable cell count of the yeast *Kl. marxianus* by the addition of molasse during aerobic cultivation in the pulverized liquid food waste.



[Fig. 4] Change of viable cell count of the yeast *Kl. marxianus* by the addition of yeast extract during the aerobic cultivation in pulverized food waste.

있는 종합 영양원으로서 yeast extract를 각각 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1g/l 첨가하여 생균수의 증가를 관찰하였다[Fig. 4].

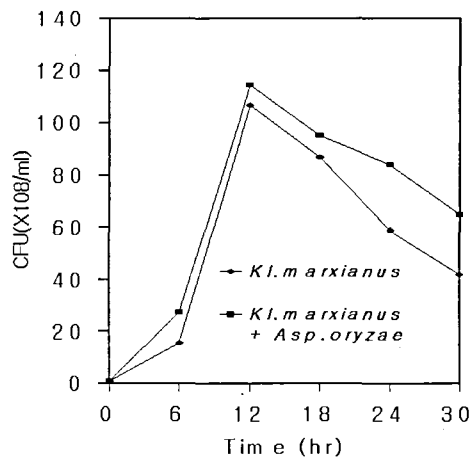
그 결과, 생균의 증가는 yeast extract의 첨가농도에 비례하여 지속적으로 증가하는 현상이 관찰되었다. 발효를 진행한지 24시간 후에는 $1.4 \times 10^9/m$ l 으로 최대 균수를 나타내었으며 모든 첨가농도에

서 생균수의 증가가 대조군 보다 높게 나타나 yeast extract 첨가할 경우에는 균의 성장 저해효과가 나타나지 않았다.

3.2 최적화 발효

가능한 단 시간내에 최대의 생균농도를 얻기 위하여 yeast extract 1g/l, molasses 4g/l, o-phosphate 0.4g/l, urea 0.5g/l 를 모두 함께 첨가하여 2-liter Jar fermenter를 이용하여 *Kl. marxianus* 단독 발효와 *Kl. marxianus*와 *Aspersillus oryzae* 혼합발효를 실시하였다. 초기의 생균농도는 $1.0 \times 10^8/ml$ 이었으나 단독이나 혼합발효 모두 빠른 균의 성장을 보였다. 혼합발효한 시료는 이미 6시간만에 $2.7 \times 10^9/ml$ 의 생균수가 관찰되었다. 12시간이 지나면서 이미 최대 생균수에 이르러 혼합발효한 것은 최대 $1.14 \times 10^{10}/ml$ 으로 진탕배양시보다 10배 이상의 매우 높은 생균수를 나타내었으며 *Kl. marxianus*만을 단독으로 발효한 군도 $1.07 \times 10^{10}/ml$ 로 높은 균수를 나타내었다. 이는 다른 결과와 비교할 때 매우 빠른 효모의 증식속도를 보여주었을 뿐만 아니라 최대 생균수에 있어서도 높은 균수를 나타냈다.

12시간 이후부터는 효모의 자가분해가 일어나면서 생균수가 감소하였는데 *Asp. oryzae*를 혼합발효한 경우 총생균수의 감소정도가 적게 일어났다.



[Fig. 5] Change of viable cell count of the yeast *Kl. marxianus* during aerobic jar cultivation in the pulverized food waste by the optimized codition.

이러한 결과를 볼 때 다량의 효모를 짧은 시간내에 생산하기 위해서는 결핍된 영양성분들을 보충하여준 뒤 충분한 통기를 해주면서 발효를 진행시키는 것이 효율적이라고 판단되었다.

4. 결론

본 연구에서는 남은 음식물을 곱게 갈아 균질화시켜 만든 액상기질에 고온성 알콜발효모인 *Kluyveromyces marxianus*를 첨가하여 호기적으로 액상 발효 시켜 효모생균이 풍부한 생균사료제(probiotics)를 생산하고자 하였다.

효모의 증식을 촉진할 수 있는 영양소들을 첨가하여 진탕배양실험한 결과 남은 음식물에 질소원이 결핍된 것으로 보이지는 않으나 흡수가 용이한 urea를 첨가하면 초기증식속도가 빨라져 발효기간이 단축되었다. 인은 약간 결핍된 것으로 나타나 첨가농도에 따라 생균농도가 증가되었고 0.4g/l 첨가시 최고 생균수를 보여주었다. yeast extract와 당밀은 첨가량에 비례해 모두 효모의 증식을 촉진하는 것으로 나타났으나 인은 일정량 이상이 첨가되면 오히려 균의 성장을 저해되는 것을 관찰할 수 있었다. 효모의 생산성을 증대시키기 위하여 각각의 영양원들을 최적 농도별로 동시에 첨가하여 jar fermenter에서 통기발효시킨 결과 1×10^{10} 이상의 높은 생균농도를 얻을 수 있었다.

위의 결과를 종합해 볼 때 남은 음식물을 이용하여 생균사료를 생산할 경우 증식율이 높은 *Kl. marxianus*를 종균으로 이용하고 동시에 탄수화물과 단백질 가수분해 효소를 풍부하게 분비하는 곰팡이 *Asp. oryzae*를 첨가하여 남은 음식물을 혼합 발효시킨다면 생균농도가 높은 생균제 사료를 효율적으로 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 심재곤, '99년도 음식물 쓰레기 감량 및 재활용 정책, 남은 음식물 사료화 심포지엄, 19-25, 1999.
2. 이기영, 양재경. 음식물 쓰레기의 혐기적 발효 사료화, 한국유기성폐자원학회 추계학술대회,

- 51-60, 1997.
3. 이기영, 이성택, 양익배, 양재경. 효모를 이용한 음식물 찌꺼기의 처리 및 사료자원화, 한국유기성폐자원학회, 추계학술대회, 46-56, 1998.
4. 김명민. 가축의 유산균 Probiotics 이용 현황과 전망 : 생물산업, 12(2), 23-28, 1999.
5. 배동훈. 가축분뇨를 이용한 SCP 생산 균주의 분리 및 균체 단백질 생산, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24(6), 749-755, 1996.
6. 김영근, 이기영, 이철호, 이용익, 이관호, 김만근. 쌀보리 알콜발효 증류폐액으로부터 균체 단백질 생산을 위한 내열성 효모, *Candida rugosa*의 이용. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21(3), 281-287, 1993.
7. Lee K.Y. G. Baerwald. Kinetic behavior of *Candida rugosa* in the batch fermentation of sugar beet stillage; temperature dependence of growth and flocculation characteristics, *Biotechnology Letters*, 13(8), 595-598, 1991.
8. Lee, K.Y. and S.T. Lee Yeast biomass production from concentrated sugar cane stillage using athermotolerant *Candida rugosa*, *Journal of Microbiology and Biotechnonolgy* 5(2), 114-116, 1995.
9. 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.
10. Choi. M.H., S. E. Cho, J.M. Yoo, Y.J. Chung, and Y.H. Park. Isolation and characterization of thermophilic bacteria for aerobic decomposition of food waste. *J. KOWEC.* 3(1), 21-34, 1995.
11. Choi. M. H., Y.J. Chung, and Y.H.

- Park. Some observations on the counting method of thermophiles and mesophiles during food waste composting. Proceedings of '95 symposium on improvement of agricultural environment, 204, 1995.
12. Choi. M. H, Y.J. Chung, and Y.H.Park. Interaction between thermophilic yeasts and bacteria during food waste composting. *Bioindustry*. 8(3), 97, 1995.
13. Lee, K.Y. and S.T. Lee, Continuous process for yeast biomass production from sugar beet stillage by novel strain of *Candida rugosa* and protein profile of the yeast, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996, 66, 349-354. ☐