

## 제지 슬러지의 동시당화발효에서 젖산과 유산균 생산을 위한 최적 배양 조건

정 다 연 · 이 상 목 · 구 윤 모 · † 소 재 성  
인하대학교 생물공학과, 초정밀생물분리기술연구센터  
(접수 : 2002. 11. 5., 게재승인 : 2002. 12. 12.)

## Optimum Conditions for the Simultaneous Saccharification and Fermentation of Paper Sludge to Produce Lactic acid and Viable *Lactobacillus* Cells

Da-Yeon Jung, Sang-Mok Lee, Yoon-Mo Koo, and Jae-Seong So†

Department of Biological Engineering and Center for Advanced Bioseparation Technology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2002. 11. 5., Accepted : 2002. 12. 12.)

In this study of the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of paper sludge, fed-batch cultivation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* KLB58 was attempted to produce viable KLB58 cells and lactic acid. Optimal culture conditions, including the temperature and concentration of the supplemented enzyme, were examined in terms of lactic acid production and viable cell count. When the effects of culture temperature and  $\beta$ -glucosidase concentration were examined in fed-batch SSF, the highest viable cell counts and lactic acid production (i.e.  $5 \times 10^9$  CFU/ml and 45 g/L, respectively) were obtained at 37°C and 2 unit/ml of  $\beta$ -glucosidase.

**Key Words :** *Lactobacillus* sp., SSF, viable cell, lactic acid

### 서 론

*Lactobacillus* sp. 는 여러 종류의 유기산, 과산화수소, 박테리옌 등을 생산하여 병원균의 성장을 저해하며, 장내에 병원균의 부착 등을 방해하여 생태계의 안정과 균형을 유지한다(1). 이러한 정장 효과는 임상 실험을 통해 확인되어, 발효식품 산업과 축산업에서 폭넓게 사용되고 있다(2,3). *L. acidophilus*, *L. faecium* 등은 이미 동물용 생균제로 이용되고 있는 유산균들이다. 특히, 축산업에서는 항생제 남용으로 유익한 장내 생태계의 불균형과 항생제 내성 균주의 출현이 초래되었으며, 최근 European Commission은 성장 촉진제로 사료에 첨가되는 항생제의 사용을 금지하였다. 이로 인해 특히, 양계 산업에서는 항균력을 보유한 정장제의 사용을 적극 권장하고 있는 실정이다(4).

한국사료협회는 현재 국내 사료 시장의 규모를 약 4조 3000억원으로 추정하였다. 최근 4년간(1998년-2001년)의 총 배합사료 생산은 계속적으로 증가하여 한 해에 15,000,000톤 이상을 생산하였으며, 특히 99년 26.3%를 점유하는 양계용 배합 사료의 경우 약 4,000,000톤의 생산을 보고하였다. 더불어 사료용 생균제를 포함한 축사 환경 개선을 위한 여러 제품들을 300여개 업체에서 생산하고 있으며 16억원 이상이 연별 소비되고 있다.

정장효과를 보이는 균체를 생균제화하여 산업적으로 이용하기 위해서는 경제적인 방법으로 대량의 균체를 생산하는 공정이 필수적이다. 특히, 균주를 배양하는 배지의 선정은 경제적인 측면에서 더욱 중요하다. 본 연구에서는 유산균을 이용하여 젖산을 생산하는 동시당화발효(SSF, simultaneous saccharification and fermentation) 공정에서 제지 슬러지를 이용하여 대량 유산균체 생산의 가능성을 제시하였다(Fig. 1). 이전 연구 결과, 제지 슬러지를 탄소원으로 하는 SSF 공정에서 젖산을 생산하기 위한 유산균의 최적 배양 조건은 확립되었으며, 제지 슬러지의 성분 조사결과 특별한 문제점은 제기되지 않았다(5-7).

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-7516, Fax : +82-32-875-0827  
E-mail : sjaeseon@inha.ac.kr

본 실험에서 사용한 *L. paracasei* subsp. *paracasei* KLB58 은 가금류의 폐혈증을 유발하는 *Salmonella gallinarum*에 대해 우수한 항균활성을 보였으며, 감염된 닭에 직접 투여하는 동물 임상 실험을 통해 probiotic 효과가 확인되었다(8). 따라서 본 실험에서는 KLB58을 동물용 생균제로 대량 생산하기 위해 제지 슬러지를 이용한 SSF 공정을 적용하였으며, 배양 온도와 배지에 첨가하는 효소의 농도를 조절하여 젖산과 유산균체를 경제적으로 생산하기 위한 최적의 SSF 배양 조건을 확립하고자 하였다.

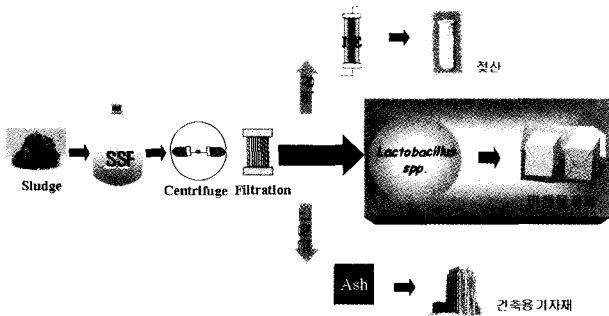


Figure 1. Production of probiotic strain from paper sludge. SSF, simultaneous saccharification and fermentation; I/E, ion exchange adsorption

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양 조건

KLB58은 MRS (Difco) 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였으며, 두 차례 계대배양 후 1% 접종( $10^{7-8}$  CFU/ml)하여 18 시간(정지기) 동안 배양하였다. SSF 공정에 사용한 배지 성분과 배양 조건은 *L. rhamnosus*을 적용하여 젖산 생산의 최적조건을 확인한 실험을 참고하였다(6,7). 플라스크(100 ml)에 제지슬러지 등을 포함한 액체 배지를 30 ml씩 분주한 후 고무마개로 밀봉하여 121°C에서 15분 동안 멸균하였다. 그 후 균체( $10^{7-8}$  CFU/ml)를 접종하여 각각의 실험 온도(37, 42, 47°C)로 맞춘 수조에서 교반(150 rpm)배양하였다. 제지 슬러지를 분해하는 효소로 cellulase (5 unit/ml)와  $\beta$ -glucosidase (2 unit/ml)를 첨가하였다.

#### 배양조건 변화에 따른 젖산 생산 및 생균수 변화 (희분식 배양)

KLB58 ( $10^8$  CFU/ml)을 접종 후 37, 42, 47°C의 수조에서 20시간 동안 교반 배양하여 생균수와 젖산 생산의 최적 온도를 확인하였다.  $\beta$ -glucosidase의 제지 슬러지 내 섬유소의 가수분해 효과를 알아보기 위해 37, 42°C 각각에 대해서  $\beta$ -glucosidase의 양을 0, 1, 2 unit/ml로 조절하여 수조에서 20시간 동안 교반 배양하였으며, 젖산과 생균수 생산의 최적 배양 조건을 확인하기 위해, 시료를 5시간마다 취하여 glucose, lactic acid 농도와 생균수를 측정하였다.

#### KLB58의 최적 배양 조건 (유가식 배양)

희분식 배양으로 확인된 최적 배양 조건으로 유가식 배양하여 KLB58의 젖산과 유산균체를 생산하였다. MRS 액상 배지에서 배양된 KLB58을 접종( $10^{7-8}$  CFU/ml)하고 균주 배양

온도를 37°C와 42°C로 조절하여 교반 배양하였으며, 각각의 온도에 대해  $\beta$ -glucosidase의 양을 0, 2 unit/ml로 조절하였다. 8시간마다 제지 3.5 g (35% w/v)의 첨가를 6회 수행하였으며, 섬유소 가수분해를 위해 두 종류의 효소를 24시간마다 2회 첨가하였다.  $\beta$ -glucosidase를 포함하지 않고 배양하는 경우에는 24시간마다 동량의 cellulase만 첨가하였으며 8시간마다 시료를 취하여 glucose, lactic acid 농도와 생균수를 측정하였다.

### 분석 방법

Glucose에서 젖산으로의 전환율은 MRS 배지 30 ml에 KLB58을 접종( $10^{7-8}$  CFU/ml)하여 총 30시간 동안 37°C에서 배양하고, 5시간마다 시료 1 ml을 취해 glucose와 젖산의 농도를 측정하여 확인되었다. SSF 공정에서 취한 시료를 포함하여 glucose와 lactic acid의 농도는 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 10 min)한 후 상등액을 취하여 HPLC와 glucose analyzer를 이용하여 측정하였으며, 생균수 측정은 평판배지에 도말한 후 콜로니 계수법을 이용하였다. 모든 실험은 3회 이상 수행하였으며, 평균값과 오차 범위로 나타내었다.

### 결과 및 고찰

#### 최적 배양 조건 모색

본 실험에 사용된 효소의 제지 슬러지 내 섬유소의 가수분해반응 최적조건은 pH 5.0이며, 온도는 50°C이다. 그리고 KLB58의 최적 배양 조건은 pH 5-6, 37°C이며, MRS 배지 내 glucose에서 젖산으로 전환율은 94%로 측정되었다(결과 미제시). 균주 KLB58의 배양 온도인 37°C와 젖산 생산을 위한 SSF 공정 결과 최적 온도 조건인 42°C(6,7), 그리고 섬유소 가수분해를 위해 첨가되는 두 효소의 최적 활성 온도를 고려하여 47°C에서 희분식 배양하였다.

KLB58의 배양온도 37°C와 42°C에서 생산된 젖산 농도의 차이는 크지 않았으나, 생균수는 42°C보다 37°C에서 높게 생산되었다(Fig. 2). 섬유소 분해 효소 활성이 다소 높은 42°C에서 KLB58을 배양시 glucose 잔류 농도는 높았으며, 15시간 배양 이후에는 유사한 잔류량이 측정되었다. 이는 37°C 효소 반응 시 생성되는 낮은 glucose 농도가 성장 속도가 늦은 KLB58에 큰 영향을 미치지 못하여, 최종 산물로 최적의 균체와 젖산의 생산이 가능하였음을 알 수 있다. 반면 KLB58의 성장이 온도에 민감하여 42°C 배양시 상대적으로 낮은 균체수 증가를 보였으나 섬유소 분해능은 우수하여 잔류하는 당 농도가 높아 젖산 생산에는 어려움이 없음을 알 수 있었다. 47°C에서 배양시 젖산과 균체는 모두 낮게 생산되었다. 그러나 47°C 배양의 경우 glucose 잔류 농도는 높게 유지되어 효소의 활성이 상대적으로 높게 나타나는 것을 알 수 있었다(결과 미제시). 그러므로 섬유소 가수분해 효소를 적정량 첨가할 경우 37°C 배양이 높은 젖산과 균체 생산에 효과적이었다.

섬유소 가수분해 효소에 의해 생성된 cellobiose는  $\beta$ -glucosidase에 의해서 glucose으로 분해된다. 이에  $\beta$ -glucosidase의 농도에 따른 섬유소의 glucose 전환율과 젖산생산에 대한

연구를 진행하였다.  $\beta$ -glucosidase의 양을 0, 1, 2 unit/ml 로 다르게 첨가하여 37°C에서 배양 시 생산된 젖산의 농도는 첨가되는 효소의 양이 많을수록 높았으며 그 차이는 2 g/L 이 내로 확인되었다. 그러나 생균수는 첨가된 효소의 양에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며, 효소를 첨가하지 않았을 때에도 상대적으로 많은 양의 젖산과 생균수를 생산하는 것을 확인하였다 (Fig. 3).

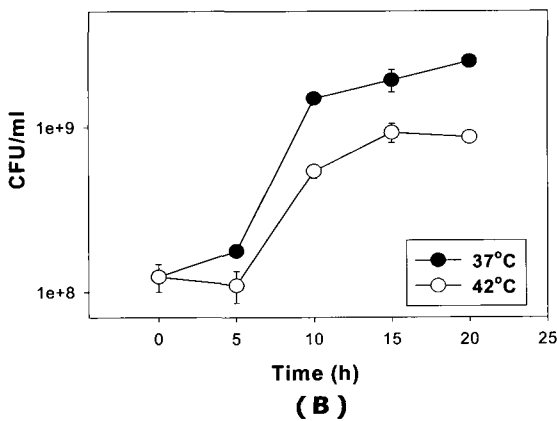
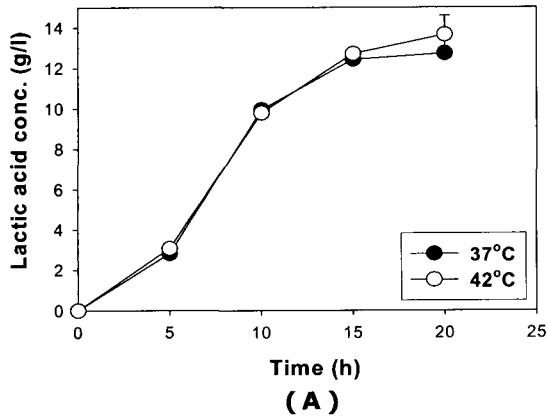


Figure 2. Lactic acid production (A) and viable cell counts (B) during batch SSF at 37°C (●) and 42°C (○).

효소를 1, 2 unit/ml 첨가하여 42°C에서 배양시 생산된 젖산 농도의 차이는 보이지 않았다. 효소를 포함하지 않았을 때에는 이보다 2 g/L 낮은 농도 차이로 젖산이 생산되었다 (Fig. 4(A)). 생균수를 측정된 결과, 균체 성장 속도는 첨가되는 효소의 농도가 높을수록 빠르며 15시간 배양 후 정지기에 도달하였을 때에는 비슷한 균체수를 생산하였다 (Fig. 4(B)). 이는 섬유소 가수분해 효소에 의해 제지 슬러지 내 섬유소가 cellobiose 및 glucose로 전환되는 비율만으로 미생물이 충분히 성장할 수 있음을 보여주며, cellobiose 또한 KLB58의 기질로 사용되어 균체 생산에 도움을 주는 것으로 보여진다(9). 더불어  $\beta$ -glucosidase에 의해 분해되는 주요 기질인 cellobiose를 탄소원으로 사용하여 KLB58을 배양하였을 때 균체 생산은 가능하였으나, 젖산 생산에는 적당하지 않았다 (결과 미제

시). 그러므로 섬유소 가수분해 효소만으로 생성된 cellobiose와 glucose는 KLB58에 의해 각각 균체와 젖산 생성에 사용되어  $\beta$ -glucosidase 농도가 적거나 포함하지 않아도 젖산이 생산되는 것으로 판단된다.

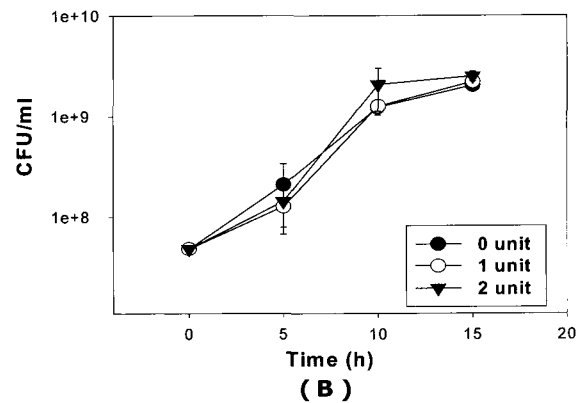
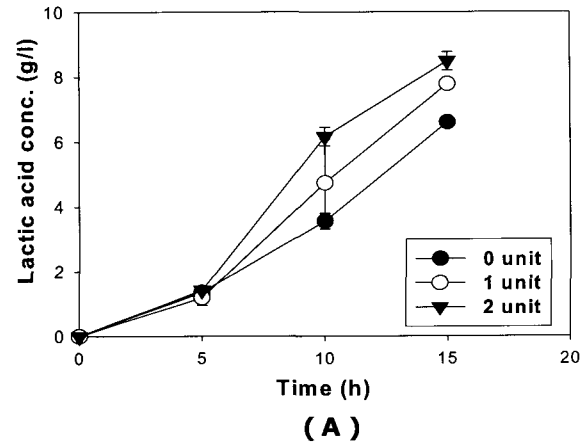


Figure 3. Lactic acid production (A) and viable cell counts (B) during batch SSF with supplemented  $\beta$ -glucosidase (0, 1, 2 unit/ml) at 37°C.

결국 KLB58의 회분식 배양에서 균체 생산과 젖산 생성을 위한 최적 배양 온도는 37°C이다. 또한 각 배양온도에서 균체 생산이 주목적일 때 제지 슬러지 분해 효소로 사용되는  $\beta$ -glucosidase의 양을 줄이거나 포함하지 않아도 큰 차이를 보이지 않았으며, 최종 산물로 고농도의 젖산을 동시에 생산하기 위해서는 각각의 온도에 대해 2 unit/ml의  $\beta$ -glucosidase를 포함할 때 효과적이라고 결론지을 수 있다. 아울러,  $\beta$ -glucosidase를 포함하지 않고 제지 슬러지를 이용한 SSF 공정에서 KLB58은 충분한 생균수 생산과 상대적으로 많은 양 생산되는 젖산은 다른 균주와 비교하여 많은 차이를 보였다 (결과 미제시). 이는 KLB58 균주 자체의 밝혀지지 않은 우수한 특성에 의한 것으로 추측할 수 있다.

#### KLB58의 최적 배양 조건

제지 슬러지 내에는 섬유소가 약 30-40%를 차지하고 있다.

회분식 배양에서는 많은 양의 슬러지를 넣어주기 어렵기 때문에 낮은 농도의 젖산만을 생산한다. 이를 해결하기 위해 상대적으로 높은 젖산 생산 및 균체 수를 유지할 수 있는 유가식 배양을 실시하였다. 균주를 접종하기 이전 배지에서 당 성분은 측정되지 않았으며, 각각의 온도에 대해 균주를 접종한 후 70시간 배양하는 동안 glucose는 거의 모두 소모되어 낮은 농도 (6 g/L 이하)를 유지하였다. 특히, 배양온도 37°C에서는 1 g/L 정도의 잔량이 측정되어 젖산과 균주 생산에 거의 모두 소비된 것을 확인할 수 있었다.  $\beta$ -glucosidase (2 unit/ml)를 포함하여 37°C에서 유가식 배양을 하였을 때 젖산 생산량과 균체 수는 가장 높게 유지되어, 회분식 배양을 통한 젖산생산과 생균수 유지의 최적 배양 조건을 재확인하였다. 배지에 포함된 모든 제지 슬러지의 양과 잔존하는 glucose 농도 및 생산된 젖산 농도에서 70%의 전환율이 측정되었다. 또한 42°C에서  $\beta$ -glucosidase 포함하였을 때 젖산 생산은 높았으나, 생균수는 37°C에서  $\beta$ -glucosidase 포함하지 않았을 때 높게 유지되었다(Fig. 5).

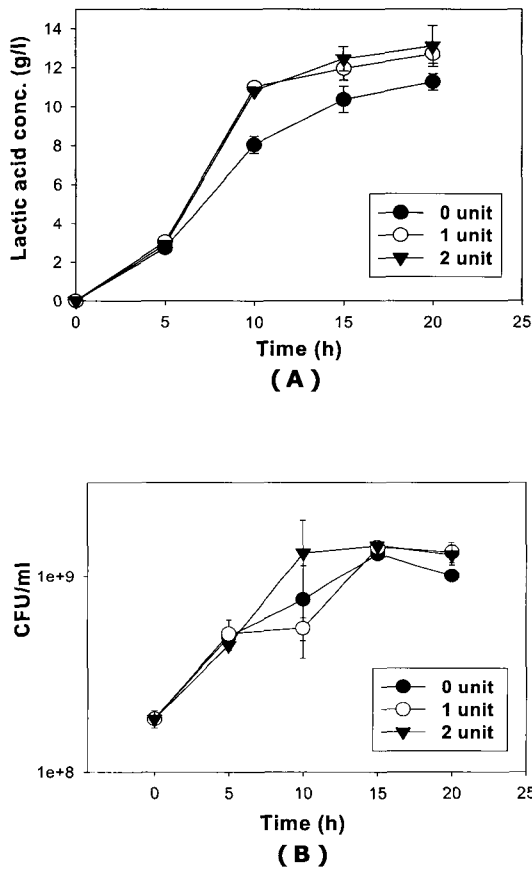


Figure 4. Lactic acid production (A) and viable cell counts (B) during batch SSF with supplemented  $\beta$ -glucosidase (0, 1, 2 unit/ml) at 42°C.

본 연구 결과에서 확인된 동시 당화 발효의 최적 온도는 균주 KLB58의 최적 성장 온도와 같았으며, 이미 보고된 최적 배양 온도 조건에 비해 낮은 온도이므로 많은 열 에너지를 절약할 수 있을 것이다(6). 향후의 연구는 SSF 공정을 이용한 KLB58 배양시 고가의  $\beta$ -glucosidase를 포함하지 않아도

상대적으로 많은 양의 젖산과 균체를 생산하는 원리를 규명하고, 나아가 제지슬러지를 이용하여 유산균을 경제적으로 대량 생산할 수 있는 SSF 공정을 수행한 후 효율적으로 균체를 분리하기 위한 방법을 강구하여야 할 것으로 본다.

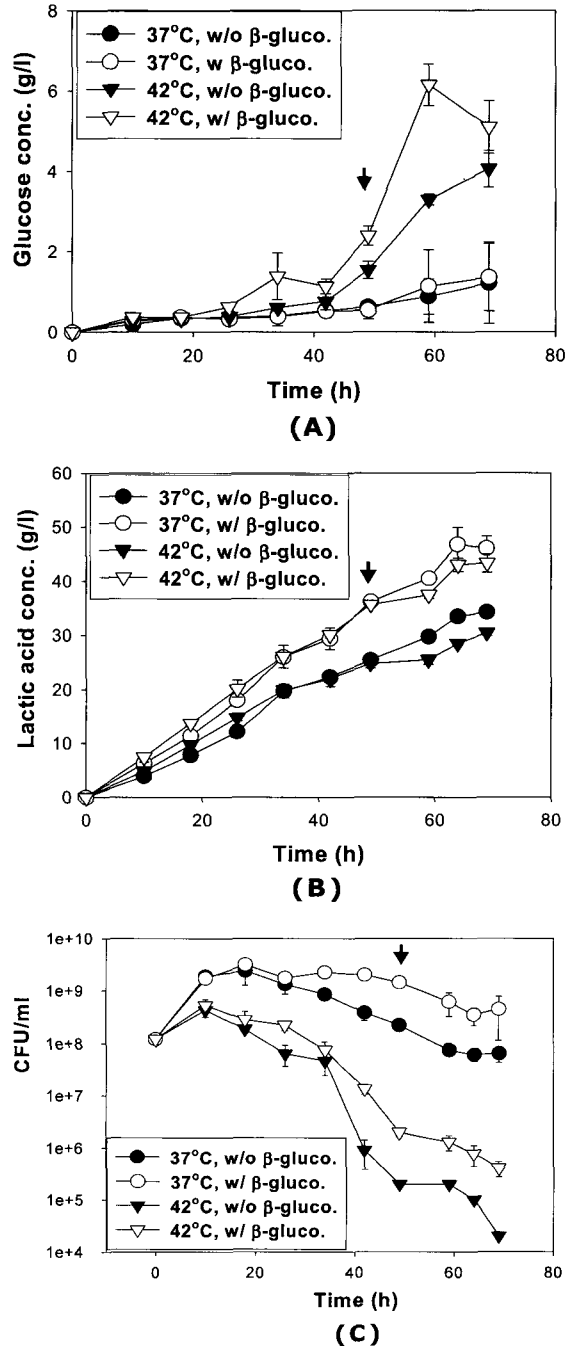


Figure 5. Effects of temperature and supplemented enzyme on glucose consumption (A), lactic acid production (B), and viable cell counts (C) in fed-batch SSF. Arrows indicate the last feeding time in fed-batch culture. w, with; w/o, without

요약

본 연구에서는 제지 슬러지를 이용한 SSF 공정에 *L. paracasei* KLB58을 적용하여 젖산과 더불어 생균제용 균체

를 경제적으로 대량 생산하고자 하였다. KLB58의 배양온도와 섬유소 가수분해 효소인  $\beta$ -glucosidase의 농도를 조절하여 최적의 생산 조건을 확인해 본 결과, 37°C에서 2 unit/ml의  $\beta$ -glucosidase를 첨가하여 배양하였을 때 최대의 젖산과 균체를 생산하였다. 또한  $\beta$ -glucosidase를 포함하지 않아도 상대적으로 많은 양의 젖산과 균체를 생산하였으므로, 이에 대한 향후 연구가 기대된다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 지원 아래 수행되었습니다.

### REFERENCES

1. Salminen, S., E. Isolauri, and E. Salminen (1996), Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges, *Antonie van Leeuwenhoek* **70**, 347-358.
2. Tortuero, F. (1973), Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndromes and intestinal flora, *Poultry Sci.* **52**, 197-203.
3. Jin, L. Z., Y. W. Ho, A. M. Ali, N. Abdullah, and S. Jalaludin (1996), Effects of adherent *Lactobacillus* spp. on in vitro adherence of salmonella to the intestinal epithelial cells of chickens, *J. Appl. Bacteriol.* **81**, 201-206.
4. Council of the European Communities (1998), Regulation EEC no. 2821/98. Off. J. Eur. Commun., L351/4.
5. Hofvendahl, K. and B. Hajn-Hagerdal (2000), Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, *Enzyme Microbial Tech.* **26**, 87-107.
6. Lee, S. M. and Y. M. Koo (2002), Simultaneous saccharification and fermentation for lactic acid production from sludge using a modified reactor, Proc. Korea Society for Biotechnology and Bioengineering Conference 2002, Cheongju, p279.
7. Lin, J., S. M. Lee, and Y. M. Koo (2001), Hydrolysis of paper mill sludge using an improved enzyme system, *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 362-368.
8. Jung, D. Y., C. E. Chang, J. C. Ra, and J. S. So (2002), Protective effect of *Lactobacillus paracasei* KLB58 against *Salmonella gallinarum* infection in chickens, Proc. Korea Society for Biotechnology and Bioengineering Conference 2002, Cheongju, pp713-716.
9. Hammes, W. P., N. Weiss, and W. Holzapfel (1992), The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, In *The Prokaryotes Vol. 2*, A. Balows, H G. Tuper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer, Eds., 2nd ed., pp1557-1568, Spring-Verlag, New York.