



*Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 남은 음식물의 생균 사료화에 대한 공기주입의 영향

이경석, 이기영, 오창석, 이대규*, 김영준**

호서대학교 자연과학부 식품생물공학전공, 경기특장*, 가톨릭대학교 생명공학부 환경공학전공**

(2003년 11월 10일 접수, 2003년 12월 15일 채택)

Effect of aeration for the probiotic feed production from food wastes by *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Kyung-seok Lee, Ki-Young Lee, Chang-seok Oh, Dae-Gyu Lee*, Young-Jun Kim**

Food Biotechnology, Hoseo University / Kyunggi Special Equipment Co. Ltd.*

Division of Biotechnology, Catholic University of Korea**

ABSTRACT

The fermentative conversion of food wastes into probiotic feed was investigated by seeding of mixed inoculum of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. After grinding finely, optimal fermentation conditions for aeration was investigated at 30°C. The viable cell count of lactic acid bacteria and yeast during fermentation were monitored by controlling aeration rate at each different aeration degree of 0v.v.m 0rpm, 0.25v.v.m 100rpm, 0.5v.v.m 200rpm, and 1v.v.m 500rpm respectively. The most active growth of the yeast was shown at 0.5v.v.m 200rpm as 4.5×10^8 CFU/ml. By controlling aeration rate, the pH of the probiotics feed could be controlled between 4-5 for the enhancement of preservation characteristics and acceptability for cattle feeding.

Key Words : food wastes, aerobic liquid fermentation, probiotic feed production, pH

초 록

본 연구는 남은 음식물의 사료화를 목적으로 *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 남은 음식물을 발효시켜 고품질의 생균사료를 생산하기 위하여 실시하였다. 액상으로 충분히 마쇄시킨 남은 음식물 시료에 공기주입량을 0v.v.m 0rpm, 0.25v.v.m 100rpm, 0.5v.v.m 200rpm과 1v.v.m 500rpm으로 다르게 조절하여 30°C에서 발효시킨 결과 0.5v.v.m 200rpm의 조건에서 생균수가 4.5×10^8 CFU/ml로 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 공기주입량을 조절함으로써 최종 발효물의 pH를 조절할 수 있었고 사료로서의 기호성에 알맞고 보존성도 좋은 4-5의 pH범위를 얻을 수 있었다.

핵심용어 : 음식폐기물, 생균사료, 발효물

1. 서론

2005년부터 음식물쓰레기의 매립장반입이 전면 금지되면서 음식물쓰레기의 효율적이고도 경제적인 처리방법 개발이 환경 분야의 연구 및 산업화 과제로 관심을 모으고 있다. 예로부터 음식물을 귀하게 여기며 살아온 우리 민족은 가정에서 배출되는 음식물 찌꺼기들을 가축의 사료나 퇴비로 이용하는 등 버리는 것을 최소화 했다. 그러나 오늘날 우리는 산업화와 함께 효율성이 낮은 비순환형 경제 구조로 인해 음식물 쓰레기의 처리가 커다란 사회적 난제로 부각되고 있다(윤, 1996). 남은 음식물은 주로 곡물과 채소, 어육류와 가공품으로 이루어져 있으며 발열량이 낮고 수분함량이 높아 소각처리에 부적합해 상당량이 매립처리 되고 있는 실정이다. 특히 악취 및 침출수 등에 의한 2차 오염과 쓰레기 매립지의 사용기간 단축 등의 문제로 이어지고 있으니 위생적이고 효과적인 처리법의 확립이 무엇보다도 중요하다(박, 1996). 현재까지 개발된 음식물 찌꺼기의 재활용 방안으로는 혐기성 메탄발효(신 등, 1993), 퇴비화(배 등, 1994), 사료화(유, 1999; 정 등, 1997; 곽, 1994) 등의 방법들이 있다. 이들 중 비교적 일찍 시작되어 널리 이용되고 있는 퇴비화는 높은 염분 농도때문에 장기적인 이용이 제한되고 있는 형편이다. 반면 사료화는 음식물 찌꺼기를 쉽게 안정화시키고 재활용 할 수 있어 부가 가치를 크게 높일 수 있다. 발효사료화의 장점은 가열 건조법에 비해 발효 중 유기물의 손실이 적어 양질의 사료를 제조할 수 있고 또한 발효미생물이 생산하는 유기산이나 알콜 등의 다양한 대사물질의 생성으로 기호성이나 저장성이 좋아진다. 이는 유산균, 효모, 고초균 등의 각종 유용한 미생물들을 함유하므로 가축의 건강과 발육에 좋은 영향을 주고 우유나 계란의 생산성을 높이기도 한다(이 등, 2001). 그러나 건조법의 경우 에너지 소모가 커서 경제성이 떨어지고, 그대로 사료로 이용할 경우엔 수집, 저장하는 동안에 발생하는 부패문제 때문에 효율적 이용이 어려운 실정이다. 따라서 본 연구에서는 식품의 보존기간 연장과 풍미향상에 유용하게 이용되어온 전

통적인 발효균들을 음식물 찌꺼기 발효에 적용시켜 보존기간의 연장과 함께 생균사료(probiotics)를 생산하고자 하였다.

probiotics란 숙주의 장내 균총에 영향을 미침으로써 숙주에게 유익한 효과를 나타내는 동물용 사료 첨가제이다. 장내 미생물 균형에 공헌하는 생물체나 물질, 숙주의 장내 미생물 균형을 향상시킴으로써 숙주에 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물 사료 첨가제, 사람이나 동물에 건조된 세포 형태로 발효산물 형태로 급여되어 사람이나 숙주 동물의 장내균총을 개선하여 유익한 영향을 주는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균 등을 말한다. 저농도에서 다른 미생물의 생육을 억제하는 저분자량의 미생물 대사 생성물인 항생제와는 달리 probiotics란 숙주의 장내 미생물 균형을 향상 시키기로서 건강 증진효과를 나타내는 활성 미생물 식이 보충제로 유산균이나 효모를 들 수 있다.

특히 유산균과 효모균들은 장내균총을 안정화시켜 가축의 건강에 큰 기여를 하며 특히 항생제를 대체할 수 있고 축사의 냄새도 없애는 잇점이 있다. 효모로 음식물의 발효사료화를 할 경우 효모에 의해 분해된 당은 서서히 알콜 발효를 일으켜 알콜취가 생성되고 이것은 다른 유해세균들의 증식을 억제하여 보존성이 연장된다(이 등, 2000). 그리고 호기적 조건이 혐기적 조건에 비해 월등한 생균수의 증가를 보여주었고 보존성을 증가시켰고(이 등, 1997). 톱밥이나 왕겨 같은 수분조절제의 첨가가 효모의 증식을 증가시켜 주었다(이 등, 1996). 또한 교반속도가 증가할수록 효모의 증식이 증가하였으나 1200rpm 이상의 지나친 교반을 할 경우 오히려 증식속도를 하락시키기 때문에 적절한 교반속도를 정하는 것이 중요하다(이 등, 2001).

유용한 probiotics를 선택하기 위해서는 여러 가지 선발 기준이 사용되고 있는데 여기에는 내산성, 내담즙성, 장내세포에의 정착성 및 서식성, 분변에서의 검출능, 면역 증강능, 항돌연변이원성, 콜레스테롤 저하능, 항암 및 항종양 활성, 병원성 세균의 생육 억제능 그리고 안전성등이 포함된다. 최근 몇 년 동안 새로운 probiotics의 분리와 개발에 커다란

관심을 가지게 되었다. 금세기 들어 probiotics의 유용 효과가 제시되고 있지만 아직까지도 이러한 신뢰성을 뒷받침해 줄 수 있는 증거가 불충분한 실정이다. 향후 probiotics의 개발은 기술 집약형 방식으로 전개 될 것이고 이를 이용한 제품의 세계 및 국내시장의 규모는 지속적인 수준으로 증가할 것으로 예상되어진다(정, 2001).

본 실험에서는 유산균인 *Lactobacillus acidophilus*와 효모 *Saccharomyces cerevisiae*를 발효 종균제로 이용하여 음식물 발효사료의 생균수를 증가시키기 위해 강제 통기가 가능한 발효조(fermenter) 이용하였다. 적당한 공기주입조건을 확립해 생균을 다량 함유한 고급 사료를 만드는 방법을 모색하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

2.1.1 남은 음식물

호서대학교 교직원식당에서 발생하는 남은 음식물을 수거하여 물이 흐르지 않을 정도로 압착시켜 물기를 제거한 후 믹서기로 분쇄하여 -20℃에서 냉동저장 시료로서 사용하였다. 시료의 성분은 [Table 1]과 같다.

[Table 1] The Composition of Food Waste used for Feed Production by Fermentation

	pH	Crude protein, dry base(%)	Crude fat, dry base(%)	Crude ash, dry base(%)	Carbohydrate, dry base(%)	Water (%)
Food waste	4.5	21.8	11.4	5.5	41.1	85.3

[Table 2] Composition of Media and Incubation Temperature.

Media	Composition	Growth temperature
Modified MRS agar	10g peptone, 10g beef extract, 5g yeast extract, 20g lactose, 1g tween 80, 2g ammonium citrate, 5g sodium acetate, 0.1g magnesium sulfate, 0.05g manganese sulfate, 2g dipotassium phosphate	37℃
Sabouraud dextrose agar	20g dextrose, 10g neopeptone	30℃

2.1.2 실험균주

실험에 사용한 균주로는 호기성 젖산균인 *Lactobacillus acidophilus*와 효모로 *Saccharomyces cerevisiae ellipsoideus*를 유전자은행에서 분양 받아 사용하였으며 각각 전발효시킨 뒤 시료 무게의 1.5%를 남은 음식물 배지에 첨가하여 발효 starter로 사용하였다. 전발효시 사용한 배지의 조성 과 배양온도는 [Table 2]와 같다.

2.2 실험방법

2.2.1 발효 및 시료 성분분석

1) 발효조건

전처리한 음식물을 1000g을 고형분함량 10%로 조절하여 멸균시킨 후 2l 용량의 jar fermentor(한국 발효기, 2l)에서 0 vvm(volume per volume, minuit), 0rpm, 0.25v.v.m, 100rpm, 0.5v.v.m, 200rpm, 1v.v.m, 500rpm로 교반속도와 공기주입량을 달리하여 30℃에서 48시간동안 발효시켰다.

2) pH측정

시료 5g에 25ml의 증류수를 가해 30분 동안 교반하여 충분히 혼합한 다음 여과(Whatman No 2)하여 여액을 pH-meter를 이용하여 pH를 측정하였다.

3) 유기산 함량 측정

시료 5g에 25ml의 증류수를 가해 30분 동안 교반하여 충분히 혼합한 다음 여과(Whatman No 2)하여 여액을 pH-meter를 이용하여 pH 8.4까지 소비된 0.1N-NaOH 소비량을 젖산으로 환산하였다.

4) 환원당 함량 측정

배양액내의 환원당은 Dinitrosalicylic acid (DNS) 법으로 측정하였다. DNS시약은 Dinitrosalicylic acid 10g과 Phenol 2g을 1l 의 volumetric flask에 넣고 1%의 Sodium hydroxide 용액으로 1l 로 묽히면서 stirring시켜 충분히 용해시켜 사용하였다. 시료를 10배로 희석하여 여과(Whatman No 2)시킨 여액 3ml를 시험관에 넣고 DNS시약 3ml을 가하여 boiling bath에서 가열하면서 40%의 Rochell salt 1 ml을 가하였다. 5분 동안 가열한 후 시험관을 흐르는 수돗물에서 식힌 뒤, 이것을 575nm에서 흡광도를 측정하여 포도당으로 미리 정해진 검량선에서 환원당 함량을 산출하였다.(Miller, 1959)

2.2.2 생균수 분석

1) *Lactobacillus acidophilus*

시료 1g을 단계별로 희석한 후 희석액을 Modified MRS에 도말 하는 평판 도말법을 사용하였다. 이 때 일반세균의 증식을 억제하기 위해 sodium azide를

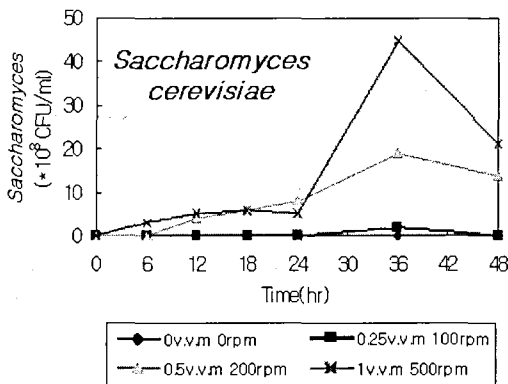
0.04g/l 첨가하였다. 배지의 조성고 배양온도는 (Table 2)와 같으며 liter당 15g의 agar를 첨가하였다.

2) *Saccharomyces cerevisiae ellipsoideus*

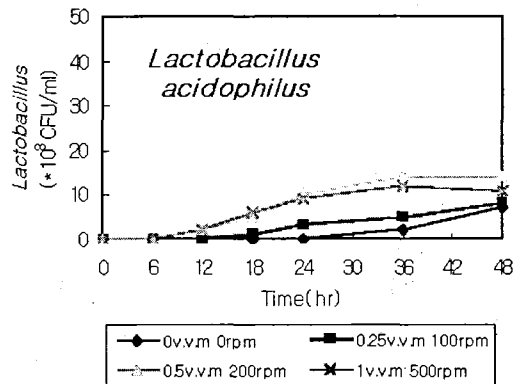
시료 1g을 단계별로 희석한 후 희석액을 Sabouraud dextrose agar에 도말 하는 평판 도말법을 사용하였다. 이 때 일반세균의 증식을 억제하기 위해 Kanamycin을 0.1g/l 첨가하였다. 배지의 조성고 배양온도는 (Table 2)와 같으며 liter당 15g의 agar를 첨가하였다.

3. 결과 및 고찰

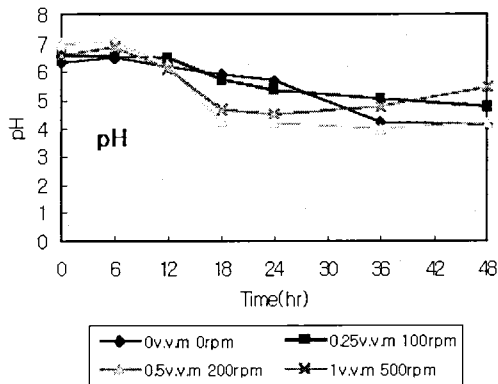
(Fig. 1)과 (Fig. 2)는 각각 남은 음식물이 발효되는 동안 효모 *Saccharomyces cerevisiae*와 유산균 *Lactobacillus acidophilus*의 생균수의 변화를 나타냈다. 효모의 경우는 공기주입의 정도가 클수록 생균수의 농도가 정비례해서 증가하였고 유산균은 0.5v.v.m, 200rpm 까지는 공기주입양이 커질수록 생균농도가 증가했으나 그이상인 1 v.v.m, 500rpm에서는 오히려 약간 감소하였다. 이것은 호기적 증식을 보여주는 효모와 통성혐기성으로 어느 정도의 산소가 필요하나 그 이상이 되면 오히려 증식에 장애가될 수 있는 유산균의 일반적인 증식곡선을 보여



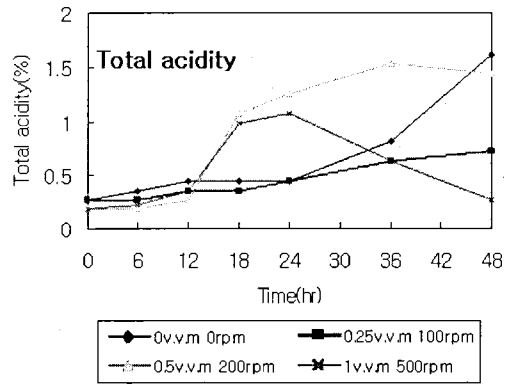
(Fig. 1) Changes in the viable cell count of *Saccharomyces cerevisiae* during the mixed fermentation of food wastes with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*.



(Fig. 2) Changes in the viable cell count of *Lactobacillus acidophilus* during the mixed fermentation of food wastes with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*.



(Fig. 3) Changes in pH of food wastes during the mixed fermentation with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae ellipsoideus*.



(Fig. 4) Changes in total acidity of food wastes during the mixed fermentation *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae ellipsoideus*.

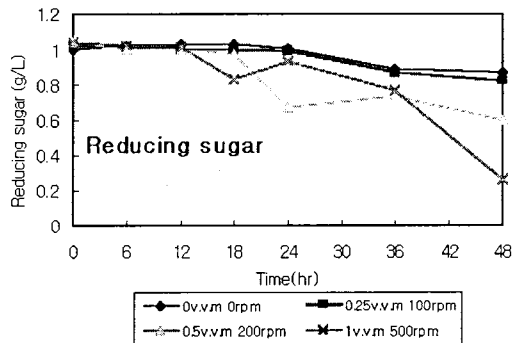
준 것으로 생각되었다.

효모는 통기를 안 시킬 경우 증식이 전혀 안 이루어졌고 적어도 0.5v.v.m, 200rpm 이상의 통기조건에서 활발히 증식을 나타냈다. 최고 통기조건인 1 v.v.m, 500rpm에서 처음 12시간까지는 효모 생균수가 서서히 증가해 6×10^8 CFU/ml를 나타낸 후 발효 24시간까지 큰 변화가 없었다. 그러나 그 후 다시 크게 증가해 발효 36시간 후엔 4.5×10^8 CFU/ml의 최고 균수를 나타냈다가 다시 감소하였다. 이것은 혼합배지에서 자화되는 탄소원의 변화와 함께 나타나는 전형적인 diauxi 증식곡선이다.

(Fig. 3)은 발효결과에 따른 pH변화, (Fig. 4)는 총유기산의 함량 그리고 (Fig. 5)는 환원당의 함량 변화를 나타냈다. (Fig. 4)에서 보듯이 생균수의 diauxi 증식곡선에 상응하여 발효초기에 0.2-0.3%에 지나지 않았던 총유기산 함량이 12시간 경과 후 급증해 1% 이상의 값을 나타냈다. 유기산은 젖산균수가 증가하면서 생성량이 급증된 것으로 생각되며 특히 산소공급이 원활한 최고 공기주입 조건에서는 효모에 의해 대부분 자화되어 생균수를 크게 높여주었다. 환원당 함량은 유기산과는 달리 (Fig. 5)에서 나타난 것처럼 처음에 최고 함량을 보여주다가 발효가 진행되면서 서서히 감소하는 모습을 보여주었다. 특히 산소공급이 원활한 1 v.v.m, 500rpm에서는 발효 18시간 이후에 급격히 감소되어 유기산의 경우처럼 대부분의 환원당이 자화된 것으로 나타났다.

그러나 0.5 v.v.m, 200rpm의 통기조건에서는 유기산이 거의 자화되지 않고 계속 증가했으며 약간의 환원당만이 자화돼 통기조건에 따라 자화율이 크게 달라질 수 있음을 보여주었다. 따라서 생효모의 원활한 증식을 위해서는 충분한 통기조건이 이루어져야 한다.

한편 통기가 전혀 안 이루어진 조건에서도 유산균은 발효종기까지 꾸준히 증식하였다. 이에 따라 유기산도 증가하여 발효종기엔 1.7%까지 이르러 자화되지 않은 상태로 남았으며 효모의 증식은 전혀 안 일어났다. 그러나 유산균도 어느 정도 충분히 통기가 이루어진 0.5v.v.m, 200rpm 통기 조건에서 더 잘 증식해 발효 종기까지 1×10^8 /ml의 생균수를 유지하였다.



(Fig. 5) Changes in reducing sugar of food wastes during the mixed fermentation with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae ellipsoideus* fermentation.

4. 결론

생균사료 생산에 있어서 최종 발효물의 pH값은 발효사료의 보존성과 섭취하는 가축의 기호성과 밀접한 관련이 있다. pH가 4.0이하가 되면 너무 시어져서 돼지의 경우 섭취율이 떨어진다. 그러나 5.0 이상이 되면 부패 할 염려가 있으므로 pH 4.0-5.0 사이로 유지시키는 것이 바람직하다고 생각된다. 본 실험을 통하여 통기조건을 조절함으로써 적당한 pH를 조정할 수 있음이 밝혀졌고 특히 유산균과 효모의 혼합배양에 있어서 통기조건이 자화원과 양을 결정하는 매우 중요한 요소임을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 서은희, 송은승, 한억, 이성택, 양재경, 이기영, "중균 첨가에 의한 음식물 찌꺼기의 발효 사료화", 한국유기성폐자원학회 5, pp. 1~13(1997)
2. 박원섭, "축산폐기물의 사료화 기술", 한국유기성폐자원학회 2, pp. 177~183(1994)
3. 유성진, "효모를 이용한 음식물쓰레기의 호기적 액상발효", 호서대학교 대학원, 석사학위논문(1999).
4. 정원태, 신기준, "음식물쓰레기의 가축사료이용", 한국유기성폐자원학회 추계학술대회, pp. 26~31(1997)
5. 박명술, "음식물쓰레기 관리 대책", 월간폐기물 5, pp. 134~141(1996)
6. 한홍의, 박현근, "Bromophenol blue 배지상에서 유산균들의 분별측정", 인하대학교 기초과학 연구소 논문집 12, pp. 89(1991)
7. 신동화, 김문숙, 한지숙, 임대관, 박완수, "시판 김치의 발효 온도별 성분과 미생물 변화", 한국식품과학회지 28, pp. 137~145(1996)
8. 윤유미, "음식물 쓰레기 줄이기 운동", 월간폐기물 6, pp. 118~123(1996)
9. 신항식, 정운진, 정연구, 황응주, 강석태, "생분해도 실험에 의한 주방 폐기물의 혐기성소화타당성 연구", 한국유기성폐자원학회 1, pp. 10~113(1993)
10. 배재근, 백광옥, 최종오, 김해경, "주방폐기물의 고속 퇴비화 소멸용장치의 특성에 관한 연구", 서울산업대학논문집, pp. 477~491(1994)
11. Miller G. L., "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", Anal. Chem 31, pp. 426~428(1959)
12. N. J. W. Kreger-van Rij., "The yeasts a taxonomic study", Elsevier, pp. 382~386 (1987)
13. Lyons, T. P., "Strategy for the future : The role of biotechnology in the feed industry", Biotechnology in the Feed Industry, Proceedings of Alltech's Eighth annual symposium, pp. 1~22(1993) ☐