

## 퇴비화 과정에 관여하는 생체 고분자 분해 미생물 및 황산 환원균의 분리

이성택, 이재정, 나현준

한국과학기술원 생물공학과

## Isolation of High-molecular-weight-compound degrading microorganisms and sulfate reducing Bacteria involved in Composting Process

Seong-Taek Lee, Jae-Jeong Lee, Hyun-Jun Na.

Dept. of Biological Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology

### ABSTRACT

For a microbiological study of composting process, screening and assay method for biopolymer degrading enzymes and microorganisms were developed and for the study of the possibility of composting in anaerobic state, distribution of sulfate reducing bacteria which plays a final role in anaerobic degradation was investigated. Substrates used for the development of assay methods for biopolymer degradation are  $\beta$ -glucan, xylan, dextran, CMC(carboxy methly cellulose), casein, and collagen. These substrates were made insoluble by a cross-linking agent and linked with dye to make chromogenic substrates.  $\beta$ -glucan and xylan substrates could substitute congo-red method for screening of polymer degrading microorganisms without damaging the colonies. Sulfate reducing bacteria contained in the sample sludge showed preference to lactic acid, propionic acid, butyric acid and formic acid and could use acetic acid and valeric acid.

### 요 약

퇴비화 과정의 미생물학적 연구를 위해 퇴비화 재료인 유기성 폐기물에 많이 존재하는 고분자 물질

의 분해에 관여하는 미생물들과 이들이 분비하는 효소들을 손쉽게 선별, 정량하는 방법을 개발하였고 아울러 혐기적 상태에서의 퇴비화 가능성을 탐색하는 연구의 일환으로 혐기적 분해의 최종적 역할을 하는 황산 환원 균의 퇴비화 과정에서의 분포를 알아보았다. 고분자 물질의 분해 측정법 개발에 사용된 기질은 각각 다당류 및 단백질 중에서  $\beta$ -glucan, xylan, dextran, CMC(carboxymethylcellulose), casein, collagen 등을 재료로 사용하였고 이들을 가교제를 써서 불용화시키고 색소를 결합시켜 색소기질을 제조하였다. 제조된 기질을 이용하여 실제의 퇴비에서 고분자 분해 세균을 분리할 수 있었으며 기존의 효소 정량법에 비해 민감하게 효소 활성을 정량할 수 있었다. xylan과  $\beta$ -glucan 색소기질의 경우 고체 배지 상에서 고분자 분해 미생물을 선별할 때 기존의 Congo red법과는 달리 미생물 집락에 손상을 입히지 않고도 손쉽게 사용할 수 있었다. 실험에 쓰인 오니에 포함되어 있는 황산 환원 세균은 lactic acid, propionic acid, butyric acid, formic acid 등의 유기산에 대해 높은 활성을 보여 주었고, acetic acid, valeric acid도 이용할 수 있었다.

**핵심용어:** 퇴비화, 고분자 물질, 황산환원세균

## 1. 서 론

도시 고형 폐기물중 유기성 폐기물을 분리 수거하여 퇴비화하는 방안은 다른 처리 방법에 비해 비교적 적은 비용으로 폐기물의 감소에 크게 기여할 수 있다. 또한 재활용이라는 측면에서 경제적이며 환경적으로도 매우 안전한 처리 방법이다. 이러한 이유로 유기성 폐기물의 퇴비화를 통한 재활용 방안에 관해 최근 관심과 연구가 집중되고 있으며 퇴비화의 효율을 높이기 위하여 각종 고속퇴비화 장치의 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다.

퇴비화 과정은 여러 미생물들이 관여하는 복잡한 생물학적 현상이므로 관련 미생물에 대한 기초적인 연구가 선행되어야 퇴비화 과정을 이해할 수 있으며 퇴비화 반응기의 효율 향상을 도모할 수 있다. 일반적으로 유기성 폐기물을 퇴비화 하는 미생물에는 고분자성 유기물을 저분자로 분해하는 종류들과 분해된 저분자 물질들을 무기물로 전환하는 종류들이 있으며 각 단계에서 호기성 미생물과 혐기성 미생물의 역할과

활성을 정확히 이해하는 것이 필요하다. 이중 혐기적 상태에서의 고분자 유기물의 분해는 대체로 고분자 물질의 가수분해 단계, 여러 유기산 및 수소의 생성 단계, syntrophic bacteria에 의한 메탄 생성균으로의 환원력의 전달, 마지막으로 메탄 생성 세균이나 황산 환원 세균들에 의한 최종 분해 과정으로 나누어 볼 수 있다.

고분자 물질을 분해하는 미생물들은 퇴비화의 초기 단계에서 다른 미생물들이 사용할 수 있는 기질을 제공한다는 점에서 중요한 위치를 차지한다. 이러한 고분자 분해 미생물들과 이들이 만드는 고분자 분해 효소들의 선별 방법 및 신속한 정량 방법의 개발은 퇴비화 과정의 미생물학적 연구를 위한 중요한 수단을 제공해 줄 수 있다.

최근에는 유기성 폐기물이나 오니를 혐기적으로 처리하여 퇴비화에 이용하려는 시도가 진행되고 있다. 유기성 폐기물을 대량으로 혐기적 처리를 할 경우 처리 과정에서 생기는 다양한 유기산, 난분해성 독성 물질, 중금속 등의 영향으로 메탄 생성 세균만으로는 완전한 처리가 어렵다. 황산 환원 세균은 수소, acetic acid,

lactic acid, butyric acid, propionic acid, 고급 지방산, 알코올, 당류, aromatic acids 등의 여러 물질을 그 기질로 사용하며 메탄 생성 세균만으로는 분해가 어려운 lactic acid, propionic acid 등을 완전 분해함으로써 폐기물의 분해 속도를 높이며, sulfide를 생성하여 메탄 생성 세균이 자라기 좋은 혐기적 환경을 만들어 주는 등의 특징을 가지고 있다. 또한 발생한 sulfide는 중금속과 반응하여 물에 녹지 않는 침전물을 만들므로 폐기물에서 중금속의 제거나 회수에 새로운 방안을 마련해 줄 것으로 기대된다.

본연구의 목적은 색소를 결합시킨 고분자의 불용성 기질을 제조하여 퇴비화의 첫 단계인 고분자성 유기물의 분해에 관여하는 미생물 및 효소를 손쉽게 선별, 정량하는 방법을 개발하고 고분자 유기물을 분해하는 미생물을 분리하며, 혐기적 분해의 마지막 위치를 차지하는 황산 환

원 세균을 이용하여 퇴비화를 속성시킬 수 있는 가능성을 모색하는 것이다. 미생물에 의한 고분자성 유기물의 효소적 분해와 황산 환원 균에 의한 혐기적 상태에서의 최종적인 분해는 앞에서와 같은 여러 장점들을 가지고 있으므로 이에 대한 연구는 유기성 폐기물의 처리에 중요한 의의를 가진다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 색소기질의 제조

색소기질의 제조 방법은 생체 고분자에 색소를 결합시킨 다음 이들 polymer 사이를 가교로 연결시키는 방법을 사용하였다.<sup>1), 2, 3)</sup> 이때 사용된 생체 고분자로는  $\beta$ glucan, xylan, collagen, CMC, casein, starch, pectin을 사용하였다. 제조 방법은 각 생체 고분자 2.0g 을 40ml 증류수에 녹인 후 0.5N NaOH 5ml, 색

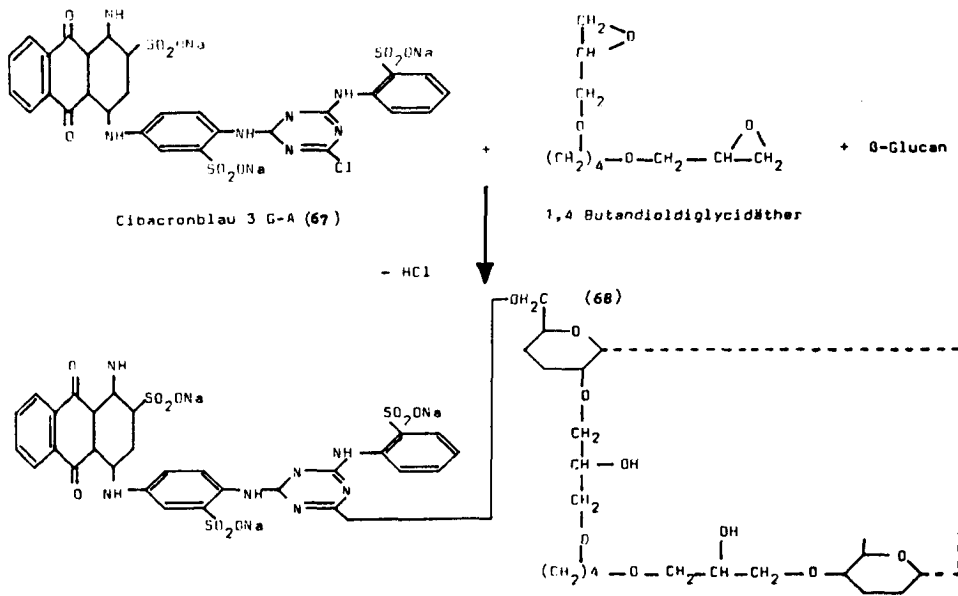


그림 1. 색소 기질의 제조 원리(Dyed glucan의 경우).

소인 Cibacron blue 3G-A 1.5g을 넣어 잘 짓는다. 가교제(cross-linking agent) 1.2ml을 첨가하여 상온에서 48 시간 방치시켜 gel 상태로 만들었다. 형성된 gel을 분쇄한 다음 생체 고분자에 결합되지 않고 남은 색소를 증류수로 세척한 후 25mM phosphate Buffer(pH 5.3)로 현탁시켜 색소기질 용액을 제조하였다. Cibacron blue 3G-A 의 최대 흡수 파장이 600nm 에서 630nm 범위 였으며 색소기질도 이와같은 흡수 파장을 보였다.<sup>1)</sup> 실험에서는 623nm를 선정하여 사용하였다. 만드는 과정을 그림 1 에서 도식화하였다. 이때 사용된 색소인 Cibacron blue 는 Ciba Geigy 제품, 가교제는 Aldrich 회사의 제품을 사용하였다.

## 2. 2 hemicellulose 생성 균주의 분리 및 선별

이 실험에서는 hemicellulose의 구성 성분인 xylan을 기질로 하여 위와 같이 색소기질을 제조한 다음 색소 용액과 complex 배지를 섞은 한천 배지(dyed xylan 0.2%, peptone 0.5%, beef extract 0.3%, agar 1.5%)에 sample의 상등액을 도달한 다음 37°C에서 24 시간 배양하였다. 배양 후 colony 주위에 10mm 이상의 환을 만드는 균주를 일차 분리하였다.<sup>1)</sup>

## 2. 3 효소액 제조 및 활성 측정

Compost에서 분리한 xylan 분해 균주를 효소 생산용 배지에 2% 접종하여 일정 시간 진탕 배양한 후 배양액을 10,000g(4°C)에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

준비된 색소기질 용액 4ml 에 조효소액 0.5ml을 넣어 37°C에서 3분간 반응시켰으며 0.5N NaOH 1ml을 첨가하여 반응을 중지시킨 후 여과지로 여과한 다음 여과액을 Beckman Spectrophotometer로 623nm에서 흡광도를

측정하였다. 효소 단위(unit)는 효소액 1ml을 1분간 반응 시켰을 때 유리되는 색소 1microgram을 1단위로 정하였다.

## 2. 4 황산 환원 균의 분리에 사용된 2중평판법에 사용되는 배지의 조성

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1.0g, CaCl<sub>2</sub>-2H<sub>2</sub>O; 0.1g, NH<sub>4</sub>Cl; 1.0g, FeSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 0.05g, MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O; 2.0g, sodium ascorbate; 0.1g, sodium thioglycolate (Mercapto-acetate); 0.1g, 한천; 15g, 인산 버퍼; 0.5g과 각종 미량 원소들을 넣어서 만들었다. 실험에 사용된 주요 탄소 기질은 약 30mM 농도로 하여 만들었다.<sup>4)</sup>

## 2. 5 황산 환원 세균 배양 조건 및 분석 조건

합성 주방 폐기물에 하수 종말 처리장 2차 혐기성 소화조에서 채취한 오니를 원심분리하여 상등액을 버리고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5mM을 함유한 60mM 인산 완충 용액으로 세정하는 과정을 거쳐 1%(부피/부피) 접종한 뒤 30°C에서 배양하였다. 합성 주방 폐기물은 탄수화물(쌀) 32%, 단백질(닭고기) 24%, 지방(버터) 약 40%의 구성 성분을 가지며 분쇄기로 잘게 간 다음 공급하였다. 반응기 내에서의 황산 환원 세균의 활성은 2중평판법을 이용하여 검은색의 집락을 세어 대강의 활성을 측정하며, 모세관 전기 영동법에 의해 황산 이온 및 그 밖의 중요한 이온들의 양을 측정(전압:25kV, 검출 파장:250nm)하고 생성된 기체는 가스크로마토그래피(TCD, Porapack Q)를 이용하여 측정하고 여러 대사 물질도 모세관 전기 영동법을 이용하여 측정함으로써 정확한 활성을 알아보았다. 황산 환원 세균의 활성을 비교하기 위해 대조 실험으로 각 기질에 일정량의 황산염을 공급한 계와 그렇지 않은 계 사이의 차이를 조사하였다. 또 퇴비로 이용 가능한 상태의 유기성 폐기물 분해 조건을

찾아보았다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 색소기질의 제조

퇴비화 과정의 기질로 사용되는 각종 유기성 폐기물에 존재하는 생체 고분자 물질들을 대표하는 시약들을 사용하였다.

cellulose:  $\beta$ -glucan, CMC(caboxymethylcellulose)

hemicellulose : xylan, pectin

protein : casein, collagen

starch : dextran

사용된 생체 고분자 중  $\beta$ -glucan, xylan, casein, dextran,은 가교제로 1,4-butenediolglycidylether를 사용하고 색소로써 Cibacron blue를 사용하여 위의 조건에서 제조한 결과 불용성의 색소기질을 형성하였다. Pectin, collagen, CMC는 불용성의 gel을 형성하지 않아 색소기질의 제조는 불가능하였다.

#### 3.2 색소 기질 제조 시의 NaOH 및 가교제 농도의 영향

NaOH의 사용은 색소기질 제조에 필수적인 요소이다. 하지만 이것을 많이 사용하였을 때 효소 반응시 용출되는 색소의 양에 영향을 미쳤다. 0.1N NaOH 에서의 효소 활성을 100으로 보았을 때 0.3N, 0.6N, 0.8N로 증가함에 따라 각각 81, 63, 56%로 급격히 감소함을 알 수 있었다. 하지만 NaOH의 농도가 낮아지면 색소기질이 효율적으로 만들어지지 않아 이들 두 요소 사이의 적당한 값을 취하는 것이 필요하였다. 이 실험에서는 0.5N가 적당 농도였다. 앞으로 더 낮은 농도의 NaOH를 이용하여

안정한 색소기질을 만드는 방법에 대한 연구가 더 필요하다고 할 수 있다.

가교제 역시 많은 양이 들어갈수록 효소 활성을 저해함을 알 수 있었다. 인공 기질로 변하는 정도에 따라 기질 성상의 변화가 많아 원래의 polymer 의 특징을 점점 잃는 것으로 여겨진다. 즉 가교제의 양이 많아짐에 따라 기질에 대한 효소의 친화도가 낮아지므로 효소의 반응이 억제된다고 볼 수 있다.

#### 3.3 제조된 색소기질의 안정성

제조된 색소는 일반적으로 높은 pH에서 불안정함을 나타내었다. 25mM Sorensen 완충액의 pH에 따른 기질의 안정성은 37°C에서 방치한 결과 pH 5에서는 상당히 안정된 양상이었으나 pH 7 이상에서 불안정성을 보였다. 이 현상은 높은 pH에서 공유 결합한 색소가 가수분해되기 때문에 발생하는 것 같다. 하지만 짧은 시간의 assay 에서는 이 효과를 무시할 수 있을 정도이며 평판 배지에서는 이런 문제점이 없었다. 이

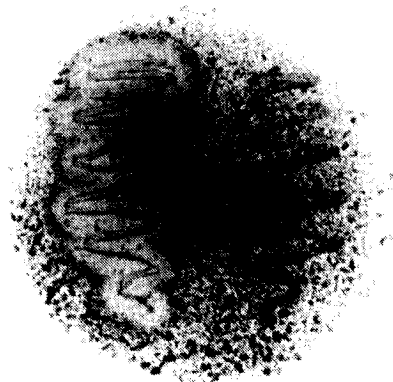


그림 2. Xylan 색소기질의 *Baillus* sp. 에 의한 분해. 평판의 오른쪽은 Xylanase를 분비하지 않는 세균을 접종하였다.

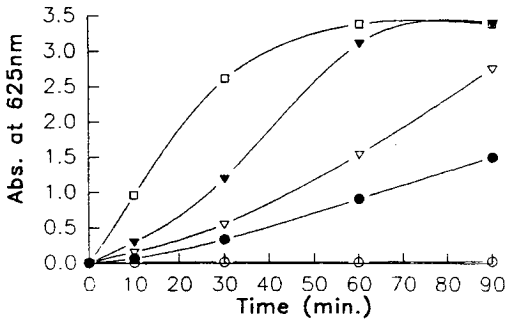


그림 3. 반응시간별, 효소농도별의 색소기질의 분해정도. 효소의 농도는 각각 200mU/ml, 100mU/ml, 25mU/ml로 하여 60°C에서 인산 완충액으로 pH를 7로 맞춘 다음 반응시켰다.

렇게 만들어진 기질은 -20°C 냉장고에 얼려서 장기간 보관할 수 있어서 보관에도 어려움이 없었다.

### 3. 4 색소기질을 이용한 고분자 물질 분해 미생물과 효소의 선별

실제로 이 방법을 응용한 결과, 평판 배지에서 xylan을 분해하는 미생물들은 탈색 부위 (clear zone)를 형성하여 평판에서 쉽게 선별할 수 있었다(그림 2). 이를 이용하면 Congo red 법과 같이 미생물집락에 손상을 입히지 않고 효소 분비 균주를 선별할 수 있는 장점이 있었다. 분리된 미생물 중에서 탈색 부위가 크게 나타나는 몇몇 미생물은 분리하여 동정 및 기초 실험을 수행하고 있다. 이렇게 선별된 균주의 조효소액을 사용하여 시간별, 효소농도별로 색소기질의 분해도를 측정하였다(그림 3). 그림에 나타난 것과 같이 전체 양의 약 1/4정도가 분해될 때까지는 색소 기질의 분해가 효소 농도에 비례하였으며 일반적인 다당류 분해 효소의 정량방법인

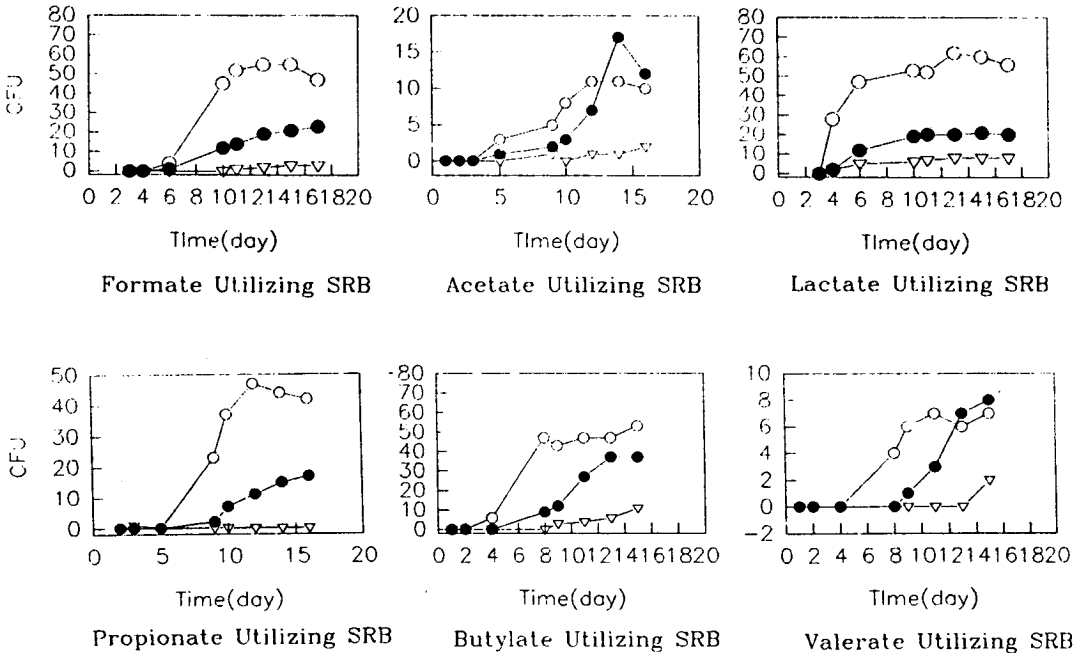


그림 4. 접종한 오니에 존재하는 황산 환원 세균의 각 유기산에 대한 활성. 각 유기산의 농도는 30mM이며 각각 (○): 1/100, (●): 1/1000, (△): 1/10000로 희석하여 사용하였다.

환원당 정량법에 비해 낮은 효소 농도에서도 효소의 활성이 검출되었다.

### 3. 5 접종에 쓰인 오니에서 황산 환원 세균의 활성

2중 평판법을 이용하여 접종에 쓰인 오니에서의 황산 환원 세균의 활성을 조사했다. 각 유기산 30mM을 탄소원으로하여 시간별로 평판에 나타나는 집락의 수를 관찰한 결과 접종에 쓰인 황산 환원 세균은 lactic acid, propionic acid, butyric acid, formic acid 등의 유기산을 잘 이용하였으며, acetic acid, valeric acid도 이용할 수 있음을 보여 주고 있다(그림 4).

유기성 폐기물을 이용한 유용물질의 생산 공정은 생물학적 과정이므로 이에 대한 미생물학적 연구는 전반적인 공정의 이해와 효율 향상을 위한 기초적인 자료로 필수적이라 할 수 있다. 본 연구에서 개발된 고분자 유기물의 분해 미생물과 효소의 선별 방법으로 기존의 방법보다 정확하고 손쉽게 미생물을 분리하고 관련 효소를 정량할 수 있었으며, 황산 환원 세균의 의한 유기물의 분해는 유기성 폐기물의 자원화에 충분

히 기여할 수 있다는 전망을 제시해 준다. 앞으로 이러한 미생물들의 실제의 공정에서 어떠한 역할을 하는가를 밝혀 반응 조건이 최적화를 추구할 수 있으며 우수한 미생물들을 배양하여 미생물 제재로도 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Yang, J. O., A. S. Chung and S. T. Lee, 1987. Kor. J. Microbiol. 25, 339-345.
- 2) Lee S. T., 1988, Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng., 16, 79-84.
- 3) Klein, B. Foreman, J. A. and Searcy, R. L., 1970, Clinical chemistry. 16, 39.
- 4) J. I. Suh, Interactions among sulfate reducers, Methanogergers and hydrogenproducing acetodgens in anaerobic sludge, 1993, Ch. 1, 2. ph. D. thesis, Tottori univ. Japan.