

음식폐기물 처리용 혐기성 산 발효조로부터 알코올발효 균주의 분리 및 특성

¹김 중 곤 · ²한 귀 환 · ³유 진 철 · ⁴성 치 남 · ⁵김 성 준 · † ²김 시 옥
¹조선대학교 생물신소재학과, ²조선대학교 환경공학부,
³조선대학교 약학과, ⁴순천대학교 생물학과, ⁵전남대학교 환경공학과
(접수 : 2006. 7. 18., 게재승인 : 2006. 12. 4.)

Isolation and Characterization of An Alcohol Fermentation Strain from Anaerobic Acid Fermentor to Treat Food Wastes

Jung Kon Kim¹, Gui Hwan Han², Jin-Cheol Yoo³, Chi-Nam Seong⁴, Seong-Jun Kim⁵, and Si Wouk Kim†²

¹Department of Bio Materials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

²Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

³Department of Pharmacy, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

⁴Department of Biology, Sunchon National University, Jeonnam 540-742, Korea

⁵Department of Civil, Geosystem and Environmental Engineering,

Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2006. 7. 18., Accepted : 2006. 12. 4.)

An efficient pilot scale (10 ton) three-stage methane fermentation system to digest food waste has been developed in this laboratory. This system consisted of three stages: semianaerobic hydrolysis, anaerobic acidogenesis and strictly anaerobic methanogenesis. From the secondary acidogenesis reactor, a novel strain KA4 responsible for alcohol fermentation was isolated and characterized. The cell was oval and its dimension was 5.5-6.5 × 3.5-4.5 μm. This strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* KA4 by 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence. Optimal culture temperature was 30-35°C. Cells were tolerant to 5% (v/v) ethanol concentration, however, were inhibited significantly by higher ethanol concentration up to 7%. The strain could grow well up to 50% (w/v) initial glucose concentration in the YM liquid medium, however, optimal concentration for ethanol fermentation was 10%. It could produce ethanol in a broad initial pH range from 4 to 10, and optimal pH was 6. In this condition, the strain converted 10% glucose to 7.4% ethanol during 24 hr, and ethanol yield was estimated to be 2.87 mol EtOH/mol glucose.

Key Words : Alcohol fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* KA4, three-stage methane fermentation system

서 론

인구의 증가와 산업의 발달은 에너지의 사용을 계속해서 증가시키고 있으며, 이로 인해 화석연료의 매장량이 점차 감소하고 있다. 더구나 현재와 같은 수준으로 에너지를 사용하면서 향후 40-60년 내에 획기적인 대체에너지가 나오지 않는다면 인류는 심각한 에너지 문제에 직면하는 위

기에 처하게 될 것이다. 따라서 재사용이 가능하고, 지속 가능하며, 효과적이고, 경제적이며, 편리하고 안전한 대체 에너지원 개발이 절실히 필요하게 되었다.

전세계적으로 바이오매스를 이용한 에너지의 공급은 9-13% 정도이고, 여기에는 난방이나 요리를 위한 연료와 같은 전통적인 에너지의 이용과 전기나 증기의 생산 및 액체 바이오연료와 같은 현대적인 에너지의 이용이 모두 포함된다(1). 신재생에너지원 가운데 하나인 바이오에너지는 동물이나 식물로부터 나오는 바이오매스에 생물공학적 방법을 응용하여 얻는 연료용 알코올이나 메탄가스 혹은 수소와 같은 재생성 무공해 에너지를 말한다.

당의 발효과정을 통해 생산되는 에탄올은 청정에너지원

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-6649, Fax : +82-62-225-6040
E-mail : swkim@chosun.ac.kr

인 동시에 재생가능한 에너지원이기 때문에 많은 주목을 받고 있고(2), 에탄올 생산에 드는 비용을 절감하기 위한 방안으로 에탄올 생산의 원료물질을 각종 유기성 폐기물과 같은 biomass를 적극 이용하려는 시도가 진행되고 있다(3-6). 바이오매스로부터 얻어지는 에탄올의 에너지 함유량은 에탄올을 생산하는데 요구되는 에너지보다 높다고 Shapouri 등(7, 8)은 보고한 바 있고, 특히 바이오매스의 발효로부터 생산되는 알코올은 그 물리적, 연소적 특성이 석유와 비슷하여 대체에너지로 각광을 받고 있으며(9), 액체 연료로서 휘발유보다 장점이 많기 때문에 재생가능 연료 원료로 널리 연구되어지고 있다(10).

최근 국내에서 발생하는 재생가능한 폐기물은 음식물쓰레기를 포함한 생활 폐기물을 비롯하여 농산부산물, 하수 슬러지 등의 사업장 폐기물, 축산폐기물 등 연간 1억 500만톤 이상의 재생가능 폐기물이 발생하고 있다. 따라서 이러한 재생가능 폐기물을 에탄올 생산의 원료물질로 이용한다면 폐기물의 처리를 통한 환경오염방지 및 신재생에너지 개발이라는 상승효과를 얻을 수 있으며, 이를 위한 첫 단계로서 바이오매스를 이용하여 에탄올 생산이 우수한 균주를 확보하는 것은 매우 중요하다.

본 연구실에서는 음식물쓰레기 처리를 위해 반헤파기성 가수분해/산발효공정, 혐기성 산발효공정, 혐기성 메탄발효 공정으로 구성된 3단계 메탄발효시스템을 개발하여 운전하고 있다(11, 12). 본 연구에서는 3단계 메탄발효시스템의 혐기성 산발효공정에서 분리한 알코올발효 능력이 우수한 균주를 분리하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구실에서 음식물쓰레기 처리를 위해 운전 중인 3 단계 메탄 발효 시스템의 2차 혐기성 산 발효반응기로부터 시료를 취한 후, 분리용 배지에 도달한 다음 35°C에서 배양하여 생장이 우수한 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 5개 균주 중 발효능이 가장 우수한 효모 균주를 최종적으로 선별하였다. 균주 분리시 사용된 배지는 음식물 쓰레기 처리를 위한 3단계 메탄발효시스템의 1차 반헤파기성 가수분해/산발효조의 발효액을 원심분리하여 상등액의 pH를 7.0으로 조절하고 1.5% (w/v) agar를 첨가한 후 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다. 알코올 발효를 위한 전배양 및 균주 특성조사시의 배지는 YM (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, w/v)를 사용하였고, 발효배지는 YM 배지에 glucose가 10%로 구성된 배지를 사용하였다. 대조구로서는 한국생명공학연구원의 유전자은행 (Korean Collection for Type Culture)으로부터 구입한 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1199를 사용하였다.

분리균주의 기질 Test

분리된 균주가 이용 가능한 기질을 알아보기 위하여 bioMerieux사의 API 20C Aux system을 사용하였고, 사용된 기질은 다음과 같다: glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose,

sorbitol, α -methyl-D-glucoside, celliobiose, melezitose, lactose, N-acetyl-D-glucosamine, adonitol, trehalose, inositol, xylitol, glucose, galactose, maltose, saccharose/sucrose, raffinose. 실험 결과는 접종 후 72시간동안 배양하여 기질 사용여부를 판단하였다.

배양 온도에 따른 생장 영향

YM 배지에서 1일간 35°C에서 전배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 배양하였다. 배양온도를 25-45°C까지 5°C 간격으로 조절하여 1일간 진탕배양하는 동안 두 시간마다 배양액을 취하여 600 nm에서 측정된 흡광도로서 배양 온도에 따른 분리균주의 생장 영향을 조사하였다.

내알코올성 측정

YM broth를 멸균한 후 0-20% (v/v)의 에탄올을 1% 간격으로 첨가하여 35°C에서 1일간 진탕배양한 후 배양액을 600 nm에서 측정된 흡광도로서 내알코올성을 측정하였다.

내당성 측정

Glucose가 0-70% (w/v)까지 10% 간격으로 함유된 YM배지에 전배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 35°C에서 2일간 진탕배양하는 동안 일정시간에 배양액을 취하여 600 nm에서 측정된 흡광도로서 내당성을 측정하였다.

초기 pH에 따른 알코올발효 효과

Glucose가 10% (w/v) 함유된 발효배지의 초기 pH를 2-10까지 조절한 뒤 전배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 35°C에서 1일간 진탕배양한 후 배양액을 취하여 에탄올 농도를 측정하였으며, 이 때 생성된 에탄올 농도로서 발효배지의 초기 pH에 따른 알코올발효 효과를 측정하였다.

분석방법

발효액 내의 당 농도는 DNS법에 의해 측정하였으며(13), 발효액내의 에탄올의 함량분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후 상등액 100 μ l를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA*/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detector (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 135°C이었고, injector와 detector의 온도는 모두 200°C이었으며, carrier gas는 N₂를 사용하였고, flow rate는 24 ml/min으로 사용하였다. 최종 선별한 분리균주는 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석하여 동정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

본 연구실에서 운전 중인 음식물쓰레기 처리를 위한 3 단계 메탄 발효 시스템에서 채취한 시료로부터 최종 선별한 균주 KA4를 분리용 배지에서 24시간 배양한 후 성장한 유백색 콜로니를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 이 균주

는 타원형으로 크기는 $5.5-6.5 \times 3.5-4.5 \mu\text{m}$ (장축 \times 단축)로 비교적 큰 효모이며, 출아흔을 발견할 수 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다(Fig. 1 및 Table 1). 또한 최종 선별한 균주의 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석한 결과 *S. cerevisiae* 표준 균주와 100% homology를 보인 것으로 나타나 분리균주를 *S. cerevisiae* KA4로 명명하였다(Fig. 2). 한편 분리한 균주의 이용 가능한 기질 범위를 조사한 결과 glucose, galactose, maltose, saccharose/sucrose, raffinose를 기질로 하였을 경우 매우 잘 성장하였고, trehalose, inositol, xylitol의 경우 기질을 이용할 수는 있지만 생장이 느렸으며, 나머지 기질인 glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, sorbitol, α -methyl-D-glucoside, celliobiose, melezitose, lactose, N-acetyl-D-glucosamine, adonitol은 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 1. Morphological characteristics of the isolate

| | Isolate |
|---------------------------------|--------------------------------------|
| Shape | Oval |
| Size | $5.5-6.5 \times 3.5-4.5 \mu\text{m}$ |
| Mode of vegetative reproduction | Budding |
| Colony | |
| Form | Circular |
| Elevation | Convex |
| Margin | Entire |
| Color | Cream |
| Surface | Smooth |

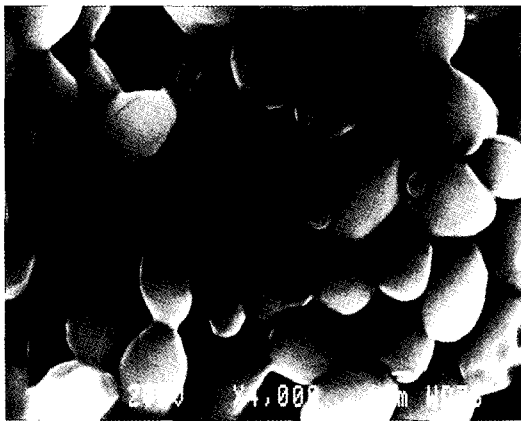


Figure 1. Scanning electron micrograph of isolated *S. cerevisiae* KA4.

배양 온도에 따른 영향

Fig. 3은 분리균주 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 배양 온도에 따른 성장 영향을 나타낸 것이다. 분리균주 *S. cerevisiae* KA4 균주의 최적 생장 온도는 30-35 $^{\circ}\text{C}$ 로 나타났으며, 40 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도조건에서 생장이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었고, 45 $^{\circ}\text{C}$ 이상에서는 성장하지 못하였다. 또한 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 온도에 따른 균체의 성장 역시 분리균주의 성장 양상과 유사하여 본 연구실에서 분리한 분리균주는 일반적인 *S. cerevisiae*의 생장온도와 유사한 것으로 나타났다.

Table 2. Substrate utilization of the isolate

| | Isolate | | Isolate |
|--------------------|---------|------------------------------|---------|
| Glucose | + | 2-keto-D-gluconate, | - |
| Galactose | + | L-arabinose | - |
| Maltose | + | Sorbitol | - |
| Saccharose/sucrose | + | α -methyl-D-glucoside | - |
| Raffinose | + | Celiobiose | - |
| Trehalose | w | Melezitose | - |
| Inositol | w | Lactose | - |
| Xylitol | w | N-acetyl-D-glucosamine | - |
| Glycerol | - | Adonitol | - |

+: positive, w: weak, -: negative

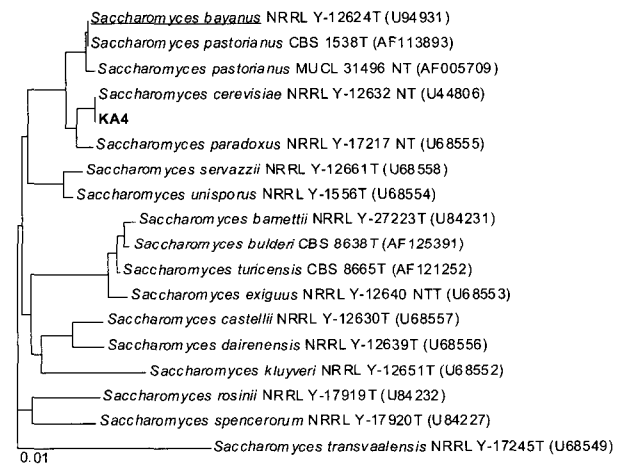


Figure 2. Neighbour-joining tree based on 26S rDNA D1/D2 region sequences of *Saccharomyces*. *S. transvaalensis* NRRL Y-17245 (U68549) was used as an outgroup. Scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position. NT, neo type; T, type strain.

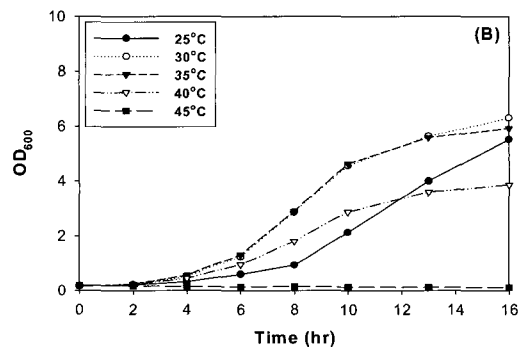
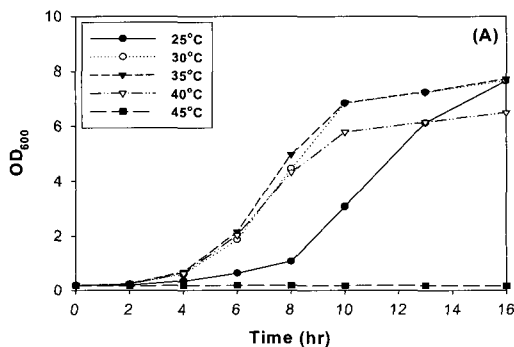


Figure 3. Effects of temperature on the growth of (A) *S. cerevisiae* KA4 and (B) *S. cerevisiae* KCTC 1199.

내알코올성 측정

분리균주인 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 내알코올성 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 대조구인 경우 에탄올 농도 5% (v/v)까지는 생장에 큰 영향을 받지 않았으나 6%에서는 균체의 생장이 관찰되지 않았다. 반면 *S. cerevisiae* KA4도 배지내의 초기 에탄올 농도가 5%까지는 생장에 영향을 받지 않았으나 그 이상에서 생장에 저해를 받았다. 단지 대조구에 비해 7%에서도 어느 정도 생장이 가능하였으며, 이때 분리균주가 액체배지에서 과립형태로 봉처 자라는 양상을 보였다. 따라서 분리균주인 *S. cerevisiae* KA4는 대조균주보다 알코올 내성이 약간 높은 균주로 판단되었다.

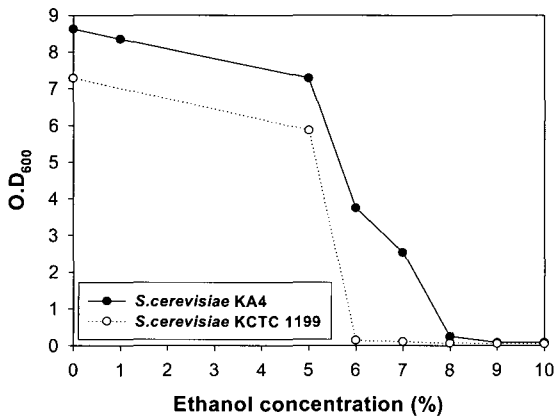


Figure 4. Effect of ethanol concentration on the growth.

내당성 측정

Jones 등(14)과 Ohta 등(15)은 발효 초기에 기질의 농도가 높을수록 초기 발효 속도가 빨라지고 최종 알코올 농도가 증가하며 공정이 단순해지는 등의 장점이 있으나, 발효가 진행되면서 알코올 농도가 높아짐에 따라 발효 속도가 떨어지고 발효시간이 길어지며 발효 종료 후 잔당이 많이 남게 되어 발효폐액의 처리에 문제가 된다고 보고하였다. Fig. 5에 분리균주인 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 내당성 및 최적 당 농도를 조사하였다. 분리균주의 내당성은 대조구와 유사하게 나타나 초기 배지내의 당 농도가 50% 이상에서 생장에 저해를 받았다. 하지만 전체적인 농도에서 분리균주가 대조구보다 더 높은 흡광도를 나타내 분리균주가 더 잘 성장하는 것으로 나타났다.

한편 24시간 발효 후에 초기 당 농도에 따른 에탄올 생산량과 잔여 당 농도를 Fig. 6에 나타내었다. 초기 10%의 당 농도에서 에탄올 생산량이 가장 높았으며 대조구보다 2배 이상 많은 양의 에탄올을 생산하였다. 그 이상의 당 농도에서는 농도가 증가함에 따라 에탄올 생산량은 감소하였고, 잔류 당 농도가 증가하는 양상을 보였다. 한편 48시간 발효 후에는 초기 배지내의 당 농도가 20%일 때 알코올 생산량이 가장 높게 나타났지만 발효 후 배지에 남아있는 잔류 당 농도를 고려했을 때 분리균주의 최적 당 농도는 10%로 나타났다. 결론적으로 10%의 당 농도에서

24시간 발효하는 것이 분리균주를 이용한 에탄올 생산에 있어서는 최적으로 사료되었다.

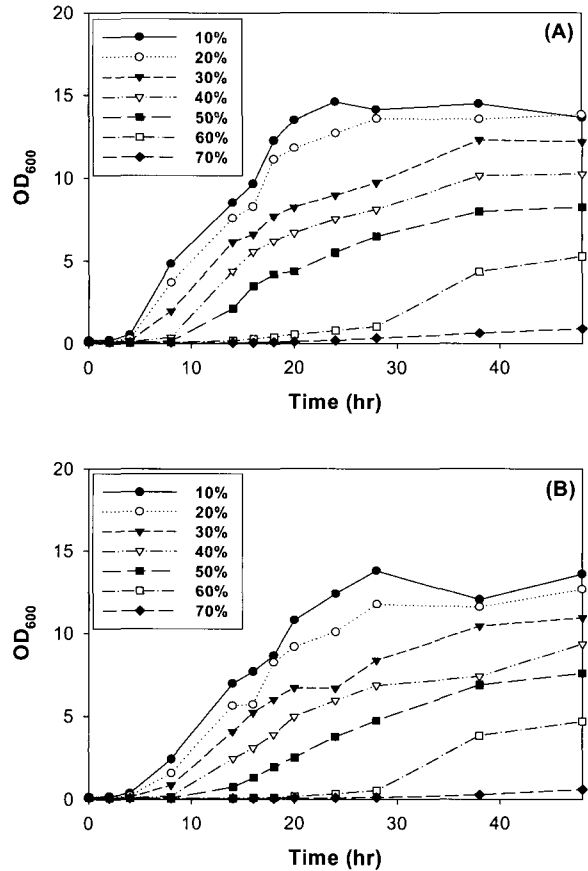


Figure 5. Effect of glucose concentration on the growth of (A) *S. cerevisiae* KA4 and (B) *S. cerevisiae* KCTC 1199.

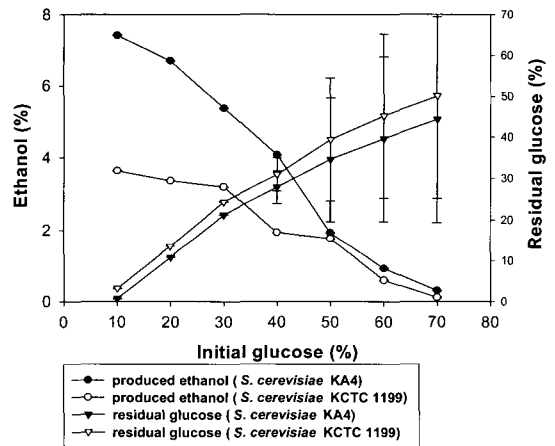


Figure 6. Changes of residual glucose or ethanol concentrations according to the initial glucose concentration after 24 hr ethanol fermentation.

초기 pH의 영향

Fig. 7은 발효배지의 초기 pH에 따른 에탄올 발효의 영향을 나타낸 결과이다. 초기 당 농도 10%에서 분리균주와

대조구 모두 pH 4 이상에서 에탄올을 생산하여 pH 10의 범위까지 안정적으로 에탄올을 생산하였다. 이와 같은 결과는 에탄올 발효에 있어서 넓은 pH 영역에서 안정되게 에탄올을 생산한다는 보고와 일치하였다(15, 16). 한편 분리균주가 대조구보다 에탄올 생산에 있어서 최고 2% 이상 많은 양의 에탄올을 생산하였으며, pH 6에서 24시간 발효 후 7.4%의 에탄올을 생산하여 가장 높은 에탄올 생산량을 나타내었고 이때의 에탄올 생산수율은 2.87 mol EtOH/mol glucose 이었다. 따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때, 분리균주 *S. cerevisiae* KA4 균주는 대표균주 *S. cerevisiae* KCTC 1199보다 내당성, 내알코올성, 고생산성 에탄올에서 보다 우수한 에탄올 발효 균주임을 확인할 수 있었다.

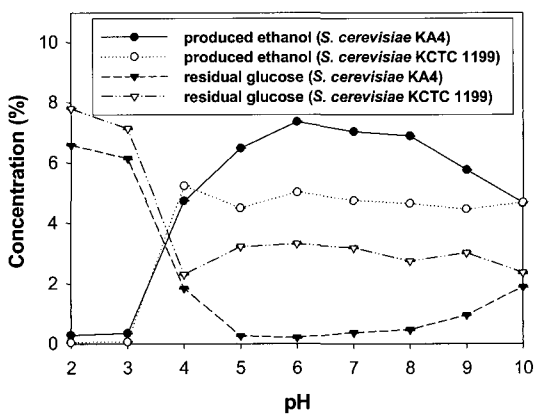


Figure 7. Changes of residual glucose or ethanol concentrations according to the initial pH after 24 hr ethanol fermentation.

요약

본 실험실에서는 음식폐기물을 효율적으로 소화처리하기 위해 Pilot 규모 (10톤)의 3단계 메탄 발효 공정을 개발하여 운전하고 있다. 3단계 메탄발효시스템은 반혐기성 가수분해조, 혐기성 산발효조, 혐기성 메탄발효조로 구성되어 있으며, 이 가운데 두 번째 공정인 혐기성 산발효조로부터 알코올발효능이 우수한 균주 KA4를 분리하였다. 세포의 형태는 타원형 모양이며, 크기는 5.5-6.5 × 3.5-4.5 μm 이었고, 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석한 결과를 바탕으로 *Saccharomyces cerevisiae* KA4로 명명하였다. 이 균주를 YM 배지에서 배양하였을 경우 30-35 °C에서 최대 생장을 보였으며, 배지내의 초기 에탄올 농도가 5% (v/v)까지는 생장에 영향을 받지 않았으나 그 이상에서는 생장에 저해를 받았고 7% 이상에서는 성장하지 못하였다. 한편 초기 50% (w/v)까지의 당 농도에서는 생장이 가능하였으나 잔류 당 농도를 고려할 때 에탄올 발효를 위한 최적 당 농도는 10%이었다. 이 농도의 당을 이용하여 초기 pH 4에서 10까지의 넓은 범위에서 에탄올 발효가 가능하였으며 최적 pH는 6이었다. 이 때 에탄올 생산량은 7.4%이었으며, 에탄올 생산수율은 2.87 mol EtOH/mol glucose이었다.

감사

본 연구는 2004년도 조선대학교 교내학술연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, S. and B. E. Dale (2004), Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues, *Biomass Bioenerg.* **26**(4), 361-375.
- Sun, Y. and J. Cheng (2002), Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, *Bioresour. Technol.* **83**, 1-11.
- Kadar, Z., Z. Szengyel, and K. Reczey (2004), Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol, *Ind. Crop Prod.* **20**, 103-110.
- Borrero, M. A. V., J. T. V. Pereira, and E. E. Miranda (2003), An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil, *Biomass Bioenerg.* **25**(3), 287-299.
- Murphy, J. D. and K. McCarthy (2005), Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland, *Appl. Energ.* **82**, 148-166.
- Zafar, S. and M. Owais (2006), Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*, *Biochem. Eng. J.* **27**, 295-298.
- Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. S. Graboski (1995), Estimating the net energy balance of corn ethanol, Agricultural Economic Report 721, United States Department of Agriculture.
- Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. Wang (2002), The energy balance of corn ethanol: an update. Agricultural Economic Report 813, United States Department of Agriculture.
- Hur, B. K., J. S. Yu, and J. W. Yang (1989), Ethanol fermentation by *Kluyveromyces fragilis* from *Jerusalem artichoke*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 50-58.
- Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, and C. E. Wyman (1991), Fuel ethanol from cellulosic biomass, *Science* **251**, 1318-1323.
- Kim, S. W., J. Y. Park, J. K. Kim, J. H. Cho, Y. N. Chun, I. H. Lee, J. S. Lee, J. S. Park, and D. H. Park (2000), Development of a modified three-stage methane production process using food wastes, *Appl. Biochem. Biotech.* **84-86**, 731-741.
- Kim, J. K., J. H. Cho, J. S. Lee, K. S. Hahn, D. H. Park, and S. W. Kim (2002), Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment, *Appl. Biochem. Biotech.* **98-100**, 753-764.
- Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Jones, M. A. and W. M. Ingledew (1994), Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1048-1051.
- Ohta, K., K. Supanwong, and S. Hayashida (1981), Environmental effects on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*, *Annual Reports ICME*, **3**, 109-116.
- Bajpai, P. K. and A. Margaritis (1986), Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol, *Biotech. Bioeng.* **28**, 824-828.