

Article

혼합미생물배양체를 이용한 폐활성슬러지 가용화 산물로부터 polyhydroxyalkanoate 생합성

박태준 · 유영재 · 정동훈 · 이선희 · 이영하*

충남대학교 미생물·분자생명과학과

Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate by mixed microbial cultures from hydrolysate of waste activated sludge

Taejun Park, Young Jae Yoo, Dong Hoon Jung, Sun Hee Lee, and Young Ha Rhee*

Department of Microbiology and Molecular Biology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Republic of Korea

(Received August 9, 2017; Revised August 29, 2017; Accepted August 30, 2017)

A new approach to the solubilization of waste activated sludge (WAS) using alginate-quaternary ammonium complex beads was investigated under controlled mild alkaline conditions. The complex beads were prepared by the reaction of sodium alginate (SA) with 3-(trimethoxysilyl)propyl-octadecyldimethylammonium chloride (TSA) in acid solution, followed by crosslinking with CaCl_2 . Treatment of WAS with SA-TSA complex beads was effective for enhancing the efficacy of WAS solubilization. The highest value of soluble chemical oxygen demand (SCOD) concentration (3,900 mg/L) was achieved after 10 days of treatment with 30% (v/v) SA-TSA complex beads. The WAS solubilization efficacy of the complex beads was also evaluated by estimating the concentrations of volatile fatty acids (VFAs). The maximum value of VFAs was 2,961 mg/L, and the overall proportions of VFAs were more than 75% of SCOD. The main components of VFAs were acetic, propionic, iso-butyric, and butyric acids. These results suggest that SA-TSA complex beads might be useful for enhancing the solubilization of WAS. The potential use of VFAs as the external carbon substrate for the production of polyhydroxyalkanoate (PHA) by a mixed microbial culture (MMC) was also examined. The enrichment of PHA-accumulating MMC could be achieved by periodic feeding of VFAs generated from WAS in a sequencing batch

reactor. The composition of PHA synthesized from VFAs mainly consisted of 3-hydroxybutyrate. The maximum PHA content accounted for 25.9% of dry cell weight. PHA production by this process is considered to be promising since it has a doubly beneficial effect on the environment by reducing the amount of WAS and concomitantly producing an eco-friendly biopolymer.

Keywords: alginate-quaternary ammonium complex beads, mixed microbial culture, polyhydroxyalkanoates, waste activated sludge

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 탄소 및 에너지원으로 사용하기 위하여 세균의 세포 내에 축적되는 저장성 고분자이다. PHAs를 구성하는 단위체인 (*R*)-hydroxyalkanoates의 탄소 사슬 길이에 기초하여 PHAs는 short-chain-length (SCL) PHAs와 medium-chain-length (MCL) PHAs로 구분된다(Kim *et al.*, 2007a). 합성플라스틱과는 달리 PHAs는 재생자원을 발효 기질로 사용하여 생산될 수 있을 뿐만 아니라, 생분해성, 생체친화성, 압전성 및 자외선에 대한 안전성이 매우 뛰어난 특징을 갖고 있다(Koller *et al.*, 2017). 이러한 성질들로 인하여 PHAs는 합성플라스틱을 대체할 수 있는 범용소재로 뿐만 아니라 식품, 정밀화학, 의료소재 등 다양한 분야에 응용될 수 있는 기능성 바이오폴리머로 큰 관심을 모으고 있다(Chanprateep, 2010; Wang *et al.*, 2014).

*For correspondence. E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr;
Tel.: +82-42-821-6413; Fax: +82-42-822-7367

PHAs가 가지고 있는 여러 가지 장점에도 불구하고 아직까지 이 고분자의 활용이 제한 받고 있는 가장 중요한 이유는 합성고분자에 비하여 이들의 생산비가 매우 높다는 점이다 (Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). 최근 PHAs 생산비를 저감시키기 위한 방법으로서 오폐수 처리 과정 중 발생하는 폐활성슬러지(waste activated sludge)와 같은 혼합미생물 배양체(mixed microbial culture)를 이용한 PHAs 생산에 많은 관심이 모아지고 있다. 혼합미생물배양체를 이용할 경우, 이미 고농도로 존재하는 폐활성슬러지 내 미생물을 직접 생산균주로 활용할 수 있으며, 또 PHA 생산과정 중 멸균 및 오염방지를 위해 소요되는 경비를 줄일 수 있다(Dias *et al.*, 2006; Castilho *et al.*, 2009; Morgan-Sagastume, 2016). 그러나 폐활성슬러지에 직접 탄소원을 공급하여 PHAs를 생산하는 전략은 매우 비효율적이기 때문에 안정적으로 PHAs 생산능을 갖는 균주들을 농화시키기 위한 전략이 수반되어야 한다. 이를 위한 방법으로서 폐활성슬러지를 포함하고 있는 sequencing batch reactor (SBR)에 PHAs 생산에 이용될 수 있는 외부탄소원을 공급하여 풍요단계(feast phase)를 유지하고, 이어서 탄소원 고갈 후 빈곤단계(famine phase)가 유지되도록 하는 풍요-빈곤(feast and famine) 배양 시스템이 잘 알려져 있다(Serafim *et al.*, 2008; Villano *et al.*, 2010). 이러한 SBR 배양조건에서는 풍요단계에서 PHAs를 저장물질로 세포 내에 축적한 미생물만이 빈곤단계에서 생존할 수 있는데, 이와 같은 배양조건이 연속적으로 수차례 반복될 경우, 군집 내에 PHAs를 생합성하지 못하는 미생물들은 제거되고 생합성 균주들만 농화될 수 있으므로 PHAs 생산 능력이 우수한 혼합미생물배양체를 확보할 수 있다.

일반적으로 PHAs 생산과정에서 미생물 배양을 위한 기질(원료)비는 전체 생산비의 40% 이상을 차지하며, 이 중 탄소 기질비가 전체 기질 원료비의 70% 이상을 차지함으로써 전체 생산비에 절대적인 영향을 미친다(Salehizadeh and Van Loosdrecht, 2004). 따라서 PHAs 생산비를 절감할 수 있는 새로운 대안으로서 최근 폐기성 기질을 탄소원으로 이용하기 위한 방안들이 제시되고 있다(Virov, 2013). 특히 폐활성슬러지의 혐기소화에서 발생하는 휘발성 지방산(volatile fatty acids, VFAs)은 PHAs 생산을 위한 탄소원으로 매우 유용하다(Lee *et al.*, 2009; Amulya *et al.*, 2014). 일반적으로 폐활성슬러지를 포함한 고분자 유기물의 혐기소화는 가수분해(hydrolysis), 산생성(acidogenesis), 아세트산 생성(acetogenesis) 및 메탄생성(methanogenesis)의 과정을 거치며, 이 중 가수분해가 전체 반응의 반응속도를 결정해 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 가수분해 반응을 촉진하는 한편, 메탄 생성 반응을 저해할

경우 acetic acid를 포함한 다량의 VFAs를 얻을 수 있다(Chen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010).

앞서 본 연구실에서는 알긴산과 4급암모늄이 결합된 복합구(alginate-quaternary ammonium complex bead)가 여러 종류의 미생물을 죽일 수 있는 항균효과가 있음을 보고한 바 있다(Kim *et al.*, 2007b, 2010). 이 복합구는 수용액 내에서 매우 안정하며, 미생물과 반응 시 항균물질의 배출 없이 세포와의 접촉에 의해 세포표면을 변화시킴으로써 항균력을 발휘한다. 이러한 복합구의 성질은 폐활성슬러지의 가수분해 및 가용화(solubilization)에도 매우 유용할 것으로 기대되었다. 이를 바탕으로 본 연구에서는 위에 기술한 복합구를 이용하여 폐활성슬러지로부터 VFAs를 수확하기 위한 방안을 모색하고, VFAs를 탄소원으로 이용하여 혼합배양체로부터 PHAs를 생산하기 위한 기초연구를 수행하였다. 안정적으로 VFAs로부터 PHAs를 생합성할 수 있는 혼합미생물배양체는 VFAs를 외부 탄소원으로 이용한 SBR 공정을 통하여 획득하였으며, 이 과정 중 혼합배양체의 군집구조의 변화를 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 방법을 통하여 분석하였다.

재료 및 방법

Alginate-quaternary ammonium 복합구의 제조

Sodium alginate (SA)를 증류수에 4% (w/v)가 되도록 녹인 후, 3-(trimethoxysilyl)propyl-octadecyl-dimethylammonium chloride (TSA)를 2 M이 되도록 첨가하고, acetic acid로 pH 4.0을 유지하면서 균질하게 혼합되도록 24시간 동안 교반하였다 (Kim *et al.*, 2007b). 충분히 혼합된 SA-TSA 용액을 주사기를 이용하여 5%의 CaCl₂ 용액에 떨어뜨리면서 교반함으로써 겔화가 진행되면서 구가 형성될 수 있게 하였다. 이때, 유사한 크기의 구를 제조하기 위해 단위시간 당 CaCl₂ 용액에 떨어뜨린 SA-TSA 혼합용액의 적하 수를 균일하게 유지하였다. 만들어진 SA-TSA 구를 5%의 CaCl₂ 용액에서 80°C로 하루 동안 경화시킨 후, 증류수로 세척하고 30°C에서 건조시켰다. 건조 후 제조된 SA-TSA 복합구의 직경은 약 2.5-3.5 mm 이었다. 본 실험에서의 SA와 TSA는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 특별한 정제과정 없이 사용하였다.

폐활성슬러지의 가용화 및 VFAs 생성

본 연구에 사용된 폐활성슬러지 시료는 대전광역시 하수종말처리장의 농축조에서 채취하였으며, 4°C에서 하루 동안 침전시킨 후, 전체 부피의 50%에 해당되는 상등액을 제거함

로써 2배 농축하여 사용하였다. 농축된 폐활성슬러지의 성상은 총화학적산소요구량(total chemical oxygen demand, TCOD)이 14,300 mg/L, 용존성화학적산소요구량(soluble chemical oxygen demand, SCOD)이 110 mg/L, 총부유고형물(total suspended solid, TSS)의 농도는 14,130 mg/L, 휘발성부유고형물(volatil suspended solid, VSS)의 농도는 10,800 mg/L이었다.

폐활성슬러지의 가용화 및 VFA 생성은 동일 유리용기 내에서 연속적으로 수행하였다. 최대한 호기 조건을 방지하기 위하여 총 용량 1.1 L의 유리용기에 800 ml의 폐활성슬러지를 담고 3 N NaOH를 이용하여 pH를 10으로 맞춘 뒤, 10~30% (v/v)의 SA-TSA 복합구를 함께 담아 마개를 봉한 뒤, 30°C 및 200 rpm의 진탕배양기에서 10일간 반응시켰다. 반응기간 중 반응액 내 용존산소는 0.05 mg/L 이하를 유지하였다. 반응 중 폐활성슬러지의 가용화는 COD analyzer (HACH DR/3000 spectrophotometer)를 이용한 SCOD 측정으로 분석하였다. 생성된 VFAs 분석은 앞서 발표된 Lee 등(2009)의 방법에 따라 gas chromatograph (GC)를 이용하였다. 폐활성슬러지로부터 생성된 VFAs는 원심분리 후, 투명한 상등액 상태로 멸균된 용기에 담아 4°C에서 보관하였다.

SBR 공정을 통한 PHA 생산 미생물의 농화배양

폐활성슬러지를 대상으로 PHA 저장능력이 높은 혼합미생물배양체를 농화하기 위하여 실험실 규모의 SBR 공정을 5 L 발효기를 이용하여 수행하였으며, 하수종말처리장 농축조에서 채취한 폐활성슬러지를 접종원으로 사용하였다. SBR 공정의 한 주기(cycle)는 총 6시간으로, 0.1시간의 기질 주입단계(feeding phase), 1.9시간의 기질 풍요단계, 3.9시간의 기질 빈곤단계 및 0.1시간의 배양액 회수단계(withdrawal phase)로 구성되었다. 한 주기가 끝난 후, 혼합배양체액 600 ml을 회수하고, 폐활성슬러지 가용화산물로부터 얻어진 VFAs 용액 600 ml에 2 L 용량에 해당하는 E* 미네랄배지 성분을 보충해 주었다. E* 미네랄 배지 1 리터에는 NH₄Cl 0.5 g, K₂HPO₄ 5.8 g, KH₂PO₄ 3.7 g, MgSO₄·7H₂O 0.37 g 및 미량 원소 용액 3 ml가 포함되었다. 미량 원소 용액은 1 N HCl 1 리터당 0.29 g ZnSO₄·7H₂O, 1.98 g MnCl₂·4H₂O, 1.67 g CaCl₂·2H₂O, 2.78 g FeSO₄·7H₂O, 2.81 g CoSO₄·7H₂O 및 0.17 g CuCl₂·2H₂O를 첨가하여 제조하였다. 반응기는 유량 0.5 vvm으로 공기를 주입시켜 주었고, 임펠러에 의해 200 rpm으로 교반하였으며, 온도는 30°C로 유지하였다. 각각의 SBR 주기가 끝날 때, PHA, 혼합미생물배양체 건체량(dry cell weight, DCW), 잔류 탄소기질의 농도, 용존산소 농도의 분석을 위해 시료를 채취하였다.

VFAs 산물을 이용한 PHA 생산

SBR에서 농화배양된 혼합미생물배양체를 이용하여 PHA 생산을 위한 회분배양을 5 L 발효조(Biotron Co.)에서 수행하였다. 2 L의 농화배양된 혼합미생물배양체(약 3.0 g/L DCW)를 원심분리(10,000 × g/15분) 한 후 2 L의 가용화산물로부터 얻어진 VFA 산물에 E* 미네랄 배지성분을 섞어 제조한 배지에 다시 접종하였다. 온도, pH, 공기 유량 및 교반속도는 앞서 설명한 SBR 공정 조건과 동일하게 유지하였다.

PCR-DGGE

SRB 공정 과정 중 서로 다른 주기에 채취한 혼합미생물배양체 시료로부터 total genomic DNA를 Fast DNA Spin Kit (Q-BIO Gene)로 추출한 후, 박테리아 16S rDNA의 V-3 영역(*E. coli* 위치 341-534)을 프라이머 GC341F/518R을 사용하여 PCR로 증폭시켰다(Muyzer *et al.*, 1993). PCR을 위한 조건은 다음과 같다. 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 55°C annealing 30초, 74°C에서 extension 30초 과정을 30 cycle 반복한 후, 74°C에서 7분 동안 post-extension하였다. DGGE는 Bio-Rad Dcode™ universal mutation detection system (Bio-Rad)를 이용하여 수행하였다. DGGE running 조건은 10%의 polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide = 37.5:1)을 사용하였고 denaturant의 농도는 35-65%로 제작하였으며 60 V로 16시간 동안 전기영동하고 gel red (100 µL/L)로 30분 동안 염색한 후 UV를 이용하여 확인하였다(Lee *et al.*, 2011). 염기서열 분석을 위해 DGGE에서 나타난 각 밴드를 잘라 증류수 100 µl에 담가 24시간 동안 DNA를 elution한 뒤, 이 액을 template로 하여 다시 PCR을 수행하였다. PCR 증폭은 위에서 사용한 동일한 프라이머나, GC 클램프가 없는 프라이머를 사용하여 수행하였다. 확보된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)에 등록되어 있는 database를 사용하여 비교하였다.

분석 방법

배양된 세포의 건체량은 배양액 10 ml을 원심분리 후 동결 건조하여 측정하였다. PHA의 조성 및 정량은 HP-5 column (30 m × 0.32 mm × 0.25 µm)을 이용한 가스 크로마토그래피 (6890 plus GC, Agilent) 방법으로 분석하였으며, benzoic acid (0.2 wt%)를 내부표준물질로 사용하였다. GC 측정을 위한 시료의 전처리 시료 10 mg에 메탄올 : 황산 : 내부표준물질

(850 ml : 150 ml : 2 g)의 비율로 만든 용액 0.5 ml와 chloroform 0.5 ml를 각각 첨가 후 95°C에서 3시간 반응 후 냉각한 뒤 증류수 1 ml를 첨가한 후 혼합하여 층분리된 아래층을 injection하였다. GC 분석을 위한 초기 오븐온도는 60°C로 4분 동안 유지한 뒤 분당 8°C씩 280°C까지 증가시켰다. PHA 단위체의 동정은 gas chromatography-mass spectroscopy (5973N GC-MSD system, Agilent) 분석에 의하였다. 배양액 내 VFA 조성 및 정량은 SUPELCO simplicity-wax column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)을 이용하였으며, flame ionization detector로 검출하였다(Lee *et al.*, 2009).

결과 및 고찰

폐활성슬러지의 가용화 및 VFAs 생성

폐활성슬러지의 가용화 정도는 SCOD 생성량으로 확인할 수 있다. SA-TSA 복합구의 양에 따른 활성슬러지의 가용화 정도를 평가하기 위하여, 서로 다른 농도의 SA-TSA 복합구를 처리한 후 SCOD의 경시적 변화를 조사하였다. 이때 반응액의 pH는 10으로 맞추어 주었는데, 이는 알칼리 조건에서 폐활성슬러지 가용화 효율이 증대되고, 메탄가스생산균의 활성을 억제하는 대신에 산생성균의 활성에는 영향을 주지 않아 VFAs의 생성량이 증대될 수 있기 때문이다(Jiang *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; Jie *et al.*, 2014). Figure 1에서 보는 바와 같이, SA-TSA 복합구를 처리하지 않고 중성 pH를 유지한 대조군의 경우 반응기간 중 400 mg/L 이하의 낮은 SCOD를 생성하는데

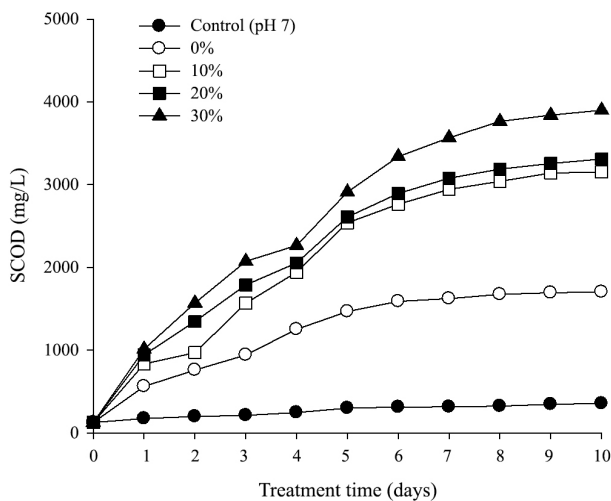


Fig. 1. Effect of various concentration of SA-TSA complex beads on the solubilization of waste activated sludge under mild alkaline conditions at pH 10.

반하여, SA-TSA 복합구 처리 없이 pH 10에서 진행된 대조군의 경우에는 10일 경과 후 최대 1,680 mg/L의 SCOD를 생성할 수 있었다. 한편, 폐활성슬러지의 가용화는 SA-TSA 복합구의 처리에 의해 크게 증가하였다. SA-TSA 복합구의 양이 증가할수록 폐활성슬러지의 가용화도 증가하여, 30% 농도의 복합구 처리 10일이 경과한 뒤 최대 3,900 mg/L의 SCOD를 얻을 수 있었다. SA-TSA 복합구는 세포와의 접촉에 의해 살균효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 2007b). 이에 따라 복합구의 양이 증가할수록 폐활성슬러지를 구성하는 미생물세포와 복합구 간의 접촉빈도가 증가하여 세포사멸률이 증가하고, 이에 발생하는 SCOD가 높아지는 것으로 사료된다. 복합구의 양을 40%와 50%로 처리한 경우에는 SCOD가 증가하는 경향을 보였으나 30% 처리의 경우와 생성된 SCOD 양의 차이가 크지 않았다(자료 미제시). 또한, 복합구의 양이 많아짐에 따라 폐활성슬러지의 유동성이 감소하고, 복합구 생산 비용문제도 있기 때문에 본 연구에서는 폐활성슬러지 가용화에 최적화된 SA-TSA 복합구의 양을 30%로 정하였다. SA-TSA 복합구 처리에 의한 가용화 효율(SCOD/TCOD)은 27.3%로서, 본 연구와 동일한 하수처리시설로부터 채취한 폐활성슬러지에 alkaline protease를 생성하는 통성혐기성 세균 *Exiguobacterium* sp. YS1을 접종하여 가용화하였을 때 획득한 34.5%의 가용화 효율에 비하여 다소 낮은 것으로 나타났다(Lee *et al.*, 2009).

SA-TSA 복합구를 이용한 폐활성슬러지의 가용화 과정 중 VFAs 생성을 조사하였다(Fig. 2). 생성된 VFAs의 총량은 반응시간에 따라 점차 증가하여 반응 10일째에 최고값(2,961 mg/L)에 이르렀는데, 이는 SCOD의 75% 수준에 해당되었다.

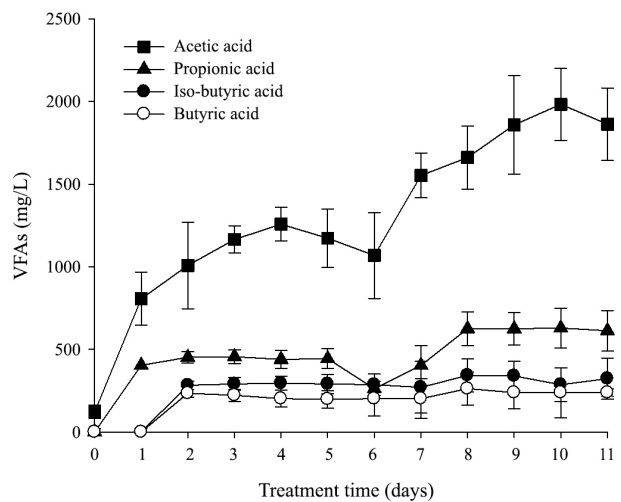


Fig. 2. Production of VFAs during the solubilization of waste activated sludge by treatment of SA-TSA complex beads (30% v/v) at 30°C (n = 3).

이때 최종적으로 생성된 VFAs의 종류와 생성량은 acetic acid 1,804 mg/L (60.9%), propionic acid 611 mg/L (20.6%), iso-butyric acid 321 mg/L (10.9%) 그리고 butyric acid 225 mg/L (7.6%) 이었다. 가장 많은 양을 차지하는 acetic acid는 반응기간 중 그 양이 꾸준히 증가되는 반면에, 다른 VFAs의 경우 반응기간 중 그 농도가 비교적 일정하게 유지되는 양상을 보였다. 본 실험에서 나타난 VFAs는 단백질 및 탄수화물 등의 유기물 혐기소화 과정 중 미생물의 산 생성(acidogenesis) 및 아세트산 생성(acetogenesis) 대사작용에 의해 쉽게 형성될 수 있는 산물이다. 그러나 본 실험에서 나타난 VFAs 조성은 폐활성슬러지의 혐기소화 과정에서 acetic acid, propionic acid 및 iso-valeric acid가 VFAs의 주성분이었음을 보고한 Chen 등 (2007)의 결과와 다소 차이가 있었다. 이러한 결과는 폐활성슬러지의 성분, 혐기소화 방법 및 반응조건의 차이에 따라 우점하는 미생물 군집구조가 달라질 수 있고, 그에 따라 생성되는 VFAs의 조성이 달라질 수 있음을 시사한다(Yuan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Jie *et al.*, 2014).

SBR 공정을 이용한 농화배양

폐활성슬러지 가용화산물로부터 얻어진 VFAs를 탄소원으로 이용하여 PHA를 효과적으로 합성할 수 있는 혼합미생물 배양체를 얻기 위하여 VFAs 산물을 외부탄소원으로 사용하여 SBR 공정을 진행하였다. 하수종말처리장의 폐활성슬러지를 접종원으로 이용하고 외부탄소원으로 VFAs 용액을 공급하여 SBR을 70주기(cycle) 이상 수행한 결과, 약 25주기 이상 되었을 때 비교적 안정한 상태가 유지되었다. SBR 공정의 한 주기는 약 2시간의 탄소원 풍요기간과 4시간의 탄소원 빈곤기간으로 구성되었다. Figure 3은 안정된 상태의 SBR 공정의 한 주기 동안 공급된 VFAs 농도, 미생물 건체량, PHA 생산량 및 용존산소량의 전형적인 변화양상을 보여준다. 처음에 공급해

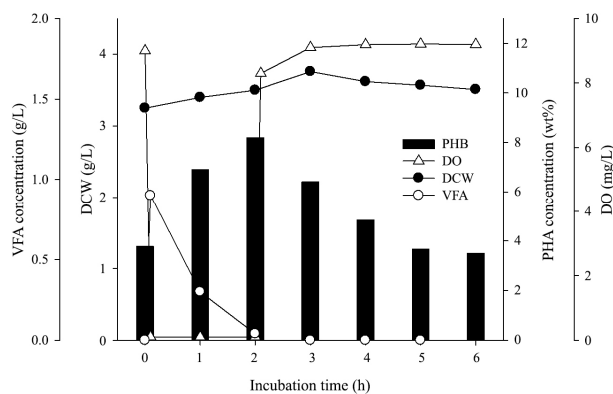


Fig. 3. Profiles of VFAs, PHA, DCW, and DO during a SBR cycle.

준 VFA가 반응 2시간 이후 고갈이 되었고, 그에 따라 풍요기간 중 전체량의 최대 8.4%까지 생성되었던 PHA도 탄소원(VFAs) 고갈 이후 급격히 저하되어 반응 6시간 후에는 반응 초기의 PHA양과 같은 수준(3% 이하)이 되었다. 용존산소량은 기질의 유무와 상응하여 기질 공급 후 급격히 떨어져 낮은 농도를 보였으며, 기질의 고갈 이후 급격히 상승하여 반응 초기의 농도와 같이 되었다. SBR 공정 중 혼합미생물배양체에 축적된 고분자는 polyhydroxybutyrate (PHB) 이었다.

PCR-DGGE를 이용한 미생물 군집구조 분석

PCR-DGGE는 DGGE상에 검출된 각 밴드의 DNA 염기서열 분석을 통하여 비교적 간단하게 미생물 군집구조를 파악할 수 있기 때문에 경시적으로 미생물 군집구조의 변화를 분석할 수 있는 분자생물학적 방법이다(Aydin *et al.*, 2015). 폐활성슬러지로부터 생산된 VFAs 용액을 외부탄소원으로 사용한 SBR 내의 미생물 군집구조 변화를 관찰하기 위하여 서로 다른 SBR 주기에서 채취한 시료를 대상으로 PCR-DGGE 분석을 수행하였다. 그 결과, SBR 내에서의 미생물 군집구조는 SBR이 수행된 지 약 25주기 이후에 비교적 안정화 되었으며, 약 50주기 이후에는 6개의 뚜렷한 밴드가 나타났다(Fig. 4). 이 6개 밴드의 염기서열을 분석하여 NCBI의 BLAST를 이용하여 서열비교를 한 결과, 이 밴드들은 *Vibrio sp.*, *Vibrio furnisii* 그리고 *Corynebacterium glutamicum*으로 동정 되었다(Table 1). 반면에 밴드 3과 5는 알려진 미생물과의 상동성이 매우 낮게(<90%) 나오므로써, 구체적 동정이 불가능하였다. 확인된 미생물 중

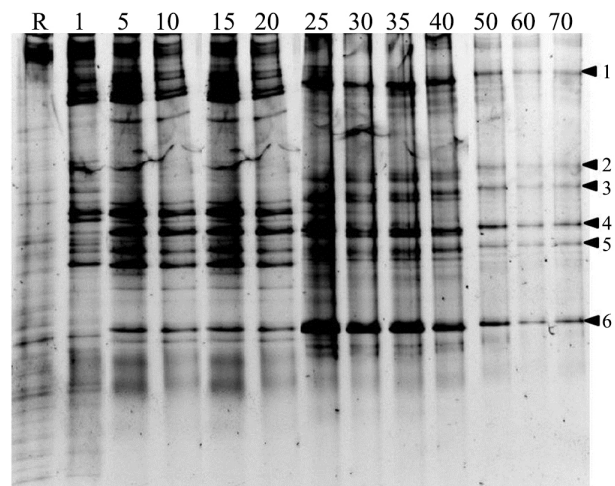


Fig. 4. DGGE profiles of the bacterial community in mixed microbial cultures enriched under feast-famine conditions in a SBR using VFAs as the external carbon source. Samples were taken during different SBR cycles (R, raw sludge sample; 1~70, the number of cycles).

Table 1. Closest phylogenetic affiliation of the bacteria in the SBR

Band number	Closest relative	Accession number	Similarity (%)
1	<i>Vibrio</i> sp.	HQ634939.1	98
2	<i>Vibrio</i> sp.	HQ634939.1	97
3	Marine bacterium HE-6	HM100848.1	80
4	<i>Vibrio furnisii</i>	HF968434.1	99
5	<i>Curtobacterium</i> sp.	HF566215.1	88
6	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	AB730627.1	98

*Corynebacterium glutamicum*은 PHB를 생산하며 PHB를 고효율로 생산해내는 재조합 숙주균주로도 이용되고 있다(Jo *et al.*, 2006; Matsumoto *et al.*, 2011). 또한, 다수의 *Vibrio* 속 균주들도 PHB 생산능력을 갖고 있음이 보고되고 있다(Chien *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2011; Mohandas *et al.*, 2017). 이러한 결과는 SRB 공정이 혼합미생물배양체를 구성하는 미생물 중 PHA 생합성 능력이 우수한 균주들을 농화하기 위한 방법으로 효과적임을 보여준다.

VFAs 산물을 이용한 PHA 생산

지금까지 VFAs를 폐활성슬러지로부터 생산하기 위한 다양한 방법들이 연구되어 왔으며(Morgan-Sagastume *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014), 최근에는 폐활성슬러지로부터 생산된 VFAs로부터 순수배양된 특정 균주(Chakraborty *et al.*, 2009) 혹은 혼합미생물배양체(Mengmeng *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013)를 이용하여 PHA를 생산하려는 시도에 많은 관심이 모아지고 있다. 최근 오폐수처리 과정 중 발생하는 폐활성슬러지의 처리가 전체 공정 경비의 50% 이상을 차지하고 있음을 고려해 볼 때(Vlyssides and Karlis, 2004), 폐활성슬러지로부터 형성된 VFAs를 PHA로 전환한다는 것은 폐기물의 양을 감소시키면서 고부가가치의 유용 바이오폴리머를 생산한다는 점에서 매우 바람직한 생물공정이라 할 수 있다.

앞서 가용화 산물로부터 만들어진 VFAs와 SBR 공정을 통해 PHA 생합성 균주가 농화배양된 혼합미생물배양체를 이용하여 PHA를 생산하기 위한 회분배양을 발효조에서 수행하였다. Figure 5에서 보는 바와 같이, 배양 24시간 이후 탄소원으로 공급된 VFAs가 모두 고갈되었으며, 그 때 생합성된 PHA의 양은 전체량의 25.9%이었다. 생산된 고분자의 조성을 분석해 본 결과, SBR 공정에서와 마찬가지로 3-hydroxybutyrate (3HB)를 단위체로 하는 PHB 단일중합체이었다. 이러한 결과는 농화된 혼합미생물배양체를 이용하여 VFAs로부터 PHA

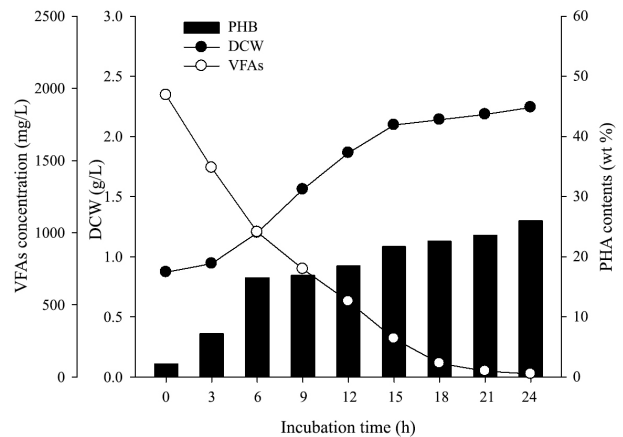


Fig. 5. Batch fermentation in a 5 L jar fermentor using VFAs as the carbon source.

를 생산할 수 있음을 보여주지만, PHA 생산수율을 제고하기 위한 배양조건의 개선이 필요함을 시사해 준다.

최근 Mengmeng 등(2009)은 고온과 알칼리 조건에서 폐활성슬러지로부터 얻은 VFAs를 이용한 회분배양에서 혼합미생물배양체 전체량의 26.7%에 달하는 PHA를, VFAs를 간헐적으로 추가 공급하는 유가배양에서는 56.5%의 PHA를 얻었으며, 생산된 PHA 단위체는 3HB와 3-hydroxyvalerate (3HV)가 각각 88.1%와 11.9%로 구성된 공중합체임을 보고하였다. 또한, Chen 등(2013)도 VFAs를 주기적으로 공급한 유가배양을 통하여 전체량의 65%에 달하는 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 얻은 바 있다. 이처럼 VFAs로부터 PHA를 효율적으로 생산하기 위해서는 배양액 내 VFAs의 농도 조절이 매우 중요한 것으로 생각된다. 특히 본 연구에서 사용된 SA-TSA 복합구는 항균물질을 방출하지 않고 미생물과의 접촉에 의해 항균력을 나타냄으로써 수차례의 세척을 거친 후에도 반복적으로 사용할 수 있는 특징을 가지고 있다(Kim *et al.*, 2007b). 이로 인해 SA-TSA 복합구는 폐활성슬러지를 가용화시키고 VFAs를 생산하는데 있어서도 반복 사용이 가능한 유용한 특징을 갖고 있지만, 농화된 혼합미생물배양체를 이용하여 PHA를 효율적으로 생산하기에는 반응액 내 VFAs의 농도를 높이는 방안을 고안해야 할 것으로 보인다. 앞서 보고된 Chen 등(2013)은 탈수시킨 고형물의 슬러지를 pH 9로 가용화시켜 약 25,000 mg/L의 VFAs를 생산하였다. 이와 같이 VFA의 생산량을 높이기 위해서는 원심분리 또는 탈수와 같은 방법으로 폐활성슬러지를 농축하여 VFAs 양을 제고하는 방법이 있을 수 있다(Ferreiro and Soto, 2003; Chen *et al.*, 2013). 위와 같은 방법을 통하여 높은 농도의 VFAs를 생산하면 미생물 배양의 개선을 통하여 PHA 생산량을 증가시킬 수 있을 것이다. 또한,

VFAs는 높은 농도에서 세포독성을 지니므로, 유가배양을 통하여 낮은 농도의 VFAs를 계속적으로 공급함으로써 일시에 VFAs를 공급하여 일어날수 있는 미생물 생장의 저해 효과를 낮추고 세포 내에 축적되는 PHA 함량도 높일 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

적 요

SA-TSA 복합구를 이용해 폐활성슬러지로부터 VFAs를 생산하고, 이를 발효 기질로 이용해 PHA를 생산하기 위한 실험을 수행하였다. 30%의 SA-TSA 복합구를 처리하였을 때 폐활성슬러지의 가용화 효율이 가장 효과적으로 일어나서 약 3,900 mg/L의 SCOD값을 얻었으며, acetic acid, propionic acid, *iso*-butyric acid 및 butyric acid를 주성분으로 하는 2,961 mg/L 농도의 VFAs를 얻었다. VFAs를 외부탄소원으로 이용하는 SBR 공정을 통해 PHA를 생합성하는 미생물을 농화배양하는 실험을 수행하고 PCR-DGGE로 분석한 결과, 우점 미생물로 *Vibrio* spp.와 *Corynebacterium glutamicum*이 확인되었다. 폐활성슬러지로부터 얻은 VFAs를 탄소원으로 사용하여 농화된 혼합 미생물배양체를 회분배양한 결과, 건체량의 25.9%에 달하는 PHB를 얻었다. 본 연구결과는 SA-TSA 복합구를 이용하여 폐활성슬러지로부터 VFAs를 얻음으로써 폐슬러지 감량화 효과를 얻고, 또 혼합미생물배양체를 이용하여 VFAs를 바이오 폴리머로 전환함으로써 경제성을 확보할 수 있는 새로운 생물 공정의 가능성을 보여준다.

감사의 말

본 논문은 2015년도 충남대학교 CNU학술연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

References

- Albuquerque, M.G.E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., and Reis, M.A.M. 2011. Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *J. Biotechnol.* **151**, 66–76.
- Amulya, K., Reddy, M.V., and Mohan, S.V. 2014. Acidogenic spent wash valorization through polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis coupled with fermentative biohydrogen production. *Bioresour. Technol.* **158**, 336–342.
- Aydin, S., Shahi, A., Ozbayram, E.G., Ince, B., and Ince, O. 2015. Use of PCR-DGGE based molecular methods to assessment of microbial diversity during anaerobic treatment of antibiotic combinations. *Bioresour. Technol.* **192**, 735–740.
- Castilho, L.R., Mitchell, D.A., and Freire, D.M.G. 2009. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* **100**, 5996–6009.
- Chakraborty, P., Gibbons, W., and Muthukumarappan, K. 2009. Conversion of volatile fatty acids into polyhydroxyalkanoate by *Ralstonia eutropha*. *J. Appl. Microbiol.* **106**, 1996–2005.
- Chanprateep, S. 2010. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J. Biosci. Bioeng.* **110**, 621–632.
- Chen, Y., Jiang, S., Yuan, H., Zhou, Q., and Gu, G. 2007. Hydrolysis and acidification of waste activated sludge at different pHs. *Water Res.* **41**, 683–689.
- Chen, H., Meng, H., Nie, Z., and Zhang, M. 2013. Polyhydroxyalkanoate production from fermented volatile fatty acids: effect of pH and feeding regimes. *Bioresour. Technol.* **128**, 533–538.
- Chien, C.C., Chen, C.C., Choi, M.H., Kung, S.S., and Wei, Y.H. 2007. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by *Vibrio* spp. isolated from marine environment. *J. Biotechnol.* **132**, 259–263.
- Dias, J.M., Lemos, P.C., Serafim, L.S., Oliveira, C., Eiroa, M., Albuquerque M.G., Ramos, A.M., Oliveira, R., and Reis, M.A. 2006. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. *Macromol. Biosci.* **6**, 885–906.
- Ferreiro, N. and Soto, M. 2003. Anaerobic hydrolysis of primary sludge: influence of sludge concentration and temperature. *Water Sci. Technol.* **47**, 239–246.
- Jiang, Y., Chen, Y., and Zheng, X. 2009. Efficient polyhydroxyalkanoates production from a waste-activated sludge alkaline fermentation liquid by activated sludge submitted to the aerobic feeding and discharge process. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7734–7741.
- Jie, W., Peng, Y., Ren, N., and Li, B. 2014. Volatile fatty acids (VFAs) accumulation and microbial community structure of excess sludge (ES) at different pHs. *Bioresour. Technol.* **152**, 124–129.
- Jo, S.J., Maeda, M., Ooi, T., and Taguchi, S. 2006. Production system for biodegradable polyester polyhydroxybutyrate by *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biosci. Bioeng.* **102**, 233–236.
- Kim, D.Y., Kim, H.W., Chung, M.G., and Rhee, Y.H. 2007a. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *J. Microbiol.* **45**, 87–97.
- Kim, Y.S., Kim, H.W., Lee, S.H., Shin, K.S., Hur, H.W., and Rhee, Y.H. 2007b. Preparation of alginate-quaternary ammonium complex beads and evaluation of their antimicrobial activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **41**, 36–41.
- Kim, H.W., Kim, B.R., and Rhee, Y.H. 2010. Imparting durable antimicrobial properties to cotton fabrics using alginate-quaternary ammonium complex nanoparticles. *Carbohydr. Polym.* **79**, 1057–1062.

- Koller, M., Maršálek, L., de Sousa Dias, M.M., and Brauneegg, G.** 2017. Producing microbial polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolyesters in a sustainable manner. *New Biotechnol.* **37**, 24–38.
- Lee, W.S., Chua, A.S.M., Yeoh, H.K., and Ngoh, G.C.** 2014. A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chem. Eng. J.* **235**, 83–99.
- Lee, S.H., Chung, C.W., Yu, Y.J., and Rhee, Y.H.** 2009. Effect of alkaline protease-producing *Exiguobacterium* sp. YS1 inoculation on the solubilization and bacterial community of waste activated sludge. *Bioresour. Technol.* **100**, 4597–4603.
- Lee, S.H., Kim, J.H., Mishra, D., Ni, Y.Y., and Rhee, Y.H.** 2011. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by activated sludge enriched under periodic feeding with nonanoic acid. *Bioresour. Technol.* **102**, 6159–6166.
- Liu, H., Wang, J., Liu, X., Fu, B., Chen, J., and Yu, H.Q.** 2012. Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: effect of pH. *Water Res.* **46**, 799–807.
- Matsumoto, K.I., Kitagawa, K., Jo, S.J., Song, Y., and Taguchi, S.** 2011. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. *J. Biotechnol.* **152**, 144–146.
- Mengmeng, C., Hong, C., Qingliang, Z., Shirley, S.N., and Jie, R.** 2009. Optimal production of polyhydroxyalkanoates (PHA) in activated sludge fed by volatile fatty acids (VFAs) generated from alkaline excess sludge fermentation. *Bioresour. Technol.* **100**, 1399–1405.
- Mohandas, S.P., Balan, L., Lekshmi, N., Cubelio, S.S., Philip, R., and Singh, I.S.B.** 2017. Production and characterization of polyhydroxybutyrate from *Vibrio harveyi* MCCB 284 utilizing glycerol as carbon source. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 698–707.
- Morgan-Sagastume, F.** 2016. Characterization of open, mixed microbial cultures for polyhydroxyalkanoate (PHA) production. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **15**, 593–625.
- Morgan-Sagastume, F., Pratt, S., Karlsson, A., Cirne, D., Lant, P., and Werker, A.** 2011. Production of volatile fatty acids by fermentation of waste activated sludge pre-treated in full-scale thermal hydrolysis plants. *Bioresour. Technol.* **102**, 3089–3097.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Salehizadeh, H. and Van Loosdrecht, M.C.M.** 2004. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance. *Biotechnol. Adv.* **22**, 261–279.
- Serafim, L.S., Lemos, P.C., Albuquerque, M.G., and Reis, M.A.** 2008. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**, 615–628.
- Villano, M., Beccari, M., Dionisi, D., Lampis, S., Miccheli, A., Vallini, G., and Majone, M.** 2010. Effect of pH on the production of bacterial polyhydroxyalkanoates by mixed cultures enriched under periodic feeding. *Process Biochem.* **45**, 714–723.
- Virov, P.I.O.** 2013. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers and plastics from renewable resources. *Mater. Tehnol.* **47**, 5–12.
- Vlyssides, A.G. and Karlis, P.K.** 2004. Thermal-alkaline solubilization of waste activated sludge as a pre-treatment stage for anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* **91**, 201–206.
- Wang, Y., Yin, J., and Chen G.Q.** 2014. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 59–65.
- Wei, Y.H., Chen, W.C., Wu, H.S., and Janarthanan, O.M.** 2011. Biodegradable and biocompatible biomaterial, polyhydroxybutyrate, produced by an indigenous *Vibrio* sp. BM-1 isolated from marine environment. *Mar. Drugs* **9**, 615–624.
- Yan, Y.Y., Feng, L.Y., Zhang, C.J., Wisniewski, C., and Zhou, Q.** 2010. Ultrasonic enhancement of waste activated sludge hydrolysis and volatile fatty acids accumulation at pH 10. *Water Res.* **44**, 3329–3336.
- Yuan, Q., Sparling, R., and Oleszkiewicz, J.A.** 2011. VFA generation from waste activated sludge: Effect of temperature and mixing. *Chemosphere* **82**, 603–607.