

## Fungal bioconversion of Korean food wastes for the production of animal feed additive enzymes

정윤순, 정상원, 조아라, 권순우, 한승호

(주)대한제당 중앙연구소

전화(032)770-1453, FAX(032)770-1603

### Abstract

Korean food waste, one of the abundantly available but environmentally problematic organic wastes in Korea, was utilized as solid-substrate by fungal strain *Aspergillus niger* ATCC 6275 for the production of enzyme mixture containing amylase, cellulase and xylanase. The enzyme mixture can be used as high value-added animal feed. Solid-state fermentation method yielded a 84-fold enhancement in xylanase activity compared with submerged fermentation method. The effect of incubation period, incubation temperature, pH of medium, moisture content, inoculum size and enrichment of the medium with nitrogen and carbon sources were observed for optimal production of these enzymes. The optimal amylase activity of 33.10 U/g, cellulase activity of 24.41 U/g, xylanase activity of 328.84 U/g were obtained at 8 days incubation with 50%(w/w) soy bean flake, with incubation temperature of 25°C, pH of 6.38, optimal moisture content of 55% and with inoculum size of  $3.8 \times 10^6$  spore/g. Enzyme activities were enhanced when 1mM CaSO<sub>4</sub>, 2% Malt extract and 2% galactose were added as mineral, nitrogen and carbon enrichment respectively.

### 1. 서론

현재 우리나라에서 발생하는 대표적인 유기성 폐기물인 음식물 쓰레기는 전체 생활 폐기물의 약 30%인 14,000톤/일을 차지하는 것으로 보고되고 있으나 음식물 쓰레기 등은 부패성이 크기 때문에 악취 발생, 오수 누출 등으로 재활용 처리가 어려워 대부분 매립에 의존하는 실정이다. 매립 처리법은 폐기물 양이 많고 안정화 하는데 시간이 오래 걸릴 뿐 아니라 침출수 등에 의한 토양 및 지하수의 2차 환경 오염을 야기한다. 이러한 배경에서 음식물 쓰레기를 사료화 하거나 퇴비화하는 재활용 방법이 다양하게 시도되어 왔다. 그러나 지금까지는 음식물 쓰레기의 고수분함량 때문에 변질되기 쉬워 기존의 사료제품보다 비교적 상품가치가 적은 사료제품이 생산되고 있는 실정이다. 현재 음식물 쓰레기를 박테리아를 이용하여 발효시키는 방법이 존재하고 있으나 역시 위의 문제점 등으로 제품의 상품가치가 기존의 사료제품보다 적은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 곰팡이를 이용하여 고부가가치 사료첨

가제재인 효소제제를 포함한 음식물 쓰레기 사료생산방법에 그 초점을 맞추었다.

## 2. 재료 및 방법

효소 생산을 위한 균주는 *Aspergillus niger* ATCC6275로서 한국종균협회에서 분양 받아 사용하였으며, 배지 원료는 모두 경기도 안성시에서 발생한 음식물 쓰레기를 수거하여 사용하였다. 생음식물 쓰레기 케익은 생음식물 쓰레기만을 분쇄기 등을 이용하여 물리적 방법으로 과쇄한 슬러리로부터 고형물을 얻어낸 것이고, 발효물 케익은 위의 생음식물 쓰레기를 *Bacillus Acidocaldarius*를 이용하여 발효한 것만을 원료로 사용하여 고형물을 분리한 것이다. 부형제로 대두박을 케익과 동량으로 (1/1, w/w) 섞고 필요시 부형제를 호밀, 면실박, 옥수수 세립자 등으로 대체하여 사용하였다. Baffle이 있는 250ml병에 40g의 배지를 넣고 고체발효 하였다. 그리고 필요시 여기에 탄소원이거나 질소원이 될수 있는 glucose, galactose, maltose, sucrose, manitol, 당밀, Yeast extract, Malt extract, peptone, soytone, CSL, MSG를 2% (w/w)정도 첨가하거나 미량 원소인  $ZnSO_4$ ,  $CaSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $MgCl_2$ 를 1mM (w/w) 정도 첨가하여 배지를 조제하였다. 모든 제조된 배지는 121℃에서 15분간 습식 멸균하여 사용하였다. 곰팡이들의 현탁액 포자수가  $4.7 \times 10^5$  spores/g의 농도가 되도록 접종하고 25℃에서 정치 배양하면서, 24시간마다 한번씩 흔들고, 일정시간 후 샘플을 취해 생산되는 아밀라아제, 셀룰라아제, 자일라나제의 역가를 측정하였다. 효소 측정방법은 환원당 분석 방법인 DNS방법을 이용하였으며<sup>1)</sup> 효소는 곰팡이 접종후 8일이 지난 시점에서 1g의 시료를 4ml의 살균 증류수로 추출한 후 10000rpm에서 5분간 원심 분리한 상등액으로부터 얻었다. 아밀라아제의 경우는 1% soluble starch를 기질로 하여 1분동안 생성되는 글루코오스의  $\mu$  mole수를 1U로 정의하였으며, 셀룰라아제는 1%의 CMC(Carboxymethyl cellulose sodium salt)를 기질로 하여 1분동안 생성되는 글루코오스의  $\mu$  mole수를 1U로, 자일라나제는 xylan을 기질로 하여 생성되는 자일로스의  $\mu$  mole수를 1U로 정의하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 고체 배양과 액체배양의 비교

우선, 곰팡이로부터 효소를 생산하는 효과적인 발효방법을 찾기 위해 액체 배양과 고체 배양을 비교하였다. 161시간 이후의 액체 배양물로부터 효소 역가를 측정한 결과와 5일후(120시간)고체배양물의 추출물로부터 효소 역가를 측정한 결과 고체 배양을 할 경우 액체 배양의 경우보다 84배 높은 xylanase역가를 보이는 것으로 보아 고체 배양이 액체 배양보다 효소 생산에 있어서 더 우수한 방법임을 알수 있었다. 이러한 고체 배양의 높은 효소 생산성은 다른 연구팀에 의해서도 보고된바 있다.<sup>2)</sup>

### *Bacillus Acidocaldarius*를 이용한 발효물과 생음식물의 비교

음식물 쓰레기에서의 기타균의 생육을 억제하기 위해서 생음식물 쓰레기에서 얻어

진 *Bacillus Acidocaldarius* 균주를 이용하여 선행 발효 후 배지를 제조하여 곰팡이를 이용한 효소생산능을 비교해 본 결과 *Bacillus Acidocaldarius*로 발효한 배지의 경우가 월등히 높은 효소 역가를 나타냄을 알 수 있었다.(그림1) 이러한 발효물과 생음식물간의 효소 발현의 차이가 pH의 영향일 수 있으므로 배양pH를 달리하여 곰팡이를 배양한 후 효소 발현정도를 측정해 본 결과 발효물과 부형제를 섞었을때의 pH인 6.05이하에서는 효소생산이 이루어지지 않는 것으로 보아 생음식물과 발효물의 효소생산차이는 배양pH의 영향인 것으로 추정할 수 있었다. (그림2)

그림1 발효물과 생음식물의 비교

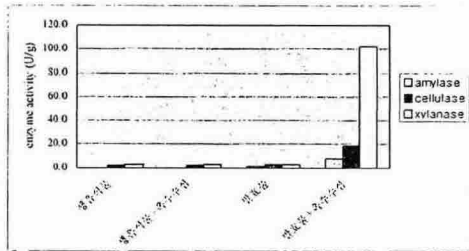
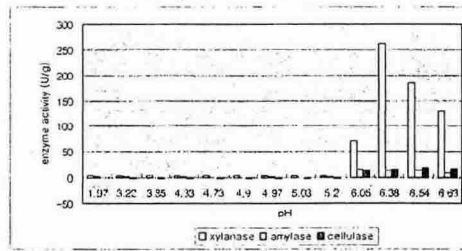


그림2 배양 pH에 따른 효소 생산



### 발효변수들의 최적화

우선 시간에 따른 효소 역가가 증가되는 경향을 살펴봄으로서 가장 최대의 효소역가를 보이는 시점을 찾았다. 발효 5일후 효소 역가는 amylase 33.10 U/g, cellulase 24.41 U/g, xylanase 366.08 U/g으로 최대화 되어 8일까지 유지되는 경향을 보였다. 따라서 이후의 실험에 있어서 발효시간은 8일로 잡았다.

발효온도의 영향을 살펴보기 위하여 발효물 케익과 부형제인 대두박을 1:1 (w/w)로 섞은 배지에서 발효한 후 발효온도에 따른 효소 역가를 측정하였다. cellulase는 30°C에서 발효했을 경우 가장 높은 효소 역가를 보였으며 xylanase는 25°C에서 발효했을 경우 가장 높은 효소 역가를 보였다. 그러나 가장 높은 효소 역가를 보이는 반응온도는 55°C로서 최적화된 발효온도와는 차이를 보였다.

곰팡이 생산에 있어서 수분함량의 중요성은 여러 논문[2]에서 중요하게 다루어지고 있는 요소로서 본 실험에서도 초기 수분함량에 따른 효소생산성을 살펴본 결과 가장 높은 효소역가를 보이는 xylanase의 경우 55%에서 가장 높은 효소 역가를 나타내었다. 특히 낮은 수분 함량에서는 거의 효소가 생산되지 않는 것으로 보아 수분함량의 정도가 효소 생산에 있어서 중요한 요소임을 알 수 있었다.

초기 접종량을 변화 시킬 경우 효소 역가 변화가 어떻게 영향을 보이는지를 알아보았다. 기존에 사용하던 접종량은  $4.7 \times 10^5$  spores/g의 포자농도로 접종하였는데 이를 변화시키기 위해 PDA plate에 키운 곰팡이를 10ml의 물로 현탁하여 포자 현탁액을 얻어내고 이를 hemocytometer로 측정하여 포자수를 각각 달리하여 접종한후 5,8일수의 xylanase activity를 측정하였다. 그 결과 포자수가 증가할수록 생산된 효소역

가가 높아짐을 알 수 있었다.

#### 배지 첨가물에 따른 효소 역가 변화

탄소원에 대한 순수한 효과를 알아보기 위해서 당이 많이 포함되지 않은 옥수수심을 부형제로 사용하여 발효를 진행하였다. 발효물 케익 과 옥수수심을 1:1 (w/w)로 섞은 배지에 탄소원이 될 수 있는 glucose, galactose, maltose, sucrose, manitol, 당밀을 2% 첨가하여 배지를 조제하였다. 12.1 U/g의 amylase역가와 21.2U/g의 cellulase 역가와 118.2U/g의 xylanase역가를 나타낸 galactose에서 가장 높은 효과를 보였으며, 모든 실험구에서 효소생산이 이루어짐을 알 수 있었다.

탄소원과 마찬가지로 방법으로 발효물 케익 과 옥수수심을 1:1 (w/w)로 섞은 배지에 질소원이 될 수 있는 Yeast extract, Malt extract, peptone, soytone, CSL, MSG를 2% 첨가하여 배지를 조제한 후 발효하여 효소 역가를 측정했다. xylanase의 경우 131.5U/g으로 malt extract에서 가장 높은 효소 역가를 보였다.

미량원소첨가에 대한 영향을 살펴본결과 CaSO<sub>4</sub>를 1mM 첨가한 경우가 131.5U/g으로 가장 높은 xylanase 역가를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 최적화 결과는 amylase의 경우 33.10U/g, cellulase의 경우 24.41U/g, xylanase 의 경우 328.84U/g 의 최대 효소 역가를 얻을 수 있었다. 그러나 음식물쓰레기의 성분이 항상 동일하지 않으므로 생산효소 역가가 일정하게 나오지 않으므로 음식물 쓰레기 성분 분석을 바탕으로 체계적인 효소 생산 연구가 더욱 필요하며, 생산된 효소를 이용한 사료화 연구도 더욱 진행되어야 할 것이다.

#### 4.참고문헌

- 1) Young Chul Chung et al. "Purification and properties of extracellular amylase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus* DT5432"(1995) , *Applied and Environmental Microbiology*, APR, 1502-15061.
- 2) Chundakkadu Krishna "Production of bacterial cellulases by solid state bioprocessing of banana wastes"(1999), *Bioresource technology*, 69, 231-239