

## 혐기성 가수분해/산 발효조에서의 음식폐기물 발효 균주 탐색

김중곤<sup>1</sup>, 김시욱<sup>2</sup>

조선대학교 생물신소재학과<sup>1</sup>, 조선대학교 환경공학부<sup>2</sup>

전화 (062) 230-6649, Fax (062) 225-6040

### Abstract

Pilot scale(2.5 ton) three-stage methane fermentation process was developed for the rapid production of methane from food wastes in our laboratory. Eleven strains responsible for the primary semianaerobic hydrolysis/acidogenic fermentation system were isolated and characterized. Among them, the number of gram positive bacteria was eight and that of gram negative bacteria was three. They were rod and showed positive reaction to catalase. The strain K5 was found to have the highest enzyme activities of amylase and protease.

### 서론

우리나라는 해마다 많은 양의 음식물 쓰레기가 발생하고 있으며 대부분을 매립에 의존하는 실정이다. 이는 악취 및 침출수 발생으로 인한 지하수와 하천의 2차 오염과 같은 심각한 문제를 초래한다. 현재 국내에서는 음식물 쓰레기를 재활용하기 위한 방법으로 사료화, 퇴비화를 이용하고 있고 최근들어 에너지화하려는 연구가 심도있게 진행되고 있다. 유기물 쓰레기를 이용한 에너지화는 우리 나라의 경우 1970년대에 시작되어 인축 분뇨나 농촌 폐기물을 이용한 메탄화가 연구·개발되었고, 최근에는 산업화, 도시화가 이루어짐에 따라 다량의 고농도 유기물이 발생하여 유기성 폐기물을 혐기성 소화처리하기 위한 연구가 이루어지고 있다<sup>1-2)</sup>. 그러나 혐기성소화의 경우 발효속도가 느리고 기존에 개발된 단상 소화조는 산충격 때문에 메탄 생산에 있어 효율이 낮다. 따라서 고형 상태의 폐기물을 단 시간 내에 액상으로 전환하기 위하여 가수분해 반응속도를 높임과 동시에 산 충격을 현저히 줄이고 메탄생산 수율을 높일 수 있는 새로운 혐기성 메탄 발효공정의 개발이 시급하다. 본 연구에서는 현재 운전하고 있는 3단계 메탄 발효시스템 가운데 첫 번째 단계인 반 혐기성 가수분해/산 발효조의 발효속도를 높이기 위한 우수 발효 균주를 탐색하여 형태, 생리학적 특성 및 효소 활성 등을 조사하여 미생물 제제로 적합한 최적 균주 개발의 기초 자료를 얻고자 한다.

### 재료 및 방법

본 연구에 사용한 음식물 쓰레기는 조선대학교 구내식당으로부터 공급받았으며 음식물내의 고형물 함량은 17.53%이고 이 가운데 유기물 함량은 91.3%로 조사되었다. 1차 반혐기성 가수분해/산발효조는 용량이 500 ℓ 이고 반응기의 하단에는 폭기를 위한 장치 가 되어 있으며 반응기 상단에 교반을 위한 모터가 설치되어 있다. 반응기의 운전은 음식물이 2일간의 체류시간을 거치며 하루 100 kg을 처리하도록 운전하였다. 실험에 사용된 1차 가수분해/산 발효조의 분리용 배지로는 음식폐기물을 1차 가수분해/산 발효조내에서 발효한 후 발효액을 원심분리하여 상등액의 pH를 7.0으로 조절하고 1.5% agar를 첨가한 후 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다.

발효균주의 탐색과 분리방법은 1차 가수분해/산 발효조내의 발효액을 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 이용하여 연속희석하여 각각의 농도에서 100  $\mu$ l를 취하여 1차 가수분해/산 발효액으로 제조된 배지에 도말한 후 45 °C에서 24~48시간 동안 호기성 및 혐기성 배양하였다. 고체배지내에 나타난 성상이 다른 각각의 colony를 순수 분리하였으며 분리한 gram 양성균의 경우 GPI 동정 kit(bioMerieux Vitek, France)를 이용하고 gram 음성균의 경우 GNI 동정 kit(bioMerieux Vitek, France)를 이용하여 생화학적 특성을 조사하였다. 또한 발효조내의 우점종 균주들의 amylase, protease의 활성도를 정량적으로 측정하였다. 효소액으로는 분리용배지에서 45°C로 진탕배양하여 일정 시간마다 sampling한 후 배양액을 원심분리(12,000  $\times$ g, 10min)하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 각 균주들의 세포의 amylase 활성은 수용성 전분을 기질로 사용하여 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)로 발색시킨 후 흡광도를 측정하였고(540 nm)<sup>3)</sup>, protease 활성은 Blumentals 등<sup>4)</sup>의 방법을 이용하여 casein을 기질로 사용하여 측정하였다. 효소활성 1 unit는 amylase의 경우 전분으로부터 1분간 1  $\mu$ M의 환원당을 방출시키는 효소의 양으로 정의하였으며, protease의 경우 1분간 0.1 흡광도가 증가된 효소량을 1 unit로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

반혐기성 가수분해/산 발효조 시료로부터 호기성 및 혐기성 배양하여 분리한 균주는 총 11개 균주(K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11)이며, 모든 균주가 간균이고 그람 양성균이 8종(K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8), 그람 음성균이 3종(K9, K10, K11)이었다. Catalase에 대하여 모두 양성반응을 나타냈으며 oxidase에 대해서는 K8 균주를 제외한 모든 균주가 양성반응을 보이는 특징을 나타내었다.

분리된 발효균주의 생화학적 특징으로는 당 분해시험에서 glucose, mannitol, sucrose등에는 11개 균주 모두 양성반응을 보였으며, pyruvate와 lactose를 이용하는 것에 대해서는 그람 양성균의 경우 각각 K1과 K6 균주를 제외한 나머지 균주에서 음성반응을 보였다. 또한 raffinose, pullulan, inulin, melezitose의 경우에는 그람 양성균 8개 균주 모두 음성반응을 나타내었다. 그람음성균의 경우에는 maltose와

lactose를 이용하는 시험에서 K10을 제외한 K9과 K11은 양성반응을 보였으며, urea의 경우 그래프양성균과 그래프음성균 가운데 K11만이 양성반응을 나머지는 모두 음성반응을 보였다.

각 균주들의 amylase 활성은 Fig. 1의 (a)에 나타난 바와 같이 K5이 다른 균주들에 비해 월등히 뛰어났으며 다음으로 K2, K11, K3의 순으로 활성이 높은 것으로 관찰되었다.

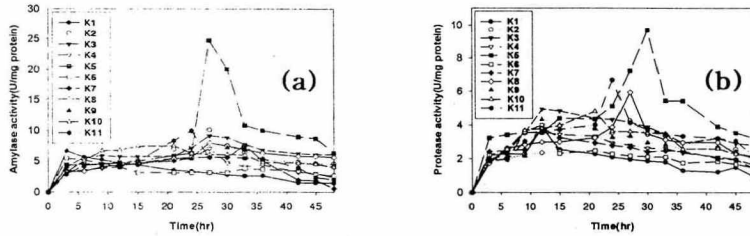


Fig. 1. (a) Comparison of amylase activity of the strains isolated from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

(b) Comparison of protease activity of the strains isolated from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

Protease의 활성으로는 역시 K5이 높은 활성을 보여주고 있으며, K11, K8, K3의 순으로 활성이 높은 것으로 관찰되었다. 따라서 전분분해작용에 활성이 높은 K2, K3, K5, K11 등은 전분이 주종을 이루는 유기성 폐기물에, 단백질이 주종을 차지하는 음식물폐기물의 처리에는 K3, K5, K8, K11를 종균제로 사용한다면 좋은 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

#### 요약

본 실험실에서는 음식폐기물을 이용하여 단시간내에 메탄을 생산할 수 있는 Pilot 규모(2.5톤)의 3단계 메탄 발효 공정을 개발하여 운전하고 있다. 3단계 메탄 발효공정 가운데 첫 번째 단계인 반혐기성 가수분해/산발효조에서 유기물 분해균주를 11개 분리하여 그 특성을 조사하였다. 분리된 균주는 gram 양성균이 8개 균주, gram 음성균이 3개 균주이며, catalase에 대해서는 모두 양성반응을 보였고 모두 간균의 형태이었다. 분리된 균주들 가운데 amylase와 protease의 활성은 분리균주 K5이 다른 균주들에 비해 매우 우수하였다.

## 참고문헌

1. Callaghan, F. J., D. A. J. Wase, K. Thayanithy, C. F. Forster. Continuous co-digestion of cattle slurry with fruit and vegetable wastes and chicken manure. 2002. *Biomass and Bioenergy* 27, 71-77.
2. Lastella, G., C. Testa, G. Cornacchia, M. Notornicola, F. Boltasio, Vinod Kumar Sharma. Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. 2002. *Energy Conversion and Management* 43, 63-75
3. Bernfeld, P., 1955. Amylases,  $\alpha$  and  $\beta$  Methods Enzymol. 1, 149-158
4. I. I. Blumentals. A. S. Robinson, and R. M. Kelly. Characterization of sodium dodecyl sulfate-resistant proteolytic activity in the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(7), 1992-1998.