

고농도 유기산폐수의 효모에 의한 분해연구

김 식 원 · 허 병 기 · †김 은 기
인하대 화공 · 고분자 · 생물공학부
(접수 : 1998. 8. 18., 게재승인 : 1999. 3. 9.)

Characteristics of Organic Acid Degradation by Yeast

Sukwon Kim, Byungki Hur, and Eunki Kim†
School of Chemical Engineering and Science, Inha University, Inchon, Korea 402-751
(Received : 1998. 8. 18., Accepted : 1999. 3. 9.)

Characteristics of organic acid degradation by isolated yeast strain was investigated. Optimum initial pH was 5. Increase in cell mass was proportional to the decrease in organic acid degradation. Also no accumulation of byproduct was observed during degradation. Acetic acid degraded fast, followed by butyric acid and propionic acid in order. No significant substrate inhibition was observed up to 12 g/L of acetic acid and 7 g/L of propionic acid, respectively. However, inhibition of butyric acid was significant above 4 g/L. Cell mass yield was 0.2-0.4 g cell/g acids and decreased at high organic acid concentration. 95% of organic acid (7.5 g/L), corresponding to 13,000 ppm, was degraded in 30-40 hours.

Key Words : Organic acids, Yeast, Biodegradation

서 론

고농도 유기폐수는 식품관련 산업 등에서 배출되는 BOD 3,000~20,000 ppm의 폐수로서 비교적 미생물에 의해 분해가 잘 되는 유기폐수를 말한다. 이러한 고농도 폐수는 직접 활성오니법으로 사용하기에는 너무 높은 BOD농도 때문에 공업용수로 회석을 하거나 혐기성 처리장치에서 1차 처리 후 활성오니법으로 처리된다. 그러나 회석을 할 경우 처리용량의 증가로 시설비용이 증가하게 된다. 또한 혐기성 전처리 방법은 체류시간이 길어서 시설이 커지며 운전 및 유지가 어려운 단점이 있다. 혐기성 처리는 유기물이 유기산으로 전환되는 유기산 생성단계와 유기산이 메탄으로 생성되는 메탄생성단계로 크게 구분된다. 두 단계반응이 보통 한 탱크 내에서 일어나나 이를 두 단계로 분리하여 2단계로 운전하는 공정이 사용되기도 한다(1). 이 경우 1단계인 유기산 생성단계는 짧은 체류시간(5-6시간)내에 주로 박테리아에 의해 유기물을 유기산으로 전환시킨다(2) 유기산은 주로 초산, 프로피온산, 뷰티릭산 등으로 구성되어 있다. 이러한 유기산은 효모에게는 좋은 탄소원이 될 수 있다. 따라서 1차로 생성된 유기산을 탄소원으로 사용하는 효모를 배양한다면 고농도 유기폐수를 처리할 수 있게 된다. 효모는 낮은 pH에서도 생장이 가능하고 박테리아보다 쉽게 침전될 수 있고, 잉여로 생성된 효모는 사료 등으로 이용할 수 있는 장점이 있다(5, 10).

유기산을 분해하는 효모에 대한 연구는 그리 많지 않다(3-9)

Park 등은 돼지의 분뇨를 혐기성으로 저장한 상등액에 존재하는 휘발성지방산(Volatile Fatty Acid, VFA)을 혐기성 상황에서 분해하는 효모를 조사하였다(3). 이 경우 혐기성에서 VFA를 분해하기 때문에 장시간이 소요되었다. 따라서 호기성에서 빠른 속도로 VFA를 분해하는 효모를 사용하는 것이 중요한 일이다. Henry 등은 *Candida sp*에 의한 분해연구에서(5-9) 분뇨상등액의 유기산을 제거함으로써 총산소소모량이 상당히 감소하였음을 보고하였다(9). 유기폐수, 특히 식품폐수의 경우 독성물질이 함유될 가능성이 적어서 생성된 효모는 동물의 사료로 사용될 보고가 있다(5, 10). 본 실험에서는 이러한 목적의 제1단계로서 유기산을 분해하는 효모를 분리하였고, 이 분리효모의 유기산 분해 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

유기산 분해 효모 분리

인근 식품공장의 폐수처리시설 중 혐기성 분해가 2단계로 분리된 폐수처리시설의 1차 유기산 생성탱크에서 시료 5mL를 취하였다. 이 시료를 유기산배지(표 1) 50 mL (500 mL 플라스크)에 접종하고 30°C, 200 rpm 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양액 5 mL를 다시 50 mL 유기산 배지에 접종하는 배양실험을 5회 반복하였다. 이 배양액을 유기산 배지 plate(유기산배지 - 15% agar)에서 배양하여 성장하는 콜로니 중 현미경의 관찰을 통해 효모를 분리 확인하였다.

배지 및 배양조건

분리효모의 저장 및 접종배양용으로 YM배지(Yeast Extract 3 g/L, Malt Extract 3 g/L, Peptone 5 g/L, 포도당 10 g/L)에

† Corresponding Author School of Chemical Engineering and Science, Inha University, Inchon, Korea 402-751
Tel : 032-860-7514, Fax : 032-875-0827
e-mail : ekkim@inha.ac.kr

sodium propionate(1 g/L)를 박테리아 성장저해제로 첨가하였다. YM slant를 이용하여 한 달마다 계대배양 하였다. 유기산 배지로는 1차 혐기성 소화처리수(유기산조)의 상등액과 유사한 조성의 합성폐수를 제조하여 사용하였다. 휘발성 지방산을 제외한 합성폐수의 조성은 리티당, K₂HPO₄, 0.2g, (NH₄)₂SO₄, 0.22g, NH₄HCO₃, 0.65g, Na₂CO₃, 0.25g, CaCl₂, 0.055g, Yeast Extract 0.1g, Trace metal 용액, 1 mL이며 휘발성지방산으로는 뷰티릭산, 초산, 프로피온산의 무게비가 4:3:0.5인 지방산의 혼합을 사용하였다. 휘발성지방산의 농도는 실험종류에 따라 변화시켰으며 유기산 배지는 멸균하지 않고 사용하였다. Trace metal 용액은 리티당 H₃BO₃, 50 mg, ZnCl₂, 50 mg, CuCl₂ · 2H₂O, 40 mg, MnCl₂ · 4H₂O, 500 mg, (NH₄)₂MnO₂ · 4H₂O, 50 mg, AlCl₃ · 6H₂O, 320 mg 2M HCl 1 mL이었다. 배양은 YM액체배지 10 mL(100 mL 플라스크) 30℃, 200 rpm으로 2일간 배양한 효모를 유기산배지 100 mL (500 mL 플라스크)에 2 mL씩 접종 후 30℃, 200 rpm으로 5일간 배양하였다

분석

균체농도는 배양액 20 mL를 4℃, 6000 rpm, 20분간 원심분리 후 침전된 효모를 증류수로 3회 세척 후 알루미늄 접시에 옮겨 85℃에서 20시간 건조시킨 후 중량을 측정하였다. 각각의 유기산은 FID detector를 장치한 가스크로마토그래피(GC-14B, Shimadzu Co, Japan)를 이용하여 정량분석 하였다. 사용 column은 15 m×0.53 mm의 Fused silica capillary column (0.53 μm thickness)(Scipelis, USA)를 사용하였고 Injector, Detector는 모두 200℃, 칼럼온도는 110℃, 2분 유지 후 8℃/min으로 증가시키고 160℃에서 1분간 유지하였으며 split ratio는 1:100으로 사용하였다. 배양상등액 1mL를 원심분리(13000 rpm, 2분)한 후 상등액에 증류수, 1N 인산용액, 5 g/L Pivalic acid (Internal standard)를 5:3:1:1의 부피 비로 혼합하여 1 μL를 주입하였다. 유기산의 농도는 미리 작성된 표준물질과의 비교를 통해 정량분석 하였고 3번 반복 분석후 평균값을 취하였다. 시료의 총 유기탄소량(Total Organic Carbon; TOC)은 TOC analyzer(Siveres 800, USA)로 분석하였다.

결과 및 고찰

혼합유기산의 분해특성

분리한 균주는 현미경 관측결과 출아법(budding)으로 성장하여 효모로 판단하고 동정 중이다. 배양이 경과함에 따라 균체는 백색을 띠면서 성장하였다. 효모는 원심분리에 의해 쉽게 침전되었고 방치 시 1시간 이내에 침전하였다. Figure 1에는 혼합유기산을 기질로 사용하였을 경우 반응시간에 따른 유기산의 분해, 미생물의 성장, pH의 변화를 보여주고 있다 초산이 가장 빨리 분해되기 시작하였으며 뷰티릭산, 프로피온산의 순으로 분해가 되었으며 분해된 유기산의 양은 세포의 성장량과 비례하였다. 또한 TOC측정결과 유기산의 잔류농도가 TOC와 유사한 것으로 보아서 분해된 유기물은 배양액 내에 중간 생성물 없이 곧바로 세포 내로 흡수, 분해되거나 세포내의 물질로 전환되었음을 간접적으로 보여주고 있다. 이는 폐수처리에서 어떤 물질이 중간 생성물로 단순전환 될 경우 전체 BOD는 감소하지 않음을 고려할 때 폐수처리에 필요한 특성임을 알 수 있다. 초기

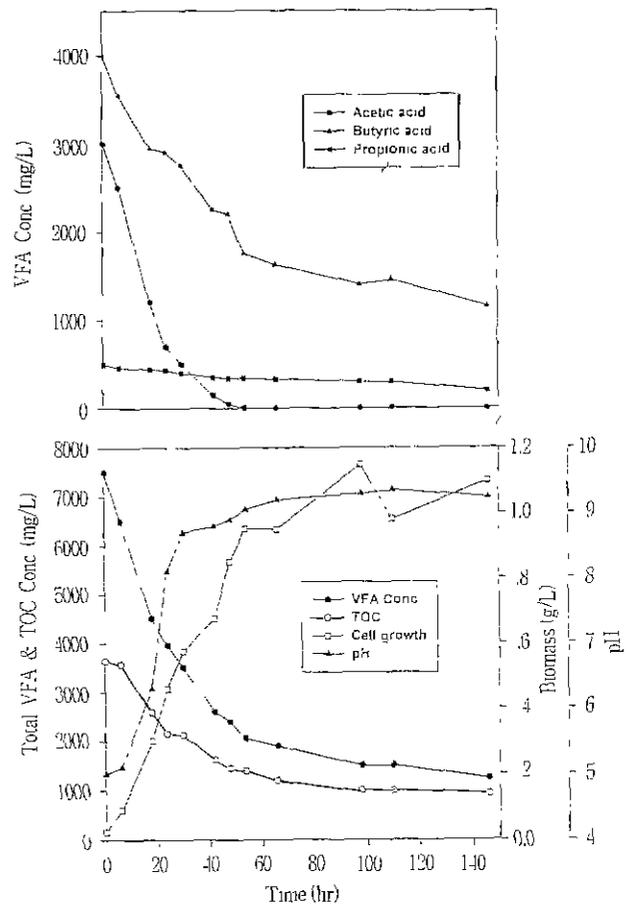


Figure 1. Time-course degradation of mixed volatile fatty acids (VFA) Medium pH, initially set at 5, was not controlled.

pH가 5인 경우 유기산의 분해가 진행되면서 cell mass의 증가와 함께 pH는 증가하여 pH 9에 도달하였다.

초기 pH가 혼합유기산 폐수의 분해와 균체 성장에 미치는 영향

pH 변화가 효모에 의한 혼합유기산의 분해특성 및 균체의 성장특성에 미치는 영향을 규명하기 위하여, 혼합 유기산의 초기 농도를 7500 ppm, 균체초기농도를 0.03 g/L로 고정하고 초기 pH를 4, 5, 6, 7로 변화시켜가면서 균체성장과 유기산분해속도를 측정하였다. 본 연구에서는 다음 식들로 정의되는 균체의 비성장속도(μ), 균체 단위 질량당의 유기산분해속도(Q_s), 균체수율($Y_{X/S}$) 및 유기산분해율, $Y(\%)$, 을 pH의 함수로 규명하였다.

$$\mu = \frac{1}{\Delta t} \ln \frac{X_f}{X_i} \tag{1}$$

$$Q_s = \frac{\mu}{Y_{X/S}} \tag{2}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \tag{3}$$

$$Y(\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \tag{4}$$

윗식에서 $X_i, X_f, \Delta X, \Delta S$ 및 Δt 는 대수기시작과 마지막 순간의 균체농도(g/L), 균체농도의 차이값(g/L), 유기산농도의 차이값(g/L)과 소요되는 시간(hr)을 나타내며, S_i 와 S_f 는 반응초기와 반응말기에서의 유기산농도(g/L)를 의미한다

Figure 2는 위에서 정의된 네 가지 특성치와 초기 pH 사이의 관계를 나타내고 있다. 초기 pH가 4인 경우에 대한 μ, Q_s 및 Y 값은 초기 pH 5, 6, 7에 대한 특성치보다 현저하게 낮은 값을 나타내고 있다. 반면 균체 수율은 초기 pH에 영향을 없음을 알 수 있다. 초기 pH 변화가 반응시간에 따른 TOC의 변화특성에 미치는 영향이 Figure 3에 표시되어있다. 초기 pH 4를 제외하고는 반응시간에 따른 TOC값은 비슷한 경향으로 감소하여 반응 60시간 근방에서는 1000 ppm까지 감소하였다 이는 분해되는 지방산이 다른 중간체로 전환되어서 TOC로 측정되지 않고 바로 균체로 전환되거나 이산화탄소로 분해됨을 의미한다.

혼합유기산내의 각 성분 유기산이 위와 같은 결과에 어떤 영향을 미치는가를 분석하기 위하여 아세트산, 뷰트릭산, 프로피온

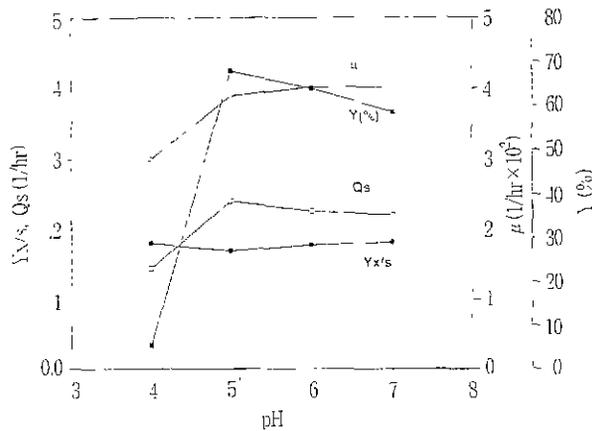


Figure 2 Effects of initial pH on Y (%), Q_s , μ and $Y_{x/s}$. Medium pH, initially set at 4, 5 and 6, was not controlled.

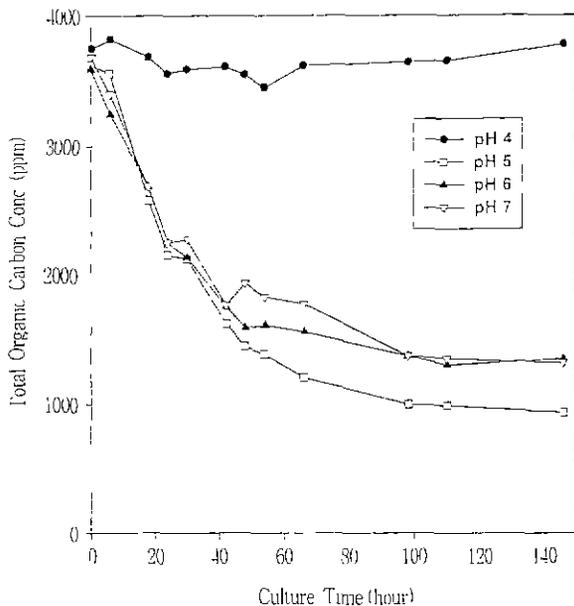


Figure 3. Characteristics of TOC variation at different initial pH.

산 각각에 대한 $Y_{S/X}, Q_s$ 및 Y 와 초기 pH값, 균체의 최대농도(X_{max}) 및 최대농도변화 (ΔX_m)와 초기 pH값 사이의 관계를 Figure 4에 도시하였다. 뷰트릭산과 프로피온산에 대한 Q_s 값은 초기 pH값이 증가함에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었으나 아세트산인 경우 초기 pH 5이상에 대한 Q_s 값은 초기 pH 4인 경우에 대한 Q_s 값의 3배 이상 큰 값을 나타내고 있다. 이 결과에 의하면 본 연구에서 사용한 효모는 pH 4에서는 아세트산을 기질로 거의 사용하지 않음을 알 수 있다. 이 결과는 바로 유기산의 분해율, Y 특성치에 영향을 미쳐 pH 4인 경우 각 유기산의 분해율이 10% 미만이었으나 pH 5, 6, 7인 경우에는 분해율이 20% 이상이었다. 특히 아세트산인 경우 pH 4에서는 분해율이 5% 내외이었으나 pH 5, 6, 7에서는 모두 분해되는 결과를 나타내고있다. 균체의 성장특성을 나타내는 X_{max} 값과 ΔX_{max} 값 역시 pH 4에서는 pH 5, 6, 7에 비하여 1/5이하의 값을 나타내어 균체가 거의 성장하지 않았다

균체초기농도 및 유기산초기농도가 비성장속도(μ)와 유기산분해속도 (Q_s)에 미치는 영향

초기 pH를 5로 고정하고 균체 초기농도와 유기산의 초기농도가 균체의 비 성장속도와 유기산의 분해속도에 미치는 영향을 규명하여 보았다(Figure 5) 균체의 초기농도가 일정한 경우 유기산의 농도 3500 ppm까지는 유기산농도 증가에 따라 균체의 비 성장속도 도 증가하나 3500 ppm이상에서는 유기산농도 증가에 따라 비 성장속도 가 감소하는 기절저해 영향을 보이고 있다. 이런 경향은 균체 초기농도 0.17, 0.25, 0.58 및 1.28 g/L 모두에 대하여 동일함을 나타내고있다. 유기산농도를 고정하고 균체의 초기농도를 변화시켰을 때 균체농도가 증가하면 비 성장속도는 감소한다. 이와 같은 결과는 유기산의 초기농도 2000, 3500, 5500, 7500 및 8500 ppm 모두에서 동일하였다.

Figure 6은 균체 초기농도 및 유기산의 초기농도와 식(2)의 유기산분해속도 사이의 함수관계를 나타내고 있다. 균체 초기농도 0.17 내지 1.28 g/L 범위와 유기산 초기농도 2000 내지 8500 ppm 사이의 범위에서는 균체의 초기농도 변화와 유기산의 초기농도 변화가 유기산분해속도에 뚜렷한 영향을 미치지 않는다. Figure 6의 실험범위에 대한 유기산분해속도 Q_s 는 0.2 내지 0.25hr⁻¹범위내에 대부분 분포되었다.

균체초기농도 및 유기산초기농도와 유기산분해시간 사이의 함수관계

혼합유기산의 농도를 활성오니처리에 적합한 농도이하로 저하시키는데 필요한 반응시간을 균체의 초기농도 및 유기산의 초기농도의 함수로 규명하여보았다. 혼합유기산의 농도가 500 ppm이면 활성오니처리에 무리가 없다고 판단하여 최종 유기산농도를 500 ppm으로 고정하였다. Figure 7은 유기산의 초기농도를 매개 변수로 했을 경우 균체의 초기농도와 유기산의 최종농도가 500 ppm까지 분해되는데 소요되는 반응시간 사이의 함수관계이다 유기산의 초기농도가 3500 ppm인 경우 0.17 내지 1.28 g/L 사이의 균체의 초기농도 범위에서는 최종농도 500 ppm까지 분해되는데 소요되는 반응시간이 20시간보다 적었다. 식품공장 폐수인 유기산 농도 8500 ppm인 경우에도 균체의 초기농도를 128 g/L로 유지시키면 500 ppm까지 분해시키는데 소요되는 시간이 34시

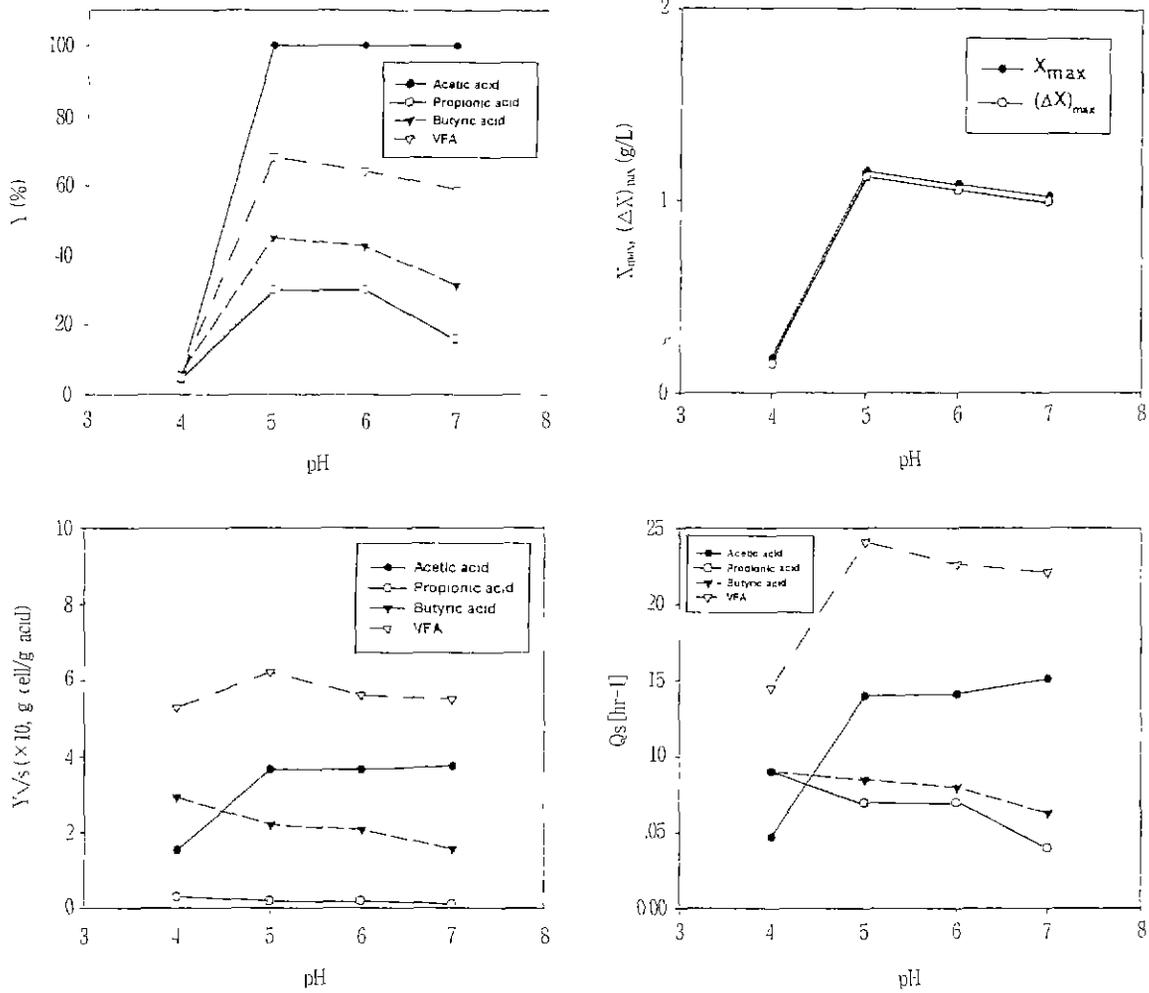


Figure 4 Effects of initial pH on Y(%), X_{max} , $Y_{x/s}$ and Q_s .

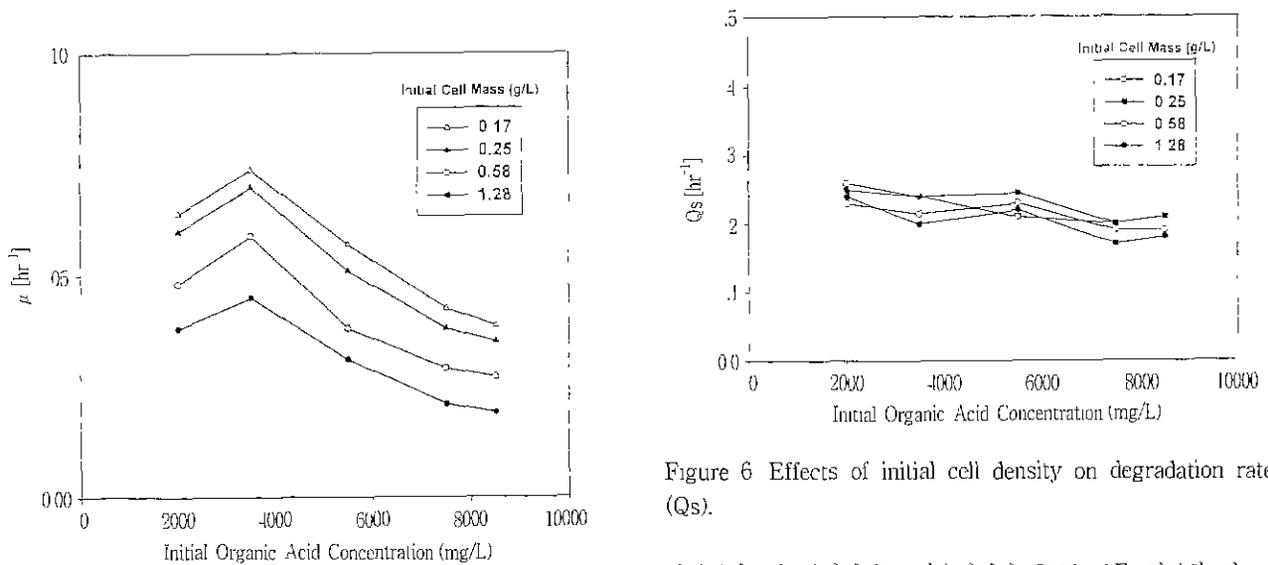


Figure 5 The effects of initial cell density and organic acid concentration on μ . Cells grown in the organic acid-containing medium was collected and different amount was inoculated to achieve initial cell density, respectively.

Figure 6 Effects of initial cell density on degradation rate (Q_s).

간이었다. 이 실험결과는 반응기내의 효모농도를 적당한 값 이상으로 유지시키면 상당히 짧은 시간내에 유기산의 농도를 원하는 값까지 낮출 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

유기산을 분해하는 효모에 대한 연구결과가 국내, 국외에 보고되어있으며 이 경우 폐지의 분해를 장시간 혐기성 저장할 때

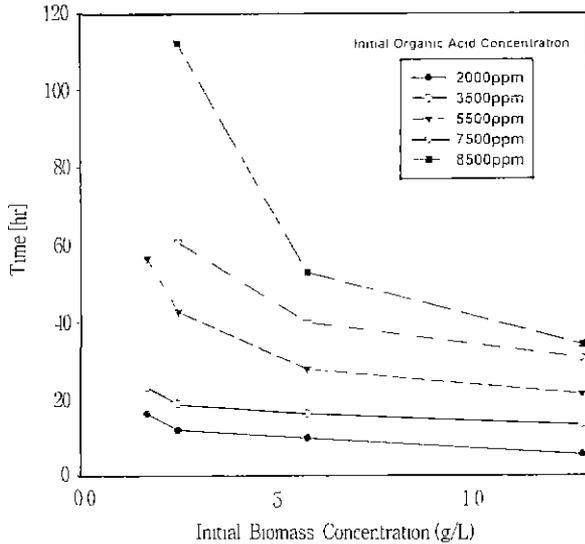


Figure 7 Effects of initial organic acid and biomass concentrations on reaction time to degrade below 500 ppm.

생성된 유기산이 포함된 상등액을 효모를 이용, 혐기성 상태에서 분해하는 특성을 조사하였다(3,9). 이 경우 분해속도가 상당히 느려서 9000 ppm의 유기산을 분해하는데 거의 15일 이상이 소요되었다 그러나 본 연구에서 분리한 효모를 호기성 조건에서 배양한 결과 훨씬 빠른 속도로 유기산이 분해되고 있음을 확인하였다 따라서 효모를 이용한 처리공정에 필요한 추가연구, 즉, 반응기형태, 고농도세포 유지방법등을 통해서 최적공정을 확립한다면 현재의 혐기성처리에 이은 활성오니법에 소요되는 대규모 시설/비용 등을 유기산 생성조-효모처리조로 대체시킬 수 있을 것이다. 이 결과를 이용, 식품공장등에서 배출되는 고농도 유기폐수를 짧은 시간에 처리하고 잉여효모를 이용할 수 있으리라 본다.

결 론

유기산 생성조에서 분리한 효모의 분해특성을 조사한 결과 초기 pH가 5이상에서 분해가 일어났으며 혼합유기산의 경우 초산이 가장 빠른 속도로 분해되었다. 높은 유기산 농도(7.5 g/L, BOD 약 13000 rpm)에서도 30~40시간만에 95% 이상의 분해율을 보임을 알 수 있었다. 이는 기존의 혐기성처리에 의한 고농도유기폐수처리보다 훨씬 빠른 속도이며 또한 잉여로 발생된 효모는 가축의 사료로 쓰일 수가 있다.

감사의 글

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

- Massey, M L., F. G Pohlard (1978) Phase separation of anaerobic stabilization by kinetic control., Research J. W.P.C.F., 63, 2205-2209
- Chu, A. Mavine, D.S., Kelly H.G. and W.D., Ramey (1994), Volatile fatty acid production in thermophilic aerobic digestion of sludge., Wat. Res, 28, 1513-1522
- Hong, S, S, N. H. Lee, N. Y. Park (1991) Production of a *Schizosaccharomyces* sp HL biomass from supernatant of anaerobically fermented pig waste, Process Biochemistry, 26, 23-29
- Schusse, L.J., J.E., Atwater (1996), A continuous alcohol oxidase bioreactor for regenerative life-support., Enz. Microbiol, Tech., 18(3), 229-235
- Henry, D.P. (1975) *Candida ingens* as a potential fodder protein. Aust vet. J. 51, 317-319
- Henry, D. P., Green Field, P. F., Ouano, E. A., Thomson, R H, G, Fleming (1978) Efficiency of protein production from yeast grown in liquor derived from anaerobically fermented tropical pasture, Nature, 274, 619
- Henry, D. P, R., H., Thomson (1979) Growth of *Candida ingens* on supernatant from anaerobically fermented pig waste: effects of temperature and pH Appl. Env. Microbiol., 37, 1132-1136
- Henry, D. P., Greenfield, P. F. R., H., Thomson (1983) The pellicle-growth of *Candida ingens*; an organism for the treatment of anaerobically fermented animal waste and the production of protein. Eur J Appl Microbiol. Biotechnol. 18 · 109-113
- Henry, D.P. R.H. Thomson (1993) A new process to treat strong biological waste, Water. Sci. Tech. 27(1), 213-218
- Plata, F., Mendoza, G. D., Barcenagama, G. R., S., Gonzalez (1994) Effect of a Yeast culture (*Saccharomyces-Cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steeres fed oat straw based diets, Anim. Feed. Science. Technol 49(3) 203-210