

# 에탄올 발효방법에 따른 음식물류 폐기물의 바이오에탄올 생산성 비교

강희정 · 리홍선 · 김용진<sup>1</sup> · 김성준\*

전남대학교 환경공학과, <sup>1</sup>목포해양대학교 해양환경공학

## Comparison of Bio-ethanol Productivity Using Food Wastes by Various Culture Modes

Hee-Jeong Kang, HongXian Li, Yong-Jin Kim<sup>1</sup>, and Seong-Jun Kim\*

Dep. of Environmental Engineering, Chonnam National University, Korea

<sup>1</sup>Dep. of Maritime Environmental Engineering, Mokpo National Maritime University, Korea

**Abstract** In order to improve bio-ethanol productivity by various cultivation methods in this paper, the culture modes using food wastes, such as batch culture, high-cell-density fermentation, SSF (simultaneous saccharification and fermentation) by fill & draw, continuous culture by fill & draw were performed and their productivities were compared. SSFs by fill & draw were performed by continuous decompression using 1 L evaporator system, and by 10 L bioreactor without decompression. In addition, the continuous cultures by fill & draw mode using SFW (saccharified food wastes) medium were performed by changes of 40% culture broth with intervals of 12 h (0.03 h<sup>-1</sup>), 6 h (0.07 h<sup>-1</sup>), 3 h (0.13 h<sup>-1</sup>). Consequently, productivities of bio-ethanol were 2.52 g/L-h and 1.30 g/L-h in batch culture and high-cell-density fermentation, respectively. The productivities of SSF by fill & draw showed 2.24 g/L-h and 2.03 g/L-h in continuous decompression with 1 L evaporator and 10 L bioreactor without decompression, respectively. Also, the productivities in continuous culture by fill & draw modes showed 2.02 g/L-h, 4.07 g/L-h and 6.25 g/L-h by medium change with intervals of 12 h, 6 h, and 3 h, respectively. In conclusion, the highest ethanol productivity was obtained in the continuous culture mode by fill & draw with dilution rate of 0.13 h<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Ethanol, productivity, batch, high-cell-density, SSF, fill & draw, continuous culture, food wastes

### 서 론

현 인류의 에너지 자원에 관한 문제는 국가를 넘어 전 세계적인 문제가 되고 있다. 이에 여러 국가에서는 대체 에너지 개발을 위해 노력하고 있으며, 특히 수송용 에너지를 대체할 수 있는 바이오 에탄올은 저장이 가능한 에너지원으로, 열원으로의 이용뿐만 아니라 화학연료 생산을 위한 재료로서 바이오 에탄올에 대한 기술개발이 활발하게 수행되고 있다.

바이오 에탄올 생산기술로는 1세대 원료인 곡물로 미국과 브라질을 중심으로 옥수수, 사탕수수, 폐당을 이용하여 당질 및 전분질계로부터 발효 가능한 당을 생산하고, 생성당을

효모 등의 미생물을 이용하여 에탄올을 발효 생산하고 있다 [1]. 2세대 원료는 목질계로 대나무, 왕겨, 갈대, 벼짚 등을 이용하여 물리화학적 당화나 셀룰로오스를 분해하는 효소를 첨가하여 셀룰로오스를 당으로 전환시켜 에탄올을 발효 생산하고 있다 [2]. 제 3세대 원료는 해조류로 우뚝가사리, 김, 꼬시래기 같은 홍조류는 탄수화물을 많이 포함하고 있어 바이오 에탄올 원료로 사용되고 있으며, 다시마, 모자반, 툫 같은 갈조류는 성장이 빠르고 단위 면적당 생산성이 높다 [3]. 최근에는 이러한 갈조류인 다시마로부터 바이오 에탄올을 생산하고 있다 [4]. 그러나 1세대 원료인 당질 및 전분질계 바이오매스는 인류가 사용하는 식량이기 때문에 곡물가 폭등 등의 문제점을 지니고 있어 합리적인 기질이라 볼 수 없으며, 2세대 원료인 목질계 바이오매스는 전처리 용액의 처리 및 부산물 형성을 최소화할 필요가 있으며, 3세대 원료인 해조류는 생산효율이 1세대 2세대보다 높지만 쉽게 구하기

### \*Corresponding author

Tel: +82-62-530-1864, Fax: +82-62-530-0864

e-mail: seongjun@chonnam.ac.kr

어려운 단점이 있다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해서는 친환경적인 새로운 형태의 바이오매스의 도입과 바이오에탄올로의 적용기술이 개발되어야 한다.

한편, 폐기물관리법에 의하여 2005년부터 젓은 쓰레기의 직매립이 금지되었으며, 2013년부터는 런던협약에 의해 음식물 쓰레기 폐수(침출수)의 해양 배출이 전면 금지되어 전량 육상처리 할 계획이다 [5]. 음식물쓰레기는 우리나라에서 매년 대량으로 발생하고 있고 많은 자치단체들은 아직도 친환경적인 처리 대안 찾기에 고심 중이다 [6]. 현재 음식물 쓰레기의 처리 및 자원화 기술에는 발효 및 건조에 의한 감량화, 호기성 또는 혐기성 상태에서 미생물에 의한 퇴비화, 건조에 의한 사료화, 혐기성 분해에 의한 연료화 등이 있다 [7]. 각 기술들은 나름대로의 장단점을 지니고 있으나, 이용되고 있는 자원화기술들이 대부분 종래의 저급 자원화기술 단계에서 벗어나지 못하고 있다. 그러나 음식물쓰레기는 미생물의 기질로 이용될 수 있는 다양한 영양물질들이 함유되어 있는 것에 초점을 맞추어 발효산업의 배양기질로 이용할 수 있다는 인식전환이 필요하다.

따라서 당 연구팀에서는 음식폐기물을 이용하여 바이오에탄올로 전환하는 기술을 개발하기 위해 그의 적합성을 조사한 결과 충분히 타당성이 있음을 이전 연구에서 확인하였다 [8]. 본 연구에서는 음식폐기물에 최적인 발효방식을 찾기 위해, 회분식, 연속배양식, 동시당화발효 등의 배양방법을 검토하여 생산성이 최대로 얻어지는 배양방법을 결정하고자 한다.

지금까지 알려진 에탄올 발효 방법에는 회분식 [9-10], Fed-batch식 [11-12], Mell-Boint 반연속식, 연속발효 [13] 등이 있다. 회분식 공정은 오랫동안 주류 생산에 사용한 경험이 있으며 반응조 구조가 간단하고 오염가능성이 낮은 장점으로 인해 현존하는 대부분의 상용프로세스로 채택하고 있다. 그러나 생산성이 낮고 반응전의 준비단계 및 반응 후의 세척 등에 소모되는 시간과 노동력이 크며 기질 저해 등에 취약한 단점이 있다 [14]. 연속배양은 신선한 배지를 일정한 속도로 발효조로 공급하면서 동시에 같은 양의 발효배양액을 배출시켜 발효조 내의 배양액을 항상 일정하게 유지하면서 발효하는 방법이다. 연속배양에서는 기질농도, 용존산소의 농도, 대사생성물의 농도, pH 등의 환경조건이 항상 일정하게 유지되기 때문에 증식속도를 임의로 조절할 수 있는 것이 특징이다. 또한, 생산성이 높고 다른 공정에 비해 노동력이 적게 들고, 자동제어를 통한 제품의 균질성을 높이고, 정상상태 (steady state)를 유지하기가 쉬워 미생물의 생리대사 및 유전에 관한 연구에 도움을 줄 수 있다. 그러나 배양중에 균주의 변이발생 가능성이 있고, 장기간 배양중에 무균상태를 유지하는 것이 어려워 오염에 대한 위험성이 높으며, 배양액 중의 생성물 농도가 낮아 상대적으로 분리 회수 비용이 많이 드는 단점이 있다 [15]. 연료용 에탄올 생산 공정은 크게 분리당화발효 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 공정 [16]과 동시당화발효 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)공정 [17]으로 나눌 수 있다. 동시 당화발효 공정은 기존의 당화와 발효가 분리된 공정에 비해 반응기

수를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 생성된 당에 의한 생산물 저해 현상 등을 방지할 수 있다. 동시 당화발효 공정에서는 당화과정에서 글루코오스가 생성되자마자 효모가 발효과정에 의해 글루코오스를 바로 제거하고 반응기내에 당의 축적을 최소화할 수 있다. 이러한 이유 때문에 동시 당화발효 공정은 분리당화발효 공정에서 나타나는 최종 생성물의 억제작용을 방지할 수 있고 효소의 가수분해 반응을 향상시킬 수 있다. 부가적 장치비의 절감과 낮은 효소 투입량에 의한 비용감소 효과를 볼 수 있고, 반응기내에 에탄올이 존재하므로 오염문제를 감소시킬 수 있는 장점이 있다.

이러한 배양법들을 토대로 하여, 본 연구에서는 음식폐기물을 분쇄하여 효소로 가수분해한 당화액을 이용하는 회분식 에탄올발효, 효모 고밀도 연속식 배양 및 fill & draw식 연속 배양방법을 검토하고, 연속적 감압을 통한 동시당화발효와 비감압식 동시당화발효법의 에탄올 생산성을 비교하고, 바이오에탄올 발효에 적합한 배양방법을 제안하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 음식물류폐기물의 전처리

본 연구에서는 C 대학교 구내식당으로부터 수거한 음식물류폐기물을 습윤상태 그대로 사용하였으며, 음식폐기물의 원소분석은 Elemental Analyzer를 이용하여 C, N, S, H를 분석하였고, 탄소 C는 (45~48%), 질소 N은 (2.5~4.0%), 황 S는 (0~0.48%), 수소 H는 (5~8%)으로 나타났다. 이러한 음식물류폐기물을 분쇄기 (WP650A, 원뿔, Korea)로 두 번 분쇄하여 직접 사용하거나 효소로 가수분해 후 사용하였다.

### 음식물류폐기물의 당화

분쇄한 음식물류폐기물을 상업용 당화효소 Termamyl 120L, Spirizyme Plus FG, Viscozyme L 등 세 가지 또는 두 가지 효소를 혼합하여 가수분해공정에 사용하였다. 이들 효소는 한국 Novozyme사로부터 구입하여 사용하였으며, Termamyl 120L는 전분 액화에 사용되는 효소로써, *Bacillus licheniformis*에서 유래  $\alpha$ -amylase이며, 1,4- $\alpha$ -glucosidic linkage를 가수분해 시키는 효소이다. Spirizyme Plus FG는 *Aspergillus niger* 유래 1,4- $\alpha$ -D-glucan-glucohydrolase (EC 3.2.1.3)이다. 이 효소는 액화된 전분 기질의 1,4- $\alpha$ , 1,6- $\alpha$  linkage를 가수분해하며 발효를 위해 분쇄된 곡류의 당화에 사용되는 효소이다. Viscozyme L은 *Aspergillus aculeatus* 유래 다중복합효소로서 beta-glucanase, xylanase, cellulase와 hemicellulase등을 포함하는 복합 효소이다.

C 대학교 구내식당의 음식물류폐기물 20 kg를 분쇄기 (WP650A, 원뿔, Korea)로 분쇄하여 당화효소 Termamyl 120L, Spirizyme Plus FG, Viscozyme L을 각각 10 mL를 첨가한 후 50°C, 150 rpm에서 10시간 반응시켜 효소학적

가수분해가 수행되도록 하였다. Termamyl 120L, Spirizyme Plus FG, Viscozyme L 등 효소의 pH 조건을 맞추기 위해 0.05 M acetic acid buffer (pH=5) 용액으로 희석하여 사용하였고. 연구를 수행하는 과정에서는 별도의 pH 조절은 하지 않았다. 음식물류폐기물을 상업용 당화효소로 당화시킨 후 8,000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리하여 얻은 당화액인 SFW (saccharafied food wastes)배지를 에탄올 발효배지로 사용하였다.

한편, 동시당화 발효에서는 분쇄한 음식물류폐기물과 Spirizyme Plus FG, Viscozyme L 효소를 0.05 M acetic acid buffer (pH=5) 용액으로 희석하여 초기 pH를 조절하였다.

**회분식 에탄올 발효**

에탄올 생산균주는 본 연구실에서 한 등이 분리한 *Saccharomyces italicus* KJ를 사용하였다 [18]. YM (yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, bacto peptone 5 g/L, glucose 10 g/L, agar 15 g/L)고체배지에 배양한 *S. italicus* KJ 콜로니 한 개를 100 mL의 YM액체배지에 접종한 후 30°C, 100 rpm에서 24시간 동안 전배양 하였다. 전배양액 5% (v/v)를 SFW (음식물류 폐기물의 당화액)배지에 접종하여 30°C, 100 rpm에서 혐기적으로 발효하였다. 당화액배지의 초기 pH는 5.0 이었으며, 배양과정 중에는 pH를 조절하지 않았다. 회분식 에탄올배양은 500 mL Erlenmeyer flasks를 사용하여 working volume 200 mL, 초기 환원당 농도는 100 g/L, 건식 배양기 (30°C, 100 rpm)에서 2일간 혐기적으로 배양하였다. 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 그 상등액을 분취하여 Gas Chromatography를 이용하여 생산된 에탄올의 농도를 측정하였다.

**연속식 효모 고밀도 배양**

에탄올 생산 농도를 향상시키기 위해 효모 고밀도 배양을 이용한 에탄올발효를 실시하였다. 그 배양시스템을 Fig. 1에 나타내고 있다. 10 L 생물반응기 (BioG, Hanil R&G Co., Korea)에서 working volume을 6 L로 하고, 전배양한 *S. italicus* KJ 배양액 3%를 접종하여 30°C, 100 rpm에서 혐기적으로 배양하였다. 접종 후 24시간 에탄올 발효를 수행한 다음 침강컬럼으로 배양액 1 L를 보낸 후 발효액의 균농도를 농축시키기 위해 6시간 방치하였다.

배양 120 h까지 6시간 간격, 그 후 4시간 간격으로 침강 농축된 균체 500 mL는 주반응조로 넣어주어 효모 고밀도 배양이 진행되도록 하였으며, 상등액 500 mL는 생산된 에탄올로 외부로 샘플링 하였다. 침강컬럼에서 주반응조로 들어간 균체는 혼합이 잘 되게끔 적절히 교반시킨 후 1 L의 배양액을 다시 침강컬럼으로 보내주었다. 다음, 주반응 조에 새로운 SFW배지 1 L를 다시 채워주었다. 주반응조, 새로운 당화액배지 저장탱크, 침강컬럼에는 모두 hepa filter를 장착하여 발효기안의 바이오가스가 외부로 빠져나가지도록 하였다.

샘플링을 하여 얻은 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 그 상등액을 사용하였으며, 글루코오스 농도, 환원당 농도, 에탄올 농도를 측정하였다. 균체농도는 12시간마다 측정하였으며, 샘플링한 배양액은 적당히 희석하여 균체농도를 흡광도 660 nm에서 측정하였다. 이때 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 5 min)하여 얻은 상등액을 균체농도의 blank로 사용하였다.

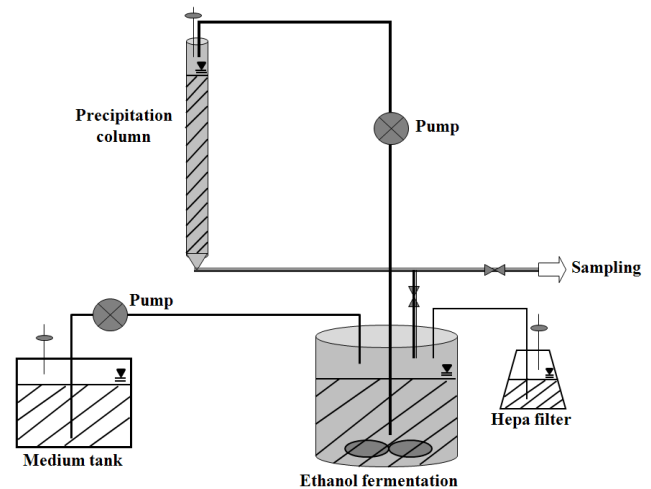


Fig. 1. Schematic diagram of continuous high-cell-density culture system.

**감압/비감압식 fill & draw 동시 당화 발효에 의한 에탄올 생산**

선행 연구에서 Yang 등 [19]은 감압식 동시당화발효를 위해, 1 L evaporator에서 200 g (함수율 80%)의 분쇄한 음식물류폐기물과 효소 Spirizyme Plus FG (최종농도 0.05 AGU/g;  $\alpha$ -amylase 최종농도 0.655 U/mL), Viscozyme L (최종농도 0.01 BGU/g;  $\alpha$ -amylase 최종농도 0.005 U/mL)를 Fig. 2와 같이 용기 A에 넣고, 150 rpm, 35°C에서 먼저 4시간 당화반응 시킨 후 *S. italicus* KJ 5%를 접종하여 20시간동안 전정상상태의 동시당화발효를 수행하였다. 동시당화 발효를 계속 유지하기 위하여 12시간 단위로 80 g의 음식물류폐기물과 24시간 단위로 효소 Viscozyme와 Spirizyme Plus를 공급하고, 24시간 후부터 발효 중 생산되는 에탄올을 -600 mm Hg에서 에탄올 증류를 시작 (냉각용매 0°C의 15% 에탄올 수용액)하여 감압식 동시당화 연속발효실험을 352시간 수행하였다.

비감압식 동시당화 연속배양은, 10 L 생물배양기 (BioG, Hanil R&G Co., Korea)에서 working volume을 5 L로 하고, 분쇄한 음식물류폐기물 4 kg (함수율 80.2%)과 효소 Spirizyme Plus FG, Viscozyme L을 0.05 M acetic acid buffer (pH 5.0)에 희석하여 250 rpm, 35°C에서 4시간 당화반응 시킨 후 *S. italicus* KJ 5%를 접종하여 20시간동안 전정상상태의 동시당화발효를 수행하였다. 동시당화발효를 계속 유지하기 위하

여 12시간 단위로 음식물류폐기물과 24시간 단위로 0.05 M acetic acid buffer (pH 5.0)로 희석한 효소 Viscozyme L과 Spirizyme Plus FG를 접종구를 통해 공급해주었다. 주입 및 배출량은 2 L로 조절하여 본 실험을 수행하였다 (Fig. 3).

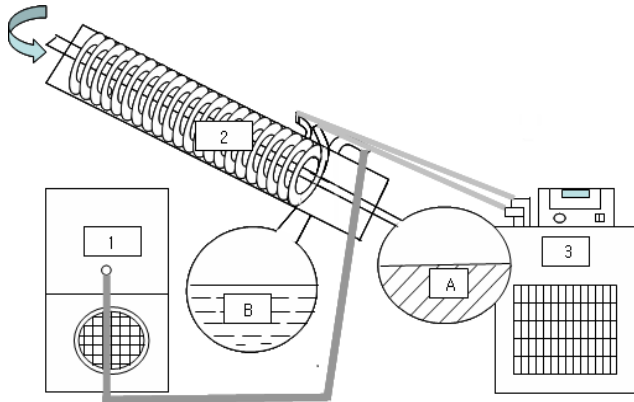


Fig. 2. The experimental equipment employed in fill & draw SSF with continuous decompression: (①: decompression pump, ②: evaporator, ③: condensing system A: culture broth, B: evaporated ethanol).

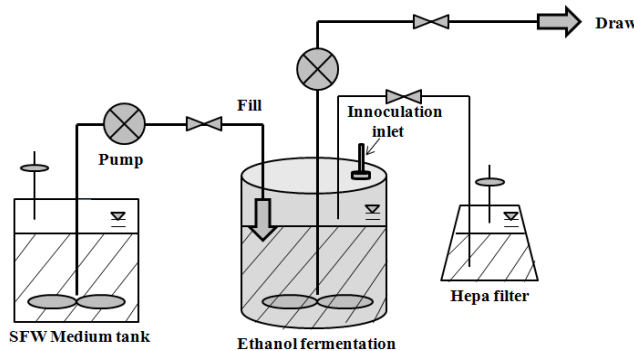


Fig. 3. Schematic diagram of SSF system by continuous fill & draw without decompression.

### SFW 배지를 이용한 Fill & draw식 연속배양

*S. italicus* KJ 를 100 mL의 YM액체배지에 접종한 후 30°C, 100 rpm에서 24시간 동안 전배양 하였다. 전배양액 5%를 음식물류폐기물의 효소학적 가수분해를 통하여 얻어진 당화액인 SFW에 접종하여 본배양 하였다. 본 연구는 연속배양식의 방법으로, 1 L Erlenmeyer flasks를 사용하여 working volume 500 mL로 하였고, 초기 환원당농도는 100 g/L, 건식생물배양기 (30°C, 100 rpm)에서 처음 20시간 에탄올 발효 [20] 후 12 h, 6 h, 3 h 단위로 발효액 200 mL를 샘플링한 후 새로운 SFW배지 200 mL를 다시 채워주는 방법으로, 연속배양을 위하여 총 221 h 동안 실험을 수행하였으며, 이때 40% 교체의 SFW배지의 희석율은 각각 0.03 h<sup>-1</sup>, 0.07 h<sup>-1</sup>, 0.13 h<sup>-1</sup>이었다. 실험 과정동안 샘플링한 배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)하여 얻어진 상등액으로 DNS

법에 의한 환원당농도와 Gas Chromatography를 이용하여 생산된 에탄올 농도를 측정하였다.

### 환원당 농도 측정법

환원당 측정법은 DNS법으로 측정하였으며 DNS법 [21]은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)와 Rochelle 염으로 발색하여 흡광도를 측정하는 정량분석법이다. 측정방법은 시료를 원심분리한 후 증류수를 가하여 희석하였다. 희석액 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 첨가하여 100°C에서 5분간 반응시킨 다음 증류수 20 mL를 넣어 희석하여 흡광도 540 nm에서 측정하였다. 이는 Glucose를 (0.5-2.0 g/L) 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교하여 유리된 환원당의 양을 측정하였다.

### 글루코스 농도 측정법

글루코스 농도의 측정은 글루코오스 측정용 kit (아산제약, Korea)를 사용하였으며, GOD (Glucose-oxidase)의 작용에 의하여 글루코오스는 용액중의 효소 및 물과 반응하여 글루콘산과 과산화수소가 된다. 이어서 이 과산화수소가 Peroxidase의 작용에 의하여, Phenol과 4-Aminoantipyrine을 산화적으로 축합시켜 키논형 적색 색소를 생성한다. 이 적색 색소를 파장 500 nm에서 비색 측정하여 검체중의 Glucose량을 구하는 원리이다.

### 균체 농도 측정법

에탄올 생산균주의 균체 농도는 원심분리 (1,200 rpm, 5 min)하여 얻어진 상등액을 blank로 사용하고, 상등액과 균체액을 각각 희석하여 흡광도 660 nm에서 측정하였다.

### 에탄올 농도 측정법

에탄올 측정은 샘플을 원심분리 (12,000 rpm, 5 min)하여 얻어진 상등액을 다시 syringe filter (0.45 µm, Smartpor Co., Korea)로 여과 후 얻어진 여과액을 Gas Chromatography (YL 6100 GC, Korea)로 분석하였으며, 칼럼 및 검출기의 조건은 HP-FFAP Column (0.32 mm × 50 m × 0.5 µm), FID detector, oven temp. 80°C, injection temp. 200°C, detector temp. 220°C, split rate 50 : 1, carrier gas He (2 mL/min)의 조건에서 측정하였다.

### 아밀라아제 활성 측정법

배양액을 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)한 상등액을 50 mM citric acid buffer (pH 4.8)로 희석하여 희석효소액 0.2 mL에 기질 (1% soluble starch) 0.8 mL를 넣어 시료로 하였고, 대조군으로 50 mM citric acid buffer (pH 4.8) 0.2 mL

와 기질 (1% soluble starch) 0.8 mL를 넣어 blank로 사용하였으며, 50°C에서 약 30분간 반응시킨 후 DNS법에 의하여 얻어진 환원당으로부터 아밀라아제 활성을 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**회분식 배양에 의한 에탄올 발효**

500 mL 플라스크 레벨에서 회분식으로 에탄올발효를 수행한 결과, 1일 후 생산된 에탄올 농도는 60.5 g/L로써 에탄올 생산성은 2.52 g/L-h 이었으며, 2일 후 생산된 에탄올은 65.1 g/L로써 에탄올 생산성은 1.36 g/L-h로 계산되었다 (data not shown).

**효모 고밀도 배양에 의한 연속식 에탄올 발효**

효모 고밀도 배양에 의한 연속식 에탄올발효에서 당화액 배지의 초기 환원당 농도가 100 g/L일 때 배양 168 h 동안 생산된 에탄올의 평균농도는 60.8 ± 5.3 g/L, 잔류 환원당 농도는 11.6 ± 0.9 g/L, 균농도는 OD 660 nm의 값으로써 점차 감소하는 경향을 보였으며 23.5 ± 3.0으로 유지되었다 (Fig. 4). 회분식 에탄올 배양에서는 배양 24시간 후의 균체농도는 OD 660 nm의 값으로써 27.52를 나타내었다 (Fig. 4). 당화액 배지의 초기 환원당 농도가 100 g/L일 때 에탄올 생산성은 1.30 g/L-h 이었다. 본 연구에서는 효모 고밀도 배양을 시도하였으나, 에탄올 생산균주인 *Saccharomyces italicus* KJ는 침강칼럼에 의한 고밀도화가 원활히 이루어지지 않은 것으로 미루어, 6시간의 침강시간이 부족했거나 침강성 그다지 높지 않는 운동성의 효모로 판단되며, 본 배양방법에 의한 효모 고밀도 배양은 연속적 고밀도 배양방법으로 적절치 않은 것으로 사료되었다.

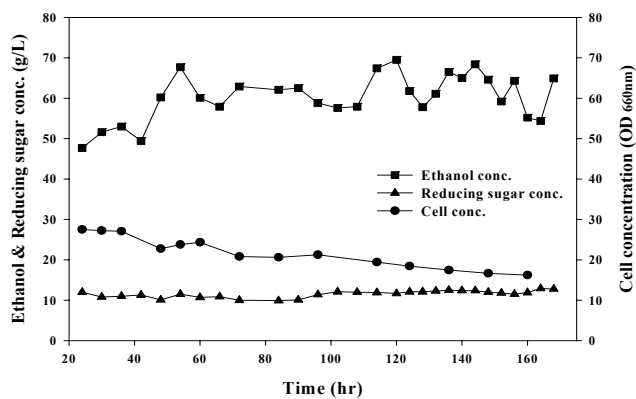


Fig. 4. The changes of concentrations of ethanol and reducing sugar in the continuous high-cell-density culture.

한편, Park 등 [22]은 2달 동안 membrane filter를 이용하여 효모 고밀도로 연속배양을 수행한 결과, 회석율 0.2 h<sup>-1</sup>,

0.3 h<sup>-1</sup>일 때 효모의 균농도는 각각 50 g/L와 58 g/L이었고, 에탄올 농도는 43 g/L이었으며, 생산성은 각각 8.6 g/L-h, 13 g/L-h로 나타났다. 본 연구도 membrane filter를 이용하는 고밀도 배양법을 향후 검토해 볼 필요가 있다고 생각한다.

**감압/비감압식 fill & draw 동시 당화 발효**

당연구실의 선행연구에 의하면 Yang 등은 fill & draw 식 동시당화 에탄올 발효를 위해, 1 L evaporator를 이용하여 -600 mm Hg 감압조건으로 연속적으로 감압하면서 35°C에서 352 h 동안 수행한 결과 44시간째부터 환원당농도는 20~35 g/L, 효소 활성은 amylase 기준으로 8.93 ± 2.17 U/mL로 유지되었으며, 에탄올 생산성은 2.24 g/L-h로 계산되었다. Yang 등은 SSF 공정에서 에탄올에 의한 생성물의 저해를 최소화하기 위해 연속적 감압증류 시스템을 도입하였다.

이전 연구를 바탕으로 10 L 생물배양기에서 비감압식으로, 35°C에서 180 h 동안 실험을 수행한 결과 24시간째부터 환원당 농도는 5.8 ± 1.2 g/L, 에탄올 농도는 60.0 ± 9.4 g/L, 36시간째부터 효소 활성은 amylase 기준으로 5.7 ± 0.9 U/mL로 유지되었으며, 실험 24시간째부터 180시간까지 에탄올 생산성은 2.03 g/L-h로 계산되었다 (Fig. 5). 연속적 감압 조건에서 동시당화 에탄올 발효가 10 L 생물배양기에서의 비감압식 동시당화 에탄올 발효보다 생산성이 9.4% 더 높은 것으로 나타났다.

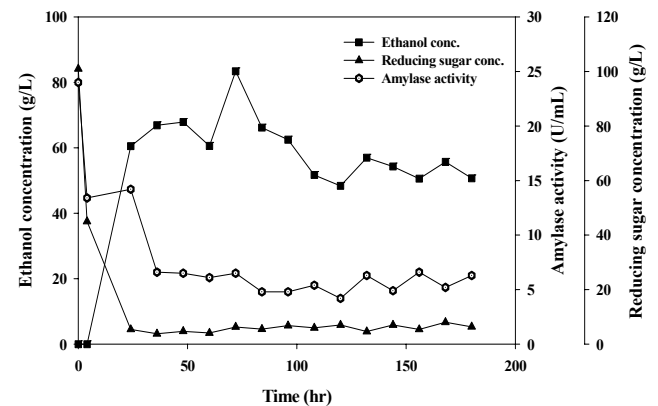


Fig. 5. The changes of concentrations of ethanol and reducing sugar by continuous fill & draw SSF culture without decompression.

한편, Na 등 [23]은 전분질계를 이용한 동시당화 발효의 최적 조건으로 효소 (Glucoamylase)의 농도는 0.1% (w/v), pH 4, 온도 38°C의 조건으로 수행하였으며, 전분 30 g/L를 반응시켰을 때 반응 15~25시간 사이에 에탄올이 생산되었고, 그 결과 12 g/L의 에탄올을 생산하였으며, 이로써 얻어진 에탄올의 생산성은 0.67 g/L-h 이었다. Kwon 등 [24]은 폐지 (신문지)의 유가식 동시당화발효에 의한 에탄올 생산에서 8% (w/v) 기질, 30 FPU/g cellulase, 0.1의 β-glucosidase: cellulase 부피비 (활성비, 1.05), 반응온도는 40°C의 조건으로

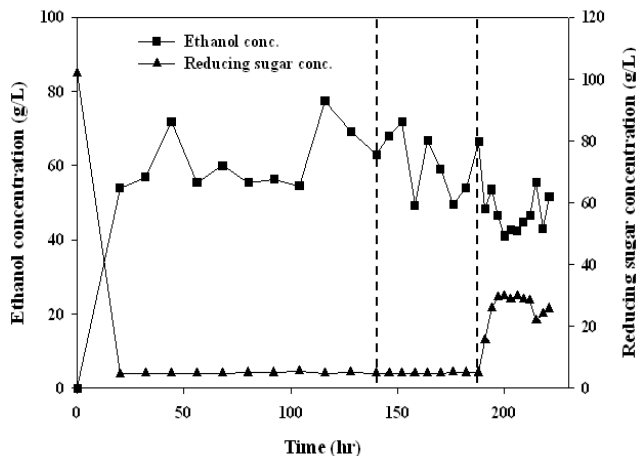
**Table 1.** Comparison of bio-ethanol productivity according to various ethanol culture modes

Ethanol culture modes	Batch (24 h)	High-cell-density (continuous)	Continuous fill & draw				
			SSF (decompression)	SSF (no-decompression)	Dilution rate (h <sup>-1</sup> )		
					0.03	0.07	0.13
Productivity (g/L-h)	2.52	1.30	2.24	2.03	2.02	4.07	6.25

수행하였으며, 유가식 동시당화발효에서 26.8 g/L의 에탄올을 생산 하였는데, 이때의 에탄올 생산성은 0.30 g/L-h 이었다.

### SFW 배지를 이용한 fill & draw식 연속 배양 발효

플라스크 레벨에서 SFW 배지를 이용하여 fill & draw식 연속 배양 발효를 총 221 h 동안 수행하였다. 12시간 단위의 배지교체로 140 h 동안 수행한 결과 에탄올농도는 61.3 ± 8.1 g/L, 잔류환원당농도는 4.9 ± 0.2 g/L 이었고, 6시간 단위의 배지교체로 140 h부터 188 h까지 발효된 에탄올농도와 잔류환원당농도는 60.7 ± 8.9 g/L와 4.9 ± 0.1 g/L로 계산되었으며, 3시간 단위로 교체된 경우 188 h부터 221 h까지 수행한 결과 에탄올농도는 47.0 ± 4.8 g/L, 잔류환원당농도는 26.2 ± 4.3 g/L로 유지되었다 (Fig. 6). SFW 배지 40%를 12 h, 6 h, 3h 단위로 주입 및 배출시 희석율은 0.03 h<sup>-1</sup>, 0.07 h<sup>-1</sup>, 0.13 h<sup>-1</sup>이었고, 에탄올 생산성은 각각 2.02 g/L-h, 4.07 g/L-h, 6.25 g/L-h로 계산되었다. 보다 높은 에탄올 생산성을 위해 다양한 희석율과 당농도 및 배지성분의 변화 등을 추가로 검토해 볼 필요가 있다.



**Fig. 6.** The changes of concentrations of ethanol and reducing sugar in the continuous fill & draw culture using SFW medium in different dilution rates (12 h → 6 h → 3 h cycle).

### 다양한 에탄올배양방식의 생산성 비교

음식물류폐기물을 이용하는 최적 에탄올 생산방식을 결정하기 위해, 본 연구에서 수행한 에탄올 배양 방법인 회분식 배양발효, 효모고밀도 연속식 배양 발효, fill & draw 동시

당화 발효, SFW 배지를 이용한 fill & draw식 연속 배양 발효의 에탄올 생산성을 Table 1에 정리하였다. 가장 높은 생산성은 음식물류폐기물 당화액을 이용한 fill & draw식 연속 배양의 희석률 0.13 h<sup>-1</sup>에서 얻어졌다. 향후, 다양한 희석률과 초기 당농도 등의 배지성분의 최적화를 통해 생산성을 더욱 향상 시킬 필요가 있다.

### 결론

당화액 배지를 이용하여 24 h 동안의 회분식 배양으로 에탄올발효를 한 결과, 에탄올 생산성은 2.52 g/L-h 이었고, 효모 고밀도 연속배양에서 에탄올 생산성은 1.30 g/L-h로 계산되었으며, -600 mm Hg로 감압을 수행한 fill & draw 동시당화 배양발효의 에탄올 생산성은 2.24 g/L-h 이었고, 10 L 생물배양기에서 비감압식 fill & draw 동시당화 배양 발효의 에탄올 생산성은 2.03 g/L-h로 계산되었다. SFW 배지 40%를 12 h (0.03 h<sup>-1</sup>), 6 h (0.07 h<sup>-1</sup>), 3 h (0.13 h<sup>-1</sup>) 단위로 교체하여 수행한 fill & draw식 연속 배양한 에탄올 생산성은 각각 2.02 g/L-h, 4.07 g/L-h, 6.25 g/L-h로 계산되었다.

이로써, 음식물류폐기물을 이용한 에탄올 생산을 위한 최적의 배양방법은 현재까지의 검토에 의거, SFW 배지 40%를 3 h (0.13 h<sup>-1</sup>) 단위로 교체한, fill & draw식 연속 배양방법이 가장 높은 것으로 나타났다.

### 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부 (과학기술부)의 재원으로 한국 과학재단의 지원과 (No. R01-2007-000-20348-0)와 2009년도 수도권 매립지관리공사 용역 (No. 2009-1519)으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2010년 9월 24일, 게재승인 : 2010년 10월 22일

### REFERENCES

1. Sheoran, A., B. S. Yadav, P. Nigam, and D. Singh (1998) Continuous ethanol production from sugarcane molasses using a column reactor of immobilized *Saccharomyces*



- cerevisiae* HAU-1. *J. Basic Microbiol.* 38: 123-128.
2. Kim, N. Y., H. J. Kim, and J. S. Kim (2005) Simultaneous saccharification and fermentation from ammonia pretreated waste oak wood for fuel ethanol production. Master. *Theories and Applications of Chem. Eng.* 11: 1731-1734.
  3. Park, J. I., H. C. Woo, and J. H. Lee (2008) Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives. *Korean J. Chem. Eng. Res.* 46: 833-844.
  4. Lee, S. M., J. H. Kim, H. Y. Cho, J. H. Lee (2009) Production of bio-ethanol from brown algae by physicochemical hydrolysis, *Korean J. Ind. Eng. Chem.* 20: 517-521.
  5. Kim, K. S. (2006) The present state of domestic acceptance of various international conventions for the prevention of marine pollution. *Korean J. Society of Marine Environ & Safety* 12: 293-300.
  6. Kim, S. H., T. K. Kwak, E. H. Choi, K. E. Lee (2007) Food waste management practices and influencing factors at elementary school food services. *Korean J. Community. Nutrition* 12: 815-825.
  7. Choi, B. S. (2002) *A Study on the Policy that Makes the Foodwaste into the Resources*. MS. Thesis. Paichai University, Daejeon, Korea.
  8. Han, H. J., H. X. Li, and S. J. Kim (2006) Ethanol production by synchronous saccharification and fermentation using food wastes. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 474-478.
  9. Pack, M. Y. (1975) Double-stage batch fermentation of beer 1. Theoretical background. *Korean J. Applied. Microbiol. Bioeng.* 3: 31-34.
  10. Park, S. H. and C. Y. Choi (1982) Optimal ethanol fermentation by batch and glucose fed-batch culture. *Korean J. Ins. Chem. Eng.* 20: 37-48.
  11. Hewitt, C. J. and A. W. Nienow (2007) The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. *Advances in applied microbiol.* 62: 105-135.
  12. Kim, Y. H., S. W. Kang, J. H. Lee, H. I. Chang, C. W. Yun, H. D. Paik, C. W. Kang, and S. W. Kim (2007) High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of  $\beta$ -Glucan. *J. ind. Eng. Chem.* 13: 153-158.
  13. Quintero, O., A. Amicarelli, F. Sciascio, G. Scaglia (2008) State estimation in alcoholic continuous fermentation of *Zymomonas mobilis* using recursive bayesian filtering: a simulation approach. *Bioresources.* 3: 316-334.
  14. Chandel, A. K., E. S. Chan, R. Rudravaram, M. L. Narasu, L. V. Rao, and P. Ravindra (2007) Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2: 14-32.
  15. Pauline M. D. (2008) *Bioprocess Engineering Principles*. pp. 446-472. World Science Press, Dongjak, Seoul, Korea.
  16. Wingren, A., M. Galbe, and G. Zacchi (2003) Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 19: 1109-1117.
  17. Hinman N. D., D. J. Schell, C. J. Riley, P. Bergeron, and P. J. Walter (1992) Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 34-35: 639-649.
  18. Han, H. J. and S. J. Kim (2006) Isolation and characterization of a strain for economical ethanol production. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 267-272.
  19. Yang, L. (2009) *Continuous Ethanol Production by the Synchronous Saccharification and Fermentation using Food Wastes*. MS. Thesis. Chonnam National University, Gwangju, Korea.
  20. Shafaghat, H., G. D. Najafpour, P. S. Rezaei, and M. Sharifzadeh (2009) Growth kinetics and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on various carbon sources. *World Applied Sci. J.* 7: 140-144.
  21. Thomas, M. W., and K. M. Bhat (1998) Methods for measuring cellulase activities, *Method Enzymol.* 160: 87-112.
  22. Park, B. G., W. G. Lee, Y. K. Chang, and H. N. Chang (1999) Long-term operation of continuous high cell density culture of *Saccharomyces cerevisiae* with membrane filtration and on-line cell concentration monitoring. *Bioprocess Eng.* 21: 97-100.
  23. Na, J. B. and J. S. Kim (2008) The optimum condition of SSF to ethanol production from starch biomass, *Korean. Chem. Eng. Res.* 46: 858-862.
  24. Kwon, J. K., H. S. Moon, J. S. Kim, S. W. Kim, and S. I. Hong (1999) Fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of waste paper to ethanol. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 14: 24-30.