

주정증류 폐액을 이용한 *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 Poly- β -Hydroxybutyrate의 생산 및 폐액의 처리

손홍주 · 이상준*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과

Production of Poly- β -Hydroxybutyrate from Alcoholic Distillery Wastes and Treatment of Alcoholic Distillery Wastes by *Actinobacillus* sp. EL-9. Hong-Joo Son and Sang-Joon Lee*. Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea — Alcoholic distillery wastes are utilized as dual purposes to produce PHB in lower production cost and to reduce the amount of waste to be treated. In this study, various attempts were made to increase PHB production under various conditions by *Actinobacillus* sp. EL-9 in a shaker culture. The addition of glucose, NH_4NO_3 to alcoholic distillery wastes slightly promoted cell mass and PHB production. Enzyme hydrolysis of alcoholic distillery wastes increased the production of PHB than that of untreated waste and acid hydrolysis treatment. The PHB weight in alcoholic distillery wastes was 1.91 g/l. Fermentation process of PHB production reduced the amount of COD value up to 54%, which reduced organic loading rate and capacity of activated sludge system.

최근 과학기술의 발달과 인구의 증가로 에너지의 수요가 급격히 증가하고 있으며, 그로 인하여 한정된 석유 에너지를 보충해 줄 대체자원의 개발에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 이루어지고 있다. 따라서 산업폐기물로 버려지는 일부 식물체나 농산 폐자원 등 재생이 가능한 biomass를 일정한 전처리 과정을 거친 후 식품원료, 공업원료, 에너지 등의 유용한 물질의 생산을 위한 기질로서 이용하려는 생물전환 공정에 대한 연구가 장래 에너지원의 부족을 해결할 수 있는 하나의 대안이 될 것으로 사료된다.

산업폐기물을 이용한 생물전환 기술은 폐기물의 재활용이라는 측면뿐만 아니라 폐기물 처리의 관점에서 매우 중요한 의의가 있다고 하겠다. 즉 폐기물의 성공적인 재이용은 폐기물양의 감소, 폐기물 처리에 따르는 비용 감소, 유용한 부산물의 생산 및 폐기처리에 수반되는 환경오염문제를 최소화시킬수 있기 때문에 그 중요성이 갈수록 증대되고 있다.

현재 국내의 약 10여개의 주정공장에서 연간 배출되는 폐기물량은 1,300만 D/M이고, 고구마, 쌀보리, 타피오카 등을 주정원료로 사용하여 발생하는 폐수는 고농도의 유기물을 함유하고 있고 또한 BOD, COD 등이 모두 20,000 ppm 이상이므로, 산업체에서 수질 환경보전법 기준치 이하로 정화하는데 많은 어려움과 비용을 요구한다(1). 따라서 주정증류 폐액을 미생물의 배지로 이용하면 폐액중의 유기물이 미생물의 생육에

필요한 에너지원으로 이용됨으로써, 폐액중의 유기물 및 COD, BOD를 줄이게 된다. 동시에 미생물의 균체 성분을 대량으로 회수하여 동물의 사료에 첨가하는 단세포 단백질 등의 유용자원 및 미생물이 생산하는 유용 대사산물을 획득할 수 있으므로 일석이조의 경제적인 방법이 될 것이다(2).

주정폐수(3, 4), 축산폐수(5), whey(6), oliver mill waste(7) 등의 폐기물을 이용한 유용물질의 생산에 관한 연구는 많이 되어 있는 편이다. 그러나 산업폐기물로부터의 poly- β -hydroxybutyrate(PHB) 생산에 관한 보고는 현재 전세계적으로 극소수에 불과하며, 특히 주정증류 폐액을 기질로 한 PHB 생산에 대해서는 보고된 적이 없다. 즉 Ramsay 등(8)은 나일론 제조시 배출되는 폐액을 발효기질로 하여 다양한 세균으로부터 biosurfactant, biopolymer, 효소의 합성 가능성을 타진하였으며, Bertrand 등(9)은 *Pseudomonas pseudoﬂava*에 의하여 lignocellulosic biomass의 구성당으로 부터 건조균체량의 17~22%에 해당하는 PHB 축적율을 얻을 수 있었다고 보고하였다. 산업폐기물로부터 직접적으로 PHB를 생산할 수 있는 세균의 검색은 폐자원 활용으로 인한 생산원가의 감소와 함께 수질오염원의 1차적인 제거 및 유용물질의 생산이라는 여러가지 장점이 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 연구에서는 주정증류 폐액을 기질로 하여 생육할 수 있는 *Actinobacillus* sp. EL-9에 의한 주정증류 폐액으로부터 PHB 생산 및 주정증류폐액의 COD 제거효율 등을 검토하여 주정증류 폐액의 양을 줄이고, PHB 생산성을 향상시켜 폐수처리 효과와 발효산물을 생산하는 이중효과를 얻는데 그 목적을 두었다.

*Corresponding author.

Key words: *Actinobacillus* sp. EL-9, alcoholic distillery waste, poly- β -hydroxybutyrate (PHB)

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 손 등(10)이 토양으로부터 분리한 *Actinobacillus* sp. EL-9로서 주정증류 폐액을 기질로 하여 생육하면서 PHB를 합성하는 특성을 가지고 있었다. 기질로 이용한 시료는 부산시 문현동 소재의 I 주정생산업체에서 배출되는 주정증류 폐액을 이용하였다. 이들 알코올 발효의 발효기질들은 계절적 요인과 국내 원료 수급현황에 따라 쌀, 쌀보리 및 타피오카를 사용하는 것으로 알려져 있으며, 그 성분과 성분들은 Table 1과 같다. 본 실험에서는 고형물이 비교적 적고, 흡광도 측정이 용이한 쌀 기원 주정증류 폐액을 발효기질로 사용하였다.

주정증류 폐액의 전처리

알코올 증류탑을 거친 고온(70~80°C)의 주정증류 폐액은 다량의 suspended solids와 효모 고형물들이 함유되어 있다. 따라서 7,000 rpm에서 원심분리하여 고형물들을 제거한 후, 상등액을 실험용 주정증류 폐액배지로 이용하였다. 폐액 원액은 110°C에서 10분동안 멸균한 후, 4°C에 냉장 보관하여 실험에 사용하였다. 가압멸균시 발생하는 침전물은 filter paper No. 2로 여과하였다.

주정증류 폐액으로부터 PHB 생산의 검토

주정증류 폐액을 농축하거나 탄소원과 질소원을 일정 농도별로 보충하여 30°C, 24시간 배양한 후, 공시균에 의한 PHB 생산성을 검토하였다. 또한 주정증류 폐액에 함유된 다당류를 *Actinobacillus* sp. EL-9가 이용하기

쉬운 포도당으로 전환시키기 위하여 효소 및 산 가수분해를 실시하였다. 이때 사용한 효소는 Thermamyl 120L(Novo Co.)이었으며, 0.2%(w/v)를 주정증류 폐액에 첨가하여 pH 5.0, 90°C에서 2시간동안 가수분해시켰다. 산 가수분해는 주정증류 폐액과 25% HCl의 비율을 5:1(v/v)로 혼합하여 120°C에서 2시간동안 가수분해시켰다. 5l 용량의 발효조(한국발효기 제품)에 pH 7.0으로 조절된 쌀보리 주정증류 폐액 2l를 넣어 회분배양하면서 건조균체량, 균체내 PHB 함량, 총당 및 pH의 변화를 경시적으로 측정하였다. 이때 종균 접종량은 5%(v/v)였으며, 배양조건은 30°C, 400 rpm, 2 vvm이었다.

주정증류 폐액의 COD 제거효율의 검토

5l 용량의 발효조에 pH 7.0으로 조절된 주정증류 폐액 2l를 넣어 24시간동안 회분배양한 후, COD의 변화를 측정하여 유기물의 제거효율을 검토하였다.

분석방법

환원당은 DNS법(11)으로 측정하였다. 총당의 정량은 phenol-sulphuric acid assay법(11)으로 실시하였다. 화학적 산소요구량(COD)은 Standard Method(12)에 준하여 분석하였다. 즉 적당히 희석된 배양상등액 100 ml에 회황산(1+3) 10 ml를 첨가하여 수 분간 진탕하였다. 여기에 0.025N KMnO₄ 용액 10 ml를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하여 반응시킨 다음 0.025N oxalic acid 용액 10 ml를 첨가하여 탈색시킨 후, 0.025N KMnO₄ 용액으로 미홍색이 될 때까지 적정하였다. 상기와 동일한 방법으로 처리한 증류수를 공시험액으로 하였다. PHB 정량 및 추출정제는 앞서 보고(10)한 바와 같이 실시하였다.

결과 및 고찰

농축한 주정증류 폐액에서의 PHB 생산

주정증류 폐액 중에 함유된 총 환원당의 농도는 0.5%로서, *Actinobacillus* sp. EL-9의 생육 최적 탄소원 농도인 2%(10)에 미치지 못함에 따라 주정증류 폐액을 원심분리한 후, 여과하여 상등액을 각각 4배, 10배로 감압농축시켜서 총 환원당의 농도가 각각 2%와 5%가 되도록 하였다. 이것을 기질로 하여 30°C, 200 rpm, 24

Table 1. Typical composition of wastewater derived from alcoholic distillery waste

Characteristics	Naked barley	Rice
pH	4.0~4.3	4.0~4.3
BOD ₅ (mg/l)	35,000	25,000
COD (mg/l)	27,000	20,000
Total reducing sugars as glucose (mg/l)	10,000~15,000	5,000
Total solid	93,000	32,000
Suspended solids (mg/l)	30,000~50,000	3,000
Total nitrogen (mg/l)	1,500~1,700	100~150
Total phosphorus (mg/l)	2.3	Not determined
Color	Brown	Light Yellow
Temperature (°C)	70~80	70~80

Table 2. Comparison of the cell mass and PHB production with concentrated waste

Concentrated rate	Dry cell weight (g/l)	PHB weight (g/l)	PHB content (wt.%)
Untreated	3.22	1.33	41.2
4 Times	3.24	1.35	41.7
10 Times	3.31	0.38	11.4

Table 3. Comparison of the cell mass and PHB production with hydrolyzed waste

Hydrolyzed	Dry cell weight (g/l)	PHB weight (g/l)	PHB content (wt.%)
Untreated	3.22	1.42	44.5
Enzyme	3.88	1.61	46.5
Acid (HCl)	2.87	0.97	33.7

시간동안 배양한 후 건조균체량과 균체내 PHB 함량을 측정된 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 주정증류 폐액을 4배로 농축했을 경우 균체량과 PHB 축적율이 각각 3.24 g/l, 41.7%였는데, 균체량은 생육 최적배지에서와 거의 비슷하였으나, PHB 축적율은 상당히 증가되었다. 10배로 농축했을 경우 균체량은 3.31 g/l이었으며, PHB 축적율은 11.4%로 상대적으로 가장 낮았다. 이러한 결과는 주정공장에서는 전분과 같은 다당류를 원료로 하여 액화 및 당화과정을 거쳐 얻은 포도당을 발효기질로 하기 때문에, 발효가 끝난 후 방출되는 폐액에는 순수한 포도당보다는 세균이 분해하기 어려운 oligo 당이나 다당류가 많이 함유되어 있기 때문(1)인 것으로 추측된다.

효소 및 산 가수분해한 주정증류 폐액에서의 PHB 생산

주정증류 폐액의 주요 성분중 고형분과 부유물질의 상당수가 oligo 당과 다당류이다(3). 이들을 미생물이 분해하기 쉬운 포도당과 여러가지 단당류로 전환시킨다면 *Actinobacillus* sp. EL-9의 균체량과 PHB 생산량을 향상시킬 수 있을 것으로 기대되므로, 효소 및 산 가수분해를 실시한 결과는 다음과 같다. Table 3에서 보는 바와 같이 주정증류 폐액을 효소로 가수분해했을 때 균체량과 PHB 축적율이 각각 3.88 g/l, 46.5%로 가장 높았다. 이것으로 보아 주정증류 폐액중에 함유된 다당류 등이 가수분해에 의하여 환원당으로 전환되고, 또한 그 중의 일부가 포도당으로 전환된 것으로 추측되었다. 반면 산 가수분해의 경우 균체량과 PHB 축적율이 각각 2.87 g/l, 33.7%로 가장 낮았는데, 이것은 산 가수분해시 본 공시균의 생육에 이용되는 주정증류 폐액중에 함유된 포도당도 함께 분해되었기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 낮은 균체량 및 PHB 축적율과 아울러 산 가수분해 후 초발 pH 조정의 어려움과 배지의 색상이 짙은 갈색으로 변색하는 현상 등으로 인하여 산 가수분해한 주정증류 폐액의 발효기질로서의 이용은 효용가치가 거의 없는 것으로 판단된다. 본 실험결과 효소처리에 의하여 미약하나마 균체생육과 PHB 축적율이 다소 향상되었으므로 발효경제적으로 타당한 저렴한 가격의 공업용 효소를 선정하는 작업이 실시될

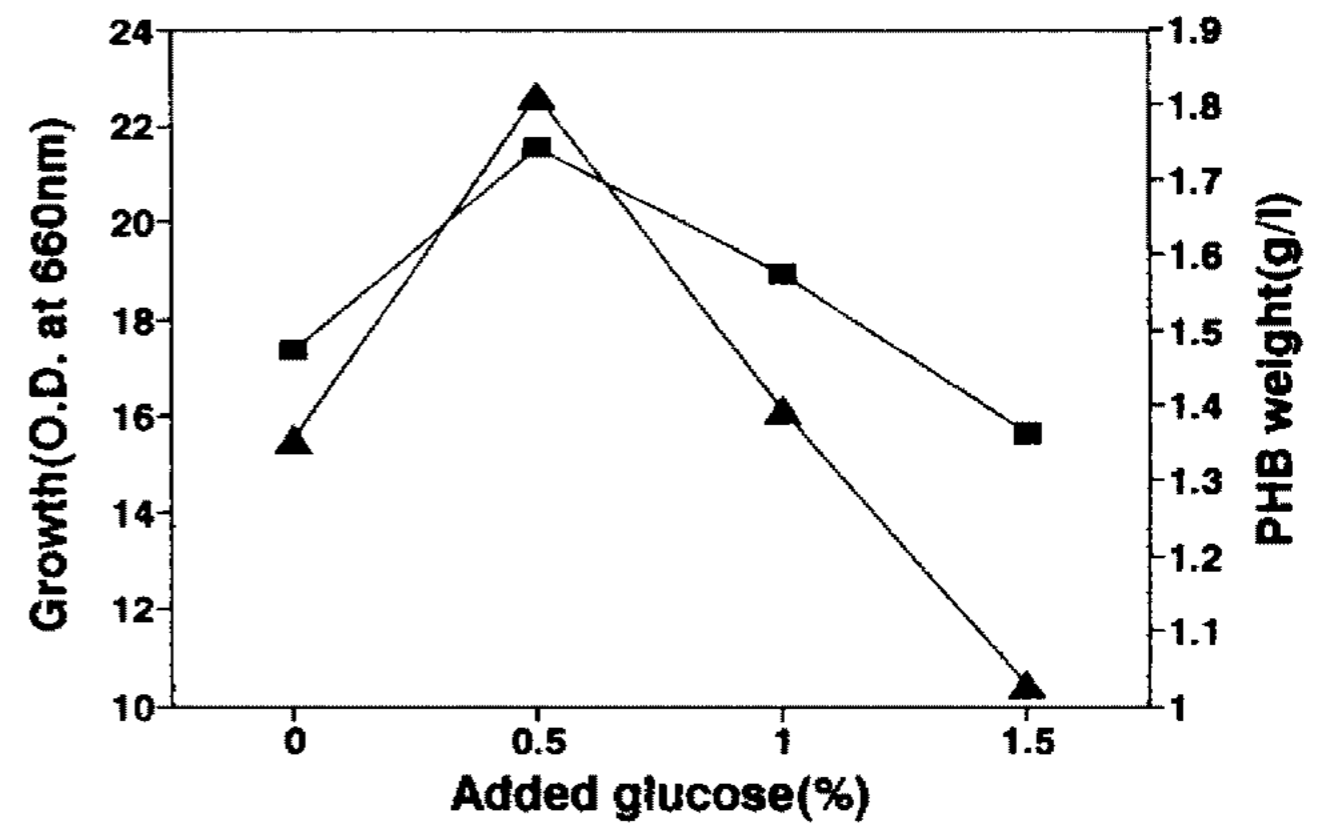


Fig. 1. Effect of glucose addition on growth and PHB production of *Actinobacillus* sp. EL-9.

—■—, growth; —▲—, PHB weight

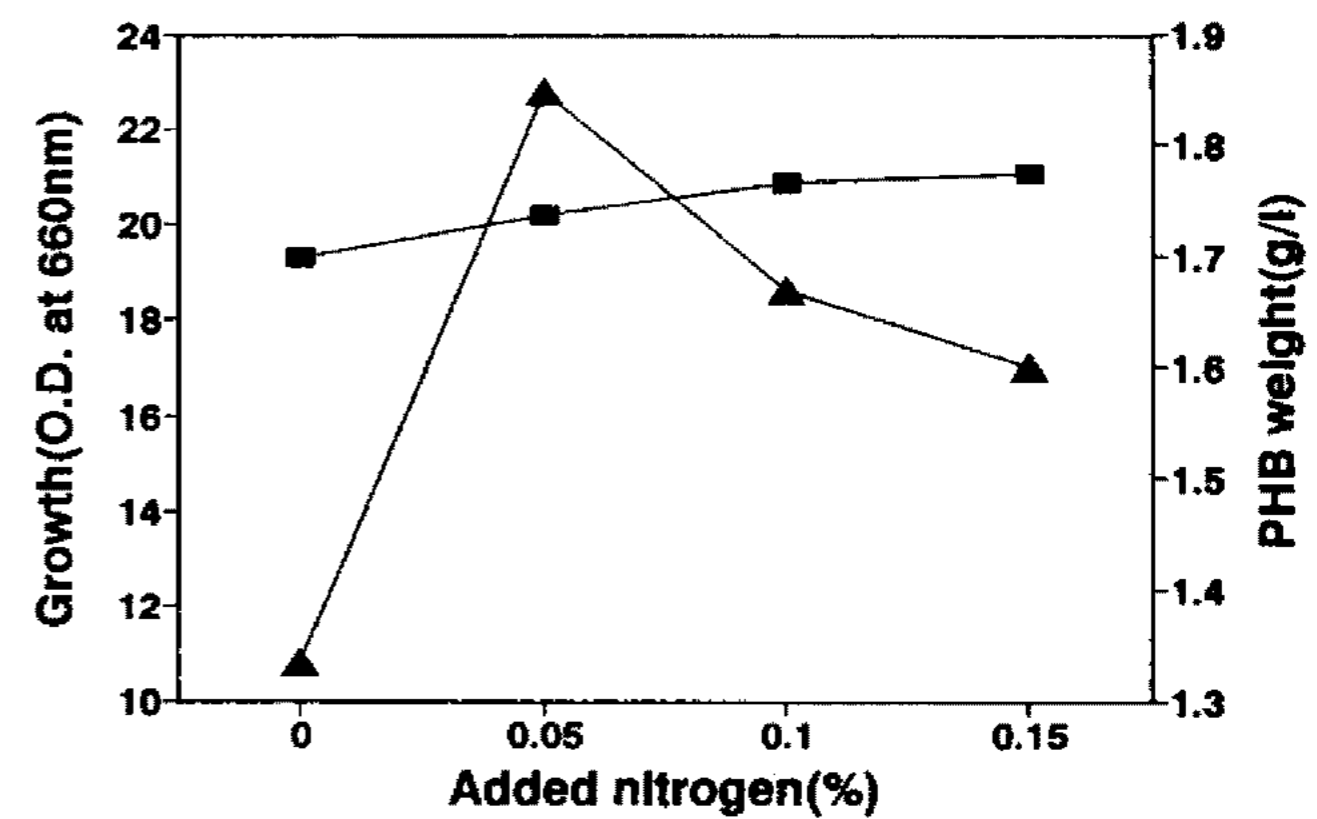


Fig. 2. Effect of NH_4NO_3 addition on growth and PHB production of *Actinobacillus* sp. EL-9.

—■—, growth; —▲—, PHB weight

때 주정증류 폐액을 산업적인 발효기질로 이용할 수 있으리라 판단된다.

탄소원 및 질소원 첨가에 의한 PHB 생산

상기 실험에 사용한 주정증류 폐액중의 탄소원, 질소원 등은 본 공시균의 생육에 필요한 최적 농도가 아니므로(10) 이 부족한 성분들을 각각 보충하여 배양한 후 생육도와 PHB 생산량을 조사하였다. 탄소원으로 각 농도의 포도당을 첨가한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 0.5%의 포도당을 첨가했을 경우 가장 높은 생육도를 나타냈으며, PHB 생산량도 1.83 g/l로 가장 높게 나타났다. 질소원으로 각 농도의 NH_4NO_3 를 첨가한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.05%의 NH_4NO_3 를 첨가했을 경우 PHB 생산량이 가장 높게 나타났으나 생육도는 0.15% 첨가시 가장 높게 나타났다. 이것은 복합적인 호영양상태에서 질소원의 농도가 PHB 생산에 영향을 미치는 것으로 보여지며, 그 이상의 질소원이 과다하게 존재하면 PHB 생산을 저해하는 것으로 사료된다.

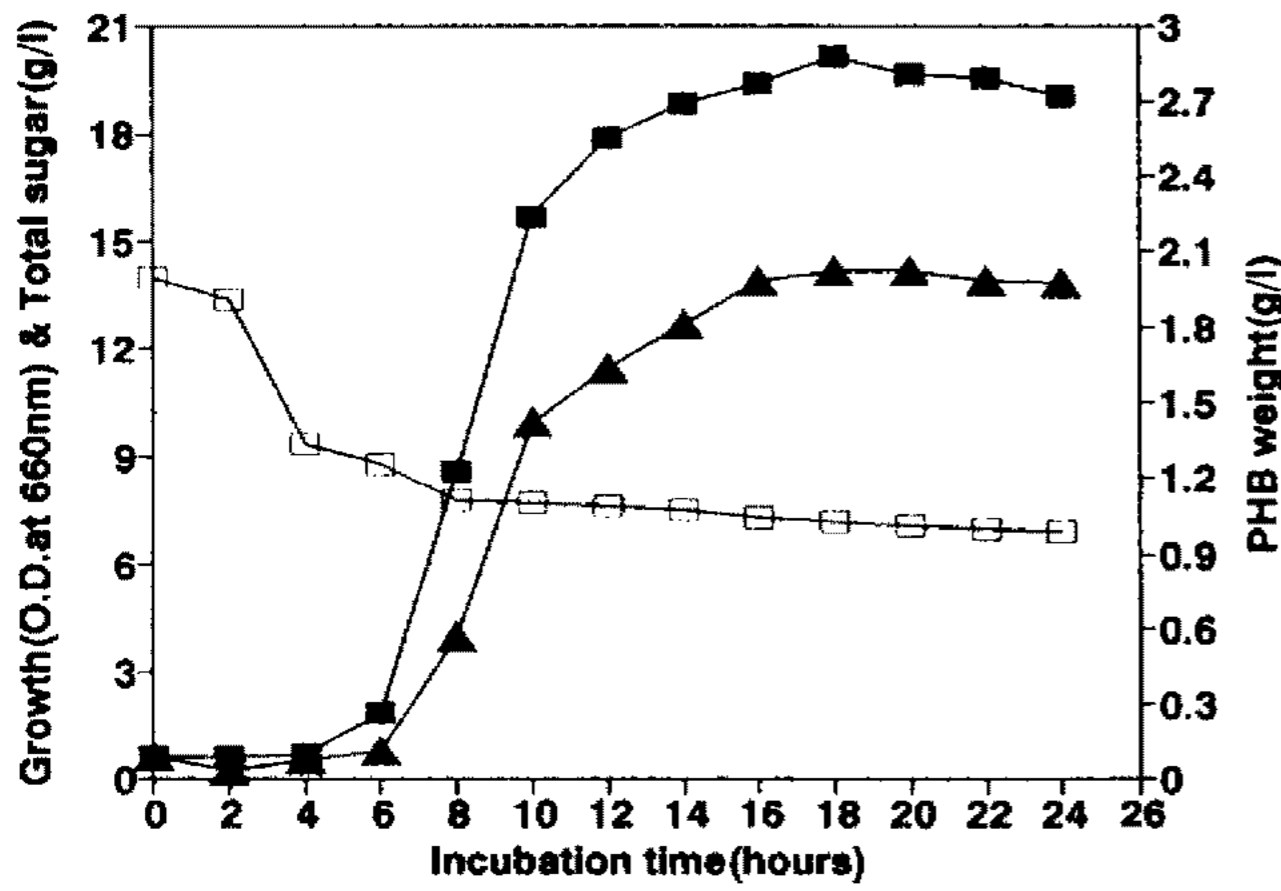


Fig. 3. Time course of batch culture of *Actinobacillus* sp. EL-9 in alcoholic distillery waste.

Culture was carried out in 5 l jar fermentor at pH 7.0, 30°C, 2 vvm, and 400 rpm.

—■—, growth; —▲—, PHB weight; —□—, total sugar

주정증류 폐액을 기질로 한 발효조 배양

5l 용량의 발효조에 주정증류 폐액 2l를 넣어 희분 배양한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 즉 배양 6시간만에 대수증식기에 돌입하였으며 18시간부터 정지기를 나타내었다. 유도기 지속시간은 생육 최적배지보다 2시간 정도 더 길었는데(10), 이것은 주정증류 폐액이 아주 다양한 영양원을 함유한 기질이므로 이러한 복잡한 환경에 적응하는 시간이 더욱 긴 것으로 사료된다. 생육 최적배지에서 조사된 바와 같이 PHB 생산량도 생육도에 비례하여 일정하게 증가되었다. 그러나 생육도는 배양 18시간대에 가장 높았으나 PHB 생산량은 14시간대에 가장 높았다. 그 후 PHB 생산량이 완만히 감소하였는데, 이것은 대다수의 PHB 생산세균들은 생육조건이 unbalanced 한 상태인 대수기 말기부터 PHB를 생산한다는 보고(13, 14)와는 다른 양상이었다.

주정증류 폐액의 COD 제거효율

5l 용량의 발효조에서 24시간 배양 후, 주정증류 폐액의 발효 전후의 COD를 측정한 결과는 Table 4와 같다. 즉 PHB 생산을 위한 발효기질로 사용하기 위하여 전처리 과정을 거친 주정증류 폐액의 COD는 13,400 ppm으로 33%의 COD 제거 효율을 보여 주었으며, 발효후의 균체를 집균한 후, 남은 여액의 COD는 6,200 ppm으로 전체 COD의 54%가 제거된 것으로 나타났다. 따라서 주정증류 폐액을 PHB 생산을 위한 발효기질로 이용시, PHB의 생산뿐만 아니라 폐수처리조에 유입되는 유기물의 부하를 현저히 감소시킬 수 있었음을 알 수 있었다.

주정증류 폐액은 대체로 COD가 20,000 ppm 이상의 고농도 유기물을 함유하며 악취를 발하고, pH가 4.0 내외이기 때문에 이를 하천수에 방류할 경우 극심한 수질 오염원이 될 수 있다. 주정증류업체에서는 이 폐

Table 4. COD reduction of alcoholic distillery waste

	Untreated waste	Pre-treatment	After fermentation
COD (ppm)	20,000	13,400	6,200
COD reduction efficiency (%)	—	33	54

액을 혐기적 처리를 통하여 COD를 7,000~8,000 ppm로 떨어뜨린 후, 이를 희석하여 활성오니법으로 처리하고 있으나, 여러 단계의 공정으로 효율이 그렇게 높지 않으며, 희석을 위하여 상당히 많은 양의 희석수가 요구되는 관계로 주정업체에서는 많은 부담으로 작용하고 있다. 따라서 이러한 주정증류 폐액을 발효기질로 하면 PHB 생산뿐만 아니라 폐액의 COD를 낮춤으로써 처리비용의 감소와 아울러 환경오염원의 제거에도 일익을 담당하는 이중적 효과를 기대할 수 있다.

삼각플라스크를 이용한 무기염 배지에서의 건조균체량과 PHB 축적율은 각각 4.285 g/l, 22.6%였다(10). 그러나 삼각플라스크를 이용하여 주정증류 폐액에서 실시한 본 실험의 경우, 건조균체량과 PHB 축적율이 각각 3.22 g/l, 44.5%로 나타났다. 이것은 무기염 배지와 다양한 물질의 혼합물인 주정증류 폐액에 존재하는 각종 원소들의 종류와 그 함량이 다르기 때문에 나타나는 결과로 판단된다. 즉, 본 공시균은 일반적으로 알려진 바와 달리 영양원이 풍부한 조건에서 PHB를 생산하는 특이한 성질을 가지고 있기 때문에 각종 영양원의 종류와 그 농도에도 영향을 받을 것으로 사료된다. 따라서 미량원소를 포함한 각종 영양원의 종류와 그 농도에 따른 PHB의 생산에 관한 연구가 이루어져야 함을 알 수 있었다.

본 실험은 삼각플라스크 또는 발효조를 이용하여 희분배양을 실시하였기 때문에 기존의 보고된 연구결과들에 비하여 PHB 생산량이 그렇게 많지 않다. 따라서 보다 실질적인 결과를 얻기 위하여 현재 본 실험실에서는 유가배양에 관한 연구를 수행중에 있다. 유가배양에 의하여 나타난 결과들을 발효경제적으로 검토할 때, 산업폐기물로 배출되는 주정증류 폐액을 본 공시균의 기질로서의 이용가능성 여부가 좀 더 확실하게 도출되리라 판단된다.

요 약

본 연구는 국내 주정공장에서 배출되는 주정증류 폐액을 생물전환 공정을 통하여 PHB의 생산에 이용함과 동시에 COD 제거 효율에 따른 폐수처리 효과를 얻는데 그 목적을 두었다. 주정증류 폐액에서 PHB를 생산하는 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9의 주정증류

폐액에서의 PHB 생산과 주정증류 폐액에서의 COD 제거효과에 대해서 실험한 결과는 다음과 같다. 주정증류 폐액 원액에 포도당 0.5%, NH_4NO_3 0.05% 첨가시 PHB 축적율이 향상되었으며, 효소 가수분해한 주정증류 폐액에서 가장 높은 PHB 축적율을 보였다. 또한 주정증류 폐액에서의 PHB 생산량은 1.91 g/l이었다. 균체 생육과 PHB 생산에 따른 주정증류 폐액의 COD 제거효율은 배양 24시간만에 약 54%를 나타내었다.

참고문헌

1. Suh, M.G., K.H. Suh, and S.K. Song. 1990. Studies on saccharification and citric acid fermentation of alcoholic distillery waste (I). *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **5**(4): 383-390.
2. Kim, D.S., H.J. Jang, K.H. Hwan, M.G. Suh, and S.K. Song. 1991. The treatment of concentrated organic alcoholic distillery wastewater by fluidized-bed biofilm reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**(4): 345-350.
3. Suh, M.G., K.H. An, M.G. Lee, and S.K. Song. 1992. Treatment of alcoholic distillery wastes through citric acid fermentation. *J. Kor. Instit. Chem. Eng.* **30**(4): 473-479.
4. Seon, Y.H., J.W. Han, D.H. park, and Y.I. Joe. 1991. Wastewater treatment and biogas production by hydrogen fermentation (I): optimum condition for hydrogen production. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**(4): 351-361.
5. Sung, K.H., C.H. lee, Y.S. Park, H.K. Yu, S.J. Ohh, and H.Y. Lee. 1994. The treatment of swine wastes and the production of high protein feedstocks from photoheterotrophic growth of *Spirulina platensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(2): 197-202.
6. Jeong, Y.I. D.W. Kim, J.H. Kim, D.H. Park, and K.Y. Lee. 1994. A study on the pullulan production using whey. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **9**(2): 91-97.
7. Hamdi, M., H. Bouhamed, and R. Ellouz. 1991. Optimization of the fermentation of olive mill wastewater by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 285-288.
8. Ramsay, A.B., G.M. Znoj, and D.G. Cooper. 1986. Use of a nylon manufacturing waste as an industrial fermentation substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 152-156.
9. Bertrand, J.L., B.A. Ramsay, J.A. Ramsay, and C. Chavarie. 1990. Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates from pentoses by *Pseudomonas pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(10): 3133-3138.
10. 손홍주, 이상준. 1995. 균형 생육조건하에서 *Actinobacillus* sp. EL-9에 의한 Poly- β -hydroxybutyrate의 생산. 산업 미생물학회지 투고중.
11. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1986. *Carbohydrate analysis*, IRL Press.
12. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, APHA, AWWA, WPCF, 16th ed., 1985.
13. Holmes, P.A. 1985. Applications of PHB-a microbially produced biodegradable thermoplastic. *Phys. Technol.* **16**: 32-36.
14. Anderson, A.J. and E.A. Dawes. 1990. Occurance, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Microbiol. Rev.* **53**(4): 450-472.

(Received 8 December 1995)