

음식물 쓰레기 동시당화 발효에 의한 에탄올 생산

한 효 정 · 리 홍 선 · † 김 성 준

전남대학교 지구환경공학과

(접수 : 2006. 10. 2., 게재승인 : 2006. 12. 2.)

Ethanol Production by Synchronous Saccharification and Fermentation using Food Wastes

Hyo-Jung Han, Hongxian Li, and Seong-Jun Kim†

Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

(Received : 2006. 10. 2., Accepted : 2006. 12. 2.)

For the economically feasible production of ethanol, utilization of SFW (saccharified food wastes) as substrate for synchronous saccharification and fermentation (SSF) process was developed in this study. When 200 g of food wastes and 40 mL of enzyme (amylase activity, 3.0 U/mL) were reacted, production rate of reducing sugar was 5.84 g/L · h, and consumption rate was -3.88 g/L · h at 35°C. So suitable condition of SSF was concluded at temperature of 35°C. Also, optimal enzyme concentration of SSF was concluded in 2.0 U/mL, at this condition, the production rate of reducing sugar was 4.80 g/L · h. At SSF process, when 50 g of food wastes was supplied in 12 h interval, 64 g/L of ethanol and 0.45 g-ethanol/g-reducing sugar in yield were obtained in 120 h fermentation. Thus, the technology of high yield of ethanol production using food wastes was confirmed. And semi-continuous SSF system for cutting off cost of enzymatic saccharification was developed in this study.

Key Words : Ethanol, *Saccharomyces italicus*, saccharified food wastes (SFW), synchronous saccharification and fermentation (SSF)

서 론

에탄올은 공해배출이 적어 대기오염 감소를 위한 청정 에너지로서 환경측면에서 에탄올의 사용을 적극 검토하고 있다. 우리나라와 같은 온대지방에서 가장 많이 쓰이는 발효기질인 전분으로부터 연료용 에탄올을 생산하는 공정은 α -amylase에 의한 전분의 용액화, glucoamylase에 의한 용액화된 전분의 당화, 그리고 당화된 기질의 효모에 의한 에탄올 발효, 생산 등의 3단계 과정을 거친다. 이는 전통적으로 에탄올 발효에 사용되는 효모균주가 전분 분해력이 결여되어 있기 때문인데, 전분 분해에 필요한 α -amylase와 glucoamylase 등이 효소비용과 에너지, 시간, 노동 등의 전처리 공정비는 전체 에탄올 생산비의 상당 부분을 차지하고 있다(1).

그래서 동시당화발효 (Synchronous Saccharification and fermentation: SSF) 공정은 경제적인 에탄올 생산을 위한 여러 가지 면에서 가장 합리적인 공정이라고 알려져 있다. 동시당화발효는 당화공정과 발효공정을 동시에 수행하기 때문에, 기존의 분리당화 발효공정에 비해 한 개의 반응기만 필요하기 때문에 설비 비용이 절감된다. 그리고 당화효소의 억제제인 glucose가 발효균주에 의해 생성되자마자 소모되므로 전체 공정에 필요한 비용의 25%를 차지하는 당화효소의 투입량을 감소시킬 수 있어 공정의 생산성을 향상시킬 수 있다(3, 4).

당 연구실에서는 음식물쓰레기 효소당화액 (SFW)을 이용하여 에탄올 발효하는 경제적인 시스템을 구축하기 위하여 Han 등이 *Saccharomyces italicus* KJ 균주를 분리하여 균주의 특성을 파악하고 SFW 배지에서 최적배양조건을 검토하였다(2). 당 연구실에서는 에탄올의 발효단가를 낮추기 위해, 혐소분해효소로 유기성폐기물의 혼합체인 음식물쓰레기 당화액을 발효배지원으로 사용한 결과, 에탄올 생산수율이 0.57 g-ethanol/g-reducing sugar이었다. 그리하여 음식물쓰레기 당화액을 에탄올 생산배지로의 대체가능성을 확인하였다.

† Corresponding Author : Department. of Civil, Earth and Environmental Engineering, college of Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

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

E-mail : seongjun@chonnam.ac.kr

본 연구에서는 에탄올의 생산단가를 낮추기 위해 발효 원료로써 음식물쓰레기 당화액을 이용하여 높은 수율을 얻을 수 있는 요소 기술을 확보하고, 또한 효소당화비용을 줄이고 환원당의 기질 저해를 감소시키기 위해 fed-batch mode의 반연속식 동시당화발효 시스템을 개발하는데 초점을 맞추었다.

재료 및 방법

균주 및 배지

섬유소분해효소 생산균주: 음식물쓰레기 효소당화에 사용되는 섬유소분해효소의 생산균주는 Kim 등(9)이 분리한 *Trichoderma harzianum* FJ1을 사용하였다.

섬유소분해효소 생산배양: 섬유소분해효소 생산의 전배양은 500 ml slant baffled flask에 *T. harzianum* FJ1을 YMEB 배지 (yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, glucose 4 g/l) 100 ml에 접종하여 30°C, 120 rpm에서 3일간 전배양하였다. 본 배양은 10 l jar fermenter (BioG, Hanil R&G Co., Korea)에서 working volume을 5 l로 하고, Mandel's medium(10)에서 탄소원인 Avicel와 CMC 대신에 섬유소 폐기물 (벗짚과 폐박스)을 기질로 각각 1%씩 사용하였다. 그리고 전배양액을 2% 접종하여 온도 30°C, 교반속도 200 rpm, 공기량 0.6 vvm (3 l/min), 초기 pH 6.0에서 4일간 배양하여 그 효소액을 음식물쓰레기의 당화에 사용하였다(9).

에탄올 생산균주: 에탄올 생산균주는 Han 등(2)이 주정공장 근처 토양에서부터 분리한 *Saccharomyces italicus* KJ를 사용하였다.

에탄올 생산배지: 에탄올 생산을 위한 배지로는 음식물쓰레기 당화액을 사용하였다. 당화액의 제조는 전남대학교 제 1 학생회관내 구내식당에서 수집한 음식물쓰레기 3 kg (함수율 80%)와 효소액 (반응액 중 농도 FPase 0.18 U/ml, amylase 2.2 U/ml) 1 L을 혼합하여 교반속도 200 rpm, 온도 50°C, 1일간 당화반응시킨 후 원심분리 (8,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 그 상등액을 당화액배지 (SFW, Saccharified Food Wastes)로 사용하였다. 이때 사용한 음식물쓰레기의 시료 성분은 C는 44.56 ± 0.30%, N은 2.373 ± 0.219%이었으며, C : N은 100 : 6.2로 미생물 성장시키는데 필요한 C : N이 100 : 5과 거의 일치하므로 SFW를 미생물 성장배지로 적절하였다.

에탄올 생산배양: 에탄올 생산에서 전 배양은 10 mL의 YM (yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 5 g/l, glucose 10 g/L) 배지가 들어있는 test tube에 고체배지에 보존 중인 균주 *S. italicus* KJ를 백금이로 접종하여 30°C, 100 rpm, 혐기성 조건에서 1일간 교반배양 후 상등액을 본 배양의 접종액으로 사용하였다. 본 배양은 YM배지를 대조배지로 하고, 당화액배지의 환원당을 100 g/l로 하여 100 ml vial에 넣어 사용하였다. 에탄올의 생산은 온도 30°C, 초기 pH 5.0, 교반속도는 100 rpm으로 1.5일 동안 배양하였다.

분석방법

환원당 및 효소활성 측정: 환원당은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 섬유소분해효소 생산배양액의 상등액을 dinitrosalicylic acid reagent (DNS)방법(11)으로 측정하였으며, FPase와 amylase의 효소활성은 1분동안 1 μmol의 환원당 (glucose)을 생산하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

동시당화발효를 위한 온도조건 검토: 에탄올 발효과정 (30°C)과 음식물쓰레기 당화과정 (50°C)의 온도를 동일하게 하기 위하여 그 중간값인 40°C에서 수행하도록, 40°C에서 계속적으로 계대배양하여 생성된 에탄올의 농도와 잔류 환원당의 농도를 측정하였다. 당화반응에 의한 환원당 생성속도와 에탄올 발효에 의한 환원당 소비속도의 균형을 맞추기 위하여, 효소학적 가수분해 반응 온도조건을 30, 35, 40°C로 변화시켜, 환원당의 생성속도와 에탄올 발효균주의 환원당 소비속도를 검토하여 동시당화발효의 최적의 온도조건을 결정하였다.

환원당 생성속도 조절을 위한 효소농도 검토: 500 ml 삼각 flask에 음식물쓰레기 200 g (함수율 80%)와 amylase 활성 1.0, 2.0, 3.0 U/ml의 효소액 40 ml와 1% sodium azide 용액 3 ml를 혼합하여 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24시간 간격으로 sampling하여 환원당을 측정하여 효소농도에 따른 환원당 생성속도를 검토하였다.

동시당화발효 (SSF, Synchronous saccharification and fermentation): 동시당화발효는 1 l jar-fermenter에서 온도 35°C, 효소농도 2.0 U/ml, 교반속도 150 rpm에서 실험을 수행하였다. 음식물쓰레기 200 g (함수율 80%)와 반응내 최종 효소농도 2.0 U/ml를 먼저 반응시켜 환원당을 확보한 후 4시간 후에 *S. italicus* KJ 1%를 접종한다. 12시간 단위로 50 g의 음식물쓰레기 (함수율 80%)를 공급하여 fed-batch culture의 동시당화발효 공정을 수행하였다.

결과 및 고찰

동시당화발효를 위한 온도조건 검토

동시당화발효 공정을 수행함에 있어서 가장 큰 문제점은 에탄올 발효 공정과 당화공정의 최적 온도조건이 다르다는 것이다. 본 연구에 사용된 에탄올 발효균주의 최적 발효공정은 온도 30°C이었으며, 음식물쓰레기 당화공정은 효소당화반응의 최적온도인 50°C이었다. 그래서 당화반응에 의한 환원당 생성속도와 에탄올 발효에 의한 환원당 소비속도의 균형을 맞추기 위해, 에탄올 발효균주를 30°C와 50°C 중간인 40°C에서 수행할 수 있도록, 40°C에서 지속적인 계대배양(Fig. 1)에 의한 순용방법과, UV를 조사하여 40°C에서 발효능력이 높은 mutant 균주 확보를 시도하였다. 그래서 당화공정에서 음식물쓰레기의 효소학적 가수분해 반응 온도조건을 30, 35, 40°C로 검토하여 당화속도를 검토하였다.

40°C에서 순용시키기 위하여 계대배양한 균주의 에탄올 생산은 계대배양 횟수에 따라 조금씩 증가하는 것을 확인할 수 있었으나, 수율 0.2 g-ethanol /g-reducing sugar 미만

으로 에탄올 생산수율이 낮은 수준이었다(Fig. 1). 그리고 UV mutant는 40℃에서 계대배양하여 얻은 균과 에탄올 생산이 비슷하였으므로 mutant 균주 확보에 실패하였다(data not shown).

효소학적 가수분해 반응의 온도조건을 변화시킨 후의 생산되는 환원당의 생성속도는 30℃에서 3.55 g/l · h, 35℃에서 5.84 g/l · h, 40℃에서 5.97 g/l · h이었다(Fig. 2, Table 1). 환원당의 생성속도는 단위 시간당 생성되는 환원당 농도 (g/L)로 계산하였으며, Fig. 2에서 직선의 기울기로 나타내었다.

한편, 온도 35℃에서 에탄올 발효균주의 환원당 소비속도는 -3.88 g/l · h이므로 동시당화발효에 적절한 온도조건은 35℃라 할 수 있다(Fig. 3). 환원당의 소비속도는 단위 시간당 소비되는 환원당의 농도 (g/l)로 계산하였으며, Fig. 3의 직선의 기울기로 나타내었고, 환원당이 소모가 되므로 “-”로 표현하였다.

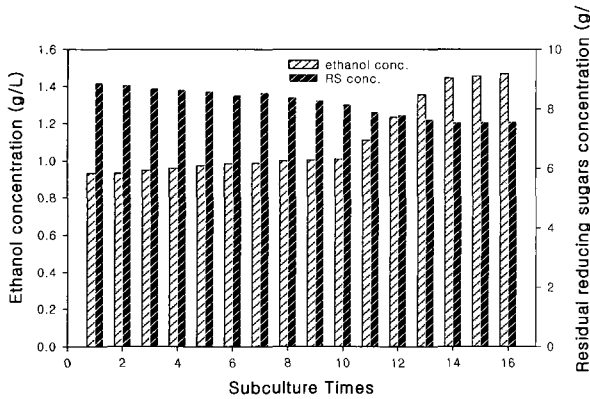


Figure 1. Adaptation by subcultures of 16 times at 40℃ for ethanol production enhancement (Elementary composition of food wastes used was C : N = 44.72 : 2.482).

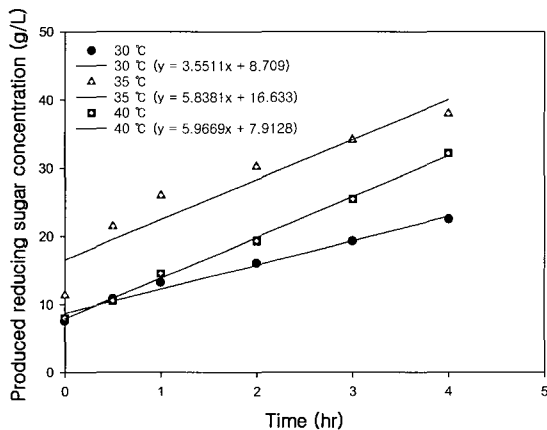


Figure 2. Production rate of reducing sugar by enzymatic reaction of food wastes according to temperature condition (30, 35, 40℃) (Elementary composition of food wastes used was C : N = 44.42 : 2.263).

동시당화발효를 위한 효소농도의 영향

음식물쓰레기 200 g (함수율 80%)와 최종효소농도 (amylase 기준으로 3.0 U/ml) 40 ml이 반응하였을 때 생산되는 환원당의 속도는 30℃에서 3.55 g/l · h, 35℃에서 5.84

g/l · h, 40℃에서 5.97 g/l · h(Table 1)이었으며, strain KJ가 소비하는 환원당 속도는 -3.88 g/L · h이었다. 이러한 결과로부터 동시당화발효의 최적온도를 35℃로 잠정 결정하였다. 그러나 생성되는 당의 속도와 소비하는 당의 속도가 약 2.00 g/l · h 차이가 나므로 여기서 축적된 당으로 인하여 에탄올 발효나 음식물쓰레기와 효소학적 가수분해 반응에 저해를 받게 된다. 그러므로 생성되는 환원당의 속도를 최적화하는 최종효소농도를 검토하였다.

35℃에서 소비하는 환원당의 속도와 생산하는 환원당의 속도를 일정하게 유지함으로써 동시당화발효가 가능하도록 당화효소의 농도를 조절하기 위하여, 효소액의 최종농도를 1.0, 2.0, 3.0 U/ml로 변화시켜 생성되는 환원당 속도를 알아보았다. 음식물쓰레기와 반응하는 효소농도 1.0, 2.0, 3.0 U/ml에서 생산되는 환원당의 속도는 각각 3.67, 4.80, 6.64 g/l · h이었다(Fig. 4, Table 2). Fig. 3에서 에탄올 생산균주가 35℃에서 소비하는 환원당의 속도는 -3.88 g/l · h이므로 효소의 최종농도는 2.0 U/ml가 동시당화발효 조건으로 적당하다고 사료된다.

Table 1. Comparison between production rate of reducing sugar under the different temperatures and reducing sugar consumption rate at 35℃

Temperature (℃)	Production rate of reducing sugar (g/l · h)	Consumption rate of reducing sugar (g/l · h)
30	3.55	-
35	5.84	-3.88
40	5.97	-

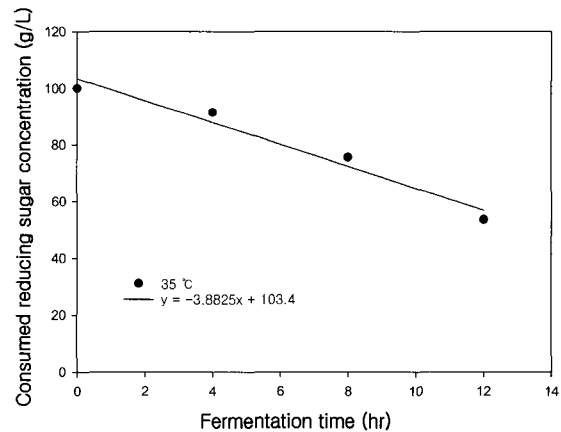


Figure 3. Consumption rate of reducing sugar in SFW medium by ethanol fermentation at 35℃ (Elementary composition of food wastes used was C : N = 44.53 : 2.375).

Fed-batch 에탄올 동시당화발효에서 음식물쓰레기 투입시간 결정

동시당화발효의 최적조건은 온도 35℃, 효소농도 (amylase 기준) 2.0 U/ml, 교반속도는 150 rpm으로 운전하였다. 이들 조건을 토대로 하여 1 l jar-fermentor에서 동시당화발효 공정을 수행하였다.

1 l jar-fermentor에 음식물쓰레기 200 g (함수율 80%)와 2.0 U/ml의 효소액 40 ml를 먼저 반응시킨 후, 4시간 후에 10 g/l 이상의 환원당이 생성되면 S. italicus KJ 1%를 접종한다. 4시간 단위로 sampling하고 분쇄한 음식물쓰레기

50 g (함수율 80%)을 주입한 후 질소가스로 치환한다. 그리고 생산되는 에탄올의 양과 지속적으로 유지되는 환원당의 양을 정량하였다.

4시간 단위로 음식물쓰레기를 주입하여 동시당화발효를 수행한 결과, 배양 36시간째 control로써 생산된 환원당 농도는 164.12 g/l, 에탄올발효에 사용하고 남은 환원당 농도는 85.70 g/l, 생성된 에탄올 농도는 41.52 g/l, 에탄올 수율은 0.25 g-ethanol/g-reducing sugar로 매우 낮았다(Fig. 5). 에탄올의 수율은 생성된 에탄올 농도 (g/l)와 control로써 생산된 환원당의 농도 (g/l)의 비로 나타내었다. 에탄올의 수율이 낮은 원인을 검토한 결과, 생산된 환원당을 다 소모하지 못한 채 다시 음식물쓰레기를 공급하게 되어 과다하게 얻어진 당으로 인하여 에탄올 생산이 원활하게 이뤄지지 못한 것으로 사료된다.

Table 2. Comparison between production rate of reducing sugar under the different amylase concentrations and reducing sugar consumption rate at 35°C

Consumption rate of reducing sugar (g/l · h)	Production rate of reducing sugar (g/l · h)			
	1.0 U/ml	2.0 U/ml	3.0 U/ml	
Rate	-3.88	3.67	4.81	6.64

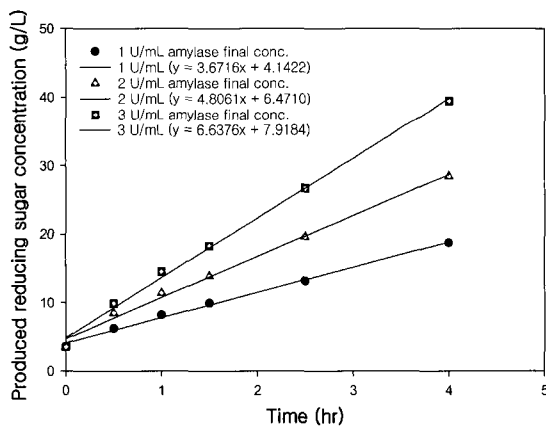


Figure 4. Production rates of reducing sugar under different amylase concentrations, 1.0, 2.0, 3.0 U/mL in SFW medium (Elementary composition of food wastes used was C : N = 44.62 : 2.562).

그래서, 동시당화발효시 음식물쓰레기의 주입시간을 4시간 간격으로 하였을 경우 배양액 내 잔존 환원당 농도가 너무 높으므로, 200 g의 음식물쓰레기를 넣은 후 생산된 환원당이 거의 소모될 때까지 기다린 결과 12시간 단위로 음식물쓰레기를 공급하는 것이 적당한 것으로 판명되었다. 그리하여 12시간 단위로 음식물쓰레기를 공급하여 동시당화발효를 수행한 결과, 120시간째 control로써 생산된 환원당의 농도는 142.4 g/l, 에탄올발효 후의 잔존 환원당 농도는 18.3 g/l, 생성된 에탄올 농도는 64 g/l, 에탄올의 수율은 0.45 g-ethanol/g-reducing sugar로, 비교적 높은 수율의 에탄올을 생산할 수 있었다(Fig. 6).

권 등(5)은 폐지로부터 fed-batch 동시당화발효하여 26.8 g/l의 에탄올을 생산하였으며, 효소를 기준으로 한 에탄올 생산성은 batch 동시당화발효의 약 2배이었다고 보고하

였다. 배양 중 glucose 농도가 저해농도보다 매우 낮게 유지되므로 glucose에 의한 저해작용은 무시할 만하다. 그러나 에탄올은 동시당화공정의 목적산물이므로 에탄올의 저해작용을 반드시 고려해야 한다. 에탄올의 저해작용은 문헌상에서 여러 형태로 보고되고 있으며, 에탄올 26 g/l 이하에서는 저해작용이 없으며, 그 이상에서는 선형관계의 영향을 미친다. Ghose와 Tyagi(12)는 cellulose 당화액을 기질로 실험한 결과에서 에탄올에 의한 영향은 선형적임을 보고하였다.

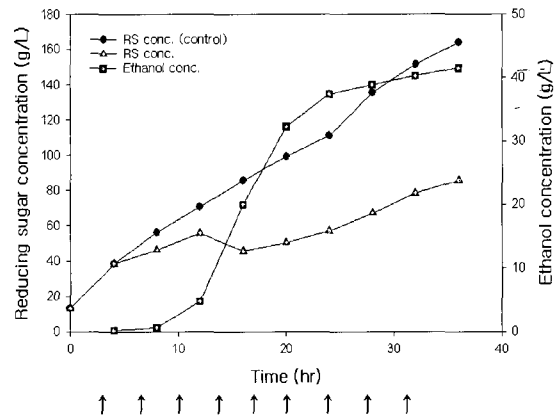


Figure 5. SSF using fed-batch culture mode supplying foodwastes with 4-hour interval. ↑ showed the addition times of foodwastes in the SSF.

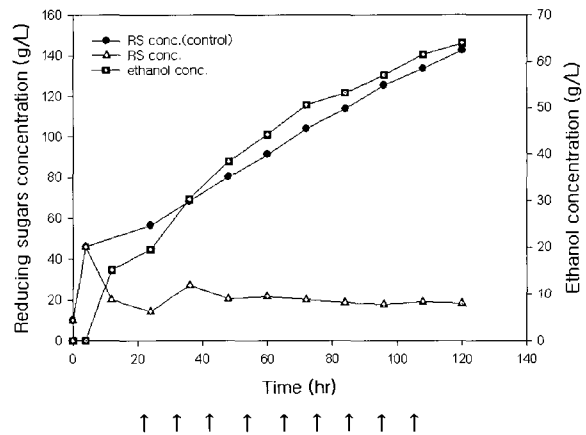


Figure 6. SSF using fed-batch culture mode supplying foodwastes with 12-hour interval. ↑ showed the addition times of foodwastes in the SSF.

요 약

본 연구에서는 에탄올의 생산단가를 낮추기 위해, 음식물쓰레기 당화액을 이용하여 효소당화비용을 줄이고 환원당의 기질저해를 감소시키기 위해 회분식의 반연속식 동시당화발효 시스템을 개발하였다. 음식물쓰레기 200 g와 최종효소액 (amylase 기준으로 3.0 U/ml) 40 ml가 반응하였

을 때 생산되는 환원당의 속도는 35°C에서 5.84 g/l · h로서, strain KJ가 소비하는 환원당 속도는 -3.88 g/l · h와 비슷하여 동시당화발효의 최적온도는 35°C로 결정되었다. 그리고 음식물쓰레기 당화를 위한 최적 효소농도는 2.0 U/ml로서 생산되는 환원당의 속도는 4.80 g/L · h이었다. 이는 에탄올 생산균주가 35°C에서 소비하는 환원당의 속도인 -3.88 g/l · hr와 비슷하므로, 효소의 최적농도는 2.0 U/ml로 결정하였다. Fed-batch식 동시당화발효에서 생산된 환원당을 다 소모하고 나서 12시간 단위로 음식물쓰레기를 공급하여 배양한 결과, 배양 120시간째 에탄올발효 후의 잔존 환원당 농도는 18.3 g/l, 생성된 에탄올 농도는 64 g/l, 에탄올의 수율은 0.45 g-ethanol/g-reducing sugar이었다. 그리하여 음식물쓰레기의 Fed-batch식 동시당화발효기술을 개발하여 효소당화비용을 줄이고 환원당의 기질저해를 감소시킴으로써 에탄올 수율을 향상시키는데 성공하였다.

감 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)”으로 지원받은 과제이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Park S. Y., M. S. Kim, and K. Kim (1996), Direct ethanol production from starch substrate by polyploid recombinant yeast secreting both α -amylase and glucoamylase, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **2**, 604-612.
2. Han H. J. and S. J. Kim (2006), Isolation and characterization of a strain for economical ethanol production, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 237-242.
3. Takagi, M., S. Abe, S. Suzuki, G. H. Emert, and N. Yata (1977), Symposium of bioconversion of cellulose substances in energy, *Chemicals and Microbial protein*, IIT, Delhi, 554.
4. Hong, Y. K. (1995), Improvement of ethanol yield by strain development and cell-immobilization for simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic materials, The university of Suwon.
5. 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, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 24-30.
6. Cysewski, G. R. and C. R. Wilke (1978), Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol, *Biotechnol. Bioeng.* **20**, 1421-1444.
7. Dzenis, A. and J. McNab (1984), Commercial recovery processes for ethyl alcohol, *In Proc. IV International Symp. Alcohol Fuels Technol.* **2**, 128-131.
8. Gulati, M. G., P. J. Westgate, M. Brewer, R. Hendrickson, and M. R. Ladish (1996), Sorptive recovery of dilute ethanol from distillation column bottoms stream, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**, 103-119.
9. Kim, K. C., S. S. Yoo, Y. A. Oh, and S. J. Kim (2003), "Isolation and characteristics of *Trichoderma harzianum* FJ1 producing cellulases and xylanase", *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 1-8.
10. Mandel, M. and D. Sternberg (1976), Recent advances in cellulase technology, *J. Ferment. Technol.* **54**, 267-286.
11. Thomas, M. W. and K. M. Bhat (1988), Methods for measuring cellulase activities, *Methods Enzymol.* **160**, 87-112.
12. Ghose T. K. and R. D. Tyagi (1979), Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and fermentor design, *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1401-1420.