

2007年 8月
碩士學位論文

음식물쓰레기 당화액을 이용한
바이오에탄올 생산 최적화 연구

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

吳 百 祿

음식물쓰레기 당화액을 이용한
바이오에탄올 생산 최적화 연구

Optimization for enzymatic saccharification of food waste
bio-ethanol production using thing

2007年 8月 24日

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

吳 百 祿

음식물쓰레기 당화액을 이용한
바이오에탄올 생산 최적화 연구

指導教授 金時郁

이 論文을 工學 碩士學位申請 論文으로 提出함

2007年 8月

朝鮮大學校 大學院

環境工學科

吳百祿

吳百祿의 碩士學位 論文을 認准함

委員長 朝鮮大學校 教授 李 仁 化 印

委員 朝鮮大學校 教授 申 鉉 載 印

委員 朝鮮大學校 教授 金 時 郁 印

2007年 8月

朝鮮大學校 大學院

제 1 장 서론	1
제 1 절 연구 배경 및 목적	1
제 2 절 이론적 고찰	3
1. Amylase의 정의 및 종류	3
1.1 Amylase	3
1.2 α -Amylase(액화형 amylase, endoamylase)	3
1.3 β -Amylase(당화형 amylase)	3
1.4 Glucoamylase(당화형 amylase)	4
2. 에탄올 발효의 원리	4
제 3 절 음식물쓰레기의 당화 및 생산의 최적화를 위한 반응표면분석법 (Response Surface Method, RSM)	8
제 2 장 실험재료 및 방법	9
제 1 절 실험재료	9
1. 기질	9
2. 효소 및 균주	9
3. 사용배지	10
제 2 절 실험방법	13
1. 가수분해 균주를 이용한 가용 전분 당화	13
1.1 배양온도에 따른 당화 영향	13
1.2 가용 전분 농도에 따른 당화 영향	13
2. 가수분해 균주와 효모를 이용한 동시당화발효	13
2.1 가용 전분의 동시당화발효에 대한 온도의 영향	13
2.2 음식물쓰레기 농도에 따른 동시당화발효 영향	14
3. <i>Trichoderma inhamatum</i> KSJ1 유래 cellulase와 Spirizyme Plus FG의 당화 비교 14	
4. 쌀밥의 효소학적 당화 및 에탄올생산	14
4.1 쌀밥의 효소학적 당화 최적화	14
4.1.1 쌀밥의 농도가 당화에 미치는 영향	14
4.1.2 효소접종 농도가 당화에 미치는 영향	15
4.1.3 효소반응 시간이 당화에 미치는 영향	15
4.1.4 효소반응 온도가 당화에 미치는 영향	15

4.2 쌀밥을 이용한 효소학적 당화 후의 에탄올생산	16
5. 음식물쓰레기의 효소학적 당화 및 에탄올생산 최적화	16
5.1 음식물쓰레기의 효소학적 당화조건 최적화	16
5.1.1 음식물쓰레기의 농도가 당화에 미치는 영향	16
5.1.2 효소접종 농도가 당화에 미치는 영향	16
5.1.3 효소반응 시간이 당화에 미치는 영향	17
5.1.4 효소반응 온도가 당화에 미치는 영향	17
5.2 음식물쓰레기를 이용한 효소학적 당화 후의 에탄올생산	17
6. 에탄올 발효 균주들의 생산성 비교	18
7. 반응표면분석법을 이용한 음식물쓰레기로부터 당화의 최적화	19
8. 반응표면분석법을 이용한 음식물쓰레기로부터 에탄올 생산의 최적화	21
9. 분석방법	22
9.1 환원당과 COD 분석	23
9.2 에탄올 분석	23
9.3 효소활성 측정	23
제 3 장 결과 및 고찰	24
1. 가수분해 균주를 이용한 가용 전분 당화	24
2. 가용 전분의 동시당화발효를 위한 온도의 영향	27
3. 음식물쓰레기 농도에 따른 동시당화발효	27
4. <i>Trichoderma inhamatum</i> KSJ1 유래 cellulase와 Spirizyme Plus FG의 당화 비 교	28
5. 쌀밥의 효소학적 당화 및 에탄올 생산	33
5.1 쌀밥의 효소학적 당화	33
5.2 쌀밥을 이용한 에탄올 생산	34
6. 음식물쓰레기의 효소학적 당화 및 에탄올 생산	40
6.1 음식물쓰레기의 효소학적 당화	40
6.2 음식물쓰레기를 이용한 에탄올 생산	40
7. 에탄올 발효 균주들의 생산성 비교	41
8. 음식물쓰레기에서 반응표면분석법을 이용한 당화의 최적화	48
9. 음식물쓰레기에서 반응표면분석법을 이용한 에탄올 생산의 최적화	53
제 4 장 결론	58
제 5 장 참고 문헌	60

List of Tables

Table 1. Compositions of YMS medium	11
Table 2. Compositions of YM medium	11
Table 3. Compositions of YMEB medium	11
Table 4. Compositions of Mandels medium	12
Table 5. Levels of enzymatic saccharification conditions in experimental design 20	
Table 6. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points	20
Table 7. Levels of enzymatic saccharification conditions in experimental design 22	
Table 8. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points	22
Table 9. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points	49
Table 10. Analysis of variance for quadratic model	50
Table 11. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)	50
Table 12. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points	54
Table 13. Analysis of variance for quadratic model	55
Table 14. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)	55

List of Figures

Fig. 1. The scheme of the enzymatic starch hydrolysis	6
Fig. 2. Pathway for production of ethanol by microorganism	7
Fig. 3. Fig. 3. Effect of starch concentration on the saccharification by (a) <i>B. amyloliquefaciens</i> K5 and (b) <i>B. amyloliquefaciens</i> KTCT1660 in the YMS medium	25
Fig. 4. Effect of temperature on the saccharification by (a) <i>B. amyloliquefaciens</i> K5 and (b) <i>B. amyloliquefaciens</i> KTCT1660	26
Fig. 5. Effect of temperature on the SSF by <i>B. amyloliquefaciens</i> K5 and <i>S. cerevisiae</i> KA4 in the 15% starch medium	29
Fig. 6. Effect of food waste concentration on the saccharification of <i>B. amyloliquefaciens</i> K5	30
Fig. 7. Effect of food waste concentration on the SSF of <i>B. amyloliquefaciens</i> K5 and <i>S. cerevisiae</i> KA4	31
Fig. 8. Comparison of Cellulolytic enzymes and Spirizyme Plus FG on the reducing sugar production using food waste	32
Fig. 9. Effect of substrate concentration on the saccharification by Spirizyme Plus FG	35
Fig. 10. Effect of enzyme concentration on the saccharification by Spirizyme Plus FG	36
Fig. 11. Effect of Enzyme reaction time on the saccharification by Spirizyme Plus FG	37
Fig. 12. Effect of temperature on the saccharification by Spirizyme Plus FG	38
Fig. 13. Time course of ethanol production by <i>S. cerevisiae</i> KA4 and changes of reducing sugar concentration after ethanol fermentation	39
Fig. 14. Effect of substrate concentration on the saccharification by Spirizyme Plus FG	42
Fig. 15. Effect of enzyme concentration on the saccharification by Spirizyme Plus FG	43
Fig. 16. Effect of Enzyme reaction time on the saccharification by Spirizyme Plus	44
Fig. 17. Effect of temperature on the saccharification by Spirizyme Plus FG	45
Fig. 18. Time-dependent ethanol production by <i>S. cerevisiae</i> KA4	46

Fig. 19. Comparison of ethanol production among the ethanol fermentative strains 47

Fig. 20. Response surface plot showing the effect of each independent variable and also their mutual effects on the production of reducing sugar ((A), (B) and (C)) 51

Fig. 21. Comparison of saccharification yield I both classic and RSM methods. 52

Fig. 22. Response surface plot showing the effect of each independent variable and also their mutual effects on the production of bio-ethanol ((A), (B) and (C)) 56

Fig. 23. Comparison of ethanol production I both classic and RSM methods 57

Abstract

Optimization for enzymatic saccharification of food waste bio-ethanol production using thing

Baek Rock Oh

Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.

Department of Environmental Engineering,

Graduate School, Chosun University

The aim of this study to investigate the optimal conditions for of enzymatic saccharification and bio-ethanol production from food waste. The *B. amyloliquefaciens* K5 could produce 96 g/L of reducing sugar from 15% soluble starch for 9 day, and 18.6 g/L of reducing sugar from food wastes for 7 day at 35°C, respectively. When *B. amyloliquefaciens* K5 and *S. cerevisiae* KA4 were inoculated simultaneously into the two different media, 23 g/L of ethanol was produced from soluble starch medium, and 12.9 g/L of ethanol was produced from food wastes medium, respectively. When Spirizyme Plus FG, a commercially available enzymes, was used for enzymatic saccharification of cooked rice wastes, the obtained optimal saccharification conditions were as follows: substrate concentration, 350 g-tCOD/L; enzyme concentration, 400 AGU/L; reaction time, 4h; and temperature, 55°C. Under the optimal condition, 250 g/L reducing sugar was produced from 350 g-tCOD/L cooked rice waste. This hydrolyzates was subjected to the ethanol fermentation under anaerobic conditions using *S. cerevisiae* KA4. This strain was able to produce 106g/L of ethanol during 4 days at 35°C.

When food wastes treated with Spirizyme Plus FG for enzymatic saccharification, the optimal conditions were obtained as follows: substrate concentration, 83 g-tCOD/L; enzyme concentration, 400 AGU/L; reaction time, 4h; and temperature, 55°C. Under the optimal condition, 105 g/L of reducing sugar was

produced from 80 g-tCOD/L of food waste. This hydrolyzates was subjected to the ethanol fermentation under anaerobic conditions using *S. cerevisiae* KA4. Finally, KA4 was able to produce 52 g/L of ethanol during 24h at 35°C. When hydrolyzates were used as the production medium, ethanol production yield was 0.50 g-ethanol/g-reducing sugar.

To produce reducing sugar and bio-ethanol from food waste, enzymatic saccharification and bio-ethanol fermentation conditions were optimized by a response surface methodology (RSM) based on the 2³ factorial central composite design (CCD). In case of reducing sugar production, RSM was adopted to derive a statistical model for the individual and interactive effects of pH, enzyme reaction temperature and enzyme concentration. This method was efficient; because only 20 experiments were necessary to assess these conditions. Model adequacy was very satisfactory, because coefficient of determination (R²) of response surface regression equation for reducing sugar production was 0.95. Optimal conditions for maximum reducing sugar production were determined as follows: pH, 5.12; enzyme reaction temperature, 46°C; and enzyme concentration, 0.156% (v/v). The model predicted that maximum reducing sugar production which can be obtained using the above optimal conditions of variables was 1.026 g-reducing sugar/g-tCOD. Similarly, experimental result of reducing sugar production was obtained as 1.050 g-reducing sugar/g-tCOD and this result was in close agreement with the model prediction. In case of bio-ethanol production, RSM was adopted to derive a statistical model for the individual and interactive effects of pH, temperature and reaction time. As a coefficient of determination (R²) of response surface regression equation for bio-ethanol production was 0.94. Optimal conditions for maximum bio-ethanol production were determined as follows: pH, 5.4; temperature, 35.45°C; and reaction time, 12h. The model predicted that maximum bio-ethanol production which can be obtained using the above optimal conditions of variables was 54.9 g/L. Similarly, experimental result of bio-ethanol production was obtained as 56.5 g/L from reducing sugar of 110 g/L and this result was in close agreement with the model prediction.

제 1 장 서론

제 1 절 연구 배경 및 목적

인구의 증가와 산업의 발달은 에너지의 사용을 계속해서 증가시키고 있으며, 이로 인해 화석연료의 매장량이 점차 감소하고 있다. 더구나 현재와 같은 수준으로 에너지를 사용하고, 향후 40-60년 내에 획기적인 대체에너지가 나오지 않는다면 인류는 심각한 에너지 문제에 직면하는 위기에 처하게 될 것이다. 우리나라의 경우에도 OECD 가입에 따른 환경규약에 따라 2010년까지 에너지원의 5% 이상을 환경친화적 신에너지원(지열, 풍력, 수소, 메탄 등)으로 대체해야 한다. 따라서 재사용이 가능하고, 지속 가능하며, 효과적이고, 경제적이며, 편리하고 안전한 대체에너지원의 개발이 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 절실히 필요하게 되었다. 다양한 신에너지 가운데 에탄올은 기능적인 면에서나 경제적인 면에서 석유를 대체할 수 있는 에너지 중 가장 적합한 연료 형태라 할 수 있다^{1,2)}. 청정에너지이며 대체에너지인 에탄올은 열 발생량이 높고 연소생성물인 CO₂ 및 CO발생량이 적기 때문에 지속 가능한 에너지원으로 이용 가치가 높다^{3,4)}. 엄청난 속도로 원유를 소비했기 때문에 유가가 가파르게 상승했고, 교토의정서 발효에 따라 탄소배출 저감대책이 필요해졌다. 최근 들어 바이오에탄올에 대한 관심과 수요가 많이 증가한 원인으로 고유가와 교토의정서 발효에 따른 탄소배출 저감대책이 필요했기 때문이다. 바이오에탄올과 휘발유를 혼합한 연료를 사용하게 되면 석유의존도를 낮춰 에너지원의 다변화를 통한 경제적 효과를 거둘 수 있을 뿐만 아니라, 일반 휘발유에 비해 이산화탄소 및 대기 오염물질 발생량이 현격하게 낮아 환경적인 이점이 있다. 바이오에탄올의 이러한 장점이 현 상황과 맞아떨어지면서 바이오 에탄올에 대한 관심이 자연스럽게 높아졌다. 현재 전 세계에서 생산되는 에탄올의 약70%는 생물학적 발효에 의해 이루어지고 있다. 세계적으로 생산에 드는 비용을 절감하기 위한 방안으로 생산의 원료물질을 각종 유기성 폐기물 또는 잉여곡물을 적극적으로 이용하고 있다. 그 한 예로 미국에서는 의 90% 이상을 잉여곡물(옥수수, 수수 등 전분질 계나 사탕수수, 사탕무우등 당질계 등)을 이용한 발효로부터 얻고 있다⁵⁾. 세계 제일의 사탕수수 생산국인 브라질에서는 지난 1976-2002년 기간의 생산에 있어 국

제수지에 무려 500억 달러나 기여했다.

발효공정에 있어서는, 생산의 향상을 위한 기존 회분식 발효공정을 개선, 유가식 공정, 균주 재순환 및 균주 고정화에 의한 연속발효공정이 꾸준히 연구되어 왔으며, 특히 섬유성 바이오매스를 이용한 동시당화발효(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 방법에 관한 연구가 가장 활발하다⁶⁾. 섬유성 바이오매스를 이용한 SSF는 당화와 발효를 분리하여 수행하는 분리당화발효(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)에 비하여 많은 장점이 있는데, 균주의 내열성으로 반응온도를 당화 효소의 최적온도까지 올릴 수 있고, 당화에 의한 환원당이 곧바로 최종 생성물로 전환되는 등 여러 가지 장점이 있다⁷⁾. 우리나라의 생활폐기물 쓰레기 발생량은 2004년 기준으로 하루 50,007톤이며, 그중 음식물쓰레기가 11,464톤으로 우리나라의 생활쓰레기 조성 중에서 가장 비중이 크고 대량으로 발생하고 있다⁸⁾. 이렇게 발생하는 음식물쓰레기의 대부분은 주로 매립에 의존하였지만 이것은 자원의 경제적 낭비이며, 매립에 의해 악취와 침출수가 발생하기 때문에 지하수와 하천의 수질이 오염될 수 있고 토양오염과 같은 2차 오염을 야기 시키는 문제점을 안고 있다^{9,10)}. 그뿐만 아니라 2005년부터 시행된 “음식물쓰레기의 직·매립 금지”는 음식물쓰레기 처리의 문제를 더욱 가중시키고 있다.

음식물쓰레기에는 발효산업의 탄소 및 에너지원으로 이용될 수 있는 유기물질을 다량 함유하고 있다. 이 유기물질을 적절한 방법을 이용하여 당화하면 고급 발효 당화액을 다량으로 얻을 수 있으며, 당화액을 생물전환 기술을 통해 발효시키면 고부가가치의 다양한 에너지로서 전환이 가능하다. 따라서 본 연구에서는 현재 많은 문제를 야기하는 음식물쓰레기를 이용하여 에탄올을 효율적으로 생산하는데 목적이 있다.

제 2 절 이론적 고찰

1. Amylase의 정의 및 종류

1.1 Amylase

Amylase는 전분을 구성하는 amylose, amylopectin과 glycogen 등 다당류의 α -1,4 glucoside결합이나 α -1,6 glucoside결합을 가수분해하는 효소이며, α -amylase, β -amylase, glucoamylase, pullulanase 등이 있다. 전분에 대한 이들의 효소작용은 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서의 E₁는 α -amylase, β -amylase의 complex로 여겨지며 E는 glucoamylase를 나타낸다¹¹⁾.

1.2 α -Amylase(액화형 amylase, endoamylase)

전분의 α -1,4결합을 임의의 점에서 분해하나 α -1,6결합은 분해하지 못한다. 그 결과 전분의 점도는 급격히 저하하고 dextrin으로 되기 때문에 환원당의 증가는 크지 않는다. 최종분해생성물은 dextrin, 맥아당과 소량의 포도당이다. 미생물에는 *Bacillus subtilis* 등의 세균과 *Aspergillus* 속 곰팡이 등에서 많이 생성된다.

1.3 β -Amylase(당화형 amylase)

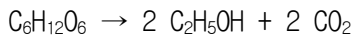
전분의 α -1,4결합을 비환원성 말단으로부터 β -형의 맥아당을 생성하면서 차례로 끊고 α -1,6 결합의 분기점에 이르러 작용이 정지된다. 따라서 다량의 맥아당과 함께 β -limit dextrin이 생성되므로 환원당은 증가하지만 점도는 점차 저하되지 않는다. 고구마, 맥아, 소맥 등에 존재하며, 이 효소를 생산하는 미생물에는 *B. polymyxa*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *Streptomyces praeus* 등이 있는데, 야생균주의 생산량은 일반적으로 낮지만 변이 주는 야생균주보다 200배 이상 생산하는 것도 있다.

1.4 Glucoamylase(당화형 amylase)

전분의 비환원성 말단으로부터 포도당 단위로 α -1,4결합을 차례로 분해하며 α -1,6결합도 분해하는 exo-형의 효소이다. Glucoamylase의 생산균은 *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. awamori*, *Rhizopus delemar*, *R. javanicus* 등이 있는데 이 중 대표적인 균은 *A. niger*이다. *A. niger*가 생산하는 glucoamylase는 전분을 70-80% 정도 분해한다. Glucoamylase는 근래에 와서 전분에서 고순도의 결정 포도당의 공업적 생산에 사용되고 잇는 매우 중요한 효소로 인식되고 있다.

2. 에탄올 발효의 원리

Fig. 2는 미생물에 의해 에탄올이 생산되는 대사경로를 나타낸 것이다. 효모의 에탄올발효는 glucose로부터 EMP 경로를 거쳐 생성된 pyruvic acid가 CO₂의 이탈로 acetaldehyde로 되고 다시 환원되어 에탄올을 생성하게 된다. 효모에 의한 당의 에탄올발효 이론식은 다음과 같으며 Gay-Lusacc의 식이라고 한다.



전분이 이용되는 경우는 전분이 glucose로 분해되는 과정을 거쳐야 하며 이론식은 다음과 같다.

	$(C_6H_{10}O_5)_n$	$+ nH_2O$	$\rightarrow nC_6H_{12}O_6$	$\rightarrow 2nC_2H_5OH$	$+ 2nCO_2$
	전분	물	포도당	에탄올	이산화탄소
분자량	162.14	18	180.14	92.14	88
	100 kg			56.82 kg (71.5 L)	
			100 kg	51.14 kg (64.3 L)	

이 식에 의하면 이론적으로는 glucose 100 kg으로부터 비중 0.7947의 에탄올이 51.14 kg (64.3 L) 생성되고, 전분 100 kg에서 56.82 kg (71.5 L)가 생성된다. 그

러나 원료성분 중 약 5%는 효모의 생육이나 부산물의 생성에 소비되므로 수득률은 이론치의 90 - 95% 정도이다. 포도당 이외에 fructose, mannose, galactose 등도 잘 발효된다. Maltose, sucrose와 같은 이당류도 잘 발효되지만 이들은 가수분해에 의해서 단당류로 되어 이용된다. 그러나 lactose, inulin은 특수한 효모에 의해서만 발효가 되고, 전분, 섬유질은 직접 발효되지 않으므로 발효를 하기 위해서는 당화과정이 선행되어야 한다.

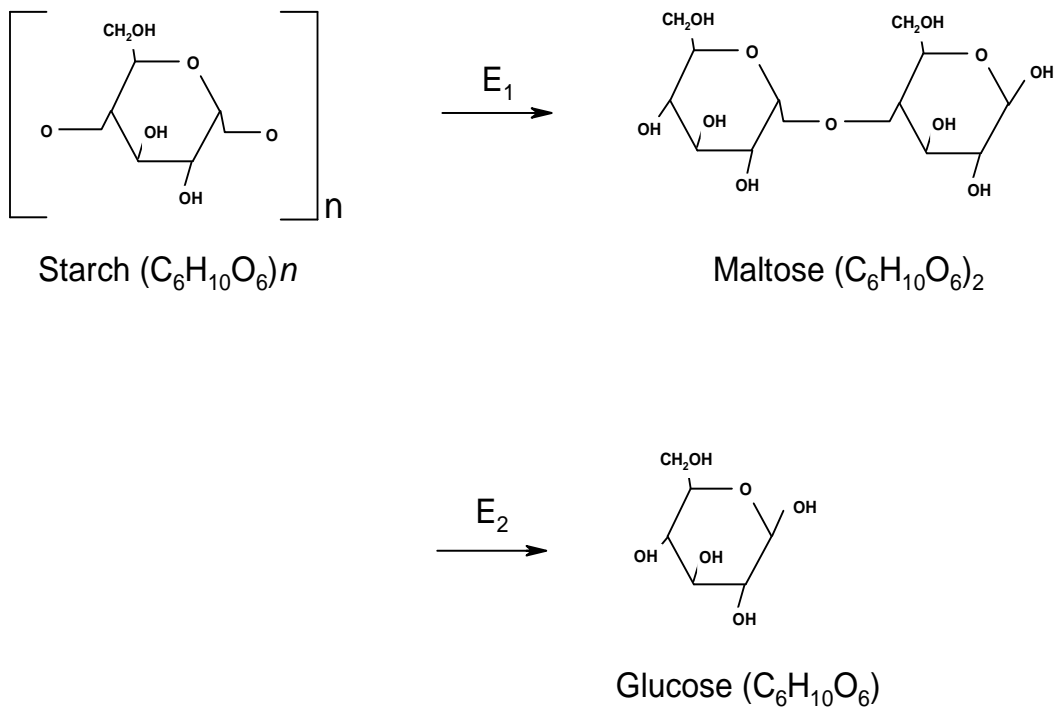


Fig. 1. The scheme of the enzymatic starch hydrolysis (E_1 : α -amylase, β -amylase, E_2 : glucoamylase).

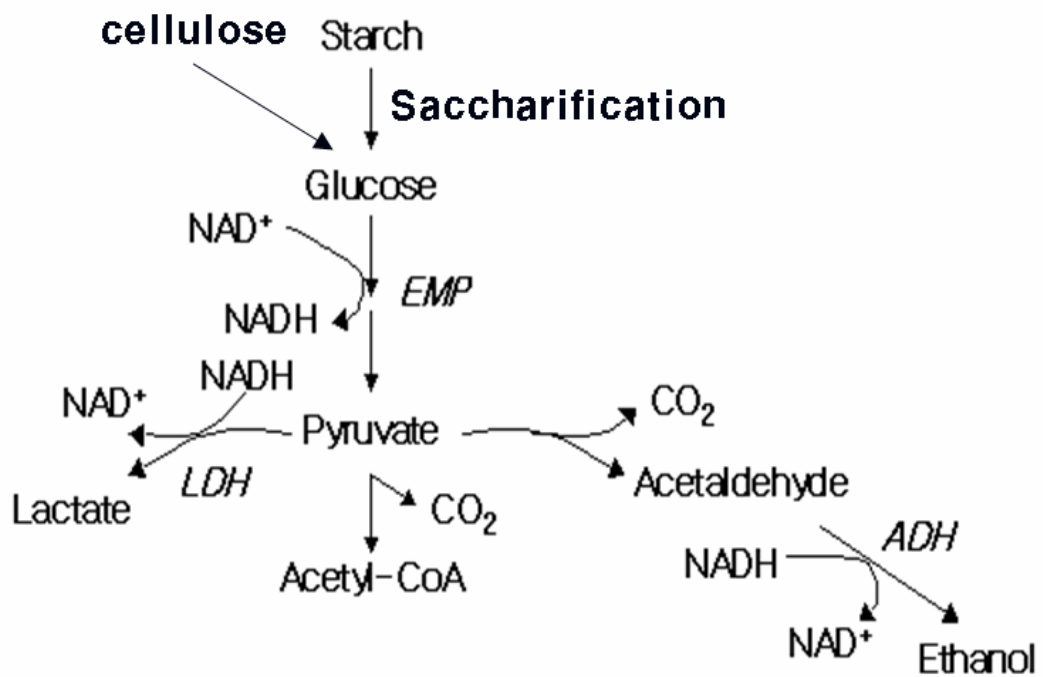


Fig. 2. Ethanol production Pathway by microorganism.

제 3 절 음식물쓰레기의 당화 및 생산의 최적화를 위한 반응표면분석법(Response Surface Method, RSM)

일반적으로 미생물 배양에 대한 최적 조건을 설정할 때 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one factor at a time method”를 많이 이용한다. 이 방법은 주어진 조건에서 그 요소의 영향을 파악할 수 있다는 장점이 있지만, 다른 요소(factor)들의 조건이 동시에 변하면 그 결과를 예측하기 어렵고, 특히 요소들 간에 상호작용이 존재할 경우 얻어진 결과가 요소만의 효과인지, 또는 다른 요소와의 상승효과에 의한 것인지를 구분할 수 없게 된다. 무엇보다도 이 방법의 가장 큰 문제점은 최대 반응치를 찾을 수 없다는 것이다. 따라서 주된 요인을 찾아내고, 요인들 간의 상호작용이 있는가를 살펴보면서 반응치에 미치는 요인들 가운데 어떠한 조합이 최대 반응치를 나타내는지 알아내기 위해서는 요인의 수준을 변경하면서 실험을 반복해야 한다. 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)은 이러한 경우에 사용되며, 이는 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호 작용에 따른 종속 변수의 변화에 대하여 최대 반응치를 나타내는 최적 조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석 방법이다. 이 방법은 주로 공업적 처리 과정에서 발생하는 문제를 주로 취급하고 있었으나, 최근에는 그 응용 범위가 넓어져서 반응관계를 갖는 모든 분야에 적용되고 있다¹²⁻¹⁴⁾. 반응 표면이 일차 다항 회기 모형으로 적절하다고 판단될 때에는 일반적으로 2^k 요인 실험을 사용하지만, 이 방법은 각 변수의 두 수준에서만 실험이 되므로 변수의 수준 변화에 따른 곡면적인 변화를 감지할 수 없는 단점이 있다. 이런 단점을 보완하고 적은 횟수의 실험으로 곡면을 추정하기 위하여 중심점(center points), 축점(axial points)을 2^k 요인 실험에 추가시킨 방법이 중심합성계획법(central composite method, CCD)이며, 반응표면분석을 용이하게 하기 위한 실험 계획법으로 주로 사용된다^{15, 16)}.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

1. 기질

본 실험의 기질로 가용 전분, 쌀밥, 음식물쓰레기를 사용하였다. 음식물쓰레기는 조선대학교 구내식당에서 수거하여 냉동실에 보관하고 필요한 때 해빙시켜 사용하였다. 음식물쓰레기의 주된 성분은 밥, 밀가루, 식품류, 채소류, 생선류, 그리고 육류였으며, 수분함량은 약80% 이었다.

2. 사용효소 및 균주

가용 전분의 가수분해 균주는 김 등이 분리한 *Bacillus amyloliquefaciens* K5을 사용하였다¹⁷⁾. 대조구로서 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660을 사용하였다. 쌀밥과 음식물쓰레기의 당화에 이용된 효소는 Spirizyme Plus FG(glucoamylase, α -amylase, cellulase, Novozyme)를 사용하였으며, 이 효소의 활성은 400 AGU/mL이였으며, 1 AGU는 1분 동안 1 μ mol의 말토오스에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 말한다¹⁸⁾. 음식물쓰레기의 당화정도를 Spirizyme Plus FG와 활성을 비교하기 위해 전남대학교 김성준 교수로부터 분양받은 *Trichoderma inhamatum* KSJ1에서 생산되는 cellulase를 사용하였다¹⁹⁾. 전 배양으로서 *T. inhamatum* KSJ1을 YMEB배지에 30 $^{\circ}$ C 진탕배양기에서 150rpm으로 2일간 진탕 배양하였다. Celluase의 생산을 위하여 30L 발효기(Ko-Biotech)에서 Mandels배지에 전배양액을 10%(v/v) 접종하였다. 이때 유효용적을 12L로 하고 30 $^{\circ}$ C, 200 rpm, 0.6vvm에서 3.5일간 배양하여 cellulase를 생산했다. cellulase 생산결과 amylase와 FPase가 각각 4.0과 0.5 U/mL가 생산되었다. 효소는 4 $^{\circ}$ C cold chamber에서 보관하여 필요시마다 사용하였다. 발효를 위한 실험은 김 등이 분리한 *Saccharomyces cerevisiae* KA4를 사용하였다²⁰⁾. 생산성을 비교하기 위해 대조구로서 구입한 *S. cerevisiae* KCTC 7296

과 서울대학교 이계준 교수로부터 분양받은 *Zymomonas mobilis* ZM4를 사용하였다.

3. 사용배지

가용 전분의 당화를 위한 *B. amyloliquefaciens* K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660의 배양은 nutrient broth를 사용하였다. 가용 전분의 당화에 적용하기 위해 YMS broth에 충분히 계대 배양하여 사용하였다. YMS broth는 YM 배지에서 glucose 대신에 탄소원으로 가용 전분이 포함된 배지를 말하며 배지 조성은 Table 1에 나타내었다. 섬유소 분해균주인 *T. inhamatum* KSJ1의 전 배양 배지는 YMEB를 사용하였으며, 효소를 생산하는 본 배양배지는 Mandels를 사용하였다. *T. inhamatum* KSJ1의 전 배양 및 본 배양배지는 Table 3과 Table 4에 나타내었다. 발효를 위한 전 배양 배지는 YM배지를 사용하였으며 Table 2에 나타내었다.

Table 1. Compositions of YMS medium

Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone(G)	5.0 g
Soluble starch	10.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1.0 L

Table 2. Compositions of YM medium

Yeast extract	3.0 g
Malt extract	3.0 g
Peptone(G)	5.0 g
Glucose	10.0 g
Agar	20.0 g
Distilled water	1.0 L

Table 3. Compositions of YMEB medium

Yeast extract	4.0 g
Malt extract	10.0 g
Glucose	4.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1.0 L

Table 4. Compositions of Mandels medium

Avicel	5.0 g	<u>Trace element solution</u>	
CMC	5.0 g	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.0 g
Peptone	1.0 g	MnSO ₄ ·H ₂ O	1.6 g
Urea	0.3 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4 g
CaCl ₂	0.3 g	CoCl ₂	2.0 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g	Distilled water	100 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4 g		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g		
Trace element solution	1.0 mL		
Distilled water	1.0 L		

제 2 절 실험방법

1. 가수분해 균주를 이용한 가용 전분 당화

1.1 배양온도에 따른 당화 영향

YMS 배지에서 1일 동안 35℃에서 전 배양한 *B. amyloliquefaciens* K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660를 YMS(가용 전분 15%)배지에 각각 접종하여 배양하였다. YMS(가용 전분 15%)배지에서 배양온도를 30-45℃까지 5℃ 간격으로 조절하여 12일간 진탕 배양하는 동안 일정시간 간격으로 배양액을 취하여 DNS법에 의한 환원당 분석 결과로서 *B. amyloliquefaciens* K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660의 당화능을 비교하였다.

1.2 가용 전분 농도에 따른 당화 영향

YMS배지에서 가용 전분 농도를 1, 5, 10, 15 그리고 20%로 하여 배양온도 35℃에서 12일간 진탕배양하는 동안 일정시간 간격으로 각각의 배양액을 취하여 DNS법에 의한 환원당 분석 결과로서 *B. amyloliquefaciens* K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660 두 균주의 당화능을 비교하였다.

2. 가수분해 균주와 효모를 이용한 동시당화발효

2.1 가용 전분의 동시당화발효에 대한 온도의 영향

YMS(가용 전분 15%)배지에서 *B. amyloliquefaciens* K5와 *S. cerevisiae* KA4를 동시에 접종한 후 발효온도를 30-45℃까지 5℃ 간격으로 조절하여 12일간 발효 하는 동안 일정시간 간격으로 각각의 배양액을 취하여 gas chromatography를 이용하여 발효 정도를 측정하였다.

2.2 음식물쓰레기 농도에 따른 동시당화발효 영향

가수분해 균주와 효모를 이용해 동시당화발효를 하기 위한 기질로서 음식물쓰레기를 사용하기 위해 음식물쓰레기 농도가 동시당화발효에 미치는 영향을 조사하였다. *B. amyloliquefaciens* K5와 *S. cerevisiae* KA4 균주를 각각 nutrient Broth와 YM 배지에서 전 배양 하였다. 음식물쓰레기 농도를 조절하기 위해 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5로 하였고 이때 음식물쓰레기 농도는 각각 83, 78, 52, 37, 30 g-tCOD/L이었다. 각각의 농도별 음식물쓰레기 배지에 가수분해균주와 에탄올발효 균주를 동시에 접종하여 35℃에서 10일에 걸쳐 발효하는 동안 일정시간 간격으로 발효액을 취하여 gas chromatography를 이용하여 발효 정도를 측정하였다.

3. *Trichoderma inhamatum* KSJ1 유래 cellulase와 Spirizyme Plus FG의 당화 비교

음식물쓰레기의 당화정도를 *T. inhamatum* KSJ1에서 유래된 cellulase와 Spirizyme Plus FG로 비교하였다. cellulase의 경우 기질의 농도는 음식물쓰레기와 cellulase의 비율을 1:1로 하였고 50℃에서 24시간 동안 효소반응을 시켰으며, 이때의 음식물쓰레기 농도는 85 g-tCOD/L이었다. Spirizyme Plus FG는 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고 효소접종량은 유효용적의 0.1% (v/v)로 하였으며, 55℃에서 8시간 동안 효소반응을 수행했다. 이때의 음식물쓰레기 농도는 85 g-tCOD/L이었다.

4. 쌀밥의 효소학적 당화 및 에탄올생산

4.1 쌀밥의 효소학적 당화 최적화

4.1.1 쌀밥의 농도가 당화에 미치는 영향

음식물쓰레기로부터 환원당 생성과 에탄올생산을 최대화 하기위한 기초 실험으로 대부분이 전분질로 이루어진 쌀밥을 이용하여 실험하였다. 기질농도에 따른 당화에 대한 영향을 알아보기 위해 밥알과 물의 비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5로 조절 하였고 이때 쌀밥의 tCOD 농도는 각각 350, 235, 175, 150, 135 g-tCOD/L이었다. 각 농도별 쌀밥배지에 0.1% (v/v)의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며 35℃에서 8시간동안 효소학적으로 당화시켰다.

4.1.2 효소접종 농도가 당화에 미치는 영향

효소 접종농도가 기질의 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 쌀밥과 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 쌀밥의 농도는 350 g-tCOD/L이었다. 효소접종농도를 100, 200, 400, 800, 2000, 4000 unit (AGU/L)으로 하였고 35℃에서 8시간동안 효소학적 당화과정을 수행하였다.

4.1.3 효소반응 시간이 당화에 미치는 영향

효소 반응시간이 기질이 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 쌀밥과 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 쌀밥의 농도는 350 g-tCOD/L이었다. 쌀밥배지에서 0.1%(v/v)의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며 35℃에서 8시간동안 효소학적 당화과정을 수행하였다. 당화 과정 중 2시간마다 시료를 취하여 시간에 따른 환원당 생성량을 측정하였다.

4.1.4 효소반응 온도가 당화에 미치는 영향

효소 반응온도에 따른 기질의 당화에 대한 영향을 알아보기 위해 쌀밥과 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 밥알의 농도는 350 g-tCOD/L이었다. 각각의 쌀밥배지에서 0.1%(v/v)의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며 효소반응 온도를 35-65℃까지 10℃간격으로 조절하여 온도에 따른 효소학적 당화과정을 수행하였다.

4.2 쌀밥을 이용한 효소학적 당화 후의 에탄올생산

쌀밥의 효소학적 당화 과정에서 최적화한 결과를 토대로 30L 발효기에서 유효용적을 12L로 쌀밥과 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 밥알의 농도는 350 g-tCOD/L이었다. 효소학적 당화 조건은 기질 농도 350 g-tCOD/L, 효소 접종농도 400AGU/L, 효소 반응시간 4h, 효소 반응온도 55°C이었다. 쌀밥의 효소학적 당화 과정 후 얻어진 환원당의 농도는 약 250 g-glucose/L이었다. 효소학적 당화 과정후 에탄올생산을 위해 YM배지에서 전 배양된 *S. cerevisiae* KA4를 2% (v/v) 접종하였으며, 당화액의 초기 pH를 6.0으로 조절한 후 발효조의 교반속도를 150rpm으로 하여 35°C에서 혐기적 조건으로 5일 동안 발효하였다. 발효가 진행 되는 동안 12시간 간격으로 발효액을 취하여 gas chromatography이용하여 을 분석하였다.

5. 음식물쓰레기의 효소학적 당화 및 에탄올생산 최적화

5.1 음식물쓰레기의 효소학적 당화조건 최적화

5.1.1 음식물쓰레기의 농도가 당화에 미치는 영향

음식물쓰레기 농도가 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1, 1:2, 1:3, 1:4로 하였고 이때 기질의 농도는 27, 35, 50, 85 g-tCOD/L이었다. 각각의 농도별 음식물쓰레기 배지에서 0.1%의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며 35°C에서 8시간동안 효소학적 당화과정을 수행하였다.

5.1.2 효소접종 농도가 당화에 미치는 영향

효소 접종농도가 기질의 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 기질의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 효소접종농도를 100, 200, 400, 800, 2000, 4000 unit (AGU/L)으로 하였고 35°C에서 8시간동안 효소학적 당화과정을 수행하였다.

5.1.3 효소반응 시간이 당화에 미치는 영향

효소 반응시간이 기질이 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 쌀밥의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 음식물쓰레기 배지에서 0.1%(v/v)의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며 35°C에서 8시간동안 효소학적 당화과정을 수행하였다. 2시간마다 시료를 취하여 시간에 따른 환원당 생성량을 측정하였다.

5.1.4 효소반응 온도가 당화에 미치는 영향

효소 반응온도가 당화에 미치는 영향을 알아보기 위해 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 기질의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 각각의 음식물쓰레기 배지에서 0.1%(v/v)의 Spirizyme Plus FG 효소를 접종하였으며, 효소반응 온도를 35-65°C까지 10°C간격으로 조절하여 온도에 따른 음식물쓰레기의 효소학적 당화과정을 수행하였다.

5.2 음식물쓰레기를 이용한 효소학적 당화 후의 에탄올생산

음식물쓰레기의 효소학적 당화 과정에서 최적화한 결과를 토대로 30L 발효기에서 유효용적을 12L로 하여 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고 이때 쌀밥의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 이때 음식물쓰레기의 효소학적 당화 조건은 기질 농도 85 g-tCOD/L, 효소 접종농도 400 AGU/L, 효소 반응시간 4h, 효소 반응온도 55°C이었다. 이때 환원당의 농도는 약 105 g-glucose/L이었다. 이후 YM배지에서 전 배양된 *S. cerevisiae* KA4를 2% (v/v) 접종하였으며, 당화액을 초기 pH를 6.0으로 조절한 후 발효조의 교반속도를 150rpm으로 하여 35°C에서 혐기적 조건으로 5일 동안 발효하였다. 발효가 진행 되는 동안 12시간 간격으로 발효액을 취하여 gas chromatography이용하여 을 분석하였다.

6. 에탄올 발효 균주들의 생산성 비교

음식물쓰레기의 효소학적 당화 과정으로 얻은 환원당을 이용하여 *S. cerevisiae* KA4와 공시균주인 *S. cerevisiae* KCTC 7296 그리고 *Zymomonas mobilis* ZM4균주의 에탄올 생산성을 비교하였다. 이때 환원당의 농도는 약 105 g-glucose/L이었다. 7L 발효기에서 4L 당화액을 초기 pH를 6.0으로 조절한 후 *S. cerevisiae* KA4의 경우는 발효온도가 35℃인 발효조에서 150rpm의 교반속도로 발효하였으며, *S. cerevisiae* KCTC 7296의 경우는 발효온도가 30℃인 발효조에서 150rpm의 교반속도로 발효하였다. *Zymomonas mobilis* ZM4의 경우에는 발효온도가 30℃인 발효조에서 정지 상태로 발효 하였다. 각각의 균주는 YM배지에서 충분히 전 배양하여 2% (v/v) 접종하였다.

7. 반응표면분석법을 이용한 음식물쓰레기로부터 당화의 최적화

반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)은 발효공정과 생산 공정의 최적화를 수행하는데 가장 영향력 있는 방법이다²¹⁾. 본 연구에서는 음식물쓰레기에서 당생성의 최적화를 위해 반응표면 분석법을 사용 하였다. 본 실험의 음식물쓰레기는 물과 음식물쓰레기를 1:1로 희석하였으며 이때 음식물쓰레기의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 당생성에 가장영향을 미칠 수 있는 변수 즉, 독립변수(X_n)는 초기 pH(X_1), 반응 온도(X_2), 효소 접종량(X_3)이었으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고, 실험값은 Table 5에 나타내었다. Table 5에 나타낸 독립변수는 중심합성실험계획(central composite design, CCD)에 따라 Table 6과 같이 20구로 설정하였으며 각각의 반응시간은 4시간으로 실시하였다. 또한, 독립변수의 영향을 받는 종속변수(Y) 즉, 환원당 농도를 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였으며, 이때 세 가지 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다²²⁾.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

여기서 Y 는 종속변수, X_1 , X_2 , X_3 은 독립변수, β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다. 중심합성법에 의거해 얻은 실험결과를 바탕으로 "Design Expert" software (version 7.1.1, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안정점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면분석으로 환원당 생성의 최적 조건을 찾았다.

Table 5. Levels of enzymatic saccharification conditions in experimental design

Variable	Symbol code	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Initial pH	X_1	4	5	6	7	8
Temperature (°C)	X_2	25	30	35	40	45
Enzyme inoculation (%)	X_3	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25

Table 6. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points

	Number	Initial pH	Temperature	Enzyme inoculation
		X_1	X_2	X_3
Fractional 2^3 factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00
	2	+1.00	-1.00	-1.00
	3	-1.00	+1.00	-1.00
	4	+1.00	+1.00	-1.00
	5	-1.00	-1.00	+1.00
	6	+1.00	-1.00	+1.00
	7	-1.00	+1.00	+1.00
	8	+1.00	+1.00	+1.00
Star points	9	-2.00	0.00	0.00
	10	+2.00	0.00	0.00
	11	0.00	-2.00	0.00
	12	0.00	+2.00	0.00
	13	0.00	0.00	-2.00
	14	0.00	0.00	+2.00
Central points	15	0.00	0.00	0.00
	16	0.00	0.00	0.00
	17	0.00	0.00	0.00
	18	0.00	0.00	0.00
	19	0.00	0.00	0.00
	20	0.00	0.00	0.00

8. 반응표면분석법을 이용한 음식물쓰레기로부터 에탄올 생산의 최적화

에탄올 생성 최적화 실험에서 사용된 배지는 제2장 나의 7에서 수행된 효소학적 당화 최적화 실험에서 최적조건을 찾아 이를 토대로 음식물쓰레기의 당화액을 얻었다. 이때의 환원당 농도는 약 110 g-glucose/L이었으며, 에탄올 발효 배지로 사용되었다. 에탄올 생산에 가장 영향을 미칠 수 있는 변수 즉, 독립변수(X_n)는 초기 pH(X_1), 발효 온도(X_2), 발효 시간(X_3)이었으며, 각 조건들은 -2, -1, 0, 1, 2로서 다섯 단계로 부호화하였고, 실험값은 Table 7에 나타내었다. Table 7에 나타난 독립변수는 중심합성실험계획(central composite design, CCD)에 따라 Table 8과 같이 20구로 설정하여 실시하였다. 또한, 독립변수의 영향을 받는 종속변수(Y) 즉, 에탄올 농도를 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였으며, 이때 세 가지 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다²²⁾.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

여기서 Y 는 종속변수, X_1 , X_2 , X_3 은 독립변수, β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다. 중심합성법에 의거해 얻은 실험결과를 바탕으로 "Design Expert" software (version 7.1.1, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, USA)을 이용하여 통계적으로 분석하여 회귀방정식을 구하였다. 회귀분석 결과 임계점이 최대점과 최소점이 아니고 안정점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면 분석으로 에탄올 생성 최적 조건을 찾았다.

Table 7. Levels of ethanol fermentation conditions in experimental design

Variable	Symbol code	Range and levels				
		-2	-1	0	1	2
Initial pH	X ₁	4	5	6	7	8
Temperature (°C)	X ₂	25	30	35	40	45
Reaction time (h)	X ₃	8	10	12	14	16

Table 8. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points

	Number	Initial pH	Temperature	Enzyme inoculation
		X ₁	X ₂	X ₃
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00
	2	+1.00	-1.00	-1.00
	3	-1.00	+1.00	-1.00
	4	+1.00	+1.00	-1.00
	5	-1.00	-1.00	+1.00
	6	+1.00	-1.00	+1.00
	7	-1.00	+1.00	+1.00
	8	+1.00	+1.00	+1.00
Star points	9	-2.00	0.00	0.00
	10	+2.00	0.00	0.00
	11	0.00	-2.00	0.00
	12	0.00	+2.00	0.00
	13	0.00	0.00	-2.00
	14	0.00	0.00	+2.00
Central points	15	0.00	0.00	0.00
	16	0.00	0.00	0.00
	17	0.00	0.00	0.00
	18	0.00	0.00	0.00
	19	0.00	0.00	0.00
	20	0.00	0.00	0.00

9. 분석방법

9.1 환원당과 COD 분석

발효액내의 환원당 농도는 DNS법에 의해 측정하였으며^{23,24)}, COD는 Cr법으로 수질 공정시험법에 준하여 조사하였다.

9.2 에탄올 분석

발효액내의 에탄올의 함량분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후 상등액 100 μ l를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼 충전물은 80/120 Carbopack B-DA*/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detector (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 135°C이었고, injector와 detector의 온도는 모두 200°C이었으며, carrier gas는 N₂를 사용하였고, flow rate는 24 mL/min이었다.

9.3 효소활성 측정

Cellulase의 활성은 FPase의 활성을 대표적으로 사용하였다. FPase 활성은 여과지(filter paper)의 가수분해 능력을 나타내었는데, 50 mg(1X6 cm)의 여과지(Watman no. 1)를 50 mM 구연산 완충용액(pH 4.8)으로 희석되어진 배양 상등액 1.0 mL와 혼합하여, 50°C에서 60분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하여 계산하였다. 효소활성은 1분 동안 1 μ mol의 말토오스에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다²⁵⁾.

Amylase의 활성은 α -amylase의 활성도를 대표적으로 사용하였다. α -amylase의 활성은 2% (w/v)의 가용 전분 용액 0.8 mL에 50 mM 구연산 완충용액(pH 4.8)으로 희석되어진 효소액 0.2 mL을 혼합한 반응물을, 50°C에서 30분간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS법으로 정량하여 계산하였다. 효소활성은 1분 동안 1 μ mol의 말토오스에 상응하는 환원당을 생성하는데 필요한 효소량을 1 unit로 정의하였다²⁶⁾.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 가수분해 균주를 이용한 가용 전분 당화

B. amyloliquefaciens K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660 균주를 이용하여 가용 전분을 당화 하였으며 당화 조건의 변화에 따른 당생성량의 변화를 측정 비교하였다. Fig. 3에서 *B. amyloliquefaciens* K5의 경우 1%의 starch농도 에서는 초기 1일후 약 5 g/L의 환원당을 생산하지만 이후 당을 모두 소모한 것으로 보아 환원된 당을 생육에 필요한 탄소원 및 에너지원으로 소비한 것으로 보인다. 반면에 20%의 starch농도에서는 110 g/L의 가장 많은 환원당을 생산했고, 15% starch농도 에서는 96 g/L의 환원당을 생산하였다. 그러나 환원당 생산 수율의 경우 15% starch농도에서 0.64 g-reducing sugar/g-soluble starch로 가장 높았다. 대조구 인 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660의 경우 15%의 starch농도에서 35 g/L의 환원당 생산량을 보였으며, 환원당 생산 수율 또한 0.23 g-reducing sugar/g-soluble starch의 생산 수율을 얻어 *B. amyloliquefaciens* K5와 마찬가지로 가장 높았다. 그러나 같은 15% starch농도에서 *B. amyloliquefaciens* K5와 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660에 의한 환원당 생산량을 비교했을 때, *B. amyloliquefaciens* K5에 의한 환원당 생산량이 대조구에 비해 약 3정도 높았다.

Fig. 4.는 YMS(가용 전분 15%)에서 당화 균주의 배양 온도에 따른 환원당 생성을 보여준다. *B. amyloliquefaciens* K5의 최대 환원당 농도는 35℃에서 11일후 약 85 g/L를 나타냈으며, *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660의 경우 최대 환원당생성 농도는 30℃에서 6일후 약 37 g/L를 나타냈다. 위의 결과를 종합해 볼 때 *B. amyloliquefaciens* K5균주가 *B. amyloliquefaciens* KCTC 1660균주보다 가용 전분에서 당화에 있어서 우수한 능력을 보여 주었으며, 따라서 *B. amyloliquefaciens* K5가 전분질계 유기물을 분해하여 당화시키는데 우수한 균주로 판단된다.

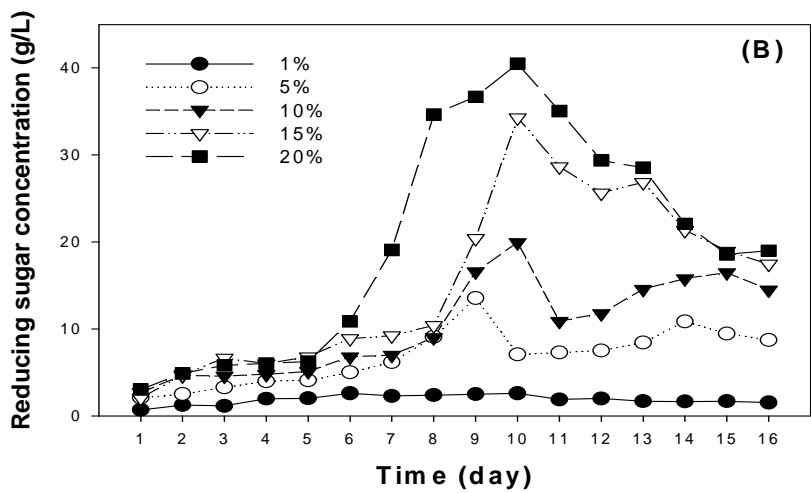
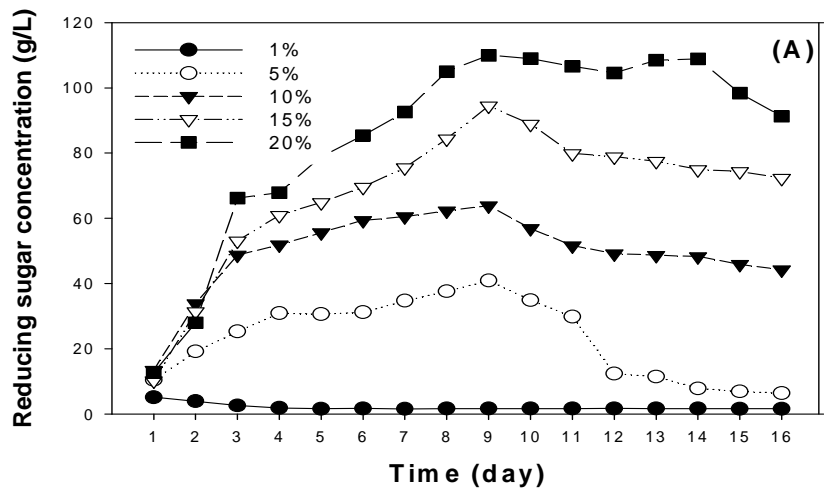


Fig. 3. Effect of starch concentration on the saccharification by (a) *B. amyloliquefacien* K5 and (b) *B. amyloliquefacien* KTCT1660 in the YMS medium.

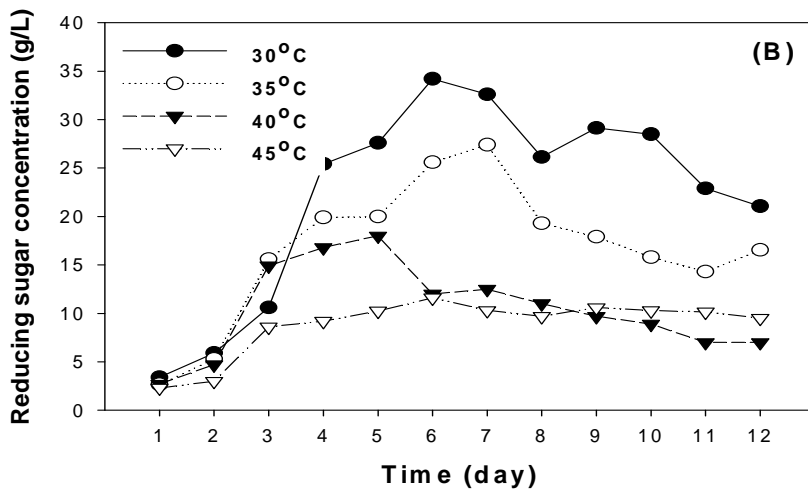
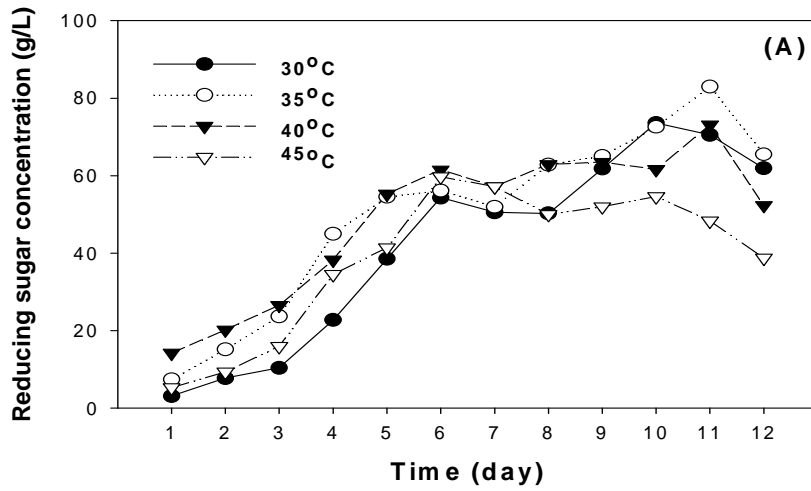


Fig. 4. Effect of temperature on the saccharification by (a) *B. amyloliquefacien* K5 and (b) *B. amyloliquefacien* KTCT1660.

2. 가용 전분의 동시당화발효를 위한 온도의 영향

SSF(simultaneous saccharification and fermentation, 동시당화발효) 공정은 경제적인 에탄올 생산을 위한 여러 가지 면에서 가장 합리적인 공정이라고 알려져 있다. 동시당화발효는 당화공정과 발효공정을 동시에 수행하기 때문에, 기존의 SHF(simultaneous hydrolysis and fermentation, 분리당화발효)공정에 비해 한 개의 반응기만 필요하기 때문에 설비비용이 절감된다. 제 3장 1의 결과로부터 우리는 음식물쓰레기 당화에 이용할 우수균주로서 *B. amyloliquefaciens* K5을 선발하였으며, YMS배지의 starch 농도를 15%로 고정했다. YMS 배지에서 동시당화발효를 위한 온도 변화는 30-45℃까지 5℃ 간격으로 조절하였다. SSF공정을 이용하여 당화균주인 *B. amyloliquefaciens* K5와 에탄올 생산균주인 *S. cerevisiae* KA4를 YMS(가용 전분 15%)배지에 동시에 접종하여 에탄올 생산에 있어 온도에 따른 영향을 조사하였다. 온도조건을 검토한 결과 35℃에서 발효 9일후 약 23 g/L의 가장 높은 에탄올 생산량을 보였으나 30℃와 45℃에서는 에탄올을 거의 생산하지 못하였다(Fig. 5).

3. 음식물쓰레기 농도에 따른 동시당화발효

Fig. 5에서 보여주듯이 *B. amyloliquefaciens* K5와 *S. cerevisiae* KA4 균주의 동시당화발효를 위한 최적온도 조건은 35℃이었다. Fig. 6은 음식물쓰레기의 농도에 따라 2일 동안 당화 했을 때 환원당 생산량을 보여주었으며, 이때 얻어진 환원당 농도에서 에탄올 발효를 수행 한 결과를 나타낸다. Fig. 7에서 보여주는 바와 같이 35℃의 발효 온도에서 83 g-tCOD/L으로 부터 2일동안 약 13 g/L의 에탄올을 생산하였으며, 음식물쓰레기의 농도가 올라감에 따라 생산되는 에탄올 농도가 높아짐을 알 수 있었으나, 최종 생산되는 에탄올 농도가 너무 낮았다. 이것은 당화균주인 *B. amyloliquefaciens* K5의해 음식물쓰레기로부터 생성된 환원당 농도가 낮기 때문으로 사료되며, 또한 음식물쓰레기내의 분해속도가 늦은 다양한 성분들 때문인 것으로 판단된다. 따라서 이후 실험 과정에서는 가수분해 균주 대신에 음식물쓰레기를 효율적으로 당화시킬 수 있는 상업적으로 이용 가능한 효소를 이용하

기로 하였다.

4. *Trichoderma inhamatum* KSJ1 유래 cellulase와 Spirizyme Plus FG의 당화 비교

Fig. 8은 *Trichoderma inhamatum* KSJ1에서 유래된 cellulase와 Spirizyme Plus FG를 이용하여 음식물쓰레기의 당화정도를 비교하였다. Fig. 8에서 보듯이 음식물쓰레기와 cellulase의 비율을 1:1로 하여 50℃에서 24시간 동안 효소반응을 했을 때 75 g-reducing sugar/L를 생산했다. Spirizyme Plus FG는 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고, 효소접종량은 유효용적의 0.1% (v/v)로 하였으며 55℃에서 24시간 동안 효소반응 했을 때 생산된 환원당은 *T. inhamatum* KSJ1에서 생성된 cellulase 보다 약 30%이상 증가한 107 g/L를 생산했다. 이러한 결과로 볼 때 Spirizyme Plus FG가 보다 우수한 효소이며, 따라서 쌀밥과 향후 음식물쓰레기의 당화에 Spirizyme Plus FG를 사용하기로 하였다.

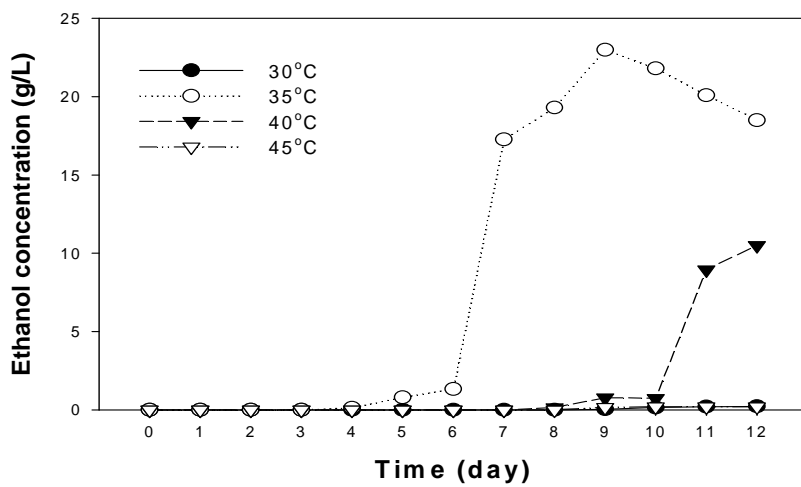


Fig. 5. Effect of temperature on the SSF by both *B. amyloliquefacien* K5 and *S. cerevisiae* KA4 in the 15% starch medium.

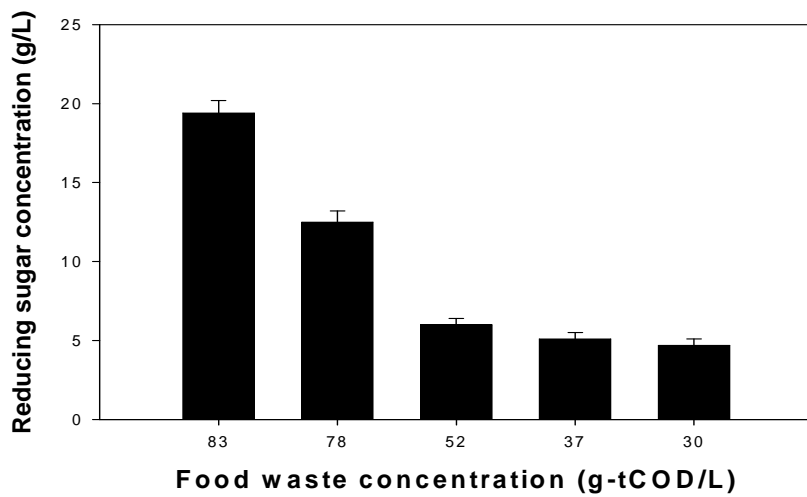


Fig. 6. Effect of food waste concentration on the saccharification of *B. amyloliquefaciens* K5.

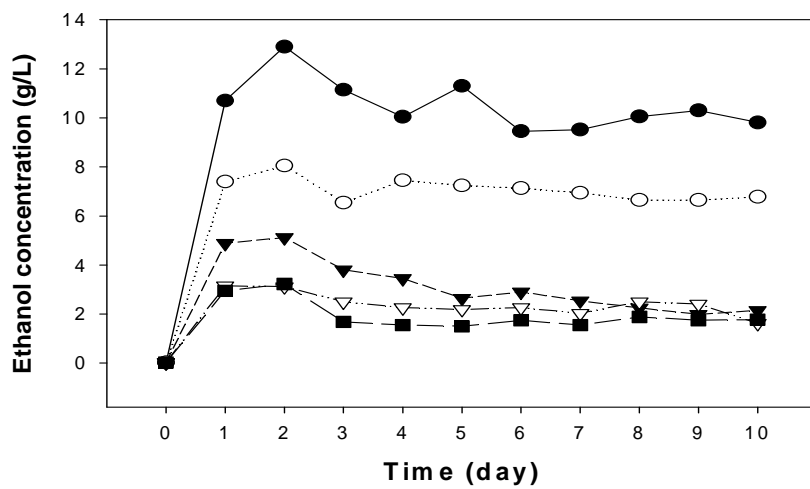


Fig. 7. Effect of food waste concentration on the SSF with both *B. amyloliquefaciens* K5 and *S. cerevisiae* KA4. Symbol(g-tCOD/L): (■), 30.5; (▽), 37; (▼), 52; (○), 78; (●), 83.

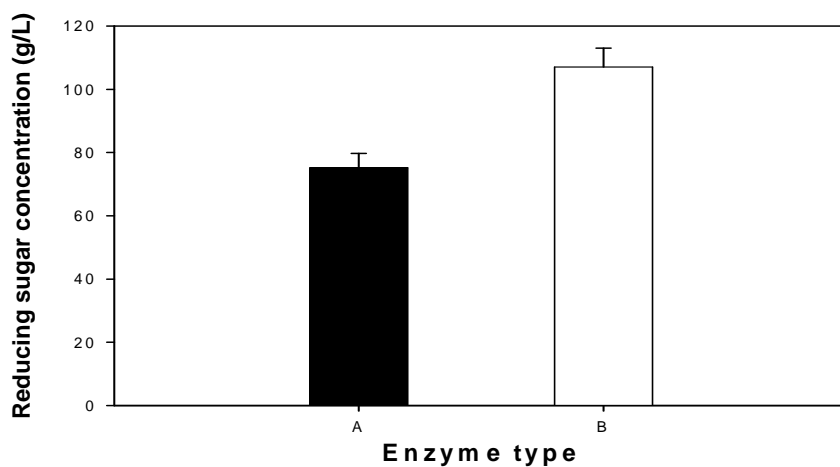


Fig. 8. Comparison of cellulolytic activity of *T. inhamatum*-derived cellulase with that of commercial Spirizyme Plus FG. Symbol:(■), *Trichoderma inhamatum*-derived cellulase; (□), commercial Spirizyme Plus FG.

5. 쌀밥의 효소학적 당화 및 에탄올 생산

5.1 쌀밥의 효소학적 당화

Spirizyme Plus FG 효소를 이용하여 기질로서 쌀밥을 당화하였으며 당화 조건의 변화에 따른 당의 생성량 변화를 측정하였다. Fig. 9는 다양한 농도의 쌀밥을 35°C에서 유효용적의 0.1%의 효소(Spirizyme Plus FG)를 접종 했을 때 당생성량을 보여준다. Spirizyme Plus FG은 glucoamylase, α -amylase, cellulase 로 구성되어 있다. 이 효소의 활성은 재료 및 방법에서 언급되었듯이 400 AGU/mL이다. 쌀밥 농도가 350 g-tCOD/L일때 약 225 g-glucose/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 이것은 Spirizyme Plus FG가 쌀밥을 당화하는데 있어서 우수한 능력을 보여주는 결과이다. Spirizyme Plus FG가 쌀밥을 당화하는데 필요한 최적의 효소접종농도를 조사하였다. Fig. 10은 350 g-tCOD/L의 기질을 35°C에서 8시간동안 다양한 양의 효소를 투입하여 당화한 후 환원당 농도를 분석한 결과이다. 효소의 접종농도가 올라갈수록 환원당의 농도가 올라감을 알 수 있었으며, 효소의 가격과 생성되는 환원당의 농도를 고려했을 때 효소접종농도는 400 AGU/L가 최적으로 판단된다. Fig. 11에서는 쌀밥을 당화하는데 적절한 반응시간을 조사한 결과를 나타내었으며, 350 g-tCOD/L의 기질을 35°C에서 당화하는 동안 2시간마다 환원당의 농도를 분석하였다. 효소 반응 후 4시간까지 환원당의 농도가 증가하였지만, 이후 시간이 지나도 환원당의 농도는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 효소와 기질의 최적 반응 시간은 4시간으로 사료된다. Fig. 12는 Spirizyme Plus FG가 350 g-tCOD/L의 쌀밥을 당화하는데 필요한 최적 온도를 조사한 결과이다. 당화 온도가 상승함에 따라 생산된 환원당의 농도가 증가 하였으며, 55°C에서 가장 높은 250 g-glucose/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 그러나 65°C의 당화조건에서는 55°C에서보다 환원당의 생성량이 감소했으며, 이것은 65°C 이상에서 Spirizyme Plus FG의 활성이 떨어지기 때문으로 생각된다. 이러한 결과를 종합해볼 때 효소학적 당화에 있어 효소접종농도와 최적온도 그리고 반응시간은 각각 400 AGU/L와 55°C 그리고 4시간 이라는 결론을 얻을 수 있었다.

5.2 쌀밥을 이용한 에탄올 생산

앞의 쌀밥 효소학적 당화과정에서 최적화한 결과를 토대로 30L 발효기에서 유효용적 12L로 쌀밥과 물의 비율을 1:1로 하여 당화과정을 수행하였다. 이때 밥알의 농도는 350 g-tCOD/L이었다. 효소학적 당화 조건은 기질 농도 350 g-tCOD/L, 효소 접종농도 400 AGU/L, 효소 반응시간 4h, 효소 반응온도 55°C이었으며, 당화과정 후 생성된 환원당의 농도는 약 250 g-glucose/L이었다. 김 등의 결과에 의하면 glucose를 이용한 *S. cerevisiae* KA4에 의한 에탄올 발효 최적 조건은 초기 pH 6.0으로 조절된 배지에서 35°C의 발효온도로 발효했을 때 최적의 발효특성을 보여준다고 보고하였다²⁰⁾. 따라서 에탄올 발효실험 또한 발효온도 35°C와 초기 pH를 6.0으로 맞추어 에탄올 발효를 수행하였다.

본 실험에서는 *S. cerevisiae* KA4의 에탄올 생산능력을 조사하기 위하여 효소학적 당화에서 얻은 당화액을 이용하여 에탄올 발효를 수행하였다. Fig. 13에서 보는 바와 같이 250 g/L의 환원당을 35°C에서 pH 6.0으로 조절한 후 교반속도 150rpm에서 120시간 발효를 시켜 106 g/L의 에탄올을 생성하였다. 에탄올 농도가 더 이상 증가하지 않는 120시간 이후 환원당의 농도를 측정한 결과 약 15 g/L이었으며, 이것은 에탄올 발효를 하는데 있어 환원당을 거의 다 소모하여 에탄올이 더 이상 생성되지 않는 것으로 판단된다.

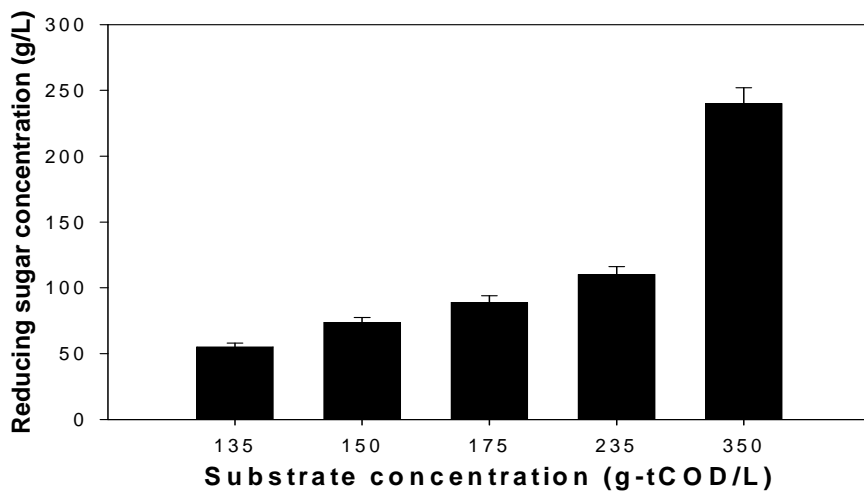


Fig. 9. Effect of cookedrice waste concentration on the saccharification by Spirizyme Plus FG.

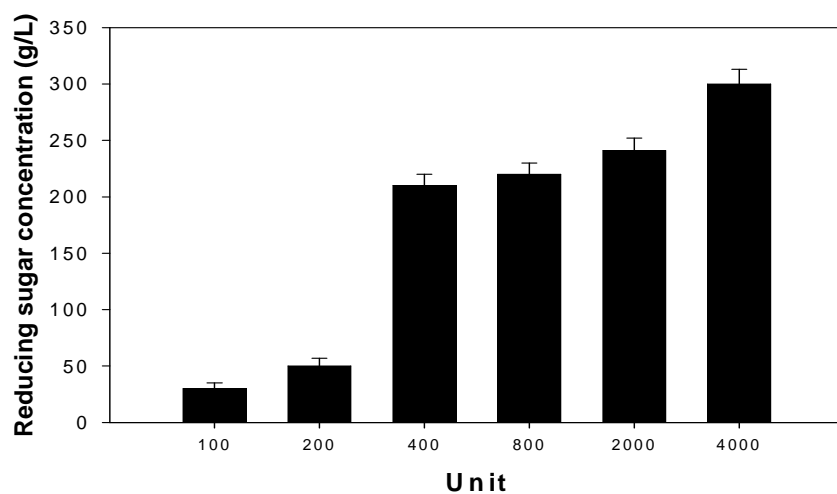


Fig. 10. Effect of enzyme concentration of pirizyme Plus FG on the saccharification of cooked rice waste.

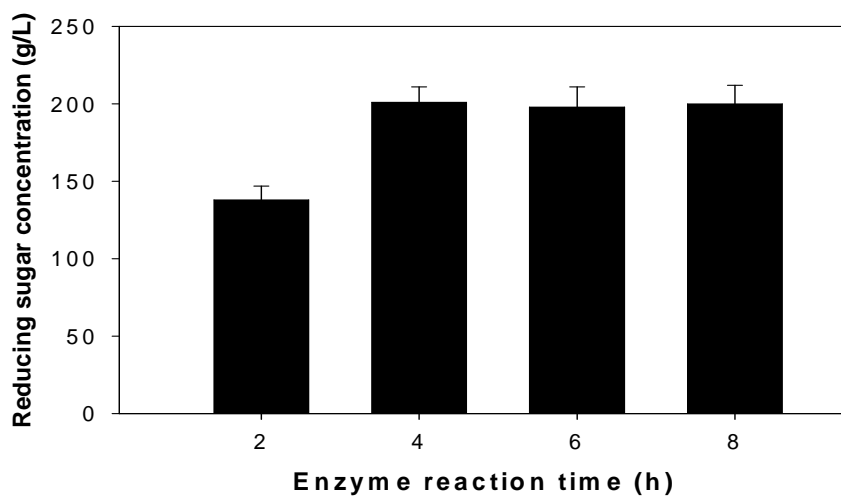


Fig. 11. Effect of Enzyme reaction time on the saccharification of cooked rice waste with Spirizyme Plus FG.

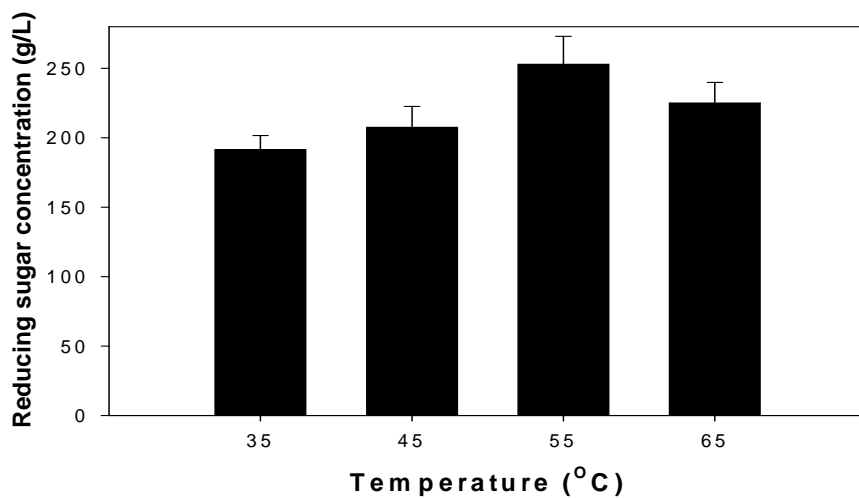


Fig. 12. Effect of temperature on the saccharification of cooked rice waste by Spirizyme Plus FG.

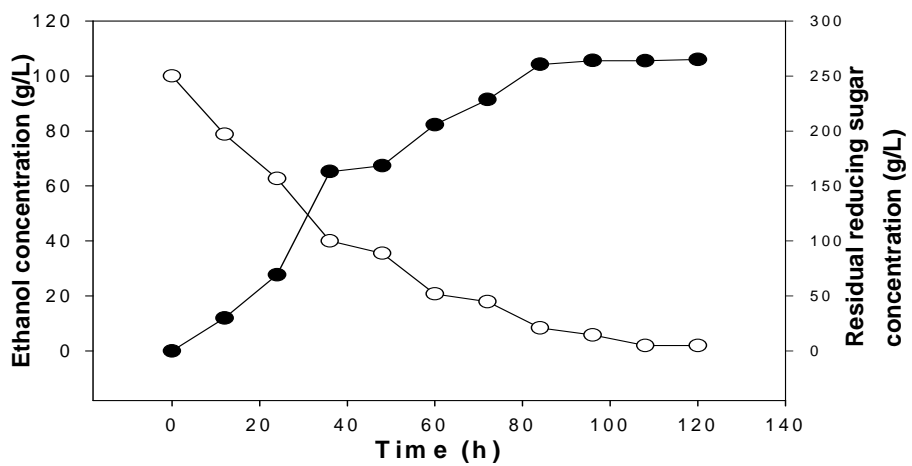


Fig. 13. Time-dependent changes of ethanol production and reducing sugar concentration during cooked rice waste fermentation. Symbol: (●), ethanol concentration; (○), reducing sugar concentration.

6. 음식물쓰레기의 효소학적 당화 및 에탄올 생산

6.1 음식물쓰레기의 효소학적 당화

Spirizyme Plus FG를 사용하여 음식물쓰레기를 당화하였으며 당화 조건의 변화에 따른 당의 생성량 변화를 측정하였다. Fig. 14는 다양한 농도의 음식물쓰레기를 35°C에서 유효용적의 0.1% (v/v)의 효소(Spirizyme Plus FG)를 접종하였을 때 당 생성량을 보여준다. Spirizyme Plus FG는 α -amylase, glucoamylase로 구성되어 있다. 이 효소의 활성은 400 AGU/mL이다. 음식물쓰레기 농도가 85 g-tCOD/L일 때 약 80 g-glucose/L의 환원당을 얻을 수 있었다. Fig. 15는 Spirizyme Plus FG가 음식물쓰레기를 당화하는데 필요한 최적의 효소접종농도를 조사하였다. 실험은 85 g-tCOD/L의 기질로부터 35°C에서 8시간동안 다양한 양의 효소를 투입하여 환원당 농도를 분석하였다. Fig. 15에 나타낸 바와 같이 효소의 접종농도가 올라갈수록 환원당의 농도가 올라감을 알 수 있었다. 여기서 효소의 가격과 생성되는 환원당의 농도를 고려했을 때 효소접종농도는 400 AGU/L가 최적으로 생각된다. 음식물쓰레기를 당화하는데 적절한 반응시간을 조사하였다. 실험은 85 g-tCOD/L의 기질을 35°C에서 2시간마다 환원당의 농도를 분석하였다. Fig. 16에 나타낸 바와 같이 효소 반응 후 4시간까지 환원당의 농도가 증가하였으며, 이후 시간이 지나도 환원당의 농도가 증가하지 않았다. 따라서 효소와 기질의 최적 반응시간은 4시간으로 사료된다. Spirizyme Plus FG가 85g-tCOD/L의 음식물쓰레기를 당화하는데 필요한 최적 온도를 조사하기 위해 35, 45, 55, 65°C에서 각각 수행하였으며, 앞서 얻은 최적 반응시간을 이용 4시간 후의 환원당을 분석하였다. Fig. 17에 나타낸 바와 같이 55°C에서 가장 높은 105 g-glucose/L의 환원당을 얻을 수 있었다. 그러므로 음식물쓰레기의 효소학적당화에 최적온도와 반응시간은 각각 55°C와 4시간 이라는 결론을 얻을 수 있었다.

6.2 음식물쓰레기를 이용한 에탄올 생산

음식물쓰레기의 효소학적 당화실험에서 최적화한 결과를 토대로 당화실험을 수행했다. 30L 발효기에서 유효용적 12L로 음식물쓰레기와 물의 비율을 1:1로 하였고

이때 음식물쓰레기의 농도는 85 g-tCOD/L이었다. 음식물쓰레기의 효소학적 당화 조건은 기질 농도 85 g-tCOD/L, 효소 접종농도 400AGU/L, 효소 반응시간 4h, 효소 반응온도 55°C이었으며 이때 환원당의 농도는 약 105 g-glucose/L이었다. 에탄올 발효 실험은 반응온도 35°C와 초기 pH를 6.0으로 조절하여 수행하였다.

본 실험에서는 *S. cerevisiae* KA4의 에탄올 생산능력을 조사하기 위하여 효소학적 당화에서 얻은 당화액을 이용하여 에탄올 발효를 실행하였다. Fig. 18에 나타난 바와 같이 105 g-glucose/L의 환원당을 35°C, pH 6.0, 교반속도 150rpm에서 24시간 동안 발효를 하였으며 15시간후 최고 52 g/L의 에탄올을 생성하였으며, 이때 에탄올 생산 수율은 0.50 g-ethanol/g-reducing sugar를 나타냈다.

7. 에탄올 발효 균주들의 생산성 비교

음식물쓰레기를 효소학적 당화 후 얻은 당화액 으로부터 *S. cerevisiae* KA4와 공시균주인 *S. cerevisiae* KCTC 7296 그리고 *Z. mobilis* ZM4의 에탄올 생산성을 비교 하였다. 초기 환원당 농도는 105 g-glucose/L 이었으며, Fig. 19에서 보듯이 각각의 균주를 접종하고 6시간 후 까지는 에탄올 농도가 별 차이가 없었다. 15시간 이후 각각의 균주의 에탄올 생산량은 각각 53.5, 44.4, 31 g-ethanol/L이었으며, 이때 에탄올 생산 수율은 각각 0.51, 0.42, 0.30 g-ethanol/g-reducing sugar으로 산출 되었다. 발효가 끝난 후 환원당은 거의 다 소모한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *S. cerevisiae* KA4균주가 *Z. mobilis* ZM4와 공시균주인 *S. cerevisiae* KCTC 7296보다 우수한 에탄올 생산성을 보여주는 결과이다.

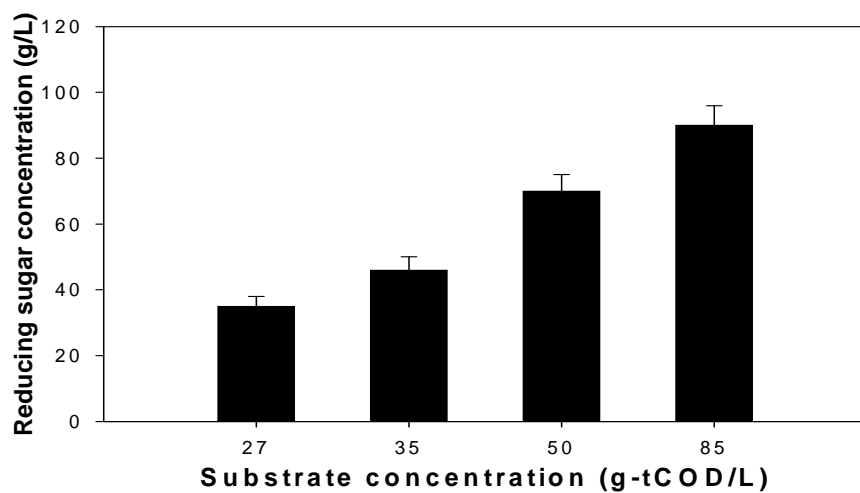


Fig. 14. Effect of food waste concentration on the saccharification with Spirizyme Plus FG.

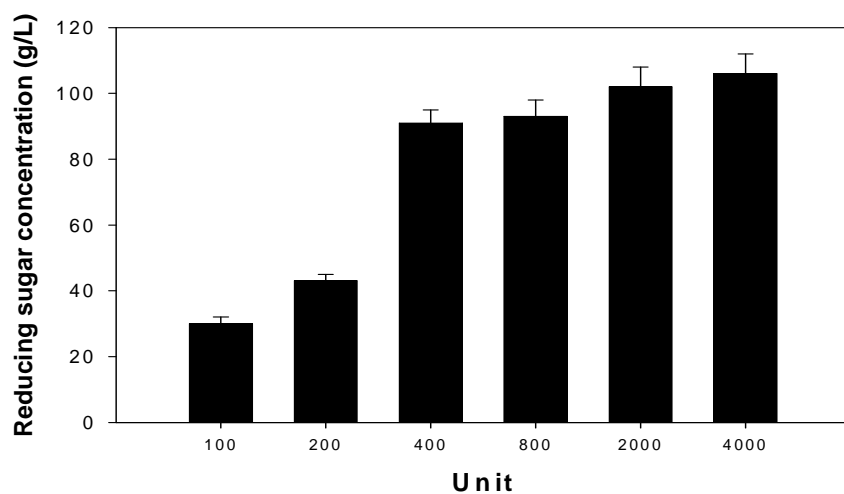


Fig. 15. Effect of enzyme concentration on the saccharification of food waste by Spirizyme Plus FG.

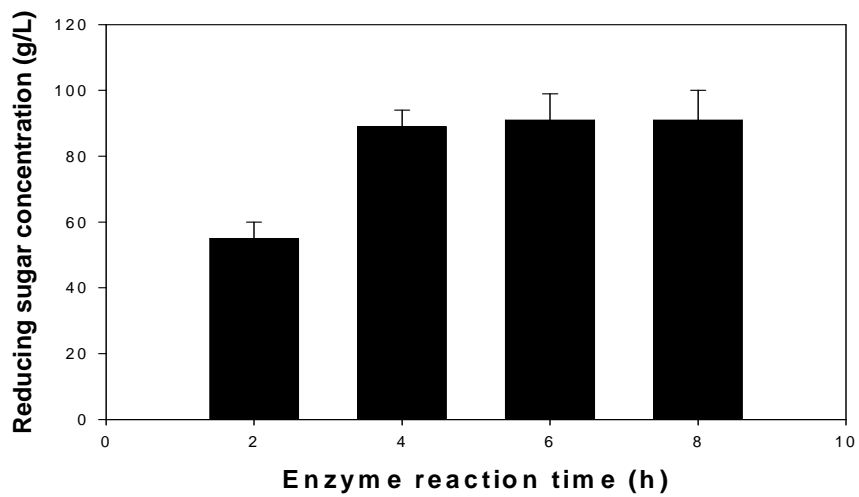


Fig. 16. Effect of enzyme reaction time on the saccharification of food waste with Spirizyme Plus.

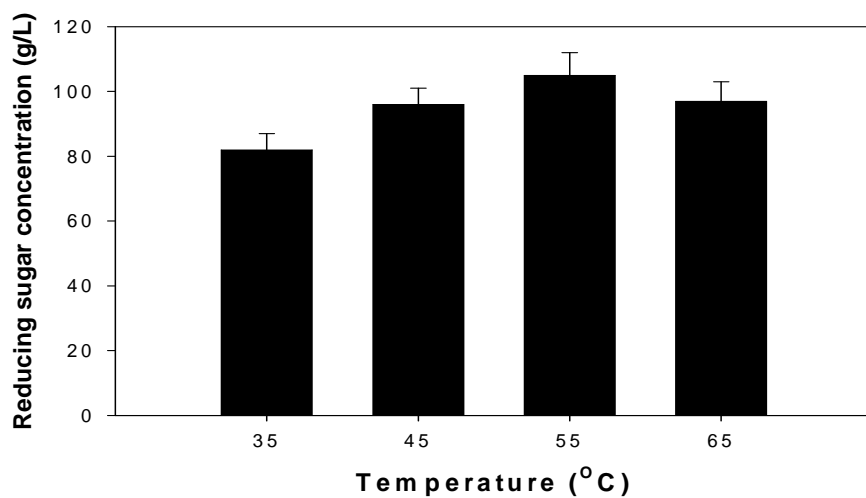


Fig. 17. Effect of temperature on the saccharification of food waste by Spirizyme Plus FG.

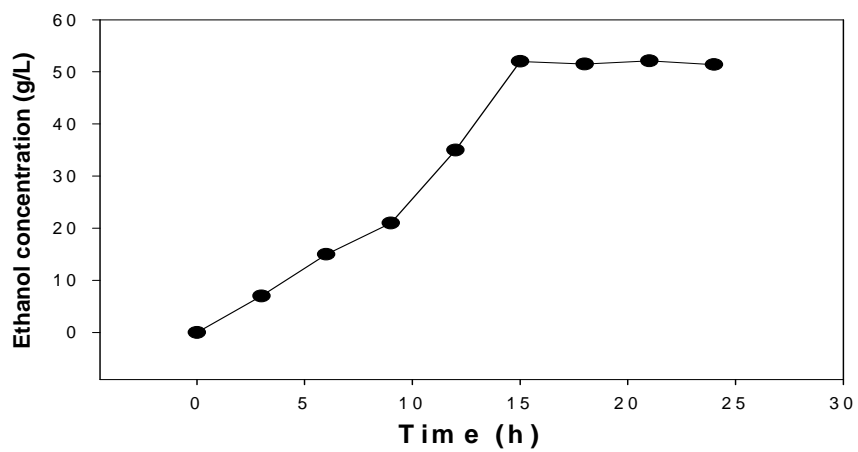


Fig. 18. Time-dependent ethanol production from food waste by *S. cerevisiae* KA4.

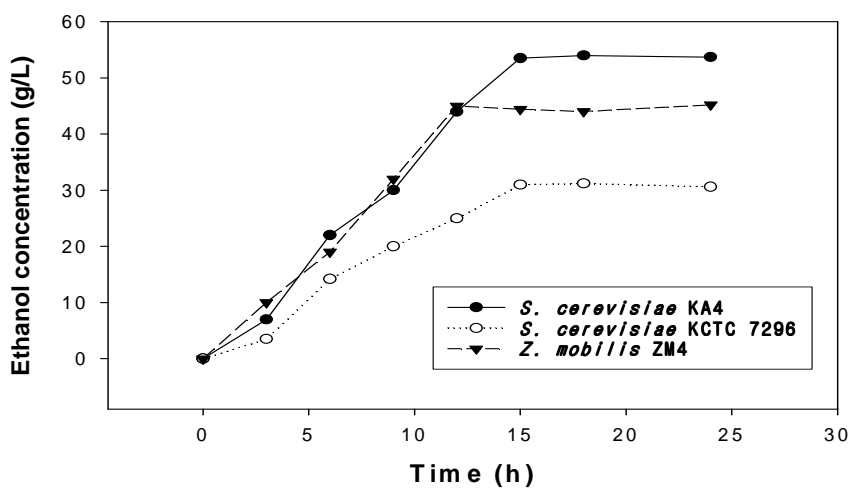


Fig. 19. Comparison of ethanol production capacities of *S. cerevisiae* KA4 with those of *S. cerevisiae* KCTC 7296 and *Z. mobilis* ZM4.

8. 음식물쓰레기에서 반응표면분석법을 이용한 당화의 최적화

음식물쓰레기로부터 당화의 최적화를 위해 6.1절에서 수행한 방법과 달리 반응표면분석법을 사용하였다. 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 초기 pH, 반응 온도, 효소 접종량으로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로써 5개로 부호화하여 당 생성능을 조사하였으며, Table 9에 결과를 나타내었다. 당생성에 영향을 주는 3개의 변수 중에서 유의확률(Probability value, P value)값이 가지는 의미는 일반적으로 0.05보다 작으면 처리간 효과 차이가 “통계적으로 유의하다(significant)”라고 하며, 이 값이 0.01보다 작으면 ”통계적으로 매우 유의하다(highly significant)”라고 말한다. 여기서 유의하다란 용어는 가정한 모형이 데이터 해석에 의미가 있다는 뜻이다. Table 10의 분산분석표 결과에 의하면 모델식은 P-value가 <0.0001으로 통계적으로 매우 유의한 범위에 있음을 알 수 있으며, 변수 변화량(CV)의 값은 2.82이므로 실험의 정확성과 신뢰도가 높고, 이차회귀식에 의하여 형성된 반응표면결과 R^2 는 0.95으로 높게 나타났다. Table 11은 분산분석법에 의해 결정된 quadratic 방정식을 나타내었으며, 이로 산출된 음식물쓰레기의 효소학적 당화의 최적조건은 초기 pH 5.12, 반응 온도 49.95°C, 효소 농도 0.156% (v/v)이었으며, 이 조건하에서 당생성 예상치는 1.03 g-reducing sugar/g-tCOD였다. Fig. 20는 Table 11에 나타난 각각의 독립변수의 상호작용을 나타내었다. Fig. 21은 산출된 최적 조건하에서 당화수율을 나타내었으며, 이 때 생산된 환원당 농도는 1.03 g glucose/g-tCOD로 예상치와 거의 일치한 값을 보였고, 기존의 최적화 방법보다 RSM에 의해 얻어진 당화 수율이 약 10%높음을 보였다.

위의 최적 조건 결정은 사용되어지는 효소 및 기질 비용과 생성물의 경제적인 가치에 따라 다양하게 변화되어질 수 있다. 상대적으로 효소 비용이 높으면 효소 이용율을 최대화하기 위한 최적 조건으로 결정해야 한다. 또한 상대적으로 생성물의 경제적 가치가 높은 경우에는 생성물의 농도에 관점을 두어 최적 조건을 결정해야 한다. 즉 경제적인 당화 조건은 생성물 농도, 당화율등을 고려하여 효소 농도 및 기질 농도를 결정해야한다.

Table 9. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points

	Run order	Initial pH X ₁	Temperature(°C) X ₂	enzyme con.(%) X ₃	Reducing sugar (g/g-tCOD)
Fractional 2 ³ factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00	0.827059
	2	+1.00	-1.00	-1.00	0.878918
	3	-1.00	+1.00	-1.00	0.869118
	4	+1.00	+1.00	-1.00	0.879294
	5	-1.00	-1.00	+1.00	0.856765
	6	+1.00	-1.00	+1.00	0.890612
	7	-1.00	+1.00	+1.00	0.916471
	8	+1.00	+1.00	+1.00	0.908806
Star points	9	-2.00	0.00	0.00	0.844047
	10	+2.00	0.00	0.00	0.897576
	11	0.00	-2.00	0.00	0.815294
	12	0.00	+2.00	0.00	0.894035
	13	0.00	0.00	-2.00	0.787059
	14	0.00	0.00	+2.00	0.827059
Central points	15	0.00	0.00	0.00	0.992471
	16	0.00	0.00	0.00	1.03500
	17	0.00	0.00	0.00	1.03676
	18	0.00	0.00	0.00	1.00901
	19	0.00	0.00	0.00	0.9916
	20	0.00	0.00	0.00	1.08188

Table 10. Analysis of variance for quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-value	Prob > F
Model	0.13	9	0.014	21.37	<0.0001
Residual (error)	6.617E-003	10	6.617E-004		
Lack of Fit	7.153E-004	5	1.431E-004		
Pure Error	5.902E-003	5	1.180E-003	0.12	0.9815
Total	0.13	19			

$R^2 = 0.9506$; $CV = 2.82\%$, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. $R^2 = 0.9061$

Table 11. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)

Model term	Parameter estimates	Standard error	F-ratio	p-value
Intercept	1.02	0.010		
X_1	0.012	6.431E-003	3.60	0.0869
X_2	0.017	6.431E-003	7.29	0.0223
X_3	0.012	6.431E-003	3.71	0.0829
X_1^2	-0.039	5.130E-003	58.98	<0.0001
X_2^2	-0.043	5.130E-003	71.69	<0.0001
X_3^2	-0.055	5.130E-003	116.36	<0.0001
X_1X_2	-0.010	9.095E-003	1.31	0.2795
X_1X_3	-4.482E-003	9.095E-003	0.24	0.6328
X_2X_3	4.433E-003	9.095E-003	0.24	0.6365

$$Y = 1.02 + 0.012X_1 + 0.017X_2 + 0.012X_3 - 0.039X_1^2 - 0.043X_2^2 - 0.055X_3^2 - 0.01X_1X_2 - 4.482E-003X_1X_3 + 4.433E-003X_2X_3$$

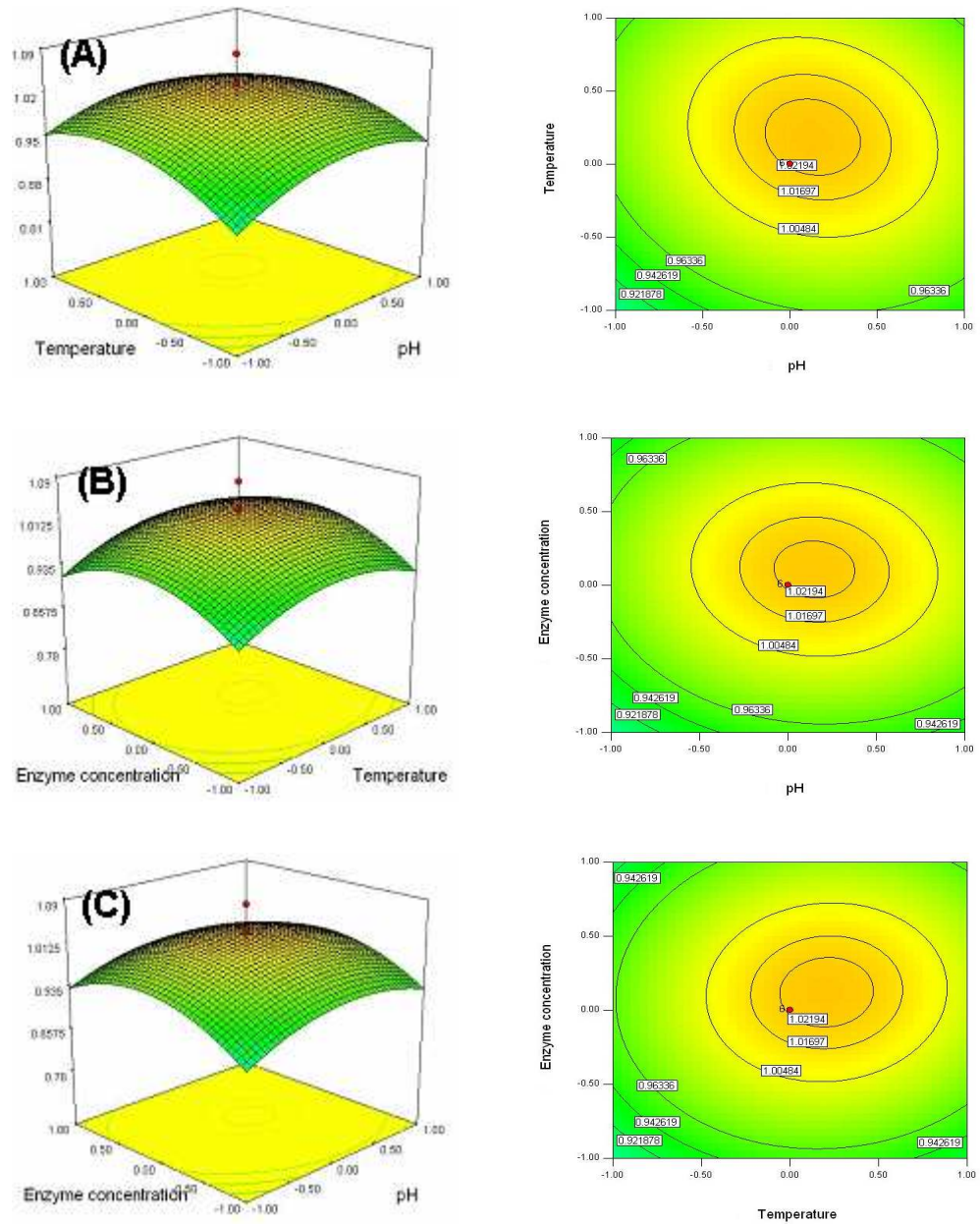


Fig. 20. Response surface plot showing the effect of each independent variable and also their mutual effects on the production of reducing sugar ((A), (B) and (C)).

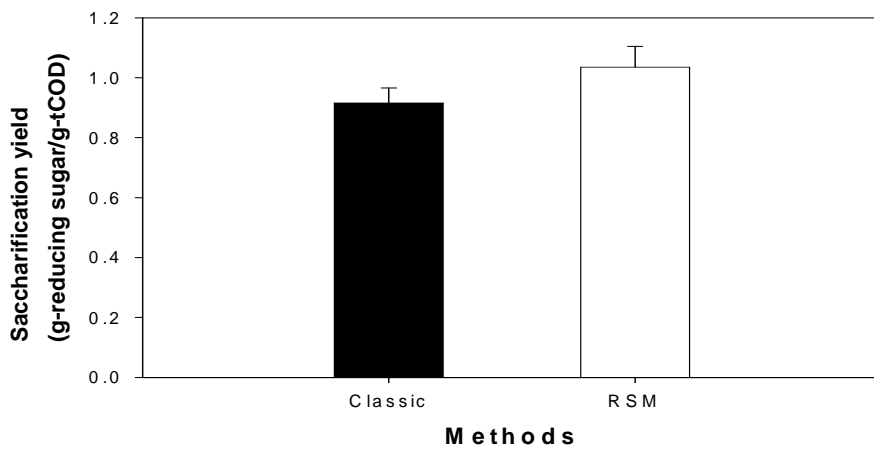


Fig. 21. Comparison of saccharification yield in both classic and RSM methods.

9. 음식물쓰레기에서 반응표면분석법을 이용한 에탄올 생산의 최적화

음식물쓰레기로부터 에탄올 생산의 최적화를 위해 8절의 결과에서 얻은 환원당을 이용하여 반응표면분석법을 사용하였다. 중심합성계획법에 따라 각 독립변수를 초기 pH, 반응 온도, 반응 시간으로 요인변수들을 -2, -1, 0, 1, 2로써 5개로 부호화하여 에탄올 생성능을 조사하였으며, Table 12에 결과를 나타내었다. Table 13의 분산분석표 결과에 의하면 모델식은 P-value가 <0.0001으로 통계적으로 매우 유의한 범위에 있음을 알 수 있으며, 이차회귀식에 의하여 형성된 반응표면결과 R^2 는 0.94으로 높게 나타났다. Table 14는 분산분석법에 의해 결정된 quadratic 방정식을 나타내었으며, 이로 산출된 에탄올 발효의 최적조건은 초기pH 5.4, 반응 온도 35.45℃, 반응 시간 12h이었으며, 이 조건에서 에탄올 예상치는 54.9 g/L였다. Fig. 22은 Table 14에서 나타낸 quadratic 방정식을 통한 각각의 독립변수의 상호작용을 보여준다. Fig. 23은 산출된 최적 조건하에서 생산된 에탄올의 농도를 나타내었으며, 이 때 생산된 에탄올 농도는 57.5 g/L로 예상치와 거의 일치한 값을 보였고, 기존의 최적화 방법보다 RSM에 의해 얻어진 에탄올 농도가 약 9%높음을 보였다.

본 연구에서는 보다 저렴한 에탄올 발효 기질로서 음식물쓰레기 당화액을 배지 원으로 하여 에탄올 생산성을 검토한 결과 환원당 110 g/L에서 56.5 g/L의 에탄올 생산성 및 0.51 g/g의 생산 수율을 보여주었다. 이는 타 연구 결과와 비교해 보면, 음식물쓰레기가 에탄올 생산의 탄소원 및 에너지원으로 충분히 이용되어질 수 있음을 보여준다. 또한 Kwon등의²⁷⁾ 연구에 의하면, 에탄올 발효에서 얻어진 에탄올이 연료용 에탄올 농도는 10%정도이며, 최근 Gulati등은²⁸⁾ 기존의 증류공정에 흡착회수공정을 이용하여 4.5%의 에탄올로부터 99.4%의 연료용 에탄올을 얻었다. 이 흡착회수공정을 이용하여 연료용 에탄올을 경제적으로 얻기 위해서는 에탄올의 농도가 최소한 4.5% 이상이어야 한다. 이는 위의 연구 결과가 연료용 에탄올을 경제적으로 얻을 수 있는 가능성을 보여주었다.

Table 12. Experimental design used in RSM studies by using three independent variables with six center points

	Run order	Initial pH X_1	Temperature(°C) X_2	Reaction tim(h) X_3	Ethanol concentration(g/L)
Fractional 2^3 factorial design	1	-1.00	-1.00	-1.00	8.90
	2	+1.00	-1.00	-1.00	13.6
	3	-1.00	+1.00	-1.00	15.9
	4	+1.00	+1.00	-1.00	19.8
	5	-1.00	-1.00	+1.00	32.0
	6	+1.00	-1.00	+1.00	35.3
	7	-1.00	+1.00	+1.00	43.6
	8	+1.00	+1.00	+1.00	41.8
Star points	9	-2.00	0.00	0.00	1.00
	10	+2.00	0.00	0.00	41.1
	11	0.00	-2.00	0.00	3.90
	12	0.00	+2.00	0.00	1.10
	13	0.00	0.00	-2.00	9.90
	14	0.00	0.00	+2.00	55.7
Central points	15	0.00	0.00	0.00	45.4
	16	0.00	0.00	0.00	46.5
	17	0.00	0.00	0.00	45.2
	18	0.00	0.00	0.00	44.7
	19	0.00	0.00	0.00	45.0
	20	0.00	0.00	0.00	43.9

Table 13. Analysis of variance for quadratic model

Source	SS	DF	MS	F-value	Prob > F
Model	5888	9	654.3	16.23	<0.0001
Residual (error)	403.0	10	40.31		
Lack of Fit	399.4	5	79.88	108.88	<0.0001
Pure Error	3.670	5	0.73		
Total	6291.5	19			

$R^2 = 0.9359$; $CV = 21.37\%$, SS, sum of squares; DF, degrees of freedom; MS, mean squares; Adj. $R^2 = 0.8783$

Table 14. The least-squares fit and parameter estimates (significance of regression coefficient)

Model term	Parameter estimates	Standard error	F-ratio	p-value
Intercept	45.3	2.53		
X_1	5.64	1.59	12.64	0.0052
X_2	1.61	1.59	1.02	0.3354
X_3	1.16	1.59	53.70	<0.0001
X_1^2	-5.93	1.27	21.91	0.0009
X_2^2	-10.6	1.27	69.61	0.0001
X_3^2	-2.99	1.27	5.57	0.0399
X_1X_2	-0.74	2.24	0.11	0.7493
X_1X_3	-0.89	2.24	0.16	0.7009
X_2X_3	0.61	2.24	0.074	0.7905

$$Y = 45.3 + 5.64X_1 + 1.61X_2 + 11.63X_3 - 5.93X_1^2 - 10.56X_2^2 - 2.99X_3^2 - 0.74X_1X_2 - 0.89X_1X_3 + 0.61X_2X_3$$

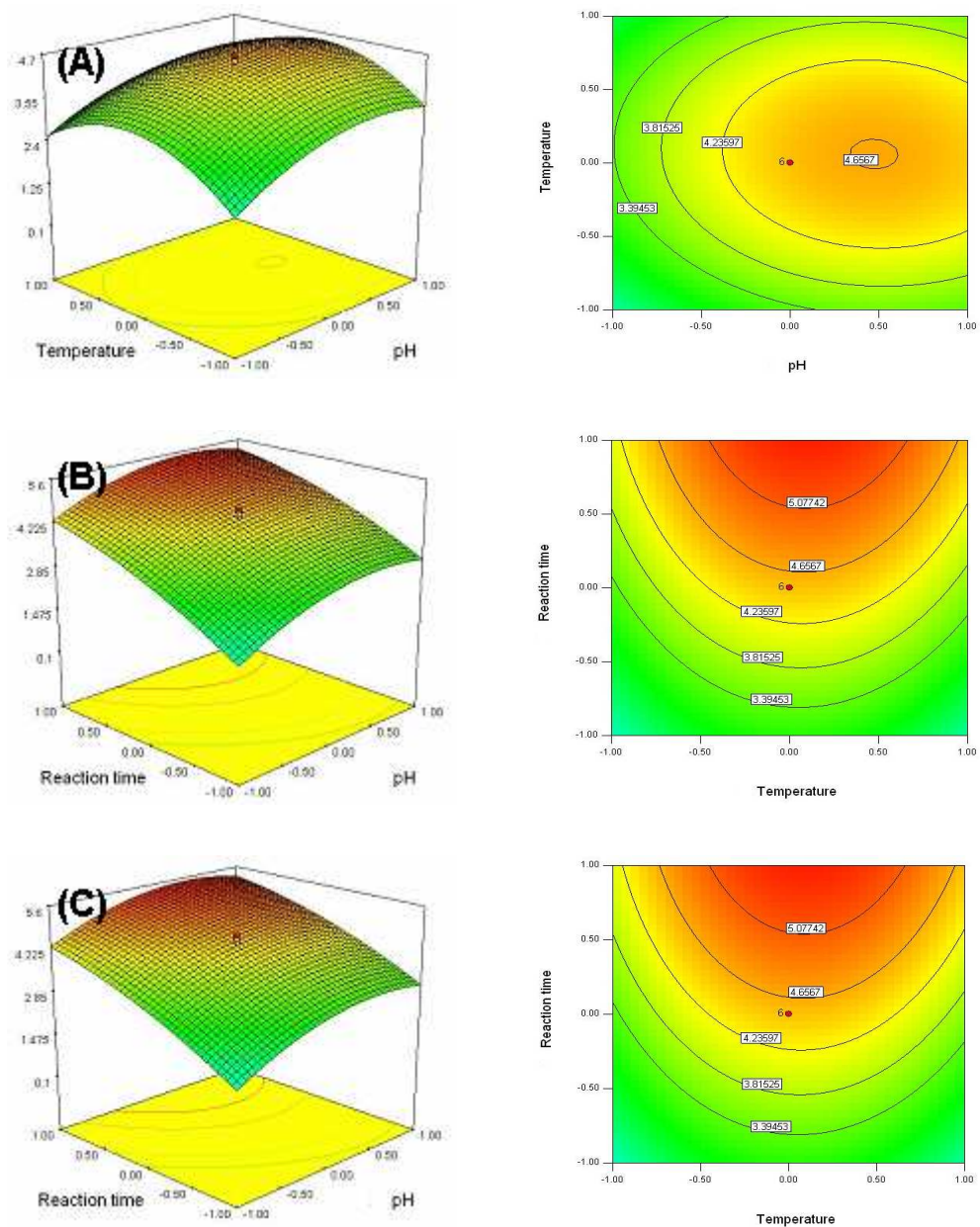


Fig. 22. Response surface plot showing the effect of each independent variable and also their mutual effects on the production of bio-ethanol ((A), (B) and (C)).

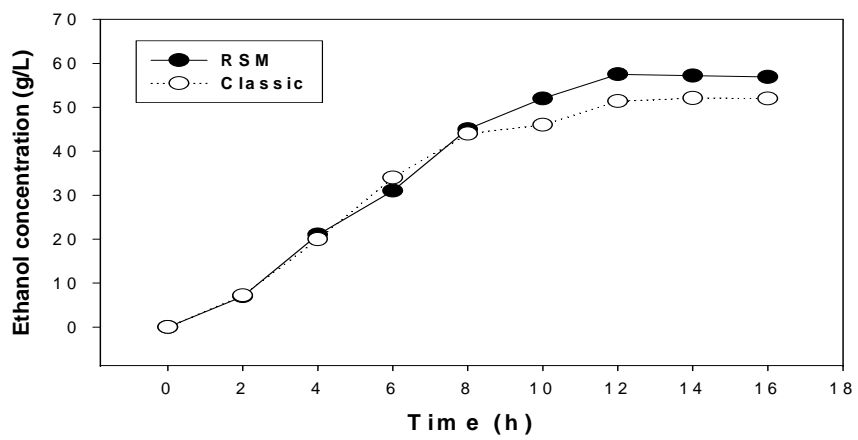


Fig. 23. Comparison of ethanol production in both classic and RSM methods.

제 4 장 결론

음식물쓰레기를 에탄올 발효의 탄소원 및 에너지원으로 활용하기 위해, 음식물쓰레기의 효소학적 당화 및 이를 이용한 바이오 에탄올 생산에 관한 연구를 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 쌀밥의 효소학적 당화의 최적 조건은 기질 농도 350 g-tCOD/L, 효소 접종 농도 400 AGU/L, 반응 시간 4h, 온도 55℃ 였으며 최적조건에서 250 g/L의 환원당을 얻었으며, 250 g/L의 환원당으로부터 35℃, pH 6.0, 교반속도 150rpm에서 *S. cerevisiae* KA4를 접종하여 120시간 발효를 시켜 106 g/L의 에탄올을 생성하였다.
2. 음식물쓰레기의 효소학적 당화의 최적 조건은 기질 농도 85 g-tCOD/L, 효소 접종 농도 400 AGU/L, 반응 시간 4h, 온도 55℃ 였으며 최적조건에서 105 g/L의 환원당을 얻었으며, 105 g/L의 환원당으로부터 35℃, pH 6.0, 교반속도 150rpm에서 *S. cerevisiae* KA4를 접종하여 24시간 발효를 시켜 15시간째 52 g/L의 에탄올을 생성하였다.
3. RSM을 이용 환원당 생성의 최적 조건은 초기pH는 5.12, 반응 온도 49.95℃, 효소접종농도 0.156%이었으며, 최적 조건하에서 생산된 환원당의 농도는 1.03 g-reducing sugar/g-tCOD로 예상치와 거의 일치한 값을 보였고, 기존의 최적화 방법보다 RSM에의해 얻어진 당화 수율이 약 10%높음을 보였다.
4. RSM을 이용 에탄올 생산의 최적 조건은 초기pH는 5.4, 반응 온도 35.45℃, 반응 시간 12h이었으며, 최적 조건하에서 생산된 에탄올의 농도는 57.5 g/L였으며 예상치와 거의 일치한 값을 보였고, 기존의 최적화 방법보다 RSM에의해 얻어진 에탄올 농도가 약 9%높음을 보였다.
5. 따라서 음식물쓰레기는 효소학적 당화과정을 거친 후 에탄올 발효 원료로서 이용이 가능하며, 생산된 에탄올은 정제 과정을 거침으로써 산업화 및 실용화가 가능할 것으로 판단된다.

제 5 장 참고 문헌

1. Kosaric, N., Ng, D. C. M., and G. S. Stewar, Ethanol production by fermentation : An alternative liquid fuel, *Adv. Appl. Microbial.* 26, 147-227, 1980.
2. Brandt, D., In S, S, sofer, and O. R. Zaborski, Ethanol roduction by fermentation : Biomass conversion process for energy and Fuel, Plenum Press, New York, 357-373, 1981.
3. Ghose T. K, and R. D. tyagi, Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol XXI, 1387-1400, 1979.
4. 김재윤, 임태윤, 수소에너지 혁명을 주도하는 연료전지, CEO information 432 호, 1-24, 2003.
5. 송부령, 셀룰로오스를 이용한 동시당화발효 공정의 모델링과 에탄올 생산에의 응용. 서울대학교, 1994.
6. Maria C., C. Laura., G. Alberto., S. Agata, and A. Francesco, Comparison of different detoxification methods for steam-exploded polar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry* 39, 1533-1542, 2004.
7. Kwon J. K., H. s. Moon, J. S. Kim, S. W. Kim and S. I. Hong. Fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of waste paper to ethanol. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 14, No. 1, 24-30, 1999.
8. 환경부 “2006 환경백서” 2006.
9. Shin H. S., S. K Han . Y. C Song . C. Y Lee, Performance of uasb reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste, *water reseach*, 35, 3441-3447, 2001.
10. Thassitou P. K. and I. S Arvanitoyannis, Bioremediation: a novel approach to food waste management, *Trend in Food Science and Technology*, 12, 185-196, 2001.
11. 한효정. “음식물쓰레기 동시당화발효에 의한 에탄올 생산” 『전남대학교 석사 학위논문』, 2005.

12. P.R.M. Reddy, B. Ramesh, S. Mrudula, G. Reddy, G. Seenayya, Production of thermostable β -amylase by *Clostridium thermosulfurogenes* SV2 in solid-state fermentation: optimization of nutrient levels using response surface methodology, *Process Biochem.* 39, 267-277, 2003.
13. F. Francis, A. Sabu, K.M. Nampoothiri, S. Ramachandran, S. Ghosh, G. Szakacs, A. Pandey, Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae* *Biochem. Eng. J.* 15, 107-115, 2003.
14. C.G. Hounsa, J.M. Aubry, H.C. Dobourguier, Application of factorial and Doehlert design for optimization of pectate lyase production by a recombinant *Escherichia coli*, *Appl. Microbial. Biotechnol.* 45, 764-770, 1996.
15. Sen R and Swaminathan T, application of response surface methodology to evaluate the optimal environmental conditions for the enhanced production of surfactin. *Appl Microbial Biotechnology* 47, 358-363, 1997.
16. Puri S, Beg QK and Gupta R, Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp by response surface methodology. *Current Microbiology* 44, 286-290, 2002.
17. 김중곤. "Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발" 『조선대학교 박사학위논문』, 2007.
18. Ljiljana. M., Svetlana N., Marica R., Maja V, Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates, *Fuel*, 85, 1750-1755, 2006.
19. 서진호. "섬유소분해효소 생산배양의 scale-up 기술에 관한 연구" 『전남대학교 석사학위논문』, 2007.
20. Kim J. K., G. H. Han, J. C. Yoo, C. N. Seong, S. J. Kim, S. W. Kim, Isolation and characterization of an Alcohol fermentation strain from anaerobic acid fermenter to treat food wastes, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21(6), 451-455, 2006
21. Eliana V.C., J. George, A. Joao, B. Joao, Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis*

- residue using response surface methodology, *Biorresource Technology*. 98, 422-428, 2007.
22. Myers R.H and Montgomery D.C, response surface methodology; Process and Production Optimization Using Designed Experiments, 1st edn. Wiley-Interscience: New York, 1995.
 23. Sun, Y. and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review" 2002. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
 24. Kadar, Z., Z. Szengyel, and K. Reczey, "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol." 2004. *Ind. Crop Prod.* **20**, 103-110.
 25. Gadgil, N.J. ; H. F. Dagainawala, T. Chakrabarti, and P. Khanna Enhanced cellulase production by a mutant of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microbial Technology*, 17(10), 942-946, 1995.
 26. Ji, G.E., Han, H.K., Yun, S.W. and Rhim, S.L. Isolation. of amylolytic *Bifidobacterium* sp. Int-57 and characterization of amylase, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2(2), 85-91, 1992.
 27. Hong, Y. K. , Improvement of ethanol yield by strain development and cell-immobilization for simultaneous saccharification and fermentation of cellulosic materials, 1995.
 28. Gulati. M G., P. J. Westgate, M. Brewer, R. Hendrickson. and M. R. Ladish, Sorptive recovery of dilute ethanol from distillation column bottoms stream, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 57, 103-119, 1996.

감사의글

내가 바라던 결과들이 하나 둘씩 품 안에 들어올 때 같이 손잡고 오던 기쁨. 그 자그만 기쁨들이 내 영혼에 단비를 내려 물기를 머금게 해 주었던 시간들이었던 것입니다. 무언가 정리되지 않은 채로 남아 있던 부분들이 하나 둘씩 자리를 잡아 가면서 하루 하루가 행복했고 또 다른 나를 하나씩 발견해 갈 때마다 내일이 그리워 지기도 했습니다. 설레는 마음으로 살 수 있다는 것이 얼마나 큰 기쁨이고 어제와 달라진 내 모습을 바라 보는 것이 또 얼마나 사람의 가슴을 벅차 오르게 하는지를 알 수 있었습니다

그 고마운 시간 속에 고마운 사람들도 참 많았습니다. 항상 아낌없는 가르침과 충고로 학문의 길을 열어주신 김시욱 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 친제자처럼 언제나 조언해주시고 동기를 불어넣어주신 이인화, 신현재 교수님께도 깊은 감사드립니다. 학위 과정 동안 저에게 많은 가르침과 조언을 해주신 정오진, 신대운, 이성기, 최형일, 정경훈, 전영남 교수님께 이 자리를 빌어 감사드립니다.

대학원 생활동안 저의 버팀목이 되어주신 김덕규 박사님, 김중곤 박사님, 희곤이 형, 동기 귀환이, 실험실 후배 성조, 길섭, 성훈, 지은, 주영에게 고마움과 격려를 전합니다.

마지막으로 하늘에서 기뻐하실 아버지, 그리고 어머님과 이 작은 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

2007년 오백록...

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20067098	과 정	석사
성 명	한글: 오 백 록 한문: 吳百祿 영문: Oh Baek Rock				
주 소	광주광역시 남구 방림2동 36-4				
연락처	E-MAIL : 5backwon@hanmail.net				
논문제목	한글 : 음식물쓰레기 당화액을 이용한 바이오에탄올 생산 최적화 연구 영어: Optimization for enzymatic saccharification of food waste bio-ethanol production using thing				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대()

2007 년 08 월 일

저작자: 오 백 록 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하