

## 음식물쓰레기 분해능을 갖는 효소활성 균주의 분리 및 동정

정한샘<sup>1</sup> · 채종찬<sup>2</sup> · 이승제<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>전라북도생물산업진흥원, <sup>2</sup>전북대학교

### Isolation and Identification of Enzyme Activity Bacteria with Food Waste Decomposition

Hansaem Jeong<sup>1</sup>, Jong-Chan Chae<sup>2</sup> and Seung-Je Lee<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Jeonbuk Institute for Food-Bioindustry, Jeonju 54810, Korea

<sup>2</sup>Division of Biotechnology, Chonbuk National University, Iksan 54596, Korea

\*Corresponding author: sjlee@jif.re.kr

#### ABSTRACT

Food waste composed of 30-60% starch, 10-40% lipids and 5-10% proteins(w/w). The increase of food waste is one of the big problem which caused world economic loss and environmental damage. In this study, for the purpose of decomposing food waste, the strain was screened from Korean traditional Nuruk and food waste. Twenty three strains were isolated from 74 isolates of Nuruk, and eleventh strains were isolated from food waste. Among them, 8 kinds of strains which have salt resistance and heat resistance and two or more enzymatic activities among the amylase, cellulase, lipase, protease were finally isolated and subjected to molecular biology identification, were identified such as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter hormaechei*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Raoultella ornithinolytica*. Six species of mixed strains were inoculated into food waste, and the result after 24 hours decomposition, the reduction of food waste was 52.7% on as biomass basis.

**Additional key words:** food waste, Nuruk, mixed microorganisms, decomposition, enzyme activity

#### 서론

EBI(Environmental Business International)에 의하면 세계 환경시장은 2000년 5,400억 달러에서 2010년 7,800억 달러로 10년간 연평균 약 4%씩 증가한 것으로 나타나고 있으며, 2020년에는 약 1조

865억 달러로 증가할 것으로 보인다.<sup>1)</sup>

국내에서는 음식물쓰레기가 하루 1만 3222톤 (2014년 기준), 국민 1인당 음식물쓰레기 발생량으로는 0.26 kg(2010년 기준)으로 프랑스 0.16 kg, 스웨덴 0.086 kg 등 선진국에 비해 월등히 높은 편이다. 음식물쓰레기로 인해 온실가스 배출, 악취

발생, 수질오염 등 환경적 문제뿐만 아니라 연간 처리비용이 8천억원 이상, 식량자원의 가치로는 20조원 이상이 버려지는 경제적 피해도 매우 크다.<sup>2)</sup>

우리나라는 2009년 런던협약 런던의정서 가입으로 2014년부터 육상 폐기물의 해양투기를 원칙적으로 금지함에 따라, 2013년 1월부터 음폐수의 해양배출이 전면 금지되었다. 환경부는 음식물류폐기물수수로 종량제 시행지침을 통해 지속적으로 증가하는 음식물쓰레기 배출량을 줄이고, 버린만큼의 수수료를 부과하는 종량제의 정착을 유도하고 RFID 기반방식, 납부칩(스티커)방식, 종량제 봉투 방식으로 나누어 시행하고 있다.

음식물쓰레기와 같은 유기물을 분해하기 위한 국내 연구는 다양하게 이루어지고 있다. 대표적인 연구로는 음식물류폐수처리를 위한 유기물분해 미생물의 분리 및 동정,<sup>3)</sup> 다양한 유기물을 분해하는 *Bacillus subtilis* CK-2의 분리,<sup>4)</sup> 지렁이로부터 분리한 *Bacillus pumilus* JS-01 균주의 유기물 분해능 및 응집능,<sup>5)</sup>  $\alpha$ -Amylase 생성 균주 *Bacillus* sp. AIV1940의 분리, 특성 및 합성폐수 분해능<sup>6)</sup> 등이 보고된 바 있지만 산업화는 초기 단계라 할 수 있다.

본 연구는 음식물쓰레기를 감소시키기 위한 효소 활성능을 갖는 혼합 균주를 개발할 목적으로 진행되었다. 혼합 균주 확보를 위해서 내염성과 내열성 그리고 음식물 분해가 가능한 효소활성을 지닌 유용한 균주를 전통누룩 및 음식물쓰레기로부터 분리·동정하였으며, 혼합 배양된 균주를 음식물쓰레기에 처리함으로써 음식물쓰레기의 감소 효율이 나타나 다음과 같이 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 미생물의 분리 및 선별

음식물쓰레기의 분해가 가능한 유용 균주를 선별하기 위하여 일반가정과 상가에서 발생하는 음식물쓰레기와 전통 누룩으로부터 균주를 분리하였다.<sup>7)</sup> 채취한 시료 10 g을 각각 멸균된 증류수에서 3시간 동안 침지시킨 후 Nutrient Agar(0.3% beef extract, 0.5% peptone, 1.5% agar) 배지(Difco, USA)에 도말하여 30℃에서 24시간동안 배양하였

다. 24시간 후 배지에 나타난 colony의 크기와 형태에 따라 서로 다른 colony를 선별하여 각각 NA 배지에 옮겨 배양한 후 균주를 분리하였다.

### 2. 분리균주의 내염성 및 내열성 평가

#### 내염성 활성

분리된 균주의 내염성을 확인하기 위하여 염분의 농도를 달리한 배지에서의 균주의 성장을 확인하였다. NaCl(99%, Sigma, USA)을 0%, 3%, 5% 농도로 첨가하여 NA 배지를 제조하였으며, 미리 액체배지에서 배양한 균주 배양액 10  $\mu$ L을 염분 농도를 달리한 배지에 접종한 후 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. Colony의 크기와 선명도를 기준으로 내염성 여부를 판정하였다.<sup>8)</sup>

#### 내열성 활성

분리된 균주의 내열성을 측정하기 위하여 30℃, 40℃, 50℃에서의 균주의 성장도를 확인하였다. 미리 액체 배지에서 배양한 균주 배양액 10  $\mu$ L을 NA 배지에 접종한 후 각각의 온도에서 24시간 동안 배양하였다. Colony의 크기와 선명도를 기준으로 내열성 여부를 판정하였다.

### 3. 효소활성 평가

분리된 균주의 효소활성 유무를 확인하기 위하여 amylase, cellulase, lipase, protease 활성을 각각 평가하였다.<sup>9-10)</sup> 효소활성이 높은 균주를 선별하기 위해 paper disc(Advantec, Japan) 방법을 이용하였고, 각 효소와 특이적으로 반응하는 기질성분이 포함된 고체 선별배지를 사용하였다. Amylase 활성 확인은 starch agar(0.3% Beef Extract, 1% soluble starch, 1.2% agar) 배지(Difco, USA)에 8 mm paper disc를 올리고 각 균주 배양액을 20  $\mu$ L씩 분주하여 30℃에서 24시간 배양한 뒤 lugol solution(Sigma, Switzerland)으로 염색하고 분해능을 억제환(clear zone)의 직경으로 조사하였다. Cellulase 활성 확인을 위하여 1% CMC가 포함된 NA 배지에 8 mm paper disc를 올리고 각 균주 배양액을 20  $\mu$ L씩 분주하여 30℃에서 24시간 배양 후, 0.1% congo red로 30분간 염색하고 1N

NaCl로 세척한 뒤 나타난 억제환의 직경으로 조사하였다. Lipase 활성은 1% tween 80이 포함된 sierra lipolytic agar(1% peptone, 0.5% sodium chloride, 0.5% calcium chloride, 1.5% agar) 배지(KisanBio, Korea)에 8 mm paper disc를 올리고 각 균주 배양액을 20 uL씩 분주하여 30℃에서 24 시간 배양하여 분해능을 억제환의 직경으로 조사하였다. Protease 활성은 1% skim milk(Difco, USA)를 첨가한 NA 배지에 8 mm paper disc를 올리고 각 균주 배양액을 20 uL씩 분주하여 30℃에서 24시간 반응하여 분해능을 억제환의 직경으로 조사하였다. 분리된 균주의 효소활성 분해능 평가는 배양 후 나타나는 disc 주위의 억제환의 크기(++ : 20~30 mm, + : 20 mm 이하, - : trace)로 나타내었다.

#### 4. 분리된 균주의 동정

효소활성을 갖는 분리된 균주로부터 염색체를 분리한 후 16s-rRNA를 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통하여 증폭하였다. PCR primer sequence로는 27F 5'(AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG)3', 1492R 5'(TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T)3'를 사용하였다. PCR로 증폭된 RNA는 vector를 이용하여 형질전환 시킨 후, 형질전환된 plasmid RNA를 분리하여 염기서열을 분석한 다음 계통분류학적 비교·분석을 통하여 균주를 동정하였다.<sup>11)</sup>

### 결과 및 고찰

#### 1. 음식물쓰레기 및 누룩균주로부터의 미생물 분리

음식물쓰레기를 분해할 수 있는 균주를 분리하기 위하여 4종류의 누룩(개량누룩, 진주곡자, 송학곡자, 산성누룩)과 1인가구(원룸, 고시원 등), 다인가구(아파트, 주택 등) 그리고 상가에서 발생하는 음식물쓰레기로부터 미생물을 각각 분리하였다. 그 결과, 누룩으로부터 72균주를 그리고 음식물쓰레기로부터 45균주를 분리 및 배양하였다.

#### 2. 분리균주의 내염성 평가

분리된 균주의 내염성 활성평가를 위하여 0%, 3%, 5% NaCl이 첨가된 고체 배지상에서 균주의 성장 여부를 확인하였다. 우리나라 음식에 포함되는 염분 농도는 대체로 3% 이하로 그 이상의 농도에서 성장 가능하다면 음식물쓰레기 분해 균주로 활용이 가능하다고 판단하였다. 누룩에서 분리한 72균주 중에는 3%의 염도에서 63균주, 5%의 염도에서는 58균주가 생육 및 배양이 가능함을 확인하였으며, 음식물쓰레기에서 분리한 45균주에서는 3%와 5%의 염도에서 모두 41균주가 생육 및 배양이 가능하였다.

#### 3. 분리균주의 내열성 평가

분리된 균주의 내열성 활성평가를 위하여 30℃, 40℃, 50℃의 배양 온도(WIG-155, DAEHAN science, Korea)에서 분리 균주의 성장 여부를 확인하였다. 각각의 온도에서 분리 균주를 배양한 결과, 누룩에서 분리한 72균주 중 40℃에 58균주 그리고 50℃에서 32균주가 배양이 가능하였으며, 음식물쓰레기에서 분리한 45균주 중 40℃에 40균주, 50℃에서 2균주가 배양 가능하였다.

#### 4. 분리균주의 효소활성 평가

분리된 균주의 효소활성을 평가한 결과, 누룩에서 분리한 72균주 중 amylase 활성을 보이는 분리균주 3종, cellulase 활성을 보이는 분리균주 1종, lipase 활성을 보이는 분리균주 8종, protease 활성을 보이는 분리균주를 17종을 확보하였다. 음식물쓰레기에서 분리한 45균주 중에서는 amylase 활성을 보이는 분리균주 3종, cellulase 활성을 보이는 분리균주 2종, lipase 활성을 보이는 분리균주 2종, protease 활성을 보이는 분리균주가 8종으로 나타났다. 분리된 균주 중에서 효소활성을 지닌 균주 34종을 확보하였으며(Table 1), 이 중 효소활성을 두 가지 이상 갖는 균주 8종(JIF16003, JIF16016, JIF16026, JIF16040, JIF16045, JIF16209, JIF16238, JIF16241)을 최종 선발하였다.

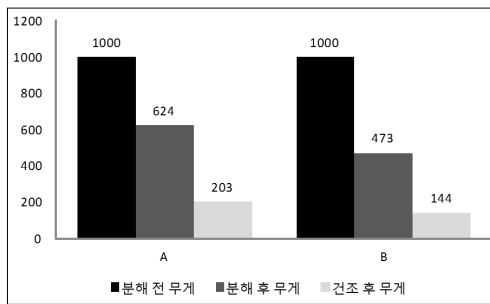
**Table 1.** Enzyme Activities of Isolated Strains by Nuruk and Food Waste

Parameters	Enzyme activity <sup>1)</sup>			
	Amylase	Cellulase	Lipase	Protease
JIF16003	+	+	-	++
JIF16011	-	-	+	-
JIF16015	-	-	+	-
JIF16016	-	-	+	+
JIF16020	-	-	+	-
JIF16023	-	-	-	+
JIF16025	-	-	-	+
JIF16026	+	-	-	+
JIF16040	+	-	-	+
JIF16044	-	-	+	-
JIF16045	-	-	+	+
JIF16046	-	-	-	+
JIF16047	-	-	-	+
JIF16048	-	-	-	+
JIF16049	-	-	-	+
JIF16053	-	-	-	+
JIF16058	-	-	-	+
JIF16061	-	-	+	-
JIF16064	-	-	-	+
JIF16068	-	-	-	+
JIF16069	-	-	+	-
JIF16072	-	-	-	+
JIF16073	-	-	-	+
JIF16207	-	+	-	-
JIF16209	+	-	-	++
JIF16213	-	+	-	-
JIF16217	-	-	-	+
JIF16219	-	-	-	+
JIF16226	-	-	-	+
JIF16237	-	-	-	++
JIF16238	+	-	++	+
JIF16240	-	-	-	+
JIF16241	+	-	+	-
JIF16245	-	-	-	+

<sup>1)</sup> Size of halo zone (++ : 20~30 mm, + : less than 20 mm, - : trace)

**Table 2.** Identification of Isolated Strains by Nuruk and Food Waste

Isolated strains	Identified name	Similarity	Sources
JIF16003	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99%	Nuruk
JIF16016	<i>Acinetobacter baumannii</i>	99%	Nuruk
JIF16026	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99%	Nuruk
JIF16040	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	99%	Nuruk
JIF16045	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99%	Nuruk
JIF16209	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99%	Food waste
JIF16238	<i>Serratia marcescens</i>	99%	Food waste
JIF16241	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99%	Food waste



**Fig. 1.** Degradation of Food Waste by Mixed Strains Treatment.

- A: Fermentation for 24 hours after inoculation of 200 mL of mixed strain into 1 kg of disposing food waste.
- B: Fermentation for 24 hours after inoculation of 400 mL of mixed strain into 1 kg of disposing food waste.

#### 5. 효소활성을 갖는 균주의 동정

2가지 이상의 효소활성을 갖는 8종의 균주를 대상으로 분자생물학적 동정을 진행한 결과, JIF16003 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*, JIF16016균주는 *Acinetobacter baumannii*, JIF16026균주는 *Enterobacter hormaechei*, JIF16040균주는 *Saccharomycopsis fibuligera*, JIF16045균주는 *Enterobacter hormaechei*, JIF16209균주는 *Raoultella ornithinolytica*, JIF16238 균주는 *Serratia marcescens*, JIF16241균주는 *Raoultella ornithinolytica*로 분석되었다(Table 2). 이중 JIF16026

균주와 JIF16045균주는 *Enterobacter hormaechei*로 그리고 JIF16209와 JIF16241균주는 *Raoultella ornithinolytica*로 동일 균주임이 확인되어 총 6종의 균주로 동정되었다.

#### 6. 혼합 균주 배양 및 처리에 따른 음식물쓰레기 분해능 평가

30℃, 200 rpm으로 배양된 6종의 혼합 균주를 대상으로 균 첨가량을 달리하여 음식물쓰레기 잔반에 투입 후 음식물쓰레기 분해 정도를 평가하였다. 먼저 음식물쓰레기 1 kg을 분쇄한 후 6종의 혼합균 200 mL( $1.4 \times 10^9$  CFU/mL)를 담체 20 g에 흡착시킨 후 24시간 동안 교반 분해시킨 결과, 음식물쓰레기가 생중량으로 624 g, 건중량 203 g으로 감소됨을 확인하였다. 또한 동일한 처리조건에 혼합균 400 mL( $1.6 \times 10^9$  CFU/mL)를 담체 40 g에 흡착시킨 후 24시간 동안 교반 분해시킨 결과 음식물쓰레기가 생중량 473 g, 건중량 144 g으로 감소되어 효소활성에 의한 분해 효율이 생중량 대비 52.7%, 건중량 대비 85.6%로 나타났다(Fig. 1).

#### 요 약

누룩과 음식물쓰레기로부터 내염성과 내열성을 갖는 균주를 분리한 후 탄수화물, 단백질, 지방 및 섬유소를 분해할 수 있는 효소활성 균주를 분리하

고 동정하였다. 분리된 누룩 균주 74종으로부터 23종의 효소활성을 갖는 균주를 분리하였으며, 음식물쓰레기로부터는 11종을 분리하였다. 이 중에서 내염성과 내열성을 가지면서 효소활성을 2가지 이상 갖는 균주 8종을 최종적으로 분리하여 분자생물학적 동정을 진행한 결과, 누룩으로부터는 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter hormaechei*, *Saccharomycopsis fibuligera*로 4종의 균주가 동정되었으며 음식물쓰레기로부터는 *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*로 2종의 균주가 동정되었다. 최종적으로 동정된 6종의 혼합균주를 분쇄된 음식물쓰레기에 24시간 분해시킨 결과, 음식물쓰레기의 감소 비율이 생중량 기준으로 52.7%, 그리고 건중량 기준으로 85.6%로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 첨단생산기술개발사업 (Project No.316001-03)에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. 한국환경공단 (2016) 음식물쓰레기정보. 한국환경공단.
2. 환경부 (2015) 전국 폐기물 발생 및 처리 현황(2014년도). 환경부.
3. 정두영, 송인근, 김영준 (2007) 음식물류폐수처리를 위한 유기물분해 미생물의 분리 및 동정. 유기물자원화. 15(2): 128-135.
4. 김철호, 이상협 (2011) 다양한 유기물을 분해하는 *Bacillus subtilis* CK-2의 분리. 한국생명과학회. 21(12): 1716-1720.
5. 정두영, 송인근, 김영준 (2006) 지렁이로부터 분리한 *Bacillus pumilus* JS-01 균주의 유기물 분해능 및 응집능. 유기물자원화. 14(4): 141-150.
6. 박형수, 김무훈, 양선영, 조미영, 고범준, 박용근 (2002)  $\alpha$ -Amylase 생성균주 *Bacillus* sp. AIV 1940의 분리, 특성 및 합성폐수분해능. 미생물학회지. 38(1): 1-6.
7. Bal, J., Yun, S. H., Yeo, S. H., Kim, J. M., and Kim, D. H. (2016) Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter nuruk. Food Microbiol. 60: 73-83.
8. Yang, S. Y., Park, H. Y., Kim, C. W., and Park, K. K. (2001) Isolation of Halotolerant Lactic Acid Bacteria for Fermentation of Food Wastes. 7(2): 137-140.
9. Wirth, S. J., Wolf, G. A. (1992) Micro-plate colourimetric assay for Endo-acting cellulase, xylanase, chitinase, 1,3- $\beta$ -glucanase and amylase extracted from forest soil horizons. 511-519.
10. Katsuya Morimoto, Hiroaki Suzuki. (2006) Micro analysis system for pH and protease activities with an integrated sample injection mechanism. 86-93.
11. Chun, J. S., Lee, J. H., Jung, Y. Y., Kim, M. J., Kim, S. I., Kim, B. K., and Lim, Y. W. (2007) EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *J Syst Evol Microbiol*, 57: 2259-2261.