

## 바이오디젤의 미생물 안정성 조사

박근형\* · 정해영\*\* · 채희정\*\*

### Microbiological Stability Test of Biodiesel

Keunhyoung Park\*, Haeyoung Jung\*\* and Hee Jeong Chae\*\*

**요 약** 동·식물성 기름으로부터 산이나 알칼리 촉매를 사용하여 제조한 친환경 에너지인 바이오디젤의 미생물학적 안정성을 테스트하기 위하여 온도와 저장기간에 따른 미생물에 의한 변질정도를 측정하였다. 측정방법으로 역상 현미경 관찰과, 3M petrifilm 분석법으로 생균수를 측정하였고, 균체 단백질의 양을 측정하기 위하여 Bradford protein assay법을 사용하였다. 바이오디젤과 석유디젤, 그리고 각각의 시료를 혼합한 시료를 서로 다른 온도조건(25°C와 35°C)에서 혐기적인 조건으로 90일 동안 장기간 저장했을 때 바이오디젤, 석유디젤 그리고 혼합한 시료에서 미생물의 생육은 관찰되지 않았다.

**Abstract** The microbiological stability was examined by detecting the growth of microorganisms in the closed bottles under anaerobic long-term storage at 25°C and 35°C. Microbial growth was examined by a microscope and total cell number on a plate medium was quantitatively measured. There was no observed microbial growth in biodiesel for 90 days.

**Key words** : biodiesel, microbiological stability

### 1. 서 론

인간이 환경에 대한 관심이 높아지면서 석유에너지 사용으로 인한 환경공해와 자원고갈이 심각한 사회 문제로 대두되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 석유를 대체할 수 있는 친환경적인 대체 에너지의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 현재 재생에너지인 바이오 에너지의 개발은 상당히 진척되어 그 중 바이오디젤(biodiesel, BD)은 국내외에서 이미 상용화 되어있다[1]. Figure 1에서 보는 바와 같이 바이오디젤 합성은 전이 에스테르화법(transesterification)을 이용하여 폐식용유, 대두유, 쌀겨 등 식물성 오일을 촉매 존재하에 알코올과 혼합하여 에스테르화 반응을 시킴으로써 진행된다. 반응 후 상 분리를 통하여 바이오디젤은 쉽게 분리되며 정제과정을 거쳐 순도 97%이상의 바이오디젤이 얻어진다. 바이오디젤은 메틸에스테르(methyl ester)라는 물질로서 분자 내 산소를 포함하고 있는 친환경 제품이다 [2, 3]. 석유디젤(petroleum diesel, PD)과 물성이 유사

하므로, 석유디젤을 대체 또는 혼합하여 압축착화 디젤 엔진에 사용할 수 있다. 이러한 바이오디젤은 석유디젤에 비하여 국내 자급이 가능하고, 재생가능한 식물자원에서 생산되므로 자원의 고갈 문제가 없고, 폐식용유 등 폐자원을 활용할 수도 있으며, 연료사용에 의해 배출된 CO<sub>2</sub>는 바이오매스의 생산과정에서 회수되므로 CO<sub>2</sub>의 순 배출량이 적다[4, 5]. 미국 신재생에너지 연구소(National Renewable Energy Laboratory, NREL)의 연료 사용에 따른 전주기 분석(life cycle analysis)에 의하면 바이오디젤유를 사용하면 석유디젤에 비해 대기 중 CO<sub>2</sub>의 증가 효과가 약 20%에 불과한 것으로 보고되어 있다[6]. 또한 산성비의 주범인 황산화물(sulfate oxides, SOX)과 벤젠 등을 배출하지 않기 때문에 독성이 적은 연료이다.

최근 수많은 종류의 다양한 유기화합물이 합성되고 이에 의한 환경오염이 우려됨에 따라 생분해도 측정방법에 대한 표준화에 관심이 높아지고 있다. 생분해란 효소의 작용에 의해 유기물질이 분해되어 본질의 분자구조가 없어지고, 이들 중의 일부는 세포의 이화작용에 직접 사용될 수 있는 분자량이 작은 유기물질로 되어 탄소가스와 물로 변화되는 것을 말한다[7]. 바이오디젤의 생분해도는 80%이상으로 유출시 환경오염이 적은

\*호서대학교 식품영양학과

\*\*호서대학교 식품생물공학과 및 벤처전문대학원 첨단산업기술전공

친환경적 연료임이 보고되어 있다[8]. 또한 유향성이 좋기 때문에 석유디젤의 저황화(desulfurization)에 따른 유향성 저하 대책으로 사용이 기대되어 진다[9]. 그러나 바이오디젤은 동·식물성 기름으로부터 제조되었기 때문에 그 저장 중에 미생물의 생육으로 인한 변질의 우려가 있으며 아직까지 이에 대한 국내외에 보고가 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 폐수로 배출되었을 때 수상에 서의 생분해성이 80% 이상이 되는 바이오디젤을 혐기적인 조건에서 장기간 저장했을 때 미생물에 의해 일어날 수 있는 변질(미생물학적 안정성, microbiological stability)에 대한 분석을 수행하였다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1 재료

대두유로부터 제조한 바이오디젤(대두-BD, BD-soybean oil)과 현미유로부터 제조한 바이오디젤(현미-BD, BD-rice bran oil)은 각각 ㈜신한에너지와 ㈜신양현미유로부터 제공받아 사용하였다. 그리고 석유디젤(petroleum diesel, PD)를 포함하여 모두 3가지 시료를 준비하였다. 각각의 대두-BD와 현미-BD에 석유 디젤을 일정한 비율(0, 2, 50%(v/v))로 혼합하여 시료를 준비하였고, wintering(포화지방산이 제거)된 대두-(w)BD(wBD-soybean oil)와 현미-(w)BD(wBD-rice bran oil)의 시료 또한 석유디젤과 일정한 비율로 혼합하여 분석시료로 사용하였다.

### 2.2 실험방법

각각의 시료를 마개가 있는 20 ml glass bottle에 각각 15 ml씩 넣고 마개를 닫은 후 25°C와 35°C에서 교반하지 않고 혐기적인 조건에서 90일 동안 방치하면서 0, 15, 30, 60, 90일 간격으로 샘플링하여 분석시료로 사용하였다. 현미경적 관찰을 위하여 각각의 시료 1 ml씩을 취하여 슬라이드글라스에 넣고 커버글라스를 위에 덮은 후 현미경(Olympus CK40, Japan)으로 400배율에서 관찰하였다.

일반 세균수 분석을 위하여 각각의 시료 5 ml과 멸균된 증류수 5 ml를 멸균된 시험관에 넣고 액-액추출(liquid-liquid extraction)하여 기름과 수용액층을 분리하였다. 이 중 수용액층 1 ml를 취하여 일반세균 분석용 배지(3M petrifilm, 3M Health Care, USA)에 도말하여 37°C에서 2-3일 배양한 후 총균수(total cell count)를 확인하였다. 균체는 배양 후 붉은 색을 띠게 된다.

Bradford법에 의한 균체 단백질 양의 분석은

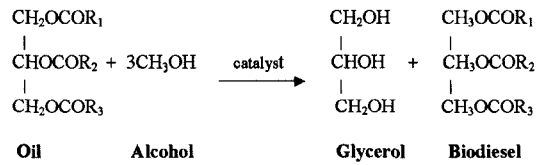


Fig. 1. Transesterification of triglycerides with alcohol for the production of biodiesel

BSA(bovine serum albumin)와 0.15 M NaCl를 농도별로 혼합하여 표준 곡선을 구하였다. 균체 단백질을 측정하기 위하여 저장 중 샘플링한 시료를 초음파 분쇄기(Sonopuls HD 2200, Bandelin, Germany)를 이용하여 초음파 분쇄(power 40%, cycle 9, 1 min)하여 얻은 각각의 시료 100 μl를 5 ml coomassie brilliant blue solution(95%의 메탄올 50 ml, coomassie brilliant blue 100 mg, 85% phosphoric acid 100 ml per 1 L distilled water)에 넣고 잘 혼합하여 실온에서 2분간 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다[10].

## 3. 실험결과 및 토의

### 3.1 현미경적 관찰(정성 분석)

석유디젤의 대체 연료로써 연구가 활발히 이루어지고 있는 바이오디젤은 호기적인 상태 즉, 미생물과 산소에 의하여 자연적으로 분해되는 생분해도가 80% 이상인 환경오염이 적은 연료임이 보고되어 있다[7]. 그러나 바이오디젤을 저장하는 동안의 미생물에 의해 변질되는 미생물학적 안정성에 대한 연구는 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 본 연구에서는 혐기적인 조건에서 바이오디젤의 미생물의 생육을 조사하고 그에 따른 변질정도를 측정하여 바이오디젤을 장기간 저장했을 때 미생물학적 안정성을 알아보기 위한 실험을 하였다.

바이오디젤(BD)의 4종류(현미-BD, 대두-BD, 현미-(w)BD, 대두-(w)BD)와 석유디젤을 0, 20, 50%로 혼합하여 조제한 시료를 0, 15, 30, 60, 90일 간격으로 25°C와 35°C의 두가지 온도조건에서 저장하였던 시료를 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, Figure 2의 (A)에서 보는 바와 같이 일반세균(*Bacillus subtilis*)의 배양액에서 1 ml를 추출하여 현미경으로 관찰한 결과 균체가 colony를 이루는 모습이 관찰되었다. 그러나 바이오디젤시료 (B), (C)와 석유디젤(D)의 경우에 35°C에서 90일간 저장하는 동안 미생물의 생육은 관찰되지 않았고 25°C에서 저장한 모든 실험구와 wintering된 바이오디젤에서도 균의 생육이 관찰되지 않았다. 또한 현미-BD와 석유디젤, 대두-BD와 석유디젤의 혼합시료에서도 균의 생육은 관찰되지 않았다. 이것은 바이오디젤이 혐

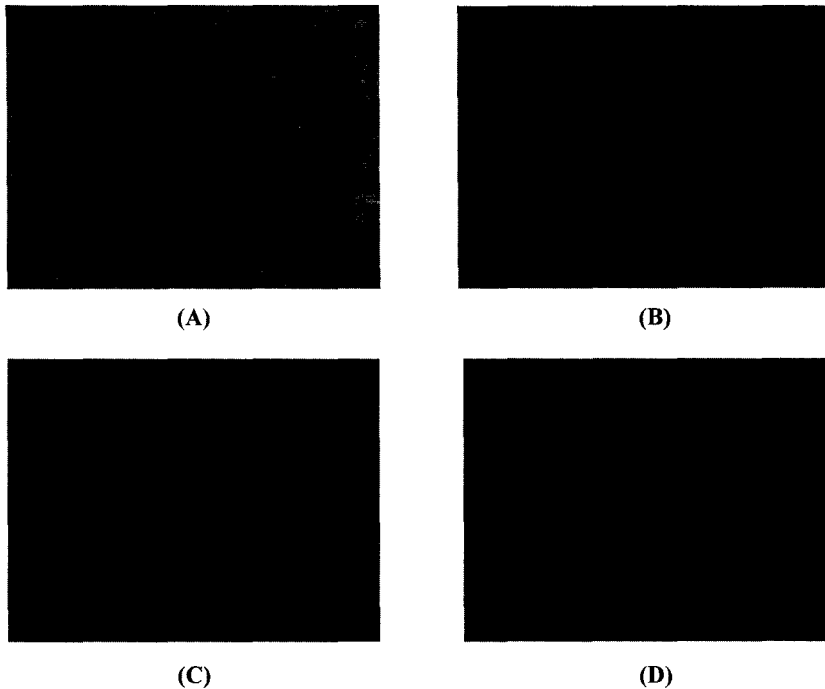


Fig. 2. Observation of microorganisms in biodiesel after 60 days of anaerobic storage in glass vessel at 35°C  
 (A) *B. subtilis* culture(control) (B) BD-soybean oil 100%  
 (C) BD-rice bran oil 100% (D) petroleum diesel

기적인 조건에서 미생물에 이용될 수 없으며 바이오디젤이 미생물의 생육을 저해하기 때문인 것으로 판단된다.

### 3.2 일반 세균수 분석(정량 분석)

바이오디젤 시료와 멸균 증류수를 1:1로 섞어서 액-액추출하여 분리된 수용액층에서 1 ml를 취하여 3M petrifilm에 접종하고 2~3일 동안 37°C에서 배양하였다. 이 방법은 시료 속에 이미 존재하거나 또한 시간이 지남에 따라 생육할 수 있는 미생물을 정량적으로 분석할 수 있는 방법이다. Figure 3은 25°C와 35°C에서 보관된 저장 60일째의 현미-BD, 대두-BD 그리고 석유디젤 시료를 접종한 후 배양한 다음 3M petrifilm을 촬영한 결과이다. 만약 어떠한 균체가 존재하게 되면 균체는 작은 붉은 색 반점으로 나타나게 되어 육안으로 확인할 수 있게 된다. Figure 3에서 보는 바와 같이 모든 분석한 시료에 대하여 어떤 미생물도 생육하지 않았음을 알 수 있었다. 바이오디젤과 wintering된 바이오디젤에 석유디젤을 혼합한 시료에서도 균은 관찰되지 않았다. 결과적으로 초기 0, 15, 30, 60, 90일 동안 저장된 모든 시료에서 균체는 발견되지 않았다. Bradford법에 의한 균체단백질 양의 분석은 각각의 시료에 대한 흡광도 데

이터에 재현성이 없어서 단백질 농도와 미생물의 생육과의 관련성을 찾을 수 없었다.

바이오디젤 및 바이오디젤 유래 생분해성 윤활유의 생분해성을 분석한 보고[8]에 의하면 대두를 원료로 제조한 바이오디젤의 생분해성이 28일 동안 80%인 점에 견주어 우려되었던 생분해의 가능성이 혐기적인 조건(밀폐된 용기)에서 수행된 실험결과 미생물에 의한 변질의 가능성이 없는 것으로 추정되었다.

## 4. 결 론

석유디젤과 바이오디젤(20, 50, 100%, BD기준)의 혼합비로 혼합된 디젤유를 혐기적인 조건에서 25°C와 35°C에서 90일 동안 장기저장한 경우 현미경 관찰, 일반 세균수의 정량에서도 미생물의 생육은 관찰되지 않았다. 바이오디젤은 동·식물을 원료로 제조하여 생분해성이 높은 환경친화적인 연료이나 저장 중 미생물에 의해 변질되지 않는 즉, 미생물에 대한 안정성이 높은 연료임을 확인하였다.

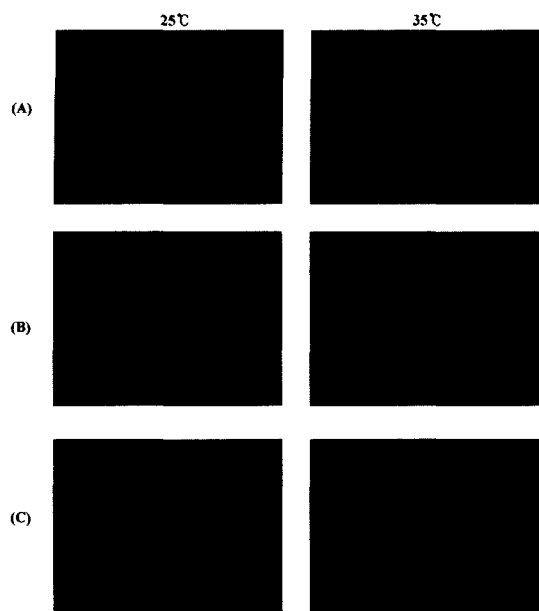


Fig. 3. Bacterial cell counting for biodiesels and petroleum diesel

(A) BD-rice bran oil 100%, 25°C, 35°C

(B) BD-soybean oil 100%, 25°C, 35°C

(C) Petroleum diesel 100%, 25°C, 35°C

### 감사의 글

본 연구의 수행을 위해 바이오디젤시료를 제공해주신 (주)신한에너지와 (주)신양현미유에 감사드립니다.

### 참고문헌

- [1] 이영재, “바이오디젤유의 현황”, 자동차공학회지, 제 24권 2호, pp. 53-55. 2002.
- [2] S. Clued, “Commercialisation of glycerol CTVO- Net Final Conference proceedings”, 129, 2000.
- [3] X. Lang, A. K. Dalai, N. N. Bakhshi, M. J. Reaney and P. B. Hertz, “Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils”, *Bioresource Technol.*, 80, 53, 2001.
- [4] W. Korbitz, “From the field to the fast lane-Biodiesel”, *Renewable Energy World*, 1(3), pp. 32-37, 1998.
- [5] K. Scharmer, “Umweltaspekte bei herstellung and verwendung von RME, In RME Hearing”, Ministry for Agriculture, Vienna, Austria.
- [6] NREL, “Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus”, NREL/SR-580-24089, May, 1998.
- [7] A. Eisentraeger, M. Schmidt, H. Murrenhoff, W. Dott and S. Hahn, “Biodegradability testing of effects of additives and usage”, *Chemosphere*, 48, pp. 89-96, 2002.
- [8] H. Y. Jung, E. Y. Kim and H. J. Chae, “Biodegradibility test for pentaerythritol-based lubricant oils”, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 2003(submitted).
- [9] V. Eychenne, “Synthese des Esters de neopentyl polyols”, INPT Thesis, 1291, 1997.
- [10] D. M. Bollag and S. J. Edelstein, “Protein Methods”, Wiley-liss, Inc., USA, pp. 50-55, 1991.