ORIGINAL PAPER 원저

혐기성 발효에 의한 생물학적 수소생산에 관한 연구

윤우현, 김현갑, 이태진†
서울산업대학교 환경공학과
(2006년 2월 15일 접수, 2006년 3월 17일 채택)

A Study of Biological Hydrogen Gas Production under Anaerobic Fermentation

Woo-Hyun Yoon, Hyun-Kab Kim, Tae-Jin Lee†
Dept. of Environment Engineering Seoul National University of Technology

ABSTRACT

In this study, the optimum condition of pH was investigated on the hydrogen gas production under anaerobic fermentation process. The results of the experiment showed that the optimum condition was observed at pH 6, resulting in 1175.87 mL/L of hydrogen gas production rate and 22.51% theoretical hydrogen conversion ratio. Hydrogen gas production rate and theoretical hydrogen conversion ratio were 901.77 mL/L and 17.48 % respectively at pH 5. At pH 7 and 8, the production rate of hydrogen gas was little low as 82.15 mL/L. Among the organic acids from the sucrose fermentation, propionate was observed as the dominant acid at pH 7 and 8 but butyrate was the dominant at pH 5 and 6.

Keywords : hydrogen, anaerbic fermentation, organic acid, sucrose

초 록

본 연구는 혐기성 발효를 이용한 수소생산과정에서 pH를 일정하게 유지한 상태에서 안정적인 수소를 생산하기 위한 최적 pH를 찾고자 하였다. 실험결과 pH 6이었을 때 최적의 조건이었으며 이때 수소생산량은 1175.87 mL/L 이고, 이론적 수소 전환율은 22.51 %였다. pH 5는 901.77 mL/L의 수소가 발생되었으며, 수소 전환율은 17.48 %, pH 7은 454.26 mL/L의 수소생산량과 8.74 %의 수소 전환율을 나타내었다. 그리고 pH 7과 8에서는 각각 452.08 mL/L와 82.25 mL/L의 저조한 수소 생산량을 나타내었다. 자당의 혐기성 발효를 통한 유기산 생성에 있어서 pH가 7과 8에서는 propionate가 주로 관찰되었으나 pH가 5와 6

†Corresponding author(leetj@snut.ac.kr)

인 영역 에서는 butyrate의 생성이 두드러지는 결과가 나타났다.

핵심용어 : 수소, 혐기성 발효, 유기산, 자당

1. 서론

현재 에너지 수요의 80%까지 차지하고 있는 화석연료는 인류의 문명을 크게 발전시켜 왔으나 화석연료의 사용은 온난화 유발 및 탄화수소, 황산화물, 질소산화물, 미세먼지 등의 오염물질 배출, 그리고 한정되고 편중된 매장량 등 여러 가지 문제점이 수반된다. 이 같은 문제를 해결하기 위하여 지속가능한 대체 에너지 개발 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다[1]. 대체에너지 중 수소는 다른 대체에너지원에 비하여 에너지밀도가 매우 크기 때문에 개발할 가치가 큰 부존자원으로 평가되고 있다. 수소 가스는 현재 연료전지(fuel cell)에 있어서 중요한 연료로 인정받고 있다. 그 주요 이유로 수소가스는 전기 화학적으로 반응성이 높고, 그 반응기구가 잘 알려져 있으며, 반응이 비교적 단조롭고 연소 시 유해한 부산물이 생성되지 않는다는 점이다. 또한, 원료가 되는 물, 유기물 등이 지구상에 풍부하게 분포되어 있어 고갈 및 분쟁의 위험이 없고, 연료전지를 통해 전기로 직접 전환이 가능하여 편리하고 효율적인 에너지 사용이 가능하다. 주요 수소생산 방법인 물의 전기분해나 탄화수소 열분해 등은 생산되는 수소보다 많은 양의 에너지가 공급되어야하는 문제가 있어, 현재는 생물학적 방법을 이용한 수소 생산에 대한 관심이 증대되고 있는 상황이다[2~10].

생물학적인 방법은 크게 광합성 미생물을 이용하는 광 생물학적 수소생산 방법과 빛이 없는 조건에서 혐기발효로 수소를 생산하는 방법으로 나누어진다. 광생물학적인 방법은 햇빛과 미생물을 이용하여 물을 광분해하여 수소를 얻는 방법으로 혐기발효에 비해 더 많은 연구가 진행되었지만 높은 활성화 에너지가 필요하며, 수소생산 속도가 상당히 느린 편으로 에너지 효용이 상당히 낮다고 보고되고 있다[3]. 혐기성 발효를 이용한 수소 생산 방법의 가장 큰 장점은 유기성 폐자원에서 쉽게 얻을 수 있는 글루코스나 녹말 등 탄수화물을 분해하여 수소를 얻는다는 친환경적인 점이다[11]. 그리고 수소생산 속도가 광 생물학적 방법에 비하여 상당히 빠르며, 광원을 필요로 하지 않아 밤, 낮 동안 운전이 가능하다. 또한, 작은 공간만 필요하므로 증축이 용이한 것으로 평가받고 있다[12].

수소생성을 위한 혐기성 발효공정은 산 생성단계와 메탄생성단계로 구별되는데 수소생성은 발효공정 중 산 생성단계에 해당한다. 최적의 생물학적 수소생성을 이해하기 위해서는 각 단계에서 수소생성에 미치는 환경요인을 자세히 이해할 필요가 있으며 수소 발생에 영향을 미치는 주요한 인자로 pH가 주목받고 있다[13~15]. 수소생성을 위한 혐기발효 중 산 생성단계에서 생성된 산에 의한 pH의 저하는 필연적인 것이나 본 실험에서는 실험기간 동안 인위적으로 pH를 일정하게 유지하고 일정한 pH에서 생물학적 수소생성의 특성을 살펴보자고 하였다. 이를 위하여 수소생산량과 이론적 수소전환률, 유기산의 생성 및 미생물 성장 특성을 살펴보고 수소 생성을 위한 최적 pH를 제시함으로서 현장에서 참조할 수 있도록 하였다.

2. 실험장치 및 방법

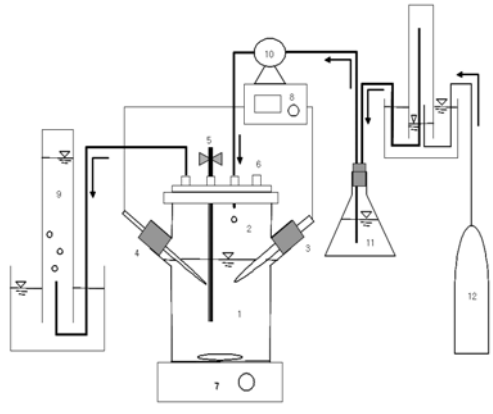
2.1 사용균주 및 배양방법

본 연구에서 사용된 균주는 E하수처리장의 반송슬러지에서 슬러지를 침전 후 상등액을 취하고 N2 가스로 충분히 purging시켜 산소를 제거 한 후 반응기의 유효 용적의 1%(v/v)에 해당하는 15mL를 균체로서 주입하였다[16]. 배양액은 [Table 1]와 같은 조성의 배지를 사용하였으며, 탄소원으로는 자당(Sucrose)을 반응기 용적의 1%(w/v)에 해당하는 양을 따로 멸균 후 배양액에 첨가하였다.

수소생산에 사용된 회분식 반응기는 [Fig. 1]과

[Table1] Component of the Culture Medium

Components	Concentration (mg/L)
NH_4HCO_3	2,000
KH_2PO_4	1,000
$MgSO_4$ $7H_2O$	100
NaCl	10
$NaMoO_4$ $2H_2O$	10
$CaCl_2$ $2H_2O$	10
$MnSO_4$ $7H_2O$	15
$FeCl_2$	2.78



1. Culture medium (1.5 L)
2. Reactor vessel (2 L)
3. pH meter sensor
4. Temperature sensor
5. Liquid sampling port
6. Gas sampling port
7. Magnetic stirrer
8. pH controller
9. Biogas collector
10. Pump
11. 3 N-NaOH solution
12. Gas tank (N_2)

[Fig.1] Schematic diagram of the batch reactor.

같으며, 반응기는 2L 용량의 PYREX 재질의 반응기로 유효용적은 1.5L이다. 반응장치 상단부에 발생된 수소가스의 함량을 측정하기 위하여 septum을 장착한 샘플링 포트를 설치하였으며, 배양액내에 축적되는 유기산과 미생물의 균체량을 측정하기 위해 배양액을 채취할 수 있는 액상 샘플링 포트를 설치하였다. 그리고 초기 pH는 HCl 용액으로 조절하였으며, 배양기간 중 발효산물에 의하여 낮아지는 pH를 조절하기 위한 3N-NaOH용액은 pH와 온도 센서가 연결된 pH controller 에서 조절되어 주입되도록 하였다.

pH는 실험조건에 따라 pH 5에서 pH 8까지 각각 일정하게 유지 시켜주었으며, 온도는 28±3℃로 유지 하였다. 배양액을 혼합하기 위하여 magnetic stirrer를 사용하여 200rpm으로 교반시켜 주었으며, 반응기에서 발생되는 총 가스를 측정하기 위하

여 2%(v/v)황산이 들어있는 포화식염수에 포집하여 가스를 측정하였다.

2.2 분석방법

2.2.1 가스분석

배양 중 발생하는 전체 가스는 2% 황산이 들어있는 포화식염수를 담은 gas collector에 포집 하였으며, 수소함량은 반응기 내 head space의 가스를 gas-tight syringe로 100㎕를 채취하여 열전도도 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피(GOW-MAC series 350)를 이용하여 측정하였다. 사용된 칼럼은 6'×1/8'' stainless steel SS 350A(Molesieve 13X(80/100 mesh))이였으며 발생가스 중 수소가스 정량을 위한 GC의 조건은 칼럼온도 80℃, injector 온도 100℃, 그리고 detector 온도는 100℃ 이었으며, carrier gas 는 질소이고 flow rate는 30mL/min로 유지하였다.

2.2.2 유기산 분석

유기산은 배양액 일정량을 원심분리(11,000 rpm, 5min.)하여 균체와 상등액을 분리하고, 상등액 20㎕를 SUPELCOGEL C-610H(130㎜×7.8㎜ ID) 칼럼을 장착한 HPLC로 분석하였다. 각종 유기산의 peak는 UV detector (Detector ERC-7215, ERMA CR. INC.)를 이용하여 파장 210nm에서 측정하였으며, 0.1% H_3PO_4를 이동상으로 하여 flow rate 0.7mL/min 로 용출하였다.

2.2.3 탄수화물 분석

배양액 내에 잔존하는 탄수화물을 정량하기 위하여 배양액 일정량을 취하여 원심분리(11,000 rpm, 5min)하여 균체를 제거한 후, 상등액을 취하여 페놀-황산법[17]으로 발색시켜 흡광도 파장 490 nm에서 측정하였다.

2.2.4 DATA 분석

누적수소생산량 곡선은 (1)을 이용하여 일정시간마다 측정된 head space의 수소함량과 발생된 총 가스량으로부터 계산되었다.

$$V_{H,i}=V_{H,i-1}+C_{H,i}(V_{G,i}-V_{G,i-1})+V_H(C_{H,i}-C_{H,i-1}) \quad (1)$$

여기서, $V_{H,i}$ 와 $V_{H,i-1}$은 시간간격에 따른 누적 수소생산량의 현재생산량(i)과 이전 생산량(i-1)이며, $V_{G,i}$와 $V_{G,i-1}$은 현재 총 가스량과 이전 총 가스량을 나타낸다. $C_{H,i}$와 $C_{H,i-1}$은 반응기의 head space에서 측정된 현재의 수소 함량(%)과 이전의 수소함량(%)이며, V_H은 반응기의 head space부피(500mL)를 나타낸다.

2.2.5 균체 농도 및 COD 분석

균체량의 측정은 배양액을 일정 간격으로 일정량씩 취하여 UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)로 OD 600nm에서 측정하였고, 건조균체량은 표준곡선과 비교하여 환산하였다. 배양 내의 pH와 온도는 각각 pH meter와 온도센서를 사용하여 측정하였으며, 초기 및 최종 COD는 배양액 일정량을 취하여 원심분리(11,000rpm, 5min.)하여 균체를 제거한 후, 상등액을 취하여 Standard Method법에[18] 의하여 측정하였다. 본 실험에서 회수률은 생성된 수소가스 및 유기산 그리고 잔류하는 당의 농도 등을 COD로 환산하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 수소생산량

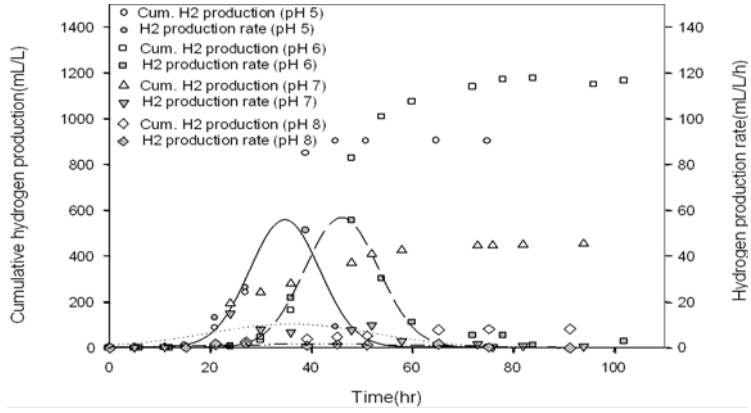
혐기성발효에 의한 수소생성에 있어서 pH의 영향을 살펴보기 위하여 배양기간 동안 pH를 5에서 8까지 일정하게 유지 시켜주었으며, 이 때 각 pH별 누적 수소생산량, 총 가스발생량 및 수소생산율에 대한 결과를 살펴보았다.

pH 5인 경우 에서는 배양 21시간부터 가스발생이 관찰되었으며, 그 후 급격한 가스발생을 보였으나 45시간 후 더 이상의 가스발생이 관찰되지 않았다. 누적수소생산량 901.77mL/L이 생산되었음을 확인할 수 있었으며 발생된 가스 중 메탄은 측정되지 않았으므로 수소가스를 제외한 나머지 가스는 이산화탄소로 추정되었으며 이 같은 이유에서 pH 5이하의 환경조건은 수소생산균의 성장에

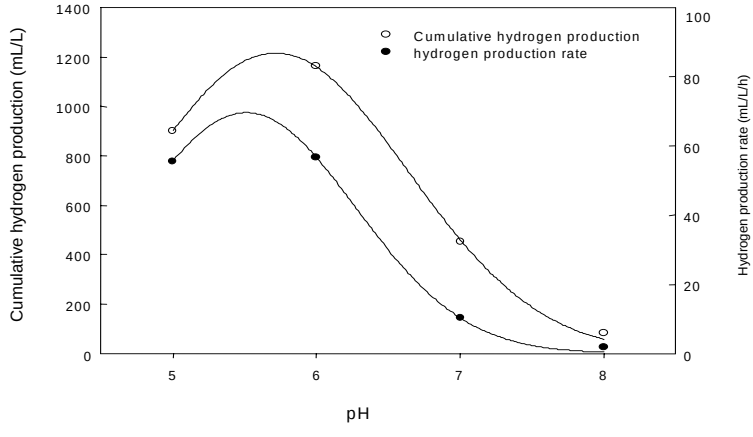
저해로 작용하여 수소생산량이 상대적으로 감소하게 되므로, 수소생산의 효율 면에서 적합하지 않다고 판단되었다.

배양기간 중 가장 높은 수소 생산을 보인 pH 6에서는 24시간부터 가스 발생이 관찰되었으며, 그 후 60시간까지 급격한 가스발생을 나타내었으나 72시간 이후에는 소량의 가스만 발생되었다. 누적수소생산량은 1175.87mL/L로 나타났고 pH 7에서는 11시간부터 가스발생이 관찰되었으며, 소량이기는 하나 지속적인 가스발생을 나타내었으나 82시간 이후에는 더 이상 가스발생이 관찰되지 않았다. 이 때 누적 수소생산량은 454.76mL/L로 비교적 낮은 수소 생산량을 나타내었다. pH 8에서는 21시간부터 가스발생이 관찰되었으나, 가스발생이 매우 저조하여 누적수소생산량 또한 83.25mL/L로 pH 6과 비교하였을 때, 7.08%에 불과한 효율을 나타내어 pH 7이상에서는 수소생산량이 상대적으로 많이 낮아지는 경향을 나타내었다[Fig. 2].

[Fig. 3]에서 볼 수 있듯이 pH에 따른 수소 생산량은 pH가 6보다 약간 낮은 영역에서 가장 축척



[Fig. 2] Time course hydrogen gas production under anaerobic fermentation process with various pH condition.



[Fig. 3] Cumulative hydrogen production and maximum hydrogen production rate under various pH condition.

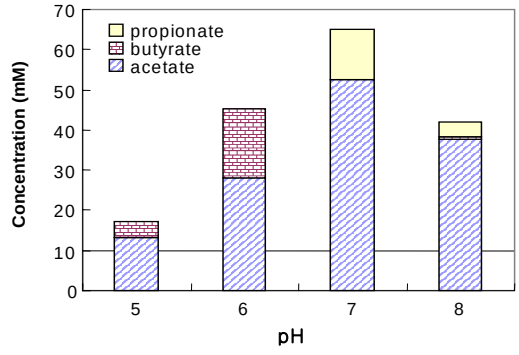
된 수소 발생량이 많이 검출되었고 또한 같은 영역에서 최대 수소생산속도가 가 장 높은 것을 알 수 있다. pH 7 이상이 되면, 수소생산량도 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 미생물은 수소를 생산하는 균이 아닌 수소를 소비하는 균이 성장 수 있는 환경조건임을 확인 할 수 있었다. pH 5에서 상대적으로 수소생산량은 pH 6보다 적었으나 수소생성속도에서는 비슷한 경향을 보여 주고 있다.

3.2 물질 수지 및 발효산물 분포특성

탄소원은 미생물의 기질로 이용되면서 수소 및 유기산 등의 부산물이 생산되므로, 탄소원으로 사용된 sucrose의 물질수지를 파악하기 위하여 초기 COD를 100%로 설정하고 pH 5~8까지 각각의 pH에서 물질수지를 검토하였다. 물질수지 및 부산물 분포는 [Table 2]에 나타내었다. 전체적인 COD 회수율은 약 90~93%로 나타났다.

[Fig. 4]에 나타난 유기산의 분포는 pH 7과 8에서의 butyrate 생산량이 pH 5와 6에 비하여 극히 소량이거나, 생산되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 그에 반하여 propionate는 pH 5와 6에서는 전혀 생성되지 않았으나, pH 7과 8에서는 많은 양이 생성되었으며, 전체 유기산의 량도 pH 6에 비하여 약 15%가량 pH 7에서 더 많음이 관찰되었다. 또한 pH 6의 경우 propionate는 생성되지 않았으며. butyrate가 전체 유기산의 약 56%를 차지하고 있다.

pH 5와 pH 6에서는 대부분 butyrate와 acetate로 분석되었으며, pH 7에서는 butyrate는 생성되지 않았으나, 생성된 전체 유기산의 약 58%가 acetate로 관찰되었으며, 각 실험조건들 중에서도 가장 많은 양의 propionate가 생성되었다. pH 8에서는 극히 소량의 butyrate와 발생된 유기산의 약 64%가 acetate로서 많은 양을 차지하고 있었으며, 소량의 propionate도 분석되었다. 이는 pH 5과 6부근에서는 환경적 조건이 butyrate type의 발효공정이[19] 주종을 이루는 반응이 진행되고 있으며 pH가 높아질수록 propionate type의 발효공정이[20] 우점종화 되어감을 알 수 있었다. 이러한 결과는 윗 절에서 언급된 바와 같이 낮은 pH에서 수소의 생성량이 많았던 결과가 일치하며 butyrate type의 발효공정에서 수소의 생성량이 propionate type의 발효공정에서 보여주는 수소



[Fig. 4] Organic acid profilws with the anaerobic fermentation under various pH condition.

[Table2] Product Distribution on COD Balance for the Sucrose Concentration

(unit: %)

pH	COD	Organic acid				remain of Sucrose	Others*	H_2	Biomass	Recovery
		Formate	Acetate	Propionate	butyrate					
5	100	2.91	7.71	0	5.46	1.50	60.36	5.82	8.95	92.70
6	100	3.33	15.98	0	24.52	0.30	31.77	7.50	9.62	93.02
7	100	9.06	30.62	12.74	0	0.80	25.46	2.95	8.41	90.04
8	100	7.91	21.66	3.89	0.87	0.98	50.41	0.68	6.87	93.27

*Other : SCOD − (remain of sucrose + organic acid)

의 발생량보다 현저히 많음을 확인시켜주는 결과라 할 수 있다.

1몰의 sucrose에서 8몰의 수소가 발생되는 것을 고려하여 이론적 수소생산량을[2] 각각 pH 5, 6, 7 그리고 8에서 계산하여 [Table 3]에 요약하였다. 각각 1몰의 sucrose 에 대하여 1.4, 1.8, 0.7 그리고 0.13mol의 수소가 발생되어 각각 17.48, 22.51, 8.74, 1.6%의 수소전환율을 나타내었다. 또한 pH에 따른 탄수화물의 분해특성을 살펴보면, pH 5와 6에서는 98.50%과 99.70%를 나타내었으며, pH 7, 8에서 각각 99.20, 99.02%로 나타나 비교적 높은 당 분해율을 보였다.

본 실험에서는 pH가 6보다 높을 경우 수소 생성균이 아닌 타 종속영양미생물의 우점화를 통해 수소 생성률이 저해될 수 있다는 추론이 가능하며, 본 실험의 경우 생물학적 수소 생산의 경우 pH 6으로 조절하는 것이 가장 바람직하다고 판단되었다.

4. 결 론

본 실험은 혐기성 발효에 의한 수소생산 시 pH의 영향에 대하여 알아보았으며, 회분식 혐기성 반응기 내에서 반응 기간동안 pH 5~8까지 각각 일정하게 유지시켜 주었을 때, 가장 안정적으로 수소를 생산 할 수 있는 최적의 pH를 찾는 실험을 수행하여 다음과 같이 도출하였다.

1) 기질 당 수소생산량에 대하여 최고효율은pH 6으로써, 1.398 mol H_2/mol sucrose가 생산되었으며, 최저효율은 pH 8에서 0.128 mol H_2/mol sucrose 이었다. pH 5와 pH 7에서는 각각 1.398, 0.699 mol H_2/mol sucrose 이었다. 수소 전환율은 pH 5, 6, 7, 8 에서 각각 17.48, 22.51, 8.74 그리고 1.6 % 이었다.
2) pH에 따른 유기산 생성 추이를 살펴보면, pH 7과 8에서는 유기산 중 초산의 생성이 주로 이루어 졌으며, 적지 않은 양의 propionate가 생성되는 것을 확인 할 수 있었다. pH 5와 6에서는 propionate가 생성되지 않았으며 상대적으로 많은 양의 butyrate가 생성되었다. 따라서 pH 6이하의 pH에서는 butyrate type의 수소생성균이 우점종이라 사료되며 pH 7이상에서는 propionate type의 발효공정이 활성화됨을 알 수 있었다.
3) 수소의 발생을 안정적으로 확보하기 위해 혐기성 발효종정의 pH를 6으로 조절하는 것이 가장 바람직하다고 판단되었으며 이 때 발생되는 수소의 양은 105.05mL H_2/g COD으로 측정되었고, 10,000mg/L의 sucrose가 사용되었을 때 총 수소가스 발생량은 1,200mL/L이고 최대 수소 발생량은 약 70mL/L/h로 측정 되었다.

참고문헌

1. "대체에너지 개발 및 이용보급 촉진법", 산업자원부 (2002).
2. 김상현, 한선기, 신항식, "기질 농도에 따른 완전 혼합형 반응조의 수소 및 유기산 생성 특성," 대한환경공학회지, 26(4), 404~409 (2004).
3. 김정옥, "혼합균을 이용한 연속적인 수소 가스

[Table3] Effect of pH on the Biological Hydrogen Production

	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
H_2 yield (mL H_2/g COD)	81.53	105.05	40.78	7.49
mol H_2/mol sucrose	1.40	1.80	0.70	0.13
sucrose removal (%)	98.50	99.7	99.2	99.02
conversion ratio of theoretical hydrogen producton (%)	17.48	22.51	8.74	1.60

생산", 충남대학교대학원 (2003).
4. 김동훈, "기체 sparging에 의한 수소 발효의 효율 향상", 한국과학기술원 (2004).
5. 윤우현, "혐기성 발효에 의한 수소생산 시 중금속이 미치는 영향", 서울산업대학교 산업대학원 (2005).
6. 유나영, "통성혐기성 세균을 이용한 수소생산에 관한 연구", 이화여자대학교 대학원 (2003).
7. 김동훈, 한선기, 김상현, 신항식, "기체 스파징에 의한 수소발효조의 거동 특성" 대한환경공학회지, 26, 690~696 (2004).
8. Benemann, J., "Hydrogen biotechnology: Progress and prospects", Nature Biotechnology, 14, 1101~1103 (1996).
9. Das, D., Veziroglu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature", International Journal of Hydrogen Energy, 26, 13~28 (2001).
10. Khanal, S. K., Chen, W. H., Li, L., Sung, S., "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products", International Journal of Hydrogen Energy, 29(11), 1123~1131 (2004).
11. Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M., and Noike, T., "Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora", Wat. Sci. Tech., 42(3), 345~350 (2000).
12. Jiunn Jyi Lay, Young Joon Lee, and Tatsuya Noike, "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste", Wat. Res., 33, 2579~2586 (1999).
13. 황문현, 장남정, 현승훈, 홍순강, 김인수, "혐기성 발효에서 수소생성을 위한pH와 무산소 조건의 영향", 대한환경공학회, 24(11), 1939~1948 (2002).
14. Herbert H. P. Fang, Hong Liu, "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture" Bio-resource Technology, 82, 87~93 (2002).
15. 이영준, "연속반응실험에서 수소생성에 대한 pH 영향", 한국위생학회지, 30(2), 149~153 (2004).
16. Ueno, Y., Kawai, T., sato, S., Otsuka, S., Biological production of hydrogen from celluose by natural anaerobic microflora, Journal of Fermentation and Bioengineering, 79(4), 395~397 (1995).
17. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Analytical Chemistry, 28(3), 350~356 (1956).
18. APWA, AWWA, WPCF. Standard methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. (1999).19. Kleerebenzen. R. and Stams, A.R., "Kinetics of Syntrophic Culture: a Theoretical Treatise on Butyrate Fermentation", Biotech. Bioeng., 54, 68, 269~278 (2000).
20. Ren, N., Wang, B. and Huang, J.C., "Ethanol-Type Fermentation from Carbohydrate in High Rate Acidogenic Reactor", Biotech. Bioeng., 54, 428~433 (1997).