大韓環境工學會誌 · 論文 - Original Paper - pp. 54～61. 2007.

혐기성 회분반응기에서 수소생산 시 최적 pH 산정에 관한 연구

전윤선 · 박종일 · 유승호* · 이태진†

서울산업대학교 환경공학과 · *한국원자력연구소 방사선이용연구부

(2006년 11월 9일 접수, 2007년 1월 2일 채택)

A Study for the Optimum pH of Hydrogen Production in Anaerobic Batch Reactor

Yoon-sun Jun · Jong-iL Park · Seungho Yu* · Tae-jin Lee†

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology Radiation Application Research Division
**Korea Atomic Energy Research Institute*

ABSTRACT : The influences of pH were investigated for anaerobic hydrogen gas production under the constant pH condition ranged from pH 3 to 10. Carbon dioxide and hydrogen gas were main components of the gas but methane was not detected in the produced gas when sucrose was added in enrichment medium. When the modified Gompartz equation was applied for the statistical analysis of experimental data, a hydrogen production potential and maximum gas production rate at pH 5 were 1,182 mL and 112.46 mL/g dry wt biomass/hr. The hydrogen conversion ratio was 22.56%. The butyrate/acetate ratios at pH 5 and pH 6 are 1.63 and 0.38. Higher butyrate/acetate ratio produced more hydrogen gas generation. The Haldane equation model was used to find the optimum pH and fitted well with the experimental data($r^2 = 0.98$). The optimum pH and specific hydrogen production were 5.5 and 119.61 mL/g VSS/hr.

Key Words : *Hydrogen Production, Anaerobic Fermentation, pH, Specific Hydrogen Production*

요약 : pH가 혐기성 수소 발효에 미치는 영향을 고찰하기 위해 배양기간 동안 pH를 3～10까지 일정하게 유지시킨 상태에서 수소생산 효율을 살펴보았다. 유입기질을 sucrose로 하여 생성된 가스는 이산화탄소와 수소였으며 메탄가스는 검출되지 않았다. 수정 Gompartz 방정식을 이용하여 수소가스 발생량(P_h)과 최대수소 생성율(R_h)을 회귀분석하였을 때 pH 5에서 수소가스 발생량(P_h)은 약 1182 mL이고 최대수소 생성율(R_h)은 112.46 mL/g dry wt biomass/hr이였다. 수소 전환율은 22.56%이였으며 butyrate/acetate 비가 pH 5에서는 1.63, pH 6에서는 0.38로 ratio값이 높은 pH 5에서 효율이 더 좋다는 것을 확인할 수 있었다. Haldane equation을 이용하여 비수소생산율을 산정해 본 결과 최대 비수소생산율은 119.61 mL/g VSS/hr이였고, 최대 비수소생산율을 나타내는 pH는 5.5로 판명되었다.

주제어 : 수소생성, 혐기성발효, pH, 최대 비수소생산률

1. 서 론

1970년대 석유 파동으로 "에너지 위기"를 겪으면서 현재 세계 에너지 수요의 약 80%까지 차지하고 있는 화석 에너지를 대체할 에너지 개발이 시급한 실정이며, 이러한 화석 에너지는 온실 효과 및 NOx, SOx 등의 오염물질 배출로 인한 환경파괴 문제와 한정된 매장량으로 인한 미래의 에너지 고갈의 문제를 야기 시키고 있다.[1,2] 현재 차세대 에너지원으로 각광 받고 있는 수소는 우리가 발견할 수 있는 원소 가운데 가장 가볍고 또한 보편적이며 수소를 에너지로 이용할 경우 고갈 및 분쟁의 위험이 없다. 더욱이 수소에는 탄소 원자가 들어 있지 않아 생태계를 교란시킬 오염물질을 생산하지 않는다. 이와 같은 이점으로 수소는 화석연료를 대체할 친 환경적인 에너지 자원으로 국제적인 연구가 활발하게 진행되고 있다.[3,4]

† Corresponding author
E-mail: leetj@snut.ac.kr
Tel: 02-970-6614 Fax: 02-971-5776

기존의 화석연료의 열분해와 물의 전기분해에 기초하고 있는 수소생산 방식은 고가의 제조비와 생산되는 수소에너지를 초과한 화석 에너지를 투입해야 한다는 근본적인 한계가 있다. 이에 생물학적 방법을 통해 수소를 생산하고자 지난 20년간 미생물을 이용한 수소 생산 연구가 활발히 진행되어 왔다. 주로 광합성 미생물을 이용한 물 분해와 광 분해를 통한 유기물 분해에 의한 수소 생산에 집중되어 연구가 진행되어 왔지만, 빛에너지를 계속 공급해 주어야 하고 반응속도가 느리며 에너지 효율이 낮은 단점들이 크게 개선되지 못하고 있어 최근에는 혐기성 발효미생물을 이용한 수소 생산 기술이 주목받고 있다.[4,5]

혐기성 발효 수소생산은 별도의 에너지 공급이 필요 없어 밤 · 낮으로 운전이 가능하며 광합성 미생물을 이용한 생물학적 방법에 비해 반응 속도가 빠르다(0.3～5.3 mmol H_2/g/h vs 1.8～29.6 mmol H_2/g/h).[5] 또한 다양한 형태의 유기물로부터 수소를 생산 할 수 있어 친환경적이며, 유기성 폐기물의 처리에 적용되고 있는 기존의 혐기성 소화 기술을 대체 · 보완할 수 있는 이점이 있어 현재 적용 가능성이 가장 앞선

생물학적 수소 생산기술로 평가 받고 있다.[6]

혐기성 발효공정에서 최적의 수소생산을 기대하기 위해선 발효과정 중 수소생성에 미치는 환경요인을 살펴보아야 하며, 그 요인으로는 pH, 온도, 체류시간, 기질 농도, 수소생산균 등의 배양 조건으로 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 pH는 혐기 발효 중 배양기간 동안 생성되는 유기산에 의해 강하 되며 이는 수소 생산 효율에 영향을 미친다.[7,8] 이 때 생성되는 유기산은 개미산, 아세트산, 프로피온산 그리고 뷰틸산 등의 지방산과 각종 알콜류가 생산된다. 이러한 지방산은 화학양론적으로 보면 당(sucrose)을 분해하여 수소를 생성하는 식 (1)과 식 (2)와 같은 생성과정 뿐만 아니라 식 (3)과 식 (4)와 같은 수소를 소비하며 지방산을 생성하는 과정이 있는데 이는 pH에 의해 배양액 중 우점 미생물 군집이 영향을 받아 결과적으로 수소 생성에 영향을 미치는 것으로 판단되며 기존의 연구들은 초기 pH를 다양하게 구성하여 수소 생성에 pH가 미치는 영향을 살펴보았다.[9~11]

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 5H_2O \rightarrow 4CH_3COOH + 4CO_2 + 8H_2 \quad (1)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow 2CH_3CH_2CH_2COOH + 4CO_2 + 4H_2 \quad (2)$$

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 4H_2 \rightarrow 4CH_3CH_2COOH + 3H_2O \quad (3)$$

$$2CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O \quad (4)$$

이들의 결과에 따르면 때로는 초기 pH가 낮은 경우[12,13] 또 때론 초기 pH가 높은 경우[14] 수소 생성 조건이 최적이라는 상반된 결과가 보고되고 있으며, 이는 초기 pH의 조정만으로는 수소 생성에 관여하는 미생물의 군집이 배양기간 동안 다양하게 출현할 수 있으며, 결국 그 결과가 다르게 나타난다고 볼 수 있다.

따라서 본 실험에서는 배양기간 동안 각각의 pH에 따른 수소생산 균의 수소 생산 효율 및 특성, 지방산의 생성, 그리고 기질 이용에 대한 특성을 살펴보고자 한다. 또한 Haldane equation을 이용하여 수소 생성을 위한 최적의 pH를 제시함으로서 실제적인 수소생산 공정의 기초적인 설계인자를 제시하고자 한다.

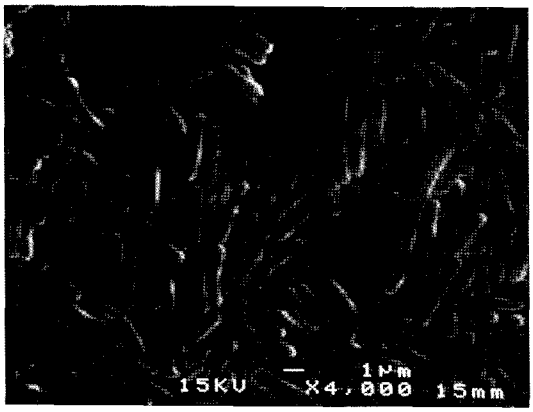
2. 실험재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양 방법

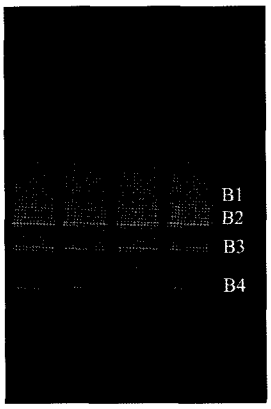
본 연구에서 사용할 균주를 분리하기 위해 E하수처리장 활성 슬러지조의 반송 슬러지를 침전 시킨 후 상등액을 취하였으며 N_2 가스로 purging 시켜 산소를 제거하였다. 이는 수소 생성을 위해 사용될 균주가 절대 혐기조에서 채취될 경우 메탄 생성균에 의해 수소 생성균이 저해될 수 있으므로 이를 막기 위해 부가적인 전처리가 별도로 필요하기 때문이다. serum bottle에 Table 1과 같은 조성의 배지와 탄소원으로 sucrose(1%, w/v)을 첨가시킨 후 N_2 가스로 purging 시켜 혐기성 상태로 만든 후 균주로 사용할 슬러지 상등액 6 mL를 serum bottle에 접종시켰다. 1주일 정도 35℃, 120 rpm으로 하여 Shaking incubator에서 배양시켜 균 성장이 육안으로 확인되면, 배양된 배지 6 mL을 조성이 같은 새로운 배지에 주입하여 계대 성장시킨다. 이와 같은 방법으로 3~4회 정도 계대 배양한 혼합미생물을 본 회분식 반응기에 Seeding 균주로 사용하였다.

Table 1. 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



(a)



(b)

Fig. 1. Morphologies(a) and DGGE Profiles(b) of hydrogen producing bacteria. Bacteria were mostly composed of bacilli of various lengths. B1, B2, B3 and B4 on (b) was respectively identified as Pantoea agglomernas(SI=94%), *Clostridium sp.* (SI = 90%), *Enterobacter sp.*(SI = 98%) and *Enterobacter cloacae*(SI = 99%).

serum bottle에 계대 배양된 혼합 미생물(Seeding 균주)에 수소 생성균의 존재를 확인하기위해 341f와 518r를 primer로 이용하여 약 200 bp의 PCR product를 증폭하여, DGGE를 한 결과[15] *Pantoea agglomernas*, *Clostridium sp.*, *Enterobacter sp.*와 *Enterobacter cloacae*이였으며(similarity index 90% 이상), 이 4종의 미생물은 일반적으로 수소생산 미생물로 기존에 보고 된 종들이다.[16,17] Fig. 1은 접종에 사용된 미생물의 형태를 SEM(Scanning Electron Microscopy)를 통해 배율 4,000배로 관찰한 사진과 DGGE profile을 나타낸다.

2.2. 실험 장치 및 운전 방법

Fig. 2는 본 연구에 사용된 회분식 반응기로 Table 1과 같은 조성의 배지와 탄소원으로 sucrose을 첨가시킨 후 N_2 가스로 purging시켜 혐기성 상태로 만든 후 가스의 유출입이 없도록 완전 밀폐 시켰다. 균주로는 계대 배양시킨 배양액을 실험 전 24시간 배양시켜 균의 활성화를 도모한 후 주입시킨다. 실험은 30±3℃의 온도 조건에서 수행되었다. 반응조의 유효 용적은 1.5 L이며 배양액을 완전혼합하기 위한 교반속도는 200 rpm으로 유지 하였다. 이 때 주입된 초기 배양액은 반응기 유효용적의 1%(v/v)이였으며 반응기 초기 생체량은 약 6 mg VSS/L이였다. 한 실험에 두 대의 반응기가 다른 pH에서 운전되었으며 각 반응기는 독립적으로 분석되었다.

pH에 대한 수소생산 효율을 알아보고자 배양기간 동안 pH를 3~10으로 각각 일정하게 유지 시켜주었다. 유입되는 배양액의 pH의 경우 pH 3~8까지는 HCl 용액으로 pH 9~10까지는 5N-KOH 용액으로 조절 하였으며, 배양기간 중 발효산물에 의해서 낮아지는 pH는 2N-KOH 용액으로 조절하였다. pH 조절을 위한 용액은 pH와 온도 센서가 연결된 pH controller에서 자동 조절되어 주입되도록 하였다. 반응기에서 발생되는 총 가스는 2%(v/v) H_2SO_4을 담은 포화식염수에 포집하였으며, 반응 장치 상단부에는 발생된 수소 가스의 함량을 측정하기 위해 septum을 장착한 gas sampling port를 설치하였다. 또한 배양액 내에 축적되는 유기산, 균체량 및 잔존 탄수화물 측정을 위한 배양액을 채취할 수 있는 liquid sampling port를 설치하였다.

2.3. 분석방법

2.3.1. 가스 분석

배양 중 발생하는 전체 가스 중 수소함량은 반응기 내 head space 가스를 gas-tight syringe로 100 μL를 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 GC의 운전조건은 칼럼온도 80℃, injector 온도 100℃, 그리고 detector 온도는 100℃였으며, carrier gas는 질소이고 flow rate는 30 mL/min로 유지하였다.

2.3.2. 누적 수소생산량

누적수소생산량 곡선은 식 (5)을 이용하여 일정시간마다 측정된 head space의 수소함량과 발생된 총 가스량으로부터 계산되었다.[18]

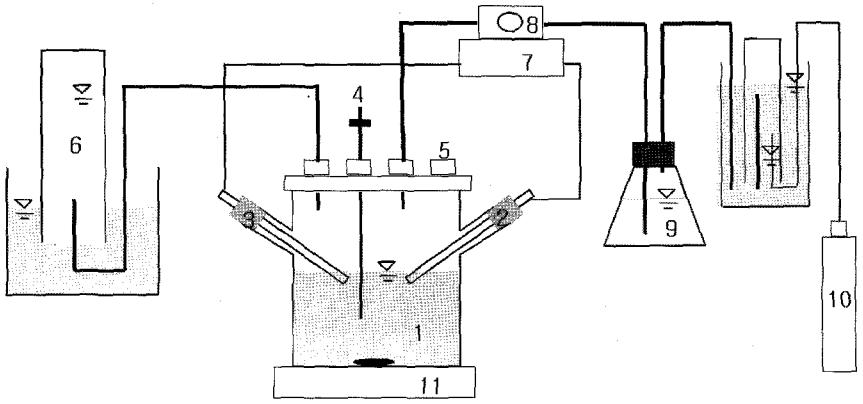
$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + C_{H,i} \cdot (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + (V_H + V_S) \cdot (C_{H,i} - C_{H,i-1}) \quad (5)$$

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_H와 V_S은 반응기의 head space부피(500 mL)와 이전의 누적된 배양액 sampling양을 나타낸다.

실험에서 1.5 L의 배양액이 사용된 것을 고려하여 총 가스와 수소 발생량을 계산하였으며 본문 중 특별한 언급이 없는 경우 생성된 가스의 생성량은 1 L에서 산출된 것으로 고려된다.

2.3.3. 최대 수소 생산률의 산정

회분식으로 구성된 반응조에서 발효 미생물에 의해 생성된



1. Culture medium(1.5 L) 2. pH meter sensor 3. temperature sensor 4. Liquid sampling port
5. Gas sampling port 6. Biogas collector 7. pH controller 8. Pump
9.2N-KOH solution 10. N_2 11. Magnetic stirrer

Fig. 2. Schematic diagram of the batch reactor for anaerobic fermentative hydrogen production.

수소 생산곡선을 분석하기 위해 식 (6)과 같이 수정된 Gompertz 방정식을[19] 이용하였다.

$$M = P \cdot \exp\left\{-\exp\left[\frac{R \cdot e}{P}(\lambda - t) + 1\right]\right\} \quad (6)$$

여기서 M은 누적가스 생성량(cumulative gas production), λ는 지연시간(lag phase time), P는 가스 생성량(gas production potential), R은 최대 가스 생성율(maximum gas production rate) 그리고 e는 exp(1)을 나타낸다.

pH의 변화에 따른 총 가스 생성율 및 누적수소 생성율은 식 (6)을 이용하여 해석되어 졌으며, 각 M, λ, P, R의 값은 SIGMA PLOT 2002(SPSS Science, UK) software 중 곡선분석을 이용하여 산출하였다.

2.3.4. 유기산 분석

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

2.3.5. 잔존 탄수화물 분석

배양액 내에 잔존하는 탄수화물을 정량하기 위하여 배양액 일정량을 원심분리(11,000 rpm, 5 min)하여 균체와 상등액을 분리하고 상등액을 취해 페놀-황산법[20]으로 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer(UV-1601, SHIMADZU)로 흡광도 파장 490 nm에서 측정하였다.

2.3.6. 기타 분석

균체량(volatile suspendid solids)의 측정은 일정량의 배양액을 취하여 UV-Visible spectrophotometer(UV-1601, SHIMADZU)로 600 ηm에서 흡수된 광량을 기존에 건조중량으로 검량된 곡선에 대입하여 환산 측정하였다. 배양액 일정량을 취하여 원심분리(11,000 rpm, 5 min)하여 측정한 초기 및 최종 COD_{Cr}와 균체량 측정을 위한 건조 중량 분석은 Standard Methods 법에[21] 의하여 측정하였다. 배양 내의 pH와 온도는 각각 pH meter와 온도 sensor를 사용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. pH에 따른 총 가스발생량 및 미생물의 성장

본 실험에서 반응기 내 빈 공간은 질소가스로 충진 된 상태로 실험이 시작 되었다. 반응이 진행되는 과정에서 메스실린더에 채집되는 가스를 통해 가스 생성을 육안으로 확인 할 수 있었으며 head space 내의 가스를 일정시간 간격으로 채집하여 분석하였다. Fig. 2의 실험장치에서 나타난 바와 같이 배양기간 동안 pH는 pH 조절기를 통해 배양기간 동안 일정한 pH를 유지하도록 하였으며, 실험에서 pH는 pH 3에서부터 pH 10까지 pH 1씩 변화시키면서 가스 발생량을 관찰 하였다. 배양기간 동안 발생된 가스는 수소와 이산화탄소로 구성되어 있었으며 각 pH에서 발생된 가스에서 메탄의 생성은 관찰되지 않았다. pH 3과 9 그리고 10에서 가스 발생량은 없거나 매우 미미 했으며, pH 5에서 가장 왕성한 가스 발생량이 관찰 되었다.(Fig. 3 참조)

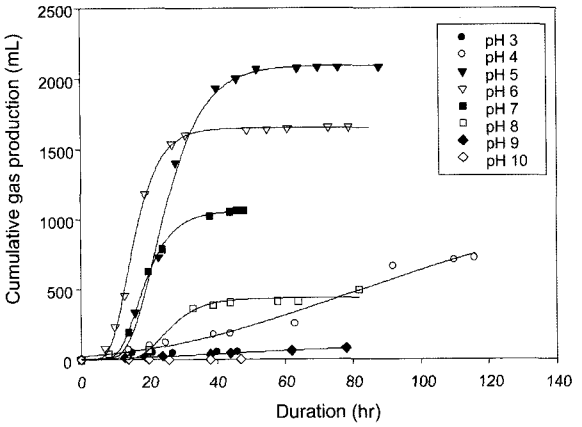


Fig. 3. Cumulative gas production curve at various pH. Graph symbols show the experimental data. The lines are the nonlinear estimation results according to equation (6).

식 (6)에 의해 산출된 각 변수들은 Table 2에 요약하였다. pH 3과 pH 10에서 총 가스 발생량은 무시할 만큼 이였으며 이 값들은 본 실험결과 해석에서 무시 되었다. 1%(w/v)의 sucrose가 초기에 공급된 상태에서 누적 가스 발생량은 pH 5에서 약 2,094 mL이 검출 되었다. 최대 가스 발생속도는 pH가 6인 상태에서 119.53 mL/hr로 분석 되었다. 식 (6)의 회귀분석 r-square 값은 0.97 이상이었으며, 각 산출된 값들의 p-value가 0.0476이하로 본 회귀분석의 95% 신뢰구간에서 통계적으로 중요한 의미를 가진다는 것을 확인 하였다.

Table 2. Calculated parameter values from nonlinear regression of equation (6) for gas production.

pH	Gas production potential		Gas production rate		Biomass (mg VSS/L)	r^2
	P_g (mL)	p-value	R_g (mL/hr)	p-value		
3	-	-	-	-	-	-
4	1287.21	0.0476	8.19	<0.0001	141.23	0.97
5	2094.03	<0.0001	99.95	<0.0001	569.08	0.99
6	1649.65	<0.0001	119.53	<0.0001	626.72	0.99
7	1057.62	<0.0001	70.05	<0.0001	674.84	0.99
8	435.94	<0.0001	26.13	0.0034	607.14	0.98
9	103.83	0.0004	1.15	<0.0001	453.94	0.99
10	-	-	-	-	-	-

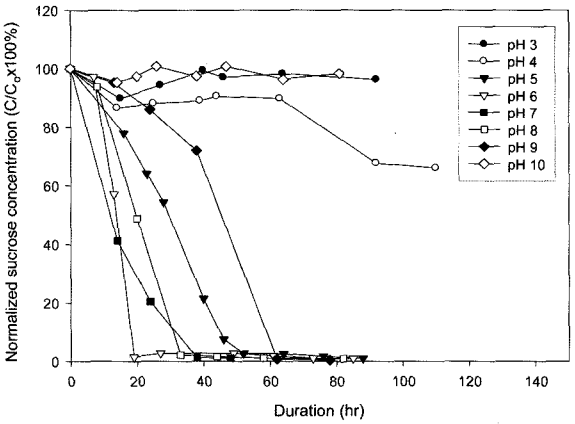


Fig. 4. Effect of pH on sucrose degradation by a mixed microbial flora.

Fig. 4는 각 pH에서 sucrose 분해효율을 나타낸다. 가스의 생성이 없는 pH 3과 pH 10에서 sucrose 분해는 거의 없었으며 pH 5에서 pH 9까지 범위에서 70시간의 실험시간이 경과한 후 거의 100%의 sucrose 분해율을 보여 주었다. pH 4의 경우 균체 성장도 저조하였고, sucrose의 분해 역시 배양시간 100시간이 경과하면서 첨가된 기질 중 42%만이 이용되었다.

3.2. 수소 생성량에 대한 pH의 영향 분석

Fig. 5는 배양액의 각 pH에서 미생물에 의한 수소생산 효율을 나타내는 그래프이다. pH 3에서는 반응 46시간 동안 균체 성장 및 기질 이용이 전혀 이루어지지 않았으며 그에 따른 가스 발생 또한 전혀 관찰 되지 않았다. pH 4 역시 수소 발생량은 비교적 적었으며(약 688 mL), 이는 pH 3 또는 4와 같이 낮은 pH 조건은 수소생성균(*Clostridium* sp.)의 활성에 저해를 주어 수소발생량이 낮다고 보고 된 기존의 연구결과와 동일한 양상을 보여준다.[12,22] pH가 높아짐에 따라 (pH 5와 pH 6) 왕성한 수소가스의 발생 양상을 보였으며 pH 6보다 pH 5에서 수소가스 발생량이 높게 나타나 누적 수소가스 발생량은 약 1,182 mL를 나타내었다. pH가 7을 넘어

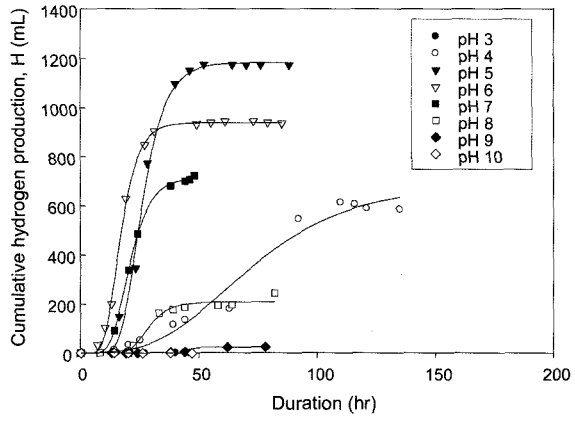


Fig. 5. Cumulative hydrogen production curve at various pH. The lines are the nonlinear estimation results according to equation (6).

Table 3. Calculated parameter values from nonlinear regression of equation (6) for hydrogen production

pH	Hydrogen production potential		H_2 yield (mL/g COD)	Hydrogen conversion ratio (%)	Specific hydrogen production rate		r^2
	P_h (mL)	p-value			R_h (mL/g VSS/hr)	p-value	
3	-	-	-	-	-	-	-
4	688.35	<0.0001	60.55	13.15	60.56	0.0002	0.98
5	1182.09	<0.0001	117.56	22.56	112.46	<0.0001	0.99
6	939.25	<0.0001	88.48	17.93	107.59	<0.0001	0.99
7	714.21	<0.0001	67.96	13.18	64.73	<0.0001	0.99
8	209.64	<0.0001	19.68	3.97	21.44	<0.0001	0.98
9	24.13	<0.0001	2.12	0.46	10.71	<0.0001	0.99
10	-	-	-	-	-	-	-

감에 따라 점차적으로 수소발생량은 감소하기 시작하였으며 pH 10 이상에서는 수소가스 발생이 검출되지 않았다. 비록 수소의 생성은 적더라도 pH 7 이상에서 균체 성장 및 기질 이용 정도는 비슷한 경향을 보인 것으로 보아(Table 2와 Fig. 3 참조) 성장한 균들이 수소를 생성하지 않는 산생성균 또는 식 (3)과 식 (4)에서 나타나는 수소이용 아세트산 생성균과 같은 비수소생성균이 우점화가 되었다고 사료된다.[23] 또한 각 pH 조건에서 배양기간 동안 생산된 수소를 제외한 나머지 가스는 이산화탄소로 추정하였다.

Table 3은 각 pH에 따른 비 수소생산 수율과 전환율을 나타낸 표이다. 이론적 수소전환율(hydrogen conversion ratio)은 이론적으로 1 mole의 sucrose 당 8 mole의 H_2가 생산된다는 가정 하에, 실제 수소전환률을 계산하게 되는데 이는 수소생산성을 쉽게 나타내는 지표이다. 수소발생량이 가장 왕성한 pH 5에서 수소 전환률은 22.56%이였다.

수소가스 발생량(P_h)과 최대수소 생성률(R_h)은 Fig. 4에 나타난 실험결과를 수정 Gompartz 방정식을 이용하여 분석 하였으며 이 때 r-square 값은 0.98 이상이, p-value는 0.0002 이하로 통계적으로 중요한 의미를 가진다는 것을 확인하였다. pH 5에서 수소가스 발생량은 약 1,182 mL이고 최대 수소 생성률은 112.46 mL/g VSS/hr이였다. 실험적으로 이 때의 수소가스 발생량과 수소 생성률이 최대값을 나타내었다.

3.3. 발효산물 분포특성 및 물질수지

각 pH에 따른 발효산물의 분포 특성을 살펴보기 위해 수소생산과 밀접하게 관계된 주요 유기산의 생산량을 측정하였다. 발효과정에서 나타나는 유기산의 분포와(butyrate/acetate의 비)수소 생산효율의 상관성을 나타내는 기존 연구보고에 따라[24] 본 실험결과를 비교 분석하였다. Fig. 6은 pH에 따른 발효산물의 구성 변화를 나타낸 것이다. pH가 높아짐에 따라 formate 및 acetate의 생산량이 많았으며, 수소생산효율이 가장 좋았던 pH 5와 6에서는 acetate의 생산량은 다소 적었지만 다른 pH에서 생산되지 않은 butyrate가 생산되었다. butyrate/acetate 비가 pH 5에서는 1.63, pH 6에서는 0.38로 ratio값이

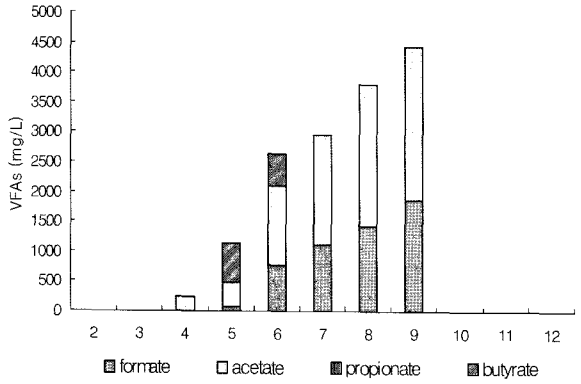


Fig. 6. Organic acid profiles under various pH condition. VFAs: volatile fatty acids.

Table 4. COD balance with various pH condition (unit: %)

pH	COD	VFAs			Biomass	remain of Sucrose	others	H_2	recovery
		formate	acetate	butyrate					
3	100	-	-	-	-	96.71	3.29	-	100.00
4	100	-	2.36	-	1.76	63.85	19.50	4.32	91.79
5	100	0.24	4.06	11.29	7.62	0.48	68.54	7.98	100.22
6	100	2.56	13.53	8.85	8.39	0.97	58.71	6.34	99.35
7	100	3.84	19.41	-	7.83	2.01	62.74	4.18	92.01
8	100	6.28	24.07	-	8.13	0.97	53.29	1.42	94.16
9	100	6.04	24.25	-	5.64	0.45	58.55	0.15	95.08
10	100	-	-	-	-	92.74	3.93	-	96.67

Others: SCOD - (VFA + soluble carbohydrate)

높은 pH 5에서 효율이 더 좋다는 것을 확인할 수 있다. 이는 butyrate/acetate 비가 낮은, 즉 acetate의 생산량이 많은 것은 수소 생산균이 수소를 생성하지 않는 산생성균 또는 수소이용 아세트산 생성균으로 전환되어 이에 따라 분해 된 기질 대비 수소 생산 효율이 저하된다고[9,10] 보고된 기존의 연구 결과와 같은 양상을 나타낸다.

탄소원으로 사용된 sucrose의 물질수지를 파악하기 위해 초기 COD를 100%로 설정하여 pH 3~10의 물질수지 검토하였다. 기질에 함유된 전자는 수소, 미생물, 각종 유기산 및 알코올류 등의 부산물로 전환되며, 반응기 내에서 기질이 생성하는 부산물중 본 실험에서 측정한 탄수화물, 유기산들을 제외한 물질을 Others라 하였으며, 본 실험에서 측정하지 못한 butanol, acetone 등의 각종 유기 용매와 lactate 등의 유기산이 이 Others에 속한다. Table 4는 물질수지 및 부산물의 분포를 나타내었다.

3.4. 비수소생산률 및 최적 pH 산정을 위한 동역학적 해석

미생물에 의한 수소생산에 있어서 pH의 영향을 나타내기 위해 Haldane equation을 사용하였다. 이 식은 pH에 관한 질산화 미생물이나 종속영양체들의 영향 해석을 위해 사용 된 적이 있으며 메탄생성균의 메탄가스 생성에 대한 수소이온의 영향해석에도 사용된 바가 있다.[25]

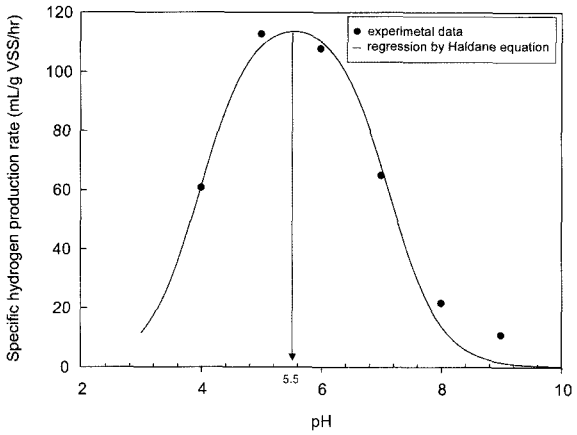


Fig. 7. Effect of pH on specific hydrogen production rate by mixed microbial flora. Regression of experimental data was conducted by Sigma plot of SPSS Inc. (r^2 = 0.98, p-value of R_m, K_{OH} and K_H was 0.0005, 0.0470 and 0.0496 respectively).

$$R_h = \frac{R_m \cdot [H^+]}{[H^+] + K_{OH} + \frac{[H^+]^2}{K_H}} \quad (7)$$

여기서 R_h는 비수소생산율(mL/g VSS/hr)이고, R_m은 최대 비수소생산율(mL/g VSS/hr)이며, KH와 KOH 속도상수이다. ($pK_H + pKO_H$)/2는 최적 pH를 나타낸다.

Fig. 7에 식 (7)을 이용한 회귀분석의 결과를 나타낸 그래프를 도식하였다. 식 (6)의 비선형 회귀분석을 이용하여 본 혐기성 발효미생물의 최대 비수소생산율(R_m)은 119.61 mL/g VSS/hr이였고, 최대 생산율을 가지는 pH값은 5.5, 그리고 속도상수 K_H와 K_{OH}는 1.065×10^{-4}와 7.688×10^{-8}으로 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 혐기성 발효에 의한 수소 생산 시 pH의 영향을 알아보기 위해 배양기간 동안 일정하게 유지하는 상태에서 pH를 3에서 10까지 pH 1단위로 증가시켜 수소 생성효율을 살펴 본 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 유입기질을 sucrose로 하여 혐기성 발효에 의해 생산된 누적 가스 발생량은 pH 5에서 약 2,094 mL로 측정 되었다. 최대 가스 발생속도는 pH가 6인 상태에서 119.53 mL/hr로 분석 되었다. 가스 성상 분석에 의해 가스는 이산화탄소와 수소로 추정되었으며 메탄의 생성을 검출되지 않았다.

2) pH 5와 pH 6에서 가장 왕성한 수소가스의 발생 양상을 보였으며 pH 5에서 누적 수소가스 발생량은 약 1,182 mL를 나타내었다. pH가 7을 넘어감에 따라 점차적으로 수소발생량은 감소하기 시작하였으며 pH 10에서의 수소가스 발생을 검출되지 않았다. 비록 수소의 생성은 적더라도 pH 7 이상에서 균체 성장 및 기질 이용 정도는 비슷한 경향을 보인 것으로 보아 성장한 균들이 수소를 생성하지 않는 산생성균

또는 수소이용 아세트산 생성균과 같은 비수소생성균이 우점화가 되었다고 사료된다.

3) 수정 Gompartz 방정식을 이용하여 수소가스 발생량(P_h)과 최대수소 생성율(R_h)을 회귀분석하였으며 pH 5에서 수소가스 발생량(P_h)은 약 1182 mL이고 최대 수소 생성율(R_h)은 112.46 mL/g dry wt biomass/hr이였다. 이 때 r-square 값은 0.98 이상이, p-value는 0.0002 이하로 본 회귀분석이 통계적으로 중요한 의미를 가진다는 것을 확인 하였다. pH 5에서 이론적 수소전환률 대비 실제 수소 전환율은 22.56%이었다.

4) 본 실험의 pH 범위에서 pH가 높아짐에 따라 formate 및 acetate의 생산량이 많았으며, pH 5와 6에서는 acetate의 생산량은 다소 적었지만 butyrate의 생성이 두드러졌다. butyrate/acetate 비가 pH 5에서는 1.63, pH 6에서는 0.38로 ratio 값이 높은 pH 5에서 효율이 더 좋다는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 butyrate/acetate 비가 높을수록 수소발생량이 증가한다는 기존의 연구결과와 동일하다.

5) Haldane equation을 이용하여 비수소생산율을 산정해 본 결과 최대 비수소생산율은 119.61 mL/g VSS/hr이였고, 최대 비수소생산율을 나타내는 pH, 즉 pH_m은 5.5로 판명되었으며, 속도상수 K_H와 K_{OH}는 1.065×10^{-4}(p-value = 0.0470)과 7.688×10^{-4}(p-value = 0.0496)으로 나타났다. 실험결과에 도식된 회귀분석 곡선은 $r^2 = 0.98$이였으며 변수들의 p-values도 0.047이하로 통계적 신뢰도를 확인하였다.

참고문헌

1. Momirlan, M. and Veziroglu, T., "Recent directions of world hydrogen production," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **3**, 219~231(1999).
2. Miura Y., Ohta, S., Mano, M., and Miyamoto, K., "Isolation and characterization of a unicellular marine green alga exhibiting high activity in dark hydrogen production," *Agric. Biol. Chem.*, **50**, pp. 2837~2844(1986).
3. Rifkin, J., "The hydrogen economy: the worldwide energy web and the redistribution of the power on earth," Penguin Putnam, New Work, NY US, pp. 15~17(2002).
4. Rifkin, J., "The hydrogen economy," *Putnam Pub Group* (2003).
5. Das, D., Vexiroglu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature," *International Journal of Hydrogen Energy*, **26**, 13~28(2001).
6. Bae, M. "Production of bio-hydrogen from waste materials", Research Report, Ministry of Trade, Industry, and Energy, 941C401-364FPI(1995).
7. Heyndrix, M., De Vos, P., Thibau, B., Stevens, P., and JI De Ley, "Effect of various external factorson the fermentative production of hydrogen gas from glucoes by Clostridium butyricum strains in batch culture system," *Appl. Microbial*, **9**, 163~168(1987).
8. Van Andel, J. G., Zoutberg, G. R., Crabbendam, P. M., and Breau, A. M., "Glucose fermentation by Clostridium butyricum grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture," *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **23**, pp. 21~26(1985).
9. Leclerc, M., Bernalier, A., and Donadille, G., Lelait M., "H_2/CO_2 metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon," *Anaerobe*, **3**, pp. 307~315(1997).
10. Morvan, B., Rieu-Lesme, F., Fonty, G., and Gouet, P., "In vitro interactions between rumen H2-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria," *anaerobe*, **2**, pp. 175~180(1996).
11. Han, S. K. and shin, H. S., "Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, pp. 569~577(2004).
12. Fang, H. H. P. and Liu, H., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture," *Bioresource Technol.*, **82**, 87~93(2002).
13. Samir Kumar Khanal, Wen-Hsing Chen, Ling Li, Shihwn Sung, "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 1123~1131(2004).
14. Lee, Y. J., Takashi, M., and Tatsuya, N., "Effect of pH on microbial hydrogen fermentation," *J. Chemical Technology and Biotechnology*, **77**, 694~698(2002).
15. Mannix Salvador Pedro, Shin Haruta, Masaru Hazaka, Rumiko Shimada, Chie Yoshida, Koichiro Hiura, Masaharu Ishii, and Yasuo Igarashi, "Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter," *J. Bioscience and Bioengineering*, **91**(2), 159~165(2001).
16. Zajic, J. E., Kosaric, N., and Brosseau, J. D., "Microbial production of hydrogen," *Adv. Biochem. Eng.*, **7**, 57~109 (1978).
17. 박종문, 조지혜, "생물학적 수소 생산의 현황 및 전망," DICER TechInfo Part I, **3**(8), 114~132(2004).
18. Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers," *Environmental Science and Technology*, **36**(11), 2530~2535(2002).
19. Lay, J. J., Li, Y. Y., Noike, T., "The influences of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solids digestion," *Water Environ. Res.*, **70**(5), 1075~1082(1998).
20. 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).
21. APWA, AWWA, WPCF, Standard methods for the

examination of water and wastewater, 20th ed.(1999).

22. Hawkes, F. R., Dinsdal, R., Hawkes, D. L., Hussy, I., "Sustainable fermentative hydrogen production: Challenges for process optimisation," *Int. J. Hydrogen Energ*, **27**, 1339～1347(2002).
23. Kusel, K., Dorch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., and Drake, H. L., "Clostridium scatologenes strain SL1 isolated as an acetoclastic bacterium form acidic sediments," *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, **50**, 537～549(2000).
24. Chen, C.-C. and Lin, C.-Y., "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen -producing reactor," *Adv. Environ. Res.*, **7**, 695～699(2003).
25. Lay, Jiunn-jyi, Yu-you Li and Tatsuya Noike, "Influence of pH and moisture content on the methane production in high-solids sludge digestion," *Water Res.*, **31**(6), 1518～1524(1997).