

두부 폐수를 이용한 수소생산 및 미생물의 군집 변화

전윤선 · 조윤아 · 이태진[†]

서울산업대학교 환경공학과

(2008년 10월 10일 접수, 2009년 2월 27일 채택)

Change of Microbial Community and Fermentative Production of Hydrogen from Tofu Wastewater

Yoon-Sun Jun · Yoon-A Joe · Tae-Jin Lee[†]

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology

ABSTRACT : In this study, characteristics of biological hydrogen production and microbial distribution were investigated with the wastewater of Tofu manufacturing process. Comparison of hydrogen production was conducted with acid or base pre-treatment of the wastewater. Maximum hydrogen production was acquired with combination of heat and acid treatment. Hydrogen production (P_h) and maximum hydrogen production rate (R_h) was calculated 661.01 mL and 12.21 mL/g dry wt biomass/hr from the modified Gompertz equation. Most of microbial community was analyzed as *Streptococcus sp.* from PCR-DGGE experiment of 16S rDNA. It was concluded that most significant microorganism for hydrogen production was *Streptococcus gallolyticus sub sp.* in this experiment.

Key Words : Anaerobic Fermentation, Hydrogen Production, *Streptococcus*, PCR-DGGE, Tofu Wastewater

요약 : 본 연구에서는 두부공장에서 발생된 폐수를 이용한 생물학적 수소생산 특성과 미생물의 군집 변화를 살펴보았다. 두부 폐수는 산 또는 알칼리 조건에서 전처리 된 후 수소생산량을 비교 하였으며, 산처리와 열처리를 병행하여 전처리 하였을 때 가장 왕성한 수소생산을 보였으며, Gompertz 방정식을 이용한 수소가스 발생량(P_h)은 약 661.01 mL이고 최대 수소 생성율(R_h)은 12.21 mL/g dry wt biomass/hr 이었다. 16S rDNA의 PCR-DGGE 결과 대부분 군집은 *Streptococcus sp.* 미생물로 규명되었으며 수소생성에 기여도가 큰 미생물은 *Streptococcus gallolyticus sub sp.*으로 판단되었다.

주제어 : 혐기성 발효, 수소생산, *Streptococcus*, PCR-DGGE, 두부폐수

1. 서론

현재 세계 에너지 수요의 약 80%까지 차지하고 있는 화석 에너지는 온실 효과 및 NOx, SOx 등의 오염물질 배출로 인한 환경파괴 문제와 한정된 매장량으로 인한 미래의 에너지 고갈의 문제를 야기시키고 있다.^{1,2)} 또 1970년대 석유 파동으로 “에너지 위기”를 겪으면서 이를 대체할 에너지 개발이 시급한 실정이다.

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.^{3,4)} 이와 같은 이점으로 수소는 화석연료를 대체할 친환경적인 에너지 자원으로 국제적인 연구가 활발하게 진행되고 있다.

기존의 수소생산 방식인 화석연료의 열분해와 물의 전기분해는 고가의 제조비와 생산되는 수소에너지를 초과한

화석 에너지를 투입해야 한다는 근본적인 한계가 있다. 이에 생물학적 방법을 통해 수소를 생산하고자 지난 20년간 미생물을 이용한 수소생산 연구가 활발히 진행되어 왔다. 주로 광합성 미생물을 이용한 물 분해와 유기물 분해에 의한 수소생산에 집중되어 연구가 진행되어 왔지만 빛에너지를 계속 공급해 주어야 하고 반응속도가 느리며 에너지 효율이 낮은 단점들이 크게 개선되지 못하고 있어 최근에는 혐기성 발효미생물을 이용한 수소생산 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(0.04~0.21 mmol H₂/L/d vs 1.6~26.9 mmol H₂/L/d).^{6,7)} 또한 다양한 형태의 유기물로부터 수소를 생산할 수 있어 친환경적이며 유기성 폐기물의 처리에 적용되고 있는 기존의 혐기성 소화 기술을 대체·보완할 수 있는 이점이 있어 현재 적용 가능성이 가장 앞선 생물학적 수소생산기술로 평가받고 있다.⁸⁾

혐기성 발효 수소생산에 대한 연구는 대부분 glucose 또는 sucrose와 같은 가수분해가 이루어진 탄수화물을 이용한 인공폐수를 기질로 한 기초적 연구가 많이 진행되었다.⁹⁾

[†] Corresponding author
E-mail: leetj@snut.ac.kr
Tel: 02-970-6614

Fax: 02-971-5776

하지만 친환경적 재생에너지로서의 수소를 생산하기 위해선 폐 활성 슬러지, 음식물 쓰레기, 식품 제조 공장 등의 실제 고농도 유기성 폐수를 이용한 연구가 진행되어야 하며 이러한 고농도의 유기성 폐수를 기질로 이용할 경우 여러 저해 요인으로 인해 glucose 또는 sucrose와 같은 인공 폐수를 이용한 기존의 연구에서 보다 낮은 수소생산 효율을 나타내는 것에 대한 개선 방법 연구도 함께 진행되어야 할 것이다. 더욱이 실제 고농도 유기성 폐수를 이용하여 수소를 생산하고자 할 때 미생물의 동적 변화 특성에 대한 연구는 상대적으로 미미하였으므로 수소의 생성률과 더불어 미생물의 군집변화를 살펴볼 필요가 있다.

이러한 분자생물학적 기법의 미생물 군집변화 해석은 DNA (deoxyribonucleic acid), RNA (ribonucleic acid)를 분석하는 것으로 이는 미생물의 생태학적 연구에 있어 세부적인 유전자 상관관계를 해석할 수 있다. 특히 bacteria의 16S rDNA (ribosomal DNA)의 특정 부위는 진화속도가 매우 느려 많은 생명체가 공통으로 보존된 염기서열과 이차구조를 나타내 다양한 분류군의 상호 비교를 가능케 하여 원핵생물의 계통분류학적 연구에 유용하게 이용할 수 있다.^{10~13)}

따라서 본 혐기성 발효 수소생산 연구에서는 식품 공장에서 발생하는 대표적인 고농도의 유기성 폐수인 두부 제조 시 발생하는 순물(이하 두부 폐수)을 기질로 이용하여 pH를 5.5로 일정하게 유지한 상태에서 수소생산 효율 및 특성, 유기산의 생성, 그리고 기질 이용 및 미생물 군집 분포의 변화 및 우점화 미생물을 확인하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 균주 및 운전방법

Fig. 1은 본 연구에 사용된 회분식 반응기로 배지¹⁴⁾와 탄소원으로 두부폐수를 첨가시킨 후 N₂ 가스로 purging 시켜 혐기성 상태로 만든 후 가스의 유출입이 없도록 완전 밀폐시켰다. 균주로는 E하수처리장 활성 슬러지조의 반송 슬러지를 계대 배양시킨 배양액을 실험 전 24시간 배양시켜 균의 활성화를 도모한 후 주입하였다.^{15,16)} 실험은 30±3

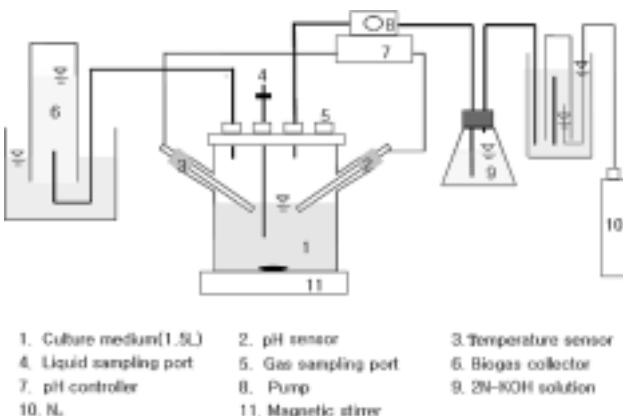


Fig. 1. Schematic diagram of the batch reactor for fermentative hydrogen production.

°C의 온도 조건에서 수행되었으며 미생물의 배양기간 동안 반응기 내 pH를 5.5로 일정하게 유지하기 위해 2N-KOH 용액을 온도 센서가 연결된 pH 자동조절장치에 의해 자동 조절되어 주입되도록 하였다. 반응조의 유효 용적은 1.5 L이며 배양액을 완전혼합하기 위한 교반속도는 200 rpm으로 유지 하였다. 이 때 주입된 초기 배양액은 반응기 유효 용적의 1% (v/v)이었으며, 접종된 반응기 내 초기 생체량은 약 6 mg VSS/L이었다.

탄소원으로 사용된 두부 폐수의 경우 유기성분이 고분자 형태로 존재하므로 고분자 탄수화물의 가수분해를 돕고자 다양한 전처리 기술을 이용하였으며 이를 위하여 알칼리 단독 처리(5N-KOH를 이용하여 120 min 동안 pH를 12로 조절), 산 단독 처리(HCl을 이용하여 120 min 동안 pH를 2로 조절), 열 단독 처리(100°C로 120 min 동안 가열), 멸균처리(autoclave에서 120°C, 30 min 동안 멸균), 알칼리 처리(pH 12) + 열처리(100°C), 산 처리(pH 2) + 열처리(100°C)를 수행하였다.

2.2. 분석방법

2.2.1. 반응기 성능 분석

반응기의 총 가스는 2% (v/v) H₂SO₄을 담은 포화식염수에 포집하며 그 중 수소함량 측정은 열전도도 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피(GOW-MAC series 350)를 이용하여 측정하였다. 유기산은 상등액 20 µL를 SUPELCOGEL C-610H (300 mm × 7.8 mm ID) 칼럼을 장착한 HPLC로 분석하였다. 배양액 내에 잔존하는 탄수화물을 정량하기 위하여 페놀-황산법¹⁷⁾으로 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)로 측정하였다. 환원당 (Reducing sugar) 정량을 위하여 상등액을 DNS (3,5-Dinitrosalicylic acid)로¹⁸⁾ 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer로 흡광도 파장 575 nm에서 측정하였으며 단백질 정량을 위하여 Lowry법으로¹⁹⁾ 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer로 흡광도 파장 660 nm에서 측정하였다. 초기 및 최종 SCOD_{Cr}와 균체량 측정을 위한 건조 중량 분석은 Standard Methods 법²⁰⁾에 의하여 측정하였다. 균체량 (volatile suspended solids)의 측정은 600 nm에서 흡수된 광량을 기존에 건조중량으로 검량된 곡선에 대입하여 환산 측정하였다.^{21,22)} 누적수소생산량 곡선은 일정시간마다 측정된 head space의 수소함량과 발생된 총 가스량으로 부터 계산되었다.²³⁾ 회분식으로 구성된 반응조에서 발효 미생물에 의해 생성된 수소생산 곡선을 분석하여 최대 수소생산률을 산정하기 위해 다음 식 (1)과 같은 수정된 Gompertz 방정식^{24,25)}을 이용하였다.

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

2.2.2. SEM을 통한 미생물 형상 관찰

혐기성 수소생산 시 수소생산 최대 시점에서 배양액을

Table 1. PCR primers used in this study

Primer pair (target)	Nucleotide sequence (5' - 3')	Size of PCR product(bp)	Reference
10f 1400r (Bacteria 16S rDNA)	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG ACG GGC GGT GTG TAC AAG	1408	26
341f 518r (V3 region)	CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GG	193	27,28
GC clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	233	27,28

* f : forward primer, r : reverse primer, * The GC clamp added DGGE

채취하였으며 주사전자현미경(Scanning electron microscope: SEM, JSM-6700F, JEOL LTD)을 이용하여 미생물의 형상을 관찰하였다.

2.2.3. 분자생물학적 기법을 통한 미생물 군집 분석

각 시료를 11,000 rpm에서 5 min 원심분리하여 상등액을 제외한 침전물을 약 0.25 g이 되도록 한 후, Power Soil DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)를 사용하여 DNA 추출을 하였다. DNA 추출여부는 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. 추출한 DNA template에서 16S rDNA의 가변 부위인 V3 region 증폭을 위해 서로 다른 2개의 primer sets을 사용하여 nested PCR을 실시하였다.²⁶⁾ 실험에 사용된 primer (Bionics, Korea) 및 GC clamp의 sequence은 Table 1과 같다.

DNA 증폭을 위한 PCR 기기(UVIgene™ State of art Thermal Cycler)의 온도조건은 95℃에 9 min 동안 pre-denaturation 한 후 95℃에서 1 min denaturation, 53℃에서 1 min annealing, 72℃에서 2 min extension을 35 cycles 반복 수행한 후 마지막으로 72℃에서 10 min final-extension 하였다.^{26,28)}

DGGE는 40~60%의 변성제 농도 구배(변성제 농도 100%는 7M Urea, 40% Formade)를 가지는 8% Polyacrylamide Gel을 만든 후(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system) 실시하였다. 전기영동 후 UV transilluminator에서 DGGE band 확인 후 원하는 band 부위를 잘라낸 후 gel에서 DNA가 분리되도록 하였다.^{28,29)} 분리된 DNA를 341f와 518r를 primer로 하여 PCR을 재실시하여 생성된 PCR product를 이용하여 sequence하였다.

염기서열 분석은 염기서열 분석 전문기관(Bionics, Korea)에서 수행되었으며, 계통분류학적 확인을 위해 16S rDNA의 염기서열 결과는 NCBI BLAST Search Database에서 검색된 염기서열 정보를 이용하였다. Phylogenetic tree의 작성 작업은 Mega 4.0 software의 neighbor-joining method

을 이용하였으며 균주들의 진화과정을 추적하는 작업은 Kimura 2-parameter Model을 이용하였다. 또한 신뢰성 확보를 위해 1000회의 bootstrap을 시행하였다.^{30~32)}

3. 결과 및 고찰

3.1. 두부공장폐수의 성분 조성

Table 2는 두부폐수의 성분 조성으로 총 유기물 중 88.7%가 생물학적 분해가 용이한 물질이며 또한 그 중 67.6%가 탄수화물로 혐기성 발효 수소생산에 적합한 기질인 것으로 사료된다. 암모니아성 질소는 3.48 mg/L로 질소의 함량이 낮은 폐수이며 응고제로부터 발생하는 Na⁺이 다량 존재한다.

3.2. 가수분해를 위한 전처리 방법 효율 비교

두부 폐수에 포함 된 고분자 탄수화물은 전처리를 통해 단당류, 소당류의 저분자 탄수화물로 변환을 시도하였으며 이러한 저분자화 된 탄수화물의 양을 환원당(Reducing sugar) 측정으로 확인하였다. 전처리 방법으로 산처리(pH 2, 120 min), 알칼리처리(pH 12, 120 min) 그리고 열처리(100℃, 120 min)를 각각 실시하여 Fig. 2와 같은 결과를 도출하였다. 전처리를 한 경우와 전처리를 실시하지 않은 경우 두부폐수의 총탄수화물과 환원당의 양 변화가 거의 없었으며 이로써 위와 같은 전처리 방법은 환원당의 생성에 효과적이지 않는 것으로 판단되었다.

두부 폐수의 전처리 방법을 개선하기 위해 산처리(pH 2)와 알칼리처리(pH 12)와 더불어 열처리(100℃, 120 min)을 가하는 복합적 방법과 멸균처리(120℃, 30 min)를 추가하여 전처리를 수행하였으며 그 결과 두부폐수의 총탄수화물과 환원당의 뚜렷한 변화를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

전처리 수행 전 총탄수화물과 환원당 양은 각각 10,339, 2,462 mg/L로 나타났으며 멸균 후 총탄수화물의 양은 11,409 mg/L, 환원당의 양은 4,056 mg/L로 전처리 전보다 약간

Table 2. Composition of Tofu wastewater

Item	TCOD _{Cr} (mg/L)	SCOD _{Cr} (mg/L)	Total Carbohydrate (mg/L)	Reducing sugar (mg/L)	Protein (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	pH
Conc.	21,200	18,800	11,909	2,462	6,359	38.33	3.48	5.1

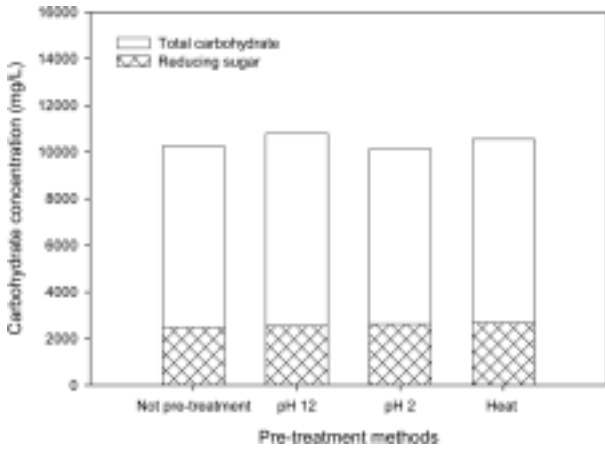


Fig. 2. Variation of total carbohydrate and reducing sugar concentration on strong acid, strong base or heating treatment.

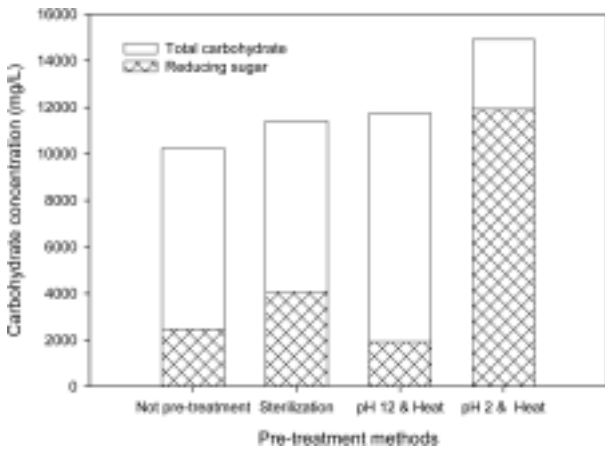


Fig. 3. Variation of total carbohydrate and reducing sugar concentration on sterilization or strong acid/strong base and heating treatment.

증가한 것을 볼 수 있다. 알칼리처리와 열처리(100°C, 120 min)를 가한 경우 총탄수화물의 양은 11,727 mg/L, 환원당은 1,916 mg/L로 확인되었다. 산처리와 열처리를 가한 경우 총탄수화물의 양은 14,909 mg/L, 환원당의 양은 11,918 mg/L로 약 4.8배 증가하여 전처리 방법 중 산처리(pH 2)와 열처리(100°C, 120 min)를 혼합하여 처리한 경우 환원당의 생성에 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

3.3. 수소생산량에 대한 전처리 방법에 따른 영향 분석

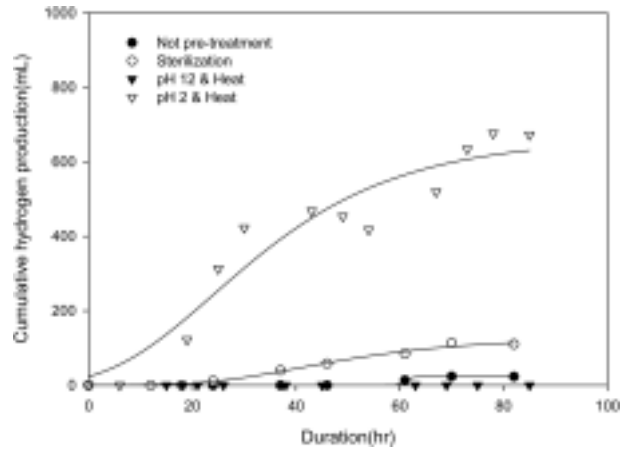


Fig. 4. Cumulative hydrogen production curve at sterilization or strong acid/strong base and heating treatment of Tofu wastewater.

전처리를 수행한 후 pH 5.5를 유지한 상태에서 실시한 혐기성 수소생산 실험에서 발생된 가스는 수소와 이산화탄소로 구성되어 있었으며 메탄의 생성은 관찰되지 않았다. Fig. 4에 전처리 방법에 따른 수소생산 효율을 나타내었다. 전처리를 수행하지 않은 두부 폐수의 누적 수소 발생량은 23.45 mL이며, 알칼리처리와 열처리를 수행한 경우 발생량은 거의 없었으며 멸균처리를 수행한 경우 122.3 mL, 산처리와 열처리를 수행 한 경우 약 661 mL로 최대의 누적 수소 발생량을 나타내었다. 따라서 산처리와 열처리를 병행하여 전처리된 두부폐수가 가장 높은 수소생산 효율을 가지며 이는 전처리에 의해 생성된 환원당의 발생량에서도 나타나듯이(Fig. 3) 두부 폐수 내 고분자 물질에서 환원당으로의 전환과 깊은 관계가 있음을 유추할 수 있다.

Table 3에 각 전처리 방법에 따른 비 수소생산 수율을 나타내었으며, 이 중 산처리와 열처리를 병행한 경우 36.76 mL H₂/g COD의 수소가 생산되는 것으로 산출되었다. 수소가스 발생량(P_h)과 최대 수소생산률(R_h)은 Fig. 4에 나타난 실험결과를 수정 Gompertz 방정식(식 (1))을 이용하여 분석하였으며 이 때 r-square 값은 0.96 이상, p-value는 0.95 이하로 본 회귀분석의 96% 신뢰구간에서 통계적으로 중요한 의미를 가진다는 것을 확인하였다. Table 3에 보여지는 생성량들은 기존의 glucose 또는 sucrose와 같은 탄수화물을 이용한 수소생산 시 산출되는 수율에 비해 떨어지지만 실 폐수에서 수소생산 가능성을 확인하였으며 이를

Table 3. Calculated parameter values from nonlinear regression of the modified Gompertz equation^{24,25)} for hydrogen production with sterilization or strong acid/strong base and heating treatment on Tofu wastewater

Pre-treatment methods	Hydrogen production potential		H ₂ yield (mL H ₂ /g COD)	Specific hydrogen production rate		r ²
	P _h (mL)	p-value		R _h (mL/g VSS/hr)	p-value	
No pre-treatment	23.45	<0.0001	1.29	8.91	0.9558	0.99
Sterilization	126.30	<0.0001	6.18	2.575	0.0002	0.99
pH 12 & Heat	-	-	-	-	-	-
pH 2 & Heat	661.01	<0.0001	36.76	12.21	0.0029	0.96

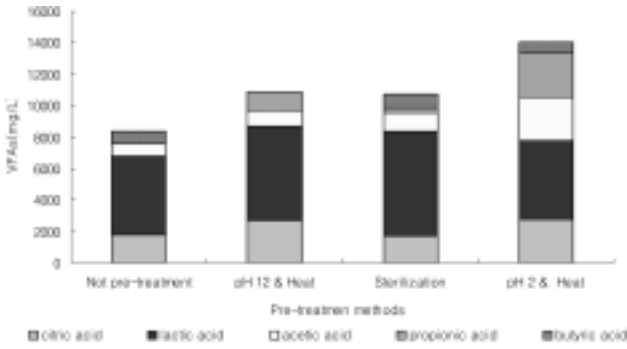


Fig. 5. Organic acid profiles at microorganisms cultured under the various pre-treatment of Tofu wastewater.

토대로 실 폐수에서의 수소생산 최적화를 위한 연구가 함께 진행된다면 더 높은 수소생산 효율을 기대해 볼 수 있을 것이다.

3.4. 발효산물 분포 특성 및 물질 수지

두부 폐수를 이용한 수소생산 시 생성된 유기산의 분포 특성을 살펴보기 위해 수소생산과 밀접하게 관계된 주요 유기산의 생산량을 측정하였으며 Fig. 5는 유기산의 구성 변화를 나타낸 것이다. lactic acid와 propionic acid가 많이 생성된 것을 볼 수 있었으며, 두부 순물에서 많이 검출되는³³⁾ citric acid와 lactic acid가 검출되었다. 기존의 연구에서 lactic acid와 propionic acid의 생성은 낮은 수소생산을 유발한다고 보고된 바 있다.¹⁴⁾ 물질수지를 파악하기 위해 초기 COD를 100%로 설정하여 각 전처리 방법에 대한 물질수지 검토하였으며 Table 4는 물질수지 및 부산물의 분포를 나타내었다.

3.5. 전처리에 따른 미생물의 군집변화

Fig. 6은 산이나 알칼리 또는 멸균 처리된 두부 폐수가 주입된 상태에서 운전된 수소생산 반응기에서 채취한 미생물의 DNA를 증폭하여 얻은 16S rDNA의 V3 region의 DGGE의 결과이다. 선명도가 각기 다른 몇 개의 band가 나타났으며 band의 형태는 단순하였다. 각 조건에서 band C의 가장 진하게 나타났으며 band A는 산이나 알칼리 처리한 경우 선명도가 약해졌다. 그에 반해 band B는 산이나 알칼리 처리 후 선명도가 진해진 것으로 나타났다. 또한 band D는 알칼리 상태에 열을 가한 처리 방법에서 다

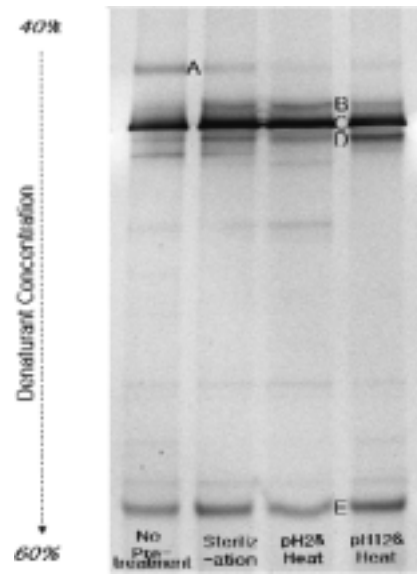


Fig. 6. DGGE profiles of microorganisms cultured under the various pre-treatment of Tofu wastewater.

른 조건에서 보다 좀 더 선명하게 나타났으며 band E는 선명도는 조금 약하지만 모든 조건에서 확인되었다.

DGGE bands 중 선명도가 높은 5개의 band를 sequence 하여 NCBI BLAST을 이용하여 GenBank database와 비교 분석하여 가장 유사도가 높은 종을 검색한 결과³⁴⁾ DGGE band로부터 얻은 clone은 *Streptococcus sp.* 미생물로 규명되었다. 그 검색결과를 Table 5에 요약 정리하였다. 따라서 각 조건에서 *Streptococcus mutans strain UA96*와 *Streptococcus suis*가 공히 존재하며 band의 선명도로 보아 수소생성에 기여도가 큰 미생물은 *Streptococcus gallolyticus sub sp.*으로 판단되었다. 알칼리 상태에 열을 가한 처리 방법에서 뚜렷하게 나타난 *Uncultured Streptococcus sp. clone 9.71*은 수소생성의 기여도가 그다지 크지 않은 것으로 사료된다. 기존의 연구에 따르면 수소생성에 관여하는 미생물 종류로 *Clostridium sp.*, *Klebsiella sp.*, 또는 *Enterobactor sp.* 등은^{9,21,31)} 보고된 바 있으나 *Streptococcus sp.*가 수소생성에 관여한다는 것은 보고된 바 없다.

결론적으로 두부 폐수를 기질로 이용한 본 실험에서 나타난 미생물 군집의 대부분의 종류를 차지하여 수소생산 수율에 중요한 역할을 담당하는 미생물은 *Streptococcus gallolyticus sub sp.*미생물로 판명되었다. Fig. 7에 제시된

Table 4. COD balance with microorganisms cultured under the various pre-treatment of Tofu wastewater (unit: %)

pre-treatment methods	Initial COD	VFAs					Biomass	remain of substrate	others	H ₂	recovery
		citric acid	lactic acid	acetic acid	propionic acid	butyric acid					
No pre-treatment	100	7.30	28.99	4.49	-	7.69	2.77	10.40	28.09	0.92	90.65
Sterilization	100	7.00	38.59	6.72	12.35	8.76	3.95	9.01	26.61	0.44	91.35
pH 12 & Heat	100	9.32	29.66	4.75	2.62	-	4.23	12.40	26.61	-	91.26
pH 2 & Heat	100	11.31	29.03	16.10	22.98	6.81	6.08	1.73	19.79	2.63	93.46

Others : SCOD - (VFA + soluble carbohydrate)

Table 5. Characteristic of DNA fragments obtained from DGGE gel with microorganisms cultured under the various pre-treatment of Tofu wastewater

Band Name	Gen Bank Search Result			Taxonomic Description (class)
	Phylogenetically Closest Relative	Accession NO.	Similarity	
A	<i>Uncultured Streptococcus sp. clone IS030B19</i>	AY807240	93%	Bacilli
B	<i>Streptococcus gallolyticus sub sp.</i>	DQ232523	96%	Bacilli
C	<i>Streptococcus mutans strain UA96</i>	AF077835	82%	Bacilli
D	<i>Uncultured Streptococcus sp. clone 9.71</i>	DQ346328	93%	Bacilli
E	<i>Streptococcus suis</i>	AF014814	93%	Bacilli

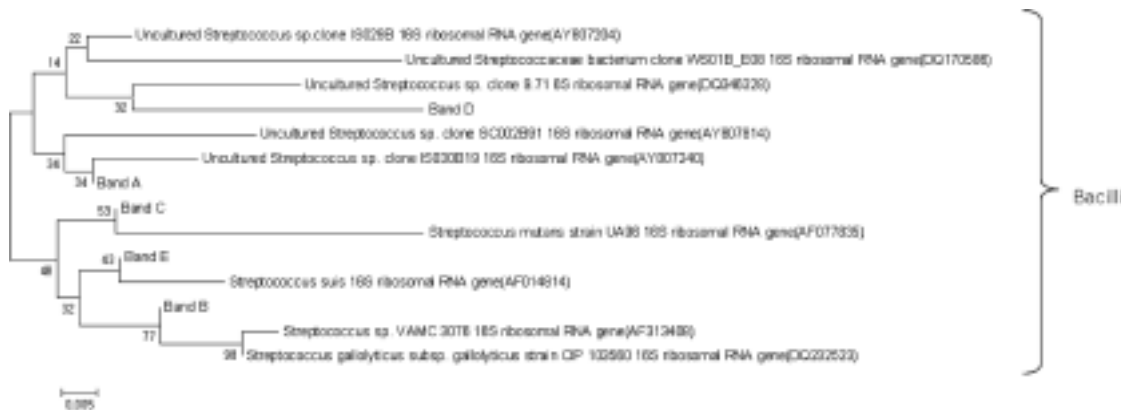


Fig. 7. Phylogenetic tree showing the relationship among the closest relatives in the GenBank databases and the isolates. The tree was produced using a neighbor-joining method. The bar indicates 5% sequence divergence. The numbers at the nodes of the branches refer to the Bootstrap values for 1000 replicates.

DGGE band로부터 판명된 미생물의 계통발생학적 유연관계를 도시한 결과이다.

4. 결론

본 연구에서는 두부 폐수를 전 처리한 후 혐기성 발효에 의한 수소생산을 실시하였으며 배양기간 동안 pH를 5.5로 일정하게 유지하는 상태에서 수소생산율과 미생물의 군집 변화를 살펴보았을 때 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

1) 유기성 폐수인 두부 폐수를 단분자성 유기물로 전환하기 위해 습윤멸균처리와 산처리(pH 2)와 알칼리처리(pH 12)를 열처리와 병행한 후 각 조건에서 수소발생량을 살펴보았을 때 기질의 소비 및 균체 성장은 비슷하게 진행되었음에도 불구하고 수소생산 효율은 산처리에 열을 가한 전처리 방법에서 가장 두드러지게 높게 나타났다.

2) 두부폐수를 산처리와 열처리를 병행한 전처리를 실시한 후 수정된 Gompertz 방정식을 이용하여 수소가스 발생량(Ph)과 최대 수소생산율(Rh)을 회귀분석하였을 때, 수소가스 발생량(Ph)은 약 661.01 mL이고 최대 수소 생성율(Rh)은 12.21 mL/g dry wt biomass/hr 이었다. 이 때 유기산은 lactic acid와 propionic acid, butyric acid 그리고 acetic

acid가 생성된 것을 볼 수 있었다.

3) 16S rDNA의 PCR-DGGE 결과를 NCBI BLAST을 이용하여 분석한 결과 대부분 군집은 *Streptococcus sp.* 미생물로 규명되었으며 각 전처리 후 배양된 액상에서 *Streptococcus mutans strain UA96*와 *Streptococcus suis*가 공히 존재하며 band의 선명도로 보아 수소생성에 기여도가 큰 미생물은 *Streptococcus gallolyticus sub sp.*으로 판단되었다. 알칼리 상태에 열을 가한 처리 방법에서 뚜렷하게 나타난 *Uncultured Streptococcus sp. clone 9.71*은 수소생성의 기여도가 그다지 크지 않은 것으로 사료된다. *Clostridium sp.*, *Klebsiella sp.* 또는 *Enterobactor sp.* 등은 수소생성에 관여하는 미생물 종으로 밝혀진 바 있으나 본 실험을 통하여 *Streptococcus sp.* 미생물 역시 수소생성에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- Momirlan, M. and Veziroglu, T. N., "Recent directions of world hydrogen production," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **3**, 219~231(1999).
- Debabrata, D., Veziroglu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature," *Int. J. Hydrogen Energy*, **26**, 13~28(2001).

3. Rifkin, J., "The hydrogen economy: the worldwide energy web and the redistribution of the power on earth," *Penguin Putnam, New York, NY US*, 15~17(2002).
4. Rifkin, J., "The hydrogen economy," *Putnam Pub Group*. (2003).
5. Benemann, J., "Hydrogen biotechnology progress and prospects," *Nature Biotechnology*, **14**, 1101~1103(1996).
6. Zaborsky, O. R., "Biohydrogen," *Plenum Press, Newyork*, 10~18(1998).
7. Levin, D. B., Pitt, L., and Love, M., "Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 173~185(2004).
8. Okamoto, M., Miyahara, T., Mizuno, O., and Noike, T., "Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes," *Water Sci. Technol.*, **41**(3), 25~32(2000).
9. Narendra, K., Debabrata, D., "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08," *Process Biochemistry*, **35**, 589~593(2000).
10. Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y., "Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora," *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(4), 397~400(2001).
11. Vreas, L., Forney, L., Daae, F. L., and Torsvik, V., "Distribution of bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367~3373 (1997).
12. Hollibaugh, J. T., Bano, N., and Ducklow, H., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).
13. 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. Biosci. Bioeng.*, **91**(2), 159~165(2001).
14. Logan, B. E., OH, S. E., Kim, I. S., Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers," *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2530~2535(2002).
15. Fang, H. H. P. and Liu, H., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture," *Bioresour. Technol.*, **82**, 87~93(2002).
16. 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).
17. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances," *Anal. Chem.*, **28**(3), 350~356(1956).
18. Miller, G. L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar," *Anal. Chem.*, **31**, 426~428(1959).
19. Lowry, O. H., Rasebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., "Protein measurement with Folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275(1951).
20. APWA, AWWA, WPCF, "Standard methods for the examination of water and wastewater," 20th ed.(1999).
21. Minnan, L., Jinli, H., Xuijuan, W., Jinzao, C., Chuannan, L., Fengzhang, Z., Liangshu, X., "Isolation and characterization of a high H₂-Producing strain *Klebsiella oxytoca* HP1 from a hot spring," *Res. Microbiol.*, **156**, 76~81(2005).
22. Nguyen, T. A. D., Kim, Y. P., Kim, M. S., Oh, Y. K., Sim, S. J., "Optimization of hydrogen production by hyperthermophilic eubacteria, *Thermotoga maritima* and *Thermotoga neapolitana* in batch fermentation," *Int. J. Hydrogen Energy*, 2007(accepted).
23. Logan, B. E., OH, S. E., Kim, I. S., Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers," *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2530~2535(2002).
24. 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).
25. Ginkel, S. V. and Sung, S. H., "Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration," *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 4726~4730(2001).
26. Vreas, L., Forney, L., Daae, F. L., and Torsvik, V., "Distribution of bacterioplankton in meromictic lake selenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA," *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(9), 3367~3373 (1997).
27. Hollibaugh, J. T., Bano, N., and Ducklow, H., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).
28. 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. Biosci. Bioeng.*, **91**(2), 159~165(2001).
29. Boillinger, R., Zurrer, H., and Bachofen, R., "Photo-production of molecular hydrogen from waste of a

- sugar refinery by photosynthetic bacteria,” *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **23**, 147~151(1985).
30. Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R., and Goker, M., “Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences,” *BioMed Central Ltd.*(2006).
 31. Hung, C. H., Cheng, C. H., Cheng, L. H., Liang, C. M., Lin, C. Y., “Application of Clostridium-specific PCR primers on the analysis of dark fermentation hydrogen-producing bacterial community,” *Int. J Hydrogen Energy*, 2007(accepted).
 32. Felgenstein, J., “Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap,” *Evolution*, **39**, 783~791 (1985).
 33. 정수현, 서형주, 이호, “순물이 *Lactobacillus acidophilus* 배지로서의 이용 및 생육균주의 내산성과 내담즙산성,” *한국식물영양과학회지*, **26**(5), 872~877(1997).
 34. Prescott, Harley, Klein, “Microbiology,” *McGraw Hill Higher Education*, 412~413(2003).