

혐기 혼합균주에서 황산염 농도변화에 따른 수소 발효 특성

황재훈[†] · 최정아 · 이종학 · 정태영 · 차기철 · 송호철* · 용보영* · 김동진** · 전병훈

연세대학교 환경공학과 · *한국지질자원연구원 · **한림대학교 환경생명공학과

(2008년 7월 4일 접수, 2009년 6월 22일 채택)

Fermentative Hydrogen Production under Various SO₄²⁻ Concentration using Anaerobic Mixed Microflora

Jae-Hoon Hwang[†] · Jeong-A Choi · Jong-Hak Lee · Tae-Young Jeong · Gi-Cheol Cha · Hocheol Song* · Bo-Young Yong* · Dong-Jin Kim** · Byong-Hun Jeon

Department of Environmental Engineering, Yonsei University

*Geologic Environment Division, KIGAM · **Department of Environmental Science, Hallym University

ABSTRACT : The effect of varying sulfate concentration on continuous fermentative hydrogen production was studied using enriched mixed microflora in continuously fed reactor. Glucose was used as a model substrate for carbohydrates, and hydraulic retention time (HRT) was maintained at 1, 0.5, 0.25 day, respectively. Sulfate concentration was 0~20,000 mg/L and the operating pH was maintained at 5.5. The experimental results indicate that hydrogen production is not affected by high sulfate concentration and shorter HRT of 0.25 day enhance hydrogen production. At HRT 1, 0.5, 0.25 day, the hydrogen production rate and hydrogen yield were 2.6, 4.6, 9.4 L/day, and 2.0, 1.8, 1.6 mol H₂/mol glucose, respectively. Residual sulfate content was 96~98, 95~97, and 94~97% at HRT 1, 0.5, 0.25 day which show that no sulfate reduction occurred in the reactor during the experiments. Results of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) may indicate the presence of HPB (hydrogen producing bacteria) under all experimental conditions. However, SRB (sulfate reducing bacteria) were not found.

Key Words : Hydrogen Producing Bacteria, Sulfate Reducing Bacteria, pH, Fluorescence in Situ Hybridization (FISH), Sulfate Concentration

요약 : 황산염의 농도변화에 따른 연속 혐기성 수소 발효에 미치는 영향을 고찰하기 위해서 혼합균주를 사용한 완전 혼합형 반응조를 운전하였다. 기질은 글루코오스를 사용하였고, 수리학적 체류시간은 1, 0.5, 0.25 일로 각각 고정하였다. 황산염 농도는 0~20,000 mg/L로 단계별 증가시켰고 pH 5.5로 운전하였다. 실험 결과 높은 황산염 농도에 관계없이 수소가 발생하였고, HRT 0.25일로 짧아짐에 따라 수소 발생이 높게 나타났다. HRT 1, 0.5, 0.25일 각 조건별 수소 생성량과 수소 수율은 2.9, 4.6, 9.4 L/day, 2.0, 1.8, 1.6 mol H₂/mol glucose로 나타났으며, 잔존 황산염 96~98, 95~97, 94~97%로 나타나 황산염 환원이 발생하지 않았다. FISH 결과 모든 조건에서 수소생성균의 분포는 나타났지만 황산염환원균의 분포는 나타나지 않았다.

주제어 : 수소생성균, 황산염환원균, FISH, pH, 황산염 농도

1. 서론

최근 수소 에너지는 여러 가지 산업 활용에 활용되고 있으며 신재생에너지의 개발과 보급의 활성화로 수소생산 기술의 중요성이 부각되고 있다. 수소는 연소 시 공해물질이 생성되지 않아 청정하며, 재생가능하고, 높은 에너지 효율(122 kJ/g)을 가지며 연료전지를 통해 쉽게 전기로 전환할 수 있다.¹⁾ 그러나 현재 사용단계인 수소연료는 화석연료의 열분해와 물의 전기분해를 기초로 생산되는 것이 대부분이며, 수소에너지 발생을 위한 화석에너지를 투입해야 하는 한계가 있다.²⁾ 따라서 1차적인 에너지의 사용 없이 대체에너지의 확보에 대한 연구가 진행 중이다.

그 중 미생물을 이용한 바이오 에너지의 개발이 주목되며, 수소발생에 있어 광분해 미생물의 연구가 보고되었다. 그러나 광분해 미생물 발효는 빛에너지를 계속 공급해야 하며 반응 속도와 에너지 효율이 낮은 단점이 개선되지 못하면서 최근 혐기성 미생물을 이용한 수소 생산기술이 주목받고 있다.³⁾ 혐기성 공정은 다양한 유기물로부터 수소를 생성할 수 있어 유기성폐기물 처리에 적합하며 별도의 에너지 공급이 필요 없으며 특히, 수소생성의 반응 속도가 빠르다고 조사되었다.⁴⁾ 혐기성 공정에서 수소 생성에 관여하는 미생물은 *Clostridium spp.*로 보고되며 불안정한 환경 조건에서 포자를 형성하며 독성물질이 있는 경우에도 생존한다. 또한, 연구보고에 의하면 혼합배양 미생물을 식중균으로 사용하는 대부분의 경우 수소 생산 우점종은 *Clostridium spp.*로 보고되었다.⁵⁾ 최근, 고농도 유기성 폐수는 수소생성을 위한 좋은 미생물 에너지원으로 보고

[†] Corresponding author

E-mail: duduke@yonsei.ac.kr

Tel: 033-760-2814

Fax: 033-760-2571

되고 있으며,⁶⁻⁸⁾ 이러한 유기성 폐수는 대부분 펄프/종이, 해산식품 공정 그리고 알콜 발효 산업으로부터 발생하는 폐수를 포함하며 이 폐수에는 황산염을 고농도로 포함하고 있다. 메탄 혐기 공정에서 황산염을 함유한 폐수를 처리할 경우는 황산염환원균의 증식이 나타나고 있는데 황산염환원균은 아세테이트와 수소를 메탄 생성 미생물과 동일한 전자공여체로 사용하며 그것으로 인한 경쟁관계 발생으로 수소 및 메탄공정을 저해한다고 보고되고 있다.⁹⁾ 또한 대부분 산발효 공정에서 황산염을 함유한 폐수를 처리할 경우에는 메탄과 수소 가스의 발생이 저해되었다고 보고되었다.¹⁰⁻¹²⁾

최근 들어 Lin and Chen¹³⁾은 혐기 발효 공정에서 pH 5.5일 때 황산염이 수소 발효를 위한 좋은 에너지원으로 작용함을 보고하였으며, Chen¹⁴⁾은 자당과 고농도 황산염(3,000 mg/L)이 함유된 시료를 혐기 발효 과정에서 pH 5.5 조건으로 운전하였을 때 높은 수소 생성을 얻었고 적절한 HRT 운전을 통해 수소 생성을 효율적으로 높일 수 있다고 하였다. 그러나 이와 같은 연구 보고는 수소생성 최적 pH 조건으로 운전된 결과로 황산염의 농도 범위에 따른 수소 생산 효율 및 황산염환원균의 영향에 대한 연구는 매우 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 혼합균주로 배양한 혐기성 반응조에서 황산염 농도 변화와 HRT 변화에 따른 수소 생성에 대한 특성 그리고 FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)법을 통해 수소생성균과 황산염환원균의 분포를 검토하고자 한다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 식종균 및 유입수

식종균은 W시 하수종말처리장의 슬러지를 채취하였으며 pH, carbohydrate, VSS (Volatile Suspended Solids)는 각각 6.8, 1.1, 4.8 g/L이었다. 반연속상태로 한 달간 운전 후 안정화상태에서 식종하여 연속 배양하였다. 유입 COD의 농도는 glucose 15 g-COD/L로 일정하게 하였으며, 황산염 농도는 각각 100, 300, 1,000, 3,000, 10,000 그리고

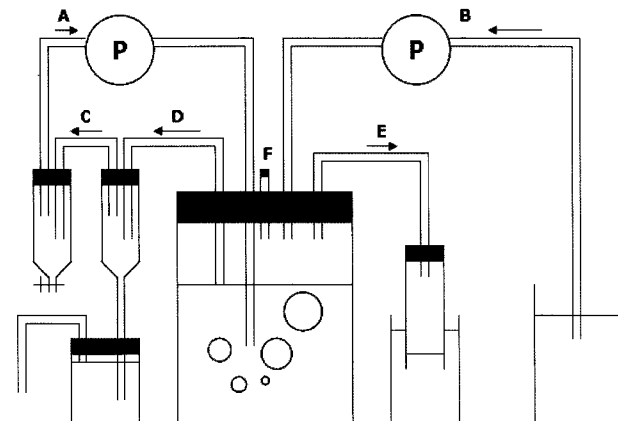
20,000 mg/L로 변화하여 기질에 인위적으로 주입하였다. 유입기질의 성분은 Table 1에 나타났다.

2.2. 실험장치

본 연구의 실험 장치는 Fig. 1에 나타내었다. 반응조는 아크릴로 제작되었으며, 발생하는 소화가스를 순환시켜 반응조 내부를 혼합교반 시킴과 동시에 생기는 흡입력에 의해 소화혼합액을 연속적으로 유출시키는 chemostat형을 사용하였다. 또한 반응조 내의 온도를 일정하게 유지하기 위해 온도자동장치를 설치하여 35±1℃로 유지하였으며, pH는 반응조 내부의 센서를 이용하여 3 N KOH로 pH 5.5±1로 유지하였다. 유입기질은 교반기를 설치하여 일정한속도로 교반하여 주었으며, 냉각장치를 통해 기질 tank 내의 온도를 4±1℃로 유지하고 마이크로튜브펌프를 이용하여 연속적으로 주입하였다. 연속반응조의 운전조건은 Table 2에 나타났다.

2.3. 분석방법

본 연구에서의 분석항목으로는 유기물 분석을 살펴보기 위해 COD_{Cr}, 단백질, 탄수화물을 분석하였다. COD_{Cr}은 Standard Method¹⁵⁾로 하였고, 단백질은 Lowry method¹⁶⁾을 이용하여 측정하였으며, 탄수화물은 Anthron-황산법¹⁷⁾으로 분석하였다. 수소가스분석은 스테인리스로 구성된 molecular sieve 5 A 열전도도 검출기(TCD) column과 아르곤가스를



A: Vacuum pump, B: Feeding pump, C: produced gas, D: Gas+Mixed liquor, E: produced gas, F: gas sample port

Fig. 1. Continuous experimental apparatus.

Table 1. The characteristics used for the substrates of continuous experiments

substrate	concentration (mg/L)
Glucose	15,000
NH ₄ HCO ₃	4,700
K ₂ HPO ₄	125
MgCl ₂ 6H ₂ O	100
MnSO ₄ 6H ₂ O	15
FeSO ₄ 7H ₂ O	25
CuSO ₄ 5H ₂ O	5
CoCl ₂ 5H ₂ O	0.1
NaHCO ₃	2,000

Table 2. Operation condition at continuous experimental

	RUN1	RUN2	RUN3
HRT (day)	1	0.5	0.25
pH	5.5±1		
Sulfate Conc. (mg/L)	0 ~ 20,000		
Temperature (°C)	35 ± 1		

Table 3. The probe of FISH used in this study

Short name	Specificity	Modification
KO226	<i>Clostridium butyricum</i>	6-FAM
Csac67	<i>Clostridium spp.</i>	Cy-3
Rbro730	<i>Clostridium leptum</i>	Cy-3
RFL1176	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	6-FAM
ENT183	<i>Enterobacteriaceae</i>	cy-3
CP1	<i>Clostridium perfringens</i>	6-FAM
Enc145	<i>Enterococcus spp.</i>	6-FAM
SRB687	<i>Desulfovibrio spp.</i>	6-FAM
SRB660	<i>Desulfobulbus spp.</i>	6-FAM
SRB129	<i>Desulfobacterium spp.</i>	6-FAM
SRB221	<i>Desulfobacter spp.</i>	6-FAM
EUB 338 I	bacteria	FITC
EUB 338 II	bacteria not covered by EUB338 I and EUB 338 III	FITC
EUB 338 III	bacteria not covered by EUB338 I and EUB 338 II	FITC
EUB 338 I	bacteria	Cy-3
EUB 338 II	bacteria not covered by EUB338 I and EUB 338 III	Cy-3
EUB 338 III	bacteria not covered by EUB338 I and EUB 338 II	Cy-3

이용하는 열전도도 검출기인 GC (GC-14A, Shimadzu)로 분석하였으며, 이산화탄소, 메탄 등의 가스는 Hayesep Q (80/100) column과 헬륨가스를 이용한 열전도도검출기로 분석하였다. Ethanol과 VFA는 불꽃이온화 검출기(FID)인 GC (GC-8A, Shimadzu)로 분석하였다. 또한, 황산염환원균에 의해 생성되는 황화물인 TS (Total Sulfide)와 DS (Dissolved Sulfide)는 iodometric method¹⁸⁾로 분석하였으며, pH는 pH meter (Orion, model 290A)로 측정하였다. SO_4^{2-} 는 이온크로마토그래프(IC, DX-120)로 측정하였다.

2.4. Fluorescence In Situ Hybridization

반응기의 시료를 채취한 후 고정액인 4% paraformaldehyde를 시료 1 volume 당 고정액 3 volume의 비율로 첨가해 준 후 4℃에서 1~3시간 동안 고정하였다. 고정된 시료를 슬라이드를 0.1% gelatin + 0.01% chromium potassium sulfate를 녹인 70℃의 용액에 담근 후 공기 중에 말려서 코팅하여 시료의 고정과 탈수의 전처리를 거친 후 hybridization buffer (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide)와 probe로 hybridization시켰다. 이 때 첨가하는 probe 농도는 25 ng/μL로 일정하게 희석하여 사용하였다. Hybridization 과정은 46℃에서 120분 동안 hybridization chamber에서 수행하였다.¹⁹⁾ 슬라이드는 Kr/Ar ion laser (Excitation wave length 494, 550, 650 nm)가 장착된 MRS-1024 (Bio-Rad, U.K.) confocal laser scanning microscope를 사용하였고, oligonucleotide probe와 형광염료는 Table 3에 나타내었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 황산염 농도에 따른 수소합량

다양한 황산염농도에 따른 biogas와 수소합량 및 ORP 변화를 pH 5.5 조건에서 측정한 그래프를 Fig. 2에 나타내었고, 황산염농도 함유에 따른 수소발효 가능성과 각각의 HRT와 수소발효의 관계를 확인하였다. HRT 1일에서 0.25일로 단축됨에 따라 biogas의 양은 5~18 L/day로 증가하였다(황산염 농도 범위 3,000~5,000 mg/L). 수소 합량은 각각의 HRT와 황산염의 농도(10,000 mg/L 이상)에 따라 3~4% 정도 미량 감소되었다. 그러나 고농도의 경우에도 수소합량은 45% 이상을 유지하여 높은 수소 생성을 유지하였다. 황산염 농도 0 mg/L에서는 수소합량이 48~51%로 나타났으며, 황산염 증가에 따라 2~3% 이상의 수소발생이 증가하였다. 이는 수소를 생성하기 위한 수소화효소의 활성에 의한 것으로 사료되며, 과거 니켈, 철, 셀리늄의 함유가 풍부한 수소화효소의 생산에 황산염이 기여 작용이 보고된바 있다.²⁰⁾ 황산염이 함유된 폐수에서는 황산염환원균에 의한 황산염 환원 작용이 보고되며,¹²⁾ 황산염 환원균은 성장 시 전자수용체로 수소를 이용하며, 수소발효에서 황산염환원균의 분포는 결과적으로 수소생산을 억제한다.²⁰⁾

본 연구에서는 황산염 함유에도 불구하고 수소 합량이 큰 차이가 나타나지 않아 황산염환원균의 생장이 없음이 사료되며, 이는 낮은 pH에서 황산염환원균의 생육이 저하되는 특성으로 인한 것이다. 보고된 연구에 따르면, pH 6.7, 5.5 조건에서의 연구 결과 pH 5.5에서 황산염 농도가 수소 생성에 큰 영향을 주지 않는다고 보고되었다.¹³⁾ 본 연구는 pH 5.5 조건에서 진행되었으며, 결과적으로 황산염 환원균의 성장억제로 인해 수소 생성이 황산염의 농도 변화와 관계없이 진행되었으므로 판단된다. ORP (Oxidation-Reduction Potential)는 혐기화의 지표로 사용되며 ORP의 값이 -500과 -400 mV 사이에서 수소생성에 가장 좋은 값

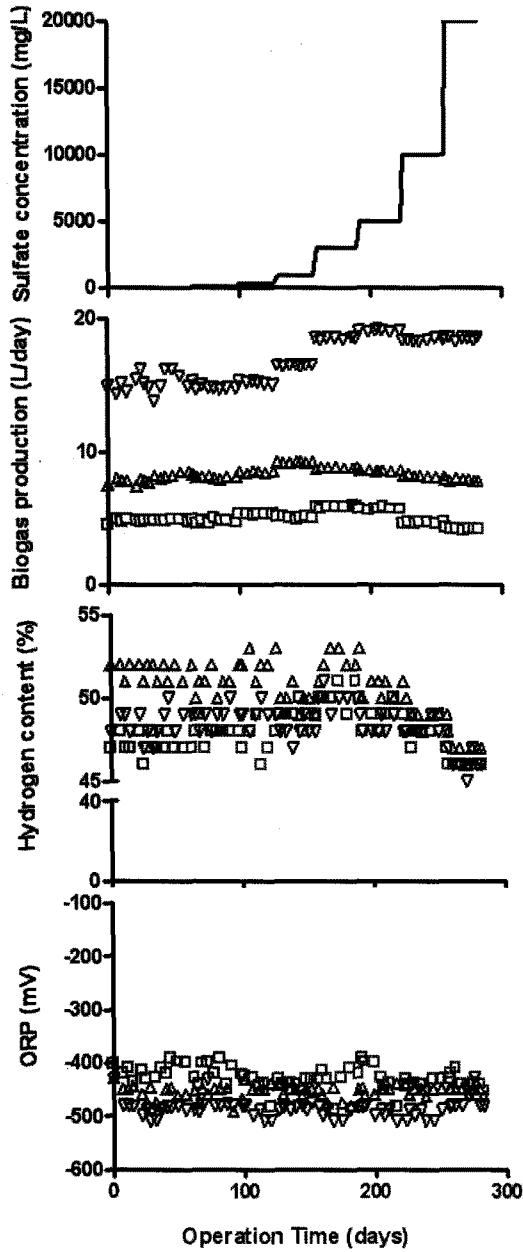


Fig. 2. Gas production of the reactor at each sulfate concentration (HRT; □: 1 day, △: 0.5 day, ▽: 0.25 day).

이라고 보고되며,²¹⁾ ORP 측정 결과 -480에서 -395 mV로, 이는 본 연구조건이 수소 생성에 적합한 혐기 발효 상태를 나타내고 있다.

3.2. 수소 생성 효율

Fig. 3은 수소 수율과 수소 발생량 및 미생물에 대한 수소수율 나타낸 그래프로 HRT의 변화와 황산염 농도에 의한 영향을 알아보기 위해 진행하였다. HRT 변화에 따라 수소 수율은 1.4~2.0 mol H₂/mol glucose를 나타냈으며, HRT 1일인 경우 1.6~2.0 mol H₂/mol glucose로 비교적 높게 나타났다. 이는 기존의 혼합균주를 사용하여 발생된 수소 생성 수율인 1.7 mol H₂/mol glucose와 유사한 범위

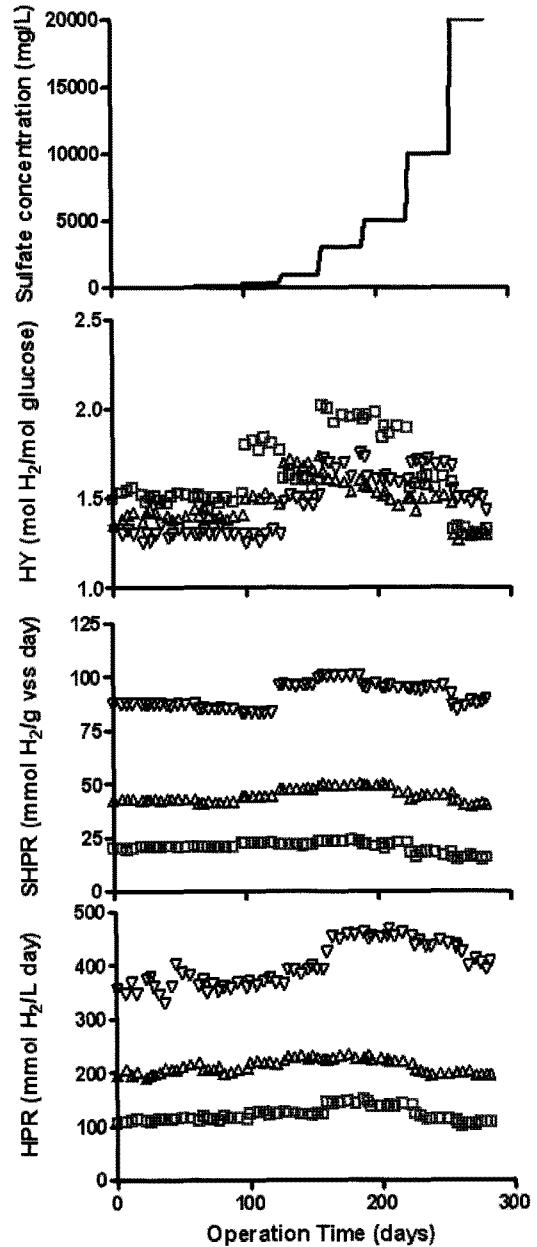


Fig. 3. Hydrogen production rate with HPR at each sulfate concentration (HRT; □: 1 day, △: 0.5 day, ▽: 0.25 day).

를 나타내었다.²²⁾ 그러나 이전 연구와 달리 본 연구에서는 황산염 농도가 함유되었으며, 황산염 증가(0~5,000 mg/L)에 따라 수소 수율 증가현상과 그 이상의 농도에서는 감소현상을 보였으나, 감소 후 수율이 황산염 0 mg/L의 수율과 비슷하게 나타나 결론적으로 수소생산에 큰 영향을 주지 않았다고 다시 확인할 수 있었다. Ueno 등²³⁾은 혐기 수소발효에서 가스 생성량은 HRT가 짧아짐에 따라 증가됨을 보고하였다. 본 연구 결과 수소 생성량(HPR)은 HRT 0.25일 일 때 350~450 mol H₂/L-day로 가장 높게 나타났고, 황산염의 농도가 3,000~5,000 mg/L의 범위에서 가장 많이 생성되었다. 미생물의 농도에 따른 수소 생성량(SHPR)은 HRT 0.25일에서 HRT 0.5일보다 250~300% 이상 증가

하여 나타났다. 수소미생물은 낮은 pH 내성과 HRT에 따른 부하에서 완전한 경로의 생성물 증감과 관련을 지니나,²⁴⁾ 황산염환원균은 pH 및 HRT 부하에 대한 경쟁력이 수소미생물보다 현저히 떨어지게 되므로 짧은 HRT에서 경쟁을 할 수 없다고 사료된다. 본 연구 결과 각각의 HRT에 따라 수소 발생량은 차이를 보였으나 황산염 농도에는 미량의 수소 발생 변화가 확인되었고, 이는 황산염 농도 수소 생성에 많은 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.

3.3. 황산염 농도 변화에 따른 잔존황산염 (residual sulfate)의 특성

Fig. 4는 황산염농도에 따른 잔존황산염과의 관계를 나타낸 것이다. Mizuno 등¹²⁾은 황산염이 존재하는 폐수에서 황산염환원균이 분포할 경우, 황산염은 황산염환원균에 의해 환원반응이 시작되며 잔존 황산염의 비율 감소 현상을 보고하였다. 본 연구에서 황산염 농도 변화에 따른 잔존 황산염의 결과, 황산염 농도 변화와 HRT에 상관없이 각각 96~98%, 95~97%, 94~97%로 높은 분율을 나타내었다. 기존의 연구결과에 의하면 pH 5.5이고 황산염의 농도 3,000 mg/L인 경우의 실험 결과 잔존황산염의 농도가 98.6%인 높은 분율 나타내었고, 이때에는 황산염환원균의 작용이 일어날 수 있는 환경이 아니며, 황산염환원

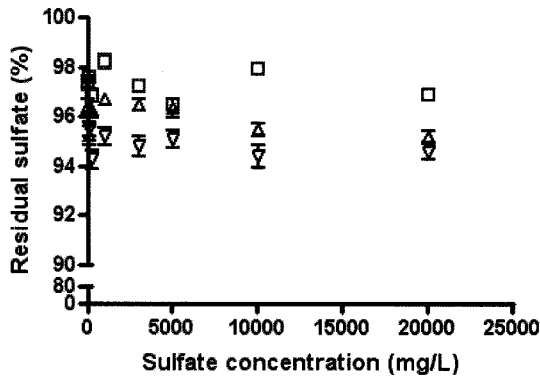


Fig. 4. Variations of residual sulfate with each HRT (HRT; □: 1 day, △: 0.5 day, ▽: 0.25 day).

이 발생하지 않는다고 보고하였다.¹²⁾ 이는 잔존황산염이 높은 분율을 나타낼 경우 황산염 환원이 발생하지 않는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서 나타난 높은 잔존황산염의 분율은 황산염 환원이 발생하지 않음을 알 수 있으며, 이는 황산염환원균과 수소생성균의 경쟁관계는 나타나지 않았다고 판단된다.

3.4. 발효산물의 특성

황산염의 농도에 따른 반응조의 물질수지를 Table 4에 나타냈다. 유입 COD를 100%로 간주하고 유출 COD의 회수율을 살펴본 결과 황산염 농도 3,000~5,000 mg/L에서 회수율이 가장 좋았으며, 황산염의 농도 10,000 mg/L 이상 증가할수록 수소 분율은 8.2%를 나타내었으며 회수율은 97% 이상 나타났다. 또한 황산염의 농도가 증가함에 따라 VSS 농도가 증가되었지만 수소 분율은 황산염 농도 0 mg/L 조건과 유사한 회수율을 보였다. 이는 본 연구 조건에서 황산염 농도 변화는 수소 생성에 대해 영향이 없다고 사료된다.

유기산 생성 결과 아세트레이트(HAc), 프로피온(HPr) 그리고 뷰틸산(HBu)이 주로 생성되었으며, 발레르산(HVa)과 카프론산(HCa)도 미량 검출되었다. HBu는 23.5~26.5%를 나타냈으며 황산염의 농도에 따른 큰 영향을 보이지 않았다.

회수율에 대한 영향으로 과거 황산염의 농도가 포함된 폐수에서의 메탄 연구 결과황산염 농도 증가에 따라 황산염 환원균의 영향으로 회수율이 낮음을 보고하며 COD/Sulfate의 비가 높을수록 유기물의 분해가 잘 이루어지고 가스 발생량이 높다고 보고하였다. 또한, COD/Sulfate 비가 낮을수록 Others가 높게 나타나는데 생성되는 황화물의 독성 작용으로 인하여 메탄 및 황화수소로 전환되지 않고 반응조 내부에 잔존하고 있다 보고하였다.²⁵⁾ 본 실험 결과 모든 조건에서 회수율과 생성 가스는 96~100%와 9~11%로 큰 변화 없이 나타났고 황산염 농도 증가에 대한 영향 없이 물질 전환이 이뤄졌다. 이는 황산염 농도 변화와 관계없이 황산염환원균의 영향이 나타나지 않은 결과라고

Table 4. Mass balance of COD in completely mixed flow reactor at HRT 0.5 day

sulfate concentration (mg-SO ₄ ²⁻ /L)	Influent COD (%)	VSS	VFA			H ₂	SVS ^{a)}	others ^{b)}	Recovery
			HAc	HPr	HBu				
0		32.1	6.2	2.5	25.5	8.4	10.9	14.2	99.9
100		29.9	6.6	2.1	26.5	8.5	6.0	18.1	97.7
300		30.3	6.2	3.0	24.8	9.1	11.6	13.7	98.7
1000	100	31.1	6.4	2.0	26.2	9.4	16.7	8.0	99.9
3000		32.0	5.9	2.8	24.9	9.4	8.0	17.7	100.8
5000		31.2	6.6	3.0	27.9	9.2	7.3	14.5	99.7
10000		31.1	6.3	3.7	24.4	8.2	19.8	5.1	98.6
20000		31.0	6.1	2.3	23.5	8.2	12.7	14.7	98.5

^{a)} SVS = soluble protein + soluble carbohydrate + soluble lipid

^{b)} Others = soluble COD - VFA - SVS

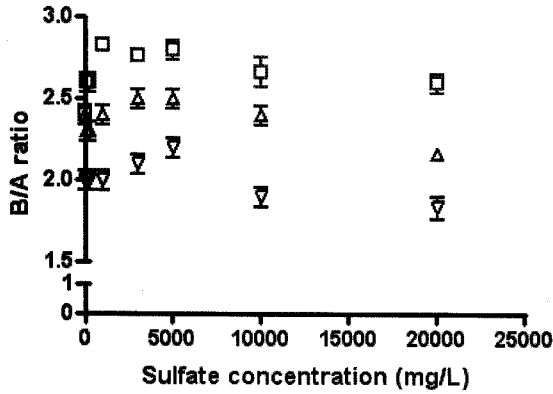


Fig. 5. Butyrate/Acetate ratio obtained under steady-state conditions at each run (HRT; □: 1 day, △: 0.5 day, ▽: 0.25 day).

사료된다. 따라서 본 실험 조건에서 수소 가스 전환은 황산염 농도와 관계없이 이루어진다고 사료된다.

HRT와 황산염 농도 변화에 따른 B/A (Butyric/Acetate) 비와 유기산 분율을 Fig. 5와 6에 각각 나타냈다.

Hawkes 등⁵⁾은 뷰틸산의 비율이 높을수록 수소 생성에 관여하는 미생물의 활동이 많이 존재하며, 수소 발생이 높다고 보고하고 있다. 또한 기존의 많은 연구자들은 뷰틸산의 분율 또는 B/A비가 낮아졌을 때 분해된 유입기질에 비해 수소 수율이 저하되고 수소 생성균과는 다른 미생물(수소를 생성하지 않은 산생성균, 수소 이용 아세트산 생성균, 수소 이용 메탄 생성균 등)의 양이 증가함을 보고하였다.^{26~28)} 따라서 발효산물 중 뷰틸산의 양에 따라 수소 발생의 증감이 결정된다고 사료된다. Fig. 5는 황산염 농도에 따른 뷰틸산의 비율을 그래프화한 것으로 모든 반응에서 황산염과 관계없이 뷰틸산이 높게 나타났으며, 각각의 HRT 1, 0.5, 0.25일에 따른 B/A 비가 2.2, 2.4, 2.8로 확인되었다. 본 연구 조건인 pH에서는 황산염의 영향이 나타나지 않고 HRT는 수소 생성 증감에 중요한 인자로 작용되는 것을 간접적으로 확인 할 수 있었다.

Fig. 6은 생성된 유기산 분율 결과를 나타낸 것으로, 각각의 HRT에 따라 평균적으로 아세트산과 뷰틸산이 각각 35%, 55% 발생하였다. 황산염 농도에 따른 각 조건에서 평균 뷰틸산은 전체반응의 55%를 차지하였으며, 황산염 농도에 영향 없이 뷰틸산의 생성되었다. 본 연구 결과 프로피온산과 에탄올의 비율은 각각 6~8%, 11~13%로 낮게 분포하였고, 과거 연구에 의하면 혐기성 발효에 있어 발효산물 중 수소 소모 반응에 의해서 생성되는 프로피온산, 젖산 및 알콜류의 구성비가 상대적으로 높을 때 수소 생성이 낮은 것으로 보고된다.⁵⁾ 이러한 연구 결과는 피로피온산과 알콜류의 낮은 구성비가 높은 수소 발생 원인 이란 것을 분명하게 설명해준다.

3.4. FISH 분석

FISH 분석은 시료안의 미생물을 고정시켜 고유의 형광 물질로 특정미생물의 분포를 파악하는 것으로 본 연구에

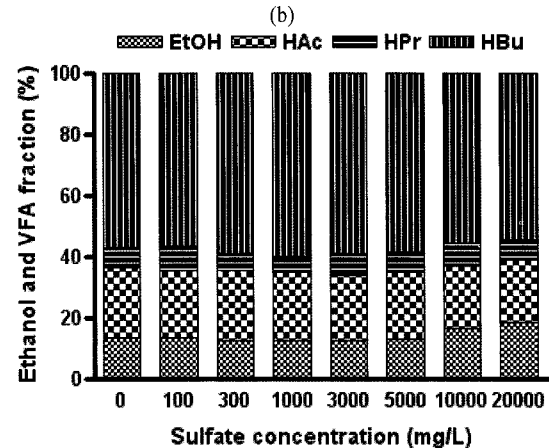
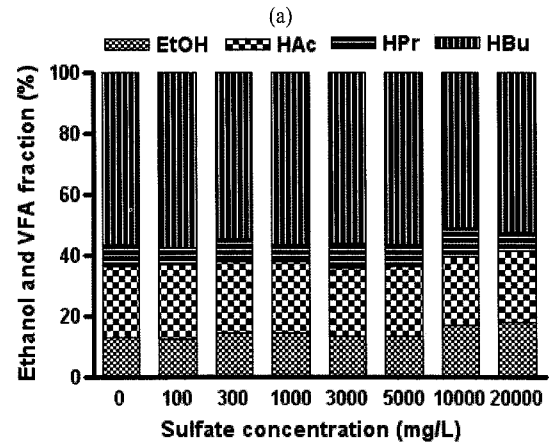
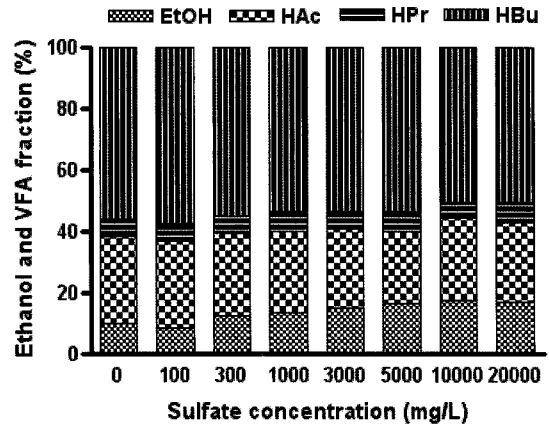


Fig. 6. Volatile fatty acid and ethanol concentration distribution fractions (a), (b), (c) HRT 1, 0.5, 0.25 day.

서는 수소생성균과 황산염환원균의 각 조건별 분포를 살펴 보았다. 수소생성균과 황산염환원균에 대한 probe는 대표적으로 수소생성균으로 보고된 *Clostridium* 계열²⁹⁾과 황산염환원세균계열³⁰⁾을 각각 사용하였다. Fig. 7은 황산염 농도 변화에서 수소생성균의 미생물 분포로 황산염의 농도 변화시기마다 추출된 시료를 분석한 결과이다. 본 연구에 사용된 형광염료는 빨강(Cy-3), 녹색(6-FAM)으로 EUB 박테리아와 in situ hybridization 이미지를 나타낸 것이다. Hawkes 등⁵⁾은 혐기성 수소 발효 공정에서 미생물 분포 연구 결과 *Clostridium* 계열의 우점종 분포를 보고하였다.

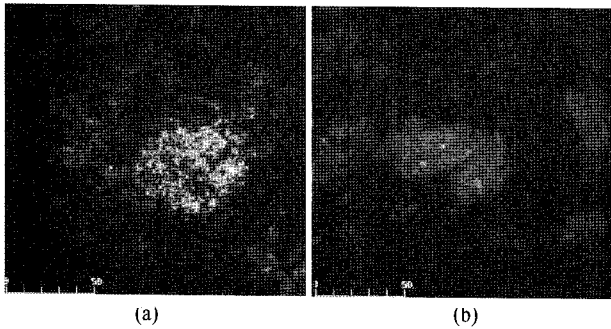


Fig. 7. (a) Simultaneous in situ hybridization with Cy3-labeled probe Casc 67 and EUBmix (EUB338 I+II+III ; FITC), (b) Simultaneous in situ hybridization with 6-FAM-labeled probe KO226 and EUBmix (EUB338 I+II+III ; Cy3), Bar = 50 μ m.

본 연구 결과 다양한 HRT와 황산염농도 변화에서 각각의 probe를 병합시켜주었을 때 모든 조건에서 수소생성균인 *Clostridium* 계열의 분포는 나타났으나 황산염환원균은 분포는 관찰되지 않았다. 이것은 pH 5.5에서 황산염 농도와 관계없이 황산염환원균의 활동은 발생하지 않았다고 사료된다.

4. 결론

혼합균주를 사용한 혐기발효에서 HRT와 황산염 농도 변화에 따른 수소 발효의 결과는 다음과 같다.

- 1) 수소 생성은 짧은 HRT인 0.25일 조건에서 가장 많이 발생되었으며, 이는 HRT는 수소 발생과 밀접한 관계로 사료된다. 또한, 황산염 농도 변화에 따른 수소 함량은 48~52%로 황산염 농도에 영향 없이 발생하여 혐기 수소 발효에 관여하는 미생물의 내성에 따른 영향으로 사료된다.
- 2) 잔존황산염은 HRT의 변화에 따라 각각 96~98%, 95~97%, 94~97%로 높은 분율 유지를 확인할 수 있었는데, 이는 황산염 환원의 저해와 상대적으로 황산염환원균이 존재하지 않는 결과로 판단된다.
- 3) 발효중 유기산은 평균 55% 뷰틸산의 분율이 가장 많이 나왔으며, B/A비는 각각 2.2, 2.4, 2.8로 나타나 높은 수소 전환율에 가능성을 보여준다. 이는 미생물 대사 경로가 유기산 발효과정에서 수소 발생에 관여되는 발효물질인 뷰틸산으로 전환된 것으로 사료된다.
- 4) FISH결과 각각의 HRT와 황산염 조건변화에서 수소 생성균은 나타났으나, 황산염환원균은 나타나지 않았으며, 이는 낮은 pH(5.5) 조건에서는 다양한 황산염 농도 변화와 관계없이 황산염환원균의 생존이 저해 받는 것으로 판단된다.

사 사

본 연구는 과학기술국제화사업의 글로벌연구실사업(사업

번호 NP2008-019), 21C 프론티어 사업(사업번호 3-4-3), BK-21(핵C6B1608) 연구사업 기술 개발비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, C.-G. and Kang, S.-H., "Effect of Temperature on Production of Hydrogen in Anaerobic Fermentation," *J. Korean Society of Water and Wastewater*, **21**(4), 467~475(2007).
2. Dincer, I., "Technical environmental and exergetic aspects of hydrogen energy systems," *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 265~285(2002).
3. Benemann, "J. Hydrogen Biotechnology : progress and prospects," *Nature Biotechnology*, **14**, 1101~1103(1996).
4. 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).
5. Hawkes, F. R., Dinsdale., Hawkers, D. L., and Hussy, I., "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process potimisation," *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1339~1347(2002).
6. Lin, C. Y. and Lay, C. H., "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**(1), 41~45(2004).
7. Lin, C. Y. and Lay, C. H., "Effects of carbonate and phosphate concentrations hydrogen production using anaerobic sewage microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**(3), 275~281(2004).
8. Chen, C. C., Lin, C. Y., and Chang, J. S., "Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 56~64(2001).
9. Jalal, S., Farideh, G., and Parisa, M., "The effect of influent COD and upward flow velocity on the behaviour of sulphate-reducing bacteria," *Proc. Biochem.*, **40**, 2305~2310(2005).
10. Esposito, G., Weijma, J., Pirozzi, F., and Lens, P. N. L., "Effect of the sludge retention time on H₂ utilization in a sulphate reducing gas lift reactor," *Proc. Biochem.*, **39**, 491~498(2003).
11. Li, Y. Y., Lam, S., and Fang, H. H. P., "Interactions between methanogenic, sulfate-reducing and syntrophic acetogenic bacteria in the anaerobic degradation of benzoate," *Water Res.*, **30**(7), 1555~1562(1996).
12. Mizuno, O., Li, Y. Y., Noike, T., "The behavior of sulfate-reducing bacteria in acidogenic phase of anaerobic digestion," *Water Res.*, **32**(5), 1626~1634(1998).
13. Lin, C. Y. and Chen, H. P., "Sulfate effect on fermen-

- tative hydrogen production using anaerobic mixed microflora," *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**(7), 953~960(2006).
14. Chen, C.-C., Chen, H.-P., Wu, J.-H., Lin, C.-Y., "Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration," *Int. J. Hydrogen Energy*, **33**, 1573~1578(2007).
 15. APHA, AWWA, and WPCF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater," 17th edition, American Public Health Association, Washington, D. C.(1989).
 16. Anderson, G. K., Donnelly, T., and McKeown, K. J., "Identification and control of inhibition in anaerobic treatment of industrial wastewaters," *Proc. Biochem.*, **17**, 28~32(1982).
 17. Mah, R. A., Xun, L. Y., Boone, D. R., Ahring, B., Smith, P. H., and Wilkie, A., "Methanogenesis from propionate in sludge and enrichment systems," *Microbiology and Biochemistry of Strict Anaerobes Involved in Interspecies Transfer*, pp. 99~111(1990).
 18. Mizuno, O., Li, Y. Y., and Noike, T., "Effects of sulfate concentration and sludge retention time on the interaction between methane production and sulfate reduction for butyrate," *Water Sci. Technol.*, **30**, 45~54 (1994).
 19. Amann, R. I., Fuch, B. M., and Behrens, S., "The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization," *Curr. Opin. Microbiol.*, **12**(1), 231~236 (2001).
 20. Aubert, C., Brugna, M., Dolla, A., Bruschi, M., Giudici-Ortoni, M.-T., "A sequential electron transfer from hydrogenases to cytochromes in sulfate-reducing bacteria," *Biochim. Biophys. Acta*, **1476**, 85~92(2000).
 21. Yu, H., Zhu, Z., Hu, W., and Zhang H., "Hydrogen Production from Rice Winery Wastewater in an Upflow Anaerobic reactor by using mixed anaerobic culture," *Int. J. Hydrogen Energy*, **27**, 1359~1365(2002).
 22. Lin, C. Y. and Chang, R. C., "Hydrogen production during the anaerobic acidogenic conversion of glucose," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **74**, 498~500(1999).
 23. Ueno, Y., Otsuka, S., and Morimoto, M., "Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora," *J. Ferment. Bioeng.*, **79**(4), 395~397 (1995).
 24. Lay, J. J., "Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen," *Biotechnol. Bioeng.*, **68**(3), 269~278(2000).
 25. 정태영, 차기철, "슬러지의 혐기성 소화에 있어서 황산염 농도에 따른 황산염 환원균과 메탄생성균의 역할," 2004 춘계학술연구발표회, 대한환경공학회, pp. 448~455(2004).
 26. 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).
 27. 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).
 28. Han, S.-K. and Shin, H.-S., "Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste," *Int. J. Hydrogen Energy*, **29**, 569~577(2004).
 29. Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M., and Igarashi, Y., "Microbial community in anaerobic hydrogen producing microflora enriched from sludge compost," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **57**, 555~562(2001).
 30. Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J., and Stahl, D. A., "Genus-and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria," *Syst. Appl. Microbiol.*, **15**, 601~609 (1992).