

혐기 발효 공정을 통한 음식물류 폐기물 탈리액으로부터 수소 생산

김동훈*, 이모권*, 임소영*, 김미선*[†]

*한국에너지기술연구원 폐자원에너지연구센터

Dark Fermentative Hydrogen Production using the Wastewater Generated from Food Waste Recycling Facilities

DONGHOON KIM*, MOKWON LEE*, SOYOUNG LIM*, MISUN KIM*[†]

*Wastes Energy Research Center, Korea Institute of Energy Research, Gajeong-ro,
Yuseong-gu, Daejeon, 305-343, Korea

ABSTRACT

The authors examined the effects of operating parameters on the H₂ production by dark fermentation of the wastewater generated from food waste recycling facilities, in short “food waste wastewater (FWW)”. Central composite design based response surface methodology was applied to analyze the effect of initial pH (5.5-8.5) and substrate concentration (2-20 g Carbo. COD/L) on H₂ production. The experiment was conducted under mesophilic (35°C) condition and a heat-treated (90°C for 20min) anaerobic digester sludge was used as a seeding source. Although there was a little difference in carbohydrate removal, H₂ yield was largely affected by the experimental conditions, from 0.38 to 1.77 mol H₂/mol hexose_{added}. By applying regression analysis, H₂ yield was well fitted based on the coded value to a second order polynomial equation ($p = 0.0243$): $Y = 1.78 - 0.17X_1 + 0.30X_2 + 0.37 X_1X_2 - 0.29X_1^2 - 0.35X_2^2$, where X_1 , X_2 , and Y are pH, substrate concentration (g Carbo. COD/L), and hydrogen yield (mol H₂/mol hexose_{added}), respectively. The 2-D response surface clearly showed a high inter-dependency between initial pH and substrate concentration, and the role of these two factors was to control the pH during fermentation. According to the statistical optimization, the optimum condition of initial pH and substrate concentration were 7.0 and 13.4 g Carbo. COD/L, respectively, under which predicted H₂ yield was 1.84 mol H₂/mol hexose_{added}. Microbial analysis using 16S rRNA PCR-DGGE showed that *Clostridium* sp. such as *Clostridium perfringens*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium bifermentans* were main H₂-producers.

KEY WORDS : Food waste wastewater(음식물류 폐기물탈리액), Hydrogen fermentation(수소발효), Substrate concentration(기질농도), Response surface methodology(반응표면법), pH

[†]Corresponding author : bmmkim@kier.re.kr

[접수일 : 2011.4.22 수정일 : 2011.6.20 게재확정일 : 2011.6.20]

1. 서 론

과도하고 집중적인 화석연료의 사용으로 인한 지구온난화 및 에너지 고갈은 친환경적이며 지속가능한 대체 에너지의 개발에 많은 관심이 집중되게 하였다. 이 중 수소는 연소 시 오직 물만 생성하고, 단위질량당 에너지 함량이 가장 높고, 연료전지로 이용 시 용이하게 전기로의 전환이 가능하기 때문에, 친환경적이고 지속가능한 에너지원으로서 가장 크게 각광을 받고 있다^{1,2)}.

수소를 생산하는 다양한 방법들 중 생물학적 방법은 물리·화학적 방법에 비해 상대적으로 에너지 소모율이 낮고, 빛에너지, 물, 미생물, 유기물만을 이용한다는 장점이 있다³⁾. 생물학적 수소 생산은 크게 빛을 이용하는 광합성 발효와 암발효로 나누어진다. 암발효는 광합성 발효에 비해 이론적 수소전환 효율은 낮지만, 수소 생산속도가 훨씬 빠르고, 유기성폐기물을 직접 이용할 수 있기 때문에 환경오염의 해결과 에너지의 생산이 동시에 가능한 공정이다³⁻⁵⁾.

음식물쓰레기는 우리나라의 대표적 유기성폐기물로서 쉽게 부패하는 특성을 지니고 있어 수집, 운반 및 매립 시 악취, 침출수, 병원균 증식 등의 다양한 환경문제를 발생시킨다⁶⁾. 음식물 쓰레기의 발생량은 2009년 기준 14,118톤/일이었으며 이들은 대부분 퇴비화 또는 액비화의 재활용(92.2%)으로 처리되고 있고, 일부는 해양 투기로 처리되고 있다. 하지만 재활용 과정에서 다량의 유출수가 발생하는데 이를 음식물류 폐기물 탈리액(food waste wastewater, FWW), 줄여서 ‘음폐수’라 칭하며 전체 음식물쓰레기의 발생량의 62.8%에 달한다⁷⁾.

음폐수는 낮은 pH, 높은 염도의 특성을 가지고 있어 그 처리가 쉽지 않아 60% 이상을 현재 해양투기 중이다. 하지만, 음폐수는 고농도의 유기물을 함유하고 있으므로 혐기성소화기술을 통한 바이오에너지 생산이 가능하며 특히 암발효에 의한 수소생산에 적합할 것으로 사료된다.

암발효에 의한 수소생산 공정에 있어 영향을 미치는 인자는 pH, 기질 농도, 온도, 영양 물질 등 여

Table 1 Characteristics of FWW and anaerobic digester sludge

Item	Unit	Value	
		FWW	ADS ^a
TS	g TS/L	120.6	31.4
VS	g VS/L	105.2	17.0
TCOD	g COD/L	136.3	24.1
SCOD	g COD/L	36.1	ND
Carbohydrate	g COD/L	55.0	1.4
Soluble carbohydrate	g/L	24.5	ND
TN (total nitrogen)	g N/L	5.4	ND
Ammonia	g NH ₄ -N/L	0.4	ND
Alkalinity	g CaCO ₃ /L		4.8
pH		4.4	7.4

^aADS = Anaerobic digester sludge
ND, not determined

러 가지가 있지만 특히 pH와 기질농도는 수소 발효에 가장 중요한 요소들로 보고되어 왔다⁸⁾. 이러한 인자들이 각각 미치는 영향과 상호작용에 대한 종합적 분석은 통계학적 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 통해 가능할 수 있으며 반응표면법(response surface methodology, RSM)을 응용하여 최적 조건 도출이 가능하다⁹⁾.

본 연구에서는 음식물류 폐기물 탈리액의 혐기성 수소 발효 시 기질의 초기 pH와 농도에 따른 수소 생산을 반응표면법을 이용하여 분석하고 최적화하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 식종균 및 기질

본 실험에 사용된 식종균은 D시 하수 종말 처리장의 소화조 슬러지로서 90°C에서 20분간 열처리를 한 뒤 사용하였다. 식종균의 성상은 Table 1에 나타난 것처럼 total solids(TS) 31.4g/L, volatile solids(VS) 17.0g/L 이었으며 알칼리도는 4.8g CaCO₃/L, pH는 7.4 이었다. 음폐수는 D시 음식물쓰레기 자원화 공장에서 채취하였고, 실험 전까지 4°C에서 냉장 보관 후 이용하였다.

Table 2 Experimental design using central composite design and responses

Run	Coded variables		Experimental variables		H ₂ yield	Carbohydrate removal	H ₂ production rate
	X ₁ : pH	X ₂ : substrate conc.	X ₁ : pH	X ₂ : substrate conc. (Carbo. COD/L)	mol H ₂ / mol hexose _{added}	(%)	mL H ₂ /L/hr
1	-1.5	0.0	5.5	11	1.16	78.4	199
2	-1.0	-1.0	6.0	5	1.64	76.7	156
3	-1.0	1.0	6.0	17	1.43	81.7	407
4	0.0	-1.5	7.0	2	0.38	75.9	56
5a	0.0	0.0	7.0	11	1.73	88.0	297
6a	0.0	0.0	7.0	11	1.77	88.2	302
7	0.0	1.5	7.0	20	1.38	80.9	435
8	1.0	-1.0	8.0	5	0.39	85.8	77
9	1.0	1.0	8.0	17	1.64	82.7	293
10	1.5	0.0	8.5	11	0.87	77.0	254

음폐수의 성상을 살펴보면 pH는 4.4, total chemical oxygen demand(COD)가 136.3g/L, soluble COD가 36.1g/L 이었고, SCOD/ TCOD가 0.27 이었다. 탄수화물 농도는 55.0g COD/L 로서 전체 유기물 함량의 약 40%를 차지한다.

2.2 실험 및 분석방법

2.2.1 실험 방법

본 실험에서는 유효부피 100mL(총 부피 250mL)인 serum bottle에 식종균을 40mL 넣고 음폐수를 탄수화물을 기준으로 한 COD 농도(Carbo. COD/L)에 따라 희석하여 주입하였다. 탄수화물을 기준으로 한 이유는 탄수화물의 수소 생산 잠재량이 지방과 단백질에 비하여 훨씬 높기 때문이다¹¹⁾. 실험의 각 조건은 기질의 주입 농도를 2.0~20.0g Carbo. COD/L로 하고 초기 pH를 5.5~8.5로 하여 실험을 구성하였다.

고순도 아르곤(Ar, 99.999%) 가스를 이용하여 치환하였고, 실험 온도는 35°C로 유지하였고 shaking incubator를 이용하여 200rpm으로 실험 하였다. 발생하는 바이오가스를 측정하기 위해 일정 시간 간격으로 바이오가스의 양과 성분을 분석하는 한편, 각 조건에 따른 pH 및 유기산의 변화를 관찰하기

위해 일정량의 sample을 채취하여 분석하였다.

최적의 수소 생산 조건을 통계학적으로 분석하기 위해 central composite design(CCD)을 사용 하였는데, CCD는 이차 반응표면 모델로 표현하기에 효율적인 방법으로 알려져 있다¹⁰⁾. 본 실험에서는 Design-Expert(Stat-Ease, Inc., USA) software를 이용하여 두 가지(pH, 기질농도) 독립변수의 matrix를 Table 2와 같이 설정하고 수소 수율과 수소 발생속도를 각각 target response로 하여 결과를 분석하였다.

2.2.2 분석방법

실험에 사용된 기질 및 식종균, 시료에 대한 TS, VS 및 TCOD, SCOD, Alkalinity, Ammonia, TN의 측정은 Standard method¹²⁾를 이용하였다. pH는 pH meter(HM-30R, DDK-TOA)를 이용하여 측정하였다. 탄수화물의 분석은 페놀-황산법을 이용하여 적당량으로 희석한 샘플에 5% 페놀 1mL, 95% 황산 5mL를 넣고 잘 흔들어 준 다음 30분 방치해 두었다. 그리고 potable data logging spectrophotometer (DR/2010; Hach Co., USA)을 사용하여 파장 490nm에 대해 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 포도당(glucose)을 이용하였다.

유기산의 분석은 상등액을 0.2μm 멤브레인으로

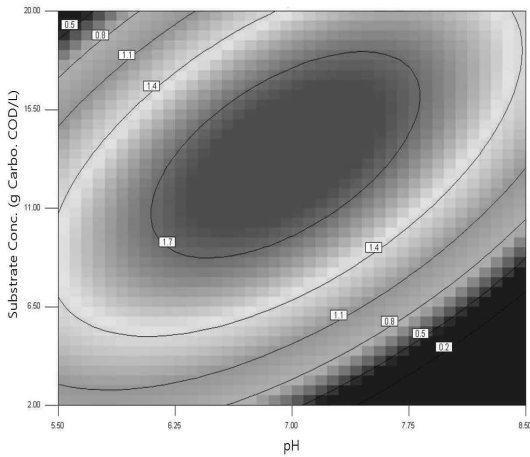


Fig. 1 Two-dimensional contour plot: Effect of initial pH and substrate conc. on H₂ yield

여과 후 Aminex HPX-87H(BioRad, USA) 컬럼이 장착된 HPLC(Model VP, Shimadzu Co., Japan)로 분석하였다. 측정은 UV detector를 이용하여 파장 216nm에 대해 수행되었고 이동상은 10mM 황산이 사용되었다. Flow rate는 0.6mL/min, 컬럼은 30°C에서 유지되었다.

바이오가스 발생량은 2시간 단위로 측정하였고 STP(Standard temperature and pressure)조건으로 환산하였다. 수소 함량은 serum bottle내의 head space 가스를 gas-tight micro syringe로 200 μ l 채취하여 gas-chromatography(Shimadzu 14-B)로 분석하였다. Molecular sieve 5A(Supelco Inc.)를 충전 물질로 사용하였고, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 수소 가스 정량을 위한 GC 조건은 injector 온도 100°C, column 온도 80°C, detector 온도 120°C 이다. Carrier 가스는 아르곤으로 flow rate 60mL/min을 유지 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 최적 수소 수율

발효 후 탄수화물 분해율을 분석한 결과 모든 시료에서 75~85%로 큰 차이를 나타내지는 않았지만,

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for a quadratic response surface model

Source	Sum of squares	DF	Mean square	F-Value	Prob > F
Model	2.31	5	0.46	9.51	0.0243
X ₁	0.25	1	0.25	5.25	0.0838
X ₂	0.76	1	0.76	15.61	0.0168
X ₁ X ₂	0.53	1	0.53	11.00	0.0295
X ₁ ²	0.45	1	0.45	9.19	0.0387
X ₂ ²	0.66	1	0.66	13.48	0.0214

수소 수율은 Table 2에 나타난 것과 같이 초기 pH와 기질 농도 조건에 따라 달랐다. Center point인 pH 7.0, 기질 농도 11g Carbo. COD/L(탄수화물 당량 COD 농도 의미)에서 1.75mol H₂/mol hexose_{added}가장 높은 수소 수율을 보였다.

반응표면법을 통해 기질농도와 pH가 수소 수율에 미치는 영향을 모사하는 2-D contour plot을 하여 Fig. 1에 나타내었다. 초기 pH 7.0, 기질 농도 13.4g Carbo. COD/L의 조건에서 수소 수율이 1.84 mol H₂/mol glucose로 가장 높은 값을 나타냈으며, 기질 농도가 높으면 수소 수율을 높이기 위한 초기 pH 조건도 높아지는 경향을 보였다.

수소 수율(Y)의 초기 pH(X₁)와 기질농도(X₂)와의 상관관계(단, X₁과 X₂는 coded value임)는 식 (1)의 2차식으로 표현이 가능하며 Table 3에 제시한 분산 분석(analysis of variance, ANOVA) 결과와 같이 P값이 0.05 이하로서 제시된 모델식은 적합하다 할 수 있다.

$$Y = 1.78 - 0.17X_1 + 0.30X_2 + 0.37X_1X_2 - 0.29X_1^2 - 0.35X_2^2 \quad (1)$$

3.2 수소 생산 속도

초기 pH와 기질농도를 달리하였을 때 각 조건에서의 수소 생산 속도를 반응표면법을 이용한 2-D contour plot을 이용하여 Fig. 2에 나타내었다. 가장 빠른 수소 생산 속도는 435mL H₂/hr로서 초기 pH 7, 기질농도 20g COD/L의 조건에서 얻어졌으며

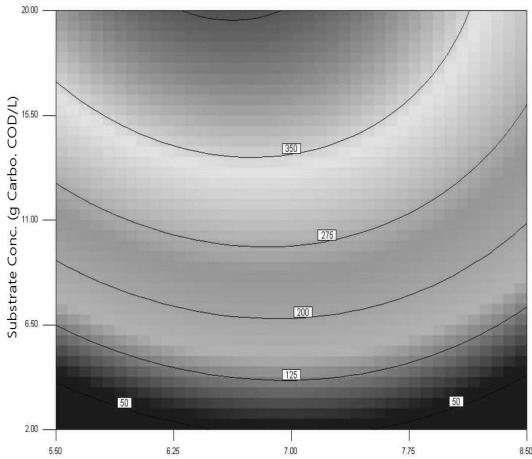


Fig. 2 Two-dimensional contour plot : Effect of initial pH and substrate conc. on H₂ production rate

기질 농도가 높은 시료에서 대체적으로 빠른 수소 생산 속도가 관찰되었다.

반면, 초기 pH는 수소 수율에 큰 영향을 주진 않았고, 이는 다양한 기질농도와 pH의 영향에 관해 실험을 하였던 Van et al(2001)¹³과 Samir et al(2004)¹⁴ 연구 결과와 일치한다. 수소 생산 속도는 다음의 식 (2)와 같이 나타낼 수 있으며 이때의 p값은 0.0188로서 상관도가 매우 높았다.

$$\begin{aligned}
 & \text{H}_2 \text{ production rate (mL H}_2\text{/L/hr)} \\
 & = 298.30 - 13.00X_1 + 121.82X_2 \\
 & \quad - 8.75X_1X_2 - 34.05X_1^2 - 25.60X_2^2
 \end{aligned} \tag{2}$$

3.3 pH 변화 및 유기산 분석

Fig. 3은 수소 발효가 진행되는 동안 pH 변화를 나타낸 것이다. 초기 pH 7.0, 기질 농도 11g/L 조건에서 가장 높은 수소 수율을 보였는데, 이는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 수소발효에 우호적인 조건으로 알려진 pH 5.5~6.0 사이에서 발효가 진행된 반면, 기질 농도가 높거나(pH 7.0, 20g/L) 낮은(pH 7.0, 2g/L) 경우에는 pH가 낮은 범위 그리고 높은 범위에서 유지되었기 때문이다.

또한, 동일한 기질 농도 조건에서 초기 pH가 높

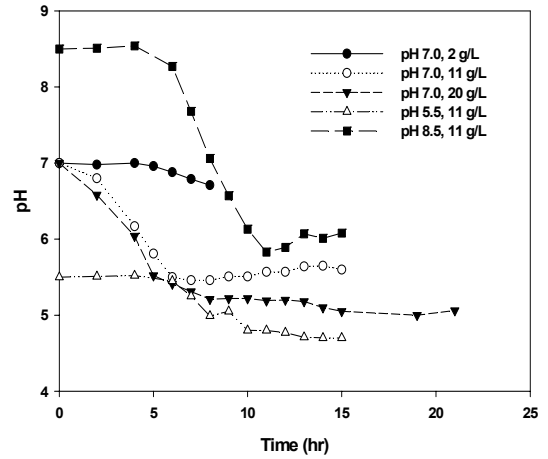


Fig. 3 pH change profile at various initial pHs and substrate concentrations

은 경우(pH 8.5, 11g/L)에는 pH가 6.0 이상으로 유지되었고 초기 pH가 낮은 경우(pH 5.5, 11g/L)에는 pH가 5.5 이하로 낮게 유지되었다. 이러한 초기 pH와 기질 농도의 차이는 발효 진행 중 pH를 변화시켰으며, 이는 Fig. 4에서 제시된 바와 같이 유기산 발생 분포의 변화를 초래하였다.

발효 진행 중의 pH 범위가 5.5~6.0 인 경우, 수소 생산과 밀접하다고 알려진 뷰틸산의 분포가 가장

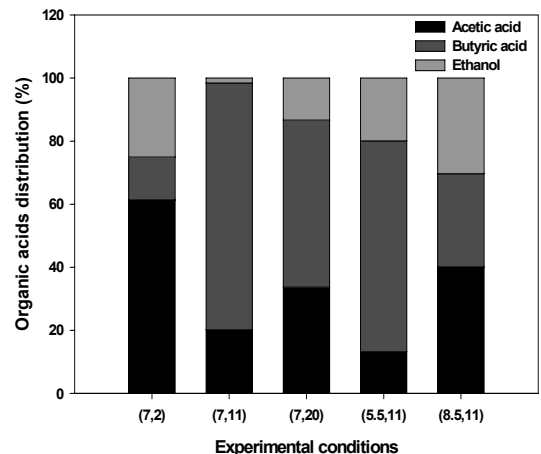


Fig. 4 Organic acids distribution at various experimental conditions (different initial pH and substrate conc.)

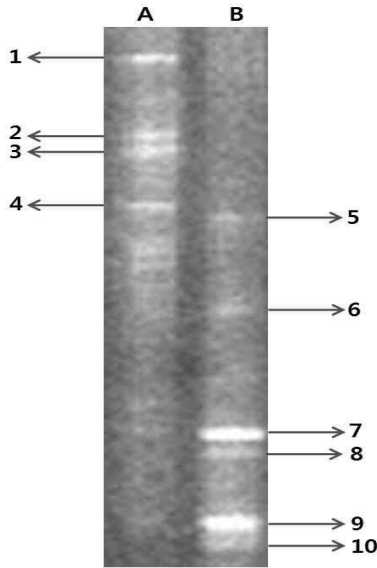


Fig. 5 DGGE profiles of the 16S rDNA gene fragment after H₂ fermentation of food waste recycling wastewater
A: Food waste wastewater B: After fermentation

Table 4 Affiliation of DGGE fragments determined by their 16S rDNA sequence

Band	Affiliation	Accession number	Determined (bp)	Similarity (%)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	EF439684	101/141	72
2	<i>Lactobacillus helveticus</i>	HM218196	106/138	77
3	<i>Lactobacillus farciminis</i>	HM130540	108/141	77
4	<i>Bacillus</i> sp.	GU121493	64/69	93
5	Uncultured bacterium	-	-	-
6	<i>Clostridium</i> sp.	AB059479	121/124	98
7	<i>Clostridium perfringens</i>	AB566417	123/125	99
8	<i>Clostridium sticklandii</i>	FP565809	94/128	74
9	<i>Clostridium bifermentans</i>	GQ180907	114/127	90
10	<i>Clostridium</i> sp.	HM036028	122/126	97

높았으며 수소 수율이 가장 높았던 pH 7.0과 기질 농도 11.0g Carbo. COD/L의 조건이 여기에 속한다.

반면, 발효 진행중의 pH 범위가 6.0 이상인 경우와 5.5 이하인 경우에는 pH 5.5~6.0 에 비하여 아세트산과 에탄올이 상대적으로 더 많이 나타났다. 이 같은 변화는 수소 발효 시 초기 pH와 기질의 농도에 따라서 유기산 생성 또는 수소 가스의 발생에 영향을 미쳤다는 것을 의미한다.

3.4 미생물 분석

본 연구의 기질로 사용된 음폐수와 최적 수소 발효 조건(초기 pH 7.0, 기질 농도 11g/L)에서 혐기 수소 발효 후 미생물을 PCR-DGGE(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 5와 Table 4에 나타내었다.

Fig. 5의 DGGE 밴드에 나타난 것과 같이 음폐수(A) 내에는 *Lactobacillus plantarum* 등 젖산 생산 미생물로 알려진 lactic acid bacteria군이 주요 균주이다. 최적조건 발효 후 혐기성소화조 슬러지 식

종균(B)에는 수소가스를 발생시키고 부산물로서 아세트산과 뷰틸산을 생성시키는 주요 수소 생성균으로 알려진 *Clostridium* sp.가 주요 균주로 나타났다.

4. 결 론

- 1) 초기 pH와 기질 농도에 대한 혐기성 수소 회분 실험결과 통계적으로 유의한 모델 값을 얻었으며 최적의 수소 수율은 1.84mol H₂/mol hexose_{added}로 초기 pH 7.0, 기질 농도 13.4g Carbo. COD/L 조건에서 얻어졌다.
- 2) 초기 pH와 기질 농도는 발효 과정에서 pH의 변화를 야기하여 수소 생산과 유기산의 생성에 영향을 미친 것으로 나타났다. 즉, 발효중 pH 범위가 5.5~6.0 인 경우, 뷰틸산이 가장 많이 생성되고 수소생산도 높았지만, 발효 중 pH 범위가 6.0 이상 또는 5.5 이하인 경우에는 아세트산과 에탄올이 많이 생성되었다.
- 3) 음폐수와 최적 조건(pH 7.0, 기질 농도 11g/L)의 혐기성 수소 발효 후 미생물을 분석한 결과 음폐

수내에는 젖산균(lactic acid bacteria)이 주요 균주였고, 최적의 수소 수율 조건에서의 미생물을 분석한 결과 수소 생성균으로 알려진 Clostridia가 주요 균주로 관찰되었다.

후 기

이 연구(논문)는 교육과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어연구개발사업(수소에너지사업단)의 일환으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- 1) D. H. Kim, S. K. Han, S.H. Kim, H. S. Shin, "Effect of gas sparging on continuous fermentative hydrogen production", *Int J Hydrogen Energy*, Vol. 31, No. 15, 2006, pp. 2158-2169.
- 2) J. L. Wang, W. Wan., "Factors influencing fermentative hydrogen production: A review", *Int J Hydrogen Energy*, Vol. 34, No. 2, 2009, pp. 799-811.
- 3) C. L. Li, H. H. P. Fang, "Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures", *Crit Rev Env Sci Technol*, Vol. 37, No. 1, 2007, pp. 1-39.
- 4) 김미선, 이동렬, 김동훈, 김옥선, 임소영, "두부제조 폐기물과 하수슬러지의 화학/초음파 전처리에 의한 가용화 및 혐기발효 수소 생산", *한국수소 및 신에너지 학회*, Vol. 21, No. 6, pp. 580-586.
- 5) J. L. Wang, W. Wan, "Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge", *Int J Hydrogen Energy*, Vol. 33, No. 12, 2008, pp. 2934-2941.
- 6) 신항식, "음식물 쓰레기의 혐기성소화처리", *J. of KOWREC*, Vol. 8, No. 2, 2000, pp. 7-13.
- 7) 환경부, 환경백서, 2009, pp. 502-598.
- 8) H. Argun, F. Kargi, I. K. Kapdan, "Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo fermentation", *Int J Hydrogen Energy*, Vol. 34, No. 15, 2009, pp. 6181-6188.
- 9) D. C. Montgomery, "Design and Analysis of Experiment", 5th ed, John Wiley & Sons, New York. 2001.
- 10) E. M. Jeng, H.W. Kim, J. Y. Nam, H. S. Shin, "Enhancement of bioenergy production and effluent quality by intergrating optimized acidification with submerged anaerobic membrane bioreactor", *Bio-resource Technology*, Vol. 101, No. 1, 2010, pp. S7-S12.
- 11) J. J. Lay, K. S. Fan, J. Chang, C. H. Ku, "Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge", *Int J Hydrogen Energy*, Vol. 28, No.12, 2003, pp. 1361-1367.
- 12) APHA, AWWA and WEF. : "Standard methods for the examination of water and wastewater", 20th ed, American Public Health Association, Baltimore, 1998, Vol. 2, pp. 30-59.
- 13) Van Ginkel S, Sung S, Lay JJ, "Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration", *Environ Sci Technol* Vol. 35, No. 24, 2001, pp. 4726-4730.
- 14) S. K. Khanal, W. H. Chen, L. Li, S. Sung, "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products", *Int J Hydrogen Energy*, Vol 29, No. 11, 2004, pp. 1123-1131.