

2단(유산발효+광발효) 발효공정을 통한 음식물쓰레기로부터의 수소생산

김옥선^{*,**}, 손한나^{*}, 김동훈^{*}, 전동진^{*}, 이영우^{***†}, 김미선^{*‡}

*한국에너지기술연구원 폐자원에너지센터, **충남대학교 화학공학과, ***녹색에너지기술전문대학원

Biohydrogen Production from Food Waste by Two-Stage (Lactate+Photo)-Fermentation Process

OKSUN KIM^{*,**}, HANNA SON^{*}, DONGHOON KIM^{*}, DONGJIN JEON^{*}, YOUNGWOON RHEE^{***†}, MISUN KIM^{*‡}

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

***Chemical engineering, Chungnam National University, Yuseong-gu Daejeon 303-764, Korea*

****Graduate School of Green Energy Technology, Chungnam National University,
Yuseong-gu Daejeon 303-764, Korea*

ABSTRACT

In the present work, it was attempted to produce H₂ from food waste by the two-stage fermentation system. Food waste was acidified to lactate by using indigenous lactic acid bacteria under mesophilic condition, and the lactate fermentation effluent (LFE) was subsequently converted to H₂ by photo-fermentation. *Rhodobacter sphaeroides* KD131 was used as the photo-fermenting bacteria. The optimal conditions for lactate fermentation were found to be pH of 5.5 and substrate concentration of 30 g Carbo. COD/L, under which yielded 1.6 mol lactate/mol glucose. By filtering the LFE and adding trace metal, H₂ production increased by more than three times compared to using raw LFE, and finally reached the H₂ yield of 3.6 mol H₂/mol lactate. Via the developed two-stage fermentation system H₂ yield of 5.8 mol H₂/mol glucose was achieved from food waste, whose value was the highest that ever recorded.

KEY WORDS : Photo-fermentation(광발효), Lactate-fermentation(유산발효), Food waste(음식물쓰레기), Hydrogen(수소), pH(pH)

1. 서 론

현재 인류가 가장 많이 사용하는 에너지인 화석

연료는 그 존재가 한정적이고, 연소 시 일산화탄소, 이산화탄소 및 황·질소 산화물 등의 온실가스 방출로 인해 지구 온난화를 유발시켜왔다. 따라서 화석 연료를 대체할 수 있는 청정에너지원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고, 그 중 수소에너지가 가장 크게 주목받고 있다. 수소는 연소 시 물만 생산하며,

^{†,‡} Corresponding author : ywrhee@cnu.ac.kr,
bmmskim@kier.re.kr

[접수일 : 2011.4.24 수정일 : 2011.6.16 게재확정일 : 2011.6.20]

단위 질량당 가장 높은 에너지 효율을 가지고 있고, 연료전지를 통해 쉽게 전기로 변환될 수 있다는 장점이 있다¹⁾. 수소를 생산하는 방법에는, 크게 물리·화학적 방법과 생물학적인 방법이 있다. 전자의 경우 수소 제조 시 고온·고압 조건을 유지하기 위한 다량의 에너지를 필요로 한다는 단점이 있다. 반면 생물학적인 방법은 빛 에너지, 물, 유기물, 미생물만을 이용하여 수소를 제조하는 공정으로서 미래의 궁극적인 수소 제조 방법으로 인식되고 있다²⁾.

생물학적인 수소생성 공정은 빛 에너지원의 이용 유무에 따라 크게 광합성 생산법과 혐기발효법으로 나뉘어진다. 광합성 생산법 중 유기산을 기질로 이용하는 광발효법(photo-fermentation)은 이론적 수소 전환율이 매우 높은 장점이 있지만, 탄소 사슬이 긴 유기물을 직접 이용하는데 한계가 있다. 반면 혐기발효(dark fermentation)는 유기성폐기물을 직접 이용할 수 있고, 수소생산 속도가 빠른 장점이 있지만, 이론적 수소전환율이 낮다³⁾. 이에 따라 혐기발효를 통해 유기성폐기물을 처리함과 동시에 수소 및 유기산을 제조하고, 후단 공정으로 광발효를 연계함으로써 혐기발효에서 생산된 유기산을 수소로 전환하여 수소전환율을 높이는 연구가 진행되고 있다⁴⁾.

혐기발효 시 주요 생산되는 유기산인 초산과 낙산은 광발효세균인 홍색비유황세균(purple non-sulfur bacteria)에 의해 수소보다는 poly- β -hydroxy butyrate (PHB) 생산쪽으로 대사 흐름이 유도되는 문제점이 있다. 반면 유산은 혐기발효 시 수소 생산과 무관한 부산물이지만, 광발효 시 수소생산에 우호적인 기질로 잘 알려져 있다.

본 연구에서는 이러한 연구배경을 바탕으로 음식물쓰레기를 먼저 유산발효를 통해 유산을 생산하고, 이어서 생산된 유산을 광발효를 통해 수소 전환율을 극대화하고자 하였다. 음식물쓰레기는 우리나라 생활폐기물의 40%를 차지하고 있으며, 해양투기금지와 관련한 국제협약에 따라 그 처리에 있어서 현재 큰 골칫거리로 떠오르고 있다. 유산발효 시 추가적인 식종균을 주입하지 않는 무식종 공법이 적용되었으며, 이 때 pH와 기질농도 영향을 관찰하였고, 광발효 효율을 최적화하기 위하여 유산발효액의 전

처리, 질소원 및 미량 영양분의 공급 효과를 알아보았다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 음식물쓰레기의 유산발효

음식물쓰레기는 대전시 K대학 구내식당에서 채취하였고, 가정용 믹서로 분쇄 후 이용하였다. 총 부피 250mL(유효용량 100mL)배양기를 이용하였고, 실험은 중온조건(35°C)에서 진행되었다. 본 실험에서는 음식물쓰레기 내에 존재하는 미생물을 이용하므로 추가적인 식종균은 주입하지 않았다. Ar 가스로 치환하여 혐기상태로 만든 후, pH를 5.0, 5.5, 6.0, 6.5로 조절하였다. 초기 및 발효 중 pH 조절은 반응기 상부에 부착된 pH센서와 2N KOH를 주입을 통하여 이루어졌다. 탄수화물 농도는 40g Carbo. COD/L였고, 탄수화물은 전체 유기물의 약 50%를 차지하였다.

기질 농도 실험은 위와 같이 채취한 음식물쓰레기를 탄수화물 농도를 10, 20, 30, 40, 50g Carbo. COD/L로 조절하여 진행하였다. 앞선 실험결과를 토대로 pH는 5.5로 유지시키고, 이하 실험방법은 pH 영향 실험과 동일하게 진행하였다.

2.2 유산 발효액을 이용한 광발효

2.2.1 균주 및 배지 조성

광합성 균주인 *R. sphaeroides* KD131은 대부분 해안에서 2005년에 분리되었다⁶⁾. 균 배양 시 배지 조성은(1L) KH₂PO₄ 2.72g, L-glutamic acid 1.2g, Nitritotriaceticacid 0.2g, MgCl₂·6H₂O 0.244g, CaCl₂·2H₂O 34mg, FeSO₄·7H₂O 2mg이고, Trace elements (EDTA 1.765mg, ZnSO₄·7H₂O 10.95mg, MnSO₄·H₂O 1.54mg, CuSO₄·5H₂O 0.392mg, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.248mg, H₃BO₃ 0.114mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.75mg, FeSO₄·7H₂O 0.5mg), Vitamins(nicotinicacid 1mg, thiamimne·HCl 0.5 mg, Biotin 0.01mg)을 이용하였다. 탄소원으로는 lactate 30mM, 질소원으로 glutamate 8mM를 첨가하였다.



Fig. 1 Experimental setting for photo-fermentation

2.2.2 *R. sphaeroides* KD131의 배양 테스트

유산발효에서 생성된 유산을 *R. sphaeroides* KD131의 광발효 시 기질로 이용하였다. 유산발효로 생성된 상등액에는 탄소원인 유산은 풍부하지만, 질소원과 미량 영양분이 부족하기 때문에 질소원(glutamate 8mM)과 미량 영양분(trace elements solution - EDTA 1.765mg, ZnSO₄·7H₂O 10.95mg, MnSO₄·H₂O 1.54mg, CuSO₄·5H₂O 0.392mg, Co(NO₃)₂·6H₂O 0.248mg, H₃BO₃ 0.114mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.75mg, FeSO₄·7H₂O 0.5mg)을 첨가하여 수소생산량과 균체성장을 비교하는 회분식 실험을 진행하였다. 배양기는 150mL serum bottle을 이용하였으며, 배양액은 50mL을 넣어 초기 균체 농도는 0.57±0.02g dcw/L를 접종하였다. 혐기상태로 만들어 주기 위해 Ar 가스로 치환하였으며, 빛은 할로겐 램프와 light meter(LI-COR LI-250A, sensor: pyranometer)를 이용해 연속적으로 110W/m²세기로 맞춰주었다. 배양온도는 30°C이며, magnetic stirrer를 이용하여 80~100rpm으로 교반하였다. 또한 램프와 stirrer에서 발생되어 배양기에 전달되는 열을 최소화하기 위해 상부에 팬을 설치하였다.

2.3 분석

배양액의 pH는 pH meter(TOA, model HM-30R)를

Table 1 Lactate fermentation of food waste at different pH

pH	Lactate yield (%)	Carbohydrate removal (%)	Lactate composition (% of total organic acids)
5.0	63	80	93
5.5	68	89	97
6.0	59	91	92
6.5	52	94	73

이용하였고, 균체농도는 일정한 시간 간격으로 채취한 발효액을 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu UV-1601)로 파장 660nm에서 흡광도를 측정하였다⁵⁾. 유기산분석은 발효액을 채취하여 9,000rpm에서 3분간 원심분리하고 균체와 상등액을 분리한 후 상등액을 0.2µm filter로 여과한 후 이용하였다. 시료 20µl를 주입하고, 0.01 M H₂SO₄를 이동상으로 하여 flow rate 0.6µl/min으로 용출하였다. 유기산 분석은 Aminex HPX-B7H를 장착한 HPLC(Shimadzu LC-10AT)를 사용하여 35°C에서 분석하였으며 UV detector를 이용하여 파장 210nm에서 측정하였다. 탄수화물 분석은 페놀-황산법을 이용하여 100배 희석한 샘플 1mL에 5%페놀 1mM, 98% 황산 5mL을 넣고 잘 흔들어 준 다음 30분 방치해 두었다가 portable datalogging spectrophotometer(DR/2010; Hach Co., USA)을 사용하여 파장 490nm에 대해 흡광도를 측정하였으며 표준물질은 포도당을 이용하였다⁷⁾.

3. 결 과

3.1 유산발효 시 초기 pH 영향

Table 1에 pH에 따른 유산 생산 결과가 나와있다. pH 5.0~6.0으로 조절해 주었을 경우, 전체 유기산 중 90% 이상이 유산이었으며, pH 6.5 일 경우 70%로 낮아졌다. 미생물 분석 결과, 음식물쓰레기를 증온에서 무식종 발효 시 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*와 같은 젖산생성균이 주종을 구성함을 알 수 있었다(data not shown). 음식물쓰레기의 탄수화물에서 유산의 전환율은 pH 5.0과 pH 5.5일 경우 50% 이상이었지만, pH 5.0에서 탄수화물은

Table 2 Lactate fermentation of food waste at different initial substrate concentration

Initial carbohydrate conc. (g/L)	Optimal time (hr)	Lactate yield (%)	Remained carbohydrate (%)
10	13.5	54	24
20	30.0	76	18
30	30.0	80	18
40	30.0	77	22
50	36.5	76	16

20%가 분해되지 않았다. pH 5.5~6.5일 경우 분해되지 않은 탄수화물 비율은 10% 내외인 것을 알 수 있었다.

발효 초기(30hr<)에는 모든 pH 조건에서 대부분 유산이 생산되었지만, 초산, 낙산, 프로피온산이 시간이 지남에 따라 증가하였다(data not shown). 이는 탄수화물로부터 생성된 유산이 발효 시간이 경과될수록 재분해되어 프로피온산으로 전환되는 것과 관련이 있는 것으로 사료된다⁸⁾. 초산은 pH 5.0~6.5에서 모두 생성되었으며, 3~11%로 축적되는 것을 확인하였다. pH 6.5에서 낙산은 16% 생성되었으며, 시간이 지날수록 증가하였다.

3.2 유산발효 시 기질 농도 영향

음식물쓰레기를 발효할 때, 초기 기질 농도에 따른 유기산 생성의 변화 패턴을 보기 위해 초기 기질 농도를 10~50g Carbo. COD/L로 조절하여 실험하였다. 2 N의 KOH를 이용하여 pH를 5.5로 조절하였다. 각각 기질 농도를 10~50g Carbo. COD/L로 조절하였을 때, 유산은 5~38g COD/L 생성되는 것을 관찰할 수 있었다. 탄수화물에서 유산의 최고생산 수율은 이론적으로 2mol이다. 초기 농도 30g Carbo. COD/L에서 유산의 생산수율은 발효 36시간 후 최적이었으며, 1.6mol lactate/mol glucose로 가장 높았고, 이 때 전환율은 80%이다. 초기 기질 농도가 20, 40, 50g Carbo. COD/L일 때, 발효 30~36 시간 후 유산의 전환율은 75%였다. 반면 10g Carbo. COD/L에서는 발효 13시간 후 최적의 전환율을 보였지만 54%

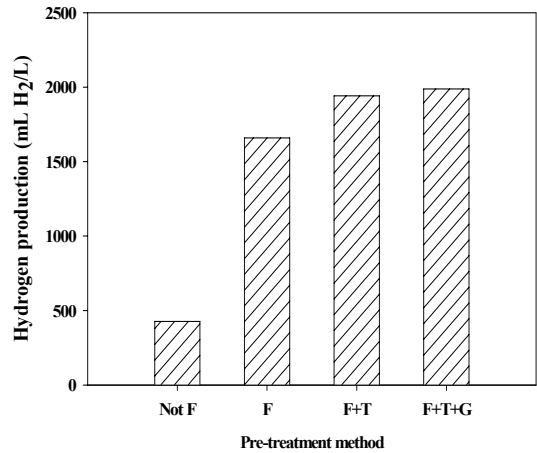


Fig. 2 Effect of trace element and glutamate to lactate from the lactate fermentation effluent (Pre-treatment method: Table 3 참고)

로 가장 낮았다(Table 2). 낮은 기질 농도에서의 낮은 유산 전환율은 기존에 보고된바 있으며, 이는 유산발효와 경쟁관계에 있는 수소발효에 작용하는 효소가 저농도에서 더 활성화되는 것과 관련이 있다⁹⁾.

3.3 유산발효액을 이용한 광발효

유산발효액을 원심분리하여 침전물과 상등액으로 나누었으며, 상등액에 포함되어 있는 유산을 광발효의 기질로 이용하였다. 상등액에 포함된 유기산은 농도가 높기 때문에 증류수를 이용해 유산을 25mM로 희석하여 실험하였다. 또한 상등액에는 원심분리를 하였지만, 약간의 유산균과 기타 물질들이 포함되어 있을 수 있고, 질소원과 미량 영양분이 부족하여 수소를 생산하는데 제한적 요소로 작용될 수 있다¹⁰⁾. 이를 알아보기 위하여 0.2μm의 필터를 이용하여 유산균과 상등액에 떠있는 물질들을 여과해 주었다. 부족한 질소원(glutamate)과 미량 영양분(trace elements)를 첨가하여 실험하였고, 이 결과를 Fig. 2에 나타냈다.

상등액은 여과를 해주는 것만으로도 수소생성은 430mL H₂/L에서 1,660mL H₂/L로 3.8배 증가했다. 이 결과 여과를 하지 않은 상등액 속에 유산균과 다른 물질들로 인해 *R. sphaeroides* KD131의 수소생

Table 3 Hydrogen production, pH and lactate degradation of *R.sphaeroides* KD131 from the lactate fermentation effluence
 Not F1: Lactate fermentation effluent was not filtered
 F2: Lactate fermentation effluent was filtered
 F+T3: Lactate fermentation effluent was filtered and added trace
 F+T+G4: Lactate fermentation effluent was filtered, added trace and glutamate

Type	Not F ¹	F ²	F+T ³	F+T+G ⁴
Time (hr)	72	72	72	72
Final pH	7.24	7.22	7.20	7.50
Cell growth (g dcw/L)	1.53	1.29	1.22	2.58
H ₂ production (mL H ₂ /L)	427	1,659	1,942	1,988
H ₂ yield (mol H ₂ /mol-lactate)	0.8	3.0	3.5	3.6
Substrate degradation rate (%)	100	100	100	100
Substrate conversion efficiency (%)	13	50	58	60

성에 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 미량 영양분 (trace elements solution)를 첨가해 주었을 때 수소 생산량은 여과를 해 주었을 때 보다 약간 더 증가하여 2,000mL H₂/L의 수소가 생성되었다. 유산으로부터 수소생산 시 최고이론수율은 6mol H₂/mol

lactate이며, 수소수율은 3.6mol H₂/mol lactate(수소 전환율: 60%)였다. 미량 영양분에 포함되어 있는 성분 중 molybdenum은 수소 발생에 관여하는 효소인 nitrogenase의 구조에서 발견되며, 철 등과 같은 2가 이온들은 전자 전달체인 ferredoxin과 같은 광합성의 electron transport system(ETS)에서 찾을 수 있었다¹¹⁾. 기질이 공급하는 전자가 nitrogenase 효소계의 전자 전달체(ferredoxin)를 환원하며, 이 환원력과 ATP를 이용하여 nitrogenase가 질소원이 없는 조건에서 분자상의 수소를 발생한다. 따라서 미량 영양분이 첨가되어 수소를 생성하는데 도움을 주는 것을 실험으로 증명할 수 있었다. 반면 미량 영양분과 함께 질소원(glutamate)을 첨가해 주었을 경우 수소생산량은 질소원을 첨가하지 않았을 경우와 동일하였다.

하지만 Table 3과 같이 균체성장의 차이를 알 수 있었다. 질소원을 첨가해 주었을 경우 균체 성장은 2.58g dcw/L 이다. 질소원을 첨가해 주지 않았을 때 (1.22g dcw/L) 보다 2배정도 높은 성장률을 보였다. 회분식 실험에서는 세포분열의 최성기인 대수 성장기 때의 균을 이용해 질소원을 넣어주지 않았을 경우에도 수소발생 효율이 높았다. 하지만 장기간 배양할 경우 시간이 지날수록 질소원이 부족하기 때문에 균의 성장이 진행될 수 없어 수소를 생성하는데 제한이 될 수 있다는 문제점이 있다. 유산의 분해

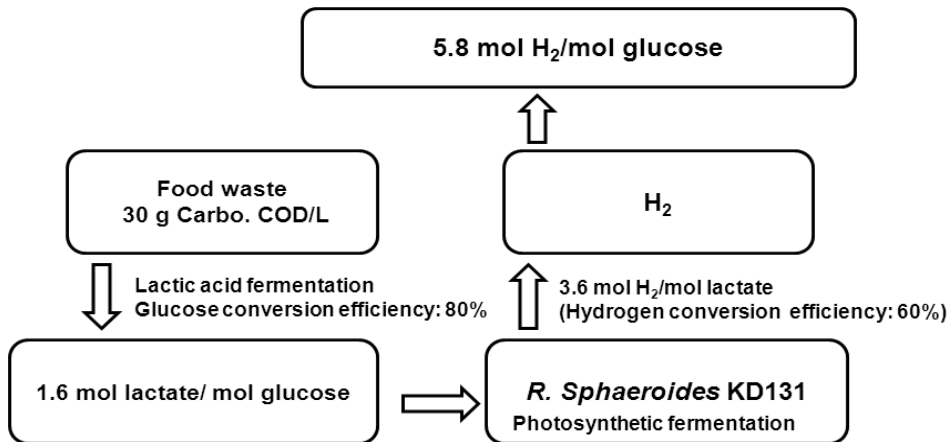


Fig. 3 Calculation of total H₂ yield by the two-stage fermentation process

율은 모두 100%였으며, 초기 pH 7.0에서 배양 후 pH 7.2~7.5로 변화한 것을 확인하였으며, 이는 *R. sphaeroides* KD131이 수소를 생성하는데 적절한 pH였다.

2단 발효공정을 통해 나온 총 수소생산 수율을 Fig. 3에 나타내었다. 음식물쓰레기 30g Carbo. COD/L를 유산발효하여 유산을 생성하였을 때 1.6 mol lactate/mol glucose가 생성되었으며, 전환율은 80%였다. 유산 발효액의 유산을 *R. sphaeroides* KD131의 광발효 기질로 이용하였으며, 수소생산 수율은 3.6mol H₂/mol lactate로 수소전환율은 60%였다. 따라서 2단 발효 공정을 통해 생성된 총 수소수율은 5.8mol H₂/mol glucose였으며, 이는 탄수화물 기준 48% 전환율로서, 음식물쓰레기로부터 수소 생산 시 현재까지 보고된 결과(<2.5mol H₂/mol glucose)중 가장 높은 값이다^{12,13)}.

4. 결 론

- 1) 음식물쓰레기를 pH 5.0~6.5로 조절한 후 35°C, 혐기조건에서 발효하여 유기산 생산 패턴을 확인한 결과 pH 5.5일 때 유산의 생산수율은 1.36mol lactate/mol glucose였고, 전체 유기산 중 97%가 유산으로 가장 높았으며, 초산과 낙산이 소량 생산되었다.
- 2) 음식물쓰레기를 이용해 초기 기질 농도를 10~50g Carbo. COD/L로 조절해주어 유산 전환율을 관찰한 결과 30g Carbo. COD/L 일 때, 유산발효 30hr 경과 후 1.6mol lactate/mol glucose가 생성되었으며, 전환율은 80%로 가장 높았다.
- 3) 유산발효액 상등액을 여과하여 유산균 및 이물질을 제거한 후 광합성 발효를 실시하였을 때 *R. sphaeroides* KD131은 여과하지 않았을 때와 비교하여 수소생산이 3.86배(430mL H₂/L에서 1,660mL H₂/L) 증가하였다.
- 4) 상등액은 미량 영양분과 질소원이 부족하기 때문에 미량 영양분과 질소원을 넣어주었으며, 수소생산은 2,000mL H₂/L로 증가하였고, 수소수율은 3.6mol H₂/mol lactate였다.

- 5) 2단 발효공정을 통해 생성된 총 수소수율은 5.8 mol H₂/mol glucose였으며, 탄수화물의 기준으로 48%의 전환율을 나타내었다.

후 기

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

참 고 문 헌

- 1) McKinlay JB, Harwood CS, "photobiological production of hydrogen as a biofuel", Current opinion in biotechnology, Vol. 21, 2010, pp. 244-251.
- 2) Li D, Fang HHP, "Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures", Crit Re Environ Sci Technol Vol. 37, 2007, pp. 1-39.
- 3) Hawkes FR, Dinsdale R, Hawkes DL, Hussy I, "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization", Int J Hydrogen Energy, Vol. 27, 2002, pp. 1339-1347.
- 4) Shi XY, Yu HQ, "Continuous production of hydrogen from mixed volatile fatty acids with *Rhodospseudomonas capsulate*", Int J Hydrogen Energ Vol. 31, 2006, pp. 1641-1647.
- 5) Son HN, Kim MS, "*Rhodobacter sphaeroides* KD131에 의한 유기산 광합성 발효 최적화", 한국수소 및 신에너지학회 논문집, 21권, 2호, 2010, pp. 6-142.
- 6) Lee IH, Park JY, Kho DH, Kim MS, Lee JK, "Reductive effect of H₂ uptake and poly-β-hydroxybutyrate formation on nitrogenase-mediated H₂ accumulation of *Rhodobacter sphaeroides* according to Light intensity", Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 60, No. 1, 2002, pp. 147-153.
- 7) Kim MS, Lee DY, Kim DH, Kim OS, Lim SY. "Fermentative hydrogen production from the

- pretreated food-processing waste and sewage sludge using chemical/ultra-sonication”, 한국수소 및 신에너지학회 논문집, 21권, 6호, 2010, pp. 580-586.
- 8) Seeliger S, Janssen PH, Schink B, “Energetics and kinetics of lactate fermentation to acetate and propionate via methylmalonyl-CoA or acryl-CoA”, FEMS Microbiol Lett, Vol. 211, 2002, pp. 65-70.
 - 9) Kim SH, Han SK, Shin HS, “Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter”, Process Biochem. Vol. 41, 2006, pp. 199-207.
 - 10) Fascetti E, D’addario E, Todini O, Robertiello A, “Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes”, Int J Hydrogen Energy, Vol. 23, No. 9, 1998, pp. 753-760.
 - 11) Eroglu E, Gunduz U, Yucel M, Eroglu I, “Effect of iron and molybdenum addition on photofermentative hydrogen production from olive mill waste water”, Int J Hydrogen Energy, In press Vol. 36, 2011, pp. 5895-5903.
 - 12) Kim SH, Han SK, Shin HS, “Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge”, Int J Hydrogen Energy, Vol. 29, 2004, pp. 1607-1616.
 - 13) Pan J, Zhang R, El-Mashad HM, Sun H, Ying Y, “Effect of food to microorganism ration on biohydrogen production from food waste via anaerobic fermentation”, Int J Hydrogen Energy, Vol. 33, 2008, pp. 6968-6975.