

양돈슬러리를 이용한 혐기소화에서 미생물 첨가가 메탄발생에 미치는 영향

김지애 · 윤영만¹ · 정광화² · 김창현*

한경대학교 바이오정보기술대학원, ¹한경대학교 바이오가스연구센터, ²농촌진흥청 국립축산과학원

Effects of Supplementation of Mixed Methanogens and Rumen Cellulolytic Bacteria on Biochemical Methane Potential with Pig Slurry

Ji-Ae Kim, Young-Man Yoon¹, Kwang-Hwa Jeong², and Chang-Hyun Kim*

The Graduate School of Bio and Information Technology, Hankyong National University,
Anseong, 456-749, Republic of Korea

¹Biogas Research Center, Hankyong National University, Anseong, 456-749, Republic of Korea

²National Institute of Animal Science, RDA, Suwon, Republic of Korea

The study investigated the biochemical methane potential (BMP) assay of pig slurry supplemented with mixed methanogens and cellulolytic bacteria to improve anaerobic digestion for methane production. For the BMP assay, 7 different microbial supplementation groups consisted of the cultures of mixed methanogens (M), *Fibrobacter succinogenes* (FS), *Ruminococcus flavefaciens* (RF), *R. albus* (RA), RA+FS, M+RA+FS, and control. The cultures were added in the batch reactors with the increasing dose levels of 1% (0.5 mL), 3% (1.5 mL) and 5% (2.5 mL). Incubation for the BMP assay was carried out for 60 days at 38°C using anaerobic digestate obtained from an anaerobic digester with pig slurry as inoculum. In results, 5% RF and RA+FS increased total biogas up to 8.1 and 8.4%, respectively, compared with that of control ($p < 0.05$). All 5% microbial culture supplements significantly increased methane production up to 12.1~17.9% compared with that of control ($p < 0.05$). Total solid (TS) and volatile solid (VS) digestion efficiencies showed no relationship to the increased supplementation levels of microbial cultures. After incubation, pH values in all treatment groups ranged between 7.527 and 7.657 indicating that methanogenesis was not inhibited during the incubation. In conclusion, the results indicated that both hydrolysis and methanogenesis stages for methane production in anaerobic batch reactors were influenced by the supplemented microorganisms due to the chemical characteristics of pig slurry, but only the 5% supplementation level of all microbial culture supplements used in the experiment affected methane production.

Key words: BMP (biochemical methane potential), Methanogens, Rumen cellulolytic bacteria, Pig slurry

서 언

혐기성 소화 (Anaerobic digestion)는 호기성 처리와 비교하여 고농도의 유기물 분해가 가능하며, 최종 슬러지 발생량과 에너지 요구량이 낮고, 혐기적 분해과정 중 병원성 미생물도 제거시킬 수 있는 장점 (Danish Energy Agency, 1992)이 있어, 유기성 폐기물계 바이오매스의 안정화 처리를 위한 우수한 방법으로 알려져 있다 (Lettinga, 2001). 또한, 혐기소화 후 소화액은 악취요인이 현저히 감소되어 친화적인 자원화 처리가 가능함과 동시에 발효과정에서 생성되는 바이오가스 (메탄함량 약 60% 이상)는 고유가 시대의

화석연료를 대체할 수 있는 유용한 청정에너지원이다 (Bonmati et al., 2001; Clemens et al., 2006; van Lier et al., 2001).

혐기성 소화 반응은 성장속도가 서로 다른 다양한 종류의 혐기미생물들에 의한 복합적인 다단계의 미생물 화학반응 (multistage biochemical process)에 의해 이루어지며, 일반적으로 가수분해단계 (hydrolysis), 산생성단계 (acidogenesis), 메탄생성단계 (methanogenesis)로 구분된다 (Lawrence and McCarty, 1967). 다단계의 미생물 반응 중 가수분해, 산생성, 초산생성 단계를 거친 유기물은 초산과 수소 (H_2)로 전환되며, 메탄생성균 (Methanogens)에 의해 최종적으로 메탄과 이산화탄소 (CO_2)가 생산된다. 메탄생성과정에는 주로 H_2 를 기질로 이용하는 수소이용 메탄균 (Hydrogenotrophic methanogens)과 초산을 기질로 이용하는 초산이용 메탄균 (Acetoclastic methanogens)에 의해 이루어지고, 메탄의 약

접수 : 2012. 10. 17 수리 : 2012. 11. 20

*연락처 : Phone: +82316705095

E-mail: kimch@hknu.ac.kr

72%가 초산으로부터 전환되는 것으로 보고되고 있다 (Leslie Grady et al., 1999). 이러한 혐기적 메탄생성은 기질의 조성분 (단백질, 지방, 탄수화물 및 리그닌 등)의 함량과 혐기소화 중에 발생하는 저해물질의 발생정도에 영향 받는다 (Angelidaki and Ahring, 2000). 특히 혐기소화 과정에서 가수분해 과정은 첫 번째 혐기적 분해반응 단계로서 일반적으로 입자성 또는 교질성 유기물의 분해에 가장 오랜 시간이 요구되는 율속단계 (Rate limiting step)로 작용한다 (van Leier et al., 2001). 이러한 이유로 혐기소화에서 원료의 고농도, 고부하 투입에 한계가 있으며, 전체 혐기소화조의 용적이 커지는 문제가 발생한다 (Gijen et al., 1986). 따라서 여러 연구자들에 의해 고분자 유기물을 물리적, 화학적으로 전처리하거나 (Shin et al., 1992), 반응조 내에 미생물 보유량을 증가시키는 방법으로 가수분해 반응을 촉진시켜 소화조 효율을 증진시키는 방법이 연구되고 있다. 또한, 가수분해 반응에 활성이 큰 가수분해 미생물을 선별한 뒤 혐기소화에 적용하여 혐기소화 효율을 향상시키는 연구도 진행되고 있다 (Muller and Trosch, 1986). 소와 같은 반추동물의 위에 존재하는 미생물들은 셀룰로오스 (Cellulose) 등의 고분자 물질을 효율적으로 가수분해할 수 있으며 (Gijen et al., 1986), 이러한 반추위 미생물을 활용한 농산 바이오매스의 혐기소화효율 증진 연구가 제지슬러지, 농축산 바이오매스 및 유기성 고형폐기물 등을 대상으로 진행되어 대부분의 경우에 있어서 혐기소화효율을 증진시키는 것으로 보고되고 있다 (Gijen et al., 1986).

우리나라에서 농산 바이오매스를 이용하는 바이오가스 생산시설은 15기 정도이며, 이중 대부분이 양돈 슬러리를 유입원료로 활용하고 있다. 그러나 대부분의 양돈농가는 분뇨와 세척수가 혼합되는 슬러리 돈사구조를 채택하고 있으며, 하절기 사육시설의 물사용량 증가는 결과적으로 슬러리의 수분함량을 증가시켜 최종 배출되는 양돈 슬러리 중의 유기물 함량은 2~5% 범위로 매우 낮고 계절적 부하변동이 크게 나타나는 특성이 있다 (Yoon et al., 2009).

따라서, 양돈슬러리에 낮은 농도로 남아 있는 분해가 어려운 유기물을 최대한 이용하여 메탄생성을 증가시키는 방법이 필요하다. 이러한 이유로 Kim et al. (2012)은 셀룰로오스계 바이오매스의 혐기소화 효율 증진을 위해 초산이용 메탄균과 셀룰로오스 가수분해 반응에 활성이 뛰어난 반추위 내 혐기성 분해균인 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefacien* 및 *Ruminococcus albus* 배양액을 셀룰로오스를 기질로 하여 메탄생산퍼텐셜 (Biochemical methane potential; BMP)을 평가하였다. 그 결과 셀룰로오스를 기질로 이용한 회분식 배양에서 메탄생성단계보다는 가수분해 단계에서 특히, *F. succinogenes* 배양액의 첨가량이 증가할수록 메탄의 생성량을 증가시킴을 알 수 있었다. 그러므로 본 연구에서는 Kim et al. (2012)의 연구에서 이용된 기질인

셀룰로오스를 대신하여 실제 혐기소화에서 유기성 기질로 이용되는 양돈 슬러리를 이용하고 BMP분석시 각 미생물배양액을 첨가하였을 때 메탄생산량의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

시험재료 본 연구에서는 혼합 메탄균 (methanogens)과 반추위 혐기성 분해균 배양액의 투입이 혐기소화시 메탄발생량에 미치는 영향을 평가하기 위하여 7,000두 규모의 돼지농장 (안성, 일죽)에서 배출되는 양돈 슬러리 (TS, 80.53 g L⁻¹; VS, 58.94 g L⁻¹)를 사용하였다. 혼합 메탄균 (methanogens)은 초산이용메탄균을 위한 선택배지에서 배양하였으며, 혐기성 분해균은 반추위 내 대표적인 혐기성 혐기성 분해균인 *Fibrobacter succinogenes* H23 (KCTC 15118), *Ruminococcus albus* Hungate (ATCC 27211) 및 *Ruminococcus flavefaciens* sijpesteijn (ATCC 19208)을 시험에 사용하였다. 혼합 메탄균의 배양은 Angelidaki et al. (1990)이 제시한 BMP용 메탄균 배지를 참고하여 Table 1과 같이 초산이용메탄균을 선택배양 할 수 있게 변형하여 사용하였으며, 반추위 혐기성 분해균의 배양은 Table 2와 같이

Table 1. Composition of the medium for mixed methanogens used in the experiment.

Ingredients	Concentration (in 1,000 mL)
Solution A [†]	10.0 mL
Solution B [‡]	2.0 mL
Solution C [§]	1.0 mL
Solution D [¶]	1.0 mL
Rumen fluid [‡]	300.0 mL
Distilled H ₂ O	686.0 mL
Sodium acetate	4.1 g
Cysteine-HCl	0.5 g
NaHCO ₃	2.6 g

[†]was made with NH₄Cl 100 g, NaCl 10 g, MgCl₂·6H₂O 10 g, and CaCl₂·2H₂O 5 g in 1 L D.W.

[‡]was made with K₂HPO₄·3H₂O 200 g in 1 L D.W.

[§]was made with FeCl₂·4H₂O 2 g, H₃BO₃ 0.05 g, ZnCl₂ 0.05 g, CuCl₂·2H₂O 0.038 g, MnCl₂·4H₂O 0.05 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.05g, AlCl₃ 0.05 g, CoCl₂·6H₂O 0.05 g, NiCl₂·6H₂O 0.092 g, ethylenediaminetetraacetate 0.5 g, concentrated HCl 1 mL, and Na₂SeO₃·5H₂O 0.1 g in 1 L D.W.

[¶]was made with biotin 2 mg, folic acid 2 mg, pyridoxine hydrochloride 10 mg, riboflavin 5 mg, thiamine 5 mg, nicotinic acid 5 mg, pantothenic acid 5 mg, vitamin B12 0.1 mg, p-aminobenzoic acid 5 mg, and thioctic acid 5 mg in 1 L D.W.

[‡]Rumen fluid was clarified by centrifugation (13,000 x g), autoclaving and recentrifugation to obtain a clear yellow solution.

Table 2. Composition of Dehority's artificial medium.

Ingredients	Concentration (in 100 mL)
Mineral I solution [†]	20.0 mL
Mineral II solution [‡]	20.0 mL
Resazurine [§]	0.1 mL
Vitamin mixture [¶]	1.0 mL
VFA solution [§]	6.7 mL
Hemin solution [‡]	0.1 mL
Cellobiose	0.5 g
Amicase	0.2 g
8% Na ₂ CO ₃	5.0 mL
2.5% Cysteine-HCl	0.1 mL

[†] was made with KH₂PO₄ 4.5g in 1 L D.W.

[‡] was made with CaCl₂ 0.25 g, MgSO₄ 0.25 g, NaCl 4.5 g, MnSO₄·H₂O 0.10 g, FeSO₄·7H₂O 0.10 g, and CoCl₂·6H₂O 0.01 g in 1 L D.W.

[§] was made with resazurine 0.1g in 100 mL D.W.

[¶] was mixed with:

① pyridoxine HCl 0.20 g, riboflavin 0.20 g, thiamine HCl 0.20 g, nicotinic acid amide 0.20 g, Ca-d-pantothenate 0.20 g, para-amino benzoic acid 0.01 g, and stock solution 1.0 mL in 1 L D.W.

② stock solution : folic acid 0.125 g, biotin 0.125 g, cobalamine 0.125 g in 25 mL D.W.

[§] was made with acetic acid 17 mL (2.9 × 10⁻²M), propionic acid 6 mL (8.0 × 10⁻³M), and n-valeric, isovaleric and DL-α-methylbutyric acids, 1 mL each (9 × 10⁻⁴M)

[‡] was prepared dissolving with 50 mg hemin in 1 mL 1N NaOH and made to 100 mL with D.W.

D-(+)-cellobiose (No. C7252, Sigma, USA)를 배지의 0.5% 수준으로 첨가한 배지 (Dehority's artificial (DA) medium; Dehority, 1963)를 이용하였다. 초산이용 메탄균을 선택적으로 배양하기 위해 양돈분뇨를 기질로 하는 혐기소화시설에서 소화액을 채취하여 초산이용메탄균 선택배지에 접종하여 일주일 간격으로 3번 계대배양 한 후 혼합 메탄균 배양액으로 사용하였으며, 각각의 반추위 섬유소 분해균은 DA 배지에서 48시간 배양한 후 그 배양액을 이용하였다. 혼합 메탄균과 섬유소 분해균들은 모두 38°C에서 배양하였다. BMP시험에 배양액을 첨가할 때는 각 균들의 총 균수는 혼합 메탄균, *R. albus*, *R. flavefaciens* 및 *F. succinogenes* 각각 6.34, 2.89, 2.98 및 3.18 log cfu mL⁻¹ 이었다.

BMP 시험 시험구의 처리는 멸균증류수를 첨가한 대조구 (Control)와 각각의 미생물 배양액을 첨가한 혼합 메탄균 첨가구 (M), *F. succinogenes* 첨가구 (FS) *R. flavefaciens* 첨가구 (RF), *R. albus* 첨가구 (RA) 및 RA+FS 혼합첨가구 (RA+FS) 와 M+RA+FS 혼합 첨가구 (M+RA+FS)로 총 7개 처리구로 각 처리구별 3반복으로 진행하였다. 미생물 배양액의 첨가량은 식중액과 양돈슬러리에 1% (0.5 mL), 3% (1.5 mL) 및 5% (2.5 mL) 씩 첨가 하였으며, RA+FS와

M+RA+FS 혼합 첨가구는 미리 멸균하여 준비한 50 mL serum bottle에 각 미생물의 배양액을 10 mL씩 동일 량을 혼합한 후 첨가용 배양액으로 사용하였다. 양돈슬러리 메탄 생산퍼텐셜은 회분식 혐기반응기를 이용하여 38°C에서 60일간 배양하였다 (Hansen et al., 2004). 식중액은 양돈분뇨와 음식물 통합혐기소화 시설의 혐기소화조에서 소화액을 채취한 후 8일간 38°C에서 혐기 배양시키고, 잔여가스를 제거한 후 시험에 공시하였다. 메탄 생산 퍼텐셜의 측정을 위한 회분식 혐기반응기는 120 mL serum bottle을 이용하였으며, 반응기질인 양돈 슬러리를 VS 기준 2 g L⁻¹ 로 (Owen et al., 1979) 정량하여 투입하고 식중액인 혐기소화액을 각 회분식 반응기에 5 mL 씩 접종하였으며, 여기에 각 처리에 따라 미생물 배양액을 첨가하였다. 이러한 과정은 모두 산소를 차단하기 위해 질소가스로 충전 하면서 혐기적 조건에서 수행하였다. 배양기간 중 주기적으로 바이오가스 생산량과 바이오가스 성상을 측정하였으며, 1일 1회 흔들어서 반응을 교반하였다.

분석방법 메탄가스발생량 측정을 위한 회분식 혐기반응기의 가스발생량은 수주차식 가스측정기를 이용하여 측정하였다 (Beuvink et al., 1992; Williams et al, 1996). 가스의 성분분석은 발생가스 중 5 mL를 가스포집용 주사기로 채취하여 TCD (Thermal conductivity detector)가 장착된 가스크로마토그래피 (GC2010, Shimadzu, Japan)를 이용하였다. 가스성분은 CO₂, H₂ 및 CH₄를 분석하였으며, GC의 조건은 주입부 (Injector) 150°C, 컬럼부 (Column) 90°C, 검출부 (Detector) 200°C이었으며, 분석용 column은 packed column (Shincarbon ST 50/80, Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 이동상 (Carrier gas)으로는 He 가스를 사용하였다. BMP 시험 전과 후 배양액의 성상을 조사하기 위하여, pH, TS 및 VS를 APHA (1998)의 standard methods에 따라 분석하였다.

통계분석 TS 및 VS의 분해율, 소화액의 pH와 총누적 바이오가스 및 메탄가스의 발생량에 대하여 미생물 처리간 3반복의 data를 수집하여 SAS package (SAS, 1999)를 이용하여 분산분석 (general linear model (GLM) procedure)을 실시하였으며, 평균간 차이는 Duncan (1955)의 다중검정법에 의해 95% 유의수준으로 분석하였다.

결과 및 고찰

메탄 발생량 Table 3에서 BMP 시험 60일 동안 양돈슬러리를 기질로 하여 혐기배양을 하였을 때 혼합 메탄균과 혐기성 섬유소 분해균 배양액의 첨가량에 따른 총 바이오가스 발생량을 나타내었다. 1% 미생물 배양액을 첨가하였을

Table 3. Effects of supplementary levels of the cultures of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on cumulative biogas production (mL) in the BMP assay using pig slurry as a substrate and anaerobic digestate as inoculum during an incubation period of 60 days at 38°C.

Treatment	Supplementation levels (of total volume)			SEM
	1%	3%	5%	
	----- mL -----			
Control	129.2 ^j	129.7a ^j	127.1b	0.89
M [†]	127.1	131.3a	134.4ab	1.99
FS [‡]	131.0	133.6a	135.7ab	1.17
RF [§]	127.0	132.2a	137.4a	2.15
RA [¶]	125.5	131.7a	133.6ab	1.69
RA+FS	125.9B	127.0abB	137.8aA	2.37
M+RA+FS	123.5	124.3b	132.0ab	2.25
SEM [§]	0.96	1.06	1.17	

[†]Mixed methanogens

[‡]*Fibrobacter succinogenes*

[§]*Ruminococcus flavefaciens*

[¶]*Ruminococcus albus*

[§] Standard error of means

^j Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

^{||} Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

때 모든 처리구간에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 3%의 미생물 배양액을 첨가하였을 때는 대조구 (Control), M (혼합 methanogens 첨가구), FS (*Fibrobacter succinogenes* 첨가구), RF (*Ruminococcus flavefaciens* 첨가구) 및 RA (*Ruminococcus albus* 첨가구) 에서 M+RA+FS (혼합 methanogens, *R. albus*와 *F. succinogenes* 혼합첨가구) 에 비하여 유의적으로 높은 총가스발생량을 나타내어 ($p < 0.05$), 3% 미생물배양액을 첨가하여도 총가스발생량 증가에는 효과를 보이지 않았다. 하지만 5% 첨가구에서는 RF와 RA+FS (RA+FS 혼합첨가구) 가 대조구에 비하여 8.1 및 8.4%로 가스발생량이 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 비록 통계적으로 유의한 차이는 없었지만 M, FS, RA 및 M+RA+FS 5% 첨가구들도 대조구에 비하여 높은 가스발생량을 나타내었다. 각 처리별 첨가수준에 따른 효과를 검토한 결과 RA+FS 만이 유의적으로 첨가수준에 반응하여 가스발생량이 증가하였으나 ($p < 0.05$), 대조구를 제외한 모든 미생물배양액 첨가구들에서 첨가수준의 증가에 따른 가스발생량이 증가하는 경향을 나타내었다.

본 실험은 섬유소 분해력이 강력한 미생물을 바이오가스 생산을 위한 BMP시험에 첨가하면 바이오가스 생산 및 메탄 생산량을 증가시키는 지를 조사하기 위해 1차로 cellulose를 기질로 하여 순수기질의 이용시 가스발생량에 대한 조사가 Kim et al. (2012)에 의해 수행되었고, 2차로 현장에 이용할 수 있는 결과를 도출하기 위해 양돈 슬러리를 기질로하여

동일한 미생물들을 이용하여 BMP시험이 수행되었다. 본 실험에서 미생물 혼합첨가구 중 *R. albus*와 *R. flavefaciens*를 혼합한 첨가구가 없는 이유는 *R. albus*가 생산하는 성장억제물질에 의해 *R. flavefaciens*이 억제받기 때문에 본 실험의 처리구에서는 제외하였다 (Odenyo et al., 1994).

양돈 슬러리를 기질로 한 BMP시험에서 메탄생성균과 섬유소분해박테리아 배양액을 첨가한 본 실험의 결과는 cellulose를 기질로하여 같은 방법으로 실험을 수행하였을 때 1% 미생물배양액 첨가의 경우 Control이 FS, RA, RA+FS 및 M+RA+FA에 비하여 높은 가스 발생량을 나타내었던 것 (Kim et al., 2012) 과는 다른 결과를 나타내었다. 그리고 5% 미생물배양액을 첨가하였을 때는 이들 첨가제의 효과가 가스발생량을 증가시키는데 뚜렷하게 나타났으며, cellulose기질을 사용하였을 때보다도 대부분의 미생물배양액 첨가구에서 가스발생량을 증가 시켰다. 양돈 슬러리에서 있어서 cellulose기질에 비해 대조구보다 더 높은 가스발생량에 미치는 효과는 cellulose기질을 이용하는 경우에는 순수한 탄소공급만을 하였던 반면 비록 난분해성의 물질을 포함하고 있는 돼지분뇨내에 탄소, 질소 공급원과 또한 다양한 무기물을 포함하여 (Kim et al., 2011) 발효에 필요한 다양한 영양소를 고루 공급함으로써 첨가된 미생물배양액의 효과를 더욱 가중시킨 것으로 생각된다. 또한 Kim et al. (2012)에서의 총배양시간이 40일이었던 것에 비하여 본 실험의 배양기간은 60일로 난분해성 성분이 충분히 발효될 수 있는 채류시간이 길어져 증가된 발효산물들을 이용하여 메탄가스의 발생이 증가될 수 있어 미생물처리구의 효과가 총 가스발생량을 증가시킨 것으로 생각된다. 또한 Kim et al. (2012)의 실험에서는 5% FS가 가장 가스발생량을 증가시킨 반면 본 실험에서는 5% RF와 RA+FS가 가장 높은 가스발생량을 나타내어 기질 및 배양조건에 따라 첨가되는 미생물의 가스발생에 미치는 효과가 다를 수 있었다.

Table 4에서 BMP 시험 60일 동안 양돈슬러리를 기질로 하였을 때 혼합 메탄균과 혐기성 섬유소 분해균 배양액의 첨가량에 따른 누적 메탄가스발생량을 제시하였다. 1%의 미생물배양액을 혐기소화 반응기에 첨가하였을 때는 총 가스발생량에서와 같이 처리구와 대조구간에 차이가 없었다. 3% 미생물배양액 첨가 때부터 효과가 나타났는데 3% FS가 M+RA+FS에 비하여 유의적으로 높은 메탄가스발생량을 나타내었다 ($p < 0.05$). 5% 미생물배양액 첨가시 3% 첨가에서는 경향을 보이던 것이 대조구에 대하여 모든 미생물배양액 첨가구에서 유의적으로 메탄가스발생량을 증가시켰다 ($p < 0.05$). 대조구에 대하여 5%의 M, FS, RF, RA, RA+FS, 및 M+RA+FS RF가 각각 12.1, 12.6, 17.3, 13.7, 17.9 및 14.7%로 메탄가스발생량을 증가시켰다. 특히, 총가스발생량의 결과에서와 유사하게 5% RF와 RA+FS가 가장 높은 메탄가스 발생량을 나타내었다. 이러한 메탄 발생량의 증가는 결국

Table 4. Effects of supplementary levels of the cultures of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on cumulative methane production (mL) in the BMP assay using pig slurry as a substrate and anaerobic digestate as inoculum during an incubation period of 60 days at 38°C.

Treatment	Supplementation levels (of total volume)			
	1%	3%	5%	SEM
	----- mL -----			
Control	56.2	58.8ab ^f	57.1b	0.87
M [†]	57.5	60.2ab	64.0a	1.48
FS [‡]	60.0	64.0a	64.3a	0.94
RF [§]	57.7B	62.3abAB	67.0aA	1.63
RA [¶]	58.4	61.4ab	64.9a	1.32
RA+FS	58.8B	59.7abAB	67.3aA	1.75
M+RA+FS	58.6	56.8b	65.5a	1.81
SEM [§]	0.68	0.79	0.96	

[†]Mixed methanogens

[‡]*Fibrobacter succinogenes*

[§]*Ruminococcus flavefaciens*

[¶]*Ruminococcus albus*

[§] Standard error of means

^f Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

^{||} Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

총 바이오가스 발생량과 상관관계가 있으며, cellulose 기질을 이용하였을 때와는 달리 양돈 슬러리를 이용하였을 때는 가수분해단계와 메탄생성 단계 모두에 미생물배양액의 첨가효과가 있음을 나타내고 있다. 섬유소분해균의 배양액 모두가 메탄가스 발생을 증가시킨 것은 순수 cellulose를 기질로 한 Kim et al. (2012)의 실험과는 달리 곡물을 위주로 섭취한 돼지의 분해 조성유 (cellulose, hemicellulose 및 lignin 등)와 조회분 (무기물)의 함량이 19.7% 및 6.0%로 (Canh et al., 1997)로 섬유소분해균들이 이용할 수 있는 영양소가 다양하고 또한 섬유질의 종류가 cellulose 이외에도 hemicellulose가 있으며, 특히 lignin은 BMP시험에서 메탄생성의 중요한 예측인자로 알려져 있다 (Triolo et al., 2011). 이와 같이 섬유질의 구조 등도 다르기 때문에 섬유소를 분해하는 미생물들의 분해특성이 다르기 때문에 모든 섬유소분해균들이 다양한 휘발성지방산 (VFA)와 H₂를 생산하여 메탄을 증가시키는 데 관여한 것으로 생각된다. *F. succinogenes*, *R. flavefacience* 및 *R. albus* 는 전분, xylan 및 cellulose와 같은 다당류를 소화 시켜 (Bryant et al., 1958), 초산 (acetic acid), 숙신산 (succinic acid), 개미산 (formic acid), H₂, 에탄올 및 젖산 (lactic acid)을 생성한다 (Ayers, 1959; Dehority, 2003). 이들 발효산물 중 actate, formate 및 H₂를 기질로 하여 메탄생성균들이 메탄을 생성함으로 메탄발생량을 대조구보다 증가시킬 수 있었던 것으로 생각된다. 특히, 본 실험

Table 5. Effects of supplementary levels of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on total solid digestion efficiency (%) in the BMP assay using pig slurry as a substrate during an incubation period of 60 days at 38°C.

Treatment	Supplementation levels (of total volume)			
	1%	3%	5%	SEM
	----- % -----			
Control	28.1ab ^f	25.7	28.8a	1.45
M [†]	29.5a	26.9	25.3ab	1.25
FS [‡]	24.4bc	29.1	23.6ab	1.58
RF [§]	21.8c	21.8	23.7ab	0.88
RA [¶]	23.1c	25.4	21.3b	1.00
RA+FS	19.9c	20.7	21.3b	0.45
M+RA+FS	20.1c	20.5	21.6b	0.79
SEM [§]	0.88	1.05	0.78	

[†]Mixed methanogens

[‡]*Fibrobacter succinogenes*

[§]*Ruminococcus flavefaciens*

[¶]*Ruminococcus albus*

[§] Standard error of means

^f Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

험에서는 메탄생성균의 배양액을 첨가하였을 때도 대조구에 비해 높은 메탄가스 발생량을 나타내어 가수분해단계 뿐만 아니라 메탄생성단계에서 메탄균의 첨가가 메탄생성을 증가시킬 수 있음을 나타내었다. 그러므로 양돈 슬러리를 이용한 혐기소화에서 순수한 기질을 이용하는 것 보다 난분해성 물질을 소화하고 메탄을 발생시키는 데에 본 실험에서 이용된 미생물들의 효과가 더 높음을 알 수 있다.

TS 및 VS 분해율 BMP 시험 시작 전과 종료 후 반응기 내 TS량을 조사하여 각 처리구별 TS 분해율을 Table 5에 나타내었다. 1% 미생물 배양액을 첨가하였을 때 M이 Control과 FS를 제외하고 다른 미생물 배양액 첨가구보다 유의적으로 높은 분해율을 나타내었다 ($p < 0.05$). 3%의 미생물 배양액 첨가를 하였을 때는 FS에서 TS분해율이 가장 높은 경향을 보였지만 처리구간 유의한 차이는 없었다. 5% 미생물 배양액을 첨가하였을 때는 Control이 RA, RA+FS 및 M+RA+FS에 비하여 유의적으로 높은 TS분해율을 나타내었다 ($p < 0.05$). 전반적으로 미생물 배양액의 첨가량이 증가하더라도 TS분해율은 모든 처리구에 있어서 차이가 없었다. 전반적으로 BMP 시험 배양동안 양돈 슬러리를 기질로 하였을 때 TS분해율은 모든 처리에서 19.9% ~ 29.5%로 상당히 낮은 분해율을 보였다. 이러한 이유는 본 실험에서는 난분해물질에 대한 분석자료를 제시하지 못하였으나, 사용된 기질내에 난분해물질이 상당히 많이 있음을 지시하고 있다.

Table 6에 메탄생성균 및 섬유소분해균 배양액의 첨가 및 첨가수준에 따른 VS분해율을 나타내었다. 각 미생물배

Table 6. Effects of supplementary levels of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on volatile solid digestion efficiency (%) in the BMP assay using cellulose as a substrate during an incubation period of 60 days at 38 °C.

Treatment	Supplementation levels (of total volume)			
	1%	3%	5%	SEM
	----- % -----			
Control	42.2	44.3a ^f	45.1a	2.13
M [†]	43.9	45.1a	42.8ab	1.84
FS [‡]	42.1	44.7a	42.2ab	1.09
RF [§]	47.1	40.6ab	44.4ab	1.50
RA [¶]	42.3	46.7a	40.3ab	1.39
RA+FS	39.9	41.7ab	38.6ab	0.85
M+RA+FS	41.6	36.8b	37.2b	1.28
SEM [§]	1.16	1.02	0.87	

[†]Mixed methanogens

[‡]*Fibrobacter succinogenes*

[§]*Ruminococcus flavefaciens*

[¶]*Ruminococcus albus*

[§] Standard error of means

^f Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

양액 첨가수준별 VS분해율은 TS분해율과 유사한 경향을 나타내었다. 1% 미생물 배양액을 첨가하였을 때 VS분해율의 범위는 39.9%~43.9%로 처리구별 유의한 차이는 없었다. 그러나 3% 미생물 배양액을 첨가하였을 때는 Control, M, FS 및 RA가 M+RA+FS에 대하여 20.4, 22.6, 21.35 및 13.3%로 VS분해율이 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 5% 첨가구에서는 Control 만이 M+RA+FS에 대하여 유의적으로 높은 VS분해율을 나타내었다($p < 0.05$). 본 BMP시험결과 전체 처리구에 있어 최대 유기물의 분해율은 3% RA에서 46.7%로 나타났다.

1970년대 후반부터 *in vitro* 가스발생량의 측정은 섬유질의 소화율 및 발효특성을 결정하는 중요한 인자로 알려지게 되었다 (Theodorout et al., 1994; Theodorout et al., 1998). 그러나 본 실험에서는 TS 및 VS 분해율이 총 바이오가스 발생량과 메탄발생량과는 상관관계가 있지 않았다. 이러한 가스발생량을 분석하는 방법은 시험에 이용된 시료의 발효 속도와 정도에 대한 자료를 제공할 수 있지만, 그 결과는 이용되는 시료에 따라 달라질 수도 있다 (Rymer and Givens, 2002). VS의 감소율은 일반적으로 양돈슬러리에 있어서 40~60% 정도로 알려져 있다 (Andreadakis, 1992; Hashimoto, 1984; Hill and Bolte, 1984; Iannotti et al., 1979; Safley and Westerman, 1990). 이러한 값들은 주로 돼지에게 급여되는 사료의 성분과 소화율에 따라 다를 수 있다. Iannotti et al. (1979)는 혐기소화조에 이용되는 양돈슬러리와 소화액에 대한 분석을 수행하였으며, 주요성분은 탄수화물이며 그 다음으로 단백질, 지질 및 리그닌 성분이라고 하였으며

난분해성 물질인 리그닌이 혐기적 분해에 저해물질일 뿐만 아니라 cellulose와 같은 다른 성분의 이용성을 감소시키는 주요한 성분이라고 하였다. Stanogias et al. (1985)은 여러 종류의 섬유질 사료 (연맥피, 옥수수피, 루핀피, 옥수수숙대, 대두피, 밀기울, 알팔파줄기 및 알팔라 잎)를 급여한 후 배설된 돼지의 분뇨를 이용하여 혐기소화를 실시하였을 때, VS분해율이 알팔파잎을 급여한 경우에는 45%이었으나, 옥수수피를 급여한 사료에서는 80.4%로 상당한 차이가 있음을 지적하였다. 이와 같이 본 실험에서 모든 처리구에서 낮은 TS 및 VS분해율을 보였던 것은 급여한 사료로부터 난분해성 물질이 많이 포함되었기 때문으로 생각된다.

최종 pH 변화 혐기소화 과정에서 pH는 매우 중요한 인자가 된다. 특히 혐기소화를 통하여 메탄생성균의 점유율을 높이기 위해서는 pH 6.0~8.0 정도를 유지해야 하고, pH 6.0 이하가 되면 메탄생성균에 있어 독성작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Speece, 1996). Table 7은 60일 시험종료시점에서 측정된 각 처리구별 pH 값을 제시하였다. 전체 배양액첨가수준에 따라 큰 차이는 없었으며 그 범위는 7.527~7.657이었다. 1% 배양액 첨가에서는 RA+FS 및 M+RA+FS가 7.630 및 7.657로 Control, M, 및 FS에 비하여 유의적으로 높았으나 ($p < 0.05$), 다른 처리구에 대하여는 차이가 없었다. 본 BMP시험에서는 최종 측정된 pH의 범위가 혐기소화과정의 적정 pH범위내에 포함되어 pH에 의한 미생물들의 성장

Table 7. Effects of supplementary levels of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on the final pH in the BMP assay using pig slurry as a substrate during an incubation period of 60 days at 38 °C.

Treatment	Supplementation levels (of total volume)			
	1%	3%	5%	SEM
Control	7.527c ^f	7.527b	7.537d	0.0024
M [†]	7.560bc	7.590a	7.597c	0.0083
FS [‡]	7.550c	7.580a	7.610bc	0.0165
RF [§]	7.620ab	7.627a	7.613abc	0.0060
RA [¶]	7.617ab	7.607a	7.617abc	0.0055
RA+FS	7.630aAB ^{ff}	7.613aB	7.650aA	0.0063
M+RA+FS	7.657a	7.630a	7.640ab	0.0114
SEM [§]	0.0117	0.0088	0.0084	

[†]Mixed methanogens

[‡]*Fibrobacter succinogenes*

[§]*Ruminococcus flavefaciens*

[¶]*Ruminococcus albus*

[§] Standard error of means

^f Means in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

^{ff} Means in the same row with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

을 억제할 수준은 아니었음을 알 수 있었다. 또한 전반적으로 처리간 pH의 변화가 TS 및 VS분해율의 변화양상과 유사한 경향을 나타냈다. 혐기소화시 배양초기에는 휘발성 지방산의 생성에 의해 pH가 감소할 수 있지만 배양시간이 5일 이상 진행되면 메탄생성균들이 휘발성지방산 특히 acetic acid를 급속히 이용하기 시작하기 때문에 배양액의 pH가 증가되고 안정화 될 수 있다 (Gerardi, 2003).

본 실험은 양돈 슬러리를 이용하여 혐기소화를 실행하였을 때 메탄생성균 및 혐기성 섬유소 분해균의 첨가가 메탄가스의 발생량을 증가시킬 수 있는지를 조사하고자 수행되었다. 국내 가축분뇨처리중 가장 문제가 되고 있는 양돈 슬러리를 이용하여 메탄생성에 관여하는 주요 미생물들을 첨가하였을 때 메탄생성에 효과가 있을 것이라는 가설하에 BMP시험이 수행되었다. 결론적으로 회분식 배양에서 5% 메탄생성균 배양액과 섬유소분해균 배양액 및 이들 혼합배양액 모두에서 메탄발생량을 증가시켜 cellulose를 기질로 한 실험 (Kim et al., 2012) 에서 *F. succinogenes* 배양액의 첨가량이 증가할수록 메탄의 생성량을 증가시킴으로 가수분해단계가 중요하였으나, 본 실험에서는 양돈 슬러리의 성분특성으로 인해 가수분해단계와 메탄생성단계 모두에 첨가한 미생물 배양액이 효과가 있었다. 그러나, 5% 첨가수준을 제외하고 낮은 첨가수준에서는 첨가효과가 나타나지 않았다. 본 연구는 단순한 회분식 배양시험이기 때문에 앞으로 연속 혐기소화과정에서 미생물 첨가의 효과에 대한 연구와 또한 각 첨가된 미생물 배양액내 어떠한 인자가 영향을 미쳤는지에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 메탄생성에 직접적으로 관여하는 혼합 메탄균과 셀룰로스 등의 고분자 물질의 가수분해 반응에 활성이 뛰어난 반추위 내 혐기성 섬유소분해균 중에서 대표적인 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* 및 *Ruminococcus albus*를 biochemical methane potential (BMP) 시험에 첨가하였을 때 메탄 발생에 미치는 영향을 조사하고자 수행되었다. BMP시험은 멸균증류수를 첨가한 control과 각각의 미생물 배양액을 첨가한 혼합 메탄균 첨가구 (M), *F. succinogenes* 첨가구 (FS) *R. flavefaciens* 첨가구 (RF), *R. albus* 첨가구 (RA) 및 RA+FS 혼합첨가구와 M+RA+FS 혼합 첨가구로 총 7개 처리구로 각 처리구별 3반복으로 진행되었다. 미생물 배양액의 첨가량은 식종액과 양돈슬러리에 1% (0.5 mL), 3% (1.5 mL) 및 5% (2.5 mL) 씩 첨가 하였다. BMP 시험을 위해 60일간 배양이 지속되었고 증온소화를 위해 38°C의 배양기에서 수행되었다. 실험의 결과 총 바이오가스 발생량은 5% RF와 RA+FS가 대조구에

비하여 8.1 및 8.4%로 가스발생량이 유의적으로 높았다 ($p < 0.05$). 메탄발생량은 3% 미생물 배양액 첨가구 중 M+RA + FS를 제외하고 대조구에 비하여 증가시키는 경향을 보였으며, 5% 배양액을 첨가하였을 때는 대조구에 대하여 5%의 M, FS, RF, RA, RA+FS, 및 M+RA+FS RF가 각각 12.1, 12.6, 17.3, 13.7, 17.9 및 14.7%로 메탄가스발생량을 증가시켰다 ($p < 0.05$). TS 및 VS 분해율은 가스발생량과는 관계 없이 모든 처리구에서 미생물 배양액의 첨가량이 증가하더라도 차이가 없었다. BMP 종료시 배양액내 pH는 모든 처리구가 7.527~7.657의 범위로 메탄발효에 큰 영향을 주지 않았다. 결론적으로, 본 실험에서는 양돈 슬러리의 성분특성으로 인해 가수분해단계와 메탄생성단계 모두에 첨가한 미생물 배양액이 효과가 있었으나, 5% 첨가수준을 제외하고 낮은 첨가수준에서는 첨가효과가 나타나지는 않았다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (과제번호: PJ00750 2042011)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

- Andreadakis, A.D. 1992. Anaerobic digestion of piggery wastes. *Wat. Sci. Technol.* 25:9-16.
- Angelidaki, I., S.P. Petersein, and B.K. Ahring. 1990. Effects of lipids on thermophilic anaerobic digestion and reduction of lipid inhibition upon addition of bentonite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:469-472.
- Angelidaki, I. and B.K. Ahring. 2000. Methods for increasing the biogas potential from the recalcitrant organic matter contained in manure. *Water Sci. Technol.* 41:189-194.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. (20th ed.) American Public Health Association, Washington, DC, USA.
- Ayers, W.A. 1959. Phosphorolysis and synthesis of cell by cell extracts from *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Biol. Chem.* 234:2819-2822.
- Beuving, J.M., S.F. Spoelstra, and R.J. Hogendrop. 1992. An automated method of measuring the time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. *Neth. J. Agri. Sci.*, 40:401-407.
- Bonmati A., X. Flotats, L. Mateu, and E. Campos. 2001. Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Water Sci. Technol.* 44:109-116.
- Bryant, M.P., N. Small, C. Bouma, and I.M. Robinson. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and

- fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* 41:1747-1767.
- Canh, T.T., M.W. Verstegen, A.J. Aarnink, and J.W. Schram. 1997. Influence of dietary factors on nitrogen partitioning and composition of urine and feces of fattening pigs. *J. Anim. Sci.* 75:700-706.
- Clemens, J., M. Trimborn, P. Weiland, and B. Amon. 2006. Mitigation of greenhouse gas emissions by anaerobic digestion of cattle slurry. *Agri. Ecosyst. Environ.* 112:171-177.
- Danish Energy Agency. 1992. Update on centralized biogas plants.
- Dehority, B.A. 1963. Isolation and characterization of several cellulolytic bacteria from *in vitro* rumen fermentations. *J. Dairy Sci.* 46:217-222.
- Dehority, B.A. 2003. *Rumen microbiology*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrics.* 11:1.
- Gerardi, M.H. 2003. *The microbiology of anaerobic digesters*. John Wiley & Sons, Inc., New York, USA.
- Gijen, H.J., K.B. Zwart, P.T. van Gelder, and G.D. Vogels. 1986. Continuous cultivation of rumen microorganisms, a system with possible application to the anaerobic degradation of lignocellulosic waste materials. *Appl. Micro. Biotech.* 25:155-162.
- Hansen, T.L., J.E. Schmidt, I. Angelidaki, E. Marca, J. Cour Jansen, H. Mosbæk, and T.H. Christensen. 2004. Method for determination of methane potentials of solid organic waste. *Waste Manage.* 24:393-400.
- Hashimoto, A.G. 1984. Methane from swine manure: effect of temperature and influent substrate concentration on kinetic parameter (*k*). *Ag. Wastes*, 9:299-308.
- Hill, D.T. and J.P. Bolte. 1984. Characteristics of screened-flushed swine waste as a methane substrate. 1984 ASAE Conference, June 24-27, 1984. University of Tennessee, Knoxville, TN. ASAE. 1-20.
- Iannotti, E.L., J.H. Porter, J.R. Fischer, and D.M. Sievers. 1979. Changes in swine manure during anaerobic digestion. *Developments in Industrial Microbiology*, 209: 519-529.
- Kim, S.H., C.H. Kim, and Y.M. Yoon. 2011. Bioenergy and material production potential by life cycle assessment in swine waste biomass. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(6): 1245-1251.
- Kim, J.A., Y.M. Yoon, and C.H. Kim. 2012. Effects of supplementation of mixed methanogens and rumen cellulolytic bacteria on biochemical methane potential. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 45(4): 515-523.
- Lawrence, A.W. and P.L. McCarty. 1967. Kinetics of methane fermentation in anaerobic waste treatment. Technical report No. 75. Stanford, California, USA.
- Leslie Grady, C.P., G.T. Daigger, and H.C. Lim. 1999. *Biological Wastewater Treatment* (2nd ed). p. 599-604. Marcel Dekker, Inc., NY, USA.
- Lettinga, G. 2001. Digestion and degradation, air for life. *Water Sci. Technol.* 44: 157-176.
- Muller, H.W. and W. Trosch, 1986. Screening of white-rot fungi for biological pretreatment of wheat straw for biogas production. *Appl. Micro. Biotech.* 24:180-185.
- Odenyo, A.A., R.I. Mackie, and B.A. White. 1994. The use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to study competition between ruminal fibrolytic bacteria: pure-culture studies with cellulose and alkaline peroxide-treated wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3697-3703.
- Owen, W.P., D.C. Stuckey, J.B. Healy, L.Y. Young, and P.L. McCarty. 1979. Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. *Water Res.* 13:485-492.
- Rymer, C. and D.I. Givens. 2002. Relationships between patterns of rumen fermentation measured in sheep and *in situ* degradability and the *in vitro* gas production profile of the diet. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 101:31-44.
- Safley, L.M., Jr. and P.W. Westerman. 1990. Psychrophilic anaerobic digestion of animal manure: Proposed design methodology. *Biol. Wastes.* 34:133-148.
- SAS. 1999. *Statistical Analysis Systems User's Guide*. (8th ed.) SAS Institute Inc. Raleigh, NC, USA.
- Shin, H.S. Y.C. Song, and K.S. Jun. 1992. Pretreatment processes for enhanced anaerobic digestion of food waste. p. 451-454. In F. Cecchi et al. (ed.) *Proceedings of international symposium on anaerobic digestion of solid waste*. Venice, Italy.
- Speece, R. 1996. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. p. 29-58. Archae Press, Nashville, TN, USA.
- Stanogias, G., M. Tjandraatmadja, and G.R. Pearce. 1985. Effects of source and level of fibre in pig diets on methane production from pig faeces. *Ag. Wastes.* 12:37-54.
- Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 48:185-197.
- Theodorou, M.K., D.R. Davies, B.B. Nilsen, M.I.G. Lawrence, and A.P.J. Trinci. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. p.55-63. E.R. Deaville et al. (ed.) *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. (Occasional publication, No. 22). British Society of Animal Science, UK.
- Triolo, J.M., S.G. Sommer, H.B. Møller, M.R. Weisbjerg, and X.Y. Jiang. 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresour. Technol.* 102:9395-9402.
- van Lier J.B., A. Tilche, B.K. Ahring, H. Macarie, R. Moletta, M. Dohanyo, L.W. Hulshoff Pol, P. Lens, and W.

- Werstraete. 2001. New perspectives in anaerobic digestion. *Water Sci. Technol.* 43:1-18.
- Williams, A., M. Amat-Marco, and M.D. Collins. 1996. Pylogenetic analysis of *Butyrivibrio* strains reveals three distinct groups of species within the *Clostridium* subphylum of gram-positive bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:195-199.
- Yoon, Y.M., C.H. Kim, Y.J. Kim, and H.T. Park. 2009. The economical evaluation of biogas production facility of pig waste. *Korean J. Agri. Management Policy.* 36(1): 137-157.