

음식물 쓰레기를 이용한 3단계 메탄생산 공정의 미생물 다양성

남지현¹ · 김시욱² · 이동훈^{3*}

¹명지대학교 에너지환경융합기술연구소

²조선대학교 환경공학과

³충북대학교 미생물학과

Microbial Diversity in Three-Stage Methane Production Process Using Food Waste

Ji-Hyun Nam¹, Si Wouk Kim², and Dong-Hun Lee^{3*}

¹Energy and Environment Fusion Technology Center, Myongji University, Yongin 449-728, Republic of Korea

²Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea

³Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

(Received June 11, 2012 / Accepted June 26, 2012)

Anaerobic digestion is an alternative method to digest food wastes and to produce methane that can be used as a renewable energy source. We investigated bacterial and archaeal community structures in a three-stage methane production process using food wastes with concomitant wastewater treatment. The three-stage methane process is composed of semianaerobic hydrolysis/acidogenic, anaerobic acidogenic, and strictly anaerobic methane production steps in which food wastes are converted methane and carbon dioxide. The microbial diversity was determined by the nucleotide sequences of 16S rRNA gene library and quantitative real-time PCR. The major eubacterial population of the three-stage methane process was belonging to VFA-oxidizing bacteria. The archaeal community consisted mainly of two species of hydrogenotrophic methanogen (*Methanoculleus*). Family Picrophilaceae (Order Thermoplasmatales) was also observed as a minor population. The predominance of hydrogenotrophic methanogen suggests that the main degradation pathway of this process is different from the classical methane production systems that have the pathway based on acetogenesis. The domination of hydrogenotrophic methanogen (*Methanoculleus*) may be caused by mesophilic digestion, neutral pH, high concentration of ammonia, short HRT, and interaction with VFA-oxidizing bacteria (*Tepidanaerobacter* etc.).

Keywords: archaeal diversity, bacterial diversity, hydrogenotrophic methanogen, three-stage methane production process, VFA-oxidizing bacteria

음식물쓰레기는 가용성 당, 전분질, 지방질, 단백질, 셀룰로오스 등과 같은 고농도의 유기화합물을 함유하고 있는 유기성 폐기물이다. 음식물 쓰레기는 유용 자원임에도 불구하고 대부분 매립 또는 소각 방법으로 처리되기 때문에 부패로 발생하는 악취, 침출수에 의한 수질오염, 님비 현상에 따른 매립장 부족 등의 문제가 발생하고 있다. 생물기질로서의 음식물쓰레기의 활용은 유기성 폐기물의 처리 비용 절감 및 환경오염 방지뿐만 아니라 자원 재순환의 측면에서 큰 의미가 있다. 특히, 음식물 쓰레기를 이용한 메탄발효는 화석에너지를 대체할 수 있는 재생에너지의 생산, 지구온난화 가스 감축 효과 및 자원 재활용의 차원에서 최근 많은 주목을 받고 있다(Kim *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010;

Kongjan *et al.*, 2011).

혐기성 소화(anaerobic digestion)는 음식물쓰레기와 같은 유기성 폐기물로부터 메탄을 생성하는데 이용되는 공정이다. 혐기성 소화는 다양한 혐기성 미생물에 의해 유기물을 단계적으로 분해하여 최종적으로 메탄, 탄산가스, 물 등으로 변화시켜 음식물쓰레기를 안정화시키는 과정으로, 크게 3가지 과정으로 나뉜다. 첫 번째 과정은 가수분해과정으로 미생물이 가진 체내의 효소에 의해 고분자 물질이 저분자 물질로 분해되는 과정이며, 두 번째 과정은 휘발성 유기산(volatile fatty acid; VFA) 및 H₂ 가스로 분해되는 산생성 과정이고, 마지막 세번째 과정은 두번째 과정에서 생성된 산물을 이용하여 메탄을 생성하는 메탄생성 과정으로 이루어져 있다(Briones *et al.*, 2009).

혐기성 소화의 효율은 소화조 내에 분포되어 있는 다양한 미생물들의 대사활동에 의해 좌우되며, 각 단계에 의해 최소한 3종

*For correspondence. E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600

류 이상의 미생물군이 작용한다. 가수분해 과정의 경우 고분자유기물을 분해하고 발효하는 다양한 발효균(hydrolytic fermentative bacteria)에 의해 이루어지며, 산생성 과정의 경우 H_2 의 농도가 낮은 환경에서 lactate, ethanol, propionate, butyrate 등을 메탄생성균(methane-producing archaea)이 이용할 수 있는 acetate와 H_2 로 분해하는 syntrophic acetogenic bacteria (obligate proton reducer)가 작용한다. 메탄생성과정은 acetate를 메탄으로 분해하는 2개 그룹의 acetoclastic methanogen (Methanosarcinaceae, Methanoacetaceae)과 H_2 와 CO_2 를 메탄으로 전환하는 3개 그룹의 hydrogenotrophic methanogen (Methanobacteriaceae, Methanospirillaceae, Methanomicrobiaceae)으로, 총 5개 family의 메탄생성균의 작용에 의해 이루어진다(Bialek et al., 2011). 메탄가스는 산생성균(syntrophic bacteria)과 메탄생성균의 상호작용으로 생성된다. 그러나 이들 두 군집 사이의 대사율 불균형은 산생성 중간물질이 소화조 내에 축적되게 함으로써 메탄생성균의 활성을 저해시킨다(Demirel and Yenigün, 2002). 이와 같은 문제점을 해결하고 효율적으로 메탄을 생산하기 위한 산생성조 및 메탄 생성조의 공간적 분리 방법인 2단계 메탄생성시스템(two-phase system)이 제안되었으며, 각각의 공정을 최적화함으로써 혐기성소화의 효율을 증가시키기 위한 연구가 진행되었다(Demirel and Yenigün, 2002). 이러한 장점에도 불구하고 2단계 메탄생성시스템에 대한 연구는 주로 포도당과 같은 쉽게 분해되는 탄수화물에 대한 것이 주종을 이루었다는 점과 첫번째 과정인 완전 혐기성 산생성 공정의 HRT가 너무 길다는 점 때문에 3단계 메탄생성시스템이 고안되었다(Kim et al., 2002). 한편, 혐기 조건에서 유기물 분해 및 바이오 가스의 생산과 관련된 미생물 군집 구조 및 상호작용에 대한 연구가 부족하여 효율적인 시스템의 개발에 제한점이 되고 있다(Angenent et al., 2002).

본 연구에서는 음식물 쓰레기와 폐수를 동시에 처리하고 가수분해와 산생성 단계, 메탄생성 단계가 분리된 3단계 메탄생성 공정의 주요 미생물 군집을 분자생물학적 방법으로 분석함으로

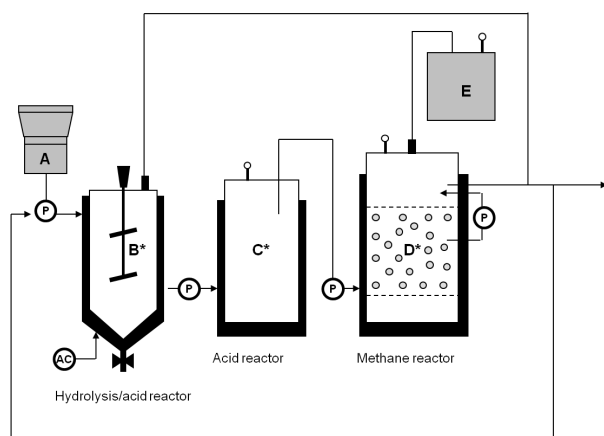


Fig. 1. Schematic diagram of the methane production process consisting of a CSTR hydrolysis/acidogenic reactor and two UASB acidogenic and methanogenic reactors. A, crusher; B, hydrolysis/acid reactor; C, acid reactor; D, immobilized-bed methane reactor; E, gas reservoir tank; P, pump; AC, air compressor, * sampling site.

써 음식물 쓰레기의 자원화 및 에너지 생산 연구에 기여하고자 한다.

재료 및 방법

Pilot plant의 운전 및 분석

3단계 메탄생성 공정은 조선대학교 구내식당의 음식물 쓰레기를 사용하여 CSTR 형태의 반혐기 가수분해/산생성조(200 L)에서 1차 처리한 후 UASB 형태의 혐기성 산생성조(200 L)와 혐기성 메탄생성조(1200 L)에서 각각 2차와 3차 처리되도록 설계되었다(Fig. 1). 반응기의 운전은 반혐기 가수분해/산생성조 2일, 혐기성 산생성조 2일, 혐기성 메탄생성조 12일간의 수리학적 체류시간(hydraulic retention time: HRT)을 거치며 음식물 쓰레기를 처리하도록 운전하였다. 메탄생성 공정을 운전하기 위한 초기 식종원으로 소에서 바로 방출된 신선한 우분과 쓰레기매립장에서 메탄이 방출되는 토양을 사용하였으며 혐기적 조건에서 운반하여 메탄생성조에 주입하였다.

3단계 메탄생성 공정의 메탄생성효율을 조사하기 위해 각각 공정의 pH, total chemical oxygen demand (tCODcr), soluble chemical oxygen demand (sCODcr), biochemical oxygen demand (BOD), 총 질소(TN), 총 인(TP), 암모니아성 질소(NH_3-N), 질산성 질소(NO_3-N)를 Standard method (APHA, 1998)와 수질오염공정시험법(2001)에 따라 분석하였다. 혐기성 소화에서 발생한 VFA 분포 분석은 flame ionization detector (FID)가 부착된 Gas Chromatography (HP-5890, Agilent Technologies, USA)를 이용하였고, 바이오가스 중 메탄가스의 함량은 FID가 부착된 GC-14B gas chromatography (Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다.

미생물군집 분석을 위한 시료는 3년 이상 운전된 200 L의 가수분해/산생성조, 200 L의 혐기성 산생성조와 1200 L의 혐기성 메탄생성조에서 각각 채취하였으며, Miller 등(1999)의 bead beating 방법으로 시료 1 ml에서 핵산을 직접 추출하였다. 추출된 핵산은 QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN, Germany)로 정제하였다. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen-Molecular Probes, USA)를 이용하여 정량 하였으며, genomic DNA는 $-20^{\circ}C$ 에 보관하였다.

Real-time PCR

Eubacteria와 archaea의 16S rRNA 유전자의 정량 분석을 위한 qPCR (Quantitative real-time PCR)은 Table 2에 제시되어 있는 프라이머와 Rotor-Gene Q (QIAGEN, Germany)를 이용하여 수행하였다. 반응액 20 μ l는 iQ™ SYBR® Green SuperMix (Bio-Rad, USA), primer 세트(0.3 μ M), 2 μ l DNA를 포함하였다. qPCR을 위한 온도 조건은 bacteria의 경우 $95^{\circ}C$ 에서 15분간 초기 열처리 한 후, $95^{\circ}C$ 에서 10초, $55^{\circ}C$ 에서 15초, $72^{\circ}C$ 에서 20초씩 40회 반복하였다. Archaea의 경우 $95^{\circ}C$ 에서 15분간 초기 열처리 한 후, $95^{\circ}C$ 에서 10초, $50^{\circ}C$ 에서 15초, $72^{\circ}C$ 에서 20초씩 45회 반복하였다. qPCR의 검량선은 6단계로 10배씩 희석한 plasmid DNA를 이용하였으며, 유전자 copy number는 아래

Table 1. Operational conditions and performance of the pilot scale three-stage methane production process

Parameter	B ^a (first stage)	C ^b (second stage)	D ^c (third stage)
HRT (d)	2	2	12
pH	5.0–5.5	5.0–5.5	7.6–7.9
Temperature (°C)	45	35	41
T-N (g/L)	5.04	4.50	4.10
NH ₃ -N (g/L)	0.18	0.20	1.95
NO ₃ -N (g/L)	0.16	0.18	0.06
T-P (g/L)	0.78	0.67	0.12
COD (g/L)			
tCOD	35.95	34.63	4.23
sCOD	22.97	22.24	3.02
BOD (g/L)	40.27	35.23	2.05
Gas yield (m ³ /kg VS)	-	-	0.65–0.70
Methane yield (m ³ /kg VS)	-	-	0.45–0.50
Gas composition (%)			
CH ₄	-	8.0	71.9
CO ₂	-	82.0	27.9
H ₂	-	10.0	0.2
Volatile acids (g/L)			
Acetic	2.86	5.22	0.39
Propionic	0.14	0.71	0
Butyric	0.21	1.19	0
Valeric	0	0.12	0
Caproic	0.12	0.23	0
Total	3.33	7.47	0.39

^a B, hydrolysis/acid reactor

^b C, acid reactor

^c D, immobilized-bed methane reactor

와 같은 식으로 구하였다.

$$16S\ rRNA\ copies = \frac{DNA\ amount\ (g) \times (6.023 \times 10^{23}\ copy/mol)}{(660\ g/l\ mole/bp) \times DNA\ length(bp)}$$

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

Eubacteria 및 archaea 군집의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 Table 2에 제시되어 있는 프라이머를 사용하였고, PCR 반응물의 조성은 1× 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 µg/ml BSA, pH 8.3), 160 µM dNTPs, 0.3 µM primer, 정제된 DNA (10-15 ng/µl)와 1 unit의 Taq polymerase (HanTaq, Genenmed)를 첨가하여 총 50 µl의 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 95°C에서 3분간 초기 열처리한 후, 95°C에서 30초, eubacteria와 archaea는 각각 49°C와 55°C에서 30초, 72°C에서 1분씩 30회 반복하고, 마지막에는 72°C에서 10분간 처리한 후 반응을 중단시켰다.

Eubacteria와 archaea의 PCR 산물은 1.0% 아가로스젤에서 전기영동 한 후 Power Gel Extraction Kit (TaKaRa, Japan)로 정

제하였으며, pGEM-T vector (Promega, USA)를 이용하여 16S rRNA clone library를 구축하고 시료 당 100개 이상의 재조합 클론을 선별하였다. T-vector의 염기서열에 상보적인 prGTf (5'-TACGACTCACTATAGGGCGA -3')와 16S rRNA의 1492R 및 Arch 958R 프라이머 쌍을 사용하여 direct amplified PCR을 수행하고(Chun *et al.*, 1999), 전기영동으로 PCR 산물의 크기를 확인하여 5'에서 3' 방향으로 삽입된 재조합 클론을 2차 선별하였다. 선별된 재조합 클론들은 T7 (5'-TAATACGACTCACTA TAGGG-3') 프라이머를 이용하여 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)로 염기서열을 분석하였다. Eubacterial 16S rRNA clone library의 경우 1차 반혐기성 가수분해/산발효 조와 2차 혐기성 산생성조, 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 48, 50, 47 클론의 염기서열을 분석하였으며, archaeal 16S rRNA clone library의 경우 2차 혐기성 산생성조와 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 21, 58 클론의 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 유전자의 염기서열은 DDBJ (DNA Data Bank of Japan; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에 등록하였다(accession no.: AB731223-AB731446).

16S rRNA 염기서열의 계통분류학적 분석

시료에서 확인된 16S rRNA 유전자의 염기서열과 Ribosomal Database Project (RDP; <http://rdp.cme.msu.edu>), GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 database로부터 확인된 염기서열을 CLUSTAL X (version 1.83) 프로그램을 이용하여 정렬하였다(Thompson *et al.*, 1997). 정렬된 염기서열은 PHYLIP package (version 3.6a3)를 이용하여 Jukes and Cantor distance model (Jukes and Cantor, 1969)과 neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987)로 염기서열간의 진화적 거리와 계통도를 추론하였다(Felsenstein, 2002). 또한, bootstrap값은 1,000회의 resampled data로부터 계산하였다(Felsenstein, 1985).

결 과

3단계 메탄생산공정의 운영 및 처리효율

3단계 전체 메탄생성 공정의 운전 조건 및 발효효율은 Table 1에 표시하였다. 메탄생산공정의 유입수는 고형유기물의 오염부하가 큰 폐수였으며, tCOD와 sCOD는 1차 반혐기성 가수분해/산생성조에서 각각 평균 35.95 g/L와 22.97 g/L, 2차 혐기성 산생성조에서 각각 평균 34.63 g/L, 22.24 g/L 수준이었다. 3차 혐기성 메탄생성조의 tCOD와 sCOD는 각각 평균 4.23 g/L, 3.02 g/L로 1차와 2차 공정에 비해 고형물의 분해가 대부분 이루어져 tCOD와 sCOD가 현저히 낮음을 확인하였다. 즉, 3단계 메탄생성 공정을 통해 음식물의 tCOD가 88%가 제거되었고, BOD의 경우 95% 제거되었다.

각 반응조에서 생성되는 유기산은 대부분 acetate와 propionic acid, butyric acid로 총 유기산의 농도는 1차 공정의 경우 3.33 g/L, 2차 공정의 경우 7.46 g/L로 산생성 미생물들에 의해 1차 공정보다 2차 공정에서 많은 유기산을 생성하였다. 3차 혐기성 메탄생성조의 경우 1, 2차 공정에 의해 생성된 유기산을 이용하여

Table 2. The 16S rRNA gene primer sets used in this study

Method	Target group	Primer	Sequence (5'→3')	<i>E. coli</i> Numbering	Amplicon size	Annealing temp. (°C)	Reference
Quantitative real-time PCR	Eubacteria	357F	CTACGGGAGGCAGCAG	341–357	194	55	Muyzer et al. (1993)
		517R	ATTACCGCGGCTGCTGG	517–534			
	Archaea	Parch 340F	CCCTACGGGGYGCASCAG	340–357	194	50	
		Parch 519R	TTACCGCGGCKGCTG	519–533			
16S rRNA gene library	Eubacteria	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	8–27	1503	49	Lane (1991)
		1492R	GGYTACCTTGTTACGACTT	1492–1510			
	Archaea	Arch21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	6–25	971	55	
		Arch 958R	YCCGCGGTTGAMTCCAATT	958–976			

메탄을 생성하는 공정이므로 유기산의 양이 현저히 감소하였다. Song 등(2010)이 효율적 혐기성소화 공정이 운영되고 좋은 biogas가 생성될 때의 메탄생성 범위는 70–80%라고 보고한 것과 같이 3차 혐기성 메탄생성조에서 가스발생량 측정결과 평균 0.65–0.70 m³/kg·VS이며 발생가스 중 메탄함량이 72%로 나타났다.

Bacteria와 archaea의 qPCR

안정화 단계의 1차 반혐기성 가수분해/산생성조(CSTR 공정), 2차 혐기성 산생성조와 3차 혐기성 메탄생성조(UASB 공정) 시료에서 eubacteria의 16S rRNA 유전자 copy는 ml당 각각 3.21×10⁷, 8.74×10⁷, 7.28×10⁷으로 조사되었고, archaea의 16S rRNA 유전자 copy는 ml당 각각 2.04×10⁷, 1.83×10⁸, 1.98×10⁸이었다(Fig. 2). 이는 CSTR 공정에 비하여 UASB 공정에서 eubacteria는 약 2배 정도, archaea는 약 9배 정도, 전체 미생물은 약 5배 정도 증가하였다는 것을 의미한다.

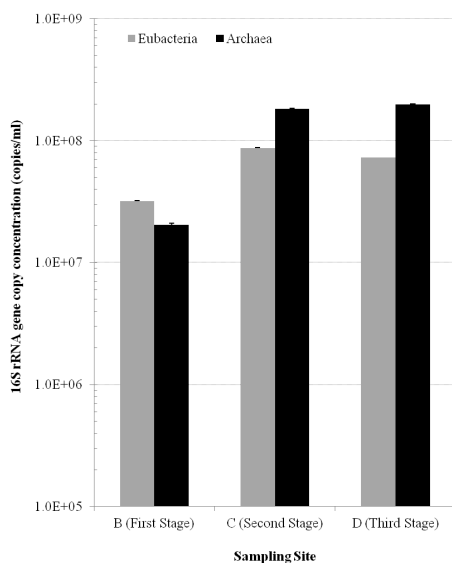


Fig. 2. The quantification of eubacterial and archaeal 16S rRNA genes in the three-stage methane production process. The values of 16S rRNA gene copies were average of the five replicate experiments. Error bars represent standard deviation.

Bacterial 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 군집구조 분석

메탄생성 공정의 3단계 반응조는 Firmicute 문의 Clostridia 강, Bacteroidetes 문의 Bacteroidia 강에 속하는 세균의 염기서열이 각각 10.6–64.7%, 22.0–65.9%로 우점하였고, Proteobacteria와 Thermotogae 그리고 candidate division OP9의 세균 군집도 확인되었다(Table 3).

속(genus) 수준에서 3단계 메탄생성 공정의 세균군집은 Clostridia의 *Anaerobaculum* 속과 Bacteroidia의 *Proteiniphilum* 속이 우점하였다. 1차 반혐기성 가수분해/산생성조의 경우 *Anaerobaculum*과 *Proteiniphilum*과 유연관계가 가까운 세균 군집으로 각각 33.3%를 차지하였고, 2차 혐기성 산생성조의 경우 *Anaerobaculum*과 *Tepidanaerobacter* (Clostridia), *Proteiniphilum*이 각각 20.0%, 16.0%, 14.0%를 차지하였다. 3차 혐기성 메탄생성조에서는 *Proteiniphilum*과 *Anaerobaculum*이 각각 55.3%와 12.8%로 속 수준에서 가장 우점하였다.

1차 반혐기성 가수분해/산생성조와 2차 혐기성 산생성조, 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 33.3%와 20.0%, 12.8%로 우점한 Clostridia 강의 *Anaerobaculum* 속은 pH 5.4–8.7에서 성장하고, tryptone, casamino acid, 유기산, 탄수화물 등을 발효하는 절대 혐기성 고온세균이다(Menes and Muxi, 2002). 유기산과 탄수화물을 이용하여 acetate와 H₂, CO₂를 생성하고 알라닌과 같은 아미노산을 산화하며, 전자수용체로 crotonate와 thiosulfate를 사용하나 sulfate, nitrate, acetate는 사용하지 못한다. 또한, 포도당과 tryptone으로부터 전자를 제공받아 crotonate를 butyrate로 환원하는 *Anaerobaculum* 속의 특징은 2차 혐기성 산생성조에서 butyrate의 농도가 1.19 g/L까지 증가하는 결과와도 일치한다. 메탄생성이 진행되는 2차와 3차 반응기의 *Anaerobaculum* 속 비율의 감소는 발효산물 H₂에 의해 생장이 저해되기 때문으로 생각된다(Rees et al., 1997; Menes and Muxi, 2002).

1차 반혐기성 가수분해/산생성조와 2차 혐기성 산생성조, 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 33.3%와 14.0%, 55.3%로 우점한 CFB group의 *Proteiniphilum* 속은 *P. acetatigenes* 한 종만 보고되어 있다. *P. acetatigenes*은 맥주공장 폐수를 처리하는 UASB 반응조에서 분리되었으며, 20–45°C, pH 6.0–9.7에서 성장하는 단백질 분해세균이다(Chen and Dong, 2005). 펩톤, 글리신, L-아르기닌과 피루브산을 탄소원과 에너지원으로 사용하고, 탄수화물과 알코올, 지방산은 이용하지 못한다. 또한, propionate와

Table 3. Phylogenetic affiliations and compositions of bacterial 16S rRNA gene clone library

Phylum	Class	Genus	B ^a (%)	C ^b (%)	D ^c (%)
Proteobacteria	Alpha	<i>Brevundimonas</i>	-	2.0	-
		<i>Roseobacter</i>	-	2.0	-
	Beta	<i>Alcaligenes</i>	-	2.0	-
		<i>Bordetella</i>	-	-	4.2
		<i>Ralstonia</i>	-	2.0	-
	Gamma	<i>Pseudomonas</i>	-	12.0	-
	Bacteroidetes	Bacteroidia	<i>Proteiniphilum</i>	33.3	14.0
<i>Salagentibacter</i>			-	2.0	-
Uncultured bacterium			-	6.0	10.6
<i>Anaerobaculum</i>			33.3	20.0	12.8
Firmicute	Clostridia	<i>Anaerovorax</i>	-	-	2.1
		<i>Caminicella</i>	2.1	-	-
		<i>Clostridium</i>	8.4	10.0	2.1
		<i>Cryptanaerobacter</i>	6.3	-	-
		<i>Desulfotomaculum</i>	2.1	-	2.1
		<i>Pelotomaculum</i>	8.3	-	4.3
		<i>Syntrophomonas</i>	2.1	-	-
		<i>Tepidanaerobacter</i>	2.1	16.0	-
		<i>Thermophilic</i>	-	2.0	-
Thermotogae	Thermotogae	<i>Petrotoga</i>	-	8.0	4.3
Candidate division OP9			2.1	2.0	2.1

^a B, hydrolysis/acid reactor

^b C, acid reactor

^c D, immobilized-bed methane reactor

butyrate 등을 메탄생성균이 이용할 수 있는 acetate와 H₂로 분해하는 산생성세균 중 propionate 산화세균과 공생하여 propionate의 분해를 가속화시키는 박테리아로 알려져 있다(Chen and Dong, 2005). 따라서, 3차 혐기성 메탄생성조에서 53%로 가장 우점한 *Proteiniphilum* 속은 20.3%를 차지한 Clostridia 강의 syntrophic bacteria들과 상호작용으로 2차 공정에서 생성된 710 mg/L의 propionate 제거와 생성된 acetate와 H₂로부터 메탄생성의 효율 증대에 기여했을 것으로 추정된다.

Clostridium 속은 1차 반혐기성 가수분해/산생성조와 2차 혐기성 산생성조, 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 8.4%와 10.0%, 2.1%를 차지하였다. 중온의 혐기소화조에서 *Clostridium* spp.는 다양한 종의 hydrogenotrophic methanogen과 협력하여 4-11개의 탄소원자로 이루어진 fatty acid를 산화하는 미생물(Schnürer et al., 1996)로 3단계 메탄생성 공정에서 VFA의 분해에 관여함을 알 수 있다.

Clostridia 강의 *Tepidanaerobacter* 속은 2차 혐기성 산생성조에서만 확인되었으며, 16.0%로 우점하였다. 절대혐기성 고온세균으로 25-60°C, pH 4.0-9.5에서 성장한다(Sekiguchi et al., 2006; Westerholm et al., 2011). 탄수화물을 발효하여 acetate와 H₂, CO₂를 생성하고 탄소원과 에너지원으로 유기산, 알코올, lactate, acetate, 당류와 아미노산을 이용하며, hydrogenotrophic methanogen과 공생관계를 이루어야 성장할 수 있다. 전자수용

체로 thiosulfate를 사용하나 sulfate, nitrate는 사용하지 못한다(Sekiguchi et al., 2006; Westerholm et al., 2011).

1차 반혐기성 가수분해/산생성조와 3차 혐기성 메탄생성조에서 각각 8.3%와 4.3%를 차지한 Clostridia class의 *Pelotomaculum* 속은 25-45°C, pH 6.5-7.5에서 생장하는 중온성 혐기세균이다(Qiu et al., 2006). 다양한 기질을 발효하여 acetate와 H₂, CO₂를 생성하며, hydrogenotrophic methanogen과 공생관계를 이루어 acetate를 메탄으로 분해한다. 전자수용체로 sulfate, nitrate는 사용하지 못하고, 알코올과 propionate, lactate, phthalate와 같은 분자량이 작은 방향족 난분해성 물질 등을 분해한다(Qiu et al., 2006).

1차 반혐기성 가수분해/산생성조에서 2.1%를 차지한 Clostridia class의 *Syntrophomonas* 속은 syntrophic fatty acid 산화세균으로 *Methanoculleus* 속과 같은 hydrogenotrophic methanogen인 Methanomicrobiales와 공생관계를 이루어 lipid의 발효산물로 반응조 내 농도가 높아진 fatty acid와 butyrate를 메탄으로 분해한다(Hansen et al., 1999; Tian et al., 2010).

Archaeal 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 군집구조 분석

UASB 공정으로 메탄이 생성되는 2차 혐기성 산생성조와 3차 혐기성 메탄생성조 시료에서 각각 100%, 96.5%를 차지하며 가장 우점한 메탄생성 균주는 hydrogenotrophic methanogen에

속하는 Methanomicrobiales 목의 Methanomicrobiaceae 과, *Methanoculleus* 속으로 *M. bourgensis* (AF095269)와 95–97%의 유사도를 나타내었다(Fig. 3). 또한 3차 혐기성 메탄생성조 시료에서 3.5%를 차지한 Thermoplasmatales 목의 Picrophilaceae 과에 속하는 archaea와 유사한 균주들이 확인되었다.

UASB 공정의 2차와 3차 반응조에서 96% 이상을 차지한 *Methanoculleus* 속을 포함하는 Methanomicrobiales 목은 H₂와 CO₂를 이용하여 메탄을 생성하나 acetate를 이용하여 메탄을 생성하지 못하는 것으로 알려져 있다(Ollivier et al., 1986; Tian et al., 2010; Bialek et al., 2011). 그러나, 본 3단계 메탄생성공정의 UASB 공정에서 관찰된 *Methanoculleus bourgensis* 뿐 아니라 *M. palmolei*, *M. marisnigri* 등의 몇몇 좋은 growth factor로

acetate를 요구한다(Ollivier et al., 1986; Maestrojuan et al., 1990; Zellner et al., 1998; Bialek et al., 2011). *M. bourgensis*는 1–2 μm 크기의 운동성이 없고, 40°C (37–45°C), 중성 pH (pH 6.7–8.0)에서 성장하는 무기독립영양세균(chemolithoautotroph)이다(Ollivier et al., 1986).

고찰

3단계 메탄생산공정의 주요 세균군집

메탄생성 공정의 세균군집의 다양성은 VFA 산화세균 (syntrophic bacteria)과 hydrogenotrophic methanogen의 상호 작용에 대해 많은 연구가 이루어지고 있으며(Hansen et al.,

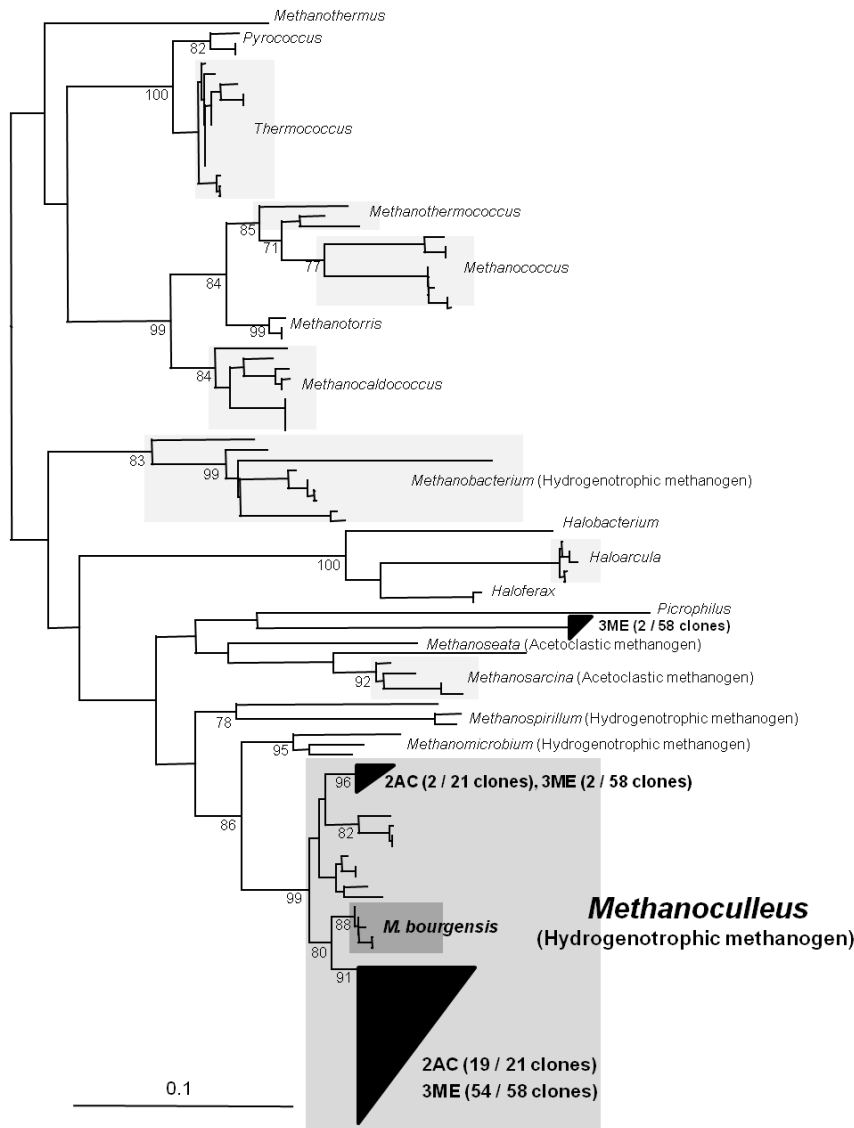


Fig. 3. Phylogenetic tree based on the partial sequence of archaeal 16S rRNA genes cloned from the two UASB reactors for acidogenic and methanogenic processes. Prefixes “2AC” and “3ME” in clone name represent the acid UASB reactor and methane UASB reactor, respectively. The tree was constructed by using the neighbor-joining method. The sequence of *Sulfolobus acidocaldarius* (D14053) was used as an outgroup. The bootstrap values above 70% are shown for internal nodes.

1999; Angenent *et al.*, 2002; Karakashev *et al.*, 2005), acetate와 propionate 등의 VFA는 syntrophic bacteria가 H₂로 분해하고 H₂에 친화도가 높은 hydrogenotrophic methanogen이 이용하여 메탄을 생성하는 것으로 보고되고 있다(Hattori, 2008; Lee *et al.*, 2010). 본 연구의 음식물을 이용한 3단계 메탄생산 공정의 주요 세균군집 구성은 96.5% 이상을 차지한 hydrogenotrophic methanogen의 *Methanoculleus* 속으로 *Anaerobaculum*, *Proteiniphilum*, *Tepidanaerobacter*, *Pelotomaculum*, *Clostridium*, *Syntrophomonas* 속 등의 VFA 산화세균과의 상호작용으로 메탄이 생성됨을 확인하였다. 음식물 쓰레기를 이용한 3단계 메탄생산 공정의 syntrophic bacteria와 methanogen에 의한 메탄생산 과정을 Fig. 4에 나타내었으며, 주요 hydrogenotrophic methanogen 및 이들과 상호작용으로 메탄을 생성할 것으로 추정되는 VFA 산화세균(syntrophic bacteria)은 굵게 표시하였다. 3단계 메탄생산 공정의 미생물 군집 분석 결과와 tCOD 및 BOD 감소율, 바이오가스 생산량 및 메탄 함량 등의 분석 결과를 고려하면 지금까지 개발된 혐기소화 공정보다 더욱 효율적이라는 것을 알 수 있다(Kim *et al.*, 2008).

3단계 메탄생산공정의 2, 3차 반응조에 적용된 UASB를 이용한 공정의 안정적 운영은 syntrophic bacteria와 hydrogenotrophic methanogen의 상호 작용과 군집구조의 유지에 의해 조절되며(Briones *et al.*, 2009), hydrogenotrophic methanogen은 UASB 공정의 슬러지 입자 안에서 유기물질을 빠르게 메탄으로 전환하는데 기여함을 알 수 있다(Song *et al.*, 2010). 또한, 본 연구의 2차 반응조와 같은 혐기성 산생성조의 세균군집 구조는 온도와 산도, HRT에 영향을 받으며(Demirel and Yenigün, 2002; Kongjan *et al.*, 2011), Song 등(2010)은 acetoclastic methanogen으로 가장 잘 알려진 Methanosaetaceae는 20일 이상의 긴 HRT로 운영되는 중온성 UASB 공정에서 우점하고, hydrogenotrophic

methanogen은 8일 정도의 짧은 HRT에서 우점 한다고 보고하였다. 그러므로, 2차 혐기성 산생성조와 3차 혐기성 메탄생산조는 각각 2일과 12일의 짧은 HRT로 운영되는 중온성의 UASB 공정으로 공정이 단순히 혐기성 미생물이 성장하고 있는 것이 아니라 hydrogenotrophic methanogen과 syntrophic bacteria의 상호 작용과 군집구조의 유지에 의해 조절되고 운영되는 메탄생산 공정으로 생각된다. 이는 UASB 공정인 2차와 3차 반응조의 메탄 생성결과(Table 1)와 16S rRNA 유전자의 copy 수가 증가하는 qPCR 결과(Fig. 2)에서도 알 수 있다. 이를 통해 UASB 공정인 2차와 3차 반응조의 경우 syntrophic bacteria의 산물이 methanogen의 성장에 적합한 기질을 제공함으로써 archaea가 eubacteria보다 약 2배 이상 우점하고 있는 것으로 보이나 CSTR 공정인 1차 반응조의 경우 eubacteria (61.1%)가 archaea (38.91%) 보다 우점하므로 직접적으로 메탄산화가 이루어지지 않는 것으로 생각된다(Fig. 2).

Hydrogenotrophic methanogen은 높은 암모니아, VFA, 칼륨, 나트륨, 중금속과 황화물의 농도에 대한 스트레스가 낮다고 알려져 있다(Schnürer *et al.*, 1999). *Methanosaeta*와 같은 acetoclastic methanogen은 암모니아의 농도가 약 1.00 g/L 이상으로 높으면 생장이 저해되고, acetate는 syntrophic bacteria에 의해 H₂와 CO₂로 분해된다(Steinhaus *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2010). 그때에 암모니아에 대한 민감도가 acetoclastic methanogen보다 낮은 hydrogenotrophic methanogen이 H₂와 CO₂로부터 메탄을 생성할 수 있다(Sawayama *et al.*, 2004). 본 연구의 3단계 메탄생산 공정의 2차 혐기성 산생성조에서 우점한 *Tepidanaerobacter* 속은 acetate를 산화하는 syntrophic bacteria로 10.00 g/L 이상의 암모니아에서도 생장이 가능하고, 2차 공정에서 확인된 hydrogenotrophic methanogen의 *Methanoculleus* 속과 공생관계를 이루어야 생장이 가능한 세균으로 알려져 있다(Westerholm *et al.*, 2011). 또한, 메탄생성이 이루어지는 3차 반응조의 경우 암모니아가 1.95 g/L로 acetoclastic methanogen 보다 hydrogenotrophic methanogen의 성장에 유리할 것으로 추정된다.

음식물을 이용한 3단계 메탄생산 공정은 acetogenesis를 기반으로 하는 고전적 메탄생산 공정과 달리 주로 hydrogenotrophic methanogen의 분해 경로에 의해 이루어 짐을 알 수 있다. 주요 세균군집 구성은 96.5% 이상을 차지한 hydrogenotrophic methanogen의 *Methanomicrobiaceae* 과, *Methanoculleus* 속으로 *Tepidanaerobacter* 속 등과 같은 VFA 산화세균(syntrophic bacteria)과의 상호작용, 중온 소화공정, 중성 pH, 높은 암모니아의 농도, UASB 공정의 짧은 HRT 등에 의해 archaea의 특정 집단이 우점하게 되고 3단계 메탄생산 공정의 안정된 운영과 효율에 기여한 것으로 생각된다.

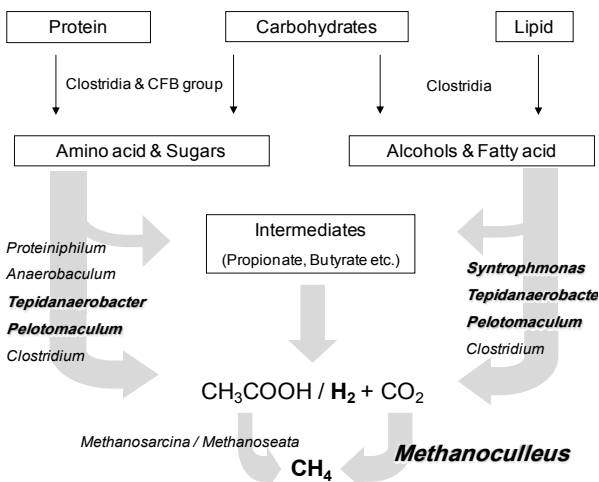


Fig. 4. A conceptual flowchart of the three-stage anaerobic process for methane production from food waste. Flowchart represents main groups of eubacteria and archaea determined by clone library analysis in this study. The bold letter refers to VFA-oxidizing bacteria (syntrophic bacteria) and hydrogenotrophic methanogen.

적요

혐기성 소화는 음식물 쓰레기와 같은 폐기물로부터 재생 가능한 에너지원으로 메탄을 생성하는 공정이다. 본 연구에서는 음식물 쓰레기와 폐수를 동시에 처리하는 3단계 메탄생산 공정을 이용한 혐기성 소화공정의 bacteria와 archaea 군집 변화를 조

사하였다. 3단계 메탄생산 공정은 음식물 쓰레기 및 폐수를 메탄과 이산화탄소로 전환하는 반혐기성 가수분해/산생성, 혐기성 산생성과 혐기성 메탄생성조로 구성되어있으며, 16 rRNA 유전자 라이브러리의 염기서열 분석과 정량 PCR 등의 분자생물학적 방법으로 주요 미생물 군집을 조사하였다. 메탄생산 공정의 주요 미생물 군집은 VFA-산화 박테리아와 *Methanoculleus* 속에 속하는 hydrogenotrophic methanogen의 두 종(species)이었다. 또한, 소수의 Picrophilaceae 과(Thermoplasmatales 목)의 archaea도 확인하였다. 음식물을 이용한 3단계 메탄생산 공정은 acetogenesis를 기반으로 하는 고전적 메탄생성 공정과 달리 주로 hydrogenotrophic methanogen의 분해 경로에 의해 이루어 짐을 알 수 있다. 이들 균주의 우점은 중온 소화공정, 중성 pH, 높은 암모니아 농도, 짧은 HRT, *Tepidanaerobacter* 속 등과 같은 VFA 산화세균과의 상호작용 등에서 기인한 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Angenent, L.T., Sung, S.W., and Raskin, L.** 2002. Methanogenic population dynamics during startup of a full-scale anaerobic sequencing batch reactor treating swine waste. *Water Res.* **36**, 4648–4654.
- APHA.** 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association/American Water Works Association/Water Pollution Control Federation, Washington, D.C., USA.
- Bialek, K., Kim, J., Lee, C., Collins, G., Mahony, T., and O'Flaherty, V.** 2011. Quantitative and qualitative analyses of methanogenic community development in high-rate anaerobic bioreactors. *Water Res.* **45**, 1298–1308.
- Briones, A.M., Daugherty, B.J., Angenent, L.T., Rausch, K., Tumbleson, M., and Raskin, L.** 2009. Characterization of microbial trophic structures of two anaerobic bioreactors processing sulfate-rich waste streams. *Water Res.* **43**, 4451–4460.
- Chen, S. and Dong, X.** 2005. *Proteiniphilum acetatigenes* gen. nov., sp. nov., from a UASB reactor treating brewery wastewater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**, 2257–2261.
- Chun, J., Huq, A., and Colwell, R.R.** 1999. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic Spacer Regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2202–2208.
- DeLong, E.F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5685–5689.
- Demirel, B. and Yenigün, O.** 2002. Article first published online: 18 Two-phase anaerobic digestion processes: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 743–755.
- Felsenstein, J.** 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783–791.
- Felsenstein, J.** 2002. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6a3. Distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- Hansen, K.H., Ahring, B.K., and Raskin, L.** 1999. Quantification of syntrophic fatty acid- β -oxidizing bacteria in a mesophilic biogas by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4767–4774.
- Hattori, S.** 2008. Syntrophic acetate-oxidizing microbes in methanogenic environments. *Microbes Environ.* **23**, 118–127.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R.** 1969. Evolution of protein molecules, pp. 21–132. In Munro, H.N. (ed.), Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, N.Y., USA.
- Karakashev, D., Bastone, D.J., and Angelidaki, I.** 2005. Influence of environmental conditions on methanogenic compositions in anaerobic biogas reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 331–338.
- Kim, J.K., Cho, J.H., Lee, J.S., Hamm, K.S., Park, D.H., and Kim, S.W.** 2002. Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**, 753–764.
- Kim, J.K., Han, G.H., Oh, B.R., Chun, Y.N., Eom, C.Y., and Kim, S.W.** 2008. Volumetric scale-up of a three stage fermentation system for food waste treatment. *Bioresour. Technol.* **99**, 4394–4399.
- Kongjan, P., O-Thong, S., and Angelidaki, I.** 2011. Performance and microbial community analysis of two-stage process with extreme thermophilic hydrogen and thermophilic methane production from hydrolysate in UASB reactors. *Bioresour. Technol.* **102**, 4028–4035.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115–175. In Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons, Chichester, England.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S.G., O'Flaherty, V., and Hwang, S.** 2010. Quantitative and qualitative transition of methanogen community structure during the batch anaerobic digestion of cheese-processing wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 1963–1973.
- Maestrojuan, G.M., Boone, D.R., Xun, L., Mah, R.A., and Zhang, L.** 1990. Transfer of *Methanogenium bourgense*, *Methanogenium marisnigri*, *Methanogenium olentangyi*, and *Methanogenium thermophilicum* to the Genus *Methanoculleus* gen. nov., emendation of *Methanoculleus marisnigri* and *Methanogenium*, and description of new strains of *Methanoculleus bourgense* and *Methanoculleus marisnigri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 117–122.
- Menes, R.J. and Muxi, L.** 2002. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 157–164.
- Miller, D.N., Bryant, J.E., Madsen, E.L., and Ghiorse, W.C.** 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4715–4724.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Ollivier, B.M., Mah, R.A., Garcia, J.L., and Boone, D.R.** 1986. Isolation and characterization of *Methanogenium bourgense* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 297–301.
- Ovreås, L., Fomey, L., Daac, F.L., and Torsvik, V.** 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3367–3373.
- Qiu, Y.L., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Imachi, H., Tseng, I.C., Cheng, S.S.,**

- Ohashi, A., Harada, H., and Kamagata, Y.** 2006. *Pelotomaculum terephthalicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. *Arch. Microbiol.* **185**, 172–182.
- Rees, G.N., Patel, B.K., Grassia, G.S., and Sheehy, A.J.** 1997. *Anaerobaculum thermoterrenum* gen. nov., sp. nov., a novel, thermophilic bacterium which ferments citrate. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 150–154.
- Saitou, N. and Nei, M.** 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425.
- Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K., and Yagishita, T.** 2004. Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. *J. Biosci. Bioeng.* **97**, 65–70.
- Schnürer, A., Schink, B.G., and Svensson, B.H.** 1996. *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **46**, 1145–1152.
- Schnürer, A., Zellner, G., and Svensson, B.H.** 1999. Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation in biogas reactors. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**, 249–261.
- Sekiguchi, Y., Imachi, H., Susilorukmi, A., Muramatsu, M., Ohashi, A., Harada, H., Hanada, S., and Kamagata, Y.** 2006. *Tepidanaerobacter syntrophicus* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, moderately thermophilic, syntrophic alcohol- and lactate-degrading bacterium isolated from thermophilic digested sludges. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**, 1621–1629.
- Song, M., Shin, S.G., and Hwang, S.** 2010. Methanogenic population dynamics assessed by real-time quantitative PCR in sludge granule in upflow anaerobic sludge blanket treating swine wastewater. *Bioresour. Technol.* **101**, S23–S28.
- Steinhaus, B., Garcia, M.L., Shen, A.Q., and Angenent, L.T.** 2007. A portable anaerobic microbioreactor reveals optimum growth conditions for the methanogen *Methanosaeta concilii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1653–1658.
- Thompson, J.D., Gilson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G.** 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882.
- Tian, J., Wang, Y., and Dong, X.** 2010. *Methanoculleus hydrogenitrophicus* sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from wetland soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 2165–2169.
- Westerholm, M., Roos, S., and Schnürer, A.** 2011. *Tepidanaerobacter acetatoxydans* sp. nov., an anaerobic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium isolated from two ammonium-enriched mesophilic methanogenic processes. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**, 260–266.
- Zellner, G., Messner, P., Winter, J., and Stackebrandt, E.** 1998. *Methanoculleus palmolei* sp. nov., an irregularly coccoid methanogen from an anaerobic digester treating wastewater of a palm oil plant in north-Sumatra, Indonesia. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 1111–1117.