

## 열처리를 통한 미세조류로부터 바이오수소 생산 향상

이채영<sup>†</sup> · 최재민  
수원대학교 토목공학과

### Enhanced of Bio-Hydrogen Production from Microalgae by Thermal Pre-Treatment

CHAEYOUNG LEE<sup>†</sup>, JAEMIN CHOI

Dept. of Civil Eng., The University of Suwon, San 2-2, Wau-ri, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Korea

**Abstract** >> This study was conducted to increase the amount of bio-hydrogen production from microalgae(*Chlorella vulgaris*) in batch reactors by thermal pre-treatment. The optimization of thermal pre-treatment was conducted using statistic experimental design of response surface methodology. Two experimental parameters of temperature and reaction time were considered. The optimization condition was founded at the coded variables of <0.52, -0.07> corresponding to the experimental of heating temperature of 95.6°C and reaction time of 57.9 min, respectively. Under the optimal condition, the maximum hydrogen production was predicted to 25.3mL H<sub>2</sub>/g dry cell weight (dcw), which was 9.1 times higher value of control(2.8mL H<sub>2</sub>/g dcw).

**Key words** : Anaerobic hydrogen fermentation(혐기성 수소 발효), Maximum hydrogen production(최대 수소 전환율), Microalgae(미세조류), Response surface methodology(반응표면분석법), Thermal pre-treatment(열전처리)

### 1. 서 론

신·재생에너지 기술이 발전함에 따라 새로운 에너지원에 대한 관심 역시 증가하고 있다. 제 1세대 곡물자원, 제 2세대 유기성 폐자원을 거쳐 제 3세대 조류계가 주목받고 있다. 조류는 식물과 달리 형태적 구분이 명확하지 않으며 지구상에 약 300,000종 이상이 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 미세조류로부터 생산 가능한 에너지는 바이오 에탄올, 바이오 디젤, 바이오 가스 등이 있으며 이 중 바이오 디젤 생산

에 관련된 연구가 집중적으로 이뤄지고 있다<sup>1)</sup>. 그러나 바이오 디젤을 생산하는 공정은 조류 배양 시 원료 소비와 지방 추출 과정에서 에너지 소비가 많아 효율적이지 못하다<sup>2,3)</sup>. 따라서 미세조류로부터 에너지 회수율을 증대하고자 지방 추출 후 남겨진 폐기물을 처리하기 위한 연구가 진행되고 있다<sup>4)</sup>. 또한, Bruno 등(2009)에 의하면 지방 함량이 40% 미만인 미세조류를 이용할 경우 바이오 디젤을 생산 하는 것에 비해 혐기성 발효를 통한 바이오 가스 생산이 경제적이라고 한다<sup>5)</sup>.

미세조류는 종에 따라 차이는 있을 수 있으나 두꺼운 세포벽이 있으며 여러 층의 구조로 구성되어 있다. 또한, 미세조류의 세포벽은 대부분 셀룰로오스

<sup>†</sup>Corresponding author : chaeyoung@suwon.ac.kr

[ 접수일 : 2013.7.7 수정일 : 2013.7.30 게재확정일 : 2013.8.31 ]

Copyright © 2013 KHNES

로 구성되어 있으며 조류 섬유소 (algaenan)가 존재하여 분해에 대한 저항성이 있다<sup>6-7)</sup>. 따라서 미세조류는 여러 층의 세포벽과 분해에 대한 저항성으로 인해 분해 또는 발효 시 전처리가 필요하다.

생물학적으로 수소를 생산하는 방법에는 광발효와 혐기성 발효가 있다. 광발효의 경우, 이론적 수소 전환율은 높으나 복잡한 구조의 유기물을 이용하기에 한계가 있다. 혐기성 수소 발효는 혐기성 발효의 최종부산물인 메탄의 생산을 pH, 수리학적 체류시간 (Hydraulic Retention Time) 등의 조절을 통해 억제하고 수소를 생산한다. 광발효의 비해 수소 전환율은 낮으나 유기물을 직접 이용하므로 복잡한 구조의 유기물을 이용할 수 있으며 안정적인 수소 생산이 가능하다. 또한, 빛 에너지가 필요하지 않아 투입되는 에너지가 적다는 장점이 있다<sup>8)</sup>. 마지막으로 혐기성 수소 발효 시 혐기성 메탄 발효, 미생물연료전지 등과 연계가 가능하여 에너지 회수율을 증가시킬 수 있다.

혐기성 수소 발효 시 최적화 연구는 대부분 전통적인 실험계획법, “one-factor-at-a-time” 방식으로 하나의 인자에 대해서만 수행되었다<sup>9)</sup>. 이러한 방식으로 수행된 연구는 여러 인자가 존재할 경우 인자 간 상호관계 표현에 적절하지 못하며, 특히 상호의존적 생물학적 공정에는 적합하지 않다<sup>10)</sup>. 이러한 여러 인자들이 각각 미치는 영향과 상호작용을 복합적 분석은 분산분석을 통해 가능할 수 있으며 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 통해 최적화 도출이 가능하다<sup>11)</sup>.

따라서, 본 연구에서는 회분식 수소 반응조를 이용하여 미세조류인 *Chlorella vulgaris*의 열처리 효율을 평가하고자 하였으며 반응표면분석법을 이용하여 최적 조건을 도출하고자 수행하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 식종 미생물 및 기질

#### 2.1.1 식종 미생물

본 연구에서 사용된 식종 미생물은 S시에 위치한

하수처리장 혐기성 소화조에서 유출되는 소화 슬러지를 사용하였다. 휘발성 고형물(Volatile Solids, VS), pH와 알칼리도는 각각 19.6g/L, 6.4 및 2.2g as CaCO<sub>3</sub>/L로 나타났다. 소화 슬러지 내 불순물을 제거하기 위해 10mm 체로 걸러 사용하였다. 또한, 수소 전환율을 증가시키고 수소소비 미생물 및 수소와 무관한 미생물의 성장을 억제하기 위해 90°C에서 20분간 열처리를 수행하였다<sup>12)</sup>.

#### 2.1.2 기질

본 연구에서 사용된 기질은 *C. vulgaris*를 이용하였다. *C. vulgaris*는 당을 기질로 이용하였으며 탱크에서 배양된 것을 이용하였다. 탱크에서 회수된 *C. vulgaris*는 가열 증발하여 분말형태로 실험 전까지 변형을 방지하기 위해 4°C, 암실에서 보관하였다. 기질의 총 화학적 산소 요구량(Total Chemical Oxygen Demand, TCOD)은 1.5g COD/g dry cell weight(dcw)로 나타났으며 화학적 조성은 탄수화물, 단백질, 지방, 수분 및 회분으로 구성되어졌으며 그 비율은 각각 39.2, 52.3, 0.7, 2.8 및 5.0g/100g dcw으로 나타났다.

## 2.2 실험장치 및 운전조건

### 2.2.1 기질의 전처리

30g dcw/L의 *C. vulgaris*를 500rpm으로 30분간 상

**Table 1** Design Matrix of RSM on thermal pre-treatment

Run	Temp. (°C)	Reaction time (min)
1	110	60
2	50	90
3	110	90
4	80	30
5	110	30
6	80	90
7	50	30
8	50	60
9*	80	60

\*center point

온에서 교반하였다. 충분한 교반이 이루어진 기질은 1L의 멸균병을 이용하여 조건(열처리 온도: 50-110°C, 열처리 반응시간: 30-90분)에 따라 온탕기를 통해 열처리되었다. Table 1은 반응표면분석법에 따른 열전처리 조건을 제시 하였다. 실험계획은 중심합성계획법 및 분산분석 (Analysis of Variance, ANOVA)이 가능한 Design-Expert(Stat-Ease, Inc., USA)를 이용하였다.

2.2.2 회분식 혐기성 수소 발효

회분식 혐기성 수소 발효 반응조는 전체용량 560mL, 유효용량 300mL의 아크릴 재질로 제작하였다. 바이오 가스 발생량 측정, 가스 조성 분석 및 pH 측정을 위해 가스발생량 측정구와 pH 전극이 장착 가능하도록 제작하였다. Fig. 1은 회분식 혐기성 수소 반응조를 제시하였다. 회분식 혐기성 수소 반응조는 열순환 펌프가 장착된 온탕기를 이용하여 중온(35±1°C)으로 유지하였으며 교반 강도는 150rpm으로 유지하였다.

식중은 반응조의 30%를 식중 미생물로 채웠으며 식중미생물-기질 비(Inoculum-Substrate Ratio, ISR)

0.3:1로 기질과 초순수를 혼합하여 나머지를 채웠다. 식중미생물과 기질로 채워진 반응조는 고순도 N<sub>2</sub> 가스를 이용하여 탈기하여 혐기 조건으로 전환하였다.

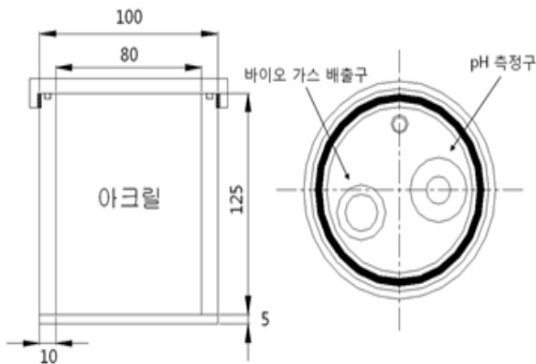


Fig. 1 Schematic diagram of anaerobic hydrogen batch reactor

2.3 분석 방법

바이오 가스 발생량은 부피 측정이 가능한 주사기를 이용하여 바이오 가스 배출구를 통해 측정하였다. 수소 가스 함량은 gas-tight syringe를 이용하여 바이오 가스 배출구로부터 0.2mL를 채취하여 열전도검출기(Thermal Conductivity Detector, TCD)가 장착된 가스크로마토그래피(Gas Chromatography, Gow Mac series 580, USA)를 이용하여 측정하였다. 컬럼은 molecular sieve 5A(80/100 mesh)를 충전제로 사용되는 1.8m × 3.2mm stainless steel column을 이용하였다. GC 측정 조건은 column, injector와 detector의 온도를 50, 80 및 90°C로 유지하였다. 운반기체는 고순도 질소(99.999%)를 이용하였으며 30mL/min의 유속을 유지하였다.

수소 가스 발생량은 식 (1)에 제시한 방법으로 산정하였으며 온도와 증기압을 표준상태로 보정하였다.

$$V_{H,i} = V_{H,i-1} + C_{H,i} (V_{G,i} - V_{G,i-1}) + V_H (C_{H,i} - C_{H,i-1}) \tag{1}$$

여기서, V<sub>Hx</sub> = x회차의 누적 수소 발생량(mL)

C<sub>Hx</sub> = x회차의 수소 가스 조성(%)

V<sub>Gx</sub> = x회차의 총 바이오 가스 발생량(mL)

V<sub>H</sub> = 반응조 기상부분의 체적(mL)

표준상태로 보정된 수소 발생량은 식 (2)에 제시한 수정된 Gompertz 식을 이용하여 표준 상태에서의 지체 시간, 누적 수소 전환율 및 수소 발생 속도를 평가하였다.

$$H = P \cdot \exp \left[ - \exp \left( \frac{R \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right) \right] \tag{2}$$

여기서, H = 누적 수소 전환율 (mL H<sub>2</sub>/g dcw)

P = 최대 수소 전환율 (mL H<sub>2</sub>/g dcw)

λ = 지체 시간 (h)

R = 최대 수소 발생 속도 (mL H<sub>2</sub>/g dcw-h)  
e = 지수

소화 슬러지의 VS와 알칼리도는 Standard Methods에 따라 실험을 수행하였다<sup>13)</sup>. pH는 Orion 8102BNUWP ROSS Ultra® pH 전극(Thermo scientific, USA)을 이용하여 측정하였다. 미세조류의 TCOD는 Standard Methods에 따라 실험을 수행하였으며 화학적 조성인 탄수화물, 지방, 수분 및 회분은 식품공전에 따라 수행하였으며 단백질은 Kjeldahl법을 이용하였다<sup>13-14)</sup>.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 열처리 최적화

열처리를 이용한 *C. vulgaris*의 전처리 최적화를

위해 반응표면분석법을 이용하였으며 열처리 온도 및 열처리 반응시간에 대한 최적화를 시도하였다. 그 결과 Table 2에 제시된 바와 같이 Run 1인 110°C의 열처리 온도와 60분의 열처리 반응시간에서 가장 높은 24.2mL H<sub>2</sub>/g dcw의 수소 전환율을 얻었다. 또한, Run 1에서 최대 수소 발생 속도가 2.3mL H<sub>2</sub>/g dcw-h로 가장 높게 나타났다.

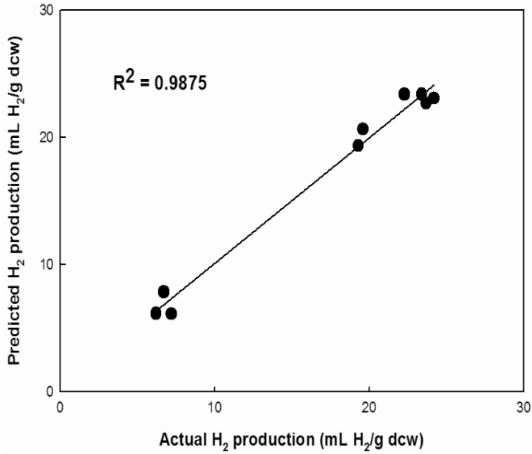
위 결과를 이용하여 분산분석을 수행한 결과, Table 3과 같이 나타났다. 식 (3)과 같이 도출된 모델은 P 값이 0.05이하로 나타나 상당히 의미가 있는 것으로 나타났다. 열처리 온도에 관련된 A와 A<sup>2</sup>의 P값이 가장 낮게 나타나 연관성이 가장 높은 것으로 판단되며 상대적으로 열처리 반응시간은 적은 영향을 끼치는 것으로 판단된다. 식 (3)을 이용하여 예측된 수소 전환율과 실측된 수소 전환율을 비교해본 결과,

**Table 2** The H<sub>2</sub> production of RSM on thermal pre-treatment

Run	Coded variables		P (mL H <sub>2</sub> /g dcw)	Rm (mL H <sub>2</sub> /g dcw-h)
	A	B		
1	1	0	24.2	2.3
2	-1	1	7.2	0.9
3	1	1	19.3	1.7
4	0	-1	23.7	2.3
5	1	-1	22.3	2.2
6	0	1	19.6	1.8
7	-1	-1	6.2	0.8
8	-1	0	6.7	0.8
9	0	0	23.4	2.2

**Table 3** ANOVA for the H<sub>2</sub> yield

Factors	Statistics				
	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value
Model	604.53	5	120.91	119.91	<0.0001
A	348.08	1	348.08	345.20	<0.0001
B	6.20	1	6.20	6.15	0.0422
AB	4.00	1	4.00	3.97	0.0867
A <sup>2</sup>	173.50	1	173.50	172.07	<0.0001
B <sup>2</sup>	8.23	1	8.23	8.16	0.0245
Residual	7.06	7	1.01		
Total	611.59	12			



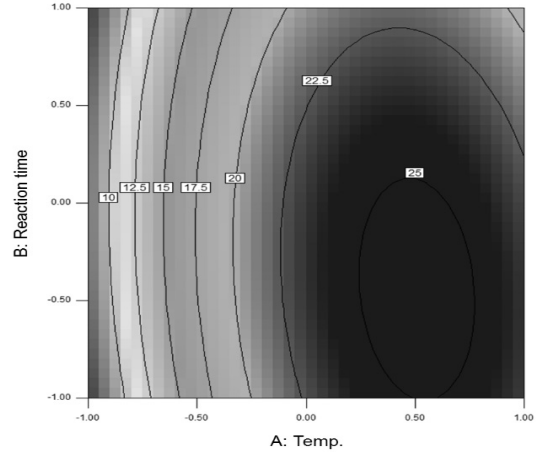
**Fig. 2** Parity plot showing the distribution of the actual vs. predicted values of H<sub>2</sub> production (mL H<sub>2</sub>/g dcw) on thermal pre-treatment

상관계수가 0.9875로 매우 높게 나타났다. 또한, 열처리 온도 및 열처리 반응시간은 복잡하고 밀접한 관계가 있는 것으로 나타났다. Fig. 2는 예측된 수소 전환율과 실측된 수소 전환율을 제시하였다.

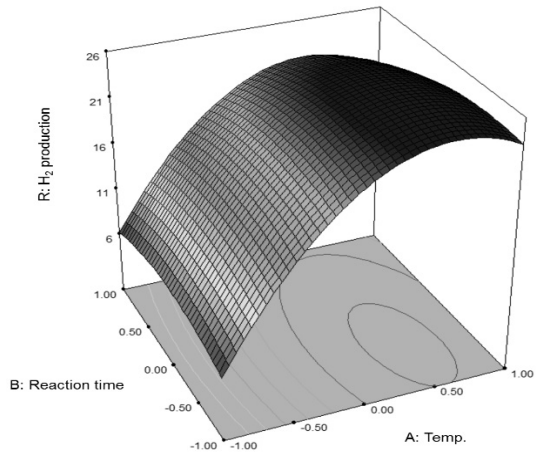
$$Y = 23.39 + 7.62A - 1.02B - 1.00AB - 7.92A^2 - 1.72B^2 \quad (3)$$

- 여기서, Y = 예측된 수소 전환율
- A = 열처리 온도의 코드값
- B = 열처리 반응시간의 코드값

Fig. 3과 Fig. 4는 열처리 온도와 반응시간이 수소 전환율에 미치는 영향을 평가하기 위해 2차원 및 3차원으로 제시하였다. Fig. 3에 제시된 바와 같이 열처리 온도에 따라 좌우 방향으로 길게 늘어진 타원형으로 나타난 것으로 보아 수소 전환율은 반응시간에 비해 열처리 온도에 상대적으로 민감하게 반응한 것으로 판단된다<sup>15)</sup>. Fig. 4와 같이 최적조건을 기준으로 수소 전환율이 증감하는 것으로 보아 실험 조건의 범위는 적절하게 설정된 것으로 판단된다. 또한, Choi (2012)의 연구에 따르면 반응표면분석법을 이용하여 병합전처리의 조건을 최적화 시 두 인자의



**Fig. 3** Two-dimensional contour line on thermal pre-treatment



**Fig. 4** Three-dimensional response surface on thermal pre-treatment

상관관계가 대각선 방향으로 길게 늘어진 타원형으로 나타나 상호의존적 관계로 보고되었다<sup>16)</sup>. 본 연구 결과에서도 유사한 경향의 등고선이 나타나 열처리 온도와 반응시간이 상호의존적 관계인 것으로 판단된다.

### 3.2 최적화 검증실험

반응표면분석법을 통해 도출된 최적조건은 열처리 온도 95.6°C, 반응시간 57.9분으로 나타났으며 예

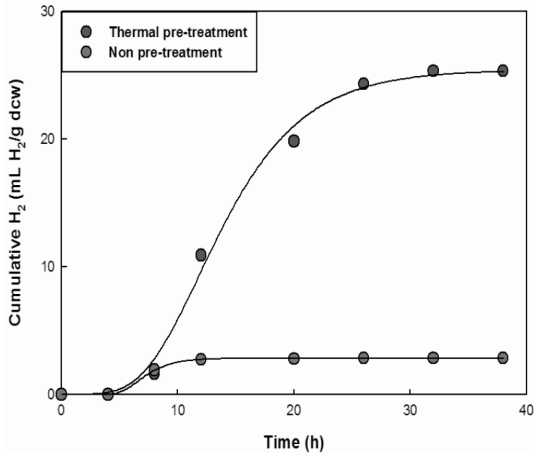


Fig. 5 Cumulative hydrogen production from *C. vulgaris* with pre-treatment and without pre-treatment

Table 4 Comparison of maximum hydrogen production and hydrogen rate in this study

Reactor	P (mL H <sub>2</sub> /g dcw)	Rm (mL H <sub>2</sub> /g dcw-h)
Non pre-treatment	2.8	0.7
Thermal pre-treatment	25.4	2.2

측된 수소 전환율 25.3mL H<sub>2</sub>/g dcw으로 나타났다. 최적조건의 재현성을 알아보기 위해 검증 실험을 수행하였으며 그 결과는 Fig. 5에 제시하였으며 Table 4에 정리하였다. 전처리를 수행하지 않은 *C. vulgaris*의 최대 수소 전환율 및 최대 수소 발생속도는 2.8mL H<sub>2</sub>/g dcw 및 0.7mL H<sub>2</sub>/g dcw-h로 각각 나타났다. 최적조건으로 열처리된 *C. vulgaris*의 최대 수소 전환율과 최대 수소 발생속도는 각각 9.1 및 3.1 배 향상된 25.4mL H<sub>2</sub>/g dcw와 2.2mL H<sub>2</sub>/g dcw-h로 나타났다. Jung 등(2011)은 *L. japonica*를 기질로 이용하였으며 열처리를 통해 대조군에 비해 1.6배 향상된 최대 수소 전환율 결과를 얻었다<sup>17)</sup>. 또한, Yun 등(2012)은 산처리를 수행한 *C. vulgaris*로부터 대조군에 비해 1.2배 높은 36.8mL H<sub>2</sub>/g dcw의 최대 수소 전환율을 얻었다. 이와 같은 결과는 *C. vulgaris*의 단단한 세포벽이 전처리로 인해 구조가 약화됨에 따라 가수분해과정에서 cell-lysis가 유도된 것에 기인 한

다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 사용된 기질인 *C. vulgaris*는 당을 기질로 이용하여 배양되어 탄수화물 농도가 높게 나타났다. 이에 따라 세포벽의 구조가 선행 연구들의 기질에 비해 상대적으로 단단하여 선행 연구결과에 비해 대조군의 최대 수소 전환율이 낮게 나타났으며 열처리를 통해 세포벽의 구조가 약화되어 최대 수소 전환율의 효율이 높게 나타난 것으로 판단된다.

## 4. 결 론

본 연구는 미세조류인 *C. vulgaris*로부터 혐기성 수소 발효 시 열처리의 최적조건을 도출하고 그 효율을 평가하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- 1) 반응표면분석법을 이용한 열처리의 최적조건은 열처리 온도 95.6°C, 열처리 반응시간 57.9분으로 나타났으며 최대 수소 전환율은 25.3mL H<sub>2</sub>/g dcw로 예측되었다.
- 2) 최적조건으로 수행된 검증실험 결과에 따르면 대조군에 비해 최대 수소 전환율 및 최대 수소 발생 속도는 각각 9.1 및 3.1배 향상되었다.
- 3) 본 연구를 통해 미세조류의 혐기성 수소 발효 시 열전처리의 효율 평가를 수행하였으며 향후 타 공정과의 결합으로 에너지 회수율 증가가 가능할 것으로 판단된다.

## 사 사

이 논문은 2012년도 수원대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이며, 이에 감사드립니다.

## References

1. S. A. Scott, M. P. Davey, J. S. Dennis, I. Horst, C. J. Howe, D. J. Smith, and A. G. Smith, "Biodiesel from algae: challenges and prospects", Energy Biotechnology-Environmental Biotechnology, Vol. 21, No. 3, 2010, p. 277-286.

2. A. F. Clarens, E. P. Resurrection, M. A. White, and L. M. Clossi, "Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstock", *Environ. Sci. Technol.*, Vol. 44, 2010, p. 1813-1819.
3. C. Pierre, H. Arnaud, L. Laurent, R. Monique, A. G. Romy, and P. S. Jean, "Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production", *Bioresource Technol.*, Vol. 102, 2011, p. 207-214.
4. E. A. Ehimen, Z. F. Sun, C. G. Carrington, E. J. Birch, and J. J. Eaton-Rye, "Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process", *Applied Energy*, Vol. 88, 2011, p. 3454-3463.
5. S. Bruno, B. Nicolas, and B. Olivier, "Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgae biodiesel sustainable", *Biotechnol. Advance*, Vol. 27, 2009, p. 409-416.
6. B. Allard, M. N. Rager, and J. Templier, "Occurrence of high molecular weight lipids (c80+) in the trilaminar outer cell walls of some freshwater microalgae a reappraisal of algaenan structure", *Org. Geochem.*, Vol. 33, 2004, p. 789-801.
7. G. J. M. Versteegh and P. Blokker, "Resistant macromolecules of extant and fossil microalgae", *Phycol. Res.*, Vol. 52, 2004, p. 325-339.
8. F. R. Hawkes, R. Dinsdale, D. L. Hawkes, and I. Hussy, "Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization", *Int. J. of Hydrogen Energy*, Vol. 27, 2002, p. 1339-1347.
9. H. W. Kim, H. S. Shin, S. K. Han, and S. E. Oh, "Response surface optimization of substrate for thermophilic anaerobic codigestion of sewage sludge and food waste", *J. Air Waste Manag. Assoc.*, Vol. 57, 2007, p. 309-318.
10. J. L. Wang, and W. Wan, "Factor influencing fermentative hydrogen production: A review", *Int. J. Hydrogen Energy*, Vol. 34, 2009, p. 799-811.
11. D. H. Kim, M. K. Lee, S. Y. Lim, and M. S. Kim "Dark fermentative hydrogen production using the wastewater generated from food waste recycling facilities", *Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society*, Vol. 22, No. 3, 2011, p. 326-332.
12. D. H. Kim, S. H. Kim, K. W. Jung, M. S. Kim, and H. S. Shin, "Effect of initial pH independent of operational pH on hydrogen fermentation of food waste", *Biore. Technol.*, Vol. 102, No. 18, 2001, p. 8646-9652.
13. APHA-AWWA-WEF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", 18th edition, America Public Health Assoc., Washington, D. C., USA, 1992.
14. Ministry of Food and Drug Safety, Korean Food Standards Codex, Korea, 2012.
15. Y. M. Yun, K. W. Jung, D. H. Kim, Y. K. Oh, and H. S. Shin, "Optimization of bio-H<sub>2</sub> production from acid pretreated microalgal biomass", *J. of Korea Organic Resource Recycling Association*, Vol. 20, No. 1, 2012, p. 78-86.
16. J. M. Choi, "Optimization of hydrogen production from microalgae using anaerobic fermentation", Master Thesis, The University of Suwon, 2012.
17. K. W. Jung, D. H. Kim, and H. S. Shin, "Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions", *Bioresource Technology*, Vol. 102, 2011, p. 2745-2750.