

# 음식물쓰레기의 혐기성 소화 시 질소농도에 따른 수소생산 및 미생물 군집변화 Variations of Hydrogen Production and Microbial Community with Different Nitrogen Concentration During Food Waste Fermentation

이플잎 · 이태진<sup>†</sup>  
Pul-eip Lee · Tae-jin Lee<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 환경공학과

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Science & Technology

(Received July 2, 2014; Revised August 6, 2014; Accepted October 16, 2014)

**Abstract :** In this study, variations of fermentative hydrogen production and microbial community were investigated with different nitrogen concentration of food waste. Optimum hydrogen production rate was acquired at 200 mg/L nitrogen concentration of the food waste. Which was equivalent to 83.43 mL/g dry biomass/hr. However, bio-hydrogen production was inhibitedly reduced at over 600 mg/L of nitrogen concentration whereas proportional relation between hydrogen production and B/A ratio were not observed. Most dominant specie of the microbial community analyzed was *Clostridium* sp. throughout PCR-DGGE analysis of 16S rDNA. It revealed that most contributing microorganism producing hydrogen were *Enterococcus faecium partial*, *Klebsiella pneumoniae strain ND6*, *Enterobacter sp. NCCP-231*, and *Clostridium algidicarnis strain E107* in this experiment.

**Key Words :** Food Waste, Anaerobic Fermentation, Hydrogen Production, Nitrogen Concentration, PCR-DGGE

**요약 :** 본 연구는 음식물 쓰레기 내 질소농도에 따른 발효과정에서 수소생성 특성과 미생물의 군집변화를 살펴보았다. 음식물 쓰레기 내 질소의 함량이 200 mg/L일 때 가장 높은 수소생산 효율을 보여주었으며, 이 때 수소생산율은 83.43 mL/g dry wt biomass/hr이었다. 질소의 함량이 600 mg/L 이상이 되면 수소생산이 저해되는 것으로 나타났으며 수소생산량과 B/A ratio (Butric acid/Acetic acid)의 비례적 상관관계는 관찰되지 않았다. 16S rDNA의 PCR-DGGE결과 대부분 군집은 *Clostridium* sp. 미생물로 규명되었으며 수소생성에 기여도가 큰 미생물은 *Enterococcus faecium partial*, *Klebsiella pneumoniae strain ND6*, *Enterobacter sp. NCCP-231*, 그리고 *Clostridium algidicarnis strain E107* 등으로 판명되었다.

**주제어 :** 음식물쓰레기, 혐기성 발효, 수소생산, 질소농도, PCR-DGGE

## 1. 서론

석유와 같은 화석에너지는 온실효과 및 NOx, SOx 등의 오염물질 배출로 인한 환경파괴 문제와 한정된 매장량으로 인한 에너지 고갈의 문제를 내포하고 있어 이를 대체할 에너지 개발이 시급한 실정이다.<sup>1,2)</sup> 대체에너지 중 수소는 에너지 밀도가 매우 크기 때문에 개발할 가치가 큰 것으로 평가되고 있으며 공기보다 가볍고 보편적인 에너지이므로 자원고갈이나 분쟁의 위험이 없다. 더욱이 수소에는 탄소 원자가 들어 있지 않아 생태계를 교란시킬 오염물질을 생산하지 않는다.<sup>3)</sup> 이와 같은 이점으로 수소는 화석연료를 대체할 친환경적인 에너지 자원으로 많은 연구가 활발하게 진행되고 있다.

기존의 수소생산 방식인 화석연료의 열분해와 물의 전기분해는 고가의 제조비와 수소에너지의 생산비를 초과한 운영비를 투입해야 한다는 한계가 있다. 이에 생물학적 방법을 통해 수소를 생산하고자 지난 20년간 미생물을 이용한 수소생산 연구가 활발히 진행되어 왔다.<sup>3)</sup>

주로 광합성 미생물을 이용한 물 분해와 유기물 분해에 의한 수소생산에 집중되어 연구가 진행되어 왔지만 빛 에너지

를 계속 공급해 주어야 하고 반응속도가 느리며 에너지 효율이 낮은 단점들이 크게 개선되지 못하고 있어 최근에는 혐기성 발효미생물을 이용한 수소생산 기술이 주목받고 있다.

혐기성 발효를 이용한 수소 생산 방법의 가장 큰 장점은 유기성 폐자원에서 쉽게 얻을 수 있는 글루코오스나 녹말 등 유기물을 분해하여 수소를 얻는다는 친환경적인 점이다. 그리고 수소 생산 속도가 광합성 미생물을 이용한 수소생산 방법에 비하여 상당히 빠르고, 24시간 생산이 가능하며 공간이 많이 소요되지 않아 증축이 용이한 것으로 평가받고 있다.<sup>4,5)</sup>

혐기 발효에 의한 수소생산에 영향을 미치는 환경요인으로는 pH, 온도, 체류시간, 기질 농도, 염분도, 질소농도, 미생물의 군집 등이 있다.<sup>6-8)</sup> 그 중 질소는 암모니아 가스 상태로 존재하는 암모니아의 농도에 따라 수소생산에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup>

혐기 발효에 의한 수소생산에 관여하는 미생물을 살펴보면, 산소 노출 민감도에 따라 절대 혐기성균(strict anaerobe)과 통성 혐기성균(facultative anaerobe)으로 나눌 수 있으며 각각 *Clostridium* 속과 *Klebsiella*속 미생물이 이에 해당된다. *Clostridium*속의 hydrogenase(수소화 효소)은 glucose 1

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: leetj@seoultech.ac.kr Tel: 02-970-6614 Fax: 02-971-5776

mol당 4 mol의 수소발생이 가능하며, 실제 최대 수소 수율은 3.24 mol H<sub>2</sub>/mol glucose으로 알려져 있다. *Klebsiella*속의 nitrogenase 효소는 N<sub>2</sub>를 NH<sub>3</sub>로 고정시키는 기능을 가지고 있으며, 질소원이 없는 경우에는 양성자를 환원시켜 수소를 생산한다. 이 때 실제 최대 수소 수율은 2.86 mol H<sub>2</sub>/mol glucose이며, *Clostridium*속에 비해 적은 양의 수소를 생산한다고 보고되어있다.<sup>10)</sup>

미생물의 군집을 확인하기 위해 배지배양이나 현미경 관찰 등을 통한 전통적 방법을 많이 이용하였지만 최근에는 미생물 군체의 구성성분(세포막, 세포벽의 지질, 퀴논, 다당, 아미노산 등)을 지표로 하는 화학분류법과<sup>11,12)</sup> 분자생물학적인 분석 기법<sup>13,14)</sup> 사용이 증가하는 추세이다. 분자생물학적 기법의 미생물 군집변화 해석은 DNA (Deoxyribonucleic acid), RNA (Ribonucleic acid)를 분석하는 것으로 특히 bacteria의 16S rDNA (ribosomal DNA)의 특정 부위는 진화속도가 매우 느려 다양한 분류군의 상호 비교를 가능하게 한다. 따라서 분자생물학적으로 염기서열을 분석해 원핵생물의 계통분류를 할 수 있다.

현재 음식물쓰레기는 2005년 직·매립이 금지되었고, 그에 따라 재활용량이 꾸준히 증가하여 발생량의 93.8%가 재활용되고 있으며, 이중 88%가 사료화, 퇴비화 방법에 의해 자원화 되었으며, 혐기성 소화 방식에 의한 재활용량은 12%로 향후 꾸준히 증가할 것으로 예상되고 있다.<sup>28)</sup>

음식물 쓰레기의 전체 재활용량의 88%를 차지하고 있는 사료화와 퇴비화는 자원화 시설의 기준강화, 생산 제품의 안정성 및 수요처 확보 제한 등의 문제로 수용한계에 직면하고 있으며, 대부분 처리비용 및 에너지비용이 많이 소요되는 호기성 퇴비화 시설이다. 또한 퇴비는 고농도 염분 함유로 인해 토양의 산성화를 초래하는 등 문제점을 나타내고 있다. 이에 따라, 음식물 쓰레기의 효과적인 감량화 뿐만 아니라 자원화를 위한 대안으로 혐기성 소화(Anaerobic digestion)에 대한 관심이 고조되고 있으며, 음식물 쓰레기를 이용한 혐기성 소화에 의한 바이오 에너지 생산도 기대

할 수 있다. 하지만 음식물쓰레기의 성상에 따라 수소생산의 큰 영향을 미치고 있으며, 그 중 염의 농도는 그 농도가 높을수록 수소생산에 저해를 준다고 알려져 있다.<sup>29,30)</sup> 그러나, 음식물 쓰레기에 다량 함유되어 있는 질소의 농도 등 기타 물질의 저해에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 혐기성 발효공정을 이용하여 대표적인 고농도 유기성 폐수인 음식물 쓰레기를 기질로 사용하여 수소를 생산할 경우 음식물 쓰레기 내 질소의 농도가 그 수율에 미치는 영향을 알아보았다. 이를 위해 질소의 농도를 단계별로 변화시켜 수소생산 효율 특성 및 그에 따른 미생물 군집변화를 규명하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 실험 장치 및 운전방법

Fig. 1은 본 연구에 사용된 회분식 반응기로 음식물쓰레기를 첨가시킨 후 N<sub>2</sub> 가스로 purging 시켜 혐기성 상태로 만든 후 가스의 유출입이 없도록 완전 밀폐시켰다. 균주로는 U하수처리장 활성 슬러지조의 반송 슬러지를 Table 1의 성분으로 구성된 배지로 계대 배양시킨 배양액을 실험 전 24

Table 1. Compositions of food waste

Item	Concentration (mg/L)
TCODcr	321,788 ± 80,448
SCODcr	201,117 ± 62,570
T-N	6,491 ± 292
T-P	397 ± 9
Total carbohydrate	263,300 ± 1,571
Reducing sugar	763 ± 250
Protein	9,447 ± 1,158
Na <sup>+</sup>	19,200
NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> -N	1,825

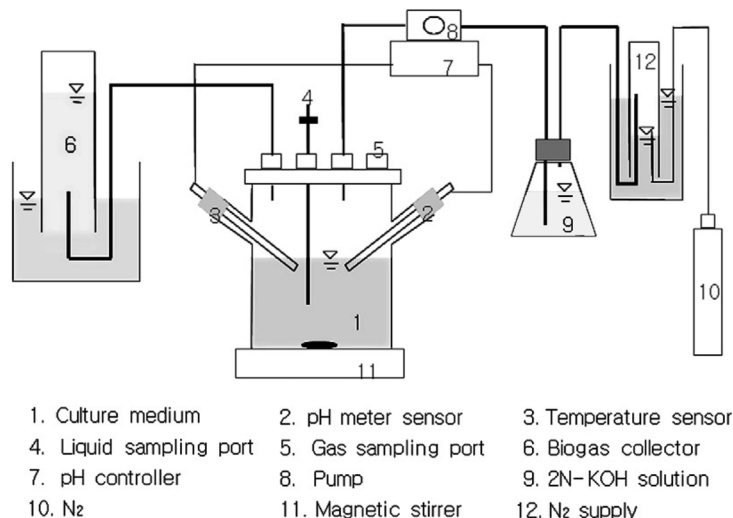


Fig. 1. Schematic diagram of the batch reactor for fermentative hydrogen production.

시간 배양시켜 균의 활성화를 도모한 후 주입하였다.<sup>15-17)</sup> 실험은 25 ± 5°C의 온도 조건에서 수행되었으며 미생물의 배양기간 동안 반응기 내 pH는 5.5로 일정하게 유지하게 위해 3N-KOH용액을 온도 센서가 연결된 pH 자동조절장치에 의해 주입되게 하였다. 반응조의 유효 용적은 1.5 L이며 배양액을 완전혼합하기 위한 교반속도는 200 rpm으로 유지 하였다. 이 때 주입된 초기 배양액은 반응기 유효용적의 1% (v/v)였으며, 접종된 반응기 내 초기 생체량은 약 10 mg VSS/L였다.

## 2.2. 음식물 쓰레기의 성분 조성

Table 1은 본 실험에서 사용된 S대학교 식당에서 배출되는 음식물쓰레기의 성분 조성으로 총 유기물 중 82.1%가 탄수화물이었다. 분쇄기(Hanill, KOREA)에 의해 잘게 부서진 음식물쓰레기는 실험목적에 따라 COD의 농도를 조절한 후 반응기에 적정량 투입하였다.

## 2.3. 분석방법

반응기의 총 가스는 2% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 담지 된 포화식염수에 포집하며 그 중 수소함량은 head space 가스를 gas-tight syringe로 100 mL를 채취하여 열전도도 검출기를 장착한 가스 크로마토그래피(GOW-MAC series 350)를 이용하여 측정하였다. 누적수소생산량 곡선은 식 (1)을 이용하여 일정시간마다 측정된 수소함량과 발생된 총 가스량으로 부터 계산되었다.<sup>15)</sup>

$$V_{H_i} = V_{H_{i-1}} + C_{H_i}(V_{G_i} - V_{G_{i-1}}) + V_H(C_{H_i} - C_{H_{i-1}}) \quad (1)$$

여기서, V<sub>H<sub>i</sub></sub>와 V<sub>H<sub>i-1</sub></sub>은 시간간격에 따른 누적 수소생산량의 현재 생산량(i)과 이전 생산량(i-1)이며, V<sub>G<sub>i</sub></sub>와 V<sub>G<sub>i-1</sub></sub>은 현재 총 가스량과 이전 총 가스량을 나타낸다. C<sub>H<sub>i</sub></sub>와 C<sub>H<sub>i-1</sub></sub>은 반응기의 head space에서 측정된 현재의 수소 함량(%)과 이전의 수소함량(%)이며, V<sub>H</sub>와 V<sub>S</sub>는 반응기의 head space 부피(500 mL)와 이전의 누적된 배양액 양을 나타낸다. 회분식으로 구성된 반응조에서 발효 미생물에 의해 생성된 수소 생산 곡선을 분석하여 최대 수소생산율을 산정하기 위해 다음 식 (2)과 같은 수정된 Gompertz방정식을 이용하였다.

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

여기서, M은 누적가스 생성량(cumulative gas production, mL), λ는 지연시간(lag phase time, hr), P는 가스 생성량(gas production potential, mL), R은 최대 가스 생성율(maximum gas production rate, mL/hr) 그리고 e는 exp(1)을 나타낸다. 누적 가스 생성량은 식 (2)를 이용하여 해석하였으며, 각 λ, P, R의 값은 SIGMA PLOT 2002 (SPSS Science, UK) software 중 곡선분석을 이용하여 산출하였다.

유기산은 상등액 20 μL를 SUPELCOGEL C-610H (300

Table 2. PCR primers used in this study

Primer pair (Target)	Nucleotide sequence (5'- 3')	Size of PCR product(bp)	Reference
10f-1400r (bacteria 16S rDNA)	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG ACG GGC GGT GTG TAC AAG	1408	14
341f-518r (V3 region)	CCT ACG GGA GGC AGC AG ATT ACC GCG GCT GCT GG	193	15,16
GC clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	233	15,16

\* f : forward primer r : reverse primer

mm × 7.8 mm ID)칼럼을 장착한 HPLC (Gilson, USA)로 분석하였으며 유기산의 peak는 UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였다. 배양액 내에 잔존하는 탄수화물을 정량하기 위하여 페놀-황산법으로 발색시킨 후 UV-Visible spectrophotometer (UV1601, SHIMADZU)로 측정하였다. 초기 및 최종 CODcr과 균체량 측정을 위한 건조 중량 분석은 Standard Methods법에 의하여 수행하였다. 균체량(volatile suspended solids)의 측정은 600 nm에서 흡수된 광량을 기준에 건조중량으로 검량된 곡선에 대입하여 환산 측정하였다.

## 2.4. 분자생물학적 기법을 통한 미생물 군집 분석

수소생산 최대의 시점에서 채취된 각 시료를 13,000 rpm에서 3분간 원심분리기(Hanill, Korea)를 이용하여 상등액을 제외한 침전물을 약 0.25 g이 되도록 한 후, DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA template에서 16S rDNA의 가변 부위인 V3 region 증폭을 위해 서로 다른 2개의 primer sets와 GC clamp을 사용하여 PCR을 실시하였다.<sup>20)</sup> 실험에 사용된 primer (Bionics, Korea)의 sequence는 Table 2와 같다.

DGGE는 40%~60%의 변성제 농도 구배를 가지는 Polyacrylamide Gel을 만든 후 전기영동(Bio-Rad Ltd. Co., Model 475 Gradient delivery system)하여 수행하였다.<sup>21)</sup> DGGE에서 확인된 밴드의 염기서열 분석은 염기서열 분석 전문기관(Bionics, Korea)에서 수행되었으며, 계통분류학적 분류는 NCBI BLAST Search Database를 이용하여 결정하였다.<sup>22-26)</sup>

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 음식물쓰레기 내 질소농도에 따른 수소생산효율

음식물 쓰레기는 충분히 분쇄한 후 그 여액을 반응기에 주입하였으며 초기 COD의 농도를 약 10,000 mg/L로 유지하였고 이 때 염분농도는 약 600 mg/L이었다. 질소의 농도에 따른 수소생산량의 변화를 알아보기 위해 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>을 이용해 질소의 농도를 100, 150, 200, 600, 1500, 3000, 5000, 7000 mg/L로 각각 변화를 주어 실험을 수행하였으며, 이 때 각각의 반응기에서 발생하는 수소생산량을 Fig. 2에 도식하

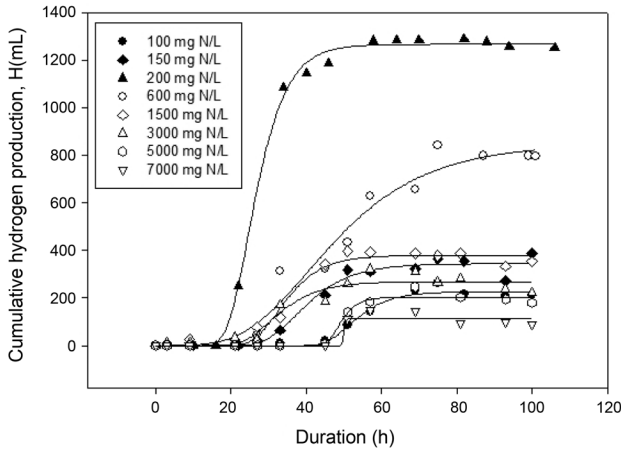


Fig. 2. Hydrogen gas production curve by anaerobic digestion of the different nitrogen concentration in the food waste.

Table 3. Calculated parameter values from nonlinear regression of modified Gompertz equation for gas production with different nitrogen concentration in the food waste

Nitrogen concentration (mg/L)	Production potential		H <sub>2</sub> yield (mL H <sub>2</sub> /g COD)	Production rate		r <sup>2</sup>
	P <sub>n</sub> (mL)	p-value		Rh (mL/g dry wt biomass/hr)	p-value	
100	226.86	<0.0001	14.38	13.83	0.0017	0.98
150	344.64	<0.0001	26.37	15.68	0.0009	0.98
200	1268.67	<0.0001	102.00	83.43	<0.0001	0.99
600	848.27	<0.0001	59.64	18.14	<0.0001	0.98
1500	379.89	<0.0001	19.64	21.83	0.0011	0.98
3000	269.21	<0.0001	12.14	13.95	0.0265	0.96
5000	203.88	<0.0001	13.41	25.52	0.0061	0.98
7000	114.92	<0.0001	6.81	49.49	1	0.96

였다. 반응기 내 용액의 pH를 5.5로 유지한 상태에서 실시한 혐기성 수소생산실험결과, 발생된 가스는 수소와 이산화탄소로 구성되어 있었으며, 메탄의 생성은 관찰되지 않았다.

Fig. 2의 질소 농도에 따른 수소가스 발생량(P<sub>n</sub>)과 최대 수소 생성률(R<sub>h</sub>)은 수정 Gompertz방정식을 이용하여 산정하였으며, 각 농도에 따른 수소 생산 분석 결과는 Table 3에 요약하였다. 이 때 r-Square 값은 0.99 이상이며, p-value는 1 이하로 90% 신뢰구간에서 통계적으로 중요한 의미를 가진다는 것을 확인하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 음식물쓰레기의 수소생산 효율은 음식물 쓰레기 내 질소의 농도에 따라 많은 영향을 받는 것을 알 수 있었으며 200 mg/L 보다 낮은 농도의 범위에서는 질소의 농도가 증가함에 따라 수소가스 발생량이 증가하지만 600 mg/L를 초과하면 오히려 수소가스 발생량이 이전보다 감소하는 것으로 나타났다. 이는 혐의 농도가 너무 적거나 많음에 따라 수소생산에 저해를 받는다고 보고된 기존의 연구와<sup>30,31)</sup> 비슷한 양상으로 음식물 쓰레기를 탄소원으로 이용할 때 혐의 농도와 질소의 농도가 적절하게 유지되어야 한다는 것을 의미한다.

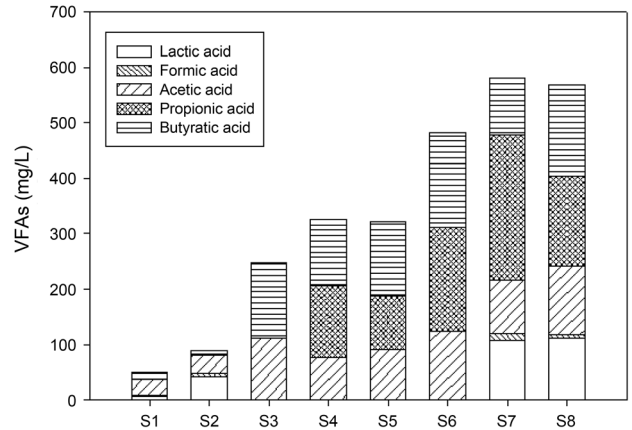


Fig. 3. Organic acid profiles at the different nitrogen concentration of food waste. (S1: 100 mg/L, S2: 150 mg/L, S3: 200 mg/L, S4: 600 mg/L, S5: 1,500 mg/L, S6: 3,000 mg/L, S7: 5,000 mg/L, S8: 7,000 mg/L).

따라서 수소생산을 위한 최적 질소함량은 약 200 mg/L로 파악되었으며 이 때 발생된 누적 수소량과 최대 수소생성율은 1268.67 mL과 83.43 mL/g dry wt biomass/hr로 각각 산정하였다.

### 3.2. 발효산물 분포 특성 및 물질 수지

발효를 통한 수소 생성에 관여하는 세균은 생화학 반응을 거쳐 수소뿐 아니라 각종 유기산을 발생시킨다. 본 실험에서 나타난 수소생산과정에서 생산되는 유기산은 Fig. 3과 같은 분포 특성을 나타내었고, 유기산 중 butyric acid가 가장 높은 비율을 차지했으며, 그 다음은 acetic acid로 나타났다. lactic acid와 formic acid는 질소의 농도가 수소생산에 최적이라고 보여지는 200 mg/L를 중심으로 낮아지거나 높아질 때에 주로 검출되었으며, 질소의 농도가 600 mg/L 이상일 때는 상당량의 propionic acid가 검출되었다. 따라서 lactic acid, formic acid, 그리고 propionic acid의 생성은 수소생산에 긍정적 영향을 주지 않는 것으로 판단되었으며 이는 기존의 연구에서 lactic acid와 propionic acid의 생성은 낮은 수소생산을 유발한다고 보고된 연구와 유사한 결과이다.<sup>27)</sup>

B/A (Butyric acid/Acetic acid) ratio는 수소생산과 비례한다는 종래의 연구결과가<sup>8)</sup> 있음을 고려하여 B/A ratio를 계산해 본 결과 질소의 농도가 100, 200, 600, 1500, 3000, 5000, 그리고 7000 mg/L에서 각각 0.41, 0.28, 1.23, 1.57, 1.47, 1.39, 1.07, 그리고 1.31로 나타나 본 실험에서는 B/A ratio와 수소생산량과의 상관관계가 없었다. 따라서 B/A ratio로 수소생산 경향을 추정하는 것은 적절하지 않다고 판단하였다.

### 3.3 DGGE의 band pattern 및 sequencing 분석

Fig. 4는 시료에서 추출한 DNA를 PCR을 통해 증폭시킨 후, 16S rDNA의 V3 region의 DGGE 수행을 통해 얻은 결

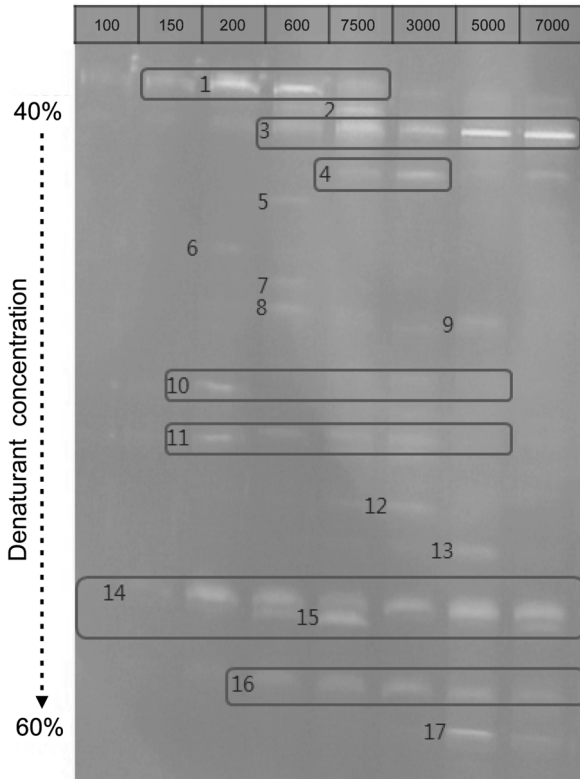


Fig. 4. DGGE profiles of different nitrogen concentration food waste.

과로 선명도가 각기 다른 여러 개의 Band가 다양하게 나타났다. 수소생산량이 높게 나타났던 질소농도 200 mg/L의 시료에서 Band 1, 6, 10, 11, 14가 가장 선명하였으며 수소생산량이 낮았던 질소농도 5000, 7000 mg/L의 시료에서 Band

4, 9, 13, 17이 뚜렷하게 나타나 질소농도에 따라 그 밴드차이를 확연하게 볼 수 있었다. Band 3은 질소의 농도가 높아질수록 선명하였으며, 이는 수소생산에 미치는 영향이 미미하다는 것을 나타낸다. Band 14와 16은 거의 모든 질소농도 영역에서 나타났다.

DGGE Band의 미생물 군집을 파악하기 위해서 17개의 Band를 NCBI BLAST를 이용하여 sequence분석하여 Table 4에 정리하였다. 미생물 군집 결과 수소생산 미생물로 잘 알려져 있는 미생물들이 다수 발견되었으며, 수소생산량이 많을 때 출현하는 미생물 군집(Band 1, 6, 10, 11, 14)은 *Enterococcus faecium partial*, *Klebsiella pneumoniae strain ND6*, *Enterobacter sp. NCCP-231*, *Clostridium algidicarnis strain E107*, 그리고 *Klebsiella sp. d252*으로 규명되었고, 수소생산량이 낮았을 때 나타난 미생물 군집(Band 4, 9, 13, 17)은 *Alcaligenes faecalis strain DPE04*, *Bacillus cereus strain FSHH4*, *Uncultured bacterium clone F1Q32TO06HDD21*, 그리고 *Paenibacillus cineris strain SDT61*으로 규명되었다.

#### 4. 결론

본 연구는 음식물쓰레기의 질소농도가 혐기성 발효를 통한 수소생산과정에 미치는 영향 및 미생물 군집의 변화양상을 살펴보고자 하였으며, 본 실험을 통해 나타난 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 음식물쓰레기를 기질로 이용한 혐기성 발효 수소 생산 실험에서 발생된 가스는 주로 수소와 이산화탄소로 구성되

Table 4. Affiliation of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) fragments determined by their 16S rDNA sequence

Band name	Gen band search result Phylogenetically closest relative	Assession No.	Similarity	Taxonomic description (class)
1	<i>Enterococcus faecium partial</i>	HE646384.1	96%	Firmicute
2	<i>Uncultured Parabacteroides sp. clone JXSH1-33</i>	JX535107.1	95%	Bacteroidetes
3	<i>Lactococcus lactis isolate TIL8</i>	JX893570.1	91%	Firmicute
4	<i>Alcaligenes faecalis strain DPE04</i>	KF663565.1	92%	proteobacteria
5	<i>Uncultured bacterium clone 70-1-2</i>	DQ842542.1	100%	Bacteria
6	<i>Klebsiella pneumoniae strain ND6</i>	JF927782.1	95%	γ-proteobacteria
7	<i>Clostridium saccharobutylicum DSM 13864</i>	CP006721.1	90%	Firmicute
8	<i>Enterobacter hormaechei strain LAB 229</i>	KJ156326.1	97%	γ-proteobacteria
9	<i>Bacillus cereus strain FSHH4</i>	KC626001.1	94%	Firmicute
10	<i>Enterobacter sp. NCCP-231</i>	AB610883.1	94%	γ-proteobacteria
11	<i>Clostridium algidicarnis strain E107</i>	JX267120.1	86%	Firmicute
12	<i>Clostridium sp. CFPA-20</i>	AB780862.1	91%	Firmicute
13	<i>Uncultured bacterium clone F1Q32TO06HDD21</i>	GU544363.1	86%	Bacteria
14	<i>Klebsiella sp. d252</i>	FJ950657.1	86%	γ-proteobacteria
15	<i>Uncultured bacterium clone B, 11</i>	KF512526.1	95%	Bacteria
16	<i>Clostridium sp. R6</i>	EF174500.1	91%	Firmicute
17	<i>Paenibacillus cineris strain SDT61</i>	KJ018989.1	97%	Firmicute

었으며, 음식물 쓰레기 내 질소의 함량이 200 mg/L일 때 수소생산율은 83.43 mL/g dry wt biomass/hr와 102.00 mL H<sub>2</sub>/g COD로 가장 높은 수소생산 효율을 보여주었으나, 질소의 함량이 600 mg/L 이상이 되면 수소생산에 저해를 주는 것으로 나타났다.

2) 유기산의 분포를 분석한 결과, lactic acid 또는 formic acid는 음식물쓰레기 내 질소의 농도가 200 mg/L 보다 낮거나 높을 때 주로 검출되었으며, 질소의 농도가 600 mg/L 이상일 때 상당량의 propionic acid가 검출된 것으로 보아 혐기성 발효를 이용한 수소생산 시 lactic acid, formic acid, 또는 propionic acid의 생성은 수소생산에 긍정적 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

3) B/A ratio는 수소생산과 비례한다는 종래의 연구결과와 다르게 본 실험에서는 B/A ratio와 수소생산량과의 상관관계는 크게 나타나지 않았다. 따라서 B/A ratio로만 수소생산 경향을 추정하는 것은 적절하지 않다고 판단하였다.

4) 미생물 군집분석 결과, 수소생산효율이 양호할 때 출현하는 미생물 군집(Band 1, 6, 10, 11, 14)은 *Enterococcus faecium partial*, *Klebsiella pneumoniae strain ND6*, *Enterobacter sp. NCCP-231*, *Clostridium algidicarnis strain E107*, 그리고 *Klebsiella sp. d252*으로 규명되었고, 수소생산효율이 낮았을 때 나타난 미생물 군집(Band 4, 9, 13, 17)은 *Alcaligenes faecalis strain DPE04*, *Bacillus cereus strain FSHH4*, *Uncultured bacterium clone F1Q32TO06HDD21*, 그리고 *Paenibacillus cineris strain SDT61*으로 규명되었다.

본 실험을 통하여 보다 효율적인 수소 생산을 위해서는 음식물쓰레기의 적절한 전처리가 필요하며, 복합적 저해요인에 대해서도 추후 후속 연구가 필요할 것으로 판단하였다. 또한 음식물 쓰레기를 이용한 수소생산을 보다 효율적으로 수행하기 위해서는 미생물 군집에 대한 개별적 특성에 관한 연구도 필요하다고 판단되었다.

## Acknowledgement

이 연구는 서울과학기술대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

KSEE

## Reference

- Scott, D. S., "Hydrogen-the case for inevitability," *Int. J. Hydro. Energy*, **29**(3), 225~227(2004).
- Debabrata, D. and Veziroglu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: a survey of literature," *Int. J. Hydro. Energy*, **26**(1), 13~28(2001).
- Rifkin, J., "The hydrogen economy: the worldwide energy web and the redistribution of the power on earth," Penguin Putnam, New Work, US, pp. 15~17(2002).
- Mizuno, O., Ohara, T., Shinya, M. and Noike, T., "Characteristics of hydrogen production from bean curd manufacturing waste by anaerobic microflora," *Water Sci. Technol.*, **42**(3), 345~350(2000).
- Okamoto, M., Miyahara, T. Mizuno, O. and Noike, T., "Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes," *Water Sci. Technol.*, **41**(3), 25~32(2000).
- Kang, J.-H., Kim, D. K. and Lee, T.-J., "Hydrogen production and microbial diversity in sewage sludge fermentation preceded by heat and alkaline treatment," *Bioresour. Technol.*, **109**, 239~243(2012).
- Ozkan, L., Tuba, H. E., Goksel, N. D., "Effects of pretreatment methods on solubilization of beet-pulp and bio-hydrogen production yield," *Int. J. Hydro. Energy*, **36**(1), 382~389(2011).
- Jun, Y.-S., Joe, Y.-A. and Lee, T.-J., "Change of Microbial Community and Fermentative Production of Hydrogen from Tofu Wastewater," *J. Kor. Soc. Environ. Eng.*, **31**(2), 139~146(2009).
- Wesley, W. and Jr., Eckenfelder, Industrial Water Pollution Control, 3rd ed., Mc Graw-Hill, New york, pp. 422(2000).
- Ueno, Y., Haruta, S., Ishii, M. and Igarashi, Y., "Characterization of a microorganism isolated from the effluent of hydrogen fermentation by microflora," *J. Biosci. Bioeng.*, **92**(4), 397~400(2001).
- Hiraishi, A., "Respiratory quinone profiles as tool for identifying different bacterial populations in activated sludge," *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **34**(1), 39~56(1988).
- Chen, X., Sun, Y., Xiu, Z., Li, X. and Zhang, D., "Stoichiometric analysis of biological hydrogen production by fermentative bacteria," *Int. J. Hydro. Energy*, **31**(4), 539~549(2006).
- Hollibaugh, J. T., Bano, N. and Ducklow, H., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to Nitrosospira-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).
- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleifer, K.-H., "Phylogenetic identification and insitu detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**(1), 143~169(1995).
- Logan, B. E., OH, S. E., Kim, I. S. and Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers," *Environ. Sci. Technol.*, **36**(11), 2530~2535(2002).
- Herbert, H. P. F. and Hong, L., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture," *Bioresour. Technol.*, **82**(1), 87~93(2002).
- Chen, C. C. and Lin, C. Y., "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor," *Adv. Environ. Res.*, **7**(3), 695~699(2003).
- James, T. H., Nasreen, B. and Hugh, W., "Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to Nitrosospira-like ammonia-oxidizing bacteria," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(3), 1478~1484(2002).

21. Mannix, S. P., Shin, H., Masaru, H., Rumiko, S., Chie, Y., Koichiro, H., Masaharu, I. and Yasuo, I., "Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter," *J. Biosci. Bioeng.*, **91**(2), 159~165(2001).
22. Auch, A. F., Henz, S. R., Holland, B. R. and Goker, M., "Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences," *Bio-Med Central Bioinformatics*, **7**(350), 1~16(2006).
23. Sudhir, K., Masatoshi, N., Joel, D. and Koichiro, T., "MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences," *Brierings Bioinformatics*, **9**(4), 299~306(2008).
24. Felgenstein, J., "Confidence limits on phylogenetics: an approach using the bootstrap," *Evolution*, **39**, 783~791(1985).
25. Kimura, M., "A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences," *J. Mol. Evol.*, **16**(2), 111~120(1980).
26. Saitou, N. and Nei, M., "The neighbour-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees," *Mol. Biol. Evol.*, **4**(4), 406~425(1987).
27. Lee, S. M., Park, J. L., Ahn, J. S., "The Study on the Alcohol Extraction from Organic Wastes by Anaerobic Digestion," *J. Kor. Soc. Waste Manage.*, **3**(2), 49~64(1986).
28. Korea Ministry of environment Homepage, <http://www.me.go.kr>(2005).
29. Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S., "Inhibition of anaerobic digestion process: a review," *Bioresour. Technol.*, **99**(10), 4044~4064(2008).
30. Kim, D.-H., Kim, S.-H., Shin, H.-S., "Sodium inhibition of fermentative hydrogen production," *Inter. J. Hydro. Energy*, **34**(8), 3295~3304(2009).
31. Zhang, S., Lee, Y.-H., Km, T.-H. and Hwang, S.-J., "Effects of NaCl Concentrations on Hydrogen Production and Microbial Community by Dark-fermentation," *J. Kor. Soc. Waste Manage.*, **39**(1), 46~51(2013).