Trans. of Korean Hydrogen and New Energy Society, Vol. 28, No. 5, 2017, pp. 440~446
DOI: https://doi.org/10.7316/KHNES.2017.28.5.440

KHNES
pISSN 1738-7264 • eISSN 2288-7407

탄수화물, 단백질, 지방 함량에 따른 혐기성 수소 발효시 부산물 및 미생물 군집 특성 평가

이채영[1] · 한선기[2†]

[1]수원대학교 토목공학과 · 하천환경기술연구소, [2]한국방송통신대학교 환경보건학과

Effects of Carbohydrate, Protein and Lipid Content of Substrate on Hydrogen Production and Microbial Communities

CHAE-YOUNG LEE[1], SUN-KEE HAN[2, †]

[1]Department of Civil Engineering and Institute River Environmental Technology, The University of Suwon, 17 Wauan-gil, Bongdam-eup, Hwaseong 18323, Korea
[2]Department of Environmental Health, Korea National Open University, 86 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 03087, Korea

[†]Corresponding author :
skhan003@knou.ac.kr

Received 31 July, 2017
Revised 25 August, 2017
Accepted 12 October, 2017

Abstract >> This study was aimed at evaluating the effects of carbohydrate, protein and lipid content of substrate on hydrogen yields and microbial communities. The hydrogen yields were linearly correlated to carbohydrate content of substrates while others (content of proteins and lipids) did not make a significant contribution. The chemical composition of substrates produced effects on the final products of anaerobic hydrogen fermentation. Acetate and butyrate were the main fermentation products, with their concentration proving to correlate with carbohydrate and protein content of substrates. The result of microbial community analysis revealed that the relative abundances of *Clostridium butyricum* increased and Clostridium perfringens decreased as the carbohydrate content increased.

Key words : Anaerobic hydrogen fermentation(혐기성 수소 발효), Carbohydrate(탄수화물), Protein(단백질), Hydrogen production microorganism(수소 생성 미생물)

1. 서 론

석유, 석탄 및 천연가스 등과 같은 화석연료는 에너지, 연료, 화학제품 등의 주요 원료로 이용가능하다. 매장량이 한정된 화석연료의 의존성을 낮추기 위한 대안으로 재생가능한 에너지원과 유기성 폐기물 등을 이용한 바이오 연료 및 제품 생산 기술이 주목받고 있다[1,2]. 음식물류 폐기물을 비롯한 유기성 폐기물은 주로 탄수화물, 단백질 그리고 지방으로 구성되어 있으며 바이오리파이너리 공정을 통해 바이오 연료와 제품을 생산하기 위한 대표적인 공급 원료이다[3].

2017 The Korean Hydrogen and New Energy Society. All rights reserved.

유기성 폐기물을 이용한 바이오리파이너리 공정에서 혐기성 발효를 이용한 생물학적 수소 생산은 중심적 역할을 수행할 수 있다[4]. 혐기성 수소 발효는 음식물류 폐기물 등에 함유된 고분자 유기 물질들을 짧은 사슬 지방산(short chain fatty acids, SCFAs), 알코올 등 분해할 수 있으며, 가스 형태의 수소를 생산하고, 유기 질소는 암모니아 형태로 전환할 수 있는 장점을 가지고 있다[4].

유기성 폐기물을 이용한 혐기성 수소 발효는 기질의 종류 및 조성, 온도, pH, 미량의 영양염류 등 다양한 인자들에 영향을 받는다[5,6].

유기성 폐기물의 조성은 수소 전환율을 적절하게 평가하기 위한 기본적인 특성 중 하나이다[7]. 많은 선행 연구 결과들을 살펴보면 탄수화물의 수소 전환율은 단백질과 지방에 비해 높게 보고되고 있다[5,8,9]. 단백질이 유기산으로 분해되는 경로는 크게 스틱랜드 반응(Stickland reaction), 산화성 탈아미노화 반응과 환원적 탈아미노화 반응으로 대변된다. 첫 번째인 스틱랜드 반응은 단백질 분해의 90%를 담당하며, 두 번째인 산화성 탈아미노화 반응은 수소를 생성하지만 수소의 분압이 매우 낮을 때 발현되는 단점이 있다. 마지막으로 환원적 탈아미노화 반응은 자연적으로 발생 가능하지만 수소를 소모하는 반응이다[10]. 단백질 분해시 미생물 성장에 필요한 영양염류들을 제공하므로 필요하지만 아미노산의 분해는 수소를 소모하는 것과 관련이 있다[11]. 지방의 혐기성 수소 발효시 글리세롤(glycerol)과 긴 사슬 지방산(long chain fatty acids, LCFAs)을 생산한다. 이 중 LCFAs는 혐기성 미생물의 세포벽에 부착되어 기질과 미생물 간의 물질전달을 방해하고 결과적으로 효율을 감소시킨다[10].

Bai 등[11]은 녹말(starch)과 펩톤(peptone), 글루코오스(glucose)와 펩톤(peptone)을 이용하여 기질내 탄수화물과 단백질의 비율이 수소 전환율에 미치는 영향을 평가하였다. 그 결과에 따르면 녹말을 탄수화물로 이용한 경우에는 탄수화물과 단백질의 비율이 4 g COD/g COD로 나타났다. 글루코오스를 탄수화물로 이용한 경우에는 녹말에 비해 낮은 1.5 g COD/g COD로 나타났다. Kim 등[12]은 탄수화물 기질로 음식물류 폐기물을 이용하였으며 단백질 기질로 하수 슬러지를 이용하였다. 탄수화물이 풍부한 음식물류 폐기물의 비율이 높을수록 수소 전환율이 높게 나타났다. 그에 반해 Boni 등[13]은 탄수화물이 풍부한 음식물류 폐기물에 단백질과 지방이 풍부한 도축 폐수를 혼합하여 수소 전환율을 평가하였다. 그 결과에 따르면 30-40%의 음식물류 폐기물과 60-70%의 도축 폐수를 혼합하였을 때 가장 높은 수소 전환율이 나타났다.

혐기성 수소 발효시 탄수화물의 수소 전환율은 단백질과 지방에 비해 높게 보고되고 있다. 그러나 유기성 폐기물과 같이 탄수화물, 단백질 및 지방이 혼합된 기질 내에서 3가지 주요 물질의 함량이 수소 전환율이 미치는 영향에 관한 연구는 미비하다.

따라서 본 연구에서는 탄수화물, 단백질 및 지방의 함량을 달리한 유기성 폐기물을 이용하여 혐기성 수소 발효의 성능과 이때의 미생물 군집 특성을 평가하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 기질 및 식종 미생물

2.1.1 기질

본 연구에서 이용한 유기성 폐기물은 기질의 특성에 따른 영향을 줄이고자 합성 음식물류 폐기물을 이용하였다. 합성 음식물류 폐기물의 구성은 탄수화물(곡식류), 단백질(육류)과 지방(유제품)을 혼합하여 제조하였다. 탄수화물, 단백질 및 지방의 구성비는 합성 음식물류 폐기물의 구성비를 달리하여 제조하였다(Table 1). 제조한 합성 음식물류 폐기물은 가정용 분쇄기를 이용하여 5 mm 이하로 분쇄 및 혼합하였으며 실험 전까지 4℃에서 보관하였다.

2.1.2 식종 미생물

본 연구에서 사용된 식종균은 S시에 위치한 혐기성 소화조 슬러지를 이용하였으며 4 mm체를 이용

하여 불순물을 제거하였다. 불순물을 제거한 소화 슬러지는 90℃에서 15분간 열처리를 통해 수소 생산과 무관한 미생물의 성장을 억제하였다.

2.2 혐기성 수소 발효 실험

본 연구에서 이용된 혐기성 수소 발효 반응기는 아크릴 재질로 제작되었으며 유효체적 300 mL이다. 반응기에는 가스 시료 채취를 위한 가스 배출구와 pH 측정을 위한 pH 전극 소켓이 장착 가능하도록 제작하였다.

혐기성 수소 발효 반응기에 식종 미생물을 50% 채우고 나머지는 기질과 초순수를 투입하였다. 기질은 기질 농도에 따른 영향을 줄이고자 총 고형물(total solids, TS) 기준으로 40 g TS/L에 맞춰 투입하였다. 식종 미생물과 기질로 채워진 반응기는 질소 가스를 이용하여 혐기성 조건으로 전환하였다. 반응조는 열순환펌프가 장착된 온탕기에서 운전온도 35±1℃를 유지하며 배양하였다. 교반 속도는 150 rpm으로 고정하였으며 초기 pH는 8.0, 운전 pH는 5.5±0.1로 고정하였다. 바이오가스의 측정은 체적 측정이 가능한 유리 주사기를 이용하여 측정하였다.

2.3 분석 방법

바이오가스내 수소의 함량은 열전도검출기(thermal conductivity detector, TCD)가 장착된 가스 크로마토그래피(gas chromatography, Gow Mac series 580, USA)를 이용하여 측정하였다. 가스 크로마토그래피의 운반체로는 초고순도 질소(99.999%)를 사용하였으며 유속은 30 mL/min으로 고정하였다. Column은 molecular sieve 5A (80/100 mesh)를 충진제로 사용한 1.8 m×3.2 mm stainless steel column을 이용하였다. Column, injector와 detector의 온도는 50, 80 및 90℃로 유지하였다. 휘발성 지방산(volatile fatty acids, VFAs) 분석은 자외선 검출기(210 nm)와 fast acid column (BIO-RAD, 100×7.8 mm, USA)이 장착된 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, YL 9100, Korea)를 이용하여 분석하였다. 이동상 물질은 0.005 M 황산을 이용하였다. 기질의 TS 및 휘발성 고형물(volatile solids, VS)은 standard methods에[14], 탄수화물, 단백질 및 지방은 식품공전에 준하여 수행하였다[15].

3. 결과 및 고찰

3.1 유기성 폐기물 화학적 조성에 따른 수소 전환율

Table 1에 제시된 기질 조건에 따라 혐기성 수소 발효 실험을 수행하였으며 그 결과는 Table 2에 제시하였다. Fig. 1에는 기질별 탄수화물 함량에 따른 수소 전환율을 제시하였다. 혼합물 1-8까지의 바이오가스내 수소 함량은 55.6±1.3-56.1±1.9%의 범위로 나타났다. 이와 같은 결과는 기질내 화학적 조성의 차이가 바이오가스내 수소 함량에 미치는 영향이 크지 않은 것으로 판단된다. 수소 전환율의 경우에는 기질내 탄수화물의 함량이 높아질수록 증가하는 것으로 나타났으며 선형적인 관계를 보였다. 상대적으로 기질내 단백질의 함량이 높아질수록 수소 전환율

Table 1. Physical and chemical characterization of the mixtures

Parameter	Mixtures					
	1	2	3	4	5	6
TS (%)	31.1±0.6	32.3±0.8	34.0±1.1	32.3±1.4	30.4±0.4	30.7±0.5
VS (%TS)	97.4±0.4	96.4±0.7	98.1±0.3	96.8±0.4	97.4±0.2	98.1±0.3
Lipid (%TS)	3.2	6.3	9.2	3.2	6.2	9.2
Protein (%TS)	80.4	61.3	36.5	32	23.6	12.5
Carbohydrate (%TS)	16.4	32.4	54.3	64.8	70.2	78.3
Carbohydrate/protein	0.2	0.5	1.5	2.0	3.0	6.3

Table 2. The biogas production, hydrogen yield and hydrogen contents obtained from mixtures

Substrates	Biogas production (mL H_2/g VS)	Hydrogen yield (mL H_2/g VS)	Hydrogen content (%)
Mix 1	98.0±12.7	54.5±3.4	55.6±1.3
Mix 2	155.71±8.6	90.5±4.2	58.1±0.8
Mix 3	205.3±11.9	115.6±4.3	56.3±2.2
Mix 4	264.2±11.3	151.3±3.2	57.3±1.8
Mix 5	301.7±12.4	172.3±4.2	57.1±2.4
Mix 6	341.8±9.1	191.7±4.1	56.1±1.9

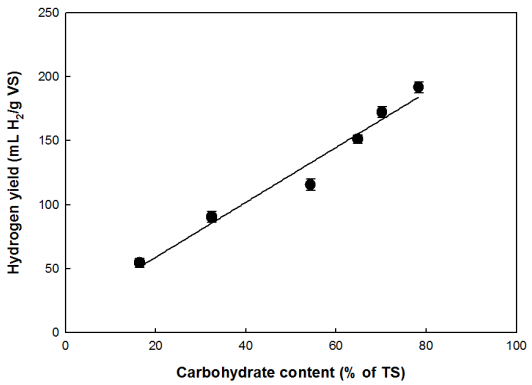

Fig. 1. The hydrogen yield of six mixtures related to their carbohydrate content (% of TS)

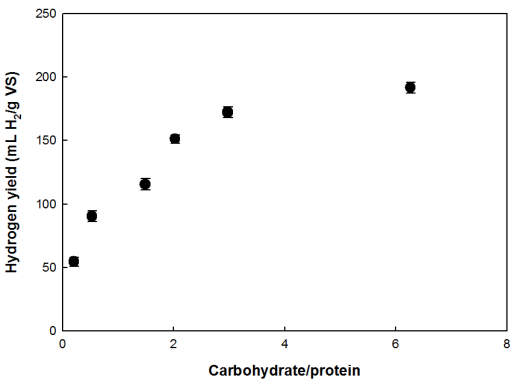

Fig. 2. The hydrogen yield of six mixtures related to carbohydrate to protein ratio

은 감소하는 것으로 나타났다. 선행 연구 결과에 따르면 단백질은 스틱랜드 반응에 의해 단백질이 가수분해되어 아미노산이 생산되며 이때 수소는 생산되지 않는다. 또한 기질 내 고농도의 단백질은 암모늄이온(NH_4^+)의 과다 축적을 유발하여 저해 작용을 유발한다[10,16]. Alibardi와 Cossu[3]의 연구에 따르면 수소 전환율과 기질내 탄수화물 함량의 관계는 선형적인 증가로 나타났다. 그에 반해 단백질 함량이 증가되는 경우에는 수소 전환율이 감소하는 것으로 나타나 본 연구와 유사하게 나타났다.

Alibardi와 Cossu[7]의 연구 결과에 따르면 지방 함량이 <1-4% 범위일 때 수소 발효에 미치는 영향은 미비한 것으로 나타났으며 15% 이상일 경우 수소 전환율이 감소하는 것으로 나타났다.

본 연구 결과를 살펴보면 3.2-9.2% 범위의 지방 함량은 수소 전환율에 미치는 영향이 미비한 것으로 나타났다. 선행 연구와 본 연구의 결과를 종합해 보면 지방의 함량이 10% 미만일 경우에는 수소 전환율에 미치는 영향이 미비하지만 15% 이상일 경우에는 저해가 나타나는 것으로 판단된다.

Fig. 2에는 기질내 탄수화물과 단백질의 비(carbohydrate to protein ratio)와 수소 전환율을 관계를 제시하였다. 탄수화물/단백질의 비가 0.2-3.0의 범위에서 증가할 때 수소 전환율은 선형적인 증가 추세로 나타났다. 그러나 탄수화물과 단백질의 비가 3.0에서 6.3으로 증가되었을 때는 수소 전환율이 선형적으로 증가하지 않는 것으로 나타났다. Lin과 Lay[17]는 기질내 질소(단백질)를 제한함으로써 C/N 비(carbon to nitrogen ratio)가 증가되며 이로 인해 수소 전환율이 증가한 것으로 보고하였다. 그러나 Alibardi와 Cossu[3]은 C/N 비 또는 탄수화물/단백질 비의 증가가 수소 전환율의 증가와는 무관한 것으로 보고하였다. 그러나 탄수화물/단백질의 비가 0.8-5.7 범위에서 수소 전환율은 증가하였으며 6.3 이상에서는 영향이 미비한 것으로 나타났다. 따라서 본 연구

Table 3. The volatile fatty acids concentration measured at the end fermentation tests from the mixtures

Substrates	Volatile fatty acids				
	Acetate	Butyrate	Propionate	Caprate	Valerate
Mix 1	2.1±0.3	0.8±0.3	0.4±0.0	0.3±0.0	0.2±0.0
Mix 2	2.3±0.2	0.9±0.4	0.7±0.2	0.2±0.0	0.2±0.0
Mix 3	1.9±0.4	1.1±0.6	0.6±0.2	0.4±0.0	0.2±0.0
Mix 4	1.8±0.3	1.3±0.2	0.5±0.0	<0.1	0.1±0.0
Mix 5	1.5±0.6	1.2±0.4	0.8±0.1	<0.1	<0.1
Mix 6	1.6±0.3	1.3±0.1	0.9±0.1	<0.1	<0.1

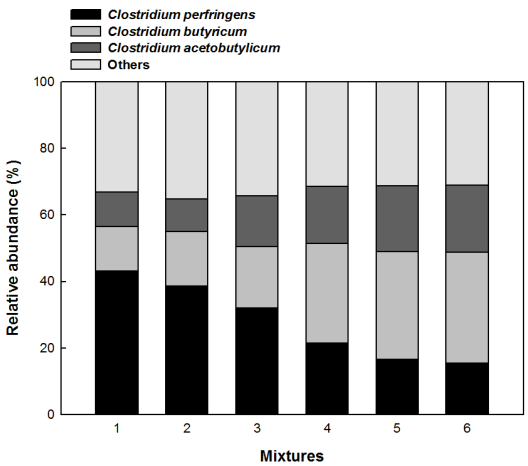

Fig. 3. Taxonomic compositions of microbial communities in reactors

와 선행 연구를 종합할 때 탄수화물/단백질 비가 6.0 이하일 경우에는 수소 전환율이 증가하지만 그 이상일 경우에는 영향이 미비한 것으로 판단된다.

3.2 유기성 폐기물 화학적 조성에 따른 휘발성 지방산 발생 및 미생물 군집

Table 3에는 혐기성 수소 발효 반응이 완료된 시점에서 휘발성 지방산의 농도를 제시하였다. 혐기성 수소 발효시 초산염과 부틸산염은 주로 부산물 중 하나이다. 기질내 탄수화물 함량이 증가할수록 초산염(acetate)의 농도가 낮게 나타났으며 부틸산염은 높아지는 경향으로 나타났다. 카프로산염과 발레르산염의 경우에는 탄수화물 함량이 증가할수록 농도가 0.1 g/L 이하로 나타났다. 또한 부틸산염/초산염의 비는 0.4-0.8 범위로 나타났다. 부틸산염/초산염의 비가 증가할수록 수소 전환율이 높게 나타나며 0.7-0.8 범위가 적정한 것으로 보고되고 있다[3].

Fig. 3에는 혐기성 수소 발효 반응 후 반응기내 미생물 군집 평가 결과를 제시하였다. 모든 반응기에서 *Clostridium*이 발견되었다. 이는 식종 단계에서 수소 생성과 무관한 미생물의 억제를 위해 수행한 전처리에 의한 것으로 판단된다.

발견된 주요 미생물은 *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*으로 나타났다. *C. perfringens*는 단백질의 함량 변화와 유사한 경향으로 나타났다. 또한 *C. perfringens*는 단백질 분해 반응인 Stickland 반응에 관여하는 미생물로써 수소 분압이 낮은 경우에 초산을 생성한다[10].

기질내 단백질 함량이 높을수록 *C. perfringens*가 차지하는 비율이 높게 나타났으며 수소 전환율은 낮고 초산염은 높아지는 경향으로 나타났다.

*C. butyricum*은 대표적인 수소 생성 미생물 중 하나로 기질내 탄수화물 분해시 부틸산염을 부산물로 생성한다(식 (1) 참조).

$$\text{Glucose} \rightarrow 2\text{Butyrate} + 2CO_2 + 2H_2 \qquad (1)$$

기질내 탄수화물의 함량이 높아질수록 전체 미생물에서 차지하는 비율이 증가되는 경향으로 나타났다. 또한 *C. butyricum*과 부틸산염의 경향이 유사하게 나타난 것으로 보아 식 (1)과 같은 반응이 진행된 것으로 판단된다.

*C. acetobutylicum*은 모든 초산염과 젖산염을 산

화시켜 수소를 생성하기도 하지만 수소를 소모하는 반응에도 관여한다(식 (2), (3) 참조)[18].

$$\text{Acetate} + 2\text{Lactate} \rightarrow 1.5\text{Butyrate} + CO_2 + H_2 \quad (2)$$

$$4H_2 + 2CO_2 \rightarrow \text{Acetate} + 2H_2O \quad (3)$$

C. acetobutylicum 경우에는 초산염이 많은 조건에서는 식 (2), 수소의 분압이 높은 조건에서는 식 (3)과 같은 반응에 관여한 것으로 판단된다.

미생물 군집 평가 결과에 의하면 기질내 화학적 조성에 따라 우점화되는 미생물이 상이하게 나타났다. 단백질이 많은 경우에는 *C. perfringens*, 탄수화물이 많은 경우에는 *C. butyricum*이 우점화되는 것으로 나타났다. 또한 기질내 화학적 조성에 따라 생성되는 부산물이 다르며 이로 인해 *C. acetobutylicum*의 반응이 서로 다르게 발현된 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 혐기성 수소 발효시 기질내 탄수화물, 단백질 및 지방 함량에 따른 수소 발생 및 미생물 군집 특성을 평가하였다.

1) 혐기성 수소 발효시 기질내 탄수화물의 비율이 높아질수록 수소 전환율은 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 기질내 화학적 조성의 변화가 바이오가스내 수소의 함량에 미치는 영향을 미비한 것으로 나타났다.

2) 미생물 군집 평가 결과에 따르면 주요 미생물은 *Clostridium perfringens*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium acetobutylicum*으로 나타났으며 기질내 화학적 조성에 따라 우점되는 미생물이 다르게 나타났다.

3) 본 연구는 혐기성 수소 발효시 기질의 조성에 따른 수소 전환율 및 미생물 군집을 평가하였으며 향후 수소 에너지 생산 플랜트 설계 및 운영을 위한 기초자료로 활용될 것으로 기대된다.

후 기

이 논문은 2016년도 한국방송통신대학교 학술연구비 지원을 받아 작성된 것이며 이에 감사드립니다.

References

1. X. Yang, H. S. Choi, C. Park, and S. W. Kim, “Current states and prospects of organic waste utilization for bioferineries”, Renew. Sust. Energ., Vol. 49, 2015, pp. 335-349.
2. B. Kamm and M. Kamm, “Principles of biorefineries”, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 64, 2004, pp. 137-145.
3. L. Alibardi and R. Cossu, “Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products”, Waste Manage., Vol. 47, 2016, pp. 69-77.
4. L. Alibardi, A. Muntoni, and A. Polettini, “Hydrogen and waste: illusions, challenges and perspectives”, Waste Manage., Vol. 34, 2014, pp. 2525-2426.
5. G. De Gioannis, A. Muntoni, A. Polettini, and R. Pomi, “A review of dark fermentation hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions”, Waste Manage., Vol. 33, 2013, pp. 1345-1361.
6. J. Wang and W. Wan, “Factors influencing fermentative hydrogen production: a review”, Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 34, 2009, pp. 799-811.
7. L. Alibardi and R. Cossu, “Composition variability of the organic fraction of municipal solid waste and effects on hydrogen and methane production potentials”, Waste Manage., Vol. 36, 2015, pp. 147-155.
8. T. Kobayashi, K. Q. Xu, Y. Y. Li, and Y. Inamori, “Evaluation of hydrogen and methane production from municipal solid wastes with different compositions of fat, protein, cellulosic materials and the other carbohydrates”, Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 37, pp. 15711-15718.
9. M. Okamoto, T. Miyahara, O. Mizuno, and T. Noike, “Biological hydrogen potential of materials characteristic of the organic fraction of municipal solid wastes”, Water Sci. Technol., Vol. 41, 2000, pp. 25-32.
10. L. Dong, Y. Zhenhong, S. Yongming, K. Xiaoying, and Z. Yu. “Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation”, Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 34, 2009, pp. 812-820.
11. M. Bai, S. Cheng, and Y. Chao, “Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates”, Water Sci. Technol., Vol. 50, 2004, pp. 209-216.
12. S. H. Kim, S. K. Han, and H. S. Shin, “Feasibility of bio-

hydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 29, pp. 1607-1616.
13. M. R. Boni, S. Sbaffoni, and L. Tuccinardi, "The influence of slaughterhouse waste on fermentative H2 production from food waste: preliminary results", Waste Manage., Vol. 33, 2013, pp. 1362-1371.
14. APHA-AWWA-WEF, "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater", American Public Health Assoc., USA, 2005.
15. Ministry of Food and Drug Safety, "Korean Food Standards Codex", Ministry of Food and Drug Safety, Korea, 2012.
16. J. Ariunbaatar, E. S. Di Perta, A. Panico, L. Frunzo, G. Esposito, P. N. L. Lens, and F. Pirozzi, "Effect of ammoniacal nitrogen on one-stage and two-stage anaerobic digestion of food waste", Waste Manage., Vol. 38, 2015, pp. 388-398.
17. C. Y. Lin and C. H. Lay, "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by microflora", Int. J. Hydrogen Energy, Vol. 29, 2004, pp. 41-45.
18. S. K. Han, J. M. Choi, and C. Y. Lee, "Hydrogen production from microalgae in anaerobic mesophilic and thermophilic conditions", Trans. of the Korean Hydrogen and New Energy Society, Vol. 25, No. 4, 2014, pp. 337-343.