creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

[UCI]I804:24011-200000267363

2019년 8월

석사학위 논문

3단계 발효시스템을 이용한 음식폐기물로부터 바이오가스의 생산 및 이를 이용한 메탄산화세균의 배양

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

이 지 형

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3단계 발효시스템을 이용한 음식폐기물로부터 바이오가스의 생산 및 이를 이용한 메탄산화세균의 배양

Biogas production from food wastes using three-stage methane fermentation system and cultivation of methanotrophs using the biogas

2019년 8월 23일

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

이 지 형

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3단계 발효시스템을 이용한 음식폐기물로부터 바이오가스의 생산 및 이를 이용한 메탄산화세균의 배양

지도교수 김 시 욱

이 논문을 공학석사학위신청 논문으로 제출함

2019년 4월

조선대학교 대학원

신재생에너지융합학과

이 지 형

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

이지형의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 이 인 화 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 성 행 (인)

위 원 조선대학교 교수 김 시 욱 (인)

2019년 5월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목 차

목차 · · ·

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

A. 실험 재료

1. 음식폐기물 · 10

2. 3단계 발효 시스템의 발효조 · · · · · · · · · · · · 10

3. 균주 및 배지 조성 · · · · · · · · · · · · · · · · · · 10

a. 발효에 사용된 균주 및 배지 조성 · · · · · · · · · · 10

b. 메탄산화세균 및 배지 조성 · · · · · · · · · · · · · · 10

B. 실험 방법

1. 3차 발효 시스템의 운전 · · · · · · · · · · · · · · · 11

2. 메탄산화세균의 배양 · · · · · · · · · · · · · · · · · 11

3. COD 분석 · 12

4. 유기산 분석 · 12

5. 가스 분석 · 12

Ⅲ. 결과 및 고찰

A. 음식폐기물의 초기 COD 농도와 시간에 따른 유기산 생산량 · 18

B. 산 생성 발효에서 *C. perfringens* 접종에 따른 유기산 생산

1. 회분식 산 생성 발효에서의 *C. perfringens* 접종에 따른 유기산 생산 · 23

2. 반복 회분식 산 생성 발효에서의 *C. perfringens* 존재

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

여부에 따른 유기산 생산 · · · · · · · · · · · · · · · 25
C. 3단계 발효 시스템의 COD 변화와 3차 메탄 발효조의 가스 생산량 · 27
D. 3단계 메탄발효 시스템의 운전조건 및 성능 · · 29
E. 3차 메탄 발효조의 균주 탐색 · · · · · · · · · 31
F. 바이오가스와 순수 메탄가스를 이용한 Methanotroph 배양 · 31

Ⅳ. 결론 · 33

참고문헌 · 35

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Tables

Table 1. Steps involved in anaerobic oxidation of complex wastes. 4

Table 2. Composition and concentration of Reinforced Clostridial Medium for *Clostridium perfringens*. 13

Table 3. Composition and concentration of nitrate minimal salt (NMS) medium for Methanotroph.. 13

Table 4. Composition and concentration of stock solution for NMS medium. 13

Table 5. Operational conditions and performance of three-stage methane fermentation system. 13

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Fig. 1. Pathway of anaerobic methane fermentation. 4

Fig. 2. Pathways for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde in methanotrophic bacteria. 9

Fig. 3. Conversion of food waste to biogas through three stage fermentation system. 12

Fig. 4. Method for culture of *Methylosinus* sp. JH using the biogas or pure methane. 13

Fig. 5. Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 120,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD. 19

Fig. 6 Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 70,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD. 20

Fig. 7 Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 50,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD. ····· 21

Fig. 8 Production of organic acids from food wastes through batch fermentation: (a) without inoculation of *C. perfringens*, (b) with inoculation of *C. perfringens* without pH control and, (c) with inoculation of *C. perfringens* with pH control at 6.5. Symbols: (●) glucose, (○) lactate, (■) acetate, (□) ethanol, and (▲) butyrate. ····· 23

Fig. 9 Production of organic acids through repeated-batch fermentation: (a) without inoculation of *C. perfringens*, (b) with inoculation of *C. perfringens* without pH control and, (c) with inoculation of *C. perfringens* with pH control at 6.5. Arrows indicates the supply of fresh food waste. Symbols: (○) lactate, (●) acetate, (□) ethanol, and (■) butyrate. ····· 25

Fig. 10 Decrease of COD concentrations (a) and concomitant methane production (b) through three-stage methane fermentation system. Symbols: CODs at different stages of hydrolysis (●), acidogenesis (○), and methanogenesis(■). ····· 27

Fig. 11 Culture of *Methylosinus* sp. JH using pure methane or biogas. Methane and oxygen ratios is 51 : 49 using pure methane. And methane and oxygen ratios is 43 : 57 using biogas. (a) Growth curve of *Methylosinus* sp. JH, (b) Percent of gas in headspace of vial. ····· 35

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Biogas production from food wastes using three-stage methane fermentation system and cultivation of methanotrophs using the biogas

Ji Hyung Lee
Advisor: Prof. Si Wouk Kim
Dept. of Renewable Energy Convergence
Graduate School of Chosun University

The three stage methane fermentation system was constructed based on the fermentation system developed in our laboratory. This system consisted of hydrolysis, anaerobic acid and methane fermenter. The first stage was a semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic process which converted food wastes into complex organics such as carbohydrates, fats and proteins. The operation temperature, hydraulic retention time (HRT) and total chemical oxygen demand (tCOD) were 45℃, 2 days and 78,542 mg/L, respectively. The second stage was an anaerobic acidogenic process which produced organic acids such as butyric acid, lactic acid and acetic acid, as well as ethanol. The operation temperature, HRT, and tCOD were 35℃, 2 days and 72,151 mg/L.

In the third stage, strictly anaerobic methane fermentation, biogas was produced by methanogenic bacterium using organic acids including acetic acid. Biogas consisted of methane and carbon dioxide with 78 % methane proportion. The operation temperature, HRT, and tCOD for methanogenesis

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

were 47℃, 12 days, and 8,412 mg/L. The effects of initial COD concentration of food waste and HRT of first stage and second stage on the organic acid productions were examined.

When the initial COD concentration of food waste was about 120,000 mg/L and HRT of the first stage and second stage were 24 : 72, the total amount of organic acid was about 12,500 mg/L. When the initial COD concentration of food waste was about 70,000 mg/L and HRT of the first stage and second stage were 36 : 90, the total amount of organic acid was about 14,000 mg/L. When the initial COD concentration of food waste was about 50,000 mg/L and HRT of the first stage and second stage were 24 : 72, the total amount of organic acid was about 9,000 mg/L.

The production of organic acid by the inoculation of *Clostridium perfringens* was examined during the second stage anaerobic acid fermentation. 4.5 g/L organic acid was produced without inoculation of *C. perfringens* in the batch experiment. On the other hand, when *C. perfringens* was inoculated and the pH is adjusted to 6.5 or not, total production of organic acids were 32.0 and 24.5 g/L, respectively. The production of organic acid was 7.0 g/L when the *C. perfringens* was not inoculated through the repetitive batch experiment. On the other hand, the production of organic acid were 25.0 and 11.5 g/L when *C. perfringens* was inoculated and the pH is adjusted to 6.5 or not, respectively.

Finally, the methanotrophic bacterium isolated from the soil was identified as *Methylosinus* sp. JH and cultured using the biogas produced by the three stage methane fermentation system and pure methane. The proportion of methane and oxygen were 43 : 57 and 51 : 49 in biogas and pure methane used for cultivation. When *Methylosinus* sp. JH was cultured using the biogas and pure methane, the growth rate was not changed significantly. The result of this experiment suggests, it is appropriate to cultivate methanotrophic bacteria using the produced biogas.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ. 서론

A. 연구배경

국내에서 발생하는 생활폐기물은 2016년 기준으로 하루에 53,772톤 이며, 그 중 음식물 쓰레기가 15,680톤으로 약 29.2%를 차지한다. 이렇게 발생된 음식물 쓰레기는 매립, 소각 그리고 재활용되는데, 각각 2.5, 7.3 그리고 90.2%의 비율로 처리되었다.[1] 음식물 쓰레기의 재활용에는 사료화, 퇴비화 그리고 혐기소화하는 방법 등이 있다. 사료화와 퇴비화는 투입시설을 통해 음식물쓰레기가 투입되면, 음식물쓰레기에 포함된 비닐, 뼈다귀 등의 이물질을 선별하는 과정을 거친 다음 음식물쓰레기를 원하는 크기로 파쇄 하여 재활용된다. 사료화의 경우 음식물폐기물이 비교적 단백질 함량이 높아 사료로서의 이용가치가 있지만, 각종 병원성 미생물이 증식할 위험이 있어 반드시 가열공정을 거쳐야하며, 영양분을 균일하게 맞추기 어려운 점을 갖고 있다. 그리고 퇴비화는 우리나라 음식물 쓰레기의 수분과 염분의 고농도로 인해 농작물에 피해를 줄 우려가 있다. 그래서 고농도 유기성 바이오매스인 음식물쓰레기를 혐기 소화 처리하여 메탄을 생산하는 방법으로 대체할 수 있다.

음식물 쓰레기는 고농도의 유기성 폐기물로 환경오염문제가 심각한 요즈음 바이오매스로써 가치가 높다. 바이오매스(biomass)는 태양 에너지를 받아 유기물을 합성하는 식물체와 이들을 식량으로 하는 동물, 미생물 등의 생물유기체를 총칭한다.[2] 이러한 음식물 쓰레기를 혐기성 미생물을 이용하여 혐기 소화시켜 메탄과 이산화탄소가 주성분인 바이오가스를 생산할 수 있다. 바이오가스는 메탄이 약 70%를 차지하는데, 메탄은 이산화탄소보다 지구온난화지수가 25배 높은 온실가스 중 하나이며, 주로 화석연료, 폐기물, 축산 및 농업 등에서 발생한다. 하지만 메탄은 천연가스의 90% 이상을 차지하며, 화석연료 고갈과 화석연료 연소에 따른 환경오염에 중요한 요소가 된다. 그러나 이러한 메탄은 운송하는데 부피가 크며, 공기와 섞여 폭발할 수 있는 문제점을 갖고 있다. 그래서 천연가

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

스의 저장과 운송에 대한 문제점을 해결하기 위해 액화시키게 되는데, 이를 액화천연가스(Liquefied Natural Gas, LNG)라고 한다. 가스상의 메탄을 액상의 메탄올로 전환하는 생물학적인 방법은 메탄을 탄소원과 에너지원으로 이용하여 생장하는 메탄산화세균 (methanotrophs 또는 methane-oxidizing bacteria)의 methane monooxygenase (MMO)를 이용하는 것이다. 메탄 1분자와 산소 1/2분자가 MMO에 의해 산화되어 메탄올로 전환된다.

빵, 육류, 채소를 주식으로 하는 외국의 경우 음식물쓰레기를 바이오매스로써 신재생에너지 연료로 만들어 이용하지만 염분농도가 높은 우리나라의 음식물 쓰레기는 외국의 혐기소화 공정에 그대로 적용하기 어렵다.

B. 연구 목적

본 연구에서는 우리나라의 음식물 쓰레기 성상에 적합하도록 본 연구실에서 개발한 3단계 혐기성 메탄발효 시스템을 실험실 스케일로 구축한 후[3], 음식물 쓰레기 혐기발효 조건을 최적화시켜 바이오가스를 생산하였다. 그 후 생산된 바이오가스를 사용하여 메탄을 탄소원으로 이용하는 메탄산화세균을 배양하였다. 이 때 메탄산화세균의 배양에 사용되는 혼합가스의 바이오가스와 산소 비율의 최적조건을 찾고, 순수메탄을 사용하였을 때와 비교하였다. 이 결과를 토대로 메탄을 메탄올로 전환하는 조건을 탐색하는 것을 최종 목표로 설정하였다.

C. 이론적 배경

1. 우리나라의 음식물 쓰레기

우리나라의 생활폐기물의 발생량은 2016년 기준으로 하루에 53,772톤 이며, 그 중 음식물 쓰레기가 약 29.2%인 15,680톤을 차지한다. 음식물 쓰레기는 식용할 수 없는 비 가식부분과 식용으로 이용할 수 있는 부분으로 나뉜다. 식용으로 이용할 수 있는 식량자원이 쓰레기로 버려지는 것은 식량 자원의 낭비와 쓰레기

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의 처리를 위한 자원의 낭비가 발생한다. 식량을 적정량 사용하였다면 원료농산물의 생산을 적게 해도 되며, 생산하기 위한 투입재가 보다 생산적인 다른 부분에 이용될 수 있다. 그리고 음식물쓰레기를 처리하기 위해서는 매립, 소각, 사료 및 퇴비화 그리고 혐기소화 등으로 이루어진다. 우리나라의 경우 면적이 작고, NIMBY (Not In My Backyard)현상으로 매립지 확보가 어렵다. 그리고 사료나 퇴비를 통한 재활용을 하더라도 재활용에 따라 창출되는 부가가치가 낭비자원의 부가가치에 크게 미치지 못하므로 음식물쓰레기의 전량을 재활용 하더라도 음식물 쓰레기의 발생은 자원의 낭비로 불가피하다.

2. 혐기성 소화

혐기성 소화 과정에서 유기물은 산소가 없는 상태에서 미생물에 의해 분해되어 주로 메탄과 이산화탄소로 구성된 바이오가스와 소화액으로 발생한다. 일반적으로, 혐기성 소화는 산 생성 및 메탄 생성 박테리아의 연속적인 작용을 포함하는 2단계 공정으로 인식되었다. 그러나 현재 다양한 종류의 박테리아가 공생하는 복잡한 발효 과정으로 알려져 있다. 한 그룹의 박테리아가 생산하는 제품은 다음 그룹의 기질로 사용된다. 주요 반응의 순서는 Table 1[4-10]이 4가지의 주요 그룹으로 분류할 수 있는데, 크게 가수분해 (Hydrolysis), 산생성 (Acetogenesis) 그리고 메탄생성 (Methanogenesis)으로 이루어진다. 먼저 탄수화물, 단백질, 지방 등의 고분자 유기물질이 아미노산, 당, 지방산 등의 저분자 물질로 가수분해 된다. 그 후 가수분해 액이 산 생성 박테리아에 의해 아세트산, 프로피온산, 부티르산, 발레르산 등의 휘발성 지방산과 젖산 및 수소가 생산된다. 그리고 마지막으로 메탄생성균에 의해 메탄이 발생한다(Fig. 1).[11,12]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

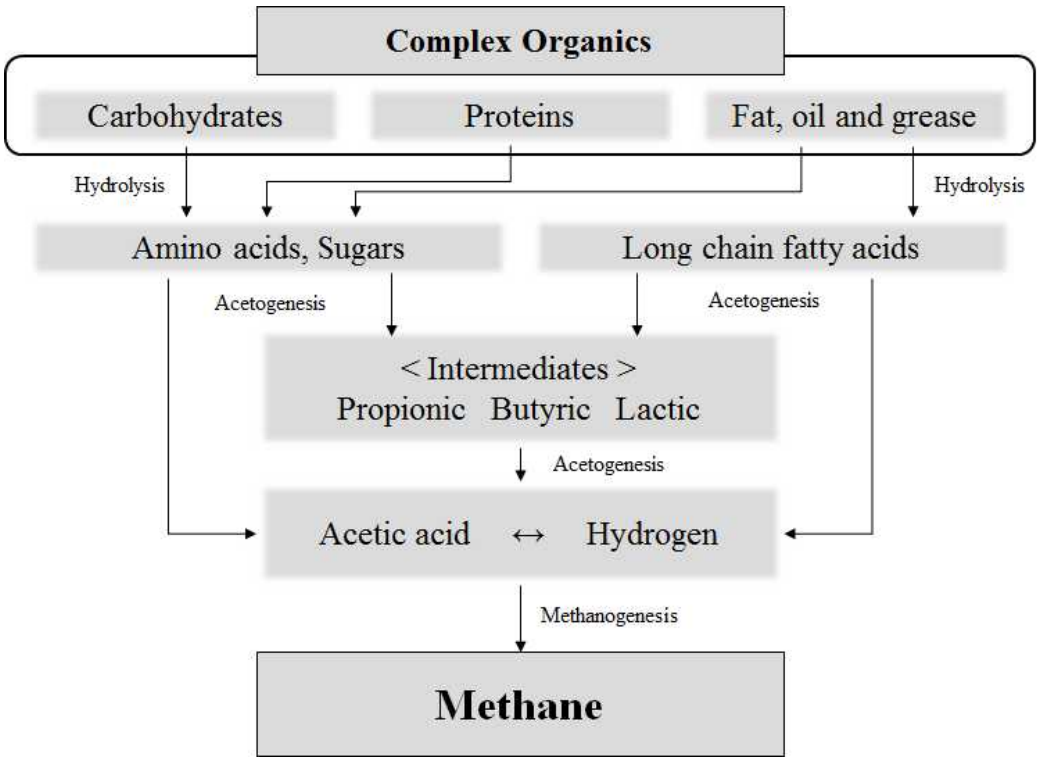

Fig. 1. Pathway of anaerobic methane fermentation.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 1. Steps involved in anaerobic oxidation of complex wastes.

Hydrolysis
sugars, amino acids and long chain fatty acids + $2H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + H_2$
Acidogenesis
$C_6H_{12}O_6 \leftrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$
$C_6H_{12}O_6 + 2H_2 \leftrightarrow 2CH_3CH_2COOH + 2H_2O$
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CH_3COOH$
Acetogenesis
$CH_3CH_2COO^- + 3H_2O \leftrightarrow CH_3COO^- + H^+ + HCO_3^- + 3H_2$
$C_6H_{12}O_6 + H_2O \leftrightarrow CH_3COO^-\ CH_3COO^- + 3H_2 + H^+$
Methanogenesis
$CH_3COOH \rightarrow CH_4 + CO_2$
$CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
$2CH_3CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2CH_3COOH$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 온실가스와 메탄

태양의 에너지는 태양복사의 형태로 방출되며 대부분이 대기를 통과해 지구 표면을 따뜻하게 만든다. 그리고 지구 표면에 의해 적외복사가 방출되는데 대부분은 대기를 통과해 외부로 방출되지만 일부의 적외복사는 이산화탄소와 같은 대기 중의 가스에 의해 흡수된다. 이러한 가스를 온실가스라 한다.[13] 만 온실가스의 증가는 더 많은 열을 흡수하게 하여 대기와 지구표면이 뜨겁게 되면서 온실효과를 가속화하였다. 온실가스에는 이산화탄소(CO_2), 메탄(CH_4), 아산화질소(N_2O), 수소불화탄소(HFC), 사염화탄소(CCl_4), 육불화황가스(SF_6) 등이 있다. 이 온실가스들은 지구온난화지수를 갖고 있는데, 이는 이산화탄소를 기준으로 한 상대적인 복사효과를 의미한다. 이산화탄소, 메탄, 아산화질소, 수소불화탄소, 사염화탄소, 육불화황가스의 온난화지수는 각각 1, 25, 298, 1,430, 1,400, 그리고 22,800이다.

4. 메탄의 전환

천연가스의 주성분인 메탄은 수송과 저장의 문제가 있으며, 산지와 시장의 거리가 먼 경우 그 이용이 제한된다. 이런 메탄가스를 물리적 또는 화학적 방법으로 액화시켜 가치를 높일 수 있다.

a. 물리화학적 방법

메탄을 메탄올로 전환하는 물리화학적 방법에는 간접적 전환방법과 직접적 전환방법이 있다. 간접적 전환방법은 천연가스를 스팀 개질을 통해 일산화탄소와 수소로 이루어진 합성가스를 제조한 후 촉매가 존재하는 반응 용기에 공급된다.

· Steam Reforming : $CH_4 + H_2O \rightarrow CO + 3H_2$ $\triangle_r H = +206\ kJ\ mol^{-1}$

· Water Shift Reaction : $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ $\triangle_r H = -41\ kJ\ mol^{-1}$

· Synthesis : $2H_2 + CO \rightarrow CH_3OH$ $\triangle_r H = -92\ kJ\ mol^{-1}$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

그리고 휘발성 물질과 물 등의 다른 물질들을 제거하는 장치로 구성된 증류 장치를 통해 메탄올이 최종적으로 생산된다. 이 때, 반응하지 않은 합성 가스는 메탄올의 전환 장치로 재순환된다. 이 프로세스는 상업단계로 진행되었고, 기술적으로도 발전했으며, 합성가스의 재순환으로 인해 메탄올의 전체 전환 효율이 높다. 하지만 에너지가 집약적이고, 많은 비용을 요구한다. 또한 고온 및 고압의 증기를 필요로 하며, 수증기 개질 공정에서는 다량의 열이 필요하다.[14]

반면에, 직접적 전환방법은 합성가스를 생성하는 과정을 포함하지 않지만, 산화제압축, 가스의 재활용 및 고온의 작동과 같은 공정의 요소가 여전히 존재한다.[15]

· Partial oxidation of methane

: $CH_4 + 1/2\ O_2 \rightarrow CH_3OH$ Temperature < 450 ℃

이러한 직접적 전환 공정은 단일 단계 반응으로 경제적이며, 메탄올 생산 비용을 비교적 크게 절감할 수 있다. 하지만 이 방법은 메탄올의 수율이 매우 낮으며, 이 때문에 상업적 단계로 진행되지 않았다.

b. 생물학적 방법

화학적인 방법을 이용하여 메탄을 메탄올로 전환할 경우 비용, 높은 에너지 소비, 환경오염 유발 그리고 부식성 환경에 의한 적합한 장비의 필요 등과 같은 단점이 있기 때문에 이를 보완할 수 있는 방법으로 메탄을 산화시키는 균을 이용하는 생물학적인 방법이 있다. 메탄을 유일한 탄소원으로 이용하는 메탄산화세균은 메탄 일원자산소화효소 (MMO)를 이용하여 메탄을 메탄올로 전환할 수 있다.[16]

5. 메탄산화세균

메탄산화세균(Methanotrophic bacteria)은 Methylotrophic bacteria에 속한

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. Methylotrophic bacteria는 메탄, 메탄올, 메틸화 아민, 할로 메탄 그리고 황과 같은 일원자탄소를 탄소원과 에너지원으로 이용하는 세균들의 집단이다. 이 중에서 메탄을 탄소원과 에너지원으로 사용하는 집단이 메탄산화세균이다. 메탄 산화세균은 메탄 일원자 산소화효소(Methane monooxygenase, MMO)를 갖고 있으며, 배양할 때의 구리 농도에 따라 soluble MMO(sMMO) 와 particle MMO(pMMO) 가 발현된다. sMMO는 낮은 구리/바이오매스 비율(≤0.9 nmol of Cu/mg of cell protein)로 배양된 세포에서 발현되며, pMMO는 보다 높은 구리/바이오매스 비율로 배양된 세포에서 발현된다. 메탄산화세균의 MMO에 의해 메탄이 산화되어 메탄올을 생산되는데, 이 때 생산된 메탄올은 또 다른 효소인 메탄올 탈수소효소(Methanol dehydrogenase, MDH)에 의해 포름 알데히드로 산화된다. 그리고 포름 알데히드는 포름 알데히드 탈수소 효소(Formaldehyde dehydrogenase, FADH)에 의해 산화되어 포름산으로 전환되고, 이 포름산은 포름산 탈수소 효소(Formate dehydrogenase, FDH)에 의해 이산화탄소로 전환된다. 한편, 일부의 포름알데히드는 FADH에 의해 포름산으로 산화되지 않고, ribulose monophosphate pathway(RuMP) 경로 또는 serine 경로에 의해 바이오매스로 동화되기도 한다(Fig. 2).[17-20]

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

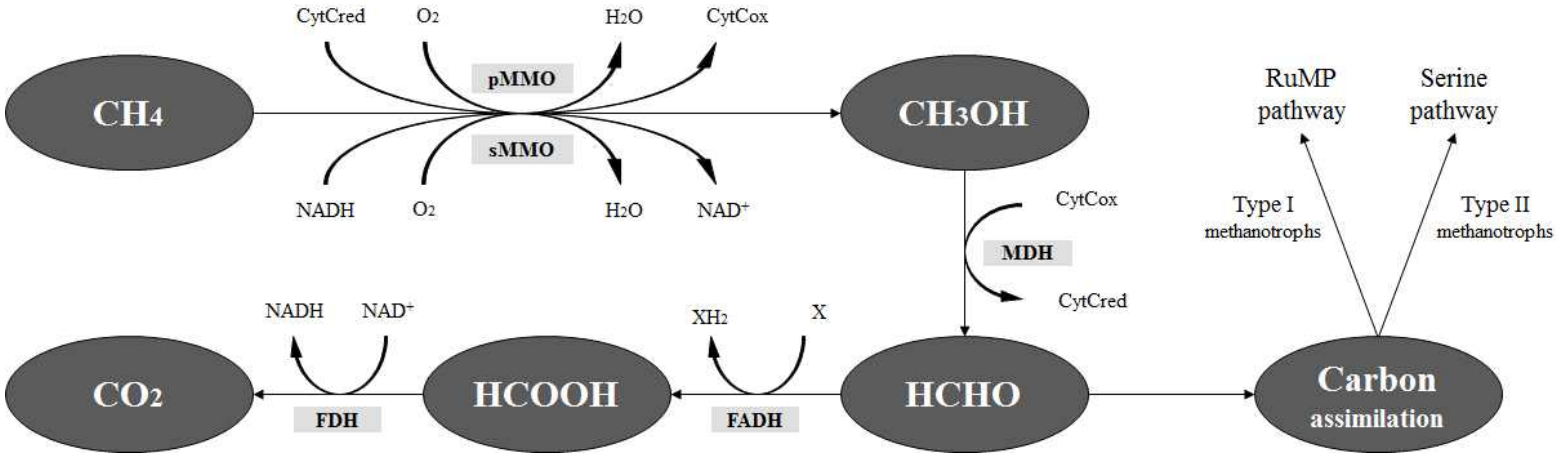

FIg. 2. Pathways for the oxidation of methane and assimilation of formaldehyde in methanotrophic bacteria.

Abbreviations MMO: Methane monooxygenase; MDH: Methanol dehydrogenase; FDH: Formate dehgydrogenase; FADH: Formaldehyde dehydrogenase; CytC: Cytochrome c; RuMP: Ribulose monophosphate.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ. 실험재료 및 방법

A. 실험 재료

1. 음식물쓰레기

본 연구에 이용된 음식물 쓰레기는 조선대학교의 글로벌하우스 기숙사 식당과 조선이공대학교의 식당에서 제공되었다.

2. 3단계 발효 시스템의 발효조

1차 반 혐기성 가수분해는 10 L의 BIOFLO 3000 발효조 (New Brunswick Scientific, USA)를 이용하였고, 2차 혐기성 산발효는 7 L의 KB-250 발효조 (KoBioTech, Korea)를 이용하였다. 그리고 11 L의 3차 혐기성 메탄 발효조는 본 연구실에서 자체 제작하였으며, 발효조의 온도를 맞추기 위해 Tokyo Aikakikai의 NTT-1200 항온조를 사용하였다 (Fig. 3).[3] 각 발효조 사이의 음식폐기물의 수송은 Watson Marlow, 313S 정량펌프를 이용하였다.

3. 균주 및 배지 조성

a. 발효에 사용된 균주 및 배지 조성

2차 혐기성 산발효의 실험에 이용된 혐기성 세균 *Clostridium perfringens* KCTC3269는 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 본 연구에 사용하였다. *C. perfringens* KCTC3269의 배양에 사용된 배지는 Reinforced Clostridial Medium으로 배지의 조성은 Table 2와 같고, 배양온도는 30℃, 배지의 pH는 6.8(±0.2)로 하였다.

b. 메탄산화세균 및 배지 조성

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

본 연구를 위해 사용된 메탄산화세균은 전라남도 보성군 득량만 습지(N - 34° 45.278′ , E - 127° 13.555′)에서 분리되었다. 균주 분리 및 배양에 사용된 배지는 Nitrate mineral salts medium (NMS)으로, 배지의 조성은 Table 3과 4와 같다. 이 때, vitamin stock은 필터(0.2㎛)하여 보관하였으며, 균주의 배양온도는 30℃로 하였다.

B. 실험 방법

1. 3차 발효 시스템의 운전

1차 반 혐기성 가수분해는 10 L의 발효조에서 working volume을 3 L로 하였고, 2차 혐기성 산 발효는 7 L의 발효조에서 working volume을 3 L로 하였다. 그리고 3차 메탄 발효는 11 L의 발효조에서 working volume을 7 L로 하였다. 이 때, 1차, 2차 그리고 3차 발효액을 각각 하루에 1.5 L, 1.5 L 그리고 0.6 L 씩 배출한 후, 1차에는 새로운 음식폐기물, 2차에는 1차 발효액 그리고 3차에는 2차 발효액을 배출한 양만큼 정량펌프를 이용하여 주입하였다. 발효액의 pH를 8.0 내외로 유지하는 3차 메탄 발효조에 산성의 2차 발효액을 넣을 경우 3차 발효액에 있는 메탄생성균이 생장에 미치는 영향을 줄이기 위해 발효조 하단에서 상향으로 주입하는 상향식 혐기성 슬러지 블랭킷(upflow anaerobic sludge blanket) 타입의 발효조를 제작하였다.

2. 메탄산화세균의 배양

바이오가스 또는 순수메탄을 이용하여 메탄산화세균을 배양시키기 위해 160 mL 유리 vial을 사용하였다. 멸균된 160 mL vial에 NMS 배지를 20 mL씩 넣어준 후 blue butyl rubber stopper로 닫고 aluminum cap으로 완전히 막아주었다. 그리고 주사기로 vial 속의 headspace의 공기를 50 mL씩 2번 뺀 후 주사기를 이용하여 균이 충분히 자랄 수 있도록 바이오가스와 산소 또는 메탄과 산소를 총 150 mL가 되게 넣어 주었다. 가스 중의 균에 의한 오염을 없애기 위해 0.2 um PTFE membrane air filter를 사용하여 가스를 주입하였다. 이렇게 준비된 vial에 미리 배양한 *Methylosinus* sp. JH를 200 uL씩 접종하고, 120 rpm, 30 ℃의 조건으로 배양하였다(fig. 4).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. COD 분석

음식물쓰레기의 COD는 중크롬산 칼륨법을 이용하여 분석하였다. 이 때, 시약은 디크로뮴산칼륨($K_2Cr_2O_7$), 황산은(Ag_2SO_4), 황산수은(Ⅱ)($HgSO_4$) 그리고 황산(H_2SO_4)이 사용되었다. 먼저 디크로뮴산칼륨 1.2198g과 황산은 3.67935g을 각각 100mL의 황산에 녹인 후 두 용액을 낮은 온도로 천천히 섞어 준다. 이 때, 갈색병을 이용하며 냉장고에 보관한다. 다음으로 황산은을 75ml 증류수에 녹인 후 5ml의 황산을 넣어준다. 황산은 용액 또한 갈색병을 이용하며 냉장고에 보관한다. 실험 순서로는 디크로뮴산칼륨과 황산은 용액을 test tube에 2ml 넣은 후, 분석하고자 하는 샘플을 2ml 넣어준다. 마지막으로 황산은 용액을 0.2ml 넣은 후 148℃에서 2시간 동안 반응 시킨 다음 620nm에서 측정한다.

4. 유기산 분석

발효를 통해 생산된 유기산은 High-performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies 1200series)와 Auto sampler (SYKAM, S 5200)를 이용하여 분석하였고, 컬럼은 Agilent Hi-Plex H (Serial No. 0003219905-104)를 사용하였다. 분석을 위한 solvent는 0.005 M H_2SO_4을 이용하였으며, 유속은 0.6 mL/min로 하였다. 이 때, 컬럼의 압력은 45-55bar 정도였다. 분석을 위한 샘플은 0.2㎛, ø13mm의 PVDF syringe filter (LK LAB KOREA, F14-61-360)를 이용하여 전처리한 후 분석하였다.

5. 가스 분석

발효를 통해 발생한 바이오가스와 메탄산화세균의 배양을 위한 메탄 및 산소의 농도는 Gas Chromatography (GC, Shimadzu GC-2010 plus)를 이용하였으며, Thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 사용된 컬럼은 Agilent CP-Molsieve 5A (30m X 0.53mm, Φ 15㎛, column max temp : 350℃)이고, carrier gas는 헬륨으로 하였다. 분석조건 중 injector, column 및 detector의 온도는 각각 150, 150 및 200℃이었으며, total flow rate는 31.9 mL/min, current 값은 25 mA로 설정하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

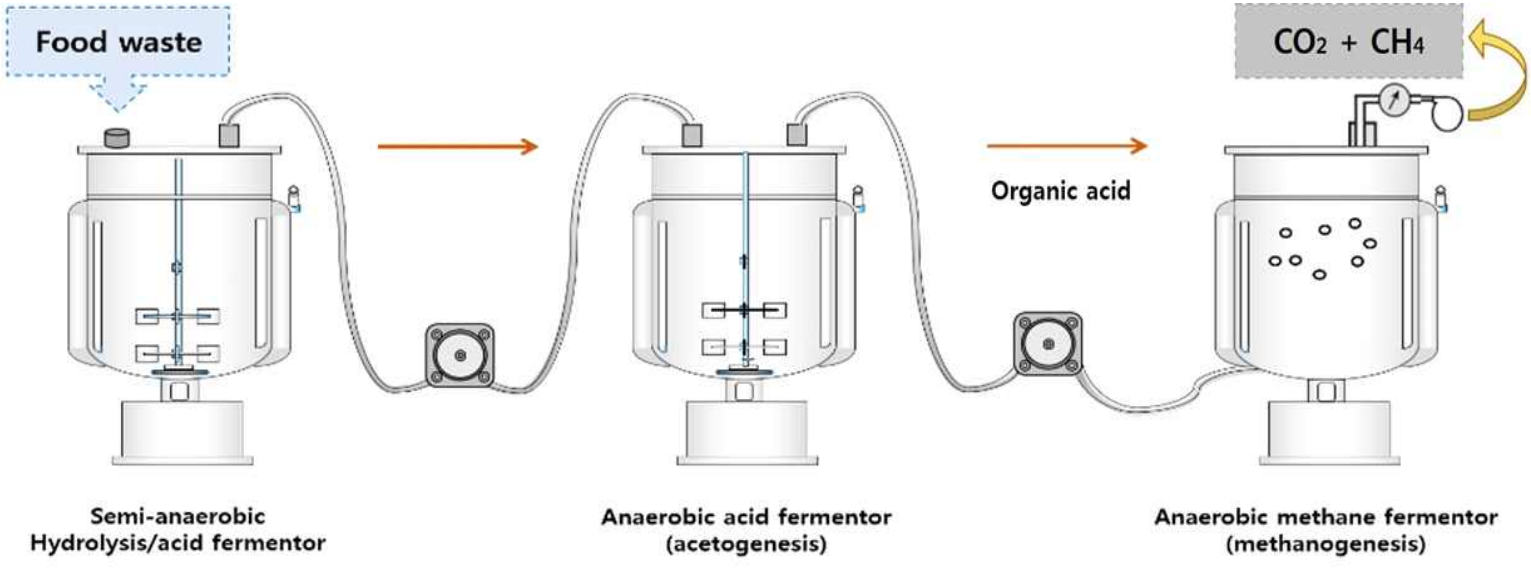

Fig. 3. Conversion of food waste to biogas through three stage fermentation system.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

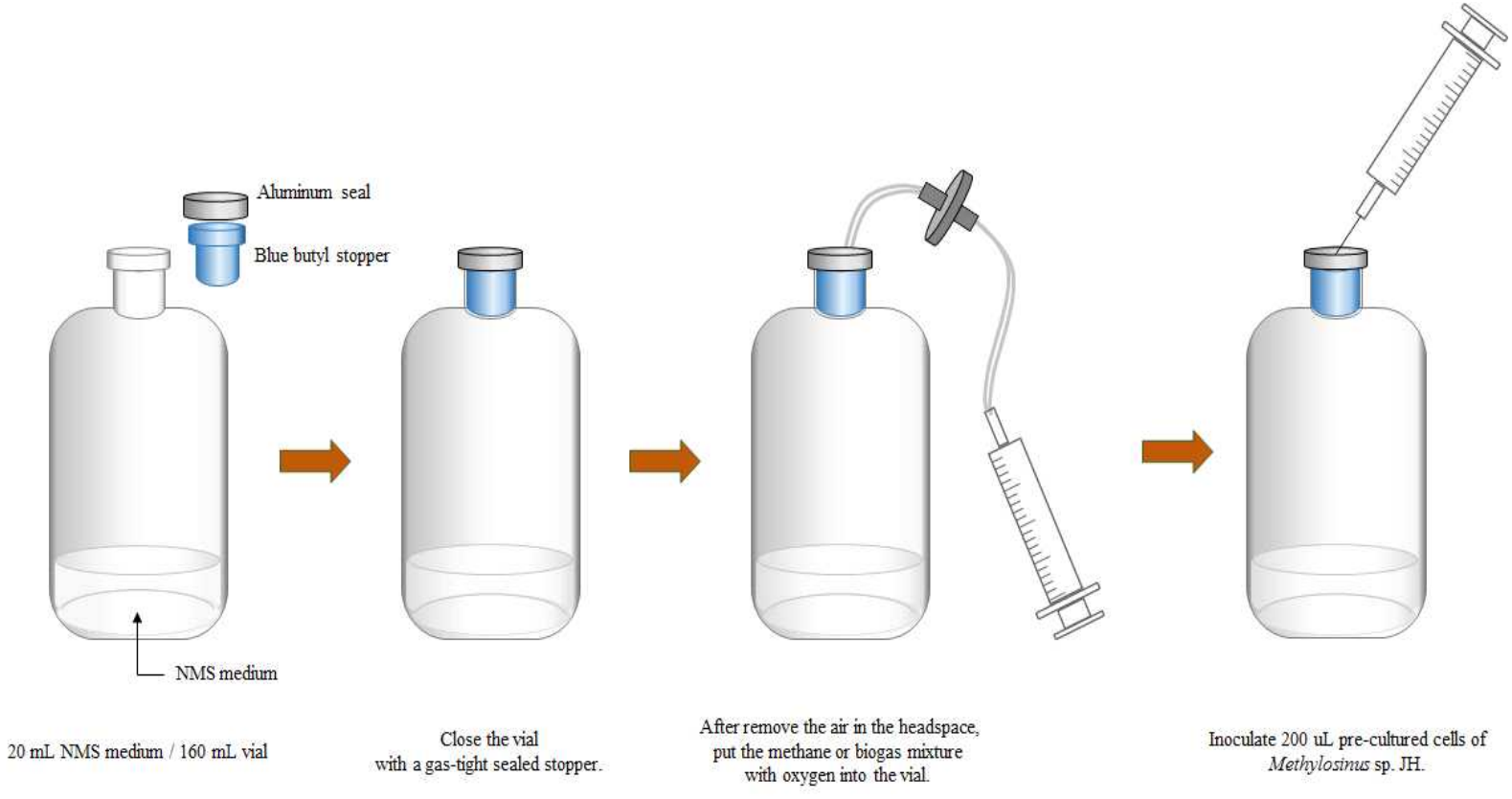

Fig. 4. Method for culture of *Methylosinus* sp. JH using the biogas or pure methane.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Composition and concentration of Reinforced Clostridial Medium for *Clostridium perfringens*

Composition	Contents (g/L)
Peptone	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	3.0
Dextrose	5.0
Sodium Chloride	5.0
Soluble Starch	1.0
Cysteine HCl	0.5
Sodium Acetate	3.0

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Composition and concentration of nitrate minimal salt (NMS) medium for methanotroph

Composition	Contents (ml/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (×100 stock, 10g/100ml)	10 (final 4.057 mM)
KNO_3 (×100 stock, 10g/100ml)	10 (final 9.891 mM)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (×100 stock, 2g/100ml)	10 (final 1.55 mM)
solution Fe-EDTA (3.8 w/v%)	0.1
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.1 w/v%)	0.5
Trace element solution	1
Phosphate stock	10
Vitamin stock	1

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Composition and concentration of stock solution for NMS medium

Composition of Trace element solution	Contents (mg/L)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	500
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	400
$MnCl_2 \cdot 7H_2O$	20
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	50
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	10
H_3BO_3	15
EDTA	250
Composition of Phosphate stock solution	**Contents (g/L)**
KH_2PO_4	26
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	62
Composition of Vitamin stock solution	**Contents (mg/L)**
Biotin	20
Folic acid	20
Thiamine HCl	50
Ca pantothenate	50
Vitamin B_{12}	1
Riboflavin	50
Nicotin amide	50

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ. 결과 및 고찰

A. 음식폐기물의 초기 COD 농도와 시간에 따른 유기산 생산량

음식폐기물의 초기 COD 농도를 다르게 한 후 특정 균주의 접종 없이 음식물 자체에 포함되어 있는 미생물로 가수분해와 산 발효 과정 동안의 시간에 따른 유기산의 생산량을 분석하였다. 음식폐기물 초기 COD의 농도를 120,000, 70,000 그리고 50,000 mg COD/L로 조절하였고, 가수분해와 산 발효 과정의 총 96시간을 24:72시간, 36:60시간 그리고 48:48시간인 경우로 분리하여 실험하였다. 가수분해 단계에서는 공기가 유통되도록 면전을 사용하여 삼각플라스크를 막아주었고, 산 발효 단계에서는 실리콘 마개를 사용하여 공기흐름을 차단시켜 혐기조건이 되도록 하였다. 음식폐기물의 초기 COD 농도를 120,000 mg COD/L로 조절하였을 때, 가수분해와 산 발효 시간이 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 8.0 과 4.5 g/L로 가장 많이 생산되었고, 36:60인 경우는 4.0 과 3.5 g/L 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다 (Fig. 5). 다음으로 음식폐기물의 초기 COD 농도를 70,000 mg COD/L로 하였을 때, 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 6.0 그리고 4.5 g/L 생산되었고, 36:60인 경우는 8.5 과 3.0 g/L이 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 120,000 mg COD/L의 경우와 마찬가지로 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다 (Fig. 6). 마지막으로 음식폐기물의 초기 COD 농도를 50,000 mg COD/L로 하였을 때, 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 6.0 그리고 3.0 g/L로 가장 많이 생산되었고, 36:60인 경우는 7.0 과 2.0 g/L 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다 (Fig. 7). 본 실험을 통해 젖산은 음식물 쓰레기의 초기 COD 농도가 70,000 mg COD/L일 때 가장 많이 생산되었고, 아세트산은 120,000 와 70,000 mg COD/L일 때 가장 많이 생산되었다. 또한 가수분해 단계와 산 발효 초기까지는 고분자물질이 분해되면서 glucose의 농도가 증가하였으나, 산 발효가 계속 되면서

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

glucose의 농도가 감소하고 대신에 젖산, 아세트산 그리고 에탄올이 생산되는 것을 확인할 수 있다.한편 가수분해와 산 발효 동안 총 COD의 농도는 크게 변화가 없었다. 음식폐기물의 초기 COD 농도를 120,000 mg COD/L로 하였을 경우 음식폐기물이 관을 이동하는데 문제가 발생하였으며, 50,000 mg COD/L로 하였을 경우는 유기산의 생산량이 가장 낮았다. 위 실험결과를 볼 때, COD 농도 대비 유기산 생성농도가 가장 효율적인 경우는 초기 COD 농도를 70,000 mg COD/L로 하고, 가수분해와 산 발효 시간을 36:60 시간으로 조절하는 것이었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

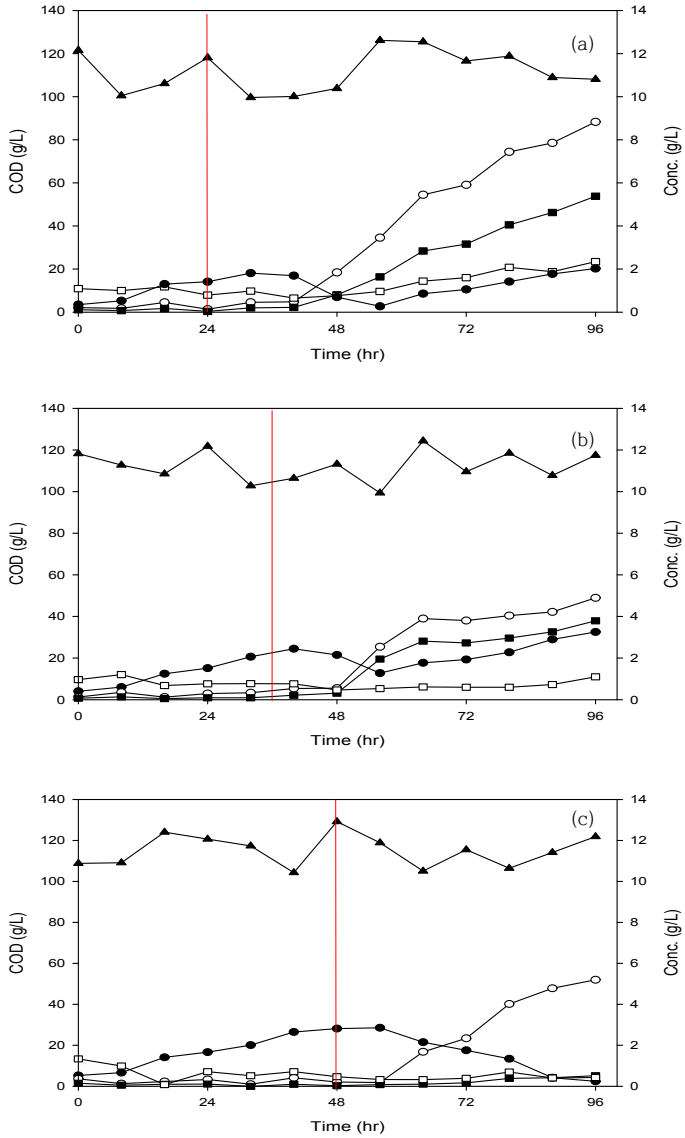

Fig. 5. Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 120,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

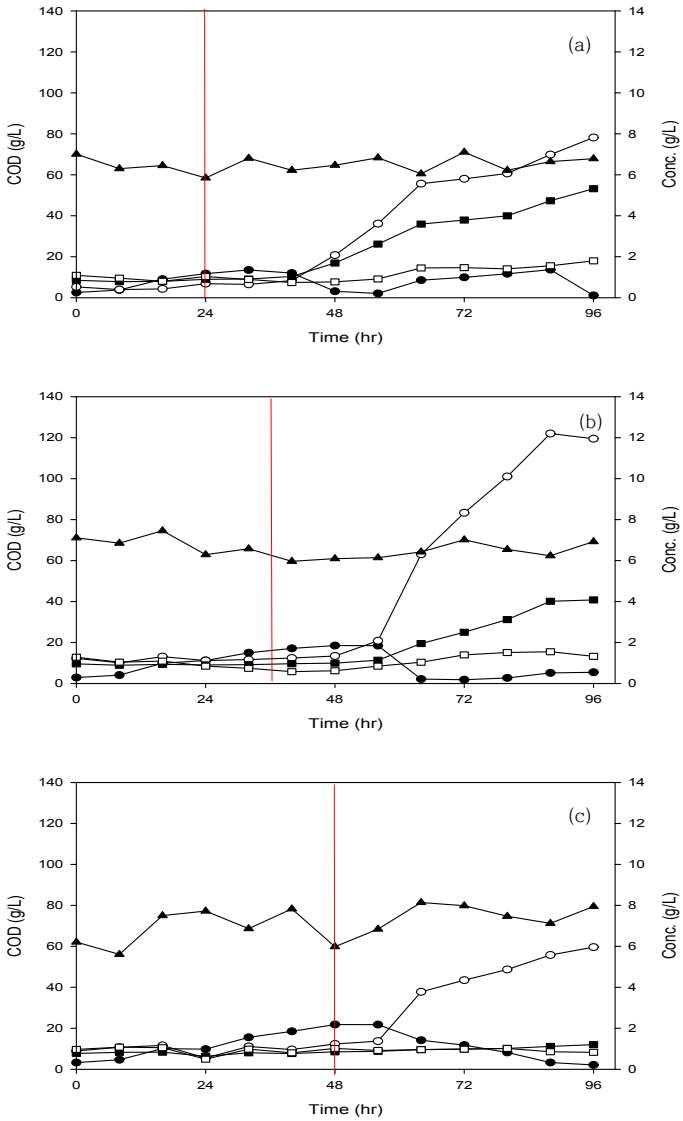

Fig. 6. Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 70,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

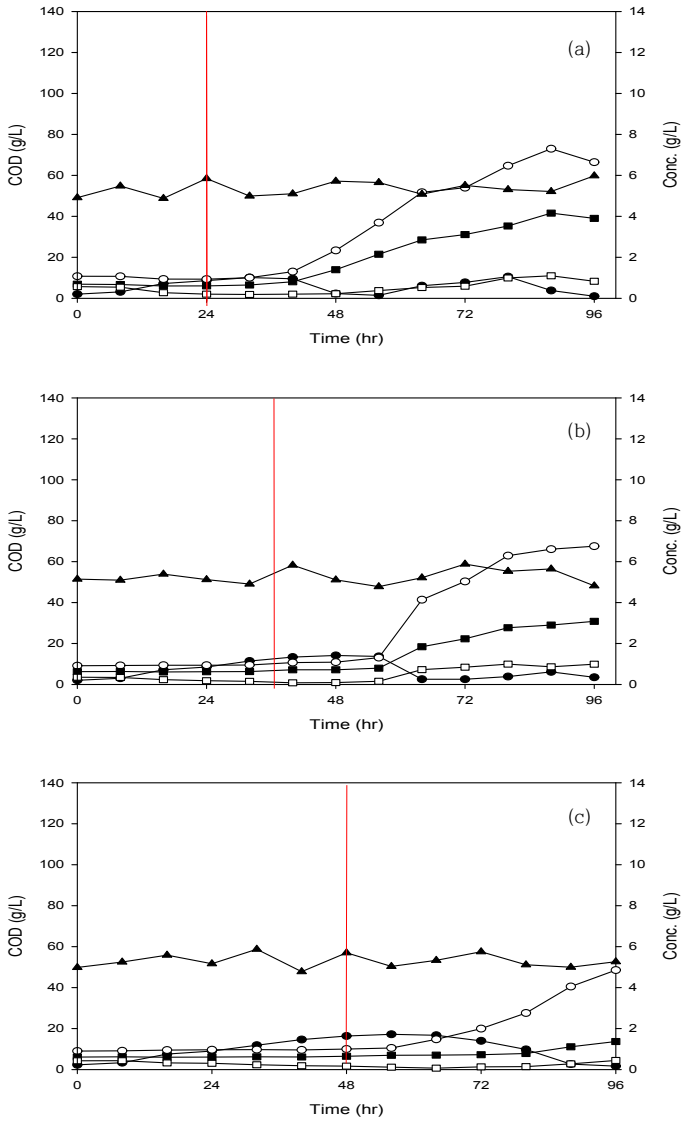

Fig. 7. Time-dependent changes of COD and VFA concentrations of food wastes containing 50,000 mg/L of initial COD. Different reaction times for hydrolysis : acid fermentation were 24:72 (a), 36:60 (b), and 48:48 (c). Symbols: (●), glucose; (○), lactate; (■), acetate; (□), ethanol and (▲), COD.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

B. 산 생성 발효에서 *C. perfringens* 접종에 따른 유기산 생산

1. 회분식 산 생성 발효에서의 *C. perfringens* 접종에 따른 유기산 생산

본 실험은 70,000 COD mg/L 농도의 음식폐기물을 48시간 동안 가수분해한 발효액을 이용하여 2단계 산 생성 발효시킬 경우, 혐기성 유기산 생성세균인 *C. perfringens*를 접종하지 않았을 때와 접종하였을 때 유기산 생산 농도의 차이를 비교하기 위해 flask level에서 진행되었다. 먼저, *C. perfringens*를 1차 발효액에 접종하지 않고 회분식 실험을 하였을 경우는 Fig. 8(a) 와 같다. 유기산은 젖산과 아세트산이 각각 3.0 그리고 1.5 g/L가 생산되었다. 반면에 *C. perfringens*를 접종하였을 경우에는 Fig. 8(b)와 Fig. 8(c) 에서 보는 바와 같이 접종하지 않았을 때와 달리 젖산과 아세트산 이외에 소량의 부티르산이 생산되었다. *C. perfringens*는 Reinforced Clostridial Medium for *Clostridium perfringens* 배지에서 2일 배양한 후 종균으로 사용하였고, 매 실험별로 2% (v/v)를 1차 발효액에 접종하였다. Fig. 8(b) 와 fig. 8(c) 는 실험이 진행되는 동안 발효액의 pH를 조절/유지하였는지에 차이를 두었다. Fig. 7(b) 의 경우 초기에만 pH를 약 6.5로 맞추고 *C. perfringens*를 접종한 이후에는 pH를 조절하지 않고 발효시켰다. 이 때, 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 22.0, 2.0 그리고 0.5 g/L 생산되었다. Fig. 8(c) 은 초기 pH를 약 6.5로 맞춘 다음 *C. perfringens*를 접종하고, 실험이 진행되는 동안에도 pH를 6.5로 유지시켜주었다. 이 때에는 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 29.5, 2.0 그리고 0.5 g/L가 생산되었다. 결국 *C. perfringens*를 접종하면 부티르산은 소량 생산되나, 젖산의 생산량은 확연히 증가하였다. 이에 더해, pH를 6.5로 계속 유지하는 경우 총 유기산 생산량은 32.0 g/L로 더욱 많이 생산되었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

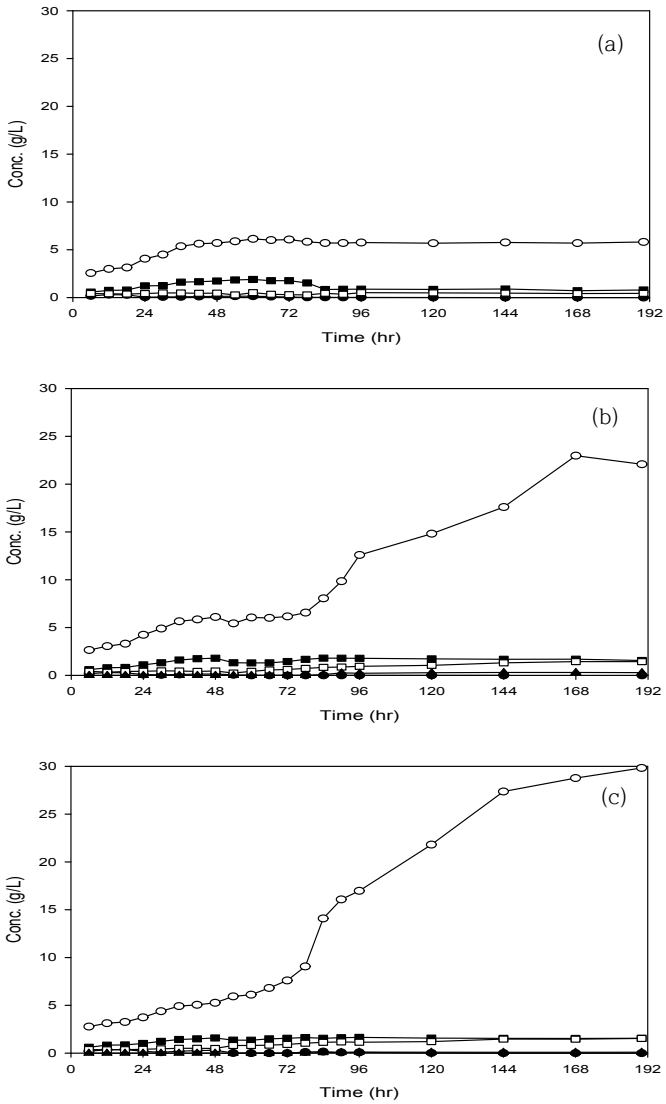

Fig. 8. Production of organic acids from food wastes through batch fermentation: (a) without inoculation of *C. perfringens*, (b) with inoculation of *C. perfringens* without pH control and, (c) with inoculation of *C. perfringens* with pH control at 6.5. Symbols: (●) glucose, (○) lactate, (■) acetate, (□) ethanol, and (▲) butyrate.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 반복 회분식 산 생성 발효에서의 *C. perfringens* 존재 여부에 따른 유기산 생산

2차 혐기성 산발효 후 3차 메탄발효를 위해 2차 발효액의 일부를 3차 발효조로 반복 운송하는 반복 회분식 실험을 실시하였다. 이 때, 2차 발효액을 3차 메탄 발효조에 옮긴 후 1차 발효액을 2차 발효조로 공급하였다. Fig. 9의 그림에서 화살표로 표시된 부분은 1차 발효액을 공급해주는 시점이며, 0 - 3일까지는 6시간 마다 유기산 생산을 확인하였고, 3일 이후부터는 하루에 한번씩 2차 발효조의 유기산 농도를 확인하였다.

Fig. 9(a)는 *C. perfringens*를 접종하지 않고 2차 발효액에 들어있는 산생성균을 이용하여 발효시킨 것을 나타낸 것이다. 수리학적 체류시간 (HRT)를 1일로 하였을 때 젖산과 아세트산은 반복적으로 각각 5.0-6.0 과 0.4 g/L, 그리고 에탄올이 2.0 g/L 생산되었다. 그리고 Fig. 9(b)와 (c)는 *C. perfringens*를 접종하고, pH를 유지하지 않은 경우와 pH를 7.0 으로 유지하면서 HRT를 1일로 하였을 경우를 나타낸 것이다. pH를 유지하지 않았을 때는 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 8.0, 1.0 그리고 0.8 g/L이 생산되었고, 에탄올은 0.9 g/L 생산되었다. 반면, pH를 7.0으로 계속 유지하였을 때에는 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 17.0, 3.0 그리고 4.0 g/L이 생산되었고, 에탄올은 1.9 g/L 생산되었으며, pH를 유지하지 않았을 때보다 더 많은 양의 유기산이 생산되었다. 2차 혐기성 산발효조에서 생산된 유기산은 주로 젖산이었으며, *C. perfringens*를 접종한 경우 회분식 실험에서와 마찬가지로 부티르산이 생산되었고, 이로 인한 악취가 발생하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

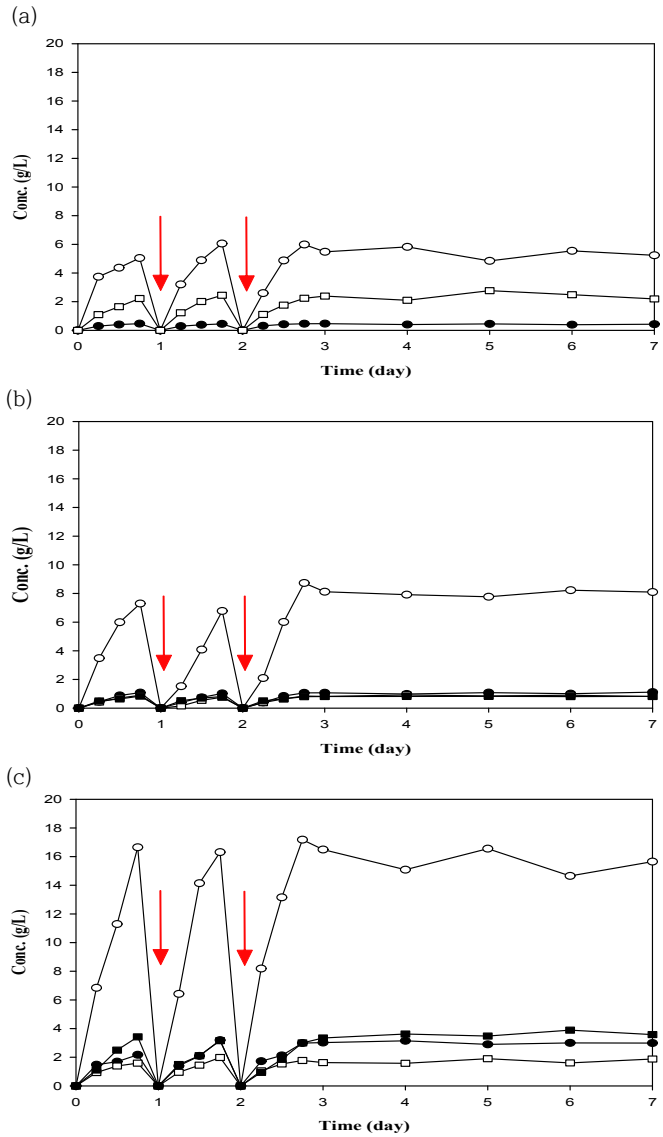

Fig. 9. Production of organic acids through repeated-batch fermentation: (a) without inoculation of *C. perfringens*, (b) with inoculation of *C. perfringens* without pH control and, (c) with inoculation of *C. perfringens* with pH control at 6.5. Arrows indicates the time which fresh food waste was supplied. Symbols: (○) lactate, (●) acetate, (□) ethanol, and (■) butyrate.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

C. 3단계 발효시스템에서의 COD 변화와 바이오가스의 생산

3단계 발효 시스템을 운전하는 동안 각 단계별 COD 농도를 측정하였다. 1단계 가수분해 발효조의 경우 음식폐기물의 COD 농도가 대체로 75,000 - 80,000 mg COD/L 이었고, 2단계 산 생성 발효조의 COD 농도는 약 70,000 mg COD/L로 1단계 가수분해 발효액의 COD 보다 약간 감소하였다. 즉, 고분자화합물로 구성된 대부분의 음식폐기물들이 저분자의 휘발성 지방산 또는 에탄올로 분해되었거나 전환되었기 때문에 총 COD의 감소는 거의 없었다. 그리고 마지막 3단계 메탄 발효조의 COD 농도는 약 8,000 mg COD/L로 나타나 최종적으로 본 발효 시스템을 거친 후 배출되는 음식폐기물의 COD 농도의 감소는 약 90% 이었다(Fig. 10a). 3단계 메탄 발효조에서 생산된 바이오가스는 메탄과 이산화탄소로 이루어져 있으며, 이때의 메탄의 함량은 약 78%이었고, 황화수소의 농도는 500 ppm 이하였다(Fig. 10b).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

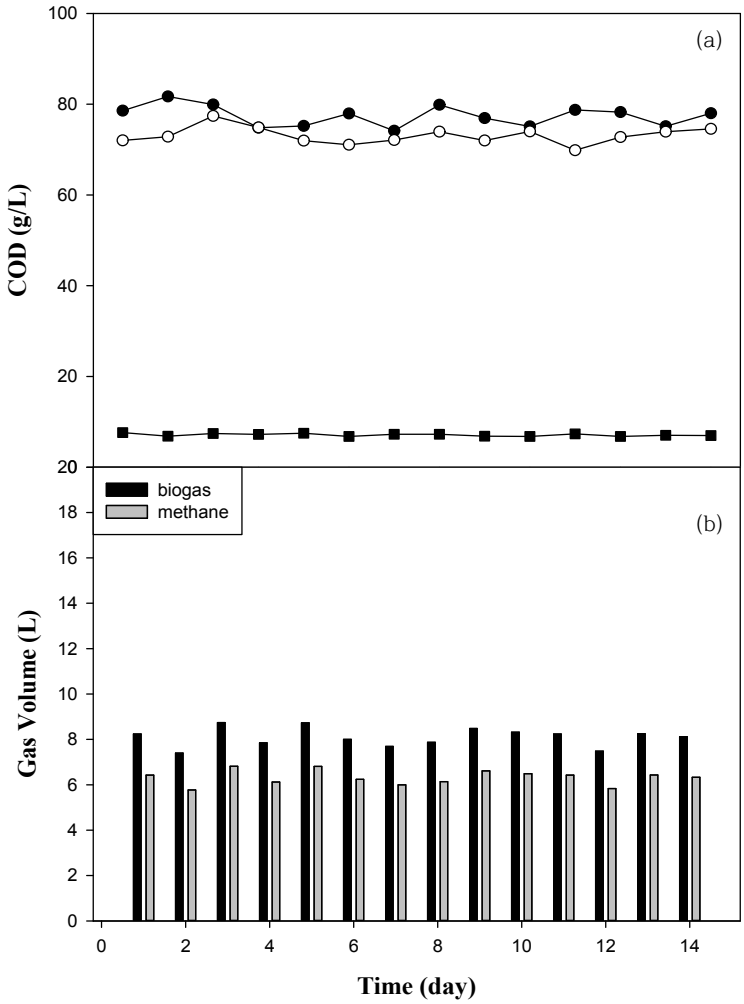

Fig. 10. Decrease of COD concentrations (a) and concomitant methane production (b) through three-stage methane fermentation system. Symbols: CODs at different stages of hydrolysis (●), acidogenesis (○), and methanogenesis(■).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

D. 3단계 메탄발효 시스템의 운전조건 및 성능

본 연구에서 사용한 3단계 메탄 발효시스템은 본 연구실에서 1999년에 이미 특허 개발한 것으로 반 혐기성 가수분해 발효조, 혐기성 산 생성 발효조 그리고 혐기성 메탄 발효조로 이루어져있다. 이에 따라 각 단계별 HRT와 온도는 2, 2, 12 일과 45, 35, 47 ℃로 설정하였다. 1차 가수분해 발효조의 음식폐기물은 약 78,500 mg COD/L로 분석되었다. 1차 발효액은 2차 산 생성 발효조로 공급되고, 2차 발효조에서는 1차에서 공급된 발효액을 산발효 시켰다. 이 때, 고분자에서 저분자로 분해된 물질들이 더 작은 물질로 쪼개지면서 COD가 감소하게 된다. 그래서 2차 발효액의 COD 는 1차 발효액보다 약 8% 감소하여 COD 농도가 약 72,100 mg COD/L로 분석되었다. 2차 혐기성 산 발효조에서는 유기산을 생산하는데, 본 실험에서는 *C. perfringens*를 접종한 2차 발효조에서 아세트산, 젖산 그리고 부티르산이 각각 2,751, 15,643 그리고 3,494 mg/L로, 총 21,888 mg/L의 유기산과 에탄올이 약 900 mg/L 생산되었다. 이 때, 프로피온산과 발레르산은 검출되지 않았다. 마지막으로 3차 발효조에는 2차 발효조의 산 발효액이 공급되는데, 메탄 생성을 위한 3차 발효조의 최적 pH는 약 7.8-8.0으로 유지되어야 한다. 2차 발효액은 유기산을 포함한 산성을 나타내므로 2차 발효액을 3차 발효조에 공급할 때에는 이송펌프를 이용하여 발효조 하단에서 상향으로 주입하는 상향식 혐기성 슬러지 블랭킷(upflow anaerobic sludge blanket) 타입의 리액터를 사용함으로써 pH 충격을 완화시켰다. 마지막으로 3차 발효조에서 배출되는 발효액의 COD는 8,412 mg COD/L 로 음식폐기물의 COD가 약 88.4% 감소되었다. 총 3단계 메탄 발효조를 통해 생산된 바이오가스 수율은 0.61 ㎥/kg VS 이며, 주성분인 메탄과 이산화탄소가 각각 78과 22%를 차지하였고, 황화수소는 500 ppm 이하로 검출되었다. 한편 메탄 수율은 151 ㎥/kg COD 이었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table. 5. Operational conditions and performance of three-stage methane fermentation system.

Parameter	First stage	Second stage	Third stage
HRT (d)	2	2	12
Temperature (℃)	45	35	47
COD (mg/L)	78542	72151	8412 (88.4 %)
Gas Yield (㎥/kg VS)	-	-	0.61
Gas composition (%)			
CH_4	-	-	78
CO_2	-	-	22
Methane yield (㎥/kg COD)	-	-	151
Glucose (mg/L)	1071.1	22.8	
Ethanol (mg/L)	672.0	1530.5	
Organic acids (mg/L)			
Acetic	820.6	2751.1	
Lactic	4319.9	15642.8	
Butyric	-	3493.7	
Propionic	-	-	
Valeric	-	-	
Total	5140.5	21887.6	

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

E. 3차 메탄 발효조의 균주 탐색

Next-Generation Sequencing (NGS) 분석을 통해 3차 메탄 발효조 내의 메탄생성균을 탐색하였다. 그 결과, 3차 발효액에 존재하는 메탄생성 고세균은 *Methanoculleus bourgensis*, *Methanomassiliicoccus luminyensis* 그리고 *Methanothermobacter wolfeii*가 각각 76, 22 그리고 2 %의 비율로 포함되어 있었다.

F. 바이오가스와 순수 메탄가스를 이용한 Methanotroph 배양

이 연구에 사용하기 위해 분리된 메탄산화세균은 *Methylosinus* species 이며, 이 균주는 Methylopila 속의 절대 호기성균이다. 이 때, 분리된 균주는 *Methylosinus* sp. JH로 하였다. *Methylosinus* sp. JH를 배양할 때 바이오가스와 순수 메탄을 이용하였고, 각각 메탄과 산소의 비율을 달리하여 실험하였다. 실험에는 160 mL vial을 이용하였고, 20 mL의 NMS 배지를 넣은 다음 blue butyl rubber stopper로 막아 주었다. 그리고 headspace의 공기를 50mL씩 2번 뺀 후 바이오가스 또는 메탄을 산소와 주입하고, *Methylosinus* sp. JH를 200 uL씩 접종하였다. 초기 상태 vial의 headspace의 공기를 분석한 결과 바이오가스를 넣어 준 경우에 메탄과 산소의 농도는 51%와 49% 이었고, 순수 메탄을 넣어 준 경우에 메탄과 산소의 농도는 43%와 57% 이었다. Vial의 headspace의 공기 중 가스 함량을 이렇게 하였을 때, 균의 생장 속도는 바이오가스를 이용한 경우와 순수 메탄을 이용한 경우 비슷하게 생장하였으며, 산소가 대부분 소모되면서 균의 생장이 멈추었다. 이 실험 결과를 통해 바이오가스를 사용하여 메탄산화세균을 배양할 수 있다는 것을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

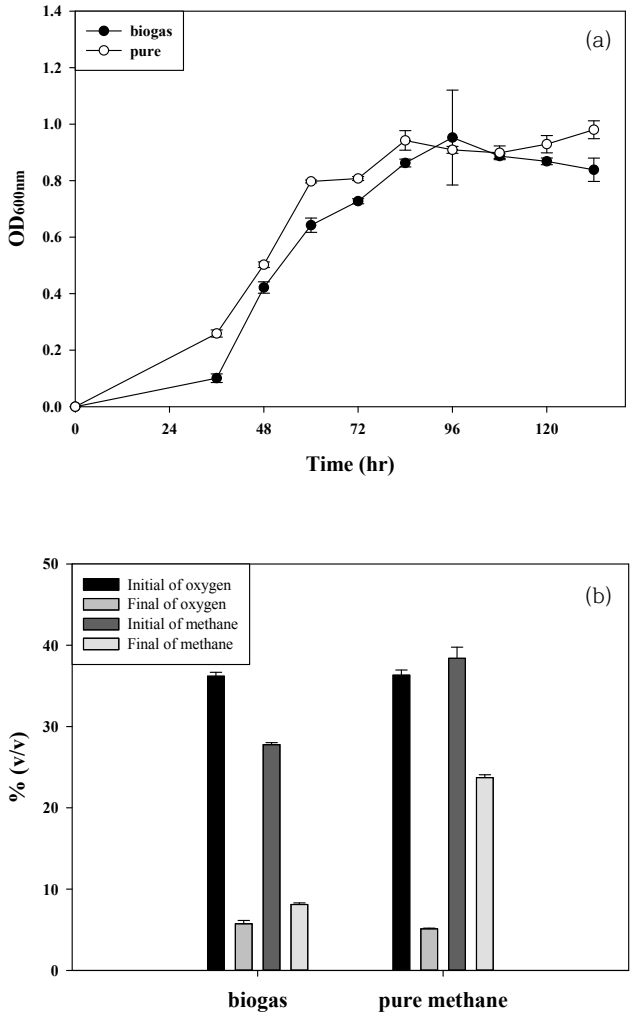

Fig. 11. Culture of *Methylosinus* sp. JH using pure methane or biogas. Methane and oxygen ratios is 51 : 49 using pure methane. And methane and oxygen ratios is 43 : 57 using biogas. (a) Growth curve of *Methylosinus* sp. JH, (b) Percent of gas in headspace of vial.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅳ. 결론

1. 본 연구실이 개발한 3단계 메탄 발효시스템을 바탕으로 1차 반 혐기성 가수분해 발효조(10L), 2차 혐기성 산 발효조(7L) 그리고 3차 혐기성 메탄 발효조(11L)를 구축하였다.
2. 음식 초기 COD 농도를 120,000 mg COD/L로 하였을 때, 가수분해와 산 발효 시간이 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 8.0 과 4.5 g/L로 가장 많이 생산되었고, 36:60인 경우는 4.0 과 3.5 g/L 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다.
3. 음식 초기 COD 농도를 70,000 mg COD/L로 하였을 때, 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 6.0 그리고 4.5 g/L 생산되었고, 36:60인 경우는 8.5 과 3.0 g/L로 가장 많이 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 120,000 mg COD/L의 경우와 마찬가지로 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다.
4. 음식 초기 COD 농도를 50,000 mg COD/L로 하였을 때, 24:72인 경우 젖산과 아세트산이 각각 6.0 그리고 3.0 g/L로 가장 많이 생산되었고, 36:60인 경우는 7.0 과 2.0 g/L 생산되었다. 그리고 48:48인 경우는 젖산이 4.0 g/L 생산되었고, 아세트산은 1 g/L 미만 생산되었다.
5. 산 생성 발효조 단계를 회분식 실험으로 하였을 때, 특정 균주의 접종이 없을 경우 유기산은 젖산과 아세트산이 각각 3.0 그리고 1.5 g/L가 생산되었다.
6. 산 생성 발효조의 회분식 실험에서 *C. perfringens*를 접종하고, pH를 유지시키지 않았을 경우 유기산은 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 22.0, 2.0 그리고 0.5 g/L가 생산되었다.
7. 산 생성 발효조의 회분식 실험에서 *C. perfringens*를 접종하고, pH를 6.5로 유지시켰을 경우 유기산은 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 각각 29.5, 2.0 그리고 0.5 g/L가 생산되었다.
8. 산 생성 발효조 단계를 반복 회분식 실험으로 하였을 때, 특정 균주의 접종이 없을

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

경우 유기산은 젖산과 아세트산이 하루에 각각 5.0, 2.0 g/L 씩 생산되었다.

9. 산 생성 발효조의 반복 회분식 실험에서 *C. perfringens*를 접종하고, pH를 유지하지 않았을 경우 유기산은 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 하루에 각각 8.0, 2.0 그리고 1.5 g/L가 생산되었다.
10. 산 생성 발효조의 반복 회분식 실험에서 *C. perfringens*를 접종하고, pH를 6.5로 유지하였을 경우 유기산은 젖산, 아세트산 그리고 부티르산이 하루에 각각 18.0, 3.0 그리고 4.0 g/L가 생산되었다.
11. 3단계 메탄발효 시스템을 거친 후 음식폐기물의 COD 농도는 70,000 - 80,000 mg COD/L에서 약 8,000 mg COD/L로 90% 감소하였다.
12. 3차 메탄 발효조에서는 바이오가스가 하루에 약 8L 생산되었으며, 메탄과 이산화탄소가 주요 성분이다. 그 중 메탄의 함량이 약 78% 이었으며, 황화수소는 500 ppm 미만 검출되었다.
13. 3단계 메탄발효 시스템 중 2차 산 생성 발효조에서는 젖산, 아세트산 그리고 뷰티르산이 생산되었고, 프로피온산과 발레르산은 검출되지 않았다. 그리고 생산된 유기산 중 젖산의 생산량이 약 72%로 가장 많이 생산되었다.
14. 3차 메탄 발효조의 발효액 속에 있는 메탄생성균을 NGS를 통해 분석한 결과 Methanoculleus bourgensis, Methanomassiliicoccus luminyensis 그리고 Methanothermobacter wolfeii가 각각 76, 22 그리고 2%의 비율로 나타났다.
15. 3단계 메탄 발효 시스템을 통해 생산된 바이오가스와 순수 메탄을 이용하여 *Methylosinus* sp. JH를 배양하였다. 메탄과 산소의 비율이 바이오 가스의 경우에 43:57, 순수 메탄의 경우에 51:49 이었을 때 균이 가장 빨리 자랐으며, 바이오가스를 이용한 것과 순수 메탄을 이용하여 균을 키웠을 때 균의 생장 속도의 차이는 크지 않았다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. 환경부, 환경백서 (2018).
2. 백기현, 최준원, 김재진 (2011), 바이오에너지 바이오매스. 북스힐.
3. 김중곤 박사 학위논문(2007). Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발.
4. Biarnes M (2013). Biomass to biogas-anaerobic digestion, E Instruments International. Retrieved 11 Oct 2013.
5. Bilitewski B, Härdtle G, Marek K (1997). Waste management. Springer, Berlin.
6. E. P. A (2006). Biosolids technology fact sheet : multi-stage anaerobic digestion. Retrieved 11 Oct 2013.
7. Ostrem K (2004). Greening waste: anaerobic digestion for treating the organic reaction of municipal solid wastes. M.S. thesis, Columbia University, New York.
8. Van Haandel A, van der Lubbe J (2007). Handbook biological wastewater treatment. Retrieved 13 Oct.
9. Verma S (2002). Anaerobic digestion of biodegradable organics in municipal solid wastes. M.S. thesis, Columbia University, New York.
10. Zupančič GD, Grilc V (2012). Anaerobic treatment and biogas production from organic waste. In: Kumar S (ed) Management of organic waste. InTech, Croatia, pp 1-28.
11. Bajpai P (2017). Anaerobic Technology in Pulp and Paper Industry, SpringerBriefs in Applied Sciences and Technology, 7-12.
12. G. F. Parkin and W. F. Owen (1986). Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. J. Environ. Eng., 112(5), 867-920.
13. Peter J Cook (2014), 청정에너지 기후 그리고 탄소. 씨아이알.
14. INTECH. (2017) Conversion of Non-Homogeneous Biomass to Ultraclean Syngas

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

and Catalytic Conversion to Ethanol.

15. Klerk, A. D. (2014). Engineering evaluation of direct methane to methanol Conversion.
16. J. Y. XIN (2004). Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. Biocatalysis and Biotransformation. 22(3), 225-229.
17. Choi et al. (2003). The Membrane-Associated Methane Monooxygenase (pMMO) and pMMO-NADH:Quinone Oxidoreductase Complex from *Methylococcus capsulatus* Bath. J. BACTERIOL, 185(19), 5755-5764
18. C. E. Bjorck, P. D. Dobson and J. Pandhal (2018). Biotechnological conversion of methane to methanol: evaluation of progress and potential. AIMS Bioengineering, 5(1), 1-38.
19. Hanson RS, Hanson TE (1996). Methanotrophic bacteria. Microbiol Rev 60: 439-471.
20. Xin JY, Cui JR, Niu JZ, et al. (2009). Production of methanol from methane by methanotrophic bacteria. Biocatal Biotransfor 22: 225-229.
21. S. Asakawa and K. Nagaoka (2003). *Methanoculleus bourgensis*, *Methanoculleus olentangyi* and *Methanoculleus oldenburgensis* are subjective synonyms. Int J Syst Evol Microbiol, 53, 1551-1552.
22. B. Dridi et al. (2012). Methanomassiliicoccus luminyensis gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faces. Int J Syst Evol Microbiol, 62, 1902-1907.
23. M. Dworkin et al. (2006). The prokaryotes: Vol. 3: Archaea. Springer, 11, 241.

Collection @ chosun