[UCI]I804:24011-200000233875

2007年 2月
博士學位論文

Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발

朝鮮大學校 大學院
生 物 新 素 材 學 科
金 仲 坤

Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발

Development of a pilot-scale three-stage fermentation system for high-efficiency methane production from organic wastes

2007年 2月 23日

朝鮮大學校 大學院

生 物 新 素 材 學 科

金 仲 坤

Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발

指導敎授　金　時　郁

이 論文을 工學 博士學位申請 論文으로 提出함

2006年　10月

朝鮮大學校 大學院

生 物 新 素 材 學 科

金　仲　坤

金仲坤의 博士學位 論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校 教授	咸 京 洙
委員	朝鮮大學校 教授	李 仁 化
委員	全南大學校 教授	金 成 準
委員	朝鮮大學校 教授	申 鉉 載
委員	朝鮮大學校 教授	金 時 郁

2006年 12月

朝鮮大學校 大學院

목 차

List of Tables ····· 5
List of Figures ····· 7
Abstract ····· 14

제 1 장 서 론 ····· 1

제 1 절 연구배경 및 목적 ····· 1

제 2 절 국·내외 기술개발 동향 ····· 4

제 3 절 이론적 고찰 ····· 9
1. 바이오에너지기술 ····· 9
2. 혐기성 소화 ····· 11
3. 발효조의 동력학적 모델 ····· 18
4. 생물학적 수소 생산 ····· 19
5. 에탄올 발효 ····· 21

제 2 장 연구 내용 및 결과 ····· 31

제 1 절 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 설계 및 제작 ····· 31
1. 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 구성 ····· 31
2. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 구성과 제작 ····· 34
3. 2차 혐기성 산 발효조의 구성과 제작 ····· 34
4. 3차 혐기성 메탄 발효조의 구성과 제작 ····· 41

제 2 절 단계별 발효공정 미생물제제 개발 ····· 45

1. 실험재료 및 방법 ····· 45
가. 발효균주를 이용한 미생물제제 개발 ····· 45
2. 결과 및 고찰 ····· 48
가. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 형태학적 특징 ····· 48
나. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 생화학적 특징 ····· 51
다. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Amylase의 효소 활성 ····· 51
라. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Protease의 효소 활성 ····· 55
마. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Cellulase의 효소 활성 ····· 55
바. 혐기성 산 발효조로부터 분리된 발효균주의 형태학적 특징 ····· 58
사. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 발효능 측정 ····· 58
카. 미생물제제의 개발 ····· 65

제 3 절 발효효율 최적화 운전 조건 검토 ····· 65
1. 실험재료 및 방법 ····· 65
가. 1차 가수분해/산 발효조의 pH조절을 위한 반송 조건 ····· 65
나. 회분식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향 ····· 66
다. 반연속식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향 ····· 68
라. 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효공정 운전 ····· 70
2. 결과 및 고찰 ····· 71
가. 1차 가수분해/산 발효조의 pH조절을 위한 반송 조건 ····· 71
나. 회분식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향 ····· 76
다. 반연속식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향 ····· 79
라. 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용한 음식물쓰레기 처리공정 운전 ····· 94

제 4 절 다양한 재생가능 폐기물의 처리시 발효 효율 검토 ····· 105
1. 실험재료 및 방법 ····· 105
가. 사용된 재생가능 폐기물의 종류 ····· 105
나. 재생가능 폐기물들의 성상 변화 및 소형 메탄 발효조 운전 ····· 105
2. 결과 및 고찰 ····· 106
가. 각종 재생가능 폐기물의 성상 변화 ····· 106

제 5 절 10 m^3 규모 Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효시스템의 설계 및 제작 ····· 113
1. Pilot-scale 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 구성 ····· 113
2. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 구성과 제작 ····· 117
3. 2차 혐기성 산 발효조의 구성과 제작 ····· 121
4. 3차 혐기성 메탄 발효조의 구성과 제작 ····· 121
5. 메탄 저장 탱크 설계 및 제작 ····· 128
6. 발효시스템의 자동화 공정 제작 ····· 131

제 6 절 10 m^3 규모 Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효 시스템의 운전 조건 검토 ····· 136
1. 실험재료 및 방법 ····· 136
가. 실험 균주 ····· 136
나. 음식물 쓰레기의 전처리 공정 ····· 136
다. 3단계 메탄 발효공정내 음식물 쓰레기 성상 변화 ····· 137
라. 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석 ··· 137
2. 결과 및 고찰 ····· 137
가. 음식물 쓰레기의 성상 ····· 137
나. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조내 발효액의 성상 변화 ····· 138
다. 2차 혐기성 산 발효조내의 발효액의 성상 변화 ····· 141
라. 3차 혐기성 메탄 발효조내의 발효액의 성상 변화 ····· 141
마. 3단계 메탄 발효공정에서 발생하는 유기산 분석 ····· 146

바. 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석 ··· 146
사. 3단계 메탄 발효시스템의 경제성 검토 ··· 151

제 3 장 결 론 ··· 153

참고문헌 ··· 158

부록 : 발효과정 중 유기산, 바이오수소 및 알코올 생산 ··· 167

부록 1. 유기산 생산 ··· 169

부록 2. 수소 생산 ··· 182

부록 3. 알코올 생산 ··· 197

CURRICULUM VITAE ··· 215

List of Tables

Table 1. Commercial anaerobic digestion process for removal of municipal solid wastes ····· 5
Table 2. Anaerobic digestion processes operated in Korea ····· 8
Table 3. Pathways of biological hydrogen production from various sources ····· 20
Table 4. Pathway of biological hydrogen production by dark fermentation ····· 22
Table 5. Morphological characteristics of isolated strains from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 49
Table 6. Physiological characteristics of isolated strains from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 50
Table 7. Biochemical characteristics of gram positive bacteria isolated from food wastes ····· 52
Table 8. Biochemical characteristics of gram negative bacteria isolated from food wastes ····· 53
Table 9. Morphological characteristics of isolated strains from anaerobic acidogenic reactor ····· 59
Table 10. Physiological characteristics of isolated strains from anaerobic acidogenic reactor ····· 60
Table 11. Comparisons of biogas productions depending on temperature and HRT by semi-continuous fermentation using anaerobic fermentors ····· 87
Table 12. Methane yield in semi-continuous fermentation ····· 88
Table 13. Elemental analysis of collected food wastes used for the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 95
Table 14. Organic acid production in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 101
Table 15. Operational conditions and performance of 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 104
Table 16. Elemental analysis of collected food wastes used for the 10 m^3

three-stage methane fermentation system ····· 139
Table 17. Organic acid production in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 147
Table 18. Operational conditions and performance of pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 149
Table 3-1. Morphological characteristics of the isolate ····· 202
Table 3-2. Substrate utilization of the isolate ····· 204

List of Figures

Fig. 1. Kind of bioenergy and application ····· 10
Fig. 2. Definition of bioenergy technology ····· 12
Fig. 3. Schematic diagram of renewable bioenergy production process from organics waste ····· 13
Fig. 4. Pathway of methane production through anaerobic fermentation ····· 15
Fig. 5. Pathway for production of ethanol by microorganism ····· 24
Fig. 6. Alcohol fermentation processes from various substrates ····· 25
Fig. 7. Schematic diagram of three-stage methane fermentation system (total 2.5 m^3) ····· 32
Fig. 8. Three-stage methane fermentation system (total 2.5 m^3) ····· 33
Fig. 9. Schematic diagram of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (0.5 m^3) ····· 35
Fig. 10. Semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (0.5 m^3) for hydrolysis of food waste ····· 36
Fig. 11. Internal structure of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ·· 37
Fig. 12. Crusher used in the three-stage methane fermentation system ····· 38
Fig. 13. Schematic diagram of anaerobic acidogenic reactor (0.5 m^3) ····· 39
Fig. 14. Anaerobic acidogenic reactor (0.5 m^3) for organic acid production from effluent of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 40
Fig. 15. Schematic diagram of anaerobic methanogenic reactor (1.5 m^3) ····· 42
Fig. 16. Anaerobic methanogenic reactor (1.5 m^3) for methane production from effluent of anaerobic acidogenic reactor ····· 43
Fig. 17. HBC-Ring for cultivation of methanogenic bacteria in methanogenic rector ····· 44
Fig. 18. (A) Extracellular amylase activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular amylase activity of selected strains from food wastes. One unit of amylase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1μM of glucose equivalent per minute ····· 54

Fig. 19. (A) Extracellular protease activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular protease activity of selected strains from food wastes. One unit of protease activity is defined as the amount of enzyme that changes 0.1 absorbance unit at 440 nm ····· 56
Fig. 20. (A) Extracellular cellulase activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular cellulase activity of selected strains from food wastes. One unit of cellulase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1μM of glucose equivalent per minute ····· 57
Fig. 21. Comparison of ethanol production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor ····· 61
Fig. 22. Comparison of acetic acid production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor ····· 62
Fig. 23. Comparison of lactic acid production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor ····· 64
Fig. 24. Schematic diagram and photograph of 30 L semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 67
Fig. 25. Schematic diagram and photograph of lab scale (11 L) methane fermentor ····· 69
Fig. 26. Automatic control system for three-stage methane fermentation system ····· 72
Fig. 27. Food wastes reservoir (200 L) for 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 73
Fig. 28. (A) Change of pH in semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor according to the mixing ratio between food wastes and final effluent wastewater; (B) Change of pH in the semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor under the condition that foodwastes were added or not; (C) Change of pH in the semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor under the condition that foodwastes mixed with wastewater with different ratio were fed continuously ····· 75
Fig. 29. Changes of pH according to the temperature in the anaerobic

methane fermentor ····· 77
Fig. 30. (A) Temperature-dependent changes in sCOD in anaerobic methane fermentors in batch reaction; (B) Grau model plot for temperature-dependent changes in sCOD ····· 78
Fig. 31. Biogas production profiles at different temperatures through batch reaction ····· 80
Fig. 32. Temperature-dependent pH changes in the anaerobic methane fermentor by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day ····· 81
Fig. 33. Temperature-dependent sCOD change (A) and removal efficiency of sCOD (B) in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation (HRT-10day) ····· 83
Fig. 34. Temperature-dependent sCOD change (A) and removal efficiency of sCOD (B) in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation (HRT-12day) ····· 84
Fig. 35. Temperature-dependent gas production in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day ····· 85
Fig. 36. Temperature-dependent NH_3-N concentration changes in different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day ····· 89
Fig. 37. HRT-dependent pH changes in the anaerobic methane fermentor by semi-continuous fermentation ····· 91
Fig. 38. HRT-dependent gas production in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation ····· 92
Fig. 39. HRT-dependent sCOD changes in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation ····· 93
Fig. 40. Changes of tCOD (A) and sCOD (B) in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 96
Fig. 41. Changes of T-N concentration in the 2.5 m^3 three-stage methane

fermentation system ····· 97
Fig. 42. Changes of NO_3-N (A) and NH_3-N (B) concentrations in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 99
Fig. 43. Changes of pH in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 100
Fig. 44. Accumulative gas and methane production in the 1.5 m^3 methane reactor ····· 103
Fig. 45. pH changes in the anaerobic methane fermentor using different organic wastes ····· 107
Fig. 46. TS (A), VS (B), and VS/TS (C) changes of different organic wastes in the anaerobic methane fermentor ····· 110
Fig. 47. Gas production in the anaerobic methane fermentor from various organic wastes ····· 111
Fig. 48. sCOD changes of various organic wastes in the anaerobic methane fermentor ····· 112
Fig. 49. Schematic diagram showing the for arrangement of each reactor in the building ····· 114
Fig. 50. Schematic diagram of pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 115
Fig. 51. Pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 116
Fig. 52. Schematic diagram of 2 m^3 semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 118
Fig. 53. Semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (2 m^3) for hydrolysis of food waste ····· 119
Fig. 54. Crusher used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system; (A) A lateral view of crusher, (B) A frontal view of crusher, (C) A screw of crusher ····· 120
Fig. 55. Schematic diagram of 2 m^3 anaerobic acidogenic reactor ····· 122
Fig. 56. Anaerobic acidogenic reactor (2 m^3) for organic acid production from effluent of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor ····· 123

Fig. 57. Schematic diagram of 6 m^3 anaerobic methanogenic reactor ····· 124
Fig. 58. Anaerobic methanogenic reactor (6 m^3) for methane production from effluent of anaerobic acidogenic reactor ····· 125
Fig. 59. Food wastes reservoir (1 m^3) used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 126
Fig. 60. Gas boiler system for combustion of biogas produced from methanogenic reactor ····· 127
Fig. 61. Schematic diagram of gas holder ····· 129
Fig. 62. Photograph of gas holder ····· 130
Fig. 63. Monitor screen of automatic control system used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 134
Fig. 64. Internal circuit of automatic control system for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 135
Fig. 65. Changes of tCOD (A) and sCOD (B) in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 140
Fig. 66. Changes of T-N concentration in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 142
Fig. 67. Changes of NO_3-N (A) and NH_3-N (B) concentrations in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 143
Fig. 68. Changes of pH in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 144
Fig. 69. Changes of T-P in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 145
Fig. 70. Accumulative gas and methane production in the pilot-scale 6 m^3 methane reactor ····· 148
Fig. 71. Material balance for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system ····· 150
Fig. 1-1. Time-dependent changes of pH in the acidogenic fermentor ····· 172
Fig. 1-2. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 4 ····· 173

Fig. 1-3. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 5 ····· 174
Fig. 1-4. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 7 ····· 175
Fig. 1-5. pH-dependent ethanol and various organic acids production in the acidogenic fermentor; (A) ethanol, (B) acetic acid, (C) propionic acid, (D) butyric acid, (E) lactic acid, and (F) valeric acids ····· 178
Fig. 1-6. pH-dependent total organic acids production in the acidogenic fermentor ····· 179
Fig. 2-1. Effect of initial pH on the cell growth (A) and hydrogen production (B) ····· 187
Fig. 2-2. Effect of temperature on the cell growth (A) and hydrogen production (B) ····· 188
Fig. 2-3. Effect of glucose concentration on the cell growth (A) and hydrogen production (B); (C) Increase of residual glucose concentration with different initial concentration after reaction finished ····· 189
Fig. 2-4. (A) Effect of nitrogen sources on the cell growth and hydrogen production; (B) Effect of various yeast extract concentration on hydrogen production ····· 190
Fig. 2-5. (A) Effect of metal ions on the cell growth and hydrogen production; (B) Effect of various $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ concentration on hydrogen production ····· 192
Fig. 2-6. Effect of pH on the hydrogen production ····· 193
Fig. 3-1. Scanning electron micrograph of isolated *S. cerevisiae* KA4. The bar shows 1 μm ····· 201
Fig. 3-2. Neighbour-joining tree based on 26S rDNA D1/D2 region sequences of *Saccharomyces*. *S. transvaalensis* NRRL Y-17245 (U68549) was used as an outgroup. Scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position. NT, neo type., T, type strain ····· 203
Fig. 3-3. Effects of temperature on the growth of *S. cerevisiae* KA4 (A) and

S. cerevisiae KCTC 1199 (B) ····· 206
Fig. 3-4. Effect of ethanol concentration on the cell growth ····· 207
Fig. 3-5. Effect of glucose concentration on the growth of *S. cerevisiae* KA4 (A) and *S. cerevisiae* KCTC 1199 (B) ····· 208
Fig. 3-6. Changes of residual glucose or ethanol concentrations depending on the initial glucose concentration after 24 hr ethanol fermentation ····· 210
Fig. 3-7. Changes of residual glucose or ethanol concentrations depending on the initial pH after 24 hr ethanol fermentation ····· 211

Abstract

Development of a pilot-scale three-stage fermentation system for high-efficiency methane production from organic wastes

Jung Kon Kim
Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.
Department of Bio Materials Engineering,
Graduate School, Chosun University

A novel pilot-scale three stage fermentation system was developed for high-efficiency methane production from food wastes. This system consisted of three reactors and total reactor volume was 2.5 m^3. The first stage was a semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic process which converted food wastes into variable sugars, amino acids, and volatile fatty acids (VFAs). The operation temperature and pH were 45℃, and 3.8 ~ 4.0, respectively. The hydraulic retention time (HRT) was 2 days. Eleven microbial strains (K1 ~ K11) were isolated and characterized through this stage. Total chemical oxygen demand (tCOD) was 71,234 mg/L. The second stage was an anaerobic acidogenic process which can produce large amounts (14,560 mg/L) of VFAs including acetate, propionate, butyrate, valerate, and lactate. The operation temperature and pH were 35℃, and 3.5 ~ 3.8, respectively. The HRT of this stage was also 2 days. Five strains (KA1 ~ KA5) were isolated and characterized in this stage. The third stage was a strictly

anaerobic methane fermentation process producing methane and carbon dioxide from VFAs. The operation temperature and pH were 50℃, and 7.1 ~ 7.5, respectively. The HRT was 12 days. Seventy two percent of methane from total biogas was generated and the yield was 360 L/Kg COD. Through out these stages, 91% of tCOD was removed.

The effects of temperature and HRT on the methanogenesis were examined. Operation temperature was adjusted from 30℃ to 55℃, and the HRTs ranged from 8 to 12 days. The rate of soluble chemical oxygen demand (sCOD) removal correlated with digestion time according to the first-order kinetic model developed by Grau *et al*[Water Res., 9, 637-642 (1975)]. With liquor food waste, thermophilic digesters showed a higher rate of sCOD removal than mesophilic digesters. The rates of biogas and methane production by thermophilic digesters were higher than those by mesophilic digesters regardless of HRT. Although maximum biogas production occurred when the HRT of 10 days was used, the methane yield was the highest in the reactor when an HRT of 12 days was used (223 L CH_4/kg $sCOD_{degraded}$). However, digestion stability decreased when an HRT of 8 days was used. The concentration of NH_3-N generated in this experiment did not inhibit anaerobic digestion.

The process characteristics of anaerobic methane fermentation using several organic wastes were investigated. The substrates used were food wastes, vegetable wastes, cow manures, pig manures and wastewater sludge. The substrates were mixed with inocula (methanogenic fluid) at a ratio of 1:1, and several parameters including total solid (TS), volatile solid (VS), sCOD, and biogas production were monitored. Anaerobic digestion of food wastes and pig manures were occurred rapidly in the initial stage of fermentation, whereas that of vegetable wastes were occurred slowly in the late stage. Cow manures were degraded in the both initial and late stages of digestion.

Total 10 m^3 pilot-scale methane fermentation system was operated under

the same condition as total 2.5 m^3 methane fermentation system. The operation temperature and pH of the first stage were 45℃, and 3.8 ~ 4.0, respectively. The HRT was 2 days. tCOD was 56,734 mg/L. The second stage was an anaerobic acidogenic process which can produce VFAs including acetate, propionate, butyrate, valerate, and lactate. The operation temperature and pH were 35℃, and 5.0 ~ 5.5, respectively. The HRT was 2 days. The third stage was a strictly anaerobic methane fermentation process producing methane and carbon dioxide from VFAs. The operation temperature and pH were 50℃, and 7.3 ~ 7.8, respectively. The HRT was 12 days. Sixty eight percent of methane was contained in the biogas. Through out these stages, total 93.5% of tCOD was removed.

제 1 장 서 론

제 1 절 연구배경 및 목적

국내에서 생산되는 유기성 폐기물은 1997년을 기준으로 농산부산물 680만톤, 음식물 쓰레기를 포함한 생활 폐기물 660만톤, 하수 슬러지 등의 사업장 폐기물 410만톤, 축분 3,000만톤 등 유기성 폐기물이 년간 4,800만톤 이상 발생하였으며, 최근에는 이러한 유기성폐기물의 발생량이 계속 증가하여 년간 1억 5천만톤 이상 발생하고 있다. 특히 음식물 쓰레기는 2002년도에 하루 11,397톤이 발생함으로써 생활폐기물 발생량의 23%를 차지하고 있다[1]. 이처럼 발생하는 유기성 폐기물들의 처리방식은 주로 매립에 의존하였지만 이것은 자원의 경제적 낭비이며, 매립에 의한 악취발생 및 침출수 발생으로 인한 지하수와 하천의 수질오염 및 토양오염과 같은 2차 오염과 NIMBY 현상을 야기한다. 더욱이 NIMBY 현상에 의한 매립장의 부족과 2005년 1월부터 시행된 음식물 쓰레기 직·매립 금지에 관한 법률의 시행으로 인하여 대량으로 발생하고 있는 유기성 폐기물의 처리문제가 심각한 상황이다. 게다가 만일 이러한 유기성 폐기물을 매립과 같은 기존의 방법으로 그대로 처리하게 된다면 매립지 토양 내에서 발생하는 다량의 메탄이 그대로 대기 중으로 방출되어 기후변화를 급속하게 촉진하게 될 것이다. 또한 음식물쓰레기의 경우 함수율이 85% 이상으로 부패하기 쉬워 보관 및 운반에 문제가 있으며 소각처리 시 614 kcal/kg의 낮은 발열량으로 인한 불완전 연소와 그에 따른 보조연료 사용량의 증대로 인하여 환경오염을 가중시키는 문제점을 지니고 있다.

한편 지난 세기동안, 인류의 산업발달과 성장을 위한 에너지소비의 양은 지속적으로 증가되어 왔다. 그로인한 결과로서 현재 사용되는 주된 화석연료인 석유의 가채년수는 약 40년 정도 밖에 남지 않았으며, 향후 40 ~ 60년 내에 획기적인 대체에너지가 나오지 않는 한 심각한 에너지문제에 직면할 위기에 처해 있다. 또한 화석연료 사용의 증가는 대기 중으로 CO_2 방출을 가속화시켰고, 그로인해 지구온난화와 기후변화를 일으키는 원인이 되고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 재생가능하고, 지속가능하며, 효과적이고, 경제적이며, 편리하고 안전한 환경친화적인 대체에너지 개발이 절실히 필요하게 되었으며, 최근 들어 바이오에너지에

관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

신재생에너지원 가운데 하나인 바이오에너지는 동물이나 식물로부터 나오는 바이오매스에 생물공학적 방법을 응용하여 얻는 연료용 알코올이나 메탄 혹은 수소와 같은 재생성 무공해 에너지를 말한다. 전 세계적으로 바이오매스를 이용한 에너지의 공급은 9 ~ 13% 정도이고, 여기에는 난방이나 요리를 위한 연료와 같은 전통적인 에너지의 이용과 전기나 증기의 생산 및 액체 바이오연료와 같은 현대적인 에너지의 이용이 모두 포함된다[2]. 바이오에너지가 풍력, 태양광, 태양열 등으로부터 생산되는 재생에너지와의 큰 차이점은 열, 전기 등과 같은 무형의 에너지가 아닌 기체·액체·고체연료로서 형태를 갖는 에너지라는 점이며, 그 결과 에너지 저장이 가능한 장점이 있다. 그리고 바이오에너지는 사용하는 과정에서 전체 이산화탄소의 생산을 증가시키지 않는 환경친화적인 에너지이다. 실제로 바이오매스를 사용할 때 이산화탄소는 분명히 배출되지만 발생하는 이산화탄소의 양은 대기 중에 이미 존재하는 양이며, 이것은 식물이 광합성할 때 고정되고 식물이 이용한 후 다시 대기 중으로 방출하여 순환하므로 전체적으로는 대기 중 CO_2 농도 증가에 기여하지 않는다. 이로 인해 CO_2-neutral 에너지로 이미 국제 사회에서 인정되었다.

그러므로 현재 대량으로 배출되고 있는 유기성 폐기물과 같은 재생가능 폐기물을 재활용하여 폐기물 처리와 동시에 바이오에너지를 생산할 수 있다면 일석이조의 효과를 얻을 수 있다.

현재 국내에서 시도되고 있는 음식물 쓰레기를 포함한 재생가능 폐기물의 재활용 기술은 주로 사료화[3,4], 퇴비화[5,6], 및 혐기성소화[7]를 이용한 처리정도이다. 사료화의 경우 건식사료화, 습식사료화, 증자(cooking)에 의한 사료화, 기름튀김 방식에 의한 사료화 기술에 현재 이용되고 있으며 2004년에는 하루 989톤이 가축의 사료로 이용되었다. 퇴비화의 경우에는 호기성 퇴비화, 혐기성 퇴비화, 건조발효, 발효분해, 소멸화 분해기술이 이용되고 있으며 2004년에 하루 208톤이 재활용되었다. 그러나 이 기술들은 기술의 특징에 따라서 고가의 설치비용이 소요되거나 대규모 부지를 요구하고, 부패 또는 악취발생의 문제점을 안고 있다. 예를 들어 음식물 사료화는 분리수거의 난점이 있고 부패성 또는 병원성 미생물의 발생과 사료 내 이물질로 인하여 가축에 피해가 우려되며, 음식물 쓰레기 내에 영양분의 불균일로 가축의 영양상태의 불균형을 초래할 수 있기 때문에 상품의 가치 및 경제성 그리고 수요의 문제 등의 문제점을 내포하고 있다. 또한 퇴비화는 우리나라 음식물 자체의

과다수분 및 염분 등으로 농작물에 피해를 줄 수 있고 퇴비화된 음식물 쓰레기를 토지화하는 과정에서 악취를 유발하게 되며 수분조절용 톱밥, 왕겨 등 부재료의 수급, NIMBY 현상에 의한 부지 확보 곤란 등의 문제점을 가지고 있다. 따라서 최근에는 국내외적으로 음식물 쓰레기와 같은 재생가능 폐기물을 혐기 소화처리하고 이 과정에서 생산되는 메탄을 에너지화하는 기술 개발에 주력하고 있다.

혐기성 소화처리는 혐기성 미생물을 이용하여 유기물을 최종적으로 메탄과 이산화탄소로 분해하는 처리방법이며 호기성 처리방법에 비해 동력소모가 적고, 고농도의 유기성 폐수처리에 적용할 수 있다. 또한 이 공정에서 생산된 바이오 가스의 주성분인 메탄은 유용한 에너지원으로서 현재 전량 수입하고 있는 액화천연가스의 주성분이기도 하기 때문에 에너지 수입 대체효과를 기대할 수 있다. 따라서 혐기성 소화처리 방법은 대규모 반응기에서 생산된 메탄을 연소를 통하여 발전할 수 있기 때문에 주변 건물의 냉·난방 및 전력공급원으로 사용할 수 있고, 혐기성 소화처리 후 발생되는 슬러지 생산량이 적어 이의 최종처분이 비교적 용이한 장점을 가지고 있다[8-10]. 그러나 혐기성 소화처리 방법은 온도, pH, 저해물질, 부하변동 등 환경조건의 변화에 민감하여 운전이 까다롭고, 반응속도와 세포합성이 호기성 공정에 비해 매우 낮아 대용량의 시설이 필요하므로 토지소요량과 건설비의 초기 투자비가 크다는 단점도 가지고 있다. 이와 같은 단점에도 불구하고 유럽의 경우 음식물쓰레기와 분뇨를 처리하기 위한 혐기성 소화방법은 바이오가스 생산설비(biogas plants[BGPs])로 적용되고 있으며, 이와 같은 BGPs는 덴마크에 19개, 독일에 11개 그리고 스웨덴에 10개의 large scale BGPs가 현재 가동 되고 있다[11,12].

그러나 국가별로 도시 유기성 폐기물의 성분, 종류, 발생 정도와 수거방법상의 특징들이 모두 다르기 때문에 각 국가는 독자적인 혐기성 소화처리 공정 즉 메탄 발효시스템의 개발을 진행하고 있다[12]. 예를 들어 우리의 음식물 쓰레기는 절대량이 많고, 다량의 염분이 포함되어 있으며 함수율이 높기 때문에 외국의 공정대로 가동할 경우 많은 문제점을 나타내게 된다. 또한 기존에 개발된 메탄 발효시스템을 비교해 볼 때 단상 혐기성 산/메탄 반응기의 경우 산 발효와 메탄 발효가 동시에 일어남으로써 산에 민감한 메탄생성세균들이 그 충격 때문에 성장에 저해를 받아 메탄 발효능이 매우 낮았다. 이를 해결하기 위하여 새로 개발된 이상 반응기의 경우 각각의 반응기를 따로 설치하여 산 발효조에서 가수분해와 산 발효가 동시에 일어나게 한 후 산 발효액을 메탄 반응기에 주입하여 메탄 발효가 효율적으로 일

어나도록 하였다. 그러나 이상 반응기의 경우도 여전히 발효 속도가 느리고 산충격 때문에 메탄생산에 있어 효율이 낮다. 따라서 고형 상태의 폐기물을 단 시간 내에 액상으로 전환하는 가수분해 반응속도를 높이고 산충격을 현저히 줄이면서 메탄생산 수율을 높일 수 있는 새로운 혐기성 메탄 발효공정 개발이 시급하다.

본 연구자가 속한 연구실에서는 1996년부터 유기성 폐기물을 혐기 소화처리하기 위한 연구를 시작한 이래로 발효시스템 총 규모가 약 0.4 m^3 규모의 mini pilot-scale에서 3단계로 메탄 발효화하는 공정을 개발하였으며[13], 현재까지 지속적인 연구를 수행하고 있다.

따라서 본 연구에서는 축산폐기물, 농산폐기물, 음식물쓰레기, 하수슬러지 등 각종 재생가능폐기물들인 유기성 폐기물을 고속발효 시키기 위해 기존에 개발된 mini pilot-scale의 혐기성발효시스템을 기반으로 하여 pilot-scale으로 scale-up시킨 3단계 메탄 발효시스템의 개발과 우리나라의 유기성 폐기물의 특성에 맞는 발효공정의 최적화 조건을 확립함으로써 폐기물 처리뿐만 아니라 이들로부터 환경친화적인 청정대체에너지를 대량 생산할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다.

제 2 절 국·내외 기술개발 동향

국외의 재생가능폐기물의 혐기성 소화에 대한 연구와 실용화에 관한 기술개발은 국내의 수준보다 진척되어 있다. 1988년 프랑스의 Amiens시에 도시 유기성 폐기물을 혐기소화 처리하기 위한 Valorga공정이 준공된 이후 1996년까지 오스트리아, 핀란드, 덴마크, 네덜란드, 독일, 스위스 등 유럽 국가와 캐나다, 미국 등 전세계적으로 50여개 정도의 대형 혐기 소화 시설이 운영되고 있으며 향후 계속해서 건설될 계획으로 알려져 있다[14].

그러나 국가별로 재생가능 폐기물의 성분, 종류, 발생 정도와 수거방법상의 특징들이 모두 다르기 때문에 각국별로 독자적으로 공정개발이 이루어지고 있다 (Table 1).

Table 1. Commercial anaerobic digestion process for removal of municipal solid wastes[15)]

지 역 명	국 가	대상폐기물	공 정 명	소화 온도	전처리의 특 징	용량 (톤/년)	준공 년도
짤쯔부르그, Salzburg	오스트리아	SS-MSW	Dranco	고온 (55℃)	Drum screen	20,000	1993
바사, Vaasa	핀 란 드	SS-MSW와 하수슬러지	Wabio (Avecon)	중온 (38℃)	Drum	40,000	1990
아미엥, Amiens	프 랑 스	MSW (미분리)	Varlorga	중온	Drum	55,000	1988
베거, Vegger	덴 마 크	SS-MSW와 축산분뇨	Jysk biogas	고온	습식분리	15,000	1991
라이덴, Leiden	네덜란드	MSW와 SS-MSW	Paques	중온	(미확인)	100,000	1996
바덴바덴, Baden-Baden	독 일	SS-MSW	BTA	중온	미분쇄	5,000	1993
룸므랑, Rumlang	스 위 스	SS-MSW와 정원쓰레기	Kompogas	고온	수선별	5,000	1992

*SS-MSW : Source Sorted Municipal Solid Wastes.

예를 들어 프랑스의 경우 도시쓰레기의 분리·수거 관행이 아직 정착되어 있지 않기 때문에 전체 쓰레기를 건식으로 처리하는 Valorga공정이 개발되어 있으며, 덴마크는 축산폐수와 음식쓰레기를 통합 소화 처리하는 Vegger공정이, 벨기에에서는 고형물이 25%를 넘는 음식쓰레기를 단일 발효조에서 소화하여 최대한의 메탄가스를 얻고 다량의 고형물을 퇴비로 반출하는 Dranco공정을 운영하고 있다. 그러나 이 기술들은 주로 재생가능 폐기물들의 소화에 역점을 두고 있고 아직 폐기물을 이용한 메탄의 대량 생산에 대해서는 많은 연구가 진행 중에 있다.

미국은 에너지성 (Department of Energy : DOE)산하의 국립재생에너지 연구소 (National Renewable Energy Laboratory : NREL) 주도하에 Biofuels Program을 수행 중에 있으며 2010년까지 미국에서 사용되고 있는 생물학적 제품과 바이오 에너지 사용량을 세 배로 높일 계획을 가지고 있다. 주 연구내용은 Cellulosic biomass로부터 에탄올 등을 생산하거나 biomass 가스화에 의한 메탄올 생산, 바이오 디젤 생산, 재생가능 폐기물 메탄가스화 기술, 그리고 에너지 작물의 재배 등 전반적인 바이오에너지 생산 기술에 관한 연구를 수행 중에 있다.

일본은 1974년부터 Sunshine Project라는 대규모 과제를 수행하고 있으며, 이 프로젝트는 크게 신에너지 기술개발, 에너지절약 기술개발, 지구환경 기술개발로 이루어져 있다. 일본의 바이오에너지 기술개발은 신에너지기술종합개발기구 (New Energy and Industrial Technology Development Organization : NEDO)를 중심으로 이루어지고 있으며, 특히 1993년에는 경제성장, 에너지, 환경보전에 대한 균형 있는 대책과 종합적인 기술개발을 위하여 기존의 Sunshine Project, Moonlight Project 및 지구환경 기술개발 계획을 통합한 New Sunshine Program(에너지 환경 영역 종합 기술개발 추진계획)을 수립하여 체계화 하였다. 현재는 메탄올 연료기술 개발, 도시폐기물을 이용한 발전 기술, 그리고 도시 재생가능 폐기물의 메탄 발효기술을 연구하고 있다.

EU(유럽연합)와 각국의 경우 EU 차원의 바이오에너지 연구개발은 JOULE (Joint Opportunities for Unconventional or Long-term Energy Supply, 신재생에너지 연구개발)과 THERMIE (신에너지 기술의 실증, 활용, 보급) 프로그램에서 이루어지고 있다. JOULE 프로그램의 중요 지원대상 과제는 유럽연합 역내에 바이오매스 자원이 많으므로 향후 장기적 에너지 공급에 큰 역할을 기대하며 가용자원의 조사 및 확보, 보급 타당성 조사, 정책연구에 주력하고 에너지 작물재배, 소규모 가스화 발전기술, 수수로부터 에탄올 생산기술 개발 등을 병행하고 있다. 또한 THERMIE 프로그램에서는 바이오

매스 가스화 발전을 1990 ~ 1994년에 걸친 계획의 핵심목적과제로 선정하여 추진한 바 있으며, 산업 및 도시폐기물의 메탄가스화 및 퇴비화 보급, LFG 발전기술 실증, Biodiesel 생산기술 실증, 그리고 바이오매스 가스화 발전 기술 실증 등의 대형과제를 선정하여 집중적으로 투자를 하고 있다.

프랑스는 특히 바이오에너지 기술개발에 주력하여 1983 ~ 1988년간 남서부의 Soustons에 발효조 규모 30m^3의 목질계 에탄올 Pilot Plant를 건설하여 요소기술을 확보하였고 그 공장은 현재 Safizym이라는 상표명을 가진 Cellulase를 생산하고 있으며 당화 효소 생산기술의 향상 등을 계속적으로 도모하고 있다. 한편, 축산폐기물의 혐기발효 기술은 상용화 단계이고 도시폐기물 메탄가스화 기술 (Gaz de France, Valorga process)도 개발하여 Amien시에 설치하였고 타국에 기술수출도 하고 있다. 바이오연료의 실용화 부문은 목재연료의 보급에 주력하여 가정은 물론 상업부문으로 공급을 확대하고 있으며, 유채유를 에스테르화한 바이오디젤, 에탄올은 시범보급 중이며 에탄올과 부틸렌에서 생산되는 ETBE는 Elf사가 년간 75,000톤 규모의 공장을 건설하여 상용화하였다. 프랑스는 농업 생산국으로 유채유는 Biodiesel, 밀, 사탕무우 등은 에탄올, 목질계 바이오매스는 일단 바이오 고체연료 생산이라는 방향으로 기술개발을 진행하고 있다.

이탈리아는 140여기의 메탄 발효조가 보급되어 바이오 가스 생산과 바이오매스를 이용한 10 ~ 100 kW급의 가스화 발전은 보급단계이고, 목질계 폭쇄 전처리 및 발효 에탄올 생산은 연구단계에 있다. 스페인은 바이오매스 연소기기의 설계, 제조 부문에서 많은 실적을 갖고 있으며 목질계 에탄올 연구에도 참여하고 있다.

독일, 네덜란드, 핀란드 그리고 특히 덴마크는 축산폐기물은 물론 도시 유기성폐기물을 반응기를 이용하여 메탄가스화하거나 LFG를 이용하여 에너지 생산과 폐기물 처리를 하는 기술의 개발에 주력하여 현재 기술은 실증되었고 보급단계에 와 있다. 현재 독일내에 보급되어 운전되고 있는 Biogas plant로는 우분과 돈분 250 m^3/day와 음식폐기물 50 m^3/day을 반입하여 110,000 m^3/year을 처리하여 년간 20,000 MWh의 전기를 생산하는 Werlte plant, 음식폐기물, 야채, 농장폐기물 등 28,000 m^3/year의 재생가능폐기물을 반입하여 년간 6,500 MWh의 전기를 생산하는 Freiburg Plant, 주로 농촌 쓰레기를 년간 200,000 m^3 처리하면서 1.6 MWh의 발전시설로 전력을 생산하는 Kiel Plant가 있고, 또한 일일 550톤, 년간 20만톤 처리 용량 규모를 건설중이며, 3,000만 유로 (약 420억원) 투자하여 3 MWh 발전시설을 가동할 예정인 Lübeck plant 등이 있다.

Table 2. Anaerobic digestion processes operated in Korea

처리장소	일일처리용량(톤)	공정	시행사
경기도 파주시	30	2상 혐기소화	한라산업개발
경기도 의왕시	15	2상 혐기소화	한라산업개발
경기도 안양시	5	2상 혐기소화	한라산업개발

OECD 국가들의 에너지원별 이용률을 보면 원자력, 수력 등의 비중은 줄어드는 반면 총 에너지에서 대체에너지가 차지하는 비중은 93년 3.9%에서 2010년 4.7%로 증가할 것으로 전망되며, 과다한 초기투자의 장애요인에도 불구하고 대체에너지는 화석에너지의 고갈문제와 환경문제에 대한 핵심 해결방안이라는 점에서 선진각국은 정부 주도하에 대체에너지에 대한 과감한 연구개발과 보급정책 등으로 추진해 오고 있으며 특히 미국, 일본, EU등의 국가들은 기술개발과 시장기반 확보를 토대로 기존 에너지원과의 가격경쟁력을 극복해 나갈 것으로 예상된다.

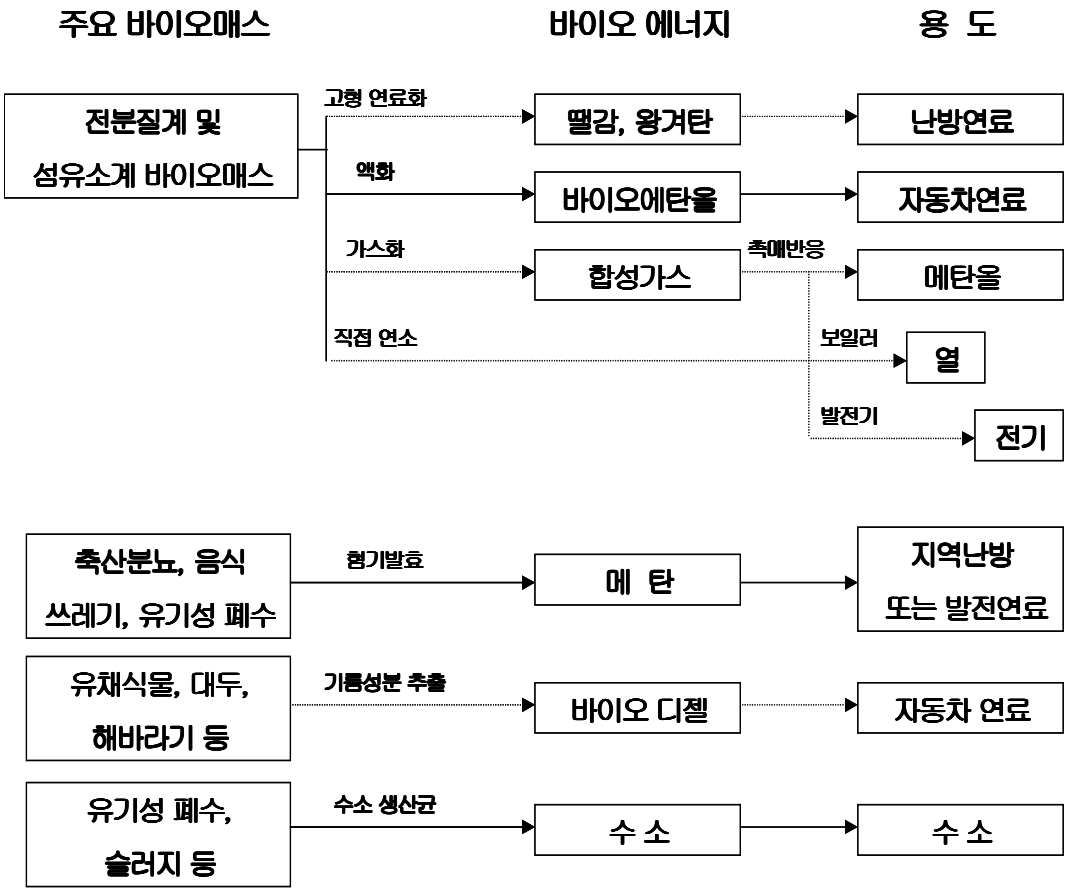
현재 운영중인 국내의 음식물 쓰레기 혐기소화시설 운영 현황은 Table 2에 나타낸 바와 같이 한국에너지기술연구소와 한라중공업에서 공동으로 안양시에 5톤 규모, 의왕시에 15톤 규모, 파주시에 30톤 규모의 음식물 쓰레기 혐기소화 처리 시설을 설치, 운영하고 있다. 산 발효상과 메탄 발효상으로 각각 나누어 소화시키는 방법인 2상소화법은 한라중공업에서 개발하여 현재 실용화 단계에 있으나 아직도 처리 속도가 늦기 때문에 발효조의 크기가 크고 따라서 설치비용이 많이 드는 단점이 있다. 이 기술은 선진국과 비교할 때 비교적 우수한 것으로 판단되지만 이 기술도 주로 폐기물 소화에 주안점을 두고 있어 본 연구에서의 기술 개발 목표와는 거리가 있다.

제 3 절 이론적 고찰

1. 바이오에너지기술

바이오에너지는 다양한 신재생에너지원 중 바이오매스로부터 생산되는 에너지를 말하며, 바이오매스라는 말은 원래 생태학에서의 '생물량'을 나타내는 것이지만 지금은 '에너지로 이용되는 유기성 자원'이라는 뜻으로 사용되고 있다.

이러한 바이오매스의 원료는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 종류에 따라 곡물, 감자류를 포함한 전분질계의 자원, 초본, 임목과 볏짚, 왕겨와 같은 농산부산물을 포함하는 셀룰로스계의 자원 그리고 사탕수수와 사탕무우와 같은 당질계의 자원, 마지막으로 가축의 분뇨, 사체와 미생물의 균체를 포함하는 동물 단백질계의 자원으로 분류된다.



(…> : thermochemical technology, —> : biological technology)

Fig. 1. Kind of bioenergy and application.

바이오매스를 구성하고 있는 탄화수소는 석유를 구성하는 탄화수소와 마찬가지로 이론적으로 화학, 생물공학기술을 응용하여 우리의 일상생활에서 사용되는 거의 모든 화학제품을 바이오매스로부터 생산이 가능하기 때문에 바이오에너지는 바이오매스의 열화학적 또는 생물학적 전환에 의해 생산되며, 전기 생산 (바이오파워) 또는 수송용 연료 (바이오연료)로서 뿐만 아니라 화학산업 연료 (바이오제품)로서도 활용이 가능하다 (Fig. 2).

2. 혐기성 소화

1920년에 개발된 IMHOFF process는 최초의 혐기성 소화 공법으로서 하수처리장의 슬러지 처리에 적용되었고, 세계 2차 대전 당시 농업폐기물로부터 바이오가스 회수에 대한 연구가 수행되었으며, 회수 바이오가스는 에너지 생산에 이용되었다. 폐기물처리방법의 일환으로서 혐기성소화는 탄소, 질소, 기타영양분의 유기성 성분을 농지로 환원시킴으로 오랫동안 이용되어 왔다. 이와 같은 혐기성소화공정은 생물학적 분해가능한 재생가능 폐기물뿐만 아니라 수분함량이 높은 유기성 산업폐기물에도 적용이 가능하며, Fig. 3에 나타낸 바와 같이 유기물의 소화단계에서 발생하는 바이오가스는 회수되어 전기 또는 난방 연료로 사용되는 화석연료를 대체하는 에너지원으로 사용할 수 있기 때문에 퇴비화와 비교했을 때 상당한 장점을 가지고 있고, 지구온실가스의 원인이 되는 메탄가스의 대기 중 비산을 감소시키는데 기여할 수 있다[16]. 따라서 70년대 에너지 위기를 경험하면서 자원의 보존 및 재활용, 대체에너지 개발이라는 개념에서 에너지가 적게 소요되며, 최종부산물로 재사용 가능한 메탄가스가 생산되는 혐기성 처리공법이 각광을 받게 되었으며 경제성, 처리효율 등의 이유로 고정상법, 유동상법, 슬러지상법 등의 생물학형성 또는 자기고정화방식(Self-immobilization)으로 반응조 내에 고농도의 혐기성 미생물을 유지시킬 수 있는 반응기가 개발됨에 따라 고농도 유기성 폐수의 적용확대를 위한 연구가 활발하게 되었다.

특히 Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Process는 과거 혐기성처리법의 경우 미생물이 유출되기 쉬운 단점을 해결하기 위해서 개발된 공법이며, 혐기성 반응조 내에 미생물을 부착시키기 위한 물질을 전혀 주입하지 않고 순수한 미생물만으로 응집된 고농도 입상슬러지 미생물을 이용하여 폐수를 처리하는 공법이다.

Fig. 2. Definition of bioenergy technology.

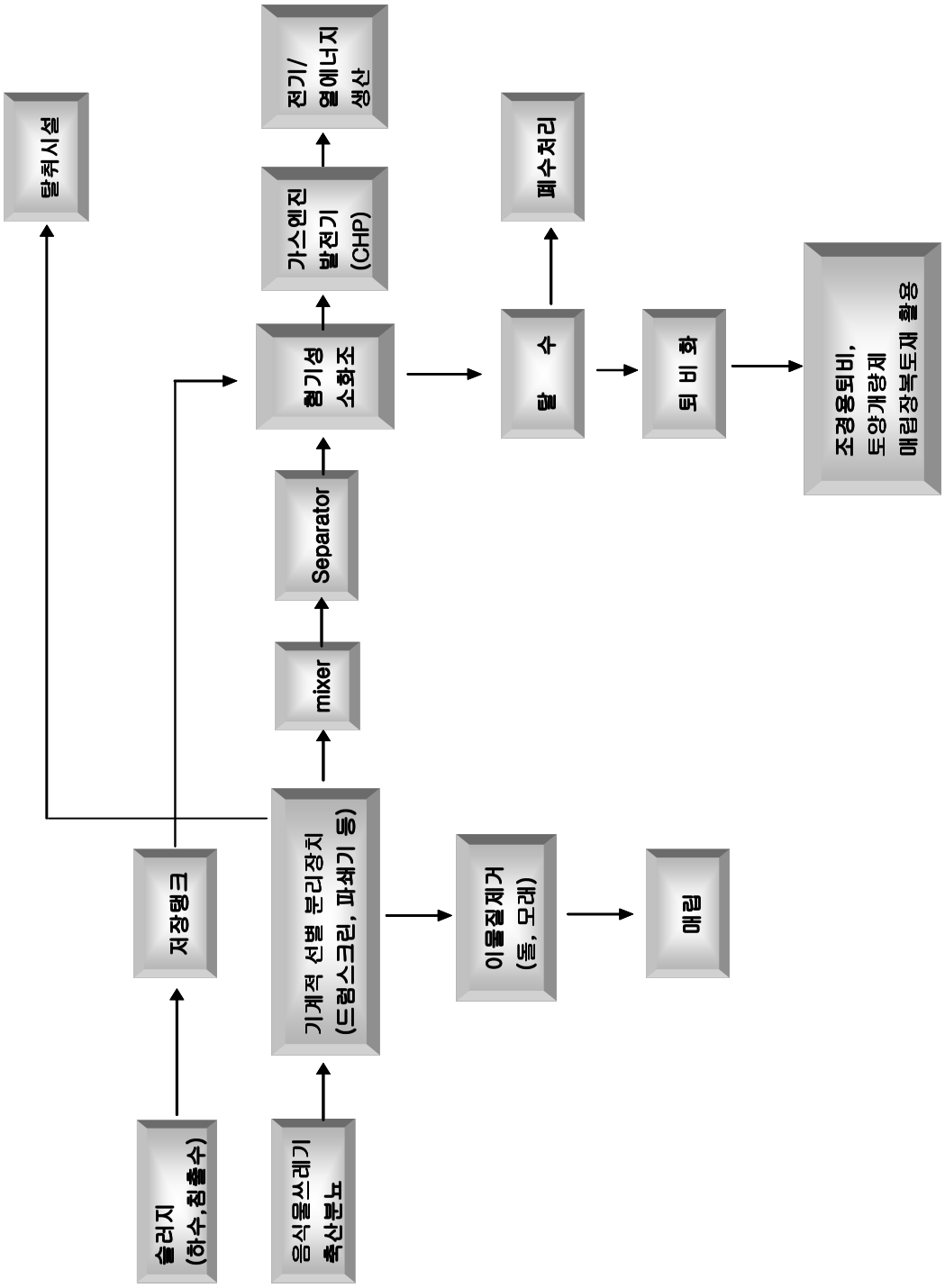


Fig. 3. Schematic diagram of renewable bioenergy production process from organics waste.

이 공법은 높은 처리효율을 안정적으로 얻을 수 있을 뿐 아니라 장치가 간단하고 운전이 용이하여 경제적인 혐기성 폐수처리 방법으로 알려져 잇다. 특히 비교적 저농도 유기물질을 포함하는 폐수도 짧은 체류시간으로 처리할 수 있는 장점을 가지고 있다[17].

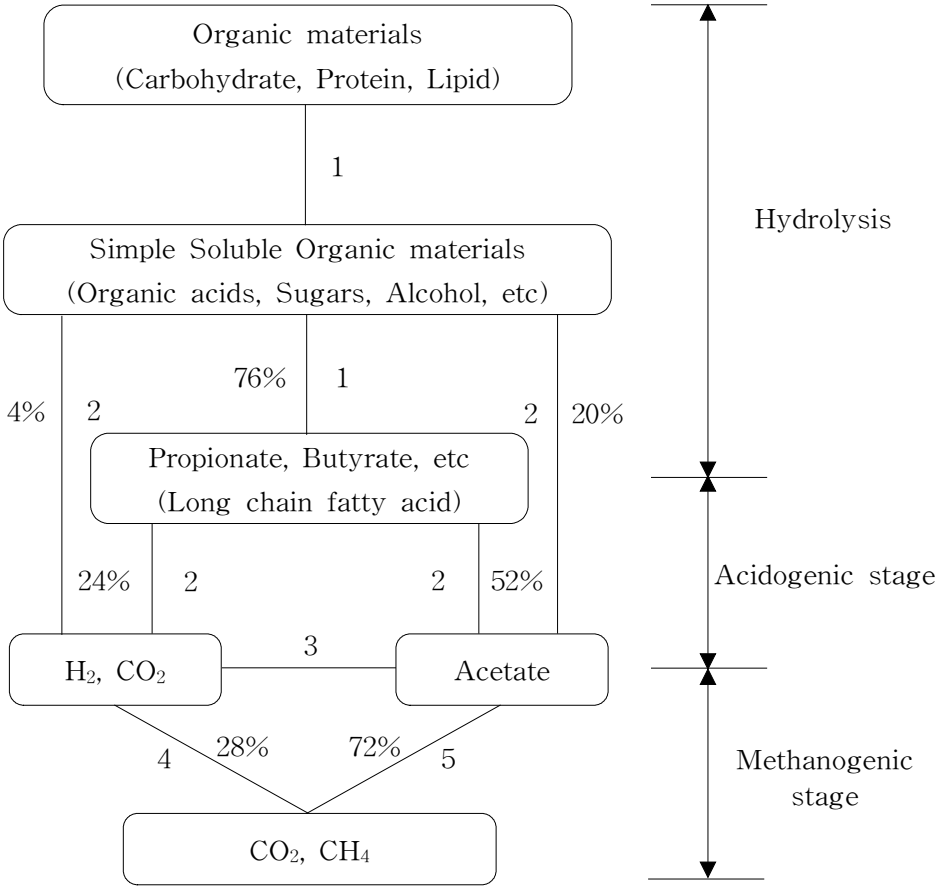
Fig. 4는 혐기성 소화의 반응 메커니즘을 나타낸 것이며, 혐기성 소화에서 바이오가스는 크게 고분자 물질을 저분자 물질로 분해하는 가수분해단계, 가수분해과정을 통해 분해된 저분자물질로부터 산생성 미생물에 의한 산생성단계, 산생성단계에서 생성된 유기산을 기질로 하여 메탄생성균에 의해 메탄을 생성시키는 메탄생성단계의 3단계 과정을 통해 생성된다.

혐기성소화의 종류에는 처리하고자하는 유기성 폐기물의 고형물함량에 따라 건식혐기소화와 습식혐기소화로 구분되며, 온도에 따라 중온혐기소화와 고온혐기소화로 나누어지고, 소화조의 구성단계에 따라 단상, 이상, 삼상혐기소화로 구분된다.

건식혐기소화의 경우 처리대상 유기성폐기물의 고형물 함량은 30~35%이며, 대체로 단상 소화공정으로 설계되며, 고형물의 함량이 40%이상일 경우 반응조 내부의 혼합 또는 물질이송을 방해하고, 미생물의 유기물 분해활동을 저해할 위험성이 증가하지만 건식소화공정은 폐기물의 수분함량이 낮아 반응기 규모를 최소화 할 수 있는 장점이 있다.

습식혐기소화는 처리대상 유기성폐기물의 고형물 함량이 약 10% 정도이며, 높은 수분함량으로 인해 건식혐기소화와 달리 반응조 내부의 혼합 및 물질 이송이 용이하다. 이러한 운전조건은 생성된 바이오가스 방출뿐만 아니라 열전달 및 물질의 이송과 교환을 상당히 양호하게 하며, 따라서 처리공정 설계시 다양한 형태의 공정배열이 가능하다.

혐기소화공정은 일반적으로 운전온도가 35 ~ 37℃의 경우를 중온소화, 50 ~ 55℃의 경우를 고온소화로 구분하지만, 메탄생성균은 15℃ 이하의 저온이나 65℃ 이상의 고온에서도 활성이 있다고 보고되었고[18-21], 일반적으로 주로 중온에서 운전되고 있다. 일반적인 화학반응에서의 반응속도는 온도에 비례하여 증가하지만 생물학적 반응속도는 반응을 수행하는 미생물의 최적 성장 온도에 따라 달라진다. 혐기성 소화공정의 주요 인자 가운데 하나인 온도는 비교적 좁은 적정온도 범위에서 유지되어야 하며 이를 벗어날 경우 미생물의 활성도에 영향을 미쳐 처리효율이 현저하게 저하된다. 그러므로 각 소화온도 영역에서 최대의 바이오가스 생성율을 나타낸다.



Bacteria group

1. Hydrolytic fermentative bacteria
2. Hydrogen production bacteria
   Syntrophic acidogenic bacteria
3. Hydrogen utilization bacteria
   Syntrophic acidogenic bacteria
4. Chemolithotrophic methanogens
5. Methylotrophic methanogens

Fig. 4. Pathway of methane production through anaerobic fermentation[22].

가스생성율은 고온소화공정이 중온소화공정에 비해 약 10%정도 더 높으며, 메탄생성균의 종 분포는 고온영역보다는 중온영역에서 다양하게 존재하다.

또한 고온소화의 경우 고온이 가지는 동력학적인 이점으로 인하여 발효속도를 증가 시키고 반응조내의 수리학적 체류시간을 감소시켜 반응조의 용적을 줄일 수 있으며, 병원성 미생물에 대한 살균효과와 같은 장점을 가지고 있는 반면[23-25] 온도유지를 위한 열에너지를 요구하며 중온소화에 비해 안정성이 다소 떨어지는 문제점이 있다.

단상, 이상, 삼상소화조의 구분은 소화조의 구성에 의한 구분이며, 단상소화조의 경우 하나의 소화조내에서 3단계에 걸친 바이오가스 생성과정이 일괄적으로 진행되며, 따라서 각 단계별 운전최적화는 불가능하다. 그리고 이상소화조의 경우 두 개의 소화조를 이용하고 첫 번째 소화조에서 가수분해와 산생성과정을 거쳐 두 번째 소화조에서 메탄을 생성하며, 반응조가 분리되어 각 공정을 최적화 할 수 있어 단상소화조에 비해 효율이 높다. 반면, 삼상소화조의 경우는 3개의 반응조를 이용하여 3단계에 걸친 바이오가스 생성과정을 단계별로 분리하여 최적화함으로써 폐기물 처리 효율 뿐 만 아니라 메탄생성효율을 극대화 할 수 있다.

지금까지 개발된 다양한 형태의 혐기성 소화 반응조의 처리공정은 다음과 같다[26].

① 건식 연속 혐기성 소화 (Dry continuous digestion)

고형물의 함량이 20 ~ 40% 상태의 폐기물을 연속적으로 처리하는 공정으로 완전혼합형 (Completely-Mixed System)과 관흐름형 (Plug-Flow System)이 이용될 수 있으며 이에 해당하는 상업 공정으로는 다음과 같다.

- Valorga process (프랑스)
- Dranco process (벨기에)
- Funnell process (미국)

② 건식 회분식 소화 (Dry batch digestion)

이 공정은 Accelerated Landfill 개념으로 반응기에 원료폐기물을 충진한 다음 이미 소화가 거의 종료된 반응기에서 소화액 (미생물 함유)을 접종한 다음 밀폐시켜 자연분해 되도록 한 시스템으로 이에 해당하는 상업 공정은 다음과 같다.

- Biocel process (네덜란드)

③ 침출상 공정 (Leach-bed processes)

본 공정은 앞선 Dry Batch Digestion 공정과 비슷한 개념이나 침출액을 서로 순환시킨다는 점에서 다르다. 즉 3개의 반응조를 이용하여 3단계로 이루어지는데 첫 운전은 발효가 거의 완료된 3번째 반응기 (stage 3)에서 내용물을 폐기한 후 새로운 폐기물이 주입되면서 소화가 시작됨. 일단 폐기물이 주입되면 stage 1으로 전환되게 되는데 stage 1에서 생성되는 침출액 (유기산 함유액)을 메탄 발효가 활발히 진행되고 있는 stage 3으로 보내어 메탄화 시킨다. 이어서 stage 3의 활성 미생물이 계속 순환되어 자체 내 발효가 성숙되면 stage 1은 stage 2로 된다. 이에 해당하는 공정으로는 다음과 같다.

- SEBAC(Sequential batch anaerobic composting) (미국)

④ 습식 연속 혐기성 소화 (Wet continuous digestion)

본 공정은 유기성 도시폐기물이 고형물 함량 약 10%인 슬러지 상태로 희석되어 재래식의 완전혼합 반응기에서 연속적으로 혐기성 소화처리 되는 것으로 일반적인 하수슬러지나 축산슬러지의 발효방식과 비슷하다. 본 공정을 적용할 경우에는 유리, 자갈등과 같은 무기물질이 소화조 바닥에 축적되지 않도록 전처리 단계에서 완전 제거시키는 노력이 필요하다. 도시폐기물만을 적용하여 소화시킬 경우 희석수의 다량 사용으로 인한 전체적인 부피를 줄이기 위해 소화 잔사 탈수액을 재순환하여 고형물 농도를 조절하는 희석수로 사용하기도 한다. 최근에는 도시폐기물에 하수슬러지나 축산분뇨등과 같은 고형물 함량이 낮은 폐기물을 섞어서 발효시키는 Co-Digestion 방식이 특히 덴마크 등에서 많이 시도되고 있다.

- Avecon process (핀란드)
- Italba process (이테리)
- Snamprogetti process (이테리)
- Herning (덴마크)

⑤ Multi-stage wet digestion (다단 습식소화)

본 공정은 반응시스템을 2단계 이상으로 구분하여 가수분해, 산생성, 메탄생성이 각각 분리된 반응조에서 단계적으로 수행되는 시스템으로 여기에 해당하는 공정으로는 다음과 같다.

- BTA process (독일)

- ANM process (독일)
- Paques process (네덜란드)
- DSD-CTA process (독일)

이와 같은 혐기성처리법은 Pasteur에 의해 용존산소가 존재하지 않는 곳에서 성장하는 혐기성 미생물이 발견된 이후 혐기성 소화에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, Cheary에 의해 오늘날 가장 많이 이용되는 2단 소화방식이 개발되었으며 초기에는 주로 혐기성 소화에 미치는 영향에 관한 연구가 이루어져 왔다. 그 후 Schlenz에 의해 체류시간에 다른 영향이 보고되었으며, Fullen은 Anaerobic contant Process를 개발하여 짧은 HRT에서 높은 BOD제거효율을 얻는데 성공하였다. 그리고 McCarty, Keefer 등에 의해 소화조 운전 방해물질에 관한 연구가 이루어졌으며, McCarty와 Young에 의해 anaerobic Filter가 개발되어 Switzenbaum and Jewell 등에 의해 발전되었으며 Andrew는 혐기성 소화의 동역학적 모델을 제시하였다[17].

3. 발효조의 동력학적 모델

본 연구에서 수행한 발효조의 동력학적인 특성을 알아보기 위해 다음 식에 나타난 바와 같이 Grau가 제안한 1차 모델을 이용하였다[27].

$$S/S_0 = \exp-(k_1 X_0 t/S_0) \qquad (1)$$

여기서 S는 발효기간중의 발효조내의 유기물의 농도 (g-COD L^{-1}), S_0는 발효조내의 최초 유기물 농도 (g-COD L^{-1}), k_1은 1차 동력학 상수(d^{-1}), X_0는 발효조내의 초기 미생물 농도이다 (VSS L^{-1}). 이때 X_0가 항상 일정하다고 가정하면 k_1X_0 (k'_1, g-COD L^{-1} d^{-1}) 역시 항상 일정하므로 식 (1)은 다음과 같이 간단히 할 수 있으며

$$S/S_0 = \exp-(k'_1 t/S_0) \qquad (2)$$

1차 모델의 동력학 상수를 계산하기 위해서 다음과 같이 식을 변형할 수 있다.

$$-\mathrm{Ln}(S/S_0) = pt \quad (p = k'_1/S_0) \qquad (3)$$

이때 $-\mathrm{Ln}(S/S_0)$는 t에 대하여 기울기가 p (d^{-1})이고 원점을 지나는 1차 방정식으로 나타낼 수 있으며 최종적으로 k'_1값을 계산할 수 있다.

4. 생물학적 수소 생산

수소는 연소시 최종산물로 물을 생성하는 청정에너지원이며, 석유에 비해 중량당 발열가능한 에너지가 3배정도 높은 에너지효율을 가지고 있어 연료로서의 가능성이 충분하기 때문에 화석연료를 대체할 수 있는 에너지원이다. 최근에 수소는 화석연료, 물, 바이오매스로부터 열화학적 혹은 생물학적 방법에 의해 생산되고 있다. 열화학적 방법에 의한 수소생산은 공정의 안전성과 경제성에 대한 문제를 가지고 있는 반면 바이오매스를 포함한 유기물과 물로부터 미생물에 의해 직접적으로 수소를 생산하는 생물학적 방법은 폐기물처리를 통한 에너지 생산이라는 점에서 자원의 재활용 측면과 열화학적 방법에 비해 공정의 안정성이 높기 때문에 향후 수소를 에너지로 이용할 수 있는 높은 가능성을 가지고 있다.

생물학적으로 수소를 생산하는 방법은 Table 3에 나타낸 바와 같이 크게 빛을 이용하는 광발효와 빛을 이용하지 않는 암발효로 구분되며, 전자의 경우 조류[28,29] 및 Cyanobacteria[30-32]를 이용한 물의 광분해와 광합성 세균[33-35]을 이용한 유기물의 광분해 방법이 해당되고 후자의 경우 혐기성 발효미생물을 이용[36-40]하여 유기물로부터 수소를 생산하는 방법이다. 광발효의 경우 빛이 필요하므로 배양장치가 대형화 되는 문제가 있지만 암발효의 경우 광발효 보다 시설이 소규모이고 기술적 제한이 적어 수소생산이 용이하며 다양한 유기성물질을 기질로 사용할 수 있고, 기존의 혐기성 공정을 재이용하여 생산할 수 있다는 장점이 있다.

암발효를 통한 혐기성 소화 공정에서 유기물질은 고분자물질에서 저분자물질로 분해되는 가수분해단계와 가수분해된 물질로부터 유기산, 이산화탄소, 수소를 생성하는 산생성단계, 그리고 산생성단계의 산물로부터 메탄생성단계를 거치면서 최종적으로 메탄과 이산화탄소로 전환된다.

Table 3. Pathways of biological hydrogen production from various sources

Source	Method	Chemistry
Biomass	Dark Fermentation	$C_6H_{12}O_6 + H_2O \xrightarrow{\text{Dark}} 4\sim6\ H_2 + CO_2 +$ 유기산
	Photosynthetic Fermentation	유기산 $+ H_2O \xrightarrow{\text{light}} 4\sim7\ H_2 + CO_2$
	In Vitro Reaction	$C_6H_{12}O_6 + GDH,\ H_2ase \xrightarrow{\text{light}} \text{gluconic acid} + H_2$
Water	Direct photolysis	$H_2O \rightarrow \overset{\nearrow O_2}{PSII} \rightarrow \overset{\text{light}}{PSI} \rightarrow FD \rightarrow H_2ase \rightarrow H_2$
	Indirect photolysis	(1st stage) $H_2O \xrightarrow{\text{light}} PS \rightarrow (CH_2O)$ (2nd stage) $(CH_2O) \rightarrow \overset{\nearrow CO_2}{FD} \rightarrow H_2ase,\ N_2ase \rightarrow H_2$
gas (CO)	Shift Reaction	$CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$

따라서 혐기성소화공정 가운데 수소를 소모하는 메탄생성균의 활성을 억제할 경우 발효조내의 수소생산량이 증가할 수 있다. 1980년대 이후로 혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 대한 연구가 이루어지고 있으며 특히 *Clostridium* sp.는 glucose나 sucrose와 같은 탄수화물로부터 유기산과 수소를 생산하는데 많이 이용되어져 왔다[41].

미생물에 의해 glucose로부터 수소가 생산되는 과정은 Table 4에 나타난 바와 같이 acetic acid와 butyric acid를 생성시키는 반응들에 의해 일어난다[42-43]. Acetic acid가 생산되는 경우 1 mole의 glucose로부터 최대 4 mole의 수소가 생산될 수 있으며, butyric acid가 생산되는 경우에는 최대 2 mole의 수소가 생산될 수 있다. 반면 혐기성 소화조 내에서는 acetic acid나 butyric acid외에 다른 유기산을 생성시키는 다른 생화학 반응도 일어나며, 특히 propionic acid를 생성하거나 수소를 이용한 메탄생성경로는 수소를 소모하는 반응이다. 그러므로 암발효 과정 중 발생되는 유기산의 생산조건을 조절함으로써 수소생산량을 증가시킬 수 있다.

5. 에탄올 발효

미생물의 대사산물을 이용하는 것은 옛날부터 이루어져 왔다. 알코올류의 양조도 그 중 하나이다. 석유화학의 진보와 더불어 ethanol, n-butanol이나 acetic acid 등은 합성법으로 값싸게 생산하게 되어 공업적으로 사용되는 대부분은 합성품으로 대체되고 있다. 그러나 최근에 석유 에너지 사용량의 증대와 석유공업의 발전은 석유 사용량의 비약적인 증가에 따라 석유 가격의 급격한 상승을 야기하여 석유를 값싼 탄소원이나 에너지원으로 이용하는 것은 어렵게 되었다.

당의 발효과정을 통해 생산되는 에탄올은 청정에너지원인 동시에 재생가능한 에너지원이기 때문에 많은 주목을 받고 있고[44], 에탄올 생산에 드는 비용을 절감하기 위한 방안으로 에탄올 생산의 원료물질을 각종 유기성 폐기물과 같은 biomass를 적극 이용하려는 시도가 진행되고 있다[45-48]. 바이오매스로부터 얻어지는 에탄올의 에너지 함유량은 에탄올을 생산하는데 요구되는 에너지보다 높다고 Shapouri 등[49,50]은 보고한 바 있고, 특히 바이오매스의 발효로부터 생산되는 알코올은 그 물리적, 연소적 특성이 석유와 비슷하여 대체에너지로 각광을 받고 있으며[51], 액체연료로서 휘발유보다 장점이 많기 때문에 재생가능 연료원으로 널리 연구되어지고 있다[52].

Table 4. Pathway of biological hydrogen production by dark fermentation

Microbial groups (By end-product)	Contribution to H_2 production	Remark
n-Butyrate	++	• Major H_2-producing bacteria in anaerobic ecosystem • *Clostridia* • $C_6H_{12}O_6$ ---> $CH_3CH_2CH_2COOH$ +$2CO_2$ + **$2H_2$**
Acetate	+++	• Ideal H_2-producing bacteria in anaerobic ecosystem • $C_6H_{12}O_6$ + $2H_2O$ ---> $2CH_3COOH$ + $2CO_2$ + **$4H_2$**
Lactate	-	• Reduced fermentation product • $C_6H_{12}O_6$ ---> $2CH_3CHOHCOOH$
Ethanol	-	• Reduced fermentation product • $C_6H_{12}O_6$ ---> $2CH_3CH_2OH$ + $2CO_2$
Propionate	- -	• Consumption of H_2 • $C_6H_{12}O_6$ + **$2H_2$** ---> $2CH_3CH_2COOH$ + $2H_2O$
H_2-utilizing methanogens	- - -	• Consumption of H_2 • **$4H_2$** + CO_2 ---> CH_4 + $2H_2O$

Fig. 5는 미생물에 의해 알코올이 생산되는 대사경로를 나타낸 것이다. 효모의 알코올발효는 당으로부터 EMP 경로를 거쳐 생성된 pyruvic acid가 CO_2의 이탈로 acetaldehyde로 되고 다시 환원되어 에틸알코올을 생성하게 된다. 효모에 의한 당의 알코올발효 이론식은 다음과 같으며 Gay-Lusacc의 식이라고 한다.

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

그러나 전분의 경우는 좀더 복잡하여 전분이 당으로 분해되는 과정을 거쳐야 함으로 아래와 같다.

	$(C_6H_{10}O_5)n$ +	nH_2O →	$nC_6H_{12}O_6$ →	$2nC_2H_5OH$ +	$2nCO_2$
분자량	162.14	18	180.16	92.14	88
	100 kg			56.82 kg (71.5 L)	
			100 kg	51.14 kg (64.3 L)	

이 식에 의하면 이론적으로는 glucose 100 kg으로부터 비중 0.7947의 에틸알코올이 51.14 kg (64.3 L) 생성되고 순전분 100 kg에서 56.82 kg (71.5 L)가 생성된다. 그러나 원료성분 중 약 5%는 효모의 생육이나 부산물의 생성에 소비됨으로 수득률은 이론치의 90 ~ 95% 정도이다.

발효알코올의 제법은 Fig. 6과 같이 원료의 당화 유무에 따라 비당화 발효법 (주로 당질 원료)과 당화 발효법 (주로 전분질과 섬유질 원료)으로 나뉜다[53].

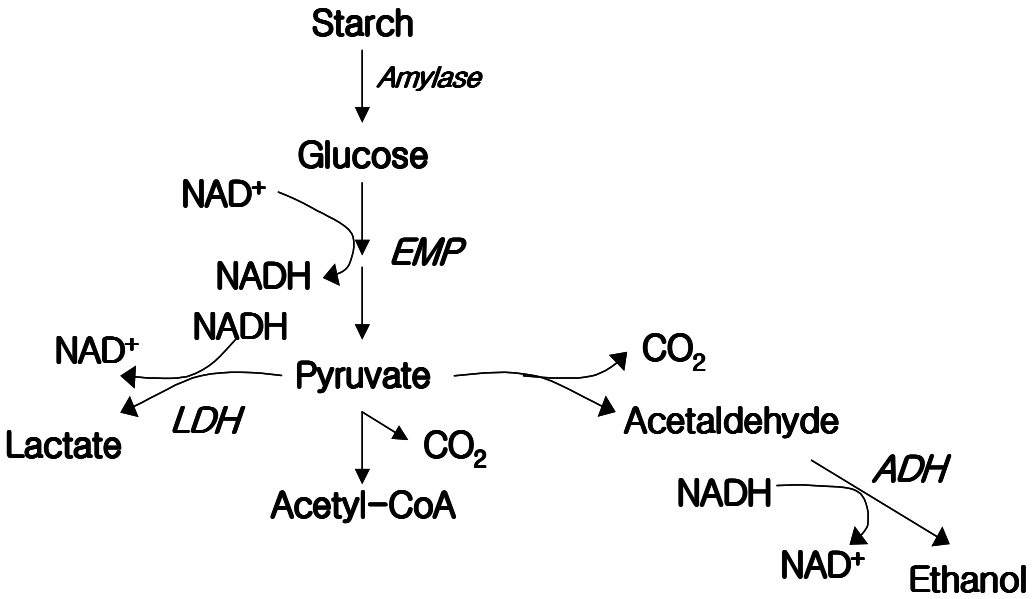


Fig. 5. Pathway for production of ethanol by microorganism.

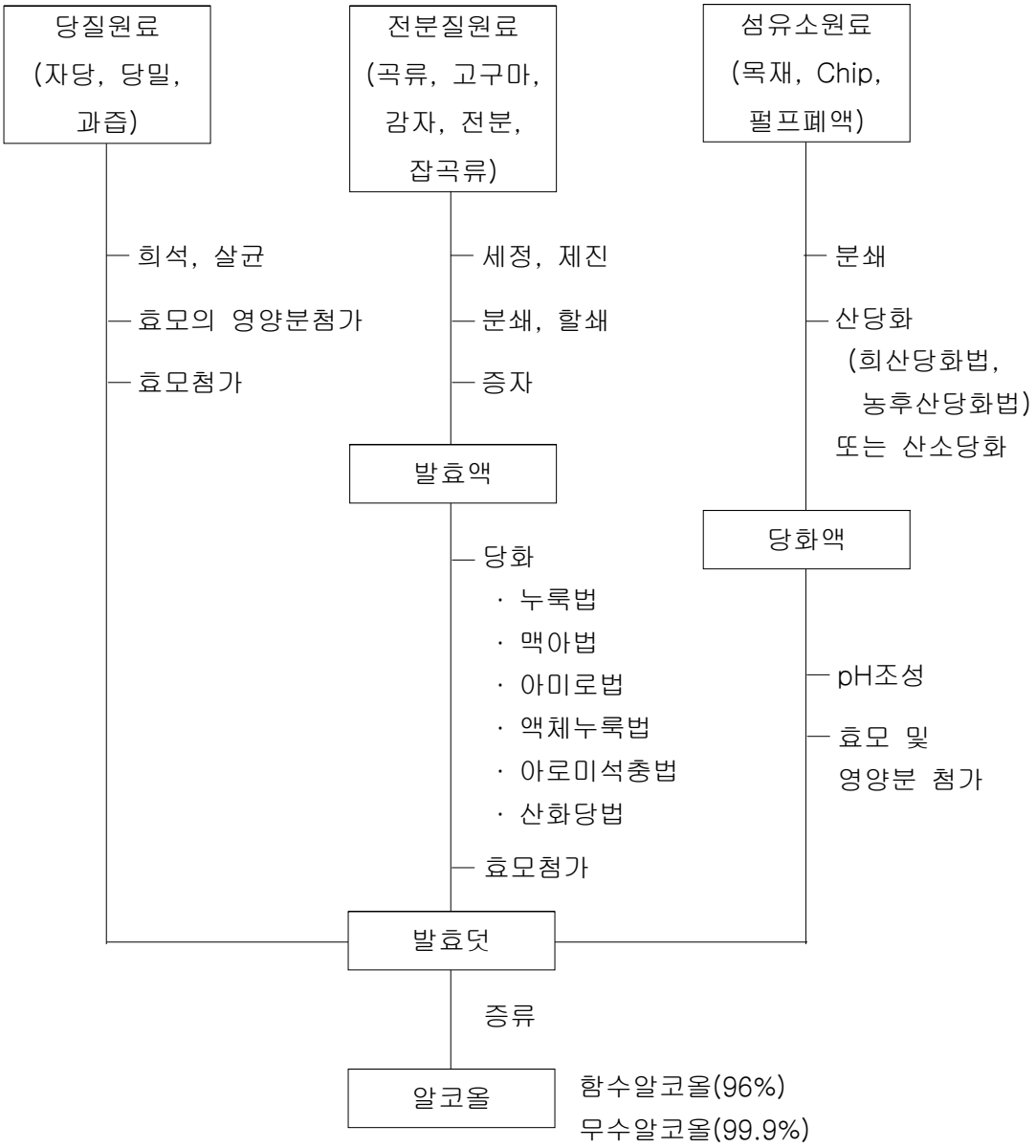


Fig. 6. Alcohol fermentation processes from various substrates.

가. 비당화 발효법

발효법의 주원료는 자당 제조시에 부산물로 생산되는 폐당밀이다. 이것은 50% 이상의 당분을 함유하고 전분 원료와 달리 당화공정이 불필요하여 직접 효모를 접종하여 발효시킬 수 있다. 사용시에 혼입되어 있는 오염물과 잡균을 제거하기 위하여 열수 또는 수증기를 주입하여 당밀을 살균 후 당 농도를 15~20%로, pH를 4.5~5.0으로 조정한다. 또한 영양원으로서 황산암모늄, 인산암모늄, 밀기울, 쌀겨 등을 첨가한다. 당밀 중제 존재하는 잡균에는 야생효모, 질산환원 세균, Hetero형 젖산균이 있고 오염성분으로서 휘발성의 염류와 아황산 등이 있다.

당밀 발효용의 효모는 *Saccharomyces formensis*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 사용하고 별도로 주모 (술밑) 를 만들어 첨가하는 수도 있다. 발효는 개방탱크나 밀폐탱크를 사용하나 대량으로 효모 (주모) 첨가에 의하여 단시간에 아주 왕성한 알코올발효가 이루어진다. 발효 원료로 하는 알코올공장을 가동하여 소규모 공정에서 능률을 올리고 있다.

나. 당화 발효법 (전분질과 섬유소 원료)

전분질과 섬유소 원료는 일단 가수분해하여 당으로 전환 (당화) 한 후 알코올발효한다. 당화법은 대별하면 식물 또는 미생물 효소를 이용하는 효소당화법과 산(무기산)을 사용하는 산당화법 (비효소법) 으로 나눈다.

(1) 효소당화법

식물과 미생물 기원의 전분질 분해효소 (amylase)를 사용하는 방법으로 효소의 기원에 따라 맥아법, 고오지법, amylo법, amylo 절충법, 액체고오지법 등으로 구별한다.

전분 분해효소에 의하여 전분이 분해되는 경우 세 가지 현상, 즉 액화 (전분호화액의 점도 저하), dextrin화 (호정화, 요오드 반응의 소실), 당화 (환원력의 증대) 현상이 인정되고 있으나 이들 현상은 당화제 즉 전분 분해효소의 기원인 예를 들면 맥아, 고오지균 (*Aspergillus*), 거미줄곰팡이 (*Rhizopus*속) 등에 의하여 이 현상이 달라진다.

전분의 당화한도 : 원료를 사용하는 알코올발효의 효율은 당연 원료 중의 전분 함량이나 그 성질에 따라 지배되지만, 또한 당화에 사용되는 amylase의 종류에 따라서도 영향을 받는다. 즉 효소의 종류에 따라서 분해한도가 다르고 또 발효되지 않는 비발효성 당분의 생성도 다르다. 따라서 비발효성 당분에는 전이효소의 작용에 의하여 생성되는 것 (isomaltose, mannose, 기타 올리고당)과 원료에서 유래되는 xylose, arabinose 등도 함유된다.

(가) 맥아법과 고오지법

당화제로서 보리의 맥아 혹은 밀기울의 국 (koji)을 사용하는 방법이 있으나 구미에서는 맥아법, 우리나라에서는 밀기울법을 주로 행하고 있다. 맥아법에 비하여 국법이 당화율이 높고 제조 단가도 싸며 설비도 간단하여 유리하다. 그러나 이 방법은 손실이 많고 제국을 무균적으로 행할 수 없는 결점이 있고 종균 배양법 (주모)을 다량으로 필요로 하며 알코올의 수율도 나쁘므로 현재에는 거의 하지 않는다. 국곰팡이로서는 *Aspergillus awamori* 또는 *Aspergillus oryzae*를 사용하여 밀기울에 발육시킨 것을 사용한다. 맥아법에서는 원료를 분쇄 후 증자하여 여기에 분쇄된 맥아를 가하여 약 60℃에서 당화한다.

(나) Amylo법

Amylo법은 1855년에 시행한 방법으로 Calmette가 amylo균 *Amylomyces (Mucor) rouxii*가 전분의 당화력은 그렇게 강하지는 않으나 알코올발효력을 가진 것에 착안하여 동일의 균으로 전분의 당화와 발효를 동시에 행하여 감자에서 알코올제조를 시도한 것이 그 시초이다. 그 후 개량되어 당화작용에 amylo균과 알코올발효에 강력한 알코올발효력을 갖는 효모를 사용하게 되었다. 일본에서는 1935년 대규모의 amylo 방식의 국영 주정공장이 설립되어 알코올공업 뿐만 아니라 여러 가지 발효공업의 기술적 발전에 크게 기여하였다.

제조방법을 보면 분쇄한 생고구마에 물을 가하여 가압증자한 것을 발효탱크 (밀폐)에 보내고 적온 (37℃)으로 냉각 후, 미리 감자 절편에서 배양한 *Rhizopus javanicus*의 포자 현탁액을 무균적으로 접종하여 밀폐탱크 중에서 무균공기를 강제통풍하면서 37℃에서 호기적으로 배양하고 그 생성된 전분 분해효소에 의하여 전분을 당화시킨다. 생성당량이 약 4%로 될 때 온도를 30℃로 내리고 알코올효모를

첨가하여 다시 통기교반으로 효모를 증식시켜 동일 탱크 중에서 당화와 발효를 병행한다. 효모 첨가 후 약 90시간 후에 발효가 종료된다. 발효 후 액에서 곰팡이의 균사나 고구마 섬유 등의 고형물을 제거하고 연속증류기에서 증류하여 알코올을 회수한다.

Amlo법은 무균적으로 행하기 때문에 첨가하는 곰팡이의 포자와 효모도 아주 소량이다. 그러나 *Rhizopus*속의 곰팡이는 당화력이 우수하지만 액화력이 약하므로 원료의 전분 농도를 높이면 점도가 높아져 곰팡이의 발육이 저해되므로 농도를 높일 수 없다. 따라서 알코올농도가 낮은 발효액이 얻어지는 것이 결점이다.

(나) Amylo 절충법

Amylo법의 전분 액화력의 약한 점을 보완하기 위하여 액화효소력이 강한 액체국을 첨가하는 Amylo 주모-액체국 절충법, 즉 Amylo 주모-국절충이 있다. 어느 것이나 국균의 강한 전분 액화력과 amylo균 (*Rhizopus*의 곰팡이)의 강한 당화력을 이용한 것이다. 이들 방법에 의하여 전분 원료의 담금 농도를 높일 수가 있으므로 발효비율도 향상되어 90 ~ 94%나 달한다.

(2) 산당화법

효소를 사용하지 않고 무기산 (황산, 염산) 또는 유기산 (초산, 수산)을 사용하여 전분원료 (또는 섬유소, 전분)를 가수분해하여 당으로 전환하여 여기에 황산암모늄, 쌀겨 등의 질소원 그리고 인산염 등을 가하여 당화덧을 만들고 여기에 효모를 가하여 발효시키는 방법이다.

이 방법은 이론적으로는 고능률로 단시간에 당화가 이루어질 것으로 생각되나 사용하는 산의 종류, 농도, 분해조건의 차이에 따라 생성되는 당량, 과분해물, 미분해물의 양이 다르고 또한 발효 저해물질이 생성되는 경우도 있다. 그러나 산 특히 염산의 가수분해력은 아주 강하여 미이용 자원의 전분 함유량 이용 또는 섬유질과 같은 효소 분해가 어려운 원료의 이용에는 적합한 방법이다.

이 방법의 결점은 산이나 열에 의한 부식, 효모배양의 곤란, 중화 생성물, 발효시 저해물의 혼입이 있고 또 효소 당화법에 비교하여 발효비율이 일반적으로 나쁘므로 거의 행하지 않는다.

목재산당화법 : 섬유소를 대량으로 함유하는 목제나 제재의 부산물의 절편, 톱

밥, 농산폐기물 (볏짚, 옥수수대)을 대상으로 한 제법이다. 가수분해력이 강한 염산 또는 황산을 사용하여 가수분해시켜 섬유소를 당으로 전환한 후 발효시킨다. 목재의 산당화법에는 황산을 사용하는 고온의 산당화법인 Sohler법과 황산 또는 염산을 사용하는 저온 농후 산당화법인 Bergius법이 있다.

목재 산당화액 중의 발효성 당분의 양은 당화조건에 따라 다르나 침엽수는 총환원당으로 77 ~88%인데 비하여 활엽수는 65 ~ 77%이다.

산당화액은 보통 중화조 중에서 석회를 사용하여 중화하고 효모에 영양물질을 가하여 별도로 배양된 효모를 사용하여 발효한다. 이 산당화도 현재 행해지지 않는다.

(3) 아황산 펄프폐액 (SWL)에 의한 알코올발효

목재에서 산성 아황산석회를 사용하여 펄프를 제조하는 경우, 당을 함유하는 펄프폐액 (SWL)이 부생된다. 폐액 중에는 다량의 아황산, 기타의 발효 저해물질을 함유하므로 증기를 취입하는 법과 석회염 첨가에 의한 중화법 등으로 전처리를 행한 후 쌀겨, 인산칼륨 등의 영양원을 보급하여 발효용의 술덧을 조제하고 여기에 별도로 배양한 알코올효모 (주모)를 가하여 알코올발효를 한다. 펄프제조법의 전환에 의하여 대개의 나라에서는 펄프공업에서는 아황산펄프를 생산하지 않게 되었다.

(4) 알코올의 증류

알코올발효가 끝난 발효액 중에는 알코올이 6 ~ 8% 이외에 알코올보다 비점이 낮은 성분으로서 acetone, aldehyde, methyl alcohol, ethyl acetate 그리고 고비점의 성분으로서 fusel oil (고급 알코올의 혼합물) 등을 함유하고 있다. 이들 협잡성분은 그 비점의 차를 이용하여 증류법으로서 분리한다. 증류기에는 간단한 단식증류기와 복잡한 연속식 증류기가 있다.

단식 증류기는 간단한 증류탑 (단식)과 냉각기로 되어 있고 알코올과 협잡 성분의 분리는 완전하게 이루어지지 않는다. 따라서 고순도의 알코올을 얻는데는 적합하지 않다. 위스키, 브랜디, 소주의 제조에는 이 형의 증류기가 사용된다. 연속식 증류기는 보통 초류탑, 정유탑, fusel oil 분리기의 등의 복잡한 탑으로 되어 있고 저비점 화합물은 초류탑에서 분별되고 고비점의 fusel oil은 fusel oil 분리기에서 분별 제거된다. 최근에는 methyl alcohol의 완전 제거를 목적으로 Super Allospas

식 증류가 개발되어 무색, 무취인 아주 고순도의 알코올이 생산되고 있다. 알코올과 물은 공비혼합물을 형성하므로 95.57% 이상의 알코올을 얻을 수가 없다. 이 때문에 무수 알코올의 제조는 다시 benzene 또는 trichloroethylene ($CHCl=CCl_2$)을 사용한 공비법을 이용한 탈수탑을 사용한다. 순도는 99.99%이다.

제 2 장 연구 내용 및 결과

제 1 절 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 설계 및 제작

1. 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 구성

본 실험에서는 2.5 m^3 규모의 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템으로 설계 및 제작하였으며 Fig. 7과 8은 각각 발효시스템에 대한 전체 모식도와 설치된 3단계 메탄 발효시스템의 사진이다. 수거된 음식 폐기물을 파쇄기를 이용하여 5 mm 이하의 미세한 입자로 분쇄한 후 정량펌프를 이용하여 일정한 속도로 1차 가수분해/산 발효조의 상단부로 투입되도록 하였다. 투입된 음식 폐기물은 1차 가수분해/산 발효조내에서 발효되어 UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) type의 2차 산 발효조의 하단 부위를 통하여 유입되도록 하였다. 이 때 발효액의 상부에 위치한 1차 가수분해/산 발효조로부터 하부에 위치한 2차 산 발효조로 중력을 이용한 자유낙하 방식으로 이동하도록 설계하여 이송펌프수를 줄이고 전력비를 절감하고자 하였다. 2차 발효된 발효액 역시 UASB type 3차 메탄 발효조의 하단부로 정량펌프를 이용하여 일정한 속도로 유입되도록 하였다. 메탄 발효 후 발생하는 발효액은 집수조에 수집되고 집수조로부터 다시 일정한 속도로 폐수처리조로 유입되도록 설계하였다. 폐수처리조에서는 잔여 유기물, 질소 및 인성분이 제거된다. 또한 3차 메탄 발효조에서 생성되는 메탄가스는 설정된 일정 압력까지 메탄 발효조에서 유지되었다가 일정 압력 이상이 되면 발효조의 상부에 설치된 자동 밸브가 열림과 동시에 콤프레셔가 작동되어 발생된 메탄가스를 압축한 후 메탄가스 저장 탱크로 운반하여 저장하였다.

각 공정내에는 level gauge가 설치되어 이 신호에 의해 각각의 공정에 장착된 정량펌프가 자동으로 작동하도록 설계하였으며 발효액의 유량제어는 유량조절이 가능한 정량펌프와 timer를 설치하여 조절이 가능하도록 설계하였다. 또한 control system을 별도로 설치하여 발효조내의 pH를 관찰하고 발효조 내부 온도와 발효액의 이동 상태를 모니터링하고 조절할 수 있도록 설계하였다.

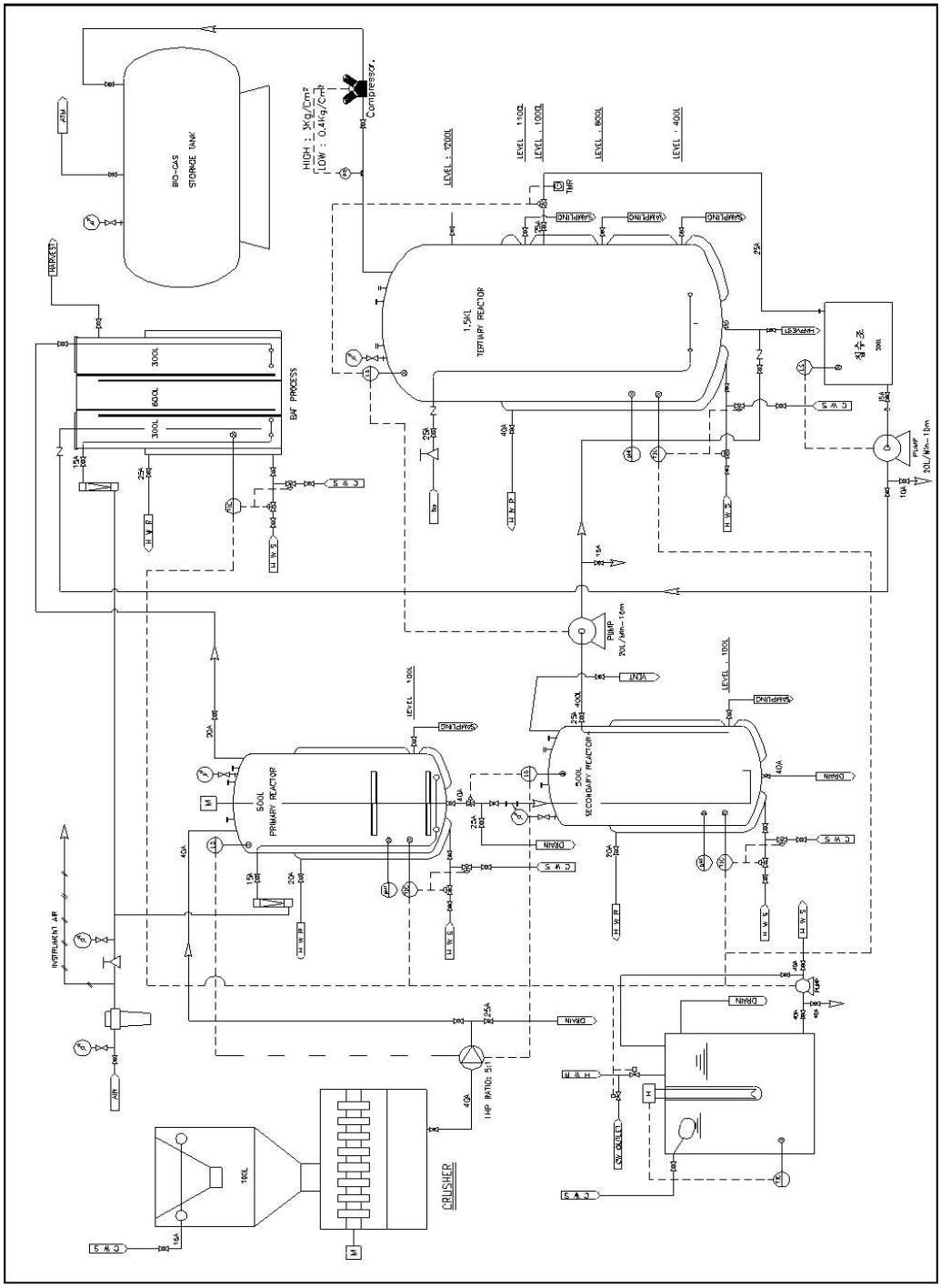


Fig. 7. Schematic diagram of three-stage methane fermentation system (total 2.5 m^3).

Fig. 8. Three-stage methane fermentation system (total 2.5 m^3).

2. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 구성과 제작

Fig. 9와 10은 가수분해/산 발효조의 설계도면과 반응기의 외부사진이다. 이 발효조는 내부용량이 0.5 m^3 규모로 되어있으며 내부에는 모터를 이용하여 교반할 수 있게 하였고 교반 속도는 300 rpm까지 조절이 가능하도록 제작하였다 (Fig. 11). 콤프레셔를 이용하여 반응기의 하단부에 설치된 blower를 통해 공기를 불어넣도록 제작하였다. 반응기의 pH와 내부 온도는 반응기에 설치된 pH meter와 온도 측정계에서 감지한 pH와 온도가 control system에 나타나며 설정된 온도를 유지하기 위해 히터를 이용하여 온수를 만든 후 이중 water jacket으로 물을 순환시키도록 구성하였다. 또한 겨울철 발효조의 보온을 위해 반응기의 외벽을 보온재로 보온처리 하였다. Fig. 12는 파쇄기를 나타내는 사진이다. 12개의 서로 다른 원통형 절단기가 각각 회전하며 물과 1:1로 혼합한 음식물 쓰레기를 잘게 부순 후 절단기 아래의 망을 통해 파쇄기 하단의 저장통으로 떨어뜨린다. 이 후 파쇄기에 의해 미세하게 분쇄된 유기성 폐기물은 일정한 속도로 1차 발효조내로 유입된다.

3. 2차 혐기성 산 발효조의 구성과 제작

Fig. 13과 14에 2차 혐기성 산 발효조의 설계도면과 반응기의 사진을 나타내었다. 내부용적은 0.5 m^3 규모로 UASB 형태로 구성되어 있으며 1차 발효조로부터 중력에 의한 자유낙하 방식으로 2차 반응기의 하단부로 유입되도록 관을 설치하여 제작하였다. 반응기의 pH와 내부 온도는 반응기에 설치된 pH meter와 온도 측정계에서 감지한 pH와 온도가 control system에 나타나며 설정된 온도를 유지하기 위해 히터를 이용하여 온수를 만든 후 이중 water jacket으로 물을 순환시키도록 구성되어 있다. 또한 겨울철 발효조의 보온을 위해 반응기의 외벽을 보온재로 보온처리 하였다.

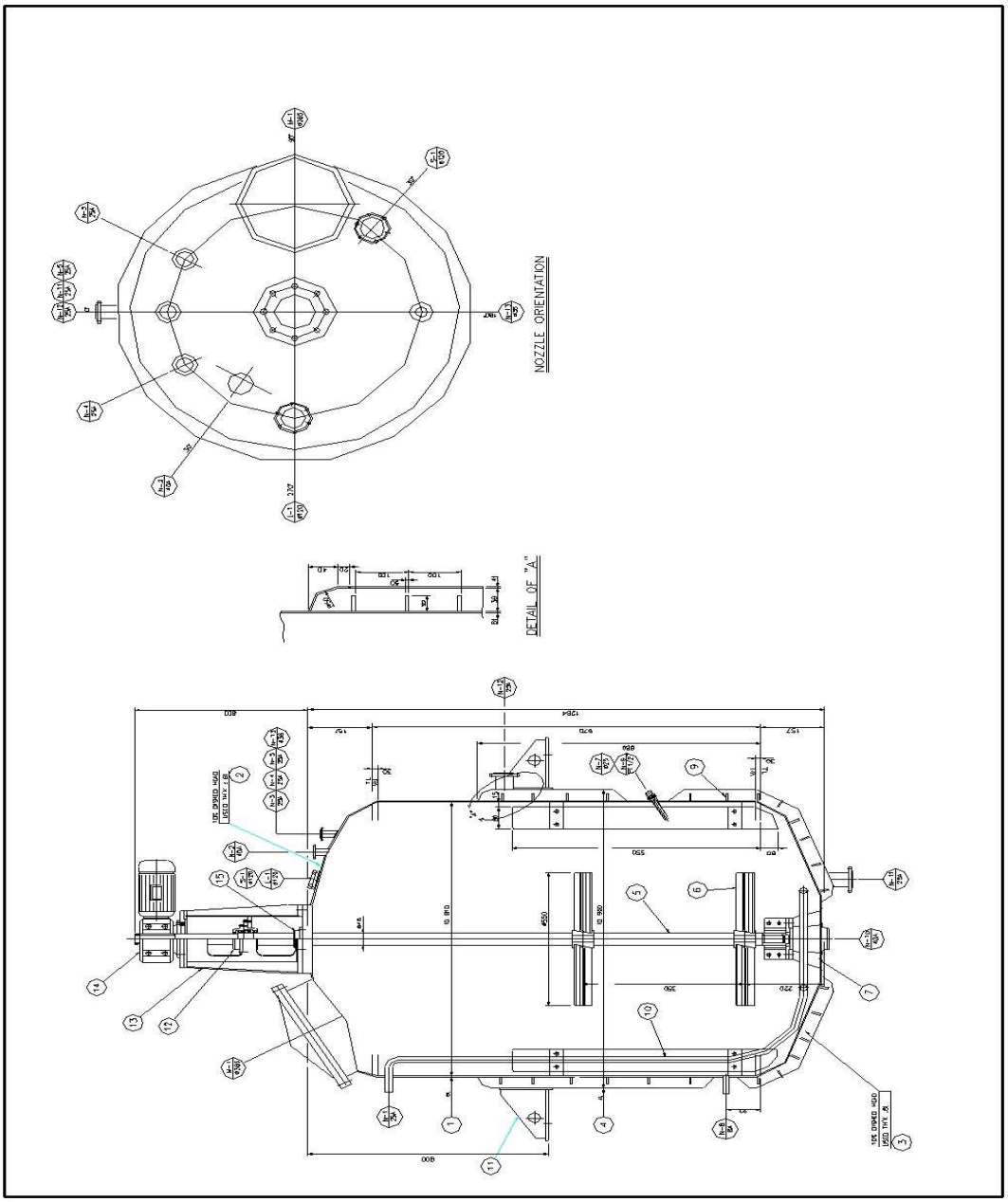


Fig. 9. Schematic diagram of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (0.5 m^3).

Fig. 10. Semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (0.5 m^3) for hydrolysis of food waste.

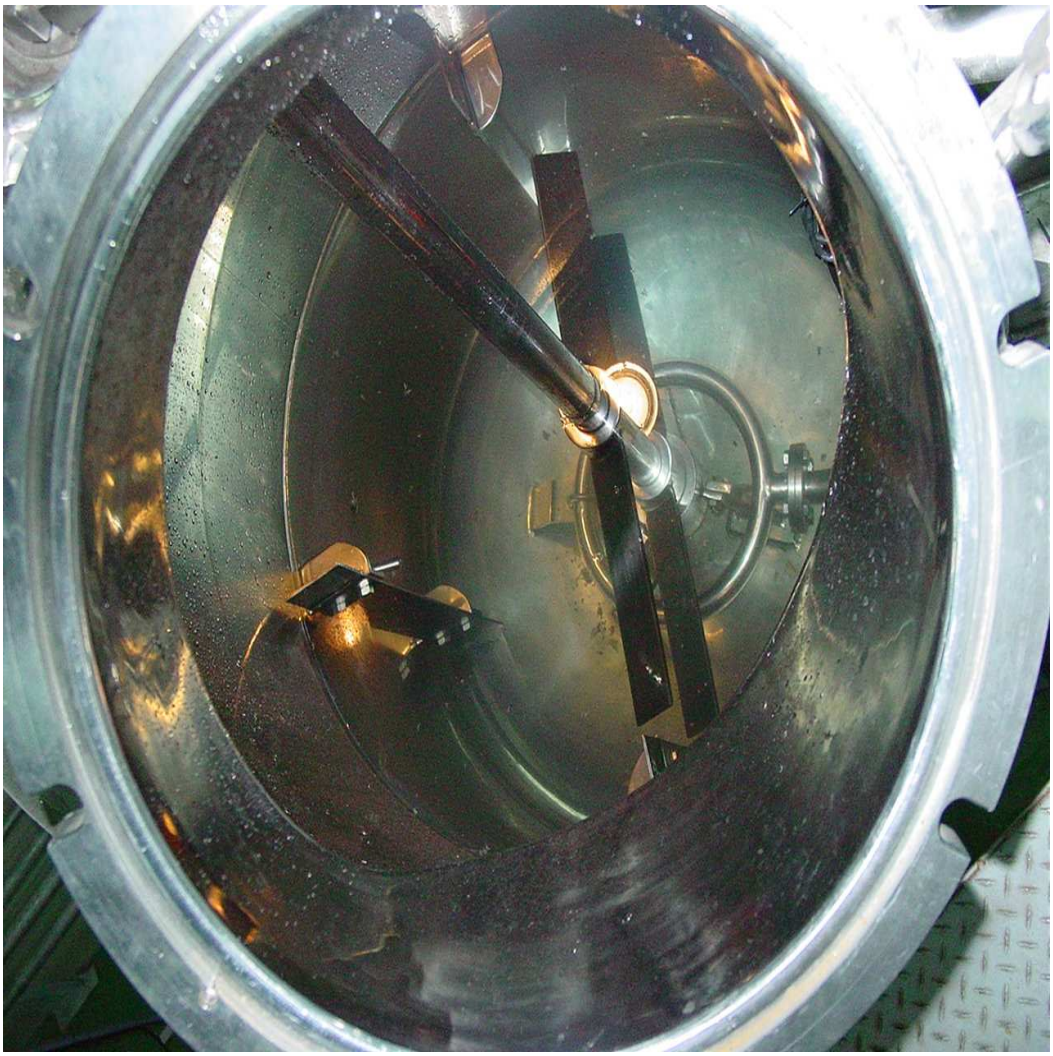


Fig. 11. Internal structure of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

Fig. 12. Crusher used in the three-stage methane fermentation system.

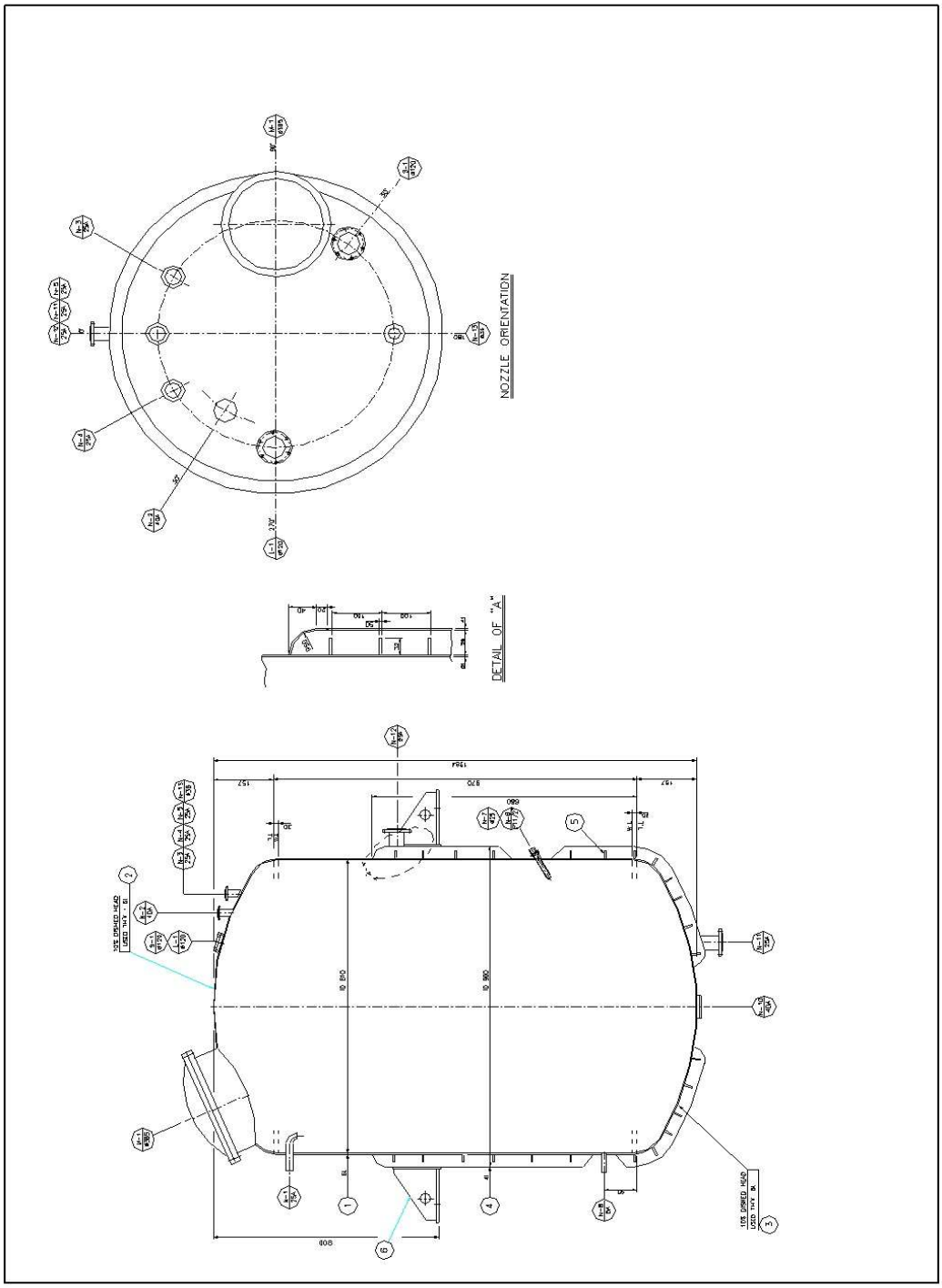


Fig. 13. Schematic diagram of anaerobic acidogenic reactor (0.5 m^3).

Fig. 14. Anaerobic acidogenic reactor (0.5 m^3) for organic acid production from effluent of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

4. 3차 혐기성 메탄 발효조의 구성과 제작

Fig. 15와 16은 3차 혐기성 메탄 발효조의 설계도면과 반응기의 사진이다. 내부 용적은 1.5 m^3 규모로 2차 혐기성 산 발효조의 구조와 유사하게 UASB 형태로 구성되어 2차 발효액이 발효조의 하단 부위로 유입되도록 제작되었다. 고효율의 메탄 생성을 위해 발효조의 중심부에 HBC (Hanging Bio Contactor) Ring을 설치하고 메탄생성균을 고정화하도록 제작하여 발효 후 배출되는 유출수로 빠져나가는 메탄 생성균의 양을 최소화하였다 (Fig. 17).

또한 발효기의 상층부에 일정압력이상이 되면 자동으로 가스가 배출되도록 자동 valve를 설치하여 생성된 메탄을 저장탱크로 이동시키는 시스템을 구축하였다. 발효 후 배출되는 유출수는 집수조에 유입되며 이곳에 설치된 level gauge의 신호를 시작으로 전체적인 발효액의 이동이 자동 제어된다.

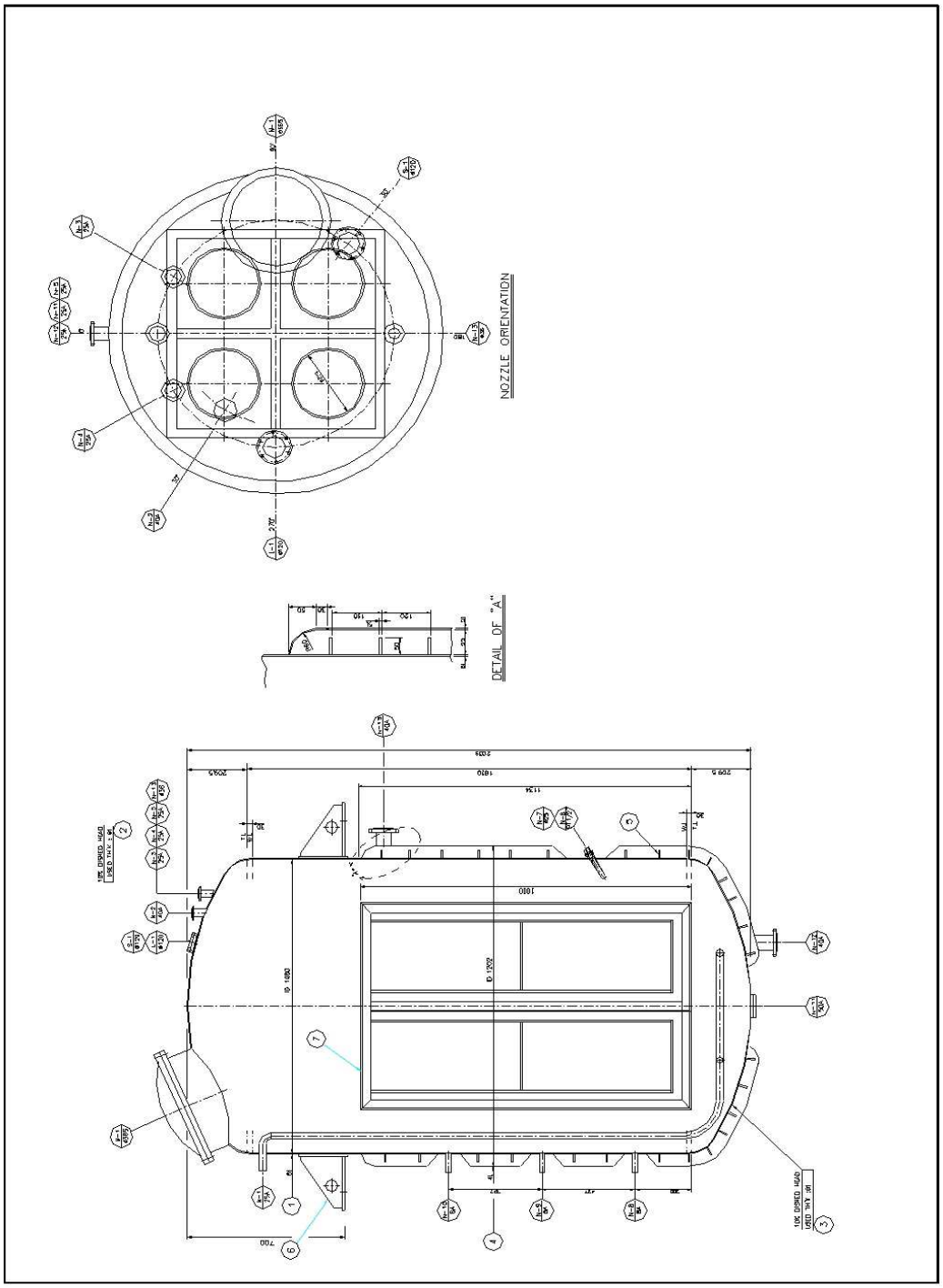


Fig. 15. Schematic diagram of anaerobic methanogenic reactor (1.5 m^3).

Fig. 16. Anaerobic methanogenic reactor (1.5 m^3) for methane production from effluent of anaerobic acidogenic reactor.

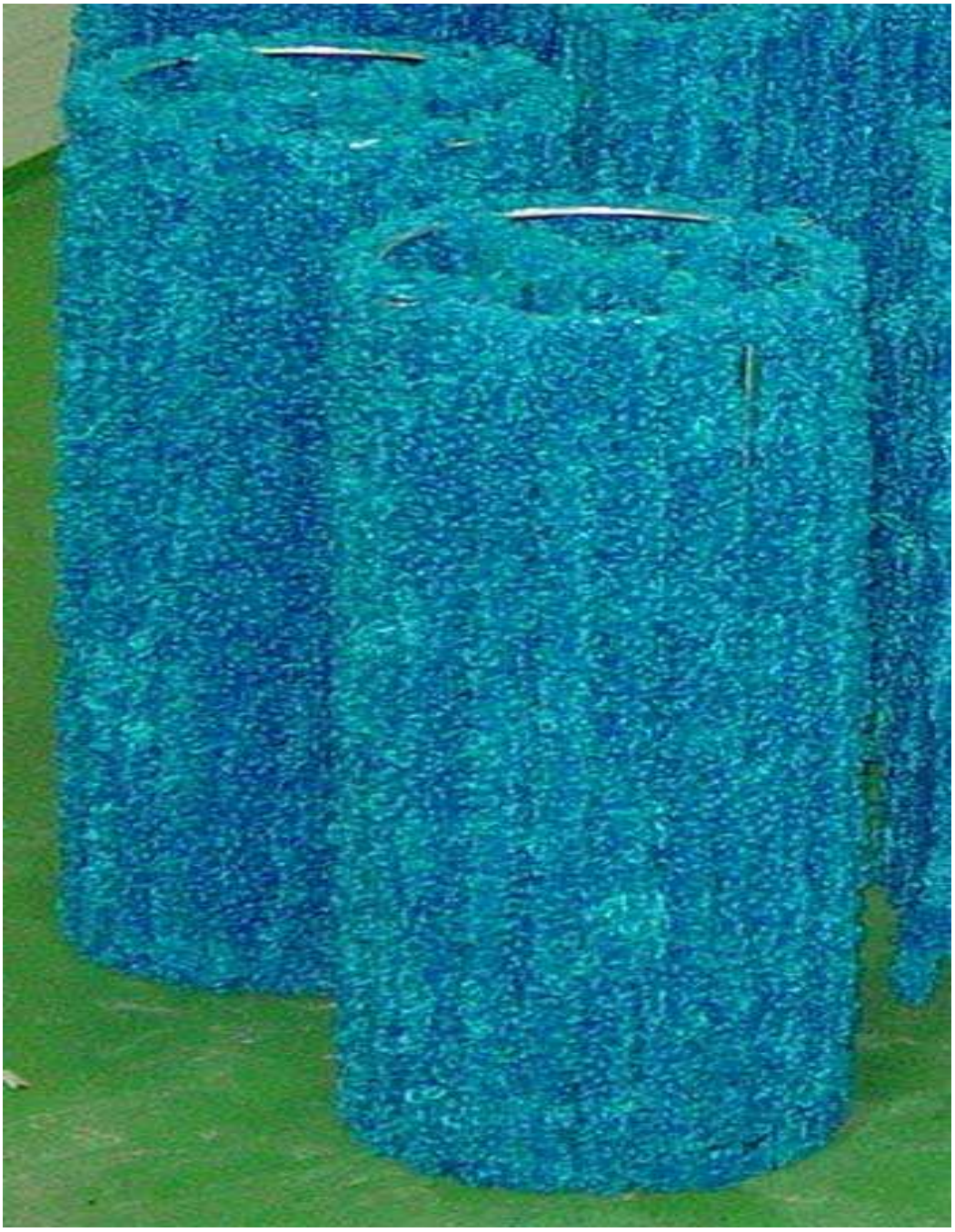


Fig. 17. HBC-Ring for cultivation of methanogenic bacteria in methanogenic rector.

제 2 절 단계별 발효공정 미생물제제 개발

1. 실험재료 및 방법

가. 발효균주를 이용한 미생물제제 개발

(1) 발효균주 탐색 및 분리

본 연구에 사용된 3단계 메탄 발효시스템 중 1차 가수분해/산 발효 공정에서 사용되는 균주를 탐색하기 위하여 시중에 유통되고 있는 미생물 제제인 GT-100WT, FM (Biogenesis technology Inc.), MS 101 (한국 MS 연구소)과 유기성폐기물의 분해능이 있을 것으로 사료되는 매립지의 토양시료를 사용하였으며 또한 기존에 다양한 고분자 화합물을 분해하는 균주들인 *Cellulomonas cellulans*, *Flavobacterium breve*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*을 생명공학연구소 유전자은행 (KCTC; Korean Collection for Type Cultures)으로 부터 분양받아 음식폐기물과 혼합하여 2개월간 안정화한 후 발효액으로부터 발효균주를 분리하였다.

본 실험에 사용된 1차 가수분해/산 발효조의 분리용 배지로는 음식폐기물을 1차 가수분해/산 발효조내에서 발효한 후 발효액을 원심분리하여 상등액의 pH를 7.0으로 조절하고 1.5% agar를 첨가한 후 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다.

발효균주의 탐색과 분리방법은 1차 가수분해/산 발효조내의 발효액을 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 연속희석한 후 각각의 농도에서 100 μL를 취하여 1차 가수분해/산 발효액으로 제조된 배지에 도말한 뒤 45℃에서 24 ~ 48시간 동안 호기성 및 혐기성 배양하였다. 이후 고체배지내에 나타난 성상이 다른 각각의 colony를 순수 분리하였다.

2차 혐기성 산 발효조의 경우 acetic acid, propionic acid, butyric acid등의 유기산 생성이 우수한 *Clostridium acetobutylicum*과 *Clostridium butyricum*을 KCTC로 부터 구입하여 1차 가수분해/산 발효조로부터 유출된 발효액과 혼합하여 안정화한 발효액을 시료로 사용하였다.

본 실험에 사용된 2차 산 발효조의 분리용 배지로는 1차 가수분해/산 발효조의

발효액을 2차 산 발효조내에서 발효한 후 발효액을 원심분리하여 상등액의 pH를 7.0으로 조절하고 1.5% agar를 첨가한 뒤 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다.

발효균주의 탐색과 분리방법은 2차 산 발효조내의 발효액을 Vacuum Anaerobic Chamber (SK-G002-A1, THREE-SHINE, Korea)내에서 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 연속희석한 뒤 각각의 농도에서 100 μL를 취하여 2차 산 발효액으로 제조된 배지에 도말하였다. 이후 35℃에서 24 ~ 48시간 동안 혐기성 배양하였고, 고체배지내에 나타난 성상이 다른 각각의 colony를 순수 분리하였다.

3차 혐기성 메탄 발효조의 미생물제제 개발을 위해 메탄생성균이 서식하고 있는 우분과 매립지내에 메탄가스가 발생하고 있는 토양가운데 지표로부터 10 ~ 15 cm 깊이의 토양을 채취하여 2차 산 발효액과 혼합하여 완전 혐기성배양을 통해 안정화 하였다.

(2) 분리된 발효균주의 특성조사

분리된 발효균주의 colony 모양, 표면, 색깔, 크기를 관찰하였으며 gram 염색과 catalase test, oxidase test, coagulase test를 통하여 각각의 결과에 따라 gram 양성균의 경우 GPI (bioMerieux Vitek, France) 동정 kit를 이용하고 gram 음성균의 경우 GNI (bioMerieux Vitek, France) 동정 kit를 이용하여 생화학적 성상을 확인하였다. 또한 1차 가수분해/산 발효조에서 분리한 일부 균주와 3차 혐기성 메탄 발효조의 발효액내에 존재하는 메탄생성균의 16S rDNA sequence를 분석하여 동정하였다.

(3) 분리된 발효균주의 효소 활성 측정

가수분해/산 발효액으로부터 분리된 균주의 효소 활성을 측정하기 위하여 amylase와 cellulase의 경우는 각각 수용성 전분과 carboxymethylcellulose를 기질로 하여 DNS법을 사용하였으며[54], protease의 경우 casein을 기질로 하여 효소의 활성을 측정하였다[55]. 분리된 발효 균주를 1차 가수분해/산 발효액으로 제조한 배지에 각각 접종하여 배양함과 동시에 배양하는 동안 일정시간마다 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 10,000 X *g* 에서 원심분리하여 상등액은 균체외 조효소로 사용하고, 회수된 균체는 초음파 분쇄하여 상등액을 균체내 조효소로 사용하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로하여 Lowry법으로 하였다.

(가) Amylase 효소 활성 측정

조효소액 100 μL, 증류수 400 μL, 1% starch 용액 500 μL를 완전 혼합한 후 45℃에서 30분간 반응시킨다. 반응시킨 시료에 DNS 용액 1 mL을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 담궈 중탕시키면서 5분간 발색시킨 후 증류수 10 mL를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로서 조효소액 100 μL와 증류수 900 μL를 혼합하여 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 unit는 1분간 1 μM의 환원당을 전분으로부터 방출시키는 효소의 양으로 정의하였다.

(나) Protease 효소 활성 측정

Casein의 농도를 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)를 이용하여 0.1%로 조절한 후 이 용액 900 μL와 조효소액 100 μL를 완전 혼합하여 45℃에서 30분간 반응시킨다. 30분 후 15% trichloroacetic acid (TCA)용액 500 μL를 시료에 첨가하여 반응을 종결시킨 뒤 시료를 15000 X *g* 에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 440 nm에서 흡광도를 측정한다. 대조군은 0.1% casein용액 900 μL와 증류수 100 μL를 완전 혼합한 후 시료와 동일한 방법으로 수행하였다. 효소활성 1 unit는 1분간 0.1 흡광도가 증가된 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

(다) Cellulase 효소 활성 측정

조효소액 500 μL와 1% carboxymethylcellulose (CMC)용액 500 μL를 완전 혼합하여 45℃에서 30분간 반응시킨다. 반응시킨 시료에 DNS 용액 1 mL을 첨가한 뒤 끓는 물속에 시험관을 담궈 중탕시키면서 5분간 발색시킨 후 증류수 10 mL를 첨가하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 조효소액 500 μL와 증류수 500 μL를 혼합하여 시료와 동일하게 수행하였다. 효소활성 1 unit는 1분간 1μM의 환원당을 CMC로부터 방출시키는 효소의 양으로 정의하였다.

(4) 분리된 발효균주의 발효능 측정

혐기성 산 발효액으로부터 분리된 균주의 발효능을 측정하기 위한 실험은 회분식으로 수행하였다. 분리균주의 전배양은 100 mL 유리병에 분리용 배지 50 mL를 첨가하여 멸균한 뒤 분리된 각 균주들을 접종하여 48시간 동안 전배양 하였고, 발

효능 측정실험은 500 mL 유리병에 분리용 배지 300 mL를 첨가하여 멸균한 뒤 전배양된 분리 균주들을 각각 5 mL씩 접종한 후 35℃ 배양기에서 혐기성 배양하면서 일정 시간마다 시료를 취한 후 배양액을 원심분리하여 그 상등액을 gas chromatography (YoungLin, M600D)를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA*/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detecter (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 185℃이었고, injector와 detecter의 온도는 모두 200℃이었으며, carrier gas는 N_2를 사용하였고, 검출기 보조가스로는 Air와 H_2를 사용하였으며, flow rate는 24 mL/min으로 사용하였다.

또한 분리된 균주들의 발효능을 비교하기 위해 공시균주인 *Clostridium acetobutylicum*과 *Cl. butyricum*을 분리균주의 발효능 측정시험과 동일한 방법으로 수행하여 분리균주의 발효능과 비교하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 형태학적 특징

반혐기성 가수분해/산 발효조에서 분리된 균주는 총 11개 균주이며, Table 5와 6에 분리된 균주의 형태학적 특징과 생리학적 특징을 각각 나타내었다.

표에 나타난 바와 같이 분리된 11개 균주의 형태학적인 특징은 각각 다른 형태를 나타내어 다른 균주들로 사료되며 모든 균주가 간균이고 그램 양성균이 8종, 그램 음성균이 3종 이었다. Catalase에 대하여 모두 양성반응을 나타냈으며 oxidase에 대해서는 K8 균주를 제외한 모든 균주가 양성반응을 보이는 특징을 나타내었다.

Table 5. Morphological characteristics of isolated strains from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor

Isolates number	Form	Elevation	Margin	Color	Surface	Transparency
K1	circular	umbonate	undulate	white	concentric	opacity
K2	circular	convex & raised	entire	cream & buff	smooth & wrinkled	clarity → opacity
K3	circular	convex & raised	entire & undulate	white	smooth & wrinkled	opacity
K4	irregular	raised	undulate	buff	wrinkled	opacity
K5	irregular	raised	undulate	white yellow	wrinkled	opacity
K6	circular	convex	entire	white	smooth	opacity
K7	circular	convex	entire	white	smooth	opacity
K8	circular	flat	entire	cream	concentric	opacity
K9	circular	raised	undulate	buff	wrinkled	opacity
K10	circular	convex	entire	white	smooth	opacity
K11	irregular	raised	undulate	light yellow	wrinkled	opacity

Table 6. Physiological characteristics of isolated strains from semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor

Items	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	K10	K11
Shape	rod	rod (chain)	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod (crooked)
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+

(+ : Positive, − : Negative)

나. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 생화학적 특징

Table 7과 8은 그램양성균과 그램음성균의 생화학적 특징을 나타낸 것이다. 당분해시험에서 glucose, mannitol, sucrose등에는 11개 균주 모두 양성반응을 보였으며, 그램 양성균의 경우 pyruvate와 lactose를 이용하는 것에 대해서는 각각 K1과 K6 균주를 제외한 나머지 균주는 음성반응을 보였다. 또한 raffinose, pullulan, inulin, melezitose의 경우에는 8개 균주 모두 음성반응을 나타내었다. 그램음성균의 경우에는 maltose와 lactose를 이용하는 시험에서 K10을 제외한 K9과 K11은 양성반응을 보였으며, urea의 경우 그램양성균과 그램음성균 가운데 K11만이 양성반응을 나머지는 모두 음성반응을 보였다. 또한 분리된 균주가운데 K1, K3, K7, K8은 16S rDNA sequence를 분석한 결과 *Bacillus coagulans* NCDO 1761T와 99% 이상 homology를 나타내어 각각 *Bacillus coagulans* K1, K3, K7, K8으로 명명하였고, K5와 K6의 경우는 *Bacillus amyloliquenfaciens* ATCC 23350T와 99.6%이상 homology를 나타내어 각각 *Bacillus amyloliquenfaciens* K5와 K6로 명명하였다.

*Bacillus*는 그람 양성균으로 다양한 효소를 생산하여 세포밖으로 분비하는 특성이 있으며 α-amylase, protease, α-galactosidase 등과 같은 효소와 치료용 재조합 단백질 생산에 많이 이용되고 있다[56-59]. 또한 Ferrero 등[56]과 Ehab 등[60]은 일반적으로 *Bacillus* 속에 속하는 미생물은 식물 잔사 등의 유기물을 분해하는 능력이 우수한 미생물로서 토양내에 서식하는 대표적인 유효 미생물로 알려져 있다고 보고한 바 있다. 따라서 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 분리된 균주의 대부분이 *Bacillus* 속에 속하므로 미생물 제재로서의 활용가능성이 충분할 것으로 사료된다.

다. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Amylase 효소 활성

Fig. 18의 (A), (B)는 각각 amylase의 균체외 효소활성과 균체내 효소활성을 나타낸 것이다.

Table 7. Biochemical characteristics of gram positive bacteria isolated from food wastes

Substrates	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
PB (Peptone base)	+	+	+	+	+	+	+	+
BAC (Bacitracin)	+	+	+	+	+	+	+	+
OPT (Optochin)	+	+	+	+	+	+	+	+
HCS (Hemicellulase)	−	−	−	−	−	−	−	−
6CN (6% Sodium chloride)	−	+	+	−	+	−	−	−
10B (10% Bile)	+	+	+	+	+	+	+	+
40B (40% Bile)	+	+	+	+	+	+	+	+
ESC (Esculin)	+	+	+	+	+	+	+	+
ARG (Arginine)	−	+	−	−	−	−	−	−
URE (Urea)	−	−	−	−	−	−	−	−
TZR (Tetrazolium Red)	+	+	+	+	+	+	+	+
NOV (Novobiocin)	+	−	+	+	+	+	+	−
DEX (Dextrose)	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC (Lactose)	−	−	−	−	−	+	−	−
MAN (Mannitol)	+	+	+	+	+	+	+	+
RAF (Raffinose)	−	−	−	−	−	−	−	−
SAL (Salicin)	+	+	+	+	−	−	+	−
SOR (Sorbitol)	+	−	+	+	−	−	+	+
SUC (Sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE (Trehalose)	+	+	+	+	−	+	+	+
ARA (Arabinose)	+	+	+	+	−	+	+	+
PYR (Pyruvate)	+	−	−	−	−	−	−	−
PUL (Pullulan)	−	−	−	−	−	−	−	−
INU (Inulin)	−	−	−	−	−	−	−	−
MEL (Melibiose)	−	−	−	−	−	−	+	+
MLZ (Melezitose)	−	−	−	−	−	−	−	−
CEL (Cellobiose)	−	+	−	−	−	−	+	−
RIB (Ribose)	+	−	−	−	−	−	+	+
XYL (Xylose)	−	−	+	+	−	+	−	+
CAT	+	+	+	+	+	+	+	+
BH/CO	−	−	−	−	−	−	−	−

Table 8. Biochemical characteristics of gram negative bacteria isolated from food wastes

Substrates	K9	K10	K11
DP3 (DP-300)	-	-	-
OFG (Glucose(oxidative))	+	+	+
GC (Growth control)	+	+	+
ACE (Acetamide)	-	-	-
ESC (Esculin)	+	-	+
PLI (Plant Indican)	-	-	+
URE (Urea)	-	-	+
CIT (Citrate)	-	-	+
MAL (Malonate)	-	-	-
TDA (Tryptophan)	-	-	-
PXB (Polymyxin B)	-	-	-
LAC (Lactose)	+	-	+
MLT (Maltose)	+	-	+
MAN (Mannitol)	+	+	+
XYL (Xylose)	-	-	+
RAF (Raffinose)	-	-	-
SOR (Sorbitol)	+	+	-
SUC (Sucrose)	+	+	+
INO (Inositol)	+	-	-
ADO (Adonitol)	-	-	-
COU (p-Coumaric)	-	-	-
H_2S (H_2S)	-	-	-
ONP (ONPG Fermentation) (O-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)	-	-	-
RHA (Rhamnose)	-	+	-
ARA (L-Arabinose)	+	+	-
GLU (Glucose(fermentative))	-	-	+
ARG (Arginine)	-	-	-
LYS (Lysine)	-	-	-
ORN (Ornithine)	-	-	-
OXI	+	+	+

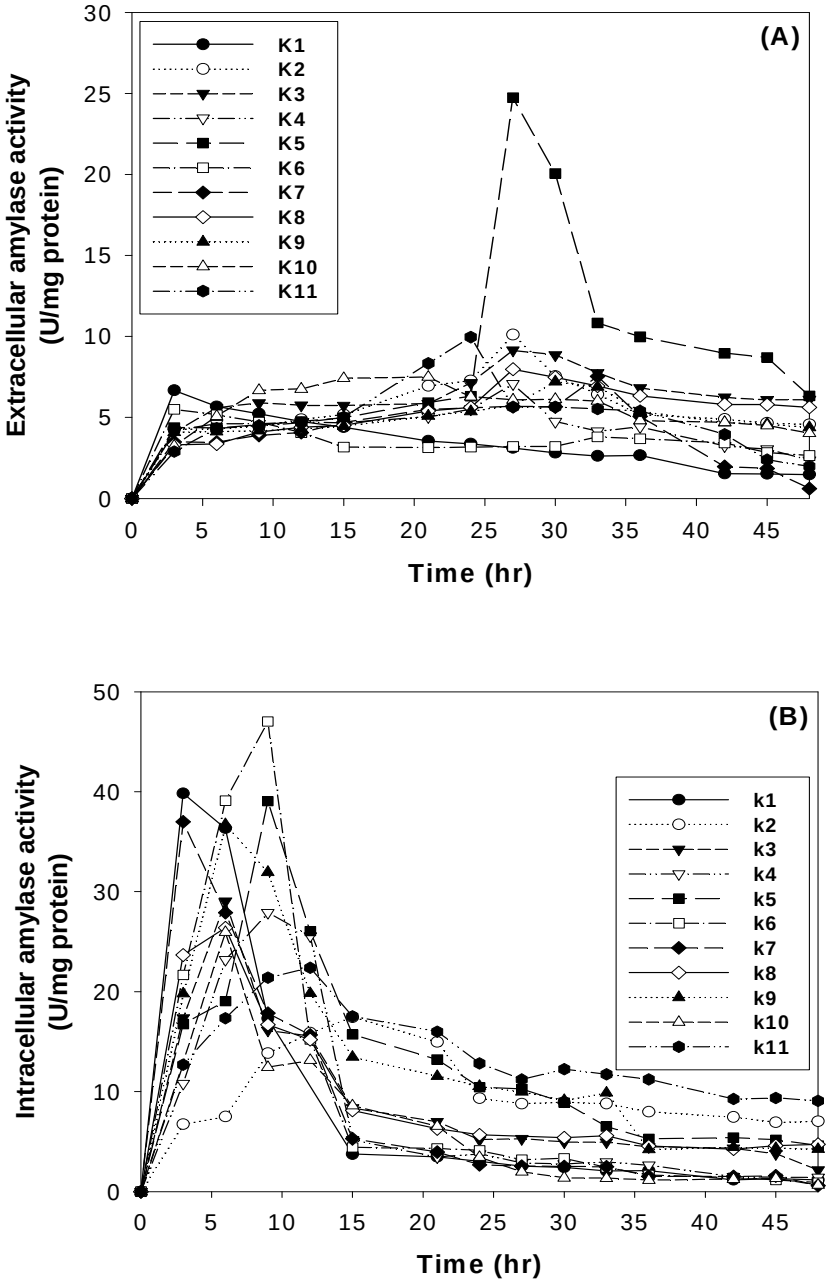


Fig. 18. (A) Extracellular amylase activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular amylase activity of selected strains from food wastes. One unit of amylase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1μM of glucose equivalent per minute.

균체외 효소활성은 K5균주가 다른 균주들에 비해 월등히 뛰어났으며 나머지 균들은 거의 유사한 효소활성을 보여주고 있지만 그 가운데에서도 K2, K11, K3의 순으로 활성이 관찰되었다. 균체내 amylase 활성은 K6균주가 가장 높은 활성을 보였으며 K1, K5, K7, K9의 순으로 활성이 높은 것으로 관찰되었다. 또한 세포내 조효소의 경우 세포배양 초기의 효소 활성이 높은 것을 알 수 있었다. 따라서 전분을 주종으로 이루는 유기성 폐기물을 처리하기 위한 종균제로 K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K11을 사용하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

라. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Protease 효소 활성

Fig. 19의 (A), (B)는 각각 protease의 균체외 효소활성과 균체내 효소활성을 나타낸 것이다. 균체외 활성의 경우 amylase와 마찬가지로 역시 K5균주가 가장 높은 활성을 보여주고 있으며, K11, K8, K3의 순으로 활성이 높은 것으로 관찰되었다. 균체내 protease의 활성의 경우 K6, K4, K1, K9의 순으로 효소의 활성이 관찰되었으므로 육류와 같은 단백질이 주종을 이루는 유기성 폐기물을 처리하기 위한 종균제로 K1, K3, K4, K5, K6, K8, K9, K11을 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료된다.

하지만 세포내 조효소 활성의 경우 세포배양 후반부로 갈수록 세포외 조효소 활성에 비해 현저히 낮은 활성이 관찰되어 발효 과정중 단백질의 분해는 주로 세포외 조효소에 의해 분해가 일어나는 것으로 생각된다.

마. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 Cellulase 효소 활성

Fig. 20의 (A), (B)는 각각 cellulase의 균체외 효소활성과 균체내 효소활성을 나타낸 것이다. 균체외 활성의 경우 역시 K5균주가 활성이 매우 높았으며 K8, K3, K11 순으로 활성이 관찰되었고, 균체내 Cellulase의 활성은 K1, K9, K10, K6의 순으로 효소활성이 관찰되어 김치와 같은 야채를 주종으로 하는 유기성폐기물의 처리에는 K1, K3, K5, K6, K8, K9, K10, K11을 종균제로 사용하면 높은 효과를 얻을 것으로 생각된다.

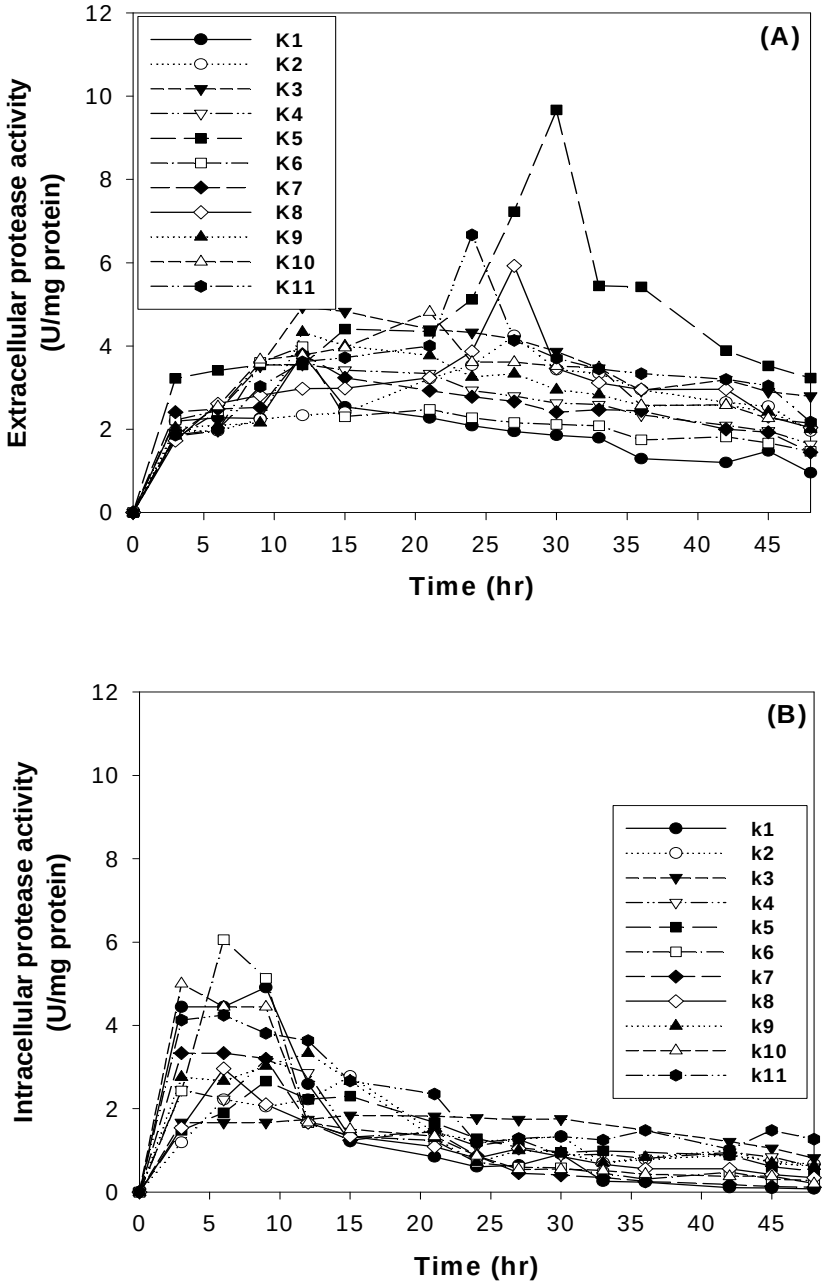


Fig. 19. (A) Extracellular protease activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular protease activity of selected strains from food wastes. One unit of protease activity is defined as the amount of enzyme that changes 0.1 absorbance unit at 440 nm.

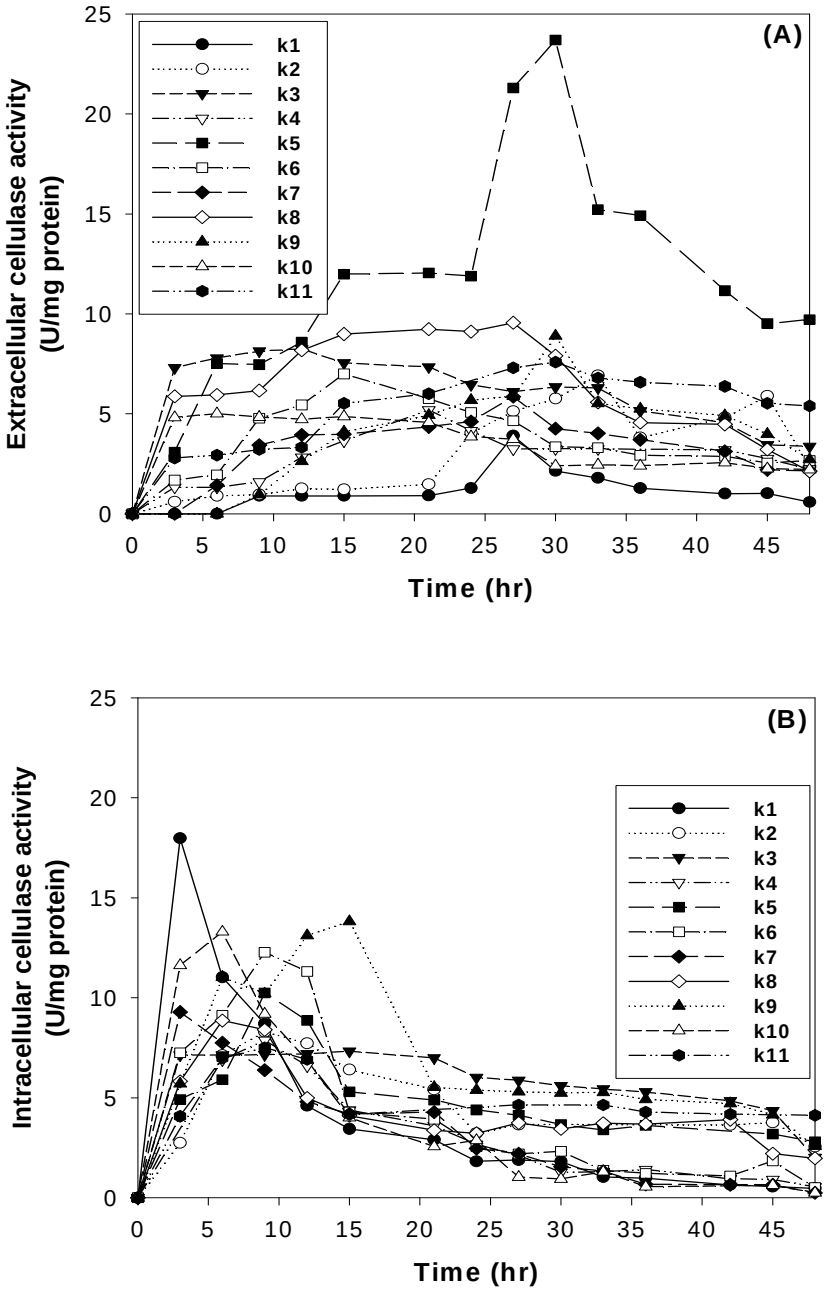


Fig. 20. (A) Extracellular cellulase activity of selected strains from food wastes; (B) Intracellular cellulase activity of selected strains from food wastes. One unit of cellulase activity is defined as the amount of enzyme that produces 1μM of glucose equivalent per minute.

따라서 amylase, protease, cellulase 효소의 활성을 종합적으로 살펴보면 K1, K3, K5, K6, K9, K11을 이용한 종균제를 사용한다면 유기성 폐기물을 분해하는데 있어 높은 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

바. 혐기성 산 발효조로부터 분리된 발효균주의 형태학적 특징

혐기성 산 발효조에서 분리한 균주는 KA1 ~ 5까지 총 5개 균주이며, Table 9와 10에 분리된 균주의 형태학적 특징과 생리학적 특징을 각각 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이 분리된 5개 균주의 형태학적인 특징은 각각 다른 형태를 나타내어 다른 균주들로 사료되며 KA4를 제외한 나머지 균주는 간균이고 KA4는 타원형 균주로 효모와 비슷한 형태를 보여주었다.

분리된 균주 가운데 그램 양성균이 4종 (KA2 ~ 5), 그램 음성균이 1종 (KA1)이었다. Oxidase에 대하여 모두 양성반응을 나타냈으며 catalase에 대해서는 KA1과 KA2 균주를 제외한 나머지 균주들은 양성반응을 보이는 특징을 나타내었다.

사. 반혐기성 가수분해/산 발효조로부터 분리된 발효균주의 발효능 측정

Fig. 21은 2차 혐기성 산 발효조로부터 분리된 균주들의 발효산물 가운데 에탄올 생산량을 나타낸 그림이다.

분리균주인 KA4의 경우 발효가 시작되고 24시간이 경과한 후 6194 mg/L의 에탄올을 생산하였으며, 발효가 진행됨에 따라 서서히 그 양이 증가하여 실험 종반부인 132시간 후에는 약 7710 mg/L의 에탄올을 생산하여 다른 분리균주 및 공시균주보다 에탄올 생산능력이 탁월하게 우수함을 관찰할 수 있었다. 공시균주인 *Cl. butyricum*의 경우 실험 종료시 최종적으로 생산된 에탄올의 농도는 분리균주인 KA4와 유사한 농도인 7060 mg/L의 에탄올을 생산하였지만 KA4에 비해 발효 속도가 월등히 떨어짐을 알 수 있었다. 나머지 다른 분리균주들은 실험이 종료될 때까지 생산된 에탄올의 양이 2000 mg/L 미만으로써 에탄올생산은 그다지 우수하지 않았다. KA4의 형태학적인 특징과 우수한 에탄올 생산능 그리고 현미경 관찰시 budding이 관찰됨을 고려할 때 분리된 KA4는 효모인 것으로 사료된다.

Table 9. Morphological characteristics of isolated strains from anaerobic acidogenic reactor

Isolates number	Form	Elevation	Margin	Color	Surface	Transparency
KA1	Irregular	Raised	Undulate	White	Undulating	clarity
KA2	Circular	Convex	Entire	Cream	Smooth	opacity
KA3	Irregular	Raised	Undulate	White	Wrinkled	opacity
KA4	Circular	Convex	Entire	Cream	Smooth	opacity
KA5	Irregular	Umbonate	Undulate	White	Wrinkled	opacity

Table 10. Physiological characteristics of isolated strains from anaerobic acidogenic reactor

Isolates number	Shape	Gram stain	Catalase	Oxidase
KA1	Rod	-	-	++
KA2	Rod	+	-	+++
KA3	Rod	+	+	+
KA4	Oval	+	+	++
KA5	Rod	+	+	+

(+ : Positive, - : Negative)

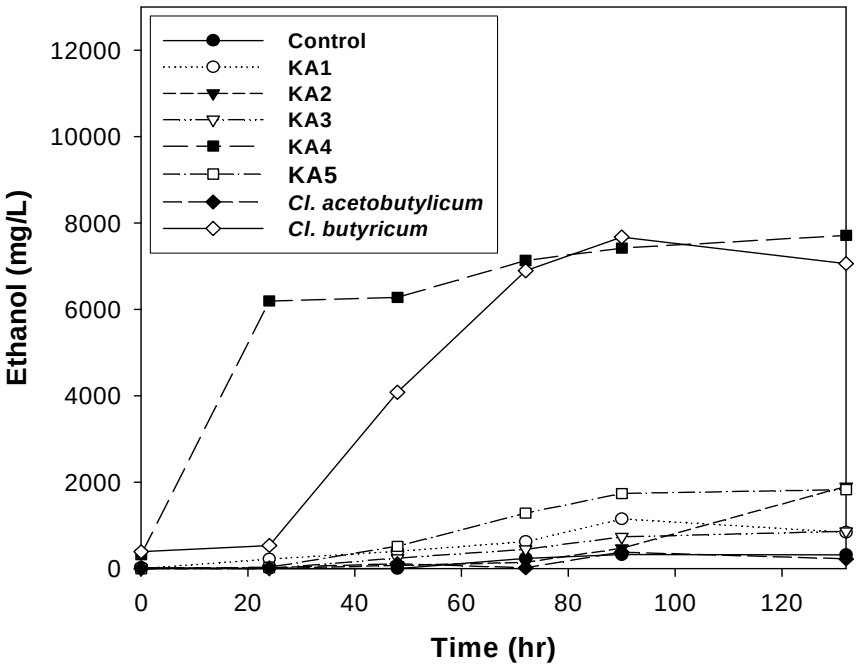


Fig. 21. Comparison of ethanol production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor.

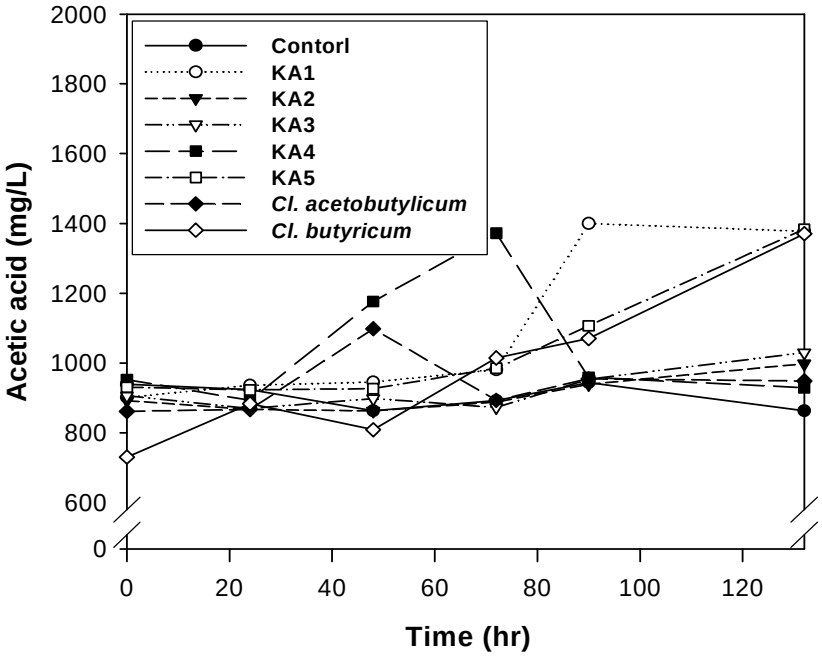


Fig. 22. Comparison of acetic acid production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor.

Fig. 22는 2차 혐기성 산 발효조로부터 분리된 균주들의 발효산물 가운데 아세트산의 생산량을 나타낸 그림이다.

그림에 나타낸 바와 같이 KA1, KA5, *Cl. acetobutylicum*만이 아주 미량의 아세트산을 생산하였을 뿐 나머지 균주들에서는 아세트산의 생산은 거의 일어나지 않았음을 알 수 있었다. 그러나 아세트산을 생산하는 것으로 알려져 있는 공시균주인 *Cl. acetobutylicum*의 경우에서도 아세트산의 생산이 미미한 것으로 보아 발효에 사용된 기질이 단일 기질이 아닌 다양한 기질이 혼합되어 있는 음식물이라는 차이와 발효과정 중 유지되는 발효액의 pH가 특정한 유기산을 생산하는데 영향을 미친다는 다른 연구자들의 보고[61)]들을 고려하면 본 실험에서 유지하고 있는 발효액의 pH에 의해 분리균주들의 아세트산 생산능이 저해 받는 것으로 사료된다.

반면 젖산 생산의 경우 아세트산과는 반대로 분리된 모든 균주에서 그 생산량이 증가하였음을 Fig. 23을 통하여 알 수 있었다.

분리균주 중 가장 많은 젖산을 생산하는 균주인 KA1의 경우 발효가 시작되고 48시간까지는 젖산의 농도가 서서히 증하여 12900 mg/L의 젖산을 생산하였으며, 이후 발효가 진행됨에 따라 젖산의 농도가 급격히 증가하여 실험 종반부인 132시간 후에는 약 26850 mg/L의 젖산을 생산하였다. 다음으로 KA2 균주의 경우 발효 초기 24시간 동안 약 8800 mg/L의 젖산을 생산하여 동일 시간동안 두 번째로 빠른 발효속도를 보였지만 이후 발효가 더디게 진행하다가 132시간 후에는 약 20000 mg/L의 젖산을 생산하였다. 공시균주인 *Cl. acetobutylicum*의 경우 발효가 시작된 뒤 24시간동안은 앞에서 설명한 2균주를 제외한 나머지 균주와 유사하게 젖산의 생산이 거의 일어나지 않았지만 48시간 이후 빠르게 증가하여 약 15000 mg/L의 젖산을 생산하였으며, 이후 실험 종료시까지 완만한 발효과정이 진행되어 약 17000 mg/L의 젖산을 생산하였다. KA5 균주의 경우 초기 48시간까지의 발효속도는 다른 균주들에 비해 다소 떨어졌지만 최종적으로 생산된 젖산의 농도는 분리균주인 KA1 다음으로 많은 양의 젖산을 생산하였다. 또한 알코올 생산에서 가장 높은 발효효율을 보인 KA4 균주는 가장 낮은 젖산 생산량을 보여주었다. 아울러 전체적으로 볼 때 대부분의 분리균주들이 공시균주인 *Cl. butyricum*과 *Cl. acetobutylicum*에 비해 발효효율이 우수하였으며, 유기산 생성 균주를 이용하여 발효과정 중 특별한 제어를 하지 않고 음식물을 발효할 경우 주생산물이 젖산임을 알 수 있었다.

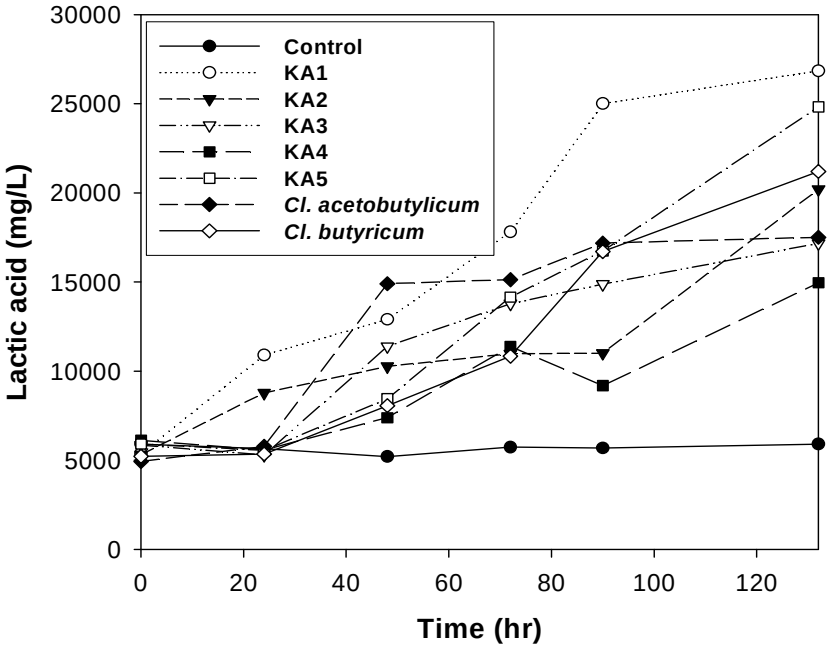


Fig. 23. Comparison of lactic acid production ability among isolated strains from anaerobic acidogenic reactor.

카. 미생물제제의 개발

미생물 제재란 특정한 유용성을 가지고 있는 하나 혹은 그 이상의 미생물이 일정한 농도로 함유되어 있는 액상 혹은 고상 분말형 제재를 말한다. 이러한 미생물 제재의 용도는 최근 농업뿐만이 아니라 음식물쓰레기의 처리, 해양 유류 오염 방제 및 적조 방제, 난분해성 오염물의 제거, 생활 및 산업하수처리 그리고 농업 폐수처리 등 환경 분야에 까지 그 효용성을 넓혀가고 있다[62-66].

Shin 등[67]은 일반적으로 용해성 기질의 경우에는 메탄생성이 율속단계(rate-limiting step)이지만, 음식물쓰레기와 같은 입자성 기질의 경우 가수분해가 율속단계이므로 가수분해의 효율향상을 위하여 gamma irradiation, ball milling, steam explosion, 산 및 알칼리 처리, white-와 brown-rot fungi를 이용한 미생물 처리와 같은 다양한 방법[68-71] 등이 시도되었지만, 보다 직접적이면서도 효율적인 방법은 뛰어난 분해능력을 갖고 있는 미생물을 이용하는 것이라고 보고한 바 있다.

따라서 앞에서 기술한 자료를 토대로 3단계 메탄 발효 시스템에 적용할 미생물 제제를 개발할 경우, 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에는 11개의 균주로 혼합된 고속 가수분해 발효균주를 제조하여 적용하고, 2차 혐기성 산 발효조에는 음식 폐기물에 적응된 *Cl. butyricum* 균주 및 5개의 균주로 혼합된 산 발효 균주를 사용하며, 3차 혐기성 메탄 발효조에는 본 연구가 진행되는 6년 동안 메탄 발효조에서 안정화되어 우점종으로 존재하는 *Methanoculleus bourgensis* (93.1%), *Methanoculleus palmolei* (3.45%), *Methanosarcina* sp. (3.45%) 등의 절대 혐기성 메탄생성세균을 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

제 3 절 발효효율 최적화 운전 조건 검토

1. 실험재료 및 방법

가. 1차 가수분해/산 발효조의 pH조절을 위한 반송 조건

Fig. 24는 본 실험에 사용된 소형 1차 가수분해/산 발효조의 모식도 및 사진이며, 반응기의 용량은 30 L이고 교반을 위해 반응기의 상부에 모터가 장착되어 있으며 반응기의 하단에는 폭기를 위해 공기펌프를 이용하여 폭기할 수 있도록 제작하였다. pH 조절을 위한 반송수로는 3단계 메탄 발효시스템의 최종 발효 폐액을 처리하기위해 본 연구자가 속한 실험실에서 운전하고 있는 폐수처리조의 최종 유출수를 사용하였다. 반송수의 성상 중 pH, tCOD, sCOD, T-N 및 NH_4-N는 각각 8.4 ~ 9.2, 510 mg/L, 490 mg/L, 500 mg/L, 65 mg/L로 조사되었다.

pH 조절실험은 크게 3가지 방식으로 수행하였다.

첫 번째 방식으로는 1차 가수분해/산 발효조의 발효액 5 L를 접종원으로 하고 1일 동안 음식물 5 kg을 한꺼번에 주입한 뒤 반송수의 비율을 음식물과 1:1, 1:2의 비율로 조절하여 일정하게 정량펌프를 이용하여 반응기에 주입하면서 반응기내의 pH를 관찰하였다.

두 번째 방식으로는 1차 가수분해/산 발효조의 발효액 5 L를 접종원으로 하고 반송수를 10 ~ 12 L를 반응기에 주입하여 반응기내의 pH를 5이상으로 유지시킨 후 1일 동안 음식물을 주입하지 않은 경우와 음식물을 5 kg을 한꺼번에 주입한 뒤 반응기를 운전하여 발효과정 중 pH가 떨어질 경우부터 반송수를 주입하는 방식으로 pH의 변화를 알아보았다.

세 번째 방식으로는 1차 가수분해/산 발효조의 발효액 5 L를 접종원으로 하고 반송수를 10 ~ 12 L를 반응기에 주입하여 반응기내의 pH를 5이상으로 유지시킨 후 1일 동안 5 kg을 10회 분할하여 반응기에 주입하고 반응기를 운전하였다. 그리고 반송수 또한 음식물과 비율을 각각 1:2와 1:4로 조절하여 일정하게 정량펌프를 이용하여 반응기내에 주입한 뒤 반응기의 pH 변화를 알아보았다.

나. 회분식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향

본 연구에 사용한 시료는 현재 본 연구자가 속한 실험실에서 운전중인 음식물쓰레기의 혐기성 소화공정인 3단계 메탄 발효시스템 가운데 2차 혐기성 산 발효조의 발효 후 유출액을 사용하였고, 실험에 사용된 접종액 역시 현재 본 실험실에서 운전중인 음식물쓰레기의 혐기성 소화공정인 3단계 메탄 발효시스템 가운데 3차 혐기성 메탄 발효조내의 발효액을 사용하였다.

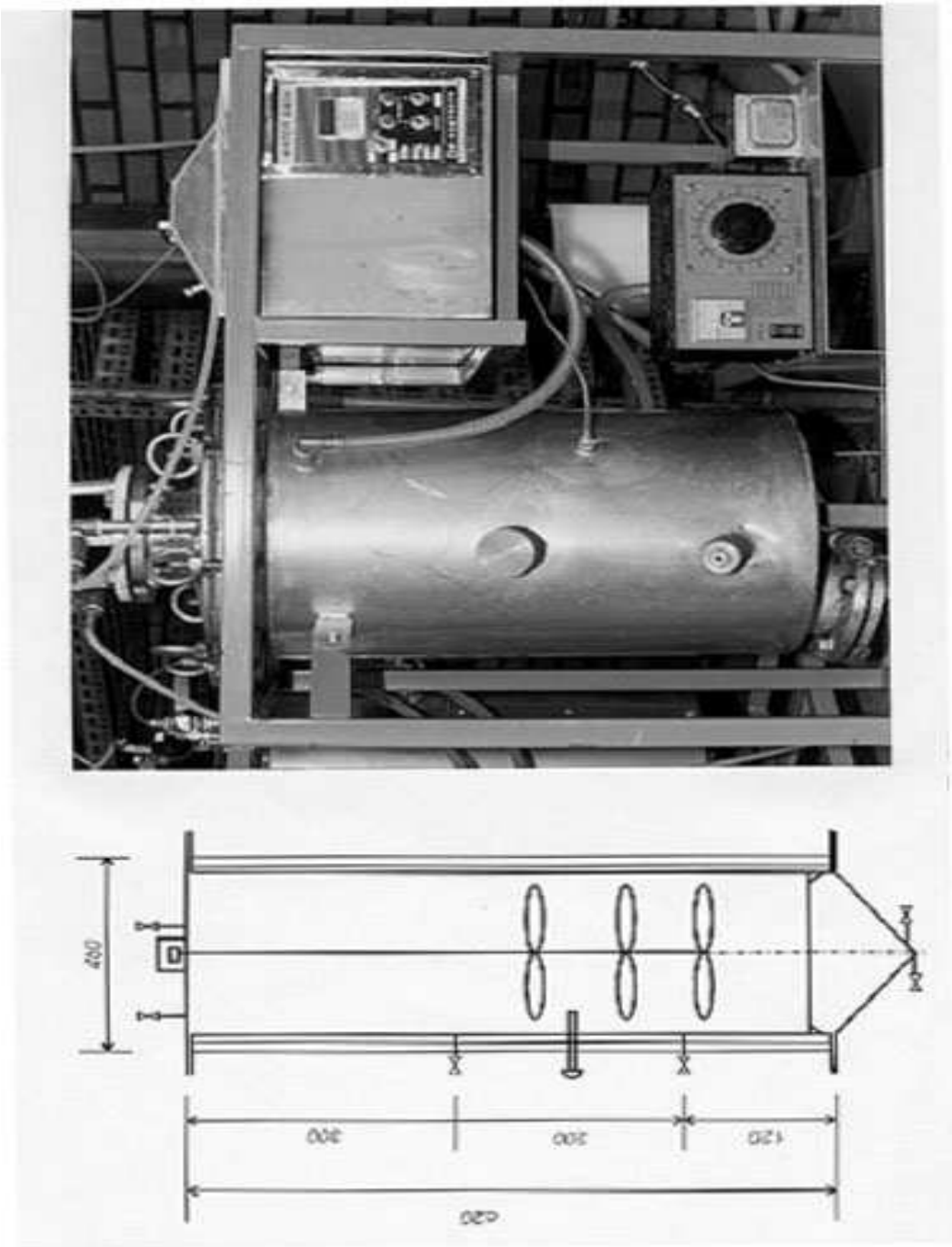


Fig. 24. Schematic diagram and photograph of 30 L semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

시료의 pH, sCOD, NH_3-N 및 C/N비는 각각, 4.5, 17000 mg/L, 380 mg/L, 15.8 이었으며 접종액의 pH, sCOD, NH_3-N는 각각 8.2, 2600 mg/L, 1300 mg/L로 조사되었다.

Fig. 25는 본 연구에 사용하기 위해 제작한 실험실 규모의 메탄 발효조 모식도 및 사진이다. 발효조의 직경이 200 mm, 높이가 350 mm로 총 용적이 11 L인 원통형 발효조이며 발효조의 측면에 시료를 채취할 수 있는 밸브를 설치하였고 발효조내의 온도는 히터가 설치된 수조내에 발효조를 설치하여 조절하였다.

회분식 실험에서는 시료와 접종액을 1:1의 비율로 하여 유효용적이 8 L가 되도록 하였으며 발효조의 온도를 각각 30, 35, 40, 45, 50, 55℃로 조절하였을 경우의 발효조내의 pH변화, COD 감량정도 및 동력학적인 특성, 가스 발생량을 조사하였다. pH는 pH meter로, COD는 Cr법으로, 발효조내에서 발생하는 가스량은 가스유량계를 이용하여 측정하였다.

동력학적인 특성을 알아보기 위해 이론적 고찰에 나타낸 Grau가 제안한 1차 모델을 이용하였다[27].

다. 반연속식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향

반연속식 실험의 경우 회분식 실험의 경우와 동일한 발효조와 시료 및 접종액을 사용하였다. 발효조의 온도는 각각 40, 45, 50, 55℃로 조절하였다. 또한 유기물의 1일 처리량을 조절하여 HRT를 8일, 10일, 12일인 경우의 발효조내의 pH변화, COD 감량정도, 가스생산량 및 메탄생산량과 NH_3-N의 농도를 조사하였다. pH는 pH meter로, COD는 Cr법으로, NH_4-N는 인도페놀법으로 수질공정시험법에 준하여 조사하였고, 발효조내에서 발생하는 가스량은 가스유량계를 이용하였다.

또한 가스 성분 분석은 gas chromatography (Shimadzu GC-14B)를 이용하여 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 Porapak Q를 사용하였고, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 분석조건 중 column, injector 및 detecter의 온도는 각각 100℃, 50℃, 150℃이었으며, carrier gas는 He을 사용하였고, flow rate는 50 mL/min으로 사용하였으며, 120 mA의 current 값을 사용하였다.

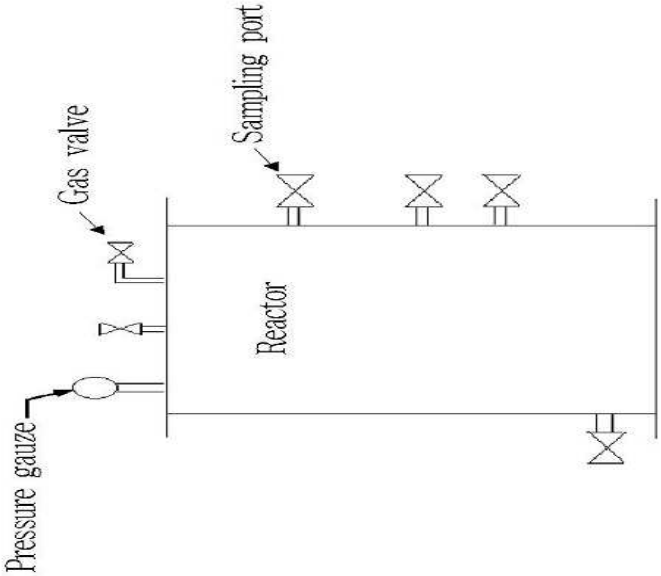


Fig. 25. Schematic diagram and photograph of lab scale (11 L) methane fermentor.

라. 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효공정 운전

(1) 실험균주

1차 가수분해/산 발효 공정에서 사용되는 균주는 본 연구에서 분리한 K1 ~ K11 균주와 시중에 유통되고 있는 미생물 제재인 GT-100WT, FM (Biogenesis technology Inc.), MS 101 (한국 MS 연구소)과 유기성쓰레기의 분해능이 있을 것으로 사료되는 매립지의 토양시료로 사용하였으며 또한 기존에 다양한 고분자 화합물을 분해하는 균주들인 *cellulomonas cellulans*, *Flavobacterium breve*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alcalophilus*을 KCTC로부터 분양 받아 전 배양하여 1차 가수분해/산 발효 공정에 접종하였다.

2차 혐기성 산 발효조의 경우 acetic acid, propionic acid, butyric acid등의 유기산 생성이 우수한 *Clostridium butyricum*과 *Clostridium acetobutylicum*을 KCTC로 부터 구입하여 혐기성 배양 후 사용하였다.

3차 혐기성 메탄 발효조의 미생물제재 개발을 위해 메탄생성균이 서식하고 있는 우분과 매립지내에 메탄가스가 발생하고 있는 토양가운데 지표로부터 10 ~ 15 cm 깊이의 토양을 채취하여 접종원으로 사용하였다.

(2) 3단계 메탄 발효공정 운전을 위한 자동화 공정

Fig. 26은 3단계 메탄 발효공정을 제어하기 위해 제작한 공정자동화 시스템 사진이며, 이 자동화 공정시스템을 이용하여 이송펌프의 작동시간, 이송속도 및 온도조절과 밸브의 작동여부 등과 같은 발효공정의 운전에 관한 것을 미리 입력된 프로그램에 의해 컴퓨터로 제어할 수 있도록 하였다.

(3) 음식물 쓰레기의 전처리 공정

본 실험에 사용된 음식물 쓰레기는 학교 구내식당으로부터 수집되었으며 1차적으로 고기뼈, 생선뼈, 비닐, 나무토막과 같은 생물학적 분해가 어려운 물질을 육안으로 확인한 후 수작업을 통하여 분리한 뒤 제거하였다. 또한 음식물과 미생물의 접촉이 용이하고 각 공정으로의 이송이 용이하도록 음식물과 물을 1:1의 비율로 혼합한 뒤 파쇄기를 이용하여 잘게 분쇄한 후 Fig. 27에 나타낸 음식물 저장조에

저장되고 펌프를 이용하여 24시간동안 나누어 1차 가수분해/산 발효조에 주입하였다.

(4) 3단계 메탄 발효공정내 음식물 쓰레기 성상 변화

전처리 공정을 거친 음식물 쓰레기는 1차 가수분해/산 발효조에 100 kg/day으로 주입되었으며 주입하기 전에 음식물 쓰레기의 COD, T-N, NO_3-N, NH_4-N, TS, VS, pH를 측정하였다. 각각의 실험방법은 COD는 Cr법으로, TS와 VS는 standard method으로, T-N, NO_3-N는 자외선 흡광도법으로, NH_4-N는 인도페놀법으로 수질공정시험법에 준하여 조사하였다. 각 공정별 수리학적 체류시간은 1차 가수분해/산 발효조에서 2일, 2차 혐기성 산 발효조에서 2일, 3차 혐기성 메탄 발효조에서 12일로 조절하였다. 또한 각 공정에서도 음식물 쓰레기의 측정항목과 마찬가지로 분석을 동일하게 수행하였다.

(5) 3단계 메탄 발효공정내의 유기산 분석

3단계 메탄 발효공정내의 유기산의 분석은 gas chromatography (FID)(YoungLin M600D)를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 제 2 장 제 2 절의 단계별 발효공정 미생물 제재 개발에서 수행한 분석조건과 동일하게 분석하였다.

(6) 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석

3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스량은 습식가스유량계를 이용하여 매일 측정하였으며 가스 성분 분석은 gas chromatography (TCD)(Shimadzu GC-14B)를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 제 2 장 제 3 절의 다에서 수행한 분석조건과 동일하게 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 1차 가수분해/산 발효조의 pH조절을 위한 반송 조건

1차 가수분해/산 발효조로 주입되는 음식물은 유기물 농도가 너무 높아 미생물

Fig. 26. Automatic control system for three-stage methane fermentation system.

Fig. 27. Food wastes reservoir (200 L) for 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system.

성장에 저해를 받을 수 있고 또한 음식물 파쇄를 원활히 하기 위해 물과 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 한편 발효과정 중 발생하는 유기산의 영향으로 발효조 내의 pH가 낮아지는 현상이 관찰되었다. 따라서 본 연구에서는 발효가 끝나고 최종적으로 유출되는 pH 8.0 이상의 알칼리 폐수를 반송하여 발효조 내의 pH를 5이상으로 유지하기 위해 반송비율에 대하여 알아보았다. Fig. 28의 (A)에는 음식물 5 kg을 주입하고 1일 동안 일정하게 반송수를 5 L 주입한 경우와 10 L를 주입한 경우를 나타내었다.

음식물 주입 후 발효조 pH가 4.4에서 반송수가 주입되는 순간에는 pH가 약간 증가하였지만 두 가지 경우 모두 발효가 진행되는 동안 pH가 점점 감소하여 24시간 후 pH가 3.8까지 하락되어 pH 조절이 되지 않는 것을 알 수 있었다. 따라서 발효조 내의 pH를 음식물 주입 전에 5이상으로 조절하고 음식물 5 kg을 주입한 경우와 음식물을 주입하지 않은 경우의 pH 변화를 비교하였으며, 실험과정 중 pH가 5이하로 낮아질 경우 반송수를 일정하게 주입한 후 발효조 내 pH 변화를 Fig. 28의 (B)에 나타내었다.

음식물을 주입하지 않은 경우는 반송수의 특징 때문에 실험과정 중 계속해서 pH가 증가하는 것이 관찰되었다. 반면 음식물이 주입된 경우에는 초기에 pH가 약간 증가하였지만 6시간 이후부터는 pH가 감소하는 것이 관찰되었고 이 때 부터 반송수를 주입하였지만 pH 조절은 할 수 없었다. 따라서 반송수의 비율을 높일 필요가 있으므로 Fig. 28의 (C)에 나타낸 바와 같이 발효조의 pH를 미리 5이상으로 높이고 반송수와 음식물의 비율을 1:2와 1:4가 유지되도록 반송수를 일정하게 유입시키면서 음식물의 주입에 있어서도 5 kg의 음식물을 1일 동안 10회로 분할하여 발효조에 주입시키면서 pH의 변화를 알아보았다. 두 경우 모두 Fig. 28의 (A)나 28의 (B)에서의 경우 보다 발효조의 pH가 높게 유지되었으며, 음식물과 반송수의 비가 1:2인 경우를 비교해 볼 때 Fig. 28의 (C)의 경우에서 더 높은 pH가 유지된 것은 음식물의 주입이 한꺼번에 주입되지 않고 분할되어 주입됨으로써 반송수의 pH 완충역할이 보다 용이하게 이루어진 결과로 사료되며, 반송수의 비율이 증가될수록 pH의 조절이 가능할 것으로 사료된다. 하지만 향후 실험을 통하여 물을 대신하여 반송수를 사용함으로써 발효과정 중에 미칠 수 있는 영향 예를 들어 전체적인 공정 내에 메탄생성량의 감소와 같은 영향 등을 살펴보아야 할 것으로 사료되며 반송수의 양이 너무 커질 경우 처리량이 커지게 되므로 발효조의 크기가 현재의 것보다 훨씬 커져야 하기 때문에 화학적으로 NaOH를 병행 사용하여 pH를 조절해야 할 것으로 사료된다.

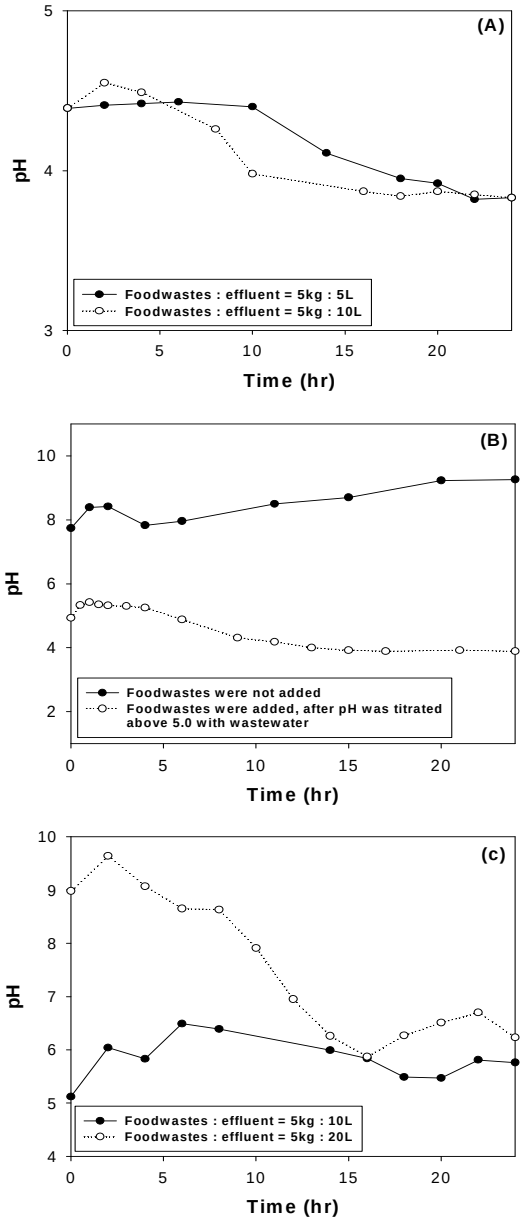


Fig. 28. (A) Change of pH in semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor according to the mixing ratio between food wastes and final effluent wastewater; (B) Change of pH in the semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor under the condition that foodwastes were added or not; (C) Change of pH in the semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic fermentor under the condition that foodwastes mixed with wastewater with different ratio were fed continuously.

나. 회분식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향

Fig. 29는 30일간의 회분식 실험기간동안 각 온도별 혐기성 메탄 발효조의 pH변화를 나타낸 것이다. 산 발효조로부터 나온 pH 4.5의 시료가 메탄 발효조의 접종액과 1:1의 비율로 혼합되어 초기 pH가 6.3 ~ 6.5로 적정된 후 메탄생성균의 유기물 분해작용에 따라 혐기성 처리수의 pH가 계속 증가하였다.

이는 Buswell 등[72)]의 보고와 일치하는 것으로 정상적인 혐기성 분해가 이루어지고 있음을 알 수 있었고, 발효조 가운데 45, 50℃의 메탄 발효조의 pH가 같은 시기에 가장 빨리 상승하였으며, 다음으로 55, 40, 35, 30℃ 메탄 발효조의 순으로 pH가 서서히 상승하는 것이 관찰되었다.

따라서 45, 50℃의 메탄 발효조가 혐기성 분해과정이 가장 빠르게 일어나는 것으로 판단된다. 또한 55℃ 메탄 발효조의 경우 실험 초기 pH의 상승 경향이 더디게 진행하였지만 5일 이후 45, 50℃와 유사한 경향으로 pH가 상승하는 것이 나타났다.

Fig. 30의 (A)는 회분식 실험기간중의 발효조내의 sCOD농도의 감소를 나타낸 것이고, Fig. 30의 (B)는 Grau가 제안한 모델을 이용하여 온도에 따른 발효능을 동력학적으로 나타낸 것이다.

50℃ 발효조의 경우 초기 sCOD농도 9520 mg/L에서 30일 후 1652 mg/L로 82.6%의 제거율을 보였고 이때 K_1은 0.61 (g COD/L day)으로 다른 발효조에 비해 가장 높은 COD 제거효율을 나타내었다. 45℃ 발효조의 경우 초기 sCOD농도 8640 mg/L에서 30일 후 1520 mg/L로 82.4%의 제거율을 보였으며 이때 K_1은 0.6 (g COD/L day)으로 50℃ 발효조와 비슷한 제거 효율을 나타내었다. 55℃ 발효조의 경우 sCOD농도 9520 mg/L에서 30일 후 2181 mg/L로 77%의 제거율을 보였고 이때 K_1은 0.42 (g COD/L day)으로 나타내었다.

그리고 35, 40℃ 발효조의 경우 초기 sCOD농도 8640 mg/L에서 실험이 끝난 후 sCOD 농도가 각각 2817 mg/L, 2556 mg/L으로 67.4%와 70.4%의 sCOD가 제거되어 효율면에서 유사한 경향을 보였으며 K_1값 역시 0.35 (g COD/L day)와 0.38 (g COD/L day)로 유사하였다.

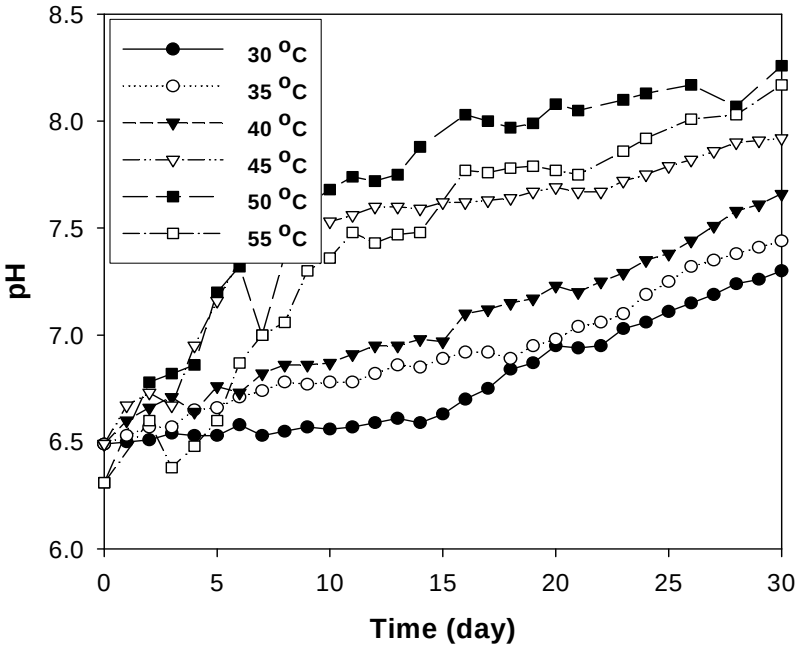


Fig. 29. Changes of pH according to the temperature in the anaerobic methane fermentor.

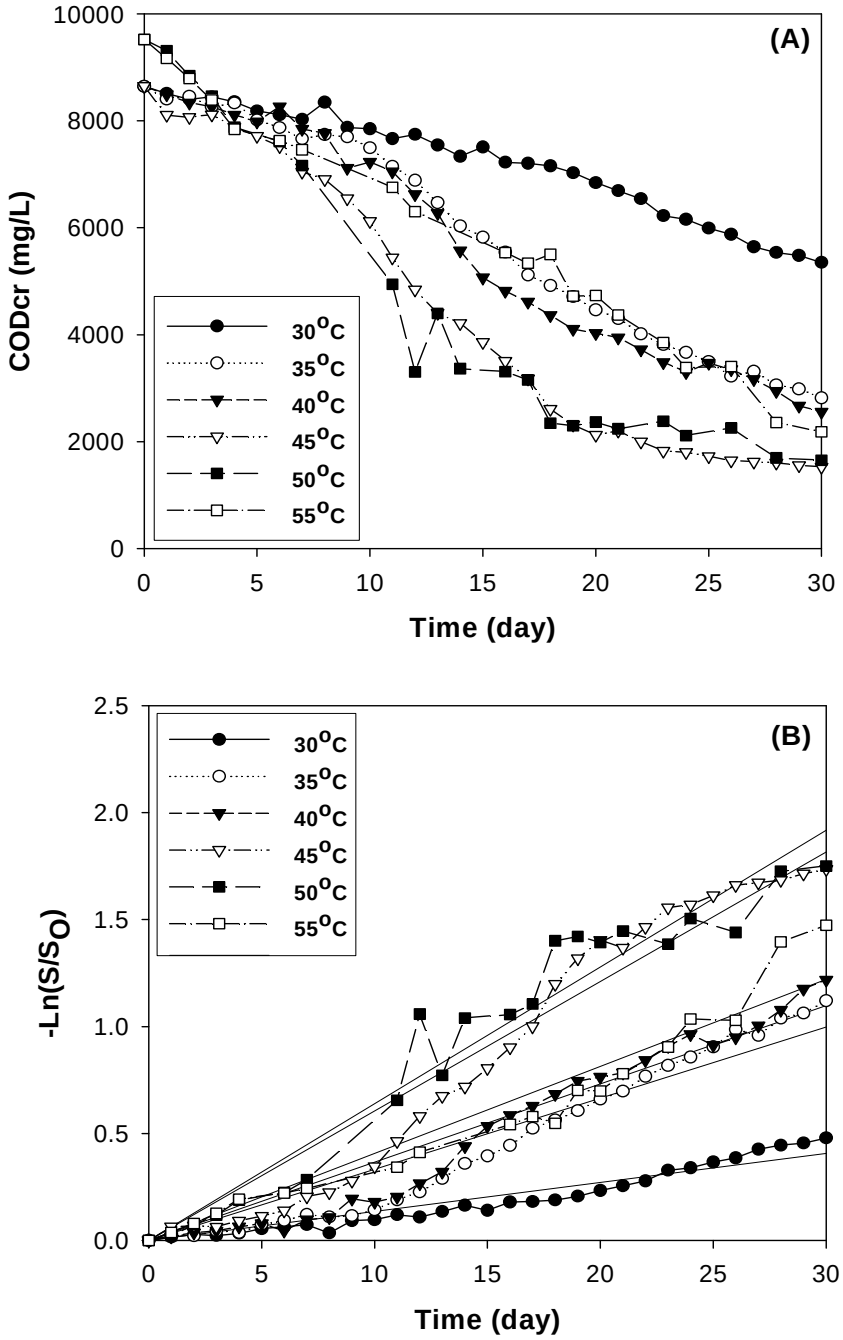


Fig. 30. (A) Temperature-dependent changes in sCOD in anaerobic methane fermentors in batch reaction; (B) Grau model plot for temperature-dependent changes in sCOD.

반면에 30℃ 발효조의 경우 30일 후의 sCOD 농도가 5350 mg/L로 38.0%의 제거효율을 보이고 K'1은 0.14 (g COD/L day)로 가장 낮은 제거효율 및 K'_1을 나타내었다. 따라서 발효조의 온도가 50℃까지는 발효온도가 높을수록 발효액 중 유기물의 제거효율과 K'_1이 높은 것을 알 수 있었지만 55℃이상에서는 발효효율이 감소함을 알 수 있었다. Chen 등[73]은 축산분뇨의 혐기소화에 있어서 고온소화가 중온소화보다 동력학적 이점이 있다고 보고하였고 또한 55℃보다 높은 온도에서 혐기소화공정의 운전에 대한 이점은 명확하지 않다고 보고한 바 있다.

회분식 실험에서 온도에 따라 메탄 발효조에서 발생되는 가스의 양을 매일 측정하였으며 그 결과를 Fig. 31에 나타내었다. 가스발생시간에 있어서도 역시 높은 sCOD 제거효율을 보인 45℃와 50℃ 발효조에서 가장 빨리 가스를 발생시켰으며, 온도가 낮아질수록 가스의 발생 속도가 늦어져 발효조의 안정화에 시간이 많이 소요됨을 알 수 있었다. 반면에 55℃ 발효조의 경우 40℃발효조 보다는 더 빨리 가스를 발생시켰지만 45℃ 발효조에 비해 늦게 가스를 발생시켰으며 발생 가스량에 있어서도 더 낮은 가스발생량을 보여주었다. 이것은 고온의 영향으로 본 연구에 사용된 메탄생성균의 활성이 낮아진 결과로 사료된다. 따라서 메탄 발효에 있어서 50℃까지는 온도가 높을수록 유기물 제거 효율 및 메탄생산속도가 빠른 것으로 판단된다. 또한 Bouallagui 등[74]도 바이오가스를 생산하는데 있어서 고온소화조를 사용하는 것이 저온이나 중온소화조를 사용하는 것보다 더 많은 바이오가스를 생산한다고 보고하였고, 이것은 본 실험의 연구결과와 일치하였다.

다. 반연속식 실험에서의 온도에 따른 메탄 발효의 영향

Fig. 32의 (A), (B)는 반연속식 실험기간 중 각각의 온도별 및 각각의 온도에서 체류시간이 10일인 경우와 12일인 경우 발효조내의 pH변화를 각각 나타낸 것이다. 유입되는 시료의 pH는 평균 4.5이었으며, 체류시간이 10일인 경우와 12일인 경우 각각의 모든 발효조에서 실험초기에 안정화가 진행되는 동안 불안정한 pH값이 나타났으나 15일 이후부터 모든 발효조의 pH가 약 7.5를 유지하여 Shin 등[75]의 결과에서 제시한 메탄생성세균의 적정 pH인 6.6 ~ 7.8을 유지하는 것으로 나타났다.

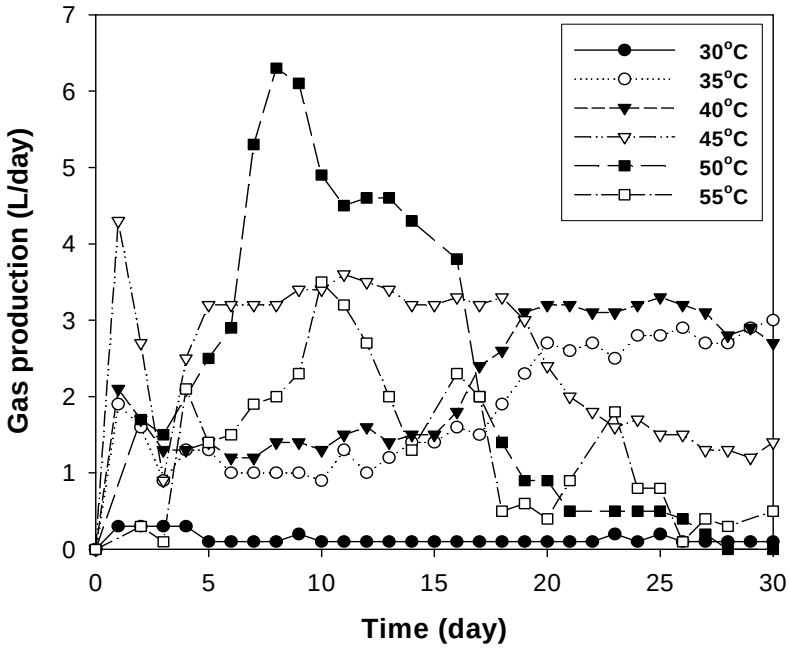


Fig. 31. Biogas production profiles at different temperatures through batch reaction.

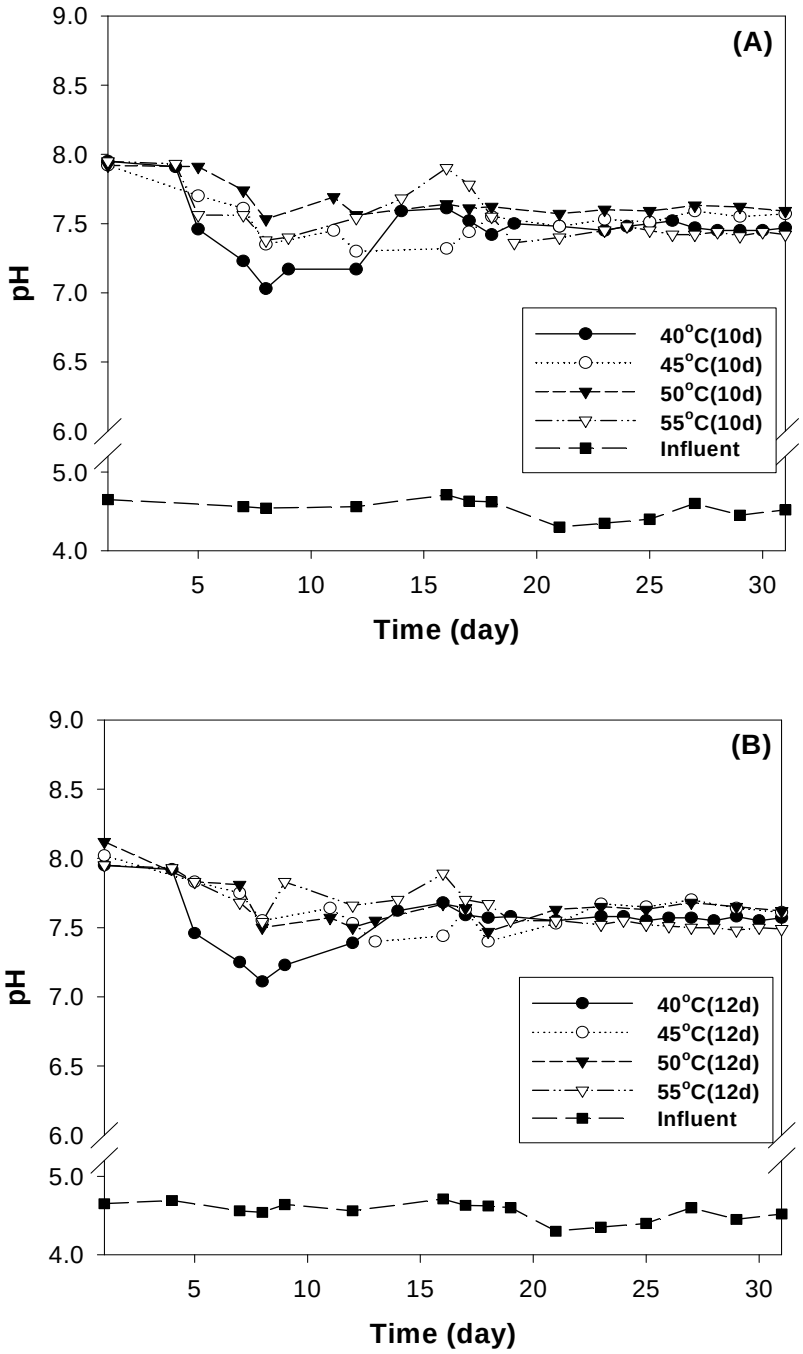


Fig. 32. Temperature-dependent pH changes in the anaerobic methane fermentor by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day.

반연속식 실험기간 중 체류시간이 10일인 경우와 12일인 경우 각각의 온도에 따른 발효조내의 sCOD의 변화와 제거율의 평균값을 Fig. 33과 34의 (A), (B)에 나타내었다. 평균 17000 mg/L유입시료의 sCOD가 30일간의 연속식 실험기간을 거치는 동안 40℃ 발효조의 경우 평균 3480 mg/L의 sCOD를 유지하여 76%의 COD 제거율을 보였고, 45℃ 발효조의 경우 평균 3361 mg/L의 sCOD를 유지하여 77%의 COD 제거율을 보였으며, 50℃ 발효조의 경우 평균 3240 mg/L의 sCOD를 유지하여 77.9%의 COD 제거율을 보였다. 반면에 55℃ 발효조의 경우 평균 3446 mg/L의 sCOD를 유지하여 76.3%의 COD 제거율을 보여 40℃ 발효조와 유사한 제거율을 나타내었다.

또한 체류시간인 12일인 경우도 10일인 경우와 마찬가지로 50℃ 발효조에서 평균 3125 mg/L의 sCOD를 유지하여 78.7%의 COD 제거율로서 가장 높은 유기물 제거효율을 나타내었다. 40, 45, 55℃ 발효조의 경우 각각 3350, 3239, 3357 mg/L의 sCOD를 유지하여 COD 제거율은 각각 76.9, 77.9, 76.9%로 나타났다. 이와 같이 체류시간이 10일인 경우와 12일인 경우, 체류시간에 관계없이 50℃까지는 온도가 상승함에 따라 유기물 제거 효율이 증가한 반면 55℃발효조의 경우 오히려 유기물 제거 효율이 감소함이 관찰되었다.

이것은 회분식 실험의 결과와 마찬가지로 50℃까지는 고온이 가지는 동력학적인 이점으로 인하여 유기물 제거 효율이 증가하였지만 55℃의 경우 온도의 영향으로 인해 발효조내의 메탄생성균의 활성을 떨어뜨려 유기물 제거 효율이 오히려 감소한 것으로 사료된다. 또한 이러한 결과는 서로 다른 HRT 조건의 축산폐기물 혐기소화에 있어서 중온소화보다 고온소화가 더 안정적이라고 보고한 Mackie와 Bryant[76)]의 결과와 일치하였다. 체류시간에 따른 유기물 제거효율에 있어서는 12일의 체류시간을 가진 각각의 발효조들이 10일의 체류시간을 가진 발효조들 보다 유기물 제거효율이 평균 약 1%정도 높은 것이 관찰되었다.

Fig. 35의 (A), (B)는 반연속식 실험기간 중 각각의 온도별 및 체류시간에 따른 발효조내의 일일 가스발생량을 각각 나타낸 것이다. 가장 우수한 유기물 제거효율을 보인 50℃ 발효조에서 체류시간이 10일인 경우와 12일인 경우 모두에서 실험기간 중 가장 많은 가스가 발생하였으며 다음으로 45, 40, 55℃ 발효조의 순으로 일일 가스발생량이 증가하였다. 온도의 영향을 받는 것으로 생각되는 55℃ 발효조의 경우 초기 약 15일 까지는 다른 발효조와 유사한 경향으로 가스가 발생되었지만 15일 이후부터는 뚜렷한 발생량의 차이를 나타내었다.

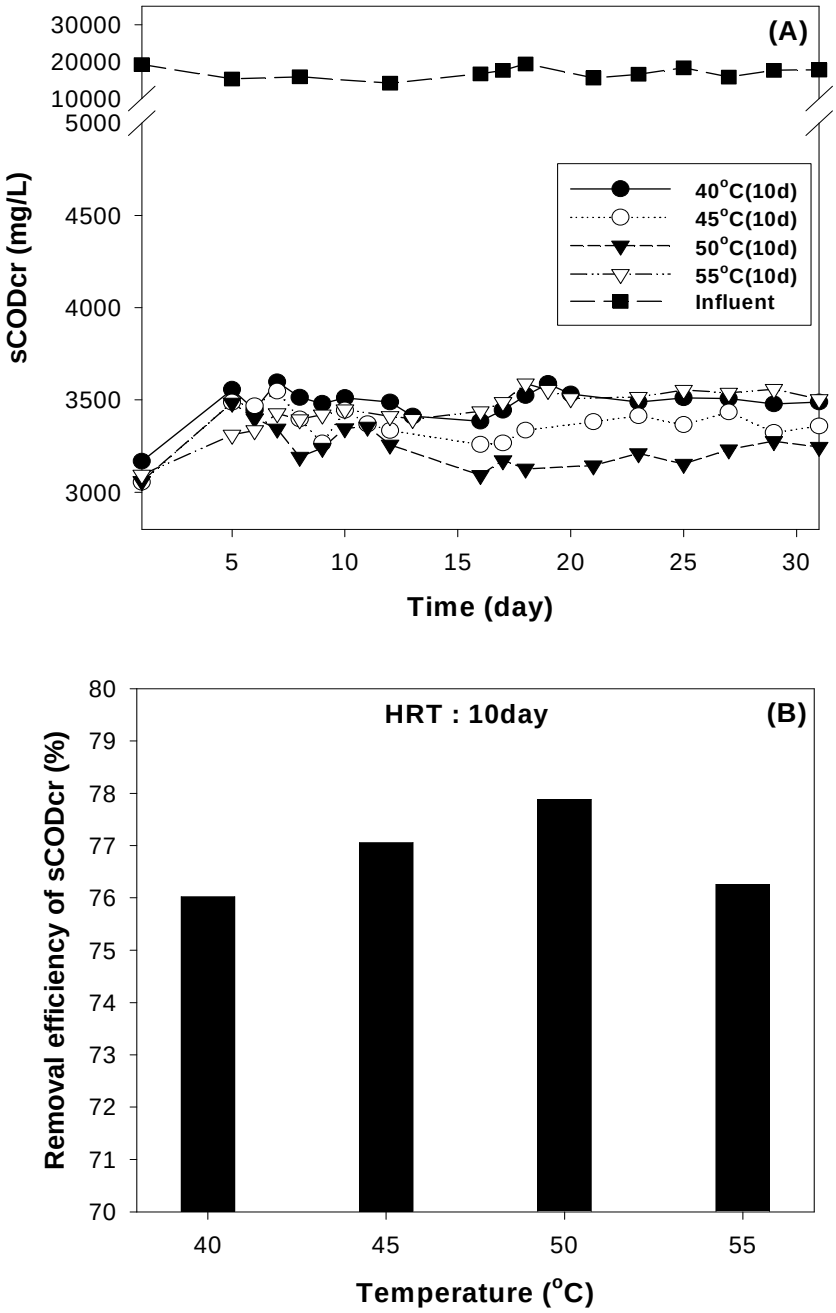


Fig. 33. Temperature-dependent sCOD change (A) and removal efficiency of sCOD (B) in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation (HRT-10day).

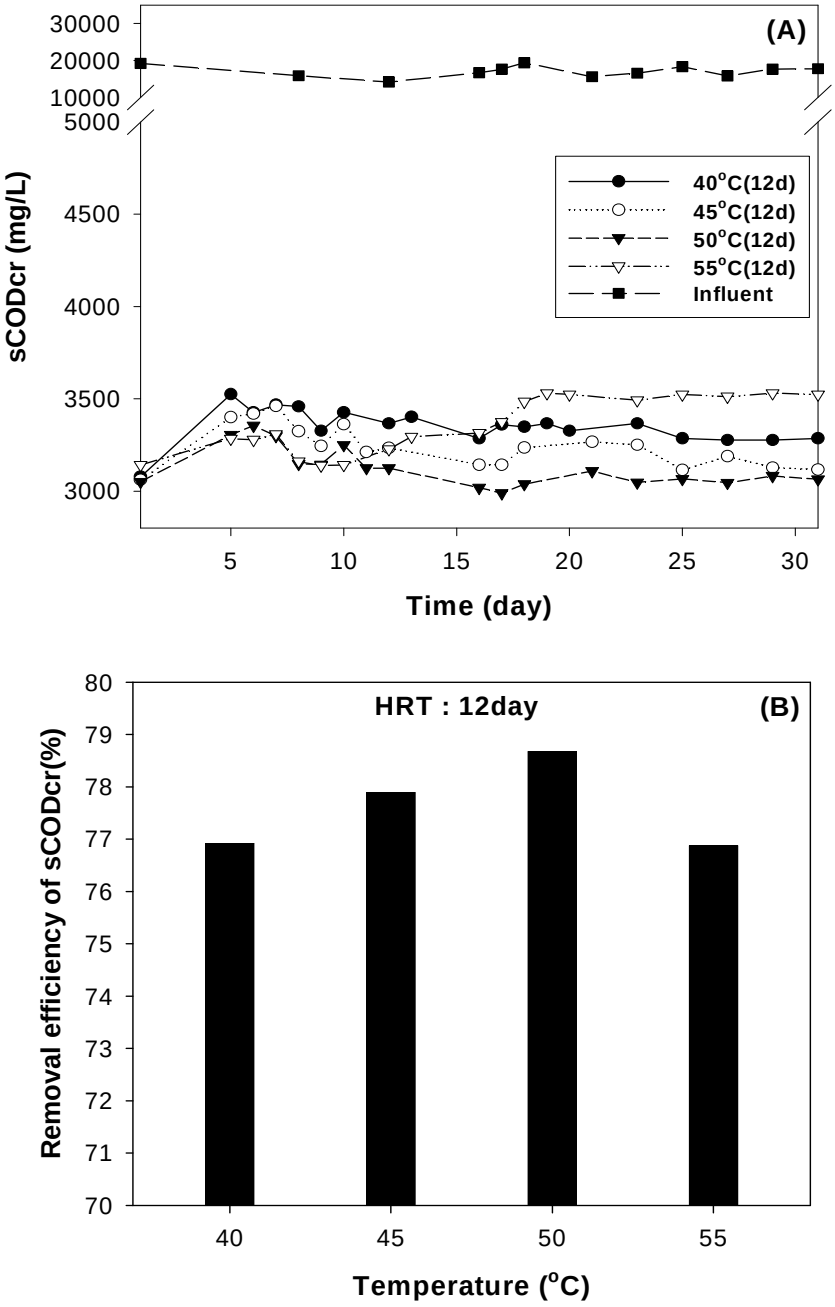


Fig. 34. Temperature-dependent sCOD change (A) and removal efficiency of sCOD (B) in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation (HRT-12day).

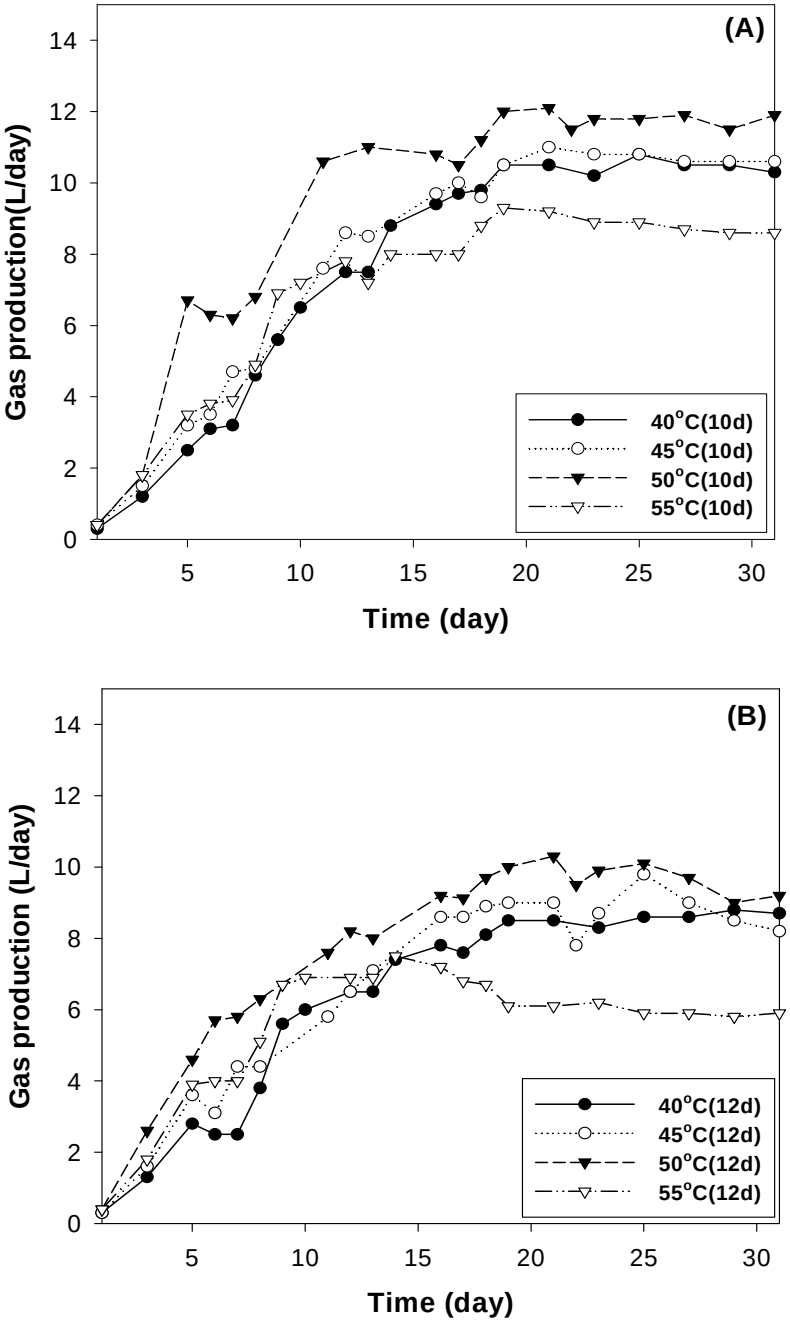


Fig. 35. Temperature-dependent gas production in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day.

Table 11은 반연속식 실험기간 중 각각의 온도별 및 체류시간에 따른 발효조내에서 발생하는 바이오가스 발생량 및 메탄가스 발생량의 실험기간 중 평균치를 각각 나타낸 것이다. 50℃ 발효조에서 가장 높은 가스발생량 및 메탄가스 발생량을 보였으며 이때 발생하는 가스 중 메탄가스 함량은 체류시간이 10일인 발효조의 경우 64.3%이고 12일인 발효조의 경우 67.6%의 메탄함량을 보였다. 45℃ 발효조에서 발생하는 가스 중 메탄가스 함량은 체류시간이 10일인 발효조의 경우 64%이고 12일인 발효조의 경우 65.7%의 메탄함량을 보여 체류시간이 10일 경우 50℃ 발효조와 메탄함량이 유사하게 나타났다. 40℃ 발효조의 경우 발생하는 가스 중 메탄가스 함량은 체류시간이 10일인 발효조의 경우 61.4%이고 12일인 발효조의 경우 65.1%의 메탄함량을 보였으며, 55℃ 발효조의 경우 가장 적은 가스를 발생시켰으며 메탄함량 또한 체류시간이 10일인 발효조의 경우 54%이고 12일인 발효조의 경우 60.1%의 메탄함량을 보여 각 발효조 가운데 가장 낮은 함량을 나타내었다.

Table 12는 Table 11에 나타낸 결과에 따라 산출된 메탄가스 생산수율을 나타낸 것이다. 비록 바이오가스 생산에 있어서 체류시간이 10일이고, 50℃에서 운전된 발효조의 바이오가스 생산량이 최대이지만, 메탄가스 생산수율은 체류시간이 12일이고, 50℃에서 운전된 발효조가 최대치를 나타내었다 (223 L CH_4/kg $sCOD_{degraded}$). Ahn과 Forster [23]는 장시간의 HRT를 갖는 고온소화조에서 보다 높은 메탄가스 생산수율을 얻을 수 있다고 보고하였다. 또한 많은 연구자들이 다양한 폐수에 적용하기 위해 고온소화의 운전가능성 뿐만 아니라 중온소화보다 나은 장점에 대해 고온소화의 잠재성을 시험하였다. 따라서, 상기 결과들을 종합적으로 고려해 볼 때 본 연구에서 시험되어진 음식물쓰레기의 고온소화에 의한 처리에 있어서 중온소화보다 고온소화가 명확한 이점이 있다는 것을 보여 주었다.

Fig. 36의 (A), (B)는 반연속식 실험기간 중 각각의 온도별 및 체류시간에 따른 발효조내의 NH_3-N의 변화를 각각 나타낸 것이다. 유입되는 시료의 암모니아성 질소의 농도가 평균 380 mg/L에서 혐기성 발효가 진행됨에 따라 시료중의 유기질소의 형태가 모든 발효조내에서 암모니아성 질소의 형태로 전환되기 때문에 암모니아성 질소의 농도가 유입수의 농도보다 증가하였음이 관찰되었다. 또한 발효조내의 암모니아성 질소의 농도가 과다할 경우 메탄 발효에 음성적인 영향을 미치는 것으로 보고되어 있지만[77-79] 본 실험에서 나타난 결과에서의 농도인 평균 900 ~ 1100 mg/L의 농도는 크게 영향을 미치지 않기 때문에 암모니아성 질소가 메탄 발효에 미치는 영향은 관찰되지 않았다.

Table 11. Comparisons of biogas productions depending on temperature and HRT by semi-continuous fermentation using anaerobic fermentors.

Digestion condition		Gas production (/ /d)		Methane content in biogas (%)
Temp. (℃)	HRT (d)	Biogas	Methane	
40	10	7.3	4.5	61.6
	12	6.1	4.0	65.6
45	10	8.7	5.5	63.2
	12	7.4	4.9	66.2
50	10	10.4	6.7	64.4
	12	8.6	5.8	67.4
55	10	6.8	3.7	54.4
	12	5.6	3.3	58.9

Table 12. Methane yield in semi-continuous fermentation

Digestion condition		Methane gas yield(L/kg sCOD)
Temp.(℃)	HRT (d)	
40℃	10 day	145
	12 day	154
45℃	10 day	177
	12 day	187
50℃	10 day	216
	12 day	223
55℃	10 day	119
	12 day	129

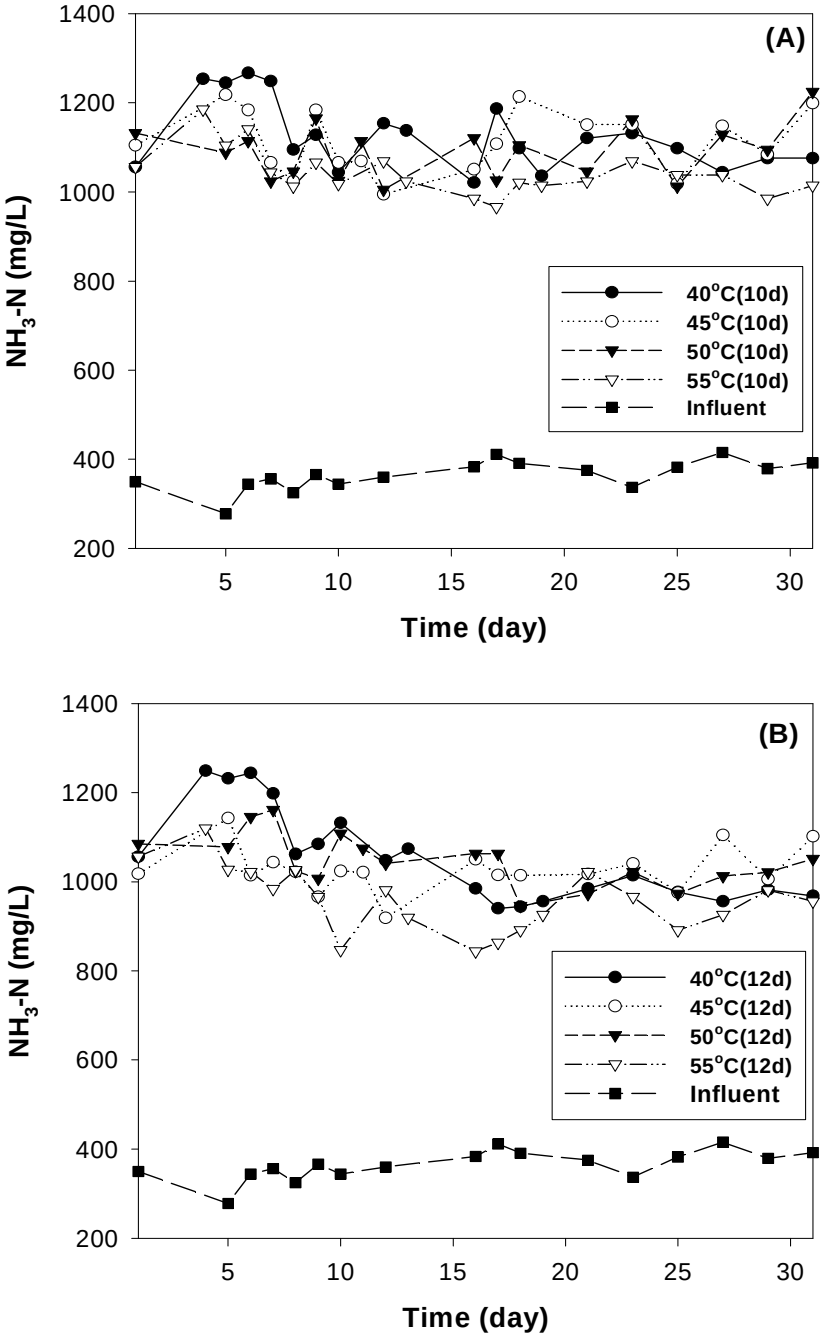


Fig. 36. Temperature-dependent NH_3-N concentration changes in different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation; (A) HRT-10day, (B) HRT-12day.

따라서 55℃ 발효조의 경우 영향을 미칠 것으로 사료된 암모니아성 농도 역시 다른 발효조에 비해 오히려 낮게 운전되었기 때문에 55℃ 발효조의 메탄 발효효율의 감소는 온도의 영향으로 사료된다. 그러므로 온도에 따른 메탄 발효조의 최적 발효조건은 50℃로 운전하는 것이 가장 효과적이며, 체류시간에 있어서도 메탄가스 수율 및 유기물 제거 효율의 경우 10일로 운전한 경우 12일로 운전한 경우에 비해 약간 떨어지지만 발효조의 규모가 대형화될 경우 체류시간을 줄임으로써 발효조의 용적이 감소되는 것을 고려하면 10일로 운전하여도 무방할 것으로 사료된다.

Fig. 37은 온도별 발효효율에서 가장 효과가 높은 온도인 50℃에서 체류시간을 8일로 조절하였을 경우 체류시간이 10일과 12일이었을 경우의 pH의 변화를 비교한 그림이다. 앞서 설명한 바와 같이 체류시간이 10일과 12일인 경우 실험 초기 pH가 8.0에서 조금 감소하였지만 메탄 발효에 영향을 미치는 범위는 아니었으며, 발효조가 안정화되면서 오히려 적정 pH인 7.5부근을 유지하는 것으로 나타났다. 하지만 체류시간을 8일로 조절한 발효조의 경우 실험이 진행되는 동안 계속해서 pH가 감소하여 10일 이후부터는 pH가 4이하로 낮아졌다. 이것은 과다한 부하량을 견디지 못하여 메탄 발효조의 메탄생성균이 유입되는 시료의 산 발효액 내의 산생성균과 경쟁에서 밀려나 발효조의 상태가 산 발효조화 된 것으로 판단된다.

Fig. 38은 온도별 발효효율에서 가장 효과가 높은 온도인 50℃에서 체류시간을 8일로 조절하였을 경우와 체류시간이 10일과 12일이었을 경우의 가스발생량 변화를 비교한 그림이다. 체류시간이 짧을수록 발효제내의 유기물 부하가 증가함에 따라 체류시간이 12일인 경우보다 10일인 경우의 발효조의 가스발생량이 더 높은 것을 알 수 있었다. 또한 이때의 발효조의 pH의 상태를 살펴보았을 경우 정상적인 메탄 발효가 진행됨을 알 수 있었지만, 8일의 체류시간을 가진 발효조의 경우 초기 발효조내의 메탄생성균에 의해 약간의 가스를 발생시켰지만 10일 이후 발생 가스량은 급격히 감소하였으며 이후 미량의 가스만을 생성시키는 것이 관찰되었다. 이것은 계속되는 고농도의 유기물 부하를 견디지 못하고 10일 이후 발효조내의 메탄생성균이 모두 유출수로 씻겨져 나간 것으로 사료된다.

Fig. 39는 온도별 발효효율에서 가장 효과가 높은 온도인 50℃에서 체류시간을 8일로 조절하였을 경우와 체류시간이 10일과 12일이었을 경우의 sCOD의 변화를 비교한 그림이다.

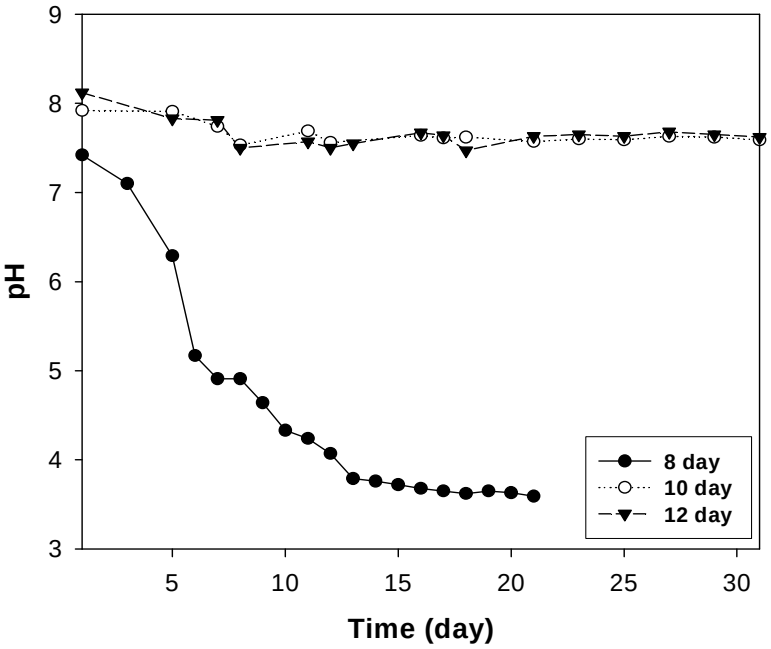


Fig. 37. HRT-dependent pH changes in the anaerobic methane fermentor by semi-continuous fermentation.

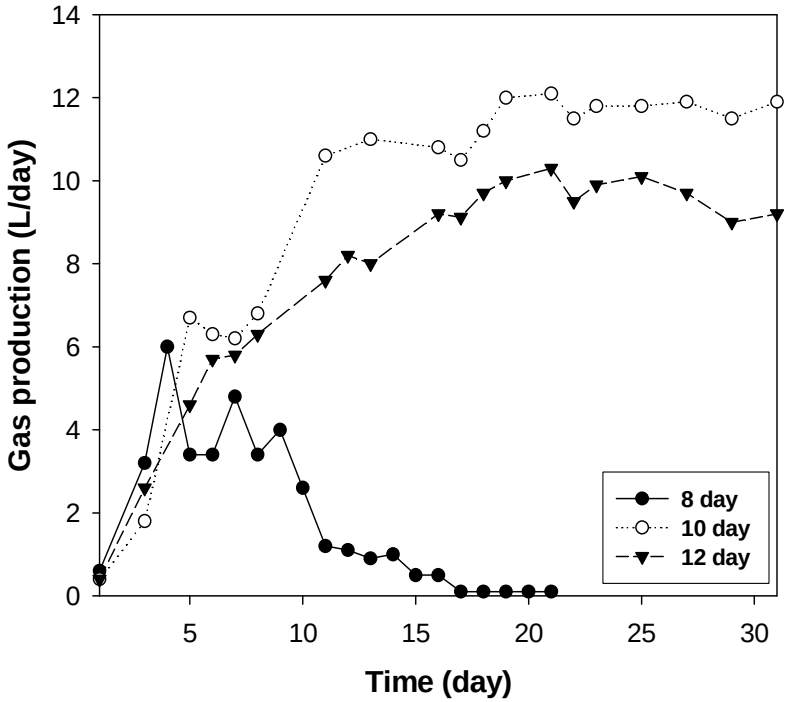


Fig. 38. HRT-dependent gas production in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation.

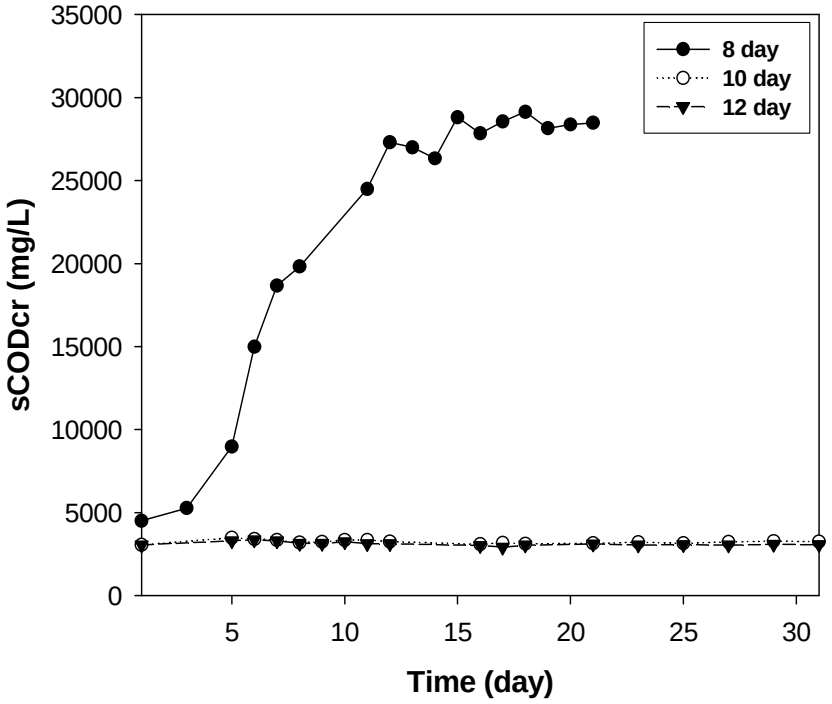


Fig. 39. HRT-dependent sCOD changes in the different anaerobic methane fermentors by semi-continuous fermentation.

체류시간이 10일과 12일인 경우 발효조의 평균 sCOD는 각각 3480 mg/L과 3125 mg/L으로 유사하였지만, 8일의 체류시간을 가진 발효조의 경우 유기물 부하를 견디지 못하고 sCOD의 농도가 계속 상승하는 것이 관찰되어 유입시료의 sCOD 농도까지 상승하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 본 연구실에서 개발한 메탄 발효온도의 최적 온도는 50℃로 운전하는 것이 보다 효율적이며, 현재 12일로 운전하고 있는 발효조의 체류시간을 향후 목적에 따라 10일까지 줄이는 경우에도 메탄 발효에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

라. 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용한 음식물쓰레기 처리공정 운전

(1) 음식물 쓰레기의 성상

학교 구내 식당에서 수집하여 본 실험에 사용된 음식물 쓰레기의 평균 고형물 함량은 12.38%로 조사되었으며, 이 가운데 유기물 함량은 평균 89.5%로 나타났다. 음식물 쓰레기의 tCOD는 평균 78980 mg/L로 조사되었으며 VS는 평균 110520 mg/L로 COD/VS의 비율은 71.4%를 보였고 pH는 5.14로 조사되었다. 또한 음식물 쓰레기 내의 총 질소는 5200 mg/L로 조사되었고, 질산성 질소의 농도가 102.5 mg/L, 암모니아성 질소의 농도가 30.5 mg/L를 함유하고 있는 것으로 조사되었다. Table 13은 수집된 음식물 쓰레기의 구성 원소 비율 및 유기물 함량을 나타낸 것이다. 음식물 쓰레기의 C:N 비율은 약 9:1로 유기물 분해조건이 매우 좋은 것으로 나타났다.

(2) 1차 가수분해/산 발효조내 발효액의 성상 변화

파쇄기에 의해 파쇄된 음식물 쓰레기는 음식물 저장조에 24시간동안 여러 차례로 나누어 1차 가수분해/산 발효조로 유입된다. 이 반응기의 체류시간은 2일로 운전하였으며 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 Fig. 40의 (A)와 (B)에 나타낸 바와 같이 평균 71234 mg/L와 27569 mg/L로 이 공정에서 음식물의 tCOD값이 평균 9.8% 제거되었다. 1차 가수분해/산 발효조의 총질소의 농도는 평균 4542 mg/L을 유지하는 것으로 나타났다 (Fig. 41). 총질소의 농도 중 질산성 질소와 암모니아성 질소의 농도는 각각 100 mg/L (Fig. 42 (A))와 52.2 mg/L (Fig. 42 (B))이었다.

Table 13. Elemental analysis of collected food wastes used for the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system

Solid content(%)	VS/TS(%)	COD/VS	Elemental composition(%)			
			C	H	O	N
12.38	89.3	0.71	47.8	6.1	40.9	5.2

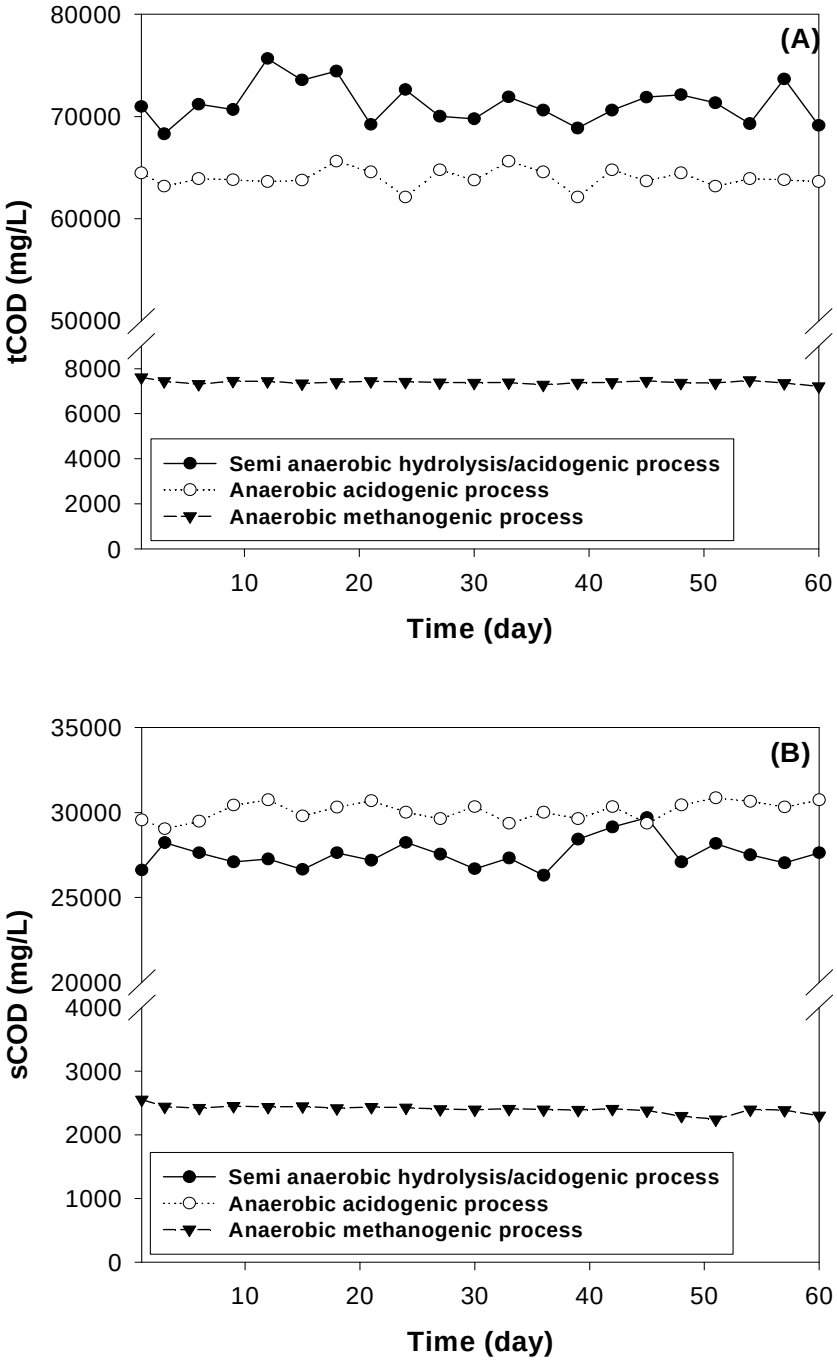


Fig. 40. Changes of tCOD (A) and sCOD (B) in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system.

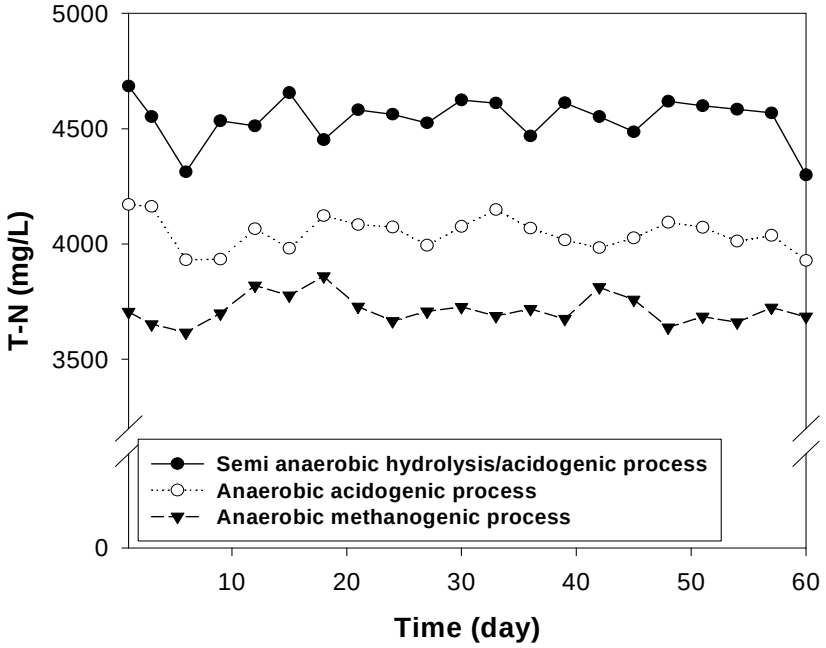


Fig. 41. Changes of T-N concentration in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system.

1차 가수분해/산 발효조의 총 질소의 농도가 음식물의 총질소의 농도와 비교해서 거의 변화가 없는 것은 질소의 경우 호기조건의 질산화와 혐기조건의 탈질과정을 통해 제거되므로 이 공정에서는 폭기로 인한 질산화를 유도하는 과정으로 볼 수 있으며 또한 암모니아성 질소의 증가는 1차 발효액의 성상이 죽상태이기 때문에 공기압축기로 충분한 폭기를 시키고 있지만 발효액내에 충분한 산소전달이 액상일 경우에 비해 이루어지지 않아 음식물 쓰레기 내의 유기성 질소의 일부가 암모니아성 질소로 전환된 것으로 사료된다. 이것은 pH의 변화를 볼 때 평균 pH가 3.8로 음식물 자체의 pH에 비해 떨어지는 것 또한 반 혐기성 상태에서 유기산의 발생으로 인해 pH 저하가 일어난 것으로 판단된다 (Fig. 43).

(3) 2차 혐기성 산 발효조내의 발효액의 성상 변화

2일간의 체류시간을 거쳐 나온 1차 발효액은 2차 혐기성 산 발효조로 유입되어 이곳에서 역시 2일간의 체류시간을 거치도록 하였다. 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 평균 63972 mg/L와 30080 mg/L로 나타나 이 공정에서 음식물의 tCOD값이 평균 19%정도 제거되었고, sCOD의 경우 1차 공정에 비해 약간 증가하였다. 이것은 음식물 쓰레기의 고형물 분해로 인해 생성된 유기산의 생성에 의한 것으로 사료된다. 따라서 2차 산 발효조의 pH가 생성되는 유기산의 축적으로 인하여 평균 3.45까지 떨어지는 것이 관찰되었다. 2차 산 발효 총질소의 농도는 평균 4046 mg/L으로 유지되어 1차 가수분해/산 발효조에 비해 약간 감소함을 알 수 있었다.

이 공정에서는 1차 가수분해/산 발효조로 내로 폭기된 공기의 유입이 일부 있을 수 있으며 따라서 주로 통성 혐기성 균이 분포되어 있을 것으로 사료되고, 공정내에서 발생하는 CO_2와 N_2와 같은 가스를 빼냄과 동시에 유입된 산소를 제거하여, 완전한 혐기성 상태를 유지해야만 하는 3차 혐기성 메탄 발효조내에 산소가 들어가는 것을 막을 수 있을 것으로 생각된다.

(4) 3차 혐기성 메탄 발효조내의 발효액의 성상 변화

2일간의 체류시간을 거쳐 나온 2차 발효액은 3차 혐기성 메탄 발효조로 유입되어 이곳에서 12일간 체류하도록 운전하였다. 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 평균 7395 mg/L와 2400 mg/L로 나타나 이 공정에서는 1차와 2차 공정에 비해 고형물의 분해가 거의 이루어져 tCOD와 sCOD의 차이가 앞선 두 공정에 비해 현저히 낮음을 알 수 있었다.

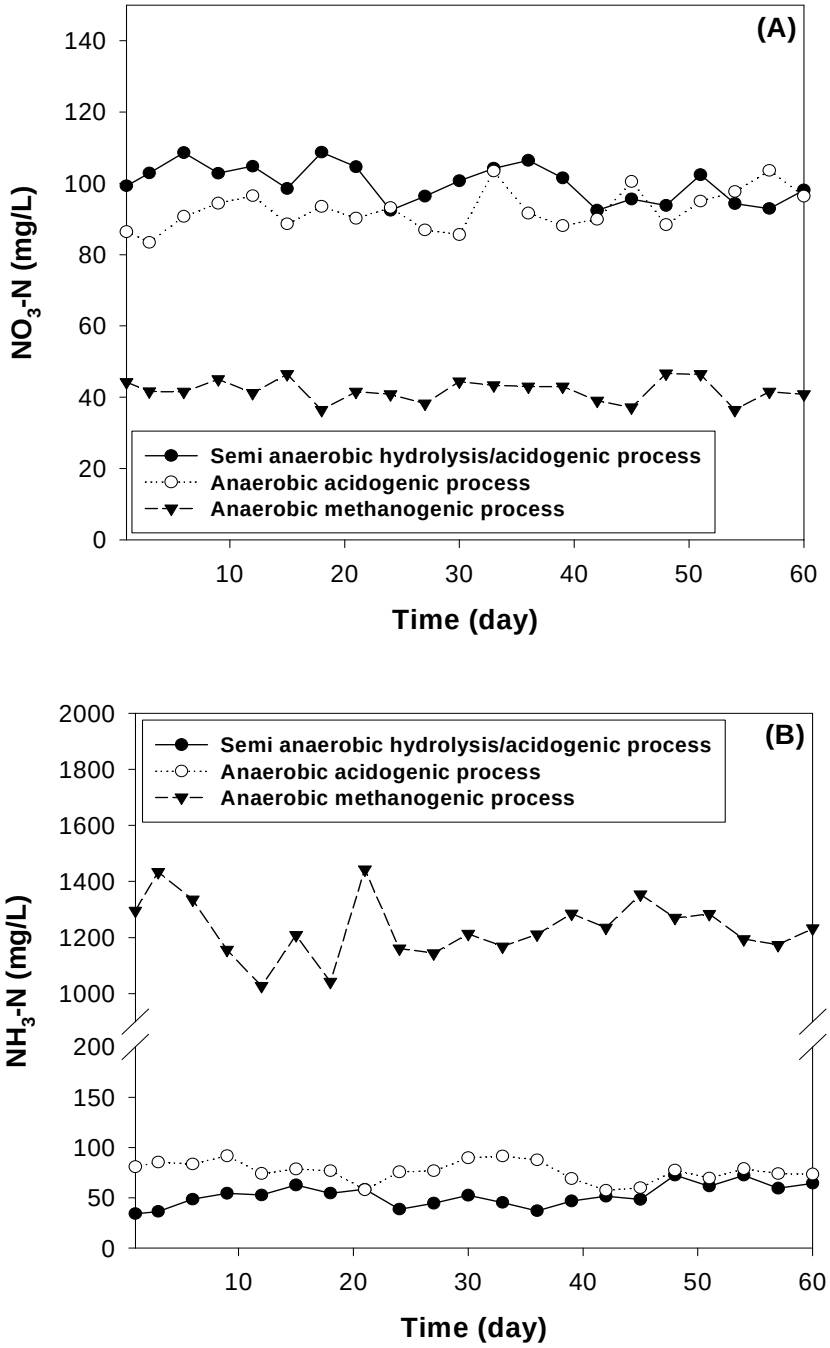


Fig. 42. Changes of NO_3-N (A) and NH_3-N (B) concentrations in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system.

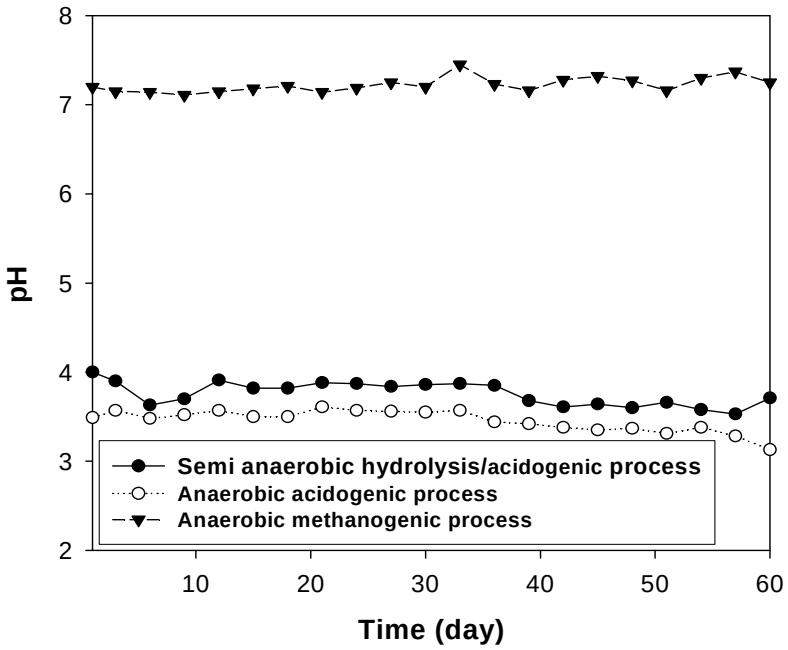


Fig. 43. Changes of pH in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system.

Table 14. Organic acid production in the 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system

Organic acid	Semi anaerobic hydrolysis/acidogenic process	Anaerobic acidogenic process	Anaerobic methanogenic process
Acetic acid(mg/L)	779	986	497
Propionic acid(mg/L)	53	62	181
Butyric acid(mg/L)	13	46	49
Lactic acid(mg/L)	5,403	13,426	422
Valeric acid(mg/L)		40	
Caproic acid(mg/L)			
Total acid(mg/L)	6,248	14,560	1,149

전체적인 공정이 끝난 후 음식물의 tCOD값에 대해 평균 90.6%의 COD가 제거되었고, 대부분이 CO_2와 CH_4 형태의 가스로 배출되었거나 혹은 미생물 성장의 탄소원으로 이용되었다. 또한 총질소의 농도는 일부가 N_2로 배출되어 평균 3714 mg/L으로 유지되고 있으며 완전한 혐기상태의 유지로 인하여 암모니아성 질소의 농도가 1231 mg/L로 대부분의 유기성 질소가 암모니아성 질소로 전환되는 것으로 관찰되었다. 또한 pH는 7.2로 유지되었다.

(5) 3단계 메탄 발효공정에서 발생하는 유기산 분석

Table 14는 3단계 메탄 발효공정에서 발생하는 유기산을 나타낸 표이다.

1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서는 약 6248 mg/L의 유기산이 발생하였고, 이 가운데 lactic acid가 약 5400 mg/L를 나타내고 다음으로 acetic acid가 약 780 mg/L을 생성하였다. 2차 혐기성 산 발효조에서는 산생성미생물들에 의해 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 보다 많은 유기산을 생성하여 총유기산 생성량은 14560 mg/L이었고, 1차공정에서와 마찬가지로 lactic acid의 생성량이 약 13400 mg/L로 가장 높았으며, 다음으로 acetic aicd, propionic acid, butyric acid, valeric acid 순으로 나타났다. 3차 혐기성 메탄 발효조의 경우 1, 2차 공정에 의해 생성된 유기산을 이용하여 메탄을 생성하는 공정이므로 유기산양이 1, 2차 공정에 비해 현저히 감소함을 보여주고 있다.

(6) 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석

3차 혐기성 메탄 발효조로 유입된 2차 산 발효액이 이 공정에서 12일간의 체류시간을 갖는 동안 메탄생성균이 메탄을 생산한다. 안정화 초기에는 주위 환경에 민감한 메탄생성균의 활성이 낮아 가스발생량도 저조하며 발생가스 성분 중 메탄의 함량 또한 50% 정도로 낮은 함량을 보였다. 하지만 안정화가 진행되면서 메탄생성균이 유기물을 분해함과 동시에 가스발생양도 증가하여 일일 발생가스량은 평균 2.8 m^3/day였고, 이와 더불어 메탄함량도 증가하여 발생가스 중 메탄함량이 최고 72%로 증가하였다 (Fig. 44).

Table 15은 상기 설명한 2.5 m^3 메탄 발효시스템의 운전 조건 및 결과들을 정리하여 나타낸 표이다.

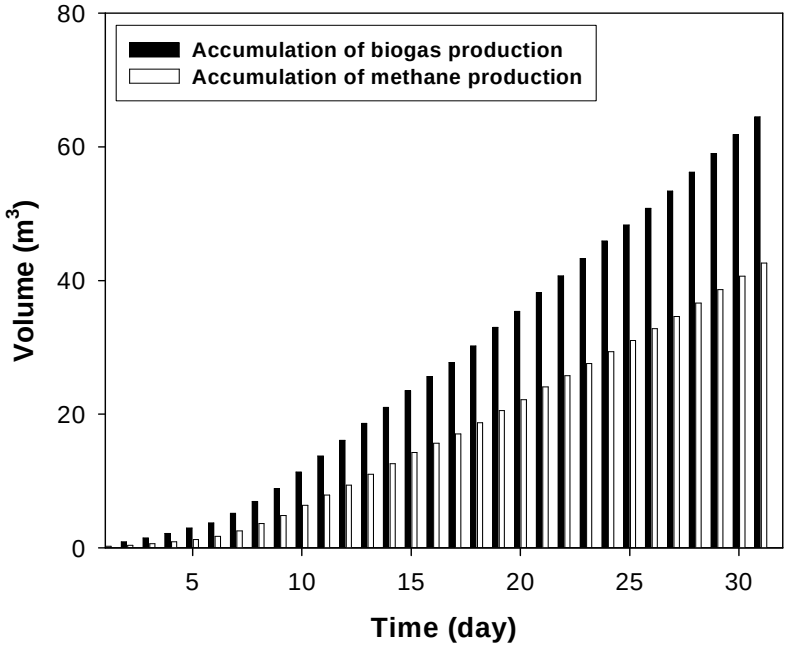


Fig. 44. Accumulative gas and methane production in the 1.5 m^3 methane reactor.

Table 15. Operational conditions and performance of 2.5 m^3 three-stage methane fermentation system

Parameter	First stage	Second stage	Third stage
HRT (d)	2	2	12
Loading (kg VS/[m^3d]	103.5	63.4	52.8
pH	3.8	3.45	7.2 ~ 7.9
Temperature(℃)	45	35	50
T-N(mg/L)	4542	4046	3538
NH_3-N(mg/L)	52.2	76.7	1231
COD (mg/L)			
TCOD	71234	63972	7394
(Removal rate)			(90.6%)
sCOD	27569	30080	2400
Gas yield (L/kg COD)	-	-	282
Gas composition(%)			
CH_4	-	9	72
CO_2	-	91	28
Methane yield (L/kg COD)	-	-	245
Volatile acids (mg/L)			
Acetic	779	986	497
Propionic	53	62	181
Butyric	13	46	49
Valeric	0	40	0
Caproic	0	0	0
Lactic	5403	13426	422
Total	6248	14560	1149

제 4 절 다양한 재생가능 폐기물의 처리시 발효 효율 검토

1. 실험재료 및 방법

가. 사용된 재생가능 폐기물의 종류

본 실험에 사용된 재생가능 폐기물은 음식폐기물, 우분, 농산부산물, 돈분과 폐슬러지를 사용하였다. 음식폐기물의 경우 현재 본 연구자가 속한 실험실에서 운전중인 음식물쓰레기의 혐기성 소화공정인 3단계 메탄 발효시스템 가운데 2차 혐기성 산 발효조의 발효 후 유출액을 사용하였고, 우분의 경우 광주광역시 외곽에 소재한 축산농가에서 발생하는 우분을 물과 1:1로 혼합하여 사용하였으며, 농산부산물의 경우 광주광역시 농산물시장에서 발생하는 야채를 수집하여 본 실험실의 음식물 파쇄기를 이용하여 잘게 분쇄한 후 우분과 마찬가지로 물과 1:1로 혼합한 뒤 실험에 사용하였다. 그리고 돈분의 경우 전라남도 화순군에 소재한 양돈장에서 발생하는 돈분을 물과 1:1로 혼합하여 사용하였으며, 폐슬러지의 경우 본교 폐수처리장에서 농축조를 지나고 탈수되어 나온 폐슬러지를 물과 1:1의 비율로 혼합한 후 실험에 사용하였다.

나. 재생가능 폐기물들의 성상 변화 및 소형 메탄 발효조 운전

본 실험에 사용된 메탄 발효조는 제 2 장 제 3 절 나와 다에서 사용된 총 용적이 11 L인 소형 메탄 발효조를 사용하였다. 발효조의 운전은 회분식으로 수행하였으며 시료와 접종액을 1:1의 비율로 하고 유효용적이 8 L로 하여 50℃로 운전하였다. 실험에 사용된 접종액은 현재 본 연구자가 속한 실험실에서 운전중인 음식물쓰레기의 혐기성 소화공정인 3단계 메탄 발효시스템 가운데 3차 혐기성 메탄 발효조내의 발효액을 사용하였다. 접종액에는 우변, 매립지토양으로부터 채취한 메탄생산세균을 포함하고 있다.

회분식실험이 진행되는 동안 유기성 폐기물의 pH, 가스발생량 및 COD, TS, VS

가 측정하였다. 각각의 실험방법은 pH는 pH meter로, COD는 Cr법으로, TS와 VS는 standard method으로, 발효조에서 발생하는 가스량은 가스유량계를 이용하여 측정하였다. 또한 각각의 유기성 폐기물의 성상은 음식폐기물의 경우 pH는 4.53, 고형물 함량은 1.6%이며, 이 가운데 유기물 함량은 70.6%로 나타났으며, 우분의 경우 pH는 8.46, 고형물 함량은 12.83%이며, 이 가운데 유기물 함량은 80.9%로 나타났으며, 농산부산물의 경우 pH는 6.76, 고형물 함량은 3.78%이며, 이 가운데 유기물 함량은 59.3%로 나타났다. 또한 돈분의 경우 pH는 7.14, 고형물 함량은 14.05%이며, 이 가운데 유기물 함량은 72.7%로 나타났으며, 폐슬러지의 경우 pH는 7.7, 고형물 함량은 6.08%이며, 이 가운데 유기물 함량은 64.8%로 나타났다.

2. 결과 및 고찰

가. 각종 재생가능 폐기물의 성상 변화

Fig. 45는 각종 재생가능 폐기물 처리의 회분식 실험기간 중 각각의 혐기성 메탄 발효조 내의 pH의 변화를 나타내었다. 음식폐기물의 경우 산 발효후의 발효액인 4.53의 pH가 접종액과 혼합된 후 초기 6.31에서 시료내의 유기산을 이용하는 혐기성 발효가 진행됨에 따라 pH가 점점 상승하고 있음을 관찰하였고 pH가 8.0 ~ 8.2를 유지하는 것이 확인되었다. 우분과 돈분의 경우 혐기성 메탄 발효조 내에서 시료의 산 발효와 메탄 발효가 동시에 진행됨에 따라 각각 7.67과 7.23의 최초 pH에서 실험초기에 산 발효의 우세에 의한 유기산 생성으로 인해 pH가 약간 감소한 뒤 다시 시료내의 자체 알칼리도와 메탄 발효가 진행됨에 따라 pH는 서서히 증가하여 7.5 ~ 8.0의 pH가 유지되는 것이 관찰되었다.

반면에 농산부산물과 폐슬러지의 경우 발효조 내에서 산 발효와 메탄 발효가 동시에 일어나지만 산 발효 보다는 메탄 발효가 더 활발히 진행되어 발효조 내의 유기산축적이 일어나지 않아 초기 pH의 감소경향이 없이 서서히 pH가 증가하는 것이 관찰되었다.

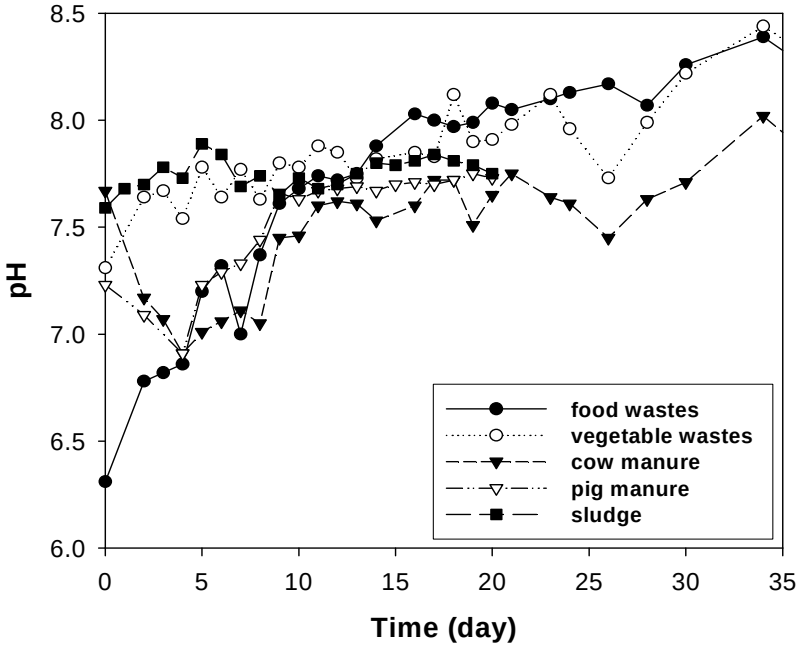


Fig. 45. pH changes in the anaerobic methane fermentor using different organic wastes.

Fig. 46의 (A), (B), (C)는 각종 유기성 폐기물의 고형물 분해 특성을 나타낸 것이다. 돈분의 경우 고형물의 농도는 다른 유기성 폐기물에 비해 상대적으로 높지만 시료의 특성상 비교적 분해되기 쉬운 고형물로 이루어져 실험초기부터 빠른 고형물 분해가 이루어지는 것을 관찰할 수 있었고 계속해서 분해가 진행되는 것을 알 수 있었다. 하수슬러지의 경우 돈분과 같이 초기에 빠른 분해가 이루어졌지만 4일 이후부터는 고형물의 분해가 더디게 이루어지는 것으로 관찰되었다. 우분의 경우 원시료의 고형물농도는 돈분과 비슷하였다. 그러나 접종액과 섞인 후 짚더미와 기타 고형물이 완전히 혼합되지 않아 발효조 하부에 축적됨으로써 시료 채취구로부터 나온 시료의 고형물 농도는 예상보다 훨씬 낮게 나타났으며 실제 초기 농도는 더 높을 것으로 예상된다. 분해경향은 실험중반까지는 고형물의 분해가 꾸준히 일어나는 것을 알 수 있었고, 실험 중반 이후 고형물 분해가 더디게 진행되는 것이 관찰되었다. 이것은 우분의 성상가운데에는 짚더미와 같은 Cellulose 성분의 난분해성 물질을 다량 함유하고 있어 고형물 분해 및 유기물의 제거가 늦어진 것으로 생각된다.

농산부산물의 경우 반응조 운전기간 18일 이후부터 본격적인 고형물 분해와 유기물 제거가 이루어지는 것이 관찰되었다. 음식폐기물의 경우 다른 유기성 폐기물에 비해 고형물함량이 낮아 고형물 분해가 완만한 경향을 보였다.

그러나 Fig. 46의 (C)에 나타난 바와 같이 음식 폐기물의 경우 주성분이 유기산으로 되어 있어 유기물의 분해가 가장 빠른 비율로 일어나고 있음을 알 수 있다. 또한 돈사 폐기물의 경우 유기물의 감소 뿐 만 아니라 고형물의 분해도 급속히 이루어짐에 따라 고형물내의 유기물의 농도비율이 완만한 것으로 판단된다.

Fig. 47과 48은 각종 유기성 폐기물 처리의 회분식 실험기간 중 각각의 혐기성 메탄 발효조내에서 발생하는 가스생산량과 sCOD의 변화를 나타내었다. Fig. 47과 48에 나타난 바와 같이 상대적으로 유기물 함량이 떨어진 농산부산물의 경우 가장 낮은 가스발생량을 보여주고 있으며 또한 sCOD 제거시기에 있어서 다른 유기성 폐기물에 비해 상대적으로 매우 늦게 떨어짐을 알 수 있었다.

농산부산물의 경우 주성분이 유기물 가운데 분해하기 어려운 Cellulose 성분으로 구성되어 있으므로 분해속도가 떨어지는 것으로 생각되며 이에 따라 발생하는 가스량 또한 적은 것으로 생각된다. 반면 음식폐기물의 경우 고형물 및 유기물 함량은 우분에 비해 다소 떨어지지만 실험에 사용된 시료의 특성이 산 발효를 거치고

나온 발효액이고 주성분이 메탄생성균의 성장에 유용한 유기산이므로 메탄생성균의 기질 이용측면에서 우분에 비해 더 많은 가스발생량을 보였으며, sCOD의 감량에 있어서도 우수한 효과를 나타내었다.

우분의 경우 높은 유기물함량으로 인해 초기 가스발생량이 농산부산물에 비해 높았으며 우분의 성상이 앞서 말한바와 같이 Cellulose 성분 많이 포함되어 있어 이와 같은 물질의 분해로 인해 실험 종반부에 농산부산물의 분해가 일어나는 시기와 유사하게 바이오가스가 생산되는 것으로 사료된다. 유기물함량이 높으며 시료의 특성이 분해되기 쉬운 것으로 이루어져 있는 돈분의 경우 가장 많은 가스를 발생하고 있다. sCOD의 경우 초기 sCOD의 농도가 증가하는 것이 관찰되었다. 이는 Fig. 46의 고형물 분해와 비교해 볼 때 급속한 고형물 분해가 일어남에 따라 분해된 고형물이 유기산과 같은 용해성 유기물의 형태로 전환되어 정상적인 메탄 발효가 진행됨에도 불구하고 유기산이 메탄생성세균에 의해 모두 가스화 되지 못하고 잔여 유기산으로 존재하게 되는 것으로 사료된다. 그러나 이들의 분해가 이루어짐에 따라 차츰 sCOD의 농도가 감소하고 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 알 수 있듯이 재생가능 폐기물 가운데 음식폐기물과 돈사 폐기물은 혐기성소화에 적합한 기질로 판단되며, 축산폐기물의 경우 시료내에 포함된 농산부산물의 파쇄와 같은 전처리가 필요하고, 하수슬러지의 경우 슬러지의 단독소화보다는 유기물의 제거 및 바이오가스 생산을 증가하기위해 다른 재생가능 폐기물과 혼합하여 처리하는 것이 보다 효과적으로 사료된다.

또한 Sung 등[80]의 결과에 의하면 하수슬러지 및 축산폐수의 단독소화보다 음식폐기물을 투여했을 경우 유기물제거율 및 바이오가스 발생량이 증가하였다고 보고한 바 있다. 따라서 하수슬러지와 같이 발효효율이 떨어지는 재생가능 폐기물의 경우 음식폐기물 또는 돈사폐기물과 같이 혐기성 소화에 적합한 기질과 혼합하여 처리함으로써 효과적은 처리를 꾀함과 동시에 고농도의 재생가능 폐기물을 상대적으로 저농도인 하수슬러지와 혼합함으로써 처리하는 유기물 농도가 희석되기 때문에 처리농도의 부하량을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

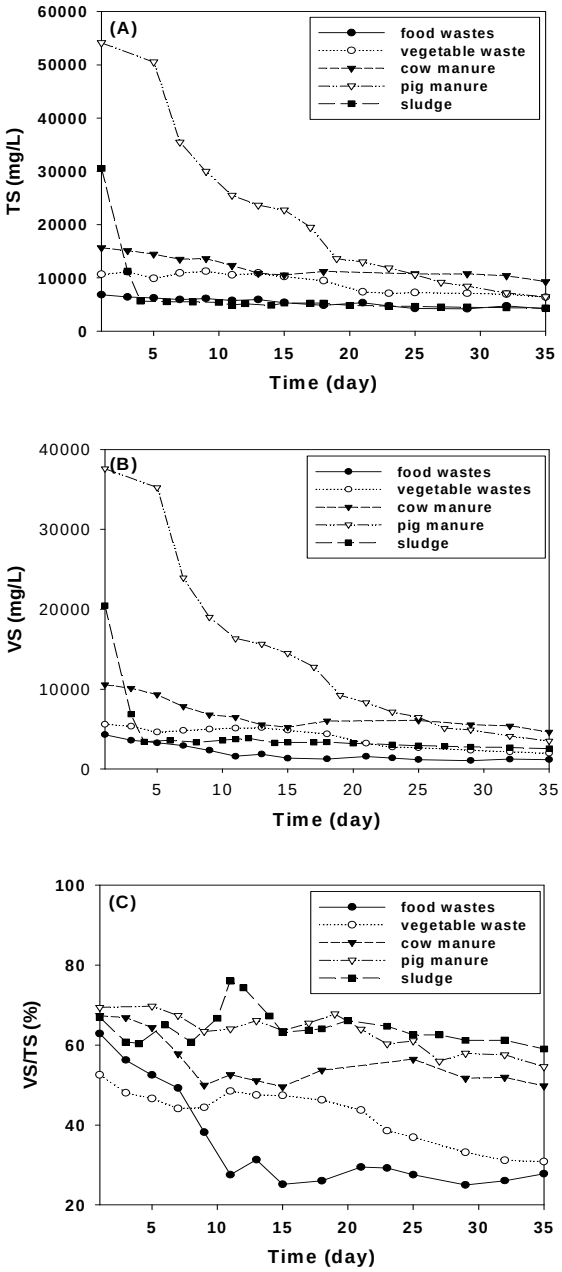


Fig. 46. TS (A), VS (B), and VS/TS (C) changes of different organic wastes in the anaerobic methane fermentor.

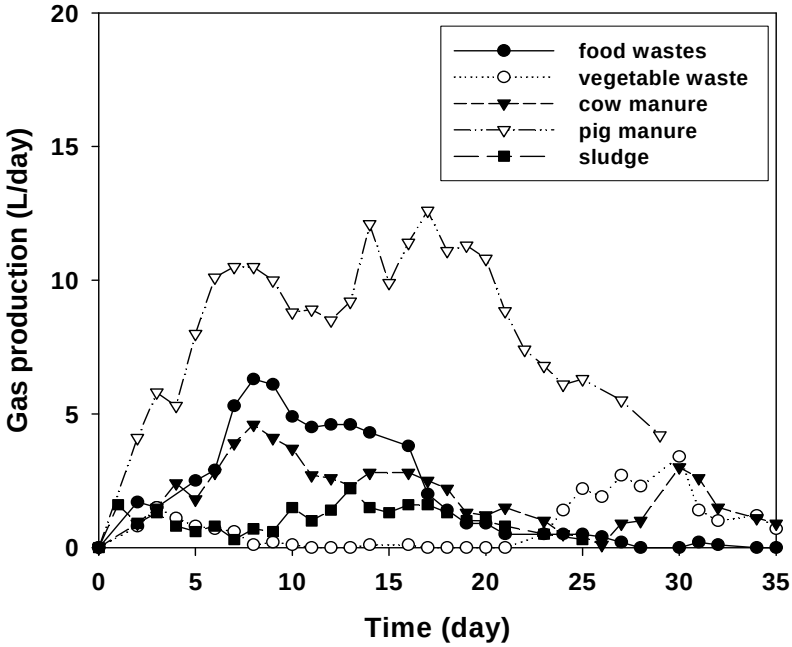


Fig. 47. Gas production in the anaerobic methane fermentor from various organic wastes.

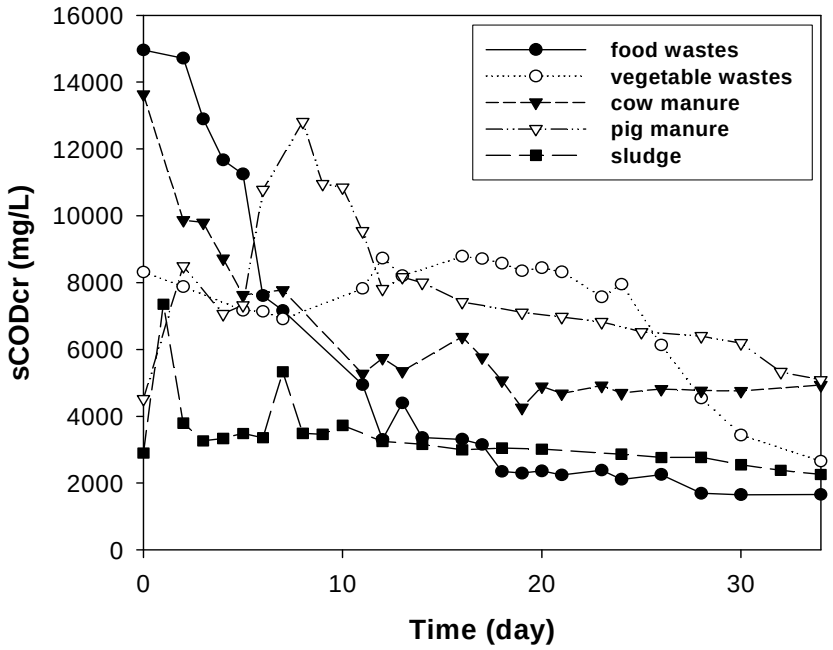


Fig. 48. sCOD changes of various organic wastes in the anaerobic methane fermentor.

제 5 절 10 m^3 규모 Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효 시스템의 설계 및 제작

1. Pilot-scale 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 구성

본 연구에서는 2 m^3 크기의 1차 및 2차 발효조와 6 m^3의 3차 발효조 등 총 10 m^3 규모의 Pilot-scale 집약형 3단계 메탄 발효시스템을 설계 및 제작하여 설치하였으며, Fig. 49에서 58 까지는 각각 발효시스템이 설치될 건물내의 발효시스템 배치도, 발효시스템에 대한 전체 모식도와 설치될 3단계 메탄 발효시스템의 설계 도면 및 사진들이다.

수거된 음식 폐기물을 Fig. 54에 나타낸 파쇄기를 이용하여 5 mm 이하의 미세한 입자로 분쇄한다. 이번에 제작된 파쇄기는 김치와 같은 야채의 분쇄를 좀 더 용이하게 분쇄하기 위하여 스크류를 이용하여 음식물을 파쇄기 앞면으로 이동시키면서 스크류와 함께 회전하는 칼날로 잘게 분쇄하도록 제작하였고, 파쇄기 하단에 분쇄된 음식물을 받아낼 수 있는 저장통을 설치하였다. 또한 저장통에 진공펌프를 부착하여 파쇄기 작동과 함께 진공펌프를 작동함으로써 분쇄된 음식물이 저장통으로 쉽게 떨어지도록 하면서 동시에 파쇄 중 발생하는 악취를 흡입함으로써 악취를 최소화 하였다. 파쇄기 하단의 저장통으로 떨어진 분쇄된 음식물은 이송펌프를 이용하여 음식물 저장조 (Fig. 59)로 이동된다. 음식물 저장조로부터 인버터와 정량펌프에 의해 일정한 속도로 1차 가수분해/산 발효조의 상단부로 투입되도록 하였다. 투입된 음식 폐기물은 1차 가수분해/산 발효조내에서 발효되어 UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) type의 2차 산 발효조의 하단 부위를 통하여 유입되도록 하였다. 이 때 1차 가수분해/산 발효조로부터 2차 산 발효조로의 이송은 2.5 m^3 규모의 소규모 집약형 메탄 발효시스템에서 나타난 이송과정 중 막힘 현상을 해결하기 위해 인버터와 정량펌프를 이용하여 일정한 속도로 2차 산 발효조의 하단부로 유입하도록 하였다. 2차 발효된 발효액 역시 UASB type 3차 메탄 발효조의 하단부로 인버터와 정량펌프를 이용하여 일정한 속도로 유입되도록 하였다. 메탄 발효 후 발생하는 발효액은 집수조에 수집되고 집수조로부터 다시 일정한 속도로 폐수처리조로 유입되도록 설계하였다. 폐수처리조에서는 잔여 유기물, 질소 및 인성분이 제거된다.

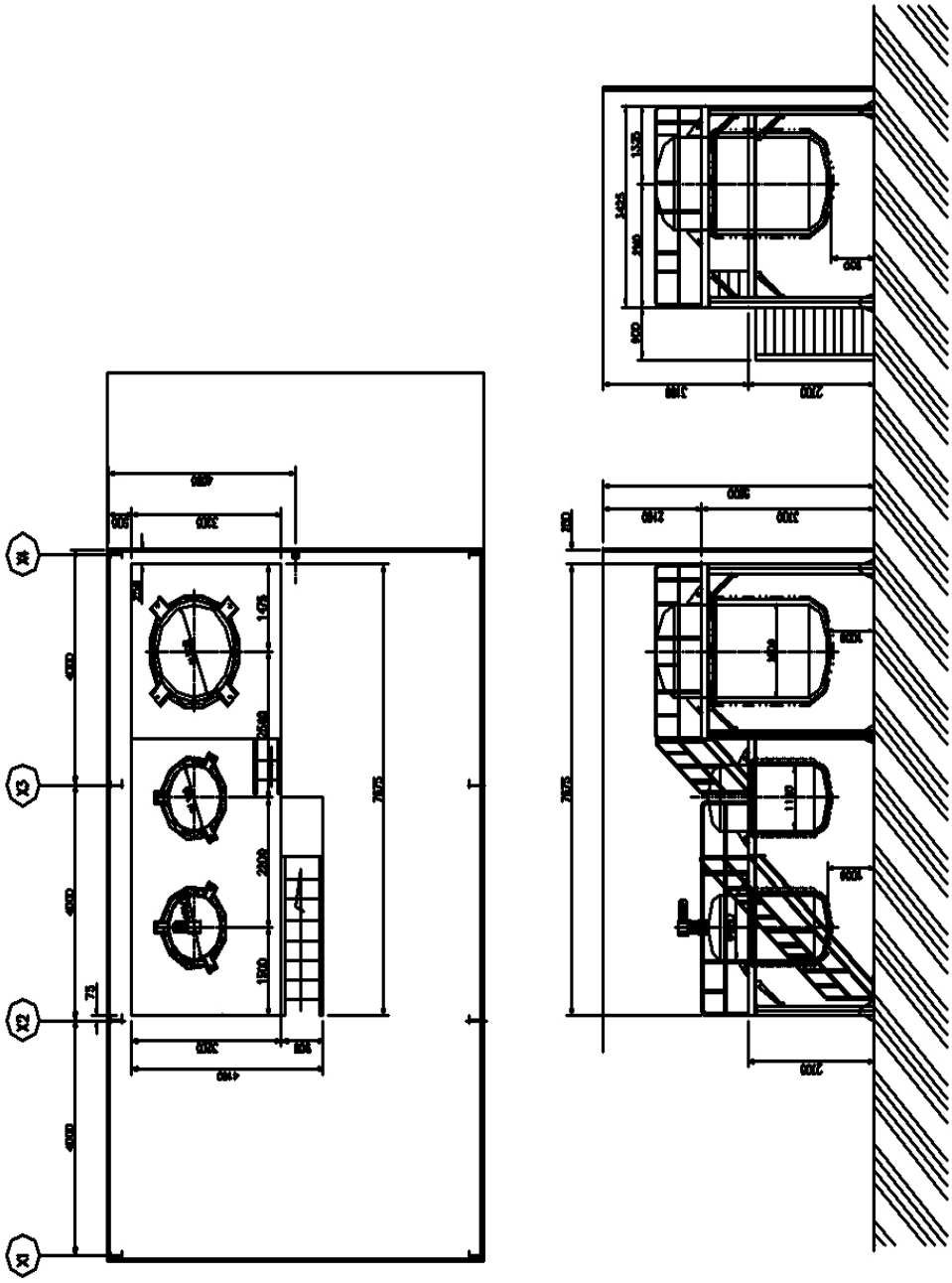


Fig. 49. Schematic diagram showing the for arrangement of each reactor in the building.

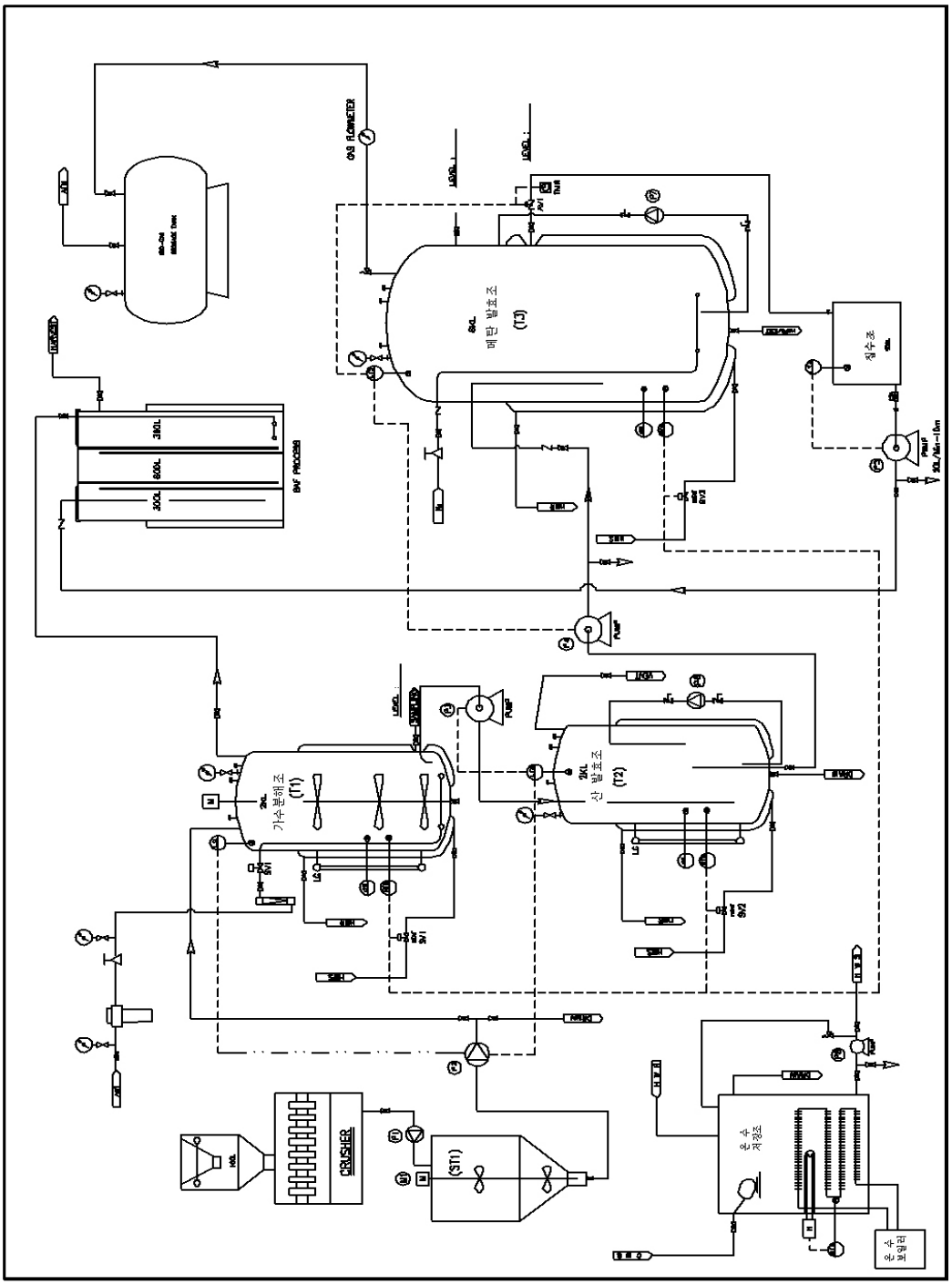


Fig. 50. Schematic diagram of pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

Fig. 51. Pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

또한 3차 메탄 발효조에서 생성되는 메탄가스는 설정된 일정 압력까지 메탄 발효조에서 유지되었다가 일정 압력이상이 되면 발효조의 상부에 설치된 자동 밸브가 열림과 동시에 발생된 메탄가스를 메탄가스 저장 탱크로 운반하여 저장하였다. 저장된 가스는 발효공정 온도제어를 위한 보일러 (Fig. 60)의 연료로 사용한다.

각 공정내에는 초음파를 이용한 level gauge가 설치되어 이 신호에 의해 각각의 공정에 장착된 정량펌프가 자동으로 작동하도록 설계하였으며 발효액의 유량제어는 유량조절이 가능한 정량펌프와 timer를 설치하여 조절이 가능하도록 설계하였다. 또한 control system을 별도로 설치하여 발효조내의 pH를 관찰하고 발효조 내부 온도와 발효액의 이동 상태를 모니터링하고 조절할 수 있도록 설계하였다.

2. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 구성과 제작

Fig. 52와 53은 가수분해/산 발효조의 설계도면과 반응기의 외부사진이다. 이 발효조는 내부용량이 2 m^3 규모로 되어있으며 내부에는 모터를 이용하여 교반할 수 있게 하였고 교반 속도는 인버터에 의해 조절이 가능하도록 제작하였다. 콤프레셔를 이용하여 반응기의 하단부에 설치된 blower를 통해 공기를 불어넣도록 제작하였다. 반응기내의 발효액 pH와 반응기 내부 온도는 반응기에 설치된 pH meter와 온도 측정계에서 감지하여 control system에 나타나도록 하였으며 설정된 온도를 유지하기 위해 3차 메탄 발효조에서 발생하는 가스를 보일러에서 연소하여 온수를 만든 후 이를 이중 water jacket으로 보내면서 순환되도록 구성하였다. 또한 겨울철 발효조의 보온을 위해 반응기의 외벽을 보온재로 처리 하였다. Fig. 54는 파쇄기를 나타내는 사진이다. 파쇄기 상부로 물과 1:1로 혼합한 음식물 쓰레기를 주입하여 스크류를 통해 파쇄기 앞으로 이동시켜 스크류와 함께 회전하는 칼날에 의해 잘게 부순 후 파쇄기 하단의 저장통으로 떨어뜨린다. 파쇄기에 의해 미세하게 분쇄된 유기성 폐기물을 음식물 저장조로 이동 시키고 음식물 저장조로부터 일정한 속도로 1차 발효조내로 유입한다.

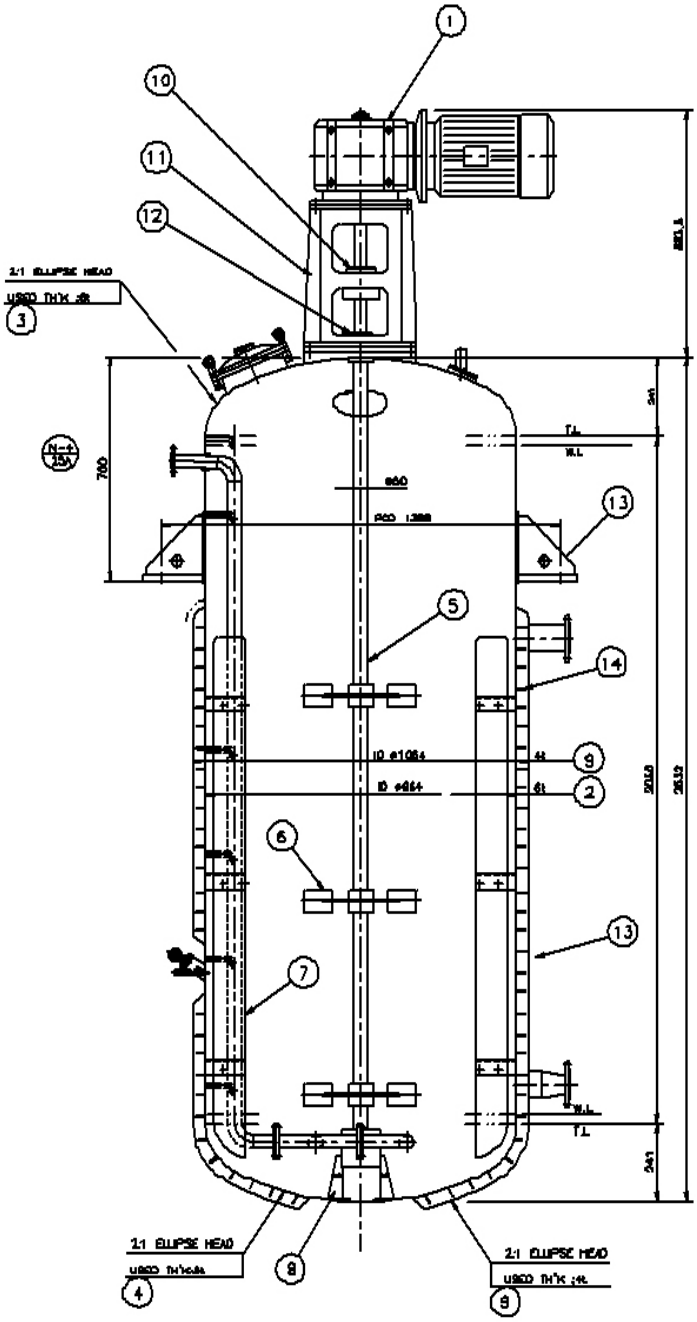


Fig. 52. Schematic diagram of 2 m^3 semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

Fig. 53. Semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor (0.5 m^3) for hydrolysis of food waste.

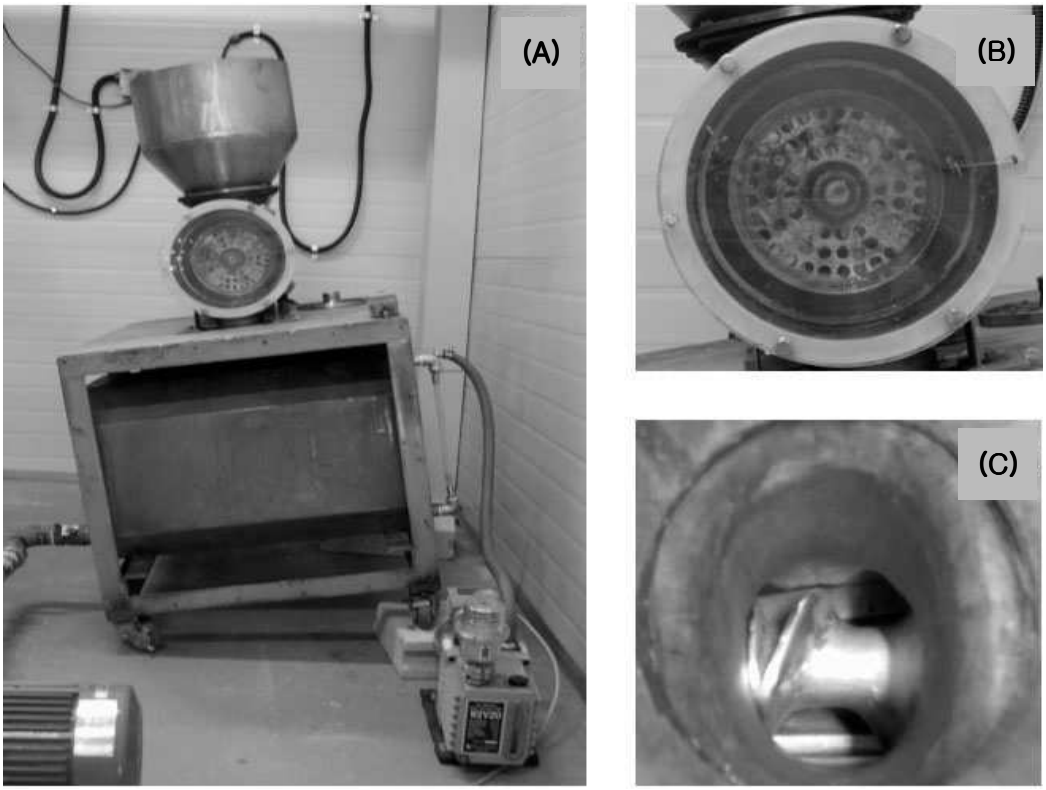


Fig. 54. Crusher used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system; (A) A lateral view of crusher, (B) A frontal view of crusher, (C) A screw of crusher.

3. 2차 혐기성 산 발효조의 구성과 제작

Fig. 55와 56에 2차 혐기성 산 발효조의 설계도면과 반응기의 사진을 나타내었다. 내부용적은 2 m^3 규모로 UASB 형태로 구성되어 있으며 1차 발효조로부터 인버터와 정량펌프를 이용하여 일정하게 반응기 하부로 유입되도록 제작하였다. 또한 반응기 측면에 내부 순환을 할 수 있도록 내부순환펌프를 설치하여 일정 시간동안 반응기내의 발효액을 내부순환 시킴으로서 발효액 상단에 스컴이 끼는 것을 방지하고 혐기성 반응기의 특성상 교반 장치의 설치가 어려우므로 교반의 효과를 얻을 수 있도록 하였다. 반응기내의 발효액 pH와 반응기 내부 온도는 반응기에 설치된 pH meter와 온도 측정계에서 감지한 pH와 온도가 control system에 나타나며 설정된 온도를 유지하기 위해 3차 메탄 발효조로부터 발생하는 가스를 연소하는 보일러를 이용하여 온수를 만든 후 이중 water jacket으로 물을 순환시키도록 구성되어 있다. 또한 겨울철 발효조의 보온을 위해 반응기의 외벽을 보온재로 보온처리 하였다.

4. 3차 혐기성 메탄 발효조의 구성과 제작

Fig. 57과 58은 3차 혐기성 메탄 발효조의 설계도면과 반응기의 사진이다. 내부용적은 6 m^3 규모로 2차 혐기성 산 발효조의 구조와 유사하게 UASB 형태로 구성되어 2차 발효액이 발효조의 하단 부위로 유입되도록 제작하였다. 또한 2차 산 발효조와 마찬가지로 반응기 측면에 발효액이 내부 순환을 할 수 있도록 순환펌프를 설치하여 일정 시간동안 발효액을 내부순환시킴으로써 발효액 상단에 스컴이 끼는 것을 방지하고자 하였다. 이는 혐기성 반응기의 특성상 교반 장치의 설치가 어려우므로 교반의 효과를 얻기 위함이다. 반응기내의 발효액 pH와 반응기 내부 온도는 반응기에 설치된 pH meter와 온도 측정계에서 감지한 pH와 온도가 control system에 나타나도록 하였으며 설정된 온도를 유지하기 위해 3차 메탄 발효조로부터 발생하는 가스를 보일러에서 연소하여 온수를 만든 후 이중 water jacket에서 물이 순환되도록 하였다. 또한 겨울철 발효조의 보온을 위해 반응기의 외벽을 보온재로 처리 하였다.

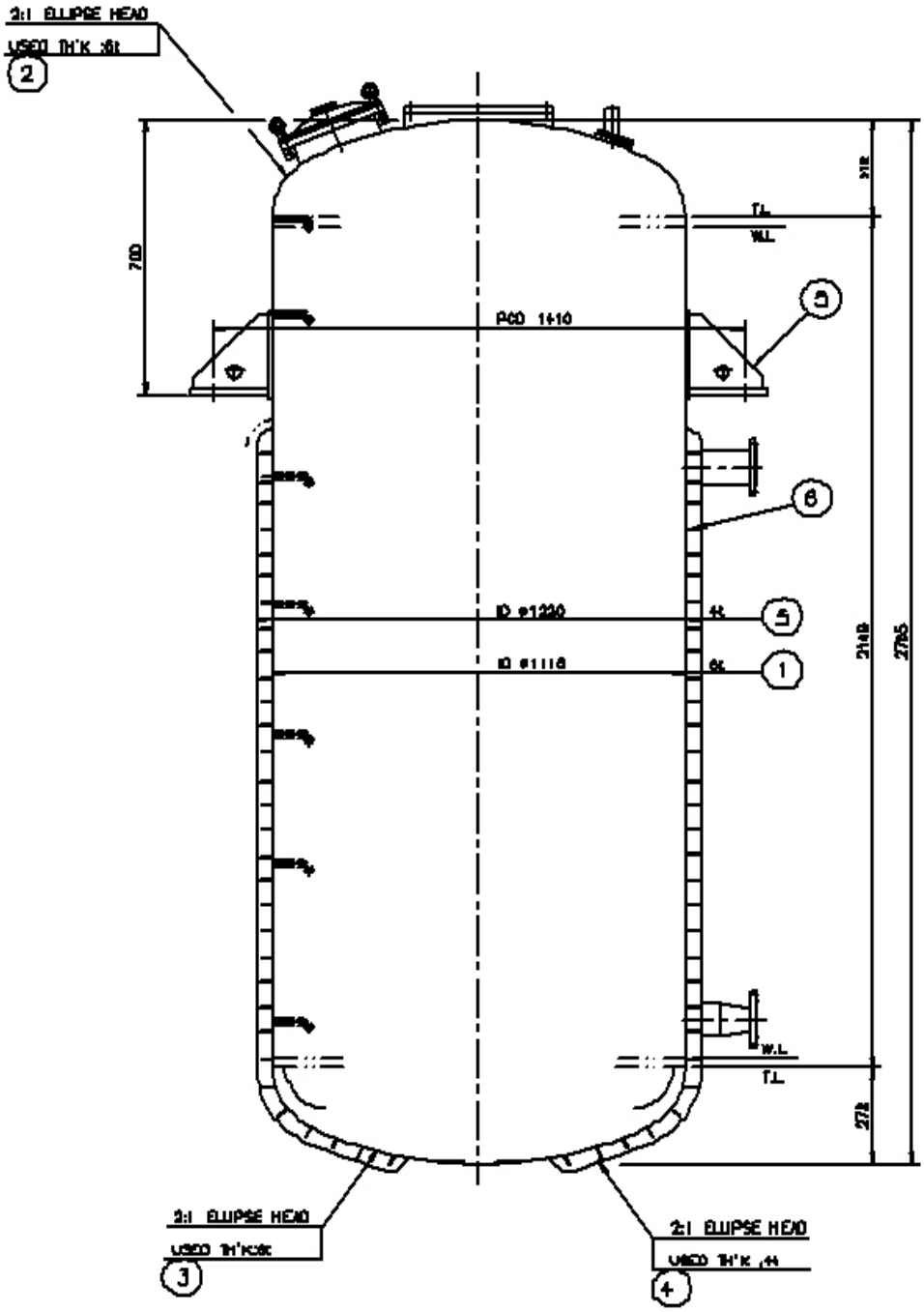


Fig. 55. Schematic diagram of 2 m^3 anaerobic acidogenic reactor.

Fig. 56. Anaerobic acidogenic reactor (2 m^3) for organic acid production from effluent of semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic reactor.

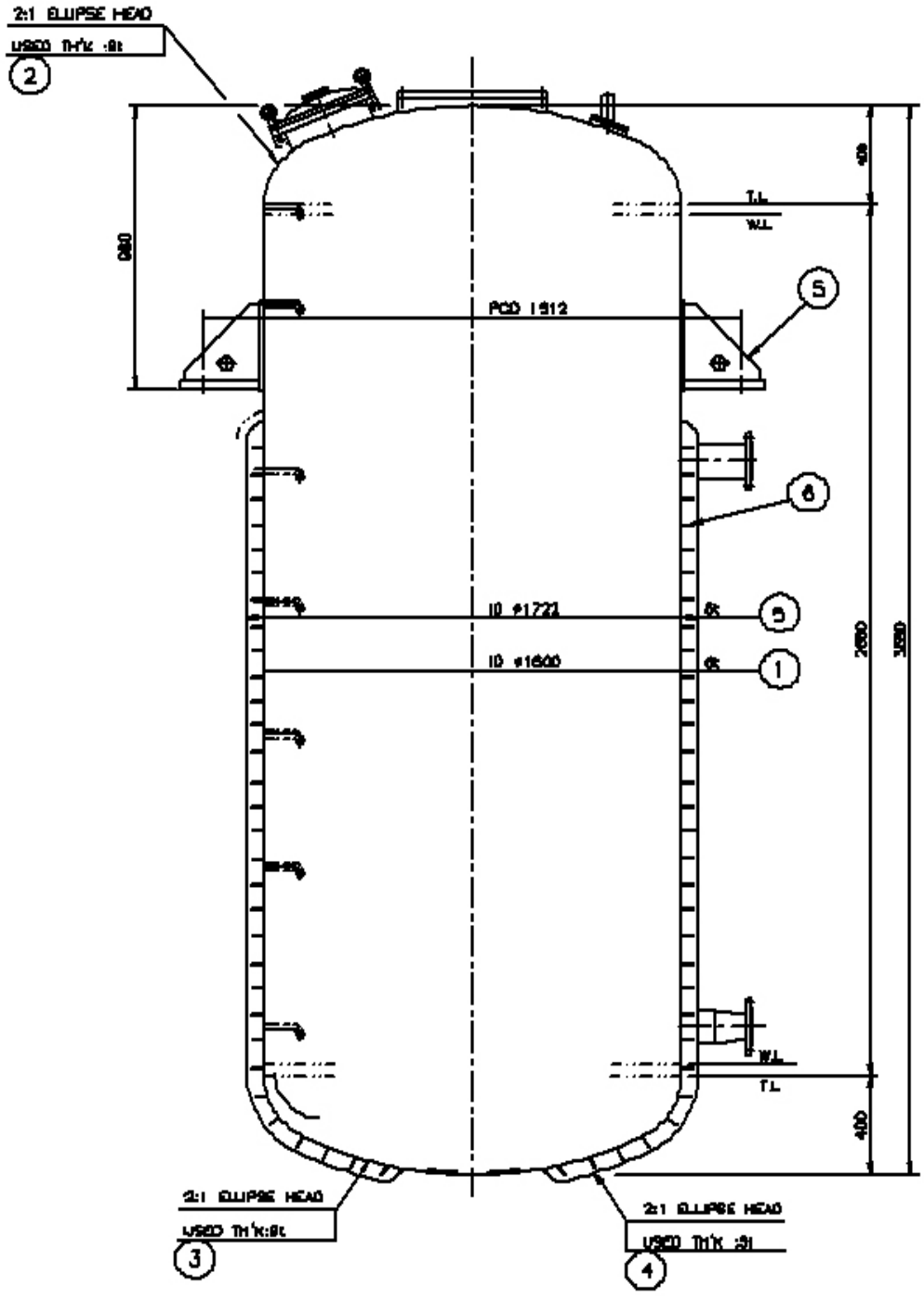


Fig. 57. Schematic diagram of 6 m^3 anaerobic methanogenic reactor.

Fig. 58. Anaerobic methanogenic reactor (6 m^3) for methane production from effluent of anaerobic acidogenic reactor.

Fig. 59. Food wastes reservoir (1 m^3) used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

Fig. 60. Gas boiler system for combustion of biogas produced from methanogenic reactor.

고효율의 메탄생성을 위해 발효조의 중심부에 HBC (Hanging Bio Contactor) Ring을 설치하고 메탄생성균을 고정화하도록 제작하여 발효 후 배출되는 유출수로 빠져나가는 메탄생성균의 양을 최소화하였다 (Fig. 17). 그리고 발효기의 상층부에 일정압력이상이 되면 자동으로 가스가 배출되도록 자동 valve를 설치하여 생성된 메탄을 저장탱크로 이동시키는 시스템을 구축하였다. 발효 후 배출되는 유출수는 집수조에 유입되며 이곳에 설치된 level gauge의 신호를 시작으로 전체적인 발효액의 이동이 자동 제어된다.

5. 메탄 저장 탱크 설계 및 제작

Fig. 61과 62는 3차 혐기성 메탄 발효조로부터 발생되는 메탄가스를 저장하는 메탄저장탱크의 설계도면과 모식도 및 제작된 메탄저장탱크의 사진을 나타낸 것이다. 저장탱크의 체적은 직경과 높이에 의해 산출하여 설계하였다.

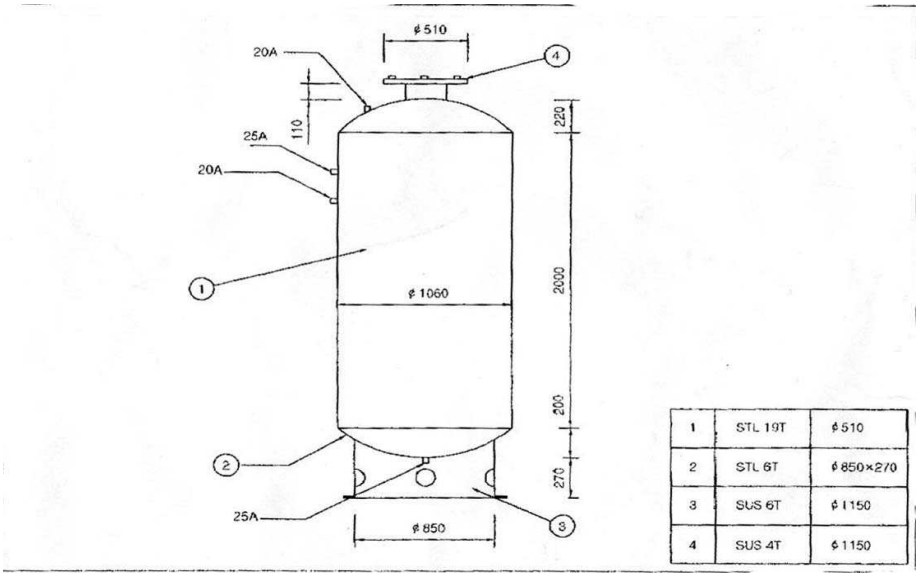
메탄저장탱크의 원통부의 내부직경을 1.06 m, 원통부의 길이 2.42 m, 경판의 내부 반지름 0.53 m, 경판의 높이를 0.21 m로 하고 저장탱크의 최대 허용압력을 7 kgf/cm^{2}인 stainless 재질의 메탄저장탱크 1기와 메탄저장탱크의 원통부의 내부 직경을 1.0 m, 원통부의 길이 1.7 m, 경판의 내부 반지름 0.5 m, 경판의 높이를 0.15 m로 하고 저장탱크의 최대 허용압력을 7 kgf/cm^{2}인 stainless 재질의 메탄저장탱크 1기를 각각 설계 및 제작하였다. 제작된 2기의 메탄저장탱크는 병렬로 연결하였다.

위의 조건일 경우 저장온도가 20℃로 상온일 때 최대 메탄 저장량은 식 (1)에 의해 다음과 같이 계산된다.

$$Q = (V1 + V2) \times \frac{p}{p'} \times \frac{T'}{T} \qquad (1)$$

$$= (2.38 + 1.38) \times (7/1.0332) \times (273/293) = 23.7 \text{ m}^3$$

Q : 최대 메탄 저장량 (m^3),
$V1$: 첫 번째 저장탱크의 체적
$V2$: 두 번째 저장탱크의 체적
p : 메탄저장탱크 저장 압력 (kgf/cm^2)
p' : 기준상태의 압력 (1.0332 kgf/cm^2)
T : 메탄저장 온도 (K)
T' : 기준상태의 온도 (273K)



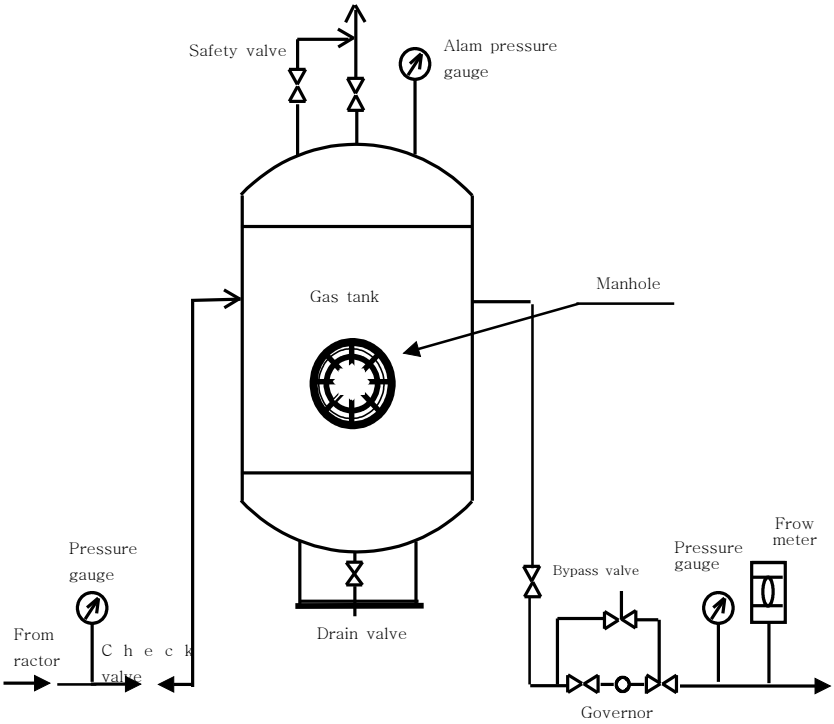


Fig. 61. Schematic diagram of gas holder.

Fig. 62. Photographs of gas holder.

상기 계산에서 알 수 있듯이 메탄저장탱크의 최대 저장용량이 23.7 m^3이 되도록 하였다. 따라서 1.5 m^3 규모의 메탄 발효시스템에서 발생하는 가스를 8일간 저장할 수 있는 저장탱크를 제작하였다.

그리고 메탄 발효조로부터 저장탱크로 주입되는 관에 가스의 역류를 방지하는 check valve를 설치하였고, 안전을 위해 저장탱크의 최대압이 7 kgf/cm^2이상의 압력이 탱크내에 걸리면 alarm pressure gauge가 감지하여 경보가 울리고 safety valve에 의해 자동으로 배출되도록 제작하였다. 또한 저장탱크로부터 가스가 배출되는 부분에 governor와 유량계를 설치하여 차후 생산된 바이오 가스를 이용한 보일러 연소에 사용할 수 있도록 제작하였다.

6. 발효시스템의 자동화 공정 제작

가. 음식물 쓰레기의 자동공급

음식물은 물과 1:1로 혼합된 뒤 파쇄기에서 죽 상태로 잘게 분쇄된 후 교반기가 장착되어 있는 1 m^3 용량의 음식파쇄물 저장조에서 서서히 교반되면서 공정제어소프트웨어에 의해 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조로 연속적으로 자동 공급되도록 하였다.

나. 발효조 온도제어

발효조의 온도는 미생물 발효의 중요한 요소이기 때문에 반응기 내의 온도가 일정한 온도로 균일하게 분포되도록 전열면적을 고려하고 반응기의 높이와 폭을 선정한 뒤 제작하였다. 발효조의 온도조절을 위해 온수탱크에 전기히터 및 온수열교환기를 장착하고 제어시스템에 의해 자동적으로 온수온도가 약 60℃ (공정제어소프트웨어에서 온도 설정은 자유롭게 변경이 가능함)가 되도록 하였다. 이 온수를 각 탱크에 부착되어 있는 온도조절용 솔레노이드밸브를 온도조절시스템에 의해 자동으로 개·폐하면서 조절되도록 구성하였다. 발효조 온도제어용 온수의 제조는 운

전비용의 절감을 위해 본 공정의 최종 부산물인 메탄가스를 연료로 사용할 수 있는 온수보일러를 사용하였다. 그리고 비상시에는 전기히터에 의해 온수가 제조되도록 하였다. 구동부 및 내부액 교반용 교반기가 장착되지 않는 2차 혐기성 산 발효조 및 3차 혐기성 메탄 발효조의 경우는 탱크 안쪽과 바깥쪽의 온도편차가 클 수 있기 때문에 탱크내부액을 저속 플렉스펌프를 사용하여 순환·혼합되도록 하여 그 편차를 최소화하였다.

각 발효조의 온도를 높이기 위해 온수를 공급할 때는 온수공급용 펌프를 사용하였다. 이 펌프는 각 발효조에 설치된 온도조절용 솔레노이드 밸브가 열리지 않으면 펌프 배관에 설치된 1차압 조정밸브에 의해 온수가 다시 온수탱크로 주입되도록 하여 펌프를 내구성을 확보하였다.

다. 발효액의 유량제어

각 발효조에서 아래 식과 같은 발효액의 수리학적 체류시간 (HRT)을 조절하기 위해 초음파 Level gauge를 반응기 상부 외벽에 탱크내압에 대한 기밀성이 유지되도록 부착하여 반응기 내부액의 수위를 자동으로 확인한 후 공정제어소프트웨어에 의해 이송펌프가 동작하여 일정한 유량으로 공급되도록 조절하였다.

$$HRT = \frac{V}{Q}$$

여기서, V : 발효조의 실제 가용용적 (㎥), Q : 발효액의 유량 (㎥/day) 임.

라. 메탄 발생량 모니터링

3차 혐기성 메탄 발효조에서 발효과정을 통해 발생하는 바이오가스가 미리 설정한 일정 압력에 도달할 경우 메탄 발효조의 가스배출배관에 장착된 안전밸브가 열려 생성된 가스가 메탄저장탱크로 저장된다. 메탄가스 농도를 측정하여 바이오가스 중 메탄가스의 발생량을 산정하였으며, 저장 탱크로 이송되는 배관에 바이오가스용 누적가스미터를 설치하여 연속적으로 메탄가스 발생량을 측정하였다.

마. 자동화시스템의 제어를 위한 조절 장치 제작

2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템의 발효공정 운전을 제어하기 위해 제작한 공정자동화 시스템을 보완하여 발효조 및 온수저장조의 온도조절, 각 발효조의 pH 변화, 이송펌프의 제어를 모두 personal computer에서 제어하고 모니터링 할 수 있도록 하였다. 또한 각종 제어장치, 밸브의 동작상태 그리고 각종 pH, 온도 등 공정파라미터를 실시간으로 그래프화하고 그 값들이 저장될 수 있도록 구성하였다 (Fig. 63).

자동화시스템을 위하여 각종 자동조절장치는 PLC (Programmable Logic Controller)와 회로를 연결하고 발효기 전문 제조업체인 코바이오텍(주)에서 제작한 공정제어소프트웨어를 통해 제어되도록 구성하였다. 소프트웨어는 AutoBase 라는 기반소프트웨어를 사용하여 본 공정에는 맞게 프로그램을 새롭게 디자인하였다. 이를 통하여 최대한 자동화된 시스템을 완성하였다 (Fig. 64).

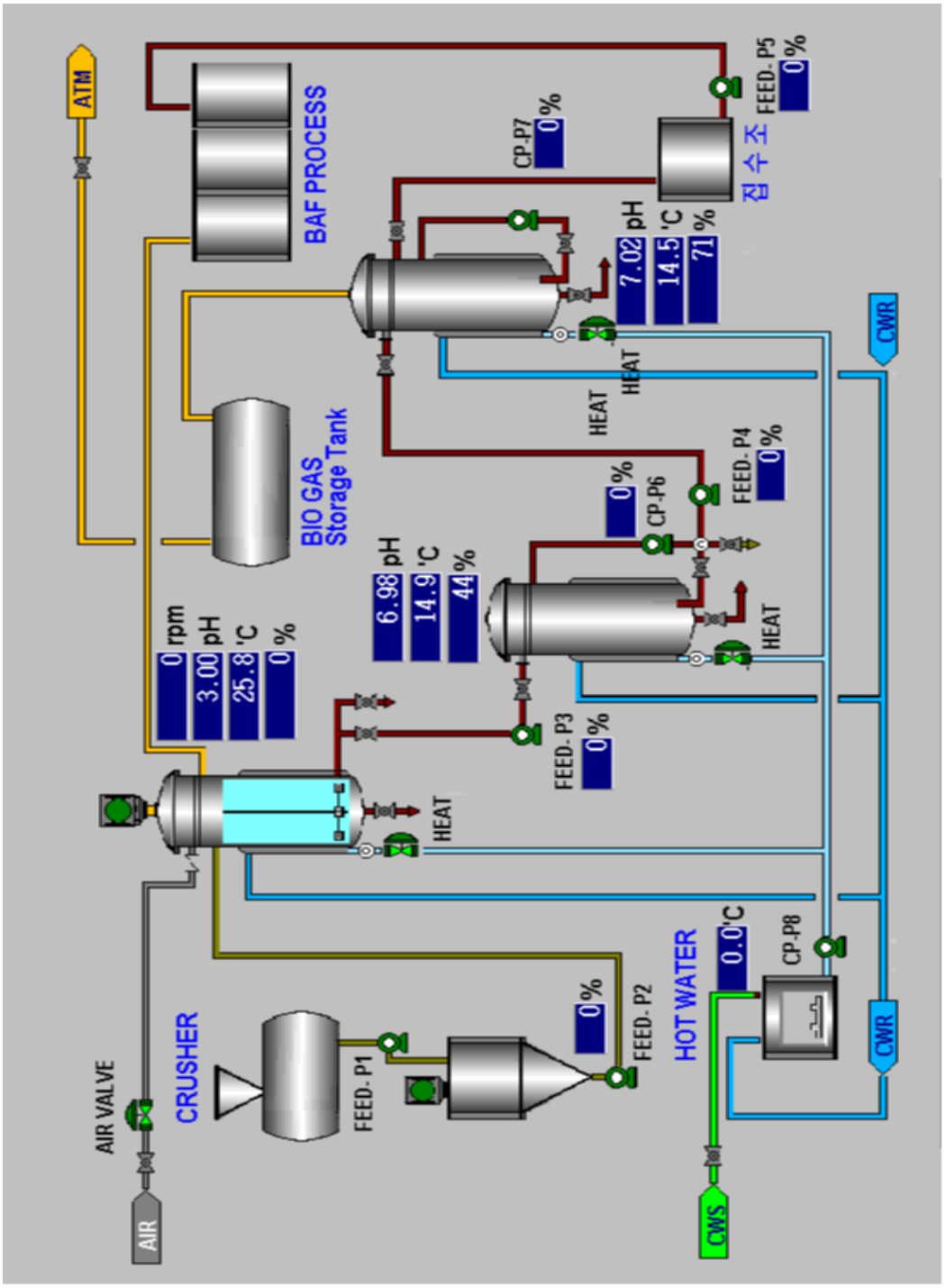


Fig. 63. Monitor screen of automatic control system used for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

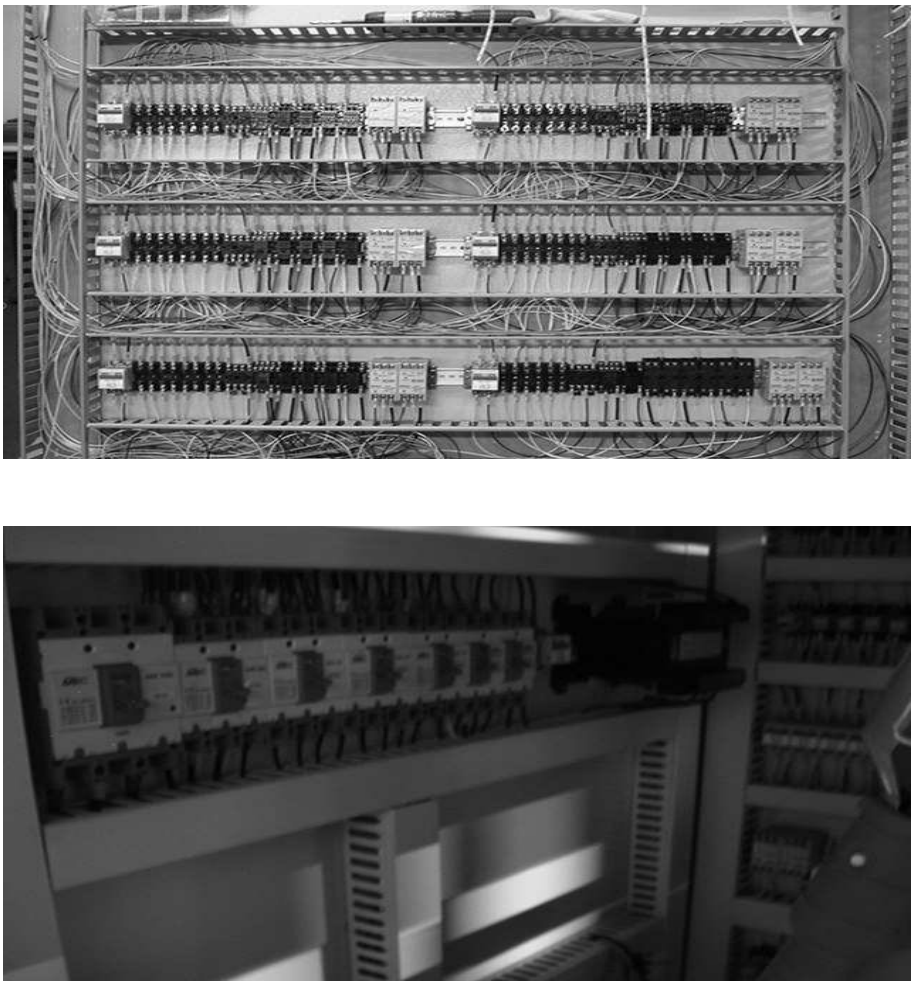


Fig. 64. Internal circuit of automatic control system for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

제 6 절 10 m^3 규모 Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효 시스템의 운전 조건 검토

1. 실험재료 및 방법

가. 실험 균주

1차 가수분해/산 발효 공정에서 사용되는 균주는 제 2 장 제 2 절에서 수행한 연구결과 가운데 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 분리한 11개 균주를 배양하고, 운전중인 2.5 m^3 규모의 메탄 발효시스템의 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 발효액을 pilot-scale 1차 반혐기성 가수분해/산 발효 공정에 접종하였다.

2차 혐기성 산 발효조의 경우도 1차 가수분해/산 발효조와 마찬가지로 제 2 장 제 2 절에서 수행한 연구결과 가운데 2차 혐기서 산 발효조에서 분리한 5개 균주를 배양하고, 운전중인 2.5 m^3 규모의 메탄 발효시스템의 2차 혐기성 산 발효조의 발효액을 pilot-scale 2차 산 발효 공정에 접종하였다.

3차 혐기성 메탄 발효조의 경우에는 메탄생성균이 서식하고 있는 우분과 2.5 m^3 규모의 메탄 발효시스템의 3차 메탄 발효조의 발효액을 접종원으로 사용하였다.

나. 음식물 쓰레기의 전처리 공정

본 실험에 사용된 음식물 쓰레기는 학교 구내 식당으로부터 수집되었으며 1차적으로 고기뼈, 생선뼈, 비닐, 나무토막과 같은 생물학적 분해가 어려운 물질을 육안으로 확인한 후 수작업을 통하여 분리하여 제거하였다. 또한 음식물과 미생물의 접촉이 용이하고 각 공정으로의 이송이 용이하도록 음식물과 물을 1:1의 비율로 혼합한 뒤 파쇄기를 이용하여 잘게 분쇄하여 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에 주입하였다.

다. 3단계 메탄 발효공정내 음식물 쓰레기 성상 변화

전처리 공정을 거친 음식물 쓰레기는 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에 400 kg/day으로 주입되었으며 주입하기 전에 음식물 쓰레기의 COD, T-N, T-P, NO_3-N, NH_4-N, TS, VS, pH를 측정하였다. 각각의 실험방법은 COD는 Cr법으로, TS와 VS는 standard method으로, T-N, NO_3-N는 자외선 흡광도법으로, T-P는 아스코르빈산 환원법으로, NH_4-N는 인도페놀법으로 수질공정시험법에 준하여 조사하였다. 각 공정별 수리학적 체류시간은 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 2일, 2차 혐기성 산 발효조에서 2일, 3차 혐기성 메탄 발효조에서 12일로 조절하였다. 또한 각 공정에서도 음식물 쓰레기의 측정항목과 마찬가지로 분석을 동일하게 수행하였다.

라. 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석

3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스량은 3차 혐기성 메탄 발효조로에서 가스저장조로 연결된 관사이에 가스적산계를 설치하여 매일 측정하였으며 가스 성분 분석은 gas chromatography (TCD)(Shimadzu GC-14B)를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 제 2 장 제 3 절의 다에서 수행한 분석조건과 동일하게 분석하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 음식물 쓰레기의 성상

학교 구내식당에서 수집하여 본 실험에 사용된 음식물 쓰레기의 평균 고형물 함량은 12.86%로 조사되었으며, 이 가운데 유기물 함량은 평균 89.5%로 나타났다. 음식물 쓰레기의 tCOD는 평균 63200 mg/L로 조사 되었으며 VS는 평균 115120 mg/L로 COD/VS의 비율은 54.9%를 보였고 pH는 5.22로 조사되었다. 또한 음식물 쓰레기 내의 총 질소는 4900 mg/L로 조사되었고, 질산성 질소의 농도가 101.7

mg/L, 암모니아성 질소의 농도가 25.35 mg/L를 함유하고 있는 것으로 조사되었다. Table 15는 수집된 음식물 쓰레기의 구성 원소 비율 및 유기물 함량을 나타낸 것이다. 음식물 쓰레기의 C:N 비율은 약 9:1로 유기물 분해조건이 매우 좋은 것으로 나타났다.

나. 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조내 발효액의 성상 변화

파쇄기에 의해 파쇄된 음식물 쓰레기는 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조로 유입된다. 이 반응기의 체류시간을 2일로 운전하였으며 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 Fig. 65의 (A)와 (B)에 나타낸 바와 같이 평균 56734 mg/L와 26489 mg/L로 이 공정에서 음식물의 tCOD값이 평균 10.23% 제거되었다. 1차 가수분해/산 발효조의 총질소의 농도는 평균 4758 mg/L을 유지하는 것으로 나타났다 (Fig. 66). 총질소의 농도 중 질산성 질소와 암모니아성 질소의 농도는 각각 150 mg/L (Fig. 67 (A))와 29.2 mg/L (Fig. 67 (B))이었다.

1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 총 질소의 농도가 음식물의 총질소의 농도와 비교해서 거의 변화가 없는 것은 질소의 경우 호기조건의 질산화와 혐기조건의 탈질과정을 통해 제거되므로 이 공정에서는 폭기로 인한 질산화를 유도하는 과정으로 볼 수 있으며 또한 암모니아성 질소의 증가는 1차 발효액의 성상이 죽상태이기 때문에 공기압축기로 충분한 폭기를 시키고 있지만 발효액내에 충분한 산소전달이 액상일 경우에 비해 이루어지지 않아 음식물 쓰레기 내의 유기성 질소의 일부가 암모니아성 질소로 전환된 것으로 사료된다. 이것은 pH의 변화를 볼 때 평균 pH가 3.85로 음식물 자체의 pH에 비해 떨어지는 것 또한 반 혐기성 상태에서 유기산의 발생으로 인해 pH 저하가 일어난 것으로 사료된다 (Fig. 68). 총 인의 농도는 평균 338.2 mg/L (Fig. 69)를 유지하고 있었다.

Table 16. Elemental analysis of collected food wastes used for the 10 m^3 three-stage methane fermentation system

Solid content(%)	VS/TS(%)	COD/VS	Elemental composition(%)			
			C	H	O	N
12.86	89.5	0.549	47.8	6.1	40.9	5.2

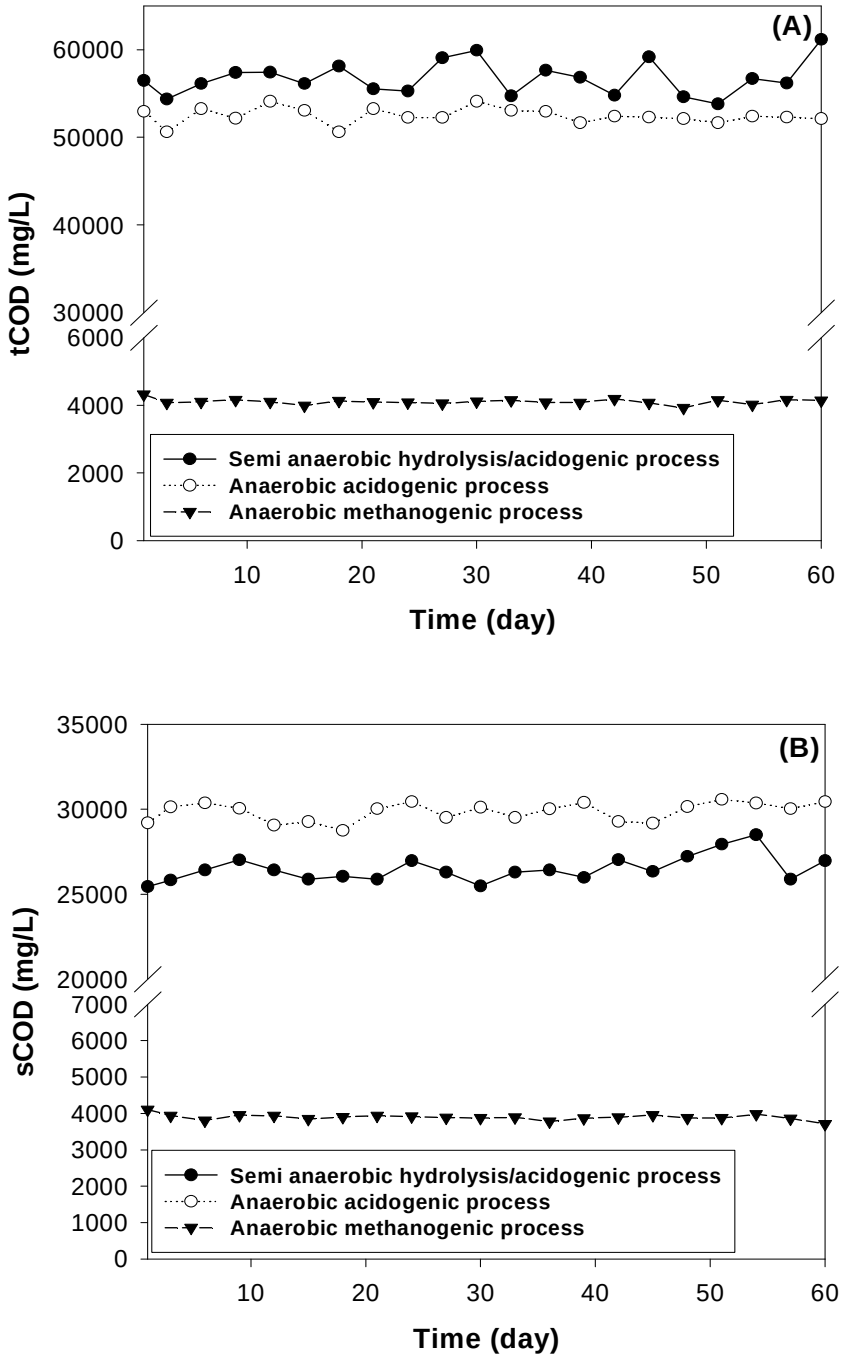


Fig. 65. Changes of tCOD (A) and sCOD (B) in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

다. 2차 혐기성 산 발효조내의 발효액의 성상 변화

2일간의 체류시간을 거쳐 나온 1차 발효액은 2차 혐기성 산 발효조로 유입되어 이곳에서 역시 2일간의 체류시간을 거치도록 하였다. 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 평균 52453 mg/L와 29853 mg/L로 나타나 이 공정에서 음식물의 tCOD값이 평균 17%정도 제거되었고, sCOD의 경우 1차 공정에 비해 약간 증가하였다. 이것은 음식물 쓰레기의 고형물 분해로 인해 생성된 유기산의 생성에 의한 것으로 사료된다. 그러나 2차 산 발효조의 pH는 평균 5.3으로 1차 공정에 비해 다소 높았다. 하지만 생성된 총 유기산의 농도는 1차 공정에 비해 높았으며, 이것은 생성되는 유기산의 종류가 pH에 영향을 받기 때문에 Table 14의 결과에 나타난 바와 같이 1차 공정과 다른 산의 생성조건이 형성되었기 때문에 pH가 상승한 것으로 사료되며, 2차공정의 공정상의 문제는 없는 것으로 생각된다. 2차 산 발효 총질소의 농도는 평균 4247 mg/L으로 유지되어 1차 가수분해/산 발효조에 비해 약간 감소함을 알 수 있었다.

이 공정에서는 1차 가수분해/산 발효조로 내로 폭기된 공기의 유입이 일부 있을 수 있으며 따라서 주로 통성 혐기성 균이 분포되어 있을 것으로 사료되고, 공정내에서 발생하는 CO_2와 N_2와 같은 가스를 빼냄과 동시에 유입된 산소를 제거하여, 완전한 혐기성 상태를 유지해야만 하는 3차 혐기성 메탄 발효조내에 산소가 들어가는 것을 막을 수 있을 것으로 생각된다.

라. 3차 혐기성 메탄 발효조내의 발효액의 성상 변화

2일간의 체류시간을 거쳐 나온 2차 발효액은 3차 혐기성 메탄 발효조로 유입되어 이곳에서 12일간 체류하도록 운전하였다. 이때의 발효조내의 tCOD와 sCOD는 각각 평균 4104 mg/L와 3894 mg/L로 나타나 이 공정에서는 1차와 2차 공정에 비해 고형물의 분해가 거의 이루어져 tCOD와 sCOD의 차이가 앞선 두 공정에 비해 현저히 낮음을 알 수 있었다. 전체적인 공정이 끝난 후 음식물의 tCOD값에 대해 평균 93.5%의 COD가 제거되었고, 대부분이 CO_2와 CH_4 형태의 가스로 배출되었거나 혹은 미생물 성장의 탄소원으로 이용되었다.

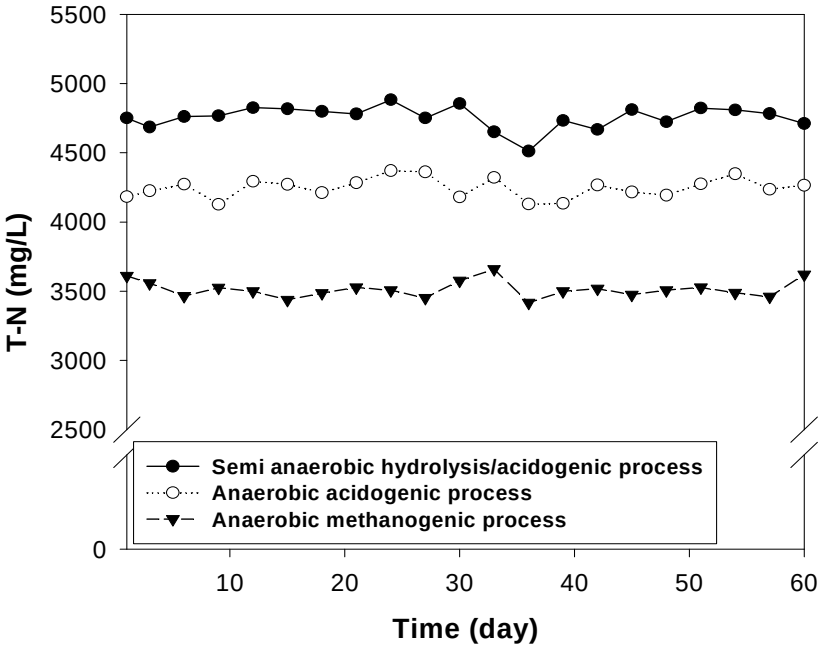


Fig. 66. Changes of T-N concentration in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

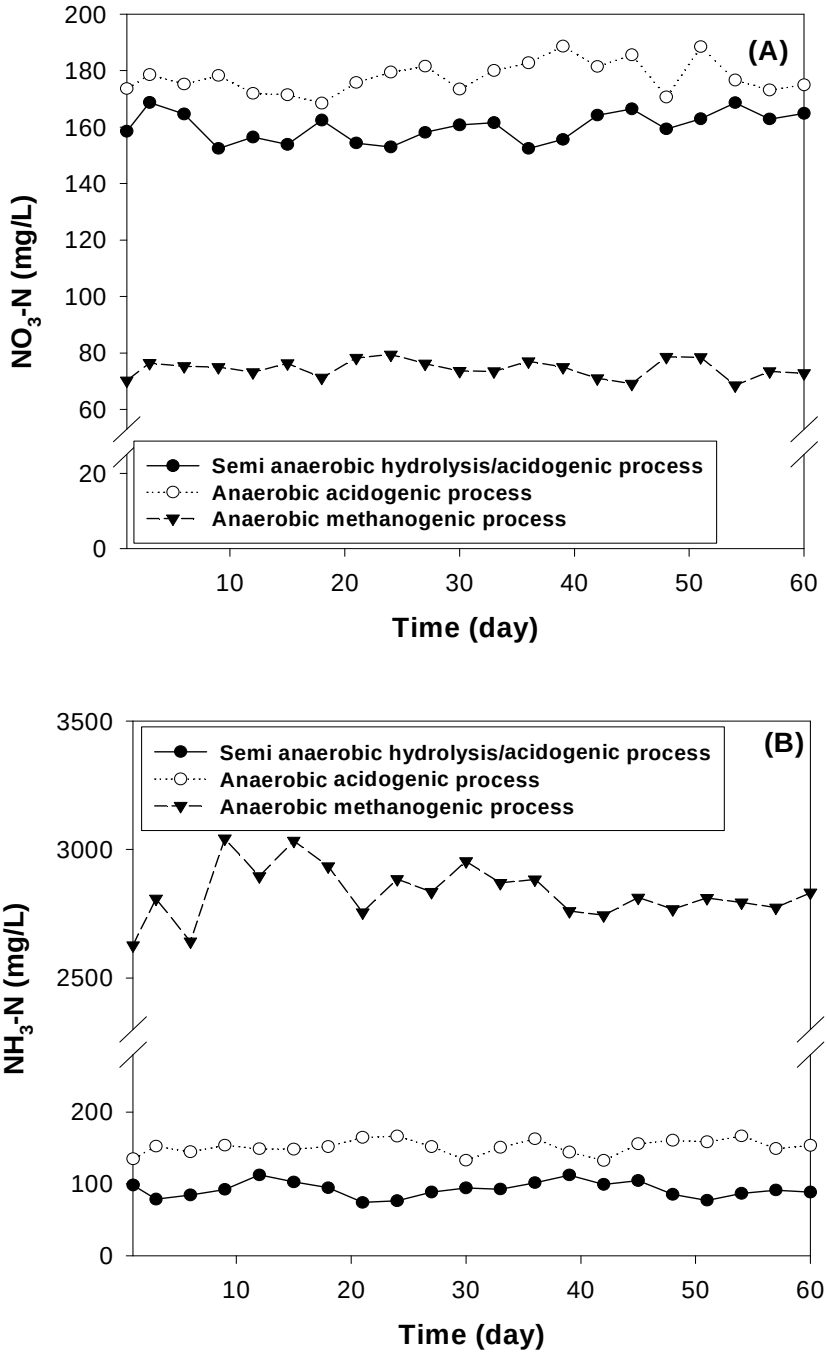


Fig. 67. Changes of NO_3-N (A) and NH_3-N (B) concentrations in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

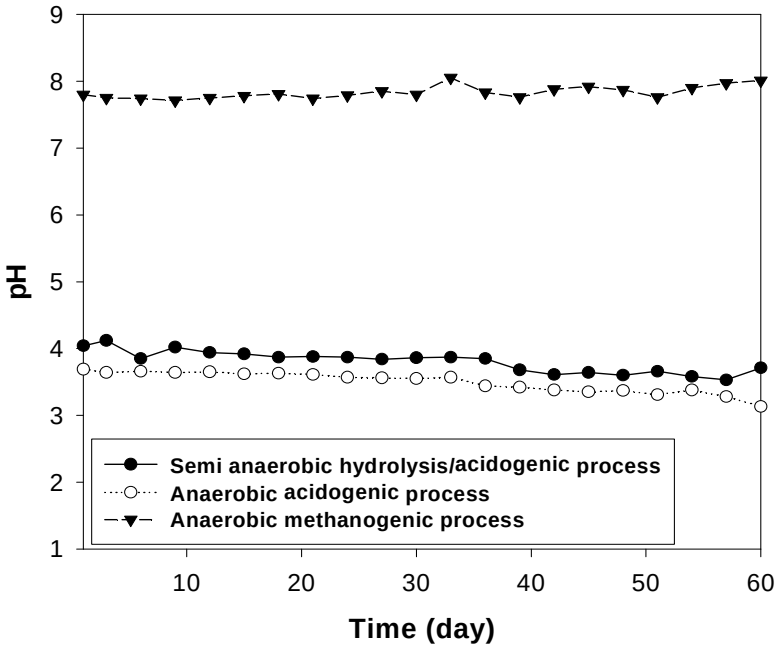


Fig. 68. Changes of pH in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

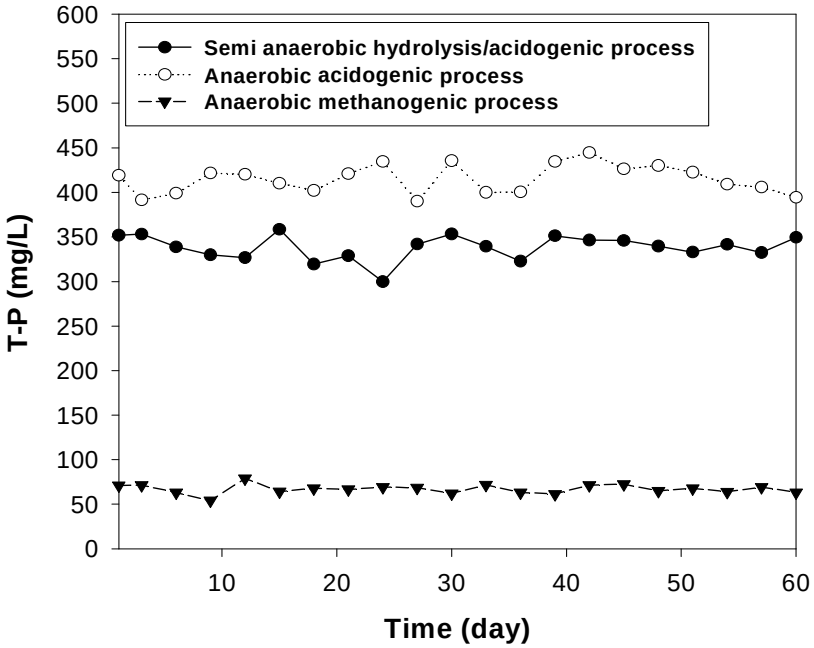


Fig. 69. Changes of T-P in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

또한 총질소의 농도는 일부가 N_2로 배출되어 평균 3515 mg/L으로 유지되고 있으며 완전한 혐기상태의 유지로 인하여 암모니아성 질소의 평균 농도가 약 2830 mg/L로 대부분의 유기성 질소가 암모니아성 질소로 전환되는 것으로 관찰되었다. 그리고 pH는 7.63으로 유지되었으며, 총 인은 67 mg/L로 조사되었다.

마. 3단계 메탄 발효공정에서 발생하는 유기산 분석

Table 16은 3단계 메탄 발효공정에서 발생하는 유기산을 나타낸 표이다.

1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서는 약 8430 mg/L의 유기산이 발생하였고, 이 가운데 lactic acid가 약 4344 mg/L를 나타내고 다음으로 acetic acid가 3774 mg/L를 생성하였다. 2차 혐기성 산 발효조에서는 산생성미생물들에 의해 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 보다 많은 유기산을 생성하여 총유기산 생성량은 16322 mg/L이었고, 1차공정과는 달리 acetic acid의 생성량이 4836 mg/L로 가장 높았으며, 다음으로 butyric aicd, propionic acid, valeric acid, lactic acid 순으로 나타났다. 2차 공정이 1차 공정에 비해 높은 pH로 lactic acid 보다는 기타 다른 휘발성 유기산의 생산량이 증가하였음을 알 수 있었다. 3차 혐기성 메탄 발효조의 경우 1, 2차 공정에 의해 생성된 유기산을 이용하여 메탄을 생성하는 공정이므로 유기산양이 1, 2차 공정에 비해 현저히 감소함을 보여주고 있다.

바. 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생하는 가스발생량 및 성분 분석

3차 혐기성 메탄 발효조로 유입된 2차 산 발효액이 이 공정에서 12일간의 체류시간을 갖는 동안 메탄생성균이 메탄을 생산한다. 안정화 초기에는 주위 환경에 민감한 메탄생성균의 활성이 낮아 가스발생량도 저조하며 발생가스 성분 중 메탄의 함량 또한 50% 정도로 낮은 함량을 보였다. 하지만 안정화가 진행되면서 메탄생성균이 유기물을 분해함과 동시에 가스발생양도 증가하여 일일 발생가스량은 최고 11.2 m^3/day였고, 평균 약 6 m^3/day이었다. 이와 더불어 메탄함량도 증가하여 발생가스 중 메탄함량이 최고 68%로 증가하였다 (Fig. 70).

Table 17은 상기 설명한 pilot-scale 10 m^3 메탄 발효시스템의 운전 조건 및 결과들을 정리하여 나타낸 표이다.

Table 17. Organic acid production in the pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system

Organic acid	Semi anaerobic hydrolysis/acidogenic process	Anaerobic acidogenic process	Anaerobic methanogenic process
Acetic acid(mg/L)	3,774	4,836	550
Propionic acid(mg/L)	66	2,289	
Butyric acid(mg/L)	140	4,533	
Lactic acid(mg/L)	4,344	1,645	
Valeric acid(mg/L)	106	1,908	155
Caproic acid(mg/L)		1,111	
Total acid(mg/L)	8,430	16,322	705

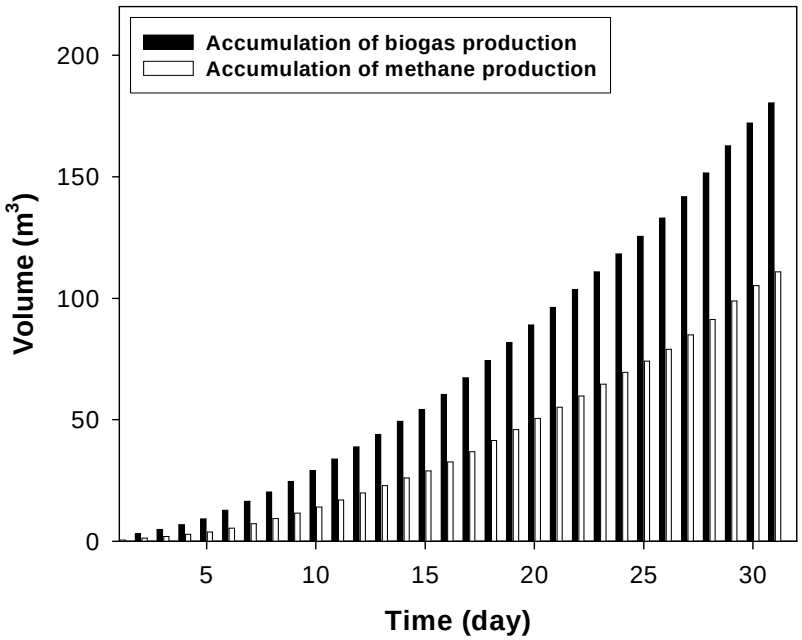
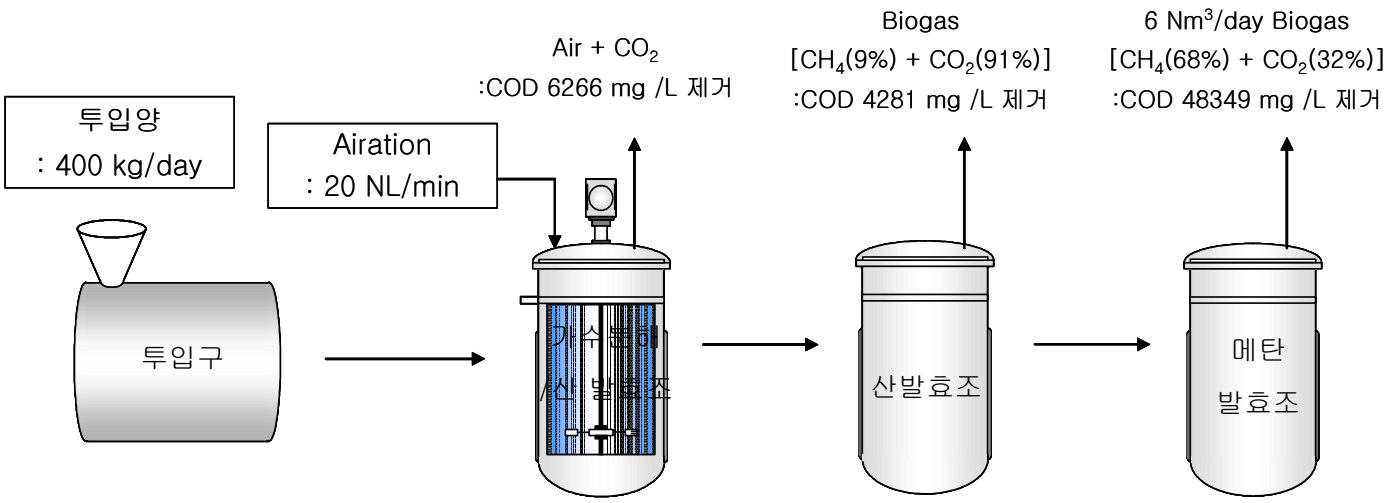


Fig. 70. Accumulative gas and methane production in the pilot-scale 6 m^3 methane reactor.

Table 18. Operational conditions and performance of pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system

Parameter	First stage	Second stage	Third stage
Microbial consortium	*Bacillus amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *Bacillus* sp.	*Clostridium acetobutylicum*, *Cl. butyricum*	*Methanoculleus bourgensis*, *M. palmolei* *Methanosarcina* sp.
HRT (d)	2	2	12
Loading (kg VS/[m^3d]	110.5	61.8	54.5
pH	3.8 ~ 4.3	4.5 ~ 5.5	7.2 ~ 7.9
Temperature(℃)	45	35	50
T-N(mg/L)	4758	4247	3515
NH_3-N(mg/L)	29.2	151.7	2832
COD (mg/L)			
TCOD	56734	52453	4104
(Removal rate)			(93.5%)
sCOD	26489	29853	3894
Gas yield (L/kg COD)	-	-	425
Gas composition(%)			
CH_4	-	9	68
CO_2	-	91	32
Methane yield (L/kg COD)	-	-	289
Volatile acids (mg/L)			
Acetic	3774	4836	550
Propionic	66	2289	0
Butyric	140	4533	0
Valeric	106	1908	155
Caproic	0	1111	0
Lactic	4344	1645	0
Total	8430	16322	705



이송량 : 400 L/day	400 L/day	400 L/day	400 L/day
tCOD : 63200 mg/L	56734 mg/L	52453 mg/L	4104 mg/L
HRT :	2 day	2 day	12 day
Temp. :	45 ℃	35 ℃	50 ℃
pH :	3.8 – 4.3	4.5 – 5.5	7.2 – 7.9
Density (at 21 ℃) : 1.0023	0.9721	0.9414	0.9114
Viscosity (at 21 ℃) : 2280 cP	48 cP	18 cP	6 cP
Agitation :	60 rpm		

Fig. 71. Material balance for pilot-scale 10 m^3 three-stage methane fermentation system.

사. 3단계 메탄 발효시스템의 경제성 검토

(1) 처리시설 100톤/일 규모의 시설 도입시 경영분석

(가) 수입예측(안) : 년 1,234백만원

· 축분 수거료 : 8,000원/톤×100톤 = 800천원 (년 288백만원)

· 음식물처리비 : 44,000원/톤×10톤 = 440천원 (년 158백만원)

· 전기판매: 1㎾당 65.2원×1000㎾×24h×75%=1,173천원 (년 428백만원)

☞ 바이오가스 발전기준단가 : 65.2원기준(현행 LFG발전단가적용)

☞ 2006년도 발전기준단가는 72.5원으로 예상되며 연매출 4억8천만원으로 기대됨

☞ 연간 설비 이용율 : 75%기준

· 퇴비·액비 : 10,000원/10㎏ × 100개 = 1,000천원(년 360백만원)

(나) 지출예측(안) : 처음 도입하는 시설이므로 운영비 등의 분석이 불가능하지만, 시군 등의 축산폐수공공처리시설(일일 약 75 ~ 150 m^3 처리 규모) 운영사례를 참고하면

·연간 운영비(10년 평균) : 212백만원/년

* 운전노무비 : 32,000천원
* 발전설비 수선유지비 : 130,000천원
* 경비 : 50,000천원

---

* 계 : 212,000천원

·연간 감가상각비 : 107백만원/년

* 감가상각방식 : 정액법=(원가 - 잔존가치)/내용년수
* 상각기간 : 15년
* 잔존가치 : 5%/설비비

·소화조 및 발전시설의 연간 예상 매출 및 지출

* 매출 : 1,234백만원/년

* 지출 : 운영유지비 212백만원/년

감가상각비 107백만원/년

---

* 매출이익 : 915백만원/년 (매출액대비 74.2%)

따라서 상기 경영분석결과 본 연구에 의해 개발된 3단계 메탄 발효시스템의 상용화 가능성 또한 충분히 가능할 것으로 판단된다.

제 3 장 결 론

1. 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템의 설계 및 제작

○ 총 발효시스템 규모 2.5 m^3의 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템을 설계 및 제작하였다. 각 단계별 공정은 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조, 2차 혐기성 산 발효조, 3차 혐기성 메탄 발효조로 구성하였으며 각각의 발효조의 총 용적은 0.5 m^3, 0.5 m^3, 1.5 m^3으로 제작하였다.

2. 단계별 발효공정 미생물제제 개발

○ Amylase, protease, cellulase의 균체외 활성은 K5균주가 다른 균주들에 비해 월등히 뛰어났다.

○ 16S rDNA sequence 분석결과 K5균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정되었다.

○ 또한 나머지 균주들도 대부분 *Bacillus* 속에 포함되는 균주로 조사되었다.

○ *Bacillus*는 그램 양성균으로 다양한 효소를 생산하여 세포밖으로 분비하는 특성이 있으며 α-amylase, protease, α-galactosidase 등과 같은 효소와 치료용 재조합 단백질 생산에 많이 이용되고 있으므로 미생물재제로서의 활용가능성이 충분할 것으로 판단되었다.

○ 전분을 주종으로 이루는 유기성 폐기물을 처리하기 위한 종균제로 K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K11을 사용하는 것이 효과적일 것으로 사료되었다.

○ 육류와 같은 단백질이 주종을 이루는 유기성 폐기물을 처리하기 위한 종균제로 K1, K3, K4, K5, K6, K8, K9, K11을 사용하는 것이 바람직 할 것으로 사료되었다.

○ 김치와 같은 야채를 주종으로 하는 유기성폐기물의 처리에는 K1, K3, K5, K6, K8, K9, K10, K11을 종균제로 사용하면 높은 효과를 얻을 것으로 생각되었다.

○ 종합적으로는 K1, K3, K5, K6, K9, K11을 이용한 종균제를 사용한다면 유기성 폐기물을 가수분해 하는데 있어 높은 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

○ 또한 전체 발효시스템의 종균제로서의 적용여부는 1차 가수분해/산 발효조의 경우 분리된 11개균주를 사용하고 2차 혐기성 산 발효조의 경우 *Cl. butyricum* 과 *Cl. acetobutylicum* 및 분리된 5개균주를 사용하며, 3차 혐기성 조의 경우 발효조내에 우점종으로 존재하는 *Methanoculleus bourgensis*, *M. palmolei*, *Methanosarcina* sp. 등을 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

3. 발효효율 최적화 운전 조건 검토

○ 음식물을 희석하기위해 사용되는 물을 대신하여 3단계 메탄 발효 후 배출되는 최종 유출수를 반송수로 일부 사용할 수 있을 것으로 판단되며, NaOH와 같이 사용하여 pH를 조절해야 할 것으로 사료되었다.

○ 3차 혐기성 메탄 발효조의 최적 온도는 50℃로 운전하는 것이 보다 효율적이며, 현재 12일로 운전하고 있는 발효조의 체류시간을 향후 목적에 따라 10일까지 줄이는 경우에도 메탄 발효에는 크게 영향을 미치지 않을 것으로 판단되었다.

○ 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 100 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 45℃, 2 day, 103.5 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 3.8, 71234 mg/L, 4542 mg/L으로 유지되었다.

○ 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서는 약 6247 mg/L의 유기산이 발생하였고, 이 가운데 lactic acid가 약 5400 mg/L를 나타내고 다음으로 acetic acid가 779 mg/L를 생성하였다.

○ 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 100 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 2차 혐기성 산 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 35℃, 2 day, 63.4 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 3.45, 63972 mg/L, 4046 mg/L으로 유지되었

다.

○ 2차 혐기성 산 발효조에서는 산생성미생물들에 의해 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 보다 많은 유기산을 생성하여 총유기산 생성량은 14560 mg/L 이었고, 1차 공정에서와 마찬가지로 lactic acid의 생성량이 13400 mg/L로 가장 높았으며, 다음으로 acetic aicd, propionic acid, butyric acid, valeric acid 순으로 나타났다.

○ 2.5 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 100 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 3차 혐기성 메탄 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 50℃, 12 day, 52.8 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 7.6 ~ 7.9, 7394 mg/L, 3538 mg/L으로 유지되었다.

○ 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생된 바이오가스 생산 수율은 282 L/kg COD 이었으며, 바이오가스 중 메탄함량은 최대 72%이었고, 메탄가스 생산 수율은 245 L/kg COD으로 조사되었다.

4. 다양한 재생가능 폐기물의 처리시 발효 효율 검토

○ 여러 가지 폐기물 가운데 음식폐기물과 돈분은 혐기성 소화에 적합한 기질로 조사되었다.

○ 우분의 경우 시료특성상 농산부산물의 파쇄와 같은 전처리가 필요할 것으로 판단되었다.

○ 슬러지의 경우 유기물 제거 및 바이오가스 생산 증가를 위해 다른 재생가능 폐기물과 혼합하여 처리하는 것이 효과적으로 판단되었다.

○ 특히 하수슬러지와 다른 혐기성 소화에 적합한 기질과의 혼합처리는 폐기물의 효과적인 처리 및 고농도의 재생가능 폐기물을 상대적으로 희석시킬 수 있으므로 처리농도의 부하량을 줄일 수 있을 것으로 사료되었다.

5. 10 m^3 규모 Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효조 설계 및 제작

○ 총 발효시스템 규모 10 m^3의 소규모 집약형 3단계 메탄 발효시스템을 설계 및 제작하였다. 각 단계별 공정은 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조, 2차 혐기성 산 발효조, 3차 혐기성 메탄 발효조로 구성하였으며 각각의 발효조의 총 용적은 2 m^3, 2 m^3, 6 m^3으로 제작하였다.

○ 음식물쓰레기 및 다른 유기성폐기물의 효율적인 파쇄를 위한 진공파쇄기를 개발하여 제작하였다.

○ 최대 메탄 저장량 23.7 Nm^3인 2.3 Nm^3 규모와 1.3 Nm^3 규모의 메탄저장탱크 2기를 설계 및 제작하였다.

6. Pilot-scale 집약형 고효율 메탄 발효 시스템 운전 조건 검토

○ 10 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 400 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 45℃, 2 day, 110.5 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 3.8 ~ 4.3, 56734 mg/L, 4758 mg/L으로 유지되었다.

○ 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서는 약 8430 mg/L의 유기산이 발생하였고, 이 가운데 lactic acid가 약 4344 mg/L를 나타내고 다음으로 acetic acid가 3774 mg/L를 생성하였다.

○ 10 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 400 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 2차 혐기성 산 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 35℃, 2 day, 61.8 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 5.0 ~ 5.5, 52453 mg/L, 4247 mg/L으로 유지되었다.

○ 2차 혐기성 산 발효조에서는 산생성미생물들에 의해 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조에서 보다 많은 유기산을 생성하여 총유기산 생성량은 16322 mg/L 이었고, 2.5 m^3 규모의 메탄 발효시스템에서와는 달리 acetic acid의 생성량이 4836 mg/L으로 가장 높았으며, 다음으로 4533 mg/L의 butyric aicd, 2289 mg/L의 propionic acid, 1908 mg/L의 valeric acid, 1645 mg/L의

lactic acid, 1111 mg/L의 caproic acid 순으로 생성되었다.

○ 10 m^3 규모의 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 400 kg/day의 음식물쓰레기를 처리하기 위한 공정을 운전한 결과 3차 혐기성 메탄 발효조의 운전온도, 체류시간, 및 기질 부하량은 각각 50℃, 12 day, 52.8 kg VS/m^3·day 이었으며, pH, tCOD 및 T-N은 각각 7.6 ~ 7.9, 7394 mg/L, 3538 mg/L으로 유지되었다.

○ 3차 혐기성 메탄 발효조에서 발생된 바이오가스 생산 수율은 425 L/kg COD 이었으며, 바이오가스 중 메탄함량은 최대 68%이었고, 메탄가스 생산 수율은 289 L/kg COD으로 조사되었다.

○ 본 연구에서 개발된 3단계 메탄 발효시스템을 이용하여 100 ton/day의 유기성 폐기물을 처리할 경우의 가상 경영분석결과 년간 915백만원의 매출이익(매출액대비 74.2%)을 얻을 수 있으며, 따라서 본 연구에 의해 개발된 3단계 메탄 발효시스템의 상용화 가능성 또한 충분히 가능할 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 환경부. “2004 환경백서” 2004.
2. Kim, S. and B. E. Dale, “Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues”, 2004. *Biomass Bioenerg.* **26(4)**, 361-375.
3. Kelley, T. R., and P. M. Walker. “Bacterial concentration reduction of food waste amended animal feed using a single-screw dry-extrusion process”, 1999. *Bioresour. Technol.* **67**, 247-253.
4. 이정채, 정우진, 임계택, 김태환. “MS미생물복합군에 의한 음식폐기물의 양돈사료화를 위한 적정처리공정”. 2000. 『한국환경농학회지』, **19(4)**, 270-275.
5. Manios, T., “The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete.” 2004. *Environment International* **29**, 1079-1089.
6. Lee, C. H., J. M. Lee, S. G. Bae, S. K. Jeon, and J. O. Kim, "A study of food waste treatment technology using earthworm." 2005. *J. of KORRA* 13(1), 71-78.
7. Heo, N. H., S. C. Park, J. S. Lee, and H. Kang, "Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Waste Activated Sludge: Effect of the Mixture Ratio of Food Waste on Solubilization and Biodegradability of the Mixture." 2003. *J. of KSEE* **25(8)**, 1050-1058.
8. Bouallagui, H., Ben Cheikh, R., Marouani, L., and M. Hamdi, "Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in a tubular digester." 2003. *Bioresour. Technol.* **86**, 85-89.
9. Uemura, S. and H. Harada, "Treatment of sewage by a UASB reactor under moderate to low temperature conditions." 2000. *Bioresour. Technol.* **72**, 275-282.
10. Milan, Z., Sanchez, E., Weiland, P., Borja, R., Martin, A., and K. Ilangovan, "Influence of different natural zeolite concentrations on the anaerobic digestion of piggery waste." 2001. *Bioresour. Technol.* **80**,

37-43.

11. Albihn, A., Norin, E., and A. Lindberg, "Regulation and present situation in Sweden concerning hygienic and environmental safety for anaerobic digestion of waste, p. 73-79. *In* Böhm, R. and Wellinger, A. (ed.), Hygienic and environmental aspects of anaerobic digestion: legislation and experiences in europe." 1999. Stuttgart-Hohenheim.
12. Sahlstrom, L., "A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants." 2003. *Bioresour. Technol.* **87**, 161-166.
13. 박진열. "혐기성 메탄 발효에 의한 유기물쓰레기의 처리공정 개발" 『조선대학교 석사학위논문』, 1998.
14. 이상필, 강현무, 박동운. "바이오매스" 2002. 『심층정보분석보고서』, 한국과학기술정보 연구원, pp.18-22.
15. 박순철. "유기성 폐기물 (음식쓰레기) 혐기소화 기술의 새로운 전개" 1998. 『ETIS 분석지』, **4**, 8-13.
16. 박순철. "고형폐기물의 혐기성소화-유럽의 현황" 2002 『ETIS 분석지』, **19**, 115-130.
17. Lee, S. H., "Treatment of leachate in the municipal refuse landfill site by UASB process." 1998. *J. Korea Solid Wastes Engineering Society* **15(4)**, 358-369.
18. Sanchez, E., R. Borja, P. Weiland, L. Travieso, and A. Martin, "Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate." 2001. *Process Biochem.* **37**, 483-489.
19. Kettunen, R. H., and J. A. Rintala, "The effect of low temperature (5-20℃) and adaptation on the methanogenic activity of biomass." 1997. *appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 570-576.
20. Vavilin, V. A., L. Y. Lokshina, S. V. Ritov, O. R. Kotsyurbenko, and A. N. Nozhevnikova, "Description of two-steps kinetics in methane formation during psycrophilic H_2/CO_2 and mesophilic glucose conversion." 2000. *Bioresour. Technol.* **71**, 195-209.

21. Vavilin, V. A., L. Y. Lokshina, S. V. Ritov, O. R. Kotsyurbenko, and A. N. Nozhevnikova, "Modeling low-temperature methane production from cattle manure by an acclimated microbial community." 1998. *Bioresour. Technol.* **63**, 159-167.
22. Parkin, G. F., and F. O., William, "Fundamentals of anaerobic digestion of wasterwater sludges." 1986. *JEED* **112(5)**, pp869.
23. Ahn, J.-H. and C.F. Forster, "A comparison of mesophilic and thermophilic anaerobic upflow filters treating paper-pulp-liquors." 2002. *Process Biochem.* **38**, 256-261.
24. El-Mashad, H.M., W. K. P. van Loon, and G. Zeeman, "A model of solar energy utilisation in the anaerobic digestion of cattle manure." 2003. *Biosyst. Eng.* **84**, 231-238.
25. Kim, M., Y.-H. Ahn, and R.E. Speece, "Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic." 2002. *Water Res.* **36**, 4369-4385.
26. 박순철, 조재경, 이준표, 홍종준, 이진석, 김미선. “생분해에 의한 폐기물의 에너지 및 비료화 공정개발연구(II)”, 1994. 『한국에너지기술연구소 보고서』, KIER-941123.
27. Grau, P., M. Dohanyos, and J. Chudoba, "Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge." 1975. *Water Res.* **9**, 637-642.
28. Schnackenberg, J., R. Schulz, and H. Senger, "Characterization and purification of a hydrogenase from eukaryotic green alga *Scendesmus obliguus*." 1993. *FFB Lett.* **327**, 21-24.
29. Greenbaum, E., "Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In *Hydrogen energy progress VIII,* T.N. Veziroglu, P. K. Takashashi Eds.; Proceedings 8th WHEC" 1990. Hawaii. New York: Pergamon Press, pp743-754.
30. Banerjee, M., A. Kumar, and H. D. Kumar, "Factors regulating nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Azolla-Anabaena* symbiosis." 1989. *J. Hydrogen Energy* **12**, 871-879.

31. Shi, D. J., M. Brouers, D. O. Hall, and R. J. Rubin, "The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*." 1987. *Planta* **172**, 298-308.
32. Tsygankov, A.S., L. T. Serebryakova, D. A. Sueshnikov, K. K. Rao, I. N. Gogotov, and D. O. Hall, "Hydrogen photo-production by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and dependence on pH." 1997. *J Hydrogen Energy* **22**, 859-867.
33. Fascetti, E., E. D' addario, O. Todini, and A. Robertiello, "Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes." 1998. *J. Hydrogen Energy* **23**, 753-760.
34. Krahn, E., K. Schnerder, and K. Muller, "Comparative characterization of H_2 production by the conventional Mo nitrogenase and alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobater capsulata* hap mutants." 1996. *Appl Microbiol Biotechnol.* **46**, 285-290.
35. Singh, S. P., and S. C. Srivastava, "Isolation of non-sulfur photo-synthetic bacteria strains efficient in hydrogen production at elevated temperatures" 1991. *J. Hydrogen Energy* **16**, 404-405.
36. Tanisho, S, N. Wakao, and Y. Kokako, "Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*." 1983. *J. Chem. Eng. Jpn.* **16**, 529-530.
37. Kumar, N, and D. Das, "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08." 1999. *Process Biochem.* **35**, 589-594.
38. Tanisho, S, Y. Suzuki, N. Wakoo, "Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005." 1987. *J. Hydrogen Energy* **12**, 623-627.
39. Taguchi, F., J. D. Hang, S. Taguchi , and M. Morimoto, "Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites." 1992. *J. Fermentation and Bioeng.* **73(3)**, 244-245.
40. Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebe, and P. Peringer, "Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation

of lactose." 2004. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1479-1485.

41. Lay, J. J., K. S. Fan, J. Chang, and C. H. Ku, "Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge." 2003. *Int. J. Hydrogen Energy* **28**, 1361-1367.
42. De Vrije, T., and P. A. M. Claassen, "Bio-methane & Biohydrogen; Dark hydrogen fermentation." 2003. *Dutch Biological Hydrogen Foundation*, 104-105.
43. Han, S. K., and H. S. Shin, "Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste." 2004. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 569-577.
44. Sun, Y. and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review." 2002. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
45. Kadar, Z., Z. Szengyel, and K. Reczey, "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol." 2004. *Ind. Crop Prod.* **20**, 103-110.
46. Borrero, M. A. V., J. T. V. Pereira, and E. E. Miranda, "An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil." 2003. *Biomass Bioenerg.* **25(3)**, 287-299.
47. Murphy, J. D. and K. McCarthy, "Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland." 2005. *Appl. Energ.* **82**, 148-166.
48. Zafar, S. and M. Owais, "Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*." 2006. *Biochem. Eng. J.* **27**, 295-298.
49. Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. S. Graboski, "Estimating the net energy balance of corn ethanol." 1995 Agricultural Economic Report 721, United States Department of Agriculture.
50. Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. Wang, "The energy balance of corn ethanol: an update." 2002. Agricultural Economic Report 813, United States Department of Agriculture.
51. Hur, B. K., J. S. Yu, and J. W. Yang, "Ethanol fermentation by *Kluyveromyces fragilis* from *Jerusalem artichoke*." 1989. *Kor. J.*

Biotechnol. Bioeng. **4**, 50-58.
52. Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, and C. E. Wyman, "Fuel ethanol from cellulosic biomass." 1991. *Science* **251**, 1318-1323.
53. 정동효 외 4명 공역. "응용미생물학", 『도서출판 동화기술』, 2001, pp.179-185.
54. Bernfeld, P., "Amylases, α and β." 1955. *Methods Enzymol.* **1**, 149-158.
55. Blumentals, I. I., A. S. Robinson, and R. M. Kelly, "Characterization of sodium dodecyl sulfate-resistant protelytic activity in the hyperthermophilic archaebacterium." *Pyrococcus furiosus*. 1990. *Appl. Environ. Microbiol.* **56(7)**, 1992-1998.
56. Ferrero, M. A., G. R. Castro, C. M. Abate, M. D. Baigori, and F. Sineriz, "Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29; isolation production and characterization." 1996. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 327-332.
57. Park, S. K., and S. H. Baek, "Effect of yeast extracts concentration on cell growth and products of *Bacillus stearothermophilus*." 2000. *Kor. J. Sci. & Mat. Res.* **22**, 41-54.
58. Sookkheo, B., S. Sinchaikul, S. Phutrakul, and S.-T. Chen, "Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33." 2000. *Protein Exp. Puri.* **20**, 142-151.
59. Wiseman, A. "Handbook of enzyme biotechnology." 1975. Wiley, New York.
60. Ehab, R. E., and M. E. Amany, "Lichenase production by catabolite repression-resistant *Bacillus subtilis* mutants" optimization of an agro-industrial by-product medium." 1999. *Enz. Microb. Technol.* **24**, 325-331.
61. Horiuchi, J., T. Shimizu, T. Kanno, and M. Kobayashi, "Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemostat culture." 1999. *Biotechnol. Techniques.* **13**, 155-157.
62. Kim, S. J. and S. K. Shin, " Effects of bioremediation products on the oil degradability." 1997. *Kor. J. Microbol.* **33**, 157-162.
63. Raghukumar, C., V. Vipparty, J. J. david, and D. Chandramohan,

"Degradation of crude oil by marine cyanobacteria." 2001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 433-436.

64. Trewavas, A., "Urban myths of organic farming." 2001. *Nature* **410**, 409-410.
65. Yamada, Y., H. Uemura, H. Nakaya, K. Sakata, T. Takatori, M. Nagao, H. Iwase, and K. Iwadate, "Production of hydroxy fatty acid (10-hydroxy-12(Z)-octadecenoic acid) by *Lactobacillus plantarum* from linoleic acid its cardiac effects to guinea pig papillary muscles." 1996. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **226**, 391-395.
66. Yun, H. J., S. J. Kim, and K. H. Min, "Crude oil-degrading properties of psychrotrophic bacterium *Acinetobacter calcoaceticus* A1-1." *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 74-81.
67. Shin, H. S., S. K. Han, Y. C. Song, and C. Y. Lee, "Enhanced acidogenic fermentation of food waste (I) : Effect of seed inoculation." 2000. *J. of KOWREC* 8(3), 112-114.
68. Kirk, T. K., and W. E. Moore, "Removing lignin from wood with white-rot fungi and digestibility of resulting wood." 1972. *Wood Fiber* **4**, 72-79.
69. Han, Y. w., J. W. pence, and P. W. anderson, " Dioxane pretreatment to improve microbial digestibility of cellulosic fibers." 1975. Appl. Microbiol. 29, 708-709.
70. Millet, M. A., A. J. Baker, and L. D. satter, "Pretreatments to enhance chemical, enzymic and microbiological attack of cellulosic materials." 1975. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **5**, 193-219.
71. Oi, S., T. Tanaka, and T. Yamamoto, "Methane fermentation to coffee grounds and some factors to improve the fermentation." 1981. *Agric. Biol. Chem.* **45**, 871-878.
72. Buswell. A. M., and M. F. Mueller, "Laboratory studies of sludge digestion." 1952. *Ind. Eng. Chem.* **44**, 550.
73. Chen, Y., V. H. Varel, and A. G. Hashimoto, “Effect of temperature on methane fermentation kinetics of beef-cattle manure.” 1980. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **10**, 325-339.

74. Bouallagui, H., O. Haouari, Y. Touhami, R. Ben Cheikh, L. Marouani, and M. Hamdi, “Effect of temperature on the performance of an anaerobic tubular reactor treating fruit and vegetable waste.” 2004. *Process Biochem.* **39**, 2143-2148.
75. Shin, H. S., Y. C. Song, and M. J. Mun, "A study on the feasibility of anaerobic digestion of food wastes by biodegradability test." 1993. *J. Korea Solid Wastes Eng. Society* **10(1)**, 35-42.
76. Mackie, R. I. and M. P. Bryant, “Anaerobic digestion of cattle waste at mesophilic and thermophilic temperatures.” 1995 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 346-350.
77. Angelidaki, I. and B.K. Ahring, “Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: The effect of ammonia.” 1993. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 560-564.
78. Zeeman, G., W. M.Wiegant, M. E. Koster-Treffers, and G. Lettinga, “The influence of the total ammonia concentration of the thermophilic digestion of cow manure.” 1985. *Agric. Wastes* **14**, 19-35.
79. Sawayama, S., C. Tada, K. Tsukahara, and T. Yagishita, “Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion.” 2004. *J. Biosci. Bioeng.* **97**, 65-70.
80. Sung, N. C, D.-H. Kang, and K.-C. Park, "Comparison of anaerobic digestion performance in mixing sewage sludge and livestock wastewater with food waste." 2002. *Journal of Korean Society on Water Quality* **18(1)**, 27-34.

[부록]

발효과정 중 유기산, 바이오수소 및 알코올 생산

부록 1. 유기산 생산

부록 2. 수소 생산

부록 3. 알코올 생산

부록 1. 유기산 생산

Abstract

Effect of pH on the organic acids production tendency during anaerobic acidogenic fermentation was monitored. The substrate used was food wastes and pH ranged from 4.0 - 7.0. At pH 4.0, most of acid produced during fermentation was lactic acid, while a small amount of acetic, propionic, and butyric acids were produced. However, butyric acid production was remarkably increased when pH was maintained over 5.0. Interestingly, significant amount of acetic and propionic acids were produced when pH was maintained around 7.0.

가. 서 론

혐기성 소화공정은 여러종류의 미생물 군집들에 의한 연속적인 일련의 반응을 통하여 유기화합물을 최종적으로 메탄과 이산화탄소로 전환시키는 복합적인 생물학적 공정이다[1]. 혐기성 소화 과정은 고분자 물질이 저분자 물질로 분해되는 가수분해 과정, 산생성 미생물에 의한 유기산을 생산하는 산발효 과정, 마지막으로 생성된 유기산을 이용하여 메탄을 생산하는 메탄발효과정으로 이루어져 있다. 특히 두 번째 과정인 산발효 과정에서는 여러종의 산 생성세균에 의해 아세트산, 프로피온산, 뷰티릭산, 젖산 등과 같은 다양한 유기산 및 알콜을 생산한다[2]. 생산된 유기산은 정제과정을 거친 후 인스턴트 식품 등의 가공식품분야 및 음료용으로도 이용할 수 있을 뿐만 아니라 의약품 및 피부관리 등의 위생제와 피혁산업 등에 널리 사용되며 폐기물의 처리라는 환경적인 문제와 결부시켰을 경우 그 가치는 매우 높다고 할 수 있다. 이와 같은 고 부가가치의 유기산을 생산하는 산발효의 주요 인자 가운데 하나가 pH이다[3-4]. 따라서 본 연구에서는 음식폐기물 처리를 위한 소형혐기성 산발효조를 이용하여 발효조내의 pH 변화에 따라 발효조에서 생산되는 유기산의 생산동향을 알아보고, pH의 조절에 의하여 생산목적에 따라 각종 유기산을 선택적으로 생산할 수 있는지 여부를 알아보고자 하였다.

나. 재료 및 방법

(1) pH 변화에 따른 산 발효조내의 유기산 생성 효과

2차 혐기성 산 발효조내의 pH 변화에 따른 유기산 생성 경향을 알아보기 위해 사용한 산 발효조로는 제 2 장 제 3 절 나와 다에서 사용된 총 용적이 11 L인 소형 발효조를 사용하였다. 발효조의 운전은 회분식으로 수행하였으며 실험에 사용한 발효액은 현재 운전 중인 3단계 메탄 발효시스템 가운데 2차 산 발효액을 사용하였고 pH를 조절하기 위해 3단계 메탄 발효시스템을 거치고 나온 발효액을 이용하였다. 3단계 메탄 발효시스템의 최종 유출수의 pH는 7.6 ~ 7.9이며 혐기성 소화폐액의 특성상 알칼리도를 포함하고 있다. 반응기의 pH는 2차 산 발효액과 3단계 메탄 발효시스템의 최종 유출수의 혼합비를 조절하여 4, 5, 7로 조절하였고, 유효용적은 8 L로 조절하여 35℃에서 운전하였다.

회분식 실험이 진행되는 동안 일정 시간마다 시료를 취하여 pH를 측정하고 시료를 원심분리하여 그 상등액을 gas chromatography (FID) (YoungLin M600D)를 이용하여 유기산 생성효과를 확인하였다.

(2) 분석 및 측정

pH 측정은 pH meter를 이용하였고, TS 및 VS는 수질오염 공정시험법으로, sCOD와 tCOD는 CODcr법으로 분석하였다. 당 생성량은 DNS법으로 glucose를 측정하였고, 유기산의 분석은 gas chromatography (FID)(YoungLin M600D)를 이용하여 분석하였으며 분석조건은 제 2 장 제 2 절의 단계별 발효공정 미생물 제재 개발에서 수행한 분석조건과 동일하게 분석하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) pH 변화에 따른 산 발효조내의 유기산 생성 효과

Fig. 1-1은 3차 혐기성 메탄 발효 후 나온 유출수로 혐기성 산 발효조의 pH를 4, 5, 7로 조절한 후 시간에 따른 발효조내의 pH 변화를 나타낸 그림이다. 반응 초기부터 8일까지는 대체로 일정한 pH를 유지하였으나 그 이후 생성되는 산의 농도에 따라 pH가 변해가는 것을 알 수 있었다. Fig. 1-2는 발효조의 pH가 4로 유

지되었을 때의 발효조내에 생성되는 유기산의 농도를 나타낸 그림이다. 그림에 나타난 바와 같이 pH 4로 유지된 발효조내에서는 발효가 진행됨에 따라 젖산의 생산이 꾸준히 증가하고 있음을 관찰할 수 있었으며, 에탄올이나 아세트산의 경우 최초 발효조내에 유지되고 있는 농도에서 거의 증가하지 않았다. 이는 발효조내에 분포되어있는 유기산 발효균주가 단일균주가 아닌 복합균주이므로 pH 4의 환경에서는 다른 유기산 생성균주들 보다 젖산 생성균의 활성이 우수한 것으로 생각되며 이로 인해 젖산의 생산이 증가하는 것으로 판단된다. Fig. 1-3는 발효조의 pH를 5로 유지한 혐기성 산 발효조내의 유기산 생성 경향을 나타낸 그림이다. pH가 4로 유지된 발효조와 마찬가지로 젖산이 발효산물 가운데 가장 많은 양을 포함하고 있으며, pH 4로 유지된 발효조에서는 나타나지 않았던 뷰티릭산이 발효가 진행됨에 따라 점차적으로 증가함을 알 수 있었으며, 그림에 나타난 바와 같이 실험종반부 발효조의 pH가 6으로 상승하면서 젖산의 농도가 급격히 감소하며 미미하지만 아세트산, 프로피온산, 발레릭산의 농도가 점차 상승하는 것을 관찰할 수 있었다.

Fig. 1-4는 발효조의 pH가 7로 유지되었을 경우 발효조내에 나타나는 유기산의 경향을 나타낸 그림이다. pH 4와 pH 5로 유지된 발효조와는 달리 젖산의 경우 발효초기 약간 증가하였지만 이후 점차 감소하여 실험중반부터는 거의 검출되지 않았다. 이와는 달리 뷰티릭산의 경우 발효산물 가운데 가장 많은 양을 포함하고 있으며 발효가 진행됨에 따라 계속해서 증가하고 있음을 관찰할 수 있었다. 아세트산의 경우에도 pH가 4나 5로 유지된 발효조에 비해 훨씬 많은 양을 생산하고 있음을 알 수 있었고, 프로피온산의 농도 역시 전체적인 발효산물 가운데 차지하는 양은 많지 않지만 서서히 증가하고 있는 것이 관찰되었다.

이상의 결과들은 발효조내의 pH를 어떻게 유지하느냐에 따라 혐기성 산 발효조내에서 생산되는 유기산의 종류가 달라질 수 있다는 것을 의미한다. Horiuchi 등[2)]은 단일균주가 아닌 여러 균주들을 혼합하여 산 발효과정을 하는 동안의 pH 영향은 혐기적 산생성과정의 특성이 아니라 혐기적 산생성과정 동안 선택적인 산생성을 위한 방법이라는 점에서 많은 관심을 받고 있다고 하였다. 또한 Zoetemeyer 등[3)]과 Horiuchi 등[4)] 은 혐기성 산 발효조내에서 생산되는 유기산의 주종은 발효조내의 배양 pH에 의해 강하게 영향을 받는다고 보고한 바 있다.

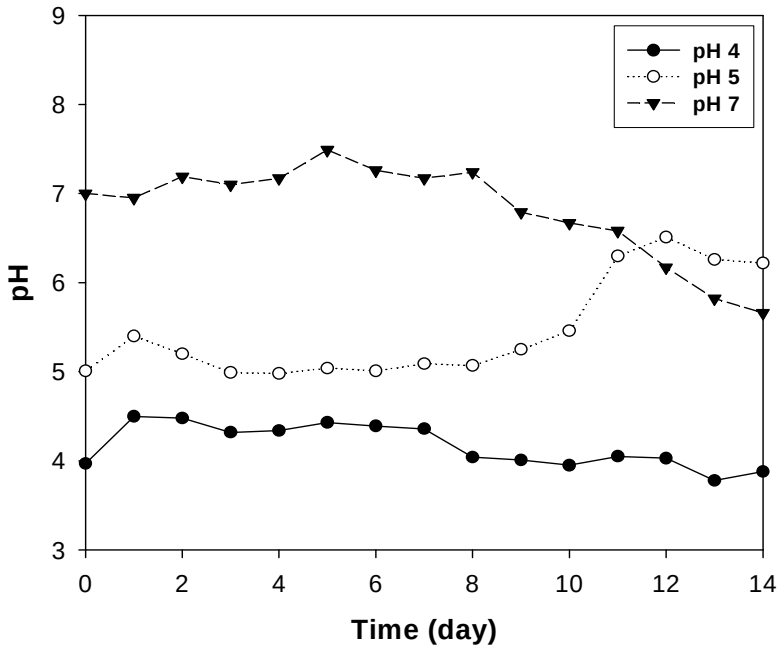


Fig. 1-1. Time-dependent changes of pH in the acidogenic fermentor.

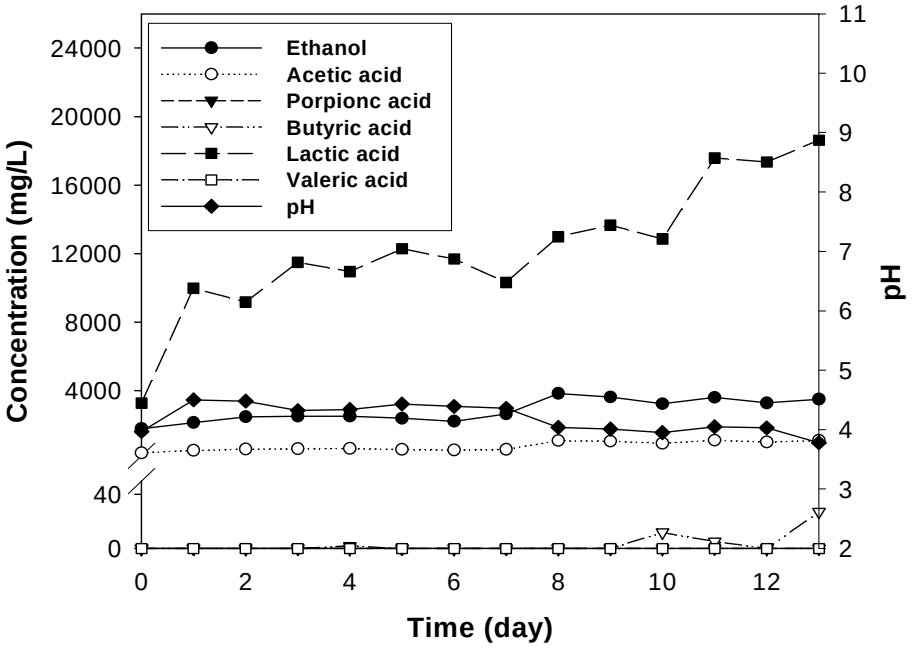


Fig. 1-2. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 4.

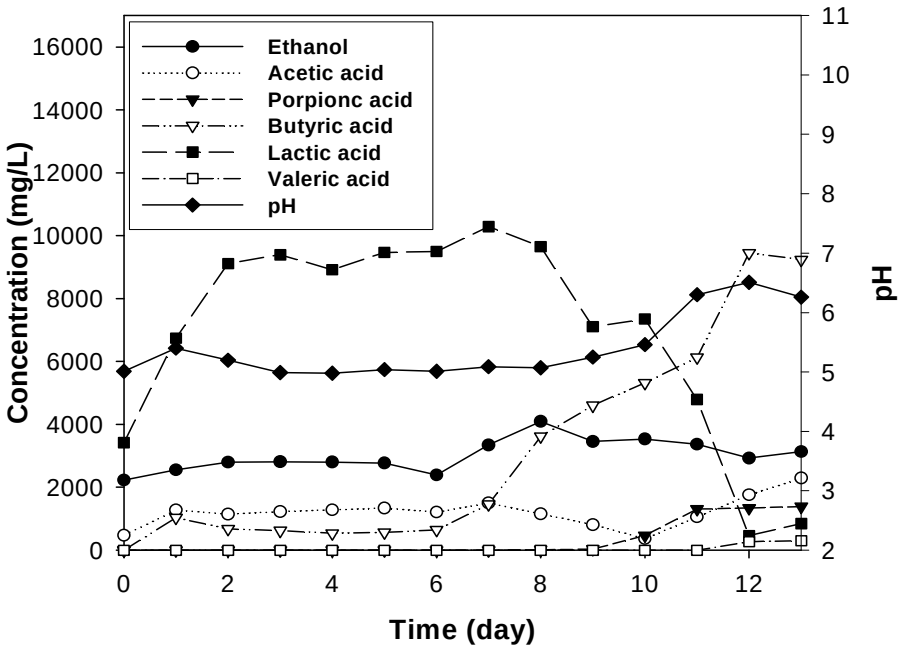


Fig. 1-3. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 5.

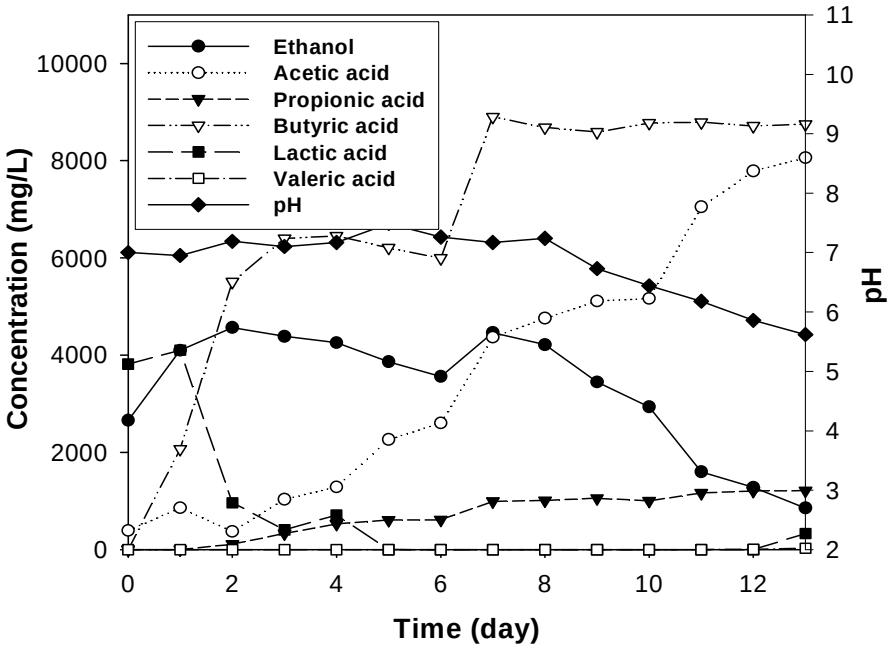


Fig. 1-4. Ethanol and organic acids production pattern in the acidogenic fermentor at pH 7.

Fig. 1-5는 Fig. 1-2부터 1-4까지의 결과를 pH에 따라 각각의 발효산물의 생산 추이를 발효산물별로 나타낸 결과이다. Fig. 1-5의 (A)는 pH에 따라 생산되는 에탄올의 변화량을 나타내었다. 결과에 나타난 바와 같이 발효조내에 유지되는 pH에 따라서 생성되는 에탄올의 농도는 크게 차이나지 않지만 pH가 7로 유지되는 발효조에서 발효 초기 가장 활발하게 발효가 진행되었음을 알 수 있었다.

Fig. 1-5의 (B)에 나타나 있는 것처럼 pH에 따라 생산되는 아세트산의 변화량은 pH가 증가할수록 아세트산의 농도도 증가하였다. 특히 pH 변화와 연관시켜 살펴보았을 경우 pH가 4로 유지되었을 경우 아세트산의 농도가 거의 변화하지 않았지만 pH가 5로 유지된 발효조의 실험 종반부의 pH는 6으로 상승하였으며 이때 발효조내의 아세트산의 농도가 점차 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 아세트산 생성균의 경우 pH가 6이상일 경우 균의 활성이 높아지는 것으로 사료된다.

Fig. 1-5의 (C)에 나타난 결과는 pH에 따라 생산되는 프로피온산의 변화량을 나타낸 것이다. 프로피온산의 생성량은 다른 발효산물에 비해 많은 비중을 차지하진 않지만, 변화양상은 아세트산의 변화양상과 거의 흡사하였다. 따라서 프로피온산을 생성하는 발효균주 역시 아세트산을 생성하는 발효 균주와 마찬가지로 pH 6이상의 pH 범위에서 활성이 높아지는 것으로 사료된다.

Fig. 1-5의 (D)에 나타난 뷰티릭산의 변화량에 대한 결과에서는 pH 4 영역에서는 농도의 변화가 거의 일어나지 않았다. 그러나 pH 5 이상의 영역에서는 뷰틱릭산의 농도가 점차적으로 증가하는 것이 관찰되었고 pH가 7로 유지되었을 때에는 뷰티릭산을 생산하는 발효균주의 활성이 활발하여 뷰틱산의 생산량이 발효실험 초기부터 뚜렷하게 증가하는 것을 알 수 있었다.

젖산의 경우 발효산물 가운데 가장 많은 양이 생산되었으며, 다른 발효산물의 생성조건과는 달리 산성영역에서 젖산발효균주의 활성이 높은 것을 Fig. 1-5의 (E)를 통하여 알 수 있었다. 결과에 나타난 바와 같이 젖산의 생성은 pH 4를 유지한 발효조에서 가장 높았으며, pH 5를 유지한 발효조에서도 pH 4를 유지한 발효조에서 생성된 젖산의 양 보다는 적었지만 비교적 발효가 잘 일어나는 것으로 관찰되었다.

하지만 발효조의 pH가 6이상으로 변하였을 경우에는 발효조내의 젖산의 양은 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 이것은 발효조내의 젖산발효균주의 최적 pH는 pH 5이하인 것으로 사료되며, pH가 6이상으로 증가할 경우 젖산균의 활성이 떨어

져 젖산의 생산량이 감소하고, 발효조내의 다른 유기산을 생산하는 발효균주에 의해 생산된 젖산이 다른 산물로 전환되는 것으로 생각된다.

Fig. 1-5의 (F)는 pH에 따라 생산되는 발레릭산의 변화량을 나타낸 것이다. 본 실험에서 생성된 발레릭산의 농도는 극히 미미하였으며, 실험 종반부에 발레릭산의 농도가 실험조건에 따라 소량 증가하였지만 실험오차 등을 고려할 때 결과에 대한 유의성을 찾아낼 수 없었다.

Horiuchi 등[2)]과 Zoetemeyer 등[3)]의 결과에 의하면 혐기성 산 발효조의 pH가 5.0 ~ 7.0일 경우 생산되어지는 주된 유기산은 뷰티릭산과 아세트산이었으며, 이것은 본 연구의 결과와 유사하였다. 또한 Horiuchi 등[2)]은 pH 8에서는 아세트산과 프로피온산이 생산되는 유기산의 주된 산물이었다고 보고하였으며, 본 연구에서도 발효조내의 pH가 6 ~ 7로 유지될 때 아세트산과 프로피온산의 생산량이 계속해서 증가하고 있는 것이 관찰되었으므로 pH 8로 유지될 경우 Horiuchi 등의 결과와 일치할 것으로 사료된다. 반면에 Zoetemeyer 등[3)]은 pH 8에서 젖산, 포름산, 에탄올이 혐기성 산 발효조내의 주생산물로 조사되었지만, 젖산의 경우 본 연구에서는 pH 4와 5로 유지된 혐기성 산 발효조의 주생산물 이었다. 동일한 산물의 생산 pH가 다르게 나타나는 현상의 원인으로는 초기 접종된 접종원의 차이로 판단되며, 실제로 Zoetemeyer 등[3)]의 경우 유기산 생산을 위해 활성슬러지를 사용하였으며, 본 연구에서는 절대 혐기성 세균인 *Cl. butyricum*과 *Cl. acetobutylicum*이 접종되어 음식물 쓰레기에 적응된 발효액을 사용하였다. 이처럼 발효조내에 존재하는 서로 다른 미생물의 군집에 의한 유기산 생성의 경우 발효조의 pH는 유기산 생산의 일반적인 지표일 뿐만 아니라 선택적으로 유기산을 생산할 수 있는 중요한 인자로 판단된다.

Fig. 1-6은 pH에 따라 생산되는 총 유기산의 변화량을 나타낸 것이다. 결과에 나타난 바와 같이 발효초기에는 pH가 낮을수록 생산되는 유기산의 총양은 증가하였다. 이것은 낮은 pH에서 생산되는 젖산의 농도가 다른 발효산물에 비해 월등히 높기 때문에 이로 인한 것으로 사료되며 실험 종반부에서는 특별한 상관관계를 찾을 수는 없었다.

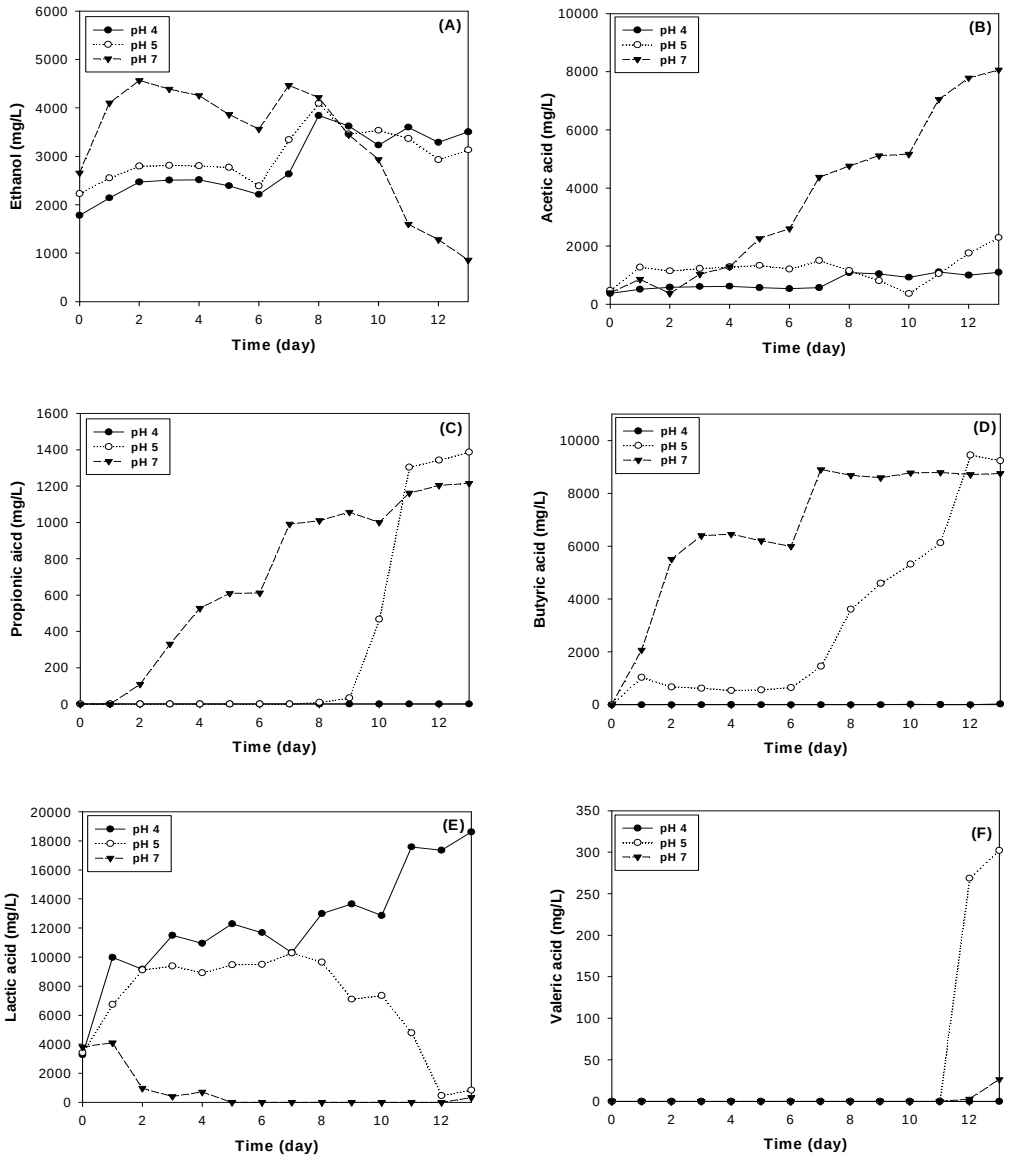


Fig. 1-5. pH-dependent ethanol and various organic acids production in the acidogenic fermentor; (A) ethanol, (B) acetic acid, (C) propionic acid, (D) butyric acid, (E) lactic acid, and (F) valeric acids.

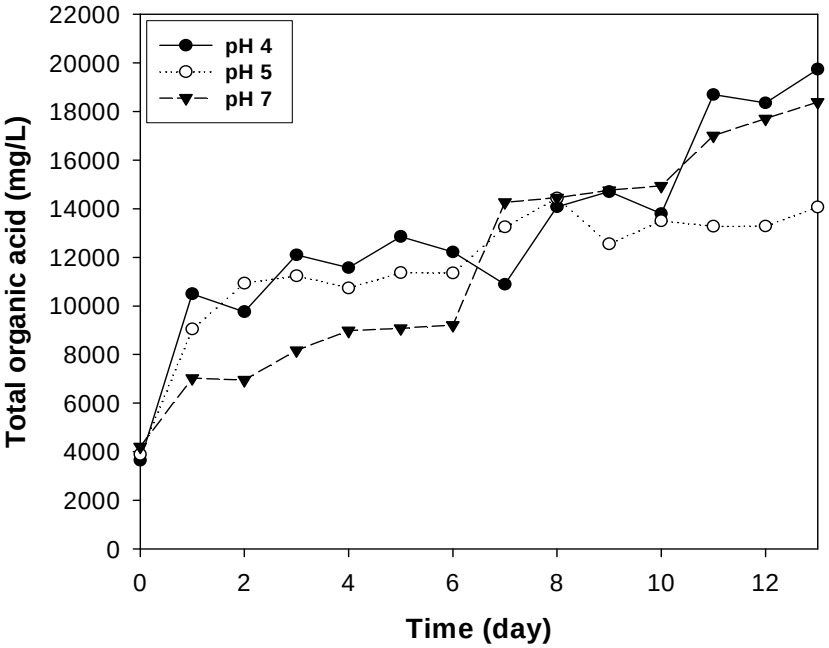


Fig. 1-6. pH-dependent total organic acids production in the acidogenic fermentor.

미생물에 의해 생산되는 유기산은 주로 아세트산, 프로피온산, 뷰티릭산, 젖산이다. 이렇게 생산된 유기산은 식품산업, 화장품산업, 제약산업, 피혁산업 그리고 화학산업 등에서 주원료로 광범위하게 사용되고 있다[5-10]. 따라서 음식물쓰레기와 같은 재생가능 폐기물로부터 부가가치가 높은 유기산을 생산하는 것은 자원의 합리적 이용 및 환경보전에 기여할 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구결과는 다양한 목적으로 사용되는 유기산을 혐기성 소화과정 중 발효조의 pH만을 조절함으로써 특정 유기산을 선택적으로 생산할 수 있는 방법으로 판단된다.

다. 결론

○ pH 영역에 따른 2차 혐기성 산 발효조의 유기산 생성 경향은 pH 4 영역의 경우 젖산의 생성이 우수하였고, pH 5 ~ 7 영역에서는 아세트산과 뷰티릭산의 생성이 우수하였으며, pH 8 이상일 경우 프로피온산의 생성이 우수할 것으로 사료되었다.

○ 효과적인 메탄 발효를 위해서는 산 발효조의 pH가 5 ~ 7사이로 유지되는 것이 바람직한 것으로 조사되었다.

○ 혐기성 산 발효조의 pH 조절은 다양한 목적으로 사용되는 유기산을 혐기성 소화과정 중 발효조의 pH만을 조절함으로써 특정 유기산을 선택적으로 생산할 수 있는 방법으로 판단되었다.

참고문헌

1. Pullammanappallil, P. C., D. P. chynoweth, G. Lyberatos, and S. A. Svoronos. “Stable performance of anaerobic digestion in the presence of a high concentration of propionic acid” 2001. *Bioresource Technol.* **78**, 165-169.
2. Horiuchi, J., T. Shimizu, K. Tada, T. Kanno, and M. Kobayashi, “Selective production of organic acids in anaerobic acid reactor by pH control” 2002. *Bioresource Technol.* **82**, 209-213.
3. Zoetemeyer, R. J, J. C. Jeuvel, and A. Cohen, "pH influence on acidogenic

disimilation of glucose in anaerobic digester." 1982. *Wat. Res.* **16**, 309-311.

4. Horiuchi, J., T. Shimizu, T. Kanno, and M. Kobayashi, "Dynamic behavior in response to pH shift during anaerobic acidogenesis with a chemostat culture." 1999. *Biotechnol. Techniques.* **13**, 155-157.
5. Woo, C. H., C. H. Park, and H. H. Yoon, "Production of acetic acid from cellulosic biomass." 2000. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 458-463.
6. Milcent, S., and H. Carrere, "Clarification of lactic acid fermentation broths." 2001. *Separ. Purifi. Technol.* **22-23**, 393-401.
7. Ravinder, T., M. V. Swamy, G. Seenayya, and G. Reddy, "*Clostridium lentocellum* SG6-a potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid." 2001. *Bioresource Technol.* **80**, 171-177.
8. Kim, J. S., H. J. Kim, K. K. Oh, and Y. S. Kim, "Acetic acid production using xylose and corn steep liquor by *thermoaceticum* strain." 2002. *J. Ind. Eng. Chem.* **8**, 519-523.
9. Hofvendahl, K., and B. Hahn-Hagerdal, "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." 2000. *Enzyme and microbial technol.* **26**, 87-107.
10. Senthuran, A., V. Senthuran, R. Hatti-Kaul, and B. Mattiasson, "Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor : a step towards optimization." 1999. *J. Biotechnol.* **73**, 61-70.

부록 2. 수소 생산

Abstract

Hydrogen is a clean energy alternative to fossil fuels. Some bacteria have been known to produce hydrogen from organic compounds by anaerobic fermentation. In this study, hydrogen production by *Citrobacter amalonaticus* Y19 from glucose was investigated. Optimum culture conditions for hydrogen production by *C. amalonaticus* Y19 were as follows: initial pH of 7.0, culture temperature 35℃ and initial glucose concentration of 1%. Agitation accelerated the hydrogen production. Organic nitrogen sources were more effective than inorganic nitrogen sources, and yeast extract was the best nitrogen source for hydrogen production. Among metal ions, $CuSO_4$ was most effective for hydrogen production. In this condition, the maximum H_2 yield was estimated to be 215.1 mmol H_2/mol glucose, and hydrogen content in the biogas was 22%. On the other hand, the maximum H_2 yield was estimated to be 227.6 mmol H_2/mol glucose, and hydrogen content in the biogas was about 24%, during the fermentation when pH was maintained at 5.5.

가. 서 론

인류의 산업발달과 성장을 위한 에너지소비는 심각한 에너지 문제에 직면할 위기에 처해 있고, 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 재생가능하고 환경친화적인 대체에너지 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 특히 수소에너지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며[1-3], 현재 알려진 수소의 생산방법으로는 화석연료, 물, 바이오매스로부터 열화학적, 전기화학적, 광화학적 혹은 생물학적 방법이 있다. 화석연료를 이용한 열화학적 방법에 의한 수소생산은 공정의 안전성과 경제성에 대한 문제 및 화석연료의 부존성과 편재성에 의한 국가간 긴장과 지구환경 오염 등의 문제점을 가지고 있다. 그러나 생물학적 수소생산의 경우 열화학적 방법에 비해 수소 생산수율은 떨어지지만, 보

다 더 안전하며 바이오매스를 포함한 유기물과 물로부터 미생물에 의해 직접적으로 수소를 생산할 수 있기 때문에 에너지 생산과 더불어 대량으로 발생하는 재생가능 폐기물도 처리할 수 있는 특징을 가지고 있다. 수소생산에 이용되는 다양한 미생물들은 조류[4,5], 광합성세균[6-8] 및 혐기성 발효미생물[9-13]들이 있으며, 특히 혐기성 발효미생물을 이용하는 경우 빛을 이용하여 수소를 생산하는 조류 및 광합성 세균을 이용한 수소생산 시설보다 소규모이고 기술적 제한이 적어 수소생산이 용이하며 다양한 유기성 물질을 기질로 사용할 수 있으므로, 기존의 혐기성 공정을 재이용하여 생산할 수 있다는 장점이 있다.

혐기성 발효미생물에 의해 glucose로부터 수소가 생산되는 과정은 아세트산과 뷰티릭산을 생성시키는 반응들에 의해 일어나며 아세트산이 생산되는 경우 1 mole의 glucose로부터 최대 4 mole의 수소가 생산될 수 있고, 뷰티릭산이 생산되는 경우에는 최대 2 mole의 수소가 생산될 수 있다. 따라서 발효과정 중 발생되는 유기산의 생산조건을 조절함으로써 수소생산량을 증가시킬 수 있다. 본 연구에서는 *Citrobacter amalonaticus* Y19를 이용하여 회분식으로 수소를 생산하기 위한 발효 최적화 조건을 탐색하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 *Citrobacter amalonaticus* Y19 이며, 부산대학교 박성훈 교수연구실로부터 분양받아 실험에 사용하였다. 기본배지로 PFN Medium을 사용하였다. 그 조성은 1 L당 glucose 10 g, yeast extract 3 g, NH_4Cl 8.1 g, K_2HPO_4 19.3 g, KH_2PO_4 9.4 g, NaCl 8 g, $MgCl_2$ 31 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.09 g, trace element solution 3 mL, vitamin 6 mL이다. Trace element solution은 1 L당 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1 g, H_3BO_3 0.03 g, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 g, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.0134 g, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.03 g, $NaSeO_3$ 0.01 g, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.02 g이며, vitamin은 1 L당 biotin 0.05 g, folic acid 0.05 g, riboflavin 0.125 g, thiamin HCl 0.125 g, Ca-D-pantothenate 0.125 g, cynocobalamin 0.125 g, *p*-aminobenzoic acid 0.125 g, nicotinic acid 0.125 g이었다.

(2) 배양조건

균주의 전배양은 100 mL media bottle에 50 mL의 배지를 넣고 멸균한 후 vacuum anaerobic chamber내에서 균주를 접종한 다음 35℃, 150rpm으로 진탕배양 하였으며, 실험에 사용하기 전에 12시간마다 계대배양 하였고 전배양을 최소 3차례이상 수행하였다. 수소생산을 위한 본 배양은 가스측정 및 시료채취를 위해 상부에 가지가 달린 500 mL media bottle을 만들어 200 mL의 배지를 넣고 전배양에서 성장시킨 균주를 1% (v/v) 접종하여 전배양과 같은 조건으로 회분식 배양하였다. 또한 수소생산 실험 중 배지의 pH를 일정하게 유지시키는 실험에서는 5 L 발효조 (KoBioTech, KF-5L)에 2 L의 배지를 넣고 위와 동일한 방법으로 배양하였다.

(3) 수소생산의 최적화 조건탐색

수소생산을 최적화하기 위해 배양배지의 초기 pH, 교반유무, 온도, glucose농도, 질소원이나 금속이온의 종류 및 발효조내의 pH 유지에 따른 수소생산의 영향을 검토하였다.

(4) 분석방법

발효과정 중 발생하는 바이오가스의 양은 가스미터를 이용하여 측정하였으며, pH는 pH meter (Orion, 720A)를 사용하였고, 발효액 내의 당농도는 DNS 법에 의해 측정하였다. 수소의 함량분석은 반응기내 head space 가스를 gas tight syringe로 0.5 mL 취하여 gas chromatography (Shimazu, GC-17A)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 molecular sieve 5A (Alltech)를 사용하였고, thermal conductivity detector (TCD)로 분석하였다. 분석조건은 column, injector, detector온도 모두 60℃이였으며, carrier gas는 Ar을 사용하였고, flow rate는 45 mL/min으로 유지하였다.

발효액내의 유기산의 함량분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 균체와 상등액을 원심분리기로 분리한 후 상등액 100 μL를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA*/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detecter (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 최초 135℃에서 2분간 유지한 후 165℃

까지 분당 15℃씩 승온하여 1.7분간 유지한 다음 다시 180℃까지 분당 15℃씩 승온한 뒤 20분간 유지하였고, 이후 또 다시 200℃까지 분당 15℃씩 승온하여 15분간 유지하였다. 또한 Injector와 detecter의 온도는 모두 200℃이었으며, carrier gas는 N_2를 사용하였고, flow rate는 24 mL/min으로 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

(1) 수소생산에 대한 초기 pH의 영향

초기 pH에 따른 *C. amalonaticus* Y19의 생장정도 및 수소생산에 대한 영향을 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 4 ~ 8로 조절하였다. 그 결과 Fig. 2-1의 (A)에 의하면 초기 pH를 7로 조절한 경우 9시간 후 가장 높은 흡광도를 나타냈으며 다음으로 8과 6으로 초기 pH를 조절한 순으로 나타났다. 또한 Fig. 2-1의 (B)에 나타난 바와 같이 12시간 동안 생산된 수소의 양은 초기 pH가 7인 경우 55 mL로 가장 많은 양의 수소를 생산하였으며, 균주의 성장 조건과는 대조적으로 수소생산에 있어서는 pH 6인 경우가 pH 8인 경우 보다 더 많은 수소를 생산하였다. 따라서 초기 pH를 7로 조절한 경우가 가장 수소생산에 효율적인 것으로 사료된다. 또한 초기 pH를 7로 조절하였을 경우 생산된 바이오가스 가운데 수소의 최고 함량은 20% 이었다. Lee 등[14)]의 결과에 의하면 초기 pH가 갑자기 떨어지면서 수소가 생산된다고 보고하였다. 또한 Khanal 등[15)]은 초기 pH는 수소생산에 있어서 중요한 인자로 작용하며, 갑작스런 pH의 감소에 의한 환경조건의 변화가 세균의 물질대사의 변화를 가져오고 그로인해 수소생산의 저해를 초래한다고 보고하였다. 따라서 초기 pH가 높을수록 빠른 pH 변화에 대한 충격의 영향을 덜 받기 때문에 수소생산에 있어서 효율적이라고 생각된다. 하지만 *C. amalonaticus* Y19의 경우 초기 pH 8이상에서는 수소생산이 현저히 저하하므로 *C. amalonaticus* Y19의 최적 초기 pH는 7로 판단된다.

(2) 교반유무에 따른 수소생산의 영향

교반의 유무가 수소생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 균주 배양시 진탕배양기의 교반속도를 150 rpm으로 해주었을 경우 12시간 동안 발효하는 과정 중 55 mL의 수소를 발생한 반면, 교반하지 않은 경우 15 mL의 수소를 발생하여 약 3배

의 수소 발생량 차이를 보여주었다 (data not shown). 그러므로 수소생산에 있어서 교반은 반드시 필요한 조건으로 판단된다.

(3) 수소생산에 대한 발효온도의 영향

Fig. 2-2의 (A)와 (B)에서는 발효온도에 따른 균체의 생장정도 및 수소생산에 대한 결과를 나타내었다. 발효온도를 각각 25 ~ 40℃까지 5℃ 간격으로 조절하여 실험을 수행하였다. 발효온도를 35℃로 조절하였을 때 균체의 성장이 가장 빨랐으며, 또한 생산된 수소의 양은 50 mL로 가장 많은 양의 수소를 생산하였다. 따라서 35℃의 발효온도에서 수소생산량이 최대로 나타난 것으로 보아 *C. amalonaticus* Y19의 최적배양온도는 35℃로 사료된다. 이것은 Oh 등[16)]의 결과와 일치하였다.

(4) 수소생산에 대한 glucose 농도의 영향

Glucose 농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 glucose 농도를 0.1 ~ 5%로 조절하여 실험한 결과 *C. amalonaticus* Y19는 배지내의 glucose 농도가 5% 이상에서 현저히 생장에 저해를 받았다 (Fig. 2-3 (A)). 또한 수소생산에 있어서 12시간의 발효기간 중 2%의 초기 당농도에서 65 mL의 수소를 생산하여 가장 많은 수소를 생산하였지만 (Fig. 2-3 (B)), 생산수율을 고려하면 53 mL의 수소를 생산하고 발효 종료 후 600 mg/L의 glucose 농도만 남아 있는 조건인 배지내 초기 glucose 농도가 1%인 것이 보다 효율적으로 판단되며, 이때 생산수율은 215.1 mmol H_2/mol glucose이었다. (Fig. 2-3 (C)). 따라서 남아있는 glucose 농도 및 수소생산량을 고려해 볼 때 1%의 초기 glucose 농도가 최적인 것으로 사료된다.

(5) 질소원이 수소생산에 미치는 영향

질소원이 수소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지조성에 각종 유기질소원과 무기질소원을 각각 0.3% (w/v) 농도로 하여 생산된 수소를 Fig. 2-4의 (A)에 나타내었다. 이 균주는 무기질소원보다 유기질소원을 더 잘 이용하여 수소생산에 효과적임을 알 수 있었다. 특히 다양한 질소원 가운데 yeast extract가 수소를 생산하는 능력 면에서 가장 좋았으며 12시간 동안 54 mL의 수소를 생산하여 가장 많은 양의 수소를 생산하였으며, beef extract, tryptose, peptone 등의 순으로 수소의 생산량이 높은 것으로 나타났다.

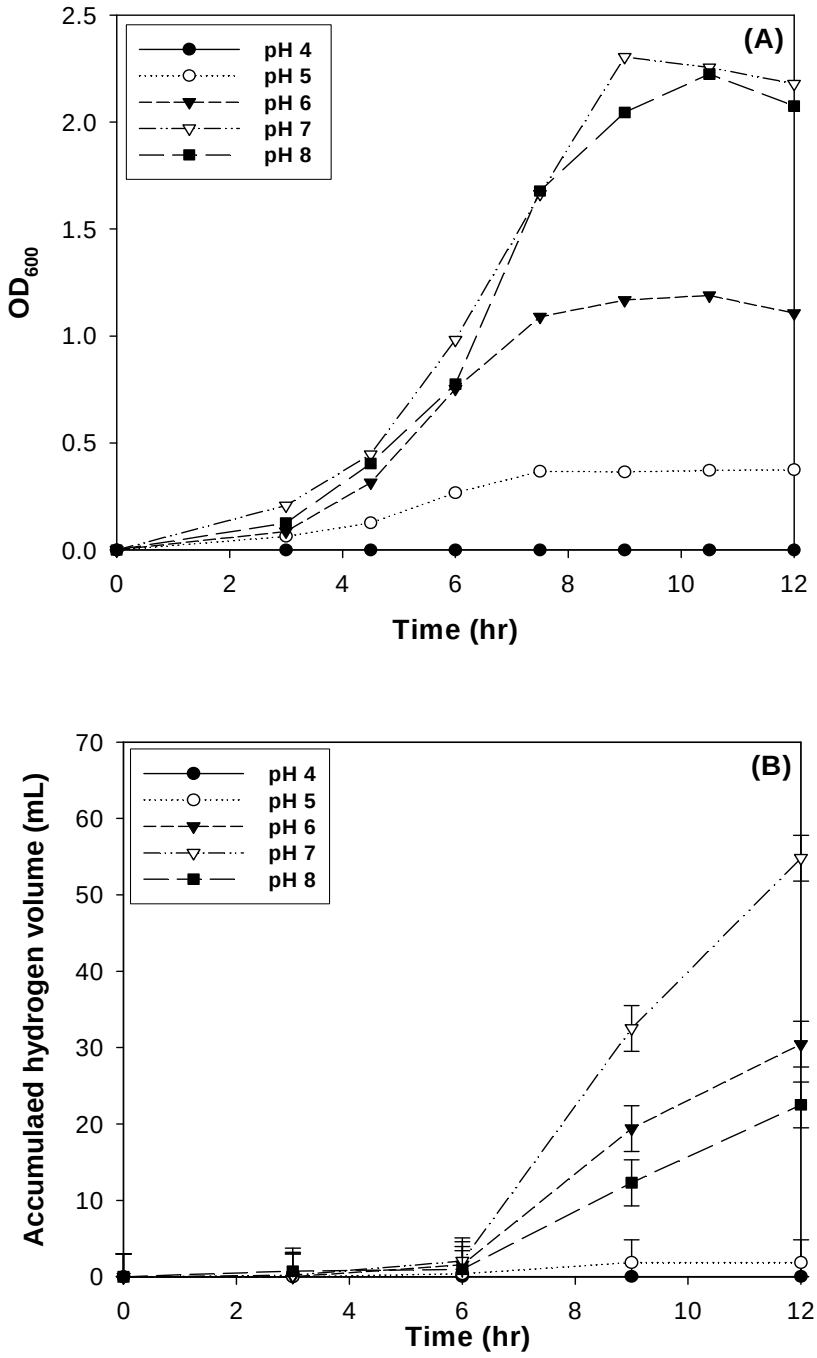


Fig. 2-1. Effect of initial pH on the cell growth (A) and hydrogen production (B).

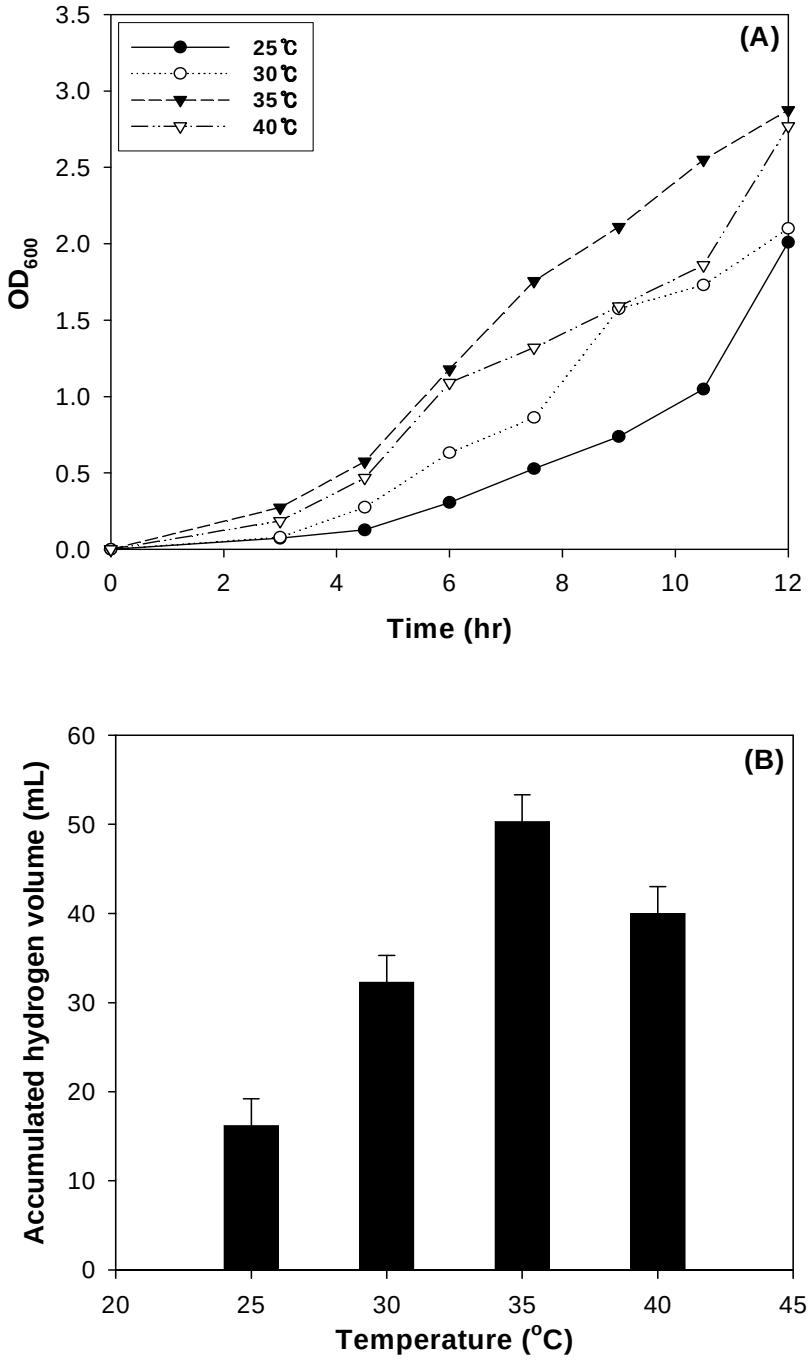


Fig. 2-2. Effect of temperature on the cell growth (A) and hydrogen production (B).

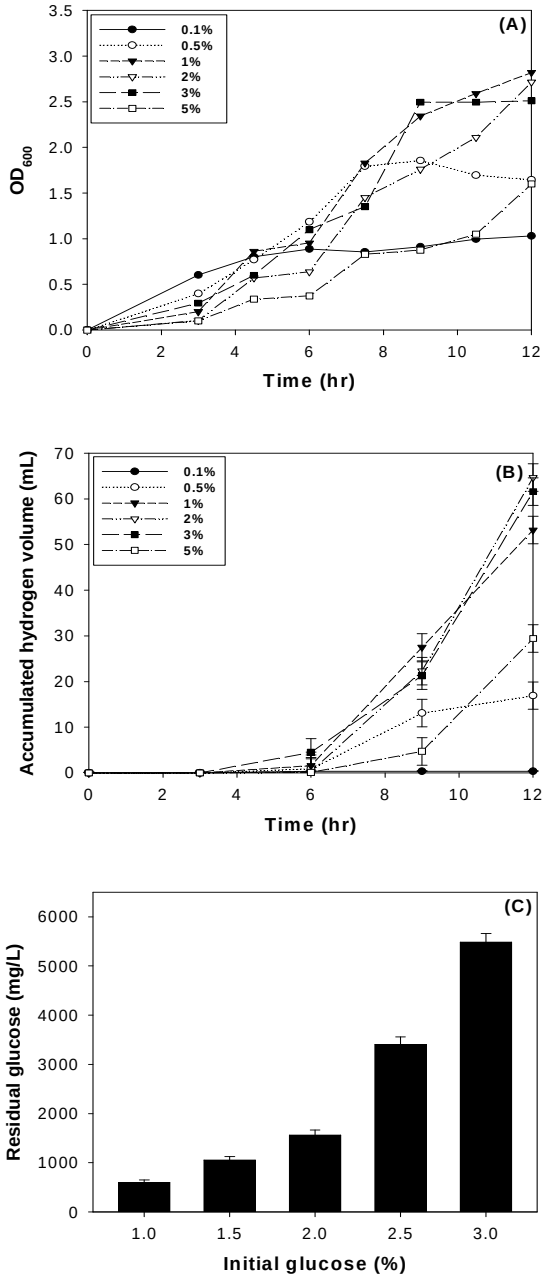


Fig. 2-3. Effect of glucose concentration on the cell growth (A) and hydrogen production (B); (C) Increase of residual glucose concentration with different initial concentration after reaction finished.

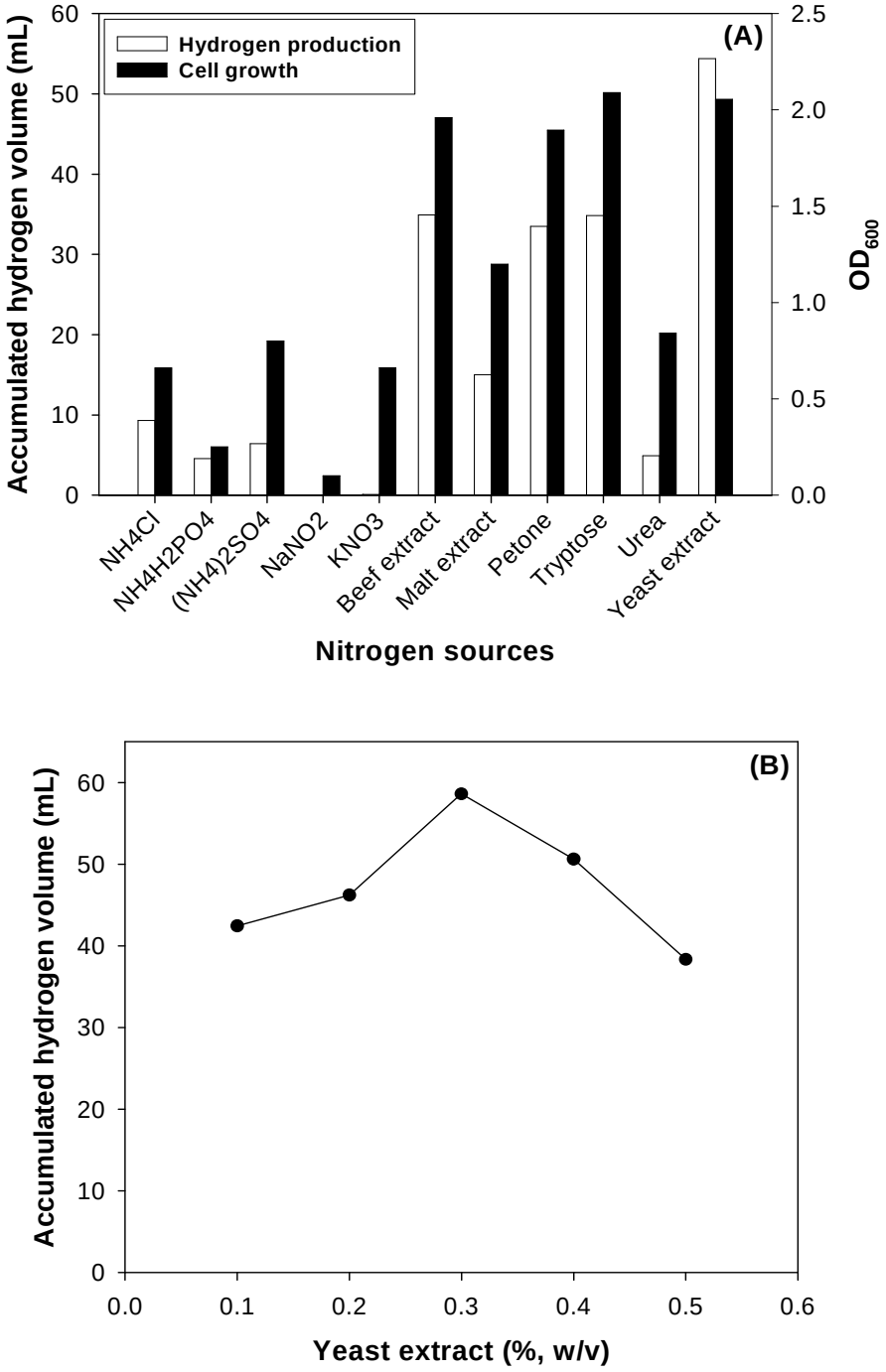


Fig. 2-4. (A) Effect of nitrogen sources on the cell growth and hydrogen production; (B) Effect of various yeast extract concentration on hydrogen production.

이것은 yeast extract와 같은 복합질소원에 함유되어 있는 아미노산 또는 비타민 등과 같은 영양성분이 수소생산에 영향을 미친것으로 사료된다.

Fig. 2-4의 (B)는 질소원 가운데 수소생산량이 가장 높은 yeast extract의 농도를 0.1 ~ 0.5% (w/v) 까지 조절하였을 때 yeast extract의 최적 농도를 산출하여 나타내었다. Fig. 2-4의 (B)에 나타난 바와 같이 0.3% (w/v)의 yeast extract를 첨가하였을 경우 12시간 동안 59 mL의 수소를 생산하여 가장 높은 수소생산량을 보이므로 yeast extract의 최적 농도는 0.3% (w/v)로 판단된다.

(6) 금속이온이 수소생산에 미치는 영향

그리고 Fig. 2-5의 (A)는 각종 금속이온이 수소생산에 미치는 영향을 나타내었다. 금속이온의 미량성분은 미생물 성장과 수소생산의 임계요소로 알려져 있다[17]. 각종 금속이온 농도를 0.15% (w/v) 농도로 하였을 때, 여러 가지 금속이온 가운데 Na_2SeCl_3는 균주성장에 효과적이었고, $CuSO_4$의 경우에는 수소생산에 가장 효과적이었다. 또한 수소생산에 가장 영향을 미친 $CuSO_4$의 농도를 0.1 ~ 0.3 mg/L의 농도범위로 하였을 때 수소 발생량을 Fig. 2-5의 (B)에 나타내었다. 0.15 mg/L 농도였을 때 64 mL의 수소를 생산하여 배지내의 $CuSO_4$의 최적농도는 0.15 mg/L으로 판단된다.

(7) 발효액 최적 pH 탐색

발효액의 최적 pH를 조사하기 위해 발효가 진행되는 동안 HCl과 KOH 용액을 이용하여 발효조내의 pH를 일정하게 유지하였다. pH조절은 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 그리고 7.0으로 유지하였으며 결과는 Fig. 2-6에 나타내었다. 수소생산에 있어서는 발효액의 pH가 5.5로 유지되었을 때 17시간동안 1%의 glucose로부터 581 mL의 수소를 생산하여 다른 조건에 비해 월등히 많은 양의 수소를 생산하였고, 이 때 생성된 바이오가스 중 수소의 함량은 24% 이었다. 일반적으로 수소와 유기산을 생성하는데 필요한 적정 pH는 4.8 ~ 6.8이라고 Van Andel 등[18]은 보고하고 있으며, 본 실험의 결과 또한 유사하게 나타나 *C. amalonaticus* Y19에 의한 수소생산의 경우 pH를 5.5로 유지하였을 때 최대이므로, 수소생산 최적 pH는 5.5로 유지하였을 때 최적임을 알 수 있었다.

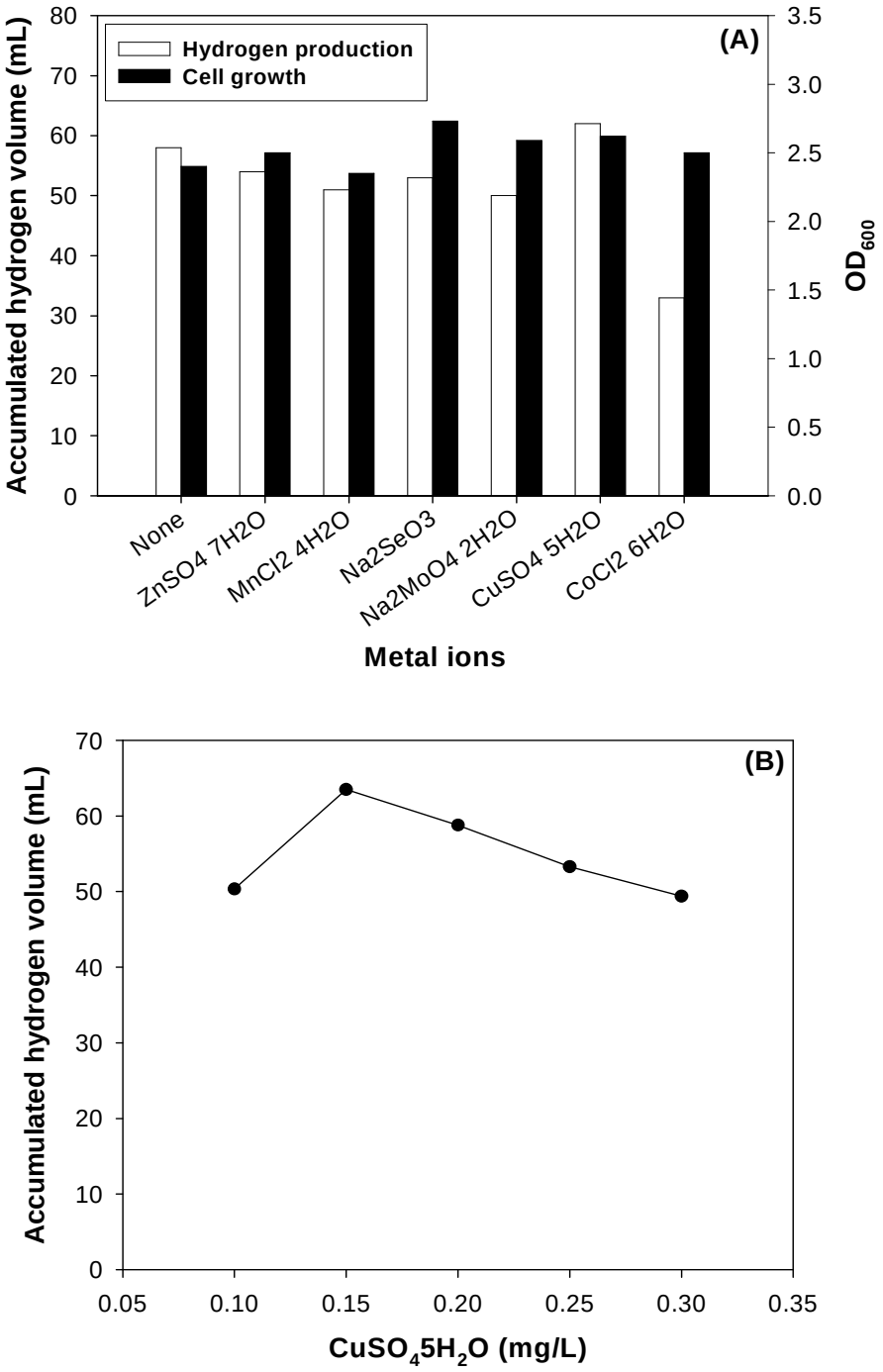


Fig. 2-5. (A) Effect of metal ions on the cell growth and hydrogen production; (B) Effect of various $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ concentration on hydrogen production.

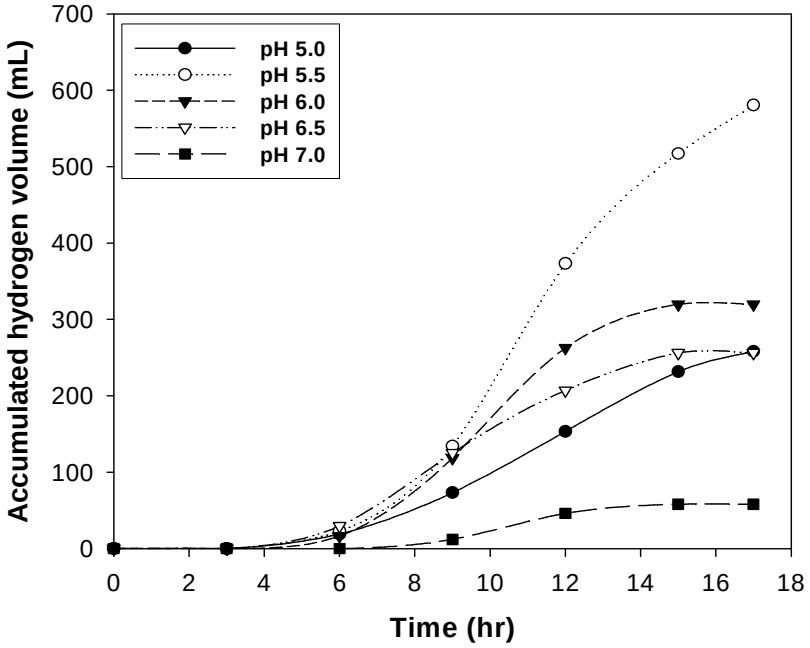


Fig. 2-6. Effect of pH on the hydrogen production.

따라서 *C. amalonaticus* Y19를 이용해 회분식 발효로 수소생산을 할 경우 초기 pH를 7로 한 후 서서히 발효조의 pH를 5.5로 유지하고, 교반을 시키며, 35℃에서 1 ~ 2%의 glucose 농도를 가지고 발효할 경우 수소생산을 최적화할 수 있을 것으로 사료된다.

또한 본 연구에서 수행된 3단계 메탄 발효시스템의 2차 공정은 유기산 생성공정이며, 이론적 고찰에서 밝힌바와 같이 아세트산과 뷰티릭산과 같은 유기산 생성조건은 수소를 생산하는 과정에 해당하기도 한다. 더욱이 *C. amalonaticus* Y19의 수소생산 최적 조건가운데 온도와 pH 영역의 경우 2차 혐기성 산 발효조의 운전 조건과 거의 같기 때문에 *Cl. butyricum* 이나 *Cl. acetobutylicum*과 같이 2차 혐기성 산 발조에서의 사용이 가능할 것으로 판단된다.

다. 결론

○ PFN medium에서 수소생산의 최적 초기 pH및 온도는 각각 7.0, 35°C으로 조사되었다.

○ 교반은 수소생산에 반드시 필요하며 교반하지 않을 경우 보다 3배 더 많은 수소 생산하였다.

○ glucose 농도가 2%일때, 12시간동안 65mL의 가장 많은 수소를 생산 하였지만 생산수율면에서는 53 mL의 수소를 생산한 1% glucose 조건이 가장 좋은 것으로 조사되었다.

○ 각종 질소원 중에서 유기질소원이 무기질소원보다 수소생산에 효과적이며, 가장 효과적인 질소원은 yeast extract이였으며 yeast extract의 최적농도는 0.3%로 조사되었다.

○ 각종 금속이온 중에서 $CuSO_4$ $5H_2O$가 수소생산에 가장 효과적으로 나타났으며, 최적농도는 0.15 mg/L로 조사되었다.

○ 수소생산 발효조의 pH를 일정하게 유지할 경우 발효조의 유지 pH는 5.5로 유지하는 것이 최적조건으로 조사되었다.

참고문헌

1. Oh, Y. K., M. S. Park, E. H. Seol, and S. Park, “Isolation of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of upflow anaerobic sludge blanket reactor.” 2003. *Biotech. Bioprocess Eng.* **8**, 54-57.
2. Oh, Y. K., Y. J. Kim, J. Y. Park, T. H. Lee, M. S. Kim, and S. Park, “Biohydrgen production from carbon monoxide and water by *Rhodopseudomonas palustris* P4.” 2005. *Biotech. Bioprocess Eng.* **10**, 270-274.
3. Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung, “Culture conditions for hydrogen production of *Enterobacter cloacae* YJ-1.” 2004. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19(6)**, 446-450.
4. Schnackenberg, J., R. Schulz, and H. Senger, "Characterization and purification of a hydrogenase from eukaryotic green alga *Scendesmus obliguus*." 1993. *FFB Lett.* **327**, 21-24.
5. Greenbaum, E., "Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In *Hydrogen energy progress VIII,* T.N. Veziroglu, P. K. Takashashi Eds.; Proceedings 8th WHEC" 1990. Hawaii. New York: Pergamon Press, pp743-754.
6. Fascetti, E., E. D' addario, O. Todini, and A. Robertiello, "Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes." 1998. *J. Hydrogen Energy* **23**, 753-760.
7. Krahn, E., K. Schnerder, and K. Muller, "Comparative characterization of H_2 production by the conventional Mo nitrogenase and alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobater capsulata* hap mutants." 1996. *Appl Microbiol Biotechnol.* **46**, 285-290.
8. Singh, S. P., and S. C. Srivastava, "Isolation of non-sulfur photo-synthetic bacteria strains efficient in hydrogen production at elevated temperatures" 1991. *J. Hydrogen Energy* **16**, 404-405.

9. Tanisho, S, N. Wakao, and Y. Kokako, "Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*." 1983. *J. Chem. Eng. Jpn.* **16**, 529-530.
10. Kumar, N, and D. Das, "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08." 1999. *Process Biochem.* **35**, 589-594.
11. Tanisho, S, Y. Suzuki, N. Wakoo, "Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005." 1987. *J. Hydrogen Energy* **12**, 623-627.
12. Taguchi, F., J. D. Hang, S. Taguchi , and M. Morimoto, "Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites." 1992. *J. Fermentation and Bioeng.* **73(3)**, 244-245.
13. Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebe, and P. Peringer, "Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose." 2004. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1479-1485.
14. Lee, Y. J., T. Miyahara, and T. Noike, "Effect of pH on microbial hydrogen fermentation." 2002. *J Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 694-698.
15. Khanal, S. K., W. H. Chen, L. Li, and S. Sung, "Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products." 2004. *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1123-1131.
16. Oh, Y. K., E. H. Seol, J. R. Kim, and S. H. Park, "Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19." 2003. *Int. J. Hydrogen Energy* **28**, 1353-1359.
17. Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung, " Medium composition of *Enterobacter cloacae* YJ-1 for maximizing hydrogen production." 2005. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **20(5)**, 350-354.
18. Van andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure, "Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture." 1985. *Appl. Micro. Biotechnol.* **23**, 21-26.

부록 3. 알코올 생산

Abstract

Several microbial strains were isolated and characterized from food waste fermentation broth. From the secondary acidogenesis reactor, a novel strain KA4 responsible for alcohol fermentation was isolated and characterized. The cell shape was oval and its dimension was 5.5 ~ 6.5 × 3.5 ~ 4.5 ㎛. This strain was identified as *Saccharomyces cerevisiae* KA4 by 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence. Optimal culture temperature was 30 ~ 35℃. Cells were tolerant to 5% (v/v) ethanol concentration, however, were inhibited significantly by higher ethanol concentration up to 7%. The strain could grow well up to 50% (w/v) initial glucose concentration in the YM medium, however, the optimal concentration for ethanol fermentation was 10%. It could produce ethanol in a broad initial pH range from 4.0 to 10.0, and optimal pH was 6.0. In this condition, the strain converted 10% glucose to 7.4% ethanol during 24 hr, and ethanol yield was estimated to be 2.87 mol EtOH/mol glucose.

가. 서 론

인구의 증가와 산업의 발달은 에너지의 사용을 계속해서 증가시키고 있으며, 이로 인해 화석연료의 매장량이 점차 감소하고 있다. 따라서 재사용이 가능하고, 지속가능하며, 효과적이고, 경제적이며, 편리하고 안전한 대체에너지원 개발이 절실히 필요하게 되었다.

당의 발효과정을 통해 생산되는 에탄올은 청정에너지원인 동시에 재생가능한 에너지원이기 때문에 많은 주목을 받고 있고[1)], 에탄올 생산에 드는 비용을 절감하기위한 방안으로 에탄올 생산의 원료물질을 각종 유기성 폐기물과 같은 biomass를 적극 이용하려는 시도가 진행되고 있다[2-5)]. 바이오매스로부터 얻어지는 에탄올의 에너지 함유량은 에탄올을 생산하는데 요구되는 에너지보다 높다고 Shapouri 등[6,7)]은 보고한 바 있고,

특히 바이오매스의 발효로부터 생산되는 알코올은 그 물리적, 연소적 특성이 석유와 비슷하여 대체에너지로 각광을 받고 있으며[8], 액체연료로서 휘발유보다 장점이 많기 때문에 재생가능 연료원으로 널리 연구되어지고 있다[9].

최근 국내에서 발생하는 재생가능한 폐기물은 음식물 쓰레기를 포함한 생활 폐기물을 비롯하여 농산부산물, 하수 슬러지 등의 사업장 폐기물, 축산폐기물 등 년간 1억 500만톤 이상의 재생가능 폐기물이 발생하고 있다. 따라서 이러한 재생가능 폐기물을 에탄올 생산의 원료물질로 이용한다면 폐기물의 처리를 통한 환경오염방지 및 신재생 에너지 개발이라는 상승효과를 얻을 수 있으며, 이를 위한 첫 단계로서 바이오매스를 이용하여 에탄올 생산이 우수한 균주를 확보하는 것은 매우 중요하다.

본 연구실에서는 음식물쓰레기 처리를 위해 반혐기성 가수분해/산 발효공정, 혐기성 산 발효공정, 혐기성 메탄발효공정으로 구성된 3단계 메탄발효시스템을 개발하여 운전하고 있다[10,11]. 따라서 본 연구에서는 장기간 안정화된 3단계 메탄발효시스템의 혐기성 산 발효공정으로부터 분리한 알코올발효 능력이 우수한 균주를 분리하고 그 특성을 조사하였다.

나. 재료 및 방법

(1) 사용균주 및 배지

본 연구에서 음식물쓰레기 처리를 위해 운전중인 3단계 메탄 발효시스템의 2차 혐기성 산 발효반응기로부터 시료를 취한 후, 분리용 배지에 도말한 다음 35℃에서 배양하여 생장이 우수한 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 5개 균주 중 발효능이 가장 우수한 효모 균주를 최종적으로 선발하였다. 균주 분리시 사용된 배지는 음식물 쓰레기 처리를 위한 3단계 메탄 발효시스템의 1차 반혐기성 가수분해/산 발효조의 발효액을 원심분리하여 상등액의 pH를 7.0으로 조절하고 1.5%(w/v) agar를 첨가한 후 고압증기멸균하여 실험에 사용하였다. 알코올 발효를 위한 전배양 및 균주 특성조사시의 배지는 YM (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%. peptone 0.5%, glucose 1%, w/v)를 사용하였고, 발효배지는 YM배지에 glucose가 10%로 구성된 배지를 사용하였다. 대조구로서는 KCTC로부터 구입한 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1199를 사용하였다.

(2) 분리균주의 기질 Test

분리된 균주가 이용 가능한 기질을 알아보기 위하여 bioMerieux사의 API 20C Aux system을 사용하였고, 사용된 기질은 다음과 같다: glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, celliobiose, melezitose, lactose, N-acetyl-D-glucosamine, adonitol, trehalose, inositol, xylitol, glucose, galactose, maltose, saccharose/sucrose, raffinose. 실험결과는 접종 후 72시간동안 배양하여 기질 사용여부를 판단하였다.

(3) 배양 온도에 따른 생장 영향

YM 배지에서 1일간 35℃에서 전 배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 배양하였다. 배양온도를 25-45℃까지 5℃ 간격으로 조절하여 1일간 진탕배양하는 동안 두 시간마다 배양액을 취하여 600 nm에서 측정한 흡광도로서 배양 온도에 따른 분리균주의 생장 영향을 조사하였다.

(3) 내알코올성 측정

YM broth를 멸균한 후 0-20% (v/v)의 에탄올을 1% 간격으로 첨가하여 35℃에서 1일간 진탕배양한 후 배양액을 600 nm에서 측정한 흡광도로서 내알코올성을 측정하였다.

(3) 내당성 측정

Glucose가 0-70% (w/v)까지 10% 간격으로 함유된 YM배지에 전배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 35℃에서 2일간 진탕배양하는 동안 일정시간에 배양액을 취하여 600 nm에서 측정한 흡광도로서 내당성을 측정하였다.

(4) 초기 pH에 따른 알코올발효 효과

Glucose가 10% (w/v) 함유된 발효배지의 초기 pH를 2-10까지 조절한 뒤 전배양된 분리균주의 배양액을 접종하여 35℃에서 1일간 진탕배양한 후 배양액을 취하여 에탄올 농도를 측정하였으며, 이 때 생성된 에탄올 농도로서 발효배지의 초기 pH에 따른 알코올발효 효과를 측정하였다.

(5) 분석방법

발효액내의 당 농도는 DNS법에 의해 측정하였으며[12], 발효액내의 에탄올의 함량 분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후 상등액 100 μL를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA*/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detecter (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 135℃이었고, injector와 detecter의 온도는 모두 200℃이었으며, carrier gas는 N_2를 사용하였고, flow rate는 24 mL/min으로 사용하였다. 최종 선발한 분리균주는 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석하여 동정하였다.

다. 결과 및 고찰

(1) 균주의 분리 및 동정

본 연구실에서 운전중인 음식물쓰레기 처리를 위한 3단계 메탄 발효시스템에서 채취한 시료로부터 최종 선별한 균주 KA4를 분리용 배지에서 24시간 배양한 후 생장한 유백색 콜로니를 주사전자현미경으로 관찰하였다. 이 균주는 타원형으로 크기는 5.5 ~ 6.5 × 3.5 ~ 4.5 μm (장축×단축)로 비교적 큰 효모이며, 출아흔을 발견할 수 있어 출아법으로 증식함을 알 수 있었다 (Fig. 3-1 및 Table 3-1). 또한 최종 선별한 균주의 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* 표준 균주와 99.9% 이상의 homology를 보인 것으로 나타나 분리균주를 *Saccharomyces cerevisiae* KA4로 명명하였다 (Fig. 3-2). 한편 분리한 균주의 이용 가능한 기질 범위를 조사한 결과 glucose, galactose, maltose, saccharose/sucrose, raffinose를 기질로 하였을 경우 매우 잘 생장하였고, trehalose, inositol, xylitol의 경우 기질을 이용할 수는 있지만 생장이 느렸으며, 나머지 기질인 glycerol, 2-keto-D-gluconate, L-arabinose, sorbitol, α-methyl-D-glucoside, celliobiose, melezitose, lactose, *N*-acetyl-D-glucosamine, adonitol는 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다 (Table 3-2).

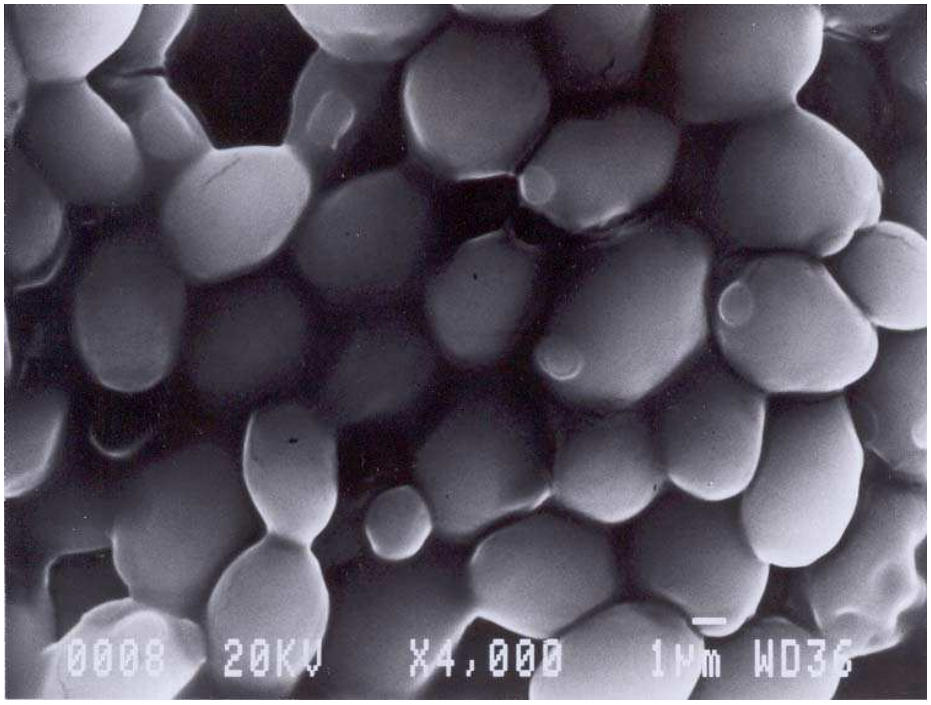


Fig. 3-1. Scanning electron micrograph of isolated *S. cerevisiae* KA4. The bar shows 1 μm.

Table 3-1. Morphological characteristics of the isolate

Items	Isolate
Shape	Oval
Size	5.5-6.5 × 3.5-4.5 ㎛
Mode of vegetative reproduction	Budding
Colony	
Form	Circular
Elevation	Convex
Margin	Entire
Color	Cream
Surface	Smooth

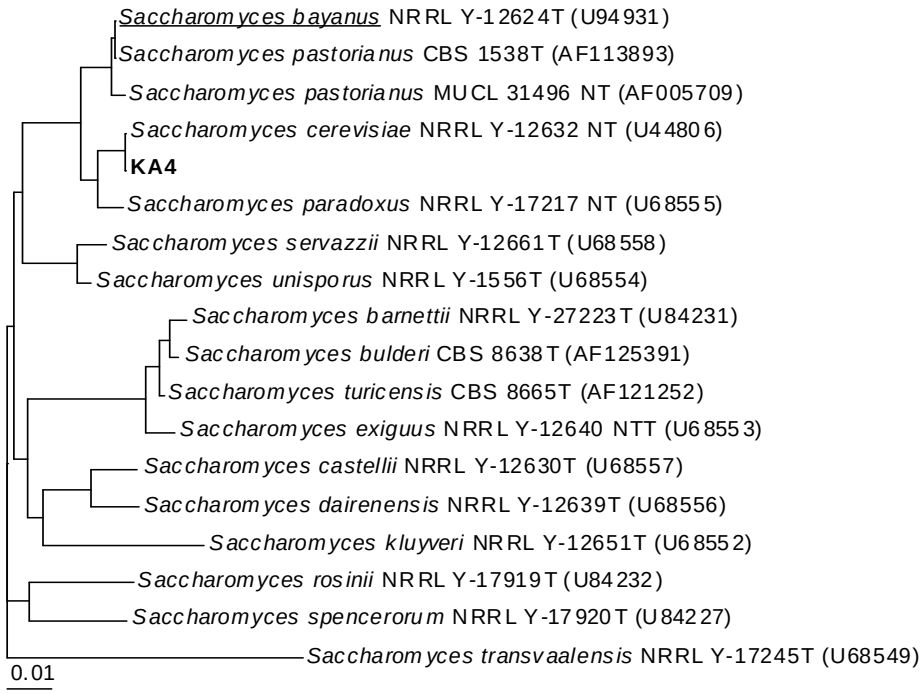


Fig. 3-2. Neighbour-joining tree based on 26S rDNA D1/D2 region sequences of *Saccharomyces*. *S. transvaalensis* NRRL Y-17245 (U68549) was used as an outgroup. Scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position. NT, neo type., T, type strain.

Table 3-2. Substrate utilization of the isolate

Substrates	Isolate
Glucose	+
Galactose	+
Maltose	+
Saccharose/sucrose	+
Raffinose	+
Trehalose, ,	w
Inositol	w
Xylitol	w
Glycerol	-
2-keto-D-gluconate,	-
L-arabinose	-
Sorbitol	-
α-methyl-D-glucoside	-
Celiobiose	-
Melezitose	-
Lactose	-
N-acetyl-D-glucosamine	-
Adonitol	-

+: positive, w: weak, -: negative

(2) 배양 온도에 따른 영향

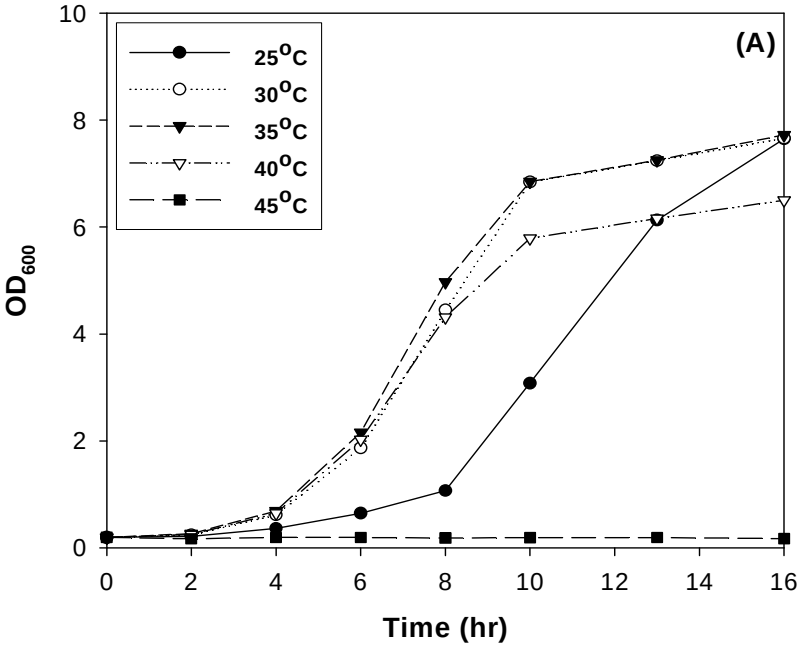
Fig. 3-3은 분리균주 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 배양 온도에 따른 생장 영향을 나타낸 것이다. 분리균주 *S. cerevisiae* KA4 균주의 최적 생장 온도는 30 ~ 35℃로 나타났으며, 40℃의 온도조건에서 생장이 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었고, 45℃ 이상에서는 생장하지 못하였다. 또한 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 온도에 따른 균체의 생장 역시 분리균주의 생장 양상과 유사하여 본 연구에서 분리한 분리균주는 일반적인 *S. cerevisiae*의 생장온도와 유사한 것으로 나타났다.

(3) 내알코올성 측정

분리균주인 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 내알코올성 결과를 Fig. 3-4에 나타내었다. 대조구인 경우 에탄올 농도 5%(v/v)까지는 생장에 큰 영향을 받지 않았으나 6%에서는 균체의 생장이 관찰되지 않았다. 반면 *S. cerevisiae* KA4도 배지내의 초기 에탄올 농도가 5%까지는 생장에 영향을 받지 않았으나 그 이상에서 생장에 저해를 받았다. 단지 대조구에 비해 7%에서도 어느 정도 생장이 가능하였으며, 이때 분리균주가 액체배지에서 과립형태로 뭉쳐 자라는 양상을 보였다. 따라서 분리균주인 *S. cerevisiae* KA4는 대표균주보다 알코올 내성이 약간 높은 균주로 판단되었다.

(4) 내당성 측정

Jones 등[13)]과 Ohta 등[14)]은 발효초기에 기질의 농도가 높을수록 초기 발효 속도가 빨라지고 최종 알코올 농도가 증가하며 공정이 단순해지는 등의 장점이 있으나, 발효가 진행되면서 알코올 농도가 높아짐에 따라 발효 속도가 떨어지고 발효시간이 길어지며 발효 종료 후 잔당이 많이 남게 되어 발효폐액의 처리에 문제가 된다고 보고하였다. Fig. 3-5에 분리균주인 *S. cerevisiae* KA4와 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199의 내당성 및 최적 당 농도를 조사하였다. 분리균주의 내당성은 대조구와 유사하게 나타나 초기 배지내의 당 농도가 50%이상에서 생장에 저해를 받았다. 하지만 전체적인 농도에서 분리균주가 대조구보다 더 높은 흡광도를 나타내 분리균주가 더 잘 생장하는 것으로 나타났다.



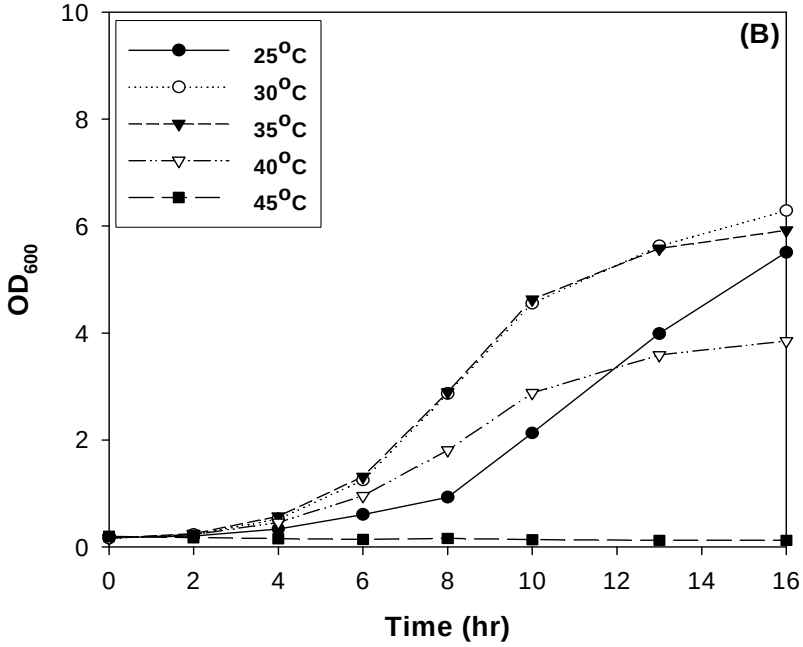


Fig. 3-3. Effects of temperature on the growth of *S. cerevisiae* KA4 (A) and *S. cerevisiae* KCTC 1199 (B).

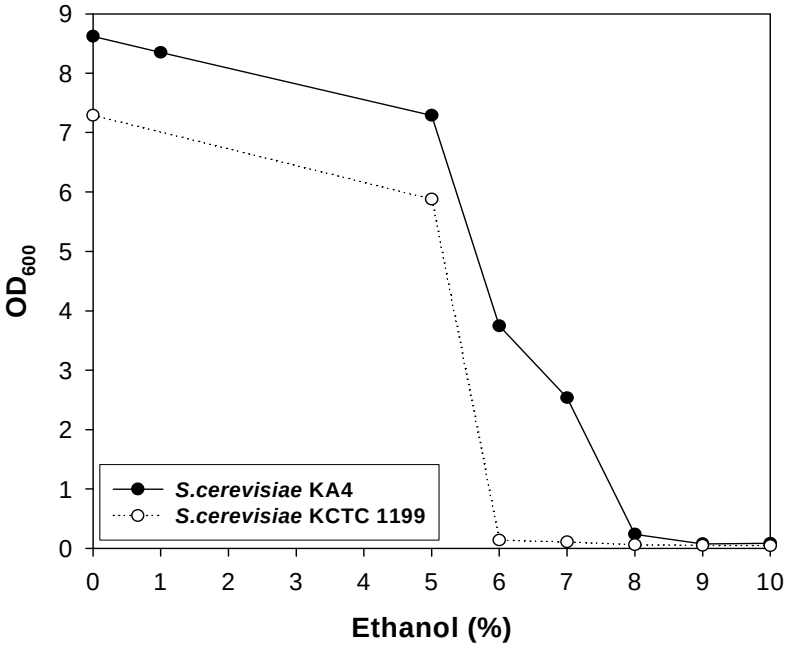


Fig. 3-4. Effect of ethanol concentration on the cell growth.

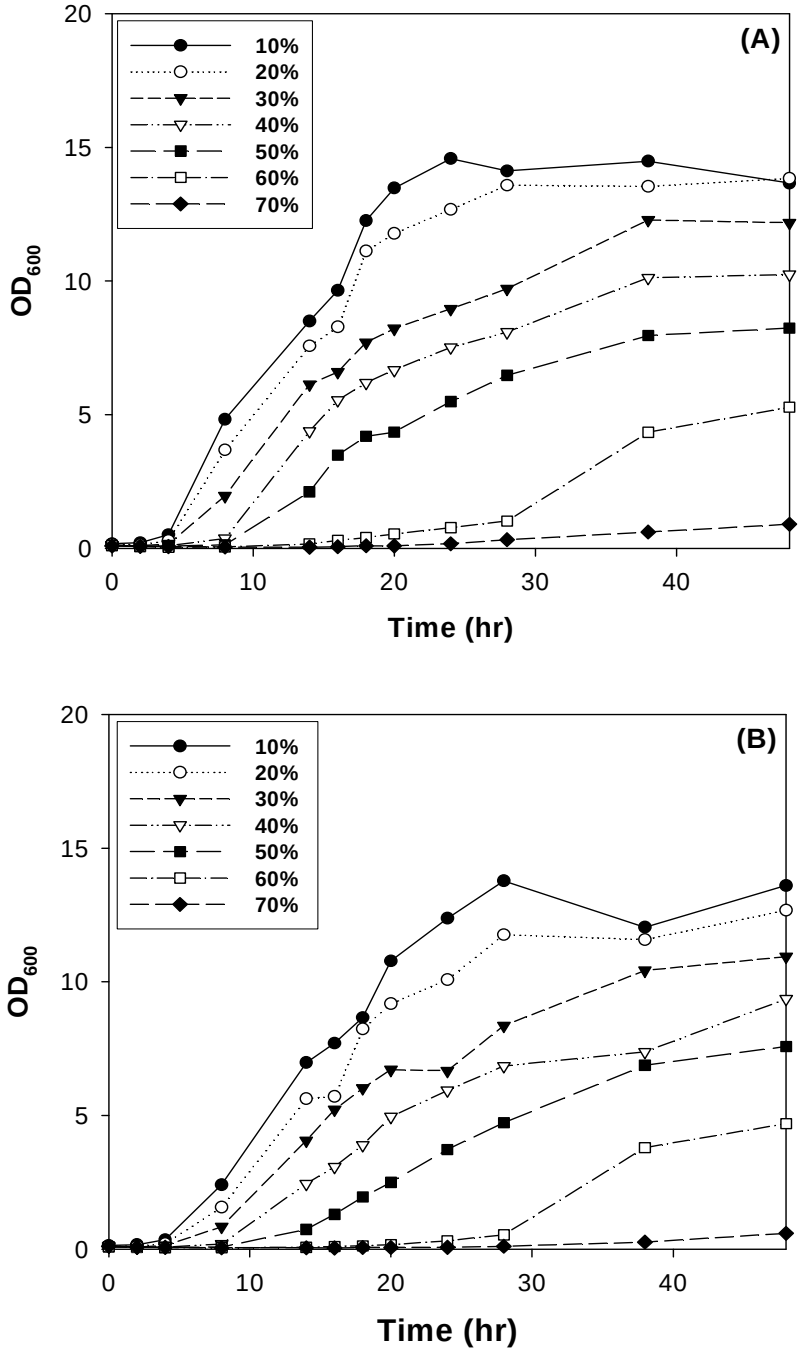


Fig. 3-5. Effect of glucose concentration on the growth of *S. cerevisiae* KA4 (A) and *S. cerevisiae* KCTC 1199 (B).

한편 24시간 발효 후에 초기 당 농도에 따른 에탄올 생산량과 잔여 당 농도를 Fig. 3-6에 나타내었다. 초기 10%의 당 농도에서 에탄올 생산량이 가장 높았으며 대조구보다 2배 이상 많은 양의 에탄올을 생산하였다. 그 이상의 당 농도에서는 농도가 증가함에 따라 에탄올 생산량은 감소하였고, 잔류 당 농도가 증가하는 양상을 보였다. 한편 48시간 발효 후에는 초기 배지내의 당 농도가 20%일 때 알코올 생산량이 가장 높게 나타났지만 발효 후 배지에 남아있는 잔류 당 농도를 고려했을 때 분리균주의 최적 당 농도는 10%로 나타났다. 결론적으로 10%의 당 농도에서 24시간 발효하는 것이 분리균주를 이용한 에탄올 생산에 있어서는 최적으로 사료되었다.

(5) 초기 pH의 영향

Fig. 3-7은 발효배지의 초기 pH에 따른 에탄올 발효의 영향을 나타낸 결과이다. 초기 당 농도 10%에서 분리균주와 대조구 모두 pH 4이상에서 에탄올을 생산하여 pH 10의 범위까지 안정적으로 에탄올을 생산하였다. 이와 같은 결과는 에탄올 발효에 있어서 넓은 pH 영역에서 안정되게 에탄올을 생산한다는 보고와 일치하였다[14-15]. 한편 분리균주가 대조구보다 에탄올 생산에 있어서 최고 2% 이상 많은 양의 에탄올을 생산하였으며, pH 6에서 24시간 발효 후 7.4%의 에탄올을 생산하여 가장 높은 에탄올 생산량을 나타내었고 이때의 에탄올 생산수율은 2.87 mol EtOH/mol glucose 이었다. 따라서 이상의 결과를 종합해 볼 때, 분리균주 *S. cerevisiae* KA4 균주는 대표균주 *S. cerevisiae* KCTC 1199보다 내당성, 내알코올성, 고생산성 에탄올에서 보다 우수한 에탄올 발효 균주임을 확인할 수 있었다.

라. 결론

○ 2차 혐기성 산 발효조로부터 분리한 KA4 균주는 26S rDNA D1/D2 rDNA sequence를 분석한 결과 *Saccharomyces cerevisiae* 표준 균주와 99.9% homology를 보인 것으로 나타나 분리균주를 *Saccharomyces cerevisiae* KA4로 명명하였다.

○ KA4 균주의 최적 성장 온도는 30 ~ 35 ℃ 로 조사되었으며, 45 ℃ 이상에서는 성장하지 못하였다.

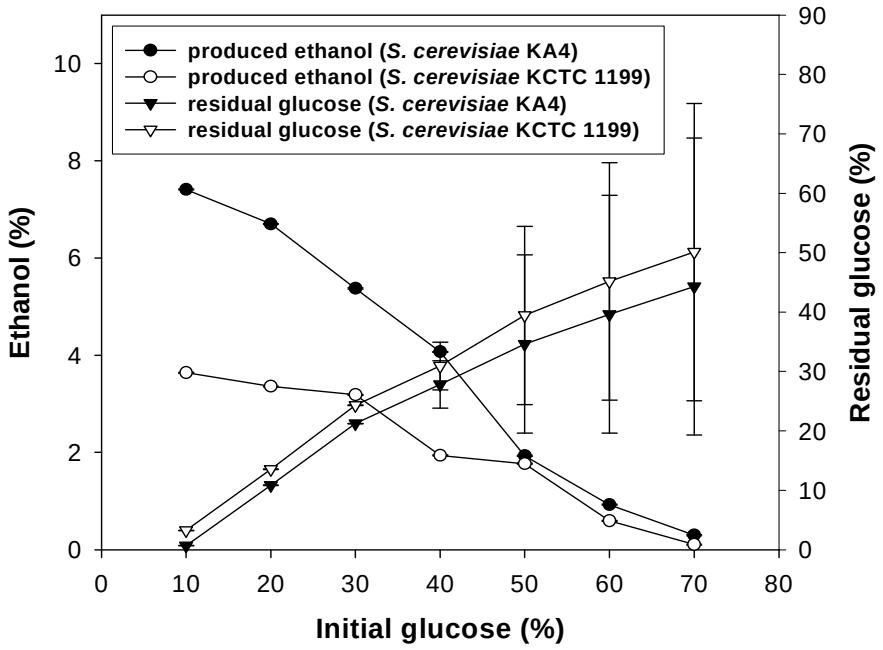


Fig. 3-6. Changes of residual glucose or ethanol concentrations depending on the initial glucose concentration after 24 hr ethanol fermentation.

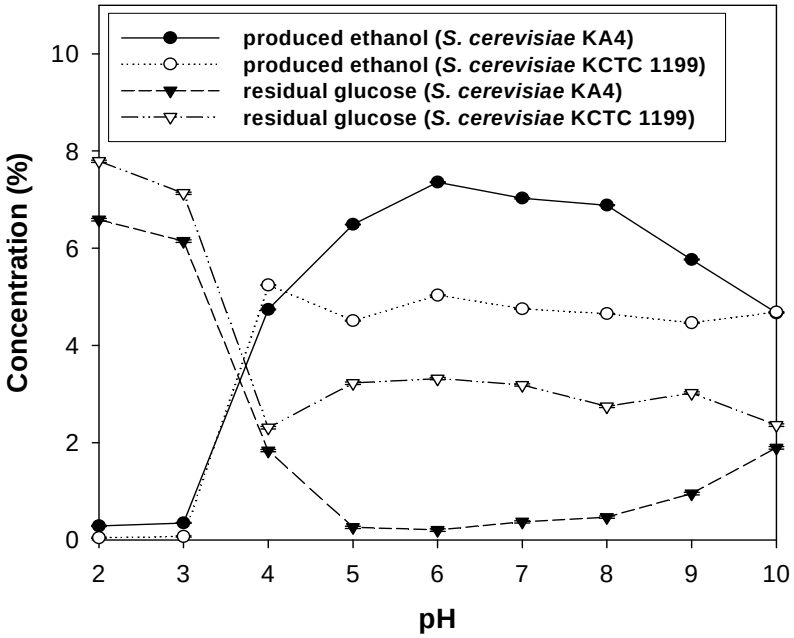


Fig. 3-7. Changes of residual glucose or ethanol concentrations depending on the initial pH after 24 hr ethanol fermentation.

○ KA4균주의 내알코올성은 6% 이상에서 생육이 급격히 저해되었지만 7%의 에탄올 농도에서도 성장속도가 매우 느리지만 생육이 가능한 반면 대조구인 *S. cerevisiae* KCTC 1199 인 경우 에탄올 농도 5% 이상에서 급격한 생육저해가 관찰되어 분리균주인 KA4는 알코올 내성이 매우 높은 균주로 사료되었다.

○ KA4균주의 최적 당농도를 측정한 결과 당농도가 70%이하에서 현저한 생육저해가 관찰되었으며, 생육정도는 분리균주가 대조구보다 더 높았다.

○ 48시간 발효시 20%의 당농도에서 에탄올 생산량이 더 높게 나타났지만 잔류당 농도를 고려했을 때, KA4의 에탄올 생산을 위한 최적 당농도는 10% 당농도를 24시간 발효하는 것이 최적으로 생각되었다.

○ 초기pH가 발효에 미치는 영향은 초기 pH 4이상에서 에탄올을 생산하였으며, 분리균주가 대조구보다 최고 2% 이상 많은 양의 에탄올을 생산하였다.

○ 10%의 glucose로부터 초기 pH 6에서 24시간 발효 후 최고 7.4%의 에탄올을 생산하였고, 이때 에탄올 생산 수율은 2.87 mol EtOH/mol glucose 이었다.

참고문헌

1. Sun, Y. and J. Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review" 2002. *Bioresource Technol.* **83**, 1-11.
2. Kadar, Z., Z. Szengyel, and K. Reczey, "Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol." 2004. *Ind. Crop Prod.* **20**, 103-110.
3. Borrero, M. A. V., J. T. V. Pereira, and E. E. Miranda, "An environmental management method for sugar cane alcohol production in Brazil." 2003. *Biomass Bioenerg.* **25(3)**, 287-299.
4. Murphy, J. D. and K. McCarthy, "Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland." 2005. *Appl. Energ.* **82**, 148-166.
5. Zafar, S. and M. Owais, "Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*." 2006. *Biochem. Eng. J.* **27**, 295-298.
6. Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. S. Graboski, "Estimating the net

energy balance of corn ethanol." 1995. Agricultural Economic Report 721, United States Department of Agriculture.

7. Shapouri, H., J. A. Duffield, and M. Wang, "The energy balance of corn ethanol: an update." 2002. Agricultural Economic Report 813, United States Department of Agriculture.
8. Hur, B. K., J. S. Yu, and J. W. Yang, "Ethanol fermentation by *Kluyveromyces fragilis* from *Jerusalem artichoke*." 1989. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **4**, 50-58.
9. Lynd, L. R., J. H. Cushman, R. J. Nichols, and C. E. Wyman, "Fuel ethanol from cellulosic biomass." 1991. *Science* **251**, 1318-1323.
10. Kim, S. W., J. Y. Park, J. K. Kim, J. H. Cho, Y. N. Chun, I. H. Lee, J. S. Lee, J. S. Park, and D. H. Park, "Development of a modified three-stage methane production process using food wastes." 2000. *Appl. Biochem. Biotech.* **84-86**, 731-741.
11. Kim, J. K., J. H. Cho, J. S. Lee, K. S. Hahm, D. H. Park, and S. W. Kim, "Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment." 2002. *Appl. Biochem. Biotech.* **98-100**, 753-764.

12. Bernfeld, P., "Amylases, α and β." 1955. *Methods Enzymol.* **1**, 149-158.
13. Jones, M. A., and W. M. Ingledew, "Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation." 1994. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1048-1051.
14. Ohta, K., K. Supanwong, and S. Hayashida, "Environmental effects on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*." 1981. *Annual Reports ICME.* **3**, 109-116.
15. Bajpai, P. K., and A. Margaritis, "Effect of temperature and pH on immobilized *Zymomonas mobilis* for continuous production of ethanol." 1986. *Biotech. Bioeng.* **28**, 824-828.

CURRICULUM VITAE

CURRICULUM VITAE

Jung Kon Kim

Home Address

101-911 Cheongam Apt., Yangsan-dong

Buk-gu, Gwangju 500-200, Korea

C.P: 82-11-9618-8829

Mailing Address

Environmental Microbiology Lab.

Department of Environmental Engineering

Chosun University

375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

Tel: 82-62-230-6649 Fax: 82-62-225-6040

e-mail: kjk9207@hanmail.net

Education

Ph.D. 2001 - 2007 Department of Bio Materials, Chosun University, Korea

M.S. 1999 - 2001 Department of Environmental Science, Chosun University, Korea

B.S. 1992 - 1999 Department of Environmental Science, Chosun University, Korea

Dissertation Titles

- The Killing Effect of Microorganisms Contaminated in the Culture Water of Vegetables by UV-TiO_2 Photocatalytic Reactor, M.S. Thesis
  Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.
- Development of a pilot-scale three-stage fermentation system for high-efficiency methane production from organic wastes
  Advisor : Prof. Si Wouk Kim, Ph.D.

Major Research Interests

- Anaerobic digestion.
- Renewable energy
- Wastewater treatment
- Fermentation
- UV- TiO_2 Photocatalytic reaction

Honors and Awards

2002-2004 Research Assistantship, Department of Environmental Engineering, Chosun University

1999-2001 Graduate Assistantship, Department of Environmental Engineering, Chosun University

1993 Scholarship, Department of Environmental Science, Chosun University

Publications

1. **Kim, J. K**., B. R. Oh, Y. N. Chun and S. W. Kim **(2006)**. Effect of temperature and hydraulic retention time on anaerobic digestion of food waste. ***J. Biosci. Bioeng***., **102(4),** 328-332.
2. **Kim, J. K.,** G. H. Hwan, J. C. Yoo, C. N. Seong, S. J. Kim and S. W. Kim. **(2006)**. Isolation and characterization of an alcohol fermentation strain from anaerobic acid fermentor to treat food wastes. ***Korean J. Biotechnol. Bioeng.,*** **21(6),** 526-530.
3. **Kim, J. K.,** Le Nhat, S. J. Kim and S. W. Kim. **(2005)**. Optimization of hydrogen production using *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785. ***Korean J. Biotechnol. Bioeng.,*** **20(6),** 401-407.
4. Cho, G. H.,**J. K. Kim,** S. J. Kim and S. W. Kim. **(2003)**. Anaerobic acid and methane fermentation using paper wastes. ***Korean J. Biotechnol. Bioeng.,*** **18(4),** 318-323.
5. **Kim, J. K.,** J. H. Cho, J. S. Lee, K. S. Hahm, D. H. Park and S. W. Kim. **(2002)**. Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment. ***Applied Biochemistry and Biotechnology,*** **98-100,** 753-764.
6. **Kim, J. K.,** H. S. Choi, E. Kim, Y. S. Lee, Y. H. Kim and S. W. Kim. **(2002)**. Comparative effects of TiO_2-immobilized photocatalytic supporters on the bactericidal efficiency of a novel photoreactor. ***Biotechnology Letters,*** **24,** 1397-1400.
7. Cho, J. H.,**Kim, J. K.,** J. H. Kim, S. M. Yoon, J. S. Lee and S. W. Kim. **(2001)**. Treatment of high organic wastewater using ecological water treatment system. ***Kor. J. Microbiol.,*** **37(4),** 317-324.

8. **Kim, J. K.,** Y. K. Shin, Y. S. Lee, Y. H. Kim and S. W. Kim. **(2001)**. Killing effect of UV-TiO_2 photocatalytic system on microorganisms. ***Kor. J. Microbiol.,* 37(2),** 130-136.
9. Kim, S. W., J. Y. Park, **J. K. Kim**, J. H. Cho, Y. N. Chun, I. H. Lee, J. S. Lee, J. S. Park and D. H. Park **(2000)**. Development of a modified three-stage methane production process using food wastes. ***Applied Biochemistry and Biotechnology,* 84-86,** 731-741.

Patent

1. Patent Number : 10-0586867, Korea
   Title of the Invention : Crusher of organic waste with vacuum pump.
   Registration Date : 2006. 05. 29
2. Patent Number : 0439195, Korea
   Title of the Invention : Method for killing of microorganisms in the the water by UV-TiO_2 photocatalytic reaction and reactor for killing of microorganisms.
   Registration Date : 2004. 06. 25
3. Application Number : PCT/KR02/01495, China
   Title of the Invention : Method for killing of microorganisms in the the water by UV-TiO_2 photocatalytic reaction and reactor for killing of microorganisms.
   Application Date : 2002. 08. 06

Participation in Professional Meetings

2006 6thEuropean Symposium on Biochemical Engineering Science(ESBES 6), European Federation of Biotechnology, Salzburg, Austria (Poster),

Hydrogen production by *Citrobacter amalonatius* Y19 and *Clostridium beijerinckii* KCTC1785.

2006 2006 Spring KSBB Annual Meeting and International Symposium, The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Chungbuk National University Cheongju, Korea (Poster) : Optimal culture conditions of hydrogen production by *Citrobacter amalonaticus* Y19.

2005 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XVII), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Jinju City Hall Jinju, Korea (Poster) : Hydrogen production from different sources by *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785.

2005 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XVII), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Jinju City Hall Jinju, Korea (Poster) :Saccharification of soluble starch and ethanol production by isolated microbial strains.

2005 2005 International meeting of microbiological society of korea , The Microbiological society of Korea, Hyundai Sungwoo Resort Hoengseong, Korea (Poster) : Optimal conditions of fermentative hydrogen production by *Clostridium beijerinkii* KCTC1785

2004 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XV), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Chungbuk National University Cheongju, Korea (Poster) :Scale-up of three stage methane fermentation system to treat food wastes.

2004 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIV), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Kyungpook National University Daegu, Korea (Poster) : The fermentation characteristics of isolated strain anaerobic acidogenic fermenter to treat food wastes.

2004 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIV), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Kyungpook National University Daegu, Korea (Poster) : The optimization of organic acids production using food wastes by *Clostridium acetobutylicum*.

2003 25rdSymposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, National Renewable Energy Laboratory, Breckenridge, Colorado, USA (Poster) : The effect of temperature on the anaerobic methane fermentation process for the digestion of organic wastes.

2003 The Organizing Committee of New Energy System and Conversion, NESC The Korean hydrogen and New Energy society, BEXCO Busan, Korea (Poster) : Optimization of operation conditions for the three-stage methane fermentation system using food wastes.

2003 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIII), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, COEX Seoul, Korea (Poster) : The effect of temperature on organic acid production tendency in the several anaerobic acidogenic bacteria.

2003 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIII), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, COEX Seoul, Korea (Poster) : The effect of pH on organic acids production tendency in the anaerobic acidogenic fermenter using food wastes.

2003 Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XIII), The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, COEX Seoul, Korea (Poster) : Isolation and application of microbial strains to anaerobic fermentation to treat food wastes.

2001 23rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, National Renewable Energy Laboratory, Breckenridge, Colorado, USA (Poster) :

Mass production of methane from organic wastes and treatment of its wastewater.

2000 15th FAOBM Symposium : Perspectives of Biochemistry and Molecular Biology in the 21 Century, Beijing, China (Poster) : Rapid Digestion of Food Wastes by the Three-stage Methane Fermentation Process.

JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING
Vol. 102, No. 4, 328–332. 2006
DOI: 10.1263/jbb.102.328

© 2006, The Society for Biotechnology, Japan

Effects of Temperature and Hydraulic Retention Time on Anaerobic Digestion of Food Waste

Jung Kon Kim,[1] Baek Rock Oh,[2] Young Nam Chun,[2] and Si Wouk Kim[2]*

Department of Bio Materials Engineering, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, South Korea[1] and Department of Environmental Engineering, BK21 Team for Biohydrogen Production, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, South Korea[2]

Received 22 May 2006/Accepted 18 July 2006

A modified three-stage methane fermentation system was developed to digest food waste efficiently. This system consisted of three stages: semianaerobic hydrolysis, anaerobic acidogenesis and strictly anaerobic methanogenesis. In this study, we examined the effects of temperature and hydraulic retention time (HRT) on the methanogenesis. Operation temperature was adjusted from 30°C to 55°C, and the HRTs ranged from 8 to 12 d. The rate of soluble chemical oxygen demand (sCOD) removal correlated with digestion time according to the first-order kinetic model developed by Grau *et al.* [Water Res., 9, 637–642 (1975)]. With liquor food waste, thermophilic digesters showed a higher rate of sCOD removal than mesophilic digesters. The rates of biogas and methane production by thermophilic digesters were higher than those by mesophilic digesters regardless of HRT. Although maximum biogas production occurred when an HRT of 10 d was used, the methane yield was the highest in the reactor when an HRT of 12 d was used (223 *l* CH_4/kg $sCOD_{degraded}$). However, digestion stability decreased when an HRT of 8 d was used. The concentration of NH_3-N generated in this experiment did not inhibit anaerobic digestion.

[**Key words:** anaerobic digestion, methane, temperature effect, organic waste, bioenergy]

Approximately 48 million tons of organic waste such as food waste, livestock manure, vegetable waste and wastewater sludge is produced in Korea each year. This organic waste is generally treated in sanitary landfills. However, this method of disposal causes secondary pollution of groundwater and soil. In particular, Korean food waste putrefies because of its high water content, which makes its transport and storage difficult.

Anaerobic digestion has been suggested as an alternative method of removing the high-concentration organic waste. Several research groups have developed anaerobic digestion processes using different substrates (1–5). The advantages of such processes over conventional aerobic processes are a low energy requirement for operation, a low initial investment cost and a low sludge production. In addition, the anaerobic digestion process produces biogas, which can be used as a clean renewable energy source (6–8). In Europe, increasing numbers of biogas plants (BGPs) employing anaerobic digestion use food waste and manure as energy sources. Currently, there are 19 BGPs in Denmark, 11 in Germany, and 10 in Sweden with additional plants under construction (9, 10).

Anaerobic digestion can be developed for different temperature ranges including, mesophilic temperatures of approximately 35°C and thermophilic temperatures ranging from 55°C to 60°C (11). Conventional anaerobic digestion is carried out at mesophilic temperatures, that is, 35–37°C. However, the thermophilic temperature range is worth considering because it will lead to give faster reaction rates, higher gas production, and higher rates of the destruction of pathogens and weed seeds than the mesophilic temperature range. However, the thermophilic process is more sensitive to environmental changes than the mesophilic process (12–14).

A modified three-stage methane fermentation system that can produce methane from easily biodegradable food waste was developed in our laboratory (15, 16). This system uses a process that entails three stages: semianaerobic hydrolysis/acidogenesis, strictly anaerobic acidogenesis, and strictly anaerobic methanogenesis. This separate-reactor system efficiently decreases hydraulic retention time (HRT) by increasing the rates of hydrolysis, acidogenesis and methanogenesis without affecting pH, and shows a high methane yield. In this study, we determined the optimum reaction temperature and HRT of the methanogenesis, which is directly related to methane production, with the aim of increasing food waste digestion efficiency using the three-stage methane fermentation system.

MATERIALS AND METHODS

Design of anaerobic methanogenic fermentor The lab-scale methanogenic digester used was a cylindrical-type reactor (200 [i.d.] ×350 [h] mm) equipped with sampling ports, a gas valve and pres-

* Corresponding author. e-mail: swkim@chosun.ac.kr
phone: +82-62-230-6649 fax: +82-62-225-6040

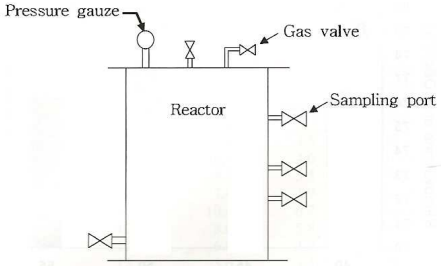


FIG. 1. Schematic of lab-scale methane digester.

sure gauze. The total volume was 11 *l* and the working volume was 8 *l* (Fig. 1).

Chemical properties of reaction mixture The three-stage methane fermentation system developed in this laboratory used a process that entailed a primary semianaerobic hydrolysis/acidogenic stage, a secondary anaerobic acidogenic stage, and a tertiary strictly anaerobic methanogenic stage. The system was operated to digest food waste rapidly. Table 1 shows the characteristics of Korean food waste. These characteristics indicate that the food waste is a good source for methane fermentation.

In this study, the acid fluid eluted from the secondary acidogenic fermentor was used as the substrate and the methanogenic fluid eluted from the methanogenic fermentor was used as the inoculum. The microorganisms used in the acidogenic fermentation were *Clostridium* species and those used in the methanogenic fermentation were a mixture of methanogenic bacteria isolated from landfill soil and cow manure. The pH, soluble chemical oxygen demand (sCOD), ammonium concentration and C/N ratio of the substrate were 4.5, 17,000 mg/*l*, 380 mg/*l* and 15.8, whereas those of the inoculum were 8.2, 2600 mg/*l*, 1300 mg/*l* and 2.0, respectively.

Operation conditions In the batch reaction, 8 *l* of a mixture of the substrate and inoculum (1 : 1) was placed in the methanogenic reactor. Each reactor was operated at increasing temperatures ranging from 30°C to 55°C at intervals of 5°C. The changes in pH, sCOD, and gas production were monitored. The effect of temperature the kinetics of the process was analyzed using the following first-order model developed by Grau *et al.* (17).

$$S/S_0 = \exp-(k_1 X_0 t/S_0) \quad (1)$$

Here, S is the concentration of organic matter at any fermentation time (g-COD l^{-1}), S_0 is the initial substrate concentration (g-COD l^{-1}), k_1 is a first-order kinetic constant (d^{-1}), and X_0 is the initial concentration of microorganisms expressed as grams of volatile suspended solids per liter (VSS l^{-1}). Assuming that X_0 was constant during the experiment, which means that k_1X_0 is a constant (k'_1, g-COD $l^{-1}d^{-1}$), Eq. 1 was simplified to

$$S/S_0 = \exp-(k'_1 t/S_0) \quad (2)$$

The kinetic constant of the first-order model was calculated by transforming Eq. 1 to

$$-\ln(S/S_0) = pt \quad (3)$$

where p is equal to k'_1/S_0.

Because p and S_0 are constants under the experimental conditions studied, a plot of $-\ln(S/S_0)$ against t yielded a straight line. k'_1 was determined from the slope (p, d^{-1}) of the line of the best fit using the least-squares method as

$$k'_1 = pS_0 \quad (4)$$

TABLE 1. Elemental analysis of collected food waste

Solid content (%)	VS/TS (%)	COD/VS	Elemental composition (%)			
			C	H	O	N
12.38	89.3	0.71	47.8	6.1	40.9	5.2

In the semicontinuous experiment, the working volume was 8 *l* (volume is changes depending on HRT) and fresh substrate was placed in the digester each day. Operation temperature was changed from 40°C to 55°C at intervals of 5°C, and HRT was set at 8, 10 and 12 d.

Analytical methods The following parameters were examined: pH, sCOD, and ammonium (NH_3-N) concentration. sCOD was measured using the sealed tube method (sample size = 2 ml) (DR/4000U spectrophotometer; Hach, Loveland, CO, USA) after filtration (Whatman GF/C). NH_3-N was determined using NH_3 sensitive electrodes (model 95-12; Thermo Orion, Beverly, MA, USA), connected to a pH meter (710Aplus pH/ISE Meter; Thermo Orion).

The amount of gas produced from the methanogenic digester was monitored using a wet gas meter (W-NK-5; Shinagawa, Tokyo), and gas composition was analyzed by gas chromatography (GC-14B; Shimadzu, Kyoto) using a packed column (100/120 mesh, 1/8″ × 10 ft, Haysep D; Alltech, Columbia, SC, USA). The temperatures of the column, injector, and detector (thermal conductivity) were 100°C, 50°C and 150°C, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

With liquor food waste, the thermophilic digester gave a stable performance, which was superior to that of the mesophilic digester. Figure 2A shows sCOD as a function of temperature for the batch reaction (S_0=9800 mg-COD/*l*). sCOD decreased with increasing digestion time. The maximum sCOD removal efficiency (83%) was obtained from the digester operated at 50°C. The removal rate at 45°C was almost the same as that at 50°C. However, the rate at 55°C decreased to 77%. Removal rates also gradually decreased at temperatures lower than 40°C. Figure 2B shows a plot of $-\ln(S/S_0)$ as a function of digestion time (d) for some temperatures. A plot of the experimental data, as indicated by Eq. 3, gave a straight line with the intercept at almost zero. The kinetic constant k'_1 was obtained using Eq. 4. The k'_1 values were 0.14 (30°C), 0.35 (35°C), 0.38 (40°C), 0.6 (45°C), 0.61 (50°C), and 0.42 (55°C). sCOD removal efficiency increased with temperature up to 50°C. Chen *et al.* (18) reported that there is a kinetic advantage in the digestion of livestock manure at thermophilic temperatures over that at mesophilic temperatures. However, the advantages of carrying out the digestion at temperatures higher than 55°C are insignificant.

Figure 3 shows the levels of biogas productions at different temperatures in the batch reaction. The a mount of biogas produced from the reactors at 45°C and 50°C increased with decreasing sCOD. Consequently, it was found that a stabilization period is needed when digestion is carried out at temperatures lower than 45°C or higher than 50°C. This result suggests that the activity of the methanogenic bacteria used in this study depends on to operation temperature. Therefore, a thermophilic temperature <55°C is more effective for biogas production than a mesophilic temperature. Bouallagui *et al.* (19) also reported higher biogas produc-

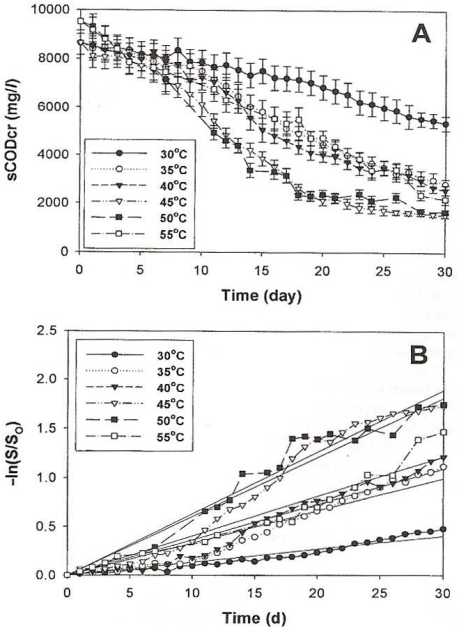


FIG. 2. (A) Temperature-dependent changes in sCOD in anaerobic methane digesters in batch reaction. (B) Grau model plot of temperature-dependent changes in sCOD.

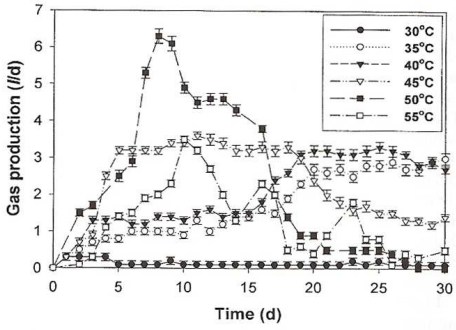


FIG. 3. Biogas production profiles at different temperatures through batch reaction.

tion using an experimental thermophilic digester than those using psychrophilic and mesophilic digesters.

Figure 4 shows the HRT-dependent removal efficiencies of sCOD by the semicontinuous reaction. The mean influent sCOD was 14,500 mg/*l*. When the HRT was 10 d, the sCODs of the digesters operated at 40°C, 45°C, and 50°C decreased

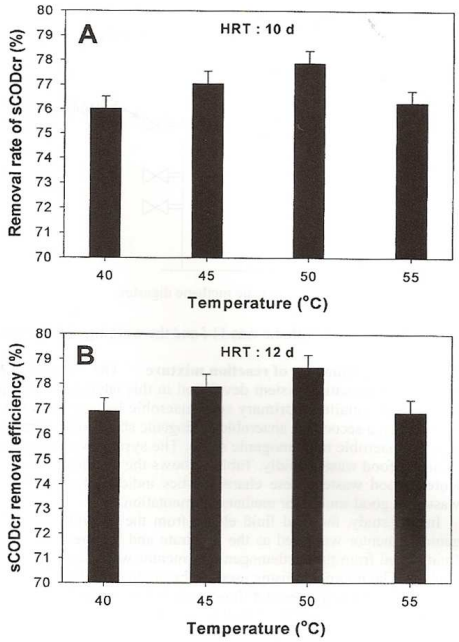


FIG. 4. Temperature-dependent sCOD removal efficiencies of different anaerobic methane digesters by continuous reaction. (A) HRT-10 d; (B) HRT-12 d.

to 3480, 3361, and 3240 mg/*l*, respectively. The rates of sCOD removal were 76%, 77%, and 78% at 40°C, 45°C, and 50°C, respectively (Fig. 4A). The rate at 55°C was similar to that at 40°C. Regardless of temperature, the pattern of sCOD removal using an HRT of 12 d was similar to that using an HRT of 10 d, even though sCOD removal efficiency using an HRT of 12 d was better (Fig. 4B). As previously stated, sCOD removal efficiency increased with increasing temperature up to 50°C, regardless of whether the HRT was 10 d or 12 d. These results are in accordance with those reported by Mackie and Bryant (20). They mentioned that the thermophilic digestion of cattle waste is more stable than the mesophilic digestion at different HRTs. However, when HRT was decreased to 8 d, pH decreased significantly and no sCOD removal or biogas production was observed (data not shown).

Table 2 shows the temperature- and HRT-dependent total biogas and methane productions in the semicontinuous reaction. At 50°C, the maximum amount of biogas was produced when an HRT of 10 d was used, whereas methane was generated efficiently when an HRT of 12 d was used. On the other hand, the lowest biogas production was observed at 55°C with methane contents ranging from 54% to 60%, depending on HRT.

Table 3 shows the calculated methane yields according to

TABLE 2. Comparisons of biogas productions depending on temperature and HRT by continuous reaction using anaerobic methane digesters

Digestion condition		Gas production (*l*/d)		Methane content in biogas (%)
Temp (°C)	HRT (d)	Biogas	Methane	
40	10	7.3	4.5	61.6
	12	6.1	4.0	65.6
45	10	8.7	5.5	63.2
	12	7.4	4.9	66.2
50	10	10.4	6.7	64.4
	12	8.6	5.8	67.4
55	10	6.8	3.7	54.4
	12	5.6	3.3	58.9

TABLE 3. Methane yields in continuous digestion

Digestion condition		Methane gas yield (l CH_4/kg $sCOD_{degraded}$)
Temp (°C)	HRT (d)	
40	10	145
	12	154
45	10	177
	12	187
50	10	216
	12	223
55	10	119
	12	129

the results shown in Table 2. Although the maximum biogas production occurred at 50°C with a 10 d-HRT, the methane yield was highest (223 l CH_4/kg $sCOD_{degraded}$) in the reactor with a 12 d-HRT. Ahn and Forster (12) reported that a high specific methane yield could be obtained in a thermophilic digester with a long HRT. In many studies, researchers have examined the potential of thermophilic digesters with the main technical concern being not whether a thermophilic digestion system will operate, but whether it has actual advantages over a mesophilic digestion system for any type of wastewater. Overall, the results show that there is a distinct advantage in considering the treatment of food waste by anaerobic digestion in the thermophilic range with a 10-d HRT.

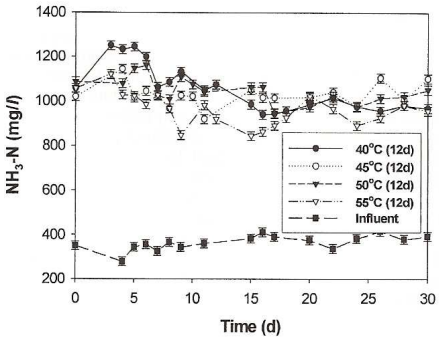


FIG. 5. Temperature-dependent NH_3-N concentration changes in different anaerobic methane digesters by continuous reaction.

As shown in Fig. 5, NH_3-N concentration increased from 380 to approximately 1000 mg/l at all the temperatures tested through semicontinuous anaerobic digestion. Many studies have reported the inhibitory effects of a high free ammonia (NH_3) concentration on the metabolism of methanogens (21–23). However, NH_3-N concentration can be ignored for the digestion of food waste because the NH_3-N concentration generated in this experiment did not inhibit anaerobic digestion significantly.

Currently, we are exploiting ways to improve the anaerobic digestion of Korean food waste using a three-stage methane fermentation system developed in this laboratory. The above results show that thermophilic digestion with a 12-d HRT in the tertiary methanogenic digester is the best way to increase the performance of anaerobic digestion and food waste digestion efficiency.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant no. R01-2006-000-10355-0 from the Basic Research Program of the Korean Science & Engineering Foundation.

REFERENCES

1. **Lastella, G., Testa, C., Cornacchia, G., Notornicola, M., Voltasio, F., and Sharma, V. K.:** Anaerobic digestion of semi-solid organic waste: biogas production and its purification. Energy Convers. Manage., **43**, 63–75 (2002).
2. **Gallert, C., Henning, A., and Winter, J.:** Scale-up of anaerobic digestion of the biowaste fraction from domestic wastes. Water Res., **37**, 1433–1441 (2003).
3. **Tada, C. and Sawayama, S.:** Photoenhancement of biogas production from thermophilic anaerobic digestion. J. Biosci. Bioeng., **98**, 387–390 (2004).
4. **Choi, D. W., Lee, W. G., Lim, S. J., Kim, B. J., Chang, H. N., and Chang, S. T.:** Simulation on long-term operation of an anaerobic bioreactor for Korean food wastes. Biotechnol. Bioprocess Eng., **8**, 23–31 (2003).
5. **Nakamura, Y. and Mtui, G.:** Anaerobic fermentation of woody biomass treated by various methods. Biotechnol. Bioprocess Eng., **8**, 179–182 (2003).
6. **Bouallagui, H., Ben Cheikh, R., Marouani, L., and Hamdi, M.:** Mesophilic biogas production from fruit and vegetable waste in a tubular digester. Bioresour. Technol., **86**, 85–89 (2003).
7. **Uemura, S. and Harada, H.:** Treatment of sewage by a UASB reactor under moderate to low temperature conditions. Bioresour. Technol., **72**, 275–282 (2000).
8. **Milan, Z., Sanchez, E., Weiland, P., Borja, R., Martin, A., and Ilangovan, K.:** Influence of different natural zeolite concentrations on the anaerobic digestion of piggery waste. Bioresour. Technol., **80**, 37–43 (2001).
9. **Albihn, A., Norin, E., and Lindberg, A.:** Regulation and present situation in Sweden concerning hygienic and environmental safety for anaerobic digestion of waste, p. 73–79. *In* Böhm, R. and Wellinger, A. (ed.), Hygienic and environmental aspects of anaerobic digestion: legislation and experiences in Europe. IEA Workshop, Stuttgart-Hohenheim (1999).
10. **Sahlstrom, L.:** A review of survival of pathogenic bacteria in organic waste used in biogas plants. Bioresour. Technol., **87**, 161–166 (2003).
11. **Sanchez, E., Borja, R., Weiland, P., Travieso, L., and**

Martin, A.: Effect of substrate concentration and temperature on the anaerobic digestion of piggery waste in a tropical climate. Process Biochem., **37**, 483–489 (2001).
12. **Ahn, J.-H. and Forster, C. F.:** A comparison of mesophilic and thermophilic anaerobic upflow filters treating paper-pulp-liquors. Process Biochem., **38**, 256–261 (2002).
13. **El-Mashad, H. M., van Loon, W. K. P., and Zeeman, G.:** A model of solar energy utilisation in the anaerobic digestion of cattle manure. Biosyst. Eng., **84**, 231–238 (2003).
14. **Kim, M., Ahn, Y.-H., and Speece, R. E.:** Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. Water Res., **36**, 4369–4385 (2002).
15. **Kim, S. W., Park, J. Y., Kim, J. K., Cho, J. H., Chun, Y. N., Lee, I. H., Lee, J. S., Park, J. S., and Park, D. H.:** Development of a modified three-stage methane production process using food wastes. Appl. Biochem. Biotechnol., **84–86**, 731–741 (2000).
16. **Kim, J. K., Cho, H. C., Lee, J. S., Hahm, K. S., Park, D. H., and Kim, S. W.:** Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment. Appl. Biochem. Biotechnol., **98–100**, 753–764 (2002).
17. **Grau, P., Dohanyos, M., and Chudoba, J.:** Kinetics of multicomponent substrate removal by activated sludge. Water Res., **9**, 637–642 (1975).
18. **Chen, Y., Varel, V. H., and Hashimoto, A. G.:** Effect of temperature on methane fermentation kinetics of beef-cattle manure. Biotechnol. Bioeng. Symp., **10**, 325–339 (1980).
19. **Bouallagui, H., Haouari, O., Touhami, Y., Ben Cheikh, R., Marouani, L., and Hamdi, M.:** Effect of temperature on the performance of an anaerobic tubular reactor treating fruit and vegetable waste. Process Biochem., **39**, 2143–2148 (2004).
20. **Mackie, R. I. and Bryant, M. P.:** Anaerobic digestion of cattle waste at mesophilic and thermophilic temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol., **43**, 346–350 (1995).
21. **Angelidaki, I. and Ahring, B. K.:** Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: The effect of ammonia. Appl. Microbiol. Biotechnol., **38**, 560–564 (1993).
22. **Zeeman, G., Wiegant, W. M., Koster-Treffers, M. E., and Lettinga, G.:** The influence of the total ammonia concentration of the thermophilic digestion of cow manure. Agric. Wastes, **14**, 19–35 (1985).
23. **Sawayama, S., Tada, C., Tsukahara, K., and Yagishita, T.:** Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion. J. Biosci. Bioeng., **97**, 65–70 (2004).

Copyright © 2002 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/02/98-100/0753/$13.00

Mass Production of Methane from Food Wastes with Concomitant Wastewater Treatment

JUNG K. KIM,[1] JAE H. CHO,[1] JUNG S. LEE,[2] KYUNG S. HAHM,[3] DON H. PARK,[4] AND SI W. KIM*,[1]

[1]*Department of Environmental Engineering,*
[2]*Department of Biological Science, and*
[3]*Research Center for Proteineous Materials,*
Chosun University, Gwangju 501-759, Republic of Korea,
E-mail: swkim@mail.chosun.ac.kr; and
[4]*Department of Biochemical Engineering, Chonnam National University,*
Gwangju 500-757, Republic of Korea

Abstract

We developed a process for production of methane at a pilot scale. This process consists of three stages. The first stage is a semianaerobic hydrolysis/acidogenic step in which organic wastes are converted to various sugars, amino acids, and volatile fatty acids (VFAs). Operation temperature and pH were 45°C, and 5.0–5.5, respectively. Hydraulic retention time (HRT) was 2 d. To remove the putrid odor and to enhance the hydrolysis of organic wastes, a mixture of bacteria isolated from landfill soil was inoculated into the reactor. Total chemical oxygen demand (tCOD) and biological oxygen demand (BOD) were 36,000 mg/L and 40,000 mg/L, respectively. The second stage was an anaerobic acidogenic process, which can produce large amount of VFAs including acetate, propionate, butyrate, valerate, and caproate. Operation temperature and pH were 35°C, and 5.0–5.5, respectively. HRT was 2 d. The third stage was a strictly anaerobic methane fermentation step producing methane and carbon dioxide from VFAs. The working volume of upflow anaerobic sludge blanket (UASB) type reactor was 1200 L, and operation temperature and pH were 41°C, and 7.7–7.9, respectively. HRT was 12 d. Seventy two percent of methane at maximum was generated and the yield was 0.45–0.50 m^3/kgVS of food wastes. Through the process, 88% of tCOD and 95% of BOD were removed. The wastewater was treated with the biological aerobic and anaerobic filters immobilized with heterotrophic and autotrophic nitrifying and denitrifying bacteria.

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Ninety percent of total nitrogen (T-N) was removed by this treatment. The residual T-N and total phosphorous (T-P) were removed by the algal periphyton treatment system. The final concentrations of nitrogen and phosphorous in the drain water were 53 and 7 mg/L, respectively.

Index Entries: Anaerobic digestion; volatile fatty acids; methane; biological filter; algal periphyton treatment system.

Introduction

Disposal of food wastes has become a major concern in Korea. From the year 2004, sanitary landfills will be prohibited by the environmental law due to the putrefaction and leachate of food wastes. Therefore, a few alternative treatment techniques have been suggested. For example, techniques converting food wastes to fermented fertilizer, foodstuff for animals, and compost have been developed. However, it has been realized that the reuse of food wastes has a practical limitation due to the nutritional imbalance and salts.

Anaerobic digestion is an alternative method to digest food wastes and to produce methane that can be used as a renewable energy source. It has long been used for the stabilization of wastewater sludges. However, recently, it has been applied to other fields through a better understanding of the microbiology of this process and improved reactor designs. The important advantage of anaerobic digestion over aerobic processes is that 50% of organic carbon is converted to biomass under aerobic conditions, whereas only 5% is converted into biomass under anaerobic conditions, as regards cell yields. The net amount of cells produced per metric ton of chemical oxygen demand (COD) destroyed is 20–150 Kg in anaerobic digestion, as compared to 400–600 Kg in aerobic digestion *(1)*.

Generally two types of processes for anaerobic digestion have been developed. In a conventional single-stage process, both acid and methane could be produced simultaneously by the acidogenic and methanogenic bacteria, respectively, so it is difficult to maintain optimal conditions for fermentation. Moreover, fermentation stability tends to be lowered by changes in influent properties. However, a two-stage digestion can provide optimal conditions for the process and allow operation at much higher loading rates and shorter hydraulic retention times (HRTs) *(2)*. In this system, syntrophic bacteria grow well even with excessive amounts of organic compounds because hydrogen is maintained at low levels *(3)*. Therefore, the two-stage anaerobic system has been studied intensively.

One of the significant problems with high-solids anaerobic digestion is volatile fatty acid (VFA) accumulation that leads to severe retardation of the methanogenesis process. The high VFA accumulation with a concomitant pH depression to 4 led to cessation of hydrolytic and acidfication reactions presumably due to end-product inhibition of fermentative acidogens. Syntrophic and acetoclastic methanogenic activities were also severely inhibited under the sour digestion conditions *(4)*. An innovative

process resolving this problem was the leach-bed two-phase anaerobic digestion process *(5)*. Although this process could be operated successfully, methane fermentation was virtually inhibited under the extreme sour-digestion condition.

A modified three-stage process that can produce methane effectively from easily biodegradable food wastes has been developed in this laboratory *(6)*. This system consisted of three stages: a semianaerobic hydrolysis/ acidogenic stage, a strictly anaerobic acidogenic stage, and a strictly anaerobic methanogenic stage. The separate reactor system efficiently reduced the HRT by increasing the rates of hydrolysis, acidogenesis, and methanogenesis without affecting the pH and showed high methane yield. These advantages were very important in the economical aspect because the reactor volume could be reduced to a small scale.

We report here the composition and operational conditions of a pilot-scale (total 2500 L) three-stage methane fermentation process. For practical use, we also developed a wastewater treatment system consisting of both biological filter system and algal periphyton treatment system to remove COD, total nitrogen (T-N), and total phosphorus (T-P) of the final effluent to satisfy the "Permissible Pollutant Discharge Standard of Wastewater" in Korea.

Materials and Methods

Design and Operation Conditions of Pilot Scale Three-Stage System

A three-stage methane fermentation system was developed to a pilot scale on the basis of the bench-scale system *(6)* which was modified from the two-phase digestion system designed by Ghosh and Pohland *(7)* (Fig. 1). It consisted of a semianaerobic hydrolysis/acidogenic process, an anaerobic acidogenic process, and a strictly anaerobic methanogenic process. The primary continuous stirred-tank reactor (CSTR) type of semianaerobic digester was designed for rapid hydrolysis and acid production from food wastes at a working volume of 200 L. Mixed household food wastes with high total solid (TS) contents were crushed to small particles (3–5 mm) and fed to the digester. The fluid was stirred at 180 rpm, and 1 vvm of air was applied to the bottom of reactor. Food wastes were hydrolyzed semianaerobically because of the unbalanced diffusion of oxygen in the reactor. To remove non-degradable materials, a drain valve (i.e., $\varnothing = 20$ cm) was made at the center of the bottom of the reactor. Operation temperature was adjusted to 45°C because a putrid smell was generated at 37°C by the putrefactive bacteria. The pH was controlled to 5.0–5.5 with a finally treated drain wastewater of pH 8.8–9.2. After 2 d digestion, 100 L of hydrolyzed acid-containing solution was transferred to the bottom of secondary UASB type digester with a 200 L working volume. In this reactor, a large amount of VFA was produced for 2 d at a mesophilic temperature (35°C). *Clostridium butyricum* was inoculated to improve the production of acids such as acetic and butyric acid. One hundred liter of acid effluent was fed to the bottom

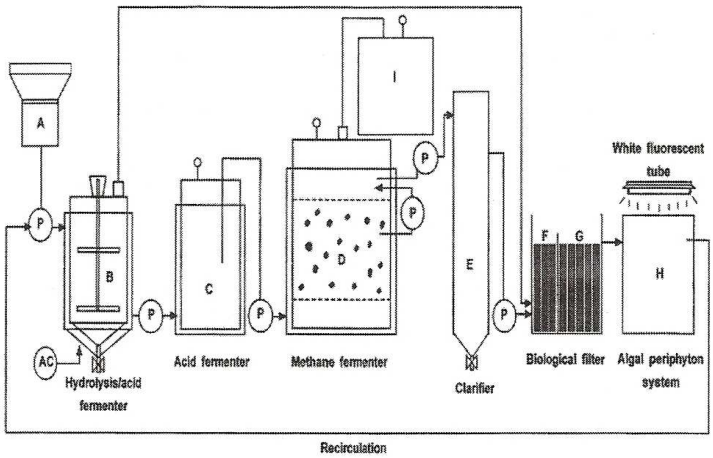


Fig 1. Schematic diagram of a pilot scale three-stage methane fermentation system consisting of a CSTR hydrolysis/acidogenic reactor and two UASB reactors for acidogenic and methanogenic processes. A, crusher; B, hydrolysis/acid reactor; C, acid reactor; D, immobilized-bed methane reactor; E, clarifier; F, aerobic biological filter chamber; G, anaerobic biological filter chamber; H, algal periphyton chamber; I, gas reservoir tank; P, pump; AC, air compressor.

of UASB type methanogenic reactor. The working volume and operation temperature were 1200 L and 41°C, respectively. Methane fermentation was performed using methanogenic bacteria. Round form ceramic biofilters (∅ = 3 cm) were used as packing materials. The digesters were equipped with heat exchangers, gas meters, flame traps, and gas vents.

Design and Operation Conditions of Wastewater Treatment System

To remove residual COD, T-N, and T-P contained in the effluent derived from the methane digester, additional wastewater treatment processes have been developed (Fig. 1). One hundred liters of effluent were transferred to the sedimentation tank (∅ = 0.4 m, h = 2.0 m) where solid fractions were precipitated and the supernatant was applied to the aerobic biological filter chamber (100 L) containing immobilized nitrifying bacteria, which convert ammonia to nitric acid. One vvm of air was applied to the chamber. One day after, 100 L of effluent were moved to the anaerobic immobilized biological filter chamber (200 L) to remove nitrogen by denitrifying bacteria. The filters were made of polyvinyl chloride bars (length = 1 m) and the surface was swelled so that they have a high ratio of surface area to volume. To immobilize microorganisms, filters were submerged into the wastewater for 30 d. Unpleasant gas blew off from the primary

digester and was transferred to the aerobic biological filter chamber to remove odor.

However, the wastewater still contained high concentration of T-N, and a more advanced process was required to reduce it. Algal periphyton treatment systems used periphyton to take up nitrogen and phosphorus dissolved in the wastewater. Initial algal density has been shown to be important for their activities and reduction of nutrients. Lau et al. *(8)* reported that initial algal density of 1×10^7 cells/mL seemed to be more beneficial for achievement of a satisfactory nutrient level within 7 d. In this study, algal cells were inoculated at $7–8 \times 10^6$/mL into the wastewater containing 200 mg/L T-N and incubated for 4 d at 25°C with illumination of 7000 lux.

Microorganisms

In the primary semianaerobic hydrolysis process, a mixture of moderate thermophilic bacteria (at least 100 strains including *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp., *Actinomycetes* sp., photosynthetic bacteria, yeast) isolated from many landfill soil samples were introduced for the rapid hydrolysis of carbohydrates, proteins, fats, chitins, and pectins. *C. butyricum* (NCIB 7423) was inoculated in the secondary acidogenic process for the mass production of VFA, especially acetic and butyric acids. In case of methanogenic process, cow manure and anaerobic methane-generating landfill soil were supplied to the reactor. Nitrifying and denitrifying bacteria used in the biological filters were prepared from the activated sludge. Algae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella* sp., were used in the algal periphyton treatment systems.

Analytical Methods

The following parameters were determined: TS, volatile solids (VS), tCOD, soluble COD (sCOD), BOD, and pH. T-N, ammonia (NH_4-N), nitric acid (NO_3-N), and T-P concentrations were also monitored. These parameters were analyzed by the methods described in the ref. *9*. COD was measured by the closed reflux, colorimetric method using $K_2Cr_2O_7$, and BOD was calculated from the difference between initial and final dissolved oxygen of sample in the airtight Winkler bottle. Total VFAs (tVFAs) were determined by gas chromatographic system (HP 5890A). Analytical conditions were as follows: FFAP capillary column (Hewlett Packard, 0.2 mm × 25 m) temperature, 150°C; injector temperature, 200°C; detector (flame ionization) temperature, 250°C; H_2 flow, 30 mL/min; air flow, 317 mL/min; column head pressure, 100 kPa. The composition of food wastes was analyzed by Elemental Analyzer (model 240C; Perkin-Elmer). The amount of gas produced from the digesters was monitored by a wet gas meter (W-NK-5; Shinagawa), and the gas composition was analyzed by a gas chromatography (GC-14B; Shimadzu) using a packed column (Haysep D, 100/120 mesh, 1/8 in. × 10 ft; Alltech). Temperatures for column, injector, and detector (thermal conductivity) were 150, 200, and 220°C, respectively.

Results and Discussion

Operation and Changes in Chemical Properties of Digestive Fluid

A three-stage process for pilot scale production of methane was operated as a stepwise system. Because of high TS (17–18%), food wastes were mixed with water at a ratio of 1:1 (v/v), then 100 L of the mixture was fed to the primary digester. The mixture was stirred at 180 rpm and hydrolyzed by a combination of aerobic and anaerobic bacteria for 2 d at 45°C. It was postulated that 2 d of HRT was enough to digest the waste in the primary digester. tCOD, sCOD, and BOD of the hydrolysate were 36,000, 23,000, and 40,000 mg/L, respectively (Fig. 2). At the same time, VFAs produced were continuously monitored through the fermentation process. In this step, the main VFA was acetic acid, whereas trace amounts of propionic, butyric, and caproic acids were produced (Fig. 3). Consequently, it seemed that the easily degradable polymers were hydrolyzed rapidly to oligomers or monomers by the aerobic bacteria, and they were simultaneously further converted to the acids by anaerobic bacteria. Although the initial pH was adjusted to 6.5, it decreased to 3.8 as acids were produced during the fermentation. The pH should be maintained at 5.0–5.5, because syntrophic and acetogenic activities were severely inhibited under sour digestion conditions *(4, 10–11)*. Therefore, mixing of acid hydrolysate with alkalic effluent (pH 8.8–9.2) derived from the finally treated drain wastewater was an efficient way to resolve the problem, and then more acid could be produced continuously.

When the primary digester was operated at 30°C, unpleasant odor was generated by the putrefactive bacteria contaminated from food wastes. However, the odor disappeared after the temperature was elevated to 45°C,because the bacteria cannot grow at the moderately high temperature.

After the hydrolysate was moved to the secondary digester, acid fermentation was carried out for 2 d. The products still showed high values of tCOD, sCOD, and BOD (Fig. 2), but more than two times large amounts of VFAs were produced (Fig. 3). It indicates that a significant amount of the biodegradable materials from food wastes is digested sufficiently and converted to VFAs and carbon dioxide without removal of organic wastes in large amounts. As shown in Table 1, the gas produced from acidogenic digester was mainly carbon dioxide.

While the acid effluent was injected to the methane digester, pH was adjusted to 5.0–5.5 with 5 N NaOH to relieve the acid impact on the methanogenic bacteria, because the methane fermentation virtually stopped under extreme sour conditions. While acid effluents resided for 12 d in the methane digester, tCOD, sCOD, and BOD decreased dramatically (Fig. 2). Removal rates of tCOD, sCOD, and BOD through the pilot-scale three-stage process were 88%, 87%, and 95%, respectively. This indicates that the digestion capability of the pilot-scale system is almost the same as that of bench scale, which has already been recognized as an effective and time-saving process for the disposal of food wastes with a high TS content *(6)*.

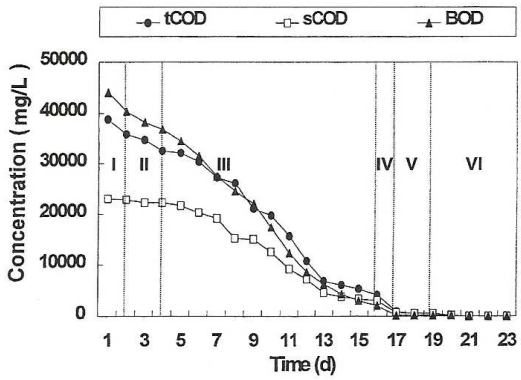


Fig. 2. Reduction of tCOD, sCOD, and BOD during the full digestion processes. I, semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic process; II, anaerobic acidogenic process; III, anaerobic methanogenic process; IV, aerobic biological filter; V, anaerobic biological filter; VI, algal periphyton system.

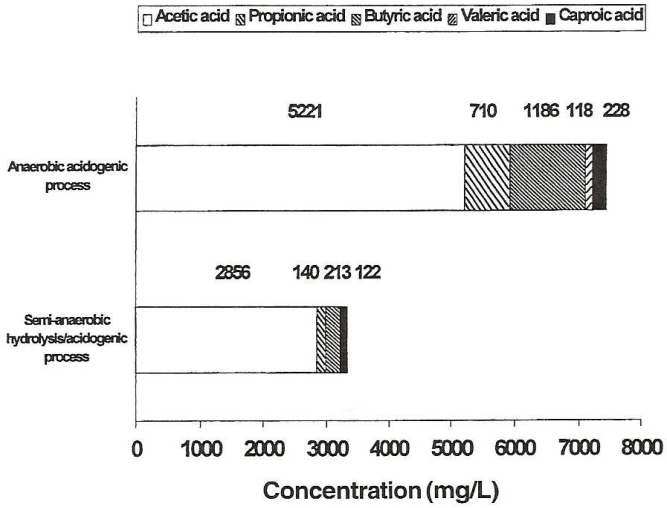


Fig. 3. VFA production from the primary semi-anaerobic hydrolysis/acidogenic process and the secondary anaerobic acidogenic process.

Table 1
Operational Conditions and Performance of Pilot Scale Three-Stage Methane Fermentation System

Parameter	First stage	Second stage	Third stage	Biological filter		
				Aerobic	Anaerobic	Algal periphyton
HRT (d)	2	2	12	1	2	4
Loading (kg VS/[m^3d])	104.4–105	60.4–61.2	54.9–55.4	5.7–6.0	1.8–1.9	1.7–1.8
pH	5.0–5.5	5.0–5.5	7.6–7.9	8.4–8.8	8.8–9.2	8.8–9.2
Temperature (°C)	45	35	41	35	35	25
T-N (mg/L)	5040	4496	4104	1124	500	53
NH3-N (mg/L)	181	203	1945	73	65	5
NO3-N (mg/L)	163	180	60	26	31	19
T-P (mg/L)	780	673	120	42	30	7
COD (mg/L)						
tCOD	35947	34625	4232	881	510	—
sCOD	22965	22244	3020	820	490	73
BOD (mg/L)	40268	35234	2046	246	161	21
Gas yield (m^3/kg VS)	—	—	0.65–0.70	—	—	
Gas composition(%)						
CH_4	—	9	72	—	—	—
CO_2	—	91	28	—	—	—
Methane yield (m^3/kg VS)	—	—	0.45–0.50	—	—	—
Volatile acids (mg/L)						
Acetic	2856	5221	385			
Propionic	140	710	0			
Butyric	213	1186	0	—	—	—
Valeric	0	118	0			
Caproic	122	228	0			
Total	3331	7463	385	—	—	—

VFAs and Methane Production

In the primary digestion process, 3331 mg/L of tVFA was produced (Fig. 3). Although acetic acid (86%) was the favored product, propionic, butyric, and caproic acids were produced in a small amount. In the secondary acidogenic process, the concentration of tVFA increased to 7463 mg/L, and acetic (5221 mg/L), propionic (710 mg/L), butyric (1186 mg/L), valeric (118 mg/L), and caproic acids (228 mg/L) were produced (Fig. 3). For the rapid acetoclastic reaction, acetic acid had an advantage to be cleaved to methane easily. Therefore, it seemed that the semianaerobic system was more effective than the strict anaerobic system in producing acetic acids.

Biogas could be accumulated in the methane reactor. The total gas yield in the methane fermentation system was 0.65–0.70 m^3/kg VS. Methane, carbon dioxide, ammonia, and hydrogen sulfide were detected. Seventy two percent of the total gas produced was methane and the yield was 0.45–0.50 m^3/kg VS (Table 1). Total gas and methane yield showed similar values compared to those of other work *(11–14)*. The most important parameters of the normal operation for the rapid digestion were particle size of wastes, pH, loading rate, and volume rate between acid and methane digester.

Wastewater Treatment

Although more than 85% of tCOD, sCOD, and BOD were removed through the three-stage process, the wastewater still contained high concentrations of them (Fig. 2). Moreover, only 19% T-N was removed through the process (Table 1). In case of NH_3-N, the concentration increased up to 1945 mg/L through the anaerobic methanogenic process. Therefore, additional wastewater treatment system was required because these concentrations were too high to be drained out. Aerobic and anaerobic biological filter systems have been developed. The biological filters were immobilized with nitrifying and denitrifying bacteria together with heterotrophic bacteria to degrade residual organic wastes in the wastewater. Through the process, T-N and NH_3-N concentrations decreased to 500 and 65 mg/L, respectively, and BOD reduced to 21 mg/L. Removal rates of T-N, T-P, and BOD were 90, 98, and 99.9%, respectively.

Since they were not further decomposed in the biological filter systems, an alternative method, algal periphyton system, was adopted. This system was very effective for wastewater containing low concentrations of T-N and T-P. *S. capricornutum* grew faster than *Chlorella* sp. under the condition that T-N concentrations are below than 500 mg/L. When they were inoculated to the wastewater having higher concentrations of T-N, they died slowly after 7 d. The optimum concentration of T-N for growth was 150 mg/L (Fig. 4A and B). At the same time, T-N removal rate of *S. capricornutum* was also higher than that of *Chlorella* sp., and it reached 53% within 4 d (Fig. 5A and B). When 3.00 mg/L of Mg^{2+} and 1.44 mg/L of Ca^{2+} were added to the wastewater (initial T-N concentration, 150 mg/L)

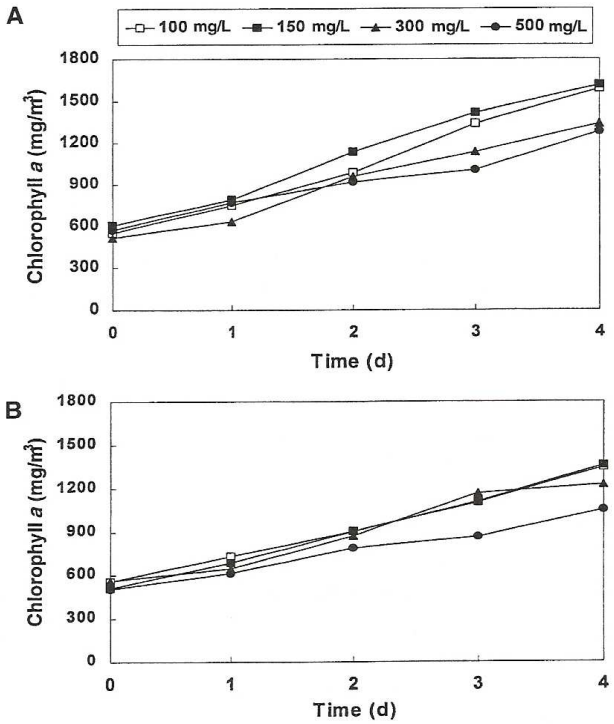


Fig. 4. Comparison of growth of *S. capricornutum* **(A)** with *Chlorella* sp. **(B)** in wastewaters containing various concentrations of T-N.

and incubated for 4 d, the removal efficiency of T-N increased and the final T-N concentration was 53 mg/L (Fig. 6). Consequently, the final effluent could maintain low concentrations of COD, BOD, T-N, and T-P, and satisfy the "Permissible Pollutant Discharge Standard of Wastewater" in Korea (Table 1). The permitted concentrations of COD, BOD, T-N, and T-P in the wastewater derived from the industrial complexes are 40, 30, 60, and 8 mg/L, respectively.

After all, three-stage methane fermentation process has more advantages than the conventional two-stage process: first, food wastes are hydrolyzed rapidly in the semianaerobic condition and HRT is reduced dramatically; second, nondegraded materials can be easily removed through a hole at the bottom of the semianaerobic reactor; third, pH of the primary and secondary reactors can be easily controlled by the addition

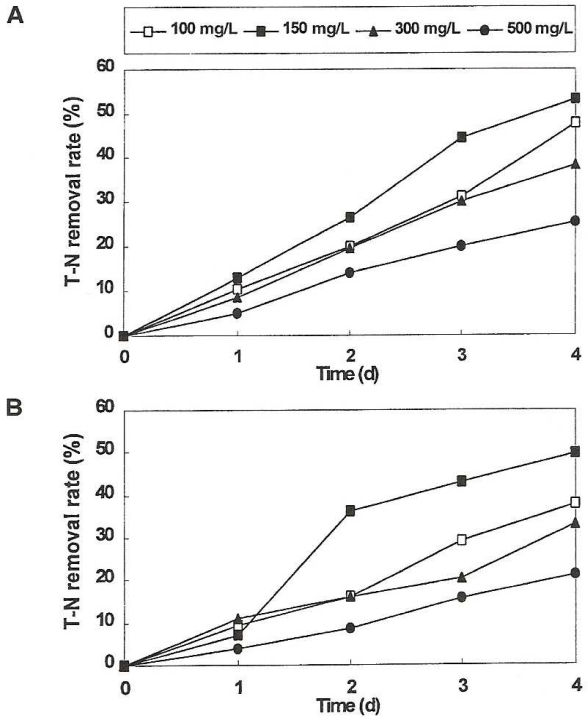


Fig. 5. Comparison of nitrogen removal rates of *S. capricornutum* **(A)** with *Chlorella* sp. **(B)** in wastewaters containing various concentrations of T-N.

of alkalic final effluent from algal periphyton process and more methane can be produced.

Conclusion

1. The pilot scale methane fermentation system developed in this study was an effective system to digest food wastes and to produce methane. Methane yield was 0.45–0.50 m^3/kg VS of food wastes. The removal efficiency of tCOD and BOD were 88 and 95%, respectively.
2. Wastewater eluted from the above system was further treated both with biological aerobic/anaerobic filter system and algal periphyton system. The remaining concentrations of COD, BOD, T-N, and T-P were 73, 21, 53, and 7 mg/L, respectively.

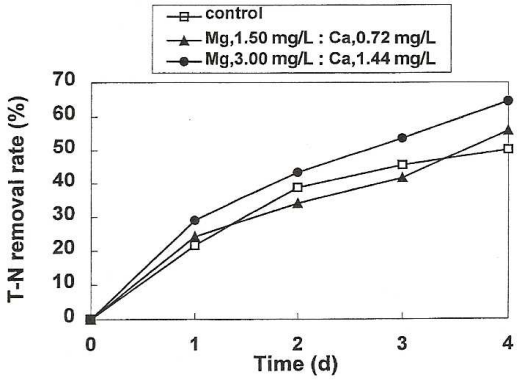


Fig. 6. Effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} on the removal of nitrogen by *S. capricornutum* in wastewater containing 150 mg/L of T-N.

Acknowledgment

This work was supported by the ERC Grants from Ministry of Science and Technology in Korea and KOSEF (Korea Science and Engineering Foundation) in the year of 2000.

References

1. Speece, R. E. (1983), *Environ. Sci. Technol.* **17,** 416A–427A.
2. Ghosh, S., Conrad, J.R., and Klass, D. L. (1975), *J. Water Pollut. Control Fed.* **47,** 30–45.
3. Zhang, T. C. and Noike, T. (1991), *Water Sci. Technol.* **23,** 1157–1166.
4. Ghosh, S. (1997), *Proc. 8th International Conferernce on Anaerobic Digestion,* Sendai, pp. 9–16.
5. Ghosh, S. (1982), US patent no. 4,323,367.
6. Kim, S. W., Park, J. Y., Kim, J. K., Cho, J. H., Chun, Y. N., Lee, I. H., Lee, J. S., Park, J. S., and Park, D.H. (2000), *Appl. Biochem. Biotech.* **84–86,** 731–741.
7. Ghosh, S. and Pohland, F. G. (1974), *J. Water Pollut. Control Fed.* **46,** 748–759.
8. Lau, P. S., Tam, N. F. Y., and Wong, Y. S. (1995), *Environ. Pollut.* **89,** 59–66.
9. American Public Health Association (APHA) (1985), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,* 16th ed., APHA Washington, DC.
10. Ghosh, S. (1984), *Proc. 1st Symposium on Biotechnological Advances in Processing Municipal Wastes for Fuels and Chemicals,* Minneapolis, MN pp. 303–320.
11. Ghosh, S. (1985), *J. Energy Resour. Technol. Trans. ASME* **107,** 402–404.
12. Park, S. C., Cho, J. K., Lee, J. P., Hong, J. J., Lee, J. S., and Kim, M. S. (1994), Report no. KIER-941123, Korea Institute of Energy Research, Taejon, Korea.
13. Ghosh, S. (1987), *J. Environ. Eng.* **113,** 1265–1284.
14. Ghosh, S. (1991), *Water Sci. Technol.* **23,** 1179–1188.

Biotechnology Letters **24:** 1397–1400, 2002.
© 2002 *Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.*

Comparative effects of TiO_2-immobilized photocatalytic supporters on the bactericidal efficiency of a novel photoreactor

Jung Kon Kim[1], Hack Sun Choi[1], Eungbin Kim[2], Young Sang Lee[3], Yong Ho Kim[3] & Si Wouk Kim[1,4,*]

[1]*Research Center for Proteineous Materials, and* [4]*Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea*

[2]*Department of Biology and Institute of Life Science and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea*

[3]*Division of Life Sciences, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea*

[*]*Author for correspondence (Fax: 82-62-225-6040; E-mail: swkim @mail.chosun.ac.kr)*

Received 16 May 2002; Revisions requested 24 May 2002; Revisions received 14 June 2002; Accepted 17 June 2002

Key words: bactericidal effect, photocatalytic supporter, TiO_2, ultraviolet illumination

Abstract

A novel and highly effective UV-TiO_2 photocatalytic reactor was developed for killing microorganisms, including *Escherichia coli*. Among tested four types of TiO_2-immobilized photocatalytic supporters (glass bead, muscovite bead, alginate bead, and TiO_2 thin film coated quartz tube), the muscovite bead had a 99.9% percent bactericidal activity within 5 min along with permanent longevity. Adding air bubbles or H_2O_2 (<50 mg l^{-1}) to the sample solution significantly enhanced the killing activity in that 100% percent of bacterial cells were killed within 3 min.

Introduction

The shortage of clean water has been identified as one of the most pressing problems of human beings as reported by the United Nations: if there is no change to current consumption patterns, two out of three people will live in water-stressed conditions by the year 2025 (BBC News 2002: UN warns of looming water crisis. http://news.bbc.co.uk/hi/english/world/newsid_1887000/1887451/stm. March 22). Consequently, global efforts have been made to develop efficient technologies for better water management including wastewater-recycling systems. Disinfection is the most important factor in recycling wastewater. Among the conventional physical and chemical methods for killing microorganisms, chlorine has been widely used to disinfect waters because it is relatively easy to use and low in price. Chlorine, however, produces carcinogenic trihalomethane, and some pathogens such as viruses, bacteria (*Legionella*, *Mycobacterium* or *Yersinia*) and protozoans (*Giardia lamblia* cyst) are resistant to chlorine disinfection (Moser 1992, Kim *et al.* 2001).

The recently developed alternative technique to inactivate microorganisms is UV illuminated TiO_2 photocatalytic reaction (Kikuchi *et al.* 1997, Maness *et al.* 1999, Koizumi 2002). Its suggested killing mechanism is lipid peroxidation of bacterial cell membrane by the UV irradiation in the presence of the TiO_2 photocatalyst (Maness *et al.* 1999). Hydroxyl radical (·OH) is one of the most powerful oxidizing agents, and can successfully degrade a wide variety of organic toxic compounds into nontoxic compounds (Dillert *et al.* 1996). As a result, the advantages of TiO_2 are high photocatalytic activity, non-toxic chemical stability, resistance to photocorrosion and low cost (Ollis *et al.* 1991). Here we describe the development of a novel, low price, and highly effective UV-TiO_2 photocatalytic reactor.

Materials and methods

Bacterial culture conditions

Escherichia coli Y1090 (ATCC 37197) was cultured aerobically at 37 °C for 6 h in 50 ml of Luria–Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 1% NaCl, pH 7). When optical density of culture medium reached to 0.7 at 600 nm, the medium was resuspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) and cell density was adjusted to the required final concentration (7×10^3 c.f.u. ml^{-1}).

TiO_2-immobilized photocatalytic supporters

As a photocatalytic TiO_2-containing solution, apatite-coated TiO_2 solutions (diam. = 30 nm, Jupiter F4-APS, Showa Denko Co. Japan) were diluted to 0.06% (w/v) with distilled water. As a supporter for TiO_2-immobilization four different types of materials were prepared: (1) TiO_2-coated glass beads (diam. = 6 mm) were prepared by submerging glass beads into the TiO_2 solution. After drying at room temperature, the beads were heated in an oven at 100 °C for 24 h. (2) Muscovite beads were provided by mixing 500 g muscovite powder with 120 ml distilled water and fabricating to small and spherical (diam. = 15 mm) beads. The beads were preheated at 800 °C for 24 h, cooled at room temperature and submerged into the TiO_2 solution. TiO_2-absorbed beads were heated again at 1400 °C for 10 h. (3) TiO_2-mixed alginate bead was prepared by an immobilizing apparatus (MIA-1, EYELA). Alginate solution (4%, w/v) was mixed with equal volume of 0.1% TiO_2 solution and was dropped into 0.1 M $CaCl_2$ solution at 4 °C. After 30 min the beads were rinsed with fresh distilled water and ready to use. (4) TiO_2-thin film coated quartz tube was prepared by chemical vapor deposition (thickness 7000 Å).

UV-illuminated TiO_2 photoreactor

Two different types of laboratory scale photoreactors were prepared as shown in Figure 1. The first photoreactor (Figure 1A) was made of cylindrical pyrex glass tube with a tubular low-pressure mercury-vapor lamp (TL40W/12RS, Philips) in the center of reactor and a plastic tube for aeration, and then filled with different types of photocatalytic supporters. Another type (Figure 1B) of photoreactor consisted of pyrex glass tube and TiO_2-thin film coated quartz tube to

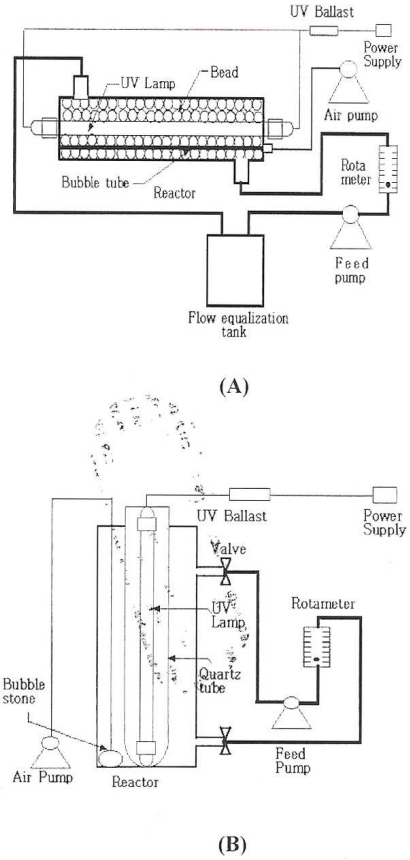


Fig. 1. Schematic diagrams of UV illuminated photoreactors. (A) Photoreactor was made of cylindrical pyrex glass tube (55 × 920 mm) and a tubular low-pressure mercury-vapor lamp (TL40W/12RS, Philips) emitting approximately 40 W of UV irradiation at 306 nm. The lamp was fixed in the center of reactor and its electrical connections of both ends were exposed out to the exterior side of reactor through holes prepared in the silicon stopper. A plastic tube with small pores was inserted and 30 l min^{-1} of air was applied. After installing UV lamp and air bubble tubes, the reactor was filled with four different types of photocatalytic supporters. (B) Photoreactor was made of pyrex glass tube (55 × 950 mm) and UV lamp was positioned inside of quartz tube (21 mm × 1 m) coated with TiO_2 thin film. Thirty l min^{-1} of air was supplied through a bubble stone.

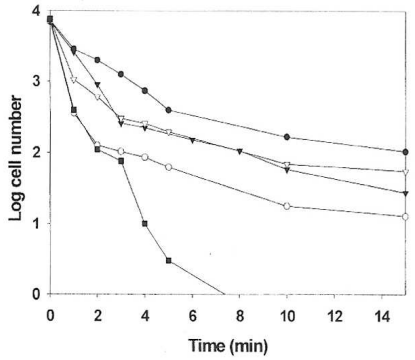


Fig. 2. Bactericidal efficiencies of photocatalytic reactors filled with different TiO_2 immobilized supporters. Sample solution containing *E. coli* was applied to the lower inlet of the reactor and was flowed out from the upper outlet by a feeding pump. The sample solution was continuously recycled at a rate of 2.5 l min^{-1} from water jacket to photoreactor. UV only was illuminated to the sample solution without any supporters (●), UV was illuminated to the TiO_2 immobilized glass beads (○), quartz tube (▼), alginate beads (▽), and muscovite beads (■).

protect UV lamp from breaking and to make the UV light transmitted to the reactor completely.

Bactericidal effect

The changes in number of viable cells in sample solution during the photocatalytic reaction recycles were determined by plating appropriate serial dilution of sample onto LB agar plates and counting the number of colonies appeared after 24 h incubation at 37 °C. Three independent replicate plates were used.

Results and discussion

Without photocatalysts, UV light inactivated 73.9, 85.2, and 96.7% *E. coli* cells during 1, 2 and 10 min of irradiation, respectively (Figure 2). Such bactericidal activity of UV irradiation could be significantly increased in the presence of photocatalysts, including TiO_2 (Block *et al.* 1997), which needs to be immobilized to the supporters for practical needs.

Among four different types of supporters tested in this experiment, all TiO_2-coated beads coupled with UV irradiation exhibited dramatically enhanced bactericidal effectiveness compared to TiO_2-thin film coated quarts tube (Figure 2). In the case of glass

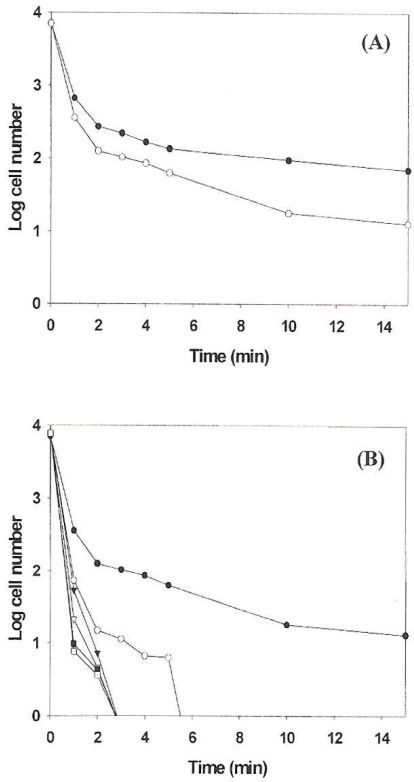


Fig. 3. Effects of air bubble (A) and H_2O_2 (B) on bactericidal efficiency of photocatalytic reactor. (A) Thirty l min^{-1} of air was applied into the reactor through a plastic tube with small pores. Without (●) and with (○) air bubble; (B) H_2O_2 was added into sample solution prior to UV irradiation and sample solution recycling in the final concentrations of 0 (●), 25 (○), 50 (▼), 75 (▽), 100 (■), and 500 (□) mg l^{-1}.

beads, however, the TiO_2 film layer was gradually removed from the bead surface by the continuous water flow, and resulted in the almost complete loss of its synergistic effects after 100 h of running. To overcome this problem, alginate beads bearing similar surface area were tested as an alternative to glass beads. The alginate beads, however, were not so effective as glass bead (Figure 2), which may due to the fact that alginate with lower density could be slanted to one side

of the reactor by the water flow pressure and result in significantly decreased surface area.

When TiO_2-immobilized muscovite beads were examined, 99.9% cells were inactivated within 5 min. Moreover, TiO_2 film layer of muscovite bead was the most durable among the four types of beads tested. These results suggested muscovite as the best candidate for photocatalytic supporter.

Several oxidants can enhance the effect of photocatalytic reaction (Augugliaro *et al.* 1991, Pelizzetti & Minero 1993). Under our experimental conditions, applying air bubbles enhanced bactericidal efficiency in that intial viable cell number (7×10^3 c.f.u. ml^{-1}) decreased down to 3.6×10^2 c.f.u. ml^{-1} within 1 min of UV irradiation (Figure 3A). The bactericidal effects of air bubbles increased gradually as the UV irradiation time increased, which may result from the increased dissolved O_2 provided by air bubbles. Such enhanced dissolved O_2 may in turn react with the electrons trapped on the surface of TiO_2 particle and generate superoxide radicals. It can also react with H^+ and form O_2 and H_2 O_2, which can readily react with the photo-generated electrons and produce hydroxyl radicals responsible for the inactivation of bacteria (Pelizzetti & Minero 1993, Pelizzetti *et al.* 1991).

Adding as little as 50 mg of H_2O_2 l^{-1} into sample solution significantly enhanced inactivation efficiency in that 100% of cells could be killed within 3 min (Figure 3B). These results suggest that H_2O_2 carries higher capacity to react with electrons than O_2, and consequently it may be even more efficient in preventing the electrons from binding to holes (Ollis *et al.* 1991). H_2O_2 can also directly form hydroxyl radicals by reacting with electrons (Okamoto *et al.* 1985, Pelizzetti *et al.* 1991) or by photocatalytic decomposition (Okamoto *et al.* 1985, Ollis *et al.* 1991, Millis & Hunte 1997). Consequently, H_2O_2 was more efficient than O_2 for the generation of hydroxyl radicals.

In conclusion, considering the low cost of major components such as muscovite, UV lamp, and TiO_2 solution, our novel UV-irradiated photocatalytic reactor filled with TiO_2 immobilized muscovite bead and optimized by adding air bubbles and H_2O_2 seems to be an economical, highly efficient and durable microorganism-inactivating reactor.

Acknowledgements

This work was supported by the special grants research program from Ministry of Agriculture (Project No. 299023-3) (2001), and ERC grant from Ministry of Science and Technology and KOSEF (2001) in Korea.

References

Augugliaro V, Palmisano L, Schiavello M, Sclafani A (1991) Photocatalytic degradation of nitrophenols in aqueous titanium dioxide dispersion. *Appl. Catalysis* **69**: 323–340.

BBC News (2002): UN warns of looming water crisis. http://news.bbc.co.uk/hi/english/ world/newsid_1887000/1887451/stm. March 22.

Block SS, Seng VP, Goswami DW (1997) Chemically enhanced sunlight for killing bacteria. *J. Solar Energy Engin.* **119**: 85–91.

Dillert R, Fornefett I, Siebers U, Bahnemann D (1996) Photocatalytic degradation of trinitrotoluene and trinitrobenzene. *J. Photochem. Photobiol.* **94**: 231–236.

Kikuchi Y, Sunada K, Iyoda T, Hashimoto K, Fujishima A (1997) Photocatalytic bactericidal effect of thin film: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J. Photochem. Photobiol.* **106**: 51–56.

Kim KJ, Hong WS, Lee KS (2001) Disinfection characteristics of waterborne pathogenic protozoa *Giardia lamblia*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**: 95–99.

Koizumi Y (2002) Photocatalytic inactivation rate of phage MS2 in titanium dioxide suspensions containing various ionic species. *Biotechnol. Lett.* **24**: 459–462.

Maness PC, Smolinski S, Blake DM, Huang E, Wolfrum EJ, Jacoby WA (1999) Bacterial activity of photocatalytic TiO_2 reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4094–4098.

Millis A, Hunte SL (1997) An overview of semiconductor photocatalysis. *J. Photochem. Photobiol.* **108**: 1–35.

Moser RH (1992) Critical issues in regulating microbes and disinfection by-products. In: Gilbert CE, Calabrese EJ, eds. *Regulating Drinking Water Quality*. Michigan: Lewis Pub., pp. 145–151.

Okamoto KI, Yamamoto Y, Tanaka H, Tanaka M (1985) Heterogeneous photocatalytic decomposition of phenol over powder. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **58**: 2015–2022.

Ollis DF, Pelizzetti E, Serpone N (1991) Destruction of water contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 1523–1529.

Pelizzetti E, Minero C (1993) Mechanism of the photo-oxidative degradation of organic pollutants over TiO_2 particles. *Electrochim. Acta* **38**: 47–55.

Pelizzetti E, Carlin V, Minero C, Grätzel M (1991) Enhancement of the rate of photocatalytic degradation on TiO_2 of 2-chlorophenol, 2,7-dichlorodibenzodioxin and atrazine by oxidizing species. *New J. Chem.* **15**: 351–359.

Copyright © 2000 by Humana Press Inc.
All rights of any nature whatsoever reserved.
0273-2289/00/84–86/0731/$12.75

Development of a Modified Three-Stage Methane Production Process Using Food Wastes

Si W. Kim,*,[1] Jin Y. Park,[1] Jung K. Kim,[1] Jae H. Cho,[1] Young N. Chun,[1] In H. Lee,[1] Jung S. Lee,[2] Jin S. Park,[3] and Don-Hee Park[4]

[1]Department of Environmental Engineering, [2]Department of Biological Science, and [3]Department of Materials Science and Engineering, Chosun University, Kwangju 501-759, South Korea, E-mail: swkim@mail.chosun.ac.kr; and [4]Department of Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, South Korea

Abstract

A modified three-stage system was developed for the rapid production of methane from food wastes. The primary stage was a semianaerobic hydrolysis/acidogenic system, in which approx 4100 mg/L of volatile fatty acids (VFAs) was produced at a hydraulic retention time (HRT) of 2 d. The operation temperature and pH were 30°C and 5.0–5.5, respectively. The nondegraded materials were removed through a hole at the bottom of the reactor. The secondary stage was an anaerobic acidogenic system equipped with an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) type of fermentor. VFA was accumulated up to 6100 mg/L by the addition of *Clostridium butyricum* to the reactor at an HRT of 2 d. The optimum temperature and pH range were 35°C and 5.0–5.5, respectively. The tertiary methanogenic stage produced CH_4 and CO_2 from the VFA in the UASB reactor. Methane content was 72% of the total gas volume, and the yield was 0.45–0.50 m^3/kg of volatile solids at an HRT of 12 d. The operation temperature and pH were 41°C and 7.6–7.9, respectively. The three-stage process exhibited an unusually high total chemical oxygen demand reduction rate up to 95%. Total nitrogen decreased to 96% and <10 mg/L of total phosphorus remained in the final effluent.

Index Entries: Anaerobic digestion; volatile fatty acid; modified three-stage methane production process.

*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

Introduction

The disposal of food wastes has become a major concern. Because of the high moisture content (75–80%) of Korean food wastes, they are easily putrefied and emit unpleasant odors. Landfilling creates serious environmental pollution, and it is difficult to find land on which to dispose of the food wastes. An alternative treatment is anaerobic digestion, which has recently been developed to utilize food wastes for the production of energy and materials. In this system, the organic compounds contained in food wastes are decomposed to volatile fatty acids (VFAs) by hydrolytic and acidogenic bacteria at the first stage (acidogenic phase). VFAs are further decomposed to methane and carbon dioxide by methanogenic bacteria at the second stage (methanogenic phase). The microbial consortia in the two phases have substantially different physiological properties and nutrient requirements. If the microbial growth conditions change, the growth balance between acetogenic and methanogenic bacteria can be destroyed. As a result, cell growth is severely inhibited. To overcome these problems, a two-phase anaerobic digestion process has been developed to separate acid- and methane-producing phases *(1–3)*.

In a conventional one-phase system, acid and methane are produced simultaneously, and it is difficult to maintain optimal conditions for the fermentation. Moreover, fermentation stability tends to be lowered by changes in influent properties. However, a two-phase system can provide optimal conditions for the process. In this system, syntrophic bacteria grow well even with excessive amounts of organic compounds because hydrogen is maintained at low levels *(4)*. Therefore, the two-phase anaerobic system has been studied intensively. However, the studies were focused mainly on easily biodegradable carbohydrates such as glucose. Hanaki et al. *(5)* reported that phase separation is not effective for the degradation of complex substrates consisting of carbohydrates, proteins, and lipids. Over the last 20 yr, a number of notable process configurations have been proposed: the leached-bed two-phase or LanFilgas Process *(6–8)*, the National Renewable Energy Laboratory high-solids system *(9)*, the Valorga Process *(10)*, the Dranco Process *(11)*, and the BTA Process *(12)*.

We report here a modified three-stage system that can produce methane effectively from easily biodegradable food wastes. This system efficiently reduced the hydraulic retention time (HRT) by increasing the rates of hydrolysis and acid production, and produced larger amounts of methane than those by conventional systems. Nondegradable materials such as shellfish and plastics in the food wastes could be easily removed from the primary digestion reactor without additional processes.

Materials and Methods

Design and Operation Conditions of Three-Stage System

A three-stage system was developed on the basis of the two-phase digestion system originally designed by Ghosh and Pohland *(1)* to produce

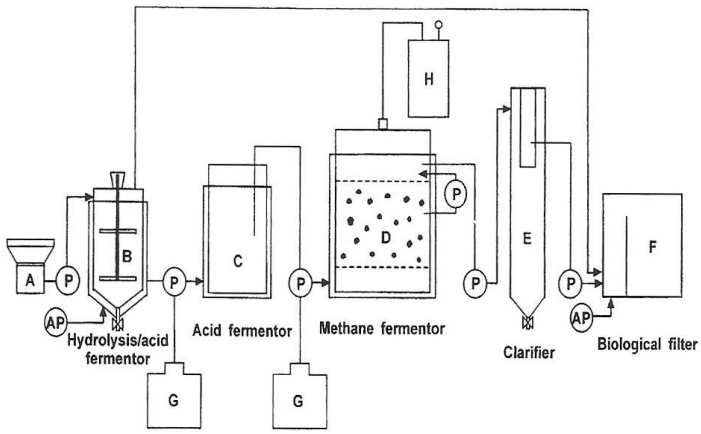


Fig. 1. Schematic diagram of a modified three-stage methane fermentation system consisting of a CSTR hydrolysis/acidogenic reactor and two upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for acidogenic and methanogenic processes. A, waste crusher; B, hydrolysis/acid fermentor; C, acid fermentor; D, immobilized-bed methane fermentor; E, clarifier; F, biological filter chamber; G, NaOH feeding bottle; H, gas reservoir tank; P, peristalic pump; AP, aerated pump.

methane at high rates (Fig. 1). It consisted of a semianaerobic hydrolysis/acidogenic process, an anaerobic acidogenic process, and a strictly anaerobic methanogenic process. The primary continuous stirred-tank reactor (CSTR) type of semianaerobic digester was designed for rapid hydrolysis and acid production from food wastes at a working volume of 20 L. Mixed household food wastes with high total solid (TS) contents were crushed and fed to the digester. The fluid was stirred at 100 rpm, and 1 vvm of air was applied to the bottom of the reactor to hydrolyze the food wastes after inoculation with a mixture of aerobic bacteria (Table 1). However, the hydrolysate still became semianaerobic because of poor oxygen dissolution owing to poor mixing in the digester. To remove nondegradable materials, a drain valve (i.e., $\phi = 10$ cm) was made in the center of the bottom of the reactor. The operation temperature and pH range were 30°C and 5.0–5.5, respectively. After a 2-d digestion, 10 L of hydrolyzed and acid-containing solution was transferred to the bottom of a secondary UASB-type digester having 20 L of working volume. In this reactor, a large amount of VFA could be produced for 2 d at a mesophilic temperature (35°C). *Clostridium butyricum* was inoculated to improve production of acids such as acetic and butyric acids. Ten liters of acid effluent was fed to the bottom of the USAB-type digester for the final step. The working volume and operation temperature were 120 L and 41°C, respectively. Methane fermentation

Table 1
Microorganisms Used for Digestion of Food Wastes

Process	Strain	Substrate
Semianaerobic hydrolysis/acidogenic	*Cellulomonas cellulans*	Cellulose, chitin, pectin
	Flavobacterium breve	Cellulose
	Bacillus amyloliquefaciens	Carbohydrates
	Bacillus licheniformis	Proteins
	Bacillus subtilis	Carbohydrates, proteins
	Bacillus alcalophilus	Fats
Anaerobic acidogenic	*Clostridium butyricum*	Sugar, amino acids, long-chain fatty acids
Anaerobic methanogenic	Methanogenic bacteria	Acetate, formate

was performed using methanogenic bacteria. The digesters were equipped with heat exchangers, gas meters, flame traps, and gas vents.

To remove residual organic carbon, nitrogen, and phosphate contained in the effluent from the methane digester, several other processes were used. The effluent was transferred to the sedimentation tank, where the solid fractions were precipitated. The supernatant was applied to the oxic biological filter chamber (45 L) consisting of immobilized nitrifying bacteria. After 3 d, the effluent was fed to the anoxic immobilized biological filter chamber (90 L) to remove nitrogen by denitrifying bacteria. The filters were made of polyvinyl chloride bars (length = 1 m). The immobilized filters were submerged into the wastewater for 6 d. The generated gas from the primary digester was transferred to the oxic biological filter chamber to remove the odors.

Microorganisms and Culture Conditions

Table 1 gives the microorganisms used for the digestion of food wastes. In the primary semianaerobic hydrolysis process, *C. cellulans* (NCIB 8868), *F. breve* (NCTC 11099), *B. amyloliquefaciens* (ATCC 23350), *B. licheniformis* (ATCC 21418), *B. subtilis* (ATCC 21394), and *B. alcalophilus* (NCIB 10436) were introduced for the aerobic hydrolysis of carbohydrates, proteins, and fats. *C. butyricum* (NCIB 7423) was inoculated in the secondary acidogenic process for the mass production of VFAs. However, in the case of the methanogenic process, cow manure and anaerobic methane-generating landfill soil were supplied to the reactor. Nitrifying and denitrifying bacteria used in the biological filters were prepared from the activated sludge.

C. cellulans was cultured in sporulation broth *(13)* at 26°C, and *F. breve* was in the nutrient broth *(13)* at 25°C. *B. licheniformis*, *B. alcalophilus*, and *B. subtilis* were cultured in nutrient broth at 30°C. *B. amyloliquefaciens* grew in spizizen potato broth *(13)* at 37°C. *C. butyricum* was cultured in *Clostridium acetobutyricum* medium *(13)* at 35°C.

Table 2
Elemental Analysis of Collected Food Wastes

Solid content (%)	VS/TS (%)	COD/VS	Elemental composition (%)			
			C	H	O	N
17.53	91.3	0.69	47.8	6.1	40.9	5.2

Analytical Methods

The following parameters were determined: TS, volatile solids (VS), total chemical oxygen demand (tCOD), soluble COD (sCOD), biological oxygen demand (BOD), and pH. Total nitrogen (T-N), ammonia (NH_4-N) and total phosphorus (T-P) concentrations were also monitored. These parameters were analyzed by the methods described in ref. *14*, and monitored three times per week during steady state. Total VFAs (tVFAs) was determined by gas chromatographic system (HP 5890A). Analytical conditions were as follows: FFAP capillary column (Hewlett Packard, 0.2 mm × 25 m) temperature, 150°C; injector temperature, 200°C; detector (flame ionization) temperature, 250°C; H_2 flow, 30 mL/min; airflow, 317 mL/min; column head pressure, 100 kPa. Waste food composition was analyzed by an Elemental analyzer (model 240C; Perkin-Elmer). The amount of gas produced from the digesters was monitored by a wet gas meter (W-NK-5; Shinagawa), and the gas composition was analyzed by a gas chromatograph (GC-14B; Shimadzu) using a packed column (Alltech; Haysep D, 100/120 mesh, 1/8 in. × 10 ft). Temperatures for column, injector, and detector (thermal conductivity) were 150, 200, and 220°C, respectively.

Results and Discussion

Chemical Composition of Korean Food Wastes

The average TS content of food wastes was 17.5%, and the average VS/TS and COD/VS values were 91 and 69%, respectively. The elemental compositions were C: 47.8%, H: 6.1%, O: 40.9%, and N: 5.2%. The C:N ratio was 9.2 (Table 2). This means that Korean food wastes are good resources for methane fermentation.

Process Operation and Changes in Chemical Properties of Digestive Fluid

The three-stage methane production process was operated in a stepwise system. The collected food wastes were mixed with water at a ratio of 1:1 (v/v), and 10 L of the mixture was fed to the primary digester. The mixture was stirred at 100 rpm and hydrolyzed by a combination of aerobic and anaerobic bacteria for 2 d at 30°C. Each strain of the aerobic bacteria listed in Table 1 was separately cultured in the optimal medium and transferred to the substrate mixture of food wastes. After adaptation to

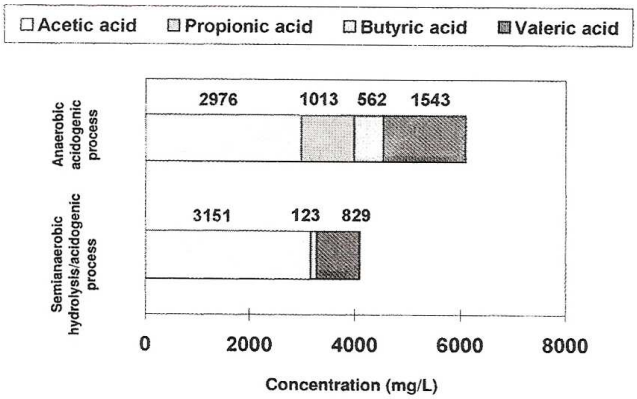


Fig. 2. VFA production from a semianaerobic hydrolysis/acidogenic process and an anaerobic acidogenic process.

serial culture, they were mixed and inoculated into the digester. During the digestion, small amounts of glucose, cellobiose, rhamnose, and several unidentified sugars were detected (data not shown). At the same time, large amounts of lactic, acetic, and propionic acids were continuously monitored in the fermentation process (Fig. 2). Although the initial pH was adjusted to 6.0, it decreased to 4.0 as the acid was produced (Fig. 3). Consequently, it seemed that the easily degradable polymers were hydrolyzed rapidly to oligomers or monomers by the aerobic bacteria, and that they were simultaneously further converted to the acids by anaerobic bacteria. Acids were fermented by the anaerobic microorganisms contaminated from food wastes. It was postulated that 2 d of HRT was enough to digest the waste in the primary digester. The tCOD and sCOD of the hydrolysate were 45,000 and 32,000 mg/L, respectively (Fig. 4). However, the BOD (51,000 mg/L) was higher than the tCOD, because the mixture contained a lot of particles, and therefore it was difficult to measure precise values of tCOD and BOD. In addition, removal of nondegradable materials was a very important step for pretreatment of food wastes. As the wastes were digested, heavy materials sedimented to the bottom and were easily removed from the reactor through a hole in the bottom of the digester.

The hydrolysate from the primary digester was added to the secondary acid digester using a gear pump. *C. butyricum*, cultured in the *C. acetobutyricum* medium, was inoculated and acclimated to the food extracts by serial cultures as described previously. The cell mixture was applied to the secondary digester, and acid fermentation was carried out for 2 d. The products still showed high values of tCOD and sCOD; however, BOD decreased to 60%, indicating that a significant amount of the biodegradable

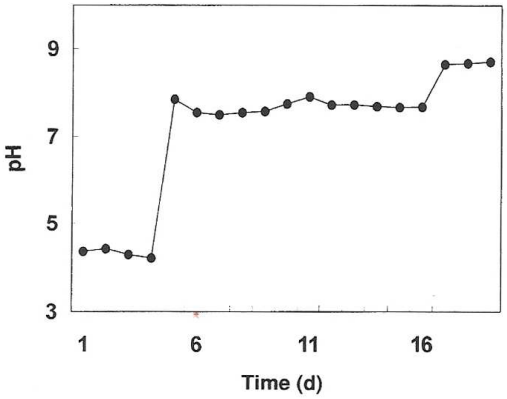


Fig. 3. pH changes through the full processes of a modified three-stage system.

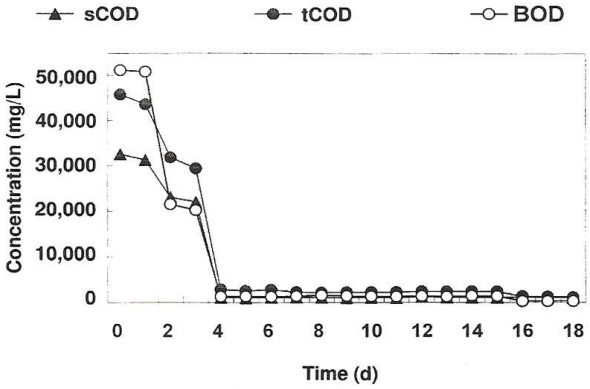


Fig. 4. Reduction of tCOD, sCOD, and BOD during the full digestion processes.

materials from food wastes is digested sufficiently and converted to VFAs and carbon dioxide. As shown in Table 3, the gas produced from the acidogenic digester was mainly carbon dioxide. During the fermentation, the pH range was maintained at 5.0–5.5 to prevent the retardation of acid production. Generally, syntrophic and acetoclastic methanogenic activities are severely inhibited under sour digestion conditions *(7,8)*. Therefore, it was necessary to mix the acid effluent and the alkalic effluent (pH 7.6–8.0) from the methane digester to neutralize it; then more acid could be produced continuously.

Table 3
Operational Conditions and Performance of Three-Stage System

Parameter	First process	Second process	Third process	Biological filter
HRT (d)	2	2	12	9
Loading (kg VS/[m^3·d])	20–22.8	25–27.4	12–18.8	1–1.2
pH	5.0–5.5	5.0–5.5	7.6–7.9	8.3–8.7
Temperature (°C)	30	35	41	30
T-N (mg/L)	4287	3216	2624	166
NH_3-N (mg/L)	117	172	1205	66
COD (mg/L)				
tCOD	44,948	30,582	2382	1145
sCOD	32,223	20,632	1071	1104
BOD (mg/L)	51,081	20,876	1356	287
Gas yield (m^3/kg VS)	—	—	0.65–0.70	—
Gas composition (%)				
CH_4	—	8.9	72	—
CO_2	—	91.1	28	—
Methane yield (m^3/kg VS)	—	—	0.45–0.50	—
Volatile acids (mg/L)				
Acetic	3151	2976	313	—
Propionic	0	1013	0	—
Butyric	123	562	0	—
Valeric	829	1543	0	—
Caproic	0	0	0	—
Total	4103	6094	313	—

As soon as the acid effluent was injected into the methane digester, the pH was adjusted to the optimal condition with 5 *N* NaOH to relieve acid impact on the methanogenic bacteria. This was done because the methane fermentation virtually stopped under extreme sour-digestion conditions. The acid effluents were retained for 12 d in the methane digester. Under this condition, tCOD, sCOD, and BOD values of the effluent were reduced dramatically. The reduction rates of tCOD, sCOD, and BOD in the complete process were 95, 96, and 97%, respectively. This indicates that the modified three-stage digestion system is an effective and time-saving process for the disposal of high TS content food wastes compared with the data of Park et al. *(15)*. At the same time, T-N was reduced from 4287 to 2624 mg/L through the processes. However, NH_3-N increased slowly in the anaerobic acidogenic process and accumulated to 1200 mg/L in the methanogenic process (Fig. 5). Because these nitrogen concentrations were too high for environmentally sound disposal, additional treatment was required. To solve this problem, oxic and anoxic biological filter systems were used. The biological filters contained immobilized nitrifying and denitrifying bacteria, together with heterotrophic bacteria to degrade residual organic wastes in the wastewater. As a result, T-N and NH_3-N concentrations decreased to 166 and 66 mg/L, respectively, and BOD reduced to 287 mg/L. T-N and BOD

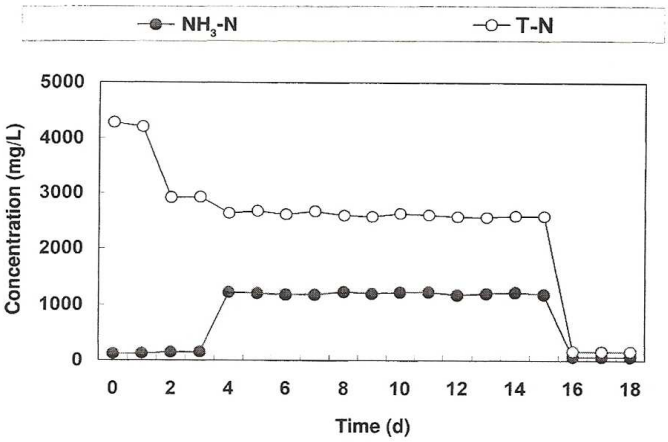


Fig. 5. Removal of T-N and NH_3-N from food wastewater during the full digestion processes.

decreased to 96 and 99.9%, respectively. Less than 10 mg/L of T-P was detected in the final effluent. Consequently, the final effluent was treated appropriately for disposal.

Production of VFAs and Methane

Although 4100 mg/L of tVFA was produced in the primary digestion process, acetic acid was the favored product (77%) (Fig. 2). Interestingly, the concentration of lactic acid was ninefold higher than that of acetic acid in this step. However, the lactic acid was further converted to acetic acid (data not shown). In the secondary acidogenic process, the concentration of tVFA increased from 6100 to 9100 mg/L, and several types of VFA were produced (Fig. 2). Because 6100 mg/L of tVFA was produced, the major VFAs were acetic (3000 mg/L), valeric (1540 mg/L), and propionic acids (1000 mg/L). Although small amounts of VFA (310 mg/L) remained in the effluent from the methane digester, most of the organic carbon was converted to methane and carbon dioxide (Table 3). The most important parameters for the normal operation of the digestion systems were pH, the organic loading rate, and the volume rate between the acid and the methane fermenter.

The total gas yield was 0.65–0.70 m^3/kg of VS. The main gas components were methane, carbon dioxide, ammonia, and hydrogen sulfide. Seventy-two percent of the total gas volume produced was methane, and the methane yield was 0.45–0.50 m^3/kg of VS (Table 3). The methane conversion rate and the yield showed similar values compared with those of

Table 4
Comparison of Performance of Three-Stage System with Conventional Anaerobic Digestion System at Mesophilic Temperature

	Three-stage system (food wastes)[a]			Two-phase (food wastes)[b]		Pilot two-phase (activated sludge)[c]	
Parameter	Hydrolysis	Acid	Methane	Acid	Methane	Acid	Methane
HRT (d)	2	2	12	5	15	3.1	9.1
Loading (kg VS/[m^3·d])	20–22.8	25–27.4	12–18.8	25–35	10–15	18.9	6.2
pH	5.0–5.5	5.0–5.5	7.6–7.9	5.5–6.5	7.4–7.8	5.6	7.7
TS in feed (%)	17.53	7.4	6.5	25.8	5–6	7.5	4.3
tVFA	4100	6100–9100	313	9000–13,000	4000–7000	9445	172
Methane yield (m^3/kg VS added)	—	—	0.45–0.50	—	0.44	—	0.29
VS reduction (%)[d]	8.2	9.5	38	—	—	25.0	41.8

[a]Data from this work.
[b]Data from Park et al. *(15)*.
[c]Data from Ghosh *(17)*.
[d]These VS reductions were calculated by the Water Pollution Control Federation (WPCF) formula in order for them to be compared with reductions reported by others.

other works *(8,15–17)*. A high NH_3-N concentration of 1200 mg/L generated from the methane fermentor did not inhibit methane production. Table 3 summarizes the data obtained from the full processes.

Conclusion

The modified three-stage system developed by this study was an effective methane-producing system, compared with those by other works (Table 4). When food wastes were used as substrate, 16 d of HRT was enough to produce methane at a yield of 0.50 m^3/kg of VS. During these periods, more than 95% of tCOD, sCOD, and BOD was removed, and 96% of T-N was also eliminated successfully.

Acknowledgment

This work was supported by the Ministry of Agriculture and Forestry-Special Grants Research Program in Korea (project no. 297009, 1997), and the Research Grant of Chosun University (1997).

References

1. Ghosh, S. and Pohland, F. G. (1974), *J. Water Pollut. Control Fed.* **46,** 748–759.
2. Ghosh, S., Conrad, J. R., and Klass, D. L. (1975), *J. Water Pollut. Control Fed.* **47,** 30–45.
3. Ghosh, S. and Klass, D. L. (1978), *J. Process Biochem.* **13,** 15–24.
4. Zhang, T. C. and Noike, T. (1991), *Water Sci. Technol.* **23,** 1157–1166.
5. Hanaki, K., Matsuo, T., Nagase, M., and Tabata, Y. (1987), *Water Sci. Technol.* **19,** 311–322.
6. Ghosh, S. (1982), US patent 4, 323, 367. April 6.
7. Ghosh, S. (1984), Proc. 1st Symp. on Biotechnological Advances in Processing Municipal Wastes for Fuels and Chemicals, Minneapolis, pp. 303–320.
8. Ghosh, S. (1985), *J. Energy Resour. Technol. Trans. ASME* 107, 402–404.
9. Rivard, C. J., Himmel, M. E., Vinzant, T. B., Adney, W. S., Wyman, W. S., and Grohmann, C. E. (1990), *Biotech. Lett.* **12,** 235–240.
10. Begouen, O., Thiebaut, E., Pavia, A., and Peillex, J. P. (1988), Proc. 5th Int. Symp. on Anaerobic Digestion, Bologna, Italy, pp. 789–792.
11. De Baere, L. and Verstraete, W. (1984), *Biocycle* **March,** 30–31.
12. Warth, W. and Schnell, R. (1989), *Recycling Int.* **1,** 256–271.
13. Atlas, R. M. (1993), *Handbook of Microbiological Media*, 1st ed., CRC Press, London.
14. American Public Health Association (APHA) (1985), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed., APHA, Washington, DC.
15. Park, S. C., Cho, J. K., Lee, J. P., Hong, J. J., Lee, J. S., and Kim, M. S. (1994), Report No. KIER-941123, Korea Institute of Energy Research, Taejon.
16. Ghosh, S. (1987), *J. Environ. Eng.* **113,** 1265–1284.
17. Ghosh, S. (1991), *Water Sci. Technol.* **23,** 1179–1188.

한국생물공학회지 제20권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 6, 401-407(2005)

Clostridium beijerinckii KCTC 1785를 이용한 수소생산 최적화 조건 탐색

[1]김 중 곤 · [1]Le Nhat · [2]김 성 준 · † [3]김 시 욱
[1]조선대학교 생물신소재학과, [2]전남대학교 환경공학과, [3]조선대학교 환경공학부
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Optimization of Hydrogen Production using *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785

Jung Kon Kim[1], Le Nhat[1], Seong-Jun Kim[2], and Si Wouk Kim[3]†
[1]Department of Bio Materials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[2]Department of Civil, Geosystem and Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[3]Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

Optimum culture conditions and medium composition for hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785 were investigated. Initial pH and temperature for growth were 7.0 and 35°C, respectively. Agitation accelerated the hydrogen production. Although *C. beijerinckii* KCTC 1785 could grow up to 6% (w/v) glucose in the medium, the optimum glucose concentration for hydrogen production was 4% and hydrogen content in the biogas was 37% (v/v). However, the economical glucose concentration for hydrogen production was 1% regarding to the residual glucose which was not used in the medium. During hydrogen fermentation, acetic and butyric acid were produced simultaneously. High concentrations of acetic (>5,000 mg/L) or butyric (>3,000 mg/L) acid inhibited hydrogen production. When pH was maintained at 5.5 in the batch fermentation, 1,728 mL of hydrogen was produced from 0.5% glucose within 15 hr. H_2 yield was estimated to be 1.23 mol H_2/mol glucose. It was found that yeast extract or tryptose in the medium was essential for hydrogen production.

Key Words : Biohydrogen, dark fermentation, organic acid, *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785

서 론

인류의 산업발달과 성장을 위한 에너지소비는 심각한 에너지 문제에 직면할 위기에 처해 있고, 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로 재생가능하고 환경친화적인 대체 에너지 개발에 많은 관심을 기울이고 있다. 특히 수소에너지에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며(1-3), 현재 알려진 수소의 생산방법으로는 화석연료, 물, 바이오매스로부터 열화학적, 전기화학적, 광화학적 혹은 생물학적 방법이 있다. 화석연료를 이용한 열화학적 방법에 의한 수소생산은 공정의 안전성과 경제성에 대한 문제 및 화석연료의 부존성과 편재성에 의한 국가간 긴장과 지구환경 오염 등의 문제점을 가지고 있다. 그러나 생물학적 수소생산의 경우 열화학적 방법에 비해 수소 생산수율은 떨어지지만, 보다 더 안전하며 바이오매스를 포함한 유기물과 물로부터 미생물에 의해 직접적으로 수소를 생산할 수 있기 때문에 에너지 생산과 더불어 대량으로 발생하는 재생가능 폐기물도 처리할 수 있는 특징을 가지고 있다. 따라서 수소생산을 위한 궁극적인 향후 수소 생산기술은 태양광, 수력, 풍력, 미생물과 같은 청정 기술을 이용하여, 지구상에 풍부하게 존재하는 물로부터 수소를 생산하고 이용 후에 다시 물로 재순환하는 방법이거나, 계속해서 증가하는 재생가능 폐기물을 원료로 수소를 생산하여야 할 것으로 전망하고 있다.

미생물을 이용한 생물학적 수소 생산 방법은 크게 빛을 이용하는 광발효와 빛을 이용하지 않는 암발효로 구분되며, 전자의 경우 조류(4, 5) 및 Cyanobacteria(6-8)를 이용한

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-6649, Fax : +82-62-225-6040
E-mail : swkim@chosun.ac.kr

물의 광분해와 광합성 세균(9-11)을 이용한 유기물의 광분해 방법이 해당되고 후자의 경우 혐기성 발효미생물을 이용(12-16)하여 유기물로부터 수소를 생산하는 방법이다. 광발효의 경우 빛이 필요하므로 배양장치가 대형화 되는 문제가 있지만 암발효의 경우 광발효보다 시설이 소규모이고 기술적 제한이 적어 수소생산이 용이하며 다양한 유기성물질을 기질로 사용할 수 있고, 기존의 혐기성 공정을 재이용하여 생산할 수 있다는 장점이 있다.

암발효를 통한 혐기성 소화 공정에서 유기물질은 고분자물질에서 저분자물질로 분해되는 가수분해단계와 가수분해된 물질로부터 유기산, 이산화탄소, 수소를 생성하는 산생성단계, 그리고 산생성단계의 산물로부터 메탄생성단계를 거치면서 최종적으로 메탄과 이산화탄소로 전환된다. 따라서 혐기성소화공정 가운데 수소를 소모하는 메탄생성균의 활성을 억제할 경우 발효조 내의 수소생산량이 증가할 수 있다. 1980년대 이후로 혐기성 미생물을 이용한 수소생산에 대한 연구가 이루어지고 있으며 특히 *Clostridium* sp.는 glucose나 sucrose와 같은 탄수화물로부터 유기산과 수소를 생산하는데 많이 이용되어져 왔다(17). *Clostridium* sp.에 의해 glucose로부터 수소가 생산되는 과정은 아래의 반응들에 의해 일어난다(18, 19).

$$C_6H_{12}O_6 + 4H_2O \rightarrow 2CH_3COO^- + 2HCO_3^- + 4H^+ + 4H_2$$

또는 $C_6H_{12}O_6 + 2H_2O$

$$\rightarrow CH_3CH_2CH_2COO^- + 2HCO_3^- + 3H^+ + 2H_2$$

Acetic acid가 생산되는 경우 1 mole의 glucose로부터 최대 4 mole의 수소가 생산될 수 있으며, butyric acid가 생산되는 경우에는 최대 2 mole의 수소가 생산될 수 있다. 그러므로 암발효 과정 중 발생되는 유기산의 생산조건을 조절함으로써 수소생산량을 증가시킬 수 있다. 본 연구에서는 *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785를 이용하여 회분식으로 수소를 생산하기 위한 발효 최적화 조건을 탐색하고 동시에 배지조성을 최적화하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 한국생명공학연구원의 유전자은행 (Korean Collection for Type Culture)에서 분양받은 *Clostridium beijerinckii* KCTC 1785를 사용하였다. 세균의 배양 및 수소생산실험을 위한 배지로 Table 1에 나타낸 Reinforced clostridial medium (RCM)을 이용하였으며, 배지성분을 최적화하기위한 최소배지는 Table 2에 나타낸 Standard mineral base medium (SMM)을 사용하였다.

배양조건

균주의 전배양은 100 mL media bottle에 50 mL의 배지를 넣고 멸균한 후 vacuum anaerobic chamber 내에서 균주를 접종한 다음 35℃, 150rpm으로 진탕배양 하였으며, 실험에 사용하기 전에 12시간마다 계대배양 하였고 전배양을 최소 3차례이상 수행하였다. 수소생산을 위한 본 배양은 가스측정 및 시료채취를 위해 상부에 가지가 달린 500 mL media bottle을 만들어 200 mL의 배지를 넣고 전배양에서 성장시킨 균주를 1% (v/v) 접종하여 전배양과 같은 조건으로 회분식 배양하였다. 또한 수소생산 실험 중 배지의 pH를 일정하게 유지시키는 실험에서는 5 L 발효조 (KoBioTech, KF-5L)에 2 L의 배지를 넣고 위와 동일한 방법으로 배양하였다.

Table 1. Composition of Reinforced Clostridial Medium

Components	Amounts
Tryptose	10.0 g
Beef extract	10.0 g
Yeast extract	3.0 g
Dextrose	5.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Soluble starch	1.0 g
Cysteine hydrochloride	0.5 g
Sodium acetate	3.0 g
D.W	1.0 L

Table 2. Composition of standard mineral base medium

Components	Amounts
Na_2HPO_4	2.34 g
KH_2PO_4	6.1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g
$CaCl_2$	0.01 g
Ferric EDTA solution[a]	0.1 mL
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.5 mg
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.1 mg
Cobalt nitrate	0.1 mg
Sodium Borate	0.1 mg
Sodium molybdate	2.0 mg
D.W	1.0 L

[a] The ferric EDTA solution was made by combining a solution containing 17.9 g of sodium EDTA and 3.23 g of KOH dissolved in 186 mL distilled water and a solution containing 13.7 g of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ in 364 mL of distilled water. The mixture was bubbled overnight with air, and stored in a brown glass bottle.

수소생산 최적화 조건탐색

수소생산을 최적화하기 위해 배양배지의 초기 pH, 교반유무, 온도, 유기산이나 glucose 농도 및 회분식 실험기간 중 발효조 내의 pH 유지에 따른 수소생산의 영향을 검토하였다.

배지성분 최적화

수소생산을 위한 배지성분을 최적화하기위해 최소배지인 SMM에 RCM의 각각의 구성성분을 조합한 배지를 제조하여 균주를 배양하였다. 계대배양을 수차례 반복하여 균주의 성장 정도를 확인함으로써 배지의 각 성분을 최적화 하였다.

분석방법

발효과정 중 발생하는 바이오가스의 양은 가스미터를 이용하여 측정하였으며, pH는 pH meter (Orion, 720A)를 사용하였고, 발효액 내의 당농도는 DNS 법(20)에 의해 측정하였다.

수소의 함량분석은 반응기내 head space 가스를 gas tight syringe로 0.5 mL 취하여 gas chromatography (Shimazu, GC-17A)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 Molecular sieve 5A (Alltech)를 사용하였고, thermal conductivity detecter (TCD)로 분석하였다. 분석조건은 column, injector, detecter 온도 모두 60℃이었으며, carrier gas는 Ar을 사용하였고, flow rate는 45 mL/min으로 유지하였다.

발효액 내의 유기산의 함량분석은 발효액을 일정시간 간격으로 채취하여 균체와 상등액을 원심분리기로 분리한 후 상등액 100 μL를 취하여 gas chromatography (Younglin, M600D)로 분석하였다. 사용된 컬럼충진물은 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax (Supelco)를 사용하였고, flame ionization detecter (FID)로 분석하였다. 분석조건 중 column 온도는 최초 135℃에서 2분간 유지한 후 165℃까지 분당 15℃씩 승온하여 1.7분간 유지한 다음 다시 180℃까지 분당 15℃씩 승온한 뒤 20분간 유지하였고, 이후 또 다시 200℃까지 분당 15℃씩 승온하여 15분간 유지하였다. 또한 injector와 detecter의 온도는 모두 200℃이었으며, carrier gas는 N_2를 사용하였고, flow rate는 24 mL/min으로 사용하였다.

결과 및 고찰

수소생산에 대한 초기 pH의 영향

초기 pH에 따른 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 생장정도 및 수소생산에 대한 영향을 알아보기 위해 배양배지의 초기 pH를 6-8로 조절하였다. 그 결과 Fig. 1A에 의하면 초기 pH를 6으로 조절한 경우 18시간 후 가장 높은 흡광도를 나타냈으며 다음으로 7과 8로 초기 pH를 조절한 순으로 나타났다. 그러나 생장속도에 있어서는 초기 pH를 7로 조절하였을 때 가장 빨랐다. 게다가 초기 pH가 증가할수록 균주가 성장하는데 있어서 보다 긴 lag phase를 요구하였다. 이는 접종균으로 사용된 전 배양액의 pH가 초기 배지의 pH보다 낮아 균체가 이에 적응하는데 요구되는 시간으로 생각된다. 또한 Fig. 1B에 나타난 바와 같이 24시간 후 생산된 수소의 양은 초기 pH가 6인 경우와 7인 경우 모두 각각 89 mL와 88 mL로 비슷하였지만 발효 초기 수소생산 속도를 고려한다면 초기 pH를 7로 조절한 경우가 가장 수소생산에 효율적인 것으로 사료된다. 또한 초기 pH를 7로 조절하였을 경우 생산된 바이오가스 가운데 수소의 최고 함량은 26.8%이었다. Lee 등(21)의 결과에 의하면 초기 pH가 갑자기 떨어지면서 수소가 생산된다고 보고하였다. 또한 Khanal 등(22)은 초기 pH는 수소생산에 있어서 중요한 인자로 작용하며, 갑작스런 pH의 감소에 의한 환경조건의 변화가 세균의 물질대사의 변화를 가져오고 그로인해 수소생산의 저해를 초래한다고 보고하였다. 따라서 초기 pH가 높을수록 빠른 pH 변화에 대한 충격의 영향을 덜 받기 때문에 수소생산에 있어서 효율적이라고 생각된다. 하지만 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 경우 초기 pH 8 이상에서는 균체의 생장 및 수소생산이 현저히 저하하므로 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 최적 초기 pH는 7로 판단된다. 그리고 초기 pH는 발효되는 가운데 유기산의 생성에도 영향을 주었으며 pH가 증가할수록 acetic acid의 생산량이 많았고, butyric acid의 양은 상대적으로 감소하였다 (Fig. 1C).

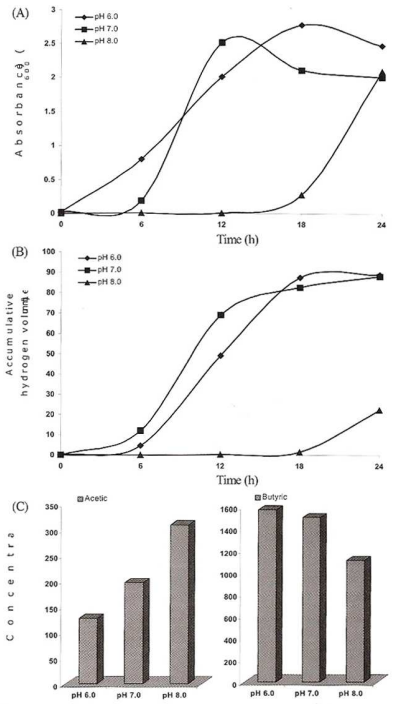


Figure 1. Effect of initial pH on (A) cell growth (B) hydrogen production and (C) organic acids production.

교반유무에 따른 수소생산의 영향

Fig. 2에서는 교반의 유무가 발효에 미치는 영향을 나타내었다. 균주 배양시 교반을 해주었을 경우 균체의 성장속도가 빨라졌음을 알 수 있으며, 수소생산에 있어서는 15시간 동안 발효하는 과정 중 교반한 경우 158 mL의 수소를 발생한 반면, 교반하지 않은 경우 83 mL의 수소를 발생하여 약 2배의 수소 발생량 차이를 보여주었다. 그러므로 수소생산에 있어서 교반은 반드시 필요한 조건으로 판단된다.

수소생산에 대한 발효온도의 영향

Fig. 3에서는 발효온도에 따른 균체의 생장정도 및 수소생산에 대한 결과를 나타내었다. 발효온도를 각각 25~45℃까지 5℃ 간격으로 조절하여 실험을 수행하였으며, 40℃의

발효온도까지는 수소를 발생하였지만 그 이상의 온도에서는 고온으로 인한 열충격으로 균체가 성장하지 못하여 수소를 생산할 수 없었다. 발효온도를 35℃로 조절하였을 때 균체의 성장이 가장 빨랐으며, 또한 생산된 수소의 양은 145 mL로 가장 많은 양의 수소를 생산하였다. 수소생산과 밀접한 관련이 있는 유기산의 생산에 있어서도 30℃의 발효온도의 경우 acetic acid의 생산량이 35℃의 경우보다 높았지만 butyric acid의 생산량에 있어서 30℃와 35℃사이에 현저한 차이를 보임을 알 수 있었다. 따라서 35℃의 발효온도에서 수소생산량이 최대로 나타난 것으로 보아 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 최적배양온도는 35℃로 사료된다. 이것은 Taguchi 등(15, 23)이 *C. beijerinckii* AM21을 이용한 결과와 일치하였다.

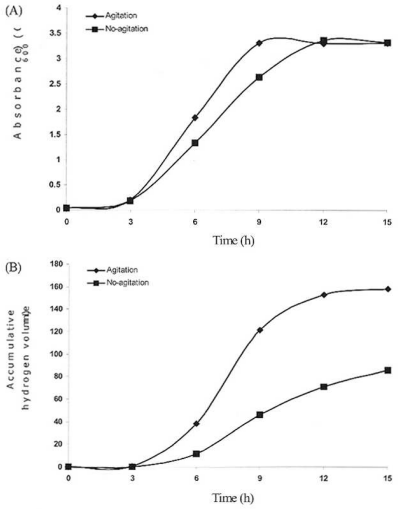


Figure 2. Effect of agitation on (A) cell growth and (B) hydrogen production.

수소생산에 대한 glucose 농도의 영향

Glucose 농도에 대한 영향을 조사하기 위하여 배지내의 glucose 농도를 1-7%로 조절하여 실험한 결과 *C. beijerinckii* KCTC 1785는 배지내의 glucose 농도가 6%까지 생장이 가능하였으며, 7% 이상에서 현저히 생장에 저해를 받았다(Fig. 4A). 또한 발효기간 중 4%의 초기 당농도에서 가장 많은 수소를 생산하였지만(Fig. 4B), 2% 이상의 glucose 농도에서는 발효가 끝난 후에도 많은 양의 glucose가 발효액 내에 남아있는 것을 알 수 있었다(Fig. 4C). 따라서 남아있는 glucose 농도를 고려해 볼 때 1%의 초기 glucose 농도가 최적인 것으로 사료된다. 그러나 이 현상은 발효가 시작되면서 발생된 유기산의 축적과 이것으로 인한 pH 감소에 의해 더 이상 수소가 생산되지 않은 것으로 생각되며, 따라서 발효액 내에서 pH가 급속히 떨어지는 것을 제어하여 계속적으로 일정하게 pH를 유지하도록 조절한다면 보다 많은 양의 수소를 생산할 수 있을 것으로 사료되었다.

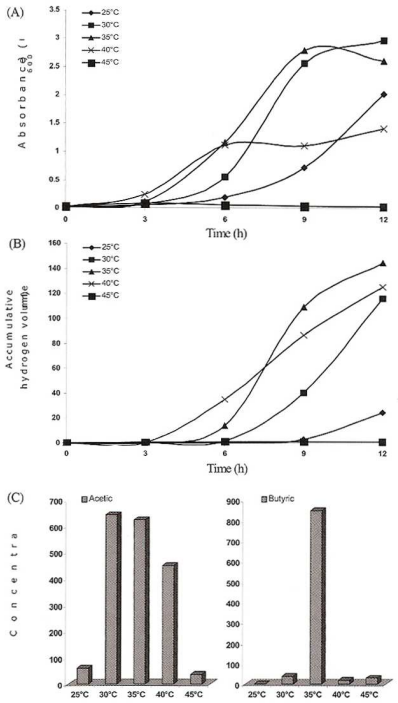


Figure 3. Effect of temperature on (A) cell growth (B) hydrogen production and (C) organic acids production.

수소생산에 대한 유기산 농도의 영향

C. beijerinckii KCTC 1785를 이용하여 유기물을 발효할 경우 발효하는 동안 수소와 동시에 acetic acid, butyric acid와 같은 유기산도 생성된다. 생성된 유기산으로 인해 pH의 저하가 나타나고 최종적으로 pH가 5.0 미만으로 떨어지면 더 이상 수소가 생산되지 않는 것으로 판단된다. 이것은 앞선 실험의 결과들에서 발효가 끝난 후 발효액의 최종 pH를 측정한 결과 4.6 이하인 점을 고려할 때 이와 같이 생각할 수 있다. 또한 발생되는 유기산 자체가 독성이 있으므로 미생물에 해를 미칠 수 있다. Van Niel 등(24)은 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*에 의한 수소생산시 최종산물에 의한 저해로써 acetic acid의 저해영향을 보고한 바

있으며, 따라서 발생되는 유기산의 농도 또한 수소생산의 중요한 인자이다. Fig. 5A와 B는 배지 내에 acetic acid와 butyric acid를 각각 농도별로 첨가하였을 경우 수소생산에 미치는 결과를 나타낸 것이다. 배지 내의 acetic acid의 농도가 4,000 mg/L의 농도까지는 수소생산에 아무런 영향을 받지 않았으며 오히려 4,000 mg/L의 경우 수소생산량이 약간 증가하는 것이 관찰되었다. 하지만 5,000 mg/L의 acetic acid의 농도에서는 수소생산이 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다. 반면 butyric acid의 경우 acetic acid에 비해 낮은 농도인 2,000 mg/L의 농도까지는 수소생산에 그다지 영향을 미치지 않았지만 3,000 mg/L 이상의 농도에서는 수소생산에 저해를 받는 것을 알 수 있었다. 따라서 지속적인 수소생산을 위해서는 반응기 내에 축적되는 유기산을 제거해줌으로써 수소생산을 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다.

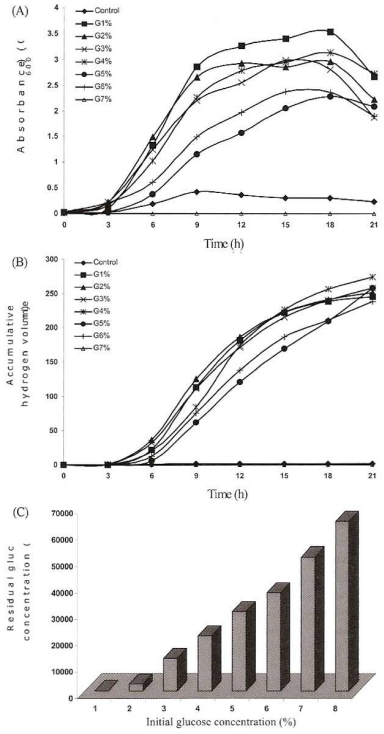


Figure 4. Effect of glucose concentration on (A) cell growth (B) hydrogen production, and residual glucose concentration after fermentation (C).

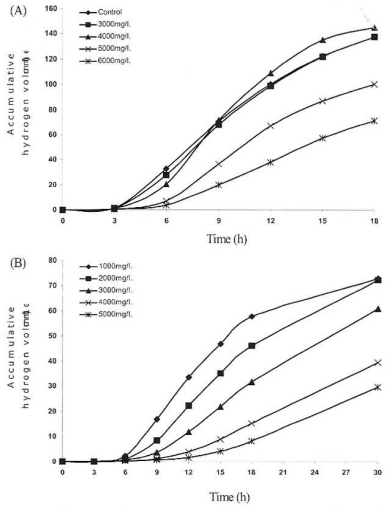


Figure 5. Effect of high concentration of (A) acetic and (B) butyric acid on hydrogen production.

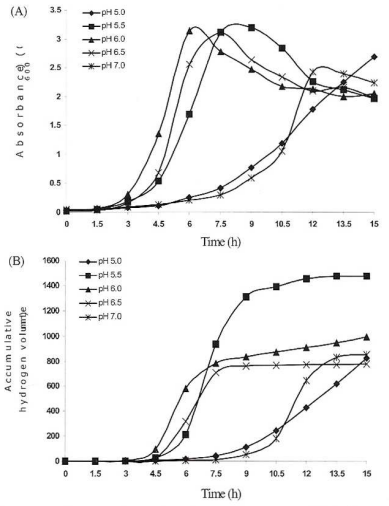


Figure 6. Effect of pH control on (A) cell growth and (B) hydrogen production during fermentation.

발효액 최적 pH 탐색

발효액의 최적 pH를 조사하기 위해 발효가 진행되는 동안 HCl과 KOH 용액을 이용하여 발효조 내의 pH를 일정하게 유지하였다. pH조절은 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 그리고 7.0으로 유지하였으며 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 균체의 생장은 발효액의 pH가 6.0일 때 가장 빨리 성장하였으며, 다음으로 pH가 6.5, 5.5, 7.0 및 5.0의 순으로 조사되었다(Fig. 6A). 하지만 수소생산에 있어서는 발효액의 pH가 5.5로 유지되었을 때 15시간동안 0.5%의 glucose로부터 1,728 mL의 수소를 생산하여 다른 조건에 비해 월등히 많은 양의 수소를 생산하였고, 이 때 생성된 바이오가스 중 수소의 함량 및 생산 수율은 각각 32%와 1.23 mol H_2/mol glucose 이었다(Fig. 6B). 일반적으로 수소와 유기산을 생성하는데 필요한 적정 pH는 4.8- 6.8이라고 Van Andel 등(25)은 보고하고 있으며, 본 실험의 결과 또한 유사하게 나타나 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 생장은 pH를 6.0으로 유지하였을 경우 최대이고, 수소생산 최적 pH는 5.5로 유지하였을 때 최적임을 알 수 있었다. 따라서 *C. beijerinckii* KCTC 1785를 이용해 회분식 발효로 수소생산을 할 경우 초기 pH를 7로 한 후 서서히 발효조의 pH를 5.5로 유지하고, 교반을 시키며, 35℃에서 1-2%의 glucose 농도를 가지고 발효할 경우 수소생산을 최적화할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 3. Determination of cell growth on different medium composition

Medium composition	Growth
SMM[a] + Glucose	-
SMM[a] + Soluble starch	-
SMM[a] + Glucose + Yeast extract	++
SMM[a] + Glucose + Beef extract	-
SMM[a] + Glucose + Tryptose	++
SMM[a] + Glucose + Cysteine HCl	-
RCM[b]	++

[a] SMM: Standard Mineral Medium
[b] RCM: Reinforced Clostridial Medium

배지성분의 최적화

수소생산 배지성분의 최적화를 위해 최소배지 SMM에 *C. beijerinckii* KCTC1785의 배양배지인 RCM의 각 구성성분을 하나씩 첨가하여 균주를 배양하였다. 그 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 배지성분 내에 yeast extract나 tryptose가 결여된 배지 내에서는 균주가 성장할 수 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 *C. beijerinckii* KCTC 1785를 이용하여 수소를 생산할 경우 발효배지 내에 반드시 탄소원과 함께 yeast extract나 tryptose 성분이 포함되어야 할 것으로 판단된다. 또한 RCM에서 cystein hydrochloride를 결여시켰을 경우 균주의 성장이 대조군에 비해 떨어졌지만(data not shown), SMM과 탄소원인 glucose 및 cystein HCl만을 조합하여 제조한 배지에서 배양한 결과 균주가 성장하지 않았다. 따라서 cystein HCl의 경우 균주의 성장에 반드시 필요한 성분은 아니지만 *Cl. beijerinckii* KCTC 1785의 성장에 필요한 성장 촉진인자로 작용하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 *C. beijerinckii* KCTC 1785의 배양배지 (RCM)에서 수소생산을 위한 최적화 조건을 탐색하고 수소생산을 위한 배지성분을 최적화하였다. 수소생산을 위한 최적 초기 pH와 발효온도는 각각 7.0과 35℃이었고, 교반은 수소생산을 가속화 시켰다. *C. beijerinckii* KCTC 1785는 6% (w/v)의 glucose 농도까지 성장할 수 있지만 4%의 glucose 농도에서 가장 많은 수소를 생산하였으며, 이 때 바이오가스 중 수소 함량은 37% (v/v)이었다. 그러나 배지내 잔여 glucose 양을 고려할 때 수소생산을 위한 최적 glucose 농도는 1%이었다. 발효가 진행되는 동안 수소가 생산됨과 동시에 acetic acid와 butyric acid가 동시에 생성되었으며, acetic acid와 butyric acid가 각각 5,000 mg/L과 3,000 mg/L 이상의 농도에서 수소생산을 저해하였다. 또한 발효조의 pH를 5.5로 계속 유지하였을 경우 15시간 동안 0.5% glucose로부터 1,728 mL의 수소를 생산하였으며 이 때 수소의 생산수율은 1.23 mol H_2/mol glucose이었다. *C. beijerinckii* KCTC 1785의 성장에 있어서 yeast extract 또는 tryptose는 반드시 필요한 배지의 성분이었다.

감 사

본 연구는 2005년도 조선대학교 교내학술 연구비로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Oh, Y. K., M. S. Park, E. H. Seol, and S. Park (2003), Isolation of hydrogen-producing bacteria from granular sludge of upflow anaerobic sludge blanket reactor, *Biotech. Bioprocess Eng.* **8**, 54-57.
2. Oh, Y. K., Y. J. Kim, J. Y. Park, T. H. Lee, M. S. Kim, and S. Park (2005), Biohydrgen production from carbon monoxide and water by *Rhodopseudomonas palustris* P4, *Biotech. Bioprocess Eng.* **10**, 270-274.
3. Lee, K. S., C. M. Kang, and S. Y. Chung (2004), Culture conditions for hydrogen production of *Enterobacter cloacae* YJ-1, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 446-450.
4. Schnackenberg, J., R. Schulz, and H. Senger (1993), Characterization and purification of a hydrogenase from eukaryotic green alga *Scendesmus obliguus*, *FFB Lett.* **327**, 21-24.
5. Greenbaum, E. (1990), Hydrogen production by photosynthetic water splitting. In *Hydrogen energy progress VIII,* T.N. Veziroglu, P. K. Takashashi Eds.; Proceedings 8th WHEC, Hawaii. New York: Pergamon Press, pp743-754.
6 Banerjee, M., A. Kumar, and H. D. Kumar (1989), Factors regulating nitrogenase activity and hydrogen evolution in *Azolla-Anabaena* symbiosis, *J. Hydrogen Energy.* **12**, 871-879.
7 Shi, D. J., M. Brouers, D. O. Hall, and R. J. Rubin (1987), The effects of immobilization on the biochemical, physiological and morphological features of *Anabaena azollae*, *Planta* **172**, 298-308.
8. Tsygankov, A.S., L. T. Serebryakova, D. A. Sueshnikov, K. K. Rao, I. N. Gogotov, and D. O. Hall (1997), Hydrogen photo-production by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and dependence on pH, *J. Hydrogen Energy* **22**, 859-867.

9. Fascetti, E., E. D' addario, O. Todini, and A. Robertiello (1998), Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes, *J. Hydrogen Energy* **23**, 753-760.
10. Krahn, E., K. Schnerder, and K. Muller (1996), Comparative characterization of H_2 production by the conventional Mo nitrogenase and alternative "iron-only" nitrogenase of *Rhodobater capsulata* hap mutants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 285-290.
11. Singh, S. P. and S. C. Srivastava (1991) Isolation of non-sulfur photo-synthetic bacteria strains efficient in hydrogen production at elevated temperatures, *J. Hydrogen Energy* **16**, 404-405.
12. Tanisho, S., N. Wakao, and Y. Kokako (1983), Biological hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*, *J. Chem. Eng. Jpn.* **16**, 529-530.
13. Kumar, N. and D. Das (1999), Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *Process Biochem.* **35**, 589-594.
14. Tanisho, S., Y. Suzuki, N. Wakoo (1987), Fermentative hydrogen evolution by *Enterobacter aerogenes* strain E.82005, *J. Hydrogen Energy* **12**, 623-627.
15. Taguchi, F., J. D. Hang, S. Taguchi, and M. Morimoto (1992), Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 244-245.
16. Collet, C., N. Adler, J. P. Schwitzguebe, and P. Peringer (2004), Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1479-1485.
17. Lay, J. J., K. S. Fan, J. Chang, and C. H. Ku (2003), Influence of chemical nature of organic wastes on their conversion to hydrogen by heat-shock digested sludge, *Int. J. Hydrogen Energy* **28**, 1361-1367.
18. De Vrije, T. and P. A. M. Claassen (2003), Bio-methane & Biohydrogen; Dark hydrogen fermentation, *Dutch Biological Hydrogen Foundation*, 104-105.
19. Han, S. K. and H. S. Shin. (2004), Biohydrogen production by anaerobic fermentation of food waste, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 569-577.
20. Miller, G. L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
21. Lee, Y. J., T. Miyahara and T. Noike (2002), Effect of pH on microbial hydrogen fermentation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 694-698.
22. Khanal, S. K., W. H. Chen, L. Li, and S. Sung (2004), Biological hydrogen production: effects of pH and intermediate products, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1123-1131.
23. Taguchi, F., N. Mizukami, K. Hasegawa, T. Saito-Taki, and M. Morimoto (1994), Effect of amylase accumulation on hydrogen production by *Clostridium beijerinckii*, strain AM21B, *J. Ferment. Bioeng.* **77**, 565-567.
24. J. van Niel, E. W., P. A. M. Claassen, A. J. M. Stams (2003), Substrate and product inhibition of hydrogen production by the extreme thermophile, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Biotechnol. Bioeng.* **81**, 255-262.
25. Van andel, J. G., G. R. Zoutberg, P. M. Crabbendam, and A. M. Breure (1985), Glucose fermentation by *Clostridium butyricum* grown under a self generated gas atmosphere in chemostat culture, *Appl. Micro. Biotechnol.* **23**, 21-26.

한국생물공학회지 제18권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 4, 318-323(2003)

폐지를 이용한 혐기성 산 발효 및 메탄발효 특성

[1]조 건 형 · [1]김 중 곤 · [2]김 성 준 · † [1,3]김 시 욱
[1]조선대학교 생물신소재학과, [2]전남대학교 환경공학과, [3]조선대학교 환경공학부
(접수 : 2003. 7. 14. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

Anaerobic Acid and Methane Fermentation using Paper Wastes

Gun Hyung Cho[1], Jung Kon Kim[1], Seong Jun Kim[2], and Si Wouk Kim† [1,3]
[1]Department of Biomaterials Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
[2]Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[3]Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
(Received : 2003. 7. 14. Accepted : 2003. 8. 27.)

This study was carried out to investigate the possibility of reusing newspaper or paperbox waste by methane fermentation. When 15 g of newspaper and box wastes were digested separately for 24 days by batch fermentation, the amount of total organic acids produced were 2461 and 4978 mg/L, respectively. The tCOD removal rates were found to be 60.9 and 62.4%, respectively. In addition, the removal efficiencies of total solid were 34.8 and 33.4%, and those of volatile solid were 40.0 and 39.2%, respectively. During this period, the amounts of biogas produced were 6.95 and 6.43 L. In a semicontinuous reaction, tCOD removal efficiencies for newspaper and box wastes were 64.7 and 65.0%, respectively, after 14 days of digestion. After 25 days, which were needed to stabilize the methane fermentation, the amounts of biogas produced daily were 0.31 and 0.30 L/g · dry wt, respectively. Methane contents were 57.3 and 56.2%, respectively, and the pHs in the anaerobic acidogenic and methanogenic fermenters were 5.0 and 7.5, respectively.

Key Words : Acid fermentation, methane fermentation, organic acids

서 론

급격한 에너지 수요의 증대와 에너지 자원의 고갈, 환경오염 등의 문제들이 대두되면서, 고농도 유기성 폐기물을 대체에너지원으로 이용하고자 하는 연구들이 활발히 진행되고 있다(1). 고농도 유기성 폐기물의 생물학적 처리공정 중 혐기성 처리방법은 처리시간이 오래 걸린다는 단점이 있지만 소각이나 매립 시 소요되는 비용과 토지 면적의 절감을 꾀할 수 있다. 또한 유기산과 대체에너지원으로 이용할 수 있는 메탄으로 전환할 수 있다는 점에서 다른 물리 · 화학적 처리에 비해 에너지 재활용이라는 측면에서 볼 때 상당히 효율적인 처리공정이라고 할 수 있다(2). 공업용 유기산은 화학 산업에서 각종 고분자 화합물의 주원료로 광범위하게 사용되고 있다(3-6).

유기산을 생산하는 방법 가운데 미생물을 이용하여 재이용이 가능한 생물량 (biomass)으로부터 고부가의 유용물질을 생산하는 방법들이 최근 들어 심층적으로 연구되고 있다. 여러 미생물 가운데 *Clostridium* 속은 주로 토양, 폐수, 동물 소화계 및 오염된 유제품으로부터 발견되며, 여러 가지 유용물질을 생산하는 상업적인 목적으로 주로 사용된다. 한편 glucose 뿐 만 아니라 lactose, sucrose, starch, cellulose 또는 dextrose 등을 대상으로 혐기발효에 이용 가능한 물질인가에 대한 연구도 시도되고 있다(7-9).

음식 폐기물이나 분해가 잘 되는 유기성 폐기물의 재활용에 관한 연구는 활발히 진행되는 것에 비하여, 폐신문지나 종이박스와 같은 폐지의 재 자원화에 관한 연구는 거의 전무하다. 본 연구에서는 cellulose 성분의 분해가 용이하지 않은 폐신문지, 종이박스와 같은 폐지를 이용하여 유용물질을 생산할 수 있는지 여부를 확인하기 위해 *Clostridium* sp.를 이용한 유기산의 생산과 메탄 생산세균을 이용한 메탄 생산효율에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험실에서는 현재 자체적으로 개발한 3단계 메탄 발효

† Corresponding Author : Department of Environmental Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel : +82-62-230-6649, Fax : +82-62-225-6040
E-mail : swkim@chosun.ac.kr

시스템 (three stage methane fermentation system)을 이용하여 교내 식당에서 발생하는 음식폐기물을 일일 100 kg을 처리하고 있다(10-12). 3단계 메탄 발효시스템은 1단계 반혐기성 가수분해/산발효조, 2단계 혐기성 산발효조, 그리고 3단계 혐기성 메탄발효조로 구성되어 있으며 반연속식 공정으로 운전되고 있다.

본 실험에서는 3단계 메탄 발효공정 가운데 산발효조내의 발효액과 메탄 발효조 내의 발효액을 각각 폐지의 산발효와 메탄발효의 접종액으로 사용하였다. 산발효액은 *Clostridium acetobutylicum* (KCTC 1788) 과 *C. butyricum* (KCTC 1785)을 포함하고 있으며, 메탄 발효에는 우분 또는 메탄이 발생하는 매립지 토양에서 채취한 시료속의 메탄 생성세균을 이용하였다.

유기산 발효

회분식 산 생성 실험을 수행하기 위하여 신문지 또는 종이박스 등의 폐지를 건조중량으로 각각 15 g씩 재어 증류수 1 L에 혼합하였다. 사용한 접종액으로는 *C. acetobutylicum* 과 *C. butyricum*을 포함하고 있는 음식폐기물 유기산 발효액을 사용하였다. 반응조는 5 L 삼각플라스크를 사용하였고 유효용적을 2 L로 하였다(Fig. 1A). 플라스크 상부는 실리콘 마개로 밀봉하였고 하단부에 가지를 만들어 시료를 채취하였다. 실험초기 폐지 슬러지와 산 발효액을 접종한 후 즉시 질소가스로 수차례 치환하여 반응조 내부를 혐기성 상태로 유지하였다. 발효온도는 35℃를 유지하였다.

메탄 발효

회분식 메탄 생성 실험은 폐신문지와 종이박스를 건조중량 15 g씩 재어 증류수 1 L에 혼합하여 사용하였다. 접종액으로는 산 발효액과 메탄생성 세균을 포함하고 있는 메탄 발효액을 혼합하여 동시에 사용하였다. 폐지, 산 발효액, 메탄 발효액을 각각 1 : 1 : 2 비율로 혼합하여 실험을 수행하였다. 반응조는 5 L 삼각플라스크를 사용하였고 유효용적은 3 L로 하였다(Fig. 1A). 발생한 가스량을 측정하기 위해 반응조 상부에 가스 포집팩을 사용하여 일일 가스 발생량을 측정하였다. 온도는 가장 많은 메탄가스를 생성할 것으로 예상되는 50℃를 유지하였다. 반 연속식 실험은 혐기성 산 발효조와 메탄 발효조로 구성된 2상 혐기성 메탄발효 시스템으로 수행하였다(Fig. 1B). 실험은 산 발효 후 생산된 발효액을 정량펌프를 이용하여 메탄 발효조로 주입하였고 체류시간은 산 발효조에서 2일, 메탄 발효조에서 12일로 운전하였다. 반응조의 온도는 항온기를 이용하여 조절하였으며, 산 발효조와 메탄

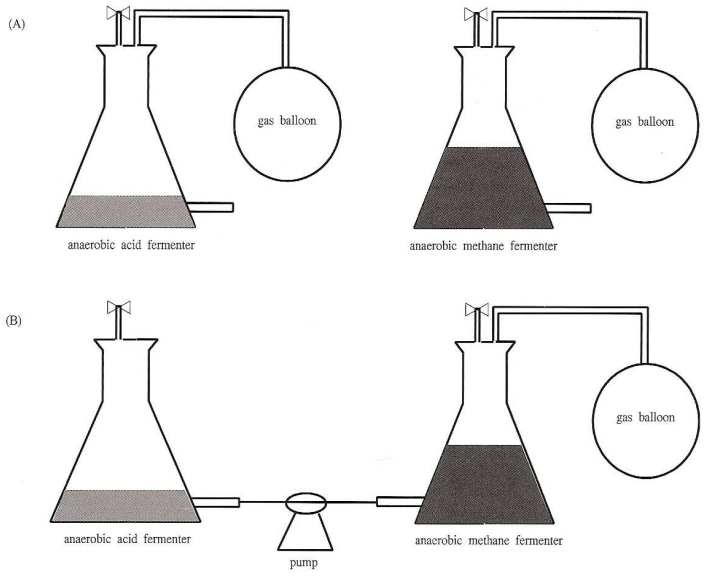


Figure 1. Schematic diagram of anaerobic fermentation system. (A) batch type acidogenic or methanogenic fermenter; (B) semicontinuous acidogenic and methanogenic (two phase) fermenter.

발효조의 운전온도는 각각 35℃와 50℃로 운전하였다.

성분 분석

pH는 pH meter를 이용하였고, TS (total solid) 및 VS (volatile solid)는 수질오염 공정시험법으로, tCOD는 CODcr 법으로 분석하였다. 가스 발생량은 습식가스 유량계 (Shinagawa, W-NK-5)를 이용하여 측정하였으며, 발생가스 성분은 Porapak Q column (Alltech, 80/100)을 이용한 TCD gas chromatography (Shimadzu, GC14/BPTF)로 분석하였다. 분석은 carrier gas로 He을 이용하여 50 ml/min의 속도로 흘려보냈고, column온도 100℃, injector 온도 50℃, detector 온도 150℃로 조절하였다. 유기산 분석은 Carbowax column (Supelco, 80/120)을 이용한 FID gas chromatography (Younglin, M600D)로 수행하였으며, 분석조건은 column 온도 200℃, injector 온도 250℃, detector 온도

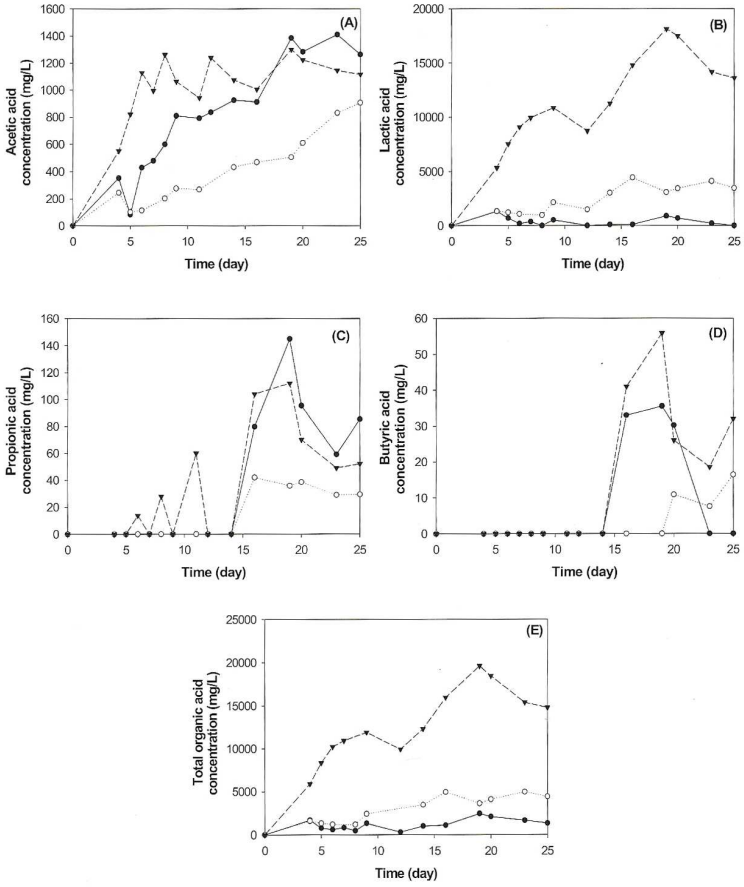


Figure 2. Production of various organic acids using several organic wastes in the anaerobic acidogenic fermenter. Symbol : food wastes (▾), newspaper wastes (●) and paperbox wastes (○).

250℃이었고 carrier gas는 N_2를 사용하였으며 유속은 24 ml/min로 하였다.

결과 및 고찰

회분식 산발효

Fig. 2는 폐지의 종류에 따라 생성된 각각의 유기산 농도를 나타낸 것이다. 현재 본 연구실에서 운전 중인 3단계 메탄 발효 시스템 중 음식 폐기물을 처리하는 산 발효조의 발효액을 접종액으로 사용하면서 이를 대조군으로 설정하여 폐지의 유기산 발효 양상을 비교하였다. Acetic acid의 경우 음식 폐기물, 폐신문지, 폐 종이박스의 순서로 산 농도가 증가하였다(Fig. 2A). 25일 발효 후 생성된 acetic acid의 농도는 음식 폐기물, 폐 신문지, 폐 종이박스가 각각 1301, 1411, 906 mg/L로 나타났다. Lactic acid의 경우는 acetic acid의 경우와는 달리 음식 폐기물의 경우 lactic acid 가 꾸준히 증가하였으나, 폐 신문지와 폐 종이박스의 경우 증가하는 lactic acid의 양이 미미하였다. 생성된 lactic acid의 농도는 음식 폐기물, 폐 신문지, 폐 종이박스가 각각 18140, 895 그리고 4442 mg/L로 나타났다(Fig. 2B). Propionic acid와 butyric acid의 경우는 acetic acid나 lactic acid의 양과 비교해 볼 때 유기산 농도의 변화량은 아주 미미하나 조금씩 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2C and D). 유기산 총 생성량은 음식 폐기물이 19608 mg/L로 가장 많았고, 폐신문지가 2461 mg/L, 폐 종이박스는 4978 mg/L 이었다(Fig. 2E). 음식 폐기물과 종이박스가 들어있는 산 발효조에서 생성된 유기산 성분 가운데 lactic acid가 대부분을 차지하였다. 일반적으로 glucose나 xylose 배지에서 *C. acetobutylicum*이나 *C. butyricum*을 이용하여 유기산을 생성할 경우 주로 acetic acid와 butyric acid가 생성된다(13, 14). 본 실험에서 *C. acetobutylicum* 과 *C. butyricum*을 이용하였을 때 lactic acid가 가장 많이 생성된 이유는 사용한 기질과 발효조건이 다르기 때문인 것으로 판단된다. 폐신문지나 폐 종이박스의 유기산 생성량이 음식물보다 작은 것은 폐신문지와 폐 종이박스의 주성분이 셀룰로오스로 이루어져서 분해가 잘 안되고 분해되더라도 시간이 오래 걸리기 때문인 것으로 사료된다. 셀룰로오스를 효과적으로 분해할 수 있는 *C. cellulovorans, C. populeti, C. thermocellum, C. cellulosi* 등과 같은 균주를 이용할 경우 좀 더 효과적으로 폐신문지와 폐종이 박스를 분해하여 유기산을 생산할 수 있을 것으로 판단된다(5).

회분식 메탄 발효

Fig. 3은 폐지를 메탄 발효시킬 때의 pH 변화를 나타낸 것이다. 최초 약 6.8의 pH에서 실험 개시 후 5일까지는 pH가 감소하였지만, 메탄발효가 진행됨에 따라 점차 증가하여 반응 15일째부터는 pH가 약 7.7을 유지하였다. 실험초기 5일동안 pH가 감소하는 이유는 초기 접종된 산 발효액의 영향으로 사료된다. Fig. 4는 실험기간 중 혐기성 메탄 발효조 내에서 발생되는 바이오 가스량을 나타낸 것이다. 반응초기에 발생된 가스는 접종액에 포함되어 있던 음식 폐기물의 유기산 성분이 메탄발효를 거치면서 메탄으로 전환된 것으로 사료되며, 이후 약 5-10일 동안에는 메탄이 생성되지 않았다. 이것은 신문지와 종이박스 용지의 주성분인 셀룰로오스가 당으로 분해되는데 장시간이 소요되며 안정화 단계를 지나면서 점차 바이오 가스량이 증가하기 때문인 것으로 사료된다. 한편 20일 이후에는 발생되는 바이오 가스량이 미미한 것으로 보아 메탄발효가 거의 종결되었음을 알 수 있다.

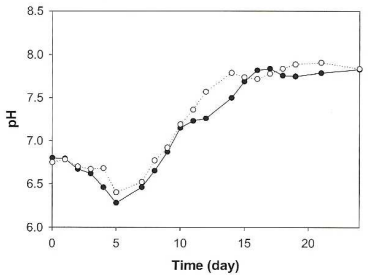


Figure 3. pH changes in the anaerobic methanogenic fermenter operated by batch reaction. Symbol: newspaper wastes (●) and paperbox wastes (○).

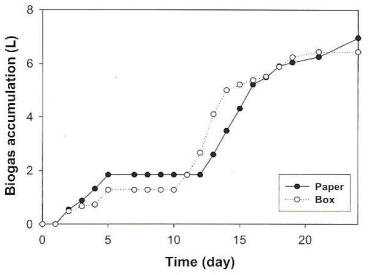


Figure 4. Accumulation of biogas in the anaerobic methanogenic fermenter operated by batch reaction. Symbol: newspaper wastes (●) and paperbox wastes (○).

Fig. 5와 6은 혐기성 메탄 발효조에서 회분식으로 유기성 폐기물을 처리할 때의 tCOD 변화와 총 고형물 및 휘발성 고형물의 변화를 나타낸 것이다. 가스 발생시기와 비슷한 시기에 tCOD의 감소가 급속히 일어났으며, 초기 35000 mg/L 정도를 유지하던 tCOD가 25일 후에는 약 14000 mg/L까지 감소하여 약 60%의 제거율을 보였다. 총 고형물 (total solid)의 변화는 신문지와 종이박스가 각각 34.8과 33.4% 감소하였고, 휘발성 고형물 (volatile solid)의 변화는 신문지와 종이박스가 각각 40.0과 39.2%가 감소하였다. 메탄 생산에 적합하지 않은 셀룰로오스 성분의 효과적인 발효를 위하여 일반적으로 산이나 알칼리로 전처리를 한다(15). 폐신문지나 폐 종이박스와 같은 셀룰로오스성 유기성 폐기물의 처

리시간을 단축시키거나, 처리 효율을 높이기 위해서는 가수분해와 효소학적 당화 그리고 산 처리 등과 같은 전처리 단계가 필요할 것으로 사료된다.

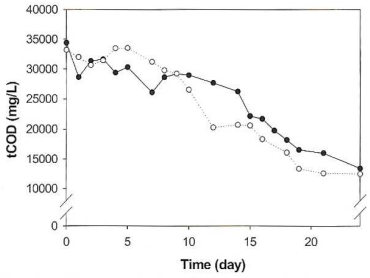


Figure 5. tCOD changes in the anaerobic methanogenic fermenter under batch reaction. Symbol : newspaper wastes (•) and paperbox wastes (○).

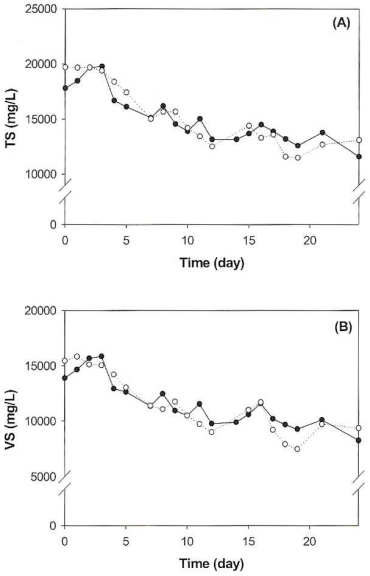


Figure 6. Reduction of total solids (A) and volatile solids (B) in the anaerobic methanogenic fermenter under batch reaction. Symbol: newspaper wastes (•) and paperbox wastes (○).

반 연속식 메탄 발효

Fig. 7은 유기성 폐기물을 반 연속식으로 처리 시 실험기간 중 혐기성 산 발효조와 혐기성 메탄 발효조 내의 pH 변화를 나타내었다. 산 발효조에 주입되기 전의 유기성 폐기물의 평균 pH는 5.5이었으나 산 발효조 내에 주입되어 산 발효가 진행됨에 따라 유기산의 생성으로 인해 pH가 다소 떨어졌으며, 발효조건이 안정화되면서 실험 종반부에 산 발효조의 pH는 약 5.0을 일정하게 유지하였다. 한편 산 발효조의 유출액을 주입하는 혐기성 메탄 발효조의 경우 발효가 진행됨에 따라 혐기성 메탄 발효조 내에서 평균 pH가 약 7.5로 상승하였음이 관찰되어 메탄발효가 적절히 진행 중인 것이 확인되었다.

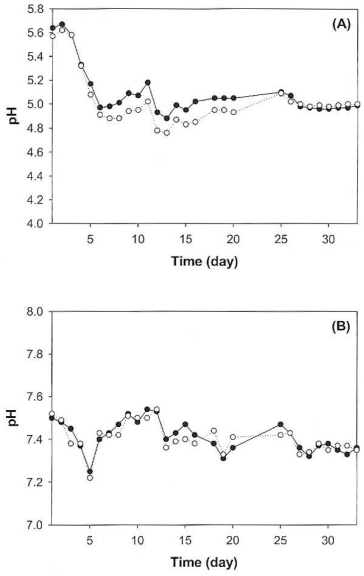


Figure 7. pH changes in the acidogenic (A) and methanogenic (B) fermenters operated by semicontinuous reaction. Symbol: newspaper wastes (•) and paperbox wastes (○).

Fig. 8은 반 연속식 메탄발효조에서 발생하는 가스 생산량을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 가스 생산량의 경우 초기 안정화 단계에서는 가스 생산이 매우 적었으나 시간이 지남에 따라 생산량이 점차적으로 증가하였고, 안정화가 이루어진 것으로 판단되는 25일째 이후에는 신문지와 종이박스에서 생산되는 바이오 가스량은 각각 2.24 L/day, 2.21 L/day로 나타났다. 이를 유기성 폐기물의 건조중량 당 가스 발생량으로 환산하면 각각 0.89 L/g paper, 0.88 L/g box로 나타낼 수 있다. 하지만 나타난 가스 발생량은 초기 주입한 음식 폐기물 산 발효액을 포함하는 가스 발생량이므로 음식 폐기물 산 발효액에 의한 가스 발생량을 보정하면 0.31 L/g paper, 0.30 L/g box로 나타낼 수

있다. 발생된 바이오 가스 중 메탄 함량은 신문지와 종이박스가 각각 57.3, 56.2%로 나타났다. 평균 31000~32000 mg/L의 tCOD 농도를 가진 신문지와 종이박스액을 산발효조에서 2일간의 체류시간으로 반 연속식으로 공급한 후 산발효액을 다시 메탄발효조에 주입하여 12일간의 체류시간을 거치는 동안 발효조 내에서 유지되는 평균 tCOD는 신문지와 종이박스가 각각 9622 mg/L와 9700 mg/L을 나타냄으로써 64.7, 65.1%의 tCOD 제거율을 보여주었다. 이상의 결과에서 나타나 있는 바와 같이 신문지 및 종이박스 등 셀룰로오스가 주성분을 이루는 유기성 폐기물을 본 연구실에서 운전 중인 메탄발효 시스템을 통하여 처리한 결과 tCOD가 감소하고 바이오 가스가 생산되는 것을 확인할 수 있다. 그러나, 음식 폐기물의 처리와 비교하였을 때 음식 폐기물보다는 낮은 tCOD 제거율과 바이오 가스 생산량을 보이기 때문에 현 운전조건보다 더 긴 체류시간이 요구된다는 것을 확인할 수 있다. 또한 발생된 메탄가스를 이용하는 측면에서는 신문지 및 종이박스 만을 처리 할 경우 메탄가스 발생량이 적기 때문에 음식 폐기물과 같은 분해가 빠른 유기성 폐기물과 혼합하여 처리하는 것이 바람직한 것으로 사료된다.

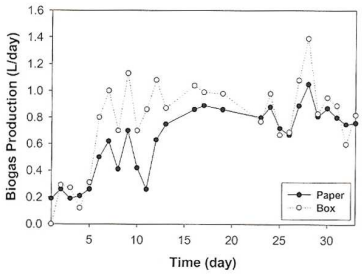


Figure 8. Time-dependent biogas production in the methanogenic fermenter by semicontinuous reaction. Symbol: newspaper wastes (•) and paperbox wastes (○).

요 약

본 연구는 셀룰로오스 성분의 분해가 용이하지 않은 폐지를 이용하여 유기산 및 메탄으로 전환시킬 수 있는지의 여부에 대하여 연구하였다. 유기산 생성 회분식 실험에서 초기 건조중량 15 g의 폐신문지와 종이박스를 음식폐기물 산 발효액과 1 : 1로 혼합하여 주입하였을 때 생성된 유기산의 총량은 신문지와 종이박스가 각각 2461과 4978 mg/L로 나타났다. 메탄발효 회분식 반응에서 초기 건조중량 15 g의 신문지와 종이박스 폐지를 주입하였을 때 24일 후 tCOD 제거율은 각각 60.9와 62.4%를 나타내었고 생산된 바이오 가스양은 각각 6.95와 6.43 L이었다. 총 고형물 (TS)의 변화는 신문지와 종이박스가 각각 34.8 과 33.4% 정도 감소함을 알 수 있었고, 휘발성 고형물 (VS)의 변화는 신문지와 종이박스가 각각 40.0 과 39.2% 정도 감소함을 알 수 있다. pH는 20일 이후부터 7.5로 일정하게 유지되어 메탄발효가 적절히 진행되는 것으로 확인되었다. 반 연속식 실험의 경우 산 발효조에서 2일, 메탄 발효조에서 12일간 체류하면서 신문지와 종이박스의 tCOD 제거 효율은 각각 64.7과 65.0%를 나타냈다. 각각의 일일 바이오 가스 생산량은 g당 0.31과 0.30 L로 나타났으며 바이오 가스 중 메탄함량은 57.3과 56.2%로 나타났다. 공정의 안정화가 이루어졌다고 판단되는 25일 이후의 pH는 혐기성 산 발효조와 메탄 발효조에서 각각 5.0과 7.5로 일정하게 나타났다.

REFERENCES

1. Noike, T., H. Takabatake, O. Mizuno, and M. Ohba (2002), Inhibition of hydrogen fermentation of organic wastes by lactic acid bacteria, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1367-1371.
2. Shin, H. S., S. K. Han, Y. C. Song, and C. Y. Lee (2001), Performance of UASB reactor treating leachate from acidogenic fermenter in the two-phase anaerobic digestion of food waste, *Wat. Res.* **35**, 3441-3447.
3. Woo, C. H., C. H. Park, and H. H. Yoon (2000), Production of acetic acid from cellulosic biomass, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 458-463.
4. Milcent, S. and H. Carrere (2001), Clarification of lactic acid fermentation broths, *Separ. Purifi. Technol.* **22-23**, 393-401.
5. Ravinder, T., M. V. Swamy, G. Seenayya, and G. Reddy (2001), *Clostridium lentocellum* SG6-a potential organism for fermentation of cellulose to acetic acid, *Biores. Technol.* **80**, 171-177.
6. Kim, J. S., H. J. Kim, K. K. Oh, and Y. S. Kim (2002), Acetic acid production using xylose and corn steep liquor by *thermoaceticum* strain, *J. Ind. Eng. Chem.* **8**, 519-523.
7. Sreenath, H. K., A. B. Moldes, R. G. Koegel, and R. J. Straub (2001), Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber, *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 518-523.
8. Talabardon, M., J. P. Schwitzguebel, and P. Peringer (2000), Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate, *J. Biotechnol.* **76**, 83-92.
9. Gardner, N. J., T. Savard, P. Obermeier, G. Caldwell, and C. P. Champagne (2001), Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures, *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 261-275.
10. Kim, S. W., J. Y. Park, J. K. Kim, J. H. Cho, Y. N. Chun, I. H. Lee, J. S. Lee, J. S. Park, and D. H. Park (2000), Development of a modified three-stage methane production process using food wastes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **84-86**, 731-741.
11. Kim, J. K., J. H. Cho, J. S. Lee, K. S. Hahm, D. H. Park, and S. W. Kim (2002), Mass production of methane from food wastes with concomitant wastewater treatment, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **98-100**, 753-763.
12. Kim, S. W., I. H. Lee, and Y. N. Chun, Korea patent, 0352811 (2002).
13. Zigova, J., E. Sturdik, D. Vandak, and S. Schlosser (1999), Butyric acid production by *Clostridium butyricum* with integrated extraction and pertraction, *Process Biochem.* **34**, 835-843.
14. Zhu, Y., Z. Wu, and S. T. Yang (2002), Butyric acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Clostridium tyrobutyricum* in a fibrous-bed bioreactor, *Process Biochem.* **38**, 657-666.
15. Kalia, V. C., V. Sonakya, and N. Raizada (2000), Anaerobic digestion of banana stem waste, *Biores. Technol.* **73**, 191-193.

The Korean Journal of Microbiology, Vol. 37, No. 4, December 2001, p. 317-324
Copyright©2001, The Microbiological Society of Korea

생태학적 수처리 시스템을 이용한 고농도 유기성 폐수처리

조재훈[1] · 김중곤[2] · 김준휘[2] · 윤성명[3] · 이정섭[4] · 김시욱[1]*

[1]조선대학교 환경공학부, [2]조선대학교 생물신소재학과, [3]조선대학교 생물교육학과, [4]조선대학교 생물과학부

본 연구실에서 개발한 3단계 메탄발효시스템을 이용하여 음식폐기물을 소화하고 배출되는 고농도 유기성 폐수를 미생물막 반응조와 조류, 물벼룩을 이용한 생태학적 수처리 시스템으로 처리하였다. 미생물막 반응조에서 유출되는 폐수에 두 종의 조류를 처리하였을 때 *Chlorella* sp. 보다 *Selenastrum capricornutum*이 더 잘 성장하였고, 질소제거 효과도 높았다. 고농도의 Mg^{2+}과 Ca^{2+}을 주입하고 유출수의 질소와 인 농도 비율을 10 : 1이 되도록 인위적으로 인 농도를 조절하였을 때에는 더욱 높은 질소 제거와 조류 성장을 나타내었다. 시험관에서 조류와 물벼룩 두 종의 개체수 변화를 관찰했을 때, 초기 조류 개체수는 물벼룩 개체수의 증가에 따라 감소하다가 물벼룩의 개체수가 최대치에 이른 후 환경저항에 의해 감소하기 시작하는 시점부터 점차적으로 증가하는 양상을 나타냈다. 본 연구에서 제시하는 생태학적 수처리 시스템은 유기성 폐수내 질소 및 인 처리에 매우 효율적이며, 시스템내의 최종 섭식자인 물벼룩을 대량 사육함으로써 이를 어류의 사료로 쓸 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

Key words □ alga, ecological water treatment system, high organic wastewater, waterflea

혐기 소화공정에서 처리 후 배출되는 음식폐기물의 최종 유출액은 고농도의 유기성 폐수로써 질소와 인 성분이 대단히 높으므로 기존의 폐수처리 공법으로는 처리하기 어렵고, 하천의 부영양화를 초래하는 질소와 인 화합물에 대한 방류기준이 최근 들어 엄격히 적용되고 있으므로 이에 대한 고도처리 기술의 개발이 시급하다.

일반폐수로부터 영양염류를 제거하기 위하여 활성슬러지법과 생물막법 등 다양한 물리적, 화학적 그리고 생물학적 방법들이 사용되어왔다. 그러나 이러한 방법들을 단일 혹은 복합적으로 사용하였을 때 영양염류의 제거가 우수함에도 불구하고 운전비용과 조절의 어려움, 그리고 많은 화학약품의 요구와 과도한 슬러지의 발생 등에 의해 선호되지 못하고 있다. 따라서, 이와 같은 일반적인 폐수처리방법을 대신하여 조류의 생산력을 이용하는 처리 시스템은 유기물 제거 방법의 대안으로 제안되고 있다(1-3,5-9,12-14). 예를 들면, Mihalyfalvy 등은 도시하수의 안정적인 처리를 위하여 고농도의 조류를 이용한 처리시스템을 연구하였고(13), Travieso 등과 Tame 등은 폐수의 영양염류를 제거하기 위해 조류를 고정화하여 실험하였다(16,17). 또한 Craggs 등은 Scotland의 도시에 설치되어 있는 물결모양의 수로에 조류를 배양시켜 하수로부터 질소와 인을 제거하는 능력을 연구하였다(8).

조류는 자연계에서 가장 큰 수질오염 현상인 부영양화 현상의 발생 주체 미생물이고 진핵 세포체로써 빛을 이용하여 탄소 동화작용을 하는 미생물이므로 조류의 인공적 성장조절이 가능하다면 수질오염 중에서 특히 부영양화 현상을 일으키는 영양물질의 제거에 매우 효율적일 것으로 판단되고 있다(1). 또한, 조류는 고농도의 유기물을 함유한 폐수로부터 질소, 인 성분을 흡수하여 성장할 수 있기 때문에 이들을 이용한다면 질소와 인을 제거함과 동시에 어류의 먹이 등과 같은 유용한 biomass를 생산할 수 있다(3). 생산되는 조류는 세포내 우량 단백질의 함량이 높아 고단백 가축사료로도 이용할 수 있다. 그러나 과다 증식한 조류를 회수하지 않으면 노쇠화하고 세포가 파괴되어 다시 유기물로 환원되므로 기계적인 회수방법이 요구된다. 한편 Carberry 등은 조류를 이용한 폐수처리시 지역적인 특성에 따른 태양빛의 유무, 주야의 변화에 의한 광합성과 호흡의 차이, 광범위한 부지 요구, 그리고 조류 분리의 어려움 등의 문제점을 제시하였다(7). 조류의 이러한 문제점을 해결하기 위해 조류가 물벼룩과 같은 무척

Table 1. Chemical properties of wastewater eluted from methane fermentation system developed in this lab

Parameter	Methane Fermentation System	Biological Filter Chamber
HRT (day)	16	3
Loading (kg VS/m^3/day)	54.9~55.4	1.8~6.0
pH	7.6~7.9	8.4~9.2
Temp. (°C)	45	30~35
T-N (*mg/l*)	4200	288
NH_3-N (*mg/l*)	1350	65
NO_3-N (*mg/l*)	60.2	31
T-P (*mg/l*)	80	30
TCOD (*mg/l*)	3282	510
SCOD (*mg/l*)	2214	490
BOD (*mg/l*)	834	161

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 062-230-6649, Fax: 062-225-6040
E-mail: swkim@mail.chosun.ac.kr

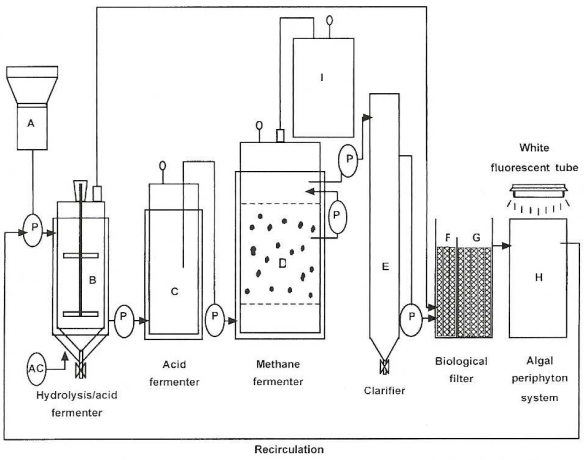


Fig. 1. Schematic diagram of a pilot scale three-stage methane fermentation system consisting of a hydrolysis/acidogenic reactor and two upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors for acidogenic and methanogenic processes. A, crusher; B, hydrolysis/acid reactor; C, acid reactor; D, immobilized-bed methane reactor; E, clarifier; F, oxic biological filter chamber; G, anoxic biological filter chamber; H, algal periphyton chamber; I, gas reservoir tank; P, pump; AC, air compressor.

추동물과 물고기에 의해서 자연적으로 섭취되는 생태계의 먹이 연쇄관계를 응용한 대안이 제안되기도 하였다(9,10,18).

본 연구에서는 국내에서 다량 발생하고 있는 음식폐기물을 제거할 목적으로 총 2.5 톤 규모의 1단계 반혐기성 가수분해/산 발효조, 2단계 혐기성 산발효조, 3단계 혐기성 메탄 발효조를 운전하였으나(Fig. 1), 최종 방출되는 폐수내 잔류 COD, 총 질소, 총인의 농도가 방류하기에 너무 높기 때문에 이들을 제거할 필요성이 있었다(11)(Table 1). 따라서 음식폐기물의 발효 공정 후 최종 배출되는 폐수를 방류수 수질기준에 맞추기 위하여 미생물막 반응조(BFC)와 조류, 물벼룩 등에 의한 생태학적 수처리 시스템을 응용하는 새로운 처리공정을 개발하고 운전조건을 산출하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

생태학적 수처리 시스템에 사용된 조류는 *Chlorella* sp.와 *Selenastrum capricornutum* 두 종으로 배양은 growth chamber 내에서 25°C, 6000-7000 lux광원으로 24시간 조사하였다. 조류 배양 배지는 ATCC (American Type Culture Collection) Culture Medium 625 Gorham's Medium 조성표에 따라 제조하였다(Table 2). 계대배양은 2주마다 하였고, 배양 배지 200 *ml*가 담긴 500 *ml* 삼각 플라스크에 조류가 2×10^5 cells/*ml* 되도록 접종하였다. 물벼룩은 *Moina macrocopa*를 사용하였으며 배양은 M4 배지를 약간 변형하여 사용하였고(Table 3)(15), growth chamber에서 25°C, 6000-7000 lux의 조건으로 3 *l* 비이커에 배양배지를 2 *l* 채운 후 먹이로 조류를 2×10^5 cells/*ml* 되도록 주입해서 초기 배양하였다. 조류와 물벼룩은 각각 초기 배양이 끝나고 왕성하게 잘 자랄 때 생물막 반응조(BFC)에서 유출되는 폐액을 조금씩 주입해서 폐액에 적응되도록 하였다.

Table 2. ATCC Culture Medium 625 Gorham's medium for alga

Constituent	Final concentration (*mg/l*)
$NaNO_3$	496.0
K_2HPO_4	39.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75.0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36.0
Ferric citrate	6.0
Na_2SiO_3	20.0
Citric acid	6.0
EDTA	1.0
Distilled Water	1000

Adjust pH to 7.5±0.5.

Algal periphyton system을 이용한 발효 폐액내 질소 제거

음식 폐기물 메탄 발효 공정 후 유출되는 폐액(전 질소 농도 4200 *mg/l*)을 질소 농도를 기준으로 100, 150, 300, 500 *mg/l*로

Table 3. M4 culture medium for waterflea

Constituent	Final concentration (*mg/l*)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123.3
K_2HPO_4	0.0184
$NaNO_3$	0.0274
$NaHCO_3$	64.8
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	1.0
H_3BO_3	2.86
KCl	5.8
LiCl	0.31
RbCl	0.071
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0.15
KI	0.0033
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	2.5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.361
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.01
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.063
NaBr	0.016
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.0165
$ZnCl_2$	0.013
Na_2SeO_3	0.0022
NH_4VO_3	0.0006
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.996
KH_2PO_4	0.0143
B_{12} (cyanocobalamin)	0.001
Biotin (*d*-Biotion)	0.0008
Thiamine (HCl)	0.075
Distilled water	1000

희석한 뒤 500 *ml* 삼각 플라스크에 각 질소 농도별로 250 *ml*씩 넣어 주었다. 여기에 *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*을 각각 주입하여 폐액 중 질소농도의 변화를 살펴 보았다. 조류의 초기 주입량은 chlorophyll *a*의 농도로 500~600 mg/m^{3}을 주입하였고, 각각의 질소 농도에서 *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*에 의한 질소 제거율과 chlorophyll *a*를 조사하였다. Chlorophyll *a*의 분석은 Standard method(4)에 따라 수행하였다.

Mg^{2+} 및 인 주입으로 인한 질소제거 및 조류 개체수 변화

메탄 발효 폐액이 BFC에서 3일간의 체류시간을 거친 후 배출될 때의 유출수의 질소 농도는 약 300 *mg/l*이다(Table 1). 이 유출수에 엽록소의 구성성분인 Mg^{2+}을 조류 배양배지 농도의 2배(150 *mg/l*)와 4배(300 *mg/l*)처리하여 질소제거 효율이 증가하는지를 관찰하였으며, 또한 조류 성장에 적합한 질소와 인의 비율을 맞춰 주기 위해 인을 주입하여 질소와 인의 비율을 10 : 1과 15 : 1로 적정하고 각각에 Mg^{2+}을 2배, 4배 처리하여 질소제거에 대한 영향을 조사하였다. 각각의 조건에는 *S. capricornutum*을 7~8×10^6 cells/*ml* 씩 접종하였다. 24시간마다 시료를 채취하여 질소 농도 및 조류 개체수 변화를 관찰하였고, 인을 적정한 것은 인 농도를 분석하였다.

저농도 폐액에 무기물 주입으로 인한 질소 제거 및 조류 성장

BFC에서 1차 처리된 질소 농도 약 300 *mg/l*의 폐액을 100, 150, 200 *mg/l*로 각각 희석한 뒤, 여기에 *S. capricornutum*을 약 8×10^6 cells/*ml* 주입하였다. 무기물은 조류 배양배지 성분 중 Mg^{2+}과 Ca^{2+}를 기준농도의 2배(Mg^{2+} 150 *mg/l*, Ca^{2+} 72 *mg/l*)와 4배(Mg^{2+} 300 *mg/l*, Ca^{2+} 144 *mg/l*)로 높여 각각의 질소 농도가 적정된 플라스크에 주입하고, 무기물을 넣어주지 않은 것을 대조군으로 하여 24시간마다 질소 제거율과 조류 개체수 변화를 비교 관찰하였다.

조류와 물벼룩간의 먹이연쇄관계에 의한 개체수 변화

BFC 유출수를 질소 농도를 기준으로 150 *mg/l*로 희석한 시료를 10 *ml*씩 넣어 10개를 준비한 후 여기에 *S. capricornutum*이 2×10^5 cells/*ml*가 되도록 주입하고, 물벼룩인 *M. macrocopa* 1마리를 5개의 test tube에 주입하였다. 그리고 물벼룩을 넣지 않은 나머지 5개를 대조군으로 하여 물벼룩 개체수의 증가에 따른 조류 개체수의 감소를 관찰하였다.

폐액 성분 분석

발효 폐액 성분 분석에 있어 COD_{Cr}, T-N, NH_3-N, NO_3-N, T-P, BOD는 Standard method(4)로 분석하였다.

결과 및 고찰

Chlorella sp.와 *Selenastrum capricornutum*에 의한 발효 폐액의 질소 제거 및 조류 성장

음식물 발효 폐액의 질소 농도를 100, 150, 300, 500 *mg/l*로 희석하였을 때, *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*에 의한 질소 제거율을 각각 Fig. 2에 나타내었다. *Chlorella* sp.에 의한 각각의 질소 농도에 대한 4일 후의 제거율은 38, 50, 33 그리고 21%로 분석되었다. 질소 농도가 150 *mg/l*일 때 가장 높은 질소 제거율을 보여주고 있고, 이 때의 농도는 75.6 *mg/l*로 측정되었다. *S. capricornutum*에 의해서는 각각의 질소 농도에서 48, 54, 38 그리고 26%를 나타냈다. *S. capricornutum*도 역시 *Chlorella* sp.와 마찬가지로 질소농도가 150 *mg/l*일 때 가장 높은 질소 제거율을 나타내고 있으며 농도값은 69.0 *mg/l*로 분석되었다. *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*에 의한 질소 제거율을 비교하여 볼 때 전자보다는 후자가 각각의 질소농도에서 더 높은 질소제거 효과를 보여주고 있다.

한편 질소 농도를 기준으로 희석한 각각의 플라스크에서 *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*의 조류 농도 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 각각의 플라스크에는 chlorophyll *a*를 500~550 *mg/m*^{3} 주입하였고, 질소농도에 따른 조류의 농도변화를 관찰하였다. 질소 농도가 100 *mg/l*와 150 *mg/l*일 때, *Chlorella* sp.의 chlorophyll *a* 농도는 4일간의 반응 후 1350, 1360 *mg/m*^{3}으로 높은 조

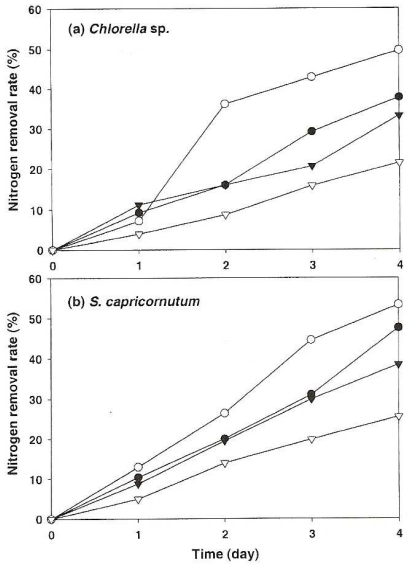


Fig. 2. Nitrogen removal efficiency of algae according to the total nitrogen concentrations.
●; T-N 100 *mg/l*, ○; T-N 150 *mg/l*, ▼; T-N 300 *mg/l*, ▽; T-N 500 *mg/l*.

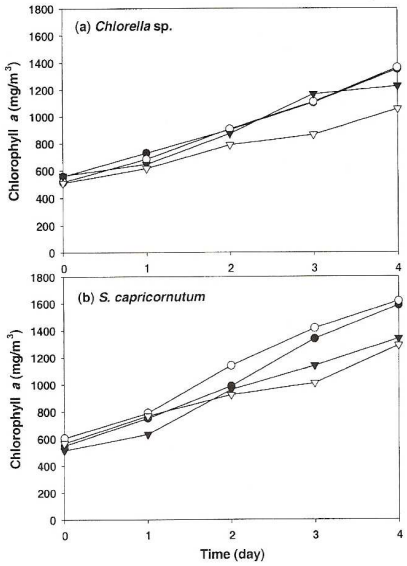


Fig. 3. Growth of algae according to the total nitrogen concentrations.
●; T-N 100 *mg/l*, ○; T-N 150 *mg/l*, ▼; T-N 300 *mg/l*, ▽; T-N 500 *mg/l*.

류 성장을 보여주고 있다. *S. capricornutum*을 넣어준 실험에서도 가장 높은 조류 성장을 보이는 것은 음식물 폐액의 질소 농도를 100 *mg/l*와 150 *mg/l*로 적정한 것으로 chlorophyll *a* 농도는 각각 550, 600 *mg*/m^{3}으로부터 1580, 1620 *mg*/m^{3}으로 가장 많이 증가하였다.

이상의 결과들에서 *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*는 폐액의 질소 농도를 기준으로 150 *mg/l*으로 희석했을 때 가장 높은 질소 제거율과 조류 성장을 보여주고 있는 것으로 나타났는데, 이것은 질소와 COD 농도가 너무 고농도일 경우 오히려 성장에 제한을 받으나 적정 농도에서는 조류가 잘 성장하여 그 개체수가 많아지고, 그로 인해 질소 성분의 흡수가 그 만큼 더 증가하기 때문에 질소 제거율 또한 높아진 것이라고 볼 수 있다. 특히 *S. capricornutum*이 *Chlorella* sp.보다 더 높은 질소 제거 효과 및 조류 성장을 보여주고 있다. 따라서 고농도의 유기성 폐액내 질소를 조류를 이용하여 제거하고자 할 때에는 두 종 가운데 *S. capricornutum*을 이용하는 것이 유리하다고 볼 수 있다.

한편, *Chlorella* sp.와 *S. capricornutum*에 의한 질소제거는 질소 농도가 100 *mg/l*에서 4일간의 반응 후 방류수 수질 기준치에 거의 근접하는 것으로 나타났다. 그러나, 폐액의 질소농도가 300 *mg/l*와 500 *mg/l*의 고농도로 적정된 경우에는 조류가 잘 자라지 못하기 때문에 폐액 속의 질소 성분 흡수가 제대로 이루어지지 못해 조류에 의한 질소 제거 효과가 낮게 나타났다. 따라서, 음식물 폐액 처리시 1차 처리 되었을 때의 질소 농도가 150 *mg/l* 이하로 되도록 한 후 조류를 이용해서 2차 처리를 하는 방안이 적절한 것으로 사료된다. Travieso 등과 Tam 등은 이러한 조류를 고정화하여 축산폐수, 가정하수를 처리하였는데(14,15), 본 연구에서도 조류를 고정화하여 음식물 폐액을 처리함으로써 조류의 유실없이 안정적으로 운전하는 방안을 차후 탐색하여야 할 것으로 사료된다.

Mg^{2+} 및 인 주입으로 인한 BFC 유출수의 질소 및 조류 개체수 변화

조류는 태양광을 이용하여 대기 중의 CO_2를 고정해서 자신의 유기물을 생산하는 독립영양생물로써 생체 내의 엽록소 구성성분 중 Mg^{2+}의 존재가 중요하게 작용한다.

여전히 고농도의 질소를 함유하고 있는 BFC의 유출수에 엽록소의 주성분인 Mg^{2+}을 정상적인 조류배양배지 조성 농도의 2배(150 *mg/l*)와 4배(300 *mg/l*)를 주입함으로써 조류의 질소제거율이

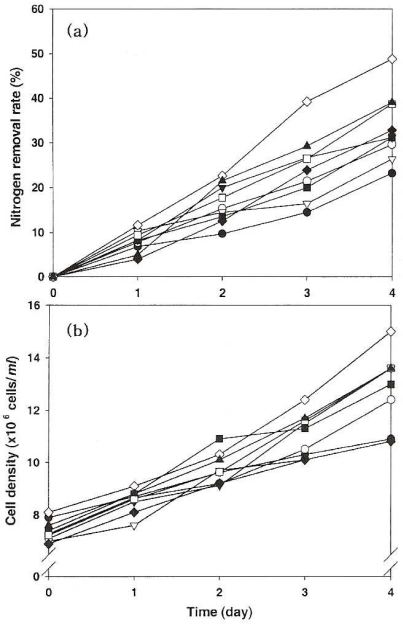


Fig. 4. Effect of Mg^{2+} and N:P ratio on the nitrogen removal efficiency (a) and growth(b) of *S. capricornutum.*
●, control; ○, Mg^{2+}×2; ▼, Mg^{2+}×4; ▽, N:P=10:1; ■, N:P=15:1; □, Mg^{2+}×2+N:P=10:1; ◆, Mg^{2+}×2+N:P=15:1; ◇, Mg^{2+}×4+ N:P=10:1; ▲, Mg^{2+}×4 + N:P=15:1.

증가하는지 관찰하였다. 또한 질소 : 인의 비율을 조절하여 조류가 질소를 효과적으로 흡수하여 더욱 성장이 잘 이루어지는지를 관찰하였다. 즉, 질소와 인이 10 : 1과 15 : 1의 비로 조절된 각각의 시료에 Mg^{2+}을 각각 2배, 4배 주입하여 각각의 조건에 따른 질소 제거율을 Fig. 4a에, 조류 개체수 변화는 Fig. 4b에 나타냈다.

Mg^{2+}을 넣어준 것이 넣지 않는 것보다 더 높은 질소 제거율과 조류 성장을 나타내고 있으나, 유출수가 고농도의 질소 성분을 함유한 폐수(300 *mg/l*)이기 때문에 조류가 잘 성장하지 못하며 질소 제거율도 낮았다. Mg^{2+}을 넣어주지 않은 것과 2배, 4배 넣어준 것의 제거율은 각각 23, 30 그리고 32%로 나타났다. Mg^{2+}을 4배 주입한 것 중에서 질소와 인의 비율을 10 : 1로 조절한 것이 가장 높은 질소 제거율인 약 50%, 농도는 153 *mg/l*를 나타냈으며, Mg^{2+}을 주입하지 않고 인 농도만을 조절한 시료는 질소 제거율이 현저히 낮게 나오는 것을 보여주고 있다(Fig. 4a). Mg^{2+}만을 주입한 것과 인 농도만을 조절한 것에서는 질소 제거율이 거의 비슷하였고, 또 인농도를 적정하고 여기에 Mg^{2+}을 주입한 시료와 Mg^{2+}을 주입하지 않은 시료에서의 질소 제거율은 Mg^{2+}을 주입한 시료에서 더 좋은 질소 제거율을 보이는 것으로 확인되었으므로, 질소와 인의 비율보다는 Mg^{2+}의 존재에 따라서 조류에 의한 보다 효과적인 질소 제거가 이루어진다고 사료된다. Mg^{2+}의 주입농도가 2배와 4배일 때 모두 질소 대 인의 농도가 15 : 1보다 10 : 1에서 더 높은 질소 제거가 이루어지는 것으로 나타났다. Fig. 4b에서는 각각의 조건에서 조류 개체수의 변화를 보여주고 있다. 조류 개체수 변화 역시 질소제거율이 가장 우수한 조건인 Mg^{2+}을 4배 주입하고 질소 대 인의 비율을 10 : 1로

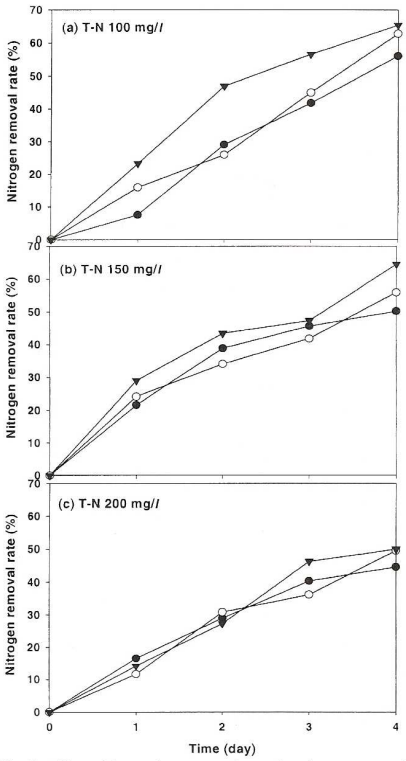


Fig. 5. Effect of inorganic compounds on the nitrogen removal efficiency of *S. capricornutum* at different nitrogen concentrations.
●, control; ○, (Mg^{2+}, Ca^{2+})×2; ▼, (Mg^{2+}, Ca^{2+})×4.

적정한 시료에서 8.1×10^6 cells/*ml*로부터 1.5×10^7 cells/*ml*로 가장 많이 증가하였다. 인 농도 제거도 마찬가지로 같은 조건인 시료에서 가장 높은 제거율인 75%를 나타냈으며, 이때의 농도는 초기 34 *mg/l*에서 8.5 *mg/l*로 감소하였다. 인을 인위적으로 처리해 주고 Mg^{2+}을 주입한 시료에서의 인은 대부분 제거되어 수질 방류기준인 8 *mg/l*에 근접하는 것으로 나타났기 때문에 폐액에 인을 첨가해 주는 것은 문제가 없는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 Mg^{2+}을 4배의 농도로 주입하고 인 농도를 적정한 시료에서 질소와 인의 제거가 가장 우수하였듯이 이 조건에서 가장 높은 조류의 개체 증식율을 보이는 것으로 나타났다.

저농도의 폐액에 무기물 주입으로 인한 질소 제거 및 조류 성장

BFC 유출수를 100, 150 그리고 200 *mg/l*의 질소농도로 희석하여 조절한 각각의 시료에 *S. capricornutum*을 일정하게 주입하고 무기물(Mg^{2+}, Ca^{2+})의 농도를 달리한 조건에서 질소제거 효과 및 조류 개체수의 변화를 관찰한 결과를 Fig. 5와 6에 나타냈다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 질소농도를 100 *mg/l*로 조절한 시료에서 무기물을 넣어주지 않은 대조군의 경우 4일간 반응시킨 후의 질소 제거율이 56%로 질소 농도는 초기 농도값 100 *mg/l*에서 44 *mg/l*로 제거되었다. 한편 Mg^{2+}과 Ca^{2+}을 기준농도의 2배(Mg^{2+} 150 *mg/l*, Ca^{2+} 72 *mg/l*)와 4배(Mg^{2+} 300 *mg/l*, Ca^{2+} 144 *mg/l*)로 처리하였을 때에는 각각 63%와 65%의 질소 제거율을 나타내었다. 이 때의 질소 농도는 100 *mg/l*에서 각각 37 *mg/l*와 34 *mg/l*로 감소하는 것으로 나타났다. 무기물을 넣어준 것과 넣어주지 않은 것 모두 4일간의 반응 후 방류수 수질 기준의 질소 농도 기준치인 60 *mg/l*이하를 나타냈기 때문에 BFC에서 유출되는 폐액의 질소 농도가 100 *mg/l*이하일 때는 인위적인 무기물 성분을 주입하지 않아도 무방한 것으로 사료된다.

Fig. 5에서 질소 농도를 150 *mg/l*로 적정하였을 때의 질소 제거율은 무기물을 넣어주지 않은 것과 2배, 4배 넣어준 것이 각각 50, 56 그리고 65%로 나타났다. 이 때 각각의 질소 농도는 75, 66 그리고 53 *mg/l*로 조사되었다. 여기에서 무기물의 농도를 4배 주입하여 준 것만이 방류수 수질 기준의 이하치를 나타냄을 확인할 수 있었다. 그리고, Fig. 5에서 보는 바와 같이 폐액의 질소 농도가 200 *mg/l* 일 때는 각각 45, 50 그리고 51%를 보여주고 있으나, 잔류 질소 농도가 모두 100 *mg/l* 이상으로 방류 기준치보다 높기 때문에 BFC에서 유출되는 폐액의 질소 농도가 200 *mg/l* 이상일 경우에는 본 실험보다 더 많은 반응시간을 주어야 할 것으로 사료된다.

각각의 질소 농도 조건에 따른 조류의 성장을 Fig. 6에 나타내었다. 질소 제거율이 무기물을 넣어 준 것이 가장 높게 나타난 것처럼 조류의 성장도 무기물을 넣어 준 것이 그렇지 않은 것보다 훨씬 더 잘 성장한 것으로 나타났다. BFC 유출수의 질소 농도에 관계없이 무기물의 농도를 조류배양배지 기준 농도의 4배를 주입하였을 때 가장 높은 조류 성장을 나타냈고, 이 때 가장 높은 질소 제거율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

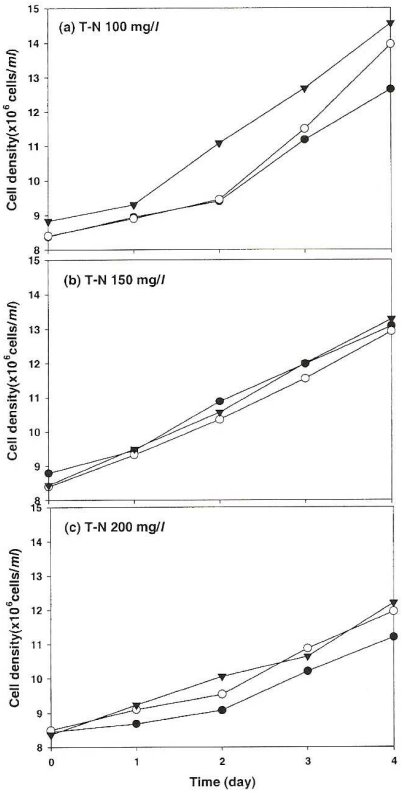


Fig. 6. Effect of inorganic compounds on the growth of *S. capricornutum* at different nitrogen concentrations.
●, control; ○, (Mg^{2+}, Ca^{2+}) ×2; ▼, (Mg^{2+}, Ca^{2+})×4.

조류와 물벼룩의 먹이연쇄관계에 의한 개체수 변화

조류를 이용하여 BFC 유출수 처리시 과다성장으로 인한 사멸로 유기물로의 재환원을 막기 위해서 조류를 먹이원으로 이용하는 물벼룩을 이용하여 이를 제어하고자 하였다.

Fig. 7에서는 18×180 mm인 시험관에 질소 농도 150 *mg/l*의 BFC 유출수 10 *ml*를 넣은 후 물벼룩(*M. macrocopa*) 1마리와 조류(*S. capricornutum*) 2×10^5 cells/*ml*을 함께 접종하였을 때의 각각의 개체수 변화를 나타내었다. 대조군인 물벼룩을 넣어주지 않은 시험관에서는 시간이 지남에 따라 계속적으로 조류 개체수

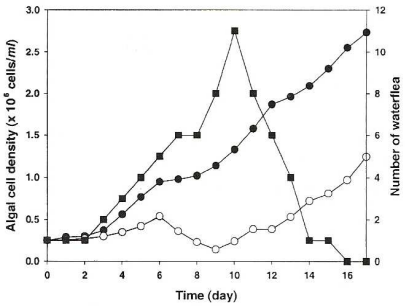


Fig. 7. Population relationship between *S. capricornutum* and *M. macrocopa*.
●, control ; ○, *S. capricornutum* ; ■, *M. macrocopa*.

가 증가하여 17일 경과한 후 2×10^5 cells/*ml*에서 2.7×10^6 cells/*ml*로 증식하였으나, 물벼룩을 넣어준 시험관에서는 물벼룩이 조류를 먹이원으로 하여 포식하기 때문에 조류 개체수가 처음 6일 동안은 약간씩 증가하다가 그 이후로는 물벼룩 개체수의 증가로 조류의 감소가 이루어지며, 물벼룩이 사멸되기 시작하는 10일을 기점으로 다시 증가하여 최종적으로 1.25×10^6 cells/*ml*의 개체수를 나타내었다. 물벼룩은 10일이 경과하였을 때 가장 많은 11마리를 나타냈으나 그 이후로는 감소하는 양상을 보였다. 이는 물벼룩이 성장하는 시험관의 공간적 제한 등 환경저항 때문에 더 이상 개체수가 증가하지 못하고 사멸한 것으로 판단되는데, 물벼룩이 조류를 포식하는 속도, 조류의 생장속도 등을 포함하여 물벼룩과 조류가 본 시스템에서 먹이연쇄에 의해 서로가 공존할 수 있는 조건에 대한 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 사료된다. 이를 통해 최종 섭식자인 물벼룩을 폐수에서 대량 사육함으로써 어류의 사료로 이용할 수 있을 가능성에 대한 연구가 병행되어야 할 것이다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 조선대학교 교내 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 공석기, 안승구. 1997. 호기성 고율 안정조에서 빛의 조사기간과 pH가 조류의 영양물질 제거에 미치는 영향. 한국환경과학회지. 6, 141-152.
2. 김성빈, 이석준, 김치경, 권기석, 윤병대, 오희목. 1998. 축산폐수의 3차처리를 위한 미세조류의 선별 및 처리조건의 최적화. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26, 76-82.
3. 최정우, 김영기, 류재홍, 이우창, 이원홍, 한정택. 2000. 축산폐수 처리를 위한 광섬유 생물반응기를 이용한 조류 배양공정 개발. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 14-21.
4. American Public Health Association (APHA). 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th ed, APHA, Washington. DC.
5. Arauzo, M., M.F. Colmenarejo, E. Martinez, and M.G. Garcia. 2000. The role of algae in a deep wastewater self-regeneration pond. *Wat. Res.* 34, 3666-3674.
6. Aziz, M.A. and W.J. Ng. 1993. Industrial wastewater treatment using an activated algae-reactor. *Wat. Sci. Tech.* 29, 71-76.
7. Carberry, J.B. and R.W. Greene. 1992. Model of algal bacterial clay wastewater treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 26, 1697-1706.
8. Craggs, R.J., P.J. Mcauley, and V.J. Smith. 1997. Wastewater nutrient removal by marine microalgae grown on a corrugated race way. *Wat. Res.* 31, 1701-1707.
9. Drenner, R.W., D.J. Day, S.J. Basham, J.D. Smith, and Susan I. Jensen. 1997. Ecological water treatment system for removal of phosphorus and nitrogen from polluted water. *Ecological Application.* 7, 381-390
10. Guterstam, B. 1996. Demonstrating ecological engineering for wastewater treatment in a Nordic climate using aquaculture principles in a greenhouse mesocosm. *Ecol. Engin.* 6, 73-97.
11. Kim, S.W., J.Y. Park, J.G. Kim, J.H Cho, Y.N. Chun, I.H. Lee, J.S. Park, and D.H. Park. 2000. Development of a modified three-stage methane production process using food wastes. *Appl. Biochem. & Biotech.* 84, 731-741.
12. Lau, P.S., N.F. Tam, and Y.S. Wong. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ. Poll.* 89, 59-66.
13. Mihalyfalvy, E., H.T. Johnston, M.R. Garrett, H.J. Fallowfield, and N.J. Cromar. 1998. Improved mixing of high rate algal ponds. *Wat. Res.* 32, 1334-1337.
14. Rectenwald, L.L. and R.W. Drenner. 2000. Nutrient removal from wastewater effluent using ecological water treatment system. *Environ. Sci. Technol.* 34, 522-526.
15. Samel, A., M. Ziegenfuss, C.E. Goulden, S. Banks, and K.N. Baer. 1999. Culturing and bioassay testing of *Daphnia magna* using Elendt M4, Elendt M7, and COMBO media. *Ecotoxicolgy and Environmental Safety.* 43, 103-110.
16. Tam, N.F.Y. and Y.S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environ. Poll.* 107, 145-151.
17. Travieso, L., F. Benitez, P. Weiland, E. Sanchez, R. Dupeyron, and A.R. Dominguez. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Tech.* 55, 181-186.
18. Umble, A.K. and L.H. Ketchum. 1996. A strategy for coupling municipal wastewater treatment using the sequencing batch reactor with effluent nutrient recovery through aquaculture. *Wat. Sci. Tech.* 34, 141-148.

(Received November 27, 2001/Accepted December 10, 2001)

ABSTRACT: Treatment of High Organic Wastewater Using Ecological Water Treatment System
Jae-Hoon Cho[1], Jung-Kon Kim[2], Joon-Hwuy Kim[2], Seong Myeong Yoon[3], Jung Sup Lee[4], and Si Wouk Kim[1], ([1]Department of Environmental Engineering, [2]Department of Biomaterials, [3]Department of Biology Education, [4]Department of Biology, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea)

We have previously developed three stage methane fermentation system capable of digesting food wastes effectively and then releasing high organic wastewater as a final product. In this study, we tried to devise an ecological water treatment system, which can efficiently remove the nitrogen and phosphorus contained in the organic wastewater. The system was made of microbiological filters, algae, and waterfleas. Of two species of alga tested, *Selenastrum capricornutum* showed higher growth rate and more efficiently removed the nitrogen from the wastewater than by *Chlorella* sp. In addition, the highest growth rate and the nitrogen removal efficiency could be obtained when high concentrations of Mg^{2+} and Ca^{2+} were added to the diluted wastewater and the molar ratio of nitrogen to phosphorus was adjusted to 10 : 1. In this study, the population relationship between alga and waterflea was also examined in a test tube. The initial number of algal cells decreased as the waterflea population increased. However, the number of algal cells gradually increased again when waterflea population decreased partly due to the environmental resistance. From these results, it was believed that the ecological water treatment system could be used for removing the nitrogen and phosphorus from organic wastewater very effectively. Moreover, the waterflea cultured by this system as a final predator could be used as a good foodstuff for fishes.

The Korean Journal of Microbiology, Vol. 37, No. 2, June 2001, p. 130-136
Copyright©2001, The Microbiological Society of Korea

UV-TiO_2 광촉매 반응기에 의한 미생물의 살균효과

김중곤 · 신용국[1] · 이영상[2] · 김용호[2] · 김시욱*
조선대학교 환경공학부, [1]조선대학교 생물신소재 센터, [2]순천향대학교 자원과학부

두가지 형태(1단 반응기와 2단 반응기)의 UV-TiO_2 광촉매 시스템과 3가지 형태의 TiO_2가 코팅된 촉매를 이용하여 미생물에 대한 살균효과를 살펴보았다. 첫번째 형태는 석영관에 TiO_2가 박막증착된 것이고 두번째 형태는 glass bead 표면에 TiO_2가 코팅된 형태이며 세번째는 alginate bead에 TiO_2가 혼합된 형태이다. 1분동안 UV를 조사하였을 때 1단 반응기에서 TiO_2가 박막증착된 석영관과 TiO_2가 코팅된 glass bead의 살균효율은 각각 63.2%와 89.9%이었다. 반응기에 기포를 주입했을 때의 살균효율은 glass bead의 경우 95%로 기포를 주입하지 않았을 때의 90.6%보다 훨씬 효과적이었다. 기포를 주입하면서 광촉매로 alginate bead에 TiO_2가 혼합된 것을 이용하였을 경우의 살균효율은 86%이었다. TiO_2가 코팅된 glass bead를 이용한 반응기에 기포를 주입하면서 H_2O_2를 처리하였을 때의 살균정도는 미량농도에서도 매우 효과적이었다. 1단 반응기보다 2단 반응기에서의 살균효율이 더욱 증가하였으며 *E. coli*에 대한 살균효과가 *S. cerevisiae*보다 더 높게 나타났다.

Key words □ bactericidal effect, UV-TiO_2 photocatalytic system

서 론

최근에 개발된 새로운 살균법으로 UV와 TiO_2 광촉매를 이용한 미생물 살균에 대한 연구가 활발해지고 있는데(10,14,21, 31,32,35), 특히 의학분야에서는 백혈병을 일으키는 세포를 죽이거나(20) 방광세포에 존재하는 암세포를 제거하는데 TiO_2를 이용하기도 하였다(11,24). TiO_2 광촉매는 빛을 이용한 광산화반응을 유발함으로써 각종 유기오염물질(2,27,30,33) 및 난분해성물질의 제거에도 이용되고 있다(25,30,33).

이런 UV와 TiO_2를 이용한 산화처리방법은 고급 산화법(Advanced Oxidation Process : AOP)의 일종이며 AOP 산화법에 관한 연구가 처음으로 시작된 것은 미국과 일본에서 산업폐수처리에 적용하기 시작된 것에서 비롯되었다. 최근에는 폐수 뿐 아니라 상수처리에 AOP 산화법의 응용이 점차 확대되고 있으며 지하수의 trichloloethylene와 tetrachloroethylene 같은 미량 유기물 제거(16)와 지표수의 맛 · 냄새 유발물질인 지오스민 및 methylisoborneol 제거, 기타 산화 부산물 생성을 억제하는 방안으로의 응용이 검토되고 있다. AOP 산화방법은 기존의 산화제보다 월등한 산화력을 가지는 OH 라디칼을 중간물질로 생성시켜 오염물질을 제거하는 공법을 말하는데, AOP의 종류로는 오존/UV, 오존/H_2O_2, H_2O_2/UV, Fenton 산화, electron beam irradiation 등의 AOP 공정과 광촉매 산화공정 등을 예로 들 수 있다. 이 방법들의 공통점은 OH 라디칼을 이용해 유해물질을 산화처리하는 방법이며, OH 라디칼은 유기물과의 반응속도 상수가 10^9~10^{10} $M^{-1}s^{-1}$로 매우 빠르고 거의 모든 유기물과 골고루 반응한다는 뛰어난 장점을 가지고 있어 모든 AOP 공정은 가능한 많은 양의 OH 라디칼을 생성하는데 목적을 두고 있다(15-18).

광촉매 산화공정 가운데 UV/TiO_2 방법은 비교적 긴 파장의 자외선인 300~400 nm 범위의 파장대의 광에너지를 TiO_2 촉매에 조사하여 TiO_2 표면에 중간물질로 생성된 OH 라디칼을 이용하여 유기물을 제거하는 방법이다. 이 방법은 비교적 적은 에너지를 이용해서 유기물을 제거할 수 있고 태양광을 자외선 에너지원으로 이용할 경우, 획기적으로 에너지를 절감할 수 있다는 장점 때문에 최근에 활발하게 연구가 진행되고 있다. 그리고 반응계에 산화제를 첨가하거나(28,29), 전이금속을 광촉매에 도핑하였을 경우에 광촉매 반응의 효율이 증가하는 것으로 보고되어 있다(9,19). 또한 광촉매에 의한 각종 유기물의 광분해 반응에서 반응 메카니즘과 반응속도식 등의 기초연구 이외에도 광촉매 반응을 상용화하기 위해 고정화시킨 광촉매를 이용하여 유기물의 분해반응을 연구하기도 하였다(4,7,34).

TiO_2 광촉매는 유독한 약품 등을 사용하지 않고, 화석연료를 사용하지 않으며, 태양광 등의 광에너지로 분해가 어려운 각종 화학물질을 안전하고 용이하게 분해시킬 수가 있으며(12,22) 살균 등도 가능하기 때문에, 환경을 배려한 환경정화재료로서 각광받고 있다(20,23). 광촉매 반응의 원리는 Fig. 1에 나타내었으며 Fig. 1의 과정을 거쳐서 생성된 OH 라디칼이 유기물과 반응해서 유기물을 제거하게 되는데, 일부 학자들은 OH 라디칼 이외에도 TiO_2 표면에 유기물이 흡착되어 valence band에서는 양공에 의해 산화가 이루어지고 conduction band에서는 전자에 의해 환원이 이루어져서 유기물이 분해 제거된다는 주장도 하고 있다(6,26). 또한 H_2O_2나 iron을 촉매로 사용하여 TiO_2 광반응의 효과를 높이기도 하였다(8,13,36). 그리고 TiO_2 광반응의 최적화를 위해서

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 062-230-6649, Fax : 062-225-6040
E-mail : swkim@mail.chosun.ac.kr

1. Absorption of Light by TiO_2 Semiconductor

$TiO_2 + h\nu \text{ -----> } e^-_{CB} + h^+_{VB}$

2. $e^-_{CB} + h^+_{VB}$ diffusion

3. Positive Hole Reaction

$h^+_{VB} + OH^- \text{ -----> } OH\cdot$
$h^+_{VB} + H_2O \text{ -----> } OH\cdot + H^+$
$OH\cdot + \text{Organic -----> Organic}^+$
$h^+_{VB} + \text{Organic -----> Organic}^+$

Electron Reaction

$e^-_{CB} + O_2 \text{ -----> } O_2^-\cdot$
1) $2O_2^-\cdot + 2H_2O \text{ -----> } 2OH\cdot + 2OH^- + O_2$
2) $O_2^-\cdot + H^+ \text{ -----> } HO_2\cdot$
$O_2^-\cdot + HO_2\cdot \text{ -----> } H_2O^- + O_2$
$HO_2\cdot + HO_2\cdot \text{ -----> } H_2O_2\cdot + O_2$
$HO_2^- + H^+ \text{ -----> } H_2O_2$
$H_2O_2 + e^-_{CB} \text{ -----> } OH\cdot + OH^-$
$H_2O_2 + O_2 \text{ -----> } OH\cdot + OH^- + O_2$
$H_2O_2 \text{ -----> } h\nu \text{ -----> } 2OH\cdot$
$OH\cdot + OH\cdot \text{ -----> } H_2O_2$

$OH\cdot + \text{Organic -----> Organic}^-$
$e^-_{CB} + \text{Organic -----> Organic}^-$

Fig. 1. Reaction mechanisms of TiO_2 with ultraviolet.

는 Re, DO, TOC level (COD), alkalinity, UV flux, electron acceptor, TiO_2, color/turbidity와 같은 인자를 고려하여야 한다.

TiO_2 광분해를 이용한 많은 연구 활동에도 불구하고 농작물 등에 많은 피해를 주는 여러 미생물들을 살균하기 위한 TiO_2 광분해 응용에 대한 연구 활동은 아직 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 단시간(15분)이내에 90% 이상의 살균효과를 나타내는 살균조건을 구하고자 본 실험에서 제조한 몇 가지 형태의 TiO_2 촉매들을 이용하여 살균효과를 측정하였으며, 또한 경제성이 있으면서 최대 살균효과를 나타내는 살균 장치를 고안하여 살균효과를 측정하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에서는 분리균주인 *Escherichia coli* Y1090과 한국생명공학연구원의 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받은 *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1199를 사용하였다. 세균의 배양은 LB 배지(pH 7.0, 37°C)를 사용하였고 효모는 YM 배지(pH 7.0, 24°C)에서 24시간 동안 진탕 배양하였다. 본 살균실험에는 모두 *E. coli*를 대상으로 하였으며 미생물 살균효과 비교실험에서 *S. cerevisiae*를 사용하였다.

살균효과측정

모든 실험에서의 세포농도는 분광 광도계(Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech. Upsal, Sweden)로 600 nm에서 흡광도 0.7인 균체를 취하여 50 mM의 potassium phosphate buffer (pH 7.0)와 0.9% NaCl 용액을 사용하여 연속희석 방법으로 결정하였다. 살균효과측정은 반응기에 희석수를 넣고 일정한 농도의 균을 접종한 뒤 5분간 순환펌프를 이용하여 희석수와 균을 완전히 혼합한 다음 초기 균체의 농도측정을 위해 시료를 채취하고 자외선 조사와 동시에 그로부터 15분간 매분별로 시료를 채취하였다. 자외선-광촉매 반응 후 살아남은 균체는 적정농도로 희석하여 영양한천배지에 100 μl씩 도말하고 24시간 배양 후 계수하였다. 살균효과를 높이기 위해 처리된 H_2O_2의 농도는 각각 10~25 *mg/l*로 조절하였고 NaClO의 농도는 각각 0.5~50 *mg/l*로 변화시키면서 각각의 살균효과를 알아보았으며, 잔존된 H_2O_2의 농도는 간접요오드 적정법(3)을 이용하여 측정하였다.

광촉매 및 자외선원

본 실험에서 사용한 자외선원으로는 254 nm에서 최대 39 watt의 방출량을 내는 850 mm 길이의 자외선 램프(Philips, USA)를 사용하였다. 광촉매로서는 apatite를 함유하고 있어 산화능력이 높은 TiO_2 (Jupiter F4-APS, Showa Denko, Japan)용액과 anatase (Sigma, USA) 결정을 적당히 희석하여 glass bead에 코팅하였거나 석영관에 박막증착시켰으며 alginate bead의 경우 희석된 TiO_2 용액과 혼합하여 제조하였다.

광촉매 코팅방법

Glass bead (5 mm)에 코팅한 광촉매는 bead의 막표면이 가능한 한 넓게 되도록 하기 위하여 1: 500으로 희석한 Jupiter TiO_2 용액을 glass bead에 적신 후 100°C에서 24시간 동안 단순히 열처리하여 실험에 사용하였다. 반면 석영관에 TiO_2 광촉매를 박막증착한 것은 TiO_2 광촉매제 결정을 chemical vapor deposition 방식으로 박막증착시킨 형태로서 석영관을 지지대로 하여 TiO_2 tablet (density : 4,260, Z-ratio : 0.4, Merckd-6100 Darm Stadt Co.)를 이용하였으며, TiO_2 tablet에 electron beam (5 kv) 발생기(Leybold Inffcon Inc.)를 이용하여 1,800 ~ 2,200°C의 증발온도 이상으로 높여 TiO_2를 증발시키고 로내 온도는 310°C, 증착율은 3.5Å/sec를 유지하고 내부압력을 2.0×10^{-5} torr의 진공하에서 증착용 석영관을 1,000 rpm으로 회전시키면서 두께를 7,000Å으로 표면을 일정하게 증착시켜 실험에 사용하였다. Alginate bead의 경우 TiO_2의 농도를 0.1%로 조절하고 4%의 alginate 용액과 1 : 1로 혼합하여 immobilizing apparatus (MIA-1, EYELA, Japan)를 이용하였으며, 0.1 M $CaCl_2$ 용액에 적하시켜 직경이 4 mm인 bead를 제조하였다. 만들어진 bead는 증류수로 몇 차례 세척한 후 증류수에 담궈 보관하고 실험에 사용할 때는 0.9% NaCl 용액과 함께 사용하였다.

반응장치

본 실험에 사용된 반응기는 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 1단 반응기는 내경이 55 mm이고, 길이가 950 mm인 pyrex관 내부에

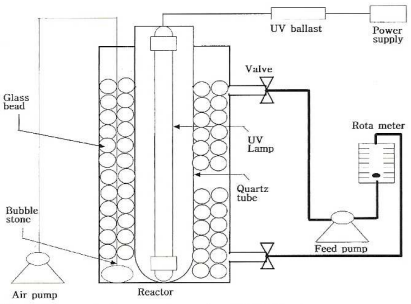


Fig. 2. Schematic diagram of one-phase UV-TiO_2 photoreactor.

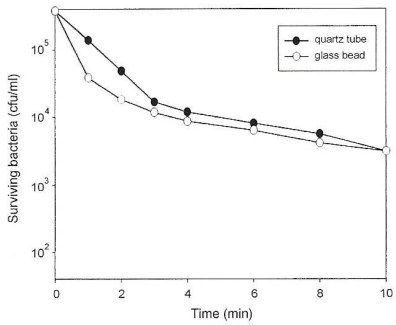


Fig. 3. Comparison of bactericidal effect between thin-film TiO_2-coated quartz tube and TiO_2-coated glass bead.

내경이 21 mm, 길이 1 m인 석영관을 넣고 그 안에 자외선 램프를 넣은 후 순환식으로 실험하였다. 수용액의 흐름은 순환 펌프(PH-80-D, Hanil)를 이용하여 2.5 *l*/min의 유속으로 일정하게 유지하였고, 반응기 하단부에서 상층부로 순환하는 형식을 취하였다. 기포주입을 이용한 실험에서는 유리관 안쪽의 바닥에 기포발생기를 설치하여 공기를 주입하였다. 2단 반응기는 내경이 55 mm이고 길이가 720 mm인 2개의 pyrex 관을 가로로 눠여 병렬 형태로 연결하였다. 1단 반응기와는 달리 석영관을 넣지 않고 직접 자외선 램프를 구멍이 뚫린 silicone 마개에 끼워 pyrex 관 양끝을 막은 뒤 순환식으로 실험하였다. 또한 기포주입을 위해 일정하게 구멍이 뚫린 관을 자외선 램프 하단에 설치하였다. 수용액의 흐름은 순환펌프(ND 300 KT. 18, KNF FLO-DOS)를 이용하여 2 *l*/min의 유속으로 일정하게 유지하였으며, 반응기 하단부에서 상층부로 순환하는 형식을 취하였다. 수용액의 유량은 반응기 하단부에 유량 조정조를 설치하여 조절하였다.

결 과

TiO_2로 박막증착된 석영관과 TiO_2로 코팅된 glass bead의 살균효과 비교

Fig. 3에 1단 반응기에서 TiO_2로 박막증착된 석영관과 TiO_2가 코팅된 glass bead 사이의 *E. coli*에 대한 비교실험 결과를 나타내었다. TiO_2로 박막증착된 석영관에서는 1분 동안에 3.8×10^5 cells/*ml*에서 1.4×10^5 cell/*ml*로 63.2%의 살균효과를 나타냈고, 2분 후에는 4.8×10^4 cells/*ml*로 87.3%의 살균효과를 나타냈으며 10분 후에는 99%의 살균효과를 나타내었다. 반면 광촉매로 TiO_2가 코팅된 glass bead를 넣었을 경우에는 초기 개체수가 3.8×10^5 cells/*ml*에서 1분 동안에 4.2×10^4 cells/*ml*로 89.9%의 살균효과를 나타냈고, 2분 후에는 1.8×10^4 cells/*ml*로 95.2%의 살균효과를 나타냈으며 10분 후에는 99%의 살균효과를 나타내었다. 즉 TiO_2로 박막증착된 석영관보다 광촉매로 TiO_2를 코팅한 glass bead를 이용 것이 반응초기에 훨씬 더 높은 살균효과를 나타내었다.

기포의 영향

1단 반응기에서 TiO_2로 코팅된 glass bead에 기포발생기를 이용하여 기포를 넣어주었을 때와 그렇지 않은 경우의 살균효과를 알아보았다. 기포를 넣지 않은 경우에는 Fig. 4에서와 같이 1분 동안에 7.1×10^3 cells/*ml*에서 668 cells/*ml*로 90.6%의 살균효과를 나타냈고, 15분 후에는 70 cells/*ml*의 개체가 생존하였다. 같은 시간동안에 기포를 주입하였을 때의 살균효과에서는 1분 후에 7.1×10^3 cells/*ml*에서 357 cells/*ml*로 95%의 살균효과를 나타냈고, 15분 후에는 13 cells/*ml*개의 개체만이 생존하여 기포를 주입하였을 경우가 그렇지 않은 경우보다 반응초기에 더 높은 살균효과를 나타내었다.

TiO_2가 혼합된 alginate bead의 살균효과

1단 반응기에서 TiO_2를 이용한 촉매들 가운데 TiO_2로 코팅된

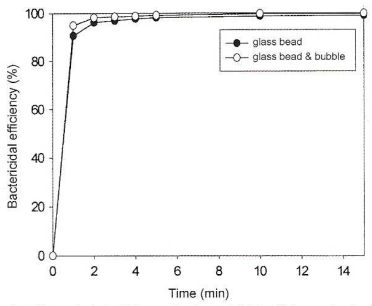


Fig. 4. Effect of air bubble on the bactericidal efficiency in the UV TiO_2 photocatalytic system.

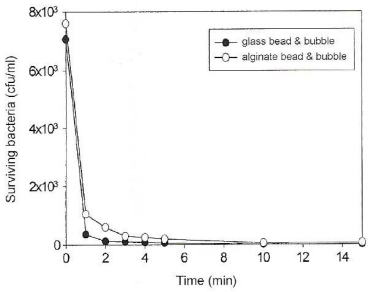


Fig. 5. Bactericidal effect of TiO_2-mixed alginate bead.

glass bead와 TiO_2가 혼합된 alginate bead에 대한 실험은 Fig. 5에 나타내었다. Alginate bead의 경우에는 1분 동안 7.6×10^3 cells/*ml*에서 1.1×10^3 cells/*ml*로 86%의 살균효과를 보였고 15분 후에는 70개의 개체가 남아 99%의 살균효과를 나타내었지만 위의 실험결과에서 나타낸 glass bead 촉매에 비해 살균 초기의 살균효과가 약간 떨어지는 것이 관찰되었다.

반응액에 H_2O_2를 첨가했을 때의 살균효과

광촉매에 의한 살균효과를 더욱 높이기 위해 살균제인 H_2O_2의 농도를 조절하면서 TiO_2가 코팅된 glass bead가 들어있는 1단 반응기에 기포를 넣어 주었을 때와 동일한 방법으로 실험을 수행한 결과 Fig. 6(a)에 나타난 바와 같이 1분 후의 살균효과가 각각 96.7, 97.7, 98.2, 99%의 살균효과를 보였으며 H_2O_2를 25 *mg/l*를 주입했을 경우 5분 후에는 완전히 살균되었음을 알 수 있었다. 또한 UV조사 없이 과산화수소에 의한 살균효과를 Fig. 6(b)에 비교실험으로 나타내었다. 과산화수소의 주입 최고 농도인 25 *mg/l*의 경우에도 UV조사가 없는 경우는 15분 동안의 살균효과가 51%밖에 되지 않았다.

광촉매 살균 후의 잔존된 H_2O_2량은 Fig. 6(c)와 같이 관찰되었다. 초기 농도를 500 *mg/l*로 했을 때 15분 후의 농도가 118.4 *mg/l* 이었고, 광촉매에 UV를 조사한지 3시간 후에 농도가 1.3 *mg/l*로 감소하였다. 100 *mg/l*의 경우 15분 후 22.3 *mg/l*이었고, 2시간 후에는 1.3 *mg/l*으로 감소하였으며 75 *mg/l*의 경우에는 15분 후에 15.6 *mg/l*, 30분 후 1.8 *mg/l*, 60분 후 0.6 *mg/l*이었다. 초기 농도를 50 *mg/l*로 조정했을 때는 15분 후 9.2 *mg/l*로 감소하였고, 30분에는 1.3 *mg/l* 그리고 1시간 후에는 검출되지 않았다. 25 *mg/l*의 H_2O_2를 넣었을 때도 50 *mg/l*의 H_2O_2를 넣었을 때와 유사하게 15분 후에 7.1 *mg/l*의 H_2O_2가 검출되었고 30분 후에는 0.89 *mg/l*로 감소하였으며 1시간 후에는 검출되지 않았다.

2단 반응기에서의 살균 효과

TiO_2로 코팅한 glass bead에 기포를 주입하면서 반응기를 2단으로 설치했을 때의 살균효과를 1단으로 설치했을 때와 비교한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 반응기를 2단으로 설치했을 경우 초기 개체수 7.3×10^3 cells/*ml*에서 1분 동안에 266 cell/*ml*로 96.4%의 살균효과를 나타내었고 이것은 1단으로 설치했을 경우의 95% 살균효과와 비교했을 때 약 1.4% 높은 효과를 나타내었

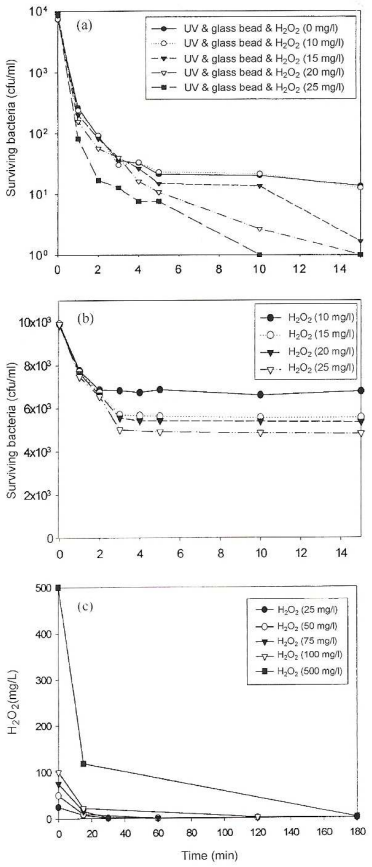


Fig. 6. (a) Synergistic effect of H_2O_2 on the bactericidal efficiency in the UV-TiO_2 photocatalytic system, (b) Bactericidal effect of H_2O_2 without UV-TiO_2 photoreaction, (c) Decrease of residual H_2O_2 concentration during reaction.

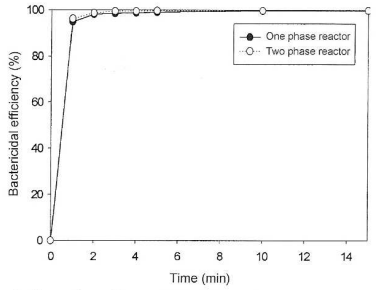


Fig. 7. Comparison of bactericidal efficiency between one-phase and two-phase photocatalytic system.

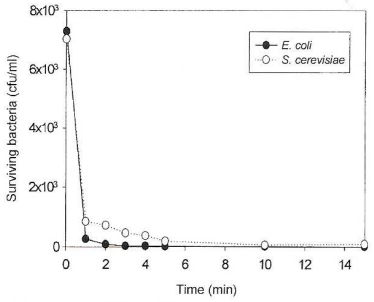


Fig. 8. Comparison of killing effect between *E. coli* and *S. cerevisiae*.

다. 15분 후 살균이 끝났을 때는 99.8%의 살균효과를 나타내어 1단 반응기를 사용할 때와 유사한 결과를 나타내었다.

세균과 효모에 대한 살균효과 비교

TiO_2를 코팅한 glass bead를 넣고 기포를 주입시키는 2단 반응기에서 균종간의 살균효과를 알아보기 위한 *E. coli*와 *S. cerevisiae*의 살균효과를 Fig. 8에 나타내었다. *E. coli*의 경우 초기 개체수 7.3×10^5 cells/*ml*에서 1분 동안에 266 cells/*ml*로 96.4%의 살균효과를 나타내었고 15분 후에는 99.8%의 살균효과를 내는 반면, 효모인 *S. cerevisiae*는 초기 개체수 7.0×10^3 cells/*ml*에서 1분 동안에 850 cells/*ml*로 87.9%의 살균효과를 보였고 15분 후에는 98.6%의 살균효과를 나타내었다. 따라서 2단 반응기를 사용했을 때 효모인 *S. cerevisiae* 보다는 *E. coli*에 대한 살균효과가 더 큰 것을 관찰하였다.

2단 반응기의 반응액에 NaClO를 첨가했을 때의 살균효과

H_2O_2와 같이 *E. coli*에 대한 살균효과를 증대시키기 위해 염소소독제의 하나인 NaClO의 유효 염소농도를 조절하면서 1단 반응기에 H_2O_2를 첨가했을 때와 동일한 방법으로 2단 반응기에서 실험을 수행하였다. 저농도의 유효 염소량을 0.5 *mg/l*, 1 *mg/l* 그리고 1.5 *mg/l*으로 각각 주입했을 때는 모든 농도에서 초기 1분 동안의 살균효과가 96.4%를 보였고 15분 살균 후에도 TiO_2를 코팅한 glass bead를 넣고 기포를 주입시키는 2단 반응기에서의 살균효과와 비슷한 결과를 나타내어 더욱 증가된 살균효과는 관찰되지 않았다. 그러나 유효 염소량을 10 *mg/l*, 30 *mg/l* 그리고 50 *mg/l*으로 각각 주입했을 경우 Fig. 9에서와 같이 초기 1분 동안의 살균율이 각각 97.7%, 98.5%, 99.6%를 나타내었고 15분 후에는 50 *mg/l*의 농도를 주입했을 때 99.98%의 높은 살균효과를 보였다.

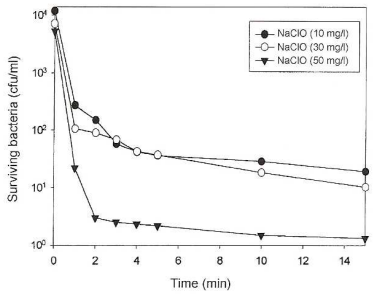


Fig. 9. Synergistic effect of NaClO on the bactericidal efficiency in the UV- TiO_2 photocatalytic system.

고 찰

자외선 광촉매 반응기를 이용한 살균실험에 이용된 광촉매 중 석영관에 박막증착시킨 것보다는 표면적이 더 넓은 glass bead에 코팅한 광촉매가 초기살균에 있어서 더욱 효과가 있었다. 또한 본 실험에 사용된 촉매들 모두 UV를 조사하면서 기포를 불어넣어 주었을 때 더 높은 살균효과를 나타냈는데 이는 조사된 UV에 의해 TiO_2로부터 생성된 전자와 정공이 폭기를 시킴으로써 증가된 용존산소와 반응하여 더욱 많은 OH 라디칼이 형성되었을 것으로 생각된다(1).

각 촉매별 살균효과에서 보면 코팅된 glass bead가 가장 우수하였으며, 다음은 박막증착된 석영관이었고, glass bead와 비슷한 효율을 보일 것으로 기대되었던 alginate bead는 예상외로 좋은 효과를 나타내지 못하였다. 그 이유는 alginate bead 역시 glass bead와 같이 bead 자체의 표면적은 넓지만 glass bead와는 달리 가볍고 말랑말랑하여 물이 순환할 때 고정되지 못하고 물의 흐름에 따라 이동하여 반응기의 한쪽으로 밀집하기 때문에 UV와 촉매간의 반응 표면적이 감소한 것으로 사료된다.

적은 양의 H_2O_2의 첨가에 의해 살균효과가 단시간에 높게 나타났으며 H_2O_2의 분해 역시 빨리 일어나는 것으로 보아 광촉매 살균시 소량의 H_2O_2를 첨가하는 것이 매우 효율적인 것으로 판

단된다.

반응기를 2단으로 설치할 경우 반응기가 하나일 때보다 좀 더 나은 살균효과를 나타내었고 *E. coli*와 *S. cerevisiae*의 살균 비교 실험에서는 세균보다는 효모인 *S. cerevisiae*의 살균효과가 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만 15분 동안의 살균 후에는 *S. cerevisiae* 역시 99%의 높은 살균효과를 나타내었다(4).

1단 반응기에서와 같이 살균효과를 보다 더 높이기 위해 2단 반응기에 살균제인 NaClO를 저농도와 고농도로 나누어 첨가하였을 경우 저농도에서는 특별한 살균효과가 나타나지 않았는데 이는 본 살균장치의 살균시간이 너무 짧아서 저농도의 염소량으로 염소 소독에 대한 기대 효과를 얻지 못한 것으로 생각되며 염소를 고농도로 높였을 경우 살균효과가 증가했음을 관찰할 수 있었다. 하지만 이 경우에는 수용액 내에서 염소 냄새가 발생했으며 따라서, 살균제를 첨가할 경우에는 염소보다는 과산화수소를 첨가하는 것이 더 바람직한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 조선대학교 학술연구비의 지원을 받아 연구되었음.

참고문헌

1. 강준원, 박훈수, 최광호. 1995. 이산화티타늄 광촉매에서의 광분해반응에 의한 유기물질 제거에 관한 연구. *J. Kor. Sci. Environ. Eng.* 17, 283-294.
2. 김현용, 조일형, 이홍근. 1999. TiO_2를 이용한 Humic acid의 광촉매분해에 대한 영향인자에 관한 연구. *Kor. J. Environ. Hlth. Soc.* 25, 26-30.
3. 이용근, 박정학, 이동수, 팽기정, 한강완. 1996. 분석화학. p.369-372. 圖書出版 喜重堂.
4. 전은주, 강성환, 김병욱, 임재명. 1999. 정수처리용 TiO_2 고정화 촉매 비교. 대한상하수도학회지. 13, 58-63.
5. 주현규. 1992. TiO_2 촉매를 이용한 광살균 효과. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* 35, 294-299.
6. Al-Ekabi, H., A. Safrazadeh-Amiri, J. Story, and W. Sifton. 1990. Advanced technology for destruction of organic pollutants by photocatalysis, in proceedings of a symposium on advanced oxidation processes. pp. 4-5. Toronto, Canada.
7. Anderson, M.C., M.J. Gieselmann, and Q. Xu. 1988. Titania and alumina ceramic membranes. *J. Membrane Sci.* 39, 243-258.
8. Benitz, F.J., J.B. Heredia, T. Gonzalez, and F. Real. 1995. Photo-oxidation of carbofuran by a polychromatic UV irradiation without and with hydrogen peroxid. *Ind. Eng. Chem. Res.* 34, 4099-4105.
9. Borgarello, E., J. Kiwi, E. Pelizzetti, M. Visca, and M. Gratzel. 1981. Sustained water cleavage by visible light. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 6324-6329.
10. Byrne, J.A., B.R. Eggins, N.M.D. Brown, B. McDinnery, and M. Rouse. 1998. Immobilisation of TiO_2 powder for the treatment of polluted water. *Appl. Catal. B : Environ.* 17, 25-36.
11. Cai, R., K. Hashimoto, K. Itoh, Y. Kubota, and A. Fujishima. 1991. Photokilling of malignant cells with ultrafine TiO_2 powder. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 64, 1268-1273.
12. Dillert, R., I. Fornefett, U. Siebers, and D. Bahnemann. 1996. Photocatalytic degradation of trinitrotolunene: influence of hydrogen peroxide. *J. Photochem. Photobio.* 94, 231-236.
13. Foster, N.S., A.N. Sancaster, R.D. Noble and C.A. Koval. 1995. Effect of organics on the photodeposition of copper in titanium dioxide aqueous suspension. *Ind. Eng. Chem. Res.* 34, 3865-3871.
14. Gaswami, D.Y., D.M. Trivedi, and S.S. Block. 1997. Photocatalytic disinfection of indoor air. *J. Sol. Energy Eng.* 119, 92-96.
15. Glaze, W.H., J.W. Kang, and K.H. Chapin. 1987. The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Eng.* 9, 335-352.
16. Glaze, W.H. and J.W. Kang. 1988. Advanced oxidation processes for treatment of groundwater contaminated with trichloroethylene and tetrachloroethylene. *J. Am. Wat. Works Asso.* 80, 57.
17. Glaze, W.H. and J.W. Kang. 1989. Descripton of a kinetic model for the oxidation of hazardous materials in aqueous media with ozone and hydrogen peroxide in aqueous media with ozone and hydrogen peroxied in a semi-batch reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* 28, 1573-1580.
18. Glaze, W.H. and J.W. Kang. 1989. Test of a kinetic model for the oxidation of organic compounds with ozone and hydrogen peroxide in a semi-batch reactor. *Ind. Eng. Chem. Res.* 28, 1580-1587.
19. Herrmann, J.M., C. Guillard, and P. Pichat. 1993. Heterogeneous photocatalysis : An emerging technology for water treatment. *Catal. Today* 17, 7-20.
20. Huang, N.P., M.H. Xu, C.W. Yuan, and R.R. Yu. 1997. The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO_2 particles on U937 cells. *J. Photochem. Photobio. A: Chemistry* 108, 229-233.
21. Ireland, J.C., P. Klostermann, E.W. Rice, and R.M. Clark. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1668-1670.
22. Kang, J.S., H.S. Park, and K.H. Choei. 1995. Photocatalytic degradation of organic pollutants over a TiO_2 semiconductor. *J. Kor. Sci. Environ. Eng.* 17, 283-294.
23. Kikuchi, Y., K. Sunada, T. Iyoda, K. Hashimoto, and A. Fujishima. 1997. Photocatalytic bactericidal effect of TiO_2 thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J. Photochem. Photobio.* 106, 51-56.
24. Kubota, Y., T. Shuin, C. Kawasaki, H. Kitamura, C.H. Sakai, K. Hashimoto, and A. Fujishima. 1994. Photokilling of T-24 human bladder canner cells with titanium dioxide. *Br. J. Cancer.* 70, 107-111.
25. Matsunaga, T. and M. Okochi. 1995. TiO_2-mediated photochmical disinfection of *Escherichia coli* using optical fibers. *Environ. Sci. Technol.* 29, 501-505.
26. Matthews, R.W. 1986. Photo-oxidation of organic material in aqueous suspensions of titanium dioxide. *Wat. Res.* 20, 569-578.
27. Matthews, R.W. 1990. Purification of water with near-U.V. illuminated suspensions of titanium dioxide. *Wat. Res.* 24, 653-660.
28. Ollis, D.F., E. Pelizzetti, and N. Serpone. 1991. Destruction of water contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 25, 1523-1529.
29. Pelizzetti, E., V. Carlin, C. Minero, and M. Gratzel. 1991. Enhancement of the rate of photocatalytic degradation on TiO_2 of 2-chlorophenol, 2,7-dichlorodibenzodioxin and atrazine by oxidizing species. *New J. Chem.* 15, 351-359.
30. Prairie, M.R., L.R. Evans, B.M. Stange, and S.L. Martinez. 1993. An investigation of TiO_2 photocatalysis for the treatment of water contaminated with metals and organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1776-1782.
31. Saito, T., T. Iwase, and T. Morioka. 1992. Mode of photocatalytic

bactericidal action of powdered semiconductor TiO_2 on mutans streptococci. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 14, 369-379.
32. Stevenson, M., K. Bullock, W.Y. Lin, and K. Rajeshwar. 1997. Sonolytic enhancement of the bactericidal activity of irradiated titanium dioxide suspensions in water. *Res. Chem. Intermed.* 23, 311-323.
33. Suri, R.P.S., J. Liu, D.W. Hand, J.C. Crittenden, D.L. Perram, and M. E. Mullins. 1993. Heterogeneous photocatalytic oxidation of hazardous organic contaminants in water. *Wat. Environ. Res.* 65, 665-673.
34. Tanaka, K., T. Hisanaga, and K. Harada. 1989. Photocatalytic degradation compounds in semiconductor suspension with added hydrogen peroxide. *New J. Chem.* 13, 5-7.
35. Wei, C., W.Y. Lin, Z. Zaina, N.E. Williams, K. Zhu, A.P. Kruzlc, R. L. Smith, and K. Rajeshwar. 1994. Bactericidal activity of TiO_2 photocatalyst in aqueous media: toward a solar-assisted water disinfection system. *Environ. Sci. Technol.* 28, 934-938.
36. Zepp, R.G. 1992. Hydroxyl radical formation in aqueous reactions(pH 3-8) of iron(II) with hydrogen peroxide : the photo-fenton reaction. *Environ. Sci. Technol.* 26, 313?319.

(Received February 21, 2001/Accepted March 26, 2001)

ABSTRACT : Killing Effects of UV-TiO_2 Photocatalytic System on Microorganisms

Jung Kon Kim, Yong Kook Shin[1], Young-Sang Lee[2], Yong-Ho Kim[2], and Si Wouk Kim*(Department of Environmental Engineering, [1]Chosun Bio-Materials Research Institute, Chosun University, Kwangju 501-759, [2]Division of Life Sciences, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea)

The killing effects of two types(one-phase reactor and two-phase reactor) of UV- TiO_2 photocatalytic system on the microorganisms have been studied. The UV-lamp which emits maximum 39 watts at 254 nm was prepared in these system. Three types of TiO_2 coating method were adopted. One type is thin film coated form on the quartz tube in the reactor and another one is surface rough coated form on the glass bead. The other one is TiO_2-mixed alginate bead form. UV irradiation was carried out for 1 min. In case of one phase reactor, the bactericidal efficiencies of *E. coli* by TiO_2-coated quartz tube and TiO_2-coated glass bead were 63.2% and 89.9%, respectively. In the air-bubbling system, the bactericidal efficiency was 95%, however, the efficiency decreased to 90.6% in the non-bubbling system. In the TiO_2-mixed alginate bead system, bactericidal efficiency was 86%. When H_2O_2 was treated (10, 15, 20, and 25 *mg/l*) to the TiO_2-coated glass bead reactor, bactericidal efficiency significantly increased according to the concentration of H_2O_2. Two phase reactor showed more elevated efficiency. *E. coli* was more sensitive to the reaction than *S. cerevisiae.*

특 허 증

CERTIFICATE OF PATENT

특 허 제 10-0586867 호
(PATENT NUMBER)

출원번호 (APPLICATION NUMBER) 제 2004-0038699 호

출 원 일 (FILING DATE:YY/MM/DD) 2004년 05월 29일

등 록 일 (REGISTRATION DATE:YY/MM/DD) 2006년 05월 29일

발명의명칭 (TITLE OF THE INVENTION)

펌프를 구비하는 유기성 폐기물 파쇄기

특허권자 (PATENTEE)

학교법인조선대학교

광주 동구 서석동 375번지

발명자 (INVENTOR)

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

(THIS IS TO CERTIFY THAT THE PATENT IS REGISTERED ON THE REGISTER OF THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE.)

2006년 05월 29일

특 허 청 장

COMMISSIONER, THE KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

등 록 사 항

특 허 등록 제 10-0586867 호

발 명 자

김시욱(590815-1******)
광주광역시 남구 봉선동 삼익 Apt. 201동 405호

김중곤(740528-1******)
전라남도 화순군 화순읍 부영3차아파트 304동 1007호

특 허 증

특 허 제 0439195 호

출 원 번 호	제 2001-0047216 호
출 원 일	2001년 08월 06일
등 록 일	2004년 06월 25일

발명의 명칭 광촉매 반응에 의한 용수 살균 방법 및 장치

특 허 권 자 학교법인조선대학교

광주 동구 서석동 375번지

발 명 자 등록사항란에 기재

위의 발명은 특허법에 의하여 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

2004년 06월 25일

특 허 청 장

등 록 사 항

특 허 등록 제 0439195 호

발 명 자

김시욱(590815-1056518)
광주광역시 남구 봉선동 삼익2차 아파트 201동 405호

김중곤(740528-1558810)
광주광역시 남구 봉선1동 라인광장 103동 306호

김용호(601111-1822814)
충청남도 천안시 신방동 897 두래현대 아파트 205-803호

이영상(620712-1019614)
충청남도 천안시 신방동 909 한라동백 2차 아파트 107 1602 호

감사의 글

환경생태 및 미생물 실험실에서 생활한지도 어느덧 10년이 넘어가고 있습니다. 강산이 변하는 세월을 뒤로하고 이제 그동안의 소중한 결과들이 이 한권의 논문에 담겨져 있습니다. 본 논문을 완성하기까지 많은 사랑과 격려를 아끼지 않으신 주위의 많은 분들께 깊은 감사의 말씀을 전해드리고자 합니다.

참으로 많이 부족한 저에게 깊은 관심과 애정으로 보살펴 주시고, 때로는 따끔한 충고와 엄한 질타로 학문의 길을 열어 여기까지 이끌어주신 지도교수님이신 김시욱 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

바쁘신 와중에도 부족한 논문을 심사해주시며 지도와 조언을 아끼지 않으신 함경수 교수님, 이인화 교수님, 신현재 교수님 전남대학교 김성준 교수님께 감사드립니다. 그리고 항상 아낌없는 사랑으로 격려해 주신 정경훈 교수님, 동신대학교 김홍식 교수님께 감사드립니다. 또한 학위과정동안 저에게 많은 학문적 지식과 가르침으로 조언해 주신 정오진 교수님, 신대윤 교수님, 이성기 교수님, 최형일 교수님, 전영남 교수님께 이 자리를 빌어 감사드립니다.

본 논문이 완성되기까지 학위과정동안 힘든 일을 마다하지 않고 도와주며 함께 격려해준 환경미생물 실험실의 김덕규 박사님, 조재훈, 김희곤, 김진권, 조건형, 이상귀, 정효기, 김준휘, Phan Trong Nhat, Le Nhat, 한귀환, 오백록, 고병혁, 홍성조, 임성훈, 김길섭, 이지은, 손주영 후배님에게 감사드립니다. 그리고 늘 곁에서 격려와 조언해 주시는 박진열 선배님, 송영일 박사님, 김현중 박사님, 김삼혁 박사님, 문옥란 선배님, 박주영 후배님께 감사드리며, 항상 격려해주신 박승렬 선배님과, 나의 소중한 친구들인 하태춘, 정훈, 김선민 그리고 환경학과 동기들에게 감사의 마음과 무심함에 대한 미안함을 전합니다. 또한 늘 같은 건물에서 동거동락했던 송형운, 설명수, 박상일, 황철호, 김성천, 임문섭, 임병갑, 한성우, 송진영, 유창훈, 김세영 후배님에게도 감사의 마음을 전하며, 본 논문의 발효조 제작과 부족한 후배를 늘 걱정하는 세심한 배려와 조언을 아끼지 않으신 코바이오텍(주)의 조영찬 선배님께도 깊은 감사를 드립니다.

사랑하는 부모님

어느덧 하얗게 변해버린 아버지의 흰머리와 거칠어져만 가는 어머니의 살결에 못난 자식의 가슴은 한없이 시리기만 합니다. 힘든 시기에도 무한한 믿음과 사랑으로 돌봐주신 은혜만큼 보답해드리지 못해 송구하였습니다. 이제 그 무엇과도 바꿀 수 없는 깨우침과 넓디 넓으신 은혜에 대한 보답으로는 너무나 작지만 이 논문을 두 분께 바치며 다시 한번 두 분의 은혜에 감사드립니다.
공부에 전념할 수 있게 여러 가지로 세심하게 신경써준 하나밖에 없는 여동생 미선이와 매제에게도 감사의 마음을 전합니다.

늘 사위의 건강과 앞날을 위해 기도해주시는 장모님과 이모님 그리고 처남들께도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 항상 곁에서 힘이 되어주고 믿어준 세상에서 가장 사랑하는 인생의 반려자인 소중한 나의 아내 이경희님께 감사하며 논문과 함께 얻은 소중한 딸 정민이와 이 기쁨을 함께 하고 싶습니다.

그 외 제가 살아가면서 거쳐간 많은 분들께 감사의 말을 전하며, 여러분들의 도움으로 이제 이 글을 쓸 수 있기에 다시 한번 고개숙여 감사의 마음을 전합니다.

2007년 1월 논문을 마치며...

저작물 이용 허락서

학 과	생물신소재학과	학 번	10141160	과 정	박사
성 명	한글: 김 중 곤 한문 : 金 仲 坤 영문 : KIM JUNG KON				
주 소	광주광역시 북구 양산동 청암아파트 101동 911호				
연락처	E-MAIL : kjk9207@daum.net				
논문제목	한글 : Pilot-scale 3단계 발효시스템을 이용한 유기성 폐기물로부터 고효율 메탄 생산 기술 개발				
	영문 : Development of a pilot-scale three-stage fermentation system for high-efficiency methane production from organic wastes				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대( )

2007년 2월 23일

저작자: 김 중 곤 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하