

음식물 쓰레기와 폐활성 슬러지를 이용한 생물학적 수소생산 및 수소생산 미생물 군집분석

^{1,2}김 동 건 · ^{1,2}이 윤 지 · ¹김 동 임 · ¹김 지 성 · ²유 명 진 · ³박 대 원 · ⁴김 미 선 · † ¹상 병 인
¹한국과학기술연구원 수질환경 및 복원연구센터, ²서울시립대학교 환경공학과,
³서울산업대학교 에너지환경대학원, ⁴한국에너지기술연구원 바이오매스연구센터
(접수 : 2005. 11. 12., 게재승인 : 2005. 11. 30.)

Continuous Bio-hydrogen Production from Food Waste and Waste Activated Sludge

Dong-Kun Kim^{1,2}, Yun-Jie Lee^{1,2}, Dong-Im Kim¹, Ji-Seong Kim¹, Myong-Jin Yu², Dae-Won Pak³,
Mi-Sun Kim⁴, and Byoung-In Sang^{1†}

¹Water Environment & Remediation Research Center, Korea Institute Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

²Department of Environmental Engineering, University of Seoul, Seoul 130-743, Korea

³The Graduate School of Energy & Environment, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea

⁴Biomass Research Center, Korea Institute of Energy Research, DeaJeon 305-343, Korea

(Received : 2005. 11. 12., Accepted : 2005. 11. 30.)

Batch experiments were performed to investigate the effects of volumetric mixing ratio (v/v) of two substrates, food wastes (FW) and waste activated sludge (WAS). In batch experiments, optimum mixing ratio for hydrogen production was found at 10~20 v/v % addition of WAS. CSTR (Continuous Stirred tank reactor) was operated to investigate the hydrogen productivity and the microbial community under various HRTs and volumetric mixing ratio (v/v) of two substrates. The maximum yield of specific hydrogen production, 140 mL/g VSS, was found at HRT of 2 day and the volumetric mixing ratio of 20 : 80 (WAS : FW). The spatial distribution of hydrogen producing bacteria was observed in anaerobic fermentative reactor using fluorescent in situ hybridization (FISH) method.

Key Words : Food waste, waste activated sludge, bio-hydrogen production, anaerobic fermentation, fluorescent in situ hybridization (FISH), specific hydrogen production yield

서 론

바이오매스 (biomass)란 어느 시점에 임의의 공간 내에 존재하는 특정한 생물군의 양을 중량이나 에너지량으로 나타낸 것으로서, 원래 생태학의 학술용어로 생물량 또는 생물현존량을 의미하고 있다. 지구상에 태양에너지를 이용하여 광합성으로 생산되는 모든 유기물 및 이 유기물을 가공, 섭취, 소비하는 과정에서 생산되는 생물 유기체를 바이오매스라고 하고 이를 원료로 얻어지는 에너지를 바

이오 에너지라고 한다. 이러한 재생자원인 바이오매스로부터 에너지를 생산하는 여러 기술 중 생물학적 수소생산기술은 연료전지의 발전에 힘입어 차세대 청정에너지 생산 기술로써 많은 주목을 받는 분야이다(1). 특히 혐기성 암발효에 의한 수소생산 기술은 이러한 재생자원인 바이오매스를 처리함과 동시에 단위 질량당 에너지 밀도가 높고, 연료전지기술의 발전에 따라 에너지 효율이 높으며, 규모에 따라 에너지 효율이 비교적 일정한 수소를 효과적으로 생산한다는 특징이 있다(2, 3). 또한 약 5,700톤/일 정도로 발생하는 폐활성 슬러지 (WAS)와 약 11,000톤/일 정도로 발생하는 음식물 쓰레기 (FW)와 같은 유기성 폐기물의 육상 매립 및 해양투기가 금지되어 이들의 처리 방안이 시급한 실정에서 유기물 함량이 높은 이러한 바이오매스를 처리함과 동시에, 재생 가능하고, 높은 에너지 효율 (122 kJ/g)을 보이면서 연료전지를 통해 쉽게 전기로 전환할 수

† Corresponding Author : Water Environment & Remediation Research Center, Korea Institute Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

Tel : +82-2-958-6751, Fax : +82-2-958-5839

E-mail : biosang@kist.re.kr

있어서 향후 2,100년에는 기존의 주요 에너지원인 화석 연료에 대체 가능한 청정에너지로 인식되는 수소를 생산한다는 면에서 매우 매력적인 분야이다(4). 그러나 혐기성 암발효 조건에서 생물학적 수소의 생산에 대한 연구는 아직까지 초기 단계의 연구가 진행되고 있으며, 실제 유기성 폐자원을 기질로 이용하는 공정에 대한 적용 예가 매우 적다. 또한 아직까지 폐활성 슬러지나 음식물 쓰레기를 이용한 생물학적 수소생산에 대한 명확한 운전인자가 확립되어 있지 않다. 하지만 이러한 두 폐자원을 적절한 비율로 혼합하여 생물학적 수소생산을 위한 기질로 동시에 처리할 경우, 서로 다른 성장상을 보이는 두 폐자원의 상승작용 및 보완작용을 기대할 수 있다(5). 따라서 본 연구에서는 회분식 실험을 통해 두 유기성 폐기물의 적정 혼합비율을 도출하고, 이를 바탕으로 최적의 혼합비율 도출과 연속적인 수소생산에 미치는 HRT의 영향을 확인하였고 동시에 FISH (Fluorescent in situ hybridization) 분석을 통하여 반응기 내의 미생물의 군집분포를 확인하였다.

재료 및 방법

폐활성 슬러지 및 음식물 쓰레기의 전처리

실험에 사용된 폐활성 슬러지는 서울에 위치한 J 하수처리장에서 채취하였으며, 샘플링 위치는 2차 침전조에서 반송되는 반송 슬러지를 채취하였다. 샘플링 후 1일 동안 중력 농축 후 원심분리기를 이용하여 재 농축하여 슬러지의 MLSS의 농도가 약 40,000 mg/L가 되도록 조절하였다. 알카리 (5 N KOH) 용액을 이용하여 pH 12로 농축된 슬러지를 가용화하는 방법으로 전처리된 폐활성 슬러지를 사용하였다. 음식물 쓰레기의 경우, KIST 식당에서 발생하는 음식물 쓰레기를 정기적으로 수거하여 사용하였으며, 2배의 세척수 (V/V)로 세척하여 염분의 영향을 제거한 후 가정용 믹서기로 균일하게 파쇄하여 사용하였다. 이때 사용된 폐활성 슬러지와 음식물 쓰레기의 특성은 Table 1과 같다. 각각 준비된 두 유기성 폐기물은 일정한 비율 (FW : WAS (V/V))로 혼합한 후, 교반기를 이용하여 강하게 교반하면서 초기 pH 8이 되도록 5 N KOH를 이용하여 조절하였다.

Table 1. Composition of pre-treated WAS and FW

pH	VSS /TSS (mg/L)	SCODcr (mg/L)	Alkalinity (mg/L)	Component(%)					
				C	H	O	N	S	
WAS	12	4,020 /5,060	3,750	4,500	41	7	23	8	1
FW	4.5	154,000 /165,000	75,440	N.D	47	7	26	3	N.D

N.D.: not detected

식종 미생물

회분식 및 연속식 실험을 위해 식종된 미생물은 모두 실험을 시작하기 직전에 J 하수처리장의 혐기성 소화조에서 채취하였으며, 채취 후 약 3 mm의 채를 이용하여 불순물을 제거하였다. 그리고 Hawkes(7)와 Lay 등(8)이 제시한

방법을 참고하여 열에 약한 메탄 생성균을 사멸시키고, 포자를 형성하는 수소 생산균만 남도록 100°C에서 20분간 가열한 후 반응기에 주입하였다.

회분식 실험

회분식 실험에 사용한 반응기의 형태는 Fig. 1과 같이 총 용적이 1,250 mL인 갈색병을 사용하였다. 이때 유효용적과 head space는 각각 1 L와 250 mL이 되도록 하였다. 시료채취 및 가스분석을 위하여 stainless 재질로 된 바늘 끝부분을 가스용 3 way valve로 끼워 시료나 가스 샘플링 이후에는 항상 혐기성 상태가 유지되도록 하였다. 실험조건에 맞게 준비된 각 회분 반응기는 온도 조절 및 교반이 가능한 shaking incubator에 넣고 35°C, 150 rpm으로 고정하여 운전하였다.

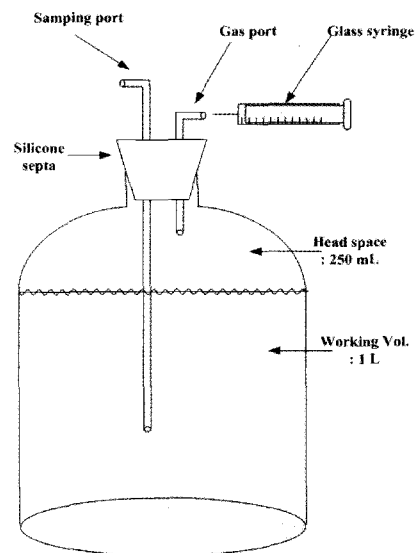


Figure 1. Schematic batch reactor for bio-hydrogen production.

폐활성 슬러지를 기질로 이용할 경우 총 용적이 1,250 mL인 갈색병에 각각의 전처리 방법으로 처리된 폐활성 슬러지를 540 mL를 취하고, 완충용액 유·무에 대한 영향을 파악할 때는 초기 pH와 함께 조절된 완충용액 350 mL 또는 증류수 350 mL를 첨가하였다. 그리고 열처리된 혐기성 미생물 110 mL를 식종하여 첨가한 용액의 총 부피가 1 L가 되고, head space가 모두 250 mL가 되도록 하였다. 이후, 혐기성 조건을 위하여 20분 이상 argon gas를 이용하여 탈기를 충분히 실시한 후 실리콘 마개로 빠르게 밀봉하였다.

연속식 실험

Fig. 2와 같이 아크릴 재질로 Continuous Stirred Tank Reactor(CSTR) 형태의 반응기를 제작하여 운전하였으며, 총 용적이 4 L가 되도록 하였으며 유효용적은 3 L이었다. 반응기 내부는 속도를 조절할 수 있는 임펠러를 설치하고 반응기 내벽에 baffle을 설치하여 유기성 폐기물과 같은 고농도의 고형물이 잘 섞이도록 하였다. 또한, pH 전극이 설치되어 1 M KOH, HCl을 이용하여 pH가 적정 범위를 벗어날 경우 자동으로 pH가 조절되도록 하였다. 반응기 외

부는 항온기와 연결하여 일정한 온도 (35°C)가 되도록 하였다. 발생한 가스는 반응기 내부에 형성된 수소의 분압으로 수소생산 효율이 저하되지 않도록 wet gas-meter (Model W-NK-0.5, SHINAGAWA, Japan)를 이용하여 대기압 이상의 기체가 발생할 때 바로 배출과 동시에 측정이 가능하도록 하였다(6). 유입수는 정량 펌프를 이용하여 원하는 체류시간 (HRT)이 유지되도록 조절하였으며, 유출수 라인을 U자 형태로 설치하여 외부의 기체가 유입되지 않으면서 유입된 양 만큼 유출관을 통해 배출되도록 하였다.

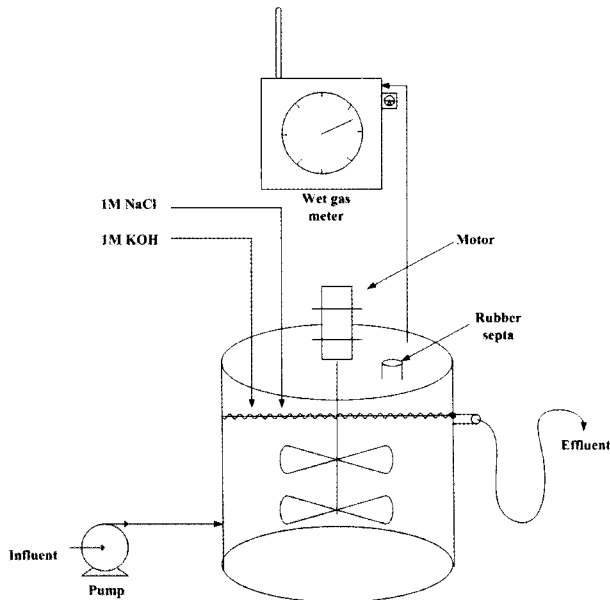


Figure 2. Schematic apparatuses for continuous bio-hydrogen production.

운전 초기 전처리된 폐활성 슬러지와 음식물 쓰레기를 각각 90 : 10의 비율 (V/V)로 혼합한 후 pH가 8이 되도록 조절된 혼합기질 1,500 mL에, K₂HPO₄ (pH 9.1)와 KH₂PO₄ (pH 4.2)를 1 M로 각각 조제한 후 두 시약의 양을 조절하여 pH 8이 되도록 조절된 phosphate 완충용액 1 L를 첨가하였다. 여기에 열처리된 혐기성 미생물 500 mL를 식중하였다. 반응기를 완벽히 밀봉하고 150 rpm으로 교반하면서 하부의 유출구 라인으로 argon gas를 20분간 주입하여 혐기성 상태가 되도록 하였다. 또한 반응기 외부에 항온기와 연결하여 35°C가 유지되도록 하였다. 처음 1일 동안은 기질을 주입하지 않고 운전하다가, 24시간이 지난 시점부터 유입수 펌프를 가동하여 수리학적 체류시간 (HRT)가 6일이 되도록 하였다. 이후, 안정상태에 도달하면 전처리된 폐활성 슬러지의 비율을 20%로 증가시키거나 HRT를 6일, 3일, 2일로 조절하여 유기물 부하에 따른 수소생산량의 변화를 관찰하였다.

분석방법

사용된 폐활성 슬러지와 음식물 쓰레기의 분석은 Standard Method(9)에 준하여 실험하였다. 가스 분석은 GC (HP 5880A, USA)를 이용하였으며 칼럼은 Porapak Q (Supelco, Inc, 6 ft x 1/8 in, SS, 80/100 mesh)를 이용하였

고, 운전조건은 오븐 50°C, 인젝터 80°C 그리고 검출기의 온도를 110°C로 하였으며 carrier gas로는 Ar 가스를 30 mL/min의 유속으로 주입하였다. 각 시간별 가스발생량은 측정된 가스량과 가스 구성비의 변화를 고려하여 계산하였으며, 이를 표준상태 (0°C, 1 atm)의 건조조건으로 환산하였다.

결과 및 고찰

회분식 실험 결과

전처리된 폐활성 슬러지와 음식물 쓰레기의 비율을 달리하여 회분식 실험을 수행한 결과, Fig. 2에서와 같이 음식물쓰레기를 100%한 경우보다 폐활성 슬러지의 혼합비율이 10~20%일 때 가장 높은 수소생산량을 나타내었다. 일반적으로 유기물의 농도가 높을수록 높은 수소생산을 나타내지만, 음식물 쓰레기만을 주입한 경우보다 폐활성 슬러지를 일정비율 혼합할 경우, 음식물 쓰레기에는 존재하지 않고 폐활성 슬러지에 존재하는 알카리도, 미량 영양물질 및 단백질 등이 공급되어 상호보완작용에 의해 높은 수소생산을 나타내었기 때문에 판단된다. 하지만 폐활성 슬러지의 비율이 40%인 경우에는 약 170시간 이후부터 메탄이 발생하여 오히려 생성된 수소가 소비되는 반응이 일어났다. 또한 운전시 pH는 초기에 생성된 유기산에 의해 pH 8에서 약 pH 6-7의 범위로 떨어졌지만, 첨가된 완충용액에 의해 실험기간동안 지속적으로 pH 6 이상으로 유지되었다.

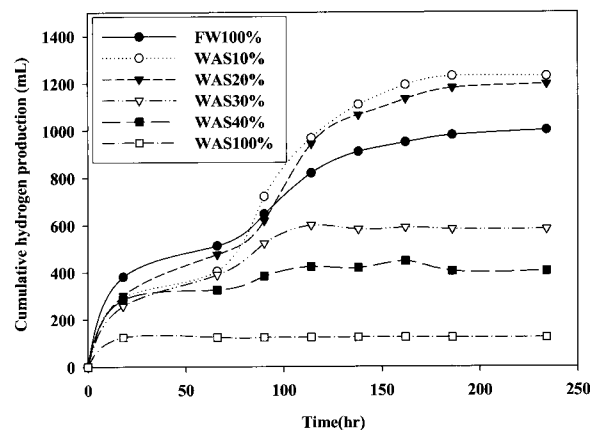


Figure 3. Effect of mixing ratio (v/v %) of WAS and FW on bio-hydrogen production.

연속 운전 결과

음식물 쓰레기와 폐활성 슬러지의 혼합비율 및 HRT를 변화시켜 실험한 결과 다음 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다. Fig. 4에서와 같이 HRT를 줄여 유기물의 부하를 증가시킬수록 수소생산량이 급격하게 증가하였으며, 폐활성 슬러지의 비율을 FW : WAS = 80 : 20 (V/V)로 증가시킨 경우에도 안정적인 수소생산을 나타내었다.

특히 HRT가 2일인 경우, FW : WAS = 80 : 20 (V/V)의

비율에서 140 mL H₂/g VSS의 높은 수소생산율을 얻을 수 있었다. 또한 이때의 수소 생산율도 7.9 g H₂/kg VSS/h로 매우 높았다. 이와 같이 2일의 짧은 HRT 에서도 미생물의 wash out 없이 안정적인 수소 생산율을 확인하였는데, 이러한 이유로는 Fig. 5와 6에서와 같이 미생물들이 음식물 쓰레기나 폐활성 슬러지를 담체로써 이용했기 때문으로 추측된다. 다만 약 30일 이후에 가스 발생량이 너무 많아 유출 라인에 가스가 생성됨으로써 운전상의 문제로 반응기내로 공기가 유입되어 수소생산량이 급격히 떨어졌다.

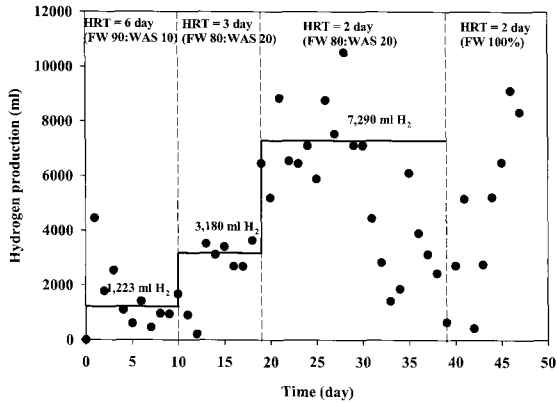


Figure 4. Time course of hydrogen production under various HRTs and mixing ratios of FW and WAS.

다음 Fig. 5는 반응조 내부의 미생물을 SEM으로 분석한 결과로써, 수소생산 미생물들이 기질 (음식물 쓰레기 또는 폐활성 슬러지)의 내부에서 다량 존재하는 것을 확인하였다. 또한 이러한 미생물의 크기는 대부분이 약 2~3 μm이며, rod 형태로 균집형태로 존재하였다.

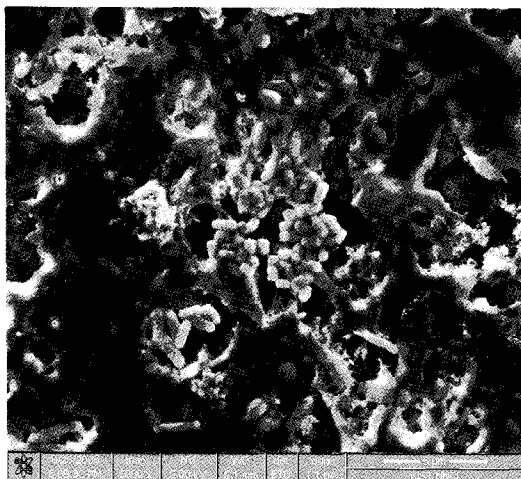


Figure 5. Observation of hydrogen-producing bacteria in CSTR using SEM.

연속운전 반응기내에 존재하는 수소생산미생물들의 존재여부와 성장형태를 관찰하기 위해 본 실험에서는 16s rRNA-targeted probe인 ARC915, LGC354A, LGC354B, LGC354C를 사용하여 FISH 분석을 실시하였다(10). 사용된 probe의 염기배열과 조성은 다음 Table 2에 나타내었다.

DAPI 염색 (blue)을 통하여 모든 미생물을 관찰하도록 하였으며, LGC354A-C (red)는 수소 생산균으로 알려진 *Clostridium*. sp. 및 *Bacillus* sp.를 분석하기 위함이다. 사용된 형광 염료로는 ARC915는 fluorescein으로 LGC354A-C는 Cy-5로 각각 라벨 되었다. Fig. 6은 FISH 분석결과이며, (a)는 DAPI 염색 (blue), 그리고 LGC354A-C (red)가 겹쳐진 모습이며, (b)는 LGC354A-C (red)만의 모습이다. 사용된 기질이 음식물과 슬러지를 이용하므로 DAPI 염색시 이러한 물질들의 영향이 있었으며, Fig. 6에서와 같이 음식물 ((a)의 둥근 형태)로 추정되는 주변에 수소 생산 미생물이 달라붙어 있는 모습이 관찰되었다. 하지만 음식물이나 슬러지를 기질로 이용하는 본 실험의 경우, 두 물질이 자체의 발광현상에 의하여 발광되어 나타남으로써, 이러한 물질을 이용 시 이러한 부작용을 제어하는 미생물 샘플의 전처리 방법에 대한 고려가 더욱 필요하다고 판단되어진다.

Table 2. 16s rRNA targeted oligonucleotide probes used in this study

Probe	Sequence(5'-3')	Target site	Specificity	FA conc. (%)
LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	354-371	part of <i>firmicutes</i>	35
LGC354B	CGGAAGATTCCTACTGC	354-371	part of <i>firmicutes</i>	35
LGC354C	CCGAAGATTCCTACTGC	354-371	part of <i>firmicutes</i>	35



Figure 6. Fluorescent in situ hybridization (FISH) ((a) Combined images of DAPI stain and H₂-producing bacteria, (b) Image of only H₂-producing bacteria).

요약

- 회분식 실험결과 유기물의 함량이 높은 음식물만을 기질로 이용한 경우보다 폐활성 슬러지의 혼합비율이 10~20%일 때 더 높은 수소생산을 나타내었다. 또한 폐활성 슬러지의 혼합비율이 40%인 경우에는 메탄이 발생하여 생성된 수소가 소모되는 반응을 나타내었다.
- 연속 실험의 경우 HRT를 줄여 유기물의 부하를 증가시킬 경우 수소생산량이 급격히 증가하였으며, HRT 2일까지는 미생물의 wash out 없이 안정적 수소생산을 보였다.
- 음식물과 폐활성 슬러지를 이용한 연속 운전을 HRT와 두 기질의 비율을 달리하여 운전한 결과 2일의 HRT와 FW : WAS = 80 : 20의 비율에서 140 mL H₂/g VSS의 높은 수소생산율을 얻을 수 있었다.

4. 음식물 쓰레기와 폐활성 슬러지의 비율을 적절히 혼합할 경우, 수소생산의 상승작용을 할 수 있는 가능성을 확인하였다.
5. SEM과 FISH 분석을 통하여 반응조 내의 수소 미생물의 공간적 분포 및 형태를 관측하였으며, 음식물이나 슬러지 주변에 많은 수소생산 미생물이 관측되었다.

감 사

이 연구(논문)은 과학기술부의 지원으로 수행하는 21세기 프론티어 연구개발사업 (수소에너지사업단) 및 에너지관리공단의 지원으로 수행하는 에너지 자원화 사업의 선행연구의 일환으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Scott, D. S. (2004), Hydrogen-the case for inevitability, *Int. J. Hydrogen energy* **29**, 225-227.
2. Lay, J. J., Lee, Y. J., and T. Noike (1999), Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solids waste, *Wat. Res.* **33**, 2579-2586.
3. Das, D. and T. N. Veziroglu (2001), Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *Int. J. Hydrogen Energy* **26**, 13-28.
4. Dunn, S. (2002), Perspectives towards a hydrogen future, *Cogeneration and on site power production* **3**, 55-60.
5. Kim, S. H., Han, S. K., and H. S. Shin (2004), Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge, *Int. J. Hydrogen Energy* **29**, 1607-1616.
6. Mizuno, O., Dinsdale, R., Hawkes, F. R., Hawkes, D. L., and T. Noike (2000), Enhancement of hydrogen production from glucose by nitrogen gas sparging, *Bioresource. Technol.* **73**, 59-65.
7. Hawkes, F., Dinsdale, R., Hawkes, D., and I. Hussy (2002), Sustainable fermentative hydrogen production :challenges for process optimization, *Int. J. Hydrogen Energy* **27**, 1339-1347.
8. Lay, J. J. (2000), Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen, *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 269-278.
9. APHA, AWWA, and WPCF (1998), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th. ed., APHA, Washington, D. C.
10. Ahn, Y. H., Park, E. J., Oh, U. K., Park, S. H., Webster, G., and A. J. Weightman (2005), Biofilm microbial community of a thermophilic trickling biofilter used for continuous biohydrogen production, *FEMS Micro. letters* **249**, 31-38.