

각종 유기성 폐수로부터 *Clostridium butyricum* 및 *Rhodopseudomonas sphaeroides*에 의한 수소생산

윤영수, 김현경, 유혜연, 이인구, 김미선
한국에너지기술연구소 대체에너지부 바이오매스연구팀

Hydrogen gas production by fermentation from various organic wastewater using *Clostridium butyricum* NCIB 9576 and *Rhodopseudomonas sphaeroides* E15-1

Young-Sue Yoon, Hyun-Kyung Kim, Hye-Yeon Ryu, In-Gu Lee and Kim, Mi-Sun
Biomass Research Team, Korea Institute of Energy Research Dae-Jon, Korea 305-343

Abstract

Anaerobic fermentation using *Clostridium butyricum* NCIB 9576, and photo-fermentation using *Rhodopseudomonas sphaeroides* E15-1 were studied for the production of hydrogen from Makkoli, fruits (orange & apple, watermelon & melon) and Tofu wastewaters.

From the Makkoli wastewater, which contained 0.94 g/l sugars and 2.74 g/l soluble starch, approximately 49 mM H_2 /l wastewater was produced during the initial 18h of the anaerobic fermentation with pH control between 6.5-7.0. Several organic acids such as butyric acid, acetic acid, propionic acid, lactic acid and ethanol were also produced. From Watermelon and melon wastewater, which contained 43 g/l sugars, generated about approximately 71 mM H_2 /l wastewater was produced during the initial 24 h of the anaerobic fermentation. Tofu wastewater, pH 6.5, containing 12.6 g/l soluble starch and 0.74 g/l sugars, generated about 30 mM H_2 /l wastewater, along with some organic acids, during the initial 24 h of anaerobic fermentation. Makkoli and Tofu wastewaters as substrates for the photo-fermentation by *Rhodopseudomonas sphaeroides* E15-1 produced approximately 37.9 and 22.2 μ M H_2 /ml wastewaters, respectively for 9 days of incubation under the average of 9,000-10,000 lux illumination at the surface of reactor using tungsten halogen lamps. Orange and apple wastewater, which contained 93.4 g/l, produced approximately 13.1 μ M H_2 /ml wastewater only for 2 days of photo-fermentation and the growth of *Rhodopseudomonas sphaeroides* E15-1 and hydrogen production were stopped.

1. 서 론

바이오매스로부터 생물학적 수소생산은 대체·청정 에너지 생산과 아울러 유기성 폐기물을 처리할 수 있는 기술로써 에너지 생산과 환경처리의 두 가지 목적에 부합된다. 식품공장 폐수, 하천 슬러지, 농산 시장 폐기물 및 음식 쓰레기와 같은 유기성 폐자원은 국내에도 가용량이 많은 자원이며, 동시에 2002년 부터는 법률로 매립이 금지되는 폐기물이기도하다. 일본을 비롯한 선진국에서는 최근 식품 가공폐수 및 슬러지로부터 생물학적으로 수소를 생산하기 위하여 지난 8년간 ‘환경조화용 수소제조기술개발’이라는 대형 프로젝트가 약 290억원의 규모로 활발히 연구되었다.

식품공장 폐수 중에서도 두부 및 막걸리 제조 폐수는 BOD, COD가 상당히 높아서 수질 오염의 주원인이 되고 있으며, 자체내의 재래식 폐수처리 시설을 갖춘 제조장에서 폐수 자체가 전분 및 당의 함량이 높고 질소원 농도가 낮아 효율적인 처리가 어려운 것으로 나타나고 있다 (1). 특히 재래식 처리 공정 중 pH를 비롯한 제반 조건이 산 생성균 및 메탄 생성균의 공존이 어려워져서 이로 인한 폐수중 유기물질의 분해가 지연되거나 제한되어 처리효율이 일정하지 않아서, 광합성 박테리아를 이용한 새로운 폐수 처리 방법이 연구되고 있으며, 국내 적용의 경우도 보고되고 있다 (2, 3, 4).

1970년대 에너지 위기 이후 수소에너지의 미래를 전망하는 연구자에 의해 태양광을 이용한 생물학적 수소생산은 계속 연구되었

고, 태양광을 이용하여 *cyanobacteria*에 의한 직접적인 물 분해로부터 광합성 작용에 의해 이산화탄소를 고정화해서 생성된 탄수화물을 수소로 분해하는 간접적인 물분해 기술이 축적되어 왔다. 최근에는 각종 유기물로부터 발효에 의한 수소생산이 일본 기술에 의해 연구되고 있다.

Clostridium butyricum NCIB 9576은 분지된 대사경로를 갖는 절대 혐기 박테리아로 각종 당과 아미노산을 분해하여 광원없이 수소를 발생한다. 이 균주는 포도당 1 M로 부터 최대 2.35 M의 수소를 생산하며, 동시에 lactate, butyrate, acetate 등의 유기산을 축적하는 것으로 보고되었으며, 분해기질의 범위가 넓어서 전분, xylan, pectin과 같은 고분자 물질을 비롯하여 올리고당, 이당류, 단당류, glycerol, sorbitol, manitol로부터 우수한 수소생산을 나타낸다(5).

Purple non-sulfur bacteria인 *Rhodospseudomonas sphaeroides* E15-1은 광합성 조건에서 단순 유기산으로부터 수소를 효율적으로 생산하며, 당으로부터 수소 전환율은 비교적 낮아서 약 32 %에 불과한 반면 (6), 유기산으로부터 수소생산 효율은 높아서 lactate의 경우 72-80 %로 알려져 있다.

본 연구에서는 유기성 폐자원인 식품공장 폐수(막걸리, 두부제조폐수), 농산시장 폐기물로부터 *Clostridium butyricum* NCIB 9576 및 광합성 미생물 *Rhodospseudomonas sphaeroides* E15-1를 이용해서 수소를 생산을 검토하였고, 이러한 자원으로부터 생물학적 방법에 의한 대량 수소생산 가능성을 밝히는 것을 연구 목표로 하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 균주

혐기수소 생산은 중온 절대혐기 세균인 *Clostridium butyricum* NCIB 9576을 배양하였으며, 광합성수소 생산에는 Purple non-sulfur bacteria인 *Rhodospseudomonas sphaeroides* E15-1을 이용하였다. 이 균주는 이화여대 생물학과에서 분리 동정된 균주이다.

2.2 유기성 폐수

막걸리 폐수는 대전 탁주 합동제조장의 발효조 세척수에서 발생하는 폐수를 수거하였으며, 두부폐수는 대전시 송강시장내 두부제조장에서 두부응고 후 하수에 들어가기 직전에 발생하는 폐수를 사용하였다. 농산시장 폐기물 중 동절기에는 굴과 사과, 하절기에는 수박과 참외를 물리적 전처리(LG전자 주서 모델 GJ 456) 후 발생하는 분리액을 실험에 사용하였다.

2.3 배지 및 배양조건

유기성 폐수로부터 혐기 발효에 의한 *C. butyricum* NCIB 9576 수소생산 실험 조건은 이미 발표된 논문(5)과 동일하며, 본 실험에서는 세 가지 다른 용량의 반응장치를 가동하여 수소생산력을 측정하였다. 소규모 배양은 50 ml 용량 유리 병에 10 ml의 유기성 폐수를 첨가하여 37°C에서 pH 조절없이 *C. butyricum* NCIB 9576 수소 생산력을 비교 검토하였고, 수소 생산성이 우수한 경우는 배양 규모를 높여서 1.2 l 용량의 아크릴 반응기(5)에 1 l 폐수를 넣어 pH를 조절

하면서 수소생산 증가를 측정하였다. 최종적으로는 15 l stainless steel 발효기로 대용량화하여 지속적인 수소생산력을 측정하였다.

광합성 세균인 *R. sphaeroides* E15-1로부터 수소생산도 이미 발표된 실험조건을 사용하였으며(22), 본 실험에서는 각종 폐수를 50 ml 용량 유리병에 넣고 10 % *R. sphaeroides* E15-1 종 배양액을 첨가하여 온도를 30°C로 유지하면서 약 9,000~10,000 lux 할로겐 등을 조사하였다.

2.4 가스 분석

수소의 함량은 serum bottle 의 head space 가스를 gas-tight microsyringe로 100 μ l를 채취하여 gas chromatography (Shimazu 14-B)로 분석하였다. 사용된 column은 300mm \times 200mm(길이 \times 내경) glass로 molecular sieve 5A(supel . Inc)를 충전 물질로 사용하였으며, thermal conductivity detector(TCD)로 분석하였다. 수소분석의 조건은 column 온도 80°C, injector 온도 100°C, detector 온도 120°C이였으며, carrier gas는 argon을 이용하고 flow rate는 35 ml/min으로 유지하였다.

2.5 유기산 분석

유기산은 관체와 상등액을 분리한 후 상등액을 20 μ l를 유기산 분석용 column인 Aminex HPX-87H, 300mm \times 7.8mm(길이 \times 내경)를 장착한 HPLC Beckmann Gold System으로 실온에서 측정하였다. 각종 유기산 peak는 UV detector를 이용하여 파장 210 nm에서 측정하였으며, 0.01N H₂SO₄를 이동상으로 하여 flow rate 0.6 ml/min로 용

출하였다.

2.6 기타 분석

배양액 중의 glucose의 농도는 dinitrosulfuric acid (DNS)방법(9)으로 정량하였으며, starch의 농도는 5.5N HCl 0.2 ml 과 2 ml 시료를 100°C 물에 30분간 가열시킨 후 2.2 ml Na₂CO₃를 첨가하여 중화시키고, DNS방법으로 정량하였다.

BOD, COD, total solids, suspended solids, volatile solid는 standard method(10)로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 유기성 폐수 조성

농산 시장 폐기물 중 과일은 두부나 막걸리 제조 폐수에 비해 높은 환원당을 함유하는 폐액이며, 이는 과일 종류에 따라서도 상당한 차이를 나타낸다(Table 1). 본 실험에 사용된 과일은 여름 및 겨울에 대표적으로 농산 시장에서 발생하는 수박과 참외, 사과와 귤 폐기물을 상업용 주서를 통과시킨 후, 발생하는 펄프를 제외한 과일즙을 대상으로 폐액을 분석하였다. 수박 및 참외에서 발생하는 폐액의 환원당은 약 45 g/l 이고, 사과와 귤 경우는 약 93 g/l 이었다. 이와 같은 환원당의 농도는 과일의 종류 및 구입시기에 따라 약간의 차이는 있었지만, 그 계절에 발생하는 과일은 비교적 거의 일정한 당도를 유지하고 있었다. 이와 같은 과일 폐기물은 두부 및 막걸리 폐수의 환원당 함량이 각각 0.9 및 0.7 g/l 과 비교할 때,

약 50~100배 이상 높은 농도의 유기물질을 함유하고 있어서 과일 쓰레기의 발생량은 식품제조 폐수 발생량에 비해 적은 양이지만, 유기물질 이용에 적합한 바이오매스로 사료된다. 또한 과일 폐기물의 BOD도 약 70,000 및 53,000 mg/l로 두부 제조 폐수 BOD보다 6.4~7.8배나 높았다.

막걸리 제조 폐수는 대부분 발효조의 세척수에서 발생하며, 제조시기나 제조장에 따라 발생하는 폐수의 농도는 차이가 있지만 폐수 중 알코올 농도가 5~15 g/l 이며, 전분이 2.7 g/l, BOD 약 20,000 mg/l, COD 13,000 mg/l 로 국내 하천 방류 기준을 훨씬 초과한다. 막걸리 제조장은 전국 도처에 산재해 있으며, 새로 설치되는 제조장은 폐수처리시설을 의무화하고 있으나, 대부분의 소규모 제조장은 하천에 방류하는 것으로 알려져 있다.

두부 제조 폐수는 환원당 함량은 낮은 반면 전분 함량이 12~13 g/l로 타 폐수에 비해 높았으며, 총 질소 함량이 517 mg/l 이며, 이 중 암모니아성 질소는 약 33.5~56.6 mg/l로 질소원이 낮았다. BOD 및 COD도 각각 9,000 및 22,000 mg/l 이었으며, 응고제로부터 발생하는 Na⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 같은 양이온이 다량 존재하였다. 두부제조 폐수는 높은 전분함량으로 발효에 의한 생물학적 수소 생산에 적합한 바이오매스이며 특히 질소원 농도가 낮아서 *R. sphaeroides* E15-1의 광합성 기작으로 발생하는 수소 생산 및 폐수 처리에 적합한 유기성 폐수이다.

3.2 *Clostridium butyricum* NCIB 9576에 의한 수소생산

C. butyricum NCIB 9576은 1 % glucose

를 함유한 PYG 합성배지 (초기 pH 6.8)로부터 배양 초기 15-16 시간 동안 $51 \mu\text{M H}_2/\text{ml broth/day}$ 를 생성하였다. 발효하는 동안 수소와 동시에 butyrate, acetate, lactate 등의 유기산을 생성하였으며, pH는 4.2-4.3으로 감소하였다. 배양 15시간 이후에는 수소가 생성되지 않았으며(Fig.1) 생성된 유기산 중 lactate가 acetate로 분해되어 시간이 경과함에 따라 배양액 중 acetate의 농도가 점차 증가하였다. 발생한 가스중 60-70 % (V/V)가 수소이었으며, 나머지는 대부분 CO_2 이었다.

환원당 및 전분을 각각 0.9, 2.7 g/l 함유하고, 초기 pH를 6.8로 조절한 막걸리 제조 폐수를 기질로 이용하여 *C. butyricum* NCIB 9576은 배양 초기 24시간 동안 $27 \mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 폐수를 생성하였다 (Fig.2). 배양 온도는 37°C 로 유지하였지만 pH는 조절하지 않았기 때문에 배양 24시간 이후는 막걸리 폐수 중의 환원당이 약 90% 분해되었으며, 이러한 기질의 분해는 *C. butyricum* NCIB 9576의 대사산물인 유기산을 생성하여 막걸리 폐수의 pH를 6.0 이하로 저하시켰다. 생성된 유기산은 propionate, butyrate, 및 acetate (Table 2)이었으며, 균체는 최대 건조 중량 1.2 g/l (=흡광도 660 nm, 1.97)을 나타내었다. 수소와 유기산을 생성하는데 필요한 적정 pH는 4.8 - 6.8로 한 Van Andel 등(11)은 보고하고 있으나 *C. butyricum* NCIB 9576의 생육은 pH 6.5-7.2에서 최대인 반면 수소 생산 최적 pH는 이보다 낮은 6.0 - 6.5이었다. pH는 또한 발효 중 유기산의 생성에도 영향을 주어서 pH가 낮아수록 배양액 중 acetate, butyrate 비율이 감소하였다. 막걸리 제조 폐수는

PYG 합성배지보다 약 10배 낮은 환원당 (0.9 g/l)을 함유하고 있지만 전분의 함량 (2.7 g/l)이 높으며, 에탄올 및 주정공정에서 발생하는 각종 아미노산 등이 포함되어 있어 *C. butyricum* NCIB 9576 수소 생산에 좋은 원료물질로 분석되나, 본 실험에서는 질소원의 농도가 낮아서 *C. butyricum* NCIB 9576 균체 증식이 제한으로, 수소 생산량이 PYG 합성배지 만큼 높지 않은 것으로 분석된다.

15 l 배양기를 장착한 발효 장치에 10 l 막걸리 제조 폐수를 넣고, 온도 37°C , pH 조절 범위 6.5-7.0로 유지하면서 *C. butyricum* NCIB 9576을 batch 배양하였다. 수소는 배양 초기 18시간 동안 $49 \text{ mM H}_2/\text{l}$ -폐수가 발생되었고 pH 6.5로 유지되고 있었지만, 균체는 더 이상 증가되지 않았다. 새로운 막걸리 제조 폐수를 희석율 0.15 hr^{-1} 로 2시간 동안 교환한 결과, 수소는 다음 13 - 14시간동안 추가로 $17.8 \text{ mM H}_2/\text{l}$ -broth가 생성되었으나 이후로는 새로운 배지를 첨가해도 수소 생산이 되지 않았다 (Fig.3). 이때 *C. butyricum* NCIB 9576 균체 농도가 0.8 g/l 로 감소한 것으로 미루어 본 실험에 적용된 희석율이 높아서 배양기 내 균체량을 유지하지 못한 것으로 분석되며, 이는 직접적으로 수소생산에 영향을 주었다. Thangaraj 등(2)도 30일간 연속 발효 실험 결과 수소생성과 균의 성장은 배양기간에 영향을 받는다고 보고하였다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 발효기 내 미생물 고정화 기술에 의한 균체의 확보 및 배지 교환 속도감소를 실험한 결과 균체 고정화에 의한 발효기 내의 균체 고농도 배양이 연속적인 수소생산을 가능하게 하였다.

C. butyricum NCIB 9576은 약 9 %의 환원당을 함유하는 귤과 사과액을 기질로 사용하여, pH 조절 없이 배양할 때 총 $24.3 \mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 과일액을 배양 초기 24시간동안 생성하였다. 이때 수소발생율은 막걸리 폐수보다 약 1.9배 가량 빠르며, 배양 24시간 이후는 전혀 수소가스가 생성되지 않았다. 대부분의 탄소원이 환원당으로 존재하는 이 폐수는 배양 40시간 동안 환원당이 약 99 % 분해되었고, 유기산으로 주로 lactate, acetate가 생성 (Table 2) 되었으며, 발효 24 시간 이후는 배양액 pH가 4.0 이하로 저하되었다. 그러나 pH를 6.5-7.0으로 조절하면서 10 l 용량으로 배양하였을 때 수소 생산량은 약 4.3배 증가하여 $104 \text{ mM H}_2/\text{l}$ 가 배양 24시간 이내에 생성되었으며, 동시에 유기산도 생산되었다. Butyrate 및 acetate는 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 당으로부터 일반적으로 생산되는 유기산이지만, 막걸리 제조 폐수로부터 *C. butyricum* NCIB 9576이 수소 생산과 동시에 축적한 lactate 농도에 비해서, 과일액을 기질로 사용할 때 생성된 lactate ($57\sim 343 \text{ mg/l}$) 농도가 높았다 (Table 1). 이와 같은 이유는 일반적으로 과일에 존재하는 젖산균은 *C. butyricum* NCIB 9576과 유사한 배양 최적 조건을 갖기 때문에 본 실험에 사용한 37°C , 혐기조건에 의해 과일 중에 존재하는 당을 이용해서 *C. butyricum* NCIB 9576과 같이 발효기 내에 공존하면서 lactate를 생성한 것으로 분석된다. Andrew 등(12)은 젖산균이 일반적으로 생합성 능력이 제한적이기 때문에 그들이 성장하는데 amino acid와 vitamin등이 필요하다고 하였으며, 때때로 yeast extract와 같은 복합물질도 요구한다

고 하였다. 이러한 복합체들의 첨가로 젖산균은 높은 성장을 보임과 동시에 많은 양의 lactate를 생성한다고 하였다.

15 l 혐기 발효기에 수박·참외폐액 10 l를 넣고 *C. butyricum* NCIB 9576로 배양한 결과 180 mM 가스/ l-배양액이 초기 16-18 시간동안 발생하였으며, 이때 최대 가스 생성량은 약 $19 \text{ mM H}_2/\text{l/hr}$ 이었으며, 7시간 동안 계속 유지되었다. 이와같은 가스량은 1 % glucose를 포함하는 PYG 합성배지 및 막걸리 제조폐수에서 *C. butyricum* NCIB 9576 발효에 의해 발생하는 가스양보다 약 2.3-2.5배 높은 발생 양이지만, 과일 액으로부터 발생하는 가스 성분은 수소가 약 40 %, 이산화탄소가 약 60 % 함유되어있었으며, 이는 PYG 합성 배지 및 막걸리 제조 폐수에서 생성되는 약 60 - 70 %의 수소 함유율보다 낮았다. 이와같은 현상은 과일 껍질에 존재하여 폐액 속에 함유된 젖산균의 발효(12)로 인해 당으로부터 다량의 lactate와 CO_2 가 생성된 것으로 사료된다. 즉 각 기질 1 l로부터 수소 생산량을 비교하면 PYG 합성배지, 막걸리 제조폐수, 수박·참외 및 귤·사과 폐액은 배양 초기 18-24시간 동안 각각 51, 49, 71 및 104 mM 수소를 생산하였다.

두부제조 폐수는 막걸리 폐수와 같이 발효 초기 약 16시간 동안 50 ml 유리병에서 pH 조절없이 37°C 로 배양할 때 $20 \mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 폐수를 생산하였으나, 20시간 이후로는 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 수소생산이 일어나지 않았다(Fig. 2). 이 발생량은 막걸리 제조폐수나 과일액의 경우보다 같은 배양 조건에서 각각 약 26 % 및 18 % 낮은 발생을 이었다. Miyake 등(14)은 두부제

조 폐수와 같은 유기성 폐수는 암모니아 및 질소원 농도가 낮기 때문에 최적 균주 성장의 C/N 비를 질소원을 첨가하여 보정하는 것이 필요하다고 보고하였다. Bagai 등(15)은 연속배양이 힘든 유기성 폐수를 질소원을 첨가함으로써 4개월 이상 배양이 가능하며, 수소생산을 높였다고 보고하였다.

전분 12.6 g/l, 환원당 0.736 g/l 조성을 갖는 두부폐수를 15 l 용량 배양조에 실험한 결과, 배양 초기 24시간 동안 30 mM H₂/l-폐수가 생성되었고, 발효하는 동안 폐수 중 전분과 환원당은 100 % 분해되었고, 24시간 이후 수소는 생성되지 않았다. 새로운 두부 폐수를 0.15 hr⁻¹ 희석 비율로 24시간 주기로 3일간 교환한 결과 약 20 mM H₂/l-폐수가 생성되었고 (Fig.4) 이때, 환원당은 최저 0.417 g/l, 전분은 1.1 g/l로 각각 유지되었으며, 4 - 5시간 동안 약 90 %이상을 분해하였다.

Wood(16)는 *C. butyricum*가 최대 2.35 M H₂/M glucose을 발생한다고 보고하였으나, 본 실험에서 1 % glucose로부터 *C. butyricum* NCIB 9576으로부터 발생한 수소는 약 1.46 M H₂/M glucose 생성율이며, Wood의 결과보다 낮았다. 그러나 1.46 M H₂/M glucose 전환율은 Hendrikx 등(17)이 보고한 수소생산을 보다는 약 8.7배 가량 더 많은 양의 수소를 발생하였고, 동시에 생성된 acetate는 3.2 배 가량 낮았다. 이와 같은 *C. butyricum*에 의한 수소생산 및 유기산 축적 현상은 같은 속의 균주 중에서도 종(species) 및 발효조건에 기인한 것으로 사료된다.

본 실험에 사용된 각종폐수는 질소함량이 일반적으로 낮아서 C/N 비가 균체 최적 성

장에는 이르지 못했지만, 풍부한 유기물질이 함유되어 *C. butyricum* NCIB 9576 발효에 의한 생물학적 수소생산 및 유기산 생산에 적합한 바이오매스로 사료된다.

3.3 광합성 세균 *R. sphaeroides* E15-1에 의한 수소생산

지구상에서 가장 풍부한 자원인 태양광을 이용하여 *cyanobacteria* (blue-green algae)에 의해 물을 수소 및 산소로 분해하는 기술은 오래 전부터 연구되어왔으나, 경제성 있는 수소생산을 위해서는 해결해야할 기술적인 어려움이 있다. 즉 발생한 산소가 proton으로부터 수소 발생을 촉매하는 hydrogenase 작용을 저해하는 현상을 제거한 O₂-insensitive hydrogenase를 갖는 균주가 개발되어야하며, 또한 태양 에너지 이용 효율을 높이기 위한 미생물 내의 광화학적 개선이 필요하다. 반면, 바이오매스 즉, 유기물로부터 이 단계에 걸친 수소생산은 *cyanobacteria*에 의한 물 분해 수소생산보다 높은 수소 생산 효율을 가지며, 비교적 쉽게 반응기를 대형화 할 수 있는 수소생산 기술로 분석되고있다. 1 단계에서 *C. butyricum* NCIB 9576 및 *Enterobacter aerogenes* 등의 혐기세균에 의해 빛 없이 유기물을 수소와 유기산으로 분해시키고, 2 단계에서는 1단계에서 생성된 높은 효율로 유기산을 purple non-sulfur 세균에 의해 태양광을 이용하여 다시 수소를 생산하는 방법으로 태양광 이용 물 분해관련 연구보다 짧은 역사를 갖고있지만, 1990년 이후 일본 기술에 의해 활발히 연구되고 있다. Sawada 등(18)은 높은 BOD값을 갖는 폐수에서 광합성 균주가 수소를 생산하면서 동

시에 BOD 값을 낮추어 주고, 배양 중에 생긴 부산물로서 single cell protein을 생산한다고 보고하였고, Singh 등(19)은 sugarcane juice로부터 $45\mu\text{l H}_2/\text{mg cell/hr}$ 을 생산하였다. 이는 potato starch와 whey를 기질로 사용하였을 때 보다 높은 수소발생효율이라고 보고하였다. 또한 사탕수수는 당이 풍부하며, pH 저하없이 효율적으로 H_2 를 생성한다고 밝혔다. Heguang 등(20)은 두부폐수로부터 고정화한 *Rb. sphaeroides* RV를 이용하여 $17\text{ mM H}_2/\text{day}/\ell$ 의 수소를 생성하였으며, D'Addario 등 (4)은 과일·채소 시장에서 얻어지는 폐기물로부터 *Rb. sphaeroides* RV가 $1.15\ell\text{ H}_2/\ell\text{ reactor/day}$ 를 생산하였다고 보고하였다. 농산시장 폐기물 중에 있는 lactate는 당으로부터 purple non-sulfur 세균인 *Rb. sphaeroides* RV 발효에 의해 생성되는 유기산으로 최대 $4.5\text{--}4.8\text{ M H}_2$ 를 1 M lactate 로부터 발생할 수 있다.

본 실험에서는 50 ml 유리병에 각각 막걸리 및 두부 제조 폐수, 과일액을 기질로 사용하여 배양온도 30°C , 조도 $9,000\text{--}10,000\text{ lux}$ 를 유지하면서 *R. sphaeroides* E15-1로 수소생산을 비교하였다(Fig. 5). 막걸리제조 폐수를 기질로 하여 *R. sphaeroides* E15-1은 평균 $4.2\mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 폐수/일을 생산하였으며, 이는 배양 9일 동안 계속되어 총 $37.9\mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 폐수를 생산하였다. 배양 9일 이후는 수소생산과 균체 증식이 모두 정지하였다. 막걸리제조 폐수 중 전분은 $2.7\text{ g}/\ell$ 에서 약 $1.5\text{ g}/\ell$ 로 감소하여 약 44% 소비되었으며, pH는 초기 6.8에서 8.0을 상승되었다. 이는 *C. butyricum* NCIB 9576에 의한 1일 수소 생산량에 비해 약 8-9%에 그

쳤다. 약 $93\text{ g}/\ell$ 환원당을 함유하는 꿀·사과액에서는 배양 이틀동안 $13.1\mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 과일액이 생성되었다가, 이후에는 수소가 생성되지 않고 대신 CO_2 는 지속적으로 생성되었다. 이와 같은 CO_2 의 생성은 과일에 존재하는 젖산균에 의해 젖산발효(12)를 하여 lactate와 CO_2 를 생성한 것에 기인하며, 환원당은 배양 10일 동안 약 50%만이 분해되었다(Fig.5). 이러한 결과는 D'Addario (4) 등에서 얻어지는 값과 유사하였으며, 당 함량이 높은 과일 폐수 등은 배양 초기에 수소와 formate와 같은 유기산이 과량 축적되어 배양액중의 pH를 급격히 저하 시켜 균체의 성장을 정지하는 반면, purple non-sulfur 세균, *R. sphaeroides* E15-1이 갖는 bacteriochlorophyll의 표백 현상을 유도하여 수소생산과 균체증식을 억제하였다(22).

두부제조 폐수는 *R. sphaeroides* E15-1에 의해 배양 9일 동안 $22.2\mu\text{M H}_2/\text{ml}$ 폐수를 생산하였다. 그 이후에 수소는 생성되지 않았고, 두부폐수 중의 환원당은 배양 10일 후 약 30%만이 분해되었다. 광합성 균주는 광합성 조건하에 단순 유기산으로부터 수소를 효율적으로 생산하여, lactate의 경우 전환율은 거의 72 - 80%인 반면, 약 32%로 유기산 전환율보다 낮기 때문에 두부제조 폐수로부터 purple non-sulfur 세균에 의한 수소생산은 *C. butyricum* NCIB 9576에 의한 것보다 낮다고 사료된다.

본 실험 결과로 미루어 분석하면 당 함량이 높은 유기성 폐수는 광합성 세균 *R. sphaeroides* E15-1보다는 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 수소를 생산하기에 적합한 기질로 분석된다. 당농도가 높은 유기성

폐수는 이 단계 공정 즉 환원당 및 전분을 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 일차적으로 수소와 유기산으로 혐기 발효한 후, 생성된 유기산을 기질로 사용하여 *R. sphaeroides* E15-1에 의해 광합성 배양을 순차적으로 적용하므로써 수소 생산을 최대화 할 수 있다고 사료된다.

4. 결 론

막걸리 및 두부제조 폐수는 유기물 함유량이 높은 폐수이었으며, 농산 시장에서 다량 폐기물로 발생하는 수박·참외 (하절기) 및 귤·사과 (동절기)도 환원당 함량이 약 45 - 93 g/l 이었다. 위와 같은 폐수 및 폐기물은 *C. butyricum* NCIB 9576에 의한 수소 생산성을 비교할 때 생물학적 기술에 의한 수소 생산에 적합한 기질로 사료된다. 그러나 일반적으로 질소원 함량이 낮아서 장기적인

배양기 가동시는 별도의 질소원 첨가가 필요하다고 분석된다. 또한 본 실험 결과로 미루어 당 함량이 높은 유기성 폐수는 광합성 세균 *R. sphaeroides* E15-1보다는 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 수소를 생산하기에 적합한 기질로 분석되며, 당농도가 높은 유기성 폐수는 이 단계 공정 즉 환원당 및 전분을 *C. butyricum* NCIB 9576에 의해 일차적으로 수소와 유기산으로 혐기 발효한 후, 생성된 유기산을 기질로 사용하여 *R. sphaeroides* E15-1에 의해 광합성 배양을 순차적으로 적용하므로써 수소 생산을 최대화 할 수 있다고 사료된다.

Acknowledgement

이 논문은 산업자원부 대체에너지개발사업으로 수행된 내용의 일부이며, 정부의 연구비 지원에 감사드립니다.

Table 1. Composition of various organic wastewater

	Reducing sugar(g/l)	Starch (g/l)	NH ₃ -N (ppm)	TS(g/l)	SS(g/l)	VS(g/l)	BOD (mg/l)	COD (mg/l)
사과·귤 폐기물	93.466	0	ND	86.5	2.7	41	71,100	53,216
수박·참외 폐기물	48.395	0	39.41	64.64	7.80	51.64	58,400	47,094
막걸리제조 폐수	0.940	2.74	ND	16.7	12.4	14.94	20,580	13,330
두부제조 폐수	0.736	12.6	56.6	17.3	1.4	12	9,060	22,000

ND : not determined

Table 2 Production of various carbon sources by *C. butyricum* in organic acid(mg/l) before and after fermentation

	Makkoli		Tofu		Fruits			
					apples & oranges		water melons & melons	
	before	after	before	after	before	after	before	after
Lactate	0	0	18.2	16.5	13.1	57.1	6	343
Acetate	0	0	0	0	2	15.4	0	20
Propionate	0	1.3	0	53.9	0	0	0	40.8
Butyrate	6	12.4	1.5	30.5	0	0	0	14.7

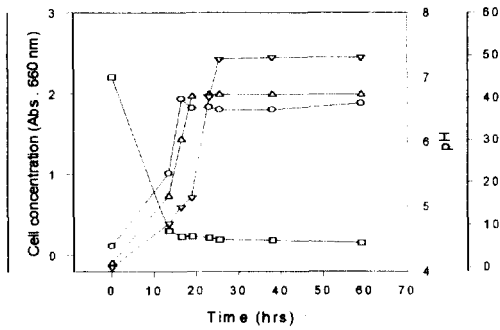


Figure 1. Hydrogen and organic acids production from PYG media containing 1% glucose by *C. butyricum* NCIB 9576

□ : pH, △ : degradation of glucose
 ◇ : H₂ production, ○ : cell concentration (Abs 660nm)

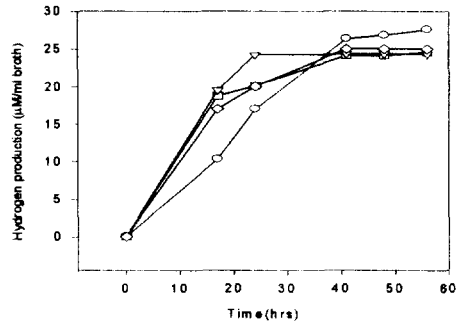
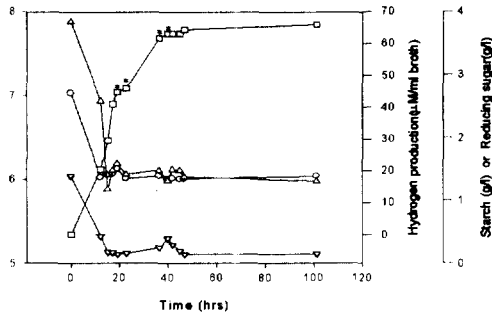


Figure 2. Hydrogen production from the various organic wastewater using *C. butyricum* during incubation at 37°C

○ : makkoli, □ : fruits (oranges & apples)
 ◇ : tofu, △ : fruits (water melons & melons)



3. Hydrogen production by anaerobic fermentation of Makkoli wastewater by *C. butyricum* NCIB 9576
 ○ : pH, □ : H₂ production
 △ : starch, ◇ : reducing sugar
 * : 1.5 l media exchange

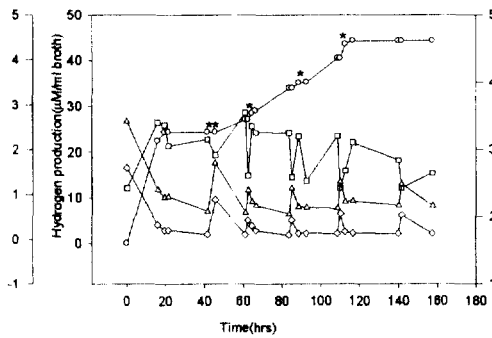
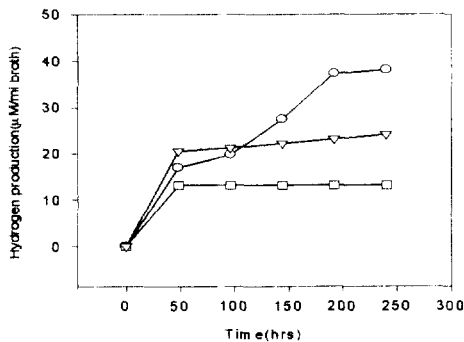


Figure 4. Hydrogen production by anaerobic fermentation of tofu wastewater by *C. butyricum* NCIB 9576
 ○ : hydrogen production, □ : cell concentration,
 △ : starch, ◇ : reducing sugar
 ** : 5 L exchange
 * : 1.5 L exchange



Hydrogen production from the various organic wastewater using *R. sphaeroides* E15-1 during incubation at 30°C under 10,000lux without pH control
 ○ : Makkoli, □ : Fruits wastewater

참고 문헌

1. Ueno, Y., Kawai, T., Sato, S., Otsuka, S., Morimoto, M., Biological production of hydrogen from cellulose by natural anaerobic microflora, *J. Ferm. Bioeng.* 79(4)(1995), 395-397
2. A. Thangaraj and G. Kulandaivelu. Biological hydrogen photoproduction using dairy and sugarcane wastewaters. *Bioresource Technology.* 48(1994), 9~12
3. S. P. Singh, S. C. Srivastava and K. D. Pandey. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *Int. J. Hydrogen Energy.* 19(5) (1994), 437~440
4. E. D'Addario, E. Fascetti, M. Valdiserri. Hydrogen production from organic wastes by continuous culture of *Rhodobacter sphaeroides* RV. *Hydrogen energy progress at proceeding of the 11th,* (1996), 2577~2582
5. 김미선, 문광웅, 이인규, 이태진, 성창근. *Clostridium butyricum* NCIB 9576에 의한 당으로부터 혐기적 수소생산. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27(1) (1999), 62~69
6. Kim, J. S., H. Yamachi, and K. Ito. Selection of photosynthetic bacterium suitable for hydrogen production in outdoor cultures among strains isolated in the Seoul, Taegu, Sendai and Bangkok

- area. *Agri. Biol. Chem.* 46(6) (1982), 1469~1474
7. Mologoski, J. H. and M. J. Klug. Characterization of anaerobic heterotrophic bacteria isolated from fresh water lake sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(1976), 80~90
8. Omerod, J. G, and H. Gest. Hydrogen photosynthesis and alternative metabolic pathways in photosynthetic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 26 (1962), 51~55
9. Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31(1959), 426~428
10. Standard method for the examination of water and wastewater. 16th ed. ADHA, AWWA and WPCF (1995)
11. J. G. Van andel, 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. *Appl. Micro. Biotechnol.* 23 (1985), 21~26
12. Andrew R. Berry, Christopher M. M. Franco, Wei Zhang and Anton P. J. Middelberg. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. *Biotechnology Letters* 21(1999), 163~167
13. M. Hiraoka, N. Takeda, S. Sakai and A. Yasuda. Highly efficient anaerobic digestion with thermal pretreatment. *Wat. Sci. Tech* 17(1984), 529~539
14. Miyake. J, X. Y. Mao, and S. Kawashima. Photosynthetic of hydrogen from glucose by a co-culture of photosynthetic bacteria and *Clostridium*. *J. Ferment. Technol.* 62(1984), 531~535
15. R. Bagai and D. Madamwar. Prolonged evolution of photohydrogen by intermittent supply of nitrogen using a combined system of *Phormidium valderianum*, *Halobacterium halobium* and *Escherichia coli*. *Int. Jour. Hydrogen energy.* 23(7) (1998), 545~550
16. Wood, W.A. Fermentation of carbohydrates and related compounds. in the *Bacteria*, Gunsalus and Stanier eds.(1961) 59-150
17. Heyndrix, M., De Vos, P., Thibau, B., Stevens, P., De Ley, JI, Effect of various external factors on the fermentative production of hydrogen gas from glucose by *Clostridium butyricum* strains in batch culture. *System. Appl. Microbiol.* 9(1987), 163-168
18. H. Sawada and P. L. Rogers. Photosynthetic bacteria in waste treatment. *J. Ferment. Technol.*, 55(4) (1977) 297~310
19. S. P. Singh, S. C. Srivastava and K. D. Pandey. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas* at the expense of vegetable starch, sugarcane juice and whey. *Int. J. Hydrogen Energy.* 19(5) (1994), 437~440
20. Heguang zhu, Tomoo Suzuki, Anatoly A. Tsygankov, Yasuo Asada, Jun Miyake. Hydrogen production from tofu

wastewater by *Rhodobacater sphaeroides* immobilized in agar gels. *Int. Jour. Hydrogen energy*. 24 (1999), 305~310

21. Masayoshi minami, Toshihito uechi, Masaaki kimura, Takashi nishishiro, Hajime kuriaki, Kazue sano and Tadaaki kawasugi. Hydrogen production by

photosynthetic bacteria using sewage sludge. *Hydrogen energy progress at proceeding of the 11th*, (1996) 2583~2588

22. 김미선, 문광웅, 이상근, 김선창. .
*Rhodopseudomonas sphaeroides*에 의한 수소
소생산 - Glucose 및 유기산의 영향.
Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26(2)
(1998), 89~95